

黒毛和種の ICT 活用型匂いセンサーをもちいた超早期妊娠鑑定技術の開発

国立大学法人佐賀大学農学部  
上野大介

要約

黒毛和種の繁殖管理の現場では適切なタイミング人工授精することが必須であるが、発情行動を呈する“発情個体”と、発情と類似した疑似発情行動をとる“超初期妊娠個体”の違いを判別することは困難である。本研究グループでは“体臭（匂い）”を指標とした“超早期妊娠鑑定技術”の開発に着目した。繁殖雌牛の発情および非発情個体から頸管粘液を採取して嗅覚官能評価に供試したところ、非発情（妊娠）個体から特徴的な“強い獣臭”が感知された。またにおい嗅ぎガスクロマトグラフ（GC-O）分析の結果、非発情（妊娠）個体に特徴的な匂い活性として“獣臭”を1か所で感知した。加えて、ガスクロマトグラフ質量分析計（GC-MS）分析および e-nose ニオイセンサー分析においては、発情と非発情（妊娠）個体の試料の間で差を検出することができなかった。

1. 背景と目的

黒毛和種は日本の誇る肉用種であり、飼育頭数の90%以上を占める重要な品種である。黒毛和種の畜産農家の経営に重要な要件としては適切な繁殖管理があげられ、なかでも発情状態を正確に鑑定し、適切なタイミングで人工授精に供することが必須の技術となる。しかし近年の担い手不足により、繁殖牛の綿密な繁殖管理は困難であるのが現状となっている。そのような中、省力化を進めるスマート畜産技術の一環として発情鑑定技術が実用化されており、現状では“行動センサー”をもちいた、行動解析による鑑定が普及してきている。一方で、行動センサーによる発情鑑定は広く普及し成果を上げている

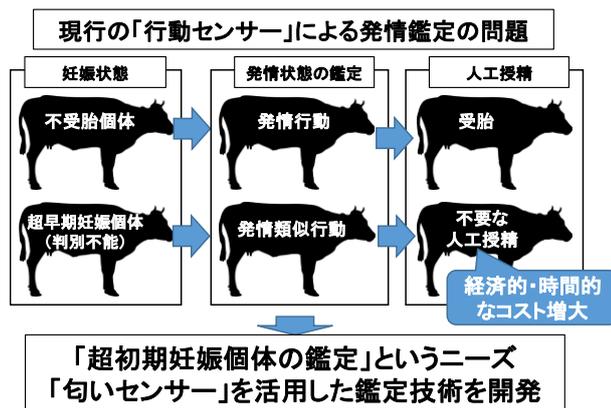


図-1 行動センサーによる発情鑑定では、発情と類似した疑似発情行動をとる“妊娠超初期個体”を判別することができない。“超早期妊娠鑑定”の技術開発に取り組んだ。

ものの、発情行動を呈する“発情個体”と、発情と類似した“疑似発情行動”をとる“超初期妊娠個体”の違いを判別することは困難である(図-1)。もし超初期妊娠個体を発情個体として誤鑑定してしまった場合、不要な人工授精による経済的損失があるだけでなく、流産の確立が上がるとの報告もあり、畜産農家の経営にとって大きな負担となっている。したがって“超早期妊娠個体”の鑑定技術の開発に対するニーズは高い。

これまでも早期妊娠鑑定については、国内外において技術開発がなされてきた。事例として“直腸検査による黄体サイズの計測 (Assey et al., 1993)”, “白血球の遺伝子発現 (Green et al., 2010)”, “黄体血流量の超音波画像解析 (金澤朋美, 2019)”などがあげられる。一方で、血液成分の分析による超早期妊娠の鑑定は可能であるが、侵襲的な採血があることから個体ストレスが大きく、また分析結果が得られるまで日数がかかるため、簡易な技術とはなっていない。超音波画像解析は非侵襲的ではあるが、特殊な計測機器とデータ解析技術が必須となるうえ、現状では明確な判別基準を見出すことはできていない。したがって、現状で開発されている新技術は現場ニーズを満たすものになっていないといえる。

そのような中、本研究グループでは“行動”に変わるまったく新しい生体計測技術として、黒毛和種の発する“体臭(匂い)”を指標とすることに着目した。これまでもさまざまな手法による発情・妊娠鑑定法が試みられてきたが、“匂い”を利用した例は皆無である。“嗅覚”は五感の中でも最後のフロンティアといわれ、畜産分野における匂いに関連した情報は圧倒的に不足している。従って、黒毛和種の匂いに着目する本研究は、畜産分野における未知の領域を切り開き、イノベーションを引き起こす可能性を秘めたものであると期待される。

本研究では“超早期妊娠鑑定”の実用化に向けて、匂いに着目した判別法を検証していくが、最終的に生産現場に落とし込むためには、誰でも簡易ににおいを判別できる手法が必要となる。その手法として本研究では、匂いセンサーの一種である“e-nose (イーノーズ)”の利用を検討している。E-noseとは、におい物質の吸着特性に対する選択性の異なる検出素子を複数個搭載した検出デバイスのことであり (Arshak et al., 2004), 日本語では人工鼻, 嗅覚センサー, 匂いセンサー (以後, e-nose ニオイセンサー) などと呼ばれている。本研究で畜産分野への応用を進めている e-nose は Quartz Crystal Microbalance (水晶振動子マイクロバランス: 以後, QCM) を検出素子として採用している。QCM は水晶振動子の振動数の変化量を計測することで匂い物質を検出する手法である。それら水晶振動子の表面には、匂い物質に対して吸着特性の異なる膜が蒸着されており、そこににおい物質が吸着すると重量に比例して水晶振動子の振動数が変化し、その変化量を値として示す。QCM は、従来のニオイセンサーで広く利用

されてきた金属酸化物半導体と比較して、気体の種類によっては感度や選択性、応答性が高いことが報告されている (Gardner and Bartlett, 1994). 本研究で利用した QCM 型 e-nose ニオイセンサーは、検出部に匂い物質に対して吸着特性の異なる 35 種の膜を蒸着した QCM 型検出素子を搭載している. 従って、選択性の異なる各素子の反応量の違いをパターンとして認識することで、匂いの違いを判別できることが特徴となっている (増田知美 et al., 2017). 本件研究では、最終的に現場で簡易に利用可能な“e-nose ニオイセンサー”を用いた鑑定技術の開発を目指している. 当面は研究向けの卓上型モデルを利用するが、将来的にセンサーメーカーと共同して小型化・低価格化を進め、インターネットに接続可能 (IoT 化) なデバイスの開発を進める. 最終的には、測定結果をスマートフォンで管理する、スマート畜産技術として応用可能であると期待される. 本研究は畜産学・分析化学・センサー工学という異分野が融合することによる技術的イノベーションが期待される、特徴的かつ挑戦的な研究であるといえる.

上述の通り、e-nose ニオイセンサーは簡易判別法として有効である一方で、“反応している対象物質が不明”であること、また化学分析と比較して“感度が低いこと”が弱点としてあげられる. そのため、e-nose ニオイセンサーでは和牛生体試料の匂いを検出できないことや、検出できたとしてもその対象物質やメカニズムを解析することはできない. 将来的な超早期妊娠鑑定技術の発展に向け、和牛の生体試料から発せられるにおい物質を同定し、においの変化を科学的に解明することが求められる.

一方で、におい物質の同定には多くの技術的な困難が付きまとう. まず、生体試料のにおい物質を機器分析に供試した場合には多数の揮発性有機物質 (VOCs) が検出されると予想されるが、それらの VOCs の中から目的のにおい物質を官能的に特定する“ヒトの嗅覚”が必須となる. 加えて、ヒトの嗅覚は物質によって極めて高い感度を示すことから (Leonardos et al., 1969), ヒトが十分ににおいを感じる濃度であっても分析機器では検出できないことが多い. 従って、生体試料から発せられるにおい物質を大量に捕集・濃縮し、それらを分離・精製し、物質同定するための高感度な分析化学的技術が必要とされる. これらのニーズに対して、すでに当研究グループではにおい物質の同定に特化した“におい物質同定システム (Odor/Aroma Substances Identification System: OASIS)”を構築している. OASIS は、におい物質を“官能的”に検出 (感知) するヒトの嗅覚と、“分析化学的”ににおい物質を分離・検出する技術とを組み合わせた手法であり、“におい嗅ぎガスクロマトグラフィー (Gas Chromatography-Olfactometry: GC-O)”を主要な技術としている. これまでも本研究グループでは OASIS を活用することで黒毛和種の皮膚ガス物質の同定 (松本英頭 et al., 2021) だけでなく、微細藻類スミレモ (小山玲音 et al., 2021), ニンニク (Matsumoto et al.,

2020; Koga et al., 2021; 古賀夕貴 et al., 2021), 食品 (松尾美咲 et al., 2018), ハウスダスト (松元美里 et al., 2020a), 工場からの流出油 (古賀夕貴 et al., 2020), 河川や海洋の底泥 (松元美里 et al., 2020b; 松元美里 et al., 2020c) など, 多様な試料の匂い物質を同定してきた. 本研究ではこれら技術を駆使することで, 超早期妊娠個体に特有の匂い物質の同定を試みる.

本研究では“超早期妊娠鑑定技術”の開発に向けた基礎研究として, “頸管粘液の匂い”に着目した. 頸管粘液は黒毛和種繁殖雌牛の膈内から非侵襲的に採取可能な生体試料であり, 発情時に分泌量が多くなると共に, 粘度にも変化がみられるなど, これまでも発情判定に利用されてきた経緯がある. 発情や妊娠といった変化を判別するにはもっとも有望な生体試料であると推察されたことから, 頸管粘液試料の匂いを対象として, 発情および非発情個体との違いを検証した. 本研究では, 発情および非発情個体から頸管粘液を採取し, それら試料を対象として, ①嗅覚官能試験, ②化学分析, ③e-nose ニオイセンサー分析, という3つの手法をもちいて, 発情と非発情個体の判別に関する基礎データの集積を目的とした.

## 2. 試料と方法

### 2.1. 対象牛と頸管粘液試料の採取

黒毛和種・繁殖雌牛は, 研究協力者として参画している佐賀県畜産試験場で飼育されている個体を対象とした (図-2). 佐賀県畜産試験場ではこれまでも黒毛和種の飼育管理や繁殖に関する試験研究を多数推進しており, 本研究においても, 試料の供与, 専門的知見からのアドバイス, および生産現場からのニーズに関する情報提供を受けた.



図-2 佐賀県畜産試験場で飼育している黒毛和種繁殖雌牛. 本試験場は黒毛和種をもちいた試験研究を多数推進しており, 適切な試料を得ることが可能である.

本研究ではホルモン剤処置により“発情”状態の繁殖雌牛を作出した. 比較対象となる非発情個体は, “非発情 (非妊娠)”と“非発情 (妊娠)”の2種を定義し, 発情と同じタイミングで試料を採取した. 分析対象とした生体試料としては“頸管粘液”に着目し, メトリチェック (頸管粘液採取専用器具) を用いて採取

した。頸管粘液試料採取は2022年2月、3月、4月、2023年2月、3月に実施した。調査開始当初である、2022年2月、3月、4月は、発情、非発情（非妊娠）、非発情（妊娠）という3区分を設定して試料を採取し、2023年2月、3月は発情および非発情（妊娠）という2区分で採取した。合計試料数としては、発情個体9検体、非発情（非妊娠）個体6検体、非発情（妊娠）個体9検体を採取した（表-1）。またバックグラウンドとして畜舎大気および牛糞を試料として採取した。採取した試料は無臭処理されたガラス容器に保管し、速やかに実験室へ輸送した。

表-1 黒毛和種・繁殖雌牛から採取した頸管粘液試料の一覧

区分	2022年			2023年		計	
	2月	3月	4月	2月	3月		
発情	1	1	1	3	3*	6	
非発情	非妊娠	1	2	3	0	0	6
	妊娠	0	1	2	3	3*	6

\*試料が少ないためプール試料とした

## 2.2. 嗅覚官能評価

嗅覚官能評価とは、ヒトの嗅覚で捉えたにおいを言葉で表現して数値化するための手法である。ヒトの嗅覚は個人差があることから嗅覚官能評価の嗅ぎ手（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（環境省，2017）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



図-3 黒毛和種繁殖牛から採取した頸管粘液を対象とした嗅覚評価の様子。嗅覚によって“匂いの印象”を言語化する。

試験に合格した 20 代の女性 4 名，男性 4 名（基礎疾患，および喫煙歴は無し）を採用した．嗅覚官能評価に際しては，嗅覚測定法安全管理マニュアル（環境省，2002）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．

採取された頸管粘液試料の嗅覚官能評価では，“匂い強度”と“匂いの印象”を評価した（図-3）．匂い強度は，試料内容を隠した容器から匂いを直接嗅ぎ，で評価した．匂い強度表示法は，0：無臭，1：やっと感じできる，2：何かわかる，3：楽に感じできる，4：強い，5：強烈という表記をした．匂いの印象はパネルによる自由回答とした．

2023 年 2 月の試料については，“判別分析”を試みた．判別分析は，2023 年 2 月に採取された発情個体 3 検体および非発情（妊娠）個体 3 検体を利用した．発情および非発情個体試料それぞれ 1 検体を基準臭として事前にパネルが匂いを嗅ぎ，その後に残りの発情および非発情個体試料それぞれ 2 検体（計 4 検体）をランダムに提供し，匂いの類似度を判別した．正解率（%）は，全検体数のうち，正解した検体数を割合として算出した．

### 2.3. 匂い物質の捕集法および GC-0 分析法

匂いセンサーは不特定多数の化学物質からなる匂いをパターンとして認識してデータ化する簡便な手法ではあるが，“反応している対象物質が不明”であること，また化学分析と比較して“感度が低いこと”が弱点としてあげられる．その問題を補完するため，本研究では頸管粘液の匂い物質を対象とした化学分析によって，主要な匂い物質の同定を試みた．それぞれの試料をガラスフラスコ内に封入して吸着材で捕集し，匂い嗅ぎガスクロマトグラフ（GC-0）をもちいて分析する（図-4）．GC-0 とは，ガスクロマトグ

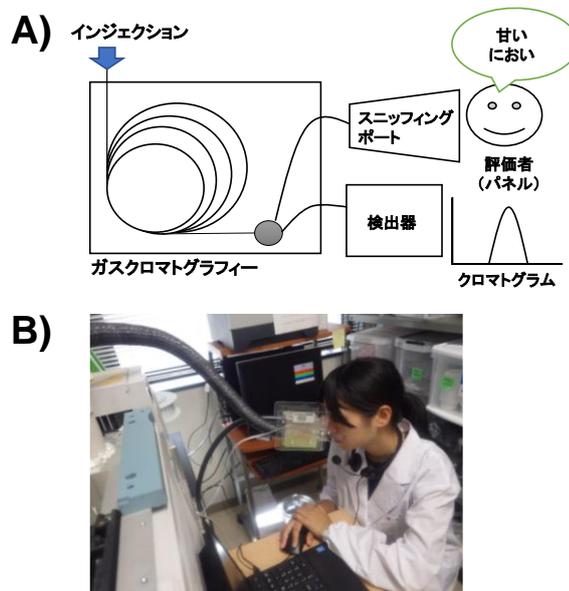


図-4 におい嗅ぎガスクロマトグラフ（GC-0）．A) 概念図，B) パネルによる GC-0 分析の様子．

ラフによって匂い物質を分離し、溶出してくる匂い物質をヒトの嗅覚と検出器をもちいて検出するという、機器分析と官能試験を融合させたユニークな機器である。

におい物質を含む VOCs の捕集法は既報に従った (小山玲音 et al., 2021). VOCs は MonoTrap (RGPS : ジーエルサイエンス, 東京) をもちいて捕集した. 試料を採取した直後に, ガラス容器のヘッドスペースに MonoTrap を投入し, 1 時間捕集した. VOC を捕集した MonoTrap は, 速やかに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た. 試料は 4°C で保管し, 3 時間以内に機器分析に供試した.

GC-0 分析法の詳細は既報に従った (小山玲音 et al., 2021). 機器構成は, においかぎ装置 (スニффイングポート, OP275 : ジーエルサイエンス, 東京) を GC-FID (GC2010Plus : 島津製作所, 京都) に装備したものである (以後, 本システムを GC-0/FID). 捕集済み MonoTrap は加熱脱着装置 (ポータブルサーマルディソーパー, HandyTD TD265 : ジーエルサイエンス, 東京 : ハンディ TD) をもちいて注入した. GC キャピラリカラムは, DB-5MS (長さ 60 m, 内径 0.32 mm, 膜厚 0.5  $\mu\text{m}$  : Agilent J&W, CA, USA : DB5), および異なる液相をもつ InertCap Pure-WAX (長さ 60 m, 内径 0.32 mm, 膜厚 0.5  $\mu\text{m}$  : ジーエルサイエンス, 東京 : WAX) を用いた. 本研究では一つの試料を, DB-5MS をもちいた分析 (GC-0/FID (DB5)), および InertCap Pure-WAX カラムを用いた分析 (GC-0/FID (WAX)) に供試した. GC-0/FID 分析前には, 混合アルカン溶液 (C6~C20 : ジーエルサイエンス, 東京) を測定することで保持指標 (Retention Index : RI) を算出した.

GC-0/FID 分析を実施するパネルは, 事前トレーニングとして同一の模擬試料を複数回分析し, 良好な再現性が得られた 3 名 (20 代の女性パネル 1 名, 男性パネル 2 名) を採用した. GC-0/FID 分析でパネルが感知した, においに関する 3 つの情報 (においを感知した RI, においの印象, においの強度) は, 音声認識ソフトウェア (Olfactory Voicegram : ジーエルサイエンス, 東京) をもちいて記録した. それらの GC-0 分析で感知された情報は “におい活性 (Odor activity : OA) と表記した. 試料の GC-0/FID 分析の結果は, パネル 3 名が 3 回ずつ GC-0/FID 分析を実施し, 得られた全員の結果の中で 2/3 以上の割合で保持時間とにおいの印象が一致したものを OA として採用した.

#### 2.4. GC-MS ノンターゲット分析法

におい物質を含む幅広い VOCs を検出するため, ガスクロマトグラフィー質量分析計 (TQ8040 : 島津製作所, 京都 ; 以後, GC-MS) をもちいた GC-MS ノンターゲット分析に着手した. 分析には GC-0 と同じ WAX カラムをもちい, 分析条件は

既報（笹川智史 et al., 2022）に従った。検出には Electron Impact (EI) スキャンモード ( $m/z$  40-250) をもちいた。分析前に混合アルカン溶液 (C6~C30) を測定し、RI を算出した。捕集済み MonoTrap に内部標準物質（シクロヘキサノン：1 ng 相当）を添加し、HandyTD をもちいて注入した。物質の仮同定には、におい物質に特化したデータベースである AromaOffice（西川計測，東京）をもちいた。AromaOffice アロマサーチをもちい、マスクロマトグラムをデコンボリューションすると共に、RI データベースおよびマススペクトルライブラリ (NIST14) を同時検索することで物質を特定した。検索結果において、ライブラリ検索の一致率が 70%以上、かつ RI の差異が  $\pm 30$  以内の物質をリストアップした。仮同定物質リストは多変量解析で利用した。

## 2.5. 多変量解析および有意検定

GC-MS ノンターゲット分析法で得られたデータは、特徴的なピークの抽出に向けて多変量解析（主成分分析）に供試した。GC-MS マスクロマトグラムのデコンボリューション、サンプル間のピーク保持時間の補正とおよびピーク高さの算出（ピークアライメント）には、津川ら（Tsugawa et al., 2015）によって開発された MS-DIAL (MS-DIAL, 2023) をもちいた。主成分分析には JMP12 をもちい、負荷量の大きいピークを抽出した。抽出されたピークの保持時間とマススペクトルを AromaOffice アロマサーチ結果で得られた物質リストと照合し、一致したものを仮同定とした。AromaOffice アロマサーチによる物質リスト内に一致する物質が見つからない場合、AMDIS (NIST, AMDIS) をもちいてデコンボリューション処理したマスクロマトグラムにおいて、該当する時間のマススペクトルをライブラリ検索に供試した。保持指標およびにおいの印象に関する情報は AroChemBase (Alpha MOS Japan, 東京) を参照した。これら検索結果において、ライブラリ検索の一致率が 70%以上、かつ RI の差異が  $\pm 30$  以内であり、さらに AroChemBase 内の引用文献リストおよび Reaxys (Elsevier Japan, 東京) による物質検索機能をもちいて文献を参照し、妥当性が確認できた物質を仮同定物質として採用した。相関関係の検定にはノンパラメトリック法であるスピアマン順位相関検定を採用し、JMP12 (SAS Japan, 東京) をもちいて  $p < 0.05$  を有意とした。

## 2.6. e-nose ニオイセンサー分析

発情および非発情（妊娠）の個体から採取された頸管粘液の特徴的な匂いを、e-nose ニオイセンサーをもちいて分析した（図-5（上））。これまで販売されて

いる一般的な匂いセンサーは検出素子が1種のみであることが多く、“匂いの強弱”が判別できるのみで、“匂いの違い”を判別することは不可能である。一方で、本センサーは水晶振動子型(Quartz Crystal Microbalance: QCM)の検出素子を採用し、異なる匂い物質に感度をもつ35種の検出素子を搭載している。すなわち、本センサーを活用することで匂いの強弱だけではなく、匂いの違いを、35種のセンサー素子の反応量の変化という形で数値化し、それらをパターンとして認識・判別することが可能となる(図-5(下))。

本研究では、QCM型 e-nose ニオイセンサー(アロマコーダーV2:アロマビット, 東京), およびサンプル調整器(アロマサンプラー:アロマビット, 東京)を使用した(本システムを以後, アロマコーダーとする)。分析は空調(室温約25°C, 湿度約50%)のある実験室で、複数パネルが臭気を感じないことを確認したうえで実施した。手順として、20 mLの培養液を100 mLバイアルに分取し、2分間の平衡化の後に、ヘッドスペース部をアロマサンプラーでセンサーユニットへ送気した。センサーユニット内には35種のQCM型検出素子が内蔵されており、素子の振動数の変化を10秒間に渡り10ポイント/秒で記録した。得られたデータは、クラウド上の自動解析アプリケーション(Aromalyzer, アロマビット, 東京)30)をもちいて解析した。解析には分析時間における最大感度値(最大差分)を採用し、Aromalyzer内で利用できる主成分分析をもちいてグルーピングした。

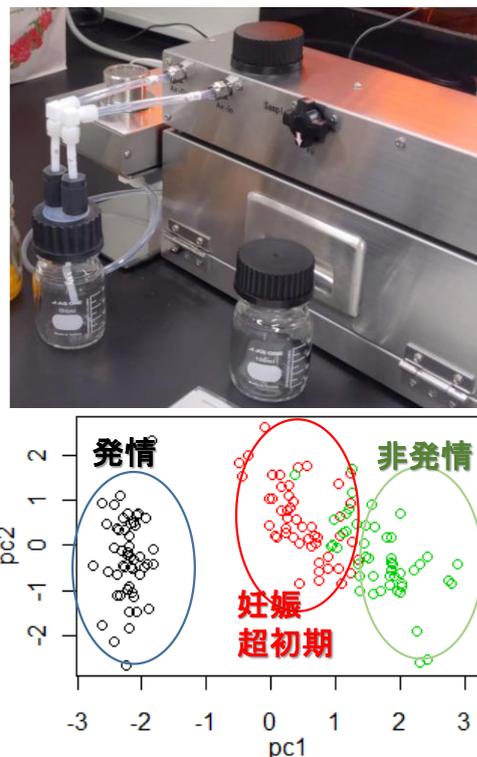


図-5 QCM型 e-nose ニオイセンサー“アロマコーダー”の外観(上), および35種の検出素子からのデータを主成分分析によってパターン解析した結果の概念図(下)。

### 3. 結果と考察

#### 3.1. 嗅覚官能評価

本研究では、発情個体と、疑似発情行動を示す超早期妊娠個体を判別する技術

表-2 和牛雌牛の発情および非発情（妊娠・非妊娠）個体から採取した頸管粘液試料の嗅覚官能評価による特徴的な匂いの印象の出現頻度

	出現頻度 (%)		
	発情	非発情（妊娠）	非発情（非妊娠）
強い獣臭	0	67	40
弱い獣臭	48	10	60
生ぐさ臭	43	0	0
酸臭	26	0	0
その他	16	11	0

の開発に向け、各状態の個体から採取した頸管粘液の匂いの違いを検証した。事前にこれまでの文献を検索したところ、頸管粘液の匂いについて言及した情報は皆無であった。

採取した頸管粘液試料の嗅覚官能評価で得られた匂いの印象について、その出現頻度をまとめた（表-2）。調査開始当初である、2022年2月、3月、4月は、発情、非発情（非妊娠）、非発情（妊娠）という3区分を設定して試料採取を試みた。まず非発情（非妊娠）と非発情（妊娠）の試料を比較したところ、“強い獣臭、弱い獣臭”という印象が優先しており、その匂いの印象に明確な差が見られなかった。現場における超早期妊娠個体鑑定の利用法としては、行動センサー等で発情と判別された個体の中から、疑似発情行動を示す“超早期妊娠個体”を判別することを想定している。非発情（非妊娠）状態の個体は数が少ないこと（出産後はすぐに次の妊娠期にはいるため）、また仮に非発情（非妊娠）個体を誤判定して人工授精を実施したとしても流産のようなリスクはないことから、非発情（非妊娠）個体と非発情（妊娠）個体は区別の必要はないと判断した。非発情試料を採取する際、非発情（非妊娠）状態の個体は数が少ないことから、2023年の調査では非発情個体としては非発情（妊娠）のみの試料を採取した。

2022年および2023年に実施した5回の採取試料を合わせた発情個体9検体および非発情（妊娠・非妊娠）15検体を対象とした嗅覚官能評価の結果を比較すると、発情個体は“弱い獣臭、生ぐさ臭、酸臭”が、非発情個体は“強い獣臭”が特徴的な匂いの印象として感知された。これら結果から、発情個体と非発情個体は嗅覚官能評価によって判別できる可能性が示唆された。

上述した嗅覚官能評価の結果により、発情個体と非発情個体が匂いで判別できる可能性が示唆されたことから、嗅覚による判別分析を試みた。試料は、2023年2月に採取された発情個体3検体および非発情（妊娠）個体3検体を対象とした。発情および非発情個体試料それぞれ1検体を基準試料として事前にパネルが匂いを嗅ぎ、残りの発情および非発情個体試料それぞれ2検体（計4検体）をランダムに提供し、匂いの類似度を判別した。判別分析の結果、正解率は平均値として50%（25～75%：パネル4名）であった。試料数およびパネル数が限られているものの、頸管粘液試料の嗅覚官能評価によって、発情および非発情を、おおよそ判別できることが明らかとなった。

### 3.2. GC-MS 分析

上述の嗅覚官能評価によって、発情と非発情（妊娠）を判別できる可能性が示された。そこでそれら試料の匂い物質をGC-MSノンターゲット分析に供試し、クロマトグラムの比較による発情と非発情（妊娠）の判別に着手した。試料は、2023年3月に採取された発情と非発情（妊娠）個体の頸管粘液試料、牛糞試料、および畜舎雰囲気試料を利用し、容器のヘッドスペースからVOCsを固相吸着剤で捕集し、GC-MS分析に供試した。

GC-MS分析によって得られたマスクロマトグラムには、多数のピークが確認された。GC-MSマスクロマトグラムを対象としてデコンボリューションおよびピークアライメント処理を施し、主成分分析をもちいて特徴的なピークの抽出を試

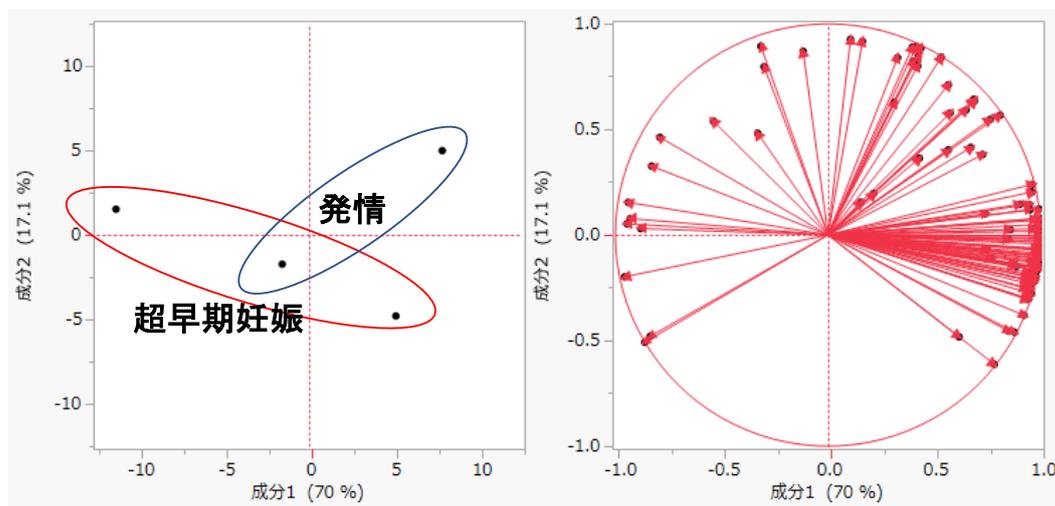


図-6 GC-MSノンターゲット分析法をもちいた発情および非発情（妊娠）個体から採取した頸管粘液試料VOCsの判別結果

みた。解析の結果，多数検出されていたピークは，バックグラウンドである畜舎  
 雰囲気，および牛糞試料のピークと相殺され，発情と非発情（妊娠）個体の VOCs  
 を明確にわけることができなかつた（図-6）。嗅覚官能評価では発情と非発情（妊  
 娠）の違いを判別できたが，GC-MS 分析では判別できなかつた理由として，頸管  
 粘液試料から放出されている VOCs は嗅覚閾値が低い物質（極低濃度でヒトの嗅  
 覚で感知可能な物質）であり，GC-MS の検出感度と比較して量的に少ないことが  
 推察された。

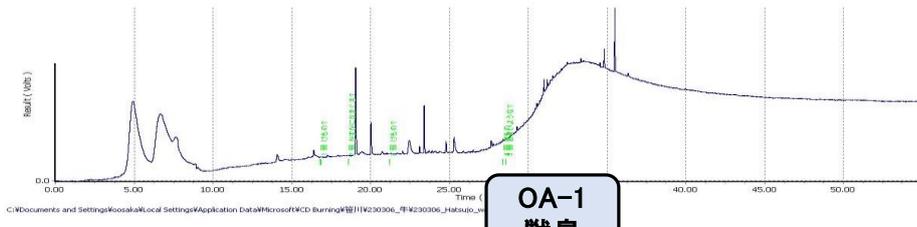
### 3.3. GC-0 分析

これまでの生体ガスの分析には GC-MS を利用するのが一般的であったが，  
 本研究の結果から頸管粘液試料から放出されている VOCs は嗅覚閾値が低い物質  
 （極低濃度でヒトの嗅覚で感知可能な物質）であるため，GC-MS の検出感度と比  
 較して量的に少ないことが示された。頸管粘液試料の VOCs を検出するため，本  
 研究では匂い物質をより高感度で匂い物質を検出できると期待される GC-0/FID  
 を利用した。GC-0/FID とは，ガスクロマトグラフによって匂い物質を分離し，  
 溶出してくる匂い物質をヒトの嗅覚と水素炎イオン化検出器（FID）をもちいて  
 検出するという機器である。GC-0 の嗅覚検出によって，物質によっては GC-MS  
 の約 1000 倍の感度を得ることができる（Young et al., 1996）と期待される。

## GC-0分析

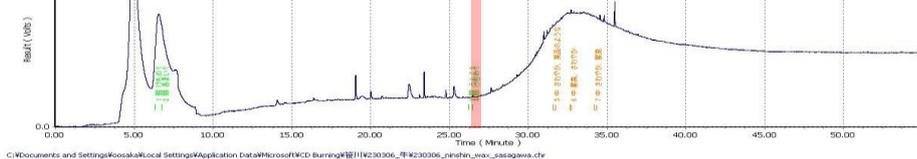
発情

強度



非発情(妊娠)

強度



保持時間

図-7 発情および非発情（妊娠）個体から採取した頸管粘液試料の VOCs を  
 対象とした GC-0/FID 分析によるアログラム

試料は、2023年3月に採取された発情と非発情（妊娠）個体の頸管粘液試料、牛糞試料、および畜舎雰囲気試料を利用し、容器のヘッドスペースからVOCsを固相吸着剤で捕集し、GC-0/FID分析に供試した。GC-0/FID（DB5）分析によって得られた頸管粘液試料のアロマグラムを示した（図-7）。発情と非発情（妊娠）、牛糞、および畜舎雰囲気のアロマグラムを比較し、重複する匂い活性（OA）を除外したところ、非発情（妊娠）のアロマグラム上に1か所から特徴的なOA-1が感知された。OA-1は非発情（妊娠）個体に特徴的な匂いであるため、将来的に物質同定することができれば、非発情（妊娠）個体の判別に向けた指標物質として利用できる可能性がある。

ところで、GC-0分析では多くの匂い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OA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、頸管粘液試料から捕集されたにおい物質の量は、ヒトの嗅覚では感知できる量であるが、FIDの検出感度よりも少ない量であると考えられた。頸管粘液試料の匂い物質を検出するためには、GC-0をもちいたヒトの嗅覚の活用が重要であることが示された。

### 3.4. E-nose ニオイセンサー分析

嗅覚官能評価およびGC-0分析によって、発情および非発情（妊娠）個体の頸管粘液試料はそれぞれ特徴的なにおい物質が存在することが明らかになった。そこで、e-nose ニオイセンサー分析によってそのにおいの違いが判別できるか検証した。試料は、2023年3月に採取された発情と非発情（妊娠）個体の頸管粘液試料（それぞれ3試料）、牛糞試料、および畜舎雰囲気試料を利用した。

アロマコーダー分析で得られた水晶振動子振動数変化値のリアルタイムモニタリングデータをプロットして波形を確認したところ、その挙動は安定しており、大きなノイズなど

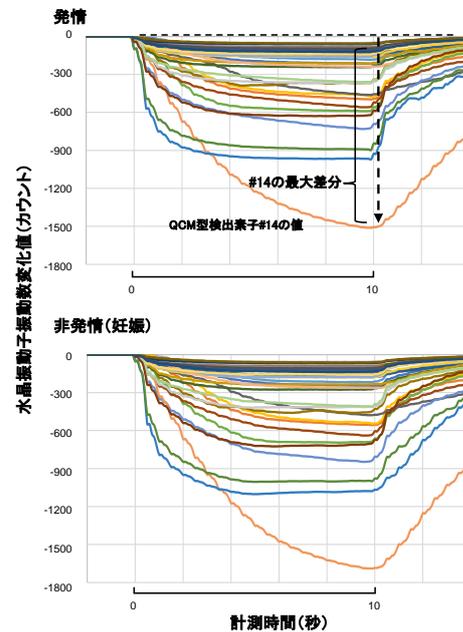


図-8 e-nose ニオイセンサー分析による発情および非発情（妊娠）個体から採取した頸管粘液試料 VOCs のリアルタイムモニタリングデータ

は確認されなかった (図-8)。また水晶振動子振動数変化値は 35 種の各 QCM 型検出素子の間で大きく異なり、物質に対する感度は素子ごとに大きく異なることが示された。またそれぞれの QCM 型検出素子の変化値に着目し、発情および非発情 (妊娠) 個体の試料の間で最大差分値を比較すると、若干の差が認められた。しかしデータ量が多いことから目視での判別は困難であったため、全ての QCM 型検出素子 (35 種) で得られた 10 秒間の時系列データを全て Aromalyzer に入力し、最大差分を自動抽出するとともに、その結果を主成分分析で解析した。

主成分分析の結果、嗅覚官能評価や GC-0 分析では差が感知されたが、e-nose ニオイセンサー分析では発情と非発情 (妊娠) 個体の試料の間に差を検出することができなかった (図-9)。その理由として、頸管粘液の放散する VOCs の量が極めて微量であり、QCM 型検出素子の感度には足りなかったことがあげられる。また QCM 型検出素子は水蒸気の影響を受けやすいことから、水分の多い頸管粘液試料から同時に放散される水蒸気が検出素子に影響し、微量の匂い物質の差が検出できなかったものと推察された。今後、試料の水蒸気を除去する脱水装置や、低濃度試料を濃縮する装置の設置、などを検討することが必要であると考えられた。

### e-noseにおいセンサー分析

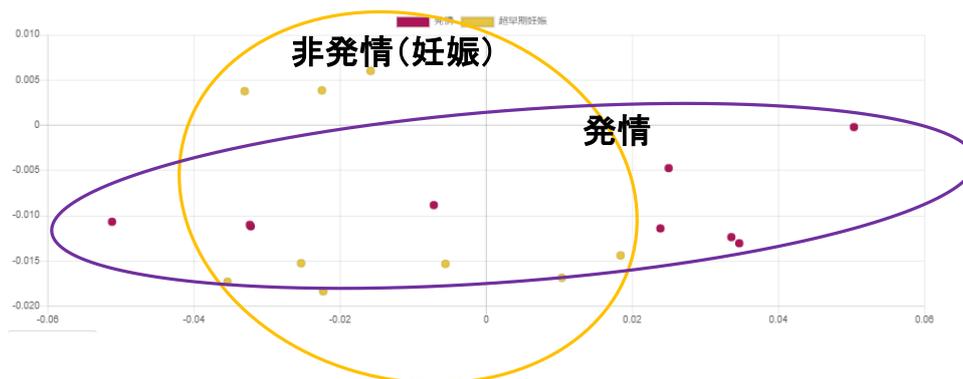


図-9 e-nose ニオイセンサー分析による発情および非発情 (妊娠) 個体から採取した頸管粘液試料 VOCs データの主成分分析結果

#### 4. まとめ

本研究では、黒毛和種繁殖雌牛の発情および非発情個体から頸管粘液を採取し、①嗅覚官能試験、②化学分析、③e-nose ニオイセンサー分析という3つの手法をもちいて、発情と非発情個体の判別に関する基礎データの集積を目的とした。

嗅覚官能評価においては、発情個体は“弱い獣臭、生ぐさ臭、酸臭”が、非発情個体は“強い獣臭”が特徴的な匂いの印象として感知された。また嗅覚による判別分析を試みたところ、正解率は平均値として50% (25~75% : パネル4名)であった。試料数およびパネル数が限られているものの、頸管粘液試料の嗅覚官能評価によって、発情および非発情を、おおよそ判別できることが明らかとなった。化学分析においては、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS) ノンターゲット分析に供試したところ発情と非発情 (妊娠) 個体の VOCs を明確にわけることができなかった。そこで匂い物質をより高感度で匂い物質を検出できると期待されるにおい嗅ぎガスクロマトグラフ (GC-O) を利用した結果、非発情 (妊娠) のアロマグラム上に1か所から特徴的な匂い活性が感知された。今後、非発情 (妊娠) に特徴的な匂い活性を物質同定することで、指標物質として利用できると期待される。e-nose ニオイセンサー分析においては、発情と非発情 (妊娠) 個体の試料の間に差を検出することができなかった。頸管粘液の放散する VOCs の量が極めて微量であり、QCM 型検出素子の感度には足りなかったことがあげられる。

本研究では、嗅覚官能評価や GC-O 分析では、ヒトの嗅覚を活用することで発情と非発情の違いをおおよそ判別できたが、GC-MS 分析および e-nose ニオイセンサー分析では、それらの違いを判別することはできなかった。将来的に簡易な“超早期妊娠鑑定”の技術として実用化するためには、e-nose ニオイセンサーの実用化に落とし込む必要がある。QCM 型検出素子は水蒸気の影響を受けやすいことから、水分の多い頸管粘液試料から同時に放散される水蒸気が検出素子に影響し、微量の匂い物質の差が検出できなかったものと推察された。今後、試料の水蒸気を除去する脱水装置や、低濃度試料を濃縮する装置の設置、などの検討が必要になると考えられた。

将来的な研究の成果としてセンサーによる判別が可能となった場合，小型化した廉価な“普及モデル”の開発をメーカーと協議している．普及モデルの e-nose ニオイセンサーが完成すれば，それらをインターネットに接続（ICT化）し，黒毛和種の超早期妊娠個体の状況を常時監視できる技術の開発につなげていくことを計画している（図-10）．本取り組みは新たな“スマート畜産技術”として，業界における人手不足に対応する革新的な技術になると期待される．



図-10 携帯型の“超早期妊娠個体鑑定センサー”のイメージ．専用機として機能を絞った小型機のプロトタイプを作成し，現場検証することを計画している．

#### 引用文献

- Arshak, K., Moore, E., Lyons, G.M., Harris, J., Clifford, S., 2004. A review of gas sensors employed in electronic nose applications. *Sens. Rev.* 24, 181-198.
- Assey, R.J., Purwantara, B., Greve, T., Hyttel, P., Schmidt, M.H., 1993. Corpus luteum size and plasma progesterone levels in cattle after cloprostenol-induced luteolysis. *Theriogenol.* 39, 1321-1330.
- Gardner, J.W., Bartlett, P.N., 1994. A brief history of electronic noses. *Sens. Actuators B Chem.* 18, 210-211.
- Green, J.C., Okamura, C.S., Poock, S.E., Lucy, M.C., 2010. Measurement of interferon-tau (IFN- $\tau$ ) stimulated gene expression in blood leukocytes for pregnancy diagnosis within 18–20d after insemination in dairy cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 121, 24-33.
- Koga, Y., Yoshiga, T., Shindo, J.-i., Aoyama, R., Nishimuta, K., Koyama, R., Miyamoto, H., Haraguchi, T., Ryuda, N., Ueno, D., 2021. Identification of specific odour compounds from garlic cloves infected with the potato tuber nematode, *ditylenchus destructor*, using gas chromatography-olfactometry. *Nematol.* 24, 55-63.
- Leonardos, G., Kendall, D., Barnard, N., 1969. Odor threshold determinations of 53 odorant

chemicals. J. Air Pollut. Control Assoc. 19, 91-95.

Matsumoto, M., Ueno, D., Aoyama, R., Sato, K., Koga, Y., Higuchi, T., Matsumoto, H., Nishimuta, K., Haraguchi, S., Miyamoto, H., Haraguchi, T., Yoshiga, T., 2020. Novel analytical approach to find distinctive odor compounds from garlic cloves infested by the potato-rot nematode *Ditylenchus destructor* using gas chromatography–olfactometry (GC–O) with heart-cut enrichment system. J. Plant Dis. Protect. 127, 537–544.

MS-DIAL, 2023. <http://prime.psc.riken.jp/compsms/index.html>, Accessed in January 2023.

NIST, AMDIS. <http://www.amdis.net/index.html>, Accessed in January, 2023.

Tsugawa, H., Cajka, T., Kind, T., Ma, Y., Higgins, B., Ikeda, K., Kanazawa, M., VanderGheynst, J., Fiehn, O., Arita, M., 2015. MS-DIAL: data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis. Nat. Methods 12, 523-526.

Young, W.F., Horth, H., Crane, R., Ogden, T., Arnott, M., 1996. Taste and odour threshold concentrations of potential potable water contaminants. Water Res. 30, 331-340.

環境省, 2002. 嗅覚測定法安全管理マニュアル. <https://www.env.go.jp/air/akushu/safety/index.html>.

環境省, 2017. 三点比較式フラスコ法について. [https://www.env.go.jp/air/akushu/olf\\_manual.html](https://www.env.go.jp/air/akushu/olf_manual.html).

金澤朋美, 2019. 黄体血流量に基づく受胎牛選定方法. 畜産診療 66, 145-151.

古賀夕貴, 井手海渡, 松元美里, 樋口汰樹, 市場正義, 上野大介, 2020. におい嗅ぎ GC (GC-O) を用いた冠水被害時における油臭の発生源解明. 環境化学 30, 29-35.

古賀夕貴, 吉賀豊司, 新藤潤一, 青山理絵, 松本英顕, 龍田典子, 原口智和, 宮本英揮, 上野大介, 2021. におい嗅ぎ GC を用いるイモグサレセンチュウ感染ニンニクから特徴的に発生するにおい物質の同定. 分析化学 70, 427-434.

笹川智史, 古藤田信博, 田中義樹, 池田繁成, 松元篤史, 佐藤克久, 上村智子, 小山玲音, 上野大介, 2022. 貯蔵臭をもつウンシュウミカンの選別法開発 (第 1 報) -可食部における貯蔵臭物質の同定-. におい・かおり環境学会誌 53, 357-365.

小山玲音, 出村幹英, 野間誠司, 林信行, 原口智和, 宮本英揮, 笹川智史, 龍田典子, 上野大介, 2021. スミレモ *Trentepohlia aurea* (Linnaeus) Martius のにおい嗅ぎガスクロマトグラフィーによるにおい物質の同定. におい・かおり環境学会誌 52, 226-232.

松元美里, 古賀夕貴, 樋口汰樹, 松本英顕, 西牟田昂, 龍田典子, 上野大介, 2020a. におい嗅ぎガスクロマトグラフィーを用いたハウスダスト中マイクロカプセル化香料の検索. におい・かお

## 詳細版

り環境学会誌 51, 319-322.

松元美里, 上野大介, 阿南光政, 佐藤克久, 長祐幸, 2020b. におい嗅ぎ GC (GC-O) を用いた農業用排水路における臭気物質分析の技術的提案. におい・かおり環境学会誌 51, 346-352.

松元美里, 野牧秀隆, 川口慎介, 古賀夕貴, 樋口汰樹, 松本英顕, 西牟田昂, 龍田典子, 上野大介, 2020c. におい嗅ぎ GC (GC-O) を用いた相模湾および小笠原海溝の深海堆積物コアを対象とした人為起源におい物質の検索. 環境化学 30, 94-99.

松尾美咲, 松元美里, 太田耕平, 佐藤克久, 上村智子, 古藤田信博, 染谷孝, 上野大介, 2018. 海産養殖魚における異臭物質の環境分析化学的アプローチ (におい嗅ぎ GC) による推定. 環境化学 28, 51-55.

松本英顕, 江原史雄, 小山玲音, 笹川智史, 原口智和, 宮本英揮, 龍田典子, 上野大介, 2021. におい嗅ぎガスクロマトグラフを用いた和牛の皮膚ガス分析技術の基礎的検討. におい・かおり環境学会誌 52, 233-239.

増田知美, 高橋恵, 寺田絵里加, 橋詰賢一, 2017. ニオイセンサーによるニオイの可視化と人による官能試験との相関性. Workshop on Interactive Systems and Software 講演要旨集, 2022年2026月アクセス.