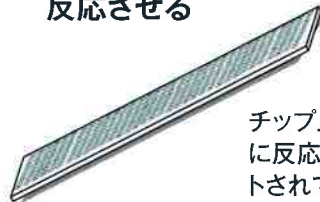


ヒラメから取り出した血液成分(タンパク)にULSという試薬を用いて発色マーカーを接着させる。正常魚にはDY547という青色蛍光色素、検査魚にはDY647という赤色蛍光色素を標識する。

発色した血液成分を抗体チップ上で競合反応させる



チップ上には様々な血液成分に反応する抗体が多数スポットされている。

抗体チップの使用方法

ヒラメの感染症を診断する「抗体チップ・プロテインチップ」の開発

¹独立行政法人水産総合研究センター 養殖研究所

²日本獣医生命科学大学 獣医学部

³大分県農林水産研究指導センター 水産研究部

中易千早¹・松山知正¹・坂井貴光¹・釜石隆¹・乙竹充¹・倉田修²・三吉泰之³・福田穰³

目 次

総 説

- 食品の安全性確保のための技術開発の動向と展望 1
川本伸一 ((独)農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所 食品安全研究領域)

総説関連

- ヒラメの感染症を診断する「抗体チップ・プロテインチップ」の開発 8
中易千早¹・松山知正¹・坂井貴光¹・釜石 隆¹・乙竹 充¹・倉田 修²・三吉泰之³・
福田 穰³ (¹(独)水産総合研究センター 養殖研究所, ²日本獣医生命科学大学
獣医学部, ³大分県農林水産研究指導センター 水産研究部)
- 生乳中混入抗菌性物質自動検知センシングシステムの開発 15
数坂昭夫^{1, 2}・大森唯義²・山川 功²・福岡 淳³・濱田辰夫³ (¹十勝テレホンネット
ワーク(株)・札幌分室, ²(株)センシングネットワーク・札幌分室, ³北海道大学・
触媒化学研究センター)
- 食品の安全性評価へのバイオセンサーの利用 21
今石浩正¹・後藤達志¹・宇野知秀²・森垣憲一¹ (¹神戸大学遺伝子実験センター
環境遺伝子制御部門, ²神戸大学農学研究科生命機能科学)

国内情報

- 目標ランプを利用した直進誘導システム 26
牧野英二・山下貴史・埴 圭二 ((独)農業・食品産業技術総合研究機構 生物系特定
産業技術研究支援センター)

地域の先端研究

- 超低温保存したウシ卵子から黒毛和種子牛の生産に成功 31
詫摩哲也・江副大輔・一丸 仁 (佐賀県畜産試験場大家畜部)

文献情報

- 性選別精子を用いた *Bos taurus*, *Bos indicus* 及び *indicus-taurus* 交雑乳牛からの大規模な
体外受精卵生産と受胎成績 35
J.H.F. Pontes et al. (*Theriogenology*, 74, 1349–1355, 2010) 抄訳: 下司雅也
- セントロメア領域を介した染色体排除機構による半数体植物の作成 36
M. Ravi et al. (*Nature*, 464, 615–618, 2010) 抄訳: 高田美信
- Saccharomyces cerevisiae*の様々なストレス応答におけるトレハロース蓄積の異なる重要性 37
Siraje Arif Mahmud et al. (*Journal of Bioscience and Bioengineering*, 10, 262–266, 2010)
抄訳: 佐々木慧

表紙の説明

ヒラメは主要な養殖魚であるが、魚病被害、魚病の種類が共に多い。ヒラメ養殖では、病気が発生した場合に有効な対処方法が少ないことから、病原体の感染を早期に検出することが大切になる。筆者らは、微量なヒラメの血液から病原体の感染状態を把握する方法として、「抗体チップ・プロテインチップ」によるヒラメの健康管理技術を開発した(表紙写真)。

詳細については8頁をご覧ください。

◀ 総 説 ▶

食品の安全性確保のための技術開発の動向と展望

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所
食品安全研究領域

川 本 伸 一

食品安全は消費者の最大関心事の一つである。食品の安全性確保のために、行政にとっては、科学的根拠に基づくリスク管理の実施が、食品製造者にとっては、消費者により安全な食品を提供するための自主衛生管理体制の向上を図ることが今後ますます重要となってくる。そこで、食品総合研究所での技術開発事例を挙げて、食品安全にかかわる研究開発の動向と今後の展望を概説する。

1. はじめに

最近の食中毒細菌による大規模集団食中毒発生や農薬などの有害化学物質の食品中への混入など食品安全に関する事故、および偽装表示等の食品の信頼に関する事故・事件の多発は、消費者に食品の安全・信頼に対して強い不安感を与えると共に、食品業界全体に対する不信感をいだかせるようになってきている。

消費者の健康志向や利便性等の重視により、最近では、生鮮食品や RTE (Ready To Eat : 調理せずですぐ食べられる)食品などの非加熱食品の消費が伸びている。また女性の社会進出、核家族化、個食化、老人家庭の増加などにより、家庭での調理の簡素化や調理機会の減少傾向が進行している。この傾向は今後ますます拍車がかかるものと予想される。すなわち、外食施設や食品工場など家庭以外で大量加工、調理された非加熱食品の利用機会はさらに増加すると考えられる。これら食品は、加熱による殺菌ができないために微生物学的安全性の確保が極めて重要となる。従って、生産から消費に至るフードチェーンの各段階で適切な食品の安全性確保が求められている。

食品総合研究所では、独立行政法人農業・食

KAWAMOTO Shinichi
〒305-8642 つくば市観音台 2-1-12

品産業技術総合研究機構に所属する食品研究の専門機関として、このような現状を踏まえ、食品の安全性確保に関わる科学と技術開発研究に取り組んでいる。本稿では、食品総合研究所での技術開発事例を挙げて、食品安全にかかわる研究開発の動向と今後の展望を概説する。

2. 食品の安全とリスク

(1) 危害要因とリスク

現在、食品の安全・安心という言葉が頻繁に使われているが、安全と安心という言葉の意味は大きく異なることを正しく理解しておく必要がある。安全とは科学的根拠に基づいた客観的なものであり、安心は安全と信頼に基づく消費者の心理的な判断すなわち主観的なものである(図1)。従って、安心感の程度は、個々人によって大きく異なることを十分認識しておく必要がある。以下では、食品の安全にかかわる事項のみを扱うこととする。

現在では、食品の安全性を確保する上で、食品には、物理的、化学的或いは生物学的な健康に悪影響を与える可能性のある危害要因が含まれ(表1)、これを完全に排除することは困難で、リスクが常に残るすなわち「リスクゼロの食品はありえない」との国際的な共通認識の上立って、リスク評価(リスクの科学的根拠による

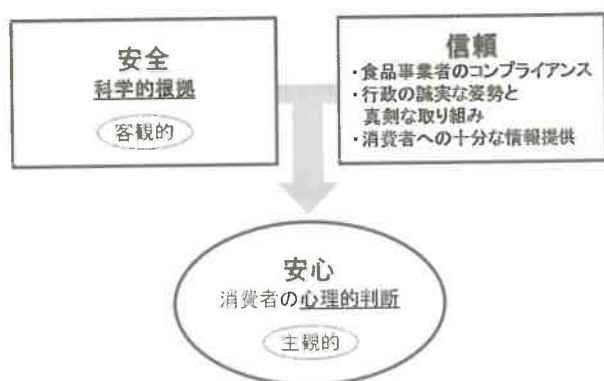


図1 食品の安全と安心の関係

推定)とリスク管理(リスク評価に基づき、行政が実施するリスク低減政策や規制措置)が行われている。リスクとは、「食品中に含まれる危害要因を摂取することによって、どのくらいの確率でどの程度の健康への影響が起きるかの推定値」を意味する。従って、食品の安全性確保には、フードチェーンの各段階で危害要因を削減し、リスクを科学的根拠に基づいた健康に影響を与えない、かつ社会的に許容される範囲内に抑えることが目標となっている。

(2) 我が国の最近10年間の食中毒発生状況

厚生労働省の食中毒統計をもとにした我が国の過去10年間(2000年~2009年)の食中毒発生状況は、2000年と2006年を除き、患者数は20,000~30,000人/年で推移している(表2)。

2000年は、大手乳業メーカー製造の低脂肪乳への黄色ブドウ球菌毒素混入による大規模集団食中毒の発生(患者数13,420人)により、また2006年にはノロウイルスによる集団食中毒が11月(患者数6,220人)と12月(患者数11,547人)に集中して頻繁に発生したため、例年に比べ年間患者数が急増した。発生件数は1,000~2,500件/年で年々減少傾向を示し、死者は数人

表1 食品の危害要因

分類	例
物理的要因	異物混入 (ガラス片・金属片・害虫など)
化学的要因	残留農薬 環境汚染物質(ダイオキシンなど) 重金属(カドミウム・ヒ素など) かび毒(アフラトキシンなど)
生物学的要因	有害微生物(腐敗・変敗) 病原微生物(食中毒・伝染病) 病原ウイルス(食中毒・発ガン) プリオン(狂牛病)
加工・調理過程で新たに生じる要因	アクリルアミド トランス脂肪酸 フラン化合物
予測不可能な要因	新興病原菌 未知有毒化合物 バイオテロリズム (毒物・強毒性病原菌など)

前後/年となっている。食中毒の病因物質としては、細菌とウイルスが最も重要な位置を占め、患者数全体の90%以上はこれらによるものである。1990年後半までは、発生件数の多い細菌性食中毒は、腸炎ビブリオ、サルモネラ、黄色ブドウ球菌であったが、最近の様相が変化した。黄色ブドウ球菌の発生件数に大きな変化はないが、腸炎ビブリオとサルモネラの発生件数は年々大きく減少している。一方、1995年以降は腸管出血性大腸菌、1997年以降はカンピロバクター、2000年以降はノロウイルスによる発生件

表2 最近10年間の食中毒発生状況と病因物質

年次	発生件数	患者数	死者数	病因物質別患者数の割合(%)			
				細菌	ウイルス	化学物質+自然毒	不明
2000	2,247	43,307	4	74.9	18.7	1.4	5.0
2001	1,928	25,862	4	61.1	28.6	1.7	8.7
2002	1,850	27,629	18	63.5	28.9	1.9	5.7
2003	1,585	29,355	6	56.4	36.5	1.8	5.4
2004	1,666	28,175	5	46.4	44.5	2.6	6.5
2005	1,545	27,019	7	61.7	32.3	1.5	4.5
2006	1,491	39,026	6	24.8	71.0	1.8	2.5
2007	1,289	33,477	7	38.7	56.0	1.3	3.9
2008	1,369	24,303	4	42.5	47.9	4.1	5.5
2009	1,048	20,249	0	33.1	54.1	4.2	8.7

数が増加した(図2)。このような新興の病原細菌やウイルスによる食中毒発生状況は欧米と類似傾向にある。

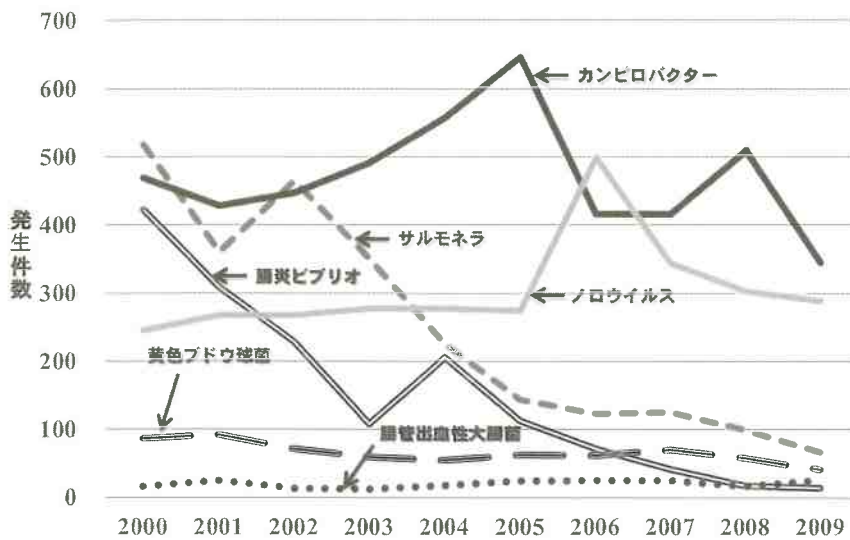


図2 主要な病原細菌とウイルスによる食中毒発生件数の年次推移

(3) 衛生管理システムの現状

食品製造過程での衛生管理によるリスク低減手法として、HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Point) の導入が食品企業で進んでいる。従来の衛生管理手法は、最終製品の抜き取り検査すなわちファイナルチェック方式であり、個々の製品の安全性を保証するものではない。また微生物検査を例にとると、消費期限の短い非加熱食品などでは検査結果が出る前に出荷するケースが多かった。一方、HACCP システムは、加工工程の各段階でリスク低減のための重要管理点を想定しモニタリングするプロセスチェック方式の衛生管理手法であり、個々の製品の安全性が保証される(図3)。HACCP システムによる衛生管理では、できる限り速やかに重要管理点の検査結果が製造工程にフィードバックできなくては意味がない。従来から、微生物検査に用いられている公定法などは、時間と労力を必要とする原因究

明型の事後検査法である。従って、これに替わる簡易・迅速・高感度なリスク予防型の事前検査技術の開発が求められている。また、検査技術に加え、有害微生物の汚染、増殖抑制および

殺菌などの効果的な微生物リスク低減技術の開発も望まれている。これら開発技術の現場普及を図るには、中小企業が大半を占める我が国の食品産業においては、低コスト化も重要な要素である。

現在では、国際連合食糧農業機関 (FAO) /世界保健機関 (WHO) が合同で設立し、食品の国際的衛生規範を定める Codex 委員会が提唱する「農場から食卓まで (From Farm To Table)」の連続した衛生管理の考え方

に基づき、食品の安全性確保が行われている。すなわち「農業生産工程管理 (GAP : Good Agricultural Practice)」で衛生的で良質な原材料を生産し、次いで「製造工程管理 (GMP : Good Manufacture Practice)」で衛生的な食品の製造・加工環境を確保し、さらに食品としての衛生管理を HACCP システムで行うことで、フードチェーンの各段階で危害要因の削減を連続的に図

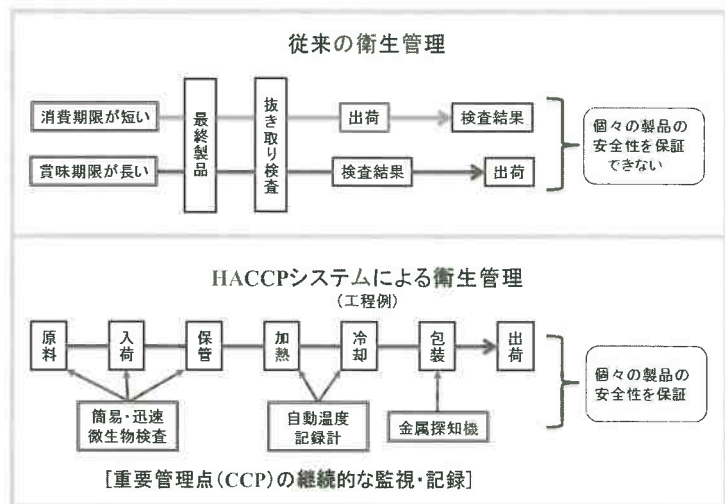


図3 従来手法と HACCP システムによる衛生管理の違い

り、リスクの大幅低減を達成して、食品の安全性確保を図る取り組みである。

(4) 分析法の妥当性確認と分析値の同等性保証

食品のリスク管理や品質保証での規制や規格に係わる分析法は、分析値の同等性を確保するために試験室間共同試験による妥当性確認が必要である。Codex 委員会では、食品の輸出入に係わる試験所の条件として、①ISO/IEC17025 (2005) (試験所及び校正機関の能力に関する一般要求事項;試験所認定)に適合していること、②第三者機関が行う適切な技能試験 (Proficiency Testing) に参加して外部制度管理を行っていること、③妥当性確認された分析法を用いていること、④内部精度管理を行っていることを挙げている。これらの要求事項に適合していない機関の出した分析値では信頼性の保証がなく、国際的問題に対処する場合には通用しないのが現状である。従って、開発した分析法がリスク管理のモニタリングなどに活用されるためには分析法の妥当性確認は必須である。

3. 食品安全確保のための技術開発事例

(1) 食中毒菌の迅速多重検出法

食肉由来の3種の主要食中毒菌 (大腸菌

O157:H7, サルモネラ属菌, リステリア・モノサイトゲネス) を同時に迅速かつ高感度に検出する技術 (多重検出法) をプリマハム株式会社との共同研究で開発した^{1) 2)} (図4)。公定法による検査では、菌の分離や確認試験に熟練技術と知識・経験が要求されると共に培養に時間がかかるため、1菌種の検査時間は5日間程度を費やしていた。一方、新たに開発した多重検出技術は、菌の特徴的な遺伝子の有無を調べるPCR (遺伝子増幅技術) 手法を応用したもので、上記の標的食中毒菌が食品25g中に1細胞存在すれば、24時間以内に検出可能である。これまでは個々の菌に応じた選択培地が必要であったが、3種類の食中毒菌をどれもほぼ同じ速さで増殖できる新規開発培地により、3種類の菌を一度に検査することができるようになった。接種試験では、乳製品や野菜など60品目以上で検出感度に問題なく、幅広く食品に適用できることが明らかとなった。市販食品を用いた自然汚染の検出率を公定法と比較した場合も、公定法と同等以上の検出感度を示した³⁾。これらの結果を踏まえ、食中毒菌迅速多重検出キット「TA10」として商品化された。食品製造現場での簡易・迅速な自主衛生管理手法として、また食中毒事故発生の際の原因菌同定検査への利用などが期待できる。

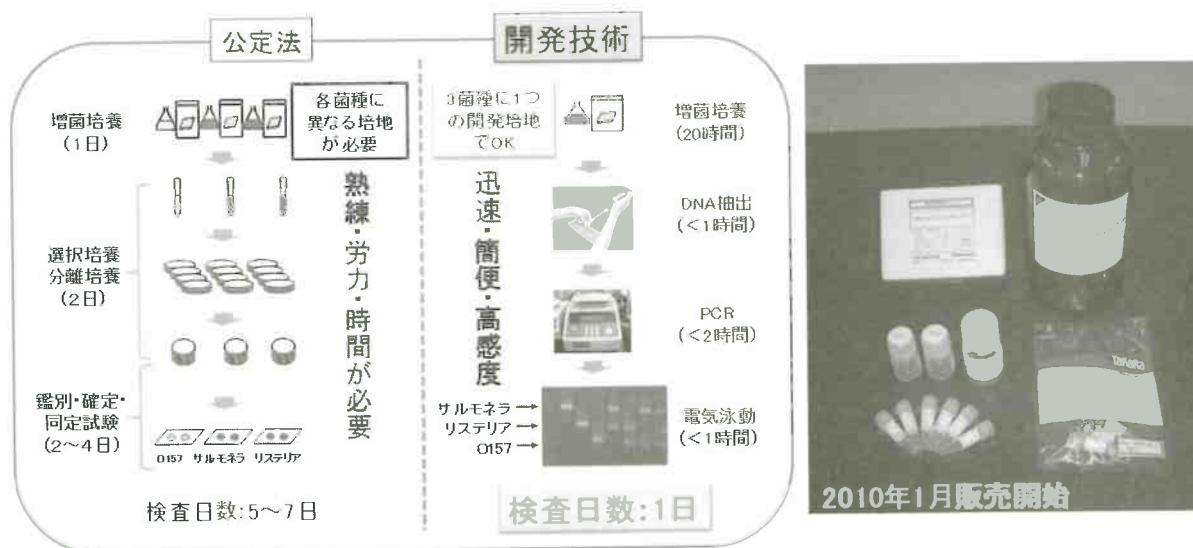


図4 開発技術の概要と市販化された検出キット

(2) 食品流通温度管理のための微生物センサー開発

非加熱食品において、流通段階での食中毒菌や腐敗菌の増殖を抑えるための唯一の有効な手段は、低温管理である。衛生管理の行き届いた工場で製造された食品でも流通過程での温度管理の失敗は食中毒事故等の原因となる。特に最近、低温でも増殖可能なリステリア等による食中毒事例が欧米先進国で報告され、我が国でも温度管理の厳密さが求められるようになってきている。そこで温度管理不備を目で見て簡単に識別できる安全・安価な食品の流通温度を管理する微生物センサーを大成ラミック株式会社との共同研究で開発・実用化した⁴⁾。このセンサーは、食品微生物であるパン酵母の糖発酵による炭酸ガス生産能（発酵によりパンがふくらむ原理）を活用したものである（図5）。パン酵母と糖の添加量を適切に調整することにより、食品の種類に応じて、それぞれの品目の流通・保管温度の管理に適したオーダーメイドの微生物センサーが低コスト（1個数円程度）で作製できる。なお冷凍耐性パン酵母を使用しているため、このセンサーは約2週間、安定に凍結保存できる。センサー内容物は全て安全な食品添加物を用いており、万一内容物が流出し食品に付着したとしても事故の危険性はない。

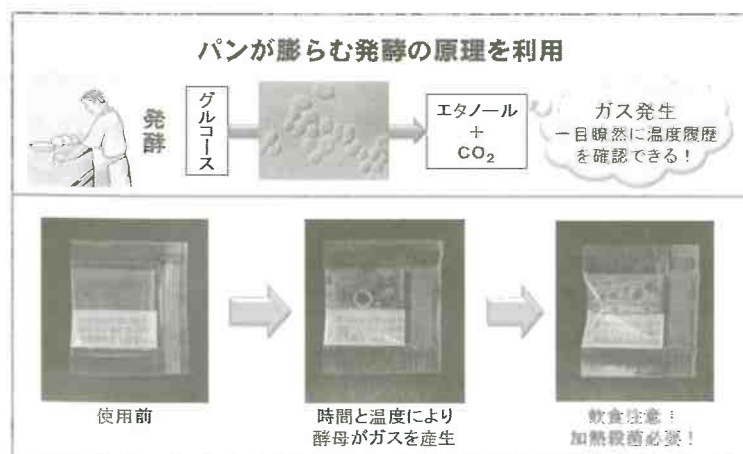


図5 微生物センサーの原理と実用モデル

(3) 予測微生物学を活用した微生物挙動データベース MRV の開発と公開

予測微生物学とは食品における微生物（特に病原菌、腐敗菌）の増殖や死滅挙動を数学モデルとして記述し、食品における微生物学的安全性を定量的に評価・確保するための手段として発達してきた研究分野である。Codex 委員会において、微生物学的リスク評価の暴露評価ステップにおける予測微生物学の有用性が言及されている⁵⁾。予測微生物学研究の国際協力の一環として食品における微生物の増殖挙動に関する国際データベースの ComBase (コンベース, <http://www.combase.cc/>)が無償で公開されている。ComBase に収録されているデータ数は、病原菌と腐敗菌合わせて、現在4万件を超え、さらに拡充が続けられている。ComBase では、各種環境条件下での微生物増殖曲線データの収載が主である。しかし、食品製造や衛生管理においては、細菌を増殖させない条件設定が求められることが多い。そこで食中毒菌および腐敗菌を含む29種類の菌種と18種類の食品群に関するComBaseの収録データ約3万件から、温度・pH・水分活性の各要因の組み合わせにおける増殖/非増殖条件と、増殖速度の情報を一括して検索可能とした微生物挙動データベース MRV (Microbial Responses Viewer) を開発・公開 (<http://cbnfri.dc.affrc.go.jp/MRV-J/>)した⁶⁾。MRV

の特徴として、目的とする情報を容易に検索できるように、直感的・視覚的に情報を見出すことができるような設計となっている。MRVを活用すれば、食品の加工・保存条件を最適化し、食中毒菌や腐敗菌の増殖を阻止することが可能である。食品加工における材料処方決定や保存条件・消費期限・賞味期限の設定において強力な意志決定援助ツールとなる。

(4) 赤かび毒の高感度一斉分析技術

かび毒は現在 300 種類以上が知られており、分子量 1,000 以下の低分子化学物質であるため熱安定性が高く、一般に通常の加工・調理過程では分解しない。農作物等のかび毒汚染は、世界各国で発生が認められることから、かび毒のリスク管理に対して国際的に関心が持たれており、Codex 委員会等において、かび毒の食品中の基準値の検討や、かび毒汚染を防止・低減するための「行動規範」(Code of Practice) の策定等が進められている。穀物などのかび毒汚染は、多くの場合複数種類のかび毒によるものである。そこで高速液体クロマトグラフタンデム型質量分析装置 (LC/MS/MS) を使用し、我が国でも麦類汚染で問題となっている赤かび病菌が産生するかび毒のニバレノール、デオキシニバレノール、T-2 トキシン、HT-2 トキシン、ジアセトキシシルペノール、ネオソラニオールおよびゼアラレノンの 7 種類を高感度 (検出限界は 10ppb) で一斉検出する技術を開発し⁷⁾、リスク管理でのかび毒汚染モニタリングに利用できるように妥当性確認を行っている。

4. 今後の研究開発

今後、病原微生物や有害物質等の危害要因に対して普通の人には比べ高い感受性を示す高齢者や生活習慣病患者などの人口割合が増加する傾向にある。物流・人交流のグローバル化に伴う外来・新興病原微生物等の侵入など、新たな危害要因の発生も懸念される。食品の安全性確保のために、行政機関にとっては、レギュラトリーサイエンス (科学的知見と規制措置との橋渡しに使われる科学や研究のこと) の考え方による科学的根拠に基づくリスク管理の実施が、食品製造者にとっては、消費者により安全な食品を提供するための自主衛生管理体制の向上を図ることが今後ますます重要となってくる。

食中毒菌の検知技術に関しては、製造現場で自主衛生管理手段として汚染リスク評価ができるように、公定法と同等以上の精度を有する迅速・高感度で低コストである定量検出技術の開

発が必要である。また、従来から個々の企業で対応し、情報が入手困難な食品クレームで大きな問題となっている腐敗菌・変敗菌について、DNA マイクロアレイ技術等を活用した網羅的な迅速検出・同定技術を開発することは、食料を輸入に大きく依存している我が国において、食品ロス的大幅削減の観点からも重要である。そのためには、産官学連携による業際・学際的協調に基づくコンソーシアムを設立し、これを母体として、食品の微生物学的リスク低減のための情報共有体制強化を推進する必要がある⁸⁾。さらに我が国の 90%以上を占める中小・零細食品企業の製造現場における衛生管理の高度化が今後の重要課題である。そのためには、まず、食品加工製造現場と連携して、現場で実施されている既存の殺菌・静菌技術等を科学的根拠に基づいて再評価することが必要である。これらの評価に基づき、「ハードルテクノロジー」による加工品の安全性と品質の向上を図る総合的な有害微生物制御技術を開発する。「ハードルテクノロジー」とは、“できるだけ温和な複数の微生物制御法(ハードル)を組合せて食品に併用し、それらの相乗効果により食品の安全性を確保すると同時に、食品本来の品質を高度に維持しながら安定に保存する技術”である。次に、食品加工における原料処理の最適化や保存条件・消費期限・賞味期限の設定に容易に活用できる予測微生物学手法の開発と普及、そして蛍光指紋イメージングなどの新技術など活用した製造ラインの清浄度や微生物汚染等をオンタイムで監視する迅速非破壊・非接触衛生管理技術の開発などが必要となる。これらの開発技術を導入・システム化することにより、食品業界全体の製造工程における衛生管理レベルの高度化および有害微生物汚染リスクの大幅な低減を図ることができる。

さらには、加工・調理段階で生成されるアクリルアミドなどは、今後新たに発見される有害物質を含めて、レギュラトリーサイエンスの中で汚染実態の解明とリスク低減のための加工法開発や、生成リスク低減のための家庭で実行可能な調理条件に関する情報提供が必要となる。

5. おわりに

食品の安全性確保にとって、複雑・高度化する関連技術や科学情報を消費者が客観的に理解できるように、わかりやすく発信することは今後ますます重要となる。例えば食品中から検出された有害物質の分析値を、この数値の持つ科学的な意義と信頼性を示さずにただ発信するだけでは、たとえ健康危害リスクがない値であっても、情報発信としては十分でない。専門知識がない大多数の消費者にとっては、発信された数値だけでは客観的な判断ができず、場合によっては主観的な判断に走り、過剰反応を起こし社会的混乱を引き起こすことがあるからである。社会心理学者や行動科学者等と連携した消費者心理行動の解明とこれに基づく情報発信システムの開発が必要となろう。これらの成果によって、消費者自身の情報リテラシーが向上し、マスコミ等による食品の安全性に関する情報提供に対しても、科学的根拠に基づく客観的な判断を下すようになり、無用の社会混乱や食糧資源の浪費などを防ぐことが期待できる。

6. 参考文献

- 1) Kawasaki, S. et al (2005) *J. Food Prot.*, 68 (3), 551-556
- 2) 川本伸一 (2009) 計測と制御, 48(2), 175-180
- 3) Kawasaki, S. et al (2009) *Foodborne Pathog. Dis.*, 6 (1), 81-89
- 4) Kogure, H. et al (2005) *J. Food. Prot.*, 68 (1), 182-186
- 5) Codex Alimentarius Commission. (1999) Report of the Thirteenth Session of the codex Committee on Food Hygiene (CCFH), Alinorm 99/13 Appendix IV, 58-64
- 6) Koseki, S. (2008) *Int. J. Food Microbiol.*, 134 (1-2), 75-82
- 7) 中川博之 (2009) 食品工業, 52(14), 39-47
- 8) 社団法人農林水産先端技術産業振興センター (2010) 平成 21 年度農林水産省食農連携推進技術対策事業 食品産業技術ロードマップ集

◀ 総説関連 ▶

ヒラメの感染症を診断する
「抗体チップ・プロテインチップ」の開発¹ 独立行政法人水産総合研究センター 養殖研究所² 日本獣医生命科学大学 獣医学部³ 大分県農林水産研究指導センター 水産研究部中易千早¹・松山知正¹・坂井貴光¹・釜石 隆¹・
乙竹 充¹・倉田 修²・三吉泰之³・福田 穂³

ヒラメは主要な養殖魚であるが、魚病被害、魚病の種類が共に多い。ヒラメ養殖では、病気が発生した場合に有効な対処方法が少ないことから、病原体の感染を早期に検出することが大切になる。今回は、微量なヒラメの血液から病原体の感染状態を把握する方法として開発した、「抗体チップ・プロテインチップ」によるヒラメの健康管理技術について紹介する。この技術は医学分野では研究が進んでいるが、養殖魚の診断への応用は初めての試みであり、魚を殺すことなく検査をすることができる。

1. はじめに

ヒラメは我が国の主要な海産養殖魚であるが、魚病による推定被害率（金額）が13～31%（2004-2008年）にも達する。養殖魚全体の推定魚病被害率は約4%であるので、それと比べるとヒラメの魚病被害率は極めて高く、養殖経営を圧迫している。ヒラメの属するカレイ目魚類に承認されている水産用医薬品は少なく、養殖ヒラメでは病状が進行してからの感染症対策は困難である。したがってヒラメ養殖では、日常から健康状態を把握し、適切な飼育管理に努めることが重要であるとともに、感染症の発生に対しては早期の対策を講じることが必要であ

NAKAYASU Chihaya¹, MATSUYAMA Tomomasa¹,
SAKAI Takamitsu¹, KAMAISHI Takashi¹, OTOTAKE
Mitsuru¹, KURATA Osamu², MIYOSHI Yasuyuki³,
FUKUDA Yutaka³

¹ 〒516-0193 三重県度会郡南伊勢町中津浜浦
422-1

² 〒180-8602 東京都武蔵野市境南町 1-7-1

³ 〒879-2602 佐伯市上浦大字津井浦 194-6

る。このため、感染症の早期発見のための監視技術（健康診断技術、感染症診断技術）を早急に確立することが生産者から強く求められている。

さらに、消費者の養殖生産物への安心・安全性への関心が高まっており、抗菌性物質等の化学的薬剤に依存しない養殖ヒラメ生産が期待されている。現在、ヒラメ用ワクチンは、魚病被害額第3位のβ溶血性レンサ球菌症のみであり、被害額第1位のエドワジエラ症をはじめとするその他の多くの疾病については、飼育管理による予防以外に薬剤の使用を減少させる手段はない。安心・安全の観点からも、飼育魚の健康状態を容易に把握できる技術の開発が、早急に求められている。

魚介類の健康診断や病気の診断では、魚等を殺して腎臓や脾臓などの臓器を取りだし、その中に含まれる病原体を寒天培地や株化細胞を用いて24時間以上培養し、その後、抗体反応や性状試験、PCR等で病原体の同定をする必要がある。一方、最近、医学分野で開発された「抗体チップ」¹⁾および「プロテインチップ」²⁾では、

微量の血液から「病原体感染」を簡便かつ迅速に診断することができる。この技術では、多数の生体成分の変動を一度に解析する。そこで、これらの医学のチップ技術を魚類に応用して、ヒラメを殺すことなく、微量の血液から迅速に健康管理を行うことができる「ヒラメ用抗体チップ・プロテインチップ」の開発を目指した。

2. 感染診断用チップの開発

1) 抗体チップの開発

私たち人間と同じように、魚も病原体の感染を受けた場合には、それらに対応するために、いくつもの種類のタンパク質を血液中に放出する。これらのタンパク質はバイオマーカーとして役立ち、量的変動を検出することで、病原体の感染を知ることができる。検出にはバイオマーカーに特異的に反応するモノクローナル抗体 (MAb) をプローブとして用いる。抗体チップとは、多種類のプローブ (抗体) を基板上にスポットしたものである。血液の液体成分 (血漿) を抗体チップに反応させることで、一度に多数のバイオマーカーの変動を測定することが可能になる。

ヒラメにおける感染マーカーの探索を行うため、感染魚と健康魚の血漿タンパク質を2D-PAGEなどで比較し、また、先に開発したヒラメ DNA マイクロアレイを用いた研究から^{3, 4)}、疾病に関連して発現変動する宿主分子を選抜した⁵⁾。これらの感染マーカー分子の検出用プローブとして、各分子に特異的な MAb を総計 150 種類作製し、精製・濃縮後、スライドガラス状

の基板の上に共有結合でスポットすることにより抗体チップを作製した。

測定には、正常なヒラメと検査に用いるヒラメから得られた2種類の血漿を使用する。正常なヒラメとは、当研究所内にて濾過海水を用いて飼育し、病原体などが検出されなかった健康な魚群を示す。2種類のヒラメ血漿 (各 2 μ L) に、異なる蛍光色素 (赤色色素: 検査魚血漿, 緑色色素: 正常魚血漿) を標識し、抗体チップに等量載せ、競合的に反応させる (図 1)。その後、蛍光スキャナーにてスポットごとに赤色と緑色の発色量を測定し、数値化することで、正常魚血漿に対して検査魚血漿の各感染マーカーが何倍に変動しているかを検出できる (図 2)。

人為的に作出したウイルス感染魚と細菌感染魚について抗体チップでの解析を行い、各感染魚における各感染マーカーの反応パターンから感染診断基準を設定した。感染魚作出に使用した病原体は、ウイルスでは VHSV および VNNV, 細菌では *Edwardsiella tarda* および *Streptococcus iniae* である。これらの病原体は、いずれもヒラメ養殖に大きな被害もたらしている。

図 3 に実際の検出結果を示した。左端の列は

図1 抗体チップの使用方法

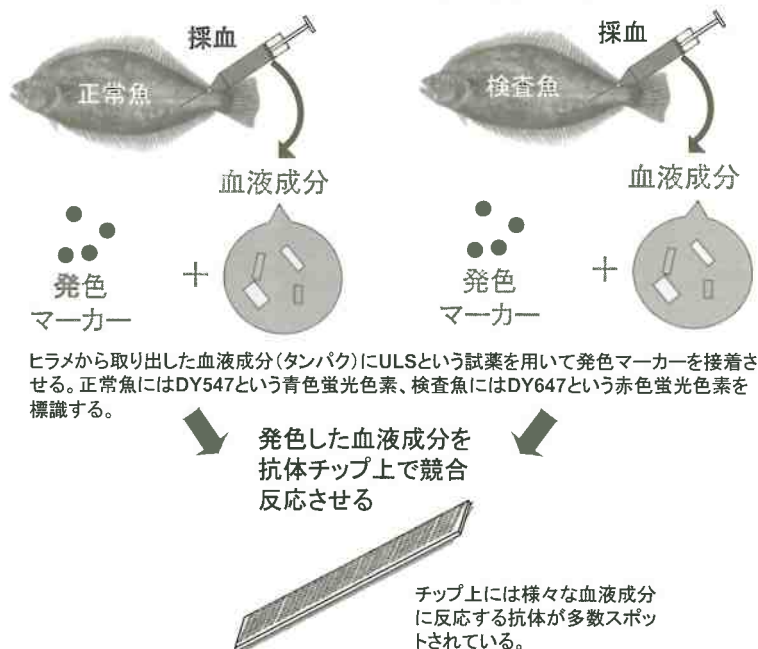
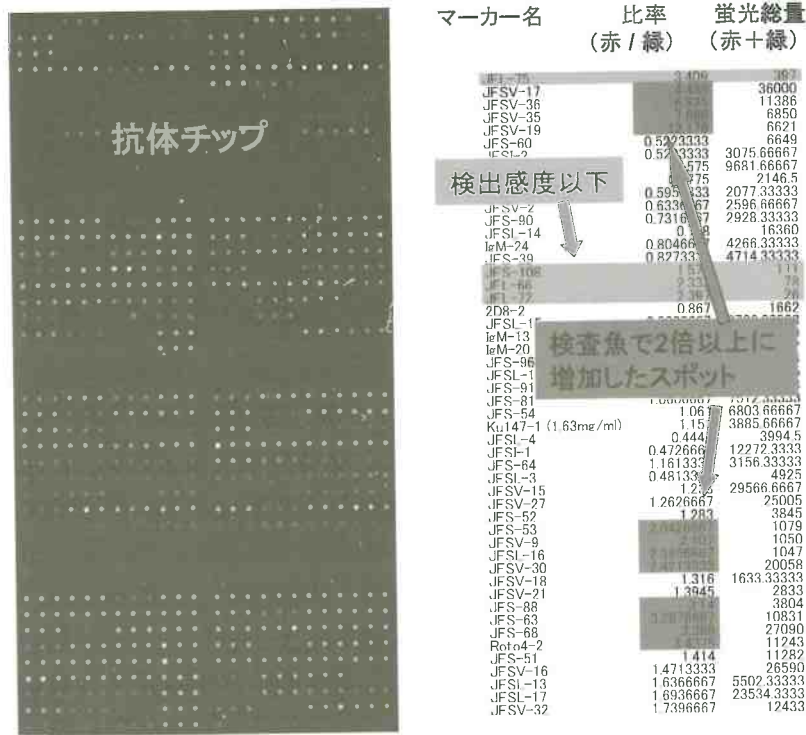
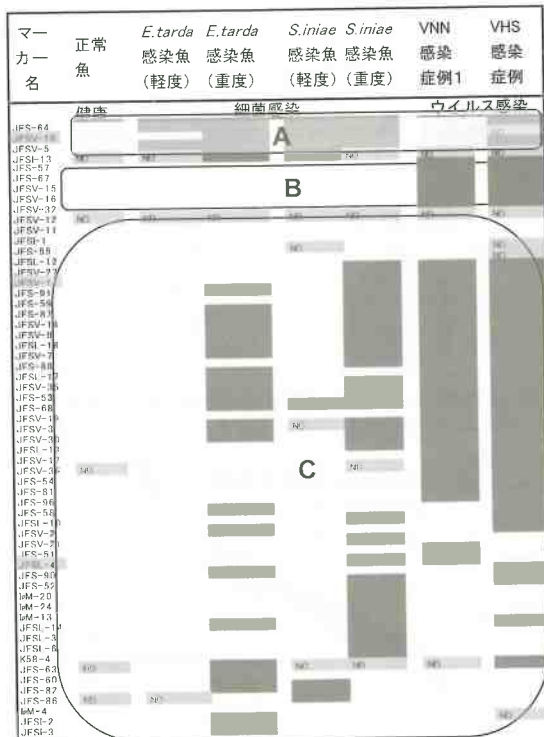


図2 抗体チップの反応例



抗体チップの解析：左の図は、蛍光スキャナによる検出図である。赤色のスポットは検査魚で増加、緑色は検査魚で減少、黄色は変動が無かったマーカーを示している（ただし、左の図は白黒印刷のため各色は全て灰色を示す）。この各スポットの蛍光量を数値化したものが、右の表である。一部だけを載せる。比率（赤/緑）の項目に、正常魚に対する検査魚の各マーカーが何倍になったかを示してある。2倍以上に増加したものを濃灰色で表示した。なお、淡灰色で表示した蛍光総量の少ないマーカー（左図で発色の少ない暗いスポット）は、検出感度以下としてデータとして使用しない。このように、チップ上の各スポットの発色のパターンにより、ヒラメの状態（感染の有無や感染度合など）を判定していく。

図3 抗体チップを用いた実験感染魚の解析



正常魚に対して、検査魚で2倍以上に増加したマーカーを濃灰色で表示した。
感染により特徴的なパターンを示したマーカーを3つのスポット群(A~C)に分けて整理した。
・細菌感染
Aのスポット群が赤く発色し、Bのスポット群は発色しない。感染が強いとCのスポット群も発色。
・ウイルス感染
BとCのスポットが発色し、Aは発色しない。ただし、VHSではA~Cのスポットが発色。

病気の感染で変動するバイオマーカーの名称を、各行はそのバイオマーカーの結果を表しており、正常なヒラメの血漿と比較して2倍以上に増加したバイオマーカーは濃灰色で示している。各バイオマーカーの増加パターンにより「ウイルス感染」や「細菌感染」を診断することができた。すなわち、ウイルス感染では主にBグループとCグループに属するマーカーが増加した。一方、細菌感染ではAグループに属するマーカーのみが変動したが、重篤な感染の場合にはCのマーカーも変動した。30例ほど検査を行った結果、このように病原体の種類により一定した反応パターンが得られることが分かった。なお、検査魚に正常魚を用いて解析を行うと、どのスポットにも変動は見られない。

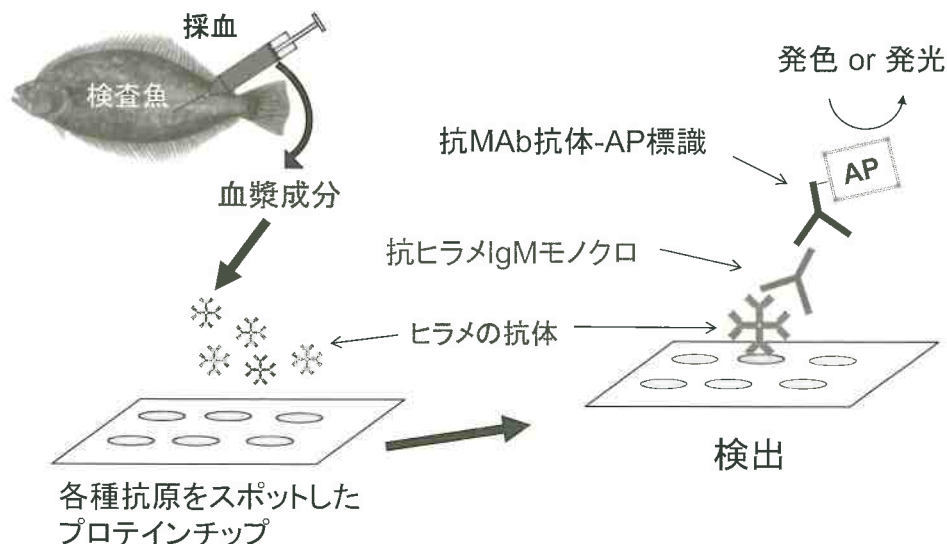
2) プロテインチップの開発

病原体に感染したヒラメの血液中には、その病原体に対する特異抗体が産生される。ヒラメがどのような病原体に対して特異抗体を持っているかを検出できれば、感染した病気の種類を判定することができる。そのためのツールとして、プロテインチップの開発を行った。上述し

た抗体チップとの違いは、抗体チップが基板の上に抗体をスポットしているのに対し、プロテインチップは各種のタンパク質をスポットしていることである。検出の原理を図4に示す。基板となるニトロセルロース膜（リトマス試験紙状のシート）の上に、各病原体の抗原（それぞれの病原体だけが有するタンパク質：病原体マーカー）をスポットしていくことで作製する。プロテインチップにヒラメから採取した血漿を反応させると、そのヒラメが特定の病原体に感染していた場合、その病原体に対する特異抗体とチップ上にスポットされている抗原が反応する。そこに検出用の2次抗体、3次抗体を反応させ、3次抗体に結合しているアルカリフォスファターゼを基質液に反応させることで、感染した病気の種類に応じて白色だったチップの上に発色がおこる。

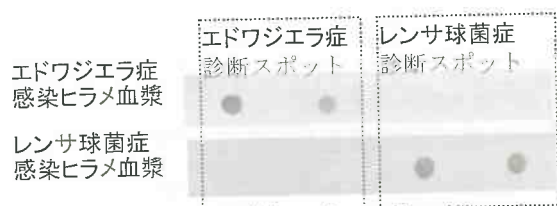
今回開発を行ったプロテインチップでは、ヒラメに大きな被害を及ぼすエドワジエラ症 (*E. tarda* が原因菌) とレンサ球菌症 (*S. iniae* および *S. parauberis*) を検出することを目的とした。まず、各病原体に感染させたヒラメの血漿 (抗血清) を用いたウェスタンブロッティング、ア

図4 プロテインチップの使用方法



フィニティーカラム、ゲノムライブラリーにより病原体マーカーの同定を行った⁶⁾。各病原体についてそれぞれ数十個のマーカー候補を同定し、塩基配列情報を解析し、遺伝子組み換え技術を用いてタンパク質合成を行い、抗原として調整した。これらの抗原を病原体マーカーとして基板にスポットし、プロテインチップを作製した。実験感染魚の血漿を用いて検証を行うと、両疾病共に各2種類の抗原が特に感度良く特異的に反応しており、マーカーとして実用に耐えられると思われた。図5にあるように、エドワジエラ症に感染させたヒラメではエドワジエラ症の病原体マーカーに、レンサ球菌症に感染させたヒラメではレンサ球菌症の病原体マーカーに発色がおこり、それぞれの病気を診断することができている。

図5 プロテインチップによる診断例



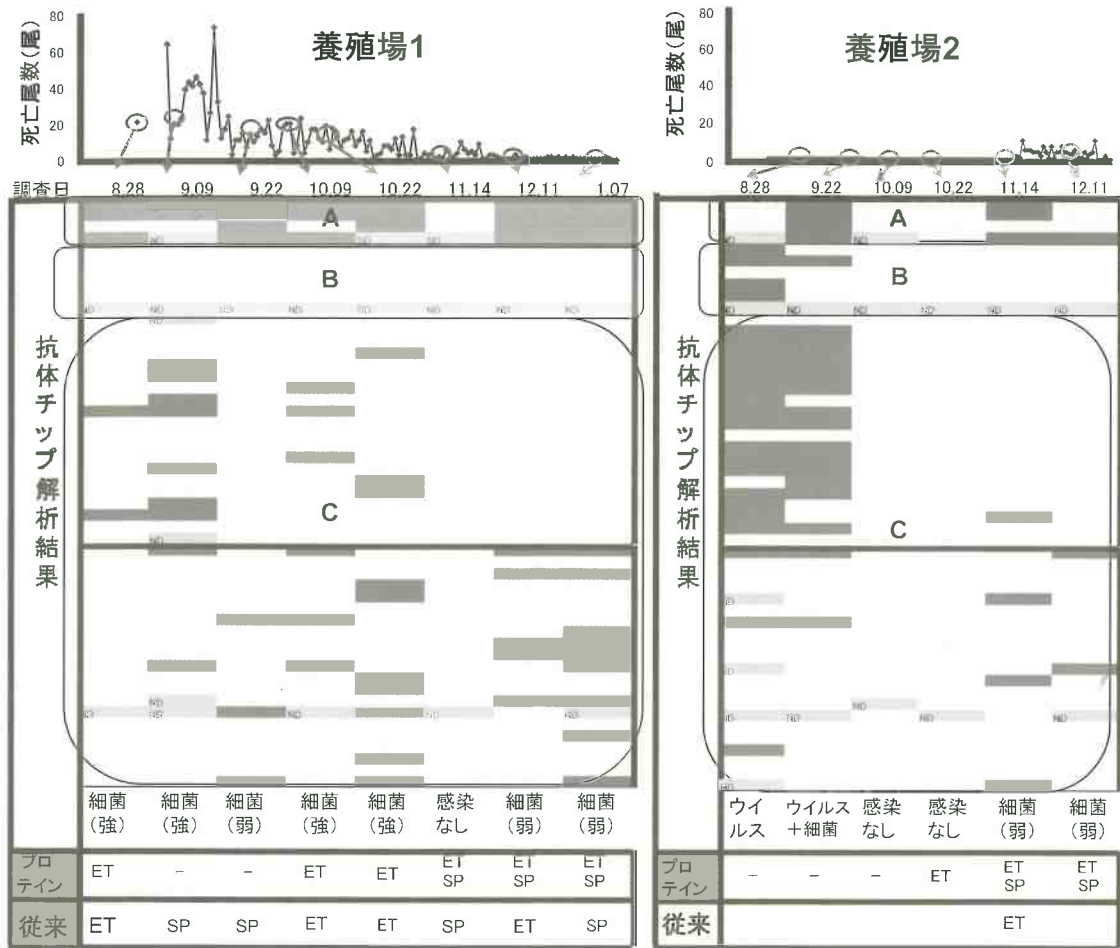
これまでの病気の診断では、寒天培地を用いて24時間以上培養する必要があったが、この方法では約4時間で結果が得られ、診断ができる。そのため、これまでよりも迅速な対応が可能となる。また、*E. tarda*, *S. iniae*, *S. parauberis* 以外の病原体についても、同様の手法によりスポットとして追加することができる。また、後述するように、従来の診断法で病気が検出されない場合、例えば病状が出ない潜伏感染などでも、プロテインチップで検出できる例がある。さらに、過去に感染した病気の履歴も確認できることがこの診断法の特徴である。

3. 養殖場での抗体チップ・プロテインチップ検査の応用

開発された抗体チップおよびプロテインチップを用いて、民間の養殖場のヒラメから得られた血液試料の検査を行った。2箇所の養殖場で飼育している外見上健康なヒラメの血漿を、8月から翌年の1月まで定期的に5尾ずつ採取して、チップ検査を行った。また、チップ検査を検証するため、サンプリングに使用したヒラメには県の水産試験場で実施されている従来の魚病診断も行った。あわせて、ヒラメを採取した飼育池の死亡尾数を経時的に記録した。

結果を図6に示した。死亡数では、養殖場1は多く、養殖場2では極めて少ない結果となった。養殖場1では、外見上健康な個体を選んだにもかかわらず、調査開始時点から抗体チップにより細菌感染と診断されると共に、プロテインチップでエドワジエラ症およびレンサ球菌症の重感染と診断された。その後、抗体チップで重篤な細菌感染と診断され、死亡尾数も多くなった。11月を過ぎると抗体チップでは軽い細菌感染となり、死亡尾数も減少した。なお、従来の魚病診断でもエドワジエラ症、レンサ球菌症と診断されており、抗体チップやプロテインチップの結果とよく一致した。養殖場2では、調査開始時点から抗体チップによりウイルス感染と診断されたが、実際には死亡はなかった。通常診断ではウイルス感染検査は行っていないため、真偽は定かではないが、魚の死亡には影響しないようなウイルスの感染があったことが考えられる。その後も、長期間にわたり抗体チップで異常はみられず、死亡もなかった。冬期になって、抗体チップにより細菌感染と診断され、若干の死亡が見られた。プロテインチップでも死亡の始まる少し前からエドワジエラ症が検出され、従来法よりも早く感染症の診断が行える場合もあった。また、本ツールによる診断は、通常診断に比べ、魚群における病状の進行度、潜伏感染や重複感染など、より多くの情報を得ることができると考えられた。これらのことから、養殖ヒラメの健康管理におけるこれらチップの有効性が確認された。

図6 養殖場での実証試験



各調査日に得られた外見上正常な個体(各5尾)の血漿をプールし各種検査を行った。結果は上から順に、死亡尾数、抗体チップ解析結果(A, B, C)、プロテインチップ解析結果、最下段が従来の検査法による診断結果。プロテインチップおよび従来の検査で表示されているETはエドワジエラ症の検出、SPはレンサ球菌症(共に細菌感染症)の検出を示している。左側は養殖場1、右側は養殖場2の結果。

4. 今後の展望

今後は、今回開発した「抗体チップ・プロテインチップ」の実用度や有用性をさらに高めていきたいと考えている。抗体チップについては、健康管理のために十分な情報を既に得ることが出来る。今後は、複雑な使用方法を改良して、養殖現場で簡便に使用できる技術にする必要がある。手法の簡略化にむけたスポットの絞り込みや測定技術の改良が必要である。一方、プロテインチップは、その診断方法の簡便さから手技的には既に実用的と考えられる。県の魚病担

当者に配布し、引き続き活用しながら、今後は診断できる疾病の種類を増やしていく必要がある。チップの作製過程が確立済みであるので、新規疾病が発生した際には、手順に従って順次抗原を特定し、チップに貼り付けることで、対応が可能になる。

これらの技術が現場で普及すれば、病気の発生を未然に防ぐことができ、水産用医薬品の使用量も減少できると期待される。さらに、安心・安全な養殖生産に向けて、今回のような新しい取り組みをしていることを消費者に発信することで、養殖魚のイメージをアップさせていきた

いと考えている。

5. 参考文献

- 1) Rivas LA. *et al.* (2008). *Anal. Chem*, 80, 7970-7979.
- 2) MacBeath G. and Schreiber SL. (2000) *Science*, 289, 1760-1763.
- 3) Matsuyama T. *et al.* (2007) *Fish & Shell. Immunol*, 22, 598-607.
- 4) Matsuyama T. *et al.* (2007) *Dis. Aqua. Organ*, 75, 79-83.
- 5) Matsuyama T. *et al.* (2009) *Fish. Sci*, 75, 253-255.
- 6) Sakai T. *et al.* (2009) *J. Vet. Diag. Invest*, 21, 504-509.

◀ 総説関連 ▶

生乳中混入抗菌性物質 自動検知センシングシステムの開発

¹十勝テレホンネットワーク（株）・札幌分室

²（株）センシングネットワーク・札幌分室

³北海道大学・触媒化学研究センター

数坂昭夫^{1, 2}・大森唯義²・山川 功²・福岡 淳³・濱田辰夫³

抗菌性物質が混入した生乳の出荷事故が多発している。現在、その混入検査が、生乳のタンクローリーによる出荷時、および、乳業会社での受け入れ時に行われているため、汚染された生乳の大量廃棄が余儀なくされている。本研究開発では、生乳に混入した抗菌性物質を早期に検知して、集荷初期段階で他の生乳への混入を防ぐことを目的として、ペニシリンGおよびテトラサイクリンを対象とする超高感度・高選択・迅速測定を可能とする、カウ・サイド（携帯型）、および、検査室（実験室型）において使用可能な電気化学センサ装置を試作した。

はじめに

乳房炎等に罹病した搾乳牛には、各種抗菌性物質投与による治療が行われる。抗菌性物質が生乳中に混入して出荷される事故が、近年多発している。表1は、厚生労働省々令による生乳中混入抗菌性物質の残留基準値である。これらは、バルククーラからタンクローリーによる出荷時に行われるチャーム法（抗菌性物質の抗体に対する抗原抗体反応を利用する簡易評価法）、あるいは、乳業会社で行われるPD法（ペーパーディスクに含浸させた牛乳が残留抗生物質検査法で指標細菌として用いられる *Bacillus stearothermophilus* 菌の生育を阻止するかどうかで判定する方法）による検査に従ってチェックされるため、汚染乳が消費者に届くことはない。しかし、それらの検査が集乳後に行われる

KAZUSAKA Akio^{1,2}, OHMORI Tadayoshi²,
YAMAKAWA Isao², FUKUOKA Atushi³, HAMADA
Tatsuo³

^{1,2}〒011-0021 札幌市北区北 21 条西 12 丁目 2
北大ビジネス・センター

³〒011-0021 札幌市北区北 21 条西 10 丁目

ため、一旦汚染事故が発生すると集荷乳の大量廃棄を余儀なくされる。例えば、平成17年に北海道で発生した事故件数は、104件、廃棄乳量1,100tと発表されている。

この様な状況を鑑み、我々は、集荷前に生産酪農家の段階で混入抗菌性物質を検知可能なセンシングシステムの開発を計画した。特に、治療に当たって、オキシテトラサイクリン（以下TCと略記）あるいはベンジルペニシリン（以下PGと略記）を主成分とする混剤が多用されていることから、これら二種類の抗菌性物質検知用センサの開発を目的とした。生乳中残留基準値が、それぞれ、4ppb (PG), 100ppb (TC) と超微量であることから、① 超高感度測定、② 高選択測定、③ 迅速測定、および、④ データ送信を可能とするセンシングシステムの構築を開発の具体的目的とした。

1. 超高感度 HIS 脱水素酵素修飾電極の調製

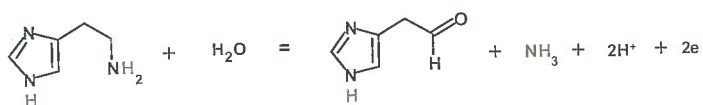
超微量抗菌性物質検知を可能とするため、我々が開発したヒスタミン (HIS) 電気化学セ

表 1 生乳中抗菌性物質残留基準値 (厚生労働省)

医薬品名	種類	残留基準値 (ppm)	備考
オキシテトラサイクリン	抗生物質	0.1	'96,7 施行, PD 0.3 ppm
スルファジミジン	合成抗菌剤	0.025	'97,10 施行
アルベンダゾール	内寄生虫剤	0.1	'97,10 施行
イソメタミジウム	内寄生虫剤	0.1	'97,10 施行
チアベンダゾール	内寄生虫剤	0.1	'97,10 施行
スピラマイシン	抗生物質	0.2	2000,6 施行
ベンジルペニシリン	抗生物質	0.004	2000,6 施行

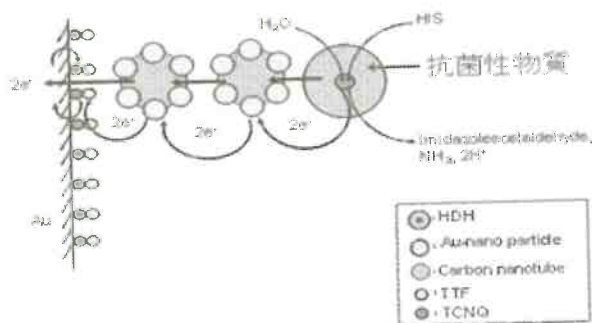
ンサ (特開 2007-333714, 特開 2009-236893) を応用する, 新たな電気化学検知センサの開発を検討した。

HIS は, ヒスタミン脱水素酵素 (Histamine dehydrogenase, HDH) の存在により, 下式に従う酸化脱水素反応を受け, イミダゾールアセト



アルデヒド, アンモニア, プロトンおよび電子を生成する。電気化学センサを用いた時, 生成する電子を電気化学的に追跡することによって, 反応の進行を知ることができる。本事業において, この電気化学反応が TC あるいは PG によって阻害されることが見出され, これら抗菌性

カーボン・ナノチューブ修飾電気化学センサ



物質によるヒスタミン脱水素反応に対する阻害効果の大きさから, TC あるいは PG の混入程度が判定されることが明らかになった。

この反応に高い活性を示す電極の開発を行った。いくつかの試行の後, 金板あるいは金スクリーン・プリント電極を HDH, Carbon Nanotube (CN),

Tetrathiafluvalene-Tetracyanoquinodimethane (TTF-TCNQ), 金ナノ粒子, および, その他の物質で修飾した多重修飾電極が, 上記反応に最適であることが明らかになった。図 1 に, 想定される電極構造と, そこで進行する HIS 脱水素

反応, および, その抗菌性物質による阻害反応等の機序を示した。ここで, CN および金ナノ粒子は, 酵素の高分散化および導電性の付与に, また,

TTF-TCNQ は電子メジエータとしての効果を持つと思われる。また, 同図に, 観測されたヒスタミン脱水素反応に対する PG の阻害効果の一例を示した。

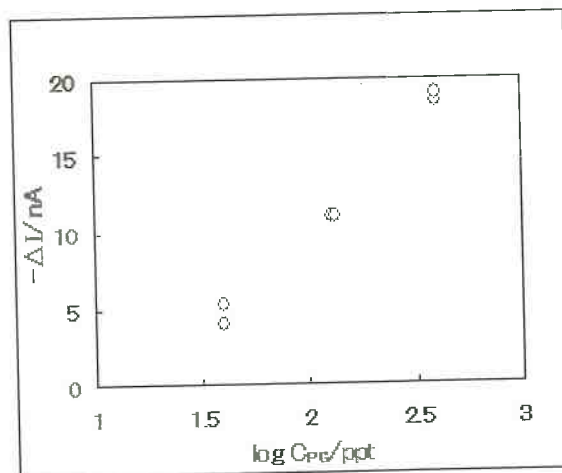


図 1 想定される修飾電極の構造とそこで進行するヒスタミン脱水素反応, およびその反応に対する PG の阻害効果の一例

2. 分子認識高分子 (Molecularly Printed Polymers, MIPs) を用いる高選択分離膜の開発

生乳に混入した超微量 PG および TC を分析するためには、それらを生乳から高選択的に分離することが必要である。図2に示す様な PG および TC を鋳型分子(Template) とする人工抗体とも呼ばれる MIPs (PG-MIPs, TC-MIPs) を、混合セルロース膜表面にコートした不均一透過膜の使用を試みた。

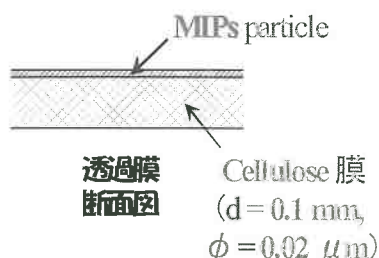


図2 想定される PG-MIPs あるいは TC-MIPs をコートした不均一透過膜の構造

まず、透過膜調製に必要な MIPs の合成を行った。



機能モノマー

機能モノマー

架橋モノマー

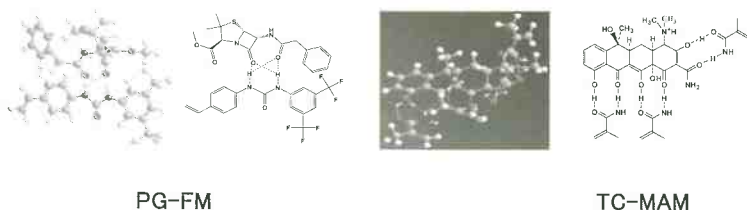


図3 MIPs 合成に用いるモノマーと計算化学から予想される最も安定な PG-FM および TC-MAM の会合体構造

計算化学による MIPs の分子設計

合成に先立ち、計算化学による MIPs の分子設計を行った。図3に 合成に適する各種モノマーの構造と、最も大きな安定化エネルギーが得られた PG あるいは TC と機能モノマー (Function Monomer, FM あるいは MAM) との会合体構造を示した。PG-FM では、FM であるウレア化合物に含まれる二個の -NH₂ の水素と PG の -C=O が水素結合することによって、構造が安定化されると予想される。また、TC-MAM では、TC に対して3個の MAM が水素結合した会合体が最も安定と考えられる。

PG-MIPs あるいは TC-MIPs の合成

組成の異なる数種類の PG-MIPs あるいは TC-MIPs を、鋳型分子 PG-プロカイン塩とジアリル系ウレアの混合物から、Urraca ら (Anal.Chem. 79 (2007) 695) に従って合成した。鋳型分子を加えず、同一条件で合成した高分子を対照試料 PG-NIPs とした。同様に、TC-MIPs あるいは TC-NIPs の合成を行った。この時、メタアクリルアミドを機能モノマーとして用いた。

PG-MIPs あるいは TC-MIPs の PG あるいは TC に対する結合能

調製した MIPs の PG あるいは TC 結合能を、組成の異なる PG-MIPs あるいは TC-MIPs への固液結合実験で検討した。PG-NIPs あるいは TC-NIPs に対しても同様な実験を行った。MIPs, NIPs とも、架橋モノマーの割合の大きい試料が大きい結合量を示した。一方、鋳型分子の結合状態の安定性は、架橋モノマーの割合による変化にも見られ、架橋性モノマー添加量が重要な要因となっていることが明らかになった。

分子認識膜 (Molecularly Printed Membranes, MIMs) の調製とキャラクタリゼーション

MIMs は、アセトニトリルの MIPs 飽和溶液をキャスト法によって混合セルロース膜 (孔径 $0.02 \mu\text{m}$, 膜厚 0.1mm) 上に塗布して調製した。図 4 は、それらの走査電子顕微鏡 (SEM) および原子間力顕微鏡 (AFM) 像である。

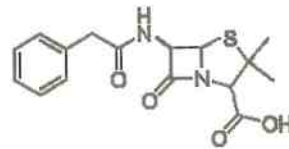
MIPs /アセトニトリル溶液をセルロース膜に塗布すると、膜表面が滑らかになる様子が SEM および AFM 像で観察されている。ただし、SEM 像中央部には、電子線照射によって生じた穴の下にセルロースの空隙が観測されており、また AFM 像では MIPs によると思われる突起が観測されている。これらの結果は、MIPs/アセトニトリル溶液で処理されたセルロース膜が、図 2 に示したような、MIPs 層を表面にコートした不均一膜になっていることを示唆している。

調製した TC-MIMs 不均一透過膜の TC に対する透過能を、容量、約 10ml のガラス製 U 字型反応管を用いて検討した。比較のため、混合セルロース・フィルターを用いて同様の実験を行った。図 5 に、アクセプター・セルに透過した TC 濃度の経時変化を示した。TC-MIMs が、セルロース・フィルターと同程度の高い透過能を保持していることが分かる。

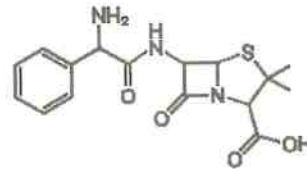
組成の異なる数種類の TC-MIPs から調製した TC-MIMs 不均一透過膜を用いて同様の実験を行った。TC 透過速度は、先に示した TC の

結合実験の解析によって算出される結合サイト数 (紙面の都合で解析方法は省略した) との間に、高い相関関係が見出された。透過メカニズムが明らかになっていない現在、詳細な結論には至らないが、「TC 透過速度が TC-MIPs の結合サイト数に比例する」事実、TC-MIMs の TC 透過能を評価する上で良い指針になると考えられる。

一方、透過膜の鑄型分子に対する選択能を、PG-MIMs の PG に対する透過実験から検討した。PG-MIMs に対し、PG と類似構造を持つアンピシリン (PG の一部に $-\text{NH}_2$ を含む、下図参照) を用いて透過実験を行ったところ、アンピシリンは全く透過されず、PG-MIMs が PG に対し特異的な選択能を持つことが見出された。



ペニシリンG



アンピシリン

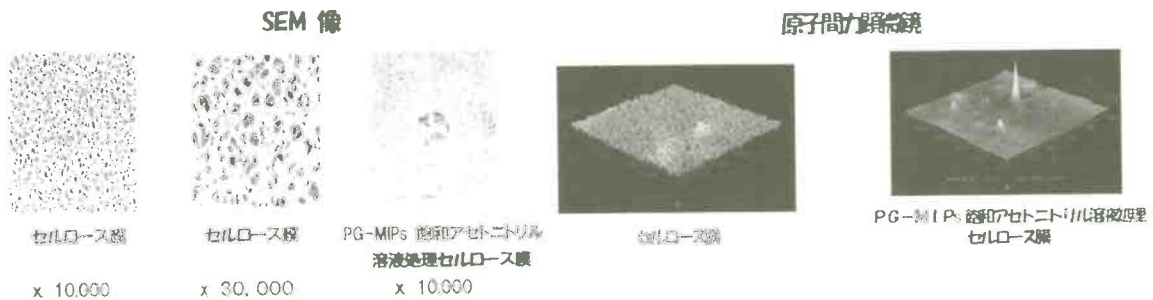


図 4 非対称分子認識高分子膜(MIMs) の走査電子顕微鏡および原子間力顕微鏡像

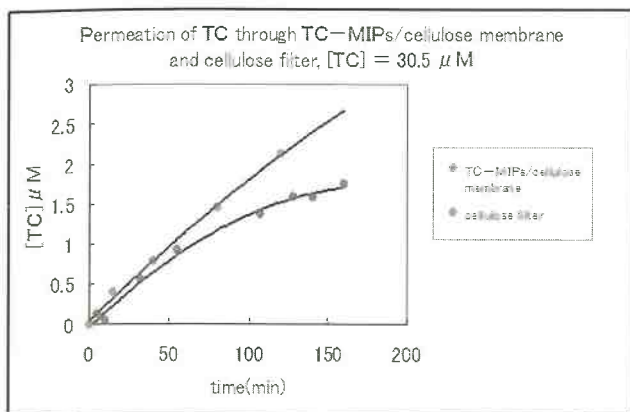


図5 TC-MIPs 不均一透過膜および混合セルロース・フィルターによる TC の透過実験

3. 試作機の作成と測定例

試験室対応ストップ・フロー装置

測定原理の確立を兼ね、試験室あるいは実験室対応型ストップ・フロー装置を試作した。装置は、三つの部分 ① 生乳試料採取および送液部、② 電極および透過膜を含む反応セルおよび ③ 装置操作部（ポテンシオスタット）からなっている。送液部および電磁ポンプなどはテフロン製で、酸あるいはアルカリを用いて洗浄することができる。反応セルは、生乳導入部、および、電気化学反応が進行する酵素修飾電極部分からなっており、その境には生乳から PG あるいは TC を高選択に透過分離する MIMs が装着されている。

カウサイド対応携帯型装置と得られた測定結果

図6は、携帯型装置の試作機と完成予定図である。試作機左部に透過膜および修飾電極を含むディスプレイの反応セルが結合されており、容易に取り外すことができる。また、完成予定図にも、ディスプレイの試料採取部と電極部からなる反応セルが示されている。生乳試料の採取は、サイホン式試料導入部を通して行われる。また、同図右端に、装置ブロック図が示されている。抗菌性物質混入に関する測定結果は、データ表示部、赤一青ランプ、および、ブザーで知ることができる。一方、そのデータは、装置に接続した PC にも表示される。

HIS 脱水素酵素酸化反応が共存する PG によって阻害を受ける時、その反応は Michaelis-Menten 機序による理論反応速度式によって整理され、測定電流 I を対数変換した、 $\log I$ と反応時間 t の間に、直線関係

$$\log I = At + B \quad A, B: \text{定数}$$

の成立が期待される。この時、直線の傾き、 A は、混入する抗菌性物質と比例関係にある。

図7は、金板あるいは金スクリーン・プリント電極を用いて、4 ppb の PG を混入した生乳で得られた電流 I の経時変化を示した。生乳導

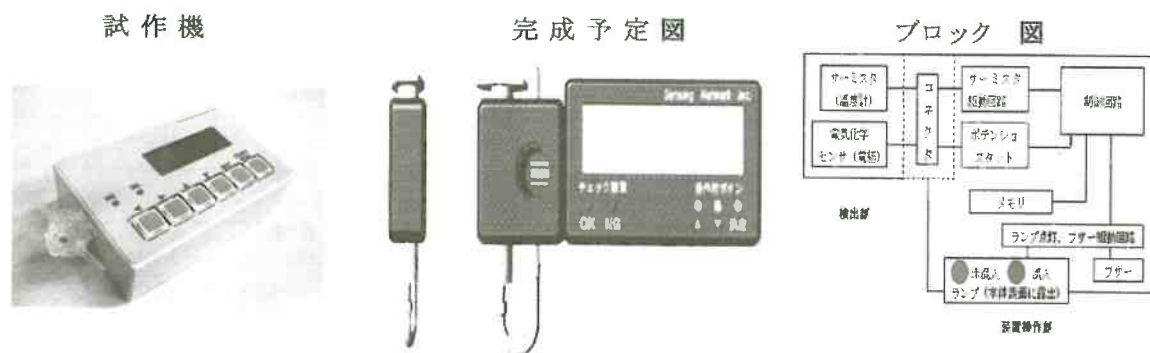
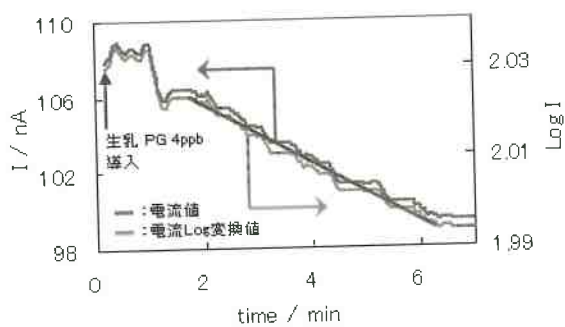
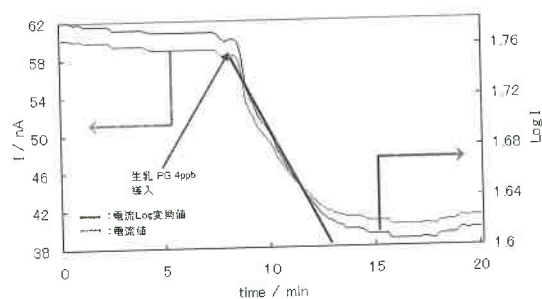


図6 携帯型装置の試作機，完成予定図およびブロック図



多重修飾金板電極



多重修飾金スクリーン・プリント電極

図7 金板あるいは金スクリーン・プリント電極を用いて4 ppb の PG を混入した生乳で得られた測定結果

入部に試料を導入すると、その直後、数分間、系の乱れに伴う電流増加が見られるが、その後、数分間に涉って

$$I = A \exp(-Bt), \quad \log I = A t + B$$

に従った電流減少を経て定常値に達する。両電極とも、生乳導入後、数分以内で測定を終了することから、迅速測定の可能性が証明された。

おわりに

表2に、開発した新規電気化学センサ法と現行・チャーム法との比較を示した。

謝 辞

本事業は、(独)農業・食品産業技術総合研究機構が実施した「平成18年度民間実用化研究促進事業」として進められた。研究開発を支援して頂いた関係諸氏に衷心より感謝する。特に、(独)農業・食品産業技術総合研究機構、生物系特定産業技術研究センター、新技術開発部、民間実用化研究促進事業担当、研究リーダー、矢野昌充博士には、事業の当初より終始変わらぬ暖かいご助言を頂いた。ここに謹んで、感謝の意を表したい。

表2 新規電気化学センサ法と現行・チャーム法との比較

	新規(電気化学センサ法)	現行(チャーム法)
測定方法	特殊分離膜による高選択分離と、酵素修飾電極による超高感度電気化学反応を利用	免疫学的生物反応クロマトグラフによる分離
対象抗生物質	PG、TC (その他の抗菌性物質へ拡張が可能)	PG、TC その他
測定時間	数分	数分
選択性	良好	良好
操作性	容易	測定経験が要
管理システム	携帯電話通信網を介する中央管理センターでのデータ管理と生乳中混入量の判定	

◀ 総説関連 ▶

食品の安全性評価へのバイオセンサーの利用

¹神戸大学 遺伝子実験センター 環境遺伝子制御部門²神戸大学 農学研究科 生命機能科学今石浩正¹, 後藤達志¹, 宇野知秀², 森垣憲一¹

食品中に残留する農薬、工業用廃棄物および現在では毒性が予測できない食品中の潜在的危険化学物質などの“食品危険因子”に対する安全性への懸念が高まりつつある。現在、食品安全性評価には実験用モデル生物などが多用されているが、モデル生物とヒトでは毒薬物代謝活性化能に大きな差があることから、新たなヒト安全性予測法が望まれている。そこで我々は、毒薬物の代謝活性化の主酵素であるシトクロム P450 (P450) を材料に用い、食品の安全性評価を目的としたバイオセンサーを試作し、その性能評価を行った。ヒト P450 を結合させたナノバイオセンサーを用いることにより、新たな“非モデル生物依存型”の食品安全評価法の開発について考察した。

1. はじめに

近年、海外から輸入される食料品の増加などにつれ、これら輸入農産物中の残留農薬、内分泌攪乱作用を有する化合物や、ダイオキシン類などのヒトへの安全性について懸念が持たれている。一方、食品中にも極微量であるが、ヒト生体内中で代謝活性化を受け毒性を持つ化合物になるいわゆる“潜在的危険化学物質”などがあることも明らかになっている。現在、これら食品の安全性評価には、ガスクロマトグラフィー-マススペクトロメトリーなどの各種機器分析法を用いた化合物分析や、実験動物を用いた安全性評価法などが利用されている。しかしながら、これら機器分析やモデル生物を用いた実験では、1) 各生物個体間での薬物代謝活性化能力の差異や、マウスやラットなどの哺乳動物から得られた結果をヒトへと応用しているなどの問題があること、2) 既存の食品危険因子については分析可能であるが、ヒトの生体内で生じる潜在的危険化学物質などには対応できないこと、が問題となっている。そこで我々は、こ

IMAISHI Hiromasa, GOTO Tatoshi, UNO Tomohide, MORIGAKI Kenichi

〒657-8501 兵庫県神戸市灘区六甲台町1-1

れら問題の解決の為に、広く生物界に存在し、薬物代謝活性化反応の初発段階である第 I 相反応において最も重要な働きをするシトクロム P450 (以下 P450 または CYP とする) を塗布したバイオセンサーの開発を進めている。

2. ヒト P450 の性質と大腸菌内発現

薬物動態学では、本来毒性を持たない化合物が生体内酸化反応を経て極めて高い毒性を持つ“活性中間体”とよばれる化合物へと変化する“代謝活性化反応”が知られており、P450 はこの代謝活性化反応を触媒する主酵素である¹⁾。一例として、食品中の焼きコゲなどに多量に含まれる本来発ガン性を持たないベンツピレンが、ヒトの P450 である CYP1A1 により酸化され発ガン性をもつ化合物へと変換することが知られている²⁾。これら潜在的危険化学物質の大半は P450 により代謝活性化され高毒性の化合物へと変換される。そこで我々は、第一にヒト P450 の取得に向けてこれらヒト P450 を大腸菌へと高発現させる P450 発現系の構築を試みた。微生物の P450 が可溶型であり異種酵素発現系が比較的容易であるのに比べ、高等生物の P450 酵素タンパク質が膜結合型であることか

ら P450 酵素タンパク質の異種生物への発現および活性測定などは一般的に非常に難しい。この問題に対して我々の研究グループでは、P450 発現用カセットプラスミドを用いた。本 P450 発現用カセットプラスミドは、Bernes らの報告を元にデザインした、5 種類の異なる変異導入を行った P450N 末端アミノ酸配列と、pCWori 由来のプロモーター配列およびヒト NADPH-P450 還元酵素遺伝子を持っている。そこで、本 P450 発現用カセットプラスミドへと PCR でクローン化したヒト P450 酵素遺伝子の部分配列を組み込むことにより、23 種のヒト P450 を大腸菌へと発現させることに成功した。図 1 に、組換え大腸菌から得られたヒト CYP2C9 の酵素発現スペクトルを示す (図 1)。

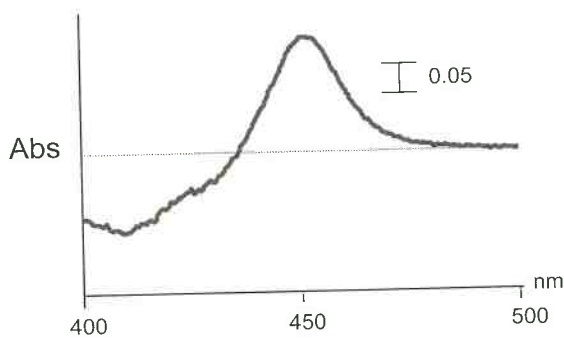


図 1 P450 発現用カセットプラスミドを用いた CYP2C9 の還元型 CO 差スペクトル

3. ヒト P450 による食品成分の代謝活性化と人種間差

サフロールやエストラゴール、8-メトキシプソラレンなどの食品成分は、生体内に取り込まれた後に P450 により代謝され、毒性をもつ化合物へと代謝活性化する事が知られている。そこで、先の P450 発現用カセットプラスミドを用いたヒト P450 発現システムを用い、ヒト CYP2A13 とその遺伝子多型酵素について食品成分の代謝活性化メカニズムを研究した。パセリなどに含まれる 5-メトキシプソラレンは、ヒト体内で代謝活性化され活性中間体になる事

が知られていたが、いずれの P450 分子種がこれら代謝活性化に関与しているのかは不明であった。そこで我々は、P450 発現用カセットプラスミドを用いて作製したヒト P450 酵素による実代謝実験を行った。その結果、5-メトキシプソラレンはヒト CYP2A13 により代謝される事が明らかとなった (表 1)³⁾。一方、フランス人白人の 3.8%に見られる 101 番目のアミノ酸がアルギニンからグルタミンへと変化した 4 番の多型では、5-メトキシプソラレンの代謝活性化能が完全に消失していた。本研究の結果より、たとえ同一の食品を摂取した場合でもその毒性は個人・人種間レベルで著しく異なる可能性があることが示唆された。

4. 食品成分の変異原性試験

P450 により代謝を受け生成した活性中間体の多くは、DNA に作用し突然変異を起こすことが知られている。一般的に、細胞の癌化は遺伝子の機能変化・発現調節の異常等が関与していると考えられており、現在これら変異原性化合物を検出するためには様々な試験法が利用されている。本研究では、化学物質などによりサルモネラ菌 DNA への損傷が生じた際、それらを修復するため SOS 反応が起こることを利用した *umu* 試験法を用いた。*umu* 試験法は、復帰突然変異試験の一つである Ames 試験とは異なり、Ames 試験で測定が不可能なヒスチジン含有物質でも評価可能な事から、食品成分の変異原性評価にも適用できると考えた⁴⁾。Ames 試験で陽性を示す食品成分について、*umu* 試験による変異原性試験を行った結果、エストラゴール、メチルオイゲノール、カテコール、カフェイン酸およびクロロゲン酸の 5 種類の食品成分にて変異原性が確認された。特に、本実験ではエストラゴールが最も高い変異原性を示した (表 2)。また、この変異原性の強さは、*umu* 試験に供したエストラゴール濃度に比例する事も判明した。今回の実験ではラットの S9 画分を用いて *umu* 試験を行っているが、我々のヒ

ト P450 分子種を用いることにより、ヒト S9 ものと考えられる。
画分の代替品として用いることも可能になる

表 1 ヒト CYP2A13 の遺伝子多型と 5-メトキシプソラレンの代謝活性化

CYP 2A13 アレル	アミノ酸 置換	アレル頻 度	5-MOP dihydrodiol 生成反応		
			K _m μM	V _{max} nmol/(min·nmol P450)	V _{max} /K _m ml/(min·nmol P450)
*1		野生型	1.44 ± 0.17	4.23 ± 0.36	2.98 ± 0.17
*4	R101Q	0.3% (日) 3.8% (仏) 1.0% (突)	N. D.	N. D.	N. D.
*5	F453Y	0.3% (日)	1.63 ± 0.12	3.20 ± 0.12	1.99 ± 0.13
*6	R494C	1.0% (日)	1.36 ± 0.10	4.69 ± 0.13	3.47 ± 0.17
*8	D158E	4.9% (日) 1.8% (中) 1% (仏)	0.85 ± 0.09	2.34 ± 0.07	2.81 ± 0.21
*9	V323L	1% (仏)	0.58 ± 0.06	1.84 ± 0.09	3.22 ± 0.23

(日): Japanese (仏): French Caucasian N.D.: not determined
(突): Tunisian (中): Chinese

表 2 *umu* 試験法を用いた食品成分の変異原性試験

食品成分	吸光度(650nm)	変異原性判定
コントロール(成分未添加)	0.35	陽性
エストラゴール	1.10	陽性
メチルオイゲノール	0.80	陽性
カフェイン酸	0.75	陽性
クロロゲン酸	0.71	陽性
ダイゼイン	0.42	陰性
クマリン	0.40	陰性

変異原性評価は、定法にもとづきコントロール値の2倍(0.7)以上の吸光度を示す場合を陽性とした

5. P450 酸素センサーによる酸素消費活性の検出

P450 は、脂溶性化合物に対して一原子酸素添加反応を触媒する酸化酵素である。すなわち、ヒト P450 酵素の酵素活性には分子状の酸素を必要とする。そこで我々は、P450 バイオセンサーにおいて多様なヒト P450 分子種の酵素活性を計測する手法を開発する目的で、酸素濃度を計測できるセンサー層（酸素センサー）表面に P450 を固定化する技術を開発した。酸素センサーには、シリカゲルに封入されたルテニウム錯体を用いた。ルテニウム錯体の蛍光は、通常の水溶液中では酸素分子による消光のため低下しており、酸素濃度が低下すると蛍光強度が増大することが知られている。基板表面に厚さ約 1 ミクロンの酸素センサー層を構築し、無機材料もしくは有機材料のマトリックスに P450 含有膜面分を封入することで、酸素センサーと固定化 P450 の積層構造を形成した。P450 を固定化したセンサー（P450 酸素センサー）の特性を評価する検討材料として、グルコースオキシダーゼによるグルコースの酸化反応を観察した。また、P450 酸素センサーにおいて P450 代

謝活性に応じて蛍光強度の増大を観測する技術を確認した⁵⁾。

6. 食品安全性評価に向けた P450 酸素センサーの開発

現在我々は、実食品に含まれる変異原性化合物について、それらの毒性と P450 酸素センサーとの反応性を評価する研究を進めている。ヒト体内に取り込まれた食品成分は、多様な P450 分子種と出会うことにより様々な酸化反応を受ける。この際、ある種の食品成分は代謝活性化により発がん化合物へと変化する物と考えられる。そこで、主に肝臓および腸、胃などの消化系器官を含むヒト臓器で発現している 23 種のヒト P450 酵素と、食品成分のカプサイシンとの反応性を評価した（図 2）。唐辛子の辛み成分であるカプサイシンは、P450 により代謝活性化を受ける変異原性物質として知られている。23 種のヒト P450 とカプサイシンとの反応を評価した結果、カプサイシンは主に、CYP1A1, CYP1B1, CYP2A6, CYP2A13, CYP2C8, CYP2C19, CYP2E1, CYP3A4 および CYP3A5 を塗布した P450 酸素センサーと強

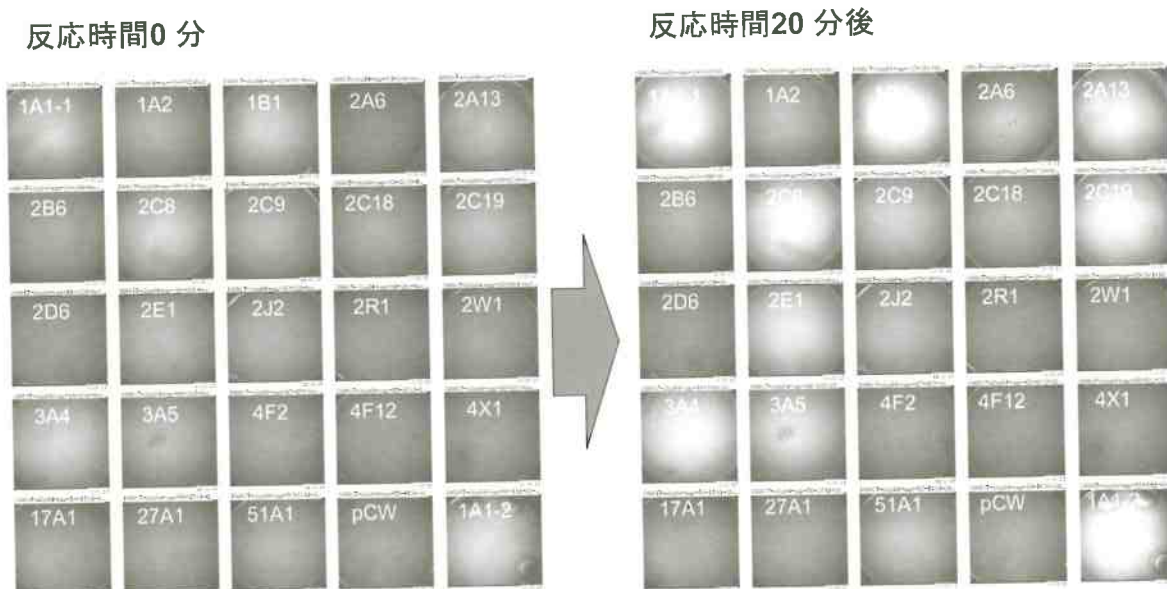


図 2 P450 酸素センサーとカプサイシンとの反応により得られたシグネチャ
基質：カプサイシン（終濃度 0.2mM）

く反応した。さらに、現在複数種の食品化合物と、P450 酸素センサーとの反応性を比較検討を行っており、P450 酸素センサーに加える食品成分により得られる P450 代謝パターンが異なることを確認している。

7. おわりに

海外からの食品輸入の増加に伴い、今まで日本人が会うことのなかった様々な食品が市場に供給されるようになってきた。一般的にヒトの発がんの 90~95%は外来性異物によるものと考えられており、日本人の食生活が戦後急激な変化を見せたことと、大腸がんなどの増加には何らかの相関関係があるものと考えられている。しかしながら現在でも、ヒト体内に取り込まれた多様な食品成分がどのような過程を経て代謝活性化を受けるのかについては不明な点が多く、食品による毒性発現の分子機構の解明が望まれている。

今回我々が独自に開発した P450 カセットプラスミドを用いることにより、ヒト P450 酵素を大腸菌へと安定的に発現させる事が可能となった。また、本 P450 酵素はヒト体内で起こる食品成分の代謝活性化を再現した。さらに、これらヒト P450 酵素を塗布した P450 酸素センサーを用いた研究から、体内に取り込まれた多様な食品成分と P450 酵素の反応を網羅的に解析する事が可能となった。今後は多様な食品成

分についてこれらの P450 反応パターンと *umu* 試験法により得られた変異原性の結果をデータベース化するなどし、現在では毒性が不明な化合物に対する毒性予測系などへの発展的応用へとつなげていきたい。

8. 謝 辞

本研究は、独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構生物系特定技術研究支援センター「新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業」平成 19 年度採択課題名「食品の安全性評価用超高感度ナノバイオセンサーの開発」の一環として実施いたしました。生研センター並びに関連の研究者の皆様へ深く感謝いたします。

9. 引用文献

- 1) Omura T.(2005), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 338(1), 404-409.
- 2) Schwarz D. *et al.* (2001) *Carcinogenesis* 22(3), 453-459.
- 3) Goto T. *et al.* (2010) *Drug Metab. Dispos.*, in press
- 4) Oda Y. *et al.* (1985) *Mutat. Res.*, 147(5), 219-229.
- 5) Chang G. *et al.* (2010) *Talanta* in press

◀ 国内情報 ▶

目標ランプを利用した直進誘導システム

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構
生物系特定産業技術研究支援センター

牧野英二・山下貴史・塙 圭二

播種、畝立て、畦塗りなど、直進性が求められるトラクタの運転操作を自動化し、従来よりも高精度な直進作業を実現するとともに、運転者の負担を軽減するシステムを開発した。本システムはビジョンシステムおよび自動操舵装置をトラクタに後付け装着し、作業経路終端に設置した目標ランプ（点滅ランプ）に向けて、高精度に自動直進作業ができる。目標ランプへ向かう方向のズレ検出だけでなく、撮影した画像上での地面の動きを解析し、車両の左右のズレを検出する画像処理手法を新たに開発し、高精度な直進作業が可能となった。

はじめに

トラクタなどの農用車両による播種や移植、畝立て、畦塗りなどの作業では、それ以降に行う管理や収穫などの作業を高精度かつ効率的に行うため、できるだけ直線的に作業することが求められる。そのため、オペレータは前方遠くのみ印、前行程の作業跡やマーカ跡などを凝視して長時間にわたる運転作業に集中しなくてはならない。さらに、その一方で、作業状態を確認するためにハンドルを握りながら振り返って後方を視認する必要もあるため、運転操作に熟練を要するだけでなく精神的にも身体的にも負担が大きかった。また、近年、GPSを用いたガイドシステムや自動操舵システムが実用化されているが、高価であるとともに、播種や移植などで要求される高い直進精度を得ることが困難な面がある。そこで、これらの問題を改善するため、比較的安価である汎用の単眼カメラを利用したビジョンシステムと自動操舵装置を市販トラクタに後付けして、作業経路上に設置した目標ランプに向けて、距離 500m程度の高精度な直進誘導が可能なシステムを開発した。

1. システムの概要と構成

トラクタを直進走行させるためには、作業経路や目標地点をシステム側に教示する方法が課題のひとつとなる。慣行のトラクタ作業では、予め目標地点にポールなどの目印を立てる場合があり、本システムはこれに倣い、目標地点に所定のランプを置き、カメラの画像で検出する方法とした。この方法は幅広い状況に対応でき、また、圃場での作業において分かり易く確実に、実用的である。

操作はいたって簡単で、作業行程の終端に目標ランプを設置し、トラクタを作業行程のスタート位置に進入させた後、本システムを作動させ、作業を開始するだけである。すると、ビジョンシステムにより目標ランプを検出するとともに、画像上での地面の動きを解析して自車両の目標経路からの左右方向の偏差を検出する。検出された目標ランプの位置情報と左右偏差情報を統合して自動操舵装置の操舵制御を行うことにより、目標ランプまで高精度に自動で直進作業を行うことができる（図1）。

本システムは、単眼カメラと画像処理装置で構成されるビジョンシステム、コントローラとモータ駆動部で構成される自動操舵装置、ターゲットの目標ランプ、システムのオン・オフな

MAKINO Eiji, YAMASHITA Takashi, HANAWA Keiji
〒331-8537 さいたま市北区日進町1丁目40-2



図1 直進誘導システムによる作業例
(大豆の播種)

どの操作を行うスイッチボックスなど比較的シンプルかつ安価な構成となっている(図2)。単眼カメラは図3のように、キャビン内の天井下面に取付けられ、前方の目標ランプと圃場の地面の様子を撮像する。目標ランプは複数個のLEDを光源とし、0.2秒間隔で点灯と消灯を繰り返す。図4は可搬性を優先したポータブル型の目標ランプで、本体部分の高さが60cm、重量は5.1kgであり、約300mの距離まで直進誘導が可能である。また、LEDの個数を増強した長距離対応の目標ランプでは、約500mの距離まで直進誘導が可能である。自動操舵装置は図5のように、電動モータにより歯付きベルトを介してステアリングホイールを駆動する構造であり、市販のトラクタにアドオン(後付け装着)が可能となっている。通常の手動操舵と自動操舵モードの切り換えは、手元のスイッチによりワン

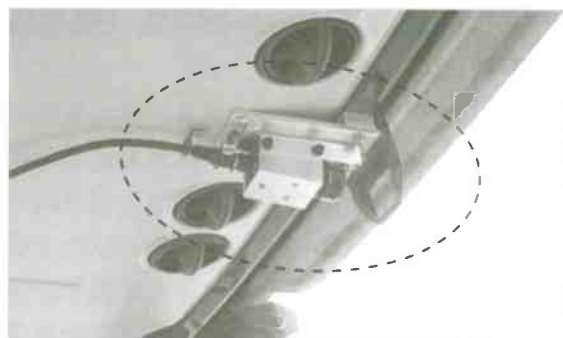


図3 ビジョンシステム(単眼カメラ)
〔カメラ: SONY XC-56〕
〔レンズ: 焦点距離 12 mm〕

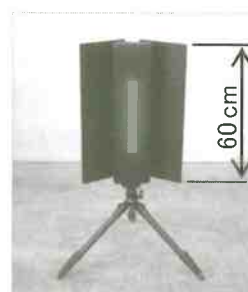


図4 目標ランプ(ポータブル型)



図5 後付け型自動操舵装置
(モータ駆動部)

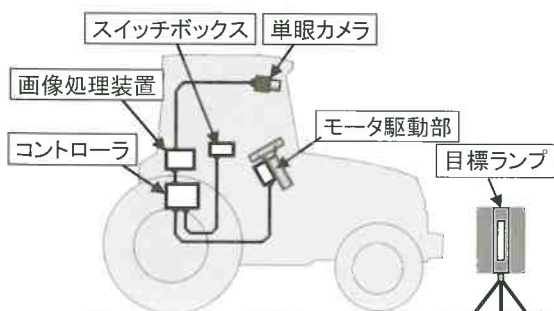


図2 直進誘導システムの構成

タッチ操作で可能であり、また、トラクタが目標地点に到達すると、ブザーが鳴ると共に自動操舵モードが解除される仕組みとなっている。

2. 新しい画像処理・制御手法（偏差修正制御）の開発

トラクタをスタート地点から直進経路上を走行させる場合、例えば、圃場の地面に横方向の傾斜がある場合や、作業機が横方向の反力を受ける場合には、トラクタは前進と共に横ずれを生じる状態となる。その場合、トラクタの車体方向を目標ランプの方向に制御する従来手法では、トラクタの走行軌跡は図6（左）のように湾曲した形状となる。そこで、本システムでは直進経路からの横偏差を検出して走行制御にフィードバックする手法を開発し、図6（右）のように安定した直進作業を実現した。

目標ランプの位置と直進経路からの横偏差は、単眼カメラの画像の処理によって検出される。図7は稲の刈り株が残る水田での直進作業中における単眼カメラの画像（白黒、横640×縦480画素）であり、右隣の暗い部分は前行程の作業跡である。図7・中央上の白枠線は目標ランプ

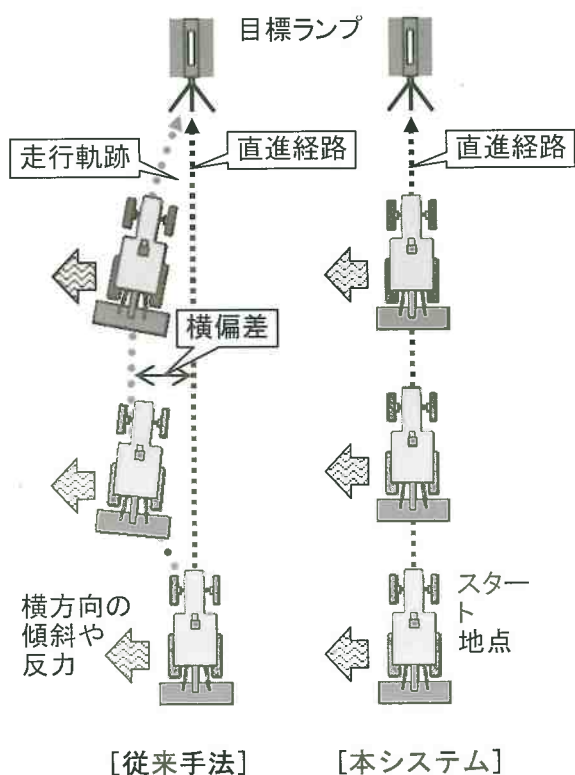


図6 横方向の外力が作用する場合

の検出処理を行うウィンドウであり、中央の白い点が目標ランプである。トラクタの走行に伴って画像は大きく揺れ動くので、ウィンドウは目標ランプの位置に追従して画像中を移動し、検出された目標ランプの位置からトラクタのヨー角が算出される。

次に、図7・中央下の5個の黒枠線は、画像上での地面の動きを検出するためのウィンドウであり、目標ランプの手前の地面上で、大きな明暗変化がある特徴的な部分（以下、特徴点）に対して設定される。トラクタの走行に伴って画面上を移動する特徴点の位置を追跡し、各特徴点の位置の変化を目標ランプとの相対位置として解析することにより、横偏差が高精度に検出される。検出されたトラクタのヨー角と横偏差は統合され、自動操舵装置によって前輪の舵角が制御され、自動直進が行われる。また、画像処理装置は小型・汎用の市販品を使用しており、0.1秒周期で処理が実行される。

開発した偏差修正制御によって、傾斜地や作業機からの外力を受けてトラクタが横方向にずれる状況への対応能力が向上するだけでなく、カメラの取付け角度などの誤差への対応能力が向上し、カメラの取り付け調整やメンテナンスの容易化が可能となり、外付け装置としての適用性が格段に向上した。以上のように、ビジョンシステムは複雑な処理を行い、高精度な直進

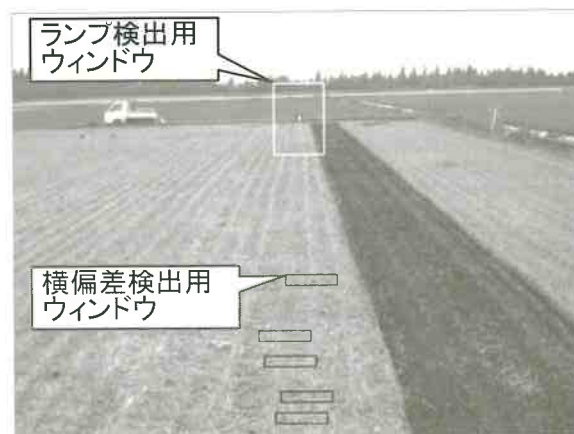


図7 単眼カメラの画像処理の例

精度を実現するが、トラクタを作業開始地点に侵入させてから、目標ランプと画像ムラを検出して自動直進が可能な状態になるまで数秒程度の時間しか要しないことも付記しておく。

3. 実作業への適用試験の一例

本システムに耕うん同時施肥播種機（2条）を装着し、大豆の播種作業を自動運転および手動運転にて行い、ディスク式中耕除草機（3連）を利用した手動運転による中耕培土作業に与える影響を調査した。中耕培土の作業精度は、その後の生育が阻害される程度に培土が過剰であるものを培土過剰とし、培土が少しもかからないものを培土不足とした。試験結果を表1に示す。圃場1は矩形圃場であり、また遠方に目標物等が設定しやすいため手動運転が運転者A及

びBいずれも標準偏差が約5cmと非常に高精度であった。筆者らの経験上、これは手動運転の限界とも言える。一方、自動運転では標準偏差が2.3cmと手動運転のさらに半分以下で、非常に高精度で播種できた。圃場1における播種後31日の大豆の様子を図8に示す。手動では作物列が湾曲しているが、自動では定規で引いたような直線になっている。中耕培土試験の結果は、手動はオペレータの特性によりその差が著しかった。手動Aは経験豊富なオペレータであり、後の管理作業のために急なハンドル操作を行わずに緩やかに曲がる曲線で隣接条間を広めにとって播種する傾向であったため、中耕培土作業では直接ロスとなる培土過剰の発生は少ないものの、培土不足が多く発生した。手動Bでは、走行経路の修正を細かく行って播種する傾向であったため直線性は高かったが、そのため

表1 大豆の播種、中耕の作業試験結果

圃場（生研センター附属農場・水田転換畑）		圃場1			圃場2			
行程長 [m]		100			70			
試験条数（使用作業機）		16条（播種:2条, ディスク式中耕除草機:3条）						
播種 ^{※1}	試験内容（運転者 ^{※2} ）	自動	手動(A)	手動(B)	自動	手動(A)	手動(B)	
	作業速度 [m/s]	0.44	0.44	0.44	0.33	0.33	0.33	
	直進経路からの標準偏差 [cm]	2.3	4.9	4.6	2.5	8.6	6.0	
	変動幅 [cm]	-12 ~ 9	-20 ~ 17	-16 ~ 12	-12 ~ 7	-20 ~ 27	-15 ~ 23	
	隣接条間 ^{※3} [cm]	72.6	84.5	76.5	74.5	83.6	74.8	
中耕 ^{※4}	試験内容（運転者 ^{※2} ）	手動(A)	手動(A)	手動(A)	手動(A)	手動(A)	手動(A)	
	作業速度 [m/s]	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	
	培土 作業精度	培土過剰割合 (%)	2.1	1.2	4.0	2.6	3.4	3.0
		培土不足割合 (%)	22.7	45.3	13.9	9.7	13.0	13.0

※1 播種日：I区(2009/6/27), II区(2009/6/26), 品種：タチナガハ

※2 運転者A（20代男性）・運転者B（50代男性）いずれも経験者、自動は目標ランプを複数設置して往復作業。

※3 条間75cmが試験設定値 ※4 播種後20日、1回目



図8 大豆の立毛状況（圃場1，播種後31日，左：自動，右：手動）

に中耕培土作業では局所的に曲がった箇所では培土過剰が多く発生する傾向となった。自動は、培土過剰を2.1%と非常に小さくでき、培土不足割合も比較的中庸であった。圃場2は、不定形圃場であることに加え、播種時の圃場が湿潤で0.33m/sと低速作業を余儀なくされたため、手動は、A、Bともに直進性が8.6、6.0と圃場1の場合に比べて劣る結果となった。一方、自動は圃場1の場合と同様、標準偏差が2.5と高い直進性能を示した。中耕培土作業の精度も、手動がA、Bともに培土過剰が3%以上、培土不足が13%であったが、自動はそれぞれ2.6%、9.7%と手動よりも良好な結果であった。

おわりに

トラクタに汎用単眼カメラを利用したビジョンシステムと自動操舵装置を後付け装着して、作業経路上に設置した目標ランプに向けて、距離500m程度までの直進誘導が可能なシステムを開発した。報告した大豆播種以外にも、水田あぜ塗り・ハウス内耕うんなど直進性を要求される作業において、本システムが手動運転に比べ、高精度な直進作業を行うことができ栽培管理の精度向上に活用できたことも確認した。

本システムを利用することにより、オペレータは作業中にハンドル操作から開放され、圃場や作業状態の確認および作業機の操作などに専念できるため、作業負担を軽減するとともに、安全かつ効率的な作業が行える。さらに、本システムを利用して隣接条間を等間隔にすると、播種機の条数と中耕機の連数が異なっても作業精度を維持できるため、使用する作業機の選定が容易になる。ただし、本システムのみで直進作業を複数行程行う際には、目標ランプを移設あるいは複数利用する必要があるため、今後、ソフトウェアの改良を行って、複数の目標ランプを利用せずに簡易に複数行程に対応できる機能を付加するための研究を継続して行う予定である。

参考文献

- 1) 塙圭二ら：農用車両の自動直進制御用の画像処理手法の研究，電気学会誌，129-C(10)，1949-1957，2009
- 2) 牧野英二，濱田安之，塙圭二：生研センター平成21年度研究報告会資料，1-12，2010

◀地域の先端研究▶

超低温保存したウシ卵子から 黒毛和種子牛の生産に成功

佐賀県畜産試験場 大家畜部

詫摩哲也・江副大輔・一丸 仁

国内における黒毛和種優良遺伝資源の保存技術確立を目的とした研究により、超低温保存したウシ卵子由来の体外受精胚（個体識別可）から黒毛和種子牛2頭の生産に成功した。また超低温保存したウシ卵子由来の体外受精胚（個体識別可）を再度保存することにも成功し、この胚移植により3頭の黒毛和種子牛が誕生した。ここでは、研究の背景、研究事例の紹介および我々の試験場における卵子保存技術の展望について紹介する。

1. はじめに

ウシの繁殖技術は、1950年における家畜改良増殖法の制定を軸として、人工授精技術の普及・実用化がはじまり、凍結精液の実用化へと発展していった。それから60年が経過した現在においても、人工授精技術は家畜の育種改良や増殖における主たる技術として利用されている。特に凍結精液の普及・実用化およびその流通により雄側からの改良が急速に進み、優良な種雄牛の遺伝形質を受け継いだ多数の子孫が国内全域で生産できるようになった¹⁾。

一方、雌側からの育種改良へのアプローチは、MOET (Multiple Ovulation and Embryo Transfer) と呼ばれる胚移植技術により行われ、同時に多数の子牛を生産することで牛群の遺伝的レベルの向上が図られてきた²⁾。この胚移植技術もまた凍結精液と同様に、様々な技術改良がなされ、凍結胚移植技術の普及・実用化による時空間を越えた利用が可能となった。

現在、ウシの胚移植技術では性ホルモン投与による過剰排卵処理を利用して体内から受精した胚を採取する方法と、ウシの卵巣から卵子を回収し体外受精を含む体外培養系によって胚を

生産する方法の2つの手法が利用されている。特に後者においては食肉処理場で採取した卵子や生体から直接採取した卵子を使用するなど、幅広い胚生産が行われている。しかし、卵子は精子や受精胚とは異なり非常に大きな単一の細胞であるため多くの水分を含有していること、さらに減数分裂という特殊な核の成熟過程を経る生理的な特徴を有していることから、卵子の長期保存は極めて困難である。実際、卵子を超低温保存して産子作出に成功した研究機関は限られており³⁾⁻⁸⁾、生体から直接採取した卵子を個体識別した状態で保存に成功したという事例はない。

2. 卵子や胚の超低温保存方法

畜産繁殖学における卵子(図1)や胚(図2)の超低温保存法は、主に2つの手法が利用されている。そのひとつが緩慢冷却急速融解法、いわゆる凍結保存法、である。この凍結保存法はプログラムフリーザーを用いてマイナス30℃以下まで徐々に冷却していくことで、細胞質内に存在する自由水の脱水を引き起こし、結果として細胞質内の氷晶形成を抑制して細胞の生存性を確保している。また凍結保存液に溶解している耐凍剤が低濃度であり、融解後の細胞質内への自由水の流入も速やかに行われることから、

TAKUMA Tetsuya, EZOE Daisuke, ICHIMARU Hitoshi

〒849-2305 佐賀県武雄市山内町宮野 23242-2

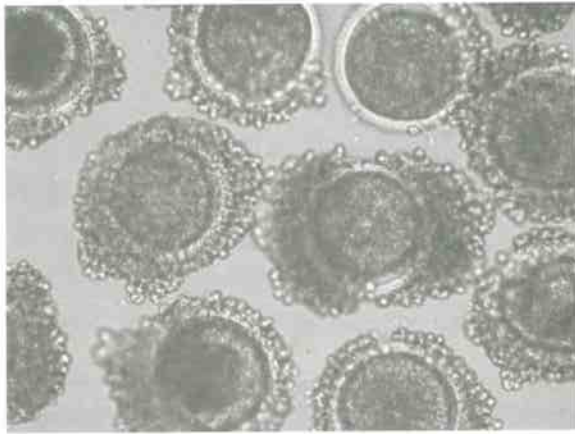


図1 ガラス化保存した卵子

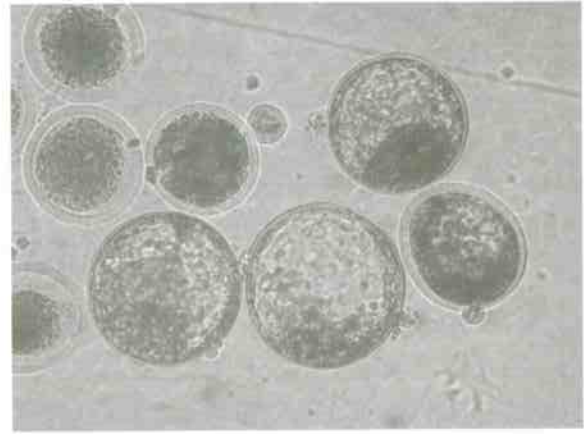


図2 ガラス化保存卵子由来体外胚

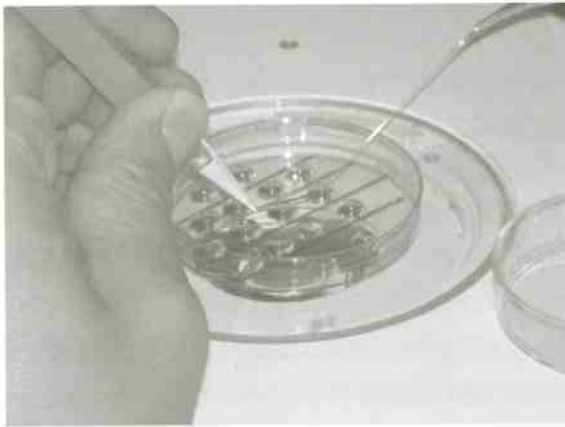


図3 卵子および胚のガラス化保存処理

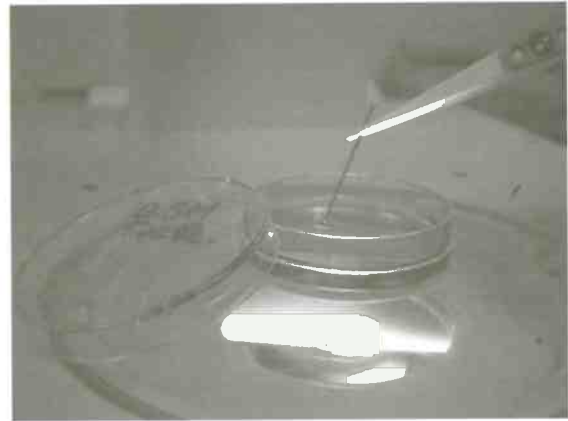


図4 ガラス化保存卵子の加温操作

簡易で操作性に優れるため生産現場で広く利用されている。2つ目の手法はガラス化保存法である。ガラス化保存法は凍結保存法とは対照的に保存液に溶解している耐凍剤が高濃度であることから、プログラムフリーザーによる緩慢冷却を必要とせず、浸透圧差を利用した細胞質内の脱水と保存液の急速な冷却による固化（ガラス化）を利用した保存法である（図3，図4）。凍結保存法に比べ技術的な難易度は高いが、耐凍性の低い胚の保存においても高い生存性を確保できることから、畜産繁殖学における新しい技術として非常に注目を浴びている。

3. 研究事例

これまで、高い能力を持った種雄牛の凍結精

液の交配およびその精液を利用して生産した胚の移植により牛の改良や増産が行われてきた。一方、種雄牛の凍結精液と同様に優良な遺伝資源と成り得る雌牛の卵子を長期間保存することで、改良効率を向上させようという試みがなされてきたが、保存後の卵子の生存性が著しく低下することから実用化は非常に困難であった。そのため、当场では平成20年度から卵子保存法の実用化に向けた技術改良に取り組んできた。

そして今回、卵子を長期間保存するために使用する保存液の量を極微量にし、冷却速度を早めるガラス化保存技術を新たに確立した。この保存法は雌牛から回収した卵子を個体毎に識別できることから、超音波エコーで雌牛の卵巣を観察しながら卵子（図1）を回収し、直ちに超低温保存を実施した。その後の体外受精により

できた胚（図2）を，県内の畜産農家の協力のもと繁殖牛2頭に新鮮胚移植したところ2頭とも受胎し，平成22年6月24日および26日に無事子牛を出生させることに成功した。

さらに，培養後すぐに移植出来なかった胚を有効利用するために再度超低温保存し，数日後に当場の繁殖牛2頭および畜産農家の繁殖牛5頭に移植したところ，うち4頭で受胎が確認された（図5）。そして，平成22年6月29日に当場にて，続いて同年7月4日に県内の畜産農家にて無事子牛を出生させることに成功した（図6）。なお，卵子の時期と胚の時期の二度の超低温保存による子牛の生産は国内では初めての事例である（図7）。

4. 卵子保存技術の展望

今回生産した子牛は事前に登録しておいた父母との間で親子判定に矛盾が認められなかったことから，個体毎に回収された卵子を優良遺伝資源として保存する技術の実用化に一步近づけたものと考えられた。では，卵子の保存技術を確立し家畜の育種改良や増産に向けて活用していくには，今後どういうことが必要になってくるだろうか。

発生工学としての観点から言えば，超低温保存した卵子が体外受精後に胚移植可能な状態にまで発育する確率は0～20%程度（保存していない卵子では25～40%程度）であり，雌牛の個



図5 再ガラス化保存胚の移植による胎子（胎齢55日目）



図6 再ガラス化保存胚の移植による子牛の生産（分娩後4日目）

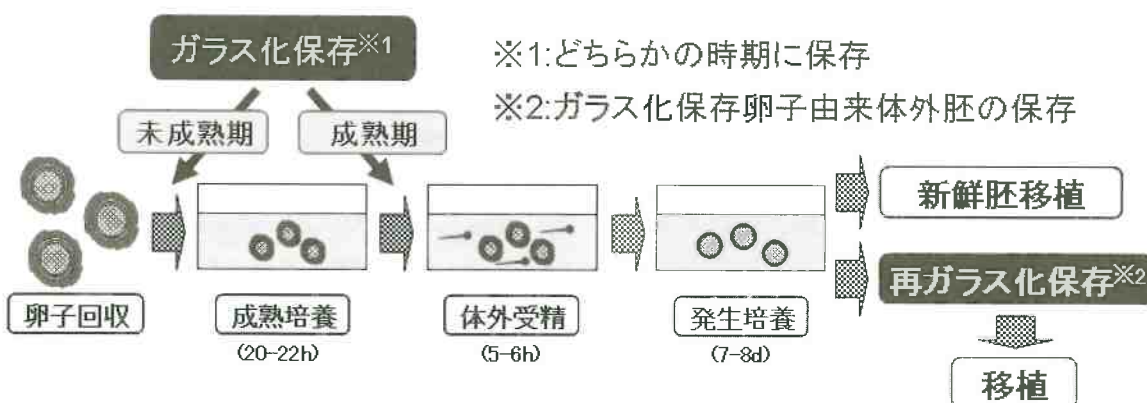


図7 ウシの体外胚生産過程における卵子および胚のガラス化保存時期

体差も認められることから、更なる技術の改良が必要になってくると思われる。科学的な成否のカギを見つけださなければならない。

また育種改良の観点からは、次世代の種雄牛候補の素となる子牛を作出していくために、この技術が利用できるのではないかと考えられる。遺伝的に優秀な種雄牛を生産していくためには、優秀な雌牛の選抜が必要となってくる。選抜された雌牛が、必要とする時に妊娠していたり、あるいは病気に罹患していたりといくつかの障害に遭遇し、必ずしも改良に供したいときに利用できるとは限らない。遺伝的多様性⁹⁾の維持という改良の源泉を加味した上で、より多くの情報（枝肉成績など）を付与して、事前に卵子を超低温保存しておけば、必要なときに必要な交配が可能となり、世代を越えた育種改良がより効率的におこなえるものと考えられる。

さらに家畜の増産や種の保存という観点からは、卵子を個体識別することを前提として、同一個体から繰り返し卵子を回収・保存していくことで、一度の体外受精で大量の移植可能胚を生産できるのではないかと考えられる。通常、生きた雌牛1頭から回収される卵子は1回あたり平均15個程度であるが、この回収・保存を繰り返し行えば数百個単位での体外受精も可能となる。

これら3つの観点のみならず、卵子保存技術に秘められた可能性は多岐にわたることから、家畜改良・増産の新たな世界が切り開かれていくものと思われる。

5. おわりに

本研究における卵子の長期保存技術の確立により、牛において優秀な遺伝資源の保存方法が精子（雄由来の遺伝資源）と胚（一個体としての遺伝資源）に限られていたものが、卵子（雌由来の遺伝資源）でも可能となり、牛の改良に大きく貢献するものと期待される。

また、一度保存した卵子から作出した胚が再度保存可能になることで、胚をより多くの雌牛

に移植することが可能となることから、ブランド牛の素となる黒毛和種の子牛を効率よく増やす技術のひとつとして実用化が進むよう、更なる技術改良を行っていきたい。

6. 謝 辞

本研究を遂行するにあたり終始ご指導とご協力いただいた山口大学の音井威重教授、佐賀大学（現：北海道大学）の川原学准教授、佐賀大学（現：家畜改良センター新冠牧場）の青野晃氏に感謝する。また、ウシ卵子の保存法の確立に向け数々のご助言とご協力をいただいた九州沖縄農業研究センターの高橋昌志氏、阪谷美樹氏、鹿児島県肉用牛改良研究所の磯部知弘氏、鹿児島県南薩家畜保健衛生所の林史弘氏、福岡県農業総合試験場の笠正二郎氏、長崎県農林技術開発センターの谷山敦氏、新潟県畜産研究センターの瀬田剛史氏、石川県畜産総合センター（現：石川県南部家畜保健衛生所）の堀登氏に深謝する。

7. 文 献

- 1) 社団法人日本家畜人工授精師協会（1998），家畜人工授精講習会テキスト，290-293，東京
- 2) 社団法人日本家畜人工授精師協会（2010），家畜人工授精講習会テキスト，25-29，東京
- 3) Otoi ら（1995），*Cryobiology*，32，455-460
- 4) Suzuki ら（1996），*Cryobiology*，33，515-524
- 5) Kubota ら（1998），*Mol Reprod Dev*，51，281-286
- 6) Vieira ら（2002），*Cryobiology*，45，91-94
- 7) Abe ら（2005），*Biol Reprod*，72，1416-1420
- 8) Vieira ら（2008），*Reprod Domest Anim*，43，314-318
- 9) 向井文雄（2009），第16回日本胚移植研究会大会講演要旨集，9-10，日本胚移植研究会，京都

◀ 文献情報 ▶

性選別精子を用いた *Bos taurus*, *Bos indicus* 及び *indicus-taurus* 交雑乳牛からの大規模な体外受精卵生産と受胎成績

Large-scale *in vitro* embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm.

J.H.F. Pontes^{a,b)}, K.C.F. Silva^{a)}, A.C. Basso^{b)}, A.G. Rigo^{b)}, C.R. Ferreira^{b,c)}, G.M.G. Santos^{a)}, B.V. Sanches^{b)}, J.P.F. Porcionato^{b)}, P.H.S. Vieira^{b)}, F.S. Faifer^{b)}, F.A.M. Sterza^{a)}, J.L. Schenk^{d)}, M.M. Seneda^{a)}

^{a)}Laboratório de Reprodução Animal, DCV-CCA-UEL, Londrina PR, Brazil, ^{b)}In Vitro Brasil Ltda. Mogi Mirim SP, Brazil, ^{c)}Thomson Laboratory. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo SP, Brazil, ^{d)}Department of Animal Sciences, Colorado State University, Fort Collins, CO, USA.

Theriogenology, 74, 1349–1355 (2010)

本論文においては、性選別精子を用いた *Bos taurus*, *Bos indicus* 及び *indicus-taurus* 交雑乳牛からの大規模な体外受精卵生産と受胎成績についての検討が行われた。計 5,407 回の生体内卵子吸引 (OPU) において、回収卵数 (90,086 個)、使用可能卵子数 (64,826 個)、Gir (617 頭)、ホルスタイン (180 頭)、1/4 ホルスタイン・3/4Gir (44 頭) 及び 1/2 ホルスタイン・1/2Gir (37 頭) 交雑種からの体外受精卵生産数と受胎成績について解析が行われた。使用可能卵を 38.8°C、5% 二酸化炭素の気相下で 24 時間体外成熟培養後に、パーコールを用いて運動精子を分画した Gir (8 頭) あるいはホルスタイン (7 頭) の種雄牛由来の凍結融解性選別 X 精子を用いて 18~20 時間体外受精後、体外成熟とほぼ同じ条件で体外培養が行われた。後半 2~5 日間はポータブルインキュベーター内で培養を行いつつ、24~72 時間の輸送 (最大 2,000km) 後に、新鮮受精卵として移植が実施された。平均 16.7±6.3

個の卵子が OPU により回収され、72.0% が利用可能卵子であった。回収卵子数及び使用可能卵子数はそれぞれ、Gir で 17.1±4.5 個及び 12.1±3.9 個、ホルスタインで 11.4±3.9 個及び 8.0±2.7 個、1/4 ホルスタイン・3/4Gir で 20.4±5.8 個及び 16.8±5.0 個、1/2 ホルスタイン・1/2Gir で 31.4±5.6 個及び 24.3±4.7 個であり、品種間に有意な差が認められた ($p < 0.01$)。OPU/IVF による平均作出胚数及び受胎率は、Gir で 3.2 個 (12,243/3,778) 及び 40%、ホルスタインで 2.1 個 (2,426/1,138) 及び 36%、1/4 ホルスタイン・3/4Gir で 3.9 個 (1,033/267) 及び 37%、1/2 ホルスタイン・1/2Gir で 5.5 個 (1,222/224) 及び 37% であった。さらに、受精卵を培養しながらの長距離輸送後の移植においても問題なく受胎可能であることが明らかとなり、胚の国際流通の可能性も示された。また、雌産子の比率は、ホルスタインで 91%、Gir で 87% であった。

雌雄産み分け技術は、目的とする性の子牛のみを生産することにより効率的な経営を可能とする。日本においても、フローサイトメーターによる雌雄産み分け用選別精子 (Sort90 など) が販売されるようになり、90% 以上の確率で未經産牛においては希望する性の子牛が生産可能となってきている。しかしながら、経産牛においては性選別精子による受胎率は低く、特に、性選別精子を利用した経産牛からの効率的な採卵は困難である。しかし、能力のわかった経産牛の後代生産への性選別精子の利用は強く望まれており、本論文に示されたような生体内卵子吸引技術と性選別精子の体外受精による受精卵の作製が必要と考えられる。現在、家畜改良事業団から販売されている Sort90 の体外受精への利用は制限されており、フィールドで広く使用することはできない状態である。後継牛を効率的に生産するためにも本技術は非常に重要な技術と考えられることから、今後、性選別精子のフィールドでの体外受精への利用が可能となることを望むものである。

(抄訳：下司雅也, GESHI Masaya, 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究所)

◀ 文献情報 ▶

セントロメア領域を介した染色体排除機構による半数体植物の作成

Haploid plants produced by centromere-mediated genome elimination.

M. Ravi and S. W. L. Chan

Department of plant biology, University of California, Davis, USA

Nature, 464, 615-618 (2010)

植物育種において、半数体作出技術は非常に重要なものである。遺伝的背景の雑多な1個体からの半数体作出は、さらにその後の染色体倍加による完全ホモ個体の作出につながる技術であり、これにより育種期間を大幅に短縮することが可能となる。現在、半数体の作出には大きく2つの方法がとられている。1つは花粉培養などの配偶体の培養から直接半数体を得るもの、もう一つは、まれなケースではあるが、種間交雑後代において、一方の染色体のみが遺伝できず、脱落してしまう現象を用いたものである。しかしながら、前者・後者ともに種・品種間での多型が非常に大きく、現状では、半数体育種が適用可能な植物は限られている。また、後者の染色体の脱落機構については、細胞分裂時、セントロメア領域と紡錘体との結合が両親染色体間で異なることが原因の一つではないかとの報告がなされているものの、詳細についてはわかっていない。本研究では、セントロメア特異的ヒストンのCENH3を用いることにより、シロイヌナズナで半数体を作成することが可能であるという報告をしている。

著者らは、CENH3のN-末端部位にあたるtail領域を通常型ヒストンH3の同部位と交換したコンストラクト(GFP-tailswap)を作成し、相補試験を行った。GFP-tailswapは、*cenh3-1*変異体の胚致死表現型を相補することができた。しかしながら、成長した植物体は体細胞分裂には影響がみえなかったものの、配偶子形成に何らか

の影響があると考えられ、大部分が不稔であった。次に*cenh3-1/GFP-tailswap*植物体を花粉親、雌しべ親にし、野生型の個体との交雑試験を行ったところ、著しい稔性の低下が見られたものの、得られた交雑種子中には生存可能な種子が存在していた。これら交雑種子の染色体数を調べたところ、雌しべ親*cenh3-1/GFP-tailswap*個体と野生型花粉の交雑の結果生じた種子中には、25-45%ほどの割合で野生型の半数体が生じることを明らかにした。また、割合は低くはなるものの、花粉親にGFP-tailswap個体を用いた場合でも半数体を得ることが可能であった。この場合、得られる半数体は、細胞質ゲノムも母方に用いた野生型のものを有していることとなる。さらに、得られた半数体個体からは、減数分裂時の不等分裂により倍数体個体が生じた。さらに、シロイヌナズナの自然4倍体生態型であるWa-1を花粉親にすることで、Wa-1の半分の染色体が脱離し2倍体個体を生む結果となった。この染色体脱離機構は受精後初期の細胞分裂時において、*cenh3-1/GFP-tailswap*を含む親由来の染色体セントロメアの機能不全によるものと考えられる。

現状では、半数体の作出のために、野生型のCENH3機能を欠失させるもしくは低下させつつ、GFP-tailswapコンストラクトを導入した個体を交雑親に使用する必要がある。しかしながら、CENH3自体は真核生物に共通に存在するタンパク質として知られていることから、全ての植物においてCENH3機能不全個体を用いた半数体個体の作成ができることが示唆された。さらに、植物育種における組換え体の問題においても、変異型*cenh3*並びにGFP-tailswapコンストラクトを導入した植物の染色体が最後には脱離するということが、有利に働くものと考えられる。

(抄訳：高田美信, TAKADA Yoshinobu, 東北大学大学院 生命科学研究所)

◀ 文献情報 ▶

***Saccharomyces cerevisiae* の様々なストレス応答におけるトレハロース蓄積の異なる重要性**

Differential importance of trehalose accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* in response to various environmental stresses.

Siraje Arif Mahmud, Takashi Hirasawa, and Hiroshi Shimizu

Department of Bioinformatic Engineering, Osaka University, Osaka, Japan

Journal of Bioscience and Bioengineering, 10, 262-266 (2010)

本論文ではトレハロース高蓄積組み換え酵母の、様々な環境ストレス条件下での応答が検討された。

トレハロースは細胞内で保水性、protein binding によるタンパク質の安定化、細胞膜の整合性の保持などの作用を持ち、生物のストレス応答において、重要な役割を果たしていることが知られている。しかしストレスの種類の違いによるトレハロース蓄積の変化はこれまで報告されていない。

Saccharomyces cerevisiae においてトレハロースは *TPS1p* と *TPS2p* によりグルコースから合成され、*NTH1p*、*NTH2p*、*ATH1p* によりグルコースに分解されている。この研究では、トレハロース分解酵素をコードしている遺伝子 *NTH1*、*NTH2*、*ATH1* の三重破壊株と、トレハロース生合成酵素をコードしている *TPS1* もしくは *TPS2* を過剰発現させた三重破壊株におけるエタノール、熱、酸化、凍結などの環境ストレスへの耐性とトレハロース含量の関係が検討された。

5~8%のエタノールストレスを導入した結果、親株のトレハロース含量に変化はなかったが、組み換え株は、ストレス導入後徐々にトレハロースを蓄積させ、その濃度はストレス強度と相関していた。また親株に比べ比増殖速度も若干向上した。38~41.5°Cの熱ストレスを導入した結果、親株、組み換え株共にストレス導入直後

から温度に相関した急激なトレハロース蓄積を示し、以降は高い蓄積レベルを維持した。組み換え株は親株より高いトレハロース蓄積を示し、比増殖速度も向上した。しかし 0.2~0.5mMH₂O₂ による酸化ストレスを導入後、親株、組み換え株共にトレハロース濃度、比増殖速度に大きな変化はなかった。(組み換え株は親株より若干トレハロース濃度が高かった)

-20°Cで1週間の冷凍ストレス導入後は、組み換え株は親株よりトレハロース濃度、生菌率共に高い値を示した。

今回の研究でトレハロース合成経路はエタノール、熱、凍結による環境ストレスから誘導を受け、トレハロース蓄積はこれらのストレス耐性に有効であることが示された。しかし酸化ストレスに対しては誘導を受けず、耐性にも寄与しないことが明らかになった。また筆者らの以前の研究で、塩ストレスにおいて、ストレス導入前のトレハロース蓄積がストレス導入後のトレハロース蓄積より重要であることが明らかにされている。以上よりトレハロース蓄積のストレス耐性に対する重要性はストレスの種類によって異なることが示された。

さらに組み換え株ではエタノール、熱、冷凍ストレス条件下で *TPS2* - 過剰発現三重破壊株が最も高いトレハロース蓄積をしたことから、*TPS2* がトレハロース合成を律速している可能性が示唆された。しかしストレス耐性とトレハロース濃度が相関していない箇所(冷凍ストレス)もあり、他の因子(アミノ酸や代謝等)の更なる研究が必要である。

(抄訳: 佐々木慧、SASAKI Kei、広島大学大学院生物圏科学研究科)



バックナンバーのご案内
第 141 号
2010 年 9 月 15 日発行

総説

牛乳および食肉の機能性食品への展開 有原 圭三

総説関連

血管保護作用を有する鶏由来低分子コラーゲンペプチドの開発研究 -コラーゲンペプチドの新規作用を探る-

..... 河口友美・高畑能久・森松文毅

親鶏由来の機能性リン脂質：スフィンゴミエリンの抗高脂血症及び抗高血糖効果 府中英孝・楠木恵太・

松山弘幸・藤野武彦・大西正男・小玉芳郎・杉山雅昭

乳脂肪球膜の摂取による肌質改善効果 後藤英嗣・辻 敏宏・明石啓子・元島英雅

.....

1073R-1乳酸菌に免疫機能を活性化させる効果があることを発見 池上秀二・牧野聖也・伊藤裕之
GABA 高含有チーズを安定生産する手法を開発～GABA 生成力が強い乳酸菌を含むチーズ発酵種菌～ 野村 将

国内情報

バイオディーゼル燃料のトラクタへの利用 清水一史・千葉大基・杉浦泰郎・高橋弘行・積 栄・手島司・原野道生

文献情報

部分的不妊化処理ニワトリ胚への始原生殖細胞の移植による生殖細胞の置換 (抄訳：下司雅也)

アブラナ自家不和合性ではトランスに作用する低分子 RNA が優劣性を決定する (抄訳：高田美信)

Lactococcus lactis 生細胞中のペプチドグリカンのナノスケール構造の可視化 (抄訳：柳原沙恵)

生研センターからのご案内



バックナンバーのご案内
第 140 号
2010 年 7 月 15 日発行

総説

家畜繁殖学の挑戦と近未来 佐藤英明

総説関連

糖尿病発症トランスジェニックブタの医療用実験動物としての実用化 梅山一大・渡邊将人・

松成ひとみ・黒目麻由子・長嶋比呂志

ブタゲノム塩基配列の概要解説の完了と今後の展望について 上西博英

超小型豚（マイクロミニピッグ）の安定生産と実験動物としての可能性 金子直樹

国内情報

ドリフト低減効果の高いスピードスプレーヤ用ノズルの開発 水上智道・吉田隆延・宮原佳彦・猪之奥康治・太田智彦・山田祐一・金光幹雄

特別情報

新たな「食料・農業・農村基本計画」の概要 萩原英樹

文献情報

ブタ胚性幹細胞と思われる細胞の体外および体内における性状 (抄訳：下司雅也)

植物において2本鎖small RNAがサイレンシングの細胞間移行シグナルとして機能する (抄訳：高田美信)

出芽酵母における、異種遺伝子発現のための染色体組み込み部位の性質決定 (抄訳：土肥良弥)

生研センターからのご案内

編集後記

142号をお届けします。本号では特集として「食品の安全・安心確保のための技術開発」を取り上げました。総説で川本伸一氏(食品総合研究所)に食品の安全性確保のための技術開発の動向と展望について、総説関連で乙竹充氏(養殖研究所)らにヒラメの感染症を診断する「抗体チップ・プロテインチップ」の開発、数坂昭夫氏(十勝テレホンネットワーク(株))らに生乳に混入した抗菌性物質の自動検知センシングシステムの開発、今石浩正氏(神戸大学)らに食品の安全性評価へのバイオセンサーの利用について、それぞれご執筆戴きました。

その他の研究情報としては、牧野英二氏(生研センター)らに目標ランプを利用したトラクタの直進誘導システムの開発、詫摩哲也氏(佐賀県畜産試験場)らに超低温保存したウシ卵子からの黒毛和種子牛の生産について、それぞれご執筆戴きました。

また、本号の文献情報は、下司雅也氏(畜産草地研究所)、高田美信氏(東北大学)、佐々木慧氏(広島大学)にご執筆戴きました。

ご多忙な中玉稿をお寄せ戴きました執筆者各位に深甚の謝意を申し上げます。(佐々木記)

本誌著作物の複写利用等について

本誌掲載の論文・記事の複写・転載等を希望される方は、執筆者ならびに生物系特定産業技術研究支援センター(生研センター)の許諾を得て行って下さい。

生研センター 業務のご案内

～研究開発を強力に支援いたします～

提案公募型の委託研究制度

- 民間企業の実用化段階の研究支援なら 民間実用化研究促進事業
- 技術シーズ開発のための基礎研究や
応用・発展研究及びベンチャー創業を目指すなら イノベーション創出基礎的研究推進事業

その他の支援制度

- 「共同研究先のあっせん」、「遺伝資源配布先のあっせん」などもお気軽にご相談下さい。
詳細は、生研センター企画部企画第1課までお問い合わせください。

ブレインテクノニュース 第142号

平成22年11月15日発行

発行人 前川 泰一郎

編集人 浅野 将人

発行所 独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構

◎生物系特定産業技術研究支援センター(生研センター)

〒105-0001 東京都港区虎ノ門3丁目18番19号 虎ノ門マリビル10階

TEL 03-3459-6565 FAX 03-3459-6566

e-mail brainki1@ml.affrc.go.jp URL <http://brain.naro.affrc.go.jp/tokyo/>