

平成22年度

食肉に関する

助成研究調査成果報告書

VOL. 29

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発起するものであります。

昭和56年6月

設立発起人 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 acknowledgment 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	
29	22	11	10,400	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30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、ひとえに関係各位のご指導ご鞭撻の賜と深く感謝申し上げるとともに、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29回（平成22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23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.29 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. 2011
Koichi Ito
The chief director
The Ito Foundation



目 次

抗肥満／食欲増進作用を有する新規食肉由来機能性成分に関する研究 長谷川 信・本田 和久・上曾山 博 (神戸大学大学院農学研究科)	1
食肉による精神機能改善に関する研究 長澤 麻央・古瀬 充宏 (九州大学大学院農学研究院)	7
食肉由来 ACE 阻害ペプチドの筋肥大作用とその機構 池内 義秀・朱 曉琳・辰巳 隆一・水野谷 航 (九州大学大学院農学研究院)	14
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 ¹ ・豊田 裕子 ² ・豊田 淳 ^{1,2,3} (¹ 茨城県畜産センター, ² 茨城大学農学部, ³ 東京農工大連合農学研究科)	19
肝臓抽出物および食品成分の併用が脂質吸収に及ぼす影響 矢澤 一良・小山 智之 (東京海洋大学大学院)	23
食肉由来機能性成分の畜種別差異の比較検討についてⅡ 久保田 大樹・河原 聡・六車 三治男 (宮崎大学農学部)	29
細菌性新規プロテアーゼの食肉加工への応用 小林 秀丈 (広島国際大学薬学部)	40
低温乳酸発酵による食肉の組織構造とタンパク質化学的变化に関する研究 芳賀 聖一・林 利哉 (名城大学農学部)	46
伝統的魚肉加工手法の食肉加工への応用 (2) 漆間 創・岩田 淑子・宇多川 隆 (福井県立大学生物資源学部)	52

試食パネルによる黒毛和種牛肉の肉質等級，脂肪酸組成と食味性との関連に関する研究 鈴木 啓一・横田 祥子・*飯田 文子 (東北大学大学院農学研究科，*日本女子大学)	60
放牧など粗飼料 100%で生産された赤身牛肉におけるドライエージングの効果 折目 愛・小笠原 英毅・*岡山 和代 (北里大学獣医学部附属フィールドサイエンスセンター八雲牧場，*北里大学保健衛生専門学院管理栄養科)	68

CONTENTS

Study on the Antiobese/Orexigenic Factor in Meat

Shin Hasegawa, Kazuhisa Honda, and Hiroshi Kamisoyama
(Graduate School of Agricultural Science, Kobe University) 1

Studies on the improvement of mental function by edible meat

Mao Nagasawa and Mitsuhiro Furuse
(Faculty of Agriculture, Kyushu University) 7

Skeletal Muscle Hypertrophic Effect of Meat-derived ACE Inhibitory

Peptides and Its Mechanism

Yoshihide Ikeuchi, Xiao-Lin Zhu, Ryuichi Tatsumi, Wataru Mizunoya
(Department of Bioscience and Biotechnology Graduate School of Agriculture, Kyushu University) 14

The study of maintenance and improvement for brain function with creatine

Naoki Onizawa¹, Hiroko Toyoda² and Atsushi Toyoda^{1, 2, 3}
(¹Ibaraki prefectural livestock research center, ²College of Agriculture, Ibaraki University,
³United Graduate School of Agricultural Science, Tokyo University of Agriculture and Technology)..... 19

Effects of liver-extract with/without combined intake of other food ingredients on lipid absorption in mice

Kazunaga Yazawa and Tomoyuki Koyama
(Tokyo University of Marine Science and Technology) 23

Functional Components Sourced from Bovine, Porcine and Poultry :

Comparative Study on Bioactive Peptides. II

Daiki Kubota, Satoshi Kawahara and Michio Muguruma
(Faculty of Agriculture, University of Miyazaki) 29

Application of a novel bacterial protease to meat processing

Hidetomo Kobayashi
(Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hiroshima International University) 40

Changes in tissue structure and chemical properties of proteins in meat during fermentation using psychrotrophic lactic acid bacteria

Seichi Haga and Toshiya Hayashi
(Faculty of Agriculture , Meijo University) 46

Application of Traditional Fish Processing Techniques to Meat Processing (2)

Hajime Uruma, Toshiko Iwata and Takashi Utagawa
(Department of Bioscience, Fukui Prefectural University)..... 52

Study on the relationship between meat grades, fatty acid composition and eating quality of Japanese black beef meat by taste panel

Keiichi Suzuki, Shoko Yokota and * Fumiko Iida

(Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University * Japan Women's University) 60

The effect of dry-aging in the complete grass-fed beef

Ai Orime, Hideki Ogasawara, * Kazuyo Okayama

(Yakumo Experimental Farm Field Science Center Kitasato University, * Department of Applied

Clinical Dietetics Kitasato Junior College of Health and Hygienic Sciences) 68

抗肥満／食欲増進作用を有する新規食肉由来機能性成分に関する研究

Study on the Antiobese/Orexigenic Factor in Meat

長谷川 信・本田 和久・上曾山 博

(神戸大学大学院農学研究科)

Shin Hasegawa, Kazuhisa Honda, and Hiroshi Kamisoyama

(Graduate School of Agricultural Science, Kobe University)

In the present study, we developed the *in vitro* assay system for measuring the effect of (+)-fraction, beef extract-cation exchanger binding fraction, on the expression of fatty acid oxidation-related genes in order to identify the antiobese/orexigenic factor in beef extract and identified a candidate of antiobese factor. Addition of (+)-fraction in the medium of Fao cells significantly increased the mRNA levels of carnitine palmitoyltransferase 1A (CPT1A), long chain acyl-CoA dehydrogenase (LCAD), and their transcription factor peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) after 6h of addition. However, the mRNA level of PPAR was not affected after 24h of the addition of (+)-fraction. These results suggest that the effect of (+)-fraction on the expression of fatty acid oxidation-related genes should be measured after 6h of addition. The effects of (+)-fraction on the mRNA levels of CPT1A and PPAR were found at 0.8 mg/ml of (+)-fraction whereas the effect of (+)-fraction on LCAD mRNA was found at 3.2 mg/ml. A HPLC fraction of (+)-fraction significantly increased the mRNA levels of LCAD and PPAR α . LC/MS analysis showed that the molecular weight of the main component in the HPLC fraction is 129. These results suggest that this component might be one of the antiobese factor in beef extract.

1. 目的

肥満、特に内臓脂肪の過剰蓄積、の解消がメタボ対策に直結することは周知の事実である¹⁾。しかしながら、これ迄に肥満改善のための数多くの医薬品が開発されているものの、そのほとんどが化学合成薬剤であり、副作用や残留の危険性が高い。また、肥満予防を標榜する多くの特定保健用食品や健康食品のほとんどが、脂肪の腸管からの吸収阻害に基づくものであることから、同時に栄養上重要な種々の脂溶性物質の吸収も阻害される可能性が高く、しかも健康食品に至ってはその信

頼性に大きな幅がある。

牛肉エキスの給与は、その機構については不明な点が多いものの、ラットの内臓脂肪蓄積を抑制することが報告されている²⁾。ここで、我々は、化学合成品に依存することなく広く天然素材から抗肥満因子を検索する過程で、ラットにおいて、脱脂牛肉のエタノール抽出画分の陽イオン交換ラム細分画画分 [(+)-fraction] の給与が内臓脂肪蓄積を抑制すること、および、この脂肪蓄積抑制作用は脂肪酸酸化の促進に基づくものであることを示唆した³⁾。しかしながら、経口投与による *in vivo* 実験を基に、牛肉に含まれる抗肥満因子の

Table 1 Primer sequences for real-time PCR analysis

Gene		Primer sequences	GenBank Accession number
CPT1A	sense	5'-CAT TAC AAG GAC ATG GGC AAG TT-3'	NM031559
	antisense	5'-CGG AAG AGC CGG GTC AT-3'	
LCAD	sense	5'-TTG CAA ATT ACG GCA CAA AAG A-3'	J05029
	antisense	5'-TGC CCG CCG TCA TCT G-3'	
PPAR- α	sense	5'-GCA GAG GTC CGA TTC TTC CA-3'	NM_013196
	antisense	5'-TGG GAT AGC CTT GGC AAA TT-3'	
β -actin	sense	5'-TCC TCC TGA GCG CAA GTA CTC-3'	NM_031144
	antisense	5'-GTG GAC AGT GAG GCC AGG AT-3'	

分離・精製を進めるにはその都度大量の各画分が必要となり大きな困難が伴うことから、効率的にスクリーニングするべく培養肝細胞を用いた脂肪酸酸化を指標とする*in vitro*評価系を開発する必要があると考えられる。既に、我々は、(+)-fractionのゲル濾過ピーク画分が、鶏においては抗肥満に加えて食欲増進能をも有することを見出している (data not shown) ことから、牛肉中には、鶏の食欲を増進し、且つ、肥満を抑制する因子が含まれる可能性が極めて高い。

そこで、本研究では、食肉中の抗肥満/食欲増進因子を特定するための一環として、先ず、抗肥満因子をより効率的に分離・精製するべく、培養肝細胞を用いた*in vitro*評価系の構築を行う。次に、この評価系を用いて、(+)-fractionのゲル濾過ピーク画分に含まれる抗肥満因子を特定する。

2. 方法

2.1 抗肥満因子精製のための、培養肝細胞を用いた脂肪酸酸化を指標とする*in vitro*評価系の改良

ラット肝細胞株であるFao細胞は、コレステロール代謝調節の研究によく用いられるヒト肝細胞株であるHepGIIよりも、PPAR α のアゴニストに対する感受性が高いことから、肝臓における脂肪酸酸化調節機構の研究に用いられている⁴⁻⁷⁾。例えば、食品由来のPPAR α アゴニストである13-ヒドロキシ-9, 11-オクタデカジエン酸は、CPT1AのmRNA量を有意に増加させるが、

HepGII細胞においてはその効果が認められないことが報告されている⁵⁾。それ故、本研究では、脂肪酸酸化を指標とする*in vitro*評価系の構築にFao細胞を用いた。

まず、Fao細胞を10%FBS、ペニシリン10,000単位/ml、ストレプトマイシン10,000 μ g/ml含有F-12培地にて37 $^{\circ}$ C・5%CO₂下で培養し、コンフルエントに達した後、終濃度3.2mg/mlになるよう、既報³⁾と同様に調製した(+)-fractionを培養液に添加し、6時間或いは24時間培養後に総RNAを抽出した。総RNAの抽出はセパゾールRNA Iを用いて行なった。cDNAの調製はDNase IおよびcDNA Reverse Transcription Kitを用いて行なった。リアルタイムPCR解析は、7300Real Time PCR System, SYBR Premix Ex Taq, およびTable 1に示したプライマーを用いて脂肪酸酸化の律速酵素およびその転写因子⁸⁾ [カルニチンパルミトイル転移酵素1 A (CPT1A), 長鎖アシル-CoAデヒドロゲナーゼ (LCAD), および、ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 α (PPAR α)] のmRNA量を調べた。次に、Fao細胞を同様の条件下でコンフルエントまで培養し、終濃度0.2, 0.8或いは3.2mg/mlになるよう(+)-fractionを培養液に添加した後、さらに6時間培養後のCPT1A, LCADおよびPPAR α のmRNA量を調べた。

2.2 抗肥満因子の分離・同定

(+)-fractionのゲル濾過ピーク画分を、逆相カラムを用いたHPLCによってさらに分画し、2.1で

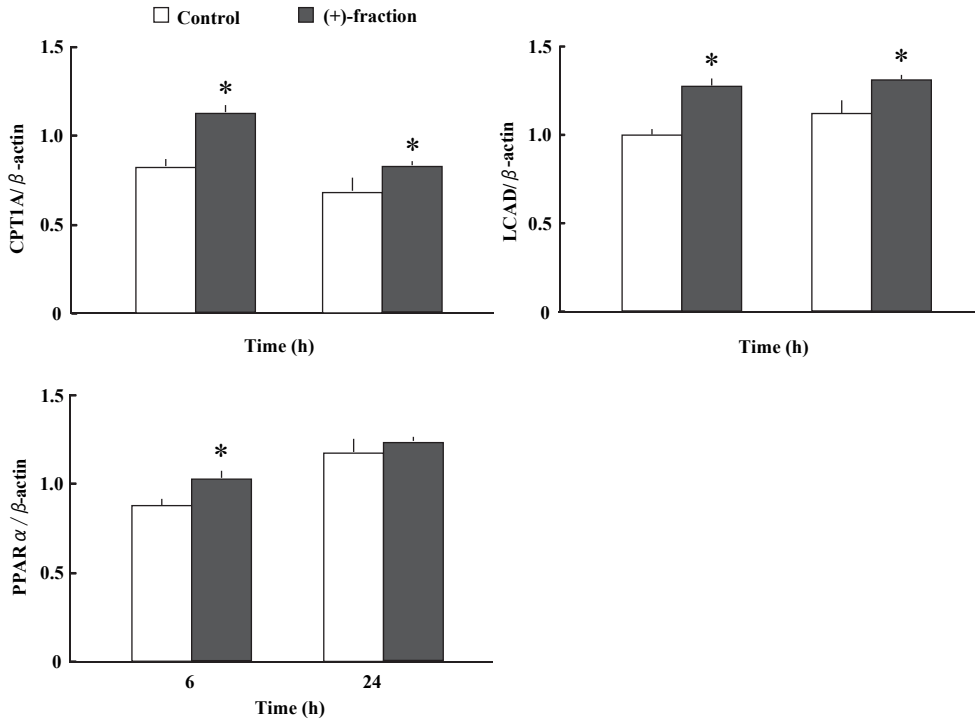


Fig. 1 Effects of (+)-fraction on the mRNA levels of CPT1A, LCAD, and PPAR α after 6h and 24h incubation of Fao cells. *, $P < 0.05$

改良された*in vitro*評価系を用いた脂肪酸酸化律速遺伝子mRNA量の測定を基に、抗肥満因子を含む画分を分離・精製した。そして、得られた画分について、LC-MSを用いて分子量を特定した。

2.3 統計処理

得られた結果についてはStudent *t*-testによって行なった。

3. 結果と考察

Fao細胞の培養液への (+)-fractionのゲル濾過ピーク画分の添加は、添加6時間後にはCPT1A, LCADおよびPPAR α のmRNA量を有意に増加させたが、添加24時間後には、CPT1AおよびLCADのmRNA量を有意に増加させたものの、PPAR α のmRNA量には影響を及ぼさなかった (Fig. 1)。Moya-Camarenaらは、強力なPPARアゴニストであるWY-14643は、Fao細胞の培養液への添加6時間後にはシトクロムP450A1のmRNA量を有意に増加させるが、その値は24

時間後には有意に低下してしまうことを報告していることから、PPAR α のアゴニスト添加後の培養時間の延長によって、脂肪酸酸化関連遺伝子の発現促進効果は低下することが示唆されている⁹⁾。それ故、(+)-fractionの添加が、Fao細胞におけるCPT1A, LCADおよびPPAR α のmRNA量に及ぼす影響を調べるためには、(+)-fractionの添加6時間後が望ましいと考えられた。

Fao細胞の培養液への (+)-fractionのゲル濾過ピーク画分の添加は、CPT1A, LCADおよびPPAR α のmRNA量を有意に増加させたが、CPT1AおよびPPAR α に対する効果は0.8mg/ml以上の濃度で認められるのに対して、LCADに対する効果は3.2mg/mlで初めて認められることが明らかになった (Fig. 2)。これらの結果から、CPT1AおよびPPAR α のmRNA量を指標とすれば、より低濃度で、(+)-fractionの肝細胞における脂肪酸酸化促進効果を評価できることが示唆された。Choiらは、ニホンカボチャ水溶性エキス

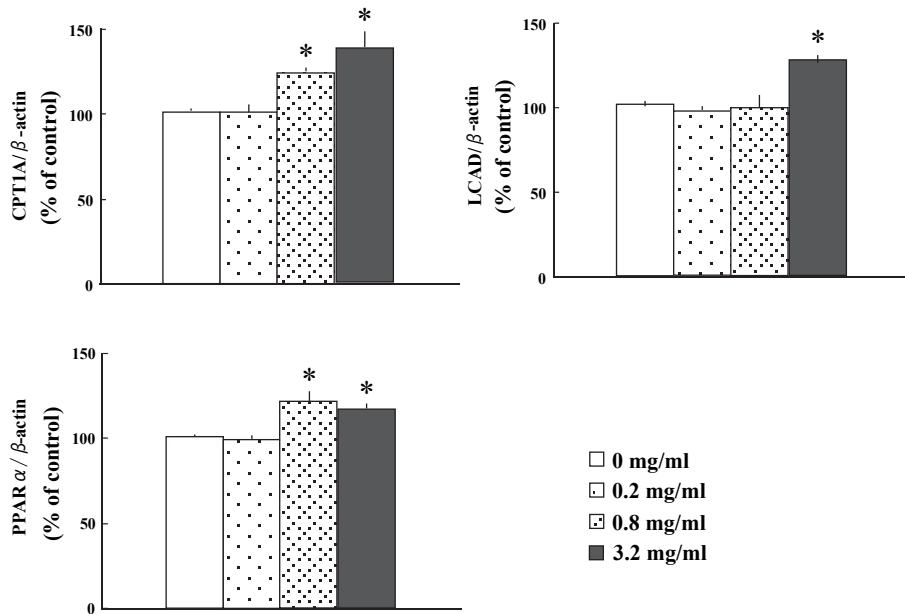


Fig. 2 Effects of (+)-fraction on the mRNA levels of CPT1A, LCAD, and PPAR α in Fao cells. *, P < 0.05

の培養肝細胞における β 酸化促進効果におけるE.C.₅₀値は0.23mg/mlであると報告している¹⁰⁾。それ故、(+)-fractionの β 酸化促進効果は、ニホンカボチャ水溶性エキスのそれに相当する可能性もあると判断された。

(+)-fractionのゲル濾過ピーク画分を、逆相カラムクロマトグラフィーを用いて細分画した画分の培養液への添加が、培養肝細胞のCPT1A、LCADおよびPPAR α のmRNA量に及ぼす影響について調べた結果、ゲル濾過カラムクロマトグラフィーの10分~11分溶出画分を逆相カラムクロマトグラフィーを用いてさらに分画して得られた3.8分~4.2分溶出画分が、LCADおよびPPAR α のmRNA量を有意に増加させることが明らかになった (Fig. 3)。また、LC/MSを用いて解析した結果、その画分の主要な物質の分子量は129であることが明らかになった。

本研究において、(+)-fractionはFao細胞においてPPAR α の標的遺伝子であるCPT1A、LCADおよびPPAR α の総てのmRNA量を増加させたが、その分画画分である分子量129の物質を含む画分は、LCADおよびPPAR α のmRNA量を増加

させたものの、CPT1AのmRNA量には影響を及ぼさなかった。このような、PPAR α の標的遺伝子の発現変動が必ずしも連動しないという結果は、*in vivo*および*in vitro*の両条件下において報告されている。例えば、48時間絶食させたラットの肝臓において、PPAR α のmRNA量は有意に増加するがACOのmRNA量は変化しないこと¹¹⁾、フェノフィブラートを給与されたラットの肝臓において、ACOのmRNA量は有意に増加するがCPT1AのmRNA量は変化しないこと¹²⁾、および、Fao細胞において、リノール酸によりPPAR α の標的遺伝子であるシトクロムP450A1、ACOおよびCPT1AのmRNA量は有意に増加するが、PPAR α のmRNA量は変化しないこと⁶⁾が報告されている。これらのことから、PPAR α の標的遺伝子の発現は、PPAR α によって上向き調節されるものの、その他の種々の条件によっても影響を受けると考えられた。

今回、我々は牛肉に含まれる抗肥満因子の候補物質を同定した。また、既に、我々は(+)-fractionのゲル濾過カラムクロマトグラフィーの分画画分が、鶏においては食欲増進能を有することを見出

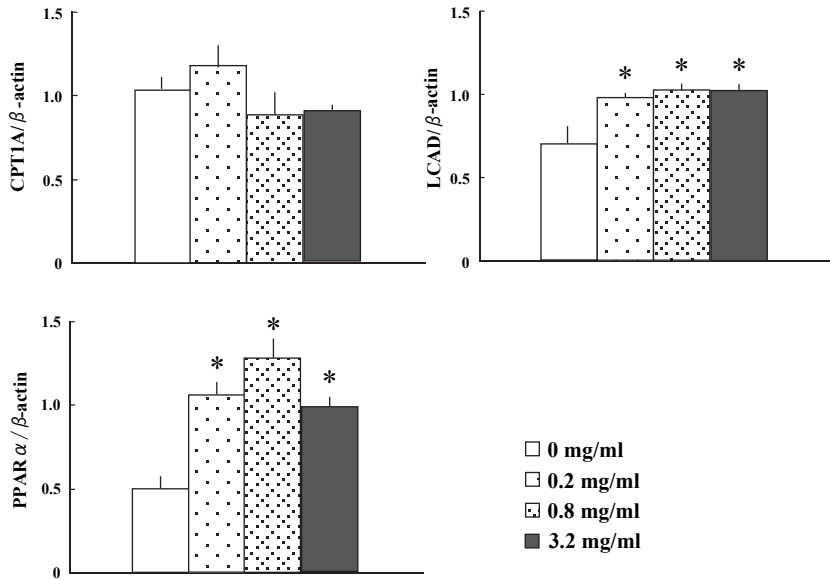


Fig. 3 Effects of the HPLC fraction of (+)-fraction on the mRNA levels of CPT1A, LCAD, and PPAR α in Fao cells.
*, P < 0.05

している (data not shown)。それ故、今後は、今回同定された抗肥満因子の抗肥満および食欲増進の両作用を *in vivo* 条件下で確認する必要があると考えられた。

4. 要 約

本研究では、牛肉中の抗肥満／食欲増進因子を特定する目的で、牛肉のエタノール抽出画分の陽イオン交換樹脂吸着画分 [(+)-fraction] のゲル濾過ピーク画分が、脂肪酸酸化関連遺伝子の発現に及ぼす影響を明らかにするための、培養肝細胞を用いた *in vitro* 評価系を構築し、抗肥満因子の候補物質を同定した。その結果、Fao細胞の培養液への (+)-fractionの添加は、添加6時間後にはCPT1A, LCADおよびPPAR α のmRNA量を有意に増加させたが、添加24時間後には、CPT1AおよびLCADのmRNA量を有意に増加させたものの、PPAR α のmRNA量には影響を及ぼさなかった。それ故、(+)-fractionの添加が、Fao細胞におけるCPT1A, LCADおよびPPAR α のmRNA量に及ぼす影響を調べるためには、(+)-fractionの添加6時間後が望ましいと考えられ

た。また、Fao細胞の培養液への (+)-fractionの添加は、CPT1A, LCADおよびPPAR α のmRNA量を有意に増加させたが、CPT1AおよびPPAR α に対する効果は0.8mg/ml以上の濃度で認められたものの、LCADに対する効果は、0.8mg/mlでは認められず、3.2mg/mlで初めて認められることが明らかになった。さらに、我々は、(+)-fractionのゲル濾過ピーク画分を、さらに逆相カラムクロマトグラフィーを用いて細分画した画分から、LCADおよびPPAR α のmRNA量を有意に増加させる画分を見出し、LC/MSを用いて、その画分の主要な物質の分子量は129であることを示した。これらの結果から、この成分が、牛肉に含まれる抗肥満因子の一つである可能性が示唆された。今後は、本実験において同定された因子の抗肥満および食欲増進の両作用を *in vivo* 条件下で確認する必要があると考えられた。

文 献

- 1) Despres JP, Lemieux I: *Nature*, 444, 881~887, 2006.
- 2) Yoshihara H, Wakamatsu J, Kawabata F, Mori S, Haruno A, Hayashi T, Sekiguchi T, Mizunoya W,

- Tatsumi R, Ito T, Ikeuchi Y : *J Nutr Sci Vitaminol*, **52**, 183~193, 2006.
- 3) 上曾山博, 本田和久, 元木徹, 長谷川信 : 平成19年度食肉に関する助成研究調査成果報告書, **26**, 11~14, 2008.
- 4) Ammerschlaeger M, Beigel J, Klein KU, Mueller SO, *Toxicol Sci* : **78**, 229~240, 2004.
- 5) Kim JH, Yamaguchi K, Lee SH, Tithof PK, Sayler GS, Yoon JH, Baek SJ, *Toxicol Sci* : **85**, 585~593, 2005.
- 6) König B, Koch A, Giggel K, Dordschbal B, Eder K, Stangl GI : *Biochim Biophys Acta* , **1780** , 899 ~ 904, 2008.
- 7) Landrier JF, Thomas C, Grober J, Duez H, Percevault F, Souidi M, Linard C, Staels B, Besnard P : *J Biol Chem*, **279**, 45512~45518, 2004.
- 8) Mandard S, Müller M, Kersten S : *Cell Mol Life Sci*, **61**, 393~416, 2004.
- 9) Moya-Camarena SY, Vanden Heuvel JP, Blanchard SG, Leesnitzer LA, Belury MA : *J Lipid Res*, **40**, 1426~1433, 1999.
- 10) Choi H, Eo H, Park K, Jin M, Park EJ, Kim SH, Park JE, Kim S : *Biochem Biophys Res Commun* , **359**, 419~425, 2007.
- 11) Sterchele PF, Sun H, Peterson RE, Vanden Heuvel JP : *Arch Biochem Biophys* , **326** , 281 ~ 289, 1996.
- 12) Ferreira AV, Parreira GG, Porto LC, Mario EG, Delpuerto HL, Martins AS, Botion LM : *Life Sci* , **82**, 876~883, 2008.

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

長澤 麻央・古瀬 充宏

(九州大学大学院農学研究院)

Mao Nagasawa and Mitsuhiro Furuse

(Faculty of Agriculture, Kyushu University)

Several studies have shown a relationship between depression and animal protein intake. To evaluate whether animal protein intake has an antidepressant-like effect and potentiates acute antidepressant effects, three levels of dietary chicken protein were used as the representative animal protein with imipramine used as the antidepressant. In addition, the effects of dietary chicken protein on brain metabolism were evaluated. After a 4-week feeding trial, a forced swimming test (FST) was conducted. FST was not influenced by both imipramine and dietary protein levels. However, characteristic effects of imipramine treatment on brain monoamine metabolism were observed in the cerebral cortex and hypothalamus. In addition, dietary protein significantly increased taurine and L-ornithine levels even though these amino acids were not contained in the diets.

In conclusion, the metabolism of several amino acids in the plasma and brain were altered by dietary chicken protein.

1. 目的

心の病の発症は現代社会において著しく、その増加は食生活環境と関連づけられて考察されることがある。たとえば、自殺願望ならびに実際に自殺を試みた若者の割合は、ベジタリアンで高いことが報告されている¹⁾。また、我が国の自殺者数は毎年3万人を超え、中でも年齢が50代、60代においてその傾向は高い。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、食による健康志向の中心は体躯にあり、脳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は、抗うつ様効果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

Table 1 The composition (g/kg) of experimental diets with different chicken protein levels

	Chicken protein level		
	Low	Medium	High
Chicken protein	100	200	300
Corn starch	500.486	400.486	300.486
α Corn starch	132	132	132
Sucrose	100	100	100
Soybean oil	70	70	70
Cellulose powder	50	50	50
Mineral mix	35	35	35
Vitamin mix	10	10	10
Choline hydrogen tartrate	2.5	2.5	2.5
Tert-butylhydroquinone	0.014	0.014	0.014

Amino acid composition (g/kg) of chicken protein: L-aspartate 98, L-threonine 47, L-serine 42, L-glutamate 160, L-proline 36, glycine 44, L-alanine 59, L-valine 50, L-cysteine 2.4, L-methionine 30, L-isoleucine 48, L-leucine 83, L-tyrosine 36, L-phenylalanine 41, L-histidine 30, L-lysine 85, L-arginine 64 and L-tryptophan 10.9.

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かった。そこで、前年度の当助成研究において植物タンパク質の代表である大豆タンパク質と畜肉タンパク質である鶏肉、豚肉および牛肉タンパク質の脳機能への影響をモノアミン代謝に着目して比較した¹¹⁾。その結果、鶏肉タンパク質摂取により各脳部位のノルエピネフリン (NE) の代謝回転が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の代謝回転が高く保たれ、視床下部ではセロトニン (5-HT) 代謝回転が唯一高かった。畜肉タンパク質3品の加水分解によるアミノ酸組成に大きな違いがなかったことから、脳のモノアミン代謝は摂取するタンパク質のアミノ酸組成のみでは説明できないことが明らかとなった。

本年度は、鶏肉タンパク質でNEの代謝回転が遅れることに着目した。抗うつ薬の多くはシナプスにおけるモノアミンの再取り込みを抑制するこ

とで、シナプス間隙でのモノアミン含量を増加させる働きを持つ。鶏肉タンパク質摂取によってモノアミンの一つであるNEの代謝が遅れることと抗うつ薬の働きとの関係が明らかになれば、食肉摂取がうつ病に対して貢献できる可能性があると考えた。本研究では、食餌鶏肉タンパク質の水準を低 (10%)、適 (20%) ならびに高 (30%) の3水準とし、抗うつ薬であるイミプラミン投与の有無によって行動ならびに脳のモノアミンとアミノ酸代謝がどのように影響を受けるかについて明らかにすることを目的とした。

2. 方法

3週齢のオスICRマウス (Japan SLC) を、23 ± 1 °C, 12L : 12D環境下で1ケージ当たり2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カゼインに代わり、鶏肉タンパク質を10, 20および30%配合した。鶏肉タンパク質は脱脂したものを使用した。飼料組成と鶏肉タンパク

Table 2 Effects of dietary chicken protein levels and acute imipramine treatment on monoamine concentrations of the cerebral cortex and hypothalamus in mice

Chicken protein level	Low (10%)		Medium (20%)		High (30%)		P		
	0	30	0	30	0	30	Food	Imipramine	Food × Imipramine
Imipramine (mg/10ml/kg)									
Cerebral cortex									
5-HIAA	163 ± 5	146 ± 4	161 ± 10	147 ± 6	162 ± 7	157 ± 7	NS	p < 0.05	NS
DOPAC/DA	0.44 ± 0.06	0.39 ± 0.04	0.44 ± 0.05	0.43 ± 0.04	0.48 ± 0.06	0.32 ± 0.03	NS	p < 0.05	NS
HVA/DA	0.34 ± 0.03	0.31 ± 0.03	0.35 ± 0.03	0.33 ± 0.03	0.47 ± 0.06	0.29 ± 0.01	NS	p < 0.01	NS
5-HIAA/5-HT	1.06 ± 0.06	0.83 ± 0.07	0.98 ± 0.05	0.86 ± 0.05	1.07 ± 0.07	0.85 ± 0.06	NS	p < 0.0005	NS
Hypothalamus									
5-HIAA	675 ± 27	479 ± 37	711 ± 65	628 ± 93	687 ± 50	634 ± 80	NS	p < 0.05	NS
5-HT	195 ± 17	244 ± 28	215 ± 24	252 ± 16	232 ± 26	257 ± 17	NS	p < 0.05	NS
5-HIAA/5-HT	3.36 ± 0.4	2.11 ± 0.3	3.13 ± 0.45	2.53 ± 0.47	2.91 ± 0.44	2.43 ± 0.34	NS	p < 0.05	NS

The number of samples used for analysis was 12. The values for 5-HIAA and 5-HT are expressed as mean ± S.E.M. in pg/mg wet tissue, and the values for DOPAC/DA, HVA/DA and 5-HIAA/5-HT are expressed as mean ± S.E.M. NS: Not significant.

質のアミノ酸組成をTable 1に示す。これらの飼料を用いて28日間の飼養試験を実施した。

Murakami and Furuse¹²⁾の方法にしたがい、飼養試験27日目にオープンフィールド試験、28日目に強制水泳試験をすべてのマウスに対して課した。強制水泳試験に際して、それぞれの飼料を与えたマウスを2群に分けた。1群には対照として生理的食塩水を、もう1群には抗うつ薬であるイミプラミン (30mg/10ml/kg) を強制水泳試験の1時間前に腹腔に投与した。試験終了後、頸椎脱臼を行い、全脳を取り出した。その後、大脳皮質と視床下部を切り出し、液体窒素で急速冷凍後に-80℃で保存した。切り出した部位のモノアミン (NE, ドーパミン (DA) および 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。血漿、視床下部および大脳皮質の遊

離アミノ酸濃度は、Pico-Tagアミノ酸分析装置を用いて測定した。アラニン (Ala), アルギニン (Arg), アスパラギン (Asn), アスパラギン酸 (Asp), グルタミン (Gln), グルタミン酸 (Glu), グリシン (Gly), ヒスチジン (His), イソロイシン (Ile), ロイシン (Leu), リジン (Lys), メチオニン (Met), フェニルアラニン (Phe), プロリン (Pro), セリン (Ser), タウリン (Tau), トレオニン (Thr), トリプトファン (Trp), チロシン (Tyr), オルニチン (Orn) ならびにバリン (Val) を測定した。

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), 「実験動物の飼養及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。二元配置分散分析の

Table 3 Effects of dietary chicken protein levels and acute imipramine treatment on plasma amino acid concentrations in mice

Chicken protein level	Low (10%)		Medium (20%)		High (30%)		P		
	0	30	0	30	0	30	Food	Imipramine	Food × Imipramine
Imipramine (mg/10ml/kg)									
L-Aspartate	17.1 ± 2.9	25.1 ± 8.0	16.1 ± 1.9	15.0 ± 2.7	52.5 ± 10.4	23.5 ± 1.6*	p < 0.005	NS ^b	p < 0.05
L-Serine	74.6 ± 14	54.6 ± 7.0	58.1 ± 8.7	40.5 ± 6.9	87.7 ± 14.5	45.8 ± 6.5	NS	p < 0.005	NS
L-Asparagine	23.5 ± 4.6	14.7 ± 2.2	18.2 ± 3.4	12.7 ± 2.1	29.0 ± 5.2	15.3 ± 1.9	NS	p < 0.005	NS
Glycine	85 ± 13	57 ± 9	96 ± 13	62 ± 10	134 ± 20	81 ± 7	p < 0.05	p < 0.001	NS
L-Glutamine	386 ± 68	375 ± 43	349 ± 52	210 ± 36	358 ± 54	235 ± 30	NS	p < 0.05	NS
Taurine	353 ± 76	327 ± 53	412 ± 57	265 ± 42	578 ± 139	506 ± 53	p < 0.05	NS	NS
L-Threonine	117 ± 25	78 ± 10	99.3 ± 11	68.6 ± 15	129 ± 24	76 ± 15	NS	p < 0.01	NS
L-Alanine	307 ± 53	265 ± 28	257 ± 30	156 ± 24	321 ± 55	195 ± 27	NS	p < 0.01	NS
L-Arginine	101 ± 20	52 ± 7	48 ± 5	18 ± 6	166 ± 58	44 ± 12	NS	p < 0.05	NS
L-Proline	78.1 ± 14	60 ± 8.3	70.7 ± 10	42.2 ± 8.2	105 ± 20	49.1 ± 8.6	NS	p < 0.005	NS
L-Tyrosine	53.6 ± 11.3	33.4 ± 6	42.5 ± 7.8	32.2 ± 8.4	76.1 ± 15.6	33.3 ± 6.2	NS	p < 0.005	NS
L-Valine	156 ± 25	133 ± 16	161 ± 19	120 ± 22	258 ± 48	163 ± 23	p < 0.05	p < 0.05	NS
L-Methionine	39.8 ± 7	25.8 ± 3.3	42.5 ± 4.4	32.0 ± 6.2	70.5 ± 16.3	37.5 ± 6.4	p < 0.05	p < 0.01	NS
L-Isoleucine	54.3 ± 9.7	40.0 ± 6.1	57.0 ± 7.3	39.9 ± 8	103 ± 22	57.3 ± 8.8	p < 0.01	p < 0.01	NS
L-Leucine	93 ± 14	76 ± 11	95 ± 11	67 ± 12	179 ± 34	92 ± 12	P < 0.005	p < 0.005	NS
L-Phenylalanine	47.5 ± 8	30.5 ± 3.8	53.3 ± 6.5	35.5 ± 7.2	75.6 ± 13.5	46.5 ± 5.7	p < 0.05	p < 0.005	NS
L-Tryptophan	16.0 ± 3.4	12.4 ± 1.6	19.9 ± 2.8	13.1 ± 3.1	31.4 ± 7.0	15.9 ± 3.0	NS	p < 0.05	NS
L-Ornithine	22.3 ± 4.1	16.2 ± 2.2	18.8 ± 2.9	13.5 ± 2.6	41.1 ± 8.8	19.4 ± 2.5	p < 0.05	p < 0.01	NS
L-Lysine	148 ± 29	100 ± 15	136 ± 15	84 ± 18	242 ± 50	111 ± 18	p < 0.05	p < 0.005	NS

The number of samples for analysis was 12. All results are expressed mean ± S.E.M. in μ mol/l plasma. * Significantly different at $p < 0.05$ compared to each the saline group. NS: Not significant.

後に, Tukey-Kramer法により多重検定を行った。

3. 結果と考察

成長 (体重増加量), 飼料摂取量, オープンフィールド試験ならびに強制水泳試験に, イミプラミンと鶏肉タンパク質水準の有意な効果は認められなかった (データ未掲載)。

Table 2 に大脳皮質と視床下部において有意な効果が検証されたモノアミンならびに代謝回転の結果を示す。大脳皮質においては, 5-HIAA濃度とDOPAC/DA, HVA/DAならびに5-HIAA/5-HTの比がイミプラミンにより有意に減少した。また, 視床下部では, イミプラミンにより5-HIAA

濃度の有意な低下と5-HT濃度の有意な上昇が確認され, その結果5-HIAA/5-HTの比がイミプラミンにより有意に減少した。鶏肉タンパク質水準によるモノアミン代謝への影響は, 本実験の設定において指標と考えたNEの代謝変化も含め両脳部位において観察されなかった。強制水泳試験におけるマウスの不動時間の短縮を抗うつ様効果の指標として取り上げた^{13, 14)} が, イミプラミンの効果は検出できなかった。一方, 脳内において, イミプラミン投与によって5-HIAA/5-HTの比が有意に減少したことから, イミプラミン本来の薬理作用は確認された。また, ベジタリアンでうつ病の罹患率が高いこと^{15, 16)} から, 鶏肉タンパク

Table 4 Effects of dietary chicken protein levels and acute imipramine treatment on amino acid concentrations of the cerebral cortex in mice

Chicken protein level	Low (10%)		Medium (20%)		High (30%)		P		
	0	30	0	30	0	30	Food	Imipramine	Food × Imipramine
Imipramine (mg/10ml/kg)									
L-Aspartate	2784 ± 182	2483 ± 233	2576 ± 169	2124 ± 107	2898 ± 201	2838 ± 116	p < 0.05	NS ^b	NS
L-Glutamate	9438 ± 689	6926 ± 712	9143 ± 552	6942 ± 412	9447 ± 659	8954 ± 309	NS	p < 0.001	NS
L-Serine	933 ± 70	825 ± 64	862 ± 58	687 ± 38	945 ± 74	907 ± 35	p < 0.05	p < 0.05	NS
L-Asparagine	97.9 ± 6.2	76.4 ± 7.2	94.2 ± 6.3	71.7 ± 4.9	96.7 ± 6.2	92.9 ± 5.3	NS	p < 0.005	NS
Taurine	7555 ± 505	6714 ± 607	7328 ± 456	6896 ± 462	8105 ± 530	8471 ± 361	p < 0.05	NS	NS
L-Histidine	55.7 ± 4.1	43.9 ± 4.5	50.8 ± 5.8	41.6 ± 3.7	51.2 ± 3.7	47.8 ± 2.9	NS	p < 0.05	NS
L-Threonine	365 ± 30	291 ± 17	369 ± 18	307 ± 22	343 ± 25	354 ± 14	NS	p < 0.05	NS
L-Alanine	804 ± 62	680 ± 65	789 ± 42	598 ± 48	811 ± 64	753 ± 28	NS	p < 0.01	NS
L-Arginine	124 ± 10	93 ± 8	104 ± 11	87 ± 5	118 ± 8	107 ± 9	NS	p < 0.01	NS
L-Proline	66.0 ± 5.2	54.7 ± 5.2	62.9 ± 5.2	49.7 ± 2.7	68.5 ± 4.1	64.0 ± 4	NS	p < 0.05	NS
L-Tyrosine	70.4 ± 5.6	58.1 ± 8.3	67.7 ± 6.5	56.2 ± 7.3	62.9 ± 5.2	65 ± 6.4	NS	p < 0.05	NS
L-Valine	93.1 ± 8.0	74.2 ± 9.0	94.8 ± 6.4	75.3 ± 6.1	99.4 ± 6.5	90.2 ± 6.2	NS	p < 0.01	NS
L-Isoleucine	32.8 ± 5	29.0 ± 1.5	33.7 ± 2.3	30.2 ± 1.9	40.2 ± 4	39.0 ± 2.6	p < 0.05	NS	NS
L-Leucine	88.7 ± 6	74.4 ± 6.7	78.3 ± 5.9	70.5 ± 4.3	96.0 ± 5.7	90.1 ± 5.8	p < 0.01	NS	NS
L-Phenylalanine	45.9 ± 2.7	36.5 ± 2.9	44.5 ± 4.1	38 ± 2.7	47.9 ± 2.9	42.8 ± 3.3	NS	p < 0.01	NS
L-Tryptophan	12.7 ± 1.2	11.8 ± 0.8	15 ± 1.6	11.6 ± 1.1	11.9 ± 1.6	15.1 ± 1.1	NS	NS	p < 0.05
L-Lysine	197 ± 17	152 ± 14	206 ± 15	153 ± 11	220 ± 17	183 ± 9	NS	p < 0.0005	NS

The number of samples for analysis was 12. All results are expressed mean ± S.E.M. in $\mu\text{mol/g}$ wet tissue. NS: Not significant.

質の摂取量の増加に伴い行動変化が起こることを想定したが、不動時間に有意な変化は認められなかった。

血漿遊離アミノ酸濃度において有意な効果が検出されたアミノ酸をTable 3に示す。AspとTauを除き、血漿遊離アミノ酸濃度はイミプラミンにより低下した。飼料鶏肉タンパク質の増加に伴い、血漿遊離Asp, Gly, Tau, Val, Met, Ile, Leu, Phe, OrnならびにLys濃度は高まった。Aspにのみ交互作用が確認され、高鶏肉タンパク質飼料で高まったAsp濃度をイミプラミンが低下させる結果となった。Ser, Gly, およびThr間には、可逆的な代謝経路が存在していることが知られている。本研究において、血漿遊離ThrおよびSer濃度に鶏肉タンパク質水準の影響は認められなかったが、Gly濃度が有意に高まっていることから

両アミノ酸がGlyに代謝されたことが示唆された。Proに関しても血漿濃度に変化は認められず、GluあるいはOrnへの代謝が考えられた。鶏肉タンパク質によりGluに関しては濃度変化がなかったが、Ornの増加が確認された。OrnはArgからも代謝されるため、Orn含量の増加は、ArgならびにProが代謝基質として貢献したものと推察された。

視床下部の遊離アミノ酸濃度にイミプラミンならびに鶏肉タンパク質水準の影響は認められなかった。大脳皮質の遊離アミノ酸濃度において有意な効果が検出されたアミノ酸をTable 4に示す。Asp, Tau, Ile, LeuならびにTrpを除いて、大脳皮質の遊離アミノ酸濃度はイミプラミンにより低下した。Asp, Ser, Tau, IleおよびLeu濃度は鶏肉タンパク質含量の増加に伴い上昇した。Trp

濃度に交互作用が認められ、20%鶏肉タンパク質水準では対照区で、30%鶏肉タンパク質水準ではイミプラミン投与区で高い値を示した。

大脳皮質における遊離Tau, IleおよびLeu濃度の上昇は、血漿濃度の増加を反映したものと考えられた。血漿Ser濃度は鶏肉タンパク質水準の影響を受けなかったが、大脳皮質では水準に従って増加した。この結果は、血漿で高まったGlyが脳に移行後にSerに代謝された結果と思われる。Tauには抗うつ作用¹²⁾が、また、Ser⁶⁾とAsp¹⁰⁾には鎮静作用が認められているため、鶏肉タンパク質の長期摂取は脳機能にプラスに働く可能性が考えられる。

鶏肉タンパク質が、血漿ならびに大脳皮質の遊離アミノ酸濃度に及ぼした影響の中で特徴的であったものに、共に鶏肉タンパク質に含まれないTauとOrnの濃度変化が挙げられる。これらの増加は、それぞれの基質となるシステインやArgの摂取量の増加によるものと考えられた。

一方、イミプラミンは血漿ならびに大脳皮質における多くの遊離アミノ酸濃度を減少させる効果を有することが明らかであった。この結果は以前の報告⁵⁾と一致するものであり、抗うつ薬が鎮静ならびに抗うつ様効果を有するアミノ酸の脳内代謝に大きく関与することが示唆された。

4. 要 約

動物性タンパク質が抗うつ様効果を有するか、また、抗うつ薬の効果を増強するか否かを評価した。1週間の馴化後、動物性タンパク質として、鶏肉タンパク質抽出物を3水準で配合した飼料をICRマウス（4週齢、雄）に4週間給与した。給与期間中の体重と摂食量を測定し、また、給与試験開始27日目後にオープンフィールド試験を行い、28日目に強制水泳試験（FST）を行った。FSTの開始前に0.9%生理食塩水あるいは抗うつ

薬であるイミプラミンを腹腔内投与した。FST終了後、血漿、大脳皮質および視床下部を採取し、モノアミン含量ならびに遊離アミノ酸含量を測定した。FSTにおいて、イミプラミンと鶏肉タンパク質抽出物の有意な効果は観察されなかった。しかし、大脳皮質ならびに視床下部のモノアミン代謝において、イミプラミンの特徴的な効果が確認され、イミプラミンが確かに中枢へと作用していることが確認された。一方、鶏肉タンパク質抽出物にタウリンならびにオルニチンは含まれていないにもかかわらず、鶏肉タンパク質抽出物摂取によって血漿中のこれらのアミノ酸含量が増加した。本実験結果より、鶏肉タンパク質抽出物摂取が血漿ならびに大脳皮質でのアミノ酸代謝に影響を与える可能性が示唆された。

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.
- 11) 古瀬充宏：平成21年度食肉に関する助成研究調査成果報告書, **28** : 10~14. 2010.
- 12) Murakami T, Furuse M. : *Amino Acids*, **39** : 427~434. 2010.
- 13) Cyran JF, Valentino RJ, Lucki I. : *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **29** : 547~569. 2005.
- 14) Lahmame A, Carmen del Arco, Pazos A, Yritia M, Armario A. : *Eur. J. Pharmacol.*, **337** : 115~123. 1997.
- 15) Baines S, Powers J, Brown W. : *Pub. Health Nutr.*, **10** : 436~442. 2007.
- 16) Larsson CL, Klock KS, Astrom AN, Haugejorden O, Johanssorn G.J. : *Adolescent Health* **31** , 190 ~ 198. 2002.

食肉由来ACE阻害ペプチドの筋肥大作用とその機構

Skeletal Muscle Hypertrophic Effect of Meat-derived ACE Inhibitory Peptides and Its Mechanism

池内 義秀・朱 曉琳・辰 巳 隆 一・水野 谷 航

(九州大学大学院農学研究院)

Yoshihide Ikeuchi, Xiao-Lin Zhu, Ryuichi Tatsumi, Wataru Mizunoya

(Department of Bioscience and Biotechnology Graduate School of Agriculture, Kyushu University)

Main aim of this experiment is to investigate whether angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory dipeptide (Ile-Tyr (IY)) that is expected to be useful as antihypertensive drug has competence to give rise to muscle hypertrophy. Mouse skeletal muscle C2C12 myoblast cells treated with 10~100 μ M dipeptide (IY) showed an increase in expression level of myogenin, molecular marker of early differentiation, and a decrease with 500~1000 μ M. Expression level of myosin heavy chain, molecular maker of late differentiation, showed a concentration-dependent increase. Addition of IY (10~1000 μ M) to the culture media also increased the diameter of C2C12 myotubues by up to 35%. The present results demonstrated that IY has muscle hypertrophic effect similar to that of drug captopril (3-mercapto-2-methylpropanoyl-L-prolin).

1. 目 的

骨格筋は、力の発揮という力学的仕事を行うために特殊化した器官であると同時に、家畜のそれはヒトにとっては重要な動物性タンパク質源でもある。その筋肉は力学的仕事の負荷量や活動量の低下により容易に萎縮する。たとえば、長期間の安静臥床や骨折によるギブス固定、無重力暴露あるいはラットにおける後肢懸垂は萎縮を引き起こす(廃用性筋萎縮)。また、老化や神経疾患時にも筋の萎縮は認められる(サルコペニア)。このように筋萎縮は筋肉の不使用、負傷、老化あるいはある種の神経筋疾患の結果として生じる筋肉の崩壊である。特にヒトの加齢に伴う身体能力の低下は急激な高齢化社会への進行とともに国民医療

費の増大という社会問題を引き起こしている¹⁾。また、家畜の加齢に伴う筋萎縮による筋肉量の損失も畜産経済的に問題である。

これまで筋萎縮の抑制・改善には薬剤(ホルモンなど)が有効であると報告されてきたが、多くの場合、他臓器への副作用が観察される。一般に運動を伴わず、食品のみによって筋肥大を誘導することは不可能と考えられてきた。しかし、我々は先に食肉(特に牛肉エキス)に未知の筋肉肥大因子が含まれていることを示唆する結果を得た。このことから、食肉摂取による加齢に伴う筋萎縮の軽減化が期待される²⁾。最近、アンジオテンシン変換酵素(ACE)の活性変動が骨格筋の機能に影響を及ぼすこと、とりわけ薬理的ACE阻害剤(captoprilなど)が筋芽細胞の分化を促進する

ことが報告され、注目されている³⁾。ACEを阻害するペプチドは食肉からも多数同定されていることから、これらの生理活性ペプチドがACE阻害剤と同様に骨格筋肥大作用を有すると予想される⁴⁾。そこで我々は、食肉由来ACE活性阻害ペプチドの筋肥大作用とその作用機序について検討することにした。本研究では、アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害ペプチドとしてよく知られているジペプチド (Ile-Try (IY))⁵⁾ をマウスサテライト細胞に由来する筋芽細胞株C2C12の培養液に添加した後、分化初期マーカーとしたmyogeninの発現量、分化後期マーカーとしたMyosin Heavy Chain (MyHC) の発現量および筋管 (幼弱筋線維) 直径を測定し、ACE阻害ペプチドが筋肥大に及ぼす影響を検討した。

2. 方法

2.1 細胞培養

マウス骨格筋由来筋芽細胞株C2C12をCell matrixによりコラーゲンコートした24穴プレートに播種した。AA-mixとgentamicinを終濃度各1%, 0.5%添加した10%FBS-Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM, Invitrogen) (1mL/well) を基本培地とした。培地は播種後24時間目一度、その後は48時間毎に交換した。subconfluentになった時点で2%HS-DMEM (500L/well) に変え、分化を誘導した (分化誘導期)。分化誘導開始から3日間ではほぼ全ての細胞が筋管を形成した時点で筋管成熟期とした。

2.2 ウェスタンブロッティング

分化誘導開始時に、2%HS-DMEMを基本培地 (2%HS, 1%AA-mix, 0.5%gentamicin in DMEM, 3ml/well) とした24穴のプレート (3セット) にACE阻害剤captopril (D-3-mercapto-2-methylpropanoyl-proline, IC₅₀:20nM) およびACE阻害ジペプチド (Ile-Try, IC₅₀:2.31μM) を10~1000μM添加した。培養72時間後、筋管を形成したプレートの培養液を捨て、温PBSで2回洗浄した後、1000μMのcaptoprilまたはIYを含む培地を添加して37℃で15分間インキュベートし

た。その後プレートを氷上に置き、冷PBSで2回洗った。さらに細胞溶解液 (0.1%Nonidet P-40, 50mM Tris (pH7.6), 250mM NaCl, 5mM EDTA, 2% protease inhibitor cocktail, 1% phosphatase inhibitor cocktail (Nacalai Tesque)) を加え、5分間振とうした。光学顕微鏡で確認しながら接着した細胞が見えなくなるまでピペットチップでウェルの底を擦って細胞を無理やり剥がした。得られた細胞溶解液をチューブに回収した。細胞溶解液と2×サンプルバッファー (50mM Tris (pH6.8), 2%SDS, 5%2-Mercaptoethanol, 0.02% Bromophenol blue (BPB), 40% glycerol) を1:1で混合後、湯浴中で3分間煮沸し、SDS-PAGE (12% gel) にて分離したタンパク質を、ニトロセルロース膜に転写した。転写膜をanti-α tubulin (内部標準), anti-myogeninあるいはanti-MyHC, およびビオチン化2次抗体とペルオキシダーゼ標識アビジンで処理した後、ECL検出試薬を用いて免疫反応像をX線フィルムに出力した。

2.3 筋管直径の測定²⁾

分化誘導開始時に、2%HS-DMEMを基本培地 (2%HS, 1%AA-mix, 0.5%gentamicin in DMEM, 3ml/well) とした24穴のプレート (3セット) にACE阻害剤captopril ((IC₅₀:20nM) およびACE阻害ジペプチド (Ile-Try, IC₅₀:2.31μM) を10~1000μM添加した。培養72時間後、各ウェルで無作為に筋管40本前後を写真に撮影し、Image J (NIH) にて筋管の最も太い部位を直径として計測し、その平均値をウェルの測定値とした。

3. 結果と考察

ACE阻害剤 (0~1000μM captoprilまたはIY) を含む分化誘導培地で筋芽細胞株C2C12の分化誘導を開始してから72時間後に、myogenin, MyHCの発現レベルをウェスタンブロッティングにより調べた (Fig. 1A)。Fig. 1Bは、myogeninおよびMHCの各バンドの強度をImage J (NIHイメージソフト) で計測し、それぞれ内部標準α tubulin

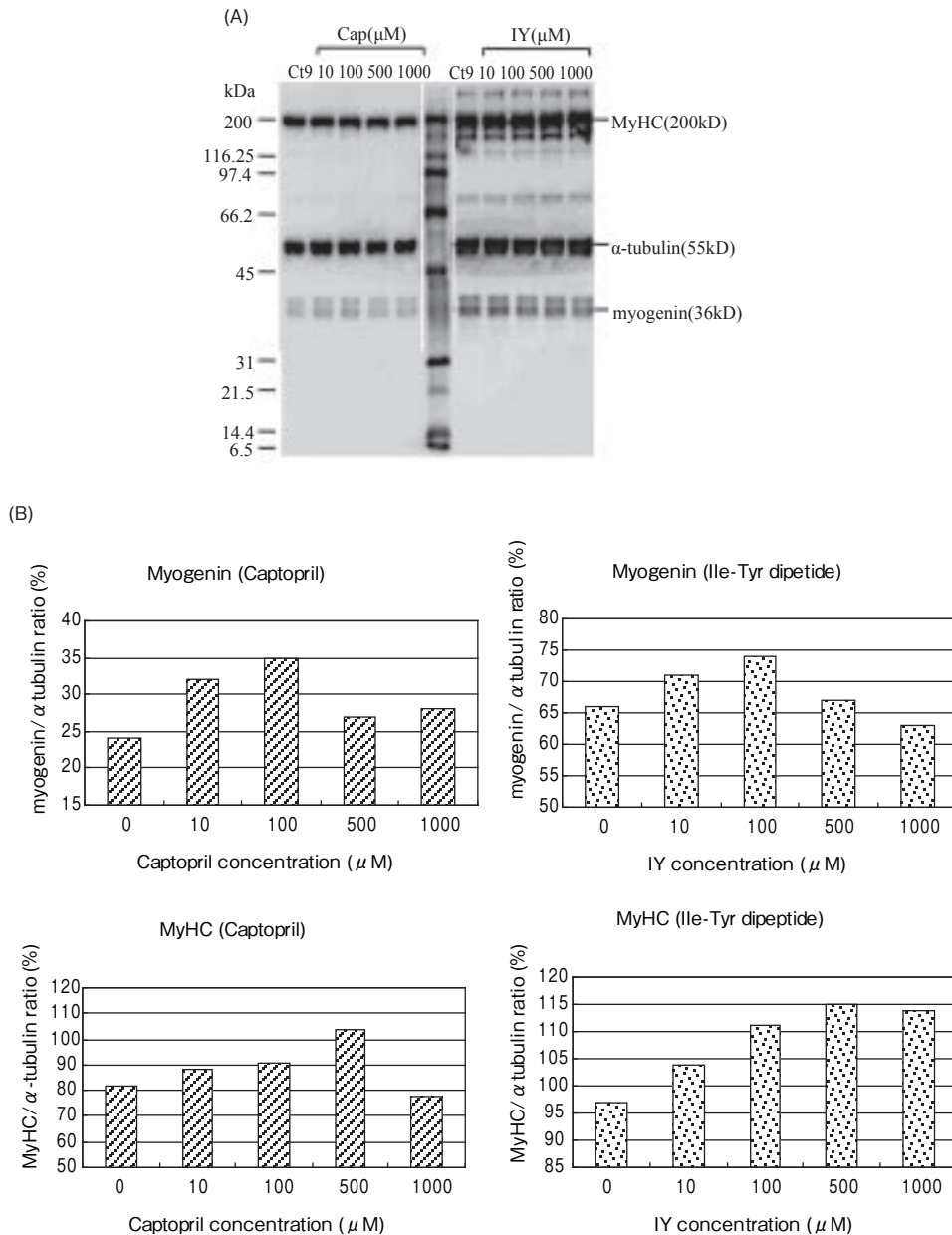


Fig. 1 Effect of ACE inhibitors (captopril and dipeptide (IY)) on the myogenic differentiation in C2C12 cells. C2C12 cells (1×10^5 cells/well for captopril and 1×10^6 cells/well for IY) were cultured in either differentiation medium (DM) alone (depicted as "0") or with various concentrations of ACE inhibitors. Each DM was changed at day 1 after induction of differentiation, and cell lysates and conditioned medium were harvested at day 3. Western blot analysis of cell lysates was performed to determine myogenin and MyHC expression levels.

(A) Representative blots pattern was shown.

(B) Expression levels of myogenin and MyHC were expressed as relative values to α -tubulin expression.

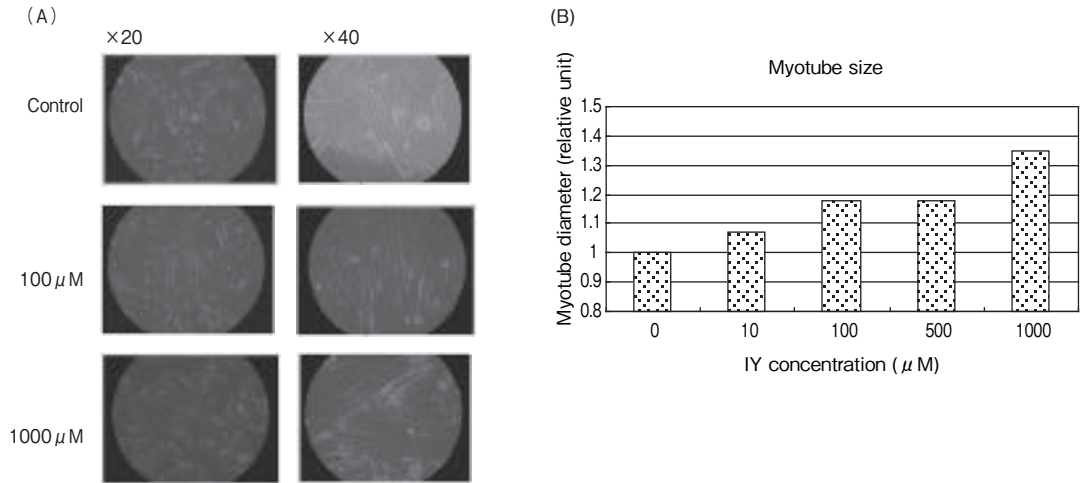


Fig. 2 Effect of ACE inhibitors (captopril and dipeptide (IY)) on C2C12 myotube diameter.
 (A) Morphological observation: morphological analyses of both non-treated (upper) and ACE inhibitor-treated myotubes were performed at day 3 after induction of differentiation.
 (B) Myotube diameter: the results were expressed as relative values to CNT (non-treated) group. Diameters were measured with the thick of 10 large myotubes per well.

に対する比で表したものである。なお、本実験ではcaptoprilをポジティブコントロールとして用いた。

筋分化初期のマーカーであるmyogeninの発現レベルはcaptopril, IY添加区とも100 μMまで増加したが、500, 1000 μMでは低下した。ACE阻害剤の濃度が高いほど分化が促進され、筋管形成が早まったのでmyogeninの発現量が抑えられたものと推測された。captopril添加区のMyHC発現レベルは500 μMまでは増加したが、1000 μMでは無添加区よりも低かった。これは、captoprilの細胞毒性に起因するものと思われる（実際、筋管の形態に異常が観察された）。一方、IYのMyHC発現レベルはcaptoprilのように1000 μMで低下することはなかった。MoriらはACEを過剰発現させることによって、筋分化マーカーとしたMyHCの発現低下が認められ、ACE阻害剤（captoprilなど）を用いてACE活性を低下させると筋芽細胞の分化が促進されると報告しているので、今回のデータはその結果を支持するものであった³⁾。captoprilのACE阻害活性はIYに比べ100倍ほど高いが、今回の実験ではACE阻害活性の強さと筋

肥大作用には明瞭な相関が認められなかった。

Fig. 2 Aと**2 B**はIYを添加した筋管細胞とその直径の計測結果をそれぞれ示している。Fig. 2Aの写真からわかるように、ジペプチドIYの添加は明らかに筋管の肥大を誘導した。特に1000 μMの添加で、筋管の最も太い部分の直径の平均値は無添加の場合と比べて1.35倍であった。

骨格筋の肥大・再生（リモデリング）には、筋幹細胞である衛星細胞が不可欠であることが知られている⁶⁾。衛星細胞の増殖や分化は筋肥大・再生の重要な過程であり、これには細胞内外の多くの因子が関与することが明らかにされている。近年、高齢者にACE阻害剤（captoprilなど）の長期投与により、筋重量の増加および筋持久力が回復することが多くの臨床調査で確認されている⁷⁾。今回drug captoprilとは異なり、ACE阻害活性を持つジペプチドであるIYも筋肥大作用を持つことがはじめて明らかになったことから、食品（食肉）由来のACE阻害ペプチドも同様の筋肥大効果を持つことが期待される。現在我々は食肉由来ACE阻害ペプチド（例えばIKW（IC50: 0.21 μM）、LKP（IC50: 3.2 μM）、MNP（IC50:

66.6 μ M)^{8~10)}について今回同様の実験を継続中である。また、その詳しい作用機序はまだ不明であることから、今後はACE活性を人為的に変動させ、筋分化に主導的な役割を果たす調節因子(MyoD, Myf5, myogenin, MRF4)および融合に重要な細胞接着因子(α 4integrin, VCAM-1)の発現、細胞内シグナル伝達因子ERK1/2およびAktリン酸化レベルについて調べる。さらに、動物への投与による生体におけるACE阻害ペプチドの筋肥大作用を検証する予定である。

4. 要 約

本研究ではACE阻害活性を持つジペプチドIle-Try (IY)の筋肥大効果について、マウス由来の筋芽細胞C2C12を用いて検討した。10~100 μ M IYの培地への添加は分化誘導72時間後の筋細胞のmyogeninの発現レベルを増加させたが、500~1000 μ Mでは逆に低下した。一方MyHCの発現レベルは濃度依存的(10~1000 μ M)に増加した。また、1000 μ M IYの添加で筋管の直径は無添加区に比べ1.35倍増加した。これらの結果から、すでに筋肥大効果が確認されているACE阻害剤captoprilと同様、IYジペプチドにも筋芽細胞の分化を促進する作用と筋細胞を肥大する作用があることが明らかになった。

文 献

- 1) Greenlund, L.J.S. and Nair K.S. : *Mechanisms of Ageing and Development*, **124**, 287~299, 2003.
- 2) 馬場研斗, 水野谷航, 辰巳隆一, 池内義秀, 関口健 : 平成20年度食肉に関する助成研究成果報告書, **27**, 17~23, 2008.
- 3) Mori, S. and Tokuyama, K. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **353**, 369~375, 2007.
- 4) Verrcruysse, L., Canp, J. V. and Ace, G. S. : *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 8106~8115, 2005.
- 5) Cheung, H-S, Wang, F-L, Ondetti, M.A., Sabo, E. F. and Cushman, D. W. : *J. Biol. Chem.*, **255**, 401~407, 1980.
- 6) Tatsumi, R. and Allen, R. E. : *Animal Science Journal*, **79**, 279~290, 2008.
- 7) Sumukadas, D., Witham, M. D., Struthers, A. D. and Mcmurdo, M. E. T. : *J. Nutri., Health & Aging*, **12**, 480~485, 2008.
- 8) Fujita H., Yokoyama K. and Yoshikawa M. : *J. Food Sci.*, **65**, 564~569, 2000.
- 9) Arihara, K., Nakashima, Y., Mukai, T., Ishikawa, S. and Itoh, M. : *Meat Sci.*, **57**, 319~324, 2001.
- 10) Katayama, K., Anggraeni, H. E., Mori, T., Ahhmed, A. M., Kawahara, S, Sugiyama, M., Nakayama, Maruyama, M. and Muguruma, M. : *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 355~360, 2008.

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¹・豊田裕子²・豊田淳^{1,2,3}

(¹茨城県畜産センター, ²茨城大学農学部, ³東京農工大連合農学研究所)

Naoki Onizawa¹, Hiroko Toyoda² and Atsushi Toyoda^{1,2,3}

(¹Ibaraki prefectural livestock research center, ²College of Agriculture, Ibaraki University,

³United Graduate School of Agricultural Science, Tokyo University of Agriculture and Technology)

Creatine is a nitrogenous organic acid that occurs naturally in vertebrates and helps to supply energy to muscle. Creatine is synthesized from the three amino acids: glycine, L-arginine and S-adenosylmethionine, and used widely for the energy supplements for the athletes. Effects of oral administration of creatine on the peripheral tissues have been widely investigated, while the studies of its function in the brain and the animal behaviors have been limited. We have investigated the functions of creatine in the brain. Creatine activates mitochondria in the spines of hippocampal neurons and changes the morphology and function of hippocampal synaptic junctions. Recently, it was reported that chronic selective-serotonin reuptake inhibitor (SSRI) reverses the maturation of hippocampal neurons and changes synaptic transmission in hippocampus. Thus, we observed whether creatine rescues the SSRI-induced immature hippocampus. Chronic SSRI (fluoxetine) reduced the expression of mature neuron marker calbindin in hippocampus, and chronic creatine administration with SSRI rescued the reduction of calbindin. However, calretinin expression was not changed with chronic fluoxetine administration.

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、運動選手はパフォーマンス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ある。

私共は、クレアチンの摂食促進作用を発見し、そのメカニズムの研究を行っている。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が視床下部で統合され、行動が制御されている。一方で、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^{4,5)}。私共は、平成20年度、21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⁶⁾およびクレアチンは摂食促進ペプチドであるオレキシンを脳各部位で減少させる作用があること⁷⁾を見出した。クレアチンの摂食促進作用はオレキシン系とは別経路で機能している可能性が示唆された。また、クレアチンには海馬由来の培養ニューロンのシナプス形成を促進する作用があり、クレアチンを投与した海馬ニューロンではシナプス数が増加する⁸⁾ことが知られている。

近年の日本では、急激な高齢化や社会的ストレスの増加によって、うつ病などの中枢神経系機能障害疾患の患者数が増加している。これらの疾患では、即効性のある薬剤がないため治療期間が長期にわたることが多く、また副作用に関する報告(自殺企図のリスク増加、攻撃性の増加)もなされている。特に、近年多く処方されるようになり、副作用の少ないとされる抗うつ薬SSRI(選択的セロトニン再取り込み阻害薬)に関して、先に挙げた副作用のリスクが注目されるようになっていく。また最近、SSRIの長期間投与により、マウス海馬ニューロンが幼若化し、行動が変容する現象が発見された^{9,10)}。この未熟ニューロンのシナプス伝達は電気生理学的にも異常になり、興奮性のシナプス伝達が抑制される。それゆえ、SSRIの副作用と関連があるのではないかと指摘されている。先にも触れたとおり、クレアチンには海馬シナプス部のミトコンドリアを活性化させて、スパインの形態を変え、シナプス伝達を増強させる作用がある。そのため、SSRI慢性投与での海馬

シナプス幼若化によるシナプス伝達の異常をクレアチンがレスキューできるのではないかと考えた。

2. 方法

2.1 実験動物

8週齢C57BL/6J雄マウス(チャールズリバー)を1週間市販飼料MF(オリエンタル酵母工業)で予備飼育した。予備飼育の時期からマウスを個別ケージに収容し、単飼した。水と飼料は自由摂取とし、室温23℃、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。マウスは対照群(蒸留水のみ)、SSRI投与群(フルオキセチンのみ)、SSRI+クレアチン投与群(フルオキセチンおよびクレアチン)の3群に分け、それぞれ3匹ずつランダムに割り当てた。フルオキセチンは、1日あたり22mg/kg体重となるよう蒸留水に溶解し、経口摂取させた。フルオキセチン水溶液は、マウスの体重に基づいて個別に作製したものを用いた。クレアチンは蒸留水に1%となるよう溶解した。なお、SSRIの苦味による飲水量減少を避けるため、すべての処理群の水溶液に0.2%になるようにスクロースを溶解した。フルオキセチンおよびクレアチン投与を28日間行った後に、と殺、サンプリングを行った。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に、直ちに全脳および肝臓、腎臓、副腎、脾臓を採取し湿重量を測定した。全脳は免疫組織化学的解析に供試した。

2.3 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 μ mの切片を作成し、抗カルビン

Table 1 Effect of oral SSRI and/or creatine administration on tissue weight in mice.

	Test group		
	Control	SSRI	SSRI+Creatine
Body Weight (g)	28.7 ± 0.9	28.9 ± 2.0	30.1 ± 2.3
Whole Brain (mg)	437.6 ± 13.4	448.9 ± 5.3	437.2 ± 3.5
Liver (g)	1.45 ± 0.08	1.47 ± 0.08	1.51 ± 0.13
Kidney (mg)	296.2 ± 32.5	304.9 ± 14.4	303.3 ± 13.3
Adrenal gland (mg)	9.3 ± 1.9	6.6 ± 1.7	17.0 ± 16.5
Spleen (mg)	66.7 ± 6.7	65.6 ± 8.7	67.7 ± 7.9

Values are means ± S.E.M for 3 animals in each group.

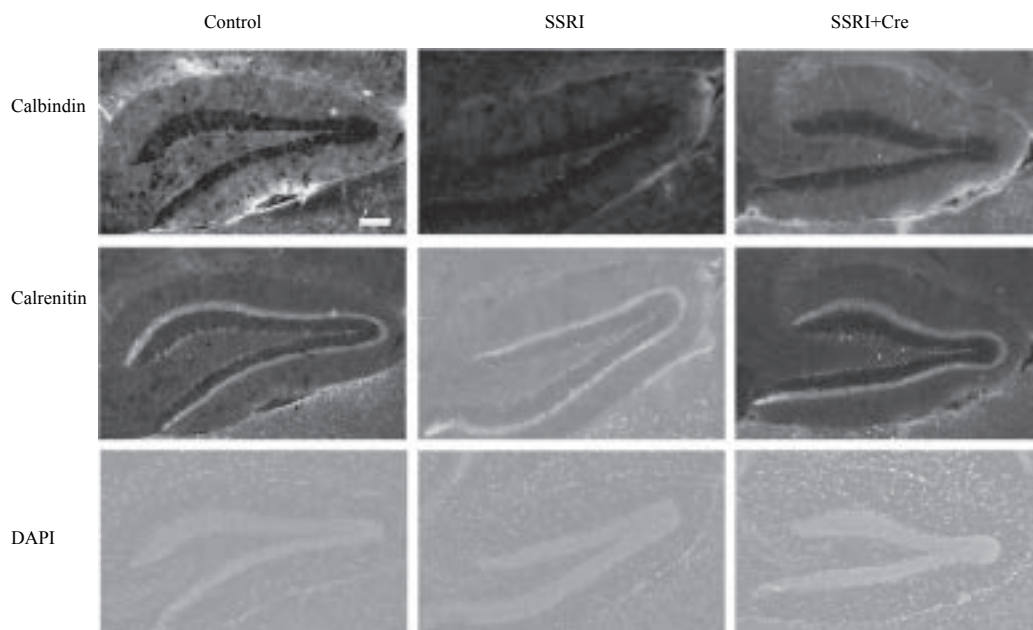


Fig. 1 Chronic fluoxetine down-regulates marker calbindin for mature granule cells. (Scale bar, 300 μ m.)

ジン抗体 (Sigma) および抗カルレチニン抗体 (Swant) 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 SSRIおよびクレアチンによる臓器重量の変化

SSRIおよびクレアチンを28日間経口投与させた際に, 体重および全脳, 肝臓, 腎臓, 副腎, 脾臓重量には有意な変化は見られなかった (Table 1)。ヒトではSSRIの慢性投与により体重変化が見ら

れることがあると知られているが, マウスでのSSRI慢性投与でそのような兆候は見られなかった。

3.2 カルピンジンおよびカルレチニンの発現

SSRIおよびクレアチン投与によるマウス海馬歯状回顆粒細胞層における神経細胞の未成熟化を免疫組織学的手法により解析を行った。その結果, SSRIの慢性投与により海馬歯状回成熟神経細胞で発現するカルピンジンの発現が低下したが, 幼若マーカーであるカルレチニンの発現は顕著な変化は見られなかった (Fig. 1)。SSRIおよ

びクレアチンの同時慢性投与においては、カルビンジンの発現が対照区と同様になっていた。故にクレアチンで一部海馬の未成熟化がレスキューされる可能性が示唆された。今回、海馬におけるカルレチニンの発現量がSSRI慢性投与によって変化しなかった。つまり、SSRI慢性投与によって海馬未成熟神経細胞が増加しなかったのであるが、SSRIの投与量が充分でなかったなど考えられる。SSRIの慢性投与による海馬神経細胞の状況が段階的に起こる可能性があり、今回の私共の条件では、成熟マーカーの低下という状況だけを引き起こしたのかもしれない。SSRIの投与量、投与期間などを再検討し、それぞれで得られる解剖学および行動学的フェノタイプを追求することが必要となろう。そのような知見を得ると、SSRIによる副作用により理解が進むと考える。

4. 要 約

SSRIの摂取により海馬歯状回顆粒細胞層における神経細胞の幼若化が、抗うつ薬による副作用の要因である可能性が指摘されている。一方、クレアチンは海馬神経細胞のミトコンドリアを活性化させることにより、シナプス形成を促進することが示唆されている。そこで、クレアチンの摂取がSSRIの副作用のリスク軽減に関与するかを検討した。SSRIの投与により、海馬歯状回顆粒細胞層における幼若化マーカータンパク質カルレチ

ニンの発現は変化せず、成熟マーカータンパク質カルビンジンの発現は減少した。クレアチンとSSRIの同時投与すると、カルビンジンの発現量が対照区と同様になった。したがって、クレアチンはSSRI慢性投与による海馬歯状回領域の未成熟化に抑制をかける分子である可能性が示唆された。

文 献

- 1) Watanabe A, Kato N, Kato T. : *Neurosci. Res.* . 42. 279~285, 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.* . 132 (1), 65~71, 2005.
- 4) 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.
- 5) Lutter M, Krishnan V, Russo SJ, Jung S, McClung CA, Nestler EJ. : *J Neurosci.* . 28 (12), 3071~3075, 2008.
- 6) 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. vol.27. 伊藤記念財団, 2008.
- 7) 鬼澤直樹, 豊田淳. 平成21年度食肉に関する助成研究調査報告書. vol.28. 伊藤記念財団, 2009.
- 8) Zheng Li, Ken-Ichi Okamoto, Yasunori Hayashi and Morgan Sheng : *Cell.* . 119 (6), 873 ~ 887, 2004.
- 9) Kobayashi K, Ikeda Y, Sakai A, Yamasaki N, Haneda E, Miyakawa T, Suzuki H. : *Proc Natl Acad Sci U S A.* . 107, 8434~8439, 2010.
- 10) Kobayashi K, Ikeda Y, Suzuki H. : *Mol Brain.* . 2011, vol 4 : 12.

肝臓抽出物および食品成分の併用が脂質吸収に及ぼす影響

Effects of liver-extract with/without combined intake of other food ingredients
on lipid absorption 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)

In our previous study, the extract of porcine liver “Liver Hi” showed inhibitory activity against pancreatic lipase *in vitro*, but did not suppress elevation of plasma triglyceride (TG) level in TG-loaded mice. In the present study, we investigated if combination with existing food ingredients increased inhibitory effects of Liver Hi on lipid absorption *in vivo*. Lipase inhibitory activity test *in vitro* had selected four kinds of food ingredient, i.e., hem iron, extracted taurine, turmeric extract, and L-ornithine hydrochloride (ornithine) for combination with Liver Hi. Among them, only ornithine with Liver Hi (2,000 mg/kg) inhibited TG absorption *in vivo*. Liver Hi (2,000 mg/kg) with ornithine showed dose-dependent inhibitory effects at 0 ~ 2,000mg/kg in TG-loaded mice. Further investigation with varying combination ratio showed that Liver Hi at 2,000 mg/kg with ornithine at 2,000 mg/kg inhibited the absorption of TG in mice significantly. The optimal food ingredients and the optimal ratio for combinations requires more detailed study, but series of our experiments revealed that inhibitory effects of Liver Hi on triglyceride absorption may be enhanced the result is obtained by combining other foods. The future experiments to elucidate optimum conditions such as the type of materials and mixing ratio will allow that the usage of Liver Hi as a functional food.

1. 目 的

我が国でも近年、運動不足、不規則な食生活により肥満者が増加している。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)}。日常の食生活に機能性を付加することで余分な脂質の取り込みを調節できる機能性食品（ヘルスフード）への関心が高まっている。

著者らは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 3 T 3-L 1 細胞などを用いた試験により、脂質代謝改善作用を有する新規食品素材を探索し、数種類の天然素材にその活性を見出し、学術論文にて発表してきた^{3~6)}。また、昨年の本財団助成研究において、ブタ肝臓抽出物に着目してその生理機能を調べたところ、*in vitro* 試験でリパーゼ阻害作用が確認され、マウス脂肪吸収試験において有意差はないものの脂肪吸収を抑

制する傾向が確認された⁷⁾。これら作用は食事とともにブタ肝臓抽出物を摂取することで食事由来の脂肪の吸収を調節できる可能性を示していると考えている。

本研究では前年度研究成果を受けて、ブタ肝臓の抽出物「レバーHi」のリパーゼ阻害作用に着目して、一般的な既存の食品成分と組み合わせることでその脂肪吸収作用を調節できるかどうかを検討した。具体的には、リパーゼ阻害作用に及ぼす影響（実験1）、マウスにおける脂質吸収抑制作用に及ぼす影響（実験2）について検討した。

2. 方 法

2.1 サンプル調製

ブタ肝臓抽出物としてレバーHi (ILS株式会社)を用いた⁸⁾。そのほかに一般的な既存の食品成分として本研究において用いた食品サンプル (ILS株式会社より供給) を以下に示した。

- ①ヘム鉄 “hem iron”
- ②タウリン (抽出物) “extracted taurine”
- ③アンセリン含有サケエキス “anserine-containing salmon extract”
- ④L-カルニチン “L-carnitine”
- ⑤L-オルニチン “L-ornithine hydrochloride”
- ⑥紅麹粉末 “Beni-Koji powder”
- ⑦ウコン抽出物 “turmeric extract”
- ⑧カンゾウ抽出物 A “licorice extract A”
- ⑨ステビア抽出物 “stevia extract”
- ⑩カンゾウ抽出物 B “licorice extract B”

各食品サンプルは、蒸留水に溶解または懸濁させて用時調製して各試験に用いた。

2.2 隣り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隣りパーゼを使用し、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、37°Cで5分間ブレインキュベートした。
- (3) その後、サンプル溶液あるいはコントロールとして10 μ lの蒸留水 (DW) 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°C、遮光下で30分間インキュベートした。ポジティブコントロール (PC) として、ウーロン茶抽出物を用いた。
- (4) 200 μ lの反応停止液を加え、405nm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 (%) を下記式のように算出した。

2.3 トリグリセリド (TG) 負荷試験

- (1) 1 ケージにddYマウス (7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3群または4群に分けて、蒸留水あるいはサンプル水溶液 (10ml/kg) と、5分後にコーン油 (8 ml/kg) を経口投与した。
- (4) 投与後に経時的に尾採血をして、3,000rpm、20°Cで10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

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

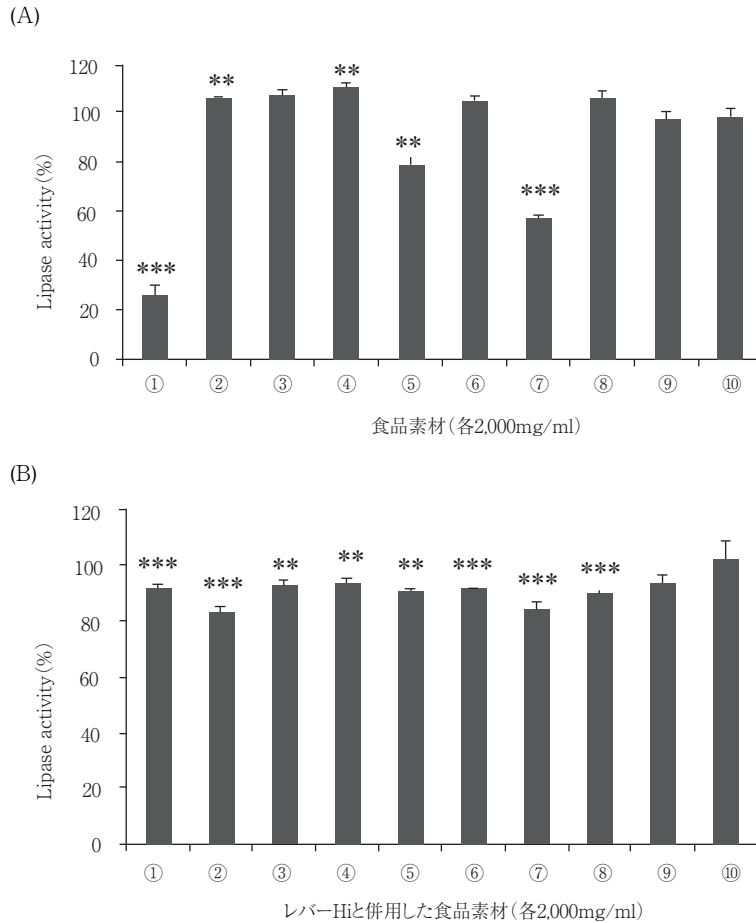


Fig. 1 Effects of Liver Hi alone (A) and Liver Hi with other food ingredients (B) on lipase activity *in vitro* ① hem iron, ② taurine (extract), ③ anserine-containing salmon extract, ④ L-carnitine, ⑤ L-ornithine hydrochloride, ⑥ Beni-Koji powder, ⑦ turmeric extract, ⑧ licorice extract A, ⑨ stevia extract, ⑩ licorice extract B. Lipase activities of control (without samples) group are defined to be 100%. Data are expressed as mean \pm S.E. (n = 3). *** : p < 0.005, ** : p < 0.01 vs control.

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（和光純薬工業株式会社）を用いて測定した。
- (7) TGの吸収量は、投与8時間後までの血漿中のTG濃度の経時変化曲線、または総吸収量の指標とされている曲線下面積から求めたArea under curve (AUC値)により評価した。

3. 結果と考察

実験1：リパーゼ阻害活性に及ぼす影響

レバーHiの*in vitro*における腓リパーゼ阻害活性の有無について検討したところ、コントロール(100%)と比較して有意に腓リパーゼ活性が減少させた。結果は図示していないが、レバーHi 4,000 μ g/mlでは88.5 \pm 0.8%, 8,000 μ g/mlでは81.3 \pm 3.2%であり、ポジティブコントロールのウーロン茶抽出物(100 μ g/ml)では61.6 \pm 0.7%

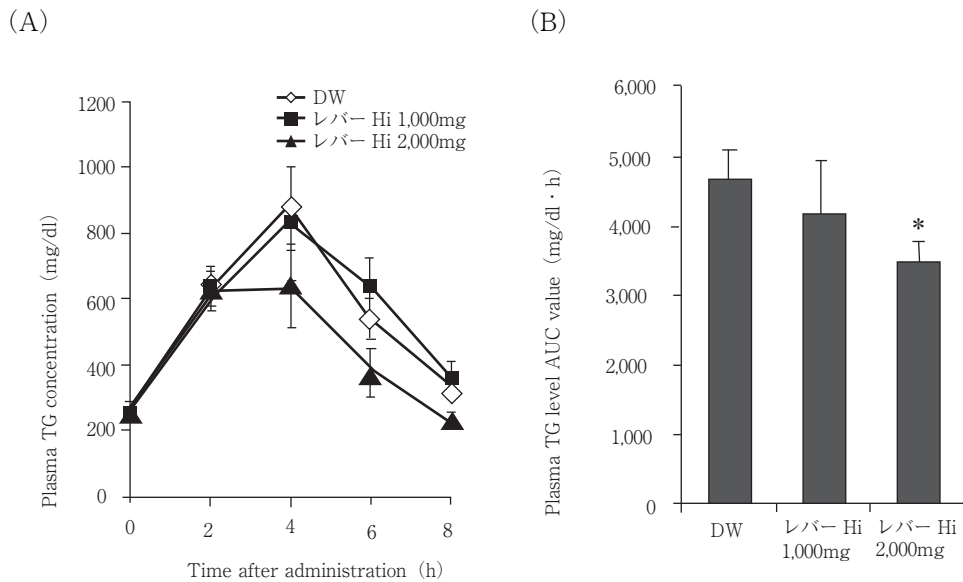


Fig. 2 Effects of Liver Hi on time-course change in plasma (A) and total absorbed amounts (B) of TG in triglyceride-loaded mice.

The total absorbed amounts in Panel A are expressed as area under curve (AUC value) for 8 h of Panel B. Data are expressed as mean \pm S.E. (n = 8). * : p < 0.05 vs control (DW).

であった。

今回用いた食品素材10種類について、2,000mg/mlの濃度でリパーゼ阻害活性を調べた結果、**Fig. 1 A**に示したとおり①ヘム鉄、⑤L-オルニチン、⑦ウコン抽出物が顕著な阻害活性を示した。また、レバーHiとこれら食品素材を併用した結果(**Fig. 1 B**)、レバーHiのリパーゼ阻害活性をとくに増強した素材は見られなかったが、②タウリン(抽出物)、⑤L-オルニチン、⑦ウコン抽出物において、比較的阻害活性が保たれていた。これらの結果を受けて、ヘム鉄、タウリン、L-オルニチン、ウコン抽出物の4つの素材について、脂質吸収抑制作用を検討することとした。

実験2：マウスにおけるTGの吸収活性に及ぼす影響

トリグリセリド(TG)を負荷したマウスにおいて、レバーHiの脂質吸収抑制作用を確認した結果、2,000mg/kgの投与量で、血中TG経時変化の

変化を示し(**Fig. 2 A**)、コントロール(DW)に対して脂質吸収の指標となるAUC値の濃度依存的な抑制傾向を示した(**Fig. 2 B**)。次に、このマウスTG負荷試験におけるAUC値を指標としてレバーHi単独の場合と他の食品素材を併用させた場合とを比較した。

マウスTG負荷試験においてレバーHi(2,000mg/kg)とヘム鉄(500mg/kg, **Fig. 3 A**)、タウリン(500mg/kg, **Fig. 3 B**)、ウコン抽出物(500mg/kg, **Fig. 3 D**)、のいずれかを併用した場合には、トリグリセリドの吸収阻害作用は確認されなかった。一方で、L-オルニチン(500mg/kg)を併用させた場合にはレバーHiの脂質吸収抑制作用が増強される傾向が確認された(**Fig. 3 C**)。そこで、レバーHi 2,000mg/kgにL-オルニチンの併用量を変化させたところ、L-オルニチン 2,000mg/kgを併用させた場合に、有意な脂質吸収抑制作用が確認された(**Fig. 4**)。L-オルニチン

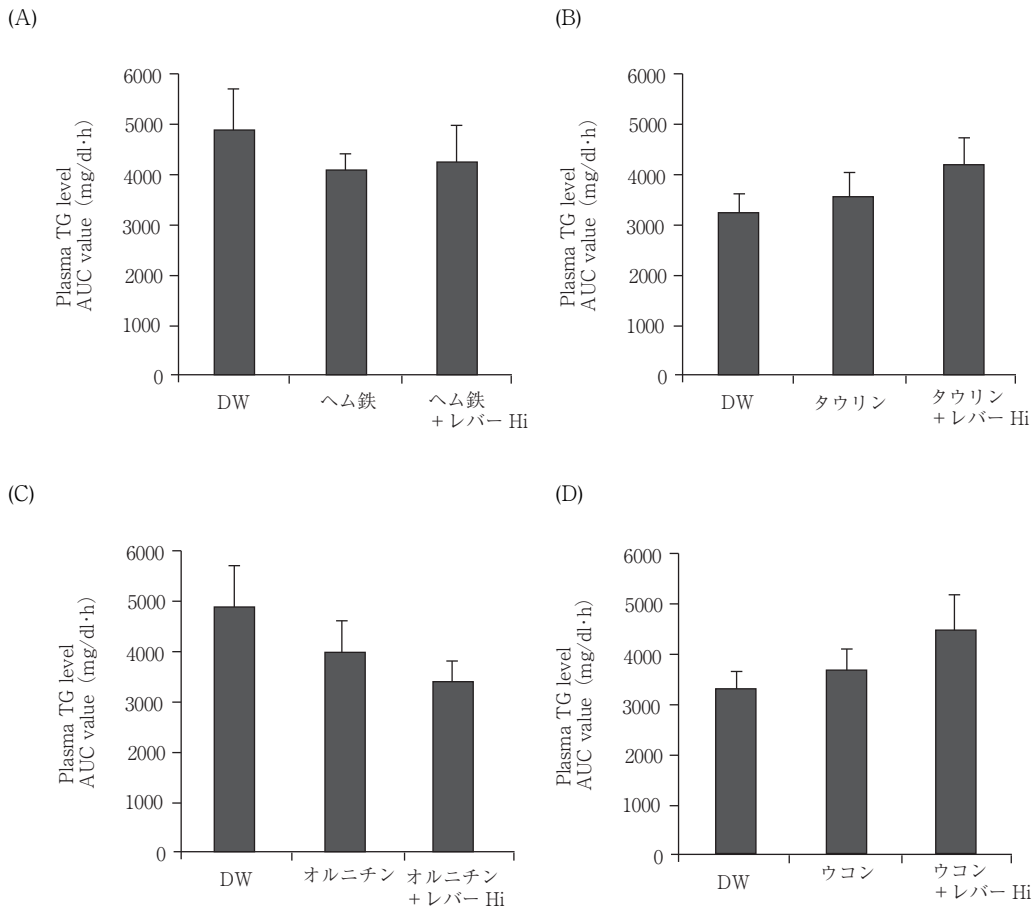


Fig. 3 Effects of Liver Hi with other food ingredients on total absorbed amounts of TG in triglyceride-loaded mice. Mice were treated Liver Hi (2,000mg/kg) with heme iron (A), extracted taurine (B), L-ornithine hydrochloride (C), or turmeric extract (D) per orally (500mg/kg each). The total absorbed amounts were calculated from time-course data of plasma TG for 8 h. The effect of each food ingredients alone were shown for comparison with combined effects with Liver Hi.

の濃度依存的に脂質の吸収が抑制されていることから、L-オルニチン単独でもレバーHi単独と同程度の脂質の吸収抑制作用を有することも示唆された。これまでの研究においてレバーHi単独投与で確認されていた脂質吸収を抑制する傾向に加えて、L-オルニチンの併用によって相加的に作用が増強されたものと考えられる。より効果的な作用を示すためには、併用する食品素材やその混合比については、更なる検討を必要とする。

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事が知られている⁸⁾。また、昨年度の本助成研究においてレバーHiにリパーゼ阻害作用が確認されたが、マウスにおける脂質吸収抑制作用は有意な変化を示さないことが示された⁷⁾。この結果を受けて、レバーHiに既存の食品素材との組み合わせることによってその作用が増強するかどうか、ならびに、生体での脂質吸収抑制作用を確認

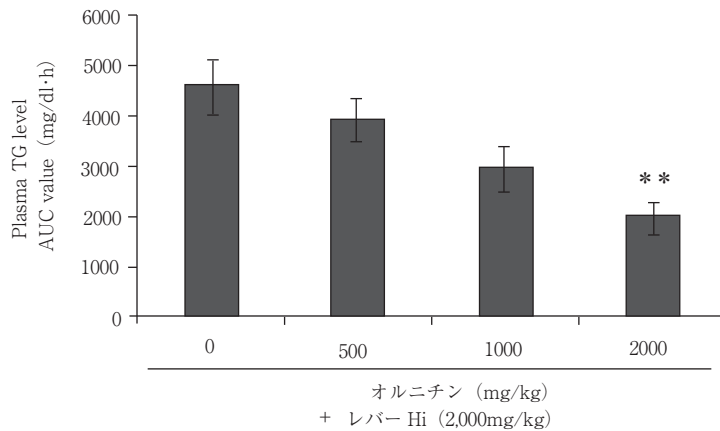


Fig. 4 Effects of Liver Hi with ornithin on total absorbed amounts of TG in triglyceride-loaded mice.

Mice were treated Liver Hi (2,000mg/kg) with L-ornithine hydrochloride (ornithine: 0, 500, 1,000, and 2,000mg/kg) per orally. The total absorbed amounts were calculated from time-course data of plasma TG for 8 h.

** : $p < 0.01$ vs control (DW).

することができるかどうかを検討した。TG負荷マウスにおいて、レバーHi投与に加えてヘム鉄、タウリン、ウコン抽出物、L-オルニチンと組み合わせることで、TG吸収に及ぼす影響を確認したところ、L-オルニチン併用群でレバーHiの作用が増強される傾向が見られた。投与量を変えて検討したところ、レバーHi (2,000mg/kg) とL-オルニチン (2,000mg/kg) の組み合わせで、マウスのトリグリセリド吸収を有意に抑制することが示された。組み合わせの素材や混合比については更なる検討が必要ではあるが、今回の一連の実験によりレバーHiのリパーゼ阻害に基づくトリグリセリド吸収抑制作用は、他の食品素材を組み合わせることで増強する結果が得られたことから、素材の種類や混合比など条件を最適化することで用途を広げることができると考えられる。

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. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, **56** (2), 2010. (in printing).
- 7) 矢澤一良, 小山智之 : 肝臓抽出物の継続投与がマウス脂質代謝に及ぼす影響. 財団法人伊藤記念財団平成21年度助成研究調査報告書, Vol. **28**, 55~60, 2010.
- 8) 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.

食肉由来機能性成分の畜種別差異の比較検討についてⅡ

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

久保田大樹・河原 聡・六車三治男
(宮崎大学農学部)

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

This research aimed to compare the biological and functional properties as well as physiological effects of beef, pork and chicken protein hydrolysates. Last year, we examined the antihypertensive effects by determining the IC₅₀ value of the three mentioned species. This year, we aimed to check the antioxidative properties.

In the current study, we evaluated the antioxidative activity of hydrolysates of biceps femoris muscles from beef, pork and chicken. All the muscles separately hydrolyzed with pepsin and trypsin and then determined their antioxidative efficiency. The antioxidative activity of the hydrolysates was determined by the DPPH radical scavenging assay and the ORAC antioxidant assay. Meat hydrolysates showed the antioxidant activity (40 μ M Trolox equivalents (TE) /mg protein) by the DPPH radical scavenging assay. Meat hydrolysates also showed the high antioxidant activity (750 μ M TE/mg protein) by the ORAC antioxidant assay. Antioxidative activity increased with increasing meat hydrolysates concentrations. No significant differences in various edible meat peptides were detected by the DPPH radical scavenging assay and the ORAC antioxidant assay. However, there are differences in the other factors for giving the antioxidative activity including amino acid sequence of those hydrolysates. For instance, Cys shows strong antioxidant activity that is considered to be specific for electron transfer reaction. On the other hand, though Trp also has also been showing a strong activity, as it indicates only for transferring atom of hydrogen during its reactions. Beef and pork peptides may show antioxidant activity in specific manner that are influenced by His and Trp. Antioxidant activity of chicken peptides are small and far from other meat peptides especially when compared to beef and pork. In ORAC evaluation, Trp pattern similar to Trp in chicken one, in which we hypothesize that Trp may be very important amino acid that determine whether peptides is effective as antioxidative or not.

We conclude that meat in the three species contain peptides that may serve several purposes. Based on its remarkable antioxidative activity, we suggest that the functional peptides from meat hydrolysates may have potential applications as functional food, which could be used as sources of natural antioxidants for foods.

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になった一つの理由とも考えられる。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。そこで昨年度は、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かかわっている高血圧症の予防効果に及ぼす各種食肉ペプチドに焦点を当て比較検討した¹⁾。

1981年以降、日本人の死因第一位になり、その増加が続いている現状を背景としてがん予防に関する早期研究が求められている²⁾。がんは様々な要因が複合的に働いた結果引き起こされる。このような危険因子の中で特に注目すべき物質は活性酸素種 (ROS: Reactive Oxygen Species) と呼ばれる悪性の酸素である。ROSは酸素が紫外線や環境中の様々な要因により化学変化を起こして生じる。通常、酸素は O_2 だが特殊な環境中では一重項酸素 O_2^- やペルオキシラジカル LOO^- のように変化する。このように酸素は様々なROSへと変化し、細胞、DNA、タンパク質、脂質等に影響を与え、動脈硬化や心筋梗塞等を引き起こすと共に細胞のがん化が促進されると考えられている。また食品中の成分にもこのようなROSを消去する能力 (抗酸化能) があると言われている。これまでにポリフェノール、ビタミンE、グルタチオン、カルノシンなど様々な物質で抗酸化活性に関する報告がなされている^{3, 4)}。従って食品成分の摂取で、日頃からROSを消去していくことは非常に効果的であると考えられる。またタンパク質を分解して生じるペプチドにも抗酸化活性を有するものがあると言われている。

食肉は良質なタンパク質を豊富に含み、近年、血圧降下作用などの保健的効果についての研究が

進められている^{5~13)}。

抗酸化活性の測定には原理の違いにより、DPPH法、ORAC法、SOD様活性法、 β -カロテン法、金属キレート活性法など多様な評価方法がある。現在主流になりつつあるのがORAC法とDPPH法である。特にORAC法は食品の抗酸化活性を評価するのに最も適した方法であると考えられ、米国を中心として世界的に統一されつつある評価方法である。ORAC法は2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) から誘導されるペルオキシラジカルにより蛍光プローブが分解されて蛍光を失う過程の抑制を評価することで抗酸化活性を測定する方法である。つまり抗酸化活性の持続能を評価できることがORAC法の特徴でもある。さらに生体に近い条件で測定できる事、そして親水性、親油性物質いずれの抗酸化物質も評価できる点が抗酸化活性測定法の標準として統一されつつある理由として考えられている。一方、DPPH法とは比較的安定な有機ラジカルであるDPPHラジカルを用い、520nmに吸収極大を有する紫色のDPPHラジカルが還元されて退色する性質を利用して試料の抗酸化活性を評価する方法である。操作が非常に簡単である事が長所であるが、生体に無いラジカルを使用していることが欠点である。ORAC法とDPPH法は原理が異なる。ORAC法は水素供与 (HAT: hydrogen atom transfer) 反応に基づく測定方法であり、DPPH法は電子供与 (ET: electron transfer) 反応に基づく測定方法である^{14, 15)}。

現在、抗酸化ペプチドに関する詳細な研究はほとんど行われていない。例えば現在、ペプチドが抗酸化力を示す要因としてペプチドの「アミノ酸組成」および「構造」の違いが考えられているが、どちらの要因がどれだけ抗酸化活性に寄与しているのかなど基本的な考えさえも提唱されていない。

そこで本研究では、タンパク質を豊富に含む食肉を題材とし、ペプシン・トリプシン・パンクレアチンによる酵素分解で生じるペプチド混合物を調製する。さらにORAC法とDPPH法に焦点を絞り、食肉由来ペプチドの抗酸化力を評価する。またペプチドを構成する20種類のアミノ酸の抗酸化活性を測定し、食肉由来ペプチドが抗酸化活性を示す要因について考察していく。この研究により抗酸化ペプチドおよび食品化学の基礎的知見を与え、新規食品素材の開発・発展に貢献していくことが本研究の目的である。

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℃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℃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℃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ー（アドバンティック東洋（株））にてろ過した試料を実験に供した。

2.3 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¹⁶⁾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¹⁷⁾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。

2.4 DPPHラジカル消去活性の測定

DPPHラジカル消去活性の測定は、DPPH分光測定法に準じて行った¹⁸⁾。すなわち、400 μ M DPPH, MES (2-morpholino-ethanesulphonic acid) buffer, 20%エタノールを同量ずつ加え、混液を作製した。混液を0.9ml分注し、80%エタノールを240 μ lとサンプルを60 μ l加え、20分間反応させた。その後、サンプルを加えた順に前述の分光光度計にて吸光度520nmで測定した。また、サンプルの代わりに、0.2mM Trolox（Sigma社製）を使って標準として測定し、検量線からサンプルのTrolox相当量を算出した。MES BufferはMESを蒸留水に溶解し、NaOHでpH 6に調整したものを使用した。

2.5 ORAC法による抗酸化活性の測定

（独）農研機構九州沖縄農業研究センターの報

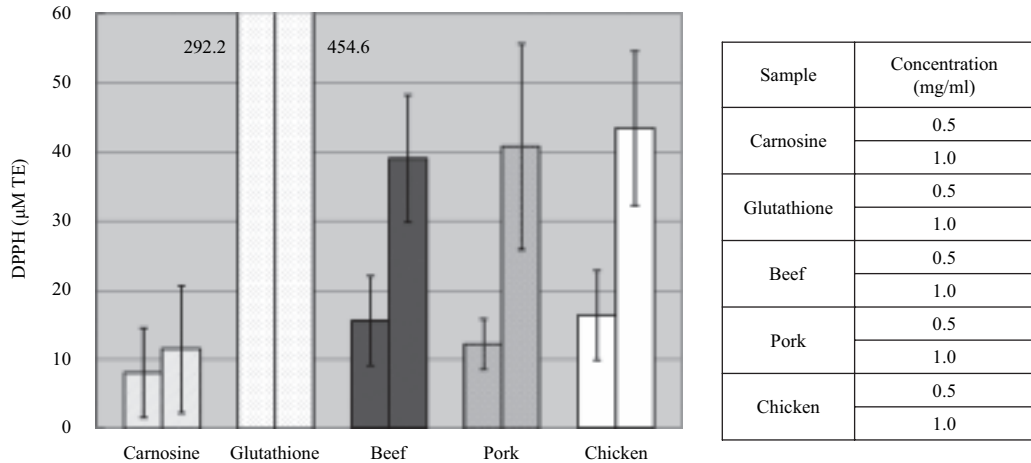


Fig. 1 Dual axis graph shows the value of DPPH radical scavenging activity of beef, pork and chicken hydrolysates. TE, Trolox Equivalent.

告をもとに改良して測定した^{19~22)}。すなわち96wellマイクロプレートに81.6nMフルオレセインを200 μ l, サンプル20 μ lを添加し, マイクロプレートリーダー (TECAN GENios Multifunction Fluorescence Virginia, USA) にて37 $^{\circ}$ Cで励起波長485nm, 蛍光波長520nmにおける蛍光強度を測定した。10分後200mM AAPH 75 μ lを添加し, 同条件にて2分間隔で45回測定した。またORAC値は Net AUC (Area Under Curve) = AUC sample-AUC blankを用いて算出した。検量線作成にはTrolox (125, 250, 500, 1000 μ M) を使用した。

2.6 遊離アミノ酸分析

分析試料1gに対して3倍量の3%スルホサリチル酸を加え, 冷蔵庫で1時間静置してタンパク質を沈殿させた。その後, 3000rpmで15分間遠心分離を行った。上清をフィルター (Cellulose Acetate 0.45 μ m) でろ過し分析試料とした。これをアミノ酸自動分析機 (JIC-500) で分析した。

3. 結果と考察

各種食肉酵素分解物のタンパク質の分子量分布

については平成21年度報告書に掲載したとおりである¹⁾。すなわち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。SDS-PAGEによって, 酵素処理時間に伴い, 各種食肉タンパク質の分解が進行したことが認められた。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となった。

3.1 食肉由来ペプチドのDPPHラジカル消去

活性およびORAC法による測定比較検討

抗酸化活性の評価に用いるタンパク質濃度の検討を行った。ゲルろ過HPLCカラムであるTSK-Gel G2000SW_{XL}を用いて食肉ペプチド混合物に含まれるペプチドがすべて安定的に検出されるには0.1mg/ml以上が必要であることが明らかになった。従って本研究では主に0.5および1.0mg/mlの食肉ペプチドを抗酸化活性の評価に供与した。なお, 標準物質には抗酸化ペプチドとして知られているヒスチジン含有ペプチドのカルノシンおよびシステイン含有ペプチドのグルタチオンを用いた。

Fig. 1 に各種食肉由来ペプチドおよび標準物質

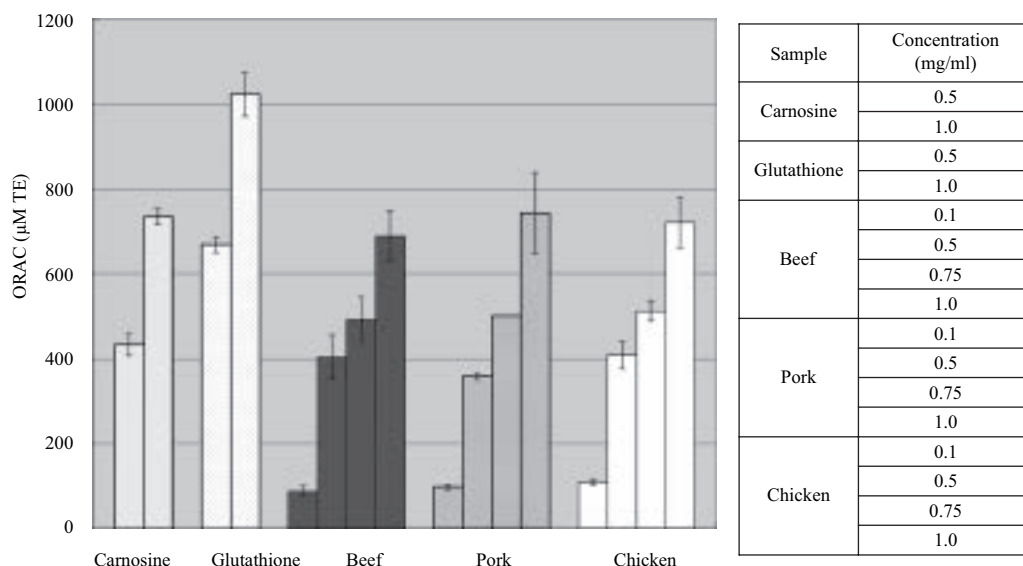


Fig. 2 - a Dual axis graph shows the value of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) of beef, pork and chicken hydrolysates. TE, Trolox Equivalent.

のDPPHラジカル消去活性を示した。TEとは既知の抗酸化物質であるトロロックス相当量 (Trolox Equivalent) の略である。各種食肉間では1.0mg/ml濃度でおよそ40 μ M TEを示し、有意差は生じなかった。またカルノシンは痕跡程度の活性しか示さず、グルタチオンはDPPHの紫色が確認できないほど強力な抗酸化活性を示した。

この結果は柳内らの報告と一致した²³⁾。これはグルタチオンが電子供与反応に基づく抗酸化力を有している証拠である。また食肉ペプチドがカルノシンよりも高い活性を示した理由としては、種々のペプチドによる相乗効果であると推測された。

Fig. 2 - a に各種食肉由来ペプチドおよび標準物質のORAC法により測定した結果を示した。カルノシン・グルタチオン共に0.5および1.0mg/mlを試験に供した。また食肉由来ペプチドは0.1, 0.5, 0.75および1.0mg/mlを試験に供した。どのサンプルも濃度上昇に伴い有意にORAC値が上昇

した。これはORAC法がDPPH法よりも非常に感度の高い評価系であることが理由として考えられる。また各種食肉間でORAC値の有意差は認められなかったが、食肉ペプチドは同濃度のカルノシンと近似したORAC値を示したことがわかる。またDPPH法と同様にORAC法でもグルタチオンは他のサンプルよりも高い活性を示した。

次に、ORAC法を用いて1.0mg/mlにおける抗酸化力持続能を調査した (Fig. 2 - b)。トロロックスとグルタチオンが似た性質、つまり、一定時間フルオレセインの分解を100%阻害し、ある時点から急激に抗酸化力が失われるパターンを持つことがわかった。一方、カルノシンや食肉由来ペプチドは徐々に活性を失っていくパターンを有していた。

Fig. 3 にORAC値およびDPPH値の相関関係を示した。食肉ペプチド間では相関係数 $r = 0.9905$, $\text{ORAC値} = 12.375 \times \text{DPPH値} + 209.69$ となり、非常に高い相関関係を示した。一方、カルノシンと

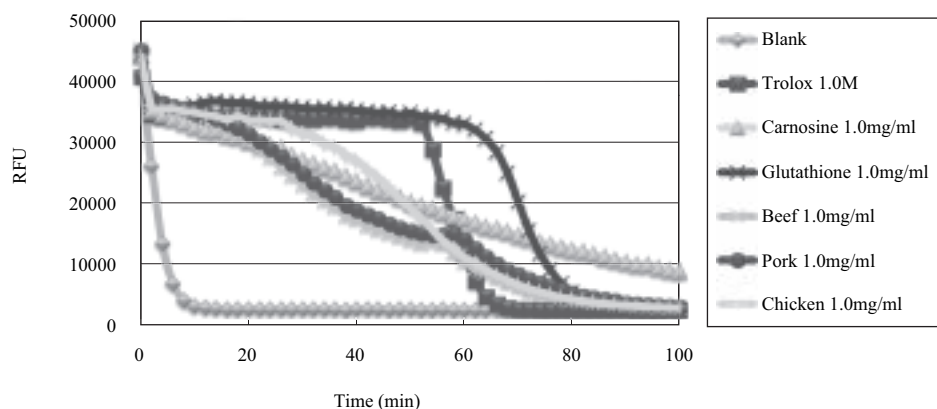


Fig. 2-b Fluorescence decay curves of fluorescein induced by AAPH in the presence of trolox, calnosine, glutathione and meat hydrolysates. RFU, relative fluorescence unit; AAPH, 2, 2'-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride.

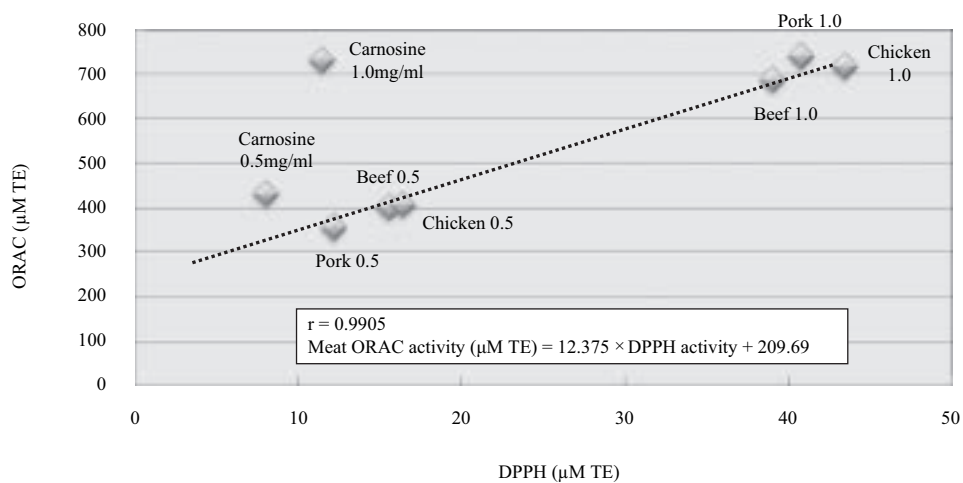


Fig. 3 Relationship between ORAC activity and DPPH activity. TE, Trolox Equivalent.

食肉ペプチドの間には相関関係は見られなかった。一般にORAC値はDPPH値よりも高い値を示す傾向があることが知られている^{14, 15)}。本研究の結果もこの報告と一致した。ORAC値がDPPH値よりも高い値を示す理由は解明されていないが、本研究を進める過程でORAC法は食肉ペプチドが 1.0×10^{-3} mg/ml以下でも測定可能なほど高感度であった事を確認した。従ってORAC値>DPPH値となる可能性が非常に高いと考えられた。

このようにペプチドが抗酸化活性を示す要因は何か。その要因の一つにはペプチドを構成するアミノ酸の種類が考えられる。そこで、次にアミノ酸の抗酸化活性について詳細に調査した。

3.2 アミノ酸の抗酸化活性

まず個々のアミノ酸単独の抗酸化活性をDPPH法により調査した。現在、抗酸化アミノ酸としてはヒスチジン (His), システイン (Cys), チロシン (Tyr) などが知られているが、どのアミノ

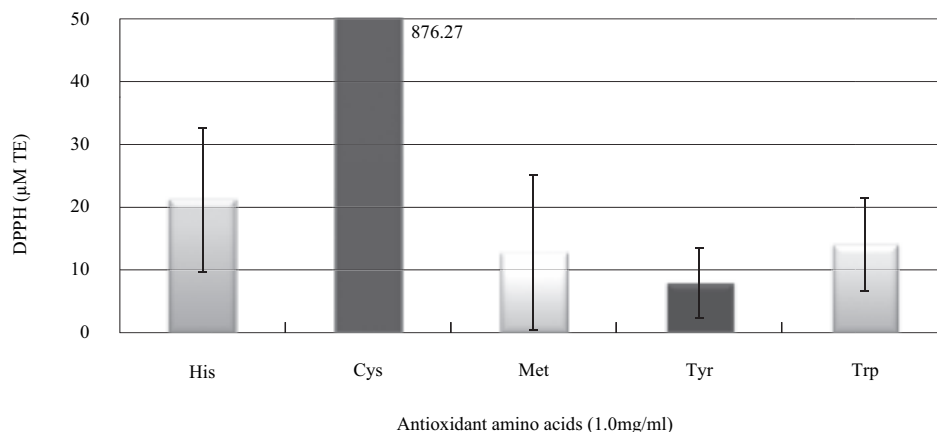


Fig. 4 - a Effects of antioxidant amino acids on DPPH radical scavenging activity. TE, Trolox Equivalent.

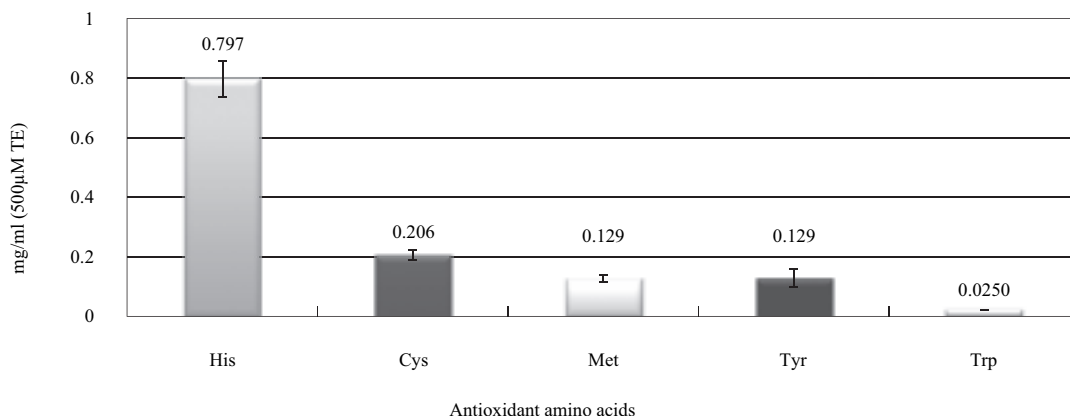


Fig. 4 - b Effects of antioxidant amino acids on ORAC activity. Vertical value showed the concentration that indicates 500μM TE. TE, Trolox Equivalent.

酸がどのような性質の抗酸化活性を示すかは明らかにされていない。Fig. 4 - a に供与濃度1.0mg/mlでDPPHラジカル消去活性を発現したアミノ酸を示した。His, メチオニン (Met), Tyr, トリプトファン (Trp) はORAC値を示したためFig. 4 - aにも掲載したが、それらのDPPH活性は痕跡程度であった。従って明瞭な電子供与反応による抗酸化能を示したアミノ酸はCysだけであった。すなわち食肉由来ペプチドの電子供与反応活性はCys含有量に大きく左右されることが示唆さ

れた。

Fig. 4 - b にORAC法にて評価したアミノ酸の抗酸化活性の結果を示した。また評価方法として500μM トロロックス相当量を示すときのアミノ酸濃度 (mg/ml) を用いた。アミノ酸の抗酸化力はTrp>Tyr≒Cys>Hisの順に高い値を示した。特にTrpは他のアミノ酸よりも非常に強い活性を示した。従ってTrpは微量でも抗酸化活性に大きな役割を果たすことが示唆された。

Fig. 4 - c はアミノ酸の抗酸化持続能をORAC法

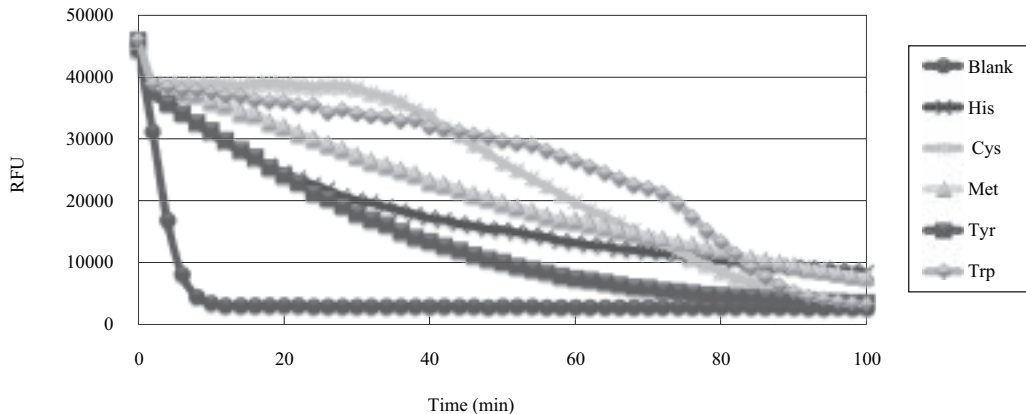


Fig. 4 - c Fluorescence decay curves of fluorescein induced by AAPH in the presence of antioxidant amino acids. RFU, relative fluorescence unit; AAPH, 2, 2'-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride.

にて解析した結果である。また各アミノ酸濃度は一律でなく、同実験系に収まる濃度に設定した。この結果から抗酸化力には2つのパターンが存在することが示唆された。それらを1. 電子供与(ET)型, 2. 水素供与(HAT)型と名付けた。ET型とはここではCys, グルタチオン, トロロックスのようにDPPHラジカル消去活性が高く、一定時間フルオレセインの分解を100%阻害し、ある時点から急激に活性が低下するパターンを持つ物質のことをいう。HAT型とはHis, Met, Tyr, カルノシンなどを指し、経時的にフルオレセインが分解されていくパターンを持つ物質のことである。このように個々のアミノ酸やペプチドには特有の抗酸化活性を持つことが明らかになった。そこでアミノ酸やペプチドの持つこのような性質は食肉ペプチドの抗酸化活性にどのような影響を及ぼしているのか調査した。

3.3 各種食肉由来ペプチドとアミノ酸の抗酸化活性の関係

各種食肉由来ペプチドとアミノ酸の抗酸化活性の関係を示した(Fig. 5)。ここで注目すべき点は、牛肉・豚肉ペプチドと鶏肉ペプチドの違いである。牛・豚肉はHisに近い曲線を描いた。つま

り2段階のなだらかなカーブを持ち、フルオレセインが経時的に分解されるパターンを示した。また鶏肉はTrpの描くカーブと非常に近似していた。Trpは微量でも大きな抗酸化活性を示すアミノ酸である。従って牛・豚肉ペプチドはTrpやHisなどの影響が大きく、鶏肉はTrpの影響をそのまま反映した抗酸化力であることが示唆された。従って次にHisやTrpなど抗酸化アミノ酸の定量が必要であると考えられた。そこで各種食肉にどのようなアミノ酸が含まれているのか、特に抗酸化アミノ酸に注目して定量した結果をTable 1に示した。すでに報告はあるが、牛肉および豚肉は非常に類似したアミノ酸組成を持つ。しかし鶏肉は牛肉や豚肉と比較してカルノシンやアンセリンの含有量が異なる点の特徴である²⁴⁾。データには示してはいないがアンセリンはカルノシンと同等のDPPH値およびORAC値を示すHis含有抗酸化ペプチドである。このように鶏肉は他の2種と比較してHis含有量が少なく、わずかであるがTrpを多く含む。しかし既述の通り、わずかなTrp量が抗酸化活性に影響を与えたと考えられる。従ってTrp含有量はペプチドの抗酸化力を大きく左右するアミノ酸であるといえる。

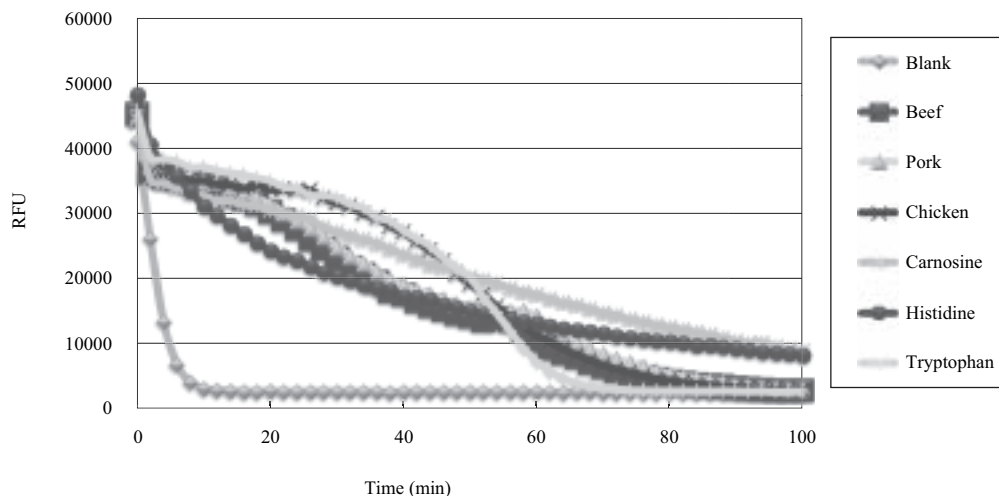


Fig. 5 Fluorescence decay curves of fluorescein induced by AAPH in the presence of meat peptides, carnosine, histidine and tryptophan. RFU, relative fluorescence unit; AAPH, 2, 2'-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride.

Table 1 The amounts of antioxidant amino acids, carnosine and anserine in beef, pork and chicken.

Antioxidant amino acids and peptides	Unit (mg/100g)		
	Beef	Pork	Chicken
His	2.15	1.48	4.74
Cys	0.19	0.21	N.D
Met	3.57	2.47	4.23
Tyr	10.79	10.15	12.49
Trp	8.39	7.34	9.17
Carnosine	208.31	243.80	44.26
Anserine	49.85	32.14	123.37

以上の結果から、食肉酵素分解物の抗酸化活性を評価した結果、単純に活性値を比較しただけでは各種食肉間に有意差は認められなかった。しかし、構成アミノ酸に注目して研究を進めた場合、牛肉・豚肉と鶏肉では抗酸化活性の性質が異なることが示された。また特にペプチドの抗酸化活性を左右する重要なアミノ酸は高い電子供与 (ET) 活性を示すCys、および高い水素供与 (HAT) 活性を示すTrpであることが示された。

一般にペプチドは多様な機構によって抗酸化活

性を発現しており、その活用においては個々のペプチドに適した使用条件の設定が必要である。そのため単一のペプチドよりは、タンパク質分解物の方がより多様な活性酸素種に対応できると考えられる²⁵⁾。従ってタンパク質酵素分解物の抗酸化活性評価を行うことは重要な研究となってくるだろう。

そこで我々は今後もタンパク質酵素分解ペプチド混合物の抗酸化活性評価や抗酸化ペプチドの基礎的研究を行っていく。例えば、ペプチドが抗酸化活性を発現する要因である「アミノ酸組成」および「立体構造」のどちらが重要であるのか、調査していく必要がある。またそれら要因の抗酸化活性への寄与度を具体的に数値化し、食肉由来ペプチド等の抗酸化活性発現作用を明確にしていく必要がある。

4. 要 約

本研究では、ORAC法とDPPH法に焦点を絞り、食肉由来ペプチドの抗酸化力を評価した。またペプチドを構成する20種類のアミノ酸の抗酸化活性

を測定し、食肉由来ペプチドが抗酸化活性を示す要因についても考察した。

DPPH法にて調査した結果、各種食肉間ではタンパク質濃度1.0mg/mlでおよそ40 μ M トロロックス相当量の抗酸化活性を示したが、畜種間の活性に有意差は認められなかった。なお、食肉酵素分解物の添加濃度依存的に抗酸化活性は増加した。カルノシンは痕跡程度の活性しか示さず、グルタチオンはDPPHの紫色が確認できなくなるほど強力な抗酸化活性を示した。これはグルタチオンが電子供与反応に基づく抗酸化力を有している証拠であると考えられた。また食肉ペプチドがカルノシンよりも高い活性を示した理由としては、食肉が有する様々なペプチドによる相乗効果であると推測された。ORAC法にて測定した結果、各種食肉共に非常に高い抗酸化活性を有することが確認された。各種食肉間でそれらの値に有意差は認められなかったが、同濃度のカルノシンと近似した値が得られた。このように単純に活性値を比較しただけでは各種食肉間に有意差は認められなかったが、食肉を構成するアミノ酸に注目し、ORAC法による抗酸化活性の経時変化を見ると、牛肉および豚肉と鶏肉では抗酸化活性を左右するアミノ酸が異なることが明らかになった。特に重要なアミノ酸は高い電子供与活性を示すCys、高い水素供与活性を示すTrpであることが示唆された。

我々は今後も、抗酸化ペプチドの基礎的研究を行っていく。次なるステップとしてペプチドの「アミノ酸組成」および「構造」どちらが重要であるのか調査することにより、食肉由来ペプチドの抗酸化活性発現作用を明確にする必要がある。

文 献

- 1) 久保田 大樹, アブドラティフ アーメド, 河原聡, 六車 三治男:平成21年度食肉に関する助成研究調査成果報告書, (財)伊藤記念財団, 28, 1~9,

- 2010.
- 2) 日本生活習慣病予防協会データ: <http://www.seikatsusyukanbyo.com/>, 2009.
- 3) 美濃 眞:がんの予防, 美濃 眞・糸川嘉則・小林 正 編, 学会センター関西, 15~37, 1997.
- 4) 豊國伸哉:酸化ストレス・レドックスの生化学, 淀井淳司・谷口直之 編, 共立出版, 176~182, 2000.
- 5) 在原圭三:最新畜産物利用学, 齊藤忠夫, 西村敏英, 松田 幹 編, 朝倉書店, 122~124, 2007.
- 6) Katayama, K., Fuchu, H., Sakata, A., Kawahara, S., Yamauchi, K., Kawamura, Y., Muguruma, M.: *Asian-Aust. Anim. Sci. J.*, **16**, 417~424, 2003.
- 7) Katayama, K., Tomatsu, M., Fuchu, H., Sugiyama, M., Kawahara, S., Yamauchi, K., Kawamura, Y., Muguruma, M.: *Anim. Sci. J.*, **74**, 53~58, 2003.
- 8) Katayama, K., Tomatsu, M., Kawahara, S., Yamauchi, K., Fuchu, H., Sugiyama, M., Kawamura, Y., Muguruma, M.: *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 771~775, 2004.
- 9) Katayama, K., Jamhari, M., Mori, T., Kawahara, S., Mياke, K., Kodama, Y., Sugiyama, M., Kawamura, Y., Nakayama, M., Mayuyama, M., Muguruma, M.: *J. Food Sci.*, **72**, S702~S706, 2007.
- 10) 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.
- 11) Muguruma, M., Ahhmed, A.M., Katayama, K., Kawahara, S., Maruyama, M., Nakamura, T.: *Food Chem.*, **114**, 516~522, 2009.
- 12) Ahhmed, A. M., Muguruma, M.: *Meat Sci.*, **86**, 110~118, 2010.
- 13) Arihara, K., Nakashima, Y., Mukai, T., Ishikawa, T., Itou, M.: *Meat Sci.*, **57**, 319~324, 2001.
- 14) 渡辺 純, 沖 智之, 竹林 純, 山崎光司, 津志田 藤二郎:化学と生物, 日本農芸化学会誌, **47** (4), 237~243, 2009.
- 15) 津志田 藤二郎:食品と開発, UBMメディア, **45** (6), 4~6, 2010.
- 16) 奥村宣明:タンパク質実験ノート, 抽出と分離精製, 岡田雅人・宮崎 香 編, 羊土社, 27~31, 1996.
- 17) Murphy J.B, Kies, M.W.: *Biochim. Biophys. Acta*, **45**, 382~384, 1960.
- 18) 篠原和毅, 鈴木建夫, 上野川修一:食品機能研究法, 光琳, 218~220, 2000.
- 19) 沖 智之, 竹林 純, 山崎 光司:食品機能マニュアル集 第II集, (社)日本食品科学工学会, 79~86, 2008.
- 20) Huang, D., Ou, B., Hmpsich-Woodill, M., Flanagan, J.A., Prior, R.L.: *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 4437~4444, 2002.
- 21) Garcia-Macias, P., Ordidge, M., Vysini, E., Waroonphan, S., Battey, N.H., Gordon, M.H., Hadley, P., John, P., Lovegrove, J.A., Wagstaffe, A.: *J. Agric.*

- Food Chem.*, 55, 10168~10172, 2007.
- 22) Bao, L., Yao, X-S., Tsi, D., Yau, C-C., Chia, C-S., Nagai, H., Kurihara, H. : *J. Agric. Food Chem.*, 56, 420~425, 2008.
- 23) 西村敏英：脳内老化制御とバイオマーカー，基礎研究と食品素材，大沢俊彦・丸山和佳子 監，ジーエムシー出版，170~183, 2004.
- 24) 646食品成分表，646食品成分表編集委員会，一橋出版，160, 2004.
- 25) 村本光二，陳華敏：機能性ペプチドの最新応用技術，有原圭三 監，ジーエムシー出版，69~77, 2009.

細菌性新規プロテアーゼの食肉加工への応用

Application of a novel bacterial protease to meat processing

小林 秀 丈

(広島国際大学薬学部)

Hidetomo Kobayashi

(Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hiroshima International University)

Several enzymes are widely applied to meat processing. Among them, proteases such as papain are utilized as a meat tenderizer. Tenderization of meat is an important process that makes meat easier for the elderly and others to eat. However, the process should be safe and reliable.

Aeromonas sobria is ubiquitously found in aquatic environments. This organism produces a variety of biologically active substances. Among them, serine protease (ASP) directly acts on various kinds of proteinaceous components. We have already cloned the ASP gene and established a method for purification of ASP. Since bacteria can be easily cultivated, bacterial proteases are thought to be useful and powerful tools in food applications. In this study, we carried out basic research on the application of ASP to meat processing.

As a result, the following findings were obtained: After treatment of the meat with a preparation containing ASP, we analyzed the proteins by SDS-PAGE. The SDS-PAGE profiles revealed that the muscle fiber proteins such as myosin and actin were markedly hydrolyzed by the action of ASP. In contrast, degradation of the muscle fiber proteins was not observed when the meat was treated with 0.1 or 1.0 μ M subtilisin, which is another bacterial serine protease produced by *Bacillus subtilis*. This result suggests that ASP may hydrolyze the muscle fiber proteins more efficiently than subtilisin. We therefore propose that ASP can be applied to the meat processing as a novel tenderizer at small dosages. However, the results are not yet sufficient because the sample containing ASP used in this study was a crude preparation. We must evaluate the proteolytic action using a purified ASP sample. Moreover, we also need to assess whether ASP actually contributes to tenderization of meat using a proper measuring instrument. Further research is in progress in our laboratory.

1. 目 的

食肉の嗜好的品质は様々な要因により決定される。その中で食肉の硬さは重要な要因の一つである。食肉の硬さは筋肉組織や結合組織の量に依存

する。そのため食肉軟化にはそれらタンパク質を物理的、化学的に切断する処理が行われている¹⁾。現在、化学的処理の一つとして微生物由来のプロテアーゼがしばしば用いられ、その有用性について様々な方面から検証されている²⁾。食肉の軟化

に用いる場合、プロテアーゼは筋肉組織や結合組織を構成するタンパク質を切断することでその効果が出ると考えられている。

近年、高齢者でも美味しく、食べやすい食事への関心が高まっている。その中で栄養価が高い肉製品の利用価値は高く、高齢者向けに軟らかい食肉の調理加工技術の開発が検討されている^{3,4)}。また、食肉の軟化技術はその嗜好的品質の向上が期待され、高齢者のみならず食肉を食べる多くの人がその恩恵をこうむる有用な技術であると考えられる。

我々は淡水中に生息している細菌である *Aeromonas* の培養上清中より高いプロテアーゼ活性を見出し、それが subtilisin 様セリンプロテアーゼであることを同定した⁵⁾。また、本プロテアーゼは 20~70℃、pH 4~11 の広い範囲で活性を有すること、さらに subtilisin とは異なるアミノ酸配列を認識して切断することを明らかにした⁶⁾。Subtilisin はこれまで食肉の軟化に一般的に使用されているプロテアーゼであるが、本プロテアーゼはいくつかの性状で subtilisin よりも優れたプロテアーゼであることが期待できる。そこで、本研究では *Aeromonas* が産生する新規プロテアーゼを食肉の軟化へ応用することを目的に、基礎的な知見を収集することにした。

2. 方法

2.1 試料

鶏もも肉は食料品店で購入し、皮および脂身を取り除き約 0.5 g に整形したものを試料として使用した。

2.2 大腸菌株およびプラスミド

プラスミド遺伝子の精製ならびにプロテアーゼの産生には大腸菌 HB101 株 (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) を使用した。プロテアーゼ遺伝子のクローニングに用いるプラスミドベクターは、

大腸菌で複製される pSA19CP を用いた。

2.3 菌体抽出物の調製

プロテアーゼ遺伝子を導入した大腸菌をプロテアーゼ産生菌として使用した。一方、プロテアーゼ遺伝子非導入大腸菌をプロテアーゼ非産生菌として使用した。LB 寒天培地にコロニーを形成した菌をエーゼで少量かき取り 2 ml の LB 液体培地中に懸濁させ 37℃ で一晚振盪培養した。培養菌液を 100 ml LB 液体培地に植菌し、さらに 37℃ で 16 時間振盪培養した。遠心分離 (8,000 × g, 15 分) にて培養液を除去後、菌体を 20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) に懸濁して超音波処理により菌体を破碎した。遠心分離 (18,000 × g, 30 分) にて不溶性画分 (菌体膜成分などが含まれる) を除去後、上清をプロテアーゼが含まれる菌体抽出物として使用した。一方、枯草菌のプロテアーゼとして市販の subtilisin (Sigma, St Louis, MO, USA) を 1 μM もしくは 0.1 μM の濃度に調製し、比較のために使用した。

2.4 プロテアーゼ活性の測定

菌の産生するプロテアーゼの活性はアゾカゼインを基質とした方法により測定した。菌体抽出物に 20 μl の 0.2 M リン酸緩衝液 (pH 7.5)、20 μl の 20% アゾカゼインを加え 37℃ で 1 時間インキュベーションした。反応後、10% トリクロロ酢酸溶液を加え反応を停止させた。遠心分離 (18,000 × g, 30 分) 後、上清に等量の 10 M 水酸化ナトリウム溶液を加え、450 nm にて吸光度を測定した。

2.5 菌体抽出物の添加

菌体抽出物および subtilisin 溶液は食肉重量 1 g あたり約 4 ml となるようにそれぞれ添加した。菌体抽出物添加後、4℃ で 16 時間、室温で 2 時間、37℃ で 2 時間それぞれ反応させた。

2.6 水溶性タンパク質の抽出

菌体抽出物処理後の鶏肉、または subtilisin 処理後の鶏肉に約 500 μl の水溶性タンパク質抽出溶

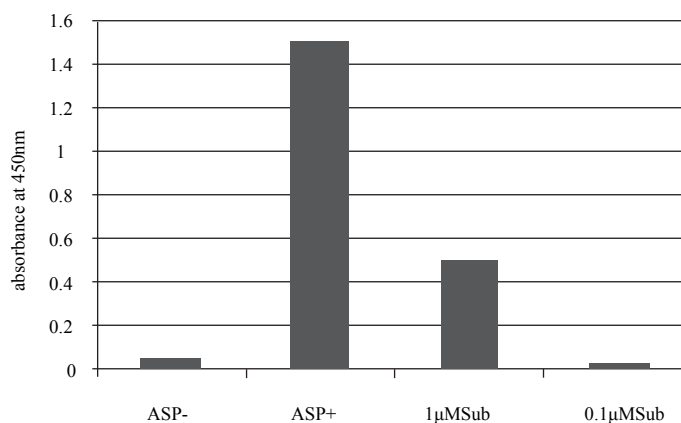


Fig. 1 Proteolytic activity of *Aeromonas* protease and subtilisin. *E. coli* HB101 was transformed with the plasmid including the *A. sobria* serine protease (ASP) gene or the vector plasmid alone. The crude preparation containing ASP (ASP+) or not (ASP-) was obtained as described in the method. The proteolytic activities of these preparations were measured using azocasein.

液〔0.25M Tris (hydroxymethyl) aminomethane, 0.25Mスクロース, 1mMエチレンジアミン四酢酸, 1mMふっ化フェニルメチルスルホニルpH7.6〕を加えホモジナイザーで食肉片を均質化した。遠心分離 (18,000×g, 20分) 後の上清を水溶性タンパク質抽出画分とした。同様の抽出操作をSDS-PAGEでバンドが確認できなくなるまで繰り返した (6回)。抽出した水溶性タンパク質溶液のタンパク質量は, BSAを検量線に用いたBradford法により決定した。

2.7 筋線維タンパク質の抽出

水溶性タンパク質抽出後の沈殿を蒸留水で洗浄後, 約500μlの筋線維タンパク質抽出溶液〔0.25M Tris (hydroxymethyl) aminomethane, 2% SDS, 10mM Imidazole, mM Dithiothreitol pH7.0〕を加え混和した。遠心分離 (18,000×g, 20分) 後の上清を筋線維タンパク質抽出画分とした。

3. 結果と考察

3.1 プロテアーゼ活性

*Aeromonas*由来のプロテアーゼを産生する菌

および非産生菌より抽出した菌体抽出物のプロテアーゼ活性を測定した。プロテアーゼ産生菌および非産生菌を, アゾカゼインを基質としたプロテアーゼ活性を測定した。その結果, プロテアーゼ産生菌は非産生菌と比較して高いプロテアーゼ活性が観察された (Fig. 1)。枯草菌産生プロテアーゼであるsubtilisinについても同様にプロテアーゼ活性を測定した結果, 使用した基質に対するプロテアーゼ活性が認められた。次いで, それらの菌体抽出物およびsubtilisin溶液を食肉に添加し解析を行った。

3.2 水溶性タンパク質への影響

種々の処理条件でプロテアーゼ産生性菌体抽出物, 非産生性菌体抽出物, subtilisinおよび未処理を行った食肉試料より水溶性タンパク質の抽出を行った。試料より抽出したタンパク質濃度を定量し, 各試料10μgとなるように10%SDS-PAGEにより分離したタンパク質のバンドを確認した。その結果, プロテアーゼ処理サンプルは未処理サンプルと比較して同様なバンドパターンを示すことが観察された (Fig. 2)。また, 今回試験した処理条件の違いによる変化も観察されなかった。従っ

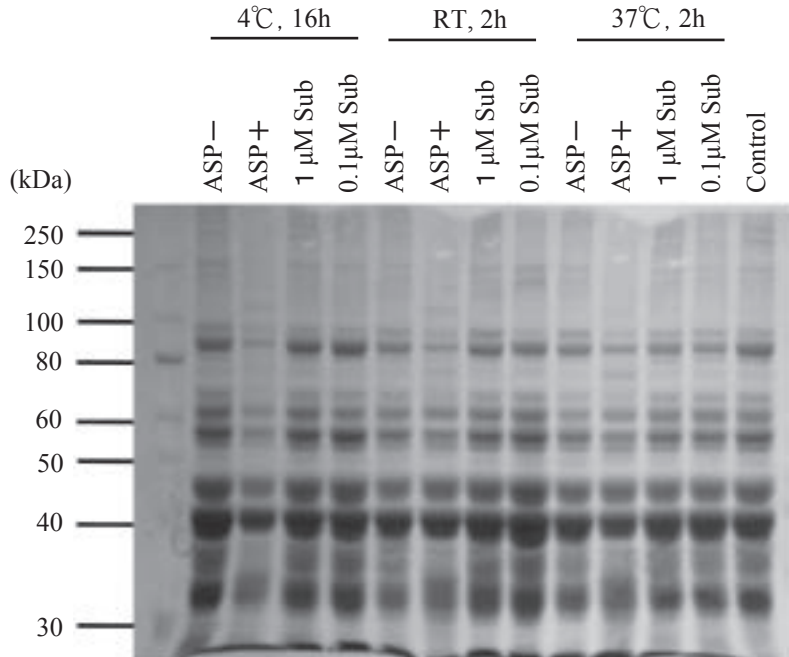


Fig. 2 SDS-PAGE profile of the water-soluble proteins extracted from meat treated with ASP or subtilisin. The water-soluble proteins were extracted from the meat treated with the crude preparations (ASP+, ASP-) as described in the method, or subtilisin (Sub). The water-soluble proteins were also extracted from the meat without such treatment (Control). The proteins (10 μ g) were separated by 10% SDS-PAGE. Numbers along the left side refer to the molecular masses of standard proteins (in kilodaltons). RT means "room temperature".

て、今回試験を行った食肉処理条件において、*Aeromonas*由来のプロテアーゼは食肉水溶性タンパク質に影響を及ぼさないことが推察される。

3.3 筋線維タンパク質への影響

水溶性タンパク質の抽出の項目と同様の処理条件下で処理した食肉試料より筋線維タンパク質の抽出を行った。試料より抽出したタンパク質濃度を定量し、各試料10 μ gとなるように7.5% SDS-PAGEによりタンパク質のバンドを確認した。その結果、未処理およびプロテアーゼ非産生性菌体抽出物を処理した食肉試料より抽出したサンプルは200kDaのミオシンおよび45kDaのアクチンのバンドが観察された (**Fig. 3**)。一方、*Aeromonas*由来のプロテアーゼを処理した食肉試料より抽出したサンプルはアクチンおよびミオシンのバンドが消失していることが観察された。この結果よ

り、*Aeromonas*由来のプロテアーゼは食肉中のアクチンおよびミオシンの分解を行うことが明らかになった。アクチンおよびミオシンは筋線維の主要な構成タンパク質であり食肉の硬さと密接に関係する。今回、*Aeromonas*由来のプロテアーゼがこれらのタンパク質を分解することで、食肉中の筋線維を分解することで食肉の軟化を導くと推察される。また、今回試験したすべての処理条件において、*Aeromonas*由来のプロテアーゼは筋線維タンパク質を分解することから、本プロテアーゼが様々な処理条件に対応できる有用なプロテアーゼである可能性が示唆される。さらに、産業的に広く使用されているsubtilisinと比較して筋線維タンパク質を分解する効果が高いことから、食肉分野において本プロテアーゼがsubtilisinに代わる有用なプロテアーゼとなることが期待できる。

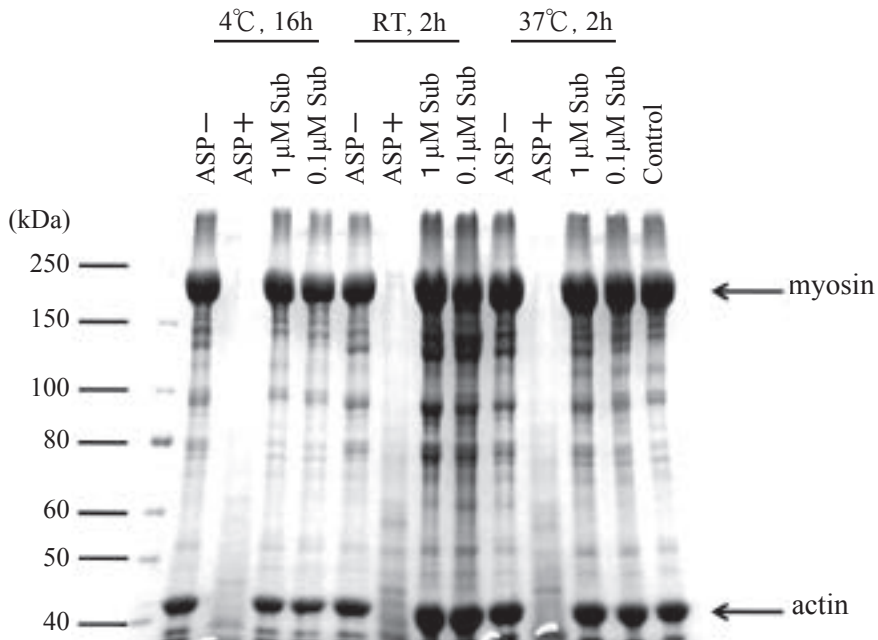


Fig. 3 SDS-PAGE profile of the muscle fiber proteins extracted from meat treated with ASP or subtilisin. The muscle fiber proteins were extracted from the meat treated with the crude preparations (ASP +, ASP -) as described in the method, or subtilisin (Sub). The water-soluble proteins were also extracted from the meat without such treatment (Control). The proteins (10 μ g) were separated by 8% SDS-PAGE. Numbers along the left side refer to the molecular masses of standard proteins (in kilodaltons). Arrows along the right side indicate myosin (200kDa) and actin (45kDa) bands, respectively. RT means "room temperature".

今後、本プロテアーゼの精製プロテアーゼ標品を調製し、食肉への処理濃度および条件を検討するとともに、剪断強度などを測定し軟化を引き起こすかについて評価する予定である。

4. 要 約

食肉加工の分野において様々な目的のために酵素が広く利用されている。特に、プロテアーゼは食肉中の筋肉組織や結合組織を構成するタンパク質を切断することで軟化させる効果が期待される。本研究では細菌由来プロテアーゼの食肉軟化への応用について検討を行ったものである。*Aeromonas*は淡水中に生息している細菌であり、その培養上清中に高いプロテアーゼ活性を有するのが特徴である。我々はこれまで本菌の産生するセリンプロテアーゼについて性状解析を行い、20

～70℃、pH 4～11で活性を有するsubtilisin様セリンプロテアーゼであることを明らかにした。さらに、塩基性側鎖のアミノ酸配列を特異的に認識して切断することなど、本プロテアーゼの性状はいくつかの点でsubtilisinよりも優れたプロテアーゼであることが期待された。そこで、食肉軟化を目的に*Aeromonas*の産生するセリンプロテアーゼの有用性について検討を行った。

*Aeromonas*の産生するセリンプロテアーゼ遺伝子を導入した大腸菌抽出液を鶏もも肉へ作用させ、水溶性タンパク質および筋線維タンパク質を抽出しそれぞれのタンパク質の分解をSDS-PAGEで解析した。その結果、プロテアーゼ産生菌抽出液処理サンプルではそれぞれのタンパク質の未処理のサンプルと比較した。セリンプロテアーゼ非導入大腸菌と比較した結果、水溶性タンパク質に

対してはそれほど大きな影響は与えなかったが、筋線維タンパク質のアクチンおよびミオシンを分解することを明らかにした。アクチンおよびミオシンは筋線維の主要な構成タンパク質であり、加熱調理後の筋線維タンパク質の変性が食肉の硬さと密接に関係している。今回、*Aeromonas*のセリンプロテアーゼを食肉へ作用させた際にアクチンおよびミオシンを分解することから、本プロテアーゼは食肉を軟化させる効果を有する可能性が示唆された。さらに、今回試験した低温でも効果が観察されたことから、と畜後の低温熟成過程での処理にも適応できる可能性があり、本プロテアーゼの優位性が示唆された。

文 献

- 1) 池内義秀, 他: 高圧力の科学と技術, 16, 17~25, 2006.
- 2) 井上國世: フードプロテオミクス食品酵素の応用利用技術, 1~12, シーエムシー出版, 東京都, 2004.
- 3) Sugiyama, S., et al.: *J Nutr Sci Vitaminol* (Tokyo), 51, 27~33, 2005.
- 4) Asakura, T., et al.: Application of plant proteinases to production of multi-functional food for elderly persons, *Urakami Foundation Memories*, 2009.
- 5) Okamoto, K., et al.: *Microbiol. Immunol.*, 44, 787~798, 2000.
- 6) Kobayashi, H., et al.: *FEMS. Microbiol. Lett.*, 256, 165~170, 2006.

低温乳酸発酵による食肉の組織構造とタンパク質 化学的变化に関する研究

Changes in tissue structure and chemical properties of proteins in meat during
fermentation using psychrotrophic lactic acid bacteria

芳賀 聖一・林 利哉

(名城大学農学部)

Seiichi Haga and Toshiya Hayashi

(Faculty of Agriculture, Meijo University)

The authors have previously reported that product quality and safety in sausage production using commercially available pork can be improved by inoculation of psychrotrophic lactic acid bacteria at the time of the routine curing process.

In the present study, we inoculated two kinds of psychrotrophic lactic acid bacterial starter culture strains and examined the tissue structure of cured pork during fermentation. The results showed a constant presence of a large number of lactic acid bacteria on the order of 10^8 in the cured pork during 10 days of fermentation. The *Lactobacillus sakei* No. 4 strain, part of our laboratory collection, was more effective for decreasing pH compared to the commercially available *Lactobacillus sakei* D-1001. There were also clear differences in muscle fiber and connective tissue structures, which determine the texture of meat products, between fermented and non-fermented samples and between strains. Specifically, in addition to exhibiting the largest decrease in pH, the sample inoculated with the lactic acid bacterial strain No. 4 showed a three-dimensional network of finer granular denatured proteins between and within muscle fibers, as well as a loose endomysium structure of collagen fibers due to the fermentation process. The above results are expected to lead to new a production process for meat products and may strongly influence preferences, such as texture.

1. 目 的

欧米では伝統的な発酵食肉製品の製造が古くから製造されているが、我が国では食肉に関しての発酵技術の使用は様々な理由であまり普及していない。しかし、発酵食品の健康への寄与については多くの報告があり、食肉製品製造においてもその技術を活かすことは有用と考えられる。我が国ではこの十数年の間に発酵食肉製品の有用性につ

いての多くの報告^{1,2)}がみられ、著者ら^{3,4)}も乳製品によく使用される乳酸菌によって派生したペプチドの有用性について報告した。著者らは、我が国で多く製造されているクックドソーセージの製造過程の塩漬工程にバイオプリザーバティブとしての低温増殖性乳酸発酵を取り入れ、安全性の向上に加え、食感の改善による嗜好特性の改善、さらには機能性の付与による製品の付加価値の向上を意図して研究を重ねてきた。特に、著者らが

保有する低温下（4℃以下）でも増殖能を有する乳酸菌は食品衛生上極めて有効な微生物といえる。これまで保有乳酸菌のスクリーニングを行い、既に塩漬食肉中で旺盛に増殖する菌株の選定・分類に至っている⁵⁾。それらの乳酸菌を用いて、食肉を低温発酵させた場合のタンパク質分解の程度やそれに伴う機能性発現の有無について種々検討した。その結果、低温乳酸発酵によって、筋原線維タンパク質が分解し、派生する分解物の中に、種々の生理機能をもったペプチドが存在する可能性を見出しており、低温乳酸発酵が食肉の機能性改善に有効であることを示した⁶⁾。しかしながら一方で、食肉製品に求められる品質には、嗜好性が極めて重要であることはいうまでもなく、特に、結着性や保水性は製品の品質決定要素として重要視されている。従って、高品質な発酵食肉製品を開発するためには、これらの品質に及ばず影響を考慮した研究が必要となる。

そこで本研究は、本研究室でスクリーニングした乳酸菌を用いて、塩漬豚肉を低温発酵させた場合の、筋原線維および結合組織の組織構造に着目して検討した。このことは塩漬・発酵工程後の製造過程において食肉製品の保水性・結着性発現の鍵因子となる可能性が高く、筋原線維タンパク質の変性・分解過程を経た後、食肉製品製造における製品品質の改善をはかるための重要な基礎データとなる。

2. 方法

2.1 スターター調製

市販の*Lactobacillus sakei* D-1001および当研究室保有の低温増殖性乳酸菌*Lactobacillus sakei* No.4（以後、D-1001, No.4と略す）をMRS液体培地中にて30℃で18~24時間培養し、遠心分離（8,000×g, 10分）して得られた沈殿を、滅菌生理食塩水で懸濁してスターターとした。本実験で

用いた低温増殖性乳酸菌はリボソームタンパク質の質量解析結果によって95%の相同性をもつが、異なるグループに分類された菌株である⁵⁾。

2.2 試料の調製

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いたおよそ1cm角の大きさの赤肉に、塩漬剤（NaCl：2.0%，NaNO₂：0.02%，KNO₃：0.05%，トリポリリン酸Na：0.30%）およびグルコース2%を加えた。その際、発酵食肉の場合、乳酸菌スターターを10⁶CFU/gレベルで接種した。その後、低温下（4℃）にて10日間静置して発酵させた。

2.3 乳酸菌数の測定

低温下（4℃）で発酵させた塩漬豚肉を滅菌生理食塩水で10倍~10⁸倍の範囲で段階希釈し、MRS寒天培地中に希釈液1mlを混和させ、30℃で48時間培養し、試料1g中の乳酸菌数を算出した。

2.4 pH測定

各試料10gに対して25mlの蒸留水を加え、ホモジナイザー（IKA-WERKE GMBH & CO.KG, IKA T25 Basic）で均質化（11,000/min, 2分）した後、pHメーター（堀場製作所, F-12）で測定した。

2.5 走査型電子顕微鏡（Scanning Electron Microscope）による筋線維構造の観察

各試料を3mm角にトリミングした後、2.5%グルタルアルデヒドを含む0.1M Na-リン酸緩衝液（pH7.0）を用いて24時間の前固定を行い、1%四酸化オスミウムを含む0.1M Na-リン酸緩衝液（pH7.0）を用いて5時間の後固定を行った。その後、脱水、置換、臨界点乾燥（日立工機株式会社, HCP-2型）、金・パラジウムを蒸着（日立株式会社, E-101）し、観察用試料とした。観察は走査型電子顕微鏡（日立計測器サービス株式会社, S-3000H）（以下、SEMと略す）を用い、加速電

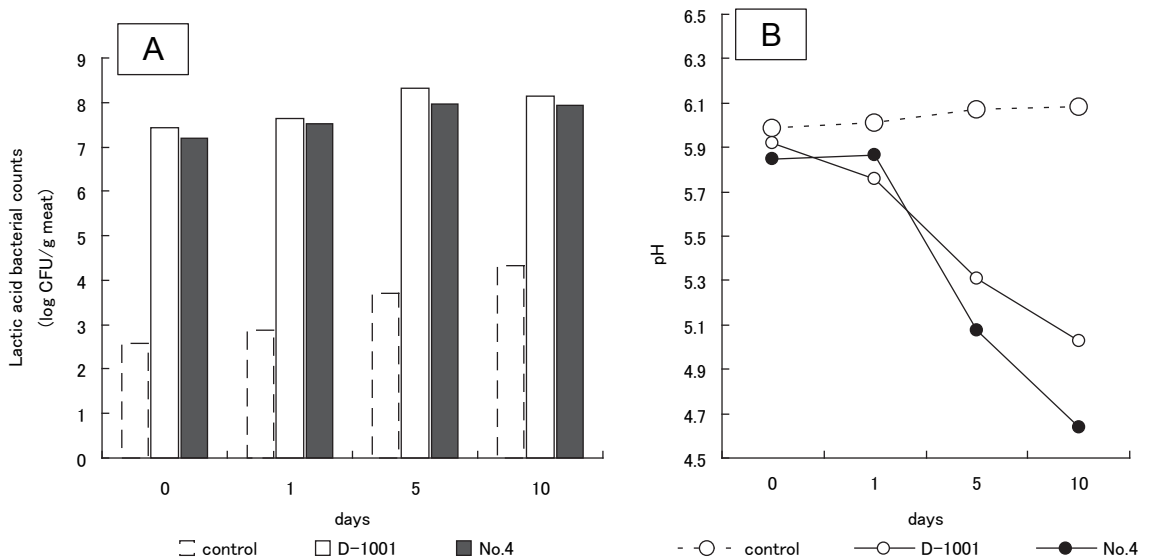


Fig. 1 Changes in psychrotropic lactic acid bacterial counts (A) and pH (B) of cured pork meat at 4°C during fermentation

圧25kVで1000倍ならびに10,000倍で観察し、装備されたカメラで撮影した。

2.6 細胞消化法による結合組織構造の観察

各試料を6mm×6mm×10mmにトリミングした後、試料の前固定を10日間行い、Ohtaniらの方法⁷⁾に従って7日間細胞消化、蒸留水で5日間洗浄、1%タンニン酸に3時間浸漬、蒸留水で5時間洗浄を行った。その後、1%四酸化オスミウムによる5時間の後固定を行い、臨界点乾燥、イオンスパッタリングを行ったものを結合組織観察用試料とした。

3. 結果と考察

3.1 低温増殖性乳酸菌を接種した塩漬豚肉における乳酸菌数とpHの経時的変化

発酵食肉製品に用いるスターターを選択する上で重要な点は、発酵過程において食肉中で安定した生育によるpHの低下にある。pHの変化は食肉の組織構造、塩漬時のタンパク質抽出量そして加熱時の加熱損失率など、食肉製品の嗜好性に関する重要因子となる。Fig. 1に低温発酵過程におけ

る乳酸菌数とpHの変化を示した。

その結果、control区では 10^2 レベルの乳酸菌数が日数経過に伴い 10^4 レベルへとわずかな増加に止まったのに対し、乳酸菌を接種した発酵試料では本実験の発酵期間を通し、 10^7 ~ 10^8 レベルと高い乳酸菌数を維持することが確認された。次に、pHに関しては、control区ではpH6.0前後で安定した値を示したが、発酵区では発酵期間の延長に伴い漸次低下し、D-1001では5.03、No.4では4.64まで低下した。本報告では示さないが、当研究室で保有する16の低温増殖性乳酸菌株についてpH低下能に基づく分類を行っており、No.4のpH低下能が最大であることが判っている。

3.2 低温発酵を施した塩漬豚肉の筋線維構造変化

食肉製品においてその物理学的特性は、組織構造の変化と密接な関係があり、それは製品の嗜好性にも反映されることから微細構造の変化を調べることは意義深いといえる。特に、筋線維およびその主体となる筋原線維タンパク質の状態は前述したように食肉の物性を決定づける要因であり、

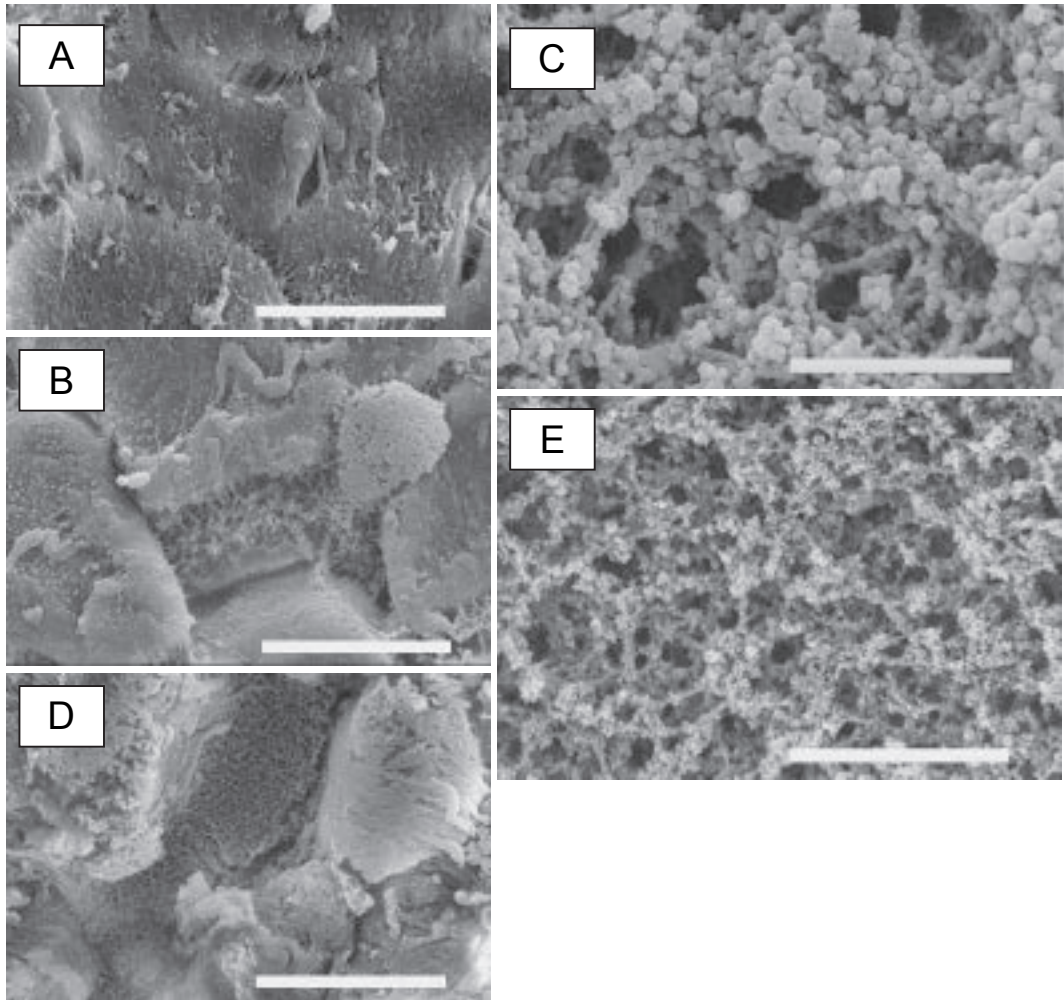


Fig. 2 Scanning Electron Micrographs of muscle fiber after ten days

A, non-fermented pork meat ; B,C, Fermented pork meat (Lactobacillus sakei D-1001) ; D,E, Fermented pork meat (Lactobacillus sakei No.4). A scale bar : A, B and D (50 μ m), C and E (5 μ m)

発酵過程における筋線維構造の変化が食肉製品の品質に与える影響は少なくないと考えられる。

そこで、低温発酵過程における筋線維の変化をSEMにより観察し、10日目の像をFig. 2に示した。その結果、control区では10日間経過しても形状、筋線維のサイズおよび筋線維間隙の形態的な変化は認められなかったが (A)、乳酸菌接種区では発酵10日目で筋線維の収縮、筋線維間の間隙拡張、筋線維内および筋線維間における三次元ネットワーク形成が観察された (B~E)。さらに、

ネットワークの形状についてはpH低下度の異なる2つの乳酸菌株間で大きな差異が認められた。すなわち、D-1001による発酵試料のネットワークはミオシンやアクトミオシンからなる球状の変性タンパク質で構成されるのに対し (C)、No.4のそれはより細かい粒状のタンパク質からなる (E) ことが明らかとなった。このような結果は、ミオシン溶液の緩慢なpH低下は加熱処理を施さなくても保水性に富んだ弾性的なゲルを形成するという報告⁸⁾を裏付けるものであり、さらには塩

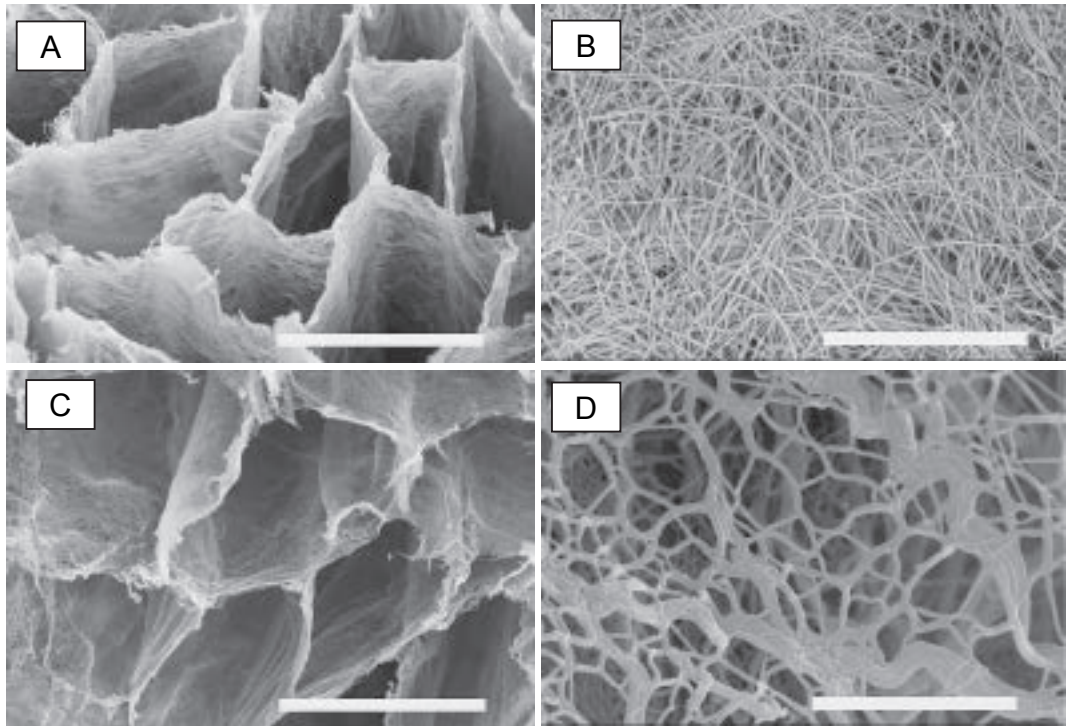


Fig. 3 Scanning Electron Micrographs of endomysium in muscle after ten days

A and B, non-fermented pork meat; C and D, Fermented pork meat (*Lactobacillus sakei* No.4). A scale bar : A and C (50 μ m), B and D (5 μ m)

漬工程の後に行う加熱処理によって得られるゲル構造の差異に反映し、物性値については嗜好性にも大きな影響を与えることがこれまでの研究から推察される。

3.3 低温発酵を施した塩漬豚肉の結合組織構造変化

食肉は死後硬直後の硬直解除によって熟成が進んでいくが、食肉の軟化現象の一因として結合組織内のプロテオグリカンの分解による筋内膜や筋周膜の崩壊がNishimuraらの一連の報告⁹⁾により明らかにされている。そこで発酵処理が食肉の結合組織構造に及ぼす影響について組織構造的に検討し、筋内膜像をFig. 3に示した。その結果、未発酵試料と発酵試料に差異が認められ (A, C), 筋内膜のシート状壁面が発酵により薄くなっている様子が観察された。すなわち、それはcontrol区とした未発酵試料では緻密なコラーゲン線維で

構成されている (B) のに対し、発酵処理を施した2試料は粗野な線維構造になっている (D) ことで裏付けることができた。Nishimuraら¹⁰⁾ は豚生肉を使用した際に、熟成14日間の結合組織構造変化について観察しており、蜂の巣状構造は維持されつつもコラーゲン線維の配列や緻密性が熟成期間に伴い失われていくことを報告している。本実験での結果は発酵により結合組織構造の崩壊が促進されたことを意味し、このことも食肉製品の物性、および嗜好性に強く反映されるものと考えられる。

4. 要 約

本研究で使用した低温増殖性乳酸菌スターターは、発酵10日間で 10^8 レベルの高い乳酸菌数を維持しており、そのpH低下能は市販される*Lactobacillus sakei* D-1001よりも当研究室保有の*Lactobacillus*

sakei No.4の方が強いことが確認された。また、食肉製品のテクスチャーを決定づける要因となる筋線維構造、結合組織構造は発酵の有無、乳酸菌株の違いによる明らかな差異が認められた。すなわち、pH低下の大きかった乳酸菌株No.4接種試料では筋線維間や筋線維内に、より微細な粒状変性タンパク質からなる三次元ネットワークが観察され、また、筋内膜を構成するコラーゲン線維は発酵処理により膜組織がルーズな構造となっていることが観察された。以上の結果は、食肉製品製造工程において通常の製品とは異なる製品製造につながり、食感をはじめとする嗜好性に強く反映されることが考えられる。

文 献

- 1) 有原圭三：食肉の科学, 48 (1), 4~19, 2007.
- 2) 有原圭三, 大畑素子：食肉の科学, 50 (2), 202~211, 2009.
- 3) 加藤久美子, 林利哉, 芳賀聖一：名城大学総合学術研究論文集, 4, 87~95, 2005.
- 4) 林利哉, 加藤久美子, 芳賀聖一：名城大学総合学術研究論文集, 7, 71~80, 2008.
- 5) 寺本華奈江, 佐藤浩昭, 孫麗偉, 鳥村政基, 田尾博明, 和栗伸吾, 林利哉, 芳賀聖一：分析化学, 56 (12), 1063~1070, 2007.
- 6) 林利哉, 和栗伸吾, 小川幸彦, 芳賀聖一：平成19年度食肉に関する助成研究調査報告書, 26, 44~49, 2008.
- 7) Ohtani,O.,Ushiki,T.,Taguchi,T. and Kikuta,A. : *Arch.Histol.Cytol.*, 51, 249~261, 1988.
- 8) K. Fretheim, B. Egelandsdal, O. Harbitz and K. Samejima : 肉の科学, 27 (2), 155, 1986.
- 9) T. Nishimura, A. Hattori and K. Takahashi : *Meat Science*, 42 (3), 251~260, 1996.
- 10) T. Nishimura, S. Fang, T. Ito, J. Wakamatu and K. Takahashi : *Animal Science Journal*, 79, 716~721, 2008.

伝統的魚肉加工手法の食肉加工への応用 (2)

Application of Traditional Fish Processing Techniques to Meat Processing (2)

漆 間 創・岩 田 淑 子・宇 多 川 隆

(福井県立大学生物資源学部)

Hajime Uruma, Toshiko Iwata and Takashi Utagawa

(Department of Bioscience, Fukui Prefectural University)

“Heshiko” is a traditional Japanese fermented fish product made from mackerel. It is made by gutting mackerel, pickling it in salt from one to two weeks and then letting it ferment in a barrel packed with rice bran for six to twelve months at room temperature. During this fermentation period, amino acids and peptides are produced from the mackerel by the reaction of protein hydrolyzing enzymes. The motivation behind Heshiko production is to preserve the mackerel and to improve its taste.

In our last study, we took up the challenge of applying the Heshiko production process to pork and beef to produce new prototypes of ham-like foods, which we named “Heshiko-ham”. We were able to confirm that pork could be preserved for more than six months without any rotting and that its amino acids were increased. However, evaluation of the finished products suggested that their taste was too salty.

In this study, we investigated the salting conditions at the initial stage to reduce this saltiness, and found that salting for two days is suitable for two kilograms of meat to produce mildly salty Heshiko-ham. After two days salting, the meat was pickled in rice bran for six to eight months to complete fermentation.

The fermented meat was evaluated by special chefs, who also gave us suggestions on how to use the Heshiko-ham. They prepared dishes with the Heshiko-ham for evaluation.

Along with the formation of amino acids, peptides were detected in extracts of the fermented meat. We examined the effect of the extracts on the angiotensin I converting enzyme inhibitory activity, which is an index for the blood pressure lowering effect, but this effect was weak compared with fish extracts.

We also applied the Heshiko production process to wild boar meat to obtain another prototype ham. We found that the wild boar ham contains a high amount of free amino acids in the extracts of its fermented meat.

1. 目 的

福井県の伝統的発酵食品の「へしこ」は、江戸

時代から続く魚介類の保存技術であり、大量のサバが越前海岸にて捕獲された時の保存方法として開発されてきたものである。内臓を除去した後に

約1週間の塩蔵後、糠に漬けて室温にて長期間保存するもので、その間に、好塩性の乳酸菌(*Tetragenococcus halophilus*)が生育し乳酸を生成することにより、糠の環境を酸性側にシフトさせる。この乳酸の効果と塩の効果で、雑菌の繁殖が抑えられ、「へしこ」の品質が保たれている。この糠漬け期間中に、サバの自己消化酵素が作用し、遊離アミノ酸及びペプチド類が生成し、「へしこ」独特の旨味が出てくる¹⁾。即ち、「へしこ」生産技術は保存と旨味を付ける優れた技術と考えられる。さらに、最近の研究で、生成するペプチドに血圧を低下させる効果があることが報告されている²⁾。

我々は「へしこ」生産方法は、魚肉の保存だけでなく、他のタンパク食材の保存に応用できるのではないかと考え、豚肉と牛肉に応用しハム様の加工食品が生産される事を報告した³⁾。

しかしながら、「へしこ」と同じ条件で食肉を漬けると、アミノ酸の遊離は認められたものの、塩味が強すぎるという評価結果が得られ、塩味の改善が課題であった。一方、食肉においても、サバと同じように糠漬け中にペプチドの遊離が予想され、その生理活性も期待された。

今回、豚肉を原料としてつくる「へしこハム」の味の改善と、遊離ペプチドの生理活性について検討することを目的とした。さらに、最近、福井県で獣害として問題になっているイノシシの肉を豚肉と同じように糠漬けにすることにより発酵させ、ハム様の加工肉の生産についても検討した。

2. 材料と方法

2.1 材 料

豚肉(モモ肉)は福井県の食肉加工専門店である(株)カワグチより入手した。イノシシの肉は地域の方から提供されたものを使用した。重量は約2kgの塊とし、必要に応じて加減した。食塩

は市販の海水塩(並塩、鳴門塩業(株)製)を50kg単位で購入し使用した。米糠は福井県内の市販品を購入し使用した。

食肉を塩漬けおよび糠漬け発酵させる樽は、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で中蓋と対になっているものを購入し使用した。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 塩漬け及び糠漬け方法

(1) 塩漬け

前報³⁾と同じように、各肉のブロック(約2kg)に食塩をすり込み、プラスチック容器に肉を重ねるように漬け込む。塩の量は、肉の重量の約30%とした。中蓋を乗せ、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。

(2) 糠漬け

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、底に米糠を敷き、その上に米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る。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6~8ヶ月間発酵させた。

2.3 遊離アミノ酸分析

各々肉片0.5gを粉碎後、2%スルホサリチル酸を添加し50mlとした後、10分間振とう混合した後、混合液を遠心分離する。その上清を精密ろ過した後、遊離したアミノ酸をアミノ酸アナライザーにて分析した。

2.4 pH測定

糠を等重量の水に懸濁し、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。

2.5 ペプチドの定量

豚肉エキスの調製：豚肉20 g に対して蒸留水100mlを加え、ホモジナイズした後、100℃で5分間加熱した。室温まで冷却した後、遠心分離機により2℃で30分間遠心分離（10000 g）して上清 a を得た。沈殿に蒸留水を50ml加えて攪拌した後、同条件で遠心分離し上清 b を得た。上清 a および b を合わせた後、ポアサイズ3 μmのセルロースアセテートメンブレンを用いてろ過し、蒸留水で250mlに定容して熱水抽出エキスとした。

ペプチドは、得られた抽出エキスを、Lowry法⁴⁾により定量した。

2.6 アンジオテンシン変換酵素（ACE）阻害活性の測定

ACE阻害活性は山本らの方法⁵⁾に準じて測定した。

(1) 試薬

ホウ酸buffer：1MNaClと0.05MNa₂B₄O₄の溶液と、1MNaClと0.2MH₃BO₃の溶液とを混合し、pH8.3に調整。

ヒプリル-L-ヒスチジル-L-ロイシン（HHL）溶液：HHLacetate saltはSIGMA社より購入し、硫酸bufferを加えて、12.5mMに調整した。

アンジオテンシンI変換酵素（ACE）溶液：ACEはLung acetone powder from rabbitをSIGMAより購入し、これに蒸留水を加え攪拌後、遠心分離し、上清を酵素液として使用した。

(2) 測定手順

- 1) 氷上でエッペンチューブに各試料を15 μl と、HHL溶液（試薬2）を30 μl 添加し、37℃で、5分間プレインキュベーションを行う。
- 2) ACE溶液（試薬3）を30 μl 添加し、攪拌した後、37℃で60分間インキュベーションを行う。
- 3) 0.5M塩酸を75 μl 加え攪拌し反応を停止させる。
- 4) 酢酸エチル450 μl を加え攪拌し、遊離し

た馬尿酸を抽出する。

- 5) 6000rpm, 10分間遠心分離し、酢酸エチル層を150 μl 回収、別のエッペンチューブに入れる。
- 6) 酢酸エチル層150 μl 入れたエッペンチューブをデシケーター中に入れ、水流アスピレーターにて酢酸エチルを乾燥する。
- 7) 蒸留水を900 μl 加えて攪拌し、228nmの吸光度を測定する。

2.7 味覚評価

発酵した肉を取り出し、糠を落とした後、薄い切片を作成して評価した。満足できたへしこハムは、近隣のレストランの専門シェフによって評価を行い、へしこハムを用いた14種類の創作料理を調理して頂いた。味覚評価は、福井県のホテルのシェフ等の料理専門家を招待して行った。

3. 結果と考察

3.1 塩味の調整

前報で調製した「へしこハム」は塩味が強すぎると言う評価であったため、塩味の加減が必要であった。その調整を、初期の塩漬け時間によって行うこととし、約2kgブロックの肉を2日、3日、4日塩漬けした後に糠漬けに移行した。糠漬け5ヶ月後に取り出し、アミノ酸分析を行った。

Fig. 1に示すように、2kgの肉に対して2日間の塩漬けした肉のアミノ酸含量が最も高く、塩漬け時間が長くなると遊離アミノ酸量が低下する傾向にあった。

このことは、肉に含まれるプロテアーゼが肉中に塩が浸透することによって塩濃度が高まり、活性が抑えられる事を示唆している。

肉の塩味も、2日間塩漬けしたものが最もマイルドであり、旨く感じられた。塩漬け期間が長くなると塩味が強くなった。そこで、2kgの肉塊に対し、2日の塩漬けすることを基準とし、糠漬

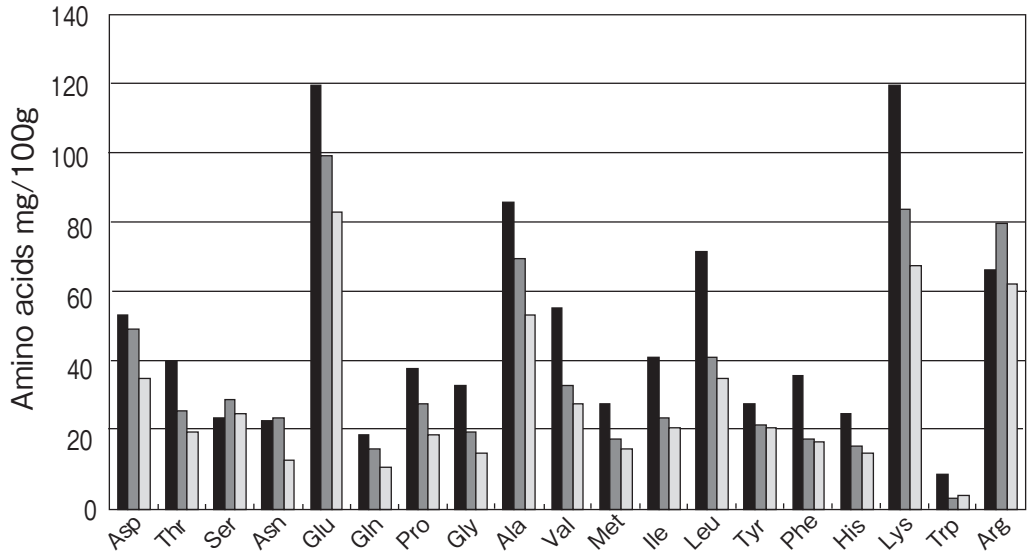


Fig. 1 Water soluble amino acids content in fermented pork
 After pork was pickled in salt for 2, 3 and 4 days, salted pork was fermented in rice bran for 6 months. Salting period : ■ 2days : ▒ 3days : □ 4days

け期間の評価を行うこととした。糠漬け期間の評価は、経時的に肉切片を切り出し、食しながら評価した。その結果、糠漬けは6～8ヶ月間の糠漬けが良いと判断した。長期間の糠漬けは、味が薄くなるように感じられた。

6ヶ月後にできた製品が写真のもので、昨年の一週間塩漬けたものに比べ色も鮮やかであり、口当たりの良いハムに仕上がっていた (Fig. 2)。

以上の検討結果に基づき、「へしこハム」の生産方法として、肉塊 2 kgを30%の塩でまぶし、等量の重石を乗せて2日間放置した後に取り出し、塩を十分に落とした後米糠にまぶし、6～8ヶ月間、等量の重石を乗せて放置する、とまとめられる。

3.2 ペプチドの生成量

へしこハム発酵中に遊離してくるペプチド量は、発酵3ヶ月目でエキス 1 ml中に28mg、10ヶ月で48mgであった。このように、経時的にペプチド量の増加が認められた。これは、肉タンパク質が自身の持つプロテアーゼで徐々に分解されア

ミノ酸と同時にペプチドを生成していることを示すものである。

3.3 アンジオテンシン変換酵素阻害効果の検討

ペプチドを含むエキスを25倍に希釈し、アンジオテンシン変換酵素阻害活性を求めた。発酵3ヶ月後のエキスの阻害率は11%、10ヶ月後のエキスは24%の阻害効果を認めた。この活性の増加は、エキス中のペプチド量にほぼ比例している。ほぼ同じペプチド濃度に調製したサバの自己消化エキスの場合、阻害活性は66%であり、サバのエキスに比較すると活性が弱いことが分かった。遊離するペプチドの構造に違いがあるものと考えられる。

サバの「へしこ」発酵中に生成するペプチドを含むエキスには、アンジオテンシン変換酵素を阻害し、ラットの血圧を下げる効果が知られている²⁾。今回得られた「へしこハム」のエキスには、アンジオテンシン変換酵素阻害活性が弱かったため、ラットへの投与試験に至らなかった。



Fig.2 Heshiko-ham
After two days salting, pork was pickled in rice bran for six months.

3.4 味覚評価

上記基準で調製した「へしこハム」を、福井県永平寺町にあるレストラン「サニーサイド」のシェフに評価を頂き、「へしこハム」を使った創作料理を作って頂いて、地域の専門家を招いて試食会を行った。その時の様子は地域のテレビ、新聞に取り上げられ、メディアの新加工肉への関心は高かった。シェフによってへしこハムを使った15種類の創作料理が作られ、29名からのアンケート回答を得た。へしこハムを使った料理の一部をFig.3の写真で紹介する。美味しいと感じた料理に投票してもらった結果はTable 1に示した通りである。料理の中で、番号5の「へしこハムの手毬寿司」は高い評価を得ており、ハムと寿司米の組み合わせが好ましいと出た。この組み合わせは、へしこハムの味を直接感じる事ができ、良い組み合わせであると思われる。次いで、「ごま豆腐とへしこハム味噌風味」、「へしこハムとキノコのブルスケッタ」と続いた。へしこハムの冷や奴、へしこハムと春野菜のパスタ等は高い評価は得られなかった。へしこハム以外の食材の影響が出過ぎて、へしこハムの味を楽しむのには適して

Table 1 Evaluation of dishes

	創作料理名	投票数
1	へしこハムの本綿豆腐とトマトのサラダ	11
2	タラの芽、ごごみとへしこハムの白和え	13
3	へしこハムと野菜の田楽串	14
4	ごま豆腐とへしこハム味噌風味	20
5	へしこハムの古代米入り手毬寿司	21
6	へしこハムと菜の花卵の花和え	8
7	へしこハムと若布のあべかわ	9
8	へしこハムの内豆なます	9
9	へしこハムの冷や奴	4
10	へしこハムとメロン	10
11	へしこハムとチコリのフィンガーサラダ	14
12	へしこハムとキノコのブルスケッタ	18
13	へしこハムと春野菜のパスタ	6
14	へしこハムとポークカツレット	15
15	へしこハムのサブレ	15
16	店で買いたい	26
17	レストランで食べたい	28

いないのかもしれない。

アンケート番号16, 17で購入意欲についての問いに対して、殆どの方が購入又はレストランで注文したいとしており、料理専門家の見方もかなり好意的であった。



Fig. 3 Dishes with Heshiko-ham

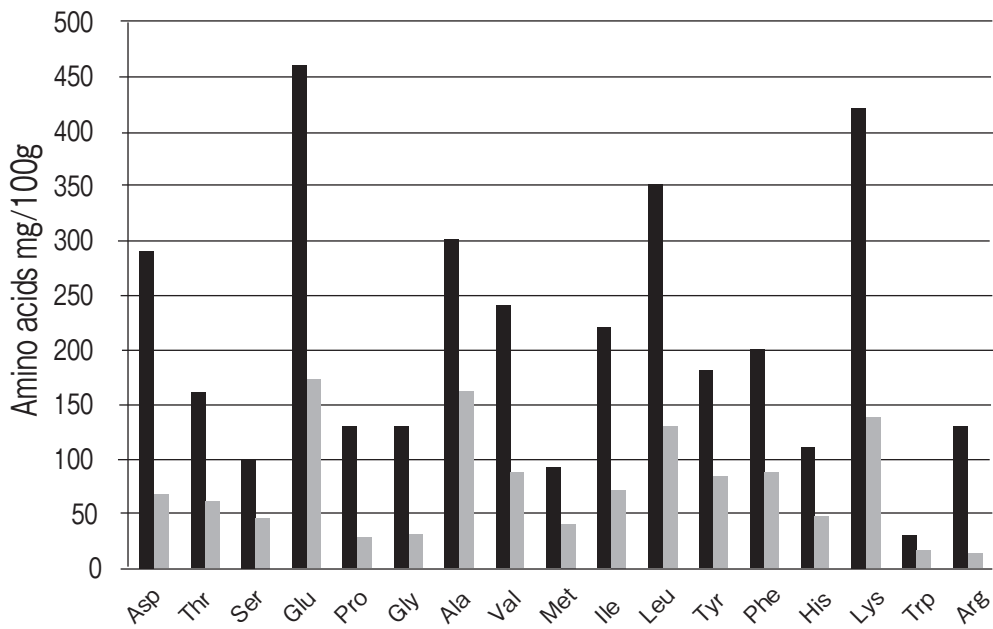


Fig. 4 Water soluble amino acids content in fermented pork and wild boar meet
After 2 days salting, meets were pickled in rice bran for 6 months.
■ : wild boar ■ : pork

自由意見欄では、お酒やご飯とよく合うという好意的な意見が多くみられたが、まだ塩味が強いというコメントもあり、今後さらに改善する必要

がある。

3.5 いのしし肉への展開

地域の方から入手したイノシシ肉は1.5kgで



Fig. 5 Fermented wild boar meat
After 2 days salting, wild boar meet was pickled in rice bran for 6 months.

あったので、塩漬けは1日半とした。後工程は豚肉同様に糠漬けを行い、6ヶ月間糠漬けしたものを取り出し、味覚評価と遊離アミノ酸分析を行った。

Fig. 4に示すように、イノシシ肉から遊離するアミノ酸のプロファイルは豚肉に類似していたが、遊離アミノ酸量は豚肉よりも多く認められた。味覚評価において豚肉よりもコクがあると評価されたのは、遊離アミノ酸が多い為と考えられる。尚、イノシシは野性であるため、食材として利用する場合は、衛生面での配慮が必要かと判断される。

Fig. 5にイノシシ肉の糠漬けの写真を示した。豚肉のへしこハムよりもやや色が濃いのが特徴的であった。

4. 要 約

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糠漬け「へしこ」の技術を豚肉に展開し、「へしこハム」ともいべき加工食品の生産方法をほぼ確立することができた。伝統的な「へしこ」は、塩漬け1週間、糠漬け8~10ヶ月が標

準的であるが、同じ条件で生産すると、塩味が強くなる傾向にあった。塩漬け期間を検討の結果、2kgの豚肉を2日塩漬けした後に糠漬けを行った場合が最もよくアミノ酸が遊離してくることが分かり (Fig. 1)、味覚評価においても、糠漬け期間が6~8ヶ月経過すると旨味が増加し、塩味もマイルドになって、ほぼ満足できると判断した。しかしながら、呈味性の向上については、今後も更に継続検討する必要があると思われる。上記条件で生産された「へしこハム」を用いた創作料理を専門のシェフにお願いし、料理専門家による評価会を開催した。この模様は福井県のメディアが取り上げるに至り、サバの「へしこ」の姉妹品としての開発が期待されている。

糠漬け期間中に、アミノ酸の遊離と共にペプチドが生成する事を認めた。サバの「へしこ」の場合、このペプチドにアンジオテンシン変換酵素を阻害し、血圧低下作用のあることが報告されているが²⁾、「へしこハム」由来のペプチド含有エキスにはその効果は弱いことが分かった。

全国的に獣害をもたらしているイノシシについても、「へしこハム」同様の操作で糠漬けを試み、

ほぼ、同じようなハム様の加工食品ができあがった。味は、豚の「へしこハム」比較してコクがあった。アミノ酸分析の結果 (Fig. 4), イノシシの糠漬けによって遊離してくるアミノ酸は、豚肉のそれよりも濃度が高く、味も濃厚であった。

謝 辞

終始、適切なアドバイスを頂いた福井県立大学生物資源学部講師、高橋正和先生にお礼申し上げます。

過去2年間にわたり、伝統的な糠漬け手法を食肉に展開する試みを行い、豚肉を用いて、ほぼ満足できる味を呈する「へしこハム」のプロトタイプ

の製法を確立することができた。ここに至るまでの、財団法人伊藤記念財団のご支援に深謝申し上げます。

文 献

- 1) 伊藤光史, 赤羽義章: 日本水産学会誌, **65**, 878~885, 1999.
- 2) Itou K. and Akahane Y.: *Fisheries Science*, **70**, 121~129, 2004.
- 3) 岩田淑子, 宇多川隆: 平成21年度食肉に関する助成研究調査成果報告書, **28**, 40~45, 2010.
- 4) Lowry O., Rosebrough N., Farr A. and Randall R.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265~275, 1951.
- 5) 山本節子, 戸井田一郎, 岩井和郎: 日胸疾会誌, **18**, 297~303, 1980.

試食パネルによる黒毛和種牛肉の肉質等級、 脂肪酸組成と食味性との関連に関する研究

Study on the relationship between meat grades, fatty acid composition and eating quality of Japanese black beef meat by taste panel

鈴木 啓一・横田 祥子・*飯田 文子

(東北大学大学院農学研究科, *日本女子大学)

Keiichi Suzuki, Shoko Yokota and *Fumiko Iida

(Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University *Japan Women's University)

The effect of BMSNo. (4, 7 and 9) sex (Heifer and Steer) and mono-unsaturated fatty acid percentage (MUFA, high : 60.09 %, moderate : 56.74 % and low : 53.41 %) on the eating quality of Japanese black cattle was examined. The trained panel of ten people evaluated the ten items by eight stage evaluation standard about 45 sirloins of beef cattle. The difference of MUFA was not found between 4, 7 and 9 of BMSNo, and the heifer was higher than that of the steer in MUFA and C18 : 1. The panel test results revealed that BMSNo. influenced all items except “desirable taste”, and high BMSNo. was excellent in all items. The effect of sex influenced the “strength of the flavor” and heifer was superior to the steer. Further, the effect of MUFA was significant in “fibrous feeling” and “total texture” and high MUFA was evaluated lower than moderate and low MUFA. However, high MUFA was significantly superior to low MUFA in “strength of flavor”. Medium MUFA was found excellent in “strength of flavor” by regression analysis. In addition, medium MUFA was higher than high and low MUFA in “overall judgment”.

1. 目 的

近年、国内で生産されている黒毛和牛の肉質は育種改良と飼養管理技術の改善により劇的に向上してきている¹⁾。特に、肉質等級4以上の割合がこの十年間に去勢で47.6%から57.3%に、雌でも32.0%から41.2%と約10%それぞれ増加し、枝肉重量やロース断面積などもそれぞれ40kgと5cm²増加あるいは太くなってきている。このような変化の一方で、新たな肉質評価基準が模索されており、より付加価値の高い美味しい牛肉の指標づく

りが課題となってきている。

肉の食味性に関しては、国産黒毛和牛に特異な香り成分（和牛香）や、最近ではオレイン酸などのモノ不飽和脂肪酸割合が関連しているとの報告がある。しかし、肉の美味しさは、アミノ酸、脂肪酸組成などの他にも未解明の複合的な要素が加わったものと考えられる。国内では、全国和牛登録協会が今後の和牛改良の重要な選抜形質の一つとして脂肪酸組成を取り上げ、全国和牛共進会の枝肉評価の項目としても採用されている。我々はこれまでモノ不飽和脂肪酸組成を育種改良の選抜

指標として有効か否かの研究を進めてきているが、融点よりもモノ不飽和脂肪酸割合が食味性に影響する知見を得ている²⁾。また、いくつかの研究機関でも食味性と脂肪酸組成との関連研究が行われている情報もあるが、学術的な報告は皆無である。我々の調査も訓練パネルではなく、一般消費者パネルテストの結果であり、脂肪酸組成と食味性との関連を詳細に研究する必要がある。脂肪酸組成と食味性との関連を明らかにすることは、今後の我が国の黒毛和牛の育種改良を進める上で最も緊急で肝腎な研究課題の一つである。本研究の目的は、黒毛和種牛肉の肉質等級と脂肪酸組成が既知の牛肉を用い、BMSNo., 脂肪酸組成と訓練パネルによる食味性との関連を検討することである。

2. 方 法

2.1 サンプルの入手

食肉市場に出荷された枝肉を購入した食肉流通業者からBMSNo. 4, 7および9に評価された牛肉の去勢と雌の牛肉サーロイン部分1kgを10頭ずつ合計60頭分の購入を予定した。しかし、BMSNo. 9の雌についてはサンプルは3頭分しか入手できず、実際に購入したのは53頭分だけだったためBMSNo. 9雌は分析対象から除外した。

2.2 脂肪酸組成の分析

真空パック冷凍保存された牛肉サーロイン部分から脂肪を採材し、採材した脂肪にn-ヘキサン(和光純薬)を1mL加え激しく振とうした後、10分以上室温に放置後、2N-NaOHメタノールを200 μ L添加し、約1分間振とうした。さらに、ウォーターバスにより50 $^{\circ}$ Cで20秒間加熱し、約1分振とうした後室温に放置して冷却させ、塩酸メタノール試薬10(2N-HCLメタノール;東京化成)を600 μ L添加し、約1分間振とうした後、2層に分離した上層をキャピラリーガラスピペットを使っ

て別の共詮試験管に分け取った。ブロックヒーターで50 $^{\circ}$ Cに加熱し窒素を吹きつけながらn-ヘキサンを揮発させて濃縮し、その後一定量のn-ヘキサンで希釈してガスクロマトグラフィーにより脂肪酸組成を分析した。分析結果に基づき、BMSNo. の各性別にモノ不飽和脂肪酸の高, 中, 低の3グループに分け、BMSNo. 4の去勢牛9頭, 雌9頭, No. 7の去勢牛9頭, 雌9頭, No. 9去勢牛9頭の合計45頭の牛肉を選び以下の官能評価に供した。

2.3 官能評価

BMSNo.の4, 7, 9の去勢または雌牛肉についてモノ不飽和脂肪酸量MUFAの高中低3点を同時に官能評価した。すなわち、BMSNo., 性およびMUFAごとに3回のパネル試験を行ったことになる。試料は、あらかじめ1cmの厚さに切りそろえ、200 $^{\circ}$ Cのホットプレートで2分15秒(内部温度60 $^{\circ}$ C・medium rare)焼き、筋線維に直角に3 \times 4cmに切り出した。評価は、訓練パネル10名により、「やわらかさ(はじめの一噛み)」「やわらかさ(咀嚼時)」「線維感」「多汁性」「総合的食感」「良い牛くささ」「悪い牛くささ」「風味の強さ」「好ましいうま味」「総合評価」の10項目について、8段階評価尺度(好ましい \rightarrow 8, 好ましくない \rightarrow 1)で評価を行った。パネルテストの結果は、45頭の牛肉についてそれぞれ10名のパネルの平均値とした。

2.4 定速圧縮破断測定

山電製Reoner-RE2-33005Bを用い、応力200N, くさび型プランジャーを用い、1cm/minで圧縮したときの破断応力と破断エネルギーを測定した。

2.5 統計処理

BMSNo. (4, 7, 9), 性(雌と去勢), モノ不飽和脂肪酸割合(低, 中, 高)を要因とした分散分析を行い、さらに全ての形質の相関を算出した。計算は全てSASプログラムパッケージを使い

Table 1 Mean and standard deviation of fatty acids and physical measurement traits.

Traits	BMS No.			Sex		FFA Grade			Interaction
	4	7	9	Heifer	Steer	Low	Medium	High	BMS No.*Sex *FFA Grade
Number of beef	18	18	9	18	27	18	18	9	
C14 : 0	2.53 0.54	2.66 0.37	2.55 0.48	2.56 0.49	2.60 0.45	2.88 ^a 0.52	2.47 ^b 0.36	2.40 ^b 0.35	ns
C16 : 0	26.29 2.73	26.46 1.99	26.79 1.60	25.74 ^b 2.03	26.94 ^a 2.24	28.37 ^a 2.00	26.20 ^b 1.08	24.80 ^c 1.82	ns
C16 : 1	3.99 1.07	4.06 0.90	3.85 0.79	4.40 ^a 1.10	3.72 ^b 0.71	3.57 ^b 0.69	3.86 ^{ab} 0.77	4.55 ^a 1.08	ns
C18 : 0	12.25 2.24	11.60 1.94	11.84 1.89	11.28 2.22	12.32 1.82	13.11 ^a 1.5	12.15 ^a 1.78	10.45 ^b 1.92	ns
C18 : 1	52.67 3.68	52.92 2.47	52.61 2.19	53.89 ^a 2.74	52.00 ^b 2.82	49.85 ^c 1.96	52.89 ^b 1.57	55.54 ^a 1.71	**
C18 : 2	2.27 0.61	2.31 0.73	2.37 0.51	2.13 0.64	2.42 0.61	2.22 0.50	2.43 0.73	2.26 0.67	ns
SFA	41.07 4.13	40.72 3.12	41.18 2.73	39.58 ^b 3.05	41.86 ^a 3.41	44.37 ^a 2.00	40.83 ^b 2.11	37.65 ^c 2.06	**
MUFA	56.66 4.22	56.98 2.92	56.46 2.72	58.29 ^a 3.17	55.72 ^b 3.20	53.41 ^c 1.96	56.74 ^b 1.95	60.09 ^a 2.18	**
Rupture stress N/m ² ×10 ³	30.98 ^a 8.80	27.06 ^{ab} 5.46	24.59 ^b 4.13	33.65 ^a 7.16	24.45 ^b 4.18	27.26 6.74	27.73 6.51	29.41 8.34	ns
Rupture energy J/m ³ ×10 ⁴	85.33 28.16	74.27 16.41	80.98 16.21	94.06 ^a 23.70	70.68 ^b 14.97	81.18 17.19	78.31 20.27	80.60 28.42	ns

Upper row is mean and lower row is standard deviation

a, b, c: Significant difference between different character of same row at 5% level. ns : not significant, *p<0.05, **p<0.01
: Significant difference at 5 and 1% level

行った。ただし、BMSNo. 9の雌のセルが完全に欠測しているためType IIの平方和を利用し有意性を評価し、Tukeyの方法により多重検定を行った。

3. 結果と考察

Table 1にはサーロインから採材した脂肪の各脂肪酸組成、肉の物理的測定値である破断応力と破断エネルギーについて、BMSNo. (4, 7, 9)と性(去勢と雌)およびモノ不飽和脂肪酸(低, 中, 高)を要因とした分散分析結果を示した。各脂肪酸組成に及ぼすBMSNo.の効果はいずれも有意ではなく、BMSNo.とロース脂肪の脂肪酸組成は関連がないことが示された。脂肪酸組成に及ぼす性の効果は、C16 : 0, C16 : 1, C18 : 1, SFA(飽和脂肪酸), MUFA(モノ不飽和脂肪酸)

について有意であり、雌は去勢よりモノ不飽和脂肪酸であるC16 : 1とC18 : 1が多かった。また、モノ不飽和脂肪酸の低, 中, 高では明らかに差が認められ、低, 中, 高の間にはモノ不飽和脂肪酸が3.3%ずつ、高低間には6.68%の差が認められた。また、C18 : 1とSFAおよびMUFAについてはBMSNo., 性と脂肪酸組成の交互作用が有意となったが、これは、BMSNo 4では雌と去勢の間でC18 : 1, SFAおよびMUFAの差が大きい、BMSNo. 7では雌と去勢と間に大きな差が認められなかったためである。物理的特性値である破断応力についてBMSNo.が有意であり、No. 9の方がNo 4と比べ応力が低くやわらかい肉であることが示された。また、去勢が雌より有意に破断応力、破断エネルギーが小さくやわらかいことが示された。さらに、脂肪酸組成はこれらの物理的特

Table 2 Mean and standard deviation of panel test results.

Panel test item	BMS No.			Sex		FFA Grade			Interaction
	4	7	9	Heifer	Steer	Low	Medium	High	BMS No.*Sex *FFA Grade
Number of beef	18	18	9	18	27	18	18	9	
Tenderness (Before)	5.14 ^c	5.67 ^b	6.32 ^a	5.49	5.65	5.75	5.74	5.27	ns
	0.71	0.56	0.23	0.62	0.79	0.52	0.68	0.86	
Tenderness (After)	5.10 ^b	5.65 ^{ab}	6.16 ^a	5.49	5.56	5.72	5.64	5.24	ns
	0.66	0.54	0.29	0.61	0.73	0.46	0.60	0.85	
Fibrous feeling	4.77 ^b	5.09 ^{ab}	5.37 ^a	5.09	4.97	5.18 ^a	5.15 ^{ab}	4.72 ^b	ns
	0.59	0.52	0.22	0.54	0.56	0.53	0.46	0.56	
Juiciness	5.15 ^b	5.53 ^{ab}	5.52 ^a	5.44	5.33	5.43	5.40	5.29	ns
	0.41	0.38	0.20	0.32	0.45	0.36	0.31	0.52	
Total texture	5.16 ^b	5.49 ^{ab}	5.67 ^a	5.41	5.38	5.53 ^a	5.50 ^a	5.15 ^b	ns
	0.53	0.33	0.17	0.45	0.45	0.38	0.30	0.55	
Good cattle aroma	4.99 ^b	5.44 ^{ab}	5.58 ^a	5.28	5.29	5.3	5.35	5.21	ns
	0.53	0.22	0.08	0.33	0.51	0.34	0.32	0.61	
Bad cattle aroma	4.81 ^b	5.23 ^{ab}	5.53 ^a	5.18	5.09	5.14	5.18	5.05	ns
	0.52	0.28	0.28	0.31	0.56	0.43	0.37	0.62	
Strength of flavor	5.28 ^b	5.36 ^{ab}	5.58 ^a	5.47 ^a	5.30 ^b	5.23 ^b	5.43 ^{ab}	5.46 ^a	ns
	0.30	0.36	0.16	0.25	0.35	0.40	0.31	0.17	
Favorable taste	5.42	5.49	5.55	5.56	5.42	5.34	5.55	5.54	**
	0.37	0.48	0.15	0.32	0.42	0.35	0.40	0.40	
Overall judgment	5.02 ^b	5.26 ^{ab}	5.45 ^a	5.25	5.17	5.12	5.28	5.20	*
	0.41	0.53	0.20	0.44	0.47	0.45	0.46	0.47	

Upper row is mean and lower row is standard deviation

a, b, c: Significant difference between different character of same row at 5% level. ns: not significant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$: Significant difference at 5 and 1% level

性値には影響しないことが明らかとなった。

Table 2 にはパネルテストに及ぼすBMSNo., 性, モノ不飽和脂肪酸組成割合の影響の結果を示した。BMSNo.の効果は, 「好ましいうま味」を除く全ての項目に影響しており, BMSNo.の高い方が全ての項目で優れることが示された。性の効果は, 「風味の強さ」で有意であり, 雌が去勢より優れる結果となった。さらに, モノ不飽和脂肪酸の効果は, 「線維感」で有意であり, モノ不飽和脂肪酸の低が高より優れる結果となった。また, 「総合的食感」でもモノ不飽和脂肪酸高が中や低よりも評価が低い結果となった。しかし, 「風味の強さ」ではモノ不飽和脂肪酸高が低よりも優れた。さらに, 「好ましいうま味」と「総合評価」について3つの要因の交互作用が有意となった。これは, **Fig. 1** に示したように, BMSNo. 4 の去

勢牛では「好ましいうま味」の評価はMUFA中で高いが, 雌では差が認められなく, BMSNo. 7 の去勢牛では, MUFA高は「好ましいうま味」について評価が高かった。しかし, BMSNo. 7 の雌では, MUFA高, 中, 低間の差はなく, 同様にBMSNo. 9 の去勢牛は, MUFA低, 中, 高間で有意差は見られなかったことが原因である。さらに「総合評価」についてもBMSNo. 4 の去勢牛では, MUFA中で高く, BMSNo. 4 の雌では, MUFA高は「総合評価」が有意に低かったことによる。

Table 3 にはBMSNo., 性とモノ不飽和脂肪酸割合をすべて込みにして求めた脂肪酸組成とパネルテストの評価項目との相関を示した。C14: 0 が「多汁性」, 「総合的食感」とそれぞれ有意 ($p < 0.05$) な正の相関を示し, 割合が高いと「多汁

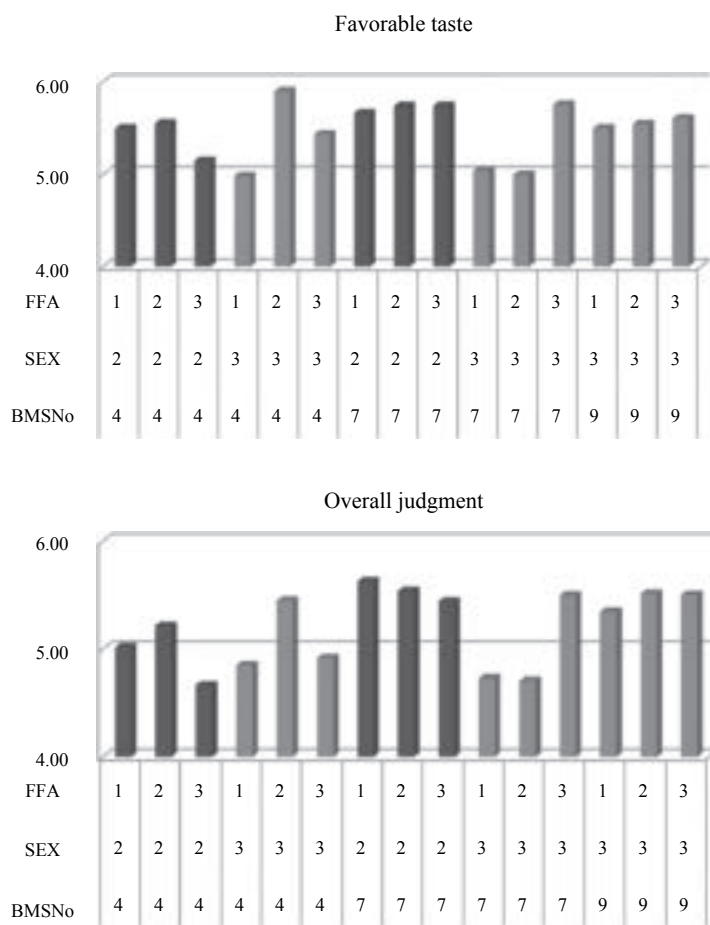


Fig. 1 Panel test results of favorable taste and overall judgment by BMSNo., sex (2 : Heifer, 3 : steer) and fatty acid classification. (1 : Low, 2 : Medium, 3 : High)

Table 3 Coefficient of correlation between fatty acids percentage and panel test.

	C14 : 0	C16 : 0	C16 : 1	C18 : 0	C18 : 1	C18 : 2	SFA	MUFA	Rupture stress	Rupture energy
Tenderness (Before)	0.254	0.370*	0.050	-0.129	-0.260	0.056	0.197	-0.209	-0.437**	-0.103
Tenderness (After)	0.273	0.370*	0.104	-0.151	-0.254	0.008	0.186	-0.189	-0.411**	-0.090
Fibrous feeling	0.170	0.268	0.001	-0.027	-0.220	0.037	0.180	-0.188	-0.259	0.037
Juiciness	0.332*	0.130	0.225	-0.196	-0.098	0.048	0.012	-0.021	-0.218	-0.071
Total texture	0.305*	0.393**	-0.003	-0.009	-0.325*	-0.069	0.289	-0.279	-0.383**	-0.147
Good cattle aroma	0.115	0.128	0.086	-0.100	-0.031	-0.196	0.039	-0.003	-0.356*	-0.248
Bad cattle aroma	-0.002	-0.008	0.058	-0.099	0.085	-0.131	-0.064	0.089	-0.271	-0.107
Strength of flavor	-0.169	-0.363*	0.258	-0.192	0.370*	-0.070	-0.373*	0.389**	0.036	0.058
Favorable taste	0.003	-0.096	0.151	-0.064	0.128	-0.274	-0.100	0.152	0.044	-0.011
Overall judgment	0.085	0.029	0.108	-0.019	-0.011	-0.211	0.019	0.020	-0.296*	-0.243
Rupture stress	-0.161	-0.381**	0.267	-0.193	0.397**	-0.147	-0.383**	0.413**	1.000	0.816***
Rupture energy	-0.191	-0.156	0.195	-0.190	0.270	-0.236	-0.239	0.285	0.816***	1.000

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

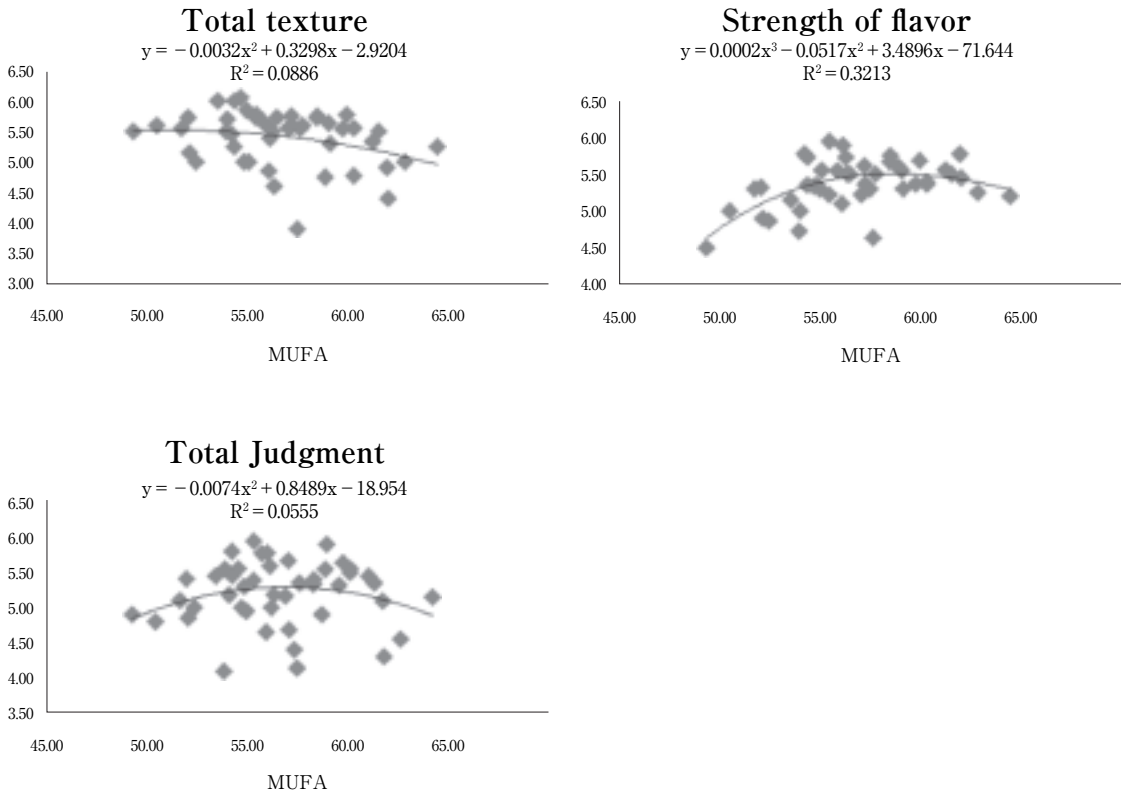


Fig. 2 Relation between MUFA and panel test (Total texture, Strength of flavor and total judgment)

性], 「総合的食感」の値が高まることが示唆された。さらに, C16: 0 については「やわらかさ」と好ましい正の相関 ($p < 0.05$) を示し, 破断応力との負の相関からも C16: 0 の割合の高い方が, 肉がやわらかくなることが示唆された。C18: 1 は「総合的食感」とは負の有意な相関 ($p < 0.05$) を示し, また, 破断応力とも正の相関 ($p < 0.01$) を示したことから, C18: 1 の割合が高いほど肉が硬いことが示唆された。ただし, C18: 1 は「風味の強さ」とは正の相関を示し, 牛肉の香りに関連することが示唆された。MUFAはC18: 1 とほぼ同様な相関が認められ, 「風味の強さ」には好ましい影響を及ぼすが, 破断応力との正の相関から, 割合が高いほど硬い肉であることが示唆された。逆にSFAは「風味の強さ」とは負の, 破断応力とは負の相関を示し肉

がやわらかいことが示唆された。最後に, 器械で測定した破断応力とパネルテストの肉の「やわらかさ」とは中程度の負の有意な相関を示し, 破断応力の高い肉ほど硬いことが確認された。

Fig. 2 には, MUFA割合とパネルテストの「総合的食感」, 「風味の強さ」および「総合評価」の関連をそれぞれプロットした。MUFAと「総合的食感」との関係は右下がりの負の関連を示しており, MUFAが高くなると「総合的食感」は低くなることが示唆された。さらに, 「風味の強さ」のグラフを見ると, MUFAが中程度だと「風味の強さ」が高いことが示された。さらに, 「総合判定」についてもMUFA高低よりも中程度の割合の方が評価の高い結果が得られた。なお, 「総合判定」と最も相関の高かったパネルテスト項目は, 「好ましい味」(0.750: $p < 0.001$) であり, モ

ノ不飽和脂肪酸と関連の高い「風味の強さ」と総合判定の相関は0.542 ($p < 0.001$) だった。

近年、美味しい牛肉に関する関心が高まってきており、特に脂肪の質を左右する脂肪酸組成や脂肪融点の重要性が指摘³⁾されている。特にモノ不飽和脂肪酸割合であるオレイン酸割合が高いと風味が良くなり、融点が低くなると言われており、これを前提に、全国和牛登録協会を中心に道府県では枝肉共進会で脂肪の質を評価するため光ファイバー分光測光法によるモノ不飽和脂肪酸割合を予測し、肉質を評価する試みが開始されている。一方、脂肪の融点や脂肪酸組成が香り、風味と関連すると言われているが、黒毛和牛について公表された学術的な報告はない。そこで我々は、食肉市場に出荷された牛肉の脂肪酸組成について遺伝的パラメータの推定⁴⁾と同時に、牛肉100頭からモノ不飽和脂肪酸と融点の異なる牛肉7頭分ずつの試食試験（一般学生、院生）の結果、融点（40.3℃と22.7℃）では差が認められないが、モノ不飽和脂肪酸（65.05%と50.54%）ではやわらかさと風味で差がある結果を得た²⁾。

モノ不飽和脂肪酸の割合だけではなく脂肪酸の絶対量も食味に影響することが考えられる。そのため、本研究では脂肪量を一定とするため、BMSNo.を4, 7, 9と去勢と雌のそれぞれについて、モノ不飽和脂肪酸割合の高中低の3区分に分けてパネルテストを実施した。国内外共に、脂肪の量、性を統一した上で、MUFAの違いだけでテストを行った報告はこれまでなく、本研究が初めての報告となる。その結果、BMSNo.のランクはパネルテストに明らかな影響を及ぼし、BMSNo.の高い牛肉ほどいずれの評価も高いことが明らかとなった。一方、性については、雌の方が去勢雄の肉より「風味の強さ」が強かった。これはC18:1やMUFAについて、雌が去勢より多いことと関連すると思われる。しかし、

MUFAの高低が食味性に及ぼす効果は「風味の強さ」を除いて差が認められず、MUFAの割合が牛肉の評価に及ぼす効果は必ずしも高いとは限らないことが明らかとなった。特に、「やわらかさ」や「線維感」の項目でMUFAの多い牛肉ほど評価が低い結果となったがこの原因は不明である。MUFAの多い牛は月齢が進んでいる可能性はある。その結果、肉が硬く、また「線維感」が認められる可能性がある。今回サンプルとして購入した牛肉の月齢その他の情報を入手することはできなかったが、再調査してこのことを確認する必要があると思われる。しかし、これまで約1,500頭の牛肉を分析した結果では、MUFAの割合と月齢との間には0.150程度の関連しかないことが分かっており（未発表）、他の要因が関連している可能性があり、今後の検討課題である。さらに、黒毛和種牛肉の風味、味について科学的分析も含めて評価を行うことが黒毛和種牛肉の質的向上を目指す上で重要と思われる。

4. 要 約

黒毛和種牛肉のBMSNo.（4, 7, 9）と脂肪酸組成（高, 中, 低）が既知の牛肉を用い、BMSNo., 性（去勢, 雌）および脂肪酸組成が食味性に及ぼす影響を検討した。10名の訓練パネルを使い、BMSNoと性、モノ不飽和脂肪酸（MUFA）ごとに、それぞれ3頭分の牛肉、合計45頭分のサーロインを用い（BMSNo.9の雌は除く）、10項目のパネルテスト項目について、8段階評価尺度で評価を行った。BMSNo.の4, 7, 9の間にはMUFAの差は認められず、雌が去勢よりMUFA, C18:1の割合が有意に高かった。MUFAの高中低の平均はそれぞれ、53.41%, 56.74%, 60.09%だった。パネルテストの結果、BMSNo.は、「好ましいうま味」を除く全ての項目に影響しており、BMSNo.の高い方が全ての項目で優れた。性の効果は、「風

味の強さ」で有意であり雌が去勢雄より優れた。さらに、モノ不飽和脂肪酸の効果は、「線維感」と「総合的食感」で有意だが、モノ不飽和脂肪酸高が中や低よりも評価が低い結果となった。しかし、「風味の強さ」ではモノ不飽和脂肪酸高が低よりも優れる結果となった。MUFAは「風味の強さ」に対しては良い影響を及ぼすが、破断応力と有意な正の相関を示し、割合が高いほど硬い肉であることが示唆された。逆にSFAは「風味の強さ」とは負の、破断応力とは負の相関を示し、肉がやわらかいことが示唆された。MUFAが中程度の場合、「風味の強さ」が良いことが示された。さらに、「総合判定」についてもMUFAが高低よりも中程度で評価の高い結果が得られた。

文 献

- 1) 家畜改良センター：全国域での種雄牛および繁殖雌牛の遺伝的能力の推移について、平成23年3月28日、<http://www.nlbc.go.jp/pdf/data/trend22s.pdf>
- 2) 大友良彦・小室純也・須田義人・鈴木啓一：黒毛和種肥育牛の胸最長筋脂肪酸組成と枝肉、肉質形質及び食味性との関連、肉用牛研究会報, 90:15~21, 2011.
- 3) 井上慶一・庄司則章・小林正人：黒毛和種肥育牛の脂肪融点、脂肪酸組成および格付形質間の遺伝的關係、日本畜産学会報, 79:1~8, 2008.
- 4) 横田祥子・杉田春奈・大友良彦・須田義人・鈴木啓一：黒毛和種牛肉における脂肪酸組成と枝肉形質および肉質形質との遺伝的關係、東北畜産学会報, 63:80~85, 2011.

放牧など粗飼料100%で生産された赤身牛肉における ドライエージングの効果

The effect of dry-aging in the complete grass-fed beef

折 目 愛・小笠原英毅・*岡山和代

(北里大学獣医学部附属フィールドサイエンスセンター八雲牧場, *北里大学保健衛生専門学院管理栄養科)

Ai Orime, Hideki Ogasawara, *Kazuyo Okayama

(Yakumo Experimental Farm Field Science Center Kitasato University, *Department of Applied Clinical Dietetics Kitasato Junior College of Health and Hygienic Sciences)

Wet-aging (WA) of beef is a widely used and growing method of aging that utilizes refrigeration and vacuum-sealed packaging. The older alternative to WA is Dry-Aging (DA), which is performed by hanging meat in a temperature and humidity controlled environment just above freezing. We produced complete grass-fed beef in the Yakumo Experimental Farm of Kitasato University. The aging method of grass-fed beef has not been established. The purpose of this study is to examine the effect of DA in the complete grass-fed beef.

We investigated the pH, moisture, free amino acid content, tissue anatomy using histology, and sensory evaluation of WA and DA grass-fed beef (dry-aged and wet-aged grass-fed beef) (*M. longissimus*). WA and DA showed similar pH, however, the moisture level in DA was significantly lower. In histochemical analysis, the DA grass-fed beef showed morphological change in connective tissue and the diameter of myofibers were smaller than WA grass-fed beef. The DA grass-fed beef was found to have significantly larger amounts of Tyr, His, Ala, Val, Gly, Pro and Ser. Relating to this, DA grass-fed beef showed significantly higher levels of sweetness and MSG-like flavor indicative of higher amounts of free amino acids. Moreover, Japanese consumers preferred DA grass-fed beef by evaluating tenderness, aroma and flavor. These results suggest that dry aging is a valid aging method of complete grass-fed beef.

1. 目 的

我が国における牛肉の熟成法の多くは真空包装によるウェットエージング (Wet-aging : WA) が主流である。近年、米国で注目を集めているドライエージング (Dry-aging : DA) は表面を露出した肉に送風し、低温の熟成庫で長期間かけて熟成させる。DA処理した牛肉は柔らかさおよび多汁性が増すことが報告されている¹⁾。日本人は高

級霜降り牛肉を嗜好してきたが、最近では健康志向から赤身牛肉への関心が高まっている。放牧や粗飼料主体で生産された赤身牛肉は、濃厚飼料多給で生産された牛肉と比較して、共役リノール酸 (Conjugated Linoleic Acid : CLA) などの機能性成分が多く含まれることが知られている²⁾。北里大学獣医学部附属フィールドサイエンスセンター八雲牧場 (八雲牧場) では、放牧など自給粗飼料100%給与による肉牛生産を実践しており、この

ような飼養方法で生産された牛肉（赤身牛肉）ではCLA含量が穀物多給の慣行肥育牛と比較して著しく高いことが明らかとされているが³⁾、現行の脂肪交雑重視の格付けによる牛肉評価では適正な評価がされにくい。一方、消費者における品質評価の指標は「味や食感」、「食品原料の安全性」であり、個々の評価基準では統一された見解が得られない。八雲牧場において学生および一般消費者に行った赤身牛肉（肥育牛）の官能試験では、「外観・食味」に関しては高い評価が得られたが、「柔らかさ」に関しては評価が分かれた⁴⁾。さらに、経産牛の牛肉は若齢肥育牛の牛肉と比較して「風味」に違いは認められないが、「柔らかさ」に有意な差があり⁵⁾、消費者が感じる赤身牛肉の「硬さ」の改善が課題となっている。

そこで、本研究ではWAおよびDA処理した赤身牛肉（経産牛）の理化学的および組織学的解析、遊離アミノ酸含量、官能試験を行い、放牧など粗飼料100%で生産した赤身牛肉に適した熟成方法を明らかにすることを目的とした。

2. 方 法

2.1 材 料

供試牛は放牧など粗飼料100%で生産された日本短角種の経産牛、4頭を用いた。供試牛の月齢および生体重をTable 1に示す。各個体の2本の最長筋（ロース肉）のうち、一方は株式会社さの萬の協力を得て、送風のできる熟成庫（室温：2℃，湿度：70%）で熟成させた（DA区）。他方は真空包装後、熟成庫（室温：2℃，湿度：80%）で熟成させた（WA区）。熟成期間は両区ともに、と畜から30日間とし、5cm厚ブロックに加工後、試験に使用するまで-30℃で保存した。

2.2 pHおよび水分含量

熟成終了後のロース芯部分を切り抜き、牛肉品質評価のための理化学分析マニュアルVer. 2

Table 1 Live body weight and slaughter age of complete grass-fed Japanese Shorthorn

Individual number	Months of Age	Live body weight (kg)
1	110.2	614
2	113.0	625
3	104.5	571
4	67.5	675

（社団法人畜産技術協会）⁶⁾に準じてサンプルを作製した。pHは突き刺し型pH計（東亜DKK HM-11P）、水分含量は電子式水分計（島津製作所 MOC-120H）を用いて測定した。

2.3 組織学的解析

WAおよびDA区のロース芯から1cm角のサンプルを切り出し、ドライアイス・アセトンにより急速凍結後、凍結切片を作製した。作製した凍結切片はアザン染色を行い、光学顕微鏡（OLYMPUS）で観察した。また、1切片3カ所を無作為に選択し、筋線維の直径を画像解析ソフト「Image J」で測定した。

2.4 遊離アミノ酸分析

遊離アミノ酸分析にはロース芯部分のみを用いた。代表的な遊離アミノ酸であるイソロイシン (Ile)、ロイシン (Leu)、リジン (Lys)、メチオニン (Met)、フェニールアラニン (Phe)、チロシン (Tyr)、スレオニン (Thr)、トリプトファン (Trp)、バリン (Val)、ヒスチジン (His)、アルギニン (Arg)、アラニン (Ala)、アスパラギン酸 (Asp)、グルタミン酸 (Glu)、グリシン (Gly)、プロリン (Pro)、セリン (Ser)の17種について日本食品機能分析研究所に委託し、高速液体クロマトグラフ法により測定された。

2.5 官能試験

(1) 対象者と調査時期

対象者となった学生および教員、一般消費者には事前に調査項目の説明を行い、調査参加の同意の得られた被験者のみを対象とした。パネリスト

は北里大学保健衛生専門学院の学生31名（男性2名、女性29名）、教員26名（男性14名、女性12名）、新潟県南魚沼市の主婦39名、計96名とした。調査は2010年7月16日、10月15日、11月19日に実施した。

(2) 調理方法

調理は北里大学保健衛生専門学院管理栄養科調理室にて実施した。WAおよびDA区のブロック肉は試験前日に2℃で24時間かけて自然解凍したものを使用した。解凍した牛肉は調理20分前に常温に置き、脂身を弱火（70℃）で10分間焼いた後、表面を強火（250℃）で2分間焼いた。60℃に設定したオーブンで供試牛肉の中心温度が52℃になるまで加熱した。その後、強火で表面を3分間焼き、常温で5分間静置した。静置後、1.5cm厚にスライスし、保温した皿で速やかに対象者に配布した。

(3) アンケート

食肉の官能評価ガイドライン⁷⁾に準じて官能試験を行った。外観では赤身肉の色の明るさ（1：暗い→5：明るい）、食感では柔らかさ（1：硬い→5：柔らかい）および多汁性（1：パサパサ→5：ジューシー）、食味では食べる前の香り（1：弱い→5：強い）、口腔を通して感知される香りと味を総称して風味（1：弱い→5：強い）および旨み（1：薄い→5：濃い）、総合評価（1：苦手→5：好ましい）を含めた7項目を調査した。評価環境は蛍光灯下でクローズドパネル法、試料コードはA、Bとし、1から5の評価点で評価させた⁸⁾。

2.6 統計処理

pHおよび水分含量、遊離アミノ酸含量、組織学的解析で測定された値はStudent's t-testにより有意差検定を行った。官能試験の統計解析は、SASソフトウェア（version8.0.2, SAS社）を用いて、Mann-Whitney U-testにより有意差検定を

行った。危険率が1または5%未満で有意な差があると判断した。

3. 結果と考察

3.1 理化学的分析

WAおよびDA処理された最長筋の理化学的特性をTable 2に示した。WAおよびDA区のpHは両区で有意な差が認められなかった。これはAhnstromらおよびOreskovichらの報告と一致しており^{9, 10)}、DAが適正に処理されたことを示している。一方、水分含量ではDA区はWA区より、有意に低かった（ $p < 0.01$ ）。AhnstromらのDA処理は除骨処理を行っておらず、WAおよびDA処理した牛肉の水分含量に有意な差は認められていない⁹⁾。本試験では熟成前に除骨をしたことから、肉表面の乾燥がロース芯部分に影響した可能性が考えられた。また、除骨前にDA処理された牛肉は除骨後にDA処理された牛肉より可食部の歩留まりが高くなることが報告されている¹⁾。したがって、本試験よりDA処理過程での除骨の有無が牛肉の歩留まりに影響することが再確認された。

Table 2 The pH and moisture of complete grass-fed beef

	Aging treatment	
	WA (n = 4)	DA (n = 4)
pH	5.67 ± 1.8	5.68 ± 1.7
Moisture (%)	70.4 ± 0.1	66.1 ± 0.2*

Data are expressed as mean ± SD (* $p < 0.01$ versus WA)

3.2 組織学的解析

食肉の構造変化にはアザン染色が用いられ、筋線維は赤く強染され、結合組織を構成する膠原線維と弾性線維は青く染色される¹¹⁾。アザン染色では熟成により筋線維が軟化すると青色で染色されるようになるが、本試験では筋線維におけるWA (Fig.1 A a) およびDA区 (Fig.1 A b) で染色性の違いは観察されなかった。これはロース芯から

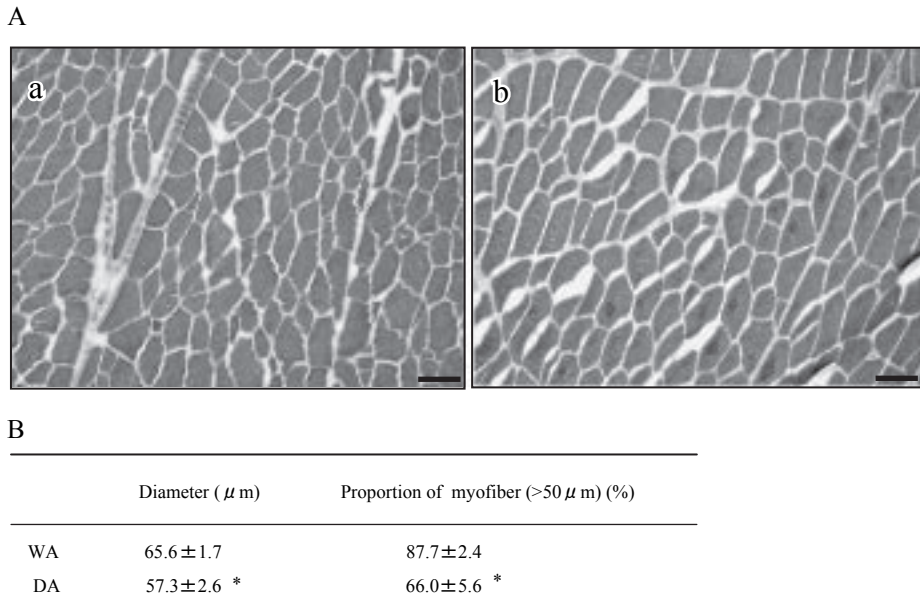


Fig. 1 Histochemical analysis of WA and DA grass-fed beef.

A : Azan-stained sections of WA (a) and DA (b) grass-fed beef. Scale bars = $100\mu\text{m}$.

B : Histomorphometric analysis of WA and DA myofibers. The diameter of myofibers and proportion of myofiber ($>50\mu\text{m}$) were smaller in DA grass-fed beef than those of WA grass-fed beef. Data are expressed as mean \pm SD (* $p < 0.05$ versus WA).

のサンプルの採取が中心部であったことから、DA区でアザン染色での検出可能な範囲に筋線維の熟成が進んでいない可能性が考えられた。一方、筋束間の結合組織においてはDA区で大型の結合組織が観察されなかった。また、筋線維の径および径が $50\mu\text{m}$ 以上の筋線維の割合においてもDA区で有意に低かった (Fig.1 B)。食肉の硬さは結合組織の存在の有無によって影響を受ける¹¹⁾。したがって、DA処理した牛肉では結合組織の脆弱化および筋線維間の空隙が認められ、牛肉の柔らかさを増加させる可能性が示唆された。

3.3 遊離アミノ酸含量

DA処理した牛肉の遊離アミノ酸含量をTable 3に示した。DA区においてThr, HisおよびAlaはWA区と比較して顕著に増加し ($p < 0.01$), Val, Gly, ProおよびSerにおいても有意に増加した ($p < 0.05$)。さらに、甘味 (Lys + Thr +

Ser + Gly + Ala + Pro) および旨味 (Ser + Glu + Ala + Met + Asp) においても、DA区で有意に増加した ($p < 0.05$)。牛肉の熟成における遊離アミノ酸の組成については同期間で異なる熟成法を比較検討した報告は少ない。本研究における遊離アミノ酸含量の増加は、DA区での水分含量の減少および筋線維の萎縮が影響したと考えられた。また、DA区では結合組織の脆弱化が観察されたことから、結合組織の分解により遊離アミノ酸含量が増加した可能性が示唆された。遊離アミノ酸の生成にはアミノペプチターゼ類が関与し、牛肉のアミノペプチターゼHは失活しやすく、牛肉の熟成過程では総アミノ酸およびグルタミン酸の生成が少ないと推定されている¹²⁾。本研究において、旨みへの寄与の大きいグルタミン酸量は各供試牛による変動が大きく、WAおよびDA区で有意差は認められなかった。しかしながら、DA区にお

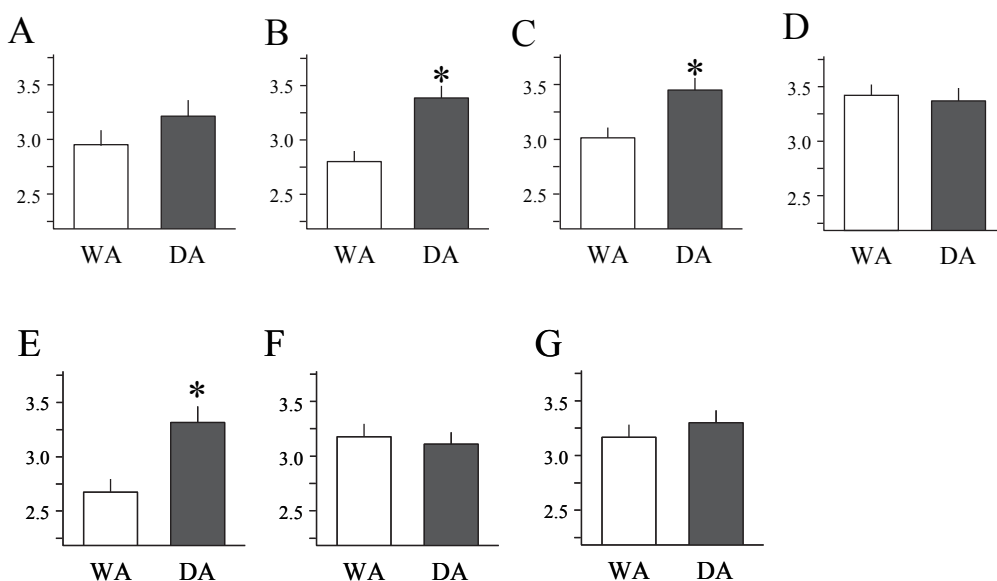


Fig. 2 Sensory evaluation for WA and DA grass-fed beef. Sensory evaluation was performed (n=96). There is not significant difference in lean meat color (A), umami (D), juiciness (F) and overall acceptability (G). However, DA grass-fed beef was preferred by evaluating aroma (B), flavor (C) and tenderness (E). Data are expressed as mean \pm SD (* p < 0.05 versus WA).

Table 3 Effect of DA in free amino acid contents of complete grass-fed beef (mg/100g)

	WA (n = 4)	DA (n = 4)
Ile	13.6 \pm 3.7	25.8 \pm 10.3
Leu	24.7 \pm 6.4	44.8 \pm 17.2
Lsy	17.0 \pm 3.1	19.0 \pm 23.2
Met	11.0 \pm 2.5	17.7 \pm 5.6
Phe	15.7 \pm 4.1	27.9 \pm 10.6
Tyr	6.0 \pm 5.9	5.2 \pm 4.0
Thr	12.8 \pm 1.7	26.4 \pm 6.1**
Trp	4.2 \pm 1.3	7.0 \pm 2.1
Val	16.8 \pm 3.1	32.6 \pm 10.1*
His	8.2 \pm 0.7	14.5 \pm 3.2**
Arg	14.4 \pm 3.9	18.8 \pm 14.5
Ala	45.3 \pm 0.9	72.8 \pm 9.0**
Asp	6.6 \pm 2.1	14.0 \pm 7.3
Glu	14.7 \pm 6.9	56.3 \pm 40.2
Gly	15.6 \pm 3.9	25.4 \pm 5.1*
Pro	4.6 \pm 0.2	13.7 \pm 1.4*
Ser	18.4 \pm 3.1	32.6 \pm 8.8*
Total	249.6 \pm 36.8	454.3 \pm 140.1*
Sweet ¹⁾	111.4 \pm 8.2	183.0 \pm 43.7*
MSG-like ²⁾	96.0 \pm 12.6	193.3 \pm 56.5*

Data are expressed as mean \pm SD (* P < 0.05 and ** P < 0.01 versus DA).

¹⁾ Lsy + Thr + Ser + Gly + Ala + Pro and ²⁾ Ser + Glu + Ala + Met + Asp

いて総遊離アミノ酸含量は有意に増加したことから、DA処理は牛肉の食味を向上させる熟成法であることが明らかとなった。

3.4 官能試験

WAおよびDA区の牛肉の外観 (Fig. 2 A), 旨み (Fig. 2 D), 多汁性 (Fig. 2 F), 総合評価 (Fig. 2 G) に有意な差はなく, 香り (Fig. 2 B), 風味 (Fig. 2 C), 柔らかさ (Fig. 2 E) においてDA区で有意に高い評価であった (p < 0.05)。遊離アミノ酸分析の結果から, 旨みについてはDA区で高い評価を期待したが, 本研究では有意な差が認められなかった。これは牛肉の香りが味と同時に知覚されたため, 旨みの濃度の差をパネリストが判断できなかった可能性¹³⁾, また, パネリストの30%が女子大生であり, 旨みの感受性が低い傾向があることが影響したと考えられた¹⁴⁾。和牛肉の芳香では生牛肉熟成香, 煮牛肉熟成香, 焼牛肉熟成香および熟成牛肉発酵臭が報告されており¹²⁾, DA処理した牛肉は焼肉熟成香など嗜好性の高い香りが強

く、WA処理した牛肉は酸臭や血液臭などの生鮮香気が強いとの報告がある¹⁵⁾。したがって、パネリストが感じた香りが焼牛肉熟成香である可能性が考えられた。一方、WAおよびDA処理の牛肉で風味に有意な差が認められないとの報告もあり^{16, 17)}、パネリストの旨みと風味の感受性に関しては統一した見解が得られていない。

本試験ではDA区の柔らかさにおいて有意に評価が高く、組織学的解析の結果と一致した。また、総合評価ではDA区を好ましいと感じたパネリストが多い傾向にあり、食肉の嗜好には柔らかさも重要な要素となることから¹¹⁾、我が国でもドライエージング技術が普及可能であることが示唆された。

本研究より、DA処理は放牧など粗飼料100%で生産した赤身牛肉の遊離アミノ酸含量を増加させ、「風味」および「柔らかさ」を向上させることが明らかとなり、ドライエージングが消費者の嗜好に適した熟成法である可能性が示唆された。

5. 要 約

近年、健康志向および環境負荷の問題から赤身牛肉への関心が高まっている。本研究では、放牧など粗飼料100%で生産された牛肉の熟成法の開発として、DA処理された牛肉の特性を明らかにすることを目的とした。

WAおよびDA処理後の牛肉は理化学的および組織学的に解析し、消費者(96名)による官能試験を行った。理化学的および組織学的解析では、DA区はWA区と比較して、pHに変化はないが、水分含量では有意に少なく($p < 0.01$)、筋束間の結合組織の脆弱化および筋線維の空隙が観察された。また、DA区のアミノ酸含量は甘みと旨みに関与するThr, His, Ala ($p < 0.01$), Val, Gly, Pro, Ser ($p < 0.05$)で有意に増加した。官能試験より、DA区では香り、風味、食感の項

目において高い評価が得られた。以上の結果は、放牧など粗飼料100%で生産した経産牛の牛肉ではドライエージングが消費者の嗜好に適した熟成法である可能性を示唆している。

文 献

- 1) Jeff W. Savell : Dry-aging of beef Executive Summary, center for research and knowledge management national cattleman's beef association, U.S.A., 1~9, 2008.
- 2) 萬田富治, 畔柳正, 中井淳二, 東善行 : 日本における放牧畜産の技術的展望. 栄養生理学会報, 49 (2), 27~29, 2005.
- 3) 佐藤洋子, 坂本千恵, 野島正博, 田中弘康, 畔柳正, 中井淳二, 東善行, 萬田富治 : 100%自給飼料で飼育した北里八雲牛と慣行肥育牛の牛肉中CLA等について, 東北畜産学会報, 54 (2), 32, 2004.
- 4) 折目愛, 久保田博昭, 米澤智洋, 小笠原英毅, 畔柳正, 萬田富治 : 放牧など自給粗飼料100%で生産した牛肉に対する消費者の階層別官能特性と嗜好性, 日本畜産学会第110回大会講演要旨, 139, 2009.
- 5) 谷本保幸, 千田雅之, 小山信明 : 遊休農林地に放牧した黒毛和種経産老廃牛の肉質及び飼養方法の評価, 近畿中国四国農業研究センター研究報告, 3, 1~14, 2004.
- 6) 社団法人畜産技術協会 : 牛肉評価のための理化学分析マニュアルVer.2, 5~8, 2003.
- 7) 財団法人日本食肉センター : 食肉の官能評価ガイドライン, 独立行政法人家畜改良センター編, 東京, 2005.
- 8) 古川秀子 : おいしさを測る, 初版, (112~113), 幸書房, 東京, 2007.
- 9) Ahnstrom, M. L., Seyfert, M., Hunt, M.C., & Johnson, D.E. : Dry aging of beef in a bag highly permeable to water vapour. *Meat Science*, 73, 674~679, 2006.
- 10) Oreskovich, D.C., McKeith, F. K., Carr, T. R., Novakofski, J., & Bechtel, P. J. : Effects of different aging procedures on the palatability of beef. *Journal of Food Quality*, 11, 151~158, 1988.
- 11) 渡邊康一, 山口高弘 : 食肉とその肉製品の食品組織学, 前編「食肉の科学」, 45 (2), 151~158, 2004.
- 12) 沖谷明紘 : 肉の科学, 初版, (80~84), 朝倉書店, 東京, 2007.
- 13) 松石昌典 : 牛肉のおいしさに貢献する香り, 栄養生理研究会報, 53 (2), 39~42, 2009.
- 14) 川上育代, 我如古菜月, 池上由美, 湯之上祐子, 松添直隆, 北野直子 : 女子大生における味覚感度の現状とだしの嗜好性, 栄養学雑誌, 69 (1), 10~19, 2011.

-
- 15) Warren, K. E., & Kastner, C. L : A comparison of dry-aged and vacuum-aged beef striploins. *Journal of Muscle Foods*, **3**, 151~157, 1992.
- 16) Parrish, F. C., Jr., Boles, J. A., Rust, R. E., & Olson, D.G. : Dry and wet aging effect on palatability attributes of beef loin and rib steaks from three quality grades. *Journal of Food Science*, **56**, 601~603, 1991.
- 17) Sitz, B. M., Calkins, C.R., Feuz, D. M., Umberger, W.J., & Eskridge, K. M. : Consumer sensory acceptance and value of wet-aged and dry-aged beef steaks. *Journal of Animal Science*, **84**, 1221~1226, 2006.

平成22年度助成研究調査一覧

本年度の対象とする研究または調査：

食肉およ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）および加工技術の向上などに関する研究または調査

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9	抗肥満／食欲増進作用を有する新規食肉由来機能性成分に関する研究		長谷川 信	神戸大学大学院農学研究科	800
研11	食肉による精神機能改善に関する研究	H.21～	古瀬 充宏	九州大学大学院農学研究科	1,000
研18	食肉由来ACE阻害ペプチドの筋肥大作用とその機構		池内 義秀	九州大学大学院農学研究科	1,000
研24	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	茨城県畜産センター 茨城大学農学部	800
研29	肝臓抽出物および食品成分の併用が脂質吸収に及ぼす影響	H.21～	矢澤 一良	東京海洋大学大学院	800
研4	食肉由来機能性成分の畜種別差異の比較検討についてII	H.21～	六車三治男	宮崎大学農学部	1,200
研19	細菌性新規プロテアーゼの食肉加工への応用		小林 秀丈	広島国際大学薬学部	800
研25	低温乳酸発酵による食肉の組織構造とタンパク質化学的変化に関する研究	H.19～	芳賀 聖一	名城大学農学部	800
研34	伝統的魚肉加工手法の食肉加工への応用(2)	H.21～	宇多川 隆	福井県立大学生物資源学部	1,000
研14	試食パネルによる黒毛和種牛肉の肉質等級、脂肪酸組成と食味性との関連に関する研究		鈴木 啓一	東北大学大学院農学研究科	1,200
研15	放牧など粗飼料100%で生産された赤身牛肉におけるドライエージングの効果		折目 愛	北里大学獣医学部附属フィールドサイエンスセンター八雲牧場	1,000
合		計	11件		

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22年度 (Vol. 29)

2011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——恒心社出版株式会社

<非売品・無断禁転載>