令和５年度

食肉に関する
助成研究調査成果報告書

VOL. 42

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）
5	42	73	128,350	**9**	2名（4,000千円）	3団体（6,200千円）

© 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42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，42回（令和５年度）助成事業における73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９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６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.42 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. 2024
Koichi Ito
The chief director
The Ito Foundation

© The Ito Foundation

研究助成事業

目　　次

経産肥育が牛肉中の L- カルニチン量に及ぼす影響

…… 島　田　謙一郎（帯広畜産大学生命・食料科学研究部門）…… 3

ソーセージの塩漬フレーバー増強へのヒポキサンチンの関与についての研究

…… 市村　さやか[1]・高橋　真佐郎[1]・中村　幸信[1]・吉田　由香[1]・山之上　稔[2]・
若松　純一[3]
（[1]一般社団法人食肉科学技術研究所，[2]元神戸大学大学院農学研究科，
[3]北海道大学大学院農学研究院）…… 8

コールドチェーンの転換に向けた食肉現場に導入可能な AI 技術の開発
―ハイパースペクトロカメラを用いた肉質変化の経時的計測―

…… 上　田　修　司（神戸大学大学院農学研究科）…… 17

黒毛和種牛肉の筋線維型構成と味との関連

…… 柴田　愛梨・水野谷　航*・山根　瑞穂・日高　健雅
（広島県立総合技術研究所畜産技術センター，*麻布大学獣医学部）…… 23

Check-All-That-Apply 法を応用した獣肉の風味特性の可視化に関する研究

…… 水野谷　　航・竹　田　志　郎（麻布大学獣医学部）…… 30

食肉の脂身の美味しさを生み出す呈味性化合物に関する研究

…… 澤　野　祥　子（麻布大学生命・環境科学部食品生命科学科）…… 36

工業型畜産の課題解決に向けた培養肉の生産技術開発（Ⅱ）

…… 岡　村　大　治（近畿大学農学部生物機能科学科）…… 41

枝肉３Ｄ計測システムの標準的性能評価法の開発

…… 本山　三知代・赤田　花林・石田　翔太・渡邊　源哉・中島　郁世・
佐々木　啓介（国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産研究部門）…… 46

ニワトリ培養肉価値を担保する結合組織構成細胞の機能について

…… 中　村　真　子（九州大学大学院農学研究院）…… 57

脊髄損傷性運動麻痺の機能回復におけるブタ肝臓由来リン脂質の有効性

…… 羽二生　久夫[1]・上野　麟太朗[1]・塚原　　完[2]・松田　佳和[3]
（[1]信州大学先鋭領域融合群バイオメディカル研究所，
[2]長崎大学大学院医歯薬学総合研究科（薬学）創薬薬理学分野，
[3]日本薬科大学臨床薬理学分野）…… 61

© The Ito Foundation

食肉・食肉製品中の亜鉛プロトポルフィリン IX 形成におけるフェロケラターゼの作用機序の解明
…… 若松　純一[1]・奥村　峻太[2]・阿部　悠[3]
（[1]北海道大学大学院農学研究院，[2]北海道大学農学部，[3]北海道大学大学院農学院）…… 70

食肉加水分解物の栄養機能について（Ⅲ）
…… 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）…… 76

食肉由来ペプチドと大豆由来ペプチドの抗酸化作用の比較
…… 西　村　敏　英（女子栄養大学栄養学部）…… 86

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（Ⅱ）
…… 岡　田　彩　加（岐阜大学応用生物科学部共同獣医学科）…… 94

食鳥処理工程における鶏肉のカンピロバクター動態解析
…… 佐々木　貴　正（帯広畜産大学獣医学研究部門）…… 99

食肉の低温貯蔵履歴と不十分な加熱がカンピロバクターの生残性に及ぼす影響
…… 本　城　賢　一（九州大学大学院農学研究院）…… 108

***Campylobacter jejuni* の IR バイオタイパーを用いた新規型別法の構築と検討**
…… 畑　中　律　敏（大阪公立大学大学院獣医学研究科）…… 116

食肉の健康リスクと環境リスクに係るリスクコミュニケーション手法の研究ならびに効果検証
…… 山﨑　毅・山﨑　深雪・阿紀　雅敏
（特定非営利活動法人食の安全と安心を科学する会）…… 122

MiCAPs 法を用いた，新規家禽エミューにおける産肉関連 QTL の同定
…… 奥　石　雄　一（東京農業大学生物資源ゲノム解析センター）…… 133

黒毛和種牛肉における「甘い香り」の育種改良手法の確立（Ⅲ）
…… 庄司　則章[1]・小松　正尚[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）…… 140

黒毛和種の白斑発生に関する分子遺伝学的研究
…… 下　桐　猛[1]・小　山　秀　美[2]
（[1]鹿児島大学農学部，[2]国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産研究部門）…… 147

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（Ⅲ）
…… 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）…… 153

ゲノム情報による褐毛和種の遺伝的多様性の評価と多様性を考慮した交配様式の開発
…… 井　上　慶　一（宮崎大学農学部）…… 160

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（Ⅱ）
…… 福原　絵里子・森　美幸・平川　達也・村上　徹哉
（福岡県農林業総合試験場）…… 166

哺乳期の栄養環境が繁殖機能に与える影響（Ⅱ）
…… 髙　橋　秀　之（九州大学農学部附属農場）…… 172

© 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？（Ⅲ）

…… 金澤　朋美[1]・木崎　景一郎[1]・三浦　亮太朗[2]

（[1]岩手大学農学部共同獣医学科，[2]日本獣医生命科学大学獣医学部獣医学科）…… 177

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（Ⅲ）

…… 鍋　西　　久・中　　美　博（北里大学獣医学部）…… 183

成熟分裂制御による新たな牛卵子輸送法の開発

…… 坂　口　謙一郎[1#]・河　野　光　平[2]

（[1]北海道大学大学院獣医学研究院，[2]岡山大学学術研究院環境生命自然科学学域）

（[#]現所属：岐阜大学応用生物科学部共同獣医学科）…… 188

新規凍害保護剤を用いた効率的なブタ卵子凍結保存法の開発

…… 三　好　和　睦（鹿児島大学農学部）…… 194

バッテリレス耳標センサーの山羊繁殖管理への利用

…… 安村　　陸[1]・滝口　　收[2]・金谷　晴一[3]

（[1]沖縄県農林水産部畜産研究センター，[2]アルセンス株式会社，

[3]九州大学大学院システム情報科学研究院）…… 201

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（Ⅱ）

…… 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）…… 208

多機能尾部センサを用いたタイストール飼育下における泌乳牛の発情検知

…… 吉　岡　耕　治[1]・尾　澤　知　美[2]

（[1]麻布大学獣医学部，

[2]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）…… 214

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（Ⅲ）

…… 中島　友紀・神田　亜樹奈・田上　貴寛

（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）…… 221

非必須アミノ酸濃度の改変による高受胎性が担保されたウシ体外受精卵培養液の開発

…… 伊　丹　暢　彦・平　尾　雄　二

（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）…… 227

鳥インフルエンザの完全制圧を目指した人工改変型弱毒生ワクチンの開発

…… 堀　本　泰　介（東京大学大学院農学生命科学研究科）…… 233

国内の牛の流死産における顧みられていない感染症の関与

…… オブライエン　悠木子・遠　藤　なつ美（東京農工大学大学院農学研究院）…… 238

牛気道上皮細胞を用いた口蹄疫ウイルスの試験管内増殖系の確立とその応用

…… 岡林　環樹[1]・深井　克彦[2]・齊藤　　暁[3]

（[1]宮崎大学産業動物防疫リサーチセンター，

[2]国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門，

[3]宮崎大学農学部獣医学科）…… 243

© The Ito Foundation

薬剤耐性プラスミド脱落により薬剤感受性を復帰させる乳酸菌の検索
…… 石　原　加奈子（東京農工大学大学院農学研究院）…… 251
豚熱ウイルス受容体候補タンパク質の網羅的探索（Ⅱ）
…… 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）…… 256
安定的な DNA 大量生産技術を用いた家畜用低コスト核酸ワクチン開発の基盤構築
…… 西川　明芳・橘　紅李・永田　礼子・下地　善弘・赤田　倫治*
（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，
*山口大学大学院創成科学研究科）…… 262
関節におけるアフリカ豚熱ウイルスの標的細胞の解析および関節炎の病態解析
…… 生　澤　充　隆
（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）…… 268
リコンビナント CathepsinL1 を抗原とした肝蛭症の迅速診断キットの開発
―ジビエを介した感染のモニタリングへの応用を目指して―
…… 関　　まどか（岩手大学農学部共同獣医学科）…… 274
牛ウイルス性下痢ウイルス経胎盤感染機構の解明
…… 内藤　郁慶[1]・平野　佑気[1]・田路　矩之[2]
（[1]北海道立総合研究機構畜産試験場，[2]北海道大学大学院教育推進機構）…… 279
鼻腔粘膜ワクチンの自然免疫活性化機構を応用した効果的な牛呼吸器感染症制御法の検討
…… 石　川　真　悟（大阪公立大学獣医学研究科）…… 286
子牛の脱水評価のための後大静脈／大動脈径比の応用の検討
…… 都　築　　直（酪農学園大学獣医学群）…… 293
バルク乳および血清を用いた抗体検査による牛群のサルモネラ感染状況の把握ならびに
牛由来およびその他由来サルモネラ分離株間の疫学的関連性の解析
…… 岡　村　雅　史（帯広畜産大学獣医学研究部門）…… 297
畜産農場周辺に生息するアカネズミ属齧歯類の強病原性家畜伝染病媒介能力
…… 高　島　康　弘（岐阜大学応用生物科学部）…… 304
効率良いウイルス分離システムの開発
…… 齊　藤　　暁（宮崎大学農学部）…… 308
バクテリオファージを利用したボツリヌス菌の新規な簡易・迅速検出法の開発
…… 阪　口　義　彦（徳島文理大学薬学部微生物学）…… 315
畜産動物用粘膜ワクチンアジュバントの開発（Ⅱ）：ウイルス感染モデルでの検証
…… 若　尾　雅　広（鹿児島大学学術研究院理工学域工学系）…… 320
子牛の呼気温度および熱流束測定による初期呼吸器疾患診断法の開発
…… 前　田　洋　佑・佐々木　結　香（北里大学獣医学部）…… 326

© The Ito Foundation

ブタの粘膜臓器間ネットワークの解明による乳腺免疫の向上
…… 古　川　睦　実・野　地　智　法（東北大学大学院農学研究科）…… 332
畜産動物の脂肪酸味覚受容体の機能解析（Ⅱ）
…… 吉　田　悠　太（茨城大学農学部食生命科学科）…… 336
グルカゴン様ペプチド１に着目した子牛のグルコース利用性向上
…… 稲　生　雄　大（広島大学大学院統合生命科学研究科）…… 342
エコフィードを活用した有機肉用牛生産の環境影響評価
…… 堤　　道　生
（国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構西日本農業研究センター）…… 349
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（Ⅱ）
…… 権　藤　崇　裕（宮崎大学フロンティア科学総合研究センター）…… 355
牧草の利用価値向上を目指したデジタルフェノタイピング技術による効率的な育種と
栽培管理技術の開発
…… 田　中　秀　典（宮崎大学農学部）…… 362
畜産系エキス抽出残さの飼料利用の可能性を探る
…… 川　島　知　之（宮崎大学農学部）…… 368
子牛期の睡眠行動発現に関与する要因の解明―母牛の影響―
…… 深　澤　　充（東北大学大学院農学研究科）…… 374
フェロトーシスが食肉の品質に与える影響とその制御に関する研究
…… 仲　西　友　紀（宮崎大学農学部応用生物科学科）…… 380
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（Ⅱ）
…… 鈴木　貴弘・前野　岳大・今給黎　耀・小川　陽平・
川崎　佑華・中田　后紀・大崎　莉果・大山　竜輝・
小川　蒼生・中村　真子・辰巳　隆一（九州大学大学院農学研究院）…… 386
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（Ⅱ）
…… 鈴　木　　裕（北海道大学大学院農学研究院）…… 395
微細藻類の飼料添加が暑熱環境下のブロイラーの高温耐性に及ぼす影響
…… 河　上　眞　一（広島大学大学院統合生命科学研究科）…… 403
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（Ⅱ）
…… 實　安　隆　興・西　本　和　樹（神戸大学大学院農学研究科）…… 407
3D画像解析を活用した肉用牛におけると畜時の適切な姿勢および放銃位置の探索
…… 髙橋　史昭・三浦　　弘・前田　洋佑・武田　一貴（北里大学獣医学部）…… 412
牛のスタニングと脳のダメージに関する解剖学的および病理学的背景データの構築
…… 安藤　　亮・柿崎　竹彦・杉山　真言・川口　博明（北里大学獣医学部）…… 419

© The Ito Foundation

雑食性昆虫を利用した家畜排せつ物処理における温室効果ガス抑制

…… 霜田　政美・杉村　　乾・鄭　　博允（東京大学大学院農学生命科学研究科）…… 425

ニワトリヒナに備わる抗炎症能力の解明（Ⅱ）～抗酸化能に注目して～

…… 橘　　哲　也（愛媛大学大学院農学研究科）…… 432

２つの機能性資材の同時給与がブロイラーの筋発達に及ぼす効果

…… 徳　武　優佳子・米　倉　真　一（信州大学農学部）…… 440

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（Ⅱ）：タンパク質・エネルギー比の影響

…… 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）…… 445

脂肪交雑と発育を予測する AI モデルで飼料組成を最適化する基盤構築

…… 山中　大介[1]・合田　祐貴[1]・西　　宏起[1]・増田　正人[2]・勝俣　昌也[3]

（[1]東京大学農学生命科学研究科，[2]東洋大学総合情報学部，[3]麻布大学獣医学部）…… 452

良質な食肉開発に資する骨格筋内脂肪細胞・線維化の運命決定機構の解明

…… 深　田　宗一朗（大阪大学大学院薬学研究科）…… 457

卵巣予備能に基づく新規受卵牛選定技術の検討（Ⅲ）

…… 小　山　　毅（北海道立総合研究機構畜産試験場）…… 462

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性発情牛の検出と授精適期の評価

…… 杉山　稔恵[1]・吉田　智佳子[1]・マリア アニスキナ[2]・
山下　　舞[3]・中川　　浩[3]・宮腰　雄一[3]

（[1]新潟大学農学部，[2]新潟大学大学院自然科学研究科，
[3]新潟県農業総合研究所畜産センター）…… 467

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）…… 473

© The Ito Foundation

CONTENTS

Effects of postpartum fattening on L-Carnitine content in Japanese Black cattle
Kenichiro Shimada
(Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine) ····· 3

Studies on the involvement in hypoxanthine on the cured meat flavor enhancement of sausage
Sayaka Ichimura[1], Masao Takahashi[1], Yukinobu Nakamura[1],
Yuka Yoshida[1], Minoru Yamanoue[2] and Jun-ichi Wakamatsu[3]
([1]Japan Meat Science and Technology Institute, [2]Graduate School of Agriculture, Kobe University,
[3]Hokkaido University, Research Faculty of Agriculture) ····· 8

Measuring spectral changes in Japanese Black cattle beef during cold and frozen storage for the development of AI techniques
Shuji Ueda
(Graduate School of Agricultural Science, Kobe University) ····· 17

Correlation between skeletal muscle fiber type and taste of Japanese Black cattles
Eri Shibata, Wataru Mizunoya*, Mizuho Yamane and Takemasa Hidaka
(Hiroshima Prefectural Technology Research Institute, *School of Veterinary Medicine,
Azabu University) ····· 23

Visualization of various animal meat taste traits by Check-All-That-Apply method
Wataru Mizunoya and Shiro Takeda
(School of Veterinary Medicine, Azabu University) ····· 30

Study on taste compounds that contribute to palatability of fat in meat
Shoko Sawano
(Department of Food and Life Science, School of Life and Environmental Science,
Azabu University) ····· 36

Development of cultured meat technology to solve the problems in industrial livestock production (Ⅱ)
Daiji Okamura
(Department of Advanced Bioscience, Faculty of Agriculture, Kindai University) ····· 41

Evaluation protocol for standardization of meat carcass 3D measurement system
Michiyo Motoyama, Karin Akada, Shota Ishida, Genya Watanabe,
Ikuyo Nakajima and Keisuke Sasaki
(Institute of Livestock and Grassland Science, NARO) ····· 46

© The Ito Foundation

Research on connective tissue cell role for the poultry culture meat quality

Mako Nakamura

(Faculty of Agriculture, Kyushu University) ····· 57

Efficacy of porcine liver-derived phospholipids in functional recovery of spinal cord injury-induced motor paralysis

Hisao Haniu[1], Rintaro Ueno[1], Tamotsu Tsukahara[2] and Yoshikazu Matsuda[3]

([1]Institute for Biomedical Sciences, Interdisciplinary Cluster for Cutting Edge Research, Shinshu University, [2]Department of Pharmacology and Therapeutic Innovation, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, [3]Division of Clinical Pharmacology, Nihon Pharmaceutical University) ····· 61

Elucidation of mechanism which ferrochelatase acts to form zinc protoporphyrin IX in meat and meat products

Jun-ichi Wakamatsu[1], Ryota Okumura[2] and Haruka Abe[3]

([1]Research Faculty of Agriculture, [2]Faculty of Agriculture, [3]Graduate School of Agriculture, Hokkaido University) ····· 70

Nutritional function of meat hydrolysates (Ⅲ)

Shinichi Takenoyama, Kumiko Kawakita and Michio Muguruma

(Faculty of Health and Nutrition, Minami Kyushu University) ····· 76

Comparison of antioxidative effect of peptides derived from meats and soy beans

Toshihide Nishimura

(Faculty of Nutrition, Kagawa Nutrition University) ····· 86

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

Ayaka Okada

(Cooperative Department of Veterinary Medicine, Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University) ····· 94

Analysis of *Campylobacter* population dynamics in chicken meat during chicken processing

Yoshimasa Sasaki

(Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine) ····· 99

Effect of cold storage history of meat on viability of *Campylobacter* after inadequate heating

Ken-ichi Honjoh

(Faculty of Agriculture, Graduate School, Kyushu University) ····· 108

Development and evaluation of novel typing method of *Campylobacter jejuni* by IR-biotyper

Noritoshi Hatanaka

(Graduate School of Veterinary Science, Osaka Metropolitan University, Osaka, Japan) ····· 116

© The Ito Foundation

Research and evaluation of risk communication method for meat concerning health and environmental risk

Takeshi Yamasaki, Miyuki Yamasaki and Masatoshi Aki

(NPO, Science of Food Safety and Security (SFSS)) ····· 122

Identification of meat production-related QTLs in novel poultry emu based on MiCAPs

Yuichi Koshiishi

(NODAI Genome Research Center) ····· 133

Establishment of breeding improvement method for "sweet smell" in Japanese Black beef (Ⅲ)

Noriaki Shoji[1], Masataka Komatsu[1] and Yoshinobu Uemoto[2]

([1]Livestock Research Institute, Yamagata Integrated Agricultural Research Center,

[2]Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University) ····· 140

Molecular genetic study on white spotting in Japanese Black cattle

Takeshi Shimogiri[1] and Hidemi Oyama[2]

([1]Faculty of Agriculture, Kagoshima University,

[2]Institute of Livestock and Grassland Science, NARO) ····· 147

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

Tatsuya Furuichi

(Laboratory of Laboratory Animal Science and Medicine, Co-Department of Veterinary Medicine,

Faculty of Agriculture, Iwate University) ····· 153

Estimation of genetic diversity with genome information and development of mating systems for maintenance of the diversity in Japanese Brown cattle

Keiichi Inoue

(Faculty of Agriculture, University of Miyazaki) ····· 160

The study of polymorphism in the chicken CCKAR and HSP70 gene associated with thermotolerance (Ⅱ)

Eriko Fukuhara, Miyuki Mori, Tatsuya Hirakawa and Tetsuya Murakami

(Fukuoka Agriculture and Forestry Research Center) ····· 166

Effects of nutritional environment during nursing period on reproductive function (Ⅱ)

Hideyuki Takahashi

(Kuju Agricultural Research Center, Kyushu University) ····· 172

Is bovine corpus luteum blood flow involved in the local regulation of endometrial functions ? (Ⅲ)

Tomomi Kanazawa[1], Keiichiro Kizaki[1] and Ryotaro Miura[2]

([1]Cooperative Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, Iwate University,

[2]School of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Science, Nippon Veterinary and Life Science University) ····· 177

© The Ito Foundation

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

Hisashi Nabenishi and Mihiro Naka

(Department of Animal Science, School of Veterinary Medicine, Kitasato University) ····· 183

Development of transportation system for bovine oocytes by controlling meiosis

Kenichiro Sakaguchi[1#] and Kohei Kawano[2]

([1]Faculty of Veterinary Medicine, Hokkaido University,

[2]Faculty of Environmental, Life, Natural Science and Technology, Okayama University)

([#]Present address : Joint Department of Veterinary Medicine,

Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University) ····· 188

Development of an efficient method for cryopreservation of porcine oocytes using a novel cryoprotectant

Kazuchika Miyoshi

(Faculty of Agriculture, Kagoshima University) ····· 194

Use of batteryless ear tag sensors for goat breeding management

[1]Riku Yasumura, [2]Osamu Takiguchi and [3]Haruichi Kanaya

([1]Okinawa Prefectural Livestock and Grassland Research Center, [2]ALSENS Inc,

[3]Graduate School of Information Science and Electrical Engineering, Kyushu University) ····· 201

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

Tadatoshi Ohtaki

(Laboratory of Theriogenology, Department of Veterinary Medicine, College of Bioresource Sciences,

Nihon University) ····· 208

Estrus detection in tie-stall housed lactating cows using a multimodal tail sensor

Koji Yoshioka[1] and Tomomi Ozawa[2]

([1]School of Veterinary Medicine, Azabu University, [2]National Institute of Animal Health, NARO) ··· 214

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

Yuki Nakajima, Akina Kanda and Takahiro Tagami

(Institute of Livestock and Grassland Science, NARO) ····· 221

Designing a bovine in vitro embryo culture medium with high fertility by modifying the concentration of non-essential amino acid

Nobuhiko Itami and Yuji Hirao

(Institute of Livestock and Grassland Science, NARO) ····· 227

© The Ito Foundation

Development of artificially modified live attenuated vaccine aiming at complete control of avian influenza

Taisuke Horimoto

(Graduate School of Agricultural and Life Sciences, University of Tokyo) ····· 233

Involvement of neglected infectious diseases in cattle abortions in Japan

Yukiko O'Brien and Natsumi Endo

(Tokyo University of Agriculture and Technology, Institute of Agriculture) ····· 238

Establishment and application of an in vitro growth system for foot-and-mouth disease virus using bovine respiratory tract epithelial cells

Tamaki Okabayashi[1], Katsuhiko Fukai[2] and Akatsuki Saito[3]

([1]Center for Animal Disease Control, University of Miyazaki,

[2]National Agriculture and Food Research Organization,

[3]Faculty of Agriculture, University of Miyazaki) ····· 243

Search for lactic acid bacteria that reverse antimicrobial susceptibility by dropping antimicrobial resistance plasmids

Kanako Ishihara

(Tokyo University of Agriculture and Technology, Institute of Agriculture) ····· 251

Comprehensive analysis of candidate receptors for Classical Swine Fever virus (Ⅱ)

Keigo Ikeda and Yoshifumi Iwamaru

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

Basic research for the development of low-cost nucleic acid vaccines for livestock using large scale PCR technology

Sayaka Nishikawa, Akari Tachibana, Reiko Nagata, Yoshihiro Shimoji and Rinji Akada*

(National Institute of Animal Health, NARO,

*Graduate School of Sciences and Technology for Innovation, Yamaguchi University) ····· 262

Analysis of target cells of African swine fever virus in joint and histopathological analysis of arthritis

Mitsutaka Ikezawa

(National Institute of Animal Health, NARO) ····· 268

Development of a rapid diagnostic kit for fasciolosis using recombinant CathepsinL1 — Application for monitoring of gibier-borne infections —

Madoka Ichikawa-Seki

(Cooperative Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, Iwate University) ····· 274

© The Ito Foundation

Mechanisms of transplacental BVDV transmission

Ikunori Naito[1], Yuki Hirano[1] and Noriyuki Toji[2]

([1]Animal Research Center, Hokkaido Research Organization,

[2]Hokkaido University Institute for the Advancement of Graduate Education) ····· 279

Effective control of bovine respiratory disease by application of the innate immune activation mechanism of nasal mucosal vaccine

Shingo Ishikawa

(Graduate School of Veterinary Science, Osaka Metropolitan University) ····· 286

Study of application of caudal vena cava / aorta diameter ratio for evaluation of dehydration of calf

Nao Tsuzuki

(School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University) ····· 293

Monitoring of *Salmonella* status in cattle using bulk milk and serum antibody testing and analysis of epidemiological relevance among bovine and other isolates

Masashi Okamura

(Department of Veterinary Medicine, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine) ··· 297

Ability to transmit highly pathogenic livestock diseases of *Apodemus* spp. inhabiting around livestock farms

Yasuhiro Takashima

(Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University) ····· 304

Development of an efficient system for virus isolation

Akatsuki Saito

(Faculty of Agriculture, University of Miyazaki) ····· 308

Establishment of a novel detection method for *Clostridium botulinum* with a rapid and convenient procedure by utilizing bacteriophage

Yoshihiko Sakaguchi

(Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokushima Bunri University) ···· 315

Development of mucosal vaccine adjuvant for livestock (Ⅱ) : Validation of a viral infection model

Masahiro Wakao

(Department of Science and Engineering, Kagoshima University) ····· 320

Development of a novel method for early diagnosis of respiratory disease in calves based on exhalation temperature and heat flux measurements

Yosuke Maeda and Yuka Sasaki

(School of Veterinary Medicine of Kitasato University) ····· 326

© The Ito Foundation

Improvement of immunity of mammary gland by clarifying the networks between mucosal tissues in pig

Mutsumi Furukawa and Tomonori Nochi

(Graduate school of Agricultural Science, Tohoku University) ····· 332

A study on fatty acid taste sensing in livestock animals (Ⅱ)

Yuta Yoshida

(Department of Food and Life Sciences, College of Agriculture, Ibaraki University) ····· 336

Improvement of glucose utilization in calves with a focus on glucagon-like peptide 1

Yudai Inabu

(Graduate School of Integrated Sciences for Life, Hiroshima University) ····· 342

Life cycle assessment of organic beef production using food waste and by-product feed

Michio Tsutsumi

(Western Region Agricultural Research Center, NARO) ····· 349

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

Takahiro Gondo

(Frontier Science Research Center, University of Miyazaki) ····· 355

Development of an efficient breeding and management method using the digital phenotyping technique

Hidenori Tanaka

(Faculty of Agriculture, University of Miyazaki) ····· 362

Exploring the possibility of using livestock-origin extraction residue as feed

Tomoyuki Kawashima

(Faculty of Agriculture, University of Miyazaki) ····· 368

The dam effect on calf sleep behaviour expression

Michiru Fukasawa

(Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University) ····· 374

Elucidation of the effects of ferroptosis on meat quality traits and their control

Tomonori Nakanishi

(Department of Biochemistry and Applied Biosciences, Faculty of Agriculture, University of Miyazaki) ····· 380

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

Takahiro Suzuki, Takahiro Maeno, Hikaru Imakyure, Youhei Ogawa, Yuka Kawasaki, Minori Nakada, Rika Osaki, Ryuki Oyama, Aoi Ogawa, Mako Nakamura and Ryuichi Tatsumi

(Research Faculty of Agriculture, Graduate School of Agriculture, Kyushu University) ····· 386

© The Ito Foundation

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

Yutaka Suzuki

（Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University）…… 395

Effects of dietary algae on resistance of broiler chickens against high ambient temperature

Shin-Ichi Kawakami

（Graduate School of Integrated Sciences for Life, Hiroshima University）…… 403

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

Takaoki Saneyasu and Kazuki Nishimoto

（Graduate school of Agricultural Science, Kobe University）…… 407

Improvement by 3D image analysis of the penetrating site and body position of captive bolt gun to properly stunning of cattle at a commercial slaughter facility

Fumiaki Takahashi, Hiroshi Miura, Yosuke Maeda and Kazuki Takeda

（School of Veterinary Medicine of Kitasato University）…… 412

Construction of anatomical and pathological background data on the relationships between stunning and brain damage in beef cattle in the commercial slaughter facility

Ryo Ando, Takehiko Kakizaki, Makoto Sugiyama and Hiroaki Kawaguchi

（School of Veterinary Medicine, Kitasato University）…… 419

Suppression of greenhouse gas emissions in livestock manure treatment using omnivorous insects

Masami Shimoda, Ken Sugimura and Bo Yun Cheng

（Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo）…… 425

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

Tetsuya Tachibana

（Graduate School of Agriculture, Ehime University）…… 432

The combination effect of two functional compounds on muscle development in broiler chickens

Yukako Tokutake and Shinichi Yonekura

（Faculty of Agriculture, Shinshu University）…… 440

Effects of diets with different CP levels on body weight gain, back fat thickness in Okinawa Agu feeder pigs（Ⅱ）: Effect of protein-energy ratio

Kyota Fusho[1] and Yoshimi Imura[2]

（[1]Okinawa Prefectural Livestock and Grassland Research Center,

[2]Faculty of Agriculture, University of the Ryukyus）…… 445

© The Ito Foundation

Building a basis to optimize feed composition with AI models that predict fat crossbreeding and growth

Daisuke Yamanaka[1], Yuki Goda[1], Hiroki Nishi[1], Masato Masuda[2] and Masaya Katsumata[3]

([1]Department of Agriculture and Life Science, The University of Tokyo,

[2]Faculty of Information Sciences and Arts, Toyo University,

[3]School of Veterinary Medicine, Azabu University) ····· 452

Elucidation of the mechanisms underlying adipogenic or fibrogenic differentiation of mesenchymal progenitors in skeletal muscle for the development of high-quality meat

So-ichiro Fukada

(Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University) ····· 457

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

Takeshi Koyama

(Animal research center, Hokkaido research organization) ····· 462

Detection of silent heat and evaluation of optimum timing of insemination using detail of milk progesterone and information from automatic milking system

Toshie Sugiyama[1] , Chikako Yoshida[1], Maria Aniskina[2],

Mai Yamashita[3], Hiroshi Nakagawa[3] and Yuichi Miyakoshi[3]

([1]Faculty of Agriculture, Niigata University, [2]Graduate School of Science and Technology,

Niigata University, [3]Niigata Agricultural Research Institute Livestock Research Center) ····· 467

Potential resource value of cattle rumen fluid discharged from slaughterhouses converted to fertilizer by methane fermentation

Kenichi Abe

(Faculty of Food Industry, Niigata Agro-Food University) ····· 473

© The Ito Foundation

伊藤記念財団賞

目　　次

上　本　吉　伸（東北大学大学院農学研究科　准教授）
肉用家畜における高密度 SNP 情報の肉質改良への応用に関する研究 …… 485

早　川　　徹（北海道大学大学院農学研究院　助教）
ミオシンの水溶化現象の発見とその応用 …… 486

© The Ito Foundation

学会等事業助成

目　　次

令和５年度学会等事業助成 実施報告書
市民公開講座『高病原性鳥インフルエンザの現状と安全な食肉と鶏卵の提供』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）…… 489

日本食肉科学会　令和５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）・
理事長　有原圭三（北里大学獣医学部）…… 493

令和５年度事業実施報告書
日本畜産学会第 131 回大会 公開シンポジウム「豊かな食と畜産の未来に向けて」
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）…… 498

© The Ito Foundation

研究助成事業

© The Ito Foundation

経産肥育が牛肉中のL-カルニチン量に及ぼす影響

Effects of postpartum fattening on L-Carnitine content in Japanese Black cattle

島　田　謙一郎
（帯広畜産大学生命・食料科学研究部門）

Kenichiro Shimada
（Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine）

We investigated the effect of post-partum/calving fattening management of Japanese Black cows（age=127.6 months; n=20）on the amount of L-carnitine content in beef loin, against conventionally fattened steers（age=33.8 month; n=5）and freshly calved cows（age=80.3 months; n=6）of the same breeds. Free carnitine, acylcarnitine, and total carnitine contents were measured in beef loin. Total and free carnitine contents were 105.1 and 97.5 mg/100 g in the freshly calved group, 77.8 and 69.3 mg/100 g in the post-partum/calving fattening group, and 45.4 and 37.9 mg/100 g in the conventionally fattened group, respectively. Total and free carnitine contents were significantly decreased in the post-partum/calving fattening group compared to the freshly calved group, but in contrast were significantly higher（p<0.05）than that of the conventionally fattened group. On the other hand, the acylcarnitine content（7.5 to 8.3 mg/100 g）was not significantly different among the three groups. Furthermore, the crude fat content in post-partum/calving fattening group was similar to that of the conventionally fattened group. Thus, post-partum/calving fattening management of Japanese Black cattle could maintain significantly higher total carnitine and free carnitine contents in beef loin along with a similar crude fat content in comparison to the conventionally fattened steers.

1．目　　的

食肉には身体機能を正常に保つ，人間の健康に役立つ多くの生物活性化合物として，カルノシン，アンセリン，L-カルニチン，共役リノール酸，グルタチオン，タウリン，クレアチン，コエンザイムQ10，ヘム鉄などが含まれていることが知られている[1, 2]。これらのなかで我々はL-カルニチンの測定方法を最適化し，L-カルニチンの各種家畜や家禽の骨格筋中における濃度を調べると，L-カルニチン量が反芻家畜の骨格筋に多く，年齢に伴って増加すること，筋線維型では赤色筋線維に多く存在することを明らかにした[3]。カルニチンは生体内で長鎖脂肪酸をβ酸化の場であるミトコンドリアマトリックスに運搬する担体として生理的に重要な役割を果たしている。常石らは，加齢に伴う遊離型L-カルニチン含量の増加が著しいことを報告している[4]。このことは加齢，つ

© The Ito Foundation

まり月齢による寄与がL-カルニチン含量に大きく影響することを示唆している。ポストコロナの牛肉生産を考えると，輸入飼料はさらに価格上昇が予想されており，SDGsの達成も踏まえると，畜産業における環境負荷軽減の取組みが確実に実施されれば，牛肉価格の上昇が起こる可能性がある。また，国内における牛肉生産を考えると，経産牛の利用をこれまで以上にうまく活用しなければ，国産牛肉が一般消費者の手に届かなくなる可能性がある。最近，国内では経産牛を肥育する経産肥育牛肉に注目が集まっており，経産牛のL-カルニチン量について量的な検証がほとんど行われていない。そこで本研究では，黒毛和種の慣行肥育，経産（肥育なし），経産肥育によりL-カルニチン量に違いがあるか否か調査することを目的とする。

２．材料および方法

2.1　実験材料

黒毛和種の慣行肥育牛５頭，経産牛６頭および経産肥育牛20頭のリブロースを試料とし，真空包装した状態のまま４℃で，と畜後21日目まで熟成した。その後，分析まで－20℃で冷凍保存した。分析時に試料を冷蔵庫内で解凍し，成分（遊離カルニチン，総カルニチン，遊離アミノ酸）の分析のために一定量を切断し，角切りにし，手回しのミキサーにより挽肉にした。さらに，フードプロセッサー（MK-K60-Wフードプロセッサー，National）でカッティングしてから，各種分析用に試料５ｇを25 mlチューブに秤量した。試料の月齢平均は**Table 1** に示した。

2.2　カルニチン分析用酸可溶性画分の調製

５ｇの挽肉に対して５倍量の0.3 M過塩素酸溶液を加えて，ポリトロン型ホモジナイザー（ヒスコトロン超高速ホモジナイザーNS-52，マイクロテックニチオン）で１分間ホモジナイズし，冷却高速遠心機（himac CR21F，日立工機株式会社）により，1,140×ｇで10分間遠心分離を行った（４℃）。得られた上清はろ紙（ミルパップ，安積濾紙株式会社）でろ過し，50 ml容の三角フラスコにろ液を回収した。沈殿に再び４倍量の0.3 M過塩素酸溶液を加え，上記の操作を繰り返した。これらのろ液をNo.5 Cのろ紙（ADVANTEC）で50 ml容のメスフラスコにろ過し，50 mlに0.3 M過塩素酸溶液を用いてメスアップした。

2.3　遊離カルニチン比色定量用試料の調製

2.2で得られた酸可溶性画分に対して1.2 M炭酸カリウム溶液を５：１の比率で混合するとpHが７～８になることから，酸可溶性画分８mlに1/5量の1.2 M炭酸カリウム溶液を1.6 mlを加えて中和した後に，8,385×ｇ・10分間遠心分離を行った（４℃）。この上澄液を0.45 μm孔径のフィルター（マイショリディスクW-13-5，東ソー株式会社）を用いて10 ml容のメスフラスコにろ過し，×１中和液（0.3 M過塩素酸溶液と1.2 M炭酸カリウム溶液を５：１の比率で混合した溶液を遠心分離した後，上清をろ過したもの）によりメスアップした溶液を比色定量用試料とした。

2.4　総カルニチン比色定量用試料の調製

2.2で得られた酸可溶性画分中に含まれるアシ

Table 1　Average age of conventional group, postpartum group and postpartum fattening group

	Conventional (n=5)	Postpartum (n=6)	Postpartum fattening (n=20)
Age in months	33.8 ± 9.6c	80.3 ± 11.6b	127.6 ± 27.7a

Data was shown as average ± standard deviation.
Different letters within the same row indicate significant differences (p<0.05).

© The Ito Foundation

ルカルニチンをアルカリ加水分解して，遊離カルニチンにするために，この溶液21 mlに対して10 N水酸化カリウム溶液を690 μl 加え，pHを11にした。これをブロックヒーターで56℃・1時間加熱してアルカリ加水分解を行った。その後，pHが再び7～8になるように0.6 M過塩素酸溶液を加えた。これを18,200× g・10分間で遠心分離し（4℃），得られた上澄液をシリンジで回収し，0.45 μm孔経のフィルター（マイショリディスクW-13-5，東ソー株式会社）を用いて25 ml容のメスフラスコにろ過し，×1中和液によりメスアップした溶液を比色定量用試料とした。

2.5　酵素法による遊離カルニチン定量

酵素法による遊離カルニチン定量はMarquis&Fritzの方法[5]を改良して行った[3]。0.93 mM 5,5'-Dithiobis （2-nitro-benzoicacid）（DTNB），0.55 mM Acetyl Coenzyme A trilithium salt（Acetyl-CoA），3.05 mM Ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid disodium salt dihydrate （EDTA ・ 2Na），610 mM Tris-HCl，pH 7.5からなる測定溶液をマイクロプレートの1穴ごとに100 μl ずつ分注し，これに2.3あるいは2.4比色用試料，あるいはL-カルニチン標準液（0，10，20，30，40，50mg/l）を100 μl ずつ分注した。マイクロプレートミクスチャー（IWAKI製）で混合後，35℃で10分間インキュベートし，Model550プレートリーダー（BIO-RAD製）で415 nmの吸光度を測定した。次いで，0.118 mg/ml Carnitine acetyltransferase（CAT, EC 2.3.1.7）を50 μl 添加し，再び35℃で10分間インキュベートして415 nmの吸光度を測定した。この吸光度から酵素添加前の吸光度を差し引いた値より生肉100 g 当たりの遊離カルニチン量（mg）を算出した。総カルニチン量から遊離カルニチン量を差し引いてアシルカルニチン量を求めた。

2.6　統計処理

統計分析には，SAS Enterprise Guide（ver.8.2, SAS Institute社）を用いた。検定にはBartlettの等分散の検定を行い，等分散でない場合はBonferroniの多重比較検定を，等分散である場合にはTukeyの多重比較検定を用いて危険率95％で統計処理を行った。

3．結果と考察

牛肉に含まれる総カルニチン量を**Fig. 1** に示した。経産牛は105.1 mg/100 g，経産肥育牛は77.8 mg/100 g，慣行肥育牛は45.4 mg/100 gとなり，経産牛＞経産肥育牛＞慣行肥育牛の順に有意に多くなった（$p<0.05$）。次に脂肪酸結合型のアシルカルニチン量を**Fig. 2** に示した。経産牛は7.6 mg/100 g, 経産肥育牛は8.5 mg/100 g, 慣行肥育牛は7.5 mg/100 gとなり，グループ間で有意差はなかった。最後に遊離型の遊離カルニチン量を**Fig. 3** に示した。経産牛は97.5 mg/100 g, 経産肥育牛は69.3 mg/100 g, 慣行肥育牛は37.9 mg/100 gとなり，経産牛＞経産肥育牛＞慣行肥育牛の順に有意に多くなった（$p<0.05$）。**Table 1** に示したように経産牛は80ヶ月齢，経産肥育牛は128ヶ月齢，慣行肥育牛は34ヶ月齢であり，経産肥育牛が最も月齢が多いが，遊離型の遊離カルニチン量が多くなったことで，総カルニチン量も増加し，経産肥育牛および経産牛が多くなったと考えられた。常石らの報告では条件の異なる牛肉の中で月齢が最も高かった黒毛の経産肥育牛が95ヶ月齢で，総カルニチン量が172.1 mg/100 gと最も高い含量を示していた[4]。カルニチン量は年齢とともに増加することは知られていたので，我々も経産肥育牛が最も高い含量を示すものと予測していたが，今回は月齢が若い経産牛のほうが有意に高い含量を示す結果となった。常石らはデータから牛肉のカルニチン量は120ヶ月齢程度（10歳）が最大となり，

© The Ito Foundation

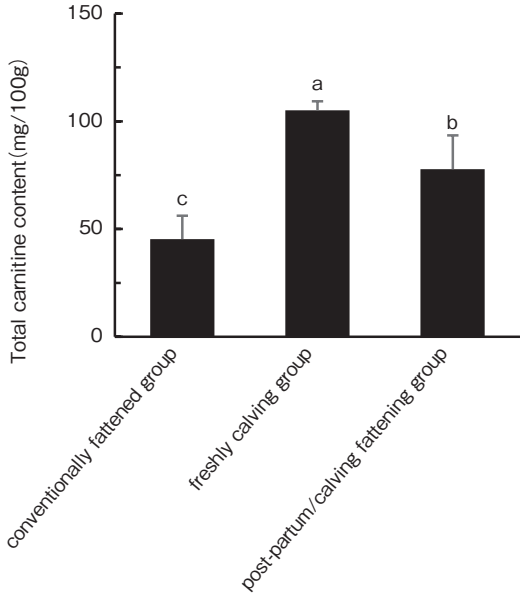


Fig. 1　Total carnitine levels in each group of conventionally fattened group, freshly calving group and post-partum/calving fattening group.
Data was presented as the mean ± standard deviation.
Different letters indicate significant differences (p<0.05).

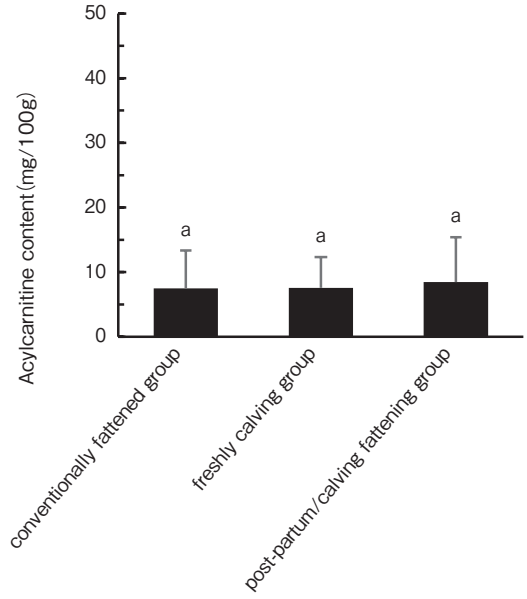


Fig. 3　Acylcarnitine levels in each group of conventionally fattened group, freshly calving group and post-partum/calving fattening group.
Data was presented as the mean ± standard deviation.
Different letters indicate significant differences (p<0.05).

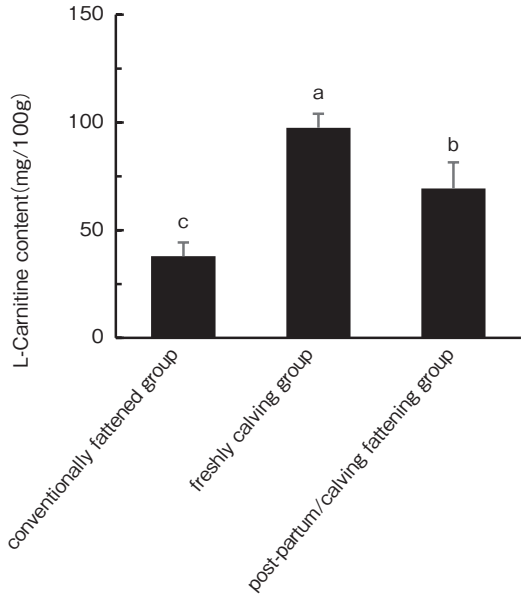


Fig. 2　Free carnitine levels in each group of conventionally fattened group, freshly calving group and post-partum/calving fattening group.
Data was presented as the mean ± standard deviation.
Different letters indicate significant differences (p<0.05).

それ以上月齢を重ねてもカルニチン量は減少すると述べている[6]。今回の我々の経産肥育牛（n = 20）の試料には120ヶ月齢以上の試料が14頭含まれており，最大で177ヶ月齢の試料があった。このことも経産牛（62～95ヶ月齢）よりも経産肥育牛（73～177ヶ月齢）が低い含量となった理由なのかもしれない。ただし，常石らの報告では試料を熟成した日数等については触れられていなかったことを記しておく[4]。しかし，本研究より経産肥育牛について，経産牛を肥育して出荷する月齢が120ヶ月齢を超えないように仕上げられれば，総カルニチン量および遊離カルニチン量も多い経産肥育牛を生産できる可能性を示唆できた。さらに，本研究で用いた試料の粗脂肪含量は経産肥育牛（33.3 g/100 g）と慣行肥育牛（37.0 g/100 g）で，両者に有意差はなく，経産肥育牛（33.3 g/100 g）

© The Ito Foundation

の粗脂肪含量は経産牛（20.9 g/100 g）と比べて有意に多くなった。以上の結果から，経産肥育にすることで粗脂肪量も慣行肥育牛レベルにして，なおかつ遊離カルニチン量を増やせる技術として黒毛の経産肥育という手法には機能性成分を強化できる可能性が示唆された。

4．要　約

黒毛和種の経産牛を肥育した経産肥育が牛肉中のL-カルニチン量へどのように影響するのかを調べるため，肥育しない経産牛（n = 6），肥育した経産牛（n =20）および慣行肥育牛（n = 5）のリブロースを試料として，遊離カルニチン量，アシルカルニチン量および総カルニチン量を測定した。総カルニチン量および遊離カルニチン量は経産牛では105.1 mg/100 gおよび97.5 mg/100 gとなり，経産肥育牛では77.8 mg/100 gおよび69.3 mg/100 gとなり，慣行肥育牛では45.4 mg/100 gおよび37.9 mg/100 gとなり，経産牛＞経産肥育牛＞慣行肥育牛の順に有意に多くなった（p<0.05）。一方，アシルカルニチンは7.5～8.3 mg/100 gを示し，経産牛，経産肥育牛および慣行肥育牛間で有意差はなかった。経産牛に比べて経産肥育牛の総カルニチン量および遊離カルニチン量は減少したが，慣行肥育牛に比べて有意にいずれも有意に多くなった。さらに，粗脂肪含量では経産肥育牛は慣行肥育牛と同じレベルにまで増加したので，経産肥育による生産技術は慣行肥育と遜色ないレベルの粗脂肪含量を有し，総カルニチン量および遊離カルニチン量を多くすることができた。

文　献

1） Arihara, K.：Strategies for designing novel functional meat products, *Meat Science*, **74**, 219～229, 2006.
2） Purchas, R. W., Rutherfurd, S. M., Pearce, P. D., Vather, R., Wilkinson, B. H .P.：Concentrations in beef and lamb of taurine, carnosine, coenzyme Q_{10} and creatine, *Meat Science*, **66**, 629～637, 2004.
3） Shimada, K., Sakuma, Y., Wakamatsu, J., Fukushima, M., Sekikawa, M., Kuchida, K., Mikami, M. ：Species and muscle differences in L-carnitine levels in skeletal muscles based on a new simple assay, *Meat Science*, **68**, 357～336, 2004.
4） 常石英作，柴伸弥，松崎正敏，森弘，垂水啓二郎：牛肉中カルニチン含量に及ぼす影響要因，西日本畜産学会報，**48**，51～55，2005.
5） Marquis, N. I., Fritz, I.：Enzymological determination of free carnitine concentrations in rat tissues, *Journal of Lipids Research*, **5**, 184～187, 1964.
6） 常石栄作：カルニチン，日本食品科学工学会誌，**53**, 361, 2006.

© The Ito Foundation

ソーセージの塩漬フレーバー増強へのヒポキサンチンの関与についての研究

Studies on the involvement in hypoxanthine on the cured meat flavor enhancement of sausage

市村　さやか[1]・高橋　真佐郎[1]・中村　幸信[1]・吉田　由香[1]・山之上　稔[2]・若松　純一[3]
（[1]一般社団法人食肉科学技術研究所，[2]元神戸大学大学院農学研究科，[3]北海道大学大学院農学研究院）

Sayaka Ichimura[1], Masao Takahashi[1], Yukinobu Nakamura[1], Yuka Yoshida[1], Minoru Yamanoue[2] and Jun-ichi Wakamatsu[3]
([1]Japan Meat Science and Technology Institute, [2]Graduate School of Agriculture, Kobe University, [3]Hokkaido University, Research Faculty of Agriculture)

Curing is an essential process in the manufacture of meat products. In the curing process, the curing ingredients, usually salt, polyphosphate and nitrite are added to meat. Curing contributes to the development of a specific cured meat flavor. We have been studying on elucidating the mechanism by which cured meat taste is expressed in meat products. It was indicated that hypoxanthine (Hx), an ATP-related compound, was involved in the enhancement of the cured meat taste. In this study, to clarify of the mechanism that Hx enhances the cured meat flavor, we investigated the involvement of Hx not only in the cured meat taste but also in the aroma and overall quality of meat products by using a sensory evaluation. For the sensory evaluation, we prepared a model system for sausage, which was the most produced meat product.

The sensory evaluation revealed that Hx enhanced the cured meat aroma, bitterness, umami, and koku of the sausages, indicating that they were dependent on Hx concentration up to a certain concentration. Furthermore, the effect weakened when Hx exceeded 4.9 μ mol/g in the sausage, suggesting that Hx is affective at the appropriate concentration.

To examine the effect of Hx addition to sausage more objectively, we compared the effect of Hx with that of MSG, a major umami component in meat products. As a result, it was confirmed that the umami enhancement caused by Hx was weaker than that caused by MSG, but Hx caused the same phenomenon as MSG. On the other hand, the cured meat aroma enhancement by Hx was greater than that by MSG, suggesting that this phenomenon is unique to Hx. It was also confirmed that Hx did not affect various chemical components, physical properties, and color tone of the sausage.

1．目　　的

塩漬（えんせき）とは，食肉製品の製造過程において，食肉を食塩や亜硝酸塩を含む塩漬剤を用いて漬け込む工程のことである。塩漬には，肉色の固定，微生物の増殖抑制，保水性・結着性の発

© The Ito Foundation

現ならびに塩漬フレーバーと称される特有の風味の付与という，製品の品質を左右する４つの重要な効果がある。このうち，４つ目の塩漬フレーバー発現メカニズムは，唯一その全容が未解明の課題である。

我々は，これまで塩漬フレーバー発現メカニズムの解明を目指し，塩漬した肉に特有の味（塩漬味）に寄与する成分を探索してきた。その結果，熟成により原料肉自体から塩漬中に増加する成分が塩漬味の増強に関与していること，またその一つが核酸関連物質のヒポキサンチン（Hx）であることを見出した。さらに，Hxをピックルに加えて塩漬したモデル試料を，味のみを正確に区別した手法で官能評価した結果，Hxが試料の塩漬味を増強することを確認した[1)]。その後，Hxが塩漬味を増強するメカニズムについて，Hxの呈味特性の一つ「苦味」をキーワードに取り組んできたが，まだ解明には至っていない。さらに，実際の食肉製品に近い形において，Hxが塩漬味のみならず塩漬フレーバー全体へ与える影響を確認する必要もあるが，実施していない。塩漬フレーバーの増強メカニズムにおけるHxの作用機序が明らかになれば，従来官能評価に頼ってきた食肉製品の品質指標としてHx含量を利用することも可能となるだろう。また，塩漬期間のコントロールを的確に行うことができるようになり，国内のみならず食肉製品製造業界への貢献も大きいと考える。

そこで本課題では，Hxが塩漬フレーバーを増強するメカニズムを解明することを目的として，食肉製品の中でも最も生産量の多いソーセージのモデル系を用い，Hxのソーセージの風味全体への関与を，定性的および定量的な官能評価により調べた。また，ピックルに添加したHxがモデルソーセージの特性に及ぼす影響を，各種成分の分析や物性の評価を通して網羅的に調べた。さらに，Hx添加ソーセージの風味の特性について，食肉製品の主要なうま味成分であるグルタミン酸ナトリウム（MSG）を添加したモデルソーセージと比較することで，より客観的にHxの添加効果を調べた。

2．方　法

2.1　試薬

ソーセージの調製に使用したHxおよびMSGは富士フイルム和光純薬株式会社より，亜硝酸ナトリウムは関東化学株式会社より購入した。いずれも特級グレードを使用した。

2.2　モデルソーセージの調製方法

試験に使用したモデルソーセージはWagaらの方法[2)]で調製し，官能評価および理化学分析に供した。原料肉は，３頭のチルド豚肉のロース（LWD種）を小川畜産（株）から購入した。と畜後は２℃で保管し，と畜３日目に胸最長筋を切り出してミートチョッパー（MS-12，プレート径6.4mm, Nantsune Co., Ltd, Japan）で挽肉にし，よく混合した。混合した挽肉にピックルを５：１の割合で加えて，肉だねの温度が上昇しないように冷やしながら３分間混合した。ピックルは，試験の目的に応じてHxあるいはMSGを添加し，**Table 1** に示したとおり配合した。肉だねを50 gずつ非通気性の袋（S-WRAP, A7-1425，厚さ0.07 mm × 横 150 mm × 縦 250 mm，STAR PLASTIC Co., Ltd, Japan）に入れて真空包装し，２℃で３日間塩漬した。塩漬後，75℃に設定した循環恒温水槽（SP-12N, TAITEC Co., Ltd, Japan）中で30分間加熱した。加熱終了後に10分間氷水で急冷したものを「モデルソーセージ」とした。なお，各ソーセージの調製は，原料の個体差等の影響を排除するため３回繰り返し行い，その後の官能評価および分析も３回ずつ行った。

© The Ito Foundation

Table 1　Blending ratio for model sausages preparation

Sausage	Minced meat	Pickle				
		Sodium chloride	Nitrite	Hx	MSG	Distilled water
	(g)	(g)	(g)	(g)	(g)	(g)
A	300.0	5.4	0.0496	−	−	54.55
B	300.0	5.4	0.0496	0.0653	−	54.49
I	100.0	1.8	0.0165	0.0119	−	18.17
J	100.0	1.8	0.0165	0.0238	−	18.16
K	100.0	1.8	0.0165	0.0477	−	18.14
L	100.0	1.8	0.0165	0.0715	−	18.11
M	100.0	1.8	0.0165	0.0954	−	18.09
N	100.0	1.8	0.0165	0.1192	−	18.06
O	100.0	1.8	0.0165	−	0.0159	18.17
P	100.0	1.8	0.0165	−	0.0319	18.15
Q	100.0	1.8	0.0165	−	0.0637	18.12
R	100.0	1.8	0.0165	−	0.0956	18.09
S	100.0	1.8	0.0165	−	0.1275	18.06
T	100.0	1.8	0.0165	−	0.1593	18.02

2.3　定性的な官能評価

ソーセージＡおよびＢをあらかじめ室温に戻し，厚さ１cmにカットし，食肉科学技術研究所に所属するハム，ソーセージおよびベーコンの官能評価に熟練したJAS官能検査員５名に供した。評価方法は評点法を用い，評価の尺度は100 mmの線尺度を用いた。評価項目は，Hxの有無によるソーセージの風味の違いを網羅的に評価する目的で次のように設定した。「香り」については塩漬特有の香りの強さを，「味」についてはうま味，塩味および苦味の強さを，「こく」については濃厚感，広がりおよび持続性を，「食感」については結着性およびかたさを評価した。

2.4　定量的な官能評価方法

Hx無添加のソーセージＡと，HxあるいはMSGをピックルに加えて調製したソーセージＩ～ＮあるいはＯ～Ｔを，2.3と同様の官能検査員に供した。評価方法は特性プロファイル法を用い，ソーセージＡをコントロール（０点）とした時のその他の試料の風味の強さを－５点～＋５点の10段階評価で評価した。評価項目は，2.3でHxの有無間で有意差が認められた項目（塩漬特有の香り，うま味，苦味，およびこく）に絞り込み，実施した。

2.5　理化学分析

分析項目は，呈味成分として核酸関連物質（イノシン酸（IMP），イノシンおよびHx），遊離アミノ酸，ペプチド総量，pH，食塩濃度を，食肉製品の評価として残存亜硝酸イオン量を測定した。また，モデルソーセージの品質に影響する物性として，加熱損失，色調およびテクスチャーを評価した。なお，成分分析に使用した試料は，各ソーセージをフードカッター（Grained Mix 200, Retsch, Germany）で均質化してから真空包装し，試験に供するまで－20℃で保管したものを用いた。

核酸関連物質量は，北田らの方法[3]に従い過塩素酸で抽出し，水酸化カリウムでpHを6.0に調整後，遠心分離により不要物を除き，Inertsil ODS-2 column（5 μm，4.5 × 250 mm, GL-Science Co., Ltd, Japan）を装着したHPLC（Waters2695, Waters Co., Ltd, Japan）システムに供し，260 nmの吸収波長で測定した。遊離アミノ酸量は，蒸留水で抽出し，スルホサリチル酸溶液を用いて除たん白質した抽出液をヘキサンで脱脂後，アミノ酸

© The Ito Foundation

分析計（L-8900, Hitachi High-Tech Technologies Co., Ltd, Japan）に供して測定した。ペプチドは，プロテインアッセイLowryキット（Nakarai Co., Ltd, Kyoto, Japan）を用いて反応後，分光光度計（U-2900, Hitachi High-Tech Technologies Co., Ltd, Japan）に供し，測定した。pHは，蒸留水でホモジナイズして得られた抽出液をPH-METER（F52, Horiba Co., Ltd, Japan）に供し，測定した。食塩濃度は，ホルハルト法により測定した。亜硝酸イオン含量は，水酸化ナトリウム溶液で抽出し，酢酸亜鉛溶液で除たん白質した抽出液を，ジアゾ化による発色を利用した比色法を用いて分光光度計で測定した。テクスチャーは，テンシプレッサー（TENSIPRESSER® Lite and TENSIPRESSER® My Boy2 System, TAKETOMO ELECTRIC, Inc., Japan）に供し，かたさ，付着性，凝集性，ガム性および弾力性を測定した。色調は，色差計（SPECTROPHOTOMETER CM-2500d, KONICA MINOLTA JAPAN, INC., Japan）に供し，L*，a*およびb*を測定した。加熱損失は，加熱前のソーセージと，75℃に設定した循環恒温水槽中で30分間加熱後のソーセージの重量を測定し，加熱によって減少した重量％を算出した。

2.6　統計解析

理化学分析値および定性的官能評価スコアは平均値±標準偏差で示し，平均値の差の検定は，対応のあるウィルコクソン検定を用いた（$p<0.05$）。定量的官能評価スコアは平均値で示し，平均値の差の検定は，対応のある３群以上のノンパラメトリック検定としてフリードマン検定を行い，群間差が認められた場合の多重比較は対応のあるウィルコクソン検定を用いた（$p<0.05$）。すべての計算は，EXCEL官能評価Ver1.0（ESUMI Co., Ltd, Japan）を用いて行った。

３．結果と考察

3.1　Hx添加ソーセージの定性的官能評価および理化学試験

Hxがモデルソーセージに及ぼす影響を網羅的に調べる目的で，Hx無添加のソーセージAおよびHx添加のソーセージB（**Table 1**）を各種理化学試験および定性的な官能評価に供した。Bにおけるhxの添加濃度は，Hx自体には苦味があるために濃度が高すぎると苦味の影響で風味のバランスが崩れることを懸念し，閾値（0.73 μmol/g）[4]よりやや高い濃度（1.3 μmol/g）となるように設定した。

まず，理化学試験の結果を**Table 2**に示す。IMP，イノシン，遊離アミノ酸，ペプチド総量，pH，食塩および亜硝酸イオン含量は，いずれもAとBの値に有意な差は認められなかった。したがって，これらの成分はピックルに加えたHxの影響を受けないと言える。また，HxはAが0.46 μmol/g，Bが1.47 μmol/gとなり，AのHx含量は苦味閾値未満であること，BのHx含量はピックルに加えた量がおおむね含まれていることを確認した。

物性においては，加熱損失，色調およびテクスチャーは，いずれもAとBの値に差は認められなかった。したがって，ソーセージの物性も，ピックルに加えたHxの影響を受けないと言える。

続いて，モデルソーセージの官能評価結果を**Table 3**に示す。塩漬特有の香り，うま味，苦味およびこくの強さは，Hxを添加したBのほうがAより有意に強いと評価された（$p<0.05$）。一方，塩味と，食感として評価したやわらかさおよび結着性は，A，B間に有意な差が認められなかった。

本結果より，定性的な手法ではあるが，モデルソーセージの塩漬特有の香り，苦味，うま味およびこくの強さは，ピックルにHxを加えることに

© The Ito Foundation

Table 2　Profiles of the sausage A and B

		sausage A without Hx	sausage B with Hx	Welch-T test
ATP-related compounds				
IMP	mg/100 g	130.93 ± 30.99	142.76 ± 20.89	n.s.
Inosine	mg/100 g	39.16 ± 13.14	43.18 ± 12.33	n.s.
Hx	mg/100 g	6.26 ± 2.31	20.01 ± 4.36	*
Free amino acids	mg/100 g			
Amount of 20 types	mg/100 g	113.47 ± 12.49	114.87 ± 8.72	n.s.
Glutamic acid	mg/100 g	5.10 ± 0.92	5.13 ± 0.71	n.s.
Amount of peptides	mg/100 g	285.09 ± 44.99	284.02 ± 40.80	n.s.
pH		5.94 ± 0.09	5.94 ± 0.09	n.s.
Sodium chloride	g/100 g	1.5 ± 0.0	1.5 ± 0.0	n.s.
Nitrite	g/kg	0.0562 ± 0.0069	0.0563 ± 0.0088	n.s.
Cooking loss	g/100 g	19.70 ± 1.47	19.80 ± 1.50	n.s.
Lab color space				
L*		75.38 ± 2.47	75.55 ± 1.10	n.s.
a*		11.70 ± 1.30	11.29 ± 0.27	n.s.
b*		9.12 ± 0.97	8.69 ± 0.30	n.s.
Texture				
Hardness	N/m^2	375035 ± 19924	377467 ± 10678	n.s.
Adhesiveness	J/m^2	15.1 ± 2.2	14.2 1.5	n.s.
Cohesiveness		0.33 ± 0.04	0.31 ± 0.02	n.s.
Gumminess	N/m^2	124738 ± 18550	118495 ± 3581	n.s.
Springiness		0.714 ± 0.042	0.684 ± 0.056	n.s.

Values are presented as means ± SD. n.s.：$p \geqq 0.05$, *：$p < 0.05$

Table 3　The qualitative sensory evaluation of the sausage A and B

	sausage A without Hx	sausage B with Hx	Paired Wilcoxon test
Aroma			
cured meat aroma	60.5 ± 11.3	67.2 ± 13.9	*
Taste			
umami	69.1 ± 6.0	76.2 ± 5.9	*
salty	66.9 ± 13.0	69.1 ± 13.9	n.s.
bitter	2.0 ± 2.9	3.4 ± 5.4	*
Koku			
complexity	57.6 ± 19.4	73.9 ± 15.1	*
lastingness	57.5 ± 17.3	73.5 ± 12.1	*
mouthfulness	56.9 ± 16.2	71.3 ± 12.2	*
Texture			
tenderness	67.8 ± 15.7	69.9 ± 14.4	n.s.
binding	59.7 ± 13.5	61.3 ± 13.9	n.s.

Values are presented as means ± SD. n.s.：$p \geqq 0.05$, *：$p < 0.05$

より有意に増強することが明らかになった。我々は，これまでにモデルハムの系においてHxが塩漬味を増強することを確認してきたが[1)]，本結果により塩漬味というある種独特であった評価基準が明瞭になり，さらに香りへの効果も明らかになった。また，Hx含量が増えることによりソーセージ中の他成分や物性，色調等への影響が懸念されたが，Hxは風味以外の成分および品質には

© The Ito Foundation

関与しないことも確認された。

3.2　Hx添加ソーセージの定量的な官能評価

前節の結果をふまえて，Hx添加により有意に増強することが確認された官能項目について，定量的な官能評価法を用いて精密な評価を行った。甘味以外の味は，一定以上の濃度に達すると自己防衛のために不快と感知される[5]ため，Hxの添加濃度に応じた風味への影響を調べる必要もある。そこで，Hxを苦味閾値からその10倍まで段階的に添加したピックルを用いてソーセージI, J, K，L，MおよびNを調製し（**Table1**），Hx添加効果を精査するための定量的な官能評価に供した。比較対象としたコントロール試料は，3.1と同様にHx無添加のソーセージAを用いた。

各種濃度のHxを添加したモデルソーセージの定量的な官能評価結果を**Fig. 1** に示す。評価の結果，塩漬特有の香り，うま味およびこくの強さは，ソーセージ中のHx濃度に応じて増強することが明らかになった（**Fig. 1A**，**B**，**D－F**）。ただし，Hxが4.9 μmol/g of sausage以上になると横ばい，または弱まる傾向となった。一方，苦味の強さは，Hxが約3 μmol/g of sausageまではコントロールとの差が認められなかったが，それ以降は徐々に強まり，6 μmol/g of sausageでスコアが0.9に達した（**Fig. 1C**）。Hx濃度が高いと風味の増強が横ばいになり苦味が強まること，結果には示していないが4.9 μmol/g of sausage以上となるソーセージについて官能パネルにより「風味のバランスが悪い」とコメントされたことから，Hxには適正な濃度があることが推定された。

3.3　Hx添加ソーセージの風味とMSG添加ソーセージの比較

前節で明らかになったHxの添加効果をより客観的に示す目的で，食肉製品の主要なうま味成分であるMSGを添加したソーセージの風味と比較した。ピックルへのMSGの添加濃度は，MSGのうま味閾値（0.71 μmol/g）[5]から最大10倍になるように，ソーセージO，P，Q，R，SおよびTを調製した（**Table 1** ）。評価項目は塩漬特有の香りおよびうま味の強さとし，3.2と同様の定量的な官能評価に供した。

Hx添加ソーセージ（3.2）とMSG添加ソーセージ（3.3）の官能評価スコアを比較すると（**Fig. 2**），塩漬特有の香りの強さは，MSGもHxと同様に加えた量に応じて増強したが，その程度はHxのほうが明らかに大きかった（**Fig. 2A**）。一方，うま味の強さは，MSGの添加に伴いソーセージのうま味は増強し，増強の程度はHxよりもMSGのほうが大きかった（**Fig. 2B**）。ただし，Hxが4.9 μmol/g of sausageの時，MSGが2.7 μmol/g of sausageと同様の強さのうま味を付与すると評価された。

本研究によって，Hxはモデルソーセージの塩漬特有の香り，苦味，うま味およびこくの強さを増強すること，さらに一定の添加量まではその効果がHx量に依存することが明らかになった。Hxがもたらすうま味の増強は，MSGがもたらす効果よりは緩やかではあるものの，MSGと同様の現象であることも確認された。

塩漬特有の香り増強についてHxとMSGを比較した結果，MSGよりもHxのほうが香りの増強が大きかった（**Fig. 2**）。香りの増強メカニズムへのHxの関与については，Hx自体が香気物質ではないため自身が香りを増強することは考えにくい。西村ら[6]によると，玉ねぎの植物ステロールについて，それ自体は香気物質ではないが香気物質を保持する物質であると報告されている。Hxは非極性構造であることから，ソーセージ中の香気成分がその非極性構造に吸着することにより，結果として口中香が増強した可能性や，Hxが豚肉の不快臭をマスキングし，結果として好ましい風味である塩漬特有の香りが感知されやすくなっ

© The Ito Foundation

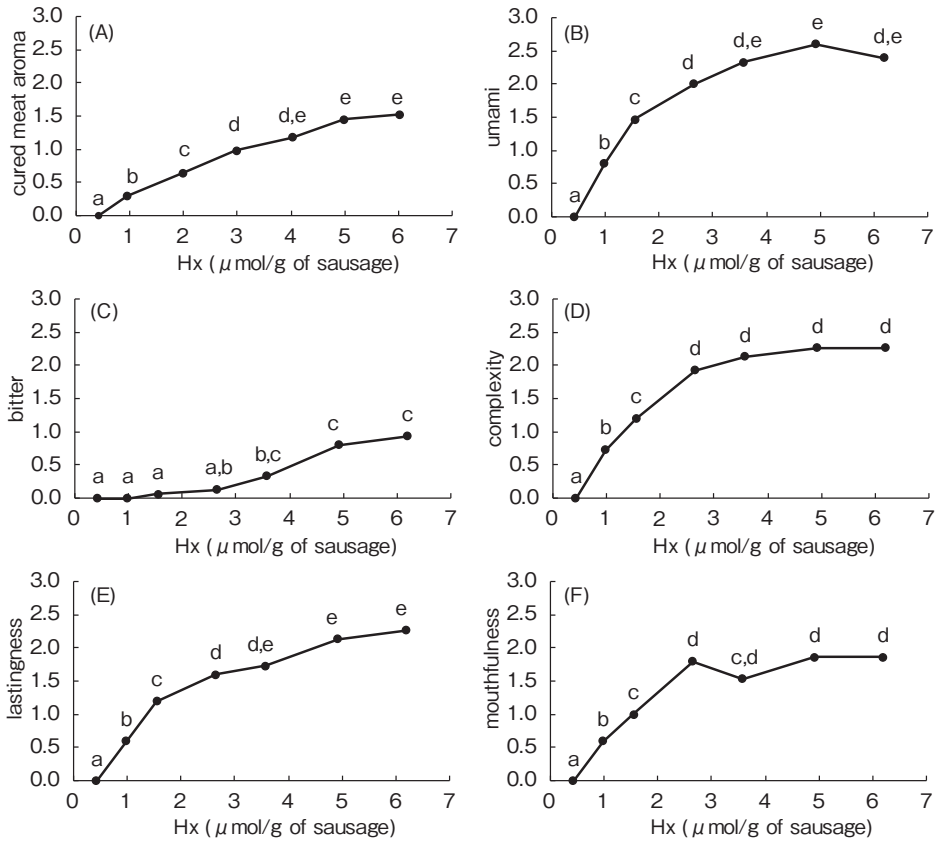


Fig. 1　The quantitative sensory evaluation of sausages added different concentrations of Hx

The strength of cured meat flavor (A), umami (B), bitterness (C) and koku (complexity (D), lastingness (E), mouthfulness (F)) of sausages (n = 3) were estimated by the quantitative sensory evaluation. Values are presented as means. Values with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

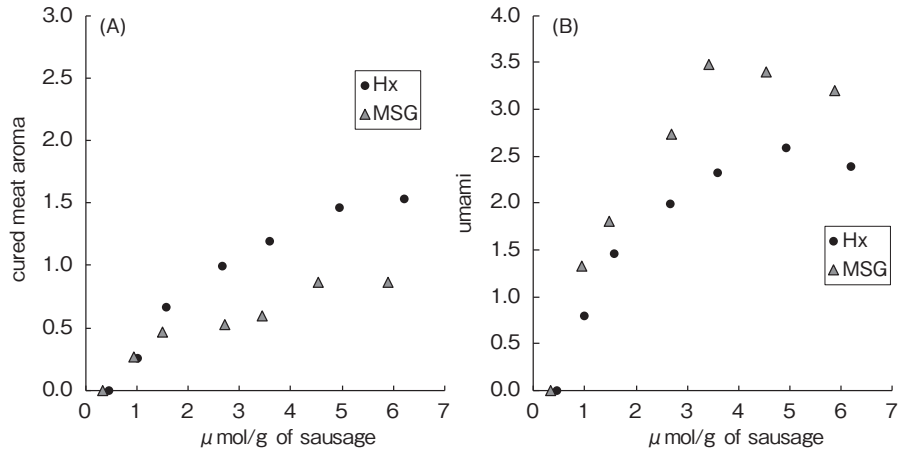


Fig. 2　The quantitative sensory evaluation of sausages added different concentrations of Hx or MSG

The strength of cured meat flavor (A) and umami (B) of sausages (n = 3) were estimated by the quantitative sensory evaluation. Values are presented as means.

© The Ito Foundation

た可能性が考えられる。このため，GC/MS/MSを用いた香気成分の評価が課題であると考える。

うま味やこくの増強については，ソーセージ中のHx量に応じて有意に増強し（$p < 0.05$）（**Fig. 1**），Hxが4.9 μmol/g of sausageの時，MSGが2.7 μmol/g of sausageと同様の強さのうま味を付与すると評価された（**Fig. 2**）。そのメカニズムについて，Hx自体が苦味を呈するため，MSGのようなうま味物質やグルタミルバリルグリシンのようなこく味物質と同様に扱うことはできない。そもそも，HxはIMPの分解物としてよく知られた物質でありながら，これまではポジティブな呈味成分としては捉えられてこなかった[7]。しかし，Hxが惹き起こすうま味やこくの増強メカニズムの一つには，Hx自体の弱い苦味が作用している可能性があげられる。これまでに，ホタテ貝やアボカドにおいて，それらの中に含まれる苦味成分は，苦味自体を増強させずにその食品の風味を向上させるという報告がされている[8, 9]。また，日本酒や豆腐においては，微量の苦味が重要とされ，佐藤ら[10]は苦味物質が微量であることでこくにつながるとの仮説を提案している。したがって，Hxの呈する苦味も，食肉成分の中で同様の現象を起こしている可能性が考えられる。また，もう一つのメカニズムとして，Hxが食肉成分や亜硝酸ナトリウムと反応して生じた生成物が風味を増強している可能性もあげられる。これについては代謝物を網羅的に評価することを課題と考え，LC-Orbitrap MSを用いたフードメタボロミクスを用いてHx添加ソーセージに特有の代謝物の特定を試みている。

風味の増強効果を示すHxの最低量はモデルソーセージ中に約1 μmol/gであり（**Fig. 1**），コントロールと比較して有意に塩漬フレーバー，うま味およびこくが増強するという結果が得られた（$p<0.05$）。松石ら[11]によると，豚胸最長筋を４℃で熟成したときのATPとその分解物の消長を調べたところ，熟成３日のHxは約1 μmol/g筋肉，10日で約2 μmol/g筋肉と報告されている。すなわち，一般的に市販に流通する豚肉中のHx濃度でも風味増強効果を有すると推察される。また，塩漬熟成に伴いIMPの分解が進んでHxが蓄積することは周知のことである。我々が2019年に調査研究を委託された国産食肉加工品国際競争力強化対策事業において，長期熟成された外国産の生ハム12品目を調査した結果，すべての試料においてIMPのほとんどが消失し，Hxとなって蓄積していた[12]。このように熟成が進んだ製品においては，Hxのもたらす風味増強効果が必須であると考える。ただし，一定以上の濃度に達すると苦味が感知されるため，適量があると推定される。Hxの適量を明らかにするためにも，今後Hxの風味増強メカニズムの解明を進展させていきたい。

4．要　約

塩漬とは，食肉製品の製造過程において，食肉を食塩や亜硝酸塩を含む塩漬剤を用いて漬け込む工程のことである。塩漬には製品の品質を左右する重要な効果があり，そのうちの一つに「塩漬フレーバー」と称される好ましい風味の付与がある。我々はこれまでに，塩漬フレーバーの発現メカニズムの解明に取り組んできた。そして，核酸関連物質の一つであるヒポキサンチン（Hx）が塩漬味の増強に関与することを突き止めた。本課題では，塩漬味のみならず塩漬フレーバー全体の増強メカニズムにおけるHxの作用機序を明らかにすることを目的として，味，香り，食感といった品質全体へのHxの関与について，官能評価を主な手法として調べた。評価をするにあたっては，食肉製品の中でも最も生産量の多いソーセージのモデル系を使用した。

試験の結果，Hxはモデルソーセージの塩漬特

© The Ito Foundation

有の香り，苦味，うま味およびこくの強さを増強し，一定の濃度まではその効果がHx濃度に依存することが明らかになった。また，Hxが4.9 μmol/g of sausage以上になると，添加効果は横ばい，または弱まる傾向となり，Hxには適量があることも示唆された。モデルソーセージへのHx添加効果をより客観的に示す目的で，食肉製品の主要なうま味成分であるMSGを添加したソーセージの風味と比較した。その結果，Hxがもたらすうま味の増強は，MSGがもたらす効果よりは緩やかではあるものの，MSG様の現象を惹き起こすことが確認された。さらに，塩漬特有の香りについては，MSGよりもHxを添加したほうが増強効果は大きく，Hxに特有の現象である可能性が示された。なお，ソーセージ中のHx含量が増えることにより他の成分や物性，色調等への影響も懸念されたが，Hxは各種成分および物性，色調には関与しないことも確認された。

謝　辞

試料の購入にご協力頂いた小川畜産食品（株）に深く感謝します。

文　献

1） Ichimura, S., *et al.*：*Animal Science Journal*, **88**, 379～385, 2017.
2） Waga, M., *et al.*：*Meat Science*, **129**, 135～139, 2017.
3） 北田善三ほか：日本食品工業学会誌，**30**, 151～154, 1983.
4） Konosu, S.：Food taste chemistry, ACS Symposium series, No.115, 185～203, American Chemical Society, Washington. DC, 1979.
5） 山口静子：日本農業化学会誌, 65(5), 903～906, 1991.
6） Nishimura, T., *et al.*：*Food Chemistry*, **192**, 724～728, 2016.
7） Tikk, M., *et al.*：*Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 7769～7777, 2006.
8） 道川恭子，鴻巣章二：日本食品科学工学会誌, 42(12), 982～988, 1995.
9） Andreas, D., *et al.*：*J. Agric. Food Chem.* 58(24), 12906～12915, 2010.
10） 佐藤信ほか：日本醸造協会誌，70(7), 509～512, 1975.
11） 松井昌典ほか：肉の機能と科学，p78-79, 2015.
12） 日本ハム・ソーセージ工業協同組合：JRA2019年度国産食肉加工品国際競争力強化対策事業，海外食肉加工品品質評価等事業報告書別冊.

© The Ito Foundation

コールドチェーンの転換に向けた食肉現場に導入可能なAI技術の開発
―ハイパースペクトロカメラを用いた肉質変化の経時的計測―

Measuring spectral changes in Japanese Black cattle beef during cold and frozen storage for the development of AI techniques

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 typically exported in vacuum-packed blocks. However, this method has disadvantages, such as low transportation efficiency and drip loss. To reduce food waste in meat production, improving the cold chain from production to consumption is necessary. In this study, to improve the productivity of Japanese Black cattle, rapid freezing storage of retail-cut beef was used to prevent the darkening of the meat color caused by skin pack packaging. The skin pack packaging showed less degradation of meat color during chilled storage periods. For the meat quality evaluation of cut Japanese Wagyu beef, a comprehensive analysis of nutrients by metabolomics and image analysis using a hyperspectral camera was combined. The image analysis provided a simpler way to obtain more data on nutrient analysis. Even with a few samples, the hyperspectral camera allowed easy multivariate analysis and machine learning-based discrimination of parts, meat quality, and deterioration by taking many plots on the meat surface. Based on these results, we propose introducing image analysis using a hyperspectral camera into a new cold chain for raw Japanese Wagyu beef using oxygen barrier films.

1．目　　的

食肉現場では近年，労働者不足が深刻化している。人手不足の背景には人口減少や労働時間の短縮など社会環境の変化，および日本国内の産業構造の変化がある。根本的な問題解消が困難な状況の中で，デジタルトランスフォーメーション（DX）を活用した製造工程の変革が急務である。一方，食肉処理施設が抱える課題に加え，食肉の流通では国内の食肉市場の縮小が懸念されている。また，我が国の畜産業の持続には，新たな海外市場の開拓が求められており，高品質な食肉の輸出に向けた生産・流通体制の強化が図られている。このような状況の中，我が国の牛肉輸出は2023年に過去最高金額570億円を記録し，さらなる輸出の拡大に期待が寄せられている。

黒毛和種牛肉の海外輸出は，透明な深絞り真空包装を施し，ブロック肉の状態で配送される。このブロック肉の配送は，輸送時の衝撃でブロック肉同士がぶつかることで，フィルムにピンホール

© The Ito Foundation

が生じやすい。また，ブロック肉での配送は，肉の形態が歪であるため，段ボール内での梱包の効率が悪く，輸送時の積載効率を下げるデメリットが指摘される。さらに，輸出金額の伸びが著しい東南アジア地域では，コールドチェーンが未整備の地域も多く，現地での食肉処理施設の整備は輸出コストの増加の一因となっている。

我々は，令和４年度伊藤記念財団の助成を受け，高性能な酸素バリアフィルムを用いたスキンパック包装による黒毛和種牛肉の鮮度保持期間の延長に取り組んだ。スキンパック包装による肉色，味覚，ドリップへの影響を検討した結果，スキンパック包装は食肉表面にフィルムが密着するため，従来の真空包装とは異なり，フィルムの隙間に残る酸素が少ないことが示された。令和４年度の取り組みでは，スキンパック包装はドリップを抑え，味と風味に遜色がないことが確認された。一方，スキンパック包装の課題として，真空包装による酸素の遮断によって生じる牛肉の変色（暗褐色化）が課題としてあげられた。牛肉は，他の畜種に比べて，筋組織中に色素タンパクであるミオグロビンが多く存在する[1)]。ミオグロビンは酸素分子と結合するヘム鉄の酸化還元状態によって色調が変化する。酸素の少ないスキンパック包装時の還元型ミオグロビンや長期保管時の酸化型ミオグロビンは，ともに暗褐色を示す（**Fig. 1**）。スキンパック包装による牛肉の変色は，消費者の視覚的な評価に大きく影響するため食肉現場で関心の高い課題である。

本研究では，このような背景を基に，酸素バリアフィルム包装した黒毛和種牛肉の肉色をハイパースペクトロカメラ（従来のカメラに対して，写真のピクセルごとのスペクトルデータも取得することが可能）で画像解析し，多変量解析および人工知能（AI）による機械学習を用いて牛肉の肉色・品質の劣化に関わるデータを提供することを目指した。

2．方　　法

2.1　スキンパック包装牛肉の調製

鮮度保持フィルム包装食肉は，と畜後６日の黒毛和種牛肉を使用し，厚さ５mmに冊切り後に，ムルチバック・ジャパン株式会社の単発機（T-200）で製造した。フィルム包装材は，住友ベークライト株式会社の酸素バリア性フィルム（製品名CEL-9830C）を使用した。

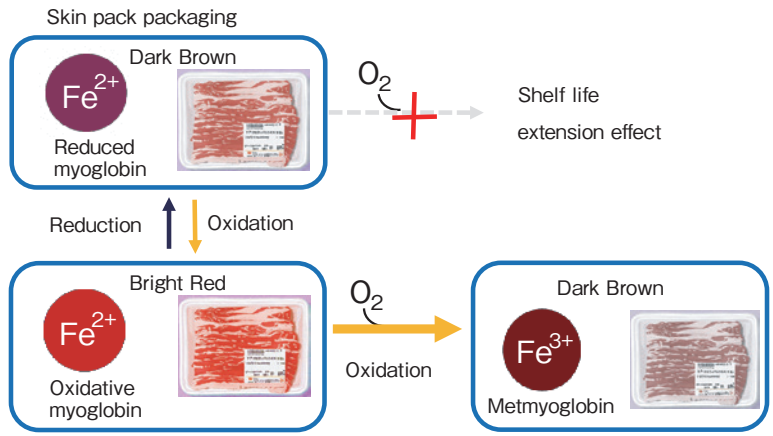


Fig. 1　Differences in meat color changes due to packaging methods of Japanese Black cattle beef

© The Ito Foundation

2.2　ハイパースペクトロカメラによる画像解析

鮮度保持フィルム包装食肉の肉色への影響を検討するため，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（470～900 nm）を画像撮影した。

2.3　肉質の評価

肉質評価は，食肉センターで枝肉の買付を行っている職人によって判断して頂いた。食味試験は，神戸大学農学研究科の畜産加工工場の官能評価室で，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)]。メタボロミクス解析は，牛肉の塊の内部よりサンプルを採取し，内部標準品（シナピン酸）を含むメタノール・水・クロロホルム溶媒で食品成分を抽出し，上清を濃縮乾固後，ガスクロマトグラフィー質量分析（島津製作所製；GCMS-QP2010Ultra）で行った。各栄養成分の濃度は，内部標準に対するピーク面積より検出成分の値を算出した。

2.4　AIによる機械学習

牛肉のカット表面をハイパースペクトロカメラで撮影し，得られたデータを，多変量解析，およびAIソフト（ソニー株式会社製；Prediction One）による機械学習を行い，肉質変化に関わる重要な可視光波長を解析した。

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

まず，我々は黒毛和種牛肉のスキンパック包装によるミオグロビンの還元反応を防ぐために，冊切りした牛肉をスキンパック包装し，急速凍結機で冷凍することにした。本研究では，台紙にはトレーパックを使用し，フィルムには酸素バリア性フィルムを組み合わせ，牛肉のミオグロビンの還元反応が進む前に急速凍結することで，牛肉の変色を抑えることに成功した（**Fig. 2**）。

我々が自作した黒毛和種牛肉のロースとモモ肉のスキンパック包装牛肉は，トレーパック包装，ガス置換包装に比べて，チルド保管では消費期限が10日ほど長かった。また，スキンパック包装した牛肉の肉色は，トレーパック包装およびガス置換包装と異なり，チルドの保存期間が長くなっていても肉色に大きな変化は見られなかった。ハイ

Fig. 2　Skin-packaged sample of retail-cut beef.
Japanese Wagyu beef is quick-frozen after skin-pack packaging to maintain its fresh red color even when oxygen barrier film is used.

© The Ito Foundation

パースペクトロカメラによる画像解析では，スキンパック包装した黒毛和種牛肉では，真空包装特有の740 nmと800 nmの二つのスペクトルのピークが観察された。この波形は，通常のトレーパック包装で見られる黒毛和種牛肉のスペクトルのピーク（620 nmと680 nm）とは異なっていた（**Fig. 3**）。

3.2　ハイパースペクトロカメラによる肉質劣化の測定

スキンパック包装した黒毛和種牛肉は，通常包装に比べて水分蒸発とドリップロスが少ないため，保水性が高く，チルド保存期間中の食味性の低下が少ない特徴が見られる。黒毛和種牛肉のロースとモモ肉を利用し，冷蔵保管による牛肉の肉色劣化の波長変化について，メタボロミクス解析およびハイパースペクトロカメラを用いて検討を行った。メタボロミクス解析では，ロースとモモ肉で栄養成分の違いが顕著に示された。例えば，ロースではクレアチニン，マンノース，グリセロール，フェニルアラニン，アラニン，グルタミン酸などが有意に多く検出された（$p<0.01$）。一方，モモ肉ではアラビノース５-リン酸，リブロース５-リン酸，アスパラギン酸などが有意に多く検出された（$p<0.01$）。

ハイパースペクトロカメラによる画像解析では，部位間の違いがスペクトラムでより明確に示された（**Fig. 4a**）。特に，黒毛和種牛肉のロースとモモ肉の違いでは，筋組織および筋内脂肪のスペクトラムの615 nm，715 nm，800 nmの比率で顕著な違いが認められた。部位間の違いとして，従来の栄養成分の違いだけでなく，肉色の違いからも容易に判別することが可能であることが示された。

次に，スキンパック包装した黒毛和種牛肉のモモ肉を40日間冷蔵保管し，肉質の劣化についてハイパースペクトロカメラで画像解析を行った。消費期限の切れた牛肉の暗色化は，筋組織および筋内脂肪の615 nm，715 nm，800 nmの吸光度の低下で示された（**Fig. 4b**）。

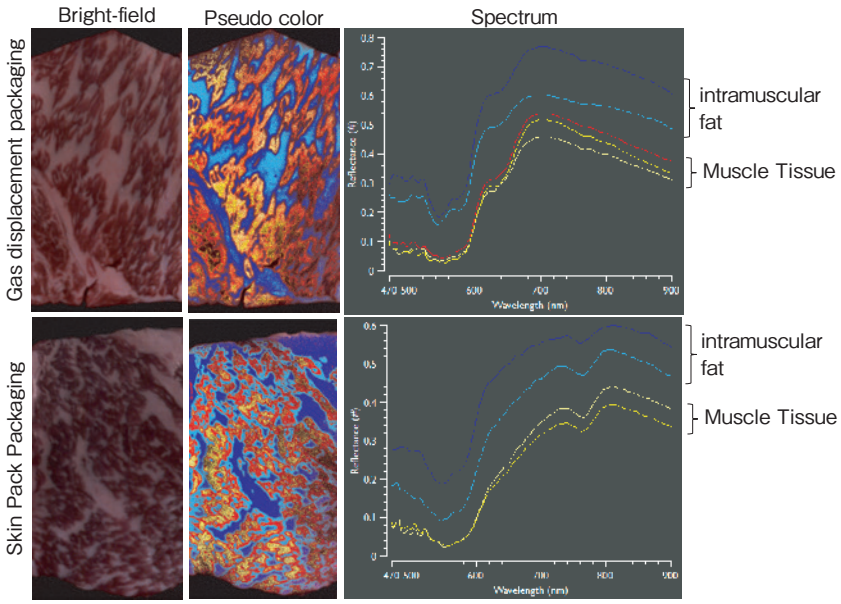


Fig. 3　Image Analysis of Japanese Black cattle beef using hyperspectro camera. Pseudocolors indicate location information on the beef surface for each spectral wavy line.

© The Ito Foundation

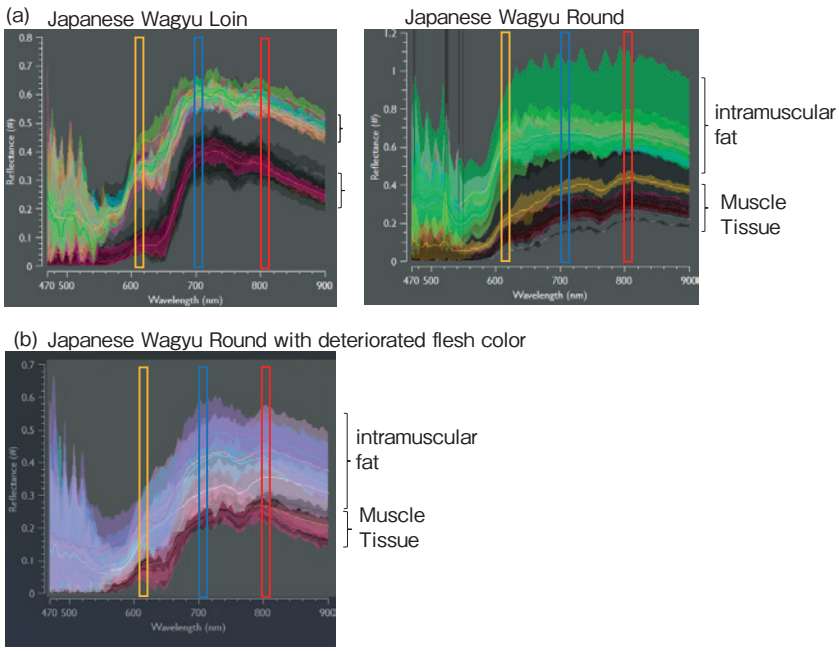


Fig. 4　Comparison between parts using hyperspectro camera.
(a) Hyperspectro-camera images of loin on the left and round meat on the right. (b) Hyperspectro-camera image of round meat stored in cold storage for 40 days. Characteristic spectra are indicated by color boxes.

3.3　AIによる牛肉の肉質の推定

黒毛和牛ロース肉のハイパースペクトロカメラの画像データを用いて，AIによる肉質の推定を試みた。ハイパースペクトロカメラは，一度の撮影でピクセルごとのスペクトルデータを大量に収集できるため，少ないサンプル数でも推定プログラムの作成が可能である。卸業者がロース芯を見て肉質を高評価または低評価と判断したロース10頭の筋組織と筋内脂肪のハイパースペクトロカメラ画像データを機械学習に用いたところ，二値分類（高評価vs低評価）の予測精度が94.03％，F値96.61％の精度で肉質の評価を推定するプログラムが構築できた。

これらの結果を基に，酸素バリアフィルム包装を用いた生鮮食肉のコールドチェーンのモデルとして，枝肉からブロック肉を切り分けた後にリテールカットし，画像解析と真空包装を組み合わせた新たな工程を提案する（**Fig. 5**）。この工程では，国内でリテールカットし品質評価を行ったうえで，国内外に輸送することを想定している。欧米では，生産工場の飛躍的な効率化を狙う「インダストリー5.0」が積極的に進められている[3)]。今後，さらにさまざまな生産工程のデータを集積することで，DX化が加速することが予想される。また，食肉の消費期限において，日本の取り組みが海外に比べて遅れていることが指摘されている[4)]。今後も管理規格のグローバル化が進むことが予測されており，本研究が食肉現場での品質管理に役立つことを願う。

4．要　　約

食肉は通常，真空パックされたブロック片で輸出される。しかし，この方法には輸送効率の低さやドリップロスなどの欠点があげられる。食肉生産における食品廃棄を減らすためには，生産から消費までのコールドチェーンを改善する必要があ

© The Ito Foundation

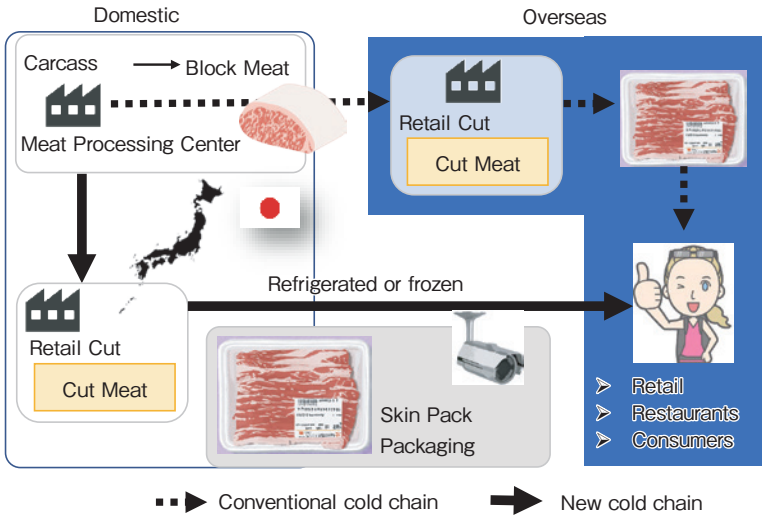


Fig. 5　Current status of Wagyu beef exports and proposed new cold chain. Skin pack packaging has the effect of extending the expiration date of beef. We have shown that skin pack packaging combined with quick freezing suppresses the deterioration of meat color caused by oxygen barrier film. In addition, image analysis using a hyperspectral-camera, combined with AI, enables rapid meat quality evaluation.

る。本研究では，黒毛和牛の生産性の向上を図るため，スキンパック包装による肉色の暗褐色化を防ぐ方法として，リテールカットした牛肉の急速凍結保存による肉色の改善を図った。その結果，スキンパック包装は，チルド保存期間による肉色の劣化が少なかった。黒毛和牛のカット牛肉の肉質評価について，メタボロミクス解析による栄養成分の包括的解析およびハイパースペクトロカメラによる画像解析を組み合わせた検討を行った。画像解析は，栄養成分の分析に比べて，より簡便に多くの機械学習に利用可能な数値データを入手することができた。また，ハイパースペクトロカメラは，少ないサンプル数でも，肉表面で多くのプロットを取ることで，機械学習による部位，肉質，劣化の判別解析が容易であることが確認された。この結果を基に，酸素バリアフィルムを用いた黒毛和牛生肉の新しいコールドチェーンにハイパースペクトロカメラによる画像解析を導入することを提案する。

文　献

1）　Gagaoua, M., Suman, S. P., Purslow, P. P., Lebret, B.：The color of fresh pork：Consumers expectations, underlying farm-to-fork factors, myoglobin chemistry and contribution of proteomics to decipher the biochemical mechanisms, *Meat Science*, 206, 109340, 2023.

2）　Japan Livestock Breeding Center, Sensory Evaluation Guideline for Mest, pp.1-77.

3）　Guruswamy, S., Pojić, M., Subramanian, J., Mastilović, J., Sarang, S., Subbanagounder, A., Stojanović, G., Jeoti, V.：Toward Better Food Security Using Concepts from Industry 5.0, In：*Sensors*, vol. 22；2022.

4）　Yu, H. H., Kim, Y. J., Park, Y. J., Shin, D. M., Choi, Y. S., Lee, N. K., Paik, H. D.：Application of mixed natural preservatives to improve the quality of vacuum skin packaged beef during refrigerated storage, *Meat Sci*, 169, 108219, 2020.

© The Ito Foundation

黒毛和種牛肉の筋線維型構成と味との関連

Correlation between skeletal muscle fiber type and taste of Japanese Black cattles

柴田　愛梨・水野谷　航*・山根　瑞穂・日高　健雅
（広島県立総合技術研究所畜産技術センター，*麻布大学獣医学部）

Eri Shibata, Wataru Mizunoya*, Mizuho Yamane and Takemasa Hidaka
(Hiroshima Prefectural Technology Research Institute, *School of Veterinary Medicine, Azabu University)

The objectives of this study were to develop a procedure for separating myosin heavy chain (MyHC) isoforms (I, IIa, and IIx) of Japanese Black cattle using sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and to investigate the relationship between MyHC isoforms and beef taste.

In this study, the glycerol concentration of the separation gel was adjusted from 35 to 38% to enable separation of MyHC (I, IIa, and IIx). The glycerol concentration of 36%, at which the MyHC could be stably separated, was selected, and the analytical precision was confirmed by multiple immunofluorescence staining. As a result, the quantitative performance of I was not high, but for IIa and IIx, the high and low percentages could be determined by SDS-PAGE.

Next, taste sensor analysis was conducted to investigate the relationship between muscle fiber type and taste. The results showed that the increase in I and IIx weakened bitterness and miscellaneous tastes, while umami taste became stronger. On the other hand, the opposite was observed for IIa. These results suggest that IIa and IIx, which have been analyzed collectively, may exhibit different taste characteristics.

Although the quantitative performance of the SDS-PAGE method established in this study needs to be improved, it is expected that this method will contribute to the characterization of eating quality and beef components by muscle fiber type in the future.

1．目　　的

哺乳動物の骨格筋を構成する筋線維は，ミオシン重鎖（Myosin heavy chain；MyHC）のアイソフォームにより，遅筋型（MyHCⅠ；Ⅰ）と速筋型（MyHCⅡａ；Ⅱａ，MyHCⅡｘ；Ⅱｘ，MyHCⅡｂ；Ⅱｂ）に分類される。また，筋線維は色調のちがいにより赤色筋線維と白色筋線維に分類され，前者はⅠとⅡａ，後者はⅡｘとⅡｂを指す。ブタの骨格筋において，赤色筋線維を多く持つ筋肉ほど食味嗜好性が高いことが報告されている[1)]。ウシの骨格筋は，特殊な筋肉を除き，Ⅱｂ以外のⅠ，Ⅱａ，Ⅱｘの３種類で構成されている。黒毛和種において，SDSポリアクリルアミド

© The Ito Foundation

ゲル電気泳動法（SDS-PAGE）による分析では，ⅠとⅡ（ⅡａとⅡｘの合計）の２種類の分類による報告[2,3]のみで，ⅡａとⅡｘを分類した報告は見当たらない。その理由としてⅡａとⅡｘの分子量がいずれも約200kDaであり，安定的な分類が難しいことがあげられる。一方，組織切片の免疫染色による分類手法があるが，筋肉全体の解析ができないことや，一度に分析できる検体数が少ないことから，多検体の分析には適さない。

そこで本研究では，SDS-PAGEにより３種類の筋線維型を安定的に分類できる手法を確立するとともに，黒毛和種牛肉の筋線維型が食味に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

２．方　法

2.1　実験材料

2023年３月から９月の間に出荷された広島県産黒毛和種雌肥育牛６頭の第７～８肋骨間部位の胸最長筋をサンプルとして用いた。サンプルは，と畜後14日間４℃で保存した後に採取し，味覚センサ分析および多重免疫蛍光染色に用いるサンプルは－30℃で，SDS-PAGEに用いるサンプルは－80℃で冷凍保存した。

2.2　SDS-PAGEによるMyHCアイソフォームの測定

本実験では，SDS-PAGEによるMyHC分離能に及ぼす分離ゲルのグリセロール（Gly）濃度の影響について検討した。

MyHCの解析には，和田ら[4]の方法を一部改訂して用いた。供試牛肉はミルサーでミンチにし，20～30㎎を40倍の抽出液中でホモジナイザーを用いて均質化した。次に，抽出液をサンプルバッファーで20～30㎎/μｌに希釈して解析に用いた。

分離ゲルの組成は，７％アクリルアミド，200mMトリス（pH8.6），100mMグリシン，0.1％SDS，0.1％TEMED，0.05％APSとし，Gly濃度は，30，33，35，36，38および40％の６区分を設けた。TEMEDとAPS以外を混合した分離ゲルの溶液およびゲル作製器（138㎜×130㎜×0.75㎜，ATTO）を４℃で30分間冷却した後に，TEMEDとAPSを加えて混合した溶液をガラスプレートに注入し，一晩静置した。濃縮ゲルの組成は，3.3％アクリルアミド，0.1％SDS，0.12％TEMED，0.12％APS，125mMトリス（pH6.8）とした。アクリルアミドとビスアクリルアミドの比は分離ゲル，濃縮ゲルともに100：３であった。サンプルバッファーで希釈した抽出液10μｌを注入し，４℃の条件下において140Ｖの定電圧で41時間泳動した。その後，銀染色（Silver Stain KANTOⅢ，関東化学株式会社）を行った。Scheffler ら[5]により決定されたMyHCの移動パターンに基づき，移動度の大きい順にMyHCⅠ，Ⅱａ，Ⅱｘに分類し，画像解析ソフト（ImageJ）を使って，その割合を算出した。

2.3　多重免疫蛍光染色（Multiple immunofluorescence；MIF）によるMyHCアイソフォームの測定

Sawano ら[6]の方法に従って以下のように行った。１cm厚にスライスした牛肉胸最長筋検体の一部を直径1.2cmの円柱状にくり抜いた後，OCTコンパウンドで包埋し，液体窒素で冷却したイソペンタンで急速凍結した。その後，クリオスタットで厚さ10μｍの凍結横断切片を作製した。Sawano ら[6]が開発した抗Ⅰ，Ⅱａ，Ⅱｘ抗体にそれぞれCF647，CF350，CF488蛍光色素を直接標識し，混合した抗MyHC抗体溶液を免疫染色に供した。切片は抗体反応前にPBSに浸漬した状態で沸騰湯浴により５分間前処理を行った。前処理を行った切片に対し抗体溶液を４℃で一晩反応させた後，TBSTで洗浄し，封入剤で封入後，蛍光顕微鏡で観察した。無作為に選んだ視野のⅠ，Ⅱａ，Ⅱｘ陽性線維数をカウントし，その比率を

© The Ito Foundation

算出した。各検体につき，少なくとも合計で1000本以上の筋線維をカウントした。

2.4　味覚センサ分析

５㎜角にカットした牛肉検体40ｇを240mlのイオン交換水とともに真空パックに封入し，オートクレーブ（LSX-300，（株）トミー精工）の溶解モードで100℃，１時間加熱後，室温で１時間放冷した。次に，サンプルをホモジナイザーで均質化した後，４℃，3000rpmで15分間遠心分離し，得られた上清をろ過したものを測定用サンプルとした。なお，うま味（先味）測定については，測定用サンプルをイオン交換水でさらに４倍に希釈して測定に用いた。

測定には味覚センサ（味認識装置TS-5000Z，（株）インテリジェントセンサーテクノロジー）を用い，塩味（CT０），酸味（CA０），うま味（AAE），苦味（C00），渋味（AE１）の５種類のセンサ電極で，先味と後味を含む８つの味を測定した。各センサの電位データについて，装置付属のソフトウェアを用いて各味の推定値に変換した。

2.5　統計処理

統計解析にはＲソフトウェア（ver．4.2.0）を使用して，Pearsonの積率相関係数を算出した。

3．結果と考察

3.1　SDS-PAGEにおける分離ゲル組成の検討

MyHCを３種類に分離するために，分離ゲルのGly濃度について検討した結果を**Fig. 1** に示した。すべてのGly濃度において，MyHCのバンドは200kD付近で確認された。Gly濃度30％および33％の分離ゲルでは，２本のバンド（Ⅰ，Ⅱ（ａ＋ｘ））しか確認できず，ⅡａとⅡｘを分離できなかった。35～40％の分離ゲルでは，ⅡａとⅡｘの分離が可能となった。また，Gly濃度が高くなるにつれて，ⅡａとⅡｘの分離能が改善した。一方で，Ⅰについては，Gly濃度30～36％のバンドに対し，38％ではやや不明瞭なバンドになり，

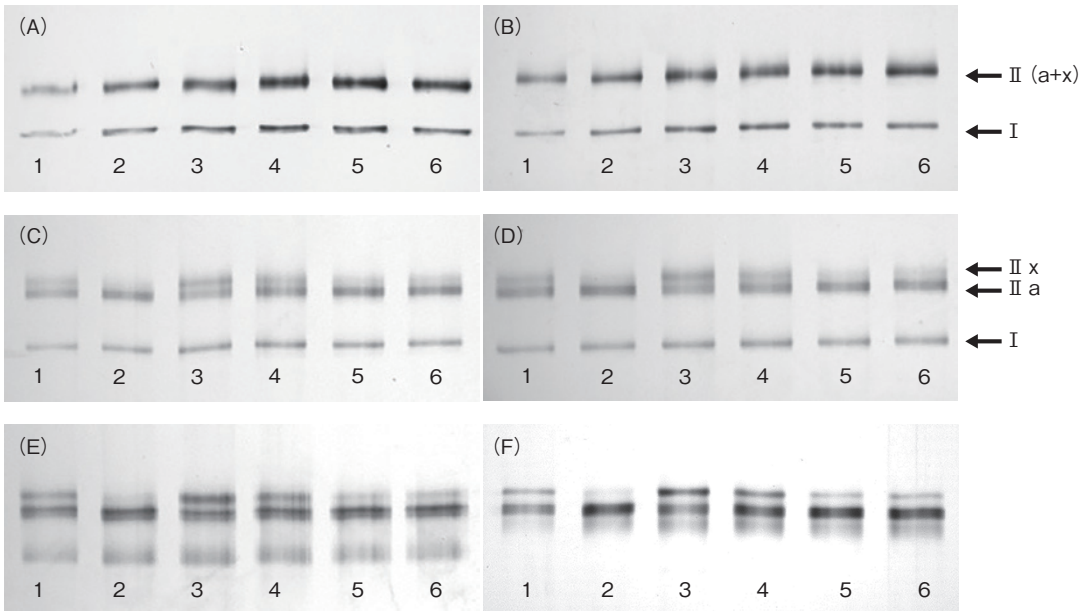


Fig. 1　Influence of glycerol concentration on sodium dodecylsulphate poluacrylamid gel electrophoresis （SDS-PAGE） of myosin heavy chain isoforms. The Separation gel was made with glycerol concentrations of 30% (A), 33% (B), 35% (C), 36% (D), 38% (E) or 40% (F).

© The Ito Foundation

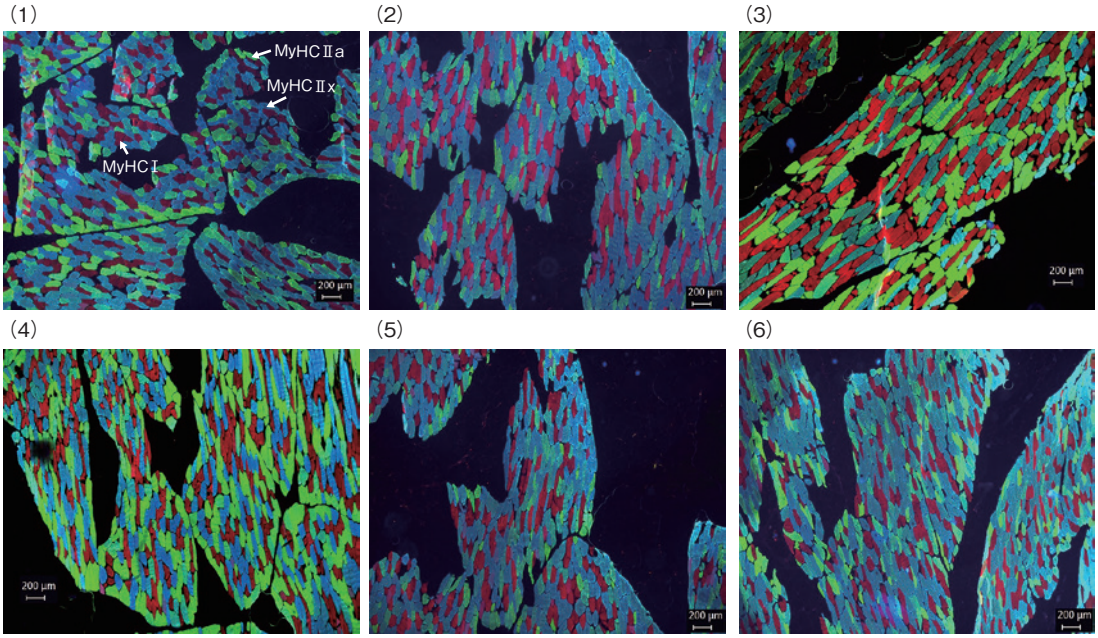


Fig. 2　Multiple immunofluorescence of myosin heavy chain（MyHC）isoforms.
Immunopositive MyHC isoforms were visually classified as MyHC Ⅰ（red）,MyHC Ⅱa（blue）, MyHC Ⅱx（green）.

40％では明確なバンドがなくなった。MyHCの組成比は，画像解析により算出するため，可能な限り各バンドの間隔が広く，より明瞭な泳動像を得ることが重要である。今回の検討ではGly濃度36％の分離ゲルにおいて，Ⅰのバンドが明瞭であり，ⅡaとⅡxを分離できたため，筋線維型割合の分析が可能であると考えられた。Scheffler ら[5]は，Gly濃度37％の分離ゲルを用いて，MyHCを３種類に分離したと報告しており，今回は既報と類似した結果となった。

次に，SDS-PAGEによる各MyHCの解析精度を確認するために，同じサンプルを用いてMIFにより分析した（**Fig. 2**）。本実験で用いた抗体はマウスとラットでは特異的な反応が確認されている[6]。また，ヒトではⅡaとⅡxの区別はできないことが報告されている[7]。ウシで本抗体を用いた染色は初めてであったが，３種類（Ⅰ，Ⅱa，Ⅱx）の特異的な反応が区別でき，ウシのMyHCアイソフォームに対してタイプを識別できることが示唆された。なお，速筋アイソフォームのⅡbの抗体も試したが，陽性線維は見られず，この結果は先行研究[8]と一致していた。

SDS-PAGE（分離ゲルのGly濃度36％）とMIFによる各サンプルのMyHC割合を**Table 1** に示した。なお，サンプルNo. ５において，ⅠとⅡaのハイブリッド線維が1.2％確認されたが，これについては各MyHCの組成に半分ずつ振り分けた。MIFと比べて，SDS-PAGEでは，Ⅰ割合が３～15ポイント低く，定量性は高くなかった。次に，SDS-PAGEとMIFの分析手法間の各MyHC割合の相関関係を**Fig. 3** に示した。まず，Ⅰについては，解析手法間で関連性が認められなかった。この理由として，今回のサンプルでは，Ⅰ割合が約10ポイント範囲内におさまり，ばらつきが小さかったことがあげられる。今後，ばらつきの大きいサンプルを用いて，再度検証する必要がある。次に，ⅡaとⅡxについては，分析手法間で強い正の相関が得られた。このことから，SDS-

© The Ito Foundation

Table.1 Myosin heavy chain (MyHC) isoform composition determined using multiple immunofluorescence (MIF) and sodium dodecylsulphate poluacrylamid gel electrophoresis (SDS-PAGE).

Sample No.	MyHC Ⅰ (%)		MyHC Ⅱa (%)		MyHC Ⅱx (%)	
	MIF	SDS-PAGE	MIF	SDS-PAGE	MIF	SDS-PAGE
1	36.1	22.0	48.3	49.8	15.7	28.2
2	35.9	24.3	50.0	64.4	14.0	11.2
3	40.5	23.9	31.3	34.8	28.3	41.3
4	38.8	30.2	39.0	48.4	22.7	21.5
5	32.9	29.4	58.5	61.0	8.7	9.6
6	33.4	29.2	44.3	58.1	22.3	12.7

SDS-PAGE：Glycerol concentration of separation gel was 36%

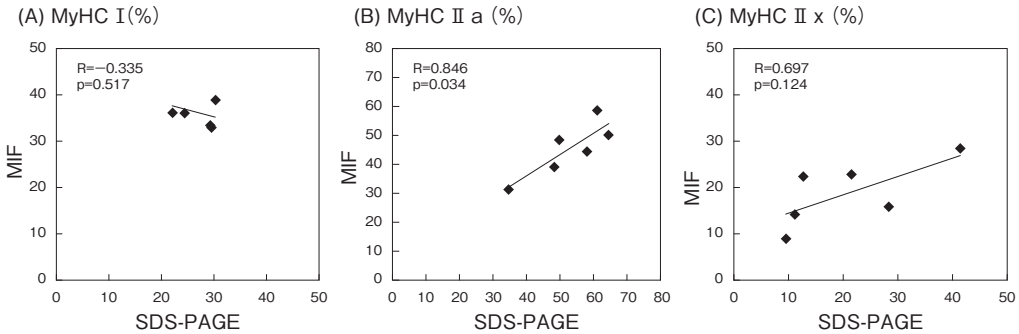


Fig. 3 Correlation between multiple immunofluorescence (MIF) and sodium dodecylsulphate poluacrylamid gel electrophoresis (SDS-PAGE) for determination of myosin heavy chain (MyHC) isoform.

PAGEにより，ⅡaおよびⅡx割合の高低を把握できることが確認された。黒毛和種胸最長筋の筋線維型を調べた過去の研究[9]によるとTypeⅠ線維（MyHCⅠに相当）は約30%，TypeⅡA線維（MyHCⅡaに相当）は約20%，TypeⅡB線維（MyHCⅡxに相当）は約50%であり，Ⅱa割合が一番多かった我々の結果と異なるものであった。この結果の不一致の理由については今後検証する必要がある。

今回確立した手法については，定量性の課題が残されているが，黒毛和種においてSDS-PAGEによる3種類のMyHCの分類を実現できた。

3.2　筋線維型組成と味との関係性調査

味覚センサの測定値が，味の有無を判定する基準値以上の値を示したのは先味の苦味雑味，うま味，後味の苦味，うま味コクであった。また，先味の苦味雑味と後味の苦味，先味のうま味と後味のうま味コクとの間で強い正の相関が認められた。（苦味雑味vs苦味：$R = 0.988$，$p < 0.01$うま味vsうま味コク：$R = 0.879$，$p < 0.05$）

味覚センサによる各味の推定値と，MIFにより解析した各MyHC割合の関連性について先味のみを抜粋して**Fig. 4**に示した。Ⅰ割合が増えると，苦味雑味が弱くなり，うま味が強くなる傾向があった。Chikuniら[10]は，遅筋型の筋肉が速筋型の筋肉より，苦味（C00）センサの応答値が高くなることを報告しており，今回の結果と異なっていた。Chikuniら[10]は，と畜後3時間でサンプルを冷凍しているのに対し，本研究ではサンプルを14日間熟成したことにより，牛肉中成分が変化

© The Ito Foundation

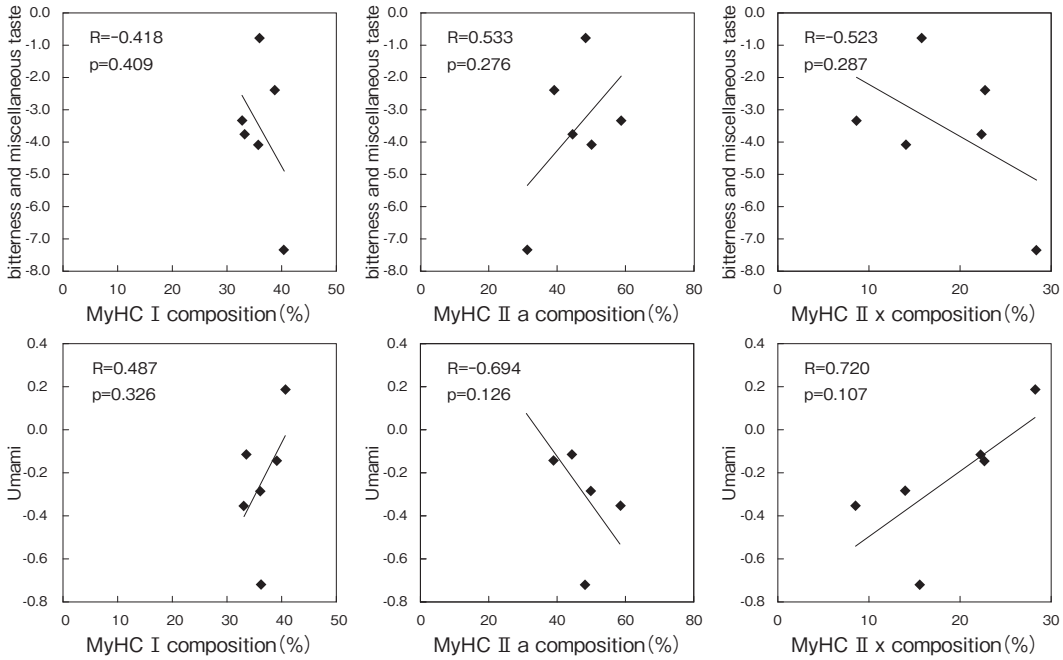


Fig. 4　Correlation between the composition of myosin heavy chain（MyHC）and the taste sensor outputs in beef samples.

し，異なる結果となった可能性がある。一方，Komiyaら[2]は，Ⅰ割合とうま味およびうま味コクとの間に有意な正の相関があることを報告しており，我々の結果と一致していた。

今回，MyHCⅡをⅡaとⅡxに分類できたことから，黒毛和種において初めてⅡaとⅡxを個別に味との関連性を調査できた。Ⅱa割合は，苦味雑味と正の相関，うま味と負の相関となった。Ⅱaのアイソフォームを持つ筋線維は収縮速度から速筋型に分類されるが，赤色を呈し好気代謝をすることから，特性がⅠに類似している。しかし，今回の分析においてⅠとⅡaは異なる結果となった。それに対し，速筋型で白色を呈すⅡxについては，Ⅰと同様に苦味雑味と負の相関，うま味と正の相関となった。Listratら[11]は，ウシやヒツジの肉において，解糖系の筋線維割合が高いとカルパイン/カルパスタチン比も高くなり，熟成が促進される可能性があるとしている。今回のサンプルは，熟成を行ったことから，Ⅱx割合の多い個体のほうがタンパク質の分解が進み，遊離アミノ酸が増加した可能性がある。今後，各MyHC割合と熟成により変化する遊離アミノ酸などの牛肉中成分との関連性を調査する必要がある。

今回の研究により，黒毛和種において速筋型の筋線維であるⅡaとⅡxは異なる食味特性を持つ可能性が示唆された。このことから，今後は筋線維を３種類に分類してそれぞれの特徴を調査する必要があると考えられた。

４．要　　約

本研究では，筋線維型のマーカーであるミオシン重鎖（MyHC）をⅠ，ⅡaおよびⅡxの３種類に分類するSDS-PAGE法を確立することと，これら３種類の筋線維型と牛肉の味との関係を調査することを目的とした。

今回，分離ゲルのグリセロール濃度を35～38％

© The Ito Foundation

に調整することで，３種類のMyHCの分類を可能とした。特に安定的に分類できたグリセロール濃度36％を選択し，多重免疫蛍光染色により分析精度を確認したところ，Ⅰの定量性は高くなかったが，ⅡａとⅡｘについてはSDS-PAGE法により割合の高低を把握することができた。

次に，味覚センサ分析により筋線維型と味との関係を調査した。その結果，Ⅰ割合とⅡｘ割合が増えると苦味雑味が弱くなる一方で，うま味が強くなる傾向があった。それに対し，Ⅱａは逆の結果となった。これらのことから，これまでひとまとめで分析されてきたⅡａとⅡｘは異なる食味特性を示す可能性が示唆された。

今回，確立したSDS-PAGE法について定量性の課題が残されたが，今後この手法を用いることで，筋線維型ごとの食味や牛肉中成分の特徴解明に寄与できると考えられた。

文　献

1） 渡邊康一：東北畜産学会報，66(1)，1～6，2016.
2） Komiya, Y., Mizunoya, W., Kajiwara, K., Yokoyama, I., Ogasawara, H., Arihara, K.：*Anim. Sci. J.*, 91, e13425, 2020.
3） Mashima, D., Oka, Y., Gotoh, T., Tomonaga, S., Sawano, S., Nakamura, M., Tatsumi, R., Mizunoya, W.：*Anim. Sci. J.*, **90**, 604～609, 2019.
4） 和田正信，土路恭子，新畑茂充，菊池邦雄：広島大学総合科学部紀要Ⅳ，第19巻別冊，1993.
5） Scheffler, T. L., Leitner, M. B., Wright, S. A.：*J. Anim. Sci.*, **96**, 4306～4312, 2018.
6） Sawano, S., Komiya, Y., Ichitsubo, R., Ohkawa, Y., Nakamura, M., Tatsumi, R., Ikeuchi, Y., Mizunoya, W.：*PLoS ONE*, 11, e0166080, 2016.
7） Nakashima, A., Yamada, T., Sugiyama, G., Mizunoya, W., Nakano, H., Yasuda, K., Takahashi, I., Mori, Y.：*Journal of Hard Tissue Biology*, **29**, 25～30, 2020.
8） Picard, B., Gagaoua, M.,：*J. Agric. Food Chem.*, **68**, 6021～6039, 2020.
9） Gotoh, T.：*Anim. Sci. J.*, **74**, 339～354, 2003.
10） Chikuni, K., Oe, M., Sasaki, K., Shibata, M., Nakajima, I., Ojima, K., Muroya, S.：*Anim. Sci. J.*, **81**, 600～605, 2010.
11） Listrat, A., Lebret, B., Louveau, I., Astruc, T., Bonnet, M., Lefaucheur, L., Picard, B., Bugeon, J.：*The Scientific World Journal*, 1～14, 2016.

© The Ito Foundation

Check-All-That-Apply法を応用した獣肉の風味特性の可視化に関する研究

Visualization of various animal meat taste traits by Check-All-That-Apply method

水野谷　航・竹　田　志　郎
（麻布大学獣医学部）

Wataru Mizunoya and Shiro Takeda
(School of Veterinary Medicine, Azabu University)

Agricultural damage caused by wild raccoons has become more noticeable in Japan. However, raccoons have rarely been utilized as meat for now. Because people tend to be wary of inexperienced foods, alleviation of such wariness is expected to promote the utilization of inexperienced foods. In this study, we applied the Check-All-That-Apply (CATA) method of sensory evaluation using various meat to establish a flavor/taste evaluation technique that enables us to analog the flavor of raccoon meat, which many people have no experience with. Beef, pork, chicken, lamb, tuna, frog, raccoon, and deer meat were minced in a food processor and then cooked in a steamer for 15 minutes. Sensory evaluation was carried out using the CATA method, which selects the applicable term from several flavor evaluation terms by 17 panelists. The results of the CATA method were subjected to correspondence analysis, which showed that raccoon meat was located near the terms 'habitual,' 'blood taste,' 'lingering aftertaste,', and 'thick,' which visually indicated that the meat was similar to lamb. Thus, the CATA method could depict the flavor/taste of uncommon raccoon meat as a flavor similar to that of lamb.

1．目　　的

アライグマ *Procyon lotor*は，食肉目アライグマ科に属する北米原産の中型哺乳類で，日本では1960年代から野生化が始まっていると言われている（安藤・梶浦，1985）。農林水産省の調査によると，日本では2000年度のアライグマによる農作物被害額は3,600万円だったが，2023年度では４億円を超えるほどに被害額が増加している[1)]。アライグマによる被害を受けた農作物は主に野菜と果樹であるが，雑食性のアライグマが国内の絶滅危惧種やそれに準ずる水生の両生・は虫類を捕食している可能性も指摘されている[2, 3)]。現在のところ，被害額が大きく捕獲数も多いイノシシやシカと比較すると，このアライグマを食肉として活用するという施策は行政からも出されていない。しかし，アライグマ肉自体は野生鳥獣肉を扱う販売業者から入手が可能であり，野生鳥獣肉を扱う飲食店でアライグマ肉を使った料理を食すことができる。また，北米ではアライグマ肉を使ったレシピも古くから存在する[4)]ため，食肉への利用が不可能という動物ではない。

© The Ito Foundation

多くの人にとって食経験がほとんどないアライグマ肉であるが，どのような風味を有しているかを示す信頼できる客観的な情報はほとんどない。人は未知の食材を基本的には忌避をする。食品としての安全性とともに，どのような風味を有するかの情報を提示できれば，未知の食材であるアライグマ肉への警戒をやわらげ，結果として食肉利用を促進できる可能性がある。

本研究では，アライグマを含めた獣肉の官能評価を主な研究手法とする。官能評価は訓練を受けたパネルによる分析型官能評価と受けていないパネルによる嗜好型官能評価が使い分けられる[5)]。分析型パネルは，被験者の選抜や訓練において多大な労力を必要とする。この問題を解消するために開発された手法がCheck-All-That-Apply（CATA）法である。CATA法はマーケティング調査などで用いられる評価手法で，パネリストに複数の評価用語の中から，試料の特徴を表すと思う用語をチェックしてもらい，チェック数の多変量解析から試料の特徴を明らかにしようとするものである。本実験では，食経験があると考えられる獣肉（牛肉，豚肉，鶏肉，羊肉）と水産物（マグロ，カエル）と野生鳥獣肉（鹿肉とアライグマ肉）をブラインドで被験者に食してもらい，CATA法からアライグマ肉がどのような評価用語が選ばれるのか，近い獣肉は何かを明らかにすることを目的とした。

2．方　法

2.1　実験材料

実験に使用したアライグマ肉は食品用として販売されている衛生的に問題のない品質の物を(株)糸島ジビエ研究所から購入した。アライグマは福岡県田川郡添田町で2023年５～６月に小型箱罠により捕獲された個体であった。アライグマは冷凍の枝肉で納品し，実験室で解体後，特定の部位に限らず採取できるだけの肉を取り，再度冷凍保存した。牛肉（ニュージーランド産牛サーロイン），豚肉（国産豚ロース），羊肉（ニュージーランド産ラムショートロイン），鶏肉（国産若鶏むね正肉），鹿肉（国産エゾシカロース），カエル（中国産ウシガエル脚肉）は川島食品株式会社からチルドあるいは冷凍品を購入した。マグロの赤身は，近隣のスーパーマーケットで購入した。これらの肉は－20℃の冷凍庫で冷凍保存を行い，挽き肉処理前に４℃の冷蔵庫で解凍を行った。すべての試料で冷凍と解凍の回数は同じとなるように処理をした。

2.2　パネル選抜

被験者として20代から40代の麻布大学獣医学部動物応用科学科に通う学生とその教員，事務員の男女17名が参加した。すべての被験者に対し試験の内容と意義を説明し，同意書を提出した者だけが試験に参加した。

2.3　官能評価用試料

解凍した肉塊からスジを取り除き，一口サイズに切りフードプロセッサーに30秒間かけて挽き肉にした。すべての獣肉を一斉に処理することは難しかったため，挽き肉をあらためて少量ずつ真空包装し，冷凍保存した。官能検査実施日の前日に，官能検査に使用する分の８種類の獣肉の挽き肉を４℃の冷蔵庫で解凍した。解凍したミンチ肉を30ｇ測り，ミンチ肉重量に対し0.7％の食塩を混ぜた。90 mlコップで型を取った挽き肉を形が崩れないようにラップで包み，フードスチーマーに入れ15分間スチームした。スチームが終わったらラップを外し，ナイフで８分割した。官能検査開始まで調理済み肉片は，乾燥しないように蓋をしたプラスチックカップに肉片１個ずつ個別にカップに入れ60℃に設定した恒温器で提供直前まで保温した。

© The Ito Foundation

Table 1　Terms used in Check-All-That-Apply method to evaluate sensory properties

種別	用語
風味	「牛肉らしい」「豚肉らしい」「鶏肉らしい」「魚肉らしい」「羊肉らしい」「甘味のある」「苦味のある」「塩味のある」「酸味のある」「旨味のある」「淡白」「血の味」「濃厚」「癖のある」「コクのある」「あっさりしている」「後味が残る」「獣臭い」「レバーらしい」
食感	「噛み応えがある」「ジューシー」「やわらかい」「パサパサ」「舌触りが良い」「舌触りが悪い」「まとまりのない」「飲み込みにくい」

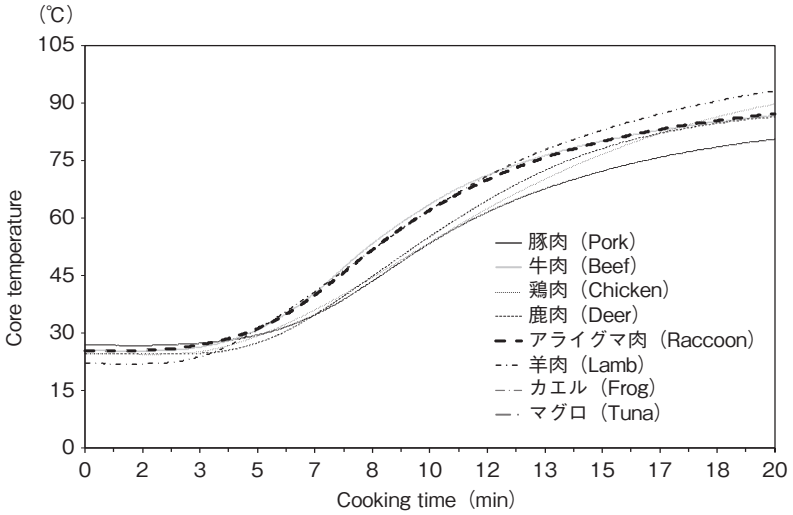


Fig. 1　Time-course change of temperature during steam cooking of eight different meat.

2.4　CATA法による官能評価試験

CATA法の評価用語の作成にあたり，事前に豚肉，牛肉，鶏肉の試料を作成し，複数名で，評価用語を選んだ。本試験では風味と食感に関する計27個の評価用語を使用した（**Table 1**）。被験者への肉試料の提供順序は無作為とした。試料は色調がまったく異なっていたことから視覚的に試料を判別できることが懸念された。そこで，視覚情報を遮断するため被験者はアイマスクをした状態で試料の肉を口に含み，その後アイマスクを外して評価表に回答した。この手順を８種類のすべての試料が終わるまで繰り返した。被験者は試料が変わるたびに水を一口以上必ず飲むようにした。評価はオンラインフォームを用いて，電子端末から回答した。

2.5　統計処理

CATA法の評価用語の選択数に試料間の度数の差があるかはコクランのQ検定を用いて検定した。統計フリーソフトRおよびRの解析パッケージの一つであるSensoMineRを用いてコレスポンデンス分析を行った。

3．結果と考察

官能試験の試料が十分に加熱されているか確認するためにスチーム調理した試料の内部温度を測定した（**Fig. 1**）。予備実験では，挽き肉以外の形態では同一加熱条件において，異なる動物種の肉の中心温度を一定に制御することは困難であった。そこでさまざまな調理法を検討した結果，重量を揃えた挽き肉のスチーム加熱は動物種による加熱の差異が生まれず，温度管理に優れた調理方

© The Ito Foundation

法であることが分かった。スチーム開始15分後に中心温度75℃５秒間以上の加熱（63℃30分間と同等の条件）となっていたため，本実験では試料のスチーム加熱時間を15分と設定した。

各用語の選択された数を試料ごとに集計してコクランのQ検定で統計処理した結果を**Table 2**に示した。有意差があった評価用語は27個の用語のうち17個であった。興味深いのは「牛肉らしい」「豚肉らしい」といった用語が豚肉，牛肉で必ずしも当てはまらない点である。事前に試料を被験者に提示し，動物種と対応を取るトレーニングはしておらず，この評価はあくまで被験者が試験実施時に有していた獣肉のイメージとの対応と言える。カエルはよく鶏肉と似ているとも評価されるが，本試験の結果からは「魚肉らしい」の評価が圧倒的に多かったため，本試験で用いた中国産カエル脚肉は魚肉の風味を強く有していたことが推測された。アライグマ肉は「獣臭い」，「癖のある」，「噛み応えがある」でチェックされることが多かった。

各用語の選択された数を試料ごとに集計してコレスポンデンス分析することにより，**Fig. 2**のような試料と用語のプロットが得られた。試料のプロットの中で特性が似ていると感じられた試料同

Table 2 Number of evaluation terms checked in the sensory evaluation（17 panelists）

用語	サンプル								
	アライグマ肉	鹿肉	牛肉	豚肉	鶏肉	羊肉	カエル	マグロ	統計的有意性
牛肉らしい	2	1	4	2	4	3	0	0	NS
豚肉らしい	0	1	4	5	6	1	0	1	**
鶏肉らしい	1	1	1	7	3	2	1	3	*
魚肉らしい	1	2	1	0	2	1	16	8	***
羊肉らしい	7	3	8	0	0	8	0	1	***
甘味のある	0	1	2	0	1	1	1	3	NS
苦味のある	0	3	1	0	0	3	0	3	NS
塩味のある	4	1	2	6	5	1	6	6	*
酸味のある	0	0	3	0	0	1	0	0	*
旨味のある	1	3	7	6	12	4	7	10	NS
淡白	2	1	2	9	5	1	10	4	***
血の味	2	4	1	1	0	2	0	0	NS
濃厚	3	5	2	2	1	6	0	3	NS
癖のある	12	14	4	4	0	12	2	1	***
あっさりしている	2	2	2	10	10	1	15	10	***
後味が残る	8	10	8	4	0	14	3	4	***
獣臭い	12	11	4	1	0	13	2	0	***
レバーらしい	3	6	0	5	1	3	0	0	**
コクのある	2	1	4	1	3	3	1	1	NS
噛み応えがある	13	0	13	2	2	5	5	5	***
ジューシー	4	5	3	2	6	4	5	11	*
やわらかい	2	15	3	13	12	8	8	11	***
パサパサ	5	8	11	12	4	7	8	2	**
舌触りが良い	4	4	3	1	6	3	6	6	NS
舌触りが悪い	2	5	2	7	1	4	2	1	NS
まとまりのない	1	7	1	7	3	3	8	1	**
飲み込みにくい	5	1	2	4	1	4	1	0	NS

*** $p<0.001$

** $p<0.01$

* $p<0.05$

NS：Not Significant

© The Ito Foundation

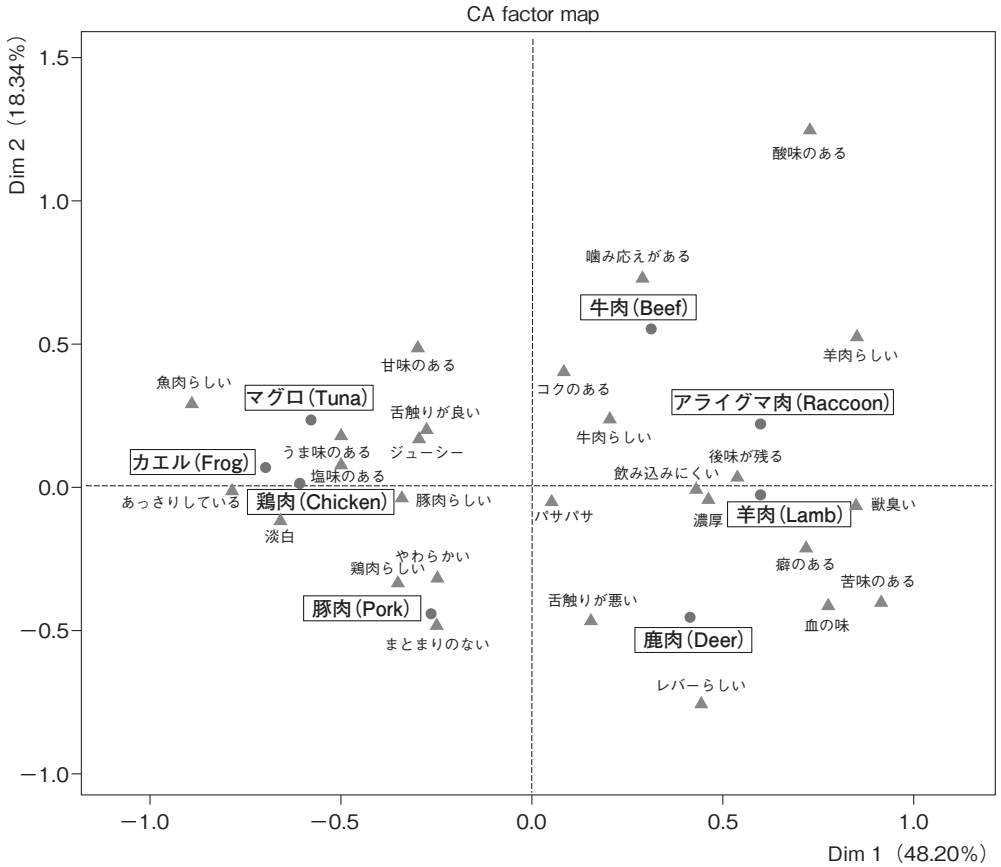


Fig. 2　Correspondence analysis（CA）factor map of the sensory terms on the check-all-that-apply（CATA）questionnaire for the eight different meat samples（beef, pork, chicken, lamb, raccoon meat, deer meat, frog legs, and tuna）.

士が近い位置にプロットされる。同様に，用語のプロットの中で試料の評価に選択された用語同士が近い位置に配置される。さらに試料のプロットと同じ方向に位置する用語が，そのサンプルの特徴を示す用語と見ることができる。**Fig. 2** に示すように，第１成分の寄与率が48.2%，第２成分の寄与率が18.34%であった。第１成分が主に赤身主体の肉とそれ以外，第２成分で嗜好に関わる用語の影響が大きいように見られた。アライグマ肉は「後味が残る」,「濃厚」,「飲み込みにくい」,「羊肉らしい」,「獣臭い」,「癖のある」の用語の近くに位置しており，家畜肉では羊肉に近い評価をされたことが視覚的に示された。CATA法は食品の特性を区別するのに有用な官能評価法であることが推測される。CATA法は新しい手法であるが，畜産学の分野ではボロニアソーセージの特性[6]，地鶏らしさを特徴付ける評価用語[7]，豚肉の商品ごとの特性の違いを見出すのに用いられた報告[8]がある。今後，さらに多くの活用が期待される手法と思われる。

4．要　　約

近年，日本では野生のアライグマによる農業被害が目立っている。しかし，アライグマは食肉としての活用があまりされていない。アライグマの食肉利用を促進するために，多くの者にとって未

© The Ito Foundation

経験であるアライグマ肉がどのような風味を呈するか，経験がなくとも類推できるような風味評価を目指した。我々は本研究で，食経験があると考えられる獣肉（牛肉，豚肉，鶏肉，羊肉，魚肉等）とアライグマ肉を用いたCheck-All-That-Apply（CATA）法による官能評価を実施した。CATA法のコレスポンデンス分析からアライグマ肉は，羊肉に近いことが視覚的に示された。以上より，アライグマ肉の食経験がない消費者に対し，アライグマ肉は羊肉の風味に似ているとCATA法の結果から示すことができた。

文　献

1） 農林水産省：野生鳥獣による農作物被害状況（令和４年度），2023.
2） 金田正人，加藤卓也：爬虫両棲類学会報／日本爬虫両棲類学会編，**2011**(**2**), 148～154, 2011.
3） 高槻成紀，久保薗昌彦，南正人：保全生態学研究，**19**(**1**), 87～93, 2014.
4） Klussmann, W., Ramsey, C., Reasonover, F.：*Bulletin/Texas Agricultural Extension Service*：*no. 987*., 1975.
5）々木啓介，本山三知代，渡邊源哉，中島郁世：日本畜産学会報，**89**(**4**), 471～488, 2018.
6） da Conceição Jorge, É., Mendes, A. C. G., Auriema, B. E., Cazedey, H. P., Fontes, P. R., Ramos, A. d. L. S., Ramos, E. M.：*Meat science*, **100**, 124～133, 2015.
7） 安部亜津子，森愛華，桑原賢治，渡邊源哉，佐々木啓介：日本畜産学会報，**94**(**2**), 199～207, 2023.
8） 笹木俊，劔持麻衣，野澤久夫：日本養豚学会誌，**57**(**3**), 116～125, 2020.

© The Ito Foundation

食肉の脂身の美味しさを生み出す呈味性化合物に関する研究

Study on taste compounds that contribute to palatability of fat in meat

澤 野 祥 子
（麻布大学生命・環境科学部食品生命科学科）

Shoko Sawano
（Department of Food and Life Science, School of Life and Environmental Science, Azabu University）

Fat has been associated with mainly texture, flavour release and thermal properties in foods. Although the sense of fat taste has been recently recognized as the sixth taste sense, animal fat such as lard and beef tallow are sometimes evaluated as 'having strong umami' or 'sweet taste'. Thus, we hypothesized that animal fat (adipose tissue) could contain enough to stimulate taste by water-soluble components such as amino acids, glutathione and so on. We evaluated glutathione in fat, and the results showed that the amount of glutathione including Japanese pork fat was higher than that of American pork fat. In addition, we morphologically observed pork fat blocks by HE staining and Oil Red O staining, and found that there were many cytoplasmic portions. Therefore, it is possible that these non-lipid components contribute to the "sweet" and "tasty" taste stimuli. In order to clarify whether pork fat actually exhibits taste, water soluble extracts from Japanese pork fat, American pork fat, French pork fat, Japanese Kurobuta pork fat, and Japanese pastured pork fat were analyzed using a taste sensor. Taste sensor analysis showed that the backfat of black pigs had a noticeably sweet taste. In addition, French and Kurobuta pork backfat were found to have higher bitterness and miscellaneous tastes than other backfat. Also, HPLC analysis clarified that water soluble components from American pork backfat had more amino acids compared to the others. These studies revealed that taste compounds and taste stimuli derived from water-soluble components other than fat are also related to the factors that cause pork fat to be rated as "umami" or "sweet".

1．目　　的

脂肪は香気成分やコクの増加から食品の嗜好性の向上に寄与する一方，脂肪自体には特定の味刺激はないとされてきた。しかし，これまでの研究により，脂肪酸についても味蕾に脂肪酸トランスポーターが発現していること[1)]，独立して脂肪酸の味を伝える神経が存在すること[2)]が明らかになっていることから，五基本味に加えて脂肪の味が独自に存在することが示唆されている。味覚としての脂肪の存在が明らかになってきているが，飲食業界では豚肉の脂身などを食した際には「うま味がある」「甘い」という別の味覚に関する表現が用いられることが多い。特に鹿児島県で多く

© The Ito Foundation

生産される黒豚では，脂の甘みが黒豚の味の特徴とみなされることが多い。豚の背脂は90％以上が脂質で構成されているが，タンパク質も３％ほど含まれているなど脂質以外の成分もわずかに存在することから[3]，脂身部分に含まれるアミノ酸や核酸などの呈味化合物が脂身のうま味や甘味を生み出している可能性が考えられ，この脂身の味質の違いは食肉全体の善し悪しを左右すると筆者は推測している。そこで本研究では，豚肉の脂身には，どの程度呈味性化合物（候補として甘味，うま味，コク味を誘発させる成分等）が含まれているのか，また，脂身にそのような呈味性化合物が存在するならば，豚の品種等によって差異が認められるか否か，すなわち脂身の質が豚肉の風味に影響を及ぼすのかどうかを明らかにすることを目的として検討を行った。

２．方　　法

2.1　実験サンプル

広く流通している三元交雑種の国産豚を基準として用いた。外国産豚としてアメリカ産豚，フランス産豚，イベリコ豚を用いた。品種・飼育環境の違いを考慮し，国産黒豚および国産北海道産放牧豚の背脂を実験に供した。豚肉・背脂以外の脂肪食品として精製牛脂を使用した。

2.2　背脂加熱試験

精製牛脂および国産豚脂を１cm角のサイコロ状にカットし，ホットプレート（200℃）で同時に熱した。０，２，５，８分の油脂の融解度を画像で記録した。

2.3　細胞学的解析

精製牛脂および国産豚脂を１cm角にカットし，OCTコンパウンドで包埋した。クリオスタットを用いて10 μm厚の薄切横断切片を作製し，各切片のHE染色およびOil Red O染色を行った。

2.4　グルタチオン定量解析

脂身および赤身部位から等量試料を量り５％スルホサリチル酸を加えてそれぞれホモジナイズ・遠心（8,000× g，10分）し，10倍希釈したものを total glutathione quantification kit（Dojindo）を用いて定量した。標準試薬の検量線から測定試料中のグルタチオン濃度を求めた。

2.5　味覚センサー解析

国産豚，アメリカ産豚，フランス産豚，国産黒豚，国産放牧豚の背脂各50 g に40℃の純水200 ml を加え，フードプロセッサーで１分間攪拌後，４℃，10分間遠心した。上清を回収し残渣を除いた試料溶液を味覚センサー（TS-5000Z）に供した。

2.6　HPLC分析

上述の試料溶液各１mlに0.1M HClを９mlずつ加え，InertSep C18でコンディショニング後，NBD-Fで誘導体化反応をさせた。反応停止後，InertSustainSwift C18カラム，紫外吸光度検出器によりHPLC測定を行った。

2.7　官能評価

五味識別テストに合格した19-22歳の男女24人を対象とした。国産豚，黒豚，アメリカ産豚，フランス産豚由来の背脂１cmブロックをフライパンで加熱（200℃，1-1.5 min.）し，甘味，うま味，コクの強さ，後味の良さ，脂っこさ，総合的な美味しさの各項目を７段階で評価した。

３．結果と考察

3.1　背脂の脂肪分および非脂肪分の分布

精製牛脂および国産豚脂の１cm角ブロックをホットプレートで同時に加熱したところ，精製牛脂が２分で融解しはじめ８分加熱後にはすべて液状化したのに対し，国産豚脂ブロックでは５分経過前後に脂が融解し，８分加熱してもすべて融解することなく塊が残った（**Fig. 1**）。これらの非

© The Ito Foundation

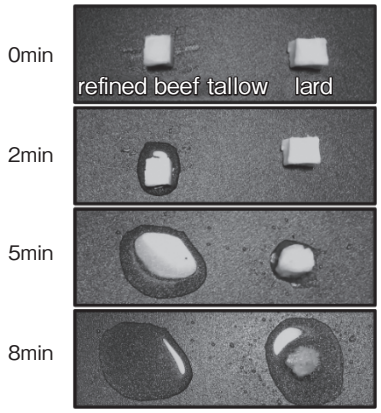


Fig. 1　Melting of purified beef tallow and domestic pork fat during hot plate heating.

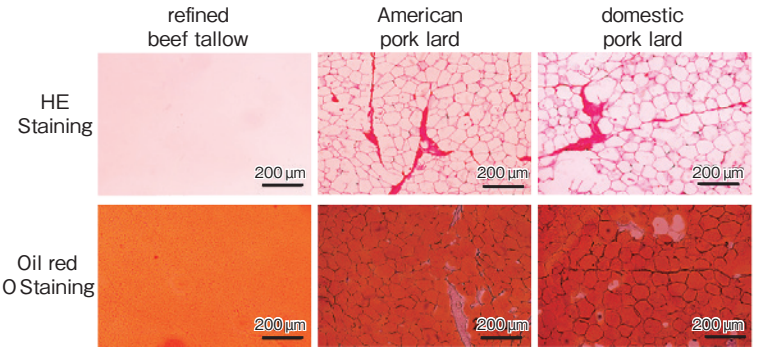


Fig. 2　Histochemically stained purified beef tallow, American prok lard and domestic prok lard. The top panels show H&E staining and the bottom panels Oil Red O staining. Cellular components are clearly present in the lard samples.

脂肪分がどのように分布しているのか検討するため，背脂薄切切片を作製しHE染色（細胞質・核）とOil red O染色（脂肪滴）を行った。その結果，**Fig. 2**（左）のように精製牛脂には細胞膜等の構成要素が見られなかったが，国産・アメリカ産豚背脂ではいずれも石畳状の構造を示していた（**Fig. 2**（中央および右））。この形状は豚骨格筋（豚赤身）の構造と類似しており[4]，背脂部分については脂肪を取り囲むように分布するこれらの構造が呈味性の要因となっている可能性が考えられた。

3.2　各種脂身および赤身に含まれるグルタチオン濃度比較

国産豚，アメリカ産豚，イベリコ豚のいずれの脂身において，コク味の指標となるグルタチオンの存在が認められ（data not shown），さらに，豚品種の違いにより脂身・赤身の両方において含有グルタチオン濃度に明確な差異が確認された。脂身・赤身とも，国産三元豚に含まれるグルタチオン濃度が最も高く，アメリカ産豚由来のグルタチオン濃度が最も低かった。

3.3　味覚センサー・HPLC・官能評価による各種背脂の呈味性評価

それぞれの背脂から脂溶性成分を取り除き味覚センサー解析に供した。国産豚背脂の応答値を基準としたところ，黒豚背脂において顕著に甘味が強いことが確認された（**Fig. 3a**）。一方で，アメリカ産豚由来の背脂は甘味が弱いことが明らかと

© The Ito Foundation

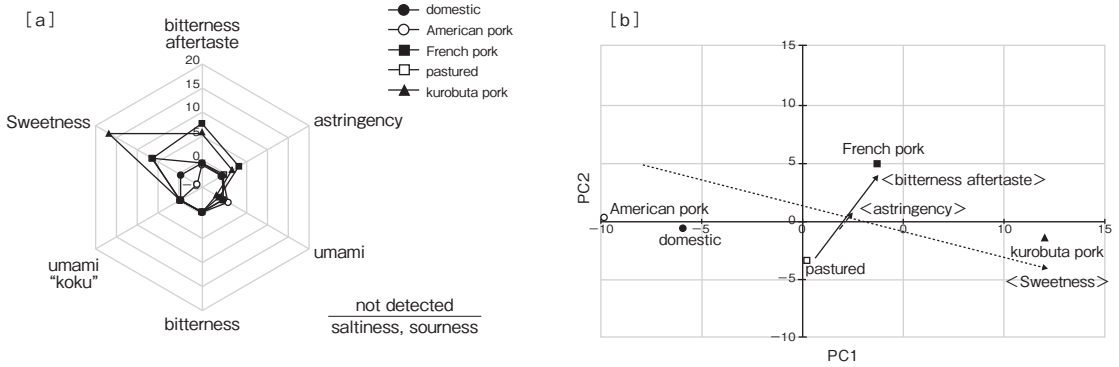


Fig. 3　Analysis of taste stimulus intensity by taste sensor (a) Taste stimulus intensity in various fat samples (b) Principal component analysis

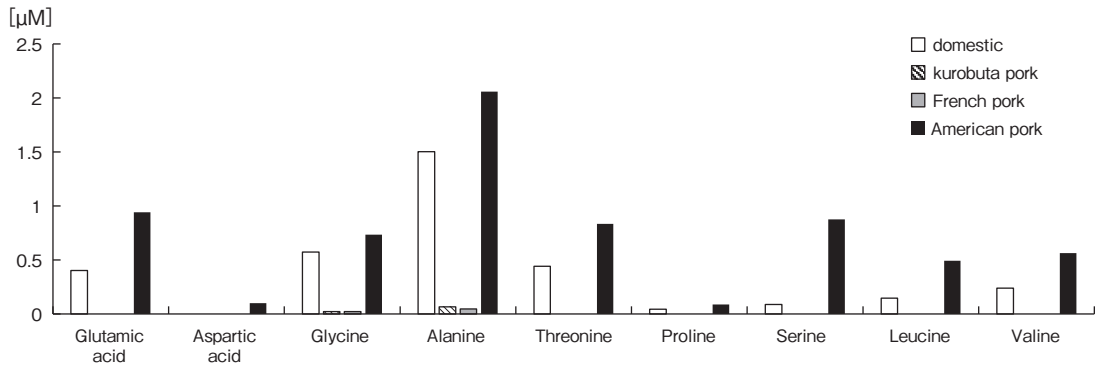


Fig. 4　Amino acid analysis of backfat-derived samples by HPLC

なった。さらに，フランス産および黒豚の背脂は他の背脂に比べて苦味雑味が高いことが分かった。黒豚の脂身は「甘く」「濃厚な味わい」と評されることが多いが，味覚センサーにおいては，そのような評価を裏付ける結果となった。これらの結果を主成分分析したものが**Fig. 3b**である。フランス産背脂は国産（北海道）放牧豚に比べて苦味雑味が顕著に強いこと，黒豚の甘味が顕著に強いことがこの分布からも確認された。

顕著な甘味の強さを示した黒豚背脂，逆に甘味が弱かったアメリカ産背脂，苦味雑味の強いフランス産背脂，そして味覚センサーにおいて基準となっていた国産豚背脂由来の試料を用いHPLCによるアミノ酸分析を行った。味覚センサーの結果から顕著な甘味を示した黒豚背脂，苦味雑味の強いフランス産背脂は，これらの味を呈する遊離アミノ酸が多く含まれると予想していたが，黒豚背脂・フランス産背脂由来の試料からはほとんどアミノ酸が検出されなかった。一方で，国産・アメリカ産背脂由来の試料からはうま味成分であるグルタミン酸，甘味成分であるグリシン・アラニン・スレオニン，苦味成分であるロイシン・バリンが検出され，いずれもアメリカ産が最も高い値を示した（**Fig. 4**）。このように味覚センサーとアミノ酸解析との結果に相関性が見られなかったことから，黒豚背脂由来の甘味はアミノ酸によるものではないことが示唆された。

最後に，国産豚，アメリカ産豚，フランス産豚，国産黒豚由来の背脂塊ブロックを200℃，約１分間加熱し，ヒトによる官能評価を行った。「後味」

© The Ito Foundation

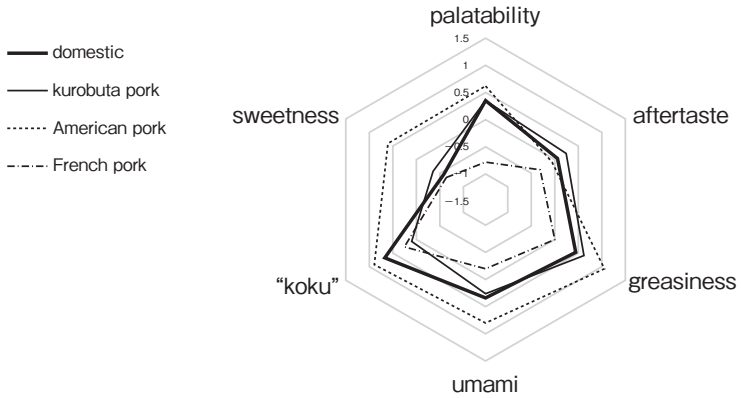


Fig. 5　Sensory evaluation of backfat samples by human

以外の全項目，すなわち「美味しさ」,「甘味」,「コク」,「うま味」,「脂っこさ」でアメリカ産豚背脂の評価が最も高かった（**Fig. 5**）。また，「コク」以外の全項目でフランス産豚背脂の評価が最も低かった。これらの結果から，脂肪の質が動物ごとに異なり，おいしさの評価に影響を与えることが確認できた。しかし，官能評価の結果は味覚センサーあるいはHPLC解析とは異なるものであった。水溶性成分のみを抽出した味覚センサーおよびHPLC解析と異なり，官能評価は脂肪も含めた総合的な評価になるため，このような差異が生じたという可能性も考えられる。また，脂の味の評価は典型的な食品の官能評価ではほとんど行われないため，被験者の訓練の不十分さも否めなかった。今後，官能評価についてはさらなる検証が求められる。

4．要　約

豚肉の脂身は消費者に「うま味がある」,「甘い」と評価されることが多い。本研究から，豚肉の脂身には水溶性成分の遊離アミノ酸やグルタチオン，呈味性化合物が存在し，味覚センサー解析においても甘味や苦味雑味の明確な応答が示された。したがって，脂身においても，水溶性呈味物質の味刺激が「うま味」や「甘味」の要因となっていると考えられる。今後，産地・種による味の違いの分類や，官能評価との整合性をさらに検証するなど継続した検討が必要である。

文　献

1）　Fukuwatari, T., Kawada, T., Tsuruta, M., Hiraoka, T., Iwanaga, T., Sugimoto, E., Fushiki, T.：Expression of the putative membrane fatty acid transporter（FAT）in taste buds of the circumvallate papillae in rats, *FEBS Lett.*, 414, 2, 461～464, Sep. 1997. doi: 10.1016/S0014-5793(97)01055-7.

2）　Yasumatsu, K., Iwata, S., Inoue, M., Ninomiya, Y.：Fatty acid taste quality information via GPR120 in the anterior tongue of mice, *Acta Physiol.*, 226, 1, e13215, May 2019. doi: 10.1111/apha.13215.

3）　文部科学省：日本食品標準成分表2020年版（八訂）https://www.mext.go.jp/a_menu/syokuhinseibun/index.htm（2021年７月）

4）　Lefaucheur, L.：A second look into fibre typing – Relation to meat quality, *Meat Science*, 84, 2, 2010. doi: 10.1016/j.meatsci. 2009.05.004.

© 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（Ⅱ）

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

岡　村　大　治
（近畿大学農学部生物機能科学科）

Daiji Okamura
(Department of Advanced Bioscience, Faculty 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. However, 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. As cells in an undifferentiated state, like myoblasts, mouse embryonic stem cells (mESCs) have been cultured in a medium supplemented with fetal bovine serum (FBS). However, serum with its inconsistent chemical composition has been problematic for reproducibility and for studying the role of specific components. While some serum-free media have been reported, these media contain commercial additives whose detailed components have not been disclosed. Recently, we developed a serum-free medium, DA-X medium, which can maintain a wide variety of adherent cancer lines. In this study, we modified the DA-X medium and established a novel serum-free condition for both naïve mESCs in which all components are chemically defined and disclosed (DA-X-modified medium for robust growth of pluripotent stem cells:DARP medium). The DARP medium fully supports the normal transcriptome and differentiation potential in teratoma and the establishment of mESCs from blastocysts that retain the developmental potential in all three germ layers, including germ cells in chimeric embryos. Thus, this study provides reliable and reproducible culture methods to investigate the role of specific components regulating self-renewal and pluripotency in a wide range of pluripotent states. Furthermore, this study provides significant insights into ensuring the proliferative capacity of myoblasts in a future serum-free condition based on DA-X medium for cultured meat production.

1．目　　的

本研究は持続可能な「培養肉」実現に向け，高価で倫理的な課題を抱えるウシ血清の添加に依存せず，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。

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

© The Ito Foundation

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，その栄養や成長因子の供給源として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，きわめて高コストであり，ウシ胎児血清を使うことは倫理的課題にも直面する。また，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にあるが，その生産にウシ胎児血清を使用することは矛盾したロジックでもある。そこで持続可能な培養肉の生産システムの構築には，ウシ胎児血清に依存しない無血清培養技術が必要である。

令和４年度の伊藤記念財団からの研究助成金を活用し，我々は「培養肉生産の無血清培養化」を目標とし，それを実現する培地添加物の探索に取り組んだ。その結果，デンプン由来の候補物質の同定に成功し，その研究成果は国際科学誌「*Frontiers in Cell and Developmental Biology*」に掲載された[1)]。令和５年度，我々は「培養肉生産の無血清培養化」の目的をさらに一歩前進させるべく，ユニバーサルな無血清培地の開発を目指した。マウス筋芽細胞株C2C12細胞と同様に，古くよりウシ胎児血清含有培地で未分化性を維持するマウス多能性幹細胞Embryonic Stem Cells（ES細胞）を材料にして，良好な分化抑制と増殖促進を実現する無血清培地の開発を行った。また以下の研究内容は，国際科学誌「*Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*」に掲載受理されたものである[2)]。

2．方　法

2.1　マウスES細胞株E14tg2aの培養

世界中で広く研究に用いられているマウス多能性幹細胞ES細胞株E14tg2aを，10％ウシ胎児血清およびDMEM培地からなる培地で増殖培養をした。今回新規に開発したDARP培地とそのベースになったDA-Xの詳細な組成は以下のとおり。DA-X培地は，1x ITS-X（Insulin-Transferrin-Selenium-Ethanolamine, Gibco, 51500056），5 mg/ml BSA （Bovine Serum Al-bumin, Sigma, A3059），1x L-グルタミン，および1 x ペニシリン-ストレプトマイシン混合溶液を添加したDMEM培地からなる。DARP（DA-X medium-based for Robust proliferation of Pluripotent stem cell）培地は，DA-X培地に100 μMのβ-Mercaptoethanol）と10 μMの水溶性コレステロール溶液を添加したものである。またES細胞の未分化性を維持するために，２iLIFを添加した。

2.2　DARP-ES細胞の胚盤胞からの樹立

雌のB6D2F1マウスにCARD HyperOvaを100 μl注射後，48時間でhCGを300 μl注射し，恒常的にGFP遺伝子を発現するR26GRR雄マウスと交尾させた。膣栓の確認を受精後0.5日目と定義し，受精3.5日目に胚を収集し，DARP培地で培養した（GFP陽性DARP-ES細胞）。樹立したDARP-ES細胞をフィーダーフリー条件に適応させるため，ラミニンコートディッシュ上で播種した。

2.3　キメラ胚の作成

雌のB6D2F1マウスにCARD HyperOvaを注射し，48時間後にhCGを注射してB6D2F1雄マウス

© The Ito Foundation

と交尾させた。受精2.5日目に胚を収集し，KSOMが入った各集合穴に置き，３細胞のGFP陽性DARP-ES細胞を入れ，共培養した。4.5日目の凝集胚は，仮妊娠したICRマウスの子宮に移植した。本実験は，近畿大学の動物実験倫理委員会の承認を受けて実施したものである。

３．結果と考察

近年我々は，ダルベッコ改良イーグル培地（DMEM）を基本培地とし，アルブミン（BSA）およびインスリン-トランスフェリン-セレニウム-エタノールアミン（ITS-X）を添加した定義された無血清培地（以下「DA-X培地」と呼ぶ）を開発した[3]。DA-X培地は，HeLa，MCF-7，A549などのさまざまな種類の接着性がん細胞株を，従来のウシ胎児血清含有培地と同等の生存率と増殖率で維持することに成功した。本研究では，DA-X培地を利用して多能性幹細胞の良好な増殖のためのDA-X改良培地（DARP培地）を開発し[2]，そのES細胞の増殖性は既存の無血清培地であるKSR培地と同等のレベルであった（**Fig. 1** 左）。また，DARP培地を利用して胚盤胞からES細胞株を樹立可能であること，およびそれらがキメラ胚における生殖細胞を含む多分化ポテンシャルを示すことも実証した（**Fig. 1** 右）。以下，具体的な実験結果を示す。

ES細胞の未分化性維持因子「２iLIF」を補充したDARP培地と，一般的なES細胞用の無血清培地（KSRおよびN2B27）とその増殖性を比較した解析では，30日間にわたる連続継代が行われた。その結果，DARP培地における増殖能力はKSRと同等であり，ラミニン被覆プレート上でもN2B27培地よりも明らかに優れていることが示された。DARP培地で維持されたES細胞の特徴と

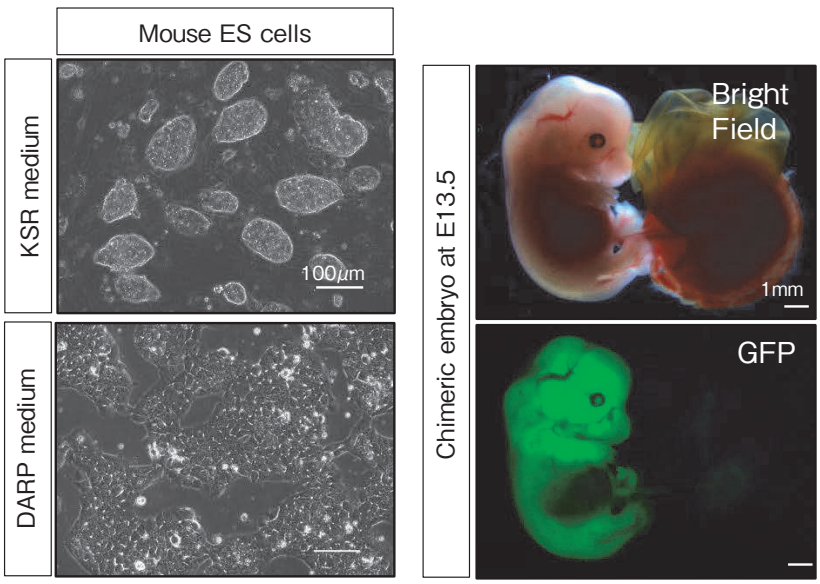


Fig. 1　Effects of the novel serum-free medium “DARP medium” on mouse ES cells：
When mouse ES cells were cultured in the novel serum-free medium “DARP medium” as a basic medium, they showed comparable or higher proliferation than serum-free medium with conventional expensive serum replacement (KSR, Thermo Fisher) or supplements (N2B27, Thermo Fisher) (left images).
In experiments for chimera formation, the high contribution rate of GFP-positive ES cells which were established and maintained in DARP was demonstrated, proving that undifferentiated or multipotent ES cells can also be maintained in DARP medium (right images).

© The Ito Foundation

して，ES細胞のコロニー形態がユニークであり，従来のドーム状の形態ではなく，単層のアメーバ様形状を呈していることが観察された（**Fig. 1** 左）。総じて，DARP培地は，従来の無血清条件と同等またはそれ以上に，ES細胞の良好な増殖性を実現した。

DARP培地を使用してES細胞株を樹立する可能性を評価するため，GFP遺伝子を恒常的に発現するマウスの遺伝子組み換え胚盤胞をDARP培地でラミニン被覆プレート上で培養した。DARP培地を使用して胚盤胞からES細胞を確立する初期段階ではマウス胚性線維芽細胞（MEFs）フィーダー層が必要だったが，MEFフィーダー細胞上で確立されたES細胞は，継代を通じてフィーダーフリーのラミニン被覆条件に適応できた。ES細胞の分化ポテンシャルを検証する最も信頼性の高いアプローチは，胚盤胞注射または胚の集合によるキメラマウス形成による解析である。今回は８細胞胚との集合によるキメラ形成アッセイでGFP陽性のDARP-ES細胞を使用した結果，DARP-ES細胞は13.5日の胚全体および新生仔に成功して寄与した（**Fig. 1** 右）。13.5日のキメラ胚の生殖腺隆起での免疫蛍光分析により，DARP-ES細胞の生殖系列への寄与も確認された。これらの結果は，DARP-ES細胞が生殖系列キメラ形成に寄与可能なナイーブな多能性状態を持っていることを示す。

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。今回我々が開発したDA-X培地を改変することにより未分化なマウスES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，同じ未分化性をもつ筋芽細胞を無血清条件下で大規模に増殖させるという，培養肉生産に向けた基盤技術開発において重要な洞察を与えるものであり，今回の知見を受け，今後は筋芽細胞の無血清培養に向けて取り組んでいく。

４．要　約

培養肉のための筋繊維を大規模に生産するには，コスト，倫理および持続可能性の問題を避けるために，ウシ血清を含まない培地での筋芽細胞の増殖が重要である。しかし，マウスC2C12細胞に代表される筋芽細胞は，高血清培地で未分化状態を維持しながら活発に増殖するが，低血清培地に置き換えると迅速に筋管に分化し，その増殖能を失ってしまう。筋芽細胞と同じ未分化な状態であるマウス胚性幹細胞（mESCs）もまた，広く胎児ウシ血清（FBS）を添加した培地で培養されてきた。しかし，血清は生体物質であることから成分組成が未知であり，かつロット差が大きいため安定しておらず，実験における再現性や特定の成分の役割を研究するうえで問題となっていた。これまでにも無血清のマウスES細胞用培地は報告されているが，これらの培地は商業用であり詳細な成分は公開されていなかった。近年我々は，多様な接着がん細胞株を維持できる無血清培地「DA-X培地」の開発に成功した。そこで本研究ではDA-X培地を改良し，すべての成分が化学的に定義され公開可能なマウスES細胞のための新しい無血清培地（DA-X medium-based for Robust proliferation of Pluripotent stem cell：DARP培地）の開発を目指した。開発したDARP培地はES細胞の未分化性維持を実現し，テラトーマおよびキメラ胚における生殖細胞を含むすべての三胚葉への多分化能性を維持していた。本研究成果は，マウスES細胞において，信頼性が高く再現可能な新規の培養方法を提供し，さらには，DA-X培地に基づいた筋芽細胞の増殖能を保証するための無血清培地の開発に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.*, 11, 1193634, 2023.
2） Katayama, T., Takechi, M., Murata, Y., Chigi, Y., Yamaguchi, S., Okamura, D.：Development of a chemically disclosed serum-free medium for mouse pluripotent stem cells, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, in press.
3） Takii, S., Wu, J., Okamura, D.：The amount of membrane cholesterol required for robust cell adhesion and proliferation in serum-free condition, *PLOS ONE*, 17(7), e0259482, 2022.

© The Ito Foundation

枝肉３Ｄ計測システムの標準的性能評価法の開発

Evaluation protocol for standardization of meat carcass 3D measurement system

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

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

Three-dimensional (3D) measurement has become more familiar in recent years, and its application in the livestock industry are increasing. 3D measurement systems for meat carcass are already on the market, and industrial implementation is progressing overseas. However, it has been found that 3D-measurement results vary depending on the system used, which is a serious concern when utilizing the 3D data. Therefore, in this study, we developed an evaluation protocol for carcass measurement performance that can be commonly applied to various 3D-systems and serves as the basis for ensuring the reliability of the data obtained.

In developing process of the protocol, an existing International Standard was used as a normative reference. Based on the reference, the protocol consisted of three sections, and we attempted to apply them to the conditions unique to carcass measurement. The developed protocol is considered to serve the basis for quality control of the 3D measurement system used for carcasses and the data obtained.

The developed protocol should continue to be improved in response to technological advances and needs of the users of 3D-measurement systems or the users of measured values extracted from the 3D data.

１．目　　的

三次元（３Ｄ）計測が近年いっそう身近になり，畜産分野における活用事例も増えてきた。海外ではすでに枝肉用の３Ｄ計測システムが上市され，枝肉分割後の重量予測アプリケーション開発なども行われている。しかし，著者らがこれまで複数の３Ｄ計測システムについて検証した結果，用いるシステムにより計測結果にかなり違いがあることが分かっており，枝肉の３Ｄデータの活用にあたり重大な懸念事項となっている。３Ｄ計測技術が身近となり，誰でもスマートフォン１台で枝肉を３Ｄスキャンすることも可能になる中，正確性に欠ける枝肉３Ｄデータが出回ってしまうことにより枝肉３Ｄデータ全体の信頼を失う恐れが生じてきた。現状では枝肉３Ｄデータの確からしさを評価する方法が存在しないことから，本研究では，用いられる種々のシステムに共通して適用可能な，枝肉３Ｄデータの信頼性確保の基盤となる，枝肉計測性能の評価法を開発することを目的

© The Ito Foundation

とした。

２．方　　法

枝肉をどれだけ正確に計測できるのかを評価するための光学式３Ｄ計測システムの枝肉計測性能の評価プロトコルの検討を行った。規範的参考文献として，ヒトのボディスキャナに関する国際標準規格[1)]を参照した。具体的には，この規範的参考文献に準じてプロトコルは2.1～2.3の３つの部分から構成することとし，枝肉計測に独特の条件への適用を以下の方針に従って試みた。

2.1　枝肉表面形状の計測性能評価プロトコル

表面形状の計測性能を評価するために，試験球の形状（直径および球面分散値）の計測結果と校正値との比較により，システムの枝肉表面形状の計測性能を評価する方法を定めた。

また，実際の現場では枝肉が生産ラインを流れる状態での計測が想定されるため，搬送中の枝肉の表面形状の計測性能も評価可能とした。具体的には，評価に用いる搬送速度を定義し，その時の計測結果を静止時と比較するための具体的な方法を定めた。

2.2　枝肉計測結果の再現性を評価するためのプロトコル

形状が不変な枝肉模型を用いて，枝肉計測結果の再現性を評価する方法を開発した。国際標準規格[1)]を踏襲し，枝肉模型表面の特徴的な点を定義し，そこにマーカーを付け，実際の計測時に想定されうる枝肉姿勢となるよう位置・向きを若干変えながら複数回計測し，マーカー位置の計測誤差を評価する方法とし，その適切な評価条件について検討した。特徴点については，枝肉３Ｄデータの活用の観点から有用と思われる特徴点を，各種規格書（産肉能力検定規程，枝肉取引規格，国際標準規格など）や各種辞書（食肉用語辞典，家畜解剖図説，畜産用語集など）および学術サイト（Animal Wikiなど）から定義が明確なものを中心に検討した。

また，枝肉模型は変形しないため再現性評価に最適であるが，入手可能性の点で懸念があったため，実際の枝肉を用いても再現性評価が可能かどうか，実物と模型の計測結果の比較を行い，どちらでも評価できる方法とした。

2.3　欠損領域の評価プロトコル

実際に流通する枝肉の形状や表面性状はさまざまであり，死角となる影の部分や，色や光沢の影響で計測不能となる部分（欠損領域）が存在するため，その多寡を評価する方法を定めた。まず実際の枝肉と模型を用いてどの部分が計測不可能になりやすいかを明らかにし，これらを中心に，評価部位と方法を具体的に定めた。

３．結果と考察

開発したプロトコルを参考資料として末尾に掲載する。本プロトコルは，規範的引用文献と同様に，計測原理や条件に関わらずどのような光学式３Ｄ計測システム（スキャナ方式，パターン投影方式，全周カメラ方式など）に対しても適用可能な，枝肉計測のためのシステム性能評価法を目指したものである。なお，規範的引用文献の著作権などにより，本報告に記載できなかった部分もあることを申し添える。計測結果の報告例として示した数値等はあくまで一例であり，基準値や目標値ではない。

本プロトコルは，国際標準規格が普通そうであるように，ユーザーの要望や技術進歩を受けて，今後改良が続けられるものである。

枝肉評価は，多くの国や地域で，現地の食肉流通形態に適合した方法で行われている。３Ｄ計測は，枝肉計測に応用が進む新しい技術であり，海外では社会実装が近年急速に進んでいる。計測により得られる枝肉外観の３Ｄデータは，枝肉の品

© The Ito Foundation

質評価や商取引，食肉加工，家畜育種などのさまざまな用途に活用できる可能性があるが，必要となるデータ品質の水準は用途によって異なる可能性があり，計測データの品質管理が重要となる。開発したプロトコルにより，この品質管理が可能になると考えられる。

先にも述べたように，本プロトコルは，計測技術の進歩や計測システムのユーザーあるいは３Ｄデータから抽出した測定値のユーザーからのニーズなどを受けて，改良が続けられるべきものである。今後予想される改良点としては，例えば以下が考えられる。

3.1　枝肉表面形状の計測性能評価法

規範的引用文献では，高い精度が求められる計測を対象としており，校正された球を用いたプロトコルとなっている。しかし，枝肉表面形状の計測においては，許容される誤差が規範的引用文献より大きい可能性がある。例えば，牛枝肉表面（体表面）は結合組織の構造の影響でテクスチャが滑らかでなく，また全体サイズも大きいため，求められる計測精度は低いかもしれない。枝肉計測に必要な精度を，まず明確にする必要がある。

また，開発したプロトコルでは，試験球として枝肉の「もも」程度の大きさの球を定めたが，規範的引用文献にあるヒトのボディスキャナで用いる試験球（ヒトの頭程度の大きさ）よりも大きくなり，特に牛枝肉を計測対象とすると巨大になるため，扱いやすさ（軽さ）と校正可能な強度を両立する試験球の開発に課題がある。

もう一つ課題として，生産ラインを流れる枝肉に適用のあるシステムを評価する場合，試験球の５回の計測（５つの計測ポジション）すべてで同じ速度で球を動かすことが難しい場合がある。この課題に対し，球ではなく，高さのある円柱を用い，５つのポジション（高さ）における計測を１回で実施できるようにすることで解決する可能性がある。円柱は枝肉の概形を表すため，球より目的適合性が高い可能性もあり，先の課題の解決法とあわせて検討に値する。

3.2　枝肉計測結果の再現性評価法

再現性評価に用いる計測点（ランドマーク）として，開発したプロトコルでは評価を簡単にするため左半丸上の点に限定した。これは，現在枝肉評価に用いられるのが主に左半丸であることを根拠としたものであるが，実際は左右の枝肉で形状が違うため（例えば，牛枝肉では肋骨間切開面の有無が異なる），右側についてもランドマークを追加する必要があるかもしれない。

3.3　欠損領域の評価プロトコル

評価を簡単にするため，評価に用いる枝肉はシステムの実用時に想定される条件（用いるハンガー，ハンガーに懸吊する２つの半丸の配向など）で懸吊することを定めたが，計測システム間の純粋な性能比較をしたい場合のために，標準の枝肉懸吊姿勢および搬送速度の定義が必要かもしれない。

今後さまざまな３Ｄ計測システムが上市されると考えられるが，その適用範囲や得られるデータの品質を明示するための枠組みを，本プロトコルが提供できるものと考えている。枝肉３Ｄデータへの信頼が確保され，誰もが安心してオンライン商取引等に枝肉３Ｄグラフィックなどの３Ｄデータを活用できるようになり，新しい価値の創造につながることを期待している。

４．要　　約

三次元（３Ｄ）計測が近年いっそう身近になり，枝肉用の３Ｄ計測システムもすでに上市され，海外では社会実装が進んでいる。しかし，用いるシステムにより計測結果に違いがあることが分かっており，枝肉の３Ｄデータの活用にあたり重大な懸念事項となっている。そこで本研究で

© The Ito Foundation

は，用いられる種々のシステムに共通して適用可能な，枝肉３Ｄデータの信頼性確保の基盤となる，枝肉計測性能の評価プロトコルの開発を行った。

プロトコル開発にあたり，規範的参考文献として，ヒトのボディスキャナの性能評価に関する国際標準規格を参考とした。具体的には，この参考文献に準じて，プロトコルは３つの部分から構成することとし，枝肉計測に独特の条件への適用を試みた。開発したプロトコルは，枝肉に用いる３Ｄ計測システムと得られるデータの品質管理の基礎になると考えられる。

開発したプロトコルは，計測技術の進歩や，計測システムのユーザーあるいは３Ｄ計測データから抽出された測定値のユーザーからのニーズなどを受けて，改良が続けられるべきものであり，引き続き検討が必要である。

文　献

1） ISO_20685-2_2023 (E)-Ergonomics — 3-D scanning methodologies for internationally compatible anthropometric databases — Part 2 : Evaluation protocol of surface shape and repeatability of relative landmark positions

© The Ito Foundation

【参考資料】

枝肉の立体計測 —互換性のある枝肉形状データベースのための三次元計測法—
表面形状およびランドマーク位置の再現性の評価プロトコル

1 適用範囲

本プロトコルでは、枝肉形状データと測定値の取得における計測システムの性能評価法について説明します。
主に枝肉全体を計測するシステムに用いますが、分割後の枝肉を計測するシステムにも適用できます。 このプロトコルは、単一の視野で枝肉を測定する様々なシステムに適用されます。ハンドヘルドのシステムを評価する場合は、操作者が全体的な誤差に寄与する可能性があることに注意が必要です。測定対象を回転させるシステムを評価する場合は、動きによるアーティファクトが発生する可能性があり、これも全体的な誤差の原因となる可能性があります。また、測定対象である枝肉がラインを搬送されている場合も、動きによるアーティファクトが発生する可能性があり、これも誤差の原因となります。
枝肉の表面形状やランドマーク位置の品質は、システムの性能と、測定者や測定対象の枝肉の特性の影響を受けます。本プロトコルでは、テスト対象として実際の枝肉だけでなく人工物も使用することで、システムの性能評価をおこないます。枝肉計測にはデータの利用目的に応じて様々なレベルの計測精度が求められますが、その精度は、国際的な長さ標準に従って校正された「ものさし」とその計測結果を比較することによって検証できます。枝肉用の3D計測システムの精度を検証または指定するために、形状とサイズが既知の校正済みの試験球を使用します。また、本プロトコルで対象とするランドマーク位置は、実物（枝肉あるいはその模型）に対して適用され、点群からソフトウェアによって自動的に計算されたランドマーク位置には適用されません。

2 規範的参考文献

（1）ISO_20685-2_2023 Ergonomics — 3-D scanning methodologies for internationally compatible anthropometric databases — Part 2: Evaluation protocol of surface shape and repeatability of relative landmark positions

3 用語と定義

球形測定誤差（error of spherical form measurement）、球面分散値（spherical form dispersion value(n)）、直径測定誤差（error of diameter measurement)を評価に用いる。定義の詳細は以下 URL を参照のこと。
ISO Online browsing platform: https://www.iso.org/obp
IEC Electropedia: https://www.electropedia.org/

4 枝肉表面形状の測定性能評価プロトコル

4．1 一般事項
（略）

4．2 試験球
アクリルや強化プラスチックなど適切な材料で作られた球を用いて、品質指標である球面分散値と直径測定誤差を決定します。
球の直径は、枝肉の「もも」の大きさを模すものとします。球の直径と形状は校正され、校正証明書が入手可能でなければなりません。試験球の直径と形状は、長さの国際標準にトレーサビリティのある三次元測定機などの精密測定機器を使用して校正されます。
キャリブレーション目的で計測システムに付属する基準球は、この試験球として使用してはいけません。

4．3 手順
4．3．1 試験球の測定
球は、計測空間内の5つの異なる位置で測定します。測定位置は、計測対象とする枝肉の実際に想定される計測位置・向きに懸吊した時の枝肉重心付近と「もも」および「肩」の高さに配置し、さらに想定よりも大きな枝肉に対する計測性能の評価の参考とするために、前述よりも上方および下方に配置するものとします。
具体的には次の5つの位置が含まれます（図1）。ポジション1は計測空間の中央であり、計測対象とする枝肉のうち平均的な形状の枝肉を想定する計測位置に懸吊した場合の、枝肉の（半丸が2つある場合は、左半丸の）第13胸椎付近に球の中心が来る位置です。ポジション2から5は、ポジション1の鉛直軸上にあります。ポジション2は

© The Ito Foundation

ポジション1の上方で、平均的な枝肉の恥骨付近が球の中心の高さです。ポジション3はポジション1の下方で、平均的な枝肉の第1胸椎が球の中心の高さです。ポジション4は、ポジション1から2の距離を2倍した位置です。ポジション5は、ポジション1から3までの距離を2倍した位置です。ポジション4および5は、大貫など平均よりも大きな枝肉を計測対象に含める場合に必要です。各ポジションに試験球を配置して計測を1回おこない、計測結果と併せて球の正確な位置を記録してください。

生産ラインを搬送中の枝肉に対して計測をおこなう場合は、球を静止(0 $m \cdot s^{-1}$)させた場合に加えて、0.1 $m \cdot s^{-1}$で球を搬送させた状態での評価もおこないます。計測時の速度の実測値を記録してください。生産ラインを搬送中の枝肉に対して計測システムの適用がない場合は、球を静止させた場合のみ評価を実施します。その他の搬送速度における評価を追加することもできます。

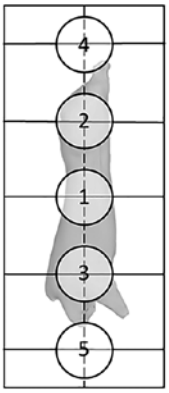


図1　球の計測位置

4．3．3　品質指標の計算

直径測定誤差および球面分散値(90)および半径方向の距離の標準偏差を求めます。規範的参考文献(1)を参照してください。

4．3．4　報告

試験球の材質と校正値(直径と球面分散値(100%))を報告します。5つのポジションについて、実際の測定位置、直径計測誤差、球面分散値(90)、およびベストフィット球からの半径距離の標準偏差を報告します。試験球のデータポイントの図は、結果の解釈に役立ちます。

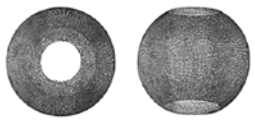
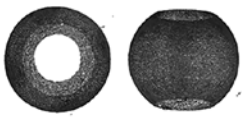
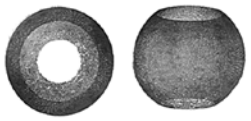
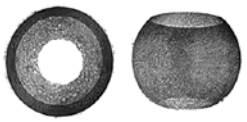
試験手順と報告書の例を表1に示します。

表1　表面形状測定性能評価結果の報告例

枝肉立体計測システムの名称(製作者)		枝肉3Dシステム(A社)		
評価者		農研機構 畜産研究部門		
評価日		2024/1/1		
評価場所		食肉市場B株式会社(C県D市)、豚枝肉冷蔵室E		
1. 試験球				
	材質	アクリル		
	表面処理	マット白		
	校正者	A研究所		
	直径	300.000 mm		
	球面分散値(100%)	1.000 mm		
2. 結果				
ポジション No.	球の中心位置	直径計測誤差 mm	球面分散値 (90) mm	半径距離の標準偏差 mm
1)静止時: 搬送速度 0 $m \cdot s^{-1}$				
1	床面から30 cm	3.5	10.2	3.5
2	床面から80 cm	1.6	4.1	1.4
3	床面から130 cm	1.5	1.9	1.2
4	床面から180 cm	2.2	3.1	1.9
5	床面から230 cm	2.3	5.9	2.5

© The Ito Foundation

表1（つづき）

2）搬送時：搬送速度 0 m・s^{-1}				
1	搬送状態に対する適用なし	適用無し	適用無し	適用無し
2				
3				
4				
5				
3）搬送時：搬送速度（　　m・s^{-1}）				
1	搬送状態に対する適用なし	適用無し	適用無し	適用無し
2				
3				
4				
5				
3. 試験球を計測した結果の図				
1）静止時：搬送速度 0 m・s^{-1}				
ポジション 1		ポジション 2		ポジション 3
				
ポジション 4		ポジション 5		
				
2）搬送時：搬送速度 0.1 m・s^{-1}				
ポジション 1		ポジション 2		ポジション 3
搬送状態に対する適用なし		搬送状態に対する適用なし		搬送状態に対する適用なし
ポジション 4		ポジション 5		
搬送状態に対する適用なし		搬送状態に対する適用なし		
3）搬送時：搬送速度（　　m・s^{-1}）				
ポジション 1		ポジション 2		ポジション 3
搬送状態に対する適用なし		搬送状態に対する適用なし		搬送状態に対する適用なし
ポジション 4		ポジション 5		
搬送状態に対する適用なし		搬送状態に対する適用なし		

© The Ito Foundation

5 枝肉計測結果の再現性を評価するためのプロトコル

5．1 一般事項
（略）

5．2 試験対象物
対象とする畜種に平均的な枝肉の大きさと形状を表す模型を使用します。模型には可動部分がなく、発泡スチロールや強化プラスチックあるいは他の適切な材料で作製された半丸形状であり、一般的な吊り下げ姿勢とします。評価に用いるランドマークを、枝肉模型上に事前にマークします。

枝肉模型が入手困難な場合は、実際の半丸枝肉で代用することもできますが、試験中の枝肉の変形によって評価結果に影響を与える可能性があります。実際の枝肉を用いた場合はそのことを報告書に記載します。

5．3 ランドマーク
評価対象となる 27 個のランドマークを表2に示します。表2に記載されたもの以外のランドマークを評価する必要がある場合、これらのランドマークには No.28 からの番号を付けて報告書に記載します。

評価したいランドマーク位置をマーカーシール等により測定前にマークします。マーカーは、テストする計測装置による自動検出に適したものを選択する必要があります。

表2 評価対象となるランドマーク

No.	ランドマーク
1	かた、皮下脂肪表面(左)
2	前肢手根骨(左)
3	肩脂肪の厚い部分の体表面(左)
4	肩脂肪の厚い部分の体軸側(左)
5	第1頸椎凹窩部(左)
6	第1胸椎前縁(左)
7	ロース、皮下脂肪表面(左)
8	ばら、皮下脂肪表面(左)
9	第4胸椎後縁(左)
10	第4－5肋骨間、胸腔面(左)
11	第4肋軟骨、腹側外縁に見える部分(左)
12	第9胸椎前縁(左)
13	第9肋骨、胸腔面(左)
14	第9～13胸椎上の背脂肪の最も薄い部分の体表面(左)
15	第9～13胸椎上の背脂肪の最も薄い部分の体軸側(左)
16	第13胸椎後縁(左)
17	第13肋骨、胸腔面(左)
18	腰脂肪の厚い部分の体表面(左)
19	腰脂肪の厚い部分の体軸側(左)
20	背割り面にみえる中殿筋、中央部直上の背脂肪の体表面(左)
21	背割り面にみえる中殿筋、中央部直上の背脂肪の体軸側(左)
22	そともも、皮下脂肪表面(左)
23	うちもも、薄筋表面(左)
24	最後腰椎後縁(左)
25	恥骨前縁(左)
26	最後尾椎後端(左)
27	足根骨(左)
注:(左)は左半丸であることを示す	

5．4 手順
5．4．1 測定
枝肉模型あるいは実際の半丸枝肉を、懸吊した状態でわずかに動かしながら 10 回スキャンします。位置の変化には、前後方向および横方向の並進および回転の違いが含まれます。表3に推奨する 10 の位置を示します。各位置で、1回計測をおこないます。

© The Ito Foundation

表3 推奨する 10 の計測位置

No.	ポジション
1	基準位置
2	基準位置より、左の半丸の背側に10 mm移動
3	基準位置より、左の半丸の腹側（2とは逆側に）に10 mm移動
4	基準位置より、左の半丸の体側方向に 10 mm移動
5	基準位置より、左の半丸の体軸方向に（4とは逆側に）10 mm移動
6	基準位置より、枝肉懸吊軸の上方から見て反時計回りに1° 回転
7	基準位置より、枝肉懸吊軸の上方から見て時計回りに1° 回転
8	基準位置より、左の半丸の背側に10 mm移動させ、反時計回りに1° 回転
9	基準位置より、左の半丸の腹側に10 mm移動させ、時計回りに1° 回転
10	基準位置

5．4．2 品質指標の計算

各ランドマークについて、計測誤差の平均値と標準偏差を計算します。計算法については規範的引用文献（1を参照してください。

5．4．3 報告

試験手順と報告書の例を表4に示します。

表4 ランドマーク計測再現性評価試験の報告例

枝肉立体計測システムの名称（製作者）		枝肉3Dシステム（A社）	
評価者		農研機構 畜産研究部門	
評価日		2023年11月30日	
評価場所		食肉市場B株式会社（C県D市）、豚枝肉冷蔵室E	
試験対象物の搬送速度（0.1 m・s^{-1}）の実測値		0.1 m・s^{-1}	
1．試験対象物（枝肉、実物）			
□ 枝肉模型			
素材／表面性状／大きさ／製造者		-	
評価したランドマーク数		-	
☑ 枝肉（実物）			
重量／性別／と畜日／皮剥ぎ・湯剥ぎの別／格付結果		81.5 kg／メス／2023年11月29日／皮剥ぎ／上	
評価したランドマーク数		下表の27ランドマーク	
2．結果			
1）座標の計測に成功した回数			
No.	ランドマーク	成功した回数（10回中）	
1	かた、皮下脂肪表面（左）	10	
2	前肢手根骨（左）	2	
3	肩脂肪の厚い部分の体表面（左）	10	
4	肩脂肪の厚い部分の体軸側（左）	10	
5	第1頸椎凹窩部（左）	5	
6	第1胸椎前縁（左）	10	
7	ロース、皮下脂肪表面（左）	10	
8	ばら、皮下脂肪表面（左）	10	
9	第4胸椎後縁（左）	10	
10	第4－5肋骨間、胸腔面（左）	6	
11	第4肋軟骨、腹側外縁に見える部分（左）	10	
12	第9胸椎前縁（左）	10	
13	第9肋骨、胸腔面（左）	7	
14	第9～13胸椎上の背脂肪の最も薄い部分の体表面（左）	10	
15	第9～13胸椎上の背脂肪の最も薄い部分の体軸側（左）	10	
16	第13胸椎後縁（左）	10	
17	第13肋骨、胸腔面（左）	4	
18	腰脂肪の厚い部分の体表面（左）	10	
19	腰脂肪の厚い部分の体軸側（左）	10	
20	背割り面にみえる中殿筋、中央部直上の背脂肪の体表面（左）	10	
21	背割り面にみえる中殿筋、中央部直上の背脂肪の体軸側（左）	0	
22	そともも、皮下脂肪表面（左）	10	
23	うちもも、薄筋表面（左）	10	
24	最後腰椎後縁（左）	10	
25	恥骨前縁（左）	10	
26	最後尾椎後端（左）	10	
27	足根骨（左）	3	
2）計測誤差の平均値と標準偏差（mm）（N=90）			
No.	ランドマーク	誤差の平均値	標準偏差
1	かた、皮下脂肪表面（左）	3.1	2.3
3	肩脂肪の厚い部分の体表面（左）	4.5	3.2
4	肩脂肪の厚い部分の体軸側（左）	4.0	2.0

© The Ito Foundation

表4（つづき）

6	第1胸椎前縁（左）	2.0	1.4
7	ロース、皮下脂肪表面（左）	3.2	1.8
8	ばら、皮下脂肪表面（左）	3.8	1.8
9	第4胸椎後縁（左）	4.4	3.0
11	第4肋軟骨、腹側外縁に見える部分（左）	3.2	1.8
12	第9胸椎前縁（左）	4.2	2.5
14	第9～13胸椎上の背脂肪の最も薄い部分の体表面（左）	4.4	3.0
15	第9～13胸椎上の背脂肪の最も薄い部分の体軸側（左）	4.2	2.4
16	第13胸椎後縁（左）	5.6	2.8
18	腰脂肪の厚い部分の体表面（左）	4.7	2.2
19	腰脂肪の厚い部分の体軸側（左）	4.6	2.1
20	背割り面にみえる中殿筋、中央部直上の背脂肪の体表面（左）	2.4	1.6
22	そともも、皮下脂肪表面（左）	2.5	1.5
23	うちもも、薄筋表面（左）	4.4	2.3
24	最後腰椎後縁（左）	5.7	2.1
25	恥骨前縁（左）	6.0	4.9
26	最後尾椎後端（左）	5.2	3.0
注：（左）は左半丸であることを示す			

6 欠損領域の評価プロトコル

6．1 一般事項

枝肉の形状データの品質には、枝肉模型を使用して評価できない側面がいくつかあります。これは、実際の枝肉の形状は様々であり、関心のある母集団のばらつきを表現できる枝肉模型を予め準備しておくことが難しいためです。表面形状とランドマーク位置の品質に影響を与える最も重要な点の一つは、体の他の部分による遮蔽のために測定できない欠損領域です。遮蔽される部位は枝肉の形状や懸吊方法によって異なるため、欠損領域を評価し、計測システムが計測対象の母集団に対応できるかどうかを検証するには、実際の枝肉を用いる必要があります。

6．2 枝肉の選択

複数の枝肉からの計測データを使用する必要があります。対象となる母集団の形状のばらつきを表す枝肉を選択することが望ましく、これには、枝肉重量、性別、格付結果の様々な組みあわせが含まれる場合や、大寛や小寛を含む場合や、奇形や割徐などの瑕疵を持つ枝肉も含まれる場合があります。

6．3 枝肉位置制御と計測

対象とする枝肉は、計測を想定する条件（使用するハンガーや、ハンガーに2つの半丸を懸吊する場合その配向など）で懸吊します。枝肉は通常の計測手順に従って1回計測します。

6．4 欠損領域の評価手順

（略）

評価者は目視で表面データの欠落を確認し、欠損がある部分のエリアコードを記録します。表5に欠損領域のコード番号を示します。必要に応じて他の領域を追加できます。

表5 欠損領域の評価に用いる枝肉表面のエリアコード

コード番号	エリア
10	肩脂肪、背割り面（左）
11	肩脂肪、体表面（左）
12	かた、皮下脂肪表面（左）
13	かた、頸部切断面（左）
14	前肢先端（左）
20	ロース前方、背脂肪、背割り面（左）
21	ロース前方、背脂肪、体表面（左）
22	ロース前方、胸腔面（左）
30	ロース後方、背脂肪、背割り面（左）
31	ロース後方、背脂肪、体表面（左）
32	ロース後方、腹腔面（左）
40	ばら前方、皮下脂肪表面（左）
41	ばら前方、胸腔面（左）

© The Ito Foundation

表5（つづき）

50	ばら後方、皮下脂肪表面（左）
51	ばら後方、腹腔面（左）
60	もも、うちもも表面（左）
61	もも、そともも表面（左）
62	もも、骨盤腔（左）
63	後肢先端（左）
注：（左）は左半丸であることを示す	

6．5　報告

対象とした枝肉の畜種、重量（平均値、最小値、最大値）、性別の内訳、格付等級、瑕疵の有無と内容を報告する必要があります。欠損を示す画像は、結果の解釈に役立ちます。報告書の例を表6と図2に示します。

表6　欠損領域の評価結果の報告例

枝肉立体計測システムの名称（製作者）		枝肉3Dシステム（A社）	
評価者		農研機構 畜産研究部門	
評価日		2024年1月1日	
評価場所		食肉市場B株式会社（C県D市）、豚枝肉冷蔵室E	
計測時の枝肉の搬送速度		0.1 $m \cdot s^{-1}$	
自動穴埋め処理		当該システムは自動穴埋め機能を有しているが使用していない	
1．対象枝肉			
豚 メス15体（平均重量 82.5 kg、最大重量 120.0 kg、最小重量 70.5 kg）、極上3／上3／中3／並3／等外3、ロース部奇形1体 去勢15体（平均重量 79.0 kg、最大重量 87.0 kg、最小重量 55.0 kg）、極上3／上3／中3／並3／等外3、かた剥徐1体			
2．方法			
計測システムから得られたデータをstl形式で出力し、表面性状はZeiss 3D inspectで可視化した。			
3．結果			
コード番号	領域	欠損領域がある枝肉数、合計数（メス、去勢）	備考
10	肩脂肪、背割り面（左）	1（1，0）	小さな欠損
11	肩脂肪、体表面（左）	7（5，2）	鎖骨上窩に多い
12	かた、皮下脂肪表面（左）	0（0，0）	食道等除去後の空隙面のみ
13	かた、頭部切断面（左）	30（15，15）	大きい枝肉で欠損が大きい
14	前肢先端（左）	27（13，14）	
20	ロース前方、背脂肪、背割り面（左）	4（2，2）	
21	ロース前方、背脂肪、体表面（左）	2（1，1）	
22	ロース前方、胸腔面（左）	27（15，12）	胸椎の影（肋骨頭付近）
30	ロース後方、背脂肪、背割り面（左）	3（3，0）	
31	ロース後方、背脂肪、体表面（左）	0（0，0）	
32	ロース後方、腹腔面（左）	22（12，10）	腎臓の影
40	ばら前方、皮下脂肪表面（左）	0（0，0）	
41	ばら前方、胸腔面（左）	0（0，0）	
50	ばら後方、皮下脂肪表面（左）	0（0，0）	
51	ばら後方、腹腔面（左）	28（14，14）	枝肉形状によって様々な大きさの欠損
60	もも、うちもも表面（左）	0（0，0）	
61	もも、そともも表面（左）	1（1，0）	小さな欠損
62	もも、骨盤腔（左）	9（5，4）	小さな欠損
63	後肢先端（左）	6（4，2）	大きい枝肉で欠損が大きい
他			
注：（左）は左半丸であることを示す			

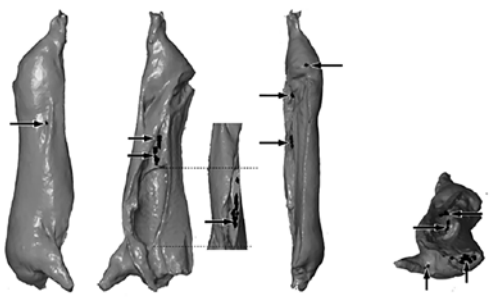


図2　欠損領域の図示例

© The Ito Foundation

ニワトリ培養肉価値を担保する結合組織構成細胞の機能について

Research on connective tissue cell role for the poultry culture meat quality

中　村　真　子
（九州大学大学院農学研究院）

Mako Nakamura
(Faculty of Agriculture, Kyushu University)

In this research project, we analyzed embryonic tissues in which mesenchymal cells are thought to be involved in the regulation of myocyte differentiation. In chick embryonic myogastric smooth muscle, connective tissue cells were observed more clearly than in skeletal muscle. However, the cells in this tissue were not able to induce the formation of myoblasts even after three days of culture. Therefore, we will conduct a single-cell analysis of four- to 15-day embryos to determine what kind of gene expression is observed in the pericellular cells of the muscle bundle and to comprehensively analyze gene expression in individual cells to identify factors that may be involved in regulating myocyte differentiation and cell migration. We will continue to elucidate at the molecular level the regulatory mechanisms of skeletal muscle (myocytes), fat (adipocytes), tissue blood vessels and digestive tract (smooth muscle cells), and connective tissues (mesenchymal cells), which constitute the complexity of meat such as flavor and firmness, with a view to developing cultured meat, which is expected to reduce environmental burden. In this study, we will focus on mesenchymal cells, which are peripheral cells of muscle bundles, and clarify their contribution to meat at the molecular level. We will clarify the differentiation mechanisms and secreted proteins of chicken mesenchymal cells, analyze their effects on smooth muscle and skeletal muscle cell differentiation, and explore the possibility of increasing meat production.

1．目　　的

食肉組織は，動物の筋肉を構成する重要な組織であり，主に筋線維とその周囲の結合組織からなる。一方，結合組織は筋線維を支え，保護する役割を果たしており，筋線維を取り巻く。骨格筋の再生プロセスでは結合組織に存在する間葉系細胞が損傷した筋肉組織で新しい筋線維の形成を促進することが明らかにされた[1)]。近年，温室効果ガス対策および全世界で課題となっている水・土地・飼料の持続可能な利用の観点から培養プレート内で人工的に食肉を生産する培養肉開発が骨格筋幹細胞を大量培養する方法で行われている。しかし，食肉の構成単位は骨格筋のみならず結合組織内間葉系細胞も筋肉の分化に関与しているため，食肉組織を包括的に培養する方法を開発する

© The Ito Foundation

ことが望まれる。本研究では，ニワトリ培養肉開発応用を目指した結合組織構成細胞の単離と同定をニワトリ胚筋胃にて解析を行った。

２．方　法

2.1　有精卵の孵卵

有精卵を４日－15日間孵卵させたのちニワトリ胚筋胃を採取した。ニワトリ胚はハンバーガーハミルトン法[2)]を用いて胚発達を確認後実験に利用した。本研究内容は九州大学動物実験計画として申請承認済みである（承認番号：A22-179-2)。

2.2　蛍光免疫染色

ニワトリ胚より筋胃を単離し，凍結切片作製用にO.C.Tコンパウンドを入れたクリオディッシュに組織を包埋して，液体窒素で冷やしたイソペンタン内で１分間凍結させた。作成した凍結ブロックを用いてクライオスタットで凍結切片を作成後30分ドラフト内で乾燥させた。リキッドブロッカー（Cosmo bio）で切片を囲み，４％パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液（PFA）を試料に滴下し，20分室温で処理した。５分間PBSで洗浄処理を３回繰り返し，0.2％（v/v）TritonX-100 in PBSを試料に滴下し，20分室温で処理した。５分間PBSで洗浄処理を３回繰り返し，３％（w/v）Bovine serum albumin（BSA）in PBSを試料に滴下し，40分室温で処理しブロッキングした。液を取り除いた後，３％　BSA in PBSで希釈した１次抗体溶液に試料をつけ，４℃で一晩反応を行った。５分間PBSで洗浄処理を３回繰り返し，３％　BSA in PBSで希釈した２次抗体溶液に試料をつけ，室温で１時間処理した。５分間PBSで洗浄処理後DAPIを添加し核染色を15分間室温で行った。５分間PBSで洗浄処理を３回繰り返し，封入剤で封入しLeica TCS SP8 STEDを用いて蛍光顕微鏡下で解析を行った。

2.3　細胞培養

マウスEHS肉腫由来Laminin溶液１ｇを氷上で溶解し，PBS（－）50 mlで20 μg/mlに希釈しコーティングした。孵卵器で37.6℃で加湿して15日間インキュベートした有精卵（ボリスブラウン種）を使用した。ニワトリ胚腹部より筋胃採取後コラゲナーゼ酵素液を15 ml加え30℃で30分間振盪させた。懸濁液にDMEM培養液を15 ml加え，細胞懸濁液をセルストレーナーに通し単細胞を単離した。遠心（800 rpm 5 min）し上清を除き1.0×10^{6} cells/dishになるようにプレートに細胞を播種した。DMEM培養液にFBSを10％となるよう加え３日間培養を行った。

2.4　一細胞解析

４日から15日胚より筋胃を単離しコラゲナーゼ処理を行った。細胞を回収した。一細胞解析は九州大学内共同利用施設にて解析を進めている。

３．結果と考察

本研究では，ニワトリ胚の側板中胚葉由来の筋胃間葉系細胞に着目した[3)]。骨格筋の筋束は結合組織内の間葉系細胞が非常に少数であり，識別と単離が困難であるのに比較し，側板中胚葉より形成される消化管間質は形態学的にも判別しやすく，実験に用いる細胞数の回収可能である。ニワトリ発生時に側板中胚葉より四肢骨格筋，消化管の筋周囲組織が形成される。本研究では，間質に富み間葉系細胞の識別が容易なニワトリ15日胚筋胃を解析に用いた。最初に筋胃平滑筋マーカーであるカルポニン１抗体で平滑筋層を染色したところ，骨格筋同様に筋細胞が房状の筋束を構成し（**Fig. 1A, B**），その周囲に結合組織細胞の核が認められた（**Fig. 1C**）。この結果よりカルポニン１抗体染色ネガティブの細胞が筋束を取り囲むように存在していることを明らかにした。次に，この組織をコラゲナーゼ処理後播種し，10％DMEM

© The Ito Foundation

培養液にて３日間培養を行った。培養１日目および３日目で細胞を固定し，カルポニン抗体を用いた蛍光免疫染色に供した（**Fig. 2A, B**）。しかし，**Fig. 1** にて確認されたような筋束形成と周囲に結合組織細胞が取り巻くような細胞集団の局在は認められなかった。この結果により平滑筋細胞と周辺細胞は10％DMEM培養条件下では細胞同士の結合作用および，周辺細胞による平滑筋細胞の遊走や組織形成誘導能は認められなかった。今後，一細胞解析のデータを基に予想される分泌因子等を培養液に加えること等で自培養条件を検討する計画としている。次に，ニワトリ４日胚から経時的にサンプリングを行い組織切片の免疫染色を試みたが，８日胚までの組織は非常に柔らかく染色処理の過程で細胞が剥がれ落ちたため，早期胚の蛍光免疫染色は解析法として適さないことが判明した。そこで，計画２のニワトリの筋組織発達と結合組織間葉系細胞へ進めることとした。発現変動の追跡を行うためニワトリ４，５，６，８，10，15日のタイムポイントを設定した（**Fig. 3**）。それぞれ卵殻破壊後ステージングを行った[2)]。コラゲナーゼ処理を行ったのち約1000細胞からRNAをそれぞれ回収し，発現遺伝子の一細胞網羅的解析を進めている。

４．要　　約

本解析によりニワトリ胚筋胃平滑筋では骨格筋より明瞭に結合組織細胞を認めた。間葉系細胞が筋細胞分化段階で筋束を形成し，発達分化に関与している可能性が示唆された。しかし，この組織に含まれる細胞をコラゲナーゼ処理し，３日間培養しても筋束の形成の誘導能は認められなかった。そこで，筋束周囲細胞にはどのような遺伝子発現が認められるか，４日胚から15日胚の一細胞

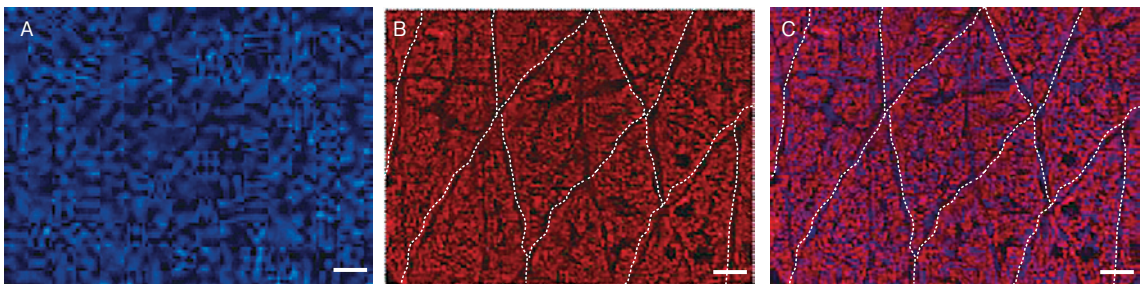


Fig. 1　Smooth muscle bundles are formed and are surrounded by mesenchymal cells in 15-day chicken embryos. A：DAPI stained cells, B：Calponin1 positive cells in red, C：Merge. Dashed line shows Calponin1 negative cells surrounding the muscle bundles.

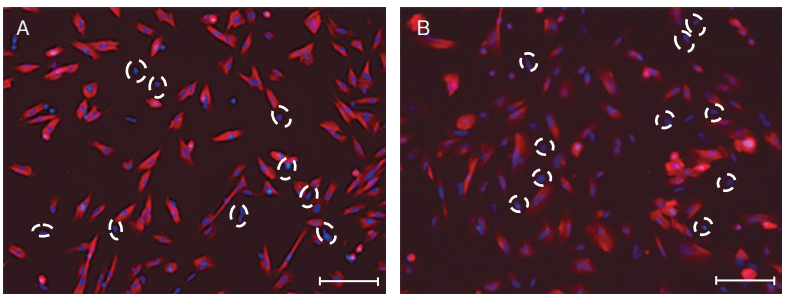


Fig. 2　Smooth muscle cells are seeded onto the laminin coated dishes. A：cultured for one day, B：cultured for three days. Dashed circles shows Calponin1 negative cells located randomly.

© The Ito Foundation

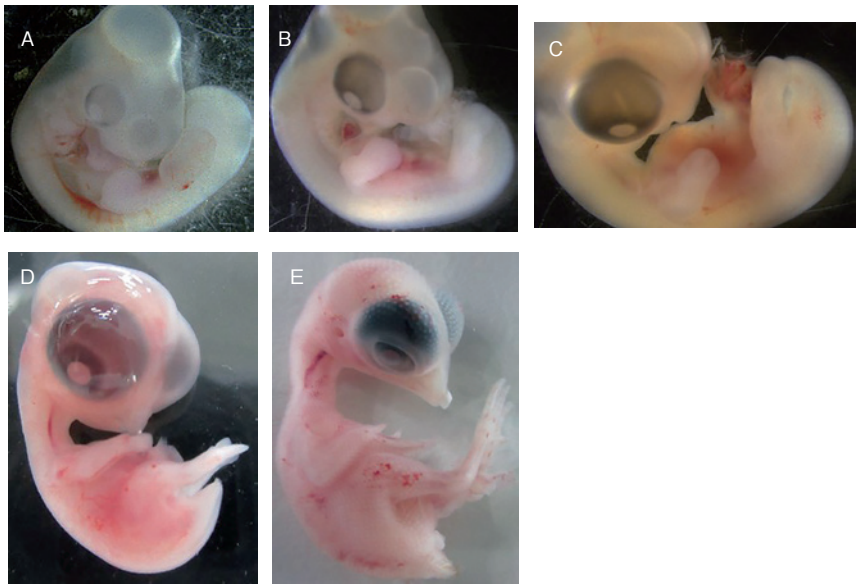


Fig. 3　Developing chicken embryos. A–E：four, five, six, eight, 10 embryonic day, respectively.

解析を行い，個々の細胞内の遺伝子発現を網羅的に解析し，筋細胞分化や細胞遊走の制御能に関わるような因子を同定する。引き続き，食肉の風味や硬さといった複雑さを構成する骨格筋（筋細胞），脂肪（脂肪細胞），組織内血管や消化管（平滑筋細胞），結合組織（間葉系細胞）の制御機構を分子レベルで解明し，環境負荷低減に期待されている培養肉開発をも視野に入れる。本研究では，筋束の周辺細胞である間葉系細胞に着目し，その食肉への寄与を分子レベルで明らかにする。ニワトリ間葉系細胞の分化機序と分泌タンパク質を明らかにし，平滑筋，骨格筋細胞分化に与える影響を解析することで食肉増産の可能性を探り，今後同定する間葉系細胞がニワトリ培養肉生産の基盤細胞と位置付ける。

文　献

1）　Uezumi, A., Fukada, S., Yamamoto, N., Takeda, S., Tsuchida, K.：Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle, *Nature Cell Biology*, **12**, 143～152, 2010.

2）　Hamburger, V., Hamilton, H. L.：A series of normal stages in the development of the chick embryo, *J Morphol*, **88**, 49～92, 1951.

3）　Developmental Biology, Barresi MJF and Gilbert SF,　13th edition, 633～648, 2016.

© The Ito Foundation

脊髄損傷性運動麻痺の機能回復における ブタ肝臓由来リン脂質の有効性

Efficacy of porcine liver-derived phospholipids in functional recovery of spinal cord injury-induced motor paralysis

羽二生　久夫[1]・上野　麟太朗[1]・塚原　　完[2]・松田　佳和[3]

（[1]信州大学先鋭領域融合群バイオメディカル研究所，[2]長崎大学大学院医歯薬学総合研究科（薬学）創薬薬理学分野，[3]日本薬科大学臨床薬理学分野）

Hisao Haniu[1]，Rintaro Ueno[1]，Tamotsu Tsukahara[2] and Yoshikazu Matsuda[3]

（[1]Institute for Biomedical Sciences, Interdisciplinary Cluster for Cutting Edge Research, Shinshu University, [2]Department of Pharmacology and Therapeutic Innovation, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, [3]Division of Clinical Pharmacology, Nihon Pharmaceutical University）

The aim of this study was to determine whether oral administration of PLDP, an enzymatically processed decomposition product of porcine liver, promotes the recovery of lower limb paralysis in a mouse model of spinal cord injury, and to identify its active components. PLDP contains abundant lysophospholipids, which are lipid mediators that have recently attracted attention. Therefore, we first evaluated the cytotoxicity of PEL, a lipid extract of PLDP, and lysophospholipids on bipotential glial cell line. The results showed that high concentrations of PEL and some lysophospholipids were cytotoxic. Evaluation in a mouse model of spinal cord injury showed that only at certain doses, PLDP was effective in accelerating recovery from paralysis of the lower limbs. However, this effect was not observed when LPC, the most abundant lysophospholipids in PLDP, was administered alone. Incidentally, there were no significant differences in blood phospholipid concentrations or lysophospholipid composition ratio, nor were there any differences in body weight after two consecutive weeks of PLDP administration. These results indicate that the restorative effect of PLDP on locomotor function may not be due to a single substance, but rather a combined effect, and that ingestion of porcine liver in adequate amounts on a daily basis may be helpful in improving locomotor function. On the other hand, verification of the efficacy of individual lipid components, including lysophospholipids other than LPC, needs to be continued. Further evaluation of lysophospholipids, which are present in smaller amounts in PLDP, will be conducted in the future.

1．目　　的

脊髄損傷は交通事故や転落などにより受傷し，脊椎の脱臼や骨折により脊髄が圧迫されることで脊髄が損傷する疾患である。脊髄損傷には神経組織の局所的な破壊を生じる一次損傷に加え，炎症や免疫応答，細胞のアポトーシスによる二次的な損傷がある。脊髄損傷の治療は広義には運動機能

© The Ito Foundation

の回復，狭義には損傷部位の神経細胞の修復を指すが，中枢神経は一度損傷を受けると二度と再生しないため現在も根本的な治療方法がない[1)]。近年，人工多能性幹（iPS）細胞の移植[2)]や自家骨髄間葉系幹細胞の治療薬ステミラックなど再生医療が進歩してきているが，悪性腫瘍形成のリスクや安全性・有効性に関する使用成績比較調査など課題もあるため有効な治療方法の確立が求められている[3, 4)]。

我々はSPFブタ肝臓の高付加価値化を目指し，その主要リン脂質成分の一つであるホスファチジルコリン（PC）に着目した。アルツハイマー病（AD）の発症がアセチルコリン（ACh）作動性神経系の障害の主因であると言われているコリン仮説に基づき，PCがコリンの供給源になり得ることからブタ肝臓由来酵素分解物（PLDP）が認知機能に与える影響をヒトで評価した。その結果，PLDPの経口摂取が，健常人および軽度認知障害者の視覚記憶と遅延想起を改善することを報告した[5)]。このPLDPの有効性の検証対象を神経疾患や神経再生など神経全般にして研究を進めており，脊髄損傷（SCI）もその一つである。

PLDPの主体はPCだけではなく，相対的にリゾリン脂質（LPL）が多く含まれていることが明らかとなっている[6)]。先行研究においてLPLはin vitro試験において，ミクログリア細胞への抗炎症作用[6)]，神経変性疾患の進行時に見られる神経細胞やグリア細胞の異常活性化を抑制する作用[7)]が報告されている。また，LPLの１分子種であるリゾフォスファチジルエタノールアミン（LPE）は神経細胞における神経突起伸長亢進作用[8)]やグルタミン酸による毒性を抑制[9)]することも報告されており，脊髄損傷に対する効果も期待できる。そこで本研究は，まだ根本的な治療法のない脊髄損傷に対してPLDPおよびPLDPに含まれるリン脂質の影響を評価した。

２．方　　法

2.1　培養細胞実験

2.1.1　OS３細胞

OS３細胞はori-SV40 DNAで転換したC3Hマウス脳由来二分化性グリア株であり，理化学研究所から購入した。細胞は基本培地としてMinimum Essential Mediumに10％ウシ胎児血清，1/100（v/v）ペニシリン-ストレプトマイシン溶液，0.2%　D-(+)-Glucose，５μg/ml Insulinとなるように添加した。細胞は週に１回継代し，その間に１回の培地交換を行った。

2.1.2　Alamar Blue法を用いた細胞毒性試験

継代培養したOS３細胞をトリプシン処理後，１wellあたり１×10^5cellsの割合で96wellプレートに播種し，CO_2インキュベーターで培養した。24時間後，サンプルまたはコントロールを培地量に対して1/100となるように添加して細胞に暴露した。コントロール群は溶媒である0.1％　BSA in PBSとし，サンプル群は溶媒で溶解した各種リン脂質を終濃度0.001，0.01，0.1，１，10，100 μMに調製した。サンプルリストを**Table 1** に示した。曝露24時間後と48時間後に100μｌの10％Alamar blue（AB）reagentを加えて１時間反応させた。マルチプレートリーダーを使用し，励起波長/蛍光波長は550nm/600 nmで測定した。測定した蛍光強度からコントロール群の蛍光強度を100％としたときの脂質添加群の細胞生存率を算出した。

2.2　動物実験

動物実験は「信州大学動物実験等実施規程」に基づき承認された動物実験計画（承認番号023015）に沿って行われた。

2.2.1　脊髄損傷モデルマウスの作製

脊髄損傷モデルマウス作製には８週齢のC57BL6/Nマウス（オス）を使用した。脊髄損傷

© The Ito Foundation

Table 1　Sample list

Substance name	Sample name	Maker
in vitro		
PEL*	PEL	
L-3-Lysophosphatidylethanolamine (LPE)	LPE	Olbracht Serdary Research Laboratories
1-Stearoyl-2-Hydroxy-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine (18：0 Lyso PE)	LPE (18：0)	Avanti Polar Lipids
L-α-Lysophosphatidylcholine (LPC)	LPC	FUJIFILM WAKO
1-stearoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphocholine (18：0 Lyso PC)	LPC (18：0)	Avanti Polar Lipids
1-oleoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphocholine (18：1 Lyso PC)	LPC (18：1)	Avanti Polar Lipids
1-palmitoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphocholine (16：0 Lyso PC)	LPC (16：0)	Avanti Polar Lipids
1-stearoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphate (18：0 Lyso PA)	LPA (18：0)	Avanti Polar Lipids
1-stearoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phospho-L-serine (18：0 Lyso PS)	LPS (18：0)	Avanti Polar Lipids
1-stearoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (18：0 Lyso PG)	LPG (18：0)	Avanti Polar Lipids
1-stearoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphoinositol (18：0 Lyso PI)	LPI (18：0)	Avanti Polar Lipids
in vivo		
Porcine Liver Decomposition product (PLDP)	PLDP	
L-α-Lysophosphatidylcholine (LPC)	LPC	FUJIFILM WAKO
1-oleoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphocholine (18：1 Lyso PC)	LPC (18：1)	Avanti Polar Lipids

*PEL：Substances from which only phospholipid components are extracted from PLDP.
The maximum concentration was a 20-fold dilution.

モデルの作製方法はBhalalaらの報告[10]に従って行った。0.75 mg/kgドミトール，4 mg/kgミダゾラム，5 mg/kgベトルファールとなるように生理食塩水で調製した三種混合麻酔薬をマウスに皮下注射した。麻酔下でマウスを手術台に固定・消毒後，皮膚を15～20 mm切開した。筋膜，背筋を順に切除し，脊柱を露出した。胸椎10－12番目の椎弓を鑷子で切除後，インパクター（Infinite Horizon Impactor）を使用し，50 kdyn（0.5 N），もしくは60 kdyn（0.6 N）の衝撃を与えて脊髄損傷モデルマウスを作製した。

2.2.2　投与実験と評価

実験は手術日をday 0としday14まで経過観察を行った。手術直後から1週間は1日1回，その後は2日に1回の排尿管理を行った。術直後から14日間連続で対照群には0.1% BSA in PBS，介入群には各サンプルを経口投与した。投与サンプルリストを**Table 1** に示した。投与量はヒトの認知機能改善効果を示したPLDP量をマウスの体重あたりの量に調製し，その半量である25 μl と50 μl に設定した。LPCとLPC（18：1）の濃度はPLDP中の総リン脂質濃度に一致するように0.1% BSA in PBSで調製し，さらにLPCはPLDP中の総LPC濃度に合わせたものも用意した。投与にはマイクロピペットを使用し，経口投与後，day 0（24h以内），1，3，5，7，9，11，14にマウスの動画撮影と体重測定を行った。撮影した動画から脊髄損傷モデルマウスの下肢運動機能をBasso Mouse Scale（BMS）スコア[11]を用いて，0－9の10段階で評価した。BMSスコアは左右のスコアを平均し，そのマウスの点数とした。

14日目に麻酔下で心採血と4％パラフォルムアルデヒドによる還流固定を行った。還流後，損傷部位を摘出し，さらに固定液で一晩浸透した。血液は血漿分離後，分析するまで－80℃で保存した。

固定した組織は脊髄の矢状面のパラフィン切片

© The Ito Foundation

（４ μm厚）にし，Hematoxylin-eosin（HE）染色を行った。

血漿成分中のリン脂質濃度を測定するためLabAssay™ Phospholipidを用いてリン脂質濃度をマルチモードマイクロプレートリーダー（SpectraMax iD５）で測定した。さらに血漿中のリゾリン脂質構成をリピドミクス分析した[12]。

2.3　統計解析

データの解析にはIBM SPSS Statistics 27を使用した。正規性の検定にはShapiro-Wilkの正規性の検定を用いた。２群間の差の検定では，正規性を示すデータにおいてはStudent'sの t 検定，非正規性を示すデータであればMann-WhitneyのU検定を用いた。統計的有意性については p 値が0.05未満を有意とみなした。

３．結果と考察

3.1　細胞実験

PLDPから脂質成分を抽出物したものをPELとし，このPELと各種リゾリン脂質によるOS３細胞に対する細胞増殖への影響を**Fig. 1** に示した。PELは最高濃度である１％で24時間後に30％以上の細胞増殖抑制が観察され，48時間後にはこの抑制が若干，減少していた。一方，PELの構成成分の一部である各種リゾリン脂質の細胞増殖への影響は分子種によってまちまちであった。LPE（18：０），LPC，LPC（18：1），LPC（18：０），LPG（18：０），LPI（18：０）が48時間後まで最高濃度でも細胞増殖に影響がなかったのに対し，LPE，LPC（16：０），LPA（18：０），LPS（18：０）は24時間の段階で優位の細胞増殖が抑制された。この中で48時間後に細胞増殖がより明らかに悪化したリゾリン脂質はなく，24時間とほとんど変わらなかったものがLPEとLPS（18：０）で，LPC（16：０）とLPA（18：０）は改善していた。面白いことに，LPE（18：０）では細胞増殖性に影響がないにもかかわらず，分子種が混ざった状態のLPEでは細胞増殖が強く抑制されており，分子種による脂肪酸差によっての違いが大きいことが示唆された。

3.2　動物実験

脊髄損傷モデルマウスに対するPLDPの有効性の再現性を検証した。これはPLDPの製造元が申請時と変更になったためである。まず，PLDP投与群とコントロール群で投与期間中の体重に有意な差は見られなかった（未掲載）。各サンプルの経口投与による観察最終日（day14）のBMSスコアを**Fig. 2** に示した。PLDPを25 μl 投与したPLDP群はコントロール群のBMSスコアと比較して有意に高値を示した（**Fig. 2a**；$p<0.05$）。一方で，PLDPを50 μl 投与したPLDP50群では有意な差は認められなかった（**Fig. 2b**）。また，作用物質の究明のため各リゾリン脂質にて検討を行った。PLDP中のLPC濃度に調製したLPC（**Fig. 2c**）とPLDP中のリン脂質濃度に調製したLPC（**Fig. 2d**），LPC（18：１）にて同様の実験を行ったが（**Fig. 2e**），有意な差は認められなかった。

組織学的評価を運動機能が有意に改善したPLDPを25 μl 投与したマウスに対して行った。HE染色の観察像からControl群とPLDP25群の両群において脊髄損傷の損傷中心部では組織の破壊像が確認されたが，PLDP25群は組織の破壊像が損傷中心部に限局しているのに対し，コントロール群は損傷中心部の周囲まで組織の破壊像が広範囲に広がっていた（**Fig. 3**）。

組織学的評価と同様に血液分析は運動機能が有意に改善したPLDPを25 μl 投与したマウスで行った。血漿中リン脂質濃度の測定結果からコントロール群とPLDP25群の両群間に有意な差は認められなかった（未掲載）。次に，同サンプルをリピドミクス分析により血漿中リゾリン脂質の構成成分を分析し，その結果を**Fig. 4** に示した。リ

© The Ito Foundation

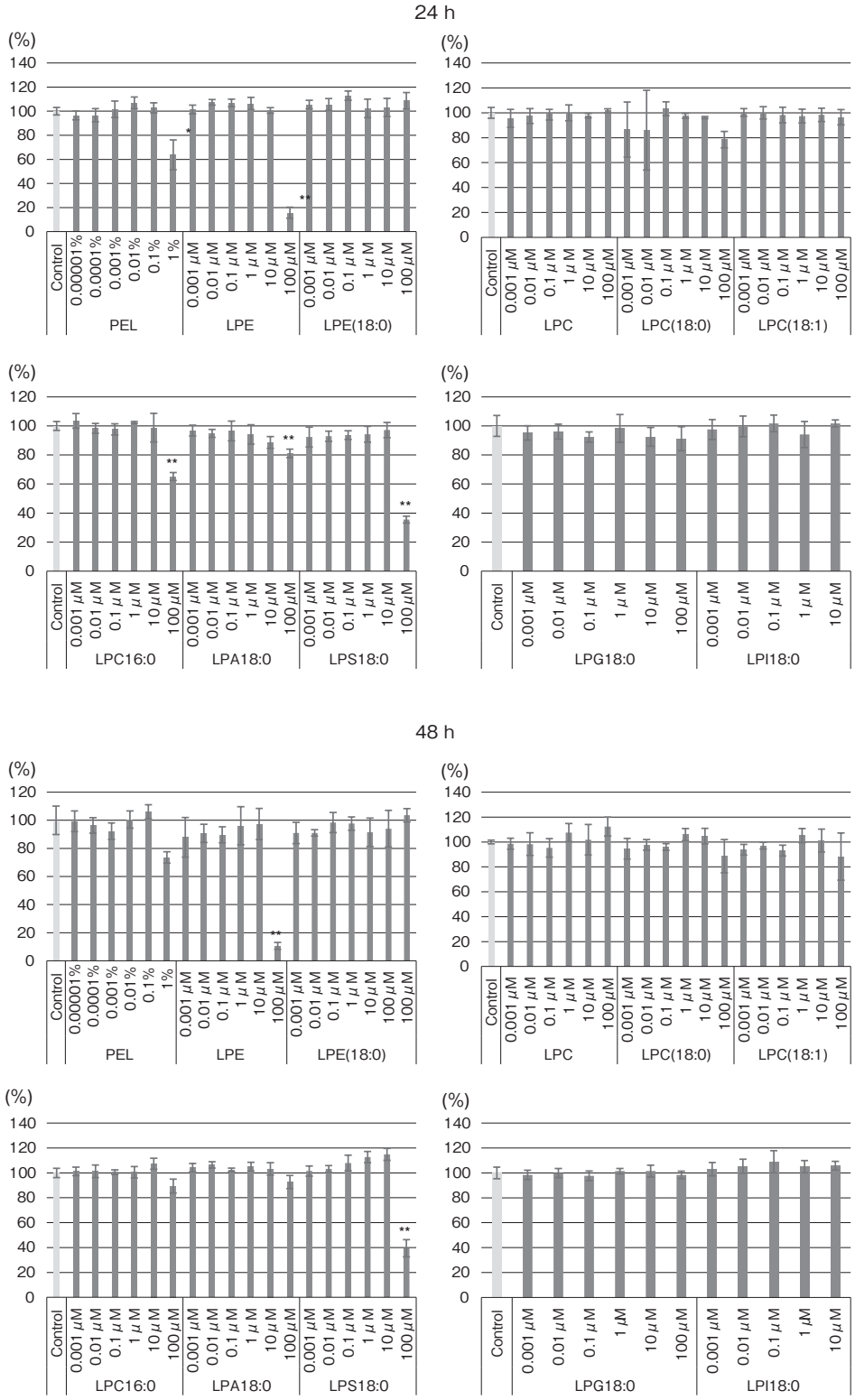


Fig. 1　Alamar blue assay for cell viability

Cell viability in OS3 cells with PEL and various lysophospholipids.

© The Ito Foundation

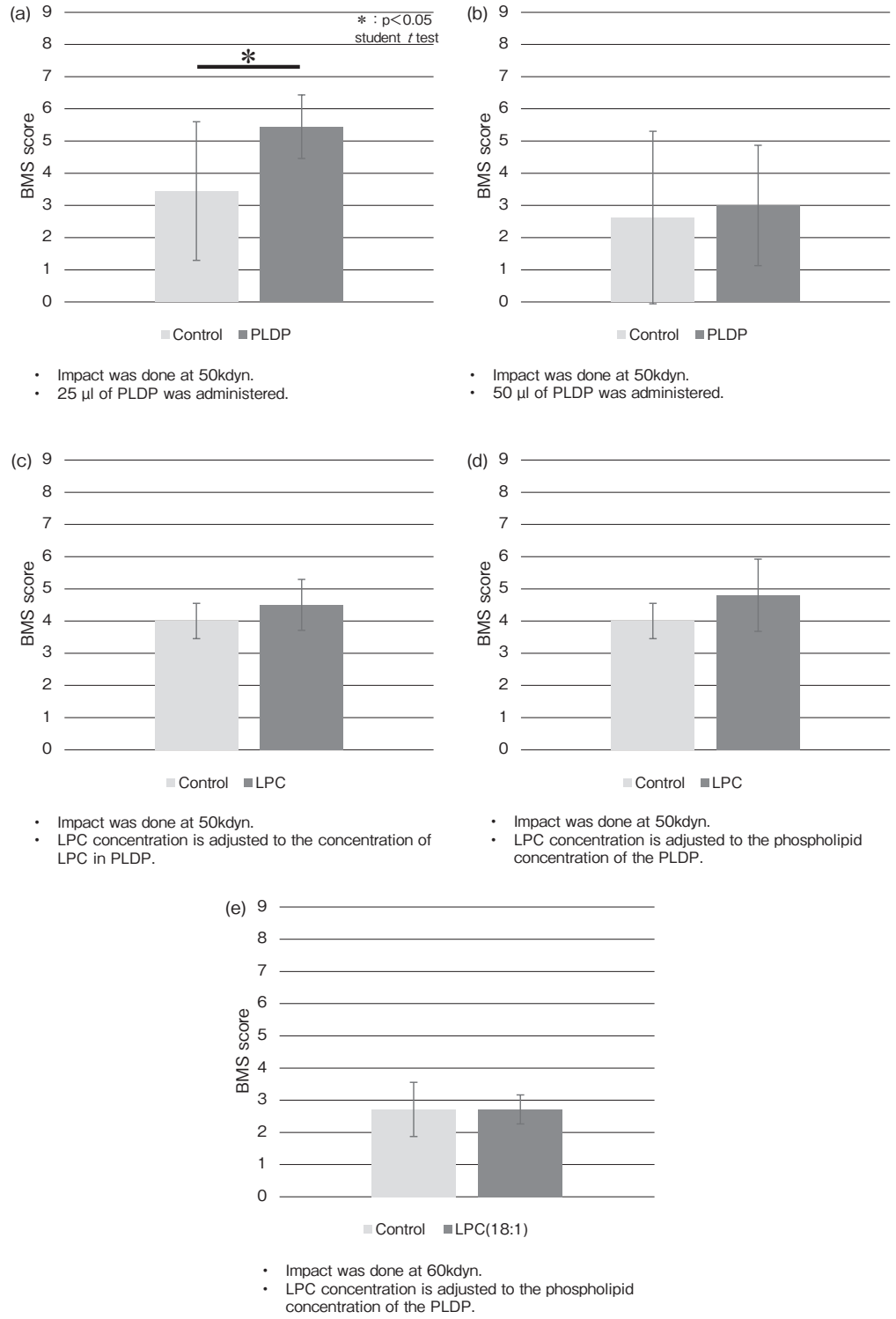


Fig. 2　Motor function assessment

BMS scores on day 14 after spinal cord injury treatment. (a) PLDP 25 μl, (b) PLDP 50 μl, (c) LPC equivalent to LPC in PLDP, (d) LPC equivalent to phospholipids in PLDP, (e) LPC（18：1）

© The Ito Foundation

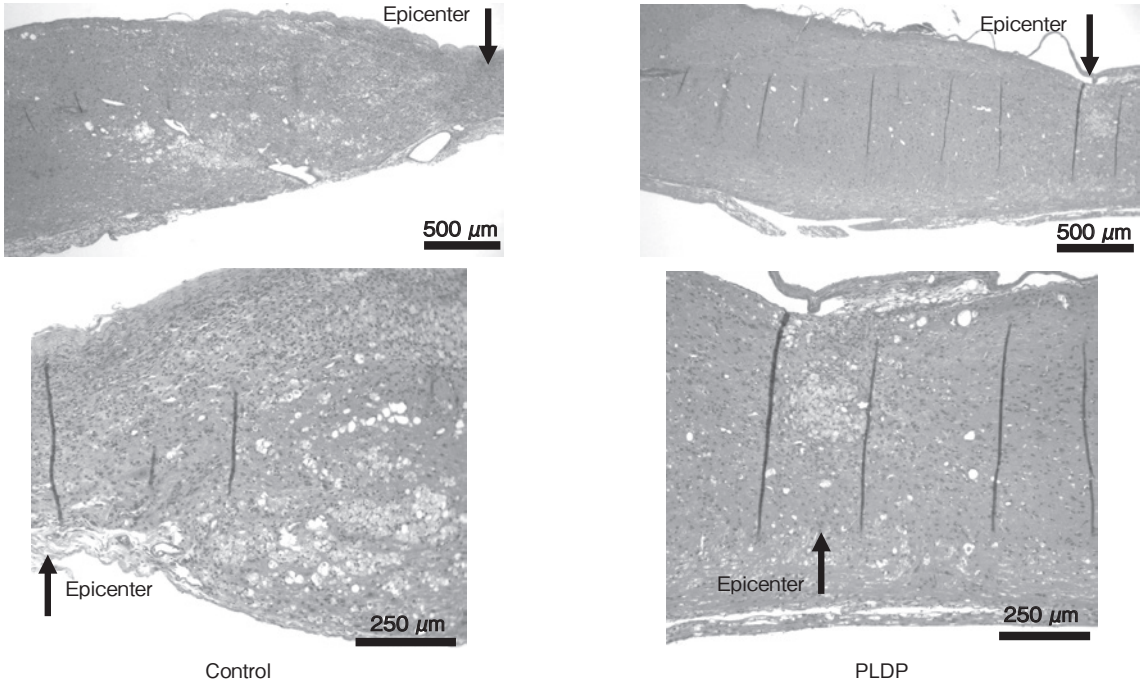


Fig. 3 Histological assessment
HE stained image of injured area of mouse 14 days after spinal cord injury treatment.

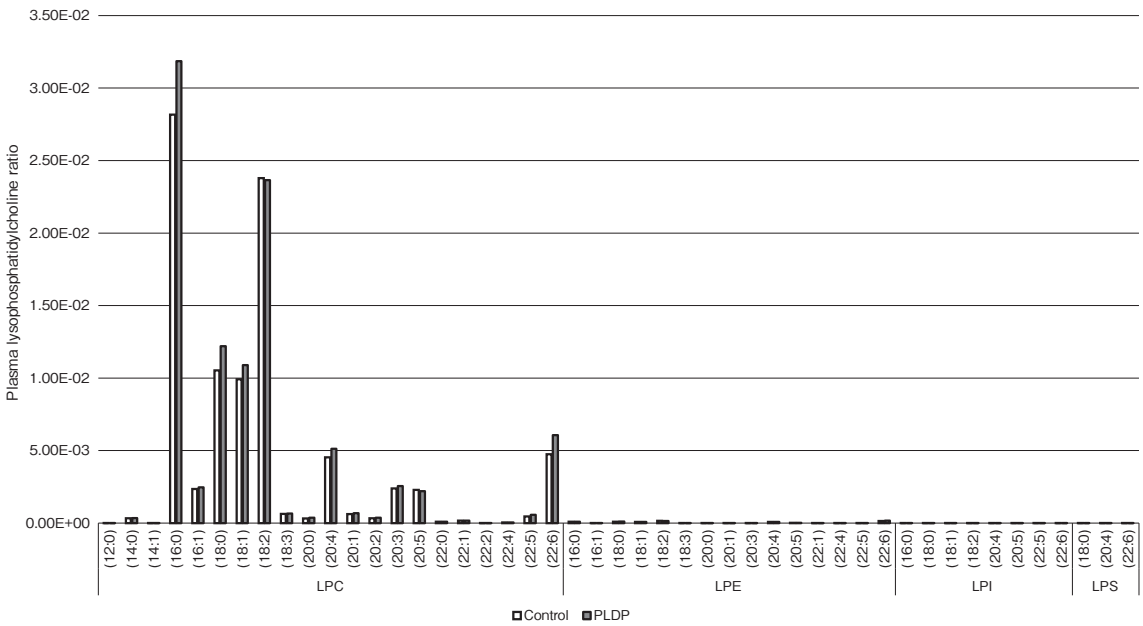


Fig. 4 Lipidomics Analysis
Composition of lysophospholipids in mouse serum 14 days after spinal cord injury treatment.

© The Ito Foundation

ピドミクスの結果から血漿中のリゾリン脂質の大部分はLPCであり，そのうちLPC（16：０）が30%，LPC（18：２）が20%以上を占めていることが判明した。また，コントロール群とPLDP群の各分子種ごとの両群間に有意な差は認められなかった。これらの結果は少なくともPLDP投与２週間後における血中リン脂質濃度やその構成成分の一部であるリゾリン脂質の構成比率に顕著な変化が認められないことが分かった。

本研究では，食用ブタ肝臓の酵素分解物を経口摂取させることで脊髄損傷マウスの運動機能改善促進効果が再現できた一方で，投与量によっては有効性が見られないという結果も示された。これはPLDPの段階では多くの成分が含まれており，それぞれの成分のポジティブな効果とネガティブな効果のトータルの結果が投与量によって変化するためと考えられる。実際，PLDPに含まれるリゾリン脂質の細胞実験結果を見ても，分子種によって細胞毒性に違いがあることから，損傷部位の再生や修復への効果も分子種ごとに異なることが予想され，現在，研究を継続している。その一方で，我々が注目したPLDPに最も多く含まれているリゾリン脂質，LPCの投与では運動機能改善促進効果は確認できなかった。LPCを優先して評価した理由としては，先行研究からミクログリア細胞への抗炎症作用[6)]や神経細胞やグリア細胞の異常活性化を抑制する作用[7)]が明らかになってことに加え，血液脳関門をLPCは通過できると考えられるからである[12)]。PLDPとして摂取されたLPCと単独経口摂取させたLPCが体内で同じ代謝を受けるかは今回の研究では明らかにできなかった。今後，ホスホリパーゼＣに分解されない合成LPCでの検討を行う予定である。

一方，我々の研究グループでは損傷部にグルタミン酸毒性抑制効果の見られたLPEを直接投与して運動機能改善促進効果を確認している[13)]。LPEは血液脳関門を通過できないためそのままでは医療応用が難しいが，損傷治療時での応用の可能性は十分にあると思われる。

４．要　　約

本研究は，ブタ肝臓の酵素処理分解物であるPLDPの経口投与が脊髄損傷モデルマウスの下肢麻痺の回復を促進するかを明らかにし，さらにその有効成分を特定することを目的とした。PLDPには多くのリン脂質成分が含まれており，その中でもリゾリン脂質が相対的に多いことが明らかになっているが，このリゾリン脂質は最近，脂質メディエーターとして注目されている。そこでまず，PLDPの脂質抽出物であるPELとリゾリン脂質の二分化性グリア細胞に対する細胞毒性を評価した。その結果，高濃度のPELおよび一部のリゾリン脂質では細胞毒性が示された。脊髄損傷モデルマウスによる評価では特定の投与量で下肢麻痺の回復促進効果が見られた一方で，PLDPに最も多く含まれているリゾリン脂質のLPCの単独投与ではこの効果は見られなかった。PLDPを２週間連続投与しても血中リン脂質濃度やリゾリン脂質の分子種に有意な差は見られず，体重にも差は見られなかった。これらの結果はPLDPによる運動機能の回復効果が単一物質によるものではなく，複合的な作用である可能性を示しており，日常的に適量のブタの肝臓の摂取は運動機能の改善に役立つ可能性がある。その一方で，LPC以外のリゾリン脂質を含む脂質成分の個別の有効性の検証は継続する必要がある。今後，さらにPLDP中に含まれる量が少ないリゾリン脂質の評価を行っていく予定である。

参考文献

１）　山崎勤，山田直史，中西徹：就実大学薬学雑誌，8，1～11, 2021.
２）　Sugai, K., Fukuzawa, R., Shofuda, T., Fukusumi,

© The Ito Foundation

H., Kawabata, S., Nishiyama, Y., Higuchi, Y., Kawai, K., Isoda, M., Kanematsu, D., Hashimoto, T. T., Kohyama, J., Iwanami, A., Suemizu, H., Ikeda, E., Matsumoto, M., Kanemura, Y., Nakamura, M., Okano, H.：*Mol Brain*, **9**, 85, 2016.
3） 緒方徹：*Jpn J Rehabil Med*, **59**, 988～993, 2022.
4） 山下敏彦：日本臨床スポーツ医学会誌，**31**, 1～5, 2023.
5） Matsuda, Y., Haniu, H., Tsukahara, T., Uemura, T., Inoue, T., Sako, K. I., Kojima, J., Mori, T., Sato, K.：*Exp Gerontol*, **141**, 111064, 2020.
6） Tsukahara, T., Hara, H., Haniu, H., Matsuda, Y.：*J Oleo Sci*, **70**, 947～954, 2021.
7） Tsukahara, T., Haniu, H., Uemura, T., Matsuda, Y.：*Sci Rep*, **10**, 3748, 2020.
8） Hisano, K., Kawase, S., Mimura, T., Yoshida, H., Yamada, H., Haniu, H., Tsukahara, T., Kurihara, T., Matsuda, Y., Saito, N., Uemura, T.：*Biochem Biophys Res Commun*, **534**, 179～185, 2021.
9） Hisano, K., Yoshida, H., Kawase, S., Mimura, T., Haniu, H., Tsukahara, T., Kurihara, T., Matsuda, Y., Saito, N., Uemura, T.：*J Biochem*, **170**, 327～336, 2021.
10） Bhalala, O. G., Pan, L., North, H., McGuire, T., Kessler, J. A.：*Bio Protoc*, **3**, e886, 2013.
11） Basso, D. M., Fisher, L. C., Anderson, A. J., Jakeman, L. B., McTigue, D. M., Popovich, P. G.：*J Neurotrauma*, **23**, 635～59, 2006.
12） Tsukahara, T., Sasaki, M., Haniu, H., Matsuda, Y.：*Biochem Biophys Res Commun*, **676**, 91～96, 2023.
13） 小谷泰士：信州大学大学院総合理工学研究科生命医工学専攻修士論文，2024.

© The Ito Foundation

食肉・食肉製品中の亜鉛プロトポルフィリンIX形成におけるフェロケラターゼの作用機序の解明

Elucidation of mechanism which ferrochelatase acts to form zinc protoporphyrin IX in meat and meat products

若松　純一[1]・奥村　崚太[2]・阿部　　悠[3]

（[1]北海道大学大学院農学研究院，[2]北海道大学農学部，[3]北海道大学大学院農学院）

Jun-ichi Wakamatsu[1], Ryota Okumura[2] and Haruka Abe[3]

（[1]Research Faculty of Agriculture, [2]Faculty of Agriculture, [3]Graduate School of Agriculture, Hokkaido University）

Zinc protoporphyrin IX (ZnPP) is a bright red pigment formed in Parma ham. Regarding the mechanism of ZnPP formation, the ferrochelatase (FECH) is thought to be involved in iron-removal from heme and zinc-insertion into PPIX. Since the optimal pH for iron-removal with FECH almost matches the pH of Parma ham (around 6.0), FECH is thought to be involved in iron-removal in the formation of ZnPP in Parma ham, but there has not been sufficient discussion taking into consideration in meat yet. The objective of this study was to clarify the contribution of FECH to iron-removal and zinc-insertion on ZnPP formation in meat. Regarding the contribution of FECH to iron-removal, PPIX was formed with a peak at pH 5 when EDTA was added. Incubation under aerobic conditions or addition of n-MMP (FECH inhibitor) significantly reduced the amount of PPIX formed at pH 4.5–5.5. The decrease in the amount of PPIX formed was thought to be due to inhibition of the enzymatic activity of FECH by oxygen and n-MMP, suggesting that FECH contributes to iron-removal in the formation of ZnPP in meat. Regarding the contribution of FECH to zinc-insertion, when the dissociation of endogenous heme was inhibited by the addition of carbon monoxide or $NaNO_2$ and exogenous PPIX was added, the amount of ZnPP formed at pH 7.5 to 8.5 in the $NaNO_2$ addition group was significantly reduced. Since $NaNO_2$ inhibited not only heme dissociation but also the enzymatic activity of FECH, the decrease in the amount of ZnPP formed at this pH was thought to be due to inhibition of FECH, but at around pH 5.5 there is no difference in the amount of ZnPP formed. The above results revealed that FECH in meat does not contribute to zinc-insertion into PPIX but contributes to iron-removal from heme to form ZnPP.

1．目　　的

パルマハムは北イタリアのパルマ地方で生産される乾塩漬生ハムで，発色剤を使用しないにも関わらず鮮やかな赤色を呈する。このパルマハムにおける発色は，海塩に含まれる硝酸塩により生成されるニトロシルミオグロビンに起因すると考えられていた。しかし，パルマハム中の色素は，既知のミオグロビン誘導体とは異なり[1)]，亜鉛プロトポルフィリンⅨ（ZnPP）であることが明らか

© The Ito Foundation

にされた[2)]。ZnPPは生体中にはほとんど存在しないことから，パルマハムの一年以上にわたる熟成中に形成されると考えられている[2, 3)]。このため，発色剤を使用しない食肉製品の色調改善技術としてZnPPの形成促進が期待され，ZnPP形成促進が提唱されてきたが[4)]，完全には明らかになっていない。

ZnPP形成における脱鉄と亜鉛挿入にはフェロケラターゼ（FECH）の関与が考えられているが[5)]，その関与については十分に議論されていない。FECHはプロトポルフィリンIX（PPIX）に鉄を挿入するヘム生合成の終末酵素で[6)]，PPIXに鉄以外の二価金属イオンも挿入することから[7)]，ZnPP形成の亜鉛挿入に関与すると考えられてきた[8, 9)]。一方で，非酵素的にPPIXに亜鉛が挿入されたという報告から[10)]，ZnPP形成における亜鉛挿入にはFECHによる反応と非酵素反応の両者が存在するとも考えられている[4)]。また，FECHによる亜鉛挿入の至適pHは7.8～8.0であり[11)]，パルマハムのpHである6.0付近[12)]における活性は低い[11)]。このため，パルマハム中のZnPP形成においてFECHが亜鉛挿入に寄与するかについては疑問が残る。

一方で，FECHはヘムから脱鉄し，PPIXを生成することが報告された[5)]。この脱鉄反応の至適pHは5.5～6.0であり[11, 13)]，パルマハムのpHと近いことから，近年はパルマハム中のZnPP形成においてFECHは脱鉄に関与すると考えられている[4)]。しかし，Chauらの報告[11, 13)]は食肉中のFECHではなく，豚や酵母由来の組み換えFECHを用いて行われた。哺乳類のFECHは活性部位の周辺に2Fe-2Sクラスターを有するが[14)]，組み換えFECHではこのクラスターの存在が確認されていないため，その活性については疑問が残る。このため，パルマハム中のZnPP形成におけるFECHの脱鉄への寄与については食肉の環境下で検証する必要があり，脱鉄ではヘムからのPPIX形成，亜鉛挿入ではPPIXからのZnPP形成におけるFECHの活性の阻害の影響を評価する必要がある。

食肉において，ZnPPはヘムタンパク質からの一連の反応により形成されるため，ZnPP形成における脱鉄および亜鉛挿入反応を観察するには，ヘムタンパク質などの内因性の影響を排除してZnPPを形成させる必要がある。ヘムタンパク質からヘムの解離を阻害する物質として，ヘムを非常に安定にする一酸化窒素（NO）が知られている[15)]。同様に一酸化炭素（CO）もヘムの解離を阻害するが[16)]，COはNOとは異なりFECHの2Fe-2Sクラスターを崩壊させないことが報告されている[17)]。このため，モデル実験系においてヘムの解離を阻害し，外因性の基質を添加することでZnPP形成における脱鉄および亜鉛挿入反応について検討できると考えられる。そこで本研究では，食肉のZnPP形成における脱鉄および亜鉛挿入へのFECHの寄与を明らかにすることを目的とし，脱鉄ではヘムからのPPIX形成，亜鉛挿入ではPPIXからのZnPP形成において，外因性の基質に対するFECHの活性の阻害の影響を評価した。

2．方　法

2.1　モデル実験系

2.1.1　ポルフィリン試薬の調製

ヘミン（Sigma Aldrich）は少量の５％アンモニア溶液に溶解させ，N，Nジメチルホルムアミド（DMF，富士フイルム和光純薬）で１mMとなるようにメスアップした。PPIX（Sigma Aldrich）は少量の１M HClに溶解させ，同様にDMFで１mMとなるようにメスアップした。n－メチルメソポルフィリン（n-MMP，Cayman Chemical）は５mMとなるように10mM KOHエタノール（１：１）に溶解させた。各試薬は調製後，遮光チューブに分注して－20℃で冷凍保存した。

© The Ito Foundation

2.1.2　モデル試料の調製およびインキュベート

モデル実験系は，Wakamatsuらの方法[18]を一部改変して行った。豚最長筋（終濃度20％（w/v））に純水を加え，ホモジナイズ（10,000 rpm，90秒間，氷冷下）後，抗生物質溶液を終濃度がゲンタマイシン硫酸塩100 μg/ml，ベンジルペニシリンGカリウム70 μg/ml，ストレプトマイシン硫酸塩250 μg/mlとなるように添加した。pHを１M塩酸または１M水酸化ナトリウムを用いて調整後，PPIX形成を観察するモデル試料にはEDTA（終濃度１mM），外因性ヘムからの脱鉄反応を観察するモデル試料にはヘミン（終濃度10 μM），外因性PPIXからの亜鉛挿入反応を観察するモデル試料にはPPIX（終濃度10 μM），FECH阻害の影響を観察するモデル試料にはn-MMP（終濃度10 μM）を添加した。すべての試験区で総量が１mlとなるように試験管に分注した。ヘムタンパク質からヘムの解離を抑えるモデル試料には一酸化炭素（CO，ジーエルサイエンス）を２倍容，またはNO源として$NaNO_2$（終濃度100 μM）を添加した。なお，ヘミン，COおよび$NaNO_2$を添加したモデル試料には還元剤としてアスコルビン酸緩衝液（pH5.5）を終濃度が10 mMとなるように，pH調整前に添加した。モデル試料はハイバリア専用保存袋（アズワン）に酸素吸収剤（アズワン）とともに入れて密封し，25℃の暗所で５日間インキュベートした。有酸素状態でのZnPP形成を観察するモデル試料では酸素吸収剤を入れずにインキュベートした。

2.1.3　ZnPPとPPIXの抽出および蛍光強度の測定

ZnPPおよびPPIXの抽出は，モデル試料に３倍量（v/v）のアセトンを混合し，４℃の冷暗所で30分間静置した。ろ過後，蛍光分光光度計を用いて蛍光強度を測定した。励起波長420 nmにおける波長590 nmの蛍光強度から，ベースラインを補正するため波長570 nmと610 nmにおける蛍光強度の平均値を引いた値をZnPP形成量とした。同様に励起波長400 nmにおける波長630 nmの蛍光強度から波長610 nmと650 nmにおける蛍光強度の平均値を引いた値をPPIX形成量とした。

2.2　統計処理

JMP®17（SAS）を用いて，ｔ検定またはTukeyの多重比較検定によって有意差検定を行い，$p<0.05$で統計学的に有意とした。

3．結果と考察

3.1　FECHの脱鉄への寄与

FECHの脱鉄への寄与についてEDTAを添加したところ，pH５をピークにPPIXが形成された（**Fig. 1**）。好気条件でインキュベートまたはn-MMPを添加すると，pH4.5～5.5におけるPPIX形成量が大幅に減少した（**Fig. 1**）。酸素およびn-MMPはFECHを阻害することから，PPIX形成量の減少はFECHの阻害に起因すると考えられ，FECHは食肉中のZnPP形成における脱鉄に寄与することが示唆された。

ZnPP形成における脱鉄へのFECHの寄与を検証するため，ヘミンを添加してヘムからのPPIX形成に及ぼすFECHの活性の阻害の影響を観察した（**Fig. 2**）。ヘミンを添加したところ，嫌気的条件下ではPPIX形成に伴うpH5.5に大きなピークとpH７に小さなピークの２つをピークが見られたが，好気条件下ではこれらのpHにおけるPPIX形成量の増加は見られず，ヘミン無添加区のpH4.5～5.0におけるZnPP形成量よりも低かった。FECHの脱鉄の至適pHは5.5～6.0であることから[11, 13]，ヘミンの添加によるpH5.5の高いPPIX形成はFECHの活性に由来すると考えられた。一方，pH７ではヘムの解離が起こりにくいと考えられるため，このpHに見られるピークについては添

© The Ito Foundation

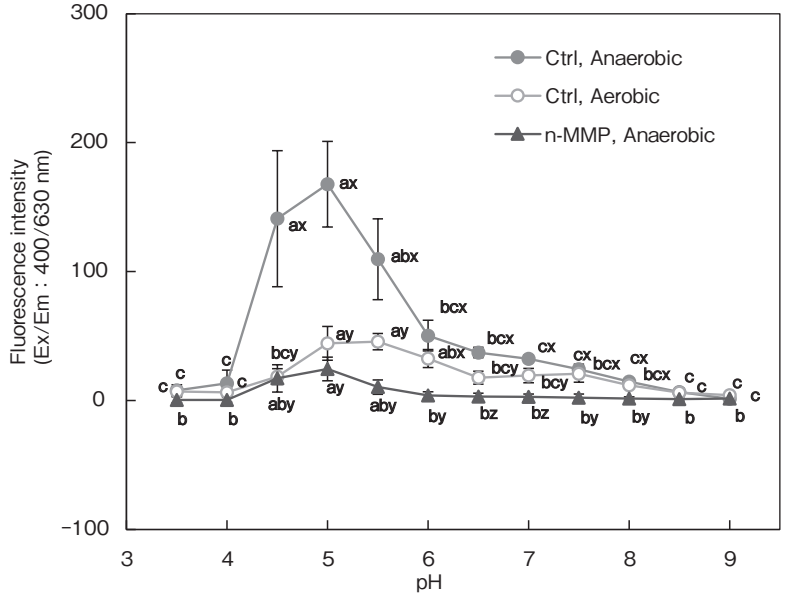


Fig. 1　Effect of the inhibition of FECH on PPIX formation in pork homogenate at various pH

Porcine longissimus homogenates (with or without n-MMP) containing EDTA adjusted to each pH were incubated anaerobically or aerobically at 25℃ for 5 days. PPIX was extracted with 75% acetone and the fluorescence intensity was measured. Error bars indicate standard error (n = 3). a, b, c : A significant difference is indicated between different characters among the same group ($p<0.05$). x, y, z : A significant difference is indicated between different characters at the same pH ($p<0.05$).

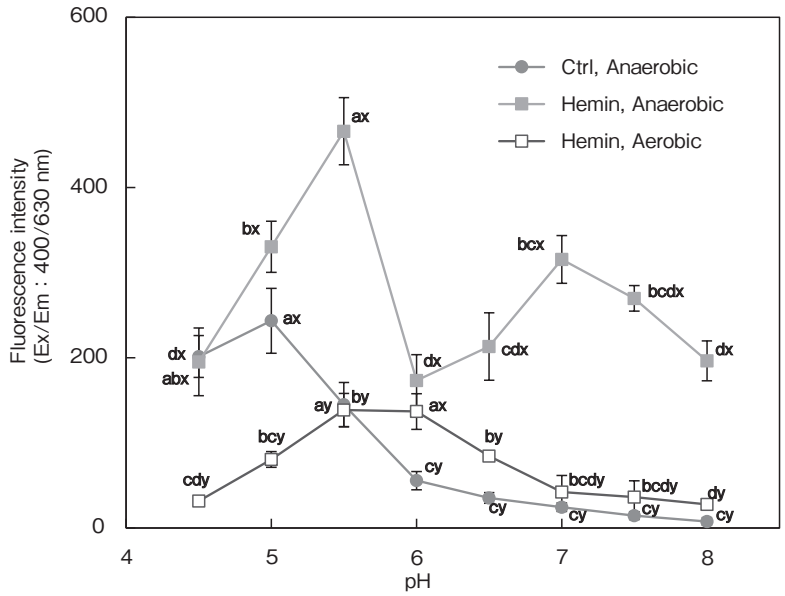


Fig. 2　Effects of hemin and oxygen on PPIX formation in pork homogenate at various pH

Porcine longissimus homogenates (with or without hemin) containing EDTA adjusted to each pH were incubated anaerobically or aerobically at 25℃ for 5 days. PPIX was extracted with 75% acetone and the fluorescence intensity was measured. Error bars indicate standard error (n = 3). a-d : A significant difference is indicated between different characters among the same group ($p<0.05$). x, y : A significant difference is indicated between different characters at the same pH ($p<0.05$).

© The Ito Foundation

加したヘミンによるものだと考えられた。中性付近はPPIXへの亜鉛の挿入の至適pHであることから，試薬ヘミン中の脱鉄によるPPIXの混入と亜鉛挿入によるZnPP形成の可能性もあるため，今後も検討を行う必要がある。

3.2　FECHの亜鉛挿入への寄与

モデル実験系においてCOおよび$NaNO_2$を添加してヘムの解離を阻害し，PPIXを添加することで外因性PPIXからのZnPP形成におけるFECHの活性の阻害の影響を検討した（**Fig. 3**）。その結果，CO添加区では高pHにおいても一定量のZnPPが形成されたが，$NaNO_2$添加区ではpHが６より高くなると減少し，pH7.5～8.5においてCO添加区と$NaNO_2$添加区で有意な差が見られた。COはFECHの2Fe-2Sクラスターを崩壊させないのに対し[17]，NOはFECHの2Fe-2Sクラスターを崩壊させることでFECHの活性を阻害することが報告されている[19]。各添加区で有意な差が見られたpHはFECHの亜鉛挿入の至適pH7.8～8.0と一致しているため[11, 13]，このpHにおけるZnPP形成量の減少はFECHの酵素活性の阻害に起因すると考えられる。また，ZnPP形成におけるPPIXへの亜鉛挿入については，FECHが存在しない有機溶媒中でPPIXに亜鉛が挿入されたことや[10]，モデル実験系において好気条件下でもPPIXに亜鉛が挿入されたことから[20]，酵素反応だけでなく非酵素反応の存在も考えられている[4]。今回の実験では，パルマハムのpHである６付近では，FECHの活性が阻害されていると考えられる$NaNO_2$添加区においても一定量のZnPPが形成され，CO添加区と$NaNO_2$添加区で有意な差は見られなかった。この結果により，パルマハムのpHにおいてPPIXへの亜鉛挿入は非酵素反応によって起こることが示唆された。

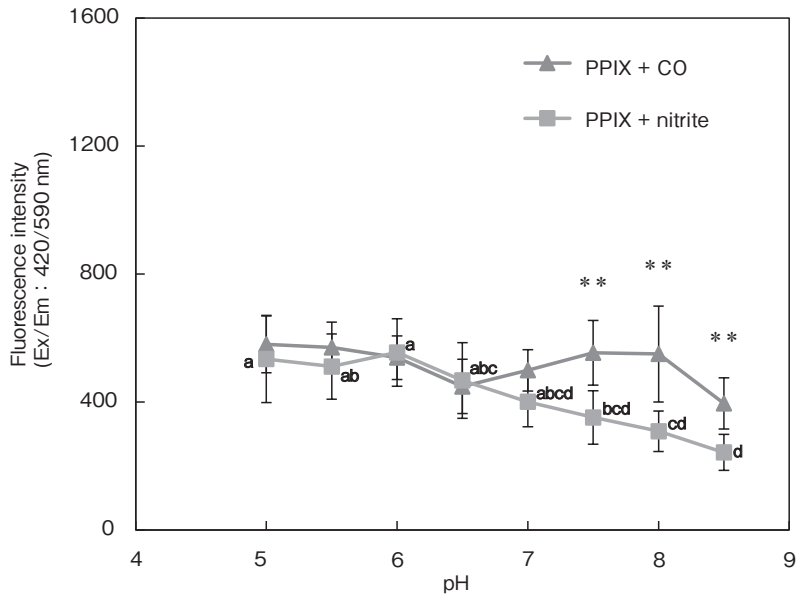


Fig. 3　Effects of CO and nitrite on ZnPP formation from exogeneous PPIX in pork homogenate at each pH

Porcine longissimus homogenate containing exogenous PPIX and CO/nitrite adjusted to each pH was incubated anaerobically at 25℃ for 5 days. ZnPP was extracted with 75% acetone and the fluorescence intensity was measured. Error bars indicate standard errors（n＝3～7）. a-d： A significant difference is indicated between different characters among the same group（$p < 0.05$）. ＊＊：A significant difference is indicated at the same pH（$p < 0.01$）.

© The Ito Foundation

以上より，pH６前後の一般的な食肉付近のpHではFECHはヘムからの脱鉄に寄与し，PPIXへの亜鉛挿入には寄与しないでZnPPが形成されることが明らかになった。

４．要　約

亜鉛プロトポルフィリンⅨ（ZnPP）はパルマハムで形成される赤色色素である。発色剤を使用しない食肉製品の色調改善技術としてZnPPの形成促進が期待されるが，その形成機構は完全には明らかになっていない。ZnPP形成機構について，ヘムからの脱鉄およびPPIXへの亜鉛挿入には，フェロケラターゼ（FECH）の関与が考えられている。FECHの脱鉄の至適pHはパルマハムのpH（6.0付近）と一致するため，パルマハム中のZnPP形成においてFECHは脱鉄に関与すると考えられるが，食肉の環境を考慮した議論は十分に行われていない。そこで本研究では，食肉中のZnPP形成における脱鉄および亜鉛挿入へのFECHの寄与を明らかにすることを目的とした。FECHの脱鉄への寄与についてEDTAを添加したところ，pH５をピークにPPIXが形成された。FECHを阻害すると，pH4.5～5.5におけるPPIX形成量が大幅に減少し，FECHは食肉中のZnPP形成における脱鉄に寄与することが示唆された。FECHの亜鉛挿入への寄与についてはCOまたは$NaNO_2$の添加により内因性のヘムの解離を阻害し，外因性のPPIXを添加したところ，$NaNO_2$添加区のpH7.5～8.5におけるZnPP形成量が有意に減少した。$NaNO_2$はヘムの解離だけでなくFECHの酵素活性も阻害することから，当該pHにおけるZnPP形成量の減少はFECHの酵素活性の阻害に起因すると考えられるが，pH5.5付近ではZnPP形成量に違いがなかったことから，FECHは食肉中のZnPP形成における亜鉛挿入に寄与しないことが示唆された。以上より，食肉中では，FECHはPPIXへの亜鉛挿入には寄与せず，ヘムからの脱鉄に寄与することでZnPPが形成されることが明らかになった。

文　献

1）Morita, H., Niu, J., Sakata, R., Nagata, Y.：*J. Food Sci.*, **61**, 1021～1023, 1996.
2）Wakamatsu, J., Nishimura, T., Hattori, A.：*Meat Sci.*, **67**, 95～100, 2004.
3）Adamsen, C. E., Møller, J. K. S., Laursen, K., Olsen, K., Skibsted, L. H.：*Meat Sci.*, **72**, 672～679, 2006.
4）Wakamatsu, J.：*Meat Sci.*, **192**, 108905, 2022.
5）Taketani, S., Ishigaki, M., Mizutani, A., Uebayashi, M., Numata, M., Ohgari, Y., Kitajima, S.：*Biochemistry*, **46**, 15054～15061, 2007.
6）Ferreira, G. C., Franco, R., Lloyd, S. G., Moura, I., Moura, J. J., Huynh, B. H.：*J. Bioenergetics Biomembranes*, **27**, 221～229, 1995.
7）Taketani, S., Tokunaga, R.：*Eur. J. Biochem.*, **127**, 443～447, 1982.
8）Ishikawa, H., Yoshihara, M., Baba, A., Kawabuchi, T., Sato, M., Numata, M., Matsumoto, K.：*Journal of the Faculty of Agriculture Kyusyu University*, **51**, 93～97, 2006.
9）Parolari, G., Benedini, R., Toscani, T.：*J. Food Sci.*, **74**, C413–C418, 2009.
10）Becker, E. M., Westermann, S., Hansson, M., Skibsted, L. H.：*Food Chem.*, **130**, 832～840, 2012.
11）Chau, T. T., Ishigaki, M., Kataoka, T., Taketani, S.：Biosci. *Biotechnol. Biochem.*, **74**, 1415～1420, 2010.
12）Abe, H., Zhai, Y., Toba, Y., Masumo, H., Hayakawa, T., Kumura, H., Wakamatsu, J.：*Food Chem.*, **441**, 138317, 2024.
13）Chau, T. T., Ishigaki, M., Kataoka, T., Taketani, S.：*J. Agric. Food Chem.*, **59**, 12238～12245, 2011.
14）Wu, C.-K., Dailey, H. A., Rose, J. P., Burden, A., Sellers, V. M., Wang, B.-C.：*Nat. Struct. Biol.*, **8**, 156～160, 2001.
15）Radi, R.：*Chem. Res. Toxicol.*, **9**, 828～835, 1996.
16）Xu, H., Zhang, Y., Chen, L., Li, Y., Li, C., Liu, L., Ogura, T., Kitagawa, T., Li, Z.：*RSC Adv.*, **6**, 43707～43714, 2016.
17）Sellers, V. M., Johnson, M. K., Dailey, H. A.：*Biochemistry*, **35**, 2699～2704, 1996.
18）Wakamatsu, J., Okui, J., Ikeda, Y., Nishimura, T., Hattori, A.：*Meat Sci.*, **68**, 313～317, 2004.
19）Weerth, R. S., Medlock, A. E., Dailey, H. A.：*J. Biol. Chem.*, **297**, 101017, 2021.
20）Kauser-Ul-Alam, M., Hayakawa, T., Kumura, H., Wakamatsu, J.：*Meat Sci.*, **176**, 108467, 2021.

© The Ito Foundation

食肉加水分解物の栄養機能について（Ⅲ）

Nutritional function of meat hydrolysates（Ⅲ）

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 this study, we found that chicken breast meat hydrolysate has high DPPH inhibition activity, high ACE inhibitory activity, and high DPP-IV inhibitory activity, and contains essential amino acids and functional peptides such as BCAA and imidazole dipeptides. Therefore, we produced the hydrolyzed chicken meat pellet (CMP) from chicken breast meat hydrolysate powder. 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. Currently, we are purifying functional peptides that express ACE inhibitory and DPP-IV inhibitory activity from the 3k-fraction of CMP solution and identifying the novel functional peptides.

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年度の研究助成により研究・開発を開始した。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]。次いで伊藤記念財団令和４年度の研究助成により，食肉加水分解物に含まれる新たな生理機能を検索した結果，食肉加水分解物には抗酸化作用や血圧降下作用のほかにジペプチジルペプチダーゼIV（DPP-IV）を阻害して血糖調節作用を発現する機能性ペプチドが豊富に含まれていることを明らかにした[17]。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鶏肉加水分解物錠剤（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週間後に筋力（握力）の増加および疲労の軽減効果を認めた[17]。

そこで本年度の研究では，各種食肉加水分解物に含まれる血糖値上昇抑制効果や血圧降下作用を有する機能性ペプチドの分画やCMPからのDPP-IV阻害活性やACE阻害活性を有するペプチドの精製を試みた。さらに，CMPを摂取したときのヒトに対する血糖上昇抑制効果解析実験を行ったので得られた結果を記述するとともに，食肉の栄養機能に関する一連の研究により得られた研究成果を取りまとめて報告する。

2．方　法

2.1　各種食肉加水分解物および鶏肉加水分解物錠剤（CMP）の生理機能発現に関与するペプチドの分画と精製

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　各種食肉の酵素処理とCMPの調製

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分間反応させた後に100℃で２分間加熱して酵素を失活させた。そ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（7,000 rpm, 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チキンミートドリンクの粉末化と，それを用いた錠剤化（鶏肉加水分解物錠剤：CMP）は，マルナカフードにより

© The Ito Foundation

行われた。

2.1.3　各種食肉加水分解物およびCMP溶解液の限外ろ過膜による分画

各種食肉加水分解物とCMP溶解液の栄養機能解析のため，それらの試料を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。さらに，それらのろ液を限外ろ過膜（Amicon Ultra Centrifuge Filter，10 kDaと３kDa）を用いて分子量10,000以下と分子量3,000以下の画分に分画して実験に用いた。

2.1.4　タンパク質の定量

タンパク質の定量はBiuret法[18]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：540 nm）にて測定した。また，分解物であるペプチドについてはUV法[19]を適用し，測定を行った。

2.1.5　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[20]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，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-IV Enzyme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360 nm，蛍光波長460 nm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）×100

2.1.6　アンギオテンシンⅠ変換酵素（ACE）阻害活性の測定

CushmanとCheungの方法[21]に準じて測定した。ACEはウサギ肺由来アンギオテンシンⅠ変換酵素（ACE, Peptidyl dipeptidase, EC 3.4.1 5.1，シグマ社）を用い，0.25 Mホウ酸緩衝液（pH8.3）で60 unit/mlに調整し，測定時には0.25 Mホウ酸緩衝液（pH8.3）で１unit/mlに希釈し使用した。ACEとの反応基質としては合成基質であるヒプリル-Ｌヒスチジル-Ｌロイシン（HHL，ナカライテスク社）を使用した。このHHLを塩化ナトリウム（和光純薬工業），0.25Ｍホウ酸緩衝液（pH8.3）をそれぞれ0.608 M，0.1 Mになるように Milli-Q水を用いて調整した溶液で溶解した。

試料６μｌに１unit/mlのACE溶液20 μｌおよび7.6 mM HHL溶液50 μｌを添加し37℃で30分間反応させた。反応は0.1 N HCl（和光純薬工業）554 μｌを加えて停止させた。反応後には酢酸エチル（ナカライテスク）1.5 mlを加えてACEの作用により遊離した馬尿酸を振とう抽出し，2,500 rpm，15分間遠心分離を行った。上清の酢

© The Ito Foundation

酸エチル層を１ml分取し，100℃，10分間の加熱により蒸発乾固させた。乾固した馬尿酸を回収するために１MのNaCl溶液を１ml加えボルテックスを行った。溶解した馬尿酸の吸光度を228nmで測定した。

阻害率は試料の吸光度をS，試料の代わりにMilli-Q水を加えた時の吸光度をC，あらかじめACEを失活させてから反応させた時の吸光度をBとして次式より求めた。得られたACE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（％）＝｛(C－S/C－B)｝×100

2.1.7　ゲルろ過高速液体クロマトグラフィー（Gel Filtration-HPLC）

展開液は50 mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.0），300 mM NaCl，１mM NaN_3を用いた。分析中は溶離液を脱気装置（DGU-14A，島津製作所（株））に通し，カラムはTSK-GEL G 2000SWXL（7.8×300 mm）（東ソー株式会社），送液ポンプはLC-20AD（島津製作所（株））を用い，流速1.0 ml/min，注入量20 μl で行った。検出器（SPD-10AVP，島津製作所（株））を用い，225 nmの検出波長でペプチドの検出を行った。分子量マーカーは，アプロチニン（MW：6,500），オキシトシン（MW：1,007），リボフラビン（MW：376）を用いた。

2.1.8　逆相高速液体クロマトグラフィー（Reverse Phase-HPLC）

展開液は0.1％トリフルオロ酢酸（TFA：trifluoroacetic acid）を用い，溶離液としてアセトニトリルを含む0.1％TFA（0.1％TFA，０％～50％濃度勾配をもつアセトニトリル）を用いた。カラムはInertsil ODS-２（7.6×250 mm）（ジーエルサイエンス），送液ポンプはLC-20AD（島津製作所（株））を用い，流速1.0 ml/min，カラム温度40℃で行った。

2.2　鶏肉加水分解物錠剤（CMP）のヒトに対する血糖上昇抑制効果解析

2.2.1　対象者

対象は南九州大学の健常な女子学生で，研究内容を説明し同意が得られた学生２名とし，それぞれの値は平均値±標準偏差で表した（年齢22.5±0.5歳，身長161.3±5.7 cm，体重55.1±3.2 kg，体脂肪率28.6±3.1，収縮期血圧109±７mmHg，拡張期血圧70±１mmHg,）。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経て実施した。試験において，耐糖能異常のある者，摂取食品のアレルギーのある者，他の臨床試験に参加中の者，生活リズムが不規則な者，その他，不適当と判断した者は除外した。

2.2.2　試験食

試験食は，鶏肉加水分解物錠剤（CMP），サトウのごはん（佐藤食品工業株式会社）（米飯）とした。CMPの栄養成分（10粒（2.8ｇ）当たり）は，熱量10.4 kcal，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，米飯の栄養成分（使用量150ｇ）は，熱量220.5 kcal，タンパク質が3.15ｇ，脂質が０ｇ，炭水化物が50.85ｇ，食塩相当量が０ｇであった（栄養成分は製造者が示した数値）。米飯は電子レンジ（Panasonic製NE-FL100）500 Wで２分加熱後150ｇ量り取り，室温にて５分間静置したのち，試験食とした。

2.2.3　測定項目

１）身長，体重，体脂肪率，血圧

１回目試験前に身長はYG-200（株式会社ヤガミ），体重および体脂肪率は体組成計HBF-255T（オムロンヘルスケア株式会社），血圧はデジタル自動血圧計HEM-1000（オムロンヘルスケア株式会社）で測定した。

２）血糖値

血糖測定は，自己検査用グルコース測定器ニプ

© The Ito Foundation

ロフリースタイルフリーダムライト（ニプロ株式会社）を使用して，指先より自己測定した。

2.2.4　試験プロトコール

被験者は試験日前日21時から水以外は絶飲食とし，激しい運動はひかえた。試験当日は終了まで座位で静かに過ごした。同一の被験者で米飯のみ摂取する場合と，CMPを10粒摂取直後から５分経過後米飯を摂取（以下，CMP10-5），CMPを20粒摂取直後から５分経過後米飯を摂取（以下，CMP20-5），CMPを20粒摂取直後から30分経過後米飯を摂取（以下，CMP20-30）の合計４とおりとした。CMPは200 ml程度の水で摂取した。血糖値は試験日当日朝指先から0.3μl（血液玉直径約１mm）の血液を採取し自己測定した（摂取前）。米飯摂取後は15，30，45，60，90，120分の合計７回自己測定した。米飯摂取は合計10分間とし，一口30回程度咀嚼してから嚥下した。摂食中の水分摂取量は180 ml程度とした。試験間隔は６日以上置いた。

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に含まれる機能性ペプチドの分画と精製

近年，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[22, 23]。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，昨年度の研究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結果，食肉加水分解物にもDPP-IV阻害活性を示すペプチドが含まれており，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を報告した[17]。

そこで，DPP-IV阻害活性を示すペプチドが多く含まれる分子量域を検索する目的で，限外ろ過膜による分画を試みた。まず，各種食肉加水分解物やCMP錠剤の溶解液を0.45μmの膜で不溶物をろ過したろ液（Hydrolysate）を調製した。次いで，そのろ液を限外ろ過膜（10 kDa）でろ過したろ液（10 k-fraction）と限外ろ過膜（３kDa）でろ過したろ液（３k-fraction）を調製した。なお，10 k-fractionには分子量10,000 Da以下の画分が含まれ，３k-fractionには分子量3,000 Da以下の画分が含まれている。それらの試料を用いて，タンパク質濃度を一定にしてDPP-IV阻害活性を測定した結果を**Table 1** に示した。その結果，牛肉，豚肉，鶏肉ともにHydrolysateから10 k-fraction，さらに３k-fractionになるにつれてDPP-IV阻害

Table 1　DPP-IV inhibitory activity of hydrolysates of beef, pork and chicken meat digested with protamex for 90 minutes and hydrolyzed chicken meat pellet (CMP).

	beef		pork		chicken		CMP	
	inhibition rate (%)	IC_{50} (mg/ml)	inhibition rate (%)	IC_{50} (mg/ml)	inhibition rate (%)	IC_{50} (mg/ml)	inhibition rate (%)	IC_{50} (mg/ml)
hydrolyzed	58.3	6.02	54.3	5.96	55.6	5.83	51.9	6.23
10k-fraction	61.6	5.25	60.2	5.38	60.8	5.32	68.0	4.77
3k-fraction	74.7	4.33	77.1	4.20	75.1	4.31	83.3	3.88

Various meat hydrolysates were filtered using ultrafiltration membrane (0.45μm). 10k-fraction is the filtrate further filtered using an ultrafiltration 10k membrane. 3k-fraction is the filtrate further filtered using an ultrafiltration 3k membrane. DPP-IV inhibitory activity was measured at a protein concentration of 6.5mg/ml.

© The Ito Foundation

Table 2 DPP-IV inhibitory activity and ACE inhibitory activity of hydrolyzed chicken meat pellet (CMP).

	DPP-Ⅳ inhibitory		ACE inhibitory	
	inhibition rate (%)	IC_{50} (mg/ml)	inhibition rate (%)	IC_{50} (mg/ml)
CMP	51.9	6.23	43.6	1.04
CMP-10k fraction	68.0	4.73	64.4	0.85
CMP-3k fraction	83.3	3.88	79.0	0.67

CMP is a filtrate filtered using a filtration membrane (0.45 μm). CMP 10k-fraction is the filtrate further filtered using an ultrafiltration 10k membrane. CMP 3k-fraction is the filtrate further filtered an ultrafiltration 3k membrane. DPP-IV inhibitory activity was measured at a protein concentration of 6.5mg/ml. ACE inhibitory activity was measured at a protein concentration of 0.65mg/ml.

活性が上昇していくことが明らかになった。また，CMP溶液にも同様の傾向が認められた。いずれの試料でもHydrolysateから10 k-fraction，さらに３k-fractionになるにつれて50％のDPP-IV阻害活性の発現に必要な試料濃度（IC_{50}）も低下し，DPP-IV阻害活性を発現する機能性ペプチドが含まれる割合が増加した。牛肉，豚肉，鶏肉およびCMPの３k-fractionのIC_{50}値は，それぞれ4.33 mg/ml，4.20 mg/ml，4.31 mg/mlおよび3.88 mg/mlを示し，CMPにおいても高いDPP-IV阻害活性が保持されていることが確認された。なお，CMP溶液から調製した分子量10,000以下の10 k-fractionにはタンパク質含量としてCMPの88％が，分子量3,000以下の３k-fractionにはCMPの65％が含まれていた。DPP-IV阻害活性や限外ろ過によるペプチドの分布状況から，DPP-IVを阻害するほとんどのペプチドが分子量3,000以下の３k-fractionに含まれることが推定された。

令和３年度の報告でCMPによる血圧低下効果について記述したが，限外ろ過膜を用いた分画によるACE阻害活性の上昇効果についても検討し，DPP-IV阻害活性の結果と併記して**Table２**に示した。CMP-hydrolysateから10 k-fraction，さらに３k-fractionになるにつれてACE阻害活性もDPP-IV阻害活性と同様に増加し，IC_{50}値も1.04 mg/ml，0.85 mg/mlから0.67 mg/mlへと低下することが認められた。これらの結果から，DPP-IV阻害活性およびACE阻害活性を発現するペプチドのCMP溶解液中で存在する分子量分布領域は分子量3,000以下の画分に多く含まれることが明らかとなった。そこで，CMP ３k-fractionを用いてDPP-IV阻害ペプチドとACE阻害ペプチドの同時の精製を試みることにした。

高速液体クロマトグラフィー（HPLC）でTSKgel G2000SWxlゲルろ過カラムを用いて225 nmの波長で測定したCMP ３k-fractionの溶出パターンを**Fig. 1A**に示した。分取した各溶出画分のDPP-IV阻害活性（**Fig. 1B**）とACE阻害活性（**Fig. 1C**）を測定した結果，両活性ともに画分４～７で阻害活性が認められた。特に画分５でDPP-IV阻害活性およびACE阻害活性ともに高い阻害活性が認められた。DPP-IV阻害活性およびACE阻害活性を示すIC_{50}値は，**Fig. 1B**と**Fig. 1C**に記載したように，それぞれ20 μg/mlと59 μg/mlを示した。画分５にはアミノ酸残基数が約20～数個ぐらいのペプチドが含有され，また画分６には高いDPP-IV阻害活性およびACE阻害活性を有するトリペプチドやジペプチドの存在も示唆された。そこで，画分５の次に高いDPP-IV阻害活性およびACE阻害活性を示す画分６も混合して次のカラムに供した。

タンパク質あるいはペプチド断片のアミノ酸配

© The Ito Foundation

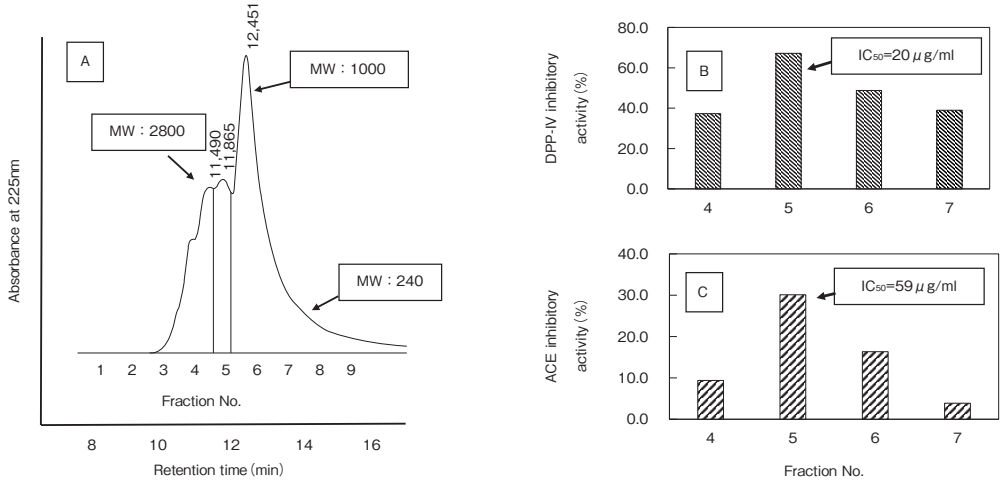


Fig. 1　Gel-filtrate chromatogram of the CMP 3k-fraction（A）. The CMP 3k-fraction was applied to a TSKgel G2000SWxl column, and eluted with a solution of 50mM sodium phosphate（Ph.7.0）, 300mM NaCl and 1mM NaN_3, at a flow rate of 1ml/min. Aprotinin（6,500 Da）, oxytocin（1,007 Da）and riboflavin（376 Da）were used as molecular weight markers. Fraction Nos. 5 and 6 showed a strong inhibitory activity against DPP-IV（B）and ACE（C）, and were collected for further purification.

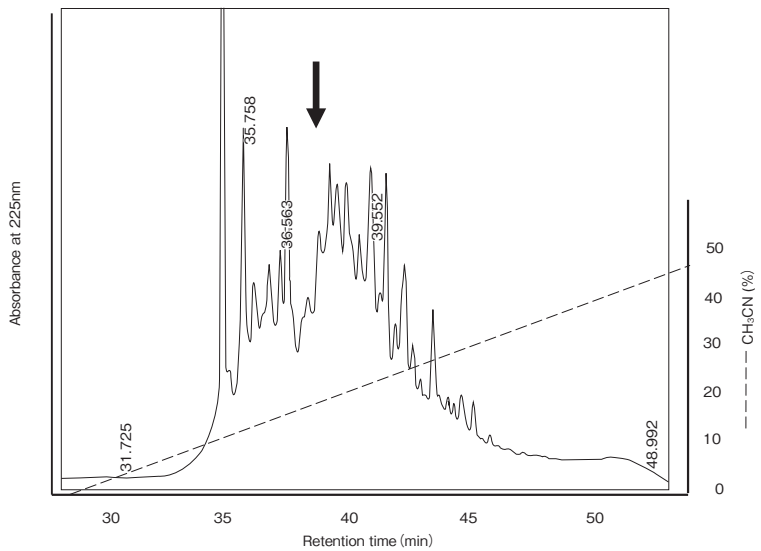


Fig. 2　Reverse phase（RP）HPLC chromatogram of the mixed fraction of No.5 and No.6 eluted from the gel filtration column. The active mixed fraction of No.5 and No.6 was applied to a RP-HPLC（Inertsil ODS-2）column and fractionated using a gradient of acetonitrile in 0.1％ TFA at a flow rate of 1 ml/mim. Fractions were collected every minute. The active fraction is indicated by the arrow.

列を解析するとき，逆相HPLCによる分離精製は不可欠である。そこで，TSKgel G2000SWxlゲルろ過HPLCカラムの溶出画分５と６の混合溶液をアプライした逆相HPLCカラム（Inertsil ODS-２）による分画パターンを**Fig. 2**に示した。カラムを0.1％TFAの展開液で流した後，溶離液（0.1％TFA，０％～50％濃度勾配をもつアセトニトリル）で溶出した結果，矢印で示したアセトニトリル濃度約20％位の画分に高いDPP-IV阻害活性およびACE阻害活性が認められ，この画分か

© The Ito Foundation

Table 3 Blood glucose levels in four different meals.

	Test foods /Time (min)	0	15	30	45	60	90	120
Blood glucose (mg/ml)	Rice (150g)	96 ± 7	137 ± 11	157 ± 5	135 ± 2	139 ± 8	109 ± 17	112 ± 8
	CMP10-5	89 ± 9	150 ± 2	150 ± 7	153 ± 5	149 ± 11	125 ± 5	106 ± 3
	CMP20-5	92 ± 7	155 ± 10	143 ± 20	152 ± 23	144 ± 6	119 ± 13	103 ± 4
	CMP20-30	91 ± 7	141 ± 15	167 ± 5	163 ± 2	137 ± 8	113 ± 1	103 ± 3

Data are expressed as mean ± SEM, n = 2, Test foods rice , rice （150g); CMP, hydrolyzed chicken meat pellet；CMP10-5, eat rice（150g）5 min after taking 10 CMP tablets；CMP20-5, eat rice（150g） 5 min after taking 20 CMP tablets；CMP20-30, eat rice（150g）30 min after taking 20 CMP tablets.

ら両阻害活性を発現するペプチドのさらなる精製と同定を進めている。

血糖上昇抑制ペプチドに関しては，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[24]。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[25]。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[26]から見いだされ，Lys-LeuおよびLeu-Argのペプチド標準品を用いたIC$_{50}$値は41.40 μMと598.02 μMであると報告されている。さらに最近，食品のソバからもDPP-IV阻害ペプチド（Val-Pro-Leu，Val-Pro-Ile）が報告されている[27]。一方，食肉由来のACE阻害ペプチドについては，われわれの研究により豚肉のペプシン加水分解物に含まれるACE阻害ペプチド（ミオシン重鎖由来；Lys-Arg-Val-Ile-Gln-Tyr，ミオシン軽鎖由来；Val-Lys-Lys-Val-Leu-Gly-Asn-Pro，アクチン由来；Val-Lys-Ala-Gly-Phe，トロポニンT由来；Lys-Arg-Gln-Lys-Tyr-Asp-Ile，トロポニンC由来；Arg-Met，-Leu-Gly-Gln-Thr-Pro-Thr-Lys）が単離・精製されている[8~11]。これらのペプチドのIC$_{50}$値は記載順に6.1 μM，28.5 μM，20.3 μM，26.2 μM，34.0 μMと高いACE阻害活性を示した[12]。これらのペプチドは**Fig. 1A**の画分５や６に含まれるペプチドの分子量域とほぼ同じで，CMP 3k-fractionには上記のようなDPP-IV阻害ペプチドやACE阻害ペプチドのほか，未知の新規阻害ペプチドが存在して生理機能を発現していると考えられる。新規ペプチドの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血糖上昇抑制効果解析

本研究では，DPP-IV阻害活性を有するCMPを摂取したときの，血糖上昇抑制効果について検討した。対象者の血糖値の経時変化を**Table 3** に示した。CMP10-5，CMP20-5，CMP20-30いずれにおいても米飯のみの血糖値の推移と比較して，大きな差はなく血糖上昇抑制効果は認められなかった。今回の研究でのCMP摂取量は先行研究[17]と同量の20粒に加えて，CMP製品の目安量１日当たり10粒とした。また，CMP摂取のタイミングは米飯摂取の５分前と30分前にした。

鍛島ら[28]は，食事30分前の粉末状大豆タンパク質（Soy Protein Isolate，以下SPI）摂取により，経口ブドウ糖負荷試験（以下OGTT）後の血中グルコース濃度の上昇が抑制され，その抑制効果は大豆タンパク質の摂取量に伴うものであったと報告している。また，大豆ペプチド（Soybean Peptide，以下PEP）でも同様の効果が認められたと報告している[29]。摂取量はSPIが20あるいは

© The Ito Foundation

40ｇ，PEPが20ｇであった。今回われわれが使用した摂取量はタンパク質量として，２あるいは４ｇとかなり少ない量であったため，血糖上昇抑制効果が認められなかったのではないかと考えられる。山口ら[30]の健常男子10名と軽症TypeⅡ糖尿病患者10名に対するOGTTにおける低分子ペプチド11ｇの同時摂取では，低分子ペプチド摂取の有無で血糖値の変化に有意差は認められなかったと報告している。鍛島ら[29]は摂取量について，タンパク質40ｇは１日の平均推定必要量の80％を占め，過剰摂取に伴う健康被害が懸念されるため，摂取量をさらに低減し，かつ食後高血糖の抑制効果が十分に得られる方法へと改良する必要があるとしている。今後は日常において継続可能な範囲で効果が得られる摂取量や継続摂取での効果についても検討する必要がある。

今回の研究で，CMPの65％を占める分子量3,000以下の画分に高い血糖調節作用や血圧降下作用を有するペプチドが豊富に含まれていることが明らかになった。逆相HPLCによる精製を継続して血糖調節作用や血圧降下作用を発現する新規ペプチドの同定を行っている。また，ヒト（健常者）によるCMPの単回摂取が血糖値変動に及ぼす効果を検討したが，顕著な差異は認められなかった。今後，日常において継続可能な範囲で効果が得られる摂取量や継続摂取での効果についても検討する。

最後に，食肉加水分解物の栄養機能に関する一連の研究で明らかとなったことを以下に列記した。
①食肉を食品用の酵素により分解して「食べる食肉から飲む食肉」へと変換し，タンパク質飲料と，その粉末や錠剤が開発された。
②鶏肉加水分解物錠剤（CMP）には，抗酸化活性，ACE阻害活性やDPP-IV阻害活性を発現する機能性ペプチドが豊富に含まれていた。
③CMPには筋肉タンパク質合成に関与する分岐鎖アミノ酸（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いた。
④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力増加効果や抗疲労効果について検討した結果，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。

本製品のCMP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。

４．要　　約

今回の研究で，鶏肉加水分解物錠剤（CMP）の65％を占める分子量3,000以下の画分に高い血糖調節作用や血圧降下作用を有するペプチドが豊富に含まれていることが明らかになった。逆相HPLCによる精製を継続して血糖調節作用や血圧降下作用を発現する新規ペプチドの同定を行っている。ヒト（健常者）によるCMPの単回摂取が血糖値変動に及ぼす効果を検討したが，顕著な差異は認められなかった。今後，日常において継続可能な範囲で効果が得られる摂取量や継続摂取での効果についても検討する。

食肉加水分解物の栄養機能に関する一連の研究で，食品用の酵素により分解して「食べる食肉から飲む食肉」へと変換し，タンパク質飲料と，その粉末や錠剤が開発された。CMPには抗酸化活性，ACE阻害活性やDPP-IV阻害活性を発現する機能性ペプチドが豊富に含まれていた。さらに，CMPには筋肉タンパク質合成に関与する分岐鎖アミノ酸（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いた。若年女

© The Ito Foundation

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力増加効果や抗疲労効果について検討した結果，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。

本製品のCMP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，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.
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研究調査成果報告書，（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） 竹之山愼一，川北久美子，六車三治男：令和４年度食肉に関する助成研究調査成果報告書，（公財）伊藤記念財団，**41**, 57～66, 2023.
18） Gornal, A. G., Baradawill, C. J., David, M. M.：*Journal of Biological Chemistry*, **177**, 751～766, 1949.
19） Murphy, J. B., Kies, M. W.：*Biochimica et Biophysica Acta*, **45**, 382～384, 1960.
20） 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.
21） Cushman, D. W., Cheung, H. S.：*Biochemical Pharmacology*, **20**, 1637～1648, 1791.
22） Holst, J. J., Deacon, C. F.：*Diabetes*, **47**, 1663～1670, 1998.
23） Drucker, D. J.：*Current Pharmaceutical Design*, **7**, 1399～1412, 2001.
24） 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.
25） 比良徹：化学と生物, **55**, 296～298, 2017.
26） Sato, K., Miyasaka, S., Tsuji, A., Tachi, H.：*Food Chemistry*, **261**, 51～56, 2018.
27） 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.
28） 鍛島秀明，上本早織，江口航平，遠藤（山岡）雅子，三浦朗，福場良之：大豆たん白質研究，**18**, 188～191, 2015.
29） 鍛島秀明，藤元将樹，江口航平，遠藤（山岡）雅子，三浦朗，小林敏夫，福場良之：大豆たん白質研究，**19**, 121～125, 2016.
30） 山口高史，川井紘一，村山耕子，山下亀次郎：糖尿病，29(1), 15～21, 1986.

© The Ito Foundation

食肉由来ペプチドと大豆由来ペプチドの抗酸化作用の比較

Comparison of antioxidative effect of peptides derived from meats and soy beans

西　村　敏　英
（女子栄養大学栄養学部）

Toshihide Nishimura
（Faculty of Nutrition, Kagawa Nutrition University）

In the human body, oxygen taken in through respiration is used for energy production, and various reactive oxygen species are generated in the process. Since these reactive oxygen species are highly reactive, excessive or localized production of reactive oxygen species reacts with proteins, lipids, DNA, and other macromolecules in the body, causing protein denaturation, lipid peroxidation, gene damage, and other problems that are believed to lead to lifestyle-related diseases and aging. The body has a defense mechanism to eliminate reactive oxygen species, but this mechanism declines with age. Therefore, it is recommended to take antioxidants from food and other sources to eliminate reactive oxygen species that cannot be eliminated in the body. In this study, we investigated the antioxidant effects of meat-derived peptides and their mechanisms of action.

Pork loin was fractionated into myofibrillar protein (Mf), sarcoplasmic protein (Sp), and muscle matrix protein (Mm), and then hydrolyzed with papain to prepare the peptide fraction, DPPH radical scavenging, metal chelation, and inhibition of ovalbumin (OVA) degradation by reactive oxygen species (HO・) were found. MfP was fractionated by HPLC using a reversed-phase column, and the peptide structures were analyzed by NanoLC/MS/MS, which revealed the structures of seven antioxidant peptides. All of these peptides had sequences of 5 to 7 residues and showed 100 % homology to partial sequences of myosin or actin by BLAST search. Among them, we identified LDENIAK (Leu-Asp-Glu-Asn-Ile-Ala-Lys) as a strong antioxidant peptide that inhibits OVA degradation induced by the Udenfriend system. It was suggested that two factors may be involved in the antioxidant effect of this peptide : Asp and Glu in the sequence chelate iron ions necessary for radical generation, and Leu and Ile are oxidatively modified by radicals and suppress the degradation of OVA.

1．目　　的

ヒトは呼吸によって酸素を取り込み，エネルギーを生産している。その過程において，種々の活性酸素種が生成されている。この活性酸素種は反応性が高いため，過剰な生成や局所的な生成は，生体中のタンパク質や脂質，あるいはDNAなどと反応してタンパク質の変性や脂質の過酸

© The Ito Foundation

化，遺伝子傷害などを起こし，生活習慣病の発症や老化の原因になると考えられている。生体内には，活性酸素種を消去する防御機構が備わっているが，加齢とともに低下することから，生体内で消去しきれなかった活性酸素種を除去するために，食品等から抗酸化物質を摂取することが推奨されている[1,2]。

近年，さまざまな食品由来タンパク質から抗酸化作用を示すペプチドやペプチド画分が見出されている。我々はこれまでに，豚筋原線維タンパク質（Mf）の加水分解物（MfP）が，脂質過酸化抑制作用やDPPHラジカル捕捉作用を有すること，MfPから脂質過酸化抑制作用を示すペプチドを報告してきた[3]。さらに，MfP，豚筋漿タンパク質（Sp），豚筋基質タンパク質（Mm）の加水分解物（SpP，MmP）が各種活性酸素種（ClO−，HO・，ONOO−）によるオボアルブミン（OVA）分解を抑制することを見出してきた。しかし，これら加水分解物に含まれる抗酸化ペプチドの同定やその作用機序については十分に解明されていないのが現状である。本プロジェクトは，食肉タンパク質由来ペプチドと大豆由来ペプチドの抗酸化作用の比較を最終目的としているが，本年度は，まず，豚肉から抽出した食肉タンパク質からUdenfriend systemによるOVA分解を抑制するペプチドを解析し，そのペプチドの抗酸化作用の評価と抗酸化作用機序の検討を行った。

2．方　法

2.1　試料調製

豚胸最長筋を細切した後，８倍量の0.16 M KCl−40 mM Tris−HCl（pH7.4）を加え，氷冷しながらホモジナイズした。これを遠心分離して得られた上清を透析し，低分子物質を除去したものを筋漿タンパク質（Sp）とした。一方，沈殿には，豚ロース肉に対して14倍量の0.16 M KClを加えて懸濁し，遠心分離を行う工程を２回繰り返した。得られた沈殿に，原料肉重量に対して12倍量（V/W）の0.6 M KClを加えて懸濁し，ガーゼでろ過後，ろ液を筋原線維タンパク質（Mf）とした。残渣には，豚ロース肉に対して12倍量の0.6 M KClを加えて懸濁した後，遠心分離して得られた沈殿を筋基質タンパク質（Mm）とした。

2.2　パパインによる食肉タンパク質加水分解物の調製

Mf，Sp，Mmに1/100量（w/w）のパパインを加えて，37℃で48時間加水分解した。反応後の溶液に４倍量のエタノールを添加後，遠心分離を行い，ペプチドを含む上清を回収した。エバポレーターによりエタノールを揮発させ，Mf由来ペプチド（MfP），Sp由来ペプチド（SpP），Mm由来ペプチド（MmP）を調製した。さらに，各ペプチド画分を，限外濾過法により，分子量5000 kDaより大きい高分子量画分とそれより小さい低分子量画分に分画した。

2.3　抗酸化作用の測定方法

抗酸化作用の指標となる「Udenfriend systemが誘導するOVA分解の抑制作用」は，以下のように測定した。卵白オボアルブミン（OVA，終濃度：２mg/ml）に，筋肉タンパク質加水分解物の分画物（終濃度：１mg/ml）を加え，よく撹拌後，室温で10分間放置した。次いで，過酸化水素と鉄によって生じるラジカルを含む溶液（H_2O_2濃度として終濃度：10 mM）を添加し，37℃で，５，15，30，60，90，120分間保持した。インキュベート終了後のサンプルに等量（v/v）のlaemmliサンプルバッファー（Biorad，Hercules，CA）を加え，沸騰水浴中で加熱したものを電気泳動用サンプルとした。15%アクリルアミドゲルを用いたSDS−PAGEに供した。泳動結果は，画像解析（Image J）[4]により数値化し，各画分の残存するOVA量により抗酸化作用を評

© The Ito Foundation

価した。なお，対照は，筋肉タンパク質加水分解物とラジカルを含む溶液を加えないもの，コントロールは食肉タンパク質加水分解物を加えないものとし，代わりに蒸留水を加えた。

また，DPPHラジカル捕捉作用，ABTSラジカル捕捉作用ならびに，銅による金属イオンキレート作用は，定法により測定した。

2.4　抗酸化ペプチドの分画と構造推定

ペプチド画分MfPを0.1％　TFA水溶液に溶解させ，ODSカラムを用いたHPLCによって分画した。分析時間60分間で，0.085％　TFAを含む80％アセトニトリル水溶液の濃度を０から50％に上げるリニアグラジエントにより分析を行った。カラム温度は40℃，検出波長は220 nmとした。

抗酸化作用の強い画分は，Ultimate 3000 RSLCnano および LTQ Orbitrap XL（Thermo Scientific）を用いたNanoLC/MS/MSにより，含まれているペプチドの配列推定を行った。

3．結果と考察

3.1　豚肉タンパク質分解物の抗酸化作用

ラジカル無添加のタンパク質（OVA）溶液に残存するタンパク質量を100％とした時，OVA溶液にラジカルを添加すると，残存タンパク質量は1.8％まで減少した（**Fig. 1**）。しかし，タンパク質分解物の低分子量ペプチド画分を添加した場合，MfP画分では60.4％，MmP画分では50.5％，SpP画分では69.0％のタンパク質（OVA）が残存していた（反応時間120分）。豚筋肉タンパク質加水分解物の添加は，Udenfriend systemで生じたラジカルによるOVA分解を抑制することが判明した。一方，高分子量画分では残存するタンパク質がすべて20％以下であり，Udenfriend systemによるOVAの分解を抑制しなかった。このことから，Udenfriend systemによるOVAの分解抑制作用は各筋肉タンパク質加水分解物の低分子画分

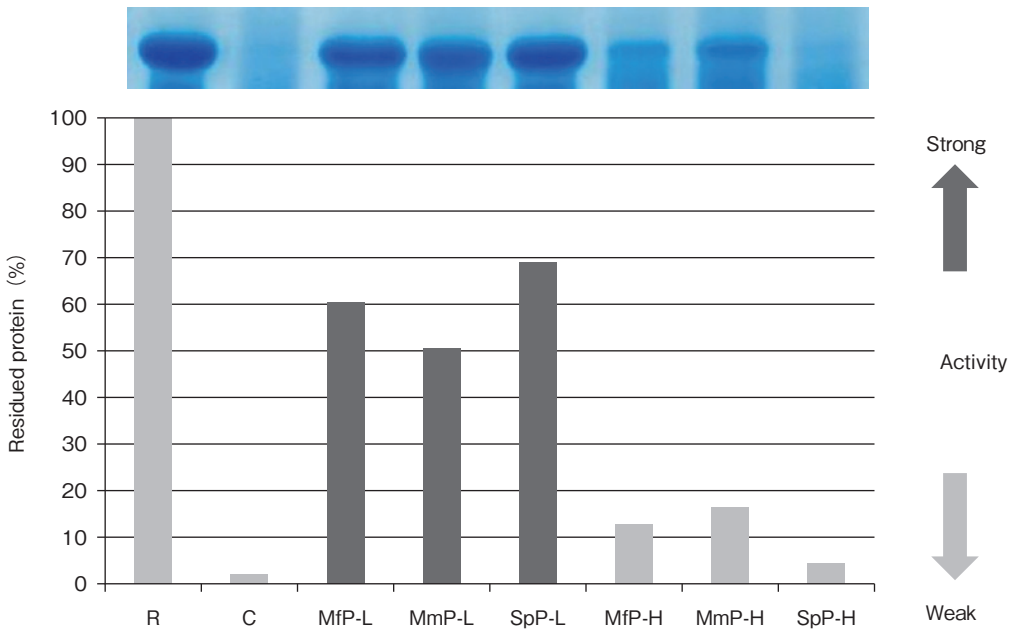


Fig. 1　Inhibition of OVA degradation by reactive oxygen species produced in Udenfriend system
R：only OVA（ovalubumin），C：OVA＋radicals，MfP-L：OVA＋radicals＋MfP-L，MmP-L：OVA＋radicals＋MmP-L，SpP-L：OVA＋radicals＋SpP-L，MfP-H：OVA＋radicals＋MfP-H，MmP-H：OVA＋radicals＋MmP-H，SpP-H：OVA＋radicals＋SpP-H

© The Ito Foundation

によりもたらされることが判明した。

ペプチドの分子サイズは抗酸化作用に大きな影響を与えるとされており，3 kDa以下のペプチド画分[5]，3～5 kDaのペプチド画分[6]や分子量の小さいペプチド[7]が強い抗酸化作用を示すことが報告されている。本研究において，分子量5000以下の低分子画分に抗酸化作用が認められたのは，これまでの報告と一致していた。

続いて，筋肉タンパク質のうち半分以上を占める筋原線維タンパク質に着目し，MfP低分子画分をHPLCによってさらに分画し，抗酸化ペプチドの同定を試みた。

3.2　豚肉の筋原線維タンパク質加水分解物の低分子画分の分画と構造決定

MfP低分子画分をHPLCで分画した後，ピーク波形に従い5つの画分（Ⅰ～Ⅴ）に分け，Udenfriend systemが誘導するOVA分解の抑制作用について調べた。その結果，アセトニトリル7～14％で溶出された画分ⅡにのみOVAのバンドが認められ，抗酸化作用があることが判明した。そこで，画分ⅡをさらにHPLCで分画した結果，19のピークを得ることができた（p1～p19）。各画分のUdenfriend systemによるOVA分解の抑制作用を調べたところ，p1，p3，p5，p13に抑制効果が認められた（**Fig. 2**）。

この4つの画分をNanoLC/MS/MSにより解析した結果を**Table 1** に示した。p1から3つ，p3から3つ，p13から1つのペプチド配列が推定された。その中でもp13の配列であるLeu-Asp-Glu-Asn-Ile-Ala-Lys（LDENIAK）が，最も高い抗酸化作用を示した。一方，p5からはペプチド由来のMSピークが確認できなかった。推定された7つのペプチド配列をBLAST検索してみたところ，すべて豚ミオシンまたはアクチンの部分配列と100％一致した。

今回，配列推定されたペプチドでは，Leu，

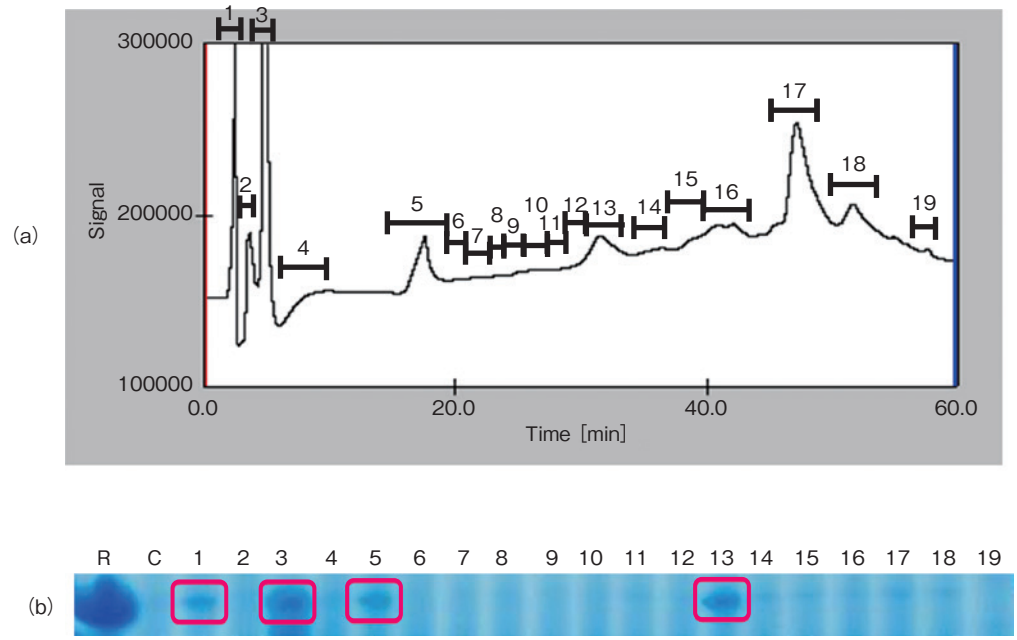


Fig. 2　HPLC chromatogram of the fractionation of Fraction II (a), and their inhibition of OVA degradation by reactive oxygen species produced in Udenfriend system (b)
R：only OVA (ovalubumin), C：OVA＋radicals, 1-19：fraction No. after the fractionation of the Fraction Ⅱ

© The Ito Foundation

Table 1　Sequence of peptides identified with NanoLC/MS/MS

Peak No.	Sequence	Estimated protein derived from
P 1	LDAEIR	Myosin-1 (1605-1610), Myosin-2 (1246-1251)
	HLDDALR	Myosin-1 (1660-1666), Myosin-4 (1658-1664)
	SADLLK	Myosin-1 (395-400), Myosin-7 (392-397)
P 3	AEREIVR	Actin (116-122), β-actin (92-98)
	REIVR	Actin (118-122), β-actin (94-98)
	LDETIAK	Myosin-1 (989-995), Myosin-3 (986-992)
P 5	Not detected	—
P13	LDENIAK	Myosin-4 (987-993)

Asp，Ala，Glu，Ile，Argを含むペプチドが多く見られた。これまでに，アミノ酸では，Cys，His，Tyr，Lys，Arg，Leu，Valは，抗酸化作用を有することが報告されている[8]。また，まぐろ血合筋加水分解物から，DPPHラジカル捕捉作用を示すペプチドとしてLeu-Pro-Thr-Ser-Gly-Ala-Ala-Lys-Tyr，Pro-Met-Asp-Tyr -Met-Val-Tyrが見出されており，これは配列中のLeu，Val，Tyr，Metが水素イオンを供与することによってラジカルと相互作用していると考えられている[9]。さらに，生ハム水溶性画分からSer-Ala-Gly-Asn-Pro-Asn，Gly-Leu-Ala-Gly-Alaが同定されており，配列中のHis，Pro，Val，Leu，Ala，Glyが寄与しているのではないかと報告されている[10]。疎水性アミノ酸やHis，Glu，Pro，Cys，Tyr，Trp，Phe，Metの存在が，ペプチドの抗酸化作用を増強させることや，疎水性アミノ酸が脂質の酸化阻害に重要であることも報告されている[11]。金属キレート作用に対しては，Leu-Gln-Ala-Glu-Val- Glu-Glu-Leu-Arg-Ala-Ala-Leu-Glu，Ala-Gly-Arg-Asp-Leu-Thr-Asp-Tyr-Leu-Met-Lys-Ile-Leu[12]や，Tyr-Ile-Asn-Gln-Met-Pro-Asn-Lys-Ser-Arg-Glu-Ala[13]が高いFe^{2+}キレート作用を示すことが報告されている。他にも，Asp-Ala-Gln-Glu-Lys-Leu-GluがFe^{2+}が誘導する脂質の過酸化を抑制すると[3]や，Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-His-Gly-Pro-Pro-GlyがCu^{2+}キレート作用を示すこと[14]が報告されている。これらは，Asp，Gluのカルボキシル基，AlaやLeuが関与していると考えられている。

MfP低分子画分で認められたペプチドの中で活性の高かったp13のLeu-Asp-Glu-Asn-Ile-Ala-Lys（LDENIAK）を合成し，各抗酸化作用を調べた。

3.3　LDENIAKの各種抗酸化作用の特徴

LDENIAKのDPPHラジカル捕捉作用，ABTSラジカル捕捉作用ならびに，金属イオンキレート作用は，**Table 2**に示す結果となり，本ペプチドは，金属キレート作用が強いことが明らかとなった。

LDENIAKのUdenfriend systemによるOVA分解の抑制作用を**Fig. 3**に示した。その結果，15分後で約60％，60分後で約45％，120分後でも30％以上のOVAが残存していた。LDENIAKのIC_{50}は1.43 mg/mlすなわち1.79 mMであることが判明した。抗酸化ペプチドとして知られるグルタチオン（GSH），カルノシン（Car），アンセリン（Ans）のIC_{50}は，GSH；5.37 mM，Car；15.68 mM，Ans；9.19 mMとなり，LDENIAKが，従来の抗酸化物質よりも高い抗酸化作用を示した。柳内らの報告によると，GSH，Car，Ansは，ClO^-，$ONOO^-$に対して強い抗酸化作用を示し，HO・に対する抗酸化作用は弱かったと報告されている[15]。

© The Ito Foundation

Table 2　Antioxidant activities of LDENIAK

Antioxidant activities（%）	LDENIAK	positive control*
DPPH radicals scavenging activity	1.8	93.6
ABTS radicals scavenging activity	0.6	79.7
Chelating activity for Cu^{2+}	89.9	99.3

*: Vitamin C for DPPH radicals scavenging activity, gluthathion for ABTS radicals scavenging activity and Chelating activity for Cu^{2+}

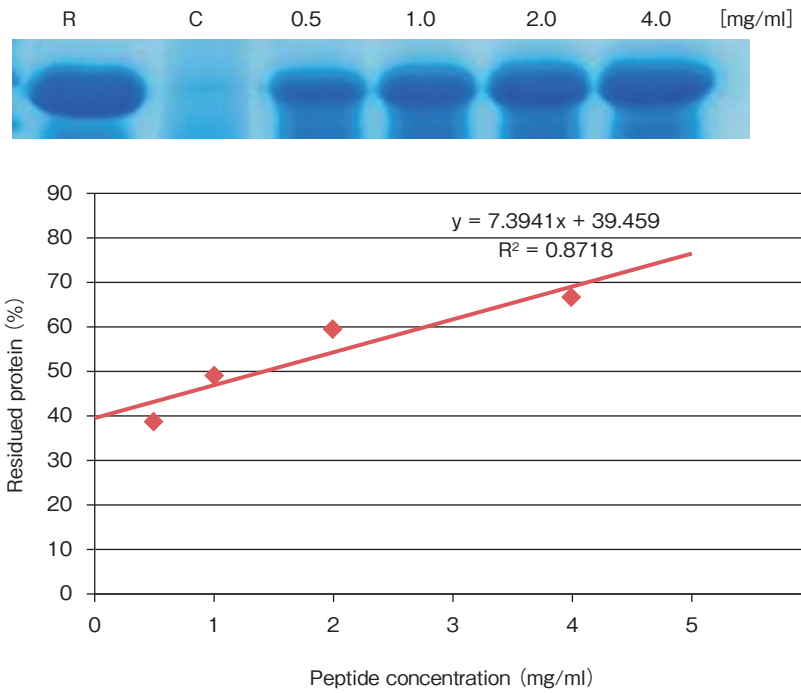


Fig. 3　Effect of amount of peptide（LDENIAK）on the inhibition of OVA degradation by reactive oxygen species produced in Udenfriend system for 60 mins at 37 degrees C.
R：only OVA（ovalubumin）, C：OVA＋radicals,

次に，Udenfriend system反応液処理前後でのLDENIAKの変化をアミノ酸分析計で調べた。Udenfriend system反応液で60分間処理した後では，処理前と比べてLeu，Ileの含有量が低下していた。一方，他のアミノ酸の含有量に大幅な変化はなかったことから，LDENIAKのUdenfriend systemが誘導するOVA分解の抑制作用は，ペプチドによる鉄イオンのキレート作用に加えて，配列中のLeuとIleがUdenfriend systemで生じるラジカルによる酸化修飾を受けることで，OVAの分解を抑制している可能性が示唆された。

Leuが酸化されると，ロイシンパーオキサイド，α-ケトイソカプロン酸，イソ吉草酸，イソバレルアルデヒドやカルボニル化合物などが，また，Ileが酸化されると，イソロイシンパーオキサイド，カルボニル化合物が生成されることが報告されている[16]。アミノ酸のTrp，Phe，LeuとIleは水中のHO・に対して高い抗酸化作用を持つことも報告されている[17]。本研究で，ペプチド配列中にこれらのアミノ酸が含まれていることでラジカ

© The Ito Foundation

ル捕捉作用を示し，ペプチドに含まれているアミノ酸の構造が酸化修飾を受けて変化している可能性が推察された。

４．要　約

ヒトの生体内では，呼吸で取り込んだ酸素をエネルギー生産に利用しているが，その過程において，種々の活性酸素種が生成されている。この活性酸素種は反応性が高いため，過剰な生成や局所的な生成は，生体中のタンパク質や脂質，あるいはDNAなどの高分子と反応してタンパク質の変性や脂質の過酸化，遺伝子傷害などを起こし，生活習慣病の発症や老化の原因になると考えられている。生体内には，活性酸素種を消去する防御機構が備わっているが，加齢とともに低下するので，生体内で消去しきれなかった活性酸素を除去するために，食品等から抗酸化物質を摂取することが推奨されている。本研究では，食肉由来ペプチドの抗酸化作用とその作用メカニズムを調べた。

豚ロース肉を筋原線維タンパク質（Mf），筋漿タンパク質（Sp），筋基質タンパク質（Mm）に分画した後，パパインで加水分解し，ペプチド画分を調製した。３種類のタンパク質由来ペプチドの抗酸化作用を調べた結果，筋原線維タンパク質由来ペプチド（MfP）に，活性酸素種（HO・）によるオボアルブミン（OVA）の分解を抑制することが見出された。逆相カラムを用いたHPLCによりMfPを分画し，NanoLC/MS/MSでペプチドの構造を解析した結果，７種類の抗酸化ペプチドの構造が明らかとなった。これらのペプチドはいずれも５～７残基の配列を有し，BLAST検索でミオシンまたはアクチンの部分配列と100％の相同性を示した。その中で，Udenfriend systemで誘導されるOVA分解を抑制する強い抗酸化ペプチドとしてLDENIAK（Leu-Asp-Glu-Asn-Ile-Ala-Lys）の存在を明らかにした。このペプチドの抗酸化作用の発現には，配列中のAspとGluがラジカル発生に必要な鉄イオンをキレートしていること，LeuとIleがラジカルによって酸化修飾を受け，OVAの分解を抑制していることの２つが関与している可能性が示唆された。

文　献

1）　吉川敏一：最終講義　フリーラジカルの医学，京府医大誌，**120**, 6, 381～391, 2011.
2）　石川（高野）祐子：平成20年度「農水産物機能性活用推進事業」報告書（2）「食品素材・成分の抗酸化性」，財団法人食品産業センター，19～58, 2009.
3）　Saiga, A., Tanabe, S., Nishimura, T.：Antioxidant Activity of Peptides Obtained from Porcine Myofibrillar Proteins by Protease Treatment, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 3661～3667, 2003.
4）　Rasband, W. S.：ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, http://rsb.info.nih.gov/ij/, 1997-2012.
5）　Ning Chen, Hongmei Yang, Yi Sun, Jun Niu, Shuying Liu：Purification and identification of antioxidant peptides from walnut（Juglans regia L.）protein hydrolysates, *Peptides*, **38**, 344～349, 2012.
6）　Bahareh, H. Sarmadi, Amin Ismail：Antioxidative peptides from food proteins: a review, *Peptides*, **31**, 1949～1956, 2010.
7）　Hang Guo, Yoshiaki Kouzuma, Masami Yonekura：Structures and properties of antioxidative peptides derived from royal jelly protein, *Food Chemistry*, **113**, 238～245, 2009.
8）　Zhengjun Xie, Junrong Huang, Xueming Xu, Zhengyu Jin：Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate, *Food Chemistry*, **111**(2), 370～376, 2008.
9）　Kuo-Chiang Hsu：Purification of antioxidative peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle by-product, *Food Chemistry*, **122**, 42～48, 2010.
10）　Elizabeth Escudero, Leticia Mora, Paul D. Fraser, Maria-Concepción Aristoy, Fidel Toldra：Identification of novel antioxidant peptides generated in Spanish dry-cured ham, *Food Chemistry*, **138**, 1282～1288, 2013.
11）　Ning Chen, Hongmei Yang, Yi Sun, Jun Niu, Shuying Liu：Purification and identification of antioxidant peptides from walnut（Juglans regia L.）protein hydrolysates, *Peptides*, **38**, 344～349, 2012.
12）　Lu-Sha Wang, Ji-Chao Huang, Yu-Lian Chen, Ming Huang, Guang-Hong Zhou, Characterization of Lunasin Isolated from Soybean, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **63**, 3437～3444,

© The Ito Foundation

2015.
13） Aleksandra Zambrowicz, Marta Pokora, Bartosz Setner, Anna Dabrowska, Marek Szoltysik, Konrad Babij, Zbigniew Szewczuk, Tadeusz Trziszka, Gert Lubec, Jozefa Chrzanowska：Multifunctional peptides derived from an egg yolk protein hydrolysate: isolation and characterization, *Amino Acids*, **47**, 369～380, 2015.
14） Lidong Guo, Padraigin A. Harnedy, Martina B. O' Keeffe, Li Zhang, Bafang Li, Hu Hou, Richard J. FitzGerald：Fractionation and identification of Alaska pollock skin collagen-derived mineral chelating peptides, *Food Chemistry*, **173**, 536～542, 2015.
15） 柳内延也，塩谷茂信，水野雅之，鍋谷浩志，中嶋光敏：チキンエキス由来アンセリン―カルノシン混合体の抗酸化活性，日本食品科学工学会誌，**51**, 5, 238～246, 2004.
16） Roger T. DEAN, Shanlin FU, Roland STOCKER, Michael J. DAVIES：Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation, *Biochemical Journal*, **324**, 1～18, 1997.
17） Sonja Milic, Jelena Bogdanovic Pristov, Dragosav Mutavdžic, Aleksandar Savic, Mihajlo Spasic, Ivan Spasojevic：The Relationship of Physicochemical Properties to the Antioxidative Activity of Free Amino Acids in Fenton System, *Environmental Science & Technology*, **49**, 4245～4254, 2015.

© 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（Ⅱ）

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

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. Previously, we established a simple method to create a high O_2MAP in the laboratory without the use of large equipment. In this study, the viability of *Campylobacter* spp. in a high O_2MAP environment was investigated using the established method. Some strains which have different aerotolerant were used to examine whether the viability is affected by the aerotolerant or not. The viability of *Campylobacter* spp. was suppressed under high O_2MAP conditions more than under atmospheric conditions, indicating the usefulness of high O_2MAP. Additionally, it was suggested that this difference may not be due to aerotolerance of each strain. Further experiments are required for statical analysis.

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

© The Ito Foundation

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。昨年度の研究課題では，実験室内で高O_2MAP環境を作出する手法を確立し，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った。昨年度は国際的に使用される標準株であるNCTC11168を用いており，また，実際の鶏肉で見られるよりも高濃度の汚染における検証を実施したため，今年度は日本国内での分離株を用いた低濃度の汚染における高O_2MAPの効果を検証することを目的とした。

２．方　法

2.1　高O_2MAP環境の作出

耐ガス透過性の高い，１ｌ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（パックリーダーRO-105LS，飯島電子工業株式会社，日本）により，酸素濃度および二酸化炭素濃度を測定した。

2.2　国内産鶏肉からのカンピロバクター属菌の検出および遺伝子型，好気耐性の決定

2.2.1　培養法による検出

岐阜市内の４つのスーパーマーケットで購入した市販鶏肉28検体（もも肉）を用いて実施した。検出はNIHSJ-02法に準じて実施した。すなわち，検体（25ｇ）にプレストン培地（OXOID，Hampshire，UK）を225 ml加えたものをストマッカー処理し試料液を作製し，42℃で24時間，微好気条件で培養した。その後，プレストン培地から１白金耳分の検体をmCCDA培地（OXOID）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。

2.2.2　MLST（Multi locus sequence typing）による遺伝子型の決定

カンピロバクター属のMLSTデータベース（https://pubmlst.org/campylobacter/）に記載の方法に従い，得られたPCR産物を精製後，サイクルシークエンス反応により７遺伝子（aspA，glnA，gltA，glyA，pgm，tkt，uncA）の塩基配列を決定した。得られた塩基配列を上記データベースと照合してアレル番号を取得しST型を決定した。

© The Ito Foundation

2.2.3　好気耐性の検証

上記分離株の一部を用いて，好気耐性能の検証を既報に従い実施した[3]。すなわち，*C. jejuni*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0.1に調整し，1.0×10^8CFU/mlの生菌サンプルとした。37℃で24±１時間，好気条件で培養後，mCCDA培地に生育するコロニー数を計測し，生育した株について好気耐性株，生育しない株については好気感受性株とした。

2.3　鶏肉上のカンピロバクター生存性の検証

2.3.1　擬似汚染鶏肉の準備および高O_2MAP環境への設置

2.2.1にて，カンピロバクター陰性であることを確認した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*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0.1に調整し，1.0×10^8CFU/mlの生菌サンプルとした。これらを階段希釈することで1.0×10^4CFU/mlの菌液とし，鶏肉10ｇあたりに100μlずつそれぞれの菌液を塗布し1.0×10^3CFU/10gの擬似汚染鶏肉とした。計測する日数分それぞれ別のサンプリングバッグに準備し，2.1の方法で高O_2MAP環境を作出した。また，一般的なストマック袋に設置した疑似汚染鶏肉も準備し，大気環境中のサンプルとした。それぞれのサンプルは測定するまで４℃冷蔵庫にて保管した。

2.3.2　培養法

鶏肉10ｇをPCS10 mlでリンスし，サンプリングバッグのフィルターを通して回収した。8,000×*g*，４℃で10分間遠心し，ペレットをPBSで懸濁し，500μlとしたものをサンプルとした。原液またはPBSで10倍階段希釈した溶液100μlをmCCDA培地に塗布し，42℃で48時間，微好気条件で培養した。すべてのコロニーに対してコロニーPCRをすることが難しいため，目視で確認し，カンピロバクターと思われるコロニーを計測し，菌数を計算した。

2.3.3　PMA-qPCR法

培養法で回収した原液のうち200μlを用い，すでに確立済みの手法を用いて実施した[2]。ただし，PMA EnhancerがVBNC状態のカンピロバクター検出を抑制することが分かったため，添加せずに実施した。PMAによる抑制効果を高くするため，PCR産物の長さを長くするように再設計したプライマー（以下に掲載）を用いた。すなわちサンプル200μlにPMAxxを終濃度が50μM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，200μlのPBSで懸濁し，再度上記の操作を行った。8,000×*g*，４℃で10分間遠心操作を行い，ペレットからDNeasy Blood & Tissue Kit （Qiagen, Hilden, Germany）を用いてDNA抽出行い，100μl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），フォワードプライマーcampF2-595（5’-ACT CAA CTG ACG

© The Ito Foundation

CTA AGG CG-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　市販鶏肉からのカンピロバクターの検出およびMLST解析

28検体中，12検体で*C. jejuni*陽性となり，それぞれのST型はST11020が１検体，ST7322が１検体，ST2988が１検体，ST822が１検体，ST1038が１検体，ST4758が１検体，ST13005が１検体，ST822が４検体，ST10012が１検体であった。同一スーパーマーケットから検出されるものは同一ST型になると予測されたが，ST822が４検体以外は異なるST型となり，同一スーパーマーケットで購入しても，異なる農場や鶏群由来であることが示唆された。今後の研究には異なるST型の*C. jejuni*を使用していくこととした。好気耐性について，これらのうち，ST11020，ST7322，ST822について検証したが，すべて好気感受性株であった。基準株として使用しているNCTC11168株は好気耐性株であった。そのため，まずは好気耐性株としてNCTC11168株を使用して検証するとともに，宮崎大学より分与を受けた株（好気耐性株：B17，B21株，好気感受性株：B3，B22，SH25株）を使用して，高O_2MAPの効果を検証することとした。

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，すべての日数においてO_2濃度が75％以上，CO_2濃度が13％以上であることを確認した。

株ごとのカンピロバクターの生存性について，コロニー数の結果を示した（**Fig. 1**）。塗布３日後以降に着目してみると，高O_2MAP包装は通常の包装と比べてカンピロバクターの生存性を低下させる傾向が認められた。一方，その効果において好気感受性株と好気耐性株間での差は認められないことが示唆された。しかし，今回は統計学的な解析を実施できなかったため，今後，検証を繰り返して統計学的有意差について検証を行う必要がある。昨年度の本研究課題において塗布４日後には菌が検出されなくなったことと一致しなかった。上述のように，PMA-qPCRにおいて損傷菌が検出されないことによる影響だった可能性が示唆された。しかし，改変したPMA-qPCRを用いた検証では検量線において10^3個の細菌数が検出限界となったため，塗布した当日（0d）においても陰性になることがあり，正確な結果とならなかった。今回検討した菌数では改良版のPMA-qPCRでの正確な検出が難しいことが分かったため，今後は少量の菌を定量可能であるデジタルPCRなどの利用を考慮する必要がある。

4．要　　約

本研究において高O_2MAP包装のカンピロバクター生存性への影響を検証した。高O_2MAP包装は通常の包装と比べてカンピロバクターの生存性を低下させる傾向が認められた。一方，生存性への影響にはカンピロバクターの好気耐性能は影響しない可能性が示唆された。今後実験を繰り返し，統計学的な有意差について検証する必要がある。

文　　献

1）　原理洋，加藤千晶，野市哲也，菊池貴子，梅津準士，

© The Ito Foundation

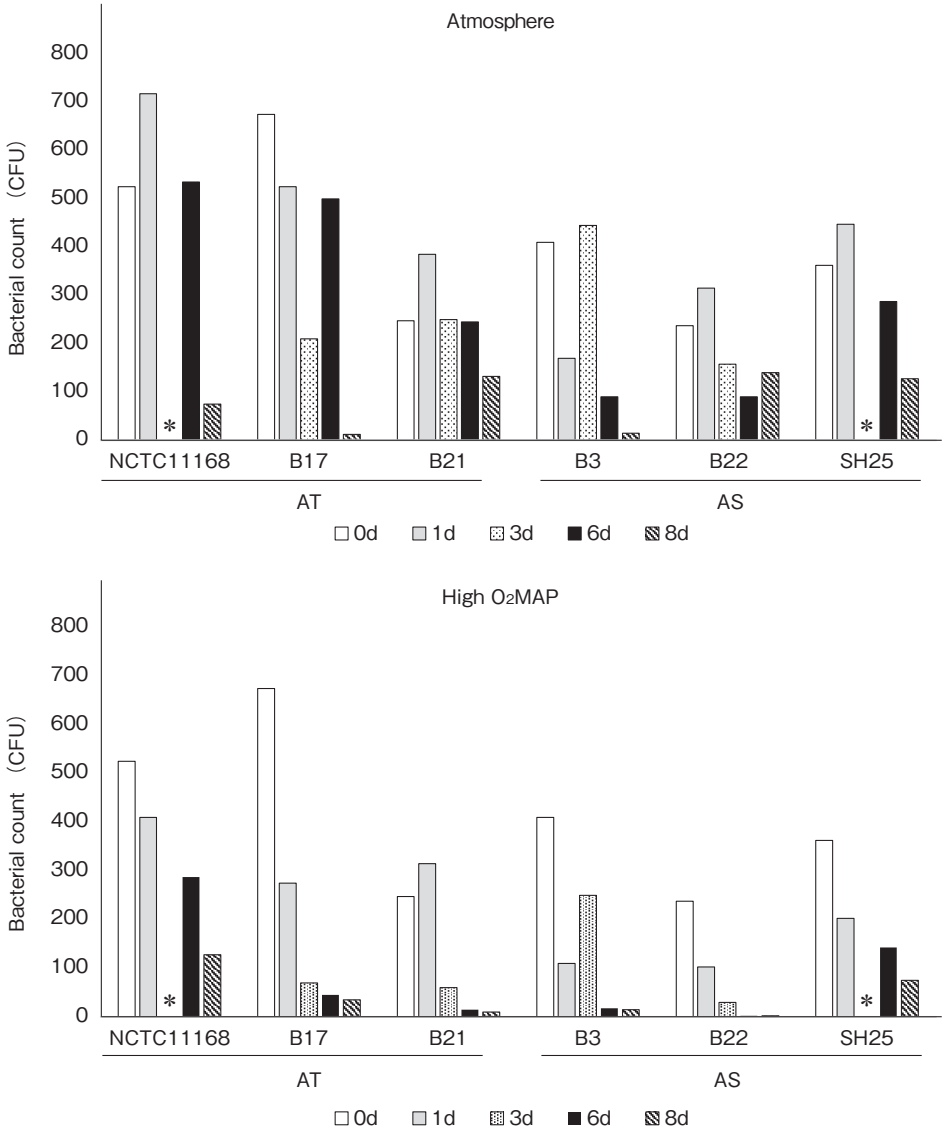


Fig. 1　Quantitative change of inoculated *Campylobacter* spp. counts in packed broiler whole legs analyzed by culture methods. CFU of samples packed under atmosphere or high-oxygen modified atmosphere packaging（High O_2MAP）at 4℃ was shown.
AT；aerotolerant, AS；aerosensitive, CFU；colony forming unit, *means not tested because of the missing of the experiment

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）　Kiatsomphob, S., Taniguchi, T., Tarigan, E., Latt, K. M., Jeon, B., Misawa, N.：Aerotolerance and multilocus sequence typing among *Campylobacter jejuni* strains isolated from humans, broiler chickens, and cattle in Miyazaki Prefecture, Japan, *J. Vet. Med. Sci*., **81**, 1144～1151, 2019.

© The Ito Foundation

食鳥処理工程における鶏肉のカンピロバクター動態解析

Analysis of *Campylobacter* population dynamics in chicken meat during chicken processing

佐々木　貴　正
（帯広畜産大学獣医学研究部門）

Yoshimasa Sasaki
(Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine)

The World Health Organization has stated that *Campylobacter* is one the four key global causative agents of diarrhea. Raw or undercooked chicken meat is a major source of *Campylobacter* enteritis. The Japanese Ministry of Agriculture, Forestry, and Fisheries has designated *Campylobacter* as a prioritized hazard in food safety risk management, and identified chicken meat as the principal source of *Campylobacter* enteritis in humans. This study aimed to characterize *Campylobacter jejuni* isolated from patients with *Campylobacter* enteritis genotypically and phenotypically, and to understand *Campylobacter* population dynamics in chicken meat during chicken processing. First, we characterized 190 *C. jejuni* isolates from patients with *Campylobacter* enteritis. These isolates were classified into 62 sequence types (STs) by multilocus sequence typing. The six major STs were ST22, ST4253, ST21, ST922, ST1044, and ST918. The resistant rates against ampicillin, streptomycin, tetracycline, nalidixic acid, and ciprofloxacin colistin were 17.9%, 1.1%, 29.5%, 54.2% and 54.2%, respectively. The results suggest that the majority of *C. jejuni* isolates from *Campylobacter* enteritis patients originated from chicken meat. Next, we investigated *Campylobacter* population dynamics in chicken meat during chicken processing. *Campylobacter*-positive broiler flocks had an average of 7.6 $\log_{10}$ CFU/g of *Campylobacter* in their cecal contents. *Campylobacter* was isolated from 87% of the breast meat samples produced from the *Campylobacter*-positive flocks. In processing plants with two chilling processes or one chilling process, the chilling processes reduced the *Campylobacter* counts in carcasses by an average of 2.4 $\log_{10}$ or 1.8 $\log_{10}$, respectively. In addition, The *Campylobacter* count in breast meat was significantly influenced by the *Campylobacter* count in the carcass after defeathering.

It is difficult to prevent *Campylobacter* contamination of chicken meat products when slaughtering *Campylobacter*-positive flocks. However, reducing *Campylobacter* counts in carcasses after defeathering may be effective in reducing *Campylobacter* counts in chicken meat products.

© The Ito Foundation

１．目　　的

カンピロバクターは感染性胃腸炎の原因として世界的に最もよく知られている病原細菌の１つであり，世界保健機関（WHO）はカンピロバクターは感染性胃腸炎の世界４大病原体の１つであるとしている[1)]。カンピロバクター腸炎の主な原因は，生または加熱不十分な鶏肉の喫食である。農林水産省は，カンピロバクターを食品安全に関するリスク管理における優先的ハザードに指定し，鶏肉をカンピロバクター腸炎の主な原因食品に位置付けている。

カンピロバクター腸炎は，原因食品の喫食後，消化管内で数日間増殖してから発症するため，多くの症例で原因食品が推定できず，食中毒と診断されない症例が多い。しかし，カンピロバクター感染リスク全体における鶏肉喫食の寄与度を推定するためには，食中毒と診断されなかった症例を含めた全カンピロバクター腸炎症例で評価する必要がある。そこで，カンピロバクター腸炎患者，家畜（牛，豚，鶏など），食肉から分離されたカンピロバクター株の性状を比較分析することにより各食品の有するカンピロバクター感染リスクの推定を行うこととした。また，従来から鶏肉の微生物汚染防止のために食鳥処理場でさまざまな微生物汚染低減策が実施されているが，カンピロバクター汚染に対する定量的な低減効果に関する実証データは乏しく，特に，国内生産量の大半を占める大規模食鳥処理場における実証データはほぼない。このため，複数の大手鶏肉生産者の協力の下，大規模食鳥処理場の食鳥処理工程におけるカンピロバクター汚染菌数の動態を解析し，微生物汚染低減策のカンピロバクター汚染に対する低減効果および重要管理点の抽出を試みた。

２．方　　法

2.1　カンピロバクター腸炎患者由来株

2022年４～８月の間に臨床検査機関においてカンピロバクター腸炎患者から分離された *Campylobacter jejuni* 190株を用いた。

2.2　食鳥処理場における検体採取および保管

2023年６月～2024年２月の間に国内の食鳥処理場８施設（A～H）において，食鳥処理作業日の最初のブロイラー群を調査対象鶏群として消化管（各群５羽），冷却工程前・後のと体の皮（各群５羽）および当該鶏群から製造された２kg詰め胸肉パックを採取し，冷蔵航空便で帯広畜産大学に送付し，到着後はカンピロバクター定量試験開始まで冷蔵条件下で保存した。さらに，２施設（AおよびG）においては，上記検体に加え，脱羽処理後のと体の皮（各群５羽）も採取した。カンピロバクター定量試験は，検体採取後48時間以内に開始した。２施設（DおよびH）のと体冷却工程は１回のみであったが，他の６施設は予冷工程と本冷工程の２回に分けて実施され，全８施設において，冷却槽に次亜塩素酸ソーダを添加していた。

2.3　カンピロバクター定量試験

各５羽の消化管から盲腸を切り出し後，盲腸内容物１ｇを採取し，９mlの滅菌緩衝ペプトン水（BPW）（関東化学）を加えて混合後，各羽2.5 mlの混合液を混合した（原液）。その後，この原液からBPWを用いて10倍段階希釈列を作成し，原液および10倍希釈列をカンピロバクター定量試験に供試した。と体の皮については，各採取地点の各５羽の皮（約150ｇ）を，滅菌ストマック袋に投入後，等重量（PBWの１mlを１ｇと換算）のBPWを加え90秒間ストマック処理した（２倍希釈液）。その後，２倍希釈液2.0 mlにBPW 8.0 mlを加えて10倍希釈液を作成した。２倍希釈液を５枚のmCCDA（SEL）培地（関東化学）に各0.2 ml

© The Ito Foundation

塗抹し，10倍希釈液を２枚のmCCDA（SEL）培地に各0.1 ml塗抹して，42℃で２日間微好気培養し，発育集落を集計した。胸肉パックについては，各袋の５ブロックから皮を切り出し，と体と同様に試験を実施した。なお，発育した集落がカンピロバクターであることを確認するため，１検体につきmCCDA（SEL）培地に発育した最大５集落を採取し，DNAを抽出後，PCR法[2]により菌種を同定した。盲腸内容物からカンピロバクターが分離されたブロイラー群を保菌群とし，カンピロバクターが分離されなかったブロイラー群を非保菌群とした。

2.4　Multilocus sequence typing（MLST）

カンピロバクター腸炎患者由来株，さらに，盲腸内容物，と体，および胸肉パックの各検体の１菌種１株について，MLST（https://pubmlst.org/organisms/campylobacter-jejunicoli）に従って遺伝子型（ST）を決定した。

2.5　薬剤感受性試験

カンピロバクター腸炎患者由来株，さらに，盲腸内容物，と体，および胸肉パックの各検体の１菌種１株について，８薬剤（アンピシリン，ストレプトマイシン，ゲンタマイシン，エリスロマイシン，テトラサイクリン，クロラムフェニコール，ナリジクス酸およびシプロフロキサシン）に対する最小発育阻止濃度（MIC）を，ドライプレート（栄研化学）を用いた微量液体希釈法により決定した。各薬剤のブレークポイントはCSLI[3]および農林水産省動物医薬品検査所のJVARM[4]に従った。

３．結果と考察

MLSTによって，カンピロバクター腸炎患者由来株は17のClonal complex（CC）に属する50のST型とCCが未分類の12のST型に分類された（**Table 1**）。10株以上が属したST型は６型あり，上位からST22（18株），ST4253（16株），ST21（14株），ST922（12株），ST1044（11株），ST918（10株）の順であった。薬剤耐性率は，ナリジクス酸とシプロフロキサシンが最も高く（54.2％），次いでテトラサイクリン（29.5％），アンピシリン（17.9％），ストレプトマイシン（1.1％）の順であった（**Table２**）。クロラムフェニコール，エリスロマイシンおよびゲンタマイシンには耐性を示す株はなかった。MLSTの上位６型のうち，ST22，ST4253，ST21およびST918の４型は，国産鶏肉の分離報告があり[5]，薬剤耐性パターンの傾向も一致している。また，ST922は牛[6]や牛肉（内臓を含む）[7]から同じ薬剤耐性パターンの分離されている一方，国産鶏肉からはほとんど分離されていない。ST1044は，国内の家畜や食肉の分離報告はほとんどないが，MLSTデータベース（https://pubmlst.org/organisms/campylobacter-jejunicoli）では鶏肉からの分離報告がある。以上のことから，カンピロバクター腸炎患者の多くは主に国産鶏肉または国産鶏肉から交差汚染を受けた食品を喫食した可能性が高く，次いで牛肉が感染源となっている可能性が高いと考えられた。この結果は，食中毒症例の疫学分析報告[8]と合致する。

食鳥処理場の調査では，50群中39鶏群（78％）の盲腸内容物からカンピロバクターが分離された。盲腸内容物中の平均菌数は7.6 $\log_{10}$ CFU/g（最小値4.7，最大値9.3）であった（**Table３**）。施設Ｂの盲腸内容物中の菌数はいずれも平均菌数以下であった。カンピロバクター保菌鶏39群から生産された胸肉パックの87％（34/39）からカンピロバクターが分離され，カンピロバクター保菌鶏群から製造された鶏肉は高確率でカンピロバクターに汚染されていることが確認された。カンピロバクター汚染胸肉パックにおける平均菌数は1.5 $\log_{10}$ CFU/g（最小値0.3，最大値3.0）であった。

© The Ito Foundation

Table 1　Antimicrobial resistane profiles of 190 *Campylobacter jejuni* isolates.

CC（No.）	ST（No.）	ARP	No.	CC（No.）	ST（N0.）	ARP	No.
21（58）	8（1）	TC+NA+CPFX	1	353（2）	2036（1）	TC+NA+CPFX	1
	21（14）	TC+NA+CPFX	6		10897（1）	susceptible	1
		NA+CPFX	3	354（4）	354（1）	NA+CPFX	1
		SM+TC	1		11347（1）	susceptible	1
		susceptible	4		12009（1）	NA+CPFX	1
	50（3）	NA+CPFX	1		13734（1）	NA+CPFX	1
		susceptible	2	403（1）	13743（1）	TC+NA+CPFX	1
	806（6）	ABPC+TC+NA+CPFX	2	443（6）	440（5）	TC+NA+CPFX	1
		TC+NA+CPFX	2			susceptible	4
		TC	2		13754（1）	susceptible	1
	883（7）	NA+CPFX	7	460（1）	5255（1）	susceptible	1
	982（3）	ABPC+TC+NA+CPFX	1	464（9）	464（1）	ABPC	1
		ABPC+NA+CPFX	1		1790（1）	susceptible	1
		ABPC	1		4389（1）	ABPC	1
	2250（1）	TC	1		6704（4）	ABPC+NA+CPFX	1
	4253（16）	NA+CPFX	2			ABPC	3
		susceptible	14		11015（1）	NA+CPFX	1
	4526（2）	TC+NA+CPFX	1		13744（1）	NA+CPFX	1
		NA+CPFX	1	508（6）	508（6）	NA+CPFX	3
	4910（1）	susceptible	1			susceptible	3
	8075（2）	ABPC	1	607（5）	607（3）	NA+CPFX	3
		susceptible	1		5801（1）	NA+CPFX	1
	9776（1）	TC+NA+CPFX	1		9757（1）	susceptible	1
	13738（1）	susceptible	1	658（11）	1044（11）	ABPC	2
22（18）	22（18）	ABPC+TC+NA+CPFX	2			susceptible	9
		ABPC+NA+CPFX	2	Unassigned（33）	922（12）	ABPC+TC+NA+CPFX	1
		TC+NA+CPFX	2			TC+NA+CPFX	9
		NA+CPFX	4			ABPC+TC	1
		ABPC	1			susceptible	1
		susceptible	7		2274（2）	TC	1
42（6）	42（4）	NA+CPFX	1			NA+CPFX	1
		TC	1		4325（3）	ABPC+TC+NA+CPFX	1
		susceptible	2			TC+NA+CPFX	2
	459（1）	TC+NA+CPFX	1		4622（2）	ABPC+TC	1
	6532（1）	ABPC+SM+TC+NA+CPFX	1			ABPC	1
45（10）	45（5）	TC+NA+CPFX	4		8071（3）	NA+CPFX	3
		susceptible	1		10006（2）	NA+CPFX	1
	3456（2）	TC+NA+CPFX	2			ABPC	1
	9681（1）	NA+CPFX	1		11570（1）	susceptible	1
	10574（1）	ABPC	1		13732（2）	ABPC+NA+CPFX	1
	11070（1）	ABPC	1			NA+CPFX	1
48（11）	48（1）	susceptible	1		13737（2）	ABPC+TC+NA+CPFX	1
	918（10）	TC+NA+CPFX	1			ABPC	1
		NA+CPFX	9		13739（1）	ABPC	1
52（4）	52（4）	NA+CPFX	4		13740（2）	ABPC+NA+CPFX	1
61（3）	61（1）	susceptible	1			ABPC	1
	1244（1）	TC	1		13751（1）	NA+CPFX	1
	10369（1）	TC+NA+CPFX	1				
257（2）	257（2）	TC+NA+CPFX	1				
		susceptible	1				

Abbreviations：CC：clonal complex, ST：sequence type, ARP：antimicrobial resistance profile,
ABPC：ampicillin, SM：streptomycin, TC：tetracycline, NA：nalidixic acid, CPFX：ciprofloxacin.

© The Ito Foundation

Table 2 Antimicrobial resistant rates in human isolates.

Antimicrobial	Rate（%）
Ampicillin	17.9
Streptomycin	1.1
Tetracycline	29.5
Chloramphenicol	0.0
Nalidixic acid	54.2
Ciprofloxacin	54.2
Erythromycin	0.0
Gentamicin	0.0

Table 3 *Campylobacter* concentrations in cecal samples and breast meat samples

Facility	Flock	Concentration（log_{10} CFU/g）		Facility	Flock	Concentration（log_{10} CFU/g）	
		Cecal content	Brest meat			Cecal content	Brest meat
A	A1	8.0	1.9	F	F1	4.0	＜0.3
	A2	＜0.7	＜0.3		F2	8.1	0.3
	A3	7.2	0.9		F3	＜0.7	＜0.3
	A4	＜0.7	＜0.3		F4	＜0.7	＜0.3
	A5	3.9	1.2		F5	9.0	1.2
	A6	8.7	2.1		F6	＜0.7	＜0.3
	A7	8.4	2.1	G	G1	8.6	1.8
	A8	＜0.7	＜0.3		G2	7.9	＜0.3
B	B1	7.3	＜0.3		G3	8.1	0.6
	B2	4.7	＜0.3		G4	7.3	0.8
	B3	7.4	1.7		G5	8.2	0.6
	B4	6.1	＜0.3		G6	＜0.7	＜0.3
	B5	6.1	1.0		G7	＜0.7	＜0.3
C	C1	8.4	3.0	H	H1	8.1	2.7
	C2	＜0.7	＜0.3		H2	7.8	1.1
	C3	7.6	1.4		H3	8.5	3.0
	C4	6.2	1.4		H4	8.1	2.0
	C5	＜0.7	＜0.3		H5	7.4	2.3
D	D1	8.8	2.4		H6	7.6	2.4
	D2	7.5	1.1		H7	8.6	2.9
	D3	＜0.7	＜0.3		H8	7.4	2.3
	D4	7.4	0.8		H9	9.0	2.3
	D5	8.0	1.9				
E	E1	7.5	1.2				
	E2	8.2	1.8				
	E3	7.6	1.8				
	E4	9.3	2.6				
	E5	8.5	1.0				

４施設（A，C，DおよびH）では，盲腸内容物中の菌数が8.0 log_{10} CFU/g以上の鶏群が食鳥処理された場合には胸肉パックの菌数は1.9 log_{10} CFU/g以上となった。さらに，施設Hでは，鶏群H２の胸肉パックを除き，胸肉パックの菌数は2.0 log_{10} CFU/g以上であった一方，３施設（E，FおよびG）では，盲腸内容物中の菌数が9.3 log_{10} CFU/gであった鶏群E４を除き，盲腸内容物中の菌数が8.0 log_{10} CFU/g以上の鶏群が食鳥処理されても，胸肉パックの菌数は1.8 log_{10} CFU/g以下であった。鶏肉のカンピロバクター汚染菌数は各施設によって異なり，食鳥処理工程の違いが鶏肉のカンピロバクター数に影響することを示唆している。

© The Ito Foundation

冷却工程後のと体からカンピロバクターが分離された17鶏群について，冷却工程が２回ある施設では，冷却工程により平均2.4 $\log_{10}$のカンピロバクター低減が認められた（**Table 4**）。一方，冷却工程が１回の施設（DおよびH）では，冷却工程によって平均1.8 $\log_{10}$のカンピロバクター低減が認められた。脱羽後と体を採取した２施設（AおよびG）について，施設Aのカンピロバクター保菌鶏群の脱羽後と体の平均カンピロバクター数は4.1 $\log_{10}$ CFU/g以下であったが，施設Gのカンピロバクター保菌鶏群の脱羽後と体の平均カンピロバクター数は2.5 $\log_{10}$ CFU/gであった。以上のことから，冷却工程を２回に分けて行うこと，脱羽時のと体におけるカンピロバクター数を低減させることが鶏肉のカンピロバクター汚染低減に有効であると考えられた。

カンピロバクター保菌39鶏群から分離されたカンピロバクターのうち，36株は*Campylobacter jejuni*，３株は*C. coli*であった（**Table 5**）。MLSTによって，*C. jejuni*株は９のCCに属する14のST型とCCが未分類の６のST型に分類された。*C. coli*株は９のCC828に属するST827とST854に分類された。*C. jejuni*株の薬剤耐性率は，ナリジクス酸とシプロフロキサシンが最も高く（55.6％），次いでテトラサイクリン（30.6％），アンピシリン（27.8％）の順であった（**Table 6**）。ストレプトマイシン，クロラムフェニコール，エリスロマイシンおよびゲンタマイシンには耐性を示さなかった。*C. coli*株はいずれもテトラサイクリン，ナリジクス酸およびシプロフロキサシンに耐性を示した。*C. jejuni*株の多くは，今回調査したカンピロバクター腸炎患者だけでなく過去に調査したカンピロバクター腸炎患者[9)]からも分離されており，これら国産鶏肉がカンピロバクター腸炎の原因となっている可能性が高いと考えられた。

鶏肉の喫食を原因とするカンピロバクター食中毒の発生を低減させるために，ブロイラー農場や食鳥処理場でカンピロバクター汚染実態調査が数多く実施されてきたが，多くは定性調査であり，食鳥工程における鶏肉のカンピロバクター数の変化について不明な点が多かった。特に冷却工程は交差汚染が生じる工程と解されてきたが，全カンピロバクター性鶏群において，明白なカンピロバクター数の減少が認められ，冷却工程が２回存在する施設では少なくとも２桁の減少が認められた。

盲腸内容物中に高濃度のカンピロバクターが存在するため，カンピロバクター保菌鶏が食鳥処理された場合には，鶏肉のカンピロバクター汚染を防止することは困難である。各食鳥処理場の鶏肉のカンピロバクター数は異なっていたことから，食鳥工程の改良により，鶏肉の汚染菌数を低下できる可能性を見出すことができた。特に，脱羽時と体のカンピロバクター汚染菌数を低下させることが効果的であり，今後，脱羽工程におけるカンピロバクター低減策の確立に向けた調査研究が必要である。

４．要　　約

世界保健機関（WHO）は，カンピロバクターは感染性胃腸炎における世界の４大病原微生物の１つであると提唱している。カンピロバクター腸炎の主な原因は，生または加熱不十分な鶏肉である。農林水産省は，カンピロバクターを食品安全に関するリスク管理における優先的ハザードに位置づけ，鶏肉をカンピロバクター腸炎の主な原因食品としている。

本研究の目的は，カンピロバクター腸炎患者から分離された*C. jejuni*の特徴を遺伝子学的かつ生化学的に明らかにすること，食鳥工程における鶏肉のカンピロバクター数の動態を理解することである。まず，カンピロバクター腸炎患者から分離された*C. jejuni* 190株の性状解析を実施した。分

© The Ito Foundation

Table 4 *Campylobacter* concentration in broiler carcasses

Facility	Flock	Concentration (log_{10} CFU/g)			Decrease during chilling process (log_{10})
		After defeathering	Before chilling	After chilling	
A	A1	4.5	3.7	1.2	2.5
	A2	<0.3	<0.3	<0.3	
	A3	ND	2.8	0.3	2.5
	A4	ND	1.9	<0.3	
	A5	ND	1.8	<0.3	
	A6	4.0	3.7	1.4	2.3
	A7	3.9	3.5	1.1	2.4
	A8	<0.3	<0.3	<0.3	
B	B1	ND	1.1	<0.3	
	B2	ND	<0.3	<0.3	
	B3	ND	2.2	<0.3	
	B4	ND	1.5	<0.3	
	B5	ND	2.9	0.6	2.3
C	C1	ND	3.8	1.4	2.4
	C2	ND	<0.3	<0.3	
	C3	ND	2.8	0.6	2.2
	C4	ND	1.8	<0.3	
	C5	ND	<0.3	<0.3	
D	D1	ND	2.9	1.3	1.6
	D2	ND	1.3	<0.3	
	D3	ND	<0.3	<0.3	
	D4	ND	1.9	<0.3	
	D5	ND	2.9	1.1	1.8
E	E1	ND	4.0	1.3	2.7
	E2	ND	4.0	1.4	2.6
	E3	ND	4.1	1.3	2.8
	E4	ND	4.5	2.1	2.4
	E5	ND	3.7	1.6	2.1
F	F1	ND	<0.3	<0.3	
	F2	ND	1.4	<0.3	
	F3	ND	<0.3	<0.3	
	F4	ND	<0.3	<0.3	
	F5	ND	3.3	1.0	2.3
	F6	ND	<0.3	<0.3	
G	G2	2.2	1.6	<0.3	
	G3	2.3	2.0	<0.3	
	G4	2.5	1.8	<0.3	
	G5	2.9	2.6	<0.3	
	G6	<0.3	<0.3	<0.3	
	G7	<0.3	<0.3	<0.3	
H	H8	ND	3.7	1.8	1.9
	H9	ND	3.8	2.1	1.7

Abbreviations：ND：not done.

© The Ito Foundation

Table 5　Antimicrobial resistane profiles of 39 *Campylobacter* isolated from cecal samples

Species	CC	ST	ARP	No.
C. jejuni	21	21	susceptible	1
		50	ABPC+TC	3
		536	ABPC+TC	1
			TC	1
		4253	NA+CPFX	1
		4526	NA+CPFX	1
	22	22	TC+NA+CPFX	2
	45	45	ABPC+NA+CPFX	1
			ABPC	1
		3456	TC+NA+CPFX	2
	257	5261	TC+NA+CPFX	1
	354	11347	susceptible	1
	443	440	susceptible	1
	460	5255	susceptible	4
	464	5731	susceptile	2
	607	607	NA+CPFX	1
	Unassingned	995	NA+CPFX	4
		2156	ABPC	4
		11570	susceptible	1
		13727	TC+NA+CPFX	1
		13729	NA+CPFX	1
		13755	susceptible	1
C. coli	828	827	TC+EM+NA+CPFX	1
		854	SM+TC+NA+CPFX	2

Abbreviations：CC：clonal complex, ST：sequence type, ARP：antimicrobial resistance profile, ABPC：ampicillin, SM：streptomycin, TC：tetracycline, NA：nalidixic acid, CPFX：ciprofloxacin.

Table 6　Antimicrobial resistant rates in *Campylobacter jejuni* isolated from cecal samples.

Antimicrobial	Rate（%）
Ampicillin	27.8
Streptomycin	0.0
Tetracycline	30.6
Chloramphenicol	0.0
Nalidixic acid	55.6
Ciprofloxacin	55.6
Erythromycin	0.0
Gentamicin	0.0

離株は，MLSTにより62個のST型に分類された。６個の主要なST型は，ST22，ST4253，ST21，ST922，ST1044およびST918であった。アンピシリン，ストレプトマイシン，テトラサイクリン，ナリジクス酸，シプロフロキサシンおよびコリスチンに対する耐性率は，それぞれ17.9%，1.1%，29.5%，54.2%，54.2%であった．この結果から，カンピロバクター腸炎患者から分離された*C. jejuni*の大部分は鶏肉に由来すると示唆された。次に，食鳥工程における鶏肉のカンピロバクター数の動態を調査した。カンピロバクター保菌群では，盲腸内容物中に平均7.6 $\log_{10}$ CFU/gのカンピロバクターが分離された。カンピロバクター保菌群から生産された胸肉の87%からカンピロバクターが分離された。冷却工程が２回または１回の食鳥処理場では，冷却工程によって枝肉のカンピロバクター数がそれぞれ平均2.4 $\log_{10}$または1.8 $\log_{10}$減少した。また，胸肉のカンピロバクター数は脱羽後の枝肉のカンピロバクター数に大きく影響された。

カンピロバクター保菌鶏群を食肉処理する場合，鶏肉製品のカンピロバクター汚染を防止する

© The Ito Foundation

ことは困難である。しかし，脱羽後のと体のカンピロバクター数を減少させることは，鶏肉製品中のカンピロバクター数を減少させるために有効であると考えられる。

文　献

1） World Health Organization（WHO）：The Global View of Campylobacteriosis：report of an expert consultation. 2013. https://www.who.int/publications/i/item/9789241564601［accessed on 18 Mar. 2024］.

2） Kamei, K., Kawabata, H., Asakura, M., Samosornsuk, W., Hinenoya, A., Nakagawa, S., Yamasaki, S.：*Jpn J Infect Dis*, 69(**3**), 256～258, 2016.

3） Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals, 5th ed. VET01S；CLSI：Wayne, PA, USA, 2020.

4） National Veterinary Assay Laboratory of Japan: Report on the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring System（JVARM）2016-2017, 2020.

5） Sasaki, Y., Ikeda, T., Yonemitsu, K., Okamura, M., Uema, M.：*Jpn J Vet Res*, 71(**2**), 56～64, 2023.

6） Sasaki, Y., Asakura, H., Asai, T.：*Anim Dis*, 2, 15, 2022.

7） Sasaki, Y., Iwata, T., Uema, M., Asakura, H.：*Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 61(**4**), 126～131, 2020.

8） Kumagai, Y., Pires, S. M., Kubota, K., Asakura, H.：*J Food Prot*, 83(12), 2087～2094, 2020.

9） Sasaki Y., Ikeda, T., Yonemitsu, K., Kuroda, M., Ogawa, M., Sakata, R., Uema, M., Momose, Y., Ohya, K., Watanabe, M., Hara-Kudo, Y., Okamura, M., Asai, T.：*J Vet Med Sci*, 85(**4**). 463～470, 2023.

© The Ito Foundation

食肉の低温貯蔵履歴と不十分な加熱がカンピロバクターの生残性に及ぼす影響

Effect of cold storage history of meat on viability of *Campylobacter* after inadequate heating

本　城　賢　一
（九州大学大学院農学研究院）

Ken-ichi Honjoh
（Faculty of Agriculture, Graduate School, Kyushu University）

Using three *Campylobacter jejuni* standard strains, the bacterial suspension was stored at low temperature in three conditions: refrigerated, frozen, and refrigerated after freezing in a microtube, and then heated in a hot water bath at 50℃ for 10 min. After that, microaerophilic culture was performed on TSA medium and CCDA agar medium at 42℃ or 37℃, and the viable count was determined. As a result, the viable counts before and after storage decreased by about 1 to 2 log CFU/ml by freezing, and by about 2 to 3 log CFU/ml by refrigeration after freezing. The survival rate calculated before and after heat treatment decreased by about 1 to 2 logs by freezing and by about 2 to 3 logs by refrigeration after freezing, and the heat resistance differed between strains. Moreover, after heating after low-temperature storage, among the three strains, only human fecal-derived *C. jejuni* ATCC33291 (*Cj1*) grew even in NaCl-added TSA medium. Measurements of D and Z values at 50 to 60℃ showed that the *Cj1* strain had the highest heat resistance. The state of injury of bacteria by comparing the viable counts after low-temperature storage using blood-containing- and blood-free-Columbia agar media were investigated to show that freezing and heat treatment produced around 1 log CFU/ml of injured bacteria. Furthermore, refrigeration after freezing increased the viable count by approximately 1 log CFU/ml compared to freezing alone, indicating that bacteria recovered during the refrigeration. Furthermore, the heat resistance at 55℃ for 5 min after storage was studied and the survival rate after heat treatment was tended to increase by about 2 to 3 logs by refrigeration after freezing compared to after freezing. In addition, fluorescence microscopy revealed that the injury of the membrane caused by freezing was recovered by subsequent refrigeration.

1．目　　的

*Campylobacter*食中毒は，近年国内で発生している細菌性食中毒の中で発生件数が最も多く，年間200件，患者数2000人程度で推移している[1)]。食中毒全体に対しては，2023年に発生した食中毒事件のうち約21％を占める[2)]。また，その原因食品としては加熱不足の食肉によるものが多い。すなわち，鳥刺しなどの未加熱の状態，あるいはたたきなどの意図的に完全な加熱が行われていない

© The Ito Foundation

ものに加え，中心部の加熱が不十分な食肉を喫食する可能性も考えられる。背景としては消費者が生に近い状態の肉を好むことも一つの理由として考えられるが，それだけでなく，原因菌となるカンピロバクターの耐熱性ならびに耐熱性に及ぼす食材の貯蔵の影響が十分に知られておらず，必要な加熱温度ならびに加熱時間が理解されていないという問題点があると考えられる。そこで本研究では，加熱前に異なる低温状態に置かれたカンピロバクターの耐熱性の違いを調べ，その後のカンピロバクターの生残性あるいは耐熱性に違いがあるのかを明らかにすることを目的とした。

2．方　法

2.1　供試菌株

Campylobacter jejuni ATCC33291（以下*Cj1*），*C. jejuni* ATCC33560（以下*Cj2*），*C. jejuni* ATCC49943（以下*Cj3*）を用いた。

2.2　培養方法

*Campylobacter jejuni*は，－80℃で保存されているものを用いた。Campylobacter Blood-Free Selective Agar Base（CCDA）（OXOID）培地上に画線し，アネロパウチ・微好気（三菱ガス化学株式会社）とパウチ袋（三菱ガス化学株式会社）を用いて微好気条件とし，42℃，48時間培養後，コロニー全体をBBL™ Brain Heart Infusion（BHI）（Becton Dickinson株式会社）培地に懸濁し，42℃，24時間微好気条件下で培養した。その後，600nmにおけるODが0.1になるように，BHI培地で菌濃度を調製した。

2.3　低温貯蔵

調製した菌液を，アイスラック上の1.5mlマイクロチューブ内で，①冷蔵（４℃，48時間）（以下R），②冷凍（－20℃，48時間）（以下F），③冷凍（－20℃，48時間）後に冷蔵（４℃，48時間）（以下FR）の各条件で低温貯蔵した。また，コントロールとして貯蔵前のもの（以下N）を用意した。

2.4　加熱処理

マイクロチューブに入れた貯蔵後の菌液を，湯浴を用いて，25℃，５分間，50℃，10分間，25℃，５分間の順に加熱処理した（以下H）。ただし，コロンビア寒天培地を用いた試験では，貯蔵なしと冷蔵条件において，加熱前に10^6CFU/ml程度に希釈してから25℃，５分間，55℃，５分間，25℃，５分間の順に加熱処理した。

また，D値とZ値の測定として，調製した菌液を，貯蔵を行わずに試験管内で，湯浴を用いて50℃，１～15分間，55℃，20秒～10分間，60℃，20秒～２分間の条件で加熱処理した。また，コントロールとして加熱処理をしないものを用意した。

2.5　生菌数測定

CCDA培地，Tryptic Soy Agar（TSA）（Becton Dickinson株式会社）培地，NaCl添加TSA培地（終濃度1.0％，2.0％），コロンビア寒天培地（OXOID），５％めん羊無菌脱繊維血液（KOHJIN BIO株式会社）添加コロンビア寒天培地の各プレート上に，オートクレーブ済み0.85％塩化ナトリウム（ナカライテスク株式会社）水溶液で段階希釈した各菌液10 μlを３回ずつスポットし，42℃，48時間または37℃，72時間，アネロパック・微好気（三菱ガス化学株式会社）と角型ジャー（三菱ガス化学株式会社）を用いて微好気条件下で培養した。D値とZ値の測定では，段階希釈後の菌液をTSA培地に100 μlずつ塗布し，42℃，48時間培養した。培養後，コロニー数を測定した。

また，貯蔵後加熱処理前の生菌数VC_1を貯蔵前の生菌数VC_0で割って算出された値を貯蔵後の生残率（Survival rate），加熱処理後の生菌数VC_2を貯蔵後加熱処理前の生菌数VC_1で割って算出された値を加熱処理後の生残率とした。

© The Ito Foundation

2.6　蛍光顕微鏡法

貯蔵後の菌液を，遠心分離（25℃，6,000×*g*，7分間）によって集菌し，0.1M HEPES-NaOH（pH7.1）で洗浄し，再び遠心分離（25℃，6,000×*g*，7分間）した。0.1 M HEPES-NaOH（pH7.1）と LIVE/DEAD ® BacLight™ Bacterial Viability kit（Molecular Probes社）を用いて説明書[3]に記載のとおりに混合し，10分間室温においた後，遠心分離（25℃，6,000×*g*，7分間）して，沈殿を2 μlの0.1 M HEPES-NaOH（pH7.1）に懸濁し，スライドガラスに載せ，カバーガラスをかけた。

システム顕微鏡（OLYMPUS（BX53F）），油浸オイルIMMERSION OIL TYPE F2（Nikon）を用いて，蛍光観察を行った。励起フィルターはBP470-490，吸収フィルターはBA515-550を用いた。

3．結果と考察

3.1　異なる寒天培地と培養温度を用いて行った低温貯蔵と加熱処理が*Campylobacter*の生残性と損傷菌の発生に及ぼす影響の評価

低温貯蔵後の菌液を，TSA培地を用いて42℃または37℃で培養したときとCCDA培地を用いて42℃で培養したときの生菌数測定の結果を**Fig. 1A**のグラフにまとめた。冷蔵による生菌数の変化はなかったが，冷凍により１～２log CFU/ml程度，冷凍後の冷蔵により２～３log CFU/ml程度減少した。また，貯蔵後加熱処理前の生菌数VC_1を貯蔵前の生菌数VC_0で割ることで，貯蔵後の生残率（Survival rate）を算出し，**Fig. 1B**のグラフにまとめた。また，加熱処理後の生菌数VC_2を貯蔵後加熱処理前の生菌数VC_1で割ることで，加熱処理後の生残率（Survival rate）を算出し，**Fig. 1C**のグラフにまとめた。生残率は，冷凍により１～２log程度，冷凍後の冷蔵により２～３log程度減少し，菌株間で耐熱性は異なった。*Cj1*は，*Cj2*および*Cj3*と比較して，冷凍や冷凍後の冷蔵による生残率の低下が大きかったが，耐熱性の低下は小さく，耐熱性が高かった。

培地に関しては選択培地（CCDA）では健常菌のみが生育し，非選択培地（TSA）には健常菌と損傷菌のどちらも生育すると考えられたが，差が見られなかった。これは，CCDA培地には活性炭が添加されており，活性酸素種の除去にはたらくことで，損傷菌の生育を助けた[4]ためであると考えられる。また，損傷菌は42℃よりも37℃で生育しやすい[4]と予想していたが，37℃では42℃よりも生菌数が少なかった。そこで，TSA培地にNaClを添加することで，完全な細胞膜をもち，浸透圧調整能が正常である健常菌のみを測定することができるのではないかと考えた。

3.2　塩化ナトリウム添加培地を用いて行った低温貯蔵と加熱処理による*Campylobacter*損傷菌発生状況の評価

健常菌数ならびに損傷菌数を算出するためにNaClを加えたTSA培地を用いた生菌数測定を行った。低温貯蔵後の菌液を，TSA培地，TSA＋NaCl（1.0％添加）培地，TSA＋NaCl（1.5％添加）培地を用いて42℃で培養したときの生菌数測定の結果を**Fig. 2**のグラフにまとめた。*Cj1*は耐塩性があったが，NaClの添加量による差はなかったため，損傷菌の算出には別の条件を用いた比較を行う必要があると推察された。*Cj2*と*Cj3*についてはNaCl添加培地では検出下限となり，損傷菌の存在割合が高いことと，耐塩性が低いことが推察された。血液を添加することで，栄養源としてだけでなく培地中の活性酸素種などの発育阻止物質を吸着することにより，発育促進のはたらきをする。このことから，５％めん羊脱繊維血液添加コロンビア血液寒天基礎培地と，血液無添加のコロンビア血液寒天基礎培地を用いて生菌数の比較を行うこととした。

© The Ito Foundation

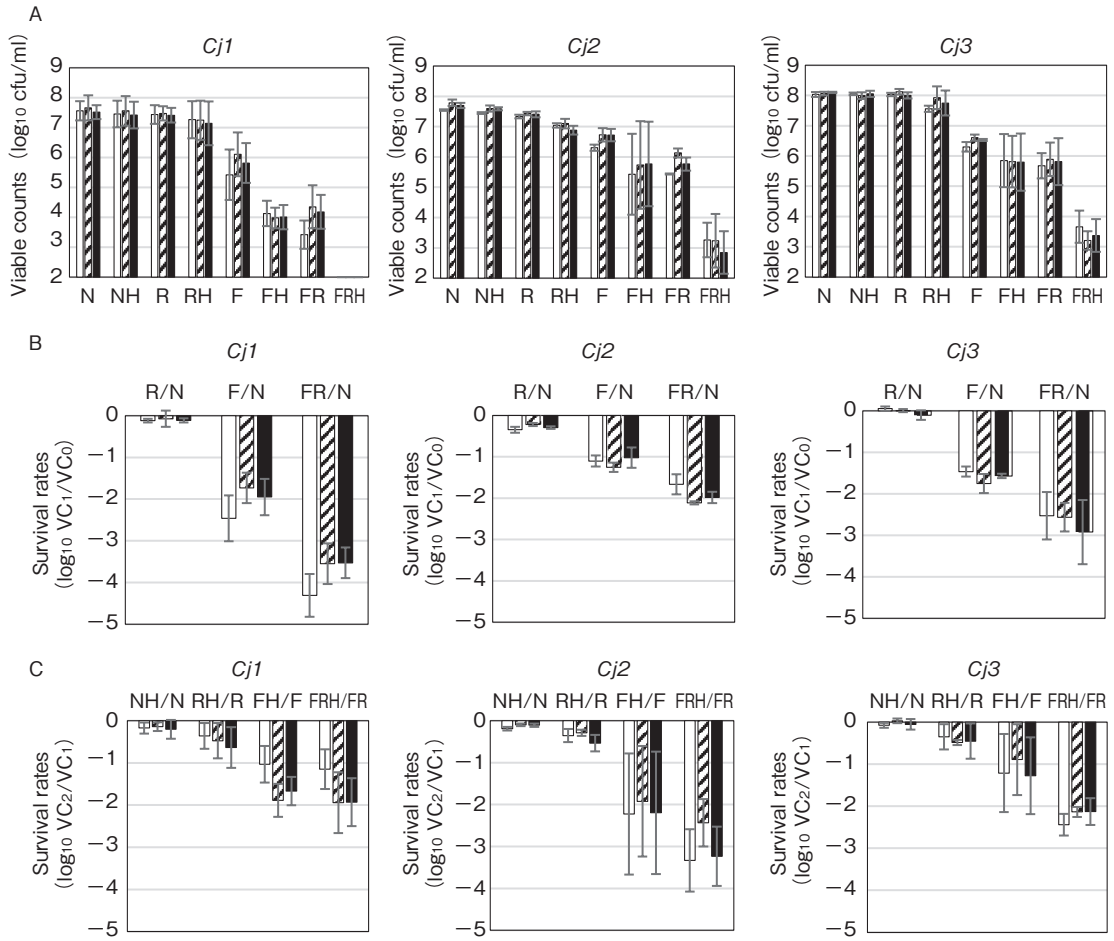


Fig. 1　(A) Viable counts and (B) survival rates of *Campylobacter* after low temperature storage. (C) Survival rate of *Campylobacter* after heat treatment.

N：before storage, R：after refrigeration, F：after freezing, FR：after freezing and refrigeration, H：after heat treatment. VC_0：viable count before storage, VC_1：viable count before heat treatment, VC_2：viable count after heat treatment.

□：TSA, at 37℃, ▨：TSA medium cultured at 42℃, ■：CCDA medium cultured at 42℃. Mean ± S.D., n = 3.

3.3　供試菌株の耐熱性評価

50℃，55℃，60℃におけるD値を測定し，その結果からZ値を算出した結果を**Table 1** にまとめた。加熱殺菌におけるD値とは，その温度で加熱したときに生菌数を10分の1にするために必要な加熱時間であり，Z値とはD値を10分の1にするために必要な温度上昇である。*Cj1*はすべての温度においてD値が比較的大きく，Z値も最も大きかった。したがって，3つの菌の中で最も耐熱性が高く，また**Fig. 3** により最も耐塩性が高いと推定されため，以降の実験では*Cj1*のみを供試菌株とした。

3.4　血液添加コロンビア寒天培地を用いて行った低温貯蔵と加熱処理が*Campylobacter*の生残性と損傷菌の発生に及ぼす影響の評価

低温貯蔵後の菌液を，コロンビア寒天培地，5％めん羊脱繊維血液添加コロンビア寒天培地を

© The Ito Foundation

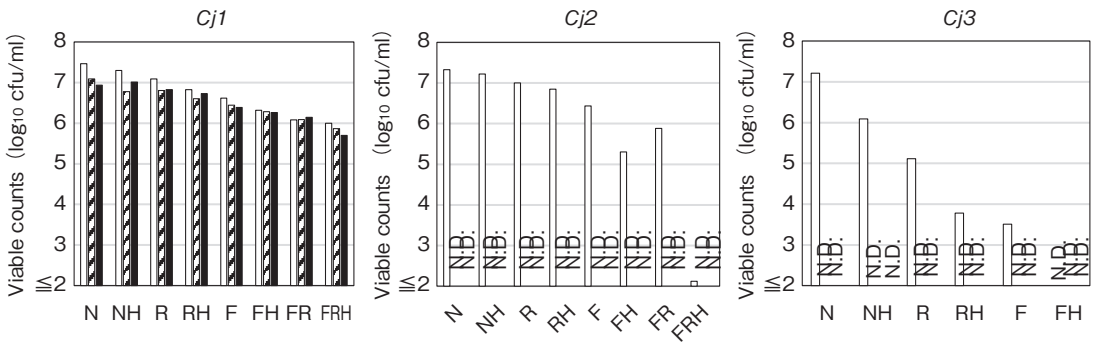


Fig. 2　Effect of sodium chloride on *Campylobacter* survival after each treatment.
N：before storage, R：after refrigeration, F：after freezing, FR：after freezing and refrigeration, H：after heat treatment.
□：TSA medium, ▨：TSA medium（1.0％ NaCl added）, ■：TSA medium（1.5％ NaCl added）. N.D.：Not detected（below detection limit）.

Table 1　D and Z values of *Campylobacter* at 50℃, 55℃ and 60℃.

	Cj1	*Cj2*	*Cj3*
$D_{50℃}$ value（min）	14.1	15.0	5.9
$D_{55℃}$ value（min）	6.3	1.9	0.75
$D_{60℃}$ value（min）	1.4	0.39	0.22
Z value（℃）	9.8	6.3	7.0

用いて42℃で培養したときの生菌数測定の結果，低温貯蔵後の生残率，ならびに加熱処理後の生残率を**Fig. 3**に示した。生菌数は冷凍により２log CFU/ml程度減少した。また，冷蔵（R）のみでは生菌数に変化がなかったが，冷凍後の冷蔵（FR）により，冷凍（F）のみよりも生菌数が１log CFU/ml程度増加する傾向が認められた。さらに，冷凍後加熱（FH）と冷凍＋冷蔵後加熱（FRH）との生菌数を比較すると，冷凍後に冷蔵することで生残菌数が２～３log程度高い値が示された。すなわち，冷凍後の冷蔵により，菌体の損傷状態が回復し，加熱に対する耐性が高まったものと推察された。

なお，５％めん羊脱繊維血液添加コロンビア血液寒天基礎培地と血液無添加培地を比較すると，冷凍ならびに加熱処理後の生菌数は，５％めん羊脱繊維血液添加培地のほうが生菌数が多く，損傷菌を含めて検出できていることが推察された。しかし，両培地間の差が小さいことから，損傷菌として生残しているカンピロバクターの割合は少ないことも推察された。

冷凍貯蔵によって，生体細胞内の溶媒である水の氷への相転移が起こり，細胞内に大きな氷晶が形成されて，水と氷が共存する相分離状態となることで，凍結損傷が発生する[5)]。また，一般に損傷から回復した菌は，回復期のストレス応答システムによって，再度負荷される致死ストレスに対する著しい抵抗性を獲得し，元の健常菌と異なる生理学的特性をもつことが多い[5)]。これらのことから，冷凍期間に細胞内における氷結晶の生成により生じた膜の損傷が，冷蔵期間にストレス応答システムによって回復し，回復した菌が元の健常菌よりも高い耐熱性をもったということが推察された。また，耐熱性変化の傾向が異なった理由と

© The Ito Foundation

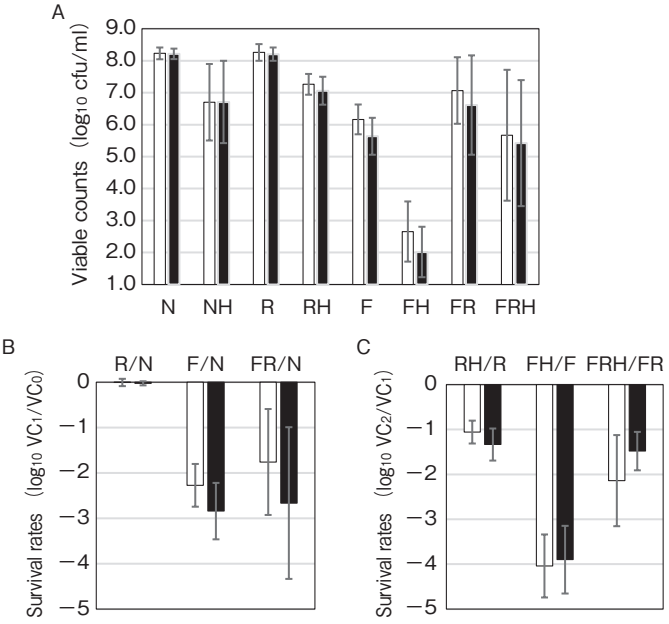


Fig. 3　Effect of low-temperature storage on the viability and survival rates of *Cj1* strain after heat treatment. (A) Viable counts after low temperature storage and heat treatment, (B) survival rates after low temperature storage, (C) survival rates after heat treatment.

N : before storage, R : after refrigeration, F : after freezing, FR : after freezing and refrigeration, H : after heat treatment. VC_0 : viable count before storage, VC_1 : viable count before heat treatment, VC_2 : viable count after heat treatment.

□ : Columbia agar medium supplemented with 5 % sheep defibrinated , ■ : Columbia agar medium.

しては，氷結晶生成速度の個体差が，損傷の程度に差を生じたためであると考えられた。

3.5　低温貯蔵後の損傷ならびに回復について

蛍光顕微鏡観察で撮影した写真を**Fig. 4** に示した。SYTO9色素は単独で用いたときに全細菌を標識するが，Propidium iodideは，膜が損傷した細菌にのみ透過し，両色素が存在する場合にSYTO9色素の蛍光が減弱するため，無傷の細胞膜を有する細菌は緑色の，損傷した膜を有する細胞は赤色の蛍光を発する[3]。冷凍後では赤色に蛍光している損傷菌が多く，冷凍によって膜損傷が確認された。一方，冷凍後に冷蔵したときには緑色に蛍光している健常菌が多く，膜の損傷が回復したものと推察された。損傷菌は，致死的損傷菌，潜在的致死的損傷菌，亜致死的損傷菌に分類され，亜致死的損傷菌は準安定状態にあって通常の非選択条件下では復活する[5]。また，潜在的致死的損傷菌も，本来致死的なものであるが，細胞分裂が抑制される環境では復活することがある[5]。損傷から回復した菌は，回復期のストレス応答システムによって，再度負荷される致死ストレスに対する著しい抵抗性を獲得し[6]，元の健常菌よりも高い耐熱性をもつと推察された。

また，食肉に関連する*E. coli*，*P. aeruginosa*，*S. enterica*，*Staphylococcus simulans*，*Enterococcus faecalis*などの菌は，*Campylobacter*の生存を可能にする交差防御を提供する[7]ことが知られており，鶏肉中での*Campylobacter*の回復

© The Ito Foundation

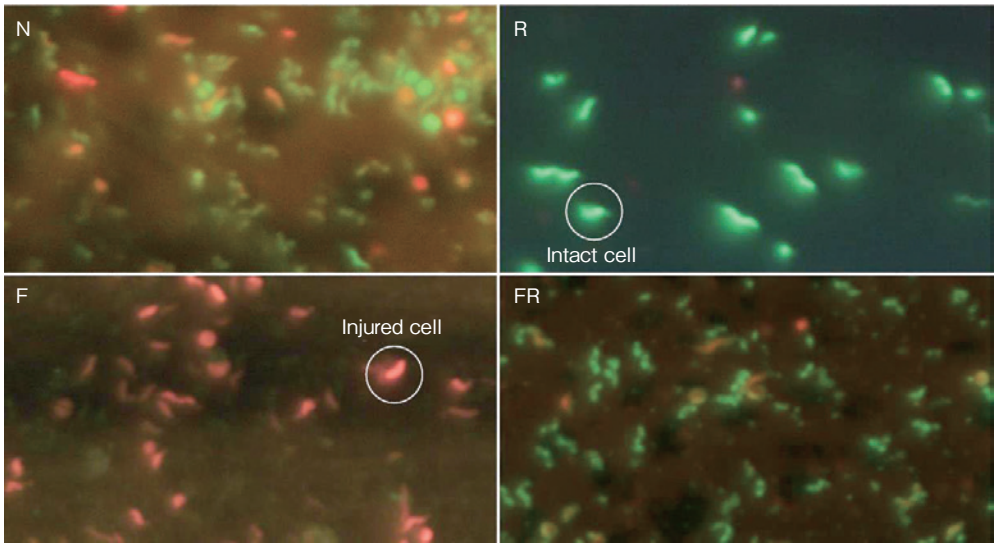


Fig. 4　Observation of cells of *Campylobacter*（*Cj1* strain）after low temperature storage using fluorescence microscopy.
N：before storage, R：after refrigeration, F：after freezing, FR：after freezing and refrigeration. Bacteria with intact cell membranes fluoresce green, cells with injured membranes fluoresce red.

の仕方や耐熱性の変化は，培地中とは異なる可能性があるため，今後は本研究で冷凍後の冷蔵中に耐熱性が高まることを見出した*C. jejuni* ATCC33291株に緑色蛍光タンパク質（GFP）を発現させるプラスミドを導入し，常在菌との識別を可能にして鶏肉中での低温貯蔵による生残率と耐熱性の変化を調べる予定である。

４．要　　約

*Campylobacter jejuni*標準株３株を供試菌株として，菌懸濁液をマイクロチューブ内で冷蔵，冷凍，冷凍後冷蔵の３つの条件で低温貯蔵し，湯浴で50℃，10分間の加熱処理を行った後，TSA培地ならびにCCDA寒天培地で42℃または37℃で微好気培養し，生菌数測定を行った。その結果，貯蔵前後の生菌数は冷凍により１～２log CFU/ml程度，冷凍後の冷蔵により２～３log CFU/ml程度低下した。加熱処理前後で算出した生残率は，冷凍により１～２log程度，冷凍後の冷蔵により２～３log程度低下し，菌株間で耐熱性は異なった。また，低温貯蔵後の加熱後において，３株のうち，ヒト糞便由来*C. jejuni* ATCC33291（*Cj1*）のみがNaCl添加TSA培地でも生育した。

次に，50～60℃でのＤ値とＺ値の測定を行ったところ，*Cj1*株が最も高い耐熱性をもち，上述のとおり耐塩性も高かったことから，５％めん羊脱繊維血液添加コロンビア血液寒天基礎培地ならびに血液無添加培地を用いて低温貯蔵後の生菌数の比較を行うことで損傷状態について調べたところ，冷凍ならびに加熱処理によって，損傷菌が１log CFU/ml程度生じることが明らかとなった。さらに，冷凍後の冷蔵によって，冷凍のみよりも生菌数が１log CFU/ml程度増加し，冷蔵中に菌が回復していることが分かった。さらに，貯蔵後の55℃，５分間の加熱処理による耐熱性を調べたところ，冷凍後と比べ冷凍後の冷蔵を経ることで加熱処理後の生菌数が２～３log程度高いことが認められた。また，蛍光顕微鏡観察により，冷凍

© The Ito Foundation

によって生じた膜の損傷が，その後の冷蔵により回復することが明らかになった。

参考文献

1） 伊藤武，一般財団法人東京顕微鏡院：カンピロバクター食中毒の実態とギラン・バレー症候群，2024. https://www.kenko-kenbi.or.jp/columns/food/8143/，（参照2024-03-24）.
2） 厚生労働省：食中毒統計資料，2023.
3） Molecular Probes，製品情報 LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit, 2004.
4） 岩田剛敏：畜産物におけるカンピロバクター損傷菌の発生と対策，日本食品科学工学会誌，65(5)，270～274, 2018.
5） Tsuchido, T., Naruki S., Shibasaki, I.：Inhibition of development of *Bacillus subtilis* var. niger spores by fatty acids and their monoglycerides, *J. Antibact. Antifung. Ag., Japan*, 20, 197～203, 1992.
6） 朝田良子，坂元仁，古田雅一，土戸哲明：生死の間をさまよう損傷菌，日本農芸化学会，化学と生物，**59**, 64～73, 2021.
7） Marmion, M., Macori, G., Ferone, M., Whyte, P., Scannell, A. G. M.：Survive and thrive：Control mechanisms that facilitate bacterial adaptation to survive manufacturing-related stress, *Int. J. Food Microbiol.*, **368**, 109612, 2022.

© The Ito Foundation

*Campylobacter jejuni*のIRバイオタイパーを用いた新規型別法の構築と検討

Development and evaluation of novel typing method of *Campylobacter jejuni* by IR-biotyper

畑　中　律　敏
（大阪公立大学大学院獣医学研究科）

Noritoshi Hatanaka
（Graduate School of Veterinary Science, Osaka Metropolitan University, Osaka, Japan）

Campylobacter spp. is a spiral rod shape microaerophilic bacterium. Foodborne disease caused by *Campylobacter jejuni* is one of the major global problems for food safety. Infection source of *Campylobacter* to human is mainly through contaminated meat particularly chicken. To control these foodborne diseases, it is important to know the way of contamination. For surveillance of this bacteria commonly used PFGE method, MLST and whole genome sequence. However, in case of *Campylobacter* it is necessary the time to culture of bacteria for getting enough number of bacterial numbers. Further, in these experiments, the enough handling skill, time to prepare samples and much effort are necessary to get results.

IR Biotyper is a one of new typing method which developed based on the result of FT-IR（Fourier Transform Infared Spectroscopy）recently. In this method, we can obtain results quickly, around 1 hour after culture bacteria on agar plate. However, there are no repots which develop the protocol for *Campylobacter* spp.. Therefore, in this study, we attempt to develop protocol and evaluate the methodology for this bacterium.

Total 232 *C. jejuni* isolates were analyzed by PFGE and no clonal isolates were found. Then, 19 and 7 isolates which were showing high similarity in PFGE and randomly 12 isolates which were showing different PFGE patters were selected and carried out whole genome sequencing. Ninety and seven isolates were characterized as ST-58 and ST-933, and 12 isolates were identified as each different STs. Further, we attempt to find appropriate culture method for IR Biotyper, several types of agar plates were examined and since, variation of each isolate data was low, lton broth supplemented with 1.5% agar was selected. However, we could not observe reproducibility of each isolate. Further, we have to modify protocol which can show reproducibility.

1．目　　的

*Campylobacter*属菌はグラム陰性のらせん状桿菌で，特に*C. jejuni*と*C. coli*は世界中でヒトの下痢症起因菌として問題となっている。本菌種は主に家禽や家畜の腸管内に分布しており，汚染された食肉等を介してヒトが感染し下痢等の消化器症状を発症すると考えられており，我が国において

© The Ito Foundation

は近年細菌性食中毒の事件数で常に上位を占めている[1,2]。本菌による食中毒事例や食品の汚染源を特定する際には，現在もpilsed-field gel electrophoresis（PFGE）法がよく用いられており，近年ではmulti locus sequencing typing（MLST）法や全ゲノム解析法等より遺伝子配列を詳細に解析・比較する方法が用いられるようになってきている。しかしながら，本菌種は，微好気性菌であり，培養には栄養価の高い培地を用いても48時間と長時間を要する。さらに，これらの方法にて結果を得るためには菌を培養後，３日間程度必要であり，時間と労力，そしてコストがかかる等の問題点が存在する。

IRバイオタイパーは，主に菌体の細胞壁上の炭水化物や多糖類の振動を測定するフーリエ変換赤外分光システムであり，近年PFGE法に変わる新しい菌株タイピング法として注目されている技術である。本法はこれまでに，ヒトの臨床現場やプロバイオティクス製品の品質管理等で用いられておりその有用性について示されてきており，結果を得るまでに菌を培養後約30分で結果が得られる迅速性が特徴である。本研究では，世界中で食中毒を引き起こしているカンピロバクターに対しても応用できるのかを明らかとすることを目的に，これまで我々が収集してきたヒト臨床，ニワトリ，ウシ由来株を用いPFGE，WGS，IRバイオタイパーの３つの方法を比較し，IRバイオタイパーで型別する方法を構築する。

2．方　法

2.1　菌株の選抜

本実験では下痢症患者70検体由来155株，ニワトリ50検体由来334株，ウシ69検体由来398株の計887株の*C. jejuni*を供試した。まず，菌体を５％ウマ血液加血液寒天培地を用い10％ CO_2，10％ H_2，80％ N_2下で48時間培養後，菌体をPBSに懸濁し濁度をOD_{600}＝1.0に調整した。調整した菌液よりアルカリ熱抽出法によりDNAを抽出し，ERIC-PCRにて得られた電気泳動像より菌株のクローナリティーを確認し，同一検体由来のクローナルな菌株を排除した。

2.2　PFGE

ERIC-PCRにてクローナルな菌株を除去し，選択した菌株を用いCDC-Protocolに従い*SmaI*および*Kpn*Iを用いPFGEを行い解析した。

2.3　全ゲノム配列の解析

PFGEの結果PFGEパターンの相同性が高かった２グループの菌株計26株とPFGEパターンがまったく異なる菌株12株を用い全ゲノム配列の解析を行った。培養した菌株より，DNeasy Blood & Tissue Kitを用いてゲノムDNAを調整した。調整したDNAよりIllumina DNA Prepおよび Illumina DNA/RNA UD indexesを用いライブラリーを調整し，NextSeq 1000/2000 P2試薬を用いNextSeq 1000でシークエンシングを行った。

得られたデータよりRidom SeqSphere＋を用いMLST解析を行った。

2.4　IRバイオタイパー用菌株の培養法の検討

全ゲノム配列を解析した菌株のうちランダムに選んだ10株について寒天培地上での発育について観察を行った。用いた培地は５％馬血液加Blood agar base No.２，血液非添加Blood agar base No.２，1.5％ Agar加Bolton broth，Muller Hinton寒天培地，1.5％ Agar加Brucella brothの５種類を用い，10％ CO_2，10％ H_2，80％ N_2下で48時間培養後菌株の発育を確認した。

2.5　IRバイオタイパーによる解析

各培養した菌体を仕様書の手順に従い処理した。つまり，IRバイオタイパーサンプル調整用チューブに50 μlの70％エタノールを分注し，菌体を懸濁後ボルテックスにて１分間しっかりと混和する。次に各チューブに50 μlのDWを添加し再

© The Ito Foundation

度ボルテックスにて１分間しっかりと混和する。混和したサンプルをIRバイオタイパー用のプレートにスポットし乾燥後IRバイオタイパーにて解析を行った。

３．結果と考察

3.1　ERIC-PCRによる菌株の選定

本研究では計887株をERIC-PCRにより同一検体由来のクローンの排除を行った。ERIC-PCRを行った結果，同一検体由来で同一のERICパターンを示す菌株を集約し，代表の１株の身を以降の実験に用いた。すなわち，下痢症患者由来71株，ニワトリ由来62株，ウシ由来99株の計232株を供試することとした。

3.2　PFGEによる菌株の解析

各菌株を*Sma*Iを用いPFGEにて解析を行った結果，ほとんどの菌株は異なるPFGEパターンを示した。一方で10株は同様のPFGEパターンを示したが，*Kpn*Iを用いた場合これらの菌株は異なるパターンを示した。以上のことより，今回供試した菌株の中には完全にクローナルと考えられる菌株は存在しないことが明らかとなった。

3.3　全ゲノム配列の解析

PFGEを行った結果，PFGEパターンの相同性が高かった19株と７株の計26株と，PFGEパターンがまったく異なる菌株をランダムに12株選択し，合計38株についてゲノムの精製を行い全ゲノム配列の解析を行った。得られた配列よりMLSTを行った結果，PFGEパターンの相同性が高かった19株と７株はそれぞれST58とST933に型別され，ランダムに選択した12株はすべて異なるSTに型別された。

3.4　*Campylobacter*の培養培地の検討

全ゲノム配列を解析した菌株の中からランダムに10株選択し，５種類の培地で培養を行った結果，５％馬血液加Blood agar base No.２，血液非添加Blood agar base No.２，1.5％ Agar加Bolton broth，の３種類の培地では10株すべての発育を確認できたが，Muller Hinton寒天培地では菌株によって発育状態が悪く，IRバイオタイパーにかけるための菌体量を得ることができなかった。また，1.5％ Agar加Brucella brothでは菌株によっては発育を確認することはできなかった。以上のことより，IRバイオタイパーにかけるための菌体の培養には５％馬血液加Blood agar base No.２，血液非添加Blood agar base No.２，1.5％ Agar加Bolton brothの３種類を候補とした。

3.5　IRバイオタイパーによる型別

PFGEパターンが異なる10株を５％馬血液加Blood agar base No.２にて培養した菌株をIRバイオタイパーにて型別したところ，CO2-128株とCO2-132株，CO2-127株とCO2-146株はそれぞれ同一のクラスターに含まれてしまい，菌株を分けることはできなかった（**Fig. 1A**）。次に，同じ10株を血液非添加Blood agar base No.２，1.5％ Agar加Bolton brothにて培養しIRバイオタイパーにて型別を行った結果，10株を分けることに成功した（**Fig. 1B, C**）。さらに，各菌株の取得データを確認すると，同一日に同一条件で作製したサンプルよりデータを取得したが，５％馬血液加Blood agar base No.２で培養した場合，データの多様性は大きく，血液非添加Blood agar base No.２，1.5％ Agar加Bolton brothの順に多様性は小さくなる傾向が見られた。

そこで，1.5％ Agar加Bolton brothを用いてST-58に型別された菌株を用いて分解能およびデータの再現性について検証を行った。IRバイオタイパーを用いて型別することで，ST-58の菌株を複数のクラスターに型別できる可能性が示されたが，一方でL32c1-1209株や9914b株のように別日に調整したサンプルでは異なるクラスターに分類されてしまう菌株も存在し，再現性が確認で

© The Ito Foundation

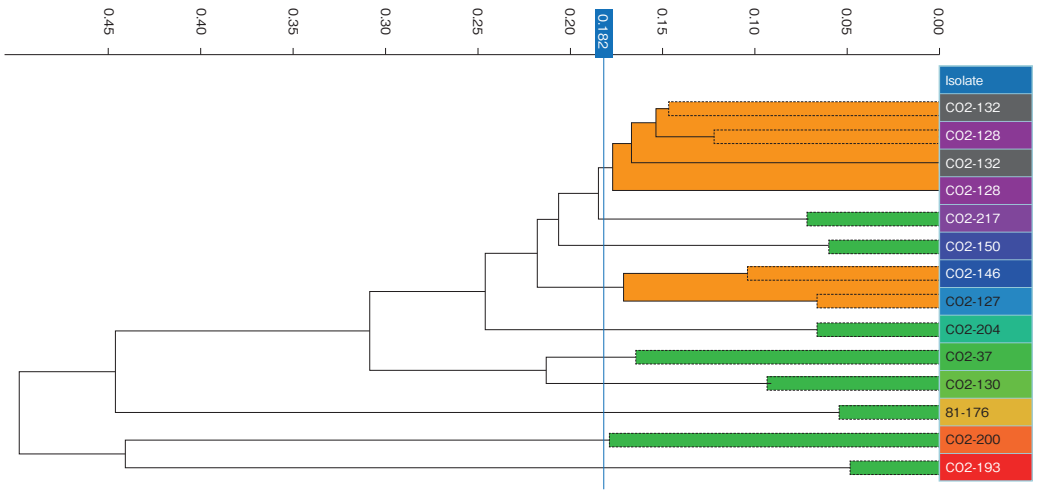


Fig. 1 (A)　The dendrogram of the IR Biotyper for the 10 *C. jejuni* strains which cultured on Blood agar supplemented 5 % horse blood.

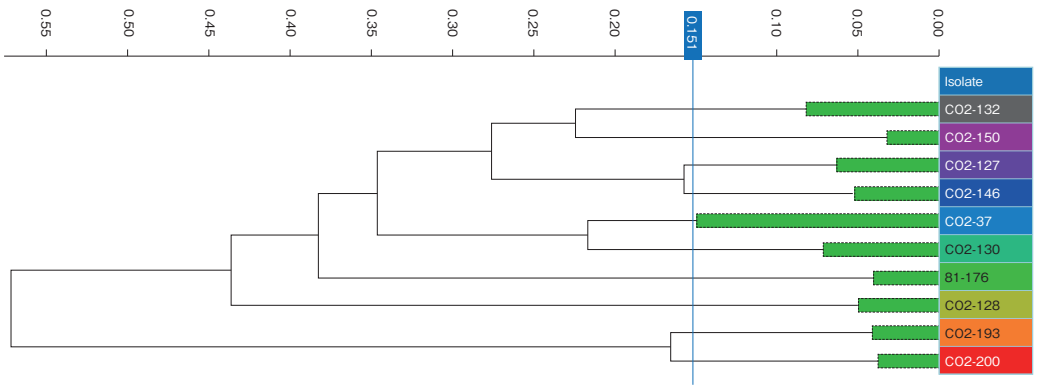


Fig. 1 (B)　The dendrogram of the IR Biotyper for the 10 *C. jejuni* strains which cultured on Blood agar without horse blood.

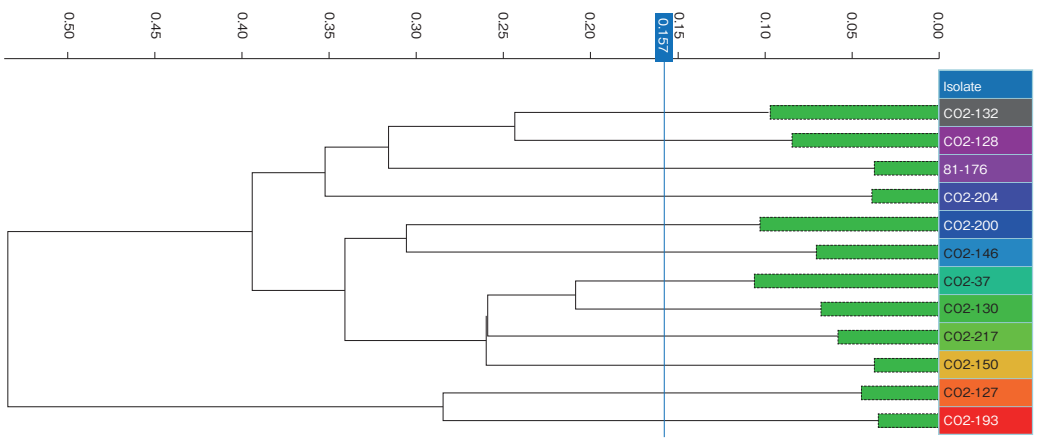


Fig. 1 (C)　The dendrogram of the IR Biotyper for the 10 *C. jejuni* strains which cultured on Bolton agar without horse blood.

© The Ito Foundation

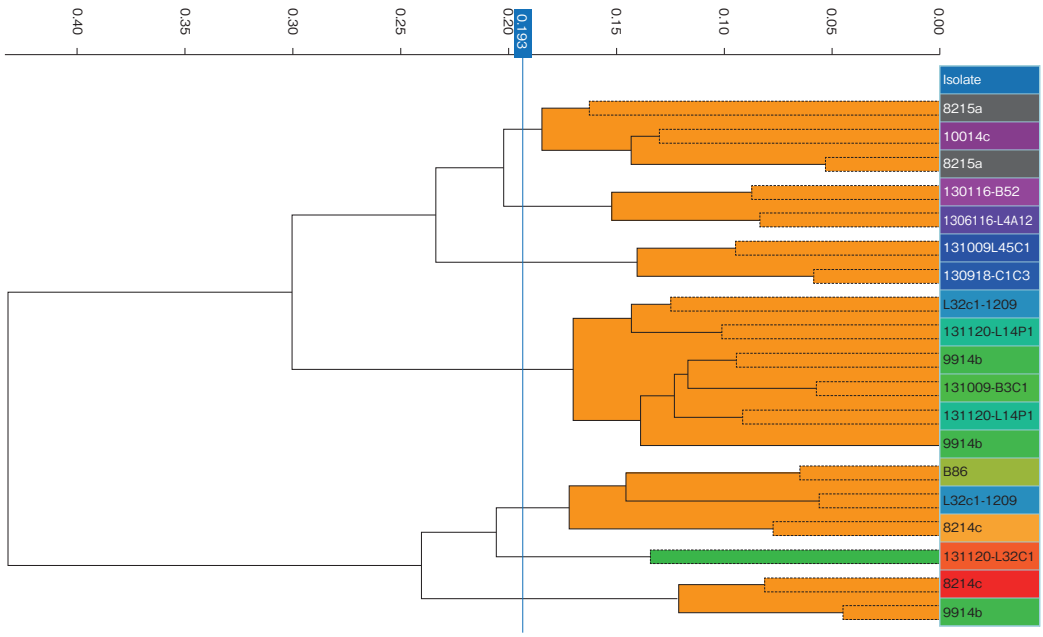


Fig. 2　The dendrogram of the IR Biotyper for the 10 *C. jejuni* strains which cultured on Bolton agar without horse blood.

きない菌株も存在した（**Fig. 2**）。

3.6　考察

本研究では，世界中で問題となっている*C. jejuni*による食中毒の制御に向けて本菌種の型別法としてGold standardであるPFGE法やMLSTに代わる迅速でかつ簡便な方法として，FT-IRによる型別をIR biotyperを用いて試みた。IR biotyperにて解析するにあたり，まず菌体の培養方法の検討を行ったところ，血液を含む培地で培養した場合は分解能が悪く，栄養価の低い培地を用いた場合のほうが分解能が高くなることが示唆された。また，逆に栄養価が低すぎる場合においては発育できない菌株も存在しており，汎用性を求めるにあたり供試した菌株すべてが発育し，かつ取得したスペクトルの安定性が高い1.5% Agar加Bolton brothを選択した。さらに，本培地を用いてさらに解析を進めると，同じSTの菌株間においてもいくつかのクラスターを形成していたことよりMLST法よりも分解能は高いことが示唆されたが，一方でスペクトルに再現性を得ることができない菌株も存在していた。*Campylobacter*属菌の培養には48時間という長時間を要しているため，死菌等も多く含まれていることが考えられるとともに，培養ステージを均一化することが困難であると考えられる。そのため，今後培養プロトコールを変更するにあたり，より短時間で十分量の菌量が得られるようなプロトコールにしていく必要があると考えられる。また，*Bacillus*属菌に対しては熱処理を加えIR biotyperにて解析を行っている研究も発表されているため[3)]，*Campyobacter*属菌においても熱処理を行い培養ステージに左右されない方法についても検討することが必要であると考えられる。

4．要　　約

本研究では培養に時間を要し，型別等の解析に

© The Ito Foundation

も時間を必要とする*C. jejuni*の新たな迅速かつ簡便な型別法としてIRバイオタイパーが使用できないか検証を試みた。まず，さまざまな*C. jejuni*菌株をIRバイオタイパーにかけるにあたり適当な培養法を検討した。５種類の培地を用い検討したところ，２種類の培地では供試した菌株のうち数株で十分な発育が確認できなかった。さらに，３種類の培地を用いIRバイオタイパーでの得られる波形の多様性についても検証を行い，同一菌株内での多様性が最も少なかった1.5％ Agar加Bolton brothを用いることとした。

従来の型別法としてPFGEおよびMLST法との解像度の違いについても検証を行った。MLSTでは同じSTに型別される菌株もPFGEでは異なるバンドパターンを示す等，PFGEはMLSTより解像度が高かった。また，IRバイオタイパーにおいても同様に同一STの菌株をさらに型別でき，PFGE同様解像度は高いことが明らかとなった。一方で，再現性を得られない菌株も存在し，培養プロトコールおよび菌体の調整プロトコールについても，さらに検討を進める必要があると考えられた。

文　献

1） Lopes, Graciela Volz *et al.*：Virulence factors of foodborne pathogen *Campylobacter jejuni*, *Microbial Pathogenesis*, 2021, vol. 161, part. A, doi：10.1016/j.micpath.2021.105265.
2） Bolton, Declan J.：*Campylobacter* virulence and survival factors, *Food Microbiology*, 2015, vol. 48, p. 99–108, doi：10.1016/j.fm.2014.11.017.
3） Manzulli, Viviana *et al.*：Application of Fourier Transform Infrared Spectroscopy to Discriminate Two Closely Related Bacterial Species：Bacillus anthracis and Bacillus cereus Sensu Stricto, *Microorganisms*, 2024, Vol. 12, doi：10.3390/microorganisms12010183.

© The Ito Foundation

食肉の健康リスクと環境リスクに係るリスクコミュニケーション手法の研究ならびに効果検証

Research and evaluation of risk communication method for meat concerning health and environmental risk

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

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

In the past, food risk communication was faithful from the perspective of food safety related to health risks, but from now on, it is necessary to take the perspective of environmental risks, which are emphasized in the SDGs（Sustainable Development Goals）. In particular, there is a concern that risk perception bias is occurring among citizens who avoid meat as a major environmental risk due to greenhouse gas emissions from meat production and livestock farming. Therefore, in this internet research study, we examined the effects of smart risk communication related to the health risks and environmental risk of meat. Information on five sources of anxiety was provided to 1,050 consumers in each of the groups who had considered the SDGs when purchasing food（SDGs＋ group）and those who had never considered them（SDGs－ group）. The respondents were concerned about the health risks of additives in processed meat, 72％～78％ for SDGs＋ and 44％～51％ for SDGs－ group, and affirmed of anxiety about the environmental risks of meat, 61％ for SDGs＋ and 36% for SDGs－ group. The anxiety relief rate through smart risk communication was 80%～82% for SDGs＋ and 72%～76% for SDGs－ group regarding the health risks of additives in processed meat, and 88% for SDGs＋ and 84% for SDGs－ group regarding the environmental risk of meat. Therfore, it is expected that smart risk communication would be effective not only in the health risks of additives but also in the perception bias of the environmental risk of meat.

1．目　　的

2018年，山﨑らは食品添加物の健康リスクを過大視する消費者に対して，その「確証バイアス」を補正するための新たなリスクコミュニケーション（以下,「リスコミ」）の手法を開発し,「スマート・リスクコミュニケーション」と命名した。このリスコミ手法は，まず「確証バイアス」の要因となっている信念や不安に共感した設問を投げかけたうえで，次に専門家から学術的説明を分かりやすく提供することで，市民の不安要因への理解が深まり，自らリスクの大小を冷静に判断できるのが特徴だ[1)]。また2021年に，我々はハム・ソーセージ・ベーコンなどの加工肉に配合される食品

© The Ito Foundation

添加物の健康リスクに過敏な20代～50代の女性に対して，上述のスマート・リスコミ手法の効果検証を試み，明確なリスク認知バイアスの補正を認めた[2)]。

ただ，これまでは健康リスクに係る食品安全の観点で忠実に伝えれば良かったが，今後はSDGsで重視されている環境リスクの観点のコミュニケーションが必要である。とくに食肉生産/畜産業による温室効果ガス排出が大きな環境リスクとして，動物性タンパクを忌避するベジタリアンが国内でも増えつつあり，食肉を避ける市民にリスク認知バイアスが起こっている懸念がある。そこで本研究では，消費者市民への正しいリスク認識の学術啓発のために，食肉の健康リスクと環境リスクに関わるリスコミ手法を開発し，インターネットアンケート調査で消費者の安心度合いへの効果検証をしたので，以下に報告する。

2．方　法

インターネットアンケート調査は楽天インサイト株式会社に委託して実施した。まず同社のモニターより最低週１回は料理をする方を抽出し，その中から「あなたは生鮮食品や加工食品を購入する際に，SDGs（ヒトの健康福祉，食品ロス削減，食料安全保障，地球環境への影響などの国際目標）を考慮したことがありますか？」という設問に，「たしかにそう思う」または「まあまあそう思う」と肯定的回答をしたヒト1,050人を「SDGs＋群」，「あまりそう思わない」または「そう思わない」と否定的回答をしたヒト1,050人を「SDGs－群」として抽出した。なお，両群の男女内訳は各525人とし，年齢は20歳代・30歳代・40歳代・50歳代・60歳以上に均等に割り付けた（たとえば，SDGs＋群の女性は各年代で105人となる）。また本設問で群分けをする際に，以下の参考情報も回答者に与えた。※「SDGs：持続可能な開発目標（Sustainable Development Goals）のこと。2015年9月25日に国連総会で採択された，持続可能な開発のための17の国際目標で，2030年までの達成を目指している」

上述のとおりランダム抽出した「SDGs＋群」，「SDGs－群」，各1,050人のモニターに対して，食肉の健康リスクならびに環境リスクに関わる不安に共感した設問を投げかけて回答をいただいた後に，スマート・リスコミ手法による丁寧な設問対応で，「加工肉や食肉が安心して食べられそうだ」との肯定的回答がどの程度得られるか，効果検証を行った。以下にその具体的設問内容を示す（設問への回答の選択肢は，いずれも４つ：①たしかにそう思う，②まあまあそう思う，③あまりそう思わない，④そう思わない）。

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

不安な消費者：「食品添加物が原因で，健康被害が起こった事故の歴史があると聞いたことがある。そう聞くと不安だよね」

Ｑ２　Ｑ１の不安要因に対するスマート・リスコミの説明

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

食品安全の専門家：「過去に食品添加物が原因で健康被害が起こった事故の歴史はたしかにありますが，もう数十年以上前のことであり，日本国内ではそれ以降，何十年もの間事故は発生していません。反対に食品添加物を使用しなかったことにより，O157などの食中毒死亡事故が何度も発生しており，食品事故を未然に防ぐためには，食品添加物を適切に使用することが望まれます。とくに，ハム・ソーセージ・ベーコンなどの加工肉

© The Ito Foundation

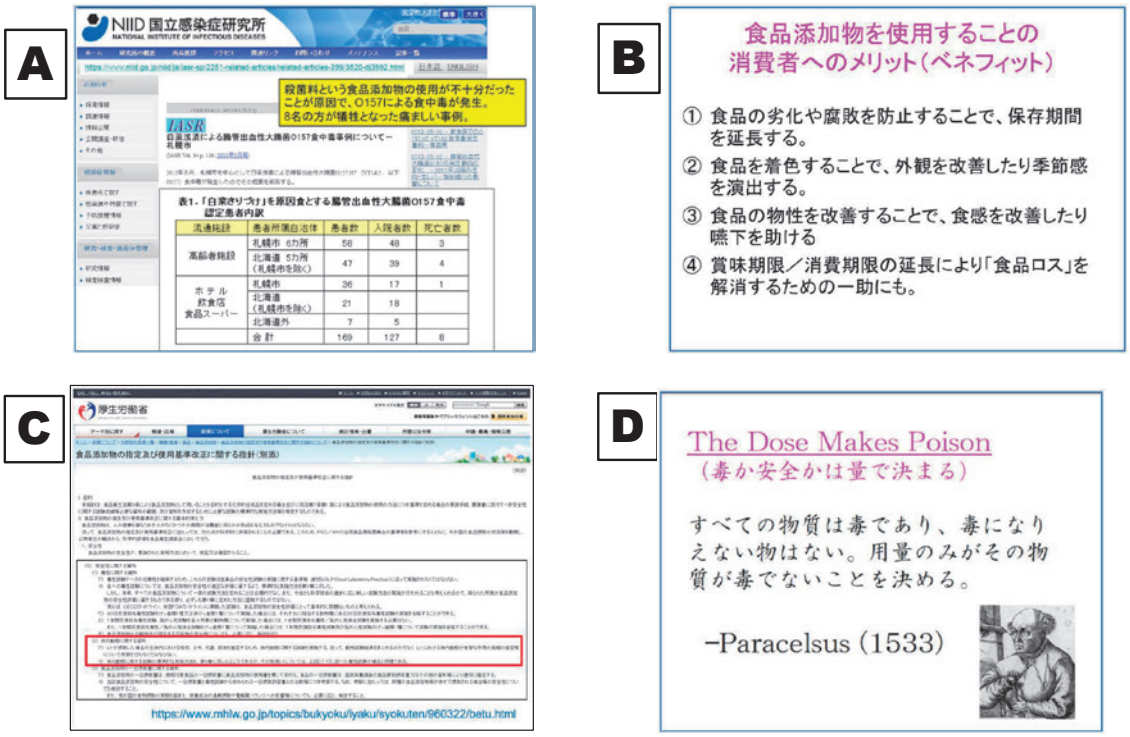


Fig. 1　The charts used in the risk communication on the health risks of food additives in process meat

の場合，保存性を高めるための添加物は必須であり，ボツリヌス菌など猛毒の食中毒細菌の増殖を抑える役割があります」

参考資料（**Fig. 1A**）：「2012年に北海道で起こった食中毒事故では，食品添加物の殺菌料を適切に使用しなかったことが原因で，８名の方がO157の食中毒で亡くなりました。逆に，食品添加物による食中毒事故は昭和の時代の話であり，ここ数十年は発生しておらず，リスク管理がうまくいっていると評価されています」

あなた：「説明を読んで，ほぼ納得したので，食品添加物の入った加工食品も安心して食べられそうだ」

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

不安な消費者：「加工肉のラベルを見ると，知らない化学物質名（食品添加物）が多く書かれていて，何の目的で使用されているのかよく分かりません。食品事業者の都合でたくさん入れているのでは，と思うと不安になります」

Ｑ４　Ｑ３の不安要因に対するスマート・リスコミの説明

リスクコミュニケータ：「たしかに，ハム・ソーセージのラベルにはいろいろな化学物質名が書かれていて，「なんでこんなに入れないといけないの？」って友達から聞かれたことがあるわ。でも，加工肉は食品添加物を使わないと，製造して３日後には腐ってしまったり，見た目も変色して美味しくない食品になるんだって。あと保存性を高めることで賞味期限が延びると，食品ロス削減にも役立つし，食料危機や自然災害の際に重要な動物性タンパク質の備蓄品として重要なのよ」

食品安全の専門家：「食品添加物の使用目的は多種多様です。具体的には風味や食感・色調の改

© The Ito Foundation

善，微生物の増殖を抑制して保存性を向上させるとともに，栄養強化・減塩食品への使用や低カロリーにするために使用されます。ハム・ソーセージに用いられる食品添加物も，食材に適した調味料・発色剤・結着剤・保存料・酸化防止剤・着色料などの役割を担っています。味や食感の改善，食の安全・安心に貢献し，食べやすい動物性タンパクとしてさまざまなメニューの材料として便利に使用されています」

参考資料（**Fig. 1B**）：「消費者が食品添加物により得られるいろいろなベネフィットを，本参考資料にまとめています。実は，添加物を食品に配合する場合には，あくまで消費者にメリットがあること，と法律で規定されています。その多種多様な役割は日本食品添加物協会のホームページにて参照可能です。なお，食品添加物そのものの安全性も，国際的なリスク評価のうえで，きわめて高いレベルで確保されていることが，食品衛生法で義務付けられています」

Ｑ５　不安要因：「添加物は体内に蓄積して，食べ続けているうちに後から影響が出るかも」

不安な消費者：「食品添加物は体内に蓄積して，食べ続けているうちに後から影響が出るかもしれないと聞いたことがある。こわいよね」

Ｑ６　Ｑ５の不安要因に対するスマート・リスコミの説明

リスクコミュニケータ：「食品添加物が身体にずっと蓄積すると聞くと，たしかに怖いわよね。でも国の独立したリスク評価機関の内閣府食品安全委員会が安全性を評価済みって聞いたから，体のなかでの代謝や排泄は調べてるはずだけど……食品安全の専門家は何て言っているかな？」

食品安全の専門家：「食品も食品添加物も，含まれる成分の多くは，消化管で消化・吸収され，肝臓で代謝・解毒された後，尿あるいは便とともに体外に排せつされます。各食品添加物の安全性試験データや文献情報からその代謝・生体内動態はおおむね分かっておりますので，体内に長期間にわたって蓄積されるというご心配は不要と考えます」

参考資料（**Fig. 1C**）：「厚生労働省が設定した食品添加物の指定および，使用基準改正に関する指針において要求する安全性資料に「体内動態に関する資料」が含まれます。：「ヒトが摂取した場合の生体内における吸収，分布，代謝，排泄を推定するため，体内動態に関する試験を実施する。従って，動物試験結果をまとめるのみでなく，ヒトにおける体内動態や，有害な作用の発現の推定等について考察を行わなくてはならない」

Ｑ７　不安要因：「加工肉は，一部ソルビン酸や亜硝酸ナトリウムなどを使用。発がんリスクも聞く」

不安な消費者：「ハム・ソーセージなどの加工肉によく入っている食品添加物の中でも，一部ソルビン酸や亜硝酸ナトリウムなど，健康によくないものがあると聞いた。あと海外の研究機関が，加工肉は発がんリスクが高いとの報告をしたらしいので不安です」

Ｑ８　Ｑ７の不安要因に対するスマート・リスコミの説明

リスクコミュニケータ：「私の友人もネット情報をよく調べてるんだけど，食品添加物のうち「保存料」や「発色剤」など一部の化学物質は健康に悪影響があると言っていたわね。あとWHOの下部機関であるIARC（国際がん研究機関）が，発がん性分類を発表しており，加工肉は「Group１：ヒトに対して発がん性がある」と分類したのは事実です。でも食品安全の専門家はどう言ってるのかな？」

食品安全の専門家：「食品添加物は，「食品衛生法」により１日摂取許容量を下回る使用基準が規定されており，我々がソルビン酸や亜硝酸塩を一

© The Ito Foundation

般食品からも摂取している事実も考慮されています。ヒトが生涯にわたって毎日食べ続けても安全と認められた１日摂取許容量をADIと言い，国際的な機関が動物実験により無害と確認した量の1/100に設定されています。また，おっしゃるとおりフランスの国際がん研究機関（IARC）は加工肉に発がん性あり（Gorup１）と，文献情報をもとに分類していますが，日本の国立がん研究センターが国内で行った疫学研究では，加工肉の摂取量とがんの発症率に相関は認められておらず，日本人の場合，加工肉の摂取量が海外ほど多くないため，発がん性リスクは十分小さく問題ないと結論付けています」

参考資料（**Fig. 1D**）：「『毒か安全かは量で決まる“The Dose Makes Poison”』というパラケルスの名言のおり，加工肉もそれに配合されている食品添加物も，日本では人体への悪影響が出ない程度の摂取量なので，許容範囲のリスクであり「安全」です」

Ｑ９　不安要因：「食肉などの畜産は温室効果ガスを大量に出して地球温暖化に悪影響をもたらす」

質問者：「食肉など畜産品は地球環境によくないと言われることがありますが，なぜなのでしょうか」

不安な消費者：「とくにウシはゲップを出すので，大量のメタンガスを空気中に放出すると，温室効果ガスとなって地球温暖化や気候変動に悪影響をもたらすそうです。その意味では畜産業自体が地球環境によくないので，タンパク源はお肉や乳製品よりも，植物性食品（プラント・ベース）のほうがSDGsに合っていると思います」

Q10　Ｑ９の不安要因に対するスマート・リスコミの説明

リスクコミュニケータ：「私の友人もヴィーガンなんですが，畜産・酪農は地球環境によくないとして，ベジタリアンになったそうです。いまSDGsが注目されるなか，食肉の生産が気候変動に影響するとなるとよくないですが，専門家はどのような見解を述べているのでしょうか？」

農業環境の専門家：「日本国内における農業由来の温室効果ガス排出量は，気候変動に影響を与えるような量ではないと評価しています。先日開催されたCOP28（国連気候変動枠組み条約第28回締約国会議）において，海外のNGOが日本に対して「化石賞」を授与したことを見ても，日本の温室効果ガス排出量は化石燃料発電によるところが大きいことは明白です。食肉や乳製品の価値を犠牲にしてまで，畜産業由来の温室効果ガスの排出量を減らしても，現時点では気候変動への好影響はまったく期待できません。美味しい食肉の生産を止めないでください」

参考資料（**Fig. 2**）：「農林水産省のホームページより，地球温暖化緩和策に関する調査データを掲載しましたので，ご参照ください。このデータによると，国内の畜産関連に限った温室効果ガス（GHG）排出量は，年間1,358万トンで日本の全排出量のわずか1.1％です。国内の畜産/酪農をすべてやめたとしても，地球温暖化に影響するような閾値には達しない見込みです」

なお，それぞれの回答傾向の相関関係に関する統計解析については，群間（SDGs＋vs SDGs－）についてピアソンのカイ二乗検定を行い，危険率（p value）が0.05未満の場合を有意差と評価した。

３．結果と考察

事前に抽出した２つの群，すなわち食品を選択する際にSDGsを考慮したことがあると回答した「SDGs＋群」とSDGsを考慮したことがないと回答した「SDGs－群」とで，５つの不安要因への共感度合い（Ｑ１，Ｑ３，Ｑ５，Ｑ７，Ｑ９），ならびにスマート・リスコミにより「安心して食

© The Ito Foundation

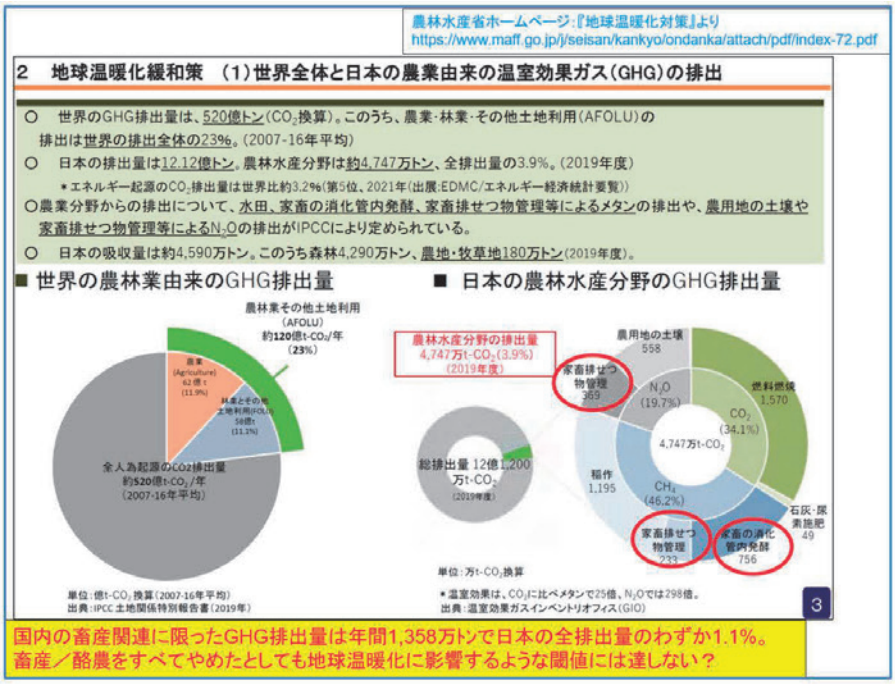


Fig. 2　The chart used in the risk communication on the environmental risk of meat.

べられそうだ」と回答した安心度合い（Q２，Q４，Q６，Q８，Q10）を集計したので，その結果を**Table 1** に示す：

まず**Table 1** の上段において，５つの不安要因のうち，加工肉中の添加物に関する４つの健康リスク（Q１：過去に事故の歴史がある，Q３：食品表示が知らない化学物質名ばかり，Q５：体に蓄積して将来悪影響があるかも，Q７：亜硝酸塩など発がんリスク報告あり）への不安を肯定した回答者数の比率を集計した。その結果，SDGs＋群では，それぞれ77.9％，73.4％，72.5％，75.2％，SDGs－群では44.5％，46.0％，47.8％，51.0％となり，明らかにSDGsを考慮して食品購入をしたことのあるSDGs＋群のほうが，SDGs－群と比較して，不安肯定者が有意差（$p<0.01$）をもって多いことが分かる。また，食肉の環境リスクに関する設問（Q９：牛のゲップなど畜産により放出される温室効果ガス（GHG）が地球温暖化を助長）への不安を肯定した回答者数は，SDGs＋群で61.0％，SDGs－群で36.4％となり，添加物に対する健康リスクに比べると若干比率が低いものの，SDGs＋群のほうが統計学的有意差（$p<0.01$）をもって多かった。すなわち，食品購入時にSDGsを考慮する人は，考慮しない人に比べて，加工肉の健康リスク情報や食肉自体の環境リスク情報に対して，２割から３割不安を感じやすいという結果となった。

次に**Table 1** の下段では，上段において質問した５つの不安要因に対して，当該不安要因に共感したうえで，「でも食品安全の専門家は違うことを言ってますよ」と学術的説明を行うスマート・リスコミを適用し（Q２，Q４，Q６，Q８，Q10），不安を感じていた健康リスクや環境リスクに対して，どの程度「安心して食べられそうだ」という回答に翻るのかを観察した。その結果，設問を読んで「安心して食べられそうだ」と肯定し

© The Ito Foundation

Table 1 Results of Questionnaire : Number of respondents where their health and environmental concerns on process meat are cleared by the Smart Risk Communication in SDGs+ and SDGs− Group. SDGs+ group are the respondents who have some experiense to purchase foods by SDGs standpoint, where SDGs− with no such experience.

Significat difference between SDGs+ and SDGs− Group by Pearson's Chi-squared test (p<0.01) were observed in all questions.

Questions No.	Q1		Q3		Q5		Q7		Q9	
Questions on the health and environmental concerns	I have health concerns on ham and sausage, because there were some histories of health accidents by food additives in the past.		I have health concerns on ham and sausage, because I see many unknown chemical names on the food labeling and do not know the role of food additives.		I have health concerns on ham and sausage, because food additives are accumulated in the body to cause bad influence to our health in the future.		I have health concerns on ham and sausage, because some food additives such as sorbic acid and sodium nitrite should be unhealthy and could be carcinogenic.		I have environmental concerns on meat and livestock, because the large quantity of greenhouse gases , such as burp of the cow are released to cause the global warming.	
Grouping by SDGs	**SDGs＋**	**SDGs−**	**SDGs＋**	**SDGs−**	**SDGs＋**	**SDGs−**	**SDGs＋**	**SDGs−**	**SDGs＋**	**SDGs−**
① I certainly agree	258	103	221	106	245	109	254	143	151	59
② I'd rather agree	560	364	550	377	516	393	536	392	489	323
③ I'd rather disagree	202	408	250	419	249	407	234	378	355	469
④ I disagree	30	175	29	148	40	141	26	137	55	199
Total Number	**1050**	**1050**	**1050**	**1050**	**1050**	**1050**	**1050**	**1050**	**1050**	**1050**
% of agree-persons (①＋②)	**77.9%**	**44.5%**	**73.4%**	**46.0%**	**72.5%**	**47.8%**	**75.2%**	**51.0%**	**61.0%**	**36.4%**

Questions No.	Q2		Q4		Q6		Q8		Q10	
Summary of questions by Smart Risk Communication (Scientific communication method with empathy to concerns and then with support to understand the size of risk calmly)	It is understandable because mothers say the same thing. However, experts say, "Although there is certainly a history of accidents involving food additives, there have been no accidents in Japan for decades. On the other hand, food poisoning deaths such as O157 have occurred many times without using food additives, and it is desirable to use additives appropriately to prevent accidents." You: "I can eat process meat with food additives without anxiety."		Certainly, a friend has asked me, "Why do you have to put so much chemicals in foods?" However, experts say, "Food additives are used for a wide variety of purposes, and they need to have benefits for consumers, such as improving taste and texture, contributing to food safety and security, and so on. The safety of the additives themselves is also ensured by international risk assessments." You: "I can eat process meat with food additives without anxiety."		It's certainly scary to hear that food additives accumulate in the body for a long time. However, experts say, "The Ministry of Health, Labour and Welfare's "Guidelines for Designation of Additives and Revision of Usage Standards" requires safety tests on the kinetics in the body to estimate absorption, distribution, metabolism, and excretion in the body when ingested by humans. If one food additive is proved to accumulate in human body, it is prohibited to market in Jaapan. You: "I can eat process meat with food additives without anxiety."		A friend of mine also said on the Internet that"preservatives" and "coloring agents" have adverse effects on health. However, the expert said, "As Paracelsus said, 'The dose makes poson: Whether it is poison or safe is determined by the amount',and then processed meat and additives are safe because they are ingested at a level that does not adversely affect the human body. In addition, the risk of carcinogenesis has not been recognized in epidemiological studies in Japan You: "I can eat process meat with food additives without anxiety."		A friend of mine also became a vegetarian because livestock and dairy farming are not good for the global environment. However, the expert said, "As shown in the reference material, greenhouse gas (GHG) emissions limited to domestic livestock farming are 13.58 million tons per year, which is only 1.1% of the total emissions. greenhouse gas emissions from livestock at the expense of meat and dairy value is not expected to have any positive impact on climate change at this time. " You: "I can eat the meat products without anxiety."	
Grouping by SDGs	**SDGs＋**	**SDGs−**	**SDGs＋**	**SDGs−**	**SDGs＋**	**SDGs−**	**SDGs＋**	**SDGs−**	**SDGs＋**	**SDGs−**
① I certainly agree	233	168	220	153	197	151	228	149	239	194
② I'd rather agree	602	473	607	517	618	511	591	521	617	510
③ I'd rather disagree	185	303	194	279	201	293	197	280	162	263
④ I disagree	30	106	29	101	34	95	34	100	32	83
Total Number	**1050**	**1050**	**1050**	**1050**	**1050**	**1050**	**1050**	**1050**	**1050**	**1050**
% of agree-persons (①＋②)	**79.5%**	**61.0%**	**78.8%**	**63.8%**	**77.6%**	**63.0%**	**78.0%**	**63.8%**	**81.5%**	**67.0%**
%of concern clearance (e.g. Q2/Q1)	**81.9%**	**73.7%**	**82.0%**	**75.6%**	**80.4%**	**73.7%**	**80.9%**	**72.7%**	**87.5%**	**84.3%**

© The Ito Foundation

た回答者の割合が，SDGs＋群では，それぞれ79.5%，78.8%，77.6%，78.0%，81.5%，SDGs－群では61.0%，63.8%，63.0%，63.8%，67.0%となり，こちらも明らかにSDGsを考慮して食品購入をしたことのあるSDGs＋群のほうが，SDGs－群と比較して，安心を肯定した回答者の比率が15%前後有意に高い（$p<0.01$）ことが分かった。

さらに，上段で不安を肯定した回答者のうち，下段のスマート・リスコミでどの程度安心に転じたかの不安解消率を算出した（Q１➡Q２，Q３➡Q４，Q５➡Q６，Q７➡Q８，Q９➡Q10）ところ，SDGs＋群では，それぞれ81.9%，82.0%，80.4%，80.9%，87.5%，SDGs－群では73.7%，75.6%，73.7%，72.7%，84.3%となった。すなわち，加工肉の健康リスクに関するリスク認知バイアスは，スマート・リスコミによりSDGs＋群で８割前後，SDGs－群でも７割強の回答者で補正が認められた。また，食肉の環境リスクに関するリスク認知バイアスは，SDGs＋群・SDGs－群ともに８割を超える強い補正（不安が安心に翻った）が認められ，スマート・リスコミが十分機能したことを示す結果となった。

また**Table２**では，Q10（食肉の環境リスクに対するスマート・リスコミ）のみのデータを性別（男女）・年代別（20歳代，30歳代，40歳代，50歳代，60歳以上）ごとに抽出して，「安心して食べられそうだ」という回答者数とその比率を示した。全体としては，SDGs＋群で８割前後，SDGs－群で６割から７割が安心を肯定していることが分かるが，女性では30歳代と40歳代，男性では20歳代，30歳代，40歳代，50歳代において，SDGs－群の安心肯定者の比率が有意に低い（それでも６割が安心）成績となった。また，男女ともに60歳以上の群では，SDGs＋群・SDGs－群ともに75%以上が安心を肯定しており，食肉の環境リスクが思ったほど大きくない説明に納得された傾向が強かった（お肉を食べたい世代か？）。ただし，性別・年代別のデータはサンプル数が105人ずつと少ないため，あくまで傾向を見るための検証結果とすべきであろう。

山﨑は2017年の日本リスク研究学会にて，リスク認知バイアスの原因をターゲットとした食のリスコミ手法を提案し，①二者択一の原理[3]，②Slovicのリスクイメージ過大因子/未知性因子など[4]，③リスク情報発信者への不信感[5]，④リスクコミュニケーションのパラドックス[6]など４つのリスク認知バイアスを逆手に取ったリスコミ手法開発の可能性を考察した。また，2018年にも同学会において，食品添加物の健康リスクに対する「確証バイアス」をターゲットとしたスマート・リスコミの開発と効果検証について発表した[1]。インターネットでの無機的な情報伝達に限界はあるものの，79%の回答者で確証バイアスの補正が認められたことから，スマート・リスコミ手法の有効性が示唆された。このように，安全・安心につながるリスクコミュニケーションのポイントは，消費者市民のリスク認知バイアスの原因である不安要因を具体的なターゲットとした情報発信／議論と我々は考えている[7]。

今回のインターネット消費者アンケート調査においては，食品購入時にSDGsを考慮したことのある人と考慮したことのない人，各1,050人に対して，ハム・ソーセージなど加工肉食品に配合された食品添加物の健康リスクと食肉自体の環境リスクに関する不安要因５項目について，スマート・リスコミ手法の効果検証を行った。その結果，SDGs＋群はSDGs－群と比較して，不安要因に対する設問に対しては不安を肯定する回答者が７割強と明らかに多く（SDGs－群は４割～５割），スマート・リスコミに対して「安心して食べられそうだ」と肯定する回答者も有意に多かった。すなわち，食品購入時にSDGsを考慮する消

© The Ito Foundation

Table 2 Results of Questionnaire : Number of respondents where their environmental concerns on meat are cleared by the Smart Risk Communication in SDGs+ and SDGs− Group in five generations.

* Q10 : A friend of mine also became a vegetarian because livestock and dairy farming are not good for the global environment. However, the expert said, "As shown in the reference material, greenhouse gas (GHG) emissions limited to domestic livestock farming are 13.58 million tons per year, which is only 1.1% of the total emissions. greenhouse gas emissions from livestock at the expense of meat and dairy value is not expected to have any positive impact on climate change at this time." You : "I can eat the meat products without anxiety."

Significat difference between SDGs+ and SDGs− Group by Pearson's Chi-squared test indicates p value (: $p<0.05$ or $p<0.01$).

Age and Sex	20's female		30's female		40's female		50's female		60's and over female	
Grouping by SDGs	SDGs+	SDGs−	SDGs+	SDGs−	SDGs+	SDGs−	SDGs+	SDGs−	SDGs+	SDGs−
① I certainly agree	29	19	17	24	19	20	21	13	19	14
② I'd rather agree	52	55	71	46	70	46	67	66	72	66
③ I'd rather disagree	22	25	15	28	14	28	17	23	11	21
④ I disagree	2	6	2	7	2	11	0	3	3	4
Total Number	105	105	105	105	105	105	105	105	105	105
% of agree-persons (①+②)	77.1%	70.5%	83.8%	66.7%	84.8%	62.9%	83.8%	75.2%	86.7%	76.2%
Chi-squared test (SDGs+ vs SDGs−)	$p<0.05$		$p<0.01$		$p<0.01$		$p<0.05$		NS	

Age and Sex	20's male		30's male		40's male		50's male		60's and over male	
Grouping by SDGs	SDGs+	SDGs−	SDGs+	SDGs−	SDGs+	SDGs−	SDGs+	SDGs−	SDGs+	SDGs−
① I certainly agree	36	23	24	20	33	22	21	17	20	22
② I'd rather agree	52	42	61	49	49	44	61	39	62	57
③ I'd rather disagree	13	25	17	25	19	32	18	36	16	20
④ I disagree	4	15	3	11	4	7	5	13	7	6
Total Number	105	105	105	105	105	105	105	105	105	105
% of agree-persons (①+②)	83.8%	61.9%	81.0%	65.7%	78.1%	62.9%	78.1%	53.3%	78.1%	75.2%
Chi-squared test (SDGs+ vs SDGs−)	$p<0.01$		$p<0.01$		$p<0.01$		$p<0.01$		NS	

© The Ito Foundation

費者は，食のリスク情報に対する感度が全般的に高く，不安を感じやすい方が多いものの，その不安に共感して学術的説明を施したスマート・リスコミに対しては安心に転じる方が多いということだ。裏を返すと，食品購入時にSDGsを考慮したことがない消費者は，食のリスク情報に対する関心が薄いのだが，リスコミに対する関心も低く安心肯定者が少なかったと解釈して良いだろう。

とくに注目すべきは，加工肉中の添加物に対する健康リスクへの不安が，スマート・リスコミにより８割前後解消したことであり，これは2018年に我々が本リスコミ手法を開発した際の，インターネット調査研究で得られたバイアス補正率（79％）と，ほぼ一致したということだ。すなわち，食品添加物の健康リスクへの不安に対するスマート・リスコミは，およそ８割の消費者に対して安心に導くことが可能と推測できるだろう。また，食肉の環境リスクへの不安に対する今回のスマート・リスコミの実例では，SDGs＋群において87.5％の非常に高い不安解消率を認めていることから，「牛はゲップを出すから畜産・酪農は地球温暖化に悪影響を与えている」との主張に対して，本リスコミによる反論が十分に機能することが期待できるだろう。

今回の研究はインターネット・ユーザーに対する限定的調査研究であることを考慮する必要があるが，消費者の一定のリスク認知に関する傾向が観察できたものと考える。また，今後はSDGsを強く意識する消費者がさらに増えていくと予想されるため，SDGsへの意識をからめた消費者意向調査の意義は高まっていくであろう。ただ，今回得られたスマート・リスコミ手法により不安が安心に転じた消費者が７割・８割にのぼっていることから，今後のスマート・リスコミ手法のさらなる改良研究につながることが期待できるところだ。

４．要　約

これまでの食のリスクコミュニケーションでは，健康リスクに係る食品安全の観点で忠実に伝えればよかったが，今後はSDGs（持続可能な開発目標：Sustainable Development Goals）で重視されている環境リスクの観点も必要である。とくに食肉生産/畜産業による温室効果ガス排出が大きな環境リスクとして，食肉を避ける市民にリスク認知バイアスが起こっている懸念がある。そこで本インターネット調査研究では，食肉の健康リスクと環境リスクに関わるスマート・リスクコミュニケーションの効果検証を行った。食品購入時にSDGsを考慮したことのある群（SDGs＋群）と考慮したことのない群（SDGs－群），各1,050人に対して，５つの不安要因に関する情報提供を行い，加工肉中の添加物の健康リスクへの不安肯定者はSDGs＋で72％～78％，SDGs－群で44％～51％，食肉の環境リスクへの不安肯定者はSDGs＋で61％，SDGs－群で36％であった。スマート・リスクコミュニケーションによる不安解消率は，加工肉中の添加物の健康リスクについてSDGs＋で80％～82％，SDGs－群で72％～76％，食肉の環境リスクについてはSDGs＋で88％，SDGs－群で84％であった。以上の結果より，スマート・リスクコミュニケーションにより添加物の健康リスクだけでなく食肉の環境リスクへの認知バイアスに対する効果が期待された。

文　献

1）　山﨑毅，大瀧直子，冨岡伸一，広田鉄磨，山口治子：リスク認知バイアスをターゲットとした食のリスクコミュニケーション手法の開発ならびに効果検証，日本リスク研究学会第31回年次大会，福島，講演論文集Vol. 31，2018.

2）　山﨑毅，山﨑深雪，阿紀雅敏：ハム・ソーセージに配合する食品添加物に関するリスクコミュニケーション手法の開発ならびに効果検証，伊藤記念財団助成研究2020年度成果報告書，161～171，2021.

© The Ito Foundation

3） 中谷内一也：リスクのモノサシ，NHK出版，東京，2006.
4） 岡本浩一：リスク心理学入門，サイエンス社，東京，1992.
5） 広田すみれ，増田真也，坂上貴之：心理学が描くリスクの世界，慶應義塾大学出版会，東京，2006.
6） 関谷直也：「災害」の社会心理，ワニ文庫（ベストセラーズ），東京，2011.
7） 山﨑毅：安全・安心とリスクコミュニケーション―食品分野を中心に，一橋ビジネスレビュー　67-No.３，『特集：安全・安心のイノベーション』，92～102，2019.

© The Ito Foundation

MiCAPs法を用いた，新規家禽エミューにおける産肉関連QTLの同定

Identification of meat production-related QTLs in novel poultry emu based on MiCAPs

輿石雄一
（東京農業大学生物資源ゲノム解析センター）

Yuichi Koshiishi
（NODAI Genome Research Center）

The emu（*Dromaius novaehollandiae*）is expected to become novel poultry producing low-fat red meat. However, genetic improvement of productive traits had not been. The marker assisted selection（MAS）and genomic selection（GS）are effective methods for selective breeding in livestock, and those methods need to large number of DNA markers. Accordingly, we performed to isolate large number of DNA markers based on RAD-seq and MiCAPs as reduced-representation genome sequencing aimed for developing tools available for genetic improvement in emu using MAS method.

We collected a total of 169 genomic DNA from 1.5 years old emus kept and slaughtered in Okhotsk Emu Farm during 2016-2017. RAD-seq method could isolate 56,984 SNPs, and MiCAPs success to found 33,655 SNPs and 985 polymorphemic SSRs. The association study with carcass traits suggested that there was significantly related region with thigh meat gain and lean body weight in chromosome 1, and chromosome 8 was founded to include the related region for the body weight. In addition, the comparation analysis between candidate locus of chromosome 1 and the same locus of Chicken QTLdb revealed that common region with emu in chicken chromosome 1 included the QTL related to body weight traits such as “Body weight”, “Carcass weight” and “Feed conversion ratio”.

In this study, we showed results that the development largely number of polymorphic DNA markers with each position on emu chromosomes and prediction of genomic region relating for industrial traits. In future, this information was used to the fine mapping of the region relation traits and the marker assisted selection for improvement of emu products.

1．目　的

エミューはオーストラリア原産の走鳥類であり，体長は1.6から2.0メートル，体重は50 kg程度まで成長する。エミューは低アレルゲン性が期待される卵[1)]，抗炎症作用を持つ脂肪[2)]およびヘルシーな食肉[3)]などの，他の主要家畜と異なる有用な性質を示す生産物を得ることができ，次世代の特用家禽として期待されている。特に食肉は低脂肪，低コレステロールかつ高タンパク，高鉄分で

© The Ito Foundation

あることから，高カロリー低タンパク質な欧米型の食事に偏りがちな現代の日本人に適合した，ヘルシーかつ高付加価値な食肉として期待されている。これらの有用な特徴に着目し，アメリカや中国およびインドなどの諸外国においてすでに大規模に飼育が開始されている[3~5]。1980年代には我が国においてもエミューの産業用飼育が開始されており，現在では北海道や九州などで多数の個体が飼育されている。その一方，エミューの生産物は遺伝的改良を目的とした選抜育種が行われておらず，これにより，産業用に飼育されている集団であるにもかかわらず遺伝的背景およびと畜形質が均一でなく，一次産業の基盤として不安定な状況である。したがって，エミューの選抜育種は性急な課題であり，効率的な選抜手法であるマーカーアシスト選抜（MAS）が有効であるものの，MASに利用可能な遺伝マーカーも世界的に報告例がない。

次世代シーケンサー（NGS）は，モデル生物だけでなく非モデル生物におけるゲノミクスを可能にした技術であり，ウシなどの主要家畜ではすでに，NGSを用いた大規模なDNAマーカーの開発が実施され，この技術を中心とした育種が一般的に行われている[6,7]。また，NGSを用いたゲノム解析手法にはさまざまな変法が存在しており，その中でも特にRestriction Site Associated DNA Sequence（RAD-seq）は多検体のゲノム情報を簡便かつ低コストで解析できることから，系統分類や育種などの分野で広く用いられている[8~13]。さらに，RAD-seqの派生法であるMicrosatellite CAPture sequencing（MiCAPs）解析は，東京農大生物資源ゲノム解析センターの田中啓介博士により開発された手法であり，RAD-seqの簡便性や多検体の同時解析などの特徴を残しながら，マイクロサテライト領域（SSR）の繰り返し回数の多型を得ることが可能である（**Fig. 1**）。そこで我々は，利用可能な遺伝マーカーが著しく制限されているエミューにおいて，これらの技術が応用可能であると考えた。

したがって本研究では，将来の有用な新規家禽となりうるエミューの産肉能力の遺伝的な向上および均一化を目的として，RAD-seqおよびMiCAPsを用いたGWAS解析ならびに産肉能力関連遺伝マーカーの開発を試みた。

2．材料および方法

北海道網走市のオホーツクエミュー牧場において飼育され，2016年および2017年に産業用にと畜された1.5歳齢の成鳥169個体の肝臓から，ISOGENOMEを用いてDNAを抽出した。また，と畜されたすべての個体について，体重，脂肪重量，脂肪重量率，除脂肪体重，もも肉重量，もも肉重量率，大腿骨なしもも肉重量および脂肪融点を計測した。まず我々は，得られたDNAについて*EcoR* Iおよび*Hind* IIIを用いて制限酵素処理を行い，Flexible-ddRAD-seq解析のためのDNAライブラリーを作成した。次に，作成したライブラリーに対して$(GA)_{10}$のビオチン標識プローブとハイブリダイゼーションを行い，マイクロサテライト配列を含む領域のみを濃縮することで，MiCAPs用ライブラリーとした。

作成されたライブラリーは，NextSeq1000を用いてシーケンスされた。またこの際のリード長は，RAD-seqでは150-bp×２で，MiCAPsでは300-bp×２でそれぞれ実施された。得られたリードはトリミング処理後に，公開されているエミューゲノム配列（GenBank GCA_016128335.1）に対してBWAソフトウェアを用いてマッピングを行った。マッピング後，SNPsの抽出にはStacksを用い，SSRsにはHipSTRを用いてそれぞれ変異の抽出およびジェノタイピングを行った。

© The Ito Foundation

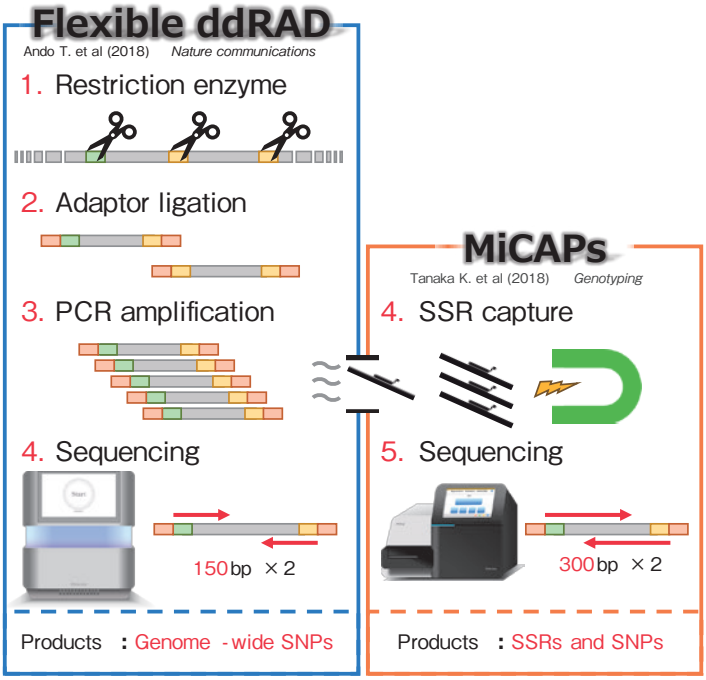


Fig. 1　ddRAD-seq and MiCAPs
RAD-seq（left）is one of the reduced-representation genome sequencing methods and is effective method for obtaining genome-wide SNPs in many samples.
MiCAPs（under）is isolated from RAD-seq library due to SSR probes. The obtaining sequences is enriched flanking region around SSR, the available information is not only SNP genotypes but number of repeats in SSRs.

3．結果と考察

169個体のエミューゲノムDNAを用いたRAD-seqおよびMiCAPs解析において，各個体あたり平均で410.6 Mbpおよび346.1 Mbpの配列が得られた。また，マッピング後に変異コールを行った結果，RAD-seqでは56,984ヶ所，MiCAPsでは33,655ヶ所のSNPを単離することに成功した。また，MiCAPsではSNPに加えて，985ヶ所の多型SSR領域の単離にも成功した。その後，60％以上の個体で共通してジェノタイプされ，HWE平衡下にあるSNPを用いて，PLINKソフトウェアによって各形質に対して関連解析を実施した（**Fig. 2**）。RAD-seqによって得られた結果では，１番染色体上の10 Mbpから56 Mbpの範囲において，もも肉重量，大腿骨なしもも肉重量および除脂肪体重と有意に関連（p＜1.0e-05）する領域が存在することが示唆された。また，８番染色体上の22 Mbp付近には体重と強く関連（p＜1.0e-08）することが推測されるSNPが観察された。

次に，検出された形質関連候補領域についてニワトリゲノムと比較するために，我々が作成したエミューゲノムの遺伝子予測情報と，NCBIに登録されているニワトリゲノム（GenBank GCA_016699485.1）で比較解析を行った。その結果，転座や逆位等は多数確認されたものの両種のゲノムはおおむね一致しており，特に１番染色体は遺伝子の並び順の保存性が高いことが明かになった。ゲノムの類似性の比較を行った後に，ニワトリのQTLDB（https://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/GG/index）と比較を行ったところ，ニワトリゲノムにおける１番染色体の当

© The Ito Foundation

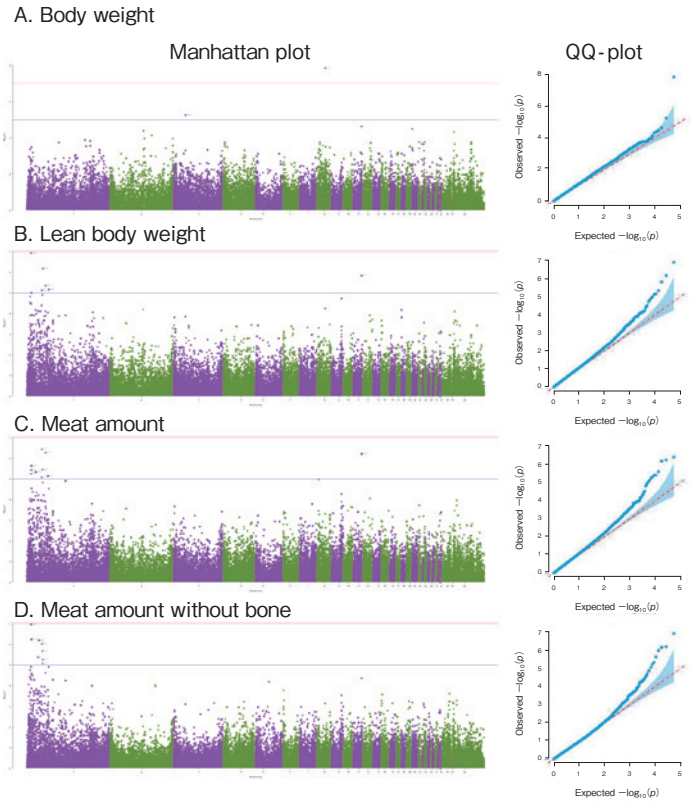


Fig. 2　Genome-Wide Associated Study in each traits

該領域には“Body weight”，“Carcass weight”および“Feed conversion ratio”などの産肉形質に関連するQTLが存在していることが明かになった。

加えて，エミューの１番染色体上に予測されている遺伝子にGO termを付与し，と体形質と関連が示唆された領域におけるコード遺伝子群の機能を推測したところ，この領域にはOlfactory receptor activityに関するGOを持つ遺伝子が集中してコードされていることが示唆された（**Fig. 3**）。したがって，１番染色体の10 Mbpから56 Mbpの範囲における原因遺伝子変異は，変異アレルを保有するエミューの嗅覚や味覚に影響を及ぼした可能性が考えられる。

また，サンプリング対象であるオホーツクエミュー牧場では，エミュー用に調整された飼料に加えて，「ほがじゃ」などのスナックを混ぜて給与している。したがって我々は，嗅覚受容体に関連する多型によりエサ中のスナック類を優先して，または排除して摂取している可能性と，エサの好みや摂取量によって増体重が変動している可能性があると考えた。

今後の課題として，今回の解析で検出されたと体形質関連遺伝子座位におけるファインマッピングを行い，より直接的な変異座位および原因遺伝子を抽出する必要がある。これに加えて，測定する形質も体重やもも肉重量などの収量に関するものに限らず，各筋肉の断面積や色味およびクロマトグラフィーなどを用いた質量分析による質的な形質に加えて，採餌量や成長曲線などの各個体における経時的な項目も測定する必要があると考えられる。

また，MiCAPs解析はRAD-seqよりも検出で

© The Ito Foundation

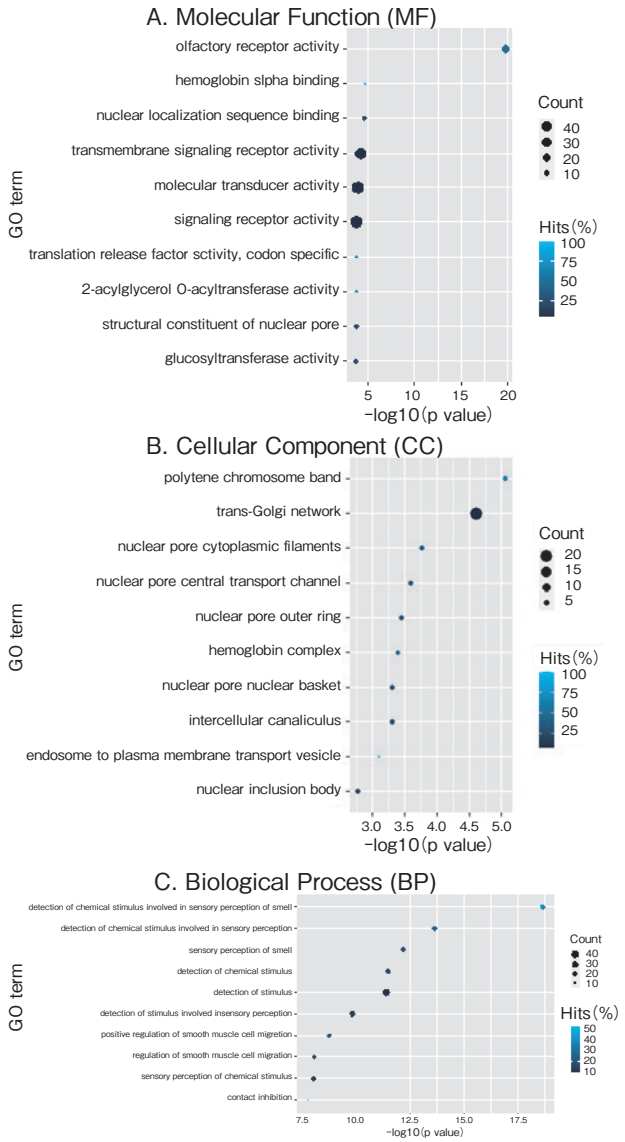


Fig. 3　The function of genes on QTL in Chromosome 1 relating with carcass traits.

きる領域を限定し，データ量を節約することでRAD-seqよりも長い配列を取得できるため，SNPハプロタイプやSSRの繰り返し多型などを高感度で検出することが可能になる手法である。しかしながら本研究では，MiCAPsによってジェノタイプに成功したSSRおよびSNPのうち，エミューの生産形質と有意に関連する領域を検出することはできなかった。我々はこの原因として，シーケンス可能な範囲の違いによるものが要因の一つであると考察している。MiCAPsはRAD-seqで用いたライブラリーから，マイクロサテライトDNAプローブを用いてSSRのエンリッチを行うことで作成される。したがって，２手法間で得られる情報は大きく異なるものの，取得できる配列のゲノム中の密度はRAD-seqの方が多くなる。したがって，計画的な交配などによる遺伝的背景

© The Ito Foundation

の統一がされていないエミューにおいて，ゲノム上における高密度な多型情報が必要なGWAS解析を行うにあたり，MiCAPsで得ることができるSNPおよびSSRではマーカー数が足りなかった可能性があると考えられる。

その一方，長期的な計画的遺伝育種を行うにあたり，家系情報や集団の遺伝的多様度は重要な指標として用いられており，この際の評価手法としてSNPやSSRなどのDNAマーカーが用いられている。SSRは１つの遺伝子座位につき複数のアレルを保有することが可能であり，SNPと比較して座位ごとの情報量が多いことが特徴としてあげられる。さらに，SSRの多型は繰り返し回数であるため，同一のプライマーを用いてもアレルによってフラグメント長に差異が生じ，多型の検出やジェノタイピングが容易である。このことから，多くの生物でSSRが開発され，家系解析などに用いられてきた。著者らのグループは先行研究において，エミューのWGSデータからSSRマーカーの単離を行い，54種類の多型SSRの開発に成功していた。しかし，本研究で用いたMiCAPsでは，多型SSRの同定からジェノタイピングを含めて985ヶ所について解析に成功した。本成果は他の手法に類を見ないほど高効率にDNAマーカーを開発することに成功した。

４．要　　約

エミューは低脂肪，高鉄分，高タンパク質のヘルシーな食肉を生産することができる新規家禽として期待されているものの，その有用な形質の遺伝的な改良は行われていない。現代の家畜における効率的な選抜育種手法として，マーカーアシスト選抜（MAS）やゲノミック選抜（GS）などがあげられるが，これらの手法には多数の形質関連遺伝子多型の情報が必要である。したがって我々は，縮約ゲノム解析手法であるRAD-seqおよびMiCAPsを用いてゲノムワイドに多型情報を取得し，エミューにおけるMASで利用可能な遺伝マーカーを開発することを目的とした。

2016年と2017に北海道網走市においてと畜された1.5歳齢のエミュー169個体の肝臓からゲノムDNAを抽出した。これらを用いたRAD-seq解析では，合計で56,984ヶ所のSNPsを抽出することに成功し，MiCAPsでは33,655ヶ所のSNPsと985ヶ所の多型SSRを単離することに成功した。次に，単離されたSNPを基に各と畜形質を対象にしたGWAS解析を行った。その結果，もも肉重量および除脂肪体重は１番染色体上に，体重は８番染色体上に有意に関連する領域が検出された。また，エミューの１番染色体上の候補領域をニワトリのQTL DBと比較したところ，当該領域はニワトリにおいて体重形質関連QTLが多くマップしている領域であることが明らかになった。

また，これまでエミューにおいて開発された多型SSRマーカーは100種類に満たず，連鎖地図を作成することが困難であった。しかしながら本解析では，MiCAPsを用いてエミューゲノムの物理地図上にマップされた約1000種の多型SSRマーカーを開発することに成功した。

本研究ではRAD-seqおよびMiCAPsを用いて，エミューの産肉能力関連候補領域の推定および物理地図情報のある多型SSRマーカーの大規模開発に成功した。これらを利用することで産業形質関連領域のファインマッピングやMASに利用可能なDNAマーカーの開発が可能になり，将来的にエミューの効率的な選抜育種が可能になると考えられる。

文　　献

１）　Menon, D. G., Bennett, D. C., Uttaro, B., Schaefer, A. L., Cheng, K. M.：*Meat Sci.,* 2014.
２）　Maehashi, K., Ueda, M., Matano, M., Takeuchi, J., Uchino, M., Kashiwagi, Y., Watanabe, T.：*J. Agric.*

© The Ito Foundation

Food Chem., 2014.
3） Buclaw, M., Majewska, D., Szczerbińska, D., Ligocki, M.：*Sci. Rep.,* 2020.
4） Kim, J. E., Bennett, D. C., Wright, K., Cheng, K. M.：*Sci. Rep.,* 2022.
5） Wright, K., Nip, K. M., Kim, J. E., Cheng, K. M., Birol, I.：*Sci. Rep.,* 2022.
6） Sanchez, M. P., Tribout, T., Kadri, N., Chitneedi, P. K., Maak, S., Hozé, C., Boussaha, M., Croiseau, P., Philippe, R., Spengeler, M., Kühn, C., Wang, Y., Pausch, H., Boichard, D.：*Genetics Selection Evolution*, 2023.
7） Gebreyesus, G., Buitenhuis, A. J., Poulsen, N. A., Visker, M. H. P. W., Zhang Q., van Valenberg, H. J. F., Sun, D., Bovenhuis, H.：*BMC Genomics*, 2019.
8） Liu, C., Chen, H., Yang, X., Zhang, C., Ren, Z.：*PLoS One*, 2021.
9） Kise, H., Iguchi, A., Saito, N., Yoshioka, Y., Uda, K., Suzuki, T., Nagano, A. J., Suzuki, A., Iwasaki, N.：*Frontiers in Marine Science*, 2023.
10） Houston, R. D., Davey, J. W., Bishop, S. C., Lowe, N. R., Mota-Velasco, J. C., Hamilton, A., *et al.*：*BMC Genomics*, 2012.
11） Kajiya-Kanegae, H., Takanashi, H., Fujimoto, M., Ishimori, M., Ohnishi, N., *et al.*：*Plant Cell Physiol.,* 2020.
12） Jing, Y., Bian, L., Zhang, X., Zhao, B., Zheng, R., Su, S., Ye, D., Zheng, X., *et al.*：*Front. Plant Sci.,* 2023.
13） Nagano, Y., Tashiro, H., Nishi, S., Hiehata, N., Nagano, A. J., Fukuda, S.：*Sci. Rep.,* 2022.

© 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（Ⅲ）

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

庄司　則章[1]・小松　正尚[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]，Masataka Komatsu[1] and Yoshinobu Uemoto[2]
（[1]Livestock Research Institute, Yamagata Integrated Agricultural Research Center,
[2]Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University）

Sensory evaluation and analysis of aroma components of boiled meat were conducted to clarify the components contributing to the “sweet smell” characteristic of Wagyu beef meat. The top 10 components with the highest correlation to “sweet smell” were Pantolactone, Acetamide, Phenylasetaldehyde, δ-Tetradecalactone, Methional, Methyl C16：1, 1-Tetradecanol, 1- Hexadecanol, δ-Decalactone, and Butyric acid. The results of the OPLS analysis using these 10 components suggested that the “sweet smell” rating could be estimated from their content. The genetic parameters of the above 10 components were also estimated using trapezius muscle collected from the carcass. The heritabilities of Pantolactone, Acetamide, Phenylasetaldehyde, and δ-Tetradecalactone, which were positively correlated with sweet aroma, were 0.25, 0.21, 0.16, and 0.24, suggesting that their genetic improvement is possible. On the other hand, the heritabilities of Methyl C16：1, 1-Tetradecanol, 1-Hexadecanol, and Butyric acid, which were negatively correlated with sweet smell, were 0.03, 0.07, 0.09, and 0.04, respectively, indicating that genetic improvement was difficult. The effects of farm and slaughter month were observed for all traits.

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５年枝肉格付における黒毛和種去勢牛の５等級率は63％にまで高まっている。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和牛肉の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。また，和牛肉の特長は甘く脂っぽい香りである「和牛香」にあることが食肉関係者の間では広く知られており，分析型官能評価による品種比較試験からも，和牛肉の特長は「甘い香り」や「脂っぽい香り」であることが明らかである。脂肪交雑量が強く影響する

© The Ito Foundation

「脂っぽい香り」はすでに十分であることから，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。

生産流通現場の経験則では，和牛肉の「甘い香り」には遺伝的な影響が大きく，但馬系の種雄牛産子で感じやすいといわれる。「甘い香り」の育種改良にあたり，分析型官能評価による「甘い香り」評価値を蓄積することが望ましいが，官能評価には多くの労力と時間と費用を要することから，十分なデータ数を蓄積することは困難である。そこで我々は，和牛肉の香気成分分析を実施し，その含有量から「甘い香り」評価値を推定することにより，育種改良に必要となる十分なデータ数を蓄積できると考えている。調査数は十分ではないものの前年度の研究において，煮肉の「甘い香り」には1-Tetradecanol, Pantolactone, γ-Crotonolactone, 1-Hexadecanol, Skatole, Acetoin, Isovaleric acid, Butyric acidの８成分が寄与するとともに，その含有量から分析型官能評価における「甘い香り」評価値を推定できる可能性が示唆された。

そこで本研究では，前年度に引き続き煮肉の分析型官能評価を実施し，香気分析値による「甘い香り」評価値の推定精度の向上を図る。また，煮肉の「甘い香り」に寄与する香気成分について，遺伝的パラメーターや種雄牛の遺伝的能力等を推定し，育種改良が可能かどうか明らかにする。

２．方　法

2.1　試験１　煮肉の「甘い香り」評価値の予測モデルの検討

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10，交雑種８，乳用種６，外国種７）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「甘い香り」を評価した。

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2000 rpm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。前報[1]では，この上清からトリグリセリドを除去するために固相抽出を行ったが，－10℃の遠心分離により大部分のトリグリセリドは沈殿して除去できていると考え，香気抽出法のさらなる簡便化を図るために本研究ではこの工程を省略した。遠心分離により得られた上清にヘキサン・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（アジレント製7000E GC/TQ，カラム：DB-WAX UI 30 m × 0.25 μm × 0.25 mmID）によりMRM分析により香気成分を測定した。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[2]。なお，前報で用いた煮肉サンプルについても，上記により香気成分を再定量した。なお，上記の抽出法により調製した黒毛和種牛肉香気をガスクロマトグラフ質量分析計によりスキャン分析し，既存データベース検索から化合物を推定後，標準試薬によ

© The Ito Foundation

りRetention Timeが一致した99化合物について定量した。

前報の31検体を上記の手法により再分析し，計62検体（黒毛和種25，交雑種14，乳用種10，外国種13）の煮肉の「甘い香り」評価値ならびに香気分析値を用い，「甘い香り」との相関係数の高い上位10化合物を選択した。次いで，「甘い香り」評価値を目的変数，香気含量を説明変数とするOPLS解析をSIMCA14（Umetrics社）により実施し，煮肉の「甘い香り」の予測モデルを検討した。

2.2　試験２　煮肉の「甘い香り」評価値に寄与する香気成分の遺伝的要因の解析

試験１で選択した香気成分の遺伝的パラメーターの推定にあたり，十分なデータ数の蓄積が必要であることから，採取が比較的容易な枝肉切開面の僧帽筋を試料とした。山形県内の市場に上場されたと畜後２～４日の黒毛和種枝肉1213検体より，第６－７肋間の切開後２時間以内に僧帽筋を採取し，香気分析まで－30℃で保管した。この未熟成の僧帽筋より，生肉の香気成分を試験１と同様に抽出，濃縮，定量を行った。

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6,167頭の血縁情報を用い，母数効果として農場，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 v4.2を用いて遺伝的パラメーターを推定した。

y＝総平均＋農場＋と畜月＋性＋と畜月齢（２次回帰）＋育種価＋誤差

３．結果と考察

3.1　試験１

分析型官能評価による煮肉の「甘い香り」は，黒毛和種1.20±0.46，交雑種0.23±0.45，乳用種－0.36±0.43，外国種－1.66±0.28であり，黒毛和種は交雑種，乳用種，外国種に比べて「甘い香り」評価が有意に高かった（**Table 1**）。「甘い香り」評価値との相関係数の高い上位10化合物は**Table 1** のとおりであり，Pantolactone, Acetamide, Phenylasetaldehyde，δ-Tetradecalactone, Methional は正の，Methyl C16：1, 1-Tetradecanol, 1-Hexadecanol，δ-Decalactone, Butyric acidは負の相関であった。前報[1)]では1-Hexadecanol, Pantolactone，γ-Crotonolactone, 1-Tetradecanol, Skatole が正の，Butyric acid, Isovaleric acid, Acetoinが負の有意な相関が認められたが，本研究において新たに31検体を追加し，計62検体について方法に記載した手法により再分析したところ，1-Hexadecanolと1-Tetradecanolは正負の相関が逆転した。1-Hexadecanol, 1-Tetradecanolの煮肉含有量の平均値は，前報31検体では687，50，本報62検体では3,545，373 ng/gであり，本報で５倍程度高い値であった。前報では中性脂質を除去するためInterSep C18FF（GLサイエンス製）による固相抽出を行ったが，その際に1-Hexadecanolや1-Tetradecanolも吸着した可能が考えられる。また，その吸着量に検体中の中性脂質含有量が影響する場合，その定量精度は大きく低下することから，前報と本報で正負の相関逆転が生じた原因となりうる。黒毛和種は他品種に比べてPantolactone, Acetamide, Phenylasetaldehyde, Methionalが有意に多く，また，Methyl C16：1, 1-Tetradecanol, 1-Hexadecanolが有意に少ないことから，これらの化合物は黒毛和種の特徴であ

© The Ito Foundation

Table 1 Sensory evaluation value and boiled meat aroma content

Beef breeds	N	Sensory evaluation value	Boiled meat aroma content (ng/g)																	
		Sweet smell	Pantol actone		Acet amide		Phenylacet aldehyde		δ-Tetradeca lactone		Methional		Butyric acid		δ-Deca lactone		1-Hexa decanol		1-Tetra decanol		Methyl C16：1	
Japanese Black	25	1.20±0.46	A	67±21	A	35±7	A	2499±1112	A	1875±698	A	3408±1705	A	613±330	B	8±3	B	1402±938	B	202±62	B	5678±3876	B
Hybrid (H×JB)	14	0.23±0.45	B	34±6	B	24±3	B	1323±348	B	1479±463	AB	1675±379	B	626±317	B	11±3	AB	3690±2910	A	433±172	A	17260±6131	A
Holstein	10	−0.36±0.43	C	29±11	B	21±5	B	757±209	B	904±409	BC	1047±378	B	470±200	B	11±3	AB	5837±2032	A	482±168	A	22254±7971	A
Foreign species	13	−1.66±0.28	D	27±12	B	22±3	B	1085±421	B	790±458	C	1339±634	B	1201±352	A	14±6	A	5748±2079	A	554±209	A	22963±9074	A
Correlation coefficient with sweet smell				0.60		0.57		0.55		0.54		0.52		−0.50		−0.53		−0.59		−0.60		−0.62	

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

ると考えられた。

煮肉中の上記10化合物の含有量を説明変数，「甘い香り」評価値を目的変数とするOPLS解析を実施したところ，主成分数２．決定係数$R^2=0.755$，交差検証$Q^2=0.726$であり，比較的良好な予測モデルが得られた。しかし，「甘い香り」評価値の実測値とこのモデルによる予測値との散布図の近似式の傾きは0.7584（**Fig 1**）となり，予測値は実測値よりも小さく評価されるとともに，予測値と実測値との間に最大で1.4の差が認められた。今後，予測モデルの精度向上に向けて，今回予測モデルに加えなかった化合物や，本研究で定量していない化合物についても検討する必要があると考える。

Uedaら[3]は黒毛和種牛肉（兵庫県産，鹿児島県産）と乳用種牛肉の焼成肉による官能評価と香気分析を行い，和牛香（甘い脂っぽい香り）はγ-Hexalactone，γ-Decalactone，γ-Undecalactoneと高い相関が認められると報告している。一方，本研究では，甘い香りとγ-Hexalactoneならびにγ-Decalactoneとの相関係数はそれぞれ，−0.28，−0.41であり，ともに黒毛和種に比べて外国種で高かった（γ-Undecalactoneは未定量）。我々は，国内６産地の銘柄牛各30検体の香気成分を分析し，いくつかの化合物で産地間差が認められるとともに，主成分分析においても産地間に違いがあることを確認している（未発表データ）。研究に用いる牛肉の品種や産地により官能評価値と相関が認められる化合物が異なる可能性がある。そのため，「甘い香り」評価値の予測モデルの作成においては，複数の品種や産地の牛肉を試料とする必要があると考える。

3.2　試験２

枝肉切開面より採取した僧帽筋を用い，試験１において「甘い香り」評価値の予測モデルの説明変数として用いた10化合物の含有量を測定すると

© The Ito Foundation

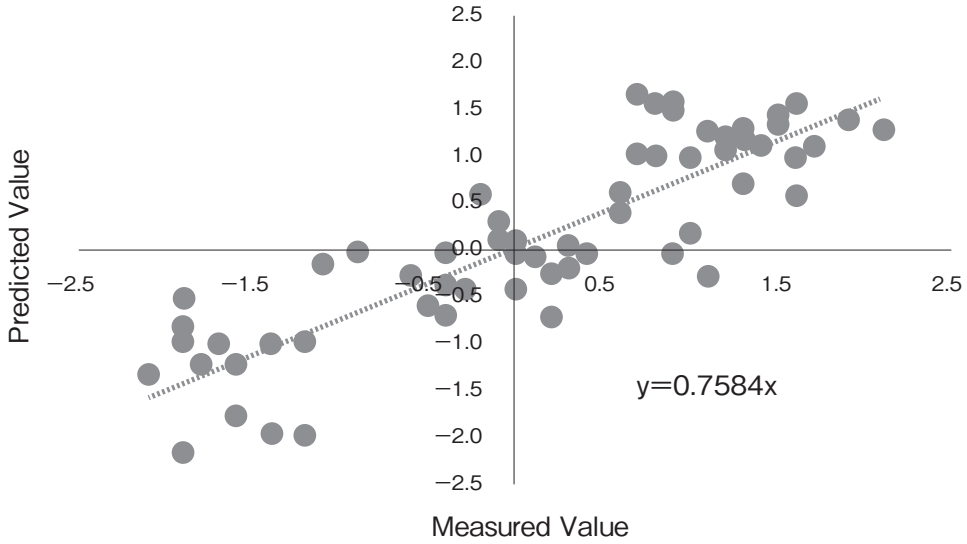


Fig. 1　Prediction of sweet smell evaluation values by OPLS analysis

Table 2　Basic statistics and heritability

Trait	N	mean	SD	h^2
Pantolactone	935	200	93	0.25
Acetamide	1173	141	36	0.21
Phenylacetaldehyde	1161	658	329	0.16
δ-Tetradecalactone	1165	956	451	0.24
Methional	1051	253	174	0.06
Butyric acid	1051	966	474	0.04
δ-Decalactone	531	14	10	—
1-Hexadecanol	901	3555	2193	0.09
1-Tetradecanol	986	1377	1330	0.07
Methyl C16：1	1004	423	367	0.03

h^2：heritability estimates
—：cannot be estimated

ともに，その遺伝的パラメーターを解析した。香気分析数は1,213検体であるが，未熟成の生肉である僧帽筋を用いたため，δ-Decalactone，1-Hexadecanol，Pantlactone，1-Tetradecanol，Methyl C16：1，Methional，Butyric acidで検出限界以下の欠測値が多く，また形質ごとに平均値±３SDの範囲のみのデータを採用したことから，各化合物のデータ数は**Table 2**のとおり1173～531となった。

各化合物の含有量の平均値±標準偏差は，Pantolactone 200 ± 093，Acetamide 141 ± 36，Phenylacetaldehyde 653 ± 2329，δ-Tetradecalactone 956 ± 451，Methional 253 ± 174，Butyricacid 966 ± 474，δ-Decalactone 14 ± 10，1-Hexadecanol 3555 ± 2193，1-Tetradecanol 1377 ± 1330，Methyl C16：１ 423 ± 367 ng/gであり，個体差が非常に大きかった。また，遺伝率 h^2 は0.25～0.03であり，データ数の少ないδ-Decalactone

© The Ito Foundation

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

Trait	farm	slaughter month	sex	age in months	
				primary	secondary
Pantolactone	0.002	<.001	0.947	0.126	0.455
Acetamide	<.001	<.001	0.05	0.407	0.936
Phenylacetaldehyde	<.001	<.001	<.001	0.156	0.115
δ-Tetradecalactone	<.001	<.001	<.001	<.001	0.631
Methional	<.001	<.001	0.005	0.906	0.424
Butyric acid	<.001	<.001	0.037	0.111	0.021
δ-Decalactone	0.001	<.001	<.001	0.278	0.573
1-Hexadecanol	<.001	<.001	<.001	0.493	0.695
1-Tetradecanol	0.042	<.001	0.003	0.303	0.055
Methyl C16:1	0.006	<.001	0.005	0.327	0.313

では推定できなかった。**Table 1** において煮肉の「甘い香り」評価値と有意な正の相関が認められたPantolactone, Acetamide, Phenylacetaldehyde, δ-Tetradecalactoneはこの10化合物のなかでは比較的遺伝率が高く，遺伝的改良が可能であると推察された。また，種雄牛550頭の遺伝的能力が評価され，最も能力が低い種雄牛の評価値を０とした場合，香気成分の遺伝的能力の平均値±標準偏差(最大値)はそれぞれ，Pantolactone 49±17(129), Acetamide 22±5(48), Phenylacetaldehyde 159 ± 39(332), δ-Tetradecalactone 236 ± 64(617)ng/gであった。

非遺伝効果については，農場，と畜月ではすべての形質，性ではPantlactoneを除く形質において有意な効果が認められた（**Table 3**）。効果が推定された50農場において，10化合物の農場効果の変動係数は0.39～0.63であり，山形県内の農場間でも飼養管理に大きな違いがあると推察された。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。

4．要　約

和牛肉の特長である「甘い香り」に寄与する成分を明らかにするため，煮肉の官能評価と香気成分分析を行った。「甘い香り」と相関の高い上位10成分は，Pantolactone, Acetamide, Phenylasetaldehyde, δ-Tetradecalactone, Methional, Methyl C16 ： 1 , 1-Tetradecanol, 1-Hexadecanol, δ-Decalactone, Butyric acid であった。この10成分によるOPLS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。また，枝肉より採取した僧帽筋を用い，上記10成分の遺伝的パラメーターを推定した。「甘い香り」と正の相関が認められたPantolactone, Acetamide, Phenylasetaldehyde, δ-Tetradecalactone の遺伝率は0.25，0.21，0.16，0.24であり，その遺伝的改良は可能であると考えられた。一方，「甘い香り」と負の相関が認められたMethyl C16：1, 1-Tetradecanol, 1-Hexadecanol, Butyric acidの遺伝率は0.03，0.07，0.09，0.04と小さく，遺伝的改良は困難であると考えられた。また，すべての形質において農場とと畜月の効果が認められた。

文　献

1）庄司則章ら：黒毛和種牛肉における「甘い香り」の育種改良手法の確立(Ⅱ)，令和４年度食肉に関する助成研究調査成果報告書，**41**，116～122，2023.

© The Ito Foundation

2） ESI友の会編：メタボロームデータの標準化方法, https://sites.google.com/site/esitomonokai/jie-xi-bu-wu/metaboromudetano-biao-zhun-hua-fang-fa/2-lowesstosplineno-li-lun

3） Ueda, S., *et al.*：Exploring the Characteristic Aroma of Beef from Japanese Black Cattle (Japanese Wagyu) via Sensory Evaluation and Gas Chromatography-Olfactometry, *Metabolites*, **56,** 11, 2021.

© The Ito Foundation

黒毛和種の白斑発生に関する分子遺伝学的研究

Molecular genetic study on white spotting in Japanese Black cattle

下　桐　　猛[1]・小　山　秀　美[2]

（[1]鹿児島大学農学部，[2]国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産研究部門）

Takeshi Shimogiri[1] and Hidemi Oyama[2]

（[1]Faculty of Agriculture, Kagoshima University, [2]Institute of Livestock and Grassland Science, NARO）

In Japanese Black cattle, white spotting is a trait that adversely affects the breed's morphological characteristics. Criteria for the location and extent of white spotting have been established to disqualify an animal from registration. In this study, we aimed to identify the candidate genes for recessive white spotting in the Japanese Black cattle with the goal of understanding and suppressing white spotting using a Next Generation Sequencing (NGS) technology. (1) We used hair root RNA samples each from three Japanese Black cows with white spotting and without for RNA-Seq analysis. This analysis yielded a total of approximately 143 million 150-bp PE reads. Our statistical analysis using DESeq2 revealed 359 differentially expressed genes (DEGs) (Up：218, Down：141) between the white spotting and solid color groups ($p < 0.05$, $|\log2 \text{ Fold Change}| > 0$). Additionally, we detected several keratin-related genes and the genes related to coat and skin color. (2) We performed re-sequencing analysis using genomic DNAs purified from nasal mucosa samples of 30 animals from each of the white spotting and solid color groups. Re-sequencing analysis yielded approximately 669 and 518 million PE reads in the white spotting and solid color groups, respectively. In our re-sequencing results, SNPs and indels were identified at 10,668,692 and 1,689,901 loci, respectively, between the white spotting and solid color groups. Of these, 688 SNPs and 531 indels were found to have significant allele frequencies between the two groups ($p < 0.05$). Some of these significant SNPs are currently being revalidated. We plan to identify polymorphisms associated with candidate DEGs and regions obtained by the RNA-Seq and GWAS analyses.

1．目　　的

ウシの白斑は，被毛が白く，その下の皮膚がピンク色を呈する形質である。白斑の有無は質的形質であり，その遺伝様式は古くから家畜育種学の教科書にも記載されている。その中で，黒毛和種のような単色品種でみられる白斑の有無は１遺伝子座の劣性形質であると考えられており，対立遺伝子がS（単色）＞s（白斑）の優劣関係にあるS遺伝子座の支配を受けるとされる。しかしながら，その遺伝子型で説明できない例外も多数あることが知られている[1)]。近年，劣性白斑sの候補遺伝子が海外の品種で解明されつつあり，ウシ22番染色体（BTA22）上にある色素細胞の分化や

© The Ito Foundation

生存に必須な転写因子*MITF*遺伝子のSNP[2, 3]，BTA２にある転写因子*PAX3*遺伝子のSNP[4]，BTA６の*KIT*遺伝子のSNP[5]が報告されている。

黒毛和種は，褐色をおびた黒毛を持つ単色品種であるが，その一部で白斑を持つ個体が発生する。黒毛和種の白斑は出現部位や程度により，失格となる基準が設けられている。失格となった個体は，子牛登記証明書が発行されず繁殖供用されない。そのため，損徴の発生は経済的価値を損じる可能性がある。他方，我々は，鹿児島県産黒毛和種約51万件のメス子牛登記データを用いて，彼らの白斑の発生率が2000年以降増えていることを示した[6]。したがって，白斑発生をコントロールするためにその遺伝的基盤を解明することが必要ではないかと考えた。これまでに我々は，前述したメス子牛の登記データを使って，黒毛和種の白斑は劣性形質であるが，１遺伝子座の優劣関係だけでは説明できないこと[6]，白斑の遺伝率は80％ほどであること[7]を明らかにした。さらに，鹿児島県の黒毛和種のゲノムDNAを用いて，論文２で報告された*MITF*遺伝子のSNPは黒毛和種でも白斑の有無と有意に関連するが，劣性ホモ型で白斑を呈すると仮定した場合に，例外も多数存在することを報告した[8]。また，鹿児島県の黒毛和種で*MITF*以外の既報の白斑関連SNPs[4, 5]を予備的に検索したが，鹿児島県の黒毛和種で当該SNPsは存在せず，黒毛和種の白斑に関連しないことが示唆された。さらに我々は，別の黒毛和種集団でゲノムワイド相関解析（GWAS）を行い，*MITF*が座乗するBTA22とそれ以外の染色体（BTA6，BTA14，BTA17等）で有意に関連するSNPsのあることを示し，黒毛和種の白斑は海外の品種とは異なる遺伝的基盤を有することを示唆するデータを得ている。そこで本研究では，黒毛和種の劣性白斑に関わる遺伝的基盤を解明して黒毛和種で白斑発生の抑制につながる知見を得ることを目的として，次世代シーケンサーを使った解析により，網羅的に白斑の発生に関連する遺伝子群の同定を試みた。

２．方　　法

2.1　RNA-Seq解析による黒毛和種の白斑関連遺伝子の検索

白斑群と単色（白斑のない）群の毛根で発現に有意な差異のある遺伝子（DEGs）をRNA-Seqにより網羅的に調べた。黒毛和種メス牛の白斑個体と単色個体の各３頭の乳座乳房部から毛根を採材し，RNA later（Sigma-Aldrich）あるいはドライアイス中で保存した。（公社）全国和牛登録協会鹿児島県支部から白斑の有無・父牛・生年月日の情報を得て，採材の際，白斑群と単色群間で月齢と父牛の構成を可能な限りそろえた。採材した毛根20本から，TRIzol Reagent（インビトロジェン）でRNAを抽出した。抽出後のRNAをRNA-Seq解析した。RNA-Seq解析はNEBNext® Ultra™ II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina（NEB）でライブラリーを調整し，Illumina社のシーケンスプラットフォームによりシーケンスリードを解読した。RNA-Seq解析は倉敷紡績株式会社で行った。

各サンプルから得たペアエンドシーケンス（PE）リードをアダプター配列や配列長の10％を超える未決定塩基を含む低品質なリードをフィルタリングにより除去した。フィルタリング後のPEリードをHisat2 v2.0.5[9]でウシゲノムリファレンス配列（Bos_taurus.ARS-UCD1.3.dna.toplevel.fa.gz）上にアラインメントおよびマッピングした。featureCounts v1.5.0-p3[10]で各遺伝子のFPKM（Fragments Per Kilobase of transcript sequence per Millions base pairs sequenced）を計算して遺伝子発現量を評価した。DESeq２[11]を使って，白斑群と単色群間で遺伝子発現量が変

© The Ito Foundation

動した遺伝子群（DEGs）を同定した（$p<0.05$, $|\log2\ Fold\ Change|>0$）。

2.2　リシーケンス解析による黒毛和種の白斑遺伝子の探索・同定

（公社）全国和牛登録協会鹿児島県支部の協力のもと，鹿児島県内の牧場で飼養されている黒毛和種繁殖メス牛個体の鼻腔内粘膜サンプルを白斑個体群30頭と単色個体群30頭から採材し，常法でゲノムDNAを抽出した。抽出したゲノムDNAはQuantus™ Fluorometer（プロメガ）で濃度測定した。その後，30頭のゲノムDNAをそれぞれ等量で混合し，白斑群サンプルと単色群サンプルを調整し，それらサンプルをリシーケンス解析に供試した。リシーケンス解析はIllumina社のTruSeq DNA Nanoにより各群のライブラリーを調整し，Illumina NovaSeq　6000装置でPEリードを解読した。リシーケンス解析は株式会社Rhelixaで行った。得られたPEリードはクオリティコントロールのために，FastQC v0.12.1プログラムで品質確認，skewer 0.2.2プログラムでアダプター配列の除去，Trimmomatic Version 0.39で低品質な塩基や低品質なリードの除去を行った。BWAでウシゲノムリファレンス配列にマッピングし，Genome Analysis Toolkit（GATK）versions 4.5.0.0プログラムでPCR重複リードの特定と変異（SNPとindel）の遺伝型判定，白斑群サンプルと単色群サンプルとの変異データの統合を行った。得られた変異は，SnpEffプログラムを使ってゲノム上のアノテーションを付与した。各変異の有意性は，白斑群と単色群との間で各変異の対立遺伝子のリード数をフィッシャーの正確確率検定で検定した後，有意水準を0.05に設定したボンフェローニ補正法でp値を補正して調査した。

3．結果と考察

3.1　RNA-Seq解析による黒毛和種の白斑関連遺伝子の検索

白斑と単色のメス牛各3頭の乳座乳房部の毛根RNAから得られたRNA-Seqライブラリーの塩基配列を決定した。RNA-Seq解析の結果，合計約1.43億本の150-bp PEリードを作成した。1サンプル当たりの総PEリード数の範囲は2,031万本から2,638万本で，平均総PEリード数は2,380万本であった（**Table 1**）。アダプター配列と低品質塩基を持つPEリードをフィルタリングした結果，総PEリード数が平均約1.05％減少した。フィルタリング後に得られた高品質PEリードは，*Bos taurus* ARS-UCD1.3ゲノムアセンブリに平均86.2％のマッピング率でマッピングされた。マッピングされたゲノム領域の内訳は，エクソン領域が平均88.8％，イントロン領域が6.0％，非遺伝子DNA領域が5.2％だった。合計20,001遺伝子の発現量が得られ，以降の解析に使用された。

DESeq 2を使った統計解析の結果，20,001遺伝

Table 1　Statistics on the paired-end sequencing（PE）reads obtained from RNA-Seq analysis of 6 cattle hair root samples.

Group	ID	No. of total PE reads（NTR）	NTR after filtering	Percentage % of filtered reads	NTR mapped	Mapping percentage %
Solid color	1	26,076,618	25,808,350	1.03	21,842,751	84.63
	2	22,432,502	22,213,542	0.98	18,864,565	84.92
	3	20,315,926	20,100,722	1.06	17,552,365	87.32
White spot	4	26,383,213	26,112,874	1.02	22,559,743	86.39
	5	25,405,954	25,130,075	1.09	21,968,204	87.42
	6	22,213,819	21,957,004	1.16	19,032,324	86.68
mean		23,804,672	23,553,761	1.06	20,303,325	86.23

© The Ito Foundation

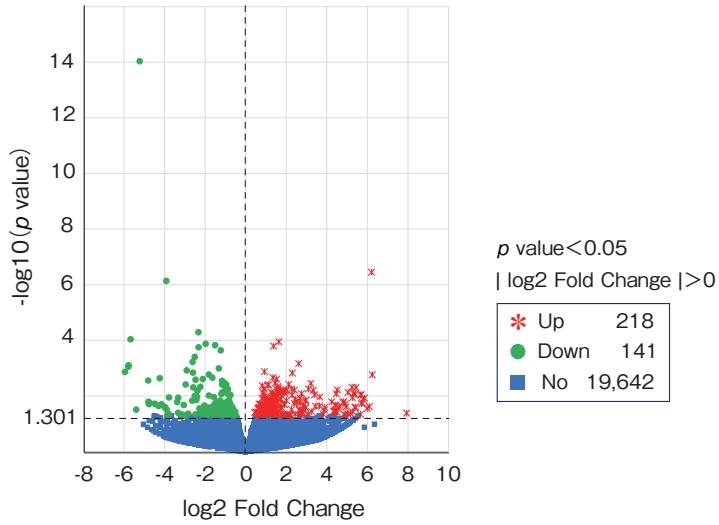


Fig. 1　A volcano plot between log2 Fold Change and −log10（*p* value）.
Red marks（＊）indicate genes that were significantly up regulated while green dots（●） indicate genes that were significantly down regulated between white spot and solid color hair root（$p<0.05$, |log2 Fold Change|＞0）. Blue squares（■）indicate genes that were not significantly expressed.

子のうち，白斑群と単色群の間で有意なDEGsが359遺伝子得られた（$p<0.05$, | log2 Fold Change | ＞0）。具体的には白斑群では218遺伝子がアップレギュレートされ，141遺伝子がダウンレギュレートされていた（**Fig. 1**）。有意性が上位の遺伝子群のうち，いくつかの遺伝子は，GWASで同定された白斑の有無と有意に関連する領域上に座乗しており，今後，候補遺伝子として周辺のSNPsを検討したいと考えている。さらに，得られたDEGsのうち，被毛や皮膚の色に関するものは17遺伝子（Up：４遺伝子，Down：13遺伝子）であり，ダウンレギュレートされたDEGsのうち６遺伝子は，ケラチンに関連する遺伝子だった。ケラチンは一般的に，色素沈着に関わるメラニンの運搬において重要であることが知られているが，毛包の最初の産毛細胞である毛球を作り出している可能性が報告されている[12]。毛色に係るメラニン生産は，毛球にあるメラノサイトにおいて行われる。我々の先行研究では，メラニン生産とメラノサイトの分化に関与する*MITF*遺伝子が黒毛和種の白斑と関連があることを報告した。*MITF*遺伝子とケラチン関連遺伝子との相互作用は今のところ不明であるが，有意に変動したケラチン関連遺伝子が黒毛和種の白斑に間接的に影響している可能性があるため，今後周辺領域のSNPsを探索する予定である。

3.2　リシーケンス解析による黒毛和種の白斑遺伝子の探索・同定

白斑と単色のメス牛各30頭の鼻腔内粘膜サンプルから得たゲノムDNAをそれぞれ等量混和し，白斑群と単色群のサンプルを作成し，リシーケンス解析を行った。リシーケンス解析の結果，白斑群で約6.69億本，単色群で約5.18億本のPEリードが得られた。各サンプルのクオリティコントロール後に，GATKプログラムによりSNPとindelを同定した結果，白斑群と単色群間でSNPが10,668,692座位，indelが1,689,901座位得られた。各染色体でまとめると，SNPはBTA1の640,862座位からBTA25の183,263座位まで，indelはBTA1の104,360座位からBTA25の26,511座位までに及

© The Ito Foundation

Table 2 SNPs and indels identified between white spotting and solid color groups.

BTA	SNP	Indel	BTA	SNP	Indel
BTA1	640,862	104,360	BTA16	323,685	51,584
BTA2	522,204	82,591	BTA17	318,732	50,490
BTA3	483,235	73,997	BTA18	283,715	43,830
BTA4	516,951	82,826	BTA19	256,731	39,060
BTA5	505,598	76,106	BTA20	309,459	49,829
BTA6	485,081	79,098	BTA21	289,015	44,733
BTA7	442,162	72,239	BTA22	229,803	36,489
BTA8	455,039	74,010	BTA23	317,425	44,942
BTA9	451,342	71,921	BTA24	257,366	39,552
BTA10	443,883	67,708	BTA25	183,263	26,511
BTA11	409,427	63,355	BTA26	221,244	35,372
BTA12	419,959	66,574	BTA27	213,501	33,860
BTA13	334,201	51,835	BTA28	210,979	32,658
BTA14	316,454	50,232	BTA29	234,554	36,096
BTA15	382,947	60,877	BTAX	209,875	47,166
			total	10,668,692	1,689,901

んだ（**Table 2**）。次に，白斑群と単色群間で各アリルの構成比をフィッシャーの正確確率検定で検定した結果，SNPで688座位，indelで531座位が有意と示された（$p< 0.05$）。有意なSNPの中でこれまでの研究結果と重複する染色体領域（BTA1，BTA4，BTA6，BTA22）に座乗するSNPについてサンガー法による検証実験を行っている。また，GWASやRNA-Seqで得られた候補領域や候補DEGsに座乗する変異を同定することで，白斑の有無に関わる候補変異を同定する予定である。

4．要　約

黒毛和種の白斑は，その出現部位や程度により失格となる基準が設けられているように，品種の特徴に負の影響を与える形質である。本研究では，黒毛和種の劣性白斑に関わる遺伝的基盤を解明して白斑発生の抑制につながる知見を得ることを目的として，次世代シーケンサーを使った解析により，白斑に関わる遺伝子群の同定を試みた。①白斑および単色各３頭の黒毛和種メス牛の毛根RNAをRNA-Seq解析に用いた。RNA-Seq解析では，合計約1.43億本の150-bp PEリードが得られた。DESeq２を使った統計解析の結果，白斑群と単色群の間でDEGsが359（Up：218，Down：141）遺伝子で得られた（$p<0.05$，$|\log2$ Fold Change$|>0$）。これらDEGsの中で，いくつかの遺伝子はGWASで同定された白斑発生に有意に関連する領域上に座乗した。両研究で絞られた遺伝子を白斑発生に関わる候補遺伝子として周辺領域のSNP検索など，さらに調査する必要がある。さらに，本研究のRNA-Seq解析ではいくつかのケラチン関連遺伝子や被毛や皮膚に関連する遺伝子群も検出された。②白斑群および単色群各30頭の鼻腔内粘膜サンプルから得たゲノムDNAを用いてリシーケンス解析を行った。解析の結果，白斑群および単色群で約6.69および5.18億本のPEリードが得られた。その結果，白斑群と単色群間でSNPが10,668,692座位，indelが1,689,901座位得られた。そのうち，白斑群と単色群間で対立遺伝子頻度の有意なものがSNPで688座位，indelで531座位得られた（$p< 0.05$），現在その一部のSNPで再検証を行っている。また，RNA-SeqやGWASで得られた候補DEGsや候補領域に関わる変異も同定する予定である。

© The Ito Foundation

文　献

1） Olson, T. A.：Genetics of colour variation. In：The Genetics of Cattle（Ed. by R. Fries & A. Ruvinsky），pp. 33-53，CAB International，Wallingford，UK. 1999.

2） Fontanesi，L.，Scotti，E.，Russo，V.：Haplotype variability in the bovine *MITF* gene and association with piebaldism in Holstein and Simmental cattle breeds，*Animal Genetics*，**43**，250～256，2012.

3） Edea，Z.，Dadi，H.，Dessie，T.，Kim，I.-H.，Kim，K.-S.：Association of MITF loci with coat color spotting patterns in Ethiopian cattle，*Genes & Genomics*，39(3)，285～293，2016.

4） Jivanji，S.，Worth，G.，Lopdell，T. J. Yeates，A.，Couldrey，C.，Reynolds，E.，Tiplady，K.，McNaughton，L.，Johnson，T. J. J.，Davis，S. R.，Harris，B.，Spelman，R.，Snell，R. G.，Garrick，D.，Littlejohn，M. D.：Genome-wide association analysis reveals QTL and candidate mutations involved in white spotting in cattle，*Genetics Selection Evolution*，**51**，62，2019.

5） Bovo，S.，Schiavo，G.，Kazemi，H.，Moscatelli，G.，Ribani，A.，Ballan，M.，Bonacini，M.，Prandi，M.，Dall'Olio，S.，Fontanesi，L.：Exploiting within-breed variability in the autochthonous Reggiana breed identified several candidate genes affecting pigmentation-related traits，stature and udder defects in cattle，*Animal Genetics*，52(5)，579～597，2021.

6） 小山秀美，今村清人，坂元信一，西和隆，井上慶一，河邊弘太郎，岡本新，本多健，大山憲二，下桐猛：鹿児島県産黒毛和種における損徴発生状況に関する調査研究，日本畜産学会報，88(4)，425～430，2017.

7） Oyama，H.，Imamura，K.，Sakamoto，S.，Nishi，K.，Kawabe，K.，Okamoto，S.，Honda，H.，Oyama，K.，Shimogiri，T.：Estimation of genetic parameters of defective appearances in Japanese Black heifer calves in Kagoshima，*Animal Science Journal*，91(1)，e13338，2020.

8） 小山秀美，加世田景示，上西愼茂，今村清人，坂元信一，大島一郎，片平清美，河邊弘太郎，岡本新，小林栄治，下桐猛：*MITF*遺伝子の変異と黒毛和種の白斑との関連性に関する研究，動物遺伝育種研究，48(1)，3～7，2019.

9） Mortazavi，A.，Williams，B. A.，McCue，K.，Schaeffer，L.，Wold，B.：Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq，*Nature Methods*，5(7)，621～628，2008.

10） Liao，Y.，Smyth，G. K.，Shi，W.：featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features，*Bioinformatics*，30(7)，923～930，2014.

11） Love，M. I.，Huber，W.，Anders，S.：Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2，*Genome Biology*，15(12)，1～21，2014.

12） Litman，T.，Stein，W. D：Ancient lineages of the keratin-associated protein（KRTAP）genes and their co-option in the evolution of the hair follicle，*BMC Ecology and Evolution*，**23**，7，2023.

© 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（Ⅲ）

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

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-GlcNAc transporter located in the Golgi membrane; however, the pathogenic mechanisms of CVM have been largely unspecified. In the present study, we showed that a *Slc35a3* knockout (KO) mutant was a perinatal lethal form in mice, which exhibited dwarfism recapitulating CVM-like vertebral anomalies. During embryogenesis, *Slc35a3* mRNA was expressed in the presomitic mesoderm of wild-type mice, suggesting that SLC35A3 transports the UDP-GlcNAc used for the sugar modification of Notch receptors, which is an essential step in somite formation. In the cartilage of *Slc35a3* KO embryos, the extracellular matrix space was severely reduced, and many flat proliferative chondrocytes were reshaped. Because these histological abnormalities were similar to those observed in several mutant mice accompanying the impaired glycosaminoglycan (GAG) biosynthesis, GAG levels were measured in the spine and limbs of *Slc35a3* KO mice using disaccharide composition analysis. Compared with control mice, the amounts of heparan sulfate, keratan sulfate, and chondroitin sulfate/dermatan sulfate, were significantly decreased in *Slc35a3* KO mice. These findings suggest that SLC35A3 regulates GAG biosynthesis and the chondrodysplasia phenotypes were partially caused by the decreased GAG synthesis. Hence, *Slc35a3* KO mice would be a useful model for investigating the *in vivo* roles of SLC35A3 and the pathological mechanisms of SLC35A3-associated diseases.

1．目　　的

複合脊椎形成不全症（CVM）は，ホルスタイン種における周産期致死性の常染色体潜性遺伝病である[1)]。CVM発症個体は，椎骨や肋骨の欠損・癒合，頚椎や胸椎の短縮，側弯など重度の脊椎形成不全を示し，その約８割が妊娠260日までに死流産する。CVM家系の連鎖解析から，CVMの原

© The Ito Foundation

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（NST）である。糖鎖は末端に単糖単位で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，糖ヌクレオチドの糖部分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年度および令和４年度に伊藤記念財団の研究助成を受け，*Slc35a3* knockout（KO）マウスを作製し，同マウスの詳細な表現型解析を行った。*Slc35a3* KOマウスは出生後，数時間で死亡し，CVMと類似した重度の脊椎形成不全を示し，CVMモデル動物としての有用性が示された（**Fig. 1**）[4)]。*Slc35a3* KOマウスの軟骨組織では，細胞外マトリックス（ECM）領域が著減し，多くの扁平な増殖軟骨細胞は変形していた（**Fig. 2**）[5)]。これらの組織学的異常は，グリコサミノグリカン（GAG）という糖鎖の合成不全を呈するいくつかのKOマウスでも報告されているため，*Slc35a3* KOマウスにおいてもGAGの合成不全が疑われた。したがって，令和５年度は*Slc35a3* KOおよびコントロール（Ctrl）マウスの脊椎および後肢サンプルを用いて，GAGの生化学的解析を実施した。

２．方　　法

*Slc35a3*ヘテロKOマウスの雌雄を交配させ，妊娠18.5日目の雌マウスを三種混合麻酔下で頸椎脱臼により安楽死させた。胎児を取り出し，弾頭により安楽死させた後，脊椎および後肢を摘出し，－80℃で保存した。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。ヘテロKOマウスの表現型に異常は認められないことから，野生型およびテヘロKOマウスをコントロールに用いた。

マウス胚の脊椎および後肢サンプルにおけるコンドロイチン硫酸（CS）/デルマタン硫酸（DS），ヘパラン硫酸，（HS）ケタラン硫酸（KS），およびヒアルロン酸の二糖組成分析は，以前の報告に従い実施した[6)]。各サンプルをホモジナイズ，超音波処理し，アクチナーゼE（Kaken Pharm.）処理を行い，タンパク質を分解した。残ったタンパク質およびペプチドはトリクロロ酢酸を使用して沈殿させ，その後エーテル抽出を行い，トリクロロ酢酸を除去した。得られた粗GAGペプチド画分を，Amicon Ultra-4 3Kユニット（Millipore）を使用して脱塩処理した。得られたGAGペプチド画分は，CS/DS/HAの二糖組成分析のためにコンドロイチナーゼABCとコンドロイチナーゼAC-II（生化学工業），HS組成分析のためにヘパリナーゼ-Ⅰ，ヘパリナーゼ-III（IBEX Pharmaceuticals），およびヘパリチナーゼ-II

© The Ito Foundation

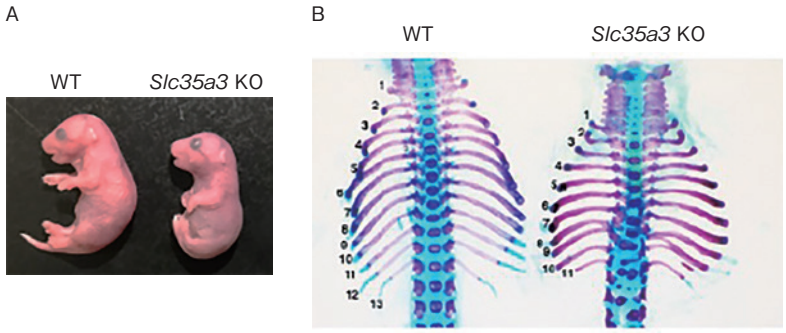


Fig. 1　*Slc35a3* KO mouse strain is a useful animal model for CVM.
（A）Gross appearance of wild-type（WT）and *Slc35a3* KO littermate embryos at E18.5.（B）Dorsal view of spine and ribs. *Slc35a3* KO mice exhibited vertebral malformation, including misshaped vertebrae, fusion of vertebral bodies, and fusion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

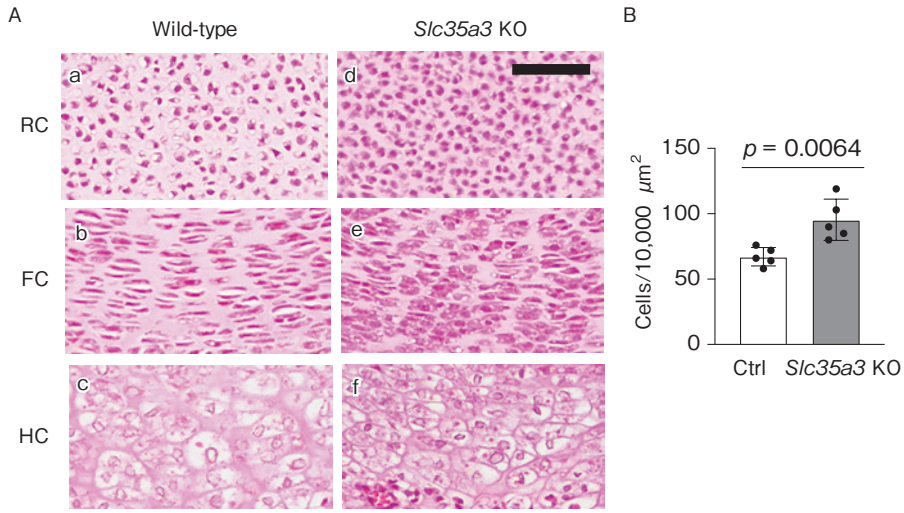


Fig. 2　Cartilaginous extracellular matrix space was severely reduced in *Slc35a3* KO mice.
Humerus and lumbar vertebrae sections of Control（Ctrl）and *Slc35a3* KO littermate embryos at E18.5 were stained using hematoxylin and eosin（HE）solution.（A）High magnification images of the round chondrocyte（RC）, 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）.

（R&D Systems），KS組成分析のためにケラタナーゼ-II（生化学工業）でそれぞれ消化した。各消化物の還元末端を2-aminobenzamide（2AB）で標識し，GAG二糖の2AB誘導体を陰イオン交換PA-Gカラム（YMC Co.）を用いたHPLC解析に供した。検出された不飽和二糖を2AB標識不飽和二糖標準品の溶出位置とピーク面積との比較によって同定し，含量を測定した。

3．結果と考察

GAGは二糖繰り返し構造を形成する直鎖状の多糖であり，CS，DS，HS，KS，そしてHAに分類される。GAGの二糖単位はウロン酸（グルクロン酸またはイズロン酸）とアミノ糖（グルコサミンまたはガラクトサミン）であり，HA以外は硫酸基を有し，KSではウロン酸の代わりにガラクトースを有する。また，HA以外はリンカー糖

© The Ito Foundation

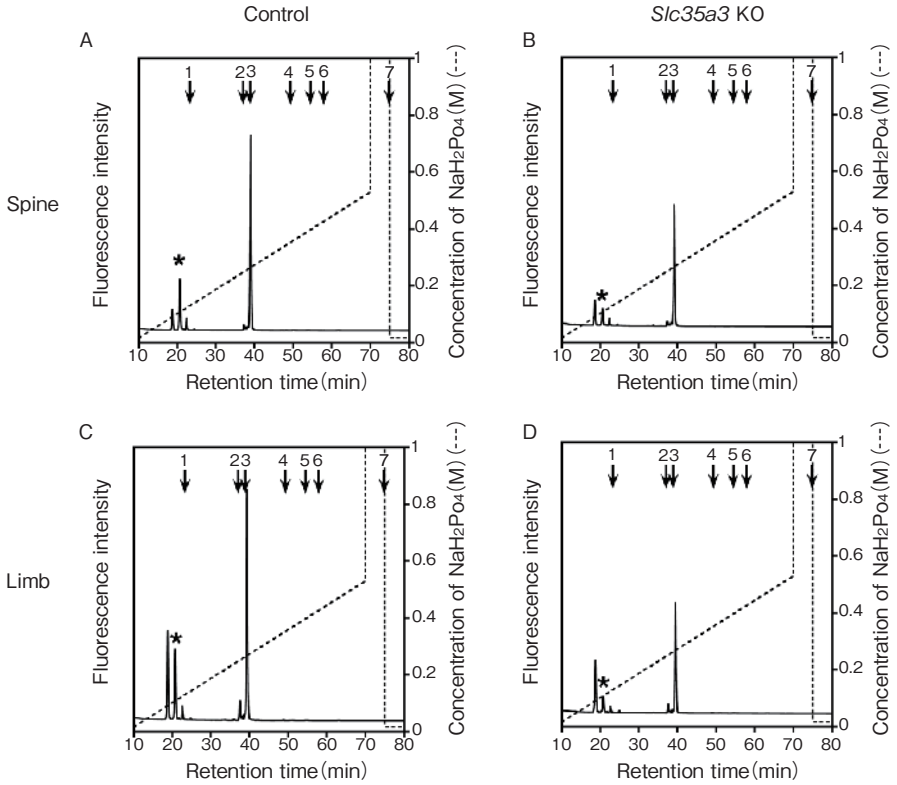


Fig. 3　HPLC profiles of the chondroitinase digests of GAG-peptide preparations from the spine and limbs.
The 2-aminobenzamide (2AB)-derivatives of the yielded CS/DS and HA disaccharides after digestion with a mixture of chondroitinases ABC and AC-II, were separated using anion-exchange HPLC on an amine-bound silica PA-G column with a linear gradient of NaH_2PO_4 as indicated by the dashed line for the analysis of CS/DS and HA. HPLC profiles of the spine (A, B) and limb (C, D) samples of control (A, C) and *Slc35a3*$^{-/-}$ mice (B, D). The elution positions of 2AB-labeled CS/DS disaccharide standards are indicated by numbered arrows : 1, ΔHexUA-GalNAc ; 2, ΔHexUA-GalNAc (6S) ; 3, ΔHexUA-GalNAc (4S) ; 4, ΔHexUA (2S)-GalNAc (6S) ; 5, ΔHexUA (2S)-GalNAc (4S) ; 6, ΔHexUA-GalNAc (4S,6S) ; 7, ΔHexA (2S)-GalNAc (4S,6S). Asterisk indicates the ΔHexUA-GlcNAc derived from HA. Abbreviations: CS, chondroitin sulfate ; DS, dermatan sulfate ; HA, hyaluronan, ΔHexUA, 5-unsaturated hexuronic acid ; GalNAc, *N*-acetyl-D-galactosamine; GlcNAc, *N*-acetyl-D-glucosamine; 2S, 2-*O*-sulfate; 4S, 4-*O*-sulfate; 6S, 6-*O*-sulfate.

鎖を介してコアタンパク質と共有結合し，プロテオグリカンと呼ばれる糖タンパク質の側鎖として存在している。CSの二糖単位は*N*-アセチルガラクトサミン（GalNAc）とグルクロン酸（GlcA），DSはGalNAcとイズロン酸（IdoA），HSはGlcNAcとGlcA，そしてHAもGlcNAcとGlcAである。

Slc35a3 KOおよびマウスの脊椎および四肢を用いて，CS/DS，HS，KS，およびHAの二糖組成分析を実施した。CS/DS分析におけるHPLCクロマトグラムを**Fig. 3** に示した。２AB標識標準品のクロマトグラムから各二糖の溶出時間とピーク面積を決定し，それを基に算出した各二糖の含有量を**Table 1** に示した。HS，KS，およびHAについても同様の解析を実施し，各GAG含量を算出した（**Fig. 4**）。*Slc35a3* KOマウスの脊椎および四肢から調製したGAGペプチド画分中のCS/DSとHS二糖の含量は，Ctrlマウスと比較して有意に減少していた。*Slc35a3* KOマウスの脊椎におけるKS含量も，Ctrマウスよりも有意に減少していた。HA含量は*Slc35a3* KOとCtrlマウス間で同程度であった。

© The Ito Foundation

Table 1 Disaccharide composition of chondroitin sulfate/dermatan sulfate (CS/DS) in the spine and limb

	Spine		Limb	
	Control	*Slc35a3*$^{-/-}$	Control	*Slc35a3*$^{-/-}$
	(pmol disaccharide/mg total protein)			
ΔHexUA-GalNAc	12,596 ± 3,551	4,238 ± 2,163**	6,815 ± 1,085	2,051 ± 311***
ΔHexUA-GalNAc (6S)	1,609 ± 368	1,059 ± 528	1,774 ± 402	991 ± 206***
ΔHexUA-GalNAc (4S)	56,193 ± 12,319	36,630 ± 10,278*	30,079 ± 6,101	19,720 ± 6,324*
ΔHexUA (2S) -GalNAc (6S)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ΔHexUA (2S) -GalNAc (4S)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ΔHexUA-GalNAc (4S,6S)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ΔHexUA (2S) -GalNAc (4S,6S)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Total CS/DS disaccharides	70,371 ± 15,758	41,927 ± 12,934**	38,6684 ± 6,790	22,762 ± 6,427**

Data are shown as the means ± standard deviation ; n = 7 (Control) and n = 5 (*Slc35a3*$^{-/-}$). *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$ (vs. Control). N.D., not detected (<1 pmol disaccharide/mg protein). Control, wild-type + *Slc35a3*$^{+/-}$.
Abbreviations : ΔHexUA, 4,5-unsaturated hexuronic acid ; GalNAc, *N*-acetyl-D-galactosamine ; 2S, 2-*O*-sulfate; 4S, 4-*O*-sulfate; 6S, 6-*O*-sulfate.

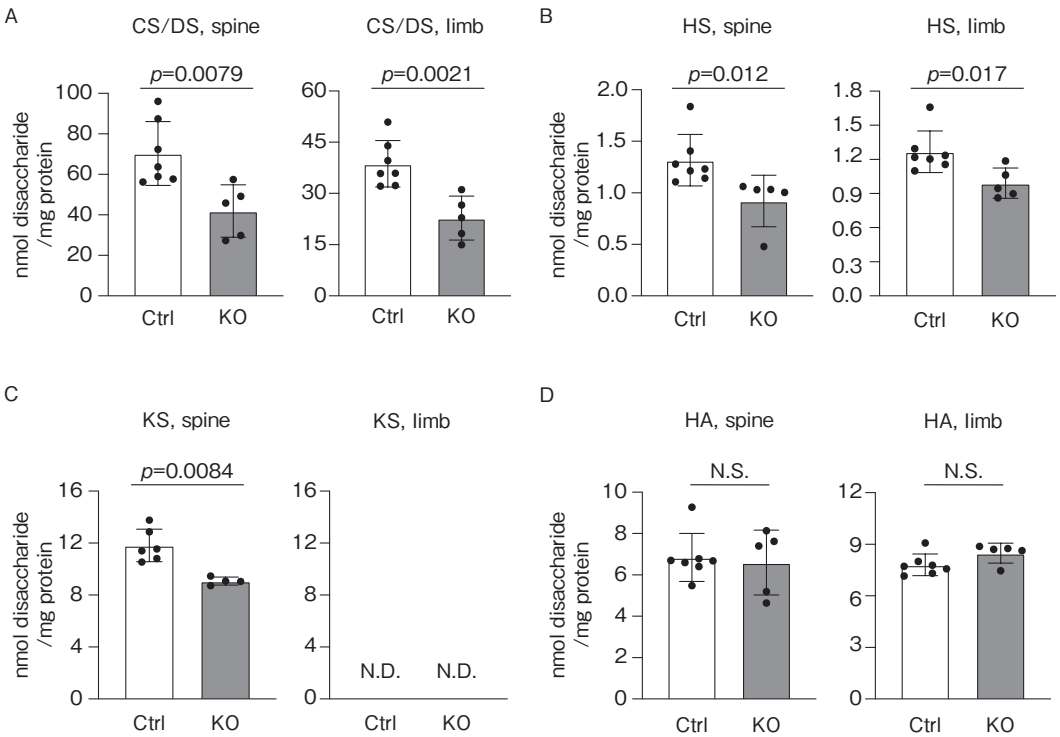


Fig. 4 GAG synthesis is impaired in the spine and limbs *of Slc35a3* KO mice.
The amounts of chondroitin sulfate/dermatan sulfate (CS/DS) (A), heparan sulfate (HS) (B), keratan sulfate (KS) (C), and hyaluronan (HA) (D) in the spine and limbs of control and *Slc35a3* KO mice were measured using a combination of enzymatic treatment and anion-exchange HPLC. Amounts of the resultant disaccharides in each sample were calculated based on the peak area in each chromatogram. Data are shown as means ± standard deviation ; n = 7 (Ctrl) and 5 (*Slc35a3* KO) in CS/DS, HS, and HA measurements ; n = 6 (Ctrl) and 4 (*Slc35a3* KO) in KS measurement. *P* values were calculated using Student's *t*-test. N.S., not significant ; N.D., not detected.

© The Ito Foundation

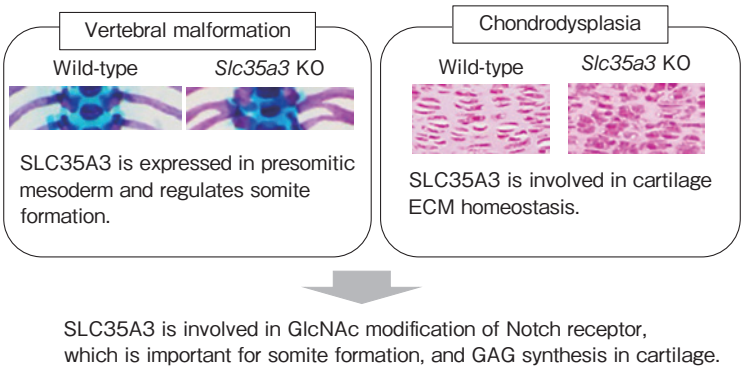


Fig. 5　Pathological mechanisms caused by SLC35A3 dysfunction

HSおよびKSは二糖繰り返し単位にGlcNAc残基をもつため，SLC35A3の機能欠損によってHSおよびKS合成酵素の基質として用いられるUDP-GlcNAcのゴルジ内腔への輸送が阻害され，その結果として，HSおよびKS含量の低下が引き起こされたと考えられる。一方，*Slc35a3* KOマウスではGlcNAcをもたないCS/DSの含量も有意に低下しており，これについてはUDP-GlcNAc輸送活性では説明できず，SLC35A3が他のNSTおよびGAG合成酵素の活性に影響を及ぼしている可能性が考えられる。SLC35A2とSLC35A3はゴルジ膜内で複合体を形成し，互いの機能を調節していると報告されている[7]。SLC35A2はUDP-GalNAcを輸送することから，SLC35A3の機能欠損はSLC35A2の輸送活性を低下させることで，CS/DS含量を低下させている可能性が考えられる。一方，SLC35A3はゴルジ膜内でmannoside acetylglucosaminyltransferasesという糖転移酵素と複合体を形成しており，その活性を調節していることも報告されている[8]。したがって，SLC35A3はCS/SD合成に関わっている糖転移酵素の活性調節に関わっているのかもしれない。

本研究によって，*Slc35a3* KOマウスの脊椎および四肢では，CS/SD，HS，そしてKSといったGAG含量が低下していることが示された。GAG含量の低下は軟骨細胞外マトリックスおよび軟骨細胞の機能異常をもたらし，重度の骨格形成不全の主な原因となっていることが強く示唆された。

4．要　　約

３年間の研究成果の要約を記載する[9]。（令和３年度）ゲノム編集システムを用いて，*Slc35a3* KOマウスを作製した。同マウスは重度の脊椎形成不全を呈し，出生後，数時間以内に死亡し，ウシCVMのモデル動物としての有用性が示された（**Fig. 1**）。（令和４年度）*Slc35a3* mRNAは胚発生の体節形成期に未分節中胚葉で発現していた。SLC35A3によって輸送されるUDP-GlcNAcはおそらくNotchシグナルを介して体節形成を調節しており，*Slc35a3* KOマウスにおける脊椎形成不全の主な原因は，Notchシグナルの伝達異常であることが示唆された。*Slc35a3* KOマウスの成長板では細胞外マトリックス領域が著明に減少しており，多くの扁平な軟骨細胞は変形していた（**Fig. 2**）。（令和５年度）*Slc35a3* KOマウスの脊椎および四肢では，CS/SD，HS，そしてKSといったGAG含量が低下していた（**Fig. 4**）。GAG含量の低下は軟骨細胞外マトリックスおよび軟骨細胞の機能異常をもたらし，重度の骨格形成不全の主な原因であることが強く示唆された。

本研究によって，SLC35A3の機能不全が引き起こすCVMの病態機序を，ある程度，解明する

© The Ito Foundation

ことができた（**Fig. 5**）。周生期致死性の疾患であるCVMの治療は現実的ではないかもしれないが，本研究から得られた知見は，ウシにおける骨格の発生と成長を制御するうえで重要であると考えている。糖ヌクレオチドは主に細胞内に存在しているが，細胞外では唯一，乳中に検出されており，ウシとヤギの初乳中にはSLC35A3によって輸送されるUDP-GlcNAcが検出されている。したがって，糖ヌクレオチドは家畜の育児用調整乳や家畜飼料素材への機能性添加物として利用できる可能性が指摘されており[10]，本研究の成果は家畜飼料学の方面にも貢献できるかもしれない。

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　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.

5） 古市達哉：令和４年　伊藤記念財団・食肉に関する助成研究調査結果報告書　VOL. 41, p91～97.

6） Mizumoto, S., Sugahara, K.：*Methods Mol Biol*, **836**, 99～115, 2012.

7） Maszczak-Seneczko, D., Sosicka, P., Majkowski, M., Olczak, T., Olczak, M.：*FEBS Lett*, **586**, 4082～4087, 2012.

8） Maszczak-Seneczko, D., Sosicka, P., Kaczmarek, B., Majkowski, M., Luzarowski, M., Olczak, T., Olczak, M.：*J Biol Chem*, **290**, 15475～15486, 2015.

9） Saito, S., Mizumoto, S., Yonekura, T., Yamashita, R., Nakano, K., Okubo, T., Yamada, S., Okamura, T., Furuichi, T.：*PLoS One*, **18**, e0284292, 2023.

10） 浦本匡：科学研究費助成事業　研究成果（16K 08003）.

© The Ito Foundation

ゲノム情報による褐毛和種の遺伝的多様性の評価と多様性を考慮した交配様式の開発

Estimation of genetic diversity with genome information and development of mating systems for maintenance of the diversity in Japanese Brown cattle

井　上　慶　一
（宮崎大学農学部）

Keiichi Inoue
（Faculty of Agriculture, University of Miyazaki）

In order to clarify the population structure to ensure genetic diversity in Japanese Brown cattle population, we conducted a genealogical classification using SNP information. SNP genotypes were identified in 496 Japanese Brown cows sampled from farmers in Kumamoto prefecture, the Kumamoto Prefectural Livestock Research Center and the National Livestock Breeding Center Kumamoto station (NLBC), as well as from farmers in Hokkaido and Nagasaki prefecture. The appropriate number of subpopulations was determined from the structure analysis using the SNP information, and each animal was assigned to the subpopulation with the largest percentage of genomic composition in each subpopulation. Animals with less than 30% of the genomic content of any of the subpopulations were considered as unclassified. Subsequently, principal component analysis was used to classify the characteristics of the subpopulations. The results of the structure analysis indicated that it would be appropriate to classify the subpopulations into 12 subpopulations. The results of structure analysis and principal component analysis revealed that animals in NLBC were genetically distinct from animals raised in general farmers. Projection of the subpopulations classified by structural analysis onto the results of principal component analysis scatterplot revealed that the specific lineages defined by Kumamoto prefecture showed a characteristic distribution.

1．目　　的

和牛はわが国固有の肉用牛品種であり，他の品種と比べても，肉質形質の一つである牛肉中の粗脂肪含量に特に優れている希少な品種である。しかしながら，その遺伝子供給資源が国内に限られるため，遺伝的な多様性の減少による近交係数の上昇などの問題が生じている。和牛品種の一つである褐毛和種は，和牛品種内で２番目に多い品種であるにもかかわらず，その頭数割合は和牛全体のわずか1.5％程度であり，その数は年々減少し，集団が小さくなることに伴う遺伝的多様性の減少が加速していると考えられる。その一方で，熊本県を中心とした九州地域で品種造成された熊本系

© The Ito Foundation

褐毛和種は，熊本県や長崎県で飼養されてきたが，東北・北海道地域にも流通し，特に北海道の池田町や道南および宮城県ではその後定着していることから，これらの地方における多様性が期待される。

家畜集団を健全に維持するため，血統情報を用いた集団の近交上昇の程度のモニタリングや，集団の有効な大きさなどの指標を用いた遺伝的多様性の評価は，国内外ともに実施されてきている。国内の和牛集団においては，Hondaら[1]が黒毛和種および褐毛和種について，Uemotoら[2]日本短角種について近交係数や集団の有効な大きさについて報告している。また，褐毛和種の近交係数および集団の有効な大きさについては，木場[3,4]により世代を超えて調査されており，近交係数の上昇が報告されている。

従来の血統情報を用いた系統分類では，父または母から受け継ぐ配偶子の違いによる効果である「メンデリアンサンプリング」の効果を推定することができないため，両親が同じ個体間（全きょうだい間）の遺伝的な違いを見分けることができない。一方，近年では家畜のゲノム解析が急速に進展し，ゲノム全体をほぼ等間隔に網羅する数万規模の一塩基多型（SNP）マーカーの利用が可能になってきており，各個体の遺伝子型を判定したSNP情報を用いることで，より正確な集団の近交度合いおよび分化の程度を知ることができる。黒毛和種においては，公益社団法人全国和牛登録協会が独自に開発した少数のSNP情報を用いて，ストラクチャー解析により黒毛和種集団の系統分類を実施しているが，３万カ所以上のSNP情報を用いて系統分類や遺伝的多様性の評価を行うという試みは，国内ではまだ行われていない。

本研究の目的は，SNP情報を利用して，熊本系褐毛和種においてこれまでの血統情報からは得られなかった，遺伝的多様性の現状および分化した系統の特徴を明らかにすることである。

２．方　　法

2.1　サンプル

サンプルを採取した個体は，熊本県，北海道および長崎県で飼養されている主に2019年以降生まれの熊本系褐毛和種繁殖雌牛496頭である。内訳は，熊本県内13地域の一般農家（377頭），熊本県農業研究センター畜産研究所（９頭），独立行政法人家畜改良センター熊本牧場（NLBC：35頭），北海道（37頭）および長崎県（38頭）の一般農家で飼養されている個体であり，登録審査時に一般社団法人あか牛登録協会が採材し，外部委託によりDNAを抽出した。

2.2　遺伝子型判定

SNP遺伝子型判定を行うチップは，GeneSeek GGP LD v4.0（30,105SNP）を用い，型判定後，個体自身のコールレートが0.95％未満の個体は除外した。判定されたSNPのうち，常染色体（29本）に位置づけられているSNPについて，SNP自身のコールレートが95％以上，マイナーアリル頻度が１％より大きく，ハーディ・ワインベルク平衡のカイ二乗検定によるp値が10^{-4}より大きい条件を満たすSNPを抽出した。これらのクオリティコントロール後の個体について，同繁殖雌牛496頭をリファレンス集団としてBeagle 4.0[5]でフェージングを行った。フェージング後の個体のSNPに対して，再度クオリティコントロール（SNP自身のコールレートが95％以上，マイナーアリル頻度が１％より大きく，ハーディ・ワインベルク平衡が10^{-4}より大きい条件を満たすSNPを抽出）を実施した。最終的に，これらの条件を満たした496頭（20,341 SNPs）のデータを以下の解析に用いた。

2.3　系統分類

SNP型判定を行った個体に対して，ソフトウェアADMIXTURE 1.3によりストラクチャー解析

© The Ito Foundation

で系統分類を行った。交差検証誤差により適当な系統（分集団）数を決定し，各個体を各分集団のゲノム構成割合が最大となる分集団に振り分けた。どの分集団のゲノム構成割合も30％に満たない個体は，未分類とした。ストラクチャー解析で得られた分集団間の遺伝的距離を用い，クラスター解析の群平均法により各グループの関係を系統樹で示した。また，ソフトウェアGCTA（Genome-wide Complex Trait analysis）により主成分分析を行い，各地域の農家，畜産研究所および熊本牧場の個体をそれぞれ分類した。

３．結果と考察

3.1　分集団数

交差検証誤差の利用による分集団数の決定では，誤差が最小になった分集団数を採用するが，今回の結果では，分集団数が20を超えても明確な最小値が得られなかった。遺伝的な背景が褐毛和種よりも多様と考えられる黒毛和種集団においても，分集団数を17としていることから（公益社団法人全国和牛登録協会），交差検証誤差の差が17以内で最少となった12を分集団数として採用した。

3.2　ストラクチャー解析結果

ストラクチャー解析で得られた12分集団（S1～S12）間の遺伝的距離を用いて，クラスター解析により得られた各分集団の関係を系統樹で示した（**Fig. 1**）。なお，系統樹の接続点（横軸）は，分集団間の遺伝的距離を示している。各分集団に分類された頭数とその割合，NLBC，北海道および長崎県の雌個体の内数と各分集団頭数に対するその割合，各分集団を代表する種雄牛名を**Table 1**に示した。

各分集団には11頭から171頭までが分類され，未分類とされた個体は，496頭中７頭であった。最も頭数が多かった分集団S8（171頭）は，「光晴重」が種雄牛の雌個体であり，現在最も一般的に供用されている種雄牛を中心とした集団となっていた。次いで，「重波泉」を種雄牛に多く持つS1（63頭），「弦球」のS9（54頭）となっていた。

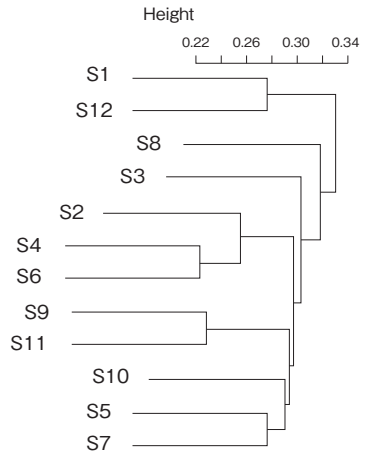


Fig. 1　Dendrogram of hierarchical clustering of the 12 subpopulations classified by the structure analysis. S1–S12 are correspond with the subpopulations shown in Table 1. Height means genetic distance between subpopulations.

NLBCの雌個体は，分集団規模が比較的小さい分集団S2（30.4％）とS10（38.5％）に多く分類された。一方，規模が最も多いS8を含む，分集団S1，S3，S5，S7およびS11では，NLBCの個体割合が5％未満と極端に少なく，また，NLBCの個体が多いグループS2と遺伝的にも離れている（**Fig. 1**）ことが明らかとなった。これらのことから，一般の農家で利用されている系統と，NLBCで繁養されている系統が遺伝的に異なる傾向にあり，NLBCの雌牛集団が遺伝的多様性の維持・拡大に効果が期待されることが示された。また，未分類に属する７頭中３頭（42.9％）がNLBC繁養個体であることから，NLBCにはさまざまな血統が混在した個体の割合も比較的高いことが示唆された。

北海道の雌個体は，S3（18.2％）を除いて，メジャーな分集団（S1やS8）に多く分類された。長崎県の雌個体も北海道と同様にS3（18.2％）に

© The Ito Foundation

Table 1　Number of animals and the included number (the rate) of animals in the National Livestock Breeding Center Kumamoto station (NLBC), Hokkaido and Nagasaki prefecture in each classified subpopulation

Subpopulation	Representative sire	Number of animals	NLBC	Hokkaido	Nagasaki
S1	Shigenamiizumi	63	2 (3.2%)	8 (12.7%)	0 (0.0%)
S2	Sigekawa6-4	23	7 (30.4%)	0 (0.0%)	1 (4.3%)
S3	Tsurumitsushige	11	0 (0.0%)	2 (18.2%)	2 (18.2%)
S4	Haruyamasakae	17	2 (11.8%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
S5	Takamitsusige	33	0 (0.0%)	3 (9.1%)	0 (0.0%)
S6	Haruyamato	33	2 (6.1%)	1 (3.0%)	4 (12.1%)
S7	Mitsushigekuma5	27	1 (3.7%)	1 (3.7%)	0 (0.0%)
S8	Mitsuharushige	171	5 (2.9%)	19 (11.1%)	13 (7.6%)
S9	Tsurutama	54	5 (9.3%)	3 (5.6%)	8 (14.8%)
S10	KikutsuruETI	13	5 (38.5%)	0 (0.0%)	2 (15.4%)
S11	Dai4Tsurumitsu	12	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (8.3%)
S12	Yukiizumi	32	3 (9.4%)	0 (0.0%)	7 (21.9%)
unclassified	–	7	3 (42.9%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
Total	–	496	35 (7.1%)	37 (7.5%)	38 (7.7%)

多く，メジャーな系統にも比較的多く分類されているが，S12（21.9%）にも多く分類されていた。系統樹（**Fig. 1**）を大きく２分すると，S1およびS12とS2～S11のグループに分かれる。分集団S1およびS12は，熊本県が遺伝的多様性維持のために定めた「特定系統」が多く含まれていることから，北海道や長崎県の雌個体も遺伝的な多様性の確保に寄与する可能性が示唆された。

3.3　主成分分析結果

ストラクチャー解析で分類された分集団を，第１－２主成分分析の結果に投影して表示した結果を**Fig. 2**に示し，分布の各頂点に相当する分集団であり，かつ規模の大きいS1，S8，S9およびS12を楕円で囲んだ。第１主成分（横軸）では，S8およびS9とS1およびS12に分類され，S1およびS12が遺伝的に特徴のある集団であることが主成分分析からも明らかとなった。第２主成分（縦軸）では，S9とそれ以外（S1，S8およびS12）に分類された。分集団S1およびS12には，熊本県が定める特定系統が含まれており，これらの分集団も含め，遺伝的に離れた分集団を維持することで遺伝的多様性の維持につながることが明らかとなった。

NLBC繁養個体を第１－２主成分分析の結果に投影した結果を**Fig. 3**に示した。なお，黒点がNLBC繁養個体，灰色点がそれ以外で飼養されている個体を示している。**Fig. 2**と比較すると，NLBC繁養個体は規模の大きい分集団（S1，S8，S9およびS12）とは異なる位置に分布しており，主成分分析でも一般農家とNLBCの対比が明らかとなった。なお，各地域の農家の個体を地域ごとに分類して主成分分析の結果に投影したが，地域間での特徴は認められなかった（図略）。

3.4　まとめ

Honda ら[6]は，黒毛和種集団において，５系統の分集団を維持し，各系統から順番に種雄牛を利用するとともに，種雄牛を定期的に系統間で交換することで一定程度，近交係数の上昇を抑制し，遺伝的多様性を維持することが可能であることを報告している。

本解析結果より，熊本系褐毛和種集団には遺伝的に異なる分集団が存在しており，特に熊本県が

© The Ito Foundation

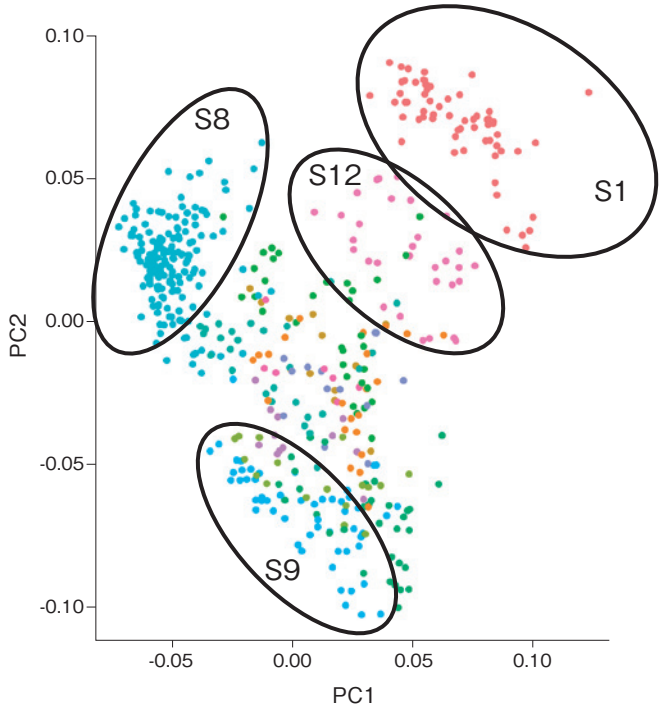


Fig. 2　Projection of the subpopulations classified by structural analysis onto the results of principal component analysis scatterplot. PC1 and PC2 is the first and second principal component, respectively. S1, S8, S9 and S12 are correspond with the subpopulations shown in Table 1 and Fig. 1.

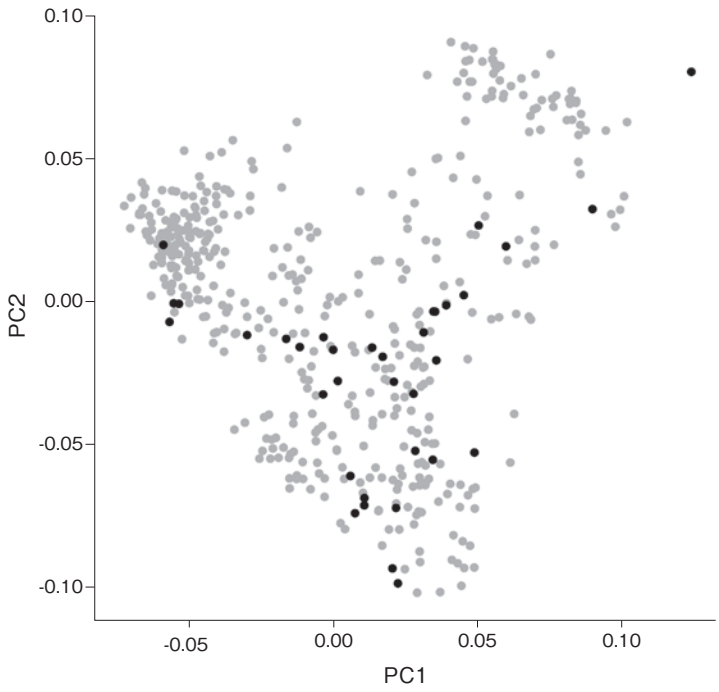


Fig. 3　Projection of the animals in NLBC onto the results of principal component analysis scatterplot. PC1 and PC2 is the first and second principal component, respectively. Black dots represent the animals in NLBC and gray dots represent those in the other farms.

© The Ito Foundation

定める特定系統やNLBC繁養雌牛に特徴のある分集団が維持されていることから，これらを維持し，各分集団から輪番で種雄牛を造成して供用することにより，遺伝的多様性を確保することが可能であると考えられた。熊本県以外の地域である北海道や長崎県の雌個体でも，特定系統に分類される個体が存在し，ある程度の遺伝的な多様性の確保に寄与する可能性が示唆されたが，それ以上の遺伝的な特徴は認められなかった。

今回の解析に用いたストラクチャー解析および主成分分析ともに，対象集団により得られる結果が異なるという性質を持つ。今回の解析では，登録審査時にサンプリングされた若い個体がほとんどであったため，今後，データが追加された場合，分類される系統の様相が変化する可能性は大きい。より正確な褐毛和種集団の特徴を捉えるためにも，さらに広範囲に多数のサンプルを確保しながら追加検討が必要である。

4．要　約

熊本系褐毛和種集団の遺伝的多様性確保に向けて集団構造を明らかにするため，SNP情報を用いた系統分類を行った。熊本県内の農家，熊本県農業研究センター畜産研究所，独立行政法人家畜改良センター熊本牧場（NLBC）の他，北海道と長崎県で飼養されている褐毛和種繁殖雌牛からサンプリングし，496頭のSNP遺伝子型を特定した。これらのSNP情報を用いたストラクチャー解析から適当な分集団数を決定し，各個体を各分集団のゲノム構成割合が最大となる分集団に振り分けた。どの分集団のゲノム構成割合も30％に満たない個体は，未分類とした。その後，主成分分析により分集団の特徴を分類した。ストラクチャー解析の結果，12の分集団に分類するのが適当であると思われ，一般農家とNLBCに特徴的な系統が分類された。主成分分析の結果，NLBC繁養雌牛が，一般農家の雌牛と遺伝的に異なる特徴を持つことが明らかとなったが，一般農家の地域間での違いは見られなかった。ストラクチャー解析で分類された分集団を，主成分分析の結果に投影したところ，熊本県が遺伝的多様性維持のために定めた特定系統が特徴的な分布を示すことが明らかとなった。これらのことから，特定系統やNLBC繁養雌牛の分集団を維持し，各分集団から輪番で種雄牛を造成して供用することにより，遺伝的多様性を確保することが可能であると考えられた。

文　献

1） Honda, T., Nomura, T., Yamaguchi, Y., Mukai, F.：Monitoring of genetic diversity in the Japanese Black population by the use of pedigree information, *Journal of Animal Breeding and Genetics*, **121**, 242～252, 2004.

2） Uemoto, Y., Suzuki, K., Yasuda, J., Roh, S., Satoh, M.：Evaluation of inbreeding and genetic diversity in Japanese Shorthorn cattle by pedigree analysis, *Animal Science Journal*, 92(1), e13643, 2021.

3） 木場俊太郎：褐毛和種の集団における近親交配に関する研究，日本畜産学会報, 42(6), 257～262, 1971.

4） 木場俊太郎：熊本県産褐毛和種集団の繁殖構造，日本畜産学会報, 62(9), 878～883, 1991.

5） Browning, S. R., Browning, B. L.：Rapid and Accurate Haplotype Phasing and Missing-Data Inference for Whole-Genome Association Studies By Use of Localized Haplotype Clustering, *American Journal of Human Genetics*, **81**, 1084～97, 2007.

6） Honda, T., Nomura, T., Mukai, F.：Conservation of genetic diversity in the Japanese Black cattle population by the construction of partially isolated lines, *Journal of Animal Breeding and Genetics*, **122**, 188～194, 2005.

© 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（Ⅱ）

The study of polymorphism in the chicken CCKAR and HSP70 gene associated with thermotolerance（Ⅱ）

福原　絵里子・森　　美幸・平川　達也・村上　徹哉
（福岡県農林業総合試験場）

Eriko Fukuhara, Miyuki Mori, Tatsuya Hirakawa and Tetsuya Murakami
（Fukuoka Agriculture and Forestry Research Cente）

The relationship between a single nucleotide polymorphism（SNP ; AB604331, g.420 C>A）in the cholecystokinin type A receptor gene（CCKAR）and two production traits, growth rate and weight gain, during hot weather was investigated in Barred Plymouth rock, Shamo, Hakata Jidori and Hakata Ichibandori from Fukuoka prefecture.

No effect of the genetic polymorphism was observed in these traits examined.

By genomic resequencing the heat shock protein 70（HSP70）gene, which is expected to be associated with heat stress in Barred Plymouth Rock, Shamo, Hakata Jidori and Hakata Ichibandori, 16, 3, 13 and 11 SNPs were found, respectively.

Additionally, as a result of investigating the relationship between polymorphisms in the HSP70 gene and body weight, it was suggested that there is a relationship between polymorphisms and body weight in Barred Plymouth Rock, Hakata Jidori and Hakata Ichibandori.

1．目　　的

夏季の暑熱ストレスは家畜・家きんの生産性低下を引き起こし，畜産農家にとって大きな損失となっている。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」を生産しているが，これらの肉用鶏でも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。

近年，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って異なり[4~7]，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

© The Ito Foundation

るが[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。

著者は，CCKARの遺伝子型の違いが「はかた地どり」および「はかた一番どり」の暑熱期の増体性に影響を及ぼさないこと，また，HSP70遺伝子の１～1000 bpをターゲットとして解析した結果，「はかた地どり」，「はかた一番どり」とその原種鶏である横斑プリマスロック（以下BP）およびシャモにおいて，鶏種ごとに複数の多型が存在することを明らかにした[8]。

そこで本研究では，「はかた地どり」および「はかた一番どり」に加えて，これらの原種鶏であるBPおよびシャモにおける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。また，これらの４鶏種において，HSP70遺伝子の全領域を対象にDNAシーケンスによる解析を実施し，多型について調査するとともに，暑熱期の発育性との関連性について検討した。

２．方　法

2.1　BP，シャモ，「はかた地どり」および「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

BP，シャモ，「はかた地どり」および「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，BP雄64羽，シャモ雄69羽，「はかた地どり」雄49羽，「はかた一番どり」雄54羽の計236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BPおよびシャモでは令和５年６月21日～９月13日の84日間，「はかた地どり」では令和５年６月14日～９月６日の84日間，「はかた一番どり」は令和５年６月13日～８月15日の63日間とした。平飼鶏舎に鶏種別に飼養し，飼料は以下の市販飼料を給与した。BPおよびシャモは，幼すう育成用飼料（CP21％，ME2,950 kcal）を３週齢まで，中すう育成用飼料（CP17％，ME2,850 kcal）を10週齢まで，大すう育成用飼料（CP14.5％，ME2,750 kcal）を12週齢まで給与した。「はかた地どり」は，前期飼料（CP22.5％，ME3,130 kcal）を３週齢まで，後期飼料（CP18％，ME3,170 kcal）を８週齢まで，仕上げ用飼料（CP18％，ME3,100 kcal）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％，ME3,130 kcal）を３週齢まで，仕上げ用飼料（CP17％，ME3,150 kcal）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，育成率，生体重とした。また，鶏舎内で30℃を超えた１日において，遺伝子型ごとに６羽（６羽に満たない場合は全羽数）の直腸温および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１元配置の分散分析を行った。

2.2　BP，シャモ，「はかた地どり」および「はかた一番どり」におけるHSP70遺伝子多型の探索と増体との関連性の解明

BP，シャモ，「はかた地どり」および「はかた一番どり」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BP，シャモ，「はかた地どり」および「はかた一番どり」の雄それぞれ56羽，67羽，43羽，45羽，計211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DNAシーケンス（株式会社ファスマック）により配列情報を取得し，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。また，それぞれの遺伝子多型の違いによる増体を調査した。

統計解析については，１元配置の分散分析を

© The Ito Foundation

Table 1　The DNA sequence of primer（forward and reverse）of HSP70 gene

Primer	Sequence（5'-3'）	Product length	position
1	F: GGAGAGGGTTGGGCTAGAGA	749	90-839
	R: AAGCGGGCACTGTGATAACA		
2	F: GCAATGAACCCCACCAACAC	829	572-1401
	R: ATCTCCTGGATCTGGCCCTT		
3	F: CTCTGAGCTCTTCCACGCAA	998	1218-2216
	R: TCGGGTTGCAGAGTTTCTCC		
4	F: AGATCAGTGACCAGGACAAGC	584	2082-2666
	R: ACCAAAATTTCCAGAAGCTGCA		

Table 2　The effect of CCKAR genotype on Barred plymouth rock, Shamo, Hakata-jidori, and Hakata-ichibandori

	SNP	n	Growth rate (%)	Body weight (g)	Rectal temperature (℃)	Panting frequency (time/minite)
Barred-plymouth rock	A/A	13	100	2803	42.8	94
	A/C	50	100	2884	43.1	112
	C/C	1	100	2900	42.2	143
Shamo	A/A	5	100	2062	42.5	128
	A/C	51	98	2178	42.2	110
	C/C	13	100	2101	42.2	122
Hakata-jidori	A/A	17	100	4522	42.9	108
	A/C	32	100	4414	42.6	120
	C/C	0	-	-	-	-
Hataka-ichibandori	A/A	30	93.3	3259	43.1	139
	A/C	22	81.8	3236	43.4	118
	C/C	2	50.0	3170	43.3	141

行った。

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　BP，シャモ，「はかた地どり」および「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

BPにおけるCCKARの遺伝子型は，A/A型が13羽，A/C型が50羽，C/C型が１羽，シャモではA/A型が５羽，A/C型が51羽，C/C型が13羽であった。「はかた地どり」においては，A/A型が17羽，A/C型が32羽，C/C型が０羽，「はかた一番どり」ではA/A型が30羽，A/C型が22羽，C/C型が２羽であった。

CCKARの遺伝子型の違いによるBP，シャモ，「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。育成率，体重，直腸温度およびパンティング数で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BP，シャモ，「はかた地どり」および「はかた一番どり」において，増体はCCKAR遺伝子多型の違いによる効果が認められなかった。「はかた地どり」と「はかた一番どり」では昨年度の試験でも効果が認められていない[8)]。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[9)]。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べて，肉用讃岐

© The Ito Foundation

Table 3 Genotype of HSP70-SNPs

SNPs		Genotype frequency'(%)											
		Barred plymouth rock			Shamo			Hakata-jidori			Hakata-ichibandori		
298	G/T	GG	GT	TT		−			−			−	
		84.0	14.0	2.0									
323	A/G		−			−		AA	AG	GG		−	
								53.5	46.5	0			
357	G/T	GG	GT	TT	GG	GT	TT	GG	GT	TT	GG	GT	TT
		16.1	80.4	3.6	21.5	75.4	3.1	81.4	18.6	0	14.0	86.0	0
358	C/A	CC	CA	AA	CC	CA	AA		−		CC	CA	AA
		58.9	37.5	3.6	72.3	27.7	0				62.8	37.2	0
448	G/A	GG	GA	AA		−		GG	GA	AA	GG	GA	AA
		82.1	16.1	1.8				90.7	9.3	0	86.0	14.0	0
649	A/G	AA	AG	GG		−		AA	AG	GG	AA	AG	GG
		17.9	46.4	35.7				18.6	55.8	25.6	20.9	32.6	46.5
667	C/G	CC	CG	GG		−		CC	CG	GG	CC	CG	GG
		23.2	50.0	26.8				72.1	25.6	2.3	65.1	30.2	4.7
682	C/T	CC	CT	TT		−		CC	CT	TT	CC	CT	TT
		82.1	16.1	1.8				90.7	9.3	0	86.0	14.0	0
946	C/T	CC	CT	TT		−		CC	CT	TT	CC	CT	TT
		76.9	21.2	1.9				90.7	9.3	0	90.7	9.3	0
1300	C/A	CC	CA	AA		−		CC	CA	AA	CC	CA	AA
		57.1	33.9	8.9				37.2	60.5	2.3	37.2	39.5	25.6
1435	G/A	GG	GA	AA		−		GG	GA	AA	GG	GA	AA
		33.9	48.2	17.9				78.6	19.0	2.4	56.8	40.9	2.3
1828	C/T	CC	CT	TT		−		CC	CT	TT	CC	CT	TT
		75.0	23.2	1.8				90.7	9.3	0	90.9	9.1	0
1867	T/C	TT	TC	CC		−		TT	TC	CC	TT	TC	CC
		14.3	50.0	35.7				55.8	44.2	0	68.2	31.8	0
1891	G/A		−			−		GG	GA	AA		−	
								53.5	46.5	0			
2509	G/A	GG	GA	AA	GG	GA	AA	GG	GA	AA		−	
		83.7	16.3	0	76.9	23.1	0	92.3	7.7	0			
2606	A/T	AA	AT	TT		−			−			−	
		20.9	0	79.1									
2607	G/T	GG	GT	TT		−			−			−	
		79.1	0	20.9									
2609	A/G	AA	AG	GG		−			−			−	
		79	0	21									

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いる。本試験で供試したBP，シャモ，「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週齢と短く，CCKARの増体効果が認められなかった可能性がある。

3.2 BP，シャモ，「はかた地どり」および「はかた一番どり」におけるHSP70遺伝子多型の探索および体重との関連

BP，シャモ，「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。

結果は**Table 3**のとおり，シャモではg.357（G/T），g.358（C/A），g.2509（G/A）の計４カ所，BPでは，g.298（G/T），g.357（G/T），g.358（C/A），g.448（G/A），g.649（A/G），g.667（C/G），g.682（C/T），g.946（C/T），g.1300（C/A），g.1435（G/A），g.1828（C/T），g.1867（T/C），g.2509（G/A），g.2606（A/T），g.2607（G/T），g.2609（A/G）の計16カ所に多型が検出された。「はかた地どり」ではg.323（A/G），g.357（G/T），g.448（G/A），g.649（A/G），g.667（C/G），g.682（C/T），

© The Ito Foundation

Table 4　The effect of HSP 70 genotype on Barred Plymouth Rock, Hakata-jidori and Hakata-ichibandori

	SNPs		n	Body weight (g)	
Barred Plymouth Rock	1300	C/C	32	992 ± 100	
		C/A	19	997 ± 91	p < 0.1（42day）
		A/A	5	1102 ± 82	
	1867	T/T	8	1111 ± 67	
		T/C	28	994 ± 77	p < 0.05（42day）
		C/C	20	975 ± 112	
Hakata-jidori	1867	T/T	24	1803 ± 166	p < 0.1（42day）
		T/C	19	1892 ± 122	
	2509	G/G	36	4464 ± 307	p < 0.05（84day）
		G/A	3	4833 ± 180	
Hakata-ichibandori	357	G/G	6	2002 ± 278	p < 0.1（42day）
		G/T	37	2193 ± 206	
	946	C/C	39	2611 ± 247	p < 0.05（49day）
		C/T	4	2295 ± 236	
	1828	C/C	40	2608 ± 247	p < 0.05（49day）
		C/T	4	2295 ± 236	

g.946（C/T），g.1300（C/A），g.1435（G/A），g.1828（C/T），g.1867（T/C），g.1891（G/A），g.2509（G/A）の計13カ所，「はかた一番どり」ではg.357（G/T），g.358（C/A），g.448（G/A），g.649（A/G），g.667（C/G），g.682（C/T），g.946（C/T），g.1300（C/A），g.1435（G/A），g.1828（C/T），g.1867（T/C）の計11カ所に多型が検出された。

また，多型と体重との関連を**Table 4** に示した。**Table 3** で示した多型のうち，遺伝子の違いで体重に違いがあった多型は，シャモでは０カ所，BPではg.1300（C/A），g.1867（T/C）の２カ所，「はかた地どり」ではg.1867（T/C），g.2509（G/A）の２カ所，「はかた一番どり」ではg.357（G/T），g.946（C/T），g.1828（C/T）の３カ所確認された。Liangらは，台湾在来鶏においてg.258（A/G）における多型で０～16週齢までの増体が異なることを報告している[7]。BP，「はかた地どり」および「はかた一番どり」においても，HSP70遺伝子の一部の多型が暑熱時の増体に影響を及ぼす可能性が示唆された。一方で，BPにおけるg.1867（T/C）では，T/TがT/CやC/Cに比べて増体が優れていたのに対し，「はかた一番どり」ではT/TがT/Cに比べて増体が低くなっていることから，HSP70遺伝子を指標として育種に活用するためには，さらに例数を重ねて検討する必要があると考えられる。

４．要　　約

横斑プリマスロック，シャモ，「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，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。育成率，体重では遺伝子多型による影響は認められなかった。また，横斑プリマスロック，シャモ，「はかた地どり」および「はかた一番どり」において，熱ショックタンパク質遺伝子（HSP70）の一塩基多型の存在箇所を調査し，シャモでは３カ所，横斑プリマスロックでは16カ所，「はかた地どり」では13カ所，「はかた一番どり」では11カ所に多型が存在することを明らかにした。また，HSP70遺伝子の多型と増体性との関連について調査した結果，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」において増体性との関連が示唆される多型が認められた。

© The Ito Foundation

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. M.：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） Liang, H. M., Lin, D. Y., Hsuuw, Y. D., Huang, T. P., Chang, H. L., Lin, C. Y., Wu, H. H., Hung, K. H.：Association of heat shock protein 70 gene polymorphisms with acute thermal tolerance, growth, and egg production traits of native chickens in Taiwan, *Archives Animal Breeding*, **59**, 173～181, 2016.

8） 福原絵里子，平川達也，森美幸：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，令和4年度食肉に関する助成研究調査成果報告書，**41**，127～131，2023

9） 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

哺乳期の栄養環境が繁殖機能に与える影響（Ⅱ）

Effects of nutritional environment during nursing period on reproductive function（II）

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. Fertility requires follicular development and oocyte maturation, and *in vivo* and *in vitro* studies have reported that changes in nutritional levels affect follicular development. Furthermore, metabolites and endocrine hormones are involved in follicular development, and it is known that the nutritional environment during preweaning has long-term effects on nutrient the metabolism in calves. However, the effects of nutritional management during the preweaning period on reproductive performance are unknown. In this study, we investigated whether octanoate, which stimulates ghrelin secretion, can promote follicular growth and improve reproductive performance by controlling metabolic and physiological functions of calves fed octanoate during the preweaning period. Twelve Japanese Black calves were offered milk replacer（MR）without（CON, n = 6）or with Ca-octanoate supplementation from 4 to 90 d of age（OCT, n = 6）. Body weights were measured monthly and blood samples were collected at 90 and 300 d of age. Follicular was monitored by transrectal ultrasonography at 10 months of age. Compared to the CON group, concentrations of acylated ghrelin increased in plasma before and after feeding MR in the OCT group. Additionally, feeding Ca-octanoate increased concentrations of growth hormone（GH）and glucose in plasma after feeding MR at 90 d. However, body weight, concentrations of hormones and metabolites in plasma at 300 d, follicular diameter, and reproductive performance were not affected by treatment groups. We concluded that feeding octanoate during the preweaning period increased concentrations of acylated ghrelin, GH, and glucose in plasma, but the effect was not observed beyond 300 d of age and did not impact follicle development or reproductive performance.

1．目　　的

黒毛和種牛は，受胎率が年々低下している。受胎には卵胞発育や卵子成熟が必要である。*in vivo* や*in vitro*の研究によって，栄養水準の変化が代謝生理機能を制御し，卵胞発育に影響を及ぼすことが報告されている[1)]。

糖代謝因子であるグルコースは卵胞発育に必要なエネルギー源であり，脂質代謝産物であるコレステロールは卵胞発育に必須の栄養素であり，卵

© The Ito Foundation

胞で産生されるエストラジオール（E_2）の基質である。さらに，血中の内分泌ホルモンである成長ホルモン（GH）・インスリン用成長因子-1（IGF-1）・インスリンは糖代謝・脂質代謝を制御する。また，IGF-1やインスリンは，卵胞に作用し直接卵胞発育を促すことが報告されている[2)]。糖代謝や脂質代謝ならびに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している。オクタン酸はグレリンの作用活性に必須であり[3)]，オクタン酸給与によって活性型グレリン濃度は増加する[3, 4)]。

さらに，哺乳期の栄養環境はその後の発育や生産性に長期的な影響を及ぼすことから，哺乳期の代謝生理機能には持続性があると考えられる。したがって，哺乳期におけるオクタン酸給与は，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し，繁殖成績を改善させることが可能であると考えられるが詳細は明らかとなっていない。そこで本研究では，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12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＝6，生時体重＝33.8 ± 1.5 kg）とオクタン酸区（n＝6，生時体重＝33.0 ± 0.9 kg）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，１日最大7 lを給与し90日齢まで給与した。代用乳濃度は200 g/lであった。オクタン酸区には，代用乳100 g当たり1.5 gのオクタン酸カルシウム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１日最大4 kg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4，30，60，90，120，150，180，210，240，300日齢に実施した。０日齢では，体重測定のみ行った。

採血は90日齢および300日齢において経時的採血を行った。採血の前日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５分おきに採血を行い，０分の採血が終わった直後（12：00）に，90日齢では代用乳を400 g（2 l）給与し，300日齢では市販の濃厚飼料を２kg給与した。飼料給与後２時間は，５分おきに10 mlずつ採血を行った。採取した血液は，100 IUのヘパリンナトリウムおよび1,000 KIU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，2,330×g，４℃，20分の条件下で遠心分離し，血漿サンプルは1.5 mlチューブに１mlずつ分注し，解析まで－80℃で凍結保存した。グレリンおよび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15 mlチューブに血漿を１ml加え，ボルテックスで混合後，抽出まで－80℃で保存した。

2.3　繁殖管理・超音波診断

子牛は，９～10か月齢において毎日粘液採取を行い，発情周期を確認した。血漿E_2濃度を測定

© The Ito Foundation

するために，採血は排卵日（０ｄ）を起点として−6，−4，−2，０，２日後の朝の採食前（9：00）に行った。卵胞の超音波診断は，排卵日を基準に，−4，−1，＋2日後にEsaote社のMyLab Tringa VETを用いて行った。

2.4　血漿成分解析

血漿グレリン・IGF-1は解析前に抽出を行った。解凍した血漿は１ml当たりアセトンを４ml添加し2,330×g，４℃，20分の条件下で遠心分離後，採取した上清を窒素ガスおよび遠心エバポレーターで乾燥させた。その後は，アプロチニン入りの（１ml当たり10 KIU）のアッセイバッファー（50 mM Tris–HCl，140 mM NaCl，0.5% BSA，0.05％ γ-globulins，0.00078％ DTPA，0.05％ sodium azide，and 0.01％ Tween 40，pH 7.9）を１ ml加え，２M Tris-HCl pH 8.5でpH調整を行った後，2,330×g，４℃，20分の条件下で遠心分離し，上清をデカントで1.5 mlチューブに移し，解析まで−80℃で保存した。

血漿グレリン・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法）を用いて解析した。血漿T-cho，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，ムタローゼ・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。

血漿E_2濃度は，Arbor Assays社のSerum 17β-Estradiol ELISA Kitsを用いて解析を行った。

2.5　統計解析

血漿ホルモン・代謝産物濃度は，JMP®14 Pro（SAS Institute Inc）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，$Calf(Treatment)_{k(i)}$は処理区で枝分かれさせた個体の変量効果，$Treatment \times Time_{ij}$は処理と時間の交互作用，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。$p < 0.05$を有意差あり，$0.05 \leq p < 0.1$を傾向ありとした。

3．結果と考察

3.1　体重および体格

子牛の体重および体格は，処理区間で差は認められなかった。オクタン酸は中鎖脂肪酸の一つであり，小腸で速やかに吸収されたのちに肝臓で分解される。中鎖脂肪酸は，分解されてエネルギーとして利用されやすく，筋肉や脂肪に蓄積されにくい脂肪酸である。本研究で体重および体格に両区で差が見られなかったことは，摂取したオクタン酸が筋肉や脂肪に蓄積されなかったためであると考えられる。

3.2　90日齢の血漿成分に及ぼす影響

90日齢では，血漿インスリン・NEFA・T-cho濃度は処理区間で差は見られなかった。一方で，血漿グレリン濃度は，オクタン酸区において対照区と比較して代用乳摂取前・摂取後ともに高く推移した（Treatment p＝0.04）。さらに，オクタン酸区の血漿GH濃度は，代用乳摂取後70分～110分まで対照区と比較し高く推移した（Treatment×Time p＝0.02）。グレリンの活性化に必要なオクタン酸給与は，血漿グレリン濃度を増加させる[4)]。

© The Ito Foundation

また，ヒツジにおいてグレリンは採食前ではGH分泌を促さないが，採食後においてGH分泌を促すことが明らかとなっている[5]。したがって，オクタン酸区で見られた血漿GH濃度の増加は，オクタン酸給与によって血漿グレリン濃度が増加したことに起因すると考えられる。

血漿IGF-1濃度は処理と時間の交互作用が見られた（Treatment × Time $p < 0.01$）。IGF-1濃度は対照区では増加しなかったが，オクタン酸区内では0分と比較し採食後120分で有意な増加が見られた。IGF-1はGHによって合成・分泌が促されることから，オクタン酸区で血漿GH濃度が増加したことが血漿IGF-1濃度の増加に寄与したと考えられる。

また，オクタン酸区の血漿グルコース濃度は代用乳摂取110，120分後において，対照区と比較し高く推移した（Treatment × Time $p < 0.01$）。グレリンやGHはインスリン感受性を低下させることで，血糖値を高める[6,7]。また，GHやオクタン酸は，肝臓における糖新生を促す[8,9]。したがって，本研究で血漿グルコース濃度が増加した要因は，オクタン酸給与によってグレリンやGH濃度が増加したためであると考えられる。

3.3　300日齢の血漿成分に及ぼす影響

300日齢では，血漿GH・IGF-1・インスリン・グルコース・NEFA・T-cho濃度は処理区間で差が見られなかった。これは90日齢でオクタン酸給与を止めたことが要因であると考えられる。また，オクタン酸給与によるGHやグルコースの増加は300日齢まで持続しないことが明らかとなった。

3.4　繁殖成績

10か月齢における排卵前日の卵胞サイズは，処理区間で差が見られなかった（対照区，1.20 ± 0.05cm；オクタン酸区，1.17 ± 0.05cm；$p = 0.84$）。また，初回種付月齢は，対照区では11.7 ± 0.2か月齢，オクタン酸区では11.4 ± 0.2か月齢であり，初回種付の成功率は，両区ともに67%（4頭/6頭）であった。妊娠月齢および妊娠に必要な種付回数も同様に，処理区間で有意な差は認められなかった（妊娠月齢，対照区，12.3 ± 0.5か月齢；オクタン酸区，12.2 ± 0.5か月齢；妊娠に必要な種付回数，対照区1.7 ± 0.4回；オクタン酸区1.8 ± 0.4回）。これは300日齢において血中成分に処理区間で差が見られなかったためであると考えられた。以上の結果から，哺乳期におけるオクタン酸給与は，90日齢ではグレリンおよびGH分泌を促すことで血漿グルコース濃度を増加させることが示された。しかしながら，その効果は300日齢まで持続せず卵胞発育や繁殖成績に影響を及ぼさないことが示された。

4．要　約

黒毛和種牛における受胎率は年々低下している。受胎には卵胞発育や卵子成熟が必要である。*in vivo*や*in vitro*の研究によって，栄養水準の変化が卵胞発育に影響を及ぼすことが報告されている。さらに，卵胞発育には代謝産物や内分泌ホルモンが関与しており，哺乳期の栄養環境が子牛の栄養素代謝に長期的に影響を及ぼすことが知られている。しかしながら，哺乳期の栄養管理が繁殖成績に及ぼす影響は不明である。そこで本研究では，グレリン分泌を促すオクタン酸を哺乳期に給与し，子牛の代謝生理機能を制御することで，卵胞発育を促し繁殖成績を改善することが可能であるか検討した。哺乳期におけるオクタン酸給与は，90日齢ではグレリンおよびGH分泌を促すことで血漿グルコース濃度を増加させることが示された。しかしながら，その効果は300日齢まで持続せず卵胞発育や繁殖成績に影響を及ぼさないことが示された。

© The Ito Foundation

文　献

1） 菅原七郎：畜産の研究, **64**, 293～298, 2010.
2） Butler, W. R.：*Livestock Production Science*, **83**, 211～218, 2003.
3） Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazono, M., Matsuo, H., Kangawa, K.：*Nature*, **402**, 656～660, 1999.
4） Ashitani, J., Matsumoto, N., Nakazato, M.：*Nutrition Journal*, **25**, 8, 2009.
5） Takahashi, H., Kurose, Y., Suzuki, Y., Kojima, M., Yamaguchi, T., Yoshida, Y., Ogino, M., Hodate, K., Azuma, Y., Sugino, T., Kojima, M., Kangawa, K., Hasegawa, Y., Kobayashi, S.：*Domestic Animal Endocrinology*, **37**, 55～60, 2009.
6） Vestergaard, E., Jessen, N., Møller, N. Jørgensen, J.：*Scientific Reports*, **7**, 42706, 2017.
7） Bellver, S. P., Beermann, D. H., Bell, A. W., Van Tassell, C. P., Hogue, D. E., McLaughlin, C. L.：*Domestic Animal Endocrinology*, **12**, 143～156, 1995.
8） Etherton, T. D., Bauman D. E.：*Physiological Reviews*, **78**, 745～761, 1998.
9） González-Manchón, C., Asuyo, M. S., Parrilla, R.：*Archives of Biochemistry and Biophysics*, **271**, 1～9, 1989.

© 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？（Ⅲ）

Is bovine corpus luteum blood flow involved in the local regulation of endometrial functions？（Ⅲ）

金澤　朋美[1]・木崎　景一郎[1]・三浦　亮太朗[2]

（[1]岩手大学農学部共同獣医学科，[2]日本獣医生命科学大学獣医学部獣医学科）

Tomomi Kanazawa[1], Keiichiro Kizaki[1] and Ryotaro Miura[2]

（[1]Cooperative Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, Iwate University,
[2]School of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Science, Nippon Veterinary and Life Science 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 investigate the effects of luteal vascularity on the biochemical composition of the uterine lumen fluid (ULF) by metabolome analysis. Ultrasound examinations were performed on 6 Japanese Black cattle to evaluated maximum diameter of corpus luteum (CL), CL area, CL tissue area, and blood flow area (BFA) on Day 7 (Day 0 = the day of estrus). After ultrasound examination, ULF and blood samples were collected from these cattle. No differences in CL area, CL tissue area, and plasma P_4 concentrations were observed between high (HV；n = 3) and low vascularity (LV；n = 3) groups. BFA was greater in HV group than in LV group. In the metabolome analysis, a total of 110 metabolites were identified, of which palmitoylethanolamide (PEA) was lower and nicotinamide riboside (NR) was higher in HV group than those of LV group. The principal component analysis (PCA) confirmed the differences in the uterine metabolome of two groups. Collectively, these results indicate that high vascularity of the CL influence the biochemical composition of ULF on Day 7 without increased plasma 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

© The Ito Foundation

梢血中P_4濃度の推移に差がなく[1]，黄体血流の多寡が受胎性に影響を及ぼすメカニズムは解明されていない。

令和３年度および４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黄体同側の子宮角内膜組織において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。さらに，黄体血流の多い牛群では少ない牛群に比較して，子宮内膜の血管新生作用[2]，胚の子宮内膜への接着[3]や胎盤形成[2]などへの関与が報告されているCCN3遺伝子発現が高いことも明らかとなった。このことから，黄体血流の多寡により黄体同側の子宮角内膜組織における遺伝子発現が変動し，受胎性に影響を及ぼす可能性が推察された。また，着床前の胚の発育は子宮内分泌物に含まれるタンパク質，糖質，脂質およびその代謝産物に依存しており，子宮灌流液中の代謝産物の組成が受胎性に影響を与えることが報告されている[4]。したがって，黄体血流の多い牛と少ない牛では子宮灌流液中の代謝産物の組成に差異がある可能性がある。しかし，これまで黄体血流量と子宮灌流液中の代謝産物の組成との関連性を検討した報告はない。

そこで本研究では，黄体血流の多寡が子宮灌流液中の代謝産物の組成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18頭（年齢：4.9 ± 1.4歳，分娩後日数：85.7 ± 58.3日，産歴：3.3 ± 1.2産，平均±SD）を供試した。発情日をDay 0（排卵日：Day 1）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灌流液および血液を採取した。本研究における動物実験は，岩手大学動物実験委員会の承認を受け実施した（承認番号：A202215）。

2.2　超音波検査による黄体血流量の測定と供試牛の分類

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の三分位数に基づき供試牛を血流の多い群（HV），中間群および少ない群（LV）に分類し，HV群とLV群の各３頭のサンプルについてメタボローム解析を行った。

2.3　子宮灌流液および血液の採取

子宮灌流液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。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），東京）により尾椎硬膜外麻酔を行い，滅菌済みバルーンカテーテル（富士平工業（株），東京）を黄体側子宮角先端に設置した。Hank's平衡塩溶液（HBSS（-）without Phenol Red，富士フイルム和光純薬（株），大阪）50 mlを子宮に注入後子宮マッサージを行い，シリンジで吸引し子宮灌流液を採取した。子宮灌流液は遠心分離後，上清を採取し解析まで－80℃で保存した。

2.4　P_4濃度の測定

血漿P_4濃度を酵素免疫測定法により測定した。

© The Ito Foundation

2.5　子宮灌流液のメタボローム解析

メタボローム解析は，ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社（HMT，山形）に委託し，CE-TOFMSによりイオン性代謝物質，LC-TOFMSにより脂溶性代謝物質を測定した。検出された物質はHMT代謝物質ライブラリに登録された全物質と照合した。内部標準物質によりピーク強度を補正後，主成分分析（PCA）を実施した。また，LV群とHV群における各物質の測定値の差の検定には，Weichのｔ検定を使用した。

3．結果と考察

3.1　各群の黄体の形態，血流量および血漿P_4濃度の比較

メタボローム解析に供試した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，BFAおよび血漿P_4濃度の比較を行った（**Table 1**）。黄体の最大直径，黄体面積，黄体組織面積および血漿P_4濃度は２群間で差が認められなかった。また，BFAは，HV群（88.77 ± 4.52 mm^2）とLV群（29.40 ± 1.09 mm^2）で有意な差が認められた（$p < 0.01$）。両群ともに機能的な黄体の診断基準である血漿P_4濃度 ＞ 1.0 ng/mlであり，黒毛和種牛のDay 7の黄体として適正なサイズであった。また，ET時（Day 7）の黄体血流量が低い牛は高い牛に比較して受胎性が低く[1, 5, 6]，BFA 43.0 mm^2以下の牛は受胎性が低い[1]ことが明らかとなっている。したがって，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ことが推察された。

3.2　黄体血流量が子宮灌流液中の代謝産物の組成に与える影響

子宮灌流液についてCE-TOFMSおよびLC-TOFMSによるメタボローム解析を行った結果，110のピーク（CE-TOFMS 77：カチオン 68，アニオン 9，LC-TOFMS 33：ポジティブ 21，ネガティブ 12）においてライブラリより候補化合物が付与された。検出されたピークを用いてPCAを行った結果，スコアプロット上でLV群とHV群に分類することができた（**Fig. 1**）。次に，LV群とHV群における各物質の相対面積値比の比較を行った。LV群に比較してHV群において，パルミトイルエタノールアミド（PEA）が有意に低かった（$p = 0.03$）（**Fig. 2a**）。PEAは，エンドカンナビノイド様化合物に分類される脂質メディエーターであり，哺乳類では脳，脊髄，肝臓，心臓，血液，羊水や臍動静脈などに存在し，さまざまな細胞においてオンデマンドで合成されている[7]。PEAは抗炎症作用，鎮痛および細胞保護作用を持つため[8]，海外ではサプリメントとして販売されている。エンドカンナビノイドの１つであるアナンダミド（AEA）はヒトやマウスにおいて雌の生殖現象に深く関与していることが知られ，卵管や子宮での発現は厳密にコントロールされている[9]。血中および子宮内のAEAが増加すると胚の発育と着床が阻害され[10]，同時に$PGF_{2\alpha}$

Table 1　Features of the corpus luteum（CL）and plasma progesterone（P_4）concentrations in the high（HV）and low（LV）vascularity groups used for metabolome analysis.

Item	HV（n = 3）	LV（n = 3）	p value
CL maximum diameter（mm）	21.2 ± 1.1	22.0 ± 1.3	0.57
CL area（mm^2）	382.28 ± 47.85	404.09 ± 44.37	0.57
CL tissue area（mm^2）	358.36 ± 41.59	355.37 ± 34.66	0.87
BFA（mm^2）	88.77 ± 4.52	29.40 ± 1.09	＜ 0.01
Plasma P_4 concentrations（ng/ml）	2.91 ± 0.17	3.32 ± 0.57	0.67

Abbreviation：BFA, blood flow area. All data are represented as the mean ± SEM.

© The Ito Foundation

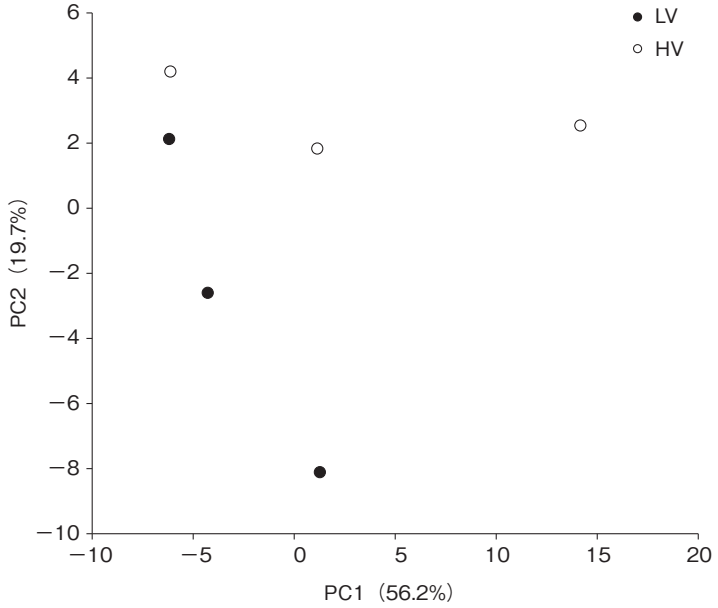


Fig. 1　Principal component analysis（PCA）for metabolites in uterine luminal fluids. Closed circles represent the low vascularity group（LV：n = 3）. Open circles represent the high vascularity group（HV：n = 3）.

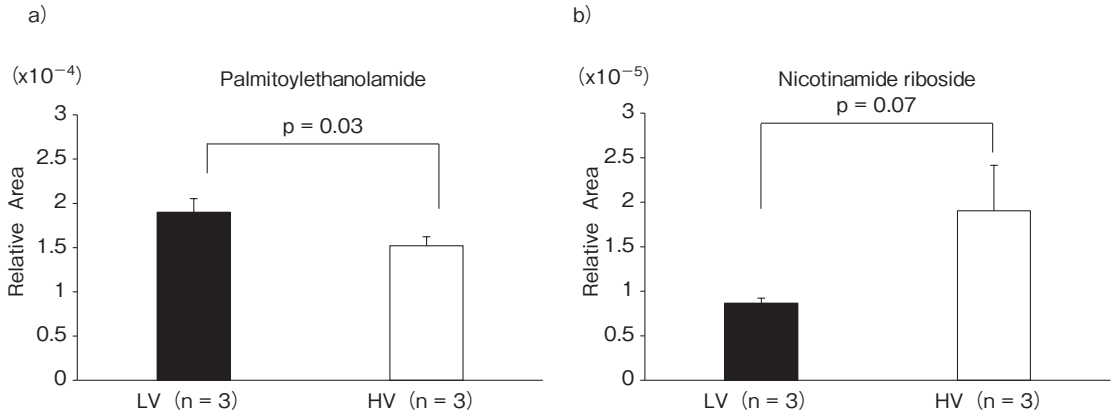


Fig. 2　Quantitative differences of metabolites from uterine luminal fluids found in low and high vascularity groups. Black bars represent the low vascularity group（LV：n = 3）. White bars represent the high vascularity group（HV：n = 3）.

の分泌が促進されることで黄体機能の低下を招き[11]，受胎性の低下や妊娠喪失の原因となることが報告されている。PEAは，AEAの分解酵素である脂肪酸アミド加水分解酵素（FAAH）の発現と活性を阻害することでAEAの作用を増強するため[12]，生殖現象に関与していると考えられている。また，胚死滅を起こした牛では正常な妊娠牛に比較して人工授精後16日の血中FAAH濃度が低いことが報告されている[13]。したがって，受胎性の低いLV群ではHV群に比較して子宮内のPEAが増加し，FAAHの発現と活性が阻害されることで受胎性の低下を招いている可能性がある

© The Ito Foundation

と推察した。

また，LV群に比較してHV群においてニコチンアミドリボシド（NR）は高い傾向（p = 0.07）が認められた（**Fig. 2b**）。NRはニコチンアミドにリボースが結合したヌクレオシドで広義でのナイアシンに含まれ，エネルギー産生に関与するニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NAD）の前駆体の１つである[14]。マウスとヒトにおいて母体のNADの欠乏が流産や胎子の先天的異常の原因となるが，ナイアシンの添加により減少することが報告されている[15]。また，培養液にNADを添加することで，卵子の品質や胚の発育が向上することも明らかとなっている[16]。したがって，受胎性の高いHV群ではLV群に比較して子宮内のNADの産生が増加し，胚の発育に適した環境であると考えられた。

以上の結果より，黄体血流量の多寡は子宮灌流液中の代謝産物の組成に影響を与えることが明らかとなった。これまで牛の黄体血流量と子宮灌流液中の代謝産物の組成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，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灌流液中の代謝産物の組成に与える影響を明らかにすることを目的として，黄体血流量，血漿P_4濃度および子宮灌流液のメタボローム解析を行った。発情後７日に採血を行い，黄体側子宮角先端にバルーンカテーテルを設置し灌流液を採取した。黄体血流の多い群（HV群）と少ない群（LV群）について，血漿P_4濃度およびメタボローム解析結果を比較した。その結果，HV群とLV群では血漿P_4濃度に差が認められなかった。主成分分析の結果から，LV群とHV群では代謝産物の組成が異なることが明らかとなった。さらに，LV群に比較してHV群において，パルミトイルエタノールアミド（PEA）が有意に低く，ニコチンアミドリボシド（NR）は高い傾向が認められた。HV群は受胎性が高くLV群は受胎性が低い牛群であると考えられることから，黄体血流量の多寡は子宮内代謝産物の組成に影響を与え，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） Winterhager, E., Gellhaus, A.：*Cell Mol Life Sci*, **71**, 2299～2311, 2014.
3） 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.
4） Moraes, J. G. N., Behura, S. K., Bishop, J. V., Hansen, T. R., Geary, T. W., Spencer, T. E.：*Biol Reprod*, 102(3), 571～587.
5） Pinaffi, F. L. V., Santos, E. S., da Silva, M. G., Filho, M. M., Madureira, E. H., Silva, L. A.：*Pesq Vet Bras*, 35(5), 470～476, 2015.
6） Pugliesi, G., de Melo, G. D., Silva, J. B., Carvalhêdo, A. S., Lopes, E., de Siqueira Filho, E., Silva, L. A., Binelli, M.：*Theriogenology*, **135**, 73～79, 2019.
7） Przybycień, P., Gasior-Perczak, D., Placha, W.：*Cells*, 11(16), 2569, 2022.
8） 坪井一人，宇山徹，上田夏生：生化学, 92(5), 666～679, 2020.
9） Maccarone, M.：*Expert opin ther targets*, 19(11), 1423～1427.
10） Schuel, H., Burkman, L. J., Lippes, J., Crickard, K., Forester, E., Piomelli, D., Giuffrida, A.：*Chem Phys Lipids*, **121**, 211～227, 2002.
11） Weems, H., Lewis, A. W., Neuendorff, D. A., Randel, R. D., Weems, C. W.：*Theriogenology*, **86**, 1453～1459, 2016.
12） Bambang, K. N., Karasu, T., Gebeh, A., Taylor, A. H., Marczylo, T. H., Lam, P., Willets, J. M., Konje, J. C.：*Pharmaceuticals*, 3(9), 2910～2929, 2010.
13） Dirandeh, E., Ansari-Pirsaraei, Z., Deldar, H., Shohreh, B., Ghaffari, J.：*Anim Sci Papers Rep*, 38(2), 135～144, 2020.
14） Lee, S. R., Jeong, S. H., Mukae, M., Kim, S. Y., Ko, J. W., Kwun, H. J., Hong, E. J.：*J Nutr Biochem*, **116**, 109310, 2023.
15） Shi, H., Enriquez, A., Rapadas, M., Martin, E. M. M. A., Wang, R., Moreau, J., Lim, C. K., Szot, J. O., Ip, E., Hughes, J. N., Sugimoto, K., Humphreys, D. T.,

© The Ito Foundation

McInerney-Leo, A. M., Leo, P. J., Maghzal, G. J., Halliday, J., Smith, J., Colley, A., Mark, P. R., Collins, F., Sillence, D. O., Winlaw, D. S., Ho, J. W. K., Guillemin, G. J., Brown, M. A., Kikuchi, K., Thomas, P. Q., Stocker, R., Giannoulatou, E., Chapman, G., Duncan, E. L., Sparrow, D. B., Dunwoodie, S. L.：*N Engl J Med*, 377(6), 544～552, 2017.

16)　Pollard, C. L., Gibb, Z., Swegen, A., Grupen, C. G.：*J Reprod Dev*, 68(6), 345～354, 2022.

© 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（Ⅲ）

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

鍋西　久・中美博
（北里大学獣医学部）

Hisashi Nabenishi and Mihiro Naka
（Department of Animal Science, School of Veterinary Medicine, Kitasato University）

A total of 100 OPUs（ovum pick up）performed by the same skilled veterinarian for embryo production on OPU donor cows of Japanese Black breed were included in the study. Higher quality oocyte rates were associated with higher blastocyst development rates, suggesting that oocyte quality may influence embryonic development and subsequent fertility. In the relationship between blood biochemical composition and follicular fluid biochemical composition, high positive correlations were observed for most items, indicating that blood biochemical composition reflects the microenvironment of the follicular fluid in which the oocytes reside. When the relationship between blood biochemical composition, good oocyte quality and follicular fluid biochemical composition and good oocyte quality was examined, the good oocyte quality decreased when the oocytes were in a negative energy balance state. It was suggested that the high concentration of NEFA in the follicular fluid may have directly affected the oocytes. Furthermore, it was clear that the cold environment 100–60 days before OPU（early follicle development）affected the quality of the oocytes more than the day of OPU. These results indicate that the follicular fluid composition also changes with the nutritional and physiological status of Japanese Black cows, and that increased NEFA concentrations due to energy deficiency affect oocyte quality. It was suggested that this may have affected the conception rate of AI. In addition, since the cold environment from 100–60 days before OPU strongly affects the quality oocyte rate, it is especially important to nutritional control that does not cause energy deficiency during this period.

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，昨年度までの研究において大規模な代謝プロファイルテスト（MPT）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てきた。新たに得られた知見として，分娩後の初回人工授精（AI）不受胎牛群では分娩前２，１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，卵子発育，受精，胚発生に関与する特定のアミノ酸濃度に差異が生じていることを確認した。しかしながら，繁殖雌牛の栄養状態の低下（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。これまでの研究で，AIの妊否を左右する要因として，分娩前後の栄養状態が卵子の品質に影響している可能性が強く推察される結果が得られている。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。

そこで本研究では，黒毛和種繁殖雌牛の繁殖成績を改善するための飼養管理技術の精密化を目標として卵胞卵子の品質に着目し，繁殖雌牛の栄養状態および血液生化学性状と卵胞液性状および卵子の品質との関連を明らかにした。

２．方　　法

青森県十和田市の民間牧場にて飼養されている黒毛和種の経腟採卵（OPU）供卵牛に対して，熟練した同一の獣医師によって体外胚生産のために実施されたOPU延べ100回（実頭数52頭）を試験対象とした。供試牛はつなぎ飼い式牛舎にて飼育され，飼料給与は牧場の常法に従い，自給粗飼料と補助飼料による制限給与とした。OPUによる採卵が行われた直後に採血を行った。また，OPUの際に卵子とともに吸引された卵胞液を採取し分析に供した。採卵後，卵子は熟練した同一の技術者によって卵丘細胞の付着具合に応じてグレード１からグレード４までランク分けされた。なお，全卵子数に占めるグレード１卵子数の割合を良質卵子率と定義した。

採取した血液と卵胞液は実験室に持ち帰った後，遠心分離を行い上清から血漿と卵胞液を回収した。一般生化学性状として，血漿はグルコース（GLU），総コレステロール（TCHO），トリグリセリド（TG），総タンパク質（TP），尿素窒素（BUN），アルブミン（ALB），グルタミン酸ピルビン酸トランスアミラーゼ（GPT）およびグルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミラーゼ（GOT），アンモニア（NH_3）の９項目，卵胞液はGLU，TCHO，TP，BUN，NH_3の５項目と遊離脂肪酸（NEFA）濃度，アセト酢酸と３-ヒドロキシ酪酸濃度を測定した。

３．結果と考察

良質卵子率と胚盤胞発生率との関係を**Fig. 1** に示した。良質卵子率が高いほど，胚盤胞発生率が高くなる正の相関が認められた（$r = 0.31$，$p < 0.05$）。良質卵子率が高いほど胚盤胞発生率が上昇したことから，卵子の品質が胚発生およびその後の受胎性に影響している可能性が示唆された。

OPU時の血液生化学成分と良質卵子率との関係を**Table 1** に示した。血中TG濃度においては，負の相関が認められた（$r = -0.26$，$p < 0.05$）。血中BUN濃度（$r = 0.48$（$p < 0.01$））とBUN/GLU（$r = 0.42$（$p < 0.01$））では，正の相関が認められた。また，血中NEFA濃度では負の相関が認められた（$r = -0.21$（$p < 0.05$））。供卵牛の栄養度と良質卵子率との間には関係性は認められなかった（$r = 0.03$）。細川ら[5]はBUN/GLUが0.2未満の時に正常卵率とAIによる受胎率が向上することを報告しており，血液生化学成分の指標と

© The Ito Foundation

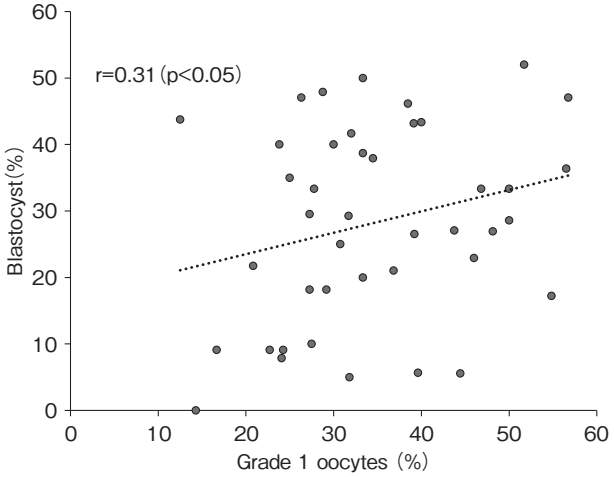


Fig. 1　Relationship between grade 1 oocytes (%) and blastocyst rate (%).

Table 1　Relationship between plasma biochemical composition and grade A oocytes (%)

	GLU	TCHO	TG	BUN	TP	NH_3	BUN/GLU	NEFA	BCS
correlation coefficient (r)	0.13	0.14	−0.26	0.48	0.06	0.09	0.42	−0.21	0.03
p-value	0.2	0.19	＜0.05	＜0.01	0.55	0.4	＜0.01	＜0.05	0.78

してBUN/GLUが活用可能なことを提案している。繁殖雌牛のMPTにおけるBUN濃度の基準値は12± 2 mg/dlとされているが[6]，本研究における血中BUN濃度の平均値は9.33±5.06 mg/dlであり，基準値を下回る結果となった。BUN/GLUにおいてもほとんどの個体において適正値を下回った。したがって，本研究の実施農場においては，飼料中のタンパク質含量が不足していることが推測され，そのために，BUN濃度が高い場合，すなわちタンパク質含量が充足した場合に良質卵子率が高くなったのでないかと推察された。血中NEFA濃度と良質卵子率との間には，負の相関が認められた。体脂肪動員の結果の象徴である血中NEFA濃度の増加は，供卵牛が負のエネルギーバランス（Negative Energy Balance；NEB）状態にあることを示すものであり，飼料エネルギーの不足が良質卵子率の低下に関与しているのではないかと推察された。飢餓時には，肝臓は脂肪酸のβ酸化で生じるアセチルCoAからケトン体を合成し主なエネルギー源とするが[7]，血中アセト酢酸と良質卵子率との間にも負の相関が認められたことから，エネルギー不足による卵子の品質低下が示唆された。

血液生化学成分と卵胞液生化学成分との関係を**Table 2** に示した。GLU濃度では r ＝0.41（p＜0.01），TCHO濃度では r ＝0.65（p ＜0.01），BUN濃度では r ＝0.88（p＜0.01），BUN/GLUでは r ＝0.88（p＜0.01），NEFA濃度では r ＝0.46（p＜0.01）となり，それぞれ強い正の相関が認められた。乳用牛において，血液生化学成分が卵胞液組成を反映することが示されている[8]。したがって，黒毛和種雌牛においても卵胞液性状は供卵牛の栄養生化学的状態を反映していることが明らかとなった。

卵胞液生化学成分と良質卵子率との関係を**Table 3** に示した。GLUと良質卵子率との間には

© The Ito Foundation

Table 2　Relationship between plasma biochemical composition and follicular fluid biochemical composition

	GLU	TCHO	BUN	TP	NH_3	BUN/GLU	NEFA
correlation coefficient (r)	0.41	0.65	0.88	0.23	−0.02	0.88	0.46
p-value	＜0.01	＜0.01	＜0.01	0.06	0.87	＜0.01	＜0.01

Table 3　Relationship between follicular fluid biochemical composition and grade A oocytes (%)

	GLU	TCHO	BUN	TP	NH_3	BUN/GLU	NEFA
correlation coefficient (r)	−0.27	−0.01	0.21	−0.17	−0.05	0.41	−0.23
p-value	＜0.05	0.9	0.07	0.15	0.7	＜0.01	＜0.05

負の相関（r = −0.27，p＜0.05），NEFAとの間には負の相関（r = −0.23，p＜0.05），BUN/GLUとの間には正の相関（r =0.41，p＜0.01）が認められた。GLUは，卵丘・卵母細胞複合体（cumulus-oocyte complex；COC）のきわめて重要な代謝産物であり，解糖，ペントースリン酸経路，ヘキソサミン生合成経路，およびポリオール経路によって代謝される[9]。また，卵母細胞成熟の間に全グルコースの大部分がエネルギー生産のために解糖経路を介して代謝される[10]。マウスにおいては，大量のGLUを吸収して乳酸に変換できる卵母細胞は高い受精能力を持つことが報告されている[11]。したがって，高品質な卵子が大量のGLUを吸収しエネルギー生産を行った結果，卵胞液中GLU濃度が低下したのではないかと推測された。

卵胞液中NEFA濃度と良質卵子率との間には負の相関が認められた。卵胞液中のNEFAが卵子に及ぼす影響として，NEFAを含む培地で培養した顆粒膜細胞数は，通常の培地で培養した時よりも一貫して有意に低いことや[12]，成熟培地へのNEFA添加によって胚盤胞発生率が有意に低下することが報告されている[13]。また，高濃度のNEFAは顆粒膜細胞のアポトーシスを引き起こすことや[14]，高濃度NEFA暴露によって卵子の活性酸素（ROS）濃度が上昇するなど，卵胞液中のNEFAが卵子やCOCに対して悪影響を及ぼすことが明らかにされている。したがって，本研究においても，供卵牛の飼料エネルギーが不足しNEBに陥って体脂肪動員が亢進したことにより，血液中のNEFA濃度が上昇し，それが卵胞液にも反映された結果，上昇した卵胞液中NEFAが卵子に直接的に悪影響を及ぼしたのではないかと推察された。また，その後の解析により100～60日前の寒冷環境が卵子品質に悪影響を及ぼすことが明らかとなった。

以上のことから，供卵牛の栄養生理的状態によって卵胞液組成も変化し，エネルギー不足に起因するNEFA濃度の上昇が卵子品質の低下に影響を及ぼしていることが明らかとなった。また，100～60日の熱環境が良質卵子率に強く影響することから，特にこの間にエネルギー不足に陥らないような飼料設計が必要であることが明らかとなった。

4．要　約

黒毛和種繁殖雌牛の繁殖成績を改善するための飼養管理技術の精密化を目標として卵胞卵子の品質に着目し，繁殖雌牛の栄養状態および血液生化学性状と卵胞液性状および卵子の品質との関連を明らかにした。黒毛和種の経腟採卵（OPU）供卵牛に対して，熟練した同一の獣医師によって体

© The Ito Foundation

外胚生産のために実施されたOPU延べ100回（実頭数52頭）を試験対象とした。良質卵子率が高いほど胚盤胞発生率が高くなったことから，卵子の品質が胚発生およびその後の受胎性に影響している可能性が示唆された。血液生化学成分と卵胞液生化学成分との関係性では，ほとんどの項目において高い正の相関が認められたことから，血液生化学成分が卵子の存在する卵胞液の微小環境を反映していることが明らかとなった。血液生化学成分と良質卵子率，卵胞液生化学成分と良質卵子率との関係を検討したところ，供卵牛が負のエネルギーバランス（NEB）状態にある時に良質卵子率が低下した。この要因として，卵胞液中の高い遊離脂肪酸（NEFA）濃度が直接的に卵子に作用した可能性が示唆された。さらに，OPU当日よりもOPU前100～60日（卵胞発育初期）の寒冷環境が卵子の品質に影響を及ぼしていることが明らかとなった。

以上のことから，繁殖雌牛の栄養生理的状態によって卵胞液組成も変化し，エネルギー不足に起因するNEFA濃度の上昇が卵子品質の低下に影響を及ぼしていることが明らかとなった。このことが，人工授精受胎率に影響している可能性が示唆された。また，OPU前100～60日の寒冷環境が良質卵子率に強く影響することから，特に，この間にエネルギー不足に陥らないような飼料設計が必要となる。

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：*Journal of Japanese for clinical infectious disease in farm animals*，Vol.6，No.3. 2011.
3）坂口実，笹本良彦，鈴木貴博，高橋芳幸，山田豊：北畜会報，**45**，33～40，2003.
4）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）細川泰子：畜産技術，**665**，25～28，2010.
6）独立行政法人 家畜改良センター 鳥取牧場：代謝プロファイルテストを用いた黒毛和種における飼養管理マニュアル，2016.
7）田宮信雄，八木達彦，遠藤斗志也，吉久徹：ヴォート基礎生化学 第5版，東京化学同人，2020.
8）Leroy, J. L. M., Vanholder, T., Delanghe, J. R., Opsomer, G., Van Soom, A., Bols, P. E. J., De Kruif, A.：*Animal Reproduction Science*，**80**，201～211，2003.
9）Sutton-McDowall, M. L., Gilchrist, R. B., Thompson, J. G.：*Reproduction*，**139**，685～695，2010.
10）Harris, S. E., Adriaens, I., Leese, H. J., Gosden, R. G., Picton, H. M.：*Reproduction*，**134**，415～424，2007.
11）Preis, K. A., Seidel, G. Jr., Gardner, D. K.：*Society for Reproduction and Fertility*，**130**，475～483，2005.
12）Jorritsma, R., César, M. L., Hermans, J. T., Kruitwagen, C. L., Vos ,P. L., Kruip, T. A.：*Animal Reproduction Science*，**81**，225～235，2004.
13）Van Hoeck, V., Sturmey, R. G., Bermejo-Alvarez, P., Rizos, D., Gutierrez-Adan, A., Leese, H. J., Bols, P. E. J., Leroy, L. M. R.：*PLoS ONE*，**6**，e23183，2011.
14）Ferst, J. G., Missio, D., Bertolin, K., Gasperin, B. G., Leivas, F. G., Bordignon, V., Gonçalves, P. B., Ferreira, R.：*Animal Reproduction Science*，**219**，106536，2020.

© The Ito Foundation

成熟分裂制御による新たな牛卵子輸送法の開発

Development of transportation system for bovine oocytes by controlling meiosis

坂　口　謙一郎[1#]・河　野　光　平[2]

([1]北海道大学大学院獣医学研究院,　[2]岡山大学学術研究院環境生命自然科学学域)

([#]現所属：岐阜大学応用生物科学部共同獣医学科)

Kenichiro Sakaguchi[1#] and Kohei Kawano[2]

([1]Faculty of Veterinary Medicine, Hokkaido University,

[2]Faculty of Environmental, Life, Natural Science and Technology, Okayama University)

([#]Present address : Joint Department of Veterinary Medicine, Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University)

Nowadays we can produce embryos from young superior animals by ovum pick-up (OPU) followed by in vitro fertilization (IVF) repeatedly, and the number of in vitro produced embryos is increasing dramatically. On the other hand, there is a limitation of IVF laboratory for veterinarian in Japan, and collected oocytes are transported to regional laboratories with collection media in many cases. However, spontaneous meiotic resumption of immature oocytes can be happened during transportation, which impairs developmental competence of oocytes. In the present study, we investigated the effect of modulators of cAMP adenosine monophosphate (cAMP) on meiotic resumption to develop efficient collection media to improve developmental competence of oocytes during transportation. Cumulus oocyte complexes (COCs) were collected with four different collection media with or without cAMP modulators (Control, 3-Isobutyl 1-methylxanthine (IBMX), Substance A, Substance B). Collected COCs were incubated at 38℃ for 0, 3, 6, 12, or 24 hours, then morphology of COCs, nuclear status of oocytes, and the concentration of cAMP in oocytes were evaluated. The rate of collected COCs with multiple layers of cumulus cells decreased in Control and IBMX ($p < 0.05$), while it was maintained until 24 hours after collection in Substance A and Substance B, and the highest in Substance A among the groups ($p < 0.05$). The rate of oocytes at the germinal vesicle stage, which means meiotic arrest, decreased from 6 hours after collection in all groups ($p < 0.05$), and was higher in Substance A and Substance B than Control and IBMX at 12 hours after collection ($p < 0.05$). The concentration of cAMP in oocytes was not changed until 24 hours after collection, and no difference was observed among the groups. In conclusion, addition of Substance A into collection media maintains meiotic arrest until 24 hours, which may improve developmental competence of oocytes.

© The Ito Foundation

1．目　　的

現在，牛の体外胚生産量は世界的に増加しており，日本における2021年の体外胚生産個数は15万個程度と見積もられ，すでに体内胚生産による胚の個数を上回っていると考えられている[1)]。体外胚生産には，食肉検査場由来の卵巣内に含まれる卵子を用いる方法と，生体から超音波診断装置を用いて卵巣を観察しながら卵子を吸引する経腟採卵法（Ovum pick-up；OPU）が用いられているが，血統が判明している優秀な牛から，繰り返し採卵が可能である観点から，生産現場においてOPUの普及が進んでいる。採卵した卵子を用いて移植可能な胚を得るためには，卵子を体外で受精が可能な状態になるまで成熟させ（体外成熟培養；In vitro maturation；IVM），その後，体外受精（In vitro fertilization；IVF）に供する必要がある。しかし現状では，採卵装置に加えて培養に必要な設備を有する家畜診療所は少ないため，培養施設を有する家畜人工授精所や大学等の研究施設に回収後の卵子を運搬する取り組みが行われている。しかし，採卵後の卵子は，発育が不十分な状態で卵子の成熟が再開してしまうことで，卵子の発生能が低下してしまうことが知られている。このことから，採卵後の卵子の発生能を減じることなく，運搬できる技術開発が必要である。

採卵後の卵子は，さまざまな発育段階の卵胞に由来するが，直径２ mm程度の発育途上の小卵胞に含まれる卵子はすでに正常に受精するための核成熟能を有する一方，その後に胚盤胞に至るまでの発生能を獲得していない。これらの卵子を体外に取り出した場合，黄体刺激ホルモン（LH）などの排卵刺激なしに自発的に成熟分裂が再開するが，胚盤胞への発生は期待できない[2)]。成熟分裂の停止は，卵子内の環状アデノシン一リン酸（cAMP）によって維持されているため，cAMP類縁体，cAMP分解酵素阻害剤，cAMP合成酵素刺激剤といったcAMP調節因子により，卵子内のcAMP濃度を維持することで成熟分裂の再開を防ぐことができる。IVM前に，cAMP調節因子を含む培地で卵子を培養するPre-IVMを行うことで，卵子発生能を向上させることができる[3)]。一方，OPUの際には，針の洗浄，卵子の輸送・洗浄および検査時に約500 ml程度の回収液が必要であり，培養液と比べて（0.05-0.5 ml）消費量が多く，既報に用いられる調節因子を回収液に用いた場合，１回あたり上乗せされるコストは各1,200-80,000円と試算される。過去，cAMP調節因子の卵子輸送用培地への添加効果を検証した報告はあるが[4)]，高価なcAMP調節因子を高濃度で添加している点，ごく少量の回収液を用いている点から現場の状況と乖離している。また，回収後の卵子をIVM培地とともにストローに入れ，IVMを行いながら輸送する方法も現場で用いられているが，専用の細胞培養輸送器が必要であり，また，成熟により粘稠性を持った卵丘細胞がストロー内に付着し卵子を紛失するリスクが高まるのに加え，卵子個数が多い場合，発生能が低下する可能性がある。

本研究は，卵子の輸送中の成熟分裂を抑制することが可能な卵子回収・輸送液を開発し，体外受精後の卵子の胚発生能を向上させることを目的として実施した。

2．方　　法

2.1　実験計画

実験１　卵子輸送期間中の成熟分裂を抑制可能な安価なcAMP分解酵素阻害剤の探索

牛卵子のPre-IVMには，cAMP分解酵素阻害剤である3-イソブチル-1-メチルキサンチン（IBMX）が広く使用されている[5)]。IBMXを回収液（ラクトリンゲル液＋１％子牛血清；１回の

© The Ito Foundation

OPUあたり約200円）に加えた場合，その１回のOPUあたりの推定価格は約７倍（約1,400円）となる。そのため本研究では，まず，IBMX（１回あたり約1,200円）より安価なcAMP分解酵素阻害剤である候補物質Ａ（１回あたり約115円）および候補物質Ｂ（１回あたり約15円）を抽出し，cAMP分解酵素阻害剤を添加しないControl，IBMX，候補物質ＡおよびＢにおいて，卵子回収後０，３，６，12，24時間の卵子の成熟段階（卵子核相）を判定し，成熟分裂を停止させることができるかを評価した。

実験２　卵子内cAMP濃度を最適にするブタ下垂体由来FSH濃度の検討

生体内において排卵刺激であるLHの一過性の多量分泌（LHサージ）を受けた卵胞中では，cAMP合成酵素の活性が高まることで，cAMP濃度は一過性に上昇した後，低下すると考えられている（cAMPサージ）[6]。cAMPサージは卵子発生能の獲得に重要であると考えられており，これを体外で模倣するため，cAMP合成酵素刺激剤であるフォルスコリンがPre-IVMに用いられている。しかし，フォルスコリンを回収液に添加した場合，そのコストは１回あたり約７万円であり，より安価にcAMP濃度を高める方法が必要である。FSHは，卵子を取り巻く卵丘細胞の受容体に結合することでcAMP合成酵素を刺激し，卵丘細胞で合成されたcAMPはギャップ結合を介して卵子へ輸送されることが知られている。また，ブタ下垂体由来FSHは，牛の胚生産のためのホルモン投与に広く用いられており，安価で入手することが可能である。これまでに，我々は低用量（2×10^{-6} IU/ml）のブタ下垂体由来FSHを用いたPre-IVMにより卵子発生能が向上することを明らかにしている[7]。そこで，実験１により最も高い効果の得られた候補物質Ａを含む回収液に異なる濃度ブタ下垂体由来FSH（0 ～ 2×10^{-5} IU/ml，OPU１回あたりの費用０～100円）を回収液に添加し，卵子内のcAMP濃度がどう変化するかをcAMP濃度測定キットを用いて測定し，最適濃度を検証した。

2.2　卵子の回収

食肉処理場由来の卵巣を常温（約20℃）で運搬し，生理食塩水で３回洗浄した。ラクトリンゲル液＋１％子牛血清にcAMP分解酵素阻害剤を添加しないControl，異なるcAMP分解酵素阻害剤（IBMX，候補物質ＡおよびＢ）を含む３群の合計４実験群を作成し，各回収液を用いて吸引卵胞を計数しながら卵胞液を吸引し，卵子を15 mlチューブに回収した。回収後，卵胞液と回収液の割合を１：３となるように回収液を15 mlチューブに加え，0，3，6，12，24時間，38℃のインキュベーターに保持した。その後，卵胞液を含む回収液を90 mmディッシュに移し，卵子が完全に卵丘細胞に包まれた卵子-卵丘顆粒層細胞複合体（COC）を回収した。

2.3　核相の評価

核相の評価は，過去の報告に基づき実施した[8]。すなわち，COCをボルテックスあるいはピペッティングにより裸化し，スライドガラスにマウントした後，酢酸エタノールで一晩固定した。固定後の卵子を１％酢酸オルセイン液で染色し，位相差顕微鏡にて卵子核相を評価した。

2.4　cAMP濃度測定

COCをボルテックスあるいはピペッティングにより裸化し，0.1 M HCl（１卵子／５ μl）に移し，10分常温でインキュベートした後，－80℃で保存した。卵子を含む0.1 M HCl中のcAMP濃度を市販キット（Complete cAMP ELISA kit, Cat ADI-900-163A, Enzo Life Sciences, NY, USA）を用いて，その手順書に従い測定した。

2.5　統計処理

すべての結果は，二元配置分散分析により，卵

© The Ito Foundation

子回収からの時間（0，3，6，12，24時間）およびcAMP候補因子（Control, IBMX, 候補物質A，候補物質B）あるいはFSH濃度（0，2×10^{-7} IU/ml，2×10^{-6} IU/ml，2×10^{-5} IU/ml）の影響と，その交互作用を解析した。Post-hoc testにはTukey-Kramer法を用いた。

3．結果と考察

実験1　卵子輸送期間中の成熟分裂を抑制可能な安価なcAMP分解酵素阻害剤の探索

吸引した卵胞に対する卵子が完全に卵丘に包まれたCOCの回収率を**Fig. 1** に示す。COCの回収率に，卵子回収からの時間とcAMP分解酵素阻害剤の交互作用がみられた（$p = 0.0171$）。COC回収率は，Control群およびIBMX群において卵子回収からの時間の経過とともに減少した（$p < 0.05$）。一方，候補物質Aおよび候補物質Bにおいては，回収後24時間後まで有意な減少はみられなかった。回収後24時間において，COC回収率は候補物質A，候補物質B，IBMX，Control群の順に高くなった（$p < 0.05$）。

減数分裂が停止している状態である卵核胞（Germinal Vesicle；GV）期の卵子の割合を**Fig. 2** に示す。GV率に，卵子回収からの時間およびcAMP分解酵素阻害剤の影響がみられた（$p < 0.05$）。GV率は，すべての実験群において回収後6時間から低下した（$p < 0.05$）。一方，回収後12時間において，候補物質Aおよび候補物質BがIBMXおよびControl群よりも高いGV率を示した（$p < 0.05$）。

以上の結果より，回収液に候補物質Aを添加することで，他の2種の添加剤や非添加の場合と比較して，卵丘細胞と卵子間のギャップ結合を維持でき，卵子の減数分裂を高率に抑制できることが明らかになった。

実験2　卵子内cAMP濃度を最適にするブタ下垂体由来FSH濃度の検討

卵子内cAMP濃度を**Fig. 3** に示す。卵子内のcAMPに，卵子回収からの時間，FSH濃度の影響およびその交互作用はみられなかった（$p > 0.05$）。これまでの研究では，2×10^{-6} IU/mlのブタ下垂体由来FSHを用いたPre-IVMにより卵子発生能が向上することが示されている[7]。しかし，2×10^{-6} IU/mlおよび2×10^{-5} IU/mlにお

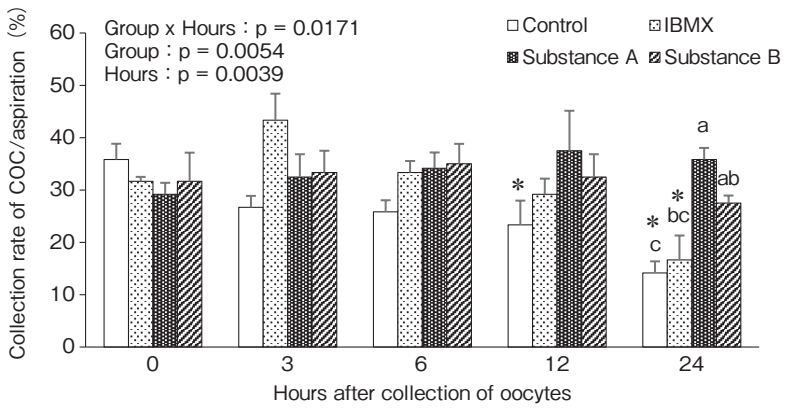


Fig. 1　Collection rates of bovine cumulus oocyte complexes (COCs) with multiple layers of cumulus cells incubated with different modulators (Control, 3-Isobutyl 1-methylxanthine (IBMX), Substance A, and Substance B) of cyclic adenosine monophosphate (cAMP).
Values on top left means the p values of two-way ANOVA. *: Differences with 0 hours after collection of oocytes. a-c: Differences among the groups. The bars indicate mean values. The error bars indicate SEM.

© The Ito Foundation

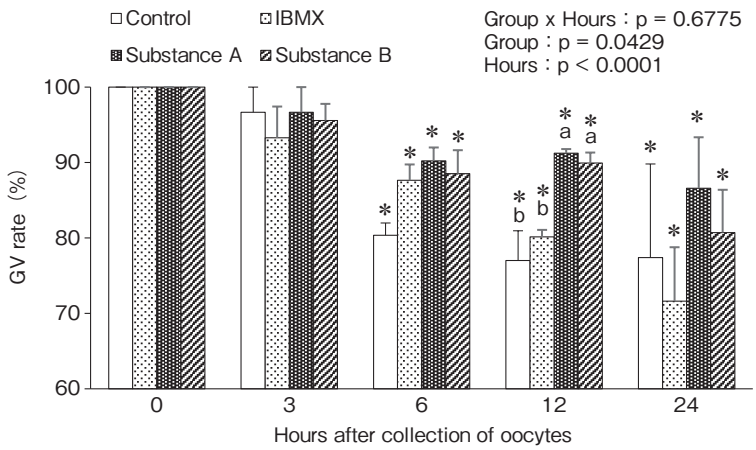


Fig. 2　Rates of oocytes at germinal vesicle（GV）stage incubated with different modulators（Control, 3-Isobutyl 1-methylxanthine（IBMX）, Substance A, and Substance B）of cyclic adenosine monophosphate（cAMP）.
Values on top right means the p values of two-way ANOVA. *：Differences with 0 hours after collection of oocytes. a, b：Differences among the groups. The bars indicate mean values. The error bars indicate SEM.

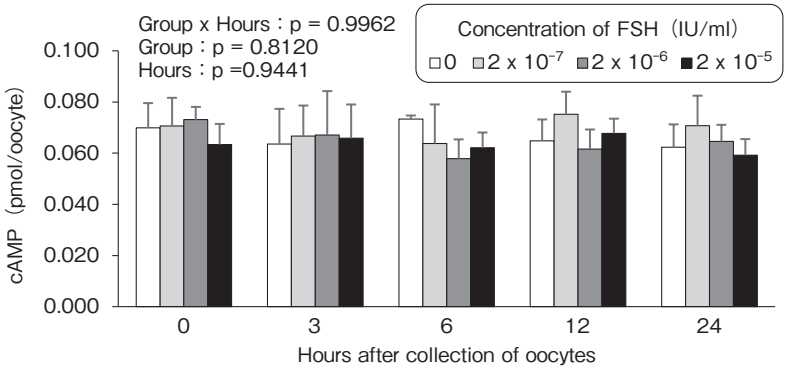


Fig. 3　Concentration of cyclic adenosine monophosphate（cAMP）in bovine oocytes incubated with different concentrations（0, 2×10^{-7}, 2×10^{-6}, and 2×10^{-5} IU/ml）of porcine follicle-stimulating hormone（FSH）.
Values on top left means the p values of two-way ANOVA. The bars indicate mean values. The error bars indicate SEM.

いてcAMP濃度の上昇がみられなかったことから，過去の報告でみられた卵子発生能を向上させる効果は，主としてFSHと同時に添加されたIBMXによるものであることが示唆された。

4．要　約

本研究により，Pre-IVMにおいて一般的に用いられるIBMXよりも安価な候補物質Aを回収液に用いることで，IBMXよりも高率に成熟分裂の再開を抑制することができ，体外受精系に供することができる卵丘細胞に卵子が完全に覆われたCOCの回収率を高めることができることが明らかになった。今後，候補物質Aを含む回収液を用いて体外受精を実施し，卵子発生能を確認するとともに，さらにOPU-IVFにおいて発生能を向上させる効果がみられるかを実証する必要がある。

© The Ito Foundation

文　献

1） 平田統一：日本胚移植学雑誌, **44**, 91～100, 2023.
2） Luciano, A. M., Sirad, M. A.：*Biol Reprod*, **98**, 162～169, 2018.
3） Richani, D., Gilchrist, R. B.：*Biol Reprod*, **106**, 243～252, 2022.
4） Dall'Acqua, P. C., Leão, B. C. D. S., Rocha-Frigoni, N. A. S., Gottardi, F. P., Mingoti, G. Z.：*Zygote*, **25**, 740～750, 2017.
5） Sakaguchi, K., Nagano, M.：*Theriogenology*, **150**, 122～129, 2020.
6） Li, H. J., Sutton-McDowall, M. L., Wang, X., Sugimura, S., Thompson, J. G., Gilchrist, R. B.：*Hum Reprod*, **31**, 810～821, 2016.
7） Abdel-Ghani, M. A., Sakaguchi, K., Kanno, C., Yanagawa, Y., Katagiri, S., Nagano, M.：*J Reprod Dev*, **64**, 365～369, 2018.
8） Nagano, M., Katagiri, S., Takahashi, Y.：*Zygote*, **14**, 299～304, 2006.

© The Ito Foundation

新規凍害保護剤を用いた効率的なブタ卵子凍結保存法の開発

Development of an efficient method for cryopreservation of porcine oocytes using a novel cryoprotectant

三　好　和　睦
（鹿児島大学農学部）

Kazuchika Miyoshi
（Faculty of Agriculture, Kagoshima University）

An ampholytic polymer compound, carboxylated poly-L-lysine (CPLL), was reported to be effective in the cryopreservation of porcine *in vitro*-fertilized oocytes (pronuclear-stage embryos). However, our recent studies have shown that another ampholytic polymer compound, 3,3-dimethylglutaric anhydride poly-L-lysine (DMGA-PLL), is a better cryoprotectant than CPLL for porcine spermatozoa and blastocysts. In this study, therefore, we investigated the efficacy of DMGA-PLL as a cryoprotectant for porcine pronuclear-stage embryos and compared its cryopreservation efficiency with that of CPLL. The viability of frozen-thawed embryos was not affected by the presence or absence of CPLL and DMGA-PLL in the vitrification solution. In contrast, the addition of 10% (v/v) CPLL or DMGA-PLL to the vitrification solution improved the *in vitro* development of embryos after thawing. When embryos were cryopreserved with DMGA-PLL, the cleavage rate, blastocyst formation rate, and number of cells in the blastocysts were higher than embryos cryopreserved with CPLL. In addition, embryos cryopreserved with DMGA-PLL had the same *in vitro* developmental potential as embryos that were not cryopreserved. Based on the results of this study, we established a novel cryopreservation method using DMGA-PLL as a cryoprotectant for porcine pronuclear-stage embryos. This method could be effectively used to preserve the genetic resources of pigs with superior genotypes and to increase their offspring through embryo transfer. Furthermore, it could contribute to the development of research on creating genetically modified pigs by providing an efficient supply of experimental materials.

1．目　　的

生殖細胞の凍結保存技術は，優良種畜や稀少種畜が保有する遺伝資源の安定的な長期保存を可能にするだけでなく，優良家畜を効率的に生産し得る人工授精や胚移植の実施においても重要である。ウシにおいては精子や胚盤胞の凍結保存技術が確立されており，それらを用いた人工授精および胚移植が実用化され，優良家畜の効率的生産に大きく貢献してきた[1, 2]。一方，ブタの生殖細胞は寒冷刺激に対してきわめて敏感であるため，それらの凍結保存技術はウシより遅れており，実用

© The Ito Foundation

化の域に達していない[3,4]。

一般的に，細胞を凍結する際には保存液に凍害保護剤を添加する。凍害保護剤は，凍結の過程で生じる種々の障害から細胞を保護する役割を果たすが，同時に細胞に対して毒性を示し，融解後の生存性や正常性を低下させることが知られている[5,6]。よって，凍害保護剤は凍結保存の成否に大きな影響を及ぼす要因の一つである。これまでに凍害保護剤として，精子の凍結保存にはグリセリン[7]，卵子や胚の凍結保存にはジメチルスルホキシド，エチレングリコール，ポリエチレングリコール，グリセリン，プロピレングリコール[8~10]が広く用いられてきたが，ブタ生殖細胞の凍結保存技術を確立するには，これらよりも細胞保護作用が高く，かつ細胞毒性が低い新規の凍害保護剤を見出す必要があると考えられる。

近年，ヒトiPS細胞の凍結保存用に開発された両性高分子化合物であるcarboxylated poly-L-lysine[11]（CPLL）が，ウシ[12]，バッファロー[13]，ウサギ[14]およびヒト[15]精子の凍結保存にも有用であることが報告された。そこで我々は，グリセリンとともに添加したCPLLがブタ精子の凍結保存に及ぼす影響について検討し，CPLLが融解した精子の運動性およびそれらを用いて作出した体外受精卵子の体外発生を改善することを示した。しかしながら，CPLL添加液中で凍結保存した精子を人工授精した雌ブタの一腹産子数は，現在一般的に利用されている冷蔵保存精子を用いた場合より有意に低くなったことから，ブタ精子にとってCPLLは最適な凍害保護剤ではないことが示唆された[16]。そこで次に，別の両性高分子化合物である3,3-dimethylglutaric anhydride poly-L-lysine[17]（DMGA-PLL）の影響について調べた結果，CPLLの場合と同様に，融解した精子の運動性およびそれらを用いて作出した体外受精卵子の体外発生を改善し得ることが明らかになった。さらに，DMGA-PLLの添加によって，凍結保存精子を人工授精した雌ブタの一腹産子数が冷蔵保存精子を用いた場合と同じレベルにまで改善されることを見出した[18]。これらの結果をもとに，ブタ胚盤胞の凍結保存に及ぼすCPLLおよびDMGA-PLLの影響について検討した結果，両者とも融解した胚盤胞の生存率を改善し得るが，DMGA-PLLのほうがCPLLよりも優れた凍害保護作用を有していることが明らかになった（未発表データ）。

受精直後の卵子である前核期胚は，前核へ外来遺伝子を導入することによるトランスジェニック動物の作出や細胞質へCRISPR/Cas9関連成分を導入することによるノックアウト動物の作出に利用できる[19,20]。よって，前核期胚の凍結保存技術が確立されれば，前述した利点が得られるだけでなく，遺伝子改変動物の作出に関する研究の発展にも貢献し得る。最近，保存液にCPLLを添加することにより，凍結融解したブタ前核期胚の胚盤胞形成率および胚盤胞細胞数を改善できることが報告された[21]。しかし，我々のこれまでの研究から，DMGA-PLLを用いることによって，さらに効率的にブタ前核期胚を凍結し得る可能性がある。そこで本研究では，保存液へのDMGA-PLLの添加が凍結融解したブタ前核期胚の生存性および正常性に及ぼす影響を明らかにし，その凍害保護作用をCPLLのそれと比較した。

2．方　法

2.1　前核期胚の作出

食肉センター由来のブタ卵巣から卵丘卵子複合体を吸引採取し，成熟用培地[16,18]中に移して38.5℃，5%CO_2，95%空気の条件下で36～38時間培養した。成熟培養後，ヒアルロニダーゼを用いて卵丘細胞を除去した卵子を80 μlの受精用培地[16,18]に移した。DMGA-PLLを用いて凍結保存した精子[18]を37℃に温めた希釈液中に懸濁して遠

© The Ito Foundation

心処理後，受精用培地中に再懸濁した。その精子懸濁液20 μlを卵子が入った受精用培地に加えることによって，媒精を行った。媒精時の最終精子濃度は，7.0×10^{6}匹/mlに調整した。媒精12時間後に，卵子から周囲に付着した精子を除去した。卵子を1.5 mlのチューブに移して37℃，9,730×gの条件下で10分間遠心処理することにより，細胞質中の脂質を偏在させた。処理後の卵子を顕微鏡下で観察し，２個の前核が確認されたものを選抜した。

2.2　平衡液，凍結液および融解液

平衡液，凍結液および融解液の基礎培地として，20%（v/v）ウシ胎児血清を添加したHEPES緩衝修正PZM-3[22] を用いた。第１平衡液には，10%（v/v）エチレングリコールを添加した基礎培地を用いた。第２平衡液には，10%エチレングリコール，１%（w/v）ポリエチレングリコールおよび0.3 Mトレハロースを添加した基礎培地を用いた。凍結液には，33%エチレングリコール，2%ポリエチレングリコールおよび0.6 Mトレハロースを添加した基礎培地を用いた。また，融解液には，10%エチレングリコールおよび0.3 Mトレハロースを添加した基礎培地を用いた。上記の凍結液に種々の濃度のCPLLあるいはDMGA-PLLを添加した。また，第１平衡液および第２平衡液には，凍結液に添加した濃度の４分の１および２分の１のCPLLあるいはDMGA-PLLをそれぞれ加えた。

2.3　凍結および融解

得られた前核期胚を第１平衡液および第２平衡液でそれぞれ５分間平衡後，凍結液に移して１分間処理した。処理後の胚をクライオトップの先端に10～20個ずつ乗せ，液体窒素に浸漬して保存した。３日間以上保存後，液体窒素からクライオトップを取り出して先端を融解液に浸漬した。クライオトップから離脱した胚を融解液で３分間平衡後，修正PZM-3中でさらに３分間平衡した。新しい修正PZM-3に移した胚を顕微鏡下で観察し，細胞膜の崩壊および脂質の白色化が見られないものを生存胚と判定した。生存胚を修正PZM-3中で体外培養し，２日後に卵割状況，７日後に胚盤胞形成状況を観察した。細胞質がほぼ均等に分裂したものを卵割胚，胞胚腔が形成されたものを胚盤胞と判定した。得られた胚盤胞の核をヘキスト33342で染色することにより，質の指標となる細胞数を測定した。

2.4　統計解析

各実験を５回ずつ実施し，得られたデータを一元配置分散分析およびFisherの最小有意差検定を用いて解析した。生存率，卵割率および胚盤胞形成率は，アークサイン変換後に解析した。p値が0.05未満であった場合を有意な差とみなした。

3．結果と考察

最初に，CPLLおよびDMGA-PLLの最適な添加濃度を明らかにするために，０，10および20%（v/v）のCPLLあるいはDMGA-PLLを添加した凍結液を用いて前核期胚を凍結した。**Table 1** には，種々の濃度のCPLLを含む液中で凍結した前核期胚の生存状況および発生状況を示した。生存率（79.9～87.5%）には，異なった濃度間で有意な差は見られなかった。卵割率は10%区（67.7%）が20%区（48.0%）より有意に高くなった（$p<0.01$）が，０%区（55.1%）との間では有意な差は見られなかった。胚盤胞形成率は，10%区（35.3%）が０%区（20.8%）および20%区（18.5%）より有意に高くなった（$p<0.05$）。胚盤胞細胞数（35.4～41.7個）には，異なった濃度間で有意な差は見られなかった。

Table 2 には，種々の濃度のDMGA-PLLを含む液中で凍結した前核期胚の生存状況および発生状況を示した。生存率（84.4～91.4%）には，異なった

© The Ito Foundation

Table 1　Viability and *in vitro* development of porcine pronuclear-stage embryos cryopreserved with different concentrations of carboxylated poly-L-lysine (CPLL)[a]

Concentration of CPLL (%)	No. of embryos cryopreserved	No. (mean % ± SEM)[b] of embryos survived	No. (mean % ± SEM)[c] of embryos developed to		Mean no. ± SEM of cells in blastocysts
			≥ 2-cell (2)[d]	Blastocyst (7)[d]	
0	73	61 (83.6 ± 3.2)	34 (55.1 ± 6.1)[ef]	13 (20.8 ± 4.9)[e]	41.5 ± 4.1
10	71	62 (87.5 ± 2.4)	42 (67.7 ± 2.5)[e]	22 (35.3 ± 2.4)[f]	41.7 ± 2.7
20	73	58 (79.9 ± 4.0)	28 (48.0 ± 3.0)[f]	11 (18.5 ± 5.1)[e]	35.4 ± 1.3

[a] Experiments were repeated five times. [b] Percentage per embryos cryopreserved. [c] Percentage per embryos survived. [d] Numbers in parentheses indicate the time of examination (days of culture). [e–f] Values with different superscripts within each column are significantly different ($p<0.01$ or $p<0.05$).

Table 2　Viability and *in vitro* development of porcine pronuclear-stage embryos cryopreserved with different concentrations of 3,3-dimethylglutaric anhydride poly-L-lysine (DMGA-PLL)[a]

Concentration of DMGA-PLL (%)	No. of embryos cryopreserved	No. (mean % ± SEM)[b] of embryos survived	No. (mean % ± SEM)[c] of embryos developed to		Mean no. ± SEM of cells in blastocysts
			≥ 2-cell (2)[d]	Blastocyst (7)[d]	
0	59	50 (84.4 ± 4.2)	18 (36.4 ± 2.5)[e]	6 (12.0 ± 3.6)[e]	38.8 ± 3.7
10	59	54 (91.4 ± 2.6)	31 (58.0 ± 4.4)[f]	15 (28.7 ± 8.2)[f]	41.3 ± 3.7
20	58	53 (91.1 ± 2.9)	28 (54.4 ± 6.2)[f]	11 (21.0 ± 1.9)[ef]	38.8 ± 2.8

[a] Experiments were repeated five times. [b] Percentage per embryos cryopreserved. [c] Percentage per embryos survived. [d] Numbers in parentheses indicate the time of examination (days of culture). [e–f] Values with different superscripts within each column are significantly different ($p<0.01$ or $p<0.05$).

濃度間で有意な差は見られなかった。卵割率は，10％区（58.0％，$p<0.01$）および20％区（54.4％，$p<0.05$）が0％区（36.4％）より有意に高くなった。胚盤胞形成率は10％区（28.7％）が０％区（12.0％）より有意に高くなった（$p<0.05$）が，20％区（21.0％）との間では有意な差は見られなかった。胚盤胞細胞数（38.8～41.3個）には，異なった濃度間で有意な差は見られなかった。

本実験の結果から，CPLLあるいはDMGA-PLLを凍結液に添加することにより，融解したブタ前核期胚の体外発生を改善し得ることが明らかになった。また，CPLLおよびDMGA-PLLのいずれにおいても，最適な添加濃度は10％であることが示された。Kamoshitaら[21]は，ブタ前核期胚の凍結保存に最適なCPLLの添加濃度は20％であると報告している。この違いは，凍結液に含まれるCPLL以外の凍害保護剤の種類や濃度の違いに起因していると思われる。Kamoshitaらが用いた凍結液には，凍害保護剤としてCPLL以外に30％エチレングリコールおよび0.5 Mスクロースが添加されていた。一方，本研究では33％エチレングリコール，２％ポリエチレングリコールおよび0.6 Mトレハロースを含む凍結液にCPLLあるいはDMGA-PLLが添加された。おそらく，Kamoshitaらの研究で用いられた凍結液と比較して，本研究で用いられた凍結液のほうが多種および高濃度の凍害保護剤を含んでいるため，CPLLの最適濃度が低くなったのだろう。

次に，CPLLおよびDMGA-PLLの凍害保護作用を直接比較するために，10％のCPLLあるいはDMGA-PLLを添加した凍結液を用いて前核期胚を凍結した。一部の胚は，それらを添加していな

© The Ito Foundation

Table 3　Viability and *in vitro* development of porcine pronuclear-stage embryos cryopreserved with 10% carboxylated poly-L-lysine（CPLL）or 10% 3,3-dimethylglutaric anhydride poly-L-lysine（DMGA-PLL）[a]

Supplement	No. of embryos cryopreserved	No.（mean % ± SEM）[b] of embryos survived	No.（mean % ± SEM）[c] of embryos developed to		Mean no. ± SEM of cells in blastocysts
			≥ 2-cell (2)[d]	Blastocyst (7)[d]	
None	77	65 (84.4 ± 1.6)	33 (51.2 ± 6.2)[e]	9 (14.1 ± 5.0)[e]	40.6 ± 4.8
CPLL	77	63 (81.8 ± 2.3)	43 (68.3 ± 2.3)[f]	23 (36.4 ± 2.5)[f]	38.5 ± 2.1
DMGA-PLL	77	66 (85.7 ± 1.4)	48 (72.8 ± 2.6)[f]	30 (45.7 ± 4.8)[f]	45.2 ± 3.1

[a] Experiments were repeated five times. [b] Percentage per embryos cryopreserved. [c] Percentage per embryos survived. [d] Numbers in parentheses indicate the time of examination（days of culture）. [e-f] Values with different superscripts within each column are significantly different（$p<0.01$ or $p<0.05$）.

い凍結液で凍結した。その結果，生存率（81.8～85.7％）には，異なった区間で有意な差は見られなかった（**Table 3**）。卵割率はCPLL区（68.3％，$p<0.05$）およびDMGA-PLL区（72.8％，$p<0.01$）が無添加区（51.2％）より有意に高くなった。同様に胚盤胞形成率も，CPLL区（36.4％）およびDMGA-PLL区（45.7％）が無添加区（14.1％）より有意に高くなった（$p<0.01$）。胚盤胞細胞数（38.5～45.2個）には，異なった区間で有意な差は見られなかった。

本実験の結果から，CPLLおよびDMGA-PLLがブタ前核期胚に対する凍害保護作用を有することが，再確認された。卵割率における有意水準は，無添加区とCPLL区の間では５％であったのに対し，無添加区とDMGA-PLL区の間では１％であった。また，有意な差はなかったものの，胚盤胞形成率および胚盤胞細胞数はいずれもCPLL区よりDMGA-PLL区のほうが大きな値になった。よって，ブタ前核期胚に対する凍害保護作用は，DMGA-PLLのほうがCPLLよりも高いと考えられた。Matsumuraら[17]は，ヒト骨髄由来間葉系幹細胞の単層およびスフェロイド状態での凍結保存における，CPLLおよびDMGA-PLLを含む各種両性高分子化合物の凍害保護作用を比較している。その結果，エチレングリコールを含む凍結液にDMGA-PLLを添加することにより，細胞毒性を低く抑えたまま冷却および融解中に生じる氷晶形成を阻害することができたので，当該化合物が最も有効な凍害保護剤であると結論付けた。このことから，ブタ前核期胚においても，CPLLよりDMGA-PLLのほうが胚に対する毒性を抑えたまま細胞質内での氷晶形成を阻害する能力が高い可能性が考えられる。その結果，細胞内小器官が受ける障害を抑制できたので，融解後の体外発生が改善されたのだろう。

最後に，DMGA-PLLを用いることにより凍結保存によって受ける障害を回避できるか確認するために，０あるいは10％のDMGA-PLLを添加した凍結液で前核期胚を凍結し，融解後の体外発生状況を凍結せずに培養した胚のそれと比較した。その結果，融解後の生存率（89.2～89.3％）は，DMGA-PLL添加の有無の影響を受けなかった。卵割率は，凍結しなかった区（77.4％）が凍結した区（０％DMGA-PLL：54.5％，$p<0.01$および10％DMGA-PLL：69.6％，$p<0.05$）より有意に高くなった（**Table 4**）。胚盤胞形成率は，凍結しなかった区（37.4％）および10％DMGA-PLLを用いて凍結した区（35.1％）がDMGA-PLLを用いずに凍結した区（16.7％）より有意に高くなった（$p<0.01$）。凍結しなかった区（37.4％）と10％DMGA-PLLを用いて凍結した区（35.1％）との間には，有意な差がなかった。胚盤胞細胞数

© The Ito Foundation

Table 4　Effects of cryopreservation with or without 10% 3,3-dimethylglutaric anhydride poly-L-lysine (DMGA- PLL) on *in vitro* development of porcine pronuclear-stage embryos[a]

Treatment	No. of embryos cultured	No. (mean % ± SEM)[b] of embryos developed to		Mean no. ± SEM of cells in blastocysts
		≥ 2-cell (2)[c]	Blastocyst (7)[c]	
None	103	80 (77.4 ± 1.9)[d]	39 (37.4 ± 2.5)[d]	43.1 ± 2.3
Cryopreservation without DMGA-PLL	65	35 (54.5 ± 5.2)[e]	11 (16.7 ± 4.1)[e]	38.2 ± 3.5
Cryopreservation with DMGA-PLL	65	45 (69.6 ± 5.0)[e]	23 (35.1 ± 5.3)[d]	39.5 ± 1.9

[a] Experiments were repeated five times. [b] Percentage per embryos cultured. [c] Numbers in parentheses indicate the time of examination (days of culture). [d-e] Values with different superscripts within each column are significantly different ($p<0.01$ or $p<0.05$).

(38.2～43.1個) には，異なった区間で有意な差は見られなかった。

本実験の結果から，DMGA-PLLを用いて凍結保存したブタ前核期胚は，凍結保存していない胚と同等の体外発生能を有していることが明らかになった。よって，DMGA-PLLを用いることにより，生存性および正常性を損なうことなくブタ前核期胚を凍結保存できることが示された。現時点では，DMGA-PLLが有する凍害保護作用のメカニズムは不明である。CPLLを添加した溶液中では，溶液粘度が増加するのに加えて，強い分子間相互作用がCPLLのガラス転移を促進し，可逆的マトリックスの隙間に水と塩を閉じ込めるとともに凍結中における細胞内氷晶の形成と浸透圧ショックを抑制する。その結果生じる細胞ストレスの低下が，凍害保護作用をもたらすと考えられている[23]。DMGA-PLLも同様の効果を持っているのかもしれない。

本研究により，DMGA-PLLを用いたブタ前核期胚の新規凍結保存技術が確立された。今後，前核期胚より凍結保存することが困難とされている，受精前のブタ卵子に対するDMGA-PLLの凍害保護作用を調べることは有益であると思われる。

4．要　約

最近，両性高分子化合物であるcarboxylated poly-L-lysine（CPLL）がブタ前核期胚の耐凍性を改善することが報告された。しかし我々のこれまでの研究は，別の両性高分子化合物である3,3-dimethylglutaric anhydride poly-L-lysine（DMGA-PLL）のほうが，ブタ生殖細胞の凍害保護剤として優れていることを示唆している。そこで本研究では，DMGA-PLLが凍結融解したブタ前核期胚の生存性および正常性に及ぼす影響について調べ，その凍害保護作用をCPLLのそれと比較した。その結果，融解した前核期胚の生存率は，凍結液中におけるCPLLおよびDMGA-PLLの有無に関わらず高かった。一方，融解した前核期胚の体外発生は，10％（v/v）のCPLLあるいはDMGA-PLLを凍結液に添加することによって改善された。また，そのような前核期胚に対する凍害保護作用は，CPLLよりもDMGA-PLLのほうが高いことが示された。さらに，DMGA-PLLを用いて凍結保存したブタ前核期胚は，凍結保存していない胚と同等の体外発生能を有していることが明らかになった。以上の結果から，DMGA-PLLを用いたブタ前核期胚の新規凍結保存技術が確立された。

文　献

1）　Vishwanath, R., Shannon, P.：*Anim. Reprod. Sci.*, **62**, 23～53, 2000.
2）　Hasler, J. F.：*Theriogenology*, **81**, 152～169, 2014.

© The Ito Foundation

3） Johnson, L. A., Aalbers, J. G., Arts, J. A. M.：*J. Anim. Sci.*, **54**, 126～131, 1982.
4） Wilmut, I.：*J. Reprod. Fertil.*, **31**, 513～514, 1974.
5） Jiang, G., Bi, K., Tang, T., Wang, J., Zhang, Y., Zhang, W., Ren, H., Bai, H., Wang, Y.：*Int. Immunopharmacol.*, **6**, 1204～1213, 2006.
6） Young, D. A., Gavrilov, S., Pennington, C. J., Nuttall, R. K., Edwards, D. R., Kitsis, R. N., Clark, I. M.：*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **322**, 759～765, 2004.
7） Fuller, B. J.：*Cryo. Lett.*, **25**, 375～388, 2004.
8） Saragusty, J., Arav, A.：*Reproduction*, **141**, 1～19, 2011.
9） Kono, T., Suzuki, O., Tsunoda, Y.：*Cryobiology*, **25**, 170～173, 1988.
10） Smorag, Z., Gajda, B., Wieczorek, B., Jura, J.：*Theriogenology*, **31**, 1227～1231, 1989.
11） Matsumura, K., Hyon, S. H.：*Biomaterials*, **30**, 4842～4849, 2009.
12） Fujikawa, T., Imamura, S., Tokumaru, M., Ando, T., Gen, Y., Hyon, S. H., Kubota, C.：*Cryobiology*, **82**, 159～162, 2018.
13） Tariq, A., Ahmad, M., Iqbal, S., Riaz, M. I., Tahir, M. Z., Ghafoor, A., Riaz, A.：*Theriogenology*, **144**, 8～15, 2020.
14） Küçük, N., Raza, S., Matsumura, K., Uçan, U., Serin, İ., Ceylan, A., Aksoy, M.：*Cryobiology*, **102**, 127～132, 2021.
15） Takeuchi, H., Nishioka, M., Maezawa, T., Kitano, Y., Terada-Yoshikawa, K., Tachibana, R., Kato, M., Hyon, S. H., Gen, Y., Tanaka, K., Toriyabe, K., Nii, M., Kondo, E., Ikeda, T.：*Cells*, **10**, 1435, 2021.
16） Jin, H., Choi, W., Matsumura, K., Hyon, S. H., Gen, Y., Hayashi, M., Kawabata, T., Ijiri, M., Miyoshi, K.：*J. Reprod. Dev.*, **68**, 312～317, 2022.
17） Matsumura, K., Hatakeyama, S., Naka, T., Ueda, H., Rajan, R., Tanaka, D., Hyon, S. H.：*Biomacromolecules*, **21**, 3017～3025, 2020.
18） Jin, H., Choi, W., Matsumura, K., Hyon, S. H., Gen, Y., Hayashi, M., Kawabata, T., Ijiri, M., Miyoshi, K.：*Anim. Sci. J.*, **94**, e13821, 2023.
19） Brinster, R. L., Chen, H. Y., Trumbauer, M. E., Avarbock, M. R.：*Nature*, **283**, 499～501, 1980.
20） Ran, F. A., Hsu, P. D., Lin, C. Y., Gootenberg, J. S., Konermann, S., Trevino, A. E., Scott, D. A., Inoue, A., Matoba, S., Zhang, Y., Zhang, F.：*Cell*, **154**, 1380～1389, 2013.
21） Kamoshita, M., Kato, T., Fujikawa, K., Namiki, T., Matsumura, K., Hyon, S. H., Ito, J., Kashiwazaki, N.：*PLoS One*, **12**, e0176711, 2017.
22） Sato, K., Yoshida, M., Miyoshi, K.：*Mol. Reprod. Dev.*, **72**, 396～403, 2005.
23） Matsumura, K., Hayashi, F., Nagashima, T., Rajan, R., Hyon, S. H.：*Commun. Mater.*, **2**, 15, 2021.

© The Ito Foundation

バッテリレス耳標センサーの山羊繁殖管理への利用

Use of batteryless ear tag sensors for goat breeding management

安村　陸[1]・滝口　収[2]・金谷　晴一[3]

（[1]沖縄県農林水産部畜産研究センター，[2]アルセンス株式会社，[3]九州大学大学院システム情報科学研究院）

[1]Riku Yasumura, [2]Osamu Takiguchi and [3]Haruichi Kanaya

([1]Okinawa Prefectural Livestock and Grassland Research Center, [2]ALSENS Inc,
[3]Graduate School of Information Science and Electrical Engineering, Kyushu University)

In this study, we investigated the accuracy of ear tag sensors in goats, as well as temperature fluctuations before and after parturition, with the aim of improving the efficiency of goat breeding technology using ICT. Correlation analysis of the readings from thermometers and ear tag sensor revealed a strong correlation in breeding season and a moderate correlation in calving season. In addition, as a result of measuring the goat's body temperature before and after estrus with an ear tag sensor, it was found that the body temperature decreased from 3 days before estrus. Moreover, after rising on the day of estrus, and after 2 days after estrus, the body temperature remained at normal temperature fluctuation. In addition, when we examined the difference between the same time average value and the measured value of the temperature for the previous 3 days before and after estrus in goats, we found that there was a difference of more than 1 ℃ before and after estrus, therefore, ear tag sensor is effective for detecting estrus in goats. Furthermore, when we measured the surface temperature of the goat's auricle before and after parturition, it decreased the day before parturition, tended to rise from the day of parturition until just before parturition, and then rapidly decreased after parturition. One day after delivery, there was an upward trend again, and after two days, the values mostly remained higher than the average value. These results revealed the accuracy of the ear tag sensor and changes in the surface temperature of the auricle during the breeding and calving seasons of goats, suggesting that the ear tag sensor may be useful for detecting heat in goats.

1．目　的

沖縄県では，伝統的な食文化として山羊肉を食べる習慣がある[1)]ことから，古くより山羊肉の需要は多い。近年は海外からの観光客向けのハラルフードとして，全国的にも山羊肉の需要が高まっているが，国内消費のほとんどが輸入肉である[2)]ことから，需要に対し供給が不足している状況にある。これらのことから，生産規模の拡大に向けた肉用山羊の多頭飼育技術の確立が求められている。

肉用山羊の多頭飼育では，発情や分娩兆候の発

© The Ito Foundation

見が重要であり，熟練の技術が必要とされる。同じ反芻動物である肉用牛の発情や分娩兆候の発見においては，基本的な生理的パラメーターである体温変化を確認することが有効であるとされている[3, 4]が，直腸温度の定期的な測定は手間がかかることから，リモートセンサーを活用した「牛温恵」や「牛歩」などの製品が開発され利用されている。さらに，耳に耳標型のセンサーを装着することにより牛をセンシングする技術も開発されており[5]，これらのICTを活用した繁殖管理は同じ反芻動物である山羊においても応用できる可能性がある。

そこで本研究では，開発中の山羊用耳標センサーを用いて，山羊の発情・分娩兆候と体温変動の関係性について検討した。

2．方　　法

2.1　耳標センサーの装着

測定部位は耳介表面とし，測定には開発中の山羊用耳標センサーを用いた。耳標センサーは太陽電池を搭載しているため充電は不要であるが，太陽光のない夜間は測定値が安定しないことから，測定は日中の時間帯とした。測定されたデータは自動で山羊舎に設置されている端末を介しネットワーク上に保存される仕様とし（**Fig. 1**），測定頻度は10～30分，温度精度は±0.7℃とした。耳標センサーは山羊用のアプリケーターおよびイヤータグにより装着した。耳標センサーを装着する期間について，発情時期は各個体の最初の発情確認日から起算し約７週間とし，分娩時期は分娩

Fig. 1　Overview of Ear Tag Sensors

© The Ito Foundation

前後の約２週間とした。

2.2　耳標センサーと体温計の相関性

山羊の発情時期や分娩時期における耳標センサーの精度を明らかにするため，それぞれの時期で耳標センサーにおける耳介温度と体温計における直腸温度の測定値の相関性を検討した。直腸温度の測定は動物用体温計（Sunnav社製）を用いて朝と夕の１日２回測定し，耳標センサーの測定値は直腸温度を測定した時刻と同じ時間帯における数値から近い値を抽出し用いた。

発情時期の調査期間は2023年８月～９月とし，供試動物として経産山羊３頭（交雑種）を用いた。分娩時期の調査期間は2024年３月とし，供試動物として経産山羊３頭（交雑種１頭，ボア種２頭）を用いた。

2.3　山羊の発情前後における体温変動

調査期間は2023年８月～11月とし，耳標センサーによる測定の時間帯は８時から18時までとした。供試動物としてザーネン種１頭，ボア種２頭，交雑種５頭の計８頭の経産山羊を用いて実施した。発情日を０日とし，前後５日間における耳介温度を耳標センサーにより測定することで，発情前後の体温変動を調査した。また，発情検知への有効性を検討するため，発情前後５日間において，前３日間の同時刻平均値と測定値の差を算出した。

2.4　山羊の分娩前後の体温変動

調査期間は2023年11月および2024年３月とし，耳標センサーによる測定の時間帯は８時から16時までとした。供試動物としてボア１頭，交雑種４頭の計５頭の経産山羊を用いて実施した。分娩日を０日とし，前後５日間における耳介温度を耳標センサーにより測定することで，分娩前後の体温変動について検討した。なお，本研究は沖縄県畜産研究センター実験等委員会の承認を受け，畜産研究センター内の山羊舎にて行った。

３．結果と考察

3.1　耳標センサーの装着

開発中の山羊用耳標センサーを山羊の耳介に装着し表面温度を測定したところ，最大で２ヵ月間安定的に測定可能であることが確認された。しかしながら，一定期間以上装着し続けると，耳標センサーの重みにより装着部位周辺の壊死が認められたため，今後は長期間の装着を想定し軽量化を図る必要がある。

また，耳標センサーの測定温度の範囲について，低い個体では33.5～36.9℃，高い個体では36.2～38.3℃と個体ごとのばらつきが認められたが，品種ごとに耳の形状が違ったことが影響したと考えられる。ザーネン種は耳が短く直立しているため耳標センサーは常に剥き出しになっているが，ボア種および交雑種は耳が長く垂れ下がる特徴から，耳標センサーが耳に覆われている。そのため，耳介の表面温度に大きな差が生じた可能性がある。

3.2　耳標センサーと体温計の相関性

耳標センサーと体温計の平均値および相関係数を**Table 1** に，耳標センサーと体温計の相関を**Fig. 2** に示した。2023年８月～９月の発情時期における耳標センサーおよび体温計の平均値は，それぞれ36.5℃，39.1℃であり，差は2.6℃であった。相関係数は0.79と強い相関が認められたことから，山羊の発情時期においては高い精度で耳標センサーが活用できる可能性が示唆された。2024年３月の分娩時期における耳標センサーおよび体温計の平均値は，それぞれ35.2℃，39.1℃であり，差は3.9℃と発情時期より大きく，相関係数は0.63であった。発情時期と比較し平均値や相関係数に差が認められた要因として，環境温度が影響した可能性がある。肉用牛では，耳根部の表面温度が外気温の影響を著しく受けることが知られており[6]，さらに膣内と外耳道の相関においては，秋

© The Ito Foundation

Table 1　Average and correlation coefficient between ear tag sensor and thermometer

Season	Estrus (August and September2023)	Parturition (March 2024)
Ear tag sensor（℃）	36.5 ± 0.8	35.2 ± 1.4
Thermometer（℃）	39.1 ± 0.3	39.1 ± 0.4
Difference（℃）	2.6	3.9
Correlation coefficient	0.79	0.63

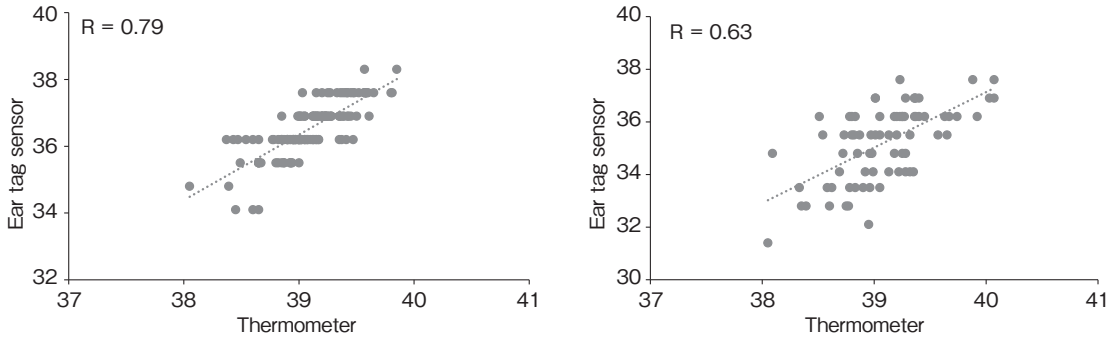


Fig. 2　Correlation between ear tag sensor and thermometer during estrus period（A）and parturition period（B）

期が0.78～0.95と高いものの冬期は－0.15と相関関係がなくなることが明らかにされている[7]。本研究では肉用牛の事例ほど顕著な差は認められなかったものの，３月は８月～９月と比較し外気温が低下することから，その影響を受けた可能性がある。しかしながら，３月においても0.63と中適度の相関が認められたことから，分娩時期にも耳標センサーの活用が期待できると考えられる。

3.3　山羊の発情前後における体温変動

供試山羊８頭のうち，８月に３頭，９月に４頭，10月に１頭の発情開始を確認した。

発情前後５日間における供試山羊８頭の平均値を**Fig. 3** に示した。発情前後における耳標センサーの平均値は36.3℃であり，35.3～37.2℃の範囲で推移した。発情の３日前は平均値より低い35.3～36.1℃の範囲で推移したものの，発情日には最大で37.2℃まで上昇し，その後は平常時に近い範囲で推移した。肉用牛の発情前後の体温変動では，発情の２日前より体温が低下し，発情日に体温が上昇するものの，発情後に再度体温が低下することが明らかになっている[8]。山羊では，発情前の体温の低下，発情日の体温の上昇は確認したものの，肉用牛のような発情後の体温の低下は，群においては確認できなかった。しかしながら，個体ごとの測定値にて発情後に体温が低下する傾向にある山羊が複数存在したことから，今後耳標センサーとあわせて直腸温度での体温変動を調査することで，牛と同様の体温の変化が認められる可能性がある。

吉岡ら[9]は，牛の体温は外的要因の影響を受けるため発情に伴う変動のみを抽出することは難しいとしており，前３日間の同時刻平均値と体温の差を発情検知に用いる手法を開発している。本研究において，牛と同様に前３日間の同時刻平均値と測定値との差を算出したところ，発情の２日前に－0.55に下降後，発情日に0.99まで上昇したことを確認した（**Fig. 4**）。発情前後で１℃以上の差が認められたことから，耳標センサーは外気温などの外的要因の影響を受けることなく山羊の発情検知に活用できる可能性が示唆された。

© The Ito Foundation

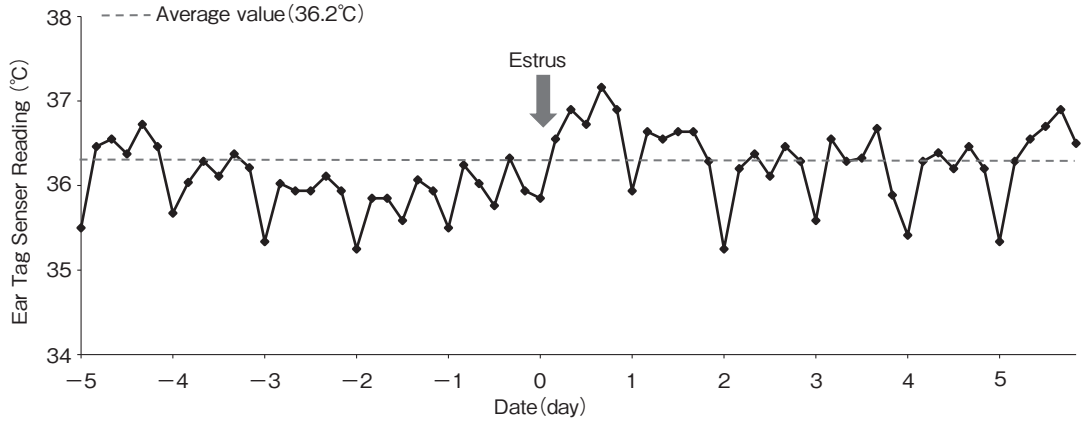


Fig. 3　Average temperature of 8 goats tested 5 days before and after estrus (Displayed every 2 hours from 8：00 to 18：00 per day)

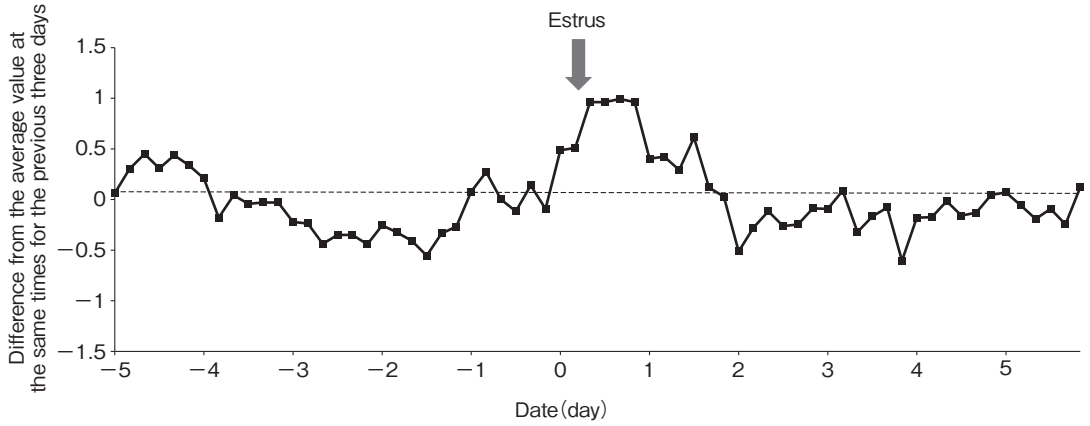


Fig. 4　Difference between the average value at the same time for the previous three days and the surface temperature of the auricle

3.4　山羊の分娩前後における体温変動

供試山羊５頭のうち４頭は11月の下旬に，１頭は３月の初旬に分娩した。なお，11月に分娩した４頭はホルモン処置による季節外繁殖であり，通常の山羊の分娩時期は３月頃とされる[10]。

供試山羊５頭の分娩前後５日間における耳標センサーの測定値を**Fig. 5** に示した。分娩前後における耳標センサーの測定値は平均して34.6℃と発情前後より低い傾向にあったが，これは季節の変動による環境温度低下の影響を受けたと考えられる。分娩前後の体温変動について，分娩の２～３日前までは平均より高い傾向にあったが，分娩の１日前には平均以下で推移し，最低で33.3℃まで低下した。その後，分娩日の朝から分娩直前にかけて上昇するものの，分娩直後に急激に低下することが確認された。分娩から１日後には上昇傾向が見られ，２日後以降は平均値より高い値で推移する傾向が認められた。牛においては，分娩前日に体温が0.4℃低下することが確認されている[11]が，体温は変動幅が小さく分娩予知の的中確率が低いことから，体温変動以外の総合的評価から分娩を予測するべきとされている[12]。そのため，牛の分娩予知は，膣内に挿入したモジュールが破水により体外に押し出されることで温度変化を検知

© The Ito Foundation

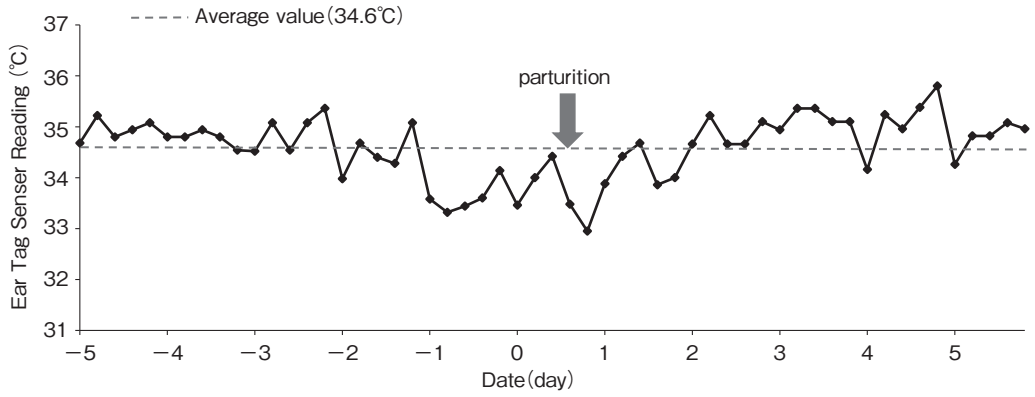


Fig. 5　Average temperature of the auricle surface of 5 goats for 5 days before and after parturition (Displayed every 2 hours from 8:00 to 16：00 per day)

するシステムが主流である。本研究における分娩１～２日前の測定値の変動幅は33.3～35.1℃と最大で1.8℃の差が認められたことから，耳標センサーにより分娩を検知できる可能性があるものの，皮膚温は外気温の影響を受けやすいため，さらなる検証が必要である。今後は供試頭数を増やし，環境温度との差などを調査していくことで，分娩前後における耳標センサーの精度や安定性について引き続き検討する。また本研究では，分娩直後に耳介の表面温度が急激に低下する牛では見られない体温変動が確認されたが，今後耳標センサーとあわせて分娩前後に直腸温度を継続的に測定することで，体温が分娩直後に急激に低下するかを確認する必要がある。

４．要　　約

本研究では，ICTを活用した山羊繁殖技術の効率化を目的に，山羊における耳標センサーの精度や発情および分娩前後の体温変動について検討した。体温計と耳標センサーの測定値を相関分析した結果，繁殖時期は強い相関が，分娩時期は中適度の相関が認められた。

耳標センサーにより山羊の発情前後の耳介の表面温度を測定した結果，発情の３日前より体温が低下し，発情日に体温が上昇後，発情の２日後には平常に近い範囲で推移した。さらに，山羊の発情前後における前３日間の同時刻平均値と測定値の差について検討したところ，発情前後で１℃以上の差が認められたことから，耳標センサーが山羊の発情検知に活用できる可能性が示唆された。

耳標センサーにより山羊の分娩前後の耳介の表面温度を測定した結果，分娩の前日に低下し，分娩日から分娩直前まで上昇傾向にあるものの，分娩直後に急激に低下し，その後平均値より高い範囲で推移する傾向があった。

以上のことから，山羊の繁殖および分娩時期における耳標センサーの精度や耳介の表面温度の変動が明らかになり，耳標センサーが山羊の発情検知に活用できる可能性が示唆された。

文　　献

１）　平川宗隆：沖縄のヤギ文化誌，（有）ボーダーインク，那覇市, 16～24, 2003.
２）　農林水産省畜産局畜産振興課：めん羊・山羊をめぐる情勢，2022.（https://www.maff.go.jp/j/chikusan/kikaku/tikusan_sogo/attach/pdf/sonota-11.pdf）
３）　三浦雅史，阪谷美樹，松山秀一，中村翔：牛尾部腹側体表温の測定に基づく分娩予知技術（https://www.naro.go.jp/project/results/4th_laboratory/nilgs/2019/nilgs19_s04.html）
４）　阪谷美樹：ウシ腟温度変化は黄体の状態と発情強

© The Ito Foundation

度とに関連がある，畜産技術, **6**, 6〜9, 2017.
5） 滝口収，金谷晴一：耳標に貼り付けたセンサーから牛をセンシングする技術を開発, 2021.（https://www.kyushu-u.ac.jp/f/43181/21_04_01_03.pdf）
6） 大井澄夫，岡部利雄：家畜の皮膚表面温度に関する研究，日本畜産学会誌報, **29**, 151〜156, 1958.
7） 武石秀一，井上一之，木下正徳，松井英徳，野々下雅彦，石田睦夫，池田哲，佐藤哲哉，小田原幸夫，利光政彦：牛体温の常時監視システムの開発，大分県産業科学センター平成17年試験成績報告書, **35**, 47, 2006.
8） 伊藤隆，小番真姫子：肉用牛の発情における体温変動，東北農業研究所, **52**, 129〜130, 1999.
9） 吉岡耕治，檜垣彰吾，岡田浩尚，三浦亮太朗：体表温の変動から牛の発情を検知する，臨床獣医, **38**, 81〜86, 2017.
10） 中西良孝：めん羊・山羊技術ハンドブック，社団法人畜産技術協会，東京都, 139，2005.
11） 籠橋太史，壁谷昌彦，矢内伸佳，阿部正彦，小林寛：乳牛の分娩前体表温の変化，東北農業研究, **53**, 115〜116, 2000.
12） 南橋昭，清家昇，本間正俊，石川和也，牧方末雄，堂地修，陰山聡一，森安悟，澤井健，平山博樹，山本祐介：ウシの分娩開始を報知する装置の性能評価，北海道畜産試験場研究報告, **26**, 34〜37, 2007.

© 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（Ⅱ）

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

大　滝　忠　利

（日本大学生物資源科学部獣医学科獣医臨床繁殖学研究室）

Tadatoshi Ohtaki

（Laboratory of Theriogenology, Department of Veterinary Medicine, College of Bioresource Sciences, Nihon University）

Eleven dairy cows were divided into six control groups and five Urso groups, and both groups were given high-concentrate feed for 28 days. During this period, the Urso group was orally administered 30 g of the UDCA preparation every morning, and the control group was not administered. Blood was collected once a week and acute phase proteins and inflammatory cytokines were measured. In addition, rumen fluid collection, endometrial cytology, and endometrial and liver tissue biopsies were performed before and after the procedure. We performed rumen LPS measurement, rumen microbiota analysis, PMN% calculation, and analysis of inflammatory cytokine mRNA gene expression in the endometrium and liver. Due to high-concentrate feed feeding, a decrease in rumen pH and an increase in LPS were observed in both groups, and an increase in acute phase proteins and inflammatory cytokines was observed in the control group, but not in the Urso group. The α-diversity of the ruminal microbiota decreased in the control group, and no significant difference was observed in the Urso group. The expression level of TNF-α mRNA in the endometrium and the expression level of LBP mRNA in the liver increased after high-concentrate feed treatment in the control group, but no increase was observed in the Urso group.

1．目　　的

乳牛への濃厚飼料の多給は，ルーメン内pHの低下により亜急性ルーメンアシドーシス（SARA）を引き起こす。このSARAに伴いルーメン内細菌叢が変化し，グラム陰性菌が死滅することで菌体成分であるエンドトキシン（リポポリサッカライド：LPS）がルーメン液に多量に遊離および放出される[1)]。ルーメンLPSは主に第一胃壁に吸収され，次に第一胃静脈に入り，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と考えられている[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。我々の研究で，濃厚飼料の多給によるルーメン内LPS濃度上昇が急性期たんぱく質（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ことが明らかになっている[6)]。

© The Ito Foundation

一方，ウルソデオキシコール酸（UDCA）は，肝細胞における抗炎症作用[7, 8]や，界面活性作用によるLPS弱毒化[9]に関する報告がされていることから，濃厚飼料多給による乳牛の生産性低下に対する予防的治療薬としての効果が期待される。そこで本研究では，乳牛への濃厚飼料多給が，ルーメン内細菌叢，肝臓，そして子宮に及ぼす影響を調査するとともに，濃厚飼料多給に対するUDCAの投与効果を評価した。

2．方　法

2.1　供試動物

ホルスタイン種乳牛11頭を使用した。群分けは，対照群６頭，ウルソ群５頭とした。すべての実験は，日本大学動物実験実施規程に基づき実施した（AP20BRS047-3）。

2.2　飼養管理

対照群，ウルソ群ともに濃厚飼料多給処置を行った。濃厚飼料はトウモロコシ，大豆粕を使用し，粗飼料はチモシーを使用した。day0からday28の28日間で濃厚飼料割合を60％から80％へ段階的に増加させた。濃厚飼料多給処置と同時に，ウルソ群には毎朝UDCA製剤（ウルソ®－10％，物産アニマルヘルス（株），東京，日本）30 gを経口投与し，対照群は非投与とした。給餌は朝８時と夕方16時の１日２回で，自由飲水とし，飼料設計はNutrient requirements of Dairy Cattle[10]に基づき決定した。

2.3　サンプリング

day －7，0，7，14，21，28に血液を採取し，血清を測定まで－30℃で保存した。また，day0および28に朝の給餌から３時間後に14G留置針の内針（全薬動物用留置針，日本全薬工業（株），福島）を用いて経皮的左腰部直接穿刺によりルーメン液採取を行った。さらに，day0および28に子宮内膜細胞診，子宮内膜バイオプシー，肝臓バイオプシーを実施した。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（Diff-Quik，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。子宮内膜バイオプシーは，子宮内膜組織採取器（富士平工業，東京，日本）により，肝臓バイオプシーは肝臓組織採取器（富士平工業，東京，日本）により実施した[11]。採取した子宮内膜および肝臓組織は，RNAレーター（Thermo Fisher Scientific， Waltham， MA，USA）に浸漬し，24時間以上4℃で冷蔵保存し，その後，新しいマイクロチューブに移してRNAの抽出まで－80℃で冷凍保存した。

2.4　測定項目

2.4.1　ルーメンpHおよびLPS

ルーメン液はpHメーターにより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による前処理を行った[12]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。

2.4.2　血中急性期たんぱく質および炎症性サイトカイン

急性期たんぱく質として，SAAおよびHpを，炎症性サイトカインとして腫瘍壊死因子－α（TNF-α）およびインターロイキン-6（IL-6）を測定した。ハプトグロビン（Hp）濃度は，中村ら[13]の方法により測定した。また，市販のキットを使用して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。

© The Ito Foundation

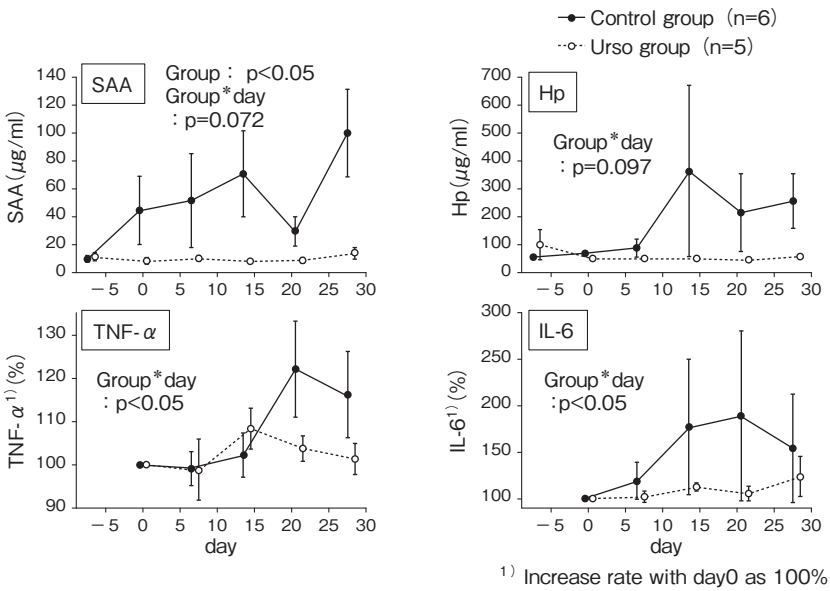


Fig. 1　Changes in acute-phase proteins and inflammatory cytokines after high-feed concentrate feeding

2.4.3　細菌叢解析

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領域を増幅するため，ユニバーサルプライマーであるBakt_341FおよびBakt_805Rを用いた。増幅産物は精製後にNextera XT Index Kit（Illumina, San Diego, Ca, USA）を用いてライブラリー構築し，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。

2.4.4　リアルタイムPCR

子宮内膜および肝臓組織からRNA抽出キット（NucleoSpin® RNA，Macherey-nagel，Duren，Germany）を用い，total RNAを抽出した。PrimeScript™ RT Master Mix（タカラバイオ，滋賀，日本）を用いて逆転写反応を行い，cDNAを合成した。その後，TB Green Premix Ex Taq Ⅱ（タカラバイオ，滋賀，日本）およびThermal Cycler Dice Real Time System Ⅲ（タカラバイオ，滋賀，日本）を用いて，リアルタイムPCRにより，LPS結合たんぱく質（LBP），TNF-α，IL-6のmRNA発現量を測定した。各種mRNAの発現量はβactinの発現量を内部標準として補正し，⊿⊿CT法を用いて解析項目ごとにmRNAの相対発現量を算出し，さらにday0を1としたときのday28日の相対発現量を比較した。

3．結果と考察

濃厚飼料多給処置により，ルーメンpHは対照群で6.54から6.19，ウルソ群で6.76から6.23に低下し，ルーメン内LPS濃度は対照群で27,241 EU/mlから50,541 EU/ml，ウルソ群で28,193 EU/mlから44,432 EU/mlに上昇したが，群間における有意差は認められなかった。

対照群とウルソ群のSAA，Hp，TNF-α，IL-6の推移を**Fig. 1**に示した。TNF-αおよびIL-6は，個体によるベースラインが大きく異なっていたため，day0を100％としたときの増加率で示した。day0からday28にかけて対照群では

© The Ito Foundation

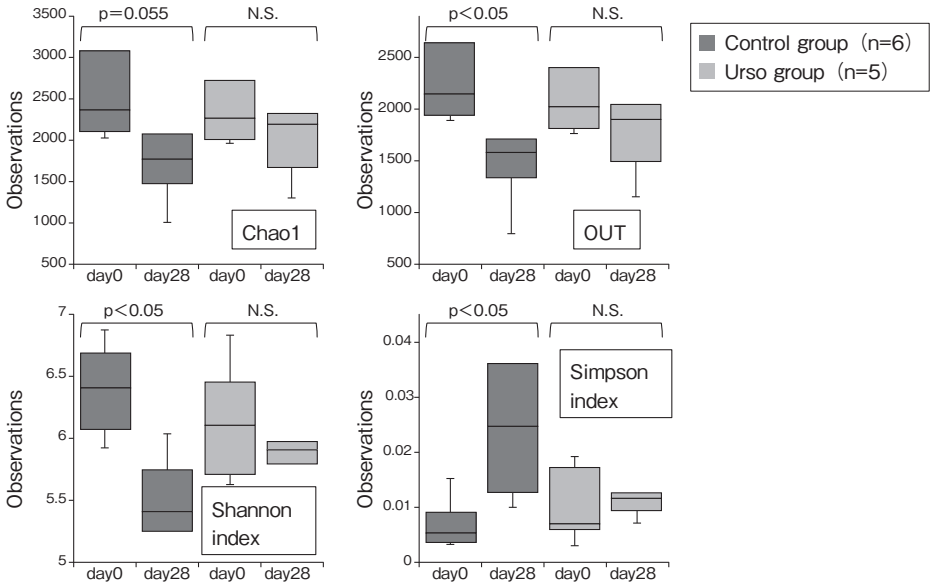


Fig. 2　α-diversity of ruminal microbiota

SAA，HpおよびTNF-α，IL-6が上昇したが，ウルソ群ではSAA，Hp，IL-6は低値のまま推移し，TNF-αの上昇は低かった。

day0とday28におけるルーメン内細菌叢のα多様性について，対照群とウルソ群の結果を**Fig. 2**に示した。濃厚飼料多給処置により，Chao1，OTU数は対照群で低下，Shannon Indexは対照群で低下，Simpson Indexは対照群で上昇し，ウルソ群ではいずれの指標も有意差を認めなかった。すなわち，濃厚飼料多給処置により，対照群では希少な種類の減少と主要な種類の均等度増加を認め，多様性は低下した。ウルソ群では，種数と均等度に著変を認めず，多様性が維持された。処置の前後におけるβ多様性は，対照群で有意差（p<0.01）を認め，ウルソ群で傾向（p=0.06）を認めた。すなわち，対照群ではルーメン内細菌叢の組成が濃厚飼料多給により有意に変化したが，UDCA投与によりそれらは緩和されたと考えられた。day0およびday28における子宮内膜細胞診によるPMN％を**Fig. 3**に示した。濃厚飼料多給後のPMN％は，ウルソ群に比べ対照群で上昇する個体が多かった。

子宮内膜および肝臓組織のmRNA発現量の解析結果を**Fig. 4**に示した。子宮内膜のTNF-α mRNA発現量と肝臓のLBP mRNA発現量は対照群で濃厚飼料多給処置後に上昇したが，ウルソ群では上昇が認められなかった。IL-6 mRNA発現量には両群間での差は認められなかった。

本研究では，濃厚飼料多給処置により，対照群とウルソ群ともに同程度のルーメン内LPS上昇とpH低下を認めたが，炎症反応においては群間で異なる結果が得られた。Gozhoら[14]は，濃厚飼料を多給した乳牛においてルーメン内LPS，血中SAA，Hp濃度が上昇することを報告しており，本研究の対照群での結果と一致した。また，濃厚飼料を多給した乳牛では，血中LPSおよび炎症性サイトカイン濃度上昇と，子宮の炎症性サイトカインのmRNA発現レベルの上昇を認め，循環血中LPSが子宮の炎症反応を引き起こすことが報告されている[15]。血中LPSと子宮の炎症反応の間には，LPSの解毒を担う肝臓が深く関与すると考えられる。代謝および解毒作用に関して，肝細胞内

© The Ito Foundation

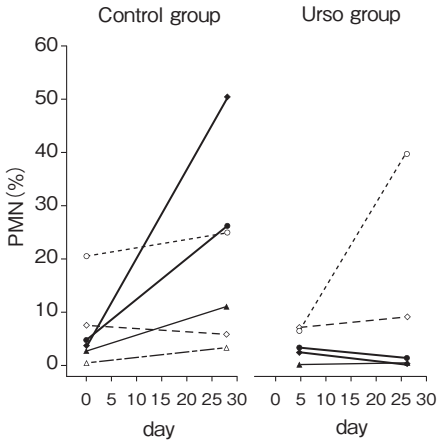


Fig. 3　Changes in PMN% after high-feed concentrate feeding

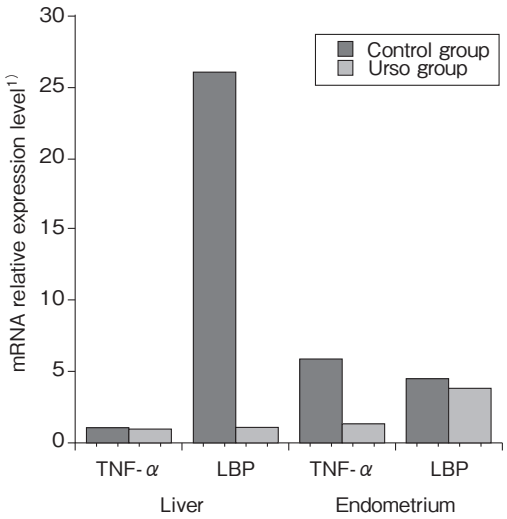


Fig. 4　Relative expression levels of TNF-α and LBP mRNA in the liver and endometrium on day28
[1)]Relative expression level when day0 is set to 1 using β-actin as an internal standard.

の胆汁酸や内因性毒性物質を細胞外：胆管腔内へ排出するためのトランスポーターとして，胆汁酸塩輸出ポンプ（Bsep）や多剤耐性たんぱく質２（Mrp2）が知られる[16)]。LPSは，BsepとMrp2の発現および局在を障害する[17, 18)]。また，UDCAが界面活性作用によってLPSを取り囲んでミセル化し，LPSを消化管内にとどめることで血中LPSの上昇と炎症メディエーターの放出を防ぐこと[19)]，LPS自体がSARAの要因となる乳酸産生菌の発育を促進することが報告[20)]されており，本研究の結果からも経口投与されたUDCAがルーメン内LPSを弱毒化し，細菌叢の変化に影響を与えた可能性が示唆された。LPS誘発性急性肝障害モデルマウスにおいて，UDCA投与により肝組織のTNF-αやIL-6のmRNA発現レベルが低下することが報告されている[21)]。さらにUDCAは，BsepおよびMrp2の合成，活性化の促進により肝細胞を保護する作用がある[22)]。すなわち，UDCAとLPSは肝細胞膜において同様のトランスポーターをターゲットとしており，これはUDCAが乳牛の濃厚飼

© The Ito Foundation

料多給に効果を示す根拠の一つになり得る。

濃厚飼料多給による繁殖成績低下には，LPSによる肝臓および子宮への炎症波及やルーメン内細菌叢の多様性低下が関与している可能性が示唆され，これらはUDCAの経口，継続投与により改善されることが明らかとなった。今後は，採取された肝臓組織を用いてBsepとMrp2の局在を実施し，さらに精査を行う予定である。

4．要　約

乳牛11頭を対照群６頭，ウルソ群５頭に群分けし，両群に28日間かけて濃厚飼料多給処置を行った。この間，ウルソ群には毎朝UDCA製剤30gを経口投与し，対照群は非投与とした。週１回の採血を行い，急性期たんぱく質，炎症性サイトカインの測定を行った。また，処置の前後にルーメン液採取，子宮内膜細胞診，子宮内膜および肝臓組織の生検を行い，ルーメン内LPS測定，ルーメン内細菌叢解析，PMN％の算出，子宮内膜および肝臓の炎症性サイトカインmRNA遺伝子発現の解析を行った。濃厚飼料多給により，両群でルーメン内のpH低下とLPS上昇を認め，対照群では急性期たんぱく質と炎症性サイトカインの上昇を認めたが，ウルソ群ではこれらを認めなかった。ルーメン内細菌叢は対照群でα多様性が低下し，ウルソ群では有意差を認めなかった。子宮内膜のTNF-α mRNA発現量と肝臓のLBP mRNA発現量は対照群で濃厚飼料多給処置後に上昇したが，ウルソ群では上昇が認められなかった。

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., Viguié, 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） Joo, S. S., Kang, H. C., Won, T. J., Lee, D. I.：*Arch. Pharm. Res.*, **26**, 1067～1073, 2003.
8） Ko, W. K., Lee, S. H., Kim, S. J., Jo, M. J., Kumar, H., Han. I. B., Sohn, S.：*PLoS One*, **12**, e0180673, 2017.
9） Haehling S. V., Schefold, J. C., Jankowska, E. A., Springer, J., Vazir, A., Kalra, P. R., Sandek, A., Fauler, G., Stojakovic, T., Trauner, M., Ponikowski, P., Volk, H. D., Doehner, W., Coats, A. J. S., Wilson, P. A. P., Anker, S. D.：*J. Am. Coll. Cardiol.*, **59**, 585～592, 2012.
10） National Research Council. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th ed., Natl. Acad. Sci., Washington, D.C. 2001.
11） Ono, M., Ohtaki, T., Tanemura, K., Ishii, M., Watanabe, G., Taya, K., Tsumagari, S.：*J. Vet. Med. Sci.*, **73**, 1145～1149, 2011.
12） Petsch, D., Deckwer, W. D., Anspach, F. B.：*Anal. Biochem.*, **259**, 42～47, 1998.
13） 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**, 682～688, 2012.
14） Gozho, G. N., Plaizier, J. C., Krause, D. O., Kennedy, A. D., Wittenberg, K. M.：*J. Dairy Sci.*, **88**, 1399～1403, 2005.
15） Bilal, M. S., Abaker, J. A., Aabdin, Z. U., Xu, T., Dai, H., Zhang, K., Liu, X., Shen, X.：*BMC Vet. Res.*, **12**, 284, 2016.
16） 前田和哉：日薬理誌, **135**, 76～79, 2010.
17） Elferink, M. G. L., Olinga, P., Draaisma, A. L., Merema, M. T., Faber, K. N., Slooff, M. J. H., Meijer, D. K. F., Groothuis, G. M. M.：*Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **287**, G1008-16, 2004.
18） Zinchuk, V., Zinchuk, O., Okada, T.：*Microsc. Res. Tech.*, **67**, 65～70, 2005.
19） Haehling, S. V., Schefold, J. C., Jankowska, E. A., Springer, J., Vazir, A., Kalra, P. R., Sandek, A., Fauler, G., Stojakovic, T., Trauner, M., Ponikowski, P., Volk, H. D., Doehner, W., Coats, A. J. S., Wilson, P. A. P., Anker, S. D.：*J. Am. Coll. Cardiol.*, **59**, 585～592, 2012.
20） Dai, X., Hackmann, T. J., Lobo, R. R., Faciola, A. P.：*Appl. Environ. Microbiol.*, **86**, e02193-19, 2020.
21） Ludwig, J. M., Zhang, Y., Chamulitrat, W., Stremmel, W., Pathil, A.：*PLoS One*, **13**, e0197836, 2018.
22） Paumgartner, G., Beuers, U.：*Hepatology*, **36**, 525～531, 2002.

© The Ito Foundation

多機能尾部センサを用いたタイストール飼育下における泌乳牛の発情検知

Estrus detection in tie-stall housed lactating cows using a multimodal tail sensor

吉 岡 耕 治[1]・尾 澤 知 美[2]

([1]麻布大学獣医学部, [2]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)

Koji Yoshioka[1] and Tomomi Ozawa[2]

([1]School of Veterinary Medicine, Azabu University, [2]National Institute of Animal Health, NARO)

In this study, we investigated the detection of estrus in tie-stall housed lactating cows on a dairy farm using our previously developed a multimodal tail-attached device. The tail-attached device equipped with thermistor and 3-axis accelerometer can monitor physiological (surface temperature : ST) and behavioral (activity intensity, standing/lying time, and posture changes) parameters simultaneously. Sensor data were collected from a total of 43 lactating cows (76 cases) throughout the estrous cycle and 55 of the 76 cases (33 animals) with the tail-attached devices were also fitted with commercially available neck-mounted accelerometer. The results showed that residual ST, ratios of activity intensity and lying time changed significantly on the day of estrus compared to the non-estrous period (n=44). These changes were similar to those in non-lactating cows previously investigated, indicating that both physiological and behavioral changes associated with estrus can be detected in tie-stall housed lactating cows by using a multimodal tail-attached device. Two machine leaning models based on the sensor data were constructed for estrus detection using 25 datasets (training data) from non-lactating cows. One estrus detection algorithm (support vector machine : SVM) has been developed previously and other (random forest : RF) has been improved robustness of the model. In RF model, machine learning platform to analyze sensor data on the cloud was implemented in the cloud to construct a system for automatic estrus detection. The results showed that the sensitivity and precision of the models generated by SVM and RF were 58-61% and 33-37%, respectively, which were comparable to the estrus detection performance of commercially available neck-mounted activity level sensors. These results suggest that the multimodal tail-attached device can be used to detect estrus in lactating cows on actual production-scale dairy farm. Since machine learning is the search for algorithms that reasons from externally supplied instances (training data) to produce general hypotheses (models), a tail-attached device may have the potential to achieve effective estrus detection, if enough training data, including the data from lactating cows is available.

© The Ito Foundation

1．目　　的

我が国の酪農および肉用牛経営では，生産費の約４割を飼料費が占めており，輸入飼料価格の高騰は，畜産経営に甚大な影響を及ぼしている。畜産経営の基盤となる繁殖雌牛の効率的利用および子畜増産のためには，受胎率の向上と分娩後の適切な時期に受胎させることによる分娩間隔の短縮が強く望まれている。国内で飼養される牛のほとんどが人工授精によって生産されている。乳用牛の初回授精受胎率はこの25年間で，20％程度低下しており，現在では５割程度の受胎率しか得られていない。これに伴い分娩間隔も延長し，乳用牛では430日を超えている。この主な原因は，牛の発情行動が微弱化・不顕在化することで，授精機会を逃したり，適切でないタイミングで授精してしまうためと考えられている。分娩後の適切な時期に受胎させるためには，効率よく発情を発見し，人工授精機会を得る必要がある。

国内では，酪農家の約70％，肉用繁殖牛を飼育している農家の約35％が繋ぎ飼いによっている。繋ぎ飼育では，牛の行動が制限されるため，スタンディング発情やマウンティング行動を確認することができず，行動制限のないフリーストール飼育などに比べ牛の発情発見が難しい。我々の研究グループはこれまでに，牛用多機能尾部センサ（温度センサと加速度センサを内蔵）を開発し，多機能尾部センサデータから発情に特異的な生理学的変化（体表温）や行動の変化を明らかにした。さらに，体表温データおよび行動解析データを機械学習法により解析することで，繋ぎ飼育下においても効率よく発情を検知する手法の開発に成功している[1)]。

そこで本研究では，発情徴候の微弱化・不顕在化が深刻な繋ぎ飼育下の泌乳牛の省力的かつ客観的なデータに基づく発情検知法を開発するため，これまでに考案した多機能尾部センサと機械学習を用いた発情検知アルゴリズムの検証と改善を図り，さらにセンサデータをクラウド上で解析する機械学習基盤をクラウドに実装して，センサデータから自動で発情を検知するシステムの構築を試みた。

2．方　　法

2.1　泌乳牛の発情周期における多機能尾部センサデータの採取

試験は，神奈川県内の酪農場（タイストール飼育，ホルスタイン種）で実施し，泌乳牛43頭（76例）に尾部センサを装着した。また，本研究は麻布大学動物実験委員会の承認を得て実施した（承認番号：230831-2）。多機能尾部センサ（幅20.0 mm，長さ26.0 mm，厚さ10.0 mm，重さ5.4 g）は，既報[1)]に従い，専用に開発した装着器具に封入した後，粘着テープおよび面ファスナーベルトを用いて装着し，体表温（３分間隔で測定），活動量（５Hzで測定した値の５秒間における最小値の３分間の標準偏差），ロール角（５Hzで測定した値の３分間平均値）およびＹ軸加速度（５Hzで測定した値の３分間平均値：挙尾の程度を推定可能）を計測した。センサデータは無線通信により専用の受信機で受信し，クラウド上へ収集した。また，尾部センサを装着した76例中55例（33頭）は，市販の首輪装着型活動量計（Farmnote Color，ファームノート）を装着し，メーカーの提供する発情アラートはタイストール用に設定した。

2.2　タイストール飼育下の泌乳牛の発情に伴うセンサデータ変動の解明

ロール角の数値から各時点における姿勢（起立あるいは横臥）を判別した。体表温データは１時間ごとの最高値，活動量データは１時間ごとの平均値を算出し，ロール角データからは１時間ごと

© The Ito Foundation

の横臥時間ならびに起臥回数を算出し，解析に用いた。

それぞれのデータから日内変動等の影響を排除するため，体表温データは前３日間の同時刻平均値との差（体表温差），活動量データ・横臥時間データ・起臥回数データは過去24時間における合計値をその前24時間（過去48時間～過去24時間）の合計値で割った値（活動量比・横臥時間比・起臥回数比）を解析した。

各例の外部発情徴候，経時的な卵巣所見等から発情日を特定できた44例について，発情日を０日（午前０時を０時間）として，体表温差・活動量比・横臥時間比・起臥回数比のそれぞれについて，発情240～169時間前の値を対照とし，発情168時間前～発情240時間後の各時点との比較を行った。解析にはSteel法を用い，$p<0.05$で有意差ありと判定した。

2.3　タイストール飼育下の泌乳牛の機械学習による発情検知

既報[1]において開発した多機能尾部センサデータからの発情検知モデル（タイストール飼育下で３時間ごとのスタンディング発情の有無により発情の正例または負例を付与した25頭分のデータを教師データとして学習）による発情検知を行った。具体的には，ロール角データから１時間ごとの起立時間ならびに起臥回数を算出し，体表温差，活動量比，起立時間比，起臥回数比のデータは指数移動平均法により平滑化した後，それぞれから５個ずつ計20個の特徴量（統計解析の説明変数に相当）を抽出した。なお，特徴量としては，発情に伴う特異的な変化を表現可能な値として，現在の値だけでなく，過去12時間や24時間における最高値・最低値などを使用した。これら特徴量を用い，R言語で提供されているサポートベクターマシン（SVM）[2]を用いて作成した（SVMモデル）。

さらに，発情検知モデルの頑健性を高めるため，ランダムフォレスト（RF）による発情検知モデルの開発と機械学習モデルのクラウド実装を試みた。すなわち，多機能尾部センサデータから体表温データは１時間ごとの最高値，活動量データは１時間ごとの平均値を算出し，ロール角データからは１時間ごとの横臥時間ならびに起臥回数を算出し，さらに，上述と同様の方法で体表温差，平滑化体表温差，活動量比，横臥時間比，起臥回数比を算出した。特徴量としては，１時間ごとの体表温最大値を加えた21個（**Table 1**）とし，SVMによる発情検知モデルと同様の25頭分のデータを教師データとしてR言語で提供されているRF[3]を用いて発情検知モデルを作成した（RF

Table 1　Description of the features used for building estrus detection models.

Feature description
Hourly maximum ST
Smoothened rST and ratios of activity intensity, lying time, and posture change
Minimum value during the last 12 h
Maximum value during the last 12 h
Minimum value during the last 24 h
Maximum value during the last 24 h

The residual tail surface temperature（rST）was calculated as the actual ST−mean ST for the same time on the previous three days. The rST data were smoothened using the exponentially weighted moving average and used for feature extraction. Ratios of activity intensity, lying time, and posture change were calculated as the total value during the last 24 h/total value during the last 25–48 h.

© The Ito Foundation

モデル）。なお，多機能尾部センサデータの収集からRFを用いた機械学習に至る工程はクラウドに実装し，１時間ごとに解析を繰り返した。

多機能尾部センサデータに基づく２つの発情検知モデル（SVMモデルおよびRFモデル）ならびに首輪型活動量センサデータに基づく発情検知モデルから出力された発情アラートのうち，発情日のアラートを真陽性，それ以外のアラートを偽陽性，発情日にアラートがなかった場合を偽陰性として，発情検知の感度（真陽性／[真陽性＋偽陰性]），精度（真陽性／[真陽性＋偽陽性]），F_1スコア（２×感度×精度／[感度＋精度]）を算出した。なお，SVMモデルでは，発情，非発情の二項分類とし，３時間以上連続で「発情」と判定された場合に陽性とし，RFモデルでは，発情を０～１の範囲の確率で算出して，直近５時間の平均が0.25以上かつ６時間以上継続した場合に陽性と判定した。

３．結果と考察

供試した76例の多機能尾部センサの装着期間は平均25.8±13.7日間であった。このうち，35例で脱落，14例で装着中の故障が認められた。加速度センサを内蔵した市販の尾装着型センサを用いた研究では，装着した牛の約17％で尾の浮腫や疼痛が認められたと報告されているが[4]，本研究では７例（9.2％）で擦過傷などの皮膚損傷が認められたものの，明瞭な浮腫や疼痛は認められなかったことから，著者らの開発した多機能尾部センサは侵襲性が低いと考えられた。

タイストール飼育下の泌乳牛の発情周期における体表温差，活動量比，横臥時間比および起臥回数比の推移を**Fig. 1** に示す。非泌乳牛を用いた既報において，体表温差，活動量比および起立時間比は，発情前期にあたる排卵前60時間ごろから上昇し始め，発情期間（排卵前32～９時間）には高値を示し，起臥回数比は，排卵前48時間ごろから低下し始め，発情開始頃に最低値を示した後，発情開始から排卵に至るまで増加することが報告されている[1]。今回の泌乳牛においても，発情日には体表温差および活動量比が有意に増加するとともに，横臥時間比は有意に減少した。また，発情翌日には横臥時間比および起臥回数比が有意に高く，非泌乳牛と同様の変動を示した。これらの推移は，既報（体表温[5, 6]，活動量[7]，起立時間・起臥回数[8, 9]）と合致しており，タイストール飼育下の泌乳牛においても多機能尾部センサを用いることで発情に伴う生理学的変化と行動学的変化の両者を検知可能であることが示された。

本研究において，タイストール飼育下の泌乳牛における多機能尾部センサデータに基づく発情検知モデルの性能は，感度57.6～60.5％，精度33.3～36.5％で，市販の首輪装着型活動量センサの性能と同程度であった（**Table２**）。今回使用した多機能尾部センサデータに基づくSVMモデルによって非泌乳牛の発情検知を行った既報では感度92％，精度55％の結果が得られており，感度，精度とも泌乳牛では非泌乳牛に比べ低下する可能性が示唆された。一方で，本研究において使用した25頭分の教師データはすべて非泌乳牛のデータから作成されているため，泌乳牛における発情検知性能を改善するためには，さまざまな飼養環境下における教師データの蓄積を進め，泌乳牛も含めた教師データを作成する必要性も示唆された。タイストールなどの繋ぎ飼育下における目視による発情検知の感度と精度はおおむね50％[10, 11]および80％程度[12]であると考えられる。したがって，本手法は目視による発情検知に比べて精度は低い（誤検知が多い）ものの，感度は同程度かやや高いことが示唆された。

乳牛では，産乳量の増加とともに乗駕許容を示す個体の割合は過去数十年間に80％から50％へ減

© The Ito Foundation

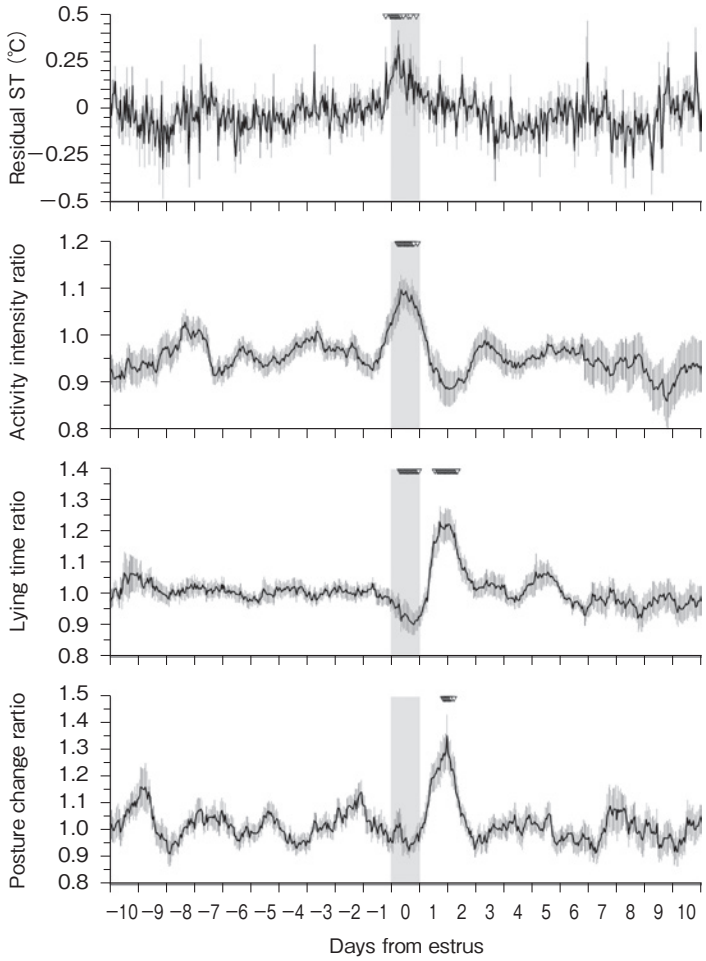


Fig. 1　Changes in residual tail surface temperature (ST) and ratios of activity intensity, lying time, and posture change throughout a natural estrous cycle in tie-stall housed lactating cows.

Residual ST was calculated as actual ST − mean ST for the same time on the previous 3 days. Ratios of activity intensity, lying time, and posture change were calculated as sum of hourly values during the last 24 h / sum of hourly values during the last 25 to 48 h. Data were standardized to the day of estrus (gray vertical bar). Inverted triangles indicate the time points with significant differences between the values at the indicated time point and the mean values during the reference period (−240 h to −169 h from the day of estrus) ($p < 0.05$, Steel test). Data are expressed as mean ± standard error (n = 44).

少し，乗駕許容の時間も15時間から５時間へと短縮したと報告されている[13]。また，最近では乳用牛・肉用牛を問わず，発情徴候の微弱化が起きているのではないかと危惧されており[14]，目視観察による発情発見はますます難しくなると考えられる。現在市販されているウェアラブルセンサの多くは，活動量などの行動学的変化を指標としているため，牛の行動を制限しない放飼下（フリーストールやフリーバーンなど）で飼養されている牛を対象としたものであり[15]，繋ぎ飼育下では十分に性能が発揮できないなどの制約がある。我々は，首輪装着型活動量センサによる発情検知率（感度）は単房での飼育に比べタイストール飼育下では有意に低下し，体表温のみの尾部センサによる感度は，単房飼育，タイストール飼育ともに首輪装着型活動量センサに比べ有意に高いことを

© The Ito Foundation

Table 2　Performance of the estrus alerts by data based on multimodal tail sensor with SVM and RF machine learning algorithm models, and neck-mounted accelerometer.

Sensor and machine learning algorithm	True positive	False positive	False negative	Sensitivity (%)	Precision (%)	F_1 score
Multimodal tail sensor, SVM model	22	44	16	57.9	33.3	0.423
Multimodal tail sensor, RF model	23	40	15	60.5	36.5	0.455
Neck-mounted accelerometer	23	32	15	60.5	41.8	0.495

The machine learning algorithms, SVM and RF, represent the support vector machine and random forest, respectively. The sensitivity, precision, and F_1 score are calculated as true positive / (true positive + false negative), true positive / (true positive + false positive), and 2 × sensitivity × precision / (sensitivity + precision), respectively. Sensitivity and precision among the three categories were not significantly different ($p > 0.05$, Fisher's exact test and generalized score statistic, respectively).

報告している[16]。本研究では，首輪装着型活動量センサデータからの発情検知においてタイストール用のアルゴリズムを用いたことから，多機能尾部センサと同様の発情検知性能を示したと考えられた。

１回の発情見逃しは，おおよそ21日間（１発情周期）の空胎日数の延長に繋がる一方，１回の誤検知（偽陽性）は発情の確認に要する数分間で済む。そのため，一般的にウェアラブルセンサによる発情検知では，精度よりも感度が優先されることから，本手法は繋ぎ飼育下における発情検知日に有用であると考えられる。しかし，誤検知が多すぎると，ユーザーはセンサの情報を重要視しなくなる傾向にあることが知られているため，今後は精度向上に向けた研究開発が必要である。

4．要　約

本研究では，我々がこれまでに開発した多機能尾部センサを用い，酪農場においてタイストール飼育下の泌乳牛の発情検知について検討した。泌乳牛における発情周期中のセンサデータを収集し，解析した結果，発情日には体表温差，活動量比および横臥時間比が発情休止期と比較して有意に変化した。これらの変化は非泌乳牛とおおむね同様であり，タイストール飼育下の泌乳牛においても多機能尾部センサを用いることで発情に伴う生理学的変化と行動学的変化の両者を検知可能であることが示された。これまでに考案した多機能尾部センサと機械学習を用いた発情検知アルゴリズムの検証と改善を図り，さらにセンサデータをクラウド上で解析する機械学習基盤をクラウドに実装して，センサデータから自動で発情を検知するシステムの構築を試みた結果，従来の発情検知モデルと頑健性を高めた発情検知モデルは，感度57.6～60.5％，精度33.3～36.5％で，市販の首輪装着型活動量センサの発情検知性能と同程度であった。これらのことから，実生産規模の酪農場の泌乳牛においても，多機能尾部センサにより発情検知が可能であり，さまざまな飼養環境下における教師データの蓄積を進めることで，飼養環境によらず，高感度・高精度な発情検知が可能になると期待される。

文　献

１）　Higaki, S., Okada, H., Suzuki, C., Sakurai, R., Suda, T., Yoshioka, K.：*Computers and Electronics in Agriculture*, **191**, 106513, 2021.
２）　Meyer, D., Dimitriadou, E., Hornik, K., Weingessel, A., Leisch, F., Chang, C. C., Lin, C. C., Meyer, M. D.：Package 'e1071', R package version 4.7-1.1,

© The Ito Foundation

2022.
3） Breiman, L., Cutler, A., Liaw, A., Wiener, M.：Package 'randomForest', R package version 1.7-14, 2023.
4） Voß, A., Fischer-Tenhagen, C., Bartel, A., Heuwieser, W.：*Journal of Dairy Science*, **104**, 3353～3363, 2020.
5） Higaki, S., Darhan, H., Suzuki, C., Suda, T., Sakurai, R., Yoshioka, K.：*Journal of Reproduction and Development*, **67**, 67～71, 2021.
6） Miura, R., Yoshioka, K., Miyamoto, T., Nogami, H., Okada, H., Itoh, T.：*Animal Reproduction Science*, **180**, 50～57, 2017.
7） Sakaguchi, M., Fujiki, R., Yabuuchi, K., Takahashi, Y., Aoki, M.：*Journal of Reproduction and Development*, **53**, 819～828, 2007.
8） Nabenishi, H,. Kawakami, S., Shimo, S., Takeshita, K., Yamazaki, A., Suzuki, K.：*Journal of Reproduction and Development*, **65**, 91～95, 2019.
9） Pollock, W., Hurnik, J.：*Journal of Animal Science*, **59**, 799～803, 1979.
10） Cerosaletti, P., Fox, D., Chase, L.：*Journal of Dairy Science*, **87**, 2314～2323, 2004.
11） Perez Marquez, H. P., Ambrose, D. J., Schaefer, A. L., Cook, N. J., Benchet, C. J.：*Journal of Dairy Science*, **102**, 4427～4440, 2019.
12） Ranasinghe, R., Nakao, T., Kobayashi, A.：*Reproduction in Domestic Animals*, **44**, 643～646, 2009.
13） Dobson, H., Walker, S., Morris, M. J., Routly, J. E., Smith, R. F.：*Animal*, **2**, 1104～1111, 2008.
14） Dash, S., Chakravarty, A. K., Singh, A., Upadhyay, A., Manvendra Singh, M., Saleem Yousuf, A.：*Veterinary World*, **9**, 235, 2016.
15） Saint-Dizier, M., Chastant-Maillard, S.：*Theriogenology*, **112**, 53～62, 2018.
16） 檜垣彰吾，岡田浩尚, Mattias, A. L., 吉岡耕治：第161回日本獣医学会学術集会, 2018.

© 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（Ⅲ）

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

中島　友紀・神田　亜樹奈・田上　貴寛
（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, Akina Kanda and Takahiro Tagami
（Institute of Livestock and Grassland Science, NARO）

The technology for long-term conservation of poultry genetic resources is necessary for the stable production of native chicken. Cryopreservation of primordial germ cells (PGC), progenitor cells of sperm and ova, has been developed as a technology for long-term conservation of poultry genetic resources. Simple and efficient method to conserve poultry genetic resources has been developed using gonadal PGC (gPGC) in the embryonic gonad in our previous study. However, it was shown that efficiency of competence of differentiation into gamete from gPGC was decreased markedly by freezing of the gonad. This study aimed to restore the physiological function and to proliferate cryopreserved gPGC by culture to efficiently use gPGC recovered from cryopreserved gonad. 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. gPGC isolated from cryopreserved gonad was cultured after thawing. The percentage of the cultured gPGC-line obtained from gPGC isolated from cryopreserved gonads ranged from 62.5 to 100% in males and 12.5% in females, respectively. tdTomato-positive cells were observed in the testis and ovary of hatched wild type (WT) chicken after transferring the cultured gPGC-line into WT embryos. This result suggests that the cultured gPGC-line maintain migratory ability into the gonad. RNA-seq analysis of the cultured gPGC-line with freezing treatment showed significant gene expression variation in the function of cell differentiation and migration in male. On the other side, in female, significant gene expression variation was observed in the function of protein metabolism. In conclusion, it was shown that male and female gPGC isolated from cryopreserved gonads of 7-day-old chicken embryo was able to proliferate by culture and it maintain the migratory ability after transferred into recipient embryos. The ratio of establishment of cultured gPGC-line and gene expression variation in cultured gPGC-line was different between male and female.

© 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し，供給する必要がある。しかし，現在の飼育による種鶏の維持は，高病原性鳥インフルエンザ等の感染症や災害等により，一度に大量の種鶏を失うことが危惧される。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，卵および精子の源の細胞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も要する。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。そこで，我々は生殖巣で増殖したPGC（gPGC）の遺伝資源保存・個体再生への利用に着目した。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ある。さらに，gPGCはcPGCと同様に凍結保存が可能であるため[2, 3)]，遺伝資源の保存試料としての利点が多い。そこで昨年度までの本助成により，生殖巣を直接凍結保存することで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。しかし，融解直後の生殖巣から分離したgPGCは，凍結操作に起因したダメージが大きく，配偶子形成能等の生理的機能が低下していることが示唆された。そこで本研究では，凍結・融解後の生殖巣から分離したgPGCを培養することで細胞機能の回復と増殖を行う，新たなgPGCの効率的な利用法を開発することを目的とした。

２．方　　法

2.1　gPGCの培養による増殖法の開発

まず，gPGCを培養により増殖させることが可能であるか，次に，増殖した培養gPGCが配偶子形成能を有しているかについて検証した。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50 μl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，200 μlのPBS内で37℃，２時間インキュベーションした。分離したgPGCを①gPGCのみ，②gPGCと生殖巣組織の共培養の２通りの方法で，48well培養プレート内にcPGCの増殖用培地（未発表）で37℃，５％CO_2下で培養した。②においては，生殖巣組織に由来する体細胞の増殖が認められた後にgPGCのみを新しいwellに移動した。gPGCの増殖が認められ次第，24wellプレートに継代し（P1），24wellプレート以降ではサブコンフルエントになった時点で12well（P2），6well（P3～）に継代し，P5まで継代できた場合に，細胞株が樹立できたとみなした。次に，P5以上継代した細胞株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。得られた受精卵を孵卵し，孵化した雛における赤色蛍光標識の検出により移植された培養gPGCの配偶子形成能の有無を判定した。

2.2　凍結生殖巣から分離したgPGCの培養による増殖

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50 μlのPBSで２回

© The Ito Foundation

洗浄し，４℃に冷却した200 μlの凍結保護液A（CELLBANKER 1 plus（ゼノジェンファーマ（株））および10％ウシ胎児血清（FBS），10％ジメチルスルホキシド（DMSO）を含むダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）で調製した凍結保護液Bにそれぞれ浸漬し，－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50 μlのPBSで２回洗浄し，200 μlのPBS内で37℃，２時間インキュベーションした。分離したgPGCを①gPGCのみ，②gPGCと生殖巣組織の共培養の２通りの方法により，上記2.1と同様に継代し，樹立率を計測した。本研究で樹立されたgPGC株を野生型のWL2.5日胚の背側大動脈に移植した。移植後，孵化したWLの生殖巣における赤色蛍光を検出することで，移植された培養gPGC株に由来する生殖巣への移住能の有無を検証した。

2.3　凍結生殖巣から分離した培養gPGC株の遺伝子発現解析

2.1および2.2において増殖したP5時点での細胞株からtotal RNAを抽出し，RNA-seqを行い，生殖巣の凍結の有無によるそれぞれのgPGC株における遺伝子の発現変動解析（DEG解析）および遺伝子オントロジー解析（GO解析）を行った。

3．結果と考察

3.1　gPGCの培養による増殖法の開発

雌雄それぞれ８胚のgPGCおよび生殖巣を培養に供した。その結果，①gPGCのみの場合，雄では３株（37.5％），雌では１株（12.5％）の培養gPGC株がそれぞれ樹立された（**Fig. 1**）。一方，②生殖巣とgPGCを共培養した場合，雄では８株（100％），雌では４株（50％）の培養gPGC株がそれぞれ樹立され，雌雄ともに②の条件での樹立効率が有意に高いことが示された（$p < 0.05$）（**Fig. 1**）。次に，樹立された雌雄の培養gPGC株

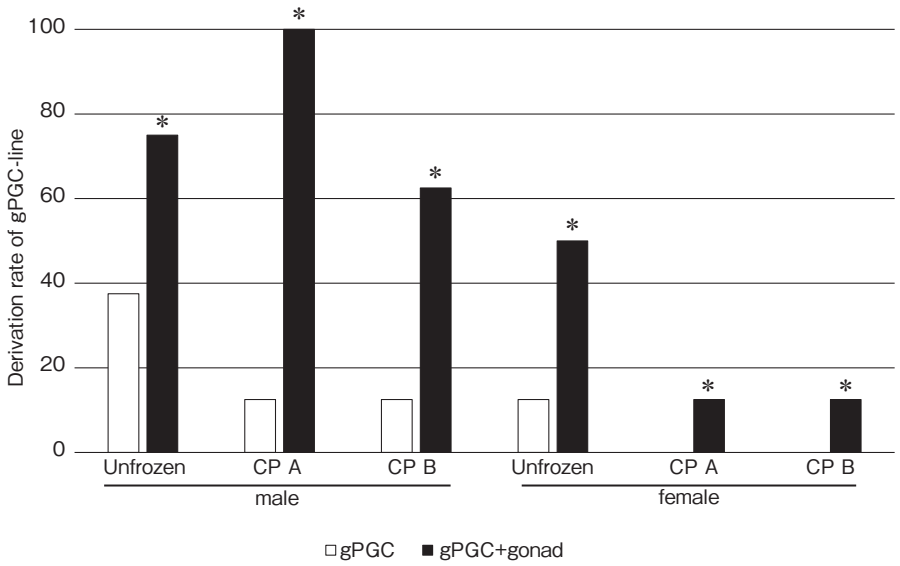


Fig. 1　Efficiency of establishment of culture gPGC-line derived from frozen gonads of male and female 7-day-old chicken embryos.
CP；cryoprotectant
＊；Derivation rate of gPGC-line derived from only gPGCs differed significantly from those of cultured gPGC with gonad（$p < 0.05$）.

© The Ito Foundation

（①条件下）を移植したWLが性成熟に達した後，後代検定を行った結果，孵化した後代のうち移植した培養gPGCに由来する後代が雄で16.7％および雌で12.5％の確率で得られた。これより，cPGCの培養液を用いることで，配偶子形成能を有するgPGCの培養による増殖が可能であることが明らかになった。

3.2　凍結生殖巣から分離したgPGCの培養による増殖

凍結保護液Ａを用いて，雌雄それぞれ８胚のgPGCおよび生殖巣を供試した結果，①gPGCのみの条件下では，雄では１株（12.5％），雌では０株（０％）の培養gPGC株がそれぞれ樹立された。②gPGCと生殖巣との共培養の条件下では，雄では８株（100％），雌では１株（12.5％）の培養gPGC株がそれぞれ樹立された。凍結保護液Ｂを用いて，雌雄それぞれ８胚のgPGCおよび生殖巣を供試した結果，①の条件下では雄では１株（12.5％），雌では０株（０％）の培養gPGC株がそれぞれ樹立された。②の条件下では，雄では５株（62.5％），雌では１株（12.5％）の培養gPGC株がそれぞれ樹立された（**Fig. 1**，**2**）。これらより，3.1の凍結していないgPGCの培養と同様に，凍結した生殖巣から分離したgPGCに関しても培養条件②の場合に，①よりも培養gPGC株の樹立率が有意に高いことが示された（$p<0.05$）。また，意外なことに，雄では凍結保護液Ａを使用し，①の条件で培養した場合，凍結保存を行っていない場合よりもgPGC培養株の樹立効率が高くなった。さらに，増殖した雌雄のgPGC株を雌雄の宿主胚にそれぞれ移植し，孵化後の生殖巣を蛍光顕微鏡下で観察した結果，赤色蛍光を示す細胞が卵巣および精巣内で検出された（**Fig. 3**）。このことから，培養により増殖したgPGC細胞株は宿主胚生殖巣への移住能を有することが明らかになった。今後，移植した宿主を性成熟させた後に後代検定を行い，配偶子形成能を確認する必要がある。

3.3　凍結生殖巣から分離した培養gPGC株の遺伝子発現解析

凍結保存した生殖巣に由来する増殖したgPGCと，凍結保存を行っていない生殖巣に由来する増殖したgPGCにおける遺伝子発現を比較することで，生殖巣の凍結操作による培養gPGCへの生理的機能への影響を解析した。まず，DEG解析の結果，マッピングされた発現差が認められた遺伝子（DEG）の数は雄で510個，雌では873個であった。次に，GO解析により細胞における機能を調べた結果，雄では細胞分化や細胞の移動に関連す

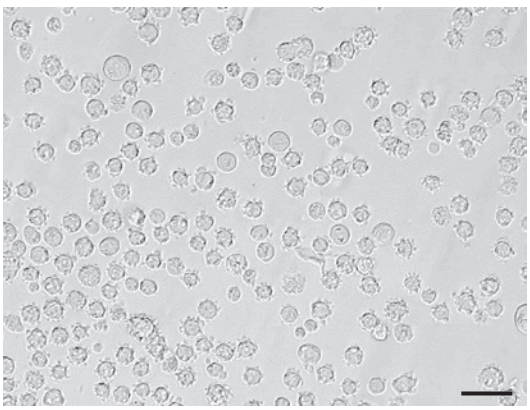


Fig. 2　Cultured gPGC-line derived from female gonad frozen in cryoprotectant B.
Bar＝20μm

© The Ito Foundation

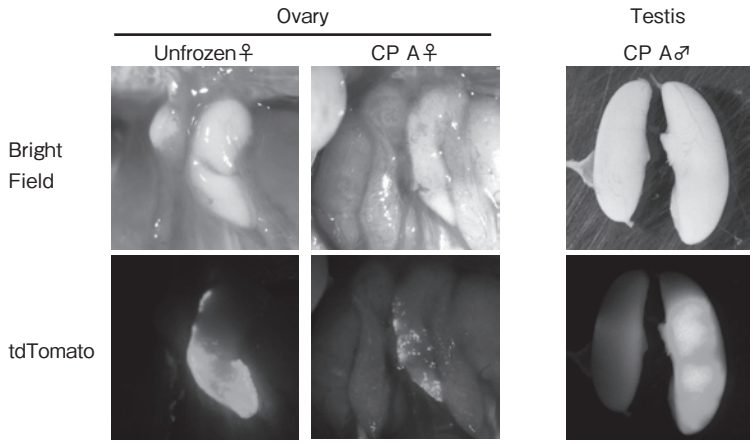


Fig. 3　Ovary and testis of White Leghorn after transfer of proliferated gPGC-line.

る機能で有意に遺伝子発現変動が認められた。このことから，凍結操作により細胞分化および細胞の移住に影響する可能性が考えられる。一方，雌ではタンパク質代謝に関連する機能で有意に遺伝子発現変動が認められた。しかし，雌における本研究の結果からは，凍結操作による培養gPGCの発生能に関連する生理的機能への影響は認められなかった。

以上の結果より，gPGCは培養により増殖が可能であり，培養gPGCから後代が得られること，凍結保存したニワトリ７日胚生殖巣から分離した雌雄のgPGCも同様に培養操作により増殖可能であり，増殖したgPGCを宿主胚に移植すると生殖巣への移住および増殖能を有することが明らかになった。また，生殖巣の凍結操作により培養gPGCの樹立率および培養gPGCの遺伝子発現変動は雌雄で異なることが示唆された。

今後は，凍結生殖巣から分離し，培養により増殖させたgPGCの配偶子形成能の解析を引き続き行い，本研究で解析した遺伝子発現解析結果と統合することで，移植後の配偶子形成に必要なgPGCの遺伝子発現情報の解明に活用する。

4．要　　約

安定的な地鶏生産のためには，家禽遺伝資源の長期保存が可能な技術の開発が必要である。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，前年度まで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。しかし，凍結操作によるダメージにより，gPGCの配偶子形成能が著しく低下することが明らかとなった。そこで本研究では，凍結保存した生殖巣から分離したgPGCを効率的に利用するために，培養により，凍結保存したgPGCの生理的機能を回復させるとともに増殖させることを目的とした。まず，血清およびジメチルスルホキシド（DMSO）をそれぞれ10％以上含む凍結保護液で凍結保存した雌雄のtdTomato導入ニワトリ７日胚の生殖巣から分離したgPGCを培養した。その結果，雄では62.5～100％，雌では12.5％で凍結生殖巣から分離したgPGCから培養gPGC株がそれぞれ樹立された。次に，樹立した培養gPGC株における生理的機能を解析するため，野生型の宿主胚に移植した結果，孵化後の精巣および卵巣への移住能を確認し

© The Ito Foundation

た。また，樹立した培養gPGC株における遺伝子発現解析を行った結果，雄では凍結操作により細胞分化や細胞の移動に関連する機能で有意に遺伝子発現変動が認められた。一方，雌ではタンパク質代謝に関連する機能で有意に遺伝子発現変動が認められた。

以上より，本研究では凍結保存したニワトリ７日胚生殖巣から分離した雌雄のgPGCは培養操作により増殖可能であり，増殖したgPGCを宿主胚に移植すると生殖巣への移住能を示すことが明らかになった。また，生殖巣の凍結操作により培養gPGCの樹立率および培養gPGCの遺伝子発現変動は雌雄で異なることが示唆された。

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, A.：*British Poultry Science*, **63**, 46～53, 2022.

© The Ito Foundation

非必須アミノ酸濃度の改変による高受胎性が担保されたウシ体外受精卵培養液の開発

Designing a bovine in vitro embryo culture medium with high fertility by modifying the concentration of non-essential amino acid

伊 丹 暢 彦・平 尾 雄 二
（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）

Nobuhiko Itami and Yuji Hirao
（Institute of Livestock and Grassland Science, NARO）

The conception rate of bovine in vitro fertilized (IVF) embryo transfer is around 40%, which has been one of the hindrances to its widespread use. Blastocysts that meet multiple criteria for developmental speed and morphology of IVF embryos have been shown to have a conception rate of over 70%. The objective of this study was to design a culture medium for highly efficient generation of IVF embryos that meet the criteria (embryos with high fertility). Non-essential amino acids (NEAA) are present in bovine oviductal fluid, and the concentration of various kind of NEAA varies greatly. However, seven NEAA are often added at a uniform concentration (e.g., MEM-NEAA：100 μM) in bovine embryonic culture medium. When developmental culture was conducted with each of the seven NEAA exclusion, the efficiency of producing embryos with high fertility was improved when alanine, asparagine, and glycine were not added. Among these, alanine improved the generation rate the most. Serine and proline decreased the efficiency of producing embryos with high fertility when they were not added. Next, the optimal concentration of serine in the culture medium without alanine was examined. The efficiency of producing embryos with high fertility was improved by increasing the concentration of serine from 100 μM to 1000 μM, which is 10 times higher than that used for MEM-NEAA. Next, when using culture medium without alanine and with 1000 μM of serine, we examined the culture medium without asparagine or glycine, and examined the concentration of proline added, but these did not affect the efficiency of producing embryos with high fertility. In conclusion, by modifying the composition of NEAA in culture medium of bovine embryos after IVF, it was possible to produce embryos with high fertility at high efficiency.

1．目　　的

ウシ体外受精卵移植の普及のためには，移植可能受精卵を安定供給するのと同時に，受精卵に高い受胎性を持たせることが重要となる。しかし，作出されるウシ体外受精卵の移植後の受胎率は40％程度である[1)]。Sugimuraらは，体外受精卵の発生速度や形態に関する４つの指標を満たした胚盤胞は，70％もの受胎率を有することを報告している[2)]。これらの指標は，発生過程の複数のタ

© The Ito Foundation

イムポイントにおける実体顕微鏡での観察により評価可能である。しかし，このような選抜手法の開発努力が行われてきたにもかかわらず，生産される受精卵のすべてにおいて指標達成の成否を調べることは困難であることから，指標を満たす受精卵を高効率で得ることのできる培養液の開発が有効であると考えられる。

非必須アミノ酸（NEAA）はウシ体外受精卵培養液に添加されている一般的な培養液構成物である。しかし，多くの培養液中のNEAAはすべて均一濃度（例えばMEM-NEAAでは100 μM）であるのに対して[3, 4]，生体で受精卵が発生する場である卵管内のNEAA濃度は，そのNEAAの種類ごとに大きく異なる[5]。本研究課題の前実験において，体外受精卵培養液のNEAA濃度をウシ卵管液中のそれと同等にした場合，高受胎性に関わる指標を満たす胚盤胞の形成率が増加する傾向にあることを確認した。このことは，これまで均一濃度で添加されてきた培養液中のNEAAには，その個々のバランスを再検討する必要があることを示唆している。

本研究では，高受胎性を有する受精卵の高効率な作出を目的として，培養液中の個々のNEAAの意義や至適添加濃度について検討した。

2．方　法

2.1　卵丘細胞-卵子複合体（Cumulus cells-Oocyte Complexes：COCs）回収

食肉センター由来のウシ卵巣（ホルスタイン種またはホルスタイン種と黒毛和種の交雑）を実験に用いた。卵巣は生理食塩水にて実験室に持ち帰り，リン酸緩衝生理食塩水にて一晩保存した。卵巣表面の３-６mmの卵胞から，18Gの針を接続した５mlシリンジにてCOCsを回収した。

2.2　体外成熟・体外受精・体外発生培養

10％のウシ胎児血清を添加したMedium 199にて，COCsを22-24時間の体外成熟培養に供した。体外受精にはBracket and Oliphant's medium[6]にて最終濃度５× 10^6/mlに調整した黒毛和種精液を用いた。媒精６時間後に精子と卵丘細胞を剥離し，受精卵を改変Charles Rosenkrans medium（CR1）[7]に移して発生培養を行った。

2.3　高受胎性に関わる指標の観察

高受胎性に関わる発生速度と形態の指標はSugimuraらの報告を参照した[2]。具体的には，（ⅰ）媒精27時間後に２細胞期に分割していること，（ⅱ）媒精31時間後に３細胞以上に分割していないこと，（ⅲ）媒精31時間後に細胞断片が存在しないこと，（ⅳ）媒精55時間後に６細胞以上に分割していることである。これらの指標をすべて満たしたうえで培養８日目までに胚盤胞に発生したものを，高受胎性を有する受精卵と判定した。

2.4　高受胎性を有する受精卵の作出におけるNEAAの意義の検討

本研究では血清非添加のCR1を基礎培養液とした。一般的な培養液に用いられている７種類のNEAA（アラニン，アスパラギン，アスパラギン酸，グルタミン酸，グリシン，プロリン，セリン）をすべて均一濃度（100 μM）で添加した区をコントロールとした。さらに，これらNEAAを一種類ずつ非添加とした培養液を７種類作成した。コントロールを含め計８種類の培養液にて受精卵を培養し，高受胎性を有する受精卵の形成率を比較した。

2.5　セリン添加濃度の検討

アラニンを非添加とした培養液を用い，セリンを0，100，500，1000 μMで添加した際の高受胎性を有する受精卵の形成率について検証した。

2.6　アスパラギン非添加の影響の検討

アラニン非添加かつセリン1000 μMで添加した培養液を用い，アスパラギンの通常濃度添加（100 μM）と非添加の間で，高受胎性を有する受

© The Ito Foundation

精卵の形成率について比較した。

2.7　グリシン非添加の影響の検討

アラニン非添加かつセリン1000 μMで添加した培養液を用い，グリシンの通常濃度添加（100 μM）と非添加の間で，高受胎性を有する受精卵の形成率について比較した。

2.8　プロリン添加濃度の検討

アラニンを非添加かつセリン1000 μMで添加した培養液を用い，プロリンを100，500，1000，2000 μMで添加した際の高受胎性を有する受精卵の形成率について検証した。

3．結果と考察

NEAAを一種類ずつ非添加とした際，アラニン，アスパラギン，グリシンの非添加培養液にて，高受胎性を有する受精卵の形成率が，コントロールと比較して増加する傾向が見られた（**Fig. 1**）。特にアラニン非添加培養液で高い値を示した。LeeとFukuiは，アラニンを高濃度で添加することで，ウシ体外受精卵培養における胚盤胞形成率が向上することを示している[8]。このような過去の報告や本実験の結果から類推できることは，胚盤胞を高効率で生産するための培養系と，高受胎性を有する受精卵を得るための培養系とは必ずしも一致しないということである。ウシの受精卵はその発生過程を通じて，周囲にあるアミノ酸のほとんどの種類を取り込んでいるのに対して，アラニンは常に受精卵から排出されているというユニークな特徴がある[9]。これは受精卵の発生過程で生じるアンモニアイオンを分解するためにアラニンを分泌していると考えられているが，Orsiらは培養液に塩化アンモニウムを添加しても受精卵からのアラニン分泌は増加しないことを報告している[10]。つまり，アンモニアイオンの分解のために必要なアラニンは受精卵が自ら分泌する量で足りており，アラニンを添加する必要はないことが考えられる。

NEAAの非添加実験では，セリンとプロリンでは非添加とした際に，高受胎性を有する受精卵の形成率がわずかに減少した。そこで次に，アラニンを非添加とした培養液において，セリンの適切な添加濃度を検討した。MEM-NEAAを参考とした際のセリンの通常添加濃度である100 μMをコントロールとした場合，1000 μM添加において高受胎性を有する受精卵の形成率が向上した（**Table 1**）。セリンは細胞内において葉酸―メチオニンサイクルの基質としての役割を持ち，その代謝産物はDNAメチル化の供与体として機能する[11]。ウシでは後期桑実胚から胚盤胞への発生において，DNAメチル化が適切に行われているこ

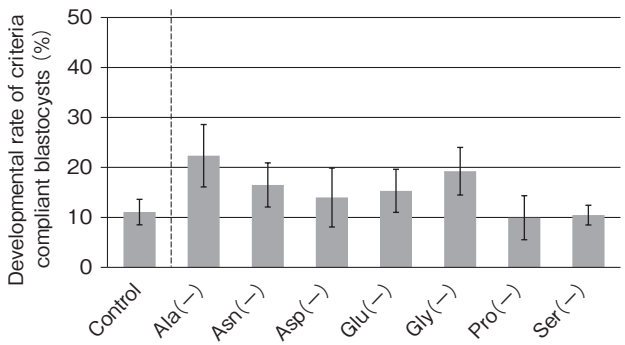


Fig. 1　Comparison of the developmental rate of criteria compliant blastocysts in media with (Control) or without non-essential amino acid. Data are presented as the mean ± standard error of the mean. Experiments were conducted 4 times. Ala；alanine. Asn；Asparagine. Asp；Aspartic acid. Glu；Glutamic acid. Gly；Glycine. Pro；Proline. Ser；Serine.

© The Ito Foundation

Table 1　Effect of various concentration of serine on acquisition of criteria compliant blastocysts

Serine (μM)	Total embryos	Criteria compliant blastocysts
100	137	20(14.6) [a]
500	137	27(19.7) [a b]
1000	137	40(29.2) [b]

Data indicate number (%).
Different superscript indicate significantly different ([a, b]：$p < 0.05$).
Experiments were conducted 5 times.

Table 2　Effect of asparagine exclusion on acquisition of criteria compliant blastocysts

Asparagine (μM)	Total embryos	Criteria compliant blastocysts
100	60	17(28.3)
0	60	15(25.0)

Data indicate number (%).
Experiments were conducted 2 times.

Table 3　Effect of glycine exclusion on acquisition of criteria compliant blastocysts

Glycine (μM)	Total embryos	Criteria compliant blastocysts
100	60	11(18.3)
0	60	8(13.3)

Data indicate number (%).
Experiments were conducted 2 times.

とが必須である[12]。セリンを通常より高濃度で添加することで，ウシ受精卵のDNAメチル化供与体が増加し，胚盤胞への発生が支持されたことが考えられる。

アスパラギンやグリシンは，それらを単独で非添加とした際には高受胎性を有する受精卵の形成率が向上する結果を得ている（**Fig. 1**）。そこで，アラニンを非添加かつセリンを1000 μM添加した培養液において，アスパラギンとグリシンをそれぞれ非添加としたが，高受胎性を有する受精卵の作出効率は変化しなかった（**Table 2, 3**）。これら一見すると矛盾した結果から考えられることは，受精卵発生における非必須アミノ酸はそれぞれが単独で機能しているのではなく，相互作用や存在比率によって発生支持能力が変わるということである。

最後に，非添加実験にて高受胎性を有する受精卵の形成率が減少したプロリンについて，その濃度を増加させた際の影響を検証した。アラニンを非添加かつセリンを1000 μM添加した培養液において，プロリンを500，1000，2000 μMまで増加させても，高受胎性を有する受精卵の形成率は変化しなかった（**Table 4**）。

本研究の結果から，一般的なウシ体外受精卵培

© The Ito Foundation

Table 4　Effect of various concentration of proline on acquisition of criteria compliant blastocysts

Proline (μM)	Total embryos	Criteria compliant blastocysts
100	52	13(25.0)
500	52	10(19.2)
1000	51	11(21.6)
2000	51	12(23.5)

Data indicate number (%).
Experiments were conducted 3 times.

養において均一濃度（100 μM）で添加されているNEAAから，アラニンを非添加として，なおかつセリンを1000 μMで添加することにより，高受胎性を有する受精卵を高効率で作出することが可能になった。今回の検討ではCR1を基礎培養液に用いたが，ウシ体外受精卵の生産現場ではさまざまな培養液が用いられていることから（SOFやKSOMなど），今回最適化したNEAA組成がそれらの培養液においても有効であるかを検討する必要がある。また，市販されている培養液（BO-IVCやIVF101など）が高受胎性を有する受精卵の作出効率に及ぼす影響を調査し，それら培養液に対してセリンや他の薬剤の添加効果を検証することも，今後の展開として期待される。

4．要　約

ウシ体外受精卵移植は，その受胎率が40％程度であることが普及の妨げの一因になっている。体外受精卵の発生速度や形態に関する複数の指標を満たした胚盤胞は，70％を超える受胎率を有する。本研究では，指標を満たして高受胎性を有する体外受精卵を高効率で作出する培養系の開発を目的とした。非必須アミノ酸（NEAA）はウシ卵管液中に存在し，その濃度は種類ごとに大きな差がある。しかし，一般的なウシ体外受精卵培養液では，７種類のNEAAが均一濃度（100 μM）で添加されている。そこで，７種類のNEAAを１種類ずつ非添加として発生培養を行ったところ，アラニン，アスパラギン，グリシンを非添加とした際に高受胎性を有する受精卵の形成率が向上した。なかでもアラニンが最も発生率を向上させていた。セリンとプロリンでは非添加とした際の高受胎性を有する受精卵の形成率がわずかに減少した。そこで次に，アラニン非添加培養液においてセリンの至適添加濃度を検討したところ，通常の100 μMから10倍の1000 μMとすることで，高受胎性を有する受精卵の形成率が向上した。次に，アラニン非添加かつセリン1000 μMで添加した培養液を用いた際の，アスパラギンもしくはグリシンを非添加とした培養液の検討，さらにはプロリン添加濃度の検討を行ったが，高受胎性を有する受精卵の形成率には影響しなかった。以上のことから，ウシ体外受精卵培養液のNEAAの組成を改変することで，高受胎性を有する受精卵を高効率で作出することが可能になった。

文　献

1） Santos, G. M. G. D., Junior, L. B., Silva-Santos, K. C., Ayres Dias, J. H., Dias, I. D. S., Seneda, M. M., Morotti, F.：*Theriogenology*, **15**, 251～255, 2023.
2） Sugimura, S., Akai, T., Hashiyada, Y., Somfai, T., Inaba, Y., Hirayama, M., Yamanouchi, T., Matsuda, H., Kobayashi, S., Aikawa, Y., Ohtake, M., Kobayashi, E., Konishi, K., Imai, K.：*PLoS One*, **7**, e36627, 2012.
3） Speckhart, S. L., Wooldridge, L. K., Ealy, A. D.：*STAR Protoc*, **4**, 101924, 2023.

© The Ito Foundation

4） Zheng, L., Luo, Y., Zhou, D., Liu, H., Zhou, G., Meng, L., Hou, Y., Liu, C., Li, J., Fu, X.：*Theriogenology*, **199**, 11～18, 2023.
5） Elhassan, Y. M., Wu, G., Leanez, A. C., Tasca, R. J., Watson, A. J., Westhusin, M. E.：*Theriogenology*, **55**, 1907～1918, 2001.
6） Brackett, B. G., Oliphant, G.：*Biol Reprod*, **12**, 260～274, 1975.
7） An, L., Marjani, S. L., Wang, Z., Liu, Z., Liu, R., Xue, F., Xu, J., Nedambale, T. L., Yang, L., Tian, X. C., Su, L., Du, F.：*Theriogenology*, **140**, 109～116, 2019.
8） Lee, E. S., Fukui, Y.：*Biol Reprod*, **55**, 1383～1389, 1996.
9） Partridge, R .J., Leese, H. J.：*Reprod Fertil Dev*, **8**, 945～950, 1996.
10） Orsi, N. M., Leese, H. J.：*Reproduction*, **127**, 131～140. 2004.
11） Anderson, O. S., Sant, K. E., Dolinoy, D. C.：*J Nutr Biochem*, **23**, 853～859. 2012.
12） Golding, M. C., Williamson, G. L., Stroud, T. K., Westhusin, M. E., Long, C. R.：*Mol Reprod Dev*, **78**, 306～317, 2011.

© The Ito Foundation

鳥インフルエンザの完全制圧を目指した人工改変型弱毒生ワクチンの開発

Development of artificially modified live attenuated vaccine aiming at complete control of avian influenza

堀　本　泰　介
（東京大学大学院農学生命科学研究科）

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

Highly pathogenic avian influenza has been occurring for many years, causing enormous economic losses to the global poultry industry, and there are concerns that a new influenza pandemic could occur if accidentally infected with humans. Avian influenza cannot be controlled with the current policy of detection and culling. In this study, we investigated a recombinant live attenuated vaccine. Low-pathogenic H5 viruses cannot be used as the basis for live vaccine strains because they can readily mutate into highly pathogenic viruses. Therefore, we investigated the creation of a recombinant virus that imparts H5 antigenicity to a low pathogenic H4 strain that does not mutate to a highly pathogenic type. First, we constructed a reverse genetics system for the low pathogenic H4N5 virus; eight genome segments were cloned into a plasmid for RNA transcription. In addition to these, when plasmids expressing four types of viral proteins responsible for genome transcription and replication were simultaneously introduced into cells, the infectious virus showing growth similar to wild-type H4N5 virus was successfully rescued. Next, we constructed plasmid with two types of H4/H5 chimeric HA genes into which sequences (900 and 1,002 bases each) encoding the N-terminal HA1 region of the H5 protein were introduced. Two H4/H5 chimeric viruses were generated by reverse genetics and showed lower growth rates than the wild-type H4N5 virus, suggesting that they were attenuated, but their growth in embryonated chicken eggs was sufficient for productivity as a live vaccine. We evaluated the immunogenicity of the recombinant virus in a mouse model and found that H5 antibodies were specifically induced in the serum after intranasal inoculation. These results indicate that the H4/H5 chimeric recombinant viruses could be used as a live vaccine candidate strain for highly pathogenic H5 avian influenza.

1．目　　的

高病原性鳥インフルエンザの流行が長年にわたって続いており，世界の養鶏業に莫大な経済被害を及ぼしている。加えて，ヒトへの偶発的感染を引き金に新たなインフルエンザパンデミックの発生も危惧されている[1～3]。現在，日本を含めた多くの国で執られている摘発・淘汰という受動的

© The Ito Foundation

な政策では，鳥インフルエンザの制御は難しい。備蓄されている不活化ワクチンは，発症予防効果にとどまるため，かえって水面下での感染を拡大させるという科学的判断から緊急時のみの使用に制限される。本研究では，鳥インフルエンザ制御のブレイクスルーとなり得る感染防御レベルの効果をもつ予防ワクチン開発の一環として，高い効果かつ安全性が賦与されるようにデザインした組換え型弱毒生ワクチンの構築を目的とした。

２．方　法

H5抗原性を保有するキメラHAタンパク質をもつ弱毒型組換えインフルエンザウイルスを作出し，その生ワクチン効果を検証する。

2.1　組換えウイルスの母体として活用する低病原性鳥インフルエンザウイルスのリバースジェネティクス系を構築した[4]。A/H4N5亜型のA/duck/Hokkaido/1058/2001株のゲノム８分節（PB2，PB1，PA，HA，NP，NA，MおよびNS分節）をRT-PCRで増幅し[5]，RNA転写用プラスミド（pHH21-base）にクローニングした。これらに加え，ゲノムの転写・複製を担う４種類のウイルスタンパク質（PB2，PB1，PAおよびNP）を発現するプラスミド（pCAGGS-base）を合わせた計12種類のプラスミドを同時にヒト胚性腎臓HEK293T細胞に導入し，感染性ウイルスをレスキューした。

2.2　A/H5N8亜型の高病原性鳥インフルエンザウイルスA/chicken/Kagawa/11c/2020株[6]のHAタンパク質のN末端HA1領域をコードする塩基配列（各1,002塩基および900塩基）をスワップ導入した２種類のH4亜型HA遺伝子（H4/H5キメラHA遺伝子）を構築し，RNA転写用プラスミドにクローニングした。これらのプラスミドを用いたリバースジェネティクスにより，２種類のH4/H5キメラ型組換えウイルスを作出した。本実験は，遺伝子組換え生物等の第二種使用等拡散防止措置に係る大臣確認を受けて実施した（確認番号：３受文科振421号）。

2.3　組換えウイルスの培養細胞での増殖性を調べるため，犬腎臓由来MDCK細胞における増殖曲線（MOI=0.01）を作成した。

2.4　発育鶏卵での増殖性を調べるため，10日齢の発育鶏卵の漿尿膜腔へ接種し，48時間後に漿尿液を回収し，MDCK細胞を用いてウイルス力価を測定した。

2.5　組換えウイルスの免疫原性を調べるため，マウス（BALB/c，４週齢，メス）の鼻腔内にウイルスを接種し，２週後に血液を回収し血清を分離後，赤血球凝集抑制（HI）試験で抗体価の上昇および抗体の特異性を調べた。本実験は，東京大学大学院農学生命科学研究科の動物実験委員会の承認（承認番号：P23-070）を受け実施した。

３．結果と考察

3.1　H4/H5キメラ型組換えウイルスの作出

構築したリバースジェネティクス法により，H4/H5キメラHA遺伝子をもつ２種類の組換えウイルスの作出に成功した（**Fig. 1**）。rH4/H5(1002)-H4N5およびrH4/H5(900)-H4N5と名づけた。

3.2　培養細胞および発育鶏卵における増殖性

MDCK細胞における野生型H4N5ウイルスと組換えウイルスの増殖曲線では，rH4/H5(1002)-H4N5は約50倍，rH4/H5(900)-H4N5は100倍以上，野生型ウイルスより増殖性が低下していた（**Fig. 2**）。最高力価はそれぞれ$10^{7.5}$，$10^{5.8}$，$10^{5.4}$ PFU/mlであった。一方，発育鶏卵におけるウイルス力価はそれぞれ$10^{8.7}$，$10^{7.9}$，$10^{7.5}$ PFU/mlであり，野生型ウイルスより低いものの，いずれの組換えウイルスとも高い増殖性が示され

© The Ito Foundation

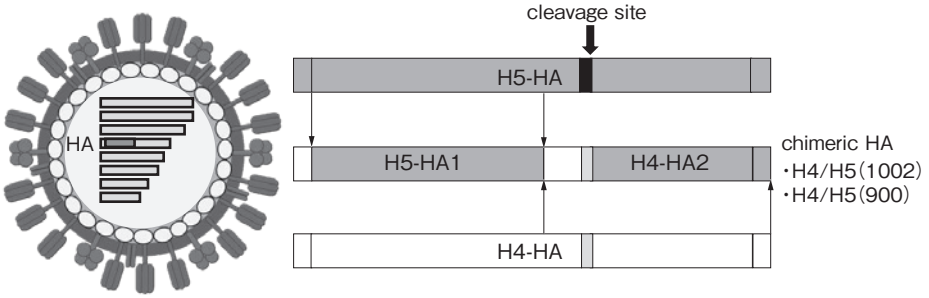


Fig. 1　Construction of rH4/H5-H4N5 chimeric virus.
The recombinant viruses were generated by H4N5 virus-reverse genetics system with two chimeric H4/H5 genes. We designated them rH4/H5(1002)- and rH4/H5(900)-H4N5, respectively.

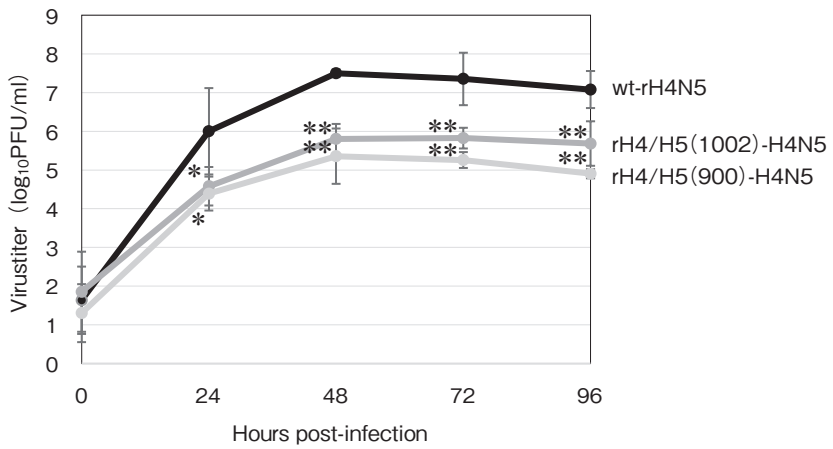


Fig. 2　Growth of rH4/H5-H4N5 virus in MDCK cells.
The wt-rH4N5 and two rH4/H5 chimeric viruses (rH4/H5(1002)- and rH4/H5(900)-H4N5) were inoculated into MDCK cells (moi = 0.01) and then virus titers were measured at a 24 hour-interval. * and ** indicate $p<0.05$ and $p<0.01$, respectively.

た（**Fig. 3**）。

3.3　免疫原性の評価

組換えウイルス（rH4/H5(1002)-H4N5ならびにrH4/H5(900)-H4N5）を接種したマウス血清には，それぞれホモのウイルスに対する高いHI抗体価（640，320）が，さらにヘテロの組換えウイルスに対する交叉反応（160，320）が認められた（**Table 1**）。一方，野生型H4N5ウイルスとの反応性はみられなかった（< 40）。また，両組換えウイルスとも野生型ウイルス（wt-rH4N5）を接種したマウス血清とは反応しなかった。さらに，PR8株をバックボーンとするH5N8ウイルス（rH5N8/PR8）に対するマウス血清と反応した（80，40）。また，rH5N8/PR8はキメラウイルスに対する血清と反応した（80，80）。これらの成績は，組換えウイルスの免疫によりH5抗体が特異的に誘導されたことを示している。

本研究により，H4亜型の低病原性鳥ウイルス株にH5亜型（高病原性株）の抗原性を賦与したH4/H5キメラ型組換えウイルスが作出できることが明らかになった。本組換えウイルスは，その病原性を規定するHA開裂部位[7,8]にH4低病原性株由来のアミノ酸配列をもつため，低病原性H5ウイルスとは異なり，増殖する間に高病原性ウイ

© The Ito Foundation

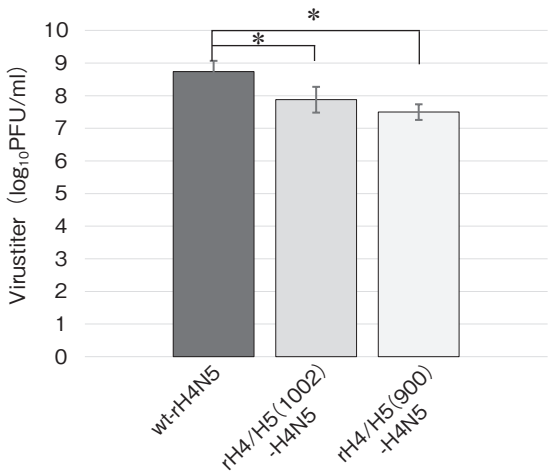


Fig. 3　Growth of rH4/H5-H4N5 virus in chicken embryonated eggs.
The wt-rH4N5 and two rH4/H5 chimeric viruses（rH4/H5(1002)- and rH4/H5(900)-H4N5）were inoculated into allantoic cavity of eggs and then virus titers in allantoic fluids were measured at 48 hours post-inoculation. *indicate $p<0.05$.

Table.1　Immunogenicity of rH4/H5 viruses in mice

Virus	Mouse serum				PBS
	Anti-H4N5	Anti-H4/H5(1002)	Anti-H4/H5(900)	Anti-H5N8/PR8	
wt-rH4N5	160*	<40	<40	<40	<40
rH4/H5(1002)-H4N5	<40	640	320	80	<40
rH4/H5(900)-H4N5	<40	160	320	40	<40
rH5N8/PR8	<40	80	80	160	<40

*HI titer

ルスに変異することはないと考えられる[9]。また，組換えウイルスの母体として用いたH4N5鳥ウイルスはあひる由来株であるため鶏に対する病原性はそれ自体低いと推測される[10]。今後，鶏を用いた免疫試験や攻撃試験によってそのワクチン効果や安全性の検証を行う必要があるが，本組換えウイルスは，H5亜型の高病原性鳥インフルエンザに対する鼻腔噴霧型の弱毒生ワクチン候補株としての可能性が示された。

4．要　約

世界の養鶏業に莫大な経済被害を及ぼしている高病原性鳥インフルエンザの流行が長年にわたって続いており，ヒトへの偶発的感染を引き金に新たなインフルエンザパンデミックの発生も危惧されている。現在の摘発・淘汰という受動的な政策では鳥インフルエンザは永久に制御できない。本研究では，鳥インフルエンザ制御のブレイクスルーとなる感染防御レベルの効果をもつ予防ワクチン開発の一環として，高い効果かつ安全性が賦与されるようにデザインした組換え型弱毒生ワクチンの構築を検討した。H5亜型の低病原性ウイルス株は増殖する間に高病原性ウイルスに変異する可能性があるため，生ワクチン株のベースとして使えない。そこで，高病原性型に変異することのないH4亜型の低病原性株にH5抗原性を賦与し

© The Ito Foundation

た組換えウイルスの作出を検討した。まず，組換えウイルスの作出に必要な低病原性H4N5鳥インフルエンザウイルスのリバースジェネティクス系を構築した。同ウイルスのゲノム８分節をRT-PCRで増幅し，RNA転写用プラスミドにクローニングした。これらに加え，ゲノムの転写・複製を担う４種類のウイルスタンパク質を発現するプラスミドを同時に細胞に導入したところ，感染性ウイルスのレスキューに成功した。このウイルスは野生型のH4N5ウイルスと同様な増殖性を示した。次に，H5亜型HAタンパク質のN末端HA1領域をコードする塩基配列（各1,002塩基および900塩基）を導入した２種類のH4亜型HA遺伝子（H4/H5キメラHA遺伝子）を構築し，RNA転写用プラスミドにクローニングした。これらのプラスミドを用いたリバースジェネティクスにより，２種類のH4/H5キメラ型組換えウイルス（rH4/H5(1002)-H4N5 ならびに rH4/H5(900)-H4N5）を作出した。どちらの組換えウイルスも，野生型H4N5ウイルスより増殖性が低下しており，弱毒化されていることが示唆されたが，特に発育鶏卵での増殖性は生ワクチンとしての生産性に十分であると考えられた。次に，組換えウイルスの免疫原性をマウスモデルで評価したところ，経鼻接種した血清中にH5抗体が特異的に誘導されることが分かった。これらの成績より，今回作出に成功したH4/H5キメラ型組換えウイルスは，H5亜型の高病原性鳥インフルエンザの生ワクチン候補株として応用できる可能性が示された。

文　献

1） Short, K., Richard, M., Verhagen, J. H., van Riel, D., Schrauwen, E. J., Brand, J. M. V. D., Mänz, B., Bodewes, R., Herfst, S.：One health, multiple challenges：The inter-species transmission of influenza A virus, *One Health*, **1**, 1～13, 2015.

2） Horimoto, T., Kawaoka, Y.：Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents, *Nature Rev Microbiol*, **3**, 591～600, 2005.

3） Horimoto, T., Kawaoka, Y.：Pandemic threat posed by avian influenza A viruses, *Clinical Microbiol Rev*, **14**, 129～149, 2001.

4） Neumann, G., Watanabe, T., Ito, H., Watanabe, S., Goto, H., Gao, P., Hughes, M., Perez, D. R., Donis, R., Hoffmann, E., Hobom, G., Kawaoka, Y.：Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs, *Proc Natl Acad Sci USA*, 96(16), 9345～9350, 1999.

5） Hoffmann, E., Stech, J., Guan, Y., Webster, R. G., Perez, D. R.：Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses, *Arch Virol*, 146(12), 2275～2289, 2001.

6） Sakuma, S., Uchida, Y., Kajita, M., Tanikawa, T., Mine, J., Tsunekuni, R., Saito, T.：First outbreak of an H5N8 highly pathogenic avian influenza virus on a chicken farm in Japan in 2020, *Viruses*, 13(3), 489, 2021.

7） Senne, D. A., Panigrahy, B., Kawaoka, Y., Pearson, J. E., Suss, J., Lipkind, M., Kida, H., Webster, R. G.：Survey of the hemagglutinin (HA) cleavage site sequence of H5 and H7 avian influenza viruses：Amino acid sequence at the HA cleavage site as a marker of pathogenicity potential, *Avian Dis*, **40**, 425～437, 1996.

8） Horimoto, T., Nakayama, K., Smeekens, S. P., Kawaoka, Y.：Proprotein-processing endoproteases PC6 and furin both activate hemagglutinin of virulent avian influenza viruses, *J Virol*, **68**, 6074～6078, 1994.

9） Nao, N., Yamagishi, J., Miyamoto, H., Igarashi, M., Manzoor, R., Ohnuma, A., Tsuda, Y., Furuyama, W., Shigeno, A., Kajihara, M., Kishida, N., Takada, A.：Genetic predisposition to acquire a polybasic cleavage site for highly pathogenic avian influenza virus hemagglutinin, *mBio*, **8**, e02298-16, 2017.

10） Hiono, T., Okamatsu, M., Nishihara, S., Takase-Yoden, S., Sakoda, Y., Kida, H.：A chicken influenza virus recognizes fucosylated α2,3 sialoglycan receptors on the epithelial cells lining upper respiratory tracts of chickens, *Virology*, 456-457, 131～138, 2014.

© The Ito Foundation

国内の牛の流死産における顧みられていない感染症の関与

Involvement of neglected infectious diseases in cattle abortions in Japan

オブライエン　悠木子・遠　藤　なつ美
（東京農工大学大学院農学研究院）

Yukiko O'Brien and Natsumi Endo
（Tokyo University of Agriculture and Technology, Institute of Agriculture）

The occurrence of abortions and stillbirth in cattle is a global issue that causes significant economic losses. This study focused on cases of unexplained abortion and stillbirth in cattle and investigated the potential involvement of new infectious agents through comprehensive analysis using next-generation sequencing. Additionally, we investigated the relationship between cattle abortion and stillbirth and Chlamydia-related bacteria, which have gained medical and veterinary importance abroad in recent years due to their role in causing abortion and stillbirth in ruminants and humans. Vaginal mucus and placental tissue samples were collected from 30 cows that experienced abortion or stillbirth in various regions of Japan (Hokkaido, Iwate, Yamagata, Tokyo, and Hiroshima) for use in this study. Comprehensive DNA analysis detected 1,582 species of prokaryotes, including *Clostridium* and *Fusobacterium*, which have been implicated in miscarriage and premature birth, as well as *Waddlia chondrophila* of *Chlamydia*-related bacteria. Comprehensive RNA analysis revealed genetic fragments of red clover vein mosquito virus and picobirnavirus. PCR testing for chlamydia-related bacteria found *W. chondrophila* in one sample, while *Parachlamydia acanthamoebae* and *Simkania negevensis* were not detected in any samples. Further detailed analysis of the pathogens for which gene fragments were detected will be carried out in the future.

1．目　　的

牛の繁殖管理において流死産の発生は大きな経済的損失をもたらす世界的な問題である。酪農が盛んなスイスでは，年間14,000-28,000頭の流産が生じており，日本円にして30-60億円の損失となっているが，約70％の流産は原因が明らかになっていない。日本では反芻動物の流死産は，共済の保険金が下りる240日以降では獣医師に報告があがってくるものの，難産などのお産の事故として処理される場合が多く，また，240日以前の保険金がおりない時期の散発的な流産は，農家が自分で片付けてしまい，獣医師にさえ認識されていない場合が多い。

牛の流死産の原因は，内分泌異常，飼養環境，暑熱ストレスなど多岐の要因に加え，ウイルスや細菌などの病原体の感染による場合があり，原因を特定することが難しい。牛ウイルス性下痢やネオスポラ症などの監視伝染病によっても反芻動物の流死産が生じるため，連続的な流死産について

© The Ito Foundation

は原因を追及する場合があるが，監視伝染病以外の病原体による流死産は現場レベルでの検査体制が十分に確立されていないのが現状である。例えば，これまで環境菌と考えられてきたクラミジア関連細菌が，近年反芻動物と人で流死産を引き起こすものとして海外では医学的・獣医学的重要性が高まっているほか，顧みられない種々の感染症が牛の流死産に関与している可能性があるが，日本での感染状況は未明である。

そこで本研究の目的は，牛の原因不明な流死産に焦点を当て，次世代シークエンサーによる網羅的解析により新たな感染性因子の関与について解明することである。本研究により，牛の感染症による流死産の発生率を低下させ食肉の安定供給を図るとともに，病原性微生物による食肉の汚染を防ぐことで食肉の安全性を高めることにつなげる。

2．方　法

流死産した母牛の腟粘液および胎盤の一部を採取し，DNAおよびRNAを抽出して次世代シークエンスにて網羅的に遺伝子を解析することで病原体の遺伝子の検出を試みた。また，反芻動物と人の流死産の原因として近年注目されるクラミジア関連細菌の遺伝子をリアルタイムPCRにて検出を試みた。

2.1　サンプルの採取

日本各地（北海道，岩手県，山形県，東京都，広島県）にて，流死産した母牛の腟粘液および胎盤の一部を採取し，冷凍保存した後に宅配冷凍便にて東京農工大学に検体を送付した。30個体から検体を収集した。

2.2　核酸抽出

腟粘液を使用し，核酸抽出キットにてDNA（Qiagen DNA mini kit）およびRNA（Trizol LS）を抽出し，Qubitにて核酸量を測定した。

2.3　次世代シークエンスによる網羅的解析

６検体ずつをひとつにまとめ，次世代シークエンス解析の受託（ゲノムリード）にてFASTQデータを得た。DNAおよびRNAはMGIEasy FS DNA Library Prep SetおよびMGIEasy FS RNA Library Prep Set（MGI社）にてライブラリを調整し，DNBSEQ-T7RSおよびDNBSEQT7 High-throughput Sequencing Set FCLフローセルにてシーケンスデータを得た。牛（*Bos taurus*）のゲノム情報を除去し，得られた配列から微生物の遺伝子配列に注目し，候補となる微生物を選抜した。

2.4　リアルタイムPCRによるクラミジア関連細菌の検出

反芻動物の流死産において特に注目するべき病原体として，クラミジア関連細菌のうち３種（*Waddlia chondrophila*，*Parachlamydia acanthamoebae*，*Simkania negevensis*）を調べた。抽出した腟粘液由来のDNAを用いてリアルタイムPCRを行った。文献ではプローブ法であったものも，インターカレーター法にて検出した。TB Green Ⅱ（Takara）とThermal Cycler Dice Real Time System Ⅲ（Takara）にてリアルタイムPCRを行った。プライマーを表に示す（**Table 1**）。

陽性であった検体は，アガロースゲル電気泳動にてバンドサイズを確認し，切り出した後にシリカゲルにて精製し，塩基配列の決定を受託（Fasmac）にて行った。得られた配列はBlastNにて相同性検索を行った。また，腟粘液にて陽性であった個体の胎盤からDNAを抽出し，リアルタイムPCRおよび塩基配列の決定を行い陽性を確認した。

3．結果と考察

3.1　次世代シークエンスによる網羅的解析

次世代シークエンスにて得られたデータサイズとリード数は表に示すとおりである（**Table 2**）。

© The Ito Foundation

Table 1　Primers for detecting Chlamydia-related bacteria.

Target	Primer sequence	Product size（bp）	Reference
W. chondrophila	CAGTCGAGAATCTTTCGCAAT CAAGGTACGCTCAAATCCAG	Approx.120	7）
W. chondrophila	GAACGAAGTGTGCTCTTGAGT CCTCTCTAGCACCATATCCGG	123	8）
P. acanthamoebae	CAAGGTAGCCCTATCGGAAG CTTGCCCAACCTCGGAAGAT	88	8）
S. negevensis	AAAGGTAACGAATAATTCCCT GCACAGTCGGGGTTGAGACCGACT	398	9）

Table 2　The number of reads and data size obtained from bulked vaginal mucus samples by next-generation sequencing.

Sample ID	Numbers of reads	Data size（Gbp）
DNA1	30,112,105	9.034
DNA2	32,211,577	9.663
DNA3	29,716,830	8.915
DNA4	36,948,264	11.084
DNA5	37,179,792	11.154
RNA1	35,699,196	10.71
RNA2	35,709, 735	10.71
RNA3	25,713,363	7.71
RNA4	31,981,792	9.59
RNA5	41,456,209	12.44

DNAの網羅的解析では1822種の原核生物が検出された。この中には，流産や死産との関連が指摘されている*Clostridium*や*Fusobacterium*も存在した。また，クラミジアに関しては，*Chlamydia suis*，Candidatus *Rhabdochlamydia porcellionis*，Candidatus *Protochlamydia naegleriophila*，*Waddlia chondrophila*，*Parachlamydiaceae* が検出された。

RNAの網羅的解析では，Red clover vein mosic virusとpicobirnavirusの遺伝子断片が検出された。しかしながら，非常に短い断片（コンティグ）であり，流死産の原因として膣粘液に存在したというよりは，餌や腸管に存在したものが混入した可能性が高いと考えられる。また，抽出したRNAはRIN値が低く（それぞれ2.3，2.1，1.9，1.7，1.7），RNAの分解が強かったため，十分な品質のデータとは言えない可能性がある。

これらの網羅的解析によって得られた情報は，今後，より詳細な解析を行う予定である。

3.2　リアルタイムPCRによるクラミジア関連細菌の検出

本研究では，１検体にて*W. chondrophila*が検出された。*P. acanthamoebae*および*S. negevensis*はいずれの検体においても検出されなかった。*W. chodrophila*は腟粘液および胎盤ともに，本研究で使用した２つのプライマーペアにていずれも検出された。決定できた塩基配列は，プライマーの配列を除いて77bp（CCTGACGAAGCGACGCCGTGTGAATGAAGAAGGCCCTTGGGTCGTAAAGTTCTTTCGCATGGGAACAAGAGAAGG

© The Ito Foundation

AT）と68bp（TGGCGGAAGGGTTAGTAATACATGGGTAATCTACCTTTAACTCTGGGATAACGGTTGGAAACGACCGC）であった。BlastNによる相同性検索にて，決定された各塩基配列はそれぞれ*Waddlia chondrophila* WSU 86-1044 16S ribosomal RNA, partial sequence（Acc. NR_074886.1）と*Waddlia chondrophila* isolate 4120/Belarus/Minsk/2021 16S ribosomal RNA gene, partial sequence（Acc. OM062605.1）と最も近縁であった。

*W. chondrophila*が検出された検体のプロフィールは，北海道のホルスタイン牛で，２産目の乾乳期前期であった。朝に起立不能のため往診したところ，早産（死産）しており，母牛は耳介が冷えており診療中に死亡した。T 35.5，P40，R40，Na 141，K4.1，Cl 97 mmol/l，glu 300 ng/ul，HCl 36%，Ca 0.93 mmol/lであった。

クラミジア目には，オウム病クラミジアの病原体である*Chlamydia psittaci*など古来より病原性が認められてきたクラミジア科の他に６科（*Criblamydiaceae*，*Parachlamydiaceae*，*Piscichlamydiaceae*，*Rhabdochlamydiaceae*，*Simkaniaceae*，*Wddiaceae*）が存在し，この６科をクラミジア関連細菌と呼称する。クラミジア関連細菌は，1990年代に病原性が相次いで指摘され，特に，*W. chondrophila*と*P. acanthamoebae*は人と反芻動物での流死産の原因として報告されており，流死産した胎盤から分離され[1]，流死産した女性の抗体価が高いことが示されている[2,3]。さらに，ヒトの未熟児の新生児の肺や羊水からも検出される[4,5]。日本の鳥においてもクラミジア関連細菌が存在することが示されている[6]。

今回検出した*W. chondrophila*は上述したように，人と反芻動物での流死産の原因として報告されている。本研究では，腟粘液だけでなく胎盤からも遺伝子断片が検出されたため，流死産の原因となった可能性が高いと考えるが，*W. chondrophila*は水などにも存在するため，環境からのコンタミネーションである可能性も否定できない。今後，胎盤組織の免疫組織化学による*W. chondrophila*の存在の証明や，細胞培養系を用いた*W. chondrophila*の分離を行う予定である。

また，人でのクラミジア関連細菌の感染は，野鳥や野生動物が感染源になっている可能性がある一方，クラミジア関連細菌に汚染された非加熱の乳肉が人への感染源となっている可能性も指摘されている[3]。牛由来の食品がクラミジア関連細菌の伝播源となることのないよう，今後も監視していく必要がある。

４．要　約

牛の繁殖管理において流死産の発生は大きな経済的損失をもたらす世界的な問題である。本研究では，牛の原因不明な流死産に焦点を当て，次世代シークエンサーによる網羅的解析により新たな感染性因子の関与について検討した。また，近年反芻動物と人で流死産を引き起こすものとして海外では医学的・獣医学的重要性が高まっているクラミジア関連細菌について，牛の流死産との関連を検討した。日本各地（北海道，岩手県，山形県，東京都，広島県）にて，流死産した30個体の母牛の腟粘液および胎盤の一部を採取し研究に用いた。DNAの網羅的解析では1582種の原核生物が検出され，流産や死産との関連が指摘されている*Clostridium*や*Fusobacterium*および*W. chondropphila*などのクラミジア関連細菌も存在した。RNAの網羅的解析では，Red clover vein mosic virusとpicobirnavirusの遺伝子断片が検出された。クラミジア関連細菌に関するPCRでは，１検体にて*W. chondrophila*が検出された。*P. acanthamoebae*および*S. negevensis*はいずれの検体においても検出されなかった。今後，遺伝子断

© The Ito Foundation

片が検出された病原体に関して，より詳細な解析を行う予定である。

文　献

1） Henning, K., Schares, G., Granzow, H., Polster, U., Hartmann, M., Hotzel, H., Sachse, K., Peters, M., Rauser, M.：*Neospora caninum* and *Waddlia chondrophila* strain 2032/99 in a septic stillborn calf, *Vet Microbiol*, **85**, 285～292, 2002.

2） Baud, D., Thomas, V., Arafa, A., Regan, L., Greub, G.：*Waddlia chondrophila*, a potential agent of human fetal death, *Emerg Inf Dis*, **13**, 1239～1243, 2007.

3） Baud, D., Goy, G., Osterheld, M. C., Borel, N., Vial, Y., Pospischil, A., Greub, G.：*Waddlia chondrophila*: from bovine abortion to human miscarriage, *Clin Inf Dis*, **52**, 1469～1471, 2011.

4） Lamoth, F., Aeby, S., Schneider, A., Jaton-Ogay, K., Vaudaux, B., Greub, G.：*Parachlamydia* and *Rhabdochlamydia* in premature neonates, *Emerg Inf Dis*, **15**, 2072～2075, 2009.

5） Baud, D., Goy, G., Gerber, S., Vial, Y., Hohlfeld, P., Greub, G.：Evidence of maternal-fetal transmission of parachlamydia acanthamoebae, *Emerg Inf Dis*, **15**, 120～121, 2009.

6） Sassa-O'Brien, Y., Ohya, K., Ikeuchi, S., Sanada, N., Kojima, A., Yorisaki, M., Ebisawa, K., Ueda, K., Iki, H., Mizukami, M., Hayashidani, H., Fukushi, H.：*J Vet Med Sci*, **85**, 907～911, 2023.

7） Goy, G., Croxatto A., Posfay-Barbe K. M., Gervaix, A., Greub. G.：Development of real-time PCR for the specific detection of *Waddlia chondrophila* in clinical samples, *Eur J Vlin Microbiol Infect Dis*, **28**, 1483～1486, 2009.

8） Zezekalo, V. K., Pochernyaev, K. F., Voloshchuk, V. M., Zasukha, L. V., Shcherbakova, N. S., Kulynych, S. M.：Muctiplex PCR assay for *chlamydia*-like bacteria detection, *Wiad Lek*, **72**, 851～855, 2019.

9） Kahane, S., Greenberg, D., Friedman, M. G., Haikin, H., Dagan, R.：High prevalence of "Simkania Z", a novel *chlamydia*-like bacterium, in infants with acute bronchiolitis, *J Inf Dis*, **177**, 1425～1429, 1998.

© The Ito Foundation

牛気道上皮細胞を用いた口蹄疫ウイルスの試験管内増殖系の確立とその応用

Establishment and application of an in vitro growth system for foot-and-mouth disease virus using bovine respiratory tract epithelial cells

岡林　環樹[1]・深井　克彦[2]・齊藤　　暁[3]

（[1]宮崎大学産業動物防疫リサーチセンター，[2]国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門，[3]宮崎大学農学部獣医学科）

Tamaki Okabayashi[1], Katsuhiko Fukai[2] and Akatsuki Saito[3]

（[1]Center for Animal Disease Control, University of Miyazaki, [2]National Agriculture and Food Research Organization, [3]Faculty of Agriculture, University of Miyazaki）

Cattle are highly susceptible to foot-and-mouth disease virus (FMDV). The target site for entry into the bovine organism is the respiratory tissue. Currently, LFBK-αvβ6 cells from pigs and ZZ-R127 cells from goats are used to culture FMDV, but an airway cell culture system derived from cattle has not been established. Therefore, we tried to establish a FMDV infection system in bovine respiratory epithelial cells (bREC). We attempted to immortalize bRECs using retroviral and lentiviral vectors but were unable to establish suitable immortalized cells. Therefore, FMDV were infected in the primary bRECs and its proliferative, innate immunity-inducing, and cytokine/chemokine-inducing properties were evaluated. Higher viral proliferation was observed in bovine trachea epithelial cells (bTEC) than in bovine bronchus epithelial cells (bBEC). In virus-infected bTEC, type III IFN was induced faster than type I IFN. In addition, cytokine and chemokine mRNAs were induced more strongly in bTEC than in bBEC. In this study, we were the first in the world to confirm the growth of FMDV in bREC. In addition, bTEC, which are closer to the upper airway, had higher viral proliferation than bBEC, which correlated with the earlier inducibility of type III IFN and higher inducibility of cytokine chemokines.

1．目　　的

口蹄疫は，食肉産業や経済に壊滅的なダメージを及ぼす越境性動物疾病であり，日本国内への侵入が最も恐れられている感染症である[1)]。口蹄疫ウイルス（FMDV）が牛生体内に侵入する際の標的部位は，軟口蓋や咽頭等の気道系組織である。現在FMDVの培養には，主に豚胎子腎臓株化細胞LFBK-αvβ6や山羊胎子舌株化細胞ZZ-R127が使用されているが[2, 3)]，FMDV侵入門戸となる牛細胞培養系は樹立されていない。そのため，牛の気道上皮由来細胞株を用いて感染モデルを樹立することは，FMDVの牛細胞における増殖系の確立だけでなく，FMDVの侵入機序に必須の課題である。そこで本研究では，牛気道上皮細胞におけるFMDVの増殖性を確認し，免疫誘

© The Ito Foundation

導性を検討することを目的とした。また，これらの牛の気道上皮細胞株を不死化することにより，有効的なFMDVの増殖を可能とする牛由来株化細胞列として確立することを目指した。

２．方　法

2.1　牛気道上皮細胞の不死化

不死化細胞樹立のためのレトロウイルスベクター作製用に，以下のプラスミドを使用した；pLXSN1E6E7，pBABE-neo largeTcDNA，pDON-5 Neo-ZsGreen，pDON-5 Neo-hCDK4（R24C），pDON-5 Neo-CyclinD１。また，レンチウイルスベクター作製用に，以下のプラスミドを使用した；pLVSIN-CMV-Exp1-EGFP-T2A-bst-hTERT。これらのプラスミドをLenti-X 293T細胞にトランスフェクションし，上清からウイルスを回収した。これらのウイルスを牛気道上皮細胞に感染させ，１mg/mlネオマイシン処理による不死化細胞の選別を行った。

2.2　牛気道上皮細胞における口蹄疫ウイルス感染

黒毛和牛の喉頭，気管に由来する上皮細胞（bovine trachea epithelial cells；bTEC，bovine bronchus epithelial cells；bBEC）を使用し，既報に従い培養した[4]。また，LFBK-αvβ6やZZ-R127も，既報の方法に従って培養した[5]。

FMDVは，タイの口蹄疫センターより入手した株O/ME-SA/Ind-2001e；isolate O/TAI/315/2016[5]を使用した。このウイルスはLFBK-αvβ6を用いて培養を行った。また，これらのウイルス力価はLFBK-αvβ6を用いた$TCID_{50}$により測定した。

牛気道上皮細胞（bTEC，bBEC）へのFMDV感染は，農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門BSL３実験室内にて実施した。それぞれの細胞を３×10^5個/mlにて24穴プレートに播種し，FMDVのMOIを0.3，３にて感染させた。対照試験として二本鎖RNA polyinosinic-polycytidylic acid（poly IC；Sigma Aldrich）をLipofectamine 2000（Invitrogen）と混和し，細胞へ処理した。感染/処理細胞およびその上清を３，６，12，24時間に回収した。

2.3　牛気道上皮細胞におけるFMDV-RNAの定量と遺伝子配列解析

定量RT-PCR法により，FMDV-RNAの定量を行った。ウイルスRNAは，FMDV感染細胞の培養上清からQIAamp Viral RNA Mini kit(QIAGEN)を用いて抽出した。定量RT-PCRには，One Step PrimeScript RT-PCR Kit （Perfect Real Time）（タカラ）を遺伝子増幅試薬として使用した。また，FMDVのVP１領域特異的プライマーを用いて増幅した[6]。SupreDye v3.1 Cycle Sequencing Kit（M&S TechnoSystems）を用いて遺伝子配列の解読を実施し，MEGA X（MEGA Software）version 11.0.13. による遺伝子配列解析を行った。

2.4　FMDV感染牛気道上皮細胞におけるインターフェロン（IFN），サイトカイン，ケモカインmRNAの定量

感染/処理細胞からRNeasy Mini Kit(QIAGEN)を用いてRNAを抽出した。抽出RNAを用いて，One Step TB Green PrimeScript plus RT-PCR kit（タカラ）を用いて定量PCRを行った。それぞれの標的遺伝子プライマーは，IFN-β，IL-６，IL-８，TNF-α，GAPDH[7]，IFN-λ３，Mx1，OAS[8]，CCL５[9]を使用した。未処理細胞におけるGAPDHを内在性コントロール遺伝子としてThreshold Cycle（Ct値）に基づいた比較Ct法を用いて比較定量した。

2.5　免疫蛍光抗体法（IFA）

FMDV感染した牛気道上皮細胞を80％アセトン（Wako）にて固定し，抗原プレートとした。

© The Ito Foundation

抗FMDVマウス抗体を一次抗体とし，Alexa蛍光標識抗マウスIgGヤギ抗体（1：400，ab150113，Abcam）を二次抗体として反応させ，蛍光顕微鏡システムEVOS M7000 Imaging System（Thermo Fisher Scientific）を用いて観察を行った。

2.6　統計解析

すべての実験は3回の実験を実施し，二元配置分散分析とダネットに多重比較検定により標準誤差（SEM）を算出し，p値0.05以下を有意差ありと判定した。これらのデータ解析はGraphPad Prism（version　10.2.2）を使用した。

3．結果と考察

3.1　牛気道上皮細胞の不死化

ウイルスベクターに組み込まれたZs Greenを指標としてウイルス感染性を測定したところ，レトロウイルスはbTECに1.756%，bBECで0.274%，レンチウイルスはbTECに12.21%，bBECで16.2%という低い感染率であった。そのためネオマイシン選択において，十分な生存細胞が確保できなかった。これらの理由から，以下の実験は20代まで継代可能な牛気道上皮細胞を使用した。

3.2　牛気道上皮細胞におけるFMDVの増殖性

FMDVをMOI 3で感染させ，上清中のウイルス遺伝子量を継時的に測定した。感染24時間にて高いウイルスコピー数が確認できた（**Fig. 1A**）。

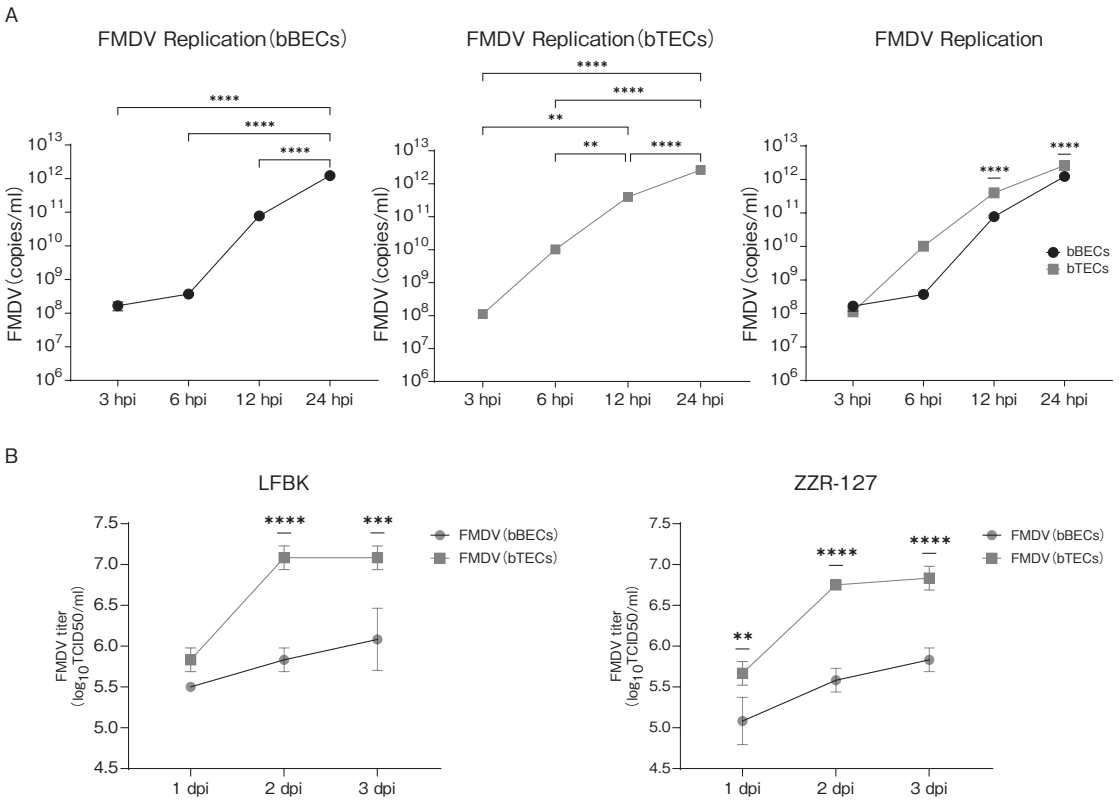


Fig. 1　Growth kinetics of FMD virus in bovine respiratory epithelial cells.
A：The FMDV RNA copies numbers were assessed based on the FMDV MOI of 3 and the duration of the virus infection.
B：Virus titers cultured in bTEC and bBEC were measured by TCID50 with LFBK and ZZR-127 cells.

© The Ito Foundation

感染12，24時間後においてbTECにおけるウイルス遺伝子増幅（平均2.6 × 10^{12}copies/ml）は，bBEC（平均1.2×10^{12}copies/ml）よりも有意に高い結果となった（ともにp＜0.05，**Fig. 1A**）。

また，FMDVをMOI３感染させ，感染後１，２，３日間培養した上清中のウイルス力価を，LFBK細胞を用いたTCID50により測定した。感染１，２，３日後のいずれにおいても，bTECにおけるウイルス力価は，bBECよりも有意に高い値を示した（いずれもp＜0.05，**Fig. 1B**）。

それぞれの細胞におけるウイルス感染性を確認するために，FMDV感染後24時間後の細胞を用いてIFAを実施した。感染24時間後においてFMDV感染細胞において細胞変性効果（CPE）が確認できており，ほぼすべての細胞におけるウイルス抗原の存在が確認できた（**Fig. 2**）。

これらの結果より，牛気道に由来する上皮細胞bTEC，bBECが，FMDVに対する感染性を有することを確認できた。また喉頭由来上皮細胞が，気管由来上皮細胞よりも有意に高いFMDV感染性を有することが明らかになった。

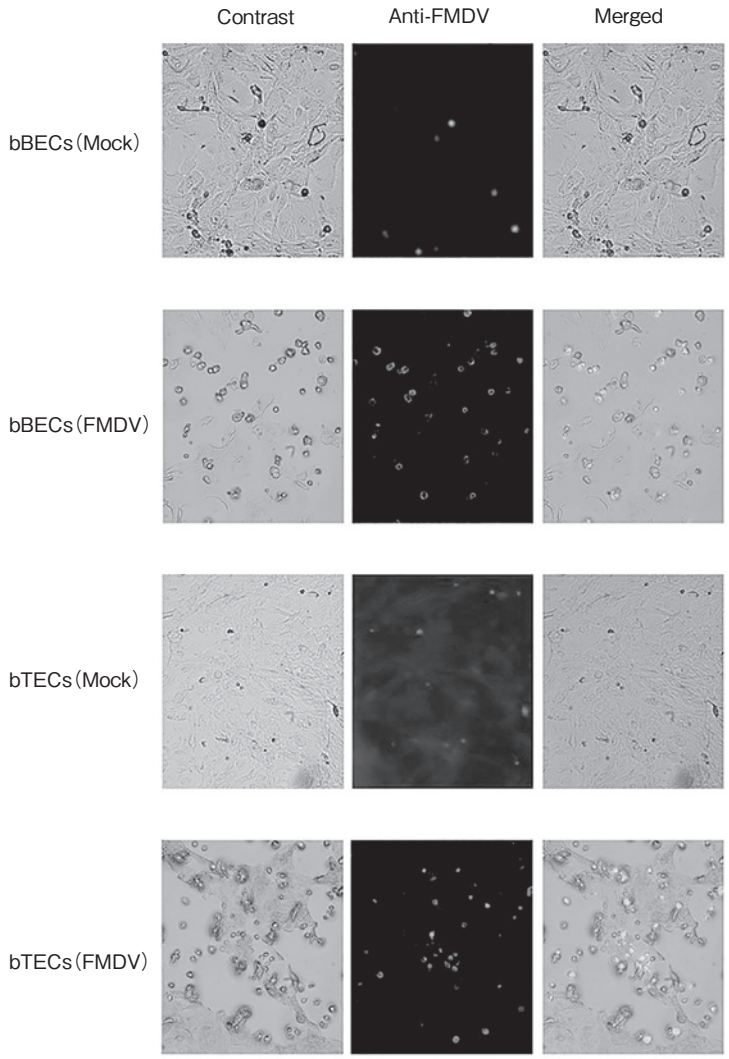


Fig. 2　Immune staining of FMD virus-infected bovine respiratory epithelial cells.

© The Ito Foundation

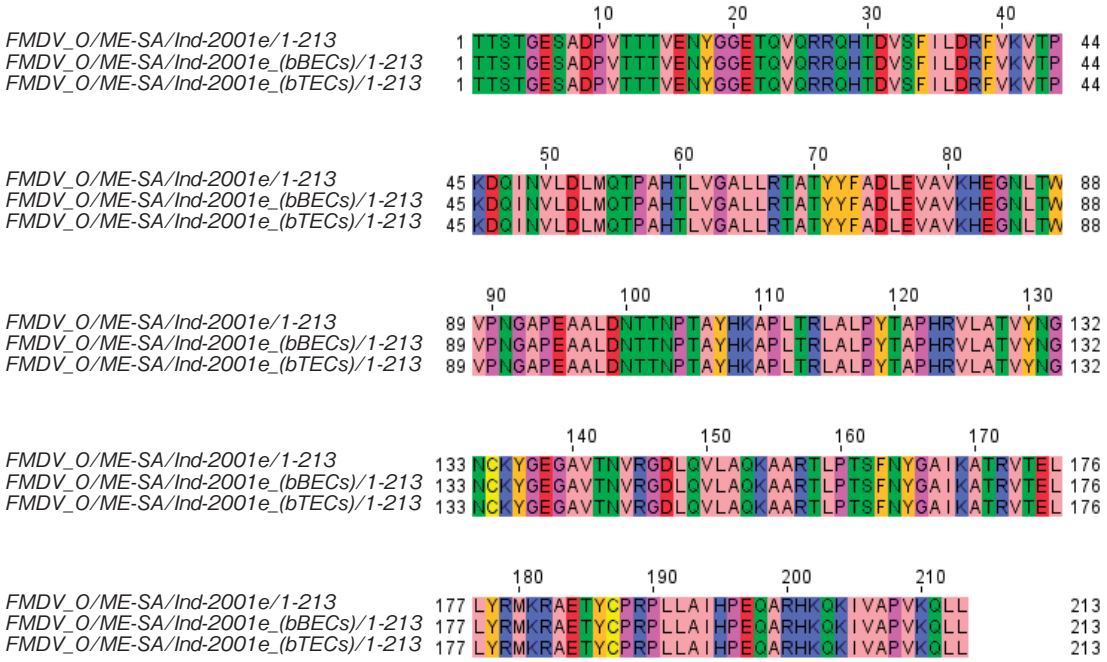


Fig. 3　Genetic Characteristics of FMD virus at VP1 region produced from bovine respiratory epithelial cells.

3.3　FMDV VP-1遺伝子配列の比較

牛気道上皮細胞にて増殖したFMDVの遺伝子変異の可能性を検証するために，VP 1 領域の遺伝子配列を比較した。bTEC，bBECの培養上清から回収されたFMDVのVP 1 領域の遺伝子配列は，感染させたLFBK細胞由来FMDVのVP 1 領域の遺伝子配列と100％一致した（**Fig. 3**）。この結果は，牛気道上皮細胞に感染したFMDVには変異が誘導されないことを示唆した。

3.4　FMDV感染牛気道上皮細胞bRECにおけるⅠ型IFN，III型IFN，IFN誘導遺伝子群mRNAの発現

FMDV感染牛気道細胞における自然免疫誘導性を検証するために，Ⅰ型IFN，III型IFN，IFN誘導遺伝子群mRNAの定量を行った。FMDV感染24時間後に，bTEC，bBECにおけるIFN-αとIFN-β mRNAの誘導が確認できた（**Fig. 4A**）。III型IFNであるIFN-λ 3 mRNAはMOI 3 で感染させたbTECにおいては感染後 3 時間ですでに誘導が始まり，感染24時間でピークに達していた。bBECでは感染後12時間で誘導が始まった（**Fig. 4B**）。これらのIFNの誘導に相関して，Mx 1 やOAS mRNAの誘導も確認できた（**Fig. 4C**）。

3.5　FMDV感染牛気道上皮細胞bRECにおけるサイトカイン，ケモカインmRNAの発現

FMDV感染牛気道細胞におけるサイトカイン，ケモカインmRNAの定量を行った。いずれの感染細胞においてもIL-6，TNF-α，IL-8，CCL 5 のmRNAの有意な誘導性が確認できた（**Fig. 5**）。bTECにおけるIL-6，TNF-α，IL-8のmRNAは，bBECよりも早い時間帯で誘導されていた。

これらの結果は，喉頭由来上皮細胞が，気管由来上皮細胞よりも高い炎症性サイトカインやケモカインの誘導を起こす可能性を示唆した。この組織部位におけるmRNAの誘導性は，FMDV感染

© The Ito Foundation

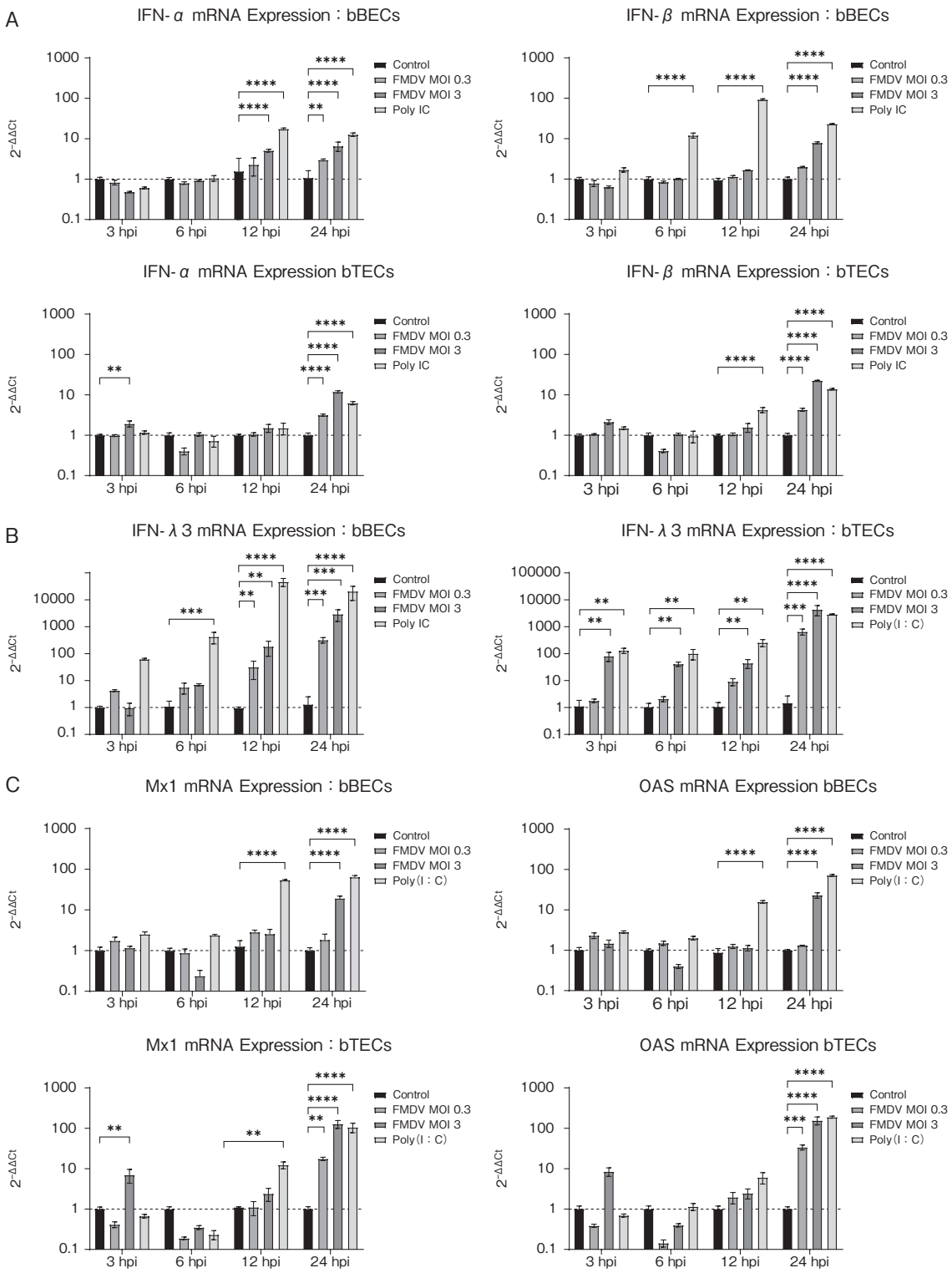


Fig. 4　Expression of genes encoding type I and type III IFNs and IFN stimulated genes in BRECs infected with FMD virus. A. mRNA expression of type I IFN in bTEC and bBEC. B. mRNA expression of type III IFN in bTEC and bBEC. C. mRNA expression of IFN stimulated genes in bTEC and bBEC.

© The Ito Foundation

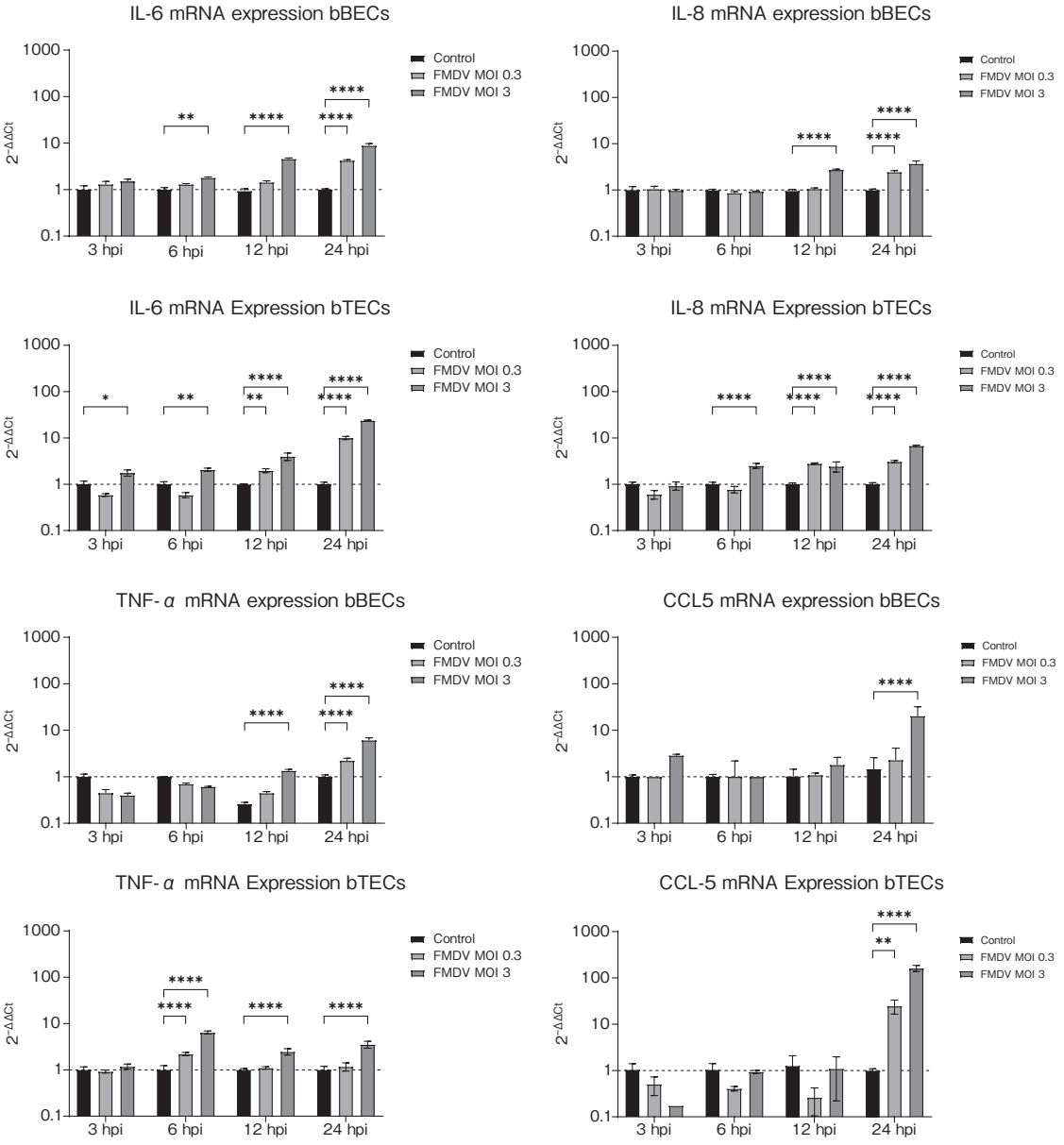


Fig. 5　Expression of genes encoding proinflammatory cytokines and chemokines in BRECs infected with FMD virus.

性（**Fig. 1**）に相関していることが考えられた。

4．要　　約

牛はFMDVに感受性が高い。牛生体内に侵入する際の標的部位は，気道組織である。現在FMDVの培養には，豚由来LFBK-αvβ6細胞や山羊由来ZZ-R127細胞が使用されているが，牛由来の気道細胞系は樹立されていない。そこで本研究では，牛気道上皮細胞におけるFMDV増殖系の確立に取り組んだ。

レトロウイルス，レンチウイルスを用いて，牛気道上皮細胞の不死化を試みたが，適切な不死化細胞は樹立できなかった。そこで初代培養系に口蹄疫ウイルスを感染させ，その増殖性，自然免疫

© The Ito Foundation

誘導性，サイトカイン・ケモカイン誘導性を評価した。喉頭由来細胞では，気管由来細胞よりも高いウイルス増殖が確認できた。ウイルス感染した喉頭由来細胞ではIII型IFNがⅠ型IFNよりも早く誘導されていることが確認できた。また，喉頭由来細胞では，気管由来細胞よりもサイトカイン・ケモカインmRNAが強く誘導されることが確認できた。

本研究では，牛気道上皮細胞におけるFMDVの増殖を世界に先駆けて確認することができた。また，より上部気道に近い喉頭由来上皮細胞が気管由来上皮細胞よりもウイルス増殖性が高く，III型IFNの早い誘導性，サイトカイン・ケモカインの高い誘導性に相関することが考えられた。

文　献

1） Knight-Jones, T. J. D., Rushton, J.：The economic impacts of foot and mouth disease – What are they, how big are they and where do they occur?, *Preventive Veterinary Medicine*, **112**, 161～173, 2013.

2） LaRocco, M., Krug, P. W., Kramer, E., Ahmed, Z., Pacheco, J. M., Duque, H., Baxt, B., Rodriguez, L. L.：Correction for LaRocco et al., A Continuous Bovine Kidney Cell Line Constitutively Expressing Bovine αVβ 6 Integrin Has Increased Susceptibility to Foot-and-Mouth Disease Virus, *J Clin Microbiol*, **53**, 755～755, 2015.

3） Fukai, K., Onozato, H., Kitano, R., Yamazoe, R., Morioka, K., Yamada, M., Ohashi, S., Yoshida, K., Kanno, T.：Availability of a fetal goat tongue cell line ZZ-R 127 for isolation of Foot-and-mouth disease virus（FMDV）from clinical samples collected from animals experimentally infected with FMDV, *J VET Diagn Invest*, **25**, 770～774, 2013.

4） Sudaryatma, P. E., Saito A., Mekata H., Kubo M., Watcharapong W., Okabayashi T.：Bovine Respiratory Syncytial Virus Decreased Pasteurella multocida Adherence by Downregulating the Expression of Intercellular Adhesion Molecule-1 on the Surface of Upper Respiratory Epithelial Cells, *Vet Microbiol*, **246**, 108748, 2020.

5） Fukai K., Morioka K., Yamada M., Nishi T., Yoshida K., Kitano R., Yamazoe R., Kanno T.：Comparative performance of fetal goat tongue cell line ZZ-R 127 and fetal porcine kidney cell line LFBK-αvβ6 for Foot-and-mouth disease virus isolation, *Vet Diagn Invest*, 27(4), 516～521, 2015.

6） Knowles, N. J., Wadsworth, J., Bachanek-Bankowska, K., King, D. P.：VP1 sequencing protocol for foot and mouth disease virus molecular epidemiology：-EN- -FR- Protocole de séquençage de la VP1 pour les études d'épidémiologie moléculaire du virus de la fièvre aphteuse -ES- Protocolo de secuenciación de la VP1 para estudiar la epidemiología molecular del virus de la fiebre aftosa., *Rev, Sci. Tech. OIE*, **35**, 741～755, 2016.

7） Lau, S. K. P., Lau, C. C. Y., Chan, K.-H., Li, C. P. Y., Chen, H., Jin, D.-Y., Chan, J. F. W., Woo, P. C. Y., Yuen, K.-Y.：Delayed induction of proinflammatory cytokines and suppression of innate antiviral response by the novel Middle East respiratory syndrome coronavirus: implications for pathogenesis and treatment, *Journal of General Virology*, **94**, 2679～2690, 2013.

8） Barathiraja, S., Gangadhara, P. A. V., Umapathi, V., Dechamma, H. J., Reddy, G. R.：Expression and purification of biologically active bovine Interferon λ3（IL28B）in Pichia pastoris, *Protein Expression and Purification*, **145**, 14～18, 2018.

9） Yang, L., Guo, R., Ju, Z., Wang, X., Jiang, Q., Liu, Y., Zhao, H., He, K., Li, J., Huang, J.：Production of an aberrant splice variant of CCL5 is not caused by genetic mutation in the mammary glands of mastitis-infected Holstein cows, *Mol Med Report*, 2019.

© The Ito Foundation

薬剤耐性プラスミド脱落により薬剤感受性を復帰させる乳酸菌の検索

Search for lactic acid bacteria that reverse antimicrobial susceptibility by dropping antimicrobial resistance plasmids

石　原　加奈子
（東京農工大学大学院農学研究院）

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

Infections caused with antimicrobial-resistant bacteria limit the choice of therapeutic antimicrobial agents and cause human health hazards. Therefore, there is a need to reduce antimicrobial-resistant bacteria in both the veterinary and medical fields. To determine whether the frequency of appearance to returned-susceptible isolates with lost antimicrobial resistance plasmid increases when antimicrobial-resistant *Salmonella* isolates were cultured under conditions of inhibition with lactic acid bacteria, which are also used feed additives.

Putative returned-susceptible isolates to trimethoprim (TMP) were selected from two *S.* Schwarzengrund isolates (Sal_249 and Sal_291) and one *S.* Infantis isolate (Sal_238) that were obtained from chicken and were resistant to TMP after these resistant isolates were cultured with culture supernatant of three lactic acid bacteria isolates from horse faces (LAB24, *Enterococcus mundtii*; LAB32, *Limosilactobacillus equigenerosi* and LAB34, *Lactbacillus equi*). TMP resistance gene was tested for putative returned-susceptible isolates. Then frequencies of appearance to return susceptible were calculated. The returned-susceptible isolates to TMP were tested antimicrobial susceptibilities and to harbor other antimicrobial resistance genes.

The frequencies of appearance to return susceptible from *S.* Schwarzengrund (Sal_249 and Sal_291) increased when resistant isolates were cultured with LAB34 culture supernatant addition ($10^{-7.73}$ and $10^{-6.92}$) compared to those frequencies without lactic acid bacteria supernatant ($10^{-8.64}$ and $10^{-8.19}$) by around 10-fold. The frequencies for *S.* Infantis (Sal_238) were similar among LAB34 culture supernatant addition ($10^{-8.23}$) and no addition ($10^{-7.87}$). Among the returned-susceptible isolates selected from Sal_249 and Sal_238, only the TMP resistance gene or both TMP resistance gene and the kanamycin resistance gene were lost, but streptomycin and tetracycline resistance genes were maintained. All of *aadA*, *sul1*, *tetA*, *dfrA14*, *aphA1* were transferred from Sal_249 and Sal_238, simultaneously. Among the returned-susceptible isolates selected from Sal_291, the TMP resistance gene, the streptomycin resistance gene, and the sulfa drug resistance gene were lost.

The culture supernatant of lactic acid bacteria LAB34 could promote of return to antimicrobial susceptibilities from antimicrobial-resistant *S.* Schwarzengrund, but the effects were different among the combination of lactic acid bacteria and antimicrobial-resistant isolates.

© The Ito Foundation

To replace antimicrobial-resistant bacteria in the animal body with susceptible bacteria, lactic acid bacteria could dramatically increase the frequency among various bacterial isolates are required for animal feed additive. Only one or two of the simultaneously transferred genes were lost, suggesting that a region on the antimicrobial resistance plasmid was partly lost.

１．目　　的

薬剤耐性菌は，ヒトおよび動物に対する抗菌剤による治療，抗菌剤の誤用や過剰使用によって選択される。薬剤耐性菌による感染症は，治療薬の選択に制限が生じるなど，世界的に重要な公衆衛生上の問題である。米国では毎年280万人以上が，薬剤耐性菌に感染し，その結果35,000人以上が死亡している[1)]。

薬剤耐性菌を感受性菌に復帰させることが可能なら，薬剤耐性菌の問題解決の大きな１歩となると考えられる。本研究では，動物が保菌または食肉等を汚染している薬剤耐性菌において，複数の薬剤耐性遺伝子を同時に拡大させるのに，重要な役割を果たしているプラスミドに着目し，*in vitro*において，飼料添加物としても利用される乳酸菌の培養上清を添加し薬剤耐性菌を培養し，薬剤耐性プラスミドが脱落し，薬剤耐性菌を感受性に復帰させられるかを評価した。

２．方　　法

2.1　供試菌

鶏肉由来トリメトプリム（TMP）耐性*Salmonella* Schwarzengrund ２株（Sal_249およびSal_291）[2, 3)]および*S.* Infantis １株（Sal_238）[2)]を親株として，これら３株からTMP感受性復帰株を分離した。

乳酸菌として，馬糞便由来LAB24（*Enterococcus mundtii*），ＬＡＢ３２（*Limosilactobacillus equigenerosi*）およびLAB34（*Lactbacillus equi*）を用いた。

2.2　乳酸菌培養上清の作成

乳酸菌３株をそれぞれMRS液体培地（Solabia Biokar Diagnostics, France）５ mlに接種し，35℃，180 rpmで一晩振盪培養し，その培養液を，10,000 rpmで10分遠心後，上清を穴径0.45 μmのフィルター（SARTORIUS, Germany）でろ過して，乳酸菌培養上清とした。

2.3　ペニシリンスクリーニング法による薬剤感受性復帰株の選択

乳酸菌培養上清添加によりTMP感受性復帰の促進を試みるため，ミューラーヒントンブイヨン（MHB）および乳酸菌培養上清を９：１で混合した培地６mlにTMP耐性サルモネラを接種し，35℃，180 rpmで一晩振盪培養し，以下のペニシリンスクリーニング法で感受性復帰株を選択した。対照として，無添加MHBで培養したTMP耐性サルモネラも同様に用いた。

TMP耐性サルモネラとTMP感受性復帰株が混在した培養液から，TMP感受性復帰株を分離できるように，吉川のペニシリンスクリーニング法[4)]を改良した。MHB ７mlにTMP溶液（最終濃度75 μg/ml）１mlを添加後，TMP耐性サルモネラの接種液１mlを接種し，35℃，180 rpmで１時間振盪培養した。この培養中に，TMP耐性サルモネラは増殖し，TMP感受性復帰株は，TMPの静菌作用により，増殖が抑制される。この培養液を0.1 mlとって，菌数を測定した。

次に，増殖している細菌に作用するペニシリンG（PCG；最終濃度5,000 μg/ml）溶液を１ml添加し，35℃，180 rpmで23時間振盪培養することにより，TMP存在下でも増殖するTMP耐性サルモ

© The Ito Foundation

Table 1　Changes in the frequency of return to susceptible from trimethoprim-resistant *Salmonella* due to the addition of lactic acid bacteria culture supernatant.

Serovar	Parent strain	Added Lactic acid bacteria supernatant			
		Free additive	LAB34	LAB24	LAB32
Salmonella Schwarzengrund	Sal_249	−8.64*	−7.73	＜−7.91	−7.79
	Sal_291	−8.19	−6.92	−7.8	−7.94
Salmonella Infantis	Sal_238	−7.87	−8.23	＜−6.49	＜−8.32

*frequency of return to susceptible (Log_{10})

ネラを，PCGにより殺菌した。静菌作用のTMPが，増殖を抑制したTMP感受性復帰株は，PCGにより殺菌されず，生残した。合計24時間培養した培養液を，ミューラーヒントン寒天培地に接種し，感受性復帰株を分離した。

2.4　薬剤感受性復帰頻度の測定

上述の改良ペニシリンスクリーニング法により，TMP耐性サルモネラから，TMP感受性復帰株を分離し，その感受性復帰率を算出した。

2.3のTMP添加MHBで1時間培養した培養液の細菌数を感受性復帰頻度の算出に用いる総菌数（A）とした。PCGを追加し，23時間振盪培養した培養液の菌数をTMP感受性復帰候補株数（B）とし，最大で25コロニーを釣菌し以下の検査に供した。

TMP感受性復帰候補株を，0.25 μg/mlおよび1.0 μg/ml TMP添加MH寒天培地に接種，培養し，発育が認められなかった株について，TMP耐性遺伝子*dfrA14*をPCRで確認した[3]。

TMP感受性復帰株の出現頻度は，感受性復帰候補株数（B）を総菌数（A）で割って算出した(仮の感受性復帰頻度)。しかし，感受性復帰候補株に耐性株が混在していた場合，*dfrA14*脱落が認められた株数（C）を，TMP添加MH寒天培地での発育検査に供試した株数（D）で割った値を仮の感受性復帰頻度に乗じて，真の感受性復帰頻度を算出した。すなわち，次の式で算出した。

真の感受性復帰率＝（B/A）×（C/D）

また，この試験は3回繰り返して行った。

2.5　TMP感受性復帰株の性状検査

TMP感受性復帰株における親株が保有していた薬剤耐性遺伝子の保有をPCRによって確認した[5]。また，寒天平板希釈法により，TMP，テトラサイクリン（TC），ストレプトマイシン（SM）およびカナマイシン（KM）の最小発育阻止濃度（MIC）を測定した[6]。

2.6　薬剤耐性遺伝子の伝達性

感受性復帰に用いたTMP耐性サルモネラから，薬剤耐性遺伝子がどのような組み合わせで同時に伝達されるかを調べるため，混合培養法による伝達試験を行った。

3．結果と考察

乳酸菌培養上清添加および無添加条件でのTMP感受性復帰頻度を**Table 1** に示す。乳酸菌培養上清の無添加条件下における*S.* Schwarzengrund（Sal_249およびSal_291）の感受性復帰頻度（$10^{-8.64}$および$10^{-8.19}$）と比べ，LAB34培養上清添加により感受性復帰頻度（$10^{-7.73}$および$10^{-6.92}$）は上昇した。また，*S.* Schwarzengrund Sal_249では，LAB32培養上清添加によっても感受性復帰頻度（$10^{-7.79}$）は上昇した。*S.* Infantis（Sal_238）では無添加条件での感受性復帰頻度（$10^{-7.87}$）と比べ，LAB34培養上清を添加しても，感受性復帰頻度（$10^{-8.23}$）は上昇しなかった。

© The Ito Foundation

Table 2 Comparison of antimicrobial resistance genes harbored for trimethoprim-resistant parental isolates and returned-to-susceptibility strains.

Strain		No.	Antimicrobial resistance gene
Sal_249	Parent strain		*aadA, sul1, tetA, dfrA14, aphA1*
	Returned-to-susceptibility strain	15	*aadA, sul1, tetA, aphA1*
		2	*aadA, sul1, tetA*
Sal_238	Parent strain		*aadA, sul1, tetA, dfrA14, aphA1*
	Returned-to-susceptibility strain	3	*aadA, sul1, tetA, aphA1*
		1	*aadA, sul1, tetA*
Sal_291	Parent strain		*sul2, dfrA14, strA, strB, aphA1*
	Returned-to-susceptibility strain	13	*aphA1*

LAB34の培養上清を添加することにより，感受性復帰頻度が10倍程度上昇したが，その効果は，*S.* Schwarzengrundでのみ認められ，*S.* Infantisでは認められなかった。2008年に鶏肉から分離された*S.* Schwarzengrundと比べ，2015-2019年に分離された*S.* Schwarzengrundでは，TMP耐性株の割合が低下したが[4]，2015-2017年に鶏肉から分離された*S.* Infantisでは[2]，TMP耐性株の割合が高く，*S.* InfantisにおけるTMP耐性遺伝子*dfrA14*の保有は安定性が高いのかもしれない。また，乳酸菌によって，感受性復帰の促進の度合いは異なった。今回供試した乳酸菌３株の中では，*Lactbacillus equi* LAB34の感受性復帰促進がより強く認められた。しかし，その効果も感受性復帰頻度が10倍程度であり，野外で動物体内の薬剤耐性菌を感受性復帰させるために，飼料添加物等として使う乳酸菌としては，多様な薬剤耐性菌に対して感受性復帰を促進するより高い能力が必要と考えられた。

親株であるTMP耐性株と得られたTMP感受性復帰株の保有する薬剤耐性遺伝子を**Table２**に示す。Sal_249およびSal_238から分離した感受性復帰株ではTMP耐性遺伝子*dfrA14*のみ，またはTMP耐性遺伝子*dfrA14*およびKM耐性遺伝子*aphA1*が脱落したが，TC耐性遺伝子*tetA*およびSM耐性遺伝子*aadA*の保有は維持された。Sal_291から分離した感受性復帰株ではTMP耐性遺伝子*dfrA14*，SM耐性遺伝子*strA*および*strB*ならびにサルファ剤耐性遺伝子*sul2*が脱落したが，KM耐性遺伝子*aphA1*は維持された。

薬剤耐性伝達試験では，Sal_249およびSal_238からは，*aadA*，*sul1*，*tetA*，*dfrA14*，*aphA1*が同時に大腸菌に伝達された。Sal_291からは*aphA1*のみが伝達した。伝達した薬剤耐性遺伝子の組み合わせと，感受性復帰株において脱落した薬剤耐性遺伝子の組み合わせは異なった。同時に伝達した薬剤耐性遺伝子が１つのプラスミド上にあると考えると，Sal_249およびSal_238では，*aadA*，*sul1*，*tetA*，*dfrA14*，*aphA1*が同一のプラスミド上にあると考えられた。感受性復帰株では，これらのうち，*dfrA14*および*aphA1*の両方または一方が脱落したことから，プラスミド全体の脱落ではなく，プラスミド上の一部の領域が脱落して感受性復帰したと考えられた。

４．要　　約

薬剤耐性菌による感染症は，治療薬の選択に制限が生じ，世界的に重要な公衆衛生上の問題である。そのため，薬剤耐性菌を減少させる必要がある。飼料添加物としても利用される乳酸菌の培養

© The Ito Foundation

上清を添加して薬剤耐性菌を培養し，薬剤耐性プラスミドが脱落し，薬剤耐性菌を感受性に復帰させられるかを評価した。

鶏肉由来トリメトプリム（TMP）耐性*Salmonella* Schwarzengrund 2株（Sal_249およびSal_291）ならびに*S.* Infantis 1株（Sal_238）からTMP感受性復帰頻度が上昇させられる乳酸菌を検索するため，馬糞便由来LAB24（*Enterococcus mundtii*），LAB32（*Limosilactobacillus equigenerosi*）およびLAB34（*Lactbacillus equi*）の培養上清を添加してTMP耐性サルモネラを培養し，その感受性復帰頻度を調べた。

乳酸菌培養上清の無添加条件下における*S.* Schwarzengrund（Sal_249およびSal_291）の感受性復帰頻度（$10^{-8.64}$および$10^{-8.19}$）と比べ，LAB34培養上清添加により感受性復帰頻度（$10^{-7.73}$および$10^{-6.92}$）は10倍程度上昇した。また，*S.* Schwarzengrund Sal_249では，LAB32培養上清添加によっても感受性復帰頻度（$10^{-7.79}$）は上昇した。しかし，*S.* Infantis（Sal_238）では無添加条件での感受性復帰頻度（$10^{-7.87}$）と比べ，LAB34培養上清を添加しても，感受性復帰頻度（$10^{-8.23}$）は上昇しなかった。

Sal_249およびSal_238から分離した感受性復帰株ではTMP耐性遺伝子*dfrA14*のみ，またはTMP耐性遺伝子*dfrA14*およびカナマイシン（KM）耐性遺伝子*aphA1*が脱落したが，テトラサイクリン耐性遺伝子*tetA*およびストレプトマイシン（SM）耐性遺伝子*aadA*の保有は維持された。Sal_291から分離した感受性復帰株ではTMP耐性遺伝子*dfrA14*，SM耐性遺伝子*strA*および*strB*ならびにサルファ剤耐性遺伝子*sul2*が脱落したが，KM耐性遺伝子*aphA1*は維持された。乳酸菌と薬剤耐性菌の組み合わせによって，感受性復帰頻度には差が認められた。野外で動物体内の薬剤耐性菌を感受性復帰させる乳酸菌には，多様な薬剤耐性菌に対して感受性復帰を促進するより高い能力が必要と考えられた。同時に伝達した1つのプラスミド上にあると考えられた遺伝子の一部が脱落したため，プラスミド上の一領域が脱落して感受性復帰したと考えられた。

文　献

1） Redfield, R. R.：Antibiotic resistance threats in the United States, Centers for Disease Control and Prevention, 2019.

2） Ishihara, K., Nakazawa, C., Nomura, S., Elahi, S., Yamashita, M., Fujikawa, H.：Effects of climatic elements on *Salmonella* contamination in broiler chicken meat in Japan, *Journal of Veterinary Medical Science*, **82**, 646～652, 2020.

3） Matsui, K., Nakazawa, C., Khin, S., Iwabuchi, E., Asai, T., Ishihara, K.：Molecular characteristics and antimicrobial resistance of *Salmonella enterica* serovar Schwarzengrund from chicken meat in Japan, *Antibiotics*, **10**, 1336, 2021.

4） 吉川昌之介：Rプラスミドの分子遺伝学的実験法，第3章変異原処理と変異株の分離，p．41-46，菜根出版，東京，1983.

5） Kozak, G. K., Boerlin, P., Janecko, N., Reid-Smith, R. J., Jardine, C.：Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from swine and wild small mammals in the proximity of swine farms and in natural environments in Ontario, Canada, *Applied and Environmental Microbiology*, **75**, 559～566, 2009.

6） Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. M100-29；Clinical and Laboratory Standards Institute：Wayne, PA, USA, 2019.

© 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（Ⅱ）

Comprehensive analysis of candidate receptors for Classical Swine Fever virus（Ⅱ）

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 for culture cells originated from their preferred host. However, the receptor that determines the cell tropism of the pestiviruses is yet unclear.

In the last year's exploratory research on novel receptors for CSFV which was supported by the Ito Foundation Research Grant, we identified 10 candidate molecules that would interact with E2 protein of CSFV by using a combination of a proximity labeling method and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. In this study, to examine whether candidate molecules involve in CSFV infection dynamics, we conducted genetic depletion and overexpression experiment. Among 9 candidate molecules examined, inhibition of molecules A and B with small interfering RNAs（siRNAs）impaired CSFV replication in PPK3F cells after CSFV infection. In addition, overexpressed molecule B localized to cell membrane in HEK293T cells and enhanced CSFV replication in PPK3F cells. These findings warrant further investigation to examine whether candidate molecules have a function as a receptor for CSFV including interaction of the molecules with CSFV.

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，*in vitro*および*in vivo*の両方において好適宿主が存在する点があげられる。これまでの研究から好適宿主を決定する受容体の存在が示唆されているが，いまだに明らかにされていない。例えばBVDVは反芻獣（ウシ，ヒツジ），CSFVはブタ，BDVはヒツジの細胞に対して指向性を有する[2, 3)]。また，BVDVのE2をCSFVやBDVのE2と入れ替えると，それぞれブタや羊の細胞に対する指向性を有するようになる[2, 3)]。このことから，

© The Ito Foundation

ペスチウイルスのE2タンパク質が細胞指向性の決定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作成されたCSFVのErns，E1，およびE2を有するシュードタイプウイルスは，ブタの細胞に対する指向性を示すことから，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]。これまでにADAM17などがCSFVの受容体として報告されているが，CSFVの細胞指向性を決定づける受容体は明らかにされていない[5]。

昨年度の伊藤記念財団研究助成において我々は，CSFVのE2タンパク質と生理条件下で相互作用する細胞膜分子を，近接依存性標識法を用いて探索し，最終的に10種類の受容体候補分子を同定した。本年度は，同定された受容体候補分子の絞り込みを行うため，短鎖干渉RNA（siRNA）による発現抑制とプラスミド導入による過発現をブタ腎由来細胞株（PPK3F）に対して行い，豚熱ウイルスの感染動態に与える影響を解析する。

2．方　法

2.1　受容体候補分子の発現抑制

CSFVの受容体候補分子10種類のうち，mRNAの配列が報告されている９種類（分子A–I）をターゲットとするStealth RNAi™ siRNA（invitrogen）をそれぞれ３種類ずつ設計し，各siRNAのノックダウン効果を検討した。また，すでにCSFVの受容体であることが報告されているADAM17に対しても同様に，Stealth RNAi™ siRNAを３種類設計した。陰性対照としてStealth RNAi™ siRNA Negative Control, Med GC（invitrogen）を使用した。それぞれのsiRNAを，Lipofectamine™ RNAiMAX Transfection Reagent（invitrogen）を用いてPPK3F細胞にトランスフェクションし，24時間後に細胞を洗浄後，RNAを回収し，細胞に存在する受容体候補分子のmRNA量をリアルタイムPCRにより定量した。最終的に，最も高いノックダウン効果が認められたsiRNAをそれぞれ１種類ずつ選択した。

2.2　発現抑制による受容体候補分子の絞り込み

選抜したsiRNAをPPK3F細胞にトランスフェクションし，16時間後にPPK3F細胞を洗浄して，多重感染度（MOI）0.01となるようCSFV GPE⁻株を感染させ，37℃，１時間静置した。ウイルス液を除去し，２回洗浄して培地を加え，24時間後に培養上清を除去後，２回洗浄して細胞のRNAを回収し，細胞に存在するCSFVのRNA量をリアルタイムPCRにより定量した。

2.3　受容体候補分子の発現

発現抑制実験により，CSFVの受容体である可能性が示唆された分子Ｂ，およびADAM17の遺伝子が組み込まれたプラスミドを使用し，目的の分子が発現するか検討した。これらの遺伝子には，分子の検出や，CSFVのE2タンパク質との相互作用解析に用いるため，Ｃ末端側にDYDDDDKタグ（Flagタグ）を付与した。Polyethylenimine “Max”（PSI）を用いて分子Ｂ発現プラスミド，またはADAM17発現プラスミドをHEK293T細胞にトランスフェクションし，Flagタグを有する分子が発現するか確認を行った。陰性対照として空ベクターを使用した。２日目に，細胞を４％パラホルムアルデヒドで固定し，マウス抗Flagタグモノクローナル抗体，およびヤギ抗マウスIgG Alexa Fluor™ 488（invitrogen）を用いた間接蛍光抗体法で検出した。

2.4　タグが付与された受容体候補分子発現時におけるCSFV増幅の解析

分子Ｂ，およびADAM17発現プラスミドをPPK3F細胞にトランスフェクション後，CSFVを感染させ，細胞におけるCSFVのRNA量に与える

© The Ito Foundation

影響について検討した。陰性対照として空ベクターを使用した。Lipofectamine® 3000（invitrogen）を用いて，プラスミドをPPK3F細胞にトランスフェクションし，24時間後に洗浄して，MOI 0.01となるようCSFV GPE⁻株を感染させ，37℃，１時間静置した。ウイルス液を除去し，２回洗浄して培地を加え，24時間後に培養上清を除去後，２回洗浄して細胞のRNAを回収し，細胞に存在するCSFVのRNA量をリアルタイムPCRにより定量した。

３．結果と考察

豚熱ウイルス受容体候補分子９種類，およびADAM17に対するsiRNAをそれぞれ３種類ずつ設計し，PPK3F細胞にトランスフェクションした。その結果，分子Ｃに対するsiRNA１種類（No.２）を除き，31－89％のノックダウン効果が認められ，設計したsiRNAがそれぞれの分子に対して機能したことを確認した（**Fig. 1**）。

次に，設計したsiRNAのうち最も高いノックダウン効果が認められたsiRNAをPPK3F細胞にトランスフェクション後，CSFVを感染させ，24時間後に，細胞におけるCSFVのRNA量を定量した（**Fig. 2**）。その結果，分子Ａに対するsiRNAを導入したPPK3F細胞では有意にCSFVのRNA量が低下し（$p<0.05$），分子ＢまたはADAM17に対するsiRNAを導入したPPK3F細胞では，CSFVのRNA量が低下する傾向が観察された（$0.05\leqq p<0.1$）。一方，分子Ｃに対するsiRNAを導入したPPK3F細胞では，有意にCSFVのRNA量が増加した（$p<0.05$）。

分子Ａについては10種類以上のアイソフォームがNational Center for Biotechnology Information（NCBI）に登録されているため，CSFVの感染動態に影響したアイソフォームについて現在解析を進めている。一方，分子Ｂについては，NCBIに登録されたアイソフォームは１種類であったため，分子Ｂを用いた解析を先行させた。まず，分子ＢまたはADAM17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，間

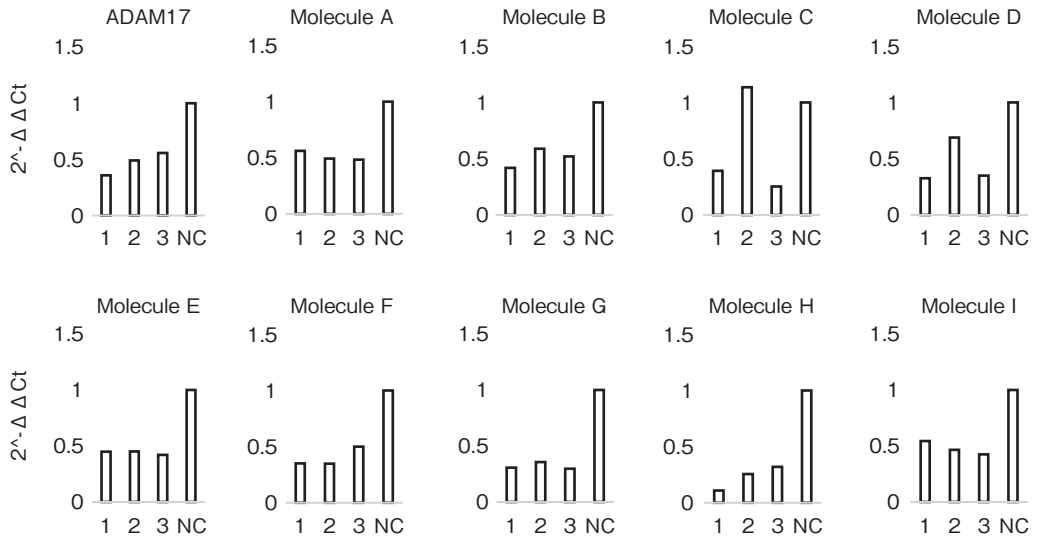


Fig. 1　Validation of siRNA against candidate molecules. The candidate molecules are indicated at the top of each graph. The Y-axis represents relative mRNA expression using 2ΔΔCT method normalized to GAPDH as housekeeping gene. The X-axis shows siRNA number（No.1, No.2 and No.3）used. NC shows negative control.

© The Ito Foundation

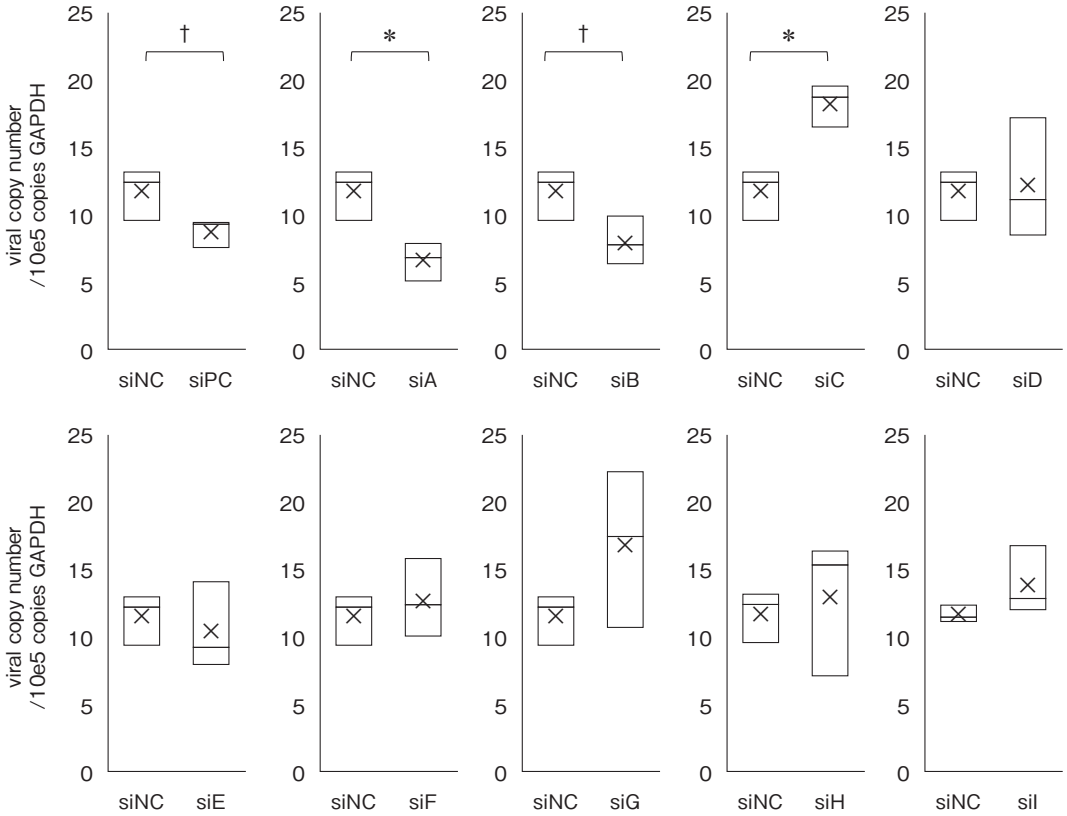


Fig. 2　Effect of candidate molecules knockdown on the copy numbers of PPK3F cell associated CSFV. CSFV viral copy numbers normalized to 10^5 GAPDH copies are presented as box-and-whisker plots. siNC, siPC and siA-I represents siRNAs of negative control, positive control (ADAM17) and candidate molecules (A-I), respectively. Statistical comparisons are versus siNC, p-values of <0.05(*) and $0.05 \leqq p < 0.1$(†).

接蛍光抗体法を実施した。その結果，いずれにおいても細胞膜上にFlagタグを有するタンパク質の発現が確認された（**Fig. 3**）。

続いて，分子ＢあるいはADAM17の遺伝子を含むプラスミドをPPK3F細胞にトランスフェクションした後，CSFVを感染させ，24時間後に，細胞におけるCSFVのRNA量を定量した（**Fig. 4**）。結果，陰性対照と比較して，いずれにおいても有意にCSFVのRNA量が増加（$p<0.05$）した。

以上の結果から，分子ＢはCSFVの感染動態に関与しており，分子Ｂの発現により，細胞におけるCSFVのRNA量が増加することが明らかとなった。また，分子Ｂは細胞膜上に存在することから，分子Ｂが受容体として機能する可能性が示された。現在，CSFVのE2タンパク質と分子Ｂの相互作用について解析を進めており，今後はCSFVの感染動態における分子Ｂの役割を明らかにしたいと考えている。

4．要　　約

豚熱ウイルス（CSFV）を含む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，好適宿主由来の細胞に対する細胞指向性を有する点があげられる。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

© The Ito Foundation

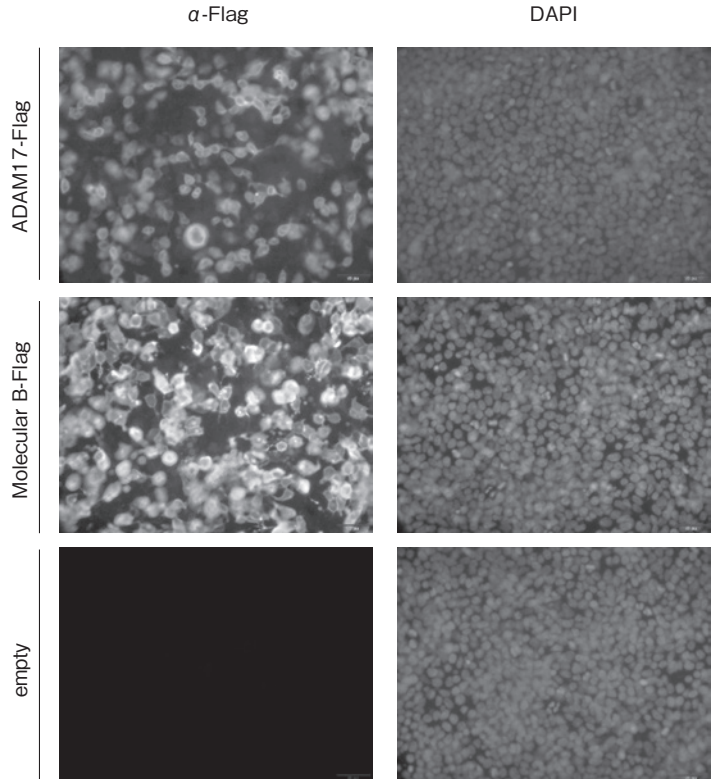


Fig. 3　Indirect immunofluorescence staining of HEK293T cells expressing Flag-tagged porcine ADAM17 or porcine Molecule B with anti-Flag tag antibody (left) and DAPI staining (right). Empty vector transfected HEK293T cells served as a negative control.

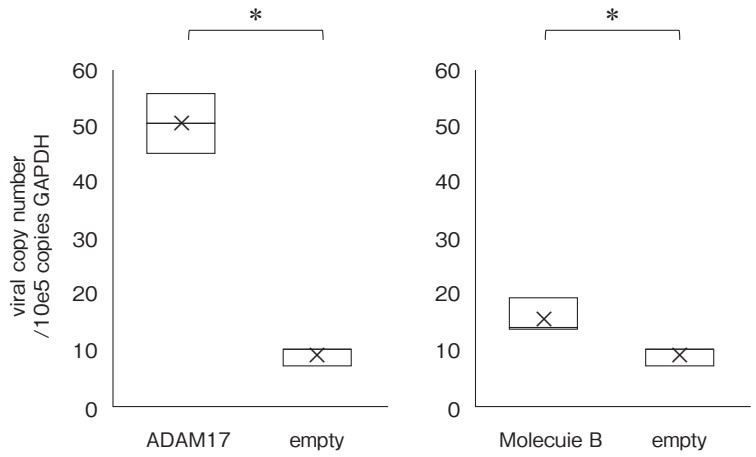


Fig. 4　The effect of the Flag-tagged ADAM 17 and Molecule B expression on the copy numbers of PPK3F cell-associated CSFV. CSFV viral copy numbers normalized to 10^5 GAPDH copies are presented as box-and-whisker plots. Statistical comparisons are versus the cells transfected with empty vector (empty), p-values of <0.05(*).

ているが，その同定には至っていない。

昨年度の伊藤記念財団研究助成で行われた研究において，我々は，CSFVのE2タンパク質と相互作用するE2分子を，近接依存性標識法と液体ク

© The Ito Foundation

ロマトグラフ質量分析法の組み合わせで探索し，最終的に10種類の受容体候補分子を同定した。本研究では，同定された受容体候補分子９種類について，豚熱ウイルスの感染動態に与える影響を解析するため，発現抑制ならびに過発現実験を行った。siRNAを用いた９種類の受容体候補分子の発現抑制結果，分子Ａおよび分子Ｂの発現抑制により，CSFVのRNA量の減少が観察された。これらのうち，先行して分子ＢをHEK293T細胞に発現させた結果，分子Ｂは細胞膜上に存在することが明らかになった。さらに，分子Ｂを発現させたPPK3F細胞では，感染後CSFVのRNA量が増加した。これらの結果から，分子ＢはCSFVの感染動態に関与しており，受容体として機能する可能性が示された。CSFVの感染動態における候補分子の役割を明らかにするためには，CSFVとの相互作用解析を含めた，さらなる研究が必要である。

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） Yuan, F., Li, D., Li, C., Zhang, Y., Song, H., Li, S., Deng, H., Gao, G. F., Zheng, A.：ADAM17 is an essential attachment factor for classical swine fever virus, *PLoS Pathog*, **17**, e1009393, 2021.

© The Ito Foundation

安定的なDNA大量生産技術を用いた家畜用低コスト核酸ワクチン開発の基盤構築

Basic research for the development of low-cost nucleic acid vaccines for livestock using large scale PCR technology

西川　明芳・橘　紅李・永田　礼子・下地　善弘・赤田　倫治*

（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，*山口大学大学院創成科学研究科）

Sayaka Nishikawa, Akari Tachibana, Reiko Nagata, Yoshihiro Shimoji and Rinji Akada*

（National Institute of Animal Health, NARO,

*Graduate School of Sciences and Technology for Innovation, Yamaguchi University）

Prevention of domestic animal infectious diseases is important for the safe and stable supply of animal products, and vaccine development is urgently needed. Plasmid DNA vaccines, which are highly stable and can be stored at room temperature, have been put to practical use as vaccines for domestic animal, for which economic efficiency is important. However, plasmid DNA vaccines generally have high production costs and low immune induction capacity. As a means of solving these problems, vaccines using linear DNA have attracted attention in recent years.

In this project, the linear DNA was prepared using an innovative large-volume PCR technology that can amplify DNA several hundred million times by controlling temperature for a short period of time. The PCR-amplified DNA was suspended in a gene transfer enhancing reagent consisting of a mixture of polyethyleneimine (PEI) and Enhancer (PEG + tRNA mix) and introduced into mammalian cells and mouse, and the protein expression efficiency was examined.

The results showed that expression efficiency of the linear GFP gene varied depending on the mammalian cells and the type of gene transfer reagent. To examine its *in vivo* expression, the GFP gene was administered into mice: however, natural autofluorescence in mouse tissue made its evaluation difficult in fluorescence microscopic observation using frozen tissue sections. *in vivo* GFP gene expression was further evaluated examining production of antibodies to GFP in serum; however, it was below the detection limit. The expression of the protective antigen *spaA* gene of *Erysipelothrix rhusiopathiae* was also not confirmed in mammalian cells or in mice.

In conclusion, to achieve highly efficient expression of the vaccine antigen *in vivo*, it was considered that in addition to the DNA concentration and administration method, both of which may affect gene expression efficiency, it would be necessary to modify the sequence upstream of the antigen gene or modify the codon according to the animal species in which the vaccine would be administered.

© The Ito Foundation

1．目　　的

畜産物高騰の一要因として豚熱や高病原性鳥インフルエンザといった感染症の流行があげられる。畜産物を安全かつ安定的に供給するためには，家畜・家きんにおける感染症予防が重要であり，安価で簡単に製造ができるワクチンの開発が望まれている。

近年，新型コロナウイルス感染症対策として開発されたmRNAワクチンをはじめとする核酸ワクチンが注目されているが，mRNAワクチンは生産コストや安定性等に課題があり，経済性が重要な家畜・家きん用ワクチンとしての普及は困難である。そこで，安定性が高く室温で保管が可能なDNAワクチンが開発され，一部の国では新型コロナウイルス[1)]や，サケアルファウイルス[2)]に対するプラスミドDNAワクチンが市販されている。しかし，一般的にプラスミドDNAワクチンも生産コストは高く，免疫誘導能が低いという問題がある。これらの問題点を解決する手段として，新たに，直鎖DNAを利用したワクチンが開発された[3)]。PCR反応で簡単に合成できる直鎖DNAワクチンは低コスト化が可能でありその開発スピードが大きなメリットであるが，免疫誘導能が低いという核酸ワクチンの問題は残されたままであった。そのため，直鎖DNAワクチンを将来の家畜・家きん分野におけるワクチン技術として利用するには免疫を効率よく誘導できる技術の開発が大きな鍵となる。

そこで本課題では，短時間の温度制御でDNA量を数億倍に増幅できる革新的な大容量PCR技術（特許6858368，国際出願PCT/JP2021/007148）[4)]と，免疫誘導能を高めるための遺伝子導入増強試薬としてポリエチレンイミン（PEI）とEnhancer（PEG＋tRNA mix）（特許5578338）を混合したものを活用し，安価で安定性と防御能の高いDNAワクチンの作製とその効果検証を行う。

2．方　　法

2.1　発現マーカー遺伝子の哺乳動物細胞での発現検討

大容量PCRで合成した直鎖DNAを細胞内に効率的に導入する技術開発のため，発現マーカーとして緑色蛍光タンパク質Green fluorescent protein（GFP）を用い発現解析を行った。直鎖DNAおよび陽性コントロールとしてプラスミドDNAをそれぞれ哺乳動物細胞株（チャイニーズハムスター卵巣株価細胞CHO，ブタ腎臓株化細胞PK15）に投与し，DNA濃度（200，500，および1,000 ng）および導入試薬（PEI＋Enhancer mix，市販Lipofectamine® 3000 Reagent）の比較検討を行った。GFP遺伝子の哺乳動物細胞での発現は蛍光顕微鏡による観察およびフローサイトメトリーで評価した。

2.2　発現マーカー遺伝子のマウスでの発現検討

10，20および40 ngの直鎖DNAを導入試薬PEI＋Enhancerと混合してddYマウスの筋肉，皮下，静脈内に投与した。2日後に接種部位や主要臓器を採材して凍結組織切片を作製し，蛍光顕微鏡による観察および抗GFP抗体を用いた免疫組織化学染色により遺伝子の発現を評価した。また，哺乳動物細胞溶解試薬を用いて組織からタンパク質を抽出し，抗GFP抗体を用いたウェスタンブロット解析によりマウスの各組織で発現されるGFPの検出を試みた。さらに，ELISAで血清中の抗GFP抗体価を経時的に測定し，間接的にGFP遺伝子の発現の有無を確認した。

なお，本実験は農研機構動物実験専門委員会承認（承認番号R5-M09-NIAH号）のもと，動物実験を実施した。

© The Ito Foundation

2.3　抗原遺伝子の哺乳動物細胞での発現検討

遺伝子およびタンパク質発現の評価系をすでに持っていることから，豚丹毒菌の表層に発現する主要抗原であるSpaAタンパク質[5]を用いて検討した。これをコードする*spaA*遺伝子および*spaA*遺伝子とGFP遺伝子の融合遺伝子（*spaA*-GFP）を含むプラスミドDNAについて，2.1と同様に発現検討を行った。

3．結果と考察

3.1　発現マーカー遺伝子の哺乳動物細胞での発現効率

蛍光顕微鏡による観察およびフローサイトメトリー解析の結果，CHO細胞におけるGFP遺伝子の発現は市販のLipofectamine® 3000 Reagentと比較して遺伝子導入試薬（PEI＋Enhancer mix）を使用したほうが発現効率は高かった。（**Fig. 1A**）。一方，PK15細胞においては遺伝子導入試薬（PEI＋Enhancer mix）より市販Lipofectamine® 3000 Reagentを用いたほうが発現効率が高くなった。（**Fig. 1B**）。

以上の結果から，GFP遺伝子の発現効率は細胞種や遺伝子導入試薬の種類によって異なることが明らかとなった。

3.2　発現マーカー遺伝子のマウスでの発現

マウス生体内におけるGFP遺伝子の発現を，凍結組織切片を用いた蛍光顕微鏡観察により確認したが，投与したDNA濃度等の条件に関わらず各組織における緑色自家蛍光が強く，評価が困難であった。また，抗GFP抗体を用いて凍結組織切片の免疫組織化学染色および組織由来タンパク質のウェスタンブロット解析を行ったが，DNA未投与の対照マウスと比較して有意な発現は認められなかった。プラスミドDNA，直鎖DNAおよびPBSを筋肉および皮下に遺伝子導入試薬（PEI＋Enhancer mix）を用いて投与した後剖検し，投与部位から抽出したタンパク質について抗GFP抗体を用いたウェスタンブロット解析を行ったが，GFP発現CHO細胞から作製したサンプルとは異なり，GFPタンパク質は検出されなかった（**Fig. 2**）。

マウス血清中の抗GFP抗体価をELISAで測定した結果，投与したDNA濃度，投与方法および投与後の経過時間に関わらず，DNA未投与の対照マウスと比較して，有意な上昇は認められなかった（**Fig. 3**）。

発現マーカーに選択した緑色蛍光を発するGFP遺伝子は，組織における自家蛍光と近い波長を呈し，その評価が困難であった。緑色以外の波長を選択することでバックグラウンドの蛍光を抑えることが可能かもしれず，さらなる検証を行う必要がある。蛍光観察以外に免疫組織化学染色また

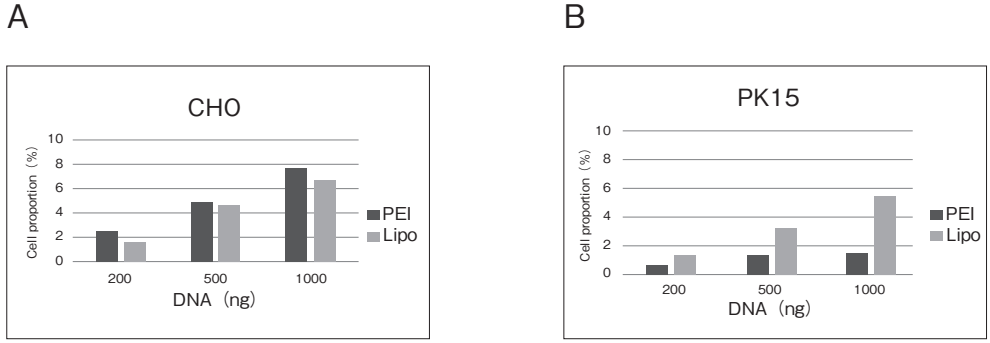


Fig. 1　GFP expression measured by flow cytometry in CHO（A）and PK15（B）cells.

© The Ito Foundation

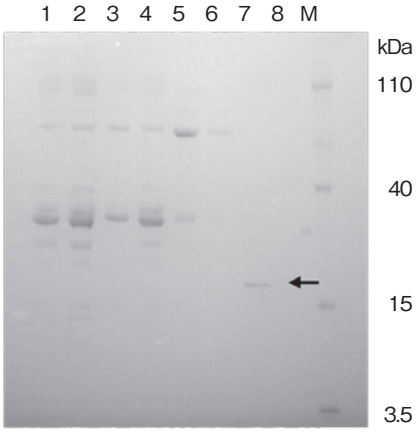


Fig. 2　Immunoblot analysis of GFP gene-introduced mouse tissue.

Mice were injected intramuscularly or subcutaneously with 40 ng of plasmid DNA or linear DNA amplicons mixed with lipofectamine® 3000 reagent or PEI/Enhancer mix. Mice injected with PBS or CHO cells inoculated with PBS were used as negative controls. GFP protein expressed in mice muscle and skin was detected using anti-GFP antibody. CHO cells transfected with GFP linear DNA amplicon was used as a positive control.

Lanes : (1) Lysate of muscle injected with plasmid DNA plus lipofectamin® 3000 Reagent, (2) Lysate of muscle injected with plasmid DNA plus PEI/Enhancer mix (3) Lysate of muscle injected with linear DNA amplicon plus PEI/Enhancer mix, (4) Lysate of muscle injected with PBS, (5) Lysate of skin injected with linear DNA amplicon plus PEI/Enhancer mix, (6) Lysate of skin injected with PBS (7) Lysate of CHO cell expressing GFP (positive control), (8) Lysate of untransfected CHO cell (negative control), and (M) Molecular weight marker. Anti-GFP antibodies were used to detect GFP expression in vivo or in vitro. GFP gene expression in CHO cells transfected with linear DNA amplicon or PBS as controls. The arrow indicates the band corresponding to the GFP with a molecular weight of 27 kDa.

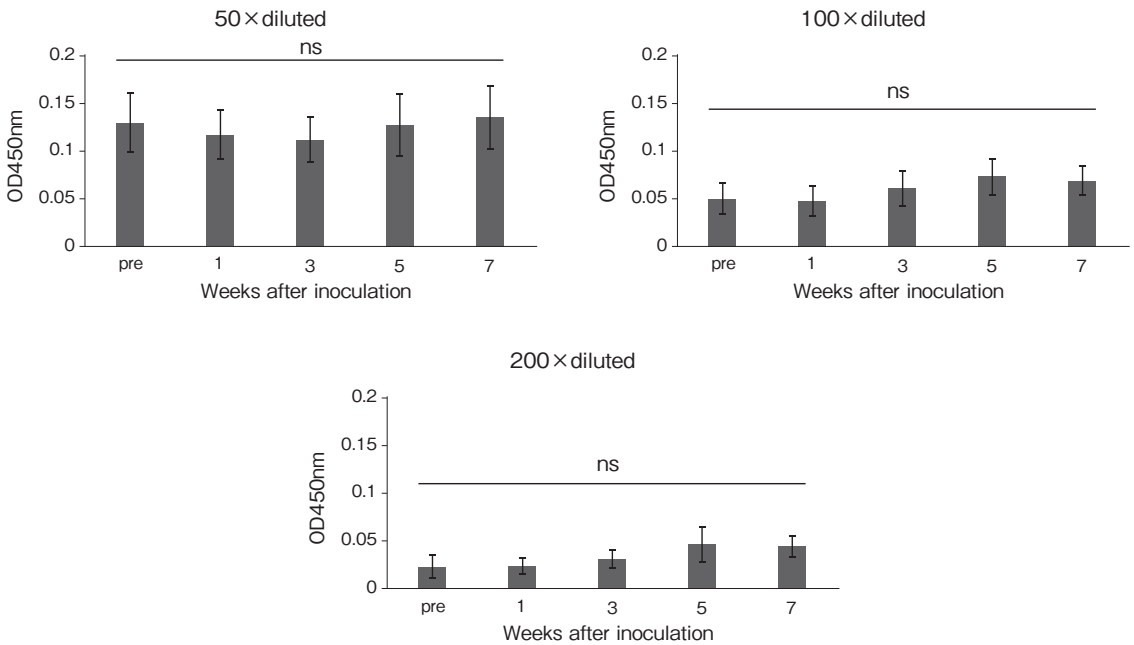


Fig. 3　Antibody levels in serum of DNA-inoculated mice after 0, 1, 3, 5 and 7 weeks were measured by ELISA. Sera were diluted 50- , 100- and 200-fold. ns indicates no significant statistical difference.

© The Ito Foundation

は，組織由来タンパク質サンプルを材料にGFPタンパク質の検出を試みたが，陰性対照との有意差を示せず検出限界以下の可能性が考えられた。さらに，血清中のGFPタンパク質に対する抗体産生を指標としてGFP遺伝子発現を評価したところ，同様に検出限界以下であり，検討項目であるDNA濃度や投与方法，投与後の時間以外の要因が発現効率に影響すると推測された。

3.3　抗原遺伝子の哺乳動物細胞での発現効率

豚丹毒菌の表層に発現するSpaAタンパク質をコードする*spaA*遺伝子発現の評価に効率的な手段として，*spaA*-GFP融合遺伝子を試したところ，蛍光観察および免疫細胞染色により遺伝子発現は認められたものの効率が低く，遺伝子融合による構造変化の影響あるいは細胞膜表面での発現をうまく捉えられていない可能性が示唆された。

*spaA*遺伝子の大容量PCR合成DNAを用いた哺乳動物細胞における発現については確認することができず，プラスミドDNAの再構築を含め高効率に発現する遺伝子作製を行う必要がある。哺乳動物細胞で安定的に*spaA*遺伝子を発現するプラスミドDNAおよびPCR合成DNAの作製に成功した際には，他のウイルスや細菌抗原を当てはめていくことが可能である。

プラスミドDNAワクチンは一部実用化されてはいるものの，免疫応答が低い点やコストが高く開発に時間を要する点が問題とされている。一方，直鎖DNAについてはまだ実用化されたものはないが，低コスト化かつ開発スピードが短縮されるメリットがあげられる。今後，生体内における*spaA*抗原遺伝子発現については，遺伝子導入試薬の検討により免疫応答の増強を目指し，SpaAタンパク質に対する抗体価の上昇を確認して，強毒株による感染防御試験を行う予定である。

4．要　　約

畜産物を安全かつ安定的に供給するため，家畜・家きんにおける感染症予防は重要であり，ワクチン開発が急務となっている。経済性が重要な家畜・家きん用ワクチンとして，安定性が高く室温で保管が可能なプラスミドDNAワクチンが実用化されている。しかし，一般的にプラスミドDNAワクチンは生産コストが高く，免疫誘導能が低いという課題がある。これらの問題点を解決する手段として，近年，直鎖DNAを利用したワクチンが注目されている。

本課題では，短時間の温度制御でDNA量を数億倍に増幅できる革新的な大容量PCR技術と，ポリエチレンイミン（PEI）およびEnhancer（PEG＋tRNA mix）の混合物を免疫誘導能を高めるための遺伝子導入増強試薬として活用し，安価で安定性の高いDNAワクチンの作製とその効果検証を行った。まず，発現マーカー遺伝子GFPの発現効率は，哺乳動物細胞や遺伝子導入試薬の種類によって差があることが明らかとなった。また，GFP遺伝子をマウスに投与し，生体内での発現を検討した結果，凍結組織切片を用いた蛍光顕微鏡観察では，各組織における緑色自家蛍光がその評価を困難にした。そこで，生体内および血清中のGFPタンパク質に対する抗体産生を指標にGFP遺伝子発現を評価したところ検出限界以下であり，検討項目であるDNA濃度や投与方法および投与後の時間以外の要因が発現効率に影響すると推測された。さらに，著者らがすでに発現評価系を有する豚丹毒菌の抗原*spaA*遺伝子の細胞および生体内の発現は確認されなかった。このため，ワクチン抗原を生体内で高効率に発現させるためには，抗原遺伝子上流の配列の改変やコドンの改変など，動物種に合わせた工夫を行う必要があると考えられた。

© The Ito Foundation

文　献

1） Mallapaty, S.：India's DNA COVID vaccine is a world first-more are coming, *Nature,* **597,** 161～162, 2021.
2） Thorarinsson, R., Wolf, J. C., Inami, M., Phillips, L., Jones, G., Macdonald, A. M., Rodriguez, J. F., Sindre, H., Skjerve, E., Rimstad, E., Evensen, O.：Effect of a novel DNA vaccine against pancreas disease caused by salmonid alphavirus subtype 3 in Atlantic salmon (Salmo salar), *Fish Shellfish Immunol.,* **108**, 116～126, 2021.
3） Conforti, A., Sanchez, E., Salvatori, E., Lione, L., Compagnone, M., Pinto, E., Palombo, F., D'Acunto, E., Muzi, A., Roscilli, G., Sun, Y., Viscount, B., Hayward, J., Shorrock, C., Diel, D. G., Impellizeri, J. A., Aurisicchio, L.：A linear DNA encoding the SARS-CoV-2 receptor binding domain elicits potent immune response and neutralizing antibodies in domestic cats, *Methods&Clinical Development*, **28**, 238～248, 2023.
4） 赤田倫治ら：大容量PCR装置によるmLスケールでのDNA生産，バイオインダストリー，**36**，58～67，2019.
5） Shimoji, Y., Mori, Y., Fischetti, V. A.：Immunological characterization of a protective antigen of Erysipelothrix rhusiopathiae：Identification of the region responsible for protective immunity, *Infection and Immunity,* **67,** 1646～1651, 1999.

© The Ito Foundation

関節におけるアフリカ豚熱ウイルスの標的細胞の解析および関節炎の病態解析

Analysis of target cells of African swine fever virus in joint and histopathological analysis of arthritis

生　澤　充　隆
（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）

Mitsutaka Ikezawa
（National Institute of Animal Health, NARO）

African swine fever（ASF）is an infectious disease with a high fatality rate in pigs and boars, and the chronic form of the disease causes arthritis and other symptoms. However, the pathogenetic mechanism of the disease remains unclear. In this study, we aimed to verify the direct involvement of ASF virus in arthritis and to clarify the pathogenesis of arthritis in ASF. Anti-ASF virus antibodies were produced, and formalin-fixed paraffin-embedded blocks of porcine tarsal joints obtained in the ASF virus infection study were used as samples for immunohistochemical staining to analyze virus antigen-positive cells and inflammatory cells in the joints. The results suggest that macrophage-like synoviocytes are the primary target cells of ASF virus in the synovium. In the early stages of infection, macrophage-like synoviocytes were infected by the virus, and macrophages infiltrated the synovium. With time after infection, lymphocytic infiltration and apoptosis of those cells were induced. These findings suggest that synovitis in ASF-infected pigs is caused directly by the ASF virus. This study contributes to the elucidation of the mechanism of ASF virus-induced arthritis. In the future, the possibility of latent virus infection in the synovium should also be investigated.

1．目　　的

アフリカ豚熱（ASF）は，ASFウイルスが豚やいのししに感染することによる，発熱や全身の出血性病変を特徴とする致死率の高い伝染病である。ASFの流行が続いている地域では，慢性型の病態を示す個体が確認されている。慢性型では，呼吸器症状・関節炎・皮膚炎等を呈するとされ[1)]，これらは感染の長期化に伴う免疫低下に起因する，細菌等による二次感染が原因であると考えられてきた。著者によるASF感染試験において，関節炎を呈した個体の関節に対する解析では，関節腔を内張りする細胞にASFウイルス抗原が認められた。このことから，慢性型で認められる関節炎については，ASFウイルスによる直接的な傷害に起因する可能性が考えられたが，その詳細は明らかとなっていない。本研究の目的は不明な点の多いASFについて，関節におけるASFウイルスの標的細胞および関節炎の病態を明らかとすることである。

© The Ito Foundation

2．方　法

2.1　サンプル

著者の所属機関で実施されたASFウイルス感染試験に用いられた豚の足根関節より，定法に従い作成されたホルマリン固定パラフィン包埋ブロック（FFPE）サンプルを用いた。いずれの感染試験も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実施された。

2.2　ハイブリドーマからの抗体作成

著者の所属機関で作出されたASFウイルスを抗原として作成されたマウス由来のハイブリドーマ（1 E8，4E1，3D3，4H2，2G 3）をハイブリドーマ用無血清培地（富士フイルム和光純薬）に順化させた。IsoStrip（Roche）を用い抗体産生を確認後，ASFウイルスを接種したIPKM細胞に対してIFAを行い，ASFウイルス特異抗体の産生を確認した。CELLine™ Bioreactor（WHEATON）により動物を用いることなく高密度の細胞培養を実施し，培養上清を硫安沈殿で粗精製後，Tris-bufferで透析を行った。透析後，Mab Trap Kit（Cytiba）でカラム精製を行い，SDS-PAGEにて抗体の有無を確認した。

得られたモノクローナル抗体の反応性を，ウイルス分離およびリアルタイムPCRの結果からASFウイルス陽性であることが確認されている臓器由来のFFPEサンプルを用い，各種の賦活化法（①Tris/EDTA pH9.0，オートクレーブ，10 min，②クエン酸バッファー pH6.0，オートクレーブ10 min，③0.1％アクチナーゼE，37℃，30 min）による抗原賦活化後，定法に従い免疫染色を実施し確認した。

FFPEサンプルに対して反応性の認められた抗体について，ASFウイルスを抗原とするウェスタンブロット法を行い標的抗原の推定を行った。推定された抗原タンパク質遺伝子をpCold I DNA（タカラバイオ）に組み込み，タンパク質発現用大腸菌DH 5 α（タカラバイオ）を形質転換しタンパク質を発現させ，発現タンパクを抗原とするウェスタンブロット法を実施し抗体の特異性を確認した[2)]。

2.3　ASFウイルス感染個体の関節におけるウイルス抗原陽性細胞の免疫組織化学的解析

関節病変を有する既存サンプルを用い，一次抗体として2.2で作出した抗ASFウイルス抗体と，種々の細胞マーカーに対するウサギ由来の抗体（抗ビメンチン抗体（AT1354-1，ニチレイバイオサイエンス），抗ケラチン抗体（422061，ニチレイバイオサイエンス），抗Iba 1 抗体（013-27691，富士フイルム和光純薬），抗OB cadherin抗体（ab151302，abcam））を用い，二次抗体としてAnti-mouse IgG（H＋L），F（ab’）2 Fragment（Alexa Fluor® 488 Conjugate）（4408，Cell Signaling Tech.）およびAnti-rabbit IgG（H＋L），F（ab’）2 Fragment（Alexa Fluor® 555 Conjugate）（4413，Cell Signaling Tech.）を用い定法に従い蛍光二重染色を実施し，ウイルス抗原陽性細胞の性状を解析した。

2.4　ASFウイルス感染個体の関節に浸潤している炎症細胞の免疫組織化学的解析

関節病変を有する既存サンプルを用い，一次抗体として抗PAX 5 抗体（M7307，Agilent），抗CD 3 抗体（M7254，Agilent），抗Cleaved Caspase-3（Ccp-3）抗体（9661，Cell Signaling Tech.）を用い定法に従い免疫染色を実施し，病変における浸潤細胞およびアポトーシスの評価を行った。

© The Ito Foundation

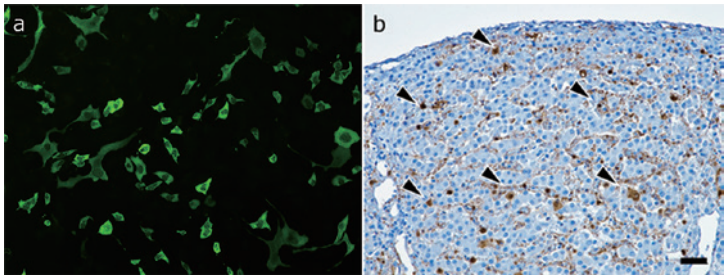


Fig. 1　(a) IPKM cells 24 hours after infection with ASF virus at MOI 0.1 were treated with 1E8 culture supernatant as primary antibody and Anti-mouse IgG (H+L), F (ab') 2 Fragment (Alexa Fluor® 488 Conjugate) as secondary antibody. Positive reactions are observed in many cells. (b) Immunostaining of ASF-positive liver FFPE samples with monoclonal antibody obtained from 1E8. Positive antigen is observed in Kupffer cells in the sinusoids (arrowhead). Bar：50 μm

３．結果と考察

3.1　ハイブリドーマより得られた抗ASFウイルス抗体のパラフィン包埋サンプルに対する反応性

IsoStripにより各ハイブリドーマより抗体産生が確認され，IFAによりいずれの抗体もASFウイルスに対して反応することが確認された（**Fig. 1a**）。FFPEサンプルを用いた免疫染色では１Ｅ８由来の抗体を用い，Tris/EDTAバッファーまたはクエン酸バッファーにて抗原賦活化を行った際に良好な染色結果が得られたが（**Fig. 1b**），その他のハイブリドーマ由来の抗体ではFFPEサンプルに対して反応が確認されなかった。ウェスタンブロット法により，１Ｅ８由来の抗体はASFウイルスの*A137R*遺伝子（GenBank，accession No. NC_044959.2）により発現するタンパクに対し反応が確認された。

培養細胞に対するIFAでは各ハイブリドーマより得られた抗体が反応したにもかかわらず，FFPEサンプルに対しては１Ｅ８由来の抗体を除き反応性が確認されなかった。FFPEサンプルではアルデヒド基の架橋形成によってタンパク質の立体構造が変化し，抗体が抗原認識部位に反応できず抗体反応が起こらないまたは弱くなることが知られており，抗原の種類によって反応性が低下したものと考えられる。

１Ｅ８由来の抗体が反応した*A137R*にコードされるタンパク質はASFウイルスの構造タンパク質であるｐ11.5であり，in vitroでのASFウイルスの複製中に最も発現量の多いタンパク質とされる[3)]。このことから抗原量が多く，FFPEサンプルでの免疫染色結果が良好であったと考えられる。今回得られた１Ｅ８由来の抗体の特異性について組み換えタンパクを抗原とするウェスタンブロット法により確認したが，組織内での局在等について特異性をさらに解析するためにはin situ hybridization法などによる検討が必要である。

3.2　ASFウイルス感染個体の関節におけるウイルス抗原陽性細胞の解析

間葉系細胞マーカーとして抗ビメンチン抗体，上皮系細胞マーカーとして抗サイトケラチン抗体，マクロファージ様滑膜細胞（Ａ型滑膜細胞）マーカーとして抗Iba１抗体，線維芽細胞様滑膜細胞（Ｂ型滑膜細胞）マーカーとして抗OBカドヘリン（カドヘリン11）抗体を用い，１Ｅ８由来抗体と蛍光二重染色を実施したところ，ASFウイルス抗原とIba１抗原の共局在が観察された（**Fig. 2**）。この共局在は滑膜に存在している細胞および滑膜下の類円形細胞で認められた。このことから，滑膜におけるASFウイルスの主要な標的はマクロファージ様滑膜細胞および滑膜下に浸

© The Ito Foundation

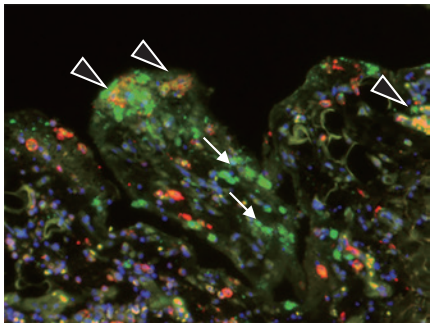


Fig. 2　Co-localization of ASF virus antigen (green) and Iba1 antigen (red) in No. 9 tarsal joint FFPE samples (merge : yellow). Nuclei are stained with DAPI (blue). Co-localization of viral and Iba1 antigens are observed in the remaining synovium (arrowhead). ASF viral antigens not co-localized with Iba1 antigen are also present in round cells in the subsynovial tissue (arrow).

潤・遊走してきたマクロファージであることが示唆された。また，Iba 1 抗原と共局在していないASFウイルス抗原は滑膜下組織の円形細胞に認められ，これらについてはリンパ球等へのウイルス感染，発現が考えられる。ウイルス感染後の時間経過に伴い，主要な標的細胞である単球/マクロファージ以外にもリンパ球や血管内皮へASFウイルスが感染することが報告されており[4]，滑膜におけるより詳細なウイルス感染動態の解析にはリンパ球や血管内皮マーカーを用いた解析が必要である。

3.3　ASFウイルス感染個体の関節に浸潤している炎症細胞の免疫組織化学的解析

強毒株接種後７日目（dpi）のサンプルでは滑膜細胞が残存し，ウイルス抗原が認められた（**Fig. 3a**，**b**，**Table 1** ）。滑膜下組織にはIba 1 陽性のマクロファージが浸潤し，その他の炎症細胞浸潤はわずかであり，Ccp-３陽性の細胞は認められなかった（**Fig. 3c**）。これは感染が成立し，マクロファージが誘導されているが炎症応答は生じていない初期病変と考えられた。低病原性株接種後21 dpiのサンプルでは滑膜細胞には変化はないが（**Fig. 3d**），滑膜下組織にはIba 1 陽性のマクロファージ（**Fig. 3e**），PAX５陽性のＢ細胞，CD３陽性のＴ細胞が浸潤していた。Ccp-３陽性のアポトーシスを呈する細胞は認められず（**Fig. 3f**）低病原性株の一過性の感染が生じ，その後ASFウイルスが免疫応答により排除されたものと推察された。中等毒病原性株接種サンプルでは11 dpiのサンプルにおいて強毒株７dpiと同様の結果が得られ，同様に初期病変と考えられた。中等毒病原性株接種個体との同居個体のサンプル（No.８と９）では滑膜細胞の大半が消失し（**Fig. 3g**），残存した滑膜細胞および滑膜下組織の炎症細胞において多数のウイルス抗原が確認された（**Fig. 3h**）。滑膜下組織に浸潤していた炎症細胞はマクロファージ，少数のＢ細胞およびＴ細胞であった。また，Ccp-３陽性細胞が認められるようになり（**Fig. 3i**），病理組織学的にも多くの核破砕物が観察され，ASFウイルス感染に起因するアポトーシスが生じていることが示唆された。これらの関節病変は，病理組織学的には組織球-リンパ球性滑膜炎であった。

ASFウイルスは感染細胞に対しCaspase-３依存性のアポトーシスを抑制する一方で，ウイルスに感染していない周囲のリンパ球等に対してはアポトーシスを誘導する（bystander apoptosis）[5]。今回滑膜下で認められたリンパ球などでCcp-３陽性のアポトーシスがみられ，ASFウイルスによって引き起こされたことが推察された。初期病

© The Ito Foundation

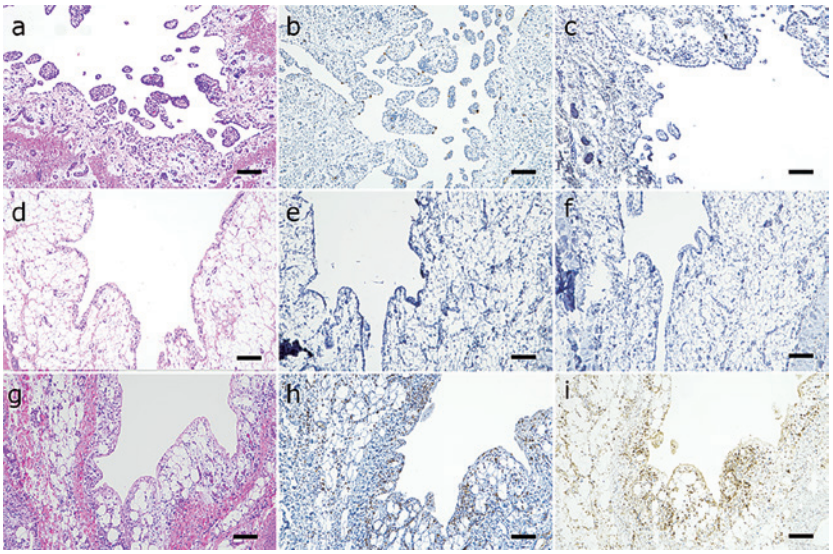


Fig. 3　This figure is composed as follows : a, d, g ; HE stain., b, e, h ; IHC for ASF virus antigen., c, f, i ; IHC for Ccp-3 antigen.
(a) No. 1, synovial cells slightly increased in length, whereas generally normal. Macrophages infiltrate the subsynovial tissue. HE stain. Bar = 50 μm.
(b) No. 1, viral antigens are present in a few synovial cells (arrowhead). IHC. Bar = 50 μm.
(c) No. 1, no Ccp-3 positive cells are present in the synovium. IHC. Bar = 50 μm.
(d) No. 4, no significant changes in the synovial epithelium. HE stain. Bar = 50 μm.
(e) No. 4, no viral antigens present in synovium. IHC. Bar = 50 μm.
(f) No. 4, no Ccp-3 positive cells are present in the synovium. IHC. Bar = 50 μm.
(g) No. 9, most synovial cells are dissapeared, and many nuclear fragments (karyorrhexis) are seen in the subsynovial tissue. HE stain. Bar = 50 μm.
(h) No. 9, many viral antigens are observed in the remaining synovial and subsynovial cells (arrowhead). IHC. Bar = 50 μm.
(i) No. 9, many inflammatory cells in the subsynovial tissue are Ccp-3 positive and undergoing apoptosis (arrowhead). IHC. Bar = 50 μm.

Table 1　Overview of samples and immunohistochemistry results of synovium.

Pig No.	Days after viral inoculation/ cohabitation	Case Summary	IHC[c] results in synovium				
			p11.5	Iba1	B cell	T cell	Ccp-3
1	7dpi[a]	ASF virus highly virulent strain inocculated	+	+	−	−	−
2	7dpi	ASF virus highly virulent strain inocculated	+	+	−	−	−
3	7dpi	ASF virus highly virulent strain inocculated	+	+	−	−	−
4	21dpi	ASF virus low virulent strain inocculated	−	+	+	+	−
5	21dpi	ASF virus low virulent strain inocculated	−	+	−	−	−
6	21dpi	ASF virus low virulent strain inocculated	−	+	+	+	−
7	11dpi	ASF virus moderate virulent strain inocculated	+	+	−	−	−
8	28dpc[b]	Cohabitation with pig inoculated with ASF virus moderate virulent strain	+	+	+	+	+
9	27dpc	Cohabitation with pig inoculated with ASF virus moderate virulent strain	+	+	+	+	+

a : days post-inoculation
b : days post-cohabitation
c : immunohistochmistry

© The Ito Foundation

変と考えられるサンプルではCcp-３陽性を示す滑膜細胞はごくわずかしか認められず，ASFウイルスが感染細胞においてアポトーシスを抑制することに起因していると考えられた。

3.4　総括

滑膜におけるASFウイルスの主要な標的細胞はマクロファージ様滑膜細胞（A型滑膜細胞）であることが示唆された。ウイルスの病原性によって経過は異なるが，滑膜にウイルスが感染することで組織球－リンパ球性滑膜炎が引き起こされることが示唆され，病期が進むことで浸潤細胞がアポトーシスを示すことが明らかとなった。ASFウイルス感染で認められる関節炎は二次的なものでなくウイルス感染による直接的な傷害によるものであり，ASFの病態解明への一助となる結果が得られた。

一方で，本研究では感染後の経過が長い個体において関節に多くのウイルス抗原が確認された。感染耐過個体ではASFウイルスが一部の組織で潜伏感染を確立し，輸送ストレスや免疫抑制などで再活性化する可能性が指摘されている[6]。ASFウイルスの潜伏感染についてはその成立の有無も含め不明な点が多いが，今回感染後の経過が長い滑膜において多くのウイルス抗原が認められたことから，今後滑膜における持続感染の有無等についても検索を進める予定である。

4．要　約

ASFは豚やいのししに致死率の高い伝染病を引き起こし，慢性型では関節炎などを呈するとされるが，関節炎の詳細な病態解析は行われておらず不明な点が多い。本研究では関節炎におけるASFウイルスの直接的な関与を検索し，ASFにおける関節炎の病態を明らかとすることを目的とした。

ASF感染個体の関節におけるウイルス抗原陽性細胞の解析から，滑膜におけるASFウイルスの主要な標的はマクロファージ様滑膜細胞であることが示唆された。さらに，関節に浸潤する炎症細胞の解析から，感染初期にはASFウイルスがマクロファージ様滑膜細胞に感染し，滑膜中にマクロファージが浸潤し，感染後時間が経過するとリンパ球浸潤およびそれらの細胞のアポトーシスが誘導されることが示された。これらのことからASF感染豚における滑膜炎は，ASFウイルスによる直接的な影響で引き起こされることが示唆された。今回感染後の経過が長い滑膜において多くのウイルス抗原が認められたことから，今後滑膜における持続感染の有無等についても検索を進める予定である。

文　献

1） Salguero, F. J.：Comparative Pathology and Pathogenesis of African Swine Fever Infection in Swine, *Front Vet Sci*., 19(7), 282, 2020.
2） Watanabe, M., *et al.*：Development of a Novel Indirect ELISA for the Serological Diagnosis of African Swine Fever Using p11.5 Protein as a Target Antigen, *Pathogens*., 12(6), 774, 2023.
3） Keßler, C., *et al.*：The intracellular proteome of African swine fever virus, *Sci Rep*., 8(1), 14714, 2018.
4） Sánchez-Vizcaíno, J. M., *et al.*：An update on the epidemiology and pathology of African swine fever, *J. Comp. Pathol*., 152(1), 9～21, 2015.
5） Portugal, R., *et al.*：Apoptosis in porcine macrophages infected in vitro with African swine fever virus（ASFV）strains with different virulence, *Arch. Virol*., 154(9), 1441～1450, 2009.
6） Gallardo, C., *et al.*：Experimental Transmission of African Swine Fever（ASF）Low Virulent Isolate NH/P68 by Surviving Pigs, *Transbound. Emerg. Dis*., 62(6), 612～6122, 2015.

© The Ito Foundation

リコンビナントCathepsinL1を抗原とした肝蛭症の迅速診断キットの開発
―ジビエを介した感染のモニタリングへの応用を目指して―

Development of a rapid diagnostic kit for fasciolosis using recombinant CathepsinL1 ― Application for monitoring of gibier-borne infections ―

関　　まどか
（岩手大学農学部共同獣医学科）

Madoka Ichikawa-Seki
(Cooperative Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, Iwate University)

Fasciolosis, caused by liver flukes (*Fasciola* spp.), is a major problem in livestock production. Fasciolosis is a zoonotic disease and humans are infected by eating vegetables or livers contaminated with juveniles of the parasite. Since deer have a high seroprevalence of the disease, there is a risk of deer-borne transmission to humans. Moreover, the risk of transmission from deer to domestic cattle has been of concern. The aim of the present study was to develop a rapid diagnostic kit for fasciolosis using recombinant cathepsin L1 (rCatL1) for use in the surveillance of fasciolosis infections. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using rCatL1 has shown good results in the serodiagnosis of deer and humans. In bovine sera, high sensitivity and specificity were observed in control sera; however, in the present study, the sensitivity decreased in fasciolosis-positive bovine sera obtained from a slaughterhouse. Therefore, we optimized the ELISA conditions to overcome the low sensitivity. Again, the purification protocols of the recombinant antigen were improved to obtain better antigens. In conclusion, we confirmed the efficacy of the recombinant antigen because the optimized ELISA protocol improved the OD values of the positive controls. In addition, the new purification protocol using Terrific broth instead of Luria Bertani broth to prepare the recombinant antigen increased the OD values of the positive controls. These results suggest that the recombinant antigen is effective in deer, humans and cattle, and that more rapid diagnostic kits based on immunochromatography can be developed in the near future to monitor giber-borne infections.

1．目　　的

肝蛭（かんてつ）症は人獣共通感染性の寄生虫症である。北海道はエゾシカを宿主とする流行地で，ヒトや家畜ウシへの伝播が懸念されるが実態は不明であった。我々はこれまでに伊藤記念財団平成28年度研究助成により，野生シカを対象とした信頼性の高い血清診断用抗原（リコンビナントcathepsinL1）を用いたenzyme-linked immunosorbent assay（ELISA）の確立に成功し（**Fig. 1A**），北海道はエゾシカの抗体陽性率が43.9％にのぼる高度流行地であることを明らかにした[1)]。

© The Ito Foundation

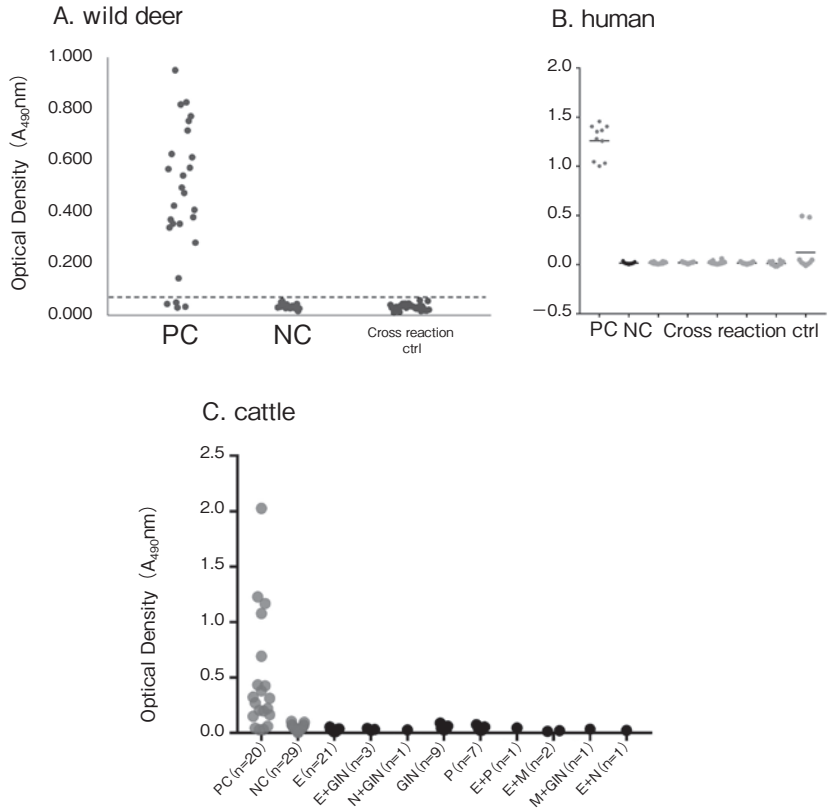


Fig. 1 Results of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for control sera using the recombinant cathepsin L1 of the *Fasciola* fluke.

また，これまでにこの系についてヒトでも有効性を確認し（**Fig. 1B**），過去に見逃された症例を検出できるレベルの感度・特異度が示された[2)]。一方，ELISAはプレートリーダーなどの機材や試薬を要するため，診断を必要とする現場での実用性が低い欠点がある。特に，ジビエとして流通するエゾシカでは，機材や試薬を必要としない迅速診断法の需要があることから，本研究では，次のステップとしてOn-site diagnosisを可能にするイムノクロマト法に基づく迅速診断キットの開発を最終目標とした。

また，北海道ではエゾシカが牧野に侵入し，糞便を介して肝蛭が牧野を汚染するため，ウシへの伝播が懸念される。したがって，本研究のリコンビナント抗原を用いた診断キットについて，ウシでの有効性を担保することも重要である。これまでに，ウシではコントロール血清を用いたELISAでは十分な感度・特異度が得られた（**Fig. 1C**）。本研究期間には，リコンビナント抗原のウシでの有用性を確認するためにELISAを実際の感染症例に適用するとともに，ウシ症例における診断能を向上させるためのELISAの最適化を実施した。また，並行して抗原作製方法の最適化を実施した。

2．方　法

2.1　リコンビナント抗原の作製

遺伝子組換え技術を用いて大腸菌や酵母に作製させるリコンビナントタンパク質は，不純物を含まないために特異性の高い診断用抗原になる。本研究では，肝蛭が宿主の体内で分泌する10種類の

© The Ito Foundation

タンパク質群[3]の中から，最も分泌量が多いと報告されているcathepsin L1（Cat L1）に着目した。RT-PCR法によって増幅したCatL1のcDNAをタンパク質発現用ベクター（pHAT10）に組み込んだ後，大腸菌（BL21）にトランスフォーメーションし，リコンビナントCatL1（rCatL1）を発現する大腸菌を得た。得られたrCatL1を６Ｍグアニジンで変性・可溶化した後に，尿素の段階希釈によりリフォールディングし，His-tagカラムを用いたクロマトグラフィによって精製した。SDS-PAGEにより精製タンパク質を確認し，ウェスタンブロット法により，rCatL１の抗原としての有用性を確認した。増菌培地として従来はLuria Bertani（LB）brothを用いてきたが，本研究ではTerrific broth（TB）による増菌も試験し，両培地で培養した大腸菌から精製した抗原を比較した。

2.2　ウシ症例のELISA解析

2017年９月から2017年12月にかけて，北海道Ｎ市の食肉処理場において，合計944頭の北海道産牛（ホルスタイン種　n＝934，ブラウンスイス　n＝５，黒毛和種　n＝２，ジャージー　n＝２，交雑種　n＝１）の血清を採取した。と畜後に実施された目視検査では肝蛭陽性が14頭，肝蛭陰性で胆管炎ありが８頭，肝蛭陰性で胆管炎なしが922頭であった。血清は，心残血を2.0 mlチューブに分取し，37℃で30分以上静置した後，3,000 rpmで15分間遠心分離を行った。分離が不十分なものについては，再度6,000 rpmで遠心分離を行い，血清を得た。

リン酸緩衝生理食塩水（PBS）を用いて最終濃度１ μg/mlに精製したrCatL1　100 μlを，ELISAプレート（Thermo Fisher Scientific Inc.）にコーティングし，４℃で一晩静置した。プレートを0.01％Tween 20を含むPBS（0.01％PBS-T）で３回洗浄し，10％スキムミルク（Wako Inc.）を含むPBS（10％PBS-SM）で，37℃でさらに２時間ブロッキングした。ウシの血清を，それぞれ３％スキムミルクを含むPBS（３％PBS-SM）で，１：250で希釈した。プレートを0.01％PBS-Tで３回洗浄した後，100 μlの血清試料を各ウェルに添加し，37℃で1.5時間インキュベートした。0.01％PBS-Tで５回洗浄後，３％PBS-SMで１：5000に希釈したHorseradish peroxidase（HRP）標識抗ウシIgG（BET，Bethyl Laboratories，TX）100 μlを各ウェルに添加し，37℃で１時間インキュベートした。プレートを0.01％ PBS-Tでさらに５回洗浄してから，基質溶液（0.05 Mクエン酸-リン酸緩衝液，30％H_2O_2，0.4 mg/mlのo-フェニレンジアミン（Sigma-Aldrich, St.Louis, MO））150 μlを各ウェルに添加した。30分インキュベート後，１ＮH_2SO_4で反応を停止し，Infinite 200PRO F Plex（TECAN, Kanagawa, Japan）を用いて，490 nmにおける吸光度（OD490 nm）を決定した。反応はduplicateで実施した。

2.3　ウシ血清を用いたELISAの条件検討

陽性コントロール血清（n＝４）と陰性コントロール血清（n＝４）を用いて条件の最適化を行った。ここでは，ブロッキング液として１％スキムミルク，抗体希釈液として0.5％ Fish Gelatin，発色試薬として3,3',5,5'-tetramethylbenzidine（TMB）を用いた。

3．結果と考察

3.1　ウシ症例のELISA解析

北海道Ｎ市のと畜場由来944頭のウシ血清サンプルのELISAを適用した結果，目視検査で肝蛭陽性と判定された14検体のうち，７検体のOD値はカットオフ値を超えたが，残りの７検体はカットオフ値以下であり，感度は50％と算出された。一方，目視検査で胆管炎があり，肝蛭虫体陰性だった８検体のうち，４検体がカットオフ値を超えた。また，目視検査で胆管炎がなく，肝蛭陰性

© The Ito Foundation

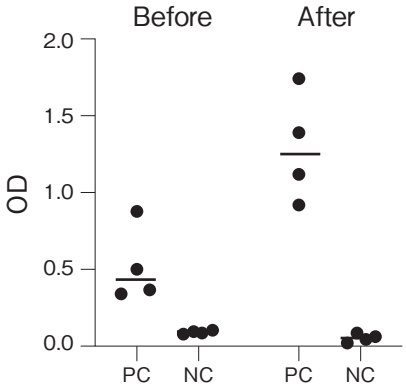


Fig. 2　Optimized ELISA results with rCatL1 using bovine positive and negative control sera. Before : before optimization, After : after optimization.

の922検体のうち，35検体がカットオフ値を超えた。残りの887検体はカットオフ値以下であった。合計すると，rCatL1を用いたELISAでは，944検体中46検体が陽性と判定され，陽性率は4.9％であった。一方，目視検査では944検体中14検体が肝蛭虫体陽性であり，陽性率は1.5％であった。

3.2　ウシ血清を用いたELISAの条件検討

3.1では感度が50％と低かったため，改善を目指してELISA条件の最適化を実施した。その結果，従来よりも陽性コントロールのOD値を向上させ，陰性コントロールのOD値を低く抑えることに成功した（**Fig. 2**）。

3.3　異なる増菌培地で作製したリコンビナント抗原の比較

従来どおり増菌培地としてLB brothを用いて作製した抗原に比較して，TBを用いた抗原のほうが陽性コントロールの値が高いことが示唆された（**Fig. 3**）。したがって，TBを用いて作製した抗原を3.2で最適化した条件で反応させることにより，ウシ症例における感度を向上できると期待される。

本研究期間内には，迅速診断キットの作製を実現するために必要となる抗原量が確保できなかったが，最適化した抗原作製方法を用いることで，抗原量を十分に確保できるようになった。したがって，近い将来に迅速診断キットへの応用を実現させられる見通しである。

4．要　　約

肝蛭（*Fasciola* spp.）によって引き起こされる肝蛭症は，畜産業に甚大な経済被害を与えている。また，人獣共通感染症であり，肝蛭の幼虫に汚染された野菜や肝臓を食べることでヒトは感染する。シカでは血清有病率が高いため，シカをレゼルボアとしてヒトに感染するリスクがある。さらに，シカから家畜への感染リスクも懸念されている。本研究の目的は，rCatL1を用いて，肝蛭症の迅速診断キットを開発し，疫学調査に活用することである。rCatL1を用いたELISAは，シカおよびヒトの血清診断において良好な結果を示した。ウシのコントロール血清では高い感度と特異性が認められたが，本研究では，と畜場から得られた肝蛭陽性のウシ血清では感度が低下した。そこで，低感度を克服するためにELISA条件を最適化した。また，より良い抗原を得るために，組換え抗原の精製プロトコールを改良した。結論として，最適化されたELISAプロトコールにより陽性コントロールのOD値が改善されたため，組

© The Ito Foundation

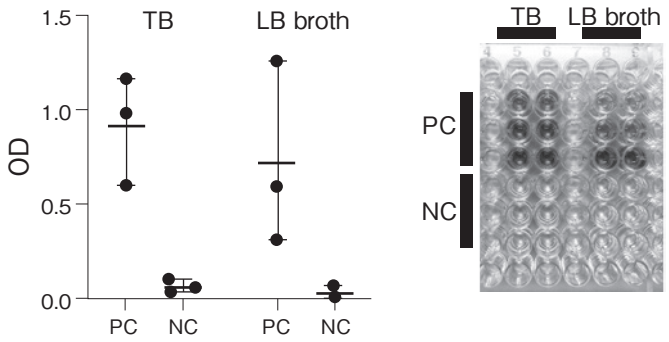


Fig. 3　Comparison of ELISAs with rCatL1 obtained using Terrific broth（TB）and Luria-Bertani（LB）broth.

換え抗原の有効性が確認された。また，LB broth の代わりにTBを用いた新しい精製プロトコールにより，組換え抗原の陽性コントロールのOD値が向上した。これらの結果は，組換え抗原がシカ，ヒトおよびウシに有効であることを示唆しており，近い将来，ジビエ媒介感染症を監視するためのイムノクロマトグラフィーに基づく迅速診断キットを開発する準備が整った。

文　献

1）Sato, H., Hiraya, H., Sugiyama, T., Fukumoto, S., Matsuyama, R., Yanagawa, Y., Nakao, R., Irie, T., Taira, K., Yamazaki, A., Hagiwara, K., Yoshida, A., Kamata, Y., Ichikawa-Seki, M.：Seroprevalence of fasciolosis in Hokkaido sika deer（*Cervus nippon yesoensis*）from Hokkaido Prefecture, Japan revealed by ELISA using recombinant cathepsin L1, *Parasitol Int*, **80**, 102222, 2021.

2）Sugiyama, T., Ichikawa-Seki, M., Sato, H., Kounosu, A., Tanaka, M., Maruyama, H.：Enzyme-linked immunosorbent assay（ELISA）using recombinant *Fasciola* cathepsin L1 for the diagnosis of human fasciolosis caused by *Fasciola hepatica*/*gigantica* hybrid type, *Parasitol Int*. **82**, 102311, 2021.

3）Robinson, M. W., Menon, R., Donnelly, S. M., Dalton, J. P., Ranganathan, S.：An integrated transcriptomics and proteomics analysis of the secretome of the helminth pathogen *Fasciola hepatica*：proteins associated with invasion and infection of the mammalian host, *Mol Cell Proteomics*, **8**, 1891～1907, 2009.

© The Ito Foundation

牛ウイルス性下痢ウイルス経胎盤感染機構の解明

Mechanisms of transplacental BVDV transmission

内藤　郁慶[1]・平野　佑気[1]・田路　矩之[2]
（[1]北海道立総合研究機構畜産試験場，[2]北海道大学大学院教育推進機構）

Ikunori Naito[1], Yuki Hirano[1] and Noriyuki Toji[2]
([1]Animal Research Center, Hokkaido Research Organization,
[2]Hokkaido University Institute for the Advancement of Graduate Education)

Bovine viral diarrhea virus（BVDV）is one of the major pathogens causing transplacental infection in cattle, but the mechanism of its transplacental infection remains unclear. In this study, we isolated fetal trophoblast cells from mature bovine placentas and analyzed 13,052 cells using single-cell RNA-seq. Based on clustering and the expression of cell marker genes, at least 9 distinct trophoblast cell clusters, including unknown cell populations, were identified in the chorion. The majority of the cells were mononuclear cells（MNCs；50%）and binucleate cells（BNCs；35%），which were further subdivided into 3 and 4 subclusters, respectively. Cell cycle analysis suggested that MNC_1 and MNC_2 were undifferentiated progenitor cells or stem cells, while MNC_3 was a differentiated mature cell population. In contrast, BNCs underwent 3 rounds of cell cycle, alternating between S and G2/M phases while skipping the G1 phase. This was thought to capture the process of BNC nuclei doubling from diploid to octoploid. Pseudo-cell lineage estimation based on mRNA maturity suggested the existence of multiple pathways of differentiation from MNCs to BNCs. The results reported here are expected to contribute not only to elucidating the mechanism of transplacental infection by BVDV but also to understanding the mechanism of pregnancy maintenance by trophoblast cells and the mechanism controlling placental formation and development.

1．目　　的

牛ウイルス性下痢症は，家畜伝染病予防法で監視伝染病に指定された，家畜衛生分野で最も重要な感染症の一つである。この感染症は牛ウイルス性下痢ウイルス（Bovine viral diarrhea virus，BVDV）によって引き起こされ，近年は年間300～400件程度の発生があり，本邦の畜産経営に多大な損失を与えている。BVDVは妊娠期間に母体から胎子へ胎盤を通じて感染を成立させることによって，牛群内にウイルス感染が広がることが知られている。そのため，本感染症の制御のためには，BVDV感染拡大の最も重要なステップである経胎盤感染の理解が必要となる。胎盤は妊娠期間に形成される器官であり，母体と胎子の両方の細胞から構成される。母体と胎子の境界には胎盤関門と呼ばれる生物学的障壁が存在し，いくつかの病原体を除いて胎子への感染を防いでいる。胎盤

© The Ito Foundation

関門は母体側の子宮上皮細胞と胎子側の栄養膜細胞が互いに向かい合って構成されているため，栄養膜細胞が母体の細胞と接している唯一の胎子由来の細胞となる。そのため，栄養膜細胞がBVDVの胎子侵入の際の最初の標的細胞であることが想定される。しかしながら，胎盤関門を再現した細胞培養系や二核細胞の分化・維持を十分に再現した細胞培養系は存在しないため，ウイルス感染実験による標的細胞の探索を実施することは困難である。また，従来の網羅的遺伝子解析では細胞種ごとの性質を十分に分離・解析することは不可能であるため，標的細胞探索に利用することができない。そこで本研究は，経胎盤感染におけるBVDV標的細胞を探索すること，および培養系の構築に向けた栄養膜細胞の単一細胞レベルでの基盤的情報を整備することを目的として，胎盤組織から栄養膜細胞を分離し，単一細胞レベルの網羅的遺伝子発現解析を実施した。

２．方　法

2.1　供試動物

本研究では，北海道畜産公社十勝工場で令和４年から令和６年にかけてと畜された妊娠牛から妊娠子宮35検体を採取した。摘出された妊娠子宮は畜産試験場に運び，胎子，胎盤節，羊水を採材した。

2.2　栄養膜細胞の単離

妊娠子宮から胎盤節を子宮内膜から切り出し，絨毛膜と子宮小丘を用手的に剥離した。絨毛膜絨毛部を眼科鋏を用いて細かく刻み，RPMI1640培地（島津ダイアグノスティクス）に入れた。組織片を４℃で５分間，300 g の条件で遠心分離を３回繰り返して洗浄した。続いて，組織片を５Unit/ml のディスパーゼII（Thermo Fisher Scientific）と250 unit/ml のDNase（富士フイルム和光純薬）を含むRPMI1640培地に入れた。消化の程度は５分ごとに目視で確認し，転倒混和しながら，合計60分間37℃で処理した。処理後，100 μmセルストレイナーで濾過した。次に，死細胞およびデブリを取り除くことを目的として，Opriprepを用いた密度勾配遠心分離を実施した。1.153 g/ml，1.122 g/ml，1.090 g/mlの濃度勾配で４℃で25分間，800 g で遠心分離し，生細胞層を注意深く分離した。分離後，ACK lysis buffer（Thermo Fisher Scientific）を用いて赤血球を溶解した。最後に，トリパンブルー染色（Thermo Fisher Scientific）によって生細胞を染色し，2.0 $\times 10^6$/mlの濃度で凍結保存した。凍結保存にはセルバンカー２（タカラバイオ）を使用しシングルセルRNA-seqライブラリー作製時まで－80℃で保存した。

2.3　シングルセルRNA-seqライブラリー調整

採集した栄養膜細胞のうち，妊娠ステージが異なる５検体分の栄養膜細胞を等量混合し，一つのライブラリーとした。ライブラリー当たり10,000個の細胞を目標に10X Chromium Controller，Chromium Next GEMシングルセル３’キットv3.1（10x Genomics）を使用して単一細胞ドロップレット形成を行った。生成されたscRNA-seqライブラリーはillumina Novaseq6000でシークエンシングされた。

2.4　シングルセルRNA-seq解析

ベースコール（BCL）ファイルは，Cell Ranger v6.0.2のmkfastqコマンドを用いてデマルチプレックスおよびfastqファイル生成処理を行った。Cell Ranger v7.0.2のcountコマンドを用いてfastqファイルのリードデータをウシゲノム（ARS-UCD2.0）にマッピングし，各細胞における各遺伝子の発現量を算出した。二次解析はRベースのsingle cell RNA-seq解析ツールであるSeurat（ｖ５）を用いて実施した。クオリティの低いデータを除くため発現している遺伝子数が

© The Ito Foundation

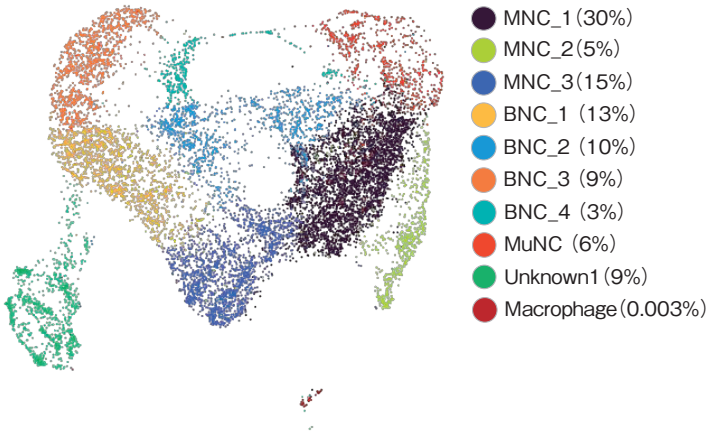


Fig. 1　Single-cell analysis of the manure bovine placenta. Uniform Manifold Approximation Plot (UMAP), where dots represent single cells and are colored by cell type for the cotyledonary areas of the placenta. MNC, mononucleate trophoblast cell ; BNC, binucleate trophoblast cell ; MuNC, multinucleate trophoblast cell.

1000以下の細胞を除外した。遺伝子発現量データは各細胞ごとにログ正規化を行った。次に，データのスケーリングを行い，全遺伝子を用いた主成分分析（PCA）による次元削減を実行した。Louvain法により細胞のクラスタリングを行い，主成分分析の結果を用いたUMAP非線形次元削減により細胞集団を分類した。FindAllMarkersにより各クラスターのマーカーを特定し，文献検索の情報を基に細胞タイプを推定した。

Souporcell singularityコンテナを用いて，個体ごとに細胞を分別した。'souporcell_pipeline.py' コマンドにより，cellrangerの出力であるbamファイルを入力として，一塩基多型（SNPs）情報を各細胞から取得した後，SNPsをクラスタリングして，細胞を指定した個体数（5個体）になるように分類した。

mRNA分子の成熟度を比較することで，疑似細胞系譜を推定した。Velocytoライブラリ（v 0.17）の 'velocyto run10x' コマンドを用いて，スプライシングを受けているmRNAとまだ受けていないmRNAの発現量をそれぞれ同定した。次にDynamoライブラリを用いて，疑似細胞系譜を推定した。'dyn.tl.cell_velocities' コマンドを用いて推定した細胞間の分化順序予測を，'dyn.pl.streamline_plot' コマンドを用いて，前述のSeuratによって描出したUMAP上に投影した。

3．結果と考察

10X Genomics Chromium system プラットフォームを使用してウシ胎子栄養膜細胞の単一細胞トランスクリプトームデータを生成した。解析に供された推定細胞数は13,052細胞であり，平均シークエンス深度は71,751 reads/cellで，検出遺伝子数の中央値が4,076 Genes/cellであった。

得られたシーケンスデータについてSeuratを用いて正規化し，10個のクラスターを同定した。（**Fig. 1**）既報のマーカー遺伝子の発現に基づいて各クラスターを特定の細胞種に割り当てた結果，ほとんどの細胞が単核細胞（Mononucleate trophoblast cell, MNC；50％）または二核細胞（Binucleate trophoblast cell，BNC；35％）であった。その他の細胞群としては多核巨細胞（Multi-nucleate trophoblast cell, MuNC；6％），マクロファージ（Macrophage，Mac；0.003％）が同定され，既知のマーカー遺伝子からは細胞種を同定できなかった細胞が9％であった

© The Ito Foundation

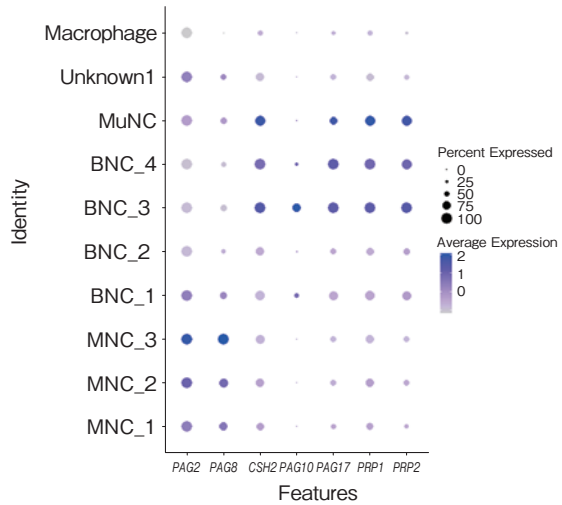


Fig. 2　Dot plots of gene expression for markers of identified cell types in the placenta. The x-axis denotes list of analyzed cell clusters, while the y-axis represents list of trophoblast marker genes. Each dot represents the expression of a specific gene in a particular cell cluster. The size of the dot indicates the percentage of cells expressing the gene (expression rate), and the color intensity represents the average expression level (log normalized count) among the cells expressing the gene.

（unknown１）。MNCおよびBNCの遺伝子発現によりMNCは３種類の，BNCは４種類のクラスターに細分化された。各クラスターにおける代表的な単核細胞（*PAG2*，*PAG8*）と二核細胞（*CSH2*, *PAG10*, *PAG17*, *PRP1*, *PRP2*）のマーカー遺伝子の発現量はそれぞれのクラスター特異的に発現していた[1]（**Fig. 2**）。各クラスターの特徴として，MNC_１は他のクラスターと比較しVEGFAの発現が高かった。MNC_３は単核細胞に特異的なマーカー遺伝子である*PAG2*および*PAG8*の発現が最も高かったため典型的な単核細胞であると考えられた。BNCについて，BNC_３およびBNC_４では二核細胞のマーカー遺伝子である*CSH2*，*PAG10*，*PAG17*，*PRP1*および*PRP2*の発現が高い典型的な二核細胞であると考えられた。BNC_１およびBNC_２は典型的な二核細胞への分化途中の細胞群であることが推測された。またBNC_４において，UMAP上でBNC_４とMuNCの間に位置する少数の細胞群が*BERB-K1*および*RUM1*を発現していた。これらの遺伝子は膜融合に関与しているため，この細胞群が母体側の上皮と融合する過程の二核細胞であると考えられた[2, 3]。

各細胞周期（Ｇ１期，Ｓ期，G2M期）に特異的に発現する遺伝子を細胞周期マーカーとして用いることで，それぞれの細胞が細胞周期のどこに位置しているのかを同定した（**Fig. 3**）。MNCに着目すると，MNC_３の多くは静止期に位置する一方で，MNC_１，２は細胞周期が回転し，盛んに分裂している細胞であることを同定した。これはMNC_１，２が未成熟な前駆細胞や幹細胞集団である一方，MNC_３が分化した成熟細胞の集団であることを示唆している。このことはMNC_３に主に発現する*PAG2*，*PAG8*が成熟MNCのマーカー遺伝子であるという仮説とも一致する[3]。他方，BNCの細胞周期に着目すると，UMAP上の細胞集団の軌跡に沿って，細胞周期が順序よく３回転していることが明らかになった。また，BNCの細胞周期の回転はＧ１期をスキップしてＳ期とG2M期を交互に繰り返している可能性が

© The Ito Foundation

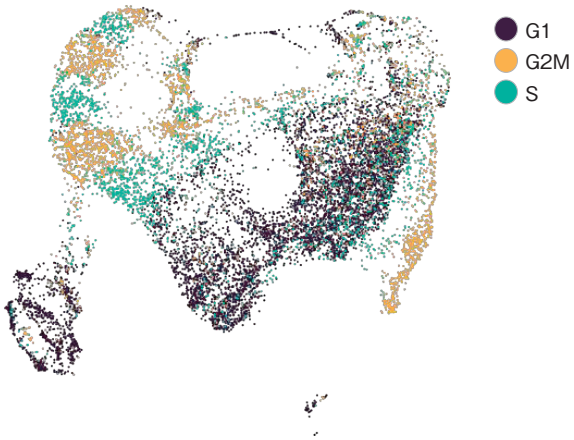


Fig. 3　Cell cycle analysis of single-cell RNA-seq data from the placenta.UMAP visualization of the single-cell RNA-seq data, with each point representing an individual cell. Colors indicate the assigned cell cycle phase (G1, S, or G2/M) for each cell based on the expression of cell cycle marker genes.

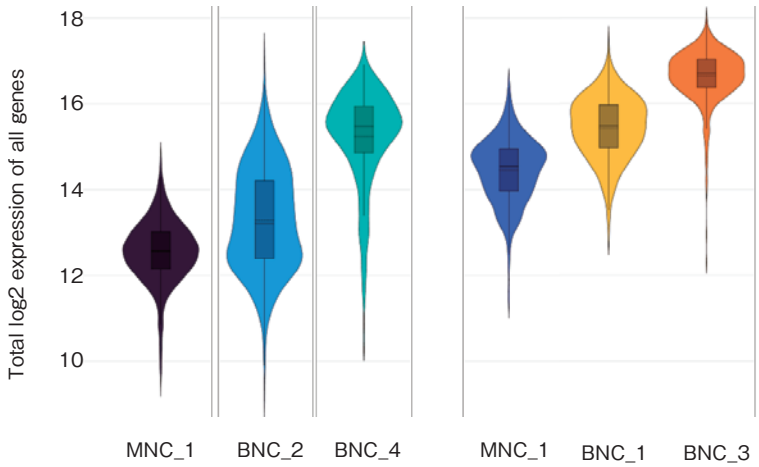


Fig. 4　Total mRNA amount in each cell cluster.

示唆された。BNCは細胞質分裂を伴わない核分裂によって形成されると考えられている。また，BNCの核ゲノムは体細胞に一般的な２倍体の他に４倍体，８倍体も見られることが知られている[4]。倍数性増加の要因については明らかではないが，二核になることで，染色体の分離に問題が生じ，M期に細胞質分裂を生じないまま，S期を再び迎えることが原因であるという説も提唱されている。これを今回の細胞周期解析に当てはめると，１回目の細胞周期回転で２核を生じた後，２回目，３回目の回転で倍数性がもとの２倍体から４倍体，８倍体へと増えて行く過程を捉えていると解釈することができる。この解釈を支持するように，BNC_１，２から３，４の先端に向かうに従い，細胞内の総mRNA量も徐々に増加していることが認められた（**Fig. 4**）。

mRNA分子の成熟度から疑似的な細胞系譜を推定した。細胞分化の起点において，ある遺伝子が発現を始めると，mRNA分子は初めはスプライシングを受けていない未成熟RNAの形で多く存在するものの，細胞の分化が進むに従ってスプライシングを受けた成熟RNAの割合が増加する

© The Ito Foundation

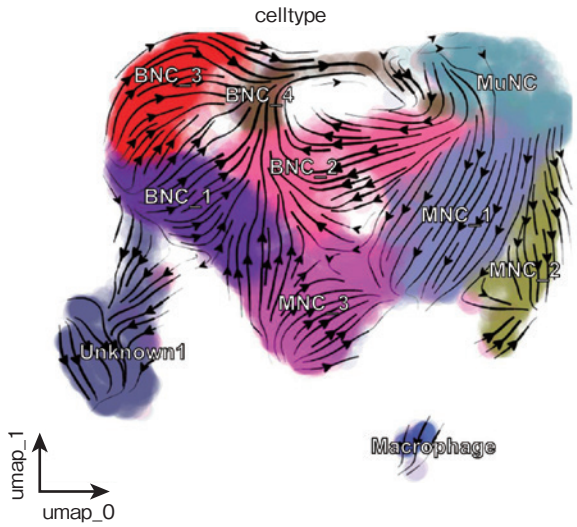


Fig. 5　RNA velocity analysis using single-cell RNA-seq data from the placenta UMAP plot showing the results of RNA velocity. The direction and magnitude of the velocity for each cell are represented by the direction and length of the arrows. Colors indicate cell types. RNA velocity was calculated using velocyto（version 0.17）. Quantification of unspliced and spliced mRNAs was based on intronic and exonic read counts.

ことが想定される。この前提のもと，細胞分化の方向を全遺伝子を用いてシミュレートした（**Fig. 5**）。解析の結果，MNCからBNCへの分化において，成熟MNCであるMNC_３からの経路の他に，未成熟MNCであるMNC_１から分化する経路も存在することが示唆された。また，２系統存在するBNC集団の軌跡については，なんらかの変化によってBNC_３からBNC_４へ遷移する経路が示唆された。一方で本解析では，どの細胞集団が細胞系譜の起点である栄養膜幹細胞なのかは明らかにできなかった。今後は，分化経路予測の正確性を強化し，２種類存在するBNC集団の形態的差異を明らかにするために，胎盤組織標本を用いて，それぞれの細胞集団の形態的特徴を明らかにし，空間的な相互関係を解析する必要がある。

以上により，ウシ成熟胎盤栄養膜細胞における単一細胞レベルでの網羅的遺伝子解析を実施した。本研究で取得したデータセットは各細胞群での新規マーカー遺伝子の特定や新しい細胞群の同定のみならず，栄養膜幹細胞の樹立や分化誘導など栄養膜細胞の培養系の確立において有用な情報となることが期待される。

４．要　　約

牛ウイルス性下痢ウイルス（BVDV）は牛で経胎盤感染を引き起こす主要な病原体の一つであるが，その経胎盤感染機構は明らかとなっていない。本研究では，ウシの成熟胎盤から胎子栄養膜細胞を分離し，単一細胞RNA-seqにより13,052細胞を解析した。クラスタリングと細胞マーカー遺伝子の発現に基づいて，絨毛膜には未知の細胞群を含む少なくとも９個の異なる栄養膜細胞クラスターが同定された。大半は単核細胞（MNC；50％）と二核細胞（BNC；35％）で，それぞれ３種類と４種類のサブクラスターに細分化された。細胞周期解析の結果，MNC_１，２は未分化な前駆細胞や幹細胞，MNC_３は分化した成熟細胞であることが示唆された。一方，BNCでは細胞周期が３回転し，Ｇ１期をスキップしてＳ期とG2M期を交互に繰り返していた。これは，BNC

© The Ito Foundation

の核が2倍体から8倍体へと倍加していく過程を捉えていると考えられた。mRNAの成熟度から疑似的な細胞系譜を推定したところ，MNCからBNCへの分化には複数の経路が存在することが示唆された。今回報告された解析結果は，BVDVの経胎盤感染機構の解明のみならず，栄養膜細胞による妊娠維持機構や胎盤形成とその発達を制御する機構の解明に貢献することが期待される。

文　献

1）Green, J. A., Geisert, R. D., Johnson, G. A., Spencer, T. E.：*Advances in anatomy embryology and cell biology*, **234**, 129～154, 2021.

2）Nakaya, Y., Koshi, K., Nakagawa, S., Hashizume, K., Miyazawa, T.：*Journal of Virology,* **87**, 10563～10572, 2013.

3）Touzard, E., Reinaud, P., Dubois, O., Guyader-Joly, C., Humblot, P., Ponsart, C., Charpigny, G.：*Reproduction*, 146(4), 347～362, 2013.

4）Klisch, K., Hecht, W., Pfarrer, C., Schuler, G., Hoffmann, B., Leiser, R.：*Placenta*, 20(5-6), 451～458, 1999.

© The Ito Foundation

鼻腔粘膜ワクチンの自然免疫活性化機構を応用した効果的な牛呼吸器感染症制御法の検討

Effective control of bovine respiratory disease by application of the innate immune activation mechanism of nasal mucosal vaccine

石　川　真　悟
（大阪公立大学獣医学研究科）

Shingo Ishikawa
（Graduate School of Veterinary Science, Osaka Metropolitan University）

Bovine respiratory disease is also called bovine respiratory disease syndrome (BRDC), as it is caused by a complex interplay of a wide variety of pathogenic microorganisms and changes in immune status caused by stress in the rearing environment. It is the most economical disease in beef cattle production. BRDC known as a disease that causes the greatest economic loss in beef cattle production. In recent years, nasal mucosal vaccines have become popular in Japan as a new method for controlling BRDC. However, the effects of administration vary greatly depending on the condition of the individual and feeding management, and innovative BRDC control has not been achieved. Therefore, in this study, we investigated ways to utilize nasal mucosal vaccines more effectively by analyzing innate immunity, and aimed to develop innovative control methods for BRDC. After transportation, it became clear that innate immune dynamics also fluctuated as the amount of BRDC-induced pathogen genes changed. On the other hand, under the transport conditions of this study, no difference was observed between the administration of the nasal mucosal vaccine and the non-administration group. This test involved a very harsh transportation environment, and nutritional factors were significantly reduced after transportation. Therefore, it was suggested that nutritional factors are important for effective prevention of BRDC by nasal mucosal vaccine through innate immunity.

1．目　　的

牛の呼吸器病は，多種多様な病原微生物・飼育環境ストレスによる免疫状態の変化などが複雑に絡み合って発生することから牛呼吸器病症候群（BRDC）とも呼ばれ，肉牛生産において最も大きな経済的損失をもたらす疾病として知られている[1)]。BRDC制御のためにさまざまな予防法・治療法が検討されてきたが，発症数は減少しないだけでなく，近年の農場の大規模化に伴いむしろ増加傾向にある。BRDC制御が困難であった大きな理由として，牛の呼吸器粘膜免疫機構が不明であったことがあげられる。そこで，著者らはこれまで，牛の呼吸器粘膜免疫機構について研究を進め，牛の呼吸器粘膜免疫は肺胞マクロファージを主体とした非特異的な自然免疫応答が主体である

© The Ito Foundation

ことを明らかにしてきた[2]。

近年わが国では，BRDC制御の新たな手法として，鼻腔粘膜ワクチンが普及している。鼻腔粘膜ワクチンはBRDC関連ウイルスを抗原として含んでいるが[3]，臨床現場では，それらの抗原以外の病原体においても予防だけでなく治療効果さえあるのではないかといった報告がされ，輸送後BRDC予防のために，多くのセリ場において鼻腔粘膜ワクチンの全頭投与が行われるようになっている[4]。しかし，投与効果は個体の状態や飼養管理により大きな差異があり，革新的なBRDC制御には至っていない。著者らはその作用機序として，*in vitro*において鼻腔粘膜ワクチンに含まれている病原体が含有している自然免疫刺激因子（病原体関連分子パターン：PAMPs）が肺胞マクロファージを刺激し，自然免疫を活性化することができることを明らかにしてきた[5]。しかし，実際の生体における自然免疫活性化機構については不明な点が多く，そのことが投与効果の差異につながっていることが想定される。

そこで本研究では，鼻腔粘膜ワクチンをより効果的に活用するための方法を，実際に活用されている輸送による呼吸器病予防時に焦点を当て，自然免疫を中心に解析することで検討し，BRDCの革新的な制御法を開発することを目的とした。

2．材料と方法

2.1　供試材料

離島でのセリで落札され，セリ後に船およびトラックを用いて約14時間にわたる輸送を行った黒毛和種牛28頭（平均日齢：265±25日，オス27頭，メス１頭）を供試し，①輸送前，②輸送後１日，③９日および④15日に末梢血を採取した。また，そのうち10頭（平均日齢：265±25日，オス９頭，メス１頭）においては，輸送前および輸送後15日において気管支肺胞洗浄液（BALF）およびサイトカイン濃度解析用のタンパク分解酵素添加血漿を採取した。それぞれ半数ずつ（血液14頭，BALF５頭）を対照群，投与群とし，投与群には鼻腔粘膜ワクチン（TSV®-２，ゾエティス・ジャパン株式会社）を輸送12時間前に投与した。

2.2　BALFの採取

供試牛を保定後，動物用気管支鏡（先端部5.5 mm：オリンパス株式会社，日本）を鼻腔から挿入し，任意の気管支に楔入した。その後，滅菌生理食塩水30 mlを注入し，即座に回収する方法によりBALFを得た。生理食塩水の回収は，同部位で連続して３回実施（30 ml × ３回：計90 ml）し，プールしたBALFをBALF検体とした。

2.3　病原微生物の解析

五嶋らの報告に従い，Multiplex RT-qPCRを実施した[6]。日本の肉牛と乳牛における最近のBRDCの流行に基づき，４つの病原体からなる３つのユニット（Unit 1：Bovine adenovirus 7（BAdV7），Bovine torovirus（BToV），Bovine coronavirus（BCoV），Bovine viral diarrhoea virus（BVDV），Unit 2：Bovine respiratory syncytial virus（BRSV），Bovine parainfluenza virus 3（BPIV3），Bovine influenza D virus（BIDV），Bovine herpes virus 1（BHV1），Unit 3：*Mycoplasma bovis*（*M. bovis*），*Mannheimia haemolytica*（*M. haemolytica*），*Pasteurella multocida*（*P. multocida*），*Histophilus somni*（*H. somni*））に分け，各ユニットの個々の病原体に対するプライマー，プローブによりリアルタイムPCRを実施した。

2.4　免疫因子の解析

BALF中免疫の解析のために，BALF検体を遠心分離により細胞成分と液性成分に分離した。細胞成分は，フローサイトメトリーにより表面抗原解析を実施し，リンパ球，好中球，肺胞マクロファージの割合および肺胞マクロファージにおけ

© The Ito Foundation

る，CD21，MHC Class Ⅱ表面抗原発現を解析した。BALFの液性成分および血漿は，サイトカイン（IFN-γ，IL-2，IL-4，IL-8，IL-17A）濃度をELISA法により解析した。

2.5　栄養因子の解析

レチノール（VA）とαトコフェロール（VE）を高速液体クロマトグラフィー法，グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ（GOT），γ-グルタミルトランスペプチダーゼ（GGT），遊離脂肪酸（FFA），総コレステロール（CHOL），尿素窒素（BUN），血糖（GLU），カルシウム（CA），リン（IP），マグネシウム（MG），トリグリセリド（TG），レチノール（VA），αトコフェロール（VE），βヒドロキシ酪酸（BHB），総タンパク質（TP），アルブミン（ALB）を自動生化学分析装置を用いて測定した。

3．結果と考察

3.1　輸送による影響

輸送後９日において，BALF中病原微生物の検出は輸送後で増加していた（**Table 1**）。よって，本試験での輸送は牛の免疫機構に影響を与え，感染を惹起したといえる。

輸送前と輸送後におけるBALF中免疫細胞の割合は，マクロファージが減少し，好中球が増加した。さらに，マクロファージの表面抗原発現について解析すると，MHC Class Ⅱ発現が増加し，CD21発現が減少した（**Table２**）。また，BALF中

Table 1　Number of pathogen-positive animals before and after transport

	pre	post
Bovine viral diarrhoea virus	0	0
Bovine coronavirus	0	8
Bovine torovirus	0	0
Bovine adenovirus 7	0	0
Bovine respiratory syncytial virus	0	5
Bovine parainfluenza virus 3	0	0
Bovine influenza D virus	0	0
Bovine herpes virus 1	0	0
Mycoplasma bovis	5	9
Mannheimia haemolytica	1	3
Pasteurella multocida	5	9
Histophilus somni	0	1

Table 2　BALF immune cell percentage and macrophage surface antigen expression before and after transport

	Unit	Pre	Post
Immune cell percentage			
Macrophages	%	64.62 ± 22.55	29.99 ± 32.97 *
Neutrophills	%	14.39 ± 15.53	55.95 ± 40.64 *
Lymphocytes	%	20.99 ± 12.01	14.06 ± 13.86
Macrophage surface antigen expression			
MHC Class II	%	14.49 ± 6.65	30.16 ± 10.56 *
CD21	%	74.43 ± 12.67	34.25 ± 22.62 *

pre：before transportation

post：9 days after transportation

*p<0.05 compared to before transportation

© The Ito Foundation

サイトカイン濃度について解析すると，IFN-γ，IL-2およびIL-17A濃度が輸送後において有意に増加した。末梢血においてはIFN-γ濃度では有意差が認められなかったが，IL-2，IL-4およびIL-17A濃度が輸送後において優位に増加していた（**Table 3**）。以上の結果から，輸送によりBALF局所の免疫動態が病原体排除の方向に変化したことが推察された。さらに，輸送後にほとんどの牛（8頭以上）で陽性となっていたBCoV，*M. bovis*および*P. multocida*のCt値とIL-17A濃度について相関分析を行ったところ，すべてで有意な負の相関が認められた（**Fig. 1**）。Ct値は病原体遺伝子量が少ないほど数値が小さくなることから，これらの病原体遺伝子の量が増加すると，IL-17Aも増加することを示している。

また，末梢血中の栄養因子について解析すると，ほとんどの栄養因子において，輸送後において有意に減少していた（**Table 4**）。

3.2　鼻腔粘膜ワクチン投与が輸送後BRDCに与える影響について

BRDC投与群，非投与群において，輸送後9日におけるBALF中病原体検出数に差異は認められなかった。また，BALF中免疫因子についても，投与群，非投与群間に有意差は認められなかった。さらに，末梢血中の栄養因子についても，投与群，非投与群間に有意差は認められなかった。

3.3　本研究の意義と今後の展望

以上のことから，輸送後に発症するBRDCにおける免疫動態について，マクロファージや好中球といった自然免疫細胞が主に変化するという詳細が明らかとなった。よって，BRDCを予防するためには，宿主の自然免疫をコントロールすることが重要であることが推察される。

我々はこれまで呼吸器局所における自然免疫の主役を担う肺胞マクロファージが*in vitro*において鼻腔粘膜ワクチンにより活性化されることを明らかにしてきた[5]。本試験では，実際の輸送時に，鼻腔粘膜ワクチン投与群と非投与群に分けて輸送後における自然免疫細胞動態の変化について解析を行い，*in vivo*において鼻腔粘膜ワクチンが自然免疫細胞に与える影響を解明することを試みた。しかし，投与群，非投与群の間に有意な差は認められなかった。つまり，本試験条件では鼻腔粘膜ワクチンの投与はBRDCの予防にあまり効果的ではなかったといえる。自然免疫細胞が応答するためには，PAMPsの認識，転写の活性化およびタ

Table 3　BALF and plasma cytokine concentration before and after transport

	Unit	Pre			Post			
BALF								
IFN-γ	pg/ml	0.32	±	0.96	48.92	±	95.22	*
IL-2	pg/ml	21.57	±	7.14	34.77	±	24.81	*
IL-4	pg/ml	6.47	±	1.07	6.47	±	1.34	
IL-8	pg/ml	107.75	±	87.30	170.31	±	142.86	
IL-17A	pg/ml	3.46	±	2.65	66.35	±	85.18	*
Plasma								
IFN-γ	pg/ml	99.16	±	246.62	99.59	±	54.65	
IL-2	pg/ml	113.26	±	83.51	241.01	±	146.57	*
IL-4	pg/ml	9.87	±	10.14	14.88	±	13.02	*
IL-8	pg/ml	164.05	±	64.61	217.91	±	160.94	
IL-17A	pg/ml	30.22	±	19.31	73.27	±	34.35	*

pre：before transportation

post：9 days after transportation

*$p<0.05$ compared to before transportation

© The Ito Foundation

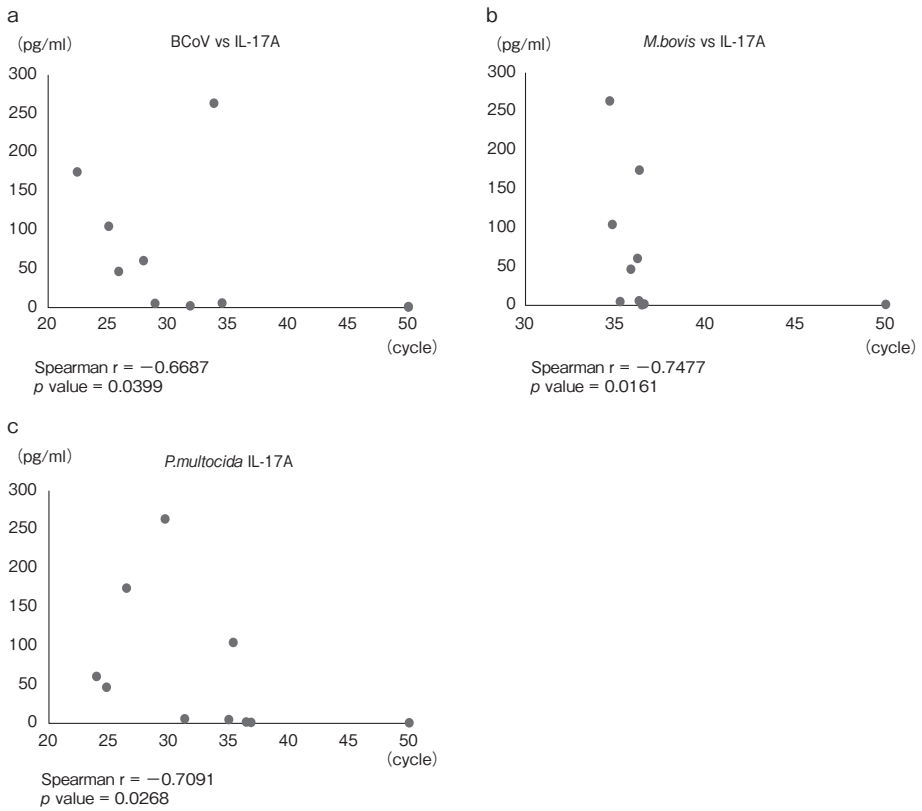


Fig. 1　Scatter plot showing significant Spearman negative correlation between IL-17A concentration and pathogen Ct value of (a) Bovine corona virus, (b) *Mycoplasma bovis*, (c) *Pasteurella multocida*.

Table 4　Trophic factor blood concentration before and after transport

	Unit	Before transportation	1 day after transportation	9 day after transportation	15 day after transportation
VA	μg/dl	88.6 ± 16.5	73.3 ± 13.9 *	76.1 ± 14.3 *	66.5 ± 15.9 *
VE	μg/dl	170.2 ± 63.1	143.6 ± 53.6 *	95.3 ± 26.2 *	88.2 ± 34.2 *
FFA	μEq/l	560.8 ± 171.0	692.3 ± 129.7	207.7 ± 108.3 *	173.3 ± 132.4 *
T-cho	mg/dl	113.4 ± 18.4	123.9 ± 83.2	87.6 ± 15.4 *	72.0 ± 17.4 *
GLU	mg/dl	76.0 ± 7.2	86.2 ± 9.6 *	83.0 ± 17.8	78.8 ± 7.3
GOT	IU/l	58.4 ± 14.2	70.2 ± 22.1 *	55.5 ± 28.0	56.8 ± 26.3
GGT	IU/l	17.3 ± 3.2	15.4 ± 3.2 *	15.1 ± 2.8 *	16.8 ± 3.5
BUN	mg/dl	9.0 ± 2.4	8.8 ± 1.6	8.9 ± 1.9	8.2 ± 1.8
TP	g/dl	6.7 ± 0.4	6.8 ± 0.4	6.4 ± 0.4 *	6.7 ± 0.5
ALB	g/dl	3.7 ± 0.2	3.8 ± 0.4	3.2 ± 0.3 *	3.1 ± 0.2 *
A/G	%	1.3 ± 0.2	1.3 ± 0.4	1.0 ± 0.2 *	0.9 ± 0.1 *
Ca	mg/dl	9.3 ± 0.4	8.8 ± 0.6 *	9.4 ± 0.6	9.3 ± 0.4
IP	mg/dl	8.6 ± 0.9	7.1 ± 1.5 *	7.1 ± 0.9 *	6.7 ± 0.9 *
MG	mg/dl	2.1 ± 0.2	1.8 ± 0.2 *	1.9 ± 0.2 *	1.9 ± 0.2
TG	mg/dl	9.0 ± 3.7	7.8 ± 3.0	15.8 ± 6.8 *	12.5 ± 4.2 *

VA：vitamin A, VE：vitamin E, FFA：free fatty acid, T-cho：total colesterol, GLU：glucose, GOT：glutamic oxaloacetic transaminase

GGT：gamma glutamil transpeptidasi, BUN：blood urea nitrogen, TP：total protein, ALB：albumin, A/G：albumin/globulin ratio

Ca：calcium, IP：inorganic phosphorus, MG：magnesium, TG：triglyceride

*$p<0.05$ compared to before transportation

© The Ito Foundation

ンパク質の産生という段階を踏む必要があるが，そのためには栄養や他の免疫細胞が産生するサイトカイン等が重要な役割を果たしている[6]。そのため，充分な栄養や適切な環境が整っていないとPAMPsが存在していたとしても自然免疫細胞の活性化は惹起されない。本試験は離島からの長時間の船およびトラック輸送という非常に厳しい輸送環境であり，栄養因子が輸送後で有意に低下していた。よって，自然免疫を介した鼻腔粘膜ワクチンによるBRDC予防のためには，栄養因子が重要であることが考えられる。

本試験により，BRDC発症時の免疫では，自然免疫が重要なこと，および鼻腔粘膜ワクチンを用いた予防のためには栄養因子の関与の可能性が考えられる。今後は，まず栄養状態やストレスの影響が少ない環境下で，*in vivo*において鼻腔粘膜ワクチンが牛の呼吸器粘膜免疫に与える影響を詳細に明らかにする必要があると考えられる。その後，本研究を踏まえて，より効果的な鼻腔粘膜ワクチンによるBRDC予防法を検討していきたい。さらに，本研究では，BRDC発症時に局所以外におけるサイトカイン濃度の変動も認められた。研究が先行しているヒトにおいては，ワクチンによる自然免疫活性化を応用した感染症予防は，局所で応答しているマクロファージだけでなく，樹状細胞が重要な役割を果たしているとされている[7]。しかし，樹状細胞に関する研究は牛ではほとんど行われていない。今後は，鼻腔粘膜ワクチンが樹状細胞に与える影響についても解明が必要であると考えられる。

4．要　約

牛の呼吸器病は，多種多様な病原微生物・飼育環境ストレスによる免疫状態の変化などが複雑に絡み合って発生することから牛呼吸器病症候群（BRDC）とも呼ばれ，肉牛生産において最も大きな経済的損失をもたらす疾病として知られている。近年わが国では，BRDC制御の新たな手法として，鼻腔粘膜ワクチンが普及している。しかし，投与効果は個体の状態や飼養管理により大きな差異があり，革新的なBRDC制御には至っていない。そこで本研究では，鼻腔粘膜ワクチンをより効果的に活用するための方法を，実際に活用されている輸送による呼吸器病予防時に焦点を当て，自然免疫を中心に解析することで検討し，BRDCの革新的な制御法を開発することを目的とした。輸送後において，BRDC起因病原体遺伝子量の変化に伴い，自然免疫動態も変動することが明らかとなった。一方で，本試験の輸送条件下では，鼻腔粘膜ワクチンを投与しても非投与群と差異は認められなかった。本試験は離島からの長時間の船およびトラック輸送という非常に厳しい輸送環境であり，栄養因子が輸送後に有意に低下していた。よって，自然免疫を介した鼻腔粘膜ワクチンによる効果的なBRDC予防のためには，栄養因子が重要であることが示唆された。

文　献

1） Johnson, K. K., Pendell, D. L.：Market impacts of reducing the prevalence of Bovine respiratory disease in United States beef cattle feedlots, *Front Vet Sci*, **9**, 298607, 2017.
2） Ishikawa, S., Miyazawa, M., Zibiki, Y., Kamikakimoto, R., Hobo, S.：Flow cytometric analysis of bronchoalveolar lavage fluid immune dynamics in calves, *J Vet Med Sci*, **84**, 548～557, 2022.
3） Walz, P. H., Newcomer, B. W., Riddell, K. P., Scruggs, D. W., Cortese, V. S.：Virus detection by PCR following vaccination of naive calves with intranasal or injectable multivalent modified-live viral vaccines, *J Vet Diagn Invest*, **29**, 628～635, 2017.
4） 叶有斗：臨床獣医師が考える子牛における牛RSウイルス病対策, *The Journal of Farm Animal in Infectious Disease*, **7**, 119～127, 2018.
5） Ishikawa, S., Miyazawa, M., Tanaka, C., Uesawa, R., Nishizawa, J., Uemura, R., Ikuo, K., Hobo, S.：Interferon gamma, lipopolysaccharide, and

© The Ito Foundation

modified-live viral vaccines stimulation alter the mRNA expression of tumor necrosis factor α, inducible nitric oxide synthase, and interferon β in bovine alveolar macrophages, *Vet Immunol Immunopathol*, 110378, 2022.

6） Goto, Y., Yaegashi, G., Fukunari, K., Suzuki, T.：Design of a multiplex quantitative reverse transcription-PCR system to simultaneously detect 16 pathogens associated with bovine respiratory and enteric diseases, *J Appl Microbiol*, **129**, 832～847, 2020.

7） Netea, M. G., Domínguez-Andrés, J., Barreiro, L. B., Chavakis, T., Divangahi, M., Fuchs, E., Joosten, L. A. B., van der Meer, J. W. M., Mhlanga, M. M., Mulder, W. J. M., Riksen, N. P., Schlitzer, A., Schultze, J. L., Stabell Benn, C., Sun, J. C., Xavier, R. J., Latz, E.：Defining trained immunity and its role in health and disease, *Nature Reviews Immunology*, **20**, 375～388. 2020.

© The Ito Foundation

子牛の脱水評価のための後大静脈／大動脈径比の応用の検討

Study of application of caudal vena cava / aorta diameter ratio for evaluation of dehydration of calf

都　築　　直
（酪農学園大学獣医学群）

Nao Tsuzuki
（School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University）

Blood tests are the most accurate method to assess the state of dehydration, but in clinical settings for cattle, where house calls are the main medical treatment request, it is often not practical to conduct blood tests during treatment. Furthermore, it is difficult to find mild dehydration by physical examination alone. This study was designed to measure the diameter ratio of the posterior vena cava to the aorta of cattle, and to create an evaluation index for dehydration status that could be applied at house calls.

In order to create a standard value for the posterior vena cava/aorta diameter ratio in healthy cows, we conducted a study using 10 Holstein female cows that had no clinical symptoms suspicious of dehydration. The posterior vena cava and aorta were visualized by ultrasound examination. Using the recorded images, the diameters of the posterior vena cava and aorta were measured in the inspiratory and expiratory phases, and the posterior vena cava/aorta diameter ratio was calculated.

The posterior vena cava/aorta diameter ratio measured in this study was 1.73 ± 0.20 in the inspiratory phase and 1.73 ± 0.33 in the expiratory phase, and there was no significant difference between them. From this, it is considered that the posterior vena cava/aorta diameter ratio is an index that is not affected by changes in body cavity pressure due to respiration.

At the time of writing this report (March 2024), we are in the stage of collecting data from the dehydration case group, and we will continue to conduct comparative studies with healthy cows to determine whether this index is useful as an index for evaluating dehydration.

1．目　　的

ロタウイルス感染症，クリプトスポリジウム感染症等で発生する下痢は，子牛において一般的に見られる疾患である。また，疾患に限らず食餌性にも下痢は発生するため，子牛において下痢は頻繁に遭遇する体調不良の一つである[1)]。下痢による子牛の脱水は，育成に悪影響を及ぼすばかりでなく時に致死的となるため，臨床現場において大きな問題となる。脱水には一般的に低張輸液剤（等張リンゲル液等）の輸液による加療が行われるが，過剰な輸液は肺水腫等の重篤な合併症を引

© The Ito Foundation

き起こし，輸液の不足は治療効果を発揮しないため，子牛の脱水状態を正確に判定することが治療のうえで重要となる。

脱水状態の評価は血液検査が最も正確であるが，往診が主体となる牛の臨床現場においては診療中の血液検査の実施が現実的ではないことも多い。また，身体所見のみで軽度脱水を判別することは困難である。このため，治療により脱水が改善されたか否かの指標は乏しく，輸液量の判断に迷うことも多い。ヒトにおいては，主に設備の乏しい開発途上国において超音波検査による脱水状態の評価が行われており，脱水の治療に対する有用性が示されている[2)]。ヒトにおいては脱水時に半径が変動する下大静脈，ならびに脱水の有無で半径が大きく変動しない大動脈の径比，すなわち，下大静脈／大動脈径比の測定が有用であると報告されている[2)]。この手法は著者らの以前の研究により，下大静脈に相当する後大静脈を用いて後大静脈／大動脈径比を測定することで，イヌにおいても応用可能である可能性が示されている[3)]。四足歩行であるイヌにおいて応用が可能であったことから，この手法は牛に対しても応用可能である可能性が考えられる。

以上の背景から，本研究は牛の後大静脈／大動脈径比を測定し，往診先でも応用できる脱水状態の評価指標の作成を目的として計画した。

２．方　　法

まず，健康な牛における後大静脈／大動脈径比の基準値を作成するために，視診，聴診，触診により疾患を疑う臨床症状のないホルスタイン種育成雌牛10頭（日齢82±25日，平均±標準偏差）を用いて検討を実施した。

いずれの牛も左頸静脈より全血の採取を実施した。採取した血液を用いて自動血球計算機により全血球計算を実施し，さらに比重計により血清総蛋白値を測定した。超音波検査の実施に先立ち，体格の影響を評価するために体高の測定を実施した。

その後，超音波検査装置により後大静脈・大動脈の描出を行った。描出ならびに記録は下記の手順で実施した。

１）音響窓の作成のためにバリカンにて右側第10～12肋間を除毛した。

２）作成した音響窓からコンベックスプローブを用い，右腎の横断像を描出した。その後，プローブ先端を固定したままプローブを尾側方向に傾けていきながら走査し，並走する後大静脈ならびに大動脈の横断像を描出した。このとき，大動脈の断面が円形になっていることを横断できていることの指標とし，さらに大動脈と後大静脈であることは，カラードップラーにより異なる方向の血流の有無の存在で確認した。

３）牛の胸壁の動き，あるいは画面に映った横隔膜の動きから呼吸相を判断し，吸気相・呼気相それぞれ３枚ずつ，計６枚の画像を記録した。

記録した画像を用い，後大静脈径ならびに大動脈径の測定を実施した。後大静脈径については，断面の中心を通り内壁と内壁をつなぐ線分のなかで最大値を示す部分の長さを測定した。大動脈径については，断面の中心を通り内壁と内壁をつなぐ線分の長さを測定した。呼気相ならびに吸気相から得られた各３枚の画像で同様の測定を実施し，得られた値の平均値を算出した。この平均値を各相における測定値とし，この値から後大静脈／大動脈径比の算出を実施した。

３．結果と考察

いずれの測定値も正規性が認められたため，以下得られた結果は平均値±標準偏差にて記載する。

本検討で用いた牛は，いずれも脱水を疑う臨床所見は認められなかった。また，本検討で用いた

© The Ito Foundation

牛のヘマトクリット値は30.7±2.0%，血清総蛋白値は7.0±0.5 g/dlであり，いずれも基準範囲内であり，血液検査結果からも脱水は否定された。

本検討で用いた育成牛において，いずれの牛においても後大静脈，大動脈を超音波装置で描出することは可能であり，後大静脈径／大動脈径比は牛においても測定可能な指標であることが明らかとなった。

本検討で用いた牛の体高は95.6±5.4 cmであった。吸気相における後大静脈径は14.3±2.4 cm，大動脈径は8.2±0.8 cmであった。呼気相における後大静脈径は14.4±3.2 cm，大動脈径は8.4±1.5 cmであった。後大静脈／大動脈径比は，吸気相では1.73±0.20，呼気相では1.73±0.33であった。

日齢と後大静脈／大動脈径比，体高と後大静脈／大動脈径比の間にはいずれも相関は認められなかった。また，吸気相ならびに呼気相から得られた後大静脈／大動脈径比の間に有意差は存在しなかった。日齢と後大静脈／大動脈径比，体高と後大静脈／大動脈径比の間に相関が認められなかったという結果から，後大静脈／大動脈径比は年齢や体格に依存しない値であることが明らかとなった。また，呼気時と吸気時の値の間に有意差が認められなかったことから，後大静脈／大動脈径比は呼吸による体腔内圧の変化の影響を受けない指標であると考えられる。このため，本研究のように測定の際に呼吸相を確認したり，画像の停止・保存をそれに合わせたりする必要はないと考えられる。したがって，臨床応用する際には後大静脈径／大動脈径比は本研究で用いた手法より容易にかつ短時間で行うことができると考えられる。

研究計画時点では脱水モデル牛を作成し，健康牛との比較検討を実施する予定であった。しかしながら，健康牛における基準値作成中に研究環境が変化し，下痢を発症し脱水を呈している牛が一定数確保できる見通しとなった。牛の脱水モデル作成は牛へ大きな侵襲を伴うため，動物愛護の観点から避けられるのならば避けるほうが好ましい。このため，脱水モデルでの検討を中止し，症例群との比較検討を実施することへと計画を変更した。

本報告書記載時点（2024年３月）では症例群のデータ採取を進めている段階であり，今後，健康牛との比較検討を進めていく予定である。

４．要　　約

脱水状態の評価は血液検査が最も正確であるが，往診が主体となる牛の臨床現場においては診療中の血液検査の実施が現実的ではないことも多い。また，身体所見のみで軽度脱水を判別することは困難である。このため，治療により脱水が改善されたか否かの指標は乏しく，輸液量の判断に迷うことも多い。本研究は牛の後大静脈／大動脈径比を測定し，往診先でも応用できる脱水状態の評価指標の作成を目的として計画した。

健康な牛における後大静脈／大動脈径比の基準値を作成するために，視診，聴診，触診により疾患を疑う臨床症状のないホルスタイン種育成雌牛10頭（日齢82±25日，平均±標準偏差）を用いて検討を実施した。いずれの牛も左頸静脈より全血の採取を実施した。超音波検査の実施に先立ち，体格の影響を評価するために体高の測定を実施した。

その後，超音波検査装置により後大静脈・大動脈の描出を行った。記録した画像を用い，後大静脈径ならびに大動脈径の測定を実施した。呼気相ならびに吸気相から得られた各３枚の画像で同様の測定を実施し，得られた値の平均値を算出した。この平均値を各相における測定値とし，この値から後大静脈／大動脈径比の算出を実施した。

本検討で用いた牛のヘマトクリット値は30.7±2.0%，血清中総蛋白値は7.0±0.5 g/dlであり，い

© The Ito Foundation

ずれも基準範囲内であり血液検査結果からも脱水は否定された。

本検討で用いた牛の体高は95.6±5.4 cmであった。吸気相における後大静脈径は14.3±2.4 cm，大動脈径は8.2±0.8 cmであった。呼気相における後大静脈径は14.4±3.2 cm，大動脈径は8.4±1.5 cmであった。後大静脈／大動脈径比は，吸気相では1.73±0.20，呼気相では1.73±0.33であった。

日齢と後大静脈／大動脈径比，体高と後大静脈／大動脈径比の間にはいずれも相関は認められなかった。吸気相ならびに呼気相から得られた後大静脈／大動脈径比の間に有意差は存在しなかった。日齢と後大静脈／大動脈径比，体高と後大静脈／大動脈径比の間に相関が認められなかったという結果から，後大静脈／大動脈径比は年齢や体格に依存しない値であることが明らかとなった。また，呼気時と吸気時の値の間に有意差が認められなかったことから，後大静脈／大動脈径比は呼吸による体腔内圧の変化の影響を受けない指標であると考えられる。このため，本研究のように測定の際に呼吸相を確認したり，画像の停止・保存をそれに合わせたりする必要はなく，後大静脈／大動脈径比の測定は，より容易にかつ短時間で行うことができると考えられる。

本報告書記載時点（2024年３月）では症例群のデータ採取を進めている段階であり，今後，健康牛との比較検討を進め，本指標が脱水評価の指標として有用であるか否かの検討を進めていく予定である。

文　献

1） Uetake, K.：Newborn calf welfare：a review focusing on mortality rates, *Anim. Sci. J.,* **84,** 101～105, 2013.

2） Chen, L., Kim, Y., Santucci, K. A.：Use of ultrasound measurement of the inferior vena cava diameter as an objective tool in the assessment of children with clinical dehydration, *Acad. Emerg. Med.,* **14**, 841～845, 2007.

3） Fujioka, T., Nakamura, K., Minamoto, T., Tsuzuki, N., Yamaguchi, J., Hidaka, Y.：Ultrasonographic evaluation of the caudal vena cava in dogs with right-sided heart disease, *J. Vet. Cardiol.,* **34,** 84～92, 2021.

© The Ito Foundation

バルク乳および血清を用いた抗体検査による牛群のサルモネラ感染状況の把握ならびに牛由来およびその他由来サルモネラ分離株間の疫学的関連性の解析

Monitoring of *Salmonella* status in cattle using bulk milk and serum antibody testing and analysis of epidemiological relevance among bovine and other isolates

岡　村　雅　史
（帯広畜産大学獣医学研究部門）

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

Outbreaks of bovine salmonellosis have occurred in many countries around the world, causing significant economic losses. In Hokkaido, where dairy farming is well developed, there have been many reports of outbreaks of salmonellosis in cattle, and effective measures to reduce this disease are strongly required on a national basis. In this study, antibody tests were performed on bulk milk and serum from farms with a history of outbreaks of salmonellosis due to serovar Dublin in order to monitor the status of *Salmonella* infection in the herd.

In addition, with the aim of finding epidemiological associations among isolates not only from cattle but also from other livestock and the environment, drug resistance profiles of *Salmonella* strains isolated from cattle, horses, and pigs stored at a livestock health center collected from within Hokkaido during the five-year period from FY 2018 to FY 2022 were also examined.

Antibody testing of bulk and aggregate milk proved useful and feasible in monitoring infection status of herds. It was also suggested that high and low PP values could be used to distinguish infected and vaccinated cows. Antibody testing of calves reflected well the antibody trend after the outbreak, and provided the possibility of estimating the duration of antibodies after infection and detecting new outbreaks at an early stage. In addition, the previous Dublin isolates in Hokkaido showed nearly identical drug resistance profiles, suggesting that the same strain may be endemic throughout the Hokkaido area.

1．目　　的

牛のサルモネラ症は世界各国で発生し，大きな経済的損失をもたらしている。わが国では，検査により摘発された患畜・疑似患畜の隔離と抗菌薬治療のほか，検査期間の子牛の移動制限や生乳の出荷制限が課されるなど，最終的に当該農場は大きな経済的損失を被り，廃業を迫られることも少なくない。酪農の盛んな北海道では，現在まで牛のサルモネラ症の発生報告が多く，その数は2022

© The Ito Foundation

年の国内発生数439頭のうち370頭（84.3％）にのぼり，2023年には639頭中560頭（87.6％）と増加傾向にある。したがって，その効果的な低減対策が国家規模で強く求められている。一方，海外では菌の分離・同定ではなく，乳や血清を用いた抗体検査によって感染牛群の早期摘発が長年にわたって行われている[1, 2]。しかし，日本国内では血清抗体検査による牛サルモネラ症のモニタリングに関する学会報告が数例あるのみで，乳中抗体検査に関する研究はまったく行われていない。

そこで我々は，発症前に定期的に抗体検査を行うことによって，潜在的に保菌している不顕性感染牛を摘発し，感染が牛群内や周囲の他農場に広がらないような対策を未然に打つことができると考えた。さらに，サルモネラがどこからどのようにして農場へ入り込むのかが理解できれば，その経路を遮断することが可能である。本研究では，①バルク乳および血清を対象とした抗体検査で牛群のサルモネラ感染状況を把握すること，さらに，②牛だけでなく他の家畜や環境に由来する分離株の間での疫学的関連性を見出すことを目的とした。

2．方　法

2.1　バルク乳および血清を用いたサルモネラ浸潤調査

対象農場は，Dublin発生歴（2022年１月）がある農場Ａである。農場Ａは，搾乳牛を飼養する２農場（Ａ−１およびＡ−２）と，子牛を飼養する１農場（Ａ−３）からなる。Ａ−１およびＡ−２では，バルク乳のほか，牛の状態に応じて分けられた搾乳ペンごとに集合乳を採取した。

2.1.1　バルク乳・集合乳の抗体検査

2022年７月から2024年３月まで３ヶ月ごとに農場Ａ−１およびＡ−２の異なる搾乳ペン単位で計12−14サンプルの集合乳およびバルク乳を採取し，抗体検査を行った。抗体検査には市販のELISAキット（PrioCHECK™　Bovine Salmonella Ab Strip Kit, Applied Biosystems™）を使用し，取扱説明書に従ってPP（Percent positivity）≤35％の検体をサルモネラ抗体陰性，PP＞35％の検体をサルモネラ抗体陽性とした。

2.1.2　子牛の抗体検査

2022年７月から2023年10月まで３ヶ月ごとに農場Ａ−３で飼養する３，６，９および12カ月齢の子牛各６頭から血清を採取し，前述と同様の方法により抗体検査を行った。

2.2　牛由来サルモネラ分離株とその他由来株における表現型の比較

2018〜2022年度の５年間に採材された家畜保健衛生所で保管されている牛，馬および豚から分離されたサルモネラ株合計138株について，主に家畜に使用される抗菌薬アンピシリン（ABPC），セファゾリン（CEZ），セフォタキシム（CTX），ストレプトマイシン（SM），ゲンタマイシン（GM），カナマイシン（KM），テトラサイクリン（TC），ナリジクス酸（NA），シプロフロキサシン（CPFX），コリスチン（CL），クロラムフェニコール（CP）およびトリメトプリム（TMP）の12薬剤に対する薬剤感受性試験を微量液体希釈法により実施し，Clinical and Laboratory Standards Institute（CLSI）のブレイクポイント[3]に基づいて最小発育阻止濃度（MIC）を決定した。CTX耐性株については，PCR法およびシークエンスにより耐性遺伝子を特定した。

3．結果と考察

3.1　バルク乳・集合乳の抗体検査

結果を**Table 1** に示す。バルク乳・集合乳では，2022年１月の血清型Dublinによるサルモネラ症発生から６ヶ月後の初回採材において１サンプルが陽性（PP＝95.96）であった。すなわち，摘発・

© The Ito Foundation

Table 1　*Salmonella* antibody status of bulk and grouped milk
*Samples with PP≤35% are negative for *Salmonella* antibody；samples with PP＞35% are positive for *Salmonella* antibody (**bold**).

Samples	Information on the herd from which the sample was derived	Percent positivity (PP)*						
		Sample collection (yy.mm)						
		2022.07	2022.10	2023.02	2023.05	2023.07	2023.10	2024.3
A-1 Bulk	Whole herd	–	32.8	3.65	10.32	7.08	28.01	**101.51**
A-1-F	Post-partum and post-treatment	–	15.09	12.59	8.73	7.86	**65.75**	**94.99**
A-1-B1	Late lactation (low producing)	7.95	**53.6**	1.04	17.19	0.61	29.91	**105.01**
A-1-B2	Late lactation (low producing)	0.62	27.38	13.46	1.86	15.6	31.66	**96.18**
A-1-A3	Early/mid lactation (high producing)	−0.93	15.88	−1.01	2.18	4.46	**35.83**	**97.58**
A-1-A4	Early/mid lactation (high producing)	0.9	15.16	0.44	16.94	6.56	29.71	**94.99**
A-2 Bulk	Whole herd	26.91	11.42	–	–	–	–	**94.99**
A-2-F	Post-partum and post-treatment	**95.96**	9.73	**39.71**	**45.49**	21.09	**62.43**	**103.26**
A-2-R1	First lactation	20.54	11.26	16.25	6.53	9.16	21.14	**106.47**
A-2-R2	First lactation	20.67	17.01	7.28	10.74	3.89	25.79	**94.99**
A-2-R3	First lactation	29.81	20.16	7.48	4.36	10.3	21.89	**94.99**
A-2-A1	Early/mid lactation (high producing)	14.09	11.75	**49.66**	**48.83**	**57.01**	–	
A-2-A2	Early/mid lactation (high producing)	12.86	5.84	12.23	18.1	16.25	**53.86**	**99.55**
A-2-A3	Early/mid lactation (high producing)	12.44	3.17	17.32	17.97	7.91	25.74	**101.34**
A-2-B	Late lactation (low producing)	–	–	–	–	–	**74.44**	**109.42**

清浄化後も抗サルモネラ抗体を保有する牛が存在することが推測される。その後も2023年７月まで計５回の採材で１－２サンプルが陽性（PP＝39.71–57.01）であった。ところが，2023年10月に５サンプルが陽性（35.83–74.44）となった。その後，2023年12月には全頭ワクチン接種を実施したところ，2024年１月には全14サンプルが陽性（94.99–109.42）を示した。なお，牛群の情報から，初産牛群では抗体レベルの高いサンプルが見られなかったが，分娩後の牛や治療後の牛を含む群や分娩後初期～中期の高泌乳牛を含む群でも一部抗体レベルの高いサンプルが見られた。

3.2　子牛の血清抗体検査

結果を**Table 2** に示す。2022年１月の発生３ヶ月前に生まれたグループ１では，発生６ヶ月後あるいは９ヶ月後に各１頭の抗体レベルが高く，発生時の感染が疑われる。発生月に生まれたグループ２では，同様に３および６ヶ月後も４～５頭の抗体レベルが高く，発生時の感染が疑われる。また，少なくとも６ヶ月はその抗体レベルが持続していることが分かった。ただし，いずれのグループもモニタリング中に新たに陽性となった個体がいた。発生３ヶ月後および６ヶ月後に生まれたグループ３および４はその後12ヶ月齢まで陰性のまま経過した。一方で，発生９，12および15ヶ月後に生まれたそれぞれグループ５，６および７については，３ヶ月齢時点では陽性個体がなかったが，発生21ヶ月後にあたる2023年10月採材時には，グループ５（12ヶ月齢）で２頭の抗体陽性牛が検出された。同採材時にはグループ８（発生18ヶ月後出生，３ヶ月齢）でも２頭の抗体陽性牛が検出された。

3.3　牛由来サルモネラ分離株とその他由来株における表現型の比較

結果を**Table 3** に示す。血清型Dublinは乳牛由来５株と肉牛由来４株であり，感受性株はなく，

© The Ito Foundation

Table 2　*Salmonella* antibody status of calf sera

*Samples with PP≤35％ are negative for *Salmonella* antibody；samples with PP＞35％ are positive for *Salmonella* antibody（**bold**）.

Group	Birth（yy.mm）and months before/after outbreak	Sample collection（yy.mm）and age at collection	ID	Percentage positivity（PP）*					
				Sample collection（yy.mm）					
				22.07	22.10	23.01	23.04	23.07	23.10
1	21.10：3 months before outbreak	22.07：9-month 22.10：12-month	7456	9.52	7.26				
			7461	−5.34	25.12				
			7465	−1.14	0.50				
			7470	−4.00	**66.86**				
			7474	**94.00**	−				
			7485	33.84	16.80				
2	22. 01：the month of outbreak	22.07：6-month 22.10：9-month 23.01：12-month	7535	**94.00**	**66.76**	**55.03**			
			7540	**88.37**	**54.21**	19.09			
			7565	**74.00**	**82.89**	7.26			
			7575	−5.87	3.36	−3.16			
			7585	−5.20	**78.54**	−4.31			
			7590	**88.13**	**79.82**	19.50			
3	22.04：3 months after outbreak	22.07：3-month 22.10：6-month 23,01：9-month 23.04：12-month	0085	−6.59	−2.58	−4.58	−5.94		
			0090	−6.64	−6.27	5.76	10.13		
			0095	−4.37	−5.84	−0.01	−2.49		
			0100	−5.75	3.82	−6.78	−4.20		
			0105	−7.02	−6.36	−6.37	−6.36		
			0110	11.86	−5.53	−5.17	−4.33		
4	22.07：6 months after outbreak	22.10：3-month 23.01：6-month 23.04：9-month 23.07：12-month	0205		−7.07	−6.56	−6.06	−0.35	
			0210		−7.16	−6.75	−6.04	20.05	
			0215		−6.71	−5.65	−3.99	−4.84	
			0220		−7.17	−3.38	−4.31	9.65	
			0225		−7.07	−6.70	−5.29	2.50	
			0230		−7.11	−2.55	−3.54	26.04	
5	22.10：9 months after outbreak	23.01：3-month 23.04：6-month 23.07：9-month 23.10：12-month	0390			−6.06	−5.49	−4.46	**62.23**
			0395			−6.59	−4.48	−2.65	−5.65
			0400			−6.92	−6.64	−3.17	**54.39**
			0405			−7.13	−6.09	−5.46	−6.76
			0410			−6.87	−4.05	−3.80	−2.51
			0415			−7.82	−7.24	−6.45	−4.43
6	23.01：12 months after outbreak	23.04：3-month 23.07：6-month 23.10：9-month	0550				−6.71	−4.66	−5.62
			0555				−6.81	−2.20	1.87
			0560				−7.26	−5.16	−2.38
			0565				−6.11	−3.75	−4.75
			0570				−6.47	−4.66	−1.49
			0575				−7.48	−6.41	−5.77
7	23.04：15 months after outbreak	23.07：3-month 23.10：6-month	0710					−6.26	−5.60
			0715					−7.60	−5.48
			0720					−7.43	−5.85
			0725					−7.58	−5.24
			0730					−7.23	−6.56
			0735					−6.71	−5.34
8	23.07：18 months after outbreak	23.10：3-month	0855						−7.85
			0860						1.67
			0865						**66.59**
			0870						**53.82**
			0875						3.85
			0880						−6.05

いずれもABPC，CEZ，CTX，SM，KM，TC，NAおよびCPに対する耐性率が高かった。Typhimurium（4；i；1，2）は全部で29株であった。乳牛由来25株は，５株が12薬剤すべてに感受性であったが，19株は４剤以上に耐性を示し，うち２株は10剤に耐性を示した。肉牛由来２株はいずれ

© The Ito Foundation

Table 3　Serovars and drug resistance profiles of *Salmonella* isolates from Hokkaido, Japan

Serovars	Sources	No. of isolates	Number of isolates resistant to each antibiotic (% in the lower row)											
			ABPC	CEZ	CTX	SM	GM	KM	TC	NA	CPFX	CL	CP	TMP
Dublin	Dairy	5	5	4	4	5	0	0	4	5	0	0	4	0
			100	80	80	100	0	0	80	100	0	0	80	0
	Beef	4	4	4	4	4	0	0	4	4	0	0	3	0
			100	100	100	100	0	0	100	100	0	0	75	0
ST (4;i;1,2)	Dairy	25	19	15	15	20	3	3	19	6	1	0	19	5
			76	60	60	80	12	12	76	24	4	0	76	20
	Beef	2	2	2	1	2	0	0	2	0	0	0	2	1
			100	100	50	100	0	0	100	0	0	0	100	50
	Pig	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ST (4;i;-)	Dairy	64	57	16	0	60	0	7	48	0	0	0	39	40
			89.1	25	0	93.8	0	10.9	75	0	0	0	60.9	62.5
	Beef	16	15	3	0	16	0	4	15	1	1	0	14	14
			93.8	18.8	0	100	0	25	93.8	6.25	6.25	0	87.5	87.5
	Pig	2	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0
			50	0	0	50	0	50	50	0	0	0	0	0
	Horse	10	7	0	0	9	0	4	8	0	0	0	0	2
			70	0	0	90	0	40	80	0	0	0	0	20
ST (4;-;1,2)	Dairy	2	2	0	0	2	0	0	2	2	0	0	2	0
			100	0	0	100	0	0	100	100	0	0	100	0
Abortusequi	Horse	6	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0
			0	0	0	83.3	0	0	0	0	0	0	0	0

も６剤耐性で，ABPC，CEZ，SM，TCおよびCPの５剤に共通して耐性を示した。豚由来２株はいずれも12薬剤すべてに感受性であった。Typhimurium単相変異株（4;i;-）は全部で92株であった。乳牛由来64株は，３株が12薬剤すべてに感受性であったが，42株は４剤以上に耐性を示し，うち２株は７剤に耐性を示した。肉牛由来16株はいずれも薬剤耐性を示し，14株が４剤以上に耐性で，ABPC，SM，CPおよびTMPの４剤に耐性を示すものが多かった。豚由来２株では１株が12薬剤すべてに感受性であったが，もう１株は４剤耐性（ABPC，SM，KMおよびTC）であった。馬由来10株では感受性株はなく，３株が４剤以上に耐性，うち１株が５剤耐性であった。

血清型未分類（4;-;1,2）は乳牛由来の２株のみであり，いずれもABPC，SM，TC，NAおよびCPに対する５剤耐性を示した。

血清型Abortusequiは馬由来の６株のみであり，うち１株は12薬剤すべてに感受性で，残り５株はいずれもSMに対してのみ耐性を示すのみであった。

24株（Typhimurium16株およびDublin 8 株）はCTXに耐性を示し，耐性遺伝子の解析を行ったところ，全株において基質特異性拡張型βラクタマーゼ（ESBL）遺伝子ではなく，セファロスポリナーゼ（AmpC）の１種であるCMY-２遺伝子を保有していた。

© The Ito Foundation

3.4　考察

本研究により，バルク乳と集合乳を対象とした抗体検査が牛群のサルモネラ感染状況のモニタリングにおいて有用であることが明らかになった。バルク乳は通常の搾乳業務の中で得ることができるため，非常に省力的である。本ELISAキットの場合，乳サンプルを４週間冷凍しても，未冷凍の乳サンプルとほぼ同等の結果が得られている[2)]ことから，一定数のサンプルが入手できてから検査を実施することもできる。また，菌分離のように病原体を直接扱うよりも安全である。これらのことから，バルク乳での抗体検査の実用性や実施可能性はきわめて高く，将来的にこれをルーチンに実施できるシステムを構築することは，理想的かつきわめて現実的であると考えられる。

バルク乳と集合乳の抗体検査では，発生から６ヶ月後の初回採材において１サンプルが陽性であったことから，清浄化６ヶ月後でも抗サルモネラ抗体を保有する牛が存在することが推測された。また，全頭ワクチン接種はバルク乳および集合乳中の抗体濃度の顕著な上昇（PP＞90）をもたらした。他のサンプルのように，実際の感染が拡大する前後の感染頭数が少ない状況では陽性牛由来の抗体濃度が希釈されるため，陽性でもPP値は90よりも低くなると考えられ，感染牛とワクチン接種牛を区別できる可能性がある。初産牛群で抗体レベルが低いのは，当該農場でのサルモネラ暴露機会が少ないことが要因の一つと考えられる。清浄化後もサルモネラが農場内に少しでも残っていれば，長く飼養されている牛群は感染機会が多くなると推測される。

子牛の抗体検査は，発生後の抗体の推移をよく反映していた。感染によって上昇した抗体レベルは少なくとも６ヶ月は維持されると推測される。グループ１および２ではモニタリング中に新たに陽性となった個体がいることから，清浄化後も農場から菌が十分に排除できていない可能性が示唆される。また，グループ５および８では2023年10月に陽性牛が現れたことから，2023年７月から10月の間にこの農場内でサルモネラが再び広がりつつあったことが推測される。

道内分離株138株のうち，Dublinは他の３種類の血清型よりも分離株数は少ないものの，４管区から分離されており，７薬剤に対して強い耐性を示している。したがって，これらの薬剤にすでに耐性を有していた菌株が道内各地に蔓延している可能性を示唆している。

Typhimurium（4;i;1,2）については，乳牛・肉牛由来株ではABPC，CEZ，CTX，SM，TCおよびCPのいずれか４剤以上に耐性を示す多剤耐性株が多かったが，豚由来株ではすべての薬剤に感受性を示し，大きく異なっていた。Typhimurium単相変異株（4;i;-）では，由来動物によらずABPC，SMおよびTCに対する耐性率が高く，乳牛と肉牛ではこれに加えてCPおよびTMPに対する耐性を示す傾向が認められた。また，分離された管区によって比較的共通した薬剤耐性プロファイルが得られているようにも見える（日高由来株ではCP耐性株が少ない，上川由来株では多剤耐性株が少ないなど）。これらのことから，分離株の薬剤耐性プロファイルの違いには，牛と豚あるいは馬で使用される薬剤の種類や使用頻度の違いが反映されているものと推測される。血清型未分類（4;-;1,2）についても，上記Typhimuriumおよび単相変異株とほぼ同様の多剤耐性を示すことから，一般的なTyphimuriumの多剤耐性株からの派生株である可能性が考えられる。

Abortusequiはいずれも薬剤耐性プロファイルがほとんど同じであり，同一管内由来であることから，遺伝学的にも同じ系統の株である可能性が高い。

したがって，いずれの血清型についても今後の

© The Ito Foundation

遺伝系統学的解析が待たれる。

4．要　約

牛のサルモネラ症は世界各国で発生している。わが国では，一旦サルモネラによる下痢症や死流産が起こると，最終的に当該農場は大きな経済的損失を被り，廃業を迫られることも少なくない。酪農の盛んな北海道では，現在まで牛のサルモネラ症の発生報告が多く，その効果的な低減対策が国家規模で強く求められている。そこで本研究では，牛群のサルモネラ感染状況を把握し，さらに牛だけでなく他の家畜や環境に由来する分離株の間での疫学的関連性を見出すことを目的として，血清型Dublinによるサルモネラ症発生歴のある農場におけるバルク乳および血清を対象とした抗体検査を行うとともに，道内から2018～2022年度の５年間に採材された家畜保健衛生所で保管されている牛，馬および豚から分離されたサルモネラ株について薬剤耐性プロファイルを調べた。バルク乳と集合乳を対象とした抗体検査では，牛群のサルモネラ感染状況のモニタリングにおいて有用かつ実用可能であることが明らかになった。また，その指標となるPP値の高低により感染牛とワクチン接種牛を区別できる可能性が示唆された。子牛の抗体検査は，発生後の抗体の推移をよく反映しており，感染後の抗体の持続期間の推測や新たな発生の早期検出の可能性をもたらした。また，道内の過去分離株のDublinはほぼ同じ薬剤耐性プロファイルを示したことから，道内全域に同じ系統が蔓延している可能性が示唆される。

文　献

1） Nielsen, T. D., Nielsen, L. R., Toft, N., Houe, H.：Association between bulk-tank milk *Salmonella* antibody level and high calf mortality in Danish dairy herds, *J Dairy Sci*, 2010 Jan；93(1), 304～310, doi：10.3168/jds.2009-2528. PMID：20059928.

2） Um, M. M., Castonguay, M. H., Mahamad Amine, K., Giguère, J., Morin, I., Dufour, S.：Repeatability of a commercially available ELISA test for determining the herd-level *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Dublin status in dairy herds using bulk milk, *Front Vet Sci*, 2020 Jul 10；7：401. doi：10.3389/fvets.2020.00401. PMID：32754623.

3） Clinical and Laboratory Standards Institute. 2013. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals；approved standard, 4th ed. CLSI document VET01-A4. 2013. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne.

© The Ito Foundation

畜産農場周辺に生息するアカネズミ属齧歯類の強病原性家畜伝染病媒介能力

Ability to transmit highly pathogenic livestock diseases of *Apodemus* spp. inhabiting around livestock farms

高　島　康　弘
（岐阜大学応用生物科学部）

Yasuhiro Takashima
（Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University）

In this study, we examined the possibility of transmission of a highly virulent strain of *Toxoplasma gondii* by wild *Apodemus speciosus* living in the vicinity of livestock farms. It is known that the susceptibility to infection in *Mus musculus* (house mouse) differs depending on the nucleotide sequence of irgb2, a gene related to early immunity. Therefore, we searched the publicly available genome information of *A. speciosus* for regions with high homology to the mouse irgb2 gene, and found four genes. In addition, we captured a total of 20 wild *A. speciosus* at three locations in Gifu Prefecture and determined their gene sequences. In wild individuals, there were individual differences in the amino acid sequences encoded by these genes, and it was inferred that the alleles carried by 6 of the 20 individuals encoded proteins with functions similar to those of the IRGB2 protein of the "highly virulent strain resistant house mouse". These individuals could be carriers of the highly virulent strain, and thus be a potential source of infection for livestock. Ten breeding stock individuals were also examined in the same manner, but none of them had such alleles. These individuals were found to be killed by experimental infection with a highly virulent strain of *T. gondii*. These results suggest that the sequence of the irgb2-like gene determines the susceptibility of *A. speciosus* to infection.

1．目　　的

2019年の豚熱アウトブレーク時に農水省調査チームが指摘したように，畜産農場周辺に生息する野生齧歯類が家畜伝染病を媒介するリスクは無視できない問題である。ところが，実験動物であるマウス・ラットと同種生物にあたるハツカネズミ・ドブネズミ（およびドブネズミに近縁のクマネズミ）以外の種の野生齧歯類については，どのような家畜伝染病をどの程度の効率で媒介するのか知見がほとんどない。例えば監視伝染病であるトキソプラズマの強毒株は，あらゆる系統の実験用マウスを短期間に殺してしまうことが知られている。野生ハツカネズミの多くの個体も同様の性質を持っているのであれば，農場周辺の野生ハツカネズミが生きたまま強毒株を体内に温存して伝播しているとは考えにくい。しかし，著者は国内某県においてブタに非常に高い致死性を示す強毒株トキソプラズマの存在を報告しており[1)]，我が国の畜産農家周辺環境に強毒株トキキソプラズマ

© The Ito Foundation

が定着していることは疑う余地がない。すなわち，我が国の畜産農場周辺には強毒株トキソプラズマに無症状で持続感染する小型齧歯類が存在し，リザーバーとして虫体を環境中に温存して家畜への直接的・間接的感染源となっている可能性が考えられる。トキソプラズマ症は人獣共通感染症で食肉家畜を介した人への感染も懸念されるため，主要な感染源を突き止めることは家畜衛生のみならず食の安全の観点からも重要である。そこで本研究では，日本の農場周辺で最も個体密度の高い齧歯類であるアカネズミ属に着目し，強毒株トキソプラズマを媒介する能力とそのメカニズムを初期免疫関連遺伝子の多様性の側面から推測する。これにより実験用マウスを用いた感染実験では単純に解決できない家畜衛生上の問題に資する知見を得る。

2．方　法

2.1　BLAST解析によるアカネズミとヨーロッパモリネズミのIrgb 2 様遺伝子およびIrgb 1 様遺伝子の検索

GenBankに登録されている日本産アカネズミ（*A. speciosus*）のゲノムデータ（GCA_002335545.1）をリファレンス，C57BL/6J系統のハツカネズミ（*M. musculus*）のIrgb 2 遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列（GenBank：NM_001045540.2）をクエリとして，プログラムTBLASTN（https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM = tblastn&PAGE_TYPE = BlastSearch&BLAST_SPEC = GDH_GCA_002335545.1 & LINK_LOC = blasttab&LAST_PAGE = blastn）を用いて類似配列を検索した。アルゴリズムパラメーターは以下のとおりに設定した。Max target sequences：100，Expect threshold：0.05，Word size：5，Max matches in a query range：0，Matrix：BLOSUM62，Gap Costs：Existence：11Extension：1，Compositional adjustments：Conditional compositional score matrix adjustments，Filter Masc：Low complexity regions。ヒットした配列のうちアライメントスコアが200以上のものを候補とし，この中から類似配列の５’末端側に開始コドンが存在し，３’末端側にスプライシングドナーサイトを有する配列を絞り込んだ。スプライシングドナーサイトの検索にはBDGP：Splice Site Prediction by Neural Network（https://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html）を用い，cut off valueは0.6に設定した。

2.2　野生アカネズミおよび飼育アカネズミ

米とバターを混ぜた餌を入れたシャーマントラップを用いて，岐阜県下の３カ所で計20匹の野生アカネズミを捕獲した。飼育下のアカネズミは宮崎大学フロンティア科学総合研究センター実験支援部門生物資源分野にて飼育されている個体を分与いただいた。捕獲については岐阜県より鳥獣の保護および管理ならびに狩猟の適正化に関する法律に基づく鳥獣所各許可を得て実施し，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行った（承認番号2021-097）。

2.3　DNA抽出およびPCR

アカネズミおよびヨーロッパモリネズミの脳，心臓または尾からE.Z.N.A.Tissue DNA kit, Omega Biotekを用いてゲノムDNAを抽出した。抽出方法はキット説明書が示す手順に従った。得られたDNAは使用まで－30℃の冷凍庫内に保存した。得られたDNAを鋳型とし，後述のアカネズミの４遺伝子（Irgbsp1，Irgbsp3，Irgbsp4，Irgbsp5）について，その推定タンパク質コード領域をPCRにより増幅し塩基配列を決定した。

2.4　感染実験

Type Ⅰ強毒株トキソプラズマであるRH株のタ

© The Ito Foundation

キゾイトをアカネズミ10匹に対して，１匹あたり100虫体ずつ腹腔接種した。

３．結果と考察

3.1　アカネズミのIrgb２様遺伝子

ハツカネズミにおいて強毒株トキソプラズマへの感受性を規定するとされるIrgb２遺伝子[2]の塩基配列をクエリとした検索により，公開されているアカネズミとヨーロッパモリネズミのゲノムデータから相同遺伝子を検索した。その結果，アカネズミのゲノムデータから，Irgb２様遺伝子候補が４カ所見つかり，それぞれIrgbsp1，Irgbsp3，Irgbsp4，Irgbsp５と命名した。ヨーロッパモリネズミについては，同様の手法によりIrgb２様遺伝子候補が15カ所見つかり，Irgsy１～Irgsy15と命名した。ヨーロッパモリネズミから見出された15のIrgb２様遺伝子候補のうちIrgbsy13とIrgbsy14については，ハツカネズミIrgb２と塩基配列に相同性がある領域内に終止コドンが確認された。

3.2　野生アカネズミのIrgb２様遺伝子がコードするアミノ酸配列の多様性

アカネズミが有するIRGB２様タンパク質のアミノ酸配列の個体差を調べるために，野生のアカネズミを捕獲して，個体ごとにIrgb２様遺伝子の塩基配列を決定しコードするアミノ酸配列を推定した。このため，岐阜県下３カ所で計20匹のアカネズミを捕獲した。一部の個体で配列が確定できていない遺伝子座があるが，これまでにIrgbsp１では12種類，Irgbsp３で10種類，Irgbsp４で８種類，Irgbsp５で９種類のアミノ酸配列が見つかった。アカネズミにおけるIRGB２様タンパクのアミノ酸配列は個体差が大きく多様性があることが明らかになった。

3.3　アカネズミIRGB２様タンパク質とTypeⅠ*T. gondii* ROP5Bの結合親和性

野生アカネズミから見つかった多様なアミノ酸配列のIRGB２様タンパク質について，強毒型トキソプラズマ株（RH株）のROP5Bタンパクとの結合親和性をコンピューターシミュレーション[3]により予測した。ハツカネズミにおいては，結合性が高いIRGB２タンパクを持つ一部の野生個体が強毒株に感染しても無症状であることが知られる。シミュレーションの結果，IRGBSP１については抵抗性ハツカネズミIRGB２以上の結合親和性が予測された配列が１種類見つかった。なお，このアミノ酸配列をコードするIrgbsp１遺伝子アレルを持つ個体はすべての捕獲地点で見つかっており，合計20匹の捕獲個体のうち６個体がこのアレルを有していた。

3.4　飼育アカネズミへの感染実験と感染個体のもつIrgb２様遺伝子アレル

飼育下のアカネズミ10匹を用いてRH株トキソプラズマの感染実験を行った。100虫体のタキゾイトを腹腔接種したアカネズミは投与から10日後または11日後にすべての個体が死亡した。それぞれの個体は死亡する２日前から動きが鈍くなり，震えが確認されるようになった。死亡個体からゲノムDNAを採取し，上述と同様の方法でIRGB２様タンパク質をコードする遺伝子の塩基配列を決定した。塩基配列から推定されるアミノ酸配列を元に，強毒型トキソプラズマ株（RH株）のROP5Bタンパクとの結合親和性を予測したが，いずれの個体が持つ遺伝子についても低親和性のタンパクをコードすることが予測された（**Table 1**）。

ハツカネズミにおいてはirgb２遺伝子のコードするタンパク質のアミノ酸配列により強毒株トキソプラズマに対する感受性が決定されることが知られている。本研究によりアカネズミにも相同性

© The Ito Foundation

Table 1　Expected Kd(M) value of IRGBSP1, 3, 4 and 5

Protein	Allele	Kd(M)
IRGBSP1	a	1.64E-08
	b	1.65E-08
	c	7.23E-09
	d	4.04E-09
IRGBSP3	a	1.84E-08
	b	4.37E-08
IRGBSP4	a	7.05E-09
	b	3.04E-08
IRGBSP5	a	1.87E-08
	b	1.91E-08
	c	7.85E-08
IRGB2 of resistant mouse strain	-	3.24E-09
IRGB2 of C57BL/6 mouse	-	2.37E-08

の高い遺伝子が複数存在しており，また，それらの遺伝子がコードするアミノ酸配列は野生化の個体において個体差が大きいことが明らかになった。また，解析した20匹の捕獲個体のうち６個体が強毒株トキソプラズマのROP5Bタンパク質と高い結合性を有すると予測されるタンパク質をコードするアレルを有していた。これらの個体は強毒株トキソプラズマに無症状のまま感染し，家畜への感染源となる可能性がある。一方，飼育下の個体はいずれもROP5Bタンパク質と高い結合性を有するIRGB２様タンパク質は有していないものと考えられた。実際の感染実験においても全個体が死亡しており，塩基配列から推測する個体の感受性と感染実験の結果は一致した。

４．要　　約

本研究では，畜産農場周辺に生息する野生アカネズミが強毒株トキソプラズマを伝播する可能性について検証した。ハツカネズミでは初期免疫関連遺伝子irgb２の塩基配列の違いにより感染感受性が異なることが知られている。そこで，ハツカネズミirgb２遺伝子と相同性の高い領域を公開されているアカネズミのゲノム情報から検索し，４遺伝子を見出した。また，岐阜県下３カ所で計20匹の野生アカネズミを捕獲し，これらの遺伝子配列を決定した。野生個体ではこれらの遺伝子がコードするアミノ酸配列に個体差が見られ，20個体中６個体が持つアレルは「強毒株耐性ハツカネズミ」のIRGB２タンパク質と類似の機能があるタンパク質をコードしているものと推測された。このような個体は強毒株のキャリアとなり家畜への感染源となる可能性がある。一方，飼育個体10匹も同様に調べたが，いずれの個体もそのようなアレルは持たなかった。また，これらの個体は強毒株トキソプラズマの感染実験により死亡することが確認された。以上の結果は，irgb２様遺伝子の配列によりアカネズミの感染感受性が決定されることを示唆している。

文　　献

1）　Taniguchi, Y.. Yanagihara, I., Nakura, Y., Ichikawa, C., Saito, T., Appiah-Kwarteng, C., Matsuzaki, M., Fukumoto, J., Nagamune, K., Kyan, H., Takasu, M., Kitoh, K., Takashima, Y.：A *Toxoplasma gondii* strain isolated in Okinawa, Japan shows high virulence in Microminipigs, *Parasitol. Int.*, 72, 101935, 2019.

2）　Murillo-León, M., Müller, U. B., Zimmermann, I., Singh, S., Widdershooven, P., Campos, C., Alvarez, C., Könen-Waisman, S., Lukes, N., Ruzsics, Z., Howard, J. C., Schwemmle, M., Steinfeldt, T.：Molecular mechanism for the control of virulent Toxoplasma gondii infections in wild-derived mice, *Nat Commun*. 2019 Mar, 15；10(1), 1233.

3）　Siva Shanmugam, N. R., Jino Blessy, J., Veluraja, K., Michael Gromiha, M.：Prediction of protein-carbohydrate complex binding affinity using structural features, *Brief Bioinform*, 22, bbaa319, 2021.

© The Ito Foundation

効率良いウイルス分離システムの開発

Development of an efficient system for virus isolation

齊　藤　　暁
（宮崎大学農学部）

Akatsuki Saito
（Faculty of Agriculture, University of Miyazaki）

Pigs play a crucial role in meat production, yet they can harbor various zoonotic diseases such as Japanese encephalitis virus, Nipah virus, and Influenza viruses. Certain viruses belonging to *Orthomyxoviridae* and *Coronavirinae* families need their envelope proteins cleaved to become infectious, thus requiring a host protease like TMPRSS2 or exogenous trypsin for facilitating viral envelope cleavage and efficient propagation. Therefore, stable expression of human TMPRSS2 in African green monkeys-derived Vero cells can boost porcine epidemic diarrhea virus replication. However, due to viruses' narrow host range, a pig cell line expressing pig TMPRSS2 might be ideal for propagating pig-derived viruses. In this study, we developed and assessed a pig-derived PK-15 cell line with stable expression of pig TMPRSS2, significantly enhancing (>1000-fold) the replication of Influenza viruses. Additionally, we showed that a PK-15 cell line lacking the *Stat2* gene with stable expression of pig TMPRSS2 is efficient in isolating viruses in the presence of type I interferons. Hence, PK-15 cells expressing pig TMPRSS2 hold promise for virus isolation, vaccine production, and virological studies of TMPRSS2-dependent viruses.

1．目　　的

本研究では，家畜の臨床検体からの効率良いウイルス分離システムの開発を目的とした。豚熱ウイルス，アフリカ豚熱ウイルスなどによる多くのウイルス感染症は持続可能な酪農，畜産における脅威となっており，その制御，対策の必要性は論をまたない。一方で，臨床検体からのウイルスの分離効率が問題となるケースがあり，その解決が強く求められている。私たちは，低いウイルス分離効率の原因として，１）宿主特異性の観点から，使用する細胞が対象ウイルスの分離に適していないこと，２）検体に含まれるインターフェロン誘導物質がウイルス分離を妨げること，３）ウイルスのエンベロープ開裂のために特殊な環境で培養する必要があること，を考えた。１）については，広くアフリカミドリザル由来のVero細胞が使われているが，その理由の一つとしてインターフェロン産生能を欠損している点がある。ヒトなど，アフリカミドリザルに種が近い動物由来のウイルスであれば問題が少ないが，家畜由来ウイルスの分離に適しているのかについては懸念がある。２）については，臨床検体に含まれる細菌由来内毒素（LPS）や２本鎖RNA（dsRNA）が

© The Ito Foundation

Toll-like receptorなどのセンサーに認識され，インターフェロン産生と，それに伴うインターフェロン誘導性遺伝子の発現誘導につながり，ウイルス分離効率を低下させる可能性が想定される。3）については，インフルエンザウイルスなど特に呼吸器由来ウイルスではウイルス分離の際，エンベロープの効率良い開裂のために培養液中にトリプシンを添加する必要がある[1]。この作業は，培養条件の至適化に時間を要する原因となり，ウイルス分離作業の遅延につながる。

そこで本研究では，これらの課題を解決するために，ブタ由来の細胞にセリンプロテアーゼの一種であるTMPRSS2を持続発現させることで，トリプシンを添加しない状況でも効率良く呼吸器由来ウイルスを分離できるシステム構築に取り組んだ。また，同アイデアをインターフェロン受容体欠損細胞に応用した。本システムの開発により，家畜由来ウイルスの分離効率の向上が期待され，家畜ウイルス感染症に関連するウイルス学的，免疫学的解析の発展と，感染症の制御，持続可能な酪農，畜産に大きく貢献していく。

2．方　法

2.1　プラスミド

psPAX2-IN/HiBiT plasmidとpWPI-Luc2 plasmidは徳永研三博士（国立感染症研究所）から分与を受けた[2]。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），PK-15（Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank（JCRB），カタログ番号JCRB9040），およびPK-15（*Stat2* k/o）細胞[3]は10%ウシ胎児血清（FBS）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（(DMEM)，ナカライテスク，カタログ番号08458-16）で培養した。

2.3　ウイルス

A型インフルエンザウイルス（Influenza A virus：IAV）（H1N1）A/PR/8/34株（American Type Culture Collection，Manassas，VA，USA，カタログ番号VR-95）を用いた。すべての実験はバイオセーフティレベル2の施設で行った。

2.4　TMPRSS2を発現するレトロウイルスベクターの作製

ブタTMPRSS2を発現するレトロウイルスベクターを作製するため，ブタTMPRSS2（GenBank，Accessionナンバー NP_001373060）のアミノ酸配列について，ブタ細胞にコドン最適化する形で人工合成した（Integrated DNA Technologies，Inc.，Coralville，IA，USA）。人工合成したDNAは，In-Fusion HD Cloning Kit（TaKaRa，草津，日本，カタログ番号Z9633N）を用いて，NotI-HF（New England Biolabs [NEB]，Ipswich，MA，USA，カタログ番号R3189L）およびBamHI-HF（NEB，カタログ番号R3136L）であらかじめ直線化したpDON-5 Neoベクター（TaKaRa，カタログ番号3657）にクローニングした[4]。プラスミドはNEB 5-alpha F'Iq competent *Escherichia coli*（NEB，カタログ番号C2992H）で増幅し，PureYield Plasmid Miniprep System（Promega，Madison，WI，USA，カタログ番号A1222）で抽出した。各プラスミドの配列はSpectrum Compact CE System（Promega社製）とSupreDye v3.1 Cycle Sequencing Kit（M&Sテクノシステムズ社製，大阪，日本，カタログ番号063001）を用いて確認した。

© The Ito Foundation

2.5　TMPRSS2を持続発現するPK-15細胞の作製

Lenti-X 293T細胞において，pDON-5 Neo-pigTMPRSS2，pGPパッケージングプラスミド（TaKaRa，カタログ番号 6160），pMD2.Gプラスミドを TransIT-293トランスフェクション試薬（TaKaRa，カタログ番号 V2700）とOpti-MEM（Thermo Fisher Scientific，カタログ番号 31985062）を用いることでコトランスフェクションした。トランスフェクションの２日後に上清を濾過し回収した。回収したレトロウイルスベクターを通常のPK-15細胞または*Stat2*欠損PK-15細胞（PK-15（*Stat2* k/o）細胞）に感染させ，感染２日後に500 μg/mlのG-418存在下で６日間培養した。その後，Cell Sorter SH800S（SONY）を用いてシングルセルクローニングを行い，各クローンにおけるTMPRSS2の発現をウェスタンブロッティングにより評価した。

2.6　ウイルス感染

通常のPK-15細胞およびPK-15/TMPRSS2 #23細胞を96ウェルプレートに１ウェルあたり１×10^4個の細胞数で播種した。必要に応じて100ng/mlのブタIFN β（Kingfisher Biotech，カタログ番号 RP0011S-025）を24時間細胞に処理した。翌日培養上清を除去し，１ウェルあたり100 μlのウイルス液に１ μg/mlのTPCK処理トリプシン（Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, Cat# 4352157）を添加または非添加した条件で感染させた。37℃で２時間培養後，培養上清を除去し，細胞をDMEM＋２％ FBS＋Pe/Stで１回洗浄した。その後，150 μlの新しいDMEM＋２％ FBS＋Pe/Stを加えた。必要に応じて50，12.5，3.13，0.78，0.2，0.05，または0.01 μMのNafamostat mesylate（Selleckchem，カタログ番号 S1386）をウイルス感染前の２時間処理した。その後，上述の方法でウイルスを感染させた。

2.7　培養上清中のvRNAレベルの定量

通常のPK-15またはPK-15/TMPRSS2 #23細胞に対し，96ウェルプレートでIAV（H1N1）を感染させた（n＝6）。２日後，One Step TB Green PrimeScript PLUS RT-PCR Kit （Perfect Real Time）を用いて，私たちが以前報告しているRT-qPCR法により，培養上清中のウイルスRNA量を測定した[3]。具体的には，培養上清を２×RNA lysisバッファー（２％ Triton X-100，50 mM KCl，100 mM Tris-HCl［pH7.4］，40％グリセロール，0.4U／μl Recombinant RNase Inhibitor［TaKaRa，カタログ番号 2313A］）と混合した。プライマーとしてフォワードプライマー（5’-GGCCCAACCACAACAAAC-3’）およびリバースプライマー（5’-AGCCCTCCTTCTCCGTCAGC-3’）を用いた。PCRプロトコールは，42℃，５分，95℃，10秒，95℃，５秒，60℃，34秒を40サイクルで行った。vRNAレベルは，コントロールとして用いた通常のPK-15細胞のvRNAレベルに対して正規化した（ΔΔCt法）。

2.8　ウェスタンブロッティング

TMPRSS2の発現を評価するために，細胞ペレットを２％ β-メルカプトエタノール（Bio-Rad，Hercules，CA，USA，カタログ番号 1610710）を添加した２×Bolt LDS sample buffer（Thermo Fisher Scientific，カタログ番号 B0008）で溶解し，70℃で10分間加熱した。TMPRSS2の発現は，抗Mycタグマウスモノクローナル抗体 （Cell Signaling Biotechnology, Danvers，MA，USA，カタログ番号 2276S，×125）と抗マウス検出モジュール（ProteinSimple, カタログ番号 DM-001）を用い，SimpleWestern Abby （ProteinSimple，San Jose，CA，USA）で評価した。総タンパク質量は，Total Protein Detection Module

© The Ito Foundation

（ProteinSimple，カタログ番号DM-TP01）を用いて可視化した。

2.9　統計解析

２つの異なる条件間（例えば，通常のPK-15細胞とPK-15/TMPRSS2 #23細胞間）の感染性の差は，two-tailed, unpaired Student's *t*-testで評価した。２つの異なる条件間（例えば，PK-15（*Stat2* k/o）/TMPRSS2 #15細胞，PK-15（*Stat2* k/o）細胞，PK-15/TMPRSS2 #23細胞，および通常のPK-15細胞間）の感染性の差は，一元配置分散分析（one-way ANOVA）後，Tukey検定により評価した。検定はPrism 9 software v9.1.1（GraphPad）を用いて行った。

3．結果と考察

ブタTMPRSS2を持続発現するブタ由来の細胞株の作製に向け，Mycタグ付加ブタTMPRSS2を発現するレトロウイルスベクターをPK-15細胞に感染させ，選択薬剤ネオマイシンで培養することで持続発現細胞の獲得を試みた。その後，セルソーティングによりシングルセルクローンを調整し，ウェスタンブロッティングで各細胞クローンにおけるブタTMPRSS2の発現レベルを評価した。その結果，PK-15/TMPRSS2 #23クローンが他のクローンよりも有意に発現量が高かったため，同クローンを今後の実験に使用した（**Fig. 1A**）。さらに，Ⅰ型インターフェロン（IFN）やIFN誘導性物質存在下における効率良いウイルス分離を目的として，*Stat2*遺伝子欠損PK-15細胞（PK-15（*Stat2* k/o）細胞）[3]においても上記方法でブタTMPRSS2を発現させ，PK-15（*Stat2* k/o）/TMPRSS2 #15細胞を得た（**Fig. 1B**）。

次に，PK-15細胞におけるブタTMPRSS2の発現の効果を検証するため，通常のPK-15細胞およびPK-15/TMPRSS2 #23細胞にA型インフルエンザウイルス（IAV）（H1N1）A/PR/8/34株をTPCK処理トリプシン存在下もしくは非存在下で感染させた。過去の報告のとおり，通常のPK-15細胞においてはIAV（H1N1）の増殖はTPCK処理トリプシンによって亢進した。重要なことに，PK-15/TMPRSS2 #23細胞では，通常のPK-15細胞と比較して約1,000倍以上高いウイルス増殖レベルが認められた。さらに，PK-15/TMPRSS2 #23細胞においてはTPCK処理トリプシンの添加はウイルス増殖に影響しなかったことから，PK-15/TMPRSS2 #23細胞を用いることでTPCK処理トリプシンを添加せずにIAV（H1N1）を高レベルに増殖させられることを明らかにした（**Fig. 2**）。

次に，PK-15（*Stat2* k/o）/TMPRSS2 #15細胞の有用性の検討に取り組んだ。通常のPK-15細胞とPK-15（*Stat2* k/o）細胞においてはIAV（H1N1）の増殖は同程度であった。また，PK-15/TMPRSS2 #23細胞およびPK-15（*Stat2* k/o）/TMPRSS2 #15細胞では，IAV（H1N1）の増殖が顕著に向上した。通常のPK-15およびPK-15/TMPRSS2 #23細胞を1 ng/mlのブタIFN β で処理すると，IAV（H1N1）の増殖は顕著に低下した。一方で，PK-15（*Stat2* k/o）細胞およびPK-15（*Stat2* k/o）/TMPRSS2 #15細胞ではブタIFN β 処理の影響は認められなかった（**Fig. 3**）。これらの結果は，臨床検体中にIFNまたはIFN誘導物質が存在する可能性がある場合，PK-15（*Stat2* k/o）/TMPRSS2 #15細胞はきわめて有用なツールとなることを示している。

さらに，PK-15/TMPRSS2 #23細胞が抗ウイルス薬の評価に使用できるかを検討した。過去の研究から，Nafamostat MesylateがTMPRSS2の機能を阻害することが示されており，実際にSARS-CoV-2感染者の治療に用いられている。そこで，PK-15/TMPRSS2 #23細胞において，Nafamostat Mesylate処理がIAV（H1N1）の増殖

© The Ito Foundation

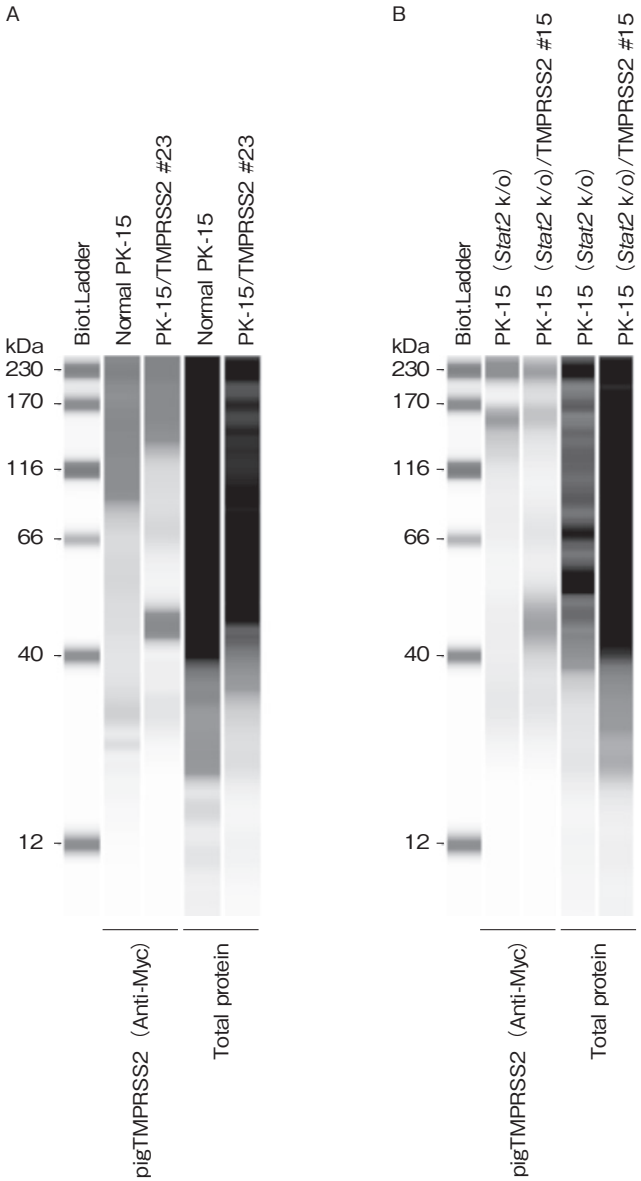


Fig. 1　Expression of Myc-tagged pigTMPRSS2 in PK-15 cells and PK-15 (*Stat2* k/o) cells

にどう影響するかを検証した。通常のPK-15細胞およびPK-15/TMPRSS2 #23細胞を用い，異なる濃度のNafamostat Mesylate存在下で行ったところ，Nafamostat Mesylateが用量依存的にウイルス増殖を阻害することを明らかにした（**Fig. 4**）。PK-15/TMPRSS2 #23 細胞における Nafamostat Mesylate のEC50値は0.83651 μMであった。対照的に，通常のPK-15細胞では，Nafamostat Mesylateの効果は見られなかった。

したがって，PK-15/TMPRSS2 #23細胞におけるIAV（H1N1）の増殖亢進はTMPRSS2依存的であり，PK-15/TMPRSS2 #23細胞はブタTMPRSS2に対する阻害剤を評価するための貴重なツールであると結論づけた。

© The Ito Foundation

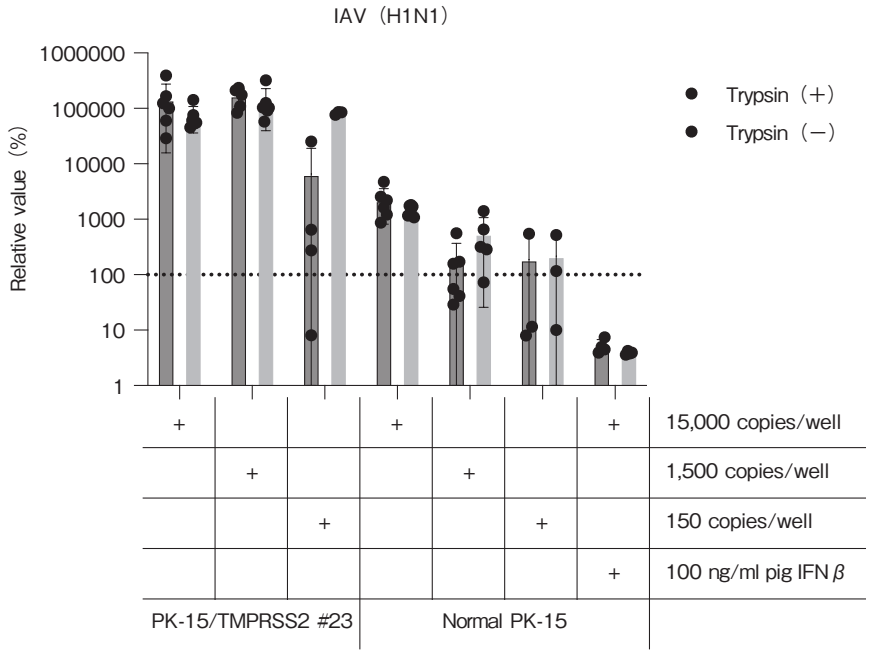


Fig. 2 Stable expression of pigTMPRSS2 enhanced IAV（H1N1）replication in PK-15 cells

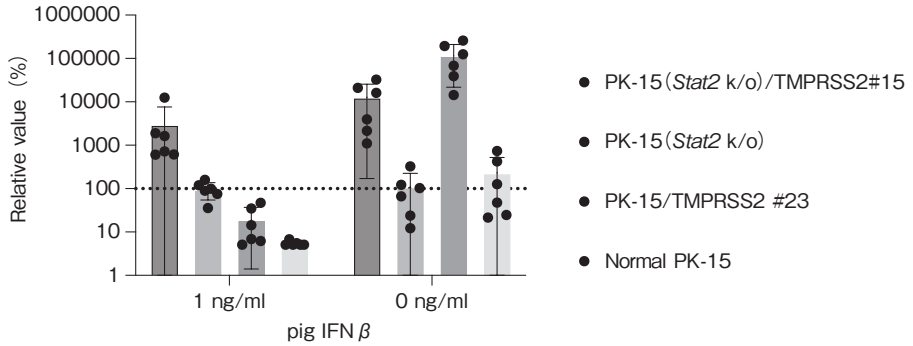


Fig. 3 PK-15（*Stat2* k/o）/TMPRSS2 #15 cells can propagate IAV（H1N1）in the presence of pig IFN β

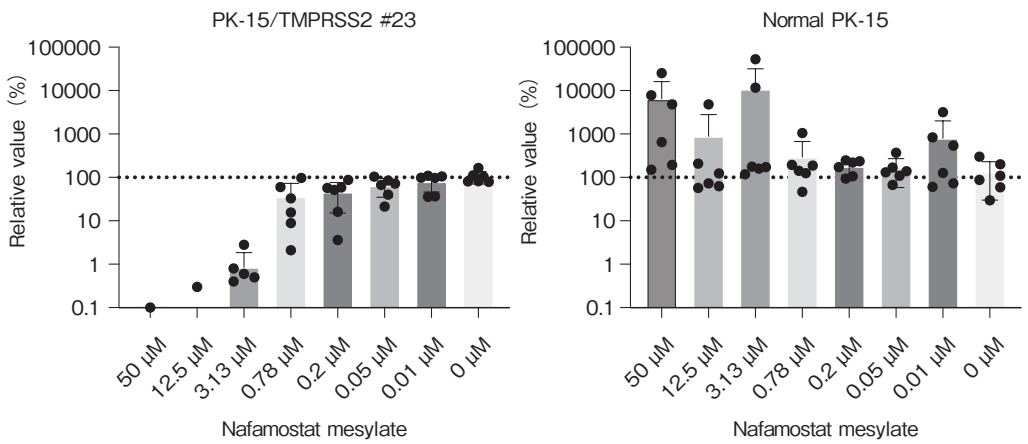


Fig. 4 PK-15/TMPRSS2 #23 cells can be used for testing TMPRSS2 inhibitors

© The Ito Foundation

４．要　約

豚は食肉生産において重要な役割を果たしているが，日本脳炎ウイルス，ニパウイルス，インフルエンザウイルスなど，さまざまな人獣共通感染症の病原体を宿すことがある。オルソミクソウイルス科やコロナウイルス科に属するウイルスの一部は感染性獲得のためにエンベロープタンパク質を開裂させる必要があり，宿主プロテアーゼ（TMPRSS2や外因性トリプシン）がその役割を果たす。このため，アフリカミドリザル由来のVero細胞にヒトTMPRSS2を安定的に発現させることで，豚流行性下痢ウイルスの複製が促進されることが報告されている。しかし，一般にウイルスの増殖は本来の宿主で最も安定であるため、ブタ由来のウイルスの増殖にはブタTMPRSS2を発現する豚細胞株が理想的であると考えた。本研究では，ブタ由来PK-15細胞株にブタTMPRSS2を安定発現させ，インフルエンザウイルスの複製が顕著に（1000倍以上）増加することを証明した。また，*Stat2*遺伝子を欠損するPK-15細胞株にブタTMPRSS2を安定的に発現させたところ，Ⅰ型インターフェロンの存在下でもウイルスの分離が効率的に行えることを示した。したがって，ブタTMPRSS2を発現するPK-15細胞は，TMPRSS2依存性ウイルスの分離，ワクチン製造，ウイルス学的研究に有望なツールとして期待される。

文　献

1） Heindl, M. R., Böttcher-Friebertshäuser, E.：The role of influenza-A virus and coronavirus viral glycoprotein cleavage in host adaptation, *Curr Opin Virol*, **58**, 101303, 2023.
2） Ozono, S., Zhang, Y., Tobiume, M., Kishigami, S., Tokunaga, K.：Super-rapid quantitation of the production of HIV-1 harboring a luminescent peptide tag, *J Biol Chem*, 295(37), 13023～13030, 2020.
3） Shofa, M., Saito, A.：Generation of porcine PK-15 cells lacking the Ifnar1 or Stat2 gene to optimize the efficiency of viral isolation, *PLoS One*, 18(11), e0289863, 2023.
4） 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

バクテリオファージを利用したボツリヌス菌の新規な簡易・迅速検出法の開発

Establishment of a novel detection method for *Clostridium botulinum* with a rapid and convenient procedure by utilizing bacteriophage

阪口義彦
（徳島文理大学薬学部微生物学）

Yoshihiko Sakaguchi
（Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokushima Bunri University）

Clostridium botulinum is classified into types A to G based on the antigenicity of the produced botulinum neurotoxin. Among them, types C and D strains mainly cause botulism in birds and cattle, respectively, resulting in significant economic losses for producers. As viral predators of bacteria, bacteriophages (phages) have the characteristic of specifically binding to host bacteria, where the phage tail plays an essential role in binding recognition. Here we have developed a simple and rapid detection method for identifying *C. botulinum* strains using specific tail molecules. First, we expressed and purified the two putative tail adsorption molecules of *C. botulinum* type C phage c-st (i.e., ORFCA and ORFCB). When binding of these gene products to *C. botulinum* was investigated, time and concentration dependency was observed. After estimating the three dimensional structure of the adsorption molecules, we predicted that the C-terminal regions would bind *C. botulinum* type C strain. Thus, when the molecules ORFCA Δ N and ORFCB Δ N were created where the N-terminal regions had been deleted, and the binding of ORFCA Δ N to the bacterium was still observed. We also examined the adsorption molecules, ORFDA and ORFDB, of *C. botulinum* type D phage d-1873. ORFDA and ORFCA were highly homologus, but ORFDB and ORFCB were well conserved only at their C-terminal region. In future, we will determine the specificity of the adsorption molecules by examining the binding of ORFDA and ORFDB derived from type D phage to bacterial strains. Based on these results, we will then develop an immunochromatographic detection method using adsorption molecules.

1．目　　的

ボツリヌス菌は，土壌や河川など自然界に広く分布している。本菌は，きわめて強力な神経毒素（ボツリヌス毒素）を産生し，家畜・家禽に重篤な感染症（ボツリヌス症）を引き起す。ボツリヌス菌は，産生するボツリヌス毒素の抗原性の違いによりA～G型菌に分類されている。その中で，主にC型菌はトリ，D型菌はウシにボツリヌス症を引き起こす。生産現場である農場でボツリヌス症が発生すると，生産者に経済的な面で多大な損失が生じることとなる。また，消費者に対して食

© The Ito Foundation

品の安全を確保するためには，生産現場である農場においてボツリヌス菌汚染源の発見とリスク管理を行い，科学的な根拠に基づいた情報発信が必要である。汚染状況の情報を農場の関係者に的確に提供して，誤った情報の流出を防ぐとともに，消費者の不安を解消することが重要である。したがって，農場におけるボツリヌス菌の感染制御は緊急な課題である。バクテリオファージ（ファージ）は，頭と尾により構成されており，宿主とする細菌を“特異的”に結合する。その特異性は，さまざまな細菌を菌株レベルで認識することが知られている。その認識には，ファージの“尾部”が重要な役割を担っている。そこで本研究課題では，吸着分子を利用したボツリヌス菌株の簡易・迅速検出法の研究開発に向けて研究を行った。

2．方　法

本研究は，徳島文理大学，大阪公立大学，北里大学および岡山大学の他施設共同研究により行った。本研究での二種病原体（ボツリヌス菌）の取り扱いについては，二種病原体等取扱施設として厚生労働省の承認を得た大阪公立大学および岡山大学で実験を行った。

2.1　組換えファージ尾部吸着分子の作製

バクテリオファージ（ファージ）の尾部吸着分子と推定した２つの遺伝子（*orfcA*，*orfcB*）を人工合成しpCold Iベクターに挿入した（プラスミド）。構築したプラスミドを大腸菌発現系によりHis融合タンパク質（ORFCA，ORFCB）として発現させた。得られた種々のタンパク質をアフィニティークロマトグラフィー（High density Cobalt）により精製した。また，ORFCAおよびORFCBのＮ末端側領域を欠損させた推定ボツリヌス菌結合領域（ORFCAΔＮ，ORFCBΔＮ）についても同様に作製し発現・精製した。

2.2　ボツリヌス菌株死菌体の調製

Ｃ型ボツリヌス菌Ｃ-468株およびＤ型ボツリヌス菌Ｄ-1873株をブレインハートインフュージョン（BHI）培地に接種し，37℃で一晩嫌気的に培養した。嫌気培養では，嫌気チャンバー装置（Baker Ruskinn，Concept　400）を用いて行った。種々の培養液を集菌（４℃，8,000 rpm，20分間）しPBS（－）で洗浄後，121℃で20分間処理した。本処理液の沈渣をPBS（－）で洗浄し死菌体を調製した。

2.3　推定尾部吸着分子のボツリヌス菌株に対する結合性の解析

2.2で調製したＣ-468株およびＤ-1873株の死菌体と種々の組換え尾部吸着分子（ORFCA，ORFCB，ORFCAΔＮ，ORFCBΔＮ）を37℃でさまざまな条件（種々の時間，濃度）で反応させた。反応液を遠心（４℃，15,000 rpm，10分間）により上清と沈渣に分け，それぞれをポリアクリルアミド電気泳動（SDS-PAGE）し，分離したタンパク質をPVDF（Poly Vinylidene Di-Fluoride）膜に転写させ一次抗体（６xHis tag monoclonal antibody）を37℃で２時間，ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ（HRP）標識二次抗体（Goat anti-mouse IgG（H+L）secondary antibody）を37℃で１時間反応させた。反応後，ECL western blotting detection reagentsにより発色させ，画像解析装置（cytiva，ImageQuant 500）により解析した。

2.4　Ｃ型とＤ型菌ファージ吸着分子のアミノ酸配列の比較解析

Ｃ型ボツリヌス菌C-Stockholm株から分離したファージc-stゲノム上の推定尾部吸着分子をコードする遺伝子情報を基に，さまざまなプライマー対を作製した。これらのプライマー対を用いて，血清型の異なるＤ型ボツリヌス菌Ｄ-1873株のファージd-1873 DNAを鋳型として，種々の推定

© The Ito Foundation

吸着分子をコードする遺伝子を増幅した。得られたPCR産物の全塩基配列を決定し，D型菌ファージの吸着分子とORFCAおよびORFCBをアミノ酸レベルで比較解析した。

3．結果と考察

3.1　ファージの推定吸着分子の発現・精製

我々は，すでにC型ボツリヌス菌から単離したバクテリオファージ（ファージ）c-stの全ゲノム解析から，ファージの尾部吸着分子をコードする遺伝子群を推定していた[1~3]。本ゲノム情報を基に，他のファージ上の個々の遺伝子産物との相同性解析およびタンパク質機能予測解析により，2つの遺伝子（*orfcA*，*orfcB*）が尾部吸着分子をコードしていると推定した。これらの遺伝子から推定するタンパク質（ORFCA，ORFCB）のアミノ酸配列はそれぞれ242aa，309aaであった。これらのアミノ酸配列を比較したところ，まったく異なる配列であった。そこで，C型菌ファージの尾部吸着分子（ORFCA，ORFCB）の発現ベクターの選定およびタンパク質の最適な発現条件（培養時間，培養温度など）について検討を行った。その結果，人工合成した吸着分子遺伝子をpCold Iベクターに挿入したプラスミドを作製し，大腸菌発現系において16℃で20時間培養することで，ORFCAおよびORFCBは可溶性タンパク質として精製することができた（**Fig. 1**）。

3.2　ファージ尾部吸着分子のボツリヌス菌株に対する結合性の解析

精製したORFCAおよびORFCBについて，C型またはD型ボツリヌス菌株死菌体に対する結合性をウエスタンブロット法により解析した。ORFCAおよびORFCBでは，いずれも時間依存的および濃度依存的にC型またはD型菌死菌体に対して強い結合が認められた。そこで，ORFCAおよびORFCBを分子可視化ソフト「Chimera」により三次元構造を推定したところ，いずれの吸着分子もN末端側が主にαヘリックス構造で，C末端側がβシート構造に分かれていることが明らかとなった。一般的に分子の細胞への結合には，βシート構造が重要であることが報告されているため，ORFCAおよびORFCBに含まれるβシート構造がボツリヌス菌への結合に重要であると考えた。

3.3　N末端領域欠損吸着分子の発現・精製

2つの尾部吸着分子（ORFCA，ORFCB）のN末端領域を欠損させた吸着分子（ORFCAΔN，ORFCBΔN）については，**Fig. 2**に示した。これらの吸着分子を2.1と同様の方法で発現・精製を試みたところ，いずれの推定吸着分子も同じ条件で発現および精製することができた（**Fig. 3**）。

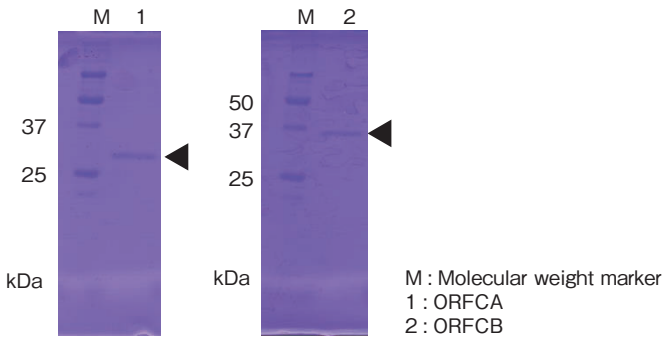


Fig. 1　SDS-PAGE analysis of the putative adhesion molecule located on the phage tail

© The Ito Foundation

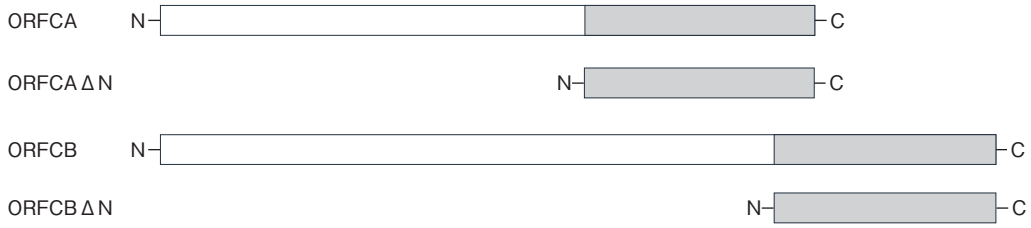


Fig. 2　Schematic illustrations of the putative phage adhesion molucule lacking its N-terminal region

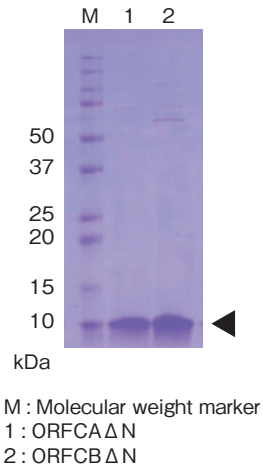


Fig. 3　SDS-PAGE analysis of the putative phage adhesion molucule lacking its N-terminal region

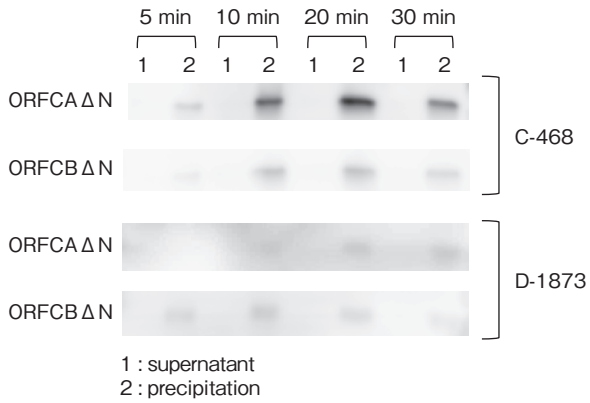


Fig. 4　An affinity of the putative phage adhesion molecule of the clostridium botulinum strains, which was evaluated by Western blot analysis

3.4　N末端領域欠損吸着分子のボツリヌス菌株に対する結合性の解析

ORFCAΔNおよびORFCBΔNについてもC型ボツリヌス菌C-468株またはD型ボツリヌス菌D-1873株に対する結合性をウエスタンブロット法により解析した。その結果，ORFCAΔNは，時間依存的および濃度依存的にC型死菌体に対して結合を示した（**Fig. 4**）。また，ORFCBΔNは，ORFCAΔNに比較して低い結合性を示した。一方，ORFCAΔNおよびORFCBΔNは，いずれもD型死菌体に対して低い結合性が認められた。このことから，ORFCAは，C-468株に対する特異性が高く，C末端側領域がボツリヌス菌株への結合に重要であることが明らかとなった。

3.5　D型ボツリヌス菌ファージの推定吸着分子の解析

*orfcA*および*orfcB*遺伝子の情報を基に，D型ボツリヌス菌ファージd-1873の２つの推定吸着分子をコードする遺伝子（*orfdA*，*orfdB*）の塩基配列を決定した。その結果，ORFDAとORFDBのアミノ酸配列は，それぞれ242aa，ORFDBは249aaであった。これらのアミノ酸配列をC型菌ファージの吸着分子と比較解析したところ，ORFDAとORFCAは高い相同性を示した。また，ORFDBとORFCBはN末端領域では相同性が低いもののC末端領域においてよく保存されていた。今後，ORFDAおよびORFDBを作製し，C型とD型菌株に対する結合性を調べることも必要

© The Ito Foundation

である。このような吸着分子の特異性を明らかにすることにより，ボツリヌス菌株を検出する材料の候補になることが期待される。今後，ファージの尾部吸着分子を用いたイムノクロマトグラフィー法へ展開し，ボツリヌス菌株の検出について検証する必要がある。

4．要　約

ボツリヌス菌は，産生するボツリヌス毒素の抗原性の違いによりA～G型菌に分類されている。その中で，主にC型菌はトリ，D型菌はウシにボツリヌス症を引き起こす。生産現場である農場でボツリヌス症が発生すると，生産者に経済的な面で多大な損失が生じることとなる。一方，バクテリオファージ（ファージ）は，宿主とする細菌を“特異的”に結合する特徴を有する。その認識には，ファージの“尾部”が重要な役割を担っている。そこで本研究課題では，尾部吸着分子を利用したボツリヌス菌株の簡易・迅速検出法の研究開発に向けて研究を行った。

まずは，C型ボツリヌス菌ファージc-stの推定していた２つ尾部吸着分子（ORFCA，ORFCB）を発現・精製した。これらの遺伝子産物のC型ボツリヌス菌に対する結合性を調べたところ，時間依存的および濃度依存的に結合が認められた。そこで，２つ尾部吸着分子の三次元構造を推定したところ，C末端側領域が菌株に結合することが予想された。次に，N末端側領域を欠損させた吸着分子（ORFCAΔN，ORFCBΔN）を作製したところ，ORFCAΔNのC型菌株に対する特異性が認められた。今回，異なる血清型であるDボツリヌス菌株ファージd-1873の２つの尾部吸着分子（ORFDA，ORFDB）も推定したところ，それぞれORFDAはORFCAと高い相同性を示したが，ORFDBとORFCBはC末端側のみ，よく保存されていた。今後，D型ファージ由来ORFDAおよびORFDBの菌株に対する結合性を調べることで，ボツリヌス菌株に対する特異性を検証する。これらの結果を基に，吸着分子を用いたイムノクロマトグラフィー法へ展開する。

謝　辞

本研究を遂行するにあたり，多大なご支援を賜りました公益財団法人伊藤記念財団ならびに関係者の皆様に心より感謝申し上げます。また，共同で実験を行って頂きました大阪公立大学大学院獣医学研究科獣医感染症学教室の向本雅郁教授，幸田知子講師，北里大学医学部微生物学単位の武晃助教，岡山大学学術研究院保健学域検査技術科学分野微生物・遺伝子学講座の後藤和義准教授，岡山大学学術研究院医歯薬学域病原細菌学分野の山本由弥子助教，徳島文理大学薬学部微生物学教室の竹原正也講師，永浜政博教授に深く感謝申し上げます。

文　献

1）Sakaguchi, Y., Hayashi, T., Kurokawa, K., Nakayama, K., Oshima, K., Fujinaga, Y., Ohnishi, M., Ohtsubo, E., Hattori, M., Oguma, K.：The genome sequence of *Clostridium botulinum* type C neurotoxin-converting phage and the molecular mechanisms of unstable lysogeny, *Proc Natl Acad Sci USA*, **102**, 17472～17477, 2005.

2）Oliva, M. A., Martin-Galiano, A. J., Sakaguchi, Y., Andreu, J. M.：Tubulin homolog TubZ in a phage-encoded partition system, *Proc Natl Acad Sci USA*, **109**, 7711～7716, 2012.

3）Sakaguchi, Y., Suzuki, T., Yamamoto, Y., Nishikawa, A., Oguma, K.：Genomics of *Clostridium botulinum* group III strains, *Res. Microbiol.*, **166**, 318～325, 2015.

© The Ito Foundation

畜産動物用粘膜ワクチンアジュバントの開発（Ⅱ）：ウイルス感染モデルでの検証

Development of mucosal vaccine adjuvant for livestock (II): Validation of a viral infection model

若 尾 雅 広
（鹿児島大学学術研究院理工学域工学系）

Masahiro Wakao
(Department of Science and Engineering, Kagoshima University)

Outbreaks of infectious diseases in farm animals cause serious problems not only for the livestock industry but also for the economy and human health. Vaccination is one of the effective strategies to prevent infectious animal diseases, and various vaccines have been developed to combat infectious diseases. Among vaccines, mucosal vaccines have been attracted much attention because they can mimic the natural infection pathways of pathogens and potentially induce not only local mucosal immune responses but also systemic immune responses, including humoral and cellular immunity. Successful immune induction at mucosal sites depends on effective delivery of antigenic components to mucosal immune cells and activation of these immune cells. Although various adjuvants, such as synthetic polymers and natural polysaccharides with immune cell delivery functions, have been studied, none has been utilized in practical applications.

Recently, we have developed glyco-adjuvants that activate immune cells via innate immune receptors. In this study, we evaluated the efficacy of mucosal vaccines containing glyco-adjuvants using the viral infection mouse model to apply the glyco-adjuvant as a mucosal vaccine adjuvant for livestock animals, and investigated further structural modification of glyco-adjuvants to improve the synthetic process and enhance the potency.

In a viral challenge study in mice, the vaccination containing glyco-adjuvants exhibited protective effects against viral infection. Furthermore, inflammation in lung tissue was suppressed by administration of the vaccine containing glyco-adjuvants. In parallel, we investigated further structural modification of glyco-adjuvants to improve the synthetic process and enhance potency. As a result, we found that glyco-adjuvants with specific sugar structures and linker moieties had a higher potency than previous conjugates. The results suggest that our glyco-adjuvants are useful for the mucosal vaccine adjuvant. Further investigation of glyco-adjuvants can lead to the development of a novel mucosal vaccine.

© The Ito Foundation

1．目　　的

畜産産業において，飼育動物の感染症対策は重要な課題である。伝染性感染症の発生は，飼育動物の損耗や畜産物の生産性の低下を招き，大きな経済的損失につながる。また，我々にとっては，人獣感染や食中毒，畜産物の安定供給などの公衆衛生，食品衛生上の課題が生じる。飼育動物の感染症対策では，ワクチンによる予防が有用であり，生ワクチンをはじめ，不活化ワクチン，抗原成分を含むコンポーネントワクチンなどが開発されている。生ワクチンは効率よく免疫誘導できるものの，弱毒化した病原体を使用するため感染症のリスクをあわせ持つ。一方，抗原などを含む不活化ワクチンは，ワクチンによる感染症のリスクはないが，免疫誘導能が低く，アジュバントによる活性化が必要である。ワクチン開発においては，より安全で，かつ，より効果的に免疫を誘導できるワクチンが求められており，これら両機能を持つワクチンとして，近年，粘膜ワクチンが注目されている。粘膜ワクチンでは，自然感染による免疫応答プロセスに沿って粘膜の局所免疫応答ならびに全身免疫応答が誘導される。また，病原体が感染する際の第一段階である粘膜での感染予防も期待される。しかし，粘膜組織の免疫細胞へワクチン成分を送達し，活性化する方法は確立されておらず，その手法の開発が求められている。

一方，近年のワクチンのアジュバント開発においては，パターン認識受容体（PRRs）が関与する自然免疫を活性化するリガンド分子の利用が注目されている[1)]。PRRsは，病原体などの外来性の分子パターン（PAMPs）や細胞などが傷害を受けた際に生じる内因性の分子パターン（DAMPs）を認識する受容体で，免疫応答初期の自然免疫を活性化する。自然免疫の活性化は，抗体産生などの液性免疫やT細胞などが関与する細胞性免疫などの獲得免疫も誘導する。そのため，自然免疫を活性化できるリガンド分子は，ワクチンアジュバントとして有望と考えられている。

我々の研究グループでは，PRRsの中でも，糖鎖を認識するC型レクチン受容体（CLR）と，脂質，核酸由来のPAMPs，DAMPsを認識するToll様受容体（TLR）に着目し，これまでに，糖鎖とTLRリガンド（TLRL）を複合化した糖鎖–TLRL複合体（以下，グライコアジュバント）を開発してきた。このグライコアジュバントは，糖鎖機能による細胞へのデリバリー能を有しており，複合化していないTLRL単体に比べ低濃度で，樹状細胞などの免疫細胞を活性化できる[2)]。また，これまでのマウスを用いたin vivo試験では，グライコアジュバント含有ワクチン製剤の経鼻投与によって，粘膜局所の免疫応答だけでなく全身性の免疫応答を誘導することが明らかとなっている（未発表）。そこで本研究では，グライコアジュバントを粘膜ワクチンのアジュバント成分として活用することを研究目的とし，グライコアジュバント含有ワクチンを用いたウイルス感染モデルでの検討ならびにグライコアジュバントの改良を行った。

2．方　　法

本研究では，グライコアジュバント含有粘膜ワクチンの有効性を評価するため，ウイルス感染モデルでの検討を行った。また，感染モデルにおける検討と並行して，より効果的なアジュバントの開発に向けてグライコアジュバントの改良についても検討した。

2.1　グライコアジュバント含有粘膜ワクチンを用いたウイルス感染防御試験

動物実験は学内の動物実験委員会承認のもと実施した（承認番号：VM21044，VM22025，VM23038）。これまでに得られているグライコア

© The Ito Foundation

ジュバントの中で高い免疫増強活性を示したグライコアジュバントＡと抗原を混合してワクチン製剤を調製し，マウス（Balb/C，７週齢，雌）への投与を行った。抗原にはインフルエンザウイルス表面タンパク質であるヘマグルチニン（HA）を使用した。グライコアジュバントＡとHAを混合してワクチン製剤を調製した後，マウスに対して１週間ごとに３回経鼻投与を行った。陰性コントロールには，生理食塩水（PBS）とHAを用いた。最終投与の１週間後にインフルエンザウイルスを感染させて性状，体温，体重変化を観察した。人道的エンドポイントに達したマウスについては，麻酔下安楽死させた。また，ウイルス感染の４日後に麻酔下安楽死させ，肺を採取した。採取した肺組織は，ホルマリン固定化，パラフィン包埋を行った後，組織切片としヘマトキシリン・エオジン（HE）染色を行った。

2.2　グライコアジュバントの改良

これまでの研究に沿って，グライコアジュバントの糖鎖成分には，CLRに結合すると考えられる糖鎖を使用した。TLRに結合するリガンド（TLRL）には，TLR７リガンド（TLR7L）を使用した。TLR7Lの合成は，プリン骨格をもとに既法[3]を参考に**Fig. 3**の経路にしたがって合成した。グライコアジュバントへの誘導は，アミド縮合またはクリック反応によって行った。合成したグライコアジュバントについては，マウス骨髄由来樹状細胞（mBMDC）を用いて免疫増強活性を評価した。mBMDCは，既法[4]にしたがい，マウス骨髄細胞を，顆粒球単球コロニー刺激因子（GM-CSF）を含むRPMI培養液で７日間培養して調製した。その後，96穴プレートに播種し，グライコアジュバントを段階希釈で添加し，18時間培養した後，培養上清を回収し，産生されたインターロイキン-６（IL-６）をELISA法により測定した。

2.3　統計解析

データは，GraphPad Prism７（GraphPad Software）を用いて解析した。データは，平均値±標準偏差で示した。一元配置分散分析で解析し，多重比較にはDunnett法を用いた。$p < 0.05$を統計学的に有意であるとした。

３．結果と考察

抗原としてオボアルブミン（OVA）とHAを用いた，これまでのマウスin vivo実験では，グライコアジュバント含有ワクチン抗原を３回経鼻投与を行うことで，鼻腔洗浄液中，血清中の抗体産生の増強が観察されている。そこで本研究でも同様に，ワクチン製剤を３回経鼻投与を行った後，ウイルス感染を行って感染防御効果を評価することにした。

グライコアジュバントＡとHAを混合してワクチン製剤を調製し，マウス（Balb/C，７週齢，雌）への投与を行った。投与は，マウスに対して１週間ごとに３回経鼻投与を行った。陰性コントロールには，PBSとHAを使用した。最終ワクチン投与の１週間後にインフルエンザウイルスを感染させて性状，体重変化等を観察したところ，グライコアジュバントＡ添加群では，体重変化等はほとんど見られず，グライコアジュバント無添加群では，６～７日後に人道的エンドポイントに達し，グライコアジュバント添加群に感染防御効果が認められた（**Fig. 1**）。また，ウイルス感染による肺の損傷を調べるため，感染後４日後に肺を採取して，組織切片を作成しHE染色を行った（**Fig. 2**）。その結果，グライコアジュバント添加群では，非感染（Naive）群と類似の染色像を示し，炎症反応が抑えられていることが示唆された。

一方，本研究では，豚や牛などの畜産動物に対するワクチン開発も目指すことから，上記ウイルス感染試験と並行して，グライコアジュバントの

© The Ito Foundation

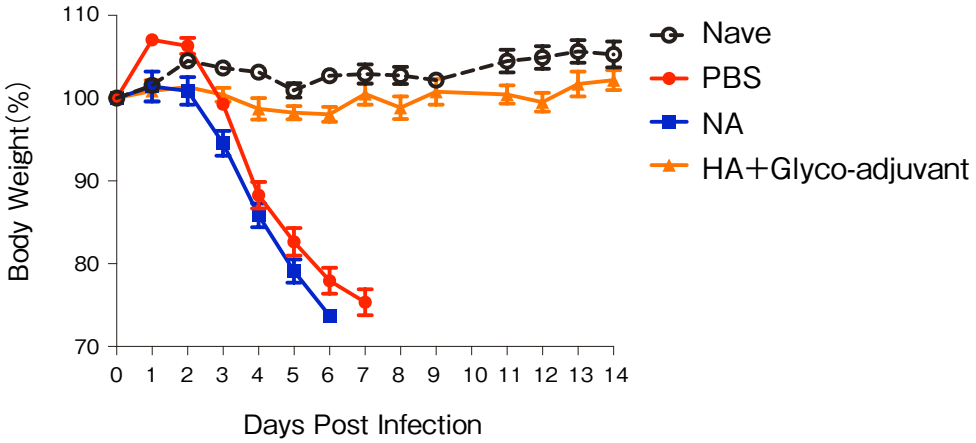


Fig. 1　Protective efficacy against influenza virus challenge with Balb/C mice. Morbidity was created using GraphPad Prism 7 (GraphPad Software).

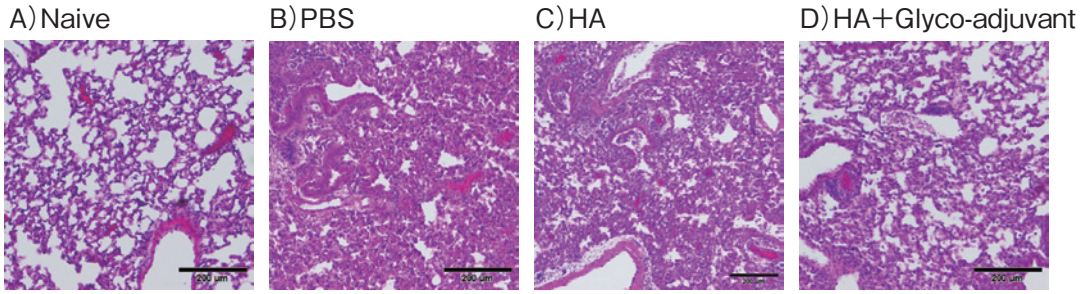


Fig. 2　HE staining of mouse lung tissue. Images are representative of each group. Scale bars indicate 200 μm.

さらなる改良を進めた。すなわち，糖鎖成分の受容体には，CLRであるデクチンやマンノース受容体に結合すると予想される，グルコースやガラクトース，マンノースから構成される糖成分に加え，それらのオリゴ糖を選択した。TLRL成分には，プリン骨格を有するTLR7L成分を選択し，カルボキシル基（R^1）の改変を行った。調製したそれぞれの糖鎖成分とTLRL成分との縮合を行い，新規グライコアジュバントB，C，Dを合成した（**Fig. 3**）。合成したグライコアジュバントB，C，Dについては，mBMDCを用いてIL-6の産生量を指標に免疫増強活性の評価を行った。その結果，特定の糖鎖成分とリンカー成分とを複合化したグライコアジュバントが高い免疫増強活性を有することが分かった（**Fig. 4**）。新規グライコアジュバントについては，今後，in vivoでの免疫増強活性を評価し，ワクチンアジュバントとしての有効性を検証する予定である。

4．要　　約

畜産動物の感染症に対する防疫対策は，畜産産業だけでなく，地域の公衆衛生や食環境の維持の面においても重要である。畜産動物の感染症対策としては，ワクチンが有効であることからさまざまなワクチンが開発されてきた。不活化ワクチンは，生ワクチンに比べ，感染症のリスクがなく安全に使用できることから，現在でも精力的に研究されており，既存ワクチンの改良が進められている。一方，不活化ワクチンは，効率よく免疫誘導できないことから，アジュバントの開発や投与経

© The Ito Foundation

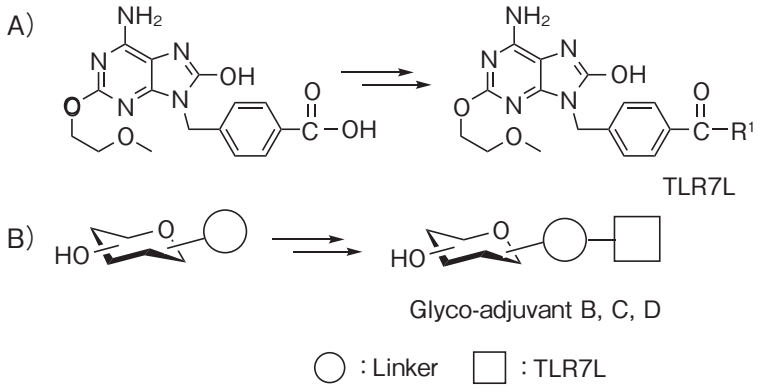


Fig. 3　Synthesis of glyco-adjuvant B, C, and D.　A）Synthesis of TLR7L, B）Conjugation of glycan with TLR7L.

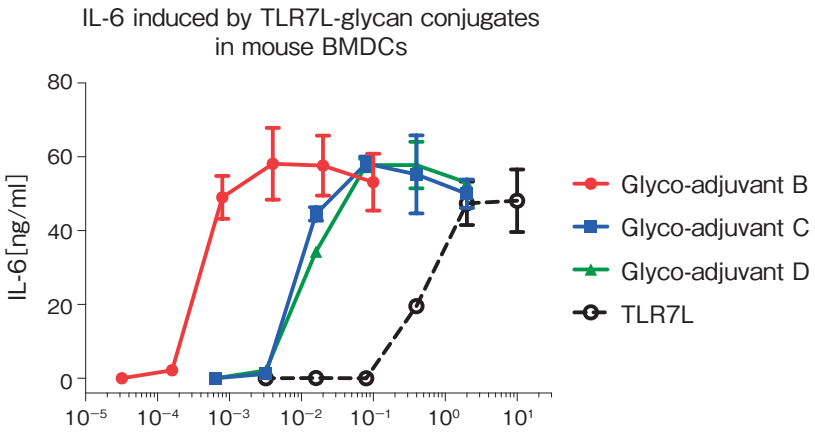


Fig. 4　IL-6 production by glyco-adjuvats in mBMDC（1×10^5cell/well）. IL-6 was measured by ELISA.

路の探索も進められている。近年，投与経路の探索では，粘膜を介した投与経路が注目されており，さまざまな粘膜ワクチンの開発が行われている。粘膜ワクチンは，病原体の感染経路を模倣した免疫誘導が可能で，粘膜の局所免疫を誘導するだけでなく，液性免疫，細胞性免疫を含めた全身性免疫応答の誘導が期待できる。粘膜ワクチンによる免疫誘導では，粘膜の免疫細胞への抗原成分のデリバリーと担当組織での免疫細胞の活性化が重要となるため，免疫細胞へのデリバリー機能をもつ合成高分子や天然多糖などのさまざまなアジュバントが検討されているが，実用化に至っていない。

一方，我々の研究グループでは，自然免疫の活性化機構に着目し，免疫細胞へのデリバリー能と免疫細胞の活性化能を持つグライコアジュバントを開発している。本研究では，これまでに開発してきたグライコアジュバントを畜産動物用粘膜ワクチンのアジュバントとして利用することを研究目的とし，ウイルス感染モデルを用いてグライコアジュバント含有粘膜ワクチンの有効性を評価するとともに，グライコアジュバントのさらなる改良を検討した。

マウスを用いたウイルス感染防御試験では，グライコアジュバント投与群において感染防御効果が認められた。また，ウイルス感染時の肺組織の

© The Ito Foundation

炎症においてもグライコアジュバント投与群で抑えられることが示唆された。また，グライコアジュバントの改良では，特定の糖鎖成分とリンカー成分を導入したグライコアジュバントが優れた免疫増強活性を示すことが明らかとなった。今後，グライコアジュバントを用いた粘膜ワクチン開発が期待される。

文　献

1） Coffman, R. L., Sher, A., Seder, R. A.：*Immunity*, **33**, 492～503, 2010.
2） Baba, A., Wakao, M., Shinchi, H., Chan, M., Hayashi, T., Yao, S., Cottam, H. B., Carson, D. A., Suda, Y.：*Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **30**, 126840, 2020.
3） Chan, M., Hayashi, T., Mathewson, R. D., Yao, S., Gray, C., Tawatao, R. I., Kalenian, K., Zhang, Y., Hayashi, Y., Lao, F. S., Cottam, H. B., Carson, D. A.：*Bioconjugate Chem.*, **22**, 445～454, 2011.
4） Shinchi, H., Yamaguchi, T., Moroishi, T., Yuki, M., Wakao, M., Cottam, H. B., Hayashi, T., Carson, D. A., Suda, Y.：*Bioconjugate Chem*., **30**, 2811～2821, 2019.

© The Ito Foundation

子牛の呼気温度および熱流束測定による初期呼吸器疾患診断法の開発

Development of a novel method for early diagnosis of respiratory disease in calves based on exhalation temperature and heat flux measurements

前　田　洋　佑・佐々木　結　香
（北里大学獣医学部）

Yosuke Maeda and Yuka Sasaki
(School of Veterinary Medicine of Kitasato University)

Bovine Respiratory Disease (BRD) is a major problem in the livestock industry today. This study aimed to develop a useful technique for the diagnosis of early BRD by measuring exhalation temperature and heat flux in calves. Calves in the suckling period were used as test cows in this study. A new exhalation measurement mask was fabricated by incorporating a temperature sensor and a heat flux sensor into an anesthetic inhalation mask for animals. First, to clarify whether exhalation temperature and heat flux reflect the temperature in the trachea, we measured and examined expiratory air temperature and heat flux and tracheal temperature in the same individuals. The results showed a strong positive correlation between expiratory temperature and tracheal temperature with a correlation coefficient of 0.72 and between expiratory heat flux and tracheal temperature with a correlation coefficient of 0.75. Next, to determine whether exhalation temperature and expiratory heat flux of calves are useful in the diagnosis of BRD, calves were fitted with an expiratory mask and exhalation temperature and heat flux were measured. Simultaneously, clinical respiratory disease score and thoracic ultrasonography consolidation (CL) magnitude were measured and grouped into clinical type BRD, subclinical BRD, and control groups. In addition, ambient temperature was recorded. The correlation coefficients between exhalation temperature, body temperature, expiratory heat flux, outside temperature, and CL (maximum diameter) showed that expiratory temperature was significantly positively correlated with body temperature, expiratory heat flux, and outside temperature. This indicates that while higher expiratory temperature is associated with higher body temperature and expiratory heat flux, it is more sensitive to outside air temperature. On the other hand, expiratory temperature did not significantly correlate with the maximum diameter of the CL. In exhalation temperature and heat flux, the clinical BRD group tended to have higher expiratory temperature and heat flux than the potential BRD and control groups, but the differences were not significant. Future work to improve the mask to make it usable in clinical settings will require the development of an exhalation mask that is less sensitive to ambient temperature, the establishment of reference values, and the correction for external factors.

© The Ito Foundation

1．目　　的

牛呼吸器病（Bovine Respiratory Disease：BRD）は肉牛の病症事故件数の約４割を占める疾患であり（2018年度家畜共済統計資料），現在の家畜業界において大きな問題となっている。また，BRDは臨床的な初期症状に乏しく，治療の遅れは病態の悪化につながるため，早期発見および早期治療が重要である。しかし，従来の診断方法では疾患の初期段階での発見が困難であるため，予防や早期治療には限界がある。また，牛の呼気ガス成分に関する研究ではこれまで特定のバイオマーカーは発見されておらず，診断の実用化には至っていない[1)]。人では呼気温度は喘息などの慢性気道疾患における非侵襲的気道炎症マーカーの一つとして報告がある[2)]。熱流束は呼吸による熱の放散量を測定し，呼気温度と熱流束の両方を測定することで，呼気の熱平衡をより正確に評価できる。そこで本研究では，牛の呼気温度および熱流束を測定することで，初期呼吸器疾患の診断に有用な技術を開発できるのではないかと着目した。本研究の目的は，呼気温度および熱流束測定マスクの製作方法を検討し，第一に，呼気温度が気管の温度を反映するかどうかを検証することであった。第二に，呼気温度および熱流束測定が呼吸器疾患の初期診断に有用かどうかを明らかにすることであった。長期的な目標は牛の呼気温度および熱流束測定による初期呼吸器疾患診断法を開発することである。

2．方　　法

2.1　供試牛

供試牛として哺乳期の子牛を用いた。本研究では反芻による第一胃からのガスの影響を排除するため，３カ月齢未満の哺乳期子牛を対象とした。北里大学動物実験委員会の承認を得て実施した。

2.2　子牛用の呼気温度および呼気熱流束測定マスクの設計および製作

子牛用の呼気温度および呼気熱流束測定用マスクを設計し，製作した。市販されている動物用麻酔吸入マスクは子牛の口と鼻の形状に適しており，ラバーカップが付いているため密着性が高く，子牛に優しい構造である。そこで，動物用麻酔吸入マスク（株式会社エスポワール）に温度センサー（温度ロガーサーミスタタイプSK-L751，ニッシン産業株式会社）と熱流束計測装置（薄膜熱流センサー：CHF-FHF05，クリマテック株式会社，熱流ロガーLR8432：日置電機株式会社）

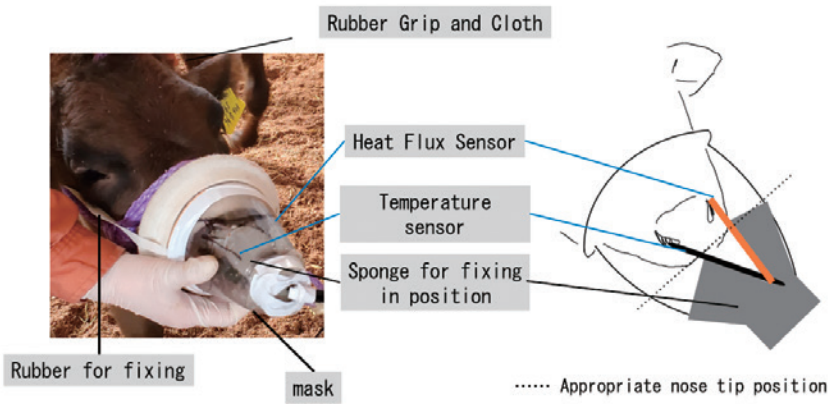


Fig. 1　Mask for exhalation measurement using a temperature sensor and heat flux measurement device integrated into an anesthesia inhalation mask for animals

© The Ito Foundation

を組み込むことで，呼気測定用マスクを製作した（**Fig. 1**）。温度センサーはサーミスタを用いた。

製作した呼気マスクの実行可能性を試験するため，実際に子牛に装着し，呼気温度を正確に測れる場所を検討した。また，センサーと装置が正しく機能するかどうかを確認した。また，赤外線サーモグラフィー（FLIR ONE Edge Pro，FLIR）を用いて視覚的な温度変化を確認した。

2.3　呼気温度および熱流束と気管温度の比較

呼気温度および熱流束が気管内の温度を反映しているかどうかを明らかにするため，同一個体における呼気温度および熱流束と気管内の温度を測定し，比較した。供試牛６頭（交雑種５頭，ホルスタイン種１頭）を用い，キシラジン（セラクタール２％注射液，エランコジャパン，0.1 mg/kg）を投与し，横臥させた。呼気マスクを装着し，呼気温度および体温を測定した。呼気温度測定後に，開口器で子牛を開口して喉頭を肉眼的に確認した。直径3.9 mmのワイヤレス内視鏡（WF070-DL，DEPSTECH）の先端に温度センサー（デジタル温度計センサー，SK-1260SK-S103T，佐藤計量器製作所）を取り付けて滅菌し，気管内に挿入した。ワイヤレス内視鏡の画像をスマートフォンの画面で確認しながらゆっくりと気管内を進め，気管分岐部における気管温度を測定した。呼気温度および熱流束と気管温度の相関を確認した。

2.4　子牛の呼気温度および呼気熱流束の測定

供試牛として子牛のべ57頭（黒毛和種55頭，交雑種２頭）を用いた。呼気マスクを子牛に装着し，呼気温度および呼気熱流束の変化を経時的に記録した。測定時間は90秒間とした。同時に臨床呼吸器病スコアリング（Clinical Respiratory Scoring：CRS）および胸部超音波検査（TUS）を実施した。CRSはWisconsinスコアリング法[3)]を参考に，鼻汁および眼脂の有無と重症度，耳の位置，自発的または誘発された咳の有無，体温について子牛を検査し，臨床スコアを記録した。各項目の合計スコアが５以上の子牛を臨床症状あり（CRS陽性）とした。TUSはMyLabOneVET（Esaote，Italy，Liguria）で，直腸検査用リニアプローブを用いた。Frequencyを10.0 MHz，Depthを７cmに設定した。右第１～10肋間，左第２～10肋間を検査した。評価方法は以下のとおりとした。含気肺で完全に反射するために見られる等間隔の高エコー線（Aライン）は正常とみなした。胸膜から垂直方向に伸びる高エコーなライン（Bライン）が少数の場合は正常とみなした。肺組織の密度が高くなり，含気が少なくなると出現する高エコーかつ不均一な陰影であるコンソリデーション（CL）の有無を記録し，１cm以上のCLを認めた場合TUS陽性とした。CRSおよびTUSともに陽性の牛を臨床型BRD群，CRS陰性かつTUS陽性の牛を潜在性BRD群，CRSおよびTUSともに陰性の牛を（対照群）に群分けして，３群間で比較した。また，外気温を記録した。さらに，呼気温度を目的変数として，呼気熱流束，体温，外気温，CL最大径を説明変数として設定し，重回帰分析を実施した。

2.5　統計解析

相関関係の分析にはピアソンの相関係数を用いた。相関係数は，0.1未満をほとんど相関なし，0.1以上0.4未満を弱い相関，0.4以上0.7未満を中程度の相関，そして0.7以上を強い相関とみなした[4)]。多重比較にはTukey検定を用いた。すべての検定において有意水準（p値）0.05未満を統計的に有意とみなした。

3．結果と考察

3.1　子牛用の呼気温度および呼気熱流束測定マスクの設計と製作

製作した呼気マスクを用いて子牛の呼気温度の実行可能性を試験した結果，温度センサーの位置

© The Ito Foundation

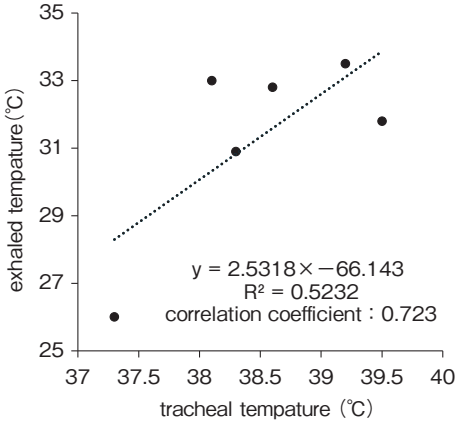


Fig. 2　Correlation between exhaled air temperature and tracheal temperature

Table 1　Correlations between exhaled temperature, body temperature, exhaled heat flux, ambient temperature, and CL (maximum diameter)

	exhaled temperature		body temperature	exhaled heat flux	ambient temperature	CL (maximum diameter)
exhaled temperature	1.000		0.376	0.342	0.363	0.154
body temperature	0.376	**	1.000	0.264	0.010	0.169
exhaled heat flux	0.342	**	0.264	1.000	0.102	0.112
ambient temperature	0.363	**	0.010	0.102	1.000	−0.013
CL (maximum diameter)	0.154		0.169	0.112	−0.013	1.000

** : $p < 0.01$, CL : consolidation

によって呼気温度に変化が生じることが判明したことから，最も呼気温度を安定して測定できる場所を検討した。その結果，温度センサーは鼻粘膜には直接触れないように，鼻腔と平行に設置した時に最も安定して測定できた。左右の鼻腔と平行に温度センサーおよび熱流束センサーを固定し，装置が安定して正しく機能することを確認した。呼気マスク装着後に呼気温度は徐々に上昇し，すべての個体で90秒以内にプラトーに達した。また，赤外線サーモグラフィーを用いて視覚的な温度変化を確認できた。

3.2　呼気温度および熱流束と気管温度の関係

3.1の結果より，呼気温度の測定時間は90秒間とした。同一個体における呼気温度と気管温度は相関係数0.72で強い正の相関を示した（**Fig. 2**）。また，呼気熱流束と気管温度は相関係数0.75で強い正の相関を示した。呼気は，胸腔内の圧力が上昇し，肺が縮むことで空気が押し出される。よって，子牛において同一の環境下で呼気温度および気管温度を測定した場合，呼気温度および熱流束は気管温度を反映していることが示唆された。

3.3　子牛の呼気温度および呼気熱流束

熱流束は単位時間あたりに単位面積を流れる熱エネルギー量で表される。呼気温度，体温，呼気熱流束，外気温，CL（最大径）の間の相関係数では，呼気温度は体温，呼気熱流束，外気温と有意に正の相関していた（**Table 1**）。一方，呼気温度とCLの最大径との相関は有意でなかった。また，臨床型BRD群は潜在性BRD群および対照群と比較して呼気温度および熱流束が高い傾向にあったが有意な差は認めなかった（**Fig. 3, 4**）。目的変数を呼気温度，説明変数を体温，呼気熱流

© The Ito Foundation

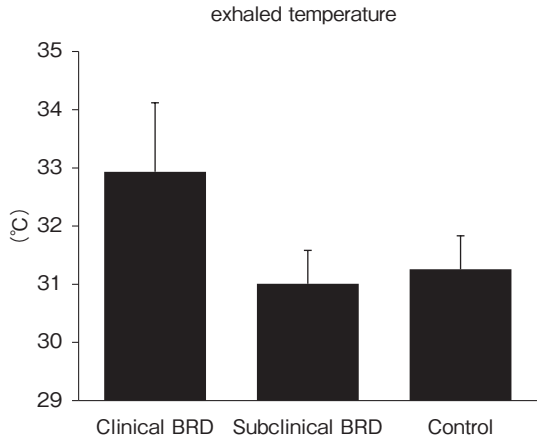


Fig. 3　Comparison of exhaled temperatures in the clinical BRD, subclinical BRD, and control groups

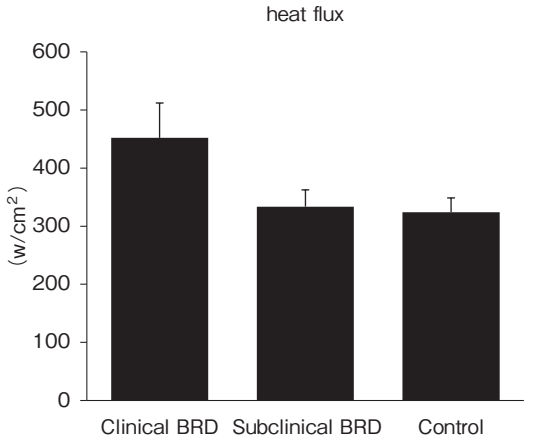


Fig. 4　Comparison of exhaled heat flux in the clinical BRD, subclinical BRD and control groups

束，外気温，CL（最大径）とした重回帰分析の結果，偏回帰係数は体温（P=0.03）および熱流束（P=0.02）が有意に影響しており，外気温（P=0.07）も影響する傾向にあった。よって，本試験で製作した呼気マスクを用いた呼気温度の上昇は体温や呼気熱流束の上昇と関連している一方で，外気温の影響を受けやすいことが示唆された。したがって，外気温などの外的要因を排除できるようなマスクに改良することで，臨床的な価値が高まると考えられる。ヒトにおいては接触状況による誤差，測定時間の長さ，体表面の熱的平衡までの時間を解決するために呼気温度を指標とした体温計測の報告があり[5]，牛においても呼気温度は体温の指標となると考えられた。一方，TUSでCLを認めたが臨床症状を示さない潜在性BRDと診断された子牛においては必ずしも呼気温度が高くなかった。この理由として，TUSでは活動性および非活動性の肺炎を区別できないことが考えられた。肺病変は一定以上進行すると不可逆性の変化となるため，TUSで肺病変を認めた場合にも，すでに治療されているなど現在は炎症状態ではない非活動性の肺炎が含まれていたことが考えられた。現在のところ，牛の活動性および非活動性の肺炎を明確に識別する方法はないため，本研究の限界であった。しかし，本研究において，TUSでCLを認め，呼気温度が高かった牛は気道内に炎症があり，TUSで肺炎像を認める牛であり，新たな活動性肺炎の指標となる可能性がある。今後，臨床現場で利用可能な呼気温度測定マスクへと改良するための課題として，外気温の影響を受けにくい呼気マスクの開発，基準値の設定および外的要因の補正が必要であると考えられた。

4．要　約

牛呼吸器病（Bovine Respiratory Disease：BRD）は現在の家畜業界において大きな問題となっている。本研究では牛の呼気温度および熱流束を測定することで，初期BRDの診断に有用な技術を開発することを目指した。本研究では供試牛として哺乳期の子牛を用いた。動物用麻酔吸入マスクに温度センサーと熱流束センサーを組み込むことで，新しい呼気測定用マスクを製作した。まず，呼気温度および熱流束が気管内の温度を反映しているかどうかを明らかにするため，同一個体における呼気温度および熱流束と気管温度を測

© The Ito Foundation

定し，検討した。その結果，呼気温度と気管温度は相関係数0.72，呼気熱流束と気管温度は相関係数0.75で強い正の相関を示した。次に，子牛の呼気温度および呼気熱流束がBRDの診断に有用かどうかを明らかにするため，子牛に呼気マスクを装着し，呼気温度および熱流束を測定した。同時に臨床呼吸器病スコアおよび胸部超音波検査によるコンソリデーション（CL）の大きさを測定し，臨床型BRD群，潜在性BRD群，対照群に群分けした。また，外気温を記録した。その結果，呼気温度，体温，呼気熱流束，外気温，CL（最大径）の間の相関係数では，呼気温度は体温，呼気熱流束，外気温と有意に正の相関をしていた。これは，呼気温度の上昇は体温や呼気熱流束の上昇と関連している一方で，外気温の影響を受けやすいことを示している。一方，呼気温度とCLの最大径は有意な相関を示さなかった。また，呼気温度および熱流束において，臨床型BRD群は潜在性BRD群および対照群と比較して呼気温度および熱流束は高い傾向にあったが，有意差は認めなかった。今後，臨床現場で利用可能なマスクへと改良するための課題として，外気温の影響を受けにくい呼気マスクの開発，基準値の設定および外的要因の補正が必要であると考えられた。

文　献

1） Haddadi, S., Koziel, J. A., Engelken, T. J.：*Anal Chim Acta*, **1206**, 339565, 2022.
2） Paredi, P., Kharitonov, S. A., Barnes, P. J.：*Am J Respir Crit Care Med*, **165**, 181～184, 2002.
3） McGuirk, S. M., Peek, S. F.：*Anim Health Res Rev*, **15**, 145～147, 2014.
4） Schober, P., Boer, C., Schwarte, L. A.：*Anesth Analg*, **126**, 1763～1768, 2018.
5） 米沢義道，伊東一典，牛山喜久：呼気温を指標とした体温計測，医用電子と生体工学, **26**, 139～145, 1988.

© The Ito Foundation

ブタの粘膜臓器間ネットワークの解明による乳腺免疫の向上

Improvement of immunity of mammary gland by clarifying the networks between mucosal tissues in pig

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)

The purpose of this study was to determine the mechanism of mammary antibody production to protect immature immune pups. First, the intestine-associated lymphoid tissue contributing to mammary gland immunity was verified by comparing sows with 6-month-old pigs. The jejunal Peyer's patches were the only gut-associated lymphoid tissue that was not diminished in the sows. Therefore, the jejunal Peyer's patches were the most important gut-associated lymphoid tissue most potentially contributing to mammary gland immunity. Furthermore, single-cell RNA-seq was performed on the mammary gland and jejunal Peyer's patches to characterize the cells present in each organ. Various cell clusters of immune cells were present in the mammary gland and jejunal Peyer's patches, respectively. On the other hand, only the cluster of antibody-producing cells was identified as having common characteristics between the mammary gland and the jejunal Peyer's patches. Both antibody-producing cells in the mammary gland and jejunal Peyer's patches expressed the chemokine receptor CCR10, and mammary epithelial cells expressed its ligand CCL28. These findings suggest that antibody-producing cells in the mammary gland migrate from the jejunal Peyer's patches with the development of the mammary gland.

1．目　　的

母子移行免疫は，免疫が未熟である子を守るために必要不可欠であるが，畜産動物では，胎盤の構造により，抗体が胎盤を移行できないことから，抗体の移行は乳を介して行われる。よって「乳」の質的向上は幼若家畜の健全育成において非常に重要である。乳腺は妊娠・分娩・授乳といった周産期のみに発達し，退縮する非常にユニークな臓器であり，そのダイナミックな変化に合わせて，乳腺へと免疫細胞は遊走されてくるが，ブタの乳汁抗体を産生する抗体産生細胞の由来および，遊走機構については明らかになっていない。そこで本研究では，母豚の乳腺および腸管関連リンパ組織から細胞を単離し，シングルセル解析を行っていくことで，各臓器の単一細胞レベルでの遺伝子発現を比較・解析する。それにより，乳腺に存在する免疫細胞がどこから遊走されてきているのかを特定し，さらには，特定した腸管関連リンパ組織を活性化する微生物を同定する

© The Ito Foundation

ことを目的とした。

2．方　法

2.1　供試動物

本研究における動物実験は，東北大学動物実験委員会の審査・許可を得て行った（2021農動-006）。出産後３週間の母豚（LW種）から乳腺，空腸パイエル板，回腸パイエル板および結腸集合リンパ小節を採材した。採材したサンプルの一部は４％パラホルムアルデヒドで一晩固定し，脱水・透徹した後パラフィン包埋した。

2.2　細胞単離とシングルセル解析

出産後３週齢のブタから乳腺および空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，空腸パイエル板は，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，空腸パイエル板および乳腺ともに1-2 mm程度まで細かく切り，0.5 mg/mlコラゲナーゼ（sigma），5 U/mlのDNase（sigma）および50 μM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℃で処理することで採材した組織から細胞を単離した。さらに，40 μmのセルストレイナー（FALCON）によってゴミを除去した。

組織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，10000 cell / μlになるように調整し，Chromium Controller（10 x 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。さらに，このcDNA libraryをHiSeq 2500（illumina）を用いてシーケンシングを行った。

シーケンス後，Cell Rangerを用いてデータをFASTQ形式に変換し，マッピング，フィラリング，細胞ごとのバーコードのカウント，UMI（Unique Molecular Identifier）のカウントを行った。また，レファレンスゲノムにはEnsenblから取得したSus scrofa 11.1を用いた。データ解析にはSeurat 4.3.0.1を使用し，まず，３つの細胞以上で発現が検出された遺伝子のみを解析に使用し，発現遺伝子が200以下または2,500以上である細胞を除去した。データセットの上位2,000個の変動性の高い遺伝子を用いて主成分分析を行い，上位20個のPCを使用して次元削減を行った後，UMAP（uniform manifold approximation and projection）を用いて可視化した。さらに，またFeaturePlot関数を用いることで各遺伝子発現を確認した。

2.3　パラフィン切片からの細菌DNAの検出

2.1で作製したパラフィンブロックからミクロトームを用いて５μm厚に薄切し，パラフィン切片を作製した。加えて，レーザーマイクロダイセクションでパイエル板内およびポジティブコントロールとして腸管腔を切り出し，可溶化バッファーに回収した後にProteinase Kを50℃で一晩反応させた。その後，Norgen社のStool DNA Isolation Kitを用いることでＤＮＡを分離・精製した。さらに，細菌が有する16S rRNAのv3-v4領域をPCRで増幅し，電気泳動を行った。

© The Ito Foundation

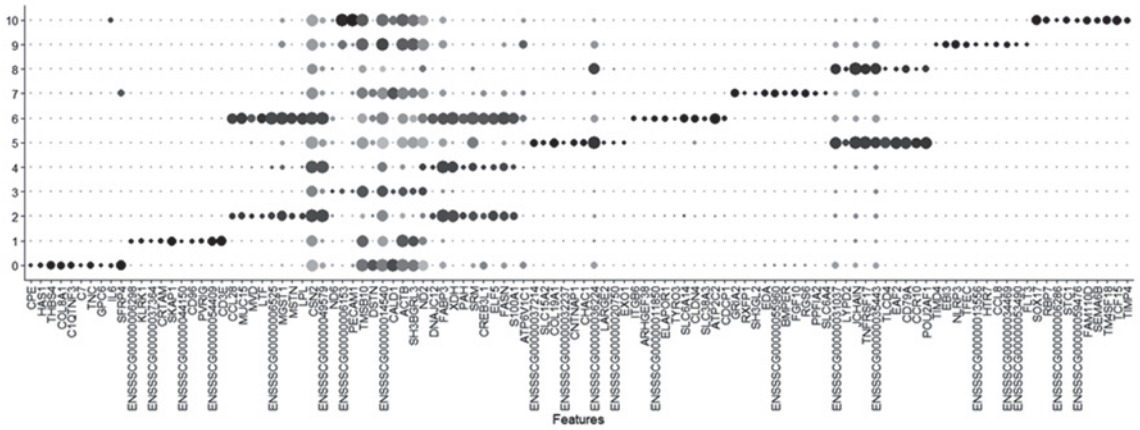


Fig. 1　Genes characteristically expressed in various cell types in the porcine mammary gland.
Porcine mammary cells were classified into 10 clusters by single-cell analysis. Genes characterizing each cell cluster indicated the presence of fibroblasts (THBS4, SFRP4), T cells (CD3E), mammary epithelial cells (CSN2), adipocytes (BMPER), plasma cells and plasmablasts (JCHAIN, CD79A), monocytes or macrophages (NLRP3, F4/80), and vascular endothelial cells (E-selectin).

３．結果と考察

3.1　各腸管関連リンパ組織の観察

まず，母豚においてどのような腸管関連リンパ組織が発達しているかを確認するため，出産後３週齢の母豚から空腸パイエル板，回腸パイエル板および結腸集合リンパ小節の組織観察を行った。その結果，出荷月齢である６か月齢と比較して回腸パイエル板および結腸集合リンパ小節は減衰していることが確認された。そのため，シングルセル解析は，乳腺と母豚での減衰が確認されなかった空腸パイエル板について行うことにした。マウスにおいては腸管関連リンパ組織については，加齢に伴って減衰することが知られている。今回用いた母豚は50か月齢であったため，出荷齢である６か月のブタよりも回腸パイエル板および結腸集合リンパ小節が減衰していたと考えられた。

3.2　シングルセル解析

乳腺に存在する細胞を解析した結果，10個の細胞クラスターに分類された。それぞれの細胞クラスターを特徴づける遺伝子として，線維芽細胞（THBS4，SFRP4），T細胞（CD3E），乳腺上皮細胞（CSN2），脂肪細胞（BMPER），形質細胞および形質芽細胞（JCHAIN，CD79A），単球またはマクロファージ（NLRP3，F4/80），血管内皮細胞（E-selectin）を用いた（**Fig. 1**）。

これら分類された細胞をより詳細に解析した結果，乳腺上皮細胞はケモカインCCL28を分泌しており，また，その受容体であるCCR10を形質細胞（抗体産生細胞）および形質芽細胞が発現していることが明らかとなった。また，T細胞については，マウスの乳腺のシングルセル解析でT細胞の割合は非常に少ないことが報告されている[1)]。また，さまざまなケモカインおよびケモカイン受容体について調べた結果，T細胞クラスターでは５種類のケモカイン受容体の発現が確認され，さらに細胞レベルでは特に，CXCR4を発現している細胞とCXCR6を発現している細胞に分類された。また，単球・マクロファージについても５種類のケモカイン受容体が確認された。さらに，それらのケモカイン受容体のリガンドであるケモカインを線維芽細胞や血管内皮細胞が分泌している

© The Ito Foundation

ことが確認された。それらを踏まえると，乳腺における免疫細胞の遊走は多段階的に起きていることが考えられた。

次に腸管関連リンパ組織の中で，母豚においても減衰していなかった空腸パイエル板について解析を行った。空腸パイエル板は12個の細胞クラスターに分かれており，複数のB細胞クラスターおよびT細胞クラスターが確認された。さらに，JCHAINを高発現する抗体産生細胞のクラスターも存在しており，そのクラスターに存在するほとんどの細胞はCCR10を発現していた。

さらに，乳腺のデータと空腸パイエル板のデータを一つのデータセットに統合し解析したところ，16個の細胞クラスターに分類された。統合されたデータセットにおいて，乳腺と空腸パイエル板の双方を比較した際に，多くの細胞が一致していたクラスターは一つのみであった。また，そのクラスターに存在する細胞の多くはJCHAINを高発現していたことから，抗体産生細胞クラスターであると考えられた。また，同様のケモカインレセプターCCR10を発現していたことからも，乳腺に存在する抗体産生細胞は，空腸パイエル板から遊走されてくることが示唆された。

3.3　パラフィン切片からの細菌DNAの抽出

レーザーマイクロダイセクションを用いてパラフィン切片から切り出し，抽出したDNAについては，腸管腔から得られたものでは細菌16S rRNA v3-v4領域の増副産物のバンドが確認できた。しかしながら，空腸パイエル板の組織内を切り出し，DNAの抽出を行った場合は増幅が確認されなかった。この原因として，空腸パイエル板の組織内を切り出した切片から抽出したDNAには，宿主細胞由来のDNAが多量に含まれていたことが考えられた。

4．要　約

本研究では，免疫が未熟である子を守るための母子移行免役の一つである乳汁抗体がどのような機序によって産生されるかを明らかにすることを目的とした。まず，母豚の解剖を行い，出荷月齢である6か月齢のブタと比較することにより，どの腸管関連リンパ組織が乳腺免疫に寄与しているかを検証した。その結果，腸管関連リンパ組織の中で減衰していなかった免疫臓器は空腸パイエル板だけであったことから，乳腺免疫に寄与している可能性が高い腸管関連リンパ組織は空腸パイエル板であると考えられた。さらに，乳腺と空腸パイエル板についてシングルセルRNA-seqを行うことにより，それぞれの臓器に存在する細胞の特徴を解析した。その結果，乳腺と空腸パイエル板のそれぞれにおいてさまざまな免疫細胞の細胞クラスターが存在する一方で，乳腺と空腸パイエル板で共通した特徴を有する細胞が多数確認されたのは，抗体産生細胞のクラスターのみであった。また，乳腺と空腸パイエル板に存在する抗体産生細胞はともにケモカインレセプターであるCCR10を発現しており，さらに，乳腺上皮細胞はそのリガンドであるCCL28を発現していた。これらのことから，乳腺に存在する抗体産生細胞は乳腺の発達に伴い，腸管関連リンパ組織である空腸パイエル板から遊走されてくることが示唆された。

文　献

1）　Hassel, C., Gausserès, B., Guzylack-Piriou, L., Foucras, G.：Ductal Macrophages Predominate in the Immune Landscape of the Lactating Mammary Gland, *Front. Immunol.*, **12**, 754661, 2021.

© The Ito Foundation

畜産動物の脂肪酸味覚受容体の機能解析（Ⅱ）

A study on fatty acid taste sensing in livestock animals（Ⅱ）

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. In our previous research, we compared the functions of a long-chain fatty acid（LCFA）taste receptor GPR120 among animals which have different dietary habits. Then, we revealed that compared to carnivorous catGPR120, omnivorous pigGPR120 and herbivorous cowGPR120 showed high responsivities to LCFA. This showed a possibility that we must understand taste receptor characteristics specific to individual animal species to develop palatable feeds. Here, we focused on elucidating the molecular basis that generates differences in taste receptor responsiveness to LCFA in animals with different dietary habits. Firstly, by comparing the amino acid sequences of GPR120 in humans, pigs, and cows, which show high responsiveness to LCFA, with that of cats, which show low responsiveness, 13 specific amino acid residues unique to cats were identified. Then, to reduce the candidate amino acid residues involved in the function of GPR120, the responsiveness of dogGPR120 were analyzed to compare with the catGPR120, since dog is omnivorous animals but classified into Carnivora as well as cats. As a result, dogGPR120 exhibited high sensitivity to LCFA. Among the 13 amino acid residues, 5 were found to differ between dogs and cats. Subsequently, we revealed that the function of the modified catGPR120 with these 5 amino acid residues replaced by residues of dogs partly rescued the responsiveness to LCFA, and the modified dogGPR120 with these 5 amino acid residues replaced by residues of cats partly reduced the responsiveness to LCFA, respectively. These results suggested that these 5 amino acid residues partly contribute to the differences in responsiveness of GPR120 among industrial animals with different dietary habits.

1．目　　的

味覚は動物の飼料摂食行動を制御する化学感覚である。動物の味覚受容機構を理解し，嗜好性の高い飼料を開発することは，畜産動物の健康や福祉の向上に直結する。飼料中に含まれる味物質は，口腔表面に分布する味蕾で受容される。味物質の検出は，味蕾を構成する味細胞に発現するセンサータンパク質である味覚受容体が担う[1)]。複数の味覚受容体が，基本六味のそれぞれ（甘味，

© The Ito Foundation

うま味，苦味，酸味，塩味，ならびに脂肪の味）に対応していることで，我々は6種類の味を感じ分けることができる[1)]。

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。実際に，昨年度までの研究では，畜産動物として重要な雑食動物であるブタや草食動物であるウシ，ならびに肉食動物であるネコにおける味覚受容特性を比較した。その結果，雑食動物であるブタや草食動物であるウシと比較して肉食動物のネコでは長鎖脂肪酸に対する味覚受容体であるG protein-coupled receptor 120（GPR120）の感受性が低いことを見出した（**Fig. 1**）。この結果は，動物種ごとに味覚感受性が異なることを示唆するものであり，嗜好性の高い飼料を開発するためには，動物種ごとの味覚受容特性を理解する必要があることを裏付けるものである。そこで本研究課題では，昨年度までの研究で得られた成果を元に，食性の異なる動物種間で長鎖脂肪酸に対する味覚受容体の応答性の差異を生み出す分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

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60 mm 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，ブタ*GPR120*（NM_001204766.2），ウシ*GPR120*（XM_005890636.2),ネコ*GPR120*(NM_001317359.1),イヌ*GPR120*(NM_001317359.1),改変型ネコ*GPR120*（catGPR120-Q178H-S185P-S197A-M218V-S247Y),または改変型イヌ*GPR120*（dogGPR120-H178Q-P185S-A197S-V218M-Y247S）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。

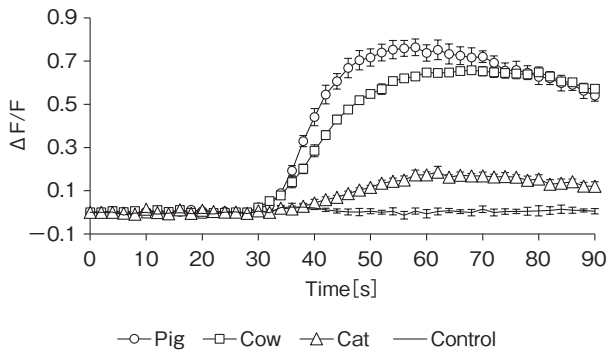


Fig. 1　Time-dependent activation of pig, cow, and catGPR120 by a linoleic acid（LA）stimulation
Time-dependent fluorescence changes of human embryonic kidney 293T（HEK293T）cells, which were transfected with omnivorous pigGPR120（circle), herbivorous cowGPR120（square), carnivorous catGPR120（triangle), and control empty vector（line）by a 120 μM LA 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 LA 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).

© The Ito Foundation

2.3　トランスフェクション

リポフェクション法により，pigGPR120/pcDNA3.1(+)，cowGPR120/pcDNA3.1(+)，catGPR120/pcDNA3.1(+)，dogGPR120/pcDNA3.1(+)，改変型catGPR120/pcDNA3.1(+)，改変型dogGPR120/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，10～160 μMのリノール酸を用いた。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，ΔF/F（蛍光強度の変化量/味刺激添加時の蛍光量）で示した。

３．結果と考察

昨年度までの研究で，ブタおよびウシのGPR120と比較して，ネコのGPR120は，リノール酸に対する応答性が低いことを明らかにしていた（**Fig. 1**）。そこで本研究では，食性の差異により長鎖脂肪酸に対するGPR120の応答性が異なる分子基盤の解明を目指した。はじめに昨年度までの成果を元に，長鎖脂肪酸に対する応答性の高いヒト[2)]，ブタ，ならびにウシのGPR120のアミノ酸配列と，長鎖脂肪酸に対する応答性の低いネコのGPR120のアミノ酸配列を比較した。その結果，ヒト，ブタ，ならびにウシのGPR120には共通するが，ネコのGPR120でのみ異なる13個のアミノ酸残基を見出した。これら13個のアミノ酸残基のうちいずれかが長鎖脂肪酸に対するGPR120の応答性の差異に関連する可能性がある。一方，これら13個のアミノ酸残基の中から原因となるアミノ酸残基を見つけ出す場合は，その組み合わせの数が膨大であるため，原因となるアミノ酸残基をさらに絞り込む必要があると考えた。

そこで，よりネコに近縁な種との比較を実施することにした。食肉目はネコ科とイヌ科に大別される。イヌは食肉目の中でも雑食性が強いことから，イヌGPR120とネコGPR120の応答性を比較することにした。その結果，ネコGPR120と比較して，イヌGPR120はリノール酸に対する応答性が高いことが明らかとなった（**Fig. 2**）。このことは，近縁の食肉目内であっても食性の差異により味覚受容体の応答性が異なることを示唆する結果であり，イヌの飼料とネコの飼料の差別化の余地があることを示す。そして，ヒト，ブタ，ならびにウシとの比較から見出された13個のアミノ酸残基について，ネコGPR120とイヌGPR120を比較した結果，８個のアミノ酸残基が共通していた。したがって，残りの５個のアミノ酸残基が長鎖脂肪酸に対するGPR120の応答性に寄与する可能性が高いと考えられた。

そこで，これら５個のアミノ酸残基がGPR120の機能に及ぼす影響を検討するため，ネコのGPR120のアミノ酸配列のうち該当する５個をイヌ型の残基に置換した「改変型ネコGPR120（catGPR120-Q178H-S185P-S197A-M218V-S247Y/pcDNA3.1(+)）」とイヌのGPR120のアミノ酸配列のうち該当する５個をネコ型の残基に置換した「改変型イヌGPR120（dogGPR120-H178Q-P185S-A197S-V218M-Y247S/pcDNA3.1(+)）」の長鎖脂肪酸に対する応答性をそれぞれ

© The Ito Foundation

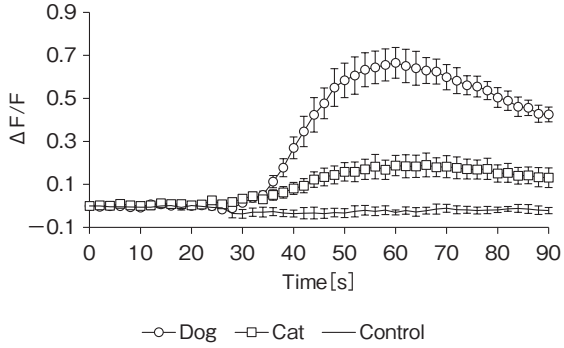


Fig. 2　Time-dependent activation of dog and catGPR120 by a LA stimulation
Time-dependent fluorescence changes of HEK293T cells, which were transfected with omnivorous dogGPR120 (circle), carnivorous catGPR120 (square), and control empty vector (line) by 80 μM LA stimulation, were shown. Horizontal line shows a timeline [s] after beginning of a measurement (0 s). Fluorescence was detected every 2 s for 90 s, and taste stimulation by 80 μM LA was automatically added at 17 s after beginning of a measurement. Values are the means of ΔF/F ± standard errors (n=4).

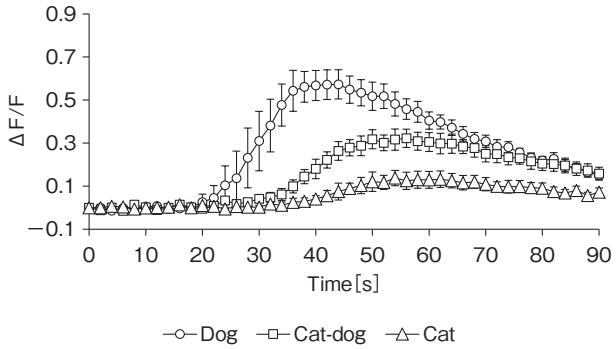


Fig. 3　Time-dependent activation of dog, dog-cat, and catGPR120 by a LA stimulation
Time-dependent fluorescence changes of HEK293T cells, which were transfected with dogGPR120 (circle), cat-dogGPR120 (catGPR120-Q178H-S185P-S197A-M218V-S247Y) (square), catGPR120 (triangle) by 80 μM LA stimulation, were 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 80 μM LA was automatically added at 17 s after beginning of a measurement. Values are the means of ΔF/F ± standard errors (n=4).

解析することにした。その結果，まずは改変型ネコGPR120のリノール酸に対する応答性を解析したところ，野生型のネコGPR120と比較して応答性が一部回復していた（**Fig. 3**）。一方，野生型のイヌGPR120と比較して完全に応答性が回復していなかったことから，この５個のアミノ酸残基以外にも長鎖脂肪酸に対するGPR120の応答性に寄与するアミノ酸残基が存在する可能性が示唆された。次に，改変型イヌGPR120のリノール酸に対する応答性を解析したところ，野生型のイヌGPR120と野生型のネコGPR120の中間程度の応答性を示した（**Fig. 4**）。これらの結果から，食性の異なる動物種間におけるGPR120の応答性の差異に，これらの５個のアミノ酸残基が一部関与していることが示唆された。今後は，これら５個のアミノ酸について一つずつ改変した点変異体のプラスミドを作製して解析することで，どのアミノ酸残基が受容体の応答に寄与するかを明らかにしていきたい。ヒトのGPR120において，長鎖脂肪酸の受容に重要な役割を果たすアミノ酸残基が複

© The Ito Foundation

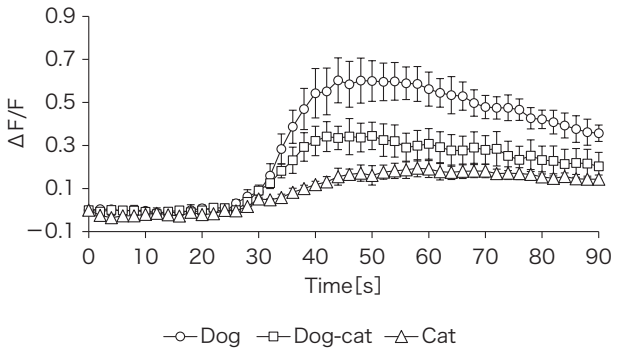


Fig. 4　Time-dependent activation of dog, dog-cat, and catGPR120 by a LA stimulation
Time-dependent fluorescence changes of HEK293T cells, which were transfected with dogGPR120 (circle), dog-catGPR120 (dogGPR120-H178Q-P185S-A197S-V218M-Y247S) (square), catGPR120 (triangle) by 120 μM LA stimulation, were 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 LA was automatically added at 17 s after beginning of a measurement. Values are the means of ΔF/F ± standard errors (n=4).

数同定されているが[3, 4]，今回見出した５個のアミノ酸残基はいずれも報告されていないことから，本研究により，GPR120の長鎖脂肪酸受容に重要なアミノ酸残基を新規に同定することができると期待される。

本研究により，動物種ごとの味覚感受性の違いが生じる分子機構の一端が明らかになった。今後の研究により，食性の異なる産業動物種に応じた味覚受容特性を理解していくことで，それぞれの動物の好みに応じた嗜好性の高い飼料を開発するうえでの分子基盤を提供できると考えられる。

４．要　　約

味覚は，動物が生命維持に必要な栄養素を積極的に摂取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。昨年度までの研究で，肉食性のネコと比較して，雑食性のブタや草食性のウシでは長鎖脂肪酸を検出する味覚受容体であるGPR120の応答性が高いことを明らかにした。このことは，嗜好性の高い飼料を開発するためには，個々の動物種ごとの味覚受容特性を理解する必要があることを裏付ける。本研究では，食性の異なる動物種における長鎖脂肪酸に対する味覚受容体応答の差異を生み出す分子基盤を解明することに焦点を当てた。はじめに，長鎖脂肪酸に対して高い応答性を示すヒト，ブタ，およびウシのGPR120とネコのGPR120のアミノ酸配列を比較することで，ネコに特有のアミノ酸残基を13個見出した。次に，長鎖脂肪酸応答に関与するアミノ酸残基を絞り込むため，食肉目のネコと近縁な動物種として，食肉目の中でも雑食性の強いイヌのGPR120の長鎖脂肪酸に対する応答性を検証した結果，イヌのGPR120は長鎖脂肪酸に対して高い感受性を示した。先述の13個のアミノ酸残基のうち，５個のアミノ酸残基がイヌとネコで異なっていた。そこで，該当する５個のアミノ酸残基をイヌのアミノ酸残基に置換した改変型ネコGPR120とネコのアミノ酸残基に置換した改変型イヌGPR120の長鎖脂肪酸に対する応答を検証した結果，それぞれ一部応答性が回復，または減弱した。これらのことから，これら５個のアミノ酸残基が食性の異なる動物種におけるGPR120の応答性の差異に一部寄与していることが明らかになった。

© The Ito Foundation

文　献

1） Doyle, *et al.*：*Physiol. Rev.*, **103**, 1193～1246, 2023.
2） Galindo, *et al.*：*Chem. Senses*, **37**, 123～139, 2012.
3） Hudson, *et al.*：*J. Biol. Chem.*, **289**, 20345～20358, 2014.
4） Hudson, *et al.*：*Mol. Pharmacol.*, **84**, 710～725, 2013.

© The Ito Foundation

グルカゴン様ペプチド1に着目した子牛のグルコース利用性向上

Improvement of glucose utilization in calves with a focus on glucagon-like peptide 1

稲 生 雄 大
（広島大学大学院統合生命科学研究科）

Yudai Inabu
（Graduate School of Integrated Sciences for Life, Hiroshima University）

Recently, high plane of nutrition program has become mainstream, in which milk replacer is fed at least twice the amount of conventional regimen to improve growth and immune function of dairy and beef calves. However, the high lactose content of milk replacer can cause insulin resistance in calves, which may be associated with suboptimal growth performance of calves. Glucagon-like peptide 1 (GLP-1), a gut-derived peptide secreted from intestinal L cells, stimulates insulin secretion and enhances insulin action. Thus, the objective of this study was to evaluate the effects of dietary supplementation of butyrate that promotes GLP-1 secretion on glucose metabolism in calves under a high plane of nutrition program. Six female Holstein calves were fed commercial milk replacer and randomly assigned to either the BUTY group, in which 10 g per day of a butyrate product containing 17–21% butyrate was added to milk replacer, or the CON group, in which no butyrate product was supplemented (n = 3 for each). Feed intake and growth performance were not affected by butyrate supplementation. Plasma glucose, GLP-1, and insulin concentrations following glucose tolerance test were not affected by treatment. On the other hand, response of plasma glucose concentration to milk replacer feeding was different between treatments ($p < 0.01$); plasma glucose increased after milk replacer feeding in the CON but no postprandial increase in plasma glucose was observed in the BUTY. In contrast to the hypothesis, plasma GLP-1 concentration after milk replacer feeding was not affected by treatment. These results indicate that the dietary butyrate supplementation to milk replacer did not affect GLP-1 secretion under the conditions of this study, but may affect postprandial glucose metabolism.

1．目　　的

従来の人工哺乳は哺乳量に制限をかけ，固形飼料の摂取を促す標準哺乳法が主流であったが，最近では子牛の体格や免疫機能の向上を目的に，代用乳を従来法の倍以上の量で給与する高栄養哺育が普及しつつあり，子牛の哺育における代用乳の利用が増加している。一般的に代用乳はラクトース含量が全乳と比較し高いため，人工哺乳ではラクトース摂取量が過剰になりやすく，特に高栄養

© The Ito Foundation

哺育では顕著である。高栄養哺育における過剰なラクトース摂取は，高血糖・高インスリン血症を引き起こし，インスリン感受性を低下させる（インスリン抵抗性）。インスリンは栄養素全般に対する同化作用を有するため，インスリン感受性の低下は子牛の発育停滞や飼料効率低下につながる。実際に，代用乳のラクトース含量の違いは乳用子牛のインスリン感受性に影響し，発育・飼料効率を変化させることが報告されている[1]。したがって，子牛の発育能力を最大限に発揮させるためには，糖代謝への影響を考慮した哺育技術の確立が必須である。

腸管Ｌ細胞から分泌される消化管ホルモンであるグルカゴン様ペプチド１（GLP-1）は，インスリン分泌促進（インクレチン）作用やインスリン非依存的な血糖降下作用（インスリン類似作用）を有する。さらにGLP-1はインスリン作用増強作用を有しており，単胃動物ではインスリン感受性を向上させ，糖代謝を改善することが報告されている[2]。さらに著者らは，インスリン感受性が低い子牛では，代用乳給与後におけるGLP-1のインスリン分泌促進作用が高まる可能性があることを見出している[3]。これらの知見は，GLP-1が子牛の糖代謝の変化に密接に関与することを強く示唆しているが，詳細は不明である。

反芻動物におけるGLP-1およびGLP-1と同じ細胞から共分泌されるGLP-2の分泌は揮発性脂肪酸（VFA）により刺激されることが報告されており，さらに著者らは，VFAの中でも特に酪酸が強力な分泌刺激因子であることを明らかにしている[4]。また著者らは，飼料への酪酸添加が乳用子牛のグルカゴン様ペプチド分泌を促進することを明らかにしている[5]。したがって，高栄養哺育下の子牛への酪酸給与はGLP-1分泌を介してインスリン感受性を変化させる可能性があるが，詳細は不明である。本研究は，酪酸製剤の代用乳への添加が，子牛の血漿GLP-1濃度およびインスリン感受性に及ぼす影響を検討した。

２．方　　法

本研究は，「広島大学動物実験等規則」に従って，広島大学動物実験委員会からの承認を得たうえで実施した（承認番号：E23-5）。

2.1　供試動物と飼養管理

ホルスタイン種メス子牛６頭を供試し，高栄養哺育体系に従い，市販代用乳を28日齢から42日齢までは1200 g/日，43日齢から49日齢までは825 g/日，50日齢から56日齢までは600 g/日給与した。代用乳の溶解濃度は155 g/lであった。28日齢より試験を開始し，子牛は代用乳に酪酸を17～21％含有する酪酸製剤（Balangut LS P，BASF株式会社）を10 g/日（酪酸量1.7～2.1 g）で添加するBUTY区，または酪酸製剤を添加しないCON区に無作為に割り当てられた（各n = 3）。代用乳は１日２回，午前９時および午後４時半に等分給与した。カーフスターターおよびクレイングラス乾草は試験期間中，自由採食させた。試験期間中，飼料摂取量は毎日記録した。また，先行研究[6]に従い，便の固さの指標である便スコア（０=通常便，３=水様便）を毎日記録した。体重，体高および胸囲は，毎週測定した。

2.2　サンプリング

５週齢および８週齢に，耐糖能試験（GTT）を実施した。GTTでは，グルコース溶液（大塚糖液50％，大塚製薬株式会社）を体重１kg当たり180 mgの割合で頸静脈カテーテルより単回投与し，投与直前（０分）および投与後５，10，15，20，25，30，40，50および60分に血液を採取した。また６週齢時において，代用乳給与後に10分間隔で90分間連続採血を行う食餌負荷試験（MTT）を実施した。GTTおよびMTT実施前日の午後の哺乳後にカテーテルを挿入し，採血終了

© The Ito Foundation

まで留置した。また，GTT・MTT実施前の22時間は絶食させた。採取した血液は，100 IUのヘパリンナトリウムおよび1000 KIUのアプロチニンが添加された試験管に移し，ただちに氷上静置した。血液は４℃，2330×gで15分間遠心分離し，得られた血漿サンプルは1.5 mlマイクロチューブに移し，−80℃で保存した。

2.3　サンプル分析

血漿GLP-1，GLP-2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。血漿グルコース濃度は，市販のキット（グルコースＣⅡ-テストワコー，富士フイルム和光純薬株式会社，大阪）を用いてムタローゼ・グルコースオキシダーゼ（GOD）法により測定を行った。

2.4　統計解析

飼料摂取量，体重，体格，便スコアおよび血漿ホルモン・グルコース濃度は，JMP®14 Pro（SAS Institute Inc., 東京）のモデルのあてはめを用いて，下記モデルにより解析した。

$Y_{ijk} = \mu + Trt_i + Time_j + Calf\ (Trt)_{k(i)} + Trt \times Time_{ij} + e_{ijk}$

Y_{ijk}は独立変数，μは全体平均，Trt_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，$Trt \times Time_{ij}$は処理と時間の交互作用，$Calf\ (Trt)_{k(i)}$は処理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。また，処理と時間の交互作用が見られた場合に単純主効果検定を行い，同一時間内における処理区間の差を解析した。

３．結果と考察

カーフスターターおよび乾草の乾物摂取量は，加齢に伴い増加したが（Time $p < 0.01$），処理区間に差は見られなかった（**Fig. 1**）。また，体重，体高および胸囲も経日的に増加したが（Time $p < 0.01$），処理区間の差は認められなかった（**Fig. 2**）。酪酸が飼料摂取量に及ぼす影響についての報告は先行研究間で一貫性がなく，議論の余地がある。著者らの先行研究では，代用乳への0.3％のトリブチリン添加は，離乳移行期におけるカーフスターター摂取量を減少させた。一方，代用乳あるいは全乳に酪酸ナトリウムを添加し給与しても，DMIは変化しないことも報告されている[7, 8]。

５週齢および８週齢に実施したGTTの結果を**Fig. 3**に示す。５週齢および８週齢のいずれにおいても，グルコース投与後に血漿グルコース濃度は顕著に増加しており（$p < 0.01$），グルコース溶液が正常に子牛の血中に投与されたことを示している。５週齢および８週齢のいずれにおいても，グルコース投与後の血漿グルコース，GLP-1およびインスリン濃度は処理区間に差はなく推移した。また，インスリン抵抗性の指標であるHOMA-IRについても処理区間に差は見られなかった。以上のことから，本試験において，代用乳への酪酸製剤添加は糖代謝に影響を及ぼさなかったと考えられた。

７週齢に実施したMTTの結果を**Fig. 4**に示す。代用乳給与後の血漿グルコース濃度は，CON区においては経時的に増加したが，BUTY区においては変化しなかった（Trt × time $p < 0.01$）。血漿GLP-1濃度は，BUTY区において高い数値を示したものの，有意差は認められなかった。同様に，GLP-1と同じ細胞から共分泌されるGLP-2およびインスリンの血漿濃度についても，代用乳給与後における差は見られなかった。GLP-1濃度に処理の影響が見られなかった理由は不明であるが，本試験では供試動物数が少なく，統計検出力も低いため，有意差を検出できなかった可能性がある。今後はサンプルサイズを拡大して，さらなる検討を行う必要がある。代用乳給与に対する血漿グルコース濃度の反応が処理区間で異なった理由とし

© The Ito Foundation

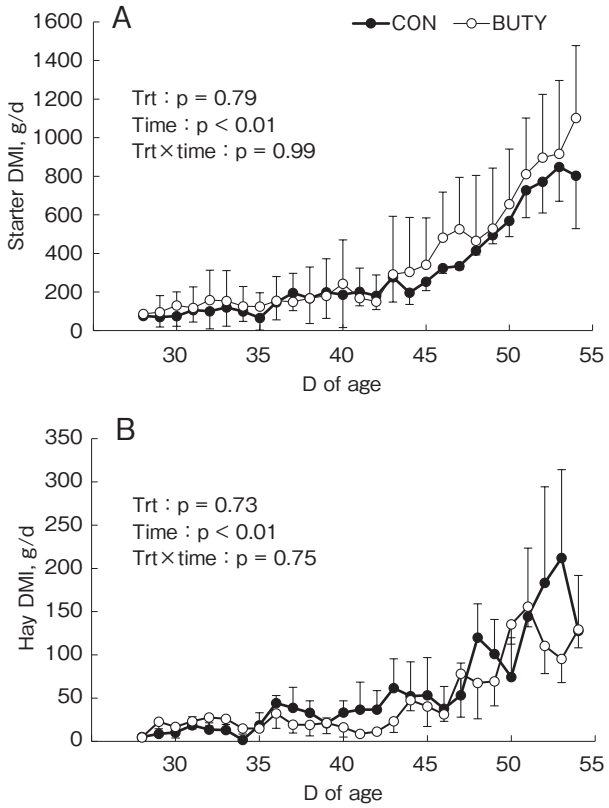


Fig. 1　Dry matter intake (DMI) of calf starter (A) and Klein grass hay (B) for calves fed milk replacer with (BUTY) or without (CON) butyrate supplementation (n = 3 for each treatment). Results are expressed as mean ± SE.

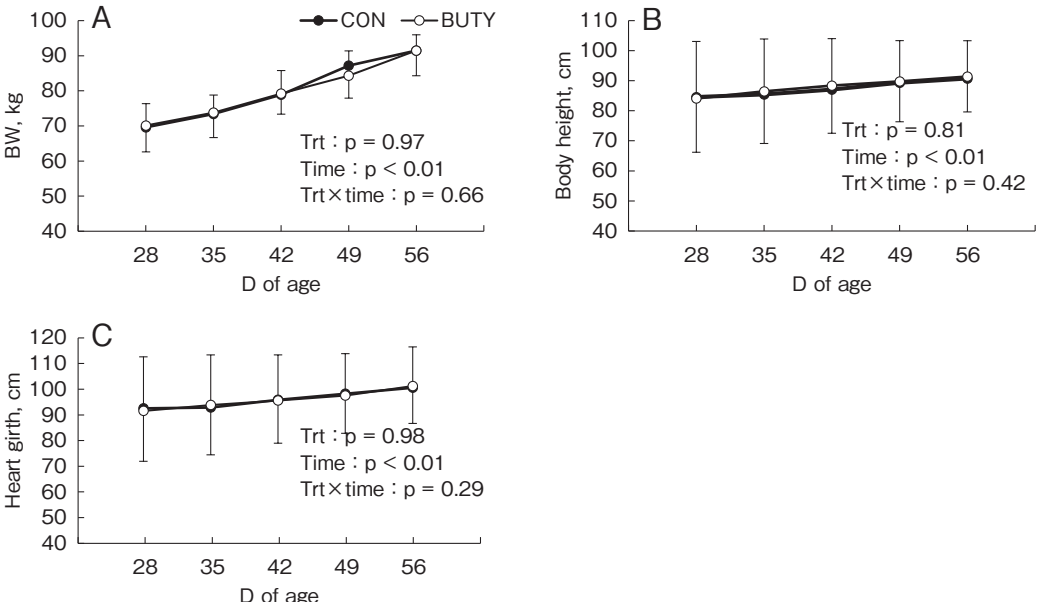


Fig. 2　Body weight (BW) (A), body height (B), and heart grith (C) for calves fed milk replacer with (BUTY) or without (CON) butyrate supplementation (n = 3 for each treatment). Results are expressed as mean ± SE.

© The Ito Foundation

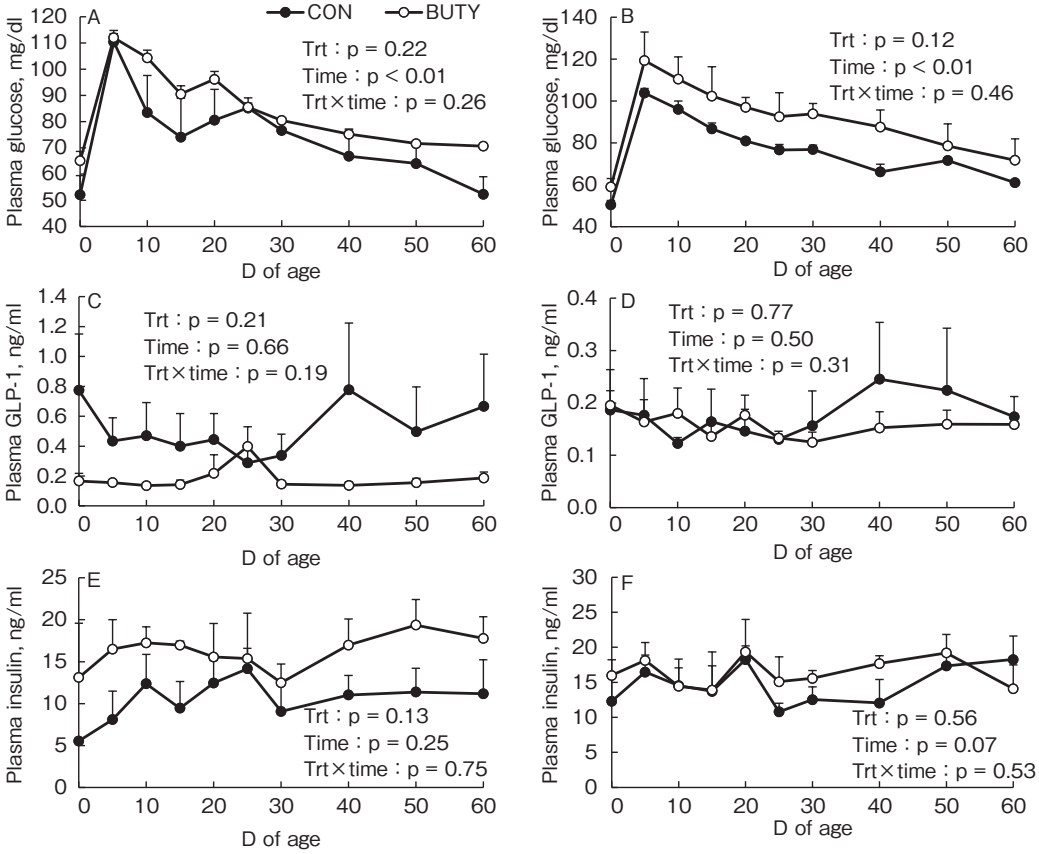


Fig. 3　Plasma glucose, glucagon-like peptide 1（GLP-1）, and insulin concentrations following an intravenous glucose tolerance test at 5 weeks of age（A, C, E）and 8 weeks of age（B, D, F）for calves fed milk replacer with（BUTY）or without（CON）butyrate supplementation（n = 3 for each treatment）. Results are expressed as mean ± SE.

て，糖代謝速度や代用乳中ラクトースの消化・吸収になんらかの変化が生じた可能性が考えられる。また上述のとおり，GLP-1が数値的にBUTY区で高値を示したことから，GLP-1による血糖減少作用によりBUTY区における食後の血漿グルコース濃度増加が抑制された可能性も考えられるが，本試験では明らかとならなかった。

便スコア，下痢発症日数（便スコアが２以上であった日の合計）の結果を**Fig. 5**に示す。便スコアは，BUTY区においてCON区と比較し数値的に低値を示したが，有意差は認められなかった。同様に，下痢発症日数についても，有意差は認められなかったが，BUTY区がCON区と比較して低い値を示した。免疫の賦活化はグルコース消費量を増加させることから[9]，下痢症によって炎症反応が誘起される場合，糖代謝が変化する可能性がある。酪酸製剤給下における下痢発症頻度・重症度と糖代謝の関係性を明らかにするためには，さらなる研究が必要である。

４．要　　約

近年，代用乳を従来法の倍量以上給与し，発育および免疫機能向上を図る高栄養哺育法が主流となりつつある。しかしながら，代用乳はラクトース含量が高いため，子牛のインスリン抵抗性を引き起こす可能性がある。グルカゴン様ペプチド1（GLP-1）は，腸管L細胞から分泌されるホルモンであり，インスリン分泌促進作用やインスリン

© The Ito Foundation

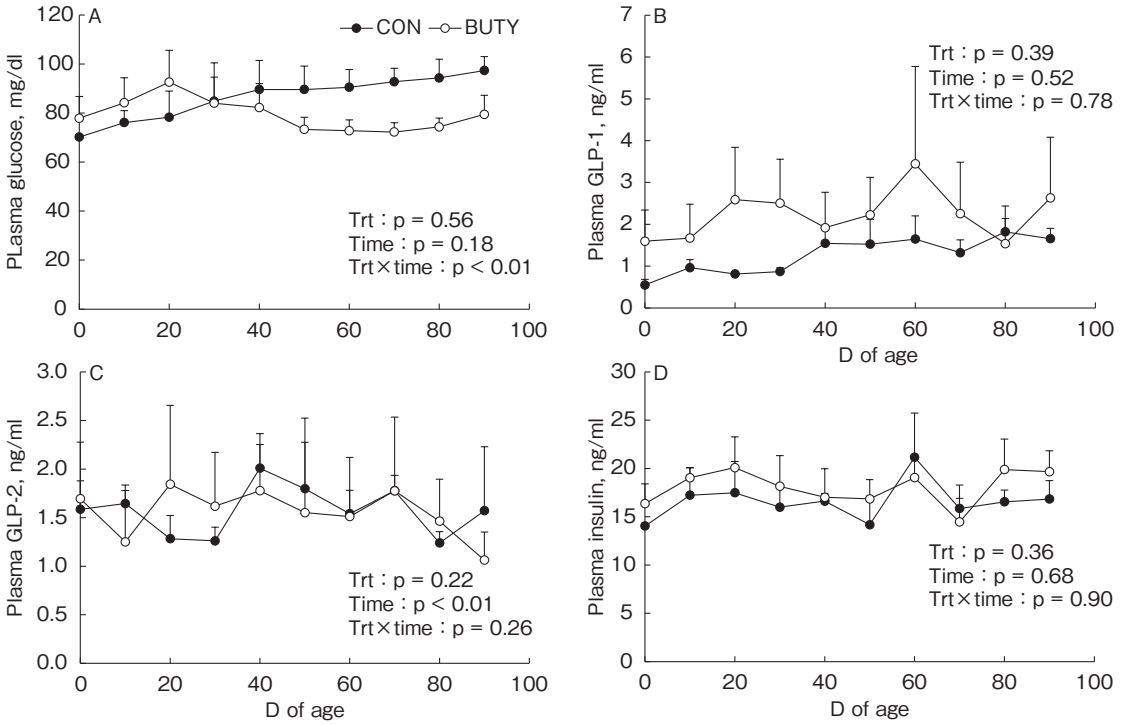


Fig. 4　Plasma glucose（A）, glucagon-like peptide 1（GLP-1）（B）, GLP-2（C）, and insulin（D）after milk replacer feeding for calves fed milk replacer with（BUTY）or without（CON）butyrate supplementation（n = 3 for each treatment）at 6 weeks after birth. Results are expressed as mean ± SE.

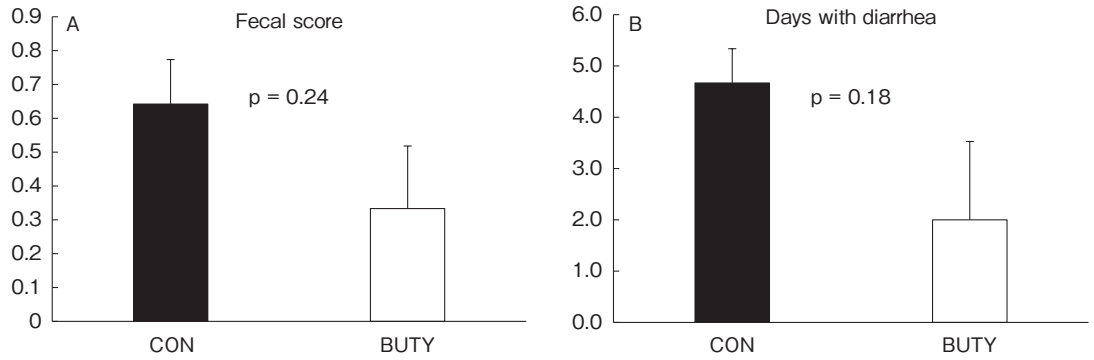


Fig. 5　Fecal score（A）and days with diarrhea（B）for calves fed milk replacer with（BUTY）or without（CON）butyrate supplementation（n = 3 for each treatment）. Results are expressed as mean ± SE. Days with diarrhea is sum of days when fecal score was 2 or higher.

作用増強作用等を有する。そこで本研究では，GLP-1分泌を促進する酪酸製剤の代用乳への添加が，高栄養哺育下における子牛の糖代謝能に及ぼす影響を検討した。ホルスタイン種メス子牛６頭を供試し，17～21％の酪酸を含有する酪酸製剤を１日あたり10 g市販代用乳に添加するBUTY区，あるいは酪酸製剤添加を実施しないCON区のいずれかに無作為に割り当てた（各n = 3）。飼料摂取量および発育成績（体重，体高および胸囲）は，酪酸製剤添加による影響を受けなかった。５週齢および８週齢に耐糖能試験を実施した結果，グルコース投与後の血漿グルコース，GLP-1およ

© The Ito Foundation

びインスリン濃度の推移に処理区間の差は認められなかった。７週齢時に実施した食餌負荷試験の結果，血漿グルコース濃度に処理と時間の交互作用が認められ（$p < 0.01$），血漿グルコース濃度はCON区において代用乳給与後に経時的に増加したが，BUTY区では増加しなかった。また，仮説とは対照的に，代用乳への酪酸製剤添加による血漿GLP-1濃度の増加は認められなかった。以上の結果から，本試験の条件下では代用乳への酪酸製剤添加はGLP-1分泌に影響しなかったが，代用乳摂取後の糖代謝に影響する可能性が示された。

文　献

1） Welboren, A. C., Hatew, B., López-Campos, O., Cant, J. P., Leal, L. N., Martín-Tereso, J., Steele, M., A.：*Journal of Dairy Science*, **104**, 5009～502, 2021.

2） Jiang, Y., Wang, Z., Ma, B., Fan, L., Yi, N., Lu, B., Wang, Q., Liu, R.：*Frontiers in Pharmacology*, **9**, 1168, 2018.

3） Inabu, Y., Haisan, J., Oba, M., Sugino, T.：*Domestic Animal Endocrinology*, **74**, 106528.

4） Elsabagh, M., Inabu, Y., Obitsu, T., Sugino, T. ；*Domestic Animal Endocrinology*, **60**, 31～41, 2017.

5） Inabu, Y., Murayama, K., Inouchi, K., Sugino, T.：*Animal Science Journal*, **90**, 1185～1192, 2019.

6） Renaud, D. L., Buss, L., Wilms, J. N., Steele, M. A.：*Journal of Dairy Science*, **103**, 10709～10714, 2020.

7） Górka, P., Kowalski, Z. M., Pietrzak, P., Kotunia, A., Jagusiak, W., Holst, J. J., Guilloteau, P., Zabielski, R.：*Journal of Dairy Science*, **94**, 5578～5588, 2011.

8） Liu, S., Wu, J., Wu, Z., Alugongo, G. M., Khan, M. Z., Li, J., Xiao, J., He, Z., Ma, Y., Li, S., Cao, Z.：*Animal Nutrition*, **10**, 399～411, 2022.

9） Kvidera, S. K., Horst, E. A., Abuajamieh, M., Mayorga, E. J., Sanz Fernandez, M. V., Baumgard, L. H.：*Journal of Dairy Science*, **100**, 2360～2374, 2017.

© The Ito Foundation

エコフィードを活用した有機肉用牛生産の環境影響評価

Life cycle assessment of organic beef production using food waste and by-product feed

堤　　道　生
（国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構西日本農業研究センター）

Michio Tsutsumi
（Western Region Agricultural Research Center, NARO）

Conventional beef production in Japan relies heavily on imported concentrate feed, resulting in important negative environmental effects. H Farm in Kushiro, Hokkaido, Japan, is a pioneering organic beef farm that uses only food waste and by-product feeds, called as "ecofeed", with farm-grown organic forage. In this study, a life cycle assessment was performed to assess the environmental impacts of organic beef production at H Farm compared with the conventional Japanese beef production method. The objective was to determine the degree to which environmental load is mitigated by using ecofeed to produce organic beef. The system boundaries were feed production, transportation, processing, animal management, enteric fermentation, manure, and its management. The functional unit was 1 kg of cold beef steer carcass. The assessment was focused on contributions to global warming, acidification, eutrophication, and energy consumption. The environmental impacts on climate change, acidification, eutrophication, and energy consumption were 81%, 88%, 96%, and 85% lower, respectively, using the H Farm feed production method than the conventional Japanese feed production method. Similarly, the environmental impacts on climate change, acidification, eutrophication, and energy consumption were 61%, 76%, 72%, and 62% lower, respectively, for the H Farm feed transportation process than the conventional Japanese feed transportation method. The environmental impacts on climate change, acidification, eutrophication, and energy consumption were 3%, 28%, 19%, and 75% lower, respectively, for the entire H Farm beef production method than the conventional beef production method without considering disposal of food waste and by-products (potential ecofeed materials) to landfill but 178%, 29%, 20%, and 80%, lower, respectively, when taking disposal of food waste and by-products to landfill into consideration. In conclusion, the environmental impacts were lower using ecofeed to produce organic beef at H Farm than using the conventional beef production system regardless of whether food waste and by-product disposal was taken into account.

© The Ito Foundation

１．目　　的

持続可能な開発目標（SDGs）が国内外に浸透しており，畜産業に対してもその持続可能性，とりわけ環境負荷が注目されるようになった。畜産物と農産物（マメ類など植物由来の代替食物）の生産に係る環境負荷を比較すると，温室効果ガス（greenhouse gas，GHG）排出量をはじめとする多くの項目で畜産物が上回る[1)]。このような分析結果を背景に，畜産の環境負荷に向けられる目が年々厳しくなっている[2)]。したがって，畜産における環境負荷低減に向けた新技術の開発と同時に，持続可能な畜産のあり方について現存の技術で可能な選択肢を考え，実践する必要がある。

わが国の畜産経営の特徴として，主に輸入穀物からなる濃厚飼料の多給があげられる。飼料の主な輸入先は米国，オーストラリア，ブラジル，アルゼンチンといった遠方の国であるため，長距離輸送に係る環境負荷が甚大となる。例えば，わが国の慣行肉用牛生産で排出されるGHGのうち，飼料生産および飼料輸送のプロセスがシステム全体の温室効果ガス排出量の約1/3を占める（後述）。したがって，飼料自給率の向上と飼料生産への資源投入の抑制が，わが国の畜産における環境負荷低減に向けてきわめて重要である。

「エコフィード」とは，食品製造副産物や余剰食品などを利用して製造された家畜用飼料である。エコフィードの給与は肉用牛生産に普及しつつあり，生産コスト削減に加え環境負荷低減への寄与も期待できる。輸入濃厚飼料をエコフィードで代替することにより，肉用牛生産における飼料生産と飼料輸送の双方に係る環境負荷の低減も可能と考えられる。

H牧場（北海道釧路市）は，自家産の有機牧草とエコフィードのみを給与する有機肉用牛（アバディーン・アンガス種）繁殖肥育一貫生産を行っている先駆的な経営体である。本研究では，同牧場の肉用牛生産に関する環境影響評価をライフサイクルアセスメント（LCA）の手法によって行い，その結果と慣行生産との比較によって，エコフィードを活用した有機肉用牛生産の環境負荷低減効果を定量化する。

２．方　　法

LCAとは，製品やサービスのライフサイクル全体（資源採取～原材料調達～製造～加工～組立～流通～使用～廃棄）あるいはその段階における環境負荷を定量的に評価する手法である。本研究では，LCAの手法を用いた環境影響評価を，H牧場における去勢雄牛生産を対象に実施した。さらに，黒毛和種の去勢雄牛の慣行生産についても同様に評価を行い，比較の対象とした。機能単位（LCAにおける評価の単位）は枝肉重量1 kgとした。システム境界は，飼料の生産・加工・輸送，家畜管理，消化管活動，排泄物およびその処理を含むものと定義した（**Fig. 1**）。

H牧場の生産システムにおける飼養管理，体重曲線，飼料生産および繁殖成績に関するデータについては2021～2022年の実測値を用いた（**Table 1**）。飼料の構成は，牧草（乾草，放牧草）およびエコフィードである（**Table 2**）。エコフィードの原料は，食品製造副産物（有機醤油粕，有機豆腐粕，有機フスマ，有機末粉，酒粕）および余剰食品（有機ナッツ類，有機ドライフルーツ類，有機小麦粉）であり，多くは北海道外から輸送されたものであった[3)]。繁殖雌牛および離乳までの子牛は季節放牧により飼養されていた。放牧地での採食量はエネルギー要求量と放牧草のTDN（可消化養分総量）に基づいて推定した[4)]。慣行生産システムについては，既報[5, 6)]を改変して飼養モデルを構築した。

インベントリ分析（環境負荷項目に関する入出

© The Ito Foundation

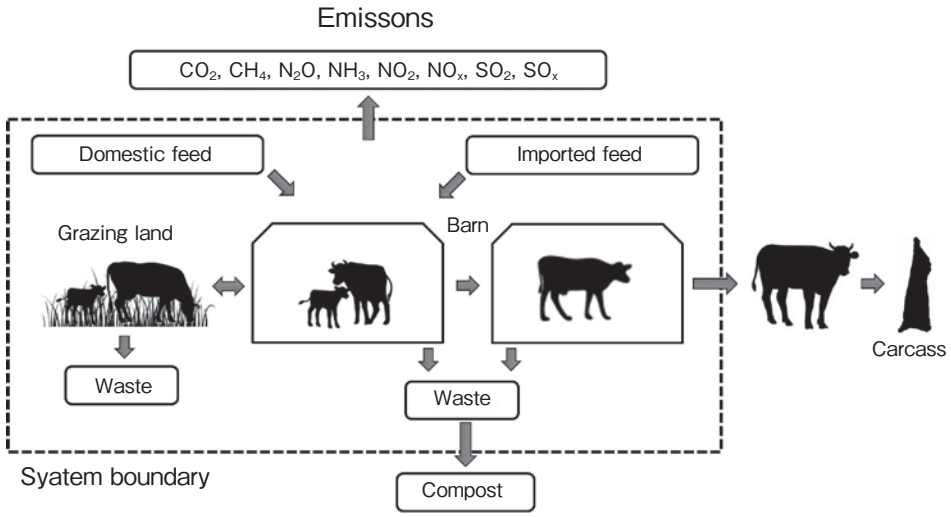


Fig. 1　Illustration of the beef production system investigated in this study

Table 1　Information about beef production in the conventional system and organic system using food waste and by-product feed (H Farm)

	Conventional	H Farm
Cow and calf		
Grazing period per year (d)	0	153
Age at first calving (d)	770	791
Calving interval (d)	406	365
Number of calves per cow	7	10
Lactation period (months)	3	6
Steer		
Age at slaughter (d)	899	824
Live weight at slaughter (kg)	799	770
Cold carcass weight (kg)	513	442

力明細一覧の作成）の対象は，二酸化炭素（CO_2），メタン（CH_4），一酸化二窒素（N_2O），アンモニア（NH_3），二酸化窒素（NO_2），窒素酸化物（NO_x），二酸化硫黄（SO_2），硫黄酸化物（SO_x）の排出量およびエネルギー消費量とした。インベントリ作成にはLCAシステムMiLCA ver.3.1.1.0[7]を使用し，LCIデータベースIDEA ver.3.1[8]を参照した。影響評価項目は気候変動，酸性化，富栄養化およびエネルギー消費量とした。

飼料生産，飼料輸送，舎内での家畜管理，消化管活動，排泄物および堆肥化（堆積発酵）過程における環境負荷を既報[9]に準じて計算した。エコフィード原料中の余剰食品のすべてに加え，醤油粕は，H牧場で飼料として活用されるまで産業廃棄物として埋め立て（堆肥化）処理されていた。また，豆腐粕や酒粕についても，一般に産業廃棄物として処理される割合が多いとされている。そこで，これらのエコフィード原料の製造および発生地までの輸送に関する環境負荷は考慮しないこととした。さらに，これらが埋め立て処理にされていたときに係っていた環境負荷を全体の環境負荷から差し引いた場合についても計算を行った。

© The Ito Foundation

Table 2　Feed composition for one marketed steer in the two beef production systems

	Conventional	H Farm
Roughage (kg DM)		
Imported		
Grass hay	881	—
Domestic		
Grass hay	3403	—
Rice straw	1098	—
Organic grass hay (farm grown)	—	4589
Organic grass (grazing)	—	2963
Concentrate (kg)		
Imported		
Alfalfa	292	—
Barley	1634	—
Corn	2606	—
Corn gluten feed	39	—
Soybean meal	431	—
Wheat bran	1653	—
Organic bran	—	325
Organic wheat feed flour (off grade)	—	322
Domestic		
Other by-product (organic)	—	8708
Other by-product (non-organic)	—	27
Food waste (organic)	—	792
Supplement		
Calcium carbonate	26	
Coral fossil	—	39
Vitamin supplement	—	2

３．結果と考察

H牧場の肉用牛生産システムにおける飼料生産および飼料輸送プロセスにおける気候変動への影響（GHG排出量）は，慣行生産と比較してそれぞれ81および61％低減されていた（**Fig. 2**）。一方，肉用牛生産システム全体で，廃棄物処理を考慮しない場合には３％の低減にとどまった。これはH牧場における消化管活動由来のメタン排出量が慣行生産のそれを大きく上回るためであった。有機JAS規格では，一部の期間を除き，給与飼料に占める粗飼料比率を50％以上とすることが定められており[10]，H牧場もこれに従っている。消化管活動によるメタン排出量は乾物摂取量の増加とともに上昇するため，上記のような結果に至ったと考えられる。翻って，廃棄物処理を考慮する場合，気候変動への影響は178％低減されていた。埋め立て処理では大量のメタン（79 g CH_4/kg）が排出される[8]ため，潜在的なエコフィード原料を廃棄物として処理せずにエコフィードとして活用することで，気候変動への影響の低減幅が一般的な肉用牛生産に係る影響を大幅に上回ることが明らかとなった。

H牧場の飼料生産における酸性化，富栄養化への影響およびエネルギー消費量は，慣行生産と比較してそれぞれ88，96および85％低減されていた。飼料輸送プロセスでは同様に，76，72および62％低減されていた。肉用牛生産全体では，廃棄物処理を考慮しない場合，同様に28，19および75％低減されていた。廃棄物処理を考慮すると，同様に，29，20および80％低減されていたが，廃棄物処理を考慮しない場合と大差なかった。埋め

© The Ito Foundation

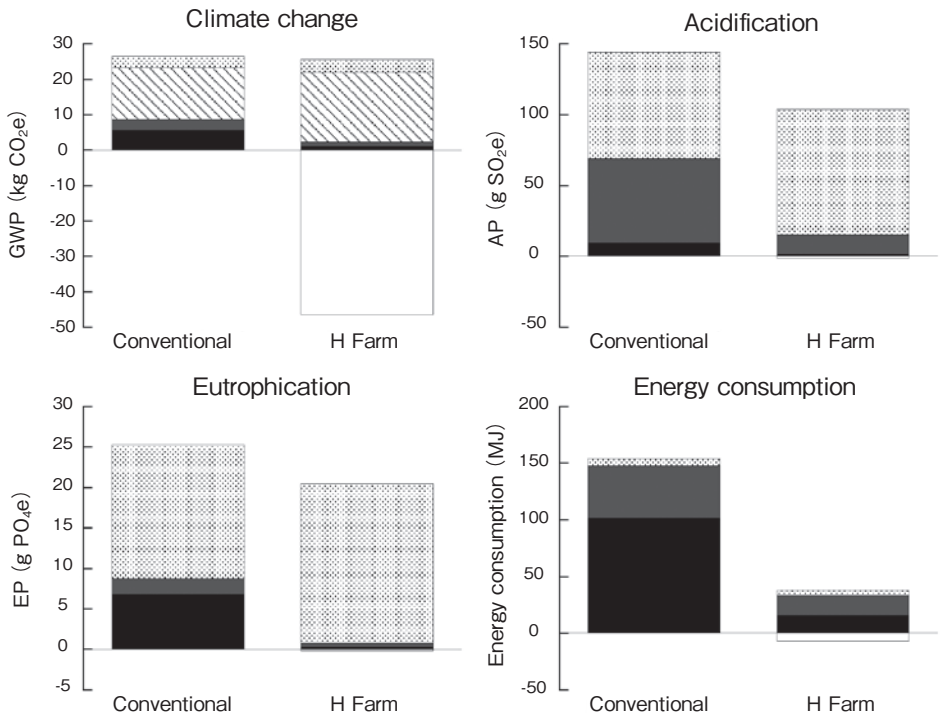


Fig. 2　Environmental impacts on climate change (GWP), acidification (AP), eutrophication (EP), and energy consumption caused by the two beef production systems, and the contribution of each process (per kilogram of cold steer carcass).
Dotted, hatched, gray, black, and white indicate animal management (including excreta and composting), enteric fermentation, feed transportation, feed production, and landfill disposal, respectively.

立て処理における酸性化，富栄養化への影響およびエネルギー消費量は小さく，廃棄物処理のプロセスでは輸送による環境負荷がほとんどを占めていた。

H牧場におけるエコフィードを活用した有機肉用牛生産では，慣行生産と比較して環境負荷が低減されることを示した。ただし，廃棄物処理を考慮しない場合の気候変動への影響における低減幅は小さかった。エコフィードの産地の多くは北海道外であり，長距離輸送による環境負荷増大も懸念されたが，その影響は小さかった。エコフィードとして活用可能な原料が多く廃棄物処理される現状では，処理のプロセスを考慮することが適切と考えられる。一方，将来的にエコフィード原料がすべて有効活用されるようになれば，この考え方を改める必要がある。

4．要　　約

自家産の有機牧草とエコフィードのみを給与する有機肉用牛繁殖肥育一貫生産を行っている先駆的な経営体（H牧場，北海道釧路市）の肉用牛生産システムに関する環境影響評価をライフサイクルアセスメント（LCA）の手法によって行い，その結果と慣行生産との比較によって，エコフィードを活用した有機肉用牛生産の環境負荷低減効果を定量化した。H牧場の飼料生産における気候変動，酸性化，富栄養化への影響およびエネルギー消費量は，慣行生産と比較してそれぞれ81，88，96および85％低減されていた。飼料輸送プロセスでは同様に，61，76，72および62％低減

© The Ito Foundation

されていた。肉用牛生産システム全体での環境負荷低減効果は，エコフィード原料の廃棄物処理を考慮しない場合，気候変動，酸性化，富栄養化への影響およびエネルギー消費量でそれぞれ３％，28，19および75％であった。廃棄物処理を考慮すると，環境負荷削減効果は同様に，178，29，20および80％であった。このように，H牧場におけるエコフィードを活用した有機肉用牛生産システムでは，廃棄物処理の考慮の有無に関わらず，慣行生産と比較して環境負荷が低減されることが示された。

文　献

1） Poore, J., Nemecek, T.：Reducing food's environmental impacts through producers and consumers, *Science*, **360**, 987～992, 2018.

2） Willett, W., Rockström, J., Loken, B., Springmann, M., Lang, T., Vermeulen, S., Garnett, T., Tilman, D., Wood, A., DeClerck, F.：Our food in the Anthropocene：the EAT-Lancet Commission on healthy diets from sustainable food systems, *Lancet*, **393**, 447～492, 2019.

3） 堤道生，青山次郎，榛澤孝：有機肉用牛生産で給与実績のあるエコフィードの原料，北海道畜産草地学会報, **11**(2), 28, 2023.

4） 農業・食品産業技術総合研究機構：日本飼養標準・肉用牛(2008年版)，55～153, 中央畜産会, 東京, 2009.

5） Ogino, A., Kaku, K., Osada, T., Shimada, K.：Environmental impacts of the Japanese beef-fattening system with different feeding lengths as evaluated by a life-cycle assessment method, *Journal of Animal Science*, **82**, 2115～2122, 2004.

6） Ogino, A., Orito, H., Shimada, K., Hirooka, H.：Evaluating environmental impacts of the Japanese beef cow-calf system by the life cycle assessment method, *Animal Science Journal*, **78**, 424～432, 2007.

7） サステナブル経営推進機構：LCA システム MiLCA ver.3.1, サステナブル経営推進機構, 東京, 2023.

8） 産業技術総合研究所：LCI データベース IDEA ver.3.1, 産業技術総合研究所, つくば, 2022.

9） Tsutsumi, M., Ono, Y., Ogasawara, H., Hojito, M.：Life-cycle impact assessment of organic and non-organic grass-fed beef production in Japan, *Journal of Cleaner Production*, **172**, 2513～2520, 2018.

10） 農林水産省：有機畜産物の日本農林規格, 2～8, 農林水産省, 東京, 2022.

© 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（Ⅱ）

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

権藤崇裕
（宮崎大学フロンティア科学総合研究センター）

Takahiro Gondo
（Frontier Science Research Center, University of Miyazaki）

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 have conducted a winter simulation study of the *NYC1* knockout mutant in *Z. matrella* prior to pasture research, and it was found that this mutant maintains leaf greenness for a long period under low temperature and short day conditions. Next, we will produce null-segregants without the transgene vector in the selfed progeny of the *NYC1* mutant. In pasture bahiagrass, a genome-editing vector targeting the *SGR* gene was constructed and transformants were generated, but the genome-editing efficiency（8.7%）, with the mutation inserted in the target sequence, was low. In the future, compacting and optimizing the genome-editing vectors will provide the basis for applying to the warm-season grasses.

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

© The Ito Foundation

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，植物の分野においては，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（ゲノム編集技術応用食品および添加物食品衛生上の取扱い要領2019年９月19日　大臣官房生活衛生・食品安全審議官決定）。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，前年度の本研究助成（R04）において，コウシュンシバ（*Zoysia matrella*）について，初めてゲノム編集に成功しており，クロロフィル分解遺伝子である*NYC1*に変異を挿入した編集個体を作出し，本遺伝子が変異することでクロロフィルの分解が抑制されることを明らかとした。また，牧草ではバヒアグラス（*Paspalum notatum*）について，*SGR*遺伝子を単離し，本遺伝子がクロロフィル分解に関与していることを発現解析により明らかとしている。本年度は，コウシュンシバにおいて冬期再現試験を実施し，冬期の日長と低温が*NYC1*変異体にどのように影響するのか，クロロフィル含量を経時的に調査した。また，バヒアグラスでは*SGR*遺伝子を標的にゲノム編集ベクターを構築し，変異体の作出を試みた。

２．方　　法

＜コウシュンシバ*NYC1*変異体の冬期再現試験＞

2.1　*NYC1*変異体の育成

得られたゲノム編集個体は，前年度（R04），*NYC1*標的配列の変異パターンから５つの遺伝子型に分けられた。すなわち，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種類のゲノム（ＡサブゲノムおよびＢサブゲノム）を持っているため，それぞれ遺伝子型は，野生型（WT）のAABBと変異型のAaBb，AAbb，AaBb，aabbで分類され，本試験に用いた。

それぞれの遺伝子型に分類された植物体は，土への順化後，３ヶ月間グロスチャンバーで生育させた後，直径10 cmのポットに移し，温室にて生育させた。その後，植物体は15 mmに刈り取り，42日後に写真を撮影した。また，温室で生育させて約７ヶ月目において，分げつ数を測定した。

2.2　*NYC1*変異体の冬期再現試験

野生型と*NYC1*完全ホモ型のゲノム編集個体19-1（aabb）を用いて，冬期再現試験を行った。両系統は，グロスチャンバーで３ヶ月間育成したものであり，それぞれ冬期再現試験として，５℃，８時間明期/16時間暗期の低温短日条件下で育成し，試験０日目，14日目，28日目，42日目のクロロフィル含量を測定した。クロロフィル含量の分析は，上記の試験日に経時的にサンプリングし，第２葉の展開葉葉身２cmを用い，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*遺伝子のゲノム編集＞

2.3　ゲノム編集ベクターの構築

ゲノム編集で標的となるガイドRNAは，前年度

© The Ito Foundation

（R04）バヒアグラスより単離した*SGR*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。設定したガイドRNAは，*Pvu*Ⅱ制限酵素サイトを含む5'-CATCAACCGCGCGCAGCTGC-3'の20 bpであり，この配列をゲノム編集ベクター（pZB_gYSA_MMCas9，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。

2.4　形質転換およびゲノム編集個体の選抜

形質転換に用いるバヒアグラスのエンブリオジェニックカルスは，完熟種子より誘導され，2 mgl^{-1} 2,4-D，0.1 mgl^{-1} BAP，50 μM $CuSO_4$および0.3％ゲランガムを添加したMS固形培地（DBCH培地）で継代培養（31℃，明条件下）しているものである。形質転換は，Gondoら[6]のパーティクルガン法により行い，ビアラホス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（*Pvu*Ⅱ）で処理した後，バンドパターンの違いにより，変異の有無を確認した。変異が認められたカルス系統は，再分化培地に移植し，1/2MS培地で発根させた植物体について同様に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。

3．結果と考察

＜コウシュンシバ*NYC1*変異体の冬期再現試験＞

3.1　*NYC1*変異体の生育と表現型

温室で3ヶ月間育成された*NYC1*変異体は，その変異遺伝子型のパターンによって，植物の成長に影響を及ぼした（**Fig. 1a**）。ヘテロ型変異体（AaBb）は，WT（AABB）と同様の成長を示し，片方のサブゲノムがホモ型の変異体（AAbbおよびAabb）は，WTと完全ホモ型の変異体（aabb）の中間の成長であった。完全ホモ型の変異体は，WTと比較して成長がかなり遅く，すべての遺伝子型の中で最も成長が滞っていた。**Fig. 1b**は，温室で7ヶ月間生育させた*NYC1*変異体の分げつ数をまとめたものである。3ヶ月目の成長と同様に，完全ホモ型の変異体（aabb）は，すべての遺伝子型の中で最も分げつ数が低く，生育の遅延が認められた。このことは，*NYC1*のノックアウトによりクロロフィルbの分解が抑制され，クロロフィルa/bの比率が変化することで光エネルギーの吸収バランスに偏りが生じ，成長阻害が起きているものと考えられる[7]。

3.2　*NYC1*変異体の冬期再現試験における常緑性の維持とクロロフィル含量の推移

WTと完全ホモ型変異体19-1（aabb）について，低温短日条件の冬期再現試験を行った。**Fig. 2**は，試験0日目，14日目，28日目，42日目の植物体の経時変化とクロロフィル含量を測定した結果である。WTは試験28日目には，葉の先端が黄化しはじめ，42日目には植物体の半分近くに広まった。一方，変異体19-1は，42日目に葉の先端の黄化がはじまる程度であり，葉の緑色を長期間維持していた（data not shown）。葉のクロロフィル含量は，0日目においても変異体19-1がWTよりも有意に高く，42日目で2倍程度のクロロフィル含量を保持しており（**Fig. 2a**），上記の

© The Ito Foundation

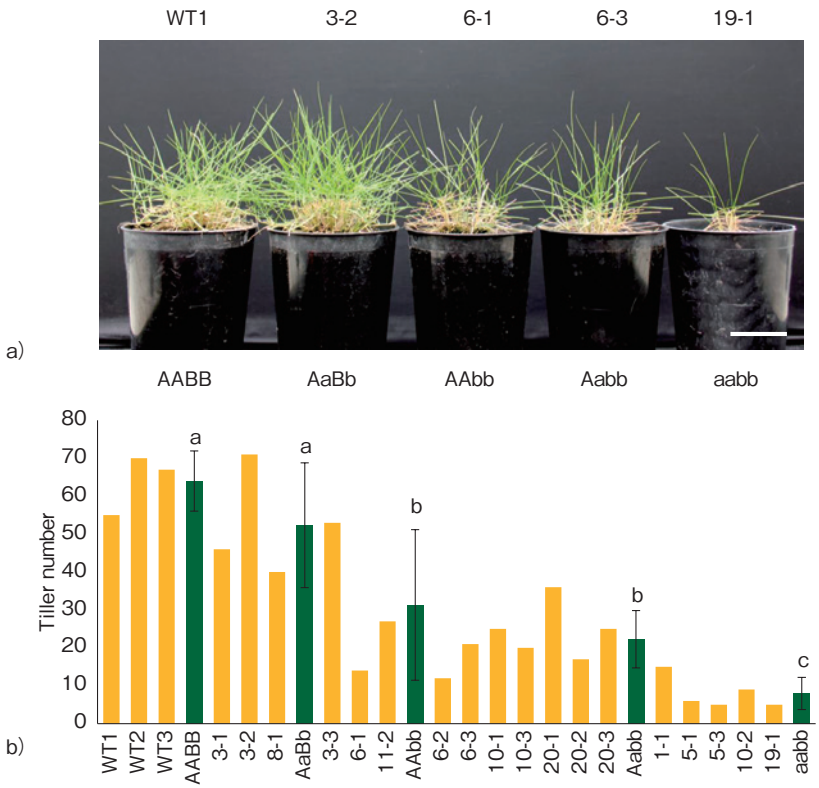


Fig. 1　Phenotypic and tiller number comparison between wild type（WT）and *ZmNYC1* mutant lines for each genotype.（a）The representative photos of mutant lines for each genotype compared with wild type（WT）. Scale bar: 5 cm.（b）Tiller number. Mean of genotypes are the values of plant lines of the same genotype. Error bars represent the standard deviation（SD）. Letters represent significant differences determined by one-way ANOVA with a post hoc LSD test（$p< 0.05$, $n \geq 3$）.

葉の緑度維持の結果を支持する結果となった。クロロフィルaは全体的に変異体19-1が高い傾向であったが（**Fig. 2b**），クロロフィルbのほうが含量の差が大きく，42日目で変異体19-1が３倍程度高い値を示した（**Fig. 2c**）。このことから，クロロフィルa/b比は，変異体19-1で有意に低い結果となった（**Fig. 2d**）。

以上のことから，*NYC1*変異体は冬期再現試験において緑度を長期間維持するものの，完全ホモ型変異体は成長が遅いことが明らかとなった。今後，品種育成を展開するには，完全ホモ型変異体（aabb）だけではなく，片方のサブゲノムがホモ型の変異体（AAbbおよびAabb）も有望な育種素材として活用し，自殖後代からベクターが除去されたヌル分離個体を選抜する必要がある。

＜バヒアグラス*SGR*遺伝子のゲノム編集＞

3.3　ゲノム編集個体の獲得および標的配列の変異

バヒアグラスの形質転換は，パーティクルガン法により行い，合計960個のカルスを供試したところ，23個の形質転換カルスが得られた（形質転換効率は2.4％）。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，２系統（T16，T17）で変異の挿入を示すバンドが認められた（**Fig. 3**）。シーケンス解析では，これらの系統はPAM配列の上流３，４塩基目で塩基の置換やインデルが検出され，本実験のゲノム編集効率は8.7％（2/23）であった。次に，変異が認められた２系

© The Ito Foundation

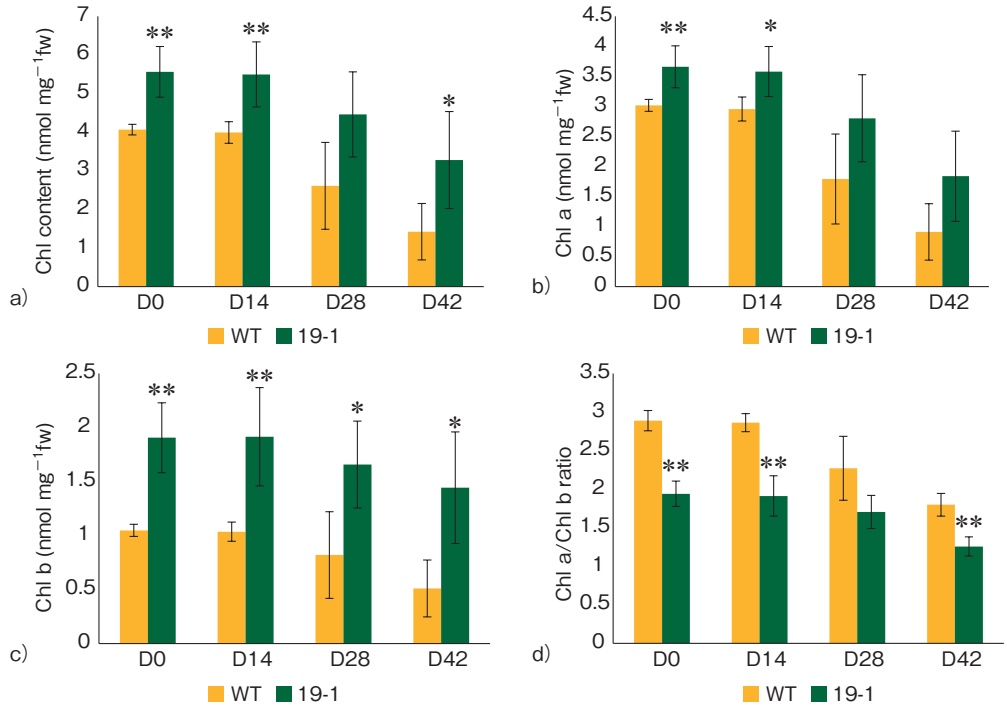


Fig. 2　Chlorophyll contents of *ZmNYC1* knockout mutant line 19-1 under winter simulation test. (a) Chlorophyll content, (b) Chlorophyll a content, (c) Chlorophyll b content, and (d) Chlorophyll a / Chlorophyll b ratio for WT and line 19-1 at Day 0, 14, 28 and 42. Error bars represent the standard deviation (SD). Asterisks indicate significant differences on each treatment day determined by Student's t-test (*$p \leq 0.05$ and **$p \leq 0.01$, n = 4).

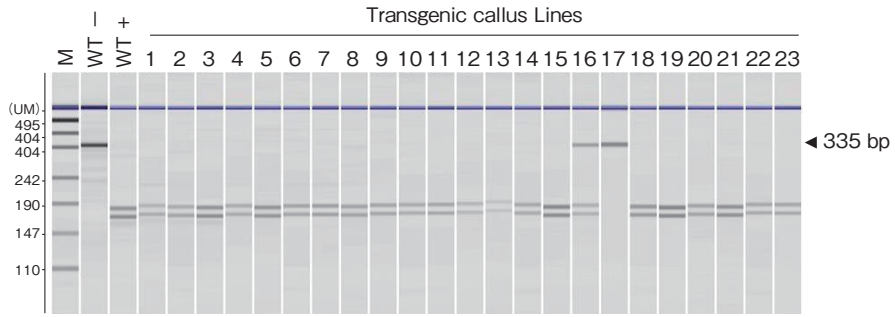


Fig. 3　Confirmation of mutations of 23 transgenic callus lines by PCR and restriction with *Pvu*Ⅱ in bahiagrass. PCR products amplified by primers F179 and R514 were digested with *Pvu*Ⅱ. Lane M shows pUC19 DNA/MspI (HpaII) marker. Lanes labelled WT+ and WT− are PCR fragments amplified from WT plants with and without *Pvu*Ⅱ digestion. Lanes 1-23 show blots of PCR fragments amplified from transgenic callus lines digested with *Pvu*Ⅱ. The bands marked arrows of transgenic callus lines are caused by CRISPR/Cas9-induced mutation.

統の再分化植物体でCAPS解析を行ったところ，２系統ともに変異の挿入を示すバンドが検出された（**Fig. 4**）。また，これら再分化個体のシーケンス解析を行った結果，系統T16は片方のアレルでCからAの塩基置換，系統T17は片方のアレルで１塩基（A）の挿入が他方のアレルで４塩基（CAGC）の欠失が確認された（**Fig. 5**）。

以上の結果より，*SGR*標的遺伝子座に変異が

© The Ito Foundation

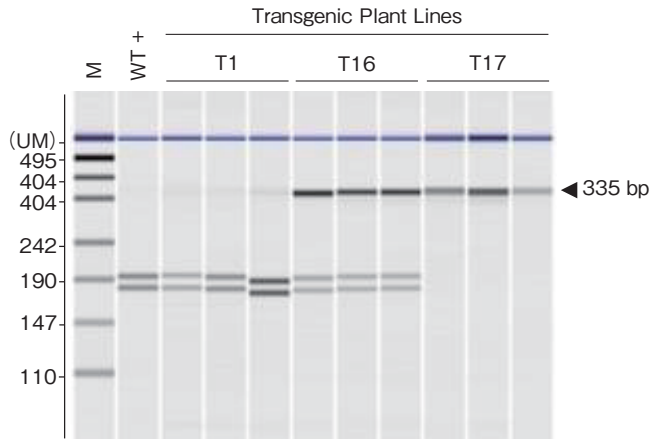


Fig. 4　Confirmation of mutations by PCR and restriction with *Pvu* Ⅱ in bahiagrass transgenic plant lines. PCR products amplified by primers F179 and R514 were digested with *Pvu* Ⅱ. Lane M shows pUC19 DNA/MspI (HpaII) marker. Lanes labelled WT+ are PCR fragments amplified from WT plants with *Pvu* Ⅱ digestion. Lanes T1, T16, T17 show blots of PCR fragments amplified from independent regenerated transgenic line digested with *Pvu* Ⅱ. The number corresponds with the transgenic callus number in Fig. 3. The bands marked arrows of transgenic plant lines are caused by CRISPR/Cas9-induced mutation.

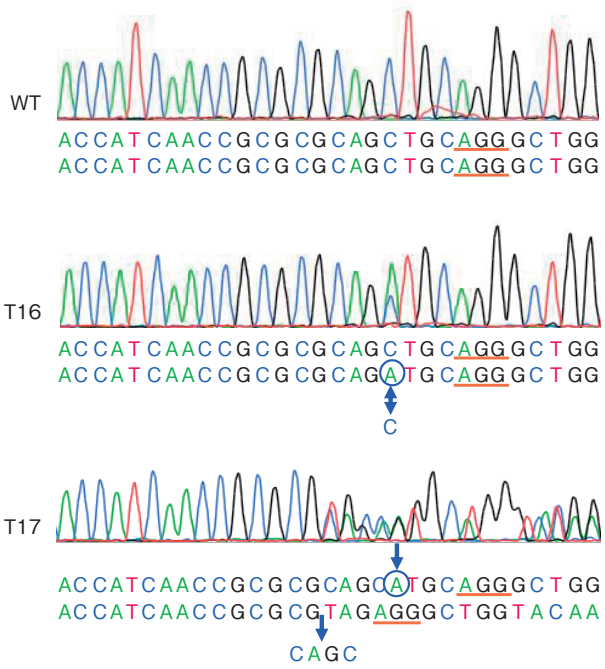


Fig. 5　Chromatograms of DNA sequencing of target region of WT and two mutated transgenic plant lines. Sequences from target region were obtained by direct sequencing of PCR products. PAM sequence is underlined; the arrowhead indicates the insertion, deletion and replacement. The sequence is shown allelic information.

挿入された個体を獲得することができたものの，そのゲノム編集効率はこれまでの報告に比べ低いものであった[8]。この大きな要因として，用いたベクターがアグロバクテリウム用のバイナリーベ

© The Ito Foundation

クターであるためベクターサイズが大きく，パーティクルガン処理でベクターが断片化した可能性があること，また，今回用いた*Cas9*がイネに最適化されたものであり，バヒアグラスに有効でなかった可能性が考えられる。今後，これらの問題を解決するため，同じC4型草種のトウモロコシに最適化された*Cas9*を保持するコンパクトなプラスミドベクターを構築し，種々の暖地型イネ科牧草類のゲノム編集に適用できる基盤を整備する。

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*完全ホモ型変異体の冬期再現性試験を行い，本変異体は低温短日条件下においても葉の緑度を長期間維持することが明らかとなった。今後は，*NYC1*変異体の自殖後代より，導入ベクターが除去されたヌル分離個体を作出する。牧草のバヒアグラスでは，*SGR*遺伝子を標的にゲノム編集ベクターを作出し，形質転換体を作出したものの，標的配列に変異が挿入されたゲノム編集効率（8.7％）は，低い結果であった。今後は，ゲノム編集ベクターのコンパクト化および最適化により，暖地型イネ科牧草類のゲノム編集に適用できる基盤を整備する。

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） Gondo, T., Tsuruta, S., Akashi, R., Kawamura, O., Hoffmann, F.：*Journal of Plant Physiology*, **162**, 1367～1375, 2005.
7） Ng, H. M., Gondo, T., Tanaka, H., Akashi, R.：*Plant Cell Reports*, 43, Article No. 50, 2024.
8） Ku, H. K., Ha, S. H.：*Front. Plant Sci*, 11, Article No. 577313, 2020.

© The Ito Foundation

牧草の利用価値向上を目指したデジタルフェノタイピング技術による効率的な育種と栽培管理技術の開発

Development of an efficient breeding and management method using the digital phenotyping technique

田　中　秀　典
（宮崎大学農学部）

Hidenori Tanaka
(Faculty of Agriculture, University of Miyazaki)

This study aimed to establish a trait evaluation method using digital 3D model technology and to link the results with genomic information, thereby creating a foundation for developing new varieties with enhanced agricultural productivity. The evaluation of traits from digital 3D models began with 62 zoysiagrass accessions (*Zoysia japonica*, *Zoysia matrella*, *Zoysia pacifica*) collected throughout Japan, followed by the reconstruction of the models for bahiagrass, rhodesgrass, teffgrass, and soybean. This process involved the reconstruction of models to measure grass height, area from the top view, color information by GRNDI (green–red normalized difference index), and volume over time. These 3D models were obtained with accuracy suitable for field analysis of fields with mixed seeding of multiple grasses using UAV (unoccupied aerial vehicle). However, due to the extremely large file sizes of 3D models, careful consideration regarding the balance between analysis accuracy and file size was deemed necessary. In addition, the polymorphic information of 64 zoysiagrass accessions was obtained by the GRAS-Di method. Incorporating these results with methods such as DNA marker detection will lead to promising results, leading to the development of a new breeding framework.

1．目　　的

日本シバ（*Zoysia*属）は，その造成のために投入する労力や資材が少ないため，放牧を目的とした低投入型草地を形成するための重要な牧草である。しかしながら，近年ではセンチピードグラスやカーペットグラスなどの導入シバ草地も見られ，その単位面積あたりの被度は日本シバより高い。しかし，これらは外来種であり，生物多様性保全の観点からは，その積極的利用は好ましいとは言えない。そこで著者らは，これまで日本各地から300点以上の日本シバを収集し，そのゲノム解析[1)]と多様性の調査[2)]や，この系統を使った品種育成[3)]などを行っている。ほかにも，遺伝子組換え法[4)]やゲノム編集技術の確立などにも取り組んでいるが，これらの技術は学術的に意義深いものである一方，市場に受け入れられ利用拡大に直接つながるかは未知である。そこで，従来からの育種法により品種を育成し，その栽培管理をすることも引き続き強く求められるが，そのためには

© The Ito Foundation

多大な労力と時間を要する。

本研究では，デジタル３Ｄモデル技術を駆使した形質評価法を確立し，人の手で行うことが困難な評価を低労力で達成することと，その結果をゲノム情報と結びつけることで，高い牧養力を持つ新しい品種育成を行うための基盤構築を目標とする。さらに，この構築した３Ｄモデルを，日本シバとその他草種が混在した牧草地に適用することで，データに基づいた効率的な栽培管理法の確立に貢献することを目的とする。

２．方　法

2.1　供試材料

シバはこれまでに日本全国から収集した３種（*Z. japonica*，*Z. matrella*，*Z. pacifica*）計62系統を使用した。その他草種が混在した牧草地に適用することを目的として，バヒアグラス，ローズグラス，テフグラスも各１系統使用した。さらに，牧草と混播して使用することを目的として，ダイズ品種フクユタカも使用した。

2.2　ポット栽培と全周囲画像の取得

デジタル３Ｄモデルを構築することを目的としたポット栽培は，宮崎大学農学部のフィールドに設置した温室にて，1/5000 a ワグネルポットにて栽培（各２反復）した。この各ポットを，約１週間ごとに，これまでに構築した前周囲画像撮影システムにて撮影した[5)]。

2.3　３Ｄモデルの構築と植物体の分離

１ポットあたり144枚の取得した画像をMetashape（Agisoft）により３Ｄモデルを再構築した。撮影した画像から高精細な３Ｄモデルを再構築するには各画像の位置合わせが重要であるため，撮影時にランダムドットパターン等を配した３本のポールを一緒に撮影している[6)]。解析時にこれらは不要であるため，人工ニューラルネットワーク（ANN）アルゴリズムによる深層学習にて構築した学習モデルを適用し，構築した３Ｄモデルから植物体だけを分離した[5)]。

2.4　分離した植物体からの形質値取得

草高は，ポット底面から最も高い位置のポイントまでの高さからポットの高さを差し引いた値を使用した。次に上面からの面積，すなわち植物体の広がりは，３Ｄモデルから上面の２Ｄ画像を生成し，OpenCVライブラリにより輪郭を検出し求めた。植物体の色情報は，３Ｄモデルの各ポイントのRGB値よりGRNDIとして求めた[7)]。体積は，まずポイントクラウドの状態である３Ｄモデルをボクセル化し，そのボクセル数を数えることで算出した。なお，１ボクセルは0.027 cm^3とした。これらの解析は，著者らがこれまでに開発しGitHubにて公開しているシバの解析スクリプトを一部改変して実行した（https://github.com/sandysan42/Zoysia3DModel/）。

2.5　圃場の撮影と解析

圃場における撮影は，UAV（DJI Air 2S）を用いて約３m上空から行った。撮影時に，色情報を補正するためカラーチャートと位置合わせのためのマーカーを同時に撮影した。撮影した画像は，Metashapeにより，傾きのない正しい大きさと位置に表示されたオルソ画像に変換し対象物の高さと色を推定した。

2.6　遺伝的多型の取得

使用したシバ64系統の葉より全DNAを抽出した。抽出したDNAの濃度および純度を確認し，遺伝的多型をGRAS-Di法によるランダムPCRで調整を行い，Illumina NovaSeq（PE150）によりシーケンシングした。取得したデータは，アダプター配列除去と低品質配列のトリミングをcutadaptにて行った後，全ゲノム解析されている*Z. japonica* ‘Nagirizaki’のPseudomolecule[1)]をリファレンス配列としてBWAにてマッピングを行った。その後，GATKにて変異解析を行い，検

© The Ito Foundation

出された変異に対して参照配列の遺伝子構造に基づくアノテーションをSnpEffにて行った。

３．結果と考察

3.1　３Ｄモデルの構築と計測

著者らは，これまでにシバにおいて３Ｄモデルの構築を行い，そのモデルからランダムドットパターン等を配した３本のポールおよび栽培用のポットをANNアルゴリズムによる機械学習にて分離することに成功している[5)]。今回は，撮影したシバだけでなく，バヒアグラス，テフグラス，ローズグラスにおいても同様のアルゴリズムと学習セットを適用し，分離を試みた。その結果，すべての草種において正常に分離することに成功した（**Fig. 1**）。ポットの撮影は，１ポットあたり約７分で完了し，その画像データ量はおおむね27 MBであった。この３Ｄモデル構築から植物体の分離までに要する時間は，解析に使用するコンピュータ処理速度に大きく依存するが，Intel Core i5-13400 F にNVIDIA GTX1080Tiを載せたパソコンで１ポットあたり約１時間を要し，そのポイントクラウドのデータ容量はおおむね１～50 MBの範囲であった。解析に要する時間やファイル容量は基本的に成長に従い大きくなるため，今回の場合は，テフグラスが最もファイル容量が小さく短時間で解析が完了した一方，ローズグラスは解析に時間がかかり，生成されたファイル容量も大きくなる傾向が確認された。今後，さらに大型の牧草を解析する際には，撮影時の解像度や構築する３Ｄモデルのポイント数の間引きなどを行い，解析精度とファイル容量のバランスについて詳細な検討が必要であると考えられた。

次に，この分離した３Ｄモデルから，草高，上面からの面積，色情報，体積を経時的に取得した。

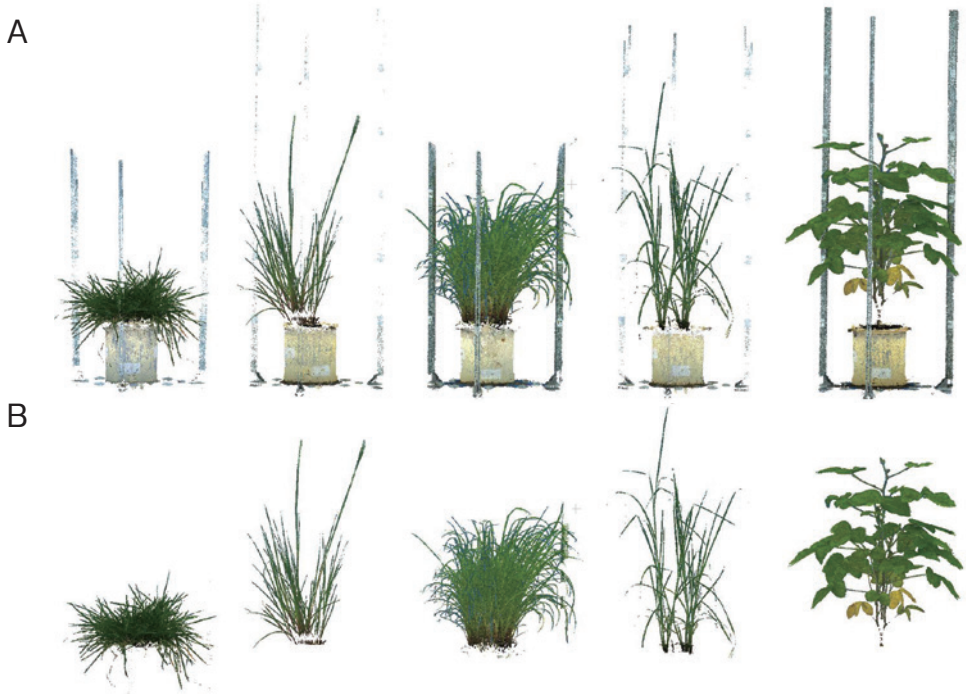


Fig. 1　Post-processing for reconstructed 3D models of various plants. (A) Reconstructed 3D model ; (B) retained plant parts by ANN segmentation method. Zoysiagrass, bahiagrass, rhodesgrass, tefgrass, and soybean from the left to the right.

© The Ito Foundation

Fig. 2 に撮影した62系統の３種の*Zoysia*属の中から代表的なものを示した。これまでの*Zoysia*属の分類のとおり[8]，主に北方に自生する*Z. japonica*は大型，南方に自生する*Z. pacifica*は小型で，*Z. matrella*はその中間的な形質を示している。また，冬季の休眠性が高い*Z. japonica*の色情報は速く低下し，ついで*Z. matrella*，*Z. pacifica*となっている。また，体積も既報の方法[5]に従い，正常に推定できた。図として示した系統以外についてもおおむね同様の結果を示し，これまでの知見[2]と大きな差異は見られなかったことから，正常に形質を評価できたと考えられた。

今後のフィールドでの数種牧草の混播時にUAVで上空から撮影し独立して各牧草を検出，計測することを目的として，バヒアグラス，ローズグラス，テフグラスについても同様に３Ｄモデルを構築して計測を行った（**Fig. 3**）。これらの植物種も*Zoysia*属と同様に経時的に形質値を取得することができた。バヒアグラス，テフグラスにおいて，色情報であるGRNDIが播種後約２週間の時点で一度低下している。GRNDIは植物体全体の色情報の平均値として計測しているため，植物体が小さい間は，一部の色の変化が全体へ与える影響が大きいことにより生じていると考えられる。今後，全体の平均ではなく特定の器官の色情報にする，一定エリアの色情報を除外するなど，実際のカラーチャート等を使った目視での値との差異を補正するなどの対策が必要であると考えられる。

3.2　圃場における撮影と解析

今年度は，イネ科牧草としてシバを，混播するマメ科牧草としてダイズを用いて，それぞれ独立した条件でUAVによるデータ取得を行い，高さを推定した。この推定した高さと，実際に手計測した高さの差は，シバで約５％，ダイズで約10％の誤差を示した。次に，撮影した画像を用いて３Ｄモデルを構築し，ANNアルゴリズムによる深層学習にて植物体を独立して検出することを試み

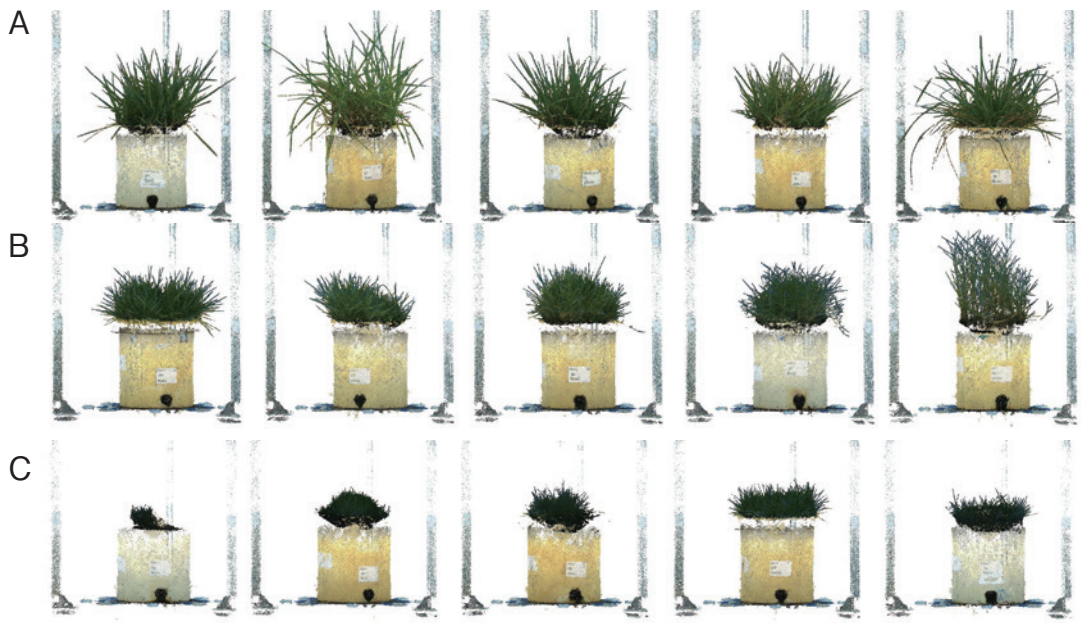


Fig. 2　Reconstructed 3D models of Zoysiagrasses. These models were reconstructed from images taken between September 18 and 20, 2024.（A）*Zoysia japonica*；（B）*Zoysia matrella*；（C）*Zoysia pacifica.*

© The Ito Foundation

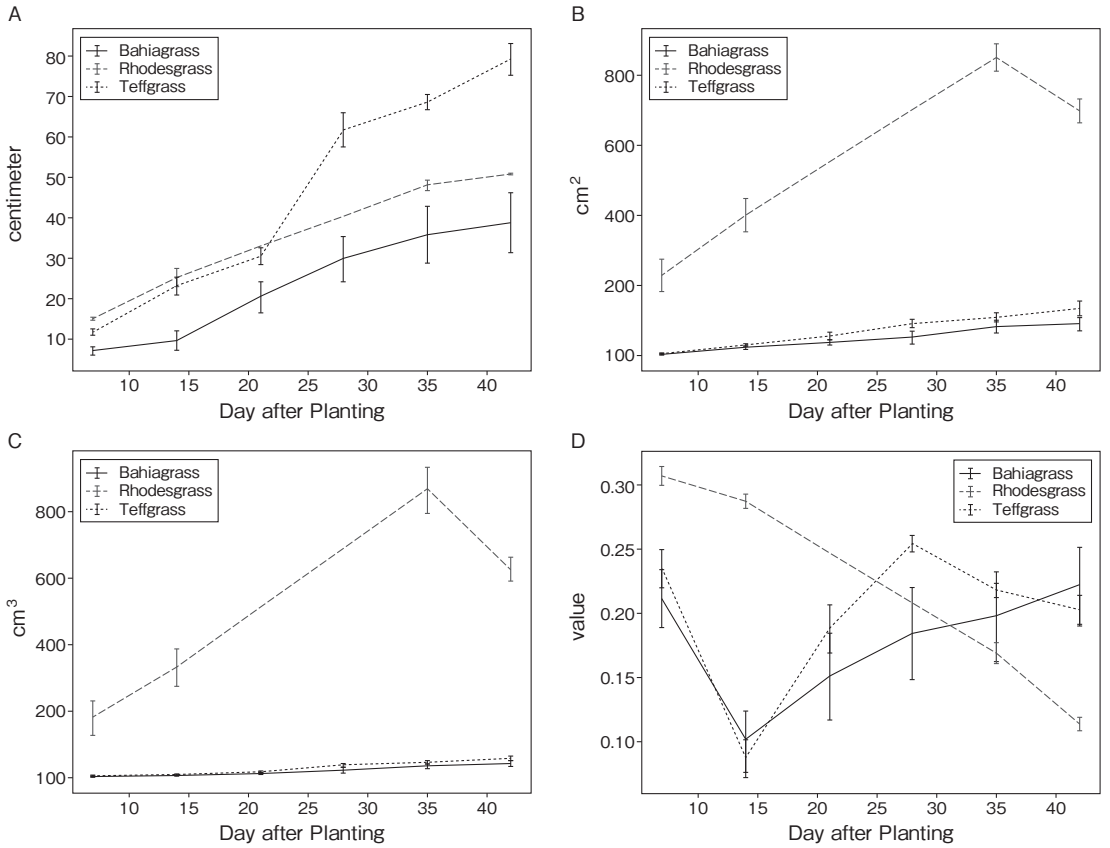


Fig. 3　Growth analysis using 3D estimated traits of various plants. (A) Height ; (B) Area ; (C) Volume ; (D) Green-red normalized difference index (GRNDI).

たが十分な精度で検出することができなかった。これは，今回使用したコンピュータの処理速度の問題から，十分な量の学習セットとレイヤー数およびノード数を増やすことができなかったためだと考えられる。ただし，今回の結果より必要なコンピュータのスペック等の知見が得られたため，今後，精度良く検出できるよう改善が可能と考えている。

3.3　多型解析

シバ64系統から解析に必要な量と純度でDNAを抽出し，GRAS-Di法に基づきランダムプライマーによるPCRで取得された増幅配列をNovaSeqによりデータ取得を行った。その結果，各サンプルから平均約5.5 Mリード，約830 Mbのデータを取得することができた。このデータをクリーニングしリファレンス配列にマップした結果，各サンプル平均約4.4 Mリードが正しい距離と向きでマップされた。このマップされた配列から，約200万SNPと，約12万インサーションおよび約14万デリーションが検出された。今回用いたリファレンス配列は*Z. japonica*であったため，*Z. japonica*のサンプルでは検出された多型は少なく，系統的に遠いと推察される*Z. pacifica*では比較的多くの多型が検出される傾向があり，これまでの報告と一致した[2, 9]。今後，この多型情報と，３Dモデルから計測した形質値を複数年取得したうえでゲノムワイドアソシエーション解析を行い，牧草として有用な形質と関連するマーカーの検出を試みる。

© The Ito Foundation

4．要　約

本研究は，デジタル３Ｄモデル技術を駆使した形質評価法を確立し，その結果をゲノム情報と結びつけることで，高い牧養力を持つ新しい品種育成を行うための基盤構築を目的として行った。デジタル３Ｄモデルからの形質評価では，これまでに日本全国から収集した日本シバ計62系統に加え，バヒアグラス，ローズグラス，テフグラス，ダイズにおいてモデルを再構築し，草高，上面からの面積，色情報，体積を経時的に取得できた。これらの３Ｄモデルは，複数の草種を混播したUAVによる圃場の解析に活用できる精度で取得できたが，ファイル容量が非常に大きいため解析精度とファイル容量のバランスについて詳細な検討が必要であると考えられた。また，GRAS-Di法による日本シバ64系統の多型情報も取得できたことから，引き続きこれらを組み合わせDNAマーカーの検出等を行うことにより新しい育種基盤の構築へとつながる成果が得られた。

文　献

1） Tanaka, H., Hirakawa, H., Kosugi, S., Nakayama, S., Gondo, T., *et al.*：*DNA Research*, **23**, 171～180, 2016.
2） Tanaka, H., Tokunaga, R., Muguerza, M., Kitazaki, Y., Hashiguchi, M., Sato, S., Tabata, S., Akashi, R.：*Crop Science*, **56**, 818～826, 2016.
3） Kunwanlee, P., Tanaka, H., Hashiguchi, M., Gondo, T., Muguerza, M., Inoue, T., Akashi, R.：*Crop Science*, **57**, 3310-3318, 2017.
4） Ng, H. M., Gondo, T., Ushiyama, M., Cho, S., Maemura, S., Hashiguchi, M., Tanaka, H., Akashi, R.：*Grassland Science*, **69**, 152～161, 2023.
5） Pongpiyapaiboon, S., Tanaka, H., Hashiguchi, M., Hashiguchi, T., Hayashi, A., Tanabata, T., Isobe, S., Akashi, R.：*The Plant Phenome Journal*, **6**, e20076, 2023.
6） Kochi, N., Hayashi, A., Shinohara, Y., Tanabata, T., Kodama, K., Isobe, S.：*Breeding Science*, **72**, 75～84, 2022.
7） Kikawada, T., Yoda, Y., Fujiwara, R., Sanada, Y., Sato, H., *et al.*：*Breeding Research*, **24**, 134～145, 2022.
8） 北村文雄：東大農園芸実験所報告, **3**, 1～60, 1970.
9） Kimball, J. A., Zuleta, C. M., Kenworthy, K. E., Lehman, V. G., Harris-Shultz, K. R., Milla-Lewis, S. R.：*Crop Science*, **53**, 285～295, 2013.

© The Ito Foundation

畜産系エキス抽出残さの飼料利用の可能性を探る

Exploring the possibility of using livestock-origin extraction residue as feed

川　島　知　之
（宮崎大学農学部）

Tomoyuki Kawashima
(Faculty of Agriculture, University of Miyazaki)

Regarding the possibility of using livestock extract extraction residue generated in the extract seasoning manufacturing process as feed and pet food raw materials, we conducted interviews with pet food companies and livestock extract extraction companies, and analyzed the proximate compositions, amino acids and *in vitro* digestibilities of the extract extraction residue. There are various methods for producing extracts, and the compositions of the extract residue vary greatly, but the amino acid profile per crude protein is better balanced than that derived from plant origins, making it a high-quality resource. It has been shown that it has the potential to be used as a useful raw material for feed and pet food by paying attention to the stability of the ingredients, hygiene management, and palatability.

1．目　　的

日本の飼料自給率は飼料全体で25%，濃厚飼料では13%にすぎない[1)]。飼料自給率の向上のため，エコフィードの利用が推進されている。エコフィードとは，食品製造副産物や売れ残った食品，調理残さ，農場残さを利用して製造された家畜用飼料である。食品残さの年間発生量は，2021年において1,670万トンとなっており，うち902万トンが飼料として生産利用されている[1)]。

一方，ペットフードの市場規模は年々拡大しており，2022年度の市場規模は3,875億円であった。これは，2013年と比べ1,194億円増加している。また，ペットフードの国産割合はやや増加しており，2013年には国産が47.7%だったが，2022年では55.9%となっている[2)]。この背景として，ペットフードに対する安心・安全と健康管理への関心の高まりにより，国産志向を持つ飼育者の増加が考えられる。

今回，飼料化あるいはペットフード化が可能とされる資源として，エキス抽出残さに注目した。調味料としてのエキスとは，食品として用いられる農・水・畜産物を原料として，抽出または搾汁，自己消化，酵素処理，精製，濃縮等により製造し，原料由来の成分を含有したもの，またはこれに副原料，呈味成分を加えたもので，食品に風味を付与するものである[3)]。エキス調味料の原料として，畜産物を食品加工したのちの端材肉や骨も多く利用されており，畜産物由来のエキス残さも多量に排出されている。本調査では，牛，豚お

© The Ito Foundation

よび鶏を原料としてエキス抽出した後の残さの排出状況の調査と一般成分分析，アミノ酸分析，in vitro消化試験を行うことで，エキス残さの飼料化およびペットフード化の可能性を検討した。

2．方　法

2.1　エキス残さの現状調査

ペットフード会社と畜産系エキス抽出会社にて聞き取り調査を行った。

2.2　エキス残さの化学分析

畜産系エキス抽出会社より入手した，合計14サンプルを分析に供した。常法[4]に準じて一般成分を測定し，in vitro法による回腸までのタンパク質消化率をBoisenとFernandezの方法[5]により評価した。また，アミノ酸は，依頼分析により加水分解後18種の分析を実施した（食品分析開発センター，三重）。統計処理は表計算ソフト（EZR 自治医科大学埼玉医療センター 埼玉）を用いて解析した[6]。

3．結果と考察

3.1　聞き取り調査

3.1.1　ペットフード会社

3.1.1.1　A株式会社

A社は年間７万トンほどのドライフードを生産している。ドライフードの製造方法は家畜の配合飼料と同様で，メインの原料はサイロからミキサーに導入し，少量の原料は袋から入れる場合もある。混合後，エクストルーダーで成形する。成形後，表面に油脂をスプレーすることで，嗜好性を向上させる場合もある。

エキス残さを原料として使用する場合，期待する方向性は２種類想定される。まず，１つ目としては，主要なタンパク質原料の一つとして，低コストで利用するという方向性である。肉骨粉より廉価であり，そのうえで，灰分含量は肉骨粉に含まれる程度のものが望まれる。また，エキス抽出の工程で，薬剤を使用していないことが前提となる。また，家畜飼料と異なり，比較的高価な包材に印刷しているため，表示の頻繁な変更はできない。そのため，頻繁に原料を変更することはできず，成分の安定した原料を安定的に導入する必要がある。１回に製造するドライフードは３–５トン程度であり，乾燥したエキス残さを使用する場合は，その10％程度は使用する必要があり，そのための物流が必要となる。

もう１つの方向性としては，低アレルギー原料としての利用である。根拠は明確ではないが，１万ダルトン以下に加水分解された肉の場合はアレルギーが発生しないとされており，各畜種の中でも豚由来のものはアレルギーを引き起こす可能性が低いとされている。もしも，そのような効果が期待される場合は，月３トン程度でも利用可能である。

3.1.1.2　B株式会社

主食的なペットフードではなく，嗜好品的なもの，あるいは口臭予防，毛づや向上等の機能性を重視した製品を生産している会社である。ドライとウェットいずれもある。嗜好性を最優先としており，原料としては人が食べるグレードの肉類がほとんどである。畜産系エキスを嗜好性向上のために使用する場合もある。エキス残さも一部使用しているが，肉メインで常圧加熱されたものを数％程度使用しているだけである。おやつ系であるため，CaやPは入れる必要がなく，骨の入っているものを使用することはない。また，加圧抽出したエキス残さの場合は酸化臭が出る場合があることから使用しない。原料としては，加熱したものより生を使用して，混合して粘り気を出してから，加熱処理する場合が多い。そのため，エキス残さは使用が難しい。

© The Ito Foundation

Table 1　Proximate analaysis of extract extraction residue

Company		C				E		D			F					Average	Standard deviation
Sample No.		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
Extraction method[1]		P	P	P	N	U	U	P	P	N	U	U	U	U	U		
Origin[2]		C	C	P	P	C&P	C	B	P	P	C	C	P	P	B		
Dry matter	%	44.1	40.7	56.5	53.1	45.2	38.4	63.0	57.5	58.1	45.2	39.8	57.4	52.1	57.6	50.6	8.1
Crude protein	%DM	35.9	48.0	19.4	31.8	33.5	36.4	16.9	17.8	23.7	52.7	45.2	18.5	21.8	11.5	29.5	12.9
Crude fiber	%DM	0.0	0.0	2.2	2.8	0.5	0.6	2.4	1.2	2.2	0.2	0.0	0.1	0.0	0.4	0.9	1.0
Ether Extract	%DM	27.8	31.3	26.9	23.7	22.0	20.3	24.0	13.3	20.7	15.7	36.4	8.1	11.1	20.8	21.6	7.8
Ash	%DM	34.0	20.7	51.4	43.5	43.0	38.9	55.8	65.1	51.5	28.3	17.1	68.5	62.1	67.8	46.3	17.0

[1] P：Pressure extraction，N：Normal pressure extraction，U：Unidentified

[2] C：Chiken，P：Pork，B：Beef

3.1.2　エキス抽出会社

3.1.2.1　C株式会社

C社は比較的新しく設立され，隣接する関連会社のと場から新鮮な豚由来の原料と牛脂がトレース可能な形で導入されている。鶏由来の原料も系列のチキンパッカーからチルドで導入されている。年間2,000トンのエキスを生産するのに，原料として豚3,000トンと鶏3,000トンが必要となり，同量の残さが発生する。エキス抽出から調味までの製造工程すべてをインラインで製造されている。エキス抽出の際に，酸や薬品は使用しない。製造を行う釜は常圧と加圧のものがある。原料として，鶏の場合は小骨（足の骨）と胴ガラに分けられ，前者はゼラチンが多く，後者は肉が多いためうま味成分が多い。豚の場合は特に分けて使用されることはない。鶏や豚のエキス以外に，牛脂から和牛オイルも生産している。和牛オイルは，鶏や豚の製造ラインとは別のラインで製造され，コンタミネーションの恐れはない。鶏と豚はそれぞれ別の窯で煮ているが，エキス残さはエアを使って共通のパイプラインを通じて屋外のコンテナに出している。

3.1.2.2　D株式会社

原料は年間1,800トン程度であり，豚由来が７割ほどを占める。場内に豚専用のと場もあるが，外部から豚の原料を導入することもある。鶏については，さまざまなところから導入している。骨は粉砕する場合としない場合がある。排出される残さは原料の４割程度である。

大きく分けて３種類のエキスを製造している。１つ目は食品添加物の酵素を用いて分解するもので，うま味調味料の原料となる。10,000ダルトン以下の，可溶ペプチドやアミノ酸が中心である。原料は，国産や輸入品の冷凍肉を使用する。年間70－80トン程度処理している。

２つ目は加圧抽出によるエキスである。10トンの加圧窯が３基あり，おおむね１日１回転で処理している。炊いた後に，窯の底部から抽出液を取り出し，その後，底部のフタを開けて，残さを掻き出す。

最後は常圧抽出によるエキスである。６トンの窯が10基ある。原料はかごに入れた状態で炊き，残さはかごに入った状態で回収する。常圧抽出の場合は，脂分を液体に混ぜ込んだ形でエキスを回収する。

3.2　エキス残さの化学成分

一般成分分析の結果を**Table 1** に示す。一般成分において，粗タンパク質と粗灰分に相補的な関係がある。また，粗脂肪含量も全体的に高かった。アミノ酸について，粗タンパク質に対する割合を**Table 2** に示す。また，アミノ酸の利用性の指標となるin vitro消化試験の結果を**Table 3** に示す。分析ロットごとに多少の誤差が生じるため，ロットごとに大豆粕を標準品として分析し大豆粕の値

© The Ito Foundation

Table 2　Amino acid profile of extract extracion residue

Company		C				E		D			F					Average	Standard deviation
Sample No.		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
Extraction method[1]		P	P	P	N	U	U	P	P	N	U	U	U	U	U		
Origin[2]		C	C	P	P	C&P	C	B	P	P	C	C	P	P	B		
Arginine	CP%	7.4	7.1	7.9	7.9	6.4	6.4	7.2	7.1	7.7	7.1	6.1	8.0	6.6	7.4	7.2	0.6
Lysine	CP%	6.2	8.1	6.6	5.2	5.4	6.4	5.6	6.3	5.7	8.2	7.9	8.4	7.3	5.3	6.6	1.2
Histidine	CP%	2.2	2.7	2.3	1.6	1.6	1.9	2.1	2.2	1.7	3.0	2.2	2.9	2.5	1.6	2.2	0.5
Phenylalanine	CP%	4.1	4.6	4.2	3.3	3.0	3.5	3.7	3.9	3.4	4.9	3.9	5.2	4.2	3.2	3.9	0.7
Tyrosine	CP%	2.8	3.8	3.0	1.9	2.1	2.4	2.6	2.9	2.2	4.2	3.3	4.3	3.3	2.2	2.9	0.8
Leucine	CP%	7.1	8.5	7.4	5.4	5.1	6.0	6.6	6.9	5.7	8.7	7.1	9.3	7.7	5.6	7.0	1.3
Isoleucine	CP%	3.7	4.8	3.5	2.4	2.4	3.3	3.0	3.4	2.6	5.3	4.2	4.8	3.8	2.6	3.6	0.9
Methionine	CP%	2.0	2.5	1.9	1.5	1.4	1.7	1.7	1.6	1.4	2.7	2.0	2.2	1.8	1.3	1.8	0.4
Valine	CP%	4.8	5.8	5.3	4.1	3.9	4.3	0.6	5.1	4.3	6.1	4.9	6.5	5.6	4.3	4.7	1.4
Alanine	CP%	7.6	6.6	7.8	8.3	6.7	6.8	7.5	6.8	7.9	6.1	5.9	7.2	6.6	7.6	7.1	0.7
Glycine	CP%	12.1	6.6	13.2	17.3	13.0	11.1	13.2	10.8	15.5	5.2	6.7	8.8	8.9	15.5	11.3	3.7
Proline	CP%	7.7	5.2	8.7	10.3	11.0	7.1	8.1	7.0	9.8	4.6	4.9	6.6	6.3	10.3	7.7	2.1
Glutamic acid	CP%	12.8	14.2	13.5	12.2	11.7	12.1	11.7	12.1	12.2	13.7	13.2	15.1	13.3	11.6	12.8	1.1
Serine	CP%	3.9	4.3	4.2	3.8	3.3	3.2	3.5	3.5	3.7	4.3	3.6	4.7	3.9	3.3	3.8	0.4
Threonine	CP%	3.9	4.7	3.8	3.0	2.8	3.3	3.6	3.8	3.3	5.0	4.2	5.4	4.1	3.0	3.9	0.8
Aspartic acid	CP%	8.5	9.4	8.9	7.5	7.0	7.9	7.2	8.0	7.7	9.3	8.8	10.1	8.9	7.6	8.3	0.9
Tryptophan	CP%	1.0	1.4	0.9	0.5	0.6	0.9	0.8	0.9	0.6	1.5	1.1	1.4	1.0	0.6	0.9	0.3
Cystine	CP%	1.1	1.3	1.0	0.7	1.0	1.0	0.5	0.6	0.6	1.0	0.9	1.0	0.8	0.4	0.9	0.3

[1] P：Pressure extraction，N：Normal pressure extraction，U：Unidentified

[2] C：Chiken，P：Pork，B：Beef

Table 3　DM and protein in vitro digestibility of exstract exstraction residue

Company	C				E		D			F					Average	Standard deviation
Sample No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
Extraction method[1]	P	P	P	N	U	U	P	P	N	U	U	U	U	U		
Origin[2]	C	C	P	P	C&P	C	B	P	P	C	C	P	P	B		
DM digestibility	76.1	75.9	77.3	63.2	79.7	74.2	86.3	87.6	64.6	64.4	80.3	84.5	89.0	92.0	78.2	9.4
Protein digestibility	92.5	90.6	94.2	86.8	93.6	89.7	95.9	96.5	88.2	87.3	94.6	96.5	98.7	100.0	93.2	4.2

[1] P：Pressure extraction，N：Normal pressure extraction，U：Unidentified

[2] C：Chiken，P：Pork，B：Beef

を用いて補正した結果を示した。統計処理は表計算ソフト（EZR，自治医科大学埼玉医療センター，埼玉）を用いて解析した[6)]。

3.2.1　エキス残さの化学成分と消化率の原料および抽出方法による比較

原料の牛，豚および鶏ごとにエキス残さの一般成分，アミノ酸，in vitro消化率の平均と標準偏差を**Table 4** に示した。アミノ酸については豚と鶏の制限アミノ酸である，リジン，スレオニン，トリプトファンおよびメチオニンのみを示した。鶏由来の残さは牛および豚由来の残さと比較して，乾物率と粗灰分含量が低く，粗タンパク質含量が高かった。一方，粗タンパク質あたりのアミノ酸含量については，原料間に差は認められなかった。鶏由来の残さは骨に付着する肉の割合が多い可能性がある。一方で，牛由来および豚由来のエキス残さは粗灰分含量が50％以上と高い値となった。粗灰分の高い残さを飼料もしくはペットフードとして利用する場合は，カルシウムとリン含量を考慮した配合が求められる。乾物消化率およびタンパク質消化率については，畜種間に差がなかった。

エキス残さの分析結果を，常圧か減圧かの製造方法ごとに分類し，平均と標準偏差を示した（**Table 5**）。乾物消化率およびタンパク質消化率について，常圧抽出よりも加圧抽出の残さのほうが高かった。高温高圧処理により，加水分解が促進され，エキス残さのタンパク質の分解が進んだ

© The Ito Foundation

Table 4 Comparison of proximate composition, amino acid profile and digestibility of exstract extraction residue among raw material origins

		Beef origin (n=2)		Pork origin (n=6)		Chicken origin (n=5)	
		Average	standard deviation	Average	standard deviation	Average	standard deviation
Dry matter	%	60.3[a]	3.8	55.8[a]	2.5	41.6[b]	2.9
Crude protein	%DM	14.2[a]	3.8	22.2[a]	5.2	43.6[b]	7.3
Crude fiber	%DM	1.4	1.4	1.4	1.2	0.2	0.3
Ether Extract	%DM	22.4	2.3	17.3	7.5	26.3	8.3
Ash	%DM	61.8[a]	8.5	57.0[a]	9.7	27.8[b]	9.0
Lysine	%CP	5.5	0.2	6.6	1.1	7.4	1.0
Methionine	%CP	1.5	0.3	1.7	0.3	2.2	0.4
Threonine	%CP	3.3	0.4	3.9	0.8	4.2	0.7
Tryptophan	%CP	0.7	0.1	0.9	0.3	1.2	0.3
DM digestibility		89.2	4.0	77.7	11.4	74.2	5.9
Protein digestibility		98.0	2.9	93.5	4.9	90.9	2.8

a, b Different letters denote significant differneces（p<0.01）

Table 5 Comparison of proximate composition, amino acid profile and digestibility of exstract extraction residue between extraction methods

		Pressure extraction (n=5)		Normal pressure extraction (n=2)	
		Average	standard deviation	Average	standard deviation
Dry matter	%	52.4	9.5	55.6	3.5
Crude protein	%DM	27.6	13.8	27.8	5.7
Crude fiber	%DM	1.2	1.2	2.5	0.4
Ether Extract	%DM	24.7	6.9	22.2	2.1
Ash	%DM	45.4	17.8	47.5	5.7
Lysine	%CP	6.6	0.9	5.5	0.4
Methionine	%CP	1.9	0.4	1.5	0.1
Threonine	%CP	4.0	0.4	3.2	0.2
Tryptophan	%CP	1.0	0.2	0.6	0.1
DM digestibility		80.6[a]	5.8	63.9[b]	1.0
Protein digestibility		93.9[a]	2.4	87.5[b]	1.0

a, b Different letters denote significant differneces（p<0.05）

ことでタンパク質の消化率が高くなったと考えられる[7]。ただし，加圧抽出のエキス残さには牛由来のものが含まれている一方，常圧抽出のエキス残さは豚由来のもののみであったため，原料による消化率の違いも影響している可能性もある。

3.3　総括

エキスの製造方法には多くのレシピがあり，原料や製造工程は多様で，野菜等の利用もあるため，エキス残さの成分は多様である。飼料およびペットフード原料として使用するには，成分の安定性が求められる。一方，タンパク質あたりのアミノ酸含量は，植物由来のものよりバランスが良く，良質な資源であるといえる。成分変動の大きな理由は骨と脂肪の混入割合である。脂肪に関しては，脂肪を分離することで，安定化させることが可能と考えられる。骨の混入については，その

© The Ito Foundation

割合に応じて分別して利用する必要がある。

また，衛生管理について，エキス残さは現状として廃棄物として捉えられているため，排出ラインの洗浄がなされていないことや，屋外で保管されているケースが見られた。飼料もしくはペットフードの原料としての利用を実現するにはより厳密な衛生管理が必要である。

エキス残さをペットフード化するためには，特に嗜好性が求められる。嗜好性についての評価は実施していないが，エキスを抽出した後の残さであることから，原料が有する嗜好性よりも劣る可能性が大きい。また，油脂の酸化についても問題になる可能性があり，抗酸化剤の添加や，速やかな密封と冷蔵・冷凍が求められる。

エキス残さの飼料もしくペットフードとしての利用について，課題も多いが，バランスの良いアミノ酸を含む資源であり，消化性も良好であることから，その有効な利用が求められる。

4．要　約

エキス調味料の製造工程で発生する畜産系エキス抽出残さを飼料およびペットフード原料として利用する可能性について，ペットフード会社および畜産エキス抽出会社における聞き取り調査と，エキス抽出残さの一般成分とアミノ酸分析，そしてin vitro消化率から検討した。エキスの製造方法は多様で，エキス残さの成分の変動も大きいが，タンパク質あたりのアミノ酸含量は，植物由来のものよりバランスが良く，良質な資源である。成分の安定性，衛生管理，嗜好性に留意することで，飼料やペットフードの有用な原料として利用できる可能性が示された。

文　献

1） 農林水産省：農林水産省エコフィードをめぐる情勢, 2023. https://www.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/lin/l_siryo/attach/pdf/ecofeed-152.pdf
2） ペットフード協会：ペットフード流通量調査，一般社団法人ペットフード協会, 2021. https://petfood.or.jp/data/chart2008/ryutu.html
3） 日本エキス調味料協会：エキス調味料製造におけるHACCPの考え方を取り入れた衛生管理のための手引書. https://www.mhlw.go.jp/content/11121000/000481712.pdf 2018.
4） Association of Official Analytical Chemists（AOAC）：Official Method of Analysis of the Association of Analytical Chemists 15th edn. Association of Official Analytical Chemists, Inc. Arlington, VA. 1990.
5） Boisen, S., Fernandez, J.A.：Prediction of the apparent ileal digestibility of protein and amino acids in feedstuffs and feed mixtures for pigs by in vitro analyses, *Animal Feed Science and Technology*, **51**. 29～43, 1995.
6） Kanda, Y.：Investigation of the freely-available easy-to-use software “EZR”（Easy R）for medical statistics, *Bone Marrow Transplant*, **48**, 452～458, 2013.
7） Qian, Y., Engel, M. H., Macko, S. A., Carpenter, S., Deming, J. W.：Kinetics of peptide hydrolysis and amino acid decomposition at high temperature, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **57**. 3281～3293, 1993.

© The Ito Foundation

子牛期の睡眠行動発現に関与する要因の解明
－母牛の影響－

The dam effect on calf sleep behaviour expression

深　澤　　充
（東北大学大学院農学研究科）

Michiru Fukasawa
（Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University）

The aim of this study was to clarify the influence of the dam on the sleep-like posture (SLP) of calf. Experiment 1：We examined the correlation between the SLP of calves and dams, and the relationship between maternal behaviors of dams (e.g., nursing and maternal grooming) and the SLP of calves during the postpartum period. We recorded the SLP expression by continuous observation on the 7 days after calving for 12 pairs of Japanese Black dams and calves. We determined the daily time, bout frequency, and bout time of SLP. In addition, nursing behaviour (calf puts its head in the hind part of the dam's body) and maternal grooming behaviour (dam with head on calf's body or head.) were also recorded. Correlations of the SLP expression between dam and calf, and between calf SLP expression and maternal behaviors were determined. The daily calf's SLP time had significant positive correlation with the dam's bout time, and tended to have positive correlation with the daily dam's SLP time. On the other hand, the calf's SLP expression did not have any significant correlation with the nursing and maternal grooming behaviour. Experiment 2：We investigated the relationship between sleep and adaptation to a stressful environment by examining the correlation between the calf's SLP expression during calf-dam cohabitation and stress responses for separation from the dam. White eye temperature 2 hours after separation and the lying time percentage 24 hours after separation were measured as behavioural and physiological stress responses, respectively. However, the SLP expression during calf-dam cohabitation did not correlate with any stress responses for separation from the dam.

1．目　　的

ヒトやマウスでは，睡眠は若齢期に発現が長く，身体的な成長に大きく関与している。ウシにおいても子牛期には長い睡眠様姿勢を示し[1)]，1日の睡眠様姿勢の長い哺乳子牛ほど日増体量が高くなる可能性が示唆されている[2)]。また，睡眠は精神的（脳）な発達にも重要な役割を果たしていて[3)]，その適切な発現は環境への適応に影響を与えるとされる。

これまでの研究では子牛期の睡眠は個体差が大きいことが示されている[1)]。子牛の行動発現には母牛の存在（遺伝的および母性環境的な要因）が大きく関与している[4)]。特に母牛の行動では，授

© The Ito Foundation

乳や子舐め行動などの母性行動と称される行動が子牛の心理的安寧や栄養充足に関わっていて[5]，子牛の行動発現や発達に影響を与えると考えられる。そこで本研究では，子牛の睡眠様姿勢発現に影響する要因として特に母牛の関与に焦点を当てる。その影響を明らかにすることを目的として，（1）子牛と母牛の睡眠様姿勢の発現との関係および分娩後の同居期間における母牛の母性行動（授乳，子舐め行動など）と子牛の睡眠様姿勢の発現の関係について検討する。また，（2）子牛の母子同居時の睡眠様姿勢の発現と母子分離後の行動的・生理的ストレス反応との関係を調べ，睡眠とストレス環境への適応との関連を調査した。

2．方　法

調査は東北大学動物実験委員会の承認を得て行った（2022農動-013）。すべての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において実施した。

2.1　子牛の睡眠様姿勢の発現と母牛の睡眠様姿勢の発現および母性行動発現との関係

子牛の睡眠様姿勢の発現に母牛の行動が与える影響について調査した。2023年５月から12月にかけて牛舎内の５ｍ×５ｍの分娩房で分娩した黒毛和種母子12ペアを供試した。分娩後は母子同居し，子牛が約14日齢の時に母子分離した。母子同居期間中の母子を赤外線カメラ（WTW-EHR195YJ，塚本無線，三重）およびDVR（WTW-DA335G，塚本無線，三重）を用いて撮影・録画した。カメラは分娩房上方４ｍに，俯角で設置した。録画した動画より，分娩後７日目の母牛および子牛の睡眠様姿勢の発現を連続観察で記録した。ウシが伏臥した状態で首を曲げ，頭を腹部に寄せた状態を睡眠様姿勢とした。また，母牛による授乳行動（子牛が母牛の後躯部に頭を入れた姿勢）および子舐め行動（母牛が子牛の体躯を舐める）についても連続観察で記録した（**Fig. 1**）。

子牛の睡眠様姿勢について１日の発現時間，発現回数および１回あたりの持続時間（以下，バウ

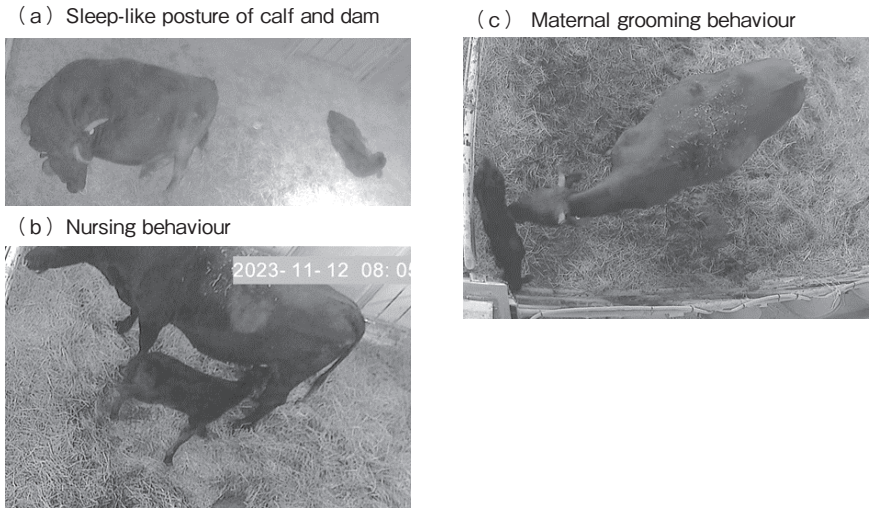


Fig. 1　Photographs of observed behaviour
(a) Sleep-like posture: cow and calf lying down with its neck bent and head resting on its flanks (b) Nursing behaviour: calf puts its head in the hind part of the dam's body, and (c) Maternal grooming behaviour : dam with head on calf's body or head.

© The Ito Foundation

ト長）を求めた。また，母牛の睡眠様姿勢について１日の発現時間，発現回数およびバウト長を求めた。母性行動として授乳および子舐め行動の１日の発現時間および発現回数を求めた。子牛の睡眠様姿勢の発現と，母牛の睡眠様姿勢の発現および母性行動発現との間の相関係数を算出した。また，母子の一日の睡眠様姿勢の発現時間について標準化した値を用いて，子牛の１日の発現時間に対する母牛の１日の発現時間への回帰係数を求めた。

2.2　子牛の母子同居時の睡眠様姿勢の発現と母子分離後の生理的・行動的ストレス反応

母牛との同居期間の睡眠様姿勢の発現が母子分離時の子牛の生理的・行動的なストレス反応に及ぼす影響について調査した。生理的ストレス反応として，2.1で供試した子牛のうち５頭について，母子分離２時間後に白目部分の温度をサーモグラフィー（E8-XT，FLIR，米国）により測定した。T-04で眼周辺の画像を撮影し，付属の解析ソフトFLIR Thermal studio（FLIR，米国）によりランダムで５点の強膜部分の温度（以下，白目温度）を測定し，その平均値を個体の値とした。また行動的ストレス反応として，2.1で供試した子牛のうち７頭について，母子分離後24時間の姿勢を赤外線カメラ（TS-NA230WP，アイ・オー・データ，石川）により録画し，横伏臥姿勢の時間を計測した。一部の子牛について通信障害のために一部の録画できなかった時間帯があったため，総観察時間に対する横伏臥時間割合を求めた。

2.1で求めた母子同居時の子牛の睡眠様姿勢の１日の発現時間，発現回数およびバウト長と母子分離時の白目温度および分離後24時間の横伏臥時間割合との相関係数を算出した。

３．結果と考察

3.1　子牛の睡眠様姿勢の発現と母牛の睡眠様姿勢の発現および母性行動発現との関係

子牛の１日の睡眠様姿勢の発現時間，回数およびバウト長の平均±標準偏差はそれぞれ500.3±126.2分/日，81.7±16.5回/日および6.14±0.90分/回であった。１日の発現時間および回数については，Fukasawa[1)]が示した２週齢時の１日の発現時間よりも長く，回数が多かったが，バウト長は短かった。

母牛の睡眠様姿勢および母性行動の発現の平均時間および子牛の睡眠様姿勢の発現との相関係数を**Table 1**に示した。子牛の睡眠様姿勢の１日の発現時間と母牛の睡眠様姿勢のバウト長との間には正の相関があり（$r = 0.77$, $t = 3.05$, $p < 0.05$），母牛の１日の発現時間との間に正の相関の傾向が認められた（$r = 0.60$，$t = 2.14$，$p < 0.10$）。子牛の睡眠様姿勢の１日の発現回数と母牛の発現回数およびバウト長との間にそれぞれ正の相関が認められた（$r = 0.67$，$t = 2.48$，$p < 0.05$および$r = 0.64$，$t = 2.32$，$p < 0.05$）。子牛の睡眠様姿勢のバウト長と母牛のバウト長との間に正の相関が認められた（$r = 0.74$，$t = 2.84$，$p < 0.05$）。標準化した母子の１日の睡眠様姿勢の発現時間の散布図を**Fig. 2**に示した。子牛の１日の睡眠様姿勢の発現時間に対する母牛の１日の睡眠様姿勢の発現時間の回帰係数は0.60だった。一方，母牛の１日の授乳行動時間および子舐め行動時間には子牛の睡眠様姿勢の発現との間には有意な相関はなかった。

本研究では，母子の睡眠様姿勢の発現には強い正の相関がみられた。この理由として遺伝的な影響が考えられる。母子回帰による行動形質の遺伝率の推定では，Sato[6)]がヒトの管理に対するウシの行動反応について0.66の遺伝率を推定している。本研究では回帰係数が0.50を超えたため，適

© The Ito Foundation

Table 1 Correlations between the calf sleep-like posture (SLP) expression (daily time, frequency and bout time) and dam SLP and maternal behaviour expression

Dam behaviour	Unit	Mean ± SD	Calf SLP		
			Time (min/day)	Frequency (times/day)	Bout time (min/time)
SLP					
Time	(min/day)	56.0 ± 25.5	0.60†	0.67*	0.16
Frequency	(times/day)	10.7 ± 4.3	0.27	0.64*	−0.28
Bout time	(min/time)	5.16 ± 1.01	0.77*	0.35	0.74*
Maternal grooming	(min/day)	85.5 ± 31.4	0.20	0.24	0.02
Nursing	(min/day)	72.2 ± 43.8	0.38	0.13	0.41

*：$p < 0.05$, †：$p < 0.10$

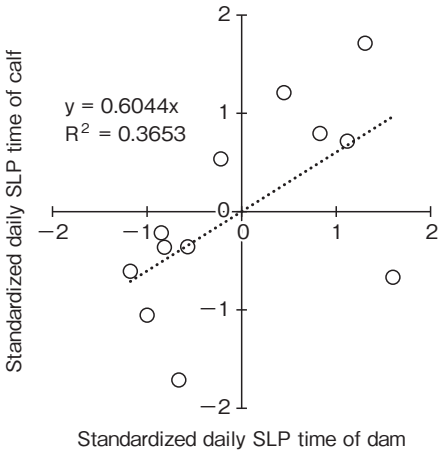


Fig. 2 The scatterplot of standardized daily sleep-like postures (SLP) time of dam and calf
The dotted line represents the regression line of calf daily SLP time on dam daily SLP time.

正な遺伝率が推定できなかった。そのため，正確な推定のために今後調査頭数を増やす必要がある。母子回帰によって推定される遺伝率には直接的遺伝効果と母性環境効果が含まれる[7]。本研究では具体的な母性環境効果として，代表的な母性行動である授乳行動や子舐め行動の発現を調べたが，同居子牛の睡眠様姿勢の発現との間に関連はなかった。授乳行動は子牛がミルクを飲むことで栄養的充足が得られる。また，子舐め行動には，出生直後の子牛の立ち上がりや授乳の促進[8]等の効果に加えて，子牛の心理的安定に寄与している可能性が示唆されている[5]。ウシは心理的に安定した状態で睡眠するとされ[9]，成牛では摂食行動により栄養的に充足した状態で横伏臥姿勢に移行し，睡眠様姿勢が発現する。本研究で母性行動と相関がみられなかった理由として，睡眠は哺乳類の成長に不可欠のため[10]母牛の行動によらない固定的な行動である可能性や，本研究における母性行動の発現が十分な水準であったために相関がなかった可能性が考えられる。

© The Ito Foundation

Table 2　The correlation between calf's Sleep-like posture (SLP) expression (daily time, frequency and bout time) during calf dam cohabituation and stress responses for separation from the dam

	Calf SLP with dam		
	Time (min/day)	Frequency (times/day)	Bout time (min/time)
Eye temperature 2 hours after separation	0.00	0.00	0.00
Lying time % within 24 hours after separation	−0.48	0.07	−0.46

3.2　子牛の母子同居時の睡眠様姿勢の発現と母子分離後の生理的・行動的ストレス反応

分離２時間後の白目温度の平均は36.6 ± 0.30℃であった。また，分離後24時間の横伏臥時間割合は，63.9 ± 2.1％であった。母子同居時の子牛の睡眠様姿勢の１日の発現時間，発現回数およびバウト長と母子分離時の分離２時間後の白目温度および分離後24時間の横伏臥時間割合との相関係数を**Table 2** に示した。いずれの睡眠様姿勢の発現とは有意な相関が認められなかった。

本研究で測定した白目温度は急性的なストレスに対する反応を非侵襲的に測定する方法であり[11]，母子分離に対する急性的なストレスを評価した。また，飼育場所の移動によるストレス環境下ではウシの横臥時間は短くなることから[12]，中期的なストレスの評価として横臥時間割合を測定した。しかし，母子分離や飼育場所の移動によるストレスは強いものではなく，子牛の睡眠様姿勢発現には影響を与えなかったと考えられる。

4．要　約

本研究では，子牛の睡眠様姿勢発現に対する母牛の影響を明らかにすることを目的とした。実験１：子牛と母牛の睡眠様姿勢の発現の相関および分娩後の同居期間における母牛の母性行動（授乳，子舐め行動など）と子牛の睡眠様姿勢の発現の関係を調べた。黒毛和種母子12ペアについて，分娩後７日目の母牛および子牛の睡眠様姿勢の発現を連続観察で記録し，１日の発現時間，発現回数および１回あたりの持続時間（以下，バウト長）を求めた。また，母牛による授乳行動（子牛が母牛の後躯部に頭を入れた姿勢）と子舐め行動（母牛が子牛の体躯を舐める）を連続観察で記録した。母子間の睡眠様姿勢の発現の相関および子牛の睡眠様姿勢の発現と母牛による授乳行動と子舐め行動との相関を求めた。子牛の睡眠様姿勢の１日の発現時間と母牛の睡眠様姿勢のバウト長との間に正の相関があり，母牛の１日の発現時間との間に正の相関の傾向が認められた。一方，母牛の１日の授乳行動時間および子舐め行動時間には子牛の睡眠様姿勢の発現との間には有意な相関はなかった。実験２：子牛の母子同居時の睡眠様姿勢の発現と母子分離後の行動的・生理的ストレス反応との関係を調べ，睡眠とストレス環境への適応との関連を調査した。ストレス反応として，分離２時間後の白目温度と分離後24時間の横臥割合を測定した。しかし，いずれの睡眠様姿勢の発現とは相関が認められなかった。

文　献

1）　Fukasawa, M.：The development of sleep-like posture expression with age in female Holstein calves, *Animal Science Journal*, **94**, e13816, 2023.
2）　深澤充，盧尚建：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，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**, 431～436, 2022.
3）　Lokhandwala, S., Spencer, R. M. C.：Relations between sleep patterns early in life and brain development: A review, *Developmental Cognitive Neuroscience*, **56**, 101130. 2022.
4）　Meagher, R. K., Beaver, A., Weary, D. M., von

© The Ito Foundation

Keyserlingk, M. A. G.：A systematic review of the effects of prolonged cow–calf contact on behavior, welfare, and productivity, *Journal of Dairy Science*, **102**, 5765～5783. 2019.

5） 小針大助，佐藤衆介，菅原和夫：黒毛和種繁殖牛における母性行動の個体変異と子牛の発育への影響，日本家畜管理学会誌, **37**, 149～155, 2003.

6） Sato, S.：Factors associated with temperament of beef cattle, *Japan Journal of Zootechnology Science*, **52**, 595～605, 1981.

7） 島田和宏，Lin EC，大島一修，竹之内直樹，高橋政義：黒毛和種の子牛の発育に対する母性遺伝効果の育種価と実測乳量の関係，日畜会報, **67**, 175～180, 1996.

8） Jensen, M. B.：The early behaviour of cow and calf in an individual calving pen, *Applied Animal Behaviour Science*, **134**, 92～99, 2011.

9） Ruckebusch, Y.：The relevance of drowsiness in the circadian cycle of farm animals, *Animal Behaviour*, **20**, 637～643, 1972.

10） Siegel, J. M.：Clues to the functions of mammalian sleep, *Nature*, **437**, 1264～1271, 2005.

11） Stewart, M., Webster, J. R., Verkerk, G. A., Schaefer, A. L., Colyn, J. J., Stafford, K. J.：Non-invasive measurement of stress in dairy cows using infrared thermography, *Physiology & Behavior*, **92**, 520～525, 2007.

12） Fukasawa, M., Komatsu, T., Higashiyama, Y.：The change of sleeping and lying posture of Japanese black cows after moving into new environment, *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, **31**, 1828～1832, 2018.

© The Ito Foundation

フェロトーシスが食肉の品質に与える影響とその制御に関する研究

Elucidation of the effects of ferroptosis on meat quality traits and their control

仲 西 友 紀
（宮崎大学農学部応用生物科学科）

Tomonori Nakanishi
（Department of Biochemistry and Applied Biosciences, Faculty of Agriculture, University of Miyazaki）

Ferroptosis represents a form of non-apoptotic cellular death. Recent studies have significantly enhanced our understanding of ferroptosis, including its implications in skeletal muscle functions. This investigation aims to elucidate the impact of ferroptosis on postmortem alterations in skeletal muscle and meat quality utilizing broiler chickens.

Broilers were divided into three groups, each receiving subcutaneous administrations of control solvents, RSL3, a glutathione peroxidase 4 (GPx4) inhibitor known to induce ferroptosis, or vitamin K, a ferroptosis inhibitor, at 48, 24, and 3 hours prior to slaughter. After slaughter, breast samples were collected and refrigerated at 4℃ for 48 hours. During the storage period, expression of ferroptosis-related genes, lipid peroxide content, glutathione levels, pH, color, water-holding capacity, and shear force were investigated.

The mRNA expression of GPx4 and ferroptosis suppressor protein 1 (FSP1) was decreased in RSL3 group. On the other hand, vitamin K tended to increase the FSP1 expression. The ratio of reduced glutathione (GSH) to oxidized GSH (GSSG) exhibited a decrease in the RSL3 group compared to the control. Concurrently, elevated levels of lipid peroxide were observed in the RSL3 group, indicative of heightened oxidative stress. Conversely, the vitamin K-treated group demonstrated a higher GSH/GSSG ratio, suggestive of reduced oxidative stress. Notably, the pH of the RSL3 group exhibited sustained elevation throughout refrigerated storage compared to the control group. Moreover, the L* values of the RSL3 group were lower than the control group, whereas the vitamin K group displayed elevated L* values. Additionally, water-holding capacity and shear force in the RSL3-treated group exhibited a trend towards higher and lower values, respectively, compared to the control group.

These findings suggest that the degree of ferroptosis changes the redox state of skeletal muscle, which in turn affects meat quality, such as pH and color.

© The Ito Foundation

1．目　的

家畜や家禽の骨格筋は死後硬直や熟成などの死後変化を経て食肉に変換される。骨格筋の死後変化は食肉の軟らかさや色，風味などを決定づける重要なプロセスであるが，メカニズムの全容解明には至っておらず，死後変化の異常に起因する肉質低下がいまだに散見される。本研究の目的は，骨格筋の死後変化に関わる新規メカニズムの解明であり，プログラム細胞死の一種であるフェロトーシスに着目した検討を行った。

細胞死は従来から，プログラムされた細胞死であるアポトーシスと事故的壊死であるネクローシスの２つに大別されてきた。しかしながら，近年の医学・生理学研究でアポトーシス以外のプログラム細胞死の存在が指摘されるようになり，ネクロトーシス，パイロトーシスおよびフェロトーシスが，それぞれ固有のメカニズムで細胞死を誘導することが明らかになっている。フェロトーシスはこれらの中でも最も新しく発見された細胞死であり，鉄に依存した過酸化脂質の蓄積によって細胞が死に至る。サルコペニアとの関連が指摘されるなど[1]，骨格筋におけるフェロトーシスの役割も理解されつつあるが，これらの知見を食肉生産に応用した例は少ない。

そこで本研究では，１）フェロトーシスがpH，色，保水性および軟らかさなどの肉質特性に影響を与えること，また，２）と鳥前の飼養管理でフェロトーシが制御可能であること，の２点を明らかにするために，ブロイラーを用いた検討を行った。

2．方　法

2.1　実験動物と処置

民間の孵化場（株式会社山形種鶏場）から購入した肉用鶏（雄チャンキー）の幼雛を28 ± 2℃の環境下で４週齢まで飼育した。飼育期間中，市販の餌（パワーチックZK前期および中期，宮崎中央農業協同組合）および水道水を自由に与えた。平均体重が１kg程度のニワトリを３群に分け（各群n=5），このうち１群にはglutathione peroxidase 4（GPx4）阻害剤でありフェトローシス誘導作用を持つRSL3（セレックバイオテック株式会社）を皮下投与した。また，他の１群には強力なフェトローシス阻害作用が報告されているビタミンK（メナキノン-4，セレックバイオテック株式会社）を皮下投与した[2]。RSL3およびビタミンKは62.5％プロピレングリコール，12.5％ジメチルホルムアミド，25％生理食塩水に溶解し，20 mg/kg・体重の投与量で，と鳥48，24および３時間前の計３回投与した。対照群には投与溶媒のみを投与した。と鳥後に採取した浅胸筋（ムネ肉）を，4℃で48時間保存し，保存中の各時間に2.2に示す肉質に関する評価を行った。なお，本研究では大腿部（モモ肉）でも同様の検討を行ったが，モモ肉に関するデータはバラツキが大きく一定の結論を導き出すことが困難であった。そのため，本報告書では紙幅の都合上からもムネ肉に関する結果を紹介する。

本研究は宮崎大学動物実験委員会の承認を得たうえで実施した（承認番号：2023-031）。

2.2　肉質に関する評価

と鳥直後のムネ肉から100 mg程度を切り出し，total RNAを抽出した。total RNAから合成したcDNAを鋳型にしたPCRで，GPx4，ferroptosis suppressor protein 1（FSP1）ならびにハウスキーピング遺伝子としてglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase（GAPDH）の発現を調査した。

48時間の冷蔵保存後に500 mg程度を採取し，Sudaらの方法[3]に準じて過酸化脂質量の測定を行った。具体的には試料のホモジネートを除タン

© The Ito Foundation

パク処理した後に，1,3-ジエチル-2-チオバルビツール酸（DETBA）と反応させた。その後，Inertsil ODS-3（GL Sciences）を装着した高速液体クロマトグラフでDETBAと反応したマロンジアルデヒド（MDA）を分離し，蛍光検出器（励起波長515 nm，蛍光波長555 nm）で検出した。また，48時間の冷蔵保存後に100 mg程度を採取し，市販の測定キット（株式会社同人化学研究所）を用いて，還元型グルタチオン（GSH）と酸化型グルタチオン（GSSG）の定量を行った。

冷蔵保存の期間中，経時的（0，2，4，24および48時間後）にpHを測定した。測定はpHメーター（Testo 205，株式会社テストー）を用いて行い，試料ごとに作成した複数の切り込みに電極を挿入することで，それぞれの平均値を求めた。また，と鳥から0および48時間経過した試料について色調の測定も行った。色調は色彩色差計（CR-200，コニカミノルタ株式会社）で$L^*a^*b^*$表色系に基づいて測定した。

48時間の冷蔵保存後に，試料を－20℃で冷凍保存した。1か月後に試料を4℃で一晩かけて解凍し，凍結解凍前後の重量差を測定することで保水性の一指標とした。また，500 mg程度の試料を遠心分離（2,200 x g，4℃，30分）し，その前後の重量差も測定した。さらに，凍結解凍した後の試料について，クリープメーター（HE2-33005C，株式会社山電）による剪断強度の測定も実施した。

3．結果と考察

GPx4は，リン脂質ヒドロペルオキシドをグルタチオン依存的に直接還元する抗酸化酵素であり，フェロトーシスを制御する重要な因子の一つである。RSL3はGPx4阻害剤として広く使用されており，哺乳類のみならずニワトリのGPx4も阻害すると考えられている[4]。本研究では，RSL3がGPx4の酵素活性のみならず遺伝子発現を抑制する結果が示されており，さらにGPx4と同じくフェロトーシスを強力に抑制するFSP1の発現もRSL3によって抑制される傾向にあった（**Fig. 1**）。本研究では，フェロトーシス阻害作用が報告されているビタミンKを投与する群も設定したが，ビタミンKはGPx4の発現に影響を与えなかったものの，FSP1の発現を上昇させる傾向にあった。また，と鳥前にRSL3を投与した場合，ムネ肉の過酸化脂質量が増加する傾向にあった（**Fig. 2**）。さらに，本研究では各組織におけるGSSGおよびGSHの定量を行ったが，RSL3を投与したニワトリのムネ肉ではGSH/GSSG比が低下しており，RSL3による酸化ストレスの亢進が示唆された。一方，ビタミンK群のムネ肉中に検出される

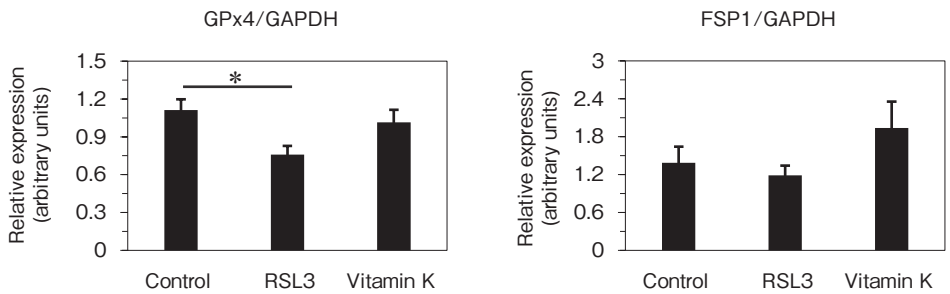


Fig. 1　Effect of administration of RSL3 and vitamin K on expression of ferroptosis-related genes. The mRNA expression of glutathione peroxidase 4 (GPx4, A) and ferroptosis suppressor protein 1 (FSP1, B) in the breast muscles were measured by quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction. $^*p < 0.05$, one-way analysis of variance, Tukey post hoc test.

© The Ito Foundation

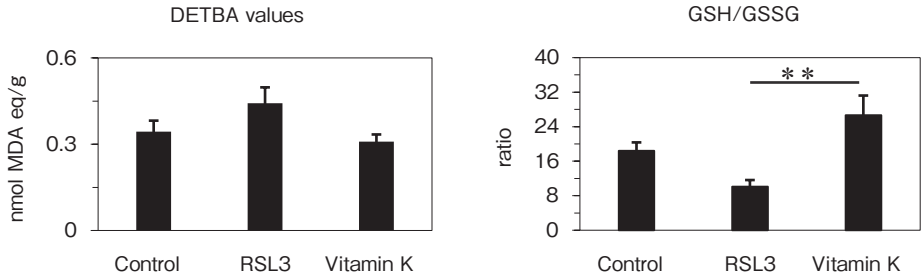


Fig. 2　Effect of administration of RSL3 and vitamin K on oxidative stress levels in the breast muscles. After the breast muscles were collected and refrigerated for 48 hours, the levels of 1,3-diethyl-2-thiobarbituric acid (DETBA)-reactive substances was determined by high performance liquid chromatography (A). The amounts of reduced glutathione (GSH) and glutathione disulfide (GSSG) were also measured and their ratios were calculated (B). $**p < 0.01$, one-way analysis of variance, Tukey post hoc test.

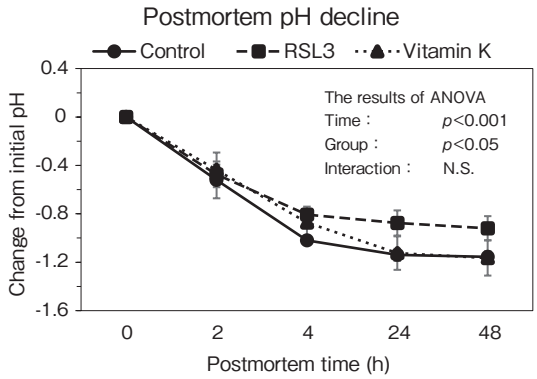
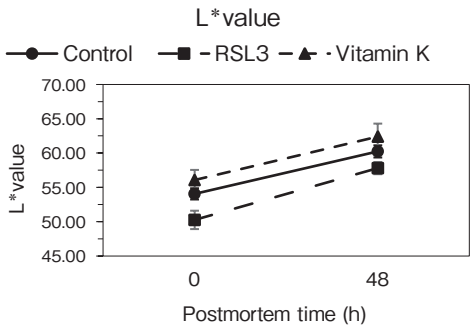


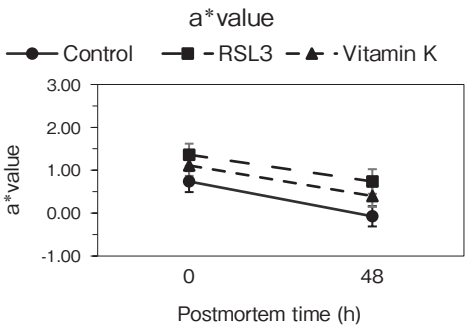
Fig. 3　Effect of administration of RSL3 and vitamin K on postmortem changes in pH of breast muscles. Data were analyzed using two-way analysis of variance. N.S., not significant.

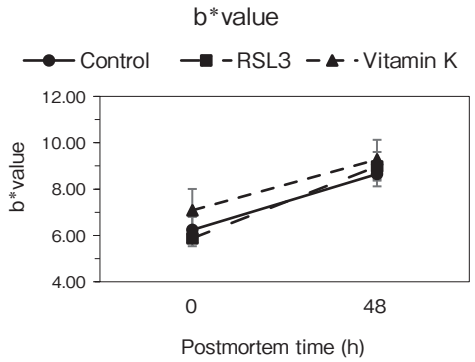
過酸化脂質量は対象群と同等もしくはそれ以下であった（**Fig. 2**）。また，RSL3群に比べるとビタミンK群ではGSH/GSSH比が有意に増加しており，ビタミンKによって酸化ストレスが軽減するものと推察された。今回の結果から，RSL3やビタミンKが実際にフェロトーシスをどの程度誘導・阻害したのかを判断することは難しいが，RSL3は酸化ストレスの亢進作用を，ビタミンKは酸化ストレスの抑制作用をそれぞれ発揮したものと考えられた。

ムネ肉のpHの変化を**Fig. 3** に示す。ムネ肉のpHは保存期間中に全群の平均値で6.93から5.88にまで低下した。この期間，ビタミンK群と対照群の間に顕著な差が見られなかったのに対して，RSL3群のpH低下は他群より緩慢であった。保存期間中に観察された色の変化を**Fig. 4** に示した。RSL3群のムネ肉は対照群に比べてL*値が有意に低く，a*値は逆に高かった。また，ビタミンK群のムネ肉のL*値は対照群より高い傾向にあった。保水性とせん断力の測定結果を**Table 1** に示す。RSL3群のムネ肉は統計学的には有意ではなかったものの，凍結解凍後の水分損失と遠心分離後の水分損失の両方で低値を示した。また保水性の結果と呼応するように，RSL3群のムネ肉の破断荷重は対照群より低値を示した。一般的に，食肉のpHが高く推移すると，保水性は向上する[5]。また，

© The Ito Foundation







Results of ANOVA	L*	a*	b*
Time	$p<0.001$	$p<0.05$	$p<0.001$
Group	$p<0.05$	$p<0.05$	N.S.
Interaction	N.S.	N.S.	N.S.

Fig. 4　Effect of administration of RSL3 and vitamin K on color of breast muscles. Data were analyzed using two-way analysis of variance. N.S., not significant.

Table.1　Effect of administration of RSL3 and Vitamin K on water-holding capacities and breaking strength of breast muscles.

	Control	RSL3	Vitamin K
Drip loss in freeze-thaw cycle (%)	8.32 ± 1.21	6.01 ± 0.96	8.27 ± 0.97
Centrifugal drip loss (%)	32.67 ± 1.46	25.60 ± 1.83	30.30 ± 2.56
Breaking strength (N)	10.70 ± 1.70	9.62 ± 0.62	10.99 ± 0.23

pHがミオグロビンの挙動を介して，肉色に影響を与えることも広く知られている[6)]。RSL3群で見られた保水性や色の変化はpHが高く推移したことに起因するのかもしれない。一方，ムネ肉の保水性や破断荷重について，ビタミンK投与による明確な差は認められなかった。

本研究の結果から，と鳥前のGPx4阻害やビタミンK投与によって酸化ストレスの程度が変化し，これがpH，色，保水性などの肉質特性にも影響を与える可能性が示された。これらはフェロトーシスが食肉の肉質に影響を与えることを強く示唆している。今回はフェロトーシスを制御する手法としてRSL3に加えて天然の栄養素であるビタミンKを使用した。ビタミンKの効果はRSL3に比べると軽微であったものの，少なくとも色などの肉質特性はビタミンKによって変化していた。ビタミンKの給与量の最適化などが今後の課題として残されているものの，本研究の結果は，と鳥前の栄養学的処置によってフェロトーシスの程度や肉質を制御できる可能性を示している。

© The Ito Foundation

4．要　約

フェロトーシスは非アポトーシス性細胞死の一種である。近年の研究でフェロトーシスの理解が飛躍的に進み，サルコペニアとの関連性が指摘されるなど，骨格筋における役割も明らかにされつつある。本研究では肉用鶏を用いてフェロトーシスが骨格筋の死後変化や肉質に与える影響を調べた。

肉用鶏を３群に分け，対照溶媒，glutathione peroxidase 4（GPx4）阻害剤でありフェロトーシス誘導作用を有するRSL3，もしくはフェロトーシス阻害作用のあるビタミンKを，と鳥の48，24および３時間前に皮下投与した。投与後に採取した浅胸筋（ムネ肉）を4℃で48時間冷蔵保存し，保存中の各時間に，フェロトーシス関連遺伝子の発現，過酸化脂質量，グルタチオン量，pH，色，保水性および破断強度の測定を行った。

RSL3群のムネ肉ではフェロトーシス抑制因子であるGPx4およびferroptosis suppressor protein 1（FSP1）の発現が低下していた。一方，ビタミンKはFSP1の発現を増加させる傾向にあった。また，酸化型グルタチオンに対する還元型グルタチオンの比（GSH/GSSG）は対照群よりRSL3群で低値であった。RSL3群のムネ肉では過酸化脂質量の増加も認められ，酸化ストレスの増大が示唆された。一方，ビタミンK群のGSH/GSSG比は対照群より高く，ビタミンKによって酸化ストレスが軽減するものと思われた。また冷蔵保存期間において，RSL3群のムネ肉のpHが対照群より高く推移した。さらに，RSL群のムネ肉ではL*値の低下およびa*値の増加が観察されたが，一方でビタミンK群のL*値は対照群より高値を示した。加えて，RSL3群のムネ肉の保水性は対照群より高く，破断強度も低い傾向にあった。

以上のことから，フェロトーシスの程度によって骨格筋の酸化還元状態が変化し，そのことで色や保水性などの肉質特性にも影響が及ぶものと考えられた。

文　献

1）Wang, Y., Zang, Z., Jiao, W., Wang, Y., Wang, X., Zhao, Y., Fan, X., Tian, L., Li, X., Mi, J.：Ferroptosis and its role in skeletal muscle diseases, *Front. Mol. Biosci.*, **9**, 1051899, 2022.

2）Mishima, E., Ito, J., Wu, Z., Nakamura, T., Wahida, A., Doll, S., Tonnus, W., Nepachalovich, P., Eggenhofer, E., Aldrovandi, M., Henkelmann, B., Yamada, K., Wanninger, J., Zilka, O., Sato, E., Feederle, R., Hass, D., Maida, A., Mourao, A. S. D., Linkermann, A., Geissler, E. K., Nakagawa, K., Abe, T., Fedorova, M., Proneth, B., Pratt, D. A., Conrad, M.：A non-canonical vitamin K cycle is a potent ferroptosis suppressor, *Nature*, **608**, 778～783, 2022.

3）Suda, I., Furuta, S., Nishida, Y.：Fluorometric Determination of a 1,3-Diethyl-2-thiobarbituric Acid-Malondialdehyde Adduct as an Index of Lipid Peroxidation in Plant Materials, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 14～17, 1994.

4）Cheng, X., Hu, Y., Yu, X., Chen, J., Guo, X., Cao, H., Hu, G., Zhuang, Y.：Sodium butyrate alleviates free fatty acid-indued steatosis in primary chicken hepatocytes via regulating the ROS/GPx4/Ferroptosis pathway, *Antioxidants* (*Basel*), 13(2), 140, 2024.

5）Huff-Lonergan, E., Lonergan, S. M.：Mechanisms of water-holding capacity of meat：the role of postmortem biochemical and structural changes, *Meat Sci.*, **71**, 194～204, 2005.

6）Andrés-Bello, A., Barreto-Palacios, V., García-Segovia, P., Mir-Bel, J., Martínez-Monzó, J.：Effect of pH on color and texture of food products, *Food Eng. Rev.*, **5**, 158～170, 2013.

© 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（Ⅱ）

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

鈴木　貴弘・前野　岳大・今給黎　耀・小川　陽平・川崎　佑華・中田　后紀・大崎　莉果・大山　竜輝・小川　蒼生・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, Youhei Ogawa, Yuka Kawasaki, Minori Nakada, Rika Osaki, Ryuki Oyama, Aoi Ogawa, Mako Nakamura and Ryuichi Tatsumi

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

Satellite cells as myogenic stem cells have key roles of skeletal muscle hypertrophy by forming nascent myofibers (myotubes) or fusing to existed myofibers. We hypothesized that some groups of satellite cells would have high differentiation and fusion capabilities to form myotubes. If we detected the specific marker of those satellite cells, we will be able to develop the novel tequnices for contributing to the meat production.

Satellite cells can synthesize multi-potent modulators, semaphorins (Sema3A and 3E) and netrins (netrin-1 and -4) during the myogenic differentiation phase. We have found that Sema3A and netrin-1 synthesized in satellite cells would have key roles to regulate myofiber types of myotubes. We recently reported that satellite cells produce Sema3E and netrin-4 at the differentiation initiation to promote myotubes formation. However, the cell-membrane receptors of those modulators in satellite cells are unclear and the physiological functions are also uncertain. When we identify the receptor which can bind semaphorins or netrins affects in the regulatory systems of myogenic differentiation, that receptor will be a specific marker of satellite cells with the high differentiation and fusion capabilities to form myotubes.

In this study, we exaimined whether netrin receptors (DCC, neogenin, Unc5A–D) may participate the autonous muscle hypertrophic systems regulated by satellite cells. First, the expression profiles of netrin receptors were performed in satellite cells isolated from the soleus muscle and the extensor digitorum longus muscle. Both satellite cell cultures stablely expressed neogenin, Unc5A and Unc5B during the myogenic diffentiation phase. Next, the binding assay between the recombinant netrin proteins and their receptors showed that Unc5A may be a strong candidate for the netrin-4 receptor in satellite cells. Furthermore, the overexpression treatment of Unc5A in myoblasts promoted MyoD, myogenin, and total myosin heavy chain expressions, speculating the efficient myotube formation.

These data suggest that netrin-4-Unc5A axis in satellite cells would promote the autonomous muscle hypertrophic system. Additionally, Unc5A would be a specific marker of satellite cells with the high myogenic differentiation and fusion capability.

© The Ito Foundation

1．目　　的

食肉の原料となる動物（家畜や家禽）の骨格筋量の出荷時までの安定的な増加は，１個体あたりから採取できる食肉量増産に直結するため，持続可能な食肉生産の実現に不可欠である。つまり，出生後における骨格筋の肥大メカニズムの解明は急務である。骨格筋を構成する筋細胞（細長い形状より「筋線維」と呼称される）は，細胞生物学的には最終分化した状態にあるため，自身での増殖ができないので数を増やせず，かつ自発的な容積増大は運動負荷など大きな刺激を与えなければ誘発できないことから，筋線維自体での肥大は難しいとされている。そこで我々は，骨格筋の組織特異的幹細胞である筋衛星細胞（衛星細胞）に着目した研究を展開している。衛星細胞は筋損傷の際，ダメージを受けた筋線維の損傷箇所への融合，または細胞同士で互いに融合して新生筋線維（筋管）を形成し失われた筋線維の補完ができる[1)]。すなわち，衛星細胞は優れた筋再生能を有することから，その能力を最大限に発揮するシステムを構築できれば，超再生ならぬ「筋肥大誘導」が実現可能と期待できる。衛星細胞の分化や融合能に影響を与える因子に関する研究は，主に筋内外を起源とするものをメインに捉えたアプローチが多いが[2)]，我々は衛星細胞自身が産生する多能性因子（semaphorinおよびnetrinの分泌型サブタイプ）がオートクライン，パラクライン様式で細胞自身に働きかけるシステムの解明に重点を置いている。すなわち，衛星細胞による自律的な筋肥大誘導機構の構築が可能であると考えており，本機構に関する基礎的知見の収集を本研究の主目的としている。

これまでに我々の研究グループでは，semaphorinサブタイプの１つであるsemaphorin 3A（Sema3A）が遅筋優勢のヒラメ筋から単離した衛星細胞において多量に合成・分泌され[3)]，かつ遅筋型の筋管形成に寄与することを報告した[4)]。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サブタイプの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も明らかとした[5)]。加えて，衛星細胞ではSema3EおよびNetrin-4といった他のサブタイプの発現も確認でき，これらの因子が細胞の分化・融合能を促進することを明らかとした[6)]（令和４年度食肉に関する助成研究調査成果報告書VOL.41）。なお，いずれの因子も生理機能を発揮するためには，細胞膜上の受容体との結合を要求するが，衛星細胞における特異的な受容体の同定には至っていない。

そこで本稿では，特にnetrinサブタイプの受容体に着目したアプローチについて報告をする。他の器官や臓器におけるnetrinの機能解析に関する知見より[7)]，受容体の候補としてThe deleted in colorectal cancer（DCC），The DCC paralogue（neogenin），およびthe Unc-5 homologues（Unc5A，B，C and D）をターゲットとした。はじめに，衛星細胞の培養系において分化誘導条件下での受容体候補の発現パターンを詳細に調べ，netrin-1および-4との結合性，および発現制御実験系における分化能への影響を解析した。

2．方　　法

2.1　実験材料

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，および過剰発現実験ではマウス骨格筋由来の継代筋芽細胞を使用した[8)]。本研究における動物実験（動物実験承認番号：A23-210）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。

© The Ito Foundation

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[9~12]。

まず，マウス後肢骨格筋（ヒラメ筋；soleus［Sol.］，長趾伸筋；extensor digitorum longus muscle［EDL］）を摘出し，37℃に温めたリン酸緩衝生理食塩水（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6 well培養プレート（IWAKI）に1 mg/ml Matrigel（CORNING）をダブルコートし，2.5 ng/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。1 mg/ml Matrigelをダブルコートした24 well poly-L-lysine coatedマルチプレート（IWAKI）に，1 wellあたり5.0×10^4 cells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[6]。

2.3　発現コンストラクトを用いたUnc5Aの過剰発現処理とセルソーティング

マウス前脛骨筋から得られたcDNAライブラリよりクローニングしたUnc5A遺伝子を，pmCherry-N1ベクターに組み込み，コンピテントセル（Competent high DH5α；TOYOBO）にトランスフォーメーションし，培養期間の薬剤耐性セレクションを通して，発現コンストラクト（Unc5A-mCherry）を作製した。Maenoら（2023年）の方法と同様に[6]，継代筋芽細胞を増殖培養液（20％FBS-F10 with bFGF）を用いて24時間培養し，Lipofectamine® LTX and PlusTM Reagent（invitrogen）を用いメーカー推奨のプロトコルに従ってUnc5A-mCherryを細胞内へ導入した。発現コンストラクトが導入された細胞をUnc5A過剰発現筋芽細胞と設定し，フローサイトメトリーのセルソーティングシステム（SH800，SONY）を用いてmCherry陽性細胞（mCherry+）と陰性細胞

© The Ito Foundation

（mCherry－）とを分取した。分取したそれぞれの細胞は，Type Ⅰコラーゲン（Cellmatrix Type I-A，新田ゼラチン）でコーティングした24 well multiplateに，1 wellあたり5.0×10^4 cellsずつ播種して24時間増殖誘導培養した。その後，分化誘導培養液（5％HS-DMEM）に切り換えて，分化96時間目まで培養した。

2.4　RNA抽出とRT-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50－100 ng/ 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，各mRNAをターゲットとして設計したプライマーとKOD Fx kit（TOYOBO）を用いてPCRを行った。増幅後のPCR産物をアガロースゲル電気泳動に供試し，HPRTを内部標準としたsemi-quantitative RT-PCRを行った。また，SYBER Green assay（Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix［Nanjing Vazyme Biotech Co., Ltd］）を用いたreal-time qRT-PCR（Light Cycler 96 system，Roche）によって定量的解析も行った。同様にHPRTを内部標準として用いた。データの分析は，添付のソフトウェアを用いて行った。

2.5　タンパク質の抽出およびWestern Blotting

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。

2.6　ELISA様アッセイ

Elgaabariら（2024年）らの方法を参考に[13]，ELISAアッセイプレートにリコンビナントnetrin-1およびnetrin-4（R&D systems）を固相化し，継代筋芽細胞より抽出した膜タンパク質溶液（濃度0，0.5，2.5 μg/well）を反応させた。ブロッキング処理をし，netrin受容体候補に特異的な1次抗体溶液をそれぞれ反応させ3時間静置してから，HRP標識2次抗体溶液に20分間反応させた後に，TMB溶液を用いて発色を促した。各wellでの発色を確認後，1 Mの硫酸溶液を反応停止液として加え，プレートリーダー（ARVO，Perkinelmer）を用いて波長450 nmおよび535 nmに対する吸光度を測定した。

2.7　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。

2.8　統計解析

測定値は平均値±標準誤差で示した。Microsoft Office Excel for Mac（office365；Microsoft）を

© The Ito Foundation

用いて，各測定値から得られたデータをStudentのt検定によって有意差検定を行い，$p<0.05$をもって統計学的に有意であるとした。

３．結果と考察

3.1　衛星細胞の分化誘導過程におけるnetrin受容体候補のパターン

衛星細胞の分化誘導過程において，netrin受容体候補であるDCC，neogeninおよびUnc5A–Dのmrna発現パターンをsemi-quantitative RT-PCRを用いて調べた（**Fig. 1**）。培養期間を通してnegenin，Unc5A–Cの発現を確認できたが，DCCとUnc5Dについてはバンドの検出が確認できず，衛星細胞での発現レベルがわずかであることが示唆された。なお，バンドが検出された４種類の候補のうち，Unc5Cでは分化の段階が進むことで発現レベルが低下する傾向にあり，特にsoleusより単離した細胞で顕著であった。続いて，mRNA発現パターンを確認した受容体候補について，タンパク質レベルでの経時的発現変化をWestern Blottingで調べた（**Fig. 2**）。neogenin，Unc5AおよびUnc5Bについて，分化誘導期間における安定的な発現を確認できたとともに，EDLより単離した衛星細胞においてsoleus由来の細胞よりも発現レベルが高い傾向にあった。Unc5Cについては，mRNA発現レベルと同様に分化誘導に伴ってバンドの検出レベルが低くなった。よって，衛星細胞から合成されるnetrinを介した自律的な筋肥大誘導に関与する受容体として，neogenin，Unc5AおよびUnc5Bが候補としてピックアップできた。

3.2　リコンビナントnetrinと受容体候補との結合性

前項にてピックアップした３種の受容体候補について，実際にnetrinとの結合性の有無についてELISA様アッセイを用いて調べた（**Fig. 3**）。すなわち，ELISAプレートにて，リコンビナントnetrin-1または-4と継代筋芽細胞より抽出した膜タンパク質含有画分とを反応させ，各候補に特異的な抗体を用いて結合レベルを捉えた。neogenin

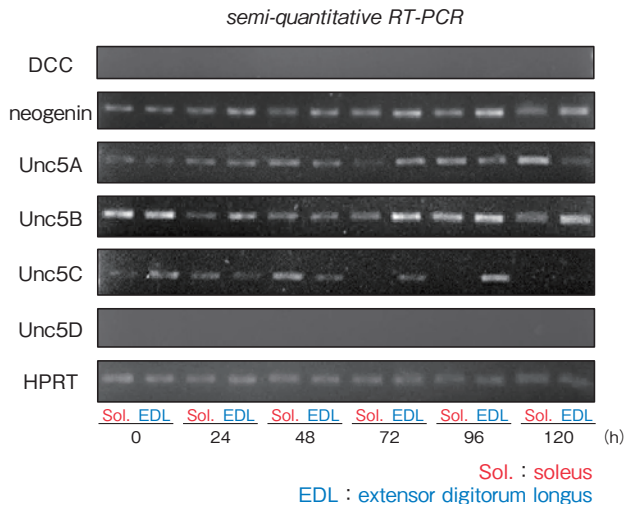


Fig. 1　The mRNA expression patterns of netrin receptors in satellite cells during myogenic differentiation. The proliferated soleus- and extensor digitorum longus (EDL)-derived satellite cell single-subcultures were maintained in differentiation medium (DMEM supplemented with 5% horse serum, 0.5% gentamicin reagent, 1% antibiotic-antimycotic solution) until 120 h. The cell lysates were analyzed for the mRNA expression of netrin receptors (DCC, negenin, Unc5A–D) by routine semiquantitaive RT-PCR standardized to HPRT level.

© The Ito Foundation

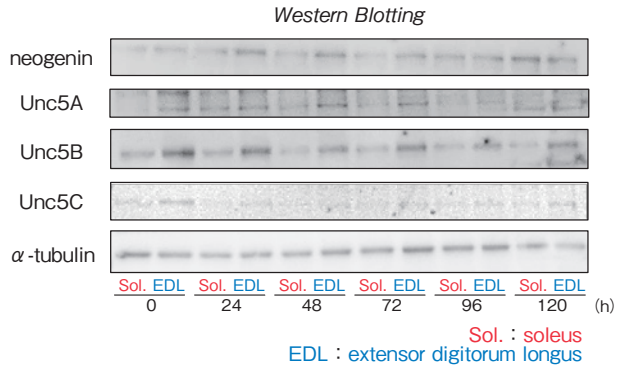


Fig. 2　The protein expression patterns of neogenin, Unc5A–C in satellite cells during myogenic differentiation. As well as Figure 1, each satellite cell single-subculture was maintained in the differentiation medium until 120 h. neogenin, Unc5A, Unc5B and Unc5C protein expression level in the satellite cell cultures during the myogenic differentiation phase was detected with Western Blotting, standardized to α-tubulin expression level.

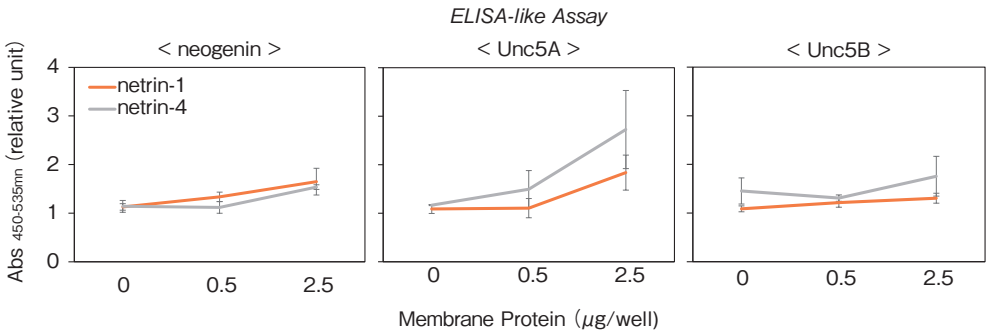


Fig. 3　Netrins binding activity of the receptor candidates. Evaluated by sandwich ELISA-like assay on solid-phase of recombinant netrins. The recombinant netrins and the cell-membrane protein fractions extracted from myoblasts were binded in each well, then the degree of them coupling were detected using specific antibodies of neogenin, Unc5A and Unc5C. The graphs depict the mean ± standard error of mean (SEM) of three independent wells by relative units, compared to the control wells using the cell-membrane protein fraction with 0 μg/well.

およびUnc5Bは，いずれのnetrinサブタイプとの強力な結合性が認められなかった。一方で，添加した膜タンパク質濃度の増加に従って，Unc5Aとnetrin-4との結合度合いが高くなる傾向にあった。つまり，衛星細胞においてUnc5Aがnetrin-4の特異的な受容体であることが示唆された。netrin-4が衛星細胞の分化・融合能を高めるという我々の先の知見と照らし合わせると[6]，Unc5Aは自律的な筋肥大能力が高い衛星細胞のマーカーとなる可能性が考えられた。

3.3　Unc5A過剰発現処理による筋芽細胞の筋分化能の変化

Unc5A自身の生理機能について検証するため，分化誘導過程にある継代筋芽細胞に発現コンストラクトをトランスフェンクションし，Unc5A過剰発現実験系における分化能の変化を調べた。

まず，遺伝子導入の有無を確かめるために培養細胞の蛍光免疫染色を行った（**Fig. 4**）。Unc5Aに特異的な抗体で強く検出された細胞では，発現コンストラクトに組み込んだmCherryが陽性であることを同時に確認した。つまり，導入された

© The Ito Foundation

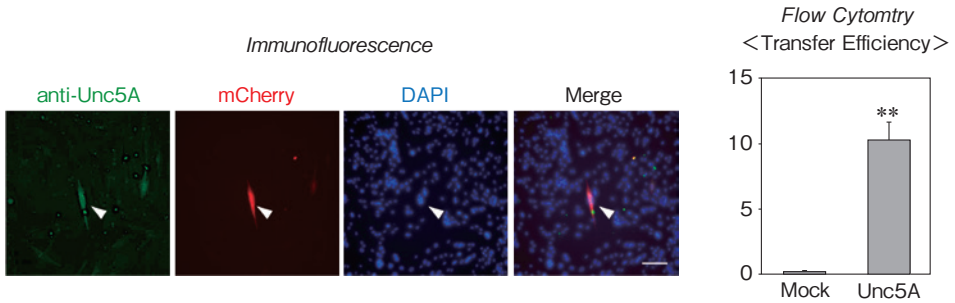


Fig. 4　The transduction efficiency of Unc5A overexpression treatment in myoblasts. The myoblasts were transfected with pmCherry-N1-Unc5A vector（Unc5A-mCherry；Unc5A+）or empty vector（mCherry；Unc5A-）on the day after cell proliferation. Immunofluorescence microscopy for Unc5A（green）, mCherry（red）and DAPI（blue）after the transfected treatments shows myoblasts overexpressing Unc5A and nuclei, respectively. The scale bar represents 100 μm. The ratio of mCherry-positive myoblasts was evaluated using the flow cytometry cell-analyzer system comparing the mock-culture with empty vector and the transfected culture. The bars depict the mean ± standard error of mean（SEM）of three independent cultures. Significant differences from the mean of Mock cultures（the left-most open bar）at $p<0.01$ are indicated by double asterisks.

細胞では過剰発現ができていることが確認された。続いて，遺伝子導入効率を算出するために，フローサイトメトリーを用いてmCherry陽性細胞割合を調べたところ約10％であった。なお，コンストラクトを導入していないMockでは，陽性細胞割合はほぼ０％であった。

導入効率がそれほどよくない点を踏まえ，セルソーティングシステムを用いてmCherry陽性細胞すなわちUnc5A過剰発現細胞のみを分取した。また，同時に分取されたmCherry陰性細胞を対照とした。それぞれの細胞の分化誘導培養を行ってから，筋管形成の制御に深く関わる転写因子群myogenic regulatory factors（MyoD，myogenin）および筋管マーカーである総ミオシン重鎖（total myosin heavy chain；total MyHC）の発現量を調べた（**Fig. 5**）。Unc5Aの過剰発現により，MyoDとmyogeninのmRNA発現レベルは対照と比べて高かった。total MyHCのタンパク質発現レベルについても，有意な差が認められなかったものの，過剰発現細胞でのバンド強度が高かった。すなわち，Unc5Aは筋管形成の促進に関与することが示された。

本研究結果より，衛星細胞で発現する受容体Unc5Aが，同じく細胞から合成・分泌されるnetrin-4との結合を介して，筋分化・融合能を高める制御機構の存在が示唆された。なお，Unc5Aを強く発現する衛星細胞は，自律的な筋肥大能が高いと推測される。本受容体が，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の根幹を担う細胞の特異的なマーカーとなることが期待される。今後は，Unc5Aの発現レベルが高い衛星細胞の局在部位の探索や，Unc5Aへのアゴニスト活性が高い物質のスクリーニングなどから得られる知見を元に，食肉生産現場への応用を目指したい。

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の増加を目指す研究アプローチが求められる。組織特異的な幹細胞である筋衛星細胞（衛星細胞）の分化・融合能が高いことは，出荷時まで効率的に筋量が増加すること，すなわち食肉生産量の増大を可能とすることが期待できる。ポテンシャルの高

© The Ito Foundation

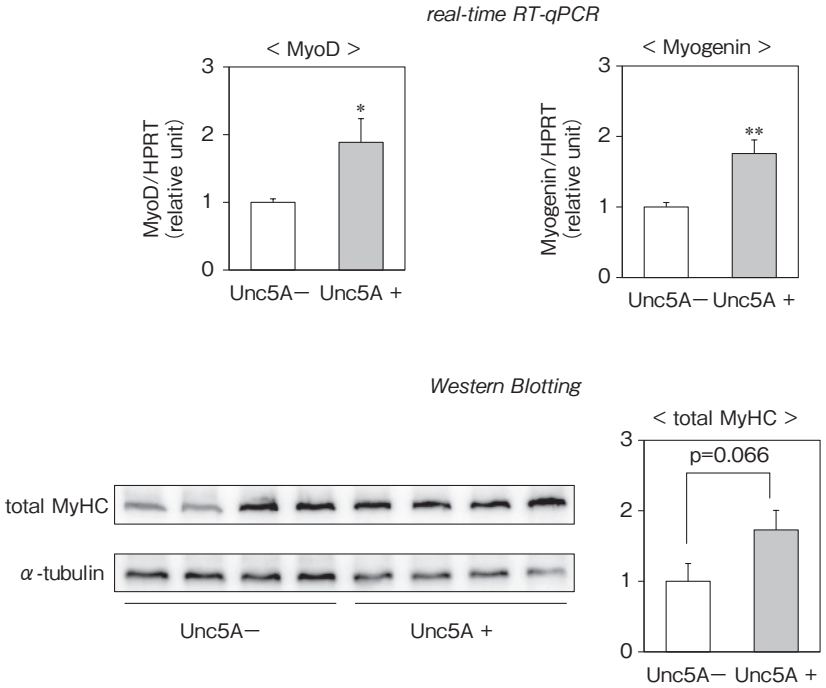


Fig. 5　Myogenic Regulatory Factors（MRFs）and total MyHC expression profiles following Unc5A overexpression treatment in myoblasts after the myogenic differentiation induction. The mCherry positive myoblasts overexpressing Unc5A were sorted using the flow cytometry cell-sorting system, and were proliferated for 24 h and maintained in a differentiation medium for the next 96 h. The mRNA expression level of MyoD, and myogenin was evaluated by real-time RT-qPCR normalized to HPRT level. The protein expression of total MyHC was detected with Western Blotting standardized to α-tubulin expression level. The bars depict the mean ± standard error of mean（SEM）of four independent cultures by relative units, compared to Unc5A-negative culture meaning mCherry negative cells. Significant differences from the mean of Unc5A-negative cultures（the left-most open bar）at $p<0.05$ and $p<0.01$ are indicated by single and double asterisks, respectively.

い衛星細胞の探索にあたって，我々は細胞自身の動態を制御するさまざまな因子の合成・分泌を介して，オートクライン・パラクライン様に作用する制御機構に着目している。これまでに，衛星細胞が筋芽細胞へと分化して新生筋線維（筋管）を形成する過程において，多能性因子netrin-4を合成すること，この因子を介して自律的に筋管形成誘導を制御することを報告した。本研究では，netrin受容体候補（neogenin，Unc5A，Unc5BおよびUnc5C）に着目したアプローチを進めた。分化誘導過程の筋芽細胞において，neogenin，Unc5AおよびUnc5Bは安定して発現した。速筋である長趾伸筋由来の筋芽細胞では，３種の受容体の発現量が遅筋のヒラメ筋由来の細胞より高かった。また，衛星細胞で発現するUnc5Aはnetrin-4との結合性が高かった。Unc5Aの発現コンストラクト導入による過剰発現培養系を用いたところ，筋分化が促進されることが示された。よって，Unc5Aは筋分化にポジティブな機能を有するとともに，自律的な筋肥大誘導機能を担う衛星細胞の特異的なマーカー分子となることが期待される。

文　献

1）　Yin, H., Price, F., Rudnicki, M. A.: Satellite cells and the muscle stem cell niche, *Physiol Rev*, **93**, 23～67, 2013. https://doi.org/10.1152/physrev.00043.2011.

© The Ito Foundation

2） Ten Broek, R. W., Grefte, S., Von den Hoff, J. W.：Regulatory factors and cell populations involved in skeletal muscle regeneration, *J Cell Physiol*, **224**, 2010. n/a-n/a. https://doi.org/10.1002/jcp.22127.

3） 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.：Comparative analysis of semaphorin 3A in soleus and EDL muscle satellite cells in vitro toward understanding its role in modulating myogenin expression, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **45**, 476～482, 2013. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.10.003.

4） Tatsumi, R., Suzuki, T., Do, M. K. Q., Ohya, Y., Anderson, J. E., Shibata, A., Kawaguchi, M., Ohya, S., Ohtsubo, H., Mizunoya, W., Sawano, S., Komiya, Y., Ichitsubo, R., Ojima, K., Nishimatsu, S. I., Nohno, T., Ohsawa, Y., Sunada, Y., Nakamura, M., Furuse, M., Ikeuchi, Y., Nishimura, T., Yagi, T., Allen, R. E.：Slow-Myofiber Commitment by Semaphorin 3A Secreted from Myogenic Stem Cells, *Stem Cells*, **35**, 1815～1834, 2017. https://doi.org/10.1002/stem.2639.

5） 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.：Abundant synthesis of netrin-1 in satellite cell-derived myoblasts isolated from edl rather than soleus muscle regulates fast-type myotube formation, *Int J Mol Sci*, **22**, 1～17, 2021. https://doi.org/10.3390/ijms22094499.

6） Maeno, T., Arimatsu, R., Ojima, K., Yamaya, Y., Imakyure, H., Watanabe, N., Komiya, Y., Kobayashi, K., Nakamura, M., Nishimura, T., Tatsumi, R., Suzuki, T.：Netrin-4 synthesized in satellite cell-derived myoblasts stimulates autonomous fusion, *Exp Cell Res*, **430**, 113698, 2023. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2023.113698.

7） Sun, K. L. W., Correia, J. P., Kennedy, T. E.：Netrins：Versatile extracellular cues with diverse functions, *Development*, **138**, 2153～2169, 2011. https://doi.org/10.1242/dev.044529.

8） Ojima, K., Uezumi, A., Miyoshi, H., Masuda, S., Morita, Y., Fukase, A., Hattori, A., Nakauchi, H., Miyagoe-Suzuki, Y., Takeda, S.：Mac-1 low early myeloid cells in the bone marrow-derived SP fraction migrate into injured skeletal muscle and participate in muscle regeneration, *Biochem Biophys Res Commun*, **321**, 1050～1061, 2004. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.07.069.

9） Rosenblatt, J. D., Parry, D. J., Partridge, T. A.：Phenotype of adult mouse muscle myoblasts reflects their fiber type of origin, *Differentiation*, **60**, 39～45, 1996. https://doi.org/10.1046/j.1432-0436.1996.6010039.x.

10） Collins, C. A., Zammit, P. S.：Isolation and Grafting of Single Muscle Fibres, in：J. Audet, W.L. Stanford（Eds.）, Stem Cells in Regenerative Medicine, Humana Press, Totowa, NJ, 2009：pp.319-330. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-060-7_20.

11） Kitajima, Y., Ogawa, S., Ono, Y.：Visualizing the functional heterogeneity of muscle stem cells, *Methods in Molecular Biology*, **1516**, 183～193, 2016. https://doi.org/10.1007/7651_2016_349.

12） Oe, M., Ojima, K., Muroya, S.：Difference in potential DNA methylation impact on gene expression between fast- and slow-type myofibers., *Physiol Genomics*, **53**, 69～83, 2021. https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00099.2020.

13） Elgaabari, A., Imatomi, N., Kido, H., Nakashima, T., Okuda, S., Manabe, Y., Sawano, S., Mizunoya, W., Kaneko, R., Tanaka, S., Maeno, T., Matsuyoshi, Y., Seki, M., Kuwakado, S., Zushi, K., Daneshvar, N., Nakamura, M., Suzuki, T., Sunagawa, K., Anderson, J. E., Allen, R. E., Tatsumi, R.：Age-related nitration/dysfunction of myogenic stem cell activator HGF, *Aging Cell*, **23**, 1～27, 2024. https://doi.org/10.1111/acel.14041.

© 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（Ⅱ）

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

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 present study examined the relationship between immunoglobulins and microbiota in the bovine rumen, aiming to provide foundational insights for potential applications in vaccine-based control of ruminal microbial activity. Initially, we assessed the concentrations of ruminal immunoglobulins (Ig) in both young and adult cows and cattle. Concentrations of IgA and IgG fell within the μg/ml range, with IgA exhibiting a higher concentration than IgG. Moreover, concentrations of IgA and IgG diminished in adult animals compared to young animals. Similarly, the proportions of IgA- or IgG-bound bacteria decreased in adult animals relative to young animals. Subsequently, we conducted a bacterial community network analysis to explore potential associations between immunoglobulin concentrations, binding proportions, and the abundance of ruminal microbiota members. Weighted correlation network analysis identified four bacterial modules exhibiting significant correlations with IgA and IgG concentrations and binding proportions. Further examination uncovered networks among bacterial members within each module, highlighting certain core ruminal bacteria (e.g., Oscillospirales) with potential to act as hubs in these networks. In conclusion, this study elucidated the potential relationship between immunoglobulins and the ruminal microbiota, offering novel insights into this complex interplay.

1．目　　的

近年の肉牛・乳牛の生産では，アシドーシスのように，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。また，ルーメン微生物が産生するメタンは環境負荷要因として懸念されている。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生理活性成分であり，細菌の活性を抑制する働きを持つ。一般に抗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

© The Ito Foundation

ワクチンが提唱されている[1]。ルーメン液バッチ培養などの*in vitro*系を用いた先行研究[2, 3]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が，*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[4, 5]。

前年度の研究では，子牛における唾液抗体の産生能力の発達動態を検討したところ，動物の成長に伴い下顎腺におけるIgAの産生・分泌が上昇することを明らかにした[6]。また，IgGとIgMの唾液中濃度は低く，成長による上昇も見られなかった。これらの結果から，IgAがウシ唾液中の主要抗体であることが示唆された。本年度の研究では，唾液抗体がルーメン内に流入することで特定の細菌の活性に影響を及ぼすという仮説を検証するため，ルーメン内の抗体関連パラメーター（抗体の濃度およびルーメン細菌への結合度）と，ルーメン細菌叢構成との間の関連性について検討した。

２．材料・方法

2.1　供試動物およびサンプル採取

北海道大学生物生産農場にて飼育されたホルスタイン種牛（１～45ヶ月齢；雌雄混合；計14頭）を供試した（実験承認番号19-0020）。なお本研究では，未経産牛またはそれと同等の月齢の個体を若齢牛，初産以降またはそれと同等の月齢の個体を成牛として２群に分けてデータ解析を行った。子牛には出生後１時間以内に母牛の初乳を１～３kg与え，それ以後は同農場のバルク乳を朝夕２回，各回２kgずつ与えた。１週齢からスターター（ミルフードBフレーク：ホクレンくみあい飼料，北海道）の給与を開始し，1.5から２ヶ月齢時点で１日２kg採食させることを目標に徐々に増給した。粗飼料（チモシーまたはオーチャードグラス一番刈乾草）は７日齢から自由採食させた。育成期以降は，自家製コーンサイレージおよび前述の粗飼料を日本飼養標準の給与体系に沿って与えて飼養した。ルーメン液は自作のストマックチューブを用いて，午前中の飼料給与から約３時間後に採取した。採取後のルーメン液は50 ml遠沈管に入れ，－80℃にて保存した。ルーメン液は解析直前に流水解凍し，５分間静置して固形分を沈殿させた後に，上清を分析用として1.5 mlチューブに回収した。

2.2　Enzyme-Linked Immunosorbent Assay（ELISA）による抗体濃度の測定

上述したルーメン液サンプル0.5 mlを，さらに遠心分離し（9,000×g，４℃，５min），得られた上清をELISA測定に用いた。ELISAには，市販のAnti-IgA抗体およびAnti-IgG抗体（いずれもFortis life sciences，Walthum，MA，USA）を使用した。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ルーメン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490 nmにおける吸光度を測定した。統計解析プログラムR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。

2.3　ルーメン細菌の抗体結合度の測定

ルーメン液サンプル0.5mlを遠心分離（100×g，

© The Ito Foundation

4℃，15 min）し，得られた上清を40 μmセルストレーナーに通したのちに，さらに遠心分離（9,000×g，4℃，5 min）し，細菌ペレットを調製した。このペレットを500 μlのPBSで懸濁したのち，遠心分離（9,000×g，4℃，5 min）し，上清を捨てることで洗浄した。ブロッキングバッファー（10％ sheep serum in PBS）100 μlでペレットを懸濁し，ボルテックスにより最低スピードで振とう（室温，1 hour）することによってブロッキング処理を行った。遠心分離（9,000×g，4℃，5 min）してブロッキングバッファーを取り除いたのちに，PBSによる洗浄操作を1回行った。4％パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液でペレットを懸濁し，インキュベート（室温，15 min）して細菌の固定を行った。遠心分離（9,000×g，4℃，5 min）してバッファーを取り除いたのちにPBSによる洗浄操作を2回行った。遠心分離後の上清を除去したのちに得られたペレットを希釈したAnti-IgA抗体またはAnti-IgG抗体と反応させ（室温，1hour）。用いた抗体はPE Labeling Kit-NH2（同仁化学研究所，熊本）によって事前に蛍光標識した。遠心分離（9,000×g，4℃，5 min）して抗体希釈液を取り除いたのちに洗浄バッファー（0.25 M NaCl，0.2％ Tween 20 in PBS）で2回洗浄を行った。細菌サンプルを洗浄バッファー1 mlで懸濁したのち，SYBR Green Ⅰ（Lonza，Basel，Switzerland）を100,000倍希釈になるよう添加し，核染色した。セルストレーナーを通したのち，2時間以内にフローサイトメトリー（FACSCanto, BD, Franklin Lakes, NJ, USA）を用いた分析を行った。ゲーティング後に得られたFITC-PE陽性イベントを抗体結合画分とし，サンプルごとのFITC陽性イベント数で除することで総細菌に対する抗体結合割合（抗体結合度）を算出した。

2.4　MiSeqによる糞便細菌叢解析

Repeated Bead Beating Plus Column（RBB+C）法（Yu and Morrison, 2004）によりDNAを抽出，精製した。具体的には，ルーメン液サンプルを遠心分離（12,000×g，5 min）し，得られた細菌ペレットを1 mlのcell lysis buffer（500 mM NaCl，50 mM Tris-HCl，pH8.0，50 mM EDTA and 4 % sodium dodecyl sulfate）により懸濁し，破砕チューブに移した。破砕チューブに0.4 gの滅菌ガラスビーズ（0.3 g of 0.1 mm and 0.1 g of 0.5 mm）を加え，ビーズビーターにて10分間ホモジナイズした。その後，70℃で15分インキュベートした後に遠心分離し，上清を回収するというステップを2回繰り返した。上清に含まれるDNAをイソプロパノール沈殿により回収したのちに，QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit（Qiagen，Hilden，Germany）を用いて再度精製した。抽出したDNAの濃度はNanodrop 2000 spectrophotometer（Thermo Fisher Scientific）を用いて測定し，TE bufferで5 ng/μlに調整した。

調整したDNAサンプルをテンプレートとして，16S rRNA遺伝子のV3-V4領域（約460 bp）を標的とするオーバーハング付きプライマーを用いてTurboCycler2（Blue-Ray Biotech, New Taipei City, Taiwan）によって1 st PCRを実施した。得られたPCR産物は，生物技研（神奈川県）に委託して，2nd PCRおよびMiSeq（Illumina, San Diego, CA, USA）によるシーケンスに供した。シーケンスにより取得したリードデータは，微生物群衆解析プログラムQIIME2（ver. 2023.5）を用いて解析した。まず，DADA2プラグインを用いてクオリティコントロールを行ったのち，Silva 138リファレンス配列を用いてASV（Amplicon sequence variant；種に相当する分類群）を抽出した。真正細菌について，総リード数に占める目

© The Ito Foundation

レベル，科レベルおよび属レベルの各細菌群の相対存在量（%）をサンプルごとに算出した。サンプル全体の10%以上に出現し，存在量が0.1%以上を占める細菌群を以後の解析に用いた。

2.5　Weighted Gene Correlation Network Analysis（WGCNA）

統計解析プログラムRのWGCNAパッケージ[7]を用いてルーメン内抗体濃度およびルーメン細菌への抗体結合度と，QIIME2を用いて得られた各細菌群の相対存在量について重み付け相関ネットワーク解析を行った。具体的には，各細菌群の相対存在量をHellinger変換し，pickSoftThreshold機能を用いてsoft thresholdの決定とscale-free性の確認を行い，各細菌群のネットワークを構築した後に，cutreeDynamic機能を用いて細菌群のモジュールを検出した。得られた細菌群モジュール，およびモジュールを構成する各細菌群に関して，ルーメン内抗体濃度および細菌の抗体結合度との相関関係をSpearmanの方法により解析した。

2.6　統計手法

二群間の数値の比較にはWelch's *t*-testを行い，$p < 0.05$の場合に郡間に有意差が，$p < 0.1$の場合に統計的傾向があるとした。

3．結果と考察

3.1　ルーメン内抗体濃度とルーメン細菌の抗体結合度

若齢牛および成牛のルーメン内抗体濃度の測定結果を**Fig. 1A**に示す。IgA濃度は群間に有意な差はなかったが，若齢牛の濃度は（13.7 ± 8.3 μg/ml）は，成牛の濃度（1.9 ± 1.6 μg/ml）を大きく上回っていた。IgG濃度は，若齢牛（1.3 ± 0.4 μg/ml）が成牛（0.2 ± 0.1 μg/ml）と比較して高い傾向を示した（$p = 0.051$）。

ルーメン内の抗体結合度の測定結果を**Fig. 1B**に示す。IgA結合度は，若齢牛（9.2 ± 2.2 μg/ml）が成牛（3.26 ± 0.96 μg/ml）と比較して高い傾向を示した（$p = 0.069$）。IgG結合度についても，若齢牛（5.1 ± 1.2 μg/ml）が成牛（2.2 ± 0.8 μg/ml）と比較して高い傾向を示した（$p = 0.087$）。

本研究では，IgA濃度はIgG濃度に対して，若齢牛では11倍，成牛では13倍と高い値を示した。これは，子牛においてIgAの分泌機能が上昇し，主要唾液抗体となることを示した当研究グループの前年度の研究結果と一致する[6]。しかし，本研

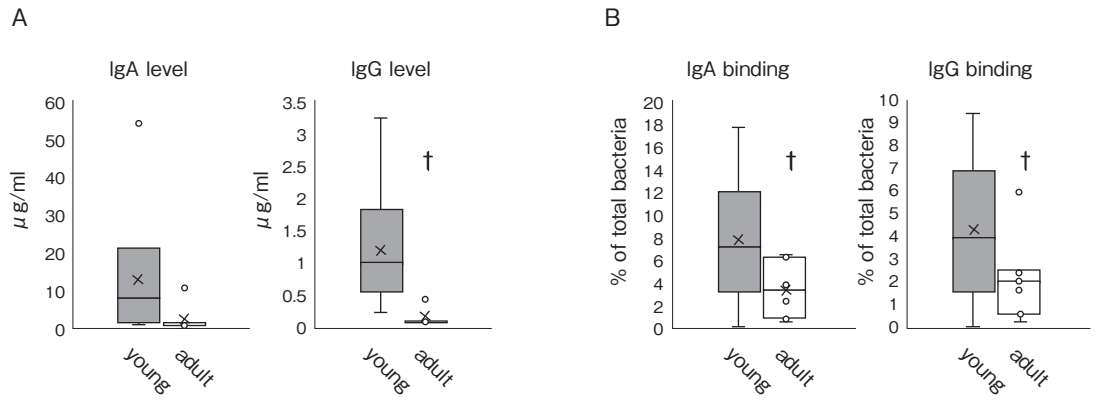


Fig. 1　Concentrations binding proportions of immunoglobulin A and G in the rumen. Concentrations (A) and binding proportions (B) of IgA and IgG were compared between young and adult animals. (†$p < 0.1$)

© The Ito Foundation

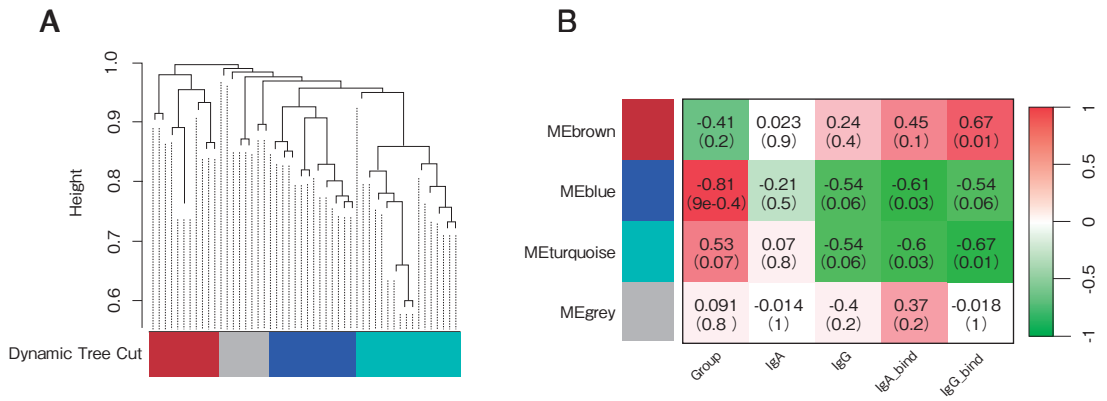


Fig. 2　Weighted Gene Co-expression Network Analysis（WGCNA）of ruminal microbiota and immunoglobulin-associated parameters.（A）Clustering of ruminal bacteria to detect modules.（B）Correlation between bacterial modules and immunoglobulin parameters.

究ではルーメン内抗体濃度はIgAとIgGともに若齢牛に比べて成牛で低下していた。ルーメン容積はウシの成長とともに急速に増加することから[8]，唾液中の抗体濃度の上昇よりもルーメン容積の上昇度合いが上回り，ルーメン液中の抗体が希釈されて濃度が低下した可能性が考えられる。また，芳賀らの報告[9]によると，泌乳中の乳牛における唾液中抗体濃度は160 μg/ml程度であり，本研究における成牛のルーメン内抗体濃度はそれよりも84倍程度低かった。成牛の１日の唾液分泌量は最大約180 lであり[10]，ルーメン内容物は約90 lであることから[11]，本研究の結果は予想される希釈倍率から大きく乖離しており，今後さらなる検証が必要である。

3.2　ルーメン内の抗体濃度および抗体結合度とルーメン内細菌叢の関連性

ルーメン内の抗体濃度はウシの成長に伴い低下することが明らかになったため，次にルーメン細菌が抗体濃度の変化と関連するのか検討した。WGCNAによる細菌群間のネットワーク解析から，本実験で得られた主要ルーメン内細菌群は４個のモジュール（MEbrown，MEblue，MEturquoiseおよびMEgrey）に分類された（**Fig. 2A**）。次にこれらのモジュールと，ウシの成長ステージ（若齢牛または成牛），抗体の濃度および結合度との相関性を解析した。モジュールMEblueおよびMEturquoiseは成長ステージ，IgA結合度（blue；r = − 0.61，turquoise；r = − 0.6），IgG濃度（r = − 0.54，r = − 0.54），およびIgG結合度（r = − 0.54，r = − 0.67）と有意に相関し，MEbrownはIgG結合度（r = 0.67）と有意に相関していた（**Fig. 2B**）。

各モジュールに含まれる細菌群間のネットワークを**Fig. 3**に示す。MEbrownはネットワークを構築する細菌群の数が少なかったが，その中ではo_Bacteroidales と f_oscillospiraceae UCG-005 の間に比較的強い関連性が見られた（r = 0.24；**Fig. 3A**）。一方で，MEblueおよびMEturquoiseについては，より多くのネットワーク構成細菌群が見られた。MEblueでは g_*Rikenellaceae_RC9*_gut_group や，g_[*Eubacterium*]_*coprostanoligenes*_group，o_Oscillospirales，f_Oscillospiraceaeの接続次数が高く，ネットワークの中心的な細菌群であった（**Fig. 3B**）。また，MEturquoiseでは g_*Prevotellaceae*_UCG-003や，g_*Candidatus_Saccharimonas*，g_

© The Ito Foundation

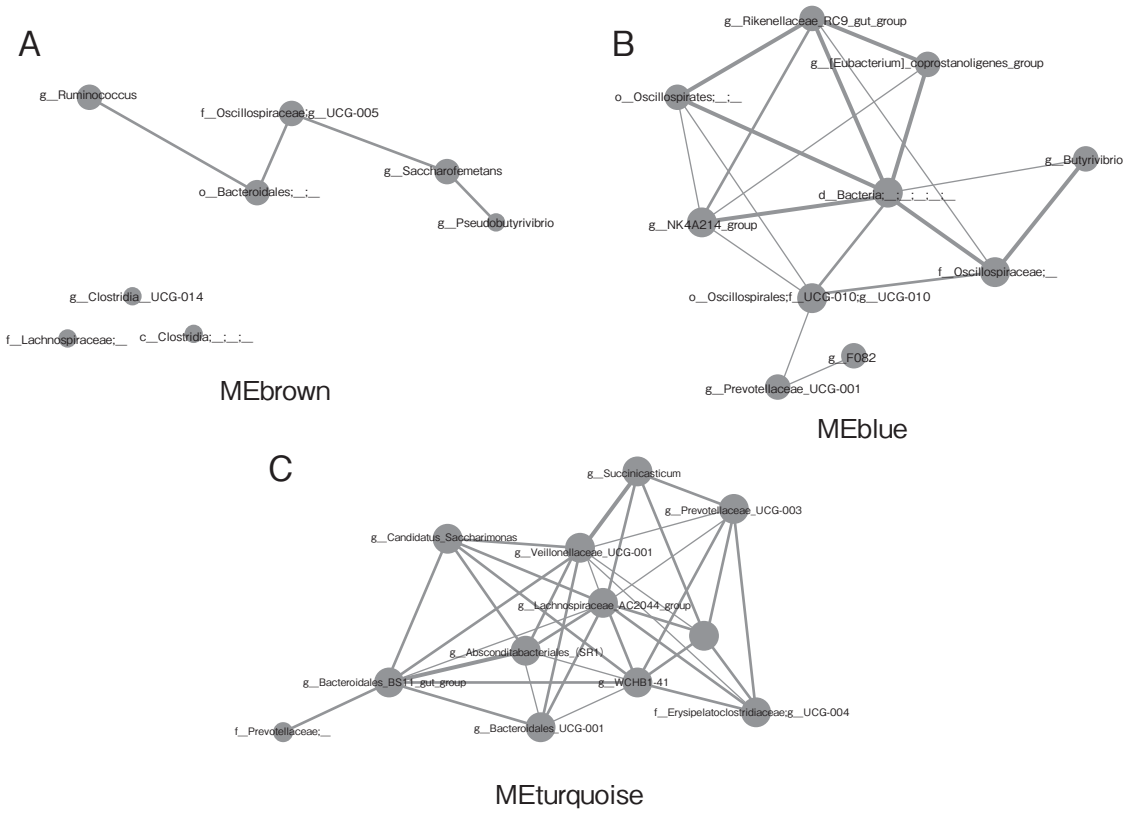


Fig. 3　Networks of bacterial members in each module. Networks were visualized in MEbrown (A), MEblue (B), and MEturquoise (C). (*$p < 0.05$)

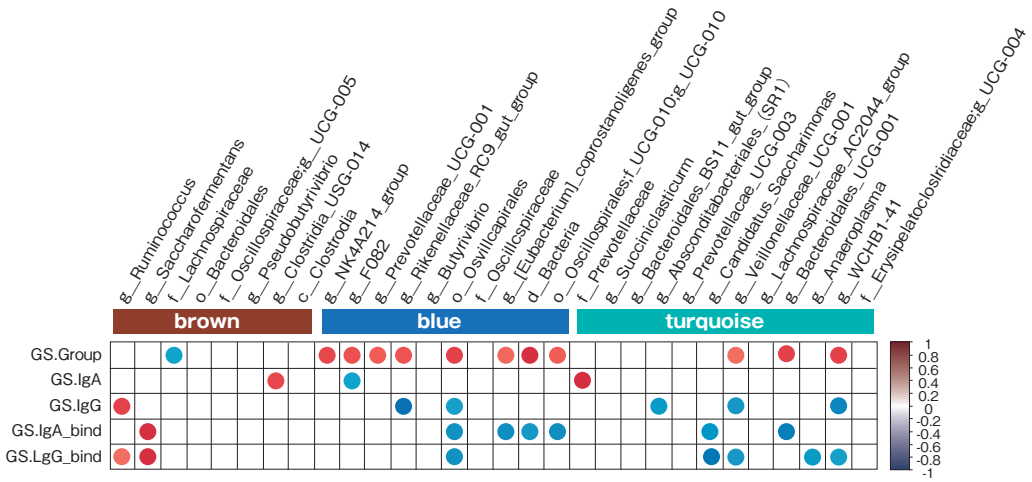


Fig. 4　Correlation between each bacterial member in modules and immunoglobulin-associated parameters.

*Veillonellaceae*_UCG-001，g_*Lachnospiraceae*_*AC2044*_groupがネットワークの中心的な細菌群であった（**Fig. 3C**）。

さらに，各モジュールの構成細菌群と，成長ス

© The Ito Foundation

テージおよび抗体データとの相関性を解析した結果を**Fig. 4**に示す。MEbrown構成細菌群では，g_*Ruminococcus*およびg_*Saccharofermentans*がIgG結合度と正の相関を示した。MEblueについては，多くの構成細菌群がウシの成長ステージと正の相関を示したが，IgA結合度についてはo_osscillospirales，g_[*Eubacterium*]_*coprostanoligenes*_group，およびo_Oscillospirales；f_UCG-010；g_UCG-010が負の相関を示した。また，IgG濃度およびIgG結合度についてはo_Osscillospiralesが負の相関を示した。MEturquoise構成細菌群では，IgA濃度についてf_Prevotellaceaeが正の相関を示した。IgA結合度についてはg_*Candidatus_Saccharimonas*，およびg_Bacteroidales_UCG-001が負の相関を示した。IgG濃度についてはg_*Absconditabacteriales*_（SR1），g_*Veillonellaceae*_UCG-001，およびg_WCHB1-41が負の相関を示した。IgG結合度についてはg_*Candidatus_Saccharimonas*，g_*Veillonellaceae*_UCG-001，g_*Anaeroplasma*，およびg_WCHB1-41が負の相関を示した。

本研究では，ルーメン内の抗体濃度および抗体結合度と一部の細菌群の間に関連性があることが明らかになった。MEbrownはIgAおよびIgG双方の関連パラメーターと正の相関を示し，その中でもg_*Ruminococcus*やg_*Saccharofermentans*がこれらのパラメーターと有意な相関を示した。これらの細菌群はルーメン内の常在菌として知られるが，g_*Ruminococcus*は繊維およびデンプン分解において重要な役割を果たす細菌群であり，g_*Saccharofermentans*は主にデンプン利用能を持つことが知られる[12]。

構成菌群数がより多いMEblueおよびMEturquoiseは，ルーメン内抗体濃度や結合度と負の相関を示し，IgA関連パラメーターについては　o_Osscillospirales，g_[*Eubacterium*]_*coprostanoligenes*_group，o_Oscillospirales；f_UCG-010；g_UCG-010，g_*Candidatus_Saccharimonas*，およびg_*Bacteroidales*_UCG-001が顕著な相関を示した。また，IgG関連パラメーターについてはo_Osscillospirales，g_*Absconditabacteriales*_（SR1），g_*Veillonellaceae*_UCG-001，g_WCHB1-41，g_*Candidatus_Saccharimonas*，およびg_*Anaeroplasma*が顕著な相関を示した。IgAおよびIgGに関連パラメーターの双方に相関が見られたo_Osscillospiralesはルーメン内の主要細菌群の一つであり，さらに，o_Oscillospirales；f_UCG-010；g_UCG-010はウシ消化管内の繊維分解能と関連性があることが示唆されている[13]。さらに，相関が検出された細菌群の中では，g_*Candidatus_Saccharimonas*は酢酸産生能を持つことが知られており[14]，これらの細菌群はルーメン内の飼料分解や短鎖脂肪酸産生に関与すると言える。

ヒトの消化管ではIgAとIgGがさまざまな種類の常在菌に結合し，特にIgGは非有用菌や病原菌への結合性が高いことが報告されている[15]。本研究では，ルーメン内抗体関連パラメーターは繊維やデンプンの利用に関わる常在菌の存在量と関連性があることが明らかになったが，IgAとIgGの性質の差については明確な結果は得られなかった。しかし，細菌群によって抗体関連パラメーターとの相関の正負が異なったため，ウシの成長に応じたルーメン内抗体濃度の変化が細菌群の動態に影響を及ぼす可能性が示唆される。ルーメン内における抗体と細菌叢のこのような関連性は，抗体による消化管細菌叢制御の実現可能性を検討するうえで，重要な基礎的知見になると考えられる。今後，抗体がルーメン内細菌群にどのような作用を与えるか検討するためには，トランスクリプトーム解析などによる抗体パラメーター関連細

© The Ito Foundation

菌群の機能推定や，セルソーティングによる抗体結合菌の同定が必要になると考えられる。

４．要　約

唾液抗体を介したワクチンによるルーメン細菌叢の制御を念頭に，ルーメン内の唾液由来抗体の濃度および細菌への抗体結合度と，ルーメン細菌叢の間に関連性が存在するか検討した。ルーメン内ではIgAとIgGがμg/mlレベルで存在しており，IgAがより高濃度であった。またこれらの抗体の濃度はともに成牛に比べて若齢牛で高かった。WGCNAによるネットワーク解析によりルーメン内の抗体と細菌叢の関連性を検討したところ，IgAとIgGの濃度または結合度と相関を示す細菌群モジュールが複数検出された。これらの中には，飼料分解や短鎖脂肪酸の産生に関わるルーメン内主要細菌群が含まれていた。本研究から，ルーメン内抗体と細菌叢の間に密接な関連がある可能性が明らかになった。一方で，ルーメン内の抗体がどのような細菌群に結合するのか，また結合した細菌群の機能に影響するのかについて検討することが今後の課題として考えられる。

文　献

1） Baca-González, V., Asensio-Calavia, P., González-Acosta, S., Pérez de la Lastra, J. M., Morales de la Nuez, A.：Are Vaccines the Solution for Methane Emissions from Ruminants?, A Systematic Review, *Vaccines* (*Basel*), **8**, 460, 2020.

2） 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.

3） 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.

4） 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.

5） 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.

6）鈴木裕：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，令和4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），**41**, 461～466, 2023.

7） Langfelder, P., Horvath S.：WGCNA：an R package for weighted correlation network analysis, *BMC Bioinformatics*, **9**, 559, 2008.

8） Diao, Q., Zhang, R., Fu, T.：Review of Strategies to Promote Rumen Development in Calves, *Animals* (*Basel*), **9**, 490, 2019.

9） Haga, S., Suzuki, Y., Miwa, M., Kubota, K., Sakatani, M.：Changes in immunoglobulin A and immunoglobulin G concentrations in the saliva of Japanese Black beef cows during calving：A pilot study, *Anim Sci J*, **93**, e13793, 2022.

10） Meyer, R. M., Bartley, E. E., Morrill, J. L., Stewart, W. E.：Salivation in Cattle. I. Feed and Animal Factors Affecting Salivation and Its Relation to Bloat, *J Dairy Sci*, **47**, 1339～1345, 1964.

11） Stokes, M. R., Bull, L. S., Halteman, W. A.：Rumen liquid dilution rate in dairy cows fed once daily：effects of diet and sodium bicarbonate supplementation, *J Dairy Sci*, **68**, 1171～1180, 1985.

12） Gaffney, J., Embree, J., Gilmore, S., Embree, M.：Ruminococcus bovis sp. nov., a novel species of amylolytic Ruminococcus isolated from the rumen of a dairy cow, *Int J Syst Evol Microbiol*, **71**, 004924, 2021.

13） Fuerniss, L. K., Kreikemeier, K. K., Reed, L. D., Cravey, M. D., Johnson, B. J.：Cecal microbiota of feedlot cattle fed a four-species Bacillus supplement, *J Anim Sci*, **100**, skac258, 2022.

14） Si, B., Liu, K., Huang, G., Chen, M., Yang, J., Wu, X., Li, N., Tang, W., Zhao, S., Zheng, N., Zhang, Y., Wang, J.：Relationship between rumen bacterial community and milk fat in dairy cows, *Front Microbiol*, **14**, 1247348, 2023.

15） León, E. D., Francino, M. P.：Roles of Secretory Immunoglobulin A in Host-Microbiota Interactions in the Gut Ecosystem, *Front Microbiol,* **13**, 880484, 2022.

© The Ito Foundation

微細藻類の飼料添加が暑熱環境下のブロイラーの高温耐性に及ぼす影響

Effects of dietary algae on resistance of broiler chickens against high ambient temperature

河　上　眞　一
（広島大学大学院統合生命科学研究科）

Shin-Ichi Kawakami
（Graduate School of Integrated Sciences for Life, Hiroshima University）

High ambient temperature is known to negatively affect production and physiology of farm animals. Dietary algae have gained attention due to their possibility to alleviate negative effects of heat stress on chicken production performance. In the present study, therefore, effects of dietary algae on resistance of male layer chicks against high ambient temperature were examined. A total of 30 male layer chicks (5 chicks per group) were used. From 5 to 9 days of age, birds were randomly divided into 6 treatment groups with 2 thermal conditions (normal : 27℃; cyclic heat stress : 38℃ for 8 hr per day) and 3 diet (supplemented with powdered algae at a concentration of 0, 1, or 2%). Supplementation of powdered algae at a concentration of 2% significantly alleviated the negative effects of heat stress on rectal temperature and panting duration. The present results suggest that dietary supplementation of 2% powdered algae alleviate negative effects of heat stress in layer chicks.

1．目　　的

地球温暖化を原因とする近年の環境温度上昇（暑熱）は，現在および将来における我が国の畜産物生産に多大な損失を与えることが危惧されているが，それらは暑熱による産業動物への環境負荷，いわゆる「暑熱ストレス」が原因であると考えられる。我が国における近年の食料品の価格高騰を受け，鶏肉および鶏卵に対する消費者のニーズはますます高まっているが，我が国の肉用鶏および採卵鶏は高飼育密度で飼養されていることから暑熱ストレスの影響を受けやすく，なんらかの対策が求められている。

我々は弊学に設立された「日本鶏資源開発プロジェクト研究センター」の業務として，暑熱によるニワトリの生産性低下を軽減するためのさまざまな方策について研究を進めている。その一環として，ニワトリへの高温耐性付加が可能な飼料添加物などについてスクリーニングを実施しているが，その過程で，ある種の「微細藻類」の飼料添加がニワトリに高温耐性を生じさせる可能性があることを偶然発見した。微細藻類とは水分中で生育する植物プランクトンの総称であり，食品，バイオ燃料，化粧品などに幅広く利用されているが，近年，微細藻類の一種であるスピルリナ（*Spirulina platensis*）粉末のブロイラー飼料への

© The Ito Foundation

添加により暑熱ストレスによる日増体量，飼料効率，血液成分などの悪化がわずかながら改善することが報告され[1,2]，ニワトリの暑熱対策への微細藻類の活用が注目されている。

よって本研究では，微細藻類の乾燥粉末を飼料添加し，高温環境下で飼育されるニワトリに給与してその高温耐性に及ぼす効果を検証するとともに，微細藻類が動物に高温耐性を誘起するメカニズムの一端についても明らかにすることを目的とした。

２．方　法

2.1　微細藻類の飼料添加がニワトリの高温耐性に及ぼす効果

本研究は「広島大学動物実験等規則」に基づいて実施した。微細藻類粉末を添加した飼料を室温，または暑熱環境下のニワトリに給与し，微細藻類の飼料添加がニワトリの高温耐性に及ぼす効果について検証した。供試動物として当初はブロイラーヒナを用いる予定であったが，培養により得られた微細藻類粉末が当初予定より少なかったため，より摂食量の少ない採卵鶏（Julia Lite）雄ヒナ（６試験区×５羽＝30羽）を用いた。

照明条件は12L12D（8：00点灯，20：00消灯）とした。試験区は２×３の完全要因配置とし，２種類の環境温度（通常飼育温度，または暑熱温度）×３種類の試験飼料（微細藻類粉末を０，１，または２％の割合で飼料添加）とした。通常飼育温度は飼養マニュアルに従い，導入時は室温30℃にて飼育を開始し，日齢に合わせて室温を１℃／２日の割合で低下させた。また，暑熱温度は９：00から２時間かけて38℃まで加温して17：00まで維持し，17：00から２時間かけて29℃まで減温した。

ニワトリヒナは１日齢時に単飼し，２－４日齢時までは通常飼育温度にて飼育して添加飼料の馴致を実施した。５日齢時に供試動物を通常飼育温度区，または暑熱温度区に分け，９日齢時まで飼育した。測定項目は体重，日増体量，摂食量，飼料要求率，および直腸温とした。また，７日齢時に暑熱温度区の個体を動画撮影し，３分間あたりのパンティング（口を開け，喉または背中を小刻みに動かす呼吸をパンティングと定義）時間を計測した。ニワトリは発汗機能がなく，パンティングにより体内の熱を体外に放出することから，パンティング時間は暑熱ストレスの良い指標となる。

2.2　暑熱環境下のブロイラー中枢神経系におけるc-FOSタンパク質の局在

微細藻類が動物に高温耐性をもたらすメカニズムは現在のところ不明であるが，高温耐性には中枢神経系の体温中枢，摂食中枢，ホルモン分泌中枢などが関与することから，間脳視床下部の関与が示唆される。本研究では神経活性化の指標として汎用される最初期遺伝子（c-FOS）[3]の免疫組織化学染色を行い，暑熱ストレス負荷によりc-FOS発現が増加する（神経細胞が活発に活動する）脳内領域を同定するとともに，微細藻類給与によりc-FOS発現が変化する脳内領域を探索することにより，脳内における微細藻類の作用部位同定を目指して以下の実験を実施した。

上記2.1の試験区のうち，通常飼育温度＋微細藻類０％添加区，暑熱温度＋微細藻類０％添加区，および暑熱温度＋微細藻類２％添加区，の３試験区に供試した採卵鶏雄ヒナ（各区３羽ずつ）を実験に供試した。暑熱負荷試験終了後に右心房内留置カテーテルを通じて４％パラホルムアルデヒド緩衝液を注入し，脳の灌流固定を実施した。ブレインマトリクスを用いてcorticoseptomesencephalic tractから乳頭体までを含む脳組織片ブロックを作成し，クリオスタットにより厚さ20 μmの凍結切片を作成した。一次抗体としてマウス抗cFos（C-10, Santa Cruz Biotechnology, Inc, CA, USA）

© The Ito Foundation

Table 1　Effects of dietary algae on resistance of male layer chicks under normal or high ambient temperature.

	Thermoneutral			Heat stress			P			
	0% added	1% added	2% added	0% added	1% added	2% added	Algae	Temperature	Algae × temerature	Algae × temperature × day
Final body weight (g)	61.07	63.17	61.76	61.68	60.21	63.11	0.7462	0.7788	0.2958	0.5045
Average daily gain (g)	5.70	6.22	5.59	5.50	5.59	6.16	0.7579	0.8167	0.4248	0.0495
Feed intake (g)	11.82	12.49	12.30	10.09	10.39	11.06	0.2218	<0.0001	0.6090	0.1741
Feed conversion ratio	2.17	2.09	2.32	1.92	1.96	1.87	0.8881	0.0296	0.5648	0.2651
Rectal temperature (℃)	41.48^{b}	41.65^{bde}	41.74^{de}	42.04^{ac}	42.14^{a}	41.78^{cd}	0.0488	<0.0001	0.0001	0.3926

を6,000倍に希釈したもの，また二次抗体としてAlexa Fluor594 標 識 抗 マ ウ ス IgG（Thermo Fisher Scientific K.K.，東京）を最終希釈倍率が800倍になるように希釈したものを使用した。染色した切片は水溶性包理剤にて包埋し，蛍光顕微鏡による観察および写真撮影を実施した。

3．結果と考察

微細藻類の飼料添加がニワトリの高温耐性に及ぼす効果について，**Table 1** に示した。摂食量，飼料要求率，および直腸温に環境温度の効果が認められたことから，本試験において暑熱ストレスが供試動物に正常に負荷されたことが示唆された。体重，日増体量，摂食量，および飼料要求率に微細藻類粉末添加の有意な効果は認められなかったものの，微細藻類粉末の添加量増加に伴い，暑熱温度区の摂食量減少の改善が観察された。また直腸温については，藻類飼料添加の有意な効果，および藻類飼料添加と環境温度との有意な交互作用が認められた。まず通常温度区において，微細藻類粉末の０％添加区と比較して２％添加区の直腸温が有意に上昇した。また，暑熱温度区で１％添加区と比較して２％添加区の直腸温が有意に低下し，微細藻類粉末添加による直腸温低下作用が認められた。また，暑熱温度区の０％添加区および１％添加区の直腸温は通常温度区のすべての添加区の直腸温より有意に上昇したものの，暑熱温度区の２％添加区における直腸温は，通常温度区の１％添加区および２％添加区の直腸温との間に有意差は認められなかった。

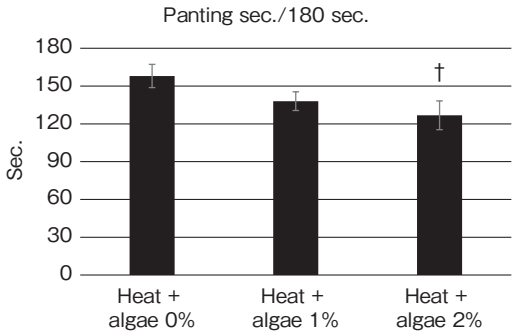


Fig. 1　Effects of dietary algae on panting duration of male layer chicks under high ambient temperature.

また，微細藻類の飼料添加がニワトリのパンティング時間に及ぼす効果について，**Fig. 1** に示した。暑熱温度区の２％添加区におけるパンティング時間は暑熱温度区の０％添加区のものと比較して短縮する傾向が認められた。

本研究において，暑熱温度区における摂食量減少は，有意差は認められなかったものの微細藻類粉末の飼料添加により改善したが，この微細藻類粉末による摂食量改善効果は本粉末が有する直腸温低下作用によりもたらされたものと考えられた。本研究では通常温度区において本粉末の２％飼料添加により直腸温が有意に上昇したが，一般的に動物の体温は高い方がより大気中への体温の放熱がしやすくなるため，暑熱による体温上昇に対応しやすくなると考えられる。本研究において暑熱温度区の２％添加区で直腸温が有意に低下したのは，微細藻類粉末の摂取により供試鶏の体温が上昇し，その結果として体外への放熱が順調に

© The Ito Foundation

行われたためと考えられた。また，体外への放熱が順調に行われたことにより，パンティングによる体外への放熱の必要性が低下し，結果としてパンティング時間が短くなったと考えられた。

次に，暑熱環境下のニワトリ中枢神経系におけるc-FOSタンパク質の局在について検証したが，予想に反し，通常飼育温度＋微細藻類０％添加区，暑熱温度＋微細藻類０％添加区，および暑熱温度＋微細藻類２％添加区，のいずれの試験区においてもc-FOS免疫陽性反応は観察されなかった。本試験で使用された抗c-FOS一次抗体（C-10, Santa Cruz Biotechnology, Inc）は弊研究グループにおいて本能行動に関与する脳内部位の検出に汎用されており，c-FOS免疫染色方法になんらかの問題があったとは考えにくい。c-FOSの発現は刺激の種類によりその発現ピークが異なるとの報告もある[3]ことから，暑熱刺激により誘導されるc-FOSのニワトリ脳内における発現ピークについてのさらなる検討が必要であると考えられた。

以上の結果より，本試験で使用した微小藻類がニワトリの暑熱対策に活用できることが示唆されたことから，2024年９月を目途に本微小藻類の特許申請を実施する予定である。

４．要　約

近年の地球温暖化による環境温度の上昇（暑熱）は，畜産物の生産に多大な損失を与えることが危惧されている。微細藻類は暑熱対策に活用可能であるとの報告もあることから近年注目されつつあり，本研究は微細藻類粉末の飼料添加が暑熱環境下のニワトリに及ぼす影響について検証した。供試動物として採卵鶏雄ヒナを使用した。試験区は２×３の完全要因配置（各区n＝５，合計30羽）とし，２種類の環境温度（通常温度区，および暑熱温度区）と３種類の飼料（微細藻類粉末を市販飼料に対して乾物あたり０，１，または２％添加）とした。餌の馴致は２日齢時から実施し，５日齢時より９日齢時まで暑熱温度区に対して高温曝露（９：00~17：00, 38℃）を実施した。測定項目は体重，日増体量，摂食量，飼養要求率，直腸温，およびパンティング時間とした。直腸温について，藻類飼料添加の有意な効果，および藻類飼料添加と環境温度との有意な交互作用が認められた。また，藻類添加により暑熱温度区のパンティング時間が短くなる傾向が認められた。以上の結果より，本試験で使用した微小藻類はニワトリの暑熱対策に活用できることが示唆された。

文　献

1）Mirzaie, S., Zirak-Khattab, F., Hosseini, S. A., Donyaei-Darian, H.：Effects of dietary Spirulina on antioxidant status, lipid profile, immune response and performance characteristics of broiler chickens reared under high ambient temperature, *Asian-Australas J Anim Sci*, 31(4), 556～563, 2018.

2）Moustafa, E. S., Alsanie, W. F., Gaber, A., Kamel, N. N., Alaqil, A. A., Abbas, A. O.：Blue-green algae (*Spirulina platensis*) alleviates the negative impact of heat stress on broiler production performance and redox status, *Animals* (*Basel*), 11(5), 1243, 2021.

3）Herdegen, T., Leah, J. D.：Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins, *Brain Res*, 28(3), 370～490, 1998.

© 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（Ⅱ）

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

實安隆興・西本和樹
（神戸大学大学院農学研究科）

Takaoki Saneyasu and Kazuki Nishimoto
（Graduate school of Agricultural Science, Kobe University）

Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha（PGC-1alpha）has several 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）. In the present study, we examined the effects of overexpression of PGC-1 α1 and α4 on lipopolysaccharide-induced inflammatory atrophy in C2C12 myotubes, culture conditions which increase gene expression of PGC-1α1 and α4, and whether AAV-LacZ vector can induce forced expression in chicken myotubes. Overexpression of PGC-1α4 but not PGC-1α1 was observed. LPS-induced phosphorylation of p38MAPK was inhibited in C2C12 myotubes overexpressed PGC-1α4. Unlike the previous study（Cell, 151, 1319-1331, 2012.）, both clenbuterol and forskolin increased mRNA levels of PGC-1α1 and α4. Force expression of LacZ was not observed in chicken myotubes treated with AAV-LacZ vector. Further studies are required to find suitable culture conditions.

1．目　的

鶏肉生産のために育種改良されてきたブロイラーでは，異常むね肉の発生が問題となっており，それに関連した研究報告が近年増加している[1)]。異常むね肉の発生機序は複雑であるが，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た炎症が生じ，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，あるいは結合組織の希薄化によって生じるとされる[1)]。それゆえ，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と考えられるが，生産性の観点からは別の方法が望ましい。また，他の畜種においても骨格筋の炎症は食肉としての価値を低下させ得るため，骨格筋の炎症の予防や抑制は畜種によらず重要である。

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）には複数のアイソフォームが存在する[2)]。PGC-1α4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アイソフォーム（PGC-1α1な

© The Ito Foundation

ど）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[3]。また，マウスの肝細胞を用いた研究において，PGC-1αl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[4]。これらのことから，骨格筋におけるPGC-1αlとα4の遺伝子発現を制御することで，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。

先行研究において，クレンブテロール（β2アドレナリン受容体作動薬）はマウス骨格筋のPGC-1α4の遺伝子発現を促進し，逆にPGC-1αlの遺伝子発現を抑制することが報告されている[5]。また，フォルスコリン（アデニル酸シクラーゼ活性化剤）はその両アイソフォームの遺伝子発現を促進することが報告されている[3]。クレンブテロールとフォルスコリンはどちらもPKAシグリングを活性化するが，それらが発現促進するPGC-1αアイソフォームが異なる理由はいまだ明らかにされていない。

本研究では，筋細胞においてPGC-1αl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，骨格筋研究で汎用されているC2C12筋管細胞におけるアデノ随伴ウィルス（AAV）ベクターによるPGC-1αアイソフォームの過剰発現が，リポポリサッカライド（LPS）による炎症性筋萎縮に及ぼす影響を調べるとともに，先行研究[3]を参考にC2C12筋管細胞におけるPGC-1αアイソフォームの遺伝子発現が促進される条件の探索を行った。また，AAVベクターを用いたニワトリ筋管細胞への過剰発現系の構築を試みた。

2．方　法

2.1　C2C12筋管細胞の培養

昨年度の報告[6]と同様の方法でC2C12（理化学研究所）を12ウェルプレート（VIOLAMO，アズワン株式会社）で培養し，筋管細胞を形成させた後，昨年度の報告[6]と同様の方法で作製したAAV-LacZ，AAV-PGC-1α1，あるいはAAV-PGC-1α4をmultiplicity of infection（MOI）が1×10^4 vg/cellとなるように添加した培地で２日間培養した。その後，１μg/mLのLPS（大腸菌O111由来）を含む培地に交換して２時間培養し，タンパク質を抽出した。

2.2　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-1αlとα4の遺伝子発現に及ぼす影響

2.1と同様の方法で筋管細胞を形成させた後，１μMクレンブテロール，あるいは10μMフォルスコリンを培地に添加し，３時間培養後にRNAを抽出してリアルタイムPCRに供した。

2.3　ニワトリ筋管細胞におけるmultiplicity of infectionの検討

先行研究と同様の方法でニワトリ胚由来筋管細胞を形成後[7]，MOIが１×10^4 vg/cellとなるようAAV-LacZを添加した培地で２日間培養後，細胞をX-gal染色に供した。

2.4　ウェスタンブロット

昨年度の報告と同様に行った[6]。

2.5　リアルタイムPCR

昨年度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。

2.6　統計解析

Student's t-test，あるいはDunnett's testを行った。

3．結果と考察

AAVベクターによりPGC-1α4の過剰発現は確認できたが，PGC-1αlの過剰発現は確認できなかった（**Fig. 1**）。MOIを１×10^5 vg/cellとして再度実験したが，同様であった（data not shown）。この理由は不明であるが，本研究で用いたAAV

© The Ito Foundation

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'
Tbp	5'-gtgccagatacattccgcct-3'	5'-agctgcgtttttgtgcagag-3'

The primer sequences of PGC-1α1 and α4 are the same as in previous studies (3,5).

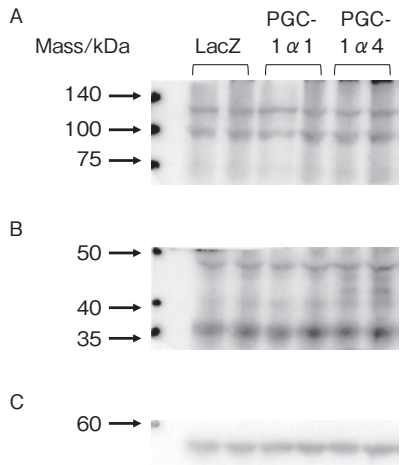


Fig. 1　Representative images of Western blot analysis of PGC-1α1 (A), PGC-1α4 (B), and α-tubulin (C).

に挿入できる目的遺伝子のサイズは2.5 kbとされており[8]，PGC-1α1のサイズは約2.4 kbであることからAAVによる過剰発現が困難なのかもしれない。今後，さらに培養条件を検討するか，別のベクターを用いた方法を検討する必要がある。

ストレス応答MAPキナーゼであるp38MAPKのリン酸化の促進はPGC-1α4を過剰発現させたC2C12筋管細胞では認められなかったが，もう1つのストレス応答MAPキナーゼであるJNKのリン酸化はいずれのベクターを添加した場合でもLPSにより有意に促進され，筋委縮の主要調節因子であるatrogin-1タンパク質量も増加する傾向を示した（**Fig. 2**）。これらのことから，骨格筋において，PGC-1α4の発現促進によりLPS誘導性の炎症反応を部分的に抑制できる可能性が示されたが，本研究程度の発現促進では筋委縮を抑制できないことが示唆された。

初代培養による先行研究では，10 μMのフォルスコリンによりPGC-1α1と4の両方の遺伝子発現は有意に促進され，500 nMのクレンブテロールではPGC-1α4の遺伝子発現のみが有意に促進されている[3]。C2C12筋管細胞を用いた本研究においても，先行研究と同様にフォルスコリンによりPGC-1α1と4の遺伝子発現は有意に促進された（**Fig. 3**）。しかしながら，クレンブテロールによっても両方の遺伝子発現が有意に促進された（**Fig. 3**）。マウスを用いた*in vivo*における先行研究では，クレンブテロールの腹腔内投与により骨格筋のPGC-1α4の遺伝子発現は有意に促進され，逆にPGC-1α1の遺伝子発現は有意に抑制されている[5]。したがって，クレンブテロールによるPGC-1αアイソフォームの発現調節は，生体内と細胞株であるC2C12の筋管細胞では異なることが示唆された。

© The Ito Foundation

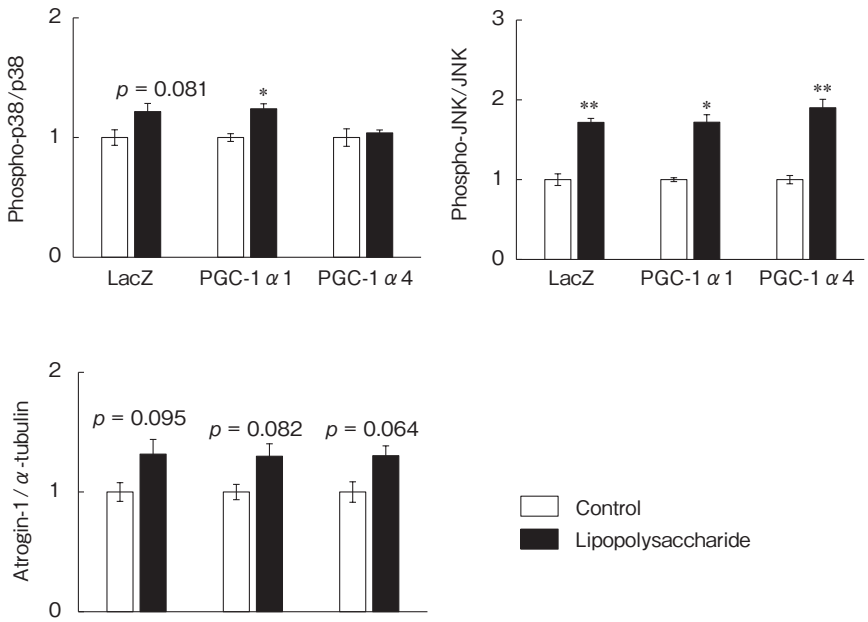


Fig. 2　Relative protein levels and phosphorylation rate in C2C12 myotubes treated with lipopolysaccharide
Data are expressed as mean ± standard error of the mean.
*, ** Significant with respect to each control group（*$p < 0.05$；**$p < 0.01$）

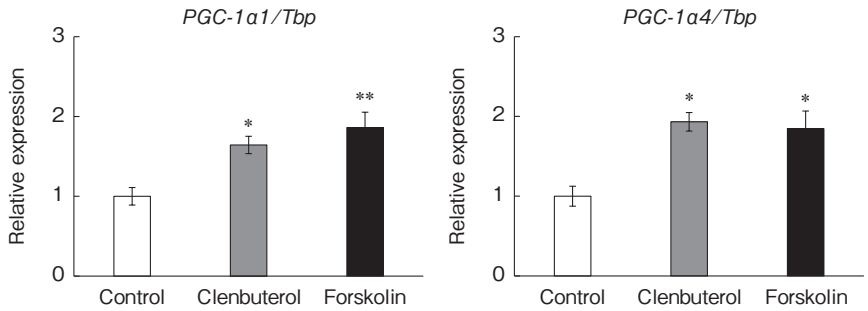


Fig. 3　Relative expression of PGC-1α isoforms in C2C12 myotubes treated with clenbuterol and forskolin
Data are expressed as mean ± standard error of the mean.
*, ** Significant with respect to control group（*$p < 0.05$；**$p < 0.01$）

AAVベクターを用いる利点として，P1レベルの施設でも取り扱いが可能であること，分裂／非分裂細胞のいずれにも遺伝子導入が可能であること，および免疫原性が低く動物への遺伝子導入に適していることなどがあげられ[9]，哺乳類における研究では他のベクターとともに汎用されている。ニワトリの研究では強制／過剰発現系の実験が少ないが，ニワトリでも比較的扱いやすいAAVベクターを用いてそのような実験系が構築できれば，研究手法として有用である。しかしながら，本研究において，X-galで染色されたニワトリ筋管細胞は見られなかった（data not shown）。したがって，少なくとも今回用いたセロタイプ（AAV1）はニワトリ筋管細胞に感染せず，今後，他のセロタイプや，別のベクターを用いた方法を検討する必要がある。

© The Ito Foundation

4．要　約

本研究では，C2C12筋管細胞におけるAAVベクターによるPGC-1αアイソフォームの過剰発現がLPSによる炎症性筋萎縮に及ぼす影響，およびC2C12筋管細胞におけるPGC-1αアイソフォームの遺伝子発現が促進される条件の探索を行った。また，AAVベクターを用いたニワトリ筋管細胞への過剰発現系の構築を試みた。その結果，PGC-1α1の過剰発現は確認できなかったが，PGC-1α4の過剰発現は確認され，LPSによるp38MAPKのリン酸化促進はPGC-1α4の過剰発現により緩和された。また，先行研究と異なり，クレンブテロールとフォルスコリンはPGC-1α1とα4の両方の遺伝子発現を促進した。C2C12筋管細胞と同じ条件でニワトリ筋管細胞へのLacZの強制発現を試みたが，X-galで染色されたニワトリ筋管細胞は観察されなかった。

文　献

1） Soglia, *et al.*：*Poultry Science*, **100**, 101180, 2021.
2） Martínez-Redondo, *et al.*：*Diabetologia*, **58**, 1969～1977, 2015.
3） Ruas, *et al.*：*Cell*, **151**, 1319～1331, 2012.
4） Léveillé, *et al.*：*Molecular Metabolism*, **34**, 72～84, 2020.
5） Martínez-Redondo, *et al.*：*The Journal of Biological Chemistry*, **291**, 15169～15184, 2016.
6） 實安ら：令和４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, **41**, 353～358, 2023.
7） Saneyasu, *et al.*：*Growth Hormone & IGF Research*, **65**, 101478, 2022.
8） Website of Takara Bio Inc. Accessed on April 15, 2024. Available from URL: https://catalog.takara-bio.co.jp/CONTENTS/catalog_request/pdf/aav_vector.pdf
9） Website of Takara Bio Inc. Accessed on April 15, 2024. Available from URL: https://catalog.takara-bio.co.jp/product/basic_info.php?unitid=U100007828

© The Ito Foundation

３Ｄ画像解析を活用した肉用牛におけると畜時の適切な姿勢および放銃位置の探索

Improvement by 3D image analysis of the penetrating site and body position of captive bolt gun to properly stunning of cattle at a commercial slaughter facility

髙橋　史昭・三浦　　弘・前田　洋佑・武田　一貴
（北里大学獣医学部）

Fumiaki Takahashi, Hiroshi Miura, Yosuke Maeda and Kazuki Takeda
(School of Veterinary Medicine of Kitasato University)

In this study, we observed the slaughter process at a commercial slaughter facility in Aomori Prefecture and observed fainting and limb and body movements from stanning to lifting of the body and investigated their effects on meat quality. The number of individuals who showed limb movements during the slaughter process increased from 32.5% immediately after forehead strike to 67.1 % after blood release and 76.2 % before lifting. The strength of limb movements also tended to increase. The time required for slaughter was 18.8 ± 5.2 s from stanning to blood release and 219.4 ± 76.2 s from forehead to hanging. These times did not differ among breeds. The relationship between these results and meat quality could not be statistically concluded in this study because only a few individuals showed defects or blood spots in the meat quality during the study period. However, the incidence of blood spotswas low at 0.55%, suggesting that the killing was done properly with respect to stanning. The binary classification machine learning model, which determines the success or failure of stanching based on multivariate data obtained at the time of stanching, showed a large effect of blood release time and lifting time. The results suggest that stanning in the correct position is important for the success or failure of stanning, and that the contribution of the left and right sides is low, suggesting that the success or failure of stanning is a vertical motion blur.

１．目　　的

肉用牛における肉質の低下を招く要因[1)]として，スタニング（打額）やステッキング（放血）の失宜による不完全な失神や異常な四肢の動きを起こす間代性痙攣の発生があげられている。本研究においては，と畜行程の打額から吊上げ行程までの，失神や異常な四肢痙攣の要因を検討し，食肉評価や格付けなどの肉質との関連性の解析を試みた。また，打額時の牛における画像データから，打額の成功・失敗を判別する学習モデルの作成を試みた。

© The Ito Foundation

2．方　法

2.1　試験（1）：と畜処理時間の解析および肉質成績との関係

調査対象は，青森県十和田市内のＩと畜場で，調査は2023年６月から12月までの期間で実施した。無作為に選定した14日間にと殺された計277頭の牛を調査対象とし，定点カメラから撮影した動画を用いて，と畜行程の打額から吊上げまでの状況を観察，分析した。Ｉと畜場では，横臥位での放血様式が採用されており，保定，打額，放血，頸部処理，吊上げの手順でと畜作業が進められていた。277頭の品種および頭数の内訳はホルスタイン種（H）76頭，黒毛和種（JB）103頭，交雑種（ホルスタイン種×黒毛和種：Ｆ１）94頭，日本短角種（JSH）４頭であった。と畜作業の解析は，と室の右側上方に設置した定点カメラの動画から，打額，放血，頸部処理および吊上げ[1)]の５つの作業間の時間を計測した（**Table 1**）。また，放銃後からの間代性痙攣の発生状況を，①打額後，②放血後および，③吊上げ前の３ポイントで観察した。間代性痙攣による四肢の動きや異常な体動は，動いた肢（前肢，後肢あるいは前後肢共）と，その動きの強さと発生頻度を０～４の５段階にスコア化することで評価し，その発生率を算出した。スコアは以下のとおりである。０：動きがない，１：弱い動きが１～２回ある，２：中程度の動きが数回ある，３：長時間の中程度の動きまたは数回の強い動きがある，４：体を動かすのに十分な強さの四肢の動きが長時間続くか，繰り返される（**Table２**）。と畜後の肉質の成績については，瑕疵や血斑が認められた個体をカウントして調査期間における発生率を算出した。

2.2　試験（2）：打額の成功・失敗を判別する二値分類機械学習モデルの作成

と室枠に360度カメラ（Insta360 ONE RS 1-Inch 360 edition）を牛の頭部上方約50 cmと左側斜め上方約40 cmの位置に２台設置し，打額時の動きを記録した。360度カメラからは任意の角度で動画を観察した。打額時に得られた多変量データから打額の成功・失敗を判別する二値分類機械学習モデルを作成した。データの前処理および機械学習分析はpython3.11.と付随する各パッケージを用い，統計学的解析にはJMP Pro17（SAS Institute）を使用した。

データ前処理として，①放血時間と吊上げ時間の処理：元の時間データを秒数に変換し，数値として扱うことで分析に適した形に整形した。②放血状態のラベル化：放血状態に関するデータでは，記録から「打額時足がバタついた」「暴れた」などを「失敗」とし，空白の場合を「成功」とした。これにより，放血状態を２値のラベル（成功，失敗）として扱うことができるようになった。③打額方法の表記ゆれ修正：打額方法に関するデータには表記ゆれをAIベースで検出し統一した。④ワンホットエンコーディング：荷受，品種，搬入日，係留所状態[2～5)]などのカテゴリカルデータに対してワンホットエンコーディングを適用し，数値データとして扱えるようにした。これにより，モデルがデータを効率的に学習できるようになった。⑤打額箇所の処理：打額箇所のデータは「上」「下」「左」「右」といった方向と距離（cm）で記述されていた。これを数値データに変換し，方向ごとに列を分けて整理した。成功例は「○」で表記されていたため，これを「打額箇所成功」という列に１としてエンコードし，その他は０で補填した。

以上の整形後データ多変量データを用い，機械学習分析・統計学的分析を実施した。分析手法には，説明可能AI（Explainable-AI）かつ分類精度の高い100本の決定木からなるランダムフォレストモデル（多くの決定木を組み合わせたモデ

© The Ito Foundation

Table 1　Required Times of the slaughter process（sec）

Breed of cattle	Stunning → sticking			Sticking → Oesophageal procedure			Sticking → Hoisting			Oesophageal procedure → Hoisting			Stunnning → Hoisting		
	Ave ± SD	Max	Min	Ave ± SD	Max	Min	Ave ± SD	Max	Min	Ave ± SD	Max	Min	Ave ± SD	Max	Min
All	18.8 ± 5.2	51	9	55.7 ± 47.3	640	12	198.3 ± 67.4	671	92	142.6 ± 59.4	481	31	219.4 ± 76.2	714	111
H	16.5 ± 3.7	30	9	49.0 ± 23.9	136	15	197.0 ± 40.2	338	122	148.0 ± 39.3	270	61	213.5 ± 40.2	357	138
JB	20.1 ± 5.6	42	13	55.1 ± 25.2	117	12	194.5 ± 58.1	431	96	139.4 ± 60.0	380	53	220.9 ± 81.2	693	111
H × JB（F1）	19.2 ± 5.4	51	12	63.5 ± 74.2	640	22	204.7 ± 92.0	671	92	141.2 ± 71.7	481	31	223.9 ± 93.2	714	113
JSH	19.8 ± 3.6	23	15	28.0 ± 6.7	38	24	201.3 ± 74.3	289	121	173.3 ± 72.6	264	96	221.0 ± 75.8	308	136

All：All of slaughtered cattle, H：Holstein Friesian, JB：Japanese Black, H × JB（F1）：Holstein Friesian and Japanese Black crossbreds, JSH：Japanese Short Horn.

Table 2　Involuntary limbs movements in slaughter

	After stunning					After sticking					Before hoisting				
	All	H	JB	H × JB (F1)	JSH	All	H	JB	H × JB (F1)	JSH	All	H	JB	H × JB (F1)	JSH
No moving	187	38	80	64	4	69	15	40	14	0	76	31	27	17	2
Forelimbs moving	4	3	0	1	0	9	0	4	4	1	5	1	4	0	0
Hindlimbs moving	59	28	12	23	0	30	16	4	10	1	15	9	3	2	0
Fore and hindlimbs moving	27	7	11	3	0	169	45	55	63	3	181	35	69	72	2
*Average of limbs movement (min0-max4)	0.68+1.15	1.05 ± 1.31	0.41 ± 0.89	0.67 ± 1.16	ND	1.87 ± 1.43	2.22 ± 1.40	1.34 ± 1.39	2.12 ± 1.35	2.30 ± 0.96	1.89 ± 1.54	1.39 ± 1.44	1.92 ± 1.58	2.26 ± 1.49	2.00 ± 2.31
Percentage of limbs moved	32.5%	50.0%	22.3%	29.7%	0.0%	67.1%	80.3%	61.2%	84.6%	100.0%	72.6%	59.2%	73.8%	81.3%	50.0%

All：All of slaughtered cattle, H：Holstein Friesian, JB：Japanese Black, H × JB（F1）：Holstein Friesian and Japanese Black crossbreds, JSH：Japanese Short Horn.

*Rated on a scale of 0 to 4.　0：No moving. 1：One or two weak movements. 2：Several moderate movements. 3：Prolonged moderate movement or several strong movements. 4：Prolonged or repeated limb movements strong enough to move the body.

© The Ito Foundation

ル）を使用した。

3．結果と考察

3.1　試験（1）：と畜処理時間の解析および肉質成績との関係

調査牛全体では，①打額から放血まで，②放血から頸部食道の処置まで，③放血から吊上げまで，④食道処置から吊上げまで，⑤打額から吊上げまでの各時間は，平均①18.8±5.2，②55.7±47.3秒，③198.3±67.4，④142.6±59.4および⑤219.4±76.2秒であった（**Table 1**）。間代性痙攣に伴う四肢の動きは，打額から放血までの間で，調査対象牛中32.5％にみられた。品種別ではホルスタイン種（H）50.0％，黒毛和種（JB）22.3％，ホルスタインと黒毛和種の交雑種（Ｆ１）29.7％で観察された。日本短角種（JSH）はと畜頭数が極端に少なく，算出できなかった。これらの数値は，放血後および吊上げ前へと行程が進むにつれて発生率が上昇傾向となった（**Table２**）。調査期間中に瑕疵や筋肉割面の血斑が確認された個体は，全体のと畜数2,365頭に対して，延べ13頭で0.55％の割合であった。その品種の内訳はHが７頭，Ｆ１が６頭，JBおよびJSHでは０頭であった。

適切な打額による失神持続時間は60から90秒，適切な放血での死亡時間は30～40秒とされ，EUでは打額から放血までの時間は，動物愛護の観点から60秒以内に行うよう指導している。また，即時に倒れず，頭の挙上，起立，発声，律動的呼吸は打額の失宜とされる。今回の調査期間には打額直後から四肢を大きく動かす，個体が散見された。また，と畜行程で打額から放血の時間が長くなると，筋肉にカット面の血斑が生じやすいとされ，打額後の急激な血圧上昇に伴う毛細血管の破断に起因し，打額後の速やかな放血により回避される[6]。本試験に供したと畜場は打額後の放血が横臥方式であり，と体を吊上げて放血を行う懸垂方式[1]よりも打額から短時間で放血ができる。輸出用食肉処理技術等マニュアル作成委員会による調査では，と体を懸垂方式で処理すると，放血まで最短で31秒以上，最長で144秒（平均で39から64秒強）を要すると報告している。一方，横臥方式の場合，打額から平均14秒余りで放血がされており，血斑発生と関連性が高いと述べている[6]。本調査では，平均時間は18.8±5.2秒であり，品種間で差は認めず，約16から20秒の間で放血されていた。今回の調査期間の肉質評価において，瑕疵および肉割面の血斑の発生率は17頭の0.55％であった。月平均で約1.6頭に相当するもので，（公社）日本食肉格付協会のデータをもとに算定した数値である0.4～0.5％に近かった[6]。2017から2019年の調査では，JBと畜成績で対米輸出施設の血斑発生率が4.0～4.8％であることを考えると，低く抑えられていることが分かった。一方，主に対米輸出向けのと畜施設では，懸垂方式による放血が行われているため，横臥方式と比較して打額から放血までに時間を要することから，このと畜行程の違いが血斑発生率を高める大きな要因になっているものと推察される。これらのデータを勘案すると，Ｉと畜場の打額から放血に至る行程は適切に実施されている確率が高いものと推察された。

今回の調査では，打額直後よりも放血後および吊上げ前の四肢の動きが増加した。これは，放血後に頸部食道などの処置が行われる際の迷走神経への刺激が体動に関与している可能性がある。吊上げ前の体動は，作業員が安全確保のため行う尾や後躯への刺激に反応して現れることが多かった。刺激は体動の鎮静化まで継続するため不随意でも運動量が増加し，ムレ肉などの肉質への影響が懸念された。ヒトでは脳死状態や末期の無呼吸状態でも脊髄反射や脊髄自動反射が観察され，誘発刺激に近い部位で反射の動きが認められる。脊

© The Ito Foundation

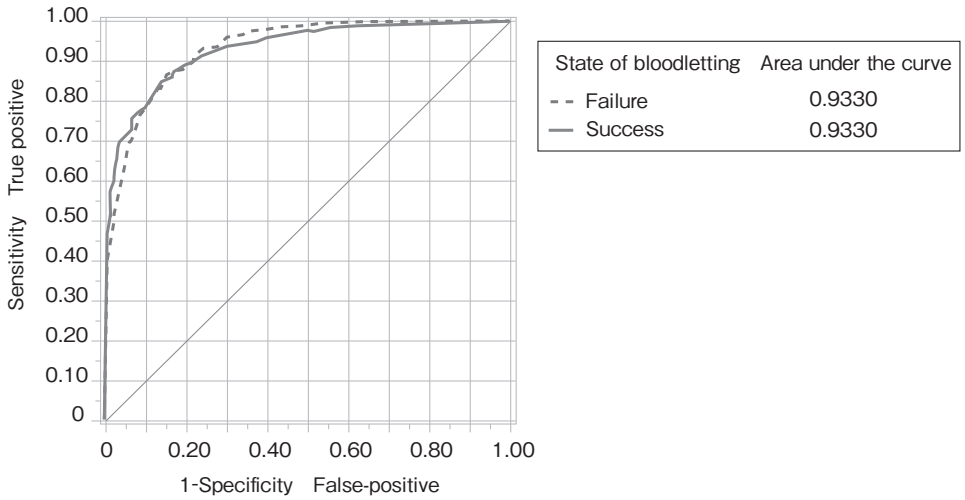


Fig. 1　ROC curve of the random forest model. The area under the curve approaches 1, indicating higher prediction accuracy.

Row contribution

Term	Ramification number	G^2	Ratio
Hoisting time (sec)	8917	338.861905	0.3226
Bloodletting time (sec)	6196	230.638601	0.2196
Stunning point_Upper part	3876	85.1895887	0.0811
Stunning point_Lower part	2495	55.0368591	0.0524
Breed_F1	1176	34.058847	0.0324
Status on mooring_Mooring	435	30.9278137	0.0294
Breed_Holstein cattle	883	30.8802591	0.0294
Stunning method_Airstunner	524	30.5031405	0.0290
Date of arrival_1 day before	827	22.5735167	0.0215
Stunning method_Cowpuncher	385	20.8609726	0.0199
Breed_Japanese black cattle	899	20.805499	0.0198
Stunning method_Cashspecial	332	20.1771163	0.0192
Receipt of cargo_IH	896	19.8326154	0.0189
Status on mooring_Paddock	400	17.9734892	0.0171
Date of arrival_Current day	805	17.8446461	0.0170
Breed_Holstein (delivered cow)	244	13.5841816	0.0129

Fig. 2　Excerpt of the top feature contributions in the random forest model.

髄自動反射は圧迫や皮膚への接触，およびその他の外部刺激[2]などで誘発されることから，吊上げ前の外部刺激による不随意な動きは，このような神経系の作用も影響しているものと考えられる。今回の調査はと畜行程に関して検討したが，今後はと畜場搬入前の要因等についても検討が必要と思われる[7,8]。

3.2　試験（2）：打額の成功・失敗を判別する二値分類機械学習モデルの作成

決定木とは数理的な手法に基づくYes/Noアンケートを無数に作成し多変量から分類を実施するモデルである。今回の分析には3,545件のデータを利用し，57種類の変数が考慮された。モデルの精度はROC曲線（モデルがどれだけ良い予測を

© The Ito Foundation

Fig. 3　Coordinate information extracted from two 360-degree cameras from two directions during stanning.

するかを示すグラフ）の下の面積（AUC）で測定した（**Fig. 1**）。AUCが1.0だと完璧な分類，0.5（対角線）だと完全にランダムな二値分類を行っていることを示す。本結果から打額の成功と失敗の両方の分類で0.9335という高い値が得られた。

これは，本研究で確立したモデルが打額の成功と失敗を高い精度で区別できたことを意味する。ランダムフォレストモデルでは予測に際し各特徴量の寄与率を算出し，多変量データの説明性を向上することができる（**Fig. 2**）。上位には放血時間と吊上げ時間という連続変数データがきたことから，ワンホットエンコード化した離散値よりも連続変数値のほうが予測に寄与しやすいことが示唆される。次いで打額位置の上と下が寄与していることから，打額の成功には正しい位置への処置が重要であり，また，左右の寄与率はいずれも20位前後と低く，打額の成否を分けるのは上下方向のブレであることが示唆された。打額時の位置情報を映像（**Fig. 3**）から得ることで，さらに高精度な予測および理想的な打額位置の検証が可能になると期待される。

4．要　　約

青森県内の一と畜場において，と畜行程を観察し，打額からと体の吊上げまでの，失神や四肢および体躯の動きを観察し，肉質に与える影響を調査した。と畜の行程で四肢の動きを認めた個体は，打額直後32.5％で，放血後は67.1％，吊上げ前は76.2％と増加した。また，四肢の動きの強さも増加する傾向が認められた。と畜行程の所要時間は打額から放血まで18.8±5.2秒，および打額から吊上げまで219.4±76.2秒を要していた。これらの時間は，品種による差は認められなかった。これらの成績と肉質との関連性は，調査期間中の肉質に瑕疵や血斑などを認める個体が少数であったことから，今回の調査ではその関連性について統計的に結論付けをするには至らなかった。しかし，血斑の発生率が0.55％であることから，打額から放血までの時間に関しては，適切な行程でと畜が進められていることが示唆された。また，今回作成された打額の成功・失敗を判別する二値分類機械学習モデルによる解析では，放血時間と吊上げ時間の影響が大きく，さらに成功には正しい

© The Ito Foundation

位置への打額が重要であり，左右の寄与率は低く，成否を分けるのは上下方向のブレであることが示唆された。

文　献

1） 小林光士，下出敏樹，永瀬正幸，水上和則，住奥寿久，水口匡敏，森田幸雄，豊福肇：懸垂放血方式を用いてと畜解体された黒毛和種牛における血液斑の発生状況，日獣会誌，**73**, 463～465, 2020.

2） Bourguet, C., Deiss, V., Gobert, M., Durand, D., Boissy, A., Terlouw, E. M. C.：Characterising the emotional reactivity of cows to understand and predict their stress reactions to the slaughter procedure, *Meat Science*, **125**, 9～21, 2010.

3） Ferguson, D. M., Warner, R. D.：*Meat Science*, 80(1), 12～19, 2008.

4） Schwartzkopf-Genswein, K. S.：Effects of pre-haul management and transport duration on beef calf performance and welfare, *App Ani Behaviour Sci*, 108(1-2), 2007.

5） Booth-McLean, M. E., Schwartzkopf-Genswein, K. S., Brown, F. A., Holmes, C. L., Schaefer, A. L., McAllister, T. A., Mears, G. J.：Physiological and behavioural responses to short-haul transport by stock trailer in finished steers, *Can vet j*, 87(3), 291～297, 2007.

6） 輸出用食肉処理技術等マニュアル作成委員会編：入江正和監修，牛のと畜・解体技術の改善について，ｐ21-24，公益社団法人 日本食肉生産技術センター，東京, 2021.

7） Oshida, T.：Guidelines for the loading,unloading and transport of animals considering the animal welfare and productive hygien, *The Japanese Society of Animal Hygiene*, **38**, 31～36, 2012.

8） Tarrant, P. V., Kenny, F. J., Harrington, D., Murphy, M.：Long distance transportation of steers to slaughter： effect of stocking density on physiology, behaviour and carcass quality, *Livestock Production Science*, 30(3), 223～238, 1992.

© The Ito Foundation

牛のスタニングと脳のダメージに関する解剖学的および病理学的背景データの構築

Construction of anatomical and pathological background data on the relationships between stunning and brain damage in beef cattle in the commercial slaughter facility

安藤　亮・柿崎　竹彦・杉山　真言・川口　博明
（北里大学獣医学部）

Ryo Ando, Takehiko Kakizaki, Makoto Sugiyama and Hiroaki Kawaguchi
(School of Veterinary Medicine, Kitasato University)

During the slaughter of beef cattle, stunning before exsanguination is crucial for reducing animal distress and ensuring worker safety. This study examined the heads of 42 beef cattle (aged 19–29 months, including 22 crossbreeds, 10 Japanese Black cattle, and 10 Holsteins) that were slaughtered and butchered at a slaughterhouse. We aimed to analyze the relationship between stunning methods, specifically the angle and site of incidence, and brain damage at the time of bloodletting. Our analysis revealed that, on average, the stunning incidence site was located 24.1 ± 16.9 mm behind the reference point in the immobilized group and 15.1 ± 22.9 mm behind in the non-immobilized group, in the anteroposterior direction. Notably, for the Holstein breed, the immobilized group's average position was 39.8 ± 5.9 mm behind, versus 10.8 ± 8.1 mm for the non-immobilized group, a statistically significant difference ($p<0.01$). This suggests that a site a few centimeters posterior to the reference might be more suitable for stunning in Holsteins. Regarding injury depth, the immobilized group averaged 6.4 ± 2.6 mm and the non-immobilized group 8.0 ± 2.2 mm, with deeper injuries observed in the latter ($p<0.05$). These result did not reveal significant differences between groups in terms of the angle of incidence or direct damage to the brainstem. These findings indicate the need for further research data collection on the incidence site to more precisely analyze and assess the effects of stunning on brain damage in cattle.

1．目　的

肉用牛のと殺では，放血前のスタニングによる不動化処理が実施されており，適切なスタニングは動物の苦痛軽減や作業者の安全確保につながる。と殺時のスタニングの目的はスタンナーによる打額や電気刺激を用いて，動物を瞬時に無意識状態にして，と殺時の苦痛を避けることにある。打額の場所が適切でない，または衝撃力が不足している場合，動物が途中で意識を回復し，アニマルウェルフェアに関する問題が発生することがある[1,2]。牛における適切な打額位置は，両眼とそれぞれの反対側の角の基部の中心点を結んだ交点から半径２cm以内とされる[1,2]。また，打額の角

© The Ito Foundation

度が頭蓋骨に対して垂直でなければ，脳への衝撃や貫通力が減少し，不十分な失神を引き起こす可能性が指摘されている[1)]。

スタニング法は国内外を問わず，これまでもさまざまな効率の改善が試みられている。例えば，スタニング銃のボルトの長さ，火薬から空気圧へ変更，打額回数の追加などによる脳幹破壊やスタニング徴候との関連性についてさまざまな観点から検討されている[3~6)]。しかし，不動化に関しては劇的な改善には至っていない。放血殺時における牛の完全な不動化を誘導するための真のスタニング効果の改善は実施者の技術と経験に依存している。と畜場ではスタニング実施のつど，作業を中断して，スタニングを検証することは現実的でなく，これらスタニングの効果は依然として実施者個々の経験の積み重ねに委ねられている。

本研究では，牛の放血時不動化に関わるスタニング方法と脳損傷部とを関連付けることで，実施されたスタニングとその結果を多角的に解析する。この解析により適切な入射角度や入射深度，さらには放銃外れの限界域の決定など，スタニング方法の抜本的な改善への基盤となる背景データを構築することを目的とする。

2．方　法

2.1　供試動物

と畜場で処理された肉用牛42頭（19～29ヶ月齢，交雑種：22頭，黒毛和種：10頭，ホルスタイン：10頭）の頭部を本研究に使用した。キャプティブボルトによるスタニング後，動物はすみやかに放血され，その際の動物の徴候をもとに以下のように不動化群（グループ１），非不動化群（グループ２）に分け，各群および各品種から同数の牛を検索した（両群とも交雑種：各11頭，黒毛和種：各５頭，ホルスタイン：各５頭）。各群の判断基準は以下のとおりである。

グループ１　不動化群：放血後も完全な不動化状態が維持された個体→放血前に不動状態

グループ２　非不動化群：放血中に肢のバタつきや呼吸などなんらかの非不動化状態が認められた個体→放血前に動化状態

不動化および非不動化の判断は，以下のスタニングの成功と失敗の徴候を元に判断した[1)]。

＜成功した場合の徴候＞

1　即時に崩れ落ちるように倒れる
2　目を触ってもまばたきしない
3　足，耳，尾，あご，舌の脱力
4　律動的な呼吸がない
5　鼻や耳をつまんでも反応しない
6　発声がない
7　筋肉が硬くなった後，足が引きつけやキックをする

＜失敗した場合の徴候＞

1　即時に倒れず頭を持ち上げる
2　まばたきをする
3　耳などが立っている
4　律動的な呼吸がある
5　鼻や耳をつまむと反応する
6　発声する
7　足を動かす

2.2　CT画像の解析

牛の頭部は全例，コンピュータ断層撮影装置［CT，Activion 16（キャノンメディカルシステムズ），仕様：16列ヘリカルCTスキャナ］を用い，ビーム幅1 mm x 16列，管電圧135 kVp，管電流200 mA，ヘリカルピッチ15，ピッチファクタ0.938の条件下で撮影を行い，入射位置や脳損傷部を撮影し，解析に用いた（**Fig. 1A**，**B**）。

2.3　病理学的解析

牛の頭部は，スタニング時の入射位置を確認し，両眼とそれぞれの反対側の角の基部の中心点を結んだ交点（基準点：reference point）からの

© The Ito Foundation

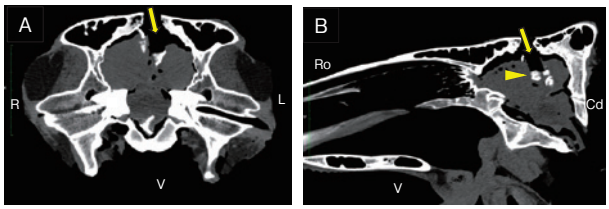


Fig. 1　Computed Tomography
The insertion site（arrow）is located slightly to the right from the midline（A）and posterior to the reference point. In transverse section, the brain damage extends from the left cerebrum to the brainstem, and dense bone fragments（arrow head）are observed deep within the lesion（B）. R：right, L：left, V：ventral Ro：rostral and Cd：caudal direction. Allow：insertion area. Allow head：bone fragment.

距離（前後方向，左右方向）を計測し，写真で記録した。その後，正中線に沿って鋸断し，切断面にて，入射角度や脳の損傷部位など各データを記録し，写真撮影した。その後，左右の脳を採材し，10％中性緩衝ホルマリン溶液にて固定した後，それぞれ脳を前部から後部まで，体軸に垂直方向で横断面を約５mm厚で連続にスライスし，写真撮影するとともに損傷部位を確認した。損傷部位を中心に脳の一部を，常法に従いパラフィン包埋した後，組織切片を作製し，ヘマトキシリン・エオジン染色を施し，組織学的に検索した。

３．結果と考察

3.1　CTおよび病理学的解析

と殺された牛の頭部では両眼とそれぞれ反対側の角の中心点を結んだ交点を基準としたその周辺領域に，入射部位である約15 mm径の刺入箇所が１ヶ所認められた（**Fig. 1A**，**2A**，**2B**）。正中で縦断した割面では，入射位置から脳底側に向かって頭蓋骨とほぼ垂直方向に損傷痕が認められ，ボルトが到達したと考えられる深部の損傷領域には破砕された骨片が認められた（**Fig. 1B**）。脳底側の表面には出血に伴う血餅が付着していた。解析した個体では，損傷が大脳にとどまり脳幹の損傷がみられない例や，視床や中脳に及ぶ例，延髄まで及ぶ例が存在した（**Fig. 2C**）。損傷が大脳にとどまり，脳幹に損傷がなかった例においても，脳幹断面に出血斑が確認される例があった。一方で非不動化群の１例では，刺入部位が頭頂の領域にあり，脳がほとんど損傷していない例も確認された（**Fig. 2D**）。なお，刺入箇所が2箇所存在し，打ち込みが２度行われたと考えられた非不動化群の１例については，試験系から除外した。

上記の脳・脳幹等の損傷部位の組織学的検査では，実質の破壊とクモ膜周辺の出血が観察され，軟膜下に及ぶ出血はほとんどみられなかった。

キャプティブボルトによる脳の損傷は，22口径ライフルによる頭部の損傷に類似するとされ[7]，その傷害には主に２種類あり，（１）発射体の貫通と永久的な損傷空洞の大きさによる組織の裂傷と破壊，（２）一時的な空洞の形成による，弾道からある程度離れた部位での血管や神経線維の切断と破裂を伴う伸張損傷があるとされる[7]。損傷部と脳幹断面にみられた変化は，これらの傷害性変化におおむね一致した。

スタニングの入射位置や角度の集計データを**Table 1** に示した。スタニングの入射位置に関して，基準点の吻側方向（前）「－」，尾側方向（後）を「＋」とした場合，不動化群は前後方向において基準とされる入射位置より，24.1 ± 16.9 mmの位置にみられ，21例中19例が後方に位置していた。前方に位置していた２例はいずれも黒毛和種

© The Ito Foundation

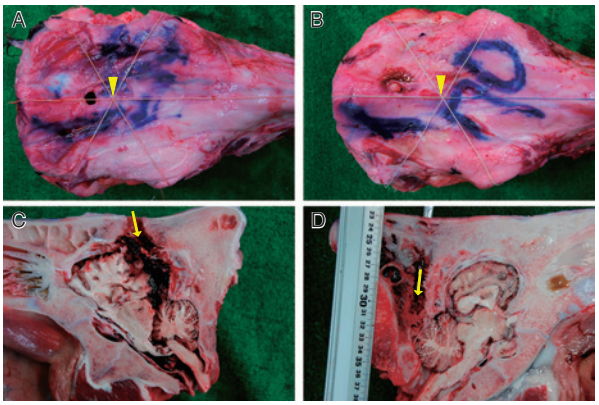


Fig. 2　Gross lesion of stunning site. The reference point is the intersection between both eyes and their opposite horns (arrow head). (A) Immobilized group, Crossbreed. The incidence site was located 30 mm behind the reference point, and 3 mm to the left of the midline. (B) Non-immobilized group, Crossbreed. The incidence site was located 58 mm behind the reference point, and 13 mm to the left of the midline.(C)Sagittal section of (A). The brain damage extends from the cerebrum to the pons and medulla oblongata of the brainstem. (D)Sagittal section of (B). The incident hole (arrow) is found in the bone behind the cerebrum, and there is almost no damage to the brain. Allow：insertion area. Allow head：reference point.

Table 1　Evaluation of the stunning site

Group / Breed	Number	Brainstem damage (N)	Distance from intersection (mm)			Angle (°)	Depth (cm)
			longitudinal	lateral	diagonal		
Group 1：Immobilized							
All	21	12	24.1 ± 16.9	10.1 ± 9.8	28.9 ± 14.9	4.9 ± 10.3	6.4 ± 2.6
Crossbreed	11	6	19.5 ± 14.0	9.3 ± 11.9	24.5 ± 13.9	4.6 ± 9.6	6.5 ± 2.5
Japanease black	5	3	18.6 ± 22.4	12.6 ± 9.0	26.4 ± 18.4	2.3 ± 11.4	7.2 ± 1.4
Holstein	5	3	39.8 ± 5.9	9.4 ± 5.7	41.3 ± 5.6	8.2 ± 12.2	5.3 ± 3.5
Group 2：Non-immobilized							
All	20	10	15.1 ± 22.9	16.6 ± 14.0	30.4 ± 16.4	6.8 ± 12.3	8.0 ± 2.2*
Crossbreed	11	5	26.5 ± 19.5	19.8 ± 14.1	38.1 ± 13.7*	6.0 ± 6.6	7.8 ± 2.3
Japanease black	5	4	−6.6 ± 22.8	9.4 ± 9.1	21.6 ± 13.5	15.6 ± 12.2	8.2 ± 2.8
Holstein	4	1	10.8 ± 8.1**	16.5 ± 18.4	20.4 ± 19.1	−2.0 ± 19.5	8.3 ± 0.6

N：Number of samples shown brainstem damage, *p<0.05, **p<0.01

であった。非不動化群では，基準位置より15.1±22.9 mmの位置にみられ，20例中14例が後方に位置していた。前方に位置していた５例中４例は黒毛和種，１例は交雑種であった。残りの１例はほぼ基準位置にあるホルスタイン種であった。品種別にみると，ホルスタイン種では，不動化群が39.8±5.9 mm，非不動化群が10.8±8.1 mmと不動化群の入射位置が基準点から後方に離れて位置し，統計学的な有意差を示した（p<0.01）。

また，正中から横方向の距離（左右区別なし）を「＋」とした場合，左右方向では，不動化群は正中より10.1±9.8 mm，非不動化群は16.6±14.0 mmの位置にみられた。品種別にみると，不動化群，非不動化群それぞれ，交雑種が9.3±11.9 mm，19.8±14.1 mm，黒毛和種が12.6±9.0 mm，9.4±9.1 mm，ホルスタイン種が9.4±5.7 mm，16.5±18.4 mmと，非不動化群の交雑種およびホルスタイン種で基準位置よりやや離れた位置で

© The Ito Foundation

あったが，ばらつきが大きく統計学的有意差はみられなかった。

基準位置からの直接的な距離は，不動化群は28.9 ± 14.9 mm，非不動化群は30.4 ± 16.4 mmであった。品種別には，交雑種でそれぞれ24.5 ± 13.9 mm，38.1 ± 13.7 mmと非不動化群のほうが離れた位置にあり，統計学的な有意差を示した（$p<0.05$）。

牛の適切な打額位置は，両眼とそれぞれの反対側の角の基部の中心点を結んだ交点から半径2 cm以内とされる。肉牛では交点から１インチ（2.5 cm）上の位置でスタニングを行うのも効果的とされ，顔の長いホルスタイン種では，打額位置が基準位置より約２インチ（５cm）上にあるとの記載もある。本研究から，特にホルスタイン種での打額位置を前後方向には基準位置より数cm後方に設定することがより適切である可能性がある。なお，正中から左右に２cm以上離れた例は，不動化群では3/22例，非不動化群では6/21例と非不動化群で若干多かった。両群とも，より正確に評価するためには，さらなるデータの蓄積が必要と考えられる。

入射角度に関して，頭蓋骨と垂直の位置から，不動化群では4.9 ± 10.3°，非不動化群では6.8 ± 12.3° の角度で入射されており，明らかな差はみられなかった。損傷部の深度に関して，不動化群では，6.4 ± 2.6 mm，非不動化群では，8.0 ± 2.2 mmで，非不動化群が深かった（$p<0.05$）。また，直接的な損傷が大脳にとどまらず視床から脳幹に及んだ例は，不動化群では12/22例，非不動化群では10/21例で，明らかな差はみられなかった。

打額の理想的な角度（入射角度）は頭蓋骨に対して垂直であり，この条件を満たさない場合，脳への衝撃や貫通力が減少し，不十分な失神を引き起こす恐れがある[1, 2]。本研究では，損傷部の深度は非不動化群でむしろ深く，また入射角度や脳幹への到達例数に明らかな差はなく，入射角と不動化および脳損傷との関連性は明らかにすることができなかった。

と殺実施施設が改築され，今回の基礎データをもとに，今後，施設，設備の改良に伴うスタニング状況の違いについても比較検討したい。

また，と殺までには，①と畜場への輸送ストレス，②係留ストレス，③スタニングのストレスが考えられるが，これらのストレスの客観的な評価も望まれる。

4．要　約

肉用牛のと殺では，放血前のスタニングによる不動化処理が実施されており，適切なスタニングは動物の苦痛軽減や作業者の安全確保につながる。本研究では，と畜場にてと殺，解体された肉用牛42例（19～29ヶ月齢，交雑種：22頭，黒毛和種：10頭，ホルスタイン：10頭）の頭部を用いて，牛の放血時不動化に係るスタニング方法（入射角度や入射部位）と脳損傷部との関連について，肉眼的に解析した。解析の結果，スタニングの入射位置は，基準点より，前後方向では，不動化群は24.1 ± 16.9 mm後方に位置し，非不動化群では15.1 ± 22.9 mm後方であった。特にホルスタイン種で抽出すると，不動化群では39.8 ± 5.9 mm後方であり，非不動化群では10.8 ± 8.1 mm後方であった（$p<0.01$）。本研究結果から，特にホルスタイン種では，前後方向には基準位置より数cm後方がより適切である可能性がある。損傷部の到達深度については，各群それぞれ，6.4 ± 2.6 mm，8.0 ± 2.2 mmと非不動化群がむしろ深く（$p<0.05$），入射角度や脳幹の直接的な損傷には，各群明らかな差を見出すことができなかった。今後牛のスタニングと脳のダメージについて，より正確に解析・評価するためには，入射位置に関するさらなるデータの蓄積が必要である。

© The Ito Foundation

文　献

1） 輸出用食肉処理技術等マニュアル作成委員会：牛のと畜・解体技術の改善について，（公財）日本食肉生産技術開発センター，令和３年３月.

2） Grandin, T.：Recommended animal handling guidelines & audit guide: A systematic approach to animal welfare, North American Meat Institute Animal Welfare Committee, 21～23, 2021.

3） Casagrande, R. R., Alexander, L., Edwards-Callaway, L. N.：Effects of penetrating captive bolt gun model and number of stuns on stunning-related variables of cattle in a commercial slaughter facility, *Meat Science*, **170**, 108231, 2020.

4） Terlouw, C., Bourguet, C., Deiss, V.：Consciousness, unconsciousness and death in the context of slaughter. Part I. Neurobiological mechanisms underlying stunning and killing, *Meat Science*, **118**, 133～146, 2016.

5） Kline, H. C., Wagner, D. R., Edwards-Callaway, L. N., Alexander, L. R., Grandin, T.：Effect of captive bolt gun length on brain trauma and post-stunning hind T limb activity in finished cattle Bos taurus, *Meat Science*, **155**, 69～73, 2019.

6） Martin, M. S., Kline, H. C., Wagner, D. R., Alexander, L. R., Edwards-Callaway, L. N., Grandin, T.：Evaluation of different captive bolt lengths and breed influence upon post- stun hind limb and forelimb activity in fed cattle at a commercial slaughter facility, *Meat Science*, **143**, 159～164, 2018.

7） Finnie, J. W.：Brain damage caused by a captive bolt pistol, *J comp pathol*, **109**, 253Finnie258, 1993.

© The Ito Foundation

雑食性昆虫を利用した家畜排せつ物処理における温室効果ガス抑制

Suppression of greenhouse gas emissions in livestock manure treatment using omnivorous insects

霜田　政美・杉村　　乾・鄭　　博允
（東京大学大学院農学生命科学研究科）

Masami Shimoda, Ken Sugimura and Bo Yun Cheng
(Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo)

Black soldier fly (BSF) larvae are expected to be useful for organic waste treatment and feeding farmed fish and livestock. We reared them using chicken manure as substrate, measured their growth rate and estimated material balance and volatility, including greenhouse gases, to quantitatively evaluate the effectiveness of black soldier fly treatment while comparing it with composting. To this end, we analyzed the components of larvae, measured gas in a closed rearing chamber, compared the growth of larvae reared with different amounts of water added to chicken manure, and surveyed literature on composting. The flow was compared between composting and black soldier fly treatment. The composition of the larvae was 63.0% moisture, 12.6% crude protein, 11.0% crude fat, 8.0% crude ash, 18.9% total carbon, and 2.1% total nitrogen. The gas monitoring device we created successfully raised animals and measured carbon dioxide concentrations. However, all methane was below the detection sensitivity, and ammonia was often above the detection limit. The weight gain of larvae was, on average, more than 100 mg per individual in colonies reared on a diet with a moisture content of 75.9% or more compared to 66.2%, and a significant difference was also observed in comparison of prepupal weight. On the other hand, the survival rate was high at over 97% in all cases except for one, and the age until prepupation was particularly small in colonies with a water content of 66.2%. When carbon and nitrogen flows were estimated, 37% of the carbon in chicken manure was lost as carbon dioxide through composting, while the BSF treatment resulted in 86% reduction in total. Previous research indicated about half of the nitrogen was lost during composting, and we estimated the majority would be lost when raising larvae. As for the greenhouse gas reduction effect, we evaluated that rearing larvae for 4 weeks would reduce the total gas emission from 5712g/kg to 4784g/kg in terms of CO_2-eq.

1．目　　的

畜産業から発生する排せつ物および残渣（廃棄処分される稲わら，オガクズ，モミガラなどの敷料，餌の食べ残し，食品加工残渣等）は主として堆肥利用がなされている。一方，肥料高騰・不足を背景に，家畜排せつ物はバイオマス資源として注目が集まっている。国内の有機性廃棄物全般で

© The Ito Foundation

は，食品廃棄物と林地残材を合わせると総資源量約３億４千万トンのおおむね４分の１を占める。このうち，１年間に発生する家畜排せつ物の量（2023年）は約８千万トンと推計され[1)]，余剰の窒素に起因する畜舎排水や施肥等からの水質汚染等が危惧されている。

また，家畜飼料や水産養殖飼料価格が高騰し，化石燃料を大量に消費する沖合漁業の見直しが迫られる中，タンパク質と脂質を代替するサステイナブルな飼料として昆虫の利用が候補にあがっている。その代表格であるアメリカミズアブ（以下，ミズアブ）は，雑食性で腐敗物を好んで食べ消化分解し，家畜昆虫として飼育しやすいことから，さまざまな残渣の大規模処理に応用可能である。ミズアブについては近年，食品加工や農業生産によって発生する有機廃棄物の処理効率や飼料としての有効性に関する研究蓄積が増大し，タンパク質と脂質，ミネラルに富み，養殖魚やペットの餌として有望であることが明らかになりつつある[2)]。

食に関わる温室効果ガスは全発生量の３分の１以上を占めると推定されているが[3)]，なかでも畜産業の寄与は大きく，メタンガス（CH_4）だけでなく，一酸化二窒素（N_2O）や二酸化炭素（CO_2）の排出削減が求められている。雑食性ハエ目昆虫は腸内微生物や体外に消化液を排出することで効果的に家畜排せつ物を分解する。特にミズアブは最も強力な分解者であり，微生物発酵による堆肥化処理よりも短期間に分解熟成が可能である。

現在広く普及している家畜排せつ物の堆肥化処理とミズアブ飼育を比較した研究報告は例がない。そこで本研究では，ミズアブの有効利用が特に大きく見込まれる鶏ふんを用い，マテリアルバランス，温室効果ガスを含めた揮発性ガスの発生について，従来の堆肥化処理と比較しつつ，ミズアブ処理の有効性について定量的に評価することを目的にする。

２．方　　法

2.1　一般成分分析・元素分析

ミズアブの産卵を誘引するための装置に水分率80％以上に保った鶏ふんを置き，孵化した幼虫が鶏ふんで育つよう放置した。成虫を放ってから３週間以上を経て，鶏ふんの中に多数の幼虫が孵化していることを確認した後，乾燥鶏ふんに重量比が２倍の蒸留水を加えた餌で育て，前蛹になる前に回収してオーブン内（80℃，48時間）で乾燥させ，重量変化（水分蒸発量）を記録した。そして，マテリアルバランスの基礎データとなる幼虫の成分，タンパク質，脂質，炭水化物，灰分，炭素，窒素の重量％を測定（日本食品分析センターおよび住化分析センターに委託）した。水分については，乾燥前後の幼虫の体重変化と成分分析に供した幼虫の水分量分析値をもとに計算した。乾燥鶏ふんについての測定値は生産者（あかぎ園芸）が提供する値，水分計（FUSO社製M70-D）による測定および既往の文献から得た。

2.2　温室効果ガスモニタリング装置の構築

プラスチック製の密閉型飼育チャンバー（容量2.7 l）を製作し，ポンプを使って一定の流量（２l/min）での空気循環を行うモニタリング装置を組み立てた。同時に，赤外線ガス検出センサーを選定し，マイクロコンピューターRaspberryPi4で信号入力と温湿度の記録が行える常時監視システムを構築した。既成の基本プログラムに追加する検出感度の調節およびデータの安定取得のためのプログラムを作製し，飼育器に孵化後７日の幼虫400個体，乾燥鶏ふん400 g，蒸留水800 gを入れて，ガスの測定を１日３回行った。

2.3　家畜排せつ物を用いた飼育試験

28℃，日長12時間，湿度50％弱の室内において，人工飼料で孵化後７日間育てた後の幼虫を約３週間，一つの容器当たり250個体を乾燥鶏ふん250 g

© The Ito Foundation

（あかぎ園芸，つぶつぶ鶏ふん）で飼育した。鶏ふんを用いた飼育に関する研究レビュー[4]では餌の水分率は平均66％と記されているが，他の研究[5]では水分率が成長に有意な影響を及ぼすことを示している。鶏ふんを用いて水分率の影響を比較した研究は見当たらないため，乾燥鶏ふんに対する水分の重量比を１：1.5，１：2，１：2.5，１：３（水分率各々66.2，71.9，75.9，78.9％）として飼育し，週１回24個体をサンプリングして体表面の水分を自然乾燥させた後に体重を計測するとともに生存率を推定した。

2.4　堆肥化に関する文献調査

鶏ふんの堆肥化について報告している文献を調査し，炭素および窒素の定量的な分析値を得た。ここではできるだけ鶏ふんのみを使用，あるいはそれに近い堆肥化実験のデータを探索した。また，堆肥化において発生する揮発性ガスの成分と量に関して調査している文献を対象とし，温室効果ガスであるメタン（CH_4），一酸化二窒素（N_2O），二酸化炭素（CO_2）について精度の高い実験を行っている文献を精査して分析値を得た。

2.5　マテリアルバランスの比較

以上（2.1～2.4）から得た数値データを用いて堆肥化およびミズアブ処理におけるマテリアルバランスシートを作成した。堆肥の分解熟成過程における家畜排せつ物からの脱窒，脱炭素フローが，ミズアブ処理によってどの程度抑制されるのか，また，ミズアブの成熟幼虫に移行・回収されるのかに関して定量化を試みた。各温室効果ガスに関しては二酸化炭素相当量に換算して，堆肥化およびミズアブ処理の間で比較を行い，ミズアブ処理の有効性について評価した。

3．結果と考察

3.1　ミズアブ幼虫の一般成分分析

水分については，オーブンでの蒸発量が60.7％，検体の水分が5.9％であったことから，幼虫の水分は63.0％と算出された。その他の成分について乾物（Dry matter）あたりで示すと，粗タンパク質12.6％，粗脂肪11.0％，粗灰分8.0％，全炭素18.9％，全窒素2.1％，C/N比8.9となった。また，炭水化物については既往研究[6]による式にもとづいて推定したところ，21.7％であった。

鶏ふんについては，水分15.6％，全炭素25.4％，全窒素3.6％，C/N比７であった（あかぎ園芸提供のデータにもとづく）。

3.2　温室効果ガスモニタリング装置

空気ポンプを使用して飼育器内の空気を循環させつつ，ガスセンサーを使用して二酸化炭素，メタン，アンモニアの発生量を測定する装置を作成した（**Fig. 1**）。ガスの測定を３週間行ったところ，二酸化炭素濃度の日平均は１日目にピーク8753 ppmを記録し，以降21日目740 ppmまでおおむね漸減の傾向を示した。これらの濃度をもとに21日間の総発生量を推定すると134 l，乾燥鶏ふん１kg当たり663 gであった。一方，メタンは検出感度以下，アンモニアは設置日と15日目以降を除き，検出限界を超えていたため，測定できなかった。ただし，二酸化炭素の発生量との相関をもとに推定すると，アンモニア排出量27 l，21 g/kg乾燥鶏ふんであった。

3.3　家畜排せつ物を用いた幼虫の成長

Table 1 にコロニーの飼育経過を示す（当初幼虫数250，鶏ふん乾重211 g）。前蛹数が半数を超えた時点で全個体を回収し，最終日齢がばらついたので，週齢４の時点で前蛹に至るまでの成長の度合いを比較した。水分率66.2％と78.9％を比較すると，既往の研究[4]と同様に，水分率が低いほうが成長は速かったが，中間的な水分率の結果を含めると，はっきりした傾向は見られなかった。幼虫の生存率は１例（水分率71.9％）を除き，97％を超え，水分率の影響は見られなかった。前

© The Ito Foundation

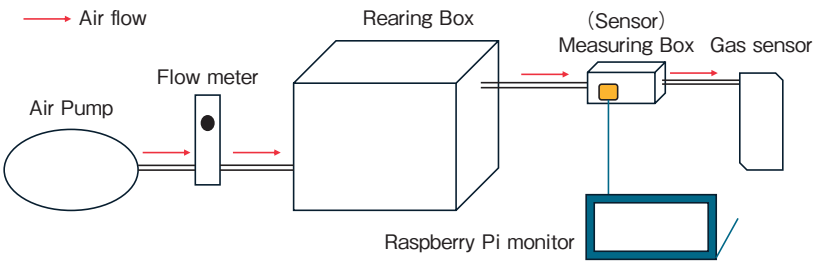


Fig. 1　Monitoring system for chicken manure rearing experiment

Table 1　Larval rearing conditions and stages during growth experiments

Substrate moisture condition	Starting date	End date	Age at the end date	Proportion of prepupae at four weeks of age	Number of living larvae at the end date	Number of living prepupae at the end date	Number of living pupae at the end date	Survival rate of larvae
66.2%	12/1/'23	12/22	34	74%	47	34	168	99.6%
66.2%	1/25/'24	2/15	28	89%	27	220	0	98.8%
71.9%	11/17/'23	12/28	41	4%	41	68	74	73.2%
71.9%	2/8/'24	2/29	28	92%	19	224	0	97.2%
75.9%	11/24/'23	12/22	35	11%	80	162	0	96.8%
75.9%	1/4/'24	1/25	28	74%	66	184	0	100.0%
78.9%	12/28/'23	1/25/'24	36	32%	23	225	0	99.2%

Table 2　Changes in the average weight per individual larva and the average weight of prepupa（mg；±S.E.）

Water content	Age 1-2 weeks	Age 2-3 wks	Age 3-4 wks	Change/ week	Total change	Average prepupa weight
66.2%		83.5	−20.7	31.4	78.0	67.6±2.9
66.2%	78.2	4.3	−28.8	17.9	79.2	62.2±1.6
71.9%	53.5	63.5	−12.8	34.7	110.1	66.0±2.8
71.9%	115.0	9.5	6.4	43.7	122.9	86.0±1.8
75.9%	109.3	56.7	25.8	63.9	183.9	122.6±2.6
75.9%	157.4	29.1	−24.6	54.0	180.0	113.5±5.2
78.9%	129.4	41.7	23.0	64.7	189.5	121.8±2.8

The second column of the first colony is blank because the colony started rearing at two weeks of age.

蛹の生存率についても上記の１例を除き，すべて100％と高かった。生存率については水分率67％とした鶏ふんで82％との報告があり[7]，本研究とほぼ同様である。

体重の変化については明瞭な差があり，水分率75.9％までは率が上がるに従って成長が良く，それ以上では差が小さかった（**Table 2**）。幼虫の成長量は１例を除き，飼育開始から１週間目が最も大きく，その後はコロニー間のばらつきが大きかった。週齢３－４では多くの個体が前蛹になり，残りの幼虫が小さいため，平均体重が低下するコロニーがあった。回収までの体重の総増加量については，週ごとの体重変化を総計したが，一部が前蛹または蛹になっている場合は体重平均値に幼虫の割合（％）を乗じて加算した。体重の総変化量では，水分率75.9％以上の体重が66.2％に比べて100 mg以上増加していた。また，幼虫は測定時の成長段階にばらつきがあるが，前蛹では成長が止まっているため，成長量についてのより良い指標と考えられる。**Table 2** で比較すると，

© The Ito Foundation

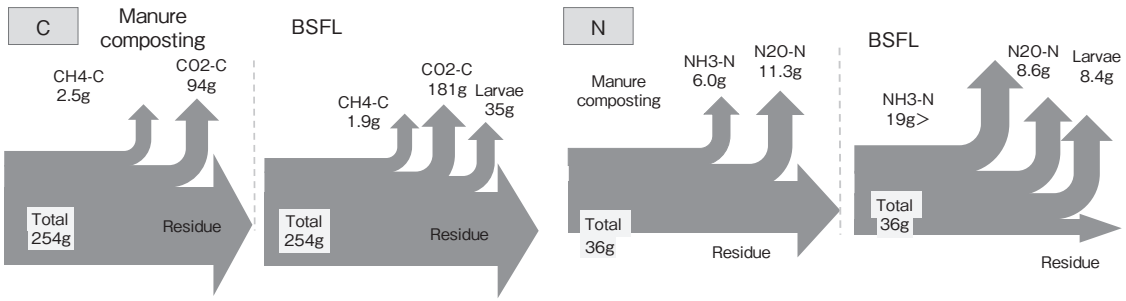


Fig. 2　Carbon and nitrogen flow from 1 kg of dried chicken manure during 4 weeks of composting and rearing black soldier flies. We estimated the flow rates in manure compositing and those of N2O in BSF based on Li et al [11]

71.9％以下と75.9％以上の間で明確な差が見られた。なお，前蛹体重と幼虫体重の総増加量に有意な差が生じているが，これは幼虫が脱皮によって体重を失うのと体内に未消化物が残っていることの相乗効果であると考えられる。

ガスモニタリング装置内で飼育した幼虫については，３週間後に幼虫273，前蛹99の段階で回収した。生存率93％，幼虫体重増加量は174 mg/個体，バイオマス総増加量59.3 gであった。

3.4　堆肥化に関する文献調査

Singhら[8]は，鶏ふんの堆肥化によって乾燥状態での炭素の比率は35.0％から43.5％に上昇し，窒素は9.2％から6.0％に低下したと記している。実験に用いたサンプル間の炭素と窒素値のばらつきが大きかったが，Bernalら[9]も同様の結果を示している。これらのことから窒素のほうがガス化されやすい傾向があると言える。

鶏ふんの堆肥化過程で発生する温室効果ガスを測定した研究は数少なかった。各々を精査した結果，鶏ふんのみを対象に含んだ研究は１つ[10]あったが，発生した二酸化炭素とメタンに含まれる炭素質量を計算すると鶏ふんに含まれる炭素量を大幅に超えるという矛盾が生じるため，解析に用いることができなかった。そこで，鶏ふんともみ殻を含む鶏ふんを３対７の割合で混ぜて日ごとに30日間測定した研究[11]を参照し，週ごとの発生量（累積値，g/kg）をグラフから読み取った。なお，この研究では「もみ殻入り鶏ふんを農場から入手した」とのみ記載されており，もみ殻対鶏ふんの比については記載されていない。一方，別の文献[12]では「もみ殻対鶏ふんの最適比率は２：２と２：３であった」とある。おそらく，農場では経験的に把握していた最適比率で混合しており，実験に用いたもみ殻入り鶏ふんはこの範囲内に収まる程度の混合比であったと推察される。

二酸化炭素（day 7，14，21，28）122，210，331，344；メタン（同）1.2，2.7，3.2，3.4

アンモニア（day 7，14，21，28）5.5，6.5，7.0，7.3；一酸化二窒素（同）11，13，16，18

これらの数値から28日目の炭素および窒素量を計算すると，CO_2-C，CH_4-C，NH_3-N，N_2O-N各々が94，2.5，6.0，11（g/kg）となった。もみ殻を含む鶏ふんはC/N比が36と鶏ふんのみのC/N比９よりも高いため，二酸化炭素とメタン発生量が鶏ふんのみの測定値よりも大きくなっている可能性がある。一方，鶏ふんのみのデータ[10]が示す値はLiら[11]よりも二桁大きい。複数のデータセットとモデルに基づく値[13]は鶏ふんの堆肥化による二酸化炭素発生量が500 g/kgDW程度と推定しており，前述したこともあわせて考えると計算ミスの可能性は否めない。そこで，Hwangら[10]が示す数値に1/100を乗じてガスに含まれる炭素量を算

© The Ito Foundation

出すると，CO_2-C，CH_4-C各々が60，1.5となり，もみ殻を混ぜると二酸化炭素とメタン発生量が大きくなるという推察と合致する。

3.5　マテリアルバランス

乾燥鶏ふん１kgを想定し，堆肥化における二酸化炭素，メタン，一酸化二窒素の発生量についてはLiら[11]が供する28日目の累積値を用い，炭素と窒素のフローを推定した（**Fig.２**）。鶏ふんから幼虫1000個体への炭素と窒素の移行については最も成長の良かった水分率を用いた飼育をベースに推定した。鶏ふんと幼虫の成分については**Table 1** の値を用い，**Table２**の最下段に示した体重増加量へ適用したが，４週目には一部が前蛹化していたので幼虫のみの体重増加分，すなわち個体当たり平均体重増加量と幼虫の割合を乗算した。その結果，鶏ふんから幼虫への移行は炭素の14%，窒素の23%であった。

ミズアブによる鶏ふん処理によって二酸化炭素（CO_2）は乾燥鶏ふん１kg当たり663.1 g，アンモニア（NH_3）は同53.3 g発生した。これは，炭素（C）量としては乾燥鶏ふん１kg当たり180.9 g，窒素（N）量としては同43.9 gに相当するが，NH_3-Nは鶏ふんに含まれる窒素量を超えてしまうので適用できなかった。他のガス発生量については，幼虫への成分移行（乾燥鶏ふんに含まれる炭素と窒素各々の14%，23%）に応じて削減されるとしたところ，鶏ふん中の炭素は二酸化炭素として堆肥化で37%が失われるのに対してメタンへの移行は小さかった。一方，ミズアブ処理による炭素の消失は計86%となり，堆肥化よりもかなり大きかった（**Fig.２**）。豚ふんを餌にミズアブを飼育した研究[14]では，飼育下のほうがミズアブなしの場合よりも二酸化炭素は1.5～２倍程度発生量の大きい観察日が多く，本研究でも約２倍の量が発生していた。窒素はほぼアンモニア１，一酸化二窒素２の比率で約半分が堆肥化で失われたのに対して，ミズアブ処理では大半の窒素が失われると推定された（**Fig.２**）。

また，二酸化炭素に相当するメタンの係数を25，一酸化二窒素の係数を298[15]として換算したところ，堆肥化で発生する温室効果ガスは二酸化炭素344，メタン85，一酸化二窒素5283で計5712，ミズアブ処理では各々663，65，4056，計4784となった。今回計測できなかった一酸化二窒素の値が特に大きいので，定量的な評価はできないが，ミズアブ処理によって残渣に含まれる窒素が大幅に減少することは確かであり，残渣から発生する一酸化二窒素の減少による削減効果が期待できる。成分分析（3.1）に用いたコロニーはより高密度で飼育したが，残渣の状態を比較すると上記の移行率より高かったと推察され，削減効果のポテンシャルはさらに大きいであろうと考えられた。

４．要　　約

有機廃棄物処理，養殖魚や家畜の飼料としての有用性が期待されているアメリカミズアブの幼虫を鶏ふんで飼育し，マテリアルバランスおよび温室効果ガスを含む揮発性ガスの発生について，堆肥化と比較しつつミズアブ処理の有効性について定量的に評価した。そのために幼虫の成分分析，密閉型飼育チャンバーでのガス測定，鶏ふんに加える水量を変えて飼育した幼虫の成長比較，堆肥化に関する文献調査を行った。幼虫の成分は水分63.0%，粗タンパク質12.6%，粗脂肪11.0%，粗灰分8.0%，全炭素18.9%，全窒素2.1%であった。作成したガスモニタリング装置では飼育と二酸化炭素濃度の測定には成功したが，メタンはすべて検出感度以下，アンモニアは検出限界を超えることが多かった。幼虫の体重増加については水分率75.9%以上の餌で飼育したコロニーでは66.2%に比べて１個体当たり平均で100 mg以上大きく，

© The Ito Foundation

前蛹体重の比較でも有意な差が見られた。一方，生存率は１例を除いてすべて97％以上と高く，前蛹になるまでの週齢は水分率66.2％のコロニーで特に小さかった。炭素および窒素フローを推定したところ，鶏ふん中の炭素は二酸化炭素として堆肥化で37％が失われるのに対してミズアブ処理では計86％であった。窒素は約半分が堆肥化で失われ，飼育下では大半が失われると推定された。４週間の幼虫飼育による温室効果ガスの削減効果としては，二酸化炭素換算値で堆肥化では計5712 g/kgのガスが発生するのに対して，ミズアブ処理では計4784 g/kgに抑えられると評価された。

文　献

1） 農林水産省：家畜排せつ物の発生と管理の状況 https://www.maff.go.jp/j/chikusan/kankyo/taisaku/t_mondai/02_kanri/#:~:text=1（2024年８月８日閲覧）

2） Huis, A.：Manure and flies：biodegradation and/or bioconversion?, *Journal of Insects as Food and Feed*, **5**, 55～58, 2019.

3） Crippa, M., Solazzo, E., Guizzardi, D.：Food systems are responsible for a third of global anthropogenic GHG emissions, *Nature Food*, **2**, 198～209, 2021.

4） Grassauer, F., Ferdous, J., Pelletier, N.：Manure Valorization Using Black Soldier Fly Larvae：A Review of Current Systems, Production Characteristics, Utilized Feed Substrates, and Bioconversion and Nitrogen Conversion Efficiencies, *Sustainability*, **15**, 12177, 2023.

5） Bekker, N. S., Heidelbach, S., Vestergaard, S. Z., *et al.*：Impact of substrate moisture content on growth and metabolic performance of black soldier fly larvae, *Waste Management*, **127**, 73～79, 2021.

6） 中村真人，柚山義人：各種バイオマス成分のデータベース整備，農業工学研究所技報, **203**, 57～80, 2005.

7） Oonincx, D. G. A. B., Huis, A., Loon, J. J. A.：Nutrient utilisation by black soldier flies fed with chicken, pig, or cow manure, *Journal of Insects as Food and Feed*,（2015 online in press）.

8） Singh, G., Shamsuddin, M. R., Aqsha, Lim, S. W.：Characterization of Chicken Manure from Manjung Region, *IOP Conf. Series*：*Materials Science and Engineering*, **458**, 012084, 2018.

9） Bernal, M. P., Alburquerque, J. A., Moral, R.：Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment：A review, *Bioresource Technology*, **100**, 5444～5453, 2009.

10） Hwang, H. Y., Kim, S. H., Kim, M. S., *et al.*：Co-composting of chicken manure with organic wastes_characterization of gases emissions and compost quality, *Applied Biological Chemistry*, **63**, 3, 2020.

11） Li, M., Li, S., Meng, Q., *et al.*：Feedstock optimization with rice husk chicken manure and mature compost during chicken manure composting_Quality and gaseous emissions, *Bioresource Technology*, **387**, 129694, 2023.

12） Murimi, S. M., Gbedemah, S. F.：Suitability of rice husk and chicken droppings as organic fertilizer for sustainable agriculture in Ghana, *Journal of Environmental Issues and Agriculture in Developing Countries*, **10**, 2, 2018.

13） Kreidenweis, U., Breier, J., Herrmann, C.：Greenhouse gas emissions from broiler manure treatment options are lowest in well-managed biogass production, *J. Cleaner Production*, **280**, 124969, 2021.

14） Parodi, A., Gerrits, W. J. J., Loon, J. J. A., *et al.*：Black soldier fly reared on pig manure：Bioconversion efficiencies, nutrients in the residual material, greenhouse gas and ammonia emissions, *Waste Management*, **126**, 674～683, 2021.

15） IPCC（2007）Climate Change 2007：The Physical Science Basis. https://www.ipcc.ch/site/assets/uploads/2018/05/ar4_wg1_full_report-1.pdf.

© The Ito Foundation

ニワトリヒナに備わる抗炎症能力の解明（Ⅱ）
～抗酸化能に注目して～

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

橘　　哲　也
（愛媛大学大学院農学研究科）

Tetsuya Tachibana
（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 against PAMPs in the light of anti-oxidant ability of uric acid and anserine. Lipopolysaccharide（LPS）and zymosan were selected as the PAMPs for the present study. Intraperitoneal（IP）injection of LPS or zymosan decreases plasma uric acid concentration and anti-oxidant capacity. Oral administration of allopurinol, an inhibitor of uric acid synthesis, also decreased plasma uric acid level and anti-oxidant capacity. When LPS or zymosan was injected to chicks treated with allopurinol, plasma activity of aspartate transaminase（AST）, a marker of organ injury, was increased. This result indicated that uric acid might be associated with anti-inflammatory ability of chicks and prevent organ injury. We also found that IP injection of LPS or zymosan affect plasma concentration of some free amino acids including histidine, a precursor of anserine, while the injection of LPS did not affect anserine concentration in the pectoralis major muscle. In order to clarify the actual role of anserine on anti-inflammatory ability, we succeed to make low anserine chicks by giving low histidine diet. IP injection of LPS to chicks fed low histidine diet caused increase of plasma activity of AST. This result also suggested that anserine might be associated with anti-inflammatory ability of chicks. However, chicks fed low histidine diet showed not only low concentration of anserine but also that of some amino acids including histidine. Since histidine is demonstrated to have anti-oxidant and anti-inflammatory capacities, this amino acid might be also associated with anti-inflammatory ability of chicks. In summary, we suggested that chicks possess anti-inflammatory ability by uric acid and anserine under pathogenic challenge. Since the organ injury was not remarkably proceeded by inhibition of uric acid and anserine syntheses, these anti-oxidant compounds would function additively or synergistically.

1．目　　的

ニワトリは良質なタンパク質を豊富に含む鶏肉や鶏卵を生産するため，世界で最も多く飼育されている家畜となっている。一方，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

© The Ito Foundation

症が重大な問題となっている。病原性微生物が動物の体内に侵入すると，その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，自然免疫が活性化する[1)]。その際に分泌される炎症性サイトカインは免疫系を活性化するが，その一方で過剰な炎症性サイトカインは，哺乳類において酸化ストレスを引き起こし，肝臓などさまざまな臓器の損傷をもたらす。

しかし，著者は細菌由来のリポポリサッカライド（LPS）や真菌由来のザイモサンをニワトリヒナに投与しても肝臓の損傷マーカーや酸化ストレスが変化しないことを明らかにし[2)]，ヒナには感染による炎症反応や組織損傷に対する抵抗性を有していることを示唆した。また，その原因として，ヒナではこれらのPAMPsに対する炎症性サイトカインの遺伝子発現の増加が短期間でおさまることを明らかにした[2)]。さらに，著者がLPSまたは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たところ，尿酸合成酵素とアンセリン合成酵素が変化することを見出した（令和4年度研究助成）。尿酸とアンセリンには抗酸化作用があるため，ヒナでは感染時に尿酸やアンセリンの合成を促すことで抗酸化能を高め，その結果として感染による臓器損傷が起きづらくなっている可能性がある。

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，尿酸とアンセリンの観点から明らかにすることを目的とした。本研究では，LPSとザイモサンをヒナに腹腔内投与した後のこれらの物質の体内濃度の変化を調べるとともに，それらの合成を抑えた場合のPAMPsに対する反応を調査した。

2．方　法

実験には約１週齢の白色レグホンオスヒナを用いた。なお，本研究は愛媛大学動物実験委員会の許可を得て実施した（許可番号08o510）。

2.1　実験１　PAMPsに対する抗炎症能における尿酸の役割の解明

2.1.1　実験1-1　PAMPsによる尿酸濃度の変化

まず，PAMPsによる尿酸の体内濃度の変化を調べるため，ヒナにLPS（0.1 mg）またはザイモサン（2.5 mg）を腹腔内投与し，その３および６時間後に採血して血漿を採取し，血漿中尿酸濃度をウリカーゼ・ペルオキシダーゼ法で測定した。また，血漿の総抗酸化能を2, 2-ジフェニル-1-ピクリルヒドラジル（DPPH）法にて測定した。

2.1.2　実験1-2　尿酸合成酵素阻害剤による尿酸濃度の低減

尿酸合成酵素阻害剤であるアロプリノールがヒナ体内の尿酸濃度に与える影響を調べた。ヒナにアロプリノール（6 mg）を経口投与し，その6および24時間後に採血して血漿を得た。血漿中尿酸濃度を測定するとともに，総抗酸化能をDPPH法で測定した。

2.1.3　実験1-3　尿酸合成の阻害がPAMPsの作用に与える影響

実験1-2で確立した方法を用い，アロプリノールの経口投与がPAMPsの作用に与える影響を調査した。LPSの実験では，ヒナを２群に分け，それぞれ生理食塩水（対照）またはアロプリノール（6 mg）を経口投与した。その直後に各群をさらに２つに分け，生理食塩水（対照）またはLPS（0.1 mg）を腹腔内投与した（対照群，LPS群，アロプリノール群，およびアロプリノール・LPS群）。その６または24時間後に採血を行い，血漿を得た。血漿中尿酸濃度，総抗酸化能，脂質過酸化の指標であるTBARS濃度，および臓器損傷マーカーであるASTおよびALTの血漿中活性を調べた。ザイモサンを用いた実験では，LPSの代

© The Ito Foundation

わりにザイモサン（2.5 mg）を腹腔内投与し，それ以外の作業はLPS実験と同様に実施した。

2.2　実験２　PAMPsに対する抗炎症能におけるアンセリンの役割の解明

2.2.1　実験2-1　PAMPsによるアミノ酸濃度の変化

PAMPsによるヒナ体内のアミノ酸濃度の変化を調べた。ヒナにLPS（0.1 mg）またはザイモサン（2.5 mg）を腹腔内投与し，その３および６時間後に採血して血漿を得て，アミノ酸濃度の測定に供試した。アミノ酸濃度の定量には高速アミノ酸分析計（L-8900，日立）を用いた。LPSの実験では浅胸筋も採取し，浅胸筋中遊離アミノ酸濃度に加え，アンセリン合成酵素の遺伝子発現量をリアルタイムPCRで測定した。

2.2.2　実験2-2　低ヒスチジン飼料を活用した低アンセリンヒナの作出

アンセリンはヒスチジンとβ-アラニンからなるジペプチドである。ブロイラーに低ヒスチジン飼料を給与することで，骨格筋中のアンセリン濃度を低下させることができることが報告されている[3)]。しかし，本研究では約１週齢のヒナを用いているのに対し，この先行研究では14日齢のブロイラーに低ヒスチジン飼料を10日間給与している。そこで，低ヒスチジン飼料を用いてより短期間で低アンセリンヒナの作出が可能であるかを検証した。実験に用いた飼料はコーンスターチと大豆粕を主成分とし，アミノ酸の添加量を調製することで対照飼料と低ヒスチジン飼料を調製した。低ヒスチジン飼料のヒスチジン含量が要求量の67%となるように設計し，その他の必須アミノ酸含量が対照飼料と等しくなるように調製した。また，粗タンパク質量および代謝エネルギーも等しくなるように設計した。これらの飼料のいずれかを５日齢ヒナに５日間給与した。最終日に採血して血漿を得るとともに，浅胸筋を採取し，それぞれアミノ酸濃度の定量に供した。

2.2.3　実験2-3　低アンセリンヒナに対するLPSの作用の解明

低ヒスチジン飼料を摂取したヒナに対するLPSの効果を調査した。まず５日齢ヒナを２群に分け，それぞれ対照飼料または低ヒスチジン飼料を５日間給与した。10日目にそれぞれの群をさらに２群に分け，生理食塩水（対照）またはLPS（0.1 mg）を腹腔内投与した（対照飼料・対照群，対照飼料・LPS群，低ヒスチジン飼料・対照群，および低ヒスチジン飼料・LPS群）。その６時間後に採血して血漿を得て，ASTおよびALTの血漿中活性を調べた。

3．結果と考察

3.1　実験１　PAMPsに対する抗炎症能における尿酸の役割の解明

3.1.1　実験1-1　PAMPsによる尿酸濃度の変化

LPSの投与３時間後には血漿中尿酸濃度に有意な変化は見られなかったが，６時間後に有意に低下した。一方，ザイモサンでは投与３時間後に尿酸濃度が低下したが，６時間後には有意な変化が見られなかった。しかし，以降の実験ではLPSによる血漿中尿酸濃度の低下が見られなかったことから，PAMPsによる尿酸濃度の変化は一定していないものと思われる。また，血漿総抗酸化能は，LPSとザイモサンともに投与３時間後に有意に低下しており，LPSによって尿酸濃度が低下するタイミングと一致しない。したがって，LPSによる総抗酸化能の低下には尿酸以外の因子が関与している可能性がある（**Fig. 1**）。

3.1.2　実験1-2　尿酸合成酵素阻害剤による尿酸濃度の低減

アロプリノールの経口投与により，投与６時間後に血漿中尿酸濃度が低下するとともに，総抗酸

© The Ito Foundation

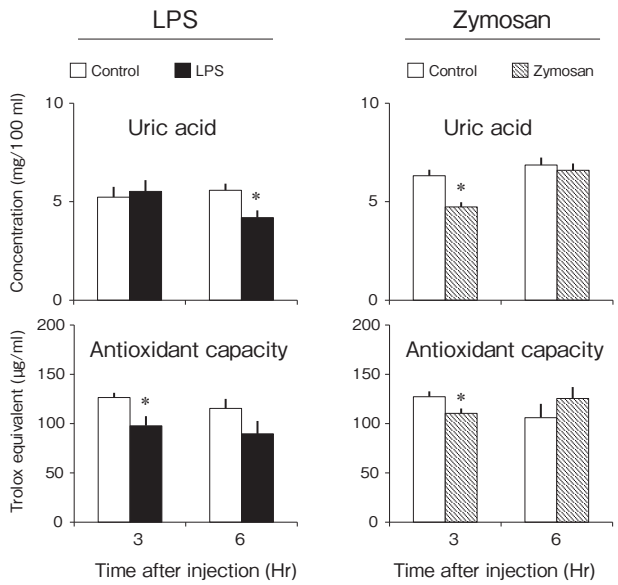


Fig. 1 Effect of intraperitoneal injection of LPS (0.1 mg) and zymosan (2.5 mg) on plasma uric acid level and antioxidant capacity in chicks. Allopurinol and LPS were orally and intraperitoneally injected, respectively. The number of chicks was 8 in each group. Values are the mean ± SEM. Asterisk Groups with different letters are significantly different in each time period ($p < 0.05$).

化能が低下することを確認した。一方，投与24時間後には尿酸濃度が増加し，総抗酸化能が増加した。これはアロプリノールが体内で代謝された結果，尿酸合成が再開したためと考えられる。以上のことから，アロプリノールを利用することで，短期間ではあるものの体内の尿酸濃度を低下させることが可能となった。

3.1.3 実験1-3 尿酸合成の阻害がPAMPsの作用に与える影響

LPSの投与直前にアロプリノールを投与したところ，アロプリノールを投与した群ではLPSの有無に関わらず投与６時間後に血漿中尿酸濃度と総抗酸化能が低下し，脂質過酸化の指標であるTBARS濃度が増加した。LPSまたはアロプリノール単独，および同時投与でも血漿中ASTとALT活性には変化が見られなかった。一方，投与24時間後ではアロプリノールによって血漿中尿酸濃度が増加する傾向を示したが，LPSとの同時投与により有意に増加した。総抗酸化能についてはLPSの有無に関わらずアロプリノールによって有意に増加したが，血漿中TBARS濃度は有意な変化が見られなかった。血漿中AST活性はLPSまたはアロプリノール単独では有意な変化は見られなかったものの，LPSとアロプリノールの同時投与により有意に増加した。一方，ALT活性はLPSの有無に関わらずアロプリノールによって有意に低下した。これらの変化は，ザイモサンとアロプリノールを同時投与した実験でも見られた（**Fig. 2**）。

尿酸は強力な抗酸化作用があることが知られており，実際にアロプリノールで尿酸の合成を阻害したところ抗酸化能が低下した。その時（投与６時間後）にLPSを投与しても血漿中ASTおよびALT活性に影響が見られなかったことから，尿酸の抗酸化能はヒナが有する免疫刺激による組織損傷に対する耐性に無関係である可能性がある。一方，アロプリノールの効果が消失した投与24時間後にはLPSおよびザイモサンによってAST活性が有意に増加したことから，尿酸またはアロプリ

© The Ito Foundation

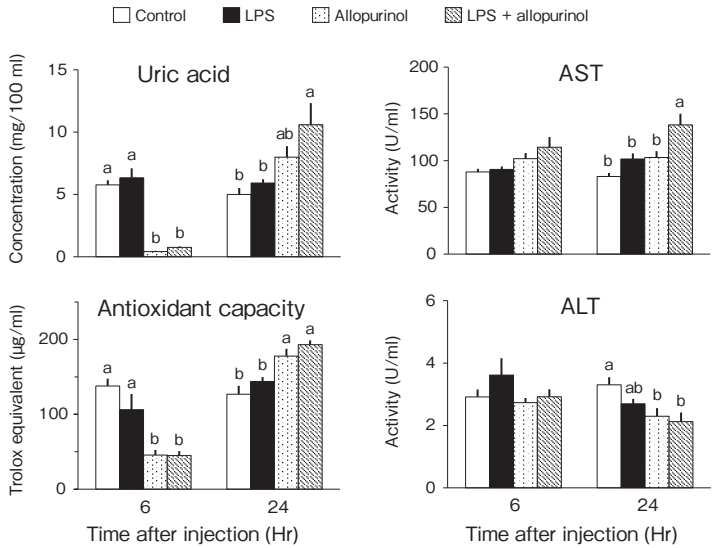


Fig. 2　Effect of co-injection of allopurinol (6 mg) with LPS (0.1 mg) on plasma uric acid level, antioxidant capacity, and activities of AST and ALT in chicks. Allopurinol and LPS were orally and intraperitoneally injected, respectively. The number of chicks was 8 in each group. Values are the mean ± SEM. Groups with different letters are significantly different in each time period ($p < 0.05$).

ノールそのものが組織損傷に対する耐性になんらかの影響を与えた可能性がある。例えば，アロプリノールによってある程度の期間抗酸化能が低下したことによって，LPSおよびザイモサンによる臓器損傷が進んだ可能性がある。これは，投与24時間後において，アロプリノールとLPSの両方を投与した10羽のヒナのうち２羽が死亡し，２羽が瀕死状態に陥っていたこともこの仮説を支持している。本研究では投与６および24時間後について調査したが，アロプリノールの効果が消失する直前における体内尿酸濃度，総抗酸化能，および臓器損傷マーカーを調査することで，組織損傷に対する耐性における尿酸の役割がより明らかになるであろう。その一方で，投与24時間後にはもう一つの臓器の損傷マーカーである血漿中ALT活性がアロプリノールとLPSの投与によって減少しており，ASTとALTの変化が一致しないこととなった。ASTは肝臓の他に骨格筋や心筋にも分布しているのに対し，ALTは主に肝臓に分布する逸脱酵素である。ALTの血漿中活性に影響が見られなかったことから，ASTの活性の増加は肝臓以外の骨格筋や心筋の損傷によるものであると考えられる。

3.2　実験２　PAMPsに対する抗炎症能におけるアンセリンの役割の解明

3.2.1　実験2-1　PAMPsによるアミノ酸濃度の変化

LPSの投与により，血漿中のヒスチジンなどの遊離アミノ酸濃度が低下し，グルタミン酸の濃度が増加した。一方，ザイモサンでもヒスチジンなどの遊離アミノ酸濃度が有意に低下した。なお，いずれの実験においても血漿ではアンセリンやカルノシンを検出できなかった。これは，本研究で用いたアミノ酸分析装置の感度が十分でなかったことが原因だと考えられる。このようにPAMPsは血漿中アミノ酸濃度に影響を与えることが明らかとなった。特に，ヒスチジン，グリシン，グルタミン，アスパラギン，アラニン，システイン濃

© The Ito Foundation

Table 1 Changes in plasma free amino acid concentration (nmol/ml) after IP injection of LPS

Amino Acid	3 h after injection		6 h after injection		LPS	Time	LPS×Time
	Control	LPS	Control	LPS			
Asp	13±1	18±3	13±2	16±1	−	−	−
Thr	3181±398	2772±349	3025±241	2594±236	−	−	−
Ser	1280±86	1320±82	1231±64	1091±1071	−	−	−
Asn	219±7	116±9	198±9	136±18	$p<0.05$	−	−
Glu	92±3	107±8	100±4	110±5	$p<0.05$	−	−
Gln	741±33	480±25	616±53	477±45	$p<0.05$	−	−
Gly	735±20	567±44	657±13	610±37	$p<0.05$	−	−
Ala	1016±58	887±95	978±60	797±65	$p<0.05$	−	−
Val	447±27	450±35	470±18	457±21	−	−	−
Cys	102±4	96±6	99±5	79±6	$p<0.05$	−	−
Met	215±15	108±7	242±18	129±16	$p<0.05$	−	−
Ile	187±12	215±20	195±9	209±9	−	−	−
Leu	412±26	406±41	438±22	357±17	−	−	−
Tyr	259±22	206±16	226±12	222±24	−	−	−
Phe	164±15	161±9	204±16	171±12	−	−	−
Trp	63±4	35±4	58±3	46±6	$p<0.05$	−	−
Lys	1356±238	1050±202	1242±126	1258±175	−	−	−
His	160±8	124±8	136±9	95±7	$p<0.05$	$p<0.05$	−
Arg	178±21	125±13	188±30	134±22	$p<0.05$	−	−
Pro	814±64	548±51	876±74	546±42	$p<0.05$	−	−

The number of chicks was 7 in each group at each time period.
Values are the mean ± SEM.

度の低下は，LPSとザイモサンの両方で見られたため，これらのアミノ酸の代謝はPAMPsの種類に関わらず感染によって変化する可能性がある。これらの中でもヒスチジンはアンセリンの前駆物質であるため，アンセリンの合成にもなんらかの影響を与えている可能性がある（**Table 1**）。

次に，LPS投与後の浅胸筋中遊離アミノ酸濃度を調べたところ，ヒスチジン，アラニン，グルタミン酸，グルタミンおよびセリン濃度が低下し，グリシン，バリン，ロイシンおよびイソロイシン濃度が増加した。浅胸筋中のアンセリンとカルノシン濃度には有意な変化が見られなかったことから，LPSがアンセリンの合成には影響を与えないことが明らかとなった。一方で，アンセリン合成酵素の遺伝子発現量はLPS投与３時間後に有意に増加した。ニワトリの浅胸筋には他の動物種の骨格筋と比較して高濃度のアンセリンが蓄積されているため，多少の合成量が増えたとしても総含量には影響がなかったのかもしれない。いずれにしても，浅胸筋に存在するアンセリンが，LPSに対して抗酸化作用を発揮した可能性が残る。そこで，低ヒスチジン飼料を利用した低アンセリンヒナの作出を実施した。

3.2.2 実験2-2 低ヒスチジン飼料を活用した低アンセリンヒナの作出

５日齢ヒナに低ヒスチジン飼料の５日間給与すると，ヒスチジンをはじめとするさまざまなアミノ酸の血漿中濃度が有意に低下した（**Table 2**）。

浅胸筋では低ヒスチジン飼料給与によりアンセリン濃度が有意に減少し（対照飼料：360±16 nmol/mg，低ヒスチジン飼料：119±7 nmol/mg），カルノシン濃度が検出限界以下（対照飼料：34±6 nmol/mg，低ヒスチジン飼料：検出不可）となった。以上のことから，先行研究[3]よりも若いヒナを用い，より短期間で低アンセリンヒナを作出できたと判断した。

© The Ito Foundation

Table 2　Plasma concentrations of free amino acids (nmol/ml) of chicks fed low histidine diet

Amino Acid	Control	Low His diet
Low His diet	44 ± 7	23 ± 2*
Thr	1781 ± 67	1867 ± 151
Ser	894 ± 53	1043 ± 78
Asn	189 ± 6	190 ± 12
Glu	220 ± 21	141 ± 7*
Gln	1332 ± 36	1056 ± 48*
Gly	377 ± 21	494 ± 36*
Ala	2411 ± 119	1828 ± 152*
Val	322 ± 17	310 ± 24
Cys	97 ± 4	94 ± 4
Met	105 ± 6	88 ± 8
Ile	196 ± 13	151 ± 14*
Leu	372 ± 9	325 ± 21
Tyr	202 ± 16	172 ± 18
Phe	126 ± 7	106 ± 8
Trp	66 ± 3	70 ± 3
Lys	303 ± 42	970 ± 145*
His	64 ± 4	20 ± 3*
Arg	326 ± 50	178 ± 28*
Pro	395 ± 16	373 ± 18

The number of chicks was 7 in each group.
Values are the mean ± SEM.
Asterisk is indicates significant difference ($p<0.05$).

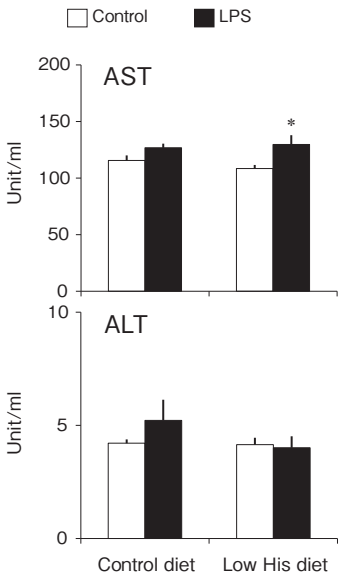


Fig. 3　Effect of intraperitoneal injection of 0.1 mg LPS on plasma AST and ALT activities in chicks fed low histidine diet. The number of chicks was 8 in each group. Values are the mean ± SEM. Asterisk indicates significant difference from the control injection ($p < 0.05$).

3.2.3　実験2-3　低アンセリンヒナに対するLPSの作用の解明

低ヒスチジン飼料を給与したヒナにLPSを投与した際の臓器損傷マーカーの血中活性を調査した。対照飼料を給与した場合では，LPSを腹腔内投与してもASTおよびALT活性に有意な変化は見られなかった。一方，低ヒスチジン飼料を給与したヒナにLPSを投与しても血漿中ALT活性に有意な変化は見られなかったものの，血漿中AST活性が有意に増加した（**Fig. 3**）。

低アンセリンヒナにLPSを投与したことで，血漿中AST活性が増加したことから，アンセリンには組織の損傷を防ぐ効果があることが示唆された。一方で，低ヒスチジン飼料によってヒナ体内のヒスチジンやその他のアミノ酸濃度が低下した（**Table 2**）。これらの中でもヒスチジンには抗酸化作用[4]や抗炎症作用[5]があることから，体内のヒスチジン含量が低下したことによって臓器の損傷が進んだ可能性が残る。なお，低アンセリンヒナにLPSを投与しても血漿中ALT活性が変化しなかった。上述のようにASTとALTの体内分布が異なることから，ALTが存在する臓器，すなわち肝臓では損傷が生じていない可能性がある。これは，ヒナが有する免疫刺激による臓器損傷に対する耐性の仕組みが臓器間で異なっていることを示唆している。

本研究により，ヒナが有するPAMPsによる臓器損傷に対する耐性において，尿酸とアンセリンが関与している可能性が示唆された。しかし，尿酸合成阻害や低アンセリンヒナでもPAMPsによる臓器損傷が劇的に発展しなかったことから，ヒナが有する臓器損傷に対する耐性は，単独の物質によるものではない可能性が示された。本研究では，PAMPsによっていくつかのアミノ酸の体内濃度が変化することを見出しており，これらのア

© The Ito Foundation

ミノ酸のうち，ヒスチジンやグリシン，システインには抗炎症作用があることが報告されている[5)]。今後はこれらのアミノ酸の機能を解析することに加え，尿酸やアンセリンなどその他の因子との関係性を調査することで，ヒナが有する臓器損傷に対する耐性を明らかにすることができるであろう。

4．要　約

本研究は，尿酸とアンセリンの抗酸化能に着目してニワトリヒナが有する抗炎症能を解明することを目的とした。そこで，病原体関連分子パターン（PAMPs）であるグラム陰性菌由来のリポポリサッカライド（LPS）と真菌由来のザイモサンによって炎症刺激を与えた際の臓器損傷に基づいて抗炎症能の解明を行った。まず，LPSおよびザイモサンの腹腔内投与がヒナの血漿中尿酸濃度とアミノ酸濃度に影響を与えることを明らかにした。次いで，尿酸の抗酸化作用とヒナの抗炎症能の関係性を明らかにするために，尿酸合成酵素阻害剤であるアロプリノールをヒナに経口投与することで，体内の尿酸濃度を低下させ，抗酸化能を低下させた。このヒナにLPSまたはザイモサンを投与したところ，臓器損傷マーカーであるASTの血漿中活性が増加した。これは尿酸の抗酸化作用が，PAMPsによる臓器損傷を防止している可能性を示唆している。最後に，アンセリンの抗酸化作用とヒナの抗炎症能の関係性を明らかにするために，低ヒスチジン飼料を用いた低アンセリンヒナの作出を行った。ヒナに低ヒスチジン飼料を５日間給与することで，浅胸筋中のアンセリン濃度を３分の１に低減することができた。このヒナにLPSを投与したところ，血漿中AST活性が増加したことから，アンセリンの抗酸化作用がPAMPsによる臓器損傷の防止に関わっている可能性が示唆された。しかし，低ヒスチジン飼料を給与されたヒナでは，ヒスチジンをはじめとするいくつかのアミノ酸濃度が低下しており，それらのアミノ酸も臓器損傷の防止，ひいては抗炎症能に関わっている可能性がある。いずれにしても，尿酸およびアンセリンの合成を低下させた場合でも臓器がそれほど損傷しなかったことから，その他の因子やそれらの協働作用によってもヒナの抗炎症能が形成されている可能性が示唆された。

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） Takahashi, M., Sengan, A., Teraoka, K., Khan, S., Makino, R., Cline, M. A., Tachibana, T.：*Journal of Poultry Science*, **60**, 2023031, 2023.
3） Kai, S., Watanabe, G., Kubota, M., Kadowaki, M., Fujimura, S.：*Animal Science Journal*, **86**, 541～546, 2015.
4） Son, D. O., Satsu, H., Shimizu, M：*FEBS Letters*, **579**, 4671～4677, 2005.
5） Hasegawa, S., Ichiyama, T., Sonaka, I., Ohsaki, A., Okada, S., Wakiguchi, H., Kudo, K., Kittaka, S., Hara, M., Furukawa, S.：*Clinical and Experimental Immunology*, **167**, 269～274, 2012.

© The Ito Foundation

２つの機能性資材の同時給与がブロイラーの筋発達に及ぼす効果

The combination effect of two functional compounds on muscle development in broiler chickens

徳　武　優佳子・米　倉　真　一
（信州大学農学部）

Yukako Tokutake and Shinichi Yonekura
（Faculty of Agriculture, Shinshu University）

Because meat production becomes highly demand in the world, it is need to more efficiently increase the quantity of muscle tissue, the cornerstone of meat. Therefore, it is essential to conduct research with a view to exploring and utilizing nutrition and natural compounds. Recently, an interesting relationship between capsaicin and ascorbic acid (vitamin C) has been found. It was reported that combination treatment of capsaicin and ascorbic acid to C2C12 mouse myoblast cell line promote myotube formation, but the effect has only been reported in cultured murine cell lines, and the effect on myoblasts derived from chickens and other livestock species is completely unknown. In this study, to clarify the effects of capsaicin and ascorbic acid on the differentiation and hypertrophy of chicken muscle cells, primary myoblast cells isolated from chickens were cultured and investigated these hypotheses. Chicken myoblasts were isolated and cultured in 48h. After cultured cells were used to immunofluostaining of MHC or gene expression analysis of *MYOG*enin and myosin heavy chain. Myotubes formations were most increased by capsaicin alone treatment (30 μM), while the simultaneous addition of ascorbic acid rather inhibited the formation of myotubes. In addition, the expression of gene encoded myosin heavy chain was significantly increased in myoblasts treated with capsaicin alone. In conclusion, this study was the first demonstrated the effect of capsaicin treatment on the development of chicken myoblasts. In the future, we plan to clarify the effects of capsaicin on muscle development in chickens in vivo.

１．目　　的

食肉の需要は世界的に増加の一途をたどっている。一方で，飼料価格高騰に伴う生産基盤の脆弱化により，食肉生産は需給ひっ迫・価格上昇などの諸問題に直面している。そのような中で，家畜の飼料効率の向上は最も重要視されるべき課題である。食肉の礎となる筋組織をより効率的に大きくするためには，栄養成分や天然資材の探索・活用を視野に入れた研究が不可欠である。近年，カプサイシンとアスコルビン酸（ビタミンＣ）には，同時添加によってマウス筋細胞の分化が促進されるという興味深い関係性が見出されている[1)]。カプサイシンとアスコルビン酸はともに家

© The Ito Foundation

畜や家禽，特に鶏で，抗菌活性や酸化ストレス低減などの好ましい効果が期待される機能性資材である。養鶏においても，カプサイシン，アスコルビン酸はいずれも生育パフォーマンスの向上や，抗菌活性，酸化ストレスの低減などの機能性を持つ物質であることが知られている。

一方，同時給与が筋発達にもたらす効果はまったく明らかになっていない。ブロイラーへのカプサイシンの給与効果を調べた研究では，ニワトリの腸管発達に正の効果を与えることが明らかになっている一方，終齢時の筋肉量に対照区との間に差がないことが判明している[2)]。また，ニワトリはアスコルビン酸の合成能を有しているため，飼料中へのアスコルビン酸添加は特段に必要ではない一方，ストレス時などにおいては血中濃度を高める目的で給与されることもある物質である[3)]。また，カプサイシンとアスコルビン酸の同時添加が筋細胞にもたらす効果に関する報告は1報のみで，マウス筋細胞株に対する分化促進作用があること以外，そのメカニズムを含め詳細はまったく明らかになっていない[1)]。したがって，家畜・家禽の細胞や生体内で同様の効果が見られるのかどうかは不明である。これまでに，筋発達において細胞内ストレスが筋組織の分化制御の一端を担っており，適切な量が重要であることが明らかとなっている。カプサイシンやアスコルビン酸はともに，小胞体ストレスや酸化ストレスといった複数の細胞内ストレスを誘導する反面，軽減作用も有する天然資材であることから，両者の量的バランスこそが筋発達促進に重要となると考えた。

そこで本研究では，カプサイシンとアスコルビン酸の同時添加がニワトリ筋組織の発達，すなわち産肉性にもたらす促進・向上効果の有無を明確にすることを目的とする。

2．方　法

2.1　筋細胞の単離

動物実験は信州大学動物実験等実施規程に基づき計画を行い，実験計画の承認を得たうえで実施した（承認番号：023040）。0～1日齢の初生雛（品種：あずさ，雄）を小松種鶏場（長野県）より入手した。初生雛は頸椎脱臼によってと殺後開腹し，浅胸筋を採取した。1×リン酸緩衝液（PBS）による洗浄後，筋組織を細断し，コラゲナーゼ・ディスパーゼ混合溶液中で37℃，30分の酵素消化を行った。その後，未分解物を取り除くためフィルタレーションを行った後，1,500 rpm（250×g），5分，室温で遠心分離を行い，新しい培地（ウシ胎児血清（FBS）10%-ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM））に置換した。この操作を数回繰り返し，筋芽細胞を取得した。得られた筋芽細胞は，コラーゲンコート済みの培養フラスコ・シャーレに4.0×10^4細胞/cm^2の密度となるように播種し，FBS20%-DMEM（+抗生物質，1% Chick embryo extract添加）培地（以下，増殖培地とする）にて培養を行った。

2.2　初代筋芽細胞の培養

播種した筋芽細胞は増殖培地にて，37℃，CO_2 5%下で培養した。筋芽細胞がフラスコ・シャーレの底部に十分に定着した後，細胞をトリプシン処理によって剥離し，5.0×10^4細胞/wellとなるように48 wellプレートに細胞を播種すると同時に，カプサイシン，あるいはアスコルビン酸を添加した培地による培養を開始した。培養開始後24時間，または48時間培養後に，細胞を蛍光免疫染色，RNA抽出に供試した。

2.3　蛍光免疫染色

筋タンパク質であるミオシン重鎖を染色するため，細胞をPBSで洗浄した後，0.1% Triton-Xを添加したPBSで透過処理を行った。10%ヤギ血清

© The Ito Foundation

入りPBSで細胞をブロッキング後，一次抗体である抗ミオシン4（MF20）抗体を１：100になるようPBSで希釈し，２時間室温でインキュベーションした。洗浄後，二次抗体であるAlexa-Fluor 488抗体を１：200になるようPBSで希釈し，再び１時間室温でインキュベーションした。PBSによる洗浄に加えて，DAPI色素によって５分間の核染色を行った。染色後の細胞は蛍光顕微鏡（EVOS FL AUTO, Invitrogen）で観察を行った。

2.4　筋管面積の定量

蛍光顕微鏡で取得した画像より，ミオシン重鎖陽性（緑色蛍光）細胞の面積についてImageJソフトウェアを用いて測定した。

2.5　RNA抽出とリアルタイムPCR

細胞をセパゾールによって溶解し，試薬のプロトコルに準拠してRNAの回収を行った。抽出した Total RNA を ReverTra Ace® qPCR RT Master Mixで逆転写した。得られたcDNAを用い，リアルタイムPCR法（ΔΔCt法）によって遺伝子（*MYOG*，*MYH1*）の発現を定量した。内部標準には*RPL13*遺伝子を用いた。

2.6　統計

すべての統計処理は4stepsエクセル統計付帯のソフトウェアを用いた。データは正規性の検定後，一元配置分散分析を行ったのち，多重比較検定（Dunnett's multiple comparison test）を用いて解析し，$p<0.05$を有意水準とした。データは平均値±標準誤差で示した。

3．結果と考察

3.1　ニワトリ筋管形成に及ぼす効果

カプサイシン単独処理による培養後48時間の筋管形成度合いは，カプサイシン30 μM添加時に最大となった（**Fig. 1**，**Table 1**）。このことから，ニワトリ筋芽細胞の筋管形成はカプサイシン単独処理によって促進されることが明らかとなった。アスコルビン酸単独処理は，筋管形成に変化を及ぼさず，むしろ濃度依存的に抑制される様相が確認された（**Fig. 1**）。カプサイシンとアスコルビン酸の同時添加では，カプサイシン30 μM添加に対してアスコルビン酸50 μM添加までは筋管形成に影響が見られなかったが，アスコルビン酸の濃度を100 μM，200 μMと高くすると逆に筋管形成が抑制されることが明らかとなった（**Table 2**）。過去の知見で，300 μMのカプサイシン添加に加えて，アスコルビン酸（100，200 μM）の添加がマウス筋細胞の筋管形成を促進していた結果と比較して，本研究ではこれらの物質がごく低濃度で筋管形成に正，または負の効果をもたらすことが明らかとなった。また，ニワトリ筋細胞においては，カプサイシン単独処理でも筋発達効果が得られた。

3.2　筋分化関連遺伝子の発現に及ぼす効果

前項で筋分化促進効果が確認されたカプサイシン30 μM添加区（Cap区），カプサイシン30 μM＋アスコルビン酸20 μM区（Cap＋Asc区），対照区の３区におけるMyogenin（*MYOG*），MHC（*MYH1*）遺伝子発現を比較したところ，培養後24時間の筋芽細胞では*MYOG*遺伝子発現に有意な差はなく，*MYH1*遺伝子発現はCap区および，Cap＋Asc区で対照区よりも有意に高い結果となった（**Table 3**）。また，培養後48時間の筋芽細胞でも，*MYOG*遺伝子の発現に区間差は認められなかったが，*MYH1*遺伝子はCap区が対照区と比較して2.5倍程度高く，Cap＋Asc区は1.8倍程度にとどまった（**Table 4**）。*MYOG*は筋分化制御に関わる遺伝子であり，*MYH1*は筋タンパク質であるミオシンをコードする遺伝子である。これらの結果より，カプサイシン単独処理は筋分化制御因子の発現には影響を与えず，筋タンパク質合成に関わる因子を活性化することによって，筋タンパク質発現の増強に働く可能性が示唆された。加えて，アスコルビン酸はニワトリ筋芽細胞において

© The Ito Foundation

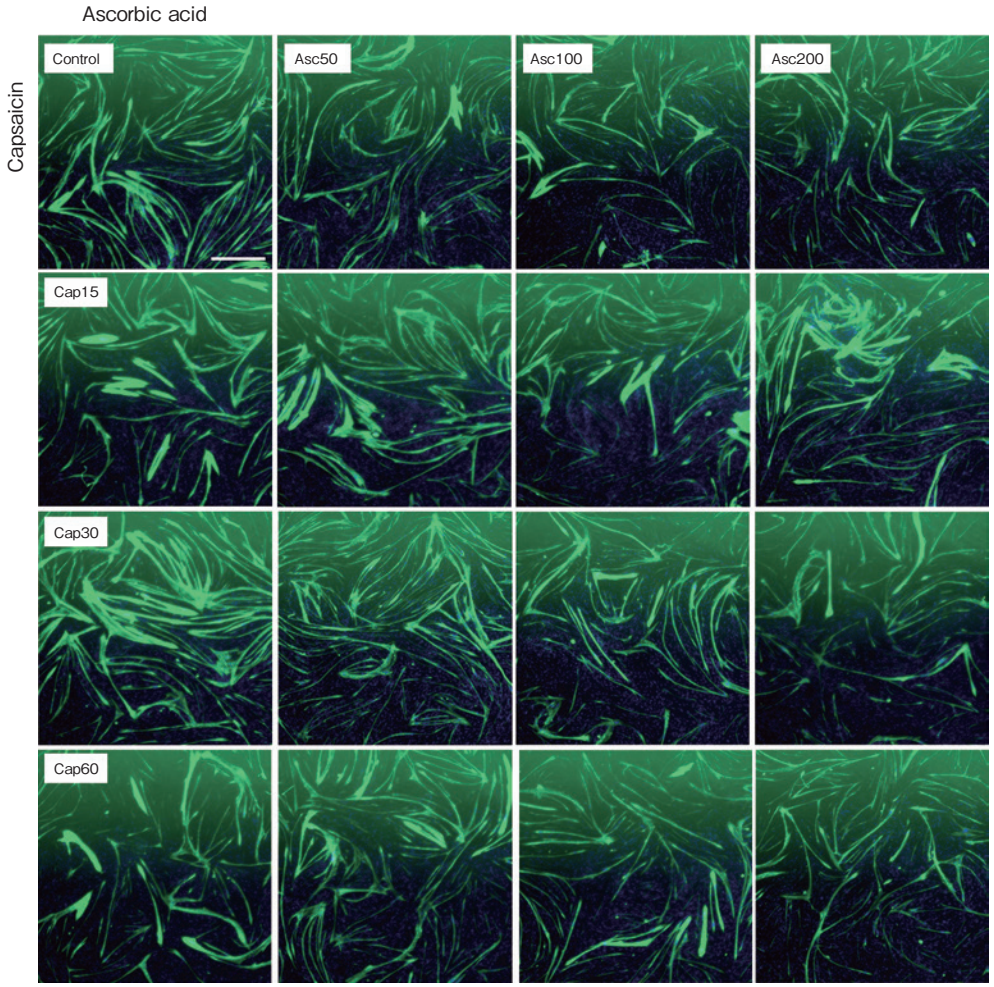


Fig. 1　Myosin heavy chain (MHC) expression of the primary cultured chicken myoblasts treated various concentration of capsaicin (Cap) and ascorbic acid (Asc). Fluorescent indicates MHC expression. Control; vehicle treated. Scale bar = 50 μm.

Table 1　MHC-positive myotube area of the capsaicin-treated or non-treated cells. Statistical significance is indicated by different letters ; $p < 0.05$.

	Capsaicin (μM)			
	0	15	30	60
MHC-positive myotubes area (%)	^{b}9.89 ± 1.38	^{ab}14.69 ± 1.80	^{a}18.63 ± 2.31	^{ab}10.86 ± 1.33

Table 2　MHC-positive myotube area of the capsaicin- and ascorbic acid-treated or non-treated cells. Statistical significance is indicated by different letters ; $p < 0.05$.

Capsaicin (μM)	0	30			
Ascorbic acid (μM)	0	0	50	100	200
MHC-positive myotubes area (%)	^{b}9.58 ± 1.42	^{a}18.63 ± 2.31	^{ab}23.75 ± 9.16	^{ab}11.60 ± 1.01	^{ab}10.05 ± 2.18

© The Ito Foundation

Table 3　Relative gene expression of *MYOG* and *MYH1* of the chicken myoblasts after 24 h of Cap and/or Asc treated. Statistical significance is indicated by different letters；$p < 0.05$.

	Control	Cap	Cap+Ase
MYOG	1.00 ± 0.18	0.94 ± 0.13	0.62 ± 0.32
MYH 1	^{b}1.00 ± 0.61	^{ab}4.38 ± 1.04	^{a}4.65 ± 0.64

Table 4　Relative gene expression of *MYOG* and *MYH1* of the chicken myoblasts after 48 h of Cap and/or Asc treated. Statistical significance is indicated by different letters；$p < 0.05$.

	Control	Cap	Cap+Ase
MYOG	1.00 ± 0.10	1.13 ± 0.10	0.93 ± 0.12
MYH l	^{c}l.00 ± 0.09	^{a}2.45 ± 0.09	^{b}1.81 ± 0.04

は，カプサイシンの与える効果に拮抗する効果があると考えられ，カプサイシン単独での添加が筋芽細胞においては最も好ましいことが示される結果となった。

本研究では，筋細胞の単離・培養技術を行い，カプサイシンとアスコルビン酸がニワトリ筋組織の効率的な増大に資するかどうか検証し，カプサイシンが持つ筋管発達への促進効果を明らかにした。一方で，アスコルビン酸は単独処理，カプサイシンとの同時添加どちらでも筋管発達への効果が得られなかった。この理由として，アスコルビン酸の有する抗酸化能が筋分化においてマイナスに働いたことが予想される。

鶏肉は，高栄養かつ低脂肪で安価であり，最も需要が高い食肉である。産肉性に優れたニワトリの生産需給は，世界的にますます拡大していくと予想される。本研究による成果は，ゆくゆくはさまざまな畜種の食肉生産の効率化を強く推進する可能性を秘めており，食肉産業が抱える脆弱性の打破に貢献しうるものである。

4．要　約

食肉の礎となる筋組織をより効率的に大きくするためには，栄養成分や天然資材の探索・活用を視野に入れた研究が不可欠である。近年，カプサイシンとアスコルビン酸には，同時添加によって筋細胞分化が促進されるという興味深い関係性が見出されているが，その効果は培養細胞株での報告にとどまり，ニワトリをはじめとする畜種由来の筋芽細胞に対する効果はまったく不明であった。本研究では，カプサイシンとアスコルビン酸の同時添加がニワトリ筋組織の発達に及ぼす影響を明らかにすることを目的とし，ニワトリ初生雛から単離した初代筋芽細胞に対する添加実験を行った。筋芽細胞から形成される筋管は，カプサイシン単独添加（30 μM）で最も増大し，逆にアスコルビン酸の同時添加によって抑制されることが明らかとなった。また，カプサイシン単独添加を行った筋芽細胞では，筋タンパク質をコードする*MYH1*遺伝子の発現が上昇した。以上より，本研究はニワトリ筋芽細胞の発達促進に対するカプサイシンの効果を世界に先駆けて明らかにした。今後，ニワトリ生体における筋発達への影響を明らかにしていく予定である。

文　献

1）　Diao, Z., Matsui, T., Funaba, M.：*Biochem Biophys Res Commun*., **568**, 83～88, 2021.
2）　Li, Z., Zhang, J., Wang, T., Zhang, J., Zhang, L., Wang, T.：*Front Vet Sci*., **9**, 841231, 2022.
3）　Rosales, A. G.：*J Appl Plult Res*, 3(2), 199～207, 1994.

© 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（Ⅱ）：タンパク質・エネルギー比の影響

Effects of diets with different CP levels on body weight gain, back fat thickness in Okinawa Agu feeder pigs（Ⅱ）: Effect of protein-energy ratio

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）

Kyota Fusho[1] and Yoshimi Imura[2]
（[1]Okinawa Prefectural Livestock and Grassland Research Center, [2]Faculty of Agriculture, University of the Ryukyus）

In this study, in order to clarify the nutritional balance suitable for Okinawa Agu feeder pigs, we examined the effects on body weight gain (BWD), back fat thickness(BF), and digestibility by feeding four types of feed with different CP levels and energy levels. We prepared four groups of which were, High CP High GE group, High CP Low GE group, Low CP High GE group, and Low CP Low GE group, respectively and fed these diets to 11-12week old Agu feeder pigs for 5 weeks. As a result, the high CP level group tended to have higher body weight, DG and feed efficiency at the end of the study. The BF tended to be thicker in the high GE level group, and the BF tended to be thinner in the low-GE level group. In addition, the apparent digestibility of the high GE level group was higher than that of the low GE level group. These results suggest that the increase in BF can be suppressed by feeding high CP and low GE feeds without affecting the increase in the body size of Agu feeder pigs. In addition, it was suggested that the energy level of conventional feed was excessive for 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，アグーの産肉能力や繁殖性等は西洋品種に劣り[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行われている[6)]。給与飼料は，通常，日本飼養標準に基づいて飼料設計された一般流通飼料が用いている。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，脂肪が付きやすいアグーは肥満の個体が散見され，肥満による繁殖

© The Ito Foundation

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，増体の改善や肥満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。

著者らは，令和４年度において，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を検討した。その結果，高CP区で背脂肪厚およびその増加量が低くなる傾向を示した。古谷ら[8]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[9]や勝俣ら[10]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，エネルギーが脂肪の蓄積に向けられることを報告している。これらのことから，低CP区において背脂肪厚が高くなった要因として飼料中の必須アミノ酸不足やエネルギー水準が高かったことがあげられ，必須アミノ酸含量やタンパク質/エネルギー比の影響を，さらに詳細に検討する必要があると考えられた。

そこで本研究においては，CP中の必須アミノ酸の含有率を一定とし，CP水準とエネルギー水準の異なる４種類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を検討した。これにより，アグーにおいて増体を保ちつつ肥満を抑制できるアグー用飼料の栄養バランスを明らかにすることを目的とした。

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2023年９月20日～12月６日の期間で行った。供試豚は2023年６～８月に生まれた11～12週齢のアグー育成豚雄８頭，雌８頭の計16頭（６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。供試飼料について**Table 1** に原料割合，**Table 2** に成分組成の設計値，**Table 3** にアミノ酸組成を示した。CPは現在アグーに用いられている慣行飼料と同等の含量となる16％とし，飼養標準の30～50 kgの豚に必要とされるリジン要求量を満たすようリジン含量を0.86 g/kgに調整した高CP区と，CP含量を高CP区の約９割の14.5％とし，リジン含量を0.77 g/kgとした低CP区の２水準，エネルギーについてもGEを慣行飼料と同等の4.0 Mcal/kgに調整した高GE区と，GEを高GE区の約９割の3.6 Mcal/kgに調整した低GE区の２水準とし，それぞれの組み合わせにより，高CP高GE区，高CP低GE区，低CP高GE区および低CP低GE区の４種類について，一般社団法人科学飼料協会に配合を依頼した。各処理区にそれぞれ４頭（雄２頭，雌２頭）ずつ配置し単房（１豚房：1.1 m×2.5 m＝2.75 ㎡）で５週間飼育した。試験飼料は朝，夕の２回に分けて給餌し，給餌量は不断給餌した場合の約９割とし，自由飲水とした。

調査項目は体重，増体日量（以下DG），飼料摂取量，飼料要求率および背脂肪厚とした。体重測定を試験開始から試験終了まで１週間隔で実施した。飼料摂取量は，給与した飼料をほぼすべての豚が完食したので給与量を摂取量として用いた（完食しなかった場合には残飼量を差し引いた値を摂取量とした）。背脂肪厚はエコー（HS-2200V，本多電子株式会社，愛知県）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6.5 cm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，

© The Ito Foundation

Table 1　Ingredients of experiment diets（%, as-fed basis）

	HighCP		LowCP	
	HighGE	LowGE	HighGE	LowGE
Corn	42.55	35.28	46.40	38.11
Brown rice	18.00	18.00	18.00	20.00
Soybean meal	11.50	12.50	8.50	8.50
Rapeseed meal	2.09	2.09	2.09	2.09
Sesame meal	3.30	3.30	3.40	3.00
Defatted rice bran	2.00	2.00	2.00	2.00
Bran	2.00	2.00	2.00	2.00
Flour	9.70	9.70	9.70	9.70
Fish meal（CP65%）	2.20	2.40	1.30	2.30
Vegetable oil	3.00	1.20	3.00	1.20
Salt	0.27	0.27	0.27	0.27
Teritary culcium phosphate	0.35	0.35	0.45	0.40
Calcium carbonate	1.30	1.30	0.95	1.35
L-lysine・HCL	0.12	0.10	0.16	0.12
DL-methionine	0.03	0.02	0.04	0.04
L-threonine	0.04	0.03	0.11	0.10
L-tryptophan	-	-	0.02	0.02
L-isoleucine	-	-	0.06	0.05
Choline chloride	0.01	0.01	0.01	0.01
Vitamin K preparations	0.003	0.003	0.003	0.003
Vitamin A, D, E mixed preparations	0.01	0.01	0.01	0.01
B vitamins premix	0.13	0.13	0.13	0.13
Mineral premix	0.10	0.10	0.10	0.10
Molsasses	1.30	1.30	1.30	1.30
Cellulose powder	-	7.90	-	7.20

Table 2　Calculated nutrient contents of experiment diets（% of air-dried diet）

	HighCP		LowCP	
	HighGE	LowGE	HighGE	LowGE
Nutrient contents				
Dry Matter（%）	86.9	87.9	86.8	87.7
Crude Protein（%）	16.0	16.0	14.5	14.5
Ether Extract（%）	6.0	4.0	6.0	4.6
Crude fiber（%）	2.5	2.4	2.4	2.5
Crude ash（%）	5.0	5.1	4.5	5.6
Nitorgen free extract（%）	57.4	60.4	59.4	58.5
Gross energy（Mcal/kg）	4.0	3.6	4.0	3.6
Digestible energy（Mcal/kg）	3.5	3.2	3.5	3.2
Amino acids				
Arginine（%）	1.01	1.02	0.90	0.90
Histidine（%）	0.41	0.41	0.37	0.37
Isoleucine（%）	0.57	0.58	0.56	0.56
Leucine（%）	1.31	1.29	1.19	1.17
Lysine（%）	0.86	0.86	0.77	0.77
Methionine + Cysteine（%）	0.61	0.59	0.57	0.57
Phenylalanine + Tyrosine（%）	1.22	1.23	1.10	1.09
Threonine（%）	0.61	0.61	0.61	0.61
Tryptophan（%）	0.18	0.18	0.18	0.18
Valine（%）	0.72	0.72	0.65	0.65

© The Ito Foundation

Table 3　Analyzed composition of experiment diets（%）

Ingredients（%）	HighCP		LowCP	
	HighGE	LowGE	HighGE	LowGE
Dry Matter（%）	92.6	92.6	92.0	92.4
Crude Protein（%DM）	17.1	16.9	14.8	14.5
Ether Extract（%DM）	8.0	6.3	8.1	5.4
Crude fiber（%DM）	3.1	7.4	2.9	5.9
Crude ash（%DM）	6.4	6.6	6.1	6.6
Nitorgen free extract（%DM）	73.4	70.8	76.7	75.8
Gross energy（Mcal/kgDM）	4.78	4.67	4.82	4.62
Digestible energy（Mcal/kgDM）	4.26	3.98	4.33	3.94

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日間朝夕２回に分けて全量を採取した。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），粗繊維（以下CF），粗灰分（以下CA）および可溶無窒素物（以下NFE）を定量し，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。見かけの成分消化率（%）は次式により算出した。見かけの成分消化率（%）＝（飼料摂取量×飼料の成分含量（%）－糞量×糞の成分含量（%））／飼料摂取量×飼料の成分含量（%）。また，見かけの可消化エネルギー（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を用いて統計処理を実施し，処理区間の差についてはDuncanの多重範囲検定法を用いて有意差検定を行い，有意水準p＜0.05の場合に有意差があると判定した。

3．結果と考察

Table 3 に試験飼料の乾物あたりの成分組成測定値を示した。CP含有率は高CP高GE区と高CP低GE区でそれぞれ17.1％と16.9％であり，低CP高GE区と低CP低GE区でそれぞれ14.8％と14.5％であった。EE含有率は高CP高GE区と高CP低GE区でそれぞれ8.0％と8.1％であり，低CP高GE区と低CP低GE区でそれぞれ6.3％と5.4％であった。CF含有率は高CP高GE区と高CP低GE区でそれぞれ3.1％と2.9％であり，低CP高GE区と低CP低GE区でそれぞれ7.4％と5.9％となった。GE含有率は高CP高GE区と低CP高GE区でそれぞれ4.78 Mcal/kgと4.82 Mca/kgであり，高CP低GE区と低CP低GE区でそれぞれ4.67 Mcal/kgと4.62 Mca/kgとなった。DE含有率は高CP高GE区と低CP高GE区でそれぞれ4.26 Mcal/kgと4.33 Mca/kgであり，高CP低GE区と低CP低GE区でそれぞれ3.98 Mcal/kgと3.94 Mca/kgとなった。

Table 4 に増体成績および飼料要求率を示した。試験開始時の体重の平均値は25.4-26.2 kgであり，処理区間に有意な差は認められなかった。試験終了時の体重は高CP高GE区が45.3 kg，高CP低GE区が43.9 kg，低CP高GE区が43.4 kg，低CP低GE区が43.0 kgであり，高CP高GE区が高い値を示し，

© The Ito Foundation

Table 4　Effect of experimental diets on growth performance and back fat parameters

Measurements	HighCP		LowCP	
	HighGE	LowGE	HighGE	LowGE
Growth performance parameters				
Initial body weight（kg）	25.4 ± 0.8	25.9 ± 0.6	26.1 ± 1.7	26.2 ± 0.9
Final body weight（kg）	45.3 ± 1.0 [a]	43.9 ± 1.0 [a b]	43.4 ± 1.3 [b]	43.0 ± 1.7 [b]
Daily body weight gain（kg/d）	0.57 ± 0.04 [a]	0.51 ± 0.02 [a b]	0.48 ± 0.05 [b]	0.47 ± 0.05 [b]
Daily Feed intake（kg/d）	1.34 ± 0.01	1.34 ± 0.02	1.34 ± 0.01	1.30 ± 0.06
Feed efficiency	0.42 ± 0.03 [a]	0.38 ± 0.03 [a b]	0.37 ± 0.02 [b]	0.37 ± 0.01 [b]
Back fat parameters				
Initial back fat（mm）	12.8 ± 0.4	13.5 ± 1.1	12.7 ± 0.7	13.2 ± 0.2
Final back fat （mm）	18.9 ± 2.3 [a]	16.6 ± 1.2 [a b]	18.2 ± 2.6 [a b]	15.5 ± 0.7 [b]

a, b ; $p<0.05$

Table 5　Apparent digestibility of experimental diets

	HighCP		LowCP	
	HighGE	LowGE	HighGE	LowGE
Dry Matter（%）	89.3 [a]	84.7 [b]	89.3 [a]	84.8 [b]
Crude Protein（%）	88.9 [a]	86.5 [b]	87.9 [a b]	85.6 [b]
Ether Extract（%）	77.6 [a]	73.1 [a]	79.4 [a]	66.9 [b]
Crude fiber（%）	64.6 [a b]	57.9 [a b]	64.9 [a]	45.6 [b]
Nitorgen free extract（%）	94.5 [a b]	91.8 [a]	94.7 [b]	92.1 [a]
Gross energy（Mcal/kg）	89.3 [a b]	85.2 [a]	89.9 [b]	85.4 [a]

a, b ; $p<0.05$

低CP高GE区および低CP低GE区との間に有意差が認められた（$p<0.05$）。DGは高CP高GE区が0.57 kg，高CP低GE区が0.51 kg，低CP高GE区が0.48 kg，低CP低GE区が0.47 kgであり，高CP高GE区が高い値を示し，低CP高GE区および低CP低GE区との間に有意差が認められた（$p<0.05$）。飼料摂取量の平均値は1.30–1.34 kg/日/頭であり，ほぼ同程度の飼料摂取量となった。飼料効率は高CP高GE区が0.42，高CP低GE区が0.38，低CP高GE区が0.37，低CP低GE区が0.37あり，高CP高GE区が高い値を示し，低CP高GE区および低CP低GE区との間に有意差が認められた（$p<0.05$）。試験開始時の背脂肪厚は12.7–13.5 mmであり，処理区間に有意な差は認められなかった。試験終了時の背脂肪厚は高CP高GE区が18.9 mm，高CP低GE区が16.6 mm，低CP高GE区が18.2 mm，低CP低GE区が15.5 mmであり，高CP高GE区が高い値を示し，低CP低GE区との間に有意差が認められた（$p<0.05$）

Table 5 に供試飼料の見かけの成分消化率を示した。DM消化率は高CP高GE区が89.3%，高CP低GE区が84.7%，低CP高GE区が89.3%，低CP低GE区が84.8%であり，高CP高GE区と低CP高GE区は，高CP低GE区および低CP低GE区との間に有意差が認められた（$p<0.05$）。CP消化率は高CP高GE区が88.9%，高CP低GE区が86.5%，低CP高GE区が87.9%，低CP低GE区が85.6%であり，高CP高GE区と低CP高GE区は，低CP高GE区および低CP低GE区との間に有意差が認められた（$p<0.05$）。EE消化率は高CP高GE区が77.6%，高CP低GE区が73.1%，低CP高GE区が79.4%，低CP低GE区が66.9%であり，高CP高GE区，高CP低

© The Ito Foundation

GE区および低CP高GE区は，低CP低GE区との間に有意差が認められた（p＜0.05）。CF消化率は高CP高GE区が64.6％，高CP低GE区が57.9％，低CP高GE区が64.9％，低CP低GE区が45.6％であり，低CP高GE区は低CP低GE区との間に有意差が認められた（p＜0.05）。NFE消化率は高CP高GE区が94.5％，高CP低GE区が91.8％，低CP高GE区が94.7％，低CP低GE区が92.1％であり，低CP高GE区は，高CP低GE区および低CP低GE区との間に有意差が認められた（p＜0.05）。

高CP高GE区の飼料の栄養価は，慣行の流通配合飼料に最も近く，CPおよびエネルギー水準の低い飼料と比較して，CPおよびDE含有率が高かった（**Table 3**）。そのため，高CP高GE区はタンパク質およびエネルギーレベルが高く消化性に優れた飼料を摂取したことで，試験終了時体重，DGおよび飼料効率の値が高くなったと考えられる（**Table 4**）。しかし，試験終了時の背脂肪厚が高くなり低CP高GE区においても背脂肪厚が高くなる傾向がみられたが（**Table 4**），これは高GE水準飼料のエネルギー含量が高く（**Table 3**），飼料中の余剰エネルギーが脂肪として蓄積したためと考えられる。**Table 4** に示したように，高CP低GE区は試験終了時体重，DGおよび飼料効率について，高CP高GE区と比較して低くなる傾向にあったが有意差はなく，試験終了時背脂肪厚においても高CP高GE区と比較して薄くなる傾向がみられた（p=0.13）。また，同じ低GE水準で試験終了時背脂肪厚の値が最も低かった低CP低GE区と比較しても有意差はなかった（**Table 4**）。これは，低GE水準飼料はエネルギー水準の高い飼料と比較して，DE含有率が低く（**Table 3**），飼料中の余剰エネルギーが少なかったことで脂肪蓄積が抑制されたためと考えられる。

高CP水準の飼料は，飼養標準における30～50 kgの豚に必要とされるリジン要求量を満たすよう設計しているが，低CP水準の飼料は高CP水準の飼料と比較してリジン含量を10％低減した設計にしている（**Table 2**）。そのため，高CP水準の処理区と比較して低CP水準の処理区はCP摂取量およびリジン摂取量が減少し，増体成績が有意に低下すると考えていた。しかし，増体成績について低CP水準の処理区と高CP低GE区との間に有意差はなく，高CP高GE区との間に有意差はあったが，これは脂肪蓄積での増体分が影響したと考えられる（**Table 4**）。このことから，低CP処理区のリジン含量でもアグー育成豚のリジン要求量を満たせていた，あるいは本試験の飼料摂取量であればリジン要求量を満たせていた可能性が考えられる。アグーは増体に占める脂肪蓄積が多いラードタイプの豚であることから，産肉性に優れたミートタイプの西洋種を基に推定されたリジン要求量は当てはまらない可能性があることから，今後はリジン要求量を推定するためにアミノ酸バランスを検討した研究が必要と思われる。

Table 5 に示したように，見かけの消化率は高CP高GE区と低CP高GE区で高い値を示し，高GE水準の飼料を給与した場合に消化率が高くなった。一方，高CP低GE区と低CP低GEの消化率は低い値を示した。**Table 1** に示したように，低GE水準の飼料の原料にはセルロースパウダーが含まれており，このことが消化率低下の原因と考えられる。豚配合飼料の公定規格では，子豚育成用配合飼料（おおむね30 kgから70 kg以内）の粗繊維の成分量の最大量は5.5％である。しかし，本試験の成分測定値（**Table 3**）において，粗繊維が高CP低GE区で7.4％，低CP低GE区で5.9％と公定規格より高い値であった。また，Zhangら[11]は育成豚において飼料中の食物繊維濃度を増加させると，DM，CPおよびエネルギーの消化率が低下すると報告している。したがって，本試験において低GE水準区で消化率が低かった要因として繊維

© The Ito Foundation

含有率が高かったことが考えられる。

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，CP中の必須アミノ酸の含有率を一定とし，CP水準とエネルギー水準の異なる4種類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。CPは一般流通配合飼料と同等の含量となる16％とし，飼養標準の30～50 kgの豚に必要とされるリジン要求量を満たすようリジン含量を0.86 g/kgに調整した高CP区と，CP含量を14.5％とし，リジン含量を0.77 g/kgとした低CP区の２水準，エネルギーについても慣行飼料と同等のGE4.0 Mcal/kgに調整した高GE区と，GEを3.6 Mcal/kgに調整した低GE区の2水準とし，それぞれの組み合わせにより，高CP高GE区，高CP低GE区，低CP高GE区および低CP低GE区の４水準を設けた。異なる４つの飼料を11～12週齢のアグー育成豚に５週間給与した。その結果，増体について高CP水準区は試験終了時体重，DGおよび飼料効率が高くなる傾向にあった。高GE水準区は背脂肪厚が厚くなる傾向にあり，低GE水準区は背脂肪厚が薄くなる傾向にあった。また，消化率について高GE水準区の見かけの消化率は低GE水準区より高くなった。以上のことから，高CP低GE飼料の給与によってアグー繁殖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。また，慣行飼料のエネルギーレベルはアグー繁殖育成豚にとって過剰であることが示唆された。

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）Touma, S., Oyadomari, M.：*Anim Sci J*, **91**(1), e13362, doi：10.1111/asj.13362., 2020.
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）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：日本養豚学会誌，**34**, 15～21, 1997.
9）梶雄次：栄養生理研究会報, **45**, 31～38, 2001.
10）Katsumata, M., Kaji, Y., Saitoh, M.：*Animal Science*, **62**, 591～598, 1996.
11）Zhang, *et al.*：*Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2013, 4:17 http://www.jasbsci.com/content/4/1/17

© The Ito Foundation

脂肪交雑と発育を予測するAIモデルで飼料組成を最適化する基盤構築

Building a basis to optimize feed composition with AI models that predict fat crossbreeding and growth

山中　大介[1]・合田　祐貴[1]・西　　宏起[1]・増田　正人[2]・勝俣　昌也[3]
（[1]東京大学農学生命科学研究科，[2]東洋大学総合情報学部，[3]麻布大学獣医学部）

Daisuke Yamanaka[1], Yuki Goda[1], Hiroki Nishi[1], Masato Masuda[2] and Masaya Katsumata[3]
（[1]Department of Agriculture and Life Science, The University of Tokyo. [2]Faculty of Information Sciences and Arts, Toyo University. [3]School of Veterinary Medicine, Azabu University）

Feeding low lysine diets is known as a method to promote fat crossbreeding in pork, but the fact that this method can cause growth retardation has been an obstacle to the diffusion of this technology. This study was aimed to establish the basis for a method to optimize intramuscular fat gain and growth using diets with regulated amino acid content, such as low lysine diets. We fed growing rats diets with different amino acid compositions and obtained data on intramuscular fat mass, body weight, and amino acid intake. We also measured serum amino acid compositions. Using these data, we attempted to create a machine learning（AI）model to predict intramuscular fat mass, body weight, and dietary amino acid composition from blood amino acid composition. The results of the present study did not lead to a good machine learning model that predicts intramuscular fat mass and body weight from blood amino acid composition. On the other hand, we succeeded in creating a good model that predicts the amino acid composition in feed from the amino acid composition in blood. Our future research will take into account the effects of other nutrients and validate the model with pig data, aiming to contribute to high-quality pork production.

1．目　　的

霜降り豚肉はやわらかさなどの食味が向上し，消費者から支持されている。霜降り（脂肪交雑）を促進する方法の一つとして低リジン飼料の給与が知られるが[1, 2]，この方法では発育抑制を起こしうることが技術普及の障害となっている。我々はこれまで，ラットをモデル動物とした基礎研究から，低リジン飼料や低必須アミノ酸飼料の給与により，それぞれに特異的な血中アミノ酸組成が形成され，このことが筋肉内脂肪の増加や発育抑制に必須であることを明らかにしてきた[3, 4]。さらに，このような血中アミノ酸組成から抹消組織の脂肪量を予測する機械学習（AI）モデルを作成可能であることも報告した[3, 4]。筋肉においては，自己組織化マップと呼ばれるクラスタリング手法によって，血中アミノ酸のみを学習データに用いてラット個体をクラスタリングした際に，筋肉内脂肪が高い個体のクラスターが形成されることも示した[5]。一連の結果は，血中アミノ酸組成

© The Ito Foundation

を変化させることにより，筋肉内脂肪量を調節でき，さらに機械学習の活用で脂肪量の予測もできる可能性を示している。

血中のアミノ酸組成を変化させる簡便な方法の一つは，飼料中のアミノ酸組成を変えることであり，適切なアミノ酸組成の飼料を給与することで，意図的に筋肉内脂肪量を調節できる可能性がある。しかし，我々はこれまでに，飼料中の１種類のアミノ酸量を変更すると，血中ではそれ以外のアミノ酸濃度も変化してしまうことを報告している。例えば，低リジン飼料の給与によって血中リジン濃度の低下だけでなくスレオニン濃度の増加も起こる[5]。このような血中アミノ酸組成の予期せぬ変化は，他の組成の飼料でも観察され[4]，飼料中のアミノ酸組成による血中アミノ酸組成の意図的な操作は実は簡単ではない。ここでも機械学習を活用することで適切な飼料組成の設計手法への活路を見出すことができる。

そこで本研究では，さまざまなアミノ酸組成の飼料を給与した動物の血中アミノ酸組成から，筋肉内脂肪量や飼料中アミノ酸組成を予測する機械学習モデルを構築する。また血中アミノ酸と体重を機械学習で関連付けることにより，発育抑制を起こさない血中アミノ酸組成の推定も目指す。データ数を確保するために，ラットにおける動物実験でデータを取得，これを用いて機械学習モデルを作成する。一連のモデルを利用して，発育抑制を起こすことなく効率よく脂肪交雑を誘導する飼料を提案する技術開発を行うことを目的とする。

２．方　　法

2.1　種々の飼料中アミノ酸組成に応じた血中アミノ酸組成と筋肉内脂肪，体重のデータ取得

15%（w/w）のアミノ酸を含む飼料を対照食とし，アミノ酸量全体を減量した低アミノ酸飼料や，低アミノ酸飼料に１種類のみアミノ酸を補充した飼料（20種類），対照食から１種類のアミノ酸のみ減量した飼料（20種類）を作成した。飼料組成は我々が過去に報告した方法に従った[4, 5]。これらの飼料を６週齢の雄性Wistarラットに給餌した。期間中の体重を毎日測定した。解剖時に骨格筋および血清を採取した。骨格筋からフォルチの方法により脂質を抽出し，含まれるトリグリセリド量を測定，筋肉内脂肪量とした[5]。また血清にメタノール法による前処理を施した後，LCMS/MS（Shimadzu, LCMS-8030）を用いてアミノ酸濃度を測定した[4]。なお動物実験は，東京大学大学院農学生命科学研究科の規則に従い動物実験委員会に申請，承認を受けて行なった。

2.2　機械学習モデルの構築

機械学習モデルの構築は，Goggle Colaboratory上でPythonプログラム（バージョン3.10.12）を記述，実行することにより行った。プログラム作成には，numpy（1.25.2），pandas（2.0.3），scikit-learn（1.2.3）のライブラリを用いた。取得した血中アミノ酸と生理応答（筋肉内脂肪量または体重）のデータセットを訓練データ（全データセットの70%）とテスト用データ（残りの30%）に分割した。これを用いて，線形の回帰手法であるLasso回帰，または非線形の回帰手法であるサポートベクター回帰（SVR）に基づく機械学習を行った。Lasso回帰におけるパラメータα，SVRにおけるパラメータC，ε，γに対してパラメータチューニングを行った。学習データまたはテストデータの実測値から，それぞれの機械学習モデルで予測値を算出し，これらの実測値および予測値を用いて決定係数R^2を計算，これを予測の精度とした。

３．結果と考察

まず，シンプルな回帰手法で筋肉内脂肪（TG）

© The Ito Foundation

を予測する機械学習モデルの作成を試みた。回帰手法としては線形重回帰の一種であるLasso回帰を用いた。定法にしたがって訓練データのみを学習に用い，20種類の血中アミノ酸データから筋肉内TG量を予測する（算出する）モデルを構築した。作成したLasso回帰のモデルに対して，テストデータ（これは学習には用いていない）の血中アミノ酸を入力し，TG量の予測値を算出した。このTG予測値とテストデータのTG実測値から決定係数R^2を算出し，精度の指標とした。R^2は大きいほど（１に近いほど）精度が高く，一般的な実用面ではテストデータにおいてR^2=0.6以上を期待される精度指標である。Lasso回帰による筋肉内TGのR^2値は，テストデータにおいてR^2=－0.122と非常に低い値であり，精度は悪かった（**Table 1**）。訓練データから算出したR^2値もR^2=0.327と決して高くはなかった。そこで，別のアプローチとして，非線形回帰が可能なサポートベクター回帰（SVR）の手法を用いて，モデル構築を行った。SVRの場合には，訓練データのR^2値はR^2=0.703と比較的高かったが，テストデータに対してはR^2=－0.258とLasso回帰の場合と比較してさらに低かった（**Table 1**）。SVRのモデルでは，訓練データに対しては比較的よくフィットしているが，テストデータに応用できないいわゆる“過学習”の状態に陥っていることが示唆された。

続いて，筋肉内TGの代わりに解剖時の体重を用いて，同様の機械学習を行った。その結果，Lasso回帰，SVRいずれのモデルにおいても，R^2の値は低く（Lasso, R^2=0.167；SVR, R^2=0.144），精度の良いモデルを作成することはできなかった（**Table 1**）。ニューラルネットワークなどを採用してモデルを作成すれば，計算量が増大する欠点はあるものの，筋肉内TGを予測するモデルも含めてより精度の高いモデルを作成できる可能性があり，今後挑戦する価値のある課題である。

さらに本研究では，血中アミノ酸組成のデータから飼料中のアミノ酸組成を予測するモデルの構築も試みた。まず，20種類の血中アミノ酸濃度から20種類の飼料中アミノ酸の“摂取量”を予測するモデルの機械学習を行った。先と同様にLassoモデルの構築を行った結果，飼料中アミノ酸の摂取量に対するR^2値（テストデータ）は，R^2＝0.419～0.748の範囲に分布した（**Table 2**）。続いてSVRを用いたモデル構築を行った結果，R^2＝0.425～0.779の範囲となり，SVRを用いることで精度が若干向上した（**Table 2**）。

他に精度を向上できるアプローチがないか検討するため，飼料中アミノ酸の摂取量ではなく，“組成”を用いた。ここでアミノ酸の“組成”は，それぞれのアミノ酸の飼料中の含有量（g/kg飼料）を指す。このデータで同様の解析を行った結果，Lasso回帰においてR^2＝0.570～0.878と精度の改善が見られ，SVRにおいてもR^2＝0.636～0.900とさらに精度が向上した（**Table 3**）。このSVRのモデルではすべてのアミノ酸がR^2=0.6以上となり，良

Table 1　Coefficient of determination R^2 comparison between Lasso and SVR in prediction of muscle TG or body weight.
Using the Lasso or SVR model, muscle TG or body weight was predicted and R^2 values were calculated.

		R^2_train	R^2_test
Lasso	muscle TG	0.327	－0.122
	Body Weight	0.704	0.167
SVR	muscle TG	0.703	－0.258
	Body Weight	0.989	0.144

© The Ito Foundation

Table 2　Coefficient of determination R^2 comparison between Lasso and SVR in prediction of "intake amount" of dietary amino acids.
Using the Lasso or SVR model, the amount of each of the 20 ingested amino acids was predicted and R^2 values were calculated ; the maximum, median, and minimum R^2 values for each of the 20 amino acids are shown in the table.

		R^2_train	R^2_test
Lasso	max	0.876	0.748
	median	0.704	0.549
	min	0.624	0.419
SVR	max	0.985	0.779
	median	0.808	0.536
	min	0.749	0.425

Table 3　Coefficient of determination R^2 comparison between Lasso and SVR in prediction of "comosition" of dietary amino acids.
Using the Lasso or SVR model, the dietary composition of the 20 amino acids was predicted and R^2 values were calculated; the maximum, median, and minimum R^2 values for each of the 20 amino acids are shown in the table.

		R^2_train	R^2_test
Lasso	max	0.918	0.878
	median	0.813	0.679
	min	0.741	0.570
SVR	max	0.964	0.900
	median	0.847	0.719
	min	0.772	0.636

好なモデルが構築できたと考えられた。アミノ酸の"摂取量"は血中アミノ酸の量や組成に影響を与えるため，今回，飼料中アミノ酸の"組成"を用いること（実際にそれぞれの個体が摂取した量ではなく，同じ種類の飼料では同一のアミノ酸量とすること）によって精度が向上したことは，一見すると齟齬があるように見える。しかし実際には，"組成"を用いることで，摂取量の場合に存在する値のばらつきがなくなるため，これが予測精度の向上に寄与したのではないかと考えている。

本研究では，血中アミノ酸から筋肉内TGや体重を精度良く予測できる機械学習モデルを作成するには至らなかったが，飼料中のアミノ酸をよく予測するモデルの構築に成功した。今回作成した飼料中アミノ酸の予測モデルでは，炭水化物や脂質など他の栄養素の影響は考慮されておらず，実際に豚の飼育に活用するにはこの点も考慮する必要がある。また，現在のところ飼料中の"20種類"のアミノ酸が出力されるモデルであるが，飼育現場ではこれほど厳密に栄養素をコントロールできない可能性も十分にある。そのため血中アミノ酸や付随する生理状態への影響が大きなアミノ酸をピックアップするなどの改善策も必要になる。これらの改善に加えて，豚データでの検証も行うことで，良質な豚肉生産に貢献できる研究に発展すると期待している。

最後に，今回は解析対象に含めなかったが，我々は低アミノ酸飼料の給与によりラット個体の皮下脂肪および内臓脂肪が増加することも報告しており[5]，血中アミノ酸組成の最適化により脂肪組織量も制御できる可能性がある。本研究は将来的には，肉質や発育促進，無駄な脂肪の減量と

© The Ito Foundation

いった幅広い観点から畜産分野に貢献できる研究課題である。

４．要　約

豚肉における脂肪交雑を促進する方法の一つとして低リジン飼料の給与が知られるが，この方法では発育抑制を起こしうることが技術普及の障害となっている。本研究では，低リジン飼料などのアミノ酸含量を調節した飼料を用いて筋肉内脂肪量の増加と発育を最適化する方法の基盤構築を目的とした。さまざまなアミノ酸組成の飼料を与えたラットにおいて，血中アミノ酸組成から筋肉内脂肪量や体重，飼料中アミノ酸組成を予測する機械学習モデルの作成を試みた。今回の結果では，血中アミノ酸組成から筋肉内脂肪量や体重を予測する良好な機械学習モデルを得るには至らなかった。一方で，血中アミノ酸組成から飼料中のアミノ酸組成を予測する良好なモデルの作成には成功した。今後は他の栄養素の影響を考慮に入れ，豚データでの検証も行うことで，良質な豚肉生産に貢献する研究を目指す。

文　献

1）Nakamura, R., Tadokoro, Y., Hatta, M., Suzuki, T., Tomiyama, M., Okada, T., Katsumata, M.：Effects of dietary lysine levels on feed intake of weanling-growing pigs－a possible role of serum amino acids profile, *Animal science proceedings*, 13(3), 331, 2022.

2）Kobayashi, H., Ishida, A., Ashihara, A., Nakashima, K., Katsumata, M.：Effects of dietary lysine levels and lighting conditions on intramuscular fat accumulation in growing pigs, *Animal Science Journal*, 89(7), 988, 2018.

3）Nishi, H., Yamanaka, D., Kamei, H., Goda, Y., Kumano, M., Toyoshima, Y., Takenaka, A., Masuda, M., Nakabayashi, Y., Shioya, R., Kataoka, N., Hakuno, F., Takahashi, S.：Importance of Serum Amino Acid Profile for Induction of Hepatic Steatosis under Protein Malnutrition, *Scientific Reports*, 8(1), 5461, doi：10.1038/s41598-018-23640-8. 2018.

4）Nishi, H., Yamanaka, D., Masuda, M., Goda, Y., Ito, K., Hakuno, F., Takahashi, S.：Alteration of serum amino acid profiles by dietary adenine supplementation inhibits fatty liver development in rats, *Scientific Reports*, 10(1), 22110, doi：10.1038/s41598-020-79234-w. 2020.

5）Goda, Y., Yamanaka, D., Nishi, H., Masuda, M., Kamei, H., Kumano, M., Ito, K., Katsumata, M., Yamanouchi, K., Kataoka, N., Hakuno, F., Takahashi, S.：Dietary lysine restriction induces lipid accumulation in skeletal muscle through an increase in serum threonine levels in rats, *J Biol Chem*, 297(4), 101179, doi：10.1016/j.jbc.2021.101179. 2021.

© The Ito Foundation

良質な食肉開発に資する骨格筋内脂肪細胞・線維化の運命決定機構の解明

Elucidation of the mechanisms underlying adipogenic or fibrogenic differentiation of mesenchymal progenitors in skeletal muscle for the development of high-quality meat

深　田　宗一朗
（大阪大学大学院薬学研究科）

So-ichiro Fukada
（Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University）

Japanese beef, famously known as WAGYU, has gained international acclaim, largely attributed to the dedication and expertise of livestock farmers. Beyond the superior quality of its lean meat, achieving the ideal balance between marbling and collagen fibers is crucial for tender and flavorful meat. Our research team pioneered the discovery of skeletal muscle resident mesenchymal progenitors, responsible for generating adipocytes (fat cells) and collagen fibers, thus opening new avenues in skeletal muscle research. Our project aims to enhance meat quality by unraveling the mechanisms governing the fate of fat and fibrosis in these progenitors. Our overarching objective is to develop a method to manipulate the marbling and fiber quality balance artificially.

In this proposal, we observed significant changes in muscle stiffness during regeneration, with low stiffness correlating with increased fat accumulation. YAP/TAZ, co-factor for transcriptions, are closely related to stiffness. In addition, we observed that mesenchymal progenitors-specific YAP/TAZ mutant mice exhibited the accumulation of fat. Therefore, we focused on downstream targets associated with adipogenesis that were downregulated in response to low YAP/TAZ activity. Interestingly, anti-adipogenic genes published by other groups were downregulated by a YAP/TAZ antagonist. Particularly noteworthy was the marked reduction in Tgfbr2 expression levels in the absence of YAP/TAZ. Given Tgfbr2's involvement in fibrosis, we propose that the YAP/TAZ-Tgfbr2 axis governs the fate determination of mesenchymal progenitors. Manipulating this pathway offers promise in producing high-quality meats while ensuring the health of WAGYU cattle.

1．目　　的

我が国の牛肉はWAGYUとして世界的に高評価を得ており，これは畜産農家の方々の努力や経験の賜物である。柔らかく旨みのある肉の条件は，赤み肉の質以外にも，適度なサシとコラーゲンなどの繊維質のバランスが重要である。著者らはサシ（脂肪蓄積）と繊維質（線維化）を生み出す原因細胞である骨格筋常在性の間葉系前駆細胞を世界に先駆けて発見し[1,2]，骨格筋研究の新た

© The Ito Foundation

な研究分野を開拓してきた。本研究課題では，この骨格筋常在性の間葉系前駆細胞の脂肪化・線維化の相互的な運命決定機構を解明することで，サシと繊維質のバランスを人工的に制御しうる手法の開発を通じて，良質な食肉開発に資することを目的に研究を実施する。

2．方　法

2.1　実験計画１　グリセロールモデルを用いた脂肪細胞誘導モデルにおけるYAP/TAZ，SMAD2/3の局在

人工的に骨格筋内で脂肪分化を誘導するモデルとして，グリセロールモデルが使用されている。間葉系前駆細胞のマーカーであるPdgfra（Platelet-derived growth factor alpha）の発現と同調して，蛍光タンパク質であるYFPを発現するマウスにグリセロールを投与した。脂肪細胞が現れはじめる投与５－10日目の筋サンプルを採取し，YAP/TAZやTGF-βの下流シグナルであるSMAD2/3の発現を特異的な抗体染色により検討し，これら因子の発現している場所を特定した。特に脂肪化が見られる場所でのYAP/TAZとSMAD2/3の局在の相関を調査し，YAP/TAZ経路とTGF-β経路の生理的な関わりについて調査した。

2.2　実験計画２　グリセロールモデルを用いた脂肪細胞誘導モデルにおけるYAP/TAZ，SMAD2/3の局在と組織の‘硬さ’の関係

間葉系前駆細胞の分化は，足場となる基質の硬さが影響を与えることはよく知られている。骨格筋内においても硬さは一定ではなく，また脂肪化が起きる場所にも偏りがある。この偏りが組織の硬さの違いを反映しているのか？　さらには，機械刺激伝達分子として働くYAP/TAZの局在がこの硬さにより制御され，最終的に脂肪細胞分化に寄与しているのかについて，原子間力顕微鏡（AFM：Atomic Force Microscopy）を用いて解析した。解析については大阪大学大学院工学研究科 松﨑賢寿先生に協力して頂いた。

2.3　実験計画３　TGF-β，YAP/TAZのクロストークと力学的刺激の関係

既報によりTGF-βの下流シグナルであるSMAD2/3とYAP/TAZの直接の会合など，二つの分子がクロストークしていることが示されている。骨格筋内において，脂肪化・線維化は同時に見られることが多く，またその組織内の局在は均一ではない。著者らは，TGF-βが結合する受容体であるTgfbr2を間葉系前駆細胞特異的に欠損させた場合にも，骨格筋内の異所性脂肪が出現することを観察している。そこで，YAP/TAZがTgfbr2の発現に与える影響を，YAPの阻害剤であるVerteporfinを用いて検討を行った。

2.4　実験計画４　間葉系前駆細胞の脂肪分化・線維化に与えるYAP/TAZ活性化剤の影響

YAP/TAZの核移行を抑制しているのが，セリンスレオニンキナーゼLATS1/2（large tumor suppressor kinase 1/2）である。つまり，LATS1/2の機能を阻害するとYAP/TAZは核に移行し，標的遺伝子の発現を増加させる。そこで，市販のLATS1/2阻害剤をグリセロールモデルに投与することで，間葉系前駆細胞の脂肪細胞分化が抑制されるかについて計画していた。しかし，より特異的にYAPを活性化させることができる間葉系前駆細胞特異的な活性型YAP5SA誘導モデルでの検証に予定を変更した。

2.5　実験計画５　ビタミンA，YAP/TAZと力学的刺激の関係（ビタミンA欠乏に変わる飼料開発を目指して）

「サシ」を入れるために，飼料からビタミンAを除去する手法が用いられている。ビタミンAの

© The Ito Foundation

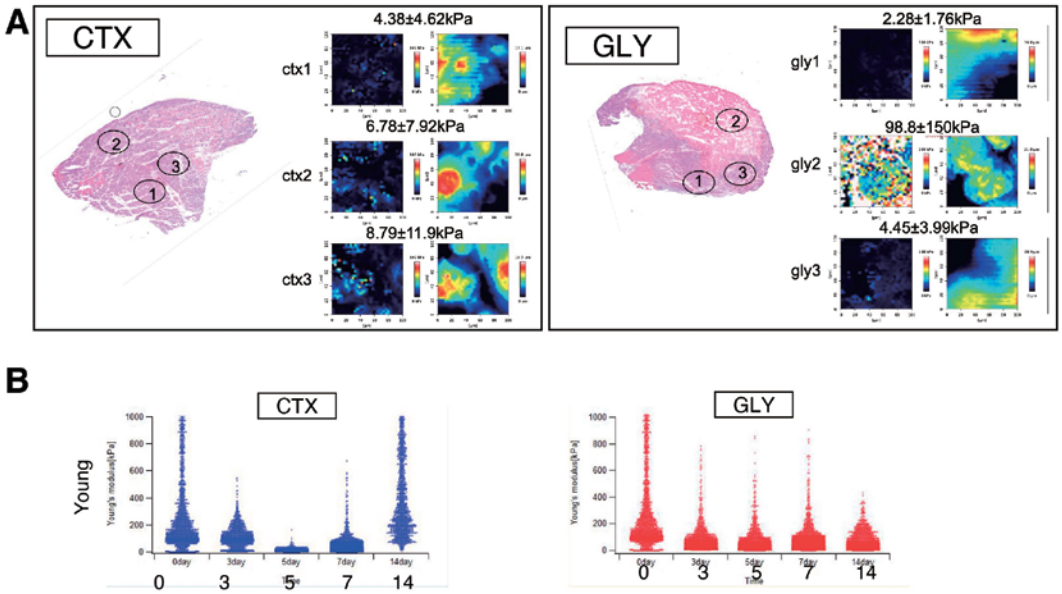


Fig. 1　Measurement of skeletal muscle tissue stiffness in cardiotoxin (CTX) or glycerol (GLY)-injury model
A：CTX and GLY Histology and tissue "stiffness" in CTX or GLY-injury model.
B：Change of stiffness over time after CTX and GLY administration.

誘導体であるレチノイン酸欠損により骨格筋内脂肪が蓄積する実験動物を用いた最近の研究成果[3]と一致する事実は，畜産家の慧眼には驚くしかない。骨格筋内脂肪を制御するYAP/TAZ経路とレチノイン酸経路にも関連性があるのかについて，実験計画３と同じ手法により，レチノイン酸経路の律速酵素であるAlhd1a2や，脂肪分化抑制作用が知られているRunx1[4]，Wnt5a[5]とYAP/TAZの関係を調査した。

３．結果と考察

3.1　実験計画１

YAP/TAZおよびSMAD2/3とも損傷５日目の間葉系前駆細胞の核にその発現が確認できた。特に，SMAD2/3陽性細胞は損傷５日目より増加傾向にあり，これは活性型TGF-βの測定結果を示している既報と一致していた[6]。一方で，グリセロールモデルでは，特に，将来的に脂肪細胞ができる場所において，損傷３日目では間葉系前駆細胞自体がほとんど存在していなかったため，結論を出すことは難しかったため，さらなる検討が必要である。また，肥大筋と比較して再生筋の染色は，バックグラントが高く，Whole-mount免疫蛍光染色法での検出が困難であったため，一次抗体の選定，染色法の改善，単離細胞による検討などの改善が必要と考えられた。

3.2　実験計画２

本学工学研究科の松崎賢寿先生の指導のもと，カルジオトキシン（CTX）とグリセロール（GLY）投与後の筋組織の硬さをAFMにより測定した。その結果，カルジオトキシン投与後は，筋組織の硬さは低下し，再生が進むに従い固くなり，14日目に損傷前の状態まで戻った（**Fig. 1A，B** 左）。一方で，グリセロール投与群では，低下した筋組織の硬さが固くならず，低値を示すことが明らかとなった（**Fig. 1A，B** 右）。つまり，

© The Ito Foundation

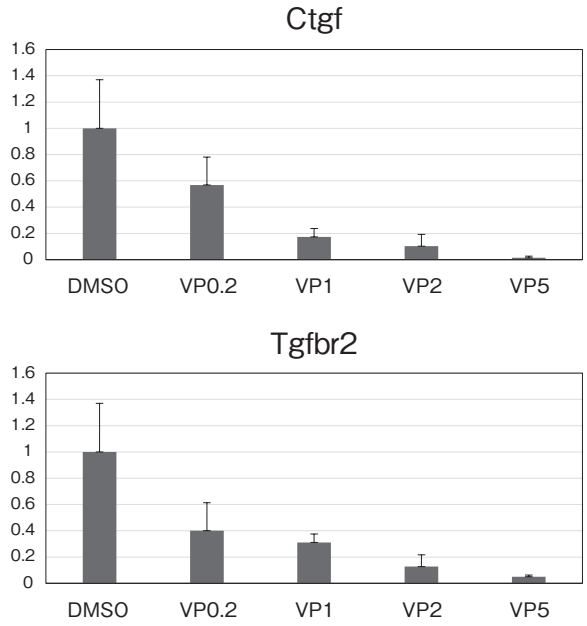


Fig. 2　YAP inhibitor suppressed the expression of adipogenic differentiation-related gene
(Upper panel) Ctgf is a gene known to be downregulated by YAP inhibition.
(Lower panel) Effect of YAP inhibitor on the expression of Tgfbr2.
Horizontal axis shows DMSO (control) and Verteporfin (VP) 0.2-5 μM treatment groups.
Vertical axis is expression relative to DMSO.

グリセロール投与群で見られる脂肪細胞の出現は，再生に伴う筋組織の硬さの回復異常との関連が予想された。

3.3　実験計画３

Verteporfinの濃度依存的に，間葉系前駆細胞におけるTgfbr2の発現は減少することが明らかとなった（**Fig. 2**）。つまり，YAP/TAZの転写機能の亢進はTgfbr2の発現も含めて線維化に働き，逆にその阻害は脂肪化に誘導することが予想された。

3.4　実験計画４

Creリコンビナーゼ依存的に活性型YAP5SAを発現するマウスとPdgfra-CreERTマウスを交配しても，両方の導入遺伝子をあわせ持つ産子は得られなかった。そこで，現在AAVを用いてPdgfra-CreERTをYAP5SAマウスに導入して，グリセロールを投与する系の立ち上げを実施している。

3.5　実験計画５

ビタミンAの合成酵素である*Aldh1a2*, *Wnt5a*, *Runx1*など知られているすべての脂肪細胞分化抑制因子の発現がYAP阻害剤の処理により低下した。つまりYAP/TAZは，骨格筋内脂肪の制御因子の中心であることが明らかとなった。

4．要　　約

霜降り肉のサシの原因でもある，間葉系前駆細胞内のYAP/TAZに着目することで，硬さや既報の脂肪分化抑制因子との関係，さらにはコラーゲン産生に寄与するTGF-βとのクロストークを検証し，特に脂肪分化制御機構の全体像を明らかにすることができた。今後は，どのような分子メカニズムにより間葉系前駆細胞内のYAP/TAZの活性化が持続し，それにより線維化になるのかにつ

© The Ito Foundation

いて検証することが間葉系前駆細胞の運命決定機構の最後のピースになると期待している。これら経路を検証することで，健康状態を維持した良肉の開発につながることが期待できる。

文　献

1） Uezumi, A., Fukada, S., Yamamoto, N., *et al.*：Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle, *Nat Cell Biol*, 12(2), 143～152, 2010.

2） Uezumi, A., Ito, T., Morikawa, D., *et al.*：Fibrosis and adipogenesis originate from a common mesenchymal progenitor in skeletal muscle, *J Cell Sci*, 124(Pt 21), 3654～3664, 2011.

3） Zhao, L., Son, J. S., Wang, B., *et al.*：Retinoic acid signalling in fibro/adipogenic progenitors robustly enhances muscle regeneration, *EBioMedicine*, 60, 103020, 2020.

4） Wosczyna, M. N., Perez Carbajal, E. E., Wagner, M. W., *et al.*：Targeting microRNA-mediated gene repression limits adipogenic conversion of skeletal muscle mesenchymal stromal cells, *Cell Stem Cell*, 28(7), 1323～1334 e1328, 2021.

5） Reggio, A., Rosina, M., Palma, A., *et al.*：Adipogenesis of skeletal muscle fibro/adipogenic progenitors is affected by the WNT5a/GSK3/beta-catenin axis, *Cell Death Differ*, 27(10), 2921～2941, 2020.

6） Lemos, D. R., Babaeijandaghi, F., Low, M., *et al.*：Nilotinib reduces muscle fibrosis in chronic muscle injury by promoting TNF-mediated apoptosis of fibro/adipogenic progenitors, *Nat Med*, 21(7), 786～794, 2015.

© The Ito Foundation

卵巣予備能に基づく新規受卵牛選定技術の検討（Ⅲ）

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

小　山　　毅
（北海道立総合研究機構畜産試験場）

Takeshi Koyama
（Animal research center, Hokkaido research organization）

This study aimed to (1) examine the relationship between anti-Müllerian hormone (AMH) concentration at any time before embryo transfer (ET) and the result of ET pregnancy diagnosis and (2) create a formula to convert the AMH concentration at a clinical laboratory to the equivalent amount of a bovine AMH EIA kit. In experiment 1, blood samples for AMH concentration measurement were collected from 368 Holstein dairy cows raised on 11 commercial dairy farms and 1 private-rearing farm. Blood samples were collected at any time before ET. The minimum, first quartile, median, mean ± standard deviation (SD), third quartile, and maximum AMH concentrations were 9, 157, 247, 329 ± 282, 409, and 2,516 pg/ml, respectively. The relationship between the AMH concentration and the result of ET pregnancy diagnosis was evaluated by logistic regression analysis using data from 346 cows with no missing data. There was no significant relationship between AMH concentration before ET and the result of ET pregnancy diagnosis ($p>0.05$). In experiment 2, we used 40 blood samples collected in experiment 1. The AMH concentrations of the blood samples were analyzed in a clinical laboratory, and we obtained the laboratory test value (lab value) and the bovine AMH kit value (kit value). The mean ± SD of the log-transformed lab and kit values were −1.43 ± 0.59 and −1.77 ± 0.92 ng/ml, respectively, and the kit value was significantly lower than the lab value ($p<0.05$). The correlation coefficient between lab and kit values was 0.91, indicating a high positive correlation. The equation for linear regression, where Y represented the kit value (pg/ml), and X represented the lab value (ng/ml), was $Y=1116.7X-70.632$. The coefficient of determination was 0.88.

1．目　　的

受精卵移植は主に遺伝的改良を行うために実施されることが多く，優秀な遺伝能力を持つ供卵牛と優秀な遺伝能力を持つ種雄牛を交配することにより複数の受精卵を作出する受精卵回収技術と，作出した受精卵を複数の受卵牛に移植・妊娠させる胚移植技術からなる技術体系である。胚移植の受胎成績を高位安定化するためには，従来から行われてきた高品質卵回収の効率化，回収卵の培養，および保存技術の改良など，供卵牛側からの取り組みに加え，受卵牛側からのアプローチが必

© The Ito Foundation

要不可欠であると考えている。

卵巣予備能は近年，ウシの繁殖領域で注目されている指標である。本指標は卵巣における卵胞の数と定義され，末梢血中の抗ミューラー管ホルモン（anti-Müllerian hormone，AMH）濃度や前胞状卵胞数によって評価することが可能である。

これまで実施してきた卵巣予備能に基づく新規受卵牛選定技術の検討（Ⅰ）および（Ⅱ）において，①卵巣予備能が高い個体は受胎しやすい生理状態にある可能性が示され，胚移植受胎率が高い傾向にあること，②受卵牛の主要な品種であるホルスタイン種乳牛において，血中AMH濃度は分娩前から分娩後21日目までの栄養状態の影響を受けること，および分娩後42日目のAMH濃度が分娩後の受胎性と関連があることを示した。

本研究では，ホルスタイン種乳牛に胚移植を実施している商用農場で飼養されていた育成牛または経産牛を供試し，①現地農場環境下において卵巣予備能と胚移植受胎率の関係を明らかにすること，および②畜産現場でのAMH濃度測定の利便性を向上させるために，畜主がAMH濃度測定を依頼すると想定される臨床検査センターの分析値をウシ専用キット等量に変換する式を作成することを目的とした。

2．方　法

2.1　ホルスタイン種乳牛におけるAMH濃度と胚移植受胎成績との関係の調査

北海道内でホルスタイン種乳牛を飼養する11戸の酪農場，および１戸の育成牛預託牧場において，AMH濃度測定用血液サンプルを採取した。血液サンプルは胚移植前の任意の時期に尾静脈から採取した。血液サンプルは抗凝固剤としてEDTA-2Naが封入された真空採血管（テルモ，VP-NA070K）に入れ，十分に転倒混和した後，遠心分離処理まで氷温条件で保存した。血液サンプルは採取後８時間以内に遠心分離を行い，血漿を採取した後，AMH濃度測定まで－30℃で保存した。

血漿サンプルを室温で融解後，ウシAMH専用キット（Ansh Lab社，AL-114）を用いてAMH濃度を測定した。キット付属の緩衝液で血漿サンプルを２倍希釈したのち，キットの説明書に従いAMH濃度を測定した。

採血し，かつ実際に胚移植が実施された牛について，①生年月日，②産歴，③胚移植に伴う発情同期化処理の有無，④移植された受精卵の凍結の有無，⑤受精卵の由来（体内胚か，体外胚か），⑥胚移植実施年月日，および⑦胚移植実施後約50日目（発情後約60日目）の妊娠鑑定結果，を収集した。

得られたAMH濃度の基本統計量を調べた。胚移植前のAMH濃度と妊娠診断結果の関係は，ロジスティック回帰により解析した。妊娠鑑定結果（受胎または不受胎）を目的変数とし，①移植前のAMH濃度，②産歴（未経産または経産），③胚移植が実施された季節（春：３－５月，夏：６－８月，秋：９－11月，冬：12－２月），④受精卵凍結の有無，⑤発情同期化の有無，および⑥受精卵の由来（体内または体外），を説明変数とした。モデルにAMH濃度と産歴，またはAMH濃度と発情同期化の有無を交互作用として投入し，交互作用が有意な場合，産歴ごと，または発情同期化ごとにモデルを構築した。農場は変量効果としてモデルに投入した。AMH濃度はAkbarinejadら[1)]の報告を参考に，二次項の連続数値としてモデルに投入した。$p<0.05$の場合，統計学的有意差ありと判断し，$p<0.1$は傾向ありと判断した。

2.2　実用化に向けたAMH測定体系の確立

2.1でAMH濃度を測定した血漿サンプル40検体を用いた。血漿サンプルを北海道内の臨床検査センターに送付し，AMH濃度の測定を依頼した。

© The Ito Foundation

依頼先において，血中AMH濃度は富士レビオの全自動化学発光酵素免疫システムであるパルスミスG1200を用いた化学発光酵素免疫測定法によって測定された。2.1で用いたウシAMH専用キットによる測定値（キット値）と，臨床検査センターによる測定値（臨検値）の濃度差の有無，相関係数，および一次回帰式を作成した。ナノオーダーに変換したキット値と臨検値を対数変換した後，t検定による平均値の検定およびピアソンの積率相関係数を算出した。一次回帰式は利便性を考慮し，ピコオーダーのキット値と臨検値を用いて作成した。

３．結果と考察

3.1　ホルスタイン種乳牛におけるAMH濃度と胚移植受胎成績との関係の調査

胚移植前に採血され，かつ実際に胚移植が実施された頭数は368頭（未経産牛：298頭，経産牛：70頭）であった。採血後から胚移植実施までの平均日数は36.5±28.9日であった。AMH濃度の基本統計量は，最小値は９pg/ml，第１四分位点は157 pg/ml，中央値は247 pg/ml，平均値±標準偏差は329±282 pg/ml，第３四分位点は409 pg/ml，最大値は2,516 pg/mlであった。**Fig. 1** にAMH濃度のヒストグラムを示した。これまでの報告と同様に，AMH濃度は個体間差が大きかった[2, 3]。

本試験の胚移植受胎率は38.2％であった。発情同期化，および受精卵の由来に関する情報にデータ欠落があったため，最終的に346頭の牛のデータを用いて解析した。産歴または発情同期化の有無とAMH濃度に交互作用は認められなかった。**Table 1** に，移植前のAMH濃度が胚移植受胎成績に及ぼす影響を示した。胚移植前のAMH濃度と胚移植受胎成績に有意な関係は認められなかった（$p>0.05$）。AMH濃度と人工授精（AI）における受胎成績との関係を調べた研究では，AMH濃度が高い個体ではAI受胎率が高いと報告されており，卵巣予備能が高い個体では発情後の子宮内膜が厚く，血中プロジェステロン濃度が高いことから，受胎しやすい生理状態にあることが指摘されている[4]。本研究においても，AMH濃度が高い個体は受胎しやすい，との仮説を立てて調査を行ったが，AMH濃度と胚移植受胎成績の間に関連性は認められなかった。この原因として，受卵牛の多くが胚移植前に発情同期化処理を受けたことが考えられた。Ribeiroら[3]は，発情同期化を伴わないAIの場合，高AMH牛のほうが高受胎であったが，発情同期化処理後に定時AIを実施した場合，AMH濃度と受胎性に関連が認められな

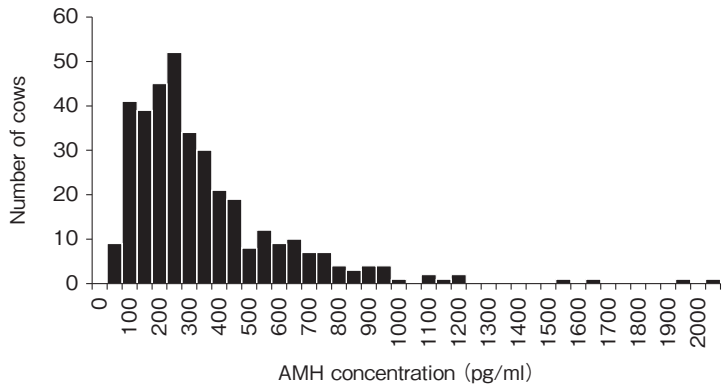


Fig. 1　The distribution of plasma AMH concentration (pg/ml) in Holstein dairy cows (n=368).

© The Ito Foundation

Table 1 Relationship between pregnancy of embryo transfer and explanatory variables of multivariate logistic regression model.

Varuable		n	Odds ratio	95% CI[1]			p value
AMH concentration（pg/ml）		346	2.54	0.03	–	208.70	0.679
Quadratic AMH concentration（pg/ml）		346	0.77	0.01	–	49.65	0.901
Birth histry	No	279		Reference			
	Yes	67	0.77	0.22	–	2.70	0.686
Age at time of ET（months）		346	0.99	0.95	–	1.02	0.450
Seasons[2] at time of ET	Spring	149		Reference			
	Summer	131	1.46	0.84	–	2.56	0.183
	Autumn	30	2.84	1.18	–	6.85	0.020
	Winter	36	1.08	0.45	–	2.60	0.858
Freezing of embryos	Yes	151		Reference			
	No	195	0.85	0.40	–	1.81	0.674
Estrus synchronization	No	86		Reference			
	Yes	260	2.41	1.01	–	5.77	0.048
Type of embryo	in vivo-drived	192		Reference			
	in vitro-drived	154	0.63	0.38	–	1.05	0.075

[1] 95% confidence intervals of odds ratio

[2] Spring：March to May, Summer: June to August, Autumn: September to Norvember, Winter: December to February.

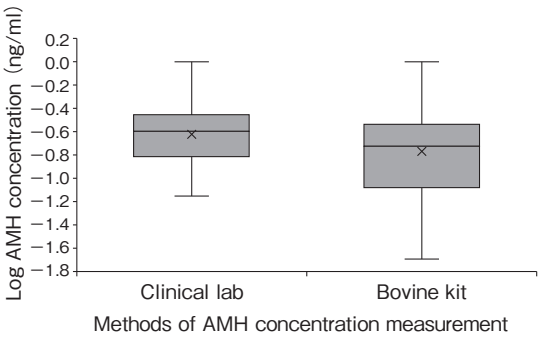


Fig. 2 Effect of different AMH concentration measurement methods on log transformed AMH concentration.
Different letters represent significant differences between methods of AMH measurement（p<0.05）.

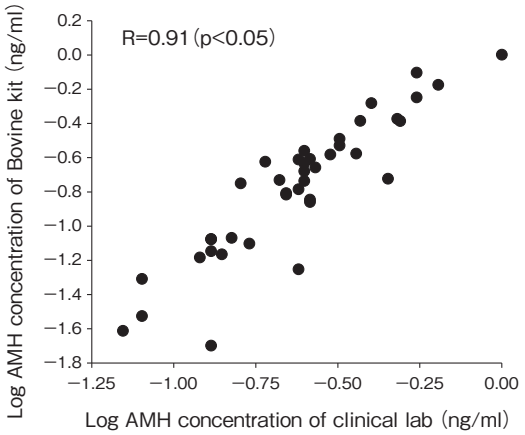


Fig. 3 Scatter plot of log AMH concentration of clinical lab and bovine kit.

くなったと報告した。その原因として低AMH牛では発情同期化処理により繁殖能力が最適化され，受胎性が向上した結果，AMH濃度と受胎性の関係が混乱すると指摘している。このため，発情同期化を伴うことが多い胚移植ではAMH濃度測定による受胎性の予測は難しい可能性が考えられる。発情同期化を実施していない胚移植の受胎成績とＡＭＨ濃度の関係は，移植件数が少ないため将来例数を増やして検討する必要がある。

3.2　実用化に向けたAMH測定体系の確立

臨検値とキット値の箱ひげ図を**Fig. 2** に示した。対数変換後の臨検値およびキット値の平均値±標準偏差は，それぞれ－1.43±0.59 ng/mlおよび－1.77±0.92 ng/mlであり，キット値のほうが

© The Ito Foundation

低い傾向にあり（p=0.05），ウシAMHを臨床検査センターで測定する場合，測定値が低くなる可能性がある。これはAMHのアミノ酸配列の種差に起因する抗原抗体反応の差が原因であると考えられた。対数変換後の臨検値およびキット値の散布図を**Fig. 3**に示した。相関係数は0.91であり，高い正の相関が認められた。Yをキット値（pg/ml），Xを臨検値（ng/ml）とした場合の一次回帰式は，Y＝1116.7X－70.632であり，決定係数は0.88であった。本補正式を用いることで，畜主または獣医師が臨床検査センターの測定値を速やかにウシ専用キット等量に変換し，利用することが可能になる。

４．要　約

本研究では，①現地農場環境下において卵巣予備能と胚移植受胎率の関係を明らかにすること，および②畜産現場でのAMH濃度測定の利便性を向上させるために，畜主がAMH濃度測定を依頼すると想定される臨床検査センターの分析値をウシ専用キット等量に変換する式を作成することを目的とした。試験１では，北海道内の11戸の酪農場および１戸の育成預託牧場において飼養されていたホルスタイン種368頭を供試した。胚移植前の任意の時期の抗ミューラー管ホルモン（AMH）濃度と胚移植受胎成績の関係を調べるとともに，臨床検査センターの分析値をウシ専用キット等量に変換する式の作成を行った。胚移植前のAMH濃度の基本統計量は，最小値が9 pg/ml，第１四分位点が157 pg/ml，中央値が247 pg/ml，平均値±標準偏差が329±282 pg/ml，第３四分位点が409 pg/ml，最大値が2,516 pg/mlであった。本試験の胚移植受胎率は38.2％であった。データの欠落がない346頭のデータを用いて，AMH濃度と胚移植後の妊娠鑑定結果との関係を解析した。胚移植前のAMH濃度と胚移植受胎成績に有意な関係は認められなかった（p>0.05）。試験２では，試験１で採取した血漿サンプルを40検体使用した。臨床検査センターでAMH濃度を測定し，臨床検査センターの分析値（臨検値）とウシ専用キットの分析値（キット値）を得た。臨検値とキット値の対数変換後の平均値は，キット値のほうが低かった（－1.43±0.59 vs. －1.77±0.92 ng/ml，p＜0.05）。臨検値とキット値の相関係数は0.91であり，高い正の相関が認められた。Yをキット値（pg/ml），Xを臨検値（ng/ml）とした場合の一次回帰式は，Y＝1116.7X－70.632であり，決定係数は0.88であった。

文　献

1）Akbarinejad, V., Gharagozlou, F., Vojgani, M., Ranji, A.：*Anim Reprod Sci*., **218**, 106457, 2020.
2）Gobikrushanth, M., Purfield, D. C., Canadas, E. R., Herlihy, M. M., Kenneally, J., Murray, M., Kearney, F. J., Colazo, M. G., Ambrose, D. J., Butler, S. T.：*J Dairy Sci*., 102(12), 11622～11635, 2019.
3）Ribeiro, E. S., Bisinotto, R. S., Lima, F. S., Greco, L. F., Morrison, A., Kumar, A., Thatcher, W. W., Santos, J. E.：*J Dairy Sci*., 97(11), 6888～6900, 2014.
4）Jimenez-Krassel, F., Folger, J. K., Ireland, J. L., Smith, G. W., Hou, X., Davis, J. S., Lonergan, P., Evans, A. C., Ireland, J. J.：*Biol Reprod*., 80(6), 1272～1281, 2009.

© The Ito Foundation

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性発情牛の検出と授精適期の評価

Detection of silent heat and evaluation of optimum timing of insemination using detail of milk progesterone and information from automatic milking system

杉山　稔恵[1]・吉田　智佳子[1]・マリア アニスキナ[2]・山下　舞[3]・中川　浩[3]・宮腰　雄一[3]

（[1]新潟大学農学部，[2]新潟大学大学院自然科学研究科，[3]新潟県農業総合研究所畜産センター）

Toshie Sugiyama[1], Chikako Yoshida[1], Maria Aniskina[2], Mai Yamashita[3], Hiroshi Nakagawa[3] and Yuichi Miyakoshi[3]

（[1]Faculty of Agriculture, Niigata University, [2]Graduate School of Science and Technology, Niigata University, [3]Niigata Agricultural Research Institute Livestock Research Center）

The objective of this study was to assess the reproductive profiles of dairy cows based on progesterone analysis and evaluate the accuracy of activity monitoring devices (pedometers). The interval from calving to commencement of luteal activity postpartum averaged around 28.7 days, with the first ovulation around 23.7 days. Normal estrous cycles had an average duration of 20.5 days, a short cycle of 15.4 days, and a long cycle of 27.5 days. Determination of cyclic patterns showed 66.7% normal cycles, 22.2% luteal phases, and 11.1% delayed cyclicity; no cessation of cyclicity was observed in the herd. This study assessed the pedometer's signals against progesterone profiles for estrus detection accuracy. The results indicated that 34.1% of expected estrus cases were undetected by pedometers, 17.0% of signals were false, and 48.9% of estrus signals were identified as correct.

Our study suggests that the activity monitored by a pedometer can be utilized for heat detection, to some degree, and offers valuable insights into dairy cow reproductive profiles. However, caution is needed when applying these findings more broadly ; they stem from a single herd study with potential influences from diverse factors affecting estrus expression and device performance.

1．目　　的

乳牛における効率的な繁殖管理は，酪農の収益性を増加させるうえできわめて重要である。牛の受胎可能な状態をモニタリングし，人工授精の適時を特定することは，受胎率の低下，胚損失，分娩間隔の延長などを最小限に抑えるうえで重要な役割を果たす[1)]。外見上の発情徴候のみに頼る従来の方法では，鈍性発情を検出できず，健全な繁殖状態も包括的に把握できないことが多い。そのため，乳牛の繁殖状態を正確に評価するための，信頼性が高く客観的な方法として，乳汁中プロ

© The Ito Foundation

ジェステロン（P4）分析が近年注目されている[2)]。乳汁中のP4濃度を経時的に測定することで，性周期の開始，発情の検出，人工授精の成功，妊娠，不妊症の原因となる卵巣異常に関する正確な情報が得られるとされている[3, 4)]。乳汁中のP4プロファイルは，通常，正常な乳牛で分娩後に低濃度となり，その後，分娩後最初の排卵を示す緩やかな上昇を示す。その後，妊娠が成立するまで，P4濃度が上昇と下降を繰り返す周期的なパターンが続くとされている。この正常パターンからの逸脱は，受胎能の低下と関連している[5, 6)]。乳汁P4分析に加え，活動モニタリングセンサーから得られるデータを統合することで，乳牛の繁殖状態を正確に評価することが可能となる。活動量モニターは，発情を示す身体活動の増加やマウンティングなどの行動の変化を検出する。

乳汁P4プロファイルと活動量モニターセンサーから収集されたデータを統合することで，牛の繁殖状態をより包括的に理解することができる[7~10)]。この統合された方法により，外見上の発情徴候は検出されないが，排卵を示すP4値が上昇する鈍性発情を特定することができると考えられる。さらに，酪農家は人工授精のタイミングを最適化することができ，受胎率の向上をもたらす。反対に，この方法は，P4レベルの上昇を伴わずに発情行動を示す牛を特定し，無排卵やその他の繁殖異常を把握することも可能とする[11)]。したがって，これらのデータセットを統合することで，酪農家は繁殖成績を総合的に把握することが可能となり，酪農家は乳牛の繁殖状態を把握し，繁殖管理戦略を最適化することができ，繁殖効率の改善，受胎率の向上，酪農経営の収益性向上につながると考えられる[4, 12)]。

本研究では，現場の酪農の実態に近い牛群を用い，乳汁中P4分析と活動モニタリングを組み合わせて検討を行い，活動量モニターセンサーによる発情の有無の正確性を評価した。

2．方　法

2.1　動物と飼育環境

動物の飼育は，新潟県農業総合研究所畜産研究センターで実施された。牛群は58頭のホルスタイン・フリージアン牛から構成され，搾乳牛25頭（初産牛13頭，多産牛12頭）の平均BCSは3.0［3.1/3.0］であった。牛群の平均305日補正乳量は9661 kgであり，搾乳牛はフリーストールに収容され，搾乳はAMS（DairyRobot R9500，GEA Orion Farm Technologies）を用いて自動で行われた。本研究では，2021年４月から９月までの分娩後の10頭を無作為に選び，本研究に用いた。

本研究プロジェクトは，新潟県農業研究所畜産研究センターの動物実験倫理委員会の審査・承認を受けた（承認番号210104）。

2.2　乳汁P4濃度測定用ELISA

自動搾乳システム（Cowscout，GEA Orion Farm Technologies）を用い，搾乳中に毎日１～５回，乳汁サンプルを採取した。サンプリング直後の牛乳は－20℃で保存した。

乳汁のP4濃度は直接酵素免疫測定法[13)]にて実施し，x軸にP4濃度（ng/ml），y軸に光学密度を対数目盛りでプロットし，標準曲線を作成し，乳汁中のP4濃度を求めた。

2.3　自動搾乳システムと活動モニターセンサー

搾乳を開始する前に，繁殖管理機器（Cowscout，GEA Orion Farm Technologies）を装備した。牛群の活動量は，頸部と足部の両方の装置に組み込まれたモーションセンサーにより，歩数，給餌時間，横臥時間，起立間隔などの指標を１時間ごとに記録した。記録したデータは，繁殖管理機器システムで処理され，発情活動の特定基準を設定した。活動により発情の兆候を示していることを

© The Ito Foundation

システムが識別すると，発情期の開始を示す信号を発するよう設定した。

2.4　活動モニタリングの精度の判定

本研究では，P4分析に基づいて予想される発情期と，活動センサーからの対応する信号の同期性を評価した。発情期は，排卵の前後，つまり黄体期（P4高値）の直前のP4低値で予想した。活動モニターからの発情期信号は，P4レベルの分析により発情が予想される期間に示された場合は「正しい」（CORRECT），P4レベルが高いため発情が予想されない期間に示された場合は「偽り」（FALSE）とみなした。また，P4値が低く発情が予想される期間に活動モニターからの信号がなかった場合，この期間は「見逃し」（MISSED）とみなした。

3．結　果

3.1　乳汁P4分析に基づく周期性の分析

乳汁P4分析に基づき排卵期と非排卵期の２期に分け，分娩後黄体活動開始までの間隔（CLA）を各個体について求めた。乳汁中のP4濃度が5 ng/mlを超えた牛は非排卵期，５ng/ml未満の牛は排卵期であった。健康な牛の生理的に正常な生殖周期は，一回の排卵期と一回の非排卵期からなる。

生殖周期はさらに，短周期（18日未満），通常周期（18～24日），長周期（24日以上）に分類した[14]。試験期間中，乳汁中のP4濃度が５ng/mlを超えない牛は，発情休止期または非排卵期であると識別した。

Fig. 1 に代表的なデータとして牛番号611の個体プロファイルを示した[15]。この図に示されたよ

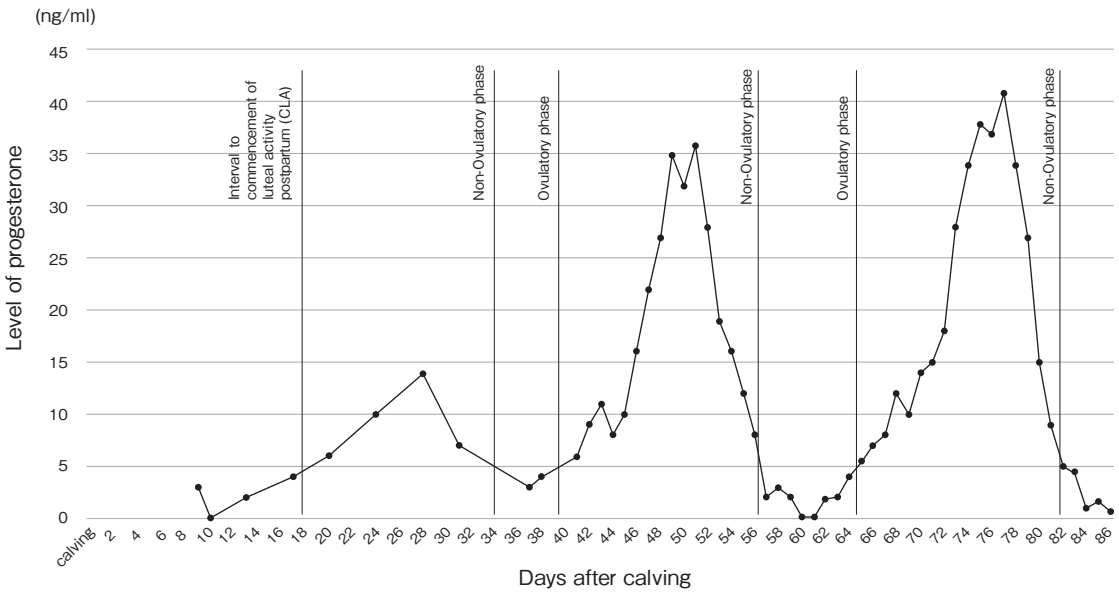


Fig. 1　Progesterone profile for cow number 611.
Fig. 1 shows the individual profile of cow number 611, serving as representative data. This figure represented the level of progesterone in the milk. The P4 was calculated separately for each day after calving. The figure also highlights the phase of interval to commencement of luteal activity postpartum, non-ovulatory phase and ovulatory phase.

© The Ito Foundation

Table 1　Description of ovarian cyclicity.

Type of profile	Description	n/%
Normal	First rise in progesterone before days 56 postpartum, followed by regular cyclicity	6/ 66.7
Delayed cyclicity	Low progesterone for the first 56 days postpartum	1/ 11.1
Cessation of cyclicity	Normal start of cyclicity, but interrupted for at least 14 days with low progesterone levels	–
Prolonged luteal phase	Normal start of cyclicity, but with high progesterone levels for at least 20 days	2/ 22.2

うに，非排卵期と排卵期からなる２つの完全な周期が観察される。排卵周期の長さは18日である。第１周期の長さは22日（非排卵期16日，排卵期６日）。第２周期の長さは24日（非排卵期16日，排卵期８日）であった。卵巣周期の分類に従い，この牛は**Table 1** に従って正常な周期の個体として特徴付けられた。実験中，９頭の牛群の24サイクルを調査し，１頭は発情休止期で除外した。

卵巣周期は分娩後28.7±12.8日で再開すると推定された。分娩から黄体活動開始までの間隔（CLA）の全平均値（28.7日）は，CLAの平均５日前に起こる最初の排卵までの指標となり，分娩から最初の排卵までの間隔は23.7日であった。

正常周期の期間は20.5±1.7日であった。正常周期，短周期，長周期の頻度は，50.0％，20.9％，29.1％であった。本研究における短周期の期間は15.4±1.5日，長周期の期間は27.5±1.9日であった。

第１周期の平均期間は21.2±4.2日で，その頻度は正常周期が44.5％，短周期が22.2％，長周期が33.3％であった。短周期と長周期の期間は，本研究では短周期が平均15.5±1.5日，長周期が平均26.7±1.2日であった。

また，各個体のP4プロファイルを，これまでの報告[16, 17]に基づき，４つのカテゴリーに分類した（**Table 1**）[15]。その結果，周期のパターンは，66.7％（6/9）は正常，22.2％（2/9）は黄体期延長，11.1％（1/9）は周期性遅延であった。

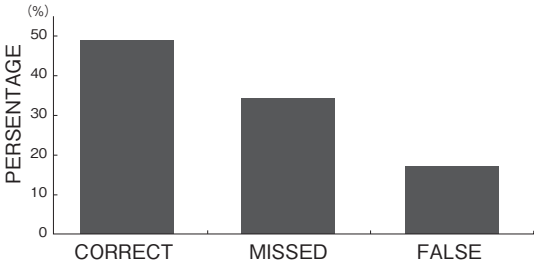


Fig. 2　The percentage of correct, missed, and false signals received by P4 profile and pedometer.
Fig. 2 shows the percentage of 41 signals received from the pedometer and P4 profile.
“CORRECT” signals was detected by pedometer and progesterone level. “MISSED” signals were detected according only progesterone levels, and “FALSE” signal were detected according signals from pedometers which did not correspond to progesterone levels.

3.2　活動モニターの信号の分析

実験期間中，活動モニタリングにより，41の発情信号を受信した。活動モニタリングより示された発情信号が乳汁中P4分析と一致し，「正しい」（CORRECT）発情信号であったのは，48.9％（20/41）であった（**Fig. 2**）[15]。一方，発情が予想される期間に活動モニターからの信号がなかった「見逃し」（MISSED）は34.1％（14/41）を示し，発情が予想されない期間に信号が示された「偽り」（FALSE）は17.0％（7/41）であった（**Fig. 2**）[15]。

4．考　　察

本研究において，乳汁P4分析と活動モニタリ

© The Ito Foundation

ングが示す発情期が一致した「正しい」発情信号は48.9％であり，活動モニターセンサーで追跡された活動が発情期の検出に十分利用でき，乳牛の繁殖プロファイルに関する有益な洞察をもたらすことが示された。しかしながら，本研究において，活動モニタリングによる「偽り」信号の頻度は17.0％であった。これまでの研究では，「偽り」の信号は6.5％から28.0％の頻度でみられることが報告されている[12, 18]。また，本研究では，活動モニタリングによる「見逃し」が34.1％であった。本研究結果は，信号「見逃し」率が8.0％から31.0％であったとする他の研究[9]のデータよりも高い頻度を示した。

得られた本研究結果はこれまでの研究と類似しているものの，この活動モニタリングによる発情期の検出は以下の要因を改善することにより，より効率よく発情期を検出できるものと考えられた。第一に，牛の行動など個体の特徴へのアルゴリズムの適応が不十分なため，検出精度が低下する可能性がある。第二に，気温の変動や給餌条件などの外部環境要因で，これらは牛の活動，ひいては発情検出精度に影響を与える可能性がある。今後，これらの要因に対処または改善することで，牛群の発情検出装置の精度を大幅に向上させ，鈍性発情をはじめとした乳牛の繁殖状態を正確に把握することが可能となることが期待される。

5．要　約

本研究は，乳汁中プロジェステロン（P4）濃度の分析に基づいて乳牛の繁殖プロファイルを明らかにし，活動モニタリング装置の精度を評価した。分娩から分娩後の黄体活動開始までの間隔は平均28.7日で，最初の排卵は約23.7日であった。正常な発情周期は20.5日，短周期は15.4日，長周期は27.5日であった。周期パターンを分類したところ，正常周期が66.7％，黄体期延長が22.2％，周期性遅延が11.1％であり，この群では周期の停止は観察されなかった。活動モニタリング装置の信号と乳汁P4濃度プロファイルを比較して発情検出の精度を評価した結果，発情しているにもかかわらず34.1％で信号が検出されず，17.0％が偽信号，48.9％が正しい発情信号であった。したがって，活動モニタリング装置で検出される信号は発情検出に利用でき，乳牛の繁殖プロファイルに関する有益な洞察をもたらすことが示された。

文　献

1） Bruinje, T. C., Colazo, M. G., Gobikrushanth, M., Ambrose, D. J.：Relationships among early postpartum luteal activity, parity, and insemination outcomes based on in-line milk progesterone profiles in Canadian Holstein cows, *Theriogenology*, **100**, 32～41, 2017.

2） Adriaens, I., Saeys, W., Huybrechts, T., Lamberigts, C., François, L., Geerinckx, K., Leroy, J., De Ketelaere, B., Aernouts, B.：A novel system for on-farm fertility monitoring based on milk progesterone, *J. Dairy Sci.*, **101**, 8369～8382, 2018.

3） Blavy, P., Derks, M., Martin, O., Höglund, J. K., Friggens, N. C.：Overview of progesterone profiles in dairy cows, *Theriogenology*, **86**, 1061～1071, 2016.

4） Gaude, I., Kempf, A., Strüve, K. D., Hoedemaker, M.：Estrus signs in holstein friesian dairy cows and their reliability for ovulation detection in the context of visual estrus detection, *Livest. Sci.*, **245**, 104449, 2021.

5） Fricke, P. M., Carvalho, P. D., Giordano, J. O., Valenza, A., Lopes, G., Amundson, M. C.：Expression and detection of estrus in dairy cows: the role of new technologies, *Animal*, **8**, 134～143, 2014.

6） de Bruijn, B. G. C., Kok, A., Ma, J., van Hoeij, R. J., van Knegsel, A. T. M.：Feeding behavior in relation to ovarian cyclicity in cows with no or a short dry period, *J. Dairy Sci.*, **106**, 1287～1300, 2023.

7） Mazeris, F.：DeLaval herd navigator: proactive herd management. In Proceedings of first North American conference on precision dairy management. pp.26-27, Delaval International AB, Sweden, 2010.

8） Saint-Dizier, M., Chastant-Maillard, S.：Towards an automated detection of oestrus in dairy cattle, *Reprod. Dom. Anim.*, **47**, 1056～1061, 2012.

9） Rutten, C. J., Velthuis, A. G. J., Steeneveld, W.,

© The Ito Foundation

Hogeveen, H.：Invited review: Sensors to support health management on dairy farms, *J. Dairy Sci.*, **96**, 1928～1952, 2013.

10） Lardy, R., Ruin, Q., Veissier, I.：Discriminating pathological, reproductive or stress conditions in cows using machine learning on sensor-based activity data, *Comput. Electron. Agric.*, **204**, 107556, 2023.

11） Roelofs, J., Lopez-Gatius, F., Hunter, R. H. F., Hanzen, C. H.：When is a cow in estrus? Clinical and practical aspects, *Theriogenology*, **74**, 327～344, 2010.

12） Ranasinghe, R. M. S. B. K, Nakao, T., Yamada, K., Koike, K.：Silent ovulation, based on walking activity and milk progesterone concentrations, in Holstein cows housed in a free-stall barn, *Theriogenology*, **73**, 942～949, 2010.

13） Isobe, N., Yoshimura, T., Yoshida, C., Nakao, T.：Incidence of silent ovulation in dairy cows during postpartum period, *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.*, **111**, 35～38, 2004.

14） Royal, M. D., Darwash, A. O., Flin, A. P. F., Webb, R., Woolliams, J. A., Lamming, G. E.：Declining fertility in dairy cattle：changes in traditional and endocrine parameters of fertility, *Anim. Sci.*, **70**, 487～501, 2000.

15） Aniskina, M., Yoshida, C., Sugiyama, T., Yamashita, M., Miyakoshi, Y.：Utilization milk progesterone analysis for evaluating reproductive status and estrus detection for dairy cows, *Hokushinetsu Journal of Animal Science*, (in press), 2024.

16） Opsomer, G., Gröhn, Y. T., Hertl, J., Coryn, M., Deluyker, H., de Kruif, A.：Risk factors for post-partum ovarian dysfunction in high producing dairy cows in Belgium：a field study, *Theriogenology*, **53**, 841～857, 2000.

17） Petersson, K. J., Gustafsson, H., Strandberg, E., Berglund, B.：Atypical progesterone profiles and fertility in Swedish dairy cows, *J. Dairy Sci.*, **89**, 2529～2538, 2006.

18） Holman, A., Thompson, J., Routly, J. E., Cameron, J., Jones, D. N., Grove-White, D., Smith, R. F., Dobson, H.：Comparison of oestrus detection methods in dairy cattle, *Vet. Rec.*, **169**, 47～47, 2011.

© The Ito Foundation

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～

Potential resource value of cattle rumen fluid discharged from slaughterhouses converted to fertilizer by methane fermentation

阿　部　憲　一
（新潟食料農業大学食料産業学部）

Kenichi Abe
（Faculty of Food Industry, Niigata Agro-Food University）

This study explored the use of anaerobic digestion to convert bovine rumen fluid, a by-product of slaughterhouses, into fertilizer. Under a temperature condition of 30℃, it was found that a portion of the organic components in bovine rumen fluid could be decomposed into CH_4 and CO_2 through anaerobic digestion. The addition of conductive materials such as iron sand, biochar, or spent heat packs was shown to enhance the anaerobic digestion process. However, the addition of these conductive materials also indicated a reduction in the concentration of phosphate in the liquid phase by adsorbing and binding phosphate present in the rumen fluid, as well as phosphate produced from the decomposition of organic phosphorus. When the anaerobically digested bovine rumen fluid was used to cultivate leaf lettuce and kale in a household hydroponic system, growth was comparable to that achieved with commercial liquid fertilizers.

1．目　　的

牛は肉・乳製品はもちろん，脂や皮関連製品などさまざまなかたちで我々の生活を支えている。食肉処理場（＝と畜場）は牛を生命から食品等に変えるために必要不可欠な場所である。食肉処理場で解体された牛の第一胃（ルーメン）液は場内の排水処理設備でエネルギーをかけて処理されているが，近年，牛ルーメン液中の微生物群がメタン発酵処理の性能を向上させることが報告され，実用化に向けた研究が進められている[1,2]。我々は牛ルーメン液中の肥料成分とその比率に着目して，市販の液肥のように利用できる可能性があることに気づいた。牛ルーメン液の液肥利用が実現した場合，『ウシと共に育った液体肥料』と銘打って，家庭菜園や家内での水耕栽培を愛好する生活者層に訴求することで，命と食をつなぐ食肉処理施設に対する理解の醸成につながると考える。牛ルーメン液を液肥として利用するには，腐敗や悪臭の原因になりうる易分解性有機物の除去，アンモニア態窒素から硝酸態窒素への変換[3]などいくつかのハードルが想定される。

本研究では，と畜場から排出する牛ルーメン液中の有機物および肥料成分（N，P，K）量を把

© The Ito Foundation

握したうえで，メタン発酵技術を用いた牛ルーメン液中の易分解性有機物の分解除去による“肥料化”と，そのメタン発酵処理液中の肥料成分濃度の把握，および水耕栽培試験を実施した。

２．方　法

2.1　牛ルーメン液の有機物・肥料成分量の把握

と畜時に毎回２～３頭から採取した牛ルーメン液（計19試料，別日採取）を，0.5 mm径ふるいを通した液区分を分析に用いた。牛ルーメン液液区分のアンモニア態窒素，全窒素，リン酸態リン，全リンの各濃度はパックテスト（共栄理化学研究所）により測定した。カリウム濃度は原子吸光分光光度計（AA-7000，島津製作所）を用いて測定した。牛ルーメン液中の有機物量はCODcrを指標として，水銀フリーニクロム酸法（ハンナインスツルメンツ）を用いて測定した。また，固形分（TS）は牛ルーメン液液区分を105℃で水分を蒸発させた後の重量を，揮発性物質（VS）はTS重量から650℃で消失した重量として，それぞれ元の牛ルーメン液重量からの百分率で表した。なお，pHはガラス電極法（HORIBA）を用いて計測した。

2.2　牛ルーメン液のメタン発酵処理試験

ポリプロピレン製のサークルポット（最大容積480 ml）の蓋に，固液分およびガス採取口を取り付けたものを発酵タンクとして用い，ガス採取口の先には発生ガスを貯留するアルミ製ガスバッグを接続した。初期の発酵液には一般家庭の食品残渣を処理する中温メタン発酵液（TS５％未満）をPETボトルに移して30℃温度下で２カ月以上保管したものを200 mlを用い，導電性物質である砂鉄（SI）30 g添加区，使用済みカイロ（UC）60 g添加区，未添加区（Nor）に対して，牛ルーメン液100 mlを加えて，31℃条件下で回分分解実験を実施した（分解試験１）。実験開始から160日目において，ガス発生がないことを確認したうえで，各試験区の発酵液を攪拌して混合された液区分200 mlを回収して（粒径の大きい砂鉄など比重が大きい固形分は自然沈降で分離・除外された）新たに，SI区由来の発酵液にバイオ炭30 gを添加したBC区，UC区由来の発酵液には使用済みカイロ60 gを追加添加し（UC区のまま），未添加であるNor区の３試験区を設け，それぞれに牛ルーメン液100 mlを添加して実験を再開した（分解試験２）。約１カ月ごとに発酵液を200 ml引き抜き，新たに牛ルーメン液200 mlを投入する連続回分試験を実施した。実験期間中，ガスバッグに貯留した発生ガスは，GC-TCD（GC-2014；島津製作所製）でガス組成を分析した後，ガラスシリンジを用いてガス量を測定した。

2.3　メタン発酵処理牛ルーメン液の肥料成分濃度

連続回分試験の３試験区から237日目と259日目に採取したメタン発酵処理された牛ルーメン液のアンモニア態窒素（N），リン酸態リン（P），カリウム（K）濃度を測定した。アンモニア態窒素とリン酸態リン濃度の測定にはパックテスト（共栄理化学研究所）を用いた。カリウム濃度は原子吸光分光光度計（AA-7000，島津製作所）を用いて測定した。237日目のメタン発酵処理牛ルーメン液は全体量300 ml中の200 mlがルーメン液A（H1-1）由来であり，259日目の試料は同様にルーメン液O（C2-2）由来である（**Table 1** 参照）。

2.4　家庭用水耕栽培装置を用いた栽培試験

室内での利用を想定した家庭用水耕栽培キット（ココベジ；/Living Farm社製）を用いて，分解試験２の初期である168日目のNor区とBC区のメタン発酵処理牛ルーメン液，対象として付属の液肥を用いた３試験区で，それぞれリーフレタスとケールを２株ずつ栽培した。アンモニア態窒素，リン酸態リン，およびカリウム濃度はそれぞれ

© The Ito Foundation

Table 1　Characteristics of rumen fluid collected at slaughterhouses

ID	Group	Breed	Sex	TS	VS	pH	CODcr（×10³）		Ammonium	Total N	Phosphate	Total P	Porassium
							mean	±S.D.					
				%	%		mg/L	mg/L	mg-N/L	mg-N/L	mg-P/L	mg-P/L	mg-K/L
C	C1-1	crossbred	steer	5.79	4.69	6.43	76.8	1.84	1938	2625	1088	1413	1821
E	C1-2	crossbred	steer	3.85	2.81	6.10	64.0	0.86	888	1875	875	1300	1612
M	C2-1	crossbred	steer	3.19	2.25	6.78	47.9	0.15	600	1500	800	1300	1526
O	C2-2	crossbred	steer	no data	no data	no data	27.1	1.05	325	850	438	688	1019
T	C2-3	crossbred	steer	no data	no data	no data	54.6	1.26	888	2375	875	1263	1612
U	C3-1	crossbred	heifer, steer	no data	no data	no data	63.9	0.56	318	2625	413	1775	877
S	C4-1	crossbred	heifer	no data	no data	no data	29.2	0.72	475	950	525	763	889
A	H1-1	Holstein	steer	3.10	2.09	6.95	45.3	0.52	525	1750	1025	1150	1744
P	H1-2	Holstein	steer	no data	no data	no data	31.0	0.50	425	750	800	1000	1246
B	H2-1	Holstein	steer	3.61	2.58	6.67	53.6	0.67	450	1375	738	1050	1519
D	H3-1	Holstein	cow	3.80	2.88	6.83	31.4	0.35	338	1375	300	525	750
I	H4-1	Holstein	heifer	3.24	2.28	6.95	31.7	6.13	413	1000	475	663	839
J	H5-1	Holstein	cow	3.51	2.47	6.89	34.2	0.43	313	1250	450	850	860
R	H6-1	Holstein	cow	no data	no data	no data	40.0	0.40	173	625	425	600	874
F	J1-1	Jersey	steer, cow	2.69	1.87	7.32	16.3	0.06	318	325	413	550	877
K	JB1-1	Japan black	cow	3.89	2.81	6.59	66.2	0.36	813	2125	875	1263	1870
G	H-JB1-1	Holstein, Japan black	cow	2.96	2.02	6.81	24.6	0.74	475	750	525	775	889
N	H-JB2-1	Holstein, Japan black	heifer, cow	2.44	1.55	6.86	29.0	0.21	173	775	425	675	874
Q	H-JB3-1	Holstein, Japan black	cow	no data	no data	no data	36.8	0.23	550	875	325	588	892

CODcr value is the average of three measurements.

Nor区で2,600 mg-N/L，700 mg-P/L，1,850 mg-K/L，BC区で2,580 mg-N/L，800 mg-P/L，1,800 mg-K/Lであった。栽培方法は上記キットの手順に準じて，付属の液肥を添加するタイミングに合わせて，窒素（N）添加量で揃えた量のメタン発酵処理牛ルーメン液をそれぞれの試験区に加えた。なお栽培試験時の温度は25℃未満で，室温の制御は行わなかった。また，栽培試験期間を通して，栽培水槽内のエアレーションは実施しなかった。

3．結果と考察

3.1　牛ルーメン液の有機物・肥料成分量の把握

牛ルーメン液19試料の各成分の測定結果を**Table 1**に示した。交雑種とホルスタイン種がそれぞれ7試料ずつであった。ルーメン液区分に対する固形物含量（TS）は2.44～5.79％，揮発性物質（≒有機物）含量（VS）は1.55～4.69％であり，固形分中の有機物含有比（VS/TS）は0.63～0.81であった。pHは6.10～7.32の範囲であった。CODcr値は16,300～76,800 mg/Lの範囲であり，牛ルーメン液の有機物負荷は最大で5倍程度の差があることが示された。アンモニア態窒素，リン酸態リン，カリウムの各濃度から試算したN，P，K含量はそれぞれ，0.03～0.26％，0.05～0.14％，0.07～0.18％（いずれもw/vo/l）であり，一般的な市販液肥（原液；使用時希釈タイプ）のおよそ1/10～1/200程度であった。

3.2　牛ルーメン液のメタン発酵処理試験

Fig. 1に牛ルーメン液のメタン発酵処理における累積ガス発生量の推移を示した。メタン発酵では分解された有機物の大部分は最終的にCH_4とCO_2に変換されるので，ガス発生量は有機物分解量の簡易的指標にもなり得る。回分分解実験であ

© The Ito Foundation

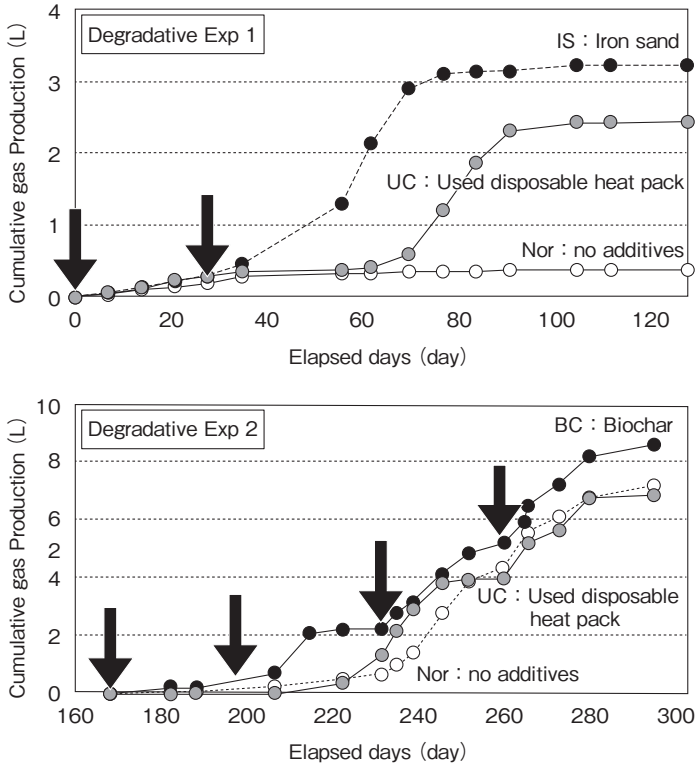


Fig. 1　Trend of cumulative gas production in batch tests of decomposition of cattle rumen fluid by methane fermentation.

る分解試験１では，実験開始からSI区では60日目付近で，UC区では80日目付近でガス発生が顕著に確認された。一方で，Nor区では実験開始初期にはガス発生がみられたが，その後実験終了時の130日目まではほぼガスは発生しなかった。これらの結果から，導電性物質の添加は既往研究で報告があるように[4,5]，牛ルーメン液のメタン発酵処理を促進させる効果があることが示された。連続回分試験に切り替えた分解試験２では，BC区で最も早くガス発生が確認され，また実験期間中の累積ガス発生量も最大であった。Nor区については，分解試験１とは対照的に，UC区と同程度のガス発生が確認された。導電性物質を添加せずとも時間をかければ，牛ルーメン液中の有機物成分は分解されることが示された。

3.3　メタン発酵処理牛ルーメン液の肥料成分濃度

連続回分試験の３試験区から237日目と259日目に採取したメタン発酵処理された牛ルーメン液のアンモニア態窒素（N），リン酸態リン（P），カリウム（K）濃度を測定した。アンモニア態窒素とリン酸態リン濃度の測定にはパックテスト（共栄理化学研究所）を用いた。カリウム濃度は原子吸光分光光度計（AA-7000，島津製作所）を用いて測定した。237日目のメタン発酵処理牛ルーメン液は全体量300 ml中の200 mlがルーメン液A（H1-1）由来であり，259日目の試料は同様にルーメン液O（C2-2）由来である（**Table 1** 参照）。

Fig. 2 にメタン発酵処理後の牛ルーメン液中の肥料成分濃度を示した。273日目の各試験区のアンモニア態窒素濃度は，投入した牛ルーメン液A

© The Ito Foundation

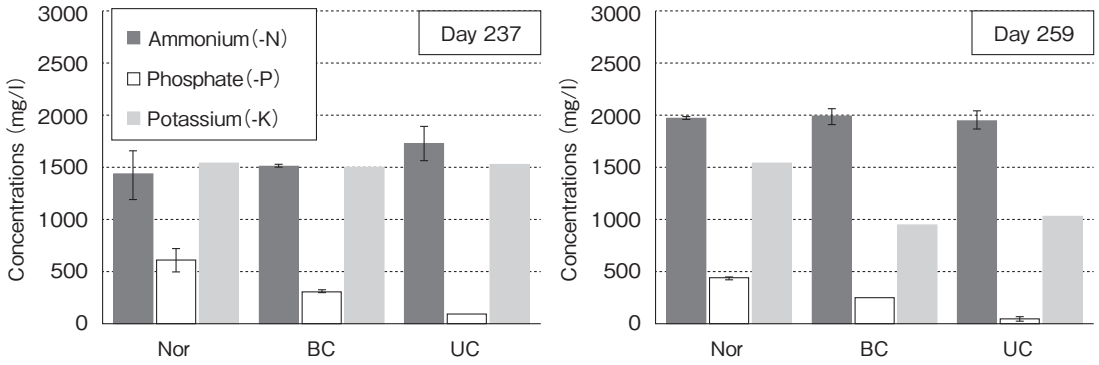


Fig. 2　Fertilizer components in methane fermentation treated cattle rumen fluid.

のアンモニア態窒素濃度よりも高くなる傾向がみられた。これは約１カ月間のメタン発酵処理において，牛ルーメン液中の有機態の窒素分が無機化（分解されてアンモニアが生成）されたことによるものだと考えられる。一方，リン酸態リン濃度については，投入した牛ルーメン液中の濃度を大きく下回る傾向にあった。アンモニア態窒素と同様に有機態区分が分解されて濃度が高くなると想定していたが真逆の結果となった。メタン発酵プロセスを促進させる狙いで導電性物質としてバイオ炭（BC）や使用済みカイロ（UC）を添加した区で，リン酸態リン濃度はさらに低い傾向がみられた。これはリン酸イオンがカルシウムやマグネシウムなどと結合して不溶化した可能性に加え，炭に吸着された可能性や，鉄と結合して不溶化した可能性などが考えられる。カリウム濃度については，投入した牛ルーメン液中の濃度よりも１～２割ほど低くなったが，試験区間の差や傾向などはみられなかった。

牛ルーメン液Ｏをメタン発酵処理した273日目においても，各種肥料成分濃度の傾向は259日目と同様であった。アンモニア態窒素については，2,000 mg-N/Lと牛ルーメン液Ｏのアンモニア態窒素濃度（325 mg-N/L）・全窒素濃度（850 mg-N/L）を大きく上回る結果となった。これは持ち越しのメタン発酵液中の有機態窒素成分の分解によるものだと推測できる（今回の実験では，メタン発酵液中の全窒素濃度は未測定であった）。

3.4　家庭用水耕栽培装置を用いた栽培試験

Fig. 3 に栽培試験終了時のリーフレタスとケールの上面からの外観画像を示した。リーフレタスについては，付属液肥で栽培した試験区と比べて，Nor区，BC区とも同程度の生育であったことがみてとれる。地上部重量（g-wet）は付属液肥区で39，38，Nor区で63，23，BC区で59，60であり，牛ルーメン液由来のNor区，BC区で付属液肥区より地上部重量が大きい傾向がみられた。一方のケールについては，付属液肥で栽培した試験区と比べて，Nor区，BC区では生育はみられたものの，葉が小さく，葉数の少ない傾向にあった。地上部重量は付属液肥区で40，57，Nor区で37，38，BC区で41，44であった。官能評価試験は実施しなかったが，本実験に関わった学部生数人とで試食した感想としては，両葉野菜ともに付属液肥区が味と食感で最も食べやすかった。Nor区とBC区のリーフレタスについては付属液肥区と比べて味が薄い，ケールについては付属液肥区と比べて塩味や苦みを強く感じ，また食感は固いという感想であった。

4．要　　約

と畜時に発生する牛ルーメン液をメタン発酵で

© The Ito Foundation

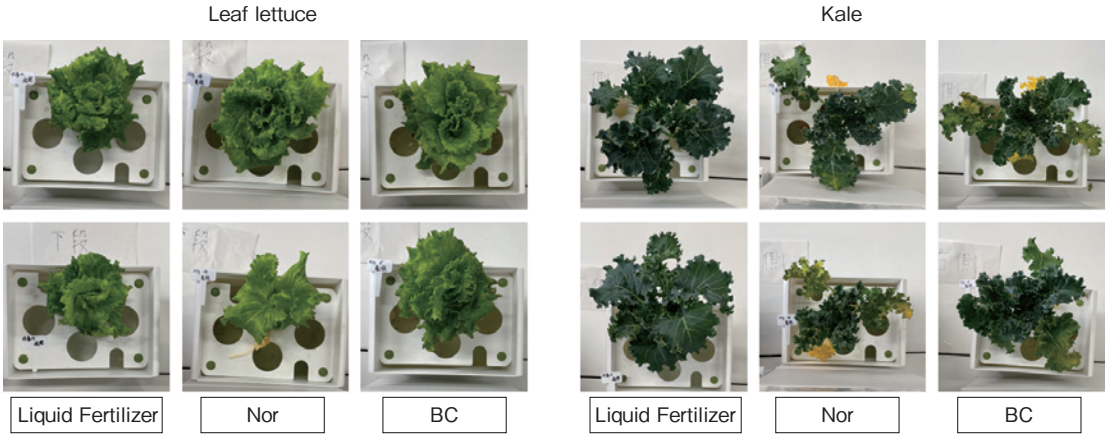


Fig. 3　Top-view images of leaf lettuce and kale at the end of hydroponic cultivation test.

処理して肥料化を試みた本研究において，30℃温度条件下でのメタン発酵処理により牛ルーメン液中の有機物成分の一部はCH_4およびCO_2まで分解されること，その際に導電性物質（メタン発酵環境中の微生物による有機物分解に伴い生成した水素イオン（実際は電子）の水素資化性メタン生成古細菌への移動を促進する効果が提唱されている）として砂鉄やバイオ炭，または使用済みカイロを添加することでメタン発酵プロセスが促進されることが示された。しかしながら，導電性物質の添加は，牛ルーメン液中に含まれていたリン酸態リン，および有機物分解によって有機態リンから生じたリン酸態リンを吸着・結合して不溶化させて，液中の濃度を低下させてしまうことが示唆された。メタン発酵処理した牛ルーメン液を用いてリーフレタスとケールを家庭用水耕栽培装置で栽培したところ，市販液肥と同等の生育が可能であることが示された。

文　献

1）　Baba, Y., Tada, C., Fukuda, Y., Nakai, Y.：*Bioresource Technology*, **128**, 94～99, 2013.
2）　Takizawa, S., Abe, K., Fukuda, Y., Feng, M., Baba, Y., Tada, C., Nakai, Y.：*Journal of Cleaner Production*, **257**, 120626, 2020.
3）　遠藤良輔：作物研究, **59**, 73～77, 2014.
4）　Park, J., Kang, H., Park, K., Park, H.：*Bioresource Technology*, **254**, 300～311, 2018.
5）　Gahlot, P., Ahmed, B., Tiwari, S. B., Aryal, N., Khursheed, A., Kazmi, A. A., Tyagi, V. K.：*Environmental Technology & Innovation*, 20, Article ID 101056, 2020.

© The Ito Foundation

令和５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（調理加工技術含む），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）（９件）				
経産肥育が牛肉中のL-カルニチン量に及ぼす影響		島田　謙一郎	帯広畜産大学 生命・食料科学研究部門	1,200
ソーセージの塩漬フレーバー増強へのヒポキサンチンの関与についての研究		市村　さやか	一般社団法人食肉科学技術研究所	2,000
コールドチェーンの転換に向けた食肉現場に導入可能なAI技術の開発―ハイパースペクトロカメラを用いた肉質変化の経時的計測―		上田　修司	神戸大学大学院 農学研究科	2,000
黒毛和種牛肉の筋線維型構成と味との関連		柴田　愛梨	広島県立総合技術研究所 畜産技術センター	2,000
Check-All-That-Apply法を応用した獣肉の風味特性の可視化に関する研究		水野谷　航	麻布大学獣医学部	1,900
食肉の脂身の美味しさを生み出す呈味性化合物に関する研究		澤野　祥子	麻布大学 生命・環境科学部 食品生命科学科	1,000
工業型畜産の課題解決に向けた培養肉の生産技術開発（Ⅱ）	R4～	岡村　大治	近畿大学農学部	2,000
枝肉３D計測システムの標準的性能評価法の開発		本山　三知代	農研機構 畜産研究部門	2,000
ニワトリ培養肉価値を担保する結合組織構成細胞の機能について		中村　真子	九州大学大学院 農学研究院	2,000
Ⅰｂ　食肉の食品的価値　（４件）				
脊髄損傷性運動麻痺の機能回復におけるブタ肝臓由来リン脂質の有効性		羽二生　久夫	信州大学 先鋭領域融合群 バイオメディカル研究所	1,900
食肉・食肉製品中の亜鉛プロトポルフィリンIX形成におけるフェロケラターゼの作用機序の解明		若松　純一	北海道大学大学院 農学研究院	2,000
食肉加水分解物の栄養機能について（Ⅲ）	R3～	竹之山　慎一	南九州大学 健康栄養学部	2,000
食肉由来ペプチドと大豆由来ペプチドの抗酸化作用の比較		西村　敏英	女子栄養大学 栄養学部	1,400

© The Ito Foundation

Ⅰc　食品安全　（5件）				
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（Ⅱ）	R4～	岡田　彩加	岐阜大学応用生物科学部共同獣医学科	1,900
食鳥処理工程における鶏肉のカンピロバクター動態解析		佐々木　貴正	帯広畜産大学獣医学研究部門	1,900
食肉の低温貯蔵履歴と不十分な加熱がカンピロバクターの生残性に及ぼす影響		本城　賢一	九州大学大学院農学研究院	1,900
*Campylobacter jejuni*のIRバイオタイパーを用いた新規型別法の構築と検討		畑中　律敏	大阪公立大学大学院獣医学研究科	1,900
食肉の健康リスクと環境リスクに係るリスクコミュニケーション手法の研究ならびに効果検証		山﨑　毅	(特非)食の安全と安心を科学する会	1,500
Ⅱa　遺伝育種　（6件）				
MiCAPs法を用いた，新規家禽エミューにおける産肉関連QTLの同定		輿石　雄一	東京農業大学生物資源ゲノム解析センター	1,800
黒毛和種牛肉における「甘い香り」の育種改良手法の確立（Ⅲ）	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
黒毛和種の白斑発生に関する分子遺伝学的研究		下桐　猛	鹿児島大学農学部	1,900
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（Ⅲ）	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	1,750
ゲノム情報による褐毛和種の遺伝的多様性の評価と多様性を考慮した交配様式の開発		井上　慶一	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（Ⅱ）	R4～	福原　絵里子	福岡県農林業総合試験場	1,900
Ⅱb　繁殖　（11件）				
哺乳期の栄養環境が繁殖機能に与える影響（Ⅱ）	R4～	髙橋　秀之	九州大学農学部附属農場	1,550
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？（Ⅲ）	R3～	金澤　朋美	岩手大学農学部共同獣医学科	2,000
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（Ⅲ）	R3～	鍋西　久	北里大学獣医学部	1,450
成熟分裂制御による新たな牛卵子輸送法の開発		坂口　謙一郎	北海道大学大学院獣医学研究院	1,600
新規凍害保護剤を用いた効率的なブタ卵子凍結保存法の開発		三好　和睦	鹿児島大学農学部	1,600
バッテリレス耳標センサーの山羊繁殖管理への利用		安村　陸	沖縄県農林水産部畜産研究センター	2,000
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（Ⅱ）	R4～	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	1,000
多機能尾部センサを用いたタイストール飼育下における泌乳牛の発情検知		吉岡　耕治	麻布大学獣医学部	1,700
ウシの低受胎の要因推定に向けた新規検査技術の創出		内山　淳平	岡山大学学術研究院	2,000
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（Ⅲ）	R3～	中島　友紀	農研機構畜産研究部門	2,000

© The Ito Foundation

非必須アミノ酸濃度の改変による高受胎性が担保されたウシ体外受精卵培養液の開発		伊丹　暢彦	農研機構 畜産研究部門	1,600
Ⅲ　動物衛生　（18件）				
鳥インフルエンザの完全制圧を目指した人工改変型弱毒生ワクチンの開発		堀本　泰介	東京大学大学院 農学生命科学研究科	2,000
国内の牛の流死産における顧みられていない感染症の関与		オブライエン 悠木子	東京農工大学大学院 農学研究院	1,850
牛気道上皮細胞を用いた口蹄疫ウイルスの試験管内増殖系の確立とその応用		岡林　環樹	宮崎大学 産業動物防疫 リサーチセンター	2,000
薬剤耐性プラスミド脱落により薬剤感受性を復帰させる乳酸菌の検索		石原　加奈子	東京農工大学大学院 農学研究院	2,000
豚熱ウイルス受容体候補タンパク質の網羅的探索（Ⅱ）	R4～	池田　圭吾	農研機構 動物衛生研究部門	2,000
安定的なDNA大量生産技術を用いた家畜用低コスト核酸ワクチン開発の基盤構築		西川　明芳	農研機構 動物衛生研究部門	2,000
関節におけるアフリカ豚熱ウイルスの標的細胞の解析および関節炎の病態解析		生澤　充隆	農研機構 動物衛生研究部門	1,600
リコンビナントCathepsinL1を抗原とした肝蛭症の迅速診断キットの開発―ジビエを介した感染のモニタリングへの応用を目指して―		関　まどか	岩手大学農学部 共同獣医学科	2,000
牛ウイルス性下痢ウイルス経胎盤感染機構の解明		内藤　郁慶	北海道立総合研究機構畜産試験場	1,850
鼻腔粘膜ワクチンの自然免疫活性化機構を応用した効果的な牛呼吸器感染症制御法の検討		石川　真悟	大阪公立大学 獣医学研究科	1,850
子牛の脱水評価のための後大静脈/大動脈径比の応用の検討		都築　直	酪農学園大学 獣医学群	1,200
バルク乳および血清を用いた抗体検査による牛群のサルモネラ感染状況の把握ならびに牛由来およびその他由来サルモネラ分離株間の疫学的関連性の解析		岡村　雅史	帯広畜産大学 獣医学研究部門	1,850
畜産農場周辺に生息するアカネズミ属齧歯類の強病原性家畜伝染病媒介能力		高島　康弘	岐阜大学 応用生物科学部	1,900
効率良いウイルス分離システムの開発		齊藤　暁	宮崎大学農学部	1,650
バクテリオファージを利用したボツリヌス菌の新規な簡易・迅速検出法の開発		阪口　義彦	徳島文理大学 薬学部微生物学	1,850
畜産動物用粘膜ワクチンアジュバントの開発（Ⅱ）：ウイルス感染モデルでの検証	R4～	若尾　雅広	鹿児島大学 学術研究院 理工学域工学系	1,800
子牛の呼気温度および熱流束測定による初期呼吸器疾患診断法の開発		前田　洋佑	北里大学獣医学部	950
ブタの粘膜臓器間ネットワークの解明による乳腺免疫の向上		古川　睦実	東北大学大学院 農学研究科	1,850
Ⅳ　家畜飼養，飼料など　（20件）				
畜産動物の脂肪酸味覚受容体の機能解析（Ⅱ）	R4～	吉田　悠太	茨城大学農学部 食生命科学科	1,900
グルカゴン様ペプチド１に着目した子牛のグルコース利用性向上		稲生　雄大	広島大学大学院 統合生命科学研究科	1,600
エコフィードを活用した有機肉用牛生産の環境影響評価		堤　道生	農研機構西日本 農業研究センター	1,500

© 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（Ⅱ）	R4～	権藤　崇裕	宮崎大学フロンティア科学総合研究センター	1,200
牧草の利用価値向上を目指したデジタルフェノタイピング技術による効率的な育種と栽培管理技術の開発		田中　秀典	宮崎大学農学部	1,700
畜産系エキス抽出残さの飼料利用の可能性を探る		川島　知之	宮崎大学農学部	1,900
子牛期の睡眠行動発現に関与する要因の解明―母牛の影響―		深澤　充	東北大学大学院農学研究科	1,800
フェロトーシスが食肉の品質に与える影響とその制御に関する研究		仲西　友紀	宮崎大学農学部応用生物科学科	1,250
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（Ⅱ）	R4～	鈴木　貴弘	九州大学大学院農学研究院	1,900
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（Ⅱ）	R4～	鈴木　裕	北海道大学大学院農学研究院	1,850
微細藻類の飼料添加が暑熱環境下のブロイラーの高温耐性に及ぼす影響		河上　眞一	広島大学大学院統合生命科学研究科	1,800
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（Ⅱ）	R4～	實安　隆興	神戸大学大学院農学研究科	1,200
3D画像解析を活用した肉用牛におけると畜時の適切な姿勢および放銃位置の探索		髙橋　史昭	北里大学獣医学部	2,000
牛のスタンニングと脳のダメージに関する解剖学的および病理学的背景データの構築		安藤　亮	北里大学獣医学部	2,000
雑食性昆虫を利用した家畜排せつ物処理における温室効果ガス抑制		霜田　政美	東京大学大学院農学生命科学研究科	2,000
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～（Ⅱ）	R4～	橘　哲也	愛媛大学大学院農学研究科	1,900
２つの機能性資材の同時給与がブロイラーの筋発達に及ぼす効果		徳武　優佳子	信州大学農学部	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（Ⅱ）：タンパク質・エネルギー比の影響	R4～	普照　恭多	沖縄県農林水産部畜産研究センター	1,500
脂肪交雑と発育を予測するAIモデルで飼料組成を最適化する基盤構築		山中　大介	東京大学農学生命科学研究科	1,800
良質な食肉開発に資する骨格筋内脂肪細胞・線維化の運命決定機構の解明		深田　宗一朗	大阪大学大学院薬学研究科	1,900
合　　計　　73件				128,350

© The Ito Foundation

伊藤記念財団賞

© The Ito Foundation

上　本　吉　伸

東北大学大学院農学研究科　准教授

〔業績の課題名〕

肉用家畜における高密度 SNP 情報の肉質改良への応用に関する研究

〔業績の概要（受賞理由）〕

わが国の食肉産業では，安価な輸入肉との差別化を図るために，高品質牛肉・豚肉生産システムの確立が求められている。このとき，肉用牛および豚などの肉用家畜の肉質形質を遺伝的に育種改良することが有効な手段の一つとして考えられる。特に，肉用牛では脂肪交雑の高い黒毛和種，豚では三元交雑豚の留め雄であるデュロック種について，肉質形質の遺伝要因をゲノムレベルで明らかにすることが肉質改良を行ううえで重要である。そこで上本氏は，黒毛和種およびデュロック種の肉質改良を目指して，高密度一塩基多型（SNP）情報を用いた肉質形質に関する遺伝解析を実施し，以下の研究成果をあげている。

１．黒毛和種を対象とした肉質形質に関する遺伝解析

高密度SNPチップが市販されて以降，ゲノム全体に位置付けられた数万個からなるSNP遺伝子型を容易に判定可能となった。それに伴って，経済形質に関連する遺伝的な個体間差を網羅的に調査するゲノムワイド関連解析（GWAS）が家畜集団にて実施できるようになった。そこで，黒毛和種の肉質形質である脂肪酸組成，化学成分，糖含量および核酸関連物質を対象に，これら肉質形質の遺伝要因をゲノムレベルで明らかにするためにGWASを実施した。その結果，脂肪酸組成であるオレイン酸含量について，脂肪酸合成酵素（FASN）遺伝子内のSNPが強く影響を与えることを明らかにした。化学成分（水分，粗タンパク質，粗脂肪）および糖含量（グルコースなど５形質）について，特に，粗タンパク質およびフルクトースに影響を与えるSNPを明らかにした。核酸関連物質（イノシン酸など４形質）について，イノシン分解酵素（NT5E）遺伝子内のSNPが強く影響を与えていることを明らかにした。

２．デュロック種を対象とした肉質形質に関する遺伝解析とSNP情報の育種の応用に関する研究

（１）肉質形質に関する遺伝要因の解明と効果の高いSNP探索法の検討

胸最長筋中の肉質形質（「やわらかさ」など13形質）についてGWASを実施した結果，これら形質に影響を与えるSNPを明らかにした。また，効果の高いSNPを検出するための統計学的手法について，各種手法の利点・欠点を明らかにした。

（２）肉質形質におけるゲノミック評価

ゲノミック評価法は，ゲノム全体に位置付けられた数万個からなるSNP情報を同時に活用して育種価を予測する手法であり，ウシ集団において実用化されてきた。そこで，実用化されていないブタ集団を対象に，肉質形質におけるゲノミック評価を試行し，その実用可能性について明らかにした。

以上の研究成果は，黒毛和種およびデュロック種の肉質形質に関与する遺伝要因を明らかにした。また，肉質改良の育種現場にて直接利用可能な情報であり，学術的成果のみならず食肉産業に高い貢献を示すものである。

© The Ito Foundation

早　川　　徹

北海道大学大学院農学研究院　助教

〔業績の課題名〕

ミオシンの水溶化現象の発見とその応用

〔業績の概要（受賞理由）〕

早川氏は長年，食肉タンパク質の水溶化のメカニズム解明およびその応用について研究してきた。主な食肉タンパク質であるミオシンは，一般に無塩および低塩濃度（0.1M以下）の溶液には溶解しないとされており，その結果，食肉タンパク質の大部分も低塩濃度溶液に不溶であると考えられてきた。

同氏は，このミオシンが塩類をほとんど含まない溶液に溶解すること（水溶化）を発見し，2009年に食肉科学の国際的な学術誌であるMeat Science誌で報告した。ミオシンの水溶化はアミノ酸の一種であるヒスチジンを含む溶液に透析することで起きることから，ヒスチジンがミオシンに対して特別な効果を発揮すると考え，そのメカニズムの解明にあたった。そこで，ヒスチジン溶液に対して透析することで，ミオシンのC末端側にあるロッド領域が伸長していることを確認し，ロッド領域の伸長が重合体形成を不完全にさせると考察し，2010年にMeat Science誌で報告した。

同氏は，この水溶化現象を食肉加工に応用するための研究にも取り組んでいる。水溶化処理をしたミオシンを加熱すると，高塩濃度溶液に溶解しているミオシンまたは生理的条件下で重合しているミオシンとは異なり，比較的低温度で脆いゲルが形成されることを報告した（Meat Science誌，2012年）。2015年には，その作用機序を検討し，ミオシンN末端領域における分子間の凝集が水溶化処理によって抑制されることをJournal of Food Science誌で報告した。また，食肉においてほとんどのミオシンがアクチンとの複合体であるアクトミオシンとして存在していることから，水溶化処理したアクトミオシンについてもその加熱特性を検討し，水溶化処理したミオシンとも異なり，加熱によってゲルを形成しないことを見出した（Animal Science Journal誌，2023年）。

© The Ito Foundation

学会等事業助成

© The Ito Foundation

令和５年度学会等事業助成 実施報告書
市民公開講座『高病原性鳥インフルエンザの現状と安全な食肉と鶏卵の提供』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〕

高病原性鳥インフルエンザは，家きんの感染症の中で一番恐れられているウイルス感染症であり，家畜の法定伝染病に指定されている。発生した農場の家きんは獣医師によって適切に処分され，感染した生産物が市場に出回ることはない。2022年秋から2023年春にかけて高病原性鳥インフルエンザが全国で発生し，鶏肉・鶏卵の需給にも影響し，マスコミでも大きく報道された。一方，この病気の実態，伝播の様式，感染予防対策などに関する情報が一般市民に浸透していない。

そこで，日本獣医学会会員による高病原性鳥インフルエンザの研究成果に加え，隣国韓国の状況，あるいは鶏肉・鶏卵を提供している生産者の取り組みを紹介し，感染症の発生防止と発生時の封じ込めへの努力を理解してもらうこととした。今回の講演により，一般市民に少しでも獣医学に関心を持ち，動物と人間の健康の維持に多くの獣医師が携わり，日々対応していることを知ってもらいたい。

〔開催概要〕

令和５年９月23日（土曜日，祝日）14：00－16：30に現地（札幌）およびWebexライブ配信を併用した「ハイブリッド方式」にて，市民公開講座を開催した。当日の参加者は259名（現地参加59名，オンライン参加200名）であった。また，開催の翌週より令和６年１月10日まで，見逃し配信をオンデマンドで提供し，219名の参加申し込み，300回のサイトアクセスが確認された。オンライン配信は複数名での視聴も考えられることから，少なくとも478名が市民公開講座に参加したと考えられる。参加者（478名）の内訳は，本学会の非会員が301名であり，うち一般市民は155名であった。これらの参加者のうち13名は家きんの生産者およびその関連団体の職員であった。

講演内容については講座開催の記録として小冊子にまとめ，現地参加者に紙媒体として配布した。さらにオンライン参加者には，この小冊子をPDF化したものを配布した。

〔市民公開講座プログラム〕

「高病原性鳥インフルエンザの現状と安全な食肉と鶏卵の提供」

司会：迫田義博（北海道大学大学院獣医学研究院）

１．はじめに：本公開講座のねらい

迫田義博（日本獣医学会・学術担当理事，北海道大学大学院獣医学研究院）

２．講演１「2022年シーズンの日本における鳥インフルエンザの流行とウイルスの特徴」

内田裕子（農研機構 動物衛生研究部門）

© The Ito Foundation

3．講演２「昨シーズンの韓国における高病原性鳥インフルエンザの流行の特徴と今後の対策」
　Yong-Myung Kang（韓国 農林畜産検疫本部）
4．講演３「北海道の鳥インフルエンザ対策」
　早川　潤（北海道 農政部生産振興局 畜産振興課）
5．講演４「安全な食肉提供への取り組み」
　阿部利夫（日本ホワイトファーム株式会社 札幌事業所生産部）
6．講演５「安全な鶏卵提供への取り組み」
　横山領央（株式会社ホクリヨウ 札幌農場技術部）
7．総合討論
　講演者および農林水産省の担当者（Web参加）
8．閉会の挨拶
　滝口満喜（日本獣医学会・副理事長，北海道大学大学院獣医学研究院）

〔講演概要〕

講演１「2022年シーズンの日本における鳥インフルエンザの流行とウイルスの特徴」
　講師　内田裕子（農研機構 動物衛生研究部門）

2022/2023年シーズンの高病原性鳥インフルエンザの家きんでの発生は，過去最速の10月28日に確認され，過去最大の件数である26道県84事例，約1,771万羽が殺処分の対象となった。そのうち対象となった採卵鶏の数は，全国で飼育される数の１割を超えたことから，卵の価格高騰にもつながり，多大なる経済的被害をもたらした。また，野鳥でも家きんでの発生より約１ケ月前の９月25日にウイルスが検出され，その件数も27道県242事例となった。

ウイルス遺伝子の系統樹解析の結果，国際機関の分類でクレード2.3.4.4bに属することがわかり，日本で発生が確認された2017/2018年，2020/2021年および2021/2022年シーズンのウイルスと同じ系統だった。また，これらの系統の中でさらにG2b，G2dおよびG2cの３つに細分類された。G2bおよびG2dについては，2021/2022年シーズンに日本を含むアジア地域で分離されたH5N1亜型の２つのウイルスグループと同じだった。G2cについては，2022/2023年シーズンに初めて日本で見つかったグループで，2021年に西シベリアおよび中国中南部で分離されたH5亜型ウイルスに近いことが明らかになった。

ウイルスの特徴を明らかにすることで日本国内への侵入経路，発生の広がり方などを推定し，農場での防疫対策につなげることができる。世界では今もなおH5亜型ウイルスの感染が拡大しており，欧米の野鳥や野生哺乳動物では渡り鳥の飛来の季節を問わず通年検出されている。世界の発生状況を把握するなどの状況の監視を行いつつ，農場においては飼養衛生管理の徹底による防疫対策を引き続き行っていく必要がある。

講演２「昨シーズンの韓国における高病原性鳥インフルエンザの流行の特徴と今後の対策」
　講師　カン・ヨンミョン（韓国 農林畜産検疫本部）

韓国でも日本の状況と同様にH5Nx（クレード2.3.4.4）亜型のウイルスによる高病原性鳥インフルエンザが発生している。冬季の流行期間中に野鳥から類似のウイルスが多数検出されていることから，野

© The Ito Foundation

鳥の渡りを通じて韓国にウイルスが持ち込まれたと考えられる。特に，2016年～2017年冬季に発生したH5N6ウイルスによる流行は，韓国で最も甚大な経済的被害をもたらした。

韓国の農林畜産食品部と環境部は，野鳥の鳥インフルエンザの調査を実施している。農林畜産食品部が養鶏場周辺の野鳥からサンプルを収集する一方で，環境部は野鳥の生息地からのサンプル収集に重点を置いている。農林畜産食品部は毎年，野鳥の鳥インフルエンザの積極的な調査を実施しており，捕獲された野鳥は1,200羽，糞便サンプルは40,000以上に及ぶ。環境部もまた，鳥インフルエンザウイルスを検出すべく，糞便サンプルや捕獲された鳥，死んだ鳥を用いて調査を実施している。

動植物検疫庁と地方獣医当局は，農林畜産食品部が策定した鳥インフルエンザ調査の年間計画に従い，臨床観察，モニタリング，鳥インフルエンザ診断のための検査を実施している。鳥インフルエンザの積極的な調査の年間計画の検体数や間隔は，家禽の種類，鳥インフルエンザの発生症例数，リスクの高い時期，リスクの高い地域（渡り鳥の生息地など）などの情報により決められている。一方，臨床症状を伴う鳥インフルエンザの診断は，臨床徴候を観察している農家からの報告に応じて行われる。

韓国政府はこれまで高病原性鳥インフルエンザに対するワクチン接種を実施せず，感染家禽の殺処分，移動制限，消毒を含む迅速な防疫措置を実施してきた。しかし2018年以降，緊急事態への備えとして国立の鳥インフルエンザワクチン抗原バンクを構築した。新型の高病原性鳥インフルエンザウイルスによる感染を防ぐためには，ウイルス抗原の在庫を継続的に更新する必要がある。韓国政府は毎年ワクチン委員会を開催し，ワクチン抗原バンクに保管されているワクチン候補株の妥当性（野外ウイルスとの抗原性の一致）を評価している。

講演３「北海道における鳥インフルエンザ対策」

講師　早川　潤（北海道農政部 生産振興局 畜産振興課）

北海道では，採卵鶏が5,256千羽，肉用鶏が5,180千羽飼養され，都道府県別農業産出額は，採卵鶏が第10位，肉用鶏が第５位に位置付けられており，家きん産業は地域経済の重要な要素を担っている。このため，高病原性鳥インフルエンザの侵入防止および発生時のまん延防止は重要な課題であり，生産者をはじめとした畜産関係者に限らず各分野が危機感を共有し，一丸となって取り組みを推進している。高病原性鳥インフルエンザは，2020年シーズン（2020年秋から2021年春）に国内で発生が相次ぎ，さらに，2021年シーズン（2021年秋から2022年春）にかけても，全国的な発生が確認されるとともに，道内の家きんでも，採卵鶏52万羽規模の大規模農場や国内初となるエミュー飼養農場を含む４事例で発生が確認された。2022年シーズン（2022年秋から2023年春）も，10月～11月に道内の肉用鶏飼養農場で計２事例の発生が確認された。その後，過去にないペースで全国的な発生が相次ぐ中，３月～４月には，道内の同一地域内の大規模農場で３事例の発生が確認された。いずれの事例も，発生農場だけでの防疫対応は困難だったため，道職員をはじめ，国や市町村，関係団体等と連携した防疫対応により，他地域への本病のまん延を防止することができた。

また，発生を防止するための取り組みとして，国内の野鳥で感染事例が確認された際や，本病の養鶏場での発生に際して，生産者や関係団体等と発生情報を迅速に共有して注意喚起を図るとともに，発生事例における疫学調査の結果から得られる改善点を把握し，衛生管理上の重要事項を周知・徹底し，効果的な取り組みの普及や対策の向上を図っている。特に情報発信に関しては，SNSやWeb配信等を活用

© The Ito Foundation

した周知を進めている。高病原性鳥インフルエンザは，今後も毎年のように流行が続くリスクが高まっている。本道では，安全な鶏肉および鶏卵の安定供給のため，引き続きこれらの取り組みを継続実施していく予定である。特に，実効性の高い対策を今後とも検討・検証し，家きん飼養農場をはじめとする各関係者・団体・機関と連携し，道内一丸となって発生防止対策を推進していく。

講演４「日本ホワイトファームグループ「安全な食肉提供への取り組み」～防疫の質の強化～」

講師　阿部利夫（日本ホワイトファーム株式会社 札幌事業所生産部）

安全な鶏肉を安定的に提供するために脅威となる高病原性鳥インフルエンザをはじめとする家畜伝染病対策としての防疫体制についてさまざまな取り組みを進めている。特に，高病原性鳥インフルエンザなどさまざまな病気から鶏を守るために，防疫のための基本の考えとなる，「３本の柱」を会社として定めた。

① 鶏舎の中と外を明確に分け，不要な持ち込みを減らす。

② 農場内と農場外，他の農場を明確に分け，不要な持ち込みを減らす。

③ 可能な限り，鶏舎周囲のウイルス量を少なくする。

これらのほとんどが，普段から実行されている内容である。社内に新しく設置した防疫委員会は，この３本の柱を社員全員が考え，実行できるように取り組んでいる。「どうすればウイルスや菌を鶏舎に持ち込まないようにできるか？」を日ごろの業務で意識させながら改善を進めている。

我々は，他の生命を食べることで生きている。いただいた生命への感謝を忘れないよう，『生命の恵みを大切に，安心・安全な商品をお客様へ』をスローガンとして，鳥インフルエンザの対策に積極的に取り組んでいる。

講演５「安全な鶏卵提供への取り組み」

講師　横山領央（株式会社ホクリヨウ 札幌農場技術部）

2022年の秋から2023年の春にかけて全国で高病原性鳥インフルエンザが84事例発生し，当社の千歳農場でも2023年４月に感染が確認され，約70万羽の鶏が殺処分された。目に見えないウイルスを相手に完璧な防御をするのは大変難しいが，少しでも感染のリスクを減らしていくために，車両消毒，農場敷地や鶏舎内の消毒，靴・衣服の着替え，手指消毒，鶏舎防鳥ネットや破損個所等の確認，野生動物対策などの基本事項をより強化するとともに，現在は特に農場の分割管理，カラス対策（捕獲，木の伐採，鶏糞搬出口や堆肥舎を建物で覆うなど）に力を注いでいる。

ここ数年，世界中で鳥インフルエンザが猛威を振るっており，今後もこのような状況が続くと予想される。日本は世界の中でも卵の消費量が多く，卵好きな人が多い国として知られており，皆様に安全・安心な卵を安定して供給できるように会社として努めていきたい。

© The Ito Foundation

日本食肉科学会　令和５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）・理事長　有原圭三（北里大学獣医学部）

１．はじめに

標記の事業の項目として，（公財）伊藤記念財団から今回の助成を受けたのは，（１）第68回国際食肉科学技術会議（神戸開催）の報告書作成の助成，（２）第69回国際食肉科学技術会議（ICoMST2023，令和５年８月イタリア・パドヴァ開催）の派遣，および（３）第65回日本食肉科学会学会大会（北里大学で開催）の助成である。

各項目の実施内容を順次報告するが，（３）の学会大会は例年３月開催のところ，季節を考慮し令和６年６月に行うこととし，令和５年９月に行った「日本食肉科学会シンポジウム2023 in 帯広畜産大学」の運営に充足した。これらの助成を受けた本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た第68回国際食肉科学技術会議（68th International Congress of Meat Science and Technology；ICoMST2022）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。その甲斐あって，ICoMST2022は盛会裏のうちに終了した。また，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29日現在で，一般会員181名（前年182名），学生会員８名（前年４名）賛助会員３社（前年３社），特別会員29社（前年29社），法人６団体（前年６団体），名誉会員６名（前年７名），功労会員６名（前年６名）である（令和６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の報告書作成の助成

前項の学会の概要で記したように，2022年８月に第68回ICoMSTを日本で開催した（開催地は神戸国

© The Ito Foundation

際会議場）。新型コロナ感染症の世界的拡大によって，リモート開催になる前年の会議（2019年ドイツでの第65回会議）まで，本会の執行部から代表者１名が参加し，会期中の各国コンタクトパーソン会議に出席し，「食肉の科学」でその参加報告を行ってきた。日本開催のために学会執行部だけでなく，実際にその時に原動力となる会員からも，貴財団助成によってICoMSTに多く参加し，情報収集と各国参加者との学術交流を行ってきた。これによって，日本での円滑な開催につながり，日本食肉科学会自体の国際的発展が進んだ。これらの成果は，貴財団発行「食肉に関する助成研究成果報告書」に日本食肉科学会の事業助成報告として掲載している[1)]。

ICoMST2022は神戸国際会議場で８月21日～25日に開催され，コロナ感染拡大がまだ収まらない中で，現地でWeb開催の様式で行い，無事終了することができた。貴財団からの多大なる支援に感謝する次第である。その成果として，日本での食肉研究のレベルの高さを世界に示し，また現地参加の外国人スピーカーと大いに国際交流が図られ，その状況報告が「食肉の科学」2022年２号に掲載されている[2)]。

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報告書的な記念誌の出版を企画し，令和６年３月に刊行し，本学会会員ならびにICoMS2022の協賛団体等に配布した（図１，２）。

この記念誌では，冒頭で理事長と組織委員長の挨拶に続き，準備段階から実施後に至るまで，各専門部会から詳細に記述され，今後他の学会でも国際会議を行ううえで，重要なマニュアル資料となる完成度である。

（２） 第 69 回国際食肉科学技術会議（イタリア開催）の参加派遣助成

2023年８月20日～25日にイタリアのパドヴァで開催された第69回国際食肉科学技術会議（69th International Congress of Meat Science and Technology：ICoMST2023）に，本学会から上田修司会員（神戸大学）と坂田が派遣された。

機関誌「食肉の科学」2023年２号に，日本からの全参加者が分担で執筆した参加報告が掲載されている（図３）[3)]。

ICoMST2023は，新型コロナウイルスの収束後に初めて対面形式で開催され，参加者にとって海外研

図１ ICoMST2022開催記念誌の表紙，全228頁，装丁もしっかりしている。

図２ ICoMST2022会議の記念誌の付録としたDVD。開会式や閉会式の動画，ならびに運営マニュアルが収録されている。

© The Ito Foundation

食肉の科学 Vol.64, No.2（2023）133-150

【海外事情】

第 69 回国際食肉科学技術会議（ICoMST2023）に参加して

上田 修司[1]・坂田 亮一[2]・江草 愛[3]・和賀 正洋[4]・若松 純一[5]・阿部 悠[5]・陳 芝夢[1]・オークル ガムゼ[6]・長澤 麻央[7]・服部 茉優[7]・川北 朗広[7]・川村 優太[7]・足立 優斗[8]・有原 圭三[8]

[1] 神戸大学・[2] 麻布大学名誉教授・[3] 日本獣医生命科学大学・[4] 伊藤ハム米久 HD 株・[5] 北海道大学・[6] 新潟大学・[7] 名城大学・[8] 北里大学

キーワード：ICoMST，イタリア，食肉，生ハム，チーズ

1. はじめに

我々は，2023 年 8 月 20 ～ 25 日にイタリアのパドヴァで開催された第 69 回国際食肉科学技術会議（65th International Congress of Meat Science and Technology; ICoMST2023）に参加した。本稿では，ICoMST2023 大会の開催概要について報告する。イタリアでの開催は，前回のローマから 21 年を経ており "From Tradition to Green Innovation"（伝統からグリーンイノベーションへ）を開催テーマとして掲げ，先進的な研究成果が披露された。パドヴァは，州都ヴェネツィアから西へ約 40 km の距離に位置し，北イタリア最古の都市で，14 世紀のフレスコ画や城壁で囲まれた古代都市の遺跡が多く存在する風光明媚な魅力的な都市である。開催会場

写真 2　PRE-Congress graduate course の記念写真

図 3　本学会の機関誌「食肉の科学」2023年２号に掲載されたICoMST2023開催の参加報告のトップページ

究者と直接交流する貴重な機会であった。本大会で学術的に注目された点としては，培養肉や代替食肉に関するプレゼンテーションで深い洞察があった。さらに，肉質評価を人工知能や，シミュレーションを用いて解析する研究は，今後の食肉科学の研究手法として活用される可能性が高いと評価される。

図 4　日本からの参加者チームの記念写真

日本人研究者にとって，このような国際会議に参加することで，グローバルな研究ネットワークに加わる意義は大きいと感じられる。特に，初めて参加する研究者や学生にとっては，国際学会に参加する喜びに加え，イタリアの歴史や食文化に触れることで，かけがえのない思い出となったと思われる（図４）。

（3）　日本食肉科学会シンポジウム 2023 in 帯広畜産大学の開催助成

標記のシンポジウムを，令和５年９月21日（木）に帯広畜産大学食品加工実習場で開催した（図５）。このシンポジウムは対面形式で実施され，参加人数は38名で，全国各地からの参加があった。

シンポジウムは以下の３演題があり，シンポジウム終了後には帯広畜産大学の食品加工実習工場の食肉加工エリアの見学と生ハムの試食会も行われた。

○第69回ICoMSTイタリア大会の報告

神戸大学の上田修司会員と坂田亮一功労会員による第69回ICoMSTイタリア大会の報告が行われた（図６）。

発表内容は，上記の「食肉の科学」2023年２号の海外事情に記したことをスライド数枚に集約したも

© The Ito Foundation

ので，この会議が従来の対面式を取り戻して開催され，日本からも多くの参加者があったことが報告された。また，2024年はブラジル，2025年はスペイン，2026年は韓国など，開催予定国が伝えられた。

○北海道生まれ“北海地鶏”のこれまでとこれから

北海道立総合研究機構畜産試験場の佐藤駿氏により，北海地鶏の作出から北海地鶏肉の加工への取り組みなどの講演があった（図７）。北海地鶏は1992年に開発されてから，2018年に現在の北海地鶏Ⅲ（大型シャモ×名古屋種とロードアイランドレッドの交雑鶏）を作出されたことが紹介された。また，北海地鶏はイノシン酸やイミダゾールジペプチド含量が多く，「歯応え」や「旨味の強さ」，「機能性成分含量」がブロイラーよりも優れた特徴を持つことが示され，地域として肉質特性を活かし加工品（コンフィや鶏めし）への利用に取り組んでいるとのことであった。

○十勝生ハム製造研究所における生ハムの製造とその技術

帯広畜産大学の名誉教授である三上正幸会員より，帯広畜産発のベンチャー企業として設立された（株）十勝生ハム製造研究所の歴史や製造技術について講演があった（図８）。本研究所は2006年11月に設立され，2022年８月に解散されたが，「本当に美味しいものを，人を幸せにできるものを作りたい」の信念のもと，骨付生ハムをはじめとし，セミドライソーセージやドライソーセージなどの製品が製造されてきた。三上会員は1998年バルセロナで開催されたICoMSTで生ハムに感銘を受け，骨付の生ハムについての研究および製造に注力した。十勝産のホエー豚の骨付もも肉（寛骨は除く）を使用し，亜硝酸ナトリウムは使用せず食塩のみを用い，先端の脂肪層を少しだけトリミングすることで赤肉と脂肪が

図５　帯広畜産大学の食品加工実習工場

図６　ICoMST2023の報告画像

図７　北海地鶏の作出と加工の研究講演

図８　三上会員：熱演（左）と講演画像（右）

© The Ito Foundation

剥離しないように工夫するなど，随所に美味しい生ハムを作るためのこだわりが見られた。また，科学的にも美味しさを実証されており，熟成に伴う遊離アミノ酸やペプチドの増加についてのデータが紹介された。

○施設見学＆試食会＆交流会

３題の講演後，帯畜大の島田会員の引率により，シンポジウムの教室と同じ建物内にある「食品加工実習工場」の見学会が行われた。この施設では，と畜と解体，食肉加工に加え乳製品加工に関して生産から製品に至るまでの一連の過程を学ぶことができる。施設内は非常に清潔に保たれており，管理者の献身的な取り組みが感じられた。試食会ではおよそ４年半熟成した生ハムの原木から，三上会員がスライスして提供された（図９）。その後，帯広市内で参加者の交流会が開催され活発な意見交換が行われた。

図９　三上会員が生ハムを切り分けて試食提供

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令和５年度で９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きわめた。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，本会を運営するうえ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，ワーキンググループを立ち上げて検討を行っている。その結果，令和５年度は帯広畜産大学で，令和６年度は京都大学で，それぞれ畜産学会大会の関連学会としてシンポジウムの開催を決め，会員の学術活動の啓発と会員拡大に努めている。別途に，従来どおり春は本大会を行い，１年に２度の開催を保っている。そのためにも本学会事業への理解と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：日本食肉科学会 令和４年度事業助成実施報告，令和４年度食肉に関する助成研究成果報告書, Vol. 41, 525～528, 2023.
2）　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, 2022.
3）　上田修司，坂田亮一，江草愛，和賀正洋，他参加者10名：第69回国際食肉科学技術会議（ICoMST2023）に出席して，食肉の科学, 64(2), 133～140, 2023.

© The Ito Foundation

令和５年度事業実施報告書
日本畜産学会第131回大会 公開シンポジウム
「豊かな食と畜産の未来に向けて」

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**〕2023年９月21日（木）13：00～17：00

〔**会場**〕帯広畜産大学 講堂

〔**主催**〕公益社団法人日本畜産学会

〔**企画**〕日本畜産学会第131回大会実行委員会（大会長：花田正明）

〔**共催**〕日本学術会議食料科学委員会 畜産学分科会・日本畜産学アカデミー

〔**プログラム**〕

司会進行：八代田真人（岐阜大学 教授）

開会挨拶：小澤壯行（日本畜産学会 理事長・日本獣医生命科学大学 教授）

基調講演　座長：近藤誠司（北海道大学 名誉教授）

講演Ⅰ：放牧による牛肉生産の課題と可能性
河合正人（北海道大学 准教授）

講演Ⅱ：鶏の代謝状態と鶏肉・鶏卵の品質との関連性
井尻大地（鹿児島大学 准教授）

講演Ⅲ：家畜飼養の本来的意義とミルクの可能性
平田昌弘（帯広畜産大学 教授）

講演Ⅳ：乳製品のナノ構造解析～食べれる状態のまま，ナノスケールの「混ざり方」を調べる～
大沼正人（北海道大学 教授）

講演Ⅴ：世界の食料事情と畜産が支える栄養への貢献
白鳥佐紀子（国際農林水産業研究センター 主任研究員）

総合討論　座長：近藤誠司（北海道大学 名誉教授）
コメンテーター：吉澤　緑（宇都宮大学農学部 名誉教授，25期畜産学分科会連携会員）
パネリスト：河合正人（北海道大学 准教授）
井尻大地（鹿児島大学 准教授）
平田昌弘（帯広畜産大学 教授）
大沼正人（北海道大学 教授）
白鳥佐紀子（国際農林水産業研究センター 主任研究員）

閉会挨拶：眞鍋　昇（日本学術会議 第二部会員・大阪国際大学 学長補佐 教授）

© The Ito Foundation

〔開催概要〕

「飽食の時代」と言われながらも，先進国の中でとりわけ食料自給率が低い日本，畜産も例外ではない。牛肉や鶏卵，牛乳などの動物性食品は，我々の豊かな食を支え，生活に欠かせないものである。しかし，家畜生産に必要な飼料等の多くを輸入に頼っている日本国内の現状において，畜産業は今後も持続可能なのであろうか。世界の人口増加により，畜産の需要はさらに増加すると予想され，それに伴い生産と競争がさらに加速すると考えられる。その一方で，現在の畜産は解決すべき多くの問題を抱えている。畜産領域を取り巻く問題として，家畜（動物）福祉，温室効果ガス（主にメタンガス）の発生，グローバル化に伴う国境を越えた新興・再興感染症の拡大や，気候変動に伴う環境ストレスが大きな社会問題になっている。日本国内においても，従事者の高齢化や担い手不足の点からも順風満帆とは言えない。これらの解決なくして，我が国の未来における豊かな食と安心安全な畜産物の持続的生産は成し得ない。また，動物性食品は人類の生存のみならず，国や地域の豊かな食文化にも貢献している。そのため，我々の豊かな食と畜産の未来に向けて，畜産に関わる研究者と生産者の知識と科学力を結集し，多角的な視点からこれらの課題に取り組まなければならない。

本シンポジウムでは，我々の豊かな食と畜産の未来に向けて，牛肉や鶏卵，牛乳などの動物性食品に関わる生産から加工について，さらに国内外における食文化と畜産の関わり，世界の食料事情と畜産の貢献に関わるトップレベルの専門家５名を招聘し，国内外における食文化と畜産の関わり，畜産学の貢献と将来についてご講演いただいた。講演者５名にコメンテーター１名を加えた総合討論では，各講演者の専門的な内容だけにとどまらず，グローバルな食料事情と畜産の貢献について熱い議論が行われた。

参加人数は，シンポジウム関係者９名，対面参加75名であり，学会員の畜産学関連研究者以外からも畜産農家や教育機関（高校）からも多くの参加者があった。大会最終日で関連学会以外，他のプログラムがすべて終了した時間帯の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します。

© 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５年度（Vol. 42）

2024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