

Bulletin of  
Shizuoka Prefectural  
Research Institute of Animal Industry  
Swine & Poultry Research Center

No. 1

December, 2007

**静岡県畜産技術研究所  
中小家畜研究センター研究報告**

第 1 号

平成 19 年 12 月

静岡県畜産技術研究所中小家畜研究センター  
静岡県畜産経営環境技術センター

静岡県菊川市西方 2 7 8 0  
Kikugawa-shi, Shizuoka-ken  
Japan

静岡県畜産技術研究所中小家畜研究センター  
Bull. Shizuoka  
Swine & Poultry  
Res. Cen.  
No. 1

# 静岡県畜産技術研究所中小家畜研究センター研究報告 第1号 (2007)

## 目 次

1. 金華豚とデュロック種交雑家系における  
DNA マーカーを利用した シェアバリュー QTL の導入試験 (2) ..... 1  
井手華子、柴田昌利、堀内篤、金谷奈保恵<sup>1)</sup>、林武司<sup>2)</sup>、栗田崇<sup>2)</sup>  
(1: 農林水産先端技術産業振興センター、2: 農業生物資源研究所)
2. 市販豚肉の肉質調査 ..... 7  
柴田昌利、井手華子、堀内篤
3. ブタ肉の保存期間中における呈味成分、物性および電気的特性の変化 ..... 13  
堀内篤、井手華子、柴田昌利
4. 体細胞クローン雄ブタおよび後代雄ブタの繁殖能力 ..... 23  
河原崎達雄、大竹正剛、柴田昌利、寺田圭<sup>\*</sup>、大津雪子  
(※: 現西部農林事務所)
5. 家畜福祉に配慮した飼育方式におけるケージ収容時の体重斉一化が生産に及ぼす影響 ..... 31  
池谷守司、松井繁幸
6. モウソウチク由来の生理活性資材の開発とその応用に関する研究 (第1報) ..... 37  
岩澤敏幸<sup>\*</sup>、松井繁幸、横越英彦<sup>1)</sup>、蔡義民<sup>2)</sup>、大石誠一<sup>3)</sup>  
(※: 現静岡県立農林大学校、1: 静岡県立大学、2: (独)農業・食品産業技術研究機構  
畜産草地研究所、3: 丸大鉄工株式会社)
7. 低コスト次世代型廃水処理技術 (第1報) ..... 45  
杉山典、黒田博通、松井繁幸

Bulletin of  
Shizuoka Prefectural  
Research Institute of Animal Industry  
Swine & Poultry Research Center  
No. 1 2007

Contents

1. Marker-assisted introgression of pig shear value QTL in backcross line of JinHua pig and Duroc breeds. (2) ..... 1  
Hanako Ide, Masatoshi Shibata, Atsushi Horiuchi, Naoe Kanaya<sup>1</sup>, Takeshi Hayashi<sup>2</sup>,  
Takashi Awata<sup>2</sup>  
(1 : Society for Techno-Innovation of Agriculture, Forestry and Fisheries  
2 : National Institute of Agrobiological Sciences)
2. Investigation on the qualities of pork on the market. .... 7  
Masatoshi Shibata, Hanako Ide, Atsushi Horiuchi
3. Changes in physical, chemical and electrical properties of pork loins during Storage. .... 13  
Atsushi Horiuchi, Hanako Ide, Masatoshi Shibata
4. Reproductive Performance in a Male Pig Cloned from Somatic Nucle and the Male progenies. .... 23  
Tatsuo Kawarasaki, Masayoshi Ohtake, Masatoshi Shibata,  
Kei Terada<sup>\*</sup>, Yukiko Ohtsu  
(<sup>\*</sup> : Shizuoka Prefectural Seibu Agriculture and Forestry Office)
5. Influence of body weight uniformity and stocking density on the productive Performance of laying hens housed in enriched cage. .... 31  
Moriiji Ikeya, Shigeyuki Matsui
6. Seeking of biologically active substances in bamboo silages And their application to feeding broiler chicks. .... 37  
Toshiyuki Iwasawa<sup>\*</sup>, Shigeyuki Matsui, Hidehiko Yokogoshi<sup>1)</sup>, Gimin Sai<sup>2)</sup>,  
Seiishi Oishi<sup>3)</sup>  
(<sup>\*</sup> : Shizuoka Prefectural Agriculture and Forestry College  
1 : University Shizuoka, 2 : National Institute of Livestock and Grassland Science,  
3 : Marudaitekkou Corp.)
7. Cost-saving 'Next Generation' wastewater treatment. (The first report) ..... 45  
Tsukasa Sugiyama, Hiromiti Kuroda, Shigeyuki Matsui

# 金華豚とデュロック種交雑家系における DNA マーカーを利用したシェアバリュー QTL の導入試験 (2)

## Marker-assisted introgression of pig shear value QTL in backcross line of Jinhua and Duroc breeds. (2)

井手華子、柴田昌利、堀内 篤、金谷奈保恵<sup>1)</sup>、林 武司<sup>2)</sup>、栗田 崇<sup>2)</sup>

要約：これまでに金華豚とデュロック種の大規模交雑家系を用いた QTL 解析研究のなかで、シェアバリュー（肉の柔らかさ）の QTL はブタ第 2 染色体に存在することが明らかとなった。この QTL において金華豚型アリルはデュロック種型アリルと比較し、肉を柔らかくする効果があると推測された。そこで本試験では、戻し交配と QTL 領域のマーカーによる選抜を繰り返すマーカーアシスト導入法により、金華豚のシェアバリュー QTL をデュロック種へ導入し、その効果を検証した。戻し交配第 3 世代同士を交配し得られた産子について、シェアバリュー QTL が金華豚型アリルのホモ個体 (JJ 型)、金華豚型とデュロック種型のヘテロ個体 (JD 型)、デュロック種型のホモ個体 (DD 型) でシェアバリューを比較したところ、JJ 型で 6.7 lb/cm<sup>2</sup>、JD 型で 7.4 lb/cm<sup>2</sup>、DD 型で 8.1 lb/cm<sup>2</sup> であった。このことから、シェアバリュー QTL は予測どおりブタ第 2 染色体に存在し、金華豚型アリルがデュロック種型アリルに対して肉を柔らかくする効果があることが確認された。

(静岡畜技研中小研セ研報 1, 1~5, 2007)

### はじめに

近年のゲノム解析技術の進歩に伴い、ブタやウシなどの家畜においても経済的に重要な形質に関与する遺伝子の探索が盛んに行われている。肉質や産肉性など多くの経済形質は量的形質であり、それに関与している遺伝子座は Quantitative Trait Loci (QTL: 量的形質遺伝子座) と呼ばれる。量的形質の表現型値は環境要因にも大きく影響を受けるため、これまで長い年月をかけて表現型に頼った選抜育種で家畜が改良されてきたとしても、実際の遺伝的な能力にはまだ多様性が残されていると考えられる。このような中で、量的形質に大きな効果をもつ QTL が明らかとなれば、この QTL の優れたマーカーを利用した選抜で集団の改良が飛躍的に進むことが期待できる。また、ある品種の優れた形質を他の品種に導入したいという場合に、あらかじめ目的とする形質に関与する

QTL が判っていれば、2 品種を交配して F1 を作出し、その後一方の品種への戻し交配を行うと同時に QTL の遺伝子型による選抜を繰り返すことで、短い期間で確実に遺伝的な改良を加えることも可能である。

静岡県では中国浙江省より寄贈された金華豚を育種素材としてこれまで維持してきた。金華豚は小型品種で、肉質は非常に優れているものの発育速度や赤肉生産能力などの産肉性が著しく劣っているため、大型の欧米品種との交雑利用が難しかった (堀内ら、1990)。しかし金華豚の優れた肉質の QTL が明らかとなれば、マーカーアシスト導入の手法で、金華豚と大型品種による戻し交配と QTL 近傍のマーカーによる選抜を行うことで、金華豚の肉質形質のみを産肉性を低下させることなくほかの品種へ導入することが可能である。

これまでに我々は金華豚とデュロック種の大規模交雑家系における産肉性および肉質に関す

(1: 農林水産先端技術産業振興センター、2: 農業生物資源研究所)

る QTL を多数検出してきた (堀内ら、2003)。そのうち肉の柔らかさ (シェアバリュー) に関する QTL がブタ第 2 染色体に検出された。この QTL は金華豚型アリルがデュロック種型アリルに対しシェアバリューを 0.652lbs/cm<sup>2</sup> 低下させる効果があり、寄与率は 5.8% と推定された (堀内ら、2003)。そこで本試験では、マーカーアシスト導入法により金華豚由来のシェアバリュー QTL をデュロック種に導入することで、これまでの研究で推定された QTL の効果を検証するとともに、DNA マーカーによる育種手法の実用化にむけた評価のためシェアバリュー以外の形質について調査を行った。

## 材料および方法

### 1. 調査個体の作出と QTL のマイクロサテライトマーカーによる選抜

金華豚の雌 3 頭とデュロック種の雄 1 頭を交配して得られた F1 から雌 3 頭を選抜し、これにデュロック種の雄 1 頭を交配して戻し交配第 1 世代を作出した (BC1)。BC1 個体はブタ第 2 染色体のシェアバリュー QTL 領域に存在する 6 つのマイクロサテライトマーカー (SW942、S0091、SW395、SW766、SW1695、S0370) を用いてタイピングを行い、金華豚型アリルを受継いでいる雌の BC1 個体 5 頭を選抜した。以下、同様にデュロック種による戻し交配とマイクロサテライトマーカーによるタイピングを繰り返し、戻し交配第 2 世代 (BC2) では 6 頭の雌を選抜し、戻し交配第 3 世代 (BC3) では雌 8 頭、雄 3 頭を選抜した。さらに選抜した雌雄の BC3 個体同士で家系内交配を行い BC3 F2 を作出した。これらも同様に QTL のタイピングを行い、シェアバリュー QTL が金華豚型のホモ型 (JJ 型) の個体 15 頭、金華豚型とデュロック種型のヘテロ型 (JD 型) の個体 25 頭、デュロック種のホモ型 (DD 型) の個体 16 頭を選抜し、肉質の調査に用いた。マイクロサテライトマーカーのタイピングには ABI PRISM 3700 (Applied Biosystems)、解析ソフトには Genotyper v. 2.5 (Applied Biosystems) を使用した。

### 2. 飼養管理

産肉性、肉質調査豚は概ね 21 日で離乳し、体重約 30kg までは市販の哺乳子豚育成配合飼料 (TDN81.0%、CP18.0%)、約 30kg から 50kg までは市販の肥育前期飼料 (TDN77.0%、CP14.0%)、50kg 以降は 90kg までと殺するまで市販の肥育後期飼料 (TDN76.0%、CP18.0%) を不断給餌した。雄は生後 1 週間から 2 ヶ月までの間に去勢を施した。約 30kg ~ 90kg の試験期間を通して当場の慣行法に従い同腹豚を性別、マーカーのアリルに関係なく混飼し、体重の計測は 1 週間に 1 回行った。

### 3. 産肉性および肉質の調査

#### (1) 産肉性の調査

試験豚は約 90kg になった段階で 24 時間絶食後、と殺した。と殺後、左半丸枝肉を 4℃ に設定した冷蔵庫で概ね 20 時間放冷した後、と体形質を測定した。カタ、ロース・バラ、ハムの 3 分割は、第 4 - 5 胸椎間および最後腰椎前端部位で切断し、ロース断面積の写し取りは第 4 - 5 胸椎間の切断面で行った。

#### (2) 肉質調査の供試部位と項目

肉質調査のため、と殺 2 日目 (概ね 24 時間後) に第 1 ~ 第 4 腰椎部胸最長筋を採取した。採取した胸最長筋の第 1、第 2 腰椎部胸最長筋を用いて肉色、ヘマチン含量、pH、水分、筋肉内脂肪含量の測定に、第 3 ~ 第 4 腰椎部胸最長筋をクッキングロスおよびシェアバリューの測定に用いた。

#### (3) 肉色およびヘマチン含量の測定

肉色の測定は切断直後と切断 30 分間後の 2 回実施し、色差計 (日本電色株式会社製: NF333) を用いて反射光を測定した。ヘマチン含量の測定は、筋肉 2g にアセトン 8.5ml、塩酸 0.2ml を加え速やかにヒスコトロン (日音医理科器製作所製) で 40 秒間 (10,000 回転) ホモゲナイズし、30 分間振とう後、5℃ で 15 分間遠心分離 (3,000 回転) した後、上澄みを 0.45 μm メンブランフィルターでろ過し、640nm の吸光度を測定し、吸光度にヘマチンの分子吸光係数 ( $\epsilon = 4.80 : 640\text{nm}$ ) を乗じてヘマチン含量とした。

## (4) クッキングロスおよびシェアバリューの測定

胸最長筋を筋線維と平行に  $2 \times 2$  cm の四角柱に切り出し、ビニール袋に入れて脱気した。次に  $70^{\circ}\text{C}$  のウォーターバスを用い 60 分間加熱調理後 30 分間流水で冷却し、加熱前後の重量差から加熱損失率 (クッキングロス) を求めた。次に、加熱調理後の肉を  $1 \times 1$  cm のスティック状に整形し、Warner-bratzler meat shear (MODEL300) を用いてシェアバリュー (shear force value) を測定した。

## 結果と考察

BC3F2 個体について、シェアバリュー QTL のアリルごと産肉性および肉質を比較した (表 1)。シェアバリューは JJ 型が  $6.7 \pm 1.9 \text{ lbs/cm}^2$ 、JD 型が  $7.4 \pm 1.4 \text{ lbs/cm}^2$ 、DD 型が  $8.1 \pm 2.4 \text{ lbs/cm}^2$  であり、JJ 型が DD 型に対し有意に肉が柔

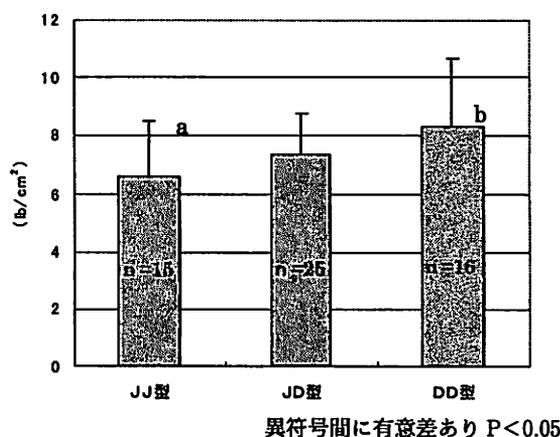


図1 アリル型とシェアバリューの関係

らかくなった ( $P < 0.05$ ) (図 1)。その他の項目では背脂肪厚 (肩・背・腰の三部位平均) が JJ 型で  $3.2 \pm 0.3 \text{ cm}$ 、JD 型で  $3.0 \pm 0.4 \text{ cm}$ 、DD 型で  $2.9 \pm 0.3 \text{ cm}$  であり、JJ 型が DD 型に対し有意に背脂肪厚が厚くなった ( $P < 0.05$ )。シェ

表 1. 各アリル型の産肉性および肉質

区 分	JJ型 (n=16)		JD型 (n=25)		DD型 (n=15)	
	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差
生時体重(kg)	1.5 ± 0.3		1.5 ± 0.3		1.5 ± 0.3	
DG30-90(g)	853.0 ± 61.7		830.9 ± 75.3		837.8 ± 81.5	
30kg日齢(日)	75.3 ± 9.6		74.0 ± 5.9		77.5 ± 8.4	
90kg日齢(日)	146.1 ± 11.2		146.9 ± 8.5		149.7 ± 10.9	
と殺体重(kg)	91.4 ± 2.7		91.2 ± 3.2		91.8 ± 3.6	
と体長(cm)	84.2 ± 1.7		85.0 ± 2.2		85.7 ± 2.1	
と体幅(cm)	29.7 ± 1.0		29.8 ± 0.8		29.3 ± 0.7	
背腰長 I (cm)	70.7 ± 1.4		71.3 ± 1.8		71.6 ± 1.8	
背腰長 II (cm)	61.4 ± 1.5		61.9 ± 2.2		62.2 ± 1.9	
ロース長(cm)	48.3 ± 1.4		48.9 ± 2.3		49.5 ± 1.8	
ロース面積(cm <sup>2</sup> )	16.4 ± 2.3		16.7 ± 2.3		17.0 ± 2.0	
背脂肪厚(cm)						
肩	3.9 ± 0.4	a	3.6 ± 0.5		3.5 ± 0.4	b
背	2.1 ± 0.3	a	2.0 ± 0.3		1.8 ± 0.3	b
腰	3.6 ± 0.5		3.5 ± 0.5		3.3 ± 0.3	
平均	3.2 ± 0.3	a	3.0 ± 0.4		2.9 ± 0.3	b
三分体の割合 (%)						
肩	30.0 ± 1.1		29.7 ± 0.8		29.6 ± 0.8	
ロース・バラ	37.8 ± 1.1		37.8 ± 1.6		37.3 ± 1.5	
ハム	32.2 ± 1.1		32.6 ± 1.2		33.2 ± 1.3	
胸椎数+腰椎数 (個)	21.3 ± 0.4		21.3 ± 0.5		21.4 ± 0.5	
水分含量 (%)	72.6 ± 0.5		72.7 ± 0.7		72.3 ± 0.7	
脂肪含量 (%)	2.5 ± 0.6		2.3 ± 0.7		2.4 ± 0.8	
pH	5.6 ± 0.1		5.7 ± 0.1		5.6 ± 0.1	
クッキングロス (%)	29.5 ± 1.3		27.3 ± 2.0		29.3 ± 2.8	
ヘマチン (mg/%)	4.1 ± 0.6		3.9 ± 0.6		3.9 ± 0.5	
シェアバリュー (lb/cm <sup>2</sup> )	6.7 ± 1.9	a	7.4 ± 1.4		8.1 ± 2.4	b

異符号間に有意差あり P&lt;0.05

アバリューと背脂肪以外の項目ではシェアバリュー QTL のアリル間に有意な差は認められなかった。

これまでの研究で、金華豚とデュロック種の F2 交雑家系を用いて推定されたシェアバリュー QTL の効果は、金華豚型アリルがデュロック種型アリルに対し 0.652lbs/cm<sup>2</sup> 肉を柔らかくする（シェアバリューを低下させる）効果があり、金華豚型アリルとデュロック種型アリルのヘテロ接合体の場合、そのシェアバリューがそれぞれのアリルのホモ接合体の差の 1/2 からどれだけずれるかを表す優性効果は -0.236lbs/cm<sup>2</sup>、寄与率は 5.8% と推定されていた。推定値どおりの効果があるとする JJ 型と DD 型の差は約 1.3lbs/cm<sup>2</sup>、JD 型の値は約 7.6lbs/cm<sup>2</sup> になると予想されたが、今回の結果では JJ 型と DD 型の差は 1.4lbs/cm<sup>2</sup>、JD 型の値は 7.4lbs/cm<sup>2</sup> であり、戻し交配による QTL のマーカーアシスト導入においても、F2 家系を用いて推定された QTL の効果が改めて確認された。

このシェアバリューの QTL はブタ第 2 染色体のマイクロサテライトマーカー SW766 を近傍とする領域に検出された。この領域にはカルパスタチン遺伝子がマップされている (Ernst ら、1998)。カルパスタチンは筋線維タンパクを分解するカルパインの阻害因子であり、さまざまな家畜においてカルパスタチンの多型と屠殺後における肉の軟化との高い関係性が報告されている (Case ら 2006、Koochmaraie ら 1991)。Ciobanu ら (2004) はパークシャーと中ヨークシャーの交雑家系を用いて我々と同じ領域に生肉の硬さ、Instron force、柔らかさ、ジュースネス、そして調理した肉の咀嚼感の QTL を検出しており、カルパスタチンの多型とそれらの形質との間に有意な関係があると報告している。また金谷ら (2007) は、これまでに QTL 解析で用いた金華豚とデュロック種の F2 交雑家系を用い、NCBI データベースに登録されているブタのカルパスタチン遺伝子配列内にマイクロサテライトマーカー (CASTmt) を検出し、これを加えてシェアバリュー QTL の再解析を行ったところ、QTL 解析における F 値は CASTmt で最大値となったことを報告した。これらのことからブタ第 2 染色体に検出され

たシェアバリューの QTL の有力な候補遺伝子がカルパスタチンであることが示唆された。

今回の結果では、シェアバリュー以外に背脂肪厚について JJ 型と DD 型で有意な差が認められた。金華豚とデュロック種の F2 交雑家系を用いたこれまでの QTL 解析では、シェアバリュー QTL と同じ領域に背脂肪厚の QTL は検出されなかった。しかし Koning ら (2000) はブタ第 2 染色体のマーカー SW240 近傍に背脂肪厚の QTL を検出しており、この位置はシェアバリュー QTL の近傍マーカー SW766 からおよそ 25 cM 程度しか離れていない。もしこの位置に背脂肪厚に関する QTL が存在するならば、厚い背脂肪厚が特徴である金華豚から由来した背脂肪厚の QTL がシェアバリュー QTL とともに導入された可能性がある。効果のある領域を絞り込めていない状態で QTL を導入する場合、このように望ましくない形質までも導入されてしまう可能性もあることから、DNA マーカーを育種に利用するには、やはり候補遺伝子内の多型や、より形質と相関の高いマーカーの開発が必要である。

今後はカルパスタチン遺伝子のコード領域内において金華豚特異的な多型を検索するとともに、それらの多型とカルパスタチンの活性やシェアバリューとの関係を調査し、金華豚の優れた肉質特性を科学的に解明することで、遺伝資源の有効活用に繋げていきたい。

## 参考文献

- 林武司. 2004. ブタにおけるマーカー育種の現状と将来展望. 第 10 回動物遺伝育種シンポジウム「動物ゲノム解析と新たな家畜育種戦略」配布資料、74-78.
- 堀内篤、稲葉満、曾根勝、野口博道. 1989. 金華豚の特性と利用に関する調査. 静岡県中小家畜試験場研究報告第 2 号、17-26.
- 堀内篤、知久幹夫、河原崎達雄、室伏淳一、鈴木滋、曾根勝、檜崎真澄、野口博道. 1996. SPF 環境によるデュロック種系統豚の造成 (2). 静岡県中小家畜試験場研究報告第 8 号、1-7.
- 堀内篤、知久幹夫、井手華子、金谷奈保恵、内田

- 陽子、山口倫子、仲沢慶紀、林武司、栗田崇. 2003. 金華豚とデュロック種の交雑家系における肉質に関与する QTL 解析. 静岡県中小家畜試験場研究報告第 16 号、1-9.
- Ernst CW, Robic A, Yerle M, Wang L, Rothschild MF, 1998. Mapping of calpastatin and three microsatellites to porcine chromosome 2 q 2.1- q 2.4. *Anim Genet.*, 29:212-215.
- Casas E, White SN, Wheeler TL, Shackelford SD, Koohmaraie M, Riley DG, Chase CC Jr, Johnson DD, Smith TP, 2006. Effects of calpastatin and micro-calpain markers in beef cattle on tenderness traits. *J Anim Sci.*, 84:520-525.
- Koohmaraie M, Whipple G, Kretchmar DH, Crouse JD, Mersmann HJ, 1991. Postmortem proteolysis in longissimus muscle from beef, lamb and pork carcasses. *J Anim Sci.*, 69:617-624.
- Ciobanu DC, Bastiaansen JW, Lonergan SM, Thomsen H, Dekkers JC, Plastow GS, Rothschild MF, 2004. New alleles in calpastatin gene are associated with meat quality traits in pigs. *J Anim Sci.*, 82:2829-2839.
- de Koning DJ, Rattink AP, Harlizius B, van Arendonk JA, Brascamp EW, Groenen MA, 2000. Genome-wide scan for body composition in pigs reveals important role of imprinting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 97:947-7950.
- 金谷奈保恵、井手華子、堀内篤、山口倫子、仲沢慶紀、林武司、栗田崇. 2007. シェアバリュー QTL とその候補遺伝子カルパスタチン近傍の新規マイクロサテライトマーカー. 第 87 回日本養豚学会大会講演要旨、P31.

# 市販豚肉の肉質調査

## Investigation on the qualities of pork on the market

柴田昌利、井手華子、堀内 篤

要約：銘柄豚の差別化指標を明確にする目的で、市販のとんかつ用ロース肉 29 パック（県内産 A 銘柄、県外産 B 銘柄及び県内産無銘柄豚）を使用し、核酸関連物質（mK 値算出）、クッキングロス、シェアバリュー、筋肉内水分等の肉質を調査した。

肉の熟成度の指標となる mK 値の各銘柄の平均値は銘柄間に差が見られ、県外産の B 銘柄が最も大きく、他の 2 銘柄との間に有意差が認められた。クッキングロスはいずれも約 31% と差は見られず、標準偏差も 1 前後と小さかった。シェアバリューは、銘柄内の差が大きかったが、平均値では A 銘柄が最も大きく他の 2 銘柄との間に有意差が認められた。筋肉内脂肪含量は、各銘柄の平均値ではいずれも 2% 前後で差は見られなかったが、銘柄内の差は大きかった。水分含量はいずれの銘柄も 72% 程度で差は無く、銘柄内のバラツキも小さかった。各調査項目のバラツキは、筋肉内脂肪含量で最も大きかった。また、シェアバリューでは B 銘柄が無銘柄よりも大きなバラツキをしめした。

以上の結果から、銘柄豚の差別化指標とするためには、そのブランドの平均値が今回調査した肉の最高値付近であることが必要と思われた。また、バラツキを少なくすることも差別化となると思われた。

（静岡畜技研中小研セ研報 1, 7~12, 2007）

### はじめに

近年、食肉に対する消費者ニーズは高品質化とともに多様化しており、(財)日本食肉消費総合センター発行の銘柄豚肉ハンドブック(2005)には、全国で 255 種類の銘柄豚肉が記載されている。また、育種改良の分野でも、脂肪交雑等の肉質に着目した系統造成が行われるようになっている(兵頭 1997、Suzuki ら 2005)。本県でも肉質に優れたデュロック種系統豚を造成し(堀内ら 1996)、それを活用した静岡型銘柄豚を推進している。さらに、DNA 解析技術により検出された肉質に関する QTL (quantitative trait loci) を活用し、より高品質な新合成豚の開発を行っており(井手ら 2005、2007)、新銘柄豚としての普及を計画している。

一方、豚肉の品質に影響する要因として、品種(鈴木ら 1997、2001)、肥育期間(清水ら 2000) および飼料成分(小川ら 1998、岩本ら 2005) 等、様々な報告がされているが、肉の品質にはと殺後の熟成期間等の環境も影響する

(Okumura ら 1996、清水ら 2000) ため、実際に店頭で販売されている肉の品質に関する報告はみられない。

そこで、今回は市販の豚肉の肉質を調査し、銘柄豚と一般の豚との差別化指標を明確しようと試みた。

### 材料と方法

#### 1. 供試材料

サンプルは、一般の消費者が実際に購入できるものとするため、市内のスーパーマーケットの店頭で並んだもので、消費期限が 2 日後以降のものとした。また、胸最長筋の部位により硬さ等の肉質が異なるとの報告がある(清水ら 2000、鈴木ら 2001) ことから、断面の模様から胸椎後部から腰椎部胸最長筋と思われる部位のものとした。平成 18 年 4 月～8 月にとんかつ用ロース肉を 29 パック 53 枚(1 パック 1～4 枚入り)を購入し、試験に供した。その内訳は、県内(隣の市)で生産された A 銘柄豚(以

表1. 供試材料

店舗	銘柄	品種	パック数	枚数	備考
I	A	LWD	8	16	県内(隣接市)産
	B	不明	7	14	県外産
II	無し	不明	14	23	県内産
合計			29	53	

下「A銘柄」8パック16枚、県外産B銘柄豚(以下「B銘柄」)7パック14枚及び県内産無銘柄豚(以下「無銘柄」)14パック23枚で、A銘柄は三元交雑豚、他の2種類の品種は不明であった(表-1)。なお、同一パック内で2~3枚の測定を行ったものは、いずれもほぼ同様の値を示したため、試験成績はパック内の平均値を1検体として扱った。

## 2. 試験方法

### (1) 核酸関連物質の測定とmK値の算出

細切した胸最長筋1gに5%過塩素酸を加え、ホモゲナイズ、振とう、遠心分離後、2NのKOHにより中和し、5℃で20分静置後、0.45μmのメンブランフィルターでろ過し、高速液体クロマトグラフ(島津製作所LC6A)で測定した。

修正K値(mK値)は、堀内ら(2002)の方法により下記の式から算出した。

$$mK(\%) = (HxR + Hx) \div (IMP + HxR + Hx) \times 100$$

\*: HxR;イノシン, Hx;ヒポキサンチン, IMP;イノシン酸

### (2) クッキングロスおよびシェアバリューの測定

胸最長筋を厚さはそのまま(約1cm)で、幅が2cmとなるように切り出し、ビニール袋に入れて脱気した。次に70℃のウォータースバスを用い60分間加熱調理後30分間流水で冷却し、加熱前後の重量差から加熱損失率(クッキングロス)を求めた。次に、加熱調理後の肉を1×1cmのスティック状に整形し、Warner-bratzler meat shear(MODEL300)を用いて販売時の割面に対して垂直方向から切断したときのシェアバリュー(shear force value)を測定した。

### (3) 筋肉内脂肪含量および水分含量の測定

水分含量は、135℃2時間乾燥法により、筋肉内脂肪含量はエーテル抽出法により行なった。

### (4) 各検査項目のバラツキの算出

上記5項目の分析値について、各銘柄内のバラツキを見るために変動係数(標準偏差を平均

値で除した数値)で比較した。

### (5) 遊離アミノ酸の測定

細切した胸最長筋1gに1%スルホサリチル酸を加え、ホモゲナイズ、振とう、遠心分離後、0.45μmのメンブランフィルターでろ過し、高速液体クロマトグラフ(島津製作所LC10A)で測定した。

### (6) 脂肪酸組成の測定

胸最長筋に付いている脂肪(皮下内層脂肪)を加熱溶出し、ナトリウムメチレート法によりメチル化し、ガスクロマトグラフ(島津製作所製GC9A)により炭素数14~18の脂肪酸について重量比から組成を算出した。

### (7) 統計処理

各銘柄間の差をみるための統計処理は、"Stat View"(SAS institute inc.)を用い、t検定を行った。

## 結 果

### 1. mK値、クッキングロスおよびシェアバリュー

肉質調査成績を表2に示した。肉の熟成度の指標となるmK値の各銘柄の平均値は、A、Bおよび無銘柄がそれぞれ34.0%、44.3%および37.7%と銘柄間に差が見られ、県外産のB銘柄が最も大きく、他の2銘柄との間に有意差が認められた。クッキングロスはいずれも約31%と差は見られず、標準偏差も1前後と小さかった。シェアバリューは、銘柄内の差が大きかったが、平均値ではA銘柄が最も大きく(8.01b/cm<sup>2</sup>)他の2銘柄との間に有意差が認められた。

### 2 筋肉内脂肪および水分含量

筋肉内脂肪含量は、各銘柄の平均値ではいずれも2%前後で差は見られなかったが、銘柄内の差は大きく、銘柄豚肉であるB銘柄でも最大値(3.5%)と最小値(1.2%)に3倍の差があった。一方、水分含量はいずれの銘柄も72%程度で差は無く、銘柄内のバラツキも小さかった。

表 2. 各銘柄豚肉の肉質調査成績

調査項目	銘柄		
	A 銘柄	B 銘柄	無銘柄
mK 値 (%)	34.0±3.2 <sup>A</sup> (25.8-37.0)	44.3±5.9 <sup>Bb</sup> (33.8-52.1)	37.7±6.2 <sup>a</sup> (26.5-43.9)
クッキングロス (%)	31.6±1.1 (30.8-33.8)	31.6±0.9 (30.7-32.9)	31.3±1.6 (29.0-33.5)
シェアバリュー (lb/cm <sup>2</sup> )	8.0±1.2 <sup>Aa</sup> (5.8-10.1)	6.4±1.5 <sup>b</sup> (4.6-8.4)	6.2±1.4 <sup>B</sup> (3.8-8.3)
筋肉内脂肪含量 (%)	1.9±0.5 (1.0-2.6)	2.4±0.9 (1.2-3.5)	2.4±1.0 (1.2-4.6)
水分含量 (%)	72.4±0.9 (70.8-73.7)	72.1±0.4 (71.4-72.8)	72.3±0.6 (71.4-73.2)

上段：平均±標準偏差、下段：(最小値-最大値)  
 異符号間に有意差有り：大文字；P<0.01、小文字；P<0.05

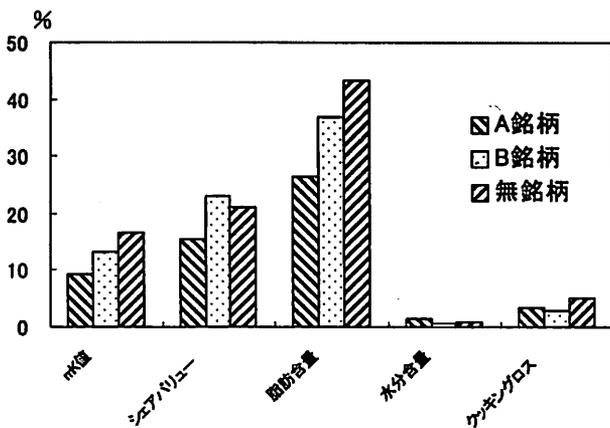


図 1 各検査項目の変動係数\*

\*：標準偏差/平均値×100

### 3 各検査項目のバラツキ

各検査項目のバラツキを図-1に示した。各調査項目のうち、最もバラツキが大きかったのは、筋肉内脂肪含量でA、Bおよび無銘柄がそれぞれ26.5、36.7、43.3%であった。また、シェアバリューではB銘柄(23.1%)が無銘柄(21.9%)よりも大きなバラツキを示した。

一方、水分含量と肉の保水力を表すクッキングロス各銘柄ともバラツキは小さく、すべて5%未満であった。

### 4 遊離アミノ酸および脂肪酸組成

遊離アミノ酸のうち旨味成分であるグルタミン酸等の5成分を図-2に示した。5成分中タウリン以外の4成分に銘柄間の有意な差が見られ、A銘柄はB銘柄に対して低値であった。

脂肪組織の脂肪酸組成を図-3に示した。オレイン酸においてA銘柄と無銘柄の間に有意な

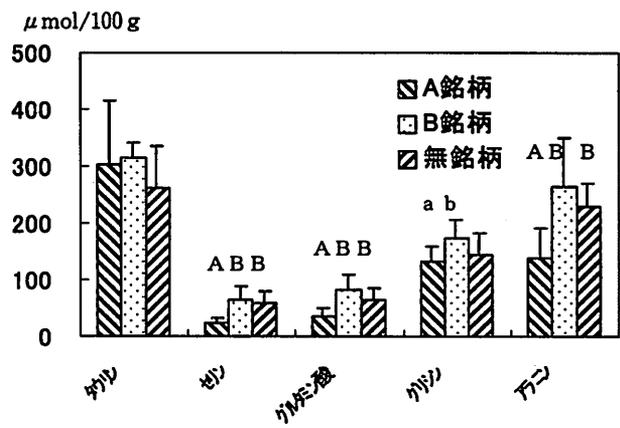


図 2 筋肉内遊離アミノ酸含量

異符号間に有意差有り：大文字；P<0.01、小文字；P<0.05

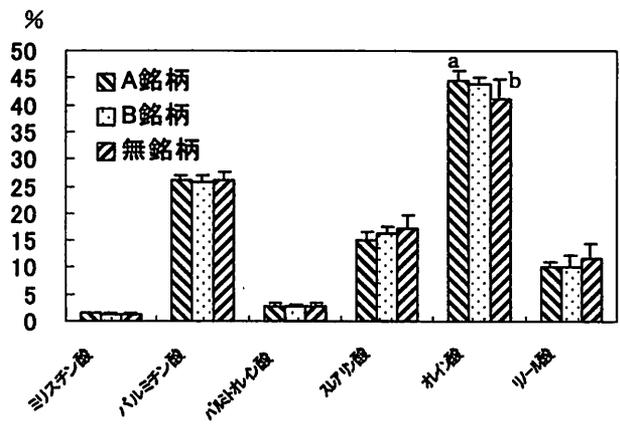


図 3 脂肪組織の脂肪酸組成

異符号間に有意差有り：P<0.05

差が認められた以外は、各銘柄間に差は見られなかった。

## 考 察

豚肉の品質評価法には、外観、味、栄養成分等、様々な項目があり、流通、加工、消費段階とそれぞれに求められる性質も異なる（入江 2002）。そのため、一概に高品質豚肉を定義することは困難であるが、近年の品質向上を目指した豚改良においては、味、香り、テクスチャーといった食味に関与する品質が重要とされる（千国ら 2002）。

今回は、実際に店頭で販売されている豚肉について、柔らかさや脂肪含量といった品質について、調査を行なった。

豚肉の品質に関する項目のうち、柔らかさやアミノ酸等の成分はと殺後の経過時間（熟成期間）によって変化するため（Okumura ら 1996、清水ら 2000）、と殺日が不明な市販豚肉等の品質調査の際問題であったが、堀内ら（2002）は核酸関連物質のうち保存期間による変化の大きなイノシン酸、イノシンおよびヒポキサンチンのみで算出した修正 K 値（mK 値）が豚肉の保存期間と高い正の相関が見られたことを報告している。そこで、今回の調査でも核酸関連物質を測定し mK 値を算出した。その結果、県外産の B 銘柄が最も高く（44.3%）、推定保存日数（4℃で保存されていたと仮定した場合の保存日数）は 6.5 日であり、隣の市で生産されている A 銘柄は平均 34.0%、推定保存日数 3.8 日であった。また、銘柄内のバラツキは特に A 銘柄で小さく、mK 値からみた保存期間は、ラベルに表示された産地からの推測（産地の近いものが新鮮）と一致した。

豚肉の品質のうち、多くの日本人が好み、差別化の指標として重要となる（入江 2002）「肉の柔らかさ」について、今回はシェアバリューにより測定した。各銘柄間では、A 銘柄が他の銘柄に比べ高い値で、有意差が認められた。このうち、A 銘柄と B 銘柄の差には保存期間（mK 値）の差も影響していると考えられたが、A 銘柄と無銘柄は同様の mK 値であったことから、品種や系統等のちがいでいるものとも考えられた。

「肉の保水力」は食べたときの食感（ジュシーさ）に重要な項目であり、今回はクッキン

グロスについて調査した。その結果、各銘柄とも平均値が 31%で、標準偏差も 0.9~1.6 とバラツキも非常に小さかった。この傾向は水分含量でより顕著に見られた。調査対象の市販豚肉は、パック内で吸湿性の紙の上に乗せられて販売されており、すべての紙で肉汁を吸収した跡が見られた。今回は、このような肉汁の損失を考慮しておらず、調査時にかなりの水分が失われており、水分関係の項目に大きく影響したもののと思われた。

筋肉内脂肪含量いわゆる「霜降り」は、柔らかさや多汁性といった肉の味の向上に関連するといわれている（DeVol ら 1988、木全ら 2001）。豚肉の品質においても重要な項目となってきており（入江 1996）、脂肪交雑に着目した育種改良（兵頭 1997、Suzuki ら 2005）や飼養管理による筋肉内脂肪の増加の研究（岩本ら 2005）がなされている。今回の調査では、銘柄間に差は見られなかったが、銘柄内のバラツキが一番大きく齊一化が難しい項目であると思われた。

各調査項目の銘柄内のバラツキでは、各銘柄とも筋肉内脂肪が一番大きく、測定値の最小値と最大値の間に 2.5 倍以上のひらきが見られた。また、様々な品種や飼養管理の豚が含まれている可能性がある無銘柄のバラツキが大きい傾向であったが、シェアバリューは B 銘柄のバラツキの方が大きく、銘柄豚が必ずしも齊一性が高い訳ではなかった。

遊離アミノ酸は、肉の旨み成分であり、熟成により増加する（Okumura ら 1996、千国ら 2002）。今回の調査では A 銘柄が他の銘柄に対して有意に低値である項目が多かったが、これは mK 値とよく一致しており熟成による影響と考えられた。

脂肪組織の脂肪酸組成は、脂肪の融点に関係し、食べたときの脂の口どけ感といった食感に影響する。これも品種や給与飼料による影響を受けるとされている（千国ら 1985、入江と藤谷 1989、山田ら 2005）が、今回の調査では一部を除き銘柄間に差は見られず、その理由は特定できなかった。

以上の結果から、「柔らかさ」や「脂肪交雑」にはバラツキが大きく、銘柄豚の差別化指標とするためには、そのブランドの平均値が今回調

査した肉の最高値付近、すなわち、シェアバリューは4 lb/cm<sup>2</sup>（保存期間が4日程度のとき）、脂肪含量は4%程度であることが必要と思われた。また、既存銘柄豚内にもバラツキがみられたことから、バラツキを少なくすることも差別化となると思われた。

### 参考文献

- 千国幸一・神部昌行・小沢忍・小石川常吉・吉武充・矢野信礼. 1985. 脂肪酸組成の品種間差と性差の成長に伴う変化. 日本養豚学会誌、22:200-205.
- 千国幸一・佐々木啓介・江森格・岩木史之・谷史雄・中島郁世・室谷進・三津本充. 2002. 豚肉風味関連物質の含量に対する加熱処理の影響. 日本養豚学会誌、39:191-199.
- DeVol D. L, McKeith F. K, Bechtel P. J, Novakofski J, Shanks R. D, Carr T. R. 1988. Variation in composition and palatability traits and relationships between muscle characteristics and palatability in a random sample of pork carcasses. *Journal of Animal Science*, 66:385-395.
- 堀内篤・知久幹夫・河原崎達雄・赤松裕久・鈴木清一・樫尾進. 2002. 核酸関連物質含量による肉豚の鮮度判定. 日本養豚学会誌、39:200-208.
- 堀内篤・知久幹夫・河原崎達雄・室伏淳一・鈴木滋・曾根勝・榑崎眞澄・野口博道. 1996. SPF 環境によるデュロック種系統豚の造成(2). 静岡県中小家畜試験場研究報告, 9:1-7.
- 兵頭勲. 1997. 脂肪交雑のある豚. 畜産の研究, 51:19-24.
- 井手華子・柴田昌利・堀内篤・金谷奈保恵・林武司・栗田崇. 2005. 金華豚とデュロック種交雑家系におけるDNAマーカーを利用したシェアバリュー QTL の導入試験. 静岡県中小家畜試験場研究報告, 16:11-14.
- 井手華子・柴田昌利・堀内篤・金谷奈保恵・林武司・栗田崇. 2007. 金華豚とデュロック種交雑家系における筋肉内脂肪含量 QTL の導入試験. 静岡県中小家畜試験場研究報告, 17:7-11.
- 入江正和. 1996. 豚肉生産における脂肪と肉質の制御. 畜産の研究, 50:996-1000.
- 入江正和. 2002. 豚肉質の評価法. 日本養豚学会誌、39:221-254.
- 入江正和・藤谷泰裕. 1989. 豚の脂肪組織と筋肉脂肪の理化学的性状に及ぼす大豆油添加と添加時期の影響. 日本養豚学会誌、26:255-259.
- 岩本英治・設楽修・入江正和. 2005. パン添加飼料給与がブタの増体量および肉質に及ぼす影響. 日本畜産学会報, 76:15-22.
- 木全誠・石橋晃・鎌田寿彦. 2001. 豚肉の理化学的成分と官能検査との関係. 日本養豚学会誌、38:45-51.
- (財)日本食肉消費総合センター. 2005. 銘柄豚肉ハンドブック.
- 小川ゆう子・鈴木啓一・阿部博行・鹿野裕志・伊藤勝. 1998. 魚油および酒米添加飼料が豚の肉質と産肉能力に及ぼす影響. 日本養豚学会誌、35:98-106.
- Okumura T, Inuzuka Y, Nishimura T, Arai S. 1996. Changes in sensory, physical and chemical properties of vacuum-packed pork loins during the prolonged conditioning at 4°C. *Animal Science and Technology*, 67:360-367.
- 清水俊郎・鈴木啓一・渡部正樹・小川ゆう子. 2000. 肉豚の肥育期間、ロース部位および熟成が肉質に及ぼす影響. 日本養豚学会誌、37:108-114.
- 鈴木啓一・阿部博行・小川ゆう子・石田光晴・清水隆弘・鈴木惇. 1997. 3元交雑豚の肉質に及ぼす留め雄品種の影響. 日本畜産学会報、68:310-317.
- Suzuki K, Irie M, Kadomaki H, Shibata T, Kumagai M, Nishida A. 2005. Genetic parameter estimates of meat quality traits in Duroc pigs selected for average daily gain, longissimus muscle area, backfat thickness, and intramuscular fat content. *Journal of Animal Science*, 83:2058-2065.
- 鈴木啓一・清水ゆう子・阿部博行・斗内佳子・鈴木惇. 2001. 豚肉質の品種間、性間および胸

最長筋部位間の比較. 日本畜産学会報、  
72:J215-J223.

山田未知・添田輝・関口志真・網中潤・山田幸二・  
武藤健司. 2005. 肥育豚へのエゴマ粕給与が  
発育性、産肉性および脂肪組織と筋肉の脂肪  
酸組成に及ぼす影響. 日本養豚学会誌、  
42:45-53.

# ブタ肉の保存期間中における呈味成分、 物性および電気的特性の変化

## Changes in physical, chemical and electrical properties of pork loins during storage

堀内 篤、井手華子、柴田昌利

要約：ブタ肉の食味性に影響を及ぼす熟成の非破壊評価法を検討するため、当场産三元交雑ブタ 12 頭 (WL・D8 頭、LW・D4 頭) を用い、と殺後 2、7、14 および 21 日目における胸最長筋の物性、呈味成分と電気的特性との関係を調査した。電気的特性調査は、3 種類の電極を試作し、LCR メータ (3532-50: HIOKI 製) を用い、印加電圧 5 V で 50Hz~1MHz の周波数範囲におけるインピーダンス (Z)、並列等価モードにおける静電容量 (CP) を掃引測定した。保存期間中に、シェアバリュウの低下、mK 値の上昇、遊離アミノ酸の増加が認められた。インピーダンスは低周波側で新鮮なものほど大きく保存日数が長くなるにつれ小さくなり、1MHz におけるインピーダンスの保存日数間に差がなかった。

電気的特性による非破壊評価法を検討するため、WL・D8 頭を校正試料として mK 値とインピーダンスとの回帰分析を行い、LW・D4 頭を検証試料として予測精度を評価した。mK 値とインピーダンス比 (100KHz~600KHz/1MHz) との間に、高い相関 ( $r=0.793\sim 0.923$ ) が認められた。100KHz/1MHz のインピーダンス比を用いた回帰式による予測 mK 値と実測 mK 値との相関係数 ( $r$ ) は 0.860~0.921、標準誤差 (SEP) は、7.9~10.4% と非破壊評価法として有効であると考えられた。電極種別間の比較では、プローブ型電極、丸型電極、はさみ型電極の順に予測精度が高かった。しかし保存期間とともに低下するシェアバリュウは個体差が大きく、熟成の指標として有効でなかった。なお、インピーダンス特性はブタ肉組織の物理的破壊により失われ、凍結肉や流通段階における不適切な取扱を受けたブタ肉において、予測誤差が大きくなることが考えられる。

(静岡畜技研中小研セ研報 1, 13~22, 2007)

### 緒 言

畜肉はと殺後一定期間熟成されてから食用に供されるが、熟成期間中には種々の成分や物性の変化が起こる。その変化は畜種や保存条件などの要因に影響され、と畜から最大硬直期までに要する時間は、0℃から 4℃においてウシで 24 時間、ブタで 12 時間、ニワトリで 2 時間である。さらに 1℃で熟成させたとき、硬直による硬さ (Rigor toughness) が 80% 消失するのにウシで 10 日、ブタで 5 日、ニワトリで半日とされている。さらに、ブタ肉は死後硬直によらない動物固有の結合組織蛋白質の量と構造に由来する硬さ (Background toughness) の寄与が小さいことから、2~3 日間の熟成で良

いとされている (沖谷 1996)。しかし、Okumura ら (1995) は真空包装したブタ肉を 4℃で保存したとき、20 日まで熟成が進むにつれて味や香りが強くなり、食味性が改善されると報告しており、ブタ肉の「食べごろ」は柔らかさだけでなく呈味成分の増加からも評価する必要がある。

また、堀内ら (2002) はブタ肉の鮮度指標として IMP と HxR および Hx の 3 成分の百分率による修正 K 値 (mK 値) が有効であり、mK 値による市販ブタ肉の推定保存日数は、国産ブタ肉で 3~14 日、輸入ブタ肉で 18~25 日であったと報告している。このように、ブタ肉の流通段階においては、熟成について考慮されておらず国産ブタ肉の熟成が不十分である可能

性が高い。したがって、国産ブタ肉による銘柄化を検討する場合、熟成を考慮し、食べごろのブタ肉を消費者に提供する流通体制の整備が必要である。そのためブタ肉の熟成度合いを非破壊・迅速に評価する技術の開発が望まれている。

畜肉における鮮度および熟度の非破壊評価として、可視光および近赤外光を用いた方法 (Mitumotoら 2002) や電気的特性を利用した方法 (Lepetitら 2001) が試みられている。電気インピーダンスやその要素である抵抗や容量の周波数特性を利用した解析法は、インピーダンススペクトロスコーピー法とも呼ばれ、組織の損傷を細胞レベルで評価できる方法である。加藤は、電気的特性を利用して青果物の鮮度・熟度および果肉内部の損傷の非破壊評価 (1988, 1989, 1993) や魚肉の鮮度評価 (2000) が可能であることを報告している。

そこで、ブタ肉の熟成期間中における物性および呈味成分の変化からブタ肉の熟成指標を検討するとともに、熟成の程度を迅速に評価する方法を開発するため、保存期間中における電気的特性との関係を調査した。

## 材料と方法

### 1) 供試材料および測定項目

熟成効果および熟成程度の評価指標を検討するため、試験1において当該産の三元交雑ブタWL・D8頭、試験2においてLW・D4頭を用いた。各試験ともにロース (第8胸椎～第4腰椎部) の4分割を脱気包装して4℃で保存

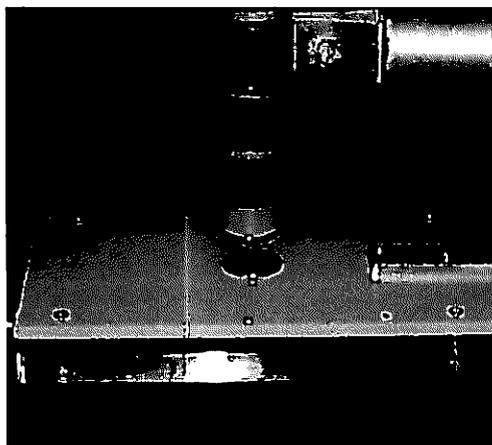
し、保存期間中 (と殺2日目、7日目、14日目および21日目) における核酸関連物質、遊離アミノ酸含量、物性および電気的特性の変化を調査した。なお、ロースの部位による肉質特性の差異の影響を除くため、4分割した部位が調査日ごとに等しくなるよう配置した。

核酸関連物質、遊離アミノ酸含量、物性の調査は前報 (堀内ら 2004) と同様に行い、熟成度合いの評価は、試験1と試験2の成績を込みにして検討した。また、電気的特性を利用した回帰分析においては、試験1の測定結果を回帰式作成のための校正試料、試験2の測定結果を回帰式の精度を検討する検証試料として扱った。なお、平均値の差の検定および回帰分析の計算はすべてStat Viewを用いて行った。

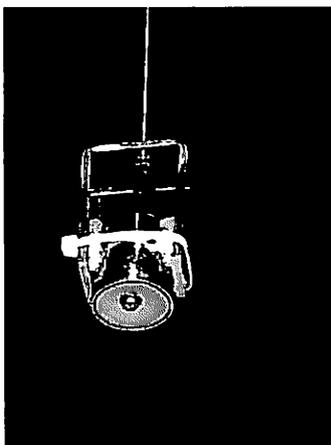
### 2) 電気的特性の調査

電気的特性調査は3種類の電極を試作し、LCRメータ (3532-50: HIOKI製) を用い、印加電圧5Vで50Hz～1MHzの周波数範囲における101点のインピーダンス (Z)、並列等価モードにおける静電容量 (CP) を掃引測定した。測定は交流4端子法を採用したLCRメータを用いたが、電極部における接触抵抗の影響を少なくするため、電極部において2極により測定した。

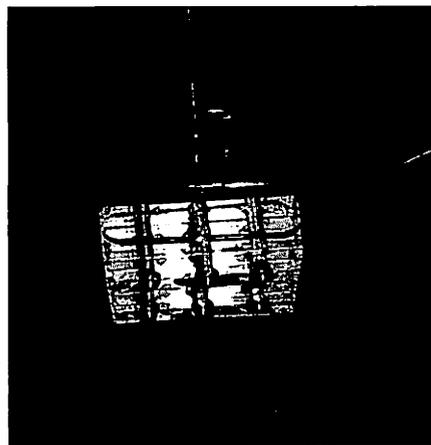
試作した3種類の電極を図1に示した。図1-①のはさみ型電極は、直径25mmのステンレス製円形電極を測定台に固定し、その直上部に同一直径の可動式電極を設けた。測定に当たっては、肉の中心部が測定台の電極を覆うように



①挟み型電極



②球形電極



③プローブ型電極

図1 電気的特性調査に用いた試作電極

乗せ、可動式電極を下ろして上下から肉を挟んで測定した。肉と電極の接触は約 60 g の可動式電極の重量により一定とし、肉の厚さを同時に測定した。

図 1-②の丸型電極は、直径 25mm 肉厚 1 mm のステンレスパイプの中央に直径 10mm のステンレス電極を設置したもので、中央および外周の電極が絶縁部よりも約 1~2 mm 突出しており、肉表面との接触を確実にした。図 1-③のプロブ型電極は、6 mm φ で高さ 4 mm の突起を片側 3 個ずつ 15mm 間隔で計 6 個配置し、片側 3 個のプロブを 1 対として 2 極による測定を行った。丸型電極およびプロブ型電極を用いて測定する場合は、電極を支持するとともに一定の圧力で肉と接触させる目的で、10mm φ、長さ 260mm のステンレス棒を取り付けた。

電気的特性の調査における肉の形状は、胸最長筋を筋繊維に対して直角に 8~15mm の厚さで切断してシャーレに入れて保管し、はさみ型電極以外の測定においてはシャーレに入れたまま電極を押し当てて測定した。

## 結果および考察

### 1) 保存期間中における呈味物質の推移

試験 1 と試験 2 を組みにした核酸関連物質含量および mK 値の推移を表 1 に示した。と殺後 2、7、14 および 21 日目と保存期間が長くなるにつれイノシン酸の減少、イノシンおよびヒポキサンチンの増加が認められた。また、これら 3 成分から算出した修正 K 値 (mK 値) は、保存日数とともに増加し、前報 (堀内ら

2004) と同様に保存日数の推定に有効であった。

遊離アミノ酸の推移を表 2 に示した。食肉を低温で保存すると、いずれの畜種の筋肉でも全ての遊離アミノ酸が増加するとされている (西村、2006)。本研究においても、タウリンと βアラニンを除く全てのアミノ酸で増加が認められ、核酸関連物質と同様に遊離アミノ酸含量による熟成程度の評価が可能であった。また、と殺後 21 日目の肉で、特にグルタミン酸、グリシン、アラニンが多く、熟成による呈味形成に重要な役割を果たしているものと考えられた。Okumura ら (1996) は、真空包装したブタ肉を 4 °C で貯蔵した場合には、20 日目の肉が官能的に最も優れていると報告している。したがって、国産銘柄ブタ肉が消費者から良食味と評価されるためには、適正な熟成度合いのブタ肉を消費者に提供する流通システムの構築が必要であり、そのためには流通過程で熟成度合いを非破壊・迅速に評価できる装置の開発が不可欠であると考えられた。

### 2) 保存期間中における物性の推移

保存期間中における物性の変化を表 3 に示した。保存期間中の pH、脂肪含量、水分含量およびクッキングロスに変化はみられなかった。胸最長筋の部位ごとの特性を調査した清水ら (1999)、鈴木ら (2001) は胸椎前部において脂肪含量が高く最も軟らかく、次いで腰椎部となり胸椎中部が最も硬いと報告している。本研究においては第 8 胸椎部から第 4 腰椎部の胸最長筋を 4 等分して用いたが、調査日ごとに各部位を均等に振り分けたことから筋肉の組成に差がみられず、筋肉部位間の差による影響は少ない

表 1. 保存期間中における核酸関連物質および mK 値の推移

保存日数 (日)	n	ヒポキサンチン (Hx: μ mol/g)	イノシン酸 (IMP: μ mol/g)	AMP (μ mol/g)	ADP (μ mol/g)	ATP (μ mol/g)	イノシン (HxR: μ mol/g)	mK 値 (%)
2	12	0.3 ± 0.1	5.3 ± 0.4	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.0	0.2 ± 0.0	1.3 ± 0.3	23.2 ± 4.7
7	12	0.4 ± 0.1	4.1 ± 0.3	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.1	2.5 ± 0.3	41.6 ± 3.8
14	12	0.7 ± 0.1	2.8 ± 0.3	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.1	3.5 ± 0.2	60.1 ± 3.1
21	12	1.1 ± 0.1	2.0 ± 0.3	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	4.0 ± 0.2	71.8 ± 3.2

異符号間に有意差あり (大文字:P<0.01、小文字:P<0.05)

表2. 保存期間中における遊離アミノ酸の推移

区 分	と殺2日後 (n=12)		と殺7日後 (n=12)		と殺14日後 (n=12)		と殺21日後 (n=12)	
ウリジン	256 ± 98		284 ± 95		242 ± 37		256 ± 39	
	A		B		C		D	
アスパラギン酸	7 ± 3		13 ± 4		22 ± 5		48 ± 6	
	A		B		C		D	
スレオニン	28 ± 8		44 ± 11		60 ± 15		100 ± 10	
	A		B		C		D	
セリン	29 ± 7		63 ± 15		90 ± 15		161 ± 16	
	A		A		B		C	
アスパラギン	11 ± 4		11 ± 3		17 ± 7		45 ± 9	
	A		B		C		D	
グルタミン酸	31 ± 11		100 ± 29		148 ± 28		235 ± 18	
	A		A		B		C	
グリシン	123 ± 42		153 ± 29		162 ± 14		219 ± 21	
	Aa		Ab		B		C	
アラニン	226 ± 56		274 ± 27		315 ± 30		424 ± 49	
	A		B		C		D	
バリン	36 ± 16		61 ± 11		80 ± 8		129 ± 15	
	a		a				c	
シスチン	77 ± 25		76 ± 19		65 ± 19		61 ± 8	
	A		B		C		D	
メチオニン	17 ± 18		34 ± 9		52 ± 5		82 ± 9	
	A		B		C		D	
イソロイシン	20 ± 6		34 ± 7		47 ± 4		73 ± 6	
	A		B		C		D	
ロイシン	40 ± 12		77 ± 18		108 ± 8		169 ± 15	
	A		B		C		D	
チロシン	18 ± 6		39 ± 10		52 ± 5		81 ± 9	
	A		B		C		D	
フェニルアラニン	20 ± 6		42 ± 10		54 ± 6		86 ± 9	
	A		B		C		D	
β アラニン	41 ± 18		47 ± 30		33 ± 15		33 ± 11	
	A		B		C		D	
ヒスチジン	11 ± 4		19 ± 6		26 ± 3		42 ± 6	
	A		B		C		D	
リジン	31 ± 12		56 ± 13		74 ± 11		116 ± 11	
	A		B		C		D	
アルギニン	19 ± 7		44 ± 11		61 ± 7		98 ± 10	
	A		Ba		Bb		C	
アミノ酸合計	1041 ± 291		1472 ± 304		1710 ± 113		2457 ± 183	

異符号間に有意差あり (大文字:P<0.01、小文字:P<0.05)

ものと推察された。

と殺2日目以降における保存期間とクッキンググロスに差がみられず、加熱損失率に差がみられないとする清水ら(1999)の報告と一致した。シェアバリューについても前報(堀内2004)と同様に熟成により有意に低下した。しかし、試験2の1頭に、各保存日数において他の11個体の平均値から1~2標準偏差以上離れた異常にシェアバリューが高い個体が観察された。この個体は発育およびシェアバリューを除く全

ての肉質測定値に異常を示すものではなく、他の個体と同様に熟成とともにシェアバリューの低下がみられたが、この個体を除外した11頭の平均値で示した(表3)。畜肉の熟成の主たる目的は、呈味成分の増加と肉の軟化効果であり、ブタ肉は10日まで軟化するが、それ以上貯蔵してもほとんど軟らかくならないとされており(西村、2006)、本研究の成績と一致したが、個体差が大きく熟成の指標としての効果は低いことが示唆された。

表 3. 保存期間中における物性の変化

保存日数 (日)	n	pH	脂肪含量 (%)	水分含量 (%)	クッキングロス (%)	シエアバリュー <sup>*1</sup> (lb/cm <sup>2</sup> )
2	12	5.6 ± 0.0	2.0 ± 0.6	73.3 ± 0.6	28.7 ± 1.7	9.7 <sup>A</sup> ± 6.2
7	12	5.6 ± 0.0	2.2 ± 0.7	73.2 ± 0.5	28.5 ± 0.9	5.7 <sup>B</sup> ± 3.2
14	12	5.6 ± 0.1	2.4 ± 0.8	72.7 ± 0.5	27.8 ± 0.9	4.0 <sup>B</sup> ± 1.3
21	12	5.5 ± 0.0	2.1 ± 0.5	73.1 ± 0.4	28.4 ± 1.0	3.6 <sup>B</sup> ± 1.2

\*1:シエアバリューは、11個体の測定値で示した。  
異符号間に有意差あり (P<0.01)

### 3) 保存期間中における電気的特性の変化

試験 1 におけると殺 2 日、7 日、14 日および 21 日目のインピーダンスの推移を 8 頭の平均値として図 2-1~図 2-3 に示した。はさみ型電極のと殺 2 日目におけるインピーダンスは、50Hz で 108Ω と高く 10KHz で 75Ω とほぼ直線的に低下し、1 MHz の測定では 30Ω に

まで低下した。と殺後の経過日数と 50Hz におけるインピーダンスの関係は、と殺 7 日目で 68Ω、そして 14 日目では 56Ω 程度と保存期間が長くなるとインピーダンスが低下したが、と殺後 14 日目、21 日目における差は少なかった。一方、1 MHz におけるインピーダンスは、と殺後の経過日数に関係なく 30Ω 程度であった。すなわち、と殺後の経過日数が短く新鮮なブタ肉のインピーダンスは周波数による変化が大きく、保存日数が長くなるにしたがって周波数特性が失われる傾向を示した (図 2-1)。

丸型電極およびプローブ型電極においてもほぼ同様の傾向を示し、筋繊維と直角に電極を設置したはさみ型電極に比べ、肉の表面に接触させて測定するタイプの電極でインピーダンスが高い値を示したが、筋繊維の方向とともに電極の接触面積および電極間の距離が影響しているものと思われた。

並列等価モードにおける静電容量の推移を図

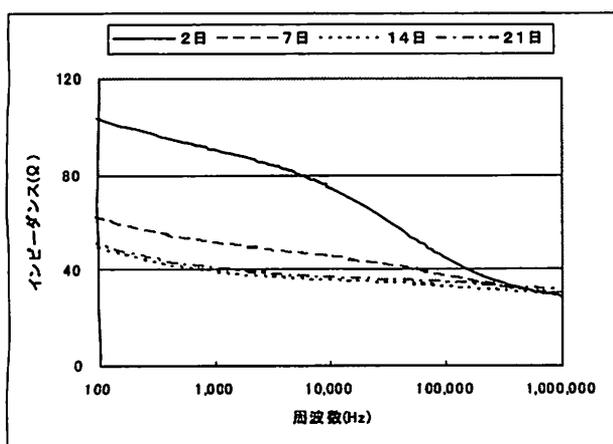


図 2-1 はさみ型電極によるインピーダンスの推移

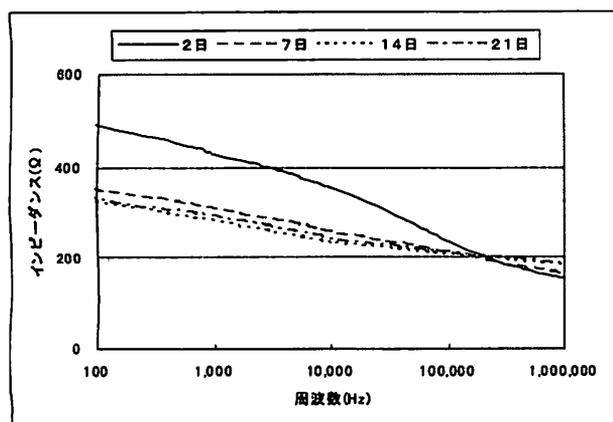


図 2-2 丸型電極によるインピーダンスの推移

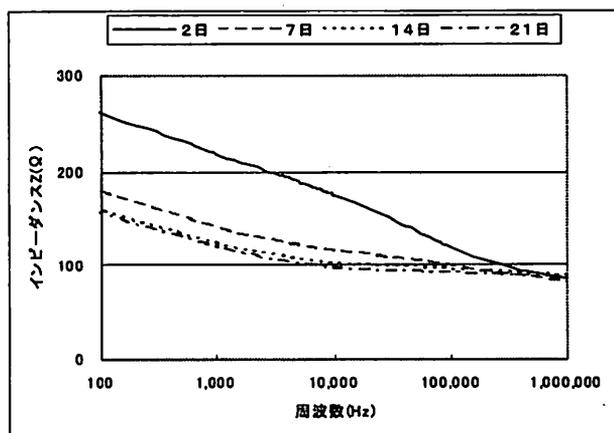


図 2-3 プローブ型電極によるインピーダンスの推移

3-1~図3-3に示した。はさみ型電極の並列等価モードにおける静電容量の周波数特性は、低い周波数側で静電容量が大きく周波数が高くなるにつれて低下した。保存日数と静電容量の関係については、低い周波数域で新鮮な肉ほど静電容量小さく推移し、5 KHz 近傍で交差した。5 KHz 以上の周波数では、保存日数の短い新鮮なブタ肉ほど静電容量が大きく推移し、周波数の増加とともに低下した。さらに、と殺2日目の肉では検出されないものの7日、14日目および21日目の静電容量はで650KHz、550KHz および 650KHz 近傍を最下点として反転した(図3-1)。

肉表面に両極を接触させて測定した丸型電極およびプローブ型電極においても低い周波数領域では新鮮なブタ肉の静電容量が低く、高い周波数領域で逆転する現象が観察された。しかし、新鮮なものと熟成が進んだものの静電容量が交差する周波数が、8 KHz 近傍とはさみ型電極に比べやや高い周波数側にずれており、1 MHz までの測定では、はさみ型電極で観察されたような静電容量が反転して高くなることはなかった。

このようなインピーダンスおよび静電容量の変化は、生体組織がコンデンサと抵抗の並列回路の特性を持つためと考えられている。ブタ肉は細胞レベルにおいて、抵抗の大きい薄い細胞膜(電気容量の大きい)およびイオン伝導性を持つ抵抗の小さい細胞液から構成されるため、電気的には不均質誘導体である。均質誘導体の分極は、電子分極、原子分極および配向分極の3種のみである。しかし、生体組織のように誘電率と導電率の比が場所によって異なる不均質誘電体では境界面に電荷がたまり界面分極が生じるため、低周波での誘電率はきわめて大きくなるとともに、誘電特性は複雑で一つの周波数だけでは決まらず、幅広い周波数範囲の測定によって明らかになるとされている(加藤 1988)。

ブタ肉の保存日数の延長に伴うインピーダンスおよび並列等価モードにおける静電容量の周波数特性の変化は、熟成に伴い細胞膜が劣化して絶縁抵抗が低下し、電流は細胞内も流れるようになるためと考えられている(宮川 1995)。すなわち、低周波電流は抵抗の大きな細胞膜を

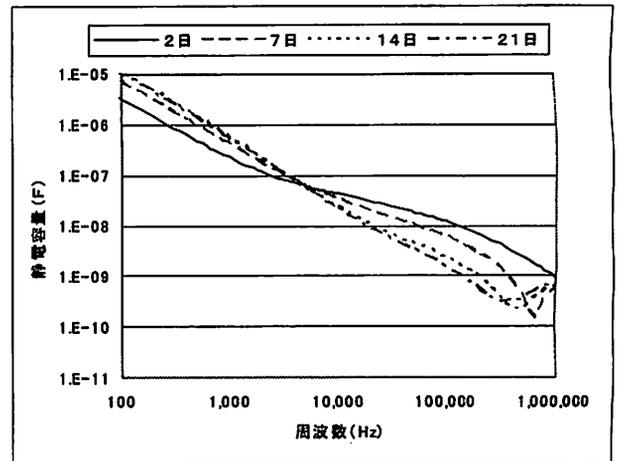


図3-1 はさみ型電極による静電容量の推移

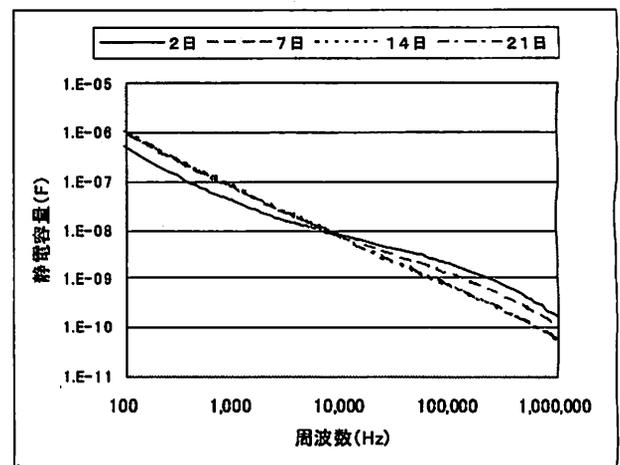


図3-2 丸型電極による静電容量の推移

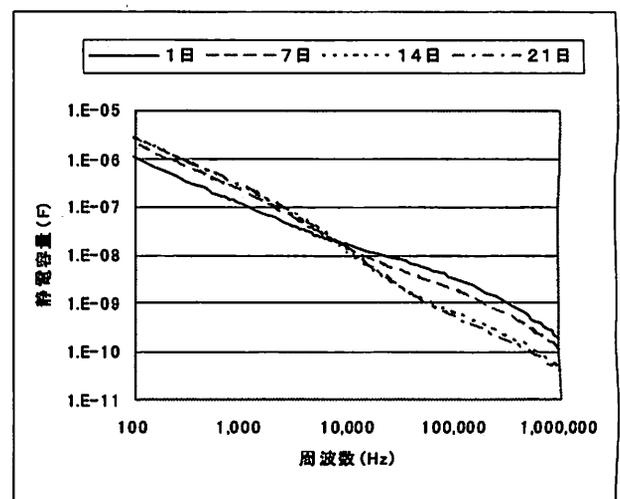


図3-3 プローブ型電極による静電容量の推移

通過できず、イオン伝導性を持つ抵抗の小さな細胞外液を通るため、組織全体としてのインピーダンスは大きい。一方、高周波電流は電気容量の大きな細胞膜を通過して抵抗の小さい細胞内

液をも通るため、周波数が高くなるにつれ組織全体のインピーダンスは低下すると考えられている。したがって、電気的特性を利用した鮮度および熟度判定は、熟成によるイオン伝導性物質の変化と、細胞膜の劣化を総合的に評価しているものと考えられた。

#### 4) インピーダンスと肉質の回帰分析

試験1のWL・D8頭の保存期間中に4回測定した32検体の測定値を校正試料として、インピーダンスと肉の物性値、保存日数および核酸関連物質との重回帰分析を実施した。

重回帰分析は101点のインピーダンス測定値( $\Omega$ )に加え、それら相互の比を独立変量、物性値、保存日数およびmK値を従属変量として、ステップワイズ変数増加法(採用F値:4.000、除外F値:3.996)により行った。そして、試験2のLW・D4頭の保存期間中に4回測定した16測定値を検証試料として回帰式の有効性を検証した。

##### (1) mK値とインピーダンスの回帰式による予測精度

電極別の重回帰分析結果と、別のブタ肉における回帰式による予測精度を表4に示した。はさみ型電極のインピーダンスおよびそれらの比

とmK値のステップワイズ変数増加法による重回帰分析によりインピーダンスの絶対値が選択されることはなかった。このことは、供試肉の厚さが一定でないことや、電極と肉の接触抵抗が影響しているものと考えられた。

ステップワイズ法により選択された10KHzから600KHzと1MHzのインピーダンス比と核酸関連物質から算出したmK値との相関係数は0.793~0.907と非常に高い相関関係が認められた( $P<0.01$ )。これら回帰式を用いて検証試料のmK値を予測できるかを検証したところ、予測mK値とHPLCによるmK値(%)の相関係数は0.735~0.893と有意な相関が認められ( $P<0.01$ )、その予測誤差(SEP)は9.8~15.2%あった。しかし、BIASは0.1%から21.6%と回帰式により測定精度が異なっていた。100KHz/1MHzのインピーダンス比による回帰式を用いた検証試料の予測mK値と実測値との相関係数( $r$ )は0.885( $P<0.01$ )、SEPが9.8%と最も小さかった(図4)。しかし、BIASは600KHz/1MHz比を用いたときに最小となった。また、選択周波数を増加させると回帰における相関係数は高められるが、検証試料の予測精度は低下した。

表4. 電極別mK値とインピーダンスの回帰分析と検証試料の予測精度

電極種別	インピーダンス比		回帰における相関係数( $r$ )	自由度調節済 $R^2$	予測値と実測値の相関係数( $r$ )	SEP (%)	BIAS (%)
	周波数1	周波数2					
はさみ型	100KHz/1MHz		0.907	0.817	0.885	9.8	8.0
	200KHz/1MHz		0.890	0.786	0.838	11.1	5.5
	300KHz/1MHz		0.865	0.740	0.799	13.1	21.6
	400KHz/1MHz		0.838	0.693	0.771	12.9	2.1
	500KHz/1MHz		0.814	0.651	0.750	13.4	0.9
	600KHz/1MHz		0.793	0.617	0.735	13.7	0.1
	10KHz/1MHz		0.875	0.758	0.893	13.8	12.8
	10KHz/100KHz		0.852	0.716	0.882	15.2	13.5
丸型	100KHz/1MHz		0.864	0.738	0.860	10.4	3.3
	200KHz/1MHz		0.872	0.753	0.812	11.9	3.2
	300KHz/1MHz		0.870	0.749	0.723	14.2	3.5
	400KHz/1MHz		0.862	0.734	0.581	17.7	4.1
	400KHz/1MHz	600KHz/1MHz	0.901	0.800	0.417	29.3	6.5
	1KHz/100KHz	100KHz/1MHz	0.888	0.774	0.850	10.7	-0.7
	700KHz/1MHz	300KHz/1MHz	0.900	0.796	0.658	19.2	3.3
プローブ型	100KHz/1MHz		0.923	0.847	0.921	7.9	2.7
	600KHz/1MHz		0.919	0.839	0.914	8.2	0.4
	10KHz/1MHz		0.892	0.789	0.875	11.1	3.6
	1KHz/10KHz	10KHz/1MHz	0.922	0.840	0.904	8.6	1.1

SEP : 予測標準誤差 (Standard Error of Prediction)

BIAS : 予測値と実測値の差の平均値

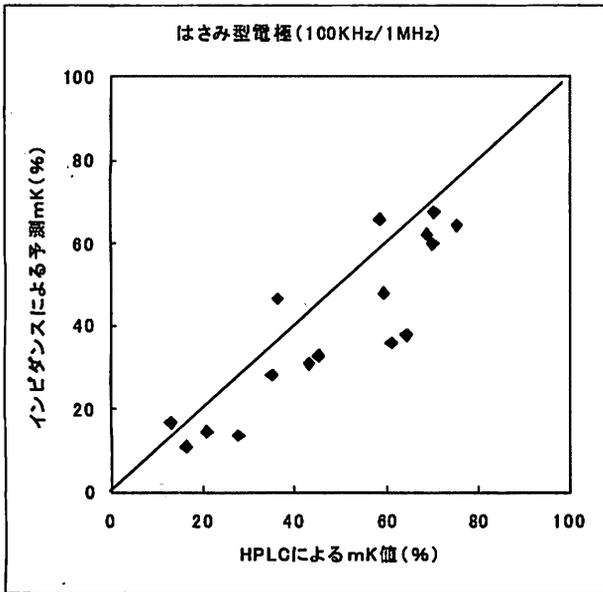


図4 はさみ型電極による予測精度

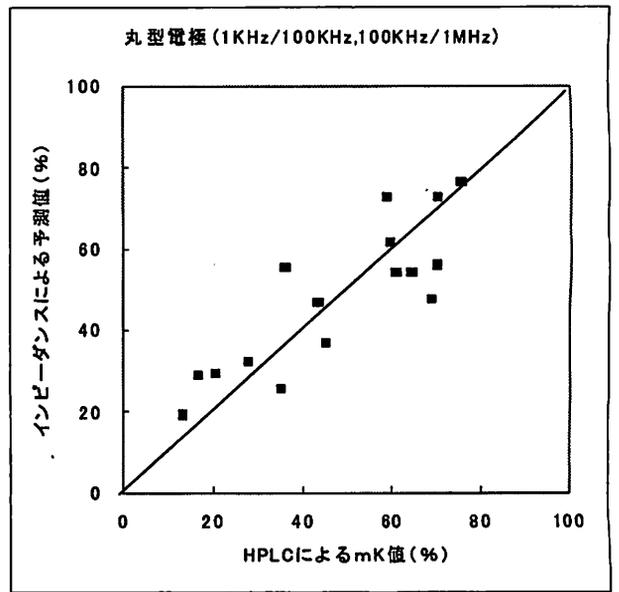


図5 丸型電極による予測精度

丸型電極では、100kHz から 600kHz と 1 MHz のインピーダンス比と mK との相関が高く、1 MHz のインピーダンスが基準となっていた。なかでも 100kHz/1MHz および 200kHz/1MHz のインピーダンス比による予測精度は高かった。また、これら回帰式による予測誤差は、と殺 21 日目で大きくなり、と殺 21 日目を除いた相関係数は、0.904 ( $P < 0.01$ ) と高くなった。このことは、ブタ胸最長筋における 50Hz から 1 MHz におけるインピーダンスの推移が、と殺後 14 日目と 21 日目で差が少なくなっていることに起因する (図 2-2)。したがって、長期保存されたブタ肉の電気的特性による鮮度評価のためには、より広域周波数の測定や要因数を増やして検討する必要がある。そこで、2 変量による回帰式を作成したところ、100kHz/1MHz に加え 1kHz/100kHz のインピーダンス比が採用され、BIAS は -0.7 と小さくなったが、相関係数および SEP は 1 変量の場合と大差なかった (図 5)。

プローブ型電極では、丸型電極と同様に 100kHz から 600kHz と 1 MHz のインピーダンス比による予測精度が高い傾向を示した。100kHz と 1 MHz のインピーダンス比は、回帰における相関係数は 0.923 と非常に高く、600kHz と 1 MHz の比と mK 値との関係は相関係数が 0.919 と 100kHz/1MHz 比よりも若干低下した。しかし、BIAS は 600kHz と 1 M

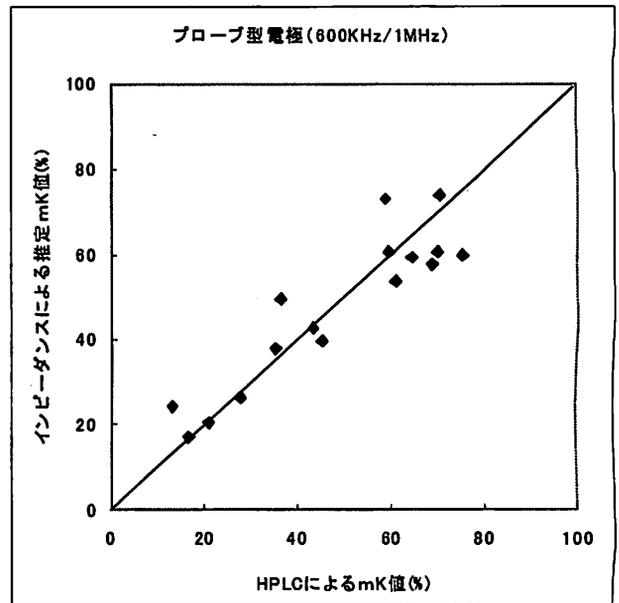


図6 プローブ型電極による予測精度

Hz の比を選択したとき 0.4% と小さかった (図 6)。

電極種別と予測精度の比較では、プローブ型電極、丸型電極、はさみ型電極の順に予測精度が高かった。はさみ型電極の誤差が大きかったが、その要因とした試料の厚さを揃えていないこと、正確な厚さの測定が難しく厚さによる補正が困難であったことが考えられた。また、肉の表面に電極を押し当てて測定する丸型電極とプローブ型電極の比較では、プローブ型電極が優れる傾向を示したが、突出しているプローブ

表5. 電極別シェアバリューとインピーダンスの回帰分析 (n=32)

電極種別	インピーダンス( $\Omega$ )または相互の比	相関係数 (r)	自由度調節済R <sup>2</sup>
はさみ型	10KHz/1MHz	0.819	0.654
丸型	100KHz/1MHz	0.844	0.703
	1KHz/10KHz	100KHz/1MHz 0.878	0.755
プローブ型	50Hz/1MHz	0.874	0.755
	250Hz	50Hz/1MHz 0.894	0.786

が肉に埋まり接触面積が広く、脂肪交雑等による接触抵抗の影響を受けにくかったものと推察される。したがって、電極を肉に押し当てて測定する場合は、肉表面との接触を確実にする電極の開発が必要であり、押し当て型電極は食肉販売店の店頭でトレイから肉を取り出す必要がなく、流通段階における簡易な測定に有利であると考えられた。

なお、本研究では同一の系統による交雑ブタを同一環境で飼育したブタ肉を供試した結果である。宮川(1995)は、性別、年齢、肥満などを含め、同一種の組織でも生体の電気的特性に個体間差異があることを指摘している。したがって本法を市販ブタ肉へ適用するためには、飼育環境や発育速度が異なった材料により例数を重ねて調査する必要がある。

## (2) シェアバリューとインピーダンスとの関係

シェアバリューを従属変量として、インピーダンスとの重回帰分析結果を表5に示した。いずれの電極においても有意な回帰式 ( $P < 0.01$ ) が得られ、はさみ型電極に比べ丸型電極およびプローブ型電極で相関係数が高かった。また、選択された変数はプローブ型電極で250KHzのインピーダンスが選択されるものの、低周波側測定インピーダンスと高周波側測定インピーダンスの比が選択された。インピーダンス比の基準となる周波数は、核酸関連物質から算出したmK値で選択された測定周波数と同様であり、熟成による筋肉細胞の劣化を検出しているものと思われる。しかし、これら回帰式を用いて検証試料のシェアバリューを予測したときの精度は低かった。Lepetitら(2001)は、と殺後1日から14日のウシ肉における電気的特性を調査し、接触型電極と挿入型電極の測定値に

高度な相関関係を認め、保存期間が長くなるにつれてインピーダンスおよび1KHz/100KHzのインピーダンス比が低下すると報告しており、ブタ肉を材料とした本研究と同様の傾向を示した。さらに、これらインピーダンスと筋線維の軟らかさと直線的な相関関係が認められるが、この直線は個体により勾配が異なっているため、これら電気的特性の変化は熟成の指標として利用できないとしている。本研究における回帰式によるシェアバリューの予測精度が低いのも個体差が影響しているものと考えられる。したがって、電気的特性を利用して肉の軟化を指標とした熟成度合いの評価は困難と考えられた。

## (3) その他の形質とインピーダンスとの関係

電気的特性を利用した肉質の非破壊評価の試みは、と殺24時間後のドリップロスを指標とした保水力(Leeら2000)や、ウシおよびブタ肉のトリミングおよび挽肉中の脂肪含量の測定(Marchelloら1999)の報告がある。本研究における保水力の測定はクッキングロスであるが、Leeら(2000)の報告している4KHzおよび1KHzの電気的特性とクッキングロスとの相関が認められなかった。このことは、と殺後一定時間経過した肉の保水性と熟成による保水性の変化が異なった機序によることが原因と考えられた。

また、筋肉中の脂肪含量に関しても有意な回帰式が得られなかったが、肉表面と電極間の接触抵抗の影響や、供試したブタ肉の筋肉脂肪含量の範囲が1.3%から3.9%と狭いことが影響しているものと考えられた。

今回の報告ではデータを示さないが、筋肉を叩いたり、強く打ち付けるなど不適切な取扱により、低周波側のインピーダンスが低下する現

象を観察した。また、凍結によりその現象は顕著となり周波数特性を失い、著しく鮮度低下した肉と同様の電気的特性を示した。したがって、インピーダンスによる鮮度および熟成の評価は、細胞の物理的破壊に大きく影響を受けることから、測定精度を低下させる原因となっていた。しかし、核酸関連物質から算出した mK 値とインピーダンスによる非破壊調査の結果が大きく異なる個体は、不適切な取扱や凍結による細胞の物理的破壊を疑うことができるものと考えられた。

### 参考文献

- 堀内篤、知久幹夫、河原崎達雄、赤松裕久、鈴木清一、櫻尾進、2002. 核酸関連物質含量による豚肉の鮮度判定、日本養豚学会誌、39、200-208.
- 堀内篤、知久幹夫、井手華子、2004、豚ロース肉の熟成指標の検索：真空包装豚ロース肉の保存期間中における物性および成分の変化、静岡県中小家畜試験場報告(15)、1-5.
- 加藤宏郎、1988、高周波インピーダンスによる農産物の非破壊鮮度判定（第1報）－青果物の電気的特性と内部品質および容量結合による非接触抵抗測定－、農業機械学会誌(50)、99-107.
- 加藤宏郎、1989、高周波インピーダンスによる農産物の非破壊鮮度判定（第2報）－果皮の影響および果皮内部の電気特性の非破壊測定－、農業機械学会誌(51)、55-61.
- 加藤宏郎、1993、高周波インピーダンスによる農産物の非破壊鮮度判定（第3報）－浸漬比較法による青果物の非破壊内部品質判定－、農業機械学会誌(55)、75-83.
- 加藤宏郎、坂口守彦、大井康之、丸尾信、豊田薫、2000、インピーダンス特性による魚肉の鮮度判定（第1報）－魚肉の電気的特性と高周波域の実用的鮮度指標の導出－、農業機械学会誌(62)、76-83.
- Lepetit J., Sale P., Favier R., Dalle R. 2002. Electrical impedance and tenderization in bovine meat. Meat Science, 60:51-62.
- Marchello M.J., W.D.Slanger, and J.K.Carlson. 1999. Bioelectrical impedance: Fat content of beef and pork from different size grinds. Journal Animal Science, 77:2464-2468.
- Mitsumoto, M., Sasaki, K., Murakami, H., Ozutsumi, K. 2002. Quick determination of meat colour, metmyoglobin formation and lipid oxidation in beef, pork and chicken by visible and near infrared spectroscopy. Near Infrared Spectroscopy Proceedings of the 10th International Conference. A.M.C. Davies and R.K. Cho (Eds). P.213-216.
- 宮川道夫、1995、電磁界の生体効果と計-1.4 生体の電気的特性と計測、電気学会・高周波電磁界の生体効果に関する計測技術調査専門委員会編、51-55、コロナ社、東京.
- 西村敏英、2006、食肉の熟成度を客観的に測る－熟成に伴う変化と熟成指標への応用－、食肉の科学、Vol47、1-12.
- 沖谷明紘、佐藤信監修、1984. 食品の熟成、551-578、光琳、東京.
- Okumura, T., Y.Inuzuka, T.Nishimura and S.Arai, 1996. Changes in sensory, physical and chemical properties of vacuum-packed pork loins during the prolonged conditioning at 4°C, Animal Science and Technology, 67:360-367.
- Stat View 5.0 日本語版ユーザーズガイド、SAS 出版局、東京、1998.
- 清水俊郎、鈴木啓一、渡部正樹、小川ゆう子、1999、肉豚の肥育期間、ロース部位および熟成が肉質に及ぼす影響、日本養豚学会誌、108-114.
- 鈴木啓一、清水ゆう子、阿部博行、斗内桂子、鈴木惇、2001、豚肉質の品種間、性間および胸最長筋部位間の比較、日本畜産学会報、72、J215-J223.

# 体細胞クローン雄ブタおよび後代雄ブタの繁殖能力

## Reproductive Performance in a Male Pig Cloned from Somatic Nuclei and the Male Progenies.

河原崎達雄、大竹正剛、柴田昌利、寺田 圭<sup>\*</sup>、大津雪子

要約：体細胞クローン雄ブタおよびその後代雄ブタの繁殖能力について検討した。体細胞クローン雄ブタ（DJ：デュロック種(D)雌×金華種(J)雄）1頭およびその後代ブタ（D・DJ：Dクローン雌×DJクローン雄）6頭について、射精能力、精液量、精子濃度、精子活力、精子形態を発育の経過とともに調査し、同一系統の一般ブタと比較した。また、交配試験により授精能力について確認した。体細胞クローン雄ブタ（DJ）は3ヶ月齢で採精可能となり、精液量、総精子数は月齢が進むにつれて増加し、8ヶ月齢でそれぞれ195ml、317億個となった。運動精子割合（++～+++）は4ヶ月齢、精子形態正常率は5ヶ月齢でそれぞれ約90%となり、その後はこの値を維持した。これらの値は同系統の一般雄ブタと変わらなかった。クローン後代雄ブタ（D・DJ）は3～4ヶ月齢で採精可能となり、精液量、総精子数、運動精子割合、形態正常精子割合は8ヶ月齢まで増加し、DとDJの中間値あるいはそれを上回る値を示した。また、体細胞クローン雄ブタ、後代雄ブタともに正常な授精能力を有していた。これらの結果から、体細胞クローンおよびその後代雄ブタの造精能力、授精能力は一般ブタと変わらないことが示唆された。

（静岡畜技研中小研セ研報 1, 23～30, 2007）

### はじめに

体細胞クローン技術は遺伝資源の保存や遺伝子改変動物の作出に有効な手段であり、ブタでも多くの成功例が報告されている（Onishiら2000；Polejaevaら2000；Betthausenら2000；Yinら2002；Bondioliら2001；Laiら2002；Walker2002；Sousaら2002；Sharmaら2003；Ramsoondarら2003；河原崎ら2003）。しかし、クローン動物の特性はまだ十分に解析されていないことから、現在のところ食肉としての流通は認められていない。

クローン動物では、核の初期化が不完全なために起こるエピジェネティックな異常が出現する。マウスでは胎盤の肥大、過大子、インプリンティング遺伝子の発現異常が認められる（Inoueら2002；Ogonukiら2002）。ウシやヒツジのクローン胚の3分の1は妊娠中に退行するが、脈管の形成不全、胎盤の過剰形成が主要

な要因ではないかと指摘されている（Wilmutterら2002）。ブタでは妊娠期間の延長、過小胎子、呼吸器や心臓系の機能不全などの発生が指摘されている（Wilmutterら2002）。

クローン動物における遺伝子のエピジェネティック変異には種差のあることが報告されている。Kangら（2001a, b）はドナーゲノムのリプログラミングをモニターするために、クローン胚と体外受精胚や体内受精胚のメチル化パターンを解析したところ、メチル化パターンはウシではクローン胚は体内あるいは体外受精胚と明らかに異なっているが、ブタでは差が少なかったことを報告している。ブタでは体細胞クローンの作出効率はあまり高くないが、異常産子の発生率は少ないことも確認されている（Yinら2002；Walker2002；Onishi2002；河原崎2004）。

一方、周産期を異常なく経過したクローン動物の多くは正常な発育能力や繁殖能力を有している。日本国内の体細胞クローンウシを対象に

（※：現西部農林事務所）

した健全性の調査においても、周産期を経過したクローンウシの多くが雌雄ともに正常な繁殖能力を有していたことが確認されている（渡辺と永井 2006）。また、体細胞クローン雌ブタにおいても正常な発育や繁殖性を示すことが確認されている（Onishi 2002；Shibata ら 2006）。しかし、体細胞クローン雄ブタの繁殖能力についての報告例はまだ少ない（Williams ら 2006）。

本研究では体細胞クローン雄ブタおよびその後代雄ブタの発育にともなう精液性状を詳細に分析し、クローン雄ブタの性成熟、造成能力、授精能力について、有性生殖で誕生した一般ブタと比較検討した。

### 材料および方法

#### 供試ブタ

体細胞クローン作出のための体細胞は45日齢の胎子細胞（DJ：デュロック種（D）雌×金華種（J）雄）を用いた。レシピエント卵子には体外成熟卵子（河原崎ら 2003）を用い、核移植は顕微注入法（河原崎ら 2003）により行った。誕生したDJクローン雄ブタ2頭のうち、生存した1頭について、発育、造成能力および授精能力を調査した。また、この雄ブタの精液を用いてD種クローン雌ブタに人工授精を行い、誕生したクローン後代雄ブタ（D・DJ：Dクローン雌×DJクローン雄）6頭、対照雄ブタとしてクローンブタと同系統の有性生殖により誕生した一般雄ブタ、D6頭、J6頭、DJ6頭を用いた。

調査ブタは8週齢まで群飼育し、9週齢に2.2×1.2mの単独房に移し、1頭で飼育した。飼料は、3ヶ月齢までは育成用配合飼料（CP 14.0%、TDN 77.0%）を不断給餌し、3ヶ月齢以降は種ブタ用配合飼料（CP 14.5%、TDN 72.0%）を制限給餌した。

#### 調査項目

誕生から毎週1回、8ヶ月齢まで体重を測定した。9週齢から週に1回以上、擬牝台への乗駕能力（射精能力）の有無を調査した。乗駕を確認した後は月齢ごとに精液を採取し、精液量、精子数、運動精子割合（++～+++活力精子の割合）、精子形態を8ヶ月齢まで調査した。

### 授精試験

体細胞クローン雄ブタおよび後代雄ブタについて、授精試験を行った。供試ブタは8ヶ月齢になったところで、用手法により精液を採取し、等量のモデナ液（曾根ら 1992）で希釈した後、許容開始数時間後から2～3回、人工授精した。

交配する雌ブタは6～8ヶ月齢の未經産雌ブタ9頭（D、W、およびWLD）、クローン雌ブタ1頭（D：1、2産次）を用いた。

### 統計処理

統計処理はStat View for Windows version 5（SAS Institute Inc. 1988）を用いて行った。初回精液採取週齢、精液量、総精子数、運動精子割合および正常形態精子割合は分散分析法、それぞれの系統間の比較はFisherのPLSD法により解析した。なお、運動精子割合および正常形態精子割合は角変換後の数字を解析に用いた。

## 結 果

### 体細胞クローンブタの作出成績

720個の未受精卵子に核移植処置を行った結果、核移植110時間後に37個（5.2%）が桑実胚～胚盤胞期に発育した。桑実胚～胚盤胞期に発育した37個の胚を4頭のレシピエントブタに移植し、2頭がそれぞれ1頭、合計2頭（5.1%）のクローン雄ブタを分娩した。

### クローン雄ブタおよび後代雄ブタの発育

クローン雄ブタ、後代雄ブタおよびクローンブタと同一系統の有性生殖で誕生した一般ブタ（対照雄ブタ）の発育曲線を図1に示した。

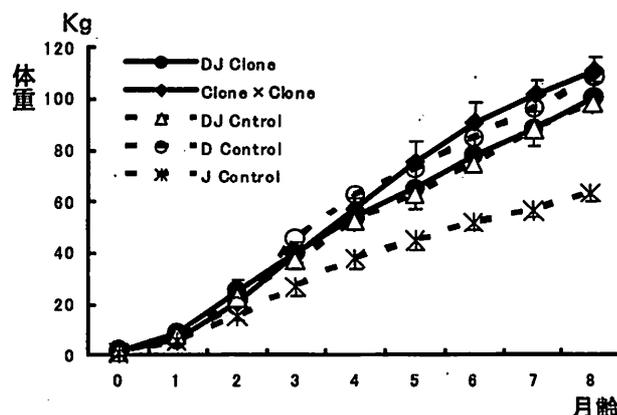


図1 体細胞クローン雄ブタ、後代雄ブタおよび同一系統の一般雄ブタの発育

対照雄ブタの生時体重は D ( $1.8 \pm 0.1$  kg)、DJ ( $1.3 \pm 0.1$  kg)、J ( $1.0 \pm 0.04$  kg) の順で大きく、それぞれに有意差が認められた (D vs. DJ:  $P < 0.05$ , D vs. J:  $P < 0.01$ , DJ vs. J:  $P < 0.01$ )。

その後の発育は 2 ヶ月齢までは DJ が D を上回った (1 ヶ月齢体重: DJ  $8.0 \pm 0.3$  kg、D  $6.5 \pm 0.2$  kg、 $P < 0.05$ ; 2 ヶ月齢: DJ  $23.8 \pm 1.0$  kg、D  $20.4 \pm 0.5$ 、 $P < 0.05$ ) が、3 ヶ月齢以降は D が DJ を上回った ( $P < 0.05$  あるいは  $P < 0.01$ )。J の発育は D、DJ よりも遅く、いずれの時期も体重は D、DJ よりも少なかった ( $P < 0.05$  あるいは  $P < 0.01$ )。8 ヶ月齢体重は D ( $108.9 \pm 1.5$  kg)、DJ ( $98.4 \pm 4.0$  kg)、J ( $63.3 \pm 1.4$  kg) の順で多く、それぞれに有意差が認められた (D vs. DJ:  $P < 0.01$ , D vs. J:  $P < 0.01$ ; DJ vs. J:  $P < 0.01$ )。

クローンブタ (DJ) の生時体重は  $0.45$  kg と  $1.05$  kg であり、 $0.45$  kg の 1 頭は生後まもなく死亡したが、 $1.05$  kg の 1 頭は順調に発育し、対照の DJ と殆ど同じ発育曲線を示した。

後代雄ブタ (D・DJ) の生時体重 ( $1.3 \pm 0.1$  kg) は対照の D よりも少なく ( $P < 0.01$ )、J よりも多く ( $P < 0.05$ )、DJ とは差がなかった。発育は順調であり、8 ヶ月齢の平均体重 ( $111.0$  kg) は D ( $108.9$  kg) と差がなく、DJ ( $98.4$  kg、 $P < 0.01$ )、J ( $63.3$  kg、 $P < 0.01$ ) より多かった。

## 体細胞クローン雄ブタおよびその後代雄ブタの造成能力

### (1) 初回採精週齢

対照雄ブタの初回採精週齢は J ( $11.0 \pm 0.6$  週齢)、DJ ( $10.8 \pm 0.6$  週齢) では非常に早く、D ( $20.5 \pm 1.9$  週齢) と有意差 ( $P < 0.01$ ) が認められた。クローン雄ブタ (DJ) の初回採精時期 (11 週齢) は対照の DJ と殆ど同時期であり、早熟性が確認された。クローン後代ブタ (DDJ) の初回採精週齢は D と J あるいは DJ の中間の値 ( $14.7 \pm 0.8$  週齢) を示し、D、J および DJ と有意差 (D:  $P < 0.01$ 、DJ, J:  $P < 0.05$ ) を認めた。

### (2) 精液量

体細胞クローン雄ブタ、後代雄ブタおよび対照雄ブタの発育に伴う精液量の推移を図 2 に示

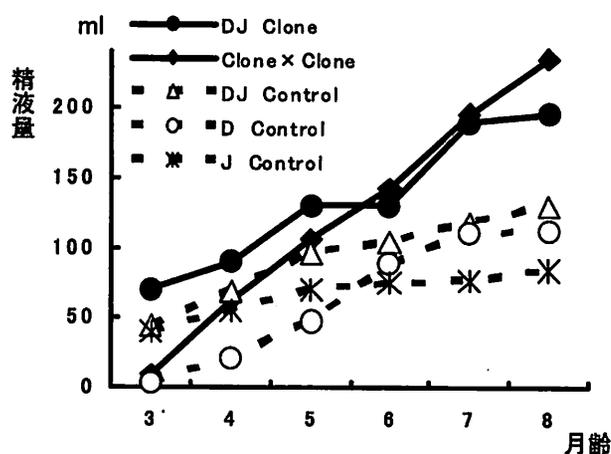


図2 体細胞クローン雄ブタ、クローン後代雄ブタおよび同一系統の一般雄ブタの一射精あたりの精液量の発育にともなう推移

した。

対照雄ブタでは、J と DJ は 3 ヶ月齢で全頭が採精でき、J ( $39.4 \pm 4.1$  ml) と DJ ( $45.0 \pm 4.8$  ml) との間に有意差はなかった。D では 3 ヶ月齢で 1 頭において採精できたが、精液量は少なかった ( $3.3 \pm 3.3$  ml)。J の精液量の増加は緩やかであった。D の精液量は徐々に増加し、5 ヶ月齢で J (D:  $47.8 \pm 17.3$  ml、J:  $69.6 \pm 7.5$  ml) と、6 ヶ月齢で DJ (D:  $88.3 \pm 8.0$  ml、DJ:  $104.6 \pm 5.8$  ml) と差がなくなり、7 ヶ月齢では J よりも多くなった (D:  $109.3 \pm 10.4$  ml、J:  $77.2 \pm 1.7$  ml、 $P < 0.05$ )。8 ヶ月齢での精液量は DJ ( $129.3 \pm 5.0$  ml)、D ( $112.3 \pm 7.1$  ml)、J ( $84.5 \pm 4.5$  ml) の順で多く、DJ と J の間に有意差 ( $P < 0.01$ ) が認められた。

体細胞クローンブタ (DJ) の精液量は 3 ヶ月齢で  $70$  ml と対照の DJ よりも多く、その後も月齢が増すにつれて増加し、8 ヶ月齢で  $195$  ml となり、対照の DJ よりも多かった。

後代雄ブタ (D・DJ) の精液量は、3 ヶ月齢では D と同様に非常に少なかった ( $9.2$  ml  $\pm$   $5.8$  ml) が、その後急激に増加し、6 ヶ月齢以降では対照 DJ よりも多くなり ( $P < 0.01$ )、8 ヶ月齢では  $236.2 \pm 19.8$  ml に達した。

### (3) 総精子数

体細胞クローン雄ブタ、後代雄ブタおよび対照雄ブタの発育にともなう総精子数の推移を図 3 に示した。

対照雄ブタでは、J は 3 ヶ月齢で全ての個体の精液で精子が存在し、総精子数も最も多かった ( $12.1 \pm 4.0 \times 10^8$ )。DJ は 3 ヶ月齢で 6 頭中

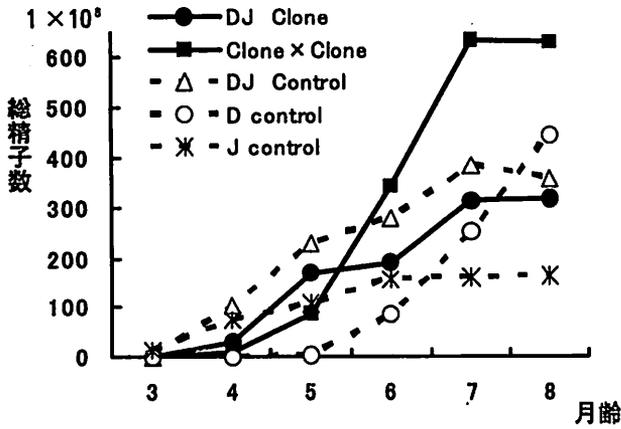


図3 体細胞クローン雄ブタ、後代雄ブタおよび同一系統の一般雄ブタの一射出精液あたりの総精子数の推移

4頭において精子が存在したが、総精子数はJより少なかった ( $0.8 \pm 0.6 \times 10^8$ )。Dは1頭でのみ精液が採取されたが、精子は存在しなかった。Jの総精子数は6ヶ月齢 ( $155.5 \pm 37.4 \times 10^8$ ) まで徐々に増加し、その後はほぼ一定となった。Dは5ヶ月齢で3頭に精子が出現し、6ヶ月齢以降に急激に増加した。8ヶ月齢での総精子数はD ( $445.7 \pm 56.1$ )、DJ ( $356.6 \pm 37.0$ )、J ( $163.5 \pm 32.3$ ) の順で多く、DおよびDJとJとの間に有意差 ( $P < 0.01$ ) が認められた。

クローン雄ブタ (DJ) の総精子数は3ヶ月齢で対照のDJと同様に少数 ( $0.21 \times 10^8$ ) の精子を認めた。その後は対照のDJとほぼ同様の経過をとって増加し、8ヶ月齢では  $316.8 \times 10^8$  まで増加した。

後代雄ブタ (DDJ) は3ヶ月齢で2頭において採精可能であったが、精子は存在しなかった。4ヶ月齢では6頭中4頭で精子が存在するようになったが、精子数は少なかった ( $11.3 \pm 6.9 \times 10^8$ )。5ヶ月齢ではDJとDの中間の値 ( $87.3 \pm 27.3$ ) となり、その後6から7ヶ月齢にかけて急激に増加し、8ヶ月齢 ( $630.6 \pm 54.9 \times 10^8$ ) では他系統より多くなった (J,  $P < 0.01$ ; DJ,  $P < 0.01$ ; D,  $P < 0.05$ )。

#### (4) 運動精子割合

体細胞クローン雄ブタ、後代雄ブタおよび対照雄ブタの発育にともなう運動精子 (++) 割合の推移を図4に示した。

対照雄ブタでは、Jは3ヶ月齢で運動精子割合がすでに高く ( $60.8 \pm 7.6$ )、DJは3ヶ月齢で6頭中4頭において精子が存在したが、Jに

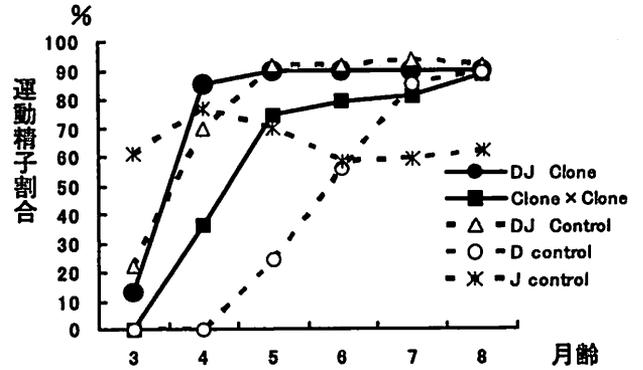


図4 クローン雄ブタ、後代雄ブタおよび同一系統の一般雄ブタの発育にともなう運動精子割合の推移

比べ低かった ( $22.5 \pm 13.0$ ,  $P < 0.05$ )。Dは3ヶ月齢で1個体でのみ精液が採取されたが、精子は存在しなかった。Jはその後8ヶ月齢までほぼ一定の値を示した。Dは5ヶ月齢で3頭に精子が出現したが運動精子割合はDJよりも低く、その後増加し、7ヶ月齢までにJよりも高くなった (D:  $85.0 \pm 1.8\%$ , J:  $59.2 \pm 12.3\%$ ,  $P < 0.05$ )。DJは4~5ヶ月齢で高い運動精子割合を示すようになり (4ヶ月齢  $70.0 \pm 9.7\%$ , 5ヶ月齢  $91.7 \pm 1.7\%$ )、その後その値を維持した。8ヶ月齢での運動精子割合はD ( $89.2 \pm 0.8\%$ )、DJ ( $91.7 \pm 1.0\%$ ) で、J ( $61.7 \pm 8.4\%$ ) よりも高かった ( $P < 0.01$ )。

体細胞クローン雄ブタ (DJ) の運動精子割合はDJと同様の推移をとり、3ヶ月齢ですすでに運動性を持つ精子が出現し (15%)、4ヶ月齢では高い運動精子割合 (85%) を示し、その後高い状態を維持した。

後代雄ブタ (D・DJ) の運動精子割合は対照のDとDJの中間の値で推移した。4ヶ月齢 ( $36.3 \pm 15.7\%$ )、5ヶ月齢 ( $74.5 \pm 8.3\%$ )、6ヶ月齢 ( $79.2 \pm 4.9\%$ ) と徐々に増加し、7ヶ月齢でD、DJと同様に高い運動精子割合 ( $80.8 \pm 2.0\%$ ) を示した。8ヶ月齢の運動精子割合はD、DJと同様の値 ( $88.3 \pm 2.5\%$ ) を示し、Jよりも高かった ( $P < 0.01$ )。

#### (5) 正常精子割合

体細胞クローン雄ブタ、後代雄ブタおよび対照雄ブタの発育にともなう正常精子割合の推移を図5に示した。

対照雄ブタでは、Jは3ヶ月齢ですでにかなり多くの正常精子 ( $34.2 \pm 8.7\%$ ) が認められ、

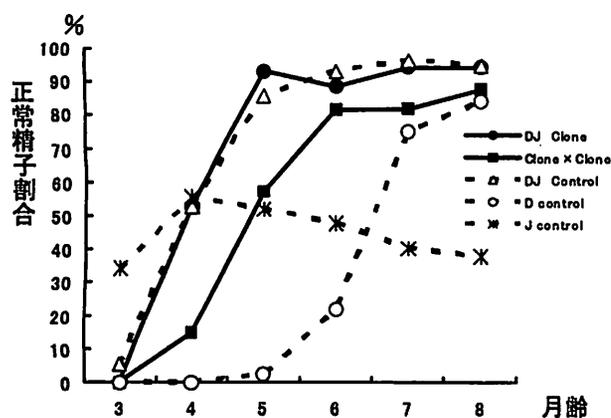


図5 体細胞クローン雄ブタ、クローン後代雄ブタおよびその同一系統の一般雄ブタの発育にともなう正常精子割合の推移

DJでも正常精子 ( $5.3 \pm 2.3\%$ ) が認められたがJに比べて低い傾向であった ( $P < 0.07$ )。Jは4ヶ月齢で最も高い値 ( $55.8 \pm 8.2$ ) を示し、その後8ヶ月齢にかけてやや低下した。Dは5ヶ月齢で正常精子 ( $4.8 \pm 1.2$ ) が初めて出現し、7~8ヶ月齢までに急激に増加した。DJは4~5ヶ月齢で高い正常率を示すようになり (4ヶ月齢： $52.8 \pm 14.7$ 、5ヶ月齢： $86.0 \pm 4.6$ )、その後は高い値を維持した。8ヶ月齢での正常精子割合はD ( $84.4 \pm 2.7\%$ )、DJ ( $95.1 \pm 1.0\%$ ) で、J ( $38.0 \pm 13.2\%$ ) よりも高かった ( $P < 0.01$ )。

体細胞クローン雄ブタ (DJ) の正常精子割合は対照のDJと同様の推移を取り、3ヶ月齢では正常精子は認められなかったが、4~5ヶ月齢にかけて著しく増加し (4ヶ月齢： $52.7\%$ 、5ヶ月齢： $93.5\%$ )、その後高い値を維持した。

後代雄ブタ (DDJ) は対照のDとDJの中間の値で推移した。4ヶ月齢 ( $7.5 \pm 3.9\%$ )、

5ヶ月齢 ( $57.5 \pm 13.2\%$ ) と徐々に増加し、6ヶ月齢で対照のDJと同様に高い正常精子割合 ( $81.8 \pm 5.9\%$ ) を示した。8ヶ月齢の正常精子割合は対照のD、DJと同様の値 ( $88.2 \pm 5.2\%$ ) を示し、Jよりも高かった ( $P < 0.01$ )。

体細胞クローン雄ブタおよび後代雄ブタの授精試験成績表1に体細胞クローン雄ブタおよび後代雄ブタの授精試験成績を示した。

クローン雄ブタの精液を用いて、延べ12頭の未経産雌ブタに交配したところ、9頭 ( $75.0\%$ ) が受胎した。7頭は妊娠45~67日齢でと殺し、 $11.6 \pm 1.1$ 頭の胎子を確認した。2頭は平均9.5頭の産子を分娩した。また1頭のクローン雌ブタ (D) の初産、2産時に交配したところ、いずれも受胎し、平均10.5頭の産子を分娩した。

6頭の後代雄ブタ (Dクローン雌ブタ×DJクローン雄ブタ) の精液を用いて、それぞれ1頭の未経産雌ブタに交配したところ、全ての雌ブタが受胎した。妊娠45日齢でと殺し、胎子数を確認したところ、 $9.5 \pm 1.3$ 頭であった。

## 考 察

本研究では、体細胞クローン雄ブタの発育、性成熟、造精能力、授精能力は品種の特性を良く備えており、同系統の有性生殖により誕生した一般の雄ブタと変わらないことを明らかにした。

誕生したクローン雄ブタのうち1頭は体重が小さく生後間もなく死亡した。この原因がクロー

表1. 体細胞クローン雄ブタおよびクローン後代雄ブタによる授精試験成績

クローン雄ブタの交配						
交配雌ブタ	交配回数	受胎頭数	受胎率%	黄体数	胎子or産子数	育成率%
一般ブタ <sup>a</sup>	10	7	70.0	$16.6 \pm 6.3$	$12.2 \pm 3.4$	
一般ブタ <sup>b</sup>	2	2	100		$10.5 \pm 0.7$	100
クローン <sup>c</sup>	2	2	100		$9.5 \pm 4.0$	65.5
合計	14	11	78.6	$16.6 \pm 6.3$	$10.6 \pm 2.9$	$82.7 \pm 28.8$
後代雄ブタの交配						
一般ブタ <sup>d</sup>	6	6	100	$16.0 \pm 6.9$	$9.5 \pm 3.08$	

a 未経産ブタに人工授精で交配後、45日~67日齢でと殺、確認、b 未経産ブタに人工授精で交配後、分娩させて確認、c クローン雌ブタに人工授精で交配後、分娩させて確認、d 未経産ブタに人工授精で交配後、45日齢でと殺、確認

ン技術によるものかどうかは必ずしも明らかでない。マウスや牛などのクローン家畜では過大子が生まれることが報告されている (Inoue ら 2002 ; Ogonuki ら 2002 ; Wilmut ら 2002)。ブタにおいては過大子の報告はなく、生時体重が少ない子ブタ (過小子) が報告されている (Wilmut ら 2002)。生後間もなく死亡したクローンブタの解剖所見では明らかな異常は認められなかった (データは示さず)。また多胎動物であるブタは通常分娩においても一定割合で過小子が誕生し、分娩前後に死亡する (Ronaldo ら 2007)。過小子の発生は生存能力の低い子ブタが自然淘汰される現象であり、生存した子ブタが正常な発育能力を有しているのであれば問題とはならない。

順調に発育したクローン雄ブタおよび後代雄ブタは有性生殖により誕生した同系統の対照雄ブタと殆ど同一の発育曲線を示し、高い相似性を有していた。体細胞クローンウシ (Lanza ら 2001 ; 渡辺と永井 2006) や体細胞クローン雌ブタ (Onishi 2002 ; Greg ら 2003 ; Shibata ら 2006) においても、ある時期を過ぎるまで生存した個体については一般の動物と変わらない発育能力を有している。体細胞クローン雄ブタにおいてもこれらの報告と同様であることが確認された。

対照雄ブタの造成能力調査において、品種による雄ブタの性成熟時期の違いや交雑による影響が明らかになった。交雑種 DJ の精子濃度、精子の運動性、精子の形態正常率などの性状からみた性成熟時期は D と J の中間であったが、初回採精時期は早熟である J とほぼ同じであった。精子形成が J よりも遅かった DJ において、初回採精時期が J と同じく早くなったのは、DJ のほうが J よりも体格が良く、擬牝台への乗駕に有利だったことが考えられる。精液量については、交雑種では交配品種の平均値よりも高くなる傾向が見られた。精液の主成分は精嚢腺から分泌される精嚢腺液である。精液量の増加は交雑種のほうが早熟性の J よりも体格が良いために、精嚢腺が大きくなり、精嚢腺液も増加したのではないかと考えられる。一方、調査ブタの中では最も晩熟であった D においてもほぼ成熟したと思われる 8 ヶ月齢時の交雑種

の精液量、総精子数、精子活力、正常形態精子率は、値の高い D の性状に近いものになった。

DJ クローン雄ブタの性成熟は、対照の雄ブタと非常に良く一致するものであり、品種の特性を良く示していた。また精液性状も非常に優れていることが確認された。体細胞クローン雌ブタの性成熟時期が一般のブタと良く類似していることはこれまでも報告されている (Shibata ら 2006)。体細胞クローンブタの性成熟時期は雌雄とのに同系統の対照雄ブタと酷似していることは、クローンブタの正常性を良く表わしているものと考えられた。

体細胞クローン雄ブタおよび後代雄ブタの授精能力についても正常であることが本研究でより明確になった。体細胞クローン雌ブタ (Shibata ら 2006) および雄ブタ (Williams ら 2006) の繁殖能力は受胎率、産子数において、一般ブタとの差がないことが報告されている。今回の成績はこれらの報告と一致するものであった。

本研究では体細胞クローンおよび後代雄ブタについて、発育、性成熟に伴う造成能力を詳細に検討した結果、体細胞クローン雄ブタおよび後代雄ブタは、有性生殖により誕生した同系統の一般の雄ブタと極めて類似した特性を示すこと、正常な授精能力を有していることを明らかにした。これらの結果から、体細胞クローンブタは種ブタとして品種改良や遺伝資源の保存に活用可能であると考えられた。

## 引用文献

- Betthausen J, Forsberg E, Augenstein M, Childs I, Eilertsen K, Enos J, Forsyth TE, Golueke P, Jurgella G, Koppang R, Lesmeister T, Mallon K, Mell G, Misica P, Pace M, Pfister-Genskow M, Strelchenko N, Voelker G, Watt S, Thompson S, Bishop M, 2000. Production of cloned pigs from in vitro systems, *Nat Biotechnol*, 18:1055-1059.
- Bondioli K, Ramsoondar J, Williams B, Costa C, Fodor W, 2001. Cloned pigs generated from cultured skin fibroblasts

- derived from a H-transferase transgenic boar. *Mol Reprod Dev*, 60:189-195.
- Greg SA, Dindot S, Friend TH, Walker S, Zaunbrecher G., Lawhorn B, Piedrahita JA, 2003. Hierarchical phenotypic and epigenetic variation in cloned swine *Biol. Reprod.* 69:430-436.
- Inoue K, Kohda T, Lee J, Ogonuki N, Mochida K, Noguchi Y, Tanemura KK, Ishino T, Ishino F, Ogura A, 2002. Faithful expression of imprinted genes in cloned mice. *Science*, 295:297.
- Kang YK, Koo DB, Park JS, Choi YH, Chung AS, Lee KK, Han YM, 2001. Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos. *Nat Genet*, 28:173-177.
- Kang YK, Koo DB, Park JS, Choi YH, Kim HN, Chang WK, Lee KK, Han YM, 2001. Typical demethylation events in cloned pig embryos. Clues on species-specific differences in epigenetic reprogramming of a cloned donor genome. *J Biol Chem*, 276:39980-39984.
- 河原崎達雄, 2004. ブタ体細胞クローン技術の現状. *日豚学誌*, 41:49-58.
- 河原崎達雄・大竹正剛・土屋聖子・柴田昌利, 2003. 体細胞核の顕微注入による体細胞クローンブタの作製. *静岡県中小試研究報告*, 14: 7-12.
- Lai L, Park KW, Cheong HT, Kuhholzer B, Samuel M, Bonk A, Im GS, Riekea, Day BN, Murphy CN, Carter DB, Prather RS, 2002. Transgenic pig expressing the enhanced green fluorescent protein produced by nuclear transfer using colchicine-treated fibroblasts as donor cells. *Mol. Reprod. Dev*, 62:300-306.
- Lanza, R.P., J.B. Cibelli, D. Faber, R.W. Sweeney, B. Henderson, W. Nevala, M.D. West and P.J. Wettstein: Cloned cattle can be healthy and normal. *Science*, 294, 1893-1894, 2001.
- Ogonuki N, Inoue K, Yamamoto Y, Noguchi Y, Tanemura K, Suzuki O, Nakayama H, Doi K, Ohtomo Y, Satoh M, Nishida A, Ogura A, 2002. Early death of mice cloned from somatic cells. *Nat. Genet.*, 30:253-254.
- Onishi A, 2002. Cloning of pigs from somatic cells and its prospects, *Cloning and Stem Cells*, 4:253-259.
- Onishi A, Iwamoto M, Akita T, Mikawa S, Takeda K, Awata T, Hanada H, Perry ACF, 2000. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei, *Science*, 289: 1188-1190.
- Park KW, Cheong HT, Lai L, Im GS, Kuhholzer B, Bonk A, Samuel M, Rieka A, Day BN, Murphy CN, Carter DB, Prather RS, 2001. Production of nuclear transfer-derived swine that express the enhanced green fluorescent protein. *Anim Biotechnol*, 12:173-181.
- Polejaeva IA, Chen SH, Vaught TD, Page RL, Mullins J, Ball S, Dai Y, Boone J, walker S, Ayares DL, Colman A, Campbell KHS, 2000. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells, *Nature*, 407:86-90.
- Ramsoondar JJ, Machaty Z, Costa C, Williams BL, Fodor WL, Bondioli KR, 2003. Production of 1,3-Galactosyltransferase-Knockout Cloned Pigs Expressing Human 1,2-Fucosyltransferase. *Biol. Reprod.* 69:437-445.
- Ronaldo DM, Wu G, Bazer FW, Park JC, Shinzato I, Kim SW, 2007. Dietary L-arginine supplementation enhances the reproductive performance of gilts. *The Journal of Nutrition*, 137:652-656.
- Sharma A, Naziruddin B, Cui C, Martin MJ, Xu H, Wan H, Lei Y, Harrison C, Yin J, Okabe J, Mathews C, Stark A, Adams CS, Houtz J, Wiseman BS, Byrne GW, Logan JS, 2003. Pig cells that lack the gene for alpha-3 galactosyltransferase express low levels of the gal antigen. *Transplantation*, 75:430-436.

- Shibata M, Otake M, Tsuchiya S, Chikyu M, Horiuchi A, Kawarasaki T, 2006. Reproductive and growth performance in Jin Hua pigs cloned from somatic cell nuclei and the meat quality of their offspring. *J Reprod Dev*, 2006:583-590.
- 曾根勝・知久幹夫・吉田光敏・番場公雄・小笠晃, 1992. 各種希釈液を用いた豚液状精液の長期保存試験. *日豚会誌*, 29:41-49.
- Sousa DPA, Dobrinsky JR, Zhu J, Archibald AL, Ainslie A, Bosma W, Bowering J, Bracken J, Ferrier PM, Fletcher J, Gasparrini B, Harkness L, P., Ritchie M, Ritchie WA, Travers A, Albertini D, Dinnyes A, King JTJ, Wilmut I, 2002. Somatic cell nuclear transfer in the pig: control of pronuclear formation and integration with improved methods for activation and maintenance of pregnancy. *Biol Reprod*, 66:642-650.
- Walker SC, Shin T, Zaunbrecher GM, Romano JE, Johnson GA, Bazer FW, Piedrahita JA, 2002. A highly efficient method for porcine cloning by nuclear transfer using in vitro-matured oocytes. *Cloning Stem Cells*, 4:105-112.
- 渡辺伸也・永井卓, 2006. わが国における体細胞クローン牛を対象とした健全性調査の実施状況. *日胚移植学誌*. 9:14-28.
- Williams NE, Walker SC, Reeves DE, Sherrer E, Galvin JM, Polejaeva I, Rampacek G, Benyshek L, Christenson RK, Graves WM, Pratt SL. 2006. A comparison of reproductive characteristics of boars generated by somatic cell nuclear transfer to highly related conventionally produced boars. *Cloning Stem Cells*, 8:130-139.
- Wilmut I, Beaujean N, Sousa PAD, Dinnyes A, King TJ, Paterson LA, Wells DN, Young LE, 2002. Somatic cell nuclear transfer. *Nature*, 419:583-586.
- Yin XJ, Tani T, Yonemura I, Kawakami M, Miyamoto K, Hasegawa R, Kato Y, Tsunoda Y, 2002. Production of cloned pigs from adult somatic cells by chemically assisted removal of maternal chromosomes. *Biol Reprod*, 67:442-446.

# 家畜福祉に配慮した飼育方式におけるケージ収容時の体重斉一化が生産に及ぼす影響

Influence of body weight uniformity and stocking density on the productive performances of laying hens housed in enriched cage.

池谷守司、松井繁幸

要約：EUで普及している巣箱、砂浴び場、止り木、ヤスリ、卵同士の衝突防止装置を備えた家畜福祉に配慮したケージを用いて、収容時の体重斉一化処理がニワトリの生産性に及ぼす影響を調査するため、供試鶏の平均体重をほぼ同じとし、変動係数が小さい区（以下均一区）と大きい区（不均一区）に分け、それぞれをさらに1ケージ当たり8羽、10羽、12羽収容する区（以下8羽区、10羽区、12羽区）と従来の単飼ケージに収容する区（以下1羽区）に分けて比較検討した。その結果、均一区と不均一区では飼育成績に差が見られなかった。これを収容羽数別にみると、1羽区が他の区より飼料消費量が少なく、1羽当たり粗収益は1羽区が12羽区より優れたが、8羽区と10羽区では1羽区と差が見られなかった。破卵・傷卵の発生割合は全産卵数の0.7%であった。

以上から家畜福祉に配慮したケージで飼育する場合、8羽もしくは10羽収容すればケージ収容時における体重の斉一化は重要な要因にならず、破卵・傷卵の発生割合もさほど多くなかった。

(静岡畜技研中小研セ研報 1, 31~36, 2007)

## はじめに

現在、我が国の大部分の養鶏場における飼育形態は、単位面積当たりの収容羽数を高めて飼育するいわゆる高密度飼育が主流である。最近、このような生産性のみを重視した飼育法とは異なり、ニワトリの福祉に配慮する飼育法に関心が高まりつつある。なかでもEUでは一羽当たりの飼育面積に下限を設けるとともに、止り木や砂浴び場を備えた家畜福祉に配慮したケージが製造販売されている。しかし、我が国では家畜福祉に配慮したケージの生産性や飼育上の課題を明らかにした報告例は数少ない。そこで、前報ではEUで普及している家畜福祉に配慮したケージを用いて、悪癖の発生防止を目的に遮光処理を施して生産性や飼育特性について検討した結果、生産性について従来の単飼ケージで飼育する方式と差がないことを報告した（池谷ら2006）。また、一般的には、育成期においては鶏群の体重斉一化が行われている（飯田ら

1984：今枝ら1984）。今回は、ケージ収容時の体重の斉一化がその後の生産性や破卵・傷卵の発生割合等に及ぼす影響を調査した。

## 方 法

試験には写真1に示すとおり1ケージが奥行60cm×間口120cm×高さ50cmで、ケージ床

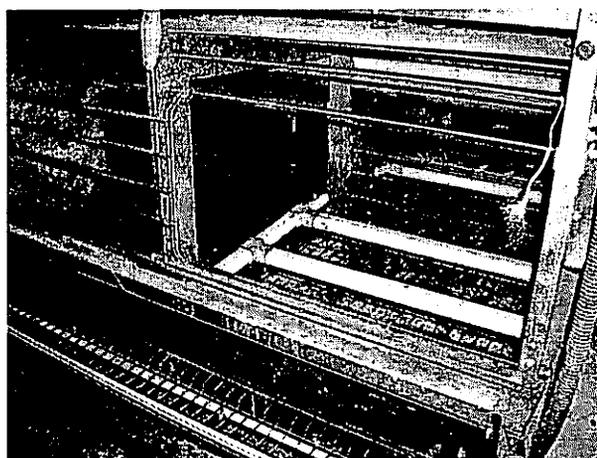


写真1 家畜福祉ケージ

面上に止まり木を備えた部分と砂浴び場と巣箱を兼ね備えた部分で構成される HELLMANN 社製の家畜福祉に配慮した飼育ケージ（ユーロモデル）を用いた。またこのケージには、ケージの内側前面に幅 2.5cm、長さ 15cm、厚さ 5 mm の金属製のヤスリがあり、卵受け部にはワイヤーが横方向に張られ、産卵時に卵同士の衝突による破卵・傷卵の発生防止装置も備えられている。なお対照としては、同一鶏舎内に設置してある奥行 40cm×間口 22.5cm×高さ 45cm の単飼ケージを用いた。試験鶏を収容する鶏舎は間口 3.6m、奥行き 32m の開放鶏舎で、側面はガラス戸で外光を採光している。このガラス戸の外面に隙間を空けてベニヤ板を交互に貼り合わせ、空気の流通ができるように遮光処理を施した。

供試鶏は 2006 年 5 月 26 日餌付けの褐色卵系 コマーシャル (B) 240 羽で、1 週齢時にデビューを実施し、当場の慣行に従い飼育管理をした後、120 日齢時に体重を測定した。121 日齢時に供試鶏の平均体重をほぼ同じとし、変動係数が小さい区（以下均一区）と大きい区（不均一区）に分け、それぞれをさらに一ケージ当たり

8 羽、10 羽、12 羽収容する区（以下 8 羽区、10 羽区、12 羽区）と従来の単飼ケージに収容する区（以下 1 羽区）に分けて家畜福祉に配慮したケージに収容した。試験区分としては表 1 に示すとおりである。

その後 2007 年 7 月 19 日（420 日齢）までの 280 日間、生産性、卵殻質、破卵・傷卵の発生割合、体重、ストレスの指標として血液中の偽好酸球とリンパ球の比率等を調査した。生産性のうち一羽当たり粗収益は以下の方法で行った。すなわち、各区分に 2 週間隔で 1 日に産卵した全ての卵重を測定して規格サイズ別に分類し、これを調査終了後に合計して規格サイズ別個数を求め、この数値を元に調査期間内の総産卵数を規格別に分類した値を求めた。その後、2006 年 1 月から 12 月までの東京市場サイズ別卵価から収入を、また飼料単価を 58 円/kg として実際の飼料消費量から飼料費を求め両者の差から収益性を求めた。

## 結 果

収容時及び終了時体重を表 2 に示した。開始

表 1 試験区分

区分	収容羽数	収容ケージ	供試羽数
均一区	8羽区	家畜福祉に配慮したケージ	3反復 24羽
	10羽区	〃	〃 30羽
	12羽区	〃	〃 36羽
	1羽区	単飼（間口22.4cm）ケージ	〃 30羽
不均一区	8羽区	家畜福祉に配慮したケージ	3反復 24羽
	10羽区	〃	〃 30羽
	12羽区	〃	〃 36羽
	1羽区	単飼（間口22.4cm）ケージ	〃 30羽

均一区：家畜福祉に配慮したケージ収容時の平均体重1453.3±

不均一区：家畜福祉に配慮したケージ収容時の平均体重1453.6

表 2 体重

区分	収容羽数	(平均±標準偏差)	
		開始時(g)	終了時(g)
均一区	8羽区	1,456±22.6	2,119±222.0
	10羽区	1,453±22.3	2,227±132.9
	12羽区	1,451±23.1	2,181±206.9
	1羽区	1,454±22.3	2,111±247.3
不均一区	8羽区	1,462±139.0	2,157±301.7
	10羽区	1,448±129.5	2164±225.0
	12羽区	1,445±131.4	2,113±218.9
	1羽区	1,453±131.5	2,128±238.6
分散分析結果	区分	n. s	n. s
	収容羽数	n. s	n. s

時にはほぼ同じとした平均体重は終了時に増加したが、均一区と不均一区間に差は認められず、収容時体重の斉一化の影響は見られなかった。これは均一区と不均一区をプールして収容羽数別に見ても同じであった。

産卵成績を表3、4に示した。すべての調査項目について均一区と不均一区間に差は認められず、収容時体重の斉一化の影響は見られなかった。均一区と不均一区をプールして収容羽数別に見ると、平均卵重は1羽区が8羽区より小さな値を示した。飼料消費量は前報と同様1羽区

が他の区より少なく、飼料要求率でも1羽区が優れた。また、卵重のサイズ別割合を表5に示した。卵価の高いLとMとMSサイズの合計が1羽区で最も多くなり、1羽当たり粗収益は1羽区が12羽区に比較して優れた。

卵殻質に関する諸形質の成績を表6、7に示した。すべての調査項目で産卵成績と同様に均一区と不均一区間に差は認められず収容時体重の斉一化の影響は見られなかった。均一区と不均一区をプールして収容羽数別に見ると卵黄色では8羽区のカラーファンの値10羽区、1羽

表3 産卵成績

区分	収容羽数	産卵率 (%)	平均卵重 (g)	産卵日量 (g)	飼料消費量 (g/羽/日)	飼料要求率	生存率 (%)	一羽粗収益 (円/羽)
均一区	8羽区	87.7	62.5	54.8	110.3	2.01	100	948
	10羽区	88.0	62.1	54.6	111.8	2.04	100	904.9
	12羽区	85.9	61.6	52.9	111.4	2.11	95.9	844.2
	1羽区	87.3	61.1	53.3	103.7	1.95	96.7	999.4
不均一区	8羽区	86.6	62.6	54.2	110.9	2.05	100	926.1
	10羽区	88.2	62.3	54.9	110.4	2.01	100	975
	12羽区	87.2	61.7	53.6	108.9	2.04	97.2	1001.5
	1羽区	89.2	60.7	54.4	106.6	1.96	100	1020
分散分析結果	区分	n. s	n. s	n. s	n. s	n. s	n. s	n. s
	収容羽数	n. s	*	n. s	*	*	n. s	*

表4 体重斉一化処理区分をプールした場合の産卵成績

収容羽数	産卵率 (%)	平均卵重 (g)	産卵日量 (g)	飼料消費量 (g/羽/日)	飼料要求率	生存率 (%)	一羽粗収益 (円/羽)
8羽区	88.1	62.5a	54.5	110.6a	2.03a	100	937.1
10羽区	86.7	62.2	54.7	110.9a	2.03a	100	961
12羽区	88.3	61.7	53.3	109.9a	2.06a	96.7	896.8b
1羽区	87.2	60.9b	53.9	105.2b	1.95b	98.3	1009a

異符号間に5%水準で有意差あり

表5 卵重のサイズ別割合 (%)

	LL	L	M	MS	S	SS	規格外	L+M+MS
8羽区	7.8	30.9	43.3	15.1	1.9	0.1	0.8	89.4
10羽区	4.5	28.5	44.8	17.2	3.0	0.2	1.9	90.5
12羽区	5.3	28.6	45.6	17.4	2.2	0.2	0.8	91.5
1羽区	4.0	23.4	45.6	23.2	3.3	0.2	0.4	92.2

表6 卵殻質に関する成績

区分	収容羽数	卵殻強度 (kg)	卵黄色	卵殻厚 (.01mm)	ハウユニット	単位面積当たり卵殻重量 (mg/cm)
均一区	8羽区	3.4	12.5	37.3	88.9	78.9
	10羽区	3.6	12.1	37.6	88.2	79.8
	12羽区	3.2	12.2	37.0	85.6	78.5
	1羽区	3.6	12.3	37.5	86.6	79.7
不均一区	8羽区	3.4	12.4	37.4	86.7	78.7
	10羽区	3.6	12.2	37.7	87.8	79.7
	12羽区	3.6	12.3	38.6	85.9	80.8
	1羽区	3.2	12.2	36.2	87.5	76.7
分散分析結果	区分	n. s	n. s	n. s	n. s	n. s
	収容羽数	n. s	*	*	n. s	*

表7 体重斉一化処理区分をプールした場合の卵殻質成績

收容羽数	卵殻強度 (kg)	卵黄色	卵殻厚 (.01mm)	ハウユニット	単位面積当たり 卵殻重量 (mg/cm)
8羽区	3.4	12.5a	37.3	87.8	78.8
10羽区	3.6	12.1b	37.6a	88.1	79.8a
12羽区	3.4	12.3	37.8a	85.9	79.6
1羽区	3.4	12.2b	36.9b	87.1	78.2b

異符号間に5%水準で有意差あり

区より有意に大きく、卵殻厚では10羽区、12羽区が1羽区より有意に厚く、単位面積当たり卵殻重量では10羽区が1羽区より有意に大きな値を示した。

調査期間内における破卵・傷卵の発生割合を表8に示した。1羽区では全期間を通じて全く破卵・傷卵の発生が見られなかったが、8羽区、10羽区、12羽区では群飼育であるため0.03から0.16%と範囲で破卵と傷卵の発生が見られた。またこれを、1ケージ内で巣箱及び止り木による部位別の発生数としてみたものを図1に示した。巣箱及び止り木による部位別の発生個数では8羽区を除いて巣箱側より止り木側に多く見られた。

元来、当該ケージでの産卵割合は巣箱側が多いことを考慮し、前々報で報告した部位別の産卵数のデータを基に、今回の総産卵個数を巣箱側と止り木側の部位別に割り当て、その値に対する今回の破卵・傷卵の発生割合の推定値を図2に示した。その結果、ケージの部位別の破卵・傷卵の発生割合は止り木側で明らかに多かった。

試験終了時における偽好酸球とリンパ球の比率を示すH/L比を表9に示した。産卵成績と同様に均一区と不均一区間に差は認められず収

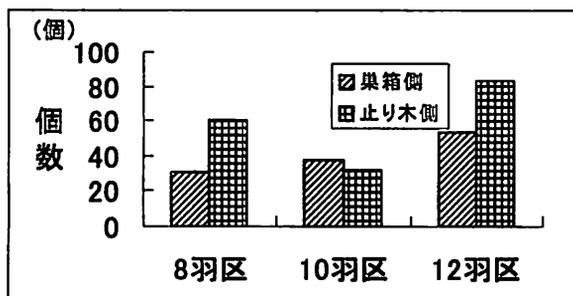


図1 ケージ部位別の破卵・傷卵の発生個数

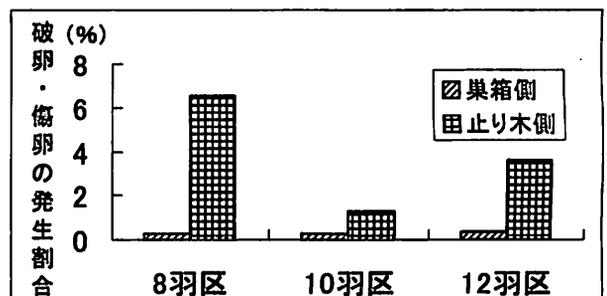


図2 ケージ部位別の産卵数から推測した破卵・傷卵の発生割合(推定値)

表8 卵重のサイズ別割合 (%)

区分	收容羽数	割合 (%)
均一区	8羽区	0.16
	10羽区	0.13
	12羽区	0.2
不均一区	1羽区	0
	8羽区	0.05
	10羽区	0.03
	12羽区	0.11
	1羽区	0
分散分析	区分	n. s
結果	收容羽数	n. s

表9 H/L比

区分	收容羽数	H/L比
均一区	8羽区	0.46±0.18
	10羽区	0.69±0.26
	12羽区	0.53±0.13
不均一区	1羽区	0.68±0.18
	8羽区	0.64±0.25
	10羽区	0.52±0.44
	12羽区	0.55±0.21
	1羽区	0.47±0.23
分散分析	区分	n.s
結果	收容羽数	n.s

容時体重の斉一化の影響は見られなかった。

### 考 察

E Uを中心として、(1) 飢えと乾きからの解放、(2) 不快からの解放、(3) 痛み・損傷、疾病からの解放、(4) 正常な行動を発現する自由、(5) 恐怖と苦悩からの解放といった5つの自由または解放の考え方を反映し基準が定められた家畜福祉に配慮した飼育方法の考え方が広まりつつある(佐藤1992:近藤2000:植竹2004:Barnett et al 1997)。この中ではニワトリに対して一羽当たりの占有面積が750cm<sup>2</sup>以上で巣箱と止り木を設置したケージか1m<sup>2</sup>

当たり9羽以下で巣箱と止り木を設けた飼育方法で飼育されることが求められている。しかしわが国における飼育方法はウィンドウレス鶏舎での高密度飼育が主流であり、家畜福祉の考え方は、やがて広く浸透するものと思われるが、事前に家畜福祉ケージの生産性や、飼育場の問題点を明らかにすることが必要であると思われる。

前々報（池谷ら2005）及び前報（池谷ら2006）においては、開放鶏舎に遮光処理をすることで、悪癖の発生防止が図られ、生産性にも従来の単飼ケージで飼育した区と差が見られないこと、巣箱側での産卵が多く見られること、羽毛のダメージは収容羽数の増加とともに大きくなること等を報告した。一般的には群飼育をする場合は収容する鶏の体重を揃えて鶏同士の競争を少なくする飼育が行われている。今回、収容時の体重齊一化が当該飼育方式での生産性に及ぼす影響を調査したが、産卵成績、卵殻質、破卵・傷卵の発生割合、H/L比等すべての調査項目において均一区と不均一区で成績に差が見られなかった。このことは、間口24cmのケージに単飼及び複飼で飼育した場合、収容体重の差が鶏の生産性に及ぼす影響はなく、鶏種の差が大きいたる報告（佐々木ら1993）と同様の成績が得られた。しかし、佐々木らはこの報告の中でケージ内に収容する鶏の体重齊一化が生産性向上のポイントとしている。同様に、収容時の体重については言及していないものの間口22.5cm、奥行39cmケージに単飼及び複飼で飼育した場合産卵性に差が見られないとする報告（茅野ら1981）とも同様の結果となった。今回は収容時の体重のバラツキをできる限り少なくしてみたが、鶏の改良が進んだ現時点においても生産性に差が見られなかった。また今回は120日齢時の体重を基準として収容時の体重の均一化を図った。この理由は、当該ケージには、巣箱の上面に砂浴び場が設置してあるが、前々報、及び前報では砂浴び場を利用する鶏はごくわずかししか観察されなかったため、収容日齢を産卵開始前にして砂浴び場を利用する鶏を増やすことを併せて調査するためであった。しかし、結果として砂浴び場を利用する鶏はほとんど観察されなかった。この理由は供試鶏の体

重が白レグ種に比較して大きく、高い位置にある砂浴び場まで飛び上がるのが不得手であるためと思われた。

従って、以後は均一区、不均一区をプールした収容羽数に関して考察を進めることとする。

産卵成績については前報告と同様に1羽区は飼料消費量が他の区より多く、飼料要求率も他の区より優れた。1羽当たりの収益性は1区が優れたが、これはサイズ別に収益性を比較した結果であると思われる。すなわち、現在の卵の価格構成はM、MSサイズを中心としたテーブルエッグの価格が高く、これらのサイズを多く産卵する鶏種は収益が高くなる。従って今回の試験においても1羽区のMとMSサイズ割合が他の区より多いため、平均卵重が軽かったにもかかわらず収益性に優れたものと思われる。

卵殻質に関しては、卵黄色では8羽区のカラファン値10羽区、1羽区より有意に大きく、卵殻厚では10羽区、12羽区が1羽区より有意に厚く、単位面積当たり卵殻重量では10羽区が1羽区より有意に大きな値を示したことから、飼料消費量が多いことにより卵黄色と卵殻厚に差が生じたものと思われる。

破卵・傷卵の発生個数は均一区と不均一区で差が見られず、収容羽数による差も見られなかった。また全産卵個数に対する割合は均一区で0.5%、不均一区で0.2%であったが、統計的な差は認められなかった。均一区の発生割合が大きかった原因は、特定のケージに破卵・傷卵の発生が多かったことによるものである。一般的なウィンドウレス鶏舎での破卵率に関して、500日齢までの調査では破卵率が1.5%で、450日齢を過ぎると2%を越えると報告している（田村ら1984）。また、卵と卵が連なり型を示したケージでは破卵率が増加することが報告されている（大塚1986）。今回の調査では420日齢時までであるが、破卵・傷卵の発生は少なく、1ケージ当たりに8羽から12羽を収容しても破卵・傷卵の発生はさほど多くないと推測され、破卵・傷卵の発生対策として当該ケージに設置されたエッグセーバーによる効果と思われた。元来、当該ケージでの産卵割合は巣箱側で多いことを考慮し、前々報で報告した部位別の産卵数のデータを基に、今回の総産卵個数を巣箱側

と止り木側の部位別に割り当て、その値に対する今回の破卵・傷卵の発生割合の推定値では、ケージの部位別の破卵・傷卵の発生割合は止り木側で明らかに多かった。この原因は巣箱側のケージ上には人工芝様のマットが敷いてあるのに対し、止り木側ではそれがなかったためであり、止り木側で観察された破卵・傷卵の発生原因は、放卵時にケージ面に衝突してできる傷卵であった。

試験終了時に血液中のH/L比を測定したが、差は見られなかった。H/L比に関しては、鶏においてストレス判定指標としての有効性が報告されている(小野1999)。今回の調査結果から、H/L比に差が見られなかったのは、ケージ収容後に長期間を経過し、鶏が飼育環境に慣れたためと思われる。

以上から家畜福祉に配慮したケージで飼育する場合、8羽もしくは10羽収容すればケージ収容時における体重の斉一化は重要な要因にならず、破卵・傷卵の発生割合もさほど多くなかった。

## 参考文献

- Barnett.J.Land Newman E.A.1997, Review of welfare research in the laying hen and the research and management implications for the Australian egg industry.Aust.J. Agric.Res., 48, 385-402.
- 飯田哲也・佐々木茂明・伊能林平. 1984, 採卵鶏の育成技術改善に関する試験(性成熟と育成体重). 千葉県畜産センター研報, 8:25-33.
- 池谷守司・岩澤敏幸・鈴木滋・辻岡孝. 2005, 家畜福祉ケージの生産性と群飼育下での強制換羽処理. 静岡中小試研報, 16:43-47.
- 池谷守司・岩澤敏幸・小松正夫. 2006, 低照度下における鶏の家畜福祉ケージシステムの生産性と飼育特性. 静岡中小試研報, 17:41-46.
- 今枝紀明・目加田博行・海老沢昭二. 1984, 採卵鶏の体重別産卵能力と育成期の体重調整が産卵に及ぼす影響. 岐阜種鶏研報, 31:13-19.
- 近藤誠司. 2000, Animal welfare と畜産. 畜産の研究, 54:121-125.
- 黒崎順二. 1986, 家畜の行動(14). 畜産の研究, 40:337-340.
- 小野浩臣. 1999, 産業動物における抗ストレス用薬の必要性和その応用(27). 畜産の研究, 53:1325-1330.
- 大塚茂. 1986, ケージ内における破卵発生機構の解明. I. 集卵回数と卵同志の衝突破卵について, 家禽会誌, 23:157-161.
- 佐々木健二・出口祐二・西口 茂・水野隆夫, 1993, 卵用鶏の成鶏ケージ収容方法に関する試験(第1報), 三重県農業技術センター試験成績報告書(畜産) 29-41.
- 佐藤衆介. 1992, 家畜福祉と家畜生産. 畜産の研究, 46:237-245.
- 植竹勝治. 2004, 欧州連合並びに英国における動物福祉に関する規制の現状と研究の動向. 日畜会報, 5:493-512.

# モウソウチク由来の生理活性資材の開発と その応用に関する研究（第1報）

## Seeking of biologically active substances in bamboo silages! And their application to feeding on broiler chicks

岩澤敏幸<sup>\*</sup>、松井繁幸、横越英彦<sup>1)</sup>、蔡 義民<sup>2)</sup>、大石誠一<sup>3)</sup>

要約：畜産草地研究所の保有乳酸菌株である、畜草1号菌とRO50菌を用いてサイレージ調製を行い、天然由来付着乳酸菌サイレージとの品質比較を行った。その結果、畜草1号菌とRO50菌添加区では、竹粉は速やかな良質サイレージ化が可能であり、さらにRO50菌添加区においてGABA（ガンマーアミノ酪酸）が多く産生されることが示された。各種サイレージを飼料に添加し調査を実施したところ、経済性調査では各区に差は認められなかった。肉質調査では、対照区に比べ、a値（赤色度）が増す傾向が示された。血液成分分析では、サイレージ添加区で対照区に比べ血中総コレステロール値、血中トリグリセライドにおいて減少傾向が示された。特にRO50区において減少が大きかった。液性免疫増強効果においては、RO50株による資材で通常区に比べ有意に高い値を示した。細胞性免疫増強効果では、畜草1号株にて高い傾向を示したが各区に有意差は認めなかった。鶏肉アミノ酸分析では、むね肉においてRO50区で旨味成分であるグルタミン酸等が増加傾向を示し、タウリンは有意に増加した。肉の歯ごたえを知る指標である破断強度測定ではむね肉においてRO50区で対照区に比べ高い強度を示し、区間に有意差を認めた。

（静岡畜技研中小研セ研報 1, 37~43, 2007）

### はじめに

竹は日本でも数少ないリサイクル可能な資源であるが、プラスチックの普及・タケノコの海外からの輸入増大等に伴い利用されない資源となったばかりでなく、繁殖力の強さゆえ植物相への悪影響や地滑りなどの自然破壊を引き起こしている。これまで、各地においてその農業・畜産利用技術につき検討されてきたが、素材が強度な繊維質であることから、大量消費につながる有効な利用法を確立するには至っていない。当研究センターでは、平成14年度に本県メーカーによって開発された竹繊維がささくれだつことのない、生竹超微粉末製造装置に着目し、15年度から研究に取り組み、これまでに成果を報告してきた（岩澤ら2005、大谷ら2004・2007）。平成18年度には農林水産省研究事業である先端技術を活用した農林水産研究高度化事

業にも採択された。今回、これまでの基礎的データに基づき、新たな乳酸菌によるモウソウチク由来の生理活性資材の開発と家畜飼養管理技術の確立及び機能性成分を有する鶏肉の作出を目的として、各種調査、研究を実施した。

### 材料及び方法

#### 1. 添加資材の違いによるサイレージ品質の検討

##### 1) 試験設定および品質検査

供試材料は、1年生のモウソウチクを5月上旬に地面から1m付近で伐採し、直ちに微粉末製造機（丸大鉄工株式会社・静岡）にて粉碎処理（粒度100ミクロン）した新鮮な生竹粉末（水分含量46%）を用いた。

試験区は、モウソウチク生粉末現物500gを茶葉の保存用袋（アルミガゼット袋・ヤナギ株式会社・愛知）に充填し、脱気密封した天然由

（※：現静岡県立農林大学校、1：静岡県立大学、2：（独）農業・食品産業技術研究機構畜産草地研究所、3：丸大鉄工株式会社）

来付着乳酸菌サイレージ区、生粉末に、畜産草地研究所の保有乳酸菌株である、畜草1号菌またはRO50菌を添加した、畜草1号サイレージ区、RO50サイレージ区とした。畜草1号は乳酸生成能が優れる乳酸桿菌であり、RO50菌株は2種バクテリオシンを生成する乳酸球菌である。

竹サイレージ発酵品質鑑定は、貯蔵期間60日目に行い、乾物量、有機酸及びアンモニア態窒素含量を測定した。また、竹サイレージの発酵過程における遊離アミノ酸量を測定した。さらに竹サイレージの物理性変化の一指標として、抱水力(WHC)試験を実施した。

pHは、試料10gに蒸留水90mlを加えてよく攪拌してから4℃冷蔵庫で12時間放置した後、この抽出液を濾過し、ガラス電極pHメーターを用いて測定した。有機酸は、抽出液をイオン交換樹脂(Amberlite IR120RH+、東京有機化学工業株式会社、東京)で処理して高速遠心分離(12,000rpm×5分間)し、その上澄み液をフィルターで濾過してから高速液体クロマトグラフによって分析した。各材料における遊離アミノ酸量の測定については全自動アミノ酸分析装置(日本電子JLC-500/V)により測定した。抱水力は、各種資材1gをサンプルチューブに分注し、蒸留水8mlと混合、30分間静置後、遠心分離(3,000rpm×15分間)し、上澄み液を除去後、残渣量により測定した。

## 2. 肉用鶏における給与試験

### 1) 試験期間及び試験区分

試験は2006年9月から11月までの50日間で、供試鶏はブロイラー(チャンキー種)50羽(雌50羽)で、経済性調査用20羽2反復についてはウインドレス鶏舎にて、免疫増強効果判定用10羽についてはケージ鶏舎にて50日齢まで飼育した。当センターブロイラー通常飼育用飼料(以下対照区飼料)に、天然由来付着乳酸菌サイレージ、畜草1号サイレージ、RO50サイレージをそれぞれ2.5%添加し効果を検証した。対照区飼料は、3週齢まではブロイラー前期用(CP23.8%、ME3,070Kcal/kg)、以後出荷までブロイラー仕上げ用(CP20.0%、ME3,160Kcal/kg)を給与した。ワクチンは中小

家畜研究センター防疫管理マニュアルにより接種した。なお、サイレージについては、前記品質調査用と同時期に調製したサイレージ(60日)を使用した。調整後のサイレージ保存については5℃冷蔵庫にて行った。

### 2) 試験方法

#### (1) 発育調査及び肉色の評価

発育調査は、各区雌20羽で2反復とした。概ね2週間毎に出荷まで全羽体重を測定し、同時に区毎の飼料摂取量を測定した。経済調査として、育成率、増体、飼料摂取量、生産指数等につき算定した。と体調査は各区10羽につき50日齢にて解体調査を実施した。測定項目は、と体重、もも肉、胸肉重量及び可食内臓重量、腹腔脂肪とした。肉色の評価は、各区10羽の胸肉及びもも肉について行い、色彩測定機[東京測定(株)]を用いて肉色のL値(明度)、a値(赤色度)及びb値(黄色度)を測定した。

#### (2) 一般血液性状の測定

ウインドレス鶏舎にて飼育されたブロイラーにつき、解体前日に、各区10羽の翼下静脈から血液採取したものを、3,000回転15分間遠心分離し、得られた血清について、臨床化学自動分析装置(CL-8000島津製作所)を用いて血中総コレステロール値、血中トリグリセロイド値、血中HDLコレステロール値を測定した。

#### (3) 免疫反応に関する調査

①抗体検査では、ヒツジ赤血球凝集抗体価及びブルセラ・アボルトス(BA)凝集抗体価を測定した。方法は、10%のヒツジ赤血球と2%のBA菌液を等量混合し、その0.1mlを2及び3週齢に翼静脈内に接種し、採血は3、5、6週齢に行った。なお、試験には各区10羽(雌雄各5羽)を供試した。検体を96穴マイクロプレートにて調製し、ヒツジ赤血球およびBAに対する凝集素力価を測定した。成績は凝集陽性を示す血清の最終希釈倍数の逆数のLog<sub>2</sub>として表示した。

②遅延型過敏反応は、ヒトγグロブリン接種による腫脹差で判定した。方法は4週齢時に前感作として、ヒトγグロブリン(シグマ社製)を400μg/ml(生理食塩水)に調製後、アジュバント・コンプリート・フロインド(ディフコ社製)を等量混合した。次に各2ヶ所の胸部筋肉

及び大腿筋肉内各2ヶ所に混合液を0.25mlずつの計1mlを接種した。そして、6週齢時にヒトγグロブリン [400 μg/ml (生理食塩水)] を左肉垂、生理食塩水を右肉垂に0.1mlずつ皮内接種し、24、48及び72時間後にノギスで左右の腫脹差を測定した。なお、試験には各区10羽（雌雄各5羽）を供試した。

#### (4) アミノ酸成分の分析

竹サイレージを加えることによる肉のアミノ酸成分の変化につき調査を行った。調査は各区の試験鶏5羽を解体し、それぞれむね肉ともも肉につき、含有量を全自動アミノ酸分析装置（日本電子 JLC-500/V）により測定した。

#### (5) 破断力の測定

竹サイレージを加えることによる肉の破断力（噛み切るのに必要な力の指標）を測定した。調査は各区の試験鶏5羽を解体し、それぞれむね肉及びもも肉を加熱料理後、肉を1×1cmのスティック状に整形し、(株)山電クリープメーターを用いて、破断力を測定した。

#### (6) 鮮度指標（K値）の測定

竹サイレージを加えることによる肉の鮮度保持能力の変化につき鮮度指標（K値）を用い調査を行った。調査は各区の試験鶏5羽を解体

し、それぞれむね肉及びもも肉につき各5gを過塩素酸にてホモジナイズし、室温で3000rpm・10分間遠心分離後、上清につき、HPLC（島津20Aシリーズ）を用い、イノシン及びヒポキサンチン量を測定した。

## 結 果

### 1. 添加資材の違いによるサイレージ品質の検討

サイレージ化に必要な最適温度、貯蔵期間については、これまでに竹粉由来の乳酸菌では、25℃、90日以上と報告（大谷ら2007）しているが、畜草1号とRO50菌株添加区では速やかな乳酸生成によるpHの低下が認められ、竹由来株によるサイレージ化よりも短期間での良質サイレージ調製が可能な事が示された（表1）。竹にはさまざまな生理活性物質が含まれることが知られている（安藤ら2003、逸見ら1996）。今回の添加試験におけるサイレージ発酵の過程では、特にRO50菌株の添加により鎮静効果や血圧降下などの効果があるGABA（ガンマーアミノ酪酸）や遊離アミノ酸が多く生産されることが示された（表2）。物理性試験においては、対照区に比べ、サイレージ区において高い

表1 竹サイレージの発酵品質（貯蔵後60日目）

添加資材	乾物率(%)	pH	有機酸含量(新鮮物%)				NH3-N (g/kg)
			乳酸	酢酸	プロピオン酸	酪酸	
天然由来	41.84	4.54	0.39	0.40	0.00	0.02	0.10
畜草1号	41.18	3.91	1.07	0.45	0.00	0.00	0.05
RO50	32.25	4.14	0.84	0.56	0.00	0.00	0.09

NH3-N：アンモニア態窒素

表2 サイレージ化に伴うアミノ酸組成の変化

	Thr	Glu	Gly	Ala	Ile	Leu	Tyr	GABA	Lys	Arg
生竹粉	2.5	4.2	8.0	27.7	9.6	15.9	7.6	43.6	10.8	8.7
天然由来 サイレージ	6.8	5.0	19.8	67.6	33.8	59.5	32.9	91.7	22.1	4.1
RO50菌株 サイレージ	4.4	1.6	96.3	333.4	109.2	166.7	72.7	711.9	10.3	10.0
畜草1号 サイレージ	5.7	6.8	20.8	62.0	31.1	57.6	27.2	108.8	31.9	34.5

遊離アミノ酸量 (mg/100g)

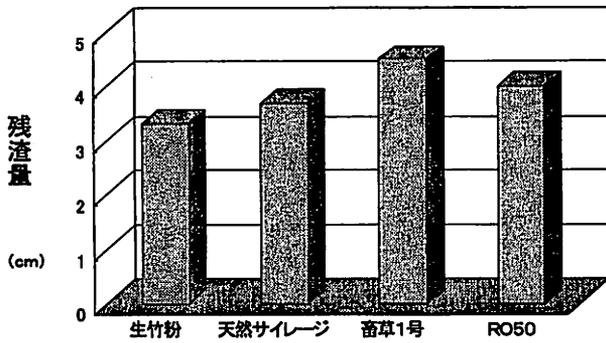


図1 サイレージの物理性 (抱水力)

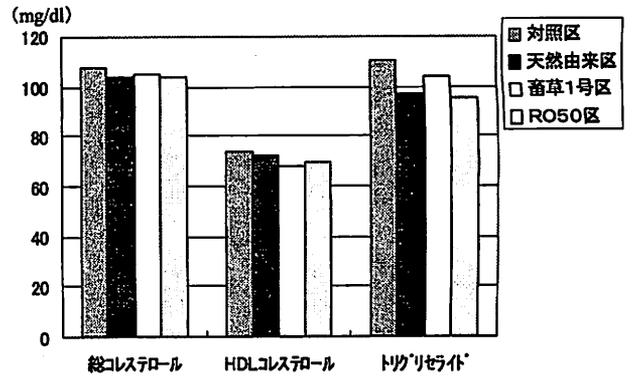


図2 血液性状 (血中脂質)

抱水力を示し、特に畜草1号添加区において最も高い値を示した (図1)。

## 2. 肉用鶏における給与試験

### (1) 発育調査及び肉色の評価

発育成績では、出荷体重・飼料要求率・育成率・生産指数においては、対照区が良好な値だったが、各区に差は認められなかった (表3)。と体成績においても差は認められなかった。肉色の評価においては、もも肉において対照区に比べ、天然由来区及びRO50区でa値 (赤色度) が高い値を示したが、有意差は認められなかった。

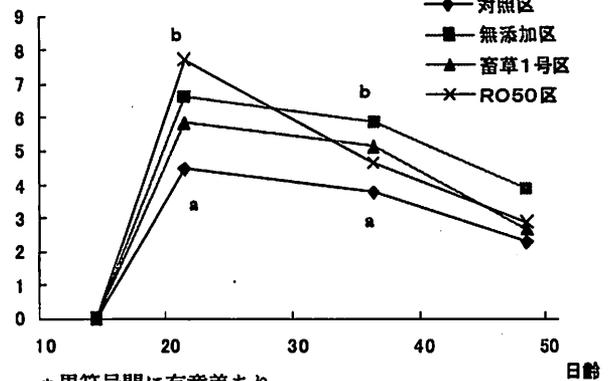
### (2) 一般血液性状の測定結果

血液中の総コレステロール値では、対照区に比べサイレージ区で減少する傾向を認めたが、有意差は認められなかった。HDLコレステロール、トリグリセリドにおいてもサイレージ区で低い傾向が見られたものの有意差は認められなかった (図2)。

### (3) 免疫反応に関する調査

① T細胞依存性液性免疫能の指標である、ヒツ

### 抗体価 (2 $\nu$ )



\* 異符号間に有意差あり

図3 液性免疫効果の推移 (T細胞依存性)

ジ赤血球の抗体価に関しては、対照区に比べ抗原接種1週後のピークはサイレージ区のいずれの区も高く、特にRO50添加区では、対照区に比べ有意に高い値を示した。また抗体価の持続も認められた (図3)。T細胞非依存性液性免疫能の指標であるブルセラ・アボルトスの抗体価では、天然由来乳酸菌添加区及び畜草1号添加区では対照区とほぼ同程度のピークを示し、持続性も同程度であったが、RO50添加区では、

表3 プロイラー発育成績

区分	羽数 (羽)	体重 (g)	飼料要求率	育成率 (%)	生産指数
対照区	40	3,189	1.78	100	366
無添加区	40	3,159	1.8	100	358
畜草1号区	40	3,156	1.81	100	356
RO50区	40	3,131	1.81	100	353

\* 生産指数 (出荷体重×育成率) ÷ (出荷日齢×飼料要求率) × 100

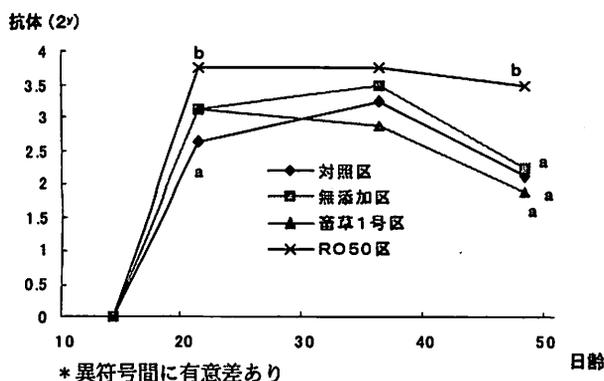


図4 液性免疫効果の推移（T細胞非依存性）

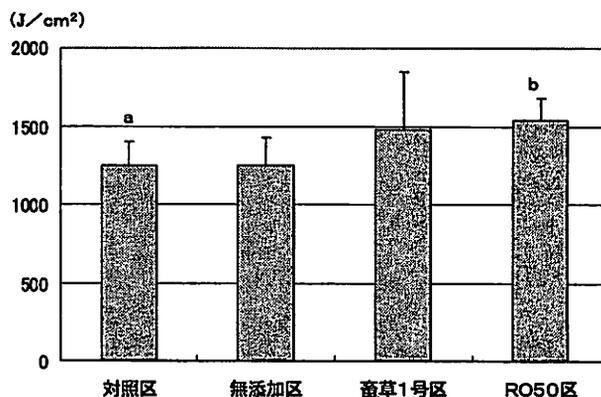


図6 むね肉破断強度

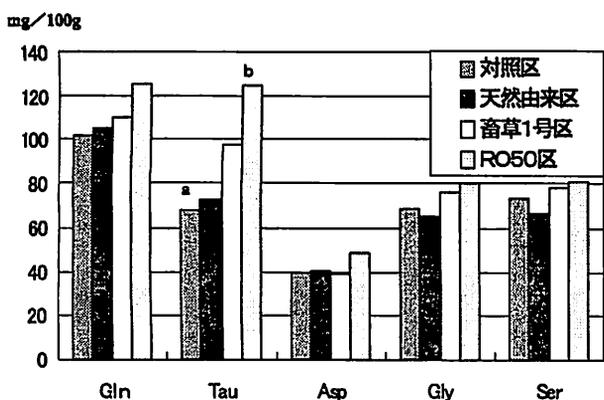


図5 むね肉遊離アミノ酸含量

### (5) 破断力の測定

破断強度測定は、むね肉において各サイレージ摂取により破断エネルギーが大きくなる傾向が見られた。特にRO50添加区において対照区に比べ有意に高い値を示した（図6）。もも肉においては、添加による変化は認められなかった。

### (6) 鮮度指標（K値）の測定

鮮度指標であるK値では、むね肉において、各添加区で高くなる傾向が見られたが、差は認められなかった。もも肉では添加による変化は認められなかった。

## 考 察

近年の全国各地における放置竹林の拡大は、植物相への悪影響、地滑りなどの自然破壊等の深刻な問題を起こしており、根本的な解決が望まれている。また国及び各県において、環境に配慮した持続可能な農林水産業の推進が大きな柱となっており、資源に乏しいわが国においてタケは数少ないリサイクル可能な無尽蔵な未利用資源であることより、その活用も大きな課題に位置づけられ、施策展開、各種利用研究に取り組んでいる。このような背景を受け、平成17年度から先端技術を活用した農林水産研究高度化事業として、（独）森林総合研究所四国支所を中心にした「タケ資源の持続的利用のための竹林管理・供給システムの開発」が開始された。これに続き、18年度より当センターを中心として、「モウソウチク由来の生理活性資材の開発とその応用に関する研究」が採択され、

対照区に比べ高いピークを示すとともに、持続性においては他の区に比べ有意に高い値を示した（図4）。

②細胞性免疫能の指標である肉垂の腫脹による遅延型過敏反応においては、畜草1号添加区において対照区よりも高い値を示したが有意差は認めなかった。また、天然由来乳酸菌添加区及びRO50添加区では、対照区とほぼ同程度の腫脹差を示し、接種後の腫脹差は24時間後にピークを示し、時間の経過に伴い小さくなった。

### (4) アミノ酸成分の分析

各種遊離アミノ酸を測定した結果、むね肉のグルタミン酸含量が各サイレージ摂取区において増加する傾向がみられた。特にRO50添加区で最も増加した。またタウリンにおいても同様な変化が見られ、RO50添加区と対照区との間に有意差を認めた。RO50添加区ではアスパラギン酸が増加する傾向を示した（図5）。その他のアミノ酸含量は対照区と同程度であった。なお、もも肉における遊離アミノ酸含量には添加による変化は見られなかった。

試験が開始された。

当センターでは、これまでに、本県メーカーが開発した「生竹超微粉末製造装置」を用い、タケの畜産利用に取り組んできた。その結果、生竹に付着する乳酸菌群を活かした嗜好性の高いサイレージ化に成功し、長期保存法を確立し、また、鶏飼育試験では、適正給与では経済性に影響がなく、肉質改善効果、免疫賦活効果、悪臭抑制効果等を有することが示唆された（大谷ら 2004、岩澤ら 2005、大谷ら 2007）。

今回、高い機能性を持つモウソウチク由来の生理活性資材の開発を目的に、天然由来乳酸菌サイレージとの発酵品質の比較を通じ、竹用サイレージに適する乳酸菌の選定を実施した。また併せて発酵過程における成分変化等も調査した。今回選定した乳酸菌は、すでに牧草用添加資材として広く活用されている乳酸桿菌の畜草1号菌株、及び乳酸球菌の RO50 菌株を用いた。畜草1号と RO50 菌株を用いたサイレージでは、竹粉由来の乳酸菌を利用したサイレージに比べ、速やかな乳酸生成による pH の低下が認められ、竹由来株によるサイレージ化よりも短期間での良質サイレージ調製が可能な事が示された。サイレージ発酵の過程では、特に RO50 菌株の添加により鎮静効果や血圧降下などの効果がある GABA（ガンマーアミノ酪酸）や遊離アミノ酸が多く生産されることが示された。また、サイレージ化に伴う物理変化は抱水力の増加という食物繊維としての付加価値が示唆された。これらの結果は、家畜生体の健康増進、生産物への移行などが期待される。近年、全国の食品関係研究施設において、有用乳酸菌を用いた高付加価値食品の開発研究（早川ら 1997、恩田ら 1998）が進められており、今回の成果は新たな高付加価値畜産物開発に寄与できるものと考えられる。今回、特に RO50 菌株を利用することにより、機能性を有する高品質サイレージ生産の可能性が示唆されたが、RO50 菌株利用に際しては、添加量の決定など解決すべき課題も多く、さらに検討が必要である。また、新たなプロバイオティック乳酸菌検索、機能性向上についても継続研究が必要である。

肉用鶏へのサイレージ給与と試験において給与資材の種類による経済性等を比較した結果、添

加による経済性への影響は認めなかった。生産物では、対照区に比べ、サイレージ区で a 値（赤色度）が増す傾向が示された。破断強度ではむね肉において RO50 区で対照区との間に有意差を認めた。血液成分では、サイレージ添加区で対照区に比べ各項目において減少傾向が示された。特に RO50 区において減少が大きかった。鶏肉アミノ酸では、むね肉において RO50 区で旨味成分であるグルタミン酸等が増加傾向を示した。以上の事から、サイレージ添加により消費者の望む赤身でヘルシーな鶏肉生産が可能となることが示された。特に RO50 株サイレージ添加区では、市場では評価の低い肉用鶏むね肉の付加価値化が期待できる結果であった。

また、液性免疫増強効果については、RO50 株サイレージの添加による生態防御作用の向上が期待された。

今回、多くの項目において、RO50 株サイレージ添加区が好成績をおさめたことから、RO50 株添加サイレージの実用化も視野に入れ、投与量及び投与方法による鶏体への影響・生産物への影響など、さらに詳しく効果を検証すべきであると考えられる。竹の持つ機能性成分と添加乳酸菌との相乗効果により、鶏体の防御能を高める生理活性資材の開発を推進することが、最終目標であり、生産者及び消費者のニーズでもある減投薬飼育技術を確立することであると考えられる。今後さらに、採算性も視野に入れた給与方法の検討、各種鶏体防御能判定法の導入による効果の確認、腸内フローラへの影響調査、成分の移行調査等を推進することにより、家畜におけるモウソウチク由来の生理活性資材の応用が可能となると思われる。

センターでは、先端技術を活用した農林水産研究高度化事業として2年後における生理活性資材の実用化を目指し、さらに研究に取り組んでいく予定である。

## 謝 辞

なお、本研究の一部は、「先端技術を活用した農林水産研究高度化事業」により得られた成果である。

## 参考文献

- 安藤浩毅・森田慎一・古川郁子・神野好孝・坂木剛・廣末英晴. 2003, 加圧熱水によるモウソウチクからのキシロオリゴ糖の生成. 木材学会誌, 49(4):293-300.
- 逸見香苗・村田健臣・碓氷泰市・河岸洋和. 1996, 未熟モウソウチク（タケノコ）由来のレクチンについて：物理化学・分析化学. 日本農藝化学會誌, 70:67.
- 岩澤敏幸・大谷利之・池谷守司. 2005, 鶏による竹資源利用に関する研究（第1報）. 静岡県中小家畜試験場研究報告, 16:49-53.
- 大谷利之・和久田高志・関哲夫・岩澤敏幸・池谷守司. 2004, 畜産分野における竹資源の利活用. *Bamboo Journal*, 21:72-77.
- 大谷利之・岩澤敏幸. 2007, モウソウチクサイレージの調製とその発酵品質. 静岡県中小家畜試験場研究報告, 17:53-57.
- 恩田匠・柳田藤寿. 1992, 有用乳酸菌を用いた高付加価値食品の開発. 山梨大学地域共同研究センター研究報告書, 4:74.
- 恩田匠・他. 1998, 有用乳酸菌を用いた高付加価値食品の開発—各種発酵食品からの抗菌性乳酸菌の分離・検索—. 山梨県工業技術センター研究報告, 12, 8-11.
- 蔡義民. 2001, サイレージ乳酸菌の役割と高品質化の調製. 日本草地学会誌. 47:528-534.
- 蔡義民. 2003, 緑茶飲料残渣とトウモロコシとの混合サイレージ調製と発酵品質. 日本畜産学会報, 74:203-211.
- 早川潔・上野義栄・河村真也・谷口良三・小田耕平. 1997, 乳酸菌による $\gamma$ -アミノ酪酸の生産, 生物工学会誌, Vol. 75、239-244.
- 萬田正治・長英司・徳田博幸・黒肥地一郎・渡邊昭三. 1990, モウソウチクの飼料的価値. 鹿児島大学農学部学術報告, 40:173-179.

# 低コスト次世代型廃水処理技術（第1報）

Cost-saving 'Next Generation' wastewater treatment. (The first report)

杉山 典、黒田博道、松井繁幸

要約：有機性の汚濁成分濃度が高い畜産廃水の簡便な浄化法の開発を目的として、無機凝集剤による凝集沈殿法を検討した。初沈水の荷電性を評価するためゼータ電位を測定した結果、中性付近でマイナス荷電であった。次に汚水中で解離していると思われる有機官能基を赤外線吸収スペクトルで分析した結果、脂肪酸・カルボシル基などの吸収ピークが多検体で検出されたことから、廃水の荷電性を左右する要因の一つとしてこれら官能基の解離が関与していると思われる。無機凝集剤としてカルシウムとアルミニウム混合液を作成して凝集沈殿試験を実施したところ、被検水の COD 値と SS 値が短時間に低減できたことから、流入水負荷を制御する方法の一つとして凝集沈殿法は有効と思われた。

(静岡畜技研中小研セ研報 1, 45~48, 2007)

## はじめに

活性汚泥法 (Activated sludge system) などの生物学的処理法は、有機性廃水の処理法として最も普及している。しかし、高濃度で、変動性の高い流入原水を生物学的処理のみで行う場合、最終放流水の水質を安定的に確保するには高度な維持管理技術を要し、曝気容積の確保や、維持管理に要する時間的な拘束が大きい。そこで、生物学的処理以外に、簡便な負荷低減法のひとつとして炭酸カルシウムと硫酸アルミニウムを混合した無機凝集剤を用いて凝集沈殿法を検討した。

## 材料と方法

### (1) 水質検査

・年間の初沈水と、最終放流水の水質性状

平成 17 年 4 月から平成 18 年 3 月までの月別の初沈水と、最終放流水の水質 (COD<sub>Mn</sub>, SS) を計 12 回毎月検査した。当センターの廃水処理方法は約 700 頭規模の飼養施設から移送された汚水がスクリーニング処理により夾雑物を除去した後、初沈槽に貯留する。この初沈水は計量槽を経由して曝気工程に流入する。曝気後に接触酸化工程を経た後で生物学的脱窒素法によ

り処理されて最終放流となる。そこで曝気槽へ流入する前の初沈水と、最終放流水を検査に供した。

・初沈水の水質検査と分析

平成 17 年 6 月から 11 月までに採取した初沈水 6 検水については COD<sub>Mn</sub>、SS 以外に pH、ORP (酸化還元電位)、ゼータ電位を検査した。

・ゼータ電位の測定

ゼータ電位は顕微鏡下で初沈水に一定電圧を加えて粒子の電気泳動時間を調べた後、スモルコフスキー式より算出した。pH の調整は 10<sup>-3</sup> M 濃度の塩酸と同濃度の水酸化ナトリウムを用いて 2 から 10 に調整した。

・初沈水に含まれる有機官能基の分析

初沈水の荷電性を左右する成分の分析を目的に、有機官能基の分析をフーリエ変換赤外吸収法 (FT-IR) により実施した。試料の前処理として初沈水を 40℃、48 時間乾燥機内に静置して水分を蒸散し、残留した固形分を瑪瑙乳鉢を用いて粉体にした。粉体試料は赤外線スペクトル測定用の臭化カリウムと約 1 : 100 の割合で混合した後、KBr 法により測定に供した。各検査法を表 1 に示した。

表1 各検査の測定方法

測定項目	単位	測定方法
pH	-	ガラス電極法(堀場製作所 F-52)
ORP	mV	複合電極法(Eutech Instruments)
SS	mg/L	下水試験法(ガラス繊維濾過法)
COD <sub>Mn</sub>	mg/L	下水試験法(100°Cにおける過マンガン酸カリウムによる酸素要求量)
ゼータ電位	mV	顕微鏡型電気泳動法(Copas Model MSV500)
FT-IR	Wavenumber	KBr法(ThermoElectron NICOLET380)
Ca	mg/L	フレイム原子吸光法(NIPPON JARREL ASH AA-880)
Al	mg/L	発色法(HACK DR/2400)

(2) 凝集沈殿試験

・被検水

被検水は初沈水 30cc をイオン交換水で 8 倍に希釈して凝集沈殿試験に供した。

・凝集剤

凝集剤はカルシウム (Ca) とアルミニウム (Al) の混合液により作成した。炭酸カルシウムは市販 (和光純薬社製) の炭酸カルシウムを 1.8M 濃度の硫酸溶液に 10% 重量比で混合溶解させたものを用いた。硫酸アルミニウムは液体硫酸アルミニウム (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 含有量 8% 以上、静岡興産製) を炭酸カルシウム溶液と 1 : 10 (v/v) の割合で混合して用いた。

・凝集試験内容

図 1 に示した内容で実施した。

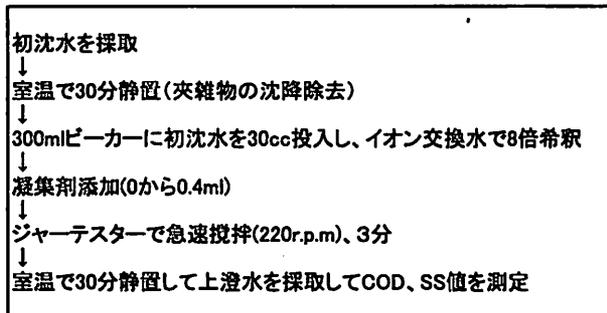


図1 凝集沈殿試験の内容

・水質検査

凝集沈殿後の上澄水を採取し、凝集剤の添加量別 (0 から 0.4ml) の COD、SS 値を測定した。

・Ca、Al 濃度の分析

凝集剤のカルシウム濃度はフレイム原子吸光法で測定した。試料は共存物質による干渉抑制のための前処理として塩化ストロンチウム六水和物溶液 (Sr : 50mg/mL) を 2% (v/v) 量添

加した後、測定波長 422.7nm にて吸光度を測定した。アルミニウム濃度はアルノミン指示薬による発色法により測定波長 522nm にて吸光度を測定した。

結 果

・年間の初沈水と、最終放流水の水質性状

曝気槽へ流入している初沈水 (流入水)、最終放流水の COD, SS の月別の結果を図 2 に示した。最終放流水は年間平均で COD 値が 37.9 mg/L、SS 値が 18.9mg/L であったのに対して曝気槽に流入している初沈水は COD 値が 2,058mg/L、SS 値が 2,036.1mg/L と高く、変動幅も大きかった。

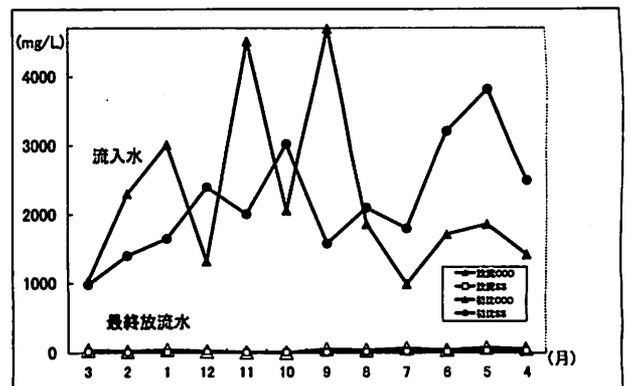


図2 年間の初沈水と最終放流水の水質性状

グラフ縦軸に COD、SS 濃度 (mg/L) を、横軸に測定月を示した。

・初沈水の水質検査

6 回採水した初沈水の水質検査の結果を表 2 に示した。

表2 初沈水の水質検査結果

	pH	ORP(mV)	CODMn(mg/L)	SS(mg/L)
平均値	7.65	-252.6	1371.5	1701.6
標準偏差	0.26	24.2	499.3	695.3

・ゼータ電位

pH別のゼータ電位の測定結果を図3に示した。グラフ中の■は6回採取した初沈水のpH別の平均値を示した。pHの中性付近ではゼータ電位はマイナス荷電であった。

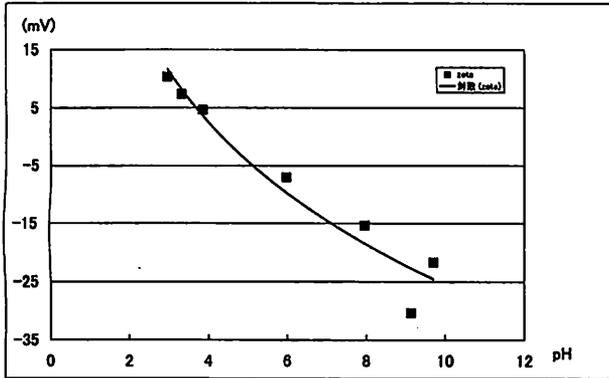


図3 ゼータ電位の測定結果

グラフ縦軸にゼータ電位 (mV) を、横軸に pH を示した。

・FT-IR

1月に採取した初沈水の FT-IR 分析における吸収スペクトルの結果を図4に示した。グラフに示した低級脂肪酸から脂肪族由来の6つのピークは検体全てにみられた。

・凝集沈殿の結果

凝集沈殿試験の結果を図5に示した。凝集試

験後の上澄水 COD と SS が最も低下したのは添加量 0.4ml の時であった。この凝集剤に含まれる Ca 濃度は 460mg/L、Al 濃度は 1mg/L であった。

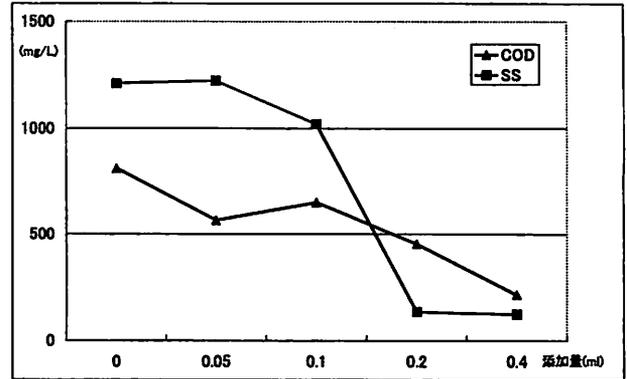


図5 凝集沈殿の結果

グラフ縦軸に COD、SS 濃度 (mg/L) を、横軸に凝集剤の添加量 (ml) を示した。

考 察

年間を通じて最終放流水は COD、SS とともに水質汚濁防止法に規定される基準値以下であった。曝気槽へ流入する初沈水は負荷濃度が高かった。標準偏差値より初沈水の COD と SS が変動するのに pH や ORP は比較的安定していることから、酸化還元状態は負荷変動に依存しない

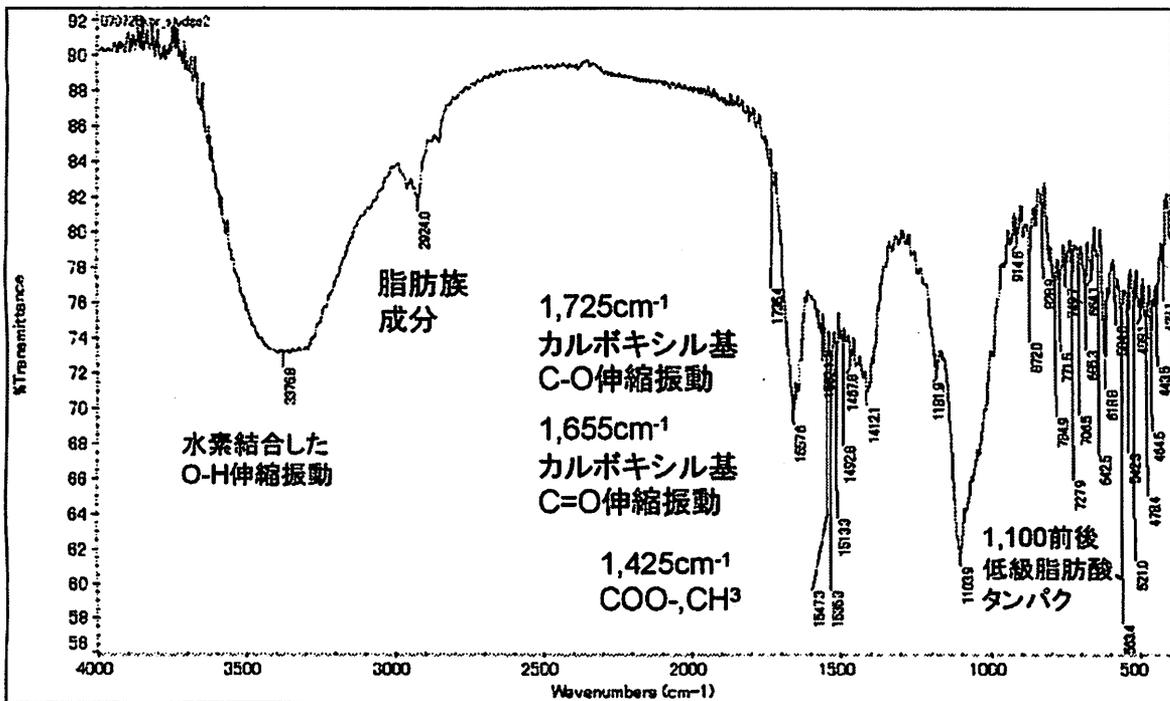


図4 FT-IR 測定結果

グラフ縦軸に透過率、横軸に 500 から 4,000 までの wavenumber を示した。

いで一定であると考えられた。ゼータ電位の測定結果では初沈水の平均的な pH (7.65) ではマイナス荷電であった。FT-IR では脂肪族、カルボキシル基の振動ピークが全ての検体で見られた。

これらの結果より、一般的に畜産廃水中では以下のような荷電反応を呈していると考えられる。

- (1) 畜産廃水は家畜由来、あるいは飼料残渣などに含まれるタンパクや脂肪成分などの有機成分が汚水中で分解して有機官能基が解離する。解離度は有機成分の負荷量 (COD や SS 値を上昇させる成分) とは関係なく一定である。還元状態での廃水中にはカルボシル基やアミノ基が多量に解離している。
- (2) 有機成分由来のカルボシル基は汚水中で  $\text{COOH} \rightarrow \text{COO}^-$ 、アミノ基は  $\text{NH}_2 \rightarrow \text{NH}_3^+$  のように解離する。
- (3) pH が低い領域では過剰のプロトンによりアミノ基のプラス荷電が優位となるが、等電点を境に pH が高くなるにつれてカルボキシル基の解離が優位となる。初沈水の pH 付近ではカルボキシル基解離が優位なため、ゼータ電位の測定結果に示すとおり、汚水は総体的なバルクとしてはマイナス荷電が支配的となる。

従って  $\text{Ca}^{2+}$  や  $\text{Al}^{3+}$  などの多価の陽イオンを含む電解質液をカチオン凝集剤として使用すれば廃水中の汚濁粒子間の静電的反発力が低下して汚濁粒子同士が凝集体を形成し、凝集体は汚濁粒子より質量が増えるため、重力により沈降除去できると推察できる。凝集沈殿反応は畜産廃水の場合、高濃度 (汚濁粒子量が多い) であるため、粒子同士の衝突頻度が高いことから従前の活性汚泥法などの微生物処理より優位性が期待できる。

活性汚泥法は県内の養豚場でも普及している方法であるが、元来、負荷濃度が低い下水などの流入水を処理するために開発された方法である。下水の受入上限値は 600mg/L BOD 値であるのに対して、畜産廃水は負荷濃度が著しく高く、変動幅も大きい。従って安定的な放流水質を確保するには容積負荷に相応した施設と、

高度な管理技術を要する。結果的にこれらの要因が養豚農家にとって多大な負担となり、生産性拡大の阻害要因となっている。

今回の試験結果では流入水の負荷低減法の一つとしてカチオン凝集剤を用いた凝集沈殿法が利用できる可能性が示唆された。今後は、汚泥の発生量、組成解析、実用化に向けた装置開発等により県内養豚農家で利用できる低コスト型の廃水処理技術を開発する必要があると思われる。

## 参考文献

- 1) 日本下水道協会 下水試験方法. 1997
- 2) 化学工業社 沈降濃縮 (化学工業 33-3). 1997
- 3) Marshall, K. C. 1976. Interfaces in Microbial Ecology. Harvard University Press.
- 4) Werner Stumm. 1996. Aquatic Chemistry. Wiley Interscience.

静岡県畜産技術研究所  
中小家畜研究センター研究報告

第 1 号

平成 19 年 12 月

編集 静岡県畜産技術研究所中小家畜研究センター  
発行 静岡県畜産技術研究所中小家畜研究センター

〒 439-0037

静岡県菊川市西方 2 7 8 0

TEL(0 5 3 7) 3 5 - 2 2 9 1(代)

FAX(0 5 3 7) 3 5 - 2 2 9 4

印刷 有限会社ティ・ケープリント  
〒 433-8124

静岡県浜松市中区泉三丁目 26 番 14 号

TEL ( 0 5 3 ) 4 7 3 - 8 3 0 0