

IoT 技術を活用した黒毛和種ストレス計測技術の開発

国立大学法人佐賀大学農学部
上野大介

要約

黒毛和種の繁殖雌牛は飼育期間が長期にわたるため、ストレスによる空胎日数の長期化が問題となっている。これらストレス問題に対応するためにはストレスの計測が必須となるが、現在のところ簡便なストレス計測法は実用化されていない。本研究では黒毛和種の“皮膚ガス”を利用したストレス計測技術の開発に着手した。におい嗅ぎガスクロマトグラフィー (GC-0) をもちいた化学分析の結果、黒毛和種の皮膚ガスに特徴的なにおい物質として (E) -3-Octen-2-one を同定した。また心拍変動解析によって牛のストレス状態を分析した結果、飼育条件により個体のストレスの感じ方が異なることが明らかとなった。内分泌系のストレスホルモンであるコルチゾールを用いたストレス分析を行う場合、ホルモンの季節的な変化や日内変動に加え、飼育条件を考慮する必要性が明らかとなった。今後、ストレスと関連する皮膚ガスを特定し、黒毛和種の皮膚ガスをもちいたストレスセンサーの実用化につなげていくことが望まれる。

1.背景

畜産分野では家畜動物の“ストレス管理”が問題となっている。とくに近年の畜産施設の大規模化と労働力不足の流れの中で、多頭飼育されている家畜のストレス管理はますます困難になると予想される。そのような家畜動物のストレス管理するためには、ストレスの計測が必須の技術となる。現状でも家畜ストレスの測定は可能であるが、これまでの畜産動物のストレス測定は、行動解析や血中ストレスホルモンを分析するものであった。行動解析は長年の経験が必要であり、また血中ストレスホルモンは採血（侵襲的手法）や専門的な機材が必要となる。従って、従来のストレス計測は、家畜動物にストレスを与えるものであり、また手間や費用もかかるため、普及法であるとは言い難いのが下上である。



図 1 佐賀大学附属農場で飼育されている黒毛和種。黒毛和種のストレスを数値化できれば、それらに対する具体的な対応が可能となる。

したがって、簡易で安価なストレス判定技術はニーズは高いと予想される。ストレス計測のニーズは、世界に誇る日本の食材である黒毛和種についても例外ではない（図1）。なかでも黒毛和種の繁殖雌牛は、飼育期間が長期にわたるため（約10年）、様々なストレスによる空胎日数の長期化が問題となっている。

そこで本研究では、黒毛和種のストレス計測技術の開発に着目した。黒毛和種のストレスを簡易に計測・数値化することができれば、現状で

家畜がどの程度ストレスを感じているか、また新しい飼育法でどの程度改善されたのかということと比較可能になる。すなわち、ストレスを低減させた結果として空胎期間を短縮させることも期待される。加えて、ストレスを数値化して管理することが可能となれば、海外輸出の際に障壁となるアニマルウェルフェアへの対応策にも利用できる」と期待される。

本研究では簡便な黒毛和種のストレス計測技術の開発に際して、“皮膚ガス”の利用を計画した。すでにヒトにおいては皮膚ガスを利用したストレス判定技術としての利用が始まっているが（図2）、これまで国内および海外においても家畜を対象とした皮膚ガス成分の研究は皆無である。加えて、これまでの国内および海外におけるヒトの皮膚ガス成分の研究報告では、分析にガスクロマトグラフィー質量分析計（GC-MS）を利用するのが一般的であったが、多くの皮膚ガス成分は濃度が低く検出されていないことが、我々の経験から明らかとなっている。本研究グループでは、分析機器より高感度である、ヒトの嗅覚を活用して化学物質を検出する新技術である“匂い嗅ぎガスクロマトグラフィー（GC-O）”を活用する。ヒトの嗅覚を利用したGC-Oを家畜の皮膚ガス成分分析に活用する事例は国内および海外でも皆無であり、本技術によって幅広い匂い物質を検出することが可能となると期待される。

黒毛和種のストレスに関連する皮膚ガス成分を特定することができれば、その成分を感知できる嗅覚センサーを利用することで、非侵襲的で、かつ従来法よりも簡易で安価なストレス計測技術を確立できると期待される。本研究では、“ストレス計測器”の開発に向け、黒毛和種のストレスに関連する皮膚ガス成分の特定とストレスとの関係の解明を目的とした。



図2 ヒトのストレス臭に関する新聞記事（佐賀新聞2018年10月4日）。ヒトにおいては皮膚ガス成分をもちいたストレス判定の研究は始まっているが、家畜への応用研究は皆無である。

2. 試料と方法

2.1. 調査対象

本研究では、佐賀大学アグリ創生教育研究センター（附属農場）で飼育している黒毛和種・繁殖雌牛（4 齢）を対象とした（図 3）。繁殖雌牛は飼育期間が長期にわたるため（約 10 年）、様々なストレスにさらされる。中でも、ストレスによる空胎日数の長期化は繁殖農家にとって大きな問題であることから、ストレス管理に対する需要が高いことがあげられる。将来的には子牛のストレス判定を視野に入れているが、萌芽的研究として実験の容易な繁殖雌牛を対象とした。繁殖牛の飼育管理は江原（家畜行動管理学：分担）が担当した。本研究では繁殖牛のストレス管理（ストレス状態と平静状態のコントロール）が重要な技術となるが、江原は長年の飼育経験をもち、飼育管理によって牛のストレスをコントロールする独自のノウハウを有している。

2.2. 皮膚ガス成分の捕集：

黒毛和種の皮膚ガス成分の化学分析は上野（分析化学：代表）が担当した。皮膚ガス成分は固相吸着材（MonoTrap：RGPS：GL サイエンス，東京）を、穴あきテフロンシャーレに封入して捕集した（図 4）。まず黒毛和種の背部を剃毛し、MonoTrap を封入したテフロンシャーレを背部に密着させ、ベルトを使って固定し、1 時間捕集した（図 5）。また畜舎雰囲気



図 3 実験対象とした佐賀大学アグリ創生教育研究センター（附属農場）で飼育している黒毛和種・繁殖雌牛。



図 4 皮膚ガスの捕集にもちいたテフロンシャーレと固相吸着材。



図 5 皮膚ガス捕集の様子。背部を剃毛し、固相吸着材をいれたテフロン容器を皮膚に密着させることで、皮膚ガスを捕集する。

試料（操作ブランク）として、同様の操作をアルミトレー上で実施した。捕集後の MonoTrap は、その場で加熱脱着装置用の脱着管に移して真鍮キャップを取り付け、氷冷下で速やかに実験室に輸送した。輸送後の試料は -20°C で保管し、24 時間以内に機器分析に供試した。



図6 パネル選定用基準臭をもちいたテストの様子。

2.3. パネル選定

GC-0 分析は、ヒトの嗅覚で捉えたにおいを言葉で表現する手法である。ヒトの嗅覚は個人差があることから官能評価の嗅ぎ手（パネル）の選定には十分な配慮が必要である。パネルの選定は環境省悪臭防止法に準拠し、5 種基準臭（パネル選定用基準臭，第一薬品産業）を嗅ぎわける嗅覚試験に合格した 20 代の女性 2 名、30 代男性 1 名（基礎疾患、及び喫煙歴は無し）を採用した（図 6）。なお官能評価に際しては、嗅覚測定法安全管理マニュアルに準じて十分に安全を期した。また実験に使用する試料は一般生活環境に存在するものであること、実験中も途中退席が可能であること、個人データが特定できるような解析は行わないこと、をパネルに十分に説明し了解を得た後に、当研究グループの管理の下で実施した。

2.4. GC-0 分析

GC-0 の機器構成は、においかぎ装置（スニッフィングポート OP275 : GL サイエンス）を GC-FID (GC2010Plus : 島津製作所, 京都) に装備したものであり（以後, GC-0/FID）、GC カラムの出口側でキャリアガスを分岐し、一方をスニッフィングポートへ、他方を FID へ接続した（図 7）。VOCs を捕集した MonoTrap はハンディ加熱脱着装置（HandyTD : TD265 : GL サイエンス, 東京）を用いて注入した。GC カラムは、DB-5MS（長さ 60 m, 内径 0.32 mm, 膜厚 $0.5\ \mu\text{m}$: Agilent J & W）、及び InertCap Pure-WAX（以後 WAX : 長さ 60 m, 内径 0.32 mm, 膜厚 $0.5\ \mu\text{m}$: Agilent J & W）を用いた。GC の昇温条件は、 45°C (5 min) $\rightarrow 10^{\circ}\text{C min}^{-1} \rightarrow 240^{\circ}\text{C}$ (15 min) とし、キャリアガスはヘリウムを用いた。保持指標 (RI) の算出のため、分析前に混合アルカン溶液 (C6~C20 : GL サイエンス, 東京) を測

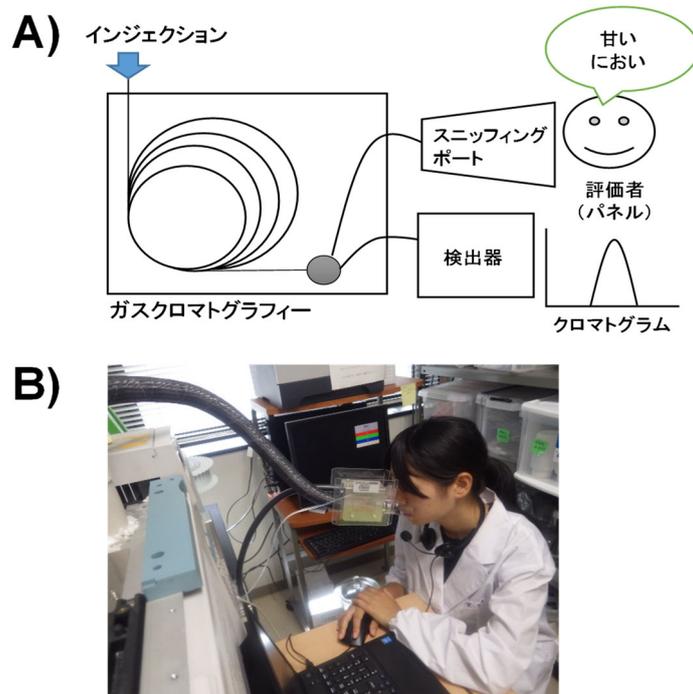


図7 皮膚ガス成分には匂い嗅ぎガスクロマトグラフィー (GC-0) を活用する。A)GC-0 の概略図、B)パネルによる GC-0 分析の様子。

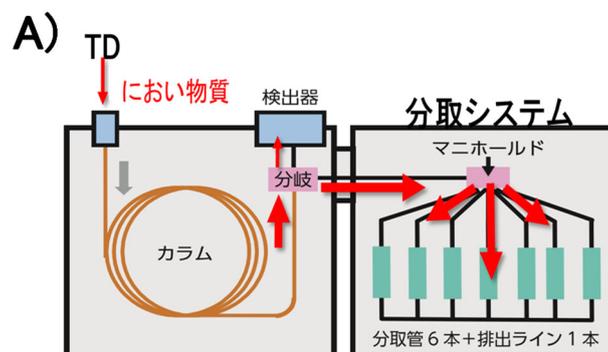
定した。“におい活性” (においを感知した保持時間、自由回答によるにおいの印象、及び3段階のにおいの強度)は音声認識ソフトウェア (Olfactory Voicegram: GLサイエンス) で記録した。パネルは、事前トレーニングとして標準試料を複数回分析し、良好な再現性が得られたパネル3名 (20代の女性パネル2名、男性パネル1名) を採用した。

物質同定には、異なる分離相をもつカラムで得られたRIが2つ以上必要となる。本研究ではGC-0/FID (DB-5MS) 分析のRIに加え、GC-0/FID (WAX) 分析のRIを取得した。しかし皮膚ガスからは多数の類似したにおい活性が感知されるため、そのままの試料を異なる分離相をもつカラムで分析しても、他のにおい活性が重複することで目的のにおい活性を見失ってしまう。そのため、本研究では、後述するGC分取システムを利用し、精製・濃縮した分取画分をGC-0/FID (WAX) 分析に供試した。

パネルによるGC-0/FID分析は、予備実験と本実験に分けて実施した。予備実験では、黒毛和種から採取した皮膚ガスを対象とし、パネル3名が3回ずつGC-0/FID分析を実施した。得られた全員の結果の中で、2/3以上の割合で類似のにおいを感知できたものを“可能性のあるにおい活性”として採用した。本試験では、予備試験で訓練されたパネル (30代男性1名) が3回分析した。可能性のあるにおい活性を中心に評価し、得られた結果の中で2/3以上の割合で感知されたにおい活性を物質同定に供試した。

2.5.GC 分取・GC-MS 分析

ヒトの嗅覚は、物質によって極めて高い感度を示す。我々の経験上、GC-O/FID 分析によってヒト嗅覚で感知されたにおい物質は、そのままの濃度で GC-MS 分析に供試しても、濃度が低すぎるために明瞭なマススペクトルを得ることはほぼ不可能である。本研究ではにおい物質の同定のため、精製・濃縮を目的とした“GC 分取システム”を利用した (図 8)。GC 分取システムの概要としては、GC 用フラクションコレクター (GC 分取装置: VPS-2800, GLサイエンス, 東京) を GC-FID (GC2010Plus: 島津製作所, 京都) に装備したものであり、試料は加熱脱着装置 (TurboMatrix650: Perkin Elmer) で注入した。GC-FID には、DB-5MS カラム (長さ 60 m, 内径 0.32 mm, 膜厚 0.5 μm : Agilent J&W) を用い、昇温条件は 100°C (5 min) \rightarrow 20°C min^{-1} \rightarrow 280°C (6 min) とした。GC 用フラクションコレクターは、トランスファーライン及び捕集管温度をそれぞれ 280°C 及び 25°C に設定し、カラム溶出物の 90% を本装置に導入した。加熱脱着装置は、脱離温度及びトランスファーライン温度をいずれも 250°C に設定した。試料のにおい物質を捕集した 5~50 個の MonoTrap を加熱脱着装置を用いて繰り返し GC 分取シス



B)



図 8 皮膚ガス成分を精製・濃縮するガスクロマトグラフィー分取システム (GC 分取システム)。A) GC 分取システムの概略図、B) GC 分取システムの写真。

テムに注入（5～15回注入）し、目的の画分を MonoTrap (RGPS) に分取・濃縮した。本システムで分画・濃縮したものを“分取画分”とした。

GC 分取システムで得られた分取画分は、ガスクロマトグラフィー質量分析計 (GC-MS : TQ8040 : 島津製作所, 京都) を用いてマススペクトルを取得した。分取画分を捕集した MonoTrap は HandyTD を用いて注入した。GC カラムは GC-0/FID と同様の WAX カラムを用い、分析条件は GC-0/FID と同一とした。検出には電子衝撃イオン化法 (EI) によるスキャンモード (m/z 30-300)、及び化学イオン化法 (CI) によるポジティブスキャンモード (m/z 100-300) を用いた。CI 試薬ガスにはイソブタンを使用した。GC-0/FID と保持時間を比較するため、分析前に混合アルカン溶液 (C6~C20) を測定して RI を算出した。

2.6. におい物質の同定

2種類 of 分離相を持つカラムを装備した GC-0/FID 分析で得られた RI は、におい物質に特化したデータベースである AroChemBase (アルファモスジャパン, 東京) の検索に供試した。AroChemBase は、におい物質の RI とにおいの印象が約 10 万種収録されている。本データベースには一つの化学物質に対して複数種の異なる分離相をもつカラムで計測された RI が登録されていることから、それらを統合して検索する“クロスサーチ”の利用が可能である。本研究では一つの試料を DB-5MS 及び WAX カラムを用いた GC-0/FID で分析し、感知したにおい活性の RI をクロスサーチに供試した。

上述の通り、目的としたにおい活性を再び GC 分取システム (DB-5MS) で精製・濃縮し、それら分取画分を GC-MS (WAX) を用いた EI 及び CI モードのスキャン分析に供試した。GC-MS (EI スキャン) 分析で得られたマススペクトルは、マススペクトルライブラリ (NIST14) を利用して物質を推定した。GC-MS (CI スキャン) 分析ではプロトン付加分子 $[M+H]^+$ が得られるため、分子量を推定することが可能である。EI マススペクトルのライブラリ検索でヒットした候補物質の中から、CI マススペクトルから推定した分子量を用いて絞り込みをかけた。GC-0/FID 及び GC-MS 分析の結果が一致した物質について、標準物質を分析し比較した。標準物質として、3-Octen-2-one (富士フィルム和光純薬, 東京) を購入し、GC-0/FID (DB-5MS と WAX) 及び GC-MS (WAX) で分析した。標準物質と RI、マススペクトル、においの印象のすべてが一致したものを同定とした。

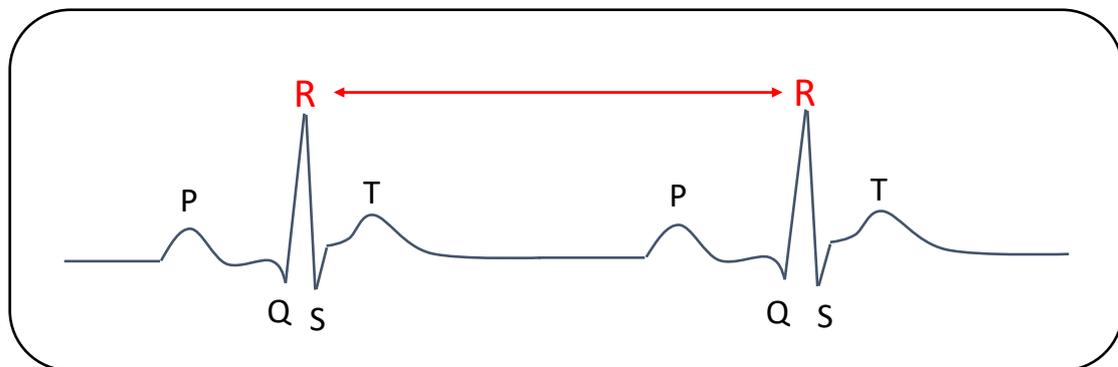
2.7. 繁殖牛のストレス計測

繁殖牛にとって環境変化の大きいと考えられる群編成時の自律神経バランスの変動に着目し、その処理が母牛のストレス状態に与える影響について調査した。供試動物は、黒毛和種繁殖雌牛 3 頭を用いた。群編成による自律神経バラン

スへの影響評価として、心拍数測定により心拍変動解析を行った（図9）。調査日は群編成前、群編成初日、群編成後2日目、群編成後7日目、群編成後14日目に行った。心拍数は調査日の9時から16時まで連続で測定し、計測した心拍数は、Polar Protrainer5を用いて心拍変動解析を行い、副交感神経の指標となるHF、交感神経の指標となるLF/HF、心拍変動の揺らぎを示すSDNNについて算出し、群編成の前後における繁殖牛の自律神経バランスの変化について比較した（図10）。また、同時に牛の行動調査も行った。



図9 牛に心拍測定装置を装着しリアルタイムの心拍数を記録することでストレスを計測した。



- **SDNN** (Standard Deviation of the NN)
RR間隔の標準偏差。ストレス状態で低く、リラックス状態で高くなる。
- **pNN50** (percent of difference between adjacent normal RR intervals greater than 50ms)
RR間隔が50ミリ秒以上の心拍回数の割合。副交感神経緊張強度の指標。
- **LF/HF比**
低周波と高周波のパワーの比率。交感神経と副交感神経のバランスを表し、数値が高いと交感神経優位、数値が低いと副交感神経優位となる。

図10 心拍変動解析により、自律神経バランスの変化をストレス状態の指標とする

3.結果と考察

3.1.GC-MS 分析による VOCs の検出

黒毛和種から捕集した皮膚ガスを GC-MS で分析した。GC-MS 分析によって得られたマスプロトグラムには多数のピークが確認された。一方で、皮膚ガス捕集の際に同時に採取した畜舎雰囲気試料（操作ブランク）のマスプロトグラムと比較したところ、すべてのピークが相殺されるという結果となった。黒毛和種の皮膚から放出されている揮発性有機化合物 (VOCs) は GC-MS の検出感度と比較して少量であるか、または畜舎雰囲気における VOCs と同一物質である、という可能性が示された。結果として、GC-MS 分析だけで黒毛和種の皮膚ガスを検出することは困難であると判断した。

3.2.GC-O/FID 分析によるにおい活性の感知

黒毛和種の皮膚ガスは、直接的な GC-MS 分析で検出することが困難であるという結果が得られた。そこで本研究では GC-O/FID の利用を検討した。GC-O/FID はヒトの嗅覚を利用し、においを持つ VOCs (におい物質) を感知する。したが

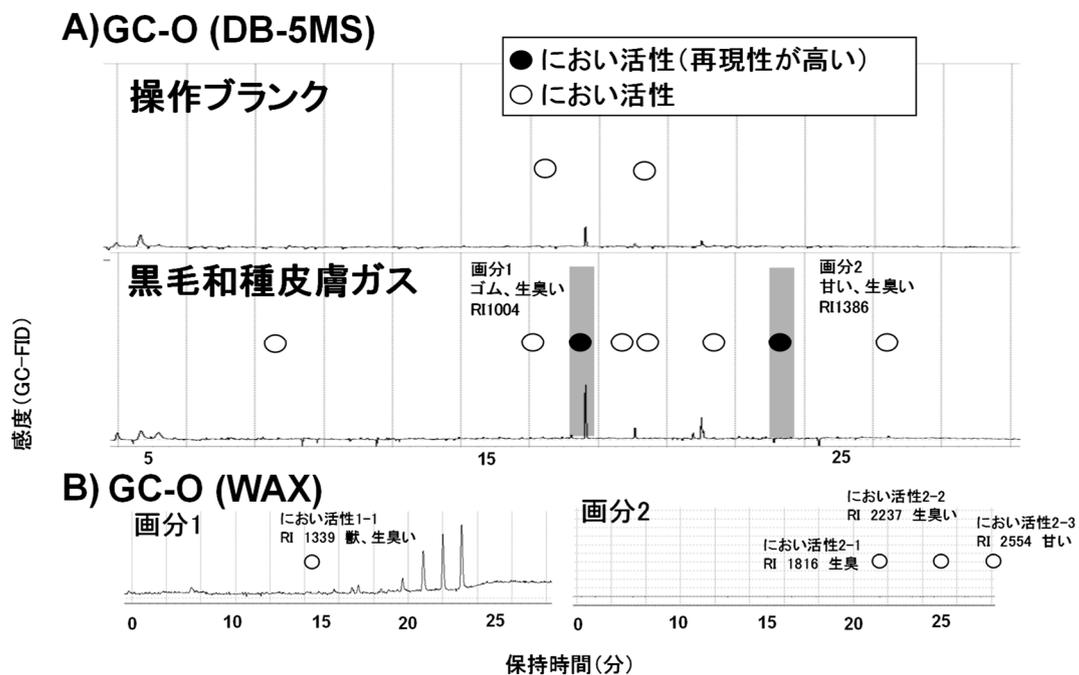


図 11 黒毛和種の皮膚ガスを対象とした GC-O/FID のアロマトグラム。a) DB-5MS によるアロマトグラム上で再現性が高いにおい活性（画分 1 および 2）を決定した。b) 画分 1 および 2 を精製・分取したのちに WAX カラムで分析したアロマトグラム。

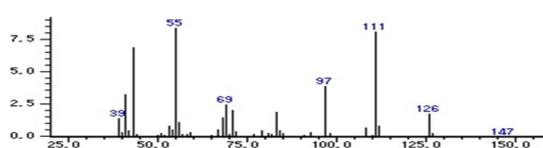
って濃度が低く GC-MS では検出できない場合でも、GC-O/FID を利用することでヒト嗅覚によって検出することができると期待される。GC-O/FID (DB-5MS) 分析によって得られた黒毛和種のアロマグラムを図 11 に示した。本データは黒毛和種の皮膚ガスを分析した初めての報告である。操作ブランクと重複するにおい活性を除外したところ、8 か所から皮膚ガスに特徴的なにおい活性が感知された。一方で、FID クロマトグラム上には、ヒトの嗅覚でにおい活性が感知された保持時間においてピークがほとんど検出されなかった。このことは、黒毛和種の皮膚ガスとして捕集された VOCs の量は FID の検出感度よりも少ないものの、ヒトの嗅覚は敏感であるため感知できたことが考えられる。感知された複数のにおい活性の中で、2 か所から比較的ににおい強度が強く、再現性の高いにおい活性が感知された。それらにおい活性のにおいの印象としては、「ゴム、生臭い (画分 1)」「甘い、生臭い (画分 2)」というものであった。本研究ではこれら 2 か所におい活性を対象として、におい物質の同定を進めることとした。

3.3.におい物質の同定

黒毛和種から捕集した皮膚ガスを対象とした GC-O/FID 分析の結果、特有のにおい活性 (2 か所) が感知された。これらにおい物質を対照として、物質同定に取り組んだ。

GC-MS (WAX)

A) 電子衝撃イオン化法 (EI)



(*E*)-3-Octen-2-one
分子量 126

B) 化学イオン化法 (CI)

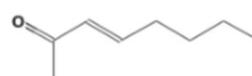
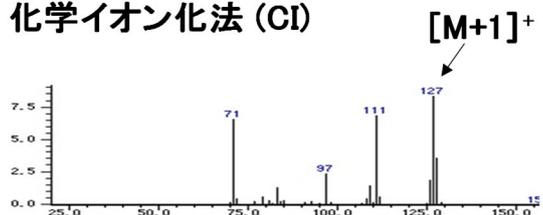


図 12 分取画分 1 の GC-MS (WAX) 分析によって得られた、におい活性 1-1 のマススペクトル。A) 電子衝撃イオン化法 (EI) によって得られたマススペクトルであり、ライブラリ検索により物質を推定した。B) EI によって推定された物質を、化学イオン化法 (CI) によってえられた $[M+1]^+$ をもちいて確認した。

第1ステップとして、2か所のおい活性を分取画分1および2として、GC分取システムをもちいて精製・濃縮した。それら分取画分を、異なる分離相をもつカラムを装備したGC-O/FID (WAX) 分析に供試した。分析の結果、画分1からは1か所（におい活性1-1）、画分2からは類似のおい活性が3か所（におい活性2-1~2-3）が感知された。2種類のカラムをもちいたGC-O/FID (DB-5MS及びWAX) 分析で得られた2つのRI及びにおいの印象を、AroChemBaseクロスサーチに供試した。本解析によってヒットしたものを候補としてリストアップした。

第2ステップとして、分取画分1~2を対象としたGC-MSマスペクトルの取得を行った。GC-MS (WAX) クロマトグラム上で、GC-O/FID (WAX) 分析で得られたRIに見られるピークのマスペクトルをライブラリ検索に供試し、シミュレーターが70以上の物質をリストアップした。更にそれら候補物質の中から、CIマスペクトル上のプロトン付加分子[M+H]⁺から推定した分子量と一致する物質に絞り込んだ。

第3ステップとして、これらデータから推定された物質の標準物質を購入し、RI、においの印象、およびマスペクトルを比較した。

第4ステップとしてこれら結果をまとめ、物質同定を判定した。画分1におけるにおい活性1-1は、RI、においの印象、マスペクトルのすべてがの標準物質と一致したことから、(*E*)-3-Octen-2-oneと同定とした(図12)。画分2におけるにおい活性2-1~2-3は、各種データベースの検索結果が一致しなかったことから不明となった。

本研究で同定された(*E*)-3-Octen-2-oneは、ヒトの皮膚ガスの成分として報告されている物質であり、脂質分解物であることが知られている。黒毛和種の皮膚ガスとして検出されたことに矛盾はないと判断された。

3.4. ストレス解析

ストレスホルモンは、季節的な変化や日内変動の影響を受けることが知られている。黒毛和種のストレスホルモンを測定する前に、ストレス状態を正確に捉え、コルチゾール測定用の唾液採取のタイミングを設定することが重要となる。これまでもストレス計測の指標の一つとして報告されており、リアルタイムで変化が分かる心拍変動を中心にそれを探った。

群編成初日のHF、SDNNの値は、新たに群に入った牛に比べて元から群を形成していた牛で低く、LF/HFは新たに群に入った牛で最も低い値を示した。行動については、群編成初日に、新たに群に入った牛は親和的な社会行動が多く、元から群を形成していた牛は新たに群に入ってきた牛に対する攻撃行動が多かった。このことから本実験では、群編成において、新たに群に入った牛は親和的であるのに対し、元から群を形成していた牛は入ってきた牛に比べて高い緊張状態に

群編成の変化とウシのストレス状態

群編成を変化させると…

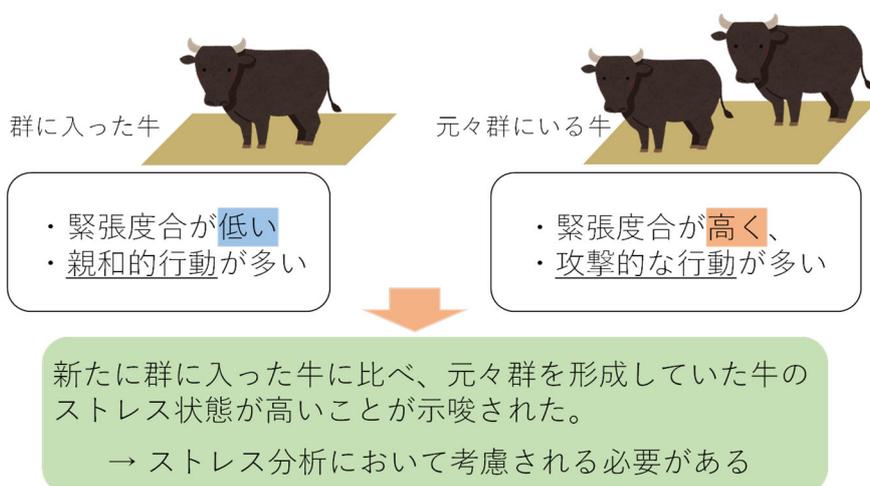


図 13 群編成の変化とウシのストレス状態の模式図

ある可能性が示唆された (図 13)。しかしながら、群編成初日に比べ群編成後 14 日目では、群全体の平均心拍数が有意に減少しただけでなく、闘争や攻撃行動がなくなったことから、群編成後 2 週間で群は安定状態になった。

以上のことから、群編成においては、新たに群に入った牛に比べ元から群を形成していた牛で緊張度が高く、高ストレス状態にあることが示唆されたため、サンプリングの注意点として考慮する必要があることが示唆された。

4.まとめ

本研究では、黒毛和種の簡易ストレス評価に向けて、ストレスと関連する皮膚ガスの分析に取り組んだ。化学分析の結果、一般的な手法である GC-MS 分析では皮膚ガスを検出できなかった。一方で、ヒトの嗅覚を活用する GC-O/FID 分析を利用することで、皮膚ガス中の特徴的なにおい物質を同定した。また、黒毛和種繁殖牛のストレス評価の基盤情報として、心拍変動解析によるストレス状態の変化を分析した。その結果、牛の飼育条件がストレスの感じ方に大きく影響するため、唾液中コルチゾールを用いたストレス分析では、群編成の考慮が必要であることが明らかとなった。

今後、黒毛和種に特徴的な皮膚ガスとしてより多くの物質を特定し、それら物質に絞った高感度ターゲット分析法を開発することを計画している。皮膚ガスの高感度分析が可能となれば、皮膚ガスと唾液中コルチゾールを定期的に分析し、ストレスに関連する皮膚ガス中のおい物質を特定できると期待される。ス

トレスに関連するにおい物質が特定できれば、それら物質に反応する「においセンサー」を検索し、黒毛和種のおいをもちいたストレスセンサーの実用化につながる。

においを用いたストレスセンサーは、非侵襲的かつ迅速・簡便であることが特徴である。本技術が確立でき、現場型の簡易ストレス計測器をインターネットに接続（IoT化）することができれば、黒毛和種のストレス状況をスマートフォンで常時監視することか可能となる（図14）。将来的な大規模施設における労働力不足に対応するためのスマート農業化は、今後の畜産業の発展を考えるうえで必須の技術であるといえる。将来的に本技術を高度化させることで、黒毛和種にとどまらず、多様な畜産動物のストレス管理を効率化させ、生産者の省労力化に貢献できると期待される。

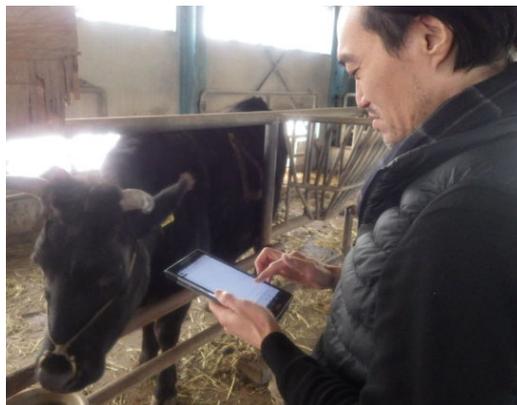


図14 現場型の簡易ストレスチェッカーをインターネットに接続（IoT化）することで、黒毛和種のストレス状況をスマートフォンで常時監視することか可能となる。将来的な人手不足を視野に入れたスマート農業を視野に入れている点は大きな特徴といえる。