

平成21年度

食肉に関する
助成研究調査成果報告書

VOL. 28

財団法人

伊藤記念財団

平成21年度

食肉に関する

助成研究調査成果報告書

VOL. 28

財団法人

伊藤記念財団

「伊藤記念財団」設立趣意書

私、伊藤傳三は、昭和3年食肉加工業を創業して以来五十有余年の永きにわたり食肉加工品の製造販売に従事して参ったところであります。

この間、昭和47年からは日本ハム・ソーセージ工業協同組合理事長、社団法人日本食肉加工協会理事長、加えて、ハンバーグ・ハンバーガー協会理事長等の重責を担わせていただく等、業界団体の役員を勤めさせていただいてきたところあります。

こうした中で昭和55年、はからずも勲二等瑞宝章受章という身にあまる榮譽に浴したのでありますが、受章に際し私自身の過ぎ来し方を振り返り、食肉及び食肉加工業界の行く末に思いを致し、2つの事柄を決意致しました。

第1は、食肉加工団体の指導体制の若返りであり、

第2は、食肉加工業の基礎的研究の充実であります。

諸情勢が激しく変わりつつある中で食肉加工業界をさらに大きく発展させるには、新しいリーダーの登場が望ましいことは論をまちません。また、食肉加工品については、これまでも日本独自の技術開発は行われてきましたものの、いずれも企業内技術であると言っても過言でなく、大学等における基礎的研究の不足が将来の日本の食肉加工業の発展を遅らせるおそれがあり、この現状を打破する必要があると考えたところあります。

以上のような基本的考えの下に私は、食肉関係団体等の役員を辞すると共に、食肉及び食肉加工に関する基礎的かつ広汎な研究を行い、あるいは助長するための財団の設立を發起するものであります。

昭和56年6月

設立發起人 伊 藤 傳 三

Philosophy Behind the Establishment of the Ito Foundation

Approximately half of a century has passed since I established a meat packing corporation for commercial products in 1928. While involved in this business, I have had occasion to serve as chairman of the boards of trustees of several organizations related to the meat industry, such as the Ham-Sausage Industrial Association of Japan in 1972, the Meat Packing Industrial Association of Japan, and the Hamburg-Hamburger Association of Japan.

In 1980, unexpectedly, I was highly honored to receive the Order of the Sacred Treasure, Gold and Silver Star from the emperor in acknowledgement of my contributions to the meat industry and improved human nutrition during my career. This illustrious award provided a strong impetus for me to act on my long-standing concern for the future of meat packing industries.

My commitment to the establishment of a new research foundation for the promotion of meat science was based on two fundamental philosophies : first, leadership of the Association of the Meat Packing Industry should be transferred to people with novel ideas and, second, an advanced system for basic research should be established in meat industries. Clearly, fresh leadership is needed in changing situations for intensive development in the meat packing industry. Although some technical product developments have been achieved in certain individual corporations, the lack of basic research in meat science at universities and other research organizations certainly will impede future development of Japanese meat packing industries. It is urgent to end the stagnation in the meat industry through research support.

On the basis of these philosophies, I myself will resign from any official positions in meat-related associations and will establish a new research foundation to support and promote basic and applied research in meat science.

Denzo Ito, Founder
June 1981

事業のあらまし

(目的)

本財団は、食肉に関する研究及び調査を行い、もって畜産業及び食品産業の振興と国民食生活の安定に資することを目的とする。

(事業)

本財団は、上述の目的を達成するため、次の事業を行う。

- (1) 食肉の生産、処理、加工等に関する基礎的研究及び調査。
- (2) 食肉の生産、処理、加工等に関する研究又は調査を行う大学等の研究機関に対する助成。
- (3) 食肉の生産、処理、加工等に関する情報の普及及び広報。

(事業実績)

回	年 度	研究調査助成		研究調査委託	
第1回	昭和57年度	48件	60,000千円	5件	18,097千円
2	58	52	54,400	4	12,064
3	59	60	49,800	7	17,000
4	60	62	48,000	9	18,100
5	61	70	53,000	8	11,681
6	62	79	58,900	2	5,151
7	63	95	70,500	2	2,764
8	平成元年度	86	74,250	3	1,900
9	2	79	60,000	1	500
10	3	70	50,000	1	2,000
11	4	86	60,000	2	5,000
12	5	81	60,000	2	4,000
13	6	81	60,000	3	4,000
14	7	82	65,000	2	2,500
15	8	81	69,100	4	7,000
16	9	78	59,000	3	5,500
17	10	82	60,000	3	6,500
18	11	67	47,000	2	5,000
19	12	57	41,000	2	16,000
20	13	53	37,000	1	9,720
21	14	58	40,000	0	
22	15	55	41,000	0	
23	16	55	48,000	0	
24	17	56	48,000	0	
25	18	11	10,000	0	
26	19	12	10,000	0	
27	20	15	16,900	0	
28	21	11	10,000	0	

ご 挨拶

当伊藤記念財団は、伊藤ハム株式会社の創業者故伊藤傳三による巻頭の「設立趣意書」に掲げた趣意をもって、昭和56年7月3日に農林水産大臣から設立を許可されました財団法人であり、事業の内容は、「事業のあらまし」にあるとおりであります。

おかげ様で当財団は去る7月3日をもちまして、創立29周年を迎えましたが、この間、次第に研究調査助成事業の存在が畜産関係の方々の中に浸透いたし、事業内容も逐次充実して参り

つつあります。

これは、ひとえに農林水産省並びに関係各位のご指導ご鞭撻の賜と深く感謝申し上げますとともに、今後とも、食肉加工等の基礎的研究の充実を希う創設者の意志にそって、益々食肉産業ひいては畜産業の振興及び国民食生活の安定のために役立つべく、更に努力を重ねて参りたいと存じております。

本書は、第28回（平成21年度）助成事業における11件の研究調査助成対象研究者の皆様からいただいた研究成果報告をとりまとめたものでありますが、以上の目的にしたがって、食肉産業の基礎的研究等に携わる諸氏の研究の一助ともなれば幸甚でございます。

平成22年11月

理事長 伊藤 功 一

Dear Sir :

I am very pleased to send you and your organization a complimentary copy of the research reports of the Ito Foundation. This research foundation was founded by the late Mr. Denzo Ito to advance research in meat science. The research reports are published annually. Unfortunately, the articles are largely in Japanese ; however, in the future we hope to contribute to the international development of meat science. Any constructive suggestions or critiques from others involved in meat-related research would be accepted gratefully.

You will find out philosophy behind the establishment of The Ito Foundation described by Mr. Denzo Ito, in the research report of The Ito Foundation, Vol.28 enclosed here. We appreciate any interest you may have in our research efforts.

It is my great pleasure to publish this report as the chief director.

Sincerely yours,
Nov. 2010
Koichi Ito
The chief director
The Ito Foundation



目 次

食肉由来機能性成分の畜種別差異の比較検討について ……………久保田 大樹・アブドラティフ アーメド・河原 聡・六車 三治男 (宮崎大学農学部) ……………	1
食肉による精神機能改善に関する研究 ……………古瀬 充宏 (九州大学大学院農学研究院) ……………	10
レトルト処理を施した筋原線維タンパク質の増粘多糖類添加によるゲル形成に関する研究 ……………芳賀 聖一・水谷 佳月・林 利哉 (名城大学農学部) ……………	15
肉由来ペプチドカルノシンの免疫調節作用 ……………清水 誠 (東京大学大学院農学生命科学研究科) ……………	21
食感・風味を再現し得る牛肉の凍結保存に関する研究 ……………菱山 和洋・*米田 一裕・**武田 哲男・佐々木 忠義・平井 力 (兵庫但馬牛増頭推進協議会, *米田遺伝子型研究所, **タケダ繁殖クリニック) ……………	28
低温乳酸発酵を施した食肉の機能性評価に関する研究 ……………林 利哉・芳賀 聖一 (名城大学農学部) ……………	34
伝統的魚肉加工手法の食肉加工への応用 ……………岩田 淑子・宇多川 隆 (福井県立大学生物資源学部) ……………	40
食肉由来機能性成分クレアチンによる脳機能の維持・改善に関する研究 ……………鬼澤 直樹・*豊田 淳 (東京農工大学大学院連合農学研究科, *茨城大学農学部) ……………	46
ブタ臓器輸送の鮮度保持に関する工夫 —異種移植モデルとしてのブタ膵臓器を用いて— ……………小玉 正太 (福岡大学医学部再生・移植医学) ……………	51

肝臓抽出物の継続投与がマウス脂質代謝に及ぼす影響

.....矢澤 一良・小山 智之
(東京海洋大学大学院) 55

高校生競泳選手のヘム鉄摂取期前後の泳能力の変化

—高強度トレーニングにおけるパフォーマンス比較—

..... 野口 智博・鈴木 淳也・*新谷 恵市・**松本 恵
朝賀 一美・勝又 美紀
(日本大学文理学部, *日本大学大学院, **北海道大学, ***ILS株式会社) 61

CONTENTS

Functional Components Sourced from Bovine, Porcine and Poultry :

Comparative Study on Bioactive Peptides

- Daiki Kubota, Abdulatef M Ahhmed, Satoshi Kawahara and Michio Muguruma
(Faculty of Agriculture, University of Miyazaki) 1

Studies on the Improvement of Mental Function by Edible Meat

- Mitsuhiro Furuse (Faculty of Agriculture, Kyushu University)10

Study on Gel Properties after the Addition of Polysaccharide Thickeners to Retort- Treated Myofibrillar Protein

- Seiichi Haga, Katsuki Mizutani and Toshiya Hayashi
(Faculty of Agriculture, Meijo University)15

Immune-modulating Functions of Carnosine, a Meat-derived Peptide

- Makoto Shimizu (School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo)21

Studies on the Storage of the Beef Meat without Loosing its Taste, Flavor and Freshness when Using Ultrasonic or Plasma Discharge Apparatus During Cooling or Freezing

- Kazuhiro Hishiyama, *Kazuhiro Yoneda, **Tetsuo Takeda, Tadayosi Sasaki and Tsuyosi Hirai
(Hyogo Tajima Beef Promotion Council, *Yoneda Genotyping Laboratory Ltd and
**Takeda Reproduction Clinic LTD)28

Evaluation of the Functional Properties in Pork Meat Fermented by Psychrotrophic Lactic Acid Bacteria

- Toshiya Hayashi and Seiichi Haga
(Faculty of Agriculture, Meijo University)34

Application of Traditional Fish Processing Technique to Meat Processing

- Toshiko Iwata and Takashi Utagawa
(Department of Bioscience, Fukui Prefectural University)40

The Study of Maintenance and Improvement for Brain Function with Creatine

- Naoki Onizawa and *Atsushi Toyoda
(United Graduate School of Agricultural Science, Tokyo University of Agriculture and Technology and
*College of Agriculture, Ibaraki University)46

Technical Improvement of Organ Transportation to Keep the Better Viability of Pig Pancreas

- Shohta Kodama
(Department of Regenerative Medicine & Transplantation, Faculty of Medicine, Fukuoka University)51

Effects of Continuous Administration of Liver-extract on Lipid Metabolism in Mice

Kazunaga Yazawa and Tomoyuki Koyama

(Tokyo University of Marine Science and Technology)55

Changes of the Performances for High Intensity Interval Training between Pre and Post Heme- iron intake Period of the High School Swimmers

Tomohiro Noguchi, Junya Suzuki, *Keiichi Shinya, **Megumi Matsumoto,

***Kazumi Asaka and ***Miki Katsumata

(Nihon University College of Humanities and Sciences, *Nihon University Graduate School,

Hokkaido University and *ILS Inc.)61

食肉由来機能性成分の畜種別差異の比較検討について

Functional Components Sourced from Bovine, Porcine and Poultry :
Comparative Study on Bioactive Peptides

久保田 大樹 ・ アブドラティフ アーメド ・ 河原 聡 ・ 六車 三治男
(宮崎大学農学部)

Daiki Kubota, Abdulatef M Ahhmed, Satoshi Kawahara and Michio Muguruma
(Faculty of Agriculture, University of Miyazaki)

This research aimed to study and compare the biological and functional properties as well as physiological effects of beef, pork and chicken protein hydrolysates; *in vitro* tests. This year we aimed to check the antihypertensive effects by determining the IC_{50} of the three mentioned species. The second and third stages of this research which will be carried out near future would be focusing about anti-oxidation properties and blood sugar lowering effects. In the current study, we evaluated the angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity of hydrolysates of *biceps femoris* muscles from beef and pork also we used leg muscles for chicken samples. All the muscles separately hydrolyzed with pepsin and trypsin and then subjected to various types of chromatography. ACE inhibitory activity of the hydrolysates was determined by Rabbit lung enzyme and Human Vascular Endothelial Cells (HUVEC).

SDS-PAGE results suggest that beef has not been hydrolyzed on the same level of pork and chicken. HPLC patterns indicate that the second peak in chicken samples digested for 4h contains bioactive peptides (MW 1560). However, undigested samples of pork and chicken meats slightly differ from each other. In comparison, values of protein concentrations insignificantly varied in beef and pork samples, which were digested for 2 and 4h. Yet, chicken samples showed a lower value of protein concentration especially that samples digested for 2 h. The three species showed a very similar ACE inhibition percentage, although chicken showed lower protein concentration. Results suggest that the chicken possesses crucial peptides that are having a great ability in undermining ACE activity, which is in accord with the findings of HPLC (second peak of 4h sample). As a comparative study, IC_{50} of chicken showed the lowest values for the both treatments (Rabbit lung ACE and HUVEC ACE). The lower the IC_{50} the stronger the species possess ACE inhibitory activity peptides.

We conclude that meat in the three species contain peptides that may serve several purposes. Based on their remarkable ACE inhibitory activity, we suggest that chicken meat peptides may have potential applications as functional food, which could be used as nutraceutical compounds.

1. 目 的

畜産食品の消費量は約半世紀の間に急増したが、これは我が国が長寿国となった理由の一つとも考

えられている。一方、日本人のライフスタイルの変化に伴い、生活習慣病の患者が増加しており、国民の健康への関心は極めて高くなっている。特に高血圧症の患者は平成11年には719万人であっ

たのに対し、平成18年には5490万人に急増している¹⁾。高血圧症は我が国の死亡原因の2～3位を占める心疾患、脳血管疾患の原因と深く関わっている。

高血圧症は脳、心臓など各種臓器障害、血管性疾患の危険因子であり、主要死因の上位を占めている脳卒中や心不全あるいは腎臓病などの合併症を引き起こす^{2,3)}ため、高血圧をいかに抑制するかが重要である。高血圧症は原因の明らかな二次性高血圧と、約90%以上を占めるといわれている本態性高血圧に分類される。本態性高血圧はこれまで原因が不明であったが、最近の研究により、生活習慣が大きな要因であることが分かってきた⁴⁾。生体内で昇圧調節を中心的に担っているのはレニン-アンジオテンシン系であり、アンジオテンシンIがアンジオテンシン変換酵素(ACE)の作用によって、昇圧物質であるアンジオテンシンIIへと代謝される。このアンジオテンシンIIは生体内で最も強力な昇圧物質であり、血管平滑筋を収縮させる直接的昇圧作用を有しているだけでなく、副腎でのアルドステロン分泌を刺激し、ナトリウムや水の貯留量増大を引き起こし、間接的な血圧上昇にも関与する⁵⁾。従って、ACEの阻害薬は血圧上昇抑制に有効であるとされており、臨床的にも心臓系疾患の改善⁶⁾や、他の降圧薬よりも副作用が少ないことが明らかになったこと⁷⁾や、ACE阻害剤単独で本態性高血圧患者の70%に効果を示していること⁸⁾などから、薬物療法において高血圧治療の第一選択薬の一つとして現在広く使用されている。

現在、高血圧症の患者には治療薬が利用されているが、薬の種類により作用機構が異なると言われている。特にカプトプリルやエナラプリルのようなアンジオテンシンI変換酵素(以下ACE)阻害薬は、臨床的にも心臓系疾患の改善⁶⁾や高血圧症の治療に利用されている⁷⁾。しかしながら、こ

のような薬には咳嗽などの副作用を発症させる可能性がある。従って、ACE阻害物質を含む食事の摂取による高血圧症予防は、副作用の心配も無く理想的だと考えられる。

食肉は良質なタンパク質を多く含んでおり、近年、疾病予防作用などの保健的な機能性に関する研究が進められている。食肉には、ACEの阻害による高血圧症予防の期待があることが報告されている⁹⁾。食肉によるこれらの効果は主にペプチドに由来する。食肉タンパク質は酵素消化によりペプチドを生成し、その機能性を発揮する。現在、食肉由来血圧降下作用ペプチドに関してはいくつか検出されているが¹⁰⁻¹⁶⁾、各種食肉に含まれる生活習慣病予防効果のある機能性ペプチドに関する畜種別の詳細な比較検討はまだ行われていない。

そこで本研究では、生体内で血圧調節を中心的に担うレニン-アンジオテンシン系に着目し、各種食肉(牛肉・豚肉・鶏肉、いずれもモモ肉)をタンパク質分解酵素で消化したペプチド混合物を用いて、試験管内(ウサギ肺由来ACE)と人血管内皮細胞(HUVEC由来ACE)における血圧上昇抑制効果を畜種別に比較検討した。

2. 方 法

2.1 実験材料

市販の宮崎県産の各種食肉(牛肉・豚肉・鶏肉いずれもモモ肉)を実験材料に用いた。

2.2 食肉由来ペプチドの調製

食肉由来ペプチドの調製は以下のとおりである。各種食肉のミンチ肉に2倍量の蒸留水を添加してフードプロセッサー(Panasonic MK-K48)を用いて30秒間、2回ホモジナイズした。70℃で30分間インキュベート後、このホモジェネートを酵素未処理の加熱食肉タンパク質サンプル「Whole」とした。その後、このホモジェネートをHClでpH1.8に調整し、胃粘膜由来ペプシン(1:10000)(和

光純薬工業株式会社製)をタンパク質量(食肉重量当たり20%のタンパク質が含まれることを仮定した)に対して1/1000倍量添加し、攪拌しながら37°Cで2時間インキュベートした。NaOHを用いてpH6.8に調整し、10分間煮沸した後、溶液温度を40°Cまで低下させた。この溶液をペプシン消化サンプル「ペプシン(2h)」とした。さらにトリプシン(和光純薬工業株式会社)およびパンクレアチン(同会社)をそれぞれペプシンと同量添加し、再び攪拌しながら37°Cで2時間インキュベートした。最後に10分間煮沸した試料を食肉由来ペプチドとした。この溶液をペプシン・トリプシン処理サンプル「ペプシン/トリプシン(4h)」とした。

なお、加熱食肉タンパク質「Whole」および各反応段階で得られた酵素消化により生じたペプチド混合物を0.45 μ mセルロースアセテートメンブレンフィルタ(アドバンテック東洋(株))にてろ過した試料を実験に供した。

2.3 ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)

得られた試料の分子種やそれらの酵素反応による分解程度を調べるためにドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)をLaemmliの方法¹⁷⁾で行った。アクリルアミド濃度7.5~17.5%のグラジエントゲルを用いてスラブ型の泳動槽で行った。ゲルバンドの染色はクーマシーブリリアントブルーR-250(Bio-RAD Laboratories)により行い、脱色には10%酢酸を用いた。また、分子量マーカーとしてSDS-PAGE Molecular weight standards, Broad Range 161-0317(BIO-RAD社製)を使用した。

2.4 ゲルろ過高速液体クロマトグラフィー(HPLC)

溶離液には0.05Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0, 0.4M)を用いた。分析中は溶離液を脱気

装置(DGU-14A, 島津社製)に通し、カラムはShodex PROTEIN KW-803(8 \times 300mm)(昭和電工株式会社)、送液ポンプはLC-10AD(島津製作所(株))を用い、流速0.5ml/min, 注入量20 μ lで行った。

ペプチドの検出には、コンピューターで制御された検出器(SPD-10AVP, 島津製作所(株))を用い、検出波長は280nmで行った。さらに分子量マーカーとしてリボフラビン、シトクロームC、アプロチニン、BSAを用いた。

2.5 タンパク質の定量

酵素未処理の食肉タンパク質「Whole」の定量はBiuret法¹⁸⁾により行った。すなわち、タンパク質溶液に対し、4倍量のBiuret試薬を加えて常温で30分間反応させた。反応液をSHIMADZU(日本)製UV-VIS Spectrophotometer 1245型分光光度計(吸光度:540nm)にて測定した。また分解物であるペプチドについてはUV法¹⁹⁾を適用し、測定を行った。すなわちタンパク質溶液の215nmの吸光度から225nmでの吸光度を差し引き、144倍した時の数値をタンパク質濃度とした。測定には上記と同じ分光光度計を使用した。

2.6 アンギオテンシンI変換酵素(ACE)阻害活性の測定

Cushmanの方法²⁰⁾に準じて測定した。ACEはウサギ肺由来アンギオテンシンI変換酵素(ACE, Peptidyl dipeptidase, EC3.4.1.5.1, シグマ社)を用い、0.25Mホウ酸緩衝液で1unit/mlに調整し、測定時には0.25Mホウ酸緩衝液で60unit/mlに希釈し使用した。ACEとの反応基質としては合成基質であるヒプリル-Lヒスチジル-Lロイシン(HHL, ナカライテスク社)を使用した。HHLは塩化ナトリウム(和光純薬工業)、0.25Mホウ酸緩衝液をそれぞれ0.608M, 0.1MになるようにMilliQ水を用いて調整した溶液で溶解した。

試料6 μ lに60unit/mlのACE溶液20 μ lおよび7.6mM HHL溶液50 μ lを添加し37°Cで30分間反応さ

せた。反応は0.1 NHCl (和光純薬工業) 554 μ lを加えて停止させた。反応後には酢酸エチル (ナカライテスク) 1.5mlを加えてACEの作用により遊離した馬尿酸を振とう抽出し、2500rpm (1000 \times g)、15分間遠心分離を行った。上清の酢酸エチル層を1 ml分取し、100 $^{\circ}$ C、10分間の加熱により蒸発乾固させた。乾固した馬尿酸を回収するために1 MのNaCl溶液を1 ml加えボルテックスを行った。溶解した馬尿酸吸光度を228nmで測定した。

阻害率は肝臓水解物の吸光度をS、肝臓水解物の代わりにMilliQ waterを加えた時の吸光度をC、あらかじめACEを失活させてから反応させた時の吸光度をBとして次式より求めた。

$$\text{阻害率(\%)} = \{(C-S/C-B)\} \times 100$$

2.7 人血管内皮細胞におけるACE活性抑制試験

本実験は財団法人日本食品分析センター彩都研究所機能科学研究チームの協力の下で行った。Balyasnikovaの方法²¹⁾に従い、人血管内皮細胞におけるACE活性抑制試験を行った。すなわち96well Micro PlateにHUVECを分注し、培地希釈した各種食肉由来ペプチド50 μ lと基質液50 μ lを添加し37 $^{\circ}$ Cで3時間反応させ、上清50 μ lを分取後、His-LeuをOPA蛍光測定した。

ACEタンパク質の活性上昇を誘導するPMA (Phorbol-12- myristate 13-acetate) を使用し、陽性対照区にはカプトプリル2.5nMを添加した。

3. 結果と考察

3.1 SDS-PAGEおよびゲルろ過HPLCによる分子量分布の分析

これまでの食品素材からのACE阻害活性の研究は、タンパク質派性ペプチドの検索が中心であることや、Stamlerらの報告²²⁾ からタンパク質摂取量の増加は血圧降下に有効であるとされることなどから、本実験においても食肉を複数の酵素に

よりによって処理したペプチドを調製し、ACE阻害活性を測定した。

まず、SDS-PAGEによるサンプル全体のタンパク質の分子量分布およびゲルろ過HPLCによる消化による食肉タンパク質の経時的変化の観察と分子量分布の測定を行った (Fig.1, 2)。SDS-PAGEによって、酵素処理時間に伴い、各食肉タンパク質の分解が進行したことが認められ、牛肉よりも豚肉および鶏肉で酵素処理による筋肉タンパク質の分解が進行する傾向も認められた。またHPLCの結果より分子量20,000Da以上の食肉タンパク質は6,000Da以下に分解されることが明らかになり、各種プロテアーゼとの反応による高分子タンパク質の低分子化が確認された。食肉の種類により消化による影響の受け易さに若干の違いが生じ、分解過程のHPLCパターンは異なったが、それらのパターンから鶏肉、豚肉、牛肉の順に分解され易い傾向にあった。ペプシンとトリプシンで4時間酵素消化した食肉由来ペプチドのピークを畜種間で比較すると、どれも分子量1,000~6,000Daの間にピークを有していることが確認された。特に、鶏肉で分子量1,560付近の低分子量のピークの増加が認められ、機能的ペプチド発現の増加が期待された。

3.2 ACE阻害活性の測定比較検討

牛肉、豚肉および鶏肉ともに消化酵素による処理で、食肉タンパク質のほとんどが6,000Da以下に分解されていることが確認された。そこで酵素処理によるACE阻害活性の比較検討を行った。

Fig.3に、食肉の加熱処理と酵素処理により0.45 μ mセルロースアセテートメンブレンフィルタを透過するタンパク質量と、それらのACE活性阻害率を示した。酵素処理前の加熱処理により各種食肉から遊離する低分子量のタンパク質に有意な差異は認められなかった。各種食肉はペプシン消化およびその後のトリプシン酵素消化によりタ

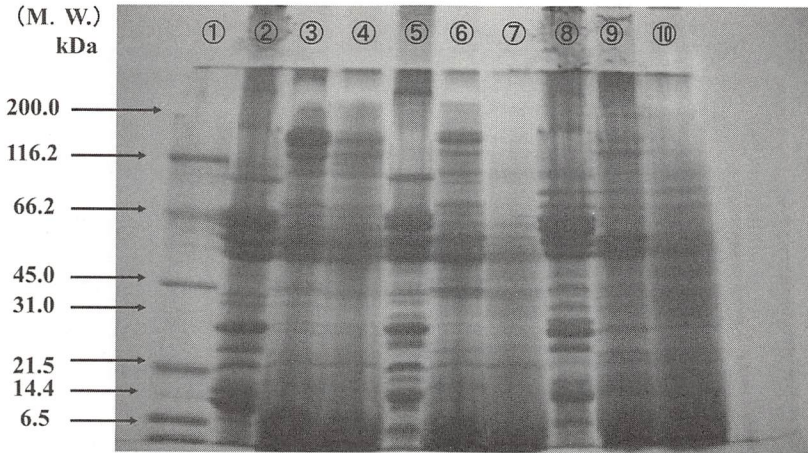


Fig.1 SDS-PAGE pattern of time course hydrolization of beef, pork and chicken digested muscles. 1 (molecular-weight marker) ; 2~4 (0, 2 and 4h digestion time of beef samples) ; 5~7 (0, 2, and 4h digestion time of pork samples) ; 8~10 (0~2~4h digestion time of chicken samples).

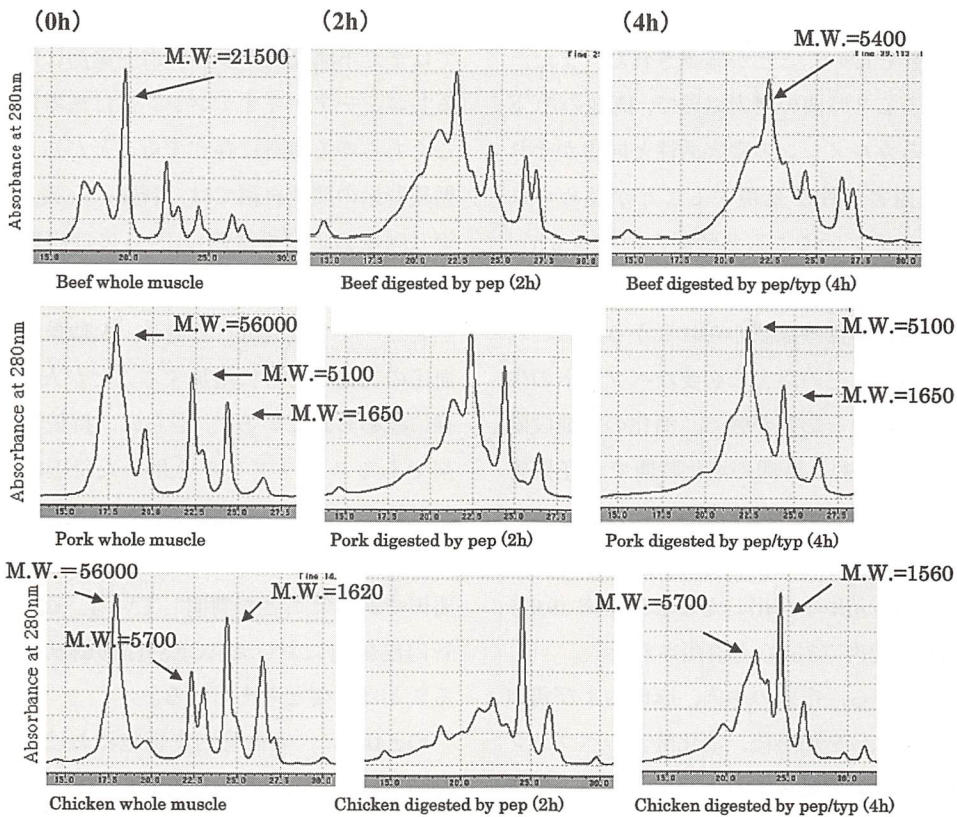


Fig.2 HPLC pattern of time course hydrolization of beef, pork and chicken digested muscles. First row indicates patterns of beef proteins; second row patterns of pork proteins; third row patterns of chicken proteins. The time course of samples digestion is associated above the patterns. pep = pepsin; typ = trypsin.

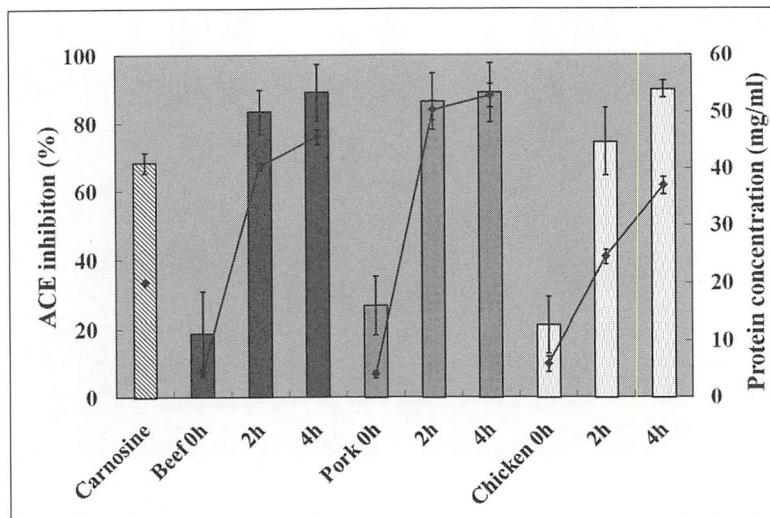


Fig.3 Dual axis graph shows the values of ACE inhibition percentage (data in bars) and protein concentration (mg/ml; data in lineation) of beef, pork and chicken muscles.

ンパク質濃度が増加する傾向が認められ、ACE阻害活性も上昇していくことが確認された。また、ペプシンによる2時間の酵素処理で、既知のACE阻害剤であるカルノシンの阻害活性と同等かそれ以上のACE阻害活性が発現することが認められた。なお、ペプシンによる2時間の消化(2h)と、さらにその後2時間のトリプシンによる処理(4h)との間に優位差は認められなかった。これらの結果から、ACEの阻害に必要なペプチドの生成はペプシンによる影響が強く、消化の初期段階で多量に生成し、約2時間の消化時間でACE阻害を高く発現するペプチドの生成終了に近づいていく可能性が示唆された。また各種食肉由来ペプチドの IC_{50} 値(mg/ml)を算出したところ牛肉(9.02)、豚肉(4.19)、鶏肉(3.55)と算出された。

以上の結果から、市販の牛肉、豚肉および鶏肉を用いて、それらを加熱後、消化酵素のペプシンおよびトリプシンで処理すると鶏肉、豚肉、牛肉の順にACE阻害活性が増加することが認められた。

3.3 人血管内皮細胞におけるACE活性抑制試験による比較検討

血圧低下ペプチドの生体内での作用機構についてはまだ不明な点が多い。血圧調節に関与しているレニン-アンギオテンシン系は循環器系だけでなくあらゆる臓器に存在することが知られている。循環器系の関連組織では、腎臓、心臓、大動脈血管(内皮および平滑筋)、さらには副腎にもレニン-アンギオテンシン系が存在する²³⁾。高血圧自然発症ラット(SHR)の場合、大動脈ACE活性が血圧の亢進とともに増加することが人の場合と同様に認められている²⁴⁾。さらに、持続性ACE阻害剤であるスピラプリルを用いたSHRに対する投与試験によって、長期間の高圧持続性の発現は、大動脈血管に存在するACE活性の抑制が1つの要因である²⁵⁾ことが判明している。従って、人血管内皮細胞におけるACE活性抑制試験を実施することは重要と考えられる。

Fig.4a-cに、人血管内皮細胞におけるACE活性抑制試験による比較検討を行い、得られた結果を示した。

図に記載されたPMA(Phorbol myristate acetate)はACEの活性を発現させる物質である。またカプトプリルは一般的に用いられている

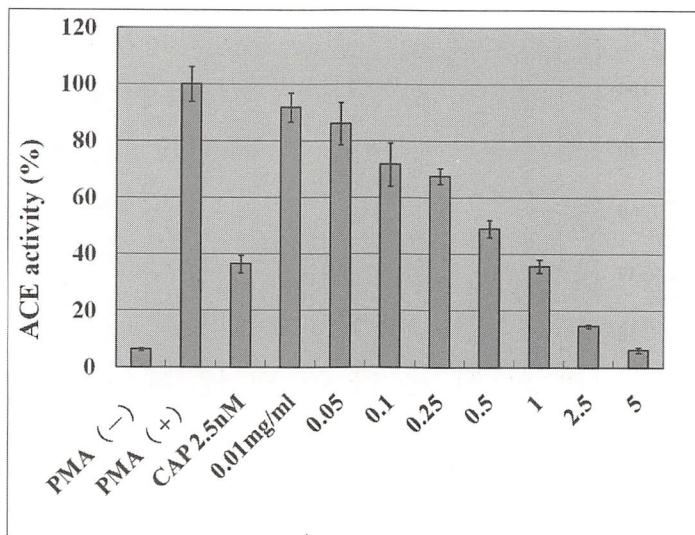


Fig.4a Changes in ACE activity of beef hydrolysates measured using HUVEC. PMA (Phorbol myristate acetate) ;CAP (Captopril).

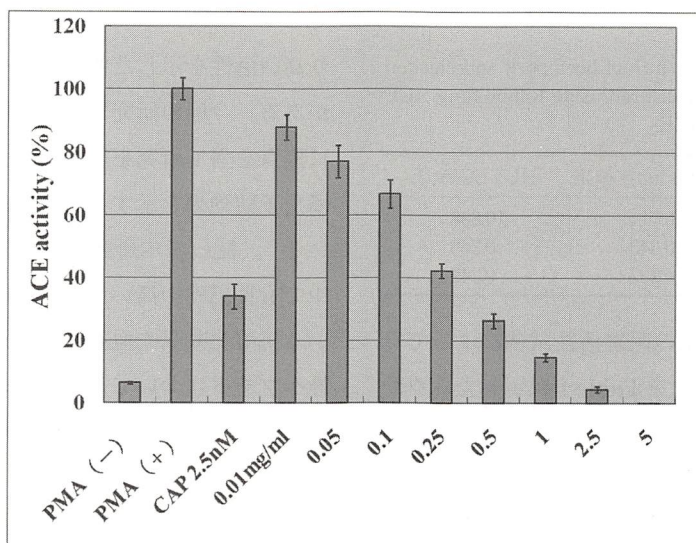


Fig.4b Changes in ACE activity of pork hydrolysates measured using HUVEC. PMA (Phorbol myristate acetate) ;CAP (Captopril).

ACE阻害薬であり、本実験では標準物質として用いた。**Fig.4a**は牛肉由来ペプチド、**Fig.4b**は豚肉由来ペプチド、**Fig.4c**は鶏肉由来ペプチドを添加した時のACEの活性を測定したものである。PMA未処理区ではほとんどACEの活性は見られず、PMAの添加によりACE活性が発現した。また、各種食肉由来ペプチドは濃度依存的にACEの

活性を抑制し、牛肉ではおよそ0.5～1 mg/ml、豚肉・鶏肉では0.25～0.5mg/mlにおいてカプトプリル2.5nMと同等のACE阻害活性を示した。本試験においても、ウサギ肺由来ACE試験同様に IC_{50} (mg/ml) を求めた。その結果、牛肉 (0.668)、豚肉 (0.260)、鶏肉 (0.249) と算出された。

食肉由来ペプチドによる、ウサギ肺由来ACEと

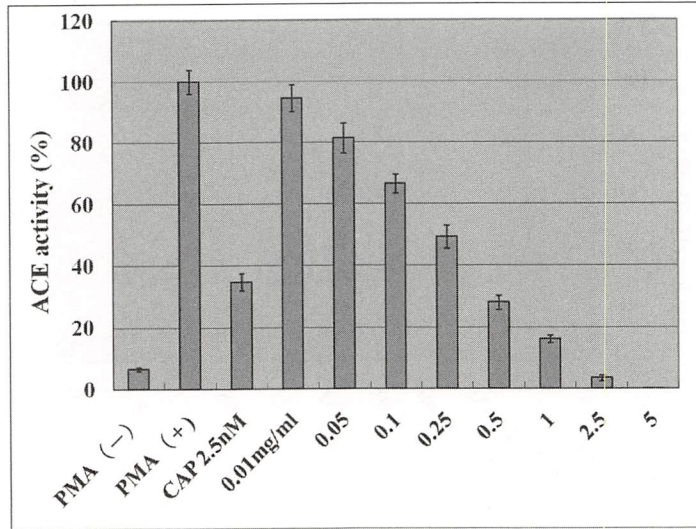


Fig.4c Changes in ACE activity of chicken hydrolysates measured using HUVEC. PMA (Phorbol myristate acetate) ; CAP (Captopril).

Table 1 IC₅₀ values (mg/ml) of beef, pork and chicken hydrolysates measured using Rabbit-lung ACE and HUVEC-ACE.

sample	Rabbit lung ACE	HUVEC-ACE
Beef	0.714	0.668
Pork	0.343	0.260
Chicken	0.287	0.249

HUVEC細胞由来ACEの阻害活性試験によって算出されたIC₅₀ (mg/ml) を**Table 1**に示した。ウサギ肺由来ACEのIC₅₀のデータはHUVEC細胞由来ACE測定時の反応液 (76μl) に換算した値である。比較の結果、どちらの試験結果も活性の強い順に、鶏肉、豚肉、牛肉となり、ほぼ同様の値が得られた。従って、ヒト血管内皮由来のACEでも食肉由来ペプチドによる阻害活性をその作用強度とともに確認することができた。

以上の結果から、牛肉および豚肉も高いACE阻害活性を示したが、鶏肉はそれらの食肉よりもさらに高いACE阻害活性を持つことが明らかになった。今後、ACE阻害活性を発現している食肉由来ペプチドを単離・精製し、同定を行うことによ

り高い活性を示した要因一つを明らかにする必要がある。今回の研究では、血圧上昇抑制ペプチドに焦点を当て研究を行った。食肉には他の生活習慣病予防効果を示すペプチドの存在も報告されている¹⁶⁾。従って本研究は引き続き、生活習慣病の中でも罹患率の高い、癌や糖尿病と深く関わっている抗酸化効果や血糖値上昇抑制効果を示す機能性ペプチドについて、畜種別の比較を行っていく必要がある。

4. 要 約

本研究では、生体内で血圧調節を中心的に担うレニン-アンギオテンシン系に着目し、各種食肉をタンパク質分解酵素で消化したペプチド混合物を用いてウサギ肺ACE阻害活性と人血管内皮細胞 (HUVEC) における血圧上昇抑制効果を畜種別に比較検討した。

食肉タンパク質はSDS-PAGEとゲルろ過HPLCによって経時的に分解・消化されたことが確認された。食肉の種類により消化による影響の受け易さに若干の違いが生じ、HPLCのパターンから鶏

肉、豚肉、牛肉の順に分解され易い傾向にあった。特に、鶏肉で分子量1,560付近の低分子量のピークの増加が認められた。ACE阻害に必要なペプチドの生成はペプシンによる影響が強く、約2時間の消化時間で阻害ペプチド生成終了に近づいていく可能性が示唆された。また各種食肉由来ペプチドのIC₅₀ (mg/ml) を算出したところ牛肉 (9.02)、豚肉 (4.19)、鶏肉 (3.55) と算出された。また、HUVECによる試験結果においてもIC₅₀: 牛肉 (0.668)、豚肉 (0.260)、鶏肉 (0.249) を算出し、ACE阻害活性の結果と同様の阻害傾向を示したことが確認された。

以上の結果から、市販の牛肉、豚肉および鶏肉を用いて、それらを加熱後、消化酵素のペプシンおよびトリプシンで処理すると鶏肉、豚肉、牛肉の順にACE阻害活性が増加することが認められた。

文 献

- 1) 日本生活習慣病予防協会データによる <http://www.seikatsusyukanbyo.com/> (2009)
- 2) 田中繁道, 飯村 政. 日本臨床 (増刊) 高血圧 (下巻), 623-629 (1992)
- 3) 尾前照雄, 河野雄平. 日本臨床 (増刊) 高血圧, 623-630 (1992)
- 4) 日和田邦夫, 阿部陽一. 高血圧の予防と管理, 学会センター関西学会出版センター 12, 9-27 (2001)
- 5) 松尾寿之, 香取 信, 大石幸子, 加藤久雄, 三宅可浩. キニンとアンギオテンシン生体調節の分子機構, 講談社サイエンティフィック, 2, 4-7, 23-24 (1994)
- 6) Kostis, J.B: Am.: *J. Hypertens.*, 8, 909-914 (1995)
- 7) 金子好宏, 山田和生, 池田正男, 尾前照男, 武田忠直, 塩之入洋, 増山義明, 熊原雄一, 国府達郎, 荒川規矩男, : *医学のあゆみ*, 122, 62-85 (1982)
- 8) Irali Z. H, Hall W. D, *Ann. Intern. Med.*, 117, 234-242 (1992)
- 9) 齊藤忠夫, 西村敏英, 松田 幹, : *最新畜産物利用学*, 朝倉書店, 123-124 (2007)
- 10) Katayama, K., Fuchu, H., Sakata, A., Kawahara, S., Yamauchi, K., Kawamura, Y., Muguruma, M., *Asian-Aust. Anim. Sci. J.*, 16, 417-424 (2003)
- 11) Katayama, K., Tomatsu, M., Fuchu, H., Sugiyama, M., Kawahara, S., Yamauchi, K., Kawamura, Y., Muguruma, M.: *Anim. Sci. J.*, 74, 53-58 (2003)
- 12) Katayama, K., Tomatsu, M., Kawahara, S., Yamauchi, K., Fuchu, H., Sugiyama, M., Kawamura, Y., Muguruma, M.: *J. Agric. Food. Chem.*, 52, 771-775 (2004)
- 13) Katayama, K., Jamhari., Mori, T., Kawahara, S., Miake, K., Kodama, Y., Sugiyama, M., Kawamura, Y., Nakayama, M., Mayuyama, M., Muguruma, M.: *J. Food. Sci.*, 72 S702-706 (2007)
- 14) Katayama, K., Anggraeni, H. E., Mori, T., Ahhmed, A. M., Kawahara, S., Sugiyama, M., Nakashima, T., Mayuyama, M., Muguruma, M.: *J. Agric. Food. Chem.*, 56, 355-360 (2008)
- 15) Muguruma, M., Ahhmed, A. M., Katayama, K., Kawahara, S., Maruyama, M., Nakamura, T.: *Food. Chem.*, 114, 516-522 (2009)
- 16) Arihara, K., Nakashima, Y., Mukai, T., Ishikawa, T., Itou, M.: *Meat. Sci.*, 57, 319-324 (2001)
- 17) Laemmli U. K. *Nature* 227, 680-685 (1970)
- 18) 岡田雅人, 宮崎 香, タンパク質実験ノート 抽出と分離精製, 羊土社, 29 (1996)
- 19) Murphy J. B, Kies M. W. *Biochim. Biophys. Acta* 45, 382-384 (1960)
- 20) Cushman D. W, Cheung H. S. *Biochem. Pharmacol.*, 20, 1637-1648 (1971)
- 21) Balyasnikova IV. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, 34, 545-554 (2001)
- 22) Stamler J, Elliott P, Kesteloot H, Nichols R, Claeys G, Dyer A. R, Stamler R, *Circulation* 94, 1629-1634 (1996)
- 23) Ehler, M. R. W., Riordan, J. F. Pathophysiology, Diagnosis, and Management. "Hypertension" (Laraph, J. H and Brenner, B. M. ed.), pp. 1217-1231, Raven Press, New York (1990)
- 23) 宮崎瑞夫. *血管と内皮*, 3, 255-262 (1993)
- 24) Okunishi, H. *Clin. Exp. Pharm. Physiol.*, 18, 649-659 (1991)
- 25) 松井利郎. *New Food Industry*, 51(1), 1 - 7 (2009)

食肉による精神機能改善に関する研究

Studies on the Improvement of Mental Function by Edible Meat

古瀬 充 宏 (九州大学大学院農学研究院)

Mitsuhiro Furuse (Faculty of Agriculture, Kyushu University)

The effect of several meat proteins (chicken, pork and beef) on brain functions of mice was investigated comparing with soybean protein. Amino acid compositions of hydrolyzed animal proteins were comparable among three proteins, but were different from soybean protein. Experimental diets were mixed with 12% level of each dietary protein and were given for 4 weeks. Thereafter, the open field test, elevated plus maze test and force swimming test were conducted. After the behavioral tests, the hippocampus, hypothalamus and cerebral cortex were obtained. Monoamines and their metabolites in each brain site were determined by HPLC. No significant differences in each behavioral test were detected by dietary protein sources. The metabolic rate of norepinephrine (NE) in all brain sites was delayed by dietary chicken protein. In beef protein, the metabolic rate of NE was kept high in the hippocampus and cerebral cortex and that of serotonin in the hypothalamus was highest among dietary proteins.

In conclusion, even though amino acid composition of meat protein was comparable, the effect on brain function was different among meat proteins.

1. 目 的

健康志向の高まりの中、野菜の重要性に関してマスコミが取り上げる機会は多い。しかし、野菜中心の食事の場合に食肉などの高タンパク質食材を同時に摂取すれば問題はないが、ベジタリアンとしての生き方を選択した場合には精神衛生上の問題が発症し易いことが指摘されるようになってきた。Perryら¹⁾の報告によれば、自殺願望ならびに実際に自殺を試みた若者の割合は、ベジタリアンで高かった。また、我が国の自殺者数は毎年3万人を超え、中でも50代60代にその傾向は高い。その年代は、社会的責任が高まる一方、健康管理上から肉食の軽減が推奨されている。しかし、栄養所要量を見る限りタンパク質の摂取量は高齢者

においても依然と高く設定されている(2005年版日本人の食事摂取基準)。肉食が敬遠される大きな理由の一つは脂肪含量の高さにあり、肉食本来の利点であるアミノ酸バランスの良さが覆い隠される結果となっている。また、成人の食による健康志向の中心は体躯にあり、脳の健康にはあまり関心が払われないのが実情である。

食肉に多く含まれるクレアチンは脳に作用すると鎮静・催眠効果を発現すること²⁾、また、同じく食肉に多く含まれるジペプチドのカルノシンに抗うつ様作用があることが報告されている^{3,4)}。これらの有効成分はすべて窒素化合物であるが、食肉にまず求められるものはそのタンパク質のアミノ酸組成の素晴らしさにある。数種のアミノ酸⁵⁻¹⁰⁾に鎮静・催眠効果が認められているが、タ

Table 1 Amino acid composition (%) of each dietary protein source

	Soybean	Chicken	Pork	Beef
Arginine	7.09	5.84	5.80	5.59
Histidine	2.48	3.52	4.93	4.70
Isoleucine	2.90	3.13	3.05	3.01
Leucine	7.10	7.46	7.56	7.51
Lysine	5.64	7.77	7.91	7.72
Methionine	1.35	3.00	2.97	2.71
Threonine	3.47	4.16	4.28	4.18
Tryptophan	1.13	1.05	1.03	1.05
Phenylalanine	4.67	3.53	3.62	3.57
Valine	3.01	3.26	3.26	3.25
Alanine	4.10	5.83	5.72	5.82
β -Alanine	0.23	2.02	1.44	1.20
Aspartic acid	13.16	10.69	10.57	10.10
Cysteine	0.32	0.13	0.16	0.23
Glutamic acid	21.73	16.22	16.61	16.76
Glycine	4.06	4.04	4.15	3.96
Proline	5.12	3.37	3.63	3.54
Serine	5.46	4.12	4.17	4.06
Tyrosine	3.48	3.31	3.38	3.30

ンパク質を構成するアミノ酸の集合体としての効果の検証は未だになされていない。特に、牛肉・豚肉・鶏肉という主要3品目間で脳機能に及ぼす効果に違いがあるのか否かは不明のままであり、本研究課題においては脳のモノアミン含量ならびに行動に対する畜肉タンパク質の影響を検証することを目的とした。

2. 方法

7週齢のオスICRマウス (Japan SLC) を、25±1℃, 12L:12D環境下で1ケージ当たり4頭飼育した。自由摂取 (オリエンタル酵母MF), 自由飲水下で1週間馴化した。

実験飼料は、AIN93Mを基準とし、タンパク質源として大豆タンパク質、鶏肉タンパク質、豚肉タンパク質および牛肉タンパク質の4種をそれぞれ14%配合した。各タンパク質源は脱脂したものを使用し、そのアミノ酸組成をTable 1に示す。大豆、鶏肉、豚肉および牛肉のタンパク質含量は、それぞれ85.7, 86.4, 86.0および85.0%であり、飼料中に14%配合することでどの飼料もほぼタンパク

質水準は12%となった。これらの飼料を用いて28日間の飼養試験を実施した。

飼養試験終了後にオープンフィールド試験 (28日目), 高架式十字迷路試験 (30日目) ならびに強制水泳試験 (32日目) をすべてのマウスに対して課し、行動への影響を検討した。飼料給与後34日目に、頸椎脱臼後に全脳を取り出し、大脳皮質、海馬ならびに視床下部を切り出し、液体窒素で急速冷却後に-80℃で保存した。切り出した3部位すべてのモノアミン (ノルエピネフリン (NE), ドーパミン (DA) およびセロトニン (5-HT)) ならびにその代謝産物 (3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニルエチレングリコール (MHPG), ジヒドロキシフェニル酢酸 (DOPAC), ホモバニリン酸 (HVA) および5-ヒドロキシインドール酢酸 (5-HIAA)) を高速液体クロマトグラフィーにより測定した。

この実験は「九州大学大学院農学研究院。大学院生物資源環境科学府及び農学部における動物実験指針」, 「動物の愛護及び管理に関する法律」(平成11年12月22日一部改正法律第105号), 「実験動

物の飼養および保管等に関する基準」(平成14年5月28日一部改正総理府告示第6号)の規則に基づいて行われた。

得られた結果の解析は、統計解析ソフトであるStatViewを用いて行った。一元配置分散分析の後に、Tukey-Kramer法により多重検定を行った。

3. 結果と考察

オープンフィールド試験、高架式十字迷路試験ならびに強制水泳試験にタンパク質源の有意な影響は認められなかった(データ未掲載)。

Table 2 に海馬におけるモノアミンおよびその代謝産物濃度に及ぼすタンパク質源の影響を示す。海馬においては、鶏肉タンパク質摂取時のNE含量が他の3区に比して有意に高くなることが示された。他のモノアミンや代謝産物にタンパク質源による有意な影響は認められなかった。

視床下部におけるモノアミンおよびその代謝産物濃度に及ぼすタンパク質源の影響をTable 3 に示す。NEに関しては、視床下部においても鶏肉タンパク質の摂取で最も高くなり、大豆タンパク質摂取に比して有意差が確認された。MHPGは、食肉タンパク質3品に比して大豆タンパク質で有意に高かった。DAにおいて、豚肉タンパク質で高い傾向が認められたが、DOPACならびにHVAにタンパク質源による影響は認められなかった。5-HTは鶏肉タンパク質で最も高く、牛肉タンパク質で最も低かった。この両者における差は有意であった。5-HIAAにおいては、牛肉タンパク質が高値を示し、豚肉タンパク質で有意に低かった。

Table 4 に大脳皮質におけるモノアミンおよびその代謝産物濃度に及ぼすタンパク質源の影響を示す。MHPGは、大豆タンパク質摂取において最も高く、鶏肉タンパク質ならびに豚肉タンパク質摂取に比して有意であった。5-HTは大豆タンパク質で牛肉タンパク質に比べ有意に高かった。そ

他のモノアミンならびに代謝産物濃度にタンパク質源の影響は認められなかった。

各脳部位におけるNE、DAおよび5-HTの代謝回転をTable 5 に示す。海馬においては、NEとDAの代謝回転が鶏肉タンパク質で最も遅かった。海馬の5-HTの代謝回転にタンパク質源の有意な影響は検出されなかった。視床下部におけるNEの代謝回転は大豆タンパク質で最も早く、畜肉タンパク質3品で遅かった。DAの代謝回転においては牛肉タンパク質で最も早く、豚肉タンパク質で遅いという結果が得られた。5-HTの代謝回転は他のタンパク質3品に比べ、牛肉で最も早かった。大脳皮質においては、NEの代謝回転が鶏肉タンパク質で遅くなり、DAに関しても同様の傾向が認められた。5-HTに関してはタンパク質源の影響は認められなかった。

本実験において、加水分解した畜肉タンパク質3品のアミノ酸組成は大きく異ならなかった。大豆タンパク質と畜肉タンパク質の間にはアミノ酸組成の明らかな違いが認められた。しかしながら、自発運動量の指標となるオープンフィールド試験、不安行動の指標となる高架式十字迷路試験ならびに積極的に泳ぐか否かを抑うつ状態の指標とする強制水泳試験のどれにもタンパク質源の影響は確認されなかった。

モノアミンの代謝はタンパク質源の影響を受ける一方、各脳部位においてその反応は異なった。代謝回転に目を向ければ、鶏肉タンパク質摂取により各脳部位のNEの代謝回転は遅くなることが判明した。牛肉タンパク質では、海馬と大脳皮質のNEの代謝回転は高く保たれ、視床下部では5-HT代謝回転が唯一高かった。これらの結果は、畜肉タンパク質3品には加水分解によるアミノ酸組成に大きな違いがないものの、それらの摂取により脳のモノアミン代謝が大きく異なることを示唆するものである。従って、畜肉タンパク質は優

Table 2 Effects of several dietary protein sources on monoamines and their metabolite concentrations of the hippocampus in mice

	Soybean	Chicken	Pork	Beef	F value (3, 27)	P value
NE	461 ± 19 ^b	621 ± 59 ^a	448 ± 47 ^b	443 ± 61 ^b	3.149	<0.05
MHPG	322 ± 22	293 ± 39	226 ± 24	282 ± 36	1.702	0.1902
DA	1839 ± 191	2574 ± 381	2002 ± 293	1885 ± 344	1.232	0.3274
DOPAC	225 ± 22	266 ± 37	214 ± 26	301 ± 43	1.445	0.2526
HVA	31 ± 2	42 ± 4	41 ± 6	31 ± 4	2.056	0.1296
5-HT	324 ± 18	386 ± 55	332 ± 18	292 ± 22	1.374	0.2719
5-HIAA	274 ± 10	302 ± 29	275 ± 17	325 ± 23	1.299	0.2951

Values are means ± S.E.M. in pg/mg wet tissue.

The number of mice used in each group was as follows: Soybean, 8; Chicken, 8; Pork, 8; Beef, 7.

Different letters indicate significant difference at $P < 0.05$.

Table 3 Effects of several dietary protein sources on monoamines and their metabolite concentrations of the hypothalamus in mice

	Soybean	Chicken	Pork	Beef	F value (3, 27)	P value
NE	896 ± 46 ^b	1210 ± 78 ^a	1090 ± 43 ^{ab}	1010 ± 46 ^{ab}	5.812	<0.01
MHPG	147 ± 4 ^a	124 ± 5 ^b	115 ± 3 ^b	116 ± 4 ^b	12.515	<0.0001
DA	271 ± 20	281 ± 26	352 ± 39	245 ± 17	2.806	0.0587
DOPAC	173 ± 4	164 ± 11	165 ± 15	197 ± 17	1.402	0.2637
HVA	146 ± 6	160 ± 15	145 ± 9	150 ± 12	0.442	0.7391
5-HT	708 ± 35 ^{ab}	842 ± 81 ^a	752 ± 32 ^{ab}	626 ± 21 ^b	3.238	<0.05
5-HIAA	409 ± 15 ^{ab}	458 ± 32 ^{ab}	382 ± 15 ^b	478 ± 22 ^a	3.903	<0.05

Values are means ± S.E.M. in pg/mg wet tissue.

The number of mice used in each group was as follows: Soybean, 8; Chicken, 8; Pork, 8; Beef, 7.

Different letters indicate significant difference at $P < 0.05$.

Table 4 Effects of several dietary protein sources on monoamines and their metabolite concentrations of the cerebral cortex in mice

	Soybean	Chicken	Pork	Beef	F value (3, 27)	P value
NE	208 ± 13	230 ± 9	204 ± 12	197 ± 20	1.073	0.3772
MHPG	119 ± 4 ^a	89 ± 6 ^b	86 ± 5 ^b	103 ± 4 ^{ab}	10.415	<0.0001
DA	811 ± 117	886 ± 83	862 ± 87	782 ± 82	0.246	0.8637
DOPAC	98 ± 15	90 ± 9	90 ± 7	130 ± 28	1.413	0.2607
HVA	114 ± 14	122 ± 8	107 ± 5	130 ± 10	0.929	0.4402
5-HT	319 ± 17 ^a	284 ± 15 ^{ab}	299 ± 11 ^{ab}	251 ± 15 ^b	3.528	<0.05
5-HIAA	113 ± 12	92 ± 7	91 ± 8	88 ± 10	1.487	0.2403

Values are means ± S.E.M. in pg/mg wet tissue.

The number of mice used in each group was as follows: Soybean, 8; Chicken, 8; Pork, 8; Beef, 7.

Different letters indicate significant difference at $P < 0.05$.

良なアミノ酸組成を有することでその利点が唱えられてきたが、アミノ酸そのものだけではなく低分子のペプチド等に畜肉の機能性を左右するものがあると考えられる。事実、食肉に多く含まれるクレアチンは鎮静・催眠効果をもたらす²⁾、また、カルノシンには抗うつ様作用が確認されている^{3,4)}。しかし、加水分解を行えばこれらの低分子

化合物もアミノ酸に分解されることになる。今後は、単に肉のアミノ酸組成にのみ捕らわれず、食肉に含まれる低分子窒素化合物の探索ならびに機能性の解明、さらにはそれら低分子窒素化合物とアミノ酸等との相互関係も明らかにする必要があろう。また、消化管内で消化酵素により切断されたペプチドに脳機能を改善するものが含まれる可

Table 5 Effects of several dietary protein sources on monoamine turnover rates of the hippocampus, hypothalamus and cerebral cortex in mice

		Soybean	Chicken	Pork	Beef	F value (3, 27)	P value
Hippocampus	MHPG/NE	0.696 ± 0.037 ^a	0.446 ± 0.033 ^b	0.517 ± 0.038 ^{bc}	0.660 ± 0.053 ^{bc}	7.666	<0.001
	DOPAC/DA	0.124 ± 0.005 ^{ab}	0.106 ± 0.008 ^b	0.113 ± 0.013 ^{ab}	0.183 ± 0.038 ^a	3.231	<0.05
	5-HIAA/5-HT	0.862 ± 0.051	0.875 ± 0.143	0.851 ± 0.072	1.121 ± 0.061	1.872	0.1582
Hypothalamus	MHPG/NE	0.164 ± 0.011 ^a	0.116 ± 0.01 ^b	0.104 ± 0.004 ^b	0.114 ± 0.006 ^b	10.593	<0.0001
	DOPAC/DA	0.663 ± 0.047 ^{ab}	0.613 ± 0.065 ^{ab}	0.490 ± 0.043 ^b	0.800 ± 0.035 ^a	6.465	<0.01
	5-HIAA/5-HT	0.595 ± 0.051 ^b	0.569 ± 0.052 ^b	0.514 ± 0.027 ^b	0.763 ± 0.015 ^a	6.471	<0.01
Cerebral cortex	MHPG/NE	0.583 ± 0.031 ^a	0.388 ± 0.028 ^c	0.430 ± 0.032 ^{bc}	0.551 ± 0.045 ^{ab}	7.802	<0.001
	DOPAC/DA	0.122 ± 0.004	0.103 ± 0.008	0.111 ± 0.013	0.176 ± 0.040	2.695	0.0658
	5-HIAA/5-HT	0.355 ± 0.033	0.326 ± 0.026	0.310 ± 0.032	0.348 ± 0.025	0.495	0.6887

Values are means ± S.E.M.

The number of mice used in each group was as follows: Soybean, 8; Chicken, 8; Pork, 8; Beef, 7.

Different letters indicate significant difference at $P < 0.05$.

能性も存在する。さらなる研究が必要とされる。

4. 要 約

食肉（鶏肉，豚肉ならびに牛肉）タンパク質の脳機能に及ぼす影響を大豆タンパク質と比較した。用いた畜肉タンパク質3品の加水分解後のアミノ酸組成に大きな違いは認められなかった。各タンパク質をタンパク質含量として12%配合する4種の飼料を作製し，4週間の飼養実験を行った。その後，オープンフィールド試験，高架式十字迷路試験ならびに強制水泳試験を実施し，実験終了時に脳を取り出し，海馬，視床下部ならびに大脳皮質を採取した。各脳部位はHPLCによりモノアミンならびにその代謝産物を測定した。各行動実験には，タンパク質源の影響は認められなかった。一方，鶏肉タンパク質摂取により各脳部位のNEの代謝回転は遅くなることが判明した。また，牛肉タンパク質では，海馬と大脳皮質のNEの代謝回転は高く保たれ，視床下部では5-HT代謝回転が唯一高かった。

本実験結果は，加水分解された畜肉タンパク質のアミノ酸組成に違いがなくとも，脳機能には畜肉タンパク質の違いが反映されること示唆する。

文 献

- 1) Perry CL, Mcguire MT, Neumark-Sztainer D, Story M. J. Adolesc. Health, 29 : 406-416. 2001.
- 2) Koga Y, Takahashi H, Oikawa D, Tachibana T, Denbow DM, Furuse M. Neuroscience, 132 : 65-71. 2005.
- 3) Tomonaga S, Hayakawa T, Yamane H, Maemura H, Sato M, Takahata Y, Morimatsu F, Furuse M. Nutr. Neurosci., 10 : 181-186. 2007.
- 4) Tomonaga S, Yamane H, Onitsuka E, Yamada S, Sato M, Takahata Y, Morimatsu F, Furuse M. Pharmacol. Biochem. Behav., 89 : 627-632. 2008.
- 5) Murakami T, Yamane H, Tomonaga S, Furuse M. Eur. J. Pharmacol., 602 : 73-77. 2009.
- 6) Asechi M, Tomonaga S, Tachibana T, Han L, Hayamizu K, Denbow DM, Furuse M. Behav. Brain Res., 170 : 71-77. 2006.
- 7) Hamasu K, Haraguchi T, Kabuki Y, Adachi N, Tomonaga S, Sato H, Denbow DM, Furuse M. Amino Acids, 37 : 377-382. 2009.
- 8) Suenaga R, Yamane H, Tomonaga S, Asechi M, Adachi M, Tssuneyoshi Y, Kurauchi Y, Sato H, Denbow M, Furuse M. Amino Acids, 35 : 107-113. 2008.
- 9) Suenaga R, Tomonaga S, Yamane H, Kurauchi I, Tsuneyoshi Y, Sato H, Denbow DM, Furuse M. Amino Acids, 35 : 139-146. 2008.
- 10) Yamane H, Asechi M, Tsuneyoshi Y, Kurauchi I, Denbow DM, Furuse M. Anim. Sci. J., 80 : 286-290. 2009.

レトルト処理を施した筋原線維タンパク質の 増粘多糖類添加によるゲル形成に関する研究

Study on Gel Properties after the Addition of Polysaccharide Thickeners
to Retort-Treated Myofibrillar Protein

芳賀 聖一・水谷 佳月・林 利哉

(名城大学農学部)

Seiichi Haga, Katsuki Mizutani and Toshiya Hayashi

(Faculty of Agriculture, Meijo University)

This study aims to obtain fundamental information required for improving the textures of retort-sterilized meat products by investigating changes in the retort-sterilized, heat-induced gel properties of myofibrils due to the addition of carrageenan thickeners. Results indicate that the addition of carrageenan tends to increase the properties and is thus effective in improving the textures of retort-sterilized meat products. Moreover, results of SDS-PAGE reveal that carrageenan greatly influences the histology of gel properties, but not their constituents. In addition, microstructural observations suggest that the addition of carrageenan leads to an increase in the properties because random aggregate structures developed into thick and continuous fibers to some extent.

1. 目 的

レトルト食品は120℃で加熱することにより微生物の増殖などの問題がなく、長期間常温保存が可能である。しかし食感を主とした品質低下により、美味しくないとされている。事実、70℃付近を至適温度とする食肉製品にとって、120℃という過酷な条件であるレトルト処理を施すことによって、色の褐変、独特なレトルト臭の発生、食感の著しい低下などの嗜好性低下の問題点があることから、レトルト食肉製品の品質改善が必要とされており、その改善策の1つとして食感改良剤の利用が積極的に行われている。しかしながら、現在これら食感改良剤の利用は経験的に利用されていることがほとんどであり、より効果的、経済的

な利用が求められている。食肉製品の場合、食感改良剤として動物性タンパク質として乳および卵白タンパク質、植物性タンパク質として大豆あるいは小麦などのタンパク質、増粘多糖類としてカラギーナン、カードランなどが用いられる^{1, 2)}。

前報³⁾では、天然アクトミオシンに異種タンパク質を添加することによって、75℃加熱よりレトルト加熱処理を施したものが食感改善に効果的であることを示した。本研究では、食肉の主要タンパク質であるアクチン、ミオシンを主として含み、構成タンパク質が天然アクトミオシンと概ね変わらず、かつ筋原線維構造を全筋レベルに維持しているミオフィブリルを使用した。また、Z. Poetetrask⁴⁾は牛肉ゲルにカラギーナン、卵白アルブミン、トランスグルタミナーゼを添加した結

果、カラギーナン添加の系は結着性や保水性が向上したと報告していることから、増粘多糖類カラギーナンを添加したミオフィブリルのレトルト加熱処理による物性変化について検討した。

2. 方法

2.1 ミオフィブリルの調製

ミオフィブリルは新鮮な豚ロース肉を、できる限り脂肪と結合組織を取り除き、挽き肉にしたものをPerry and Grey⁵⁾, Etlinger⁶⁾らの方法を改変したもので調製し、0.6M-NaCl/50mM-Naリン酸緩衝液 (pH6.0) で透析した。その後、終濃度が15mg/mlになるように上記緩衝液で希釈した。またカラギーナンは終濃度が0.1, 0.3, 0.5%になるように添加した。

2.2 加熱ゲル化処理

調製したミオフィブリルをねじ口平底試験管に3mlずつ分注し、プログラム精密恒温槽プロサーモバスを用いて75℃恒温で30分加熱したゲルと、レトルト圧力殺菌釜(株式会社花木製作所)を用いて120℃で15分加熱したゲルを作製した。

2.3 物性測定

各種加熱ゲルの物性測定はレオメーター(山電株式会社, RE 2 -33005S)を用いて、破断強度測定、クリープ測定を行った。さらに離水率の測定⁷⁾も行った。

2.4 加熱ゲル構成タンパク質の組成

各種加熱ゲル形成に関与するタンパク質成分を調べるために、各種加熱ゲル試料を遠心分離(45,000×g, 15分, 4℃)して得られた沈殿画分をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動^{8, 9)}(以下、SDS-PAGEと略す)に供した。

2.5 走査型電子顕微鏡による微細構造観察

加熱ゲル試料を5×5×5mm程度の大きさに切り、Hagaらの方法¹⁰⁾により固定、洗浄、脱水、置換し、走査型電子顕微鏡(日立計測機サービス

株式会社, S-3000H)(以下、SEMと略す)を用いて加速電圧25kVで観察した。

3. 結果と考察

3.1 ミオフィブリル加熱ゲルの物性変化に関するカラギーナン添加による効果

レトルト食肉製品の食感改善に関する基礎的知見を得るために、カラギーナン添加によるミオフィブリル加熱ゲル物性の変化に関して検討し、Table 1に示した。その結果、75℃加熱ゲルは120℃加熱ゲルと比較すると、破断エネルギー、破断弾性率で有意に($p<0.05$)高い値を示し、レトルト加熱処理によって物性が大きく低下することが明らかとなった。また、レトルト加熱ゲルはカラギーナン添加濃度の増加に伴って破断物性値が高くなる傾向が認められた。また、クリープテストによる物性変化はカラギーナン添加濃度が0.5%になると有意に($P<0.05$)低下する傾向があり、食感評価の上で興味ある結果であったが、詳細については今後の検討が必要である。離水率は、レトルト加熱を施したものが高い値を示したが、いずれの加熱区においてもカラギーナンを添加することによって、離水率が減少し、添加したレトルト加熱ゲルの中には、75℃加熱ゲルよりも離水率の低いものも示された。

3.2 カラギーナン添加によるミオフィブリル加熱ゲルの構成成分の変化

カラギーナンの添加によりゲル物性は大きく変化し、同一加熱条件下であっても、カラギーナンの有無や濃度によって特徴的な変化を示した。これまでの研究から筋原線維タンパク質を120℃に加熱すると、ミオシンおよびアクチンからなる巨大会合体を形成し、この会合体が物性低下を誘発する要因であることを報告した⁷⁾。そこでカラギーナン添加によるミオフィブリル加熱ゲルの構成成分の変化を、加熱に深く関与する沈殿画分を

Table 1 Changes physical properties of heat-induced gel of myofibril with or without carrageenan.

mixed carrageenan [%]		0	0.1	0.3	0.5
Breaking energy [J/m ³]	75°C	57.42a	18.45bc	15.00c	54.40a
	120°C	9.80a**	11.16a**	19.56b	30.38c**
Modulus of breaking elasticity [N/m ²]	75°C	38.91a	16.55b	86.95c	143.74d
	120°C	16.81a**	21.19a*	26.86b*	121.75c*
Instantaneous modulus [10 ³ Pa]	75°C	4.32a	2.66b	30.46c	21.74c
	120°C	3.43a	3.98a*	5.83b**	4.54ab**
Retarded elastic modulus 1 [10 ³ Pa]	75°C	8.77a	2.80b	43.07c	13.54a
	120°C	4.27a**	6.15b**	7.64c**	7.20abc
Retarded elastic modulus 2 [10 ³ Pa]	75°C	1.62a	1.10b	7.02c	5.14d
	120°C	0.89a**	1.22b	1.74bc**	1.97cd**
Coefficient of retarded viscosity 1 [10 ³ Pa·s]	75°C	6.49a	2.56b	20.73c	34.69c
	120°C	3.92a**	5.96b**	11.91c	8.88abc*
Coefficient of retarded viscosity 2 [10 ³ Pa·s]	75°C	0.97ad	1.22bc	1.08ab	3.17cd
	120°C	12.04a	15.64*b	13.26ab	14.86b**
Newtonian viscosity [10 ³ Pa·s]	75°C	2.50a	2.22a	19.03bc	18.34c
	120°C	2.11a*	2.91b**	4.72c**	4.81bc**
Rate of released water [%]	75°C	63.42a	53.92b	48.72c	41.72d
	120°C	72.01a**	64.60b**	54.32c**	43.22d

Mean values not followed by the same letter differ significantly ($P < 0.05$).

The asterisk shown in each parameter has a significant difference between heat-treatment (**, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$).

調べることによって、物性変化との関連について検討した。

その結果、Fig.1に示すように未加熱の成分と同一成分が75°C加熱ゲルでは認められたが、120°C加熱ゲルではミオシンヘビーチェーンや α アクチニンの消失が確認された。また、本研究でも120°Cの加熱ゲルにミオシンおよびアクチンからなる巨大な会合体が確認された(矢印)ことから、75°C加熱ゲルでは主としてミオシンとアクチンからゲルが形成されているが、120°C加熱ゲルでは両タンパク質会合体によってゲルが形成され、カラギーナン添加はゲル形成に関与するタンパク質構成に関わりなく物性を増大させる役割を果たしたものと考えられる。

3.3 カラギーナン添加によるミオフィブリン加熱ゲルの微細構造変化

前述したように、カラギーナン添加また添加濃度依存性を示す物性増大効果の背景で、加熱ゲル

を構成する組成成分に特徴的な変化が得られなかったことから、ゲルの組織構造について検討することとした。ゲルの物性は、その緻密な組織構造と密接な関係にあることから、それぞれの加熱ゲルの微細構造をFig.2に示した。筋原線維タンパク質の加熱ゲルは主としてミオシンとアクチン、あるいはアクトミオシンの変性体が数珠状に連なった構造を呈しており、それは加熱時のタンパク質のおかれる様々な条件(加熱温度、pH、タンパク質濃度、イオン強度など)により、それぞれのネットワーク構造が凝集体構造(aggregated-type)を呈したり、繊維状構造(strand-type)を呈したりする。ここでカラギーナン無添加の75°C加熱ゲル、レトルト加熱ゲルでは、いずれも典型的な三次元の網目構造を呈していたが、前者の方がより細かい繊維状構造のネットワークからなり、レトルト処理は凝集体からなる部分が多くなっていることが観察された(A, B)。異種タンパク質

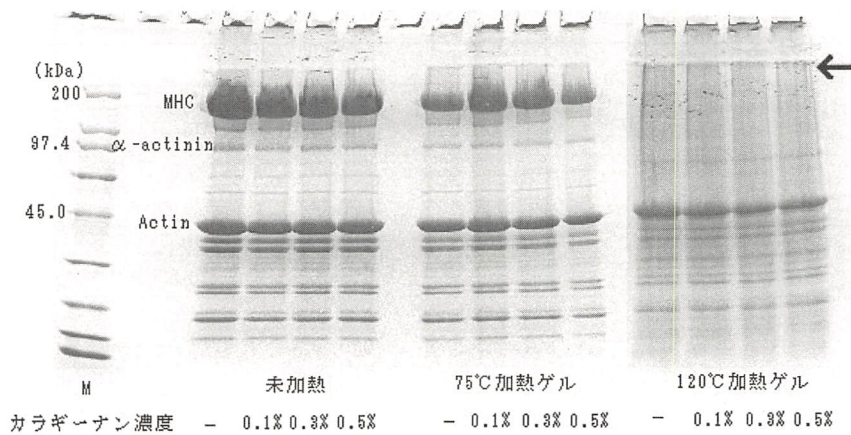


Fig.1 SDS-PAGE patterns of the protein extracted from heat-induced gel of myofibril with or without carrageenan. 0.1~0.5% were shown the concentration of carrageenan. The letter M stands for molecular weight markers. MHC, Myosin heavy chain

(大豆タンパク質分離物、ホエータンパク質分離物、 β -ラクトグロブリン)の混入によって物性は大きく変化し、aggregated-typeの構造を形成したゲル物性は低下し、strand-typeの構造を形成したそれは増大したという報告^{11, 12)}や前報³⁾からも、本実験のネットワーク構造と物性の関わりを裏付けるものといえ、その詳細については既に示したとおりである。

カラギーナンの添加は75°C加熱、レトルト加熱いずれも基本的な構造には特徴的变化は認められないが、細かく観察すると、球状の小さな凝集体が幾重にも連なることで太い一つのネットワークとなり、さらにネットワークの連続性が増していることが認められた。さらにそれらの変化はカラギーナン添加濃度に依存したもので、濃度が増すに従い全体として緻密になり、物性増大に反映されたものと考えられる。前報³⁾に示した異種タンパク質混入の研究において、120°C加熱を行ったものは、単独ではランダムな凝集体構造が観察されたが、大豆タンパク質グリシニンを混入したものは塊状の凝集体が数珠状に連なり規則的な構造を形成し、卵白由来の粗オボアルブミンを混入したものは細かく緻密な繊維状の構造を呈した。

以上のように添加試料によって加熱ゲルの組織構造は様々と変化し、構造を反映したゲル物性値が得られることから、今後ゲルネットワーク構造の画像解析データを重ね、物性を示す多くのパラメータとの関連性についてさらに検討を進め、画像解析値からより確かな物性値の推定を確立していく予定である。

4. 要 約

レトルト食肉製品の食感改善に関する基礎的知見を得ることを目的として、増粘多糖類カラギーナンの添加によるミオフィブリルのレトルト加熱ゲル物性の変化について検討した。

その結果、カラギーナンを添加することによって物性値を増大させる傾向がみられ、レトルト食肉製品の食感改善に効果的であることが示唆された。またSDS-PAGEの結果より、ゲル物性にカラギーナンはゲル構成成分より、組織構造に大きく関与している可能性が示された。さらに微細構造観察からカラギーナンの添加により、ランダムな凝集体の構造はいくらか太い線維とネットワークの連続性が付与されることによって緻密性が得られ、物性値に反映したと示唆された。

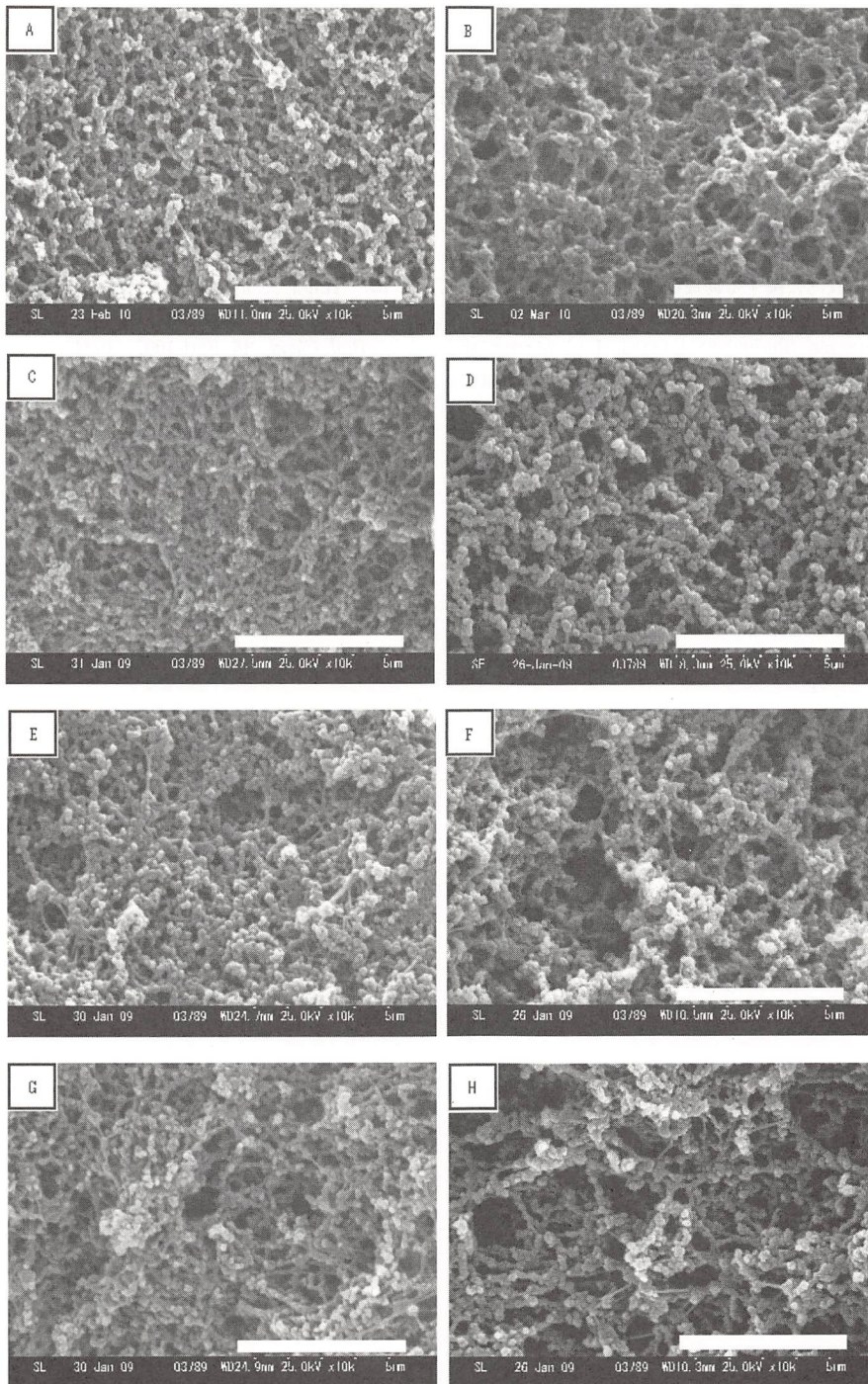


Fig.2 Scanning electron micrographs of the heat-induced gel of myofibril with or without carrageenan.

The left side, at 75°C; The right side, at 120°C.

A and B, gel of MF without carrageenan ; C and D, gel of MF with 0.1% carrageenan ; E and F, gel of MF with 0.3% carrageenan ; G and H, gel of MF with 0.5% carrageenan.

A scale bar : 5 μ m

文 献

- 1) 加藤昭夫, 松富直利, 多糖類-蛋白質複合系ゲル, 日本食品科学工学会誌, **45**, (2), 171-175 (1998).
- 2) 國崎直道, 佐野征男, 混合系の食品多糖類, 「食品多糖類, 乳化・増粘・ゲル化の知識」, p.205-234, 幸書房, 東京, (2001).
- 3) 芳賀聖一, 林 利哉, レトルト加熱による天然アクトミオシンの物性変化に関する異種タンパク質 (グリシニン, オボアルブミン) 混入による効果, 平成20年度食肉に関する助成研究調査成果報告書 (伊藤記念財団), **27**, 61-67 (2009)
- 4) Z. Pietrasik, Binding and textural properties of beef gels processed with κ -carrageenan, egg albumin and microbial transglutaminase, *Meat Science*, (2002)
- 5) S. V. Perry, T. C. Grey, *Biochem. J.*, **64**, 184 (1956)
- 6) J. F. Etlinger, D. A. Fiscman, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **37**, 516 (1972)
- 7) 藤田利宗, 林利哉, 芳賀聖一, レトルト加熱によるアクトミオシンの物性変化に関する研究, 日本食品科学工学会誌, **53** (8), 423-429 (2006)
- 8) Laemmli, U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685 (1970)
- 9) Tatsumi, R. and Hattori, A., Detection of giant myofibrillar proteins connectin and nebulin by electrophoresis in 2% polyacrylamide slab gels strengthened with agarose, *Anal. Biochem.*, **224**, 28-31 (1995)
- 10) Haga, S. and Ohashi, T., Heat-induced gelation of a mixture of myosin B and soybean protein, *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 1001-1007 (1984)
- 11) Manee, V., James, F. S., Stanley, L. F. and Denise, M. S., Gelation of chicken pectoralis major and heat-induced β -lactoglobulin, *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 760-765 (2003)
- 12) McCord, A. Smyth, A. B. and O'Neill, E. E., heat-induced gelation properties of salt-soluble muscle proteins as affected by non-meat proteins, *J. Food Sci.*, **63**, (4), 580-583 (1998)

肉由来ペプチドカルノシンの免疫調節作用

Immune-modulating Functions of Carnosine, a Meat-derived Peptide

清水 誠 (東京大学大学院農学生命科学研究科)

Makoto Shimizu (School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo)

Carnosine, a bioactive peptide found in most types of dietary meat, has been investigated for its ability to modulate immune reactions, specifically with respect to the IL-8 secretion in intestinal epithelial cells (IECs). We previously reported that carnosine inhibited the hydrogen peroxide- or TNF-alpha-induced IL-8 production by human intestinal epithelial Caco-2 cells (Son et al., Cytokine, 2008), suggesting that carnosine plays as a suppressive regulator of the intestinal immune system. IECs are also exposed to various bacteria in the intestinal tract. These bacteria may stimulate IECs via Toll-like receptors (TLRs) expressing on the cell surface. Activation of TLR may result in increased production of IL-8, thereby activating the intestinal immune system. This study was undertaken to investigate the effect of carnosine on the TLR-mediated IL-8 production in IECs.

Caco-2 cells were stimulated with several TLR ligands, and IL-8 secreted from the cells after stimulation with or without carnosine was determined by ELISA. The IL-8 production induced by such TLR ligands as Pam3CSK4 (for TLR1/2), peptide glycan (for TLR2), and flagellin (for TLR5) was significantly enhanced by carnosine. This increased IL-8 secretion was accompanied by the increasing level of IL-8 mRNA, suggesting that carnosine up-regulates IL-8 production at a transcriptional level. An increase in the stability of IL-8 mRNA was also observed in the cells treated with carnosine. Since the effect of carnosine was attenuated by a p38MAPK inhibitor, the p38MAPK pathway may be involved in the IL-8 enhancing activity of carnosine. Carnosine is likely to be transported into the cells via the peptide transporter without hydrolysis and express its function. Anserine, a methylated form of carnosine, also showed a similar activity. Carnosine is an abundant dipeptide in meat and also in certain supplements. Daily intake of carnosine may be beneficial to modulate the intestinal immune system and keep barrier functions of the gut.

1. 目的

腸管は消化吸収の場であると同時に、病原細菌やアレルギー物質など様々な生体異物にさらされている。これらの異物から生体を防御するため、腸管の最表面にある上皮層は物理的なバリアーになるほか、様々な液性因子を分泌する。その代表例であるIL-8は、リポ多糖 (LPS) などの刺激に

よって産生され、免疫細胞を活性化するケモカインである。

カルノシンは β -アラニンとL-ヒスチジンからなるジペプチド (β -Ala-His) で、鶏肉や豚肉などに多く含まれており、骨格筋や心筋におけるその濃度は時に50mMにも達する¹⁾。生理機能としては、抗酸化作用、抗老化作用、キレート作用あるいは血圧降下作用などが知られているが^{2), 3)}、カルノシ

ンにはそれ以外の未知の機能もあると推定されている。我々は酸化ストレス（過酸化水素処理）や炎症性サイトカイン（TNF- α 処理など）によって刺激された腸管上皮細胞においてはケモカインであるIL-8の産生が上昇するが、その上昇はカルノシンによって抑制されるという抗炎症作用を見出した⁴⁾。さらに、この抑制作用のユニークなメカニズムを明らかにした⁵⁾。

一方、腸内には多数の細菌が存在し、このような細菌類による刺激に対してもIL-8の分泌誘導が起こることが知られているが、これには腸管上皮細胞や免疫細胞の表面に存在するToll様受容体（TLR）での微生物の認識が関わっていることが知られている。TLRの刺激を介して産生量が上昇したケモカインは好中球やマクロファージを上皮層下に誘引し、これらの細胞が病原微生物の殺菌や除去を行うため、ケモカイン分泌は生体防衛上、大切なプロセスと考えられている。我々はヒト腸管上皮細胞株を用いて、「TLRを介して誘導されるIL-8分泌をカルノシンが促進する」という大変興味深い現象を見出した。本研究は、この「免疫系の活性化物質としてのカルノシン」の特性を明らかにすることを目標としている。

2. 方 法

2.1 実験材料

TLRリガンドとして用いたPam3CSK4, Poly (I:C), Ultra pure *E.coli* LPS, フラジェリン (*S. Typhimurium*由来), イミキモドはInvivogenより, ペプチドグリカン (PGN) はFlukaより, LPSはシグマより購入した。

2.2 細胞培養

ヒト結腸癌由来株化細胞Caco-2, HT-29はAmerican Type Culture Collectionより購入した。これらの細胞を14日間培養し、腸管上皮様に分化させたものを実験に供した。カルノシンのみを含

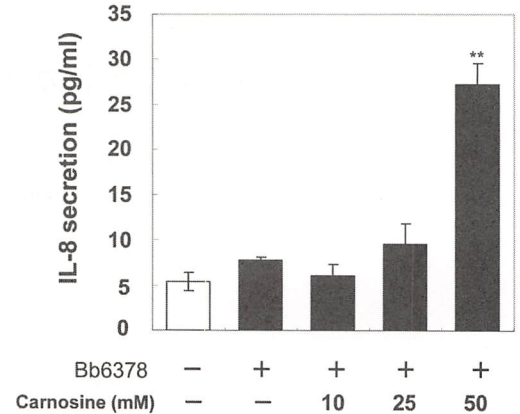


Fig.1 Effect of carnosine on the IL-8 secretion by Caco-2 cells stimulated by heat-killed bifidobacterium.

Caco-2 cells were cultured with different concentrations of carnosine for 24 hours. Then the culture medium was replaced by a fresh medium containing *Bifidobacterium bifidum* OLB6378 (10 μ g/ml) and carnosine. After 24 hour-culturing, the IL-8 concentration in the medium was measured by ELISA. Each value is the mean \pm SD (n=3). **Significantly different from the control value ($p < 0.01$).

んだ培地中、あるいはカルノシンと各種TLRリガンドを含んだ培地中で24時間培養を行った後、培養上清を回収し、IL-8の測定を行った。

2.3 IL-8産生の測定

ELISA法によって上清中のIL-8の分泌量を測定した。また、細胞を回収し、IL-8mRNAの発現量をReal-time RT-PCR法によって調べた。

2.4 細胞内のアミノ酸、ジペプチドの測定

Caco-2細胞をPBSで洗浄し、0.1% Triton X-100で細胞を可溶化した後、遠心して上清を回収した。除タンパクした後、アミノ酸分析機でアミノ酸、ジペプチドの量を測定した。

2.5 統計処理

結果は平均値 \pm 標準偏差で表した。2標本間の有意差検定にはStudentのt検定 (t-test) を、また3つ以上の群間での有意差検定にはTukeyの方法を用い、有意水準 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

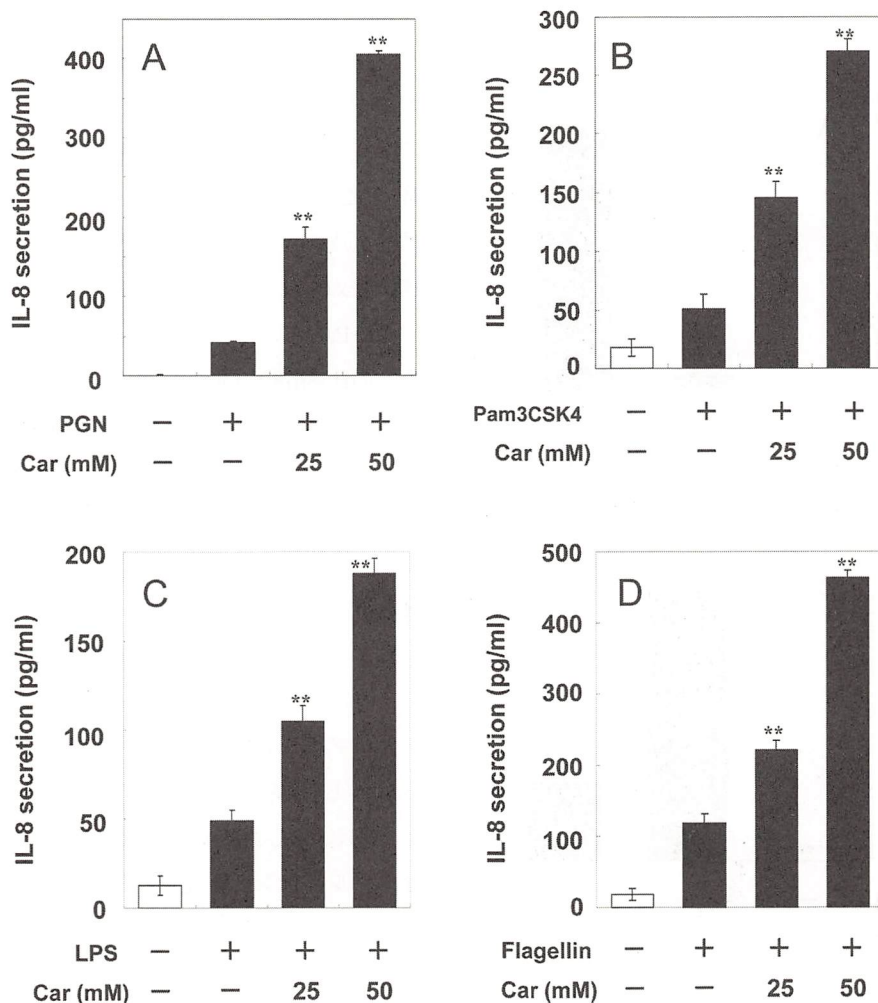


Fig.2 Effect of carnosine on the IL-8 secretion by Caco-2 cells stimulated by TLR ligands.

Caco-2 cells were cultured with carnosine (Car) for 24 hours. Then the culture medium was replaced by a fresh medium containing 10 μ g/ml peptide glycan (PGN) (A), 100ng/ml Pam3CSK4 (B), 1 μ g/ml LPS (C), or 50 ng/ml flagellin (D), with carnosine. After 24 hour-culturing, the IL-8 concentration in the medium was measured by ELISA. Each value is the mean \pm SD (n=3). **Significantly different from the control value ($p < 0.01$).

3. 結果

3.1 TLR刺激によって誘導されたIL-8分泌に対するカルノシンの影響

ビフィズス菌の一種である*Bifidobacterium bifidum* OLB6378株の加熱死菌体をCaco-2細胞に加えると、細胞からのIL-8分泌量が上昇する傾向が観察されたが、カルノシンを共に添加するとそ

れが著しく上昇することが見出された (Fig.1)。この応答には上皮細胞表面で細菌由来物質の認識を担っているTLRの関与が考えられる。そこで、様々なTLRリガンドを用いてCaco-2細胞を刺激した時のIL-8分泌量がカルノシンの存在下で上昇するかどうかを調べた。その結果、細胞膜表面に発現しているTLRをペプチドグリカン (TLR2リガンド)、Pam3CSK4 (TLR1/2リガンド)、LPS

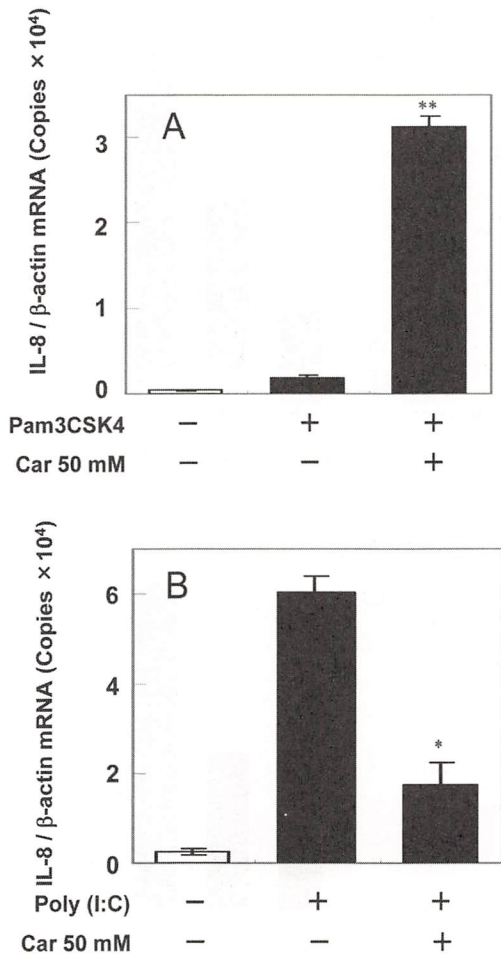


Fig.3 Effect of carnosine on the IL-8 mRNA level in Caco-2 and HT29 cells.

(A) Caco-2 cells were pretreated with carnosine for 24 hours. Then the culture medium was replaced by a fresh medium containing Pam3CSK4 (100ng/ml) and carnosine, and the cells were cultured for further 3 hours. (B) HT-29 cells were pretreated with carnosine for 24 hours. Then the culture medium was replaced by a fresh medium containing Poly (I:C) (10 μ g/ml) and carnosine, and the cells were cultured for further 3 hours. After the culture, IL-8 mRNA was determined by Real-time RT-PCR. Each value is the mean \pm SD (n=3). *** Significantly different from the control value (* p <0.05, ** p <0.01).

(TLR4リガンド), フラジェリン (TLR5リガンド) などで刺激して誘導されたIL-8分泌は, 菌体による刺激時と同様に, カルノシンによって亢進した

(Fig.2)。しかし, poly (I:C) (TLR3リガンド) や イミキモド (TLR7リガンド) 処理など, 細胞内 エンドソームに発現しているTLRの刺激に対しては, カルノシンは抑制効果を示した (データ省略)。この亢進・抑制効果は, Caco-2とは別のヒト腸管上皮細胞株であるHT-29を用いた実験でも同様に認められた (データ省略)。

次にPam3CSK 4 およびPoly (I:C) で刺激した細胞のIL-8mRNA量を, カルノシン処理群, 無処理群について測定したところ, mRNA量はカルノシン存在下で顕著に上昇あるいは低下したことから, カルノシンによるこの調節作用は, IL-8の転写レベルで起こっていることが示唆された (Fig.3)。

3.2 Pam3CSK4刺激で誘導されたIL-8産生に

対するカルノシンの亢進作用とその機構

カルノシンによるIL-8産生亢進の作用機序をさらに詳しく調べた。Pam3CSK4をカルノシンとともに添加した際のCaco-2細胞のIL-8mRNA量は, カルノシンの濃度依存的に増加することが認められた (データ省略)。また, 細胞をアクチノマイシン処理してmRNA合成をストップさせた条件下でのmRNA量をカルノシン存在下, 非存在下で測定したところ, カルノシン存在下ではmRNA量の減少が顕著に抑えられたことから, カルノシンはIL-8mRNAの安定性を高める効果を有していることも示唆された (データ省略)。

mRNAの安定性にはMAPキナーゼ経路が関わっていることが知られている⁶⁾。そこで, MAPキナーゼの各種阻害剤を用いて検討した。その結果, ERK経路やJNK経路の阻害剤による影響は認められなかったが, p38MAPK経路の阻害剤であるSB203580で処理した細胞ではカルノシンの亢進効果が有意に抑制されることが明らかになった (データ省略)。すなわち, カルノシンはp38MAPK経路を活性化することによりmRNAの

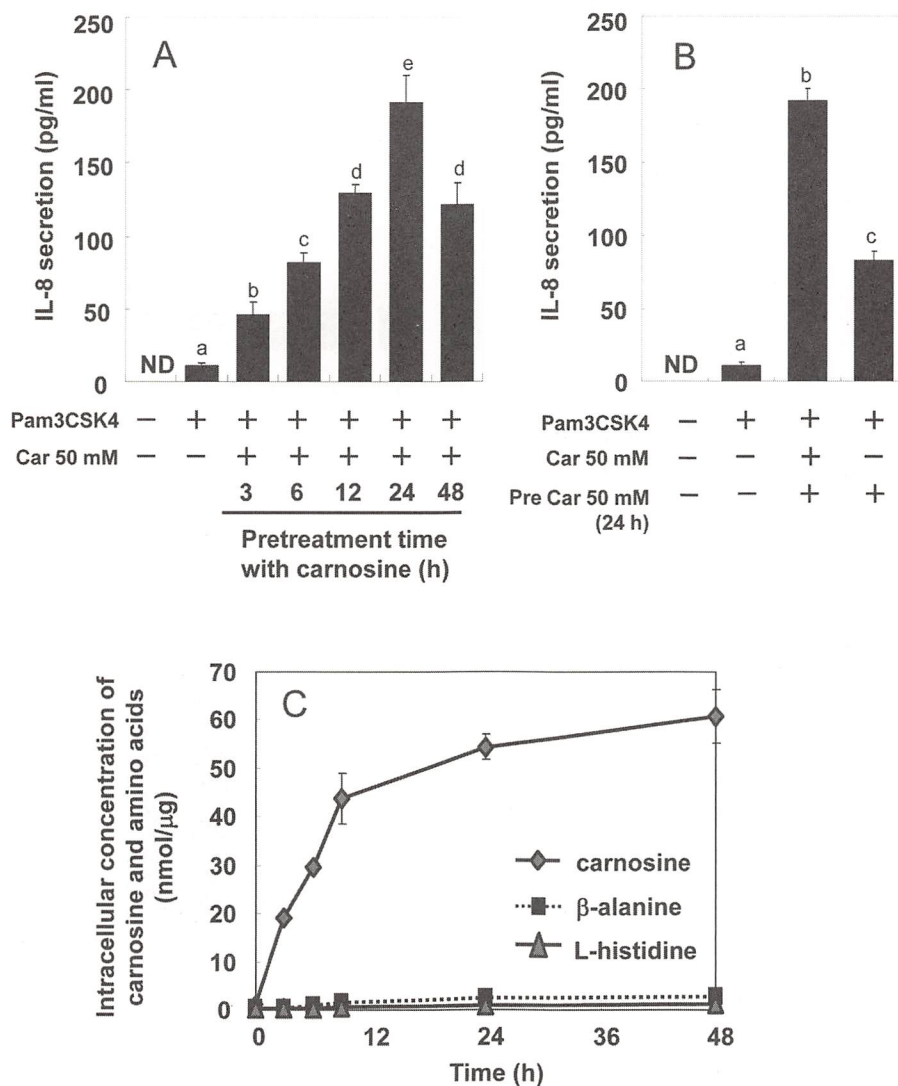


Fig.4 Effect of the pretreatment of Caco-2 cells with carnosine on the IL-8 secretion activity (A and B) and the intracellular carnosine concentration (C).

(A) Caco-2 cells were pretreated with 50 mM carnosine for 0-48 hours. Then the culture medium was replaced by a fresh medium containing Pam3CSK4 (100ng/ml) and 50 mM carnosine for 24 hours. (B) Caco-2 cells were pretreated with 50 mM carnosine for 24 hours. Then the culture medium was replaced by a fresh medium containing Pam3CSK4 (100ng/ml) and 50 mM carnosine for 24 hours. After the culture, the IL-8 concentrations in the media were measured by ELISA. (C) Caco-2 cells were pretreated with 50 mM carnosine for 0-48 hours. Then the cells were recovered and the intracellular concentrations of amino acids and carnosine were measured by amino acid analysis.

安定性を上昇させ、IL-8産生量を高めている可能性が示唆された。

3.3 IL-8産生亢進作用とカルノシンの動態

カルノシンによる細胞の前処理時間とIL-8産生亢進効果の関係を調べた。その結果、前処理の時間依存的にカルノシンによる亢進効果が上昇し、

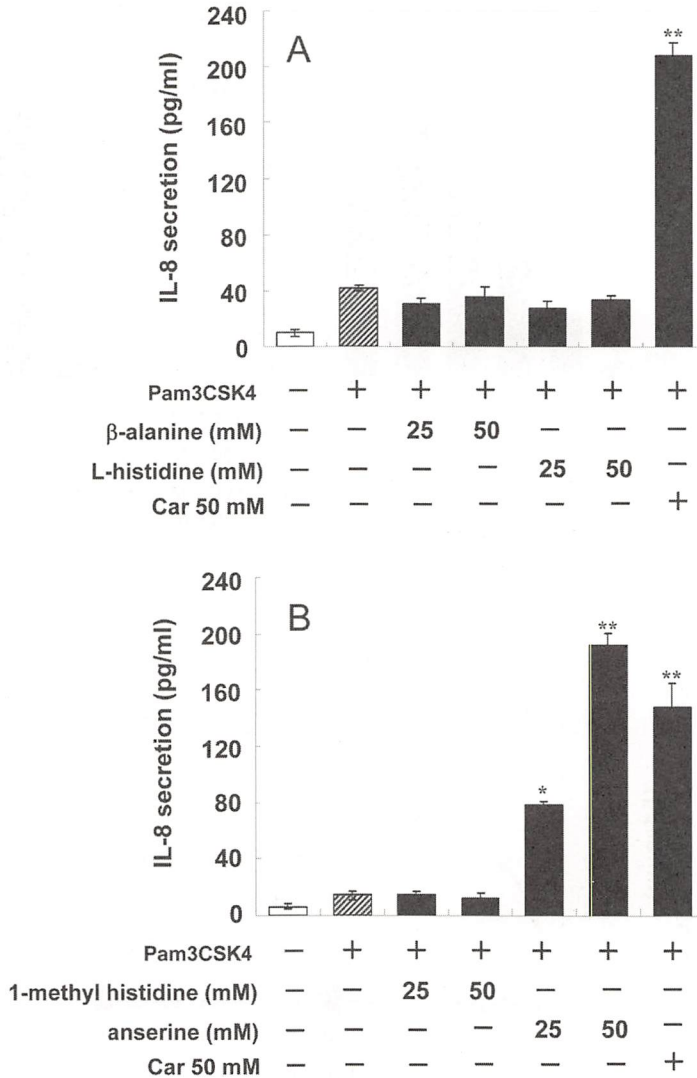


Fig.5 Effect of carnosine and its related compounds on the Pam3CSK4-induced IL-8 secretion from Caco-2 cells.

Caco-2 cells were pretreated with carnosine, β -alanine, and L-histidine (A) or with anserine and 1-methylhistidine (B) for 24 hours. Then the culture medium was replaced by a fresh medium containing Pam3CSK4 (100ng/ml) and carnosine or the related compounds. The cells were cultured for further 3 hours, and then the IL-8 concentration in the medium was measured by ELISA. Each value is the mean \pm SD (n=3). *** Significantly different from the control value (* p <0.05, ** p <0.01).

またPam3CSK4刺激時にカルノシンが共存しなくても、カルノシン前処理だけでIL-8分泌が亢進することも明らかになった (Fig.4)。細胞内のカルノシン、 β -アラニン、L-ヒスチジンの量をアミ

ノ酸分析により測定したところ、添加したカルノシンはほとんど分解されることなく細胞内に取り込まれて約24時間で飽和に達していることが明らかになった (Fig.4)。

ジペプチドはペプチドトランスポーター (PepT1) で細胞内に輸送されることが知られている。そこで、PepT1を介して細胞内に輸送されることが知られるジペプチド、グリシルサルコシン (Gly-Sar) を用いて競合実験を行ったところ、カルノシンの亢進効果はGly-Sarの濃度依存的に抑制され、それに伴って細胞内カルノシン量が減少していた (データ省略)。これらのことから、添加されたカルノシンはPepT1を介して細胞内に輸送され、そこで働くものと推定された。構成アミノ酸によるIL-8分泌亢進は観察されなかった一方、カルノシンと同様に筋肉中に含まれるメチル化ジペプチドであるアンセリン (β -Ala-1-Met-His) は同様の強いIL-8分泌亢進作用を示した (Fig.5)。

4. 考 察

TLRは病原細菌やウイルスなどから生体を守るための防御機構として重要な役割を果たしている。また腸内の常在細菌を含む微生物成分のTLR刺激によってIL-8などのケモカインが誘導されると、その作用によって遊走された免疫細胞による異物の除去や、さらにそれらの免疫細胞の働きによる炎症の収束といった一連の流れが起ると考えられている。食品成分であるカルノシンがIL-8産生を高めることは、このような腸管の恒常性を保つのに役立つと期待される。

また、IL-8以外にも様々な因子がTLRを介した刺激で誘導されることが知られているが、本研究においても、IL-8だけでなくCCL20という樹状細胞やメモリーT細胞の遊走を促すケモカインの発現が、カルノシンの添加によって亢進していることが確認された (データ省略)。今後マイクロアレイ解析などを用いてIL-8以外の因子にも着目することで、カルノシンの腸管免疫系に与える影響がさらに明確になると考えられる。

動物実験などでin vivoでのカルノシンの効果を

検証していくことも重要な課題である。本研究ではマウスでの実験を開始するために、まずマウス腸管上皮細胞での実験を試みたが、我々の研究室で樹立したマウス腸管上皮細胞株はPepT1をほとんど発現していないことがその後明らかになり、マウスでの検証を進めることができなかった。今後、in vivoでのカルノシンの効果を見るための実験系の再検討を行いたい。さらに、感染防御力を増強する食品としての食肉におけるカルノシンの意義、および機能性素材としての可能性についても幅広く検討を進めていきたいと考えている。

5. 要 約

ヒト腸管上皮細胞表面に存在するTLRを刺激すると、IL-8のようなケモカインの分泌が誘導されるが、カルノシンはこのIL-8誘導に対して亢進作用を持つことが分かった。さらに亢進メカニズムについて検討した結果、カルノシンは上皮細胞内に輸送され、そこでアミノ酸に分解されることなく、IL-8産生のプロセスを促進することが示唆された。カルノシン処理した細胞ではIL-8mRNAレベルが上昇することから、カルノシンの亢進効果はIL-8の転写レベルでの調節に起因するものと考えられたが、同時にIL-8mRNAの安定化にも関わっていることが示され、これにはp38 MAPK経路が関与していることも示唆された。

文 献

- 1) Jackson, M. C. and J. F. Lenney, *Inflamm Res.*, **45**, 132-135 (1996).
- 2) Zhou, S. and E. A. Decker, *J Agric Food Chem.*, **47**, 51-55 (1999).
- 3) Hipkiss, A. R. et al., *Ann N Y Acad Sci.*, **854**, 37-53 (1988).
- 4) Son, D. O. et al., *Biofactors*, **21**, 395-398 (2004).
- 5) Son, D. O. et al., *Cytokine*, **42**, 265-276 (2008).
- 6) Subramaniam, D. et al., *Gastroenterology*, **134**, 1070-1082 (2008).

食感・風味を再現し得る牛肉の凍結保存に関する研究

Studies on the Storage of the Beef Meat without Loosing its Taste, Flavor and Freshness when Using Ultrasonic or Plasma Discharge Apparatus During Cooling or Freezing

菱山 和洋 ・ *米田 一裕 ・ **武田 哲男 ・ 佐々木 忠義 ・ 平井 力

(兵庫但馬牛増頭推進協議会, *米田遺伝子型研究所, **タケダ繁殖クリニック)

Kazuhiro Hishiyama, *Kazuhiro Yoneda, **Tetsuo Takeda, Tadayosi Sasaki and Tsuyosi Hirai

(Hyogo Tajima Beef Promotion Council, *Yoneda Genotyping Laboratory Ltd and **Takeda Reproduction Clinic LTD)

Physical properties, such as taste, flavor and freshness of beef meat were analyzed when the plasma and/or ultrasonic discharge apparatus was used to preserve Wagyu meat (Japanese beef meat) at -5°C or -20°C for weeks. First, bovine embryos were assigned to find the optimal discharging conditions in each apparatus for storage at sub-zero temperature. Giving the ultrasonic at 1W, 46kHz or the plasma discharge at 3000V, -5°C to the embryos during freezing, resulted in the least damage to embryonic cells post thawing were seemed to be optimum. Beef meat, then, was tested for storage at -5°C for weeks under the above conditions. The ice-crystallization, generally seen, in the normal frozen meat fiber were observed in neither ultrasonic nor plasma discharged meat samples. These plasma and ultrasonic discharged meat fiber were histologically similar to the feature of fresh raw meat. It seemed that there were no significant differences between the two discharge systems among water holding capacity and color of meat. The beef meat treated by plasma discharge led physically tender rather than that of ultrasonic. For practical use of ultrasonic preservation, appropriate sound impedance may have to be determined. As like as, level of 3000V, at -3°C for plasma discharge to be examined. Discharged beef meat, however, require the analyzing amino acid components and the flavor test to establish the optimal storage, two storage systems in this study might be useful to maintain original texture of meat as fresh as it should be even after freezing.

1. 目的

農産物の輸出促進は政策としてあるが³, 和牛肉の輸出に関しては, 輸出検疫と保存の問題がある。とりわけ, 銘柄和牛肉では, その食感・風味が重要であり, それらを再現できる保存法が求められる。白樫は, 食品の品質について, 味, 香りとテクスチャーで捉えている¹⁾。テクスチャーの中で

最も氷晶が問題であることをGrujicらが Structure and Ultrastructureの変化・変性を電顕像で示した²⁾。このことから, 風味・食感に大きく影響する細胞破壊の最小となる保存法が必要と考える。凍結牛肉の品質については, Petrovicらが最適の凍結スピードを示し³⁾, 大きく改善されてきたが解凍時のドリップについては, さらなる改善が必要と考える。これらテクスチャーの問題を

クリアする方法として、近年、磁場凍結法やプラズマ保存法が製品化されている。これらは、過冷却現象の応用で、氷晶害とは無縁であり、解凍時の再結晶も問題にならない。われわれは、和牛肉の食感と風味を再現し得る保存法の開発にあたり両者を検討対象としたが、保存コスト面からプラズマ保存法に絞った。加えて、振動エネルギーの小さい超音波凍結法の可能性についても検討した。すなわち、和牛肉の普通凍結をコントロールとして、プラズマ保存法と超音波凍結で保存後の色調・筋肉の破断荷重と弾性率・水分含量・保水性と組織標本を比較検討した。

2. 試験の方法

2.1 超音波凍結の最適条件

牛受精卵の桑実胚または胚盤胞をエチレングリコール1.6M+シュクロース0.1MのPBS液でストロー封入し、プログラムフリーザーでマイナス7℃植氷10分、0.5℃/分でマイナス30℃まで下げ液体窒素へ投入。3日後に36℃温湯で解凍したものをコントロールとした。超音波試験卵は、トレハロース300 mosmol/kgのPBS液でストロー封入し、超音波1W（ワット）をかけながら0.5℃/分でマイナス20℃まで下げ凍結し、超音波を切った状態でマイナス20℃を保ち、3日後36℃温湯で解凍した。同様にして10W区と70W区を設けた。

2.2 プラズマ保存卵の最適条件

牛受精卵の胚盤胞をトレハロース300 mosmol/kgのPBS液でストロー封入し、1000Vプラズマ保冷库へ入れ、プラズマ放電状態のマイナス5℃で保冷後3日目に36℃温湯解凍した。同様に7000V区と3000V区を設けた。さらに、形態判別を容易にするため蛍光染色を行った。すなわち解凍した試験卵を5%CO₂加空気38℃環境下で、10μg/mlのヘキスト33342（シグマアルドリッチ、製品番号B2261）と10μl/mlのヨウ化プロピジュー

ム（同、製品番号P4170）を加えた10%CS加TCM199で30分間インキュベーションした後、蛍光顕微鏡で観察した。PIは540nm、ヘキスト33342で352nmの励起波長を照射して、青色に発光するものを生細胞と認定した。この生細胞が最も多い場合の条件を最適値とした。

2.3 牛肉検査

(1) 牛肉の超音波凍結およびプラズマ保存
牛肉（ウチヒラ肉）6cm×6cm×10cmのブロック2検体を真空パックし、0.5℃/分のスピードでマイナス20℃まで普通凍結し、7日間凍結保存した後自然解凍し、水分含量・保水性の測定・筋肉弾性率および破断荷重・色調測定・組織検査を実施しコントロールとした。同様にブロック2検体について超音波凍結装置（(株)本多電子）にて1W、46kHzの超音波をかけながら（ブロック肉を38℃エタノールに浸漬して、10cmの距離から）マイナス20℃冷凍庫で凍結し（ただし、マイナス20℃到達時に超音波は切る。）、7日後自然解凍し同じ検査を実施した。コントロール肉と超音波凍結肉の比較試験を2回実施した。プラズマ保存法については、1618保冷システム（(株)プラデラボ社）により、同様ブロック肉2検体を真空パック後、入庫して3000V、2.2mA、マイナス5℃のプラズマ保存状態で2週間保冷後自然解凍して、同じ検査を実施し、普通凍結のコントロール2検体と比較した。この試験を2回実施した。

(2) 組織学的検査

牛肉（ウチヒラ肉）2cm×2cm×10cmのブロックをコントロール2検体、超音波凍結したもの2検体、プラズマ保存したもの2検体を36℃解凍してから10%磷酸緩衝ホルマリン液で固定、パラフィン包埋し、切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色し、顕微鏡下で組織変化を観察した。

(3) 水分含量の測定

110℃で2時間以上加熱乾燥し、恒量に達した

ステンレス製秤量缶 2 個に挽肉にした約 4 g の牛肉試料をとり、精秤した。110℃の定温乾燥機で 2 時間乾燥後、デシケーター内で放冷し秤量した。この操作を繰り返して恒量を求め、重量減少分を水分とした。

(4) 保水性の測定

加圧濾紙によって求めた。すなわち牛肉を筋線維に沿って、断面が 1 片 10mm の正方形で、重量が 400~600mg の範囲になるように切断した。筋肉試料を 9 cm 径の濾紙 (Whatman, No.1) にのせ 2 枚のプラスチック板に挟み、加圧計を用いて 35kg/cm² で 1 分間加圧し、1 分後に素早く減圧した。肉片の面積 (As) および肉汁の広がった面積 (Ad) を測定し、次式によって算出した。

保水性 =

$$\left\{ 1 - \frac{\text{肉汁の面積 Ad} - \text{肉片の面積 As}}{\text{肉片の面積 As}} \right\} \times 100$$

(5) 破断荷重および弾性率

筋線維に平行して約 1.5cm の厚さの牛肉試料を切り出し、直径 3 mm のプランジャーと 8 kg のロードセルを装着したクリープメーター (YAMADEN, RE-3305) で破断荷重と弾性率を測定した。ステージの上昇速度を 1 mm/sec とし、プランジャーが筋肉試料に陥入するときの応力ひずみ曲線を記録した。プランジャーが最初に牛肉に陥入するときの力を破断荷重とし、弾性率は応力ひずみ曲線のヤング率で算出した。

(6) 色調測定

牛肉を筋線維方向に対して直角に切断し、断面を 60 分間 4℃ で空気中に晒した後、測色色差計 (日本電色工業, ND-1001DP) で測定した。牛肉の色調は、L*, a*, b* 表色系を用いて表した。L* 値は明度、a* 値は赤色度、b* 値は黄色度を表す。

3. 結果と考察

3.1 超音波凍結の最適値

超音波については、46kHz で 70W・10W・1W のそれぞれの区ごとに 5 個の受精卵を使用し、凍結 3 日後に解凍し培養後の形態観察を行った。70W 区では、細胞塊が萎縮し、振動による崩壊状態を呈した。10W 区では死滅細胞と生細胞が混在するが 24 時間後にはすべて死滅した。1W 区は正常に近い形態で最適値とし牛肉検査を行った。しかし、48 時間後には、ほとんどが死滅した。これは、音圧を考えた受精卵の固有音響インピーダンスを液体と考えるか固体と考えるかで 1W~0.1W の検討が必要と考える。

3.2 プラズマ保存の最適値

メーカーで最適値が定まっていないため、牛肉細胞よりデリケートな牛受精卵を牛肉と同じ条件に保存した後、培養し染色で生細胞の最も多い条件を最適値とした。7000・3000V・1000V の条件でそれぞれ 5 個の受精卵を用いた。7000V と 1000V は、ほぼ同じレベルで生細胞が少なかったが (Fig.1-a), 3000V の生細胞が比較的多い (Fig.1-b) とことから 3000V を最適値として牛肉検査を行った。

3.3 牛肉検査

(1) 組織検査

コントロール肉の横断像 (Fig.2-a) の線維間空隙は氷晶で大きく開かれていた。超音波凍結牛肉試料およびプラズマ保存牛肉試料の横断像は、生肉像に近く理想的保存法と考えられた (Fig.2-b)。

(2) 保水性

超音波凍結牛肉試料よりプラズマ保存牛肉試料が低いのは、コントロールも連動しているところからも、保存期間の差で乾燥したためと考えられる (Fig.3)。

(3) 色調検査

黄色度でプラズマ保存牛肉試料が約 9% 低いのみで、大きな差は見られなかった (Fig.4)。

(4) 物性試験

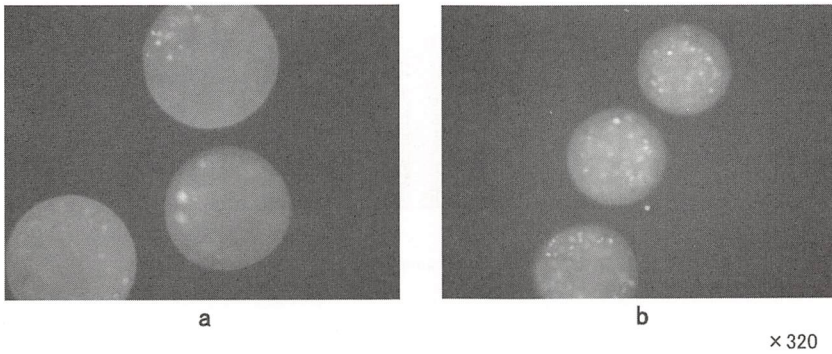


Fig.1 Fluorescence of the bovine embryos preserved for 3days at -5°C under the consecutive discharging plasma 7000V and 1000V (a) and 3000V (b).

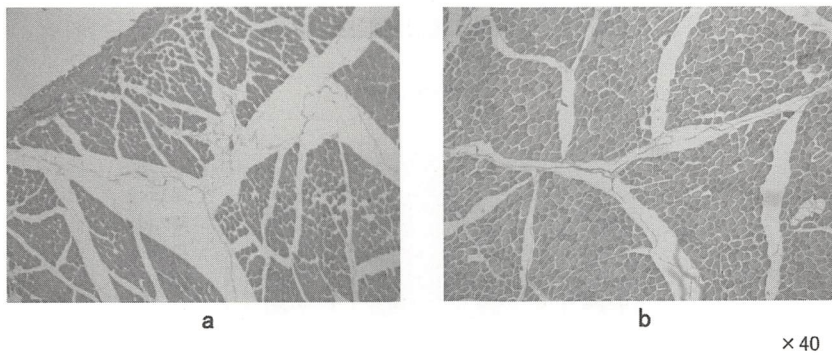


Fig.2 Microscopic feature of the bovine meat tissue followed by different preservation (a, Stored at -20°C with conventional method; b, Stored at -5°C with plasma preservation method).

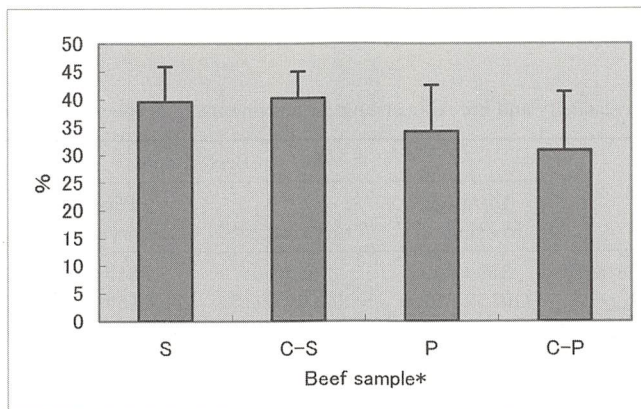


Fig.3 Changes in water holding capacity of bovine meat as affected by freezing.

*; Ultrasonic freezing sample (S), control (C-S), plasma preservation sample (P) and control (C-P).

プラズマ保存牛肉試料の弾性率は、超音波凍結牛肉試料より大きく、コントロールも同様傾向あり、保存期間の影響と考えられた。破断荷重は、超音

波凍結牛肉試料およびコントロールより小さいがバラツキが多かった。このバラツキは、保存庫内の冷気噴出し口からの距離および温度誤差設計の

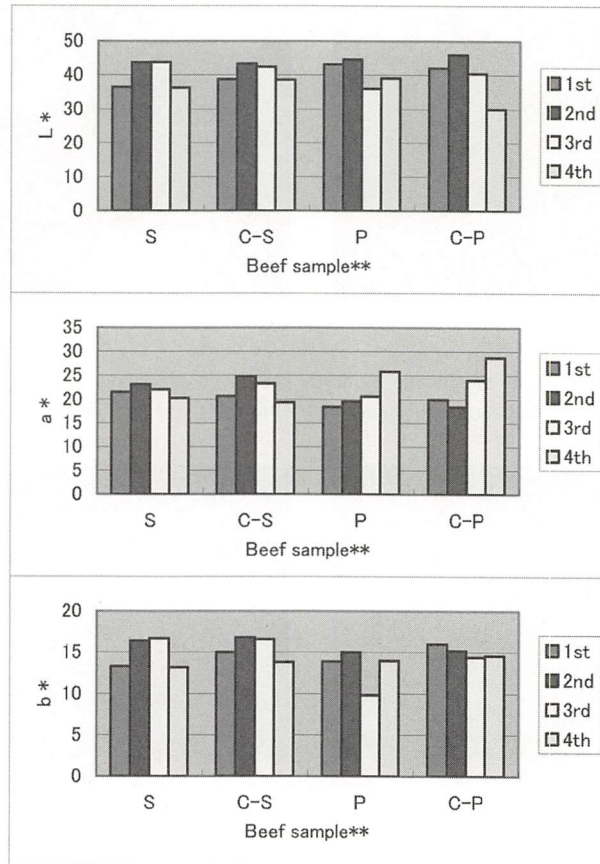


Fig.4 Changes in color measurements of bovine meat as affected by freezing.

** ; Ultrasonic freezing sample (S), control (C-S), plasma preservation sample (P) and control (C-P).

Table 1 Changes in elasticity and breaking strength of bovine meat as affected by freezing.

	Beef sample			
	Ultrasonic freezing (S)	Control (C-S)	Plasma preservation (P)	Control (C-P)
Elasticity ($\times 10^6$ dyne/cm ²)	3.59 \pm 2.19	2.65 \pm 1.04	11.84 \pm 8.16	17.19 \pm 11.13
Breaking strength (g)	1107.5 \pm 376.66	1021.0 \pm 392.53	1013.5 \pm 488.62	1362.0 \pm 547.91

Average \pm SD.

問題と考える (Table 1)。

4. 要 約

和牛肉の食感・風味を再現し得る保存法として、プラズマ保存法および超音波凍結法について、それぞれの保存肉の物性について調査した。最初に

それぞれの最適条件を知る方法として牛受精卵をそれぞれの方法で保存し、細胞破壊の最も少ない条件を求めたところ超音波凍結では、1W・46kHz、プラズマ保存では3000V・マイナス5℃が近似値と示唆された。次にこれらの条件で牛肉検査を行った。組織検査では普通凍結で見られる氷晶害像

が超音波凍結およびプラズマ保存像では認められず、生肉像に近く理想的保存法と考えられた。保水性・色調では、大きな問題差は無く、物性でプラズマ保存の牛肉がやや柔らかい傾向を示したがバラツキがあり例数を重ねる必要がある。実用化には、超音波では音響インピーダンスから0.1Wレベルの検証が必要と考えられた⁴⁾。プラズマ保存法では、マイナス3℃・3000Vが有望と考えられた。さらに、ドリップ・ロス〔解凍時と調理時における〕の測定と官能検査で実際の味覚を評価する必要があるが、テクスチャーとして有望な保存法と示唆されたことは収穫であった。

本研究を行うにあたり、ご助力いただいた神戸大学大学院山之上稔先生および検体の牛肉を提供して頂いた(株)森谷商店社長平井良幸氏に深謝申し上げます。

文 献

- 1) 白樫 了,日本機械学会誌55, 3, 21-23 (2001)
- 2) Grujic, R., Petrovic, L., Pikula, B. and Amidzic, L., Meat Science., 33, 301-318 (1993)
- 3) Petrovic, L., Grujic, R., and Petrovic, M., Meat Science., 33, 319-331 (1993)
- 4) 本多洋介,超音波ハンドブック〔第2版〕, 196-197〔株〕本多電子, 豊橋 (2008)

低温乳酸発酵を施した食肉の機能性評価に関する研究

Evaluation of the Functional Properties in Pork Meat Fermented by
Psychrotrophic Lactic Acid Bacteria

林 利 哉 ・ 芳 賀 聖 一

(名城大学農学部)

Toshiya Hayashi and Seiichi Haga

(Faculty of Agriculture, Meijo University)

Food functionality of model pork sausages fermented with psychrotrophic lactic acid bacteria was evaluated by analyzing protein degradation, inhibitory activity on angiotensin I-converting enzyme (ACE) and dipeptidyl peptidase (DPP) IV levels.

The concentration of water-soluble protein extracted from fermented meat was significantly lower than that extracted from non-fermented meat ($p < 0.05$). In contrast, peptide contents of the fermented meat significantly increased with fermentation at 4°C ($p < 0.05$). The sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis indicated that the band intensities of low molecular weight (<30kDa) proteins obtained from fermented model sausages were slightly stronger than those obtained from control sausages heated at 75°C. Thus, we believe that lactic acid fermentation may lead to degradation of myofibrillar proteins even under low temperature conditions.

Inhibitory effects of water-soluble protein fractions obtained from model sausages on ACE and DPP IV levels were assessed using *in vitro* assays. The fermented model sausages displayed higher ACE- and DPP IV-inhibiting activity than control sausages heated at 75°C ($p < 0.05$).

These results suggest that lactic acid fermentation under low temperature conditions may improve food functionality of meat products.

1. 目 的

一般に食肉は優れた栄養価や嗜好性を有する食品であると認識されている一方で、健康に対してはどちらかといえばマイナス面が強調され易い食品でもある。著者らはこれまで、伝統的食品加工技術である発酵を食肉加工に導入することにより、微生物学的的安全性に加え、色調や物性等をも改善し得ることを製品レベルやタンパク質を用いたモデル系で明らかにしてきた¹⁻³⁾。特に最近では、

低温下で増殖が可能な低温増殖性乳酸菌を用いて、乳酸発酵をより安全に食肉加工に導入するための基礎的検討を行っている。その成果として、塩漬豚肉に当研究室で保有する低温増殖性乳酸菌株を接種して、4°Cで低温発酵させることにより、筋原線維の小片化やタンパク質の分解が亢進することを既報において報告した⁴⁾。著者らはこのような肉中のタンパク質分解に伴う低分子ペプチドの増加は、呈味性だけでなく、種々の保健的機能を持った機能性ペプチドの生成も期待できるものと

考え、いくつかの機能性指標を用いて発酵食肉の機能性評価を行い、その中で、低温発酵により食肉中に骨芽細胞の成長を促す因子が派生する可能性を前報にて報告した⁵⁾。さらに他の機能として、血圧上昇抑制作用の指標としてよく知られるアンジオテンシンI変換酵素 (ACE) 阻害活性や、血糖値上昇抑制効果が期待されるジペプチジル・ペプチダーゼ (DPP) IVの阻害活性についても引き続き検討を行ってきた。

そこで本報では、既に発酵食肉用スターターとして確立されている市販の低温増殖性乳酸菌である*Lactobacillus sakei* D-1001,あるいは当研究室で保有している未同定低温乳酸菌株を接種し、低温発酵を施した食肉におけるタンパク質分解の程度と、ACEおよびDPPIV阻害活性について評価した結果を報告する。

2. 方法

2.1 試料調製

新鮮な市販豚モモ肉から、脂肪と結合組織をできるだけ取り除き、およそ3 cm角に整形した赤肉に、塩漬剤 (塩化ナトリウム; 2.0%, 亜硝酸ナトリウム; 0.02%, 硝酸カリウム; 0.05%, トリポリリン酸ナトリウム; 0.3%, アスコルビン酸ナトリウム; 0.05%) および2%グルコースを加え、サイレントカッターで60秒間細切した。次いで低温増殖性乳酸菌*Lactobacillus sakei* D-1001 (*Lb.* D-1001; サンエイ糖化株式会社), *Lactobacillus sakei* 類縁⁶⁾の未同定低温増殖性乳酸菌株 *Lb.* No. 3, *Lb.* No. 12および*Lb.* No.13をそれぞれ 10^6 log CFU/g meat になるように接種し、低温下 (4℃) にて5日間発酵させた。また、乳酸菌を接種せず、3日間塩漬したものを非発酵区 (対照区) とした。この時、低温発酵過程における乳酸菌数とpHを経日的に測定した。塩漬・発酵開始3日目に、発酵区、非発酵区のいずれもポリ塩化ビ

ニリデンケーシング (折り径4 cm) に充填し、発酵区についてはそのまま5日目まで発酵を継続した後、非発酵区は3日目に、湯温75℃ (中心温度が63℃に到達後、30分間保持) で加熱した。加熱後直ちに氷水中で30分間冷却した。

各塩漬・発酵試料をジエチルエーテルで脱脂後、6倍量の蒸留水中でホモジナイズし、遠心分離 (35,000×g, 15分, 4℃) して得られた上澄画分を水溶性タンパク質画分とした。この得られた水溶性画分を蒸留水に対して透析 (Spectro/porCE, M.W.: 500) し、凍結乾燥したものを機能性評価用試料とした (使用時に蒸留水に溶解)。

2.2 水溶性タンパク質およびペプチド量の測定

上記超遠心分離後の水溶性タンパク質画分 (遠心上清) のタンパク質濃度を、ビウレット法 (波長: 550 nm) により定量し、肉試料1 g当たりの水溶性タンパク質量を算出した。また、同水溶性タンパク質画分を用いて2%トリクロロ酢酸 (TCA) 可溶性画分を調製し、三上らの方法⁷⁾ に準じてペプチド量を測定した。

2.3 ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

上記の水溶性タンパク質画分のタンパク質分布をSDS-PAGE⁸⁾ (アクリルアミド濃度: 7.5~20%) により調べた。ゲルの染色はCoomassie Brilliant Blue R-250により行った。

2.4 アンジオテンシンI変換酵素 (ACE) およびジペプチジル・ペプチダーゼ (DPP) IV阻害活性

ACE阻害活性は、ACE (シグマ) と合成基質Hip-His-Leu (ペプチド研究所) を用い、CushmanとCheungの方法⁹⁾ に準じて測定した。すなわちACEと基質が反応した結果、遊離する馬尿酸を酢酸エチルで抽出し、その吸光度 (228 nm) を測定する方法である。DPPIV阻害活性は、DPPIV (シ

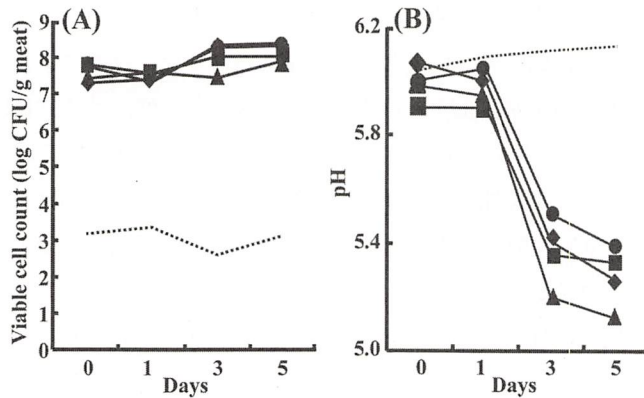


Fig.1 Changes in lactic bacterial counts (A) and pH (B) of cured meat during lactic acid fermentation at 4°C.

—, Non-fermented; ◆, *Lb.* D-1001; ●, *Lb.* No. 3; ■, *Lb.* No. 12; ▲, *Lb.* No. 13

グマ)と基質Gly-Pro-NA・p-tosylate (ペプチド研究所)を用い、Ikeharaらの方法¹⁰⁾を一部改変して測定した。すなわち、DPPIVと基質が反応した結果、遊離するp-NA量を分光光度計(波長:385 nm)で測定する方法である。

試料タンパク質濃度が0.5~5.0mg/mlの範囲で阻害活性を求め、両酵素活性を50%阻害するのに必要な試料タンパク質濃度(mg/ml)を算出した(IC₅₀値)。

3. 結果と考察

著者らが保有している16種類の低温増殖性乳酸菌株の中から、市販の*Lb.* D-1001, およびそれと類縁の*Lb.* No.3, *Lb.* No.12, *Lb.* No.13の計4菌株を選抜して使用した。これらの乳酸菌の塩漬豚肉中における低温下での生育挙動を調べたところ、*Lb.* No.13を除いて発酵日数の経過に伴い漸次増加し、発酵3日目には10⁸レベルに達していた。*Lb.* No.13については、発酵3日目から増加に転じ、発酵5日目には10⁸レベル付近まで達した(Fig.1-A)。pHについても、D-1001, *Lb.* No.3, *Lb.* No.12および*Lb.* No.13のいずれの乳酸菌を接種した場合も日数経過に伴って低下し、最終的にはpH6.0付近から、それぞれpH5.26, 5.39, 5.33および5.12まで低

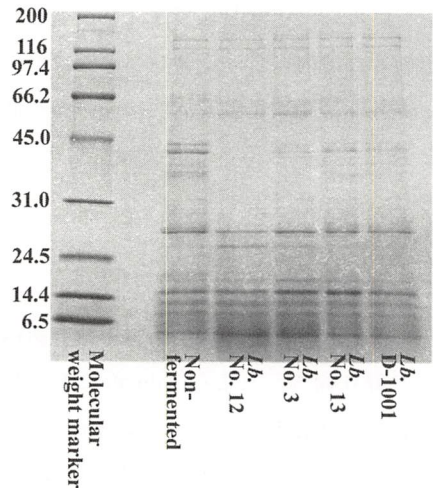


Fig.2 SDS-PAGE pattern of water-soluble protein fractions prepared from non-fermented and fermented model pork sausages using psychrotrophic lactic acid bacteria.

下した(Fig.1-B)。

食品中に内在する、あるいは加工等の処理によって派生してくるペプチド性機能性因子には水溶性のものが多く、従って次に、低温発酵による食肉中の水溶性タンパク質の分布変化をSDS-PAGEによって調べた(Fig.2)。その結果、乳酸菌を接種しない非発酵区では、40~45 kDa付近、25~30 kDa付近および15 kDa以下の領域に明瞭なバンドが観察されているのに対し、発酵区ではいずれの

乳酸菌を接種した場合も40~45 kDaと25~30 kDa付近のバンドが消失あるいは減少する様子が観察された。特に、*Lb.* No.3と*Lb.* No.12接種区においてそれが顕著であり、両発酵区とも26 kDa付近に新たなバンドが出現し、6.5 kDa以下のバンドの染色強度が強くなる様子がみられた。著者らは、低温乳酸発酵により、豚肉中のミオシン、アクチン、 α -アクチニンといった筋原線維タンパク質が分解されることを既に報告している³⁾。本実験でみられた水溶性画分のタンパク質分布変化から、低温発酵によって水溶性タンパク質も分解される可能性が示唆されたが、これには筋原線維タンパク質の分解産物も反映されている可能性も考えられる。

次に、低温発酵を施した食肉の水溶性画分を用いて、それに含まれるタンパク質量と、ペプチド量をそれぞれ測定した (Fig.3-A, B)。その結果、水溶性タンパク質量はいずれの乳酸菌を接種した場合も発酵によって有意に低下した ($p < 0.05$)。接種菌株による違いについては、*Lb.* No.3接種区の値が最も高く、*Lb.* No.12接種区の値が最も低かったが、いずれも有意な差ではなかった。一方のペプチド量の変化では、*Lb.* No.13接種区については、非発酵区の値と有意な差はみられなかったが、他の乳酸菌接種区については、いずれも有意なペプチド量の増加がみられた ($p < 0.05$)。特に、*Lb.* No.12接種区の値が最も高く、次いで*Lb.* No.3接種区が高いという結果となり、先のタンパク質分布変化ともおよそ対応がみられた。

そこで次に、様々な食品から、これまでに数多くの活性ペプチドが報告されている血圧上昇抑制の指標であるACE阻害活性^{11~16)}と、創薬分野で血糖値上昇抑制の新たなターゲットとして注目されているDPPIV阻害活性の*in vitro*評価系を用いて発酵食肉試料の機能性評価を行った。ACE阻害活性については、創薬はもちろん、機能性指標とし

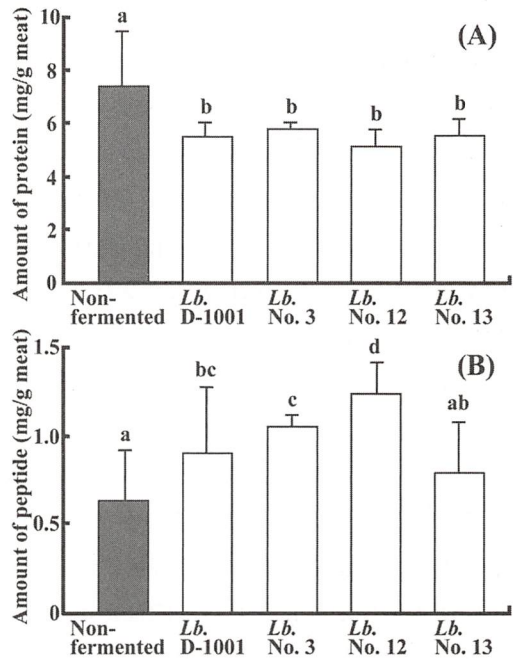


Fig.3 Effect of cold fermentation on the water-soluble protein (A) and peptide contents (B) in water-soluble fraction of model sausages.

Data represent the means \pm SD of at least four independent experiments.

Values with different superscript letters are significantly different ($p < 0.05$).

ても広く認知されている指標であるが、DPPIV阻害活性については、食品分野ではまだまだ検討されていない。DPPIVはインスリン分泌を増強する消化管ホルモンであるインクレチンを速やかに不活化する作用があり、これを阻害することによってII型糖尿病患者やその予備軍における糖代謝が改善されることが期待されている。食品においてはチーズの中に本酵素を阻害するペプチドが存在することが唯一報告されており¹⁷⁾、タンパク質分解が進む発酵食肉中にも本阻害活性が存在する可能性は十分考えられる。各種低温発酵試料を用いてACE阻害活性ならびにDPPIV阻害活性を測定したところ、すべての試料区において添加タンパク質濃度依存的に阻害活性が上昇したことから (data not shown), IC_{50} 値 (mg/ml) を算出し、その結果をFig.4にまとめた。ACEおよびDPPIV

阻害活性 (IC_{50} 値) のいずれにおいても、すべての乳酸菌接種区の値が非発酵区と比較して有意に低値を示し、発酵によって両阻害活性が上昇することが示唆された。中でも比較的ペプチド量が多かった *Lb.* No.3 と *Lb.* No.12 接種区の活性が高く、比較的ペプチド量の少ない *Lb.* No.13 接種区の活性が低かったことから、両活性ともタンパク質分解の程度とおおむね対応がみられた。特に DPPIV 阻害活性における乳酸菌接種区間の差異は明瞭かつ有意であった。

以上より、低温増殖性乳酸菌を用いて食肉を低温発酵させることにより、食肉中のタンパク質分解が亢進し、それに伴い ACE 阻害活性ならびに DPPIV 阻害活性が強化される可能性が示唆された。特に、食肉における DPPIV 阻害活性の存在を示した研究はまだ例がなく、より確かなものにするために今後さらに詳細な検討が必要である。今後は、活性本体の特定や発酵によるタンパク質分解のメカニズムを解明するとともに、総合的に高品質な発酵食肉製品の開発を目指して、嗜好面の検討も引き続き行っていきたい。

4. 要 約

低温増殖性乳酸菌 *Lactobacillus sakei* D-1001 (*Lb.* D1001)、あるいはこれと類縁の3種類の未同定乳酸菌 (*Lb.* No. 3, 12 および 13) を接種し低温下で発酵させたモデル豚肉ソーセージにおける機能性発現の有無について、水溶性タンパク質およびペプチド量の分析、ならびにアンジオテンシン I 変換酵素 (ACE) とジペプチジル・ペプチダーゼ (DPP) IV の阻害活性を指標に検討を行った。

その結果、低温発酵処理により、いずれの乳酸菌株を接種した場合もモデルソーセージの水溶性画分におけるタンパク質量が有意に減少し、ペプチド量は増加した。低温発酵による水溶性タンパク質の分布変化からも、タンパク質が分解してい

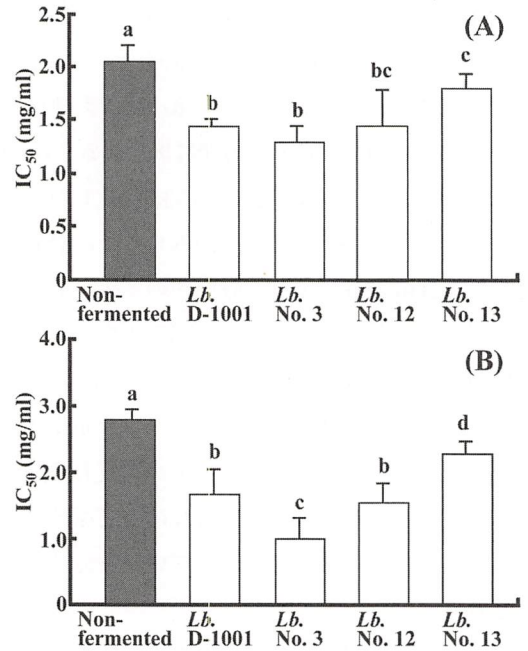


Fig.4 Inhibitory effect of water-soluble protein fractions from non-fermented and fermented model pork sausages on angiotensin I-converting enzyme (A) and dipeptidyl peptidase IV (B) activity.

Data represent the means \pm SD of at least four independent experiments.

Values with different superscript letters are significantly different ($p < 0.05$).

る様子が確認された。

各試料から抽出した水溶性タンパク質画分における ACE と DPPIV 阻害活性を調べたところ、両活性とも、いずれの乳酸菌株を接種した場合も低温発酵による有意な活性の上昇がみられ ($p < 0.05$)、その程度はタンパク質分解の程度とおおむね対応がみられた。

本研究の遂行にあたり、助成いただきました財団法人伊藤記念財団に心より感謝申し上げます。また、乳酸菌をご提供いただいたサンエイ糖化株式会社へ深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) 芳賀聖一, ミートジャーナル, 36 (1), 107-113

- (1999)
- 2) 寺本華奈江・朱 政治・林 利哉・芳賀聖一, *New Food Industry*, 44 (4), 25-32 (2002)
 - 3) 芳賀聖一・林 利哉・大場正春・坂田亮一, 名城大学総合研究所 総合学術研究論文集, 8, 91-96 (2009)
 - 4) 林 利哉・和栗伸伍・小川幸彦・芳賀聖一, 食肉に関する助成研究調査成果報告書 (伊藤記念財団), 26, 44-49 (2008)
 - 5) 林 利哉・鷺尾修一・小川幸彦・芳賀聖一, 食肉に関する助成研究調査成果報告書 (伊藤記念財団), 27, 68-73 (2009)
 - 6) 寺本華奈江・佐藤浩昭・孫 麗偉・鳥村政基・田尾博明・和栗伸伍・林 利哉・芳賀聖一, *分析化学*, 56 (12), 1063-1070 (2007)
 - 7) 三上正幸・長尾真理・関川三男・三浦弘之, *日本畜産学会報*, 66, 630-638 (1995)
 - 8) Laemmli, U. K., *Nature*, 227, 680-685 (1970)
 - 9) Cushman, D.W. and Cheung, H. S., *Biochem. Pharm.*, 20, 1637-1648 (1971)
 - 10) Ikehara, Y., Ogata, S. and Misumi, Y., *Methods In Emzymology*, 244, pp. 215-227, Academic Press, New York (1993)
 - 11) Okamoto, A., Hanagata, H., Matsumoto, E., Kawamura, Y. and Koizumi, Y., *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59, 1147-1149 (1995)
 - 12) 齋藤忠夫・中村友美・伊藤敏敏, *畜産の研究*, 54 (8), 889-894 (2000)
 - 13) Arihara, K., Nakashima, Y., Mukai, T., Ishikawa, S. and Itoh, M., *Meat Sci.*, 57, 319-324 (2001)
 - 14) Katayama, K., Tomatsu, M., Fuchu, H., Sugiyama, M., Kawahara, S., Yamauchi, K., Kawamura, Y. and Muguruma, M., *Anim. Sci. J.*, 74, 53-58 (2003)
 - 15) Saiga, A., Okumura, T., Makihara, M., Katsuda, S., Morimatsu, F. and Nishimura, T., *J. Agric. Food Chem.*, 54, 942-945 (2006)
 - 16) Hayashi, T., Kato, K. and Haga, S., *J. Res. Inst. Meijo Univ.*, 7, 71-80 (2008)
 - 17) 冠木敏秀, *Milk Science*, 55 (3), 157-160 (2007)

伝統的魚肉加工手法の食肉加工への応用

Application of Traditional Fish Processing Technique to Meat Processing

岩田 淑子 ・ 宇多川 隆

(福井県立大学生物資源学部)

Toshiko Iwata and Takashi Utagawa

(Department of Bioscience, Fukui Prefectural University)

“Heshiko” is a traditional Japanese fermented fish product made from mackerel, and is produced in the coastal areas of the Sea of Japan, particularly in Fukui prefecture. There are many heshiko manufacturers in Fukui, and some of them have production history of over 100 years. It is said that heshiko has been produced since the middle of the Edo period. The production process is simple yet highly skilled. First, the mackerel is gutted, rinsed with water to remove blood and then pickled in salt from one to two weeks at room temperature. Next, the salt-pickled mackerel is removed from the salt, and rinsed with a brine and then placed in a barrel with rice bran. The mackerel is pickled in the rice bran for six to 12 months at room temperature. During this fermentation period, the pH of the bran decrease to around 5.5 due to the growth of acid-forming bacteria. The heshiko production process is a unique protein preservation method and may be applied to preserve certain other protein foodstuffs, such as meat.

In this study, we applied the heshiko production technique to pork and beef, and found that new ham-like foods can be produced in the rice bran.

1. 目 的

福井県の伝統的発酵食品である「へしこ」は、サバを塩漬けにしたのちに米糠をまぶし、6-12カ月間漬け込んだものである。その間に発酵が進み、独特の風味を有する魚加工食品が仕上がる。本手法によるサバの加工は、江戸時代に始まるといわれており、福井県を中心とする北陸地方の魚の保存技術として伝統的に伝えられてきた。

我々は、本技術はタンパク質を加工し保存するユニークな方法であると理解し、本法を魚類以外のタンパク系食品である食肉等に展開し、新しいタイプの食肉加工食品を生産することを目的に研

究を行った。

このようにして出来た新しい食肉加工食品の豚肉由来のものを「へしこハム」、牛肉由来のものを「へしこぎゅう」と呼ぶことにする。

2. 材料と方法

2.1 材 料

牛肉および豚肉のもも肉を仕入れ、500gから2kgまでの大きさのブロックを調製した。食塩は市販の海水塩（並塩、鳴門塩業(株)製）を購入し使用した。糠は福井県の米糠を市場にて購入し使用した。

食肉を塩漬けおよび発酵させる樽は、漬物用に

市販されている15Lから30Lのプラスチック製の容器を用いた。重石は市販されている、2～5kgのものを組み合わせて使用した。

2.2 加工

(1) 塩漬け

各肉のブロックに食塩を刷り込み、プラスチック容器に肉を重ねるように仕込み、上蓋を乗せ、上から肉重量とほぼ同じ重量の重石を乗せて室温に置いた。

漬け込み時間は、各ブロックの大きさによって異なり、肉1kg当たり1日を目標とした。

(2) 糠仕込み

塩漬け後、肉を取り出し、肉に付着している塩を十分に落とす。プラスチック容器にポリエチレンの袋を入れ、底に糠を敷き、その上に糠を刷り込むようにしてまぶした肉を乗せ、肉と肉の間に糠の層を作るようにして重ねていった。最後に、糠を上部に重ね、空気を追い出すようにして抑え、ポリエチレン袋の上部を縛った。その上に落とし蓋を乗せ、肉とほぼ同重量の重石を乗せて室温にて3～6カ月間発酵させた (Fig.1)。

2.3 分析

発酵前および3カ月、6カ月後に肉を取り出し、各々肉片を粉碎後、水を添加し混合した後、混合液を遠心分離する。その上清を精密ろ過した後、アミノ酸アナライザーにて水に遊離するアミノ酸を分析した。なお、これらの操作は日本食品機能分析研究所 (福岡市) に依頼した。

糠のpHは、糠を等量の水に懸濁し、肉のpHは肉片を粉碎後等量の水に懸濁してpH計 (堀場製作所) にて計測した。

2.4 味覚評価

発酵6カ月经過した肉を取り出しスライスにした後、学生のボランティアにより味覚評価を行った。



Fig.1 Fermentation vessel

3. 結果および考察

3.1 遊離アミノ酸量

発酵前および3カ月、6カ月後に肉を取り出し、前記の方法にて水に遊離してくるアミノ酸を分析した。

1) 遊離アミノ酸総量

Fig.2に遊離アミノ酸総量の変化を示した。遊離してくるアミノ酸は経時的に増加傾向が認められるが、へしこハムにおいては、3カ月をピークにそれ以後は増加しなかった。へしこぎゅうに関しては、3カ月以後も継続的に増加を認め、6カ月後には100g当たりの遊離アミノ酸総量は1.8gに達した。

2) 遊離アミノ酸組成

Fig.3にへしこぎゅう、Fig.4にへしこハムの経時的に遊離してくる各種のアミノ酸組成分析結果を示した。へしこハム、へしこぎゅうそれぞれ特徴ある組成変化を示している。

(1) グルタミン酸

Fig.3, Fig.4に示したとおり、遊離してくるアミノ酸の中でグルタミン酸量は他のアミノ酸よりも最も多かった。牛肉の場合は6カ月にわたって継続的に増加したが、豚肉の場合は3カ月でピークに達し、それ以後の増加は認められなかった。グルタミン酸はうま味アミノ酸として知られてお

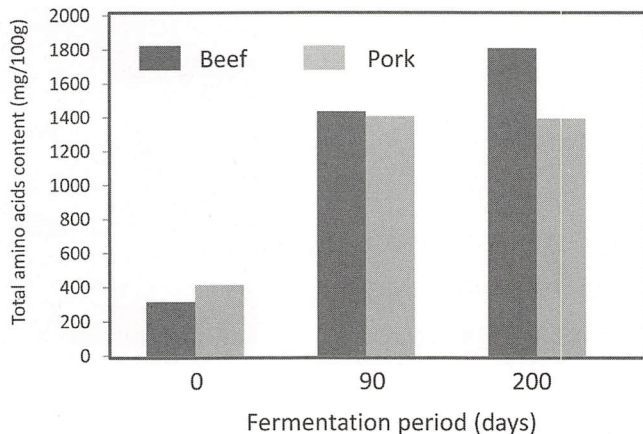


Fig.2 Changes in total water soluble amino acids content during the fermentation.

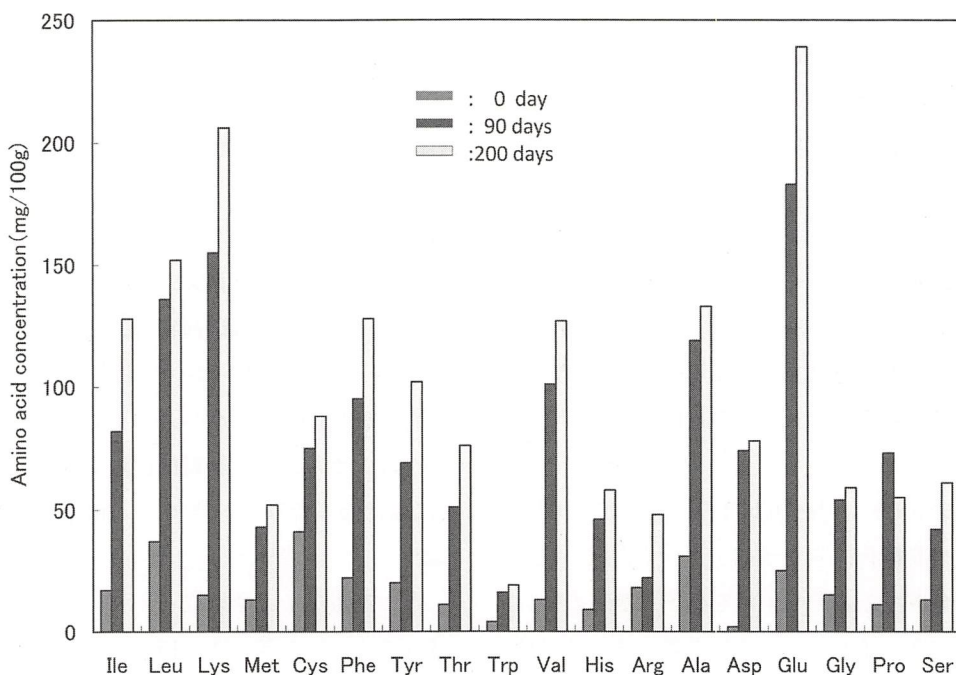


Fig.3 Changes in water soluble amino acids content during the beef fermentation.

り、豚肉よりも牛肉の方が多く含まれていることが分かった。へしこハム、へしこぎゅうの呈味性にはグルタミン酸が大きく影響していると考えられるが、次項に示した味覚評価結果をみると、へしこハムが旨いと評価されている。肉のうま味はグルタミン酸だけではなく、様々なアミノ酸類が影響していることが示唆されている。

うま味に影響を与える、イノシン酸、グアニル

酸についてはほとんど検出することができなかった。

(2) アラニン

アミノ酸分析結果でユニークな挙動を示したのがアラニンである。

Fig.4に示すように、へしこハムの遊離アラニン量は塩漬けした直後において、圧倒的に他のアミノ酸よりも多く含まれていたが、経時的にアラ

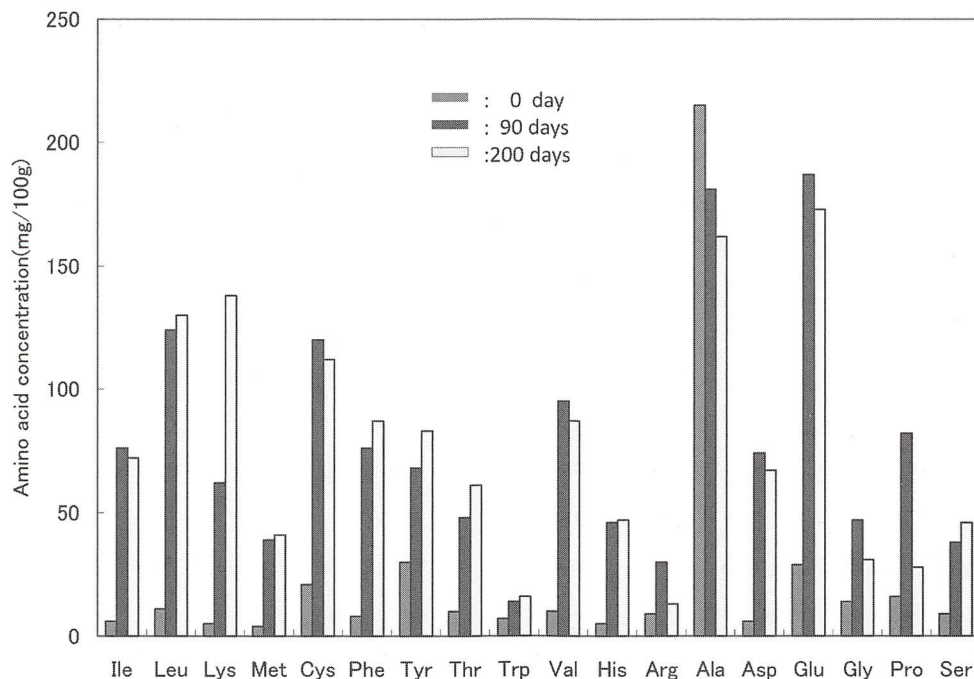
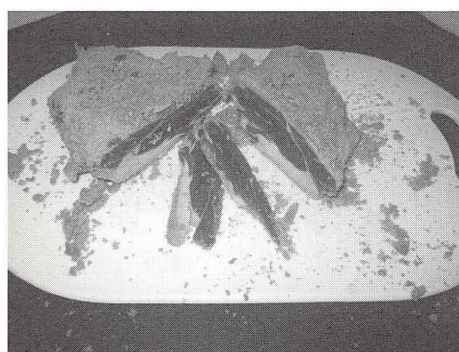
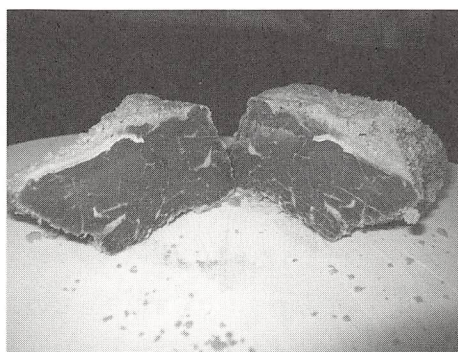


Fig.4 Changes in water soluble amino acids content during the pork fermentation.



Fermented pork covered with rice bran



Fermented beef covered with rice bran

Fig.5 Fermented pork and beef after 200 days fermentation

ニン量が低下した。一方、へしこぎゅうの場合は他のアミノ酸同様に経時的に増加した。アラニンの挙動は、へしこハム特有の現象と思われる。アラニンは甘みを呈するアミノ酸であり、へしこハムの味に大きく影響していると考えられる。

3.2 味覚評価

約6カ月漬け込んだへしこハム、へしこぎゅうを樽から取り出し (Fig.5), 糠を水で洗い流し、

薄くスライス後、20代の学生を中心とする41名を対象として官能試験を行った。へしこハムやへしこぎゅうは市販の生ハムやビーフジャーキー様の色彩を示していた。へしこハムおよびへしこぎゅうのpHは共に5.3付近であり、糠のpHは5.9~6.1であった。

(1) 嗜好性

へしこハムは、若干の糠風味を有しているが、

市販のハムに近い味を呈した。へしこぎゅうは、ビーフジャーキーを柔らかくした触感と味を呈した。

味覚評価で、へしこぎゅうとへしこハムのどちらかを選択させると、70%の学生はへしこハムを選んでいる。へしこハムが好きと答えた学生は93%であったが、へしこぎゅうが好きと答えた学生は68%であった。

性別に見ると、男性の方が、へしこぎゅうを嫌う傾向が強く、女性に関しては、へしこぎゅうとへしこハムへの好みはほぼ同じ割合であった。また、風味に関して、へしこぎゅうに独特の風味がすると答えた人はほぼ全員であり、へしこぎゅうの風味を嫌うコメントが多かった。

65%以上の学生が、へしこハム、へしこぎゅう共に塩味が強いと答えており、減塩のための取り組みが望まれる。

(2) 調理法提案

また今回のアンケートからそれぞれ、へしこハムとへしこぎゅうに似合う料理、また感想等求めたところ、以下の様な回答が得られた。

へしこハム

ピザ(アンチョビのような利用)、スパゲッティのソース、クリームでもオイルでもアンチョビのような使い方、サンドイッチにチーズと一緒に、サラダ、ポテトサラダ、生春巻き、卵焼き、カルボナーラ、キャベツと一緒に煮込むor炒める、生ハムメロン、炒飯、どんぶり、お茶漬け、イタリア料理等、にぎり、おにぎり、クリーム+リッツ、ベーコンやハムの代わりに。

へしこぎゅう

サラダドレッシングに入れる。ワインと一緒につまむ。クリームチーズと合わせてバケットにのせる、まぜごはん、たまごかけご飯の上にのせ、ねぎとごまをふって食べる、そのままがベスト、鍋、串物にして焼いたりする、ゴーヤチャンプ

ルー、コンソメスープに入れる、ご飯とビールがほしい、パスタ、菜の花とあえる、お茶漬け、ふりかけ、サンドイッチ、薫製、卵焼き、大根おろしを添えて、かぶにはさむ、にぎり、おにぎり、ラーメン、サラダ、シーザーサラダ、クリーム+リッツ、乾燥してジャーキー(ふりかけに)、ピラフ。

(3) 食後の感想

- ・少量を調味料のようにして使うのが良いと思う。
- ・へしこ独特の香りがしてどちらも美味しかった。
- ・へしこハムもへしこぎゅうも美味しく仕上がっている。
- ・へしこぎゅうは塩辛いので単独で食べるならへしこハムだと思う
- ・酒のつまみにちょうどいい
- ・くさみを変えてほしい、くさみが気になる
- ・へしこぎゅうはスパイスと組み合わせるといいと思う。
- ・ブルーチーズのようでアルコールとの相性も良さそう
- ・焼くとどうなるのか。
- ・へしこぎゅうの匂いが強く感じた。

4. 要 約

福井県を中心に、サバ等の魚類の保存方法として伝統的に伝えられているへしこ発酵技術を、牛肉と豚肉に展開した。へしこ生産工程では、塩漬けと糠漬けの2つの工程からなる。最初の塩漬け工程をサバ等の魚類と同じ条件(1週間から2週間)に合わせた場合に得られるへしこハムやへしこぎゅうは塩味が強すぎて、そのままでは食することが出来なかった。種々検討の結果、食肉1kg当たり1日の塩漬けを目途とすることが好ましいことが分かった。しかしながら、味覚評価におい

ではまだ塩味が強いとの評価もあり、塩漬けの条件については更に検討する必要がある。

次の糠漬け工程は嫌気的な条件を保ち、経時的に肉片のアミノ酸分析を行うことによって味覚成分の変化を追跡した。遊離アミノ酸の変化は、豚肉と牛肉では挙動が異なっていた。**Fig.3, 4**が示すように、牛肉は3カ月以後もアミノ酸の増加が認められたが、豚肉は3カ月以後のアミノ酸の増加は認められなかった。この両者の挙動の違いについての解析は、今後検討される必要がある。

発酵6カ月後に樽から取り出し味覚評価を行っ

た。**Fig.3, 4**が示すように、へしこハムとへしこぎゅうの間でアミノ酸組成の違いが明確であり、これらの組成の差が、味の差に大きく影響していると考えられる。

今後、塩漬け、糠漬け条件を更に検討し、嗜好性を向上させる為の工夫の余地はあるが、北陸に古くから伝わる伝統的魚類発酵手法を食肉に展開し、新しいタイプの食肉加工食品生産の可能性を示すことができた。

食肉由来機能性成分クレアチンによる 脳機能の維持・改善に関する研究

The Study of Maintenance and Improvement for Brain Function with Creatine

鬼澤直樹・*豊田淳

(東京農工大学大学院連合農学研究科, *茨城大学農学部)

Naoki Onizawa and *Atsushi Toyoda

(United Graduate School of Agricultural Science, Tokyo University of Agriculture and Technology and
*College of Agriculture, Ibaraki University)

Creatine is a nitrogenous organic acid that occurs naturally in vertebrates and helps to supply energy to muscle. Creatine is synthesized from three amino acids: glycine, L-arginine and S-adenosylmethionine, and used widely for energy supplements for athletes. Effects of oral administration of creatine on the peripheral tissues have been widely investigated, while the studies of its function in brain and behavior have been limited. We have investigated the functions of creatine in the brain. Recently, we discovered that the oral administration of creatine induces feeding behaviors in rat, although the mechanism was unclear. Because hypothalamus regulates feeding behaviors using various neuropeptides including orectic peptide, orexin, we examined the effect of creatine administration on orexin expression in hypothalamus and other brain regions in this study. We observed that oral administration of creatine decreased orexin concentration in whole brain.

1. 目的

クレアチンは食肉に多く含まれており、グリシン、アルギニン、S-アデノシルメチオニンから合成される物質である。クレアチンは合成されたのち、細胞内でクレアチンキナーゼによりリン酸化されクレアチンリン酸になり、ATPの再合成に関与する。それゆえ、多くの一流運動選手が運動能力向上のためにクレアチンをサプリメントとして活用している。また、ヒトがクレアチンを摂取することで、精神疲労の軽減が報告されている¹⁾。神経系におけるクレアチンの作用部位のひとつとしてGABA受容体があるが²⁾、クレアチンがGABA受容体を活性化することにより抗ストレス

や抗不安作用を示す可能性が示唆されている³⁾。さらに、クレアチンの経口摂取により、クレアチンの脳内濃度は上昇し、脳機能の調節に関与する可能性が示唆されている。

私どもは、クレアチンの経口投与、中枢投与で摂食が促進することを発見し、そのメカニズムの研究を行っているが、これらの研究はストレスなどで起こる食欲不振 (Anorexia) などの改善に資するものと考えられる。摂食行動は、視床下部におけるニューロペプチドYやオレキシン、メラニン凝集ホルモンなどの摂食ペプチドの発現調節と、末梢組織からのレプチンやグレリンなどの因子の情報統合され、制御されている。私どもは、平成20年度の貴財団助成によって、クレアチンが視

床下部摂食中枢のニューロンを活性化することを明らかにした⁴⁾。近年、オレキシンやグレリンにより不安様行動やうつ様行動が抑制されることが示され、摂食ペプチドと精神疾患の関連が示唆されている^{5,6)}。従って、摂食促進ペプチドを食事により効果的に増加させ得るかを検証することで、ストレス社会に対応した食品開発のための基礎的知見を得ることが期待される。そこで本研究では、視床下部におけるクレアチンの摂食促進の分子メカニズムに焦点を当て、クレアチンが視床下部の摂食関連ペプチドであるオレキシンの発現に与える影響を解析することを目的とした。

2. 方法

2.1 実験動物

7週齢ウイスター系オスラット（紀和実験動物、和歌山）18頭を実験に用いた。1週間、市販飼料（MF；オリエンタル酵母工業）を給与して、個別ケージに収容して単飼にて予備飼育した後、実験に供した。水と飼料は自由摂取とし、室温23℃±1℃、12時間の明暗サイクル（明期：07:00-19:00）の環境下で飼育した。試験区にはクレアチンを蒸留水に1%（w/v）で溶解したものを、対照区には蒸留水をそれぞれ自由飲水として10日間給与した。なお、実験はすべて茨城大学農学部実験動物委員会規則に沿って行った。

2.2 脳組織の採取

給与期間終了後、ジエチルエーテルにより麻酔し、頸椎脱臼によりと殺した後、直ちに全脳を採取した。全脳は氷冷したシャーレ上で小脳と橋・延髄を除去および各脳部位（大脳皮質、海馬、視床下部、小脳、橋・延髄）に切り分け、それぞれオレキシンの定量に供試した。また、免疫組織化学的解析には全脳を供試した。全脳の採取は、クレアチンによる摂食量の増加がみられる明期（10:00-14:00）に行った。

2.3 ELISAによるオレキシンの定量

サンプルに対し、5倍量の1% Trifluoroacetic acid, 2 μg/ml Aprotininを入れ、超音波破碎した。破碎液を遠心処理（12,000g, 20min, 4℃）した後、上清を回収し、48時間凍結乾燥した。この残渣を3 mlのEIA kit（Phoenix Pharmaceutical Inc.）に付属の緩衝液で再溶解し、そのうち50 μlを採取しオレキシン濃度測定に、100 μlを採取しBradford法によるタンパク質の定量にそれぞれ供試した。オレキシンの定量は小脳と橋・延髄を除いた全脳はOrexin EIA kit（Phoenix Pharmaceutical Inc.）を、脳各部位（大脳皮質、海馬、視床下部、小脳、橋・延髄）はOrexin Fluorecence EIA kit（Phoenix Pharmaceutical Inc.）をそれぞれ用い、付属のプロトコルに従って行った。

2.4 免疫組織化学的解析

全脳を採取後、直ちに4%パラホルムアルデヒドにて固定した。固定後、20%スクロース溶液にて置換し、包埋した。クリオスタット（ライカ）を用いて厚さ20 μmの凍結切片を作成した。抗オレキシン抗体（Santa Cruz）を用いて免疫染色を行い、DAPIにより対比染色を行った。

3. 結果と考察

3.1 脳内オレキシン含量

オレキシンは視床下部外側野のニューロンで産生される。脳内の広い領域に投射されたオレキシンニューロンを介して、摂食だけではなく覚醒など様々な機能を担う。本研究ではクレアチン給与と脳内オレキシンの関係に着目した。クレアチンを10日間経口投与させた際に、小脳と橋・延髄を除くクレアチンの脳内濃度は有意に減少した（Fig.1）。そこで、クレアチンによる脳内オレキシン濃度の低下が脳のどの部位で起こっているか調べることにした。脳を5つの部位（大脳皮質、海馬、視床下部、小脳、橋・延髄）に分け、オレ

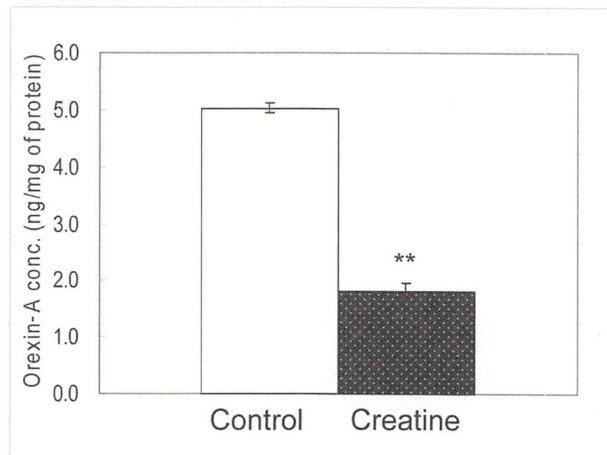


Fig.1 Effect of creatine administration on rat brain orexin A concentration for 10 days. Values are means \pm S.E. control (\square) (n=3) v.s. treated group (\blacksquare) (n=4). Significant difference ($P < 0.01$) was observed between two groups.

Table 1 Effect of oral creatine administration on brain orexin level in rats.

	Test group		P value
	Control (pg/ml)	Creatine (pg/ml)	
Cortex	12.81 \pm 5.92	3.87 \pm 1.02	0.275
Hippocampus	31.45 \pm 14.12	7.70 \pm 1.38	0.236
Hypothalamus	85.06 \pm 50.07	11.90 \pm 3.53	0.282
Cerebellum	27.25 \pm 22.32	ND	0.348
Pons & Medulla	46.46 \pm 23.85	4.10 \pm 0.66	0.209

Values are means \pm S.E. for 3 animals in each group.

キシンの定量を行った。その結果、統計的な有意差は認められないものの、いずれの脳部位においてもクレアチン投与によりオレキシン濃度が減少する傾向がみられた (Table 1)。Table 1から、対照区のオレキシンの濃度は個体間でばらつくことも明らかになった。オレキシン濃度のばらつきを考慮すると、実験例数をさらに重ねることが必要であるが、クレアチン投与による脳全体のオレキシン濃度の減少は、視床下部オレキシン産生量の減少が原因である可能性が示唆された。

3.2 オレキシン陽性細胞

クレアチン投与によるオレキシンの減少について免疫組織学的に解析を行った。その結果、クレアチン投与により、視床下部における陽性細胞数

は変化がなかった (Table 2)。クレアチン投与によって視床下部オレキシン産生細胞が減少しているわけではなく、オレキシンの発現量自体が減少していることが示唆された。

3.3 クレアチンと視床下部オレキシンの役割

オレキシンは摂食中枢として知られていた視床下部外側野 (LHA) とその周辺の特定のニューロンに発現している。オレキシンA およびB を脳室内に投与すると、ラットの摂食量は容量依存的に増加する。また、絶食したラットではオレキシン mRNA の発現が上昇する。これらのことから、オレキシンは生理的に摂食行動を制御していると考えられている。オレキシンを投与したマウスでは、摂食行動とともに、探索行動や自発運動量の

Table 2 Effect of oral creatine administration on brain orexin immunoreactive cells in hypothalamus.

	Test group		
	Control (number)	Creatine (number)	P value
cell number	152 ± 28.7	145 ± 3.79	0.831

Values are means ± S.E. for 3 animals.

更進がみられ、オレキシンはかなり複雑な生理作用をもっていることが示唆される。また、オレキシン産生細胞が、レプチンと血糖値によって制御されることが明らかとなり、オレキシン神経は、動物の栄養状態をモニターしつつ、覚醒レベルを制御する物質であると考えられている⁷⁾。

本研究において観察されたオレキシンの減少は明期（休息期）に観察されたものであり、以前私どもが見出した明期における摂食量の増加を合わせて考えると、摂食量の増加に引き続きオレキシンの減少が引き起こされたものと考えられる。この経時的なオレキシンの発現変化は今後の課題である。

クレアチン含量の分布をみてもその大部分は末梢組織に集中しており、エネルギー貯蔵物質として機能し、エネルギーの緩衝作用を持つといわれている。クレアチンをラットに経口投与すると末梢組織においてグルコース輸送体 4 (glucose transporter: GLUT 4) の発現を増加させることが報告されており⁸⁾、クレアチンは末梢組織における糖代謝を改善させることが示唆されている。私どもはクレアチンの中枢投与が摂食量の増加を引き起こすことを報告しており⁴⁾、また、クレアチンの経口投与は末梢での糖代謝の変化も引き起こすことから、クレアチンによる摂食促進作用は末梢および中枢組織の複合的なによるものでないかと推察される。一方で、エネルギー要求量の高い脳においてもクレアチンは重要なエネルギー供給物質であるが、中枢における代謝制御とクレアチンの関連は不明である。それゆえ、今後

はクレアチン投与が暗期（活動期）におけるオレキシン発現に及ぼす影響を調査するとともに、オレキシンが関わる高次機能・情動へのクレアチンの影響を解析する必要があると考える。これらの研究によりクレアチンと摂食や睡眠に関する新発見が生れる可能性がある。

4. 要 約

クレアチンの摂取によって摂食量が増加することが示唆されているが、作用機序については不明である。そこで、脳におけるクレアチンと摂食行動の関連について検討した。クレアチンの経口投与により脳内オレキシン濃度の減少が認められ、また、視床下部におけるオレキシン量も減少する傾向が認められた。以上より、クレアチン投与によるオレキシンの減少は視床下部におけるオレキシンの産生量の低下が原因と考えられた。この現象は摂食量の増加した明期に観察されたため、クレアチンによる摂食量の増加に引き続きオレキシンの減少が起こったと考えられた。今後はクレアチンが活動期におけるオレキシン濃度に及ぼす影響を調査するとともに、オレキシンが関与する高次機能・情動への影響も調査する必要がある。

文 献

- 1) Watanabe A, Kato N, Kato T. *Neurosci. Res.* 42: 279-85 (2002).
- 2) Neu A, Neuhoff H, Trube G, Fehr S, Ullrich K, Roeper J, Isbrandt D. *Neurobiol Dis.* 11: 298-307. (2002).
- 3) Koga Y, Takahashi H, Oikawa D, Tachibana T, Denbow DM, Furuse M. *Neuroscience.* 65-71 (2005).

- 4) 鬼澤直樹, 豊田 淳. 平成20年度食肉に関する助成研究調査報告書. 27. 伊藤記念財団 (2008).
- 5) Lutter M, Sakata I, Osborne-Lawrence S, Rovinsky SA, Anderson JG, Jung S, Birnbaum S, Yanagisawa M, Elmquist JK, Nestler EJ, Zigman JM. *Nat Neurosci*. 11. 752-753 (2008).
- 6) Lutter M, Krishnan V, Russo SJ, Jung S, McClung CA, Nestler EJ. *J Neurosci*. 28(12). 3071-3075 (2008).
- 7) Yamanaka A, Beuckmann CT, Willie JT, Hara J, Tsujino N, Mieda M, Tominaga M, Yagami K, Sugiyama F, Goto K, Yanagisawa M, Sakurai T. *Neuron*. 38 (5) 701-713. (2003).
- 8) Ju J.S., Smith J.L., Oppelt P.J., Fisher J.S. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 288 (2). E347-52 (2005).

ブタ臓器輸送の鮮度保持に関する工夫

—異種移植モデルとしてのブタ膵臓器を用いて—

Technical Improvement of Organ Transportation to Keep the Better
Viability of Pig Pancreas

小 玉 正 太 (福岡大学医学部再生・移植医学)

Shohta Kodama

(Department of Regenerative Medicine & Transplantation, Faculty of Medicine, Fukuoka University)

We are now in an obstructive situation that has been filled to the waiting recipients for donor in clinical transplantation. To break through the insufficient number of donors, xenotransplantation might be a second choice for human. Swine would be a strong candidate for human organs such as liver, kidney and pancreas however severe xeno-rejection might be caused by complements and etc..

As the other aspect for transplantation, the organ preservation is critical for engraftment after the organ replacement. To keep the better viability during in exposing to cold ischemia, a unique approach has been done in this proposal. Micro-charging system that was developed in Santetsu Engineering called DePak, had dramatically reduced apoptotic gene regulation using real-time PCR array in our previous experiments.

In this report, we demonstrate that micro-charged pancreas has kept the better viability using BrdU uptake but not TUNEL assay in exocrine cells. Unexpectedly, endocrine cells have decreased number of TUNEL positive cells that were caused by down-regulation for Caspase signaling although there were no critical differences in BrdU uptake.

In conclusion, the micro-charging system has the advantage of anti-apoptosis effect to compare with conventional method for organ preservation during cold ischemia.

1. 目 的

日本の移植医療はドナー不足の現状から、移植待機患者に十分な移植臓器を提供できず、閉塞的な状況を迎えている。それを打開する案として、移植臓器にヒト以外の種を用いる異種移植が挙げられる。ブタは肝臓器をはじめ、膵臓を移植に用いる異種移植モデルとして、早くから注目されてきた動物である。ただ異種臓器移植においては、異種抗原や補体活性により惹起される、拒絶反応を制御することが難しく、臓器移植での臨床応用

には至っていない。また異種移植では特に膵臓移植で、膵臓器から膵島細胞を選択的に単離して移植を行う、膵島移植に期待が向けられている。膵島移植はインスリンを分泌する、インスリン産生細胞を選択的に移植する細胞移植である。その為様々な免疫修飾を加え易く、異種膵島移植は最も臨床応用に近い現実的な移植医療といえる。この様に膵臓器移植と比べ有利な膵島移植ではあるが、膵島細胞を膵臓器から単離する過程で、最終細胞収量に決定的なダメージを与える因子が存在する。それは阻血時間と呼ばれる、臓器摘出後から単離

に至るまでの時間と、移植に至るまでの摘出臓器保存状態である。

膵臓の生理機能的な役割として、インスリンを含む内分泌腺の働きや、トリプシンなど消化酵素を分泌する外分泌腺の働きが挙げられる。そして膵臓器の保存状態は、外分泌腺の細胞活性維持による所が大きい。運搬時の時間延長や粗悪な膵臓保存状態では容易に膵外分泌腺が破壊され、漏出した消化酵素により膵島細胞を含めた膵実質が、消化されるためである。膵島細胞が消化酵素に曝されるとタンパク分解が進行し、高い細胞収量を得られないため、膵外分泌細胞を温存する保存や運搬法が必要となる。現在二層法と呼ばれる、PerfluorocarbonsとM-Kyoto液からなる、組織保存液を重層し膵臓器摘出後に運搬液として用いる方法が、主流となっているが、膵外分泌腺細胞の温存は制御されておらず、高い膵島細胞の収量を得る為に今後改良を加える必要である。

新たな細胞および臓器保存法として、微量電流通電法により細胞活性を維持する保存法の技術開発に、我々のグループは携わっている。今まで細胞レベルでの効果として、分子生物学的手法を用いた遺伝子解析で、微量電流通電法がアポトーシスを回避させることを明らかにしてきた。この技術と合わせ、ブタ臓器を用いた新たな移植臓器運搬法や臓器保存法を確立することを今回の目的とする。

2. 方 法

食肉センターから運搬するブタ膵臓は、成体Landrace, メス, と殺後15分以内(温阻血時間), 単離までの運搬時間90分(冷阻血時間)である。運搬臓器重量は約100gで脾門部膵尾部を用い、保存運搬実験は月1回の頻度で約10回を予定する。また通常のヒト膵臓器摘出後から単離に至るまでの時間を考慮して、今回の実験では微量電流通電

(50 μ A)は4時間とする。

それぞれ2群のグループを設定し1) Group 1:二層法群, 2) Group 2:二層法と微量電流通電群とする。保存運搬後, 2群からなる各グループの臓器は更に(A). 形態サンプル, (B). RNAサンプル, (C). タンパクサンプルに分割する。

(A) 形態サンプル

標本はBrdU液に浸透させてから、無固定凍結標本および20%ホルマリン固定パラフィン標本として保存する。20%ホルマリン固定パラフィン標本からの切片は、形態評価を行うためH&E染色を行い、連続切片のTUNEL染色から膵外分泌腺細胞のアポトーシスと抗BrdU抗体を用いS期の細胞周期にある細胞を、細胞活性の高い増殖期の細胞として検討する。無固定凍結標本は(B)(C)実験施行後、再度特定遺伝子の検出あるいは、免疫染色用に保存する。

(B) RNAサンプル

全tRNA抽出後、精製を行いmRNAをi). RT-PCR Array, ii). RT-PCR, iii). qRT-PCR (Real time) 用に保存する。

(C) タンパクサンプル

膵臓からのタンパク抽出は、消化酵素を包括する臓器である為に困難を極める。早期に細胞内分画別にタンパク抽出を行い保存しておく必要がある。標的タンパクとの免疫沈降反応後、Mass Spectrometryで関連タンパクの検索を行う。

3. 結果と考察

微量電流通電法により細胞活性を維持する保存法は、マウス線維芽細胞を用いた実験で、通常培養環境に様々な微量電流通電状態を設定して効果判定を行った。微量電流通電を行った群と行わなかった群との比較検討に、アポトーシス・テンプレートを用いたRT-PCR Microarrayを行って

いる。サンプルから抽出された mRNA を用いて、90 種類に及ぶアポトーシス関連遺伝子を検索した結果から、微量電流通電後の細胞は通電を行わなかった細胞と比べ、明らかに高い抗アポトーシス遺伝子を発現していることが判明している。加えてラット単離膵島を用いて同様に施行した実験でも、単離を行った膵島は、過程において collagenase を用いた細胞消化の過程や、細胞選別過程で用いる Ficoll が細胞毒であるため、細胞活性を良好に保つ目的で微量電流通電実験を行った。ラット単離膵島を用いた実験でも、マウス線維芽細胞を用いた実験同様、微量電流通電後の細胞は通電を行わなかった細胞と比べ、明らかに高い抗アポトーシス遺伝子を発現していた。今回の実験では更に臓器レベルでの検証を行うこととなった。

形態を中心とした病理組織学的検索で、HE染色で 2) Group 2 : 二層法と微量電流通電群は 1) Group 1 : 二層法群に比べ明らかに外分泌腺細胞の形態保持が保たれていた。更に抗 BrdU 抗体を用いた実験では、外分泌腺細胞に注目したところ 2) Group 2 : 二層法と微量電流通電群の方が、1) Group 1 : 二層法群に比べ平均 $4.4 \pm 1.7\%$ ($n = 4$)、陽性細胞率が高かった。一方、予想に反し TUNEL 染色では膵外分泌腺細胞のアポトーシス細胞陽性率に差異はなかった。しかし膵島細胞で TUNEL 陽性細胞を検索したところ、 $9.5 \pm 3.8\%$ ($n = 4$) 2) Group 2 : 二層法と微量電流通電群の方が、1) Group 1 : 二層法群に比べ陽性率が高かった。

RNA・タンパクサンプルからの実験では、Caspase を介したアポトーシスシグナルが 2) Group 2 : 二層法と微量電流通電群と比べ 1) Group 1 : 二層法群で増強していた。

以上の実験から 2) Group 2 : 二層法と微量電流通電群では、1) Group 1 : 二層法群と比べ、

膵島細胞の抗アポトーシス効果と外分泌腺細胞の細胞活性が高く、その結果膵島細胞収量や膵島細胞の機能保持性が高いことが判明してきた。また二層法単独と二層法と微量電流通電群での保存状態の違いを、更に生物学的レベルで解明すべく、研究を継続している。

4. 要 約

本研究を通じて新たな細胞および臓器保存法として、微量電流通電法により細胞活性を維持する保存法を提唱している。また以前から細胞レベルでの効果は、分子生物学的手法を用いたマイクロアレイ遺伝子解析で、微量電流通電法を施行するとアポトーシスが回避される効果として明らかにされている。この技術をブタ臓器を用いた新たな移植臓器運搬法や臓器保存法に応用することは、ユニークな研究と言える。更に本研究は異種移植臓器としての候補となるブタを研究材料としているが、今回用いる成体 Landrace は食肉として広く理解される材料であり、研究結果は食肉業界へ即時に転用可能であろう。また膵臓器は多くの消化酵素を含むため、心停止後早くからタンパク融解が始まり、全臓器中最も臓器損傷が激しい臓器である。その為、食肉の対象とされる骨格筋組織では、本研究結果を最も厳しい条件として、微量電流通電法の初期設定として使用可能である。よって全臓器で最も保存の困難とされる、膵臓を用いた検証には高い可能性を包括するものと考えられる。

加えて通常行われる、食肉の保存状態評価法として、ドリップ量や細菌増殖程度判定、組織鏡的検索が挙げられる。しかし残念ながらこれらの評価法は、腐敗状態を反映する筋組織のタンパク融解現象や、商品価値のない食肉の最終転帰を評価するだけで、保存状態の悪化を早期に判断できたり、転帰を予想できる評価法ではなかった。し

かし我々の提唱する分子生物学的手法による遺伝子評価を用いた場合、今後は保存状態の悪化を早期に示唆する遺伝子を検索することにより、味覚や食品安全性に問題の無い充分商品価値のある食肉を、保存状態の悪化を来すだろう予測優先順に、選別出荷できる可能が含まれていると考えられる。

文 献

- 1) Karcz M, Cook HT, Sibbons P, Gray C, Dorling A, Papalois V. An ex-vivo model for hypothermic pulsatile perfusion of porcine pancreata: hemodynamic and morphologic characteristics. *Exp Clin Transplant.* 2010 Mar ; 8 (1) : 55-60.
- 2) Seo JY, Masamune A, Shimosegawa T, Kim H. Protective effect of lycopene on oxidative stress-induced cell death of pancreatic acinar cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2009 Aug ; 1171 : 570-5.
- 3) Lim JW, Song JY, Seo JY, Kim H, Kim KH. Role of pancreatitis-associated protein 1 on oxidative stress-induced cell death of pancreatic acinar cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2009 Aug ; 1171 : 545-8.
- 4) London NJ, Swift SM, Clayton HA. Isolation, culture and functional evaluation of islets of Langerhans. *Diabetes Metab.* 1998 Jun ; 24 (3) : 200-7.

肝臓抽出物の継続投与がマウス脂質代謝に及ぼす影響

Effects of Continuous Administration of Liver-extract on Lipid Metabolism in Mice

矢澤 一良・小山 智之

(東京海洋大学大学院)

Kazunaga Yazawa and Tomoyuki Koyama

(Tokyo University of Marine Science and Technology)

“Liver Hi”, the extract of porcine liver, is known to suppress plasma triglyceride (TG) level during continues ingestion for 12 weeks in human. In this study, to elucidate the mechanisms of action, effects on absorption of TG in vivo, and on fat-accumulation and adipocytokines-producing activity in vitro. As a result, Liver Hi (2,000 mg/ml) showed significant inhibitory activity against lipase in vitro, where as its oral administration (250, 500, 1,000 mg/kg) showed no significant changes in TG levels in TG- loaded mice. In the experiment on 3T3-L1 cell line, addition of Liver Hi (25-400 $\mu\text{g}/\text{ml}$) to culture fluid did not shown significant effects on the amounts of TG, adiponectine, and MCP-1 for 3 weeks. Unfortunately, despite our results provided new findings about Liver Hi against lipid dynamics in vivo and in vitro, elucidation for action of mechanisms for TG levels in long-term administration of Liver Hi was not accomplished with our results shown here. Further studies on the possible causes by the other factors, lipoprotein concentration in the blood, and activity of lipid-degrading enzyme in cell will be remained.

1. 目 的

近年、運動不足、不規則な食生活により、肥満になる人が増加している。肥満はメタボリックシンドローム発症の起点とされており、生活習慣病、さらには、動脈硬化性疾患を未然に防ぐために、肥満を予防・改善することが必要とされている^{1, 2)}。その達成には生活習慣を改善することがもっとも確実ではあるが、現代の社会における日常生活の習慣を切り替えることは困難である。そこで、日常の食生活に目的に応じて機能性を付加することで日常の食生活を改善できる機能性食品（ヘルスフード）への関心が高まっている。

とくに私たちの身体において肥満の予防・改善

が期待される生理機能としては、腸管における脂質の吸収量の抑制、脂肪細胞における脂肪蓄積量の抑制、脂質代謝の改善による脂肪消費量の促進などが重要であり、これらの機能性を有するヘルスフードを用いた肥満の予防・改善が求められている。

著者らのこれまでの研究において、高脂肪食飼育-肥満モデルマウスおよび、マウス由来の白色脂肪前駆細胞株3T3-L1細胞などを用いた評価試験により、脂質代謝改善作用を有する新規食品素材を探索し、フェヌグリーク³⁾、アスタキサンチン⁴⁾、とろろ昆布⁵⁾、ドクダミ⁶⁾などの数種類の天然素材にその活性を見出し、その作用メカニズムについて考察している。

本研究では、種々の天然由来抽出物のなかから、ブタ肝臓の抽出物に着目して、脂質代謝を中心とした生体での作用について検討することとした。ブタ肝臓（レバー）は畜産物の中でも栄養価が高く、健康への寄与度が高い食品素材として知られている。ブタレバーから酵素処理により調製した「レバー Hi」は生体への吸収性も高く、これまでにヒトの臨床試験において、長期摂取によるBMIや血中TG値の低下等が確認されていることから⁷⁾、脂質代謝に何らかの影響を及ぼしている事が期待される。従って、それらの作用機序を解明するため、レバー HiのTGの腸管からの吸収（実験1）や脂肪細胞へのTGの蓄積（実験2）、さらには、脂肪細胞から分泌されるアディポサイトカイン量に及ぼす影響（実験3）について検討した。

2. 方 法

2.1 腓リパーゼ阻害活性試験

この試験はリパーゼキットS（DSファーマバイオメディカル）を用いて行った。

- (1) 酵素液はブタ由来の腓リパーゼを使用し、1 unit/mlとなるように調製した。
- (2) 96ウェルプレートに5 μ lの酵素液、2 μ lのエステラーゼ阻害剤、発色液73 μ lを入れて混合し、30℃で5分間プレインキュベートした。
- (3) その後、レバー Hi溶液、あるいは、コントロールとして10 μ lの蒸留水を加えて、さらに、10 μ lの基質液を加えてよく混合してから、30℃、遮光下で30分間インキュベートした。
- (4) 200 μ lの反応停止液を加え、405 nmで吸光度を測定した。また、反応停止液を加えた後に基質液を加えたものをブランク溶液とした。コン

トロールの反応率を100%として、*反応率（%）を次式のように算出した。

2.2 トリグリセリド（TG）負荷試験

- (1) 1 ケージにddYマウス（6週齢、雄性）を4匹ずつ入れて、1週間予備飼育した。
- (2) 予備飼育後、マウスを24時間絶食させた。
- (3) マウスを平均体重がほぼ等しくなるように4群に分けて、蒸留水、あるいは、レバー Hi溶液とコーン油を経口投与した。
- (4) 投与後0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8時間に尾採血をして、5,000 rpm, 4℃で1分間遠心分離を行った。
- (5) 遠心後、それぞれ血漿を2 μ l採って、96ウェルプレートに移した。
- (6) 血中TG値は、トリグリセリドE-テストワコー（Wako）を用いて測定した。

2.3 培養脂肪細胞を用いた脂肪蓄積阻害試験⁸⁾

- (1) 脂肪蓄積作用をマウス繊維芽細胞3T3-L1は10%の仔牛血清を含むDMEM培地で培養し、コンフルエントになったら、3枚の24 well plateに細胞をまく。
- (2) コンフルエントになったら、培地を除去し、蒸留水、あるいは、レバー Hi（終濃度：12.5～50 μ g/ml）を添加させた分化誘導培地（0.5 mM イソブチルメチルキサンチン、0.25 μ M デキサメタゾン、10 μ g/mlインスリン、10%ウシ胎児血清を含むDMEM培地）に入れ換えて2日間培養した。
- (3) 分化誘導培地を取り除いて、8日間蒸留水、あるいは、レバー Hi（終濃度：12.5～50 μ g/ml）を添加させた分化促進培地（5 μ g/mlインスリン、10%ウシ胎児血清を含むDMEM培地）で培養した

$$\frac{(\text{サンプル溶液を加えた反応液の吸光度}) - (\text{サンプル溶液を加えたブランク溶液の吸光度})}{(\text{コントロールの反応液の吸光度}) - (\text{コントロールのブランク溶液の吸光度})} \times 100$$

(2日おきに培地を交換)。

(4) 2枚のプレートの細胞はオイルレッドO染色, MTTアッセイに用い, 培地はアディポサイトカイン発現量の測定に用いた。

2.4 オイルレッドO染色

(1) 3 mg/ml オイルレッドO (溶媒: 100% イソプロパノール) をD.W.と6:4で混合し, 15分間室温で静置させ, ろ過し染色液を得た。

(2) 分化促進培地を取り除いてPBSで1回洗浄したあと, 10%ホルマリンを加えて15分間室温で固定した。

(3) 10%ホルマリンを取り除いてD.W.で1回洗浄したあと, 染色液を加えて15分間室温で静置させた。

(4) 染色液を取り除いて60%エタノールで2回洗浄したあと, イソプロパノールを加えて染色部を抽出し, 550 nmの吸光度で測定した。

2.5 MTTアッセイによる細胞生残率の推定

(1) 分化促進培地を取り除いてPBSで1回洗浄したあと, 0.5 mg/ml MTT (Thiazolyl blue tetrazolium bromide) を加えて37°Cで1時間反応させた。

(2) MTT溶液を除去して, DMSOを加えて染色部を抽出し, 550 nmの吸光度で測定した。

2.6 アディポサイトカイン分泌量の測定

3T3-L1細胞からの分泌されるアディポネクチンの量, 単球走化活性因子 (MCP-1) の量は, それぞれマウス・ラットアディポネクチンELISAキット (大塚製薬), Mouse ELISA Kit (Bender MedSystem) を用いて常法に従って測定した。

3. 結果と考察

実験1: TGの吸収に及ぼす影響

レバーHiのin vitroにおける腓りパーゼ阻害活性の有無について検討したところ, Fig.1に示したように濃度依存的な抑制作用が見られた。レ

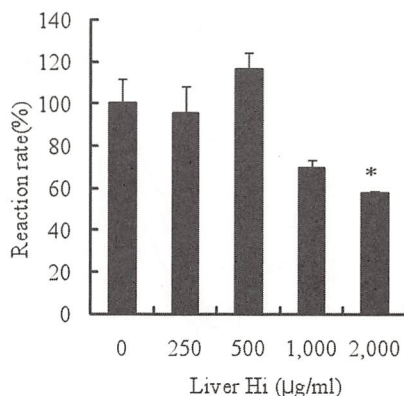


Fig.1 Effects of Liver Hi on lipase activity in vitro Data are expressed as mean \pm S.E. (n=3).

*: p<0.05 vs control (Liver Hi 0 µg/ml)

バーHi 2,000 µg/mlで, コントロールと比較して, 有意に腓りパーゼ活性が減少した。従って, レバーHiは腓りパーゼ阻害活性を有するものと判断されるが, 高い濃度を必要とすることから, その活性は弱いものであると考えられた。

リパーゼ阻害作用が見られたことから, 次にマウスにトリグリセリド (TG) を負荷した際の, 血中TGの上昇に対する作用を確認した。レバーHi 500, 1,000 mg/kg投与群は, コントロール群と比較して, それぞれ投与後, 1~2時間目, 1~3時間目で有意に血中TG値の上昇が抑制された。しかしながら, これらのサンプル投与群は, ピークの時間が遅れてきており, 投与後4時間目以降の血中TG値の平均値はコントロール群よりも高値を示している。また, レバーHi 250 mg/kg投与群は, コントロール群と比較して, 投与後7~8時間目で有意に血中TG値が低値を示した。しかしながら, 総TG吸収量の指標として用いられるAUCで評価すると, コントロール群と各サンプル投与群との間に変化が見られなかった (Fig.2)。今回の実験結果からは, レバーHiはTG吸収抑制作用を示さないものと考えられた。

実験2: 脂肪細胞におけるTGの蓄積に及ぼす影響

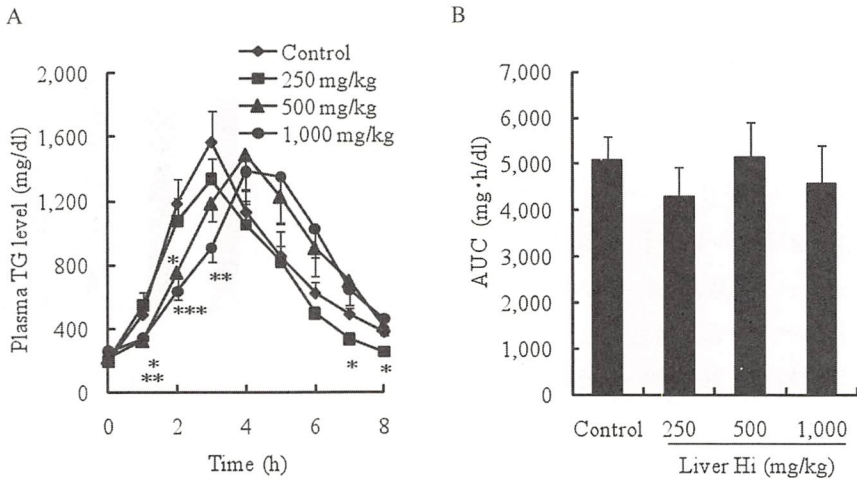


Fig.2 Effects of Liver Hi on time-course change (A) and total absorbed amounts (B) of plasma TG in triglyceride-loaded mice.

The total absorbed amounts in Panel A are expressed as area under curve of Panel B. Data are expressed as mean \pm S.E. (n=8).

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.005$ vs control.

培養したマウス白色脂肪細胞3T3-L1細胞を用いた試験において、レバー Hiは25~400 $\mu\text{g/ml}$ の濃度範囲ではTG蓄積率に変化を与えなかった。従って、レバー Hiは脂肪細胞へのTG蓄積を抑制しないものと考えられる。同時に測定したMTTアッセイの結果から、この濃度の範囲では細胞に対する増殖抑制作用や毒性は見られないと判断された (Fig.3)。

実験3：脂肪細胞からのアディポサイトカイン分泌量に及ぼす影響

レバー Hiは25~400 $\mu\text{g/ml}$ の濃度範囲ではアディポネクチンとMCP-1の分泌量に変化が見られなかった (Fig.4)。従って、レバー HiはアディポネクチンとMCP-1の分泌に関与しないものと考えられる。脂肪細胞はTNF- α 、アディポネクチン、レプチン、プラスミノゲンアクチベーターインヒビター-1 (PAI-1)、アンジオテンシノーゲン、レジスチン、IL-6、IL-8といったアディポサイトカインを分泌することが知られている⁹⁾。脂肪細胞に中性脂肪が過剰に蓄積すると、これらのアディポサイトカインの分泌バランスが崩れてしま

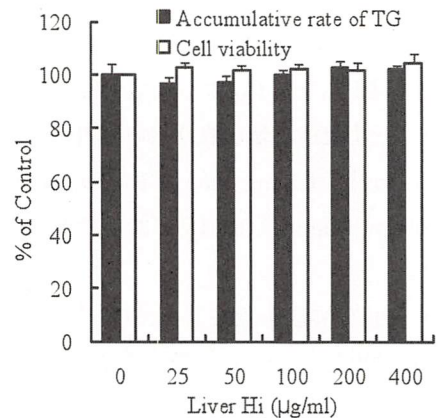


Fig.3 Effects of Liver Hi on lipid accumulation and cell viability in 3T3L cells.

Data are expressed as mean \pm S.E. (n=3).

い、その結果、脂肪の蓄積による肥満にとどまらず、代謝系に異常を来すメタボリックシンドロームが誘発されることが報告されている。今回測定したアディポネクチンはインスリン作用の増強因子として、またMCP-1は2型糖尿病の促進因子としてそれぞれ位置づけられている。本実験系においてレバー Hiがこれらアディポサイトカインの分泌量を低下させれば、細胞レベルでの中性脂肪

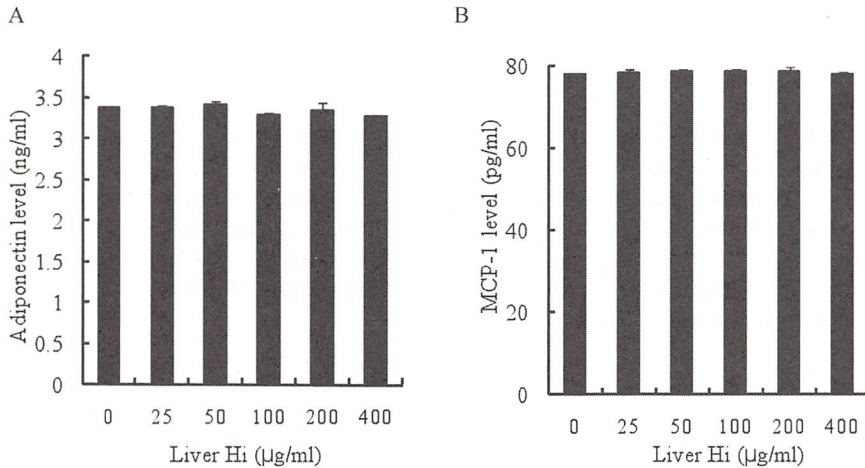


Fig.4 Effects of Liver Hi on secretions of aciponection (A) and MCP-1 (B) from 3T3-L1 cell. Data are expressed as mean \pm S.E. (n=3).

の蓄積阻害作用や脂質代謝の調節作用が期待されると考えたが、今回の検討の範囲ではこれら脂質代謝異常を調節することを示唆するデータは得られなかった。

以上の結果から、レバー HiはTG吸収抑制作用、脂肪細胞へのTG蓄積抑制作用を示さず、脂肪細胞からのアディポネクチンとMCP-1の分泌にも関与しないことが示された。ただし、TG吸収に関しては、レバー Hiが脂肪酸パーゼ阻害活性を有しており、また、TG負荷試験で、レバー Hiの高投与量で投与後早期の時間帯で、TGの吸収を抑制していたことを考慮すると、さらに、高濃度のレバー Hiを投与する、レバー Hiを2, 3回に分けて投与する等の手段を取ることで、TG吸収抑制作用が認められる可能性が考えられる。

4. 要 約

ブタ肝臓抽出物であるレバー Hiは、継続投与によりヒトの血漿トリグリセリドレベルを低下させることが知られている。本研究では、その作用メカニズムを推定するために、脂質吸収に対する作用、脂肪細胞への脂肪取込みおよび脂肪細胞からのアディポサイトカインの分泌に対する作用につ

いて検討した。その結果、レバー Hiは2,000 mg/mlでパーゼ阻害作用を示すものの、トリグリセリド負荷したマウスの脂肪吸収に対しては有意な変化を示さなかった (250, 500, 1,000 mg/kg)。また脂肪細胞の脂肪取込みおよびアディポネクチンとMCP-1の分泌量に影響を与えなかった (25~400 µg/ml)。残念ながら、今回検討した結果からは継続投与により血漿TGレベルが低下するメカニズムの推定には至らなかった。今後は、組織における脂質分解、血中リポタンパク量の変動、今回測定しなかったアディポサイトカイン量などに影響を与える可能性については検討の余地があると考えられる。

文 献

- 1) A WHO Consultation on Obesity, Obesity-preventing and managing the global epidemic. World Health Organization, Geneva.
- 2) 吉池信夫, Body Mass Index に基づく肥満の程度と糖尿病, 高血圧, 高脂血症の危険因子との関連—他施設共同研究による疫学的検討—. 肥満研究, 6, 4-17, 2000.
- 3) M. Ikeuchi, K. Yamaguchi, T. Koyama, Y. Sono and K. Yazawa, Effects of fenugreek seeds (*Trigonella foenum graecum*) extract on endurance capacity in mice. J. Nutr. Sci. Vitaminol. 52 (4), 287-292, 2006.

- 4) M. Ikeuchi, T. Koyama, J. Takahashi and K. Yazawa, Effects of astaxanthin in obese mice fed a high-fat diet. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71 (4), 893-899, 2007.
- 5) M. Miyata, T. Koyama, T. Kamitani, T. Toda, and K. Yazawa, Anti-Obesity Effects of the Traditional Japanese Food 'Tororo-Kombu', Shaved Laminaria in Rodents. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 73 (10), 2326-2328, 2009.
- 6) M. Miyata, T. Koyama, and K. Yazawa, Water extract of *Houttuynia cordata* Thunb leaves exerts anti-obesity effects by inhibiting fatty acid and glycerol absorption. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 56 (2), 2010. (in printing).
- 7) ILS株式会社製造業者用資料, 「Liver-Hi (ブタ肝臓酵素分解物)」, ILS株式会社, 2009.
- 8) R. M. Cowherd, R. E. Lyle, and R. E. McGehee Jr., Molecular regulation of adipocyte differentiation. *Semin. Cell Dev. Biol.* 10, 3-10, 1999.
- 9) 小村徳幸, 木原進士, 内臓脂肪組織と皮下脂肪組織. 脂肪細胞と脂肪組織, 207-210, 2007.

高校生競泳選手のヘム鉄摂取期前後の泳能力の変化

—高強度トレーニングにおけるパフォーマンス比較—

Changes of the Performances for High Intensity Interval Training between Pre and Post
Heme- iron intake Period of the High School Swimmers

野口 智博・鈴木 淳也・*新谷 恵市・**松本 恵
朝賀 一美・勝又 美紀

(日本大学文理学部, *日本大学大学院, **北海道大学, ***ILS株式会社)

Tomohiro Noguchi, Junya Suzuki, *Keiichi Shinya, **Megumi Matsumoto,
***Kazumi Asaka and ***Miki Katsumata

(Nihon University College of Humanities and Sciences, *Nihon University Graduate School,
Hokkaido University and *ILS Inc.)

This research focused on the examination using high school swimmers as subjects as follows: First, what influence heme-iron intake and training for a short term (for four weeks) would have on high-intensity interval training performance. Second, what affects they would have on lactate level after a cool-down and the change of mood condition before and after training. And the research also centered on what influence the intake of heme-iron brings about to blood constituent including Hb (hemoglobin) and also studied the degree of changes in swimming records in the competition before and after the period. The result was as follows:

1) The swimming speeds significantly increased in the competition at post-intake heme-iron compared with the ones of the previous competition ($p < 0.001$).

2) The intake of heme-iron significantly increased average swimming speeds at the first and second round lactate tolerance set (LTS, 1 R: $p < 0.001$, 2 R: $p < 0.001$). The HR(heart rate), RPE(Rate of Perceived Exertion), and lactate level(ΔLa after 1 R- before LTS) at the first round were significantly increased, too.

3) Each item of POMS (Profile of Mood States) (Tension-Anxiety: T-A, Depression, Anger-Hostility: A-H, Vigor, Fatigue, and Confuse) significantly decreased in T-A ($p < 0.001$) and D($p < 0.05$) after training at pre-intake of heme-iron compared with before LTS. Likewise, at post-intake of heme-iron each item of POMS significantly decreased in T-A ($p < 0.001$) and D ($p < 0.001$). This showed that test subjects came to endure more severe training than ever at post-intake of heme-iron. But it was found that psychological condition was kept intact.

4) Hb were significantly increased at post-intake of heme-iron ($p < 0.001$). No significant difference was noted on Hb on blood constituent inspection but, in contrast, PLT (Platelet) ($p < 0.01$) and TIBC (Total Iron Binding Capacity) ($p < 0.001$) significantly decreased at post-intake of heme-iron. This was apparently because the decrease of the training opportunities caused by the conflict of the intake at the latter half with the competition period didn't stimulate red blood cell production. However, conversely, the increase of ferritin was noted in many test subjects, so the further extension of intake period was thought necessary for additional examination in the future.

From the above mentioned results, the followings became clear. The high school swimmers who went for the training at post-intake of heme-iron could increase swimming speed through high-intensity interval training even in the short period of 4 weeks. As a result, they could improve their swimming speed in the competition.

1. 目的

競泳競技の短距離種目（50mや100m）では、長距離に比べて直接的ではないにせよ、酸素摂取能力はパフォーマンスを構成する一因子であろうとされている¹⁾。また短距離の選手が低酸素環境で強化トレーニングを行い、好成績を挙げている例も散見される²⁾。これらのことから競泳の場合は、たとえ短距離といえども、有酸素能力の向上をまったく無視して強化を行うことは難しい。更に、短距離の選手が無酸素作業能力を高めようと、休息時間が比較的長く、1本1本を全力で泳ぐインターバル・トレーニングを行い、その平均泳タイムの向上が、短距離種目のパフォーマンスの変化と関連があるとも考えられている³⁾。

そういった高強度のインターバル・トレーニングにおいて、平均泳タイムを伸ばすためには、休息時間中に酸素摂取によるATPの再合成能力の向上が必要となり、また筋内の疲労物質の速やかな代謝のために、十分な酸素の供給が求められる。すなわち、短距離選手が大会でより高いパフォーマンスを発揮するためには、よりハードにトレーニングを積むことが求められ、酸素供給能力の向上はトレーニングの質を高めるためにも必要である。

一方で、従来、鉄源として吸収性の高いヘム鉄を摂取してトレーニングを継続することは、中・長距離選手のトレーニングを貧血により中断させないための手段として用いられてきた^{4, 5)}。しかし競泳の場合には、上記のような目的で酸素運搬能力が短距離選手のパフォーマンスにも関与しているため、ヘム鉄の摂取によるヘモグロビン(Hb)や赤血球の減少抑制をさせて強化を進めることは、有効な手段であるように思える。特に高校生競泳選手の中でもトレーニング中のメインセットの距離が比較的多い選手や女子の選手は、

ヘモグロビンが比較的低値で、起床時心拍数も比較的高い特徴があることが分かった⁶⁾。これがHb低値だけでなく、貯蔵鉄(フェリチン)の低下にまで至ると、競技力の低下だけでなく日常生活上支障をきたすような認知機能の低下を招く可能性も示されているため⁷⁾、高校生競泳選手の鉄栄養状態を改善することは、単にパフォーマンスを左右するだけでなく、日常生活の質を向上させることにも繋がるだろう。

そこで本研究は、50, 100m種目を専門とする選手や、高校から競技を始め、必然的に短距離である50, 100mを専門距離とする選手が多く、地域高校選手権出場レベルの高校水泳部部員を被験者とし、短期間（4週間）のヘム鉄摂取とトレーニングが、高強度インターバル・トレーニングのパフォーマンスや、クーリングダウン後の乳酸値にどのような変化を及ぼし、試合結果にどのような影響を与えるかを調べた。また、短期間のヘム鉄摂取が血液成分や心理的コンディションの変化にも影響を示すかどうかを調べた。

2. 方法

2.1 被験者

被験者は2010年2月現在S高校水泳部に所属し、心身ともに健全な、地域高校選手権出場レベルの競泳選手20名（男子8名、女子12名）とした。そのうち分析対象としては、調査期間中に体調不良を生じた者や、他の団体による強化合宿などに参加し、インターバル・トレーニングテストが受けられなかった者を除外して抽出された男子5名、女子10名となった（Table 1）。被検者とその父兄には、あらかじめ実験の趣旨や本試験によって得られる情報を説明し、実験参加に関する承諾を得た。

2.2 調査項目および方法

① Lactate Tolerance Set (LTS)

Table 1 Characteristics of subjects

subj.	sex	age(y)	height(cm)	weight(kg)
a	male	16	170.9	68.0
b	male	17	170.9	64.5
c	male	17	175.0	67.0
d	male	17	173.0	60.0
e	male	16	164.8	53.5
f	female	16	170.0	58.0
g	female	16	158.8	48.8
h	female	16	155.4	55.0
i	female	16	165.8	80.6
j	female	15	153.5	45.0
k	female	15	153.0	48.0
l	female	16	156.2	47.2
m	female	16	157.2	50.0
n	female	17	166.0	48.0
o	female	17	163.0	57.0
mean		16.20	163.57	56.71
sd		0.68	7.46	9.92
mean (male)		16.60	170.92	62.60
sd		0.55	3.82	5.95
mean (female)		16.00	159.89	53.76
sd		0.67	5.91	10.41

本摂取試験のパフォーマンス評価として、高強度インターバル・トレーニングであるLTSを、ヘム鉄摂取期前 (Pre) と摂取期終盤 (Post) に1回ずつ行った (Fig.1)。

LTSは、これまで同校水泳部で定期的に行ってきたトレーニングセットであり、仙石らの研究³⁾に近い形式で行われているゴール・セット・トレーニングに近い方法である「2ラウンド×5本×50mを2分サイクル(2分に1本の割合で行う)」を採用した。なお、ラウンド間は200mのイージースイムを含む10分休憩を与え、2ラウンド目が終了した後は、野口らの報告⁸⁾を参考に、比較的効率よく疲労物質が低減できるとされる「クーリングダウンセット」(16本×50mを1分10秒~20秒サイクルを、被験者の泳力に応じて処方する)を、全力泳+15秒~20秒程度のゆったりとしたスピードで行わせた。

LTSの全力泳中は、25mずつのラップタイムと25mずつのストローク数(Stroke Number:SN)を

計測し、全力泳後にはハートレートモニタを用いて心拍数(HR:b/m)を測定させた。また、ウォームアップ前、各ラウンド終了直後、クーリングダウン後には、アークレイ社製ラクテート・プロを用いて、指尖からの自己採血法により血中乳酸値(La:mM)を計測した。更に、全力泳とクーリングダウンについては、各試泳後に心拍数計測とともに主観的運動強度(RPE)も計測した (Fig.2)。

② ヘモグロビン値 (Hb:g/dl)

血液の酸素運搬能力の指標として、ヘモキュー社製プラズマ・ヘモグロビンフォトメータを用いて、乳酸測定と同様に指尖からの自己採血法でHbを計測した。測定日はPreにあたる3月2日と、Postにあたる2回目のパフォーマンステスト後で、かつ試合終了後の4月7日とした。いずれも計測は夕刻のトレーニング前に行われた。

③ 採血による血液成分検査

②の検査で、基準値と比較し低値と思われた者(男子2名、女子5名)についてのみ、静脈採血による血液成分検査を行った。そのうち女子1名が2回目の採血日に風邪により採血できなかったため、分析対象からは除外した。検査項目は、赤血球数(RBC:10⁴/μl)、ヘモグロビン(Hb:g/dl)、ヘマトクリット(Ht:%)、赤血球平均容積(MCV:fl)、赤血球平均ヘモグロビン量(MCH:pg)、赤血球平均ヘモグロビン容積(MCHC:%)、血清鉄(Fe:μg/dl)、総鉄結合能(TIBC:μg/dl)、網状赤血球数(%), フェリチン(ng/ml)であった。測定日は、Hb測定の前日とした。

④ 心理的コンディション

LTSの前後に、心理的コンディションの指標として妥当性が認められているPOMSTM短縮版(Profile of mood states, 金子書房)を用いて、緊張—不安(T-A)、抑うつ—落ち込み(D)、怒り—敵意(A-H)、活気(V)、疲労(F)、混乱(C)の各項目の得点よりT得点を導き出し、Preと

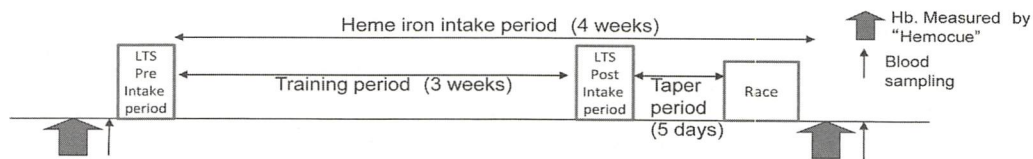


Fig.1 Training and LTS test schedule

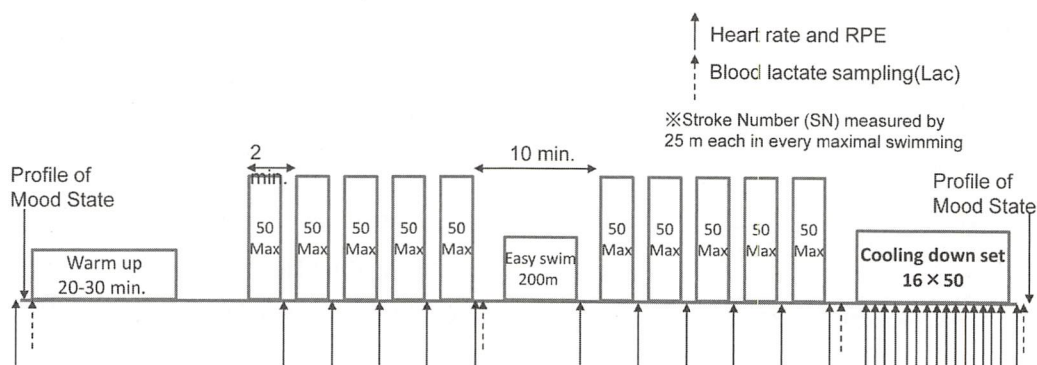


Fig.2 Lactate Tolerance Set protocol

Postの、LTS前後のT得点差を項目別に比較した。

2.3 ヘム鉄の摂取

被験者らは、鉄欠乏貧血予防の目的で、動物性赤血球由来の「ヘム鉄」(ILS社製)を、朝、夕食後にそれぞれ700mg(鉄として7mg相当)、1日合計1400mg(鉄として14mg)を摂取させた。摂取期間は、平成22年3月3日～4月6日までとした。

2.4 分析方法

得られたデータはMicrosoft社製Excel2003に入力した。泳タイム情報はすべて速度(m/s)として算出した。LTSで得られたデータは、全て1R、2Rの各5本の平均値と標準偏差(SD)を算出した。これらの手順で得られたデータから、PreとPost間の比較を、対応のあるt検定を用いて行った。なお、有意水準は5%未満とした。

3. 結果と考察

LTSので得られた結果は、すべてTable 2に示したとおりである。以下、各項目の結果について考察を加える。

3.1 ベスト記録の変化とLTSのパフォーマンス、POMSの変化

① ベスト記録の変化

被験者のベストタイム(Personal Best)から算出した泳速度(いずれも、泳距離は50か100m)は0.05m/sほど有意に増加した($p < 0.001$)。この変化は、50mにつき約1.1秒短縮したこととなる。男女別に見ると、女子($p < 0.01$)も男子($p < 0.01$)も有意にPostの方が速く泳げていたが、男子の方が、女子に比べ若干伸び幅が大きいように見受けられた。

② LTSの結果の変化

LTSでの泳速度を見ると、PreよりPostの方が、1Rの平均泳速度($p < 0.001$)、2Rの平均泳速度($p < 0.001$)、1Rの後半25mの平均泳速度($p < 0.001$)、2Rの前半($p < 0.01$)、後半25mの泳速度($p < 0.001$)において有意に増加し、ヘム鉄摂取後のトレーニングタイムの向上が認められた。男女別に見ると、女子の方がその傾向が顕著であった。

Table 2 Changes in parameter of LTS between pre and post intake period

	All n = 15		Female n = 10		Male n = 5	
	mean	sd	mean	sd	mean	sd
Pre Personal Best	1.47	0.14	1.40	0.12	1.59	0.09
Post Personal Best	*** 1.52	0.15	** 1.44	0.12	** 1.67	0.09
Pre1R: 50	1.39	0.21	1.33	0.22	1.52	0.11
Post1R: 50	** 1.43	0.20	*** 1.36	0.21	1.56	0.11
Pre2R: 50	1.35	0.20	1.30	0.22	1.45	0.09
Post2R: 50	** 1.40	0.20	* 1.33	0.21	* 1.52	0.10
Pre1R: 0-25	1.46	0.23	1.38	0.24	1.62	0.11
Post1R: 0-25	1.48	0.21	1.40	0.21	1.64	0.11
Pre2R: 0-25	1.41	0.22	1.35	0.24	1.55	0.07
Post2R: 0-25	** 1.46	0.22	1.39	0.23	1.61	0.10
Pre1R: 25-50	1.33	0.19	1.28	0.20	1.44	0.12
Post1R: 25-50	*** 1.37	0.20	*** 1.32	0.21	* 1.49	0.10
Pre2R: 25-50	1.29	0.18	1.25	0.20	1.37	0.11
Post2R: 25-50	** 1.34	0.19	* 1.28	0.21	* 1.45	0.09
Pre1R: F.I. (%)	91.82%	3.75%	93.18%	2.95%	89.12%	4.00%
Post1R: F.I. (%)	92.73%	2.99%	93.80%	3.16%	90.58%	0.49%
Pre2R: F.I. (%)	91.55%	3.85%	93.22%	2.77%	88.21%	3.70%
Post2R: F.I. (%)	91.83%	3.34%	92.67%	3.70%	90.17%	1.70%
Pre1R:	16.05	1.66	15.64	1.65	16.88	1.47
Post1R:	* 16.91	1.27	** 17.04	1.18	16.64	1.53
Pre2R:	17.17	1.44	16.86	1.55	17.80	1.09
Post2R:	17.81	0.81	* 17.72	0.96	18.00	0.37
Pre1R:	174.16	10.18	171.76	11.59	178.96	4.16
Post1R:	*** 180.57	9.14	* 178.89	8.48	183.92	10.48
Pre2R:	194.97	65.08	200.90	80.42	183.12	2.89
Post2R:	181.71	7.82	180.38	8.58	184.37	5.90
Pre1R 0-25 SN	18.04	4.04	16.76	4.05	20.60	2.81
Post1R 0-25 SN	18.18	4.17	17.26	4.75	20.01	1.97
Pre2R 0-25 SN	18.59	3.73	17.10	3.46	21.56	2.25
Post2R 0-25 SN	19.21	4.51	18.18	5.25	21.28	1.08
Pre1R 25-50 SN	21.12	4.39	19.96	4.84	23.44	2.19
Post1R 25-50 SN	20.92	4.50	20.32	5.38	22.13	1.70
Pre2R 25-50 SN	21.95	4.02	20.66	4.26	24.52	1.81
Post2R 25-50 SN	22.11	4.64	21.16	5.45	24.00	1.28
Pre before LTS	1.59	0.37	1.66	0.41	1.44	0.25
Post before LTS	* 1.25	0.28	* 1.22	0.27	1.32	0.33
Pre after 1R	12.19	2.07	11.96	2.51	12.64	0.66
Post after 1R	13.41	3.14	13.12	3.58	14.00	2.24
Pre after 2R	13.29	2.30	13.78	2.60	12.32	1.22
Post after 2R	14.31	3.10	13.76	3.59	15.40	1.55
Pre after CD	4.72	1.58	4.88	1.51	4.40	1.84
Post after CD	5.59	2.26	5.21	1.88	6.36	2.96
Pre Lactate Removal Rate	63.73%	12.75%	63.12%	13.34%	64.95%	12.89%
Post Lactate Removal Rate	60.26%	13.36%	60.42%	13.12%	59.93%	15.41%
Pre ΔLa (after 1R - before LTS)	10.60	2.08	10.30	2.48	11.20	0.76
Post ΔLa (after 1R - before LTS)	* 12.16	3.04	11.90	3.47	12.68	2.15
Pre ΔLa (after 2R - after 1R)	1.11	2.04	1.82	2.10	-0.32	0.92
Post ΔLa (after 2R - after 1R)	0.89	1.65	0.64	1.26	1.40	2.35
Pre ΔLa (after 2R - after CD)	-8.57	2.57	-8.90	3.06	-7.92	1.15
Post ΔLa (after 2R - after CD)	-8.71	2.66	-8.55	3.16	-9.04	1.45

* : p<0.05 ** : p<0.01 *** : p<0.001

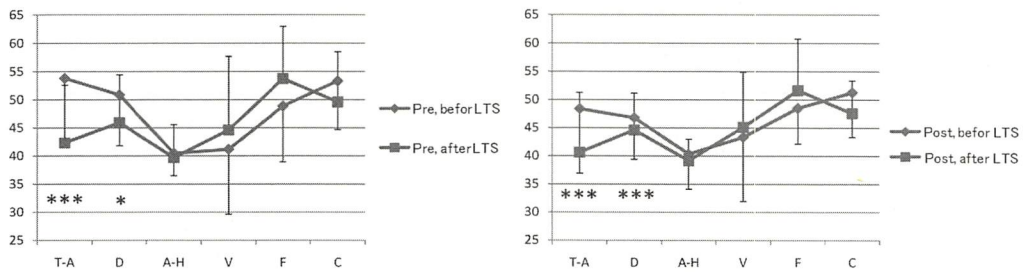


Fig.3 Changes in test profile of POMS
 Left: Pre-Heme iron intake period
 Right: Post-Heme iron intake period
 *: $p < 0.05$, ***: $p < 0.001$

SNは泳ぎの技術評価の指標として計測したが、1R、2RともにPre-Post間で有意な差は認められなかったため、ここでのパフォーマンス向上は、泳技術の向上による可能性は低いと考えられた。RPEは1RではPost 16.91 ± 1.27 が有意に増加し ($p < 0.05$)、女子は1R、2RともにPostで有意に増加したが ($p < 0.01$)、男子では有意な差が認められなかった。

HRは、1RのHRが有意に増加し ($p < 0.001$) た。男女別に見ると、女子は1RのHRがPreに比べPostで有意に増加 ($p < 0.05$) したものの、2Rについては、有意差は認められなかった。男子は1R、2Rともに同様であったものの、1Rの平均値はPostの方が高値であった。

Laは安静時においてPostの方が有意に減少し ($p < 0.05$)、女子では同様の傾向が見られた ($p < 0.05$) もの、男子では有意差が認められなかった。また、各セット後、クーリングダウン後のLaはPre-Post間で有意差が認められなかったが、1R終了までのLaの増加分 (ΔLa after 1R-before LTS) については、Postの方が有意に増加した ($p < 0.05$)、平均で約2mMの差があった。

HR、RPE、Laの結果から、全体的にはヘム鉄摂取期後の方が、前半から主観的に高い強度で頑張ることができ、さらにそれが泳速度や全力泳後の心拍数に反映されていたことが明らかになった。

また、1Rの5×50mの間で乳酸がより多く生産されたことにより、1R目からより高い疲労状態に追いつむことができている可能性が考えられた。

3.2 心理的コンディションの変化

心理的コンディションを示すPOMSの各項目 (T-A, D, A-H, V, F, C) のPre, PostそれぞれのLTS前後の変化はFig.3に示した。Preにおいては、LTS後の「T-A」 ($p < 0.001$) と「D」 ($p < 0.05$) が、LTS前に比べて有意に低下した。Postでも同様に、「T-A」 ($p < 0.001$)、「D」 ($p < 0.001$) の項目が、Postで有意に低下した。PreとPost両者の「before LTS」同志でT得点を比較したところ、すべての項目で有意差は認められず、「after LTS」のT得点についても同様であった。更に、各項目のLTS前-後のT得点差を算出し、PreとPost間にその差があるかどうかを調べたが、有意な差は認められなかった。

これらのことから、LTSのような高強度のトレーニングセットは、被験者に対し心理的な負荷を与えており、LTS後に、その状態から解放されるような現象が見受けられたが、その変化の様相については短期間のヘム鉄の摂取により変化はしなかった。逆に言えば、以前より ΔLac やLTSで前半のRPEが有意に高値を示している状態、すなわち、肉体的にも主観的にも最初から大きな努力を課しているのに、心理的な変化の様相がヘム鉄摂

取前と変わらず、更にLTS前・後それぞれのT得点も摂取期間後に有意な差が見られなかったと見ることもできるため、心理的コンディションを崩さずに強化ができたとも受け止められる結果であった。

3.3 血液成分の変化

① 被験者全体のHbの変化

血液成分のPre-Postの変化を、Table 3に示した。指尖採血からヘモグロビンフォトメータを用いて測定したHbは、Postの方が有意に増加した($p < 0.01$)。しかし、男女別に分けて比較すると有意差は認められなかった。

② 血液成分検査による各項目の変化

ヘモグロビンフォトメータで測定したHbが、比較的的低値だと思われた被験者について、静脈採血による血液成分検査を行った(Table 3)。Pre-Postの間に有意差が認められたのは、WBC、PLT、TIBCの3項目であった。Hbの変化は、フォトメータでの測定と成分検査とは異なる結果となったが、フォトメータの測定誤差の影響も考えられるため、以下の考察においては血液成分検査の結果をもとに考察する。

WBCは、2回目の採血が試合後であったこともあり、試合の際の心理的プレッシャーなどによる免疫力の低下か、もしくは試合の疲労により、被験者たちの身体がウイルスなどの雑菌を得易い状態になっていたことによるものではないかとも考えられた。PLT、TIBCの低下は、ヘム鉄を摂取した後半の期間が、時期的に試合が近く、疲労回復目的でトレーニング量を低下させ、スピードを上げるようにする時期であった。そのことから、トレーニング距離が減少し、赤血球産生の刺激がうまく与えられず、そのことが生理的適応を促すに至らなかったために引き起こされた現象なのではないかと考えられた。

それでも男子の2名は、比較的よくフェリチン

やFeが増加しており、Hbも増加傾向にあることから、Hbを盛んに使用し代謝している可能性が見られた。女子では、同様の傾向のある被験者がいたが、逆の傾向を示す被験者も混在した。このことは恐らく、日程の都合上、月経のタイミングを外して個々に採血を行うことが困難であったため、全体の傾向にばらつきが見られたのではないかと考えられた。

それでも、男子2名と女子4名中3名の被験者にフェリチン増加が見られたことは興味深い。本実験での被験者の多くは、以前より強く追い込めるようになったにも関わらず、POMSの各項目の変化が摂取期間前・後で変わらないことと併せて考えると、ヘム鉄を摂取した3週間のトレーニングでは、「トレーニングの質の向上—フェリチンの減少抑制—心理的コンディションの維持」の三者のバランスが取れた強化期間となったようにも見える。実際に被験者fは、これまで、追い込んだトレーニング中に必ず過呼吸の症状が発生したのに、ヘム鉄摂取を開始すると、1週間程度で過呼吸が発生しなくなり、今では安心してきついトレーニングに打ち込んでいるとの報告もあった。

結果的に、被験者の多くはLTSにおいて、主にきつい状態からの「粘り強さ」の向上がLTSや競技会でのタイムの向上に繋がっているが、多くの男子選手と一部の女子選手に見られた血液成分検査の傾向から、摂取期間にHbがよく代謝できる状態が引き起こり、その結果、運動時、あるいはインターバル時の酸素供給量が高まったことが好影響を及ぼしている可能性も否定できない。

4週間という短期間のヘム鉄の摂取とトレーニングの継続でも、高校生競泳選手のパフォーマンスが高まったという結果は、今後の高校生競泳選手の栄養指導の導入方法としても効果的であると考えられた。今後更に摂取期間を長くして、更に女子の選手については、血液成分検査のタイミン

Table 3 Changes in physiological markers on blood between pre and post intake period

subj.	sex	RBC ($10^4/\mu\text{l}$)		Hb (g/dl) on Hemocue		Hb (g/dl)		Ht (%)		MCV (fl)		MCH (pg)	
		Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
a	M	535	543	13.1	14.9	15.8	16.3	48.1	48.0	89.9	88.4	29.5	30.0
b	M	492	510	14.3	14.1	14.9	15.1	43.3	44.7	88.0	87.6	30.3	29.6
f	F	507	462	9.5	9.7	11.2	10.2	37.9	34.2	74.8	74.0	22.1	22.1
g	F	451	430	11.0	12.5	14.5	13.5	44.3	42.0	98.2	97.7	32.2	31.4
h	F	474	458	11.2	13.0	14.2	14.0	43.3	42.4	91.4	92.6	30.0	30.6
i	F	489	461	11.4	13.8	14.5	13.8	44.4	42.0	90.8	91.1	29.7	29.9
mean		491.3	477.3	11.8	* * 13.0	14.2	13.8	43.6	42.2	88.9	88.6	29.0	28.9
sd		28.6	41.2	1.7	1.8	1.6	2.1	3.3	4.6	7.7	8.0	3.5	3.4

グを個々の月経リズムに合わせ、同条件で検査を行う、再度トレーニング内容の変化と血液成分の変化の対応関係については、改めて検討する必要があるのではないかと考えられた。

4. 要 約

本研究は、高校水泳部の生徒を被験者とし、短期間（4週間）のヘム鉄摂取とトレーニングが、高強度インターバル・トレーニングのパフォーマンスや、クーリングダウン後の乳酸値、トレーニング前後の心理的コンディションの変化にどのような影響を及ぼすかを調べたものである。また、短期間のヘム鉄摂取がHbをはじめ血液成分にどのような影響を示すか、またその期間の前後に行われた競技会における泳記録が、どの程度変化するかも調べた。結果は以下のとおりであった。

- (1) ヘム鉄摂取期後に行われた試合では、以前の試合に比べ泳速度が有意に高くなったことから、ヘム鉄摂取期間とその間のトレーニングによりパフォーマンス改善がなされた。
- (2) Lactate Tolerance Set (LTS) の、1ラウンド、2ラウンドの平均泳速度はヘム鉄摂取期後に有意に増加した。1ラウンド目の心拍数やRPE、乳酸値 (ΔLa after 1 R- before LTS) も有意に増加した。このことから、ヘム鉄摂

取期後には、1ラウンド目からより強く追い込めていて、その状態で後半も泳速度が低下していなかったことが分かった。

- (3) POMSのT得点は、摂取期前・後ともにT-A（緊張—不安）、D（抑うつ—落ち込み）のT得点が、LTS後に有意に低下したものの、摂取期前・後でそれらの変化に差は認められなかった。LTSの結果から、以前よりきつい練習に耐えられるようになった反面、心理的コンディションが崩れていないことが分かった。
 - (4) 指尖採血により計測したHbは摂取期後に有意に増加したが、血液成分検査のHbでは有意差が認められず、逆にPLTやTIBCが有意に低下した。これらは摂取期後半が試合期に重なったため、トレーニング量が低下したことが赤血球産生をあまり促さなかったことが要因であると考えられた。しかし、フェリチンは逆に増加する被験者も多く、今後さらに摂取期を延ばしてこれらを検討する必要があると考えられた。
- これらのことから、4週間という短期間でありながらも、ヘム鉄を摂取してトレーニングを行った高校生競泳選手は、高強度インターバル・トレーニングの泳速度が向上させることができ、その結果、試合での泳速度も向上させることができた。

MCHC (%)		Ferritin (ng/ml)		Fe (μg/dl)		TIBC (μg/dl)		WBC		PLT (10 ⁴ μl)		Reticulocyte (%)	
Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
32.8	34.0	48.8	52.9	77	95	405	378	5700	6500	20.4	19.1	11	9
34.4	33.8	12.3	21.8	75	96	389	365	5900	5700	21.6	21.2	13	10
29.6	29.8	5.2	6.3	23	22	490	455	4500	5500	29.9	27.6	9	10
32.7	32.1	2.8	13	103	78	430	392	6000	6600	16.5	16.6	7	9
32.8	33.0	21.5	15.2	66	56	417	393	6000	6800	35.6	30.0	8	11
32.7	32.9	33.3	46.5	91	119	423	381	6600	7400	29.5	27.7	13	12
32.5	32.6	22.3	26.0	72.5	77.7	425.7	**394	5783.3	**6416.7	25.6	*23.7	10.2	10.2
1.6	1.5	16.2	19.2	27.5	34.4	34.7	31.6	696.9	708.3	7.2	5.5	2.6	1.2

* : p<0.05 ** : p<0.01

文 献

1) 荻田 太：トレーニングによるからだの適応（水泳の代謝特性とトレーニング），164-172，杏林書院，東京，2003
 2) 岩原文彦，平井伯昌，小沢邦彦：日本水泳 釜山からアテネへ，日本体育学会第54回大会号，2003
 3) 仙石泰雄，高野千春，椿本昇三：耐乳酸トレーニング中およびレース後の血中乳酸濃度と記録の関係，日本スポーツ方法学会21回大会号，26，2010
 4) 鯉川なつえら：ラクトフェリン摂取が長距離ランナーの運動性貧血の改善に及ぼす効果，日本陸上競

技学会第4回大会抄録，26，2005
 5) 樫村 修ら：箱根駅伝出場を目指した貧血予防策，東京農業大学農学集報，49（3），119-124，2004
 6) 野口智博ら：高校生競泳選手の，泳能力の変化とその要因に関する研究，平成20年度食肉に関する助成研究調査成果報告書，Vol.27，財団法人 伊藤記念財団，2009
 7) Marray-Kolb LE, Beard JL: Iron treatment normalizes cognitive functioning in young women, Am J Clin Nutritions, 85（3）,2007
 8) 野口智博ら：競泳のクーリングダウンの実践的研究，桜門体育学研究，38，23 -37，2003

平成21年度助成研究調査一覧

本年度の対象とする研究又は調査：食肉及び食肉製品の食品的価値（機能性，栄養性，好味性，安全性
など）の向上に関する研究又は調査

単位：千円

整理 番号	研究調査のテーマ	継続 年度	代表研究者		助成金額	
			代表研究者名	所属機関		
研 12	食肉由来機能性成分の畜種別差異の比較検討について	H.19～	六車三治男	宮崎大学大学院 農学工学総合 研究	1,100	
研 17	食肉による精神機能改善に関する研究		古瀬 充宏	九州大学大学院 農学研究院	900	
研 23	レトルト処理を施した筋原線維タンパク質の増粘多糖類添加によるゲル形式に関する研究		芳賀 聖一	名城大学農学部	800	
研 24	肉由来ペプチドカルノシンの免疫調節作用		清水 誠	東京大学大学院 農学生命科学 研究	1,100	
研 25	食感・風味を再現し得る牛肉の凍結保存法に関する研究		菱山 和洋	兵庫但馬牛 増頭推進協議会	800	
研 26	低温乳酸発酵を施した食肉の機能性評価に関する研究		H.19～	林 利哉	名城大学農学部	800
研 27	伝統的魚肉加工手法の食肉加工への応用		宇多川 隆	福井県立大学 生物資源学部	1,100	
研 28	食肉由来機能性成分クレアチンによる脳機能の維持・改善に関する研究		H.20～	豊田 淳	茨城大学農学部	900
研 29	ブタ臓器輸送の鮮度保持に関する工夫－異種移植モデルとしてのブタ臓器を用いて－		小玉 正太	福岡大学医学部	800	
研 39	肝臓抽出物の継続投与がマウス脂質代謝に及ぼす影響		矢澤 一良	東京海洋大学 大学院ヘルス フード科学講座	900	
研 42	高校生競泳選手のヘム鉄摂取期前後の泳能力の変化－高強度トレーニングにおけるパフォーマンス比較－	H.20～	野口 智博	日本大学 学部	800	
合		計	11件		10,000	

食肉に関する助成研究調査成果報告書

[Final Reports for Research Grants for Meat and Meat Products]

平成21年度 (Vol. 28)

2010年11月 発行

編集・発行——財団法人伊藤記念財団

THE ITO FOUNDATION

東京都目黒区三田1丁目6番21号 アルト伊藤ビル

〒153-8587

Alt Ito Building, 1-6-21 Mita, Meguro-ku, TOKYO

153-8587 JAPAN

TEL : 03 (5720) 8611

FAX : 03 (5720) 8612

印刷・製本——株式会社 三 恭 社

<非売品・無断禁転載>

財団法人
伊藤記念財団