

要約

牛群検定を行っている生産者 2 軒（農場 I および II）のホルスタイン種計 141 頭を対象として、ゲノミック評価に基づく A2 化のベネフィット・リスク評価を行った。農場 I における CSN2 遺伝子型頻度は、A1A1 が 0.19、A1A2 が 0.49、A2A2 が 0.32 であり、農場 II ではそれぞれ 0.10、0.49 および 0.41 であった。クラリファイド・プラスで生産性、繁殖性、体型、乳質、疾病発生リスク等を調べたところ、農場 I の牛群では、A1A1 型の方が娘牛妊娠率、経産牛受胎率、近交係数において優れる一方、A2A2 型の方が 305 日搾乳での脂肪量、タンパク質量、乳脂肪率、乳タンパク質率、生涯利益、チーズ適正、牛乳適正、放牧適正、アイジェニティ能力指数、娘牛分娩難度、娘牛死産率、体型、乳器混合指数、肢蹄混合指数、肢蹄得点が優れると評価された。また、農場 II の牛群では A2A2 型の方が第四胃変位のリスクが高いと評価された。305 日搾乳での乳量、生産寿命に有意差はなく、A2 化はベネフィットが大きいと判断されるが、娘牛妊娠率、と経産牛受胎率が低く、第四胃変位のリスクが高いという知見は、ゲノミック評価を拡大して精度を高める必要がある。続いて、A1 ミルク、A2 ミルク、A1 ヨーグルト、A2 ヨーグルトからカゼインを調製し、それらを酵素分解および限外濾過して BCM-7 を測定した。A1 ミルクからだけでなく A2 ミルクからも BCM-7 が少量生成し、DPP4 活性を有する乳酸菌でヨーグルトを作成すると BCM-7 生成量は半分以下となった。A2 ミルクからの BCM-7 生成は理論的に説明し難く、酵素消化後の BCM-7 生成から A1 ミルクと A2 ミルクを識別する方法は改良あるいは修正すべきであろう。低温保存、ホモジェナイズ、加熱殺菌といった牛乳の生産工程で β カゼインの Ile⁶⁶-Pro⁶⁷ 結合が脆弱になるか等について現在も検討を続けている。

1. はじめに

A1 型の β -カゼインが胃腸の運動性や炎症に影響するなどの報告を受けて、これを含まない A2 ミルクが製造販売されるようになった。先導したのは 2000 年に設立されたニュージーランドの A2 コーポレーション（現 A2 ミルクカンパニー）で、乳幼児突然死症候群、冠動脈性心疾患、I 型糖尿病、自閉症といった多くの疾患に A1 ミルクの摂取が関与するという主張がなされた。健康影響については当初から異論、反論があり、科学的レビューを行った欧州食品安全機関は、A2 ミルクの優位性を示す根拠は十分でないとして論じている（EFSA Science Report 2009）。日本の食品安全委員会もその見解を支持しているが、2018 年にそれまで懐疑的だったネスレやフォンテラが参入し、世界の A2 ミルク市場は一気に活性化した。2022 年の市場は 1 兆 3,000 億円規模と推測されており、2029 年には 3 兆 5,000 億円規模になると予測されている。日本では一部の消費者が A2 ミルクを知っているという程度であるが、アジア特に中国では A2 ミルクに興味お

よび購買意欲を示す消費者が急増している。A2 ミルクは、 β -カゼインをコードする CSN2 遺伝子が A2A2 の牛を集め、その生乳を同一ロットで殺菌・充填する体制があれば作ることができる。

A2 ミルクを認めることは、普通のミルク（A1 ミルク）が危険であるという誤解を招き、消費者の牛乳離れを誘発する恐れがある。クーラーステーションを介した生産流通体制が主流ということもあり、日本ではこれまで A2 ミルクに関する研究が非常に低調であった。一方、生産者の中には A2 ミルクに活路を見出そうとする者がおり、2018 年 12 月にスタートした JA 中標津を皮切りに、現在 10 団体が小規模の B to C マーケティングを行っている。A1 ミルク（A1A1 だけでなく A1A2 の牛が産み出すミルクも A1 とみなされる）が混入してはいけないので、製造ロットが小さい方が A2 化に取り組みやすい。2020 年には A2 ミルクに関する情報交換の場として、一般社団法人 A2 ミルク協会が設立されている。

我々は、岡山県蒜山地域のジャージー種を対象とした飼養、衛生、乳質管理に関わる調査研究を行ってきた。蒜山酪農農業協同組合（蒜酪）他の要望に応じて始めた問題解決型研究である。蒜山地域で A2 化の機運が高まったのは 2018 年頃で、それを受けて我々は蒜酪組合員が飼育するジャージー種 590 頭の CSN2 遺伝子診断を行った。岡山県（真庭家畜保健衛生所、農林水産総合センター畜産研究所）、中国四国酪農大、蒜酪組合員の協力で実施できた実態調査である。ジャージー種で A2 化を進める基礎情報を提供することができたが、この調査研究を行うなかで、A2 ミルクに関する研究は未整備、未解明の課題が少なくないことに気付いた。育種改良に潜在するリスク、品質管理、品質保証の方法など、検証が不十分という課題が数多くある。A1 ミルクの不安を払拭する乳加工法の開発という、さらなる広がりが期待できる課題があることも分かった。専門分野を横断する調査研究が必要と考え、2022 年 10 月の関西畜産学会岡山大会において「A2 ミルクって何？」というテーマで公開シンポジウムを開催した。このシンポジウムをきっかけに、酪農および食品産業関係者と意見交換する機会が増えた。

日本の乳牛は 99%以上がホルスタイン種であり、本事業ではホルスタイン種およびそのミルクを対象として品質管理および品質制御に関する調査を行った。ホルスタイン種は A1A1 および A1A2 の牛が合わせて 60-70%と多い。育種改良を誤ると、酪農乳業の持続性、乳製品の品質などが大きく影響される。一方、ホルスタイン種で社会実装につながる技術開発ができれば、A2 市場では後発ながら、付加価値の高い日本ブランドを食品産業に加えることができるかもしれない。生乳や牛乳はそのまま飲むだけで消費されているのではなく、菓子・デザート、アイスクリームなど、加工によって様々な形態、味、食感に変化して消費されている。乳酸菌を利用した機能性修飾の可能性についても調査することとした。

2. A2 化のベネフィット・リスク評価

ヒト、ヤギ、ヒツジ、ブタ等、ウシ以外の動物は CSN2 遺伝子型がすべて A2A2 で、A1 ミルクはウシだけが産み出す。家畜化前はウシも A2A2 だったと考えられており、A1 という変異は改良

が進んだホルスタインで多くみられる（図 1）。すなわち、A2 化はこれまでの育種改良を逆行させる可能性がゼロではない。A2A2 牛は A1A1 および A1A2 牛より乳脂率が低いという報告もある。乳牛は育種計画から実際に生乳を得るまでおよそ 3 年の月日を要するため、搾乳牛すべてを A2A2 牛とする A2 化は 5~10 年がかりの事業である。育種改良が誤りであれば、それを修正するのもにも同様の時間がかかる。

コドン	18	25	36	37	67	72	88	93	106	122	138
ウシ											
A1	Ser	Arg	Glu	Glu	His	Gln	Leu	Met	His	Ser	Pro
A2	Ser	Arg	Glu	Glu	Pro	Gln	Leu	Met	His	Ser	Pro
A3	Ser	Arg	Glu	Glu	Pro	Gln	Leu	Met	Gln	Ser	Pro
B	Ser	Arg	Glu	Glu	His	Gln	Leu	Met	His	Arg	Pro
C	Ser	Arg	Glu	Lys	His	Gln	Leu	Met	His	Ser	Pro
D	Lys	Arg	Glu	Glu	Pro	Gln	Leu	Met	His	Ser	Pro
E	Ser	Arg	Lys	Glu	Pro	Gln	Leu	Met	His	Ser	Pro
F	Ser	Arg	Glu	Glu	His	Gln	Leu	Met	His	Ser	Leu
G	Ser	Arg	Glu	Glu	His	Gln	Leu	Met	His	Leu	Pro
H1	Ser	Cys	Glu	Glu	Pro	Gln	Ileu	Met	His	Ser	Glu
H2	Ser	Arg	Glu	Glu	Pro	Glu	Leu	Leu	His	Ser	Pro
I	Ser	Arg	Glu	Glu	Pro	Gln	Leu	Leu	His	Ser	Pro
ヒツジ	Ser	His	Glu	Glu	Pro	Gln	Leu	Met	His	Ser	Pro
ヤギ	Ser	His	Glu	Glu	Pro	Gln	Leu	Met	His	Ser	Ser
フタ	Ser	His	Glu	Glu	Pro	Gln	Leu	Met	Arg	Ser	Pro
ウマ	Ser	His	Glu	Gly	Pro	Gln	Leu	Met	Arg	Arg	Leu
ヒト	Ser	Glu	Glu	Asp	Pro	Gln	Pro	Met	Gly	Pro	Pro

図 1. β-カゼインをコードする CSN2 遺伝子の多様性。ヒトを含む多くの動物が A2A2 だが、A2 ミルクがヒトのミルクと同じというわけではない。ホルスタイン種には対立遺伝子 B をもつ個体も多い。

現在の A2 化は、CSN2 遺伝子の表現型 (A2A2) だけで進められているが、SNP 情報に基づくゲノミック評価を組み合わせれば、泌乳、繁殖、管理、体型などの形質を含めた遺伝情報統合型の育種改良が可能となる。まず、牛群検定を実施している 2 軒（農場 I および II）の生産者を対象として合計 141 頭（農場 I および II からそれぞれ 91 および 50 頭）のゲノミック評価を行った。毛根あるいは耳片を採取してゾエティス・ジャパンの検査ラボに送り、クラリファイド・プラスで生産性、繁殖性、体型、乳質、疾病発生リスク等を評価した。家畜改良事業団でも乳牛のゲノミック評価は行われているが、本調査の実施時には CSN2 遺伝子の SNP 評価は調査項目に含まれていなかった。なお、家畜改良事業団は 2024 年 1 月から β-カゼインの遺伝子検査を開始している。

農場 I における CSN2 遺伝子型頻度は、A1A1 が 0.19、A1A2 が 0.49、A2A2 が 0.32 であり、A1 および A2 遺伝子頻度はそれぞれ 0.43 および 0.57 であった。農場 II では A1A1 が 0.10、A1A2 が 0.49、A2A2 が 0.41 であり、A1 および A2 遺伝子頻度はそれぞれ 0.35 および 0.65 であった。調査した乳牛集団はいずれもハーディーワインベルクの法則に従っており、CSN2 遺伝子について選抜は行われていないと判断できた。Turkey-Kramer test による多重比較の結果、農場 I の牛群では、A1A1 型の方が娘牛妊娠率、経産牛受胎率、近交係数において優れる一方、A2A2 型の方が 305 日搾乳での脂肪量、タンパク質量、乳脂肪率、乳タンパク質率、生涯利益、チーズ適正、牛乳適正、放牧適正、アイジェニティ能力指数、娘牛分娩難度、娘牛死産率、体型、

乳器混合指数、肢蹄混合指数、肢蹄得点が優れていると評価された(図 2)。305 日搾乳での乳量、生産寿命に有意差はなかった。農場Ⅱの牛群では、調査個体数が少なかつたためか有意差がみられる項目はほとんどなかったが、A2A2 型の方が第四胃変位のリスクが高いと評価された。これらの結果は、A2 化が育種改良を逆行させることはなく、生涯利益の向上も期待できることを示しているが、A2A2 型の方が娘牛妊娠率と経産牛受胎率が低く、第四胃変位のリスクが高いという評価は無視できない懸念項目であろう。現時点では 141 頭を対象とした解析にとどまっているため、ゲノミック評価を拡大して精度を高めるよう努めたい。

レポート	平均値 (A1A1)	平均値 (A1A2)	平均値 (A2A2)	レポート	平均値 (A1A1)	平均値 (A1A2)	平均値 (A2A2)
Fat(lbs)	-18.059b	5.311a	22.241a	CCR	-0.724b	-2.016a	-2.003a
Fat(%)	-0.092b	-0.02a	0.007a	DSB	7.182a	6.813ab	6.269b
Pro(lbs)	1.412a	9.556a	20.345b	FLC	0.145a	0.409ab	0.602b
Pro(%)	-0.019a	0.003ab	0.014b	UDC	-0.071b	0.718a	1.103a
NM(\$)	-131.824a	-27.889a	136.966b	RLR	0.185a	0.702ab	0.944b
DPR	-0.624b	-1.782a	-2.045a	FTA	0.442a	0.948ab	1.121b
DCE	2.994a	2.833a	2.545b	FUA	0.116b	1.092a	1.581a
IPI	1851.412a	2019.8a	2202.828b	RUH	0.31b	1.42a	1.786a
GM(\$)	-154.941a	-65.556a	93.103b	RUW	0.246b	1.243a	1.611a
PTAT	0.634b	1.335a	1.599a	UDP	0.166a	0.765ab	1.201b
GFI	7.4b	8.836a	9.534a	FTP	-0.104b	0.492a	0.592a
CM(\$)	-134.941a	-27.711a	139.586b	RTP	0.075b	0.66a	0.74a
FM(\$)	-107.882a	-32.133ab	116.172b				

A1優性
 A2優性

図 2. 農場Ⅰの牛群におけるゲノミック評価結果. 多くの形質で A2 型の方が優れており、乳量、乳成分、生産寿命が低下するという懸念はないが、娘牛妊娠率と経産牛受胎率が低いと評価されている。

続いて、農場Ⅰの乳検データに基づいて、A1A1 牛、A1A2 牛、A2A2 牛の乳量、乳成分等を比較した。6 ヶ月間のデータであり、期間中に一定数の乳牛が乾乳あるいは新たに搾乳を開始したほか、泌乳初期、最盛期、中期、後期という詳細な泌乳サイクルで評価できるほどの頭数を確保できなかった。それでも、分娩後 5 ヶ月を前期、それ以降を後期とすることで図 3 の結果が得られた。統計処理は反復測定分散分析で行った。

乳量は前期で多く、乳タンパク質、乳脂肪、無脂乳固形分の割合が後期で高くなるのは一般的だが、乳タンパク質と無脂乳固形分が A1A2 牛でその他より高いという知見は調査事例を増やして確認する必要があるだろう。有意差はなかったが、本調査では A1A2 牛で乳量が少ない傾向にあった。そのことが A1A2 牛の乳成分割合を高めたと考えられるが、A2A2 牛に適した飼養管理技術というものがあるかもしれない。乳検日に採血を行っているので、血液性状のデータと合わせた解析を継続している。

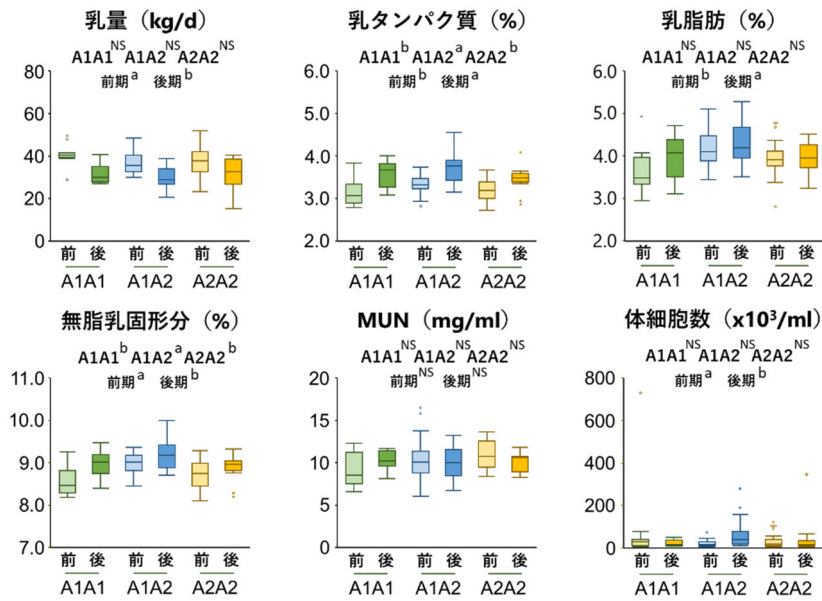


図 3. 農場 I の牛検データに基づく乳量、乳成分の比較. 分娩後 5 ヶ月を前期、それ以降を後期とした反復測定分散分析の結果を示す. ゲノミック評価とは異なり、A1A2 牛とそれ以外で違いがみられる.

3. A1 ミルクと A2 ミルクの品質評価とその制御

A1 型と A2 型の β -カゼインの違いをもたらすのは、67 番目のアミノ酸 (Pro67His) とされている。A2 ミルクの β -カゼインは Val⁵⁹-Tyr⁶⁰-Pro⁶¹-Phe⁶²-Pro⁶³-Gly⁶⁴-Pro⁶⁵-Ile⁶⁶-Pro⁶⁷-Asn⁶⁸ のアミノ酸配列をもち、Val⁵⁹-Tyr⁶⁰ はエラスターゼで分解されるものの、Ile⁶⁶-Pro⁶⁷ はどの消化酵素にも分解されない。A1 ミルクの β -カゼインは Ile⁶⁶-His⁶⁷ となっており、このペプチド結合を切る消化酵素は複数ある。これにより A1 ミルクからのみ β -カゾモルフィン 7 (BCM-7; Tyr⁶⁰-Pro⁶¹-Phe⁶²-Pro⁶³-Gly⁶⁴-Pro⁶⁵-Ile⁶⁶) が生じるとされ、BCM-7 のオピオイド様作用で健康被害が生じると考えられている。そのため、A2 ミルクと表示されるものの、重要なのは A1 フリーすなわち BCM-7 を生じないことである。しかし、カゼインを酵素分解して BCM-7 生成の有無を調べると、A2 ミルクからも微量の BCM-7 を確認できるという報告が多い。 α_{S1} -、 α_{S2} -、 κ -カゼイン、 α -ラクトアルブミン、 β -ラクトグロブリンに BCM-7 に相当するアミノ酸配列はなく、これらをコードする *CSN1S1*、*CSN1S2*、*CSN3*、*LALBA*、*LBG* 遺伝子に変異があっても BCM-7 に相当するアミノ酸配列にはならない。搾乳後の生乳は、半日以上酪農家で低温 (4°C) 保存される。集乳後も常に低温下に置かれるが、乳業会社で加熱殺菌されるまで低温細菌の活動が穏やかとはいえ継続しうる。この間に Ileu⁶⁶-Pro⁶⁷ の結合が分解され、A2 ミルクから BCM-7 が生じるようになるのかもしれない。現在のところ、A2 ミルクの品質保証は設計図 (*CSN2* 遺伝子の塩基配列) で行われており、製品 (タンパク質) ではなされていない。

人であれ動物であれ、腸細胞には DPP4 (Dipeptidyl peptidase IV) と呼ばれるプロリン特異的なペプチダーゼが存在する。プロリン周辺のペプチド結合は消化酵素の作用を受けにくい、DPP4 他のペプチダーゼが作用することで、我々はカゼインに含まれるアミノ酸はほぼ 100%

(95%程度) 吸収できる。BCM-7 が生成するしないという話から、 β -カゼインは消化吸収率が悪いという誤解をもたれることがあるが、ミルクタンパク質の栄養価は疑いなく非常に優れている。一方、DPP4 に類似する酵素活性が乳酸菌を含む多くの微生物に確認されることから、ヨーグルトやチーズの発酵中に BCM-7 前駆体が分解される可能性が指摘されている。A1 ミルクの不安を払拭する発酵法となるかは分からないが、品質の制御因子として調査を行った。

農場 I の A1A1 牛および A2A2 牛からバケットミルカーで搾乳を行い、65°C で 30 分間殺菌した生乳を等電点沈殿 (pH 4.6) してカゼインを凝固させた。遠心分離で脂肪を除き、凍結乾燥した粉末を脱脂して BCM-7 の測定に供した。酵素消化はカゼイン 24 mg/ml の濃度で行い、ブタペプシン (pH 2.5、37°C、5 時間) およびウシパンクレアチン (pH 7.0、37°C、5 時間) によって生じたペプチドを、MWCO 10,000 および 3,000 の Vivaspin で限外濾過して分子量 3,000 以下の分画を得た。これを逆相 HPLC で分析するとともに、MALDI-TOF-MS で BCM-7 の有無を確認した。

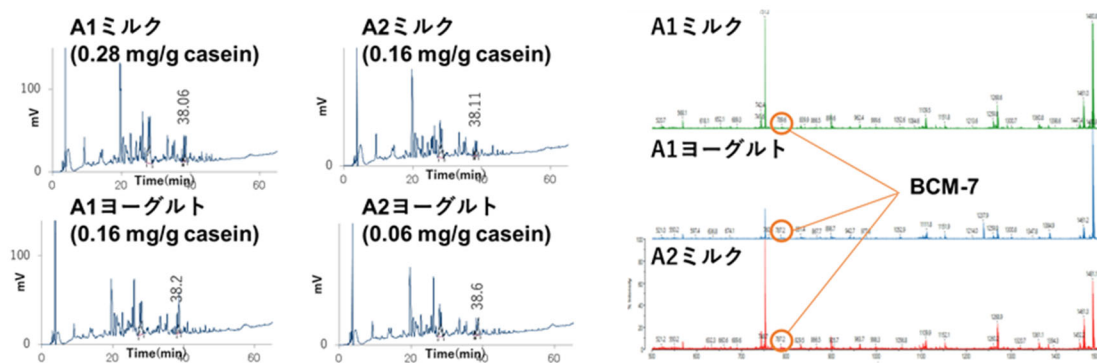


図4. A1 ミルク、A1 ヨーグルト、A2 ミルク、A2 ヨーグルトの酵素分解で生じた BCM-7. A1 ミルクからだけでなく、A2 ミルクからも BCM-7 生成が確認された。

A1 ミルクからだけでなく、A2 ミルクからも BCM-7 が生成することを確認した。理論的に説明することは難しいが、同様の結果を示す報告は少なくない。既に述べたように、カゼイン、ラクトアルブミン、ラクトグロブリンに BCM-7 に相当するアミノ酸配列はなく、A2 ミルクから BCM-7 が生成するということは、Ile⁶⁶-Pro⁶⁷ のペプチド結合が考えられているほど強固ではないことを示唆する。消化酵素の基質特異性がそれほど厳密でなく、プロリン周辺のペプチド結合にも作用するということがあるかもしれない。また、低温耐性の微生物群が生乳保存中に DPP4 様の酵素を作用させる可能性もある。今回用いたミルクは、サンプリング前日夕方の生乳と当日朝の生乳を混合したもので、カゼインを調製するまでに最大で 20 時間程度低温保存されていた。

BCM-7 は β -カゼインに酵素が作用して生じるものであり、ミルクをそのまま用いても BCM-7 を測定することはできない。ペプシン、トリプシン、キモトリプシンといった消化酵素を作用させて検出可能な形にする必要がある。本研究ではウシパンクレアチンを使用した。パンクレアチンは膵臓由来の酵素混合物で、トリプシン、キモトリプシン、カルボキシペプチダーゼの他に

アミラーゼ、リパーゼ、リボヌクレアーゼといった多様な酵素を含む。高度に精製された酵素ではなく、臍あるいは腸管に由来する DPP4 が混在している可能性もある。もし酵素消化に用いる試薬に問題があるとすれば、BCM-7 生成の有無から A1 ミルクと A2 ミルクを識別する方法は改良あるいは修正されなければならない。これらについての検討は始めており、総括できるよう知見を積み重ねて公表したい。

DPP4 活性を有する乳酸菌スターターで BCM-7 前駆体を発酵分解することは、市販スターター 3 種 (CH-1、YC-X11、Mild1.0) の DPP4 活性をモニタリングすることで調査した。A1A1 型および A2A2 型の乳牛からミルクを採取し、65°C で 30 分間殺菌した生乳にスターターを接種して 37 あるいは 43°C で 6 および 24 時間発酵させた。DPP4 活性は、Gly-Pro-pNA からのニトロアニリン生成量および BCM-7 の分解率で測定した。

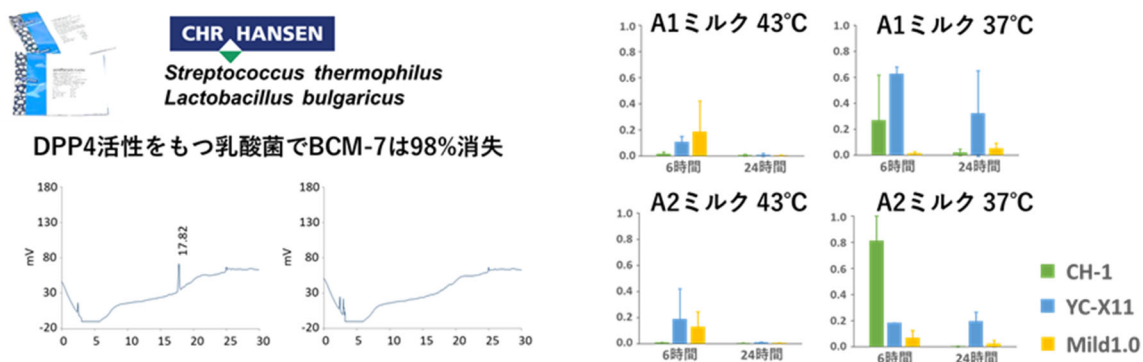


図 5. A1 ミルクおよび A2 ミルクに市販スターター 3 種を接種した作成したヨーグルトの DPP4 活性。発酵後乳酸菌体を回収して超音波破碎し、細胞内 DPP4 活性を測定した。

37°C で培養すると、24 時間後の pH は CH-1 が 3.9 まで低下しており、YC-X11 と Mild 1.0 では 4.3 程度にとどまった。43°C で培養した場合も、24 時間後の pH は CH-1 で最も低くなった。DPP4 活性はスターターおよび培養条件による違いが明確で、CH-1 と YC-X11 は 37°C、6 時間後に高値を示す一方、24 時間後には活性値が著しく低下した。また、43°C では培養時間に関わらず DPP4 活性が低値であった。すなわち、いずれのスターターも DPP4 の耐酸性は低く、BCM-7 前駆体を分解する能力があったとしても、ヨーグルト製造の初期段階でそれらは半減あるいは失活すると考えられた。スターターによって耐酸性や培養条件に対する反応は異なるので、BCM-7 前駆体の分解をどこまで高められるかについて検討を続けている。

A1 ミルク、A2 ミルクの品質制御という目的からすれば、低温保存、ホモジェナイズ、加熱殺菌といった牛乳の生産工程で β カゼインの Ile⁶⁶-Pro⁶⁷ 結合が脆弱になるか等を明確にすることが必要であった。現在も A1 ミルクと A2 ミルクの識別方法を明確にすることに注力しており、当初の計画通りには調査が進んでいない。サンプリングは順調に進んでいるので、酵素消化に用いる試薬に問題がある場合は、近年示された UHPLC による直接識別を合わせて品質制御に関する

情報を整えたい。