平成元年度

# 食肉に関する助成研究調査成果報告書

VOL.8

財団法人
伊藤記念財団

平成元年度

# 食肉に関する助成研究調査成果報告書

VOL.8

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であります。

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栄誉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であります。

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

© The Ito Foundation

## Philosophy Behind the Establishment of the Ito Foundation

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

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

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

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

Denzo Ito, Founder
June 1981

© The Ito Foundation

# 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。

⑴　食肉の生産，処理，加工等に関する基礎的研究及び調査。

⑵　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。

⑶　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 | 18,101千円 |
| 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 | 5,000 |
| 7 | 63 | 95 | 70,500 | 2 | 2,915 |
| 8 | 平成元年度 | 83 | 74,250 | 3 | 1,900 |

# 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，去る昭和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９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間に浸透いたしまして，助成希望者数も，初年度の74件から，９年目の平成２年度には，181件の多きに達する等，事業内容も逐次充実してまいりつつあります。

© The Ito Foundation

これは，ひとえに農林水産省並びに関係各位のご指導ご鞭韃の賜と深く感謝申し上げております。そして，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８回（平成元年度）助成事業における83件にのぼる研究調査助成対象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る諸氏の研究の一助ともなれば幸甚でございます。

本報告書の刊行に当たり，編集のため多大の労をわずらわせました専門委員会委員長の九州大学農学部深沢教授をはじめ，専門委員会委員の各位に対し，深甚なる謝意を表します。

平成２年12月

理事長　伊　藤　研　一

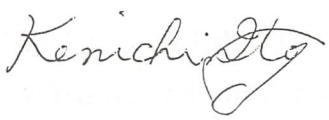
Dear Sir:

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. 8 enclosed here. We appreciate any interest you may have in our research efforts.

Sincerely yours,

Kenichi Ito
The chief director
The Ito Foundation



© The Ito Foundation

# 目　　次

豚卵胞卵の体外成熟と体外受精に関する研究
……豊田　裕・内藤　邦彦（東京大学医科学研究所）…… 1

体外成熟・体外受精由来ウシ8細胞期胚単一割球と
除核未受精卵との融合胚の発生能に関する研究
…… 三谷　匡・内海　恭三・入谷　明（京都大学農学部）…… 7

子牛から得た卵胞卵子の体外受精について
……梶原　豊・米谷　尚子・*下中　裕次・斉藤　聡
小柴　雄二・菱山　和洋（丸紅飼料株式会社，*伊藤ハム株式会社）……13

牛，豚およびイノブタ卵巣の効率的利用，とくに卵胞卵の保存法の開発に関する研究
…… 宮本　元・佐藤　英明（京都大学農学部）……19

ブタ生殖腺刺激ホルモン遺伝子の構造
…… 加藤　幸雄（群馬大学内分泌研究所）……25

ブタ卵胞液中の卵成熟促進物質の単離と諸性質
…… 河岸　洋和・吉田　光敏（静岡大学農学部）……31

牛初期胚（16～32細胞期）の体外発生能に及ぼす
栄養塩類とサイクリックAMPの効果について
…… 堀内　俊孝（広島農業短期大学，現在：広島県立大学）……37

内部細胞塊の細胞数ならびに形態を指標とした牛胚盤胞期胚の品質評価
……岩崎　説雄・*吉羽　宣明（東京農業大学，*埼玉県畜産試験場）……42

受精卵移植による新めん羊資源の開発に関する研究
―メラトニンによるめん羊季節外繁殖の誘起―
……澤崎　徹・大久保　忠旦
・*森　裕司（東京大学農学部，*東京農工大学）……47

雌牛の性現象に及ぼす雄牛の行動的影響
……佐藤　衆介・*太田　実
・本田　祐介（宮崎大学農学部，*東北大学農学部附属農場）……52

褐毛和種集団の繁殖構造に関する研究
…… 木場　俊太郎（熊本県農業研究センター）……57

ブラーマン種およびサンタガートルデイス種の遺伝的性能の日本における有用性の検証
……水間　豊・*太田　実・山岸　敏広・篠原　久
・八巻　邦次（東北大学農学部，*同附属牧場）……62

牛の生産性に及ぼす騒音の影響に関する研究―特に，繁殖機能について―
……阿部　和司・吉田　吉明・丹羽　太左衛門・*菅原　伯
**正木　淳二・**梅津　元昭・**石井　伸一
（岩手県立農業短期大学校，*岩手大学農学部，**東北大学農学部）……69

© The Ito Foundation

家畜の腸管免疫強化法
……清水　悠紀臣・喜田　宏・伊藤　寿啓（北海道大学獣医学部）……74
離乳期前後における飼料条件の肉用家畜の消化管成長に及ぼす影響 (II)
……尼崎　肇・後沢　秀司・阿久澤　良造・鈴木　勝士
・醍醐　正之（日本獣医畜産大学）……79
人工哺乳初生豚に対する豚血清γ-globulin 経口投与の効果
……楢崎　昇（酪農学園大学）……86
豚における背脂肪厚への選抜が枝肉の脂肪組織蓄積部位に与える影響
……西田　茂・鈴木　啓一・佐藤　秀俊
・渡辺　好造（宮城県畜産試験場）……92
ニホンジカにおける飼料の通過速度と消化率の季節変動に関する研究
……佐々木　康之・庄司　芳男・加藤　和雄（東北大学農学部）……97
肉豚用飼料原料としての焼酎粕の有効利用：発育成績，枝肉形質および肉質について
……大橋　登美男・*川井田　博
・山内　清（宮崎大学農学部，*鹿児島県畜産試験場）…… 102
ミモシン含量を減少させたギンネムの豚に対する
給与試験と体成績および肉質に関する研究
……本郷　富士弥・川島　由次・川本　康博
・砂川　勝徳（琉球大学農学部）…… 106
副産物の飼料化による低コスト牛肉生産に関する研究
—とくにわらのアルカリ処理について—
……飛岡　久弥・*萬田　富治
（九州東海大学，*農林水産省北海道農業試験場）…… 114
大麦稈の乾物消化率とそのアンモニア効果の
品種間差異に関する植物形態学・組織化学的研究
……後藤　正和（三重大学生物資源学部）…… 119
植物の冷害と塩害に関する NMR 分光法による研究
……坂田　亮（慶應義塾大学理工学部）…… 126
放牧利用による肉用牛（黒毛和種）の低コスト生産技術の開発
2.　肥育用素牛の育成過程の違い
（放牧および舎飼）が肥育成績に及ぼす影響
……梅津　頼三郎・*増田　泰久・中西　良孝・*五斗　一郎
衛藤　哲次（九州大学農学部附属農場高原農業実験実習場，
*九州大学農学部）…… 131
乳用雄肥育素牛の哺育・育成期における生産費と離乳飼料の調製に関する研究
……大原　久友（国際酪農研究センター）…… 137
牛枝肉の規格格付に関する研究
……並河　澄・*原田　宏・*福原　利一・**三谷　克之輔
・***岡山　高秀（全国和牛登録協会，*宮崎大学農学部，
**広島大学生物生産学部，***神戸大学農学部）…… 146
豚枝肉の評価方法に関する研究—赤肉歩留推定回帰式の検証—
……古澤　栄作・内田　実・天田　豊（㈱全国食肉学校）…… 159

© The Ito Foundation

鶏肉の評価に関する研究
……松岡　尚二・新小田　修一・古市　信夫・井上　政典
・久木元　忠延・*川井田　博
(鹿児島県養鶏試験場，*鹿児島県畜産試験場)…… 165

食鳥処理場で認められる疾患の調査・研究—食鳥検査制度実施のために—
……板倉　智敏・御領　政信・落合　謙爾(北海道大学獣医学部)…… 172

食鳥における各種人畜共通伝染病原体の浸潤調査並びにそれらの迅速診断法の確立
……源　宣之・金城　俊夫・平井　克哉・杉山　誠
・鈴木　有二(岐阜大学農学部)…… 175

生検筋肉材料を用いて牛骨格筋の筋線維の特質を検索する方法についての検討
……岩元　久雄・尾野　喜孝(九州大学農学部)…… 179

肉用牛の成長に伴う筋原線維および筋肉中結合組織の変化
……大杉　次男・小竹森　訓央・近藤　誠司・服部　昭仁
・中村　富美男(北海道大学農学部)…… 184

家畜・家禽の死後硬直に関する生理学的研究—各種ガス処理の影響—
……田中　耕作(九州大学農学部)…… 189

筋原線維タンパク質，ネブリンの死後変化に関する研究（第3報）
……辰巳　隆一・服部　昭仁・髙橋　興威(北海道大学農学部)…… 193

食肉熟成へのプロリン特異性ペプチダーゼ類の役割
……芳本　忠(長崎大学薬学部)…… 200

食肉熟成の調節へのオリザシスタチンの応用
……荒井　綜一(東京大学農学部)…… 207

電気刺激による食肉のプロテアーゼ活性について
……三上　正幸・三浦　弘之(帯広畜産大学)…… 212

食肉の熟成に関する膜酵素の活性と核磁気共鳴(NMR)分光法による研究
……萬場　光一・石田　哲也・川田　睦・野崎　昭利
利部　聰・牧田　登之(山口大学農学部)…… 217

食肉貯蔵中におけるアミノ酸の消長
……山中　英明(東京水産大学)…… 227

高圧処理が筋肉タンパク質に及ぼす影響
……鈴木　敦士・池内　義秀(新潟大学農学部)…… 233

高圧処理による筋肉タンパク質の変性と熱ゲル化特性
……田口　武・田中　宗彦(東京水産大学)…… 240

加圧による筋肉タンパク質，特にミオシンの機能特性の改善
……山本　克博(酪農学園大学)…… 247

貯蔵温度の違いが真空包装豚肉の呈味成分に及ぼす影響
……石田　光晴(宮城県農業短期大学)…… 253

国産牛肉余剰部位の付加価値向上に関する研究
……田中　喜代重・本城　英美(岩手県畜産試験場)…… 257

ブタ筋肉組織中の多価不飽和脂肪酸組成の研究
……古泉　巖・鈴木　嘉彦(麻布大学獣医学部)…… 263

© The Ito Foundation

骨格筋組織の高度不飽和脂肪酸／α－
トコフェロールモル比と肉質との関連に関する研究
…… 山内　清・村田　寿（宮崎大学農学部）…… 269
ホットプレート加熱による油脂の劣化とその防止について
…… 広井　勝・金田　尚志（郡山女子大学家政学部）…… 274
食肉の結合組織における架橋アミノ酸に関する研究
…… 須山　享三・中村　文彦（東北大学農学部）…… 280
エラスチン―コラーゲン複合体膜の創製
…… 和田　敬三・高橋　幸資（東京農工大学農学部）…… 287
生体内で生成される亜硝酸塩およびニトロソアミン
―食肉加工品中の存在量との比較―
…… 渡辺　道子・*三輪　操（東京大学農学部，*農林水産省畜産試験場）…… 292
免疫化学的手法による牛肉中のタンパク同化
ステロイドおよびその関連化合物の一斉分析
……安生　孝子・伊東　富晴・松木　容彦
（(財)食品薬品安全センター，泰野研究所）…… 297
畜産食品中の残留抗菌性物質の系統的分析法の確立に関する研究
……堀江　正一・斉藤　貢一・星野　庸二
能勢　憲英・方波見　重兵衛（埼玉県衛生研究所）…… 303
タンパク質に結合した蛍光物質の定量による畜肉およびその加工品の酸化的劣化の評価
…… 藤本　健四郎（東北大学農学部）…… 310
微生物の抗酸化性物質の生産能に関する研究
…… 石川　行弘（鳥取大学教育学部）…… 315
鶏卵法による毒性評価法の検討，特に鶏胚およびラット
胎仔に対するエタノールと Cycrophosphamide の影響
…… 中村　経紀・二宮　博義・猪股　智夫（麻布大学獣医学部）…… 321
食肉および食肉製品のリステリア菌汚染とその制御に関する研究
……山内　邦男・木村　貞司・*小久保　彌太郎
（日本大学農獣医学部，*東京都立衛生研究所）…… 327
肉および肉製品におけるボツリヌス中毒危険性の評価と制御
―各種食品中のボツリヌス毒素の安定性に影響する因子について―
…… 中野　宏幸・福田　哲夫・橋本　秀夫（広島大学生物生産学部）…… 334
食肉タンパク質より精製タンパク質およびペプチド標品の調整およびその栄養学的評価
…… 野口　忠・金　鍾姫（東京大学農学部）…… 340
個体発生途上の家畜脳から分泌される抗癌因子，神経系作用因子と細胞増殖促進物質
……三羽　信比古・土井　澄江・*松野　哲也
（広島県立大学生物資源学部，*国立予防衛生研究所）…… 345
神経ペプチドの代謝に関与する脳内プロテアーゼの研究
……横沢　英良・石井　信一（北海道大学薬学部）…… 356
マウス神経冠細胞の増殖・分化に及ぼすブタ・フィブロネクチンの作用
……竹内　拓司・川瀬　栄八郎・佐藤　滋・*濱中　和也
*吉原　忠志（東北大学理学部，*伊藤ハム株式会社中央研究所）…… 361

© The Ito Foundation

家畜由来の細胞接着性タンパク質の生理化学的研究
—血清ビトロネクチンのコラーゲン結合性—
……林　正男・石川　総子（お茶の水女子大学理学部）…… 366

ヒト血小板由来成長因子（Platelet-Derived Growth Factor：PDGF）に対する固相サンドイッチ酵素免疫測定法（EIA）の検討
……林　恭三・*黒部　真章（岐阜薬科大学，*岐阜医療技術短期大学）…… 372

ラットの実験的高脂血症および糖尿病に対するブタプラズマペプチドの作用
……末綱　邦男・石井　睦実・*岡　周作・*吉原　忠志・*中村　豊郎・**梶原　茂雄（農林水産省水産大学校，*伊藤ハム株式会社中央研究所，**㈱実験生物医学研究所）…… 379

血中物質と免疫応答細胞を利用した癌化学療法開発の試み
……松野　哲也・*藤本　大三郎・**吉原　忠志・**渡辺　重明・**中村　豊郎（(財)腫瘤研究所，*東京農工大学農学部，**伊藤ハム株式会社中央研究所）…… 385

食肉に含まれるポルフィリン誘導体の血液細胞分化・増殖に及ぼす影響
……前出　吉光・稲葉　睦・佐川　真由美・池田　富夫（北海道大学獣医学部）…… 389

グロビンの化学修飾と修飾タンパク質の機能特性
…… 宮口　右二・堤　将和（茨城大学農学部）…… 393

食品素材としての家畜血液の三次機能に関する研究
—ウシ血清アルブミン由来のオピオイドペプチドの単離—
…… 吉川　正明・塩田　明・谷　史人（京都大学農学部）…… 401

家畜血液の有効利用に関する基礎的研究
— PEG-ヘミンを触媒とし，化学発光法による過酸化物の定量—
……二見（松島）瑞子・木村　香代子・小寺　洋・稲田　祐二（桐蔭学園横浜大学）…… 407

高タンパク質食事が人のカルシウム，リンおよびマグネシウム代謝に及ぼす影響
—動物と人の比較—
……江指　隆年・*中嶋　洋子・西牟田　守・**阿左美　章治（国立健康・栄養研究所，*聖徳大学，**聖徳栄養短期大学）…… 411

肉用牛大規模一貫経営の成立条件に関する技術的・経営的研究
…… 宮崎　昭・新山　陽子・石田　直彦（京都大学農学部）…… 415

食肉需要の安定性に関するノンパラメトリック分析
…… 澤田　学（帯広畜産大学）…… 419

食肉卸売市場における牛肉流通の課題
…… 宮田　育郎（鹿児島大学農学部）…… 425

北海道における乳用種肉牛の流通と経済性に関する研究
……岩崎　徹・*萬田　富治・**荒木　和秋・***長沢　真史・****須藤　純一（札幌大学，*北海道農業試験場，**酪農学園大学，***東京農業大学，****北海道畜産会）…… 430

豚枝肉出荷成績の要因分析
…… 石岡　宏司・新井　肇（東京農業大学）…… 440

© The Ito Foundation

国際化時代の牛肉の生産・流通・消費に関する計量経済的研究
…… 甲斐　諭（九州大学農学部）…… 446
牛肉輸入自由化が東北地帯の牛肉生産に及ぼす影響
…… 堀田　和彦・*植野　歩未（東北大学農学部，*岩手県庁）…… 452
新技術の主要牛肉生産国の経営に及ぼす影響に関する研究
…… 渋谷　佑彦（麻布大学獣医学部）…… 460
タイ国のブロイラー産業の実態並びにわが国のブロイラー産業への影響に関する調査
……國松　豊・*矢野　秀雄・**中嶋　隆
（京都府立大学，*京都大学農学部，**滋賀県立短期大学）…… 468
食肉の生産，処理，加工技術に関するパテント調査 (III)
と殺，加工，食肉製品の出願公開状況
…… 中島　健次（中島技術士事務所）…… 475
日本古代の食肉文化の再検討
……佐原　真・沢田　正昭・松井　章
（奈良国立文化財研究所，埋蔵文化財センター）…… 483
第 7 回国際反芻動物生理学シンポジウム
……津田　恒之・*佐々木　康之・**川島　良治
・***柴田　章夫・*堀口　雅昭・*星野　忠彦
・*正木　淳二・*庄司　芳男（東京農業大学，
*東北大学農学部，**京都大学農学部，***日本大学農獣医学部）…… 488
第 35 回国際食肉科学技術会議の概略
……日本食肉研究会…… 493

© The Ito Foundation

# CONTENTS

**Studies on the in vitro Maturation and Fertilization of Porcine Follicular Oocytes**
Yutaka Toyoda and Kunihiko Naito
(Institute of Medical Science, The University of Tokyo) ..... 1

**Developmental Ability of Enucleated Bovine Oocytes Matured *in Vitro* Following Fused with Single Blastomere of 8-Cell Embryos Matured and Fertilized *in Vitro***
Tasuku Mitani, Kyozo Utsumi and Akira Iritani
(Faculty of Agriculture, Kyoto University) ..... 7

**Studies on *In vitro* Fertilization of Follicular Oocytes obtained from Prepubertal heifers**
Yutaka Kajihara, Naoko Kometani, *Yuji Shitanaka, Satoshi Saito, Yuji Koshiba and Kazuhiro Hishiyama
(Marubeni Shiryo Co., Ltd. and *Ito Ham Inc.) ..... 13

**Effective Utilization of the Ovary of Cows, Pigs and the Crossbreds of Pig× Wild Boar with reference to the Development of Oocyte Preservation**
Hajime Miyamoto and Eimei Sato
(Faculity of Agriculture, Kyoto Uriversity) ..... 19

**Molecular Cloning of Porcine Gonadotropin Genes**
Yukio Kato
(Institute of Endocrinology, Gunma University) ..... 25

**Isolation and Some Properties of an Oocyte-Maturation-Promoting Substance from Pig Follicular Fluid**
Hirokazu Kawagishi and Mitsutoshi Yoshida
(Faculty of Agriculture, Shizuoka University) ..... 31

**Effects of Energy Sources and Cyclic AMP on the *in vitro* Development of Bovine 16～32 Cell Embryos**
Toshitaka Horiuchi
(Hiroshima Agricultural College, Present:Hiroshima Prefectural University) ..... 37

**Quality Assessment of Bovine Blastocyst by the Cell Number and Morphology of Inner Cell Mass**
Setsuo Iwasaki and *Noriaki Yoshiba
(Tokyo University of Agriculture and *Saitama prefectural Livestock Experimental station) ..... 42

**Developmental Studies on New Sheep Resources using Embryo Transfer Methods —Melatonin Reactivates Quiescent Ovarian Activity of Mid-Anestrous Ewe—**
Toru Sawasaki, Tadakatsu Okubo and *Yuji Mori
(Faculty of Agriculture, The University of Tokyo and *Tokyo University of Agriculture and Technology) ..... 47

© The Ito Foundation

**Behavioural Influence of a Bull on Sexual Phenomena in Newly Calved Cows**
Shusuke Sato, *Minoru Ota and Yuusuke Honda
(Faculty of Agriculture, Miyazaki University and *University Farm, Faculty of Agriculture, Tohoku University) ····52

**Studies on the Breeding Structure of Japanese Brown Cattle**
Shuntaro Koba
(Kumamoto Prefectural Agricultural Research Center) ····57

**Studies on the Usefulness for the Genetic Character of Brahman and Santa Gertrudis Cattle in Japan**
Yutaka Mizuma, *Minoru Ota, Toshihiro Yamagishi, Hisashi Shinohara and Kuniji Yamaki
(Faculty of Agriculture and *University Farm, Tohoku University) ····62

**Effect of Noise on Blood Levels of LH, Estrus and Ovulation in Heifer**
Kazushi Abe, Yoshiaki Yoshida, Tazaemon Niwa, *Haku Sugawara, **Junji Masaki, **Motoaki Umezu and **Shinichi Ishii
(Iwate Prefectural College of Agriculture, *Faculty of Agriculture, Iwate University and **Faculty of Agriculture, Tohoku University)····69

**Enhancement of Intestinal Immunity of Domestic Animals**
Yukio Shimizu, Hiroshi Kida and Toshihiro Ito
(Faculty of Veterinary Medicine, Hokkaido University)····74

**Developmental Effect of Feeding Condition on the Rumen of Domestic Ruminants in the Pre- and Post- Weaning Stage (II)**
Hajime Amasaki, Shuji Gozawa, Ryozo Akuzawa, Katsushi Suzuki and Masayuki Daigo
(Nippon Veterinary and Zootechnical College) ····79

**Effect of Orally Administered Swine Serum Gamma-globulin to raise Immunity in Artificially Nursed Newborn Piglet**
Noboru Narasaki
(Rakuno Gakuen University) ····86

**Effects of Selection for Low Backfat Thickness in Pigs on the Sites of Fat Tissue Deposition in the Carcass**
Shigeru Nishida, Keiichi Suzuki, Hidetoshi Satou and Kouzou Watanabe
(Miyagi Prefectural Animal Industry Experiment Station)····92

**Studies on the Seasonal Changes in Feed Passage and Digestibility in Sika Deer (*Cervus Nippon*)**
Yasuyuki Sasaki, Yoshio Shoji and Kazuo Katoh
(Faculty of Agriculture, Tohoku University) ····97

**Efficient Utilization of Shōchū-Lees as a Feedstuff in Growing-Finishing Pig Diets: Growth Performance, Carcass Traits and Meat Quality**
Tomio Ohashi, *Hiroshi Kawaida and Kiyoshi Yamauchi
(Faculty of Agriculture, Miyazaki University and *Kagoshima Prefectural Animal Husbandry Station)····102

**Production in Meat Performance, Carcass Characteristics and Meat Qualities of Pigs fed with Mimosine-Reduced Leucaena (*Leucaena leucocephala*)**
Fujiya Hongo, Yoshitsugu Kawashima, Yasuhiro Kawamoto and Katsunori Sunagawa
(Faculty of Agriculture Ryukyu University) ····106

© The Ito Foundation

**The Investigation on Beef Meat Production at Lowered Cost with By-product Utilization —Special Reference to Ammonia Treatment of straw—**
Hisaya Tobioka and *Tomiharu Manda
(Kyushu Tokai University and *Hokkaido National Agricultural Experiment Station)····· 114

**Anatomical Variations of Different Barley Cultivars related to Straw Degradability Before and After Ammonia Treatment**
Masakazu Goto
(Faculty of Bioresources, Mie University) ····· 119

**Study of Chilling Injury and Salinity of Plant Cells by *in vivo* NMR**
Makoto Sakata
(Faculty of Science and Technology, Keio University) ····· 126

**Development of Low Cost Beef (Japanese Black Cattle) Production Systems by Grazing Utilization 2. Effect of Rearing Systems of Feeder Cattle (Grazing or Pen-Feeding) on Their Performance during Fattening Period**
Raizaburo Umetsu *Yasuhisa Masuda, Yoshitaka Nakanishi, *Ichiro Goto and Tetsuzi Etoh
(Kuju Agricultural Research Center and *Faculty of Agriculture, Kyushu University)····· 131

**Feeding Costs in Rearing Dairy Calf Feeders for Fattening and Formulation of Calf Starter Diets at the Weaning Stage**
Hisatomo Oohara
(International Dairy Research Center)····· 137

**Studies on the Beef Carcass Grading System**
Kiyoshi Namikawa, *Hiroshi Harada, *Riichi Fukuhara, **Katsunosuke Mitani and ***Takahide Okayama
(Wagyu Registry Association, *Faculty of Agriculture, Miyazaki University, **Faculty of Applied Biological Science,Hiroshima University and ***Faculty of Agriculture, Kobe University) ····· 146

**Studies on the Evaluation Method of Pig Carcass —Possibility of Regression Equations to estimate Lean Meat Percentage—**
Eisaku Furusawa, Minoru Uchida and Yutaka Amada
(Federal Meat Academy)····· 159

**Studies on the Evaluation of Physico-Chemical Characteristics of Muscles in 5 Chicken Breeds**
Shoji Matsuoka, Shuichi Shinkoda, Nobuo Furuichi, Masanori Inoue, Tadanobu Kukimoto and *Hiroshi Kawaida
(Kagoshima Prefectural Poultry Experiment Station and *Kagoshima Prefectural Animal Husbandry Experiment station) ····· 165

**Survey and Study on Diseases at Dressing Plants —For Conducting the Poultry Meat Inspection System—**
Chitoshi Itakura, Masanobu Goryo and Kenji Ochiai
(Faculty of Veterinary Medicine, Hokkaido University)····· 172

**Prevalence of Several Zoonosis Agents in Poultry and the Establishment of Rapid Diagnosis**
Nobuyuki Minamoto, Toshio Kinjo, Katsuya Hirai, Makoto Sugiyama and Yuji Suzuki
(Faculty of Agriculture, Gifu University) ····· 175

© The Ito Foundation

**Studies on the Research Techniques to make the Fiber Characteristics of Individual Beef Cattle clear with Biopsy Materials excised from Skeletal Muscle**
Hisao Iwamoto and Yoshitaka Ono
(Faculty of Agriculture, Kyushu University) ..... 179

**Changes in Myofibrils and Muscle Connective Tissues during Muscle Growth in Beef Cattle**
Tsugio Osugi, Kunio Kotakemori, Seiji Kondo, Akihito Hattori and Fumio Nakamura
(Faculty of Agriculture, Hokkaido University) ..... 184

**Physiological Studies of Rigor Mortis in the Domestic Animals —Effects of Various Gases—**
Kousaku Tanaka
(Faculty of Agriculture, Kyushu University) ..... 189

**Studies on Postmortem Changes in a Myofibrillar Protein, Nebulin (Part 3)**
Ryuichi Tatsumi, Akihito Hattori and Koui Takahashi
(Faculty of Agriculture, Hokkaido University) ..... 193

**Studies on Role of Proline Specific Peptidases at the Meat Maturation**
Tadashi Yoshimoto
(Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagasaki University) ..... 200

**Application of Oryzacystatin to Modulating the Aging of Meat**
Soichi Arai
(Faculty of Agriculture, The University of Tokyo) ..... 207

**Protease Activities in Beef by Electrical Stimulation**
Masayuki Mikami and Hiroyuki Miura
(Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine) ..... 212

**Studies on Aging of Pork Meat by Activities of Membrane Binding Enzymes and Nuclear Magnetic Resornance (NMR) Spectroscopy**
Kouichi Mamba, Tetsuya Ishida, Mutsumi Kawada, Akitoshi Nozaki, Satoshi Kagabu and Takashi Makita
(Faculty of Agriculture, Yamaguchi University) ..... 217

**Studies on Changes in Contents of Free Amino Acids in the Meat during Storage**
Hideaki Yamanaka
(Tokyo University of Fisheries) ..... 227

**Effect of High Pressure Treatment on Muscle Protein**
Atsushi Suzuki and Yoshihide Ikeuchi
(Faculty of Agriculture, Niigata University) ..... 233

**Thermal Gelation and Denaturation of Muscle Proteins by High Pressure Treatment**
Takeshi Taguchi and Munehiko Tanaka
(Tokyo University of Fisheries) ..... 240

**Effect of High Pressure on the Charactristics of Muscle Protein, especially Myosin**
Katsuhiro Yamamoto
(Rakuno Gakuen University) ..... 247

**Effects of Storage Temperature on the Major Taste Compounds in Vaccum Packed Pork**
Mitsuharu Ishida
(Miyagi Agricultural College) ..... 253

© The Ito Foundation

**A Study for Implement of the Adding Value on Unvalued Low Quality Parts of Domestic Beef**
Kiyoshige Tanaka and Hidemi Honjo
(Iwate Prefectural Animal Experimental Station) ..... 257

**Composition of Poly-unsaturated Fatty Acid in Pig Muscle**
Iwao Koizumi and Yoshihiko Suzuki
(School of Veterinary Medicine, Azabu University) ..... 263

**A Molar Ratio of Polyunsaturated Fatty Acids to α-Tocopherol in Skeletal Muscular Tissue and Its Relationship to Meat Quality**
Kiyoshi Yamauchi and Hisashi Murata
(Faculty of Agriculture, Miyazaki University) ..... 269

**Deterioration and its Prevention of Fats and Oils during Hot Plate Heating**
Masaru Hiroi and Takashi Kaneda
(Faculty of Home Economics, Koriyama Women's College) ..... 274

**Studies on the Crosslinking Amino Acids of Connective Tissue of Meat**
Kyozo Suyama and Fumihiko Nakamura
(Faculty of Agriculture, Tohoku University) ..... 280

**Preparation of Elastin-Collagen Hybrid Membrane**
Keizo Wada and Koji Takahashi
(Faculty of Agriculture, Tokyo Noko University) ..... 287

**Nitrite and N-Nitrosamine Production *in vivo*: In Comparison with Their Amounts in Meat Products**
Michiko Watanabe and *Misao Miwa
(Faculty of Agriculture, University of Tokyo and *National Institute of Animal Industry) ..... 292

**A Method for Immunochemical Simultaneous Determination of Anabolic Steroids and Their Related Compounds in Beef**
Takako Anjo, Tomiharu Ito and Yasuhiko Matsuki
(Food and Drug safety Center, Hatano Research Institute) ..... 297

**A Study on the Systematic Analysis of Residual Antibacterials Agents in Livestock Products**
Masakazu Horie, Kouichi Saito, Youji Hoshino, Norihide Nose and Jubei Katabami
(Saitama Prefectural Institute of Public Health) ..... 303

**Evaluation of Oxidative Deterioration in Meats and Meat Products by Determination of Protein-Bound Fluorescence**
Kenshiro Fujimoto
(Faculty of Agriculture, Tohoku University) ..... 310

**Studies on the Producibility of Antioxidative Materials by Microorganisms**
Yukihiro Ishikawa
(Faculty of Education, Tottori University) ..... 315

**Use of Chick Embryo in Screening for Toxicity 1. Effects of Ethanol and Cycrophosphamide on Chick Embryos and Rat Fetuses**
Tsunenori Nakamura, Hiroyoshi Ninomiya and Tomoo Inomata
(School of Veterinary Medicine, Azabu University) ..... 321

© The Ito Foundation

**Presence and Behavior of *Listeria monocytogenes* in Meats and Meat Products**
Kunio Yamauchi, Teiji Kimura and *Yataro Kokubo
(The College of Agriculture and Veterinary Medicine, Nihon University and
*Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health) ..... 327

**Evaluation of Potential Hazards and Control of Botulism in Meat and Meat Products**
**—Factors Influencing Heat Stability of Botulism Toxin in Various Foods—**
Hiroyuki Nakano, Tetsuo Fukuda and Hideo Hashimoto
(Faculty of Applied Biological Science, Hiroshima University) ..... 334

**Preparation of Purified Protein and Peptide Mixture from Meat and Evaluation of their Nutritional Value**
Tadashi Noguchi and Jong Hee Kim
(Faculty of Agriculture, The University of Tokyo) ..... 340

**Carcinostatic Factor, Neurotrophic Factor and Proliferation-Promoting Factor Secreted from the Animal Brain during the Ontogeny**
Nobuhiko Miwa, Sumie Doi and *Tetsuya Matsuno
(School of Bioscience, Hiroshima Prefectural University and *National Institute of Health) ..... 345

**Studies on Brain Proteases Functioning in Neuropeptide Metabolism**
Hideyoshi Yokosawa and Shin-ichi Ishii
(Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University) ..... 356

**Studies on the Effect of Porcine, Fibronectin on the Growth and Differentiation of Mouse Neural Crest Cells**
Takuji Takeuchi, Eihachiro Kawase, Shigeru Sato, *Kazuya Hamanaka and
*Tadashi Yoshihara
(Faculty of Science, Tohoku University and *Ito Ham Inc., Central Research Institute) ..... 361

**Biochemistry and Cell Biology of Cell Adhesion Proteins from Domestic Animals**
**—Binding of Serum Vitronectin to Collagen—**
Masao Hayashi and Michiko Ishikawa
(Faculty of Science, Ochanomizu University) ..... 366

**Studies on Development of Solid-Phase Sandwich Enzyme Immunoassay Method for Human Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)**
Kyozo Hayashi and *Masayuki Kurobe
(Gifu Pharmaceutical University and *Gifu College of Medical Technology) ..... 372

**Effect of Peptides Originating from Pig Plasma on Experimental Hyperlipidemia and Diabetes Mellitus in Rats**
Kunio Suetsuna, Mutsumi Ishii, *Shusaku Oka, *Tadashi Yoshihara,
* Toyoo Nakamura and ** Shigeo Kajiwara
(Shimonoseki University of Fisheries, *Ito Ham Inc., Central Research Institute and
** Experimental Biomedical Research Inc.) ..... 379

**Development of a New Combination Chemotherapy Utilizing Blood Substances and Immune-response Cells**
Tetsuya Matsuno, *Daisaburo Fujimoto, **Tadashi Yoshihara,
**Shigeaki Watanabe and **Toyoo Nakamura
(Tumour Laboratory, The Foundation for Basic Research of Oncology,
*Tokyo University of Agriculture and Technology and **Ito Ham Inc., Central Research Institute) ..... 385

© The Ito Foundation

**Studies on the Effect of Porphyrin Derivatives from Meat on Hematopoiesis**
Yoshimitsu Maede, Mutsumi Inaba, Mayumi Sagawa and Tomio Ikeda
(Faculty of Veterinary Medicine Hokkaido University) ..... 389

**Chemical Modification of Globin and Functionarity of the Modified-protein**
Yuji Miyaguchi and Masakazu Tsutsumi
(Faculty of Agriculture, Ibaraki University) ..... 393

**Studies on the Physiological Functions of Blood from Livestocks as Food Resources : Isolation of an Opioid Peptide from a Peptic Digest of Bovine Serum Albumin**
Masaaki Yoshikawa, Akira Shiota and Fumito Tani
(Faculty of Agriculture, Kyoto University) ..... 401

**Basic Studies on Efficient Utilization of Domestic Animal Blood — Determination of Peroxide by Chemiluminescence with Polyethylen Glycol-modified Hemin —**
Ayako (Matsushima) Futami, Kayoko Kimura, Yoh Kodera and Yuji Inada
(Toin University of Yokohama) ..... 407

**Effects of High Protein Diet and Exercise on Calcium, Phosphorus and Magnesium Metabolism in Man —Comparison between Animal and Man —**
Takatoshi Esashi, *Yoko Nakashima, Mamoru Nishimuta and **Shoji Azami
(National Institute of Health and Nutrition, *Seitoku University and **Seitoku Junior College of Nutrition) ..... 411

**The Technical and Management Study on the Possibility of Large-scale Cow-calf, Fattening Beef Operation**
Akira Miyazaki, Yoko Niyama and Naohiko Ishida
(Faculty of Agriculture, Kyoto University) ..... 415

**Non-Parametric Analysis of the Stability of Meat Demand**
Manabu Sawada
(Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine) ..... 419

**The Problems and Beef Distribution at the Meat Wholesale Markets**
Ikuro Miyata
(Faculty of Agriculture, Kagoshima University) ..... 425

**The Research on Currency and Economy of Dairy Cattle for Beef in Hokkaido**
Tohru Iwasaki, * Tomiharu Manda, **Kazuaki Araki, ***Masashi Nagasawa and ****Junichi Sudoh
(Sapporo University, *Hokkaido National Agricultural Experiment Station, **Rakuno Gakuen University, ***Tokyo University of Agriculture and ****Hokkaido Livestock Industry Association) ..... 430

**Multiple Regression Analysis on the Shipping Ratings of Pork Carcass**
Hiroshi Ishioka and Hajime Arai
(Tokyo University of Agriculture) ..... 440

**Econometric Studies on Beef Production, its Distribution and Consumption in an Internationalizing Period**
Satoshi Kai
(Faculty of Agriculture, Kyushu University) ..... 446

© The Ito Foundation

**The Effect of Beef Liberalization on Beef Production at Tōhoku Area**
Kazuhiko Hotta and *Ayumi Ueno
(Faculty of Agriulture, Tohoku University and *Iwate Prefectural Office) ..... 452

**Study of the Effect of Biotechnology on Beef Farming in Developed Countries**
Sukehiko Shibuya
(School of Veterinary Medicine, Azabu University) ..... 460

**Broiler Industry in Thailand and the Effect on Broiler Production in Japan**
Yutaka Kunimatsu, *Hideo Yano and **Takashi Nakajima
(Kyoto Prefectural University, *Faculty of Agriculture, Kyoto University and
**Shiga Prefectural College) ..... 468

**Survey on the Patents Related to the Production, Treatment and Processing Techniques of Meats (III)**
**Present State on Application and Public Notice in Field of Slaughtering, Precessing and Meat Products**
Kenji Nakajima
(Dr. Nakajima Consulting Office) ..... 475

**The Reconsideration of Meat Comsumption on Japanese History**
Makoto Sahara, Masaaki Sawada and Akira Matsui
(Nara National Cultural Properties Research Institute, Center for Archaeological Operations) ..... 483

**VII International Symposium on Ruminant Physiology**
Tsuneyuki Tsuda, *Yasuyuki Sasaki, **Ryoji Kawashima, ***Fumio Shibata, *Masaaki Horiguchi, *Tadahiko Hoshino, *Junji Masaki and *Yoshio Shoji
(Tokyo University of Agriculture, *Tohoku University,
**Kyoto University and ***Nihon University) ..... 488

**An Outline of Research Presentation in the 35th International Congress of Meat Science and Technology**
The Japanese Research Society of Meat and Meat Products ..... 493

© The Ito Foundation

# 豚卵胞卵の体外成熟と体外受精に関する研究

Studies on the in vitro Maturation and Fertilization of Porcine Follicular Oocytes

豊田 裕・内藤邦彦（東京大学医科学研究所）

Yutaka Toyoda and Kunihiko Naito
(Institute of Medical Science, The University of Tokyo)

We have reported previously that porcine fillicular oocyts matured in porcine follicular fluid (pFF) in vitro showed normal male pronucleus (mPN) development after in vitro fertilization. In the present study, developmental ability of these ova was examined at first. After 48 h of insemination, 50% of ova developed to 2-cell stage or further, and 66 h after insemination, 25% of ova developed to 4-cell stage or further. These rates are high enough and confirm the usefulness of our maturation system. Most cleaved embryos stopped developing at the 4-cell stage and neither the morula nor blastocyst stage was observed throughout the culture period. This result is the same as reported in vivo matured and in vivo fertilized porcine embryos. Therefore this failure of development will not be due to maturation cultuer system.

We examined next the efficiency of bovine follicular fluids (bFF) on male pronucleus (mPN) formation of porcine follicular oocytes matured in it. Bovine FF was dose-dependently elevated the mPN formed oocytes as the same manner as pFF, suggesting that the effective factor(s) will be essentially the same between pigs and cows. The concentrations of the factor(s) in bFF were about two times higher than pFF, and decreased with growing the follicular size. Heating of pFF at 56℃ for 30min did not deteriolate its efficiency. High molecular weight components (12,000<) of pFF improved mPN formation rate, but low molecular weight components (25, 000>) were not effective. These results suggest that the effective factor(s) will be present widely in many species and might function physiologically. The examined characteristics of the factor(s) are compatible with glucosaminoglicans and inhibin.

## 1. 目　的

肥育豚としてと殺される性成熟前の雌豚の卵巣内には多数の卵母細胞が存在するが，全く利用されずに捨てられている。これらの卵巣内の未熟な卵母細胞を体外培養によって成熟させることができれば，体外受精と組み合わせることによって，新しい個体に発生することが可能な多数の初期胚を作ることができ，豚の生産性ひいては肉質の向上に大きく貢献するものと考えられる。しかし現状では卵胞卵の成熟機構には不明の点が多く，必ずしも満足な成績は得られていない。

豚の体外成熟卵は，受精後，卵細胞質内に侵入した精子頭部を膨化する能力（雄性前核の形成率）が著しく低いことが1974年に報告され[1]，これを改善する方法が求められていた。我々は豚卵胞液中で豚卵子を成熟することにより，これを飛躍的に高めることに成功し[2]，豚卵胞液中に卵子成熟

© The Ito Foundation

を促進する物質が存在することを示すと共に，これら卵子の畜産分野への応用の可能性を示唆した。

そこで本実験では，まず豚卵胞液中で体外成熟し体外受精した豚卵子がどのような発生能力を持つかを調べた。また，この有効物質が他の肉用家畜の卵胞液中にも存在している物であれば，同様の成熟法はそれらの家畜の生産性をもさらに改善できる可能性がある。そこで次に，この卵子成熟の促進因子が牛の卵胞液にも存在するかを調べ，さらに物質同定の一助にすべく，卵子の成熟時期による変化と若干の生化学的特徴（熱安定性，凡その分子量）を探った。

## 2. 方　法

### 2.1 体外成熟・体外受精・体外発生

と場より入手した未成熟豚の卵巣に存在する直径2～5㎜の卵胞を，生理食塩水中で針で裂いて緊密な卵丘細胞につつまれた卵子を採取した。卵子は豊田らのマウス体外受精用培地（TYH）[3]で洗浄後，成熟培地内（後述）で，37℃ 5％ $CO_2$ 95％空気の条件下で48時間培養することによって成熟を誘起した。培養終了後，卵子は体外受精用培地（TYH＋2mM カフェイン）に移し換え，受精能獲得精子で受精（最終濃度 $1\times10^5$/m$l$）した。

精子は繁殖能力の確認されている種雄豚（ハンプシャー×デュロック）より，用手法によって採取した濃厚部精液を TYH で2回洗浄後，高濃度処理[4]を行って受精能獲得を誘起した。

雄性前核形成率は媒精20時間後にホールマウント標本を作成（固定；酢酸：エタノール＝1：3，染色；0.75％酢酸オルセイン）し，雄性前核の有無を顕微鏡で観察した。発生を調べる実験では，媒精後6時間で卵子を発生用培地（BMOC-2）[5]に移し換え，成熟培養と同じ条件で96時間後まで培養した。倒立顕微鏡下で適宜発生段階を観察した。

### 2.2 成熟培地

成熟培地には未成熟豚の卵巣の直径2～5㎜の中卵胞より採集した豚卵胞液（pMFF）を主として用いた。その他，成熟豚の卵巣の直径5㎜以上の大卵胞より採集した卵胞液（pLFF），牛卵巣の直径2～5㎜，および1～2㎝の卵胞より採集した卵胞液（それぞれ bMFF, bLFF）も使用した。いずれの卵胞液も注射筒で吸い取った後，4℃で1,500×g 10分間の遠心分離を行い，上清を－20℃で保存した。

発生能を調べる実験では，100％の pMFF を，4種類の卵胞液の作用を比べる実験では，それぞれの卵胞液を TYH で0～100％の範囲で希釈して用いた。有効物質の熱安定性には pMFF を56℃，30分間熱処理した卵胞液（heat-FF）を5-100％濃度に TYH で希釈し，また凡その分子量は pMFF を遠心分離型の限外濾過器（セントリコン；アミコン）にかけ，濾過された低分子量画分（low-FF；分子量25,000以下）と，透析膜によって透析されなかった高分子量画分（high-FF；分子量12,000以上）を TYH で50％濃度に希釈して用いた。

すべての成熟培地には FSH（0.12IU/m$l$）を添加して使用した。

## 3. 結果と考察

発生成績は **Table 1** に示した。卵割卵は媒精後24時間まで見られず，24から48時間後に出現した。媒精後48時間では約50％の卵が卵割し，大部分の卵割卵は2細胞期であった。培養時間を延長すると2細胞期胚は減少し，66時間後には主として4細胞期胚が増加し，少数ながら8細胞期胚も見られた。4細胞期以上に発生した卵子は全体の約25％であった。本培養系における豚卵胞卵の成熟率，精子侵入率，雄性前核形成率は，それぞれ約90，50，80％であり[2]，これから計算すると，全卵子の約36％が雄性前核をもつことになる。これと比

© The Ito Foundation

**Table 1** Development of in vitro matured and in vitro fertilized porcine ova cultured in BMOC-2 up to 96 h after insemination

| Culture period (h)[a] | No. embryos at stage[b] | | | | | | | | No. of abnormal embryos |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | |
| 24 | 120 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 48 | 49 | 40 | 13 | 5 | 1 | 3 | 0 | 0 | 9 |
| 66 | 12 | 29 | 17 | 23 | 4 | 0 | 0 | 2 | 33 |
| 72 | 11 | 27 | 17 | 20 | 4 | 1 | 0 | 2 | 37 |
| 96 | 9 | 25 | 13 | 19 | 4 | 1 | 0 | 2 | 47 |

[a] Hours after insemination.
[b] Number of blastomeres.

**Table 2** Coefficient of correlation, regression line and 50% effective dose between the FF concentrations in maturation media and mPN incidences of porcine oocytes matured in the media.

| Follicular fluid | Coefficient of correlation | Regression line (Y = A + Blog X) | | 50% effective dose (%) |
|---|---|---|---|---|
| | | A | B | |
| pMFF | 0.971 | 24.7[a] | 33.3[d] | 5.75 |
| pLFF | 0.976 | 2.5[b] | 38.0[d] | 17.78 |
| bMFF | 0.935 | 33.2[c] | 43.3[d] | 2.44 |
| bLFF | 0.942 | 26.6[a] | 25.5[d] | 8.27 |

[a~c] Significant differences are present between a and c ($p < 0.05$) and b and c ($p < 0.01$)
[d] These values are not significantly different ($p > 0.05$) by the analisis of covariance.

較すると雄性前核が形成されたものの7割は4細胞期以降まで発生することになり，非常に高い発生率と考えられる。また，全使用卵子の4個に1個は4細胞期以降まで発生するという結果は，本実験系が豚生産性向上に有用であることを裏付けている。なお，2細胞期胚の率が50%と高いが，一部，単為発生などの異常卵割を含むものと思われる。

一方，媒精66から96時間後では発生段階に有意な変化はないが，時間と共に異常卵が増加した。培養時間を通じて桑実胚や胚盤胞は見られなかった。体内成熟，体内受精豚卵を，1細胞期から体外で培養すると大部分の卵子が4細胞期で発生を停止することが報告されている[6]。従ってこれは体外成熟培養系ではなく，体外発生培養系に原因があるものと思われる。最近，器官培養したマウス卵管内で豚胚が高率に胚盤胞に発生することが報告されており[7]，このような系を用いてさらに確認することも必要であろう。

豚体外成熟卵の雄性前核形成能力に対する4種類の卵胞液の効果を調べた結果は **Fig. 1** に示した。いずれの卵胞液中で成熟した場合にも，体外受精後の雄性前核形成は卵胞液濃度が上昇するにつれて有意に高まり，雄性前核形成率と卵胞液濃度の間には高い相関が得られた（0.935-0.976；**Table 2**）。これにより，牛卵胞液も豚卵胞液同様，豚卵胞卵の成熟に有効に作用することが示された。最も高い雄性前核形成率（75.6-88.4%）は，それぞれの卵胞液の間に有意差はなく，また回帰係数にはいずれの卵胞液の間にも有意差はなかった（**Table 2**）。この結果は，これら4卵胞液に含まれる有効物質が同一であることを強く示唆している。なお回帰直線より求めた50%有効量は有意に差があり，中卵胞液は大卵胞液の3倍，また牛卵胞液は豚卵胞液の2倍有効であった（**Table 2**）。従って有効物質の濃度には違いがあると思われる。

© The Ito Foundation

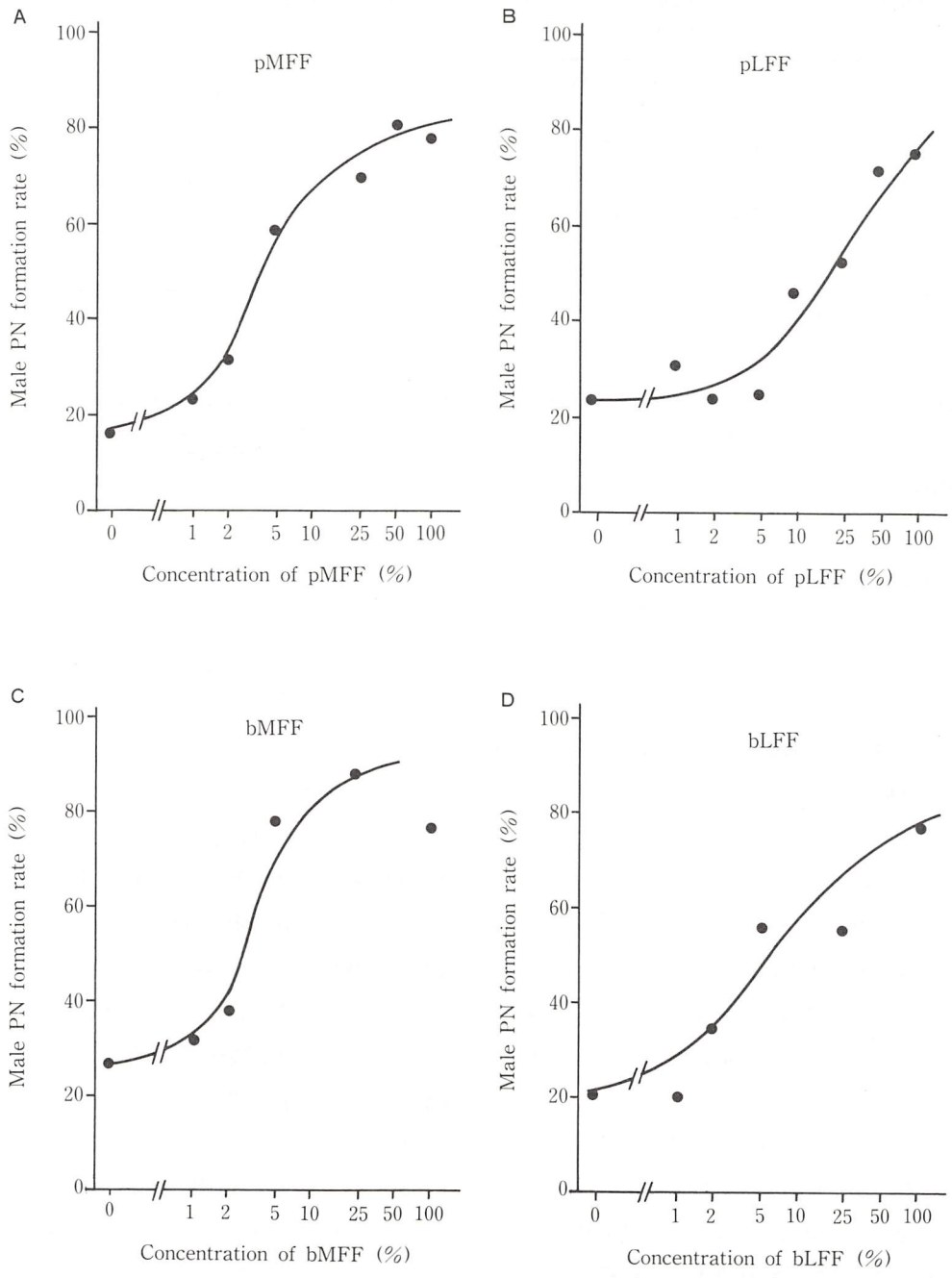



**Fig. 1** Male pronucleus formation rates of porcine follicular oocytes matured in various concentrations of follicular fluids (FFs) and fertilized in vitro. FFs were obtined from prcine middle-sized (pMFF; A), poecine large-sized (pLFF; B), bovine middle-sized (bMFF; C) and bovine large-sized (bLFF; D) foiicles. For details, see in the text.

© The Ito Foundation

以上より，我々が豚卵胞液中に存在を示唆した物質は豚のみに限られるものではなく他の家畜にも存在していることが示唆され，このことはこの物質が卵子成熟過程において重要な作用を担っていることを暗示するものと我々は考えている。この物質が同定されれば，家畜の生産性向上の研究材料として体外成熟卵が多く用いられている牛においても，その卵子の発生率を改善する可能性があり，これら肉用家畜の生産性ひいては肉質向上に貢献するものと期待される。そこでこの物質同定の一助とすべく，有効物質の生化学的特徴を次に調べた。

Heat-FF の効果は **Fig. 2** に示した。豚卵胞卵を5–100%の Heat-FF 中で体外成熟した結果，雄性前核形成率は58.0–77.3% と高く，無処理の卵胞液の効果と差がなかった。従って，56℃，30分の熱処理には安定であることが示された。

High-FF で成熟した時の雄性前核形成率（64.9%）は，無処理の対照群の値（77.8%）と有意差はなかった。一方，Low-FF を使用した時の率は10.0%であり，TYH で成熟した時の値（18.2%）と有意差はなかった（**Table 3**）。この結果は，有効物質が分子量25,000以上であることを示している。

以上まとめると，この有効物質は豚と牛，おそらくは他の動物種の卵胞液中にも存在し，卵胞が成長すると濃度が減少する。56℃の熱処理には安定で分子量が25,000以上ということになる。現在までに知られている卵胞液中の物質でこの条件を満たすものとして，タンパク質ホルモンのインヒビン[8]，およびグルコサミノグリカンのコンドロイチン硫酸，ヘパラン硫酸[9]などが考えられる。

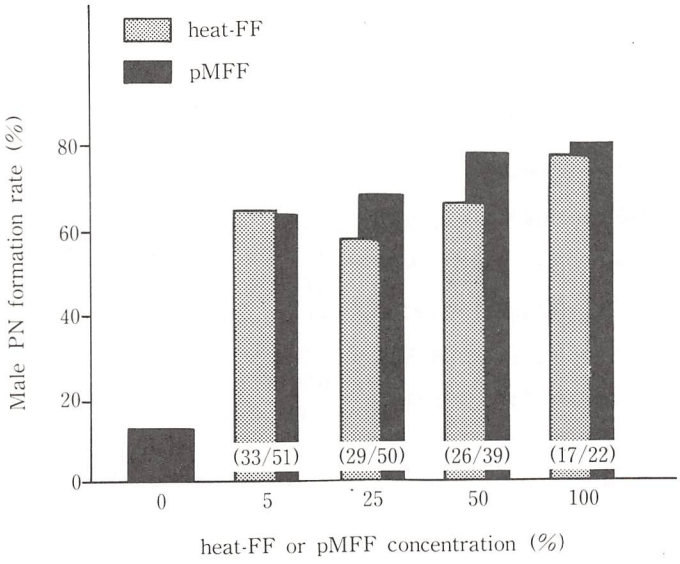



**Fig. 2** Effects of heat-treated follicular fluid on the male pronucleus formation of porcine follicular oocytes. The oocytes were matured in indicated concentrations of heat-treated (56 C, 30 min) porcine middle-sized follicular fluid (heat-FF; ▨) or non-treated control (pMFF; ■)and fertilized in vitro. The numbers of male-pronucleus formed oocytes per penetrated oocytes in heat-FF experiments were shown in the parentheses. Significant differences were not present between heat-FF and pMFF in any concentrations.

© The Ito Foundation

Table 3 Effect of low-or high-molecular weight components in pMFF on mPN formation of porcine oocytes matured in vitro

| pFF components in TYH | No. of oocytes | |
|---|---|---|
| | penetrated | developed mPN (%) |
| none | 33 | 6(18.2)[a)] |
| Low-MW 50% | 20 | 2(10.0)[a)] |
| High-MW 50% | 37 | 24(64.9)[b)] |
| pFF 50% | 72 | 56(77.8)[b)] |

[a, b)] Significant differences are present between a and b ($p < 0.001$).

今後これらの有効性を検査してゆくことを計画している。

## 4. 要 約

豚の生産性を向上するため，現在と場で廃棄されている豚の未成熟卵子を有効利用することを目的として，これらの体外成熟法の検討を行った。我々はすでに豚体外成熟卵子の雄性前核形成能力を高める培養方法として豚卵胞液を使用する系が有効であることを示したので，ここではまず本培養系で体外成熟された豚卵子の発生能を調べた。その結果，媒精48時間後に2細胞期以降へ発生した卵は全体の50%また媒精66時間後に4細胞期以降へ発生した卵は25%と極めて高率であり，本成熟培養系の有用性が示された。体内成熟・体内受精豚卵子を体外発生培養した場合，多くが4細胞期で発生を停止することが知られており，本培養系の体外成熟・体外受精卵も同様であった。つぎに豚卵胞液中の有効性分が他の家畜にも存在するものであるかを調べるため，豚卵胞液に代えて牛卵胞液の豚卵子に対する有効性を調べたところ，同様に雄性前核形成能を高める効果があった。卵胞液中の有効成分は豚と牛で同一であり，その濃度は牛では豚の約2倍と考えられた。この物質同定の一助とすべく，有効物質の生化学的特徴を調べた結果，卵胞が成長すると濃度が減少し，56℃の熱処理には安定で分子量が25,000以上ということがわかった。これらの特徴を満たす卵胞液中の成分としてはインヒビン，グルコサミノグリカンのコンドロイチン硫酸，ヘパラン硫酸などが考えられる。今後これらの有効性を検査してゆくことが必要であろう。

## 文 献

1) Motlik J, Fulka J. Reprod. Fertil., 36, 235-237, (1974).
2) Naito K, Fukuda Y, Toyoda Y, Gamete Res. 21, 289-295, (1988).
3) 豊田，横山，星，家畜繁殖誌: 16, 147-151, (1971).
4) 浜野，豊田，家畜繁殖誌：32, 177-183, (1986).
5) Brinster RL, J. Reprod. Fertil., 10, 227-240, (1965).
6) Lindner GM, Wright RWJr, J. Anim. Sci. 46, 711-718, (1978).
7) Krisher RL, Petters RM, Jonson BH, Bavister BD, Archibong AE, J. Exp. Zool., 249, 235-239, (1989).
8) 長谷川，家畜繁殖誌：33, 40-53, (1987).
9) Bushmeyer SM, Bellin ME, Boehm SK, Brantmeier SA, Kubajak CL, Ax RL, Proc. 5 th Ovarian Workshop: Ovarian Glycosaminoglycans, 491-495, (1984).

© The Ito Foundation

# 体外成熟・体外受精由来ウシ８細胞期胚単一割球と除核未受精卵との融合胚の発生能に関する研究

Developmental Ability of Enucleated Bovine Oocytes Matured *in Vitro* Following Fused with Single Blastomere of 8-Cell Embryos Matured and Fertilized *in Vitro*

三谷　匡・内海　恭三・入谷　明（京都大学農学部）

Tasuku Mitani, Kyozo Utsumi and Akira Iritani
(Faculty of Agriculture, Kyoto University)

One blastomere from 8-cell bovine embryo matured and fertilized in vitro was fused with a enucleated oocyte matured in vitro by electric stimulation. The percentage of the reconstituted embryos developed to the 2- to 8-cell stage 48h after electric fusion was increased when 8-cell embryos and oocytes were derived from the oocytes cultured with granulosa cells at the concentration of $1\times10^6$ cells/ml (14% vs 38%).

Although both ethanol treatment and electric stimulation highly induced parthenogenetic activation of oocytes matured in vitro for 26-28 h (ethanol treatment, 89%; electric stimulation, 73%, respectively), the percentage of the second polar body extrusion was very different between those treatments (80% vs 22%). Ethanol pretreatment to enucleated oocytes was not effective on in vitro early cleavage of the reconstituted embryos 48 h after electric fusion (nontreated, 38%; treated, 43%, respectively).

The reconstituted embryos developed to the 2-to 8-cell stage 48 h after electric fusion were cocultured with granulosa cells for further 5 days. When 8-cell embryos and enucleated oocytes were derived from the oocytes matured in vitro without granulosa cells and enucleated oocytes were not pretreated with ethanol, non of the reconstituted embryo developed beyond to the 2-to 8-cell stage. In contrast, when embryos and oocytes derived from the oocytes matured in vitro with granulosa cells were used for fusion, the reconstituted embryos developed to the 9- to 32-cell stage (7-11%), but not to morula, regardless of ethanol pretreatment.

## 1. 緒　言

近年，哺乳動物初期胚由来のドナー核を別の除核細胞質に核移植する方法による一卵性多生子作出の試みが盛んに行なわれているが，家畜では分割期胚の供給には外科的手術を必要としてきたことから体外受精技術との併用が期待される。体外で成熟・受精した卵子は，体内で成熟・受精した卵子に比べその発生能力が明らかに低いが，体外成熟・体外受精由来ウシ初期胚の分離割球の胚盤胞への発生から８細胞期割球においても発生能を維持していることが示されている[1]。Prather ら[2]は体内成熟・体内受精由来ウシ２～32細胞期胚のドナー核を排卵卵子あるいは体外成熟卵の除核細胞質へ核移植して，いずれにおいても産子を得ている。しかし体外成熟卵を用いた再構築胚の発生能は著しく低下し，除核細胞質側の要因によって大きく左右されることが示された。そこで本研究

© The Ito Foundation

では，体外成熟・体外受精由来のウシ初期胚割球と体外成熟卵との再構築胚による産子の作出を目的として，卵子の体外成熟の方法や卵子の活性化が再構築胚の発生能に及ぼす影響について検討した。

## 2. 材料および方法

### 2.1 ウシ卵胞卵の体外成熟および体外受精

卵胞卵の体外成熟培養，体外受精および受精卵の体外培養は佐伯ら[3]の方法に準じた。と殺場卵巣より採取した卵胞卵をホルモン添加修正 TCM 199液（m-TCM 199＋H）中で28時間成熟培養し，10 $\mu$g/m$l$ ヘパリン添加パーコール液で凍結融解精子を洗浄し，10 $\mu$g/m$l$ ヘパリン添加修正タイロード液[4]（以下 BO 液）中で授精した。授精後48時間で８細胞期に達しているものをドナー割球用胚として用いた。

卵胞卵の体外成熟および再構築胚の体外培養時に添加する顆粒膜細胞は卵胞液約２m$l$を２％ヒアルロニダーゼ液２m$l$に希釈し，約80g，５分間の遠沈した。沈査を m-TCM 199＋10% FCS 液約500$\mu l$ で再懸濁し，体外成熟および体外培養用の小滴中に最終濃度が $1\times10^6$ cells/m$l$ になるように細胞を添加した。

### 2.2 胚の顕微操作

胚の顕微操作は20%子牛血清添加リン酸緩衝液（m-PBS＋20% CS）中で行なった。初期胚の割球分離操作は，Willadsen[5]の方法に従い，微細ガラス針で透明帯を切開して吸い出した割球をピペッティングにより機械的に分離した。除核未受精卵の作成とドナー割球の注入操作は McGrath & Soltor[6] および Tsunoda ら[7]の方法に準じた。体外成熟卵の卵丘細胞を除去した後，微細ガラス針で第１極体付近の透明帯を一部切開し，7.5 $\mu$g/m$l$サイトカラシンB添加 m-PBS 中（m-PBS＋CB）で15～20分前処理した後，同液中で脱核操作を行なった。透明帯の切開部より脱核用ピペットを挿入し，第１極体とともに第１極体付近の卵細胞質を約1/3吸い出し，卵細胞質より除去したものを除核未受精卵とした。除核未受精卵の透明帯の切開部より挿入した脱核用マイクロピペットでドナー割球を静かに注入した。

ドナー割球と除核未受精卵の融合は三宅ら[8]の方法に準じて電気融合により行なった。0.1 mM $MgSO_4$，0.05 mM $CaCl_2$ 添加 0.3Mマンニトール液中で卵子を２台のマイクロマニピュレーターに装着した白金線電極（先端直径＝0.1㎜，東京理科製あるいは自家製）を用いてドナー割球と除核未受精卵との接触面を両電極面と平行にして保定し，100V/mm・100 $\mu$sec の直流矩形波（東京理科製電気融合装置）を１回与えた。処理後30分で融合していた卵子は7.5 $\mu$g/m$l$サイトカラシンB添加 m-TCM 199 液中で１時間培養した。卵子はさらに48時間 m-TCM 199＋10% FCS液中で培養し，電気刺激後48時間で分割していた再構築胚は m-TCM 199＋10% FCS 液中で顆粒膜細胞（$1\times10^6$ cells/m$l$）とともに５日間共培養した。

### 2.3 体外成熟卵の活性化処理

体外成熟卵の活性化はエタノール処理法[9]を用いた。体外成熟培養後に卵丘細胞を除去した卵子を m-PBS＋CB で15～20分処理した後，７％エタノール添加 m-PBS（m-PBS＋７% EtOH）で７分間処理した。16～18時間後に卵子を常法に従い固定・染色し活性化の状態を観察した。また再構築胚作成に用いる除核未受精卵は，除核後エタノール処理しドナー割球と電気融合した。さらに卵子の一部は電気刺激による活性化の誘起を調べるため，卵丘細胞を除去後電気融合と同様の方法で電気刺激を与え，16～18時間後に固定・染色し観察した。

© The Ito Foundation

## 3. 結　果

8細胞期胚および体外成熟卵を得るための卵胞卵の体外成熟培養系に添加する顆粒膜細胞が再構築胚の発生に及ぼす影響を調べた（**Table 1**）。その結果，顆粒膜細胞無添加区では電気刺激後48時間での再構築胚の分割率は14%（11/80）にすぎず，5～8細胞期に達する胚は見られなかったのに対し，添加区では38%（54/143）が分割し，7%（10/143）が5～8細胞期にまで達していた。したがって以後の実験では卵胞卵の体外成熟培養系には顆粒膜細胞を添加した。

次にエタノール処理あるいは電気刺激による体外成熟卵の活性化について調べた（**Table 2**）。その結果，活性化未処理の卵子で体外成熟培養後44～46時間に前核を形成していたのは23個中わずかに1個であったのに対し，エタノール処理区では89%（40/45），電気刺激処理区では73%（33/45）の卵子に処理後18時間で前核が観察された。しかし両処理区では前核の形成パターンに明らかな差が見られ，エタノール処理区では活性化卵のうち80%が第2極体を放出し1個の前核を形成していたのに対し，電気刺激処理区では活性化卵のうち78%が第2極体を放出せずに活性化していた。

そこで除核未受精卵のエタノール処理が再構築胚の発生に及ぼす影響について調べた結果を**Table 3**に示した。電気刺激後48時間における分割率は未処理区およびエタノール処理区でそれぞれ38%（54/143）および43%（18/42）で有意差は見られなかった。また両区とも再構築胚の7%が5～8細胞期に達していた。

卵胞卵の体外成熟培養における顆粒膜細胞の添加の有無および除核未精卵に対するエタノール処理の有無によって得られたさまざまな再構築胚のうち電気刺激後48時間で2～8細胞期に分割した卵子を顆粒膜細胞とともにさらに5日間体外培養した結果を**Table 4**に示した。顆粒膜細胞無添加・エタノール未処理で得られた再構築胚のうち2～8細胞期に達した11個を顆粒膜細胞と5日間共培養した結果，6個の胚は2～8細胞期にとどま

**Table 1** Developmental ability of bovine oocytes cultured with granulosa cells during maturation and fused with blastomeres of 8-cell embryos by electric stimulation

| Addition of GCs | No. of eggs used | No. (%) of eggs developed to* | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Total | 2-cell | 3-cell | 4-cell | 5-to 8-cell |
| + | 143 | 54(38) | 24(17) | 10( 7) | 10( 7) | 10( 7) |
| − | 80 | 11(14) | 5( 6) | 3( 4) | 3( 4) | 0( 0) |

* The eggs were examined 48h after electric stimulation.

**Table 2** Activation of in vitro matured bovine oocytes by ethanol or electric stimulation after exposure to cytochalasin B

| Treatment | No. of oocytes examined | No. of activated oocytes with* | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Total (%) | 1-PN+2ndPB** | 1-PN only | 2-PN only | 3-PN< |
| — | 23 | 1( 4) | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 7%-EtOH*** | 45 | 40(89) | 32 | 2 | 4 | 1 |
| D. C. pulse | 45 | 33(73) | 7 | 8 | 16 | 2 |

* The oocytes were examined 18h after treatment.
** PN means pronucleus or pronuclei and 2ndPB means the second polar body.
*** The oocytes were exposed to m-PBS with 7%-EtOH for 7min.

© The Ito Foundation

**Table 3** Effect of ethanol treatment of enucleated oocytes on in vitro development of reconstituted bovine embryos

| EtOH treatment | No. of eggs used | No. (%) of eggs developed to* | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Total | 2-cell | 3-cell | 4-cell | 5-to 8-cell |
| − | 143 | 54(38) | 24(17) | 10( 7) | 10( 7) | 10( 7) |
| + | 42 | 18(43) | 6(14) | 2( 5) | 7(17) | 3( 7) |

* The eggs were examined 48h after electric stimulation.

**Table 4** Further development of reconstituted and cleaved (2-to 8-cell) bovine embryos cocultured with granulosa cells for 5 days

| GCs during IVM | EtOH treatment | No. (%) of 2-to 8-cell embryos | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | cultured* | developed to | | |
| | | | 2-to 8-cell | 9-to 32-cell | morula |
| − | − | 11 | 6(55) | 0( 0) | 0( 0) |
| + | − | 44 | 22(50) | 3( 7) | 0( 0) |
| + | + | 18 | 10(56) | 2(11) | 0( 0) |

* The eggs developed to the 2-to 8-cell stage 48h after electric stimulation were cocultured with $1\times10^6$ granulosa cells／m*l*.

ったままであったが残りの５個は退行した。一方，顆粒膜細胞添加・エタノール未処理の区では共培養した44個の分割卵のうち３個（７％）が，また顆粒膜細胞添加・エタノール処理区では18個の分割卵のうち２個（11％）が９～32細胞期にまで発育した。しかしいずれの区においても桑実胚以上にまで発育した胚は得られなかった。

## 4. 考　察

哺乳動物卵子を用いた核移植では核と細胞質との相互作用が再構成胚の発生能に大きく影響すると考えられている。ウシでは細胞質として前核期卵を用いた再構成胚は桑実胚へ発育しなかったが[10]，未受精卵を用いて正常な産子が得られた[2]ことから家畜においては除核細胞質には未受精卵が適当であるとされている。その理由として核の初期化に関与する細胞質中の因子が融合後の活性化に伴って核に作用すると仮定すれば，前核期卵ではすでにその過程が終了しておりそのような因子がもはや働かない状態になっているか，あるいは作用中の因子が除核操作の際に前核とともに除去されている可能性などが考えられている[10~12]。Prather ら[2]は，除核未受精卵として成熟度の高い排卵卵子を用いた方が成熟度の低い体外成熟卵を用いた場合よりも再構成胚の桑実胚から胚盤胞期胚への発生能が高いことを認めた。また Tsunoda ら[13]はマウス受精卵の前核を単為発生卵の除核細胞質に移植し，単為発生卵の活性化のパターンが再構成胚の発生能に影響することを報告している。このように除核細胞質として用いる卵子はその核のステージだけでなく同一ステージにおいてもその由来によって再構成胚の発生能に影響することが示され，細胞質の成熟度が供与核の発生能に強く影響することが示された。

近年，卵胞卵の体外成熟培養時に顆粒膜細胞と共培養することにより発生能が向上することがウシでも報告されており[14]，本実験でも顆粒膜細胞を添加して得られた除核未受精卵を用いることにより再構成胚の分割率の向上が認められ，顆粒膜細胞は体外成熟卵の特に細胞質の質的向上を促

© The Ito Foundation

しているということを示唆していると思われる。

また成熟卵子の除核細胞質を使った再構築胚の発生には卵子細胞質の活性化の程度が関係する可能性が考えられているが，この点に関して直接的に調べられたものはない。本実験では電気刺激により割球と除核細胞質を融合しており，融合と同時に卵子の活性化が誘起されているものと思われる。しかし未受精卵に活性化処理をした場合，卵子の成熟時間や活性化処理法によって第２極体の放出の有無や形成する前核の数などに幾つかのパターンがみられる。本実験では前核期になる以前のM-Ⅱ期卵を除核して割球と融合しているが，マウス[13]と同様にウシでも活性化の程度とパターンが再構築胚の発生能に影響している可能性がある。実験の結果，体外成熟培養26～28時間での卵子に対するエタノール処理や電気刺激処理は高い活性化率が得られた。エタノール処理[15]でも電気刺激処理[16]でも体外成熟時間が26時間を越えると卵子の活性化率は急激に高くなることや，成熟培養時間によって再構築胚の分割率に差が見られるという報告[17]と比較しても本研究で得られた活性化率は満足なものである。エタノール処理と電気刺激処理とでは体外成熟卵の活性化のパターンに相違があることが明らかとなったが，割球との電気融合前に除核細胞質を受精時の活性化に類似した活性化を導くためにエタノール処理をしても，再構築胚の発生には影響は見られなかった(**Table 3, 4**)その原因としてはウシでは活性化のパターンは再構築胚の発生能に影響しないためなのか，あるいは前核形成前に核を除去したため細胞質にエタノール処理をしてもこのような差が生じないためなのか，またそれ以外の理由によるのかは本実験からは明らかとはされなかった。しかし活性化に関与する因子と再構成胚の発生に関与する因子との間に直接的あるいは間接的関係が存在する可能性が示唆された。また本実験では桑実胚にまで達する再構成胚は得られなかったが，今後体外培養系の改善や分割した再構築胚の染色体の分析などの検討が必要であると思われる。

## 5. 要　約

体外成熟・体外受精由来ウシ８細胞期胚単一割球と体外成熟由来除核未受精卵との融合胚の体外発生能について検討した。体外成熟時に顆粒膜細胞を添加することにより再構築胚の分割率は有意に上昇した（14% vs 38%）。エタノール処理および電気刺激による卵子の活性化について調べた結果，いずれの区も高い活性化率（89% vs 73%）を示したが，第２極体の放出率に明らかな差が見られた（80% vs 22%）。そこで除核未受精卵へのエタノール処理が再構成胚の発生に及ぼす影響について調べた。しかしエタノール処理による分割率への影響は見られなかった（未処理区38%；処理区43%）。また融合48時間後の分割卵を顆粒膜細胞とともに５日間共培養した結果，成熟培養時顆粒膜細胞を添加した区では９細胞期以上に発育した胚は見られなかったが，顆粒膜細胞添加区ではエタノール処理の有無にかかわらず９～32細胞期に達する胚が見られた。

### 文　献

1) 三谷ら，第81回日畜大会講演要旨 pp. 8, 1989
2) Prather, RS et al., Biol. Reprod. 37, 859-866, 1987
3) 佐伯ら，第79回日畜大会講演要旨 pp.7 , 1987
4) Brackett, BG & Oliphant, G, Biol. Reprod. 23, 189-205, 1975
5) Willadsen, SM, Nature 277, 298-300, 1979
6) McGrath, L & Soltor, D, Science 220, 1300-1302, 1983
7) Tsunoda, Y et al., J. Exp. Zool. 240, 119-125, 1986
8) 三宅ら，第78回日畜大会講演要旨 pp. 24, 1986
9) Cuthbertson, KSR, J. Exp. Zool. 226, 311-314, 1983
10) Robl, JM et al., J.Anim. Sci. 64, 642-647, 1987

© The Ito Foundation

11) Barnes, FL et al., Biol. Reprod. 36, 1267-1274, 1987
12) Czolowska, R et al., J. Cell Sci. 69, 19-34, 1984
13) Tsunoda, Y & Shioda, Y, Gamete Res., 21, 151-155, 1988
14) Fukui, Y & Ono, H, J: Reprod. Fert. 86, 501-506, 1989
15) Nagai, T, Gamete Res., 16, 243-249, 1987
16) Ware, CB et al., Gamete Res., 22, 265-275, 1989
17) 青柳ら, 第76回家畜繁殖学会講演要旨 pp. 41, 1989

© The Ito Foundation

# 子牛から得た卵胞卵子の体外受精について

Studies on *In vitro* Fertilization of Follicular Oocytes obtained from Prepubertal heifers

梶原　豊・米谷　尚子・*下中　裕次・斉藤　聡
小柴　雄二・菱山　和洋（丸紅飼料株式会社，*伊藤ハム株式会社）

Yutaka Kajihara, Naoko Kometani, *Yuji Shitanaka, Satoshi Saito,
Yuji Koshiba and Kazuhiro Hishiyama
(Marubeni Shiryo Co., Ltd. and*Ito Ham Inc.)

The objective of this study was to produce blastocysts from follicular oocytes collected from prepubertal heifers by surgery. 12 prepubertal heifers (2-to 6-months-old) were injected with FSH (2 or 3 days; total 10 A.U.) followed by LH (100 i.u.) on the second or third day of FSH injection. Treatment was done once or twice in each heifer. One hundred sixty-three follicular oocytes were collected from 12 heifers with a hypodermic needle. One hundred twenty-six oocytes were used for *in vitro* maturation and fertilization. The medium used for maturation was 25 mM HEPES-buffered TCM-199 supplemented with 5% calf serum and antibiotics. B.O. solution supplemented with 5 mM theophyllin, 1 mg/ml BSA and 5 μg/ml heparin was used for sperm washing and for fertilization. Fertilization was conducted by introducing oocytes into sperm microdrop. After 6 h of fertilization, ova and oocytes were maintained with cumulus cells monolayers for co-culture. 3 frozen-thawed embryos developed into blastocysts and they were transferred to 3 recipient cows.

1. The average number of follicles (diameter: 1-10 mm) of $F_1$ and $F_2$ were lower than those of Holstein heifers.

2. The average number of follicles obtained from the first treatment was 26.0, but nvmber decreased to 16.0 at the second treatment.

3. When FSH was injected for 2-days, average number of follicles was 17.7, but this number was found to increase to 27.6 with a 3-days injection.

4. The percentages of oocytes either degenerated or developed to 2-cell stage after 48 h of IVF were 28.6% and 27.0%, respectively.

5. Three frozen-thawed blastocysts were non-surgically transferred to three recipients (one blastocyst/recipient). Out of 3 recipients, 1 cow became pregnant and gave a birth (Fed. 14, 1990).

The oocyte came from Holstein heifer at 126 days of age.

Supported by Grant from Ito-memorial Foundation.

## 1. 目　的

牛の対外受精の成功例は，1977年に Iritani and Niwa[1] によって報告され，1986年に花田ら[2] が体外成熟・体外受精後ウサギ卵管を用いて得た胚により産子を得ている。

成牛の卵巣より得た卵胞卵子は，体外成熟，体外受精後，同一シャーレ内で卵丘細胞層と共培養することにより脱出胚盤胞期胚にまで発育することが報告されている（梶原ら[3]，1987）。またそれ

© The Ito Foundation

らの胚盤胞期胚は非外科的手法をもって仮親に移植されることで，産子と成り得ることも報告されている（Fukuda et al[4]，1987；Goto et al.,[5] 1988）。

当バイオ技術グループおよび伊藤ハム㈱では，牛体外受精胚を用いたE.T.（受精胚移植）の実用化に向けて研究を進めている。

現在までに114頭の子牛を生産し，実用化への第一歩は踏み出せたと思える。今後の研究方向としてこの体外受精技術をさらに発展させると共に，子牛卵巣から取り出した卵胞卵子を利用することも考えられる。通常牛は11～13ヵ月齢にならなければ，排卵しない。そこで，子齢牛（生後２～６ヵ月齢）の生体より未成熟卵子を外科的に採取し，体外受精胚を生産することで，畜産分野に貢献することが可能であると考えられる。つまり牛の世代間隔を短縮できることにより下記の効果が期待される。

1. 遺伝的改良速度が速くなる
2. 改良にともなう飼育管理費用の経費節減
3. 生産性の良い優良牛（乳牛：乳量・乳質，肉牛：増体・肉質）の子牛の増産
4. 受精生理等，学問上の貢献度が大きい。

この様に子牛の体外受精から培養系の技術開発が確立されれば，経済動物のみならず自然保護の立場から絶滅しつつある野生動物の保護，増殖に貢献が可能と思われる。

## 2. 方　法

子牛（生後２～６ヵ月齢，平均149日齢，７頭，延べ12頭）にFSHを２日間または３日間に分けて総量10 A.U.投与することにより卵巣刺激を行った。FSH投与開始２日目，または３日目の朝，LH（100 units）を投与した。その約３～６時間後に左あるいは右膝部切開を施し，すべての小卵胞（１～10㎜）より卵胞卵子を吸引採取した。

採取卵子は採取卵子数，体外成熟および受精に用いた卵子数（卵丘細胞付着卵子で卵子細胞質が正常と思われる卵子数），退行卵子数に区分した。

採取卵子数は術者のテクニック，その時の種々の条件により影響されるため，吸引採取前の目視により，発育卵胞数を数え，吸引採取後，得られた卵子数を数えた。**Table 1**：供試動物の品種（ホルスタイン種vs. $F_1$および$F_2$種）の違いが発育卵胞数に及ぼす影響，**Table 2**：供試回数（１回目vs. ２回目）が，発育卵胞数に及ぼす影響，**Table 3**：FSH処理日数（２日間 vs. ３日間）が，発育卵胞数に及ぼす影響について検討した。

12頭から得られた163個の卵子のうち，卵子細胞質が良好と思われ，卵丘細胞が付着している卵子126個を体外成熟・体外受精に供試した。その発生成績を**Table 4**に示した。体外成熟・体外受精の方法を以下に記す。

（１）卵　子：供試卵子は子牛卵巣の小卵胞（１～10㎜）から注射針（20～22G）をつけた注射筒にて採取した。卵丘細胞が卵子の周囲に1/2以上付着しており，細胞質が形態的に均一で良好な卵子のみを３回洗浄液で洗浄後，成熟培養に供した。成熟培養は25 mM HEPES緩衝Earle型TCM 199（SIGMA, M-2520，以下TCM 199）に非働化子牛血清５％と抗生物質（アンピシリン，0.1g/$l$，ストレプトマイシン，0.1g/$l$）を添加した。

培養液を作製する水はBarnstead社製の純水装置で作製した。

ポリスチレン製デイシュ（テルモ社製）の各ホールに培養液を2.0m$l$入れ，卵子を投入した。

ミネラルオイル（SQUIBB社製）で表面を覆い，６％ $CO_2$，10％ $O_2$，84％ $N_2$，39℃の条件下の培養器に静置し，18～24時間の成熟培養を行った。

（２）精　子：　人工授精用の凍結精液ストローを温水（32～35℃）にて解凍し，テオフィリン

© The Ito Foundation

（SIGMA, T-1633）5mM, カフェイン（SICMA, C-4144）2mM, BSA（SIGMA, A-4387）1mg/ml, ヘパリン（SIGMA, H-3125）5μg/ml添加したm-B.O.液を加えて遠心操作を行うことで3回洗浄した。

精子濃度は2～3×10⁶個/mlに調整し，35mmのデイッシュ（テルモ社製，細菌用）に100μlのマイクロドロップとし，上面はミネラルオイルで覆って2～3時間の前培養を行った。

（3） 体外受精：前培養終了後，卵子は前述のm-B.O.液，すなわちテオフィリン，カフェイン，BSA，ヘパリンを含むm-B.O.液で2回洗浄後，精子のマイクロドロップに導入し，体外受精を行った。受精6時間後に卵子を発生培地で洗浄し，新鮮な発生培地に移した。発生培地としては子牛血清1％を含む25mM HEPES緩衝TCM 199（抗生物質含）を用いた。容器，培養方法はすべて成熟培養と同じである。

受精78～96時間後にピペッテイングによりシャーレ底面に付着した卵丘細胞層より卵子を遊離した。卵子はさらに卵丘細胞の単層上で継続培養した。培養液は受精後36～72時間毎に新しいものに交換した。

（4） 凍結および移植：体外受精（以下IVF.）後7.5～8.5日目に得られた胚盤胞期胚を米谷ら[6]（1989）の方法により凍結胚を作製した。凍結にはEYELA MPF-40を用いた。

移植は鈴木ら[7]（1987）の方法に従った。凍結胚を解凍後，耐凍剤の除去等の操作なしに発情後6.0～7.0日目の牛子宮内に非外科的に移植した。

## 3. 結果と考察

供試動物の品種の違いが発育卵胞数に及ぼす影響は**Table 1**に示した。

$F_1$および$F_2$種の発育卵胞数（ホルモンに対する応答性）は，平均16.7個とホルスタイン種の平均29.0個に比べて有意（$P<0.01$）に低かった。平均採取卵子数も同様に$F_1$および$F_2$（平均8.5個）は，ホルスタイン種に比べて有意（$P<0.01$）に低かった。ホルスタイン種は人工哺乳の歴史が長いため，強健に選抜されホルモン処理というストレスに対し$F_1$等に比べて強いものと考えられる。

ホルモン処理—外科手術に供試した回数が発育卵胞数に及ぼす影響は**Table 2**に示した。

供試回数1回目の平均発育卵胞数は26.0個であ

**Table 1** 供試動物の品種の違いが発育卵胞数に及ぼす影響

| 品　種 | 供試頭数 | 平均発育卵胞数 | 平均採取卵子数 |
|---|---|---|---|
| ホルスタイン | 5 | 29.0[a] | 20.0[a] |
| $F_1$および$F_2$* | 7 | 16.7[b] | 8.5[b] |

[a, b]：$p<0.01$, Duncan's new multiple range test.
*$F_1$：ホルスタイン♀×黒毛和腫♂
$F_2$：上記$F_1$♀×黒毛和腫♂

**Table 2** 供試回数が発育卵胞数に及ぼす影響

| 供試回数 | 供試頭数（ホルスタインの頭数） | 平均発育卵胞数 | 平均採取卵子数 |
|---|---|---|---|
| 一回目 | 7( 3) | 26.0 | 15.5 |
| 二回目 | 5( 2) | 16.0 | 10.8 |

Differences are not significant by Duncan's new multiple range test ($p<0.01$).

© The Ito Foundation

ったが，供試回数２回目の平均発育卵胞数は16.0個と低下した。

同様に供試回数１回目の平均採取卵子数は15.5個であったが，供試回数２回目の平均採取卵子数は10.8個と低下した。ホルスタインの供試頭数（全供試頭数に占める割合）は１回目３頭（40%），２回目２頭（40%）と同様の比率で含まれているため，品種の違いによるホルモン応答性は考慮しなくても良いと考えられる。供試２回目の平均発育卵胞数，平均採取卵子数が低下したのはホルモン処理―外科手術による卵胞卵子の吸引操作等により卵巣組織がかなりダメージを受けたことに起因すると思われる。

成牛では過剰排卵処理を繰り返すことにより，卵巣反応が低下することは多く報告（Hafez et al.,[8] 1965; Laeter et al.,[9] 1971; Betteridge and Mitchell.,[10] 1974）されている。過剰排卵処理の繰り返しによる卵巣反応の低下は，ホルモンに対する抗体産生によるためと示唆する報告が多いが，そうではないという報告（Gordon,[11] 1982）もある。

本研究において，ホルモン注射時，注射後に子牛が軟便をすることが多く見うけられた。連続して２～３日間注射を打つことにより，かなりのストレスを受けたのではないかと考えられる。山海ら[12]（1987）のウサギを使った報告で，持続的に作用させる目的で FSH をグリセリンと混ぜることにより，注射回数を減じることが可能だとしている。この方法により少ない注射回数でストレスを少なくすることが可能であろう。

FSH 処理日数（２日間 vs. ３日間）の違いが発育卵胞数に及ぼす影響は **Table 3** に示した。２日間で FSH を 10 A. U. 投与した場合，平均発育卵胞数は17.7個であったが，３日間で FSH を同量（10 A.U.）投与した場合，平均発育卵胞数は27.6個と有意（$P<0.01$）に増加した。

同様に２日間で投与した場合，平均採取数は10.8個であったが，３日間で投与した場合，平均採取数は17.4個と有意（$P<0.01$）に増加した。これは，３日間投与の区で，ホルモン処理に良好に反応するホルスタインの供試頭数の比率が高かったのが主因であると思われる。しかし注射回数が増加することが，より大きなストレスとなるとしても仔牛卵巣に対する２日間の FSH 投与より３日間の投与の方が効果が大きかったと思われる。

体重 500～600kg の成牛において通常28～36 A. U. の FSH を投与するので，体重100kg程の子牛に対する 10 A. U. という量は多すぎたとも考えられるが，同様の実験において塩谷，大田ら[13]（1986，および私信）は36 A. U. を子牛に投与し

**Table 3**　ＦＳＨ処理日数が発育卵胞数に及ぼす影響

| 処理日数 | 供試頭数（ホルスタインの頭数） | 平均発育卵胞数 | 平均採取卵子数 |
|---|---|---|---|
| 二日間 | 7( 2) | 17.7[a] | 10.9 |
| 三日間 | 5( 3) | 27.6[b] | 17.4 |

[a]，[b]：$p<0.01$，Duncan's new multiple range test.

**Table 4**　外科手術によって得た卵胞卵子のＩＶＦ．後の発生成績

| IVF. 48h 後における退行卵子率 | ２細胞期以上に発育した卵子率 | 桑実胚期以上に発育した胚率 | 胚盤胞期以上に発育した胚率 |
|---|---|---|---|
| 28.6(36/126) | 27.0(34/126) | 2.4(3/126) | 2.4(3/126) |

© The Ito Foundation

Table 5　外科手術－ＩＶＦ．後に得られた胚盤胞期胚の受胎成績

| 借腹牛番号 | 発情日 | 移植日 | 借腹牛 day[1] | 胚 day[2] | 結　果 |
|---|---|---|---|---|---|
| 108 | 89.5.9 | 89.5.15 | 6.0 | 7.5 | 不　妊 |
| 64 | 89.5.8 | 89.5.15 | 7.0 | 8.5 | 不　妊 |
| 78 | 89.5.8 | 89.5.15 | 7.0 | 8.5 | 妊娠 1990.2.14分娩 ♀45kg |

[1] 発情日から移植日までの日数
[2] ＩＶＦ．から凍結時点までの日数

ているので，10 A.U. が多量であったとは思えない。

**Table 4** に外科手術によって得た卵胞卵子の IVF. 後の発生成績を示した。生体から得た卵胞卵子の IVF. 後48時間目における退行卵率は 28.6％（36/126）と比較的高かった。IVF. 後48時間目における２細胞期以上に分割した卵子率は27.0％（34/126）と比較的低かった。また，桑実期胚，胚盤胞期胚に発育した率はいづれも2.4％(3/126)と低かった。

外科手術により卵子を得る際，血液が混入することが多く，その凝固防止のため多量のヘパリンを加えざるを得なかった。この血液とヘパリンが卵子の正常な成熟分裂・受精に影響し，発生成績を悪くしたのではないかと考えている。

本実験によって得られた凍結胚盤胞期胚の移植・分娩結果は **Table 5** に示した。３頭のホルスタインの受胚牛にそれぞれ１個ずつ移植し，１頭の子牛が得られた。４月26日現在，順調に生育している。これは生後 126 日齢のホルスタイン子牛から得られた卵子によるものであり，性成熟以前の子牛卵巣の卵胞卵子から子牛を得た例としては，希なケースと思われる。この成功例は幸運に助けられたものであり，さらに研究を進めていく予定である。

## 4. 要　約

子牛（生後２～６ヵ月齢）の生体より未成熟卵子を外科的に採取し，体外受精胚を生産することを目的とした。

子牛（延べ12頭）に FSH を投与した。FSH 投与開始２日目，または３日目の朝，LH を投与後，左あるいは右腰部切開を施し，卵巣から卵胞卵子を吸引採取した。163個の卵子の内，126個を体外成熟・体外受精に供試した。卵子を前培養の終了した精子のマイクロドロップに導入し，体外受精を行った。受精６時間後に卵子を発生培地に移し，卵丘細胞の単層上で体外培養を行った。体外培養により得られた胚盤胞期胚を凍結－解凍後，牛子宮内に直接移植した。

主なる結果は次のとおりであった。

(1) $F_1$ および $F_2$ 種の平均発育卵胞数は，ホルスタイン種に比べて低かった。平均採取卵子数も同様に低かった。

(2) 供試回数１回目の平均発育卵胞数は26.0個であったが，供試回数２回目の平均発育卵胞数は16.0個と低下した。

(3) ２日間で FSH を 10 A.U. 投与した場合，平均発育卵胞数は17.7個であったが，３日間で投与した場合，27.6個と増加した。

(4) IVF. 後48時間目における退行卵率は 28.6％と高く，２細胞期以上に分割した卵子率は27.0％と低かった。桑実期胚，胚盤胞期胚に発育した率はいづれも2.4％と低かった。

(5) ３頭のホルスタインの受胚牛にそれぞれ１個ずつ移植し，１頭の子牛が得られた。これ

© The Ito Foundation

は生後126日齢のホルスタインから得られた卵子による。

本研究の開始・遂行に際して，岡山県中央牧場，兵庫県村田牧場，兵庫県佐用幸友ファーム，岡山県中央農業協同組合の方々にご協力頂きましたことを感謝いたします。

本研究を援助して頂きました財団法人伊藤記念財団および伊藤ハム㈱関係者各位に深く謝意を表します。

**文　献**

1) Iritani and Niwa, J. Reprod. Fert., 50：119-121. 1977
2) 花田，塩谷，鈴木，第78回日本畜産学会大会講演要旨 p. 18. 1986
3) 梶原，後藤，小坂，中西，小川：家畜繁殖学雑誌 Vol. 33, No. 4. 173-180, 1987
4) Fukuda Y, Ichikawa M, Naito K, Toyoda Y, 11 th Int. Congr. Anim Reprod. 3：327, 1988
5) Goto K, Kajihara Y, Kosaka S, Koba M, Nakanishi Y, Ogawa K, J. Reprod. Fert., 83：753-758, 1988
6) 米谷，梶原，小林，下中，斉藤，小柴，菱山，白岩第82回日本畜産学会大会講演要旨 p. 115. 1989
7) 鈴木，松田，酒井，石田：1978年度日本獣医師学会 p. 203. 1987
8) Hafez, ESE. et al., Acta Endocrinol., Suppl. 102, p. 5-43. 1965
9) Laster DB, J. Anim. Sci. 33, p. 443-449. 1971
10) Betteridge KJ and Mitchell D, Theriogenology 1, p. 69-82. 1974
11) Gordon I, Mammalian Egg Transfer p. 63-80, CRC Press Inc, Frorida. 1982
12) 山海，井口，金山，遠藤，佐久間：第79回日本畜産学会大会講演旨 p. 32. 1987
13) 塩谷，大田，上田，斉藤，桑山，花田：第70回家畜繁殖学会大会講演要旨 p. 14. 1986

© The Ito Foundation

# 牛，豚およびイノブタ卵巣の効率的利用，とくに卵胞卵の保存法の開発に関する研究

Effective Utilization of the Ovary of Cows, Pigs and the Crossbreds of Pig× Wild Boar with reference to the Development of Oocyte Preservation

宮本　元・佐藤英明（京都大学農学部）

Hajime Miyamoto and Eimei Sato (Faculity of Agriculture, Kyoto Uriversity)

The present study was carried out to clarify the tolerance of oocytes of cows, pigs and the crossbreds of pig × wild boar toward cooling to temperatures above freezing or to −196℃. Oocytes at the germinal vesicle stage were recovered from ovarian follicles. When cow oocytes were frozen to −196℃, the proportion of oocytes matured to metaphase II during culture was 2.4～3.6% in the presence of glycerol and 5.9～11.2% in DMSO. When pig oocytes were cooled to 30, 20, 10 and 0℃ without the cryoprotectant, the survial rate was 47.7, 21.5, 0 and 0%, respectively. The similar results were observed in the presence of DMSO. Pig oocytes could not survive freezing to −196℃. After vitrification at −196℃, the survival rate was 12.7% for cow oocytes and 0% for pig oocytes. The oocytes of the crossbred of pig × wild boar did not survive cooling to 10℃. These results show that cow oocytes survive freezing and the oocytes of pig and the crossbred of pig × wild boar can not survive cooling to 0～10℃ and freezing. It seems that there are differences between species in the responses of oocytes to cooling and freezing.

## 1. 目　的

卵子になりうる卵巣中の卵細胞（卵母細胞）数は，出生後はほとんど増加せず出生時でほぼ決まっている。出生時における各家畜の卵細胞数は，両側卵巣あわせて数十万個であるが，これらのうち成熟し排卵にいたるものは牛で200個以下であり，大部分の卵細胞は個体に発生する機会を得ることなく退行閉鎖する。

今日，多数の卵細胞を含んだ卵巣はすべて廃棄されている。したがってこれらの潜在的卵細胞をいかに有効に利用するかが家畜の効率的な改良・増殖にとって重要な問題である。本研究は，ほとんどが利用されず廃棄処分されている卵巣中の卵細胞の液状保存または凍結保存を確立して，卵巣を有効利用することを目的としている。

現在，胚の凍結保存は牛をはじめ大部分の家畜および実験動物で実現している[1～4]。これに対して豚胚の凍結保存はいまだ成功例はなく，0～10℃に冷却しただけで胚は死滅する[5～8]。

一方未受精卵の凍結保存はマウス[9,10]およびハムスター[11,12]で報告されている。これらはいずれも過排卵処理をして排卵した卵子，すなわち第二成熟分裂中期の卵子を用いている。これに対して家畜の未受精卵の凍結保存の成功例はない。

家畜卵巣の卵胞内に含まれる卵細胞すなわち卵

© The Ito Foundation

胞卵は，と場で入手した卵巣から容易にしかも多数採取できる。そこで牛および豚卵胞卵を0℃付近に冷却するか－196℃に凍結して，その後の生存性の可能性について検討した。イノシシと豚の交雑であるいわゆるイノブタの卵巣を10℃付近に冷却して，卵胞卵の生存性を検討した。

## 2. 方　法

と場に出荷された牛（黒毛和種，年齢不明）および豚（ランドレース種，6～8ヵ月齢）の卵巣を用いた。と殺後30分以内に卵巣を摘出し，魔法瓶中の30～35℃の生理食塩水に浸漬して実験室に持ち帰った。一部の実験ではイノブタ（24～36ヵ月齢）卵巣も使用した。

牛および豚卵巣表面に付着している血液や脂肪組織片などをろ紙で除き，生理食塩水で数回洗浄後卵巣を時計皿にのせた。加熱した牛胎児血清を20% 含む修正 Dulbecco リン酸緩衝液（血清加PBS：浮遊液）を数 m*l* 時計皿に入れ，30～35℃下で直径2～5㎜の卵胞を解剖針で破り，卵核胞期の卵胞卵を採取した。血清加 PBS を 0.2m*l* 含む小試験管（10×100-㎜）中に15～30個の卵胞卵を移した。サンプルを0.5℃／分の速度で0～20℃に冷却した。対照として，30～35℃下で卵胞から採取した卵子を冷却せずにただちに培養した。

卵胞卵を凍結する場合には，凍害保護物質として1～1.5Mグリセリンまたは1～1.5Mジメチルスルフォキサイド（DMSO）を添加した。－7℃まで1℃／分で冷却し，同温度で植氷した後10分間保った。その後0.3～0.5℃／分で－40℃に冷却後，サンプルを－196℃の液体窒素中へ浸漬した。融解は40℃の温水中でおこなった。

イノブタ卵巣については，卵巣を30または10℃に0～12時間保った後，卵胞卵を採取して培養した。

一部の実験では牛および豚卵胞卵を超急速冷却し，氷晶を形成せずいわゆるガラス化状態で－196℃で保存した[13,14]。ガラス化液は修正 Dulbecco リン酸緩衝液を基本液とし，20% DMSO, 15.5% アセトアミド，10%プロピレングリコールおよび6%ポリエチレングリコールを含む混合液である[13,14]。－196℃に冷却，融解および保護物質を除去した[13,14]後に培養した。

各温度に冷却後または凍結後37℃，炭酸ガス5%空気95%に調整した炭酸ガス培養器内で卵子を培養した。なお培養液として，牛胎児血清(20%)加の修正 Krebs-Ringer bicar bonate 液[15] を用いた。40～43時間の培養後に卵子をとり出し，酢酸・エタノール（1：3）で4～7日間固定し，酢酸オルセインで染色後に検鏡した。培養によって，卵核胞期から第2成熟分裂中期に移行した卵子を数えた。実験は2～6回くり返して行い，結果の有意性を $\chi^2$ 検査で調べた。

## 3. 結果と考察

### 3.1 牛卵胞卵の凍結

牛卵胞卵を0.3～0.5℃／分で－40℃に冷却後，－196℃の液体窒素へ浸漬した。凍結融解後の牛裂中期へ移行した割合を**表1**に示した。凍害保護物質を添加しないときには卵胞卵は死滅した。しかし1～1.5Mのグリセリンおよび DMSO の存在下で2.4～3.6%および5.9～11.2%が第2成熟分裂中期へ移行し，低率ではあるが牛卵胞卵が生存した。グリセリンと DMSO の間には牛卵胞卵の凍結に対する有効性に差はみられなかった。
卵の凍結に対する有効性に差はみられなかった。

### 3.2 豚卵胞卵の冷却と凍結

豚卵胞卵を0～20℃に冷却しこの温度に60分間保った後，または－196℃に凍結後に卵核胞期から第2成熟分裂中期へ移行した割合を検討した。成績をそれぞれ**表2**と**表3**に示した。

保護物質を加えずに30（対照），20，10，0℃に

© The Ito Foundation

表1　−196℃に凍結後，培養によって卵核胞期から第2成熟分裂中期へ移行した牛卵胞卵の割合

| 凍害保護物質 | 凍結，融解後に回収された卵胞卵の数 | 卵核胞期から第2成熟分裂中期へ移行した卵胞卵数(%) |
|---|---|---|
| 無添加 | 66 | 0( 0) |
| 1Mグリセリン | 110 | 4( 3.6) |
| 1.5Mグリセリン | 83 | 2( 2.4) |
| 1M DMSO | 89 | 10(11.2) |
| 1.5M DMSO | 102 | 6( 5.9) |

表2　各温度へ冷却，保持後，培養によって卵核胞期から第2成熟分裂中期へ移行した豚卵胞卵の割合

| 保護物質 | 冷却温度(℃) | 保持時間(分) | 冷却，保持後に回収された卵胞卵の数 | 卵核胞期から第2成熟分裂中期へ移行した卵胞卵の数(%) |
|---|---|---|---|---|
| 無添加 | 30 | 0 | 88 | 42(47.7) |
| | | 60 | 75 | 31(41.3) |
| | 20 | 0 | 93 | 20(21.5) |
| | | 60 | 95 | 2( 2.1) |
| | 10 | 0 | 74 | 0( 0) |
| | | 60 | 80 | 0( 0) |
| | 0 | 0 | 51 | 0( 0) |
| 1M DMSO | 30 | 0 | 65 | 29(44.6) |
| | | 60 | 48 | 17(35.4) |
| | 20 | 0 | 47 | 8(17.0) |
| | | 60 | 65 | 1( 1.5) |
| | 10 | 0 | 49 | 0( 0) |
| | | 60 | 44 | 0( 0) |
| | 0 | 0 | 52 | 0( 0) |

表3　−196℃に凍結後，培養によって卵核胞期から第2成熟分裂中期へ移行した豚卵胞卵の割合

| 保護物質 | 凍結，融解後に回収された卵胞卵の数 | 卵核胞期から第2成熟分裂中期へ移行した卵胞卵数(%) |
|---|---|---|
| 無添加 | 41 | 0(0) |
| 1M グリセリン | 63 | 0(0) |
| 1M DMSO | 58 | 0(0) |

© The Ito Foundation

冷却直後の第２成熟分裂中期への移行率は47.7，21.5，0，0％であった。10および０℃に冷却すると豚卵胞卵は死滅した。このとき30および20℃に60分間保ったときの移行率は41.3および2.1％であり，これらの温度に60分間維持することによって生存率が低下したが，20℃においてとくにその傾向が大きかった。

凍害に対する保護物質である DMSO を添加した場合，30（対照），20，10，0℃に冷却直後の移行率は44.6，17.0，0，0％であり，無添加のときと同じ傾向がみられ，DMSO の添加効果はなかった。

**表３**に示すように，保護物質無添加または１M グリセリン，1M DMSO の存在下で豚卵胞卵を－196℃に凍結すると，いずれの場合も卵核胞期から第２成熟分裂中期へ移行した卵胞卵はなく，卵は生存できなかった。

3.3　牛および豚卵胞卵の－196℃におけるガラス化

氷晶を形成せずガラス化状態で－196℃に冷却された牛および豚卵胞卵の生存性を調べた（**表４**）。培養によって卵核胞期から第２成熟分裂へ移行した牛卵胞卵は12.7％であり，豚卵胞卵は０％であった。ガラス化状態で－196℃に保ったときの卵の生存性は，**表１**，**３**に示した従来の凍結方法によって得られたものと同様であった。

3.4　イノブタ卵巣の冷却

イノブタ卵巣を30～10℃に冷却し，これらの温度に０～12時間保ったときのイノブタ卵胞卵の生存性を調べた（**表５**）。卵巣を30℃（対照）に０および10～12時間保ったときのイノブタ卵胞卵の第２成熟分裂中期への移行率は，それぞれ61.0および7.9％であった。これに対して10℃に冷却すると，その直後および10～12時間保持後には卵胞卵は死滅した。

本研究の成績から，牛の卵胞中に含まれる卵母細胞すなわち牛卵胞卵は－196℃に凍結しても生存できることが明らかになった。これに対してブタおよびイノブタ卵胞卵は０～10℃に冷却するだけで死滅することも明らかになった。

マウス[9,10]およびハムスター[11,12]では排卵した第２成熟分裂中期の未受精卵を凍結保存するこ

表４　超急速冷却によって－196℃でガラス化状態にした後の牛および豚卵胞卵の生存性

| 動物種 | －196℃に冷却後に回収された卵胞卵の数 | 培養によって卵核胞期から第２成熟分裂中期へ移行した卵胞卵の数（％） |
|---|---|---|
| 牛 | 63 | 13(12.7) |
| 豚 | 57 | 0(　0) |

表５　イノブタ卵巣を各温度へ冷却，保持後，培養によって卵核胞期から第２成熟分裂中期へ移行したイノブタ卵胞卵の割合

| 冷却温度（℃） | 保持時間（時間） | 冷却，保持後に回収された卵胞卵の数 | 卵核胞期から第２成熟分裂中期へ移行した卵胞卵の数（％） |
|---|---|---|---|
| 30 | 0 | 41 | 25(61.0) |
| | 10-12 | 38 | 3( 7.9) |
| 10 | 0 | 45 | 0(　0) |
| | 10-12 | 37 | 0(　0) |

© The Ito Foundation

とが可能である。牛卵胞卵も凍結保存後も生存している（本研究）。これらの動物種に比べ豚卵胞卵は10℃に冷却しただけで死滅することから，ブタ卵胞卵は冷却処理にきわめて弱いと思われる。

豚の８細胞胚と胚盤胞を15～20℃に冷却すると胚は生存性を維持できるが，０～10℃に冷却すると豚胚は生存できなかった[5~8]。豚の卵胞卵および胚が他の動物種に比べて冷却に弱い原因は明らかでない。しかし豚の卵胞卵と胚には多量の脂質が含まれていて，冷却と加温の間に細胞内の脂質が流出することが観察されているので，細胞膜の脂質構成が原因の一つではないかと推察されている[1,8]。

本研究では，冷却または凍結後の卵胞卵を培養して，卵核胞期から第２成熟分裂中期へ移行するか否かを検討した。今後は第２成熟分裂中期へ移行した卵を体外受精して，その後の胚，子どもへの発生能を検討することが必要である。牛の卵胞卵の凍結は可能なので，これらの卵を用いて子牛を得ることができれば牛の改良・増殖が期待できる。

## 4. 要　約

牛，豚およびイノブタの卵核胞期の卵胞卵を，０～10℃に冷却または－196℃に凍結したときの生存性を明らかにするために本研究を行った。牛卵胞卵を－196℃に凍結後，培養によって卵核胞期から第２成熟分裂中期へ移行した割合は，グリセリン存在下で2.4～3.6%，DMSO存在下で5.9～11.2%であった。卵核胞期の豚卵胞卵を凍害保護物質なしで30（対照），20，10，0℃に冷却した直後の，培養による第２成熟分裂中期への移行率は47.7，21.5，0，0%であり，0～10℃への冷却によって死滅した。これはDMSOを添加しても同じ傾向であった。豚卵胞卵は－196℃に凍結すると死滅した。氷晶を形成せずガラス化状態で－196℃に冷却すると，牛および豚卵胞卵の生存率はそれぞれ12.7%と０%であった。イノブタ卵胞卵は10℃に冷却すると生存できなかった。これらの成績から，牛卵胞卵は凍結後も生存するが，豚およびイノブタ卵胞卵は０～10℃で死滅し冷却処理にきわめて弱いことが明らかになった。

### 文　献

1) Polge, C. (1977) The freezing of mammalian embryos: perspectives and possibilities. In The Freezing of Mammalian Embryos (Elliott, K. and Whelan, J., eds.), 3-13. Elsevier/Excerpta Medica, Amsterdam.
2) Whittingham, D. G. (1980) Low Temperature Preservation in Medicine and Biology (Ashwood-Smith, M. J. and Farrant, J., eds.), 65-83. Pitman Medical, London.
3) 内海恭三（1984）哺乳動物卵子の凍結と移植．日本畜産学会報55：523-534.
4) Polge, C. (1985) How does embryo manipulation fit into present and future pig reproduction ?. J. Reprod. Fert., Suppl. 33：93-100.
5) Wilmut, I. (1972) The low temperature preservation of mammalian embryos. J. Reprod. Fert. 31：513-514.
6) Polge, C., Wilmut, I. and Rowson, L. E. A (1974) The low temperature preservation of cow, sheep and pig embryos. cryobiology. 11：560.
7) Polge, C. and Willadsen, S. M. (1978) Freezing eggs and embryos of farm animals. Cryobiology 15：370-373.
8) Polge, C. (1982) Embryo transplantation and preservation. In Control of Pig Reproduction (Cole, D. J. A. and Foxcroft, G. R., eds.), 277-291. Butterworths, London.
9) Whittingham, D. G. (1977) Fertilization in vitro and development to term of unfertilized mouse oocytes previously stored at －196℃. J. Reprod. Fert. 49：89-94.
10) Nakagata, N. (1989) High survival rate of unfertilized mouse oocytes after vitrification. J. Reprod. Fert. 87：479-483.
11) Tsunoda, Y., Parkening, T. A. and Chang, M. C. (1976) In vitro fertilization of mouse and hamster eggs after freezing and thawing. Experientia 32：223-224.
12) Quinn, P., Barros, C. and Whittingham, D. G. (1982) Preservation of hamster oocytes to assay

© The Ito Foundation

the fertilizing capacity of human spermatozoa. J. Reprod. Fert. 66 : 161-168.

13) Rall, W. F. and Fahy G. M. (1985) Ice-free cryopreservation of mouse embryos at −196℃ by vitrification. Nature 313 : 573-574.

14) 河野友宏，角田幸生（1987）ガラス化急速凍結法によるマウス初期胚の生存性および移植試験。家畜繁殖学会誌，33 : 77-81.

15) Whittingham, D. G. (1971) Culture of mouse ova. J. Reprod. Fert., Suppl. 14 : 7-21.

© The Ito Foundation

# ブタ生殖腺刺激ホルモン遺伝子の構造

Molecular Cloning of Porcine Gonadotropin Genes

加藤幸雄（群馬大学内分泌研究所）

Yukio Kato (Institute of Endocrinology, Gunma University)

To elucidate the molecular mechanism of expression of gonadotropin genes, the genes encoding the porcine glycoprotein hormone subunit (common$\alpha$, FSH$\beta$ and LH$\beta$) were isolated from a porcine genomic library constructed in EMBLE 3 using cDNAs previously cloned. The nucleotide sequences of LH$\beta$ gene consisted of 3 exons and 2 introns. In the 5'-untranslated region, several consensus regulatory elements, AP2, GC-box and CACCC-box, were present as well as TATA-box and CAATT-box. Periodical presence of GC-box and CACCC-box were characteristic. The nucleotide sequence of FSH$\beta$ gene consisted of 4 exons and 3 introns. In the 5'-untranslated region, AP-1 and AP-2 were present. Part of common $\alpha$ gene including vicinity of the transcription start site was determined. Two sequences homologous to a consensus cAMP-responsive element were present. These three glycoprotein hormone subunit genes thus showed dissimilarity in the 5'-flanking regions. This fact corresponds to that three genes are expressed differentially in the same pituitary cell.

## 1. 目　的

下垂体で合成・分泌される２種のタンパク質（FSH と LH）は，生殖器官での配偶子形成に係わるホルモンであり，機能は互いに関連している。両者とも２種のサブユニット（$\alpha$鎖と$\beta$鎖）からなり，$\alpha$鎖は FSH と LH に共通で，$\beta$鎖は異なり[1]，おのおの遺伝子は１つである。視床下部の因子や生殖腺で産生されるステロイドホルモンなどにより合成・分泌が両ホルモンともに同じような調節を受けているが，性周期中の３種のサブユニット mRNA の変動が異なることや，一方のホルモンのみを調節する因子の存在が報告されている。一体，１つしかない$\alpha$鎖の遺伝子と異なる$\beta$鎖の遺伝子の発現調節が同じ細胞内で，どのような仕組で行なわれているのだろうか。本研究課題では，ホルモンの遺伝子の構造解析を通じて，発現調節に係わる分子機構を明らかにする。

## 2. 方　法

ブタ下垂体ホルモン遺伝子のクローニング：ファージベクター EMBL 3 に組込んだブタ遺伝子ライブラリー（$10^6$プラーク）より，既に我々がクローニングした生殖腺刺激ホルモンの cDNA インサート[3~6]をアイソトープ標識したプローブを用いて$\alpha$鎖，LH$\beta$鎖，FSH$\beta$鎖遺伝子クローンを順次スクリーニングした。それぞれのクローンは，制限酵素を用いた簡単な遺伝子地図を作成し，ホルモンのコーディング領域を含む断片の同定を行なった。ゲノムクローンの断片をプラスミドベクターに組込み，サブクローンを作成した。それらのサブクローンについてサンガー法により塩基

© The Ito Foundation

配列決定を行なった[7]。とくに，調節領域に近接するcDNAの5'非翻訳部分は，プライマーエクステンション法により作成したプローブにより同定した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 ブタ生殖腺刺激ホルモン遺伝子のクローニングと構造

ブタ下垂体前葉のcDNAライブラリーの調製およびその結果については，既報のごとくである[3~6,8]。およそ100万のプラークより，α鎖について4つ，LHβ鎖について3つ，FSHβ鎖について2つのゲノムクローンを得た。制限酵素を用いた簡単な遺伝子地図を作成し，ホルモンのコーディング領域を含む断片の同定を行なった(**図1**)。いままでの実験結果から，コーディング領域は，ウシやヒトで知られているものとほぼ同じ位置で介在配列（イントロン）により分断されていることが判った。

### 3.2 ブタ生殖腺刺激ホルモンLHβ鎖遺伝子の塩基配列

全長2756塩基よりなるLHβ鎖遺伝子の塩基配列を**図2**に示す。遺伝子は，3つのエクソンと2つのイントロンからなる。第1エクソンは，7塩基の短い非翻訳領域とシグナルペプチドの一部（5残基）からなる。第2エクソンは，シグナルペプチド（−15）から＋41までをコードし，第3エクソンは残りのペプチド部分および3'非翻訳領域をコードしていた。

遺伝子の転写開始位置より5'上流に，転写開始のシグナルであるTATA-box（−30）とCAATT-box（−369と−443）がある。また，図中に示したごとく，転写の調節に係わる各種の配列が存在していた。その特長は，ステロイドホルモン受容体が結合する配列がなく，膜の情報伝達系（cAMPおよびProtein kinase C）に応答するAP-2が4箇所存在している。そのほか転写活性を促進するといわれるGC-boxやCACCC-boxが周期的な配置をしており，興味深いことに，これらの配列は，イントロンや3'非翻訳領域にも存在していた。

### 3.3 ブタ生殖腺刺激ホルモンFSHβ鎖遺伝子の塩基配列[10]

全長10，172塩基よりなるFSHβ鎖遺伝子の塩基配列を**図3**に示す。遺伝子は，4つのエクソンと3つのイントロンからなる。第1エクソンは，33塩基の非翻訳領域からなり，第2エクソンは非翻訳領域，20残基のシグナルペプチドと分泌型ホルモンの一部（33残基）からなる。第3エクソンは残りのホルモン部分および3'非翻訳領域をコ

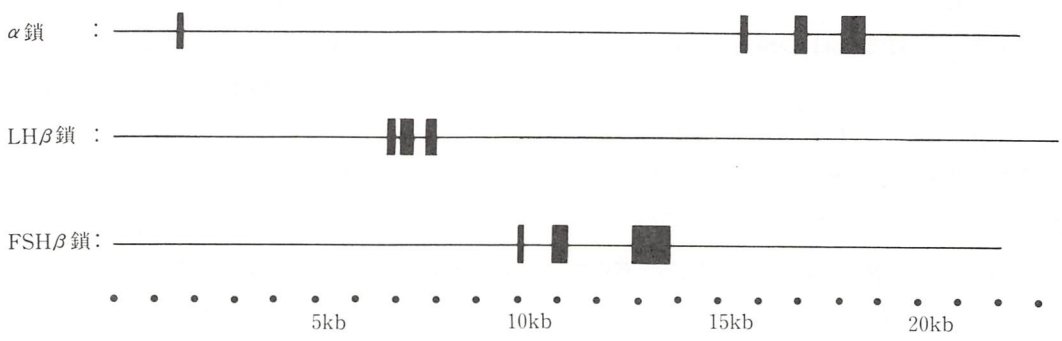



**図1**　ブタ生殖腺刺激ホルモンサブユニットの遺伝子地図
EMBL 3に組込んだゲノムライブラリーよりスクリーニングしたα鎖，LHβ鎖，FSHβ鎖クローンについて，制限酵素の切断位置，および同定したエクソン（黒四角）の大まかな位置を示してある。

© The Ito Foundation

ードしていた。

この遺伝子の5'上流領域にはLHβ鎖遺伝子と同じように転写開始のシグナルであるTATA-boxが，転写開始位置より−32にある。また，図中に示したごとく，転写の調節に係わる各種の配列が存在していた。その特長は，5'上流の6kbにわたりステロイドホルモン受容体が結合する配列がなく，膜の情報伝達系（cAMP および Protein kinase C）に応答するAP-1とAP-2が，それぞれ7および5箇所にあった。LHβ鎖遺伝子に存在した，GC-boxやCACCC-boxはなかった。

### 3.4　ブタ生殖腺刺激ホルモンα鎖遺伝子の塩基配列[11]

α鎖遺伝子の全塩基配列決定を現在進めており，**図4**には転写開始点部分を含む5'上流領域の一部を示した。第1エクソンは，94塩基の非翻訳領域のみからなる。転写開始点より5'上流−144と−216には，ヒトα鎖遺伝子で近接した2箇所に同

**図2**　ブタ生殖腺刺激ホルモンLHβ鎖遺伝子の塩基配列

アミノ酸配列を塩基配列の下に，mRNAをコードするエクソンの領域を上線で示した。TATA-boxとAATAAA-boxを波線で示した。cDNAのデータと異なる塩基およびギャップの位置をその塩基名と▲で示した。

© The Ito Foundation

定されているcAMP依存結合タンパク質(CREB)の結合配列（CRE）とくらべ，８塩基中１塩基が違う配列がヒトα鎖遺伝子と同様に２箇所存在している。しかし，その間隔はヒトα鎖遺伝子のものと異なる。ブタα鎖遺伝子上のCRE類似配列は，実は，先に述べたLHβ鎖とFSHβ鎖遺伝子におのおの１箇所ある。興味深いことに２つのα鎖のCRE類似配列には，それぞれ１つのAP-1類似配列が近接していた。

３種の生殖腺刺激ホルモンサブユニットの遺伝子は，発現調節に係わると思われる5'上流域に必ずしも高い相同性を示さない。このことは，同じ細胞内で合成されるサブユニットが，mRNAレベルで性周期中に必ずしも同じ変動のしかたを示

© The Ito Foundation

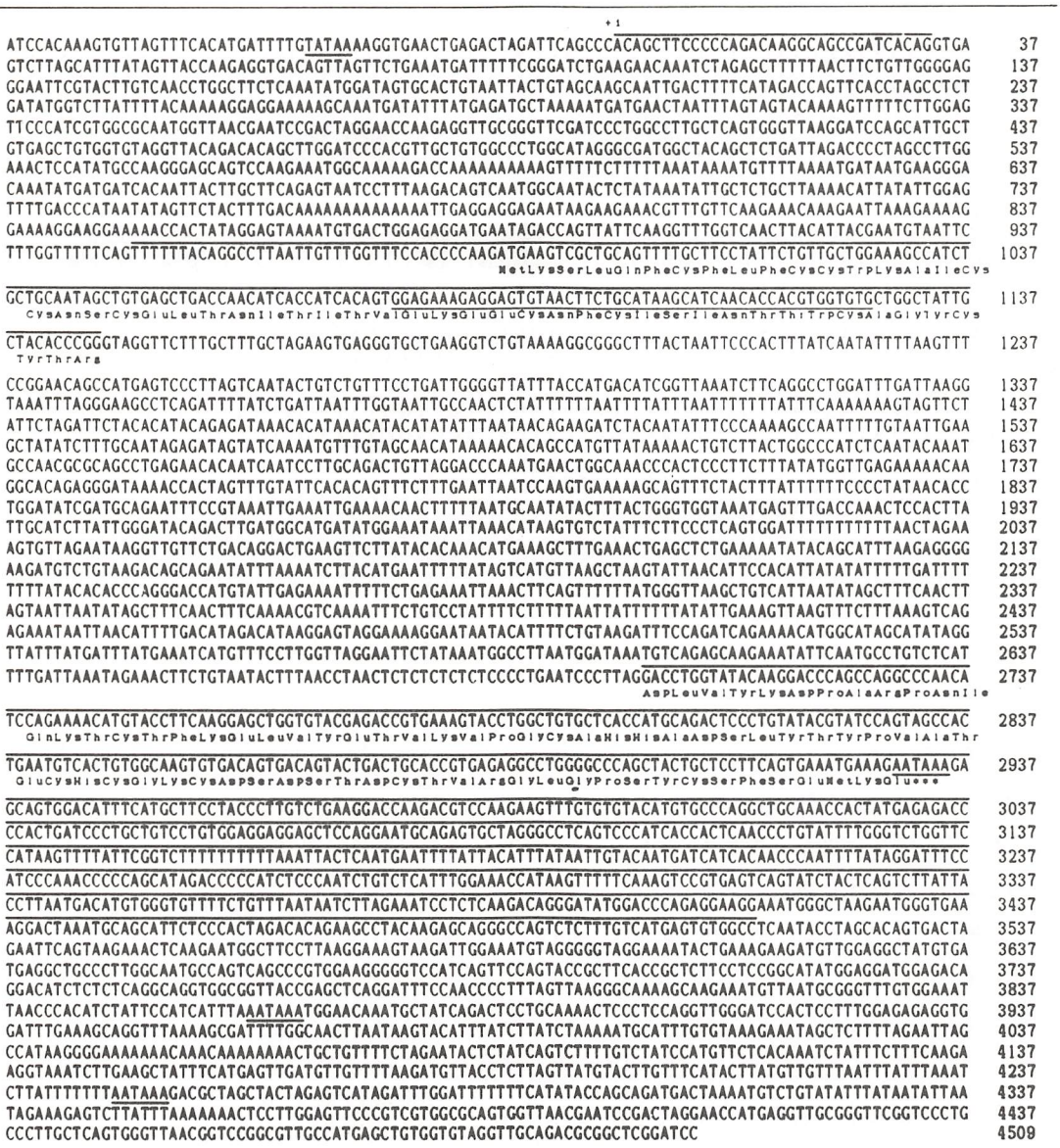


図 3　ブタ生殖腺刺激ホルモン FSHβ鎖遺伝子の塩基配列

アミノ酸配列を塩基配列の下に，mRNA をコードするエクソンの領域を上線で示した。TATA-box と AATAAA-box を下線で示した。発現調節に係わると思われる塩基配列を，その配列の略号と波線，下線，二重下線などで示した。

さないという報告に合致する。視床下部や生殖腺組織からの因子によるシグナルが下垂体細胞に伝わる時，生殖腺刺激ホルモン遺伝子上のどのような構造と，どのような転写調節因子が相互作用し，遺伝子の発現調節を行なっているかは今後の課題である。

## 4. 要　約

ブタ生殖腺刺激ホルモン LH と FSH は，共通のα鎖と異なるβ鎖を持ち，性周期の異なる時期に機能する。その遺伝子発現の調節機構を知る目的で，ブタの3種のサブユニット（α，FSHβ，LHβ）をコードする遺伝子をクローニングし，塩

© The Ito Foundation

**図 4** ブタ生殖腺刺激ホルモンα遺伝子の塩基配列
5' 上流域と第1エクソンの一部分を示した。TATA-box と CCAAT-box を枠で囲った。CRE と AP-1 に類似の配列を反転字で表わした。

基配列を決定した。3種のサブユニット遺伝子の発現調節に係わると思われる5' 上流域は，塩基配列における相同性が低く，既知の調節配列がそれぞれの遺伝子中に異なる様式で存在していた。この事実は，生殖腺刺激ホルモンサブユニット合成の調節は，共通の細胞外調節因子を持つにもかかわらず，遺伝子レベルでは異なる調節配列を介して行なわれていることを意味する。

本研究の一部は(財)伊藤記念財団研究助成および水産庁受託研究費によって行なわれたものであり，記して謝意を表します。この研究の内容は平井俊朗博士，江指俊彦氏，富澤恭子氏，加藤たか子博士の研究協力によるものです。

## 文 献

1) Pierce, J.G., and Parsons, T.F. Annu. Rev. Biochem. 50, 465-495, 1981.
2) Liu, Y.C., Kato, Y., Inoue, K., Tanaka, S., and Kurosumi, K. Biochem. Biophys. Res. Commun. 154, 80-84, 1988.
3) Kato, Y. Mol. Cell. Endocrinol. 55, 107-112, 1988.
4) Kato, Y. and Hirai. T., Mol. Cell. Endocrinol. 62, 47-53, 1989.
5) Hirai, T., Takikawa, H., and Kato, Y. Mol. Cell. Endocrinol. 63, 209-217. 1989.
6) 加藤幸雄，食肉に関する助成研究調査成果報告書, 7, 6-11, 1989.
7) Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74, 5463-5467, 1977.
8) 加藤幸雄，食肉に関する助成研究調査成果報告書, 6, 26-30, 1988.
9) Ezashi, T., Hirai. T., Kato, T., Wakabayashi, K. and Kato, Y.J. Mol. Endocrinol. 5, in press.
10) Hirai, T., Takikawa, H. and Kato, Y.J. Mol. Endocrinol. 5, in press.
11) Kato, Y., Ezashi, T., Hirai, T. and Kato, T. in preparation.

© The Ito Foundation

# ブタ卵胞液中の卵成熟促進物質の単離と諸性質

Isolation and Some Properties of an Oocyte-Maturation-Promoting Substance from Pig Follicular Fluid

河岸洋和・吉田光敏（静岡大学農学部）

Hirokazu Kawagishi and Mitsutoshi Yoshida
(Faculty of Agriculture, Shizuoka University)

In the previous report, we described that the addition of pig follicular fluid (pFF) or its fractions obtained by some chromatographies to the maturation medium improved the rates of nuclear maturation, normal fertilization and normal cleavage of pig oocytes after in-vitro fertilization. Here we report isolation of the oocyte-maturation-promoting substance from pFF and the effects of the substance on the maturation of pig oocytes and on their subsequent fertilizability and developmental capacity *in vitro*.

A maturation promoting substance was isolated from pFF by ultrafiltation, anion-exchange chromatography, gel filtration and FPLC; ultrafiltrated pFF (10,000 $\leqq Mr \leqq$ 200,000) was fractionated by anion-exchange chromatography on a DEAE-Toyopearl column equilibrated with 10 mM phosphate buffer (pH 6.15). After washing the unadsorbed materials, the active fraction (DA3) was eluted with a linear salt gradient (0 to 0.5 M NaCl in the buffer). DA3 was further fractionated by gel filtration on a Toyopearl 55S column equilibrated with PBS. FPLC with Mono Q of the active fraction G1 obtained by the gel filtration gave three fractions Q1-3. Among them, Q2 exhibited the strongest activity. The SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of Q2 showed that this protein is almost pure and has a molecular mass of 70.000.

## 1. 目　的

一般に哺乳動物の未成熟卵子は，卵胞から取り出し，適当な培地で体外培養すると成熟分裂が再開し，第２成熟分裂中期に至り成熟することが知られている[1,2]。しかし，体外成熟卵子の体外受精では，生体内成熟卵子のそれと比べて，異常受精の頻度が高いことが，ウサギ[3]，ハムスター[4]およびウシ[5]で報告されている。ブタにおいては，生体内成熟卵子の体外受精により産仔が得られているものの[6~8]，体外成熟卵子の体外受精では前述した動物種と同様に異常受精の頻度は高く，その後の発生能は限られている[9]。

前報において，我々はブタ卵胞液の卵子成熟培地への添加が，ブタ卵子の正常な体外成熟と受精に促進的であることを示し，その有効成分の分離条件に一部検討を加えた[10,11]。本研究はその有効成分の精製と諸性質の検討を目的とした。

## 2. 方　法

ブタ卵子および卵胞液（pig follicular fluid, pFF）は，と場で回収した性成熟直前の雌豚（６

© The Ito Foundation

～7ヵ月齢）の卵巣卵胞（直径2～5㎜）から，注射筒を用いて吸引採取した。ブタ精子は大ヨークシャー種雄からの濃厚部精子を用いた。卵子の体外培養，精子の前処理，体外受精，培地および培養条件は既報[7,8,12]に準じて行った。成熟培地への pFF あるいは pFF 画分の添加量は培地に対して10%とし，媒精時の精子濃度および受精培地量は，それぞれ $5\times10^5$/m$l$ および 2.0m$l$ であった。また，卵子の体外培養期間は36時間であり，それらの体外受精後の成熟状況は媒精から18時間後に検査した。各実験における推計処理は，すべて $X^2$ 検定を用いた。

2.1 卵子成熟促進物質の単離

すべての操作は4℃で行った。まず，pFF を限外濾過膜（UK-200，分画分子量≧200,000，アドバンテック東洋；PM-10，分画分子量≧10,000，アミコン）によって濾過し，活性のあった分子量10,000～200,000画分を回収した。この画分をあらかじめ10mM-リン酸緩衝液（pH 6.15）で平衡化した DEAE-Toyopearl カラムに供した。非吸着部を同緩衝液で洗浄後，吸着部の溶出は同緩衝液中の 0～0.5M NaCl による直線的濃度勾配法によって行った。UV 280nm の吸収を指標に3つの画分（DA 1～3）にまとめた。活性画分（DA 3）はさらに Toyopearl 55S（展開溶媒 PBS）によるゲル濾過を行った。溶出物は280nm における UV 吸収をもとにして4つの画分にまとめた（G1～4）。活性のあったG1は，FPLC によってさらに精製した。すなわち，あらかじめ 20mM-トリス塩酸緩衝液（pH 7.14）で平衡化しておいた Mono Q カラムに吸着させ，同緩衝液中の 0～1M NaCl による直線濃度勾配法によって溶出し，3つの画分（Q1～3）を得た。

2.2 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）

SDS-PAGE は Laemmli の方法[13]によって10%ゲルを用いて行なった。サンプルは2-メルカプトエタノールの存在下あるいは非存在下で，100℃，10分間処理した。染色は銀染色法を用いた。分子量マーカー（ファルマシア製）は，phosphorylaseb（分子量94,000），bovine serum albumin（67,000），ovalbumin（43,000），soybean trypsin inhibitor（20,100），$\alpha$-lactalbumin（14,000）を用いた。

［実験1］ FPLC によって得られた各画分の成熟培地への添加が体外成熟・体外受精に及ぼす影響

FPLC によって得られた各画分Q1～3を，最初に分画に用いた卵胞液量に相当するように2次蒸留水に希釈した後，成熟培地に10%添加し，体外成熟・体外受精に及ぼす影響を調べた。

［実験2］ 活性物質Q2の添加効果の濃度依存性

実験1により，活性を示したQ2の成熟培地への添加効果を濃度をかえて検討した。すなわち実験1に用いた濃度を1.0とし，それに対して2/3倍（0.67），2倍（2.00）の濃度の3種のサンプルを調製した後に，成熟培地に10%添加し，活性を比較した。

## 3. 結果と考察

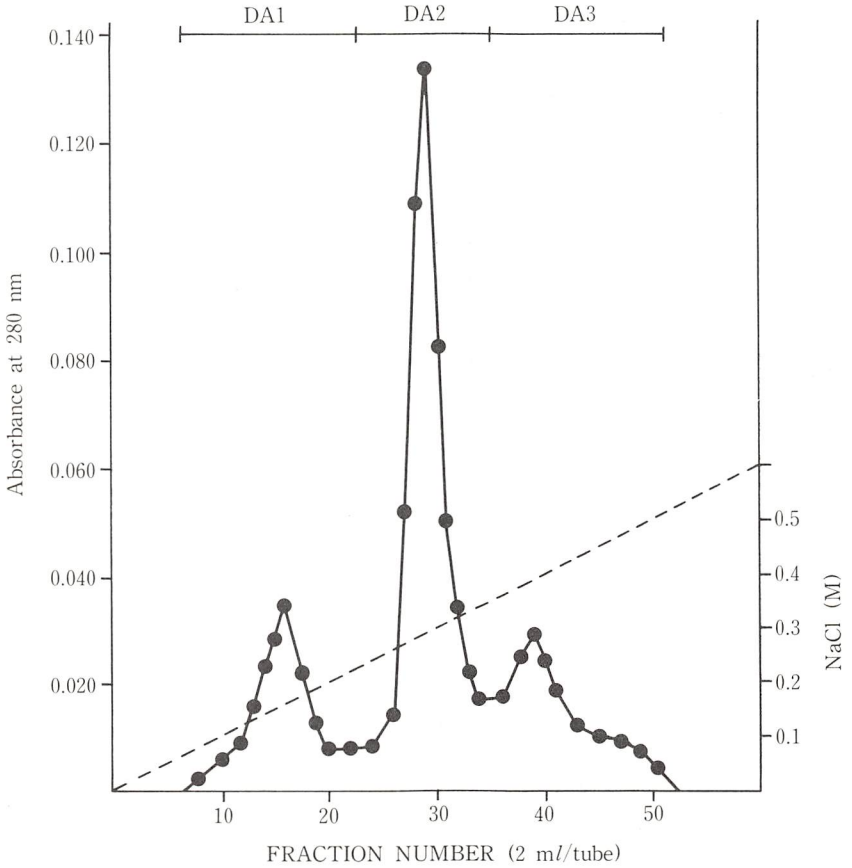
前報において[10]，成熟培地への pFF の添加により，体外におけるブタ卵の核成熟率，正常受精率および正常卵割率が改善されることを報告した。また，この活性は限外濾過，ゲル濾過，陰イオン交換クロマトグラフィーによって失活することなく分画された。さらにこの画分の添加によって得られた受精卵を受卵ブタへ移植した結果，胚盤胞への発生を初めて実証した[11]。

本研究では，まず精製方法の確立を試みた。前報[10,11]では，限外濾過で得られた画分は，ゲル濾過に続いて陰イオン交換クロマトグラフィーを

© The Ito Foundation

行ったが，今回は，より効率的に分画を行うために，まず陰イオン交換クロマトグラフィー，次にゲル濾過によって分画を行った。すなわち，10 mM-リン酸緩衝液（pH 6.15）であらかじめ平衡化しておいた DEAE-Toyopearl に限外濾過後の卵胞液を吸着させ，NaCl 直線濃度勾配法（0→0.5M）によって溶出させ，活性画分 DA 3 を得た（**図1**）。この DA 3 をあらかじめ PBS にて平衡化しておいた Toyopearl 55 S を用いたゲル濾過によって分画し，活性画分G1 を得た（**図2**）。G1 はさらに陰イオン交換体である MonoQ（20mM-トリス塩酸緩衝液，pH 7.40）を用いた FPLC によって，3 つの画分Q1～3 を得た（**図3**）。

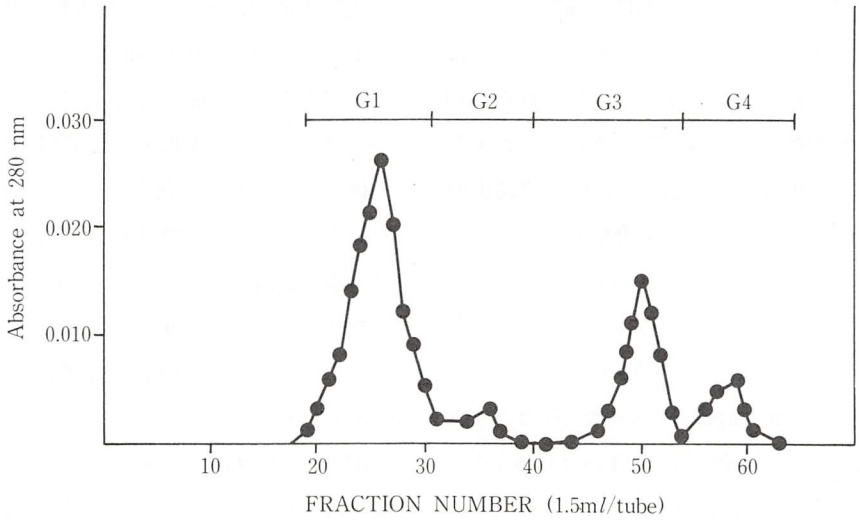
実験 1 におけるQ1～3 の添加効果を**表1** および**2** に示した。Q2 添加区では無添加区に比較してCME率および成熟率が有意に高い値を示した（$P<0.05$）。Q3 添加区では CME 率が有意に高い値を示したが，成熟率では有意差は示さなかった。実験 2 では，実験 1 において活性のあったQ 2 の添加濃度を変えることによる効果を調べた（**表3**，**4**）。1.0倍添加区では無添加区に比較して，CME 率（$P<0.01$），雄性前核形成率（$P<0.05$）で有意に高い値を示した。2.0添加区では，CME 率，雄性前核形成率，正常受精率が有意に高い値（$P<0.01$）を示し，受精率が有意に低い値（$P<0.05$）を示した。多卵核受精率は，無添




カラム：φ1.2×12cm
緩衝液：10mM phosphate buffer (pH6.15)

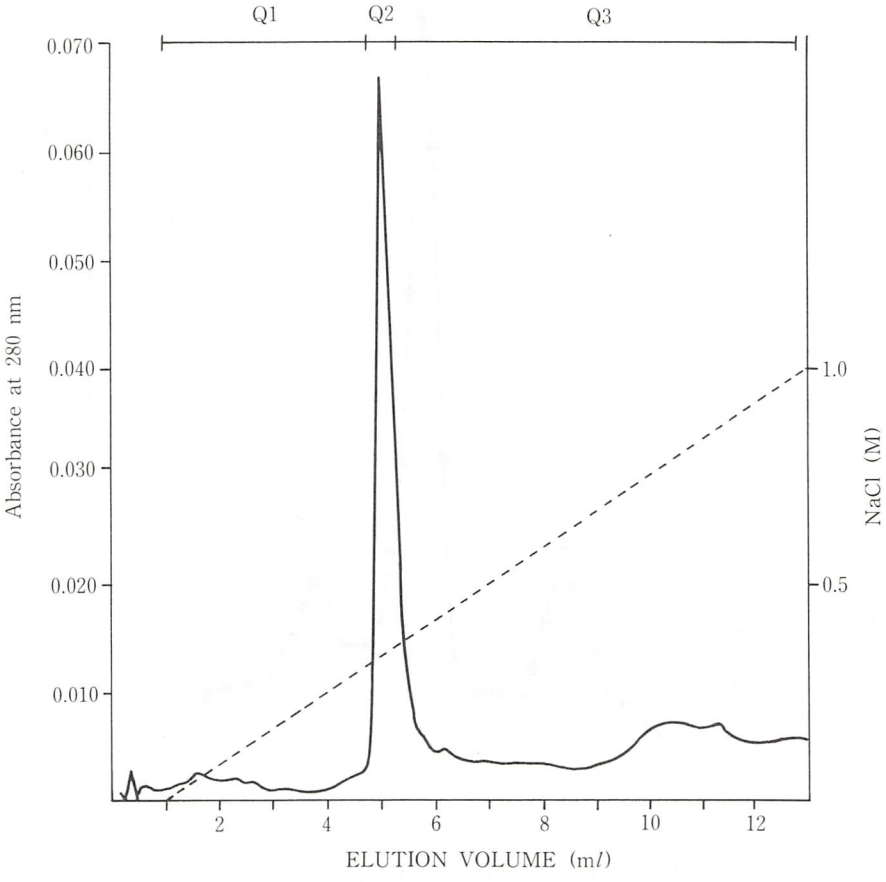
**図 1**　限外濾過で得られた活性画分の DEAE-Toyopearl を用いた陰イオン交換クロマトグラフィー

© The Ito Foundation




カラム：φ1.5×90cm
緩衝液：PBS

**図 2**　DA 3 の Toyopearl 55 S を用いたゲル濾過




カラム：Mono Q HR5/5
緩衝液：20mM Tris-HCl buffer (pH7.14)

**図 3**　G1 の FPLC

© The Ito Foundation

表1　FPLCによって得られた画分Q1～3の添加がブタ卵子の体外受精・成熟に及ぼす影響

| 画分† | CME率‡[1] % | 成熟率[1] % | 受精率[2] % | 多精子[3] 受精率% | 雄性前後[3] 形成率% | 正常[1] 受精率% |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 無添加 | 39.3 (37/ 94) | 73.9 (68/92) | 89.7(61/68) | 72.1 (44/61) | 23.0(14/61) | 2.2(2/92) |
| Q1 | 43.4 (43/ 99) | 77.1 (74/96) | 87.8(65/74) | 90.7**(59/65) | 33.8(22/65) | 1.0(1/96) |
| Q2 | 57.4*(58/101) | 89.9*(87/99) | 94.2(82/87) | 85.4 (70/82) | 34.1(28/82) | 5.1(5/99) |
| Q3 | 55.2*(53/ 96) | 83.2 (79/95) | 79.7(63/79) | 77.4 (48/62) | 34.9(22/63) | 4.2(4/95) |

( ) 内は実数
†FPLCによって得られたpFF各画分　‡ CME；卵丘細胞層膨潤化
[1] 検査卵に対する割合　[2] 成熟卵に対する割合　[3] 成熟受精卵に対する割合
*$p<0.05$　**$p<0.01$

表2　FPLCによって得られた画分Q1～3の添加がブタ卵子の多卵核受精出現に及ぼす影響

| 画分† | 検査受精卵数 | 多卵核受精卵数(%) |
|---|---|---|
| 無添加 | 92 | 9( 9.8) |
| Q1 | 96 | 10(10.4) |
| Q2 | 99 | 5( 5.1) |
| Q3 | 95 | 3( 3.2) |

†表1に準ずる

表3　濃度を変えたQ2の添加がブタ卵子の体外成熟・受精に及ぼす影響

| 濃度† | CME率[1] % | 成熟率[1] % | 受精率[2] % | 多精子[3] 受精率% | 雄性前後[3] 形成率% | 正常[1] 受精率% |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 無添加 | 51.3 (59/115) | 84.3( 97/115) | 83.5 (81/ 97) | 65.4(53/81) | 32.1 (26/81) | 4.3 ( 5/115) |
| 0.67 | 54.9 (67/112) | 84.3(102/121) | 78.4 (80/102) | 60.0(48/80) | 45.0 (36/80) | 5.8 ( 7/121) |
| 1.00 | 70.3**(83/118) | 92.2(107/116) | 76.6 (82/107) | 68.2(56/82) | 50.0* (41/82) | 8.6 (10/116) |
| 2.00 | 75.6**(84/111) | 88.2( 98/111) | 69.3*(68/ 98) | 69.1(47/68) | 58.8**(40/68) | 15.3**(17/111) |

( ) 内は実数
†濃度は分画前のpFF量に希釈したものを1.00とし，その2/3倍の濃度を0.67，2倍の濃度を2.00とした
[1],[2],[3]は表1に準ずる
*$p<0.01$　**$p<0.05$

表4　濃度を変えたQ2の添加がブタ卵子の多卵核受精出現に及ぼす影響

| 濃度† | 検査受精卵数 | 多卵核受精卵数(%) |
|---|---|---|
| 無添加 | 96 | 8(8.3) |
| 0.67 | 98 | 4(4.1) |
| 1.00 | 93 | 6(6.5) |
| 2.00 | 87 | 4(4.6) |

†表3に準ずる

加区に比較して，すべての添加区で低くなる傾向にあるものの，有意差はみられなかった。以上のことから，卵胞液中の活性物質は失活することなく単離され，Q2が活性本体であると推定される。Q3にも若干の活性が認められたが，これは，FPLCにおいてQ2のピークの裾の部分はQ3にまとめたため，Q3にはQ2が含まれているからであると考えられる。活性のあったQ2は，純度の検定および分子量の推定のために，SDS-PAGEを行った(**図4**)。その結果，還元剤の存在下あるいは非存在下ともに，分子量70,000のところにほぼ単一のバンドを示した。

卵胞液には，成熟分裂促進因子（meiosis inducing substance, MIS）の存在が報告されている。このMISは胎児期の成熟分裂を誘起する[14]

© The Ito Foundation

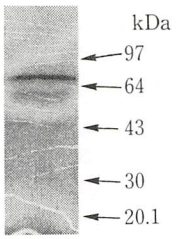



図 4 Q2 の SDS-PAGE

と共に性成熟に達した卵巣内での卵子の成熟分裂を誘起する[15]といわれている。ブタ卵子の体外成熟・受精においては，Naito らも卵胞液の添加が効果的であることを示している[16]。彼らはこの活性成分の分画は試みておらず，彼らの報告した活性物質が我々の分離した物質と同一であるか否かは不明であるが，我々の見いだした活性が熱に不安定であるのに対し，彼らは報告では熱に安定であるなど相違がみられる。

以上のように，目的とした活性物質の単離・精製方法の確立にほぼ成功した。しかしながら，この物質は極めて微量にしか得られないため，生化学的諸性質の詳細については不明である。今後は大量の卵胞液を処理することによって，この活性物質を得，諸性質の検討さらにアミノ酸の１次配列を決定すること，またその産生母地の解明をさらなる目的としている。

## 4. 要　約

ブタ卵胞液中から，限外濾過，陰イオン交換クロマトグラフィー，ゲル濾過，FPLC を駆使することによって，卵成熟分裂促進物質の単離を試みた。その結果，SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって，ほぼ単一バンドを示すまでに精製された。この電気泳動によって，この物質は分子量約70,000であることが判明した。この物質の添加によって，CME 率，雄性前核形成率，正常受精率が，対照区に比較して有意に高い値を示した。

本研究の遂行にあたり，実験に協力して頂いた本学部，石崎芳彦，石垣浩司両君に感謝します。さらに，ブタ卵巣を提供して頂きました静岡市食肉衛生検査所，安蔵忠夫所長をはじめ関係各位に，また，ブタ精液を提供して頂きました富士宮市，桑原康獣医師に深謝いたします。

### 文　献

1) Pincus, G. & Enzmann, E. V.: J. Exp. Med., 62, 665-675, (1935)
2) Edwards, R. G.: Nature, 208, 349-351, (1965)
3) Thibault, C.: J. Reprod. Fertil., 51, 1-15, (1977)
4) Leibfried, M. L., & Bavister, B. D.: J. Exp. Zool., 226, 481-485, (1983)
5) Leibfried-Rutledge, M. L., Crister, E. S., Eyestone, W. H., Northey, D. L. & First N. L.: Biol. Reprod., 36, 376-383, (1987)
6) Cheng, W. T. K.: Ph. D. Thesis, Council for National Academic Awards, (1985)
7) Yoshida, M.: Jpn. J. Vet. Sci., 49, 711-718, (1987)
8) Yoshida, M.: Jpn. J. Anim. Reprod., 35, 1-4, (1989)
9) 吉田光敏：日本養豚学会誌，24，116-118，(1987)
10) 河岸洋和・吉田光敏：食肉に関する助成研究調査成果報告書，7，30-36，伊藤記念財団，東京，(1989)
11) Yoshida, M, Ishizaki, Y. & Kawagishi, H: J. Reprod. Fert., 88, 1-8, (1990)
12) Yoshida, M., Bamba, K. & Kojima, Y.: Jpn. J. Anim. Reprod., 35, 86-91, (1989)
13) Laemmli, U. K.: Nature (London), 227, 680-685 (1970)
14) Byskov, A. G. & Saxen, L.: Dev. Biol., 52, 193-200, (1976)
15) Westergaad, L., Byskov, A. C., Anderson, G. Y., Grinsted, J. & McNatty, K. P.: Fertil. Steril., 41, 377-384, (1984)
16) Naito, K., Fukuda, Y. & Toyoda, Y.: Gamete Res., 21, 289-295, (1988)

© The Ito Foundation

# 牛初期胚（16～32細胞期）の体外発生能に及ぼす栄養塩類とサイクリックAMPの効果について

Effects of Energy Sources and Cyclic AMP on the *in vitro* Development of Bovine 16～32 Cell Embryos

堀内俊孝（広島農業短期大学，現在：広島県立大学）

Toshitaka Horiuchi (Hiroshima Agricultural College, Present:Hiroshima Prefectural University)

In the present study, five experiments were made on the *in vitro* development of 16～32-cell bovine embryos derived from *in vitro* and/or *in vitro* matured, fertilized and developed oocytes. The results were as follows:

1) The development of 16～32-cell bovine embryos to blastocysts in M16 medium was supported better without glucose than with 5mM glucose (*in vitro*; 71% vs 20%, *in vitro*; 30% vs 9%).

2) The development of 16～32-cell bovine embryos to blastocysts was supported in the glucose-free M16 medium with/without 23.28 mM sodium lactate (*in vitro*; 50% vs 67%).

3) The addition of α-ketoglutarate (1～5mM) to the glucoee-free M16 medium depressed the development rates of 16～32-cell bovine embryos to blastocysts (*in vitro*; 0 mM 56%, 1 mM 43% and 5 mM 39%, respectively).

4) There was no effect on the *in vitro* development of 16～32-cell bovine embryos, derived from *in vitro* fertilized oocytes, by the addition of dbcAMP (0.5～1mM).

5) The amount of sudanophilic lipid droplets in blastocysts, developed in the glucose-free medium, was much aboundant in the region of inner cell mass, especially with *in vitro* fertilized oocytes, compared with *in vitro* oocytes. On the other hand, the region of trophoblasts had less droplets in both *in vitro* and *in vitro* fertilized oocytes.

## 1. 目　的

牛受精卵移植技術の普及にともなって牛胚の安定した確保が重要な課題となっている。

牛胚を確保するひとつの方法として未利用資源である卵巣を用いる方法がある。すなわち，と殺場から採取した牛卵巣からの未成熟卵を体外成熟，体外受精，体外培養し，牛胚を生産する方法である。そして，この牛胚の移植によって子牛が得られており[1]，広範な地域でこの技術の活用[2]が試みられている。

この技術を確立するためには，移植可能な胚を高率に発生させることが必要である。しかし，今のところ，その発生率は低く，培養条件の検討が必要である。

本研究は，体内受精由来で体内で発生した牛胚（体内由来胚）と体外成熟・体外受精由来で体外発生した胚（体外由来胚）を併用し，まず，16～32細胞期牛胚の培養条件として栄養塩類（特にグルコースとα-ケトグルタール酸）について検討し，次いで細胞分裂を活性化する目的でディベチル・サイクリックAMP（dbcAMP）の添加を試みた。

© The Ito Foundation

## 2. 方　法

2.1　体内受精由来の16～32細胞期牛胚の採取

広島農業短期大学付属農場で飼育している黒毛和種経産牛を用い，PMSG-PGF$_2\alpha$法に LHRHの投与を組み合わせた既報の方法[3]にしたがって，過剰排卵誘起した。すなわち，性周期の11～14日目にPMSG（セロトロピン;帝国臓器製薬）2,000 iuを筋注，72時間後にPGF$_2\alpha$（エストラメイト;住友製薬）750$\mu$gを筋注した。PGF$_2$投与後2日目の朝，スタンディング発情を確認しLHRH（コンセラール；武田薬品）200$\mu$gを筋注し，その日の夕方，凍結牛精液を子宮体部に注入し人工授精した。

採卵は，発情日を0日として5日目の牛前中（LHRH投与後120時間）に非手術的に行った[4]。

子宮灌流液を牛胚回収フィルター（EmCon）で濃縮後，実体顕微鏡下で検索し16～32細胞期の牛胚を採取した。

2.2　体外受精由来の16～32細胞期牛胚の作出[5]

広島市食肉市場においてと殺されたホルスタイン種雌牛から卵巣を採取し，と殺後3時間以内に実験室に持ち帰った。直ちに注射針（21G5/8）を付けた注射筒で卵胞（2～5㎜）を吸引し，卵胞卵を採取した。卵丘細胞層が密に付着し細胞質が均一な暗黒色を呈する卵胞卵のみ選び，10%非働化子牛血清，FSH（1.2I U/m$l$，アントリン；デンカ製薬），0.2mM ピルビン酸Na加Hepes-TCM 199（GIBCO, Cat. No. 380-2340）培養液で，空気下5% $CO_2$の気相，38.5℃の条件にて20～24時間培養し体外成熟させた。

精子は宮城県畜試けい養種雄牛の凍結精液を用いた。精子は融解後10mM カフェイン加 BO液（BSA無添加）で2回洗浄（500G，5分間）し，精子濃度を約$2.0\times10^7$/m$l$に調整した。この精子浮遊液50$\mu l$をミネラルオイル下 BSA（20mg/m$l$），ヘパリン（20$\mu$g/m$l$）加BO液50$\mu l$に加え，空気下5% $CO_2$の気相，38.5℃で2～3時間前培養した[6]。

次いで，体外成熟卵を前培養精子ドロップに加え媒精した。媒精後5時間で10%非働化子牛血清加Hepes-TCM 199（150$\mu l$）に移した。

媒精後72時間で，培養皿表面に付着・増殖した単層卵丘細胞から卵胞卵を遊離させ，さらに48時間培養した。媒精した日を0日として，5日目の午後，形態的に正常に発育した16～32細胞期を選び実験を実施した。

2.3　16～32細胞期牛胚の体外発生に及ぼすグルコース，乳酸，$\alpha$-ケトグルタール酸，dbcAMPの効果について

基礎培地をM16[7]として0.33mM ピルビン酸Naと23.28mM 乳酸Naを添加した。実験1は，この培地に0～5mM グルコースを添加し，体内と体外由来の牛胚を用い，桑実期と胚盤胞期への発生を調べた。実験2では，基礎培地M16に0.33mM ピルビン酸Naを添加し，23.28mM 乳酸Naと5mM グルコースの組み合わせを，体内由来の牛胚を用いて検討した。次に，$\alpha$-ケトグルタール酸（0～5mM）の効果について体外由来の牛胚で調べた（実験3）。さらに，基礎培地へのdbcAMP（0～1mM）の添加を体外由来の牛胚で試みた。

2.4　体外で発生した胚盤胞胚の脂肪染色

胚盤胞胚を中性ホルマルリン（リン酸緩衝液使用）で固定し，ズダンⅢ（Daddi氏法）[8]で脂肪染色を行った。

## 3. 結果と考察

3.1　16～32細胞期牛胚の体外発生に及ぼすグルコースの効果について（実験1）

体内と体外由来の牛胚の体外発生に及ぼすグルコース濃度（0～5mM）についての結果は**Table 1**

© The Ito Foundation

**Table 1** Effect of glucose concentration on *in vitro* development of bovine 16～32-cell embryos (Experiment 1)[a)]

| Embryo source | Glucose conc.(mM) | No.of embryos cultured | Day 6[b] | Day 7[c] | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | No.(%)of morulae | No.(%)of morulae | No.(%)of blastocysts |
| *in vivo* | 0 | 7 | 7(100) | 2(29) | 5(71) |
| | 1 | 3 | 3(100) | 2(67) | 1(33) |
| | 5 | 5 | 3( 60) | 1(20) | 1(20) |
| *in vitro* | 0 | 33 | 16( 49) | 4(12) | 10(30)[d] |
| | 1 | 31 | 22( 60) | 7(32) | 13(45) |
| | 5 | 33 | 9( 27) | 4(12) | 3( 9)[d] |

[a] Basic medium of M 16 with 0.33mM sodium pyruvate and 23.28mM sodium lactate.
[b] 24～26 h culture.
[c] 48～50 h culture.
[d] Differ significantly ( $p < 0.05$)

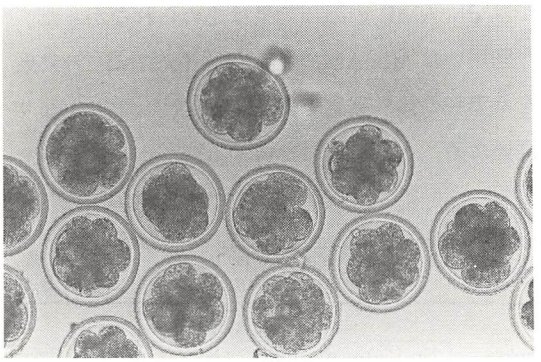


**Fig. 1** Bovine 16～32-cell embryos recovered from uterus 5 days after the onset of estrus (120 h after the injection of LHRH).

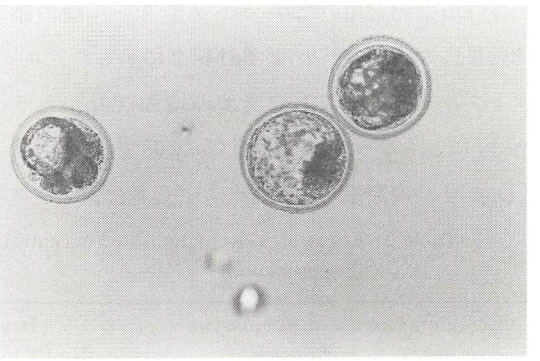


**Fig. 2** Blastocysts developed *in vitro* from 16～32-cell stage in glucose-free M 16 medium

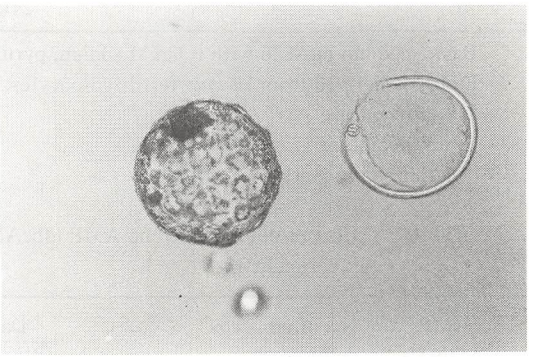


**Fig. 3** A hatched blastocyst developed *in vitro* from 16～32-cell stage in glucose-free M 16 medium.

に示した。体内と体外由来の牛胚は両区とも，グルコース濃度の上昇にともなって（0mM から 5 mM），胚盤胞期への発生率は低下した。また，体外由来胚は，体内由来胚より低い発生率であった。**Fig. 1** は培養試験に用いた体内由来牛胚（16～32細胞期）の写真である。**Fig. 2** はグルコース無添加区において胚盤胞期に，**Fig. 3** は脱出胚盤胞期に発生した牛胚の写真である。

発生初期の牛胚は体外培養液にグルコースを添加する必要のないことが血清加合成培養液（TCM 199）で発表[9)]されており，またハムスター 8 細胞期胚の体外発生をグルコースが阻害することが報告[10)]されている。

高分子物質として牛血清アルブミンのみである M16培養液において胚盤胞期まで発育することを確認したが，**Fig. 2** での胚は細胞数が少なく見え，

© The Ito Foundation

牛胚の質（活性）の改善については細胞分裂を制御する機構を踏まえた今後の研究が必要である。

3.2 16～32細胞期牛胚の体外発生に及ぼす乳酸の効果について（実験2）

M16培養液の栄養塩類としてピルビン酸 Na（0.33mM），ピルビン酸 Na と乳酸 Na（23.28 mM），ピルビン酸 Na と乳酸 Na とグルコース（5mM）を添加した培養液で体内由来胚は各 50%（1/2），67%（2～3），50%（1/2）で乳酸の顕著な添加効果はなかった。

3.3 16～32細胞期牛胚の体外発生に及ぼすα-ケトグルタール酸の効果について(実験3）

体外由来胚を用いたα-ケトグルタール酸の添加効果についての結果は **Table 2** に示した。α-ケトグルタール酸の添加濃度の増加（0から5 mM）にともなって，桑実期（Day 6）と胚盤胞期（Day 7）への発生率は低下した。これは，グルコースと同様の結果であった。しかし，これは本研究に用いた培養液の条件での結果であり，血清内の細胞増殖因子を含めた多様な要因によって異なることも考えられる。

また，栄養塩類としてα-ケトグルタール酸のみ添加した単純培養液で16細胞期牛胚は脱出胚盤胞期まで発生するとの報告[11]もあり，今後の詳細な検討が必要である。

3.4 16～32細胞期牛胚の体外発生に及ぼす dbcAMP の効果について（実験4）

体外由来胚を用いた dbcAMP の効果についての結果は **Table 3** に示した。0.5～1mM の濃度では dbcAMP の添加効果は認められなかった。今回用いた dbcAMP 濃度は，dbcAMP の効果を桑実胚の体外発生で認めた報告[12]よりかなり高いため，さらに検討を要する。

**Table 2** Effect of α-Ketoglutarate concentration on *in vitro* development of 16～32-cell embryos (Experiment 3)[a]

| Ketoglutarate conc.(mM) | No. of embryos[b] cultured | Day 6[c] | Day 7[d] | |
|---|---|---|---|---|
| | | No.(%)of morulae | No.(%)of morulae | No.(%)of blastocysts |
| 0 | 39 | 34(87)[f g] | 5(13) | 22(56) |
| 1 | 47 | 28(60)[f h] | 6(13) | 20(43) |
| 5 | 44 | 24(55)[g h] | 4( 9) | 17(39) |

[a] Basic medium of M 16 with 0.33mM sodium pyruvate and 23.28mM sodium lactate.
[b] Embryos derived from *in vitor* fertilized oocytes.
[c] 24～26 h culture.
[d] 48～50 h culture.
[f-h] Differ significantly ($p<0.05$)

**Table 3** Effect of dibutyryl oyclic AMP (dbcAMP) on *in vitro* development of 16～32-cell embryos (Experiment 4)[a]

| dbcAMP conc.(mM) | No. of embryos[b] cultured | Day 6[c] | Day 7[d] | |
|---|---|---|---|---|
| | | No.(%)of morulae | No.(%)of morulae | No.(%)of blastocysts |
| 0 | 15 | 7(87) | 1( 7) | 3(20) |
| 0.5 | 14 | 5(60) | 6(43) | 2(14) |
| 1 | 20 | 12(55) | 4(20) | 5(25) |

[a] Basic medium of M 16 with 0.33mM sodium pyruvate and 23.28mM sodium lactate.
[b] Embryos derived from *in vitro* fertilized oocytes.
[c] 24～26 h culture.
[d] 48～50 h culture.

© The Ito Foundation

3.5　体外および体内由来の胚盤胞期胚における脂肪分布について（実験5）

グルコース無添加区において培養した体内と体外由来で，胚盤胞期に発生した胚について脂肪顆粒の分布を調べた。その結果，トロホブラストにおいては両者とも中程度であったが，体外由来胚では内細胞塊に脂肪顆粒が強く分布した。

## 4. 要　約

体外成熟・体外受精由来の牛胚の体外培養条件を検討するため，まず16～32細胞期胚の体外発生用培養液における栄養塩類について体内と体外由来胚を用いて一連の実験を行い，次のような結果を得た。

(1) 体内と体外由来の16～32細胞期牛胚の胚盤胞期への発生率は基礎培地M16（ピルビン酸Naと乳酸Na含）へのグルコース（5mM）の添加によって低下した。

(2) 基礎培地M16（ピルビン酸Na含）への乳酸（23.28mM）の添加は，体内由来の16～32細胞期牛胚の胚盤胞期への発生率に影響しなかった。

(3) 体外由来の16～32細胞期牛胚の胚盤胞期への発生率は基礎培地M16（ピルビン酸と乳酸Na含）へのα-ケトグルタール酸（1～5mM）の添加によって低下した。

(4) 基礎培地M16（ピルビン酸と乳酸Na含）へのdbcAMP（0.5～1mM）の添加は，体外由来の16～32細胞期牛胚の胚盤胞期への発生率に影響しなかった。

(5) グルコース無添加区培養液で発生した胚盤胞胚の内細胞塊における脂肪顆粒は，体内由来胚と比較し体外由来胚において多く分布した。トロホブラストでは両者で同様であった。

## 文　献

1) Goto, K., Kajihara, Y., Kosaka, S., Koba, M., Nakanishi, Y. and Ogawa, K.: J.Reprod. Fertil., 83：753-758.
2) 堀内俊孝・高田直和・沼辺孝・大久範幸・石川勇志：哺乳卵研誌，5：134-134，1988.
3) 堀内俊孝・沼辺孝：哺乳卵研誌，4：78-83.
4) 堀内俊孝・新川賢二・吉本傳：広島農短大報，8：639-644，1989.
5) 堀内俊孝：広島農業の研究：26，31-40，1990.
6) Niwa, K. and Ohgoda, O.: Theriogenology 30：733-741.
7) Hogan, B., Costantini, F. and Lacy, E.: In Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual p.250, Cold Spring Harbor Laboratory, 1986.
8) 岡本耕作他：顕微鏡的組織学，第3版，pp. 333-334，医学書院，1965.
9) 佐藤隆・塩谷康生・山田均・北村聰：第74回家畜繁殖学会講演要旨Ⅰ-28，p. 63，1988.
10) Seshagiri, P. and Bavister, B.D.: Bio. Reprod., 40：599-606，1989.
11) Boone, W.R., Dickey, J.F., Luszcz, L.J. and Dantzler J.R.: J.Anim. Sci., 47：908-913，1978.
12) Bielanski, A., Hare W.C.D. and Yadav, B.R.: Theriogenology, 31：174，1989.

© The Ito Foundation

# 内部細胞塊の細胞数ならびに形態を指標とした牛胚盤胞期胚の品質評価

Quality Assessment of Bovine Blastocyst by the Cell Number and Morphology of Inner Cell Mass

岩崎説雄・*吉羽宣明（東京農業大学，*埼玉県畜産試験場）

Setsuo Iwasaki and *Noriaki Yoshiba
(Tokyo University of Agriculture and *Saitama prefectural Livestock Experimental station)

The morphology and proportion of inner cell mass (ICM) of bovine blastocysts cultured *in vitro* or *in vivo* in rabbit oviducts after in-vitro fertilization of in-vitro matured follicular oocytes were compared with those of blastocysts fertilized *in vivo* by a differential fluorochrome staining technique. The delineation of each ICM cell was improved by the transfer of embryos derived from in-vitro fertilization to a rabbit oviduct although the cell-cell contacts of ICM cells were not as tight as those from in-vivo fertilization. The proportions (15.8 and 14.9%) of ICM in blastocysts cultured *in vitro* at early and expanded stages were significantly lower than those cultured in rabbit oviducts after in-vitro fertilization and fertilized *in vivo*. These results show that the transfer of bovine embryos derived from in-vitro fertilization to the rabbit oviduct increased the proliferation of ICM cells to the level of embryos fertilized *in vitro* although the cell-cell contact of ICM cell is not improved by the process.

## 1. 目　的

牛内の輸入自由化を間近にひかえ，和牛子牛の大量生産が急務とされている。このような中で，最近，と場で採取した黒毛和種卵巣から得た卵子を用いて体外受精し，体外培養により作出した胚盤胞期胚をホルスタイン種雌牛に移植（胚移植）することにより，黒毛和種子牛を大量に生産することが試みられている。

しかしながら，体外受精後体外培養のみを行う完全体外培養系により作出された胚盤胞期胚は，体外受精後ウサギ卵管内で培養した胚，または人工授精後妊娠7日目に生体内回収した胚に比べ，移植後の受胎率や生存率は低く胚盤胞期胚の質に問題があることが指摘されている[1]。

胚移植に用いられる胚盤胞期胚は，将来胎児となる内部細胞塊（ICM）と胎盤となる栄養膜細胞（Tr）の二種類により構成されている。本研究では，特にICMに照準を置き，ICMの総細胞数に対する割合ならびに細胞の形態を指標として，完全体外培養系および体外受精—ウサギ卵管内培養系により作出した胚盤胞期胚，および生体内回収した胚盤胞期胚の品質を比較し，完全体外培養系における移植後の低受胎性，低生存性に及ぼす要因の解明を目的として行った。

## 2. 方　法

### 2.1 牛胚盤胞期胚の作出

© The Ito Foundation

（1）体外受精ならびにその後の体外培養および ウサギ卵管への移植は既報[2,3]に準じ，と場で採取した卵巣からの卵胞内卵子を体外成熟・体外受精し，その後体外培養のみ（完全体外培養系）もしくは4細胞期にウサギ卵管内に移植（ウサギ卵管内培養系）して胚盤胞期胚を作出した。すなわちホルスタイン種の凍結射出精液を$25\times10^6$/m$l$の濃度に調整し，0.1$\mu$Mイオノフォア A23187（Calbiochem-Behring Corp.）で1分間処理したのち，1時間前培養後媒精した。媒精8時間後，卵子を10%牛胎児血清（FCS, GIBCO），0.5mMピルビン酸ナトリウム，ペニシリンGカリウム（100 IU/m$l$），硫酸ストレプトマイシン（100$\mu$g/m$l$）を加えた，HEPES緩衝 TCM 199（Earl's塩，GIBCO）から成る発生用培養液に移した。完全体外培養系では，媒精後48時間間隔で発生用培養液を交換し，未分割卵および発生停止胚はそのつど除去し，初期ないし脱出胚盤胞期胚は媒精後7～13日で得られた。一方，ウサギ卵管内培養系では，媒精40～42時間後に4細胞期胚を外科的にウサギ卵管内に移植し，5日後に胚を回収した。

（2）体内受精した胚盤胞期胚の回収　FSH（アントリン，デンカ製薬）を朝夕2回，3日間（5/5mg，4/4mg，3/3mg）投与し，最終日に$PGF_2\alpha$（プロナルゴン）15mg，2回投与して過剰排卵誘起した雌牛に人工授精し，妊娠7日目に非外科的に子宮洗浄することにより胚盤胞期胚を回収（体内培養系）した。

2.2　二重蛍光染色法によるICMの形態観察とICM, Tr両細胞数の分別計測

（1）家兎抗牛脾臓細胞血清の作製　皮膜を除いた約15gの牛脾臓を細切して金属メッシュに入れ，乳棒により組織を押しつぶして冷PBS(－)（日水製薬）内に脾臓細胞を浮遊させた。浮遊細胞を遠心分離（1,000rpm, 10分間）により4回洗浄後，細胞浮遊液を$1\sim2\times10^8$/m$l$の濃度に調製した。浮遊液2m$l$を週1回5週間，家兎耳静脈内に注射し，最終免疫後1週間目に全放血により血清を得た。

抗体価の測定は，前述の牛未分割卵を0.5%アクチナーゼE（科研製薬）で3分間処理して透明帯を除去したものを用いた。抗血清を5～80倍，補体（モルモット血清）を発生用培養液で5～40倍に倍数希釈して行った。対照として抗血清の代わりに非免疫家兎血清を用いて同様に反応させた。卵子を希釈抗血清と39℃，30分間反応後，発生用培養液で5回洗浄後，希釈補体血清と39℃，30～120分間反応させて卵子の崩壊を観察した。10倍希釈した補体と30分間反応させたときの抗体価は10倍であった。また対照区では卵子の崩壊は認められなかった。そこでさらに，完全体外培養系により作出した牛胚盤胞期胚を用いて，抗血清を10～160倍に倍数希釈し，10倍希釈した補体と反応させて卵子と同様に抗体価を測定した。その結果，10倍希釈血清ではTrは十分に崩壊し，ICMとの分離は十分であったが，20倍および40倍に希釈した血清では一部の胚で，また80倍以上に希釈した血清では全ての胚で分離が不十分であった。したがって本実験では，抗血清，補体ともそれぞれ培養液で10倍に希釈して用いた。

（2）二重蛍光染色によるTrとICMの分別染色と細胞数の計測　TrとICMの分別染色は，Papaioannou and Ebert（1988）の方法[4]に準じて行った。本法の原理は，抗体と補体により傷害を受けたTrが，ヘキスト33342とヨウ化プロピジウム（PI）によりピンクに染色され，一方抗体の作用を受けなかったICMはヘキスト33342のみによりライトブルーに染色され，両細胞を分別染色することである。すなわちプロナーゼ処理により透明帯を除去した胚盤胞期胚を，10%抗血清10$\mu l$を入れたテラサキ・マルチプレート（Nunc）のウエル内で39℃，30分間反応させ後，発生用培

© The Ito Foundation

養液で5回洗浄し，ヘキスト33342とPI（各10μg/ml）を含む補体（10%モルモット血清）10μlと39℃，30分間反応させた。反応後，胚を0.3%牛血清アルブミン（生化学工業）含有PBS（+）内で洗浄後，少量のPBSと共にスライドグラス上に移し，蛍光観察（UV励起，Ex 330-380, BA 420）を行った。TrとICMの細胞数の分別計測は，胚周辺のPBS量を少なくし，TrとICMを扁平な状態にさせて行った。この処理で細胞の重複がみられる場合は，先端を微細にしたガラスピペットにより細胞を分散させた後に計測した。さらに重複がみられる場合は，観察深度をかえて写真撮影後計測した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 異なる培養系により作出された胚盤胞期胚のICMの形態比較

二重蛍光染色により，ピンクとライトブルーに染め分けられた2種類の細胞が観察された（**Fig. 1**）。これを同一視野で光学的に観察すると，ライトブルーに染色された細胞塊はICMに，またピンクに染色された細胞はTrに相当することが確認された。すなわち抗体と補体の作用を受けて死滅したTrは，ヘキストとPIによりピンクに，また抗体の作用を受けなかったICMは，ヘキストによりライトブルーに染め分けられることが示された。

胚のICMの個々の核の形態は，体内培養系（**Fig. 1**-a）およびウサギ卵管内培養系（**Fig. 1**-b）により作出されたものでは輪郭が明確であったが，完全体外培養系（**Fig. 1**-c）によるものでは輪郭が不鮮明であった。またICMの個々の細胞間の結合は，体内培養系により作出されたものでは緊密であったが，ウサギ卵管内培養系および完全体外培養系によるものはゆるいことが明らかになった。したがって体外受精胚をウサギ卵管内

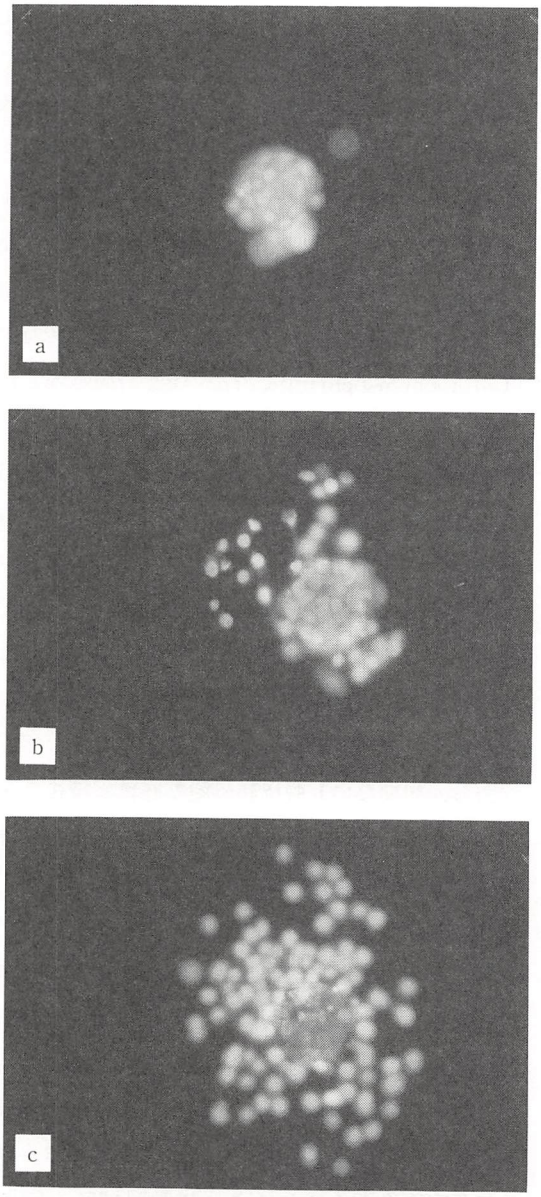



**Fig. 1** Fluorescence micrographs of the ICM and trophectcderm nuclei of bovine expanded blastocysts derived from various culture systems by labelling with bisbenzimide and propidium iodide (blue, ICM nuclei; pink, trophectoderm nuclei). ×200. (a) Fertilized and developed *in vivo*(control). (b) Cultured in a rabbit oviduct after in-vitro fertilization. (c) Cultured *in vitro* after in-vitro fertilization.

© The Ito Foundation

で培養することにより，ICM の個々の細胞の輪郭は明瞭になったが，細胞間の結合の度合いに変化はみられないことが示唆された。

コンパクションの過程において，細胞間の結合に影響を与える要因には，カルシウム・イオン[5]，微小管[6]，ミオシン[7]，プロティン・キナーゼC[8]など，多くの要因が考えられている。マウスにおいて，8細胞期におけるコンパクションの非同時性は，桑実期から胚盤胞期にかけて ICM と Tr への分化において重要であることが示唆されている[9]。完全体外培養系により作出された胚では，他の系による胚とは異なり桑実期でのコンパクションが明確ではないことから，ICM細胞間の結合はコンパクションの状態と密接に関連していることが示唆された。

### 3.2　異なる培養系により作出された胚盤胞期胚の ICM の細胞数の比較

各培養系により作出された初期～脱出胚盤胞期胚の総細胞数および ICM の細胞数の割合を **Table 1** に示した。これら胚，とくに完全体外培養系により作出された胚のいくつかは，ICM の形態が不良，もしくは ICM が認められなかったので，データから削除した。

完全体外培養系により作出された初期および拡張胚盤胞期胚の総細胞数（44および77）は，ウサギ卵管内培養系（75および89）および体内培養系（63および113）により作出されたものに比べ，有意に低い値を示したが，脱出胚盤胞期胚では差は認められなかった。ウサギ卵管内培養系により作出された胚盤胞期胚の総細胞数は，拡張期を除き体内培養系によるものとほぼ同じ成績であった。

完全体外培養系により作出された初期および拡張胚盤胞期胚の ICM の細胞数（8および11）および総細胞数に対する割合（15.8%および14.9%）は，ウサギ卵管内培養系による細胞数（19および18）および割合（23.4%および20.8%），ならびに体内培養系による細胞数（16および23）および割合（25.0%および20.9%）に比べ有意に低い値を示した。また ICM の割合は初期から拡張期にかけて増加したが，その後増加はみられなかった。このことから完全体外培養系では，ICM の一部がすでに崩壊を開始していることが予測された。

**Table 1**　Total cell number and proportion of inner cell mass (ICM) of bovine blastocysts derived from each culture system at each stage

| Culture system | No.of embryos | Total cell number | ICM | |
|---|---|---|---|---|
| | | | Cell no. | Proportion (%) |
| Early | | | | |
| IVF-in vitro* | 56 | $44\pm18^{a}$ † | $8\pm5^{a}$ | $15.8\pm7.8^{a}$ |
| IVF-in vivo** | 18 | $75\pm27^{b}$ | $19\pm13^{b}$ | $23.4\pm11.4^{b}$ |
| In vivo | 21 | $63\pm19^{b}$ | $16\pm8^{b}$ | $25.0\pm8.3^{b}$ |
| Expanded | | | | |
| IVF-in vitro | 86 | $77\pm33^{a}$ | $11\pm7^{a}$ | $14.9\pm6.9^{a}$ |
| IVF-in vivo | 30 | $89\pm26^{b}$ | $18\pm8^{b}$ | $20.8\pm7.6^{b}$ |
| In vivo | 11 | $113\pm23^{c}$ | $23\pm7^{b}$ | $20.9\pm5.4^{b}$ |
| Hatched | | | | |
| IVF-in vitro | 31 | $121\pm46^{a}$ | $16\pm8^{a}$ | $12.8\pm5.0^{a}$ |
| IVF-in vivo | 6 | $122\pm40^{a}$ | $21\pm7^{ab}$ | $17.2\pm2.8^{a}$ |
| In vivo | 7 | $113\pm29^{a}$ | $31\pm12^{b}$ | $27.2\pm7.2^{b}$ |

*　Cultured *in vitro* after in-vitro fertilization.

**　Cultured *in vivo* after in-vitro fertilization.

† Figures with different superscript letters were significantly different at the 5 % level within the same stage.

© The Ito Foundation

脱出期では，完全体外培養系による ICM の細胞数（16）および割合（12.8%）とも，体内培養系によるものに比べ，有意に低かった。しかしウサギ卵管内培養系による ICM の細胞数および割合は，脱出期での割合を除き，すべてのステージで体内培養系による成績に比べ有意差は認められなかった。これらの成績は，体外受精胚のウサギ卵管内への移植により Tr におけるよりも，ICM における細胞増殖を改善したことを示した。ICM の割合の減少は，胚の生存性を減少させることが報告されていることから[10]，完全体外培養系により作出された胚盤胞期胚の低受胎率は，ICM 細胞の増殖の低下が一因であることが示唆された。

## 4. 要　約

本研究は，内細胞塊（ICM）の形態ならびに胚の総細胞数に対する ICM の割合を指標として，完全体外培養系および体外受精後のウサギ卵管内培養系により作出した胚盤胞期胚，および生体内回収（体内培養系）による胚盤胞期胚の品質を比較し，完全体外培養系における移植後の低受胎性，低生存性に及ぼす要因の解明を目的として行った。完全体外培養系により作出された胚の ICM の個々の細胞の輪郭は，体内培養系によるものに比べ不明瞭で，細胞間の結合はゆるかった。体外受精胚をウサギ卵管内で培養することにより，ICM の個々の細胞の輪郭は明瞭になったが，細胞間の結合の度合いに変化はみられなかった。完全体外培養系により作出された初期および拡張胚盤胞期胚の ICM の細胞数の割合は，他の培養系に比べ有意に低い値を示した。以上のことより，体外受精胚をウサギ卵管内で培養することにより，ICM の細胞の増殖は，体内培養して得られた胚のそれと同等の水準に達したが，細胞間の結合の度合には改善はみられないことが明らかになった。

### 文　献

1) 湊芳明：東日本家畜受精卵移植技術研究会誌，5：11-14，1989.
2) Iwasaki S, Shioya Y, Masuda H, Hanada A & Nakahara T, Theriogenology, 30 (6) : 1191-1198, 1988.
3) Iwasaki S, Shioya Y, Masuda H, Hanada A & Nakahara T, Gamete Res, 22 (1) : 83-91, 1989.
4) Papaioannou VE & Ebert KM, Development 102 : 793-803, 1988.
5) Ducibella T & Anderson E, Devl Biol, 47 : 45-58, 1975.
6) Maro B & Pickering S, J Embryol exp Morph 84 : 217-232, 1984.
7) Sobel JS, Devl Biol, 100 : 207-213, 1983.
8) Bloom TL, Development 106 : 159-171, 1989.
9) Johnson MH & Ziomek CA, Cell 24 : 71-80, 1981.
10) Willadsen SM & Polge C, Vet. Rec. 108 : 211-213, 1981.



© The Ito Foundation

# 受精卵移植による新めん羊資源の開発に関する研究
## —メラトニンによるめん羊季節外繁殖の誘起—

Developmental Studies on New Sheep Resources using Embryo Transfer Methods
—Melatonin Reactivates Quiescent Ovarian Activity of Mid-Anestrous Ewe—

澤崎　徹・大久保　忠旦・*森　裕司
（東京大学農学部，*東京農工大学）

Toru Sawasaki, Tadakatsu Okubo and *Yuji Mori
(Faculty of Agriculture, The University of Tokyo and
*Tokyo University of Agriculture and Technology)

Melatonin in Silastic capsules was implanted subcutaneously to examine the effect on reproductive activities of anestrous ewes under natural photoperiods.

Ten non-lactaiting ewes were randomly allocated into two groups. Group A was subcutaneously implanted with melatonin capsules on April 18 (Day0), which increased plasma melatonin levels by about 200 pg/m*l* for at least 5 months, while Group B was untreated with melatonin.

Ovarian function of the ewe was assessed on June 6-29 (Days 52-64) by monitoringplasma progesterone profiles. Luteal function (plasma progesterone > 1ng/m*l* for a week or longer) was evident in the melatonin-treated ewes but not in those untreated: 5/5 in group A, 0/5 in Group B.

Rams were introduced to both groups on Day 72 (June29). By ultrasonography on Day105 (Aug. 1) 4 ewes in Group A were diagnosed pregnant but none in the Group B.

These results indicate that chronic melatonin treatment is capable of advancing the reproductive recrudescence in seasonally anestrous ewes even at the mid-anestrous period, during this period when the reproductive neuroendocrine system is deeply suppressed under long-day photoperiod.

### 1. 目　的

わが国におけるめん羊産業は北海道が中心であるが，これは，北海道以南では，高温多湿により，めん羊の飼養管理が困難であることに起因している。現在までに，わが国に輸入されためん羊は，概ね，このような高温多湿に対する抵抗性の低さという品種的特徴を所有しており，更に，内部寄生虫に対する抵抗性も低い。以上のような背景から，わが国のめん羊産業は大きく発展できなかったが，近年各方面で，外国からの新品種導入をも含め，めん羊産業の発展を図る試みがなされ始めた[1)]。

本研究は，前述した欠点を持たない，つまり高温多湿の気候条件にも十分対処でき，内部寄生虫に対する抵抗力が高く，飼養管理が容易で，更に，肉質面でも魅力のある品種をわが国に導入するための基礎的研究である。

© The Ito Foundation

新しい品種のめん羊の導入方法として，簡便な，凍結受精卵移植法を採用し，受胎率，或は分娩率の向上を図るための移植法の確立，更に得られた新品種仔めん羊の発育，肉質等について検討を加えることを本研究の目的とした。

移植法の確立のためには，まず胚受容雌の発情誘起，性周期の同期化を図る必要があり，特に，繁殖季節外にある胚受容雌の発情誘起は，仔めん羊生産の効率を高めることができ，本研究の受精卵移植のみならず，広くめん羊生産に応用が可能である。

めん羊のみならず，繁殖季節を持つ多くの哺乳動物において，繁殖は光周期（日照時間）に支配されており，この光周期支配の主役を担っているのが松果体であることは広く知られている[2,3]。この松果体から分泌されるメラトニンは，その特異的な日周分泌パターンにより，光周期情報を生殖神経内分泌軸へ伝達する役割を担う[4,5]。よって，めん羊の繁殖季節のメラトニンの分泌パターンを人為的に作り出すことができれば，非繁殖期を短縮することが可能となる[5~8]。

繁殖生理学上の興味からだけでなく上記のような，めん羊生産という実際的な立場に立ちいくつかの試みを行ってきたのでその一部を報告する。

## 2. 方　法

### 2.1 供試動物

10頭の品種間交雑種（コリデール種×サホーク種）で非泌乳期にある雌めん羊を供試した。

### 2.2 メラトニン処理[8]

シリコンカプセルは2枚の Silastic sheets（25×50㎜，厚さ0.125㎜；Dow Corning, Midland, M1, USA）よりなり，この中に100㎎の結晶メラトニンを封入した。1％アルブミンを含む緩衝液に37℃で5日間放置した，インビトロの実験では，このカプセルから1日当たり約300μgのメラトニンが放出されることになる。2個のカプセルを，塩酸キシラジンによる鎮静下で，めん羊の腋下部皮下に埋め込んだ。埋め込んだ直後に，一時的に多量のメラトニンが放出しないように，あらかじめ，カプセルをペニシリン 1000IU/m$l$ を含む滅菌生理食塩水中に1晩放置した。

### 2.3 実験計画

10頭のめん羊を2群に分け，5頭にはメラトニンカプセルを前述の方法で2個づつ埋め込んだ（A群）。残りの5頭は未処置でコントロール群とした（B群）。この試験開始日（4月18日）を試験0日とした。0日におけるA群の雌めん羊の体重は63.4±4.9kg，B群では59.2±2.9kg（平均値±標準誤差）であり，有意な差は認められなかった。実験期間中，めん羊を自然光下の屋内で飼養した。試験72日（6月29日）には，交配のために雄めん羊3頭を同居させた。

採血は，試験0日（カプセル埋め込み前），27，52，54，56，58，60，62，64，77，91，105，147日に行い，遠心分離後，血漿を−20℃で，プロジェステロン，メラトニン，プロラクチン濃度測定に供するまで凍結保存した。

妊娠診断は，メラトニンの外生的長期投与により，繁殖季節外妊娠が成立したか否かを確認するために105日（8月1日）に，また147日（9月12日）に再度確認した。診断は，超音波診断装置（横川，RT50）により胎仔の心拍動を確認する方法によった。

### 2.4 ラジオイムノアッセイ

プロジェステロン濃度は，血漿200μ$l$を用い，ジエチルエーテルにより抽出後，二抗体法により測定した[9]。検出限界（緩衝液を用いたコントロールの95％信頼限界）は0.025ng/m$l$であった。

メラトニン濃度は，血漿200μ$l$を用い測定した[10,11]。検出限限界は25.0pg/m$l$であった。

プロラクチン濃度は，血漿10μ$l$を用いて測定

© The Ito Foundation

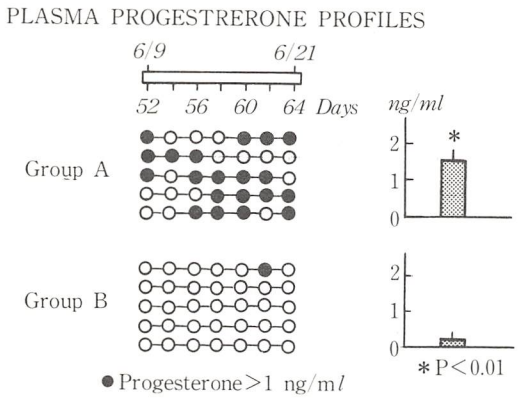



**Fig. 1** Plasma progesterone profiles during Days 52-64 in individual ewes are schematically illustrated on the left. Solid circles indicate progesterone levels exceeding lng/m*l*. Pooled group-mean (±SEM, n=35) progesterone values for this period are shown on the right.

した[12]。検出限界は15.6ng/m*l*であった。

### 3. 結果と考察

集中的に採血した試験52日から64日の間の，血漿プロジェステロン濃度をめん羊個体毎に図示した（**Fig. 1**）。血漿中のプロジェステロン濃度が1 ng/m*l*以上であり，かつ，この状態が1週間，あるいはそれ以上継続するときに，雌めん羊に機能黄体が存在すると考えられる。メラトニン処置群（A群）と非処置群（B群）では機能黄体を持つ個体数に明らかな差が認められた。この期間中，A群では100%（5/5），B群では0%（0/5）であった。またプロジェステロンの血漿中の濃度はA群（1.65±0.22ng/m*l*）とB群（0.29±0.07ng/m*l*）

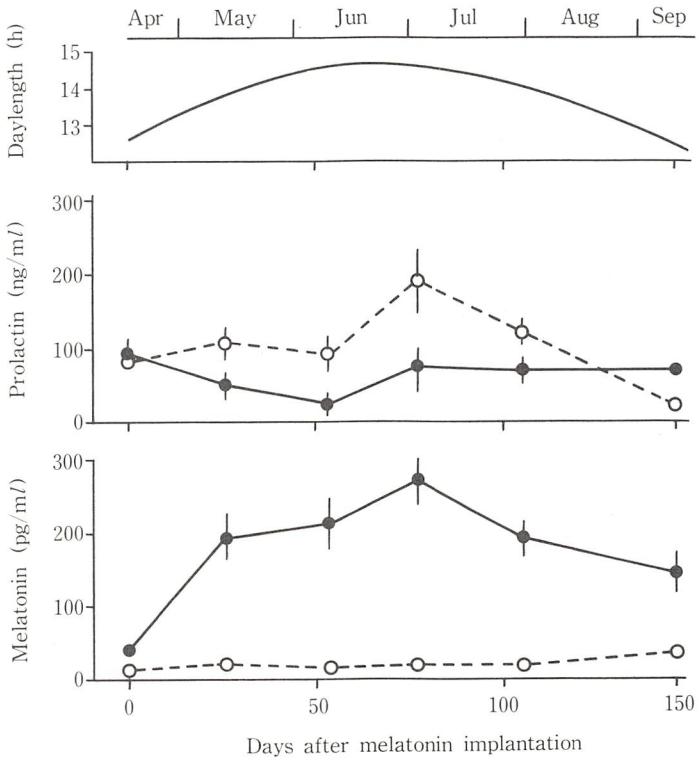



**Fig. 2** Chages in day-time plasma levels of prolactin (middle panel) and melatonin (bottom panel) in anestrous ewes. Group A (●—●) ewes were treated with melatonin from Day 0, whereas Group B (○- -○) ewes were untreated. Each point represents mean ± SEM (n=5). Photoperiodic alternation during the experimental period is shown as hours from sunrise to sunset (top panel).

© The Ito Foundation

の間に有為な差（P＜0.01）が認められた。

**Fig.2** に，試験期間中の血漿中のプロラクチン，メラトニン濃度の消長と日長時間（日の出より日の入りまで）を示した。血漿メラトニン濃度は，メラトニンカプセルを埋め込んだ後上昇し，試験期間中高い濃度を示した（134～270pg/m*l*）が，B群では常に低値を保った（20～30pg/m*l*）。

血漿プロラクチン濃度は，メラトニン未処置のB群では，日長時間の変化と似た季節的な変化を示し，日照時間の長い6月には高く，短くなる9月には低い値を示した。一方A群では，明らかな変化はなく常に低値を保った。

試験105日（8月1日），超音波診断装置により胎仔の心拍動を指標とし，妊娠診断を行ったところ，A群では4頭が妊娠陽性であったが，B群はすべて陰性であった。11月には計9頭の仔めん羊が生まれた。

今回の実験では，4月に雌めん羊にメラトニンカプセルを埋め込むことにより，6月，つまり卵巣が休止期にある非繁殖季節の中期に，正常な受精能力を備えた繁殖能力を誘発できることを明らかにした。メラトニンカプセルを埋め込んだ後，生殖機能が再度誘発されるまでの期間は約2ヵ月であった。この期間はMoriら[8]が行った，5月に埋め込み，約2ヵ月後の7月初旬に誘発させた結果と良く似ている。

季節外繁殖を誘発させるためには，内性メラトニン濃度を高レベルに保つ必要がある[8]。今回の実験では5ヵ月間という長期にわたり血漿メラトニンレベルを高値に保つことができた。繁殖季節を早めるためには，少なくとも5週間はメラトニンを高濃度に保ち続ける必要があり[13]，この立場から言えば，今回使用したメラトニンカプセルは，埋め込んだメラトニン絶対量ではなく，メラトニン拡散量に直接関係する表面積において，本実験の目的を達するに有効であったことが判る。

メラトニンを処置した雌めん羊は，正常な受精能力を発揮し，妊娠期間中は，高温である夏期にもかかわらず，妊娠期間を全うした。非繁殖期に発情周期を誘発し，妊娠させ，産仔を得ることができれば，産仔生産率を上昇させうるのは当然である。が，排卵周期を早めることとは別に，メラトニン処置により，空胎率を下げ，双仔率を上げ，その結果産仔率を23%も高められる[14]ことを合わせて考えれば，この方法の実用化はめん羊産業にとって極めて意義のあることと考えられた。

## 4. 要　約

非繁殖期にあって，卵巣活動を停止している雌めん羊10頭を2群に分け，メラトニン処置の，季節外繁殖に及ぼす影響について解析した。A群には，メラトニン封入カプセルを皮下に埋め込み，実験全期間を通じて，血中メラトニン濃度を暗期の分泌相に匹敵する高レベルに維持した。B群は無処置とした。メラトニン処置は，4月18日（試験0日）に開始し，両群の卵巣機能を調べるために，試験52～64日（6月）の期間における，血中プロジェステロン濃度の推移を調べたところ，機能黄体の存在が，A群では5/5，B群では0/5で認められた。また試験72日（6月29日）に雄めん羊を同居させ，試験105日（8月）に，超音波法により妊娠診断を行ったところ，A群では4頭に妊娠が確認されたのに対し，B群ではいずれも陰性であった。以上の成績より，雌めん羊に季節外の繁殖活動を誘起するために，メラトニン処置を行うことが有功であることが明かとなった。

### 文　献

1) 福井　豊，畜産の研究，39，909-910，1985.
2) Karsch, F.J., Bittman, E.L., Foster, D.L., Goodman, R.L., Legan, S.J., and Robinson, J.E. Rec. Prog. Horm. Res. 40：185-225. 1984.
3) Lincoln, G.A. and Short, R.V. Rec. Prog. Horm. Rec. 36：1-43. 1980.

© The Ito Foundation

4) Bittman, E.L. and Karsch, F.J. Biol. Reprod. 30 : 585-593. 1984.
5) Bittman, E.L., Dempsey, R.J., and Karsch, F.J. Endocrinology 113 : 2276-2283. 1983.
6) Arendt, J., Symons, A.M., Laud, C.A., and Pryde, S.J. J. Endocr. 97 : 395-400. 1983.
7) English, J., Poulton, A.L., Arendt, J., and Symons, A.M. J. Reprod. Fert. 77 : 321-327. 1986.
8) Mori, Y., Shimizu, K., and Hoshino, K. Jpn. J. Anim. Reprod. 33 : 155-159. 1987.
9) Mori, Y. and Kano, Y.J. Reprod. Fert. 72 : 223-230. 1984.
10) Maeda, K., Mori, Y., Sawasaki, T., and Kano, Y. Jap. J. Vet. Sci. 46 : 837-842. 1984.
11) Mori, Y. and Okamura, H.J. Pineal Res. 3 : 77-86. 1986.
12) Mori, Y., Maeda, K., Sawasaki, T., and Kano, Y. Jpn. J. Anim. Reprod. 31. 9-15. 1985.
13) Nowak, R. and Rodway, R.G. J. Peprod. Fert. 74 : 287-293. 1985.
14) Kennaway, D.J., Dunstan, E.A., and Staples, L. D.J. Reprod. Fert. Suppl. 34 : 187-199. 1987.

© The Ito Foundation

# 雌牛の性現象に及ぼす雄牛の行動的影響

Behavioural Influence of a Bull on Sexual Phenomena in Newly Calved Cows

佐藤 衆介 ・ *太田 実 ・ 本田 祐介（宮崎大学農学部，*東北大学農学部附属農場）

Shusuke Sato, *Minoru Ota and Yuusuke Honda
(Faculty of Agriculture, Miyazaki University and *University Farm,
Faculty of Agriculture, Tohoku University)

The effect of bull's social behavour to cows on the first ovulation and the resumption of estrous after calving was investigated.

Each of two herds consisting of 7 beef suckler cows respectively was reard in a group pen with a paddock for 41 days. A bull was added in one herd, when 3 to 18 days passed after calvings. The focal animal sampling of a bull was done for 6 hours a day for 32 days in order to record all occurrences of bull's social behaviour and social partners. The behaviour of the two herds was monitored continuously during the experimental period using a time lapse video system to check behavioural estrous in cows. The first ovulation in each cow was checked using changes of ovaries and changes of a plasma progesterone level every 7 days. A uterus in each cow was also checked by rectal palpation and the reco ery day was confirmed as the day when the uterine horns became the same size and a uterus contracted in a handful size.

The results are as follows;

1) Frequency of bull's social behaviur to cows peaked at around the first and the second ovulation days.
2) The mean first ovulation day and the mean uterus recovery day in cows with a bull were faster by 10 days and 6 days, respectively, than those in cows without a bull.
3) The numbers of cows resuming estrous after being injected with PGF2$\alpha$ did not differ between herds with and withont a bull.

In a herd with a bull, however, cows resuming estrous tended to receive social behaviours more frequently than unestrous cows.

It is concluded that a bull positively stimulates a reproductive physiology of cows and this male effect may derive not from bull's smell but from bull's active behaviour with physical contacts with cows.

## 1. 目 的

前回雌牛の発情回帰に対する male effect の可能性を行動学的見地から実用牛群で検討した[1]。鹿児島県頴娃町営熊ケ谷牧場において，黒毛和種まき牛繁殖牛群2群を調査し，雄の雌に対する行動的関与には個体差がみられ，それに対応して分娩間隔や受胎率が異なることを明らかにした。さらに雄の雌への行動的関与量は分娩後の経過日数に伴って増加するのに対し，雌からの行動的関与量は極めて少ないことを報告した。すなわち，雌牛の繁殖性の改善は，羊や豚で指摘されている雄のニオイ（フェロモン）が刺激となる[2]消極的なものに由来するのではなく，雄からの積極的な物

© The Ito Foundation

理的接触を伴う行動的関与に依存する可能性が示唆された。

そこで今回は，雄の行動的関与と発情や排卵との関係を実験的に明らかにする目的で，同時期に分娩した雌牛から成る２群の一方に雄牛を導入し，それらの関係を調査したので報告する。

## 2. 材料および方法

東北大学農学部附属農場（宮城県鳴子町）の春分娩の雌牛14頭を２群に分け，運動場付きの群飼ペンに入れ，一方に雄牛を導入して41日間飼養した。雄牛の行動を追跡調査し，雌牛との全ての行動的関与を調査するとともに全雌牛の発情，排卵，子宮の修復状態を調べ，行動との関連を検討した。

（１） 供試牛：４月３日～18日に分娩した２～４歳の日本短角種４頭，黒毛和種４頭，および日本短角種と黒毛和種の$F_1$ ６頭を７頭づつの２群に分け，哺乳子牛とともに飼養した。一方の群にまき牛経験のある３歳の日本短角種雄牛１頭を導入した。

（２） 供試場所：両群それぞれ，約300㎡（20.5ｍ×13.5ｍ）の運動場をもつ約20㎡の群飼ペンで飼養した。両群の運動場間の間隔は約１ｍであり，しかも雄牛のいない区はやや低地とした。従って，雄牛からの物理的接触はないものの，その区にも雄牛からのニオイや尿は十分届くものと考えられた。しかし，この時期は雪解けによる増水と長雨により運動場は汚泥化し，極めて悪い状態でもあった。

（３） 飼養管理：両群ともに水とオーチャードグラス主体の乾草を自由摂取させ，補助飼料として濃厚飼料（乳用牛飼育用配合飼料）を雄に５kg/日，雌に３kg/日を10：00と18：00の２回に分けて与えた。

（４） 調査期間：両群とも，1989年４月21日から５月31日（分娩後３～18日から43～58日）まで飼養した。雄の追跡調査を直検，採血，および日曜日を除く32日間，前回の調査で雄牛が最も活動的であった７：00–10：00，15：00–18：00の２つの時間帯に行った。

（５） 調査項目

①雄牛の行動的関与：雄牛１頭を追跡し，それが関わるすべての社会行動を**表１**に示した22種の行動単位からなるエソグラムをもとに分類し，その相手牛も記録する Focal Animal Sampling を行った。雌牛からの雄牛への行動も同様に分類した。放牧地での調査と異なり，Herding（群れから離れた雌牛を軽く突いたり，威嚇しながら群れの中心へ誘導する動作）は見られなかった。

②発情，初回排卵および子宮修復状況：両群について以下の３つの調査を行った。

（１） 行動的発情の確認：牛群全体の動きを高

**表１** 社会行動単位の分類

| 行動単位 | 行動型 |
|---|---|
| 鼻接触<br>頭部接触<br>接近<br>追従 | 集合行動 |
| 威嚇（鼻息）<br>威嚇（角）<br>攻撃<br>追う | 攻撃行動 |
| 嗅ぐ | 探査行動 |
| 陰部を嗅ぐ<br>尿を嗅ぐ<br>尿を舐める<br>フレーメン | 性的探査行動 |
| 陰部を揉む（鼻）<br>陰部を揉む（角）<br>陰部を舐める | 性的刺激行動 |
| 舐める<br>じゃれあう | 親和行動 |
| リビドー<br>ノッヂング<br>顎乗せ<br>乗馬 | 前交尾行動 |

© The Ito Foundation

感度カメラ（SONY AVC-D1，最低被写体照度31 ux）とタイムラプスビデオ（Panasonic AG-6020）を用いて，調査期間中連続撮影し，発情をチエックした。夜間照明として，300Wの投光器を各群1基ずつ点灯した。

（2） 初回排卵日の確定：直腸検査と超音波による画像解析を7日間隔で行ない，黄体および成熟卵胞を確認すると共に，プロジェステロンの血中濃度を7日間隔で測定し，その変化から初回排卵日を確定した。

（3） 子宮修復状況：前述の直検および画像解析により左右子宮角がほぼ同じ大きさとなり，子宮が掌中に収まる時期を確定した。

③発情の誘起：今回は管理上の制約により，5月31日までしか調査ができなかったが，その間に行動的発情は回帰しなかった。そこで，発情を誘起するために，6月2日（分娩後45～60日）および12日（同55～70日）にプロスタグンディン$F_2\alpha$の投与を行い，それぞれその後3日間ヒートディテクターにより発情誘起の有無をチェックした。

## 3. 結果および考察

### 3.1 雄牛の行動的関与の行動型別頻度

全調査期間中に観察された雄牛の行動的関与を行動型別に分け，**図1**に示した。受容とは雌牛から雄牛に対して行われた行動的関与である。全部で2,086回の社会行動が観察され，攻撃行動36回，集合行動206回，親和行動190回，探査行動198回，性的探査行動756回，性的刺激行動127回，前交尾行動318回および受容行動255回であった。すなわち雄から雌に行った社会行動の66%は性的探査，性的刺激および前交尾行動という，陰部を中心とした性的関与であった。前回[1]と同様に雌牛からの行動的関与は極めて少なく，雄雌間の行動的関与は，雄牛からの行動に大きく依存していると言える。

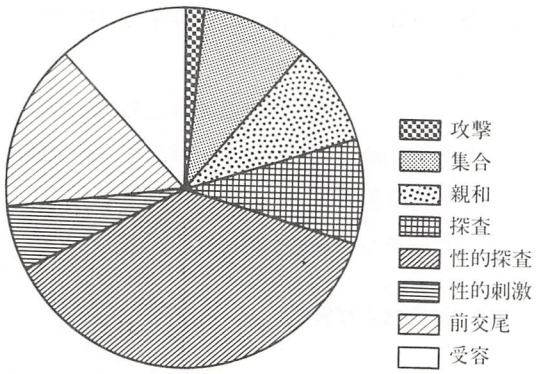



**図1**　雄牛の行動的関与の行動型別回数

雌牛1頭に対する1時間当たりの行動頻度の平均と標準偏差，および範囲を**表2**に示した。変動係数は21%から93%と非常に大きく，雌により雄の関与量は大きく異なることが明らかとなった。変動の大きな行動型は，親和行動，攻撃行動および性的接触行動（性的刺激と前交尾行動）で，比較的小さな行動型は，集合行動と性的および非性的な探査行動であった。

### 3.2 分娩後の経過日数に伴う雄牛の行動的関与の変化

分娩後の経過日数に伴い，雄牛からの行動的関与量は2峰性に推移することがみられた（**図2**）。前回は分娩後約30日まで調査し，経過数に伴い行動量が増加する傾向を報告したが，今回も同様の傾向がみられた。さらに，20日後位に再び行動量の増加がみられた。卵巣検査および血中プロゲス

**表2**　雌牛1頭に対する雄牛の行動的関与の頻度
（回／頭／時間）

| 行動型 | 平均±SD | 範　囲 |
|---|---|---|
| 攻撃 | 0.03±0.02 | 0.01～0.05 |
| 集合 | 0.19±0.05 | 0.10～0.23 |
| 親和 | 0.15±0.14 | 0.03～0.40 |
| 探査 | 0.18±0.05 | 0.11～0.25 |
| 性的探査 | 0.70±0.15 | 0.49～0.86 |
| 性的刺激 | 0.12±0.07 | 0.05～0.25 |
| 前交尾 | 0.27±0.15 | 0.07～0.50 |
| 受容 | 0.23±0.14 | 0.10～0.44 |
| 計 | 1.97±0.60 | 1.18～2.87 |

© The Ito Foundation

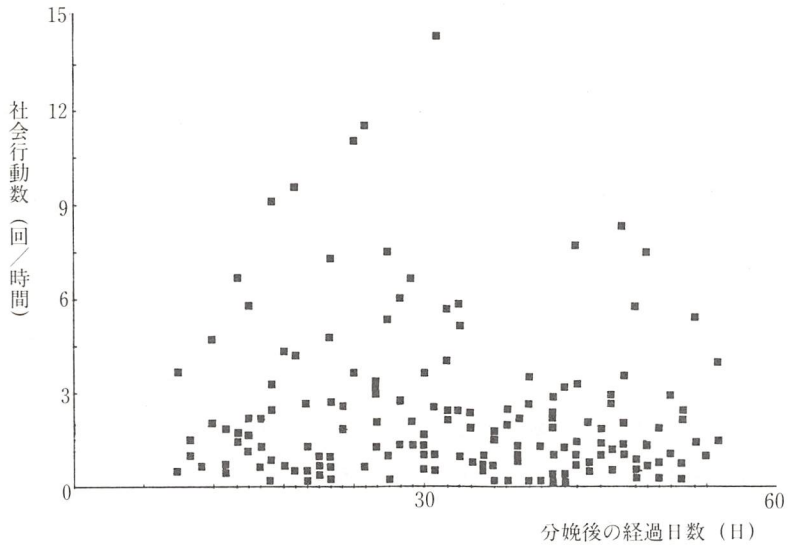



**図2**　分娩後の経過日数に伴う雄牛の行動的関与の変化

テロン濃度の動きにより分娩後平均31.8日で無発情初回排卵がみられたが，これと行動的関与量との関連が示唆された。さらに次回排卵と考えられる約20日後にも行動量の増加がみられ，無発情排卵にもかわらず，雄牛はそれを感知している可能性も示唆された。

3.3　分娩後の初回排卵および子宮修復日数

両群の分娩後の初回排卵および子宮修復日数の平均および標準偏査を**表3**に示した。雄牛を導入した群では初回排卵で10日，子宮修復日数で6日も短かくなり，特に子宮修復日数の差は1％水準で有意であった。つまり，初回排卵と子宮修復という雌牛の性現象に対し，雄牛の効果，すなわちmale effectの存在が認められた。

**表3**　分娩後の初回排卵および子宮修復日数
（平均±SD）

| | 調査群 | 対照群 |
|---|---|---|
| 初回排卵 | 31.8±11.7 | 41.3±13.1 |
| 子宮修復 | 32.3± 5.7* | 38.1± 3.0 |

* 群間に有意差あり（$P<0.01$）

3.4　プロスタグランディン$F_2\alpha$投与による発情誘起と行動的関与量との関係

調査期間中，両群とも発情は起こらなかった。そこで$PGF_2\alpha$を投与し，発情誘起を行ったが，両群間で誘起率に差は認められなかった。雄導入群内の雌牛を発情誘起グループと無発情グループとに分け，両グループ間で雄牛からの行動的関与量を比較した（**表4**）。発情誘起グループでは雄牛から，ほとんどの行動型において無発情グループに比較して多く行動を受ける傾向にあった。探査

**表4**　$PGF_2\alpha$投与による発情誘起と行動的関与
（平均±SD）

| 行動型 | 発情群（4頭） | 非発情群（3頭） |
|---|---|---|
| 攻撃 | 0.04±0.02 | 0.03±0.01 |
| 集合 | 0.20±0.04 | 0.16±0.06 |
| 親和 | 0.18±0.16 | 0.11±0.12 |
| 探査 | 0.21±0.03* | 0.13±0.02 |
| 性的探査 | 0.79±0.10 | 0.58±0.13 |
| 性的刺激 | 0.12±0.03 | 0.13±0.11 |
| 前交尾 | 0.36±0.11* | 0.14±0.07 |
| 受容 | 0.20±0.16 | 0.26±0.12 |
| 計 | 2.01±0.46 | 1.32±0.39 |

* 群間に有意差あり（$P<0.05$）

© The Ito Foundation

行動および前交尾行動は5％水準で有意差さえみられた。雄牛の行動的関与が，プロスタグランディンに対する性的反応性の生理的基盤を改善する可能性が示唆された。

前述したように，今回の調査は運動場の汚泥化に伴う衛生環境や温熱環境の不備および積雪寒冷地でありがちな冬期間の低栄養という悪条件の中で行われた。従って，分娩後40～60日までの調査にも拘らず，雌牛の発情を回帰させることはできなかった。しかし，その悪条件下でも雌牛の性現象に対する雄牛の効果は明らかであり，しかもその効果はニオイと言うよりも雄牛の物理的接触を伴う積極的行動に由来する可能性が示唆された。

## 4. 要　約

雌牛の分娩後の初回排卵や，発情回帰に及ぼす雄牛からの行動的関与の影響を調査した。春分娩の肉用繁殖牛14頭を同数づつの2群に分け，運動場付きの群飼ペンにいれ，一方に雄牛を導入し，41日間飼養した。雄導入時の雌牛の分娩後の経過日数は3～18日であった。行動調査は，雄牛を追跡し，雄牛が関る全ての社会行動とその相手牛を記録する Focal Animal Sampling 法で，1日6時間計32日間行った。牛群全体の動きをタイムラプスビデオで昼夜連続撮影し，発情の有無をチェックした。初回排卵日は，7日間隔で行った直検による卵巣の状態とプロジェステロンの血中濃度の変化から確定した。直検により，左右子宮角がほぼ同じ大きさとなり，子宮が掌中に収まる時期を子宮修復日として確定した。

その結果，分娩後の経過日数に伴って，雄牛からの行動的関与量は2峰性に推移し，それは初回排卵および次回排卵と一致していた。雄牛を導入した群では初回排卵で10日，子宮修復日数で6日も短くなった。$PGF_2\alpha$ 投与により発情誘起を行ったが，両群間で誘起率に差はみられなかった。しかし，雄導入群内における発情誘起雌牛は，無発情雌牛に比べて雄からの行動的関与を多く受ける傾向にあった。以上より，雌牛の性現象に対する雄牛の促進効果は明らかであり，それはニオイというよりも雄牛の物理的接触を伴う積極的行動に由来する可能性が示唆された。

本研究の実験設定に対しご協力いただいた東北大学農学部附属農場の二瓶章技官，千葉孝技官はじめ職員の方々並びにホルモン定量をしていただいた東北大学農学部の梅津元昭博士に感謝いたします。

### 文　献

1) 佐藤衆介・本田祐介，発情再帰前の雌牛に対する雄牛の行動的関与，昭和63年度食肉に関する助成研究調査成果報告書，Vol. 7：79-84. 1989.

2) Fraser, A.F., Reproductive Behaviour in Ungulates, 58-63. Academic Press. London. 1968.

© The Ito Foundation

# 褐毛和種集団の繁殖構造に関する研究

Studies on the Breeding Structure of Japanese Brown Cattle

木　場　俊太郎（熊本県農業研究センター）

Shuntaro Koba (Kumamoto Prefectural Agricultural Research Center)

The Japanese Brown Cattle is one of the beef cattle breeds in Japan and the ori gin of this breed was a local cattle in kumamoto prefecture , Japan.

To improve draught ability, imported foreign breeds (Simmental, Ayrshire, Brown Swiss, etc.) was crossed 93 years ago.

This breed was recognized as a breed in 1944.

From 1962, to improve the meat productive ability, the performance test was introduced.

In order to clarify the changes in breeding structure of this cattle population from 1955 to 1990, the author sampled breedng cows from the population at intervals of 5 or 11 years and calculated the value of inbreeding coefficient, components of current inbreedng, components of inbreeding expected from relationship, index of subdivision and effective size of population, and estimated the breeding process of this breed.

Results were summarized as follows; (1) The inbreeding coefficient has increased remarkably, but the frequency of the current inbreeding was observed to be comparatively constant. (2) The degree of relationship has increased year by year, but the population has not necessarily increased genetical homogeneity. (3) Emigration and immigration of the breeding stocks between area are still going on. (4) The index of subdivision has showed that the local or strain division has occured. (5) The effective size of population has not decreased.

## 1. 目　的

褐毛和種は他の品種の和牛と同様に，1890年代から輸入外国種との交雑による改良が行われた。とくにシンメンタール種との交雑種は飼養条件への適性が高いものと評価され，1923年に熊本県産牛調査会は改良基礎牛とすることを決定した。1944年に和牛を１つの固定種とみなすにあたり，褐毛和種と称されることになり品種として公式に成立した。その後，1962年の審査標準の改訂はそれまでの役肉用牛の用途から肉用牛の用途に向けての改良方向を意図して行われ，同時に産肉能力検定（間接法）が開始された。さらに1968年から産肉能力検定（直接法）を開始して種雄牛の選抜を行ってきた。これら検定の導入ならびに子牛や肉質の市場評価情報を基に改良に係る繁殖集団の交配および選抜が進められてきたが，この品種に対する改良上の命題は肉質の向上であり，血統ならびに市場評価情報を組み込んだ種雄牛の選抜手法や受精卵移植技術を応用した種雄牛作出も開始されてきた。そこで当然のことながら今後の育種計画のなかで，選抜強度は高められることも予測されるが，世代の経過にともなう繁殖に係る集団の血縁の高まりの問題を考慮しておくべきである。

© The Ito Foundation

この品種について近親交配による繁殖性の低下などに関する事柄が顕現しているとは言えないが，既報[1,2]のように1955年以降の褐毛和種繁殖集団の平均近交係数は微増していて，品種全体としては系統的分化が生じてきている傾向がみられる。そこでこの品種の繁殖構造すなわち集団の近親交配の度合およびこれらに影響を与える要因の解析ならびに今後の経時的分析を迅速に行うための調査個票のデータファイルを行い，育種管理評価の一手法としたい。

## 2. 方　法

この種の研究は，遺伝的改良量とくに形質の改良速度の大きさを決定するとされる世代間隔に相当する年次の間隔を採って調査年次を設定すべきであると考えられている。このため，褐毛和種集団の平均世代間隔を推定したところ，1954年中期は5.44年で1975年には4.75年と年次の経過に伴ない短縮されていて，国内の他品種より短かい約5年と推定される[3]。このことから，調査年次を1955年から1985年までは～2.1世代に相当する1966年，1975年を中に採り，1985年以降は1世代に相当する年次を設定するため，今回の調査では1990年を採った。結果の整理は熊本県内の行政区画に基づく地域ならびに県全体について分けて行った。調査材料は調査年次に相当する年次および前年次に日本褐毛和牛登録協会から発行された登録簿から9行おきに記載されている種雌牛の個体を採り，熊本県外で飼育されているものを除いたものを調査標本とした。この調査は時系列分析であるため品種成立の1944年を基準年次とすることし，1955年は3世代，1966年は5世代遡った血統図を作成した。1975年および1985年の調査では基準年次をそれぞれ1955年と1966年とし4世代遡り，1990年は1975年を基準年次とし3世代遡った血統図を作成した。近交係数はWrightの式[4]（F） $F=1/2\sum(1/2)^{n+n'}\cdot(1+F_A)$ nおよびn'：標本個体の父および母から共通祖先に至る世代数，$F_A$：共通祖先の近交係数を用いて算出し，個体毎の数値の平均値を全近交係数とした。平均血縁係数はWright & McPheeの式[5]（R） $R=C/m(m-1)^{2n-1}$ C：共通祖先のある対の数，m：調査個体数，n：遡った世代数を用いて算出した，集団内の平均血縁係数の全近交係数への寄与量（F'）はR/2とした。細分化指数（Index of subdivision）はF/F'[6]により求めた。強度な近親交配（Current inbreeding）の全近交係数への寄与量（F''）は，半きょうだい交配以上の個体値から分画した。移入率は行政区画で区分された地域内へ雄を介して（種雄牛または精液）と雌を介して（種雌牛）の移入の割合を求め，その平均値を全移入率とした。集団の有効な大きさ（Effective size）は野澤の式[7]（N） $N=4Nm/V^2_{Km}+1$ Nm：種雄牛の数，$V_{Km}$：種雄牛のi番目のものがKm頭の雌子牛を生産したときの変動係数により求めた。各調査年次の調査標本の血統図および項目毎の計算値はファイル化し保存した。

## 3. 結果と考察

調査年次別の標本数は，1955年518頭，1966年327頭，1975年743頭，1985年492頭，1990年474頭となった。各年次に供用された種雄牛の数は，1955年194頭，1966年113頭，1975年110頭，1985年92頭，1990年83頭であった。

### 3.1 全近交係数

1955年から1990年までの地域および県全体の推移を**Table 1**に示した。地域内での数値の動きは一様ではないが，近交係数ゼロの個体の割合は1955年の90.5%から1990年の47.5%と減少していて全近交係数の値は漸増してきている。また，親子交配，半きょうだい交配のような強度の近親交配の全近交係数への寄与量を**Table 2**に示したが，

© The Ito Foundation

**Table 1** Inbreeding Coefficient.

(%)

| Area | 1955 | 1966 | 1975 | 1985 | 1990 Year |
|---|---|---|---|---|---|
| Tamana | 0 | 0.97 | 1.81 | 1.38 | 6.02 |
| Kamoto | 0.07 | 0.97 | 0.39 | 2.07 | 1.51 |
| Kikuchi | 0.37 | 0.87 | 0.69 | 2.54 | 2.24 |
| Aso | 1.73 | 2.19 | 2.18 | 3.65 | 4.67 |
| Kamimashiki | 0.92 | 2.02 | 1.84 | 2.87 | 3.38 |
| Shimomashiki | 0 | 0.61 | 0.04 | 1.15 | 1.74 |
| Kuma | 0.24 | 2.57 | 0.90 | 2.22 | 2.59 |
| Total | 0.83 | 1.26 | 1.34 | 2.38 | 3.36 |

**Table 2** Coefficient of Current Inbreeding

(%)

| Area | 1955 | 1966 | 1975 | 1985 | 1990 Year |
|---|---|---|---|---|---|
| Tamana | 0 | 0 | 1.49 | 0 | 1.66 |
| Kamoto | 0 | 0.66 | 0 | 0.93 | 0 |
| Kikuchi | 0 | 0 | 0 | 1.85 | 0.04 |
| Aso | 1.00 | 0.73 | 0 | 0.62 | 0.91 |
| Kamimashiki | 0.74 | 1.39 | 0 | 0.33 | 0.88 |
| Shimomashiki | 0 | 0 | 0.55 | 0 | 0.61 |
| Kuma | 0.20 | 0 | 0.32 | 0.27 | 0 |
| Total | 0.47 | 0.46 | 0.20 | 0.62 | 0.56 |

地域によっては意識的に交配がなされたことも推察出来るものの，比較的に一定の頻度で出現しているものと考えられた。さらに非常に近交度の高い種雄牛によって改良が進められていないことも，この品種の繁殖構造の一つの特徴である。

3.2　平均血縁係数

地域内および県全体の平均血縁係数を**Table 3**に示した。地域により一様ではないが，1975年から以降の数値は増加している。繁殖に係る集団の動態は地域によって増減がみられるが，現状では

**Table 3** Relationship Coeffient within Area.

(%)

| Area | 1955 | 1966 | 1975 | 1985 | 1990 Year |
|---|---|---|---|---|---|
| Tamana | 1.25 | 1.08 | 1.05 | 0.21 | 13.84 |
| Kamoto | 0.69 | 0.49 | 0.79 | 2.72 | 6.84 |
| Kikuchi | 1.29 | 0.62 | 0.44 | 3.42 | 4.87 |
| Aso | 2.41 | 2.22 | 1.52 | 6.90 | 11.97 |
| Kamimashiki | 1.01 | 0.99 | 1.24 | 1.59 | 3.17 |
| Shimomashiki | 1.14 | 0.69 | 1.12 | 1.31 | 7.20 |
| Kuma | 1.31 | 0.56 | 2.60 | 5.10 | 9.86 |
| Total | 0.89 | 0.89 | 1.36 | 2.61 | 4.21 |

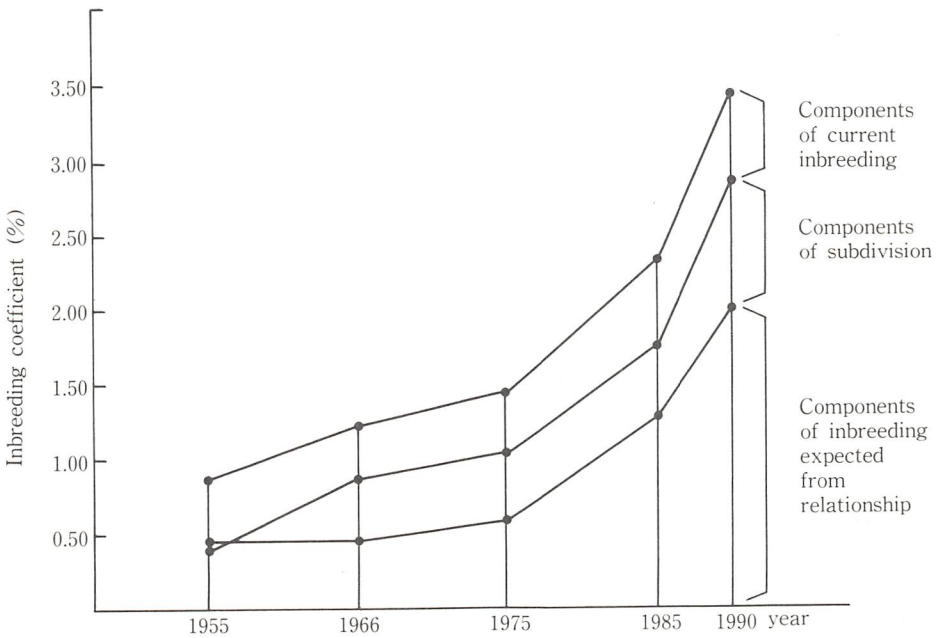



**Fig. 1** Time Trends of Inbreeding Coeffcient in each Period and their Components.

© The Ito Foundation

限定された繁殖集団のなかで，設定した改良目標に向けて優良形質を持った特定系統の交配の推進がなされるものと考えられる。ただ平均血縁係数の数値の構成成分のなかに共通祖先の異なった系統によるものも包含されていて，これが今後の繁殖構造の変化に影響を与える一つの要因になるであろう。また地域間の平均血縁係数は阿蘇および球磨の2地域と他の地域との間の数値が高いことが認められていて[1,8]，この2地域からの種畜供給の割合が高かったが，1985年以降は地域内への移入も限定されていない。これらのことから遺伝的な均質化は生じていないものと考えられる。

3.3 全近交係数の構成成分

この品種の集団における全近交係数の構成成分をみるため，**Table 3** に示した平均血縁係数を用いて集団内の平均血縁係数の全近交係数への寄与量（F'）を計算し，強度な近親交配の全近交係数への寄与量（F''）は **Table 2** を用いて構成成分の分画を調査年次ごとに求めたものを **Fig. 1** に示した。この図のなかで前記の2つの構成成分の中間を構成するものは，地域または系統的な分化による全近交係数への寄与量を示すことになる。1966年以降はF'の上昇が明白で約5世代の経過のなかで4.7倍になっている。F''および地域，系統的分化による構成成分は調査年次によっては変動が認められるが，全近交係数を上昇させてきている主要因はF'であると言える。

3.4 地域内への移入率

地域への種畜（種雄牛および種雌牛）ならびに精液の移入率を求め **Table 4** に示した。古くからの産牛地帯であり，種畜の供給地域である阿蘇と球磨の移入率は低い。この表は全移入率を示しているが，各地域の移入は種雄牛の移動または精液の広域利用による雄を介してのものが種雌牛の移動である雌を介してのものよりも多かった。調査年次別にみると，1975年にはどの地域も移入率が増加し，1985年に減少し，1990年には再び増加している。このことが集団の平均血縁の度合を増加させる要因となっていることが推察される。

**Table 4** Imigration Rate of Breeding Cattle.

(%)

| Area | 1955 | 1966 | 1975 | 1985 | 1990 Year |
|---|---|---|---|---|---|
| Tamana | 48.08 | 33.89 | 85.30 | 83.33 | 100.00 |
| Kamoto | 28.87 | 17.65 | 67.00 | 44.44 | 71.43 |
| Kikuchi | 37.91 | 17.76 | 56.98 | 36.23 | 45.21 |
| Aso | 2.46 | 4.10 | 34.15 | 3.56 | 32.06 |
| Kamimashiki | 37.96 | 33.34 | 54.17 | 7.32 | 53.45 |
| Shimomashiki | 42.59 | 40.00 | 48.84 | 30.77 | 57.14 |
| Kuma | 19.33 | 7.36 | 48.71 | 3.76 | 23.59 |

3.5 細分化指数

Lushが提唱した細分化指数[6]を求め **Table 5** に示した。調査年次の経過に伴う地域の数値は上益域を除いて変動があり，種畜の供給地域においても近交の回避が行われていることがわかる。しかし品種の全体としては地域または系統的分化が

**Table 5** Index of Subdivision.

| Area | 1955 | 1966 | 1975 | 1985 | 1990 Year |
|---|---|---|---|---|---|
| Tamana | 0 | 1.79 | 3.45 | 13.14 | 0.87 |
| Kamoto | 0.20 | 3.88 | 0.80 | 1.52 | 0.44 |
| Kikuchi | 0.57 | 2.51 | 1.45 | 1.49 | 0.92 |
| Aso | 1.44 | 1.97 | 0.60 | 1.06 | 0.78 |
| Kamimashiki | 1.84 | 2.02 | 1.50 | 3.68 | 2.13 |
| Shimomashiki | 0 | 1.74 | 0.07 | 1.74 | 0.16 |
| Kuma | 0.37 | 2.03 | 0.51 | 0.87 | 0.53 |
| Total | 1.93 | 2.80 | 1.18 | 1.82 | 1.74 |

**Table 6** Effective Size of Population.

| Area | 1955 | 1966 | 1975 | 1985 | 1990 Year |
|---|---|---|---|---|---|
| Tamana | 101.33 | 33.89 | 86.56 | 42.91 | 18.80 |
| Kamoto | 94.01 | 38.99 | 101.62 | 54.36 | 55.75 |
| Kikuchi | 45.92 | 41.92 | 81.04 | 62.86 | 86.02 |
| Aso | 41.15 | 54.72 | 100.00 | 156.00 | 57.73 |
| Kamimashiki | 50.87 | 36.74 | 56.01 | 41.27 | 46.73 |
| Shimomashiki | 26.44 | 31.74 | 75.14 | 35.61 | 39.32 |
| Kuma | 120.69 | 58.40 | 98.11 | 83.48 | 30.88 |
| Total | 370.69 | 188.57 | 341.09 | 165.26 | 175.79 |

© The Ito Foundation

生じてきていると言える。したがって地域内の動きに変化があるため，集団としてみる限り繁殖構造上の均質化の傾向はみられていない。

3.6　集団の有効な大きさ

集団の有効な大きさの計算値を**Table 6**に示した。地域の数値には変動があるが，調査年次の経過に伴う推移をみると，1955年から1966年にかけて縮少し，1975年に拡大した後に1985年に縮少し1990年に至っている。このことは**Table 4**に示した移入率の増加，減少に関連していて，雄を介しての増加と特定種雄牛の娘牛生産のかたよりが少なくなったことによるものと考えられる。

以上3.1から3.6まで褐毛和種集団の繁殖構造に関係する事項の分析を行ったが，我が国の和牛の品種について必らずしもこの種の調査が多いとは言えない状況のもとで，公表されたものから概観すると，特定の閉鎖集団の系統繁殖を除いて，いづれの品種も集団の近交度を問題視する状況にあるとは言えない。勿論，近交の回避，育種に係る繁殖集団の拡大および移出入の増大など育種計画の推進のなかでの配慮が介在していることによるものと考えられ[9]，緊急的な対応を論議する場面展開にあるとは言えないが，今後，育種手法の精度向上は選抜強度を高めるであろうし，受精卵移植技術を応用した育種法は世代間隔を短縮出来ることなど，繁殖構造に影響を与える要因の分析は側面的に行われるべきであると考える。同時に現状の育種目標とは直接的には係わりを持たない品種内の系統群の取り扱いにも配慮が必要ではないかと考えられる。

## 4. 要　約

我が国の肉専用種の1つである褐毛和種は，93年前に役能力改良のため輸入されたシンメンタール，エアシャー，ブラウンスイスと熊本県在来牛との交雑種を基礎とした品種で，1944年に品種として成立した。1962年から肉専用種として産肉能力を高めるため能力検定事業を行い改良を進めている。そこで1955年から1990年に至るこの品種の繁殖構造の推移を調査するため，5年または11年間隔で繁殖に係る種雌牛集団から抽出した標本個体を用いて，近交係数，強度の近親交配，平均血縁係数の近交係数への寄与量，細分化指数ならびに集団の有効な大きさなどを調査し，この品種の育種過程を観察した。結果の概要はつぎのとおりである。(1)　集団の全近交係数は明らかに増加している。しかし強度の近親交配の出現頻度は大きく増減していない。(2)　集団の血縁の度合は年々増加傾向にあるが，遺伝的に均質化されているとは言えない。(3)　種畜の地域間の移出入は行われている。(4)　細分化指数をみると地域的または系統的分化が起っている。(5)　集団の有効な大きさは必らずしも縮少されてはいない。

### 文　献

1)　木場俊太郎，日畜会報，42：257-262，1971.
2)　S. Koba, Proceeding of 5th WCAP：517，1988.
3)　木場俊太郎，西日本畜会報，26：39-40，1983.
4)　Wright, S., J. Hered., 14：339-348，1923.
5)　Wright, S., and Mcphee, H., C., J. Agric. Res., 31：377-383，1925.
6)　Lush, J., L., Amer. Nat., 80：318-342，1946.
7)　野澤　謙，日畜会報，32：65-73，1961.
8)　木場俊太郎，研究会資料（未印刷）1985.
9)　木場俊太郎，西日本畜会報，31：1-8，1988.

© The Ito Foundation

# ブラーマン種およびサンタガートルデイス種の遺伝的性能の日本における有用性の検証

Studies on the Usefulness for the Genetic Character of Brahman and Santa Gertrudis Cattle in Japan

水間 豊・*太田 実・山岸 敏広・篠原 久・八巻 邦次
（東北大学農学部，*同附属牧場）

Yutaka Mizuma, *Minoru Ota, Toshihiro Yamagishi, Hisashi Shinohara and Kuniji Yamaki (Faculty of Agriculture and *University Farm, Tohoku University)

The studies are carried out to investigate the genetic characters of Brahman and Santa Gertrudis-sired crossbred cattle whether useful or not for the beef production system in Japan.

（1） Each four cows, of Brahman × Japanese Black (ZB) and Japanese Black (BB) were fed on ad libitum in low-quality timothy hay and cubed alfalfa hay. Mean intake of timothy per unit body weight was 1.3% in ZB and 1.9% in BB. This difference is significant, but the mean intake of alfalfa showed no difference in both breed. Digestibility of dry matter, neutral detergent fiber and acid detergent fiber of timothy hay were higher for ZB cows than those for BB cows. This result suggests a contribution of cross breeding of Brahman to improving utilization of low-quality roughage in cattle, while the digestibility of alfalfa in both breeds showed no difference.

（2） Average daily feed intake per metabolic body weight in pasture of the Brahman cross cow group (Z) is more than 149% that of the Japanese Black cow group (B) in June. In Sept ember average daily feed intake of Z is also superior (159%) than that of B. These results were shown in the case of the steer of Z and in range[3].

（3） Milk yield ability of the cows in ZB is superior to those of BB. These results reflected by growth of their calves.

（4） On 9th of February 1990, 60 Santa Gertrudis and 40 Brahman frozen semen were imported from Wacol Artificial Insemination Center, Departmet of Primary Industries, Wacol, Queenzland, Australia, to produce hybrid between Bos indicus Breeds and Japanese beef cattle Breeds. From February to April, artificial insemination of Santa Gertrudis semen were carriedout to Japanese Black cows and to Japanese Shorthorn cows treated $PGF_2\alpha$ in usual way. At present, 10 Japanese Black cows and 6 Japanese Shorthorn cows have been pregnant.

## 1. 目　的

牛肉の輸入自由化時代を迎える中で，わが国の肉用牛生産を発展させるためには，肉用牛の生産技術全般にわたって再検討する必要がある。そこで，わが国の肉用牛品種の特性を点検する目的で，Bos indicusに属するブラーマン種の精液を，伊藤記念財団の昭和59年度[1]と60年度[2]の研究助成を受けてオーストラリアから輸入し，本学附属農場で飼育中の黒毛和種，日本短角種，ホルスタイ

© The Ito Foundation

ン種に人工授精して分娩させ，それらの産子がわが国の夏山冬里の飼養条件下で有用か否かを点検することにした。そして，昭和60年11月末より62年5月までにZB（ブラーマン種ZZ×黒毛和種BB）9頭（♀4，♂5）と，ZN（ブラーマン種×日本短角種NN）8頭（♀2，♂6）およびZH（ブラーマン種×ホルスタイン種HH）8頭（♀4，♂4）の産子を得た。

これらの産子のうち去勢牛の性能を調査したところ基礎代謝が低いこと，放牧地での採食性と成長がよいこと，ピロプラズマに対する抵抗性に優れていることが明らかとなり，ブラーマン種の性能が$F_1$に遺伝し，日本の条件下でも優れた成績[3]を示すことを確認した。

本年度においては，$F_1$成雌牛の粗飼料利用性を純粋種と比較するほか，放牧地における採食性ならびに舎飼時の授乳量について検討することとした。また，サンタガートルデイスの精液を輸入し，本学農場の肉専用種に人工授精して$F_1$を生産し，ブラーマン種$F_1$と比較することとした。

## 2. 方　法

### 2.1　$F_1$成雌牛の粗飼料利用性の比較

ZB4頭（36ヵ月齢・体重440kg）とBB4頭（38ヵ月齢・体重390kg）をスタンチョン牛舎に収容し，チモシー乾草（結実期，5cmに細断）を試験開始30日前より23日間飽食させた。その後7日間定量給飼（時刻，9.00と17.00）したあと，7日間消化試験を行った。さらに，この試験終了後直ちにヘイキューブ（アルファルファ単品）飽食に切り換えた。そして，7日目より定量給与の7日間の予備飼育を行ったあと，アルファルファの消化試験を7日間行った。全期間を通して水は自由飲水させた。

消化試験期間中，給与飼料の約1％を毎日2回の給与直前に採取し，8頭分を混和し保存した。残飼は毎日2回の給飼時刻前に各牛ごとに計量した後，その10％を採取し保存した。飼料給餌後1時間以内にゴムマット上に排泄された新鮮糞を採取し，バケツ内でよく混和後，約100gを採取して凍結保存した。これらの各保存試料は7日分をそれぞれよく混和し，四分法により約200gを採取し分析に供した。飼料および糞中の一般成分[a]，酸性デタージェント不溶性線維（ADF）[b]および酸性デタージェントリグニン（ADリグニン）はAOAC法[4]に従い，中性デタージエント不溶性線維（NDF）[c]はVAN SOEST and WINE[5]の方法に従って測定した。消化率は，ADリグニンを指示物質とする指示物質法により算出した。

注a．b．c：飼料よび糞の一般成分の分析は全酪連に，また飼料中のNDF，ADFの分析は雪印種苗（株）に依頼した。

### 2.2　$F_1$成雌牛の放牧地での採食量の比較

ペレニアルライグラス・オーチャードグラス・クロバー主体の牧草地（11m×100m）を電牧により2つに区切り，一方にブラーマン交雑種（Z）雌牛群，他方に黒毛和種（B）雌牛群を収容した。6，7，10月の各月1日ずつ，24時間の放牧中の採食量を推定した。供試頭数は6，7月は9頭ずつ，10月は6頭ずつである。

採食量の推定は，放牧前後に各牧区内に1m×1mのコドラートを10ヵ所設置し，各コドラート内の草の重量を測定し，それに草地面積を乗じて，放牧地内の草の現在量を求め，その放牧前後差から両牛群の採食量を推定した。また，NDF，TDNの摂取量も推定した。

### 2.3　舎飼時における授乳量の比較

11月末より1月末までに各月1回，3回に亘り，子牛の哺乳前後の体重差から授乳量を推定した。調査前日17.00に母子分離後，調査当日8.00に授乳させ子牛体重の変化量を朝の授乳量とし，その後再び母子分離後17.00に再び子牛に吸乳させ，

© The Ito Foundation

その体重差を夕の授乳量とし，朝と夕の授乳量を合計した。用いた母牛は，ZB，ZN，ZH各2頭，BB，NN，BN（黒毛×短角）各7頭ずつで，産子はこれらの母牛に黒毛和種を交配して出生させたものである。子牛の開始時の日齢は40日から68日齢である。

## 3. 結果と考察

### 3.1 $F_1$成雌牛の粗飼料利用性の比較

両飼料の成分を**Table 1**に示す。チモシー乾草の粗タンパク質が僅に低く，アルファルファのリグニン含量が僅に高いことを除けば，両飼料は標準的な成分値[6]を示した。チモシー乾草はアルファルファに比べかなり低質飼料である。1日の両飼料摂取量（%/BW）は**Table 2**に示すようにZB 1.3～1.4でBBの1.9～1.6より小さい。日本飼養標準[7]の推奨する同月齢の肉用雌牛の摂取量は1.8前後であり，ZBはかなり少ないことが明らかとなった。

飼料各成分の消化率を**Table 3**に示した。チモシー乾草を給与した場合，タンパク質以外の乾物，中性および酸性デタージェント線維（NDFおよびADF）の消化率はZBがBBより有意に高かった。このことは12ヵ月齢のZBとBB去勢牛でのチモ

**Table 1** Composition of timothy hay and cubed alfalfa hay (% dry matter).

| Feed | C.P. | C.Fat | C.Fiber | NFE | C.Ash | NDF | ADF | Lignin |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Timothy hay | 4.8 | 1.8 | 37.4 | 50.7 | 5.2 | 70.0 | 42.3 | 8.5 |
| Cubed hay (alfalfa) | 18.0 | 2.0 | 26.1 | 39.9 | 13.8 | 56.6 | 31.9 | 8.4 |

**Table 2** Feed intake of two Breeds of cattle.

| Feed | Breed[1] | Cattle No. | Body weight(kg) | Daily feed intake (% BW) | Intake (kg/day) Dry matter | Crude protein |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Timothy hay | ZB | 568 | 418 | 1.4 | 5.9 | 0.29 |
| | | 570 | 420 | 1.6 | 6.7 | 0.32 |
| | | 571 | 401 | 1.6 | 6.4 | 0.32 |
| | | 572 | 516 | 1.2 | 6.2 | 0.30 |
| | | | 439±52[a] | 1.4±.2[a] | 6.3±.4[ac] | 0.31±.01[a] |
| | B | 562 | 409 | 1.8 | 7.5 | 0.36 |
| | | 603 | 379 | 2.1 | 7.8 | 0.37 |
| | | 606 | 438 | 1.6 | 6.9 | 0.34 |
| | | 610 | 351 | 2.0 | 7.1 | 0.36 |
| | | | 394±38[a] | 1.9±.2[b] | 7.3±.4[b] | 0.36±.02[a] |
| Cubed hay (alfalfa) | ZB | 568 | 417 | 1.6 | 6.5 | 1.2 |
| | | 570 | 426 | 1.2 | 5.1 | 0.9 |
| | | 571 | 393 | 1.2 | 4.8 | 0.8 |
| | | 572 | 532 | 1.2 | 6.2 | 1.1 |
| | | | 442±62[a] | 1.3±.2[ab] | 5.7±.8[ac] | 1.0±2[b] |
| | B | 562 | 410 | 1.7 | 6.8 | 1.2 |
| | | 603 | 380 | 1.6 | 6.1 | 1.1 |
| | | 606 | 427 | 1.5 | 6.5 | 1.2 |
| | | 610 | 353 | 1.8 | 6.2 | 1.1 |
| | | | 392±33[a] | 1.6±.1[ab] | 6.4±.3[ac] | 1.2±.1[c] |

[1] Abbreviations: ZB. $F_1$ of Brahman×Japanese Black: BB. Japanese Black.

[2] Means±SD.Means with different superscripts in the same column are significantly different ($p<0.05$).

© The Ito Foundation

**Table 3** Digestibility of dry matter, crude protein, neutral detergent fiber and acid detergent fiber of feeds in two breeds of cattle.

| Feed | Breed[1)] | Cattle No. | Digestibility (%) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Dry matter | Crude protein | Neutral detergent fiber | Acid detergent fiber |
| Timothy hay | ZD | 568 | 53.3 | 28.7 | 52.1 | 40.3 |
| | | 570 | 53.2 | 19.1 | 54.2 | 44.1 |
| | | 571 | 50.1 | 19.4 | 51.7 | 41.7 |
| | | 572 | 54.7 | 25.6 | 57.7 | 42.5 |
| | | | 52.8±1.9[a] | 23.2±4.7[a] | 53.9±2.8[a] | 42.2±1.6[a] |
| | ZD | 562 | 44.5 | 24.6 | 42.8 | 29.9 |
| | | 603 | 46.3 | 12.3 | 46.9 | 36.5 |
| | | 606 | 45.7 | 14.1 | 49.9 | 38.6 |
| | | 610 | 44.9 | 20.1 | 47.1 | 34.7 |
| | | | 45.4±0.8[b] | 17.8±5.6[a] | 46.7±2.9[b] | 34.9±3.7[b] |
| Alfalfa Cube | ZD | 568 | 56.0 | 75.9 | 62.2 | 34.0 |
| | | 570 | 48.7 | 70.3 | 55.0 | 29.7 |
| | | 571 | 51.2 | 71.1 | 62.9 | 32.2 |
| | | 572 | 53.9 | 73.8 | 66.2 | 38.0 |
| | | | 52.4±5.5[a] | 72.8±2.6[b] | 61.6±4.7[c] | 33.5±3.5[b] |
| | ZD | 562 | 47.4 | 68.4 | 62.8 | 30.4 |
| | | 603 | 51.2 | 69.3 | 60.3 | 32.6 |
| | | 606 | 50.9 | 69.4 | 57.3 | 30.8 |
| | | 610 | 50.9 | 69.3 | 59.9 | 33.5 |
| | | | 50.1±3.1[a] | 69.1±0.5[b] | 60.1±2.2[c] | 31.8±1.5[b] |

1) Abbreviations: ZB. $F_1$ of Brahman×Japanese Black: BB. Japanese Black.
2) Means±SD. Means with different superscript in the same column are significantly different ($p<0.05$).

シー乾草給与時にみられた結果[8]と同様であった。アルファルファ給与の場合には摂取量はやや少ないが消化率に有意差はなかった。

低質なチモシー乾草給与時における消化率の向上は，低質飼料利用性に関するブラーマン種の高い能力が$F_1$にも遺伝している結果と考えることができる。しかも，ZBがBBより体重が大きいにも拘らず飼料摂取量が23.6%少ないので飼料のルーメン内貯留時間が長くなって微生物消化が進んだ可能性も考えられる。また，HUNGATE & PHILLIPS[9]はブラーマン種は胃内容物の乾物量当たりの微生物活性が高いと報告しているので，ZBにおいては微生物活性が高いかもしれない。

以上のように，ブラーマン種の遺伝子の導入は，粗飼料摂取量に対し減少効果を与えたが，乾物および線維成分の消化に対して促進効果があり，特に粗飼料が低質の場合NDF，ADFの利用性が向上することが明らかになった。摂取量が少なくて済むことは基礎代謝が低い[3]ことと関連するとも考えられる。消化率の向上に関しては，飼料摂取量を揃える条件下で，ルーメン内容積，胃内容物の滞溜時間，胃内微生物消化活性，下部消化管における消化吸収能の比較により，さらに検討する必要がある。

3.2　$F_1$成雌牛の放牧地での採食量の比較

黒毛和種B区とブラーマン雑種Z区との牧草地での採食量の結果を**Table 4**に示した。7月のB区の採食量は測定の際の事故によって異常な値となったので除外した。6月の1日1頭当たりの採食量は代謝体重当たりB区は5.5kgに対し，Z区

© The Ito Foundation

**Table 4** Daily dry matter intake(kg/day)of two groups of cow in the pasture.

| Date (month/day) of test | | 6/29 | | 7/29 | | 10/11 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Cow group | | B | Z | B | Z | B | Z |
| Average body weight (kg) | | 428 | 520 | 451 | 553 | 468 | 548 |
| Daily dry matter intake (kg)/head | | 5.2 | 8.9 | - | 8.9 | 6.1 | 11.0 |
| Daily dry matter intake (kg)/body weight | | 1.2 | 1.7 | - | 1.0 | 1.3 | 2.0 |
| Daily dry matter intake (kg)/body weight$^{0.75}$ | | 5.5 | 8.2 | - | 7.1 | 6.1 | 9.7 |
| Intake/100kgBW | NDF | 0.45 | 0.69 | - | 0.75 | 0.06 | 0.24 |
| | TDN | 1.05 | 1.45 | - | 1.75 | 1.43 | 2.20 |

B: Japanese black cow group Z: Brahman crosses cow group

**Table 5** Average milk yield of cows in six breeds and daily gain of body weight of their calves.

| Date (month/day) of test | | 11/27 | 12/27 | 1/25 | Average | DG (kg/day) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Breed of cow | number of cows | | | | | |
| ZH | 2 | $7.0^{a}$ | $5.5^{ab}$ | $5.6^{ab}$ | $6.6^{ab}$ | $1.13^{a}$ |
| ZN | 2 | $4.3^{ab}$ | $8.6^{a}$ | $5.6^{ab}$ | $6.6^{ab}$ | $0.93^{ab}$ |
| ZB | 2 | $4.2^{ab}$ | $7.2^{a}$ | $3.8^{ab}$ | $5.5^{abc}$ | $0.89^{bc}$ |
| BB | 7 | $3.1^{b}$ | $4.1^{b}$ | $3.6^{ab}$ | $3.9^{c}$ | $0.76^{c}$ |
| NN | 7 | $7.1^{a}$ | $7.0^{ab}$ | $6.2^{a}$ | $7.2^{c}$ | $0.98^{ab}$ |
| BN | 2 | $4.7^{ab}$ | $5.5^{ab}$ | $3.0^{b}$ | $4.9^{bc}$ | $0.98^{bc}$ |

Abbreviations: ZB; $F_1$ of Brahman×Japanese Black, ZN; $F_1$ of Brahmbn×Japanese Shorthorn, ZH; $F_1$ of Brahman×Holstein, BB; Japanese Black, NN; Japanese Shorthorn, BN; Japanese Black×Japanese Shorthorn.
$^{a,b,c}$ : Means with different superscripts in the same column are significantly different ($p<0.05$).

は8.2kgと49%増であった。6月より7月にかけての1日増体量がB区は0.77kg, Z区は1.1kgで採食量の差を反映していた。10月についてもZ区の採食量がB区の59%増となっていた。このような結果はブラーマン雑種去勢群の昭和62年5月と9月の野草放牧地での採食量が前者で35%増, 後者で39%増であった結果と近似した成績[3]であった。なお, 6月と10月の体重100kg当たりのNDF, TDN摂取量でもZ区がB区より多かった。

3.3 舎飼時における授乳量の比較

**Table 5** に授乳量およびDGに関する多重検定の結果を示す。なお, これらの母牛の産子の平成元年11月27日より平成2年1月25日まで60日間の1日当たりのDGを示した。表にみられるように, 授乳量は11月はZHとBB, 12月はZNとBB, 1月はNNとBNの間に, そして3回の平均では, NNとBN, BBに, ZH, ZNとBBの間に5%水準で有意差が認められた。

純粋種とブラーマン交雑種を比較すると, NNとZNではZNがやや多く, BBとZBとではZBがすべての月で乳量が上回っていた。ブラーマン雑種の各区の頭数が少ないので今後も検討が必要だが, ブラーマン種との交雑$F_1$母牛は黒毛和種より乳量が多くなる可能性が示唆された。なお, 子牛の成長には授乳量が反映しているがBNの産子の発育がやや低くなっており, 子牛の成長の比較には子の遺伝子型を考慮する必要があると考えられる。

3.4 サンタガートルデイス♂×農場の黒毛和種および日本短角種との$F_1$の作出について

サンタガートルデイスとブラーマン種の精液を農林水産省畜産局長の許可を得て, 平成2年2月

© The Ito Foundation

9日に輸入した。本数はサンタガートルデイス60本およびブラーマン種40本である。直ちに，サンタガートルデイスの精液を発情を同期化した農場の黒毛和種15頭，日本短角種12頭に人工授精した。妊娠を確認したものは現在まで黒毛和種10頭と日本短角種6頭で平成2年度中に出生させ，それらの$F_1$牛の性能をブラーマン種との$F_1$と比較する準備を行っている。

なお，平成2年2月14日より16日まで，沖縄県の関係者とブラーマン交雑種の性能を調査する可能性について協議し，平成2年度において石垣島パナリ牧場において，ブラーマン種と黒毛和種の$F_1$を生産し，それらの$F_1$の性能を調査することを予定することとした。

## 4. 要　約

(1) ブラーマン種×黒毛和種の$F_1$(ZB)成雌牛4頭（36ヵ月齢440kg）と黒毛和種純粋種（BB)成雌牛4頭（38ヵ月齢390kg）を用い，チモシー乾草単一給与条件およびアルファルファヘイキューブ単一給与条件の2回に分けて，飼料の消化試験を実施し，両者間の粗飼料利用性を比較した。

体重当たりの飼料摂取量はZBチモン一区で1.4%，アルファルファ区で1.3%であったのに対し，BBはそれぞれ1.9%と1.6%であって，ZBの飼料摂取量は低い傾向がみられた。また，栄養水準の低いチモシー乾草区では，粗タンパク質以外の乾物，中性デタージエント線維（NDF)，酸性デタージエント線維（ADF)の消化率がZBでBBより有意に高くなり，12ヵ月齢去勢牛でのチモシー単一飼料給与下での成績[8]と同様の結果となった。

(2) 牧草放牧地でのブラーマン種の$F_1$雌牛群（Z区）と黒毛和種成雌牛群（B区）について，6月と10月に24時間の採食量を測定したところ，6月にはZ区が代謝体重当たりでB区より49%増，10月にも59%増となりZ区の放牧地での採食量が黒毛和種に比し，大きく勝れていることが確認された。この結果も去勢牛群についてみた成績[3]と同様であった。

(3) ブラーマン$F_1$雌牛の授乳量を授乳前後の体重差法で推定し，純粋種のそれと比較した。ZBはBBより授乳量が明らかに多いこと，そして，それが子牛の発育にも反映していることが明確になった。

(4) サンタガートルデイスの精液を農水省畜産局長の許可を得て，平成2年2月9日にオーストラリアから輸入し，直ちに農場の黒毛和種15頭と日本短角種12頭に発情を同期化して人工授精を行った。現在までに妊娠を確認したものは黒毛和種10頭，日本短角種6頭である。

なお，沖縄県においてブラーマン種と黒毛和種の雑種を生産し，それらの性能を調査する試験を平成2年度以降実施することとなった。

本研究を実施するに当たり，附属農場長伊藤巖教授はじめ高橋久，二瓶章技官，鎌田弘人他多くの方々の多大の御協力をいただいた。また，東北大学農学部家畜飼養学教室堀口雅昭教授，淵上正昭博士，家畜育種学教室の稲垣靖彦君他多くの院生，学生の助力をいただいた。ここに記して深甚の謝意を表する。

### 文　献

1) 水間　豊，山岸敏宏，正木淳二，太田　実，昭和59年度食肉に関する助成研究調査成果報告書　Vol. 3：31～33，伊藤記念財団　東京　1985
2) 水間　豊，山岸敏宏，正木淳二，太田　実，昭和60年度食肉に関する助成研究調査成果報告書　Vol. 4：57～65，伊藤記念財団　東京　1986
3) 水間　豊，山岸敏宏，八巻邦次，篠原　久，太田

© The Ito Foundation

実，二瓶　章，高橋　久，伊藤　巖，太竹秀男，西脇亜也，佐伯英治，勝野正則，正木淳二，堀口雅昭，佐々木康之，星野忠彦，足立　達，佐藤晃三，肉用牛研究会報　46：47-48　1988
4) Official Methods of Analysis (HOROWITZ, ed.), 129-146, Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, 1975
5) VAN SOEST P.J. and R. HWINE, J. AOAC, 50：50-55　1967
6) 農林水産技術会議事務局編，日本標準飼料成分表（1987年版）：52-60　中央畜産会　1987
7) 農林水産技術会議事務局編，日本飼養標準肉用牛（1987年版），21～30，中央畜産会　1987
8) 淵上正昭，秋葉征夫，堀口雅昭，太田　実，篠原久，山岸敏宏，水間　豊，日畜学会報　投稿中　1990
9) HUNGATE, R.E., G.D, PHILLIPS, J, Agric, Sci. 54：196-201　1960

© The Ito Foundation

# 牛の生産性に及ぼす騒音の影響に関する研究
## —特に，繁殖機能について—

Effect of Noise on Blood Levels of LH, Estrus and Ovulation in Heifer

阿部　和司・吉田　吉明・丹羽　太左衛門・*菅原　伯
**正木　淳二・**梅津　元昭・**石井　伸一
（岩手県立農業短期大学校，*岩手大学農学部，**東北大学農学部）

Kazushi Abe, Yoshiaki Yoshida, Tazaemon Niwa, *Haku Sugawara,
**Junji Masaki, **Motoaki Umezu and **Shinichi Ishii
(Iwate Prefectural College of Agriculture, *Faculty of Agriculture,
Iwate University and **Faculty of Agriculture, Tohoku University)

One Holstein heifer was experimentally exposed to an intermittent noise, 70-75 phones at l h intervals, throughout an estrous cycle. Duraton of estrus, number of ovulation, and blood concentrations of LH was compared with those obtained in preestrous cycles. The results obtained in the two successive estrous cycles were as follows.

1) In the first first cycle, pre-trearment control cycle, ovulation was detected by rectal palpation 32 h after the onset of estrus in the heifer. Tyical LH surge, followed by an increase of progesterone during the luteal stage was observed.

2) In the second cycle, the noise-loading cycle, duration of estrus was prolonged as compared with previous cycle and ovulation took place 60 h after the onset of estrus. Although two ovulations were confirmed in the heifer, 2 HL surge were ovserved in the heifer during the 42 h observation period. Blood progesterone level in the subsequent luteal phase showed a normal change.

KEY WORDS: NOISE STRESS, ESTRUS AND OVULATION, LH SURGE, COW

### 1. 目　的

動物に共通したストレス適応症候群として胸腺の萎縮，副腎の肥大，好酸球の減少等があり，視床下部—下垂体がACTH産生に集中し，性腺刺激ホルモンを含む下垂体ホルモンの分泌が乱されることが知られている[7, 9, 18, 20]。

騒音負荷の場合は，ウサギやラットで発情が異常に長びき，卵巣が肥大し，負荷日数が長くなるほど1頭当たりの分娩数が少なくなるという報告がある[5, 17, 22, 23]。またヒトでは騒音発生地帯に生活している婦人の妊娠中断，異常分娩，低体重児分娩，尿中ホルモン濃度等について調査研究がなされている[6, 15, 19]。しかし，産業動物の生殖内分泌および排卵に及ぼす騒音の影響についてはほとんど知られていない。

そこで，本研究ではウシに騒音を負荷して血中ＬＨとプロジェステロン（Ｐ）濃度，発情および排卵に及ぼす影響について調べたので報告する。

© The Ito Foundation

## 2. 材料と方法

（1） 実験動物：発情を同期化した1ヵ月齢のホルスタイン種未経産牛1頭を供試した。発情同期化には4頭を用い，プロスタグランジン類縁製剤（エストラメート，住友製薬）500μgを11日間隔で2回筋肉内注射して，調整効果が最もよく現れた1頭を選んだ。供試牛は，実験期間中スタンチョンにつなぎ，定時に飼料を給与し飲水は自由にした。

（2） 騒音負荷：第1性周期の排卵確認直後から，第2性周期の排卵確認直後までの21日間にわたって，あらかじめ磁気録音した自動車エンジン音を主とする道路上の騒音を，自動車用オートリバース・プレーヤーを用いて1時間負荷と1時間休止を反復しつつ1日累計12時間負荷した。負荷時のスピーカーの位置は，起立したウシの頭上50cmとし，騒音の大きさは70～75ホーン（測定機器，リオン Na 02型）とした。

（3） 採血：第1性周期開始から第2性周期終了までの42日間にわたって，非発情期は毎日7時30分と19時30分に，発情期は2時間間隔で頸動脈よりヘパリン採血管に採血した。

採取した血液は冷却遠心機を用いて3,000rpm 10分で血漿を分離し，ホルモン測定時まで－80℃で冷凍保存した。

（4） 血漿LHの測定：標識抗原は精製ウシLH標品（LER-1702），抗体は抗ヒツジLH-1家兎血清，標準品はNIH-LH-BIOを用いた。測定方法は，Niswender[12]に準じて行った（RIA）。

（5） 血漿Pの測定：標識抗原は［1, 2, 6, 7-$^3$H］Progesterone（Amersham），抗体は抗Progesterone-3-CMO-RSA家兎血清（帝国臓器）を用いた。測定方法はTerranova & Greenwald[12]に準じて行った。

（6） 発情・排卵の検査：発情開始および排卵の確認は，外部徴候および直腸検査によって，経験豊かな複数の術者で行い，判定は農水省の基準[4]に従った。

## 3. 結　果

騒音を負荷する前の第1性周期における結果は**Fig.1**に示すとおりで，発情開始から排卵までの時間は，発情発現からLH-サージまで7時間，LH-サージから排卵まで25時間で合計32時間であった。血漿中のLH濃度は，周期中低濃度の安定した状態で推移したが，発情発現7時間後に最高100ng/m*l*台の典型的なLHサージを示した。Pは黄体期に特有の増加を示した。

騒音を負荷した第2性周期における結果は**Fig.2**に示すとおりで，発情開始から排卵までの時間が60時間となり，騒音を負荷しない第1性周期の32時間に比べて1.9倍も長びいたことになった。LHサージは，発情開始後60時間に30ng/m*l*のピークが見られ，その42時間前にも一過性の上昇（20ng/m*l*）が認められた。血漿中のP濃度は黄体期に特有の増加を示した。

卵巣の状態については，第一性周期には，正常な卵胞の発育と排卵が認められた。しかし，騒音を負荷した第2性周期では，左と右の卵巣でそれぞれ1回ずつ，計2回ずつの排卵が認められた。

## 4. 考　察

騒音負荷によりラットでは不妊と妊娠中断が見られ[22]，さらにラットやウサギでは卵巣が肥大し分娩率が著しく低下したと報告されている[23]。ヒトにおいても低体重新生児，奇形分娩などが生じたとする報告がある。

一方，産業動物の内分泌および排卵などの繁殖機能は，騒音によって重大な影響をうけると推測されているが[3]，わずかに生産性に及ぼす影響に

© The Ito Foundation

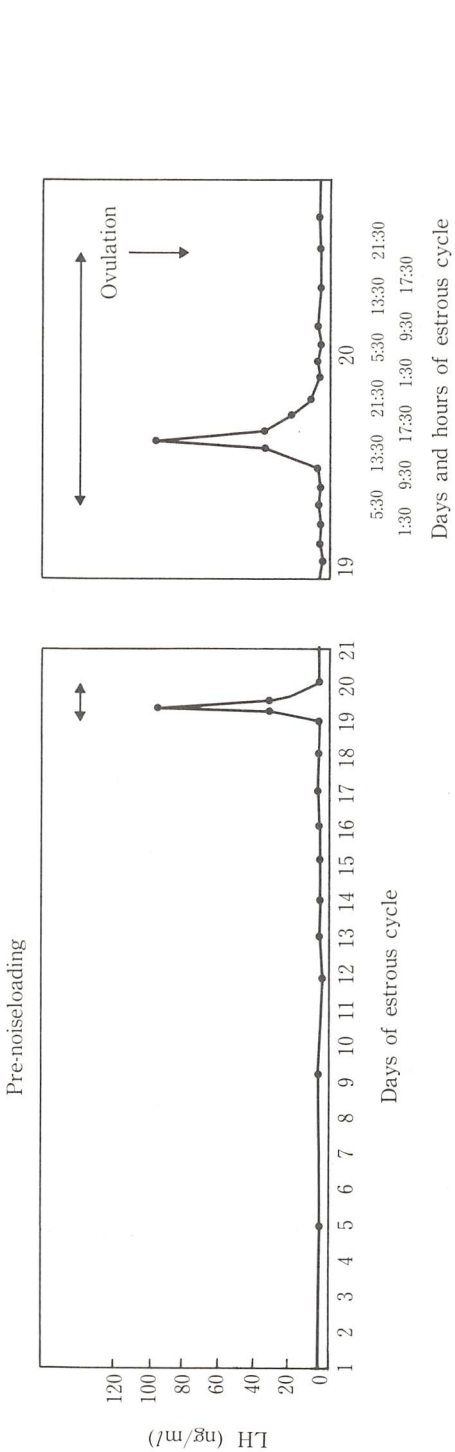



**Fig. 1** Plasma LH (●—●) concentrations and duration of estrous (←——→) in Cow during the first estrous cycle after synchronization (non treatment period).

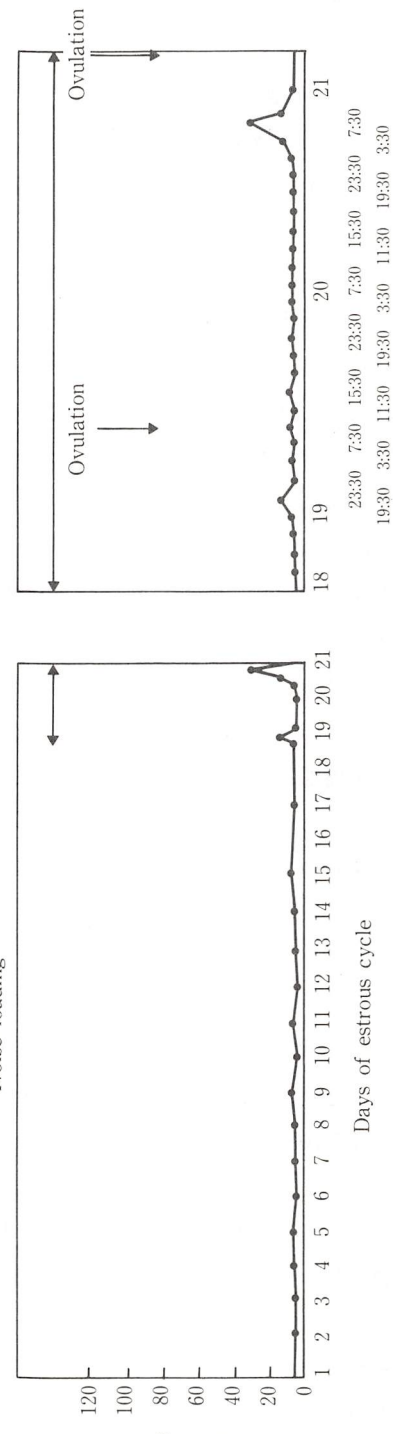



**Fig. 2** Plasma LH (●—●) concentrations and duration of cstrous (←——→) in Cow during the second estrous cycle after synchronization (treatment period).

© The Ito Foundation

ついて報告されているだけで[1,2,13,14,16]，多くは今後の解明に残されている。

今回の著者らのウシを用いた実験では，第1性周期の正常な発情持続時間に比し，騒音を負荷した第2性周期では発情徴候が容易に消失せず，発情開始から排卵に至るまでの時間は第1性周期の2.3倍にも長びいた。このことは，Singh and Rao[17]のラットを用いた実験結果と一致するもので，視床下部一下垂体系に何らかの混乱が生じたものと考えられた。

性周期中における雌牛の卵巣は，視床下部および下垂体前葉ホルモンの支配の下に，卵胞の発育，排卵，黄体形成をくりかえしており，本実験における騒音負荷前の第1性周期における血中LHおよびP濃度と発情開始から排卵に至るまでの時間的関係はいずれも正常なパターンを示した。これに対し，騒音を負荷した第2性周期においては，発情出現から，排卵に至るまでの時間が延長し，左右卵巣から1周期に2回排卵の事実が起こることが示された。また，LHサージが2回検出され，そのような現象ののち正常なPの増加が認められる事例が示されたことは興味深い。

## 5. 要　約

$PGF_2\alpha$アナログで発情を同期化したホルスタイン種未経産牛を用い，磁気録音した道路上の自動車エンジン音を70～75ホンの範囲で1時間負荷と1時間休止をくりかえして与え発情持続時間，血中LH，プロジェステロン濃度および排卵に及ぼす影響を調べた。得られた結果は下記のとおりである。

(1) 騒音を負荷する前の第1性周期において，発情開始から排卵までの時間は32時間であった。RIAによるホルモン測定の結果，典型的なLHサージと黄体期におけるプロジェステロン濃度の増加が見られた。また，直腸検査によって正常な卵胞の発育と排卵が確認された。

(2) 騒音を負荷した第2性周期では，発情開始から排卵までの時間が60時間に延長した。LHサージは発情開始10時間後と52時間後に2回見られた。しかし，プロジェステロンは2頭とも黄体期に特有の増加を示した。排卵は2頭とも左右の卵巣にれぞれ1回ずつ計2回認められた。

以上の結果から，騒音がウシの内分泌および排卵に混乱を生じさせる可能性が示された。

本実験を実施するにあたり，ご援助，ご協力をいただいた本校副校長菊地宏氏，教授中田寛次氏，助教授佐藤彰芳氏，助教授鷲盛精氏，助手小原太一氏に深謝する。

### 文　献

1) Abe K, Sugawara H. Jap J. Zootech Sci. 5 : 83-88 (1986).
2) Akers R.M., Efcont A.M. L. Hormone and Behavior. 17 : 87-93 (1982).
3) Busnel MC. Karger, Paris, pp 209-228 (1984).
4) Economy Department of The Ministry of Agriculture forestry and Fishery The Rectal Palpation. The clinical pathologic test on cooperative society of domestic animals 248-263 (1987).
5) Geber WF New York pp 85-90 (1970).
6) Hartikainen Anna L, Martti S, Hannu PA, Risto T, Esa L, Int Arch Occup Environ Health. 60 : 279-283 (1988).
7) Kabuto S. Igaku-no-Ayumi 103 : 62-68 (1977).
8) Kennaway DJ, Gilmore TA and Seamark RF. Endocrinology. 110 : 1766-1772 (1982).
9) Kikawa T Physiology of ovulation. Tokyo J Me Sci 84 : 6-17 (1976).
10) Kosin IL. J Appl Physiol 12 : 217-220 (1957).
11) Muduuli DS, Sanford LM, Palmer WM, Howland BE, J Anim Sci 49 : 543-553 (1979).
12) Niswender GD, Reichert LE go, Midgley AR gr, Nalbandov AV. Endocrinology 84 : 1166-1173 (1969).
13) Oda R. Animal Husbandry 14 : 888-890 (1960).

© The Ito Foundation

14) Okamoto S. Animal Hasbantry 19 : 613-618 (1973).
15) Osada Y. Bull Inst Publ Health 22 : 209-227 (1973).
16) Petersen WE. J Dairy Sci 24 : 211-223 (1941).
17) Singh KB, Rao PS, Am J Obstet Gynec 15 : 557-564 (1970).
18) Singh KB, Am J Obstet Gynec 7 : 981-985 (1972).
19) Takai K, Osada Y. Bull Inst Publ Health 14 : 200-212 (in Japanese) (1965).
20) Taya K.J Clin Vet Med 8 : 27-37 (in Japanese) (1990).
21) Terranova PF, Greenwald. Biol Reprod 18 : 170-17 (1978).
22) Zondek B, Tamari I. Am J Obstet Gynec 6 : 1041-1048 (1960).
23) Zondek B, Tamari I. Infertility induced by auditory stimuli prior to mating Acta Endocrinol Suppl 90 : 227-234 (1964).

© The Ito Foundation

# 家畜の腸管免疫強化法

## Enhancement of Intestinal Immunity of Domestic Animals

清水 悠紀臣 ・ 喜田 宏 ・ 伊藤 寿啓 (北海道大学獣医学部)

Yukio Shimizu, Hiroshi Kida and Toshihiro Ito
(Faculty of Veterinary Medicine, Hokkaido University)

Multiplication of virulent and avirulent strains of transmissible gastroenteritis virus in pigs were compared. Immune responses of these pigs were also investigated.

In the pigs inoculated with a virulent strain, the virus was recovered mainly from the digestive organs, and lgA antibody was detected in the sera, intestinal contents and milk of the pigs. They were challenged with the same virulent virus on several days after the first inoculation. None of the pigs manifested clinical signs after the challenge exposure. On the contrary, the virus was recovered mainly from the respiratory organs in the pigs inoculated with an avirulent strain. Only IgG antibody was detected in the sera of these pigs. They had severe diarrhea after the challenge exposure.

To develop the effective antigen carrier, *Clostridium botulinum* type C hemagglutinin was purified and characterized. The purified hemagglutinin showed hemagglutinating activity with human, horse, cat, rat, mouse, dog, chicken, sheep and rabbit red blood cells. It adsorbed also to the small intestinal epithelial cells. The complex of viral antigen with the hemagglutinin may effectively stimulate the intestinal lymphoid tissues. It is required to develop capsules to protect the antigen from digestion by the enzymes in the intestinal tracts.

### 1. 目　的

致死性の高い家畜の急性伝染病に対しては，品質の高い診断液やワクチンが開発され，それを用いた防疫が効を奏し，撲滅または制圧されている。現在，畜産に被害を与えている伝染病のほとんどは下痢や肺炎などの腸管や呼吸器の粘膜感染病である。これらの病気の原因となる病原微生物は侵入部位である粘膜で増殖することによって細胞に障害を与え，病気を惹き起こすので，血清中の抗体は防御に効果がない。このような粘膜感染を防ぐためには粘膜に付属する免疫機構を明らかにし，粘膜表面の免疫強化を図らなければならない。

近年，免疫法として標的とする組織細胞に親和性の高い物質と免疫原を結合することによって効率的に抗原刺戟を与える試みが行われており，新しいワクチン開発の方向の一つとして注目されている[1]。このような物質の一つとして細菌毒素の毒素活性部分を除いた細胞結合部分が広く使われるようになった[2]。ボツリヌス菌の赤血球凝集素はこの目的のため最適と考えられるので，その精製と生物活性について検討を加え，有効なキャリアー開発のための基礎試験を行った。

一方，豚伝染性胃腸炎は定型的な粘膜感染病で，ウイルスの感染は腸管特に小腸粘膜に限局する[3]。そこで，腸管粘膜に効率的に免疫を与える方法を

© The Ito Foundation

開発するため，その免疫機構の解明を目的とした研究を行った。

## 2. 方　法

### 2.1 ボツリヌス菌赤血球凝集素の精製と生物活性の測定

ボツリヌスC型菌の培養上清に等量の飽和硫安を加え4℃で2日置いた後，遠心沈渣を緩衝液で4℃2時間透析し，不溶部分を遠心で除いた。赤血球凝集素をDEAEセルロースカラムに吸着させた後，カラムを0.02Mトリス・グリシン緩衝液（pH 8.0）で洗浄，食塩溶液の濃度を除々に上げることによつて解離させた。ラット赤血球を用いて赤血球凝集活性の最も高い分画を集め，セファクリルS-400カラムクロマトグラフィーで精製後，限外濾過によって濃縮し，再びセファクリルS-400で精製した。精製度はデスク電気泳動と免疫拡散法によって確認した。

赤血球凝集活性は0.15M燐酸緩衝食塩液（pH 7.0）で2倍階段希釈し，0.3%の赤血球浮遊液を加え，室温で2時間置いて凝集を起こした最高希釈倍数からその程度を判定した。

### 2.2 ウイルス株

1956年静岡県下で発生した豚伝染性胃腸炎罹患豚の小腸から分離された強毒ウイルスSH株と[4]1962年富山県下で発生した豚伝染性胃腸炎罹患豚から分離し，初代豚腎細胞で186代継代して弱毒化したウイルスTO-163株を使用した[5]。

### 2.3 中和試験

弱毒TO-163株を指示ウイルスとして200$TCID_{50}$/m$l$を用いた。可検血清を56℃30分加熱非働化後2倍階段希釈して，指示ウイルス液と等量混合し，37℃1時間置いて，各希釈0.1m$l$を予め試験管に培養しておいた初代豚腎細胞2本に接種した。37℃で4日培養後，細胞変性効果の出現の有無を観察し，陰性の最高希釈倍数を中和抗体価とした。

### 2.4 同位元素標識抗原沈降反応法[6]

初代豚腎細胞に弱毒TO-163株を接種後，$^{32}P$正燐酸1 mCi/m$l$を含む培養液で培養し，しょ糖密度勾配遠心法でウイルスを精製し，標識抗原とした。標識抗原は4,000cpm/0.1m$l$の濃度に調整し，その0.1m$l$と40倍に希釈した可検血清，2倍に希釈した小腸分泌液0.05m$l$とをそれぞれ混合し，37℃2時間反応後，2倍に希釈した抗豚$\gamma$鎖，抗豚$\mu$鎖，抗豚$\alpha$鎖血清をそれぞれ0.05m$l$加え，37℃2時間後4℃1夜反応させた。3,000rpm 30分遠心後，上清と沈渣を別々の濾紙に吸着させた。この濾紙を10%と5%の冷トリクロル酢酸溶液に30分浸した後，エーテルに浸して37℃で乾燥後，5m$l$のトルエンシンチレーターの入ったバイアルに入れ，液体シンチレーションカウンターで測定した。沈降比を求め10%以上を陽性とした。

### 2.5 強毒および弱毒の豚体内での増殖試験

初乳を接種した生後2日目以内の子豚4頭を2群に分け，1群には強毒を$10^{6.0}$ $TCID_{50}$経口接種し，接種1日後と2日後に放血殺し，体内各臓器からウイルスの検出を試みた。もう1群には弱毒を$10^{7.0}$ $TCID_{50}$経口接種し，接種2日後と3日後に放血殺し，強毒接種群と同様にウイルスの検出を試みた。

各臓器は無菌的に採取後，乳鉢で磨砕し，培養液を加え，10倍乳剤とし4℃で1,400 g，15分間遠心し，上清を集めウイルス価測定まで−70℃に保存した。ウイルス価の測定は初代豚腎培養細胞を用い常法に従って行った。

### 2.6 免疫豚の攻撃試験

体重15～25kgの抗体陰性豚を用い，2群に分けて強毒と弱毒を接種した。接種後，適当な間隔を置いて強毒ウイルスで攻撃し，下痢発病の有無を観察した。攻撃前には血清を採取し，中和抗体価とIgA抗体価を測定した。

© The Ito Foundation

2.7 感染豚の血清と小腸分泌液中の抗体の免疫グロブリンクラス

体重15～25kgの抗体陰性の豚を2群に分けて強毒と弱毒を接種し，接種後，適当な間隔を置いて殺処分し，血清と小腸分泌液を集め，同位元素標識抗原沈降反応によって各免疫グロブリンクラスの抗体の検出を行った。

## 3. 結果と考察

3.1 ボツリヌス菌赤血球凝集素の精製と生物活性

精製した赤血球凝集素はデスク電気泳動と免疫拡散法で単一のバンドまたはラインを示し，その活性はラット赤血球に対してタンパク1mgあたり$1.6\times10^4$単位であった。精製赤血球凝集素はラットばかりでなく人，馬，猫，マウス，犬，鶏，めん羊，家兎の赤血球に対しても凝集活性を示した（**表1**）。また，赤血球ばかりでなく腸上皮細胞にも結合することが明らかとなった。

3.2 豚伝染性胃腸炎ウイルス強毒と弱毒の豚体内での増殖

強毒接種豚におけるウイルスの主要な増殖場所は腸管特に小腸とその付属リンパ節であったのに反して弱毒ウイルスでは呼吸器とリンパ節が主で，きわめて対照的であった（**表2**）。従って強毒が感染した場合には腸管リンパ組織に効率的に抗原刺戟が与えられるが，弱毒ではほとんど抗原刺戟が与えられないことが明らかとなった。

**表1** 精製赤血球凝集素の各種動物赤血球凝集活性

| 赤血球 | 赤血球凝集活性に必要な最低タンパク濃度(μg/ml) |
|---|---|
| 人 | 60 |
| 馬 | 60 |
| 猫 | 60 |
| ラット | 120 |
| マウス | 244 |
| 犬 | 244 |
| 鶏 | 240 |
| めん羊 | 320 |
| 家兎 | 480 |

**表2** 強毒と弱毒の豚体内での増殖

| 組織 | 強毒 | | 弱毒 | |
|---|---|---|---|---|
| | 1* | 2 | 2 | 3 |
| 鼻粘膜 | 0 | 0.6 | 2.0 | 1.5 |
| 気管 | 0 | 0 | 1.5 | 1.0 |
| 肺 | 0 | 0 | 4.3 | 3.5 |
| 扁桃 | 1.1 | 0.8 | 1.3 | 1.1 |
| 顎下リンパ節 | 0.8 | 1.4 | 2.3 | 2.0 |
| 腸管膜リンパ節 | 3.8 | 3.3 | 2.3 | 2.0 |
| 脳 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 肝 | 1.5 | 0.6 | 0 | 0 |
| 脾 | 0 | 0 | 0.6 | 0.8 |
| 腎 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 十二指腸 | 2.0 | 4.0 | 0 | 0 |
| 空腸 | 4.5 | 3.0 | 1.5 | 0.6 |
| 回腸 | 4.3 | 2.0 | 0 | 0 |
| 結腸 | 0 | 0.8 | 0 | 0 |

* 接種後日数

3.3 免疫豚の血清および小腸分泌液中の抗体の免疫グロブリンクラス

強毒接種後7日目の豚の血清からはIgM, IgA, IgGすべての免疫グロブリンクラスの抗体が検出されたが，21日目以降ではIgAとIgGのみでIgM抗体は検出されなかった。小腸分泌液中からはIgA抗体のみが検出された。一方，弱毒接種豚の血清からはIgMとIgGのみでIgA抗体は検出されなかった。小腸分泌液からは全く抗体が検出されなかった（**表3**）。

このように，腸管リンパ組織に抗原刺戟が与えられた場合，小腸分泌液中にIgA抗体が産生され，同時に血清にもIgA抗体が検出されるのに反して，腸管リンパ組織に抗原刺戟が与えられないと腸管に抗体が産生されないことを反映して血清中にもIgA抗体が検出されないことが明らかになった。このようにIgA抗体の産生には腸管リンパ組織は欠かせない役割を果たしており，

© The Ito Foundation

表3　強毒または弱毒感染豚の血清および小腸分泌液中の抗体の免疫グロブリンクラス

| ウイルス | 接種後日数 | 血清 | | | 小腸分泌液 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | IgG | IgA | IgG | IgM | IgA | IgG |
| 強毒（SH株） | 7 | + | + | + | − | + | − |
| | 21 | − | + | + | − | + | − |
| | 35 | − | + | + | − | + | − |
| | 63 | − | + | + | − | + | − |
| 弱毒（TO-163株） | 10 | + | − | + | − | − | − |
| | 20 | + | − | + | − | − | − |
| | 24 | + | − | + | − | − | − |
| | 30 | − | − | + | − | − | − |
| 対照 | | − | − | − | − | − | − |
| | | − | − | − | − | − | − |

しかも腸管と血清のIgA抗体の産生は密接に関連していることが明らかになった。

3.4　免疫豚の乳汁および血清中の抗体

強毒接種豚の血清および乳汁中の抗体価は比較的長くその価を維持していたが，弱毒接種豚では血清抗体価は維持されていたのに反し，乳汁抗体価は急速に低下し，7日以降は検出されなくなった。**表4**に示したように，乳汁中の抗体を抗IgG血清で吸収すると，強毒接種豚の乳汁抗体価は半減しかしなかったが，弱毒接種豚では六分の一以上低下した。強毒接種豚乳汁の抗体価はIgAが主であるのに反し，弱毒接種豚ではIgGが主体であることが明らかになった。

この結果から，強毒ウイルス接種によって腸管リンパ組織に抗原刺戟を与えた場合には感染防御に有効なIgA抗体が乳汁中に産生されるが，弱毒接種で抗原刺戟が腸管リンパ組織に到達しなかった場合には乳汁中にIgA抗体が産生されず，腸管リンパ組織への抗原刺戟が遠隔の乳房リンパ組織のIgA抗体産生にも大きく関連していることが明らかになった。

表4　初乳，3日目乳汁の抗IgG血清吸収後の抗体価

| ウイルス | 初乳 | 3日目乳 | 吸収後低下率 |
|---|---|---|---|
| 強毒（経口） | 384 | 192 | 1/2 |
| | 384 | 192 | 1/2 |
| 弱毒（筋肉） | 768 | 12 | 1/6 |
| | 384 | 6 | 1/6 |

表5　強毒または弱毒免疫豚の血清IgA抗体価と感染防御の関係

| 免疫ウイルス | 接種後日数 | 攻撃後症状 | 攻撃時抗体価 | |
|---|---|---|---|---|
| | | | 中和抗体 | IgA抗体 |
| 強毒（SH株）経口 | 18 | − | 128 | 64 |
| | 21 | − | 128 | 32 |
| | 80 | − | 128 | 64 |
| | 120 | − | 64 | 16 |
| 弱毒（TO-163株）筋肉・経鼻 | 80 | + | 512 | ＜2 |
| | 140 | + | 512 | ＜2 |
| | 200 | + | 512 | ＜2 |

© The Ito Foundation

3.5 免疫豚の攻撃試験

強毒接種後18～120日経過した豚を強毒ウイルスで再攻撃した豚は攻撃後全く臨床症状を示さなかった。これらの豚の攻撃時の血清抗体価は中和抗体価が64～128倍で，IgA抗体価が16～64倍であった。一方，弱毒接種後80～200日を経過した豚は攻撃後すべて発症した。これらの豚の攻撃時の抗体価は中和抗体価が512倍であったが，IgA抗体は検出されなかった（**表5**）。

このように，強毒で免疫した豚では血中にIgA抗体が産生され，感染防御が成立するのに反して，弱毒接種では血中に中和抗体は産生されるが，IgA抗体は産生されず，且感染防御が成立しなかった。従って，血中IgA抗体の産生と感染防御とは強く相関し，血中IgA抗体価によって腸管免疫の程度を知ることが可能となった。

## 4. 要　約

豚伝染性胃腸炎ウイルス強毒株と弱毒株を感染させた豚について，豚体内のウイルス増殖と免疫産生を比較した。

強毒接種豚ではウイルスは主として腸で増殖し，腸分泌液，血清，乳汁からIgA抗体が検出された。この豚を強毒で再攻撃したところ，発病することなく耐過し，感染防御が成立した。一方，弱毒接種豚ではウイルスは主として呼吸器で増殖し，血清からIgG抗体が検出されたのみで，攻撃後，感染防御は成立しなかった。

腸管に有効な抗原刺戟を与えるため，抗原キャリアーとしてボツリヌスC型菌の赤血球凝集素を精製しその生物活性を調べたところ，赤血球凝集活性ばかりでなく腸管細胞にも結合能があることが明らかとなった。

以上の成績から，豚伝染性胃腸炎ウイルス抗原にボツリヌスC型赤血球凝集素を結合させることによって，腸管リンパ組織に有効な抗原刺戟を与えることが可能となった。

ウイルス抗原と赤血球凝集素の結合抗原を効率的に腸管リンパ組織に到達させるためにはカプセルの開発も必要であろう。

**文　献**

1) 首藤文栄. 獣医学　1989, 17～31, 1989.
2) 竹田美文ら, 蛋白質核酸酵素, 31, 324～352, 1986.
3) Bohl, E. H., Virus Infections of Porcines 初版, 139-153, Elsevier, Amsterdam, 1989.
4) Sasahara, J. ら, Jap, J, vet, Sci., 20, 1～6, 1958.
5) Harada, K, ら, Nat, Inst, Anim. Hlth Ouart., 7, 127～137, 1967.
6) Ozer, H.L. ら, J. Virol, 3, 17～24, 1969.

© The Ito Foundation

# 離乳期前後における飼料条件の肉用家畜の消化管成長に及ぼす影響（II）

Developmental Effect of Feeding Condition on the Rumen of Domestic Ruminants in the Pre- and Post- Weaning Stage (II)

尼崎　肇・後沢　秀司・阿久澤　良造
鈴木　勝士・醍醐　正之（日本獣医畜産大学）

Hajime Amasaki, Shuji Gozawa, Ryozo Akuzawa, Katsushi Suzuki and Masayuki Daigo (Nippon Veterinary and Zootechnical College)

The diets might affect the postnatal development of digestive tract during the suckling periods. Particularly, the expressions of the gastric proteoritic enzymes (chymosin and pepsin) changes drastically. Therefore, the digestive functions also change through the pre- and post- suckling periods (Andrén et al., 1982a[6], 1982b[7]). The development of the gastric digestive function in general is controled by the cell-function and the cellular composition, i.e., the chief cells as the proteoritic enzyme producing cells, the parietal cells as the HCl producing cells and the mucous cells.

In the present paper, the gastric proteoritic enzymes (prochymosin and pepsinogen) and the carbonic anhydrase isozyme type 2 were determined by the physiochemical and immunohistochemical analyses in the new born goats before starting diets, young goats maintained by maternal milk alone, young goats maintained by substitutional milk after suckling and mature goats maintained by conventional diets.

The levels of pepsinogen tended to be stable, and the levels of prochymosin once increased to make a peek on day 8 and then decreased gradually during the experimental periods. It is suggested that the levels of proteoritic activity of these enzymes were influenced by the levels of carbonic anhydrase, which reflected the functional levels of the parietal cells.

## 1. 目　的

本研究は，昭和63年度における当該実験研究の継続として，離乳期前後の肉用家畜，とくに草食動物であるウシにおける離乳期前後の食性の変化が，消化管に及ぼしている影響について，能動的に消化酵素を分泌している第四胃の機能的活性を細胞生理学的な視点から免疫反応を利用した方法によって生化学的および組織化学的に検索を加えたものである。とくに，本研究では第四胃の複雑な機能的成熟状態および器官形成状態を直接細胞学的なマーカー物質をプローブとして量的探査を行なうことにより，数量的に知ることが可能となった。本実験の結果は，基礎的ではあるが離乳期以降の駆体成長のコントロールに影響を及ぼす飼養管理の効率化，早期成長促進および消化器系の疾病予防に良い結果を導く指針となることが期待される[1~5]。

一方，第四胃における固有胃腺は，消化酵素を分泌する主細胞，消化酵素の活性化などに影響す

© The Ito Foundation

る塩酸を分泌する壁細胞と粘液を主に分泌する細胞の主な3種の細胞群から構成されている。そしてこれらの細胞は，同一の胃腺上皮の原基細胞から分化していると考えられている。これまでの研究によって消化酵素分泌細胞である主細胞の動きについては，チモシンとペプシンをマーカーとしてかなり明らかになった[6,7]。しかし，これらの酵素の酵素活性の獲得も生体内では壁細胞からの塩酸の分泌が必須となっている。そこでこれらの細胞群の複合的な動きをとらえるために，これまでのタンパク分解酵素系のマーカーに加え壁細胞の機能的マーカーとしてこれまでに成ウシの第四胃等において組織化学的な報告のある炭酸脱水酵素のisozyme[8]であるcarbonic anhydorase type 2（CA 2）を使用した。実験に先立ち，本研究ではウシCA 2を抗原とした抗体を用いたが，さらに飼養試験にはヤギを実験系に用いたためヤギ抗原との交叉性について，ゲル濾過および電気泳動を用いた生化学的な手法によりに粗抽出物からの酵素画分を分離し，酵素活性および免疫活性について確認をおこなった。

## 2. 材料と方法

21頭の日本在来産シバヤギを本研究にもちいた。その内訳は，第1群；生後12時間以内のまだ授乳を受けていない新生仔3頭，第2群；母乳のみによる飼養管理を生後8日間おこなった4頭および同様に14日間のもの3頭の計7頭，第3群；生後14日で離乳後ソイミールと脱脂粉乳を主体とする代用乳で34日間飼養管理をおこなったもの3頭および同様に管理した70日齢のもの5頭の計8頭，および第4群；通常の飼養管理下で成熟した1才齢以上のもの3頭である。すべての個体は，ペントバルビタールの静脈内過剰投与による麻酔下で放血殺後ただちに第四胃を採取し，さらに採取したサンプルは，免疫生化学的検索と免疫組織化学的検索の2群に分け処理をおこなった。

（1） 抗体と抗原：ヤギの胃プロチモシンおよびペプシノゲンの検出には，抽出精製したウシのチモシンおよびペプシノーゲンによりつくられたポリクロナールウサギ血清をもちいた。これらの抗血清は，Dr. Andrénより分与されたものであり，すでにDr. Andrénら[6,7]によって抗チモシン血清はウシのチモシンとプロチモシンに交叉し，抗ペプシノーゲン血清はウシのペプシンとペプシノーゲンに交叉するが，チモシンとペプシン間ではそれぞれ交叉性を示さないことが確認されている。われわれは，これらのウシの抗原に対する抗血清と今回使用したヤギの抗原との交叉性について確認をおこない交叉性を認めてから使用した。

また，抗ウシcarbonic anhydorase isozyme 2血清は，ウシの大腿四頭筋より抽出精製し，ウサギで免疫したもので西田博士（麻布大学，獣医生理学教室）より分与されたものである。また，本抗体は，Nishitaら[9,10]によって他のアイソザイムであるtype 1およびtype 3との交叉性がないことは，証明されているが，本酵素の免疫交叉性が非常に特異的であることからさらに前述のタンパク分解酵素の場合と同様にヤギの粗抽出物に対する免疫活性と酵素活性についてイオン交換クロマトグラフィー（DEAE）による炭酸脱水酵素の部分精製を行ない確かめた。またこの時精製分画の炭酸脱水酵素の総活性は，Matsumotoら[11]の方法に従い計測し，同時に後述する抗CA 2血清によるELISA法でのCA 2としての抗原量を計測した。

第四胃の胃底腺部の組織から得られた粗抽出のサンプルは，Amasakiら[12]，Foltmannら[13]およびNishitaら[9,10]の示した方法により抽出をおこない，実験まで凍結乾燥後−20℃で保存した。

（2） SDS-PAGE後のイムノブロットによる抗ウシCA 2血清とヤギ抗原の交叉性の確認：

© The Ito Foundation

Legender and Matsudaira[14]の方法にもとづき抽出したヤギのサンプルと炭酸脱水酵素の精製抗原としてウマの isozyme 1, isozyme 2 および isozyme 3 を7.5% SDS-ポリアクリルアミドゲル（SDS-PAGE）による電気泳動後，ミニブロットSDA（ミリポア社製）にてイモビロン・トランスファーメンブランにウエスタンブロッティングを行ない，抗ウシ CA 2 抗体と反応後，抗ウサギ IgG-HRP 抗体による間接法をもちいて，DAB 発色をおこなった。

（3） ELISA によるヤギ抗原の定量：Johnson ら[15]の方法にもとづきヤギ第四胃粘膜中の抽出プロチモシン量，ペプシノーゲン量および炭酸脱水酵素アイソザイム 2 型の量を計測した。

（4） 免疫組織化学によるヤギ抗原の組織内局在の観察：免疫生化学的分析にもちいたサンプル採取部に近い部位を採取し，Banks[16]の方法にもとづき Zamboni もしくは4% paraform aldehyde 固定後常法に基づきパラフィン包埋後，5μmに薄切し ABC 法をもちい，さらに DAB により発色をおこない光学顕微鏡にて観察をおこなった。

## 3. 結　果

（1） ウエスタンブロット後の免疫学的反応：7.5% SDS-PAGE 後のウエスタンブロット転写膜上のヤギ抽出物中の抗 CA 2 血清との反応バンドからヤギ CA 2 は，およそ 30kDa であった。またこの時，本抗血清は，他の isozyme である CA1 および CA3 とは非交叉性であった（**Fig. 1**）。

（2） イオン交換クロマトグラフィー（DEAE）による抗原の部分精製画分の酵素活性と ELISA 法による免疫活性の確認：イオン交換クロマトグラフィー（DEAE）での部分精製は，**Fig. 2-A** に示すように NaCl によるイオン強度 0 M から 0.4 Mでのリニアグラディエントによる溶出画分として得られたものの，フラクションナンバー28から

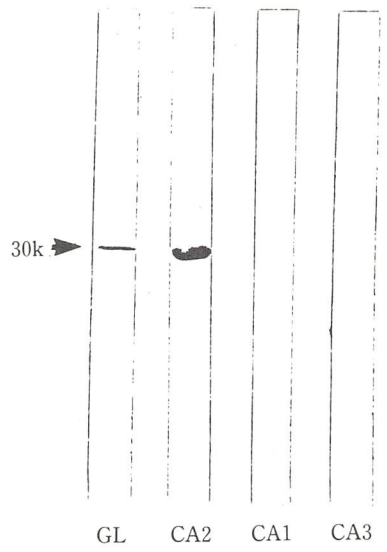



**Fig. 1** Immuno-blots against the anti-carbonic anhydrase isozyme 2 serum after 7.5% SDS-PAGE. GL: crude sample from the goat's stomach, CA 1, 2, 3: purified equine carbonic anhydrase isozyme 1, 2, 3, respectively.

38までの画分についての各画分の総炭酸脱水酵素活性および ELISA 法による抗ウシ CA 2 血清との免疫反応量に相当する O. D. 値を **Fig. 2-B** に示した。酵素の活性ピークと免疫反応ピークが一致していることが確認された。

（3） ELISA による抽出物中の酵素量の定量：プロチモシン量は，生後から授乳期間を通して常に高値を維持しているが，成獣では非常に減少していた。一方，ペプシノーゲン量は生後から授乳期間中は比較的低値を示す傾向がみられるが，もっとも低い値は母乳のみによる飼養管理の生後 8 日齢と14日齢の母乳実験群で観察された。さらに，ペプシノーゲン量は成獣でもっとも高い値を示した。また，CA 2 は，生後34日齢以降はじめて検出され順次増加して成獣でピーク値を示していた（**Table 1**, **Fig. 3**）。

（4） 胃タンパク分解酵素分泌細胞の免疫組織化学的分布の観察：抗チモシンおよび抗ペプシノーゲン血清に反応する免疫陽性顆粒は，いずれも

© The Ito Foundation

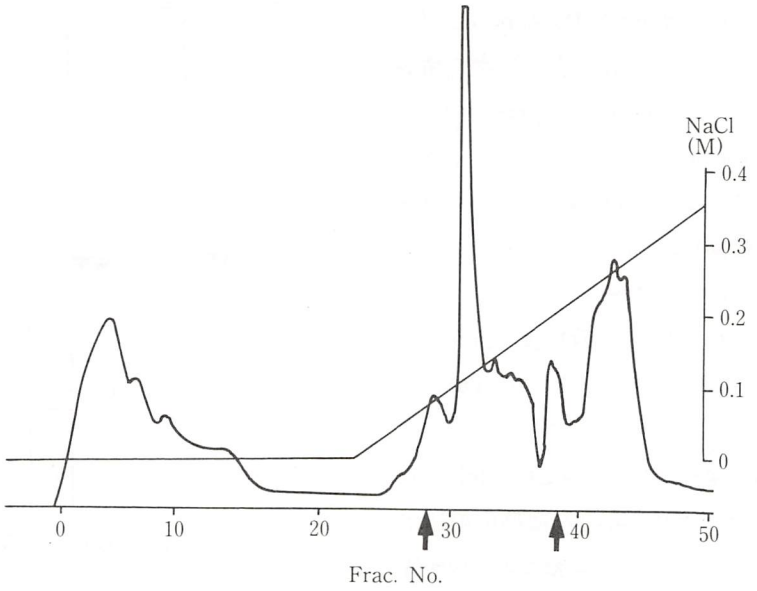



**Fig. 2-A** DEAE-cellulose column chromatography of the crude sample from the goat's stomach.

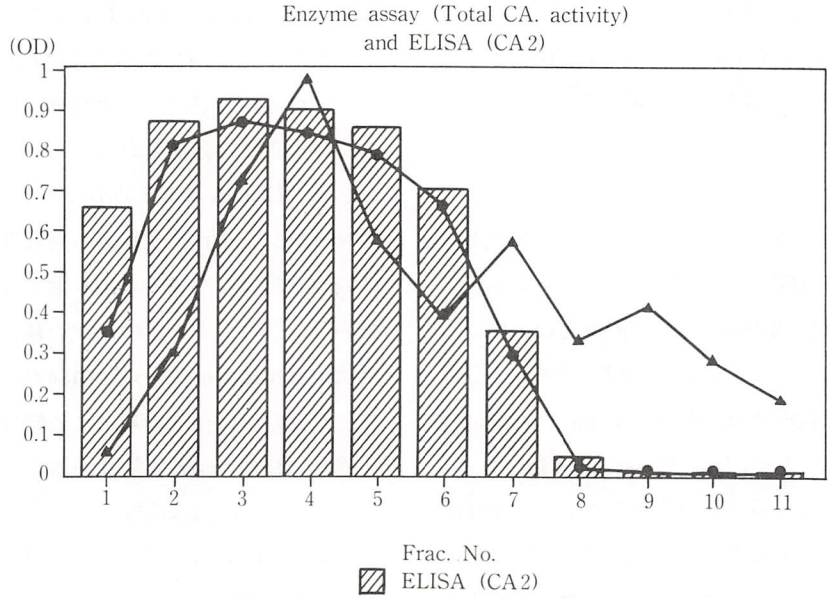



**Fig. 2-B** The fractions between arrow points (**Fig. 2-A**) are analyzed for the total carbonic anhydrase activities (●) and immuno-reactivties with the ELISA (bar). The levels of total protein in each fraction in terms of optical density at 280nm (▲). The enzyme activities, immunoreactivities and protein levels are well corresponding each other between the fractions from 2 to 6.

© The Ito Foundation

**Table 1** Detectional amount of pepsinogen, prochymosin and carbonic anhydrase isozyme 2 in the goat's abomasal tissue by ELISA.

(O.D./mg, Mean±SE)

| Stages | Numbers | Pepsinogen | Prochymosin | CA 2 |
|---|---|---|---|---|
| At birth | 3 | 1.551±0.058 | 0.788±0.003 | not detect |
| 8 days MMF | 4 | 1.797±0.107 | 2.301±0.108 | not detect |
| 14 days MMF | 3 | 1.614±0.077 | 1.103±0.102 | not detect |
| 34 days SMF | 4 | 1.163±0.017 | 0.635±0.024 | 0.137±0.007 |
| 70 days SMF | 5 | 1.606±0.132 | 0.502±0.058 | 0.354±0.008 |
| Adult | 3 | 1.599±0.045 | 0.034±0.029 | 1.532±0.124 |

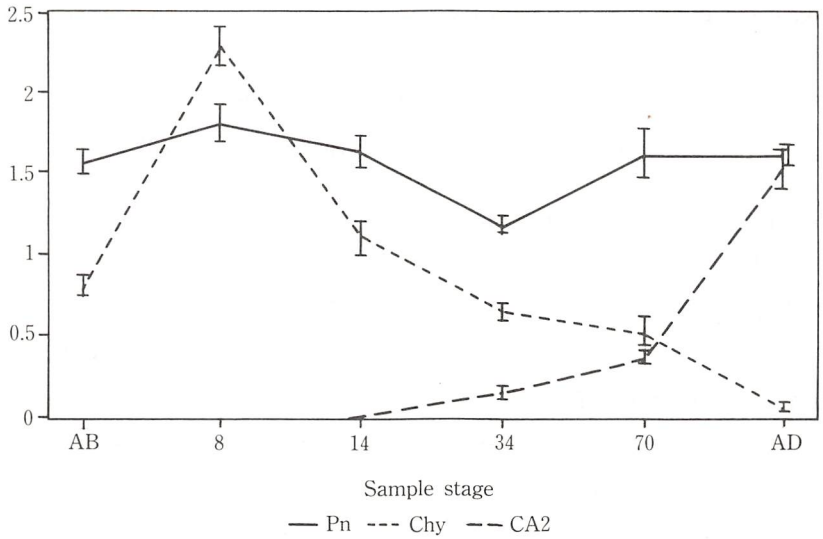



**Fig. 3** Developmental changes in the amounts of pepsinogen, prochymosin and carbonic anhydrase isozyme 2 in the goat's abomasal tissue by the ELISA-method (O.D. level/mg, mean ± SE)

固有胃腺の腺底部の胃腺主細胞に限局してみられる傾向を示した。また，抗 CA 2 血清反応細胞は，壁細胞に限局して見られた。これらの免疫組織化学的な抗体陽性果粒を有する細胞数は，前述の ELISA 法による各酵素の量的変化と一致する結果を示した（**Fig. 4-A,4-B,4-C**）。

## 4. 考　察

（1） ヤギ炭酸脱水酵素 isozyme 2 と使用した抗ウシ CA 2 血清（CA 2）の免疫交叉性：ヤギの CA 2 と抗ウシ CA 2 ウサギポリクロナール抗体との免疫交叉性については，ヤギの第四胃からの粗抽出物の SDS-PAGE 後のウエスタンブロット法により転写した画分の抗ウシ CA 2 ウサギポリクロナール血清と反応するバンドはほぼ単一であり，さらに推定した分子量は，他の動物で知られている CA isozyme の分子量とよく類似しており，約30kDa であった[9, 10, 11]。また，標品として加えた炭酸脱水酵素の他のアイソザイムである CA 1 および CA 3 との免疫交叉性がないことが本実験によって確認された。

（2） イオン交換クロマトグラフィー（DEAE）による炭酸脱水酵素の部分精製とその酵素活性中心と ELISA 法による抗ウシ CA 2 血清の免疫交

© The Ito Foundation

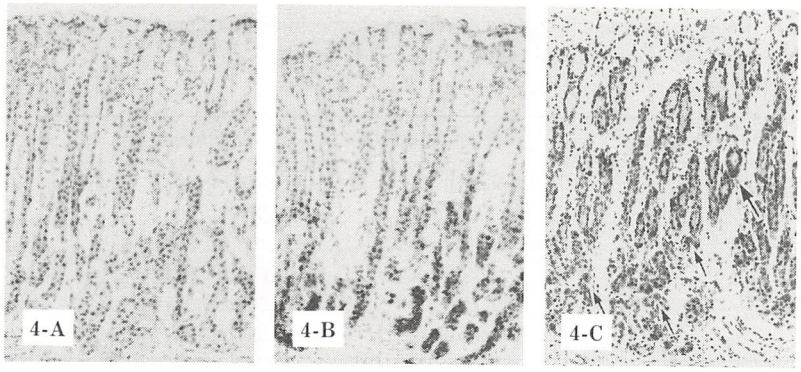



**Fig. 4-A, 4-B, 4-C** Immuno-histochemical localiization of pepsinogen, prochymosin and carbonic anhydrase isozyme 2 in adult abomasal tissues(proper gastrfc portion).
A; no cell reacted against the anti-chymosin serum. B; many gastric chief cells reacted against anti-pepsinogen serum. C; gastric parietal cells reacted against the anti-carbonic anhydrase isozyme 2 serum (arrows).

叉性：**Fig. 2-A**に示すようにヤギの第四胃粘膜からの粗抽出物をイオン交換クロマログラフィー(DEAE)を用い吸着後NaClによるイオン強度0 Mから0.4Mのリニアグラデエントの溶出画分を得た。この溶出画分について**Fig. 2-B**に示すように，その280nmの吸光度でのタンパク量ピークと総炭酸脱水酵素活性量およびELISA法による抗ウシCA 2血清との免疫交叉量を得たが，この結果はヤギの第四胃粗抽出物から回収されたタンパク画分のピークと総炭酸脱水酵素活性量および抗ウシCA 2血清によるELISAでのO.D.値のピークがすべて一致しており，この結果および前述のSDS-PAGEの結果から抗ウシCA 2血清は，ヤギのCA 2を認識していることが確認された。

（3） ELISA法による抗原の定量：**Table 1**および**Fig. 3**にそれぞれの結果を示した。胃腺において主細胞が主に生産し分泌しているものはタンパク分解酵素であるペプシノーゲンとプロチモシンであり，これらの酵素の量的変化については，これまでの報告[12, 17]で示したように生後授乳刺激によってはじめてその生産と分泌は，ピークを示した。さらに，ペプシノーゲンは生後ほぼ安定した変化を見せるが，プロチモシンは，生後量的ピークをむかえた後，人工乳による長期哺乳を行っていてもしだいに減少傾向を示し，成ヤギで最少値を示した。このことは，おそらく人工乳では，母乳と異なり胃腺主細胞におけるプロチモシン維持作用が弱いことが考えられた。一方，主に壁細胞から分泌されている炭酸脱水酵素の発現量は，生後2週齢の母乳における実験群では，検出されず，その後人工乳による実験的な長期哺乳群では，わずかに発現が認められ，成ヤギで最大値を示したことは，非常に興味ある所見であり，前述のプロチモシンの変化と相反する結果を示した。すなわち，母乳期間の終了とともに壁細胞が活性化したことを意味しており，自立的な壁細胞からの塩酸の分泌とそれによるペプシノーゲンの機能的活性化の行われる時期が，授乳による食性変化と連動しており，壁細胞についても機能的発現制御が主細胞と同一の作用によって行われていることが示唆された。また，ペプシノーゲンの主細胞からの発現量は，幼若期ではそれほど大きくは変化を示さず，酵素活性の力価の制御は，壁細胞からの胃酸の分泌によることが，示唆された。このことは，幼若期におけるミルクを主体とする食物の消化と母体からの母乳を介しての移行免疫の摂取に

© The Ito Foundation

都合の良いメカニズムを形成していた。

（4） 免疫組織化学的検索：プロチモシンおよびペプシノーゲンについては，すでに報告[17]した通りであるが，CA 2については反応陽性像はほぼ壁細胞に限局してみられた。また酵素の発現量は，前述のELISAデータと相関していた。

## 5. 要　約

反芻家畜の出生後における食性変化とくに授乳刺激と第四胃の形態形成と主細胞の酸性プロテアーゼ発現系および壁細胞からのCA 2の発現系に関してシバヤギを用いて免疫学的に検索を加えた結果以下の点が明らかになった。

(1) 母乳および人工乳は，第四胃主細胞に対しプロチモシンの発現を維持するが，CA 2の発現を抑制し，胃酸の分泌を結果的に抑制していた。

(2) しかし，人工乳は母乳に比して上記の様なプロチモシンおよびCA 2に対する分泌抑制作用は，弱いことが示唆された。

(3) ペプシノーゲンの発現量は，幼若期ではそれほど大きくは変化を示さず，酵素活性の力価の制御は，壁細胞からの胃酸の分泌によることが示唆された。

## 文　献

1) H. Tamate, A.D. McGilliard, N.L. Jacobson and R. Getty., J. Dairy Sci., 45, 408-420 (1962)
2) J.T. Huber, J. Dairy Sci., 52, 1303-1315, (1968)
3) 尼崎　肇, 家畜診療, 283, 5-14, (1987)
4) 尼崎　肇, 家畜診療, 284, 5-13, (1987)
5) P. Garnot, E. Palles, J.L. Thapon, R. Foullec, R. Tomassone and B. Ribadean-Dumas, J. Dairy Sci., 41, 19-23, (1974)
6) A. Andrén, L. Bjorck and O. Cleasson, J. Physiol., 327, 247-264, (1982)
7) A. Andrén, L. Bjorck and O. Cleasson, Swedish J. Res., 11, 11-15, (1982)
8) M. Asari, K. Sasaki, Y. Kano and T. Nishita, Arch. Histol. Cytol., 52, 337-444, (1989)
9) T. Nishita, H. Matsushita and M. Kai, Equine Vet. J., 19, 509-513, (1987)
10) T. Nishita and H.F. Deutsch, Biochem. Biphys. Res. Commun., 103, 573-580, (1981)
11) H. Matsumoto, F. Fujioka, V, Obara and N. Taniguchi, Comp. Biochem. Physiol., 71(A), 317-320, (1982)
12) H. Amasaki, S. Gozawa, R. Akuzawa, K. Suzuki, M. Daigo and A. Andrén, Asian-Austrarasian J. Anim. Sci., (in print.)
13) B. Filtmann, V.B. Pedersen, H. Jacobsen, D. Kauffman and G. Wybrandt, Pro. Natl. Acad. Sci., 74 (6), 2321-2324, (1977)
14) J.T. Legnder and P. Matsushita, Bio-Techniques, 41, 19-23, (1988)
15) G.D. Johnson, E.J. Holborow and J. Dorling, Immunofluorescence and Immunoenzymetechniques. in Handbook of Experimental Immunology. ed., D.M. Weir, 3rd Ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford.
16) P.M. Banks, J. Histochem. Cytochem., 27 (8), 1192-1194, (1979)
17) S. Gozawa, H. Amasaki, R. Akuzawa, K. Yokoyama, M. Daigo and A. Andrén, Asian-Australasian J. Anim. Sci., 2 (3), 173-174, (1989)

© The Ito Foundation

# 人工哺乳初生豚に対する豚血清 γ-globulin 経口投与の効果

Effect of Orally Administered Swine Serum Gamma-globulin to raise Immunity in Artificially Nursed Newborn Piglet

楢崎 昇（酪農学園大学）

Noboru Narasaki (Rakuno Gakuen University)

The purpose of the present study is to evaluate the effect of orally administered porcine γ-globulin on serum concentration and its fraction, IgG concentration, growth performance and health promotion in artificially nursed newborn piglets.

The γ-globulin powder contained 82.7% of protein and 52.3% of IgG, and was comfirmed pathogenic microorganisms free. Four litters of 48 newborn piglets were randomly alloted to an artificially nursed group and a naturally nursed group. The naturally nursed piglets were allowed to remain with sows, while the artificially nursed piglets were removed immediately at birth from the sows. Each of groups was composed of 24 piglets. During the first 2 days, the artificially nursed group was given 14.4g of γ-globulin powder per head, per day, with powder milk for human baby that was dissolved in warm water. After that, they were given commercial milk replacer prepared for piglets and were weaned at 5 days of age. The naturally nursed group was weaned at 3 weeks of age. Both groups were kept under conventional conditions until the experiment was accomplished at 9 weeks of age.

Total serum protein concentration in the artificially nursed group was 3.64g/dl, approximately 1.6times lower than that of the naturally nursed group at 12 hours after the birth. Following a slight elevation, it reached the same level as that in the naturally nursed group at 5 weeks of age. Serum IgG concentration in the artificially nursed group at 12 hours after the birth was 7.4mg/ml, which was approximately 3.3 times lower than that of the naturally nursed group. Furthermore, it decreased as time went by, and reached the lowest level of 2.8mg/ml at 2 weeks of age. Then, it incrased and changed to higher level than that in the naturally nursed group after 5 weeks of age. Average body weight and survival rate at 9 weeks of age were 20.02 kg, 79.2% in the artificially nursed group and 24.91kg, 91.7% in the naturally nursed group, respectively. The dead piglet caused by pathogenic microorganisms were not observed in both groups.

## 1. 目　的

高等動物は多種多様な抗病機能を備えているが，なかでもγ-globulinが関与する免疫応答は，感染防御に極めて重要な役割を演じている。豚では，母豚のγ-globulinが胎生期においては胎盤をとおして胎子に移行せず，分娩後に初乳を経由して初生豚に移行し，いわゆる母子免疫が成立する。

幼齢期の豚では環境に対する適応性および感染防御の機能が未発達なために，種々の疾病に感染

© The Ito Foundation

しやすく，生後間も無い時期の下痢症などは死亡率の増加や発育の低下をもたらす。初生豚に初乳を与えず，代用乳で人工育成した場合には，出生時から30日齢にわたってγ-globulinを全く欠き，育成率や発育は著しく低下すると報告されている[1]。

このように，初生豚の初乳摂取は免疫獲得のために重要な役割を果たしている。しかし，分娩時の事故による母豚の死亡や授乳拒否，無乳症，あるいは乳房炎，過剰産子，生時体重が小さく，吸乳力の乏しい虚弱子等では，母子免疫が十分に行われないこともしばしば起こる。そこで，種々の感染症に耐過して，それらの抗体を保有する豚の血清γ-globulinを投与することにより，母子免疫が不可能な人工哺乳の初生豚に対しても抗体を獲得させることが可能であれば，疾病の予防をはじめ発育，育成率の向上にも好影響を及ぼすことが期待できる。

本研究は，と場において副生する豚血液の有効利用を図るとともに，子豚の生産性向上のための飼養技術改善を目的とするものであり，前年度は自然哺乳の初生豚に対して豚血清γ-globulinを経口投与したところ，投与後に血清IgG濃度は高まる傾向が示され，下痢発生頭数割合や症状の軽減，継続日数の短縮が認められ，発育もやや，優れる傾向が認められた[4]。今回は，初乳を全く与えられない人工哺乳の初生豚に対して豚血清γ-globulinを経口投与し，血液性状，抗病性ならびに発育に及ぼす影響を検討した。

## 2. 材料と方法

### 2.1 供試豚血清γ-globulin

供試した豚血清γ-globulin（以下γ-glb）は前年度の供試品と同一である。と場血液を原料として分画精製した乾燥粉末品で，その成分組成は水分含量4.8%，粗タンパク質含量82.7%，IgG含量52.3%であり，特定病原微生物が陰性と確認されたものである。供試品は伊藤ハム株式会社中央研究所より提供されたものを用いた。

表1　試験区分および供試豚の概要

| 母豚記号 | D | E | F | G | 合計 |
|---|---|---|---|---|---|
| 母豚品種 | L | L | L | L | |
| 交配雄品種 | D | D | D | D | |
| 分娩頭数 | 10 | 14 | 10 | 14 | 48 |
| 供試子豚頭数 | 10 | 14 | 10 | 14 | 48 |
| 対照区 | 5 | 7(2) | 5 | 7 | 24(2) |
| 試験区 | 5(1) | 7(3) | 5(1) | 7 | 24(5) |

（　）内数字は試験期間中の死亡頭数

### 2.2 試験区分および供試豚

試験区分および供試豚の概要は**表1**のとおりである。供試子豚は4頭の種雌豚から生産された48頭で，出生後直ちに，各腹ごとに母乳を全く与えず人工哺乳する試験区と，自然哺乳による対照区に無作為に分け，各区に合計24頭ずつ配置した。

### 2.3 哺乳方法

試験区の1日1頭当たりの哺乳量は，1，3，5日目で300ml，2，4日目で320mlとした。γ-glbの投与量は1日1頭当たり14.4gで，2日目まで代用乳とともに経口投与した。代用乳の調製法と哺乳法は以下のとおりである。1日目はγ-glb 1.2g，育児用粉乳6.3gに温湯を加えて25mlとし，2時間間隔で12回哺乳した。2日目はγ-glb 1.8g，育児用粉乳10.2gに温湯を加えて40mlとし，3時間間隔で8回哺乳した。3日目は育児用粉乳7.5g，市販の子豚用代用乳7.5gに温湯を加えて50mlとし，4時間間隔で6回哺乳した。4日目は子豚用代用乳20gに温湯を加えて75mlとし，4時間間隔で4回哺乳した。5日目は子豚用代用乳18gに温湯を加えて75mlとし，4時間間隔で4回哺乳した。6日目以降は子豚用代用乳を粉状のまま自由給飼したが，10日目までの間は採食の状態により，日中1～2回代用乳を哺乳した。哺乳は育児用哺乳瓶で行った。市販の子

© The Ito Foundation

豚用代用乳にはγ-glbが添加されていることが予想されたので，その影響を避けるために，パイノサイトーシスが作用する出生後の2日間は育児用粉乳を用いた。対照区は自然哺乳させた。

2.4 試験期間および飼養管理

試験期間は出生時から9週齢到達までとした。母豚の飼料給与やその他の一般管理は慣行法によった。対照区は1週齢から人工乳を自由採食させ，3週齢で離乳した。試験区は10日齢で完全離乳し，2週齢から人工乳に切り替えた。鉄剤注射は2日齢に，ARワクチンの接種は1週齢と2週齢の2回に行った。

2.5 調査項目およびその方法

（1） 発 育 体重は生時および各週齢ごとに試験終了時まで測定した。

（2） 血液性状 血液試料は生後12時間，24時間および72時間，1週齢から9週齢までの各週齢ごとに，前大静脈より2mlずつ採取した。血清は遠心分離した後，−30℃で凍結保存した。血清タンパク量はエルマ・タンパク屈折計により求め，血清タンパク分画はセルロースアセテート電気泳動法，IgG濃度は，あらかじめ作成した抗豚IgG羊血清を用いて一元放射免疫拡散法によりそれぞれ測定した。

（3） ふんの性状 ふんの性状は，水様性下痢便，下痢便，軟便，正常便，塊状便の5段階に分類して観察記録した。

（4） 一般健康状態 活力．挙動，ふん性状を観察し，異常が認められた場合はその状態，程度さらに治療を要する場合には，その方法，経過，日数などを記録した。

## 3. 結果と考察

3.1 血清タンパク量，分画比およびIgG濃度

血清タンパク量とその分画比およびIgG濃度の変化は**表2**のとおりである。試験期間中に両区供試豚に死亡例をみたが，事故発生までの血液試料はすべて分析に供し，データ集計に用いた。

血清タンパク量は，出生12時間後で試験区3.64±0.36g/dl，対照区5.82±0.85g/dlと差がみられ，その後も4週齢まで試験区が有意に低く推移した。しかし5週齢以降では対照区の水準に達し，両区近似した値で推移し，有意差が認められなかった。対照区は出生12時間後から5週齢にかけて徐々に減少し，その後再び増加したが，試験区は生後の時間，週齢の経過とともに増加した。

血清γ-glbの割合は，出生12時間後で試験区が30.4±7.7%と，対照区61.4±10.3%のおよそ2分の1で有意に低い値を示した。両区とも出生24時間後にわずかな増加がみられたが，その後は急速かつ大幅に減少し，3週齢で試験区2.1±0.6%，対照区3.9±1.5%のそれぞれ最低値を示した。4週齢以降では両区とも緩やかな増加の傾向を示した。出生12時間後から6週齢まで，試験区は対照区に比べて有意に低い割合を示した。

血清IgG濃度は，試験区が出生12時間後で7.4±2.7mg/mlと対照区の24.1±6.4mg/mlのおよそ3分の1と低い値であった。試験区はその後減少して2週齢で2.8±1.1mg/mlの最低値を示した。4週齢からは徐々に増加し，5週齢以降では対照区を上回った。対照区は，出生12時間後から24時間後にかけて変化はなかったが，出生72時間後から減少して4週齢で4.6±1.6mg/mlの最低値を示し，その後緩やかに増加した。試験区のIgG濃度は，出生12時間後から4週齢までの各時期において，対照区に比べて有意に低い値で推移した。

古郡は[1]，初生豚に初乳を与えず人工育成した場合には，出生時から30日齢までの間，血清γ-glbを全く欠くことを認め，KLOBASA[3]は，出生後の哺乳開始時間を遅らせることにより血清IgGの出現は遅れ，しかも哺乳開始までの時間が

© The Ito Foundation

表2　血清タンパクとその分画の変化

| 時期区分 | 血清タンパク | アルブミン | グロブリン α | グロブリン β | グロブリン γ | IgG |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | g/dl | % | % | % | % | mg/ml |
| 出生12時間 | | | | | | |
| 対照区 | 5.82±0.85$^{C}$ | 14.7±3.6$^{C}$ | 3.1± 1.7 | 20.9± 7.7 | 61.4±10.3$^{C}$ | 24.1±6.4$^{C}$ |
| 試験区 | 3.64±0.36 | 10.8±3.4 | 8.6± 1.8$^{C}$ | 50.3± 6.6$^{C}$ | 30.4± 7.7 | 7.4±2.7 |
| 出生24時間 | | | | | | |
| 対照区 | 5.75±0.90$^{C}$ | 16.9±4.3$^{A}$ | 3.4± 2.1 | 17.4± 4.6 | 62.3± 8.3$^{C}$ | 24.5±6.5$^{C}$ |
| 試験区 | 3.87±0.97 | 14.3±4.6 | 7.7± 2.3$^{C}$ | 46.3± 7.5$^{C}$ | 31.0± 7.6 | 6.5±2.3 |
| 出生72時間 | | | | | | |
| 対照区 | 5.43±0.89$^{C}$ | 25.8±4.4 | 15.6± 9.5 | 27.2± 7.9 | 31.5± 9.3$^{C}$ | 18.4±6.7$^{C}$ |
| 試験区 | 3.92±0.88 | 24.3±5.6 | 32.1±22.2$^{B}$ | 26.3±12.4 | 17.4±13.1 | 6.0±4.0 |
| 1週齢 | | | | | | |
| 対照区 | 5.23±0.63$^{C}$ | 40.8±9.3 | 23.4± 6.5 | 21.0± 4.7$^{C}$ | 14.8± 4.3$^{C}$ | 11.5±4.7$^{C}$ |
| 試験区 | 4.00±0.41 | 39.9±8.4 | 41.3± 7.5$^{C}$ | 15.6± 2.2 | 3.2± 1.5 | 3.2±0.9 |
| 2週齢 | | | | | | |
| 対照区 | 5.06±0.46$^{C}$ | 52.8±6.3 | 21.5± 5.7 | 19.0± 6.2$^{A}$ | 6.8± 3.1$^{C}$ | 7.8±3.4$^{C}$ |
| 試験区 | 4.14±0.49 | 49.7±6.6 | 32.3± 8.2$^{C}$ | 15.4± 5.6 | 2.6± 1.5 | 2.8±1.1 |
| 3週齢 | | | | | | |
| 対照区 | 5.22±0.48$^{C}$ | 56.9±5.3$^{B}$ | 22.6± 2.8 | 16.6± 2.6$^{A}$ | 3.9± 1.5$^{C}$ | 5.6±2.0$^{C}$ |
| 試験区 | 4.11±0.43 | 52.1±6.0 | 31.3± 5.5$^{C}$ | 14.6± 3.1 | 2.1± 0.6 | 2.9±1.0 |
| 4週齢 | | | | | | |
| 対照区 | 4.45±0.43$^{B}$ | 56.8±5.0$^{A}$ | 24.3± 3.1 | 15.0± 2.8 | 4.0± 1.4$^{B}$ | 4.6±1.6$^{A}$ |
| 試験区 | 4.14±0.23 | 52.2±6.3 | 30.9± 5.4$^{C}$ | 14.3± 1.9 | 2.7± 1.2 | 3.6±1.5 |
| 5週齢 | | | | | | |
| 対照区 | 4.40±0.45 | 56.2±4.6 | 24.5± 3.5 | 15.3± 2.1 | 4.1± 1.5$^{B}$ | 4.8±1.7 |
| 試験区 | 4.51±0.45 | 56.6±5.4 | 24.7± 3.9 | 16.1± 2.8 | 2.7± 1.3 | 5.0±2.5 |
| 6週齢 | | | | | | |
| 対照区 | 4.53±0.44 | 55.4±3.8 | 24.5± 2.7 | 16.1± 1.2 | 4.2± 1.3$^{A}$ | 5.0±1.2 |
| 試験区 | 4.68±0.49 | 56.7±4.5 | 23.5± 3.5 | 16.6± 1.7 | 3.4± 1.1 | 5.7±1.7 |
| 7週齢 | | | | | | |
| 対照区 | 4.83±0.42 | 54.7±3.9 | 24.5± 2.4$^{A}$ | 16.0± 1.5 | 4.8± 1.4 | 6.1±1.0 |
| 試験区 | 4.98±0.57 | 56.5±4.3 | 22.6± 3.0 | 16.9± 1.7 | 4.1± 1.5 | 6.8±7.8 |
| 8週齢 | | | | | | |
| 対照区 | 5.19±0.51 | 56.9±4.6 | 22.2± 4.0 | 17.3± 5.3 | 4.3± 1.0 | 6.8±1.3 |
| 試験区 | 5.27±0.56 | 55.4±5.1 | 22.4± 5.4 | 17.3± 5.3 | 4.3± 1.2 | 7.8±1.9 |
| 9週齢 | | | | | | |
| 対照区 | 5.44±0.44 | 57.0±4.2 | 29.9±15.0 | 16.0± 2.5 | 5.1± 1.4 | 7.5±1.4 |
| 試験区 | 5.37±0.34 | 54.9±3.5 | 28.7±13.2 | 17.1± 2.1 | 5.5± 1.7 | 8.2±1.5 |

各時期の区間有意差　A = $p < 0.05$,　B = $p < 0.01$,　C = $p < 0.001$

© The Ito Foundation

長びくほどIgG濃度は低くなることを認めている。本実験における試験区の血清タンパク量，γ-glb割合およびIgG濃度はいずれも対照区に比べて有意に低い値ではあったが，豚血液由来のγ-glbは経口投与によって血清中に取り込まれ，確実に受動免疫された。本実験のγ-glb投与量1日1頭当たり14.4gは，自然哺乳子豚の文献値[2,6]を参考に，γ-glbの吸収率を50%，血清IgG濃度を40mg/mlと期待して設定た。しかし出生12時間後のIgG濃度から吸収率は17.7%と推算された。このようにγ-glbの吸収率が低く見積られた原因には次のことが考えられる。(1) 初乳タンパクと，育児用粉乳とともに溶解した血清γ-glbの物性および吸収能の相違。(2) 出生後24時間内は2時間間隔で人工哺乳したが，1回当りの哺乳量が多いために消化管内通過速度が早く，パイノサイトーシスによる吸収が十分でなかった。(3) 初乳にはパイノサイトーシスを促進させるために，胃・腸管内でのタンパク消化を抑制するトリプシン・インヒビター物質が含有されるが，血清γ-glbには含有されない。(4) 腸管内および吸収移行したIgGは，同時に侵入した病原性微生物を制圧するために，早い速度で消費された。これらの点については更に検討が必要であると考えられる。

3.2　疾病の発生状況および育成率

試験期間をとおして，両区に下痢症以外の疾病は観察されなかった。試験区は，2日齢で全頭に早発性大腸菌症と思われる下痢の発生をみた。ほとんどが水様性下痢であったが，抗生物質の投与により回復した。1週齢から2週齢にかけて消化不良によると思われる下痢がみられ，その後も35日齢まで下痢は散見された。1頭当たりの延下痢日数は5.3日であった。一方，対照区では10日齢から下痢の発生がみられ，発生頭数率は54%であった。その後も散発的な発生がみられたが，1頭当たりの延下痢日数は2.3日であった。

試験区に1週齢から3週齢にかけて4頭の死亡豚をみたが，病性鑑定では特定病原菌が検出されず，人工乳餌付けの不良による衰弱死と判断された。このほか，3週齢で1頭が採血時にショック死した。対照区では，2日齢に1頭が母豚により圧迫死し，3週齢で1頭が採血時にショック死した。その結果，9週齢における育成率は試験区79.2%，対照区91.7%であった。試験区は2日齢から全頭に下痢の発生が見られたが，それが直接の原因となる死亡はなかった。血清IgG濃度は対照区に比べて低いものの確実に取り込まれており，その免疫作用と抗生物質投与により損耗を克服することができたと考えられる。ちなみに，同一環境条件下のγ-glb無投与の人工哺育実験[4]では，供試豚24頭の全頭が2日齢から5日齢までの間に早発性大腸菌症により死亡した。

3.3　発育成績

体重の推移は**表3**のとおりであ。

試験区は生時体重が有意に大きいが，その後の初期発育は停滞した。早期の下痢，超早期離乳に

表3　発　育　成　績

| | 生　時 | 1週齢 | 2週齢 | 3週齢 | 4週齢 | 5週齢 | 6週齢 | 7週齢 | 8週齢 | 9週齢 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 対照区 mean(kg) | 1.19 | 2.33 | 3.89 | 5.21 | 6.52 | 8.27 | 11.16 | 14.83 | 19.35 | 24.91 |
| SD (kg) | ±0.27 | ±0.61 | ±0.92 | ±1.16 | ±1.48 | ±1.97 | ±2.49 | ±3.03 | ±3.81 | ±4.71 |
| 試験区 mean(kg) | 1.35 | 1.80 | 2.40 | 3.45 | 4.99 | 6.99 | 9.31 | 12.44 | 15.92 | 20.02 |
| SD (kg) | ±0.26 | ±0.33 | ±0.55 | ±0.94 | ±1.31 | ±2.15 | ±2.83 | ±3.53 | ±4.48 | ±5.40 |
| 平均値の有意差 | $p<0.05$ | $p<0.001$ | $p<0.001$ | $p<0.001$ | $p<0.001$ | NS | $p<0.05$ | $p<0.05$ | $p<0.05$ | $p<0.01$ |

© The Ito Foundation

よる養分摂取不足，毎週に行う採血のストレス等が原因と考えられる。5週齢頃から人工乳の摂取が旺盛になるとともに順調な発育を示した。9週齢の体重は20.02±5.40kgで，変動係数は27％と不斉一は避けられなかった。一方対照区は，同腹子豚の半数を試験区のため取り除いてあるため，母乳の摂取量も十分であり，9週齢の体重は24.91±4.71kg，変動係数18％であった。

## 4. 要　約

と場において副生する豚血液の有効利用を図るとともに，子豚の哺育期における損耗防止のための飼養技術改善を目的として，初乳を全く与えられない人工哺乳の初生豚に豚血清γ-globulinを経口投与し，血液性状，抗病性ならびに発育に及ぼす影響を検討した。

供試した豚血清γ-globulinは，と場血液を原料に分画精製した乾燥粉末品で，γ-globulin 82.7％，IgG 52.3％を含有し，特定病原微生物が陰性と確認されたものである。供試子豚は4腹48頭の初生豚で，各腹ごとに出生後直ちに，母乳を全く与えず人工哺乳する試験区と，自然哺乳による対照区に無作為に分け，各区に合計24頭ずつ配置した。試験区には，初めの2日間，γ-globulin 1日1頭当たり14.4gを育児用粉乳とともに溶解して哺乳した。3日齢からは子豚用代用乳に切り替え，10日齢で離乳した。試験期間は出生時から9週齢までとした。結果は要約すると次のとおりである。

(1) 血清タンパク量は，出生12時間後で試験区が3.64±0.36g/dlと，対照区の5.82±0.85g/dlに比べて有意に低い値であった（P＜.001）。しかし経日的に徐々に増加し，5週齢で対照区の水準に対した。

(2) 血清γ-glb割合は，出生12時間後で試験区が30.4±7.7％と，対照区の61.4±10.3％に比べて有意に低い値であった（P＜.001）。両区とも経日的に減少し，3週齢で試験区2.1±0.6％，対照区3.9±1.5％と，ともに最低値を示した。

(3) 血清IgG濃度は，出生12時間後で試験区が7.4±2.7mg/mlと，対照区の24.1±6.4mg/mlに比べて有意に低い値であった（P＜.001）。試験区は2週齢で2.8±1.1mg/ml，対照区は4週齢で4.6±1.6のそれぞれ最低値を示した。試験区のIgG自己産生能は対照区に比べて優れる傾向を示した。

(4) 試験の初期発育は，早発性下痢症，超早期離乳による養分摂取不足等によって遅延したが，5週齢頃から順調に発育した。9週齢の体重および育成率はそれぞれ試験区20.02±5.40kg，79.2％，対照区24.91±4.71kg，91.7％であった。両区供試子豚に疾病による損耗はなかった。

以上のように，母乳を全く与えない人工哺乳初生豚に豚血清γ-globulinを経口投与したところ，血清中にIgGが確実に取り込まれて受動免疫が成立することを確認できた。さらに，これらをとおして子豚の損耗は防止できた。今後は，更に投与量や投与法について検討を加える必要があろうと思われる。

### 文　献

1) 古郡　浩，美斉津康民，秋田富士，姫野健太郎：畜産試験場報告，26，31-37，1973
2) 古郡　浩：畜産の研究，34，760-764，1980
3) KLOBASA F., E. WERHAHN: Research in Veterinary Science, 31, 195-206, 1981
4) 栖崎　昇：食肉に関する助成研究調査成果報告書，Vol. 7, 105-111，伊藤記念財団，1989
5) 栖崎　昇：未発表資料
6) 清水悠紀臣・清水実嗣：豚病学，第二版，182-202，近代出版，東京，1983

© The Ito Foundation

# 豚における背脂肪厚への選抜が枝肉の脂肪組織蓄積部位に与える影響

## Effects of Selection for Low Backfat Thickness in Pigs on the Sites of Fat Tissue Deposition in the Carcass

西田 茂・鈴木 啓一・佐藤 秀俊・渡辺 好造（宮城県畜産試験場）

Shigeru Nishida, Keiichi Suzuki, Hidetoshi Satou and Kouzou Watanabe
(Miyagi Prefectural Animal Industry Experiment Station)

In order to investigate the effects of selection for low back fat thickness in pigs on the sites of fat tissue deposition in the carcass, fat area of cross section of carcass and carcass fat percentage was studied with 93 Landrace boars from the base to four generations. The sites of cross section were the 1 st, 5 th, 13 th and 15 th thoracic vertebrae and the 4 th lumbar vertebrae and the femur. The area of fat on the cross section was measured with a Digitaizer. The variation of the fat percentage of carcass with generation was influenced mainly by the variation of the fat area percentage of cross section of 13 th and 15 th thoracic vertebrae and the subcutaneous fat area percentage of 4 th lumbar vertebrae. The correlations between carcass fat percentage and live backfat thickness measured by an ultrasonic flaw detecter and carcass backfat thickness were 0.46 and 0.42 respectively. On the basis of the ratio of fat area and the ratio of subcutaneous fat, the fat percentage of carcass was presumed as $R^2$ of 77% using the three independent variables of the fat area percentage of 13 th thoracic vertebrae and 4 th lumbar vertebrae and subcutaneous fat percentage of 15 th thoracic vertebrae.

### 1. 目　的

豚育種の分野では過剰な脂肪を含まない枝肉の生産が重要な改良の目標とされてきた。このため，体全体の脂肪量や割合を生体または体の部分的な記録から推定する方法について様々な試みが行われ，選抜の指標として用いられてきた[1]。その中で，スキャンニング・スコープを利用した背脂肪の厚さの記録は，わが国の豚産肉能力直接検定に採用されてきた。また，近年行われている豚系統造成試験の選抜形質としても採用され，あきらかな選抜反応が認められている[2,3]。しかし，選抜に伴う背脂肪厚の減少が，枝肉全体の脂肪量との関係から検討されてはいない。一方，J.D.Woodら[4]は豚の背脂肪厚減少への選抜の結果，対照群と比較して選抜群の枝肉の組織構成割合には選抜の影響が認められず，また体を6分割して脂肪の分配について比較したところ両系統間で違いが認められなかったとしている。

そこで，生体における超音波を利用した測定記録に基づく背脂肪厚減少への選抜が，枝肉の脂肪組織蓄積部位に与える影響について調査するため，系統造成選抜過程豚の脂肪組織の分布状況を調査した。また，体全体の脂肪重量割合と枝肉断面における脂肪面積割合との関係について調査した。

© The Ito Foundation

## 2. 方　法

系統造成における選抜は，選抜候補豚の生体重30から90kgの間の1日平均増体重，90kg時点での背脂肪の厚さ，ロース断面積の3形質について選抜指数法により行った。世代の交代は初産で行い1年に1世代ずつ更新した。背脂肪厚は，スキャンニング・スコープまたは超音波探傷器で，体長の2分の1部位およびその前後10cmの合計3部位で体上線から2cm体側に下がった点を測定しその平均値を用いた。選抜候補豚の雄は産肉能力直接検定と同様の飼養方法で，また雌は6頭群飼で不断給餌の条件で検定した。

本試験の供試豚は，選抜候補雄豚の同腹豚を不断給餌，単飼したと体調査用の雄豚であり，造成過程の選抜第3世代から第6世代まで，各世代20頭余りのランドレース種計93頭である。供試豚は体重90kg到達後24時間絶食し，生体でスキャンニング・スコープおよび超音波探傷器により背脂肪厚を測定した後，湯はぎ法により解体した。枝肉右半丸を重量測定後にカタ，ロース・バラ，ハムの3部位に分割して−30℃で凍結保存した。左半丸は1夜放冷後生体での測定部位に合わせて皮膚を含む背脂肪厚をノギスを用いて実測した。

凍結保存した枝肉の各部位をバンドソーを用いて2cm間隔で体長軸を横断するように切断した。各切断面を複写機を用いて写し取り，椎骨が含まれる断面についてはその名称を記録した。切断片は肉粉砕器に通して，十分混合しながら粉砕した。粉砕後サンプルを採取し凍結保存した。サンプルの脂肪含量はエーテル抽出法により測定した。

複写した横断面図の中から各部位2ヵ所（カタ：第1胸椎，第5胸椎　ロース・バラ：第13胸椎，第15胸椎　ハム：第4腰椎，大腿骨遠位端）についてデジタイザーにより断面全体の面積，脂肪組織全体の面積，皮下脂肪の面積を各々測定した。

## 3. 結果と考察

**表1**には選抜世代別に，生体での超音波を利用して測定した体長2分の1およびその前後10cmの3ヵ所平均背脂肪厚，と殺後の枝肉での同様の部位の測定値と，枝肉右半丸の化学分析により求めた脂肪重量割合を示した。種類の項目で示したB

表1　世代の推移と背脂肪厚，脂肪重量割合の変化

（平均値±標準偏差）

| 世　代 | 種　類 | 頭　数 | 超　音　波（mm） | 実　測　値（mm） | 重量割合（%） |
|---|---|---|---|---|---|
| 第　3 | A | 25 | 16.1±1.7 | 19.3±2.3 | 22.5±2.5 |
| | B | 50 | 18.3±1.8* | | |
| | C | 126 | 20.5±2.4* | | |
| 第　4 | A | 23 | 17.7±2.6 | 18.0±2.8 | 22.8±2.3 |
| | B | 50 | 16.3±1.6 | | |
| | C | 126 | 18.2±1.7 | | |
| 第　5 | A | 22 | 17.8±2.7 | 19.3±3.7 | 22.4±3.0 |
| | B | 48 | 17.1±1.8 | | |
| | C | 124 | 19.5±2.2 | | |
| 第　6 | A | 23 | 17.8±3.0 | 19.1±3.3 | 23.6±3.5 |
| | B | 48 | 16.5±1.6 | | |
| | C | 113 | 18.4±1.9 | | |

A：供試豚　　B：選抜候補豚雄　　C：選抜候補豚雌

超音波は探傷器による生体での測定値，但し* はスキャンニング・スコープによる生体での測定値

© The Ito Foundation

とCは，各々選抜候補の育成豚である。

供試豚については，これらの測定値では分散分析の結果に世代間の有意差は認められず，明らかな選抜の影響はなかった。ただし，供試豚は，重量割合では3世代から5世代までほぼ一定であったが，6世代では23.6%とわずかではあるが増加の傾向を示した。と体での背脂肪厚の実測値では4世代が18㎜で最も薄く，他の3世代では19㎜程度であった。生体からの超音波による測定では，3世代で最も薄く，以後は17.8㎜と増加し横ばいとなった。この様に枝肉全体の脂肪組織含量の測定値である重量割合と背脂肪厚について世代毎の平均値では対応した動きが認められなかった。候補豚は雄，雌共に3世代以降増減を繰り返しながらも3世代よりは明らかに減少する傾向を示しており，また，選抜対象である候補豚については雄，雌がよく似た経緯を示した。背脂肪厚減少への選抜が，給餌条件の違う供試豚と候補豚雄との間で，また性および飼養条件の違う供試豚と候補豚雌との間で背脂肪厚への反応を異ならせた可能性を示唆していた。

次に，**表2**に世代別に枝肉における6ヵ所の横断面と，カタ，ロース・バラ，ハムの分割毎に合計した脂肪面積割合とその標準偏差を示した。**図1**には世代別に脂肪重量割合と脂肪断面積割合とを示した。これらの測定値についても世代間に有意差はなく明らかな選抜の影響は認められなかった。一方，部位別の面積割合では第4腰椎，第15胸椎，第13胸椎次いで第5胸椎の順で脂肪量が多く，第1胸椎と大腿骨遠位端では少なかった。脂肪重量割合の変化量に比べると，特に第13胸椎，第15胸椎と第4腰椎での変化量が大きく，脂肪重量割合の変化に主に寄与していることをうかがわせた。第1胸椎および大腿骨遠位端での変化量は少なかった。

**表3**に世代別に皮下脂肪が断面積の中に占める割合について示した。皮下脂肪面積とは，皮膚面

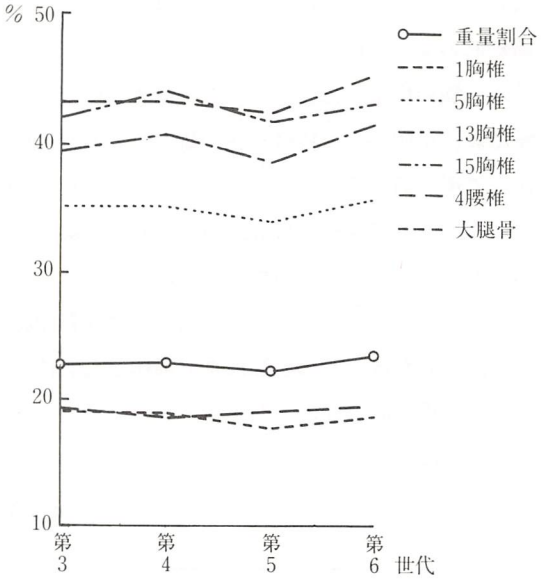



**図1**　世代の推移と脂肪重量割合，脂肪面積割合の変化

**表2**　世代の推移と枝肉横断面における脂肪面積割合の変化

（単位：%　　平均値±標準偏差）

| 世　代 | 1胸椎 | 5胸椎 | 13胸椎 | 15胸椎 | 4腰椎 | 大腿骨 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 第　3 | 19.0±2.6 | 35.2±4.0 | 39.5±4.3 | 42.3±4.9 | 43.2±4.7 | 19.0±2.3 |
| | カタ合計 25.8±2.8 | | ロース合計 41.0±4.4 | | ハム合計 28.4±2.7 | |
| 第　4 | 18.9±3.0 | 35.2±3.0 | 40.9±4.3 | 44.1±7.2 | 43.4±3.7 | 18.6±2.5 |
| | カタ合計 25.1±2.9 | | ロース合計 42.5±5.4 | | ハム合計 28.3±2.8 | |
| 第　5 | 17.7±2.5 | 34.1±6.6 | 38.8±5.4 | 42.0±5.2 | 42.6±3.7 | 19.1±2.2 |
| | カタ合計 23.9±3.6 | | ロース合計 40.5±5.1 | | ハム合計 28.0±2.8 | |
| 第　6 | 18.6±2.6 | 35.8±5.7 | 41.7±5.1 | 43.3±4.6 | 45.5±4.7 | 19.5±2.7 |
| | カタ合計 25.1±3.6 | | ロース合計 42.5±4.4 | | ハム合計 29.5±3.6 | |

© The Ito Foundation

に最も近い部位の筋肉外縁をなだらかな線で結んだ皮下脂肪層の面積とした。筋肉間および腹腔内脂肪の多い第5胸椎，第13胸椎，第15胸椎の3断面について測定した。平均値間の差の検定の結果，第5胸椎では第3世代がそれ以降の世代より有意に多かった。また，第13胸椎では第3世代，第4世代，第5世代が第6世代に比較して有意に少なく，また，第3世代と第5世代は第4世代と第6世代より有意に少なかった。これらの有意差および平均値の推移は，第3世代第5胸椎での値を除くと脂肪重量割合の動きとよく合致しており，これは，脂肪重量全体の変化の主な部分がこれらの部位における背脂肪（皮下脂肪）の増減によってもたらされていることを示している。しかし，この変化は供試豚の生体時の超音波による背脂肪厚と，と体での実測値とは対応してはいなかった。

表3　世代の推移と背脂肪面積割合の変化
（単位：%　上段：平均値±標準偏差
下段：変動係数）

| 世　代 | 5胸椎 | 13胸椎 | 15胸椎 |
|---|---|---|---|
| 第　3 | 29.7±3.3[a] | 26.7±3.2[a] | 26.8±2.9 |
| 第　4 | 27.2±2.3[b] | 28.0±3.1[ab] | 27.7±2.1 |
| 第　5 | 26.0±3.3[b] | 26.5±2.8[a] | 26.7±3.1 |
| 第　6 | 27.7±4.4[b] | 29.7±4.3[b] | 28.3±3.2 |

[ab]：異符号間で有意の差がある

表4に世代をプールして，各測定形質の平均値と標準偏差および脂肪重量割合との相関係数を示した。脂肪断面積割合については第4腰椎で43.7%と最も多く第13，15胸椎でも40%を越えていた。第1胸椎と大腿骨遠位端では18.6，19.1%と少なかった。第1胸椎，第5胸椎ではその他の部位より分散が大きくなる傾向にあった。皮下脂肪断面積割合については3部位とも27%であった。生体の超音波，と体の実測での背脂肪厚は17.3，19.1mmであった。

枝肉の脂肪重量割合との相関係数を見ると背脂肪厚は超音波，実測ともに0.4余りの中程度の正の相関となっていた。脂肪断面積については第13胸椎と第4腰椎部分での相関が高く0.81，0.80であった。これは氏家ら[5]の報告と一致した。次いで，第15胸椎と大腿骨遠位端がともに0.73であり，第1，第5胸椎ではやや低くなった。皮下脂肪断面積割合では第13，第15胸椎が0.72，0.79であり，第5胸椎では0.52となった。このように脂肪面積

表4　枝肉の脂肪重量割合と横断面脂肪面積割合，背脂肪厚との相関

| 項　目 | 部　位 | 平均値 | 標準偏差 | 相関係数 |
|---|---|---|---|---|
| 超音波背脂肪厚 | 体長1/2と前後 | 17.3mm | 2.6 | 0.46** |
| 実測背脂肪厚 | 10cm3部位平均 | 19.1mm | 3.0 | 0.42** |
| 脂肪断面積割合 | 第1胸椎 | 18.6% | 2.7 | 0.51** |
| 脂肪断面積割合 | 第5胸椎 | 35.1% | 4.9 | 0.58** |
| 脂肪断面積割合 | 第13胸椎 | 40.2% | 4.8 | 0.81** |
| 脂肪断面積割合 | 第15胸椎 | 42.9% | 5.6 | 0.73** |
| 脂肪断面積割合 | 第4腰椎 | 43.7% | 4.3 | 0.80** |
| 脂肪断面積割合 | 大腿骨遠異端 | 19.1% | 2.4 | 0.73** |
| 皮下脂肪断面積割合 | 第5胸椎 | 27.7% | 3.6 | 0.52** |
| 皮下脂肪断面積割合 | 第13胸椎 | 27.7% | 3.6 | 0.72** |
| 皮下脂肪断面積割合 | 第15胸椎 | 27.4% | 2.9 | 0.79** |
| 脂肪重量割合 | 枝肉半丸 | 22.9% | 2.8 | - |

N＝93　　*p＜0.05　　**p＜0.01

© The Ito Foundation

と皮下脂肪面積割合でともにロース・バラとハムの部位で脂肪重量との相関が高く相関係数は0.7から0.8を示した。

そこで，脂肪重量割合を目的変量とする重回帰分析を行ったところ，第13胸椎脂肪面積割合が寄与率0.66で第1の説明変数となり，次いで第15胸椎の皮下脂肪面積を加えることにより寄与率は0.74，更に第4胸椎の脂肪面積割合が加わって0.77となった。と体からまたは生体からの背脂肪厚の測定値と脂肪重量割合との相関を考慮すると，これらの部位での脂肪面積割合によって脂肪重量割合を推定することの有効性が示唆された。

## 4. 要　約

豚における背脂肪厚減少を含む選抜過程が選抜各世代における枝肉への脂肪蓄積部位に与える影響について検討するため，系統造成の途中である4世代93頭のランドレース雄豚について枝肉断面に占める脂肪組織の面積割合について検討した。枝肉断面の測定は第1，5，13，15の各胸椎，第4腰椎および大腿骨の6ヵ所で行い，面積の測定にはデジタイザーを用いた。世代間の脂肪重量割合の平均値の変動は，主に第13胸椎，第15胸椎，第4腰椎の皮下脂肪面積割合の変動と対応することが示唆された。世代をプールした重回帰分析の結果，枝肉の脂肪重量割合と超音波を利用した生体測定での背脂肪厚および枝肉で実測した背脂肪厚との相関は各々0.46，0.42であり，脂肪面積割合のほうが高かった。特に，第13胸椎と第4腰椎での脂肪面積割合および第15胸椎での皮下脂肪面積割合を説明変量とすると寄与率0.77の回帰が得られた。

### 文　献

1) Vangen, O. and N. Kolstad : 3rd World Congr. Appl. Livestock prod. Nebraska b, 367-380, 1986
2) 伊藤　菁・神部昌行・西田　朗・仁昌寺博・阿部猛夫・山田行雄・田中弘敬・三上仁志：日豚研誌，22巻，2号，82-87，1985
3) 佐藤　勲・高坂宗夫・三上仁志・甲斐勝利・黒木政博・阿部猛夫・山田行雄・田中弘敬・西田　朗：日豚研誌，22巻，2号，88-93，1985
4) Wood, J. D. Anim. Prod., 36 : 389-397, 1983
5) 氏家　哲・鈴木啓一・浅野安夫：日豚研誌，25巻，1号，29-34，1988

© The Ito Foundation

# ニホンジカにおける飼料の通過速度と消化率の季節変動に関する研究

Studies on the Seasonal Changes in Feed Passage and Digestibility in Sika Deer (*Cervus Nippon*)

佐々木　康之・庄司　芳男・加藤　和雄（東北大学農学部）

Yasuyuki Sasaki, Yoshio Shoji and Kazuo Katoh
(Faculty of Agriculture, Tohoku University)

The seasonal changes in digestive function remain to be investigated in Japanese *Sika* deer. The aim of the present study was to measure the mean retention time (MRT) and feed digestibility in deer and sheep in summer (July) and winter (February). Three castrated male animals of each species were fed alfalfa hay cubes at 0900 h. The ration was 2 % of body weight. The MRT was calculated from the recovery of the stained hay particles excreted. The feed digestibility wasd etermined by the common procedure.

The MRT was significantly shorter in winter than in summer, and also shorter in deer than in sheep. The digestibility of dry matter, neutral detergent digestive fiber (NDF) and acid detergent digestive fiber (ADF) was significantly lower in winter than in summer. Furthermore, the significantly lower value was observed in the digestion of organic matter, NDF and ADF in deer.

These results showed that the passage time through the whole digestive tract (MRT) is shorter in winter than in summer in both animal species, and suggest that the lower feed digestibility in winter is attributable to the shorter MRT. Our present and previous results support our hypothesis that the Japanese deer might belong to the adaptable-feeder-type ruminants which preferably feed forb and browse as well as grass, and have a relatively shorter MRT. The detailed mechanisms for the shorter MRT in winter should be subjected to further investigation.

## 1. 目　的

野生のニホンジカは，本来在来の家畜とは競合しない山間部に棲息し，伝統的な狩猟対象動物であったが，最近では養鹿産業の出現により外国から輸入したシカとともに多頭飼育されるようになってきた。日本における養鹿産業の主な目的は，現在のところ観光と漢方薬の材料としての角の採取である。

ニホンジカを食肉用動物として組織的に飼育している例はわが国においてはまだ見られない。しかし，山間部の灌木や雑草のみで成育することのできるニホンジカの飼育には興味が持たれる。なぜなら，食肉動物としてのニホンジカ飼育の試みは，現在わが国の内外で求められている安価な食肉需要に対応することにもなり，かつ新しい地方産業にもなりうると期待されるからである。一方，わが国における養鹿産業の歴史は浅く，ニホンジカの林業における食害や生態系に及ぼす影響，他の反芻家畜との違いなどから生じる飼育技術など，これから解決せねばならない問題は多い。

著者らは，これまで行ってきたニホンジカの採

© The Ito Foundation

食行動や消化機能に関する研究から，1）ニホンジカは，ササを主食とし，体重増加が冬季に停滞すること，また，ニホンジカの血液組成がヒツジと若干異なること[1]，2）プラスチック・パーティクルの排泄速度の測定から，ニホンジカにおける飼料片の消化管内通過速度は，ヒッジやヤギよりも速い可能性があること[2]，3）ニホンジカにおける飼料成分の消化率がヒツジより低く，その原因は飼料片の消化管内通過速度が，ヒツジより速いことによる可能性があること[3]，などを報告してきた。

こうした一連の研究から，産業としてシカを多頭飼育し生産物を周年にわたって安定して供給するためには，ニホンジカの採食量や体重増加および繁殖周期に見られる季節性の問題は，克服せねばならない重要な課題であることが示された。そこで，今回の実験では，ニホンジカの消化機能における季節的変動を知る目的で，夏期（7月）と冬期（2月）に体重の2％のアルファルファ・ヘイ・キューブを給与した時の飼料片の消化管内通過速度および消化率を測定し，ヒツジの結果と比較検討した。

## 2. 方　法

ニホンジカおよびヒツジ各3頭（いずれも去勢雄）を用いた。実験は，7月と翌年の2月に各30日間にわたって行った。実験期間中は，体重の2％のアルファルファ・ヘイ・キューブを朝9時に給与した。用いた動物の実験直前の平均体重を**表1**に示した。

各実験期間の20日目に，飼料片の消化管内通過速度を測定するためにブリリアント・グリーンで染色したアルファルファ・ヘイ・キューブ40gを追加給与した。翌日から7日間にわたって朝9時に全糞を採取し，湿重量の測定後よく混和してから，飼料片数計測および消化率測定用に各10％の糞を分取し，−20℃にて保存した。

染色飼料片数の計測は，冷凍糞を100 m*l*の水で氷解・粉砕し，ガーゼ上で軽く水洗してから行った。消化管内平均滞留時間（MRT）は，Faichneyら[4]の方法で算出した。乾物（DM）消化率は，一日当たりの給与飼料と排泄した糞の乾物重量（60℃で3日間乾燥した後，更に105℃で2時間乾燥）から算出した。有機物（OM）消化率は，乾物を600℃で6時間燃焼し，粗灰分を求めて算出した。中性および酸性デタージェント線維（NDF およびADF）消化率は，乾物を常法[5]により分析した後，算出した。

結果は，各々3頭の平均値±標準誤差で表した。統計は，種と月を因子とする2元配置の分散分析を用い，危険率5％以下で有意とした。因子間に有意な交互作用が認められた場合には，さらにStudent tテストを用いて検定した。

## 3. 結果と考察

ニホンジカでは2月の実験期間中に若干の残食が認められたが，ヒツジは両実験期間中に給与した飼料をすべて採食した。

**図1**（上段）に，ニホンジカおよびヒツジにおける染色飼料片数の1日毎の排泄率を示した。また**図1**（下段）には，両動物における染色飼料片排泄率の累計を示した。1日毎の排泄率においては，染色飼料給与後2日目までは両動物種の2月の排泄率が7月よりも高い値であったが，3日目以降は逆に低い値であった。両動物種の異積排泄率は，一日毎の排泄率を反映して，染色飼料投与後5日まで2月の排泄率が7月より高い値を示した。この結果は，両動物種における2月の消化管内通過速度が7月のそれより速いことを示唆している。

算出したMRTの結果を**表2**に示す。両動物種の2月のMRTは7月よりも有意に小さく，また，

© The Ito Foundation

ニホンジカのMRTはヒツジより有意に小さかった。因子間に交互作用は認められなかった。この結果は，冬期における飼料片の消化管内通過速度が夏期よりも速いこと，また，ニホンジカにおける消化管内通過速度がヒツジより速いこと，を示している。ニホンジカのMRTがヒツジよりも小さいという結果は，著者らの以前の報告[3]と一致している。

**表3**に飼料の消化率の結果を示した。ニホンジカの消化率は，DMを除く他の3成分の消化率で，

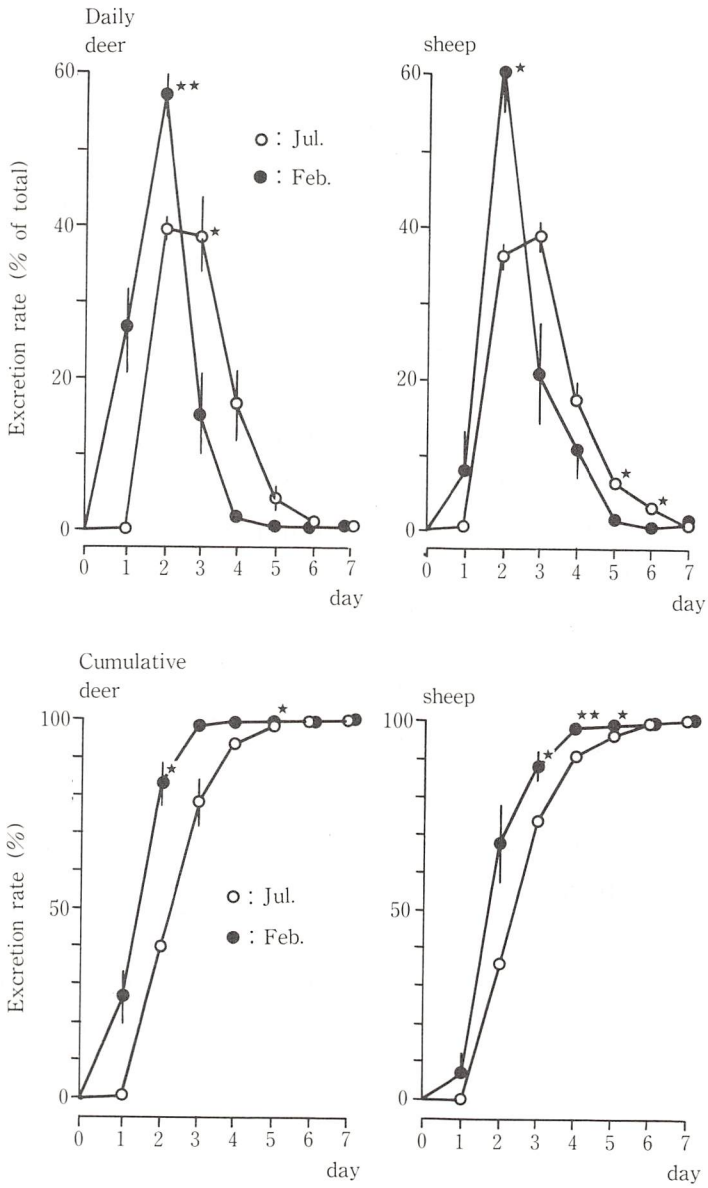



**図1**　ニホンジカおよびヒツジの染色飼料片の1日毎の排泄率（上段）とその累積（下段）
排泄率は，染色飼料給与後7日間に糞から回収された染色飼料片総数を100%として表した。月間に有意差がある場合は，アスタリスク・マークを付記した（＊：P＜0.05；＊＊：P＜0.01）

© The Ito Foundation

表1　ニホンジカおよびヒツジの平均体重
（単位：kg）

| 動物種 | 7月 | 2月 |
|---|---|---|
| ニホンジカ | 42.3 | 52.0 |
| ヒツジ | 44.0 | 48.3 |

表2　ニホンジカおよびヒツジの夏期および冬期における消化管内滞留時間（MRT）
（単位：時間）

| 動物種* | | 7月 | 2月** |
|---|---|---|---|
| ニホンジカ | m | 45.7 | 22.5 |
| | S.E | 2.2 | 3.0 |
| ヒツジ | m | 50.1 | 33.7 |
| | S.E | 0.6 | 4.5 |

平均値（m）±標準誤差（S.E）。月間と種間にそれぞれ有意差が認められる（*：$p<0.05$；**：$p<0.01$）。

ヒツジより有意に低かった。また，OMを除く他の3成分の2月の消化率は，7月のそれより有意に低い値であった。一方，OMとADFの消化率では，因子間に有意な交互作用が認められたので，更にt検定を行ない結果の解析を試みた。その結果，OM消化率に関しては，ヒツジの消化率が2月に低下しなかったこと，また，ADF消化率に関しては，7月の消化率が両種間で差がないことが判明した。以上の消化率に関する結果は，両動物種における冬期の飼料消化率が夏期より低下すること，更に，ニホンジカの飼料消化率がヒツジよりも低いこと，を示している。種間に関する今回の結果は，著者らの以前の報告[3]と基本的に一致している。

消化管の形態的特徴に基づいたHofmann[6]による反芻動物の分類によると，ヒツジはGrass eater型に，シカ類はConcentrate selector型に属する。大部分のシカ類を含むConcentrate selector型の動物は，前胃の容積が小さく繊維を多く含む草類の消化には適さないので，若葉や木の芽などを好んで採食する。Henkeら[7]の報告は，ニホンジカのこうした食性を支持している。また，反芻動物の第一・二胃の容積は体重の10%近くを占め，全消化管内滞留時間の約60%がこれらの前胃を通過するのに要する[8]とされている。これらの報告から，ニホンジカのMRTがヒツジに比較して小さい原因は，ニホンジカの前胃の容積がヒツジより小さいこと，あるいは第二・三胃口の径や開閉頻度が大きいためと考えられる。

冬期に消化率が低下する理由は，冬期に飼料片の消化管内通過速度が速まるためと考えられる。著者ら[3]が以前に報告したように，飼料摂取量が増加すれば消化率は低下し，消化管内通過速度は速まる。一方，冬期の日照時間の減少と気温の低下は採食行動に対して互いに逆の効果を示すことが知られている。すなわち，日照時間の減少は採食行動を抑制し，気温の低下は採食行動を刺激する[9,10]。しかし，冬期に消化管内通過速度が低下する原因としては，今回の実験では給与した飼料の量は一定であったので飼料摂取量の増加は考えられず，むしろ気温や日照時間の短縮による内分

表3　ニホンジカおよびヒツジの夏期および冬期における飼料消化率

| | | DM | | OM* | | NDF* | | ADF* | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 7月 | 2月** | 7月 | 2月 | 7月 | 2月 | 7月 | 2月 |
| ニホンジカ | m | 60.8 | 55.4 | 61.6 | 59.8 | 49.9 | 38.9 | 48.0 | 41.1 |
| | S.E. | 0.8 | 0.8 | 0.8 | 0.6 | 1.3 | 1.3 | 1.2 | 0.6 |
| ヒツジ | m | 59.9 | 57.2 | 61.2 | 62.8 | 53.6 | 46.0 | 47.9 | 45.9 |
| | S.E. | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.1 | 2.5 | 0.9 | 0.4 | 0.4 |

平均値（m）±標準誤差（S.E.）。月間や種間に有意差が認められる場合は，2月および成分の右上にそれぞれアスタリスク・マークを付記した（*：$p<0.05$；**：$p<0.01$）。

© The Ito Foundation

泌系あるいは自律神経系の変化による消化管機能の変化によるものと推察される。

以上の結果から，体重の２％のアルファルファ・ヘイ・キューブを制限給餌した場合，ニホンジカの消化率はヒツジのそれよりも低く，その主な原因は飼料片の消化管内通過速度が速いためであることが再確認されるとともに，冬期には両種における飼料片の消化管内通過速度が夏期より速まるために消化率が低下するものと考えられた。しかしながら，通過速度が冬期に速まる機構は不明であり，また，放牧中の動物はおそらく飽食していると考えられるため，今後は自由採食動物を用いた研究を行い，今回の結果とを比較する必要があると言える。

## 4. 要　約

(1) ニホンジカおよびヒツジに，体重の２％のアルファルファ・ヘイ・キューブを給与した時の飼料片の消化管内通過速度および消化率を，夏期（７月）と冬期（２月）に測定して比較した。

(2) 両動物種における冬期の消化管内通過速度は夏期より有意に速かった。また，ニホンジカの消化管内通過速度は，ヒツジより有意に速かった。

(3) 両動物種における冬期の飼料消化率は夏期より有意に低かった。また，ニホンジカの消化率は，ヒツジより有意に低かった。

(4) 以上の結果から，ニホンジカの飼料消化率はヒツジと同様に冬期に低下するが，この原因は冬期に飼料片の消化管内通過速度が速くなったためと考えられる。また，ニホンジカにおける消化率がヒツジよりも低い理由は，ニホンジカの消化管内通過速度がヒツジよりも速いためと考えられる。

## 文　献

1) 津田恒之，伊藤　厳，星野忠彦，西口親雄，佐々木康之，太田　実：伊藤記念財団報告書，5 (11)，147-153，1987.

2) 加藤和雄，小田島守，太田　実，李　相洛，小田伸一，大友　泰，圧司芳男，佐々木康之：東北大学川渡農場報告，4 (10)，61-63，1988.

3) 佐々木康之，圧司芳男，加藤和雄：伊藤記念財団報告書，7，90-94，1989.

4) Faichney, G.H.: Aust. J. Agric. Res., 13, 319-327, 1975.

5) 阿部　亮：農林水産省畜産試験場研究資料，2，16-28，1988.

6) Hofmann, R.R.: Aspects of Digestive Physiology in Ruminants. Comstock Publishing Associates, 1-20, Itheca, 1988.

7) Henke, S.E., Demarais, S. and Pfister, J.A.: J. Wildl. Manage., 52 (4), 595-598, 1988.

8) Van Soest, P.J.: Nutritional Ecology of the Ruminant. p 221, O & B Books, Portland, 1982.

9) Kay, R.N.B.: Recent Developments in Ruminant Nutrition 2. Butterworths, 199-210, London, 1985.

10) Young, B.A.: The Nutrition of Herbivores. 163-190, Academic Press, London, 1987.

© The Ito Foundation

# 肉豚用飼料原料としての焼酎粕の有効利用：発育成績，枝肉形質および肉質について

Efficient Utilization of Shōchū-Lees as a Feedstuff in Growing-Finishing Pig Diets: Growth Performance, Carcass Traits and Meat Quality

大橋　登美男 ・ *川井田　博 ・ 山内　清（宮崎大学農学部，*鹿児島県畜産試験場）

Tomio Ohashi, *Hiroshi Kawaida and Kiyoshi Yamauchi
(Faculty of Agriculture, Miyazaki University and
*Kagoshima Prefectural Animal Husbandry Station)

Effect of feeding supplemental shōchū-lees was investigated on the growth performance, carcass traits and meat quality of growing-finishing pigs. Basal diets (70.1% TDN and 12.9% DCP) supplemented with sweet potato or barley shōchū-lees and with water (control) at additional amount of 70% each were fed for the period of about 65–70 days from 60 to 105 kg live weight.

The growth performance of pigs fed with the shōchū-lees diet tended to be superior to that of pigs fed with the control diet. However, no significat differences could be observed in the carcass traits and meat quality between the two groups of pigs. Feeding the sweet potato shōchū-lees to the pigs significantly increased the deposited amount of α-tocopherol in their skeletal muscle and adipose tissues, sincet he sweet potato shōchū-lees diet contained more than two-fold higher α-tocopherol than the barley shōchū-lees diet and the control diet.

## 1. 目　的

南九州地域は，甘藷，麦を主原料とした焼酎の主生産地である。その副産物として年間膨大な量の焼酎粕（アルコール蒸留粕）が産出している。現在，焼酎粕の処理方法は，鹿児島県の場合，その大部分は未利用状況のまま海洋などへの投棄（約69%）と肥料として耕地への還元（約24%）となっているが，一部は家畜用飼料（約7%）として利用されている。家畜へ給与する場合は，高水分含量（93～96%）のため，家畜の排泄物中の水分含量が多くなり不衛生であること，また焼酎粕の運搬および夏季における貯蔵が困難なことなど，年間給与には問題点が多く，その給与量は制限されている。須藤[1]は，焼酎粕を家畜用飼料（特に肉豚用）として利用する場合，穀物またはフスマなどの配合飼料の1/3以内に給与量を制限するのが適切であると報告している。しかし，川井田ら[2]は，バークシャー豚肥育用飼料として，高カロリー，高タンパク質飼料（TDN 78%，DCP 14%）に，甘藷焼酎粕を70%上乗せ添加した練り状飼料を生体重60kgから105kgまで給餌し，次のことが明らかとなった。餌養管理上の利点としては，供試豚がおとなしく，闘争性がなく，嗜好性が非常に良く，採食時間が短いことがあげられる。また，発育成績および枝肉成績，さらには肉質検査（理化学的分析）においてもほとんど影響を受けないことを認めた。しかし，特徴的なことは甘藷焼酎粕給与豚の血清，筋肉組織のビタミンE（α-トコフェロール）含量が有意に高くなること

© The Ito Foundation

を明らかにした。

そこで本研究では，焼酎粕の飼料原料としての価値を，主として筋肉組織と脂肪組織へのビタミンE（α-トコフェロール）の蓄積を通して評価することを目的とし，また甘藷焼酎粕と麦焼酎粕の比較並びに発育成績と枝肉形質への影響をも併せて検討した。

## 2. 方　法

### 2.1 供試豚と飼養条件

バークシャー種系統造成豚「サツマ」（以下B'S豚と略記）を供試豚とし，1豚房4頭，去勢雄，雌別飼の4反復12豚房の計48頭を用いた。生体重60kgから105kgまで，産肉能力検定飼料（TDN 70.1%，DCP 12.9%）に水70%（対照区），甘藷焼酎粕70%（甘藷焼酎粕区）および麦焼酎粕70%（麦焼酎粕区）をそれぞれ上乗せ配合した練り状飼料を制限給餌して飼育した。

### 2.2 発育成績

試験期（生体重60kg～105kg）における肥育所要日数，飼料要求率の各調査項目が算出された。

### 2.3 枝肉形質

供試豚は生体重約105kgでと殺し，と体枝肉を一昼夜放冷後，その左半丸枝肉のロース断面積，背脂肪層の厚さなどを測定した。

### 2.4 肉質

対照区，甘藷焼酎粕区および麦焼酎粕区からそれぞれ12頭分（雌6，去勢雄6）の左半丸枝肉を用いて，脂肪組織（背脂肪外層，背脂肪内層，腎臓周囲脂肪）および筋肉組織（胸最長筋，大腿二頭筋）を採取し，そのビタミンE（主としてα-トコフェロール）含量の定量[3]を含め，その他の理化学的特性[2]を調査した。

## 3. 結果と考察

供試豚の肥育期間（生体重60～105kg）における肥育所要日数および飼料要求率は，次のとおりであった。対照区の肥育所要日数（平均日数±標準偏差）および飼料要求率（平均値±標準偏差）は70.5±2.5および3.92±0.20を示し，甘藷焼酎粕区65.1±1.8および3.60±0.09，麦焼酎粕区64.6±1.2および3.56±0.07を与えた。肥育所要日数および飼料要求率について，それぞれ各区の間に統計的有意差は認められなかったが，両焼酎粕区では肥育所要日数の短縮と飼料要求率の低下の傾向が示された。また枝肉形質としてのロース断面積および背脂肪層の厚さについては，各区の間に有意な差が認められなかった[4]。さらに，筋肉組織（胸最長筋，大腿二頭筋）の保水性（加熱遠心分離法），肉色（L，a，b値）およびテクスチャー特性（凝集性，ガム性，付着性）についても，各区の間に有意な差を認めなかった[4]。脂肪組織（背脂肪外層，背脂肪内層，腎臓周囲脂肪）の脂肪色（L，a，b値），脂肪融点，不飽和脂肪酸含量，テクスチャー特性（硬さ，凝集性，ガム性，付着性）および水分含量について，背脂肪内層の場合，甘藷焼酎粕区の脂肪色（L，a，b値）およびテクスチャー特性のガム性（物体を咬み砕くために必要な仕事量）が他の2区との間に差異を示した。すなわち，背脂肪内層のL，aおよびb値は，それぞれ甘藷焼酎粕区が73.1±0.9，4.0±0.5および5.5±0.7，対照区が70.3±0.3，2.3±0.4および6.8±0.2，麦焼酎粕区が70.0±0.3，2.1±0.3および6.7±0.2を示し，甘藷焼酎粕区と他の2区との間に有意差が認められた。しかしながら，脂肪組織の他調査項目では各区の間に有意差がなかった。

今回供試した対照区，甘藷焼酎粕区および麦焼酎粕区の給餌飼料のビタミンE（α-トコフェロール）含量（μg/100g）は，それぞれ426，905および468μgであった。甘藷焼酎粕区には，他の2区の約2倍量のビタミンEが含有されていた。予

© The Ito Foundation

**表1**　焼酎粕給与豚の筋肉および脂肪組織のα-トコフェロール含量（μg/100g）

| 組織 | | 試験区 | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 対照区 | 甘藷焼酎粕区 | 麦焼酎粕区 |
| 筋肉組織 | 胸最長筋 | 41.4± 2.1[a)] | 87.0±11.2 | 47.2± 3.3 |
| | 大腿二頭筋 | 35.5± 3.4 | 107.0±12.6 | 53.0± 6.4 |
| 脂肪組織 | 背脂肪外層 | 220±25 | 328±26 | 176± 9 |
| | 背脂肪内層 | 250±45 | 373±37 | 210± 8 |
| | 腎臓周囲脂肪 | 336±25 | 575±46 | 275±19 |

a)　平均値±標準偏差

想に反し，麦焼酎粕区のビタミンE含量が対照区に近似していたが，このことは“おいしい焼酎造り”の精米の過程でビタミンEを多量に含有する麦（大麦）の胚芽部分が除去されていたためである。

これら給餌飼料のビタミンE（α-トコフェロール）含量の相違は，**表1**に示すように，筋肉組織（胸最長筋，大腿二頭筋）および脂肪組織（背脂肪外層，背脂肪内層，腎臓周囲脂肪）のビタミンE（α-トコフェロール）含量の差異に反映された。すなわち，甘藷焼酎粕区の筋肉組織および脂肪組織のビタミンE（α-トコフェロール）含量が，他の2区に比較して有意に高かった。なお，今回の脂肪組織では腎臓周囲脂肪＞背脂肪内層＞背脂肪外層の順で，腎臓周囲脂肪が最も高いビタミンE含量を示し，また甘藷焼酎粕添加飼料の給餌豚では，対照区の該当脂肪のビタミンE含量に対比して腎臓周囲脂肪での増加率が高い（背脂肪外層，内層の1.49倍に対し腎臓周囲脂肪は1.71倍）ことから，このことは腎臓周囲脂肪にビタミンE（α-トコフェロール）が効率的に蓄積されることを示唆した。筋肉組織では，甘藷焼酎粕添加飼料の給餌が大腿二頭筋のビタミンE（α-トコフェロール）含量を胸最長筋筋に比較して有意に高くした。豚肉では，大腿二頭筋のビタミンE（α-トコフェロール）含量が胸最長筋に比べて高いことが知られている[5)]。両筋肉間の同様な相違は，雄豚の場合と，両焼酎粕給餌雌豚の場合に認めることができる（**図1**）。さらに，両焼酎粕区では，去勢雄豚の両筋肉のビタミンE含量が雌豚に比較して高い傾向を示した（**図1**）。脂肪組織においても，両焼酎粕区の去勢雄豚のビタミンE含量が雌豚に比べて高い傾向にあった（**図2**）。麦焼酎粕区の場合，筋肉組織のビタミンE含量は対照区に比較して高い傾向にあった（**図1**）が，脂肪組織では対照区に比較してビタミンEの蓄積量が低下する傾向にあった（**図2**）。

また，焼酎粕区と対照区の雌豚1頭を用いて，それぞれの胸最長筋からポークソテーを調製し，

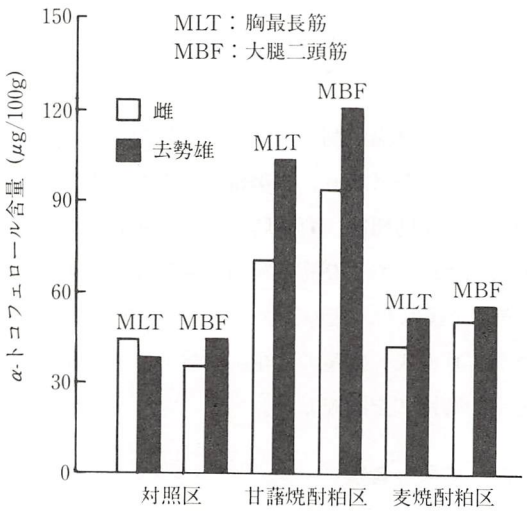



**図1**　豚筋肉組織のα-トコフェロール含量の性差

© The Ito Foundation

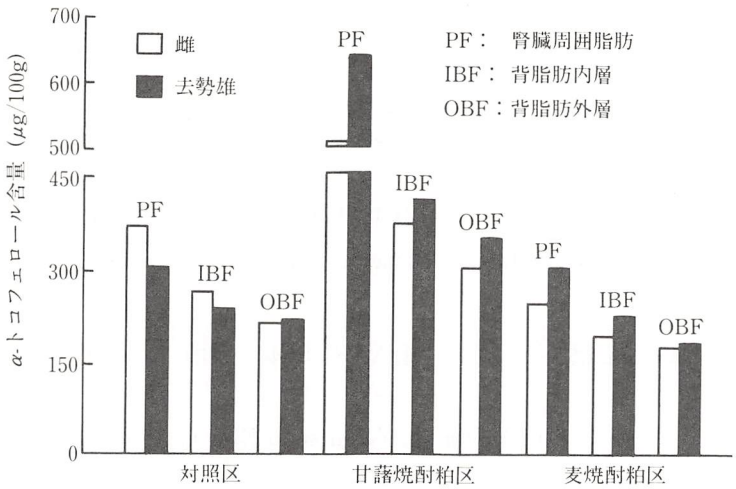



**図 2**　豚脂肪組織のα-トコフェロール含量の性差

30名のパネラー（19～22歳）による官能検査を行った。「おいしさ」において，対照区と甘藷焼酎粕区の間にほとんど相違のないことが，順位法の合計得点に基づいたKramer法によって確認された[4]。

今回の結果は，肉豚への焼酎粕の利用が可能であることを示した。さらに，甘藷焼酎粕の場合，筋肉組織および脂肪組織へのビタミンE（α-トコフェロール）の蓄積量を有意に高めることが明らかであった。

## 4. 要　約

焼酎粕（甘藷焼酎粕および麦焼酎粕）添加飼料の肉豚への効果を，発育成績，枝肉形質，並びに肉質，特に筋肉組織および脂肪組織へのビタミンE（α-トコフェロール）の蓄積量を通じて検討した。その得られた結果の要点は，次のとおりであった。

肉豚（と殺時生体重105kg）の発育成績（肥育所要日数，飼料要求率），枝肉形質（ロース断面積，背脂肪層の厚さ）および肉質（保水性，肉色，テクスチャー）では，焼酎粕無添加区と添加区の間に有意な差異がなかったが，発育成績において両焼酎粕区がやや優れている傾向にあった。また，焼酎粕給餌の特徴として，甘藷焼酎粕給餌豚の筋肉組織および脂肪組織のビタミンE（α-トコフェロール）含量が有意に高くなった。

### 文　献

1）須藤　浩：カス類飼料と給与法，養賢堂，東京，1975.
2）川井田博，松田　誠，福永智明，横山純夫，田村清治，久保田稔：鹿児島県畜産試験場研究報告，20号，73-83（1988).
3）山内　清，門田利作，村田　寿，大橋登美男，芳賀聖一，平川良子，那須裕二：栄食誌，**41**，60-64（1988).
4）川井田博，福永智明，上山繁成，松元計士，横山純夫，牧内一男：鹿児島県畜産試験場研究報告，21号，59-72（1989).
5）Yamauchi, K., Nagai, Y. and Ohashi, T.: Agric. Biol. Chem., **44**, 1061-1067（1980).

© The Ito Foundation

# ミモシン含量を減少させたギンネムの豚に対する給与試験と体成績および肉質に関する研究

Production in Meat Performance, Carcass Characteristics and Meat Qualities of Pigs fed with Mimosine-Reduced Leucaena (*Leucaena leucocephala*)

本郷 富士弥 ・ 川島 由次 ・ 川本 康博 ・ 砂川 勝徳 (琉球大学農学部)

Fujiya Hongo, Yoshitsugu Kawashima, Yasuhiro Kawamoto and Katsunori Sunagawa (Faculty of Agriculture Ryukyu University)

A feeding experiment of mimosine-reduced leucaena formulated in feed was conducted to production in performance, carcass characteristics and meat qualities of pigs.

Four formula feeds containing different levels of leucaena meal, the combination ratio of concentration feed to leucaena meal, 100:0 (Control), 90:10 (T-10), 80:20 (T-20) and 70:30 (T-30) were prepared.

The results obtained were as follows:

1) Mean daily gains (kg/day) in T-0, T-10, T-20 and T-30 were 0.64, 0.70, 0.71 and 0.64, respectively. The higher the level of leucaena meal in the feed, the better feed efficiency was.

2) After the end of feeding experiment, all the pigs were slaughtered and organs and dressed carcasses were weighted. No tendency was determined among four feed types.

3) Meat characteristics water content, water-holding capacity, total pigment quantities and value of color tone, were also determined among pigs fed with different feeds. The values of the pigs fed feeds containing leucaena meal were higher as comparing with those of control pigs.

4) In the fatty acid composition of back fat, the content of oleic acid of the pigs fed leucaena meal was higher than that of the control.

From the results above, it is suggested that as much as 30% of fermented leucaena in feed did not exert a harmful influence on performance, carcass characteristics and meat qualities of pigs.

## 1. 目 的

筆者らは，熱帯性マメ科多年生の常緑灌木であるギンネム（*Leucaena leucocephala* de Wit）を飼料資源として，家畜に効率的に利用するために，含有する毒性アミノ酸であるミモシンの減少法について検討を行ってきた。その結果，サイレージ調製後のギンネム乾燥ミールが，加熱乾燥あるいは天日乾燥を行ったギンネムミールに比べてミモシン含量の減少が著しく，ラットやめん羊に対して高い飼料価値と安全性を有していることを明らかにした[1~3]。しかし，ギンネム給与による豚への影響についての報告は少なく，これまでにギンネム乾燥ミールを豚飼料に10%以上配合して給与すると増体量，飼料摂取量および飼料効率の低下，さらに繁殖障害，代謝障害等を発現することが報告されている[4~5]。

以上のことから，本研究においてはサイレージ

© The Ito Foundation

乾燥ギンネムがこれまでに報告されている豚に対する配合量を上回って利用できるかどうかを明らかにするために肥育試験および解体試験を行い，本乾燥ギンネムの飼料価値，安全性および肉質に及ぼす影響についても併せて検討を行った。

## 2. 方　法

ギンネム群生地より茎葉部を採取し，カッターにて切断，生重量当たり糖蜜を10%添加して十分に混合しながらサイレージ調製（2週間埋蔵）を行い，ミモシンの大部分を減少させた後，天日乾燥を行い粉砕して乾燥ミールとし，これを豚飼料に配合して肥育試験を行った。供試豚は，ランドレース×大ヨークシャー×ハンプシャー（LWH）の去勢豚（平均体重，約32kg）で計12頭を用い，本ミールをそれぞれ0%（対照区），10%，20%および30%配合した4試験区を設定し，トウモロコシ，大豆粕等で各区の栄養価（TDN）をほぼ一定にした。子豚期と肥育期の供試飼料配合割合および一般成分と栄養価計算値は**Table 1**，**2**のとおりである。なお，飼料は自由摂取で行い，1試験区を3頭ずつとし，1頭ずつ代謝ケージで体重約100kgに達するまで飼育した。試験期間中は一定期間毎に採食量，体重および各成分の消化率（全糞採取法[6]）を測定した。次に，肥育試験終了後，と殺解体を行い，枝肉とし産肉能力検定法[7]に従って各部位の測定を行った。また，主要臓器の肉眼的観察と湿重量を測定し，肝臓，腎臓および甲状腺については組織切片を作成して[8]病理学的検索を行った。さらに，供試肉（ロース部およびハム部）のpH，保水性[9]，一般化学組成，全色素量[10]を測定し，供試脂肪（背脂肪）については脂肪酸組成[11]の測定をそれぞれ行った。

## 3. 結　果

供試豚の発育成績に関する結果を**Table 3**にとりまとめて示した。試験開始時から終了時に至る対照区，10%区，20%区および30%区の増体は，

**Table 1** Composition of the control and the experimental diets containing LLM used for growing and fattening pigs (%)

| Ingredient | Growing pig (30～60kg) | | | | Fattening pig (60～100kg) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Control | 10% | 20% | 30% | Control | 10% | 20% | 30% |
| LLM | —— | 10.00 | 20.00 | 30.00 | —— | 10.00 | 20.00 | 30.00 |
| Maize* | 55.70 | 63.40 | 64.20 | 51.50 | 55.91 | 63.61 | 64.41 | 51.71 |
| Soybean meal | 6.00 | 7.50 | 7.50 | 6.70 | 6.00 | 7.50 | 7.50 | 6.70 |
| Fish meal | 3.00 | 3.00 | 3.00 | 3.00 | 3.00 | 3.00 | 3.00 | 3.00 |
| Wheat bran | 30.00 | 13.00 | —— | —— | 30.00 | 13.00 | —— | —— |
| Tallow | | 0.50 | 1.90 | 5.50 | —— | 0.50 | 1.90 | 5.50 |
| Alfalfa meal | 2.50 | —— | —— | —— | 2.50 | —— | —— | —— |
| Salt | 0.40 | 0.40 | 0.40 | 0.40 | 0.40 | 0.40 | 0.40 | 0.40 |
| Calcium carbonate | 0.82 | 0.60 | 0.21 | —— | 0.82 | 0.60 | 0.21 | —— |
| Calcium phosphate | 0.95 | 1.04 | 1.24 | 1.28 | 0.95 | 1.04 | 1.24 | 1.28 |
| Lysine | 0.12 | 0.03 | —— | —— | 0.12 | 0.03 | —— | —— |
| Tryptophan | —— | —— | 0.02 | 0.02 | —— | —— | 0.02 | 0.02 |
| Methionine | —— | —— | —— | 0.07 | —— | —— | —— | 0.07 |
| Antioxidant | —— | 0.02 | 0.02 | 0.02 | —— | 0.02 | 0.02 | 0.02 |
| Vermifuge | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | —— | —— | —— | —— |
| Antibiotic | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | —— | —— | —— | —— |
| Vit. and min. premix | 0.30 | 0.30 | 0.30 | 0.30 | 0.30 | 0.30 | 0.30 | 0.30 |

*: Contained 2.0% fish meal.

© The Ito Foundation

それぞれ60.5kg，66.3kgおよび60.2kgであった。1日平約増体量は，対照区0.64kg，10%区0.70kg，20%区0.71kgおよび30%区は0.64kgであり，増体指数は，10%区109，20%区で111および30%区では100であったことからギンネム配合区の方が増体量の点で優れていたが，1日平均増体量は，各試験区間に有意差はみられなかった。飼料要求率は，対照区3.80に対して10%，20%および30%の各試験区では，それぞれ3.86，4.14および4.22とギンネムの配合量が増すにつれて段階的に増加していたが，試験区間における有意差は認められなかった。なお，10%，20%および30%の各試験区における1日1頭当たりのミモシンの摂取量は，それぞれ257.82mg，344.60mgおよび424.17mgであ

**Table 2** Chemical composition and nutritive value of the experimental diets

| | Control | 10%LLM | 20%LLM | 30%LLM |
|---|---|---|---|---|
| Chemical composition: | | | | |
| Dry matter (%) | 88.72 | 88.83 | 89.36 | 89.65 |
| Crude protein (%) | 18.26 | 17.31 | 17.21 | 17.17 |
| Ether extract (%) | 4.57 | 4.78 | 7.50 | 9.80 |
| Nitrogen-free extract (%) | 65.68 | 65.22 | 60.30 | 52.50 |
| Crude fiber (%) | 4.53 | 5.17 | 7.79 | 12.16 |
| Crude ash (%) | 6.96 | 7.51 | 7.87 | 8.38 |
| Mimosine (mg%) DM | — | 10.55 | 11.70 | 15.69 |
| DHP* (mg%) | — | 0.09 | 0.29 | 0.32 |
| Nutritive value: | | | | |
| TDN (%) | 70.45 | 70.65 | 70.29 | 70.23 |
| DE(kcal/g) | 4.33 | 4.31 | 4.45 | 4.50 |
| DCP (%) | 12.40 | 12.21 | 12.17 | 12.10 |

*: 3-hydroxy-4(1H)-pyridone

**Table 3** Measured values of carcass of pigs fed the diets containing various ratio of LLM

| Item | | Control | 10%LLM | 20%LLM | 30%LLM |
|---|---|---|---|---|---|
| Live weight (kg) | | 97.0±3.96 | 102.8±3.38 | 102.5±3.08 | 97.6±3.12 |
| Dressed weight (kg) | | 71.7±3.27 | 74.3±2.90 | 76.1±2.25 | 69.1±1.85 |
| Dressing percentage (%) | | 73.9±0.47 | 72.2±0.87** | 74.2±0.27 | 70.8±0.37** |
| Chilled carcass/Warm carcass (%) | | 98.2±0.16 | 97.8±0.25 | 98.5±0.38 | 98.7±0.22 |
| Thickness of back fat (cm) | Shoulder | 3.2±0.22 | 3.0±0.13 | 3.2±0.15 | 2.7±0.30 |
| | Back | 1.2±0.21 | 1.1±0.22 | 0.8±0.09 | 0.8±0.17 |
| | Loin | 2.0±0.15 | 2.1±0.09 | 2.2±0.20 | 1.8±0.21 |
| | Mean | 2.1±0.57 | 2.1±0.55 | 2.1±0.70 | 1.8±0.55 |
| Thickness of belly (cm) | Front | 1.5±0.17 | 1.7±0.16 | 1.9±0.35 | 1.9±0.17 |
| | Middle | 0.6±0.24 | 1.0±0.32 | 1.0±0.40 | 1.0±0.38 |
| | Back | 2.6±0.42 | 3.5±0.20 | 3.7±0.22 | 3.0±0.20 |
| | Mean | 1.6±0.58 | 2.1±0.74 | 2.2±0.79 | 2.0±0.58 |
| Carcass width (cm) | | 36.9±2.33 | 35.2±2.09 | 36.5±0.65 | 35.4±0.12 |
| Carcass length (cm) | | 93.9±3.21 | 93.1±4.04 | 104.0±1.73 | 94.8±3.29 |
| Back and loin length (I) (cm) | | 79.4±1.23 | 80.6±1.57 | 83.0±2.25 | 80.9±2.28 |
| Back and loin length (II) (cm) | | 69.5±1.52 | 70.2±2.62 | 73.7±2.11 | 70.2±2.18 |
| Rib eye area ($cm^2$) | | 21.3±1.62 | 17.6±1.22 | 25.8±1.01* | 20.4±1.50 |

Values are mean±SE. *: $p<0.05$, **: $p<0.01$
LLM: Leucaena leaf meal.

© The Ito Foundation

った。また，各試験区における摂取した供試飼料のTDNの平均値は対照区，10%区，20%区および30%区ではそれぞれ68.8%，94.6%，91.59%および93.3%であり，いずれも対照区に比べて高い値を示していた。

肥育試験終了時における各試験区のすべての供試豚の体成績を**Table 4**に示した。と殺時における供試豚の日齢は200日齢であり，絶食時における平均体重は約100kgであった。体長，背腰長（Ⅰ）および（Ⅱ）は20%区が他の試験区に比べて高い値を示していた。背脂肪の厚さは30%区，腹部脂肪の厚さは対照区で低い値を示したが，体の各測定部位に関して統計的な有意差はみられなかった。なお，体解体にあたりすべての供試豚について病理解剖所見を行ったが，内臓部および肉部のいずれにおいても特別な異常は認められなかった。枝肉歩留りは，対照区と10%区間および対照区と30%区間に1%レベルで有意差がみられ，ロース断面積については20%区が他区に比べて有意に高い値を示していた。

各試験区の供試豚より得られた主な臓器重量を**Fig. 1**に示した。脾臓および甲状腺の重量は，対照区に比べていずれもギンネム区が低い値を示していたが，対照区と比較して有意差はみられなかった。その他の臓器でも特に差は認められなかった。すべての試験区の供試豚について，肝臓，腎臓および甲状腺の組織学的な検索を行った結果，ギンネム給与区のいずれにおいても対照区と比べて特に異常な変化はみられなかった。また，筋肉（ロース部およびハム部），肝臓および腎臓におけるミモシン含量を測定した結果，いずれの組織中にもミモシンは検出されなかった。

各試験区における肉質成績すなわちロース部およびハム部のpH値，一般成分および保水性について測定した結果を**Table 5**に示した。pH値は，対照区と比較して20%および30%区のロース部において比較的高い値を示していたがハム部では逆に低い値であった。水分含量はロース部では対照区と比較してすべてのギンネム区が有意に高い値を示し，ロース部の灰分は有意に低い値を示した。また粗脂肪含量は，ロース部では対照区よりもギンネム区の方がやや低い値であったのに対し，ハム部では高い値を示していた。ロース部およびハム部の色差計による測定結果と色素量を**Table 6**に示した。ロース部では，対照区に比べ30%区のL値と10%および20%区のb値が高い値を示し，30%区のa値では若干低い値を示したが，ハム部では特に差がみられなかった。総色素量は，ロー

**Table 4**　Summary of the production trial of pig fed with rations containing different LLM levels

| Item | | Control | 10% L L M | 20% L L M | 30% L L M |
|---|---|---|---|---|---|
| Initial weight | (kg) | 36.5±0.77 | 37.5±0.58 | 35.6±0.45 | 36.4±1.74 |
| Gain in weight | (kg) | 60.5±4.00 | 66.3±2.03 | 66.9±3.36 | 60.2±2.11 |
| Total feed consumed | (kg) | 229.6 | 225.8 | 276.8 | 254.0 |
| Average daily gain | (kg) | 0.64±0.04 | 0.70±0.02 | 0.71±0.04 | 0.64±0.02 |
| Gain index | (%) | 100 | 109 | 111 | 100 |
| Average daily feed consumed | (g) | 2,443.8 | 2,721.7 | 2,945.3 | 2,703.5 |
| Feed consumed index | (%) | 100 | 111 | 121 | 111 |
| Feed conversion ratio | (kg) | 3.80 | 3.86 | 4.14 | 4.22 |
| Feed effciency ratio | (kg) | 0.26 | 0.26 | 0.24 | 0.24 |
| Daily intake of mimosine and DHP* | | | | | |
| Mimosine | (mg) | —— | 73.85 | 83.07 | 100.42 |
| DHP | (mg) | —— | 0.60 | 2.07 | 2.04 |

*：3-hydroxy-4(1H)-pyrldone

© The Ito Foundation

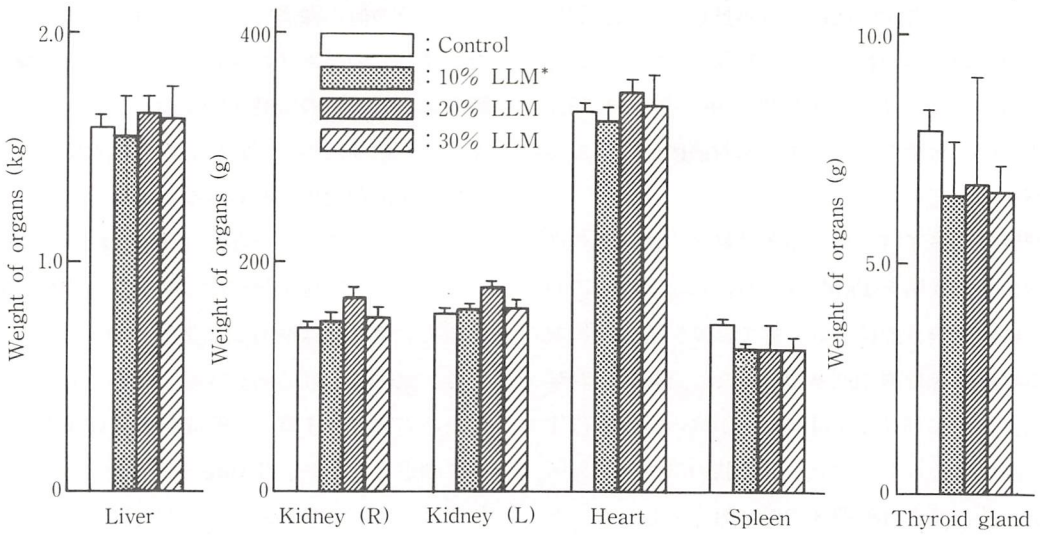



**Fig. 1** Weight of organs from pigs fed the diets containing various ratio of LLM. Each value is expressed as mean±S.E., * : Leucaena leaf meal.

**Table 5** pH, chemical composition and water-holding capacity of the lean meat from pigs fed the diet containing various ratio of LLM

| Treatment | | pH | Chemical composition (%) | | | | Water-holding capacity (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Moisture | Crude protein | Crude fat | Crude ash | |
| Control | Loin | 5.40±0.33 | 70.50±0.16 | 20.97±0.37 | 3.97±0.80 | 1.26±0.02 | 44.44±0.59 |
| | Ham | 5.53±0.13 | 72.37±1.69 | 22.32±1.12 | 1.80±0.51 | 1.21±0.07 | 57.83±0.48 |
| 10% L L M | Loin | 5.40±0.03 | 73.08±0.15** | 22.61±0.19** | 1.85±0.11* | 1.21±0.01* | 50.26±0.66** |
| | Ham | 5.50±0.10 | 69.84±1.14 | 20.97±0.89 | 3.35±0.64 | 1.09±0.07 | 53.66±1.14 |
| 20% L L M | Loin | 5.75±0.03* | 72.77±0.35 | 21.75±0.19* | 3.00±0.11 | 1.14±0.01** | 49.40±1.18* |
| | Ham | 5.42±0.09 | 70.73±1.36 | 23.25±0.50 | 5.52±0.89 | 1.22±0.01 | 54.09±1.04 |
| 30% L L M | Loin | 5.60±0.03 | 72.95±0.06** | 19.40±0.07** | 3.62±0.30 | 1.15±0.003** | 50.86±1.71** |
| | Ham | 5.37±0.03 | 70.66±0.50 | 22.11±1.24 | 4.03±1.25 | 1.16±0.04 | 56.87±3.28 |

LLM: Leucaena leaf meal. Loin: Muscle longissimus thoracis. Ham: Muscle biceps femoris. Each value is expressed as mean±SE., * : $p<0.05$, ** : $p<0.01$

**Table 6** Meat color and total pigment content of the lean meat from pigs fed the diet containing various ratio of LLM

| | | | Control | 10% L L M | 20% L L M | 30% L L M |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Meat color (Values of Hunter) | Loin | L | 42.07±1.07 | 42.23±0.60 | 41.63±0.55 | 45.43±1.73* |
| | | a | 10.83±0.34 | 11.50±0.38 | 11.77±0.64 | 9.60±0.45 |
| | | b | 7.87±0.20 | 9.80±0.10** | 9.40±0.10** | 8.13±0.27 |
| | Ham | L | 41.37±1.80 | 39.77±2.22 | 43.10±2.50 | 41.97±1.15 |
| | | a | 9.93±0.64 | 9.37±0.50 | 7.93±0.59 | 9.40±0.47 |
| | | b | 7.97±0.49 | 7.43±0.57 | 8.87±0.12 | 8.93±0.69 |
| Contents of total pigment (mg %) | Loin | | 1.98±0.15 | 2.45±0.01** | 2.24±0.06 | 2.28±0.10* |
| | Ham | | 2.69±0.03 | 2.77±0.16 | 2.85±0.38 | 2.79±0.10 |

LLM: Leucaena leaf meal. Loin: Muscle longissimus thoracis. Ham: Muscle biceps femoris. Each value is expressed as mean±SE., * : $p<0.05$, ** : $p<0.01$.

© The Ito Foundation

ス部，ハム部ともに対照区よりもギンネム給与区の方が高い値を示し，ロース部の10%区と30%では対照区と比べ有意差がみられた。

背脂肪の脂肪酸組成の測定結果を**Table 7**に示した。ミリスチン酸（$C_{14:0}$），パルミトオレイン酸（$C_{16:1}$），ステアリン酸（$C_{18:0}$）およびオレイン酸（$C_{18:1}$）などの脂肪酸は，すべてのギンネム配合区が対照区に比べ高い値を示し，ギンネム配合量の増加に伴って高い値であった。これに対し，リノール酸（$C_{18:2}$）およびリノレン酸（$C_{18\ 3}$）はすべてのギンネム配合区が対照区よりも低い値を示し，ギンネム配合量の増加に伴って低い値であった。なお，本試験に供試した肥育用飼料中の脂肪酸組成の測定結果は，**Table 8**に示すとおりである。各試験区ともにオレイン酸，パルミトオレイン酸，ステアリン酸およびリノール酸の順に多く含まれており，オレイン酸は対照区に比べいずれのギンネム区ともに有意に高い値を示していた。

## 4. 考　察

発育試験の結果，サイレージ乾燥ギンネムミールの配合割合が増すと，1日平均増体量は増大した。飼料要求率も配合割合が増すにつれて段階的に増大する傾向が認められた。むしろギンネム配合区の方が飼料の採食量は多く，特に10%区と20%区における増体成績は対照区よりもまさっていた。このことから，サイレージ乾燥ギンネムミールの今回の配合量は，加熱あるいは天日乾燥によるミールを用いて，本試験と同じ配合割合で豚に給与した場合，これらのミール配合区はいずれも増体量の減少，採食量の低下を示したとする結

**Table 7**　Fatty acid composition of back fat (inner layer) from pigs fed the diet containing various ratio of LLM (wt,%)

| Fatty acid | Control | 10% L L M | 20% L L M | 30% L L M |
|---|---|---|---|---|
| $C_{12:0}$ | 0.46 | 0.24 | 0.26 | 0.39 |
| $C_{14:0}$ | 1.01 | 1.05 | 1.42 | 1.66 |
| $C_{16:0}$ | 22.77 | 20.00 | 22.80 | 25.75 |
| $C_{16:1}$ | 1.21 | 1.45 | 1.95 | 2.43 |
| $C_{18:0}$ | 3.79 | 5.40 | 10.10 | 11.87 |
| $C_{18:1}$ | 24.34 | 28.48 | 34.15 | 36.80 |
| $C_{18:2}$ | 44.40 | 41.84 | 28.42 | 20.36 |
| $C_{18:3}$ | 2.03 | 1.53 | 0.90 | 0.75 |

LLM: Leucaena leaf meal.　Each value is expressed as mean of duplicated analyses.

**Table 8**　Fatty acid composition of experimental diet containing various ratio of LLM used for growing and fattening (wt, %)

| Fatty acid | Control | 10% L L M | 20% L L M | 30% L L M |
|---|---|---|---|---|
| $C_{12:0}$ | 0.08±0.01 | 0.08±0.01 | 0.08±0.002 | 0.09±0.003 |
| $C_{14:0}$ | 1.63±0.01 | 1.59±0.15 | 1.54±0.05 | 1.62±0.04 |
| $C_{16:0}$ | 29.01±0.82 | 28.44±1.50 | 28.41±0.43 | 27.71±0.91 |
| $C_{16:1}$ | 2.39±0.05 | 2.60±0.23 | 2.30±0.22 | 2.44±0.34 |
| $C_{18:0}$ | 19.82±1.29 | 18.53±0.55 | 20.01±0.90 | 18.30±1.55 |
| $C_{18:1}$ | 34.57±0.56 | 37.83±0.73* | 37.21±0.41* | 37.55±1.05* |
| $C_{18:2}$ | 11.80±0.66 | 10.35±1.46 | 9.91±0.65 | 11.72±1.16 |
| $C_{18:3}$ | 0.62±0.12 | 0.50±0.08 | 0.49±0.08 | 0.56±0.10 |

LLM: Leucaena leaf meal.　Each value is expressed as mean±SE.,　*: $p<0.05$

© The Ito Foundation

果[12~14]とは異なる傾向を示した。次に体成績をみると，体各部位の測定結果については試験区間に有意差は認められなかった。枝肉歩留りについては10%区と30%区が対照区より有意に低い値を示した。またロース断面積は20%区が他の試験区に比べ有意に高い値であった。部分肉としての重量は，カタ，ロースおよびモモでは各試験区間に有意差はみられなかったが，バラは10%区と20%区が他区よりも有意に高い値を示していた。しかし，枝肉重量は対照区，10%区，20%区および30%区それぞれ，71.7kg，74.3kg，76.1kgおよび69.1kgであり，10%区と20%区の方が高い値を示していた。このため枝肉重量の差を考慮に入れると，体成績についての試験区間の差はほとんどないものと考えられた。

肉質を調査した結果，ロース部およびハム部のいずれも色調および総色素量において試験区間の著しい差は認められなかった。また，pH，水分および保水性などを合せて検討しても，PSE豚にみられるふけ肉などの異常な肉の発生もみられなかったことから，すべてのギンネム給与区の豚は正常な肉質であると考えられた。本実験で供試した各試験区の飼料の中で最　多く含まれていた脂肪酸は，オレイン酸であり，次いでパルミチン酸およびステアリン酸の順であった。また，ギンネム配合区の背脂肪に多く含まれていた脂肪酸は，オレイン酸，パルミチン酸，ステアリン酸およびリノール酸などであり，これらの脂肪酸は飼料中にも多く含まれていたことから，ギンネムを配合しても豚体の脂肪酸組成に特に目立った変化はないものと思われた。今回の供試飼料中のミモシン含量は，30%区が最も高く15.7mg%であったが，肥育中の病徴や主要臓器の病理学的所見においても異常はみられなかった。最近，Chenら[15]は，本実験と比べて多量のミモシンを含んだギンネム乾燥ミール16%配合飼料（ミモシン含量，240mg%）で肥育した豚の肝臓や筋肉中におけるミモシンの移行について検討したところ，ミモシンは含まれていなかったと報告している。これらのことから，サイレージ乾燥ミールは肥育豚用飼料として利用可能であり30%程度配合しても悪影響はないものと考えられた。

## 5. 要　約

ギンネムを飼料原料として有効利用するためにサイレージ調製によってミモシン含量を減少させたギンネムを豚飼料にそれぞれ10，20および30%配合して肥育試験を行い，殺解体後，諸臓器，肉質および脂肪の性質に及ぼす影響を調査した。得られた結果は次のとおりである。1）対照区，10%区，20%区および30%区の1日平均増体量はそれぞれ0.64kg，0.70kgおよび0.64kgであった。飼料要求率は対照区が3.80，10%区3.86，20%区4.14および30%区4.22とギンネムの配合割合が増すにつれて段階的に増加したが，各試験区間における有異差はみられなかった。2）肥育試験終了後，すべての試験区の全頭を殺解体し病理所見および各部位の測定を行った結果，ギンネム給与区における異常，枝肉形成および肉量に対する悪影響は認められなかった。3）肉質を調査した結果，ロース部では水分含量，保水性，総色素量および色調のいずれについても，対照区に比べギンネム区が有意に高い値を示したが，灰分含量は有意に低い値であった。しかし，ハム部では各試験区間に一定の傾向は認められなかった。4）背脂肪（内層）の脂肪酸組成を調査した結果，オレイン酸はすべてのギンネム区が対照区よりも高い値を示していた。

以上の結果，本実験に供試したギンネム乾燥ミールは，肥育豚用飼料原料として30%程度配合しても悪影響はみられず，これまでの配合量を大きく上回って利用できることが明らかとなった。

© The Ito Foundation

## 文　献


1) 本郷富士弥・多和田真吉・渡辺由美・城間定夫，日畜会報，57（3），223～230（1986）
2) 本郷富士弥・田仲亜紀・川島由次・多和田真吉・砂川勝徳，日畜会報，59（8），688～700（1988）
3) 砂川勝徳，本郷富士弥・川島由次・多和田真吉，日畜会報，60（2），133～140（1989）
4) Iwanaga. I., K.K. Otagaki and O. Wayman, Proceedings of the Western Section, American Society of Animal Production, 8, 1～4（1957）
5) 松田祐一，沖縄畜産，2，4～10（1967）
6) 森本宏監修，動物栄養試験法，192～199，養賢堂，東京（1971）
7) （社）日本種豚登録協会，産肉能力実務書，25～32，東京（1975）
8) 佐野豊著，組織学研究法，71，南山堂，東京（1977）
9) 食肉加工シリーズ編集委員会編，食肉加工の機械装置4，285～290，光琳書院，東京（1963）
10) 岡山高秀，永田致治，日畜会報，50，15～21（1979）
11) 大武由之，日畜会報，53，797～803（1982）
12) 宮城悦生，日豚研誌，6，125～129（1969）
13) Jones, R.J., C.G. Blunt and J.H.G. Holmes, Trop. Grassld, 10, 113～116（1976）
14) Jones, R.J., R.M. Jones and D.C. Coosley, CSIRO division of tropical crops and stures, Information service. Sheet No. 41～4, October（1982）
15) Chen, M.T., T. Chang and L.S. Lin, Leucaena Research Rept, 2, 46（1981）


© The Ito Foundation

# 副産物の飼料化による低コスト牛肉生産に関する研究
## —とくにわらのアルカリ処理について—

The Investigation on Beef Meat Production at Lowered Cost with By-product Utilization
—Special Reference to Ammonia Treatment of straw—

飛岡久弥・*萬田富治（九州東海大学，*農林水産省北海道農業試験場）

Hisaya Tobioka and *Tomiharu Manda (Kyushu Tokai University and *Hokkaido National Agricultural Experiment Station)

The purpose of research is to survey the present status of practical ammonia treatment of straw in Norway. To treat straw with caustic soda (sodium hydroxide), the Beckmann system was introduced after the Second world War. The amount of straw treated by the system was more than 100,000 tons in 1965. However the system was not safe from the point of view of environment conservation. It used a lot of caustic soda which polluted rivers and lakes. Therefore the amount of treated straw decreased sharply. In 1981, the Beckmann system was improved and the closed system was proposed as an alternative.

On the other hand, in 1975 the treatment system of straw with ammonia was introduced to 1,000 farmers. It was a new experiment on farm level and subsidized by Norweigian Government for three years. It was a cooperative practice of Norweigian Feed Conservation association (NOFO) with Agricultural University of Norway and Norsk Hydro lnc. Norsk Hydro supplied ammonia and NOFO supervised ammonia treatment of straw on farm. The University was responsible for basic problems of both straw treatment with ammonia and feeding the treated straw to animal.

The amount of treated straw was 150,000 tons in 1987. The treatment costs 6.3 yen per kg straw at present. Most of straw was roll-baled for ammonia treatment and ammonia was in troduced to straw through injection machine which should be handled by trained technician. Roll-baled straw with a moisture less than 15% was stacked and treated with ammonia. However roll-baled straw with more moisture was treated one by one and in this case, bale wrapping system was superior to the others.

Treated straw could be given at ratio of 8 to 11 kg per day per head to fattening cattle which is fed on little concentrate and the amount could be reduced to 4 to 6 kg for the animals fed on 3 to 4 kg concentrate. Five to 7 kg of treated straw might be given to heifer.

### 1. 目　的

肉用牛の生産を拡大し，コストの低減を図るためには，既存草地や耕地を高度に利用するとともに，低・未利用飼料資源の活用による肉用牛生産体系を確立する必要がある。わが国にはイナわらや麦かん類などの圃場副産物が豊富にあり，最近ではアンモニア等のアルカリ処理により，これらの飼料価値を改善する技術も提示されている[1~3]。また雑魚や水産加工副産物をサイレージ化して一

© The Ito Foundation

次貯蔵する省エネルギー型の新技術も開発されており，これら農水副産物の飼料的利用の拡大による低コスト肉用牛生産の展開が期待される。

ノルウェーでは，麦わらのアンモニア処理等副産物の飼料化や飼料的利用に関する試験研究が活発に行われ[4]，すでに実用化しているので，当該国の実用技術の実態を調査し，わが国での実用化に活用する。

## 2. 方　法

1989年9月11日から5日間，ノルウェー農科大学，ノルウェー飼料保蔵協会ヘレルト研究ステーション，ノースヘドロウ社および肉牛・乳牛飼養農家を訪問し，ノルウェーにおける低質粗飼料のアルカリ処理特にアンモニア処理の歴史と現状および今後の展望について調査を行った。

## 3. 結果と考察

### 3.1 アンモニア処理技術の普及

ノルウェーの農家は，第二次世界大戦以来ベックマン法による苛性ソーダ処理技術を導入し，1960年の半ばには年間処理量が10万トンとなり，ピークに達した。現在ではこの技術は多くの農家で十分に習熟されている。しかし，ベックマン法による苛性ソーダ処理技術は河川の汚染やその他の理由により，激減した。そして1981年に苛性ソーダの新しい湿式処理方式としてディツプ法が発表され，現在ではこの方式が有望と考えられている。この新方式で処理した麦わらの飼料価値は早刈牧草程度に著しく改善され，実際の飼養試験でも好成績をあげている。

苛性ソーダ処理わらに比べると，アンモニア処理わらのエネルギー価は劣っているが，1975年にアンモニア処理技術がノルウェーで実用に供されて以来，この技術は農家に抵抗なく受け入れられている。現在，アンモニア処理わら量は年間15万トンにものぼっている。ノルウェーで年間生産されるわらがおよそ75万トンであるから，アンモニア処理量は全生産量の20%という驚異的な数字である（**表1**）。処理わらを利用している農家戸数は全有畜農家の60～70%に達している。

**表1** ノルウェーにおけるアンモニア処理わら量と処理率の年次推移

| 年 | トン | 処量わら量／全生産わら量（%） |
|---|---|---|
| 1975 | （農家でアンモニア処理始まる） | |
| 1976 | 9000 | 1.2 |
| 1977 | 15000 | 2.0 |
| 1978 | 32000 | 4.3 |
| 1979 | 65500 | 8.7 |
| 1980 | 85000 | 11.3 |
| 1981 | 103000 | 13.7 |
| 1982 | 125000 | 16.7 |
| 1987 | 150000 | 20.0 |

前述したように，アンモニア処理技術の普及は1975年から始まったが，普及開始に際してはアンモニア輸送トラック運転手の研修と，供給地域に技術スタッフが組織化され，安全面には特別な注意が払われた。最初，アンモニア処理技術は1000戸の農家に政府の補助金をうけて導入され，アンモニア処理技術に関する簡単なパンフレットが発行された。最初に導入に踏み切った農家はアンモニア処理技術に特に関心を持っている農家が厳選された。折しも，この年と翌年は悪天候が続き，粗飼料が不作で，まさにノルウェーにおいてアンモニア処理技術が「離陸」するのにふさわしい年であった。

### 3.2 アンモニア供給体制

肥料と石油精製企業であるノースヘドロウ社（Norsk Hydro社）がアンモニアを製造し，鉄道で6～7ヵ所の基地に供給している。基地までの輸送は企業が責任をもって行う。これらの基地は南東部の穀物生産地帯に点在している。基地から農家までは農業協同組合の専用トラックで行い，

© The Ito Foundation

運転手は特別に訓練された職員である。トラック保有台数は50台である。企業の役割は基地までアンモニアを輸送することと，農協担当者の訓練に責任をもつことである。アンモニア注入量は，わら乾物当たり３％である。現在まで事故はない。注入経費（アンモニア代＋注入代金）はわらkg当たり0.35クローネで，円換算で6.3円となる。

3.3　アンモニア処理効果に影響する諸要因

アンモニア注入量，温度，処理期間，水分含量，材料の種類がアンモニアの処理効果に影響する諸要因である。これらの要因についてノルウェーで示されている数値と，日本で示されている数値との間に若干の相違がある。この相違点についてはアンモニア処理条件や材料の種類など，処理システムの違いを含めて検討する必要がある。以下にノルウェーと日本の数値を比較して示した。

アンモニアは添加量を増やすと処理効果が高まるが，経済的な添加量は乾物当たり2.5～3.5％である。この添加量は日本と同値である。

アンモニア処理時の温度は高い程，反応が速くすすむ。インジェクター方式では，アンモニア注入後の温度上昇は急激で，２～６時間で最高温度に到達する。最高温度の範囲は40～60℃で，最高温度は処理時の温度，注入量，水分含量，その他の要因で変動する。反応が終了すると次第に温度が低下するが，この低下速度も種々の要因で変動する。アンモニアとわらが反応する速度は外気温の影響を最も強く受けるが，外気温が低い場合は処理期間を延ばすことによって，処理効果を高めることができる。被覆フィルムには耐候性と耐アンモニア性が具備されなければならないが，フィルムの色がどの程度アンモニア処理効果に影響を及ぼすのか，かならずしも明確にされていない。

アンモニア処理効果を発揮させるには処理時の温度が低いほど長い処理期間が必要である。例えば５℃以下では８週間，５～15℃では４～８週間，15～30℃では１～４週間，30℃以上では１週間程度の処理期間が必要とされている[5]。

原材料の水分含量はアンモニア処理効果を決定づける重要な要因の一つである。わが国では30％程度が推奨されている。このため原材料の水分が30％以下の場合は，加水が行なわれている。確かに極端な低水分わらには加水は必要な処置であるが，乾燥わらの平均的な水分含量は12～15％程度であるから，このような材料に対しても加水が本当に必要かどうか再検討したほうがよい。ノルウェーのアンモニア処理はインジェクター方式で行なわれているが，この方式では最適水分は15～20％と日本よりは低く設定されている。水分が多いほうが処理効果が高まるという事実はノルウェーでも同様に認められている[6]。しかし加水するとその分重量が増え，ハンドリング上の問題が生じる，また水分の多いわらは開封後にかびが生じ易くなる等の理由から，ノルウェーでは加水処理は省略している。

アンモニアの処理効果は材料の飼料価値にも影響される。飼料価値が低い材料ほど処理による改善率が高い傾向がある。しかし，もともと飼料価値が高い材料は処理後の飼料価値も優れている。したがって，良質な処理わらを得ようとすれば，良質な材料を確保する必要がある。一般に，麦の場合は，えん麦，大麦，小麦の順に飼料価値が優れており，アンモニア処理した場合も飼料価値も

**表２**　可消化有機物含量（％）に及ぼすわらの種類とアンモニア処理の効果

| | 可消化有機物含量（％） | |
|---|---|---|
| | 無処理 | アンモニア処理 |
| 大　麦 | 53 | 61 |
| えん麦 | 57 | 66 |
| 小　麦 | 48 | 60 |
| 良品質麦 | 55 | 64 |
| 劣品質麦 | 51 | 61 |

© The Ito Foundation

ほとんどの場合，同様な順番である（**表2**）。

3.4　アンモニア処理技術の実際

ノルウェーにおけるアンモニア処理技術は以下のとおりである。

(1)　麦の収穫時期は8～9月で，わらは収穫後1～2日経ってから収集される。雨が降った場合は，さらに1～2日干してから収穫される。

(2)　わらの水分が15%以下の場合はスタックでまとめて，15%以上の場合は1個ずつアンモニアを注入する。

(3)　密封はスタック方式，ベールラップ方式，ロングチューブ方式で行っている。ベールラップ方式はスタック方式やバッグ方式よりも貯蔵性がよく，移動も簡単で，貯蔵施設も不要なのでコスト的にみても優れた方法である。ラップは4層巻が望ましい。ラップコストは1個当たり25クローネ（450円）で，機械は4万～7万5千クローヌ（72～135万円）で販売されている。

(4)　気温の低い時期に高水分のわらをアンモニア処理すると，アンモニア臭が強く残る。この処理わらを気温の高い時期に開封すると，アンモニア臭が強烈である。また，かびが発生し易くなる。したがって，高水分の処理わらは冬期間しか給与できない。しかし，冬期間でも牛舎の換気が悪いと，アンモニア臭が牛舎内にこもることになる。

(5)　高水分わらには無水アンモニアが，過乾燥わらにはアンモニア水が適している。しかし，アンモニア水は添加量が多いので，大量のアンモニア水を運搬しなければならない。

(6)　処理わらの給与時にビタミンA・DおよびMg, S等のミネラルの補給に留意する。

3.5　ノルウェーにおけるアンモニア処理わらの飼養試験の要約

(1)　めん羊の冬期間飼料として利用可能

(2)　哺乳期間をすぎた牛（4～6ヵ月齢）では唯一の粗飼料源として利用可能

(3)　集約的な肥育では，濃厚飼料を3～4kgと処理わら給与により，1日当たり1～1.2kgの増体が可能。この場合，処理わらの摂取量は4～6kgで，摂取量は体重とわらの品質で変動する。

(4)　未経産牛は，急激な増体を抑えるために，濃厚飼料の給与量を控え，処理わらを5～7kg給与する。

(5)　処理わらが良質な時は，去勢雄牛の飼料のかなりの部分を処理わらで賄うことができる。特に2年目の冬を迎えた1～2才の場合は，8～11kgの処理わらを摂取できる。

(6)　処理わらのエネルギー価は乾草よりも劣っているので，高泌乳牛に給与する場合は飼料中の線維含量を調節する機材として利用する。

3.6　苛性ソーダディップ装置

ヘレルド研究ステーションは，閉鎖方式の苛性ソーダ（NaOH）処理システムを開発した。この新方式は環境汚染を防止できたので，古いベックマン方式の装置を取り壊すことなく，若干の改造によって使用が可能となり，すでに数ヵ所で稼動が始まっている。

この新方式では，苛性ソーダと尿素が併用して使用される。12㎥の槽に1.5～1.7%濃度の苛性ソーダ液と5%量の50%尿素液の混合液を入れ，わらをディップ処理する。処理に要する時間は45分で，処理が終ったらポンプで混合液を排出し，3～4時間放置して水を切る。その間，残りの槽のディップ装置を使用するので連続作業ができる。

乳牛に対する苛性ソーダ処理わらの給与量は1日当たり8kgで，最大12kgである。肥育牛についても5～6kg給与できる。10kgのわらに300～400kgのナトリウムが付着しているので，腎臓に還流

© The Ito Foundation

するナトリウム量は1日当たり5～6kgとなるが，この程度の量であれば乳牛の生理に対しても悪影響を及ぼすことはない。

3.7 まとめ

以上がノルウェーにおけるわらのアルカリ処理の概況である。ノルウェーはわが国と同様山が多く，飼料輸入国である。輸入飼料の種類は，穀物とタンパク質飼料が大部分である。ノルウェー政府は，このような輸入飼料に依存した畜産から脱脚するため，国産飼料に依存した家畜生産方式に転換することを政策として掲げている。わが国の畜産業とくに肉用牛をめぐる環境は極めて厳しい。このような状況の中で，ノルウェーの経験は，わが国における永続的でかつ地域の資源に立脚した低コスト牛肉生産を確立するうえで示唆に富むものと考えられる。

## 4. 要　約

ノルウェーでは，第二次世界大戦後わらの苛性ソーダ処理のベックマンシステムが導入され，1965字に処理わらは10万トン以上となった。しかし，この技術は河川等の汚染の原因となったため処理量は激減した。1981年にこれを改良した閉鎖系システムが提唱された。一方1975年，わらのアンモニア処理技術が約1000戸のモデル農家に導入され，3年間の実用化試験が政府の援助のもとに実施された。本試験は大学，協会およびノースクヘドロウ社が一体となって行なわれた。会社はアンモニアの供給と輸送，協会はわらの処理と普及，大学は基礎的試験を担当した。わらのアンモニア処理量は，1987年には約15万トンであった。処理価格は，現在わら1kg当たり6.3円である。アンモニア処理は，ロールベールわらによるインジェクター方式で行なわれ，わらの水分が15%以下のときはスタック方式，15%以上のときはロールベールの1個ずつの注入となっている。この中でベールラップ方式が優れていた。処理わらの肥育牛への給与量は，濃厚飼料の量によって異なるが，濃厚飼料をほとんど与えない場合8～11kg，濃厚飼料3～4kgのとき処理わら4～6kgであった。未経産牛にも5～7kgの処理わらを給与していた。

### 文　献

1) 中央畜産会，粗飼料の品質，貯蔵を高めるアンモニア処理技術指針，中央畜産会，東京，1988
2) 中央畜産会，高めよう粗飼料の利用価値アンモニア処理の実際，中央畜産会，東京，1989
3) 農水省草地試験場，粗飼料のアルカリ処理利用研究会報告集，資料№60～3，草地試，西那須野，1986
4) Sundstol, F. and E. Owen, Straw and other fibrous byproducts as feed, Elsevier, 1984
5) Silva, A.T., Greenhalgh, J.F.D. and Orskov, E. R., Anin, Prod, 48, 99-108, 1989
6) Sundstol, F., Coxworth, E. and Mowat, D.N., Wld, Anin, Rev., 26：13-21, 1978

© The Ito Foundation

# 大麦稈の乾物消化率とそのアンモニア効果の品種間差異に関する植物形態学・組織化学的研究

## Anatomical Variations of Different Barley Cultivars related to Straw Degradability Before and After Ammonia Treatment

後 藤 正 和（三重大学生物資源学部）

Masakazu Goto (Faculty of Bioresources, Mie University)

The three cultivars of barley (Golden promise. Klaxon, Doublet; *Hordeum vulgare* L.), selected on the basis of different dry matter degradability and response to ammonia treatment, were examined on botanical composition and, the proportion of tissue area, cell number and cell wall thickness of specific tissues in the internodes. Scanning electron micrographs and an image analysis systems were used to measure the anatomical characteristics of straw internodes. The far higher degradability of Doublet compared to Golden Promise and Klaxon could be related to the higher leaf content of this cultivar coupled with the inherently higher degradability of its stem fraction compared to stems of the other barley cultivars. The extent of improvement in rumen degradability following ammonia treatment was greatest for Golden Promise and lowest for Doublet, due to a greater response in the degradability of stem fraction which was associated with enhanced microbial degradation of sclerenchyma and parenchyma cells. Although the proportion of total area occupied by individual tissues in the internodes was very similar for all three barley straws, the cell number per unit area and the thickness of cell walls found in each tissue indicated that Doublet had a higher density of ground parenchyma whose walls were thicker than the corresponding walls in Golden Promise and Klaxon. Golden Promise, in contrast, was relatively richer in sclerenchyma cells than the other cultivars. Teqse observations taken in combination suggest that differences in dry matter degradability of the three barley cultivars examined and the extent of their response to ammonia treatment were closely related to variations at both a morphological and anatomical level and that the differences were quantifiable. Image analysis does appear to provide numerical data capable of discerning anatomical variation between closely related cultivars.

### 1. 目　的

著者らは，先にアンモニア処理による麦稈の消化率と細胞壁構造への化学的作用を検討して，大麦数品種の稈消化率とそのアンモニア処理による改善効果は元来低品質な品種ほど処理効果の高いことを示した[1]。また，「リグニン—ヘミセルロース」複合体の主要な結合様式とされるアラビノースC-5位等のアルカリ易分解性結合頻度への影響とアンモニア処理後の消化率増加程度との間に一定の関係がみられないことから，アンモニア処理による稈の消化率向上の作用機作に新たな論議を展開している。Ramanzin ら[2]は，大麦稈の消化率の品種間差異を植物形態学的に検討して，

© The Ito Foundation

葉部と茎部の乾物割合が品種間で異なることや，またアンモニア処理による効果が稈の部位によって異なることと関連することを明らかにした。

一般に，ルーメン微生物による飼料草の消化率を左右する要因は，以下の3点に要約される。すなわち，葉部と茎部の構成割合などで示される形態学的要因，様々な器官細胞の占有面積などで示される組織学的要因，個々の細胞（あるいは細胞壁）の成分組成と構造性で示される化学要因である。このことは，アンモニア効果の化学的機作を解明するうえで，大麦稈のルーメン内消化性や細胞壁の化学構造における不均一な状態を組織細胞レベルで十分に把握する必要性を示唆する。

本研究では，稈の消化率とそのアンモニア効果に顕著な差異の認められた大麦3品種（*Hordeum vulgare* L.）を供試し，各部位の乾物構成割合と消化率，節間組織細胞の相対占有面積割合・単位面積当たりの細胞数・細胞壁の厚さとそれら組織の消化性との関連性において，稈消化率とアンモニア効果における品種間差異を検討した。植物組織学的諸形質の調査は，走査電顕と画像解析装置を用いて行った。

## 2. 材料および方法

### 2.1 麦稈の乾物ならびに組織細胞の消化性

大麦3品種，ゴールデンプロミス，クラクソン，ダブレットの稈を通常の刈り高さで収穫して，一部をオープン方式（3g $NH_3$/100gDM, 80℃で20時間加熱）でアンモニア処理し，またその他は無処理稈のままで供試した。乾物構成割合は葉身，葉鞘，茎部に分解して調査し，各部位の乾物消化率は1㎜メッシュサイズに粉砕後，フェステル装着めん羊（濃厚飼料200g＋ヘイキューブ500g＋イタリアンライグラス乾草自由給与）を用いたナイロンバック法（$5\times10^{-6}$mポアサイズ，72時間挿入）で推定した。

各組織細胞の消化性は，葉身・葉鞘・節間とも，第2節の上端1～2㎝でサンプリングした各切片をTilley & Terry[3]の方法に準じてルーメン人工培養（24時間）して，走査電顕で観察した。電顕用試料の作製は久能らの方法[4]に従い，タンニン酸＋オスミウム酸固定，脱水，臨界点乾燥の燥作のあと，イオンコーターで金塗布して行った。

### 2.2 稈節間部の形態学的諸形質

無処理稈の節間切片（前述した固定箇所から），1品種につき15～22個をサンプリングして，各細胞器官の相対占有面積割合(大維管束間の)，単位面積当たりの細胞数，細胞壁の厚さを電顕写真と画像解析装置（IBAS-1, Carls Zeiss, 西ドイツ)によって調査した。また，各組織細胞のリグニン化程度は，フロログルシノール-塩酸法（AP)，塩素—亜硫酸法（CS）で染色し[5]，Akin（1986）らの標準色度基準に従って数値を与えて推定した[6]。

## 3. 結果と考察

### 3.1 各部位の乾物構成割合と消化率

大麦稈の部位別乾物構成割合は，供試品種間で顕著に異なった。ゴールデンプロミスは葉身8.5％，葉鞘21.5％，茎70.0％と茎部割合が高く，ダブレットはそれぞれ15.7％，32.2％，52.1％と葉部割合に優れていた。クラクソンは両者の中間で，葉身13.3％，葉鞘25.8％，茎60.9％であった。

葉身と葉鞘の乾物消化率は3品種ともほぼ同程度で，それぞれ平均68.4％，71.9％であったが，茎部の消化率には顕著な品種間差異が認められ，また葉部のそれよりもかなり劣っていた（**Table 1**）。すなわち，ゴールデンプロミスとクラクソン茎部の乾物消化率はそれぞれ28.3％，27.9％で，ダブレットの43.2％よりも明らかに低かった。

アンモニア処理による乾物消化率の増加はいずれの品種でも認められたが，その程度はゴールデンプロミスが最も高く（9.2％），次いでクラクソ

© The Ito Foundation

**Table 1** Dry matter degradability of each fraction from the untreated and ammonia-treated straw.

| Cultivar | Dry matter degradability (%) | | | | | | | | Increase of dry matter degradability (%) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Untreated straw | | | | Ammonia-treated straw | | | | | | | |
| | Leaf blades | Leaf sheaths | Stems | Whole plant† | Leaf blades | Leaf sheaths | Stems | Whole plant | Leaf blades | Leaf sheaths | Stems | Whole plant |
| Golden Promise | 63.2 | 74.1 | 28.3 | 41.1 | 76.2 | 78.0 | 38.7 | 50.3 | 13.0 | 3.9 | 10.4 | 9.2 |
| Klaxon | 71.0 | 70.6 | 27.9 | 44.6 | 76.8 | 75.0 | 38.2 | 52.8 | 5.8 | 4.4 | 10.3 | 8.2 |
| Doublet | 71.1 | 71.1 | 43.2 | 56.8 | 77.0 | 76.7 | 49.0 | 62.3 | 5.9 | 5.0 | 5.8 | 5.5 |

† The degradability of whole straw was calculated by the values of botanical composition and degradability.

ン（8.2%），ダブレット（5.5%）の順であった。これは，葉身や葉鞘での増加程度は3品種とも同じであった（5.3%ユニット）が，茎部のそれはゴールデンプロミス10.4%ユニット，クラクソン10.3%ユニットで，ダブレットの5.8%ユニットを大きくうわまわったことによる。このことは，「無処理稈のセルロース消化率とそのアンモニア処理による改善効果との間に負の相関関係（r＝−0.774）」を認めた先の結果[1]を裏づけるとともに，他の研究結果[2,7]とも一致する。

3.2　稈切片の人工ルーメン消化性

節間切片の横断面は大きな細胞からなる柔組織で占有され，大維管束はこの柔組織に包まれるように存在する。小維管束はこの大維管束間にあって，柔組織と厚膜組織の双方に隣接している（**Fig. 1**-1，3）。ルーメン微生物による細胞壁へのアタックは，表皮・厚膜・柔細胞の横断切面やクチクラ層が剝離した表皮外層に認められたが（**Fig. 1**-5，6，7，8），ルーメン人工培養（24時間）における消化作用は厚膜組織や柔組織での“細胞壁が薄くなる程度の”部分的消失に限られているのが観察された（**Fig. 1**-2，4）。表皮細胞や導管では，ルーメン微生物による消化の形跡は全く認められなかった。なお，茎部の乾物消化率に顕著な違いがみられたゴールデンプロミスとダブレットとの間に，組織細胞レベルにおける消化性差異があるかどうかについては，本実験からは明らかでなかった。一方，葉身・葉鞘では，表皮細胞や導管を除いて各組織のすべてが消失し，この点からも乾物消化率の優れていることがうかがわれた。

アンモニア処理による細胞壁構造への影響は柔組織最内層の小さな亀裂程度であったが（**Fig. 1**-9，11），アンモニア処理稈の消化性は，その範囲と程度において，無処理稈のそれよりも顕著に増大された（**Fig. 1**-10，12）。すなわち，柔組織の広範囲な消失と剝離や厚膜細胞壁の相当な消失のほか，新たに維管束鞘や導管部でも消化作用の影響が観察された。これらの組織細胞における消化率の向上がアンモニア処理効果に寄与していることが示唆された。なお，伊藤ら[8]は，水稲藁に対するアンモニア効果が本研究の大麦稈とほぼ同様であるとの観察結果を得ているが，Harbersら[9]は小麦稈では柔組織のみが消化促進対象であったと報告している。

3.3　節間試料の組織化学的・形態学的形質

フロログルシノール塩酸法（AP）と塩素—亜硫酸法（CS）に対する染色反応は，師管と同化柔組織を除く，すべての組織細胞で陽性反応を示し，節間全体がリグニン化していることが観察された（**Table 2**）。リグニン化程度は個々の組織細胞間で異なったが，それらの品種間差異は明確でなかった。リグニン化度が最も高かったのは，難消化性を示した木部で，それぞれ平均3.0（AP），2.9

© The Ito Foundation

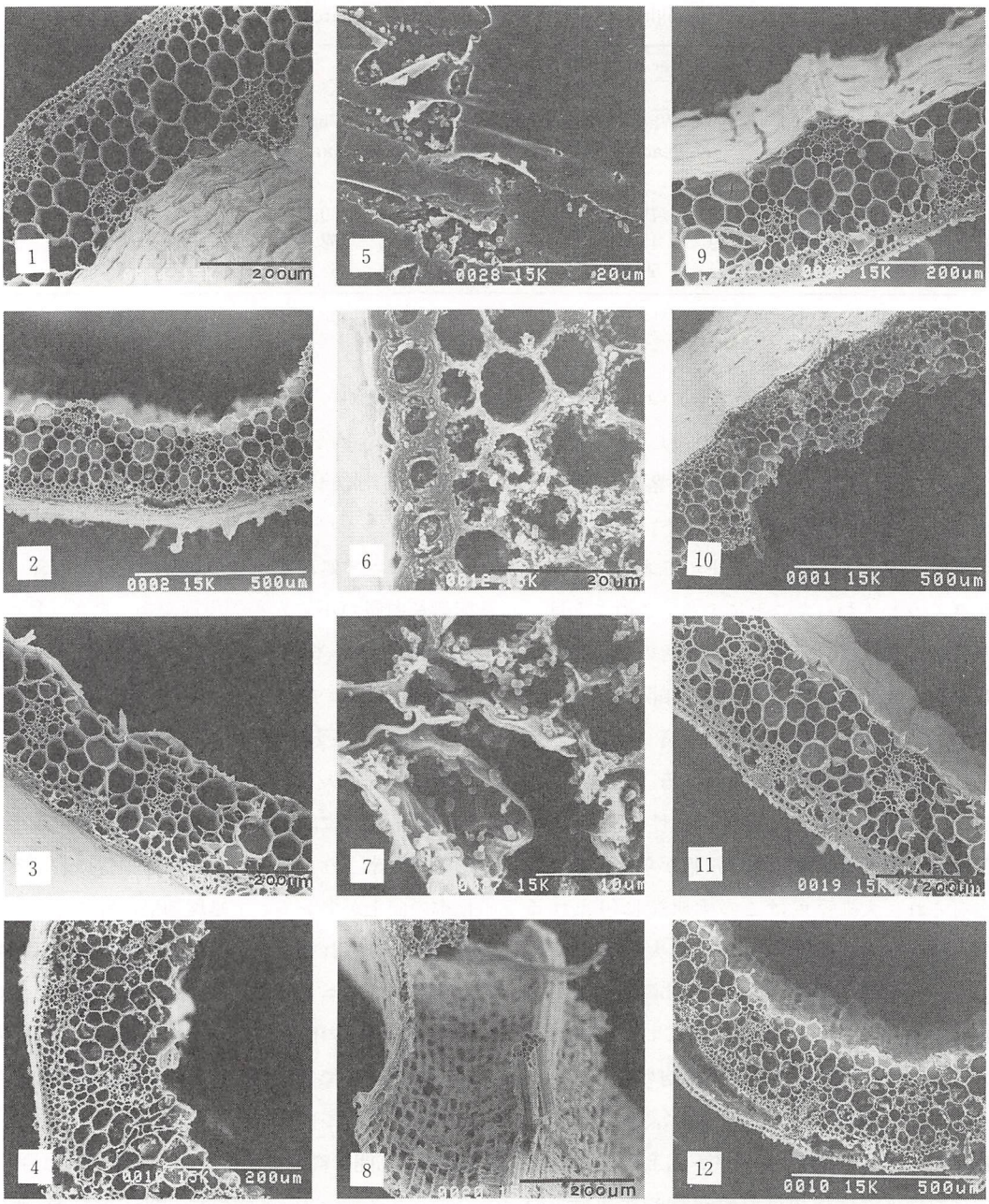



**Fig. 1** Scanning electron micrographs of barley straws before and after 24 hr *in vitro* rumen incubation: Untreated internodes from Golden promise (Photo 1 and 2) and Doublet(3 and 4). Extensively digestive attack of rumen microbes were observed on exposed edges and/or to the inner surface of epidermis, sclerenchyma and ground parenchyma cells in the internodes, respectively (5, 6 and 7). Most of tissues in leaf sheath, except epidermise and vascular bundles, was fully degraded (8). Ammonia-treated internodes from Golden Promise (9 and 10) and Doublet (11 and 12).

© The Ito Foundation

**Table 2** Histological reactions of specific tissue cells for lignin with acid phloroglucinol(AP)and chlorine-sulfite(CS).

| Cultivar | Staining score † | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Epidermis | | Sclerenchyma | | Phloem | | Xylem | | Assimilatory parenchyma | | Ground parenchyma | |
| | AP | CS | AP | CS | AP | CS | AP | CS | AP | CS | AP | CS |
| Golden Promise | 1.8 | 2.4 | 1.2 | 2.6 | 0 | 0 | 3.0 | 3.0 | 0 | 0 | 1.8 | 3.0 |
| Klaxon | 1.8 | 0.6 | 2.0 | 2.0 | 0 | 0 | 3.0 | 3.0 | 0 | 0 | 2.0 | 2.0 |
| Doublet | 2.4 | 1.4 | 1.8 | 2.8 | 0 | 0 | 3.0 | 2.6 | 0 | 0 | 2.2 | 2.8 |

† Scores are averages for the first and second internode sections.

(CS)であった。厚膜細胞は1.7(AP)と2.5(CS)，柔細胞は2.0(AP)と2.6(CS)で，ほぼ同じ程度に，しかし相当にリグニン化しているのが認められた。なお，表皮細胞のリグニンスコアが厚膜細胞や柔細胞のそれに優っていることから，表皮細胞の難消化性には，走査電顕で観察されたクチクラ層の影響が大であると推察された。

試料切片の横断面における表皮細胞，厚膜組織，維管束，同化柔組織，柔組織の相対占有面積割合は3品種間で違いがみられず，それぞれ平均5.0%，12.8%，9.5%，6.4%，66.3%であった(**Table 3**)。一方，単位面積当たりの細胞数では，

**Table 3** The proportion of tissue area occupied by individual cell types in the straw internodes.

| Cultivar | Tissue percentage (%) † | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Epidermis | Sclerenchyma | Vascular bundle | Assimilatory parenchyma | Ground parenchyma |
| Golden Promise | 4.7(0.6) | 12.0 (2.2) | 9.1 (2.2) | 5.5 (2.4) | 68.7(3.0)‡ |
| Klaxon | 5.6(1.0) | 13.1 (2.5) | 9.9 (1.8) | 6.8 (2.5) | 64.6(4.5) |
| Doublet | 4.8(1.4) | 13.4 (2.5) | 9.5 (3.5) | 6.6 (2.4) | 65.7(5.4) |
| T-test | NS | NS | NS | NS | NS § |

† Tissue percentage was calculated between the two adjacent large vascular bundles.
‡ The values in brackets was s.e.m..
§ NS ; no significant with T-test.

**Table 4** Cell number and cell wall thickness of specific tissues in the straw internodes.

| Cultivar | Cell number ($\times 10^2/mm^2$) | | | Thickness ($\mu$m) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Epidermis | Sclerenchyma | Ground parenchyma | Epidermis | Sclerenchyma | Ground parenchyma |
| Golden Promise | 77.2(20.2) † | 79.1(19.2)$^{a}$‡ | 7.2(1.7)$^{b}$ | 2.37(0.24)$^{c}$ | 3.30(0.49) | 1.32(0.15)$^{b}$ |
| Klaxon | 89.2(18.0) | 65.1(17.4)$^{b}$ | 9.5(1.4)$^{a}$ | 3.06(0.44)$^{a}$ | 3.54(0.38) | 1.37(0.18)$^{b}$ |
| Doublet | 87.5(21.5) | 64.2(11.8)$^{b}$ | 9.3(2.0)$^{a}$ | 2.65(0.30)$^{b}$ | 3.29(0.41) | 1.55(0.22)$^{a}$ |

† The values in blakets were s.e.m..
‡ Means with different superscripts were different significantly at $p < 0.05$.

© The Ito Foundation

厚膜組織と柔組織との間に著しい違いが認められるとともに，それらの組織において品種間差異も認められた(**Table 4**)。すなわち，厚膜組織では，ゴールデンプロミス(79.1×10²/mm²)がクラクソン(65.1×10²/mm²)やダブレット(64.2×10²/mm²)よりも有意に細胞数が多く(P<0.05)，柔細胞はクラクソン(9.5×10²/mm²)とダブレット(9.3×10²/mm²)がゴールデンプロミス(7.2×10²/mm²)よりも有意に多かった(P<0.05)。既に明らかなように，1細胞当たりの面積は，柔細胞が厚膜細胞よりも圧倒的に大きい。細胞壁の厚さは，厚膜細胞(平均3.38μm)が表皮細胞(2.69μm)や柔細胞(1.41μm)よりも大きく，またゴールデンプロミスはクラクソンやダブレットよりも厚膜細胞の細胞壁が厚い傾向に，ダブレットは柔細胞の細胞壁が有意に(P<0.05)厚いことが認められた。ゴールデンプロミスは相対的に厚膜細胞に富み，一方ダブレットは柔細胞に富むことが認められた。Schertz and Rosenow[10]は，定性的な観察に基づきながらも，ソルガム稈の表皮細胞，厚膜細胞，維管束鞘細胞の数や細胞壁の厚さが系統間で異なると報告している。

したがって，器官組織における消化性差異の程度は明らかにされなかったけれども，こうした組織形態学的差異が大麦稈の消化率やアンモニアに対する反応性における品種間差異と関連している可能性はきわめて高いものと推察された。また，穀類残茎の飼料価値を高めることへの育種学的期待が高まるなか，本研究において採用された電顕写真と画像解析装置の組合せ利用は，近縁な系統間差異の測定手法として，きわめて有効であると考えられる。さらに，アンモニア処理効果が厚膜細胞や柔細胞の2次壁内側で特徴的であったことから，今後，アンモニアによるそれら細胞の微細構造への作用効果と消化性向上との関係について検討される必要があると思われる。

## 4. 要　約

無処理稈の消化率ならびにそのアンモニア処理効果における品種間差異を，各部位の乾物構成割合と消化率，節間組織細胞の相対占有面積割合・単位面積当たりの細胞数・細胞壁の厚さとそれら組織の消化性との関連性において検討した。供試材料は大麦3品種(*Hordeum vulgare* L. ゴールデンプロミス，クラクソン，ダブレット)で，植物組織学的諸形質は走査電顕と画像解析装置を組み合わせて調査した。

無処理稈の乾物消化率が最も優れていたダブレットは，ゴールデンプロミスやクラクソンよりも，茎部にくらべて相対的にその消化率が顕著に高い葉部の乾物割合が明らかに高く，また茎部の消化率そのものも他の2品種よりも顕著に高かった。一方，ゴールデンプロミスは，茎部の構成割合が最も大きく，その消化率も低いために全体としての消化率が最も劣っていた。

アンモニア処理による乾物消化率への効果は元来低品質な品種ほど大きく，茎部の消化率の増加量の違いとの関係が認められた。また，アンモニア効果は，茎部の主要な可消化器官である厚膜組織や柔組織において増大されることが電顕観察で認められた。

この茎部における各組織細胞の相対占有面積割合は品種間に違いがなく，柔組織割合が最も高く，次いで厚膜組織の順であった。しかし，厚膜組織と柔組織の単位面積当たりの細胞数と細胞壁の厚さに品種間差異が認められ，ゴールデンプロミスは相対的に厚膜細胞に富み，ダブレットは柔細胞に富むことが示唆された。以上のことから，大麦稈のルーメン消化性における品種間差異を植物形態学的に論議した。

© The Ito Foundation

## 文　献


1) Goto, M., A.H. Gordon and A. Chesson, *J. Sci. Food Agric.* (accepted)

2) Ramanzin, M., E.R. Orskov and A.K. Tuah, *Anim. Prod.* 43 : 271-278, 1986.

3) Tilley, J.M.A. and Terry, R.D., *J. Br. Grassl. Soc.* 18 : 104-111, 1963.

4) Kunoh, H., H. Ishizaki and K. Nakaya, *Physiol. Plant Pathol.* 10 : 191-199, 1977.

5) Jensen, W.A., In: *Botanical Histochemistry*, pp. 205. W.H. Freeman and Company, London, 1962.

6) Akin, D.E., W.W. Hanna and L.L. Rigsby, *Agron. J.* 78 : 827-832, 1986.

7) Hartley, R.D., G. Deschard, A.S. Keene and V. C. Manson, In: *Proceedings of a second seminar on the Upgrading of Crops and By-products*, pp. 11-14. Ministry of Agric. Fish. and Fd. London, 1984.

8) Itoh, H., Y. Terashima and A. Hayashizaki *Jpn. J. Zootech. Sci.* 52 : 671-679, 1981.

9) Harbers, L.H., G.L. Kreitner and G.V. Davis, Jr., *J. Anim. Sci.* 54 : 1309-1319, 1982.

10) Schertz, K.F. and D.T. Rosenow, *Crop Sci.* 17 : 628-631, 1977.


© The Ito Foundation

# 植物の冷害と塩害に関するNMR分光法による研究

Study of Chilling Injury and Salinity of Plant Cells by *in vivo* NMR

坂田 亮（慶應義塾大学理工学部）

Makoto Sakata (Faculty of Science and Technology, Keio University)

Observation of NMR (Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy) signal from various containing the nucleus ($^{13}C$, $^{15}N$, $^{31}P$), can provide a convenient, nondestructive technique for obtaining the specific kinds of information about plant metabolism. With $^{31}P$ NMR it is feasible to determine intracellular conditions such as pH.

Using $^{31}P$ NMR, we investigated *in vivo* intracellular pH and ATP level in mung bean [Vigna mungo (L.) Hepper] root exposed to low temperature. The intracellular pH and ATP level were estimated using $^{31}P$ NMR spectra.

After chilling exposure at 5℃ for more than 24 hours, the cytoplasmic pH decreased and vacuolar pH slightly increased. ATP level declined to less than 50% of the unchilled tissues. After 62 hours of chilling, Δ pH of cytoplasm and vacuole was not observed and the ATP level declined to undetectable level.

In the other hand, we investigated the effect of $Ca^{2+}$ in external medium on intact mung bean roots under high NaCl stress. The $K^+$ and $Na^+$ contents of root cells were determined by atomic absorption spectroscopy.

Addition of $Ca^{2+}$ to external medium alleviated the inhibition of root elongation under the high NaCl stress and maintained high intracellular $K^+$ concentration in elongating region of the roots. This counter effect of $Ca^{2+}$ against the NaCl stress on roots were related to the $(Ca^{2+})/(Na^+)^2$ ratio in external medium. The ratio above $5.0\times10^{-4}$ $mM^{-1}$ gave almost complete recovery of high intracellular $K^+$ concentration in root cells and root elongation even under high NaCl concentration.

We have reported that NMR method can be used to determine the $K^+$ levels and net fluxes of the $K^+$ transport in root tips (1988). This technique may available to study on ion transport under high NaCl stress.

## 1. 目 的

植物の冷害および塩害の問題は，現象論的には説明されているものの，根本的な解決に結び付く分子機構は解明されていない。これらの問題の克服は，将来的な飼料問題解決への重要な課題の一つといえる。冷害の分子機構としては，初発反応として生体膜脂質の相転移が起こり，それに引き続いて代謝異常が生じるという仮説が提唱されている[1]。また，塩害に対する植物細胞の耐塩性は，細胞膜を介するイオン輸送に及ぼす$Ca^{2+}$の影響と密接な関係があると考えられている[2]。NMRによる生体計測法は，生体の外側の環境変化に対する生理状態の変化を無侵襲・非破壊的に追跡できる手段として優れている[3~5]。したがって低温環境下の植物細胞のエネルギー代謝の研究や，高濃度環境におけるイオン輸送の研究に応用価値が高いものと考えられる。そこで本研究では，NMR

© The Ito Foundation

分光法をマメ科植物細胞に適用し，植物における冷害および塩害の機構を解明することを目的とする。

## 2. 方　法

### 2.1 モヤシマメ幼根細胞内 pH, ATP レベルに及ぼす低温処理の影響

試料には比較的低温に弱いとされるモヤシマメ根端組織を用いた。モヤシマメ幼植物を，暗黒中30℃の水耕液で48時間育成した後(発芽後２日目)，暗黒中５℃の水耕液で一定時間育成することによって低温処理を行った。次にモヤシマメの根端３㎜を切断し，この根端およそ1200本（約３ｇ fr. wt.）を，NMRスペクトルの定量的測定の基準とする80mM MDP(methylene diphosphate)を封入したキャピラリとともに外径10㎜のNMR試料管に詰めた。実験中の試料の酸素欠乏を防ぐために，100mM GIucose 0.05mM $CaCl_2$ 15mM MES-Tris(pH 6.5)からなる溶液に酸素を通気し，これを灌流した。灌流液には，磁場ロックのために10%の重水を含ませた。

NMRスペクトルの測定には，日本電子 GX400分光計を用いた。$^{31}P$ の共鳴周波数は，161.8〔MHz〕である。データ点数は16384点とし，観測周波数の範囲を20〔KHz〕とした。測定温度は22±１℃とした。測定条件は，45°パレス（20$\mu$s）を0.2秒の間隔で照射し，積算時間を10分とした。細胞内に比較的高濃度に含まれるPi（無機リン酸）の化学シフトが生理的pHの範囲内でpHに感受性をもつことから，細胞内のイオン組成に類似の溶液を用いて，化学シフトとpHの関係を示す特性曲線を作成し，これを用いて試料のPiの化学シフトから細胞内pHを見積った。

細胞内のATPレベルは，NMRスペクトルのピーク面積がそれぞれのリン化合物の量に比例し，また$\beta$-ATPのピークがATPに特異的なピークであることから，試料のスペクトル$\beta$-ATPのピーク面積より算出した。

### 2.2 モヤシマメ幼根の伸長に及ぼす外液 $Na^+$, $K^+$濃度の影響

発芽後２日目のモヤシマメ幼植物50本を，様々な濃度の NaCl, $CaCl_2$ を含む0.1mM KCl溶液に移植し，一定時間育成した後，その伸長を物差しで測定した。さらに差動トランスを用いて植物生長計を自作し，これを用いて幼根の短時間における伸長過程を観測した。

### 2.3 モヤシマメ幼根細胞内 $K^+$, $Na^+$ 濃度に及ぼす外液 $Na^+$, $Ca^{2+}$ 濃度の影響

2.2と同様の処理をしたモヤシマメ幼植物の根端５㎜を切断し，根端細胞内液を抽出し，この溶液の $K^+$, $Na^+$ 濃度を測定した。細胞内液の抽出は，根端切片を液体窒素中で凍結した後，室温（25℃）で融解し，細胞膜の半透性を失わせることによって行った。$K^+$, $Na^+$ 濃度の測定には，原子吸光分光度計 HITACHI 180-50 を用いた。

## 3. 結果と考察

### 3.1 モヤシマメ幼根細胞内 pH, ATP レベルに及ぼす低温処理の影響

**図1** に低温処理0時間と48時間の根端の $^{31}P$ NMRスペクトルを示す。低温処理時間は，発芽後２日目を0時間とした。

このようなスペクトルより見積った細胞内pHと処理時間の関係を，**図2** に示した。発芽後２日目のモヤシを30℃で育成し続けた場合，根端の細胞内pHは殆ど変化しない。低温処理をした場合，処理時間が24時間以下の根端では，細胞内pH，液胞pHともに変化がみられなかったが，それ以上の処理時間では，細胞質pHは低下し，液胞pHはわずかに上昇した。62時間以上の処理では，スペクトルからは，細胞質と液胞に存在するPiの区別がつかなくなり，細胞質と液胞のpH差が検

© The Ito Foundation

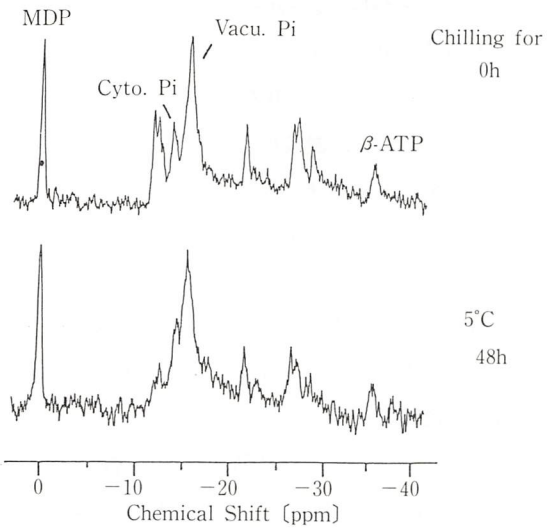



**図1**　低温処理0時間と48時間のモヤシマメ根端の $^{31}$P NMR スペクトル

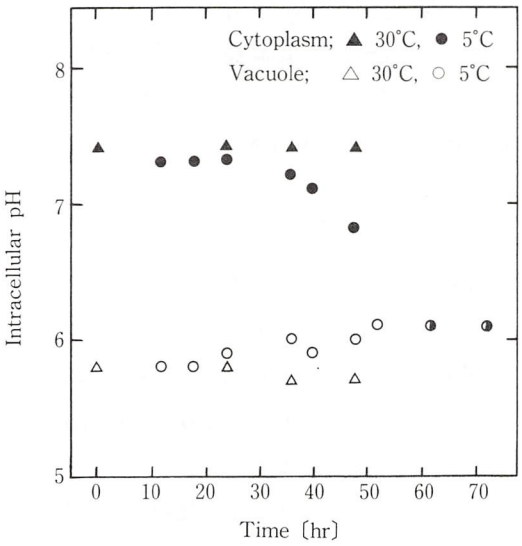



**図2**　処理時間と細胞内 pH の関係

出されなかった。次に，ATP レベルと処理時間の関係を**図3**に示す。ATP レベルは，発芽後2日目の ATP 量を100% とした相対レベルで表した。ATP レベルも，30℃で育成し続けた場合，殆ど変化がない。低温処理によって ATP レベルは処理時間とともに低下し，62時間以上の処理では検出不可能なほどのレベルとなった。

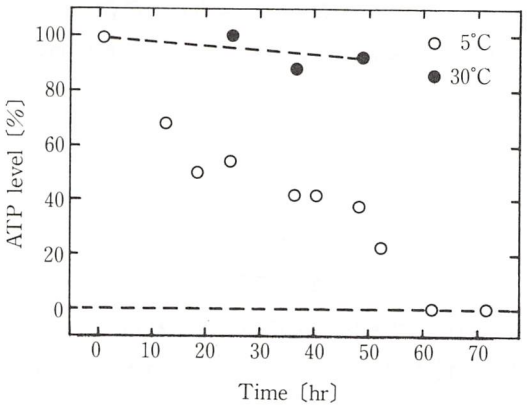



**図3**　処理時間とＡＴＰレベルの関係

### 3.2　モヤシマメ幼根の伸長に及ぼす外液 $Na^+$，$K^+$ 濃度の影響

発芽後2日目のモヤシマメ幼植物を50mM，$Na^+$ を含む溶液に移植すると，根の伸長速度が育成液に $Na^+$ を含まない場合の約70%に低下した。育成液中に $Ca^{2+}$ がない場合には，$Na^+$ 濃度が25mM において根の生長は殆ど観測されない。育成液中0.5mM $Ca^{2+}$ の存在下では，根の伸長量は外液 $Na^+$ 濃度上昇とともに減少するが，200mM の $Na^+$ において根の生長が観測されなくなった。$Na^+$ が0mM の場合には，外液から $Ca^{2+}$ を除いても，生長の低下はわずかであったことから $Ca^{2+}$ の有無は，高塩濃度環境下の根の伸長に影響を及ぼすと考えられる。そこで60から150mM の $Na^+$ 存在下で育成液の $Ca^{2+}$ 濃度を上昇させると，根の伸長は $Ca^{2+}$ 濃度の増加とともに増加した。また，伸長量（24時間）は育成液の $Na^+$，$Ca^{2+}$ の濃度比 $(Ca^{2+})/(Na^+)^2$ によってよく対応づけられた（**図4**）。

### 3.3　モヤシマメ幼根細胞内 $K^+$，$Na^+$ 濃度に及ぼす外液 $Na^+$，$Ca^{2+}$ 濃度の影響

モヤシマメを50mM の $Na^+$ を含む育成液に移植すると，根伸長域の細胞内 $Na^+$ 濃度は，処理時間とともに急激に増加し，移植前は10mM以下であった細胞内 $Na^+$ 濃度は，24時間後には，80mM に

© The Ito Foundation

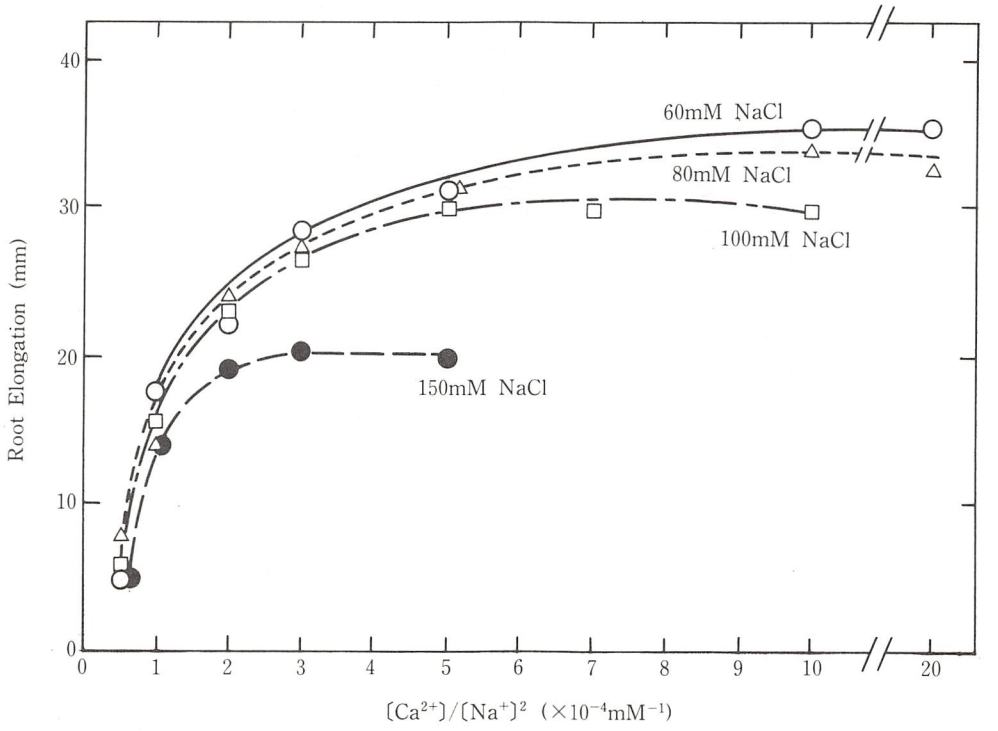



**図4**　外液の $Na^+$，$Ca^{2+}$濃度比 $(Ca^{2+})/(Na^+)^2$ と根の伸長量の関係

達した。この$Na^+$濃度の経時変化は，高塩環境での細胞内浸透圧の上昇とよく対応することから，高塩濃度環境下では，モヤシマメは外界に豊富に存在する$Na^+$を積極的に吸収して細胞内浸透圧を高め，吸水を維持していると考えられる。

一方細胞内$K^+$濃度は，処理時間とともに減少する傾向が観測された。特に外液に$Ca^{2+}$がない場合には，細胞内$K^+$濃度は急激に大きく減少し，数時間以内に60mMから5 mM以下に低下した。これらは，外液$Na^+$により細胞膜の半透性が損なわれ，細胞内の$K^+$が流出した結果と解釈される[6]。また外液$Ca^{2+}$濃度を上昇させると，細胞内$K^+$濃度は，元の値に回復した。外液の$Na^+$，$Ca^{2+}$濃度比 $(Ca^{2+})/(Na^+)^2$ と24時間高塩濃度環境で育てた根の伸長域の細胞内$K^+$濃度との関係を**図5**に示す。高濃度$Ca^{2+}$は，細胞膜のイオン透過性を制御し，細胞内の$K^+$濃度を維持する作用を有すると考えられる。

## 4. 要　約

$^{31}P$ NMR分光法を低温処理したモヤシマメ幼植物に適用することにより，低温による細胞内pHとATPレベルの変化を*in vivo*において観測した。冷害を引き起こすと考えられるいくつかの分子機構が報告されているが[7,8]，NMR分光法は，冷害の初期過程の解析において非破壊的な計測方法として重要な役割を果たすであろう。

一方，モヤシマメ幼根の伸長と細胞内$K^+$濃度に及ぼす外液$Na^+$，$Ca^{2+}$濃度比の影響を調べた。高塩濃度環境下での根の生長阻害は，外液に$Ca^{2+}$を加えることによって緩和された。また，モヤシマメは，高塩濃度下において外液に存在する$Na^+$を吸収することがわかった。外液$Na^+$によって細胞内$K^+$濃度は減少したが，外液$Ca^{2+}$濃度を上昇させると回復した。高塩濃度環境下では，細胞内$K^+$濃度が高い値に維持されている程，伸長生

© The Ito Foundation

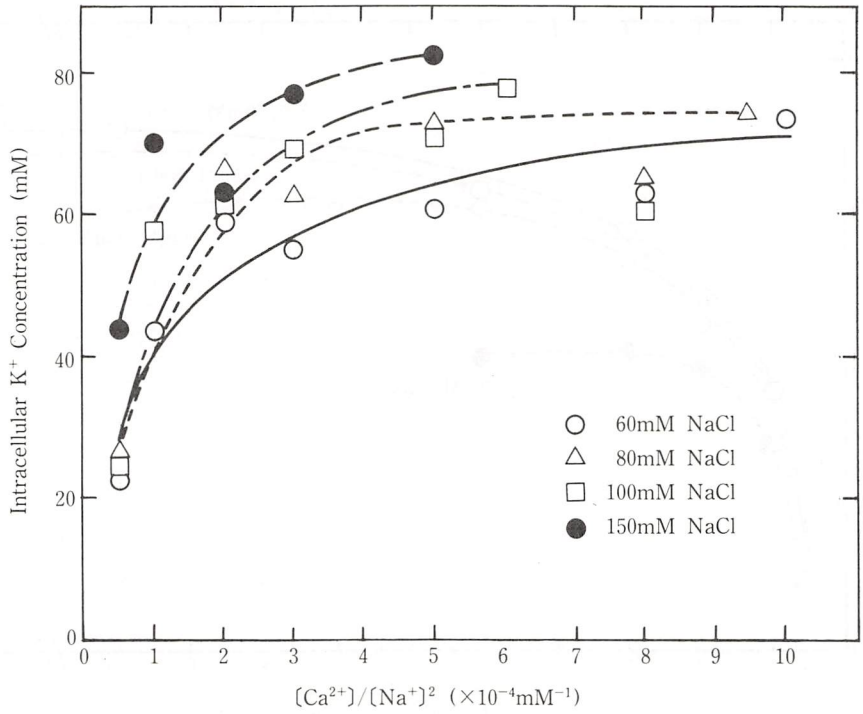



**図5**　外液の $Na^+$，$Ca^{2+}$濃度比 $(Ca^{2+})/(Na^+)^2$ と根の細胞内$K^+$濃度の関係

長も活発であることが明らかになった。これらの結果から，イオン輸送に及ぼす$Ca^{2+}$影響と，植物細胞の耐塩性には関連性があると考えられる。

$^{39}K$ NMR 分光法によって植物細胞の遊離$K^+$濃度と$K^+$イオン輸送量を *in vivo* において測定できることを報告してきた[9]。現在，高塩濃度環境における細胞膜を介する$K^+$イオン輸送の観測へ$^{39}K$ NMR 分光法の適用を検討中である。また$^{31}P$ NMR と$^{39}K$ NMR を組み合わせることにより，イオン輸送現象とエネルギー代謝を直接結び付けることができ，冷害，塩害に関するさらに多くの情報が得られる可能性があると考えられる。

**文　献**

1) Raison, J.K. and Lyons, J.M., Plant Cell Environ., 9, (685-686), 1986
2) Camer, G.R., Lynch, J., Lauchli, A. and Epstein, E., Plant Physiol., 83, (510-516), 1987
3) Roberts, J.K.M. Annu. Rev. Plant Physiol., 35, (375-386), 1984
4) Roberts, J.K.M., Linker, C.S., Benoit A.G., Jardetzky, O. and Nieman, R.H., Plant Physiol., 75, (947), 1984
5) 鳥光慶一，矢崎芳明，太田英二，坂田　亮，応用物理，54，(726-731)，1985
6) Cramer, G.R., Lauchli, A. and Polito, V.S., Plant Physiol., 79, (207-211), 1985
7) Frances M. Dupont, Plant Physiol., 89(1401-1412), 1989
8) T. Kawata and S. Yoshida, Plant Cell Physiol., 29, (1423-1427), 1988
9) Y. Yazaki, K. Maki, T. Sato, E. Ohta and M. Sakata, Plant Cell Physiol., 29, (1417-1422), 1988

© The Ito Foundation

# 放牧利用による肉用牛（黒毛和種）の低コスト生産技術の開発
## 2．肥育用素牛の育成過程の違い（放牧および舎飼）が肥育成績に及ぼす影響

Development of Low Cost Beef (Japanese Black Cattle) Production Systems by Grazing Utilization 2. Effect of Rearing Systems of Feeder Cattle (Grazing or Pen-Feeding) on Their Performance during Fattening Period

梅津　頼三郎・*増田　泰久・中西　良孝・*五斗　一郎
衛藤　哲次（九州大学農学部附属農場高原農業実験実習場，*九州大学農学部）

Raizaburo Umetsu *Yasuhisa Masuda, Yoshitaka Nakanishi, *Ichiro Goto and Tetsuzi Etoh (Kuju Agricultural Research Center and *Faculty of Agriculture, Kyushu University)

The fattening performance of steers from 10 months to 28 months of age was investigated with the feeder-cattle which had been raised on pasture (pasture group) and in feed-lot (feed-lot group).

The cattle in the pasture group with about 260 kg of body weight at 10 months of age almost recovered their retarded growth due to the raising on pasture and attained 650 kg at 28 months of age, though one with 200 kg of body weight at 10 months of age could not reach the recommended weight for finishing weight. The estimated intake of digestible dry matter for the pasture group was observed to be a little higher than the feed-lot group, and this might contributed to their recovered growth.

At the early fattening stage when the feeding of concentrate was restricted, lowered daily gain was observed in a cattle which showed lower bunt order. It is noted that an improved group feeding system decreasing the individual competition is necessary to attain a uniform growth.

The carcass grading for the pasture group cattle slaughtered at 28 months of age were similar to those the feed-lot group.

### 1．はじめに

前報[1]では，肉用子牛の肥育素牛としての育成過程における，放牧主体と舎飼との育成方法の違いが市場出荷時の体重に及ぼす影響について検討した。その結果，放牧育成牛群は市場出荷時に約50ｋｇ低体重となったため，子牛販売が唯一の収入源である繁殖農家にストレートに子牛の放牧を勧めるわけにはいかないことを指摘した。しかし，放牧育成群の中で特に発育が遅れた７号牛を除けば，10ヵ月齢で260kgを超える発育を示したことから，牛群内の競合を可能な限り少なくする技術開発やダニ寄生の防止および放牧草地に栄養価の高い草種（例えばフェストロリウム等）の導入に

© The Ito Foundation

より，市場価格がそれほど劣らない放牧による素牛の育成は可能であることを報告した。

肥育牛は現行の平均では30ヵ月齢650から670kgで出荷される。したがって，いたずらに金と手間をかけて生産費の高い素牛を育成するよりも，放牧により市場出荷時には少し位小さくても，その後の肥育で28ヵ月齢に650kg以上の肥育牛となるならば，そのほうがより合理的な育成法と考えられる。本報では，放牧育成した肥育素牛と舎飼育成したそれとの肥育期間中における増体を比較検討するとともにと体の枝肉格付け成績を報告する。

## 2. 試験方法

（1） 供試牛：前回の試験において舎飼で育成した舎飼育成群3頭（2，3および4号牛）と放牧主体で育成した放牧育成群4頭（5，6および7号牛並びに予備として子牛期に前3頭と同様に放牧して育成した8号牛）を10ヵ月から28ヵ月齢まで舎飼肥育した。

（2） 飼養方法：牛房は2つに区分し，原則として舎飼育成群と放牧育成群を同居させることはしなかった。牛房から直結する運動場等はなかったため供試牛はと殺まで狭い牛舎から出ることはなかった。敷料はオガクズを用い，1週間に1度交換した。糞の除去は毎日実施した。削蹄は18ヵ月間に2回実施した。

飼料給与量は**表1**のとおりで1日2回に分けて給与した。肥育用配合飼料は黒毛和種登録協会の間接検定用配合飼料のフレークを全期間使用した。試験期間中，病気事故等はなかったが，ビタミンA，D，Eを2ヵ月に1回必要に応じ経口投与した。

（3） 調査方法：採食量調査は前報[1]と同様であり，体重測定は毎月実施した。毎年，4月と12月および出荷前には体各部の測尺を行った。と殺時の肉質等級の格付けは日本食肉格付協会が実施した。

## 3. 結果および考察

子牛市場で平均価格以上で販売することを配慮した慣行的飼養形態をとって育成した舎飼育成群（2～4号牛）と，子牛生産コスト低減を念頭において省力化と多頭化達成のため放牧を主体として育成した放牧育成群（5～8号牛）の10ヵ月齢以降の増体成績を**図1**に示した。

**図1**に示すように，全体としては両区とも当初の目標である28ヵ月齢650kg以上仕上げにはほぼ到達したと云えよう。舎飼育成群と放牧育成群とを比較すると，仕上げ時体重は舎飼育成群で平均708kg，放牧育成群のそれは649kgとなり，10ヵ月齢時の体重（舎飼育成群平均295kg，放牧育成群平均248kg）の差がそのまま肥育終了時まで続いたことになる。この原因の一つは舎飼育成群の2

**表1**　供試牛の肥育期間中の飼料給与量（kg/日・頭）

| 飼養区分 | 濃厚飼料 | 粗飼料 | |
|---|---|---|---|
| | 肉用牛肥育用配合飼料 | 市販ヘイキューブ | 稲ワラ |
| 前期（11～16ヵ月齢） | 4.0 | 3.0 | 1.0 |
| 中期（17～22ヵ月齢） | 6.5 | 3.0 | 1.0 |
| 後期（23～28ヵ月齢） | 9.0 | 2.0 | 1.0 |

注）飼料給与量の設定基準は黒肥地ら[2]および滝本ら[3]の報告と日本飼養標準[4]を参考にして，肥育期間中のDG0.8kg以上を期待するため，粗飼料からのTDN摂取量を前，中および後期において，それぞれ40，30および20%とした。

© The Ito Foundation

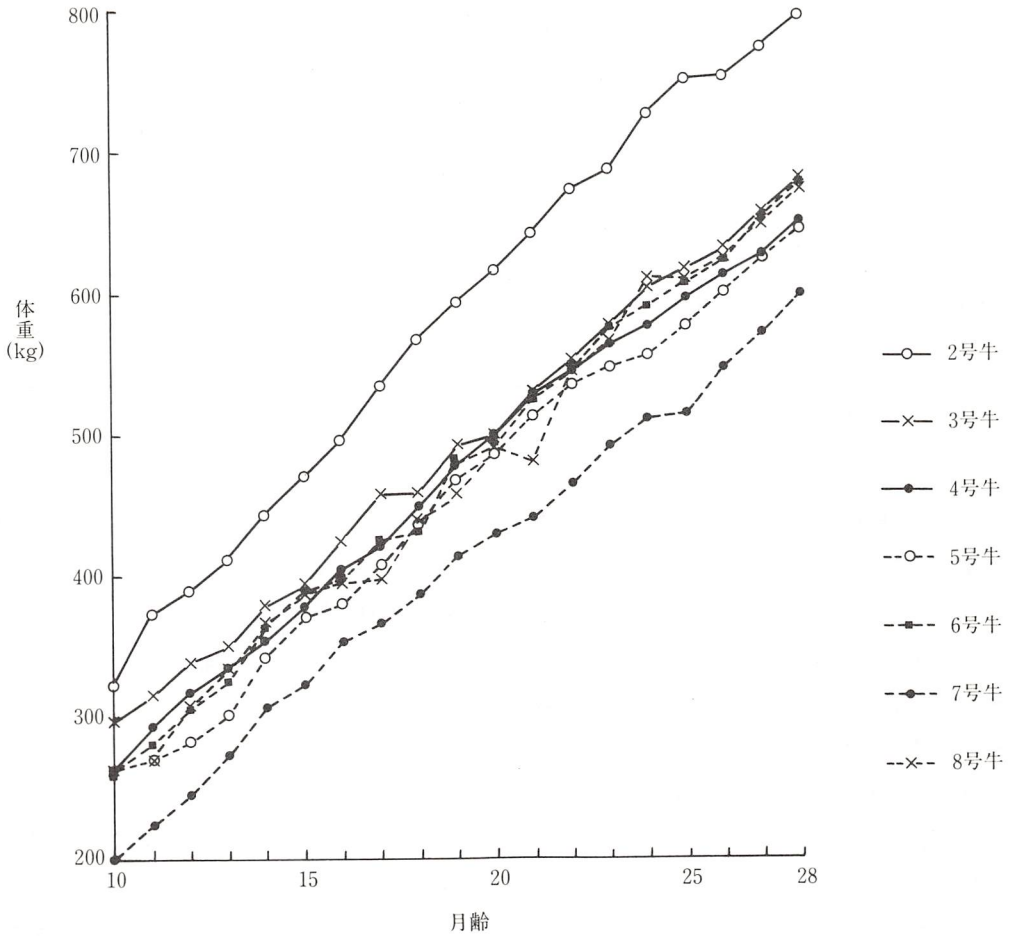



**図1**　肥育期間中の体重推移

号牛の10ヵ月齢体重が322kgと特に重かったことによる。そこで2号牛を除く2頭の平均仕上げ体重については665kgとなっている。雄の発育は去勢のそれに比べて著しく優れるので発育成績から除外して検討するのが妥当と考えられる。なお，この牛については去勢が完全でなかったため，20ヵ月齢で再去勢を実施した。2号牛を除くことにより仕上げ時における体重差は16kgと小さくなった。

一方，放牧育成群では7号牛の体重が他の2頭より著しく低いことが同群の仕上げ体重を低くする結果となっている。7号牛は10ヵ月齢で201kgしかなかったが，この原因は前報[1]で考察したように生時体重も小さく，生後31日から母子放牧したことおよび群内で最も小さかったため，競合に負け濃厚飼料の摂取量も少なかったためである。しかし，肥育期になってからの濃厚飼料の摂取量は他の3頭に劣らないことが観察された。このことは子牛期の発育がかなり低い場合は，肥育期間中の代償成長による体重の取り戻しはあまり期待出来ないことを示唆している。他方，10ヵ月齢で260kg～266kgであった他の放牧育成牛の仕上げ体重は647kg～673kgとなった。このことから10ヵ月齢で260kg程度の発育をさせることが出来れば，放牧育成は従来の舎飼育成に代わる低コスト，多頭飼養の肥育素牛育成技術として定着が可能であ

© The Ito Foundation

表2　肥育牛の発育比較（kg）

| | 牛番号 | 生時体重 | 離乳時体重 | 市場出荷時体重（10ヵ月齢） | 22ヵ月齢体重 | 10－22ヵ月齢のDG 寒冷期（12－4月） | 温暖期（5－11月） | | 肥育終了時体重 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 舎飼育成群 | 2号牛 | 34 | 115 | 322 | 673 | 0.93 | *0.94 | 0.88 | 794 |
| | 3号牛 | 30 | 108 | 298 | 553 | 0.72 | *0.63 | 0.71 | 680 |
| | 4号牛 | 28 | 94 | 264 | 544 | 0.71 | | 0.79 | 649 |
| 放牧育成群 | 5号牛 | 35 | 112 | 266 | 536 | 0.61 | | 0.81 | 647 |
| | 6号牛 | 28 | 86 | 263 | 544 | 0.84 | | 0.73 | 678 |
| | 7号牛 | 26 | 76 | 201 | 464 | *0.71 | 0.80 | 0.80 | 598 |
| | 8号牛 | 29 | 100 | 260 | 545 | 0.63 | | 0.68 | 673 |

*；10から22ヵ月齢の間に寒冷期あるいは温暖期が2回あった場合の値

ると考えられる。牛舎から近い良質の草地に放牧しながら，濃厚飼料を不断給餌すれば，去勢子牛の発育は放牧でも10ヵ月齢260kgは決して困難な数字でないことを付言する。

次に増体の経過について考察してみよう。**表2**に10～22ヵ月齢における寒冷期と温暖期および**表3**に肥育期間を肥育前期，中期および後期に分けた場合のそれぞれの一日当たり増体量（DG）を示した。寒冷期には当地が標高950mの高地にあるため気温が－15℃度以下になることも希ではない。厳冬期には体温保持のためエネルギーの消耗が増大するので，限界に近い飼料の摂取をしている肥育牛の増体は低下すると云われている。しかし本試験の結果では寒冷期と温暖期との間に大きな違いは認められなかった。なお，5号牛は寒冷期における発育が劣るように見受けられるが，同牛のDGは肥育前期において他牛より低い値を示したことと関連する。これは5号牛を牛舎の都合上，最初の2ヵ月間，2～4号群に同居させた時競合に負けた結果（**図1**の10～12ヵ月のDG参照）生じたものである。飼槽はドラム缶を縦切りしたものを頭数より1個余分に充当したにもかかわらず，群内で上位の牛が採食に集中し飼槽から離れないのを確認しない限り，下位の牛は飼槽にすら近付けない傾向が認められた。この傾向は肥育の初期，濃厚飼料が制限されている場合に顕著であった。

表3　肥育期間別の日増体量（kg/日）

| | 牛番号 | 肥育前期 | 肥育中期 | 肥育後期 |
|---|---|---|---|---|
| 舎飼育成群 | 2号牛 | 0.94 | 0.98 | 0.65 |
| | 3号牛 | 0.69 | 0.71 | 0.69 |
| | 4号牛 | 0.76 | 0.78 | 0.57 |
| 放牧育成群 | 5号牛 | 0.61 | 0.87 | 0.62 |
| | 6号牛 | 0.72 | 0.82 | 0.72 |
| | 7号牛 | 0.82 | 0.62 | 0.72 |
| | 8号牛 | 0.74 | 0.83 | 0.69 |

したがって群飼肥育において増体重の個体間差を少なくするためには，競合発現の著しい肥育初期の競合を回避させる飼養方法の開発が重要な課題と判断される。表には示していないが，同一群内で上位牛が出荷された後の4号牛の1ヵ月のDG 0.77は直前2ヵ月のDG 0.45より極めて大きく，また，全体としてDGの悪かった7号牛も6号牛が出荷された後の2ヵ月のDGが0.85であったことは，肥育技術として牛間の競合除去法の開発が如何に大切かを物語るものである。

**表4**に肥育期間中15ヵ月から25ヵ月齢における可消化乾物摂取量の推定値を示した。DGの個体間差と採食量との間に明確な関連を見いだすことは困難であった。しかし，可消化乾物摂取量が放牧育成群でやや高い値となったことは，肥育期における舎飼育成群との体重差減少の一因と考えられる。

**表5**および**6**には出荷時の体各部の測尺値と枝

© The Ito Foundation

表4　可消化乾物摂取量（g/100kgBW/日）の推定値

| | | 月齢 | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 牛番号 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 |
| 舎飼育成群 | 2号牛 | | | | | 1,205 | | 1,076 | | 1,335 | | |
| | 3号牛 | | | | 1,342 | | 1,263 | | 1,250 | | | |
| | 4号牛 | | | 1,397 | | 1,358 | | 1,243 | | | | 1,465 |
| 放牧育成群 | 5号牛 | | 1,344 | | 1,444 | | 1,295 | | | | 1,560 | |
| | 6号牛 | | 1,200 | | 1,452 | | 1,357 | | | | 1,401 | |
| | 7号牛 | 1,386 | | 1,491 | | 1,593 | | | | 1,391 | | |

表5　出荷時における体各部の測尺値（cm）

| | 牛番号 | 体高 | 胸囲 | 体長 | 胸幅 | 胸深 | 尻長 | 十字部高 | 腰角幅 | 臍幅 | 座骨幅 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 舎飼育成群 | 2号牛 | 145 | 231 | 172 | 62 | 80 | 59 | 140 | 55 | 51 | 31 |
| | 3号牛 | 143 | 220 | 153 | 57 | 75 | 53 | 139 | 52 | 69 | 30 |
| | 4号牛 | 139 | 224 | 150 | 57 | 75 | 56 | 139 | 53 | 48 | 27 |
| 放牧育成群 | 5号牛 | 137 | 215 | 142 | 53 | 75 | 53 | 136 | 51 | 44 | 33 |
| | 6号牛 | 138 | 223 | 162 | 57 | 78 | 59 | 140 | 52 | 47 | 26 |
| | 7号牛 | 131 | 213 | 158 | 55 | 73 | 53 | 133 | 50 | 49 | 30 |
| | 8号牛 | 142 | 215 | 155 | 58 | 73 | 55 | - | 53 | 48 | 34 |

表6　出荷牛の枝肉格付け成績

| | 牛番号 | 等級 | 枝肉重量 | 肉質 | | | | 備考 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | BMS | BCS | 締り | きめ | |
| 舎飼育成群 | 2号牛 | B-3 | 506.3 | 5 | 5 | 3 | 3 | |
| | 3号牛 | A-4 | 411.1 | 7 | 4 | 4 | 4 | 多発生筋出血 |
| | 4号牛 | A-5 | 404.4 | 9 | 4 | 5 | 5 | |
| 放牧育成群 | 5号牛 | A-3 | 376.3 | 4 | 4 | 3 | 3 | |
| | 6号牛 | A-3 | 409.0 | 4 | 4 | 3 | 3 | 多発生筋出血 |
| | 7号牛 | A-5 | 359.3 | 8 | 3 | 5 | 5 | |
| | 8号牛 | A-3 | 420.9 | 4 | 4 | 4 | 4 | |

肉格付け成績を参考までに示した。枝肉格付けにおいては等級および肉質とも，舎飼育成群と放牧育成群との間に大きな差は認められなかった。なお，当場の牛はBCSが高く，黒ずんだ肉色が多いことが指摘されているので，今後この点の改善も合わせて検討していく予定である。

## 4．要　約

(1) 子牛市場出荷までの育成手段として放牧を主体として用いた子牛4頭（放牧育成群）と慣行的舎飼を用いた子牛3頭（舎飼育成群）とを慣行的な方法で10ヵ月齢から28ヵ月齢まで肥育し，両者の肥育成績を比較検討した。

(2) 放牧育成群は舎飼育成群よりやや良好な増体を示した。この一因として放牧育成群の可消化乾物摂取量が舎飼育成群よりやや高い値となったことがあげられる。

(3) 放牧育成群でも10ヵ月齢体重が260kg程度あれば28ヵ月齢650kgの仕上げは十分に可能であることが認められた。しかし，肥育開始時に200kg程度しか発育していなかった牛は，仕上げ目標体重に達しなかった。

© The Ito Foundation

(4) 群飼肥育では肥育前期の濃厚飼料制限期に著しい競合が見られるので，この時期の競合緩和策の開発が重要である。

(5) と殺時の枝肉格付け成績には両群間に大きな差は認められなかった。

## 文 献

1) 梅津頼三郎・増田泰久・中西良孝・五斗一郎：昭和62年度食肉に関する助成研究調査成果報告書，6，80～85（1988）

2) 黒肥地一郎・滝本勇治・岩成寿・美濃貞治郎・吉田正三郎・田中彰治・上田敬介・寺田隆慶・橋爪徳三・針生程吉・森本宏：九州農試報告，15，331～366（1970）

3) 滝本勇治・黒肥地一郎・中西雄二・美濃貞治郎・渡辺昭三・伊藤 稔・亀岡喧一・湯沢 勝・近藤郁夫・片山政男・藤田浩三・石橋 明・酒見武典・図師隆一・安田三郎：九州農試報告，18，175～190（1976）

4) 農林水産技術会議事務局編：日本飼養標準・肉用牛，中央畜産会，東京（1987）

© The Ito Foundation

# 乳用雄肥育素牛の哺育・育成期における生産費と離乳飼料の調製に関する研究

Feeding Costs in Rearing Dairy Calf Feeders for Fattening and Formulation of Calf Starter Diets at the Weaning Stage

大　原　久　友（国際酪農研究センター）

Hisatomo Oohara (International Dairy Research Center)

The objectives of this study are to survey the production costs of dairy-breed calves reared for beef and pursue possibilities to cultivate some cereal crops introduced from abroad, particularly the effects of cereal grains such as feed barley, triticale, oats in calf starter diets in calf performance. The results of this study are summarized as follows:

1. Surveys were carried out on production costs in rearing calves during the period from the birth to the feeder stage of about 6 months of age at 12 farms, Average number of calves per farm were 194 with 2.6 workers in charge, or the number of calves per worker was 75.

2. The most expensive expenditure affecting production costs was the price of new-born calves, which was ¥131,897/head, accounting for 62.7% of the total expenditures, followed by the feed cost, which was ¥51,092, accounting for 24.2%.

3. Average live weight of calves when introduced to the farms was 54 kg, and the increase in the body weight during the rearing period of 177 days was 220 kg; the daily gain was 1.24 kg; the loss rate was 7.02%; the feed cost per dsy was ¥311; and the average income was ¥45,193/head.

4. On the cultivation of some cereal crops such as feed barley, triticale and oats introduced from abroad, good yields were harvested and their feed value was found desirable. From the viewpoint of self-sufficiency of feedstuffs for beer cattle, it is considered acceptable by major crop producers in that these cereal crops seem adaptable as forage, and also as feed grains under the environmental conditions in Japan.

5. The author prepared experimentally diets of calf starter or grower using self-supplied feed grains and imported dehy-alfalfa pellets, whereby he obtained a palatable, digestible feed ration for the dairy-breed calves successfully.

## 1. 目　的

日本における旺盛な牛肉需要増大が期待されている環境の中にあって，その供給源は国産牛肉と外国からの輸入牛肉であるが，両者間に強い競合関係が生じている。その対応としては良質牛肉の低コスト生産，さらに流通の合理化と消費の拡大が大きな要因となる。研究者はこの課題解決のために国産牛肉の供給を乳用種と肉用種に，また飼育形態を哺育・育成・肥育の3段階と一貫飼育に区分し，いかにして良質の枝肉を低コストで生産するかが大きな解決への鍵になるとの問題点提起

© The Ito Foundation

を行い，本財団助成による研究計画の下で研究を実施してきた[1~3]。今回は主として乳用雄子牛の哺育から肥育素牛としての育成期における生産コスト，特に肉用牛飼料源としての麦類（穀実）の栽培と飼料成分の分析，タンパク質，ミネラル，ビタミン源であるデハイアルファルファペレットを組み合わせた飼料調製を行った調査研究に関する報告である。

## 2. 方　法

### 2.1　乳用雄肥育素牛の生産費

農林水産省の統計情報に関する昭和63年の調査データに基いて北海道における道央の深川市４戸，道北の士別市４戸，美深町１戸および道東の池田町の３戸の計12戸の事例についてホルスタイン種雄子牛（以下「ぬれ子」と称す）の肥育素牛となるまでの育成期における生産費について解析を行った。さらに環境条件と「ぬれ子」の飼養技術および生産費との関係を明らかにするため稚内市営樺岡肉牛牧場（「ぬれ子」の地域内生産農家からの購入と一貫飼育経営）および幌延町農事法人北斗牧場等において調査を実施した。

### 2.2　肉牛用飼料麦類の栽培と飼料成分分析

肉用子牛の育成期における離乳飼料（カーフスターター）としても諸外国で広く用いられている麦類（穀実）の飼料大麦，ライ麦，ライ小麦およ

表 1-1　乳用雄肥育素牛の生産費（昭63）
1.　経営規模

| 農家番号 | 産地 | 経営形態 | 経営土地 (ha) | | | 農業就業者数（人） | 経営者年齢（才） | 飼育頭数の推移 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 田 | 畑 | 計[1] | | | 年間飼養頭数 | 年間販売頭数 | 死廃頭数 | 死廃率（%） | 死亡頭数 | 廃とう汰頭数 |
| 1 | 深川市 | 水田・肉牛複合 | 5.50 | 0.14 | 5.64 | 2 | 45 | 170 | 164 | 6 | 3.53 | 6 | 0 |
| 2 | 同上 | 同上 | 4.66 | 0.05 | 4.71 | 4 | 38 | 240 | 235 | 5 | 4.16 | 5 | 0 |
| 3 | 同上 | 同上 | 7.40 | 0.10 | 7.50 | 3 | 55 | 131 | 120 | 11 | 8.40 | 11 | 0 |
| 4 | 同上 | 同上 | 9.65 | 0.10 | 9.75 | 4 | 60 | 61 | 59 | 2 | 3.28 | 2 | 0 |
| 5 | 士別市 | 肉専 | 0 | 6.70 | 6.70 (5.40) | 3 | 49 | 345 | 298 | 47 | 13.60 | 38 | 9 |
| 6 | 同上 | 畑・肉牛複合 | 0 | 10.00 | 10.00 (4.80) | 2 | 46 | 205 | 192 | 13 | 6.34 | 5 | 8 |
| 7 | 同上 | 同上 | 0 | 22.00 | 22.00 | 2 | 37 | 160 | 146 | 14 | 8.75 | 3 | 11 |
| 8 | 同上 | 同上 | 0 | 9.80 | 9.80 | 2 | 41 | 27 | 27 | 0 | 0.00 | 0 | 0 |
| 9 | 美深町 | 水田・肉牛複合 | 4.00 | 3.80 | 7.80 (山 4) | 2 | 45 | 44 | 42 | 2 | 4.55 | 2 | 0 |
| 10 | 池田町 | 水田・肉牛複合 | 0 | 11.50 | 11.50 (7.80) | 2 | 47 | 372 | 340 | 32 | 8.60 | 11 | 21 |
| 11 | 同上 | 同上 | 4.50 | 3.00 | 7.50 (3.00) | 2 | 52 | 200 | 169 | 31 | 15.50 | 28 | 3 |
| 12 | 同上 | 水田・肉牛複合 | 0 | 11.20 | 11.20 (9.00) | 3 | 53 | 374 | 346 | 28 | 7.49 | 28 | 0 |
| 平均 | | | | | 9.50 | 2.6 | 47 | 194 | 178 | 16 | 7.02 | 12 | 4 |
| 平成元年全国平均 | 全国 | | | | 9.30 | 2.5 | | | 74 | | | | |

備考）１）計の（　）内は牧草地面積であり，№9は山林である。

© The Ito Foundation

びエン麦の計4種類，18品種を札幌市郊外広島町の試験地で栽培を行い，飼料成分を分析した。

2.3　離乳飼料の調製

離乳期における飼料は嗜好性・消化性と共に栄養素のバランスのとれたものが要求されるので栄養的にも経済的にももっとも望ましいものを試調製し，「ぬれ子」に対する嗜好性，全般的なパフォーマンス等について調査を行った。特にタンパク質，ミネラルおよびビタミン源としてのをハイアルファルファペレット（以下「デハイ」と称す）

表1-2　乳用雄肥育素牛の生産費（昭63）
2．飼育の概要

| 農家番号 | 導入時の体重(kg) | 育成期間(日) | 増体重(kg) | 1日当たり増体重(DG, kg) | 肥育素牛 月齢(月) | 肥育素牛 生体重(kg) | 主な給与飼料(kg) 購入飼料 種類・数量(kg) | 主な給与飼料(kg) 自給飼料 種類・面積(ha) | 育成期間中1日当たり飼料費(円) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 53 | 225 | 250 | 1.11 | 7.9 | 303 | 人工乳16，離飼1,055 屑砕米1，乾牧草102 塩1 | | 254 |
| 2 | 53 | 220 | 252 | 1.15 | 7.6 | 305 | 人工乳19，離飼1,111 大麦(圧)1，フスマ1 乾牧草107，塩2 | | 284 |
| 3 | 54 | 207 | 234 | 1.13 | 7.2 | 288 | 人工乳10，離飼1,207 屑砕米1，乾牧草83，塩1 | | 304 |
| 4 | 53 | 210 | 242 | 1.15 | 7.5 | 295 | 人工乳24，離飼1,106 ビール粕1，稲ワラ2，乾牧草84，塩1 | | 292 |
| 5 | 51 | 203 | 240 | 1.18 | 7.1 | 291 | 人工乳22，離飼896，大麦(圧)1，塩2 Ca 1 | 牧草 5.4 | 262 |
| 6 | 51 | 185 | 240 | 1.30 | 6.5 | 291 | 人工乳14，離飼835， | 牧草 4.8 | 268 |
| 7 | 70 | 168 | 233 | 1.39 | 6.4 | 303 | 人工乳12，離飼729，乾牧草35 | | 242 |
| 8 | 52 | 189 | 242 | 1.22 | 6.6 | 294 | 人工乳30，離飼638，大麦(圧)4，塩2 | 牧草 1.0 | 255 |
| 9 | 55 | 203 | 235 | 1.16 | 7.2 | 290 | 人工乳10，離飼841，乾牧草53 | | 217 |
| 10 | 55 | 184 | 221 | 1.20 | 6.5 | 276 | 人工乳 8，離飼267，成配463，フスマ18 | 牧草 7.8 | 283 |
| 11 | 43 | 184 | 235 | 1.28 | 6.3 | 278 | 人工乳8，　離飼409， | 牧草 3.0 | 155 |
| 12 | 53 | 203 | 232 | 1.14 | 7.1 | 285 | 人工乳18，離飼748，塩1 | 牧草 8.0 デントコーン 1.0 | 260 |
| 平均 | 54 | 198 | 238 | 1.20 | 7.0 | 292 | | | 258 |
| 平成元年全国平均 | 53 | 177 | 220 | 1.24 | 6.4 | 273 | | | 311 |

© The Ito Foundation

配合の意義について検討した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 乳用雄肥育素牛の生産費

（1） 調査農家の経営規模（**表1-1**） 調査農家12戸のうち，経営的には6戸が，水田・肉牛複合，5戸が畑・肉牛複合，1戸が肉専業である。経営土地の平均は9.5ha，そのうち牧草地を有するもの5戸，山林を有するもの1戸である。諸元の平均数値で示すと，農業就業者数は2.6人，経営者の年齢は47才である。経営土地の規模は標準的なものであり，経営者の年齢は中・壮年の階層に属するだろう。1戸当たり「ぬれ子」飼養頭数は194頭であるが，多いものは374頭（№12），少ないものは27頭（№8）である。就業者1人当たり飼養頭数は75頭の規模である。死廃率は7.02％であるが，この率の高低は生産コストに及ぼす影響が大きく，初生子牛の哺育・育成における一つの問題点といえよう[4]。5％以下を飼養技術の到達目標にしている農家が多いが，さらに低いほどコスト低減に連動する。

（2） 乳用雄哺育・育成牛飼養の概要（**表1-2**） 導入時の「ぬれ子」の平均体重54kgであるが，通常生後の3日間位は初乳を充分に飲ませて母乳からの強い免疫力を与えることが「ぬれ子」を疾病からまもる体質を向上させる第1のポイントである。育成期間は200日前後，DGは1.2kgであるから概して順調な発育を示しているといえよう。主な給与飼料は哺育期が人工乳または生乳であるが，つづいて育成期は離乳飼料（カーフスターター）を主とし，これに単味飼料の圧扁大麦，屑・砕米，フスマなどと共に乾牧草，塩等を給与している農家が多い。育成期間中における1日当たり飼料費は258円，増体重1kg当たり飼料費は215円，いずれも，12戸の調査農家間でも高低の差がある。離乳期における離乳飼料の栄養的意義は大きいが，同時にルーメンの発育をはかるため線維質の牧乾草の品質にも考慮する必要がある。

（3） 素畜費と飼養費（**表1-3**） 素畜費，つまり「ぬれ子」の購入価格は12戸の平均が131，897

表 1-3　乳用雄肥育素牛の生産費（昭63）
3. 飼養費用に占める素畜費と飼料費の内訳

| 農家番号 | 素畜費（円／頭） | 「ぬれ子」導入法（頭） | | | | 飼料費（円／頭） | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 農家 | 家畜商 | 農協 | 市場 | 購入 | 自給 | 計 |
| 1 | 124,360(57.5)[1)] | 17 | 44 | 0 | 115 | 57,142 | 0 | 57,142(26.5)[1)] |
| 2 | 123,992(58.3) | 28 | 0 | 0 | 212 | 62,587 | 0 | 62,587(29.4) |
| 3 | 139,118(57.8) | 11 | 0 | 0 | 120 | 63,013 | 0 | 63,013(26.2) |
| 4 | 121,051(57.5) | 39 | 0 | 0 | 22 | 61,333 | 0 | 61,333(29.1) |
| 5 | 139,466(63.5) | 0 | 19 | 295 | 31 | 53,273 | 0 | 53,273(24.2) |
| 6 | 130,066(65.8) | 0 | 0 | 205 | 0 | 45,326 | 4,198 | 49,524(25.1) |
| 7 | 145,922(71.8) | 0 | 0 | 160 | 0 | 40,658 | 0 | 40,658(20.0) |
| 8 | 130,319(57.7) | 0 | 0 | 27 | 0 | 45,242 | 2,933 | 48,175(21.3) |
| 9 | 123,535(64.7) | 0 | 14 | 0 | 30 | 44,064 | 0 | 44,064(23.1) |
| 10 | 139,367(65.4) | 0 | 0 | 372 | 0 | 46,593 | 5,519 | 52,112(24.5) |
| 11 | 140,120(74.8) | 0 | 0 | 200 | 0 | 24,321 | 4,138 | 28,459(15.0) |
| 12 | 125,452(57.9) | 0 | 0 | 374 | 0 | 41,389 | 11,449 | 52,838(24.4) |
| 平均 | 131,897(62.7) | | | | | 48,745 | 2,353 | 51,098(24.2) |
| 平成元年全国平均 | 131,727(59.8) | | | | | 51,131 | 4,016 | 55,147(25.0) |

備考．1)（ ）内は費用合計に占める割合（％）を示す。

© The Ito Foundation

円，哺育・育成期における全費用の62.7％を占めている。「ぬれ子」導入時の体重は54kgであるから体重１kg当たり素畜費は2,443円となり，かなり高い価格水準になる。これは「ぬれ子」を供給する酪農家側の収入増に大きく寄与するが，牛肉生産者の経営収支には重くのしかかっている。このような背景は最近の肉牛の需要増が強く反映しているものといえよう。つぎに「ぬれ子」の導入法は№1～4までの深川市では酪農家と直接契約導入のものと家畜商を通じての導入（№1）もあるが，主として市場から導入している。土別市と池田町のものは農協を通じてのものが多い。このように「ぬれ子」手当ての仕方は飼育農家によって多少異なる。育成期間中の飼料費は平均51,098円，全費用の24.2％である。使用する飼料の栄養組成，価格，効率などは肉用牛飼育の経済におよぼす影響も大きいので，この面からの家畜飼養の対応が必要である。

（４）収益性（**表1-4**）　一般に乳用雄肥育素牛を飼育する農家の収益性のうち，所得は平均45,193円であるが，農家によって異なる。№7農家の収益性はもっと大きいが，飼料費も安い。所得は64,934円である。

3.2　環境の異なる牧場飼育の肉用牛の哺育・育成期における比較調査

北海道北部地域にある稚内市営樺岡牧場と農事組合法人北斗牧場における調査結果について考察する。

（１）稚内市営樺岡牧場（表**2-1～2**）　稚内市内酪農家の飼養する乳用種（Ｄ）にアバーデンアンガス種（Ａ）または黒毛和種（Ｂ）の精液を用いて$F_1$種と$F_1$クロスをつくり，生産された初生子牛を肥育素牛として哺育，育成する。肥育素牛の１部は同市にある(社)宗谷畜産開発公社牧場で肥育牛として飼育する。通常，分娩後の「ぬれ子」は10～14日間位農家で飼育させる。発育はＡ×ＤとＢ×Ｄによって若干異なるが，初生体重の重い前者の方が後者に比してやや大きい。飼料給

表 1-4　乳用雄肥育素牛の生産費（昭63）
4．経営の収益性（円／頭）

| 農家番号 | 費用合計 | ①<br>粗収益<br>（主産物＋副産物） | ②<br>生産物総額<br>（費用合計＋資本利子＋地代） | ③<br>②－（家族労働費＋資本利子＋地代） | ④<br>②－家族労働費 | ⑤<br>利潤<br>①－② | ⑥<br>所得<br>①－③ | ⑦<br>家族労働報酬<br>①－④ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 216,035 | 245,253 | 220,539 | 200,127 | 204,631 | 84,714 | 45,126 | 40,622 |
| 2 | 212,696 | 249,625 | 216,111 | 199,224 | 202,639 | 33,514 | 50,401 | 46,986 |
| 3 | 240,813 | 237,873 | 247,191 | 224,232 | 230,610 | △ 9,318 | 13,641 | 7,263 |
| 4 | 210,472 | 242,070 | 212,244 | 197,062 | 198,834 | 29,826 | 45,108 | 42,236 |
| 5 | 219,793 | 241,762 | 223,074 | 207,200 | 210,481 | 18,688 | 34,562 | 31,281 |
| 6 | 197,622 | 253,393 | 202,238 | 188,791 | 193,407 | 51,155 | 64,602 | 59,986 |
| 7 | 203,272 | 260,968 | 205,204 | 196,034 | 197,966 | 55,764 | 64,934 | 63,002 |
| 8 | 225,816 | 245,550 | 233,602 | 212,642 | 220,428 | 11,948 | 32,908 | 25,122 |
| 9 | 190,938 | 238,581 | 194,815 | 174,353 | 178,230 | 43,766 | 64,228 | 60,351 |
| 10 | 213,175 | 240,905 | 218,719 | 207,373 | 212,917 | 22,186 | 33,532 | 27,988 |
| 11 | 187,235 | 226,754 | 190,097 | 177,527 | 180,389 | 36,657 | 49,227 | 46,365 |
| 12 | 216,494 | 244,403 | 224,282 | 200,259 | 208,047 | 20,121 | 44,144 | 36,356 |
| 平均 | 211,197 | 243,928 | 215,676 | 198,731 | 203,215 | 28,252 | 45,193 | 40,630 |
| 平成元年全国平均 | 220,230 | 251,116 | | | | | 45,840 | 41,580 |

© The Ito Foundation

表 2-1　稚内市営樺岡牧場における肉用一代雑種飼育の概要（昭63，平成元）

| 年次 | 項目 | A×D初生牛[1] | | A×D素牛 | | B×D初生牛[2] | | B×D素牛 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | オス | メス | オス | メス | オス | メス | オス | メス |
| 昭63 | 頭数 | 47 | 41 | 26 | 26 | | | | |
| | 体重，kg | 48 | 45 | 245 | 230 | | | | |
| | 価格，円／頭 | 128,623 | 110,952 | 204,474 | 198,787 | | | | |
| | 体重1kg当たり価格，円／kg | 2,680 | 2,466 | 835 | 864 | | | | |
| 平成元 | 頭数 | 27 | 26 | 13 | 20 | 15 | 8 | 14 | 28 |
| | 体重，kg | 46 | 48 | 286 | 302 | 40 | 39 | 283 | 277 |
| | 価格，円／頭 | 142,768 | 143,712 | 266,366 | 278,951 | 129,378 | 126,037 | 317,858 | 311,501 |
| | 体重1kg当たり価格，円／kg | 3,104 | 2,994 | 931 | 924 | 3,234 | 3,232 | 1,123 | 1,125 |

備考．　1）Aはアバーデン　アンガス種，Dはホルスタイン種
　　2）Bは黒毛和種，Dはホルスタイン種

表 2-2　哺育・育成期（肥育素牛まで）における給与飼料量（kg）と飼料費（円）

| 性 | 給与期間（日） | 増体重（kg） | 給与飼料量（kg） | | | | 飼料費（円／頭） | 1kg増体に要する飼料費（円） | 1日当たり飼料費（円／日） |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 代用乳 | カーフスターター | グロア | 乾草 | | | |
| オス | 180 | 186 | 11.2 | 99.7 | 405 | 211.2 | 36,735 | 198 | 204 |
| メス | 180 | 132 | 11.2 | 89.5 | 315 | 196.6 | 31,409 | 238 | 174 |

与は慣行方式によるが，オスはメスよりも増体重が大きいので飼料摂取量も多い。1kg増体に要する飼料費も1日当たり飼料費も比較的安い。

（2）　農事組合法人北斗牧場（**表3**）

第2次世界大戦終了後の昭和22年に現在地に入植し，現在12戸の組合員で組織する酪農経営の法人である。現在ホルスタイン種の経産牛200頭，育成牛100頭を飼養し，総産乳量1,300tを生産し，雄子牛を哺育・育成・肥育の一貫経営で行っている。乳用雄肥育牛は昭和56年より飼育し始め，平成元年の肉用牛「ぬれ子」の飼育頭数は当牧場産84頭と市場から購入の233頭，計317頭である。この牧場の哺育はカウハッチ，育成は群飼育で行う。死廃頭数は27頭（死亡16頭，とう汰11頭），その率は8.51％でやや高い。哺育期の飼料は初乳と生乳，離乳期にカーフスターター（細切牧草混合）

表 3　農事法人北斗牧場の哺育・育成期における給与飼料量（kg/180日）と飼料費（円）

| 項目 | 初乳生乳 | カーフスターター | グロア | 計 |
|---|---|---|---|---|
| 給与量（$l$ またはkg） | 90 | 270 | 630 | |
| 単価（円／$l$，kg） | 50 | 61.85 | 41 | |
| 金額（円） | 4,500 | 16,700 | 25,830 | 47,030 |

備考　1）イーストカルチュアも若干与えている。
　　2）カーフスターターには細切乾草も少し含まれている。
　　3）哺育・育成期間は180日，この間の増体重は182kg，DGは約1kg，1日当たり飼料費は261円，1kg増体に要する飼料費は258円である。

© The Ito Foundation

とイーストカルチュア，肥育期にグロアを与えているが，期間中のDGは約1kgであり，死廃率がやや高いことが一つの問題点である。なお18ヵ月齢の平均体重は720kg，販売価格は生体重1kg当たり680円であるから489,600円/頭となる。

3.3　肉牛用飼料としての麦類（飼料大麦，ライ麦，ライ小麦，エン麦等）の栽培とその飼料価値（表4）

今回の研究では肉用牛飼料，特に離乳飼料・育成飼料の配合原料としての麦類の効率的飼料価値（収量等の作物学的特性，飼料成分・嗜好性・消化性等の畜産学的特性，価格等の経済性）を明らかにするため外国等より導入した飼料大麦，ライ麦，エン麦等の若干品種の栽培を行い，飼料成分を分析し，カーフスターターまたはグロア等の配合原料としての可能性について調査研究した。表4に示すように各麦類ともよく生育して適応性があり，特に飼料大麦では6条粒のものが2条粒のものに比し収量も高く，ライ小麦・エン麦等もそれぞれ肉用牛飼料として評価できるものであるこ

表4 肉用牛飼料源としての麦類（穀実）の乾物牧量と飼料成分

| 種類 | 品種 | 導入先 | 乾物牧量（kg/10a） | | | 飼料成分（乾物中%） | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 稈 | 穀実 | 計 | DM | CP | DCP | CF | NFE | CFi | ADF | TDN |
| 飼料大麦 | あまぎ2条 | 九州 | 520 | 300 | 820 | 86.6 | 8.0 | 6.4 | 2.2 | 69.0 | 4.9 | 5.8 | 76.6 |
| | ニシキノアキラ | 同上 | 510 | 330 | 840 | 86.8 | 9.0 | 7.1 | 2.1 | 68.6 | 4.6 | 5.6 | 76.7 |
| | ダイセンゴールド | 同上 | 510 | 320 | 830 | 87.2 | 8.4 | 6.6 | 2.0 | 69.6 | 4.8 | 5.7 | 76.9 |
| | リパ | スウェーデン | 500 | 340 | 840 | 86.2 | 10.0 | 8.0 | 2.0 | 67.6 | 4.5 | 5.5 | 76.2 |
| | カリン | 同上 | 580 | 350 | 930 | 87.0 | 12.0 | 9.4 | 2.0 | 65.8 | 4.4 | 5.5 | 76.0 |
| | ハートランド | カナダ | 810 | 550 | 1,360 | 87.7 | 10.4 | 8.2 | 2.1 | 68.2 | 4.7 | | 77.3 |
| | レダック | 同上 | 730 | 470 | 1,200 | 87.5 | 9.9 | 7.8 | 2.2 | 68.6 | 4.7 | | 77.5 |
| | ジョンストン | 同上 | 800 | 540 | 1,340 | 87.7 | 10.1 | 8.0 | 2.2 | 68.9 | 4.2 | | 77.9 |
| | ボナンザ | 同上 | 800 | 520 | 1,320 | 87.7 | 11.3 | 8.9 | 2.1 | 67.8 | 4.1 | | 77.4 |
| ライ小麦 | ウイントリー | カナダ | 950 | 450 | 1,400 | 87.2 | 9.5 | 7.6 | 1.8 | 71.3 | 2.7 | | 72.9 |
| | ワピィティ | 同上 | 1,200 | 560 | 1,760 | 87.0 | 13.0 | 10.4 | 1.4 | 67.9 | 2.3 | 3.3 | 72.2 |
| | SV 846021 | スウェーデン | 1,020 | 460 | 1,480 | 86.3 | 11.9 | 9.5 | 2.5 | 68.9 | 2.5 | 3.7 | 70.6 |
| | SV 856003 | 同上 | 1,000 | 460 | 1,460 | 86.2 | 12.5 | 10.0 | 1.4 | 67.9 | 2.4 | 3.5 | 71.7 |
| | SV 8006 | 同上 | 960 | 450 | 1,410 | 85.7 | 12.7 | 10.2 | 1.6 | 67.3 | 2.2 | 3.3 | 71.5 |
| ライ麦 | ライドル | アメリカ | 1,400 | 500 | 1,900 | 87.0 | 13.1 | 9.9 | 2.2 | 66.4 | 2.7 | | 67.0 |
| エン麦 | ティタス | スウェーデン | 900 | 500 | 1,400 | 86.8 | 9.1 | 7.1 | 5.5 | 59.4 | 10.2 | 12.9 | 70.0 |
| | サング | 同上 | 1,200 | 580 | 1,780 | 86.6 | 10.7 | 8.4 | 4.9 | 58.6 | 9.8 | 11.8 | 70.3 |
| | SV 80395 | 同上 | 1,100 | 560 | 1,660 | 86.8 | 9.4 | 7.4 | 4.3 | 60.9 | 9.6 | 11.7 | 68.8 |

© The Ito Foundation

とを確認できた。飼料成分についてはタンパク質，熱量などにおいて離乳飼料・育成飼料として望ましい栄養組成のものであると考えられる。今後の日本における肉用牛飼料源としては離乳飼料でも育成飼料でも未だ充分に利用されてないデハイ，ライ小麦[5,6]等の利用価値が高まってくるものと期待される。飼料大麦については，さきに報告したように[2]肉用牛飼料としての価値は高いが，今回はカナダ産，スウェーデン産の6品種と本州産の3品種を試作したものを比較したところ飼料大麦で高い収量を期待でき，日本でも今後の肉用牛飼料資源としての可能性の大きなことを実証できた。

3.4 離乳飼料・育成飼料としてのデハイ・麦類(穀実の圧扁が加工)等の配合による調製

通常，「ぬれ子」の哺育期から育成期に移行する際に給与されるのが離乳飼料（カーフスターター）である。諸外国においても日本においてもいろいろな離乳飼料が製造販売されている。今回の離乳飼料の原料は，1. 嗜好性の高いものとして廃糖蜜，2. エネルギー源として圧扁麦類，トウモロコシ，動物性油脂，3. タンパク源として大豆ミール，尿素，4. ミネラル・ビタミン源としてデハイ[7]（タンパク源，線維源にもなる），プレミックス等を用いて調製した。この調製離乳飼料を離乳子牛に給与したところ嗜好性があって消化もよく，養分的にバランスの取れたものであることを実証できた。

## 4. 要 約

今回の研究は乳用雄子牛を肥育素牛に飼育するまでの哺育・育成期間（生後の約6ヵ月）における生産コストと肉用牛飼料としての麦類の栽培と飼料価値，特に離乳飼料の調製等に関して実施したが，結果について要約するとつぎの如くである。

(1) 生産費調査は北海道における12戸の乳用雄子牛飼育農家について行ったが，経営は水田・肉牛複合が6戸，畑・肉牛複合が，5戸，肉専が1戸である。年間の1戸当たり飼育頭数は194頭，就業者数は2.6人，1人当たり飼育頭数は75頭の規模である。

(2) 費用のもっとも多いのは素畜費の131，897円（導入初生子牛の平均体重は54kgであるからkg当たり2,443円となる）で，全費用の62.7％を占め，ついで飼料費の51,098円で24.2％となっている。両者を合計して全費用の86.9％を占めている。農家間の差異も大きい。育成期間177日間の増体重220kg，DGは1.24kg，死廃頭数率は7.02％，1日当たり飼料費は311円となっている。所得は平均して45,193円/頭である。

(3) 飼料麦類の飼料大麦，ライ麦，ライ小麦，エン麦等4種類，18品種の種子を外国と九州から導入して試作を行い肉牛用飼料としての可能性について検討した。特にカナダ産飼料大麦，スウエーデン産ライ小麦等の品種の中には肉牛用飼料として適応性があり，栄養組成もよく，嗜好性，消化性も大きいものがあることを実証できた。

(4) 離乳飼料または育成飼料を調製するため各種の麦類，デハイなどを原料として用いて配合し，嗜好性，飼料成分等の分析を行い，低コストで栄養組成のバランスのとれたものを調製できた。特にデハイのもつ栄養的意義を高く評価したいと考える。

今回の研究は良質牛肉を低コストで生産する理論と実際について究明するために実施したものであるが，なお多くの解決すべき問題点も提起される。これらについては今後の研究に期待したい。

## 文 献

1) 大原久友：牛肉の低コスト生産および肉質向上に

© The Ito Foundation

関する実証的研究，昭和59年度食肉に関する助成研究調査成果報告書 Vol. 3, 40-52, 財団法人伊藤記念財団，昭59
2) 大原久友：肉用牛の品種および環境要因が牛肉生産費および枝肉格付に及ぼす影響，昭和60年度食肉に関する助成研究調査成果報告書 Vol. 4, 90～101, 財団法人伊藤記念財団，昭60
3) 大原久友：肉用牛の品種および環境要因が牛肉生産費および枝肉格付に及ぼす影響，昭和61年度食肉に関する助成研究調査成果報告書 Vol. 5, 17～191, 財団法人伊藤記念財団，昭61
4) 大原久友：肉用飼育素牛の哺育・育成における損耗防止と飼養コスト低減，昭和63年度食肉に関する助成研究調査成果報告書 Vol. 7, 148～157, 財団法人伊藤記念財団，昭63
5) Wright, K.L., et al: Evaluation of white Lupines and Triticale in Calf Starter Diets. J. Dairy Sci., Vol. 72, No. 4, 1002-1011, 1989,
6) Radcliffe, B.C., et al: Nutritional evaluation of triticale grain as an animal feed., Aust. L. Exp. Agric. Anim. Husb. 23 419, 1983
7) Christensen, D.A., et al: Alfalfa Cubes for Growing Heifers. Greenbrae Dairy Herd Report 1990, 1-108, Dep't of Animal & Poultry Science, Univ. of Saskatchewan, 1990

© The Ito Foundation

# 牛枝肉の規格格付に関する研究

## Studies on the Beef Carcass Grading System

並河 澄・*原田 宏・*福原 利一・**三谷 克之輔・***岡山 高秀
(全国和牛登録協会, *宮崎大学農学部, **広島大学生物生産学部, ***神戸大学農学部)

Kiyoshi Namikawa, *Hiroshi Harada, *Riichi Fukuhara, **Katsunosuke Mitani and ***Takahide Okayama
(Wagyu Registry Association, *Faculty of Agriculture, Miyazaki University, **Faculty of Applied Biological Science,Hiroshima University and ***Faculty of Agriculture, Kobe University)

1. Early prediction of carcass traits on live fat animals must be a useful mean for their sire selection and on the other hand for the decition of their feeding programs and marketing chance.

In this experiment, serial ultrasound measurement records on subcutaneous fat thickness, intermuscular fat thickness, rib-eye area and the degree of marbling at 6th-7th rib section on 215 steers, included in 15 sets of the progeny testing program in Miyazaki and Kagoshima Testing Stations, were used for multiple regression analyses on these real carcass measurements after slaughtering.

Progressive developmental features of carcass traits were characterized each other. Rib-eye area showed a rapid and linear developing pattern at the early and middle stages of the fattening period, while subcutaneous fat thickness at *latissimus dorsi* section, as well as intermuscular fat thickness, tended to have a developmental impetus after middle stage of fattening. The degree of marbling showed a steady increase according to the progress of the fattening period.

It was confirmed by the multiple regression analyses, that the rib-eye area at slaughtering could be estimated by equations including ultrasound estimates, and some body measurements, which obtained after 6 months of the fattening period, at 73.6-87.6% of the coefficient of determination. The subcutaneous fat thickness measured on carcass rib section was estimated by similar regression equations at 62.1-65.1% level of $R^2$ after 8 months of fattening period. The intermuscular fat thickness at slaughtering seemed to have some difficulties, showing low level of $R^2$, such as 24.3-46.9%, in any equations, in which ultrasound estimates obtained at any stage of the fattening period were used as an independent variable. The estimated degree of marbling reached to 52.5-64.8% of $R^2$ level after 8 months of the fattening period.

2. It is an unavoidable problem at the chilling room of carcass markets, to take a picture of ribbed surface of carcasses by oblique camera angle, because wide opening of ribbed section is restricted by ususl treatment and handling of carcasses. This restriction has obstructed the development of accurate measurement of rib-eye area and the evaluatoion of the degree of marbling in it by photographic and electronic procedures.

In this experiment, an electronic steel camera, introduced in the previous report, was used with a hood to get a constant distance and the middleline of the camera lens was fixed at 40° to the ribbed surface, when information on the image inputed in 2 inch video floppy. In order to correct the distorted image information

© The Ito Foundation

on rib-eye area, a multiple regression equation was successfully designed by using vertical and horizontal axes and 1㎠ grid units on digital image. Accurate total rib-eye areas were obtained by this correction procedure on 6 steer carcasses, comparing with those measurements on images by right angle and real measurement on carcasses.

3. There is no reliable objective measurement to standardize the evaluation on meat firmness and texture of beef carcass at present.

In this experimental field, apparent elasticity of beef measured by a Creep Meter RE-3305 has been taken up as a possible indicator of firmness and/or texture. The apparent elasticity may relate also with raw meat tenderness. Although further data on this physical characteristics were needed to make sure the relationship with meat quality traits, some additional data in this year on 6 kinds of muscles of 2 steers cross-bred between Japanese Black and Holstein were presented in this report.

# Ⅰ．緒　言

牛枝肉からの yield および肉質を構成する各要素について，電子機器による測定を実用化し，その結果に基づいて適正な格付ならびに価格形成を行おうとする気運が高まりつつある。最近この分野での国際会議が各国で計画されてきている。さらに，このような客観的評価を生体の段階で早期に実施することによって改良面での効果を狙う研究や生産の合理化に役立てようとする研究活動も展開されている。

本研究は，わが国の牛肉評価においてとくに重要な価格決定要素となる肉質形質について客観的評価できる手法の開発に重点を置きながら，新たな概念として枝肉規格に導入された正肉歩留の間接指標である「推定歩留」に関与している枝肉測定値について，生体および枝肉段階で迅速かつ正確に測定する手法の開発をも検討するために実施してきたものである。

今年度の検討課題は次の3点である。

1. 肥育牛の生体で経時的に超音波法によって推定した皮下脂肪厚，筋間脂肪厚，バラの厚さ，胸最長筋横断面積（ロース芯面積）および脂肪交雑程度などから枝肉でのこれら実測値の推定方法の検討
2. 電子スチルカメラを用いて枝肉切開面における胸最長筋横断面積および脂肪交雑程度の測定の際に生じるカメラアングルによる歪みの修正方法の検討
3. 客観的評価方法の確立していない「肉の締まりおよびきめ」に関する指標としての弾性率の有効性の検討

これらはいずれも昭和61年度以来の助成研究調査成果をふまえての計画であり，研究の経過については各年度の報告書を参照されたい。

© The Ito Foundation

# II．肉用種肥育牛の産肉形質早期推定法確立に関する研究

Studies on Early Predicting Carcass Traits of Fattening Beef Cattle by Use of Ultasound

原田　宏・福原　利一・並河　澄

## 1．目　的

種雄牛の遺伝的産肉能力を把握し，かつ選抜する手段として，産肉能力検定直接法および産肉能力検定間接法が実施されており，肉用牛の産肉能力を改良するうえで，種雄牛が大きな役割をもっていることは，従来統計遺伝学的研究の結果として報告[1~4]されている。一方，原田ら[5]は，超音波利用による肉用牛の肥育終了後の産肉形質を高い精度で早期に予測可能であると報告している。超音波を利用することによって，肥育期間中の産肉形質の経時的変化を生体でとらえることができれば，種雄牛の選抜に極めて有効であると考えられる。また，肥育の早期に終了後の産肉形質を予測することができれば，出荷時期を正確に予測することができ，その後の飼養管理等における経済的損失を低減させることにつながると考えられる。そこで，間接検定調査牛に超音波を利用し，その推定値から検定期間中の産肉形質の経時的変化，および検定の早い時期に超音波推定値から検定終了後の実測値を予測する精度を検討した。

## 2．材料および方法

本研究には，宮崎家畜改良事業団および鹿児島県畜産試験場において，1988年から1889年にかけて間接検定に供用された，宮崎県10セット，鹿児島県15セット，計215頭の調査牛を用いた。調査項目は，第7胸椎部の皮下脂肪厚（以後僧帽筋部をFT-Ⅰ，広背筋部をFT-Ⅱとする），筋間脂肪厚（以後僧帽筋部をIMFT-Ⅰ，広背筋部をIMFT-Ⅱとする），バラの厚さ（以後バラ厚とする），胸最長筋横断面積（以後7-REAとする），脂肪交雑と第13胸椎部の胸最長筋横断面積（以後13-REAとする）である。なお，測定には，電子走査方式の超音波診断装置スーパーアイ・MEAT（富士平工業K．K）を用い，探触子は2MHzのリニアモデル（27×147mm）を使用し，牛生体の左側第7および第13胸椎部を検定開始後2ヵ月から終了まで2ヵ月ごと経時的に測定した。得られたデータから，超音波推定時の産肉形質推定値と体測定値を独立変数としてStep-wiseの重回帰分析[6]を行い，肥育終了後の産肉形質の早期予測の際の精度について検討した。

## 3．結果および考察

### 3.1　産肉形質の経時的変化

調査項目の内7-REA，FT-Ⅱ，IMFT-Ⅱおよび脂肪交雑の超音波推定値の経時的変化は，**表1**に示すとおりである。

7-REAの検定開始後2ヵ月（25.3±4.3㎠）から4ヵ月（29.9±4.0㎠）までの平均増加量は，4.8±3.0㎠で，同4ヵ月から8ヵ月（39.5±4.2㎠）までの平均増加量は，9.6±3.1㎠であった。また同8ヵ月から12ヵ月（47.6±4.6㎠）の平均増加量は8.1±2.8㎠と同2～4ヵ月および，4～8ヵ月増加量に比べて小さくなる傾向が認められた。

FT-Ⅱの検定開始後2ヵ月（12.1±2.3mm）から4ヵ月（14.3±2.8mm）までの平均増加量は，2.1

© The Ito Foundation

表1　検定開始後月数における超音波推定値の基本統計量

| | 2ヵ月 | | 4ヵ月 | | 6ヵ月 | | 8ヵ月 | | 10ヵ月 | | 12ヵ月 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 産肉形質 | Mean | S.D. | Mean | S.D. | Mean | S.D. | Mean | S.D. | Mean | S.D. | Mean | S.D. |
| 7-REA | 25.3 | 4.3 | 29.9 | 4.0 | 35.2 | 4.3 | 39.5 | 4.2 | 43.6 | 4.2 | 47.6 | 4.6 |
| FT-II | 12.1 | 2.3 | 14.3 | 2.8 | 16.8 | 3.5 | 19.2 | 3.7 | 21.5 | 4.1 | 23.6 | 4.4 |
| IMFT-II | 13.6 | 4.6 | 17.2 | 5.0 | 23.2 | 6.4 | 29.7 | 7.3 | 35.6 | 8.5 | 41.5 | 9.7 |
| 脂肪交雑 | 0.40 | 0.43 | 0.69 | 0.55 | 1.19 | 0.64 | 1.52 | 0.66 | 1.92 | 0.70 | 2.18 | 0.79 |

7-REA：第7胸椎部胸最長筋面積（㎠），FT-II：皮下脂肪厚（㎜），IMFT-II：筋間脂肪厚（㎜），脂肪交雑（BMS値）

±1.5㎜で，同4ヵ月から8ヵ月（19.2±3.7㎜）までの平均増加量は，4.9±2.3㎜と同2～4ヵ月の増加量に比べ大きかった。また，同8ヵ月から12ヵ月（21.5±4.1㎜）までの平均増加量は，4.3±2.8㎜と同4～8ヵ月と比べると小さくなり若干増加量が停滞する傾向が認められた。

IMFT-IIの検討開始後2ヵ月（13.6±4.6㎜）から4ヵ月（17.2±5.0㎜）までの平均増加量は，3.8±2.3㎜で，同4ヵ月から8ヵ月（29.7±7.3㎜）までの平均増加量は，12.5±5.9㎜と大きかった。また，同8ヵ月から12ヵ月（41.5±9.7㎜）までの平均増加量は，11.9±6.2㎜と同4～8ヵ月の増加量とほぼ同程度の増加を示す傾向が認められた。

脂肪交雑の検定開始後2ヵ月（0.40±0.43）から4ヵ月（0.69±0.55）までの平均増加量は，0.30±0.35と小さく，同4ヵ月から8ヵ月（1.52±0.66）までの平均増加量は，0.85±0.46，また，同8ヵ月から12ヵ月（2.18±0.79）までの平均増加量は，0.67±0.48と比較的大きな増加量を示すことが認められた。すなわち，筋肉内への交雑脂肪は，検定前期（2～4ヵ月）では，ほとんど認められず，検定中期には急速に増加することが認められ，検定後期（8～12ヵ月）に次第に増加速度が低下すると考察された。原田ら[7~9]は黒毛和種種雄牛および種雄牛候補牛について16ヵ月から22～23ヵ月齢まで著しく増加し以後徐々に増加割合は減少すると報告しており，本試験の場合とよく一致していた。

3.2　検定終了後の産肉形質の早期予測

検定終了後に得られた7-REA，FT-II，IMFT-IIおよび脂肪交雑の枝体実測値を従属変数とし，検定開始後2ヵ月ごとの産肉形質推定値および超音波測定時に得られた体測定値を独立変数として，予測の精度を検定した。

（1）　第7胸椎部胸最長筋横断面積　検定終了後の7-REA実測値を予測するための重回帰分析結果は，**表2**に示すとおりである。7-REAの超音波推定値は，検定開始後いずれの時期においても最も高い標準偏回帰係数で取り上げられることが認められた。また，13-REAはいずれの時期においても正で，FT-IIは検定開始後8ヵ月を除く全ての時期について負で，それぞれ比較的高い標準偏回帰係数で取り上げられ，これらの超音波推定値は，7-REA実測値の予測には重要な要因であると考えられた。その他，体測定値では，坐骨幅および臍幅が，それぞれ正で取り上げられた。

検定開始後6ヵ月での寄与率は73.6%と同2ヵ月（57.1%）および4ヵ月（65.9%）に比べ高い値であった。また，同8ヵ月の寄与率は73.9%と同6ヵ月と同程度の値であった。なお，検定開始後10ヵ月および12ヵ月の寄与率は，77.0%および87.9%と同12ヵ月で90%近くの値になるものの検定開始後10ヵ月では，同6ヵ月とほぼ同程度の値であった。検定開始後6ヵ月以降における，7-REAの超音波推定値の標準偏回帰係数は，0.6654

© The Ito Foundation

表2　第7胸椎部胸最長筋横断面積予測に関する重回帰分析結果

| 検定開始後月数 | 独立変数 標準偏回帰係数 | | | | 寄与率 (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| 2 | 7-REA | 13-REA | FT-II | FT-I | |
| | 0.5168 | 0.3573 | −0.1566 | −0.1526 | 57.1 |
| 4 | 7-REA | 13-REA | FT-II | バラ厚 | |
| | 0.5648 | 0.2955 | −0.2551 | 0.1638 | 65.9 |
| 6 | 7-REA | FT-II | 13-REA | 坐骨幅 | |
| | 0.6654 | −0.2649 | 0.2461 | 0.1300 | 73.6 |
| 8 | 7-REA | 13-REA | IMFT-II | 脂肪交雑 | |
| | 0.7025 | 0.2604 | −0.1827 | 0.0893 | 73.9 |
| 10 | 7-REA | 13-REA | FT-II | 臍幅 | |
| | 0.6689 | 0.2395 | −0.1840 | 0.1449 | 77.0 |
| 12 | 7-REA | 13-REA | FT-II | 脂肪交雑 | |
| | 0.7576 | 0.2175 | −0.0811 | 0.0773 | 87.6 |

体測定値以外はすべて超音波推定値，7,13-REA：胸最長筋面積（第7，13胸椎部），IMFT-II：腸肋筋上筋間脂肪厚
FT-I，II：皮下脂肪厚（I：僧帽筋部，II：広背筋部）

表3　広背筋部皮下脂肪厚予測に関する重回帰分析結果

| 検定開始後月数 | 独立変数 標準偏回帰係数 | | | | 寄与率 (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| 2 | FT-II | 坐骨幅 | FT-I | 脂肪交雑 | |
| | 0.2987 | 0.2623 | 0.2166 | −0.1230 | 29.9 |
| 4 | FT-II | FT-I | 尻長 | 脂肪交雑 | |
| | 0.3957 | 0.2305 | 0.2014 | −0.1395 | 40.3 |
| 6 | FT-II | 尻長 | FT-I | IMFT-I | |
| | 0.4618 | 0.2026 | 0.1849 | 0.0995 | 50.5 |
| 8 | FT-II | 尻長 | FT-I | 7-REA | |
| | 0.5155 | 0.2883 | 0.2163 | −0.1093 | 62.2 |
| 10 | FT-II | FT-I | 尻長 | 7-REA | |
| | 0.5506 | 0.2644 | 0.1898 | −0.1551 | 65.1 |
| 12 | FT-II | FT-I | 脂肪交雑 | 胸幅 | |
| | 0.5292 | 0.2706 | −0.1689 | 0.1211 | 64.0 |

体測定値以外はすべて超音波推定値，137 REA：第7椎部胸最長筋面積，IMFT-I：胸最長筋上筋間脂肪厚　FT-I，II：皮下脂肪厚（I：僧帽筋部，II：広背筋部）

～0.7576と他に比べかなり高く，7-REA超音波推定値のみでも比較的高い精度で体実測値を予測できると考えられた。

（2）広背筋部皮下脂肪厚　検定終了後のFT-II実測値を予測するための重回帰分析結果は，**表3**に示すとおりである。FT-IIの超音波推定値は，検定開始後いずれの時期においても7-REAと同様最も高い標準偏回帰係数で取り上げられることが認められた。また，FT-Iも検定開始後いずれの時期においても比較的高い正の標準偏回帰係数で取り上げられた。体測定値では，尻長が検定開始後12ヵ月を除く全ての時期において比較的高い正の標準偏回帰係数で取り上げられた。検定開始後6ヵ月での寄与率は50.5%と同4ヵ月(40.3%)

© The Ito Foundation

に比べ10%以上高くなることが認められた。また，検定開始後８ヵ月では，62.2%とかなり高い値を示した。検定終了時に近い検定開始後10ヵ月および12ヵ月の寄与率は，それぞれ65.1%および64.0%と検定開始後８ヵ月とほぼ同程度の値であった。すなわち，検定開始後８ヵ月にはかなり高い精度で終了後の広背筋部皮下脂肪を予測できることが認められた。

（３） 腸肋筋上筋間脂肪厚　検定終了後のIMFT-Ⅱ実測値を予測するための重回帰分析結果は，**表4**に示すとおりである。IMFT-Ⅱの超音波推定値は，いずれの時期においても取り上げられたものの，他の独立変数に比較して必ずしも高い標準偏回帰係数ではなかった。これに対し，胸囲は検定開始後12ヵ月を除く全ての時期において正で取り上げられた。また，体高が検定開始後４ヵ月，８ヵ月および10ヵ月で，体長が同２ヵ月で，それぞれ比較的高い負の標準偏回帰係数で取り上げられた。検定開始後６ヵ月までの寄与率は若干低い値であったが，同８ヵ月では，43.7%となり，以後検定開始後10ヵ月（46.0%）および12ヵ月（44.4%）の寄与率と同程度となった。これらのように筋間脂肪厚の予測の精度は，他の形質に比較して低かったが，これは，と殺後の枝肉のけん垂や冷蔵による変化が大きいことによるものではないかと推察された。

（４） 脂肪交雑　検定終了後の脂肪交雑を予測するための重回帰分析結果は，**表5**に示すとおりである。脂肪交雑の超音波推定値は，検定開始後２ヵ月では取り上げられていないものの，同４ヵ月以降はいずれの時期においてもとりあげられ，同８ヵ月以降は他に比べかなり高い標準偏回帰係数を示した。また，検定開始後いずれの時期においても坐骨幅，腰角幅および尻長等後軀の幅が比較的高い負の標準偏回帰係数で取り上げられ，胸囲および胸深が検定前期から中期において比較的高い正の標準偏回帰係数で取り上げられた。これらに関して，同様の試験を行った原田ら[5]は，検定開始後２～８ヵ月までは胸囲が高い標準偏回帰係数で取り上げられたと報告している。検定開始後６ヵ月では，寄与率は38.8%と同４ヵ月よりは高くなったものの低い値であった。また，検定開始後８ヵ月では，52.5%と検定開始後６ヵ月よりかなり高い値を示し，この時期には，比較的高い

**表4**　腸肋筋上筋間脂肪厚予測に関する重回帰分析結果

| 検定開始後月数 | 独立変数 標準偏回帰係数 | | | | 寄与率 (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| 2 | 体長 | 腕幅 | IMFT-II | 胸囲 | |
| | −0.5569 | 0.5116 | 0.3183 | 0.1919 | 24.3 |
| 4 | 胸囲 | 体高 | IMFT-II | 脂肪交雑 | |
| | 0.4953 | −0.2726 | 0.2683 | 0.1622 | 34.2 |
| 6 | IMFT-II | 脂肪交雑 | 胸囲 | IMFT-I | |
| | 0.3217 | 0.2882 | 0.2626 | 0.1683 | 30.5 |
| 8 | 胸囲 | IMFT-II | 体高 | 脂肪交雑 | |
| | 0.5620 | 0.2523 | −0.2502 | 0.1464 | 43.7 |
| 10 | 胸囲 | IMFT-II | 体高 | 脂肪交雑 | |
| | 0.5240 | 0.3115 | −0.2490 | 0.1944 | 46.9 |
| 12 | IMFT-II | 脂肪交雑 | FT-I | 体重 | |
| | 0.3480 | 0.2780 | 0.2473 | 0.2319 | 44.4 |

体測定値以外はすべて超音波推定値，IMFT-I，II：筋間脂肪厚（I：胸最長筋上，II腸肋筋上），FT-I：僧帽筋部皮下脂肪厚

© The Ito Foundation

表5　脂肪交雑予測に関する重回帰分析結果

| 検定開始後月数 | 独立変数 標準偏回帰係数 | | | | 寄与率(%) |
|---|---|---|---|---|---|
| 2 | 胸囲 | 尻長 | FT-I | 坐骨幅 | |
| | 0.5760 | −0.3533 | −0.2207 | −0.1871 | 24.5 |
| 4 | 坐骨幅 | 胸深 | 脂肪交雑 | FT-I | |
| | −0.5742 | 0.4590 | 0.3983 | −0.1774 | 34.1 |
| 6 | 坐骨幅 | 胸深 | 脂肪交雑 | FT-I | |
| | −0.4829 | 0.4558 | 0.2841 | 0.1719 | 38.8 |
| 8 | 脂肪交雑 | 坐骨幅 | バラ厚 | 体高 | |
| | 0.6244 | −0.3060 | 0.1526 | 0.1176 | 52.5 |
| 10 | 脂肪交雑 | 坐骨幅 | 体高 | バラ厚 | |
| | 0.7215 | −0.2276 | 0.1627 | 0.1083 | 62.7 |
| 12 | 脂肪交雑 | 腰角幅 | 体高 | 胸囲 | |
| | 0.7634 | −0.2264 | 0.1653 | 0.0921 | 64.5 |

体測定値以外はすべて超音波推定値，FT-I：僧帽筋部皮下脂肪厚

精度で検定終了後の脂肪交雑を予測できることが認められた。

以上のように，推定の精度に違いがあるものの，いずれの産肉形質においても，超音波推定値と体測定値を独立変数とする重回帰式により，検定開始6ヵ月ないし8ヵ月ころには，比較的高い精度で検定終了後の実測値を予測できることが認められた。

## 4. 要　約

肉用種肥育牛の産肉形質を生体のまま推定することができれば，種雄牛選抜手段として利用でき，また，肥育牛の肥育終了後の産肉形質を早期に予測でき出荷時期を決定する上で極めて有効である。そこで，宮崎および鹿児島において，産肉能力検定間接法調査牛の検定期間中における産肉形質の経時的変化について検討した。さらに，検定終了後の産肉形質の早期予測の可能性について検討した。

産肉形質の経時的変化について，7-REAは検定期間前期および中期で直線的に最も盛んに発育し，その後次第に発育速度は低下して推移することが認められた。FT-Ⅱは，検定前期の発育に比べ，検定中期から後期にかけて発育速度はかなり高くなり，その後ゆるやかにそれぞれの個体の成熟値に近づいて行くことが認められた。IMFT-Ⅱの検定中期から後期にかけて発育速度はあまり低下しなかった。脂肪交雑については，検定中期に急速に増加することが認められた。

重回帰分析の結果，検定終了後の7-REAは，検定開始後6ヵ月以降では73.6%～87.6%とかなり高い寄与率で検定終了後の実測値を予測できることが確かめられた。なお，検定開始後6ヵ月以降になると7-REAの超音波推定値のみを独立変数としても，63.9%～84.0%のかなり高い寄与率で予測できることが認められた。検定終了後のFT-Ⅱについては，検定開始後8ヵ月以降は62.1%～65.1%と高くなることが認められた。検定終了後のIMFT-Ⅱについては，いずれの時期においても寄与率は，24.3%～46.9%と他の産肉形質に対し低い値であった。脂肪交雑の予測については，検定開始後8ヵ月以降は52.5%～64.8%と比較的高くなった。

### 文　献

1) 松川　正：東北農試報告，45，117-170，1973.
2) 熊崎一雄・原田　宏，日畜会報，49，486-493，1978.

© The Ito Foundation

3) 熊崎一雄・福原利一・原田　宏，宮大農報，27，99-742，1980.
4) 楊　茂成・向井文雄・佐々木義之，日畜会報，56，193-198，1985.
5) 原田　宏，宮大農報，29，1～65，1982.
6) Draper, N. and Smith, H., "Applied Regression Analysis" lst ed., 163-216, Wiley Interscience, N. Y., 1966.
7) 原田　宏・守屋和幸，昭和58年度食肉に関する助成研究調査成果報告書　2，29-36，1984.
8) 原田　宏・守屋和幸・福原利一，昭和59年度食肉に関する助成研究調査成果報告書　3，53-59，1985.
9) 原田　宏・守屋和幸・福原利一，日畜会報，56，250-256，1985.

# Ⅲ．電子スチルカメラを利用した枝肉ロース芯面積の測定

## Measurements of Rib-eye Area of Beef Carcasses by a Use of an Electronic Still Camera

三谷　克之輔・並河　澄

### 1．目　　的

電子スチルカメラは，約２インチの超小型磁気ディスク（ビデオフロッピー）に高画質の静止画像を記録できるので，枝肉市場におけるリブロース切断面等の画像の入力装置として利用でき，記録された画像をコンピュータにより解析することにより，枝肉格付の補助手段として利用することも可能なことを報告した[1]。しかし，市場における第６～７肋骨間の切開の程度は一般にあまり大きくなく，枝肉の切開部位断面に対して垂直にカメラを固定して撮影することは困難な場合が多い。そこで，現場における枝肉切開部位断面の撮影方法と垂直方向に撮影できない場合の画像の処理方法について検討した。撮影した画像の面積測定を行うためには，マクロ撮影時のレンズ特性による撮影画像の歪みと，撮影角度によって生じる遠近の画像の歪みと補正する必要がある。これらの歪みは，撮影するカメラおよびレンズは同一のものを使用し，被写体に対する撮影角度と距離を常に一定に保定することにより補正が容易となる。また，撮影角度と距離を一定にすることによって，撮影した画像の各座標軸における１画素当たりの面積を一定にすることもできる。そこで，電子スチルカメラを使用して一定の角度と距離で撮影したデジタル画像の一画素当たりの面積を簡易に算出する方法について検討し，この方法によってロース芯面積（最長筋の断面像の面積）を測定する方法を開発した。

### 2．方　　法

本研究で使用した画像処理装置は次の装置によって構成される。

1. 電子スチルカメラ
   CANON RC-701
2. スチルビデオレコーダー
   SONY MVR-5600
3. A－Dコンバーター
   NEXUS 68320
4. 画像処理装置本体
   NEXUS 6400
5. カラービデオモニター
   SONY PVN-1371Q
6. ホストコンピュータ
   NEC 9801E
7. デジタイザー
   OSCON グラディマスタU4-30
8. カラーハードコピー

© The Ito Foundation

JRC VIDEOFIX-85（NJW-85）

撮影面に対して一定の角度と距離に電子スチルカメラを保定できる固定台を制作し，カメラのレンズの中心線を撮影面から40°の角度に設定して最長筋の断面像をマクロ撮影した（**図1，2**）。電子スチルカメラによって撮影したリブロース断面像は前報[1]の方法によって画像処理した。デジタル画像の各座標軸における1画素当たりの面積を求めるために，1㎜単位の方眼紙を使用し，25cm×25cmの範囲で縦横1cm間隔に黒線を書込み，1㎠の格子を25×25個作成したものを撮影して基準とした（**図3**）。**図3**の1㎠の格子の交差する各座標軸（縦軸をY座標，横軸をX座標とする）て

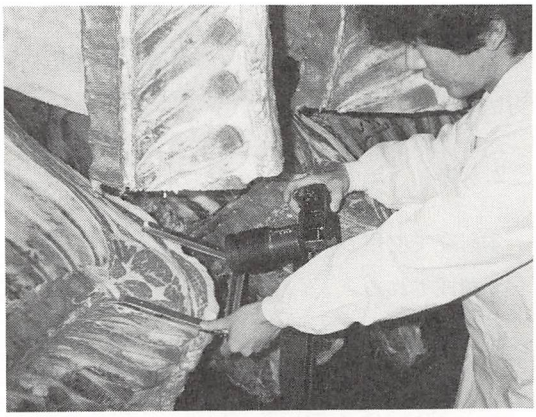


**図1**　電子スチルカメラによる枝肉断面の撮影

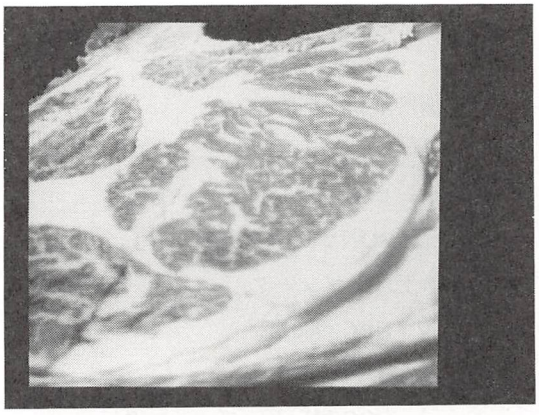


**図2**　電子スチルカメラで撮影したリブロース断面像

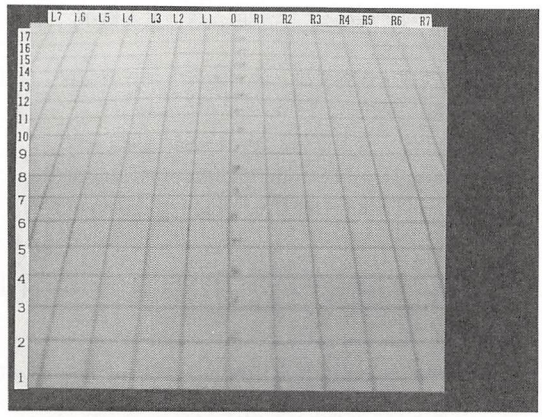



**図3**　電子スチルカメラで撮影した1㎠の方眼紙と座標軸

おける1画素当たりの縦および横の長さを求め，それぞれの長さを従属変数とし，Y座標およびX座標値を説明変数として，変数増加法によって重回帰式を求めた。この重回帰式から得られるY座標およびX座標における縦および横の長さから，各座標軸における1画素当たり面積を求めた。ロース芯面積の測定は，2値化した最長筋の断面の画素数に，1画素当たり面積を乗じることによって求めた。6頭の肥育牛の枝肉の第6～7肋骨部位の切開断面を実際に電子スチルカメラで撮影したものと，第6～7肋骨および第7～8肋骨部位のリブロース断面を複写機で複写したものを電子スチルカメラで撮影したものについてロース芯面積を測定し比較した。また，ロース芯をトレースして面積を測定し，電子スチルカメラによる測定値と比較した。

## 3.　結果および考察

各座標軸における1画素当たりの縦および横の長さを**表1**および**表2**に示した。1画素当たりの長さは，縦および横の長さのいずれもレンズからの位置が手前から遠くなるにしたがって（Y座標が2から15になるにしたがって）長くなり，レンズの中心から左右にずれるにしたがって長くなったが，横軸方向は縦軸方向と比較してレンズの中

© The Ito Foundation

表1　各座標における1画素当たり横軸（X軸）方向の長さ（mm）

| Y座標 | X座標 | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | L5 | L4 | L3 | L2 | L1 | 0 | R1 | R2 | R3 | R4 | R5 |
| 15 | 0.303 | 0.294 | 0.294 | 0.299 | 0.290 | 0.290 | 0.286 | 0.290 | 0.294 | 0.290 | 0.299 |
| 14 | 0.294 | 0.290 | 0.286 | 0.282 | 0.282 | 0.282 | 0.278 | 0.282 | 0.282 | 0.286 | 0.290 |
| 13 | 0.286 | 0.278 | 0.278 | 0.278 | 0.274 | 0.270 | 0.270 | 0.274 | 0.270 | 0.274 | 0.286 |
| 12 | 0.282 | 0.267 | 0.267 | 0.267 | 0.263 | 0.263 | 0.260 | 0.260 | 0.263 | 0.270 | 0.274 |
| 11 | 0.274 | 0.260 | 0.256 | 0.256 | 0.256 | 0.253 | 0.250 | 0.256 | 0.260 | 0.260 | 0.263 |
| 10 | 0.263 | 0.256 | 0.250 | 0.247 | 0.244 | 0.244 | 0.244 | 0.247 | 0.247 | 0.250 | 0.260 |
| 9 | | 0.244 | 0.238 | 0.241 | 0.238 | 0.233 | 0.238 | 0.241 | 0.241 | 0.241 | 0.244 |
| 8 | | 0.241 | 0.235 | 0.230 | 0.225 | 0.225 | 0.227 | 0.230 | 0.230 | 0.233 | 0.241 |
| 7 | | 0.235 | 0.225 | 0.217 | 0.220 | 0.217 | 0.220 | 0.222 | 0.222 | 0.222 | 0.227 |
| 6 | | 0.222 | 0.220 | 0.213 | 0.211 | 0.208 | 0.211 | 0.215 | 0.213 | 0.270 | |
| 5 | | | 0.208 | 0.206 | 0.204 | 0.200 | 0.202 | 0.204 | 0.206 | 0.213 | |
| 4 | | | 0.202 | 0.196 | 0.196 | 0.192 | 0.194 | 0.196 | 0.200 | 0.204 | |
| 3 | | | 0.196 | 0.191 | 0.185 | 0.187 | 0.191 | 0.189 | 0.191 | 0.196 | |
| 2 | | | 0.187 | 0.184 | 0.182 | 0.179 | 0.180 | 0.180 | 0.184 | 0.191 | |

表2　各座標における1画素当たり縦軸（Y軸）方向の長さ（mm）

| Y座標 | X座標 | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | L5 | L4 | L3 | L2 | L1 | 0 | R1 | R2 | R3 | R4 | R5 |
| 15 | 0.625 | 0.606 | 0.606 | 0.588 | 0.606 | 0.588 | 0.588 | 0.556 | 0.588 | 0.606 | 0.588 |
| 14 | 0.556 | 0.556 | 0.571 | 0.571 | 0.571 | 0.540 | 0.556 | 0.540 | 0.571 | 0.556 | 0.540 |
| 13 | 0.500 | 0.513 | 0.513 | 0.526 | 0.500 | 0.500 | 0.513 | 0.526 | 0.513 | 0.500 | 0.513 |
| 12 | 0.488 | 0.476 | 0.476 | 0.476 | 0.465 | 0.465 | 0.476 | 0.488 | 0.465 | 0.488 | 0.513 |
| 11 | 0.444 | 0.444 | 0.454 | 0.444 | 0.454 | 0.454 | 0.454 | 0.454 | 0.465 | 0.465 | 0.465 |
| 10 | 0.426 | 0.435 | 0.426 | 0.417 | 0.426 | 0.444 | 0.426 | 0.417 | 0.435 | 0.426 | 0.435 |
| 9 | | 0.408 | 0.385 | 0.392 | 0.385 | 0.400 | 0.392 | 0.400 | 0.400 | 0.408 | 0.408 |
| 8 | | 0.364 | 0.364 | 0.364 | 0.364 | 0.364 | 0.370 | 0.370 | 0.370 | 0.377 | 0.364 |
| 7 | | 0.339 | 0.339 | 0.333 | 0.339 | 0.333 | 0.345 | 0.345 | 0.345 | 0.339 | 0.345 |
| 6 | | 0.317 | 0.303 | 0.313 | 0.308 | 0.308 | 0.308 | 0.317 | 0.313 | 0.313 | |
| 5 | | | 0.286 | 0.286 | 0.282 | 0.286 | 0.282 | 0.282 | 0.282 | 0.290 | |
| 4 | | | 0.267 | 0.263 | 0.260 | 0.263 | 0.263 | 0.260 | 0.263 | 0.267 | |
| 3 | | | 0.247 | 0.244 | 0.244 | 0.241 | 0.241 | 0.241 | 0.247 | 0.247 | |
| 2 | | | 0.230 | 0.227 | 0.230 | 0.225 | 0.222 | 0.225 | 0.227 | 0.230 | |

心からの位置が1画素当たりの長さに与える影響は小さかった。また，横軸方向の長さよりも縦軸方向の長さの方が，レンズの位置の影響が大きいことが認められた。**表1**および**表2**の測定値をもとにして，1画素当たりの縦および横の長さを従属変数とし，X軸の座標値とY軸の座標値を説明変数とした重回帰分析の結果を**表3**に示してある。1画素当たり横の長さの回帰式には，XおよびY座標値，XおよびY座標値の2乗値，XおよびY座標値の自然対数値のいずれもが説明変数に取り込まれた。一方，1画素当たり縦の長さの回帰式には，X座標値の自然対数値を除く上記の説明変数が取り込まれた。

これらの式を使用してロース芯面積を測定した結果は**表4**に示してある。撮影材料としてリブロース断面を複写したものを使用した場合には，電子スチールカメラで測定したロース芯面積とトレース法による測定値は良く一致し，標準誤差の平

© The Ito Foundation

表3　1画素当たり縦および横の長さの重回帰式

| | 1画素当たり横の長さ（mm／ドット） | 1画素当たり縦の長さ（mm／ドット） |
|---|---|---|
| 切片 | 0.4014 | 0.8956 |
| 説明変数 | | |
| X座標値(X) | −0.00007798 | −0.0001273 |
| $X^2$ | 0.000000247 | 0.000000261 |
| 1n X | −0.0108 | |
| Y座標値(Y) | −0.0004291 | −0.001135 |
| $Y^2$ | 0.000000382 | 0.00000116 |
| 1n Y | −0.008087 | −0.06483 |
| 寄与率（$R^2$） | 0.9960 | 0.9931 |
| 標準誤差 (SEE) | 0.0023 | 0.0097 |
| 変動係数 (CV,%) | 0.93 | 2.37 |

表4　電子スチルカメラによるロース芯面積の測定

| | 枝肉測定方法 複写 | 現物 |
|---|---|---|
| 例数 | 8 | 6 |
| ロース芯面積（$cm^2$） | | |
| トレース法（Y） | 53.1±5.3 | 46.4±10.3 |
| 電子カメラ法（X） | 53.2±5.3 | 46.2±10.0 |
| Y/X×100 | 99.8 | 100.4 |
| 回帰式(Y＝a＋b・X) | | |
| 切片（a） | −0.0325 | 1.6125 |
| 回帰係数（b） | 1.0021 | 0.9596 |
| 寄与率（$R^2$） | 0.9843 | 0.9922 |
| 標準誤差 (SEE) | 0.77 | 1.08 |
| 変動係数 (CV,%) | 1.44 | 2.34 |

均値に対する比率（変動係数）は1.44%と小さく，電子スチルカメラによる測定値とトレース法の測定値の回帰式の切片は−0.0325で原点の近くを通り，傾きも1.0021と1に非常に近い値となった。実際の枝肉（現物）を撮影した場合にも両者の測定値は良く一致しているが，複写したものを撮影した場合よりも，標準誤差の平均値に対する比率（変動係数）が2.34%とやや大きく，切片と傾きについても0および1からややずれる傾向が認められた。複写したものを撮影する場合には，撮影面に対するカメラの角度を一定に保定することは容易であるが，現場における枝肉の切開断面は平坦でない場合があり，ロース芯断面に対するカメラの角度を一定にすることが困難な場合もある。このことが現物撮影における誤差をやや大きくしているものと思われるが，今回得られた測定値と誤差の大きさの範囲であれば実用化は可能と考えられる。実用化に当たっては，カメラの角度をロース芯断面に対して簡易に一定に保定できるように，さらに保定台を改良する必要があり，現在検討中である。

## 4. 要　約

電子スチルカメラを使用して一定の角度と距離で撮影したデジタル画像の1画素当たりの面積を簡易に算出する方法について検討し，この方法によってロース芯面積（最長筋の断面像の面積）を測定する方法を開発した。カメラの角度を撮影面に対して一定に保定できれば測定誤差を小さくすることができ，電子スチルカメラによるロース芯面積測定を実用化できることを明らかにした。

### 文　献

1）三谷克之輔，並河　澄，牛枝肉の規格格付に関する研究・Ⅲ・電子スチルカメラを利用した枝肉ロース芯面積の測定，昭和63年度食肉に関する助成研究調査成果報告書　7，247-251（1987）

© The Ito Foundation

# Ⅳ．牛肉の物理的特性について

Physical Characteristics of Beef Muscles

岡山　高秀・並河　澄

## 1．目　的

牛枝肉取引規格の改正により，肉質等級は「脂肪交雑」,「色の色沢」,「肉の締まりおよびきめ」,「脂肪の色沢と質」の4者について判定することになった。「脂肪交雑」はビーフ・マーブリング・スタンダード,「色の色沢」はビーフ・カラー・スタンダード,「脂肪の色沢と質」はビーフ・ファット・スタンダードとそれぞれ客観的評価の指標になるものがある[1]。しかし,「肉の締まりおよびきめ」についての判定項目には機器による測定が不可能なことから，肉眼と触感で判定されている。締まりは筋肉の保水力，きめはロース芯断面での筋束密度を観察し，等級を決定している[2]。いずれにしても，肉の締まりおよびきめは肉のテクスチャーに深く関わりを持つ項目である。これまでの研究から食肉のテクスチャーを測定する方法としては，Warner-Bratzler Shear Device, Compression Method, Tensile Method および Water-Holding Capacity Measurement などが挙げられる[3]。どの方法によっても生肉のテクスチャーを客観的に評価することは，現在のところ非常に困難であるといわれている[4]。しかしながら，機器関係の分析能力の向上と測定条件の詳細な検討により徐々に解析技術は進歩している。

そこで今回も，牛肉の物理的特性を把握する目的で前報[5]で用いた各筋肉試料につき弾性率（みかけの弾性率）を求めたので，その結果について報告する。

## 2．方　法

### 2.1　供試牛

広島大学生物生産学部附属農場で飼育された$F_1$雌牛1頭と$F_1$雌牛に黒毛和種を戻し交雑して生産した去勢牛（$F_1$クロス去勢牛）1頭を用いた。供試牛についての詳細は**表1**に示した。いずれもと殺5日後に前報[6]と同じ方法で解体し，6部位の筋肉［中臀筋，半腱様筋，半膜様筋，大腰筋，胸最長筋（第7胸椎部），棘上筋］を採取し，分析まで−80℃にて貯蔵した。

### 2.2　弾性率の算出法

前報[5]の破断強度の測定時に得られた破断波形から定法に従い弾性率を算出した。

## 3．結果と考察

得られた結果は**表2**に示した。$F_1$雌牛の弾性率（値が小さいほどやわらかい）は胸最長筋＜大

表1　供　試　牛

| | $F_1$雌牛 | $F_1$クロス去勢牛 |
|---|---|---|
| 月　齢（ヵ月） | 43.6 | 20.7 |
| と殺時体重(kg) | 737 | 582 |
| 枝肉重量（kg） | 421 | 351 |
| 枝肉構成（%） | | |
| 筋肉 | 50.4 | 54.3 |
| 脂肪 | 38.0 | 33.2 |
| 骨 | 10.4 | 11.7 |
| サシ | 2 | 1 |
| 格付 | C－3 | B－2 |
| 備　考 | ——— | 締まりおよびきめやや悪い |

© The Ito Foundation

表2 各筋肉の弾性率（$\times 10^7$ dyn/cm²）

| 筋 肉 | $F_1$雌牛 | $F_1$クロス去勢牛 |
|---|---|---|
| 中臀筋 | 3.61±0.48* | 3.51±0.34 |
| 半腱様筋 | 2.98±0.43 | 3.61±0.33 |
| 半膜様筋 | 1.75±0.26 | 2.48±0.40 |
| 大腰筋 | 1.49±0.02 | 2.23±0.39 |
| 胸最長筋 | 1.43±0.15 | 2.43±0.21 |
| 棘上筋 | 3.98±0.73 | 4.02±0.60 |

*：標準偏差

腰筋＜半膜様筋＜半腱様筋＜中臀筋＜棘上筋であった。一方，$F_1$クロス去勢牛の弾性率は大腰筋＜胸最長筋＜半膜様筋＜中臀筋＜半腱様筋＜棘上筋となった。すでに，みかけの弾性率と破断強度はそれぞれ同様の傾向をしめすと報告[7]されているように，前報[5]の破断強度の結果と今回の結果はほぼ同様の傾向を示した。前報[5]と全く同様に中臀筋を除くすべての筋肉の弾性率は$F_1$クロス去勢牛において高い値が得られた。前報[5]でも述べたが$F_1$クロス去勢牛は$F_1$雌牛の半分以下の月齢にもかかわらず**表1**備考にある“締まりおよびきめ”の悪いことが特に胸最長筋の弾性率の差として出ているように思われる。さらに，両試料において胸最長筋の測定値の標準偏差は小さく，測定値のバラツキは少ないことを示している。

これらのことから，胸最長筋における物理的測定値は肉質判定の締まりおよびきめと高い相関関係が得られる可能性を示唆するものである。

## 4. 要 約

牛肉の物理的特性を把握する目的で6部位の筋肉の弾性率を求めた。その結果，$F_1$雌牛の弾性率は胸最長筋＜大腰筋＜半膜様筋＜半腱様筋＜中臀筋＜棘上筋であった。$F_1$クロスの弾性率は大腰筋＜胸最長筋＜半膜様筋＜中臀筋＜半腱様筋＜棘上筋であった。

## 文 献

1) 「食肉通信」編集部：食肉界，**24**，115～119（1987）
2) 「食肉通信」編集部：食肉界，**25**，55～63（1988）
3) Harris, P.V. and Shorthose, W.R., Developments in Meat science-4, Ed. by Lawrie, R., 245-296, Elsevier Applied Science, London and New York（1988）
4) 田中亮一・吉田達行：昭和63年度食肉に関する助成研究調査成果報告書，**7**，268～274（1989）
5) 岡山高秀・並河 澄：昭和63年度食肉に関する助成研究調査成果報告書，**7**，251～253（1989）
6) 岡山高秀・並河 澄：昭和62年度食肉に関する助成研究調査成果報告書，**6**，181-182（1988）
7) 中浜信子：家政学雑誌，**23**，18～26（1972）

© The Ito Foundation

# 豚枝肉の評価方法に関する研究
## —赤肉歩留推定回帰式の検証—

Studies on the Evaluation Method of Pig Carcass
—Possibility of Regression Equations to estimate Lean Meat Percentage—

古澤　栄作・内田　実・天田　豊（㈱全国食肉学校）

Eisaku Furusawa, Minoru Uchida and Yutaka Amada (Federal Meat Academy)

In order to progress the rusults which have been proved so far and to put them to practical use, the relation between the measurement value and the presumption value of regression equations to estimate lean meat percentage based on data from 30 pig carcasses was inspected. The practical use of the regression equations was also inspected at the same time.

The correlation coefficient between the measurement value and the estimation value by practical regression equation lean meat percentage (**Fig. 2**) was 0.96. At the stage of practical application of the evaluation of pig carcass, the economical decline by cutting the loin off etc., should be avoided as much as possible. If the accurate side fat thickness measurement by the principle function of MFA Recorder etc., are possible, the estimation of lean meat percentage by the practical regression equation will be able to systematize. Evaluation of pig carcass based on lean meat percentage could be used practically at the stage of the pig carcass circulation in Japan.

### 1. 目　的

本研究は，これまで豚枝肉の評価基準として赤肉推定歩留を用いて，客観的に豚枝肉評価を行なうということを前提として実施してきた。

当初は，赤肉歩留を推定するために，歩留と関係の深い要因は何か，また，歩留推定回帰式の寄与率をどうすれば高められるのか等々基本的な内容を検討してきた。

昨年度は，データ数も増加したため，性別による赤肉歩留推定回帰式の検討等を行ない，高い寄与率の回帰式が得られた。通常，研究段階における推定回帰式の検討は，これまでの本研究の内容がそうであったように，回帰式そのものの寄与率を重要視する傾向にある。しかし，本研究の最終目的が豚枝肉の評価という，枝肉の売手側ひいては生産農家と買手側の接点としての重要な課題を取上げており，推定回帰式の寄与率の高低もさることながら，歩留推定回帰式を実際に使用した場合にどのような結果となるのか，また，この回帰式を具体的にどのように活用すればよいのかまでも検討することが不可欠となる。

今回は，赤肉歩留による豚枝肉評価の実用段階に向けて，昨年度得られた歩留推定回帰式の検証を行うとともに，回帰式の具体的活用方法について検討を行った。

© The Ito Foundation

## 2. 方　法

### 2.1 赤肉歩留推定回帰式

今回用いた赤肉歩留推定回帰式は，昨年度80頭（去勢41頭，雌39頭）のデータを用いて計算された，2つの回帰式である。1つは，脂肪厚（バックファット，サイドファット），ロース芯面積および太さ等の測定値，測定値を加工した脂肪面積，脂肪面積比等36要因のすべてを説明変数の候補として計算された全変数全データによる歩留推定回帰式[1]である。これはあくまでも統計上の回帰式であり，測定要因のなかにロース部位の切断等，枝肉評価段階において枝肉の経済価値を大きく損う要因を含んでいる。従って，この回帰式を統計的回帰式と言うこととする。昨年度得られたこの統計的回帰式は**表1**のとおりである。

もう1つの回帰式は，実用化段階において枝肉の経済価値を損わない程度に測定が可能な要因群（具体的には，ロース芯を切断しないで測定可能な要因群）を説明変数の候補として計算された26要因全データによる歩留推定回帰式である。この回帰式は，実用化された時点を意識したものであり，先の統計的回帰式に対し，実用的回帰式と言うこととする。昨年度得られたこの実用的回帰式は**表2**のとおりである。

**表1**　統計的赤肉歩留推定回帰式

| 説　明　変　数 | 標準偏回帰係数 | p[1] |
|---|---|---|
| 第1－第2胸椎ＢＦ | −0.154** | |
| ランジリ中央部ＢＦ | −0.243*** | |
| 最後胸椎－第1腰椎10cmサイドＳＦ | −0.471*** | |
| 第3－第4腰椎ロース芯面積 | 0.183** | |
| 第13－第14胸椎ロース芯の太さ | 0.151** | |
| 寄与率[2]　0.888 | 残差平方和　107.521 | |

n＝80
1)偏回帰係数の有意性
2)重回帰式の寄与率
***：P＜0.001，**：P＜0.01

**表2**　実用的赤肉歩留推定回帰式

| 説　明　変　数 | 標準偏回帰係数 | p[1] |
|---|---|---|
| 第1－第2胸椎ＢＦ | −0.221*** | |
| ランジリ中央部ＢＦ | −0.211** | |
| 枝肉表示重量 | 0.243*** | |
| と　体　長 | −0.258*** | |
| 最後胸椎－第1腰椎脂肪面積 | −0.750*** | |
| 寄与率[2]　0.868 | 残差平方和　125.949 | |

n＝80
1)偏回帰係数の有意性
2)重回帰式の寄与率
***：P＜0.001，**：P＜0.01

### 2.2 供試豚枝肉

上記の回帰式を検証するため（株）群馬県食肉卸売市場に上場された去勢15頭，雌15頭，計30頭の枝肉を用いた。規格別では「上」20頭，「中」10頭であった。去勢豚の平均重量は71.8kg，重量範囲は68.0～77.5kg，雌豚の平均重量は70.6kg，重量範囲は66.5～76.0kgであった。

枝肉の選定方法は昨年度までと同様とし，豚枝肉取引規格本文[2]で言う，外観のうち仕上げ，肉質において欠点のないものを対象とした。つまり，これまでの研究では肉質による評価はまったく対象外とし，歩留推定は肉質に問題がない枝肉のみをデータとしている。

枝肉の各要因測定は，推定回帰式に示してある要因は当然であるが，他の説明変数にならなかった要因についても昨年度同様とした。

### 2.3 赤肉歩留推定回帰式の検証方法

**表1，表2**に示した歩留の統計的回帰式および実用的回帰式について，説明変数に対応した本年度分（30頭）の各要因測定値を代入し，これによって得られた歩留推定値（以下推定値）と，30頭を簡易剝離して実際に計算された実測値（以下実測値）との相関係数およびこれらの誤差を比較し，歩留推定回帰式の検証を行った。

© The Ito Foundation

## 3. 結果および考察

### 3.1 赤肉歩留推定回帰式の検証

（1） 統計的赤肉歩留推定回帰式の検証：推定値と実測値との関係は**図1**のとおりであり，両者の相関係数は0.964と高い値となった。

推定値と実測値を比較すると，推定値が実測値より低い値を示したのは30頭のうち5頭で，他は推定値が高い値を示した。その結果，実測値は66.09%となったのに対し，推定値平均は66.87%となり，推定値が0.78%（標準偏差0.953）高い結果となった。

先にも述べたように，豚枝肉の赤肉歩留というように個々の枝肉について，歩留が高いか低いかが重要な視点となるものは，回帰式の信頼性もさることながら，推定値と実測値の誤差の多少が問題となる。今回の30頭の検証の結果，推定値と実測値の誤差（絶対値）の平均は0.88%となり，誤差分布は1%未満19頭（63.3%），1%以上2%未満8頭（26.7%），2%以上～3%未満2頭（6.7%），3%以上1頭（3.3%）となった。試験研究機関等で，2%未満を許容される誤差（絶対値）と仮定すると90%が許容範囲内にあったということになる。

（2） 実用的赤肉歩留推定回帰式の検証：推定値と実測値との関係は**図2**のとおりである。両者の相関係数は0.960と高い値となり，統計的回帰式とほぼ同じ値となった。

推定値と実測値を比較すると，推定値が実測値よりも低い値を示したのは3頭であり，他の27頭は高い値となった。その結果，実測値平均が66.09%であったのに対し，推定値平均は67.23%となり，推定値が1.16%（標準偏差1.02）高い結果となった。統計的回帰式による差と比べると0.38%推定値と実測値の差が大きくなった。

推定値と実測値の誤差（絶対値）平均は1.31%となり，誤差分布は1%未満13頭（43.3%），1%以上2%未満12頭（40.0%），2%以上～3%未満4頭（13.3%），3%以上1頭（3.3%）となった。枝肉流通段階において，歩留の推定値と実測値の許容誤差（絶対値）が2%未満と仮定するならば83.3%が許容範囲内にあったということになる。

（3） 実用的赤肉歩留推定回帰式による豚枝肉

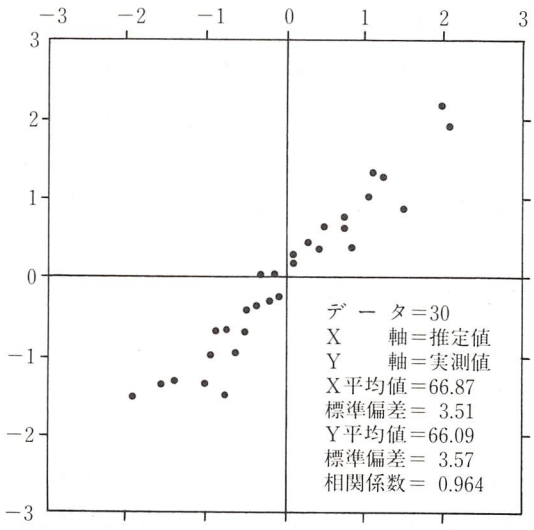



**図1**　統計的赤肉歩留推定値と実測値

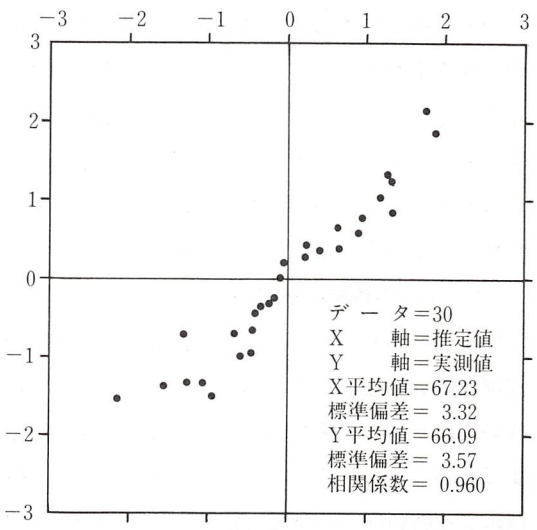



**図2**　実用的赤肉歩留推定値と実測値

© The Ito Foundation

評価の実現性：以上のとおり，昨年度検討した赤肉歩留推定回帰式による推定値と実測値が高い相関係数を示し，これらの回帰式は，実際に豚枝肉評価の１手法としての使用が可能であろうとの結論を得た。

また，実用的赤肉歩留推定回帰式による推定値と実測値の相関係数と，先に示した統計的回帰式の相関係数はほぼ同じ値となり，統計的回帰式の説明変数に含まれているロース芯の面積や太さをあえて測定しなくとも，脂肪厚（サイドファット）測定さえできれば，赤肉歩留推定値の信頼性には変りがないと言えよう。

しかし，現時点では豚枝肉を，経済価値を損わない程度という条件付で，サイドファット脂肪厚等を計測するのは困難であり，脂肪厚の測定機械開発が望まれるところである。このような測定機械が開発されれば，本研究で得られた回帰式を用いてシステム化することが可能となり，赤肉歩留による客観的な豚枝肉の評価が迅速に出来るのではないかと思われる。

一方，現在の豚枝肉の評価基準は豚枝肉取引規格[2)]に示してあるとおり，第９～第13胸椎関節部直上における背脂肪の薄い部位で計った脂肪厚と，枝肉半丸重量による等脂肪率線を根拠とした脂肪の多少を主な基準としている。これも間接的には赤肉の多少に関連するが，諸外国では赤肉歩留を第１の評価基準としている。評価基準が脂肪あるいは赤肉の多少であれ，より正確で客観性のある豚枝肉評価方法の確立が望まれる所である。

3.2 歩留の機械的測定方法

以上のとおり，赤肉および脂肪歩留の推定回帰式はほぼ実用化できるであろうとの結論が得られ，我が国における正確な脂肪厚測定機械の開発が必要であると思われる。そこで，諸外国における機械による脂肪厚等の測定方法と赤肉歩留測定事例を検討した。

（１） ロース部位の要因測定：これまでの研究結果では，赤肉および脂肪歩留の高低に大きく関与しているのは，ロース部位の測定要因が多いことが明かとなっている。よって，歩留推定回帰式に説明変数として取込まれる可能性が高く，実際に統計的歩留推定回帰式にも取込まれている。ロース部位の測定でもサイドファット程度であれば問題はないにしても，ロース芯に機械的測定痕が残ることには問題があると思われる。

デンマーク等においては，赤肉歩留を推定するために，脂肪厚と合せてロース芯の太さも機械で測定している。諸外国における豚肉特にロースの購入形態はブロックが主体となっており，消費形態もロースト類が多いので，仮に機械による測定痕が残っていても大きな問題とはならない。しかし，我が国のロースの購買形態は切り身やスライスが多く，小売段階で測定痕が残っていると問題が起きるものと思われる。また，赤肉歩留の実用的回帰式のところでも述べたように，今回の結果からは，ロース芯の要因を測定しなくとも赤肉歩留は高い確率で推定できるという結果もえられた。従って，ロース芯には傷をつけず，また，外観から見ても枝肉の商品価値を損わない測定原理を用いた機械開発が必要となってくるであろう。

（２） 機械による赤肉歩留の測定事例（MFA レコーダー）：脂肪厚のみを測定する機械（道具）は幾つか市販されているが，脂肪厚の測定値と他の枝肉重量等の情報からシステム的に赤肉歩留を測定する機械は数少なく，デンマークの SFK 社製 MFA レコーダー，ニュージーランドのフィリップ社製ヘネシーグレーディングシステム等がこれに該当するであろう。ここでは MFA レコーダーについてだけ示すこととする。

MFA レコーダーはデンマークで開発され，同国では1975年から屠場のラインに組込まれており，EC 諸国等多くの国々で同様の方式により格付が

© The Ito Foundation

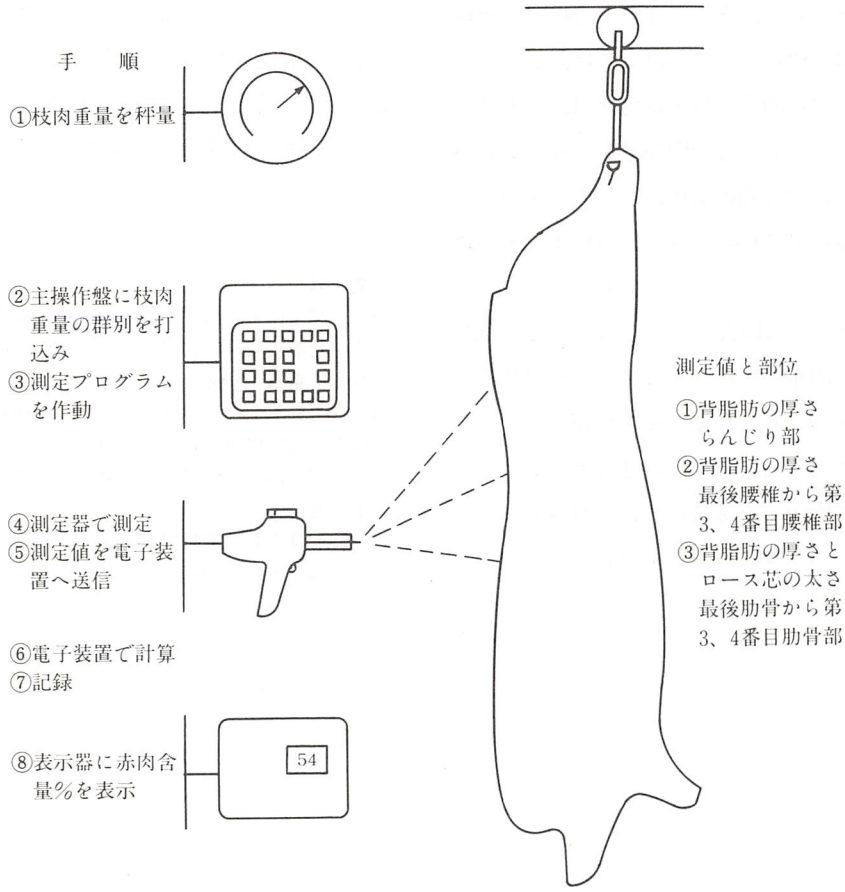



**図3**　MFA レコーダーによる赤肉歩留測定方法の概要

なされている[3]。

MFA レコーダーによる赤肉歩留測定方法の概要は**図3**のとおりである[3]。コンピューターに組込まれた手順に従い，枝肉の重量範囲をキーボードから入力し，測定器で3ヵ所の脂肪厚および1ヵ所のロース芯の太さを測定する。これらのデータがコンピューターに送られ，組込まれたプログラムによって赤肉歩留が計算され，表示器への表示および記録が自動的になされる。

このシステムで重要なのは，測定器と赤肉歩留計算のプログラムである。測定器は，赤肉と脂肪の電導度の差異を利用した方式で，メジャリングリングによって赤肉と脂肪の厚さを測定するものである。赤肉歩留計算のプログラムは先に述べた5つを説明変数とした重回帰式となっているが，枝肉の状態が我が国と異なる[4]（湯はぎ，頭・四肢・尾付状態）ので，現在我が国で取引されている枝肉では使用不可能である。

また，デンマークでは測定された赤肉歩留によって，枝肉価格まで決定されるシステムとなっており，MFA レコーダー等の機械による測定により，格付の迅速性および客観性の向上を計っている[3]。

## 4. 要　約

これまでの研究結果を実用化段階へ進めるため，30頭の豚枝肉を用いて，既に作成された赤肉歩留推定回帰式による赤肉歩留の推定値と実測値の関

© The Ito Foundation

係について検証した。また，赤肉歩留推定回帰式の具体的活用方法についても併せて検討した。

その結果，実用的赤肉歩留推定回帰式（**表2**）による推定値と実測値の相関係数は0.96と高い値となった。豚枝肉評価の実用段階においては，ロースの切断等による枝肉の経済価値低下を極力避けなければならない。この意味において，サイドファット脂肪厚をMFAレコーダ等の測定原理によって正確な測定が可能となれば，この実用的赤肉歩留推定回帰式を用いて，赤肉歩留推定のシステム化が可能となる。豚枝肉流通段階において，赤肉歩留を基準とした豚枝肉評価は日本においても実用化できるであろうとおもわれる。

本研究の遂行にあたりご協力いただいた，群馬畜産加工販売農業協同組合連合会，(社)日本食肉格付協会，助言いただいた関係各位，そして助成いただいた(財)伊藤記念財団に対し心から感謝の意を表します。

**文　献**

1) 古澤栄作・内田　実・天田　豊：食肉に関する助成研究調査成果報告書，7，254-261，(財)伊藤記念財団，東京，1989
2) (社)日本食肉格付協会：枝肉取引規格解説書，豚枝肉取引規格編，14-15，1989
3) (社)全国食肉学校研究研修所：枝肉評価制度合理化研究，第1報，42-46，1980
4) (社)日本食肉格付協会：海外研修報告書，デンマーク編，9-14，1988

© The Ito Foundation

# 鶏肉の評価に関する研究

Studies on the Evaluation of Physico-Chemical Characteristics of Muscles in 5 Chicken Breeds

松岡 尚二・新小田 修一・古市 信夫・井上 政典・久木元 忠延
*川井田 博（鹿児島県養鶏試験場，*鹿児島県畜産試験場）

Shoji Matsuoka, Shuichi Shinkoda, Nobuo Furuichi, Masanori Inoue, Tadanobu Kukimoto and *Hiroshi Kawaida
(Kagoshima Prefectural Poultry Experiment Station and *Kagoshima Prefectural Animal Husbandry Experiment station)

To evaluate the Physico-Chemical Characteristics (chemical composition, pH, water holding capacity, color, melting point of fat, hardness, cohesiveness, gumminess and muscle fiber diameter) of various chicken stocks, major breast muscles and leg muscles of Satsuma native fowl (SA), Satsuma cross-bred (SA × WR), White plymouth rock (WR), White cornish (WC) and Commercial broiler (WC×WR) were analyzed at 12 weeks of age.

The results were summarized as follows:

1. Chemical composition, crude protein content and crude ash content of the major breast muscles were larger than those of the leg muscles. On the contrary, crude fat content of the major breast muscles was samller than that of the leg muscles.

2. The water holding capacity was highest in SA, and lowest in WC. The highest values in the hardness and gumminess was seen in WC×WR. On the contrary, SA×WR showed the highest value in the cohesiveness, but SA showed the lowest value.

3. On muscle fiber diameter, SA, showing the smallest body weight gain, had the samllest muscle fiber diameter, whereas WC×WR showed the largest diameter.

4. The correlations between the hardness and the gumminess, and the water holding capacity and the number of muscle fibers were significantly positive. The correlations between the cohesiveness and the moisture, the moisture and the crude fat content, and the number of muscle fibers and the diameter were significantly negative.

5. On sensory test, the tastes of soup of SA and SA×WR were evaluated as more favorite than WC×WR, but no significant difference was found in the saute.

## 1. 目　的

最近のブロイラー肉は，淡泊でまずいという不満が多く，消費者ニーズは高品質の鶏肉指向に移行しつつある。このため鶏肉の食味を改善する試みが国内各地で行われており[1,2]，鹿児島県においても1969年から薩摩鶏を利用したおいしい鶏肉の開発を行ってきた[3]。

今後，このような高品質の鶏肉の消費は増加していくものと思われるが，消費者が鶏肉を購入する場合の指標となるものはまだ示されていない。また，肉質を改善していくうえで必要な基礎情報

© The Ito Foundation

としての鶏肉の理化学的特性についても，ほとんど報告がなされていない。このような背景から，著者らは鶏肉の評価方法を確立することを最終目的として，薩摩鶏，薩摩鶏交雑ブロイラー，白色プリマスロック，白色コーニッシュおよびブロイラー専用種の５鶏種の肉の理化学的特性について分析し，比較検討した。

## 2.　材料および方法

### 2.1　供試材料

供試鶏は，当場で保有している薩摩鶏（以下ＳＡと略記）農林水産省兵庫種畜牧場から導入した白色プリマスロック（以下ＷＲと略記）と白色コーニッシュ（以下ＷＣと略記），民間ふ化場から導入したＳＡ雄とＷＲ雌との交雑種である薩摩交雑ブロイラー（以下二元交雑と略記）とＷＣ雄とＷＲ雌との交雑種であるブロイラー専用種（以下専用種と略記）を用いた。これらの供試鶏は全期間市販のブロイラー飼料を不断給与し，１日齢から21日齢までは前期用（CP 22%以上，ME 3100 kcal/kg以上），以後は後期用（CP 18%以上，ME 3200Kcal/kg以上）を与え飼育した。理化学的特性の調査は，各鶏種の平均体重に近い個体の雄をそれぞれ10羽ずつ，85日齢にと殺解体し，直ちに浅胸筋（以下胸肉と略記），大腿部の筋（以下腿肉と略記）および腹腔内脂肪を摘出し，約24時間５℃で冷蔵したものを使用した。官能検査はSA，二元交雑および専用種の３鶏種についておこなった。この場合の試料は91日齢にと殺解体し，約24時間冷蔵したものを焼肉およびスープにしてパネルに供出した。

### 2.2　実験方法

一般成分は胸肉および腿肉を試料とした。水分は100～105℃加熱乾燥法により，粗タンパク質はケールダール法により，粗脂肪はソックスレー脂肪抽出器を用いるエーテル抽出法により，粗灰分は灰化法により定量した。

保水力，pH，肉色，テクスチャー特性，筋線維の数および筋線維の太さは胸肉でのみ分析した。この場合に保水力は加圧ろ紙法により，pH はチョッパーでミンチした試料に直接 pH メーターの電極を差し込み測定した。肉色はと殺解体後約５時間冷蔵した後，色差計（日本電色 Z1001DP）により測定した。テクスチャー特性（硬さ，凝集性，ガム性）は浅胸筋および大腿二頭筋を直径24㎜の円柱状にくり抜き，４㎜の厚さに切りそろえ，テクスチュロメーター（全研 GTX-２型）にセットして測定した。筋線維の数および筋線維の太さは浅胸筋より凍結切片を作成し，エオジン染色したものを顕微鏡写真（×25）により実測した。この場合，筋線維の数は顕微鏡写真一視野当たりの個数とした。脂肪融点は腹部脂肪を材料として上昇融点法により測定した。

解析は胸肉と腿肉の両部位について測定した項目については二元配置法，その他の項目については一元配置法により分散分析をおこない，区間検定は TUKEY の多重検定法[4]を用いた。

### 2.3　官能検査

官能検査は焼肉およびスープについて順位法を用い，焼肉は“味”，“歯ごたえ”および“好み”の３項目を，スープは“味”，“臭み”および“好み”の３項目をそれぞれ調べた。焼肉は胸肉を約５㎜の厚さ，約３㎝平方に切ったものをガスコンロの上にフライパンを乗せ焼いた。スープは１羽分のと体から内臓，頭および脚を除き約６時間煮出したものを供した。なお，食塩などの調味料は使用しなかった。パネルは鶏肉の嫌いでない30～40歳代の婦人14人とした。調査用紙は**図１**に示したものを使用した。解析は KENDALL の一致性の係数[5]を用いておこなった。

© The Ito Foundation

焼　肉　　氏名＿＿＿＿＿＿　年齢＿＿＿＿

次の試料をA→B→Cの順に試食して，
以下の項目について順位をつけて下さい。

1．味

| A | B | C |
|---|---|---|
| | | |

2．歯ごたえ，かたさ

| A | B | C |
|---|---|---|
| | | |

3．あなたの好み

| A | B | C |
|---|---|---|
| | | |

注）わかりにくいときは，何回食べてもけっこうです。また，この時の食べる順番は特にありません。
よく似ていると感じても，かならず順位をつけてください。

スープ　　氏名＿＿＿＿＿＿　年齢＿＿＿＿

次の試料をA→B→Cの順に試食して，
以下の項目について順位をつけて下さい。

1．味

| A | B | C |
|---|---|---|
| | | |

2．においい

| A | B | C |
|---|---|---|
| | | |

3．あなたの好み

| A | B | C |
|---|---|---|
| | | |

注）わかりにくいときは，何回食べてもけっこうです。また，この時の食べる順番は特にありません。
よく似ていると感じても，かならず順位をつけてください。

図1　官能検査用紙

## 3．結　果

### 3.1　増体量，飼料要求率および肉量

それぞれの鶏種について1日齢から84日齢における増体量と飼料要求率および85日齢におけると殺後の肉量の分析結果は**表1**のとおりである。増体量は，専用種でWRおよびWCに比べ約500g，二元交雑に比べ約1,600g，SAに比べ約2,800g大きかった。飼料要求率はSAで他の4鶏種に比べて約0.5劣った。正肉の生体重に対する割合はSAで他の4鶏種に比べ約3～4%劣った。

### 3.2　一般成分

それぞれの鶏種について胸肉および腿肉の水分，粗タンパク質，粗脂肪，粗灰分の分析結果は**表2**のとおりである。胸肉および腿肉の一般成分は鶏種間に有意差は認められなかった。しかし，水分

表1　1日齢から84日齢における増体量と飼料要求率および85日齢における肉量割合

| 鶏　種 | 増体量 (g) | 飼育要求率 | 肉量割合[1] (%) 胸正肉 | 腿生肉 | ささみ | 正肉計 | 腹腔内脂肪 | 可食内臓 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| SA | 1907[d2)] | 3.04[b] | 13.3[b] | 18.6[b] | 3.5[ab] | 35.4[b] | 1.6 | 5.0[a] |
| 二元交雑 | 3085[a] | 2.54[a] | 14.3[ab] | 20.5[ab] | 3.6[ab] | 38.3[a] | 2.9 | 4.2[b] |
| WR | 4119[b] | 2.53[a] | 13.7[b] | 21.1[a] | 3.3[b] | 38.1[a] | 2.7 | 3.9[b] |
| WC | 4169[ab] | 2.59[a] | 15.1[a] | 20.7[ab] | 3.8[a] | 39.6[a] | 3.5 | 3.8[b] |
| 専用種 | 4693[a] | 2.50[a] | 14.9[a] | 21.4[a] | 3.6[ab] | 39.9[a] | 3.4 | 3.8[b] |

注　1）肉量割合は生体重に対する割合
2）縦列アルファベット異文間に5%水準で有意差あり

© The Ito Foundation

表2　腿肉および胸肉における一般成分（%）

| 鶏種 | 水分 | | 粗タンパク質 | | 粗脂肪 | | 粗灰分 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 胸肉 | 腿肉 | 胸肉 | 腿肉 | 胸肉 | 腿肉 | 胸肉 | 腿肉 |
| SA | 74.1 | 73.9 | 23.5 | 20.2 | 0.8 | 4.2 | 1.1 | 1.1 |
| 二元交雑 | 73.6 | 72.2 | 23.9 | 19.7 | 0.8 | 6.0 | 1.1 | 1.0 |
| WR | 73.3 | 72.6 | 23.0 | 19.1 | 1.2 | 6.4 | 1.1 | 1.0 |
| WC | 73.6 | 72.0 | 23.6 | 19.3 | 0.8 | 7.0 | 1.1 | 1.0 |
| 専用種 | 72.7 | 72.8 | 23.6 | 20.2 | 1.1 | 5.6 | 1.1 | 1.1 |
| 平均 | 73.4 | 72.7 | 23.5-**-19.7 | | 0.9-**-5.8 | | 1.1-**-1.0 | |

注　**は1%水準で有意差あり

はSAが最も多い傾向を示し，粗脂肪ではSAが最も少なく，逆にWCが最も多い傾向にあった。また，胸肉と腿肉の部位間では粗タンパク質および粗灰分に有意差が認められ，胸肉が腿肉に比べて多かった。一方，粗脂肪は腿肉が胸肉より有意に多かった。

3.3　保水力，pH，肉色および脂肪融点

それぞれの鶏種について胸肉の保水力，pH，肉色および腹腔内脂肪の融点の分析結果は**表3**のとおりである。保水力，pH，肉色および脂肪融点ともに鶏種間で有意差は認められなかった。しかし，保水力はSAで最も大きく，逆にWCで最も小さい値を示した。肉色の赤の度合を示すaは専用種で最も低い値を示した。

表3　pH，保水力，肉色および脂肪融点

| 鶏種 | pH | 保水力 | 肉色 | | | 脂肪融点 (℃) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | L | a | b | |
| SA | 5.75 | 65.4 | 21.8 | 2.2 | 3.3 | 35.4 |
| 二元交雑 | 5.73 | 63.2 | 22.0 | 2.1 | 3.1 | 35.9 |
| WR | 5.70 | 62.0 | 22.7 | 2.2 | 3.3 | 35.3 |
| WC | 5.78 | 60.4 | 21.7 | 2.0 | 2.8 | 35.0 |
| 専用種 | 5.75 | 62.2 | 22.2 | 1.5 | 3.0 | 35.2 |

注　Lは明度，aは赤の度合，bは黄の度合

表4　胸肉の硬さ，凝集性およびガム性

| 鶏種 | 硬さ | 凝集性 | ガム性 |
|---|---|---|---|
| SA | 3.25 | 0.531 | 183 |
| 二元交雑 | 2.83 | 0.656 | 183 |
| WR | 2.55 | 0.602 | 151 |
| WC | 2.96 | 0.614 | 176 |
| 専用種 | 3.45 | 0.644 | 226 |

表5　胸肉の筋線維の数および太さ

| 鶏種 | 筋線維の数（個） | 筋線維の太さ（μ） |
|---|---|---|
| SA | 370 | 22.71 |
| 二元交雑 | 321 | 25.12 |
| WR | 256 | 27.13 |
| WC | 270 | 27.41 |
| 専用種 | 210 | 30.15 |

3.4　テクスチャー特性

それぞれの鶏種について胸肉の硬さ，凝集性およびガム性の分析結果は**表4**のとおりである。硬さ，凝集性およびガム性ともに鶏種間で有意差は認められなかった。しかし，硬さは専用種＞SA＞WC＞二元交雑＞WRの順に，凝集性は二元交雑＞専用種＞WC＞WR＞SAの順に，ガム性は専用種＞SAおよび二元交雑＞WC＞WRの順にそれぞれ高い値を示した。

3.5　筋線維の数および太さ

それぞれの鶏種について胸肉の筋線維の数および筋線維の太さの分析結果は**表5**のとおりである。筋線維の数および太さともに鶏種間で有意差は認められなかった。しかし，筋線維の数はSA＞二元交雑＞WC＞WR＞専用種の順に多い傾向を示し，筋線維の太さは専用種＞WC＞WR＞二元交雑＞SAの順に太い傾向を示した。

© The Ito Foundation

表6　焼肉およびスープの官能検査（n＝42）

| 焼肉 | | | | | スープ | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 質問 | 順位合計[1] | | | 検定結果 | 質問 | 順位合計[1] | | | 検定結果 |
| | SA | 二元交雑 | 専用種 | | | SA | 二元交雑 | 専用種 | |
| 味 | 88 | 76 | 88 | N・S[2] | 味 | 79 | 71 | 102 | p〈0.01[3] |
| 硬さ | 84 | 87 | 81 | N・S | におい | 81 | 75 | 96 | N・S |
| 好み | 90 | 76 | 86 | N・S | 好み | 74 | 76 | 102 | p〈0.01 |

注　1）順位1，2，3をそれぞれ度数1，2，3とした合計
2）有意差なし
3）1％水準で有意差あり

表7　各特性間の相関係数（n＝10）

| | 凝集性 | ガム性 | L | a | b | 水分 | 粗タンパク | 粗脂肪 | 保水力 | 筋線維の数 | 筋線維の太さ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 硬さ | -0.1176 | 0.8302** | -0.0253 | -0.4545 | -0.1401 | 0.1373 | 0.2615 | 0.4065 | -0.2325 | -0.1868 | 0.1102 |
| 凝集性 | | 0.4320 | 0.0916 | 0.0508 | -0.1512 | -0.7781** | 0.1104 | 0.3433 | -0.2405 | -0.3378 | 0.3399 |
| ガム性 | | | 0.0367 | -0.4115 | -0.1644 | -0.3551 | 0.2887 | -0.0994 | -0.2399 | -0.3245 | 0.2698 |
| L | | | | -0.1678 | 0.1910 | -0.1456 | -0.4446 | 0.2000 | -0.3015 | -0.3881 | 0.1794 |
| a | | | | | 0.5265 | 0.1499 | -0.1413 | -0.0452 | 0.0818 | 0.4410 | -0.5103 |
| b | | | | | | 0.1386 | -0.1767 | -0.0091 | 0.3520 | 0.4854 | -0.6480* |
| 水分 | | | | | | | 0.1526 | -0.7496* | 0.0302 | 0.4462 | -0.4861 |
| 粗タンパク | | | | | | | | -0.5764 | 0.1693 | 0.3959 | -0.2953 |
| 粗脂肪 | | | | | | | | | 0.1512 | -0.4180 | 0.4774 |
| 保水力 | | | | | | | | | | 0.7144* | -0.5318 |
| 筋線維の数 | | | | | | | | | | | -0.9472** |

注　**は1％水準で，*は5％水準で有意差あり

3.6　官能検査

SA，二元交雑および専用種の3鶏種についておこなった焼肉およびスープの官能検査の分析結果は**表6**のとおりである。焼肉では鶏種間で有意差は認められなかった。しかし，“味”および“好み”でやや二元交雑の順位が高い傾向を示した。スープでは“味”および“好み”の2項目に1％水準で有意差が認められSAおよび二元交雑は専用種に対して有意に味がよく，好まれた。

3.7　理化学的特性間の相関関係

主な特性間の相関関係を，全鶏種のデータを基にして分析した結果は**表7**のとおりである。硬さとガム性および保水力と筋線維の数の間に高い正の相関が，また逆に凝集性と水分，水分と粗脂肪および筋線維の数と太さの間に高い負の相関が認められた。

## 4.　考　察

本研究は鶏肉の評価方法を確立することを最終目的として，5鶏種の肉の理化学的特性について検討した。その結果，全ての特性において鶏種間に有意な差異は認められなかった。しかし，一般成分の部位間で有意差が認められ，粗タンパク質および灰分は胸肉が，粗脂肪は腿肉が，それぞれ有意に多かった。

粗タンパク質，粗脂肪および粗灰分が部位間で異なるのは，これまでの報告[6,7]と一致するものであるが，胸肉より腿肉で鶏種間差が大きい傾向にあり，腿肉の方が鶏種の肉質の特徴が顕著であることが考えられる。

© The Ito Foundation

保水力ではSAと二元交雑が高い傾向を示し，増体が良くなる方向に改良すると保水力は低下する傾向にあるように思われた。また，保水力と筋線維の数の間に正の相関が認められたことから，筋線維の構成が保水力と関係していることが考えられた。

テクスチャー特性では，硬さおよびガム性は専用種が高い値を示し，凝集性ではSAが低い値を示したが，有意な差ではなかった。著者らは二元交雑および専用種の2鶏種について胸肉と腿肉のテクスチャー特性を比較検討し，腿肉では二元交雑の方が硬さ，凝集性およびガム性ともに高い値を示したのに対し，胸肉では差異がなかったことを報告した[8,9]。このように，テクスチャー特性で胸肉より腿肉の方が鶏種間差が大きく認められた理由として，本報の成績からも明らかなように腿肉の方が一般成分の鶏種間差が大きかったこと，また，筋線維を構成するⅡ-R型筋線維とⅡ-W型筋線維の割合の鶏種差が胸肉より腿肉の方が大きいこと[10]に基づくものと考えられる。

川井田ら[11]によると凝集性は食品の形態を構成している内部結合力の大きさと考えられ，肉のきめ細かさや粗さを示すものと定義されている。本試験では水分と凝集性の間に高い負の相関が認められたが，鶏の水分は加齢とともに割合が少なくなることが知られており[12]，凝集性と成熟の関連性を示唆するものであろう。このようなことから，凝集性がSAで低かったのは，SAが晩熟なためと考えられる。

筋線維の太さは増体が大きいほど太い傾向にあった。筋線維の太さはテクスチャーと何らかの関連性があるものと思われるが[9,13]，本試験では高い相関が認められず，硬タンパク質コラーゲンの量などの他の要因についても検討を要する。

官能検査では，胸肉を材料とした焼肉は鶏種間の差異が認められなかったが，と体全部を使ったスープはSAおよび二元交雑が味がよく，好ましいと判定された。このことは胸肉は味が淡泊でテクスチャーもほとんど同じであるが，と体全体では味に差があることを示している。

## 5. 要　約

薩摩鶏，薩摩鶏交雑ブロイラー，白色プリマスロック，白色コーニッシュおよびブロイラー専用種の筋肉の理化学的特性と薩摩鶏，薩摩鶏交雑ブロイラーおよびブロイラー専用種の官能検査について比較検討し，次の結果を得た。

(1) 水分，粗タンパク質，粗脂肪および粗灰分ともに鶏種間で差は認められなかった。しかし，粗タンパク質，粗脂肪および粗灰分では部位間で有意差が認められた。

(2) pH，保水力，肉色および脂肪融点ともに鶏種間で差は認められなかった。

(3) テクスチャー特性は，硬さ，凝集性およびガム性ともに有意差は認められなかったが，硬さはブロイラー専用種および薩摩鶏で，凝集性は薩摩鶏交雑ブロイラーおよびブロイラー専用種で，ガム性はブロイラー専用種で，それぞれ高い値を示した。

(4) 筋線維の数および太さは有意差は認められなかったが，薩摩鶏および薩摩鶏交雑ブロイラーで数が多く，細い傾向にあった。

(5) 官能検査では，スープで薩摩鶏と薩摩鶏交雑ブロイラーがブロイラー専用種に対して有意に味がよく，好まれた。

(6) 理化学的特性間の相関関係は，硬さとガム性および保水力と筋線維の数の間に正の相関が，凝集性と水分，水分と粗脂肪および筋線維の数と太さの間に負の相関が認められた。

© The Ito Foundation

**文　献**

1) 三枝弘育，平野直彦，斉藤季彦：東京畜試研報，22，21-29，1988
2) 小谷秀行，駒井一茂：埼玉鶏試研報，21，20-27，1987
3) 小島正秋，加香芳孝，後藤静夫，持田行盛，東上床久司：鹿大農学術報告，25，103-108，1975
4) 吉田　実：畜産における実験計画法，養賢堂，東京，81，1975
5) 日科技連官能検査委員会編：官能検査ハンドブック，日科技連，東京，301-303，1985
6) 小島正秋，加香芳孝，後藤静夫，持田行盛：鹿大農学術報告，25，125-138，1975
7) 福永隆生，古賀克也，舞田裕二，松岡尚二：鹿大農学術報告，39，223-232，1989
8) 松岡尚二，中村　研，古市信夫，平原　実，田中浩人，久木元忠延，柏木　忍，川井田博：鹿児島鶏試研報，26，86-95，1988
9) 松岡尚二，中村　研，古市信夫，平原　実，田中浩人，久木元忠延，柏木　忍，川井田博：鹿児島鶏試研報，27，143-149，1989
10) 岩元久雄，守田　智，尾野喜孝，高原　斉，東上床久司，久木元忠延，後藤静夫：日畜会報，55，87-94，1984
11) 川井田博，奥園義美，福元守衛，楠元薩男，宮内泰千代，加香芳孝，小島正秋：日豚研誌，18，(2)，89，1981
12) 朴　壮熙，秋葉征夫，野上　茂，村上　斉，高橋和昭，堀口雅昭：日本畜産学会80回大会要旨，57，1988
13) 小松明徳：肉の科学，7，(2)，148，1966

© The Ito Foundation

# 食鳥処理場で認められる疾患の調査・研究
## —食鳥検査制度実施のために—

Survey and Study on Diseases at Dressing Plants
—For Conducting the Poultry Meat Inspection System—

板倉　智敏・御領　政信・落合　謙爾（北海道大学獣医学部）

Chitoshi Itakura, Masanobu Goryo and Kenji Ochiai
(Faculty of Veterinary Medicine, Hokkaido University)

This survey and study were carried out to collect the basic data prior to conducting the poultry meat inspection system. Especially, lesions occurring in broiler chickens at dressing plants were investigated this year.

The following diseases were relatively frequent; acute type of Marek's disease, reoviral tenosynovitis, atrophy of Bursa of Fabricius, purulent osteomyelitis-arthritis, colibacillosis, fatty liver, tibial dyschondroplasia, and perosis. The incidence of these diseases varied with each farm.

### 1. 目　　的

日本の厚生省は，平成４年度から食鳥検査制度を実施するため，平成２年４月17日，閣議を経て国会に「食鳥処理の事業の規制および食鳥検査に関する法律案要綱」をを提出した。著者らは，この食鳥検査実施に先がけて，食鳥処理場で発生する疾病・病変の実態調査が急務であると考え，昨年度（昭和63年度）伊藤記念財団から研究助成を受けて，廃鶏処理場で認められる疾病の調査・研究を行った[1)]。

本年度（平成元年度）は，ブロイラー処理場において認められる疾病についての調査・研究を行った。日本におけるブロイラーなど食鳥肉の消費は年々増大し，昭和61年には約196万トン，処理羽数で約８億１千万羽にも達し，国民の食肉消費量の35％を占めるようになった。このような処理羽数の増加に伴い，食鳥処理場で認められる疾病の比率も高くなっている。例えば，農水省が昭和47年度から昭和60年の間に実施した全国の食鳥処理場において発見される異常鶏の状況は，昭和47年に全国平均5.3％の発生率であったものが，昭和60年においては12.1％に増加している。著者らが本年度に行ったブロイラーの疾病の発生調査は，一部の限られた食鳥処理場においてなされたものであるが，その成績は日本の実態の一端を示すものと考える。

### 2. 方　　法

目的で記述したように，平成元年度はブロイラー処理場で認められる疾病についての調査・研究を行った。この調査・研究は，１日に約１万羽を処理している札幌市近効と宮崎市近効に所在する２ヵ所の食鳥処理場で実施した。方法としては，と体あるいは解体された鶏体の筋肉，内臓を含む全身を病理解剖学的に検索した。肉眼的に診断困難な組織は，10％ホルマリンに固定して実験室に持ち帰り，病理組織学的に検索して診断した。ま

© The Ito Foundation

た，ウイルス性あるいは細菌性疾病が疑われる組織については，その組織片を冷蔵して実験室に持ち帰り，常法に従って菌分離ならびにウイルス分離を実施した。

## 3. 結果と考察

結果では，調査した2ヵ所のブロイラー処理場で比較的良く認められる疾病の病態について記述し，発生率については詳しく言及しない。

### 3.1 マレック病

本病の主変化は肝と脾に認められた。すなわち，肝は腫大して微細な白斑をび漫性に多数有するか，あるいは小指頭大に至る白色結節形成の何れかであった。脾は最大ピンポン玉大に至るさまざまな程度の腫大と微細な白斑の密発を示した。これらのマレック病病変は急性型[2]に属するが，このような病変が比較的しばしば処理場で認められることは注目されるべきである。その理由は，近年，マレック病のワクチン接種がブロイラーに必要か否かが論議され，またワクチンブレークならびにワクチンに用いるウイルス株間によるワクチン効果についても問題視されているからである。食鳥処理場において，著明に腫大した肝や脾は廃棄されているが，軽度ないし中等度に腫大した臓器は食用に供されていた。この実状は，食鳥検査制度の速やかな実現を訴えているようであった。なお，慢性型（神経型）マレック病例は認められなかったが，これは生体時に排除されたためと推察された。

### 3.2 レオウイルス性腱鞘炎

本病の特徴病変は，片側性あるいは両側性の腓腹腱断裂であった。腓腹腱断裂例は，と体の段階で，断裂部の皮下が出血で紫赤色化しており，発見が容易であった。病変部の皮膚を切開すると，断裂した腓腹腱断端が明らかに認められ，その周囲は出血して水腫性でであった。また，おかされた腓腹腱は組織学的には慢性の腱鞘炎を示していた[3]。本病の発生は50日齢を過ぎてから認められ，雌よりも雄に多い傾向を示した。また，本病罹患例では，病変が局所（腓腹腱）に限られ，その他には病変を認めないため，その局所のみを廃棄すれば他の部位の筋肉は食用に供されて何ら問題はないと判断された。

以上の成績とは別に，野外鶏から分離されたレオウイルスをSPF鶏雛に接種した結果，食鳥処理場で認められたと同一の腱鞘炎が作出された。よって本病の原因はレオウイルスであることが確認された。

### 3.3 ファブリキウス嚢の萎縮

検査したほとんどの鶏のファブリキウス嚢は萎縮し，小指頭大の大きさであった。食鳥処理場で処理される日齢（50～60日齢）の鶏のファブリキウス嚢の正常な大きさはウズラ卵大であるべきである。よって，認められたファブリキウス嚢の萎縮はかなり重度であることが指摘された。萎縮したファブリキウス嚢は，組織学的に，リンパ濾胞の萎縮（リンパ球脱落と上皮性細網細胞の増殖）と嚢上皮の不整配列を示した。これらの変化は伝染性ファブリキウス嚢病を耐過した例の変化と同一であった[2]。このようなファブリキウス嚢の萎縮は，食肉とは直接的には何ら関係ないが，感染性疾病の発病病理を考えるうえでは注目すべき変化である。すなわち，ファブリキウス嚢の萎縮は液性免疫産生能の低下を意味し，この低下は多くの疾病を誘発する[4]。

### 3.4 化膿性骨髄炎・関節炎

本病の病変としては，骨髄の軟化，まれに脛骨近位骨幹端の膿瘍形成，さらに足関節に主座して化膿性滲出が認められた。現在の食鳥処理では，骨髄や関節を切開することはないので，これらの部位の検査も必要であると考えられる。なお，本病では化膿性骨髄炎・関節炎が目立つが，実際に

© The Ito Foundation

は全身がおかされ，肝や脾などの腫大あるいは壊死巣形成が伴われる[5]。したがって，本病と診断された時には全廃棄が適当であると考える。本病例からは細菌分離がなされ，分離菌はブドウ球菌と同定される。

3.5　大腸菌症

本病の特徴的変化は，線維素・化膿性心外膜炎，同肝被膜炎，ファブリキウス嚢の萎縮であった。この心外膜炎ならびに肝被膜炎は概して重度であり，気嚢壁や腸漿膜などに広く広がっていた。また，重度な例はしばしば肺炎を伴っていた。本病は養鶏場単位で多発傾向にあり，多発する養鶏場は衛生管理状態が不良であった。本病にファブリキウス嚢萎縮が伴うことは普通であり，この変化が本病の病理発生に重要とみなされている[2,4]。

3.6　脂肪肝

食鳥処理場で処理されるブロイラーの約半数以上の肝は退色し，正常な赤褐色でなかった。これらの肝を組織学的に検索するとさまざまな程度の脂肪変性を示していた。この脂肪肝については10数年前から問題視され，原因究明がなされているが，未だ原因不明である[2]。食鳥処理場においては，脂肪肝は肝の商品的価値を失い，経済的損耗になっている。

3.7　脛骨軟骨異形成

本病の特徴的変化は脛骨近位骨幹端における白色の異常軟骨組織塊の形成で，これは左右対称性に生じていた。異常組織塊は，大きくなると周囲の皮質骨を圧迫して骨頭を肥大させ，重度例では骨幹端の骨折を引き起こしていた。本病の発生率は養鶏場単位で0％から10％内外で，養鶏場単位で明らかな発生差を示した。本病の発生原因として，遺伝的要素が重視されているが[6]，養鶏場単位での発生率の差はそれを示唆するものであった。

3.8　ペローシス

本病は症候群的に扱われ[2,6]，変化は多様であった。すなわち，食鳥処理場では，脛骨の彎曲あるいは捻転，脛骨遠位端の骨折，中足骨の短小あるいは彎曲として認められた。殊に，脛骨の彎曲は多数のブロイラーで認められ，鶏の急速な体重増加に対応して脚骨の強化が伴なっていないことが示唆された。ブロイラーには古くからの脚弱症が多く，これに包含される病変も食鳥処理場で多く認められている[7]。本病の原因については，遺伝的素因，栄養障害，急速な肥育形態などが疑われているが，少なくとも感染性因子は形態学的に否定される。

## 4. 要　約

食鳥検査制度が実施されるのに先がけて，その基礎資料を集積する目的で本調査・研究を実施した。平成元年度は，ブロイラー処理場で認められる疾病について調査・研究した。比較的良く認められる疾病として，急性型マレック病，レオウイルス性腱鞘炎，ファブリキウス嚢の萎縮，化膿性骨髄炎・関節炎，大腸菌症，脂肪肝，脛骨軟骨異形成，ペローシスが認められた。これらの疾病の多くは，養鶏場単位で発生差を示した。

### 文　献

1) 板倉智敏・橋本信夫・喜田　宏・昭和63年度食肉に関する助成研究調査成果報告書，Vol. 7，183-186，伊藤記念財団，東京，1989
2) 板倉智敏・鶏病病理学カラーアトラス。学窓社，東京，1988
3) Itakura, C., Matsukawa, Y. and Goto, M. Jpn. J. Vet. Sci., 39, 509-520, 1977
4) 平井克哉・鶏病研報，15，23-40，1979
5) Itakura, C., Kurisu, K. and Goto, M. Jpn. J. Vet. Sci., 38, 451-459, 1976
6) 板倉智敏・鶏病研報，14，45-80，1978
7) Bergmann, V. und Scheer, J. Monatsh. Veterinaermed., 31, 576-581, 1976

© The Ito Foundation

# 食鳥における各種人畜共通伝染病原体の浸潤調査並びにそれらの迅速診断法の確立

Prevalence of Several Zoonosis Agents in Poultry and the Establishment of Rapid Diagnosis

源　宣之・金城　俊夫・平井　克哉
杉山　誠・鈴木　有二（岐阜大学農学部）

Nobuyuki Minamoto, Toshio Kinjo, Katsuya Hirai, Makoto Sugiyama and Yuji Suzuki
(Faculty of Agriculture, Gifu University)

In order to investigate the prevalence of several zoonoses in poultry, we determined for antibodies against the agents in serum collected from broiler chickens.

*Toxoplasma gondii* antibody was detected by latex aggultination test in only four (0.8%) of 495 sera at titers of 1:16 and 1:32. When tne cut-off titer for the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was set at 1:400, positive antibody against rotavirus was detected in 10 sera (2.2%) at titers of 1:800 through to 1:3200. These results suggested that both agents almost never prevalent in broiler chickens. On contrary, 92 (45.1%) of 204 sera had antibody to *Campylobacter Jejuni* in the range of 1:400 to 1:3200 when titers of 1:400 or higher by ELISA were read as positive. This positive rate intimated that broiler chickens are highly contaminated by *Campylobacter Jejuni*.

Next, we developed the antigen capture ELISA based on monoclonal antibodies as a model method for the detection of agents in the poultry faeces.

A pooled antibody consisted of four monoclonal antibodies, which directed against the common group-specific pigeon rotavirus antigen and belonged to each antigenic sites of VP 6, was used as a antigen capture and detector reagent. All ten rotavirus strains contained 4 human strains (1～3 and 8 serotype) and each one strain of canine (3), feline (3), porcine (5), bovine (6), equine (6), and pigeon (7), were detected as positive by this assay. The minimum 50% tissue culture infectious dose detected was 2.7～5.0 (log) by this assay versus 3.1～6.7 (log) by commercial latex agglutination test.

From these finding, it was indicated that the capture ELISA for several rotaviruses antigen detection is sensitive, quick and may have application for use in the poultry examination.

## 1. 目　的

ニワトリ，アヒル等食鳥の消費は年々増加し，現在，摂取される食肉全体の1/3以上に達している。需給量の増大に伴い飼育形態が大規模多数羽飼育に変わり，多くの疾病が持続的に発生している。なかでも，オーム病やブドウ球菌症等の人畜共通伝染病（ズーノーシス）は年々増加傾向にある[1]。また近年カンピロバクターによる食中毒が増加しており，この疾病に食鳥肉が何らかの形で関与していると考えられている[2]。これらズーノーシスの摘発は1992年より実施される食鳥検査の主目的の1つである。しかし，一日に1万羽以上の食鳥を処理している所が多く，従来の食肉検査

© The Ito Foundation

体制では十分な対応ができない。簡単な器具で短時間に検出可能な検査方法は食鳥検査にとって必須といえる。そこで，まずこれまで十分に調べられていない食鳥における数種の病原体の浸潤状況を検出感度の高いラテックス凝集反応や酵素抗体法(ELISA)による抗体調査で検討した。また，それらの病原体の迅速診断法を確立するモデルとして，ハトロタウイルスに対する単クローン抗体（MAb）を用いて，抗原を検出する Capture-ELISA を開発した。

## 2. 方　法

2.1　ブロイラーの血清

岐阜県のA食鶏処理場で採取した60日齢ブロイラーの血清を用いた。

2.2　抗体調査

（1）　トキソプラズマ病：市販のトキソテスト-MT（栄研）により，ラテックス（LA）凝集反応で行った。16倍以上を陽性とした。

（2）　カンピロバクター感染症：ビオチン-アビジンによるELISAで測定した[3]。抗原に用いた菌株は先にニワトリから分離したカンピロバクター・ジエジユニーのC-1，C-11，C-13およびC-14の4株である[4]。抗原は基礎培地で培養した菌をPBS(－)に浮遊させ，20KC, 5分間音波処理し，6,000rpm 20分間遠心した上清で，各菌株の上清を等量ずつ混合したものである。抗原量はbox titrationによって決定し，160倍に希釈後ELISAプレート（Dynatech. Lab., USA）に固相化した。ビオチン化抗ニワトリ IgG 抗体（EY Lab., USA）およびペロオキシダーゼ標識ストレプトアビジン（Zymed Lab., USA）は市販品を用いた。

（3）　ロタウイルス感染症：カンピロバクター感染症と同様のELISAで測定した。抗原は先に報告した方法で作製したハトロタウイルス，PO-13株の濃縮ウイルスである[5]。

（4）　Capture-ELISA：抗原の検出はプレートに固相化した抗体とビオチン化抗体とで抗原をサンドイッチする方法で試みた[6]。抗原捕捉および検出用抗体には先に作出したPO-13株の群特異抗原に対するMAbで[7]，VP6の各抗原領域を認識する4つのMAbを混合して用いた。

## 3. 結果と考察

（1）　抗体調査：トキソプラズマに対する抗体保有率は0.8%であった（**表1**）。ニワトリにおける本病の抗体調査の報告は少く，ブロイラーに関してはほとんど明らかにされていない。泉谷は産卵鶏で21.3%が抗体陽性と色素試験で報告しているが[8]，年齢が高く低年齢のブロイラーと比較できない。ウシ，ウマおよびブタでは3～67%と報告によって大きくばらついている。正確に比較するものがないが，トキソプラズマのブロイラーへの浸潤は少いものと考えられる。ただわずかではあるが汚染されているのも事実であり，十分な警戒が必要である。

カンピロバクターに対する抗体価の分布は≦：100と：800にそれぞれピークが認められたことから，抗体の陽性限界を：400とした。その結果，陽性率は45.1%であった（**表2**）。ニワトリにおける本菌の分離率も報告者によって10～100%とばらついているが[4]，市販の鶏肉における菌の分離率は58～77%で[9]，今回の成績を裏付けている。したがって，ELISAによる抗体測定は短時間に判定できることから，菌分離に代る汚染状態を知

**表1**　ブロイラーにおけるトキソプラズマに対する抗体の分布

| 検査数 | 陽性数 (≧16) | 陽性率 (%) | 抗体価 〈:16 | :16 | :32 | :64 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 495 | 4 | 0.8 | 491 | 3 | 1 | 0 |

ラテックス凝集試験

© The Ito Foundation

る有用な手段といえよう。

ロタウイルス感染症はいまだズーノーシスに認定されていないが，我々のこれまでの抗体調査から，ヒトとトリとの間で共通のウイルスの存在が示唆されている[10]。しかも産卵鶏では57%がPO-13株に対するHI抗体を保有していた。しかし，今回の成績では：800以上を陽性とした場合，2.2%ときわめて低いことが明らかになった（**表2**）。以上の成績はほんの一時点のものであり，今後，長期間にわたり継続的に測定する必要がある。またオーム病，ブドウ球菌症およびサルモネラ病の各病原体に対する抗体調査も続いて実施する予定である。

（2） Capture-ELISAによるロタウイルスの検出：抗原捕捉用抗体として単一のMAbを用いたが，抗原の捕捉力が弱く，そこで，各抗原領域を認識した4つのMAbを混合し，多価抗体にして用いた。その結果，捕捉用抗体，ビオチン化抗体およびペロオキシダーゼ標識ストレプトアビジンの各至適濃度はそれぞれ4000，600，3200倍であった。この方法はロタウイルスのみを検出し，伝染性ファブリキウス嚢病，ニューカッスル病および狂犬病ウイルスとまったく反応しなかった。また，反応はロタウイルスをその抗血清で処理することによってブロックされた。このことから，この方法の特異性が確認された。

次に，ヒトを含めた各種動物由来のロタウイルスを用いて，この方法の検出感度を調べた。**表3**に示した如く，各株によって若干の違いがあるものの，この方法では2.7～5.2 log $TCID_{50}/ml$の感染量のウイルスの存在で種々のウイルスが検出された。この感度は糞便存在下でもほぼ同じであ

**表2**　ブロイラーにおけるカンピロバクターおよびロタウイルスに対する抗体の分布

| 病原体 | 検査数 | 陽性数 | 陽性率 (%) | 抗体価 ≦:100 | :200 | :400 | :800 | :1600 | :3200 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| カンピロバクター | 204 | 92[1] | 45.1 | 101 | 11 | 35 | 53 | 2 | 2 |
| ロタウイルス | 463 | 10[2] | 2.2 | | 453[3] | | 4 | 5 | 1 |

ELISA
1)　≧:400　2)　≧:800　3)　≦:400

**表3**　各種ロタウイルスのELISA，感染及びラテックス(LA)価

| ウイルス株 | (血清型) | 由来 | 力価[1] ELISA (A) | ウイルス (B) | LA (C) | (B－A) | (B－C) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Wa | 1 | ヒト | 2.8 | 6.1 | 2.2 | 3.3 | 3.9 |
| KUN | 2 | 〃 | 1.6 | 5.7 | 1.9 | 4.1 | 3.8 |
| MO | 3 | 〃 | 2.8 | 5.5 | 2.2 | 2.7 | 3.3 |
| RS-15 | 3 | イヌ | 3.4 | 7.3 | 2.8 | 3.9 | 4.5 |
| C-100 | 3 | ネコ | 3.4 | 6.9 | 2.8 | 3.5 | 4.1 |
| S-80 | 5 | ブタ | 2.8 | 7.8 | 1.9 | 5.0 | 5.9 |
| NCDV | 6 | ウシ | 3.1 | 6.9 | 2.2 | 3.8 | 4.7 |
| SH-15 | 6 | ウマ | 3.4 | 8.6 | 2.8 | 5.4 | 5.8 |
| PO-13 | 7 | ハト | 4.3 | 8.6 | 1.9 | 4.3 | 6.7 |
| 69M | 8 | ヒト | 2.5 | 5.3 | 2.2 | 2.8 | 3.1 |

1)　$\log_{10}$/ml

© The Ito Foundation

った。また，市販のLA凝集反応よりも明らかに高い感度を示した。そこで，この方法をブロイラーの糞便に用いたところ，7/154（4.5%）が陽性となった。現在，陽性例の糞便中のウイルスの確認をウイルス分離，電子顕微鏡による観察およびウイルスRNAの抽出によって行っている。

ウイルス抗原を検出するCapture ELISAはすでに多くの人々によって報告されている。しかし，抗原捕捉および検出用の抗体として，VP6の各抗原領域に対するMAbを混合した抗体を用いた報告はない。由来の異なる多くのロタウイルスがこれまで以上に高感度で検出されたのはこのMAbを用いた結果と思われる。今後，この方法をモデルにして，各種病原体に対するMAbを混合し，数種の病原体を同時に検出する方法を確立したい。

## 4. 要　約

ヒトに感染する恐れの高い2，3の疾病のブロイラーにおける浸潤状況を抗体調査によって検討した。トキソプラズマおよびロタウイルスに対する抗体保有率はそれぞれ0.8%，2.2%と低いことが明らかになった。一方，カンピロバクターに対する保有率は高く45.1%で，本菌のこれまでの分離状況を裏付けた。次に，食鳥糞便中の各種病原体の迅速検出法を確立するモデルとして，ロタウイルスによるCapture-ELISAを開発した。抗原捕捉および検出用抗体にVP6の各抗原領域を認識するMAbを混合して用いたところ，高い検出感度と特異性が得られ，さらに，各種ロタウイルスが同じ系で検出された。今後，数種病原体に対するMAbを作出混合して，それらの病原体を同時に検出する方法を確立したい。

## 文　献

1) Fukushi, H., Ogawa, Y., Shimakura, S., and Hirai, K. Res. Bull. Fac. Agr. Gifu Univ., 50：271-277, 1985
2) 伊藤　武・坂井千三　鶏病研報，20：2-12，1983
3) Shaw, R.D., Vo, P.T., Ofitt, P.A., Coulson, B.S. and Greenberg, H.B. Virology 155：434-451, 1986
4) 坂井智恵・金城俊夫・源　宣之　岐阜大農研報，52：217-222，1987
5) Minamoto, N., Oki, K., Tomita, M., Kinjo. T. and Suzuki, Y. Epidem, Inf., 100：481-492, 1988
6) Harlow, E and Lane, D. Antibodies. A Laboratory Manual 553-612, Cold Spring Harbor Lab., New York 1988
7) 富田眞之・源　宣之・杉山　誠・金城俊夫　岐阜大農研報，54：233-240，1989
8) 泉谷武祥　大阪市大医学誌，7：181-192，1958
9) 岩上泰雄・山田米重・星川博文・石田謙子・吉野正克・大中隆史・山野井茂樹　食品衛生研究，40：101-108，1990
10) 源　宣之・平尾　恵・金城俊夫・平井克哉　岐阜大農研報，51：235-242，1986

© The Ito Foundation

# 生検筋肉材料を用いて牛骨格筋の筋線維の特質を検索する方法についての検討

Studies on the Research Techniques to make the Fiber Characteristics of Individual Beef Cattle clear with Biopsy Materials excised from Skeletal Muscle

岩元久雄・尾野喜孝（九州大学農学部）

Hisao Iwamoto and Yoshitaka Ono (Faculty of Agriculture, Kyushu University)

In this study, the research techniques to make the muscle fiber characteristics of individual beef cattle clear with biopsy materials were ivestigated in skeletal muscle of Japanese black steers. Proportional distribution of fiber types was estimated in *M. biceps femoris* when frozen cross sections were serially taken from both biopsy and carcass materials, and treated with histochemical methods for acid- and alkaline-preincubated myosin ATPase activity, and NADH-dehydrogenase activity. The results obtained were as follows:

(1) It was suggested that we are able to estimate the proportional distribution of fiber types in *M. biceps femoris* with small muscle materials taken by biopsy.

(2) When the proportional distribution of fiber types was compared among the fifteen parts of *M. biceps femoris* in carcass materials, an apparent difference of the proportional distribution was observed between the proximal and the distal part, but not between the superficial and the profound part.

(3) It was the proximal part of *M. biceps femoris* in which the characteristics of an individual steer in the proportional distribution of fiber types were recognized most clearly.

(4) From these results, it became clear that the muscle fiber characteristics of an individual steer could be obtained by the small amount of biopsy materials excised from *M. biceps femoris* at the line that links *Trochanter major* in *Os femoris* with *Tuber ischiadicum*.

## 1. 目　的

肉用牛は育成・肥育過程を通じて，肉質を高めるための特殊な飼養管理を必要とする。如何に高度な肥育技術を用いてもすべての牛が高品質の食肉を生産するわけではない。それには個々の牛が持っている資質も大きく関与していることは事実であり，現在では資質の良い系統牛の造成も進められている。しかし如何なる特質の骨格筋を持った牛が高品質の食肉を生産するかは不明であり，これらの点について詳細な検討を行った報告はない。そこで，生体から生検筋肉材料を採取し，各個体の筋線維の特質を明らかにして，肉質と相関関係があるのかどうかを検討することとした。まず，本研究では生検筋肉材料の採取方法とそれによる筋線維型構成割合の推定法を検討し，併せて大腿二頭筋における生検筋肉材料の採取部位を調査し，若干の結果を得たので報告する。

## 2. 方　法

（1） 材料牛：供試牛は九州大学農学部附属農場高原農業実験実習場で繁殖育成された黒毛和種

© The Ito Foundation

去勢雄牛4頭（10ヵ月齢1頭，12ヵ月齢2頭および28ヵ月齢1頭）であった。

（2） 生検筋肉材料による検討：生検筋肉材料を大腿二頭筋 *M. biceps femoris* の椎骨頭中央部の浅層より各個体について3個ずつ採取した。組織化学的方法により筋線維型を同定し，その構成割合を3個の平均値で求めた。その結果をと殺後に同部位から採取したと畜材料による結果と比較検討した。

（3） 大腿二頭筋の各部位における検討：大腿二頭筋の椎骨頭を近位端から遠位端に向かって，上・中・下の3部位に大別し，それぞれの部位で浅層から深層にかけて5部位を区分し，計15部位を作った。それぞれの部位の中心部から材料肉片を採取し，組織化学的方法により処理した。

（4） 組織化学的方法：生検およびと畜材料筋肉片より8 μm厚の連続凍結切片を作製し，酸およびアルカリ処理後[1~3]の myosin ATPase 活性[4]，ならびに NADH 脱水素酵素活性[5]を検出した。筋線維型の同定は Ashmore and Doerr[6]の方法に従い，αR型，αW型およびβR型筋線維を分類した。各生検材料およびと畜材料において筋線維型の構成割合を求めた。

（5） 統計処理の方法：筋線維型構成割合を生検材料とと畜材料の間で比較し，両者の差を求めてt分布による95%信頼区間を用いて検定を行った。また，大腿二頭筋の各部位における筋線維型の構成割合の差異，および各部位における個体間のその差異は分散分析法により検定し，それぞれの部位間および個体間の差異は Scheffé の方法[7]による95%同時信頼区間を設定して検定を行った。

## 3. 結　果

### 3.1 生検材料とと畜材料の比較

（1） βR型筋線維：βR型筋線維は基本的には酸処理後の myosin ATPase 活性が高く，アルカリ処理後の同酵素活性が低い筋線維で，いずれでも NADH 脱水素酵素活性が強かった。しかし，特に若齢でβR型筋線維を多く持っていた個体では Suzuki and Cassens[8]のいう中間型，すなわちαR型からβR型筋線維への移行型が多く観察された。将来，これらの移行型はβR型筋線維になるものとみなされるので，βR型に算入した。このようにして求めたβR型筋線維の構成割合を生検材料とと畜材料の間で比較したのが **Table 1** である。その差は有意ではなかったものの生検材料の方がやや多く見積もる傾向にあった。

（2） αR型筋線維：酸およびアルカリ処理後の myosin ATPase 活性がβR型筋線維とは逆の反応を示し，NADH 脱水素酵素活性の強い筋線維がαR型筋線維である。この型の筋線維の構成割合を生検材料とと畜材料の間で比較検討したのが **Table 2** である。この筋線維の構成割合は生検材料で少なく見積もる傾向にあることが判然と示された（$P < 0.05$）。

（3） αW型筋線維：αR型筋線維と myosin ATPase 活性では同様の傾向を示すが，NADH 脱

**Table 1** Difference of the proportional distribution of type βR fibers between biopsy and carcass materials. (%)

| Materials | Steer No. | | | | M±SD |
|---|---|---|---|---|---|
| | 18 | 19 | 7 | 16 | |
| Carcass material (A) | 40.0 | 27.8 | 33.2 | 24.7 | 31.4±6.7 |
| Biopsy material (B) | 40.7 | 28.0 | 35.0 | 26.7 | 32.6±6.5 |
| Difference (A−B) | −0.7 | −0.2 | −1.8 | −2.0 | − 1.2±0.9 |

© The Ito Foundation

水素酵素活性の弱い筋線維がαW型筋線維である。αW型筋線維の構成割合を生検材料と畜材料の間で比較すると**Table 3**のとおりとなり，生検材料の方で有意な差ではなかったものの多く見積もる傾向が示された。

3.2　大腿二頭筋の各部位における検討

個体間と部位間において分散分析を行なった結果，筋線維型の構成割合は個体間で異なり，また部位間では，近位端から遠位端方向における上・中・下部の間で異なることが示された。しかし，上・中・下部のそれぞれの部位において浅層から深層にかけての各部位間では筋線維型の構成割合はほとんど差異を示さなかった。これらの結果をふまえて上・中・下部における5部位の平均値を個体別に取りまとめて表にしたものが**Table 4**である。

（1）　部位間の差異：どの個体でもβR型筋線維は上部で多く，中部が続き，下部で最も少なくなった。βR型筋線維と逆の関係を示し，下部で最も多くなったのがαW型筋線維であった。αR型筋線維では個体番号18の牛で上部が他の部位より少なかったことを除けば，部位間の差異はほとんど観察されなかった。これらのことから，大腿二頭筋は基本的に近位端の方でβR型筋線維を多く持ち，遠位端の方でαW型筋線維を多く持っていることが示唆された。

（2）　個体間の差異：**Table 4**に示すとおり，それぞれの個体が極めて特徴ある筋線維型の構成割合を示すことが明らかになった。個体番号18の牛はβR型筋線維を多く持ち，αR型筋線維を含めた赤色筋線維を70～82%も持っていることが示された。これに対して個体番号16の牛ではβR型筋線維が少なく，αR型筋線維が多いことが示された。個体番号7の牛ではβR型筋線維が18と16の中間で，αW型筋線維が多く，αR型筋線維が少ないことが示された。さらに，個体番号19の牛は各型筋線維ともそれぞれの個体の中間の構成割合を示した。このように筋線維型の構成割合は個体間で著しく異なることが示唆され，それぞれの牛が極めて特徴ある骨格筋を有することが明らかになった。

## 4.　考　　察

豚大腿二頭筋では浅層部でαW型筋線維が多く，

**Table 2**　Difference of the proportional distribution of type αR fibers between biopsy and carcass materials.（%）

| Materials | Steer No. | | | | M±SD |
|---|---|---|---|---|---|
| | 18 | 19 | 7 | 16 | |
| Carcass material（A） | 38.0 | 33.0 | 22.5 | 34.9 | 32.1±6.7 |
| Biopsy material （B） | 35.5 | 29.0 | 19.1 | 28.3 | 28.0±6.8 |
| Difference （A－B） | 2.5 | 4.0 | 3.4 | 6.6 | 4.1±1.8* |

*　shows the significant difference from 0 at 5% level.

**Table 3**　Difference of the proportional distribution of type αW fibers between biopsy and carcass materials.（%）

| Materials | Steer No. | | | | M±SD |
|---|---|---|---|---|---|
| | 18 | 19 | 7 | 16 | |
| Carcass material（A） | 22.0 | 39.2 | 44.3 | 40.5 | 36.5± 9.9 |
| Biopsy material （B） | 23.8 | 43.0 | 45.9 | 45.0 | 39.4±10.5 |
| Difference （A－B） | −1.8 | −3.8 | −1.6 | −4.5 | −2.9±1.4 |

© The Ito Foundation

**Table 4** Difference of the proportional distribution of fiber types among different parts of *M. biceps femoris*, and its characteristics of individual steer. (%)

| Fiber types | Steer No. | Proximal part | Middle part | Distal part |
|---|---|---|---|---|
| βR | 18 | $52.5^{A,a}$ | $38.1^{B,a}$ | $28.7^{C,a}$ |
| | 19 | $38.8^{A,b}$ | $32.2^{AB,ab}$ | $25.7^{B,ab}$ |
| | 7 | $35.0^{A,b}$ | $28.7^{AB,b}$ | $27.2^{B,ab}$ |
| | 16 | $28.8^{A,c}$ | $25.7^{AB,b}$ | $23.0^{B,b}$ |
| αR | 18 | $29.7^{A,a}$ | $38.7^{B,a}$ | $41.5^{B,a}$ |
| | 19 | $32.6^{A,ab}$ | $34.5^{A,ab}$ | $32.6^{A,b}$ |
| | 7 | $31.1^{A,ab}$ | $29.4^{A,b}$ | $28.9^{A,b}$ |
| | 16 | $40.2^{A,b}$ | $36.6^{A,a}$ | $40.5^{A,a}$ |
| αW | 18 | $17.8^{A,a}$ | $23.3^{AB,a}$ | $29.9^{B,a}$ |
| | 19 | $28.7^{A,b}$ | $33.3^{A,b}$ | $41.8^{B,bc}$ |
| | 7 | $33.9^{A,b}$ | $42.0^{AB,c}$ | $44.0^{B,c}$ |
| | 16 | $31.0^{A,b}$ | $37.8^{B,bc}$ | $36.7^{B,b}$ |

$^{A,B,C)}$ shows the significant difference among parts with different superscripts at 5% level.

$^{a,b,c)}$ shows the significant difference among steers with different superscripts at 5% level.

深層部でβR型筋線維が多いことが報告されている[9]が，今回の牛の大腿二頭筋ではそのような傾向はまったく観察されなかった。しかし，牛大腿二頭筋では近位部と遠位部の間で筋線維型の構成割合の著しい差異が認められた(**Table 4**)。このような筋線維型の構成割合の部位による差異は，βR型筋線維を最も多く持っていた個体番号18の牛で顕著であり，同型筋線維を最も少なく持っていた個体番号16の牛で小さかった。このことは同時に最も個体差が判然としている部位が近位部であり，遠位に行くにしたがって個体差が曖昧になることを示唆している。この点は今後生検筋肉材料により個々の牛骨各筋の特質を検討する際に最も重要であり，生検材料採取部位を示唆するものである。

生検筋肉材料による筋線維型の構成割合はと畜材料のそれとはやや異なるものであった(**Table 1~3**)。特にそれはNADH脱水素酵素活性の違いに基づいて区別するαR型とαW型筋線維の構成割合で，前者が少なく，後者が多いという結果であった。その原因としては生検筋肉材料は極めて微量な肉片であり，凍結したサンプルをクリオスタットで薄切するために台木に水で貼付するが，その際に材料肉片が多少とも溶解してNADH脱水素酵素活性が低下するのではないかと考えられる。したがって，この点は今後微量サンプルの取り扱いに慣れてくれば，かなりの部分が解決されるものと思われる。これらのことから，生検筋肉材料のような微量なサンプルからも十分に筋線維型の構成割合を求めることができると考えられる。しかし，今回は1頭につき3個のサンプルを採取したが，もっと数を増やすことによってデータの信頼度がどの程度増すのかを検討する必要があろう。

以上のような結果から，今後は大腿二頭筋の近位部，それも体表面からみて常に同一部位を特定することが重要であり，大腿骨大転子と座骨結節を結ぶ線が生検筋肉材料の採取部位として最適であるという結論に達した。また，その部位の生検筋肉材料は各個体牛の骨格筋の特質について多くのことを示してくれるものと推察される。このようにして得た骨格筋の特質と産肉能力との相互関

© The Ito Foundation

係が追求される。

## 5. 要　約

本研究では個々の肉用牛における骨格筋の特質を生検筋肉材料によって推定する方法について検討を行った。大腿二頭筋の材料肉片から凍結切片を作製し，組織化学的方法により筋線維型を同定し，それらの構成割合を求めた。その結果は以下のとおりであった。

(1) 生検筋肉材料のような微量なサンプルを用いても筋線維型の構成割合を求めることができるものと推察した。

(2) と畜材料を用いて大腿二頭筋の各部位における筋線維型の構成割合の変化を調べた結果，近位部と遠位部で著しく異なることが明らかになった。

(3) さらに大腿二頭筋の各部位における筋線維型の構成割合の結果から，個々の牛の特徴は近位部で最も判然と出現することが明らかになった。

(4) 以上のような結果に基づき，今後生検筋肉材料を大腿骨大転子と座骨結節を結ぶ線で採取することによって，個々の牛の骨格筋の組織化学的特質を把握できるものと推察した。

## 文　献

1) Brooke, M.H. and K.K. Kaiser, J. Histochem. Cytochem., 17：431-432, 1969.
2) Suzuki, A., Jpn. J. Zootech. Sci., 47：95-103, 1976.
3) Suzuki, A., Histochemistry, 51：121-131, 1977.
4) Padykula, H. A. and E. Herman, J. Histochem. Cytochem., 3：161-169, 1955.
5) 岡本耕造・上田政雄・前田隆英・水谷　昭・杉山武敏，顕微鏡的組織化学（上巻），323-324, 335－337, 医学書院，東京. 1976.
6) Ashmore, C.R. and L.Doerr, Exp. Neurol., 30：431-446, 1971.
7) Scheffé, H., The Analysis of Variance, 66-72. John Wiley and Sons, Inc., New York. 1959.
8) Suzuki, A. and R.G. Cassens, J. Anim. Sci., 51：1449-1461, 1980.
9) 岩元久雄・田畑正志・尾野喜孝・川井田博・高原斉，九大農学芸誌，35：31-36, 1981.

© The Ito Foundation

# 肉用牛の成長に伴う筋原線維および筋肉中結合組織の変化

Changes in Myofibrils and Muscle Connective Tissues during Muscle Growth in Beef Cattle

大杉 次男・小竹森 訓央・近藤 誠司
服部 昭仁・中村 富美男（北海道大学農学部）

Tsugio Osugi, Kunio Kotakemori, Seiji Kondo, Akihito Hattori and Fumio Nakamura
(Faculty of Agriculture, Hokkaido University)

Changes in connective tissue protein of muscle during growth were studied by means of immunohistochemical technique in newborn calf, 6, 18 and 23 months old steers of Hereford cattle. The results summarized as following.

1) The thickness of primary muscle fasciculus increased rapidly from birth to 6 months old and then increased gradually until 23 months old. But the thickness of intramuscular connective tissues, particularly perimysium, decreased during growth.

2) In newborn calf, anti-type I collagen antniserum reacted with perimysium but not with endomysium. The endomysium at 6 months old was immunostained by antitype I collagen antiserum and the immunostainability increased to 23 months old.

3) Type Ⅲ collagen was distributed in endomysium and perimysium but type Ⅳ collagen was distributed only in endomysium. The staining intensity of endomysium and perimysium by anti-type Ⅲ and Ⅳ collagen antisera were constant from birth to 23 months old.

## 1. 目　的

食肉の品質を決定する要素の中で，硬さや軟らかさとして表現される物性は，人の嗜好性と密接に関わり合っている。食肉の物性は筋肉中で高次構造を組んで存在している筋原線維と結合組織に関連しており，死後筋肉の熟成に伴う食肉の物性変化や筋肉組織の発生に関する研究はこれら筋原線維や結合組織を生化学および組織化学的に追求することによって行われてきている。一方，動物の成長に伴う食肉としての筋肉の変化は，牛では産肉量や肉質の一般的特性について生産方式の違いなどから検討されてきたが，その品質変化を筋原線維や結合組織の変化として検討した研究はほとんどない。

本研究ではヘレフォード種肉用牛の初生子牛，離乳子牛，放牧育成牛および肥育牛を例にとり，加齢に伴う食肉の変化を筋肉内結合組織のタンパク質，特に様々な局在性を示す多型の主要構成タンパク質であり[1,2]，また，牛筋肉においては加齢に伴う熱変性挙動の変化が知られている[3,4]コラーゲンについて免疫組織化学的に検討した。

## 2. 方　法

### 2.1 供試牛および飼育方法

北海道大学農学部附属牧場において牧草多給方式で飼育されているヘレフォード種肉用牛の初生子牛，離乳子牛，育成牛および肥育牛各1頭を供

© The Ito Foundation

試し，試料を採取した。初生子牛としては生後3日間初乳のみを給与した雄子牛を，離乳子牛としては出生後6ヵ月間母牛と共に24時間放牧されていた去勢子牛をと殺し，実験に供した。放牧期間中母乳のほかに4ヵ月齢位から1日1頭当たり約0.3kgの幼牛用配合飼料を給与した。育成牛としては離乳後の冬期に粗飼料主体で飼育し，次いで2夏目の放牧育成を終えた18ヵ月齢の去勢牛を，肥育牛としては18ヵ月齢まで粗飼料主体で育成した後5ヵ月間肥育した去勢牛をと殺し，実験に供した。肥育期間中，1日1頭当たり肥育用配合飼料を4kg，コーンサイレージ20kgを給与し，乾草を自由摂取とした。

2.2　試　料

と殺解体後，背肉（サーロイン）ともも肉（うちもも）を採取し，液体窒素中に使用時まで保存した。

5㎜角程度に切り取った肉片をOCTコンパウンド（Tissue-Tek, MILES）で包埋し，再凍結した。横断凍結切片（厚さ10μm）は−20℃でクリオスタット（Minotome, DAMON）を用いて作成した。作成した切片は10%ホルマリンを含むリン酸緩衝塩溶液 pH 7.4（PBS）によって室温で5分間固定後，1%トライトンX-100を含むPBSで5分間処理し，PBSで洗浄した。通常の光学顕微鏡観察にはこの後ヘマトキシリン・エオシン（HE）染色を施した。筋肉内の型別コラーゲンの局在を観察するためには，この後に蛍光抗体法を行った。

2.3　蛍光抗体法

前処理を終った切片は10%の正常山羊血清をふくむ PBS で非特異結合部位をブロックした後に各々Ⅰ，ⅢおよびⅣ型コラーゲンに特異的な抗血清を第一抗体として37℃で90分間反応させた。反応を終った切片は0.05%の Tween 20 を含むPBS（T-PBS）とPBSで洗浄後，第二抗体として Anti-Rabbit IgG Fluorescein-conjugated goat IgG（Cappel）を反応させた。30分後に T-PBS と PBS で洗浄し，Perma Fluor（LIPSHAW）封入後，蛍光顕微鏡（オリンパス）で観察した。

第一抗体として用いた各抗血清は，成牛皮由来のⅠ型コラーゲン(高研)，仔牛皮由来のⅢ型コラーゲン（新田ゼラチン）および牛レンズカプセル由来のⅣ型コラーゲン（新田ゼラチン）を家兎に免疫して作成した。抗原に用いた各コラーゲンはSDS-PAGE, CBB染色ではほぼ純品であった[5]。

## 3.　結果と考察

### 3.1　結　果

初生子牛もも肉横断切片（**図1**-A）においては，筋実質が充実しておらず，各筋線維束間には間隙が観察された。一方，筋肉内の結合組織には多くの線維芽細胞（矢印）が存在しており，厚みのある筋周膜（矢尻）が未発達な筋実質を取りまとめるように囲んでいた。23ヵ月齢牛（**図1**-B）においては初生子牛とは逆に，筋実質は充実しており，各筋線維束間の間隙は観察されなくなった。筋肉内結合組織（筋周膜，矢尻）は薄くなり，HE染色像では断片としてしか観察されなくなった。

**図2**はⅣ型コラーゲン抗体を第一抗体とした間接蛍光抗体法による染色像である。初生子牛（**図2**-A），6ヵ月齢牛（**図2**-B）および23ヵ月齢牛（**図2**-C）のいずれの横断切片においても，Ⅳ型コラーゲンは筋肉膜でしか観察されず，その染色像は，成長・加齢による変化はなかった。しかし，筋内膜で囲まれた一次筋線維束の太さは，初生子牛から6ヵ月齢にかけては急速に，その後23ヵ月齢までは徐々に太くなっていた。

Ⅲ型コラーゲン抗体による染色像（**図3**）においては，初生子牛（**図3**-A）から23ヵ月齢牛（**図3**-B）までいずれの月齢の背およびももも肉切片上でも陽性反応は，筋内膜と筋周膜の両方で観察された。染色強度は，筋内膜と筋周膜ではわずか

© The Ito Foundation

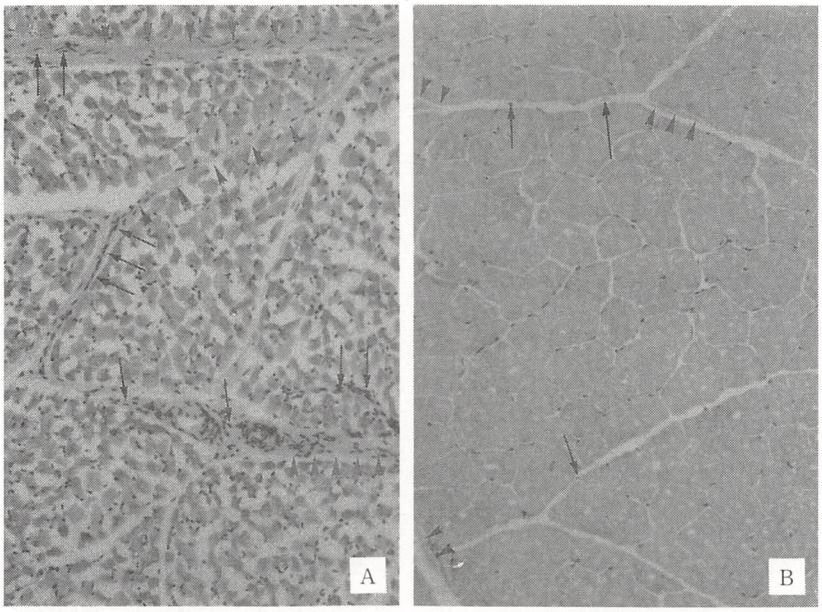



**図1**　ヘレフォード種肉用牛筋肉横断切片のHE染色像
初生子牛もも肉（A）および23ヵ月齢牛背肉（B）横断切片のHE染色像を示す。矢印は線維芽細胞の核を，矢尻は筋周膜を示す。×125.

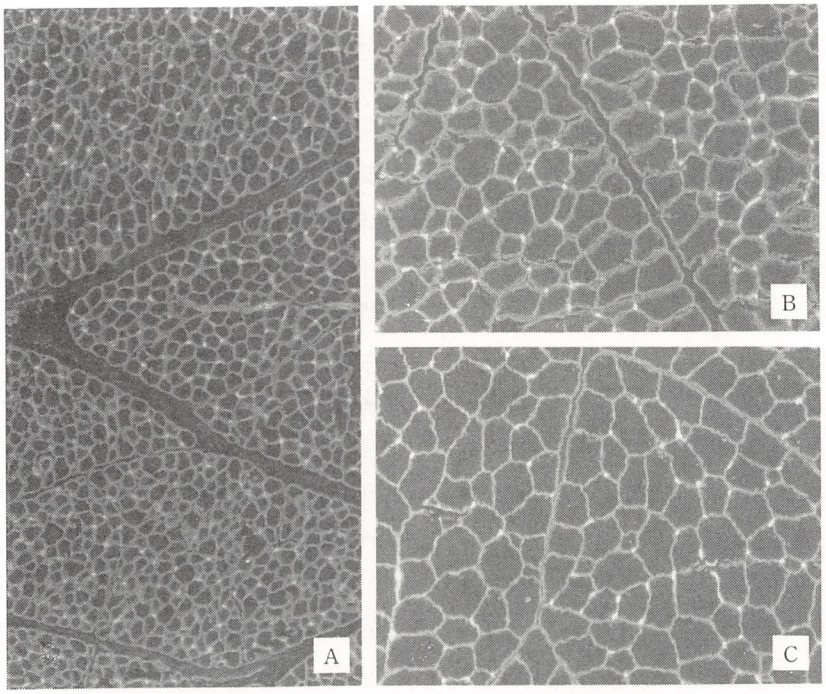



**図2**　ヘレフォード種肉用牛筋肉横断切片のⅣ型コラーゲン抗血清による免疫染色像
初生子牛（A），6ヵ月齢牛（B）および23ヵ月齢牛（C）もも肉の凍結横断切片にⅣ型コラーゲン抗血清を第一抗体とする間接蛍光抗体法を施した。一次筋線維束を囲む筋内膜のみが陽性反応を示している。×125.

© The Ito Foundation

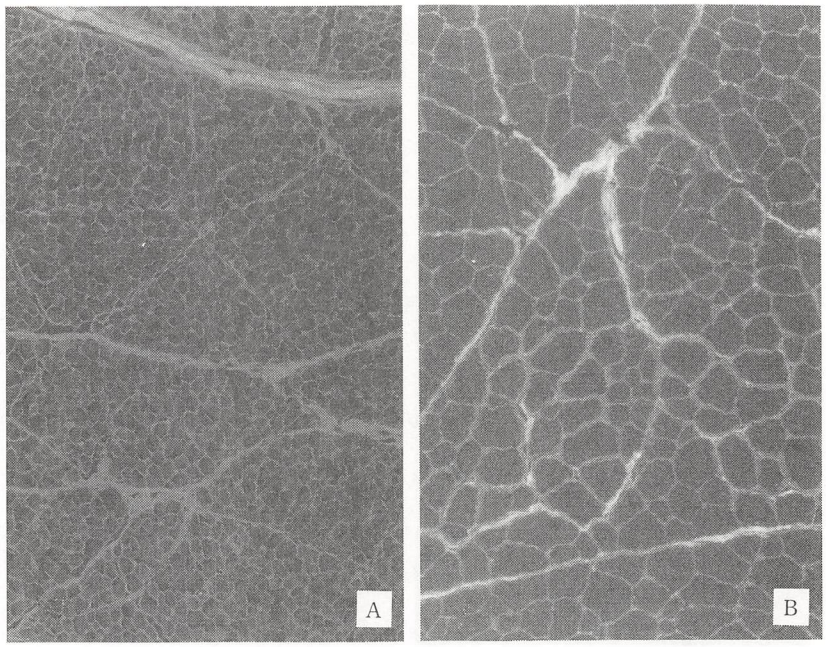



**図3**　ヘレフォード種肉用牛筋肉横断切片のⅢ型コラーゲン抗血清による免疫染色像
初生子牛もも肉（A）および23ヵ月齢牛背肉（B）の筋内膜と筋周膜いずれも陽性反応を示している。×125.

に筋周膜が強く，初生子牛と23ヵ月齢牛でも幾分23ヵ月齢牛が強く染色されていた。

Ⅰ型コラーゲン抗体による染色像（**図4**）においては，初生子牛では背肉でももも肉（**図4**-A）でも筋周膜にしか明確な陽性反応は観察されなかった。6ヵ月齢牛からは，筋内膜においても弱い反応が観察されるようになり，23ヵ月齢牛（**図4**-B）においては，筋周膜より幾分弱いが，筋内膜においても明瞭な陽性反応が観察された。全体的な染色性は，成長・加齢に伴い強くなった。

HE染色では観察しずらかった23ヵ月齢牛の筋周膜（**図1**-B）も，間質系コラーゲン（ⅠおよびⅢ型）抗体による免疫染色においては，その存在が明瞭に観察された。

3.2　考　察

ヘレフォード種肉用牛の成長・加齢に伴う筋肉組織像の最も顕著な変化は，筋内膜で囲まれた一次筋線維束の太さの変化（**図2**）であった。誕生後直ちに歩行を開始し，急速に運動能力を獲得してゆく哺育期には，これに平行して一次筋線維束も太くなるが，その後は加齢に伴って徐々に太くなるものと思われる。この一次筋線維束の太さの変化に対応するかのように，一次筋線維束を囲んでいる筋内膜も変化したことが，筋内膜のⅠ型コラーゲン抗体に対する免疫染色性の変化（**図4**）で示されている。初生子牛の筋内膜とはほとんど陽性反応を示さなかったⅠ型コラーゲン抗体が，6ヵ月齢牛とは明かに反応するようになり，23ヵ月齢牛の筋内膜とは筋周膜と同程度の陽性反応を示した。また，初生子牛では未発達な筋実質を疎で比較的厚い結合組織が囲んでいるのに対して，牛の成長に伴い発達充実する筋実質に圧迫されるように，23ヵ月齢牛の筋肉内結合組織は緻密化し薄い膜状を呈していた。従って，筋肉内コラーゲンは，牛の成長・加齢に伴い質と量が相互に連係して変化し，生理的機能を果たしているものと思

© The Ito Foundation

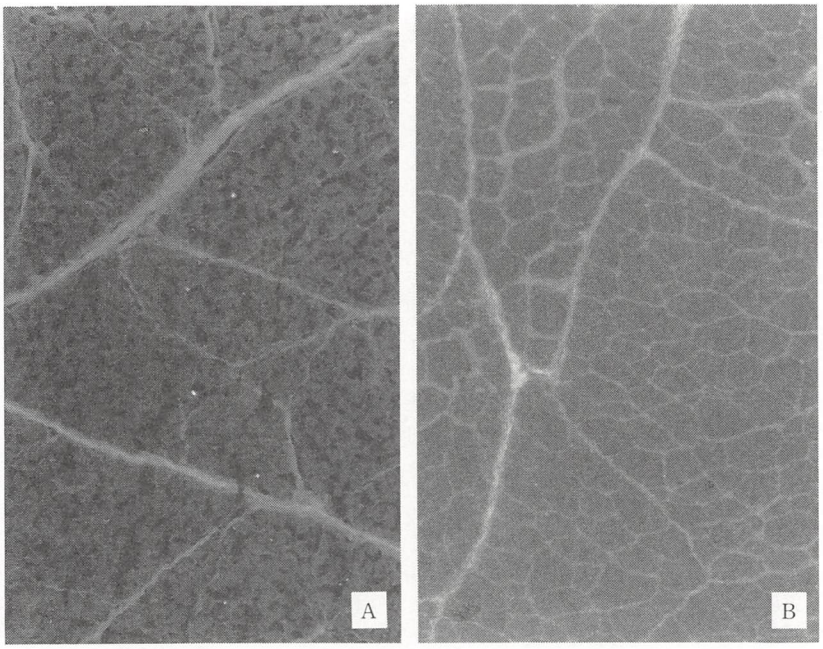



**図4**　ヘレフォード種肉用牛筋肉横断切片のⅠ型コラーゲン抗血清による免疫染色像
初生子牛もも肉（A）では筋周膜のみが，23ヵ月齢牛背肉（B）では筋内膜，筋周膜とも陽性反応を示している。×125.

われる。特に，Ⅰ型コラーゲンは，一次筋線維束の成長に深く関与しているものと思われる。

型別コラーゲンと肉用牛筋肉の成長と運動および食肉の物性との関連性は，今後さらに検討してゆく必要がある。

## 4. 要　約

ヘレフォード種肉用牛の初生雄子牛，6ヵ月齢離乳去勢子牛，18ヵ月齢去勢育成牛および23ヵ月齢去勢肥育牛各1頭をと殺し，背およびもも肉から試料を採取し，成長・加齢に伴う筋肉の変化を筋肉内結合組織のコラーゲンについて免疫組織化学的に検討した。得られた結果の大要は以下のとおりであった。

(1)　筋内膜で囲まれている一次筋線維束は6ヵ月齢までは急速に，その後は徐々に太くなったが，逆に筋肉内結合組織，特に筋周膜は成長・加齢に伴い薄くなり膜状化した。

(2)　Ⅰ型コラーゲン抗血清は初生子牛の筋周膜とは強く反応し，筋内膜とはほとんど反応しないが，6ヵ月齢からの筋内膜とは成長・加齢に伴い反応性が増加した。

(3)　Ⅲ型コラーゲンは筋内膜と周膜に，Ⅳ型コラーゲンは筋内膜にいずれの月齢においても局在しており，成長・加齢に伴う染色性の顕著な変化は示さなかった。

### 文　献

1)　Bailey, A.J., Shellswell. G.B. and Duance, V.C.: Nature, **278**：67-69（1979）
2)　Bailey, A.J.: J.Anim. Sci., **60**：1580-1587（1985）
3)　Hill, F.: J.Food Sci., **31**：161-166（1966）
4)　大杉次男，小竹森訓央，近藤誠司，服部昭仁，中村富美男：食肉に関する助成研究調査成果報告書，7，171-177（1989）
5)　中村富美男，大杉次男：日本畜産学会報，59：997-1003（1988）

© The Ito Foundation

# 家畜・家禽の死後硬直に関する生理学的研究
## —各種ガス処理の影響—

Physiological Studies of Rigor Mortis in the Domestic Animals
—Effects of Various Gases—

田　中　耕　作（九州大学農学部）

Kousaku Tanaka (Faculty of Agriculture, Kyushu University)

A system was developed for continuous measurement of muscle tension during rigor mortis. Longitudinal muscle strip (3 × 25 mm) dissected from the *Peroneus Longus* was suspended in a highly humidified gas chamber. Mechanical activity was transmitted to a strain-gauge transducer which is connected to a potentiometric pen-recorder. At the onset of measurement 1.2g was loaded on the muscle strip. This model was used to study the muscle response to various gases during rigor mortis at holding temperature of 15℃ or 0℃.

1. When muscle strip was incubated in saturated $N_2$ or $CO_2$ chamber at 15℃, only slight contraction was observed. In contrast, incubation of muscle in ethylene, $O_2$ or air resulted in a strong contraction, giving a peak at about 28 h after the onset of treatment. Thereafter, their tensions decreased and reached approximate starting tension at the end of the experimental period (3 days).

2. When muscle strip was incubated with ethylene, $O_2$ or air at 0℃, a small spike tension occurred within 6 h after incubation but it was restored immediately. However, their tensions increased quickly when incubation temperature was elevated to 15℃ after 2 days of incubation at 0℃ and a high level of tension was kept for considerable period. In contrast, no such change in tension was observed in $N_2$ and $CO_2$ groups following elevation of incubation temperature; a low level of tension was maintained throughout the experimental period.

3. Incubation of muscle strips in anaerobic conditions resulted in lower pH value than that in aerobic conditions, regardless of incubation temperature.

## 1. 目　的

家禽と哺乳動物の筋肉は，共通した死後硬直を起すが，その解除に要する時間は異る。また硬直に影響する要因には，と殺前およびと殺後の２つに大別できる。前者では環境，年齢，飼養条件ならびにストレスなどが考えられる。後者では温度，凍結，電気刺激などを含む物理的加力，あるいは化学物質による処理などによって硬直の強弱や硬直解除の時間に差が生じる。このような変化に関して多くの基礎的研究がなされてきたが，その目的はと殺後短時間内に新鮮にしてかつ柔かい肉を得ることにある。

昭和63年度において，と殺後鶏の骨格筋を超音波および低温（０℃）処理を行なうと，筋肉の死後硬直が起りにくいという結果が得られた。本研究は，鶏骨格筋の死後硬直に対する各種ガスならびに温度処理の影響について検討したものである。

© The Ito Foundation

## 2. 方　法

供試鶏は白色レグホン系コマーシャルで，約7月齢の産卵鶏を用いた。頸静脈の切断による放血と殺後，長腓骨筋の最下部を両筋膜に包まれた部位を摘出して供試筋肉とした。この筋肉をストリップ（3×25mm）にし，両端を木綿糸で結紮した。一端は**Fig. 1**のように円筒チャンバー（直径5.5cm，高さ11.5cm）の底部に固定し，上端の糸はそれが接触しない最小の穴をもつ蓋にとおしてストレインゲージ-トランスジューサーに連結した。チャンバー内は高湿を保つため，その側面に水を十分含んだろ紙を密着させた。

窒素（$N_2$），二酸化炭素（$CO_2$），エチレンおよび酸素（$O_2$）ガスは，水を入れた容器内の水中に（**Fig. 1**参照）微細泡状に噴出させ，湿度の高いガスをチャンバー内に送り，筋肉の張力変化を測定した。エチレンを用いた理由は，この物質が筋肉弛緩作用を有するとともに非酸素供給物質であるためである。なお，チャンバーの蓋に糸をとおした穴（直径2mm）からガスが漏出すのを補うため，**Fig. 1**のように小量（1ml/分）の高湿ガスを連続してチャンバーに送った。最初1.2gの負荷を筋肉ストリップにかけ，これを0点として張力をgで表示した。測定中のチャンバー内の温度は0°±1.0℃および15°±1.5℃で行なった。一方空気の場合は，チャンバーに小量（上記）の高湿空気をロータリーポンプで送りながら測定した。同一処理に対して2～8回の実験を行なったが，ほとんど同じような結果が得られたので，そのうちの一つを図に示した。

筋肉のpHは，測定前後の2回，コンパクトpHメーターC1（堀場）で測定した。

## 3. 結果と考察

長腓骨筋肉ストリップをチャンバー内に吊し，15℃の温度で各種ガスに対する張力変化を測定したところ，**Fig. 2**の結果が得られた。すなわち，筋肉を飽和$O_2$および空気内に置くと，張力は著しく増加し，約28時間後ピーク（$O_2$，5.5g；空

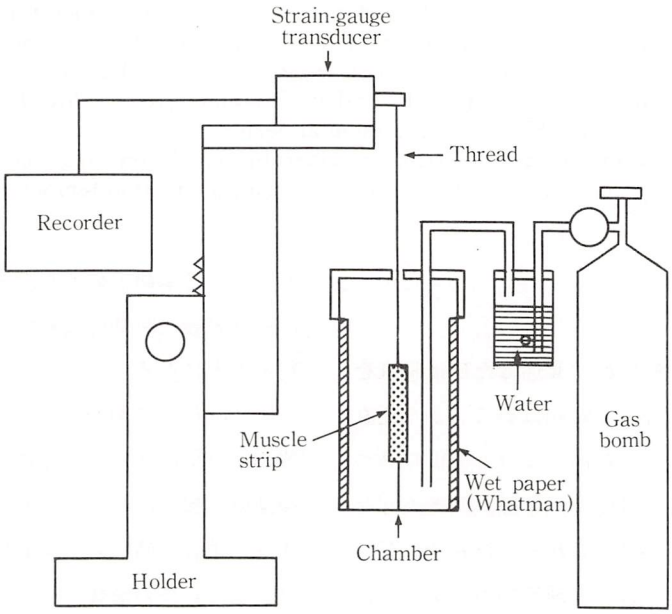



**Fig. 1**　Schematic drawing of apparatus for continuous measurement of muscle tension

© The Ito Foundation

気，４ｇ）に達した。これはおそらくグリコーゲンの好気的代謝により，ATP の生産とその消費によってもたらされたものと推定される[1,2]。

一方嫌気的条件である $N_2$ および $CO_2$ の場合は，筋肉張力はともに低い水準で72時間維持された（**Fig. 2**）。特に $CO_2$ の場合，筋肉は最初のスパイク後単時間に弛緩し，その後72時間ほとんど処理直前の張力を保持した。すなわち，筋肉を流動パラフィン内に吊し，嫌気的条件を設定して行なった中平ら[3]の実験とほぼ類似した結果が得られた。しかし，エチレンの場合は嫌気的でしかも筋肉に対して弛緩作用があるので硬直は起りにくいと考えていたが，予想に反して筋肉は強い収縮を示し，あたかも好気的環境にあるかのように反応した。この原因については現在のところ明らかでない。

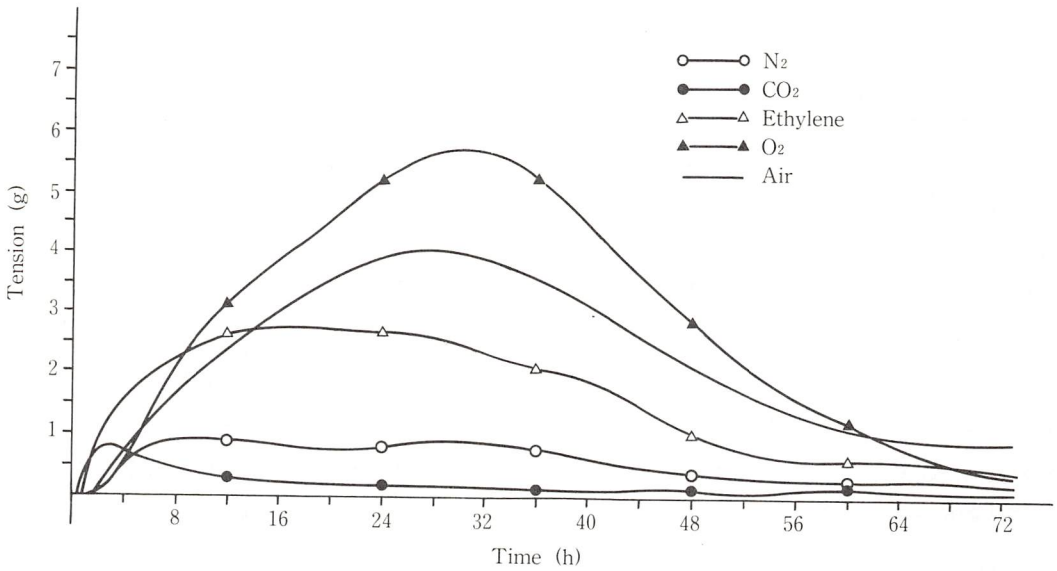



**Fig. 2**　Effects of various gases on the rigor mortis of fowl leg muscle at 15℃

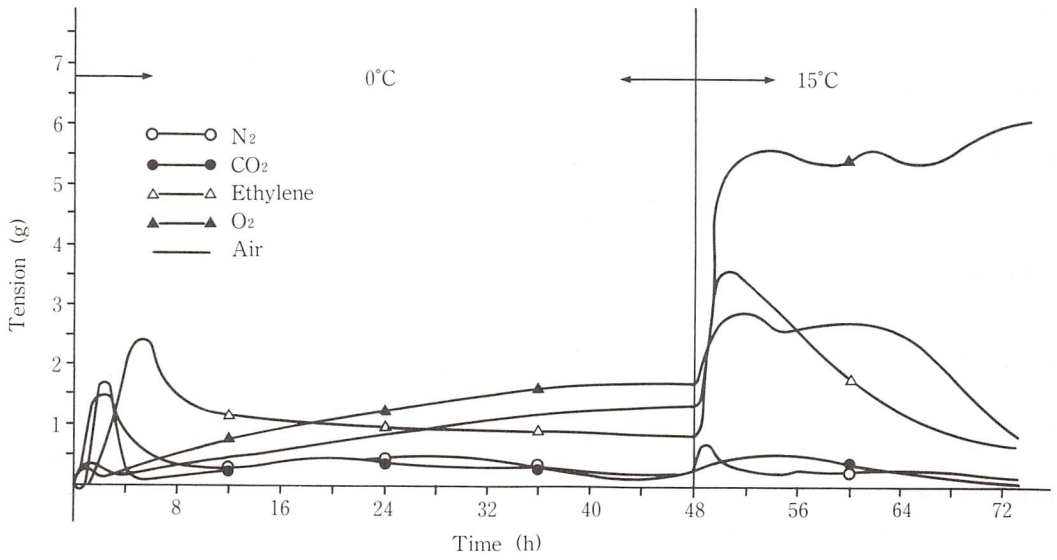



**Fig. 3**　Effects of various gases on the rigor mortis of fowl leg muscle at 0℃—15℃

© The Ito Foundation

**Table 1** Average pH value of muscle strip at start and end of gas treatment

| Temperature | Gas | pH value | |
|---|---|---|---|
| | | Start | End |
| 15℃ (3 days) | $N_2$ | 6.8 | 7.4 |
| | $CO_2$ | 6.7 | 6.1 |
| | Ethylene | 6.8 | 6.9 |
| | $O_2$ | 6.7 | 7.7 |
| | Air | 6.8 | 7.3 |
| 0℃ (2 days) and raised to 15℃ (1 day) | $N_2$ | 6.8 | 6.2 |
| | $CO_2$ | 6.8 | 6.1 |
| | Ethylene | 6.8 | 6.2 |
| | $O_2$ | 6.7 | 7.0 |
| | Air | 7.0 | 7.5 |

一方，チャンバーの温度を0℃に設定し，各種ガスに対する筋肉の反応を観察した。その結果(**Fig. 3**)，$N_2$ および $CO_2$ 処理では張力はともに0に近く，しかも48時間後温度を15℃にあげても筋肉の収縮はほとんどみられなかった。エチレン，空気および $O_2$ の場合も筋肉の収縮は弱かったが，48時間後温度を15℃にあげると3者とも急速に筋肉の収縮が起り，そのピーク値はそれぞれ3，3.5，5.5gとなった。しかし，エチレンおよび空気の場合は時間の経過に伴って徐々に弛緩し，24時間後張力は1g以下となった。これに反して，$O_2$ 処理では24時間後においても弛緩はまったくみられなかった。終末pH(**Table 1**)は好気的より嫌気的の方が低くなった。

## 4. 要　約

約7月齢産卵鶏の長腓骨筋の死後硬直の過程を連続的に測定する方法を考案した。すなわち，筋肉ストリップ(3×25mm)を高湿ガス($N_2$, $CO_2$, エチレン，$O_2$ または空気)で飽和させたチャンバー内に吊し，上端をストレインゲージ-トランスジューサーに連結してストリップの張力(g)を測定した。チャンバーの温度は次の2つに設定した。15℃で24時間筋肉張力を測定するグループ，および0℃で48時間ストリップを処理し，その後温度を15℃にあげて24時間観察するグループである。

(1) 筋肉ストリップを15℃の $N_2$ および $CO_2$ ガス中に吊したところ，測定72時間をとおして張力はともに1g以下であった。一方，エチレン，$O_2$ および空気の場合は強い張力が観察され，始めの約28時間迄にその値はピークに達したが，その後徐々に弛緩し約70時間後ほぼ回復した。

(2) 筋肉ストリップを0℃で，エチレン，$O_2$ または空気内に置いて観察すると，始めの約6時間以内に1回張力ピークが現われ，その後は比較的低い値が維持された。しかし，48時間後チャンバーの温度を15℃にあげると，筋肉は急速かつ強く収縮した。これに反し $N_2$ および $CO_2$ の場合は，温度をあげても張力にほとんど変化は認められなかった。

(3) 筋肉ストリップを嫌気的条件下におくと，好気的条件に比較して低いpH値が得られた。特に $CO_2$ の場合は両温度区(0℃，15℃)ともpHは中性から6.1まで低下した。

以上総合すると，長腓骨筋のストリップを15℃または0℃の飽和 $CO_2$ チャンバー内で，少なくとも2日間処理すると死後硬直は起らないものと推定される。

### 文　献

1) De Fremery, D. and Pool, M.F., Food Res., 25, 73-78 (1960)
2) De Fremery, D., In Physiology and Biochemistry of Muscle as a Food, Ed., E.J. Briskey, R.G. Cassens and J.C. Trautman, University of Wisconsion Press, Madison, Milwauke and London
3) Nakahira, S., Kaneko, K. and Tanaka, K., Jpn. Poult. Sci., 27, 47-51 (1990)
4) Khan, A.W. and Nakamura, R., J. Food Sci., 35, 266-267 (1970)

© The Ito Foundation

# 筋原線維タンパク質，ネブリンの死後変化に関する研究（第3報）

Studies on Postmortem Changes in a Myofibrillar Protein, Nebulin (Part 3)

辰巳 隆一・服部 昭仁・髙橋 興威（北海道大学農学部）

Ryuichi Tatsumi, Akihito Hattori and Koui Takahashi
(Faculty of Agriculture, Hokkaido University)

Changes in nebulin, a myofibrillar protein with molecullar weight of 800,000, during postmortem storage of chicken skeletal muscles were studied by SDS-PAGE and immunological analysis. During postmortem storage of chicken breast muscles at 5℃, the amount of nebulin decreased with time, and nebulin disappeared completely from myofibrils within 24 h. Concomitantly with the disappearance of nebulin in whole muscles, a 90 kDa polypeptide whose mobility is slightly greater than that of α-actinin (M. W. of 93,000) on SDS-PAGE, and a 42 kDa polypeptide which shows almost the same mobility as that of actin on SDS-PAGE, were immunologically stained with antinebulin antibodies. And the intensity of the stained 90 kDa and 42 kDa polypeptide bands increased according to storage period. On the other hand, the 90 kDa and 42 kDa polypeptides were not detected in myofibrils prepared from postmortem muscles on SDS-PAGE and immunological analysis. When myofibrils prepared from fresh chicken breast muscles were treated with $10^{-4}$ M $Ca^{2+}$ at 5℃ in the presence of 30 μg/ml leupeptin, a protease inhibitor, the 90 kDa and 42 kDa polypeptides in supernatant obtained by centrifugation of the myofibrillar suspensions were immunologically stained with antinebulin antibodies, and the intensity of stained 42 kDa polypeptide band increased according to the period of $Ca^{2+}$-treatment. The indirect immunofluorescence staining of intact chicken breast muscle myofibrils with anti-90 kDa polypeptide antibodies showed that the 90 kDa polypeptide was exclusively located at the I band region of sarcomeres. We therefore conclude that during postmortem ageing of meat nebulin filaments are weakened and divided into the 90 kDa and 42 kDa polypeptides following an increase in the cytosolic calcium ion concentration to $10^{-4}$M.

## 1. 目　的

食肉を利用する場合，家畜のと殺後一定期間熟成することが不可欠であり，この間に肉質の改善が図られ，軟らかさ，風味などの付加価値が与えられる。軟らかさは肉質を決定する最も重要な因子であり熟成に伴う食肉の軟化機構を解明することは，食肉の有効利用のうえで大きな意義を有する。食肉の軟化は，筋原線維の構造が脆弱になることに起因しており，Z線の構造，アクチン・ミオシン間結合，およびコネクチンフィラメントの構造が脆弱化するという3つの現象が食肉の軟化と直接的に関係し，かつそれぞれ独立したこれらの現象がいずれも筋細胞内の $Ca^{2+}$ 濃度が $10^{-4}$M に上昇することによって誘起されることが明らかになっている[1]。

ネブリンは，1980年，米国のWangとWilliamson[2]によって発見された筋原線維のI帯に局在する分子量約80万の高分子量タンパク質である。1989年，WangとWright[3]はポリクローナル抗

© The Ito Foundation

体を用いた免疫電顕法によりネブリンは筋原線維のI帯全体に局在して，縦方向の連続性に関与していることを明らかにしている。われわれ[4]は，食肉の熟成中に起こる筋原線維の構造変化を追究する過程で，ネブリンが筋原線維から消失することを観察した。すなわち，食肉の熟成中に，$10^{-4}$ M $Ca^{2+}$ によって弾性タンパク質コネクチンが分子量280万のα型から210万のβ型へと変換する過程でネブリンがコネクチンの変化と平行して，筋原線維から消失した。さらに，筋原線維からのネブリンの消失に伴い分子量4万2千のポリペプチドが出現すること，精製ネブリンは非酵素的に $10^{-4}$M $Ca^{2+}$ で処理すると経時的に減少し，それに伴って分子量4万2千のポリペプチドが生成されることを明らかにした[5]。これらの結果から，上述の3種類の筋原線維の構造変化に加えて，筋原線維からのネブリンの消失も，$10^{-4}$M $Ca^{2+}$ によって誘起され，熟成に伴う食肉の軟化の要因として直接的に関与している可能性が大きい。そこで本研究は，食肉の熟成に伴うネブリンの変化を追究し，食肉の軟化との関連を明らかにしようとするものである。

## 2. 材料と方法

### 2.1 実験材料

と殺直後の新鮮な鶏浅胸筋を供試した。

### 2.2 SDS-PAGEのための筋原線維および全筋試料の調製

放血と殺後，5℃で貯蔵した筋肉から30μg/ml ロイペプチン存在下でPerryとGreyの方法[6]に従って筋原線維を調製した。筋原線維のSDS処理は，5mM EDTA, 5mM Tris-HCl buffer, pH 8.0の溶液で2回洗浄した後，1% SDS, 1% β-mercaptoethanol, 10% glycerol, 5mM EDTA, 5mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, タンパク質濃度3mg/mlとして2分間煮沸した後，氷中で室温まで急速に冷却することによって行った。また，全筋のSDS処理は筋肉を液体窒素中で凍結・粉砕し，筋肉粉末50mgに対して50% glycerolを100μl加えた後，予め加熱しておいた3% SDS, 10% glycerol, 1mM EDTA, 40mM DTT, 10mM Tris-HCl buffer, pH 8.0の溶液を200μl添加し，90秒間煮沸することによって行った。また，試料は電気泳動に供するまで−85℃にて凍結保存した。

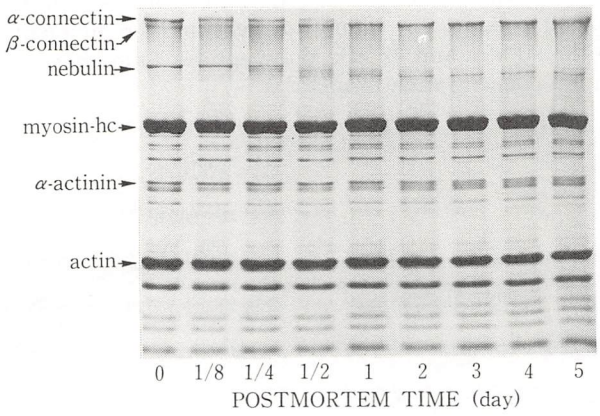



**図1**　鶏浅胸筋から経時的に調製した筋原線維のSDS-PAGE像
鶏浅胸筋を5℃で貯蔵し，30μg/ml ロイペプチン存在下で調製した筋原線維をSDS-PAGEに供試した。

© The Ito Foundation

2.3　SDS-PAGE

Fairbanksの方法[7]に従い2～12%ポリアクリルアミドグラデイエントゲル（対ビス比37.5：1）を作成し，20mA/plate（55×83×1.5mm）で泳動した。

2.4　筋原線維の $Ca^{2+}$ 処理

と殺直後の新鮮な鶏浅胸筋より30μg/ml ロイペプチン存在下で調製した筋原線維を0.1M KCl, 10mM Tris-maleate buffer, pH 7.0, 1mM DTT, 1mM $NaN_3$, 0.1mM $CaCl_2$, 30μg/ml ロイペプチン，タンパク質濃度15mg/ml とし，5℃に保存した。その後，筋原線維の懸濁液を経時的に15,000rpm で30分間遠心分離し，沈澱および上澄液を回収した。上澄液は5mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, 5mM EDTA の溶液に対して30分間透析した後，SDS処理した。

2.5　イムノブロット法

鶏浅胸筋から経時的に調製した筋原線維および全筋を，また，調製した筋原線維の $Ca^{2+}$ 処理残渣および上澄液を SDS-PAGE に供試した後，western blotting 法によりニトロセルロース膜にタンパク質を転写し，抗鶏ネブリン抗体を用いて免疫学的にネブリンの変化を追求した。

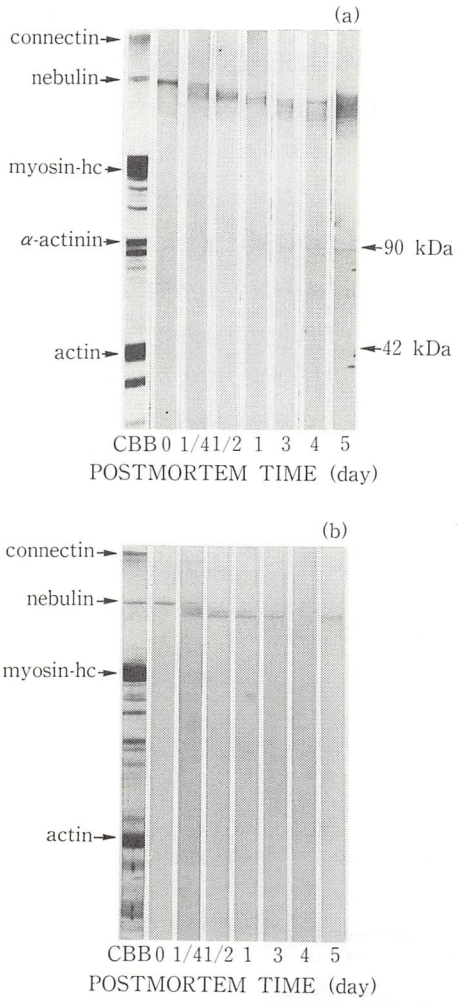



**図2**　抗ネブリン抗体を用いたイムノブロット法による鶏浅胸筋におけるネブリンの死後変化

5℃に貯蔵した鶏浅胸筋から経時的に調製した筋原線維および全筋を SDS-PAGE に供試した後，Western Blotting 法によりタンパク質をニトロセルロース膜に転写し，抗鶏ネブリン抗体を用いてネブリン由来のポリペプチドを検出した。CBB はと殺直後の試料をクマーシーブルで染色した像を示す。

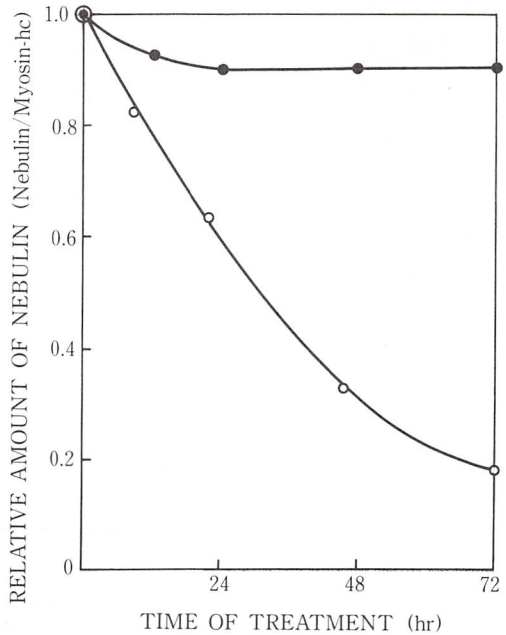



**図3**　筋原線維の $Ca^{2+}$ 処理によるネブリンの変化

と殺直後の新鮮な鶏浅胸筋から調製した筋原線維を30μg/ml ロイペプチン存在下で $10^{-4}$M $Ca^{2+}$（○）および5mM EGTA（●）で処理した。筋原線維の懸濁液を経時的に遠心分離し，沈澱を SDS-PAGE に供試し，そのデンシトグラムからネブリンの含量を測定した。縦軸はと殺直後の筋肉から調製した筋原線維におけるネブリンのミオシン重鎖に対する割合を1として，その後の変化を相対値として表した。

© The Ito Foundation

2.6　粗α-アクチニンの調製[9]

鶏浅胸筋から調製した筋原線維を0.6M $MgCl_2$, 1mM DTT として乳鉢で十分磨砕した後，室温で24時間放置した。1mM Tris-HCl buffer, pH 8.5の溶液に72時間透析した後，試料に同体積の透析液を加えてよく混合し，10,000gで30分間遠心分離した上澄液の30%飽和硫安画分を粗α-アクチニン標品とした。

2.7　間接蛍光抗体法

と殺直後の新鮮な鶏浅胸筋から調製した筋原線維を用い，常法に従い，位相差顕微鏡および蛍光顕微鏡下で観察した。

## 3.　結果と考察

3.1　死後筋肉におけるネブリンの変化

と殺後，5℃で貯蔵した鶏浅胸筋から経時的に調製した筋原線維のSDS-2～12%ポリアクリルアミドグラデイエントゲル電気泳動像を**図1**に示した。と殺直後の筋肉から調製した筋原線維では，ネブリンはβ-コネクチンとミオシン重鎖との間に明瞭な1本のバンドとして観察されたが，死後時間の経過とともにネブリン含量は減少し，貯蔵後1日目には完全に消失した。これら変化は，前報[4]でも報告したように，死後筋肉におけるコネクチンの変化，すなわちα-コネクチンが経時的に減少し，β-コネクチンが増加するという変化とほぼ平行して生じた。死後筋肉における筋原線維からのネブリンの減少・消失の過程を明らかにするため，鶏浅胸筋から死後経時的に調製した全筋(a)および筋原線維(b)を抗鶏ネブリン抗体を用いて免疫学的に調べた(**図2**)。全筋(a)において，ネブリンは死後時間の経過とともに減少し，死後1日目で完全に消失した。また，貯蔵3日目以降にα-アクチニンより移動度が僅かに大きい分子量9万，およびアクチンと同じ移動度を示す分子量4万2千の位置に新たに反応が認められた。一方，死後筋肉から調製した筋原線維(b)においては，この分子量9万と4万2千の成分は検出されなかった。抗ネブリン抗体を用いたイムノブロット法によりポリペプチドのバンドが染色されるということは，そのバンドに，ネブリンもしくはネブリン由来のポリペプチドが存在していることを示している。従って，分子量9万と4万の成分はネブリン由来のポリペプチドであり，この両成

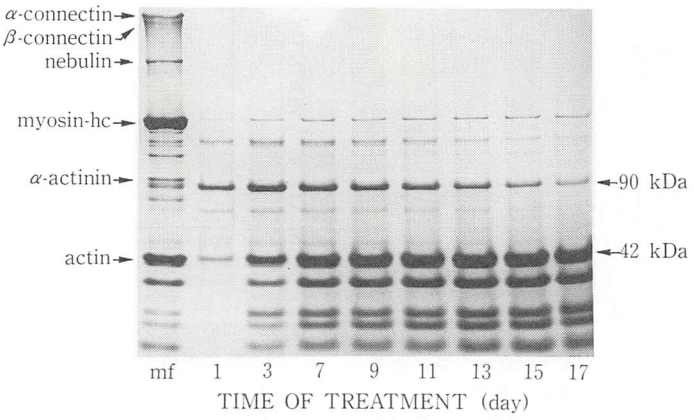



**図4**　$Ca^{2+}$処理によって筋原線維から遊離するタンパク質のSDS-PAGE像

$10^{-4}M$ $Ca^{2+}$で処理をした筋原線維の懸濁液を経時的に遠心分離し，得られた上澄液をSDS-PAGEに供試した。m.fは$Ca^{2+}$処理前の筋原線維を示す。

© The Ito Foundation

分は筋原線維を調製する過程で除去される画分に存在するものと考えられる。

3.2　筋原線維の $Ca^{2+}$ 処理によるネブリンの変化

死後筋肉においてネブリンが経時的に減少・消失し，9万および4万2千の成分が新たに出現するという現象は，$10^{-4}$M以上に上昇したサイトゾル $Ca^{2+}$ によって誘起されると考え，新鮮な鶏浅胸筋から調製した筋原線維をプロテアーゼインヒビターであるロイペプチン存在下で $10^{-4}$M $Ca^{2+}$ で処理した。筋原線維の懸濁液を経時的に遠心分離し，沈澱物および上澄液に分画した。沈澱物，すなわち $Ca^{2+}$ 処理した筋原線維の残渣中のネブリン含量をSDS-PAGEのデンシトグラムから測定した（**図3**）。$10^{-4}$M $Ca^{2+}$ 処理（○）により筋原線維中のネブリン含量は減少するが，$10^{-4}$M $Ca^{2+}$ を5mM EGTAによって置き換える（●）と，殆ど変化がなかった。従って，$10^{-4}$M $Ca^{2+}$ 処理によって生ずる筋原線維中のネブリン含量の減少は $Ca^{2+}$ の直接的作用によるものと考えられる。**図4**に $Ca^{2+}$ 処理の過程で筋原線維から遊離した成分を含有する上澄液画分のSDS-PAGE像を示した。種々の低分子量成分が観察されるが，特にα-アクチニンのバンドの直下の分子量9万の成分およびアクチンと同じ移動度を示す分子量4万2千の成分に着目すると，前者の含量は処理後3日目まで増加し，その後徐々に減少した。また，分子量4万2千の成分は，次第に増加する傾向が認められた。そこで筋原線維の $Ca^{2+}$ 処理によって生ずるネブリン由来のポリペプチドを検出するため，$Ca^{2+}$ 処理した筋原線維残渣および上澄液を抗鶏ネブリン抗体を用いてイムノブロッティングを行った（**図5**）。筋原線維残渣（a）ではネブリン含量の減少に伴って新たにミオシン重鎖とほぼ同じ移動度を示す成分が検出されたのに対し，上澄液（b）では死後筋肉の場合（**図2**）と同様に分子量9万と4万2千の成分が観察された。また，分子量9万の成分は，7日目まで増加するが，さらに $Ca^{2+}$ 処理の時間が長くなると減少し，15日目以降では検出されなかった。この分子量9万の成分の減少に対応して分子量4万2千の成分が増加した。このことは，分子量9万の成分が

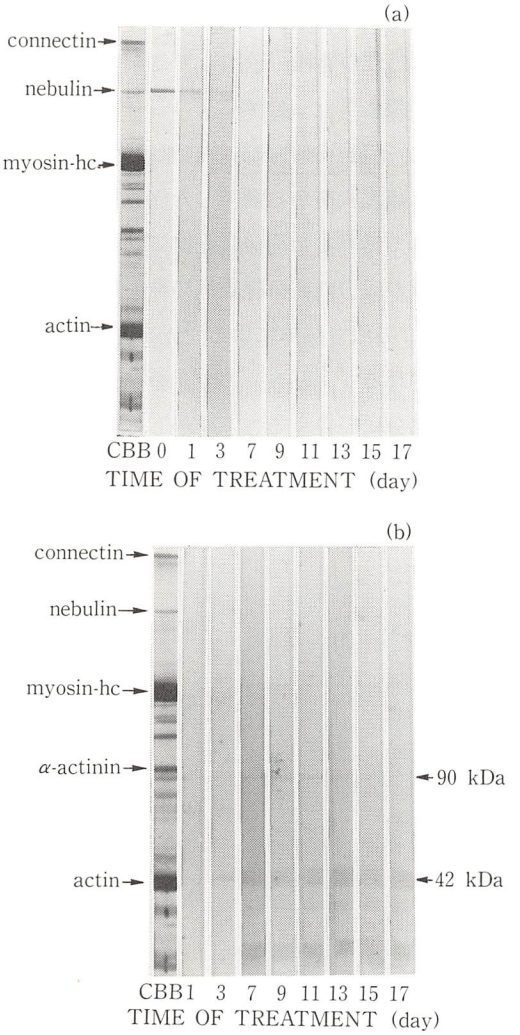



**図5**　抗ネブリン抗体を用いたイムノブロット法によって検出される筋原線維の $Ca^{2+}$ 処理によるネブリンの変化

$10^{-4}$M $Ca^{2+}$ で処理した筋原線維の懸濁液を経時的に遠心分離し，得られた沈澱物（a）および上澄液（b）をSDS-PAGEに供試した後 Western blotting 法によりタンパク質をニトロセルロース膜に転写し，抗鶏ネブリン抗体を用いてネブリン由来のポリペプチドを検出した。CBB は未処理の筋原線維をクマーシブルーで染色した像を示す。

© The Ito Foundation

$Ca^{2+}$ 処理によって分子量4万2千の成分に分割されることを示唆している。

3.3　分子量9万の成分とα-アクチニンとの比較

上澄液画分に存在する分子量9万の成分と分子量がほぼ同じであるα-アクチニンとの異同をSDS-PAGEとイムノブロッテイングによって検討した（**図6**）。aはと殺直後の新鮮な鶏浅胸筋から調製した筋原線維，bは筋原線維を $Ca^{2+}$ 処理して得られた上澄液，cは分子量9万3千の粗α-アクチニン標品である。筋原線維を $Ca^{2+}$ 処理して得られた上澄液（b）と粗α-アクチニン標品（c）とを混合して電気泳動に供する（d）と分子量9万の成分とα-アクチニンの2本のバンドが認められ，この2つの成分は分子量が異なることが明らかとなった。さらに，抗α-アクチニン抗体および抗9万成分抗体を用いて免疫学的にその違いを検討すると，筋原線維を $Ca^{2+}$ 処理して得られた上澄液（b）の分子量9万の成分は抗9万成分抗体とは反応するが，抗α-アクチニン抗体とは反応しなかった。従って，分子量9万の成分はα-アクチニンとは，分子量および免疫学的にまったく異なるポリペプチドであることを示している。この結果はまた，α-アクチニンは筋原線維の $Ca^{2+}$ 処理の過程で遊離してこないという我々の以前の報告[9]と一致する。

3.4　分子量9万の成分の筋原線維内局在

新鮮な鶏浅胸筋から調製した筋原線維を抗9万成分抗体で処理した間接蛍光抗体法によって，分子量9万の成分の筋原線維内局在を観察した（**図7**）。抗9万成分抗体による蛍光がI帯部分のみに観察される（aとb）ので，分子量9万の成分はI帯部分に局在することを示している。一方，抗ネブリン抗体を用いて同様に観察する（cとd）

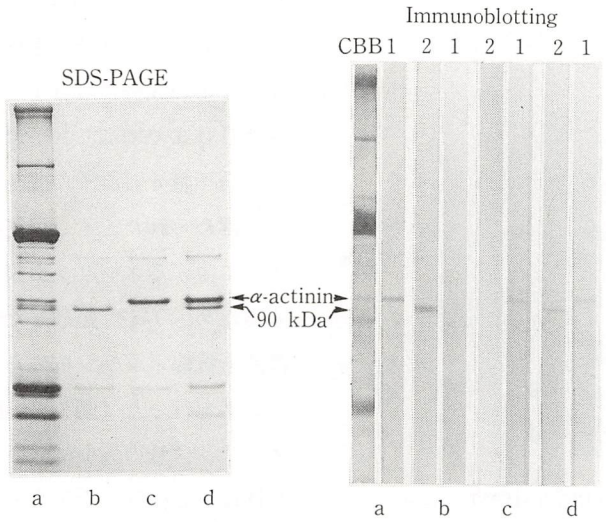



**図6**　SDS-PAGEおよびイムノブロット法による分子量9万の成分とα-アクチニンとの比較

筋原線維を $10^{-4}$ M $Ca^{2+}$ で処理することによって得られた上澄液とα-アクチニン標品をSDS-PAGEおよびイムノブロッテイングに供試した。左がSDS-PAGE像で右がイムノブロット像を示す。CBBはクマーシーブルー染色，1は抗α-アクチニン抗体は，2は抗9万成分抗体で処理したことを表し，aはと殺直後の鶏浅胸筋から調製した筋原線維，bは筋原線維の $Ca^{2+}$ 処理で得られた上澄液，cは粗α-アクチニン標品，dはbとcの混合物である。

© The Ito Foundation

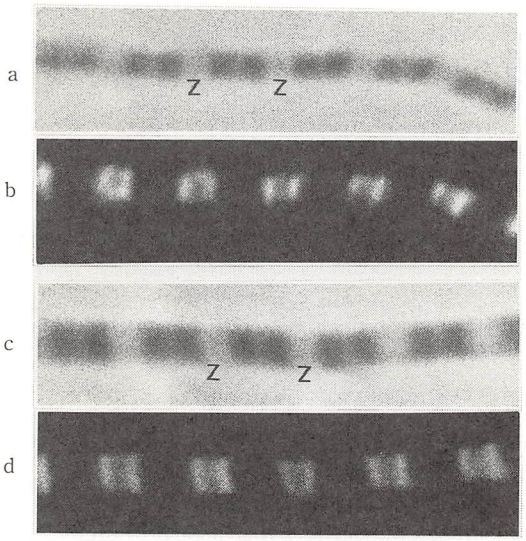



**図7**　分子量9万の成分の筋原線維内局在
新鮮な鶏浅胸筋から調製した筋原線維を抗9万成分抗体（a，b）および抗ネブリン抗体（c，d）を用いた間接蛍光抗体法で観察した。いずれも上段は位相差顕微鏡像，下段は蛍光顕微鏡像を示す。図中のZは筋原線維のZ線を示す。

と，抗9万成分抗体の場合とまったく同じ結果（cとd）が得られた。また，すでに述べたように，分子量9万の成分は抗ネブリン抗体と反応することが確認されているので，この分子量9万の成分は $Ca^{2+}$ の作用によってネブリンから分割されたものであることが明らかとなった。

以上の結果は，死後筋肉および筋原線維を非酵素的に $10^{-4}$M $Ca^{2+}$ で処理した場合にも，分子量約80万のネブリンの減少・消失に伴って分子量9万と4万2千の成分が出現することを示している。ネブリンがZ線と結合し，アクチンフィラメントを支えて筋原線維の縦方向の連続性に関与していることが明らかにされている[3]ので，死後筋肉においてネブリンフィラメントが $Ca^{2+}$ の作用により脆弱になることもまた，熟成に伴う食肉の軟化に寄与していると結論される。

## 4. 要　約

熟成中の食肉において，分子量約80万のネブリンは筋原線維から経時的に減少・消失したが，その過程で分子量9万と4万2千のポリペプチドが出現することが抗鶏ネブリン抗体を用いたイムノブロット法により確認された。また，筋原線維を非酵素的に $10^{-4}$M $Ca^{2+}$ で処理した場合にも同様の成分が生成され，さらにこの分子量9万の成分は間接蛍光抗体法により，ネブリンと同様に筋原線維のI帯に局在することが確認された。

## 文　献

1) 高橋興威：肉の科学，26，93-101（1986）
2) K. Wang and C. L. Williamson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 3254-3258 (1980)
3) K. Wang and J. Wright, J. Cell Biol., 107, 2199-2212 (1989)
4) 辰巳隆一，服部昭仁，高橋興威：食肉に関する助成研究調査成果報告書，6，227-231（財）伊藤記念財団（1988）
5) 辰巳隆一，服部昭仁，高橋興威：食肉に関する助成研究調査成果報告書，7，356-361（財）伊藤記念財団（1989）
6) S. V. Perry and T. C. Grey, Biochem. J., 64, 184-192 (1956)
7) G. Fairbanks, T. L. Steck and D. F. H. Wallach, Biochem., 10, 2606-2617 (1971)
8) K. Pinter, A. Jancso and E. N. A. Biro, Acta. Biochem. et Biophys. Acad. Sci. Hung., 15, 217-222 (1980)
9) A. Hattori and K. Takahashi, J. Biochem., 92, 381-390 (1982)

© The Ito Foundation

# 食肉熟成へのプロリン特異性ペプチダーゼ類の役割

Studies on Role of Proline Specific Peptidases at the Meat Maturation

芳本 忠（長崎大学薬学部）

Tadashi Yoshimoto (Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagasaki University)

Since most of the proteases and peptidases were inert around proline residues, cooperative action with proline specific enzymes will be necessary for the hydrolysis of proline containing peptides. The author estimated the cooperative action of proline specific enzymes with cathepsins through out the meat maturation. To clarify the distribution of proline specific enzymes in muscle, specific substrates designed forthose enzymes were used for assay.

Prolyl endopeptidase, dipeptidyl aminopeptidase, proline iminopeptidase and prolidase activities were detected in the supernatant of homogenized muscle. Since prolyl endopeptidase activity was the highest in them, the enzyme was purified from porcine muscle by chromatographies on CM-cellulose, DEAE-Sephadex, hydroxyapatite, PCMB-Sepharose and Sephadex G-150. The enzyme appeared homogeneous as judged by disc gel electrophoresis. The molecular weight of the enzyme was estimated to be 75,000 by gel filtration. The optimum pH of the activity was 7.3. The enzyme was inactivated with diisopropylphosphorofluoridate, Z-GIy-Pro-$CH_2$ Cl, Z-Pro-prolinal and p-chloromercuribenzoate. The enzyme hydrolyzed biologically active peptides at the carboxyl side of prolyl residues.

In order to study about biological significance of prolyl endopeptidase in muscle specific inhibitor for the enzyme was synthesized. A series of N-blocked L-proline containing compounds and their derivatives were synthesized. Their inhibitory activities for prolyl endopeptidase from bovine brain were examined and comparad with that of N-benzyloxycarbonyl-L-prolyl-L-prolinal, which is the most effective enzyme inhibitor hitherto reported. Introduction of a sulfur atom into pyrrolidine ring quite effectively increased the inhibitory activity: replacement of pyrrolidine with thiazolidine or thiazolidine aldehyde (thioprolinal) and conversion of L-proline to L-thioproline residue resulted in increase in the inhibitory activity. Thus, N-benzyloxycarbonyl-L-thioprolyl-thiazolidine (Z-Thiopro-thiazolidine) and Z-L-Thiopro-L-thioprolinal showed Ki values of 0.36 and 0.01 nM, respectively, for prolyl endopeptidase from bovine brain: both values were gignificantly lower than that of Z-prolinal. The enzyme from porcine muscle was also innhibited strongly.

The role of the prolyl endopeptidase in meat maturation is under study using of these inhibitors.

## 1. 目　的

プロリンは他のアミノ酸と異なりイミノ酸であることから，ペプチド結合の自由度が制限され，タンパク質中ではヘリックスやβ-構造がとれないなどの性質がよく知られており，プロリンを多く含むタンパク質は特異な性質を持つ場合が多い。一方，多くの生体内ペプチダーゼやプロテアーゼはその立体障害からプロリンの周辺には作用できないため，プロリンを多く含むタンパク質の栄養価値を低下している。著者はこれまで小腸や腎臓においてプロリンに特異性を持つエンドペプチダ

© The Ito Foundation

ーゼとアミノペプチダーゼを研究し，これら酵素と多くのペプチダーゼの相互作用によりアミノ酸への分解が起こることを明らかにした。一方，骨格筋に於いても種々のプロリン特異性ペプチダーゼ活性を見いだしている。これらのことから，筋肉中のタンパク質分解酵素（特にカセプシン類）との相互作用が強く示唆される

プロリンの特異な構造と性質は古くから注目され，プロリダーゼやプロリナーゼの存在が知られていたが，酵素学的に研究されだしたのはここ10年程である。著者らは種々のプロリン特異性酵素について酵素化学的，遺伝子工学的に研究してきた[1~11]。

本研究では，これまであまり研究されていない筋肉中の種々のプロリン特異性酵素について，その酵素化学的性質を研究した。

## 2. 方　法

（1） 酵素活性測定：プロリルエンドペプチダーゼはZ-GIy-Pro-2-NNapを，ジペプチジルアミノペプチダーゼはGIy-Pro-2-NNapを，プロリンイミノペプチダーゼはPro-2-NNapを，アミノペプチダーゼはLeu-2-NNapをそれぞれ基質とし，遊離するナフチルアミンをアゾ発色し測定した[4]。ペプチドに対する作用は，HPLCにより分離後，酸水解し，そのアミノ酸組成から切断点を明らかにした。

（2） 阻害剤の合成法：これまで化学合成阻害剤としてはZ-Gly-Pro$CH_2$Clを開発してきた[1]。さらに，アルデヒドを持つ化合物に焦点を当て合成を行った。プロリンは，種々の保護基アシルクロリドによりN末保護プロリンとした。これらN末が保護されたプロリンはDCCを用い，N-ヒドロキシサクシンイミドエステルとし，さらに塩基と反応させることにより，または種々の塩基とを直接DCC法により脱水縮合し，N末保護プロリン誘導体とした。生成した化合物は，シリカゲルカラムクロトマトグラフィー（主な展開溶媒はAcOEtbenzene 6：4）により精製した。それぞれの化合物は，TLC，元素分析，赤外線吸収スペクトル，Massスペクトル（EI-MSまたはFAB-MS），NMRスペクトルなどを測定し，確認した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 プロリン特異性ペプチダーゼの分布

これまでの我々の研究からZ-GIy-Pro-β-naphthylamide（Z-GIy-Pro-2-NNap）やZ-GIy-Pro-7-amino-4-methylcoumarinyl amide（Z-GIy-Pro-MCA）はプロリルエンドペプチダーゼの特異的な基質であることが判っている。これらを用い豚の各臓器についてプロリルエンドペプチダーゼの分布を調べた。脳，睾丸，肝臓，骨格筋，腎臓などに高い活性がみられたが，ほとんどの臓器に活性が見られ，酵素は広く分布することが明らかとなった。

### 3.2 プロリン特異性酵素の精製

豚骨格筋200 gをスライスし，800 m$l$の20 mMトリス塩酸緩衝液，pH 7.0（10mM EDTAと2-メルカプトエタノールを含む）を加え，4 minホモジェネートした。ホモジェネート液を遠心分離し，上清を50~80飽和の硫安で分画し，沈澱を10 m$l$の緩衝液で溶解後，Sephadex G-25により脱塩し，酵素液をDEAE-Toyopearlでカラムクロマトグラフィーを行った。高いプロリルエンドペプチダーゼ活性が0.1M塩濃度溶出部分にみられたが，アミノペプチダーゼP，ペプチダーゼ，カルボキシペプチダーゼP，ジペプチジルアミノペプチダーゼⅣ，プロリルエンドペプチダーゼおよびアミノペプチダーゼについてもその活性を検出した。プロリルエンドペプチダーゼ活性区分を集め，DEAE-トヨパールによる再クロマトを行った後，ヒドロキシアパタイト，セファデスクG-

© The Ito Foundation

150によるクロマトグラフィーにより約3,000培に精製した。

3.3 酵素化学的性質の検討

上記酵素に関してはまだ酵素化学的性質の研究が行われていないので，その性質の詳細を検討した。Z-Gly-Pro-2-NNap を基質とした酵素の至適 pH は7.3であり，酵素は37℃で30分の条件でpH 6.0～8.5 の間で安定であった。また，至適温度は37℃で，pH 7.0 で 43℃で30分の処理で酵素は50% の残存活性が見られた。酵素の分子量は75,000，等電点は 4.8 であった。これらの値は，著者らが明らかにしてきた牛脳からのプロリルエンドペプチダーゼと[7] よく一致した。(**Table 1**)

酵素は DFP, Z-Gly-Pro-$CH_2$ Cl および PCMB により阻害されたが，EDTA や o-phenanthroline などのキレート剤によっては阻害されなかった。また，大豆やすい臓および卵白由来のトリプシンインヒビターによっても阻害されなかった。

**Table 1** Enzymatic Properties of Prolyl Endopeptidases

| | Porcine muscle | Bovine brain | *F. meningosepticum* |
|---|---|---|---|
| Optimum pH | 7.3 | 7.5 | 7.0 |
| pH stability (37℃ for 30 min) | 6.0-9.5 | 5.5-9.5 | 5.0-9.0 |
| Optimum temperature (at pH 7.0) | 37℃ | 37℃ | 40℃ |
| Thermal stability (50% remaining activity) | 43℃ | 43℃ | 42℃ |
| Isoelectric point | 4.8 | 4.8 | 9.6 |

**Table 2** Effects of Chemicals and Metal Salts on Prolyl Endopeptidase.
The enzyme was preincubated with respective inhibitor or metal salt in 20 mM Tris HCl buffer (pH 7.0) for 10 min at 37 ℃ and the residual activities were assayed by the standard method.

| Chemicals | Concn. (mM) | Remaining activity (%) Porcine muscle | Bovine brain | *F. meningosepticum* |
|---|---|---|---|---|
| None | 0 | 100 | 100 | 100 |
| EDTA | 1.0 | 104 | 98 | 105 |
| o-Phenanthroline | 1.0 | 100 | 95 | 101 |
| PCMB | 0.1 | 3 | 0 | 97 |
| Iodoacetate | 1.0 | 100 | 60 | 79 |
| DFP | 1.0 | 4 | 0 | 2 |
| PMSF | 1.0 | 87 | 72 | 85 |
| Pepstatin | 1.0 | 100 | 100 | 100 |
| Chymostatin | 1.0 | 83 | 100 | 102 |
| Soybean trypsin inhibitor | 0.1 | 100 | 87 | 100 |
| Bovine pancreas trypsin inhibitor | 0.1 | 100 | 98 | 87 |
| Egg white trypsin ibhibitor | 0.1 | 100 | 98 | 100 |
| Z-Gly-Pro-$CH_2Cl$ | 1.0 | 0 | 0 | 2 |
| Tos-Lys-$CH_2Cl$ | 1.0 | 93 | 100 | 100 |
| Z-Pro-prolinal | 0.001 | 4 | 2 | 0 |
| $Zn^{2+}$ | 1.0 | 0 | 4 | 7 |
| $Mn^{2+}$ | 1.0 | 88 | 100 | 87 |
| $Ni^{2+}$ | 1.0 | 94 | 90 | 94 |
| $Cu^{2+}$ | 1.0 | 1 | 4 | 10 |
| $Hg^{2+}$ | 1.0 | 0 | 2 | 0 |

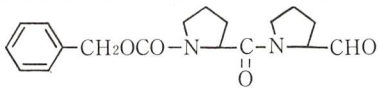
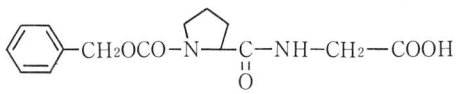
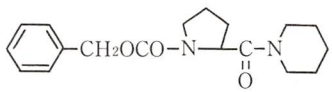
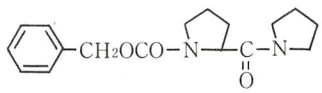
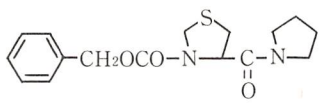
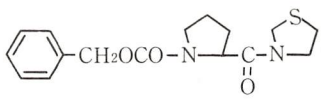
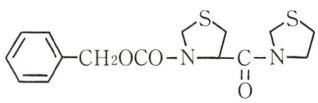
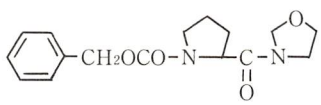
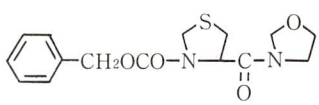
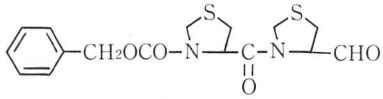
© The Ito Foundation

(**Table 2**)

3.4　酵素阻害剤

合成したアミノ酸誘導体のプロリルエンドペプチダーゼに対する阻害活性を **Fig. 1** に示す。P1サイトにNを含む5員環化合物があると阻害活性が現れ，P2サイトのProやP1サイトのpyrrolidineにSを導入すると阻害活性は上昇した。またP1サイトの5員環にアルデヒド基を加えると阻害活性はさらに上昇した。このアルデヒド基をカルボキシル基やアルコールに変えると活性は

**Fig. 1**　Inhibitory Activity of Synthesized Compounds on Prolyl Endopeptidase.

| Compounds | Structure | IC 50 | Ki |
|---|---|---|---|
| Z-Pro-prolinal |  | 0.74nM | 3.4nM |
| Z-Pro-glycine |  | >1mM | ——— |
| Z-Pro-piperidine |  | >1mM | ——— |
| Z-Pro-pyrrolidine |  | 540nM | 2.4μM |
| Z-Thiopro-pyrrolidine |  | 160nM | 210nM |
| Z-Pro-thiazolidine |  | 4.6nM | 39nM |
| Z-Thiopro-thiazolidine |  | 0.14nM | 0.36nM |
| Z-Pro-oxazolidine |  | 810μM | 910μM |
| Z-Thiopro-oxazolidine |  | 590nM | 590nM |
| Z-Thiopro-thioprolinal |  | 0.01nM | 0.035nM |

© The Ito Foundation

著しく低下した。P 2サイトのL-proline をD-Proに変えると阻害活性は極端に低下し，上述のP 2，P 1，P1' サイトに高い立体特異性を示すこととよく一致した。なおP 1サイトの含N 5員環化合物はP 2サイトのPro(またはThiopro)とアミド結合していることが必要であり，例えば4-(4'-Z-thiazoli dinyl carbonyl)-thiazolidine-HClの酵素阻害活性は極めて弱い。一方，N-保護基としてはbenzyloxycarbonyl(Z)基が最も有効で，これをCinn, Tos, Phenyl-, Acetyl やIso-nicotionyl基に置き換えると阻害効果は低下した。またPheやβ-Alaなどのアミノ酸を導入してN-未端側へ鎖長を伸ばした場合も阻害活性はむしろ低下する。すなわち，酵素阻害剤としてはP 3からP 1までのある限られた鎖長を持ち，かつP 2サイトはL-Thioproが最も好ましく，P 1サイトにはthiazolidine またはL-thioprolinal が位置した場合，最も強い酵素阻害活性が現れることが判った。

3.5　酵素の基質特異性

筋肉由来のプロリルエンドペプチダーゼについてその基質特異性を調べた。Z-Gly-Pro-2-NNapを基質とするとKm およびVmax 値はそれぞれ0.31mM と 0.24μmol/min/unit であった。すでに配列の明らかにされている2種のペプチドに対する作用点を調べたのが **Fig. 2** である。酵素はプロリンのカルボキシル側を切断した。ただし，Pro-Pro 結合には作用しなかった。

サブサイトの広がりを種々の合成基質を用いて調べた。**Table 3**に示すごとく，Pro-2-NNap, Z-Pro-2-NNap や Gly-Pro-2-NNap には酵素は全く働かなかった。さらにアミノ基側へ鎖長を延ばすと Z-Glu-Pro-2-NNap, Z-Gly-Pro-p-NA や Z-Ala-Pro-2-NNap のように酵素によって容易に切断された。しかし，更に鎖長を延ばし，Z-Ala-Gly-Pro-2-NNap は kcat/Km の値に大きな上昇は見られなかった。一方，切断位置からカルボキシル側へはZ-Gly-Pro をそのまま保ち，アミノ酸を延ばしていくと，P2' 位まで速度の上昇がみられたがP3' 位まで延ばすと逆に減少した。こられのことから，酵素と基質の結合には少なくともS 3，S 2，S 1，S1'，S2' の5つのサブサイトが関与することが推定された。

さらに，各サイトの光学的特異性を，アミノ酸をL-型からD-型に変えた時の影響で調べた。その結果S 2，S 1，S 1' に高い特異性が見られた。

## 4. 要　約

本研究の特色はこれまで殆ど研究されていない

**Fig. 2**　Cleavage of some Bioactive peptides by prolyl Endopeptidase of Porcine Muscle.

| Peptide | Products |
|---|---|
| ↓　↓<br>Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg<br>(Bradykinin) | Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg (r.t.=40min)<br>GIy-Phe-Ser-Pro (r.t.=40min)<br>Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro (r.t.=55min) |
| ↓　↓<br>Pyr-Leu-Tyr-Glu-Asn-Lys-Pro-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu<br>(Neurotensin) | Pyr-Leu-Tyr-Glu-Asn-Lys-Pro (r.t.=53min)<br>Arg-Pro (r.t.=60 min)<br>Tyr-Ile-Leu (r.t.=79min) |

Arrow indicates cleavage site.　　r.t. : Retention time

© The Ito Foundation

**Table 3** Substrate Specificity of Pfolyl Endopeptidase from Porcine Muscle.

| Substrate $P_3$ $P_2$ $P_1$ $P_1'$ $P_2'$ $P_3'$ | Km (mM) | K*cat* ($s^{-1}$) | K*cat*/Km ($mM^{-1}\ s^{-1}$) |
|---|---|---|---|
| Pro -- 2 - NNap | | not hydrolyzed | |
| Z --- Pro -- 2 - NNap | | not hydrolyzed | |
| Gly --- Pro -- 2 - NNap | | not hydrolyzed | |
| Z --- Gly --- Pro -- 2 - NNap | 0.42 | 130 | 310 |
| Z --- Gly --- Pro -- p - NA | 0.13 | 57 | 438 |
| Z -- Gly -D - Pro -- p - NA | | not hydrolyzed | |
| Z --- Ala --- Pro -- 2 - NNap | 0.14 | 71 | 507 |
| Z -D - Ala --- Pro -- 2 - NNap | | not hydrolyzed | |
| Z - Ala --- Gly --- Pro -- 2 - NNap | 0.97 | 63 | 65 |
| Z -- Ala -D - Gly --- Pro -- 2 - NNap | 0.76 | 55 | 72 |
| Z --- Gly --- Pro --- Phe | | 7.5[a] | |
| Z --- Gly --- Pro --- Leu | | 10.5[a] | |
| Z --- Gly --- Pro --- Ala | | 7.5[a] | |
| Z --- Gly --- Pro -D - Ala | | not hydrolyzed | |
| Z --- Gly --- Pro --- Leu --- Gly | | 56[a] | |
| Z --- Gly --- Pro --- Leu --- Ala | | 38.5[a] | |
| Z --- Gly --- Pro --- Leu -D - Ala | | 40.1[a] | |
| Z --- Gly --- Pro --- Leu --- Gly --- Pro | | 28.7[a] | |

2-NNap, $\beta$-naphthylamide : p-NA, p-nitroanilide. [a] $\mu$mol/min per $\mu$mol at 0.8 mM substrate.

豚筋肉のプロリン特異性ペプチダーゼ類を研究した。活性の大小はあっても，プロリルエンドペプチダーゼ，ジペプチジルアミノペプチダーゼやプロリダーゼの活性が筋肉抽出液で検出された。

本研究では，これまであまり研究されていない筋肉中の種々のプロリルエンドペプチダーゼについて，その酵素化学的性質を研究した。Z-Gly-Pro-2-NNap を基質とした酵素の至適 pH は 7.3 であり，酵素は37℃で30分の条件で pH 6.0～8.5 の間で安定であった。また，至適温度は37℃で，pH 7.0で43℃で30分の処理で酵素は50％の残存活性が見られた。酵素の分子量は75,000，等電点は 4.8 であった。

プロリルエンドペプチダーゼに特異的な新規インヒビターとして Z-Thiopro-thiazolidine や Z-Thiopro-thioprolinal を開発した。このような特異的阻害剤は酵素の生理的役割を研究するのに有効であると思われる。

プロテアーゼやペプチダーゼによりタンパク質が分解を受けるとき，プロリン特異性酵素の関与が必須であることが明らかになってきた。食肉熟成時のプロテオリシスにおいてもプロリン特異性酵素の関与が推定された。今後，前述の阻害剤を用い，酵素の食肉熟成時での作用研究に用いる予定である。

本研究の遂行に当たり，研究奨励金を援助いただいた伊藤記念財団に感謝いたします。

**文　献**

1) Yoshimoto, T., Orlowski, R.C. and Wlter, R., Biochemistry, 16, 2942-1948 (1977)
2) Yoshimoto, T. and Walter, R., Biochim. Biophys. Acta, 485, 391-401 (1977)
3) Yoshimoto, T., Fischl, M., Orlowski, R.C. and Walter, R.J. Biol. Chem., 253, 3708-3716 (1978)
4) Yoshimoto, T., Ogita, K., Walter, R., Koida, M. and Tsuru, D., Biochim. Biophys. Acta. 569, 184-192 (1979)
5) Yoshimoto, T., Walter, R. and Tsuru, D., J.Biol. Chem., 255, 4786-4792 (1980)

© The Ito Foundation

6) Yoshimoto, T., Simmmons, W.H., kita, D. and Tsuru, D., J. Biochem., 90, 325-334 (1981)
7) Yoshimoto, T., Nishimura, T., Kita, T. and Tsuru, D., J.Biochem., 94, 1179-1190 (1983)
8) Yoshimoto, T., Kita, T., Ichinose, M. and Tsuru, D., J.Biochem., 92, 275-282 (1982)
9) Yoshimoto, T., Tsukumo, K., Takatsuka, N. and Tsuru, D., J. Pharm. Dyn., 5, 734-740 (1982)
10) Yoshimoto, T. and Tsuru, D. J. Biochem., 94, 619-622 (1983)
11) Yoshimoto, T. Murayama, N., Honda, T., Tone, H. and Tsuru, D., J.Biochem. 104, 93-97 (1988)

© The Ito Foundation

# 食肉熟成の調節へのオリザシスタチンの応用

Application of Oryzacystatin to Modulating the Aging of Meat

荒 井 綜 一（東京大学農学部）

Soichi Arai (Faculty of Agriculture, The University of Tokyo)

A new process was developed to regulate the papain-induced overtenderization of meat by using oryzacystatin, a cysteine proteinase inhibitor of rice seed origin. A meat cube (2×2×2cm), aged 3 days, was treated with a one-tenth fold volumn of a papain solution and incubated at 8℃. The most favorable degree of tenderization resulted by using a 2% papain solution for 2 hours at 8℃. When the incubation time was made up to 24 hours or longer, overtenderization resulted. When a meat cube was treated with papain for 2 hours and then with an adequate amount of oryzacystatin for 22 hours, the overtenderization was effectively regulated. It was also confirmed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis that the use of oryzacystatin under a similar condition of incubation regulated the papain-added hydrolysis of myofibrillar proteins.

## 1. 目　的

食肉の熟成は組織の軟化と旨味の向上を目的とする重要なプロセスである。しかしながら現在のところ，熟成の促進が主要な研究対象になっており，過熟の制御による熟成の最適化を目指す研究は，必要性は予てから認識されているものの，技術的な困難性のためにほとんど行われていないのが実情である。

食品の熟成は通常，内因性プロテァーゼの作用に依存する[1]。そのプロテァーゼにはカテプシンH，カテプシンLなどのシステインプロテイナーゼ［EC 3. 4. 22］が含まれる[2]。時として，熟成促進剤として，やはりシステインプロテイナーゼの一種であるパパイン［EC 3. 4. 22. 2］が添加されることもある[3]。とくにパパインを用いる場合，熟成の行き過ぎをどのように制御するかが懸案となっている。使用したパパインを加熱によることなく失活させ食肉の過熟を防止する方法としてパパインを阻害する物質の使用が考えられる。

最近，Abeら[4,5]はコメ種子にシステインプロテイナーゼインヒビター（オリザシスタチン）を見いだし，これを精製するとともに，全一次構造を決定した。オリザシスタチンはパパインをきわめて効率よく阻害する[4]。しかも高度に耐熱性で，炊飯条件でもほとんど失活しない[4]ことから，日常われわれは米飯からオリザシスタチンを活性型のまま摂取しており，したがってこれを使用することの安全性は経験的に証明されていると考えられる。

本研究は，オリザシスタチンを過熟防止剤として使用，食肉の熟成の最適化を達成しうることを検証し食肉加工に1つの新しい技術思想を導入することを目的として実施された。

## 2. 材料および方法

（1） 材　料：肉は去勢したホルスタインの殺後3日目の外もも肉を用い，使用時まで−20℃

© The Ito Foundation

で保存した。

（2） 酵　素：パパインはダイジィスティブパウダー（和光純薬）とパパイアラテックス・タイプⅢ（Sigma）を用いた。

（3） インヒビター：オリザシスタチンはコメ種子胚乳中よりAbeらの方法[4]に従い精製した。

（4） 肉の調製：凍結した肉を2㎝角に切り，室温で解凍した。完全に解凍する前に筋線維に対して水平方向に各面6ヵ所垂直方向に各面3ヵ所ずつ金串で穴をあけた。

（5） 肉の軟化：パパイン（ダイジィスティブパウダー）溶液は1mM EDTA, 1mM システインを含む0.1Mリン酸緩衝液（pH 6.0）に0～10％溶解した。肉にその重量の1/10のパパイン溶液を加え，8℃で浸漬した。一定時間後水洗し水気をふきとり，官能検査用試料は160℃の電気ホットプレートで各面20秒ずつ14回裏返しながら（中心が65℃になるまで）加熱した。レオメーター測定用の試料は95℃で5分間湯煮した。

（6） オリザシスタチンによる肉の軟化制御：2％パパイン（ダイジィスティブパウダー）溶液に2時間浸漬した肉をとり出し，軽く水洗した後オリザシスタチン水溶液（0.3mg/m*l*）に浸漬した。このさいオリザシスタチンはパパイン活性を十分に阻害する量を使用した。

（7） 官能検査：赤ランプを点灯したブースでパネル7～12名により実施した。検査は，柔らかさ，ざらつき，全体的な評価について行った。ざらつきは肉を口に入れた時，サンプルの表面の部分が粒子状に舌の上に残るような感覚で判断した。順位法は柔らかさとざらつきについては，程度の最も強いものを5として順位をつけ，全体的な評価については，最も好ましいものを5として順位をつけた。検定は順位の一致性の係数Wを用いて行った。2種類のサンプルを比較する時は2点比較法で行った。

（8） 機械的テクスチャー測定：機械的テクスチャー測定はレオメーター（不動工業）により行った。測定条件はTsujiらの方法[6]に従い，直径5㎜のプランジャーを用いクリアランス9㎜，試料台の昇降速度5㎝/minで咀しゃく試験を行った。固さは最初のピークの高さから測定し，ブランク（酵素を含まないリン酸緩衝液に浸漬した肉）の固さを1として測定した。

（9） パパインによる筋原線維の分解：筋原線維はYangらの方法[7]に従って調製した。1mgタンパク質を含む筋原線維を（5）と同様の緩衝液200$\mu l$に溶解し，パパイン（Sigma, type Ⅱ）溶液（0，0.5$\mu$g，2.5$\mu$g，5.0$\mu$gタンパク量）を加え，37℃，60分インキュベーションした後，SDS-PAGEを行った。

（10） オリザシスタチンによるパパイン反応の制御：基質溶液は（9）と同条件で調製し，パパインを2.5$\mu$g添加し，0，30，60分反応した。また，0分，30分後にオリザシスタチンを2.5$\mu$g添加し，60分まで反応を行った。反応終了後100℃，5分煮沸し，SDS-PAGEに供した。

（11） SDS-ポリアクリルアミド電気泳動：Laemmliの方法[8]によった。但し，ゲルはグラジエントゲル（第一化学）を用いた。

## 3. 結果および考察

### 3.1 パパインによる肉の軟化

0～10％のパパイン溶液に肉を24時間浸漬し，各々の官能検査およびレオメーターによる測定を行った。**Table 1**に示すように，浸漬するパパイン溶液の濃度が高くなる程，肉は軟化するが，反面，表面がざらつき不快感が強くなった。軟化度はレオメーターによる測定結果も官能検査と同傾向を示した。全体的な評価として，2％パパイン溶液を使用したさい最も好ましい結果が得られた。ついで2％パパイン溶液に浸漬し経時的にサンプ

© The Ito Foundation

リングしたところ，コントロール（緩衝液のみに浸漬した肉）と2時間浸漬した肉とでは，1％の危険率で，2時間浸漬した肉が有意に柔らかく，これはレオメーターによる測定値とも一致した。また，全体的な評価では，2時間反応の肉はややざらつく傾向を示すものの1％の危険率で好まれた（**Table 2**）。さらに，2時間浸漬と24時間浸漬の比較では柔らささにおいては，24時間浸漬した肉が圧倒的に有意であったが，表面がざらつき，線維質が崩壊していた。その結果，全体的な評価は低く好まれなかった（**Table 2**）。以上のことから，2時間浸漬した肉は表面があまりざらつかず，柔らかさはコントロールより大で食肉として良い状態であることが判明したので，ついでこの状態でパパイン反応を停止することを試みた。

3.2　パパイン浸漬肉のオリザシスタチンによる制御

2％パパイン溶液に2時間浸漬した肉は，元の肉より明らかに良好な熟成状態を示したことから，2時間の時点でオリザシスタチン処理し，反応を

**Table 1**　Effect of the concentration of added papain on sensory and rhelogical scores of meat samples

| Concentration of papain (%) | Sensory scores | | | Rheometric hardness[d] |
|---|---|---|---|---|
| | Tenderness[a] | Smoothness[b] | Preference[c] | |
| 0 | 0 | 0 | 13 | 1.00±0.09 ) * |
| 1 | 11 | 11 | 21 | 0.76±0.05 ) * |
| 2 | 12 | 12 | 26 | 0.64±0.13 ) * |
| 5 | 21 | 21 | 8 | 0.55±0.09 ) * |
| 10 | 26 | 26 | 2 | 0.53±0.82 ) * |

[a] Seven independent meat samples were evaluated by seven panelists for tenderness. A five-point descriptive quality scale was used in judgements and each result was represented as a sum of the seven scores obtained.

[b] A similar way of evaluation and representation was adopted.

[c] A similar way of evaluation was adopted at a five-point hedonic scale and each result was represented as a sum of the seven scores obtained.

[d] Seven independent samples were measured for the hardness as a height of the first press curve and each result was represented as an average ± standard deviation. Statistical significance was obtained at 1% level between two measurements as asterisked.

**Table 2**　Sensory and rheological scores for meat samples incubated in the presence of added papain[a]

| Meat | Incubation time (hr) | Sensory parameters | | | Rheometric hardness |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Tenderness | Smoothness | Preference | |
| First evaluation | | | | | |
| A | 0 | 0 | 0 | 0 | 1.00±0.12 |
| B | 2 | 8 | 8 | 8 | 0.89±0.11 |
| Second evaluation | | | | | |
| B | 2 | 0 | 0 | 0 | 0.89±0.11 ) * |
| C | 24 | 8 | 8 | 0 | 0.74±0.04 ) * |

[a] Meat A and meat B were compared for the three parameters in the first evaluation test and meat B and meat C were compared likewise in the second evaluation test. Eight independent samples were used for each of meats A, B and C. A paired comparison test was conducted by eight panelists and each result was represented by the number of their positive answers. The rheometic measurements were obtained as in **Table 1.** Statistical significance was obtained at 5% level and indicated as asterisked.

© The Ito Foundation

停止する実験を行った。その結果を**Table 3**に示した。2時間後シスタチン処理したものは，そのまま24時間浸漬したものより明らかに軟化しすぎず，ざらつきも少なく，全体的評価は高かった。このようにシスタチン処理することにより，パパイン反応が停止し，その結果，それ以上熟成が促進しないことが裏づけられ，オリザシスタチンを用いることにより，過熟の防止が可能であることが示された。

3.3 筋原線維を用いたオリザシスタチンのパパイン反応制御の検証

筋原線維タンパク質のパパイン水解がオリザシスタチンの添加により制御されるか検討した。また，パパイン量（0.05μg, 2.5μg, 5.0μg）による筋原線維の水解状態をSDS-PAGE（**Fig. 1**—A）によりしらべた。パパイン量が増加する程，筋原線維が分解され，低分子タンパク質が増加しており，5μg添加すると約80%が分解された。特にミオシン重鎖は少量の酵素でも分解され，またトロポニンTとトロポミシオシン，ミオシン軽鎖の減少も見られた。

次にパパイン反応の0分あるいは30分でオリザシスタチンを添加し，60分まで反応を継続したものと，パパイン無添加あるいはパパイン添加後30分で煮沸し反応を停止したものを各々比較したところ，その泳動パターン（**Fig. 1**—B，レーン5と1，レーン2と3）はほとんど同じであった。このことから，オリザシスタチンによるパパイン反応の制御が確認された。

以上の結果，オリザシスタチンにより食肉の熟成の最適化を図ることが可能であることが証明され，食肉の熟成調節における新たなる方向性を示すことができた。さらに，このオリザシスタチンを使用した熟成調節の規模を拡大し，工業レベルにおける実現化を期待する。

## 4. 要　約

食品由来のシステインプロテイナーゼインヒビターであるオリザシスタチンを用いることにより，パパインを使用した肉の熟成促進の調節が可能であることを示した。

と殺後3日目の肉を2cm角に切り，肉の重量の1/10量のパパイン溶液を加え8℃で反応したところ，パパイン濃度2%で2時間反応した肉が最も良い熟成状態を示し，それ以上反応した肉は過熟状態であった。そこで2時間の時点でオリザシスタチンを添加し，24時間まで放置したところ，過熟が防止され，オリザシスタチンによりパパイン反応の調節が可能であることが明らかとなった。このことは，筋原線維タンパク質のパパイン水解

**Table 3** Effect of the addition of oryzacystation on sensory and rheological scores of meat samples[a]

| Meat | Treatment | Sensory parameters | | | Rheometric hardness |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Tenderness | Smoothness | Preference | |
| A | Papain alone | 12 | 12 | 0 | 0.44±0.03 ) * |
| B | Papain plus oryzacystatin | 0 | 0 | 12 | 0.79±0.06 |

[a] Meat A was prepared by incubation with papain for 24 hr., whereas meat B was prepared by incubation with papain alone for the first 2 hr and by incubation in the presence of added oryzacystatin for the following 22 hr. Twelve independent samples were used for each of meats A and B. A paired comparison test was conducted by twelve panelists and each result was represented by the number of their positive answeres. Therheometric measurements were obtained as in **Table 1.** The two measurements were significantly different at 0.1% level.

© The Ito Foundation

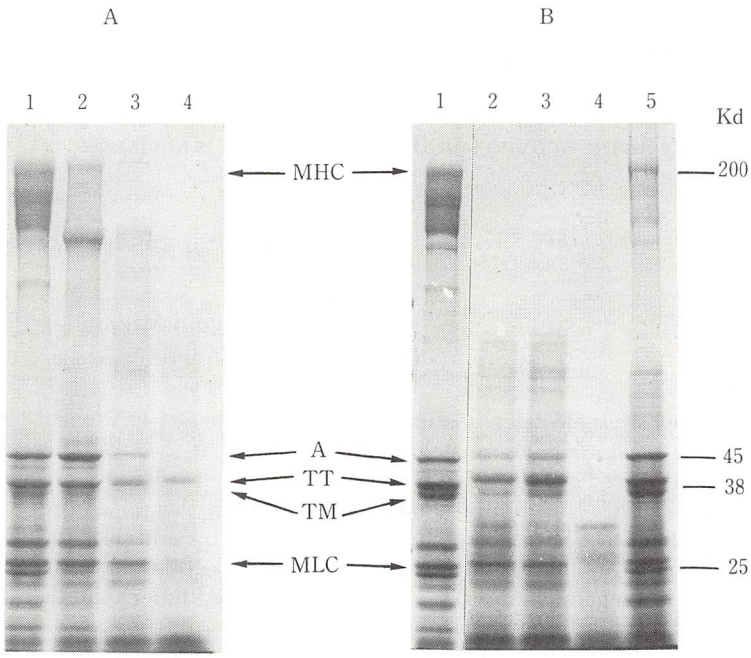



**Fig. 1** SDS-polyacrylamide gel electrophroresis of myofibril proteins.
A. A myofibril fraction was prepared from an intact meat sample and electrophoresed (lane 1). The same fraction was then treated with papain under various conditions and electrophoresed. Lanes 2, 3 and 4 : 200 $\mu l$ of the fraction (1 mg in protein content) incubated at 37℃ for 60 min in the presence of 0.5 $\mu$g, 2.5 $\mu$g and 5.0 $\mu$g papain, respectively.
B. The myofibril fraction with a protein concentration of 1 mg/200 $\mu l$ was autodigested by incubation for 60 min in the absence of papain and oryzacystatin (lane 1). The same fraction was then treated under various conditions and electrophoresed. Lane 2 : 200 $\mu l$ of the fraction incubated with papain (2.5 $\mu$g) for the first 30 min, mixed with oryza-cystatin (2.5 $\mu$g), and incubated for the following 30 min. Lanes 3 and 4 · 200 $\mu l$ of the fraction incubated with papain (2.5 $\mu$g) for 30 min and 60 min, respectively. Lane 5 : 200 $\mu l$ of fraction incubated in the presence of both papain (2.5 $\mu$g) and oryzacystatin (2.5 $\mu$g) for 60 min. All the incubation experiments were carried out at 37℃.
Symbols: MHC, myosin heavy chain; A, actin; TT, troponin-T; TM, tropomyosin; and MLC, myosin light chain. Molecular mass positions were calibrated with standard marker proteins.

がオリザシスタチンの添加で制御されることを検証した電気泳動の結果からも裏づけられた。

## 文 献


1) 天野慶之，藤巻正生，安井 勉，矢野幸男，食肉加工ハンドブック，pp 189-190，光琳，東京（1980）
2) N. Katunuma and E. Kominami, Curr. Top. Cell. Regul. **22**, 71-101 (1983)
3) R. E. Feeney and J. R. Whitaker, 食品蛋白質，第2版，pp 194-209，（藤巻正生，荒井綜一訳）学会出版センター，東京（1979）
4) K. Abe, H. Kondo and S. Arai, Agric. Biol. Chem., **40**, 47-51 (1987)
5) K. Abe, Y Emori, H. Kondo, K. Suzuki and S. Arai, J. Biol. Chem., **262**, 16793-16797 (1987)
6) R. F. Tsuji, M. Hamano, I. Koshiyama and D. Fukushima, J. Food Sci., **52**, 1177-1177 (1987)
7) R. Yang, AOkitani and M. Fujimaki, Agric. Biol. Chem., **36**, 2087-2095 (1972)
8) V.K.Laemmli, Nature, 227, 680-685 (1970)


© The Ito Foundation

# 電気刺激による食肉のプロテアーゼ活性について

Protease Activities in Beef by Electrical Stimulation

三上正幸・三浦弘之（帯広畜産大学）

Masayuki Mikami and Hiroyuki Miura
(Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine)

Holstein cows were electrically stimulated at low voltage (40 V and 13.8 Hz) for 60 sec. Samples of *b. femoris* muscle were obtained at 2 days after slaughter, homogenized and stored at 1±1℃ for 21 days.

Content of peptides and amino acids increased than that of control by electrically stimulation (ES). These contents also increased by addition of EDTA, but there is no increment in control homogenate by addition of EDTA.

Activities of cathepsins B and B+L in ES muscle are higher than that of control and are corresponding in high content of peptides.

## 1. 目　的

近年食肉の商品寿命を延ばすためにコールドチェーンが発達し，食肉は常時低温に保持されるようになった。しかしながらこの低温流通機構によって死後硬直に関与する種々の酵素系の活性が抑制されて死後硬直が遅れたり，コールドショートニングを引き起こしたりすることが知られている。

電気刺激（electrical stimulation：ES）によって筋肉の解糖作用を促進させ，pHを急激に下げ，ATPを消費して死後硬直を短時間に終了させることができる[1]。

食肉の熟成中におけるタンパク分解酵素には，カルパインやリソソーム内のカテプシンB，D，HおよびLなどが知られている[2]。カルパイン活性は中性付近にあり，電気刺激を行った食肉においてpHは急速に低下することから，通常より抑制され，カテプシン酵素の活性は酸性側にあるので活性化されると考えられる。

Dutsonら[3]の報告によると，電気刺激によってリソソーム膜は破壊され，リソソーム酵素であるカテプシンの活性は増加すると言われている。食肉の熟成中に筋原線維タンパク質および筋漿タンパク質が分解されると，低分子画分であるペプチドおよびアミノ酸量は増加する。前回我々はホルスタイン肥育牛の筋原線維および筋漿タンパク質について，電気刺激したものはこれらタンパク質は減少して，低分子のものが出現していることを報告した[4]。その場合肉塊を用いたが，本実験ではドリップロスによる誤差をなくすため，筋肉ホモジネートを調製し，電気刺激によるプロテアーゼの作用をペプチドおよびアミノ酸の増加量，カテプシン活性，さらに官能検査等から比較検討した。

## 2. 実験材料および方法

### 2.1 供試牛および電気刺激の方法

実験に用いた牛はホルスタイン種の経産牛（6～7年齢）4頭で，その内2頭に低電圧の40V，13.8 Hz, 60秒間の電気刺激を行ない，残りの2頭を対照区とした。供試筋肉部位は，大腿二頭筋（*M. biceps femoris*）で，と殺2日目に採取した。

© The Ito Foundation

2.2　ホモジネート試料の調製

と殺後2日目の大腿二頭筋を細切し，その3倍量の緩衝液（0.1M塩化ナトリウムおよび0.05%アジ化ナトリウムを含む30mM クエン酸—リン酸，pH 5.5）を加え，ホモジナイズした。このホモジネートにそれぞれ1mM $CaCl_2$, 1mM EDTAおよび100$\mu$M ロイペプチンを添加したものおよび無添加の4つをそれぞれ調製し，1±1℃でと殺後2，7，14および21日目まで貯蔵した。各ホモジネートのpHは約5.6であった。

2.3　2% TCA可溶性画分の調製

一定日数貯蔵したホモジネートからTCA可溶性画分を調製した。ホモジネート試料を11,000×gで20分間，1℃で遠心分離した後，この上澄液に4% TCA溶液を等量加えた。37℃で30分間保温した後，遠心分離してろ過（No. 5C）した。これを2% TCA可溶性画分としてペプチドおよびアミノ酸量の測定に用いた。

2.4　ペプチド量の測定

0.5m$l$の2% TCA可溶性溶液を用い，ローリー法により660nmの吸光度から測定した。なお検量線には，牛血清アルブミンを標準物質として用いた。

2.5　ニンヒドリン陽性物質（アミノ酸）量の測定

アミノ酸分析は日本電子JLC-6AUSを改良して使用した。すなわち20倍希釈した2% TCA可溶性溶液を吸い込ませ，ニンヒドリン溶液と混合し，95℃で加熱発色後，570nmの吸光度で自動的に測定した。なお検量線には，標準アミノ酸混合溶液（19$\mu$M/m$l$）を用いた。

2.6　カテプシンBおよびB＋L活性測定用の粗酵素液の調製

と殺後2日目の試料20gを取り，細切後80m$l$の1mM EDTAを含む100mM酢酸緩衝液，pH 5.0を加え，ホモジナイズした。これを2つに分け，一方にはTriton X-100を0.2%加え，両者とも一晩1±1℃でスターラーで撹拌抽出した。次に25,000×gで20分間，1℃で遠心分離し，ろ過（No. 5C）した上澄液をカテプシンBおよびB＋L活性測定用の粗酵素液とした[5]。なおTriton X-100を加えたものを全酵素とし，加えないものを遊離型の酵素とした。

2.7　カテプシンBおよびB＋L活性の測定

前述の粗酵素溶液を用い，基質としてカテプシンB活性の測定にはZ-Arg-Arg-NMecを，カテプシンB+L活性の測定にはZ-Phe-Arg-NMecを用い，30℃で一定時間（10分，30分および60分間）反応させた。活性測定は，日立蛍光光度計650—40により，X：340nm/2.5，M：460nm/2.5で行なった。酵素活性の値は各時間毎の数値を読み取り，これを10分間当たりの増加量で表した。

2.8　官能検査，ドリップロスおよびクッキングロスの測定

官能検査用の肉（厚さ約2cm，約190g/枚）は3枚をそれぞれ真空パックして1±1℃でと殺21日目まで貯蔵した。この時包装袋の中にドリップとして流出した量をドリップロスとした。この肉に2%の食塩，0.4gの胡椒を塗布し，調理温度は200℃で片面3分間ずつ焼いた。この時の損失をクッキングロスとした。官能評価は柔らかさ，多汁性および総合評価について9段階評価（1：大変悪い，9：大変良い）で行った。

## 3.　結果および考察

3.1　ペプチド量

ローリー法によるペプチド量の測定の結果を図**1**および**2**に示した。対照区と電気刺激区を比較すると，対照区では$CaCl_2$およびEDTAを添加してもペプチド量はほとんど増加しなかった。しかしながら，電気刺激区においては1mM EDTAを添加したものは14および21日目に他の3つより

© The Ito Foundation

も高い値を示し，また$CaCl_2$を添加したものも無添加のものより僅かに高かった。これはカテプシン酵素およびカルパインがそれぞれEDTAまたは$CaCl_2$の添加により活性化されたと考えられる。また電気刺激区における２日目の値は対照区よりも高く，冷却中にもかかわらず電気刺激によってプロテアーゼ作用が賦活したことによるものと考えられる。なおシステインプロテアーゼ（カテプシンB，HおよびL，カルパイン）を阻害するロイペプチンの添加は，電気刺激区および対照区ともに低く推移した。

3.2　ニンヒドリン陽性物質（アミノ酸）量の変化

主としてアミノ酸と考えられるニンヒドリン陽性物質量の結果も同様に**図1**および**2**の中に示した。ペプチドの変化と同様に対照区に$CaCl_2$またはEDTAを添加してもニンヒドリン陽性物質はほとんど増加しなかった。それに較べ電気刺激区では14および21日目においてEDTAを添加したものが高くなった。この場合無添加のものは通常の食肉の熟成に相当するが，電気刺激区における２日目の値は対照区よりも僅かに高い程度で，その後の増加量もほとんど差がなかった。

3.3　カテプシンBおよびB＋L活性

カテプシンBおよびB＋L活性の測定結果を**表1**に示した。カテプシンB活性の対照区以外はい

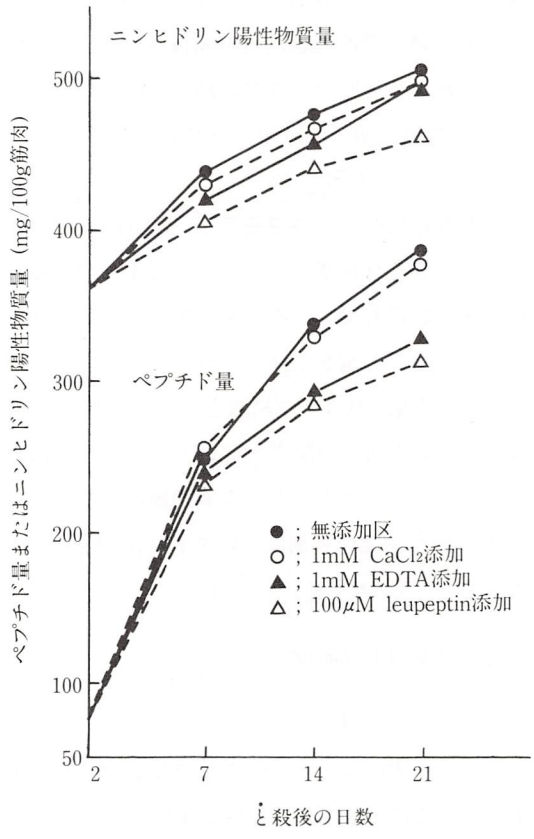



**図1**　牛肉貯蔵中のプチペドおよびニンヒドリン陽性物質量の変化
対照区ホモジネート試料を１±１℃で貯蔵した時の上澄液に，４％TCAを等量混合し，２％TCA可溶性画分を分析した。

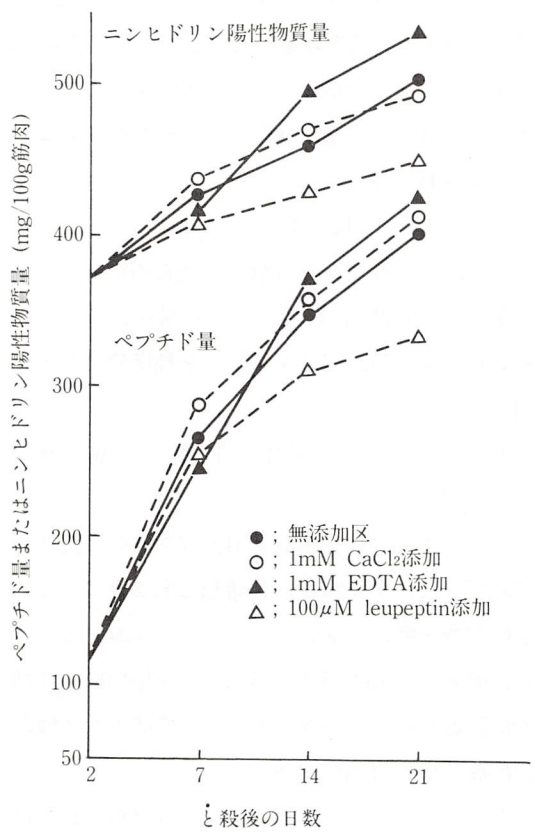



**図2**　牛肉貯蔵中のプチペドおよびニンヒドリン陽性物質量の変化
ES区ホモジネート試料を**図1**と同様に行った。

© The Ito Foundation

表1　カテプシンBおよびB＋L活性

| | カテプシンB活性[1] | | カテプシンB＋L活性[2] | |
|---|---|---|---|---|
| | 遊離型 | 全酵素 | 遊離型 | 全酵素 |
| 対照区 | 1.64 | 1.67 | 5.06 | 4.76 |
| ES区 | 1.68 | 1.53 | 5.40 | 4.59 |

試料；と殺2日目，大腿二頭筋。酵素活性の値は蛍光光度計より直読し，10分間当たりの増加量で表した。
1) 基質；Z-Arg-Arg NMec (Benzyloxycarbonyl-arginyl-arginine-4-methyl-7-coumarylamide)
2) 基質；Z-Phe-Arg NMec (Benzyloxycarbonyl-Phenylalanyl-arginine-4-methyl-7-coumarylamide)

ずれも遊離型が高い値であり，電気刺激区におけるカテプシンBは1.68，B＋Lは5.40といずれも対照区よりも高い値を示した。本来リソソーム膜を破壊して抽出した全酵素型の方が高い値を示すはずであるが，膜の破壊に用いたtriton X-100によるため，遊離型の方が高かったことも考えられる。しかしながら通常の肉の熟成には遊離したものが作用するので，遊離型に注目した方が実際的であると考えられる。

3.4　官能検査，ドリップロスおよびクッキングロス

官能検査，ドリップロスおよびクッキングロスの測定結果を**表2**に示した。対照区と電気刺激区の値を比較すると，官能検査では柔らかさの評価において，電気刺激したものに対してパネラーの75%が良い評価を与え，多汁性では58%であった。しかし総合評価では両者の間に差がないとするものが50%であった。ドリップロスおよびクッキングロスではいずれも有意差はなかった。

本実験ではと殺後直ちに筋肉を採取すると，電気刺激でグリコリシスによるPH低下がまだ進行中で，同一条件のホモジネート（pH5.6）を調製しにくいため枝肉の状態で冷却し，と殺2日目のものを用いた。従って出発時点におけるペプチド量に電気刺激による効果がすでに見られた（**図1**および**2**）。

ペプチド量の分析で，電気刺激区においてEDTAを添加したものが高いのは，EDTAはカルシウムをキレートしてカルパイン活性を抑えるが，カテプシンBおよびLをより活性化させたためと考えられる[6,7]。**表1**のカテプシンBおよびB＋L活性について見ると，電気刺激を行ったものはいずれも遊離型の方が高く，このためEDTAを添加した時，更に活性が上がったと考えられる。と殺後の筋漿内のカルシウムイオンの濃度は$1\times10^{-4}$M程度となり，これは生筋の約1000倍の濃度である。

表2　官能検査，ドリップロスおよびクッキングロス

| | 対照区 | 電気刺激区 |
|---|---|---|
| 官能検査[1] | | |
| 柔らかさ | 25.0% | 75.0%（0%*） |
| 多汁性 | 16.6 | 58.4　(25%*) |
| 総合評価 | 8.3 | 41.7　(50%*) |
| ドリップロス%[2] | 1.73±0.67 | 1.60±0.51 |
| クッキングロス%[3] | 17.9±3.21 | 16.6±3.51 |

1) 官能検査は12人により行い，各2頭づつの柔らかさ，多汁性および総合評価につき，1−9点で評価した。各項目の値は，高い評価を得た方の割合を%で表した。なお，かっこ内の＊印は差がないと答えた割合を示す。
2) 2頭分6枚のステーキ肉（190g/枚）を1±1℃で，と殺21日目まで貯蔵した時の平均値および標準偏差
3) 2頭分6枚のステーキ肉（190g/枚）を加熱，調理した時の平均値および標準偏差

これはカルパイン活性には十分な濃度と考えられる。本実験で用いたホモジネートのpHは5.6付近であるので，カルパイン活性は制限されていると思われたが，電気刺激区の場合は$CaCl_2$の添加によりペプチドおよびアミノ酸は僅かに増加傾向にあった。しかしながら対照区の場合は$CaCl_2$添加により僅かに減少傾向にあり，またEDTA添加によりペプチド量はかなり低くなった。これはEDTAのキレート作用によりカルパイン活性は抑制され，またカテプシン酵素も活性化されないためと考えられる。これらのことから電気刺激によって両酵素系はともに活性が高められていることが判る。

© The Ito Foundation

ロイペプチンを添加するとカルパインおよびカテプシン活性は抑制されるが，ペプチドおよびアミノ酸量は貯蔵中に増加している。従って食肉の熟成には両プロテアーゼ以外にタンパク質やペプチドを分解する酵素系の作用が比較的大きいことが推測される。

以上の結果より，電気刺激を行なうことにより，食肉中のタンパク質分解酵素が活性化され，特にカテプシン酵素により食肉の熟成が促進されることが判かった。

## 4. 要　約

本実験では，ホルスタイン経産牛に対する電気刺激（低電圧40V，13.8Hz, 60秒間）の効果を，低分子画分のペプチドおよびアミノ酸量の変化，カテプシンBおよびB＋L活性，官能検査，ドリップとクッキングロス等から比較検討した。

ペプチド量の増加は電気刺激区において高く，EDTAを添加したものは特に14日目以降一番高い値を示し，またアミノ酸量も同様な傾向であった。これはカテプシン酵素の作用によるものと考えられ，カテプシンBおよびB＋L活性の測定結果からも対照区より高い値であった。また電気刺激区では$CaCl_2$を添加したものは無添加のものより高く，pH5.6の条件でもカルパインの作用が認められた。

21日間熟成した牛肉の官能検査によれば，電気刺激区の方が柔らかさにおいて良好な結果を示したが，ドリップロスおよびクッキングロスにおいて有意差はなかった。

### 文　献

1) W.A. Carse, J. Food Technol., 8：163-166 (1973).
2) D.E. Goll, Y. Otsuka, P.A. Nagainis, J.D. Shannon, S.K. Sathe and M. Muguruma, J. Food Biochem., 7：137-177 (1983).
3) T.R. Dutson, G.C. Smith and Z.L. Carpenter, J. Food Sci., 45：1097-1098 (1980).
4) 三上正幸，三浦弘之，食肉に関する助成研究調査成果報告書，7：349-355 (1989).
5) D.J. Etherington, M.A.J. Taylor and E. Dransfield, Meat Sci., 20：1-18 (1987).
6) H. Kirschke, J. Langner, B. Wiederanders, S. Ansorge and P. Bohley, Eur. J. Biochem., 74：293-301 (1977).
7) I.F. Penny and R. Ferguson-Pryce, Meat Sic., 3：121-134 (1979).

© The Ito Foundation

# 食肉の熟成に関する膜酵素の活性と核磁気共鳴(NMR)分光法による研究

Studies on Aging of Pork Meat by Activities of Membrane Binding Enzymes and Nuclear Magnetic Resornance (NMR) Spectroscopy

萬場　光一・石田　哲也・川田　睦・野崎　昭利
利部　聰・牧田　登之（山口大学農学部）

Kouichi Mamba, Tetsuya Ishida, Mutsumi Kawada, Akitoshi Nozaki, Satoshi Kagabu and Takashi Makita
(Faculty of Agriculture, Yamaguchi University)

The study was carried out to observe the aging of pork meet by activities of membrane binding enzymes by electron microscopy and to detect amino acids and organic acids of the meet by nuclear magnetic resornance (NMR) spectroscopy. 100g of musculilongissimus lumborum from five adult swine (40 to 60kg) were preserved at 4℃ for 0, 3, 7 and 14 days. Approximately 1mm$^3$ cubic specimens from those samples were prepared for electron microscopy. Control samples were preserved at the same temperature for the same period of times. 1cm$^3$ cubic specimens cut from the muscles were applied to detect amino acids and organic acids by NMR at the same condition of control samples. Four enzymes, alkaline phosphatase (ALP), acid phosphatase (ACP), glucose-6-phosphatase (G6P) and Ca-adenosine triphosphatase (Ca-ATP) were studied. ALP showed a middle activity in the sarcoplasmic reticulum from 0 day to 7 days and a week activity at the same place on 14 days. ACP showed a weak activity in the outer layer around the sarcoplasmic reticulum and outer membrane of vacuoles from 0 days to 14 days. G6P showed a intense activity in the sarcoplasmic reticulum on 0 and 3 days, but a weak activity at the same place at 7 and 14 days. Ca-ATP showed a intense activity in the mitochondoria and sarcoplasmic reticulum at 0, 3 and 7 days, but no activity at the same place at 14 days.

Water, creatinine and lactic acid were detected by NMR spectroscopy from 0 day to 14 days. Creatinine is a kind of amino acid derivatives and amino acids are the composition of the taste. Creatinine peak was relatively maximum at 7 days and next high peak was at 3 days. Lactic acid is a kind of organic acids and produced as a result of the acidification. Therefore, lactic acid is used to measure the postmorterm time at the legal medicine. Lactic acid peak was relatively maximum at 14 days.

These findings suggest that the most adequate aging time is during 3 to 7 days.

## 1. 目　的

肉や漬物の野菜の質的変化としての熟成について，NMRでは野菜についてのみ報告されているだけで，肉の熟成については全く報告されていない。我々は肉の熟成が細胞膜の半透明性の程度とタンパク質が分解してアミノ酸や有機酸に変化した量でとらえられることに着目し，膜酵素の変動を電顕酵素化学的に検討し，併せてNMRによりアミノ酸あるいは有機酸の検出を行い，熟成を計数的に解明し，係数化したその値を熟成の一つの指標とすることを目的とした。

© The Ito Foundation

## 2. 材料と方法

雌成豚40～60kg 5頭の背最長筋 100ｇを使用した。豚はと殺放血後，直ちに腰最長筋 100ｇを摘出し4℃に保存した。電子顕微鏡とNMRでの観察と測定のため，と殺直後のもの，3日目，7日目および14日目と経時的に採材した。電顕酵素化学的に検討した酵素は，アルカリ性フォスファターゼ（ALP），酸性フォスファターゼ（ACP），グルコース-6-フォスファターゼ（G6P）およびCa-アデノシントリフォスファターゼ（Ca-ATP）の4種類であった。ALPの検出はOgawa等（'69）の金属鉛法に準拠して行った。ACPの検出はGomori（'52）の金属鉛法に準拠して行った。G6Pの検出は金村（'80）の方法に準拠して行った。Ca-ATPの検出はAndou等（'81）の方法に準拠して行った。各酵素反応をした組織は1％四酸化オスミウムで4℃1時間固定，常法どおりアルコール系列で脱水，Epon 812 包埋し，超薄切片を作製，酢酸ウランとクエン酸鉛の二重染色を施し，

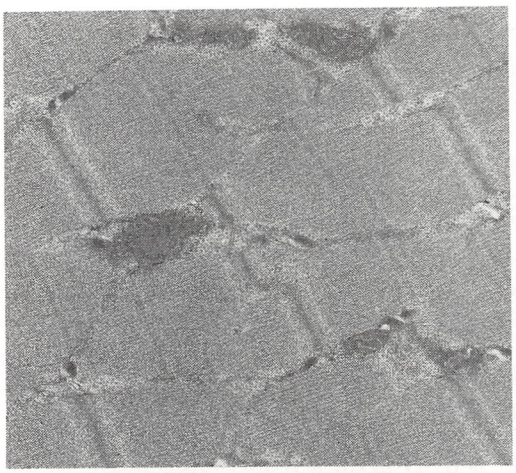


**Fig. 1**　と殺直後のアルカリ性フォスファターゼ，筋形質小胞体に活性有．

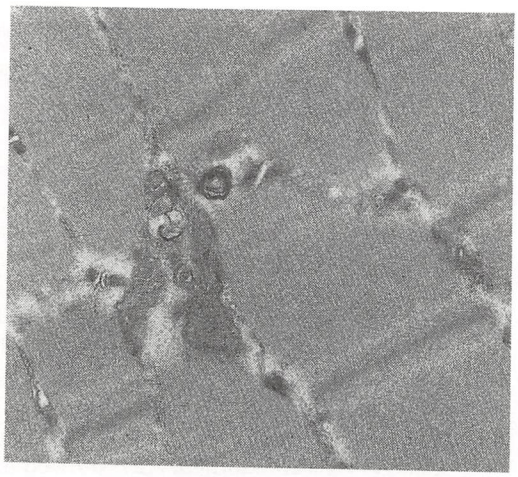


**Fig. 2**　3日目のアルカリ性フォスファターゼ，筋形質小胞体に活性有，ミエリン様小体の出現

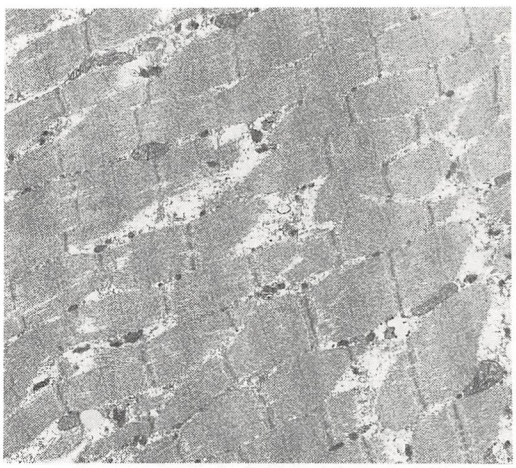


**Fig. 3**　7日目のアルカリ性フォスファターゼ，一部の筋形質小胞体に活性有，空胞変性出現

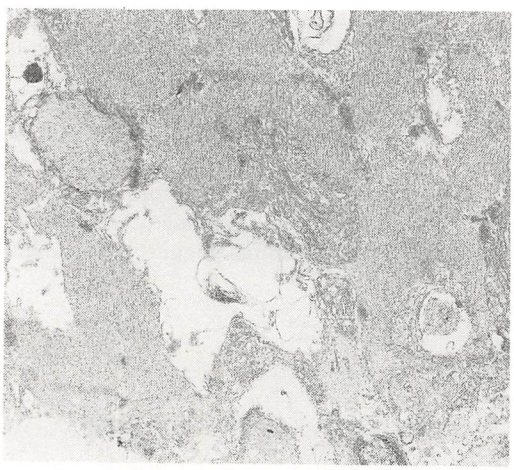


**Fig. 4**　14日目のアルカリ性フォスファターゼ，膨化した筋形質小胞体膜に弱い活性有，全体的に変性

© The Ito Foundation

日立H-700にて加速電圧 80KV で観察した。

NMRの測定のために，と殺直後，3日目，7日目および14日目のもの1.0gを経時的に採材し，その各々をハサミで細切，2m$l$の超純水に30分間4℃にて浸漬し，その上清の0.4m$l$を5㎜$\phi$の試料管に入れ，この試料管の底から4㎝の高さのところ迄重水を加え，更に一滴のテトラメチルシランを滴下して，測定用試料とした（竹内，'84）。NMRの測定条件は測定核：$^{1}$H，共鳴周波数：270MHz，積算回数：4回，照射：ホモゲート，試料管サイズ：5㎜$\phi$，プローブ：$^{13}$C/$^{1}$H 5㎜$\phi$で日本電子 JNM-GX270 にて測定した（竹内 '84，松下 '89）。

## 3. 結果と考察

### 3.1 酵素の検討

ALKは至適pHが7.6～9.9でリン酸モノエステルをアルコールとリン酸に加水分解する酵素である。と殺直後のものでは筋原線維間の筋形質小胞体の一部にALPの活性が認められる（**Fig. 1**）。3日目のものになると筋線維間に空胞やミエリン様小体も見られるようになったが，まだ筋形質小胞体の一部にALPの活性が認められた（**Fig. 2**）。

**Fig. 5**　と殺直後の酸性フォスファターゼ，筋形質小胞体付近の層状構造に活性有

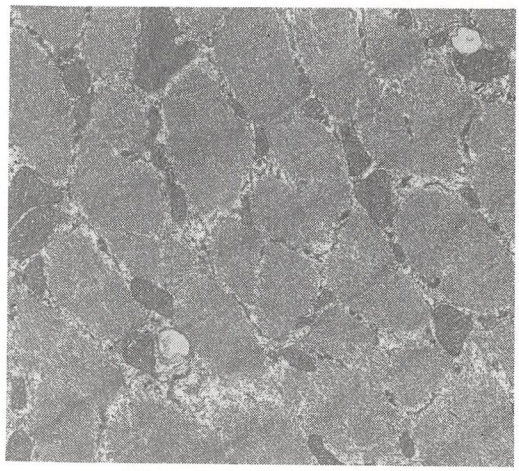


**Fig. 6**　3日目の酸性フォスファターゼ，膨化した空胞周囲膜に活性有

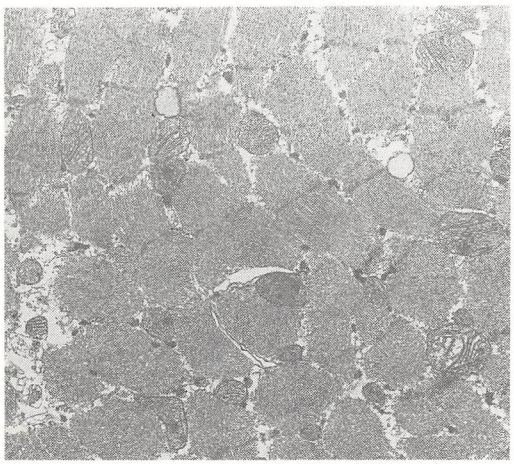


**Fig. 7**　7日目の酸性フォスファターゼ，空胞周囲膜に弱活性有，筋線維間の間隙拡大

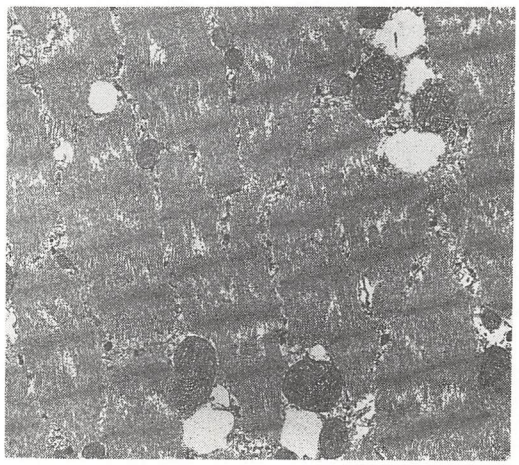


**Fig. 8**　14日目の酸性フォスファターゼ，一部の筋形質小胞体に弱活性有．全体的に変性

© The Ito Foundation

7日目になると筋線維間の空胞は拡大し，筋原線維やZ帯の断列も認められるようになった。一方，ALPの活性は筋形質小胞体やミトコンドリアの崩壊産物に認められた（**Fig. 3**）。14日目では筋線維間の空胞はより拡大し筋原線維間にも及び，筋原線維やZ帯の断列は顕著になった。筋形質小胞体やミトコンドリアの崩壊も目立つが，ALPの活性は筋形質小胞やミトコンドリアの崩壊した膜様物に僅かに認められた（**Fig. 4**）。**Fig. 1**，**2**いずれも対照群との差は認められたが，**Fig. 3**，**4**はともに対照群との差は少なかった。一般的にこの酵素の局在は形質膜であるが，また，小胞体との報告もある（Tokumitsu et al. '81）。筋線維の膜である筋鞘に活性が弱かったのは，反応液に問題があるものと思われる。7および14日目の小胞体に活性が認められたのは，組織変性に伴なう結果であって，決して本来の反応ではないと思われる。特に14日目ではその傾向が強いと考えられる。

ACPは至適pHが5.0付近で酸性領域で酸モノエステルを加水分解し，リン酸を遊離させる酵素

**Fig. 9**　と殺直後のグルコース-6-フォスファターゼ，筋形質小胞体に活性有

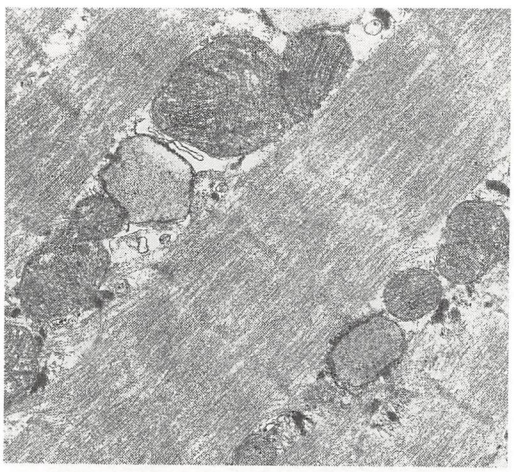


**Fig. 10**　3日目のグルコース-6-フォスファターゼ，大小の筋形質小胞体に活性有，組織の膨化出現

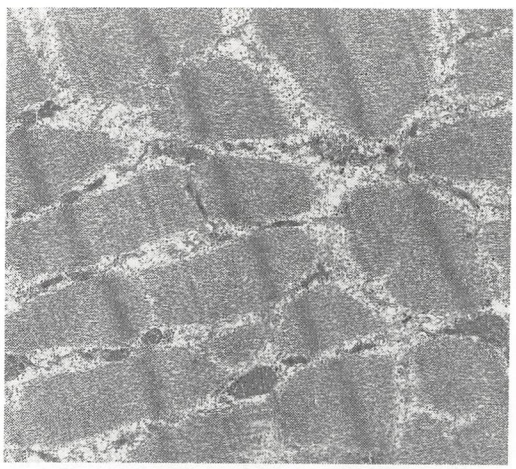


**Fig. 11**　7日目のグルコース-6-フォスファターゼ，少数の筋形質小胞体に活性有，筋線維間の間隙拡大

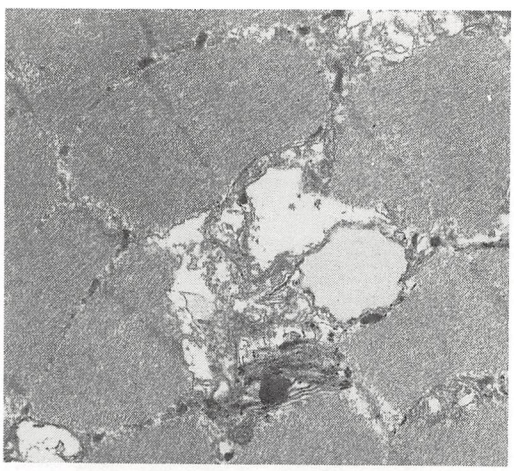


**Fig. 12**　14日目のグルコース-6-フォスファターゼ，変性したミトコンドリアと筋形質小胞体に活性有.

© The Ito Foundation

である。と殺直後のACPの活性は筋形質小胞体付近の小胞に観察される（**Fig. 5**）。3日目のACP活性はと殺直後のものと同様に筋形質小胞体付近の空胞に見られたが，その活性は弱かった。空胞化した筋形質小胞体が散在し筋線維間にも空隙が認められるようになった（**Fig. 6**）。7日目のACP活性は空胞化した筋形質小胞体の膜に僅かに認められた。また，筋線維間の空隙の拡大と一部ミトコンドリアの崩壊が見られた（**Fig. 7**）。14日目のACP活性は空胞周囲膜およびミトコンドリア崩壊産物に弱く認められた。なお，筋原線維内の空隙の拡大やZ帯の断列等全体的に空隙が目立っていた（**Fig. 8**）。これらACPの活性は，**Fig. 5**，**6**では対照群とは差が認められたが，**Fig. 7**, **8**の対照群との差は僅かであった。ACPの活性が小胞体付近の空胞に見られ，と殺直後より3日目，7日目と失活していくことが判明したが，14日目に組織や空胞の周囲に活性が観察されたことは，少なくとも変性産物の影響と考えられる。

G6Pはカルバミルリン酸等を加水分解する酵素で至適pHは6.0～6.5である。と殺直後のG6P活性は筋形質小胞体に強く認められた（**Fig. 9**）。

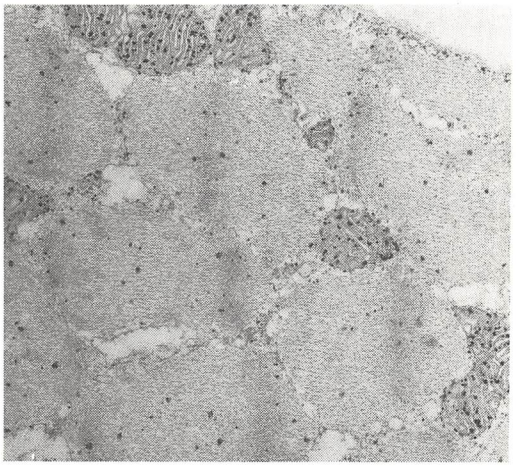


**Fig. 13**　と殺直後のCa-アデノシントリフォスファターゼ，ミトコンドリアに大部分活性有

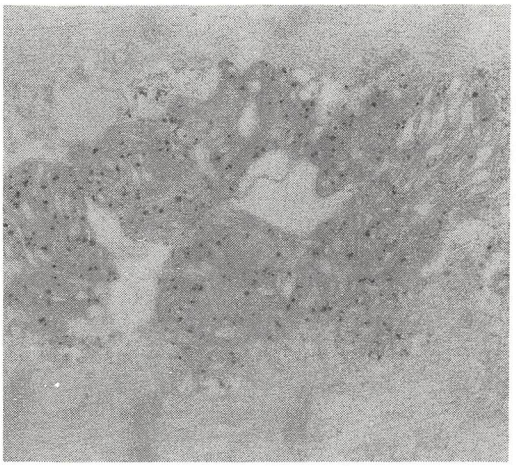


**Fig. 14**　3日目のCa-アデノシントリフォスファターゼ，膨化したミトコンドリアにのみ活性有

**Fig. 15**　7日目のCa-アデノシントリフォスファターゼ，膨化変性した筋形質小胞体に活性有

**Fig. 16**　14日目のCa-アデノシントリフォスファターゼ，組織変性のため活性無

© The Ito Foundation

3日目のG6P活性は正常に近い筋形質小胞体とその拡大した空胞の膜に顕著に認められた。ミトコンドリアの膨化，筋原線維の配列の乱れ，その筋原線維間の膨化，Z帯の断列および筋線維間の間隙の拡大等が見られた(**Fig. 10**)。7日目のG6P活性は極く少数の筋形質小胞体に認められるだけであった。筋線維間の全体的膨化，筋原線維の配列の乱れとZ帯の断列が一部に見られた（**Fig. 11**)。14日目のG6P活性は一部の筋形質小胞体と変性したミトコンドリアの膜様物に強く観察された。その他に筋線維間の膨化，筋原線維の配列の乱れとZ帯の断列が見られた（**Fig. 12**)。これらG6Pの活性は**Fig. 9～12**において対照群との間に顕著に差が認められた。この酵素の局在は小胞体と知られ，と殺後より経時的に失活することは，筋肉組織の変性の状態とよく符合し，14日目のG6P活性が一部に強く観察されることは，より変性の影響を受けているものと考えられる。

Ca-ATPとは，μM～mMオーダーのCaを添加することによって活性化されるATP分解酵素をいう。と殺直後のCa-ATP活性は大部分がミトコンドリアに，筋形質小胞体と筋フィラメントには極く僅かしか見られなかった（**Fig. 13**)。3日目のCa-ATP活性は殆どミトコンドリアにしか観察されなかった。筋形質小胞体とミトコンドリアの膨化が認められた（**Fig. 14**)。7日目のCa-ATP活性は空胞化した筋形質小胞体の膜の一部と変性したミトコンドリアに見られた。その他に，筋原線維の配列の乱れとZ帯の断列が見られた（**Fig.15**)。14日目のCa-ATP活性はまったく観察されず，ミトコンドリアや筋形質小胞体の崩壊，筋線維間の膨化，筋原線維の配列の乱れとZ帯の

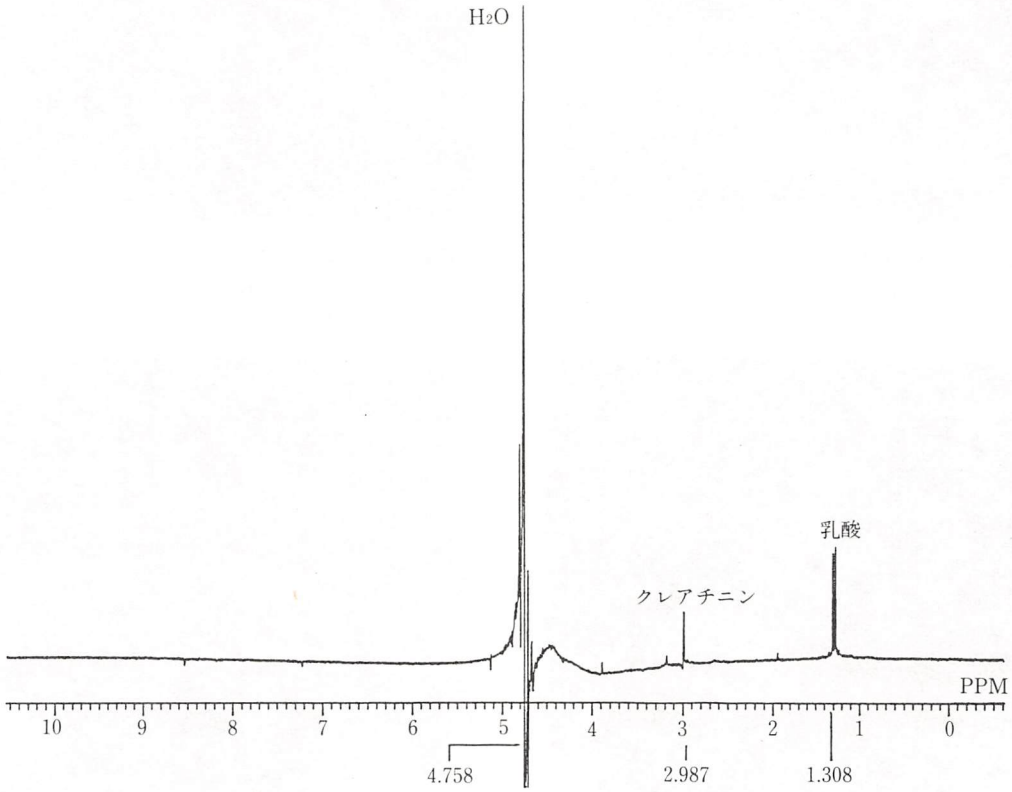



**Fig. 17**　と殺直後の最長筋の水溶出液の $^1$H-NMRスペクトル，$H_2O$，タンパク分解産物のクレアチニン，乳酸のピークが認められる。

© The Ito Foundation

断列が見られた(**Fig. 16**)。これらCa-ATPの活性は**Fig. 13～15**では対照群と差が認められたが，**Fig. 16**ではその差は認められなかった。この酵素はミトコンドリア，筋形質小胞体や筋フィラメントに局在することが知られている。今回の実験では活性の程度はミトコンドリア，筋形質小胞体，筋フィラメントと弱くなった。これは各々ミトコンドリア，小胞体と筋フィラメントの断面積にも関係があると思われる。

豚肉の死後変化については牧田('84, '85)の広範な研究がある。その中でも指摘されているが，肉の熟成のうえからアクチンフィラメントを初めとする中間フィラメントと多種類のタンパク質からなるZ帯(Stanley '83, Locker '84, Yamaguchiet al.' 85, '86)の脆弱化が最大の要因とされている(沖合' 83)。このようにZ帯に特徴的に変性が起るのは，他の手段，電気刺激(Voyle' 81)，加圧(Elgasim et al.' 82)，塩類やリン酸等の添加の場合(Lewis' 81, Voyle et al.' 84)も報告されている。以上のように4種類の酵素活性の消退とZ帯等の脆弱性から見て7日目と14日目とでは非常に大きな差があり，14日前後では肉の変性，崩壊の程度が進み過ぎ，味覚という点から疑問視される。この観点からアミノ酸やタンパク分解物，その他の味覚を左右する物質の検出が必要とされる所以である。

3.2　NMR分光法による測定

と殺直後の腰最長筋の水抽出液の$^1$H-NMRのスペクトルでは水，タンパク分解産物のクレアチニンおよび乳酸のピークが認められた。各々のケミカルシフトは6.758，2.987および1.308であった(**Fig. 17**)。3日目の$^1$H-NMRのスペクトル

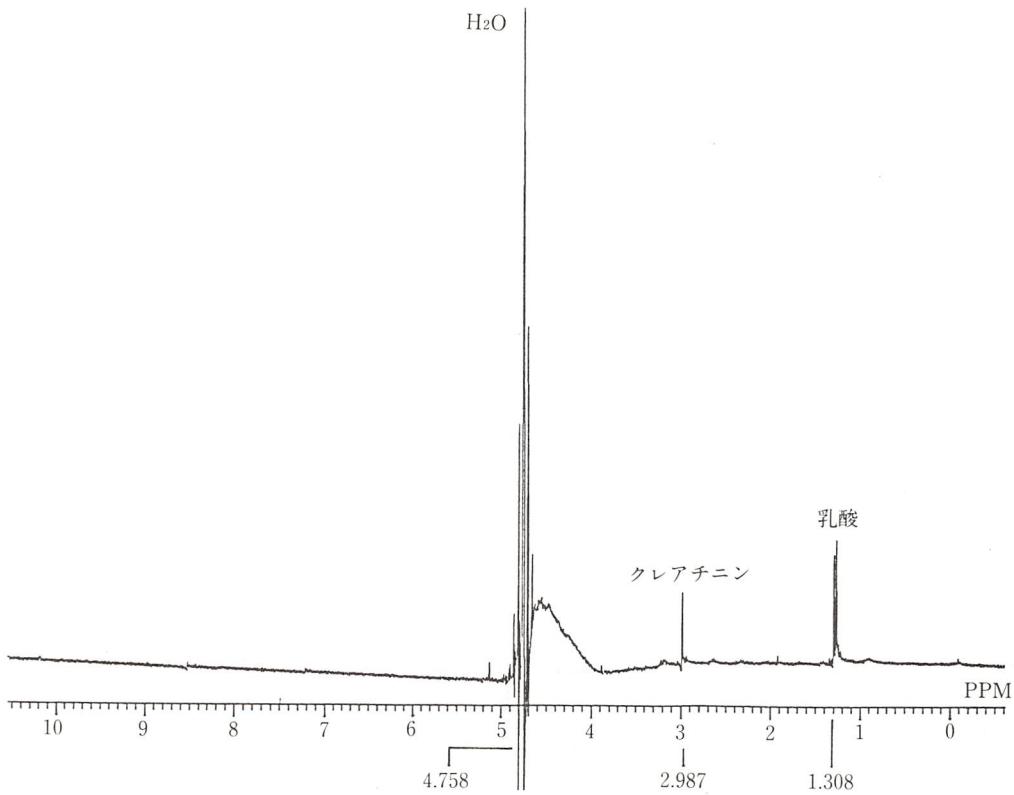



**Fig. 18**　と殺後3日目の最長筋の水溶出液の$^1$H-NMRスペクトル，クレアチニンのピークは3日目より相対的に大きい。

© The Ito Foundation

では同じく水，クレアチニンおよび乳酸のピークが認められたが，クレアチニンのピークはと殺直後のものより相対的に大きかった（**Fig. 18**）。7日目の $^{1}$H-NMR のスペクトルでも同じく水，クレアチニンおよび乳酸のピークが認められ，クレアチニンのピークは相対的に最大となり，また，乳酸のピークは相対的に減少していた（**Fig. 19**）。14日目の $^{1}$H-NMR のスペクトルでも同じく水，クレアチニンおよび乳酸のピークが認められ，クレアチニンのピークは7日目より減少していた。しかし，乳酸のピークは相対的に最大となっていた（**Fig. 20**）。豚や牛等の肉は，と殺してすぐに食べないのが原則である。それは，タンパク質がある一定時間経過した後に分解を起して，アミノ酸や有機酸に変化していき，うまみ成分であるアミノ酸の量がある程度になったところで食べるのがおいしからである（松下 '89）。今回，検出されたクレアチニンはアミノ酸の誘導体である。また，乳酸は有機酸の一種である（水島 '72）。うまみの成分であるアミノ酸誘導体のクレアチニンのピークが7日目で最大であり，次に，3日目であった。これは3日目以降7日目前後にうまみ成分がより多く存在することを示している。即ち，熟成という観点からは，3日目以降7日目前後が適当で，特に7日目前後が最も良いと思われる。乳酸は筋肉中に存在するが，その量は酸敗によって増加することが知られており，そのため筋肉中の乳酸量は法医学において死亡時間の判定に利用されている（久保 '87，小川 '75）。従って，乳酸量の最も多い14日目前後は酸敗が相当進んでおり，熟成とはいえないと考えられる。今回は NMR 分光法による肉の最初の測定ということで，試行錯誤が多

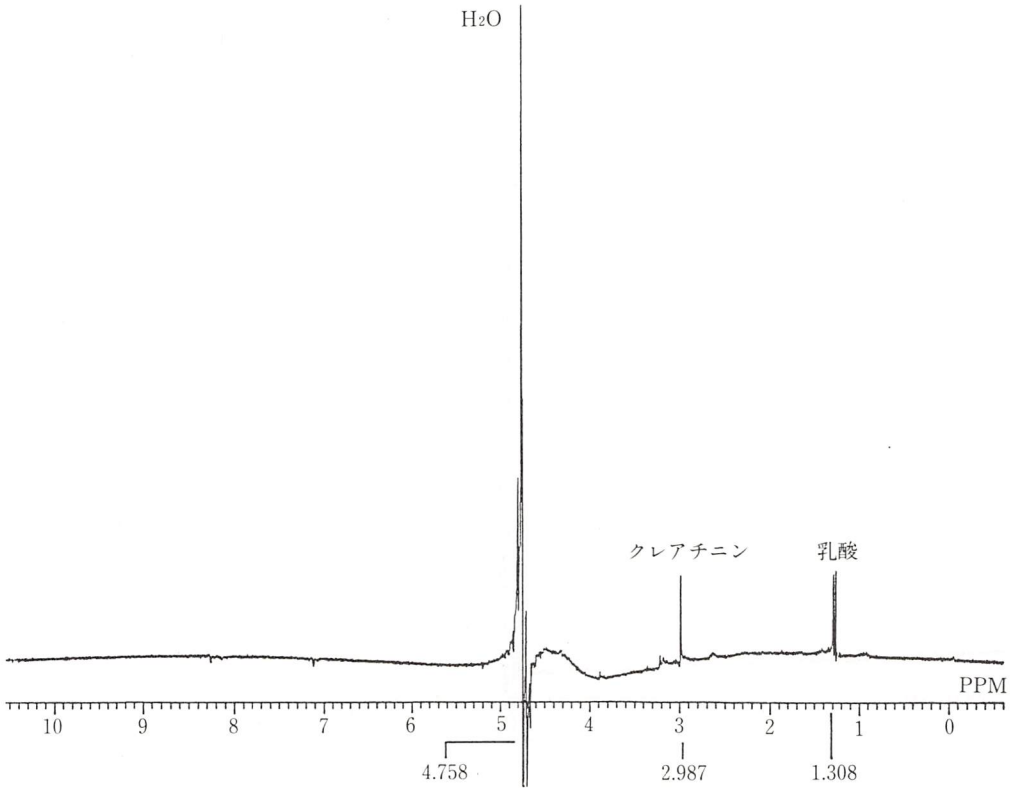



**Fig. 19**　と殺後7日目の最長筋の水溶出液の $^{1}$H-NMR スペクトル，クレアチニンのピークは最大となる，乳酸は相対的に減少。

© The Ito Foundation

かったが，今後より詳細なデータを得るため，採材時間，肉の種類および各種の加工肉等について検討することにより，興味深い結果が得られると思われる。

## 4. 要　約

豚肉の酵素の経時的変化を電顕にて観察した。観察した日はと殺直後，3日目，7日目および14日目で，いずれも腰最長筋100gを4℃に保存したものである。その一部をNMR分光法にて測定した。

検討した酵素はALP, ACP, G6PおよびCa-ATPであった。ALPはと殺直後のものより14日目まで筋形質小胞体に活性が認められたが，日数を増すごとに活性は失活し，14日目では極く僅かであった。ACPはと殺直後のものより筋形質小胞体付近の層状構造と空胞に活性が認められたが，日数を増すごとに活性は失活し，14日目では極く僅かであった。G6Pはと殺直後のものより14日目まで筋形質小胞体に活性が認められたが，日数を増すごとに活性は失活し，14日目では極く僅かであった。Ca-ATPはと殺直後のものより7日目まで筋形質小胞体やミトコンドリアに活性が認められたが，日数を増すごとに活性は失活し，14日目ではまったく観察されなかった。

NMR分光法ではと殺直後のものより14日目まですべてに水，クレアチニンおよび乳酸のピークが検出された。クレアチニンはうまみの成分であるアミノ酸の誘導体でその最大のピークは7日目にあり，また，乳酸の最大のピークは14日目にあり，これは酸敗の指標となる。以上の結果より，肉の熟成は3日目より7日目前後にあり，特に7日目前後が最適であると思われる。

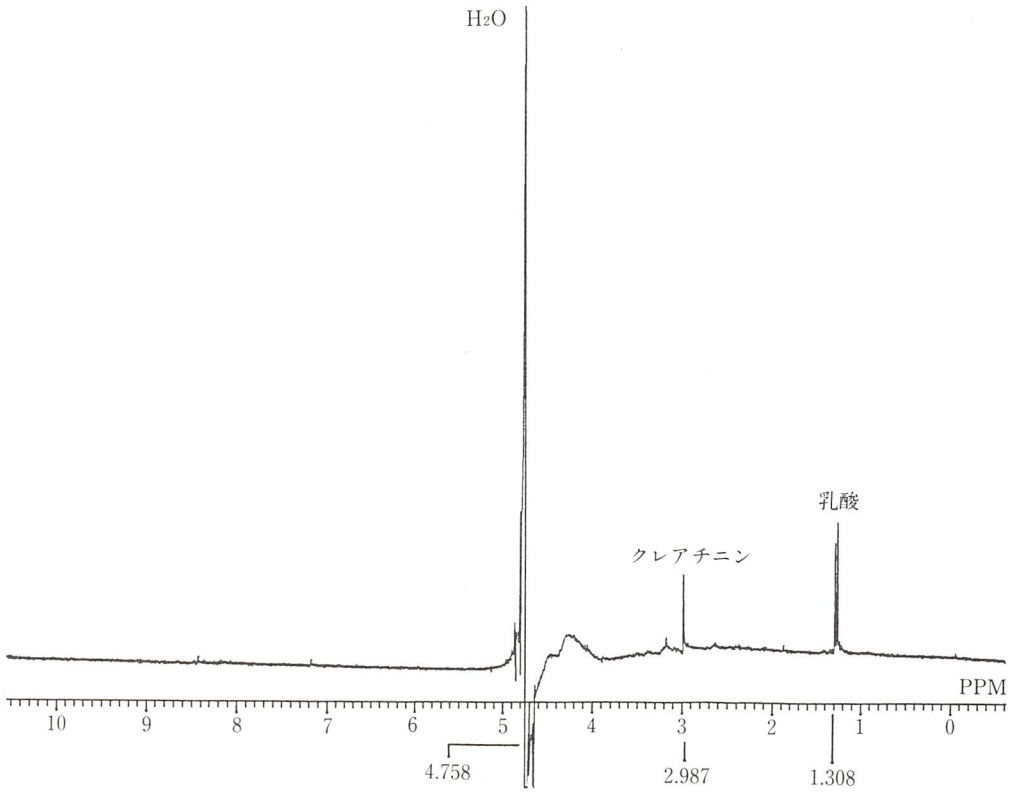



**Fig. 20**　と殺後14日目の最長筋の水溶出液の $^1$H-NMR スペクトル，クレアチニンのピークは7日目より減少，乳酸のピークは最大となる。

© The Ito Foundation

## 文 献


1) Ogawa, K. and Mayahara, H.: J. Histochem. Cytochem., 17: 487-490 (1969)
2) Gomori, G.: In "Microscopic Histochemistry Principles and Practice", P. 189, Univ. Chicago Press., Chicago (1952)
3) 金村泰輔：新酵素組織化学, p. 322-327, 武内忠男, 小川和朗編集, 朝倉書店, 東京 (1980)
4) Andou, T., Fujimoto, K. Mayahara, H., Miyajima, M. and Ogawa, K.: Acta Histochem. Cytochem., 6: 705-726 (1981)
5) 竹内敬人：実用 NMR, p. 28-236, 講談社, 東京 (1984)
6) 松下和弘：遠赤外線区 NMR, p. 117-184, 人間と歴史社, 東京 (1989)
7) Tokumitsu, S., Tokumitsu, K. and Fishman, W.H.: Histochemistory, 73: 1-6 (1981)
8) 牧田澄之：食肉に関する助成研究調査成果報告書, 3: 237-243 (1984)
9) 牧田澄之：食肉に関する助成研究調査成果報告書, 4: 177-186 (1985)
10) Stanley, D. W.: Food Microstructure, 2: 99-109 (1983)
11) Yamaguchi, M., Izumimoto, M., Robson, R. M.: J. Mol. Bio., 184: 621-643 (1985)
12) Yamaguchi, M., Kamisoyama, H., Nada, S., Yamano, S., Izumimoto, M., Hirai, Y., Cassens, R. G., Nasu, H., Murayama, H. and Fukuzawa, T.: Food Microstructure, 5: 197-205 (1986)
13) 沖谷明紘：食品工業と酵素, p. 111-133, 一島英治編集, 朝倉書店, 東京 (1983)
14) Voyle, C. A.: Scanning Electron Microsc., Ⅲ: 427-434 (1981)
15) Elgasim, E. A. and Kennickm, W. H.: Food Microstructure, 1: 75-82 (1982)
16) Lewis, D. F.: Scanning Electron Microsc., Ⅲ: 391-404 (1981)
17) Voyle, C. A., Jolley, P. D. and Offer, G. W.: Food Microstructure, 3: 113-126 (1984)
18) Locker, R. H.: Food Microstructure, 3: 17-32 (1984)
19) 水島三一郎編：化学大辞典, p. 163, 339, 共立出版, 東京 (1972)
20) 久保亮五他：理化学辞典, p. 940, 岩波書店, 東京 (1987)
21) 小川鼎三他：医学大辞典, p. 1143, 南山堂, 東京 (1975)


© The Ito Foundation

# 食肉貯蔵中におけるアミノ酸の消長

Studies on Changes in Contents of Free Amino Acids in the Meat during Storage

山　中　英　明（東京水産大学）

Hideaki Yamanaka (Tokyo University of Fisheries)

The changes in contents of free amino acids and dipeptides were examined in pork, beef and chicken during storage at 4℃ after slaughter. The analysis of free amino acids and dipeptides was possible by using gradient elution high performance liquid chromatograph and forming o-phthalaldehyde derivatives for detection. Thirty six kinds of free amino acids and dipeptides were well separated from each other. The concentration of carnosine in these meats was highest, followed by glutamic acid, proline and taurine. There were no rules in the changes in contents of free amino acids and dipeptides during storage at 4℃ and therefore it was not certain whether the relation between improvement of meat taste and aging existed or not. As for total amounts of free amino acids and dipeptides in these meats, pork and chicken were large in quantity (780 mg/100 g and 672 mg/100 g). On the other hand, the total amounts in beef were one half (344 mg/100 g), compared with those of pork and chicken. During the storage at 4℃, the total amounts of pork or beef were nearly constant, but those of chicken increased remarkably. Free amino acids in chicken were considered to increase during aging. In these meats, the concentration of ammonia increased with storage time and reached about 20 mg/100 g at the stage of initial decomposition. Ammonia seemed to be useful as an index for freshness and decomposition as well as putrescine reported before.

## 1. 目　的

前年度，食肉（豚肉，牛肉，鶏肉）を低温に貯蔵した時の7種類のポリアミンおよびモノアミンの消長について報告した。また，プトレシンが食肉の鮮度判定指標として適していることも述べた。ポリアミンやモノアミンはアミノ酸が細菌の酵素によって脱炭酸されて生ずる。そこで，食肉低温貯蔵中のアミノ酸の消長について調べてみる必要がある。また，低温貯蔵中のアミノ酸含量の変化は食肉の呈味にも関係している可能性が大きい。魚肉とは異なり，食肉においては低温での熟成が行われ，その間に嗜好性が向上するといわれる。テクスチャーが向上することは多くの研究者により明らかにされているが，味が向上するか否かについて科学的に調べられた研究は少ない。西村らの総説[1]や論文[2]によると，味だけに関して言えば，豚肉，牛肉，鶏肉ともにそれらの味は熟成により向上すると述べている。そこで，本研究では豚肉，牛肉，鶏肉それぞれについて，と殺後低温貯蔵中のエキス中のアミノ酸およびジペプチドの含量の変化について調べてみた。

## 2. 方　法

（1） 試　料：部分肉とした新鮮なLWD種去勢豚のロース，ホルスタイン種去勢牛のサーロインおよびチャンキー種鶏もも肉を試料とした。と殺後4℃に貯蔵し，経時的に分析に供した。すなわち，豚肉は1，2，4，6，9日（初期腐敗），牛肉は2，5，7，10日（初期腐敗），鶏肉は2，

© The Ito Foundation

3，6日（初期腐敗）にそれぞれサンプリングした。筋肉8gを採取し，7%過塩素酸溶液20ml と10mlで2回抽出し，水酸化カリウムで中和後，上清を50mlに定容した。

（2） アミノ酸およびジペプチドの定量：上記抽出液にクエン酸を加えてpHを2.2に調整後，島津製作所製の二液グラジエントによるアミノ酸自動分析装置に10μlインジェクトし分析を行った[3]。

## 3. 結果と考察

### 3.1 標品アミノ酸およびジペプチドの分離

**Fig. 1** には36種類の標品アミノ酸およびジペプチドの分析結果を示す。相互によく分離し，感度も良好であった。

### 3.2 豚肉4℃貯蔵中のアミノ酸およびジペプチドの消長

**Table 1** に豚肉を4℃に貯蔵した時の結果を示す。と殺後貯蔵1日ではカルノシンが358.4mg/100gと最も高含量で，次いでプロリン，グルタミン酸，タウリン，アンセリン，グリシンと続いた。総量が780.1mg/100gであるので，これらのアミノ酸およびジペプチドで約90%を占めた。貯蔵2日後にはほとんど変化はみられなかった。貯蔵4日後，プロリン，タウリン，グルタミン酸，グリシン，バリン，アスパラギンの顕著な減少が観察された。しかし，カルノシンはわずかに減少がみられたにすぎなかった。貯蔵6日後にはタウリン，グルタミン酸，アスパラギンなどの減少がみられ，一方，プロリン，バリン，イソロイシン，ロイシン，チロシン，フェニルアラニン，ヒスチジン，リジン，アルギニンなどの増加が認められた。貯蔵9日後にはわずかに腐敗臭が感じられ，初期腐敗の状態と判定した。タウリンの顕著な減少が観察されたが，その他のアミノ酸は一般的に増加がみられ，とくにプロリンの増加が顕著であった。

アミノ酸の種類によって変化のパターンは異なっていたが，タウリンとグルタミン酸は鮮度と高い相関があり，貯蔵期間が長くなるに従い顕著に減少がみられた。また，アンモニアは初期腐敗時に20.9mg/100gであった。アミノ酸およびジペプチドの総量は貯蔵中にやや減少がみられたが，初期腐敗時に再び増加が観察された。

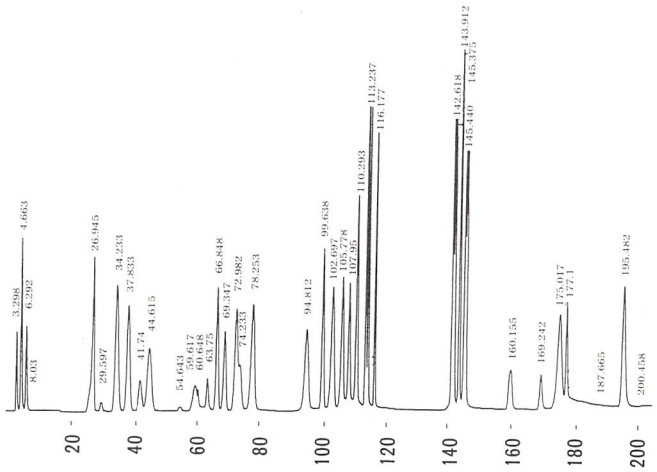
### 3.3 牛肉4℃貯蔵中のアミノ酸およびジペプチドの消長

**Table 2** に4℃貯蔵牛肉の結果を示す。と殺後貯蔵2日では豚肉の場合と同様にカルノシンが233.9mg/100gと最も高含量であり，次いで，アンセリン，グルタミン酸，プロリン，チロシンの順であった。総量が344.2mg/100gであるので，これらのアミノ酸およびジペプチドで約90%を占めていた。貯蔵5日後，グルタミン酸およびリジンの顕著な減少とカルノシン，グリシン，バリンのわずかな減少が観察された。一方，セリン，フェニールアラニンなど数種類のアミノ酸で増加がみられた。貯蔵7日後にはタウリン，チロシンなどの減少とグルタミン酸の増加が認められた。貯蔵10日後は初期腐敗の状態と判定した。カルノシンとアンセリンにおいて減少がみられたが，アミノ酸のほとんどが増加した。アンモニアは鮮度低下とともに増加し，初期腐敗時に20.7mg/100gであった。アミノ酸およびジペプチドの総量はほとんど変化しなかった。

### 3.4 鶏肉4℃貯蔵中のアミノ酸およびジペプチドの消長

**Table 3** に4℃貯蔵鶏肉の結果を示す。と殺後貯蔵2日目の分析結果をみると，豚肉や牛豚と同様にカルノシン含量が最も高く，285.7mg/100gを示した。次いで，タウリン，プロリン，グルタミン酸の順であった。総量が672.2mg/100gであるので，これらの4種類のアミノ酸およびジペプ

© The Ito Foundation




| Peak No. | Time | Amino acids and dipeptides |
|---|---|---|
| 1 | 3.298 | Phosphoserine |
| 2 | 4.663 | Taurine |
| 3 | 6.292 | Phosphoethanolamine |
| 4 | 26.945 | Aspartic acid |
| 5 | 29.597 | Hydroxyproline |
| 6 | 34.233 | Threonine |
| 7 | 37.833 | Serine |
| 8 | 41.74 | Asparagine |
| 9 | 44.615 | Glutamic acid |
| 10 | 54.643 | Sarcosine |
| 11 | 60.648 | $\alpha$-Aminoadipic acid |
| 12 | 63.75 | Proline |
| 13 | 66.848 | Glycine |
| 14 | 69.347 | Alanine |
| 15 | 72.982 | Citrulline |
| 16 | 74.233 | $\alpha$-Aminobutyric acid |
| 17 | 78.253 | Valine |
| 18 | 94.812 | Methionine |
| 19 | 99.638 | Cystine |
| 20 | 102.697 | Isoleucine |
| 21 | 105.778 | Leucine |
| 22 | 107.95 | Tyrosine |
| 23 | 110.293 | Phenylalanine |
| 24 | 113.237 | $\beta$-Alanine |
| 25 | 113.967 | $\beta$-Aminoisobutyric acid |
| 26 | 116.177 | $\gamma$-Aminobutyric acid |
| 27 | 141.618 | Histidine |
| 28 | 142.222 | 3-Methylhistidine |
| 29 | 143.912 | 1-Methylhistidine |
| 30 | 145.448 | Carnosine |
| 31 | 145.975 | Anserine |
| 32 | 160.155 | Hydroxylysine |
| 33 | 169.242 | Ornithine |
| 34 | 175.017 | Ammonia |
| 35 | 177.1 | Lysine |
| 36 | 195.482 | Arginine |

**Fig. 1** Chromatogram of standard amino acids and dipeptides

© The Ito Foundation

**Table 1** Changes in free amino acids contents of pork during storage at 4℃ (mg/100 g)

| Amino acids | Storage time (Days) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 4 | 6 | 9 |
| Taurine | 79.0 | 85.9 | 45.8 | 31.4 | 9.3 |
| Aspartic acid | 1.5 | 1.6 | 1.9 | 2.0 | 6.0 |
| Threonine | 3.7 | 3.5 | 3.3 | 3.7 | 6.9 |
| Serine | 6.4 | 6.3 | 5.5 | 6.9 | 10.7 |
| Asparagine | 7.0 | 6.7 | 3.5 | 1.9 | 3.7 |
| Glutamic acid | 88.1 | 89.0 | 34.9 | 22.5 | 21.8 |
| Proline | 105.6 | 102.5 | 60.3 | 82.9 | 138.5 |
| Glycine | 30.6 | 29.8 | 15.9 | 15.9 | 16.4 |
| Alanine | 2.1 | 1.6 | 1.5 | 0.9 | 1.3 |
| Valine | 5.9 | 4.9 | 1.6 | 5.6 | 8.2 |
| Isoleucine | 1.8 | 1.8 | 1.8 | 4.7 | 7.0 |
| Leucine | 3.0 | 3.5 | 3.3 | 7.0 | 10.7 |
| Tyrosine | 7.1 | 6.9 | 5.8 | 10.3 | 14.5 |
| Phenylalanine | 3.0 | 3.1 | 3.3 | 7.3 | 8.1 |
| β-Alanine | 7.5 | 5.8 | 4.1 | 3.3 | 4.0 |
| Histidine | 3.4 | 3.3 | 2.5 | 3.9 | 5.9 |
| Carnosine | 358.4 | 364.0 | 342.6 | 338.9 | 354.5 |
| Anserine | 42.8 | 43.0 | 47.2 | 50.8 | 49.1 |
| Ammonia | 13.0 | 13.2 | 13.5 | 13.8 | 20.9 |
| Lysine | 5.0 | 6.4 | 4.8 | 9.2 | 15.6 |
| Arginine | 5.2 | 4.7 | 3.8 | 10.5 | 18.8 |
| Total | 780.1 | 787.5 | 616.9 | 633.4 | 731.9 |

**Table 2** Changes in free amino acids contents of beef during storage at 4℃ (mg/100 g)

| Amino acids | Storage time (Days) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 2 | 5 | 7 | 10 |
| Taurine | 8.5 | 9.8 | 6.8 | 5.8 |
| Threonine | 0.9 | 1.7 | 1.1 | 1.8 |
| Serine | 1.5 | 3.7 | 2.5 | 3.2 |
| Glutamic acid | 18.0 | 6.6 | 14.0 | 19.3 |
| Proline | 14.1 | 17.5 | 16.5 | 16.6 |
| Glycine | 6.2 | 5.1 | 5.2 | 6.2 |
| Valine | 3.0 | 2.2 | 1.8 | 3.4 |
| Isoleucine | 0.5 | 1.4 | 1.8 | 2.9 |
| Tyrosine | 10.7 | 12.0 | 5.1 | 5.3 |
| Phenylalanine | 0.7 | 2.8 | 3.5 | 5.2 |
| β-Alanine | 0.6 | 0.5 | 0.8 | 1.3 |
| Histidine | 1.3 | 1.6 | 1.1 | 1.7 |
| Carnosine | 233.9 | 211.6 | 220.1 | 195.4 |
| Anserine | 26.6 | 28.8 | 27.9 | 18.0 |
| Ammonia | 8.4 | 11.5 | 16.6 | 20.7 |
| Lysine | 7.0 | 3.4 | 2.8 | 5.3 |
| Arginine | 2.3 | 2.4 | 1.9 | 2.3 |
| Total | 344.2 | 322.6 | 329.5 | 314.4 |

© The Ito Foundation

**Table 3** Changes in free amino acids contents of chicken during storage at 4 ℃ (mg/100 g)

| Amino acids | Storage time (Days) | | |
|---|---|---|---|
| | 2 | 3 | 6 |
| Taurine | 77.7 | 265.6 | 241.4 |
| Aspartic acid | 9.8 | 13.3 | 15.8 |
| Threonine | 12.6 | 10.4 | 20.5 |
| Serine | 2.9 | 20.4 | 26.1 |
| Asparagine | 10.9 | 6.9 | 8.5 |
| Glutamic acid | 72.5 | 114.0 | 65.0 |
| Proline | 72.9 | 109.9 | 178.7 |
| Glycine | 10.0 | 15.7 | 23.9 |
| Valine | 13.0 | 5.1 | 4.9 |
| Isoleucine | 3.0 | 4.3 | 2.4 |
| Leucine | 6.4 | 15.9 | 31.1 |
| Tyrosine | 1.9 | 23.4 | 73.6 |
| Phenylalanine | 7.6 | 9.9 | 17.2 |
| β-Alanine | 2.6 | 4.3 | 5.2 |
| Histidine | 4.2 | 4.7 | 9.6 |
| 1-methylhistidine | 37.6 | 36.3 | 35.4 |
| Carnosine | 285.7 | 284.4 | 294.1 |
| Ammonia | 5.9 | 8.9 | 19.0 |
| Lysine | 21.3 | 22.9 | 5.4 |
| Arginine | 12.7 | 16.3 | 34.1 |
| Total | 672.2 | 992.6 | 1111.9 |

チドで約75%を占めていた。貯蔵3日後，カルノシン含量は変わらなかったが，タウリン，グルタミン酸，プロリン，チロシン，セリンなどの顕著な増加がみられた。バリン，アスパラギンは減少した。鶏肉は貯蔵6日後が初期腐敗と判定され，豚肉や牛肉より腐敗が早かった。プロリン，チロシン，ロイシン，フェニルアラニン，アルギニンの顕著な増加がみられ，一方，グルタミン酸，リジンは著しく減少した。豚肉や牛肉に比較して鶏肉では貯蔵中に増加するアミノ酸が多いのが特徴であった。アンモニアは鮮度低下とともに増加し，初期腐敗時に19.0mg/100gであった。アミノ酸およびジペプチドの総量は鶏肉においては貯蔵中に著しい増加がみられた。

以上の3種類の食肉中のアミノ酸およびジペプチドについて比較してみると，カルノシン含量が最も高く，次いで，グルタミン酸，プロリン，タウリンが多量含有されていた。また，貯蔵中に各種のアミノ酸はそれぞれ複雑な変化を示した。呈味に関しては，貯蔵中のアミノ酸およびジペプチドの消長からは結論を出すことはできなかったが，総量についていえば，豚肉と鶏肉が高く，牛肉ではそれらの約1/2であった。また，4℃貯蔵中に豚肉および牛肉ではアミノ酸およびジペプチドの総量はほぼ一定であったが，鶏肉では著しい増加がみられた。すなわち，熟成によってアミノ酸が顕著に増加した。3種類の食肉において，鮮度低下とともにアンモニアは増加し，初期腐敗時に約20mg/100gであった。

## 4. 要　約

4℃貯蔵中の豚肉，牛肉および鶏肉の遊離アミノ酸およびジペプチドの消長について調べ，次の結果を得た。

© The Ito Foundation

(1) これらの食肉中ではカルノシン含量が最も高く，次いでグルタミン酸，プロリン，タウリンが高含量であった。

(2) アミノ酸およびジペプチドの総量に関しては豚肉と鶏肉が高く，牛肉はそれらの1/2であった。また，4℃貯蔵中に豚肉および牛肉では総量がほとんど変化しなかったが，鶏肉では著しく増加した。すなわち，熟成によってアミノ酸が顕著に増加した。

(3) 4℃貯蔵中に各種のアミノ酸およびジペプチドはそれぞれ異なる変化を示した。呈味に関してはそれらの消長から結論を出すことはできなかった。

(4) これらの食肉においては鮮度低下に伴い，アンモニアは増加し，初期腐敗時に約20mg/100gであった。

## 文 献

1) 西村敏英，加藤博通：肉の科学，**29**，1～13（1989）.
2) T. Nishimura, M. R. Rhue, A. Okitani and H. Kato: Agric. Biol. Chem., **52**, 2323～2330（1988）.
3) 島津 Application Report No. 2（2液グラジエント法によるアミノ酸の分析）p. 1～p. 16.

© The Ito Foundation

# 高圧処理が筋肉タンパク質に及ぼす影響

Effect of High Pressure Treatment on Muscle Protein

鈴木敦士・池内義秀（新潟大学農学部）

Atsushi Suzuki and Yoshihide Ikeuchi (Faculty of Agriculture, Niigata University)

High hydrostatic pressure of 100 MPa to 300 MPa was applied to beef post-rigor muscle to investigate the efficiency of pressurization as a meat tenderizer.

Fragmentation of myofibrils increased with the increase of intensity of pressure applied to the muscle, and the extent of the fragmentation reached to the maximal level in a brief exposure of post-rigor muscle to the high pressure. The electron microscopic studies of the pressurized muscle revealed that remarkable rupture of I-band and loss of M-line materials were progressed in the myofibrils with the increase of the pressure applied. However, degradation of Z-line in myofibrils naturally observed in the conditioned muscle was not observed in the pressurized muscle. Significant difference of the electrophoretic pattern of myofibrillar protein was not observed among the preparations from control and pressurized muscles in spite of the remarkable changes of the ultrastructure.

From the results, it was suggested that application of high hydrostatic pressure to post-rigor muscle caused tenderization of meat in a different manner of conditioning.

## 1. 目　的

食品に数百メガパスカル（1 MPa＝10kg/cm²）の圧力を加えると，加熱処理とは異なる機構で食品の特性あるいは物性に変化が起こることから，最近高圧処理法が新しい食品加工法として注目されるようになってきた[1]。

本研究は，高圧処理が食肉の軟化・熟成を促進させる新手段になり得るかどうかを検討するために，死後硬直後の牛肉の肉塊に高圧処理を施し，筋肉構造および筋原線維の受ける変化を研究した。

## 2. 方　法

### 2.1 高圧処理

と殺後4日目の乳廃牛の肩ロース肉を購入し，使用まで−25℃で凍結保存した。必要に応じて低温室（2℃）で1晩解凍し，小さな肉塊（50×50×30㎜）にカットした後，ポリエチレンの袋にいれて脱気後，大きなビニル袋にいれ，袋に水を注入してから Cold Isostatic Press Apparatus（日本鋼管株式会社）を使って，100, 150, 200および300 MPa で5分間高圧処理を施した。高圧処理後，試料を取り出し氷冷した。

### 2.2 筋原線維の調製

圧力処理後の肉塊から Busch らの方法[2]により筋原線維を調製し，100 mM KCl および1 mM $NaN_3$ を含む溶液に懸濁させた。

### 2.3 筋原線維の小片化

筋原線維の小片化は，基本的には Takahashi らの方法[3,4]に従い測定した。筋原線維の濃度を0.25mg/m$l$に調整した後，位相差顕微鏡で観察した。小片化の度合は，観察した筋原線維の総数に対する，筋節数が1～4個からなる筋原線維の数の百分率で示した。

© The Ito Foundation

2.4　筋肉のpHの測定

圧力処理後の試料を細切し，その約3ｇに対して5倍量（V/W）の脱イオン水を加えて30秒間ホモゲナイズし，10,000ｇで10分間遠心分離した。ホモヂネートおよび抽出液のpHをモデルCOM-8 pHメータ（電気科学計器株式会社）で測定した。

2.5　SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）

調製した筋原線維を5,000ｇで10分間遠心分離した沈殿物に5％SDS，1％2-メルカプトエタノールを含む0.01Mリン酸緩衝液（pH 7.0）を加えて沸騰浴中で30分間加熱溶解させ，不溶物を10,000ｇで15分間遠心分離して上清を試料とした。SDS処理後の試料を1％SDS，0.1％2-メルカプトエタノールを含む0.01Mリン酸緩衝液（pH 7.0）に対して透析し，Weber と Osborn の方法[5]によりSDS-PAGEにかけた。

2.6　電子顕微鏡による微細構造の観察

高圧処理後の試料から調製した肉片および筋原線維を3％グルタールアルデヒド，つづいて1％四酸化オスミウムで2重固定した後，Suzuki らの方法[6]に従い，脱水包埋後，JEM 100S電子顕微鏡（日本電子株式会社）により観察した。

2.7　タンパク質の定量

ミクロケルダール法により標準化したビウレット法[7]により定量した。

## 3.　結果と考察

3.1　筋肉pHへの影響

高圧処理が筋肉 pH に及ぼす影響を **Table 1** に示す。この表に示す結果は，異なった試料肉を使ってくり返し実験を行ったものの代表的な例を示している。筋肉ホモヂネートのpHは，200MPaまでは処理圧力の増加につれて少しづつ低下し，300 MPaになるとわずかに上昇した。一方，筋肉抽出液のpHは，100 MPaで大きく低下し，その後は少しづつ上昇した。と殺直後の硬直前の肉に高圧を加えると，死後解糖を促進し，短時間のうちにpHは大きく低下するが，硬直後の肉に高圧処理をしてもpHの低下は小さいことが多くの研究者によって報告されている[8~11]。本研究で得られた pH の変化は比較的小さく，pHの低下あるいは上昇は，加えられた圧力の大きさに依存していた。

3.2　筋原線維の小片化への影響

高圧処理が筋原線維の小片化に及ぼす影響を **Fig. 1** に示す。図に示すように，小片化の度合と処理圧力の強さの間にS字状の関係が得られた。筋原線維の小片化の度合は，無処理区（対照区）では10％以下であったのが，100，150，200MPaの圧力処理によって，それれぞれ30％以上，70％以上および80％以上に増大した。

熟成させた肉から調製した筋原線維は，熟成前の肉から調製したものに比べて短く，筋節の数が少ないこと[3,4]，また，筋原線維のZ線の破壊が肉の軟化と関係すること[3,4,12~16]がよく知られている。それ故，筋原線維の小片化は食肉の軟化の指標になるのではないかと考えられている[17~19]。

**Table 1**　pH of homogenates and extracts prepared from pressurized muscle

| Pressure applied | pH of homogenate | pH of extract |
|---|---|---|
| untreated | 6.14 - 6.15 | 5.88 - 5.90 |
| 100 MPa | 6.09 - 6.10 | 5.48 - 5.50 |
| 150 MPa | 5.96 - 5.97 | 5.53 - 5.54 |
| 200 MPa | 5.72 - 5.73 | 5.58 - 5.60 |
| 300 MPa | 5.75 - 5.76 | 5.72 - 5.73 |

© The Ito Foundation

**Fig. 1** に示すように，筋原線維の小片化は加えられる圧力の増加に伴って増加し，短時間の高圧処理によって，自然に熟成させた肉に生じる小片化の最高レベルに達することが明らかにされた。筋原線維の小片化を基準にすると，硬直後の肉への高圧処理は食肉の軟化の有効な手段と考えられる。

3.3　微細構造への影響

高圧処理した筋肉から調製した筋肉片および筋原線維の微細構造を **Fig. 2**，**3** に示す。筋肉に加えられた圧力が150MPaまでの場合は，筋節が収縮すること以外は，筋肉片の微細構造に無処理区との明確な差は認められなかった。処理圧力が200MPaになると，はっきりしたフィラメント構造の消失やM線構造の破壊が筋節全体にわたって認められるようになった。これらの変化は，処理圧力が300 MPaになるとさらに促進され，A-フィラメントの構造上の連続性が破壊され，A帯のところどころに電子密度の高い物質の沈着が認められた（**Fig. 2**-e）。I-フィラメントの密度と均一性の崩壊もまた認められた。

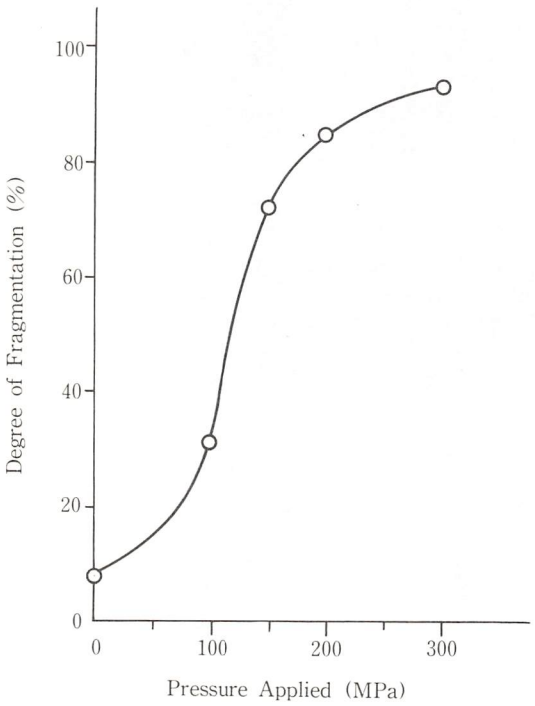



**Fig. 1**　Effect of high-pressure treatment on the degree of fragmentation of myofibrils prepared from pressurized beef skeletal muscle.
The degree of fragmentation of myofibrils was expressed as percent of the number of myofibrillar fragment composed of 1-4 sarcomeres to the total number of myofibrils, (about 100) observed.

100MPaで加圧処理された筋肉から調製した筋原線維では，筋節の収縮が認められ，無処理区に比べるとA帯とI帯の密度の差が区別しにくくなった。処理圧力150MPaでは，I帯のフィラメント構造の破壊とM線の消失が激しくなり，Z線の構造も不規則になっている。処理圧力200MPaでは，筋節の構造的連続性がほぼ完全に失われ，A-フィラメントやI-フィラメントの破壊が筋節全体に拡がっている。M線の完全な消失，およびI-フィラメントの崩壊によるものと思われるZ線の密度の増加と太さの拡大が認められた。圧力がさらに300 MPaに上がると，前述の変化に加えて，A帯の開裂も認められるようになった。100MPaの圧力処理でいったん収縮した筋節の長さは，処理圧力の増加につれて少しづつ回復する傾向にあった。おそらく，構造的な連続性の消失が大きくなるためであろう。

通常の熟成した肉の筋原線維の小片化は，筋原線維がZ線のところで分断されるために起こることはすでに述べたが[3,4,12~16]，加圧処理した筋肉から調製して小片化した筋原線維のZ線はあまり変化をせずに残っているようにみえる（**Fig. 3** と **4**）。筋原線維の主要な構成成分であるアクチンやミオシンの凝集状態に高圧が影響を与えることは広く知られている。F-アクチン[20~22]やミオシン[23~25]およびアクトミオシン[26]の重合体は圧力処理によって脱重合すると報告されている。圧力処理した肉塊中でF-アクチンの脱重合が実際に生じているかどうかは明瞭ではないが，高圧処理によるI-フィラメントの崩壊，即ち，F-アクチンの脱重合，は筋原線維の小片化をもたらす

© The Ito Foundation

原因の1つになるものと考えられる。

3.4　筋原線維タンパク質への影響

加圧処理した肉から調製した筋原線維の構成タンパク質をSDS-PAGEにかけた結果を**Fig. 4**に示す。加圧処理により筋肉の微細構造は大きく変化するにもかかわらず，筋原線維タンパク質の電

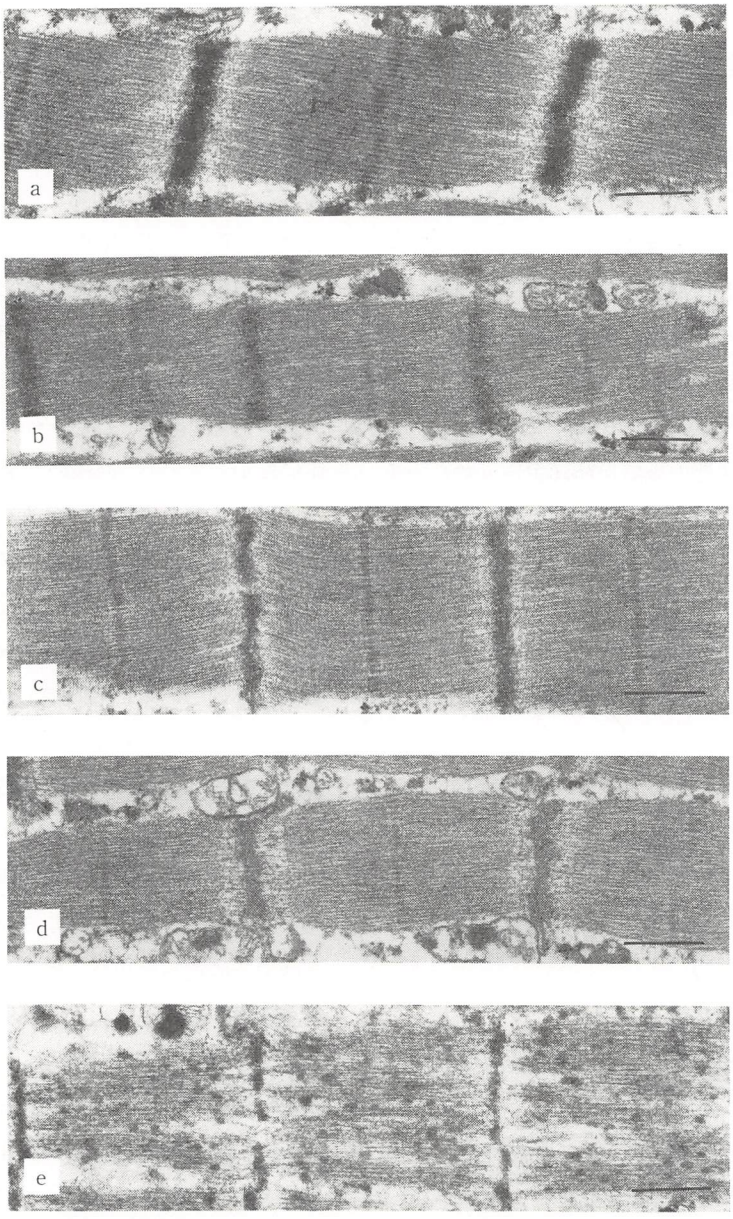



**Fig. 2**　Ultrastructure of muscle strips prepared from pressurized beef skeletal muscle.

Muscle strips taken from pressurized muscle were fixed with glutaraldehyde-$OsO_4$, embedded in Epon, and stained with uranyl acetate-lead citrate. Each scale mark on electron micrographs indicates 0.5$\mu$m (×25,000)

(a) control (untreated); (b) pressurized at 100 MPa; (c) pressurized at 150 MPa; (d) pressurized at 200 MPa; (e) pressurized at 300 MPa.

© The Ito Foundation

気泳動像には，加圧処理区と無処理区の間にはっきりした差は認められなかった。熟成した肉から調製した筋原線維に認められる30,000ダルトンタンパク質の出現やα-アクチニンの減少[27]は，加圧処理した肉から調製した筋原線維には認められなかった。

## 4. 要　約

高圧処理が食肉の軟化・熟成を促進させる手段になり得るかどうかを検討するために，死後硬直

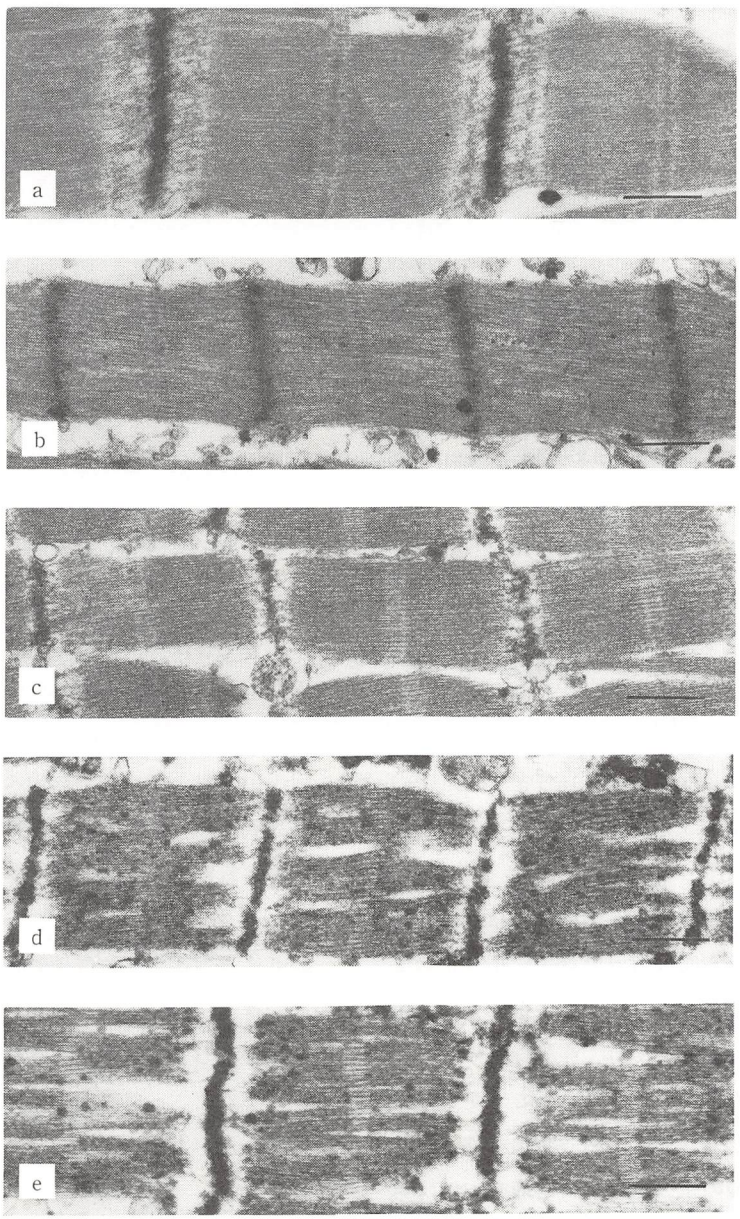



**Fig. 3** Ultrastructure of myofibrils prepared from pressurized beef skeletal muscle.

Myofibrils prepared from pressurized muscle were fixed, embedded and stained under the same conditions as specified for **Fig. 2.**

(a) control (untreated); (b) pressurized at 100 MPa; (c) pressurized at 150 MPa; (d) pressurized at 200 MPa; (e) pressurized at 300 MPa.

© The Ito Foundation

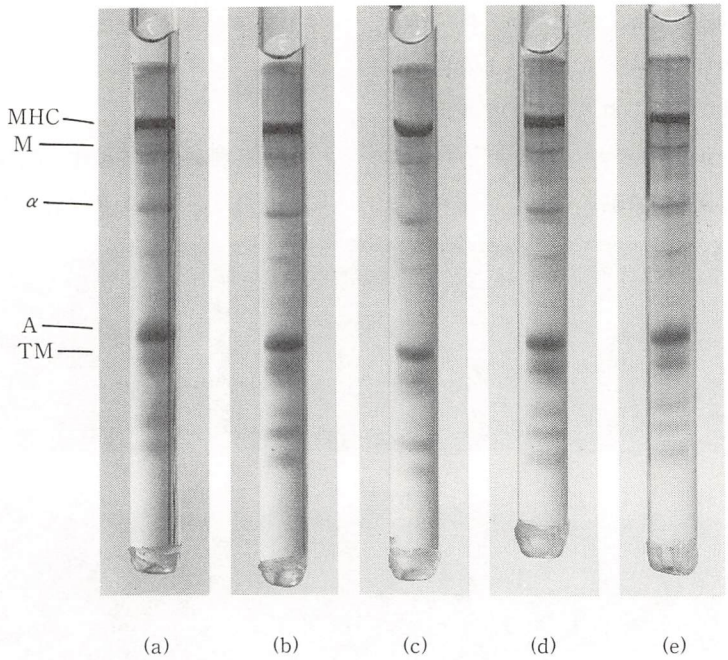



**Fig. 4**　SDS-PAGE of myofibrillar protein prepared from pressurized beef skeletal muscle.

Myofibrillar proteins were analyzed by electrophoresis on 5% polyacrylamide gels containing 0.1% SDS. The amount of protein loaded on to each gel was about 60μg.

MHC, myosin heavy chain; M, M-protein; α, α-actinin; A, actin; TM, Tropomyosin.

(a) control (untreated); (b) pressurized at 100 MPa; (c) pressurized at 150 MPa; (d) pressurized at 200 MPa; (e) pressurized at 300 MPa.

後の牛肉の肉塊に高圧処理（100 MPa～300 MPa）を施し，筋肉構造および筋原線維タンパク質への影響を研究した。

筋原線維の小片化は処理圧力の上昇につれて増加し，高圧処理を短時間行うだけで，小片化の度合は最高水準に到達した。電子顕微鏡による観察から，処理圧力の上昇につれて筋原線維のＩ帯の破壊およびM線の消失が促進されることが認められた。しかしながら，通常の熟成筋肉に認められる筋原線維のＺ線の脆弱化は圧力処理筋肉には認められなかった。圧力処理による微細構造の変化は著しいが，筋原線維タンパク質の電気泳動像には，圧力処理区と無処理区との間に差異は認められなかった。

以上の結果，硬直後の筋肉への高圧処理は，熟成とは異なる仕組みで，肉の軟化をもたらすことが示唆された。

終りに，本報告書の電子顕微鏡写真は，本学電顕室の斎藤　信技官によるものであることを記して謝意を表します。また高圧処理装置の利用を可能にしてくださった高圧応用食品研究会（新潟）に感謝いたします。

© The Ito Foundation

## 文 献


1) 林 力丸, 食品への高圧利用, 林 力丸編, p. 1～30, さんえい出版, 京都 (1989).
2) W. A. Busch, M. H. Stromer, D. E. Goll and A. Suzuki, J. Cell Biol., **52**, 367～381 (1972).
3) K. Takahashi, T. Fukazawa and T. Yasui, J. Food Sci., **32**, 409～413 (1967).
4) K. Takahashi, A. Hattori and T. Yasui, J. Biochem., **67**, 609～610 (1969).
5) K. Weber and M. Osbron, J. Biol. Chem., **244**, 4406～4412 (1969).
6) A. Suzuki, M. Saito, H. Sato and Y. Nonami, Agric. Biol. Chem., **42**, 2111～2116 (1978).
7) A. G. Gornall, C. T. Bardawill and M. M. David, J. Biol. Chem., **177**, 751～766 (1949).
8) J. J. Macfarlane, Developments in Meat Science－3, ed. by R. Lawrie, p. 135～184, Elsevier Applied Science Publishers Ltd., London. (1985).
9) J. J. Macfarlane, J. Food Sci., **38**, 294～298 (1974).
10) W. H. Kennick, E. A. Elgasim, Z. A. Holmes and P. F. Meyer, Meat Sci., **4**, 33～40 (1980).
11) J. J. Macfarlane, I. J. Mckenzie, R. H. Turner and P. N. Jones, Meat Sci., **5**, 307～317 (1981).
12) C. L. Davey and K. V. Gilbert, J. Food Technol., **2**, 57～59 (1967).
13) T. Fukazawa and T. Yasui, Biochem. Biophys. Acta, **140**, 534～537 (1967).
14) D. W. Henderson, D. E. Goll and M. H. St-romer, Am. J. Anat., **128**, 117～136 (1970).
15) A. J. Moller, T. Vestergaard and J. Wismer-Pedersen, J. Food Sci., **38**, 824～825 (1973).
16) D. G. Olson, F. C. Parrish, Jr. and M. H. Stromer J. Food Sci., **41**, 1036～1041 (1976).
17) D. G. Olson, F. C. Parrish, Jr., J. Food Sci,. **42**, 506～509 (1977).
18) F. C. Parrish, Jr., C. J. Vandell and R. D. Culler, J. Food Sci., **44**, 1668～1671 (1979).
19) C. R. Calkins and G. W. Davis, J. Animal Sci., **50**, 1067～1072 (1980).
20) I. I. Ivanov, Y. N. Bert and N. A. Lebedeva, Biokhimiya, **25**, 505～510 (1960).
21) T. Ikkai and T. Ooi, Biochemistry, **5**, 1551～1560 (1966).
22) J. M. O'shea, D. J. Horgan and J. J. Macfarlane, Aust. J. Biol. Sci., **29**, 197～207 (1976).
23) R. Josephs and W. F. Harrington, Biochemistry, **5**, 3474～3487 (1966).
24) R. Josephs and W. F. Harrington, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **58**, 1587～1594 (1967).
25) R. Josephs and W. F. Harrington, Biochemistry, **7**, 2834～2847 (1968).
26) T. Ikkai and T. Ooi, Biochemistry, **8**, 2615～2622 (1969).
27) I. F. Penny, Developments in Meat Science－1, ed. by R. Lawrie, p. 115～143, Applied Science Publishers Ltd., London, (1980).


© The Ito Foundation

# 高圧処理による筋肉タンパク質の変性と熱ゲル化特性

Thermal Gelation and Denaturation of Muscle Proteins by High Pressure Treatment

田口 武・田中宗彦（東京水産大学）

Takeshi Taguchi and Munehiko Tanaka (Tokyo University of Fisheries)

The effect of pressure treatment on the thermal gelation of meat and myosin pastes, and the pressure denaturation of actomyosin, myosin, and actin were studied by means of jelly strength and ATPase activity. It was shown that pressure-treated meat and myosin pastes at 200 atm or 500 atm for sardine and 500 atm or 3,000 atm for Alaska pollack promoted their thermal gelation at 40°, 50°, 60°, and 70℃. The pressure-treated actomyosins showed that the activity of Ca-ATPase decreaseddepen ding on the duration and intensity of pressure treatment, and the Mg-ATPase activity drastically decreased, whereas the EDTA-ATPase activity increased rapidly. It was suggested that denaturation of myosin and actin occurred during pressure treatment and the interaction between myosin and actin became less strong. This tendency was confirmed by comparison with the pressure-treated F-actin plus myosin system. On the basis of the denaturation,the △V values for myosin were different among fish species; that is−5.40m$l$・mol$^{-1}$ for pork,−8.12m$l$・mol$^{-1}$ for flying fish,−18.8m$l$・mol$^{-1}$ for sardine. On the other hand, the△V of actin exhibited the similar values except −9.19m$l$・mol$^{-1}$ for pork; that is −15.7m$l$・mol$^{-1}$ for fly-ing fish, −17.7m$l$・mol$^{-1}$ for sardine, −15.8m$l$・mol$^{-1}$ for Alaska pollack.

## 1. 目　的

ゲル型タンパク性食品の魚肉および畜肉加工品は，温度，pH, 塩濃度，あるいは圧力のような環境変数の変化によって，系全体として自由エネルギーの減少を伴いながら，生肉からより安定な製品へと転じる。ここでは，環境要因として圧力を主に取り扱う。圧力効果は，温度効果と並行関係にあることが指摘されており[1,2]，自由エネルギーに与える影響としては両者間に全く差がない。しかしながら，圧力によるタンパク変性が体積減少を通じてのエンタルピー項依存型であるのに対し，温度による変性はエントロピー項依存型である。したがって，両変性の現象画には相違点が見られる場合が多い。本研究は，圧力処理した肉糊およびミオシンの熱ゲル化および加圧による筋肉タンパク質の変性様式に検討を加えたものである。

## 2. 方　法

市販の豚のロース肉から脂肪組織を取り除いたもの，また，魚類ではイワシ，トビウオ，およびスケトウダラの血合肉を除いた背肉を試料として用いた。それぞれの肉試料から，つぎのようにして肉糊およびアクトミオシン，ミオシンおよびアクチンを調製した。

肉糊は，それぞれのひき肉を0.3% $NaHCO_3$-0.15% NaCl 溶液で晒処理および遠心脱水して，水分85%，必要に応じて0.2N NaOH でpH6.8～6.9に調節した後，これに対し食塩2.5%を加え擂潰して得た。得られた肉糊をケーシング（$\phi$1.5

© The Ito Foundation

cm×1.6cm）詰した。

加圧は，高圧容器と油圧ポンプによる圧力発生部からなる高圧処理装置で行った。ケーシングされた肉糊あるいはミオシンの表面をサランラップでおおい，高圧容器内に置き，水を媒体として加圧処理した。高圧容器内の温度はとくにことわらない限り，0℃とした。これらの加圧した肉糊を所定の温度（40°，50°，60°，および70℃）で加熱した後，これらのゲルの物性値は，ブランジャー押し込み試験（ブランジャー径：0.5cm，進入速度：0.15cm/sec）に供し，ジェリー強度（g・cm）で表わした。加熱ゲルのジェリー強度は，実験5回の平均値で示した。一方，アクトミオシンは Weber-Edsall 溶液（0.6M KCl，0.04M $NaHCO_3$，0.01 M $Na_2CO_3$）で2°～4℃，24時間抽出した。抽出物の粘度の高いときには，0.6M KCl を加えてガーゼでロ過した。その後，塩濃度を変えて，タンパク質溶液について沈殿一溶解を繰り返し，最終的には，0.6 M KCl-20 mM Tris-maleate（pH 7.0）に対し，充分透析し，ATPase 活性測定に供した。また，ミオシンは，Mackie and Connell (1964)[3] の方法によったが，最終的には 5mM ATP の存在下で飽和硫安40%～50%の画分を0.5 M KCl－10mM トリス緩衝液（pH 7.0）に対し透析して得た。アクチンは，アセトン粉末を0.5 mM ATP，0.2mM $CaCl_2$，10mM Tris-HCl pH 8.0で

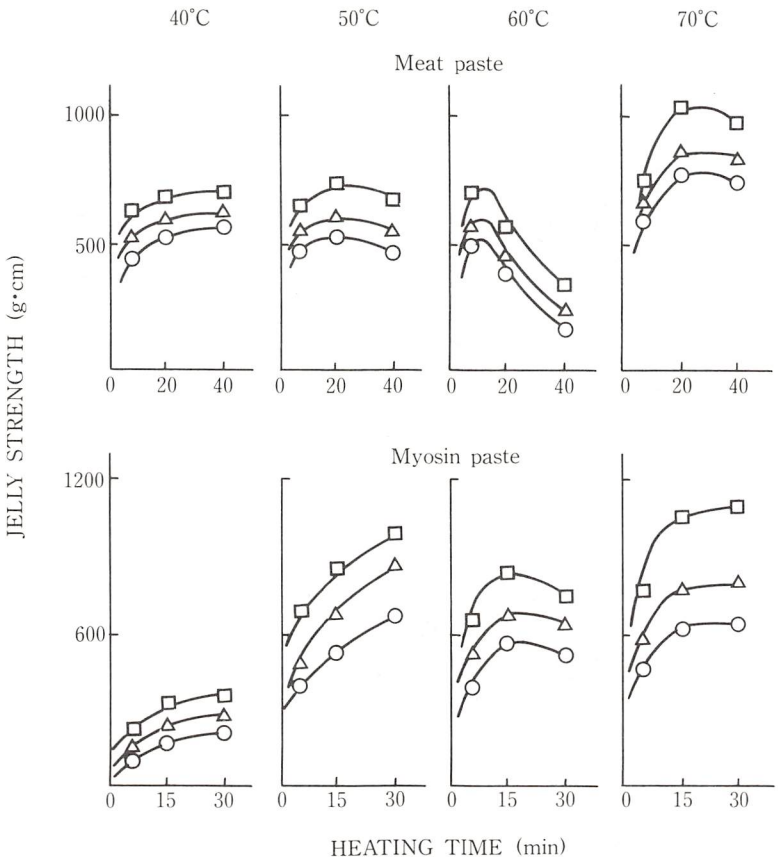



**Fig. 1** Effect of pressure treatment on thermal gelation of sardine meat and myosinpastes.
After pressure treatment at 1 (○), 200 (△), and 500 (□) atm for 30 min, the pastes (78% moisture for meat, 88% for myosin) were heated at 40°, 50°, 60°, and 70℃.

© The Ito Foundation

抽出し，Spudich-Watt[4] の方法によって精製したが，F-アクチンとした後，0.1 M KCl-10 mM トリス緩衝液に対して透析した。加圧の効果は，それぞれタンパク質溶液をプラスチック容器内に充塡して0℃で所定の時間圧力処理した。解圧後，それぞれの ATPase 活性が求められた。

天然アクトミオシン，および合成アクトミオシン ATPase 活性測定は，つぎのとおりである。Mg-ATPase に対しては，1mM $MgCl_2$，20mM Tris-maleate（pH 7.0），0.03M KCl，2mM ATP；EDTA-ATPase に対しては1mM EDTA，20mM Tris-maleate（pH 7.0），0.6 M KCl，1mM ATP；また，Ca-ATPase 活性に対しては，5mM $CaCl_2$，20mM Tris-maleate（pH 7.0），1 mM ATP で0.5 M KCl あるいは0.05M KCl の存在下で，それぞれ0.3～0.5 mg/m*l* タンパク質を含む反応混液を用いて25℃において生成した無機リン酸を比色定量した。

### 3. 結果と考察

イワシ肉糊およびミオシンの熱ゲル化に及ぼす加圧処理効果を **Fig. 1** に示す。さきに，Suzuki ら[5] が黒豚筋原線維に及ぼす加圧の促進効果を報告したように，イワシ肉糊に対し200および500気圧処理は，40°，50°，60°，および70℃における熱ゲル化を促進した。ミオシンの場合にも各温度域において肉糊と同様な効果が観察された。肉糊の熱ゲル化においてミオシンが重要な役割を果たす

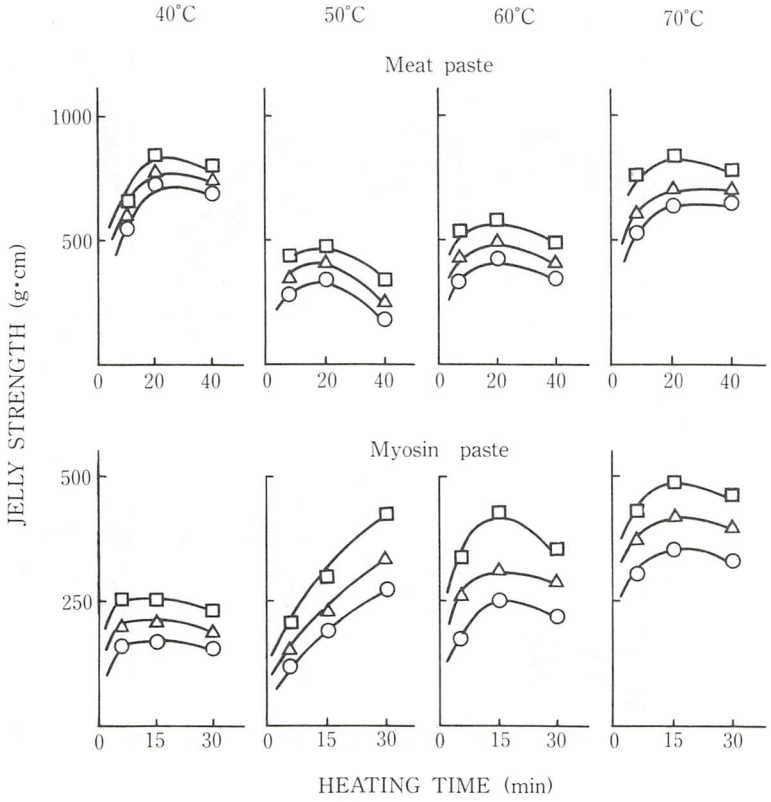



**Fig. 2**　Effect of pressure treatment on the thermal gelation of Alaska pollack meat and myosin Pastes.
After pressure treatment at 1 (○), 500 (△), and 3,000 (□) atm for 30 min, the pastes (81% moisture for meat, 90% for myosin) were heated at 40°, 50°, 60°, and 70℃.

© The Ito Foundation

ものと理解できる。**Fig. 2** では，スケトウダラ肉糊およびミオシンの熱ゲル化に対する加圧効果が示されている。肉糊およびミオシンの加熱ゲルの強度は，加圧処理によって増大した。ここで，イワシとスケトウダラの加圧処理効果について500気圧で比較すると，イワシに対する加圧効果は，スケトウダラのそれより高いことを示した。海生生物に見られる環境適応の生化学的知見によれば，深海魚（ソコダラ）の圧活性化酵素（ピルビン酸キナーゼ）と表層魚（マス）のそれとの間に可成りの相異のあることが論じられている[6]。それによると，日周移動生物が広温性で，温度不感受性の酵素系をもっているのと同様に，深海魚は，概して圧の急激な変化に対し不感受性の酵素系からなるものと考えられている。もし，筋肉タンパク質の圧に対する不感受性が深海魚スケトウダラ＞表層魚イワシであるとすれば，**Fig. 1** と **Fig. 2** を比較して，加圧処理効果の相異を説明することが可能であろう。

ついで加圧に伴う筋肉タンパク質の変性様式について述べる。**Fig. 3** では，アクトミオシンATPase活性に及ぼす圧力処理効果を示している。トビウオおよびイワシMg-ATPaseの変性は，加圧の強度および加圧時間によって促進され，また，Ca-ATPase のそれに比べて激しい。一方，EDTA-ATPase 活性は加圧によって増大することを示した。この変化は，アクトミオシン分子上でミオシンとアクチンの解離する傾向を示すものである。したがって，アクトミオシンATPaseに対する加圧処理は，ミオシンとアクチンの両方に影響を与えていることになる。

まずミオシンATPaseに及ぼす加圧処理効果を **Fig. 4** に示す。ミオシンの Ca-ATPase および EDTA-ATPase活性は，加圧によって共に減少

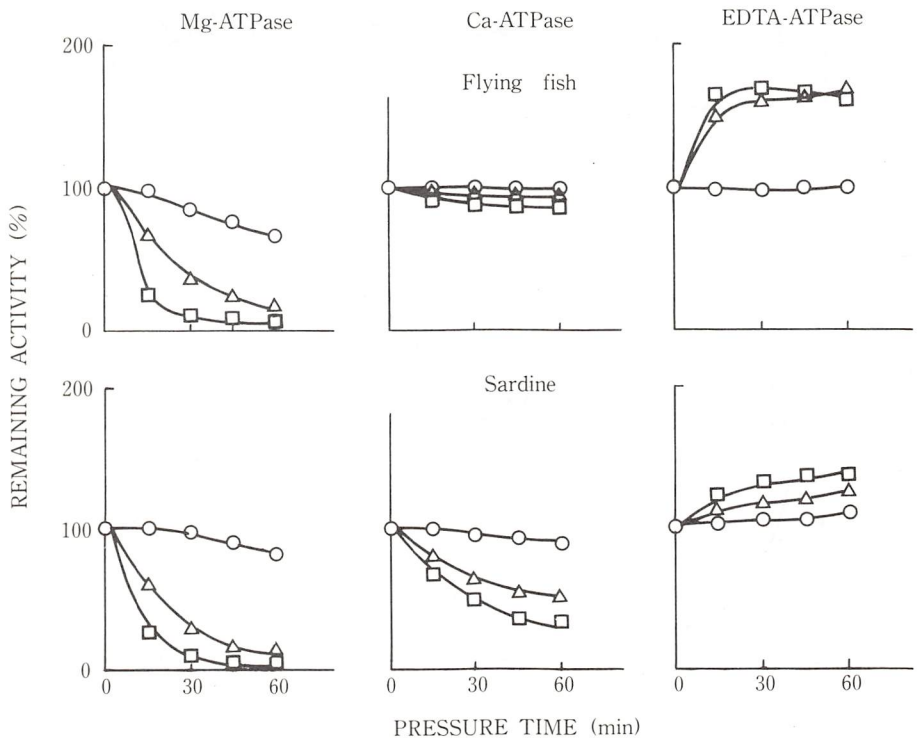



**Fig. 3** Effect of pressure treatment on flying fish and sardine actomyosin ATPases.
○：1,000 atm,　△：3,000 atm, □：5,000 atm

© The Ito Foundation

した。この場合，イワシ・ミオシンの活性減少は，いずれもトビウオ・ミオシンのそれに比べて著しい。ここには図示しないが，加圧処理したミオシンと非加圧アクチンからの合成アクトミオシンのMg-, Ca-，およびEDTA-ATPaseについて調べると，**Fig. 4** のように，それぞれの活性は，加圧強度および加圧時間によって減少し，しかもイワシの活性減少はトビウオのそれより大きいことを示した。

**Fig. 5** は，加圧処理アクチンと非加圧ミオシンからなるアクトミオシンATPaseの活性変化を示す。アクトミオシンMg-ATPaseは，アクチンの加圧処理によって減少したが，Ca-ATPase は，全く活性の変動を示さなかった。これは，アクトミオシンCa-ATPaseの活性発現においてアクチンとは全く無関係であることを極めて明瞭に示したものである。一方，EDTA-ATPase 活性は，圧力処理で増大した。増大の傾向がトビウオとイワシで同程度であったことは興味深い。なぜなら，アクチンに対する圧力の影響は，魚種間に差がない可能性を示すからである。

つぎに，アクトミオシンとミオシンはCa-ATPaseの変性速度から，またアクチンはMg-ATPase変性速度からそれぞれ△Vを求めて **Table 1** に示す。その結果，アクトミオシンおよびミオシンにおける△Vは，それぞれ−6.77，−5.40 $ml \cdot mol^{-1}$ 豚，−6.94，−8.12 $ml \cdot mol^{-1}$ トビウオ，−14.07，−18.80 $ml \cdot mol^{-1}$ イワシ，−21.03 $ml \cdot$

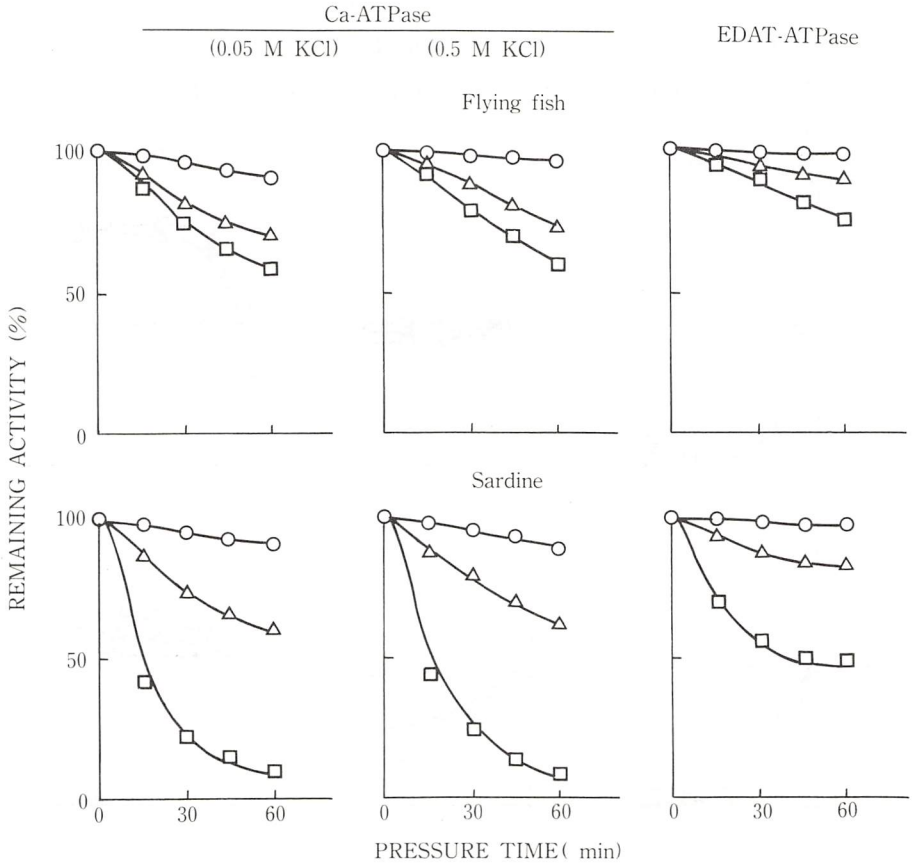



**Fig. 4**　Inactivation of flying fish and sardine myosin ATPases due to pressure tre-atment.
○：1,000 atm,　△：3,000 atm,　□：5,000 atm

© The Ito Foundation

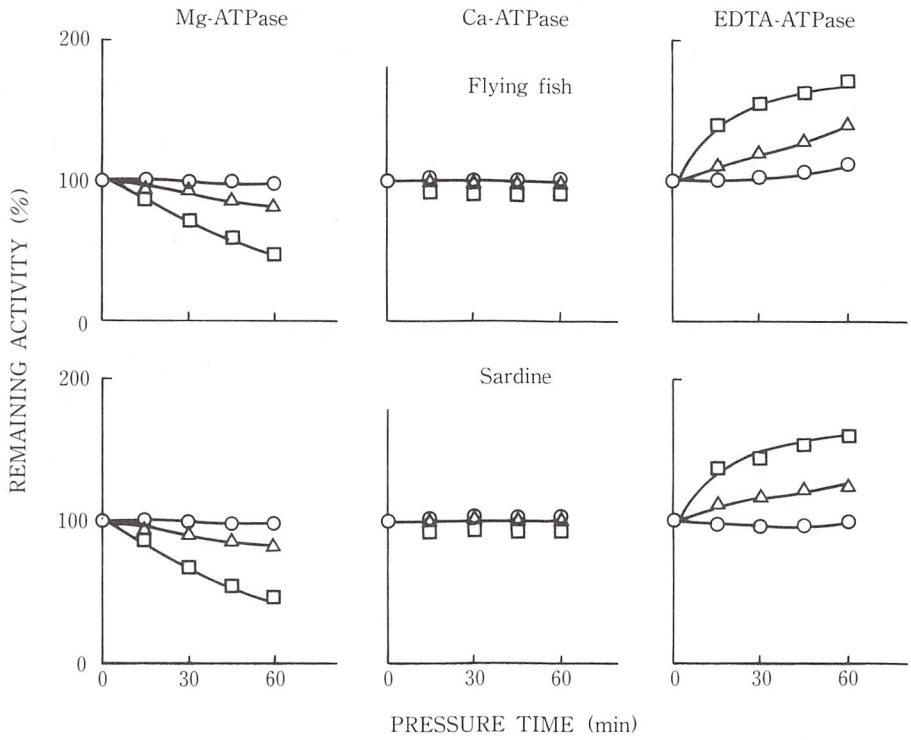



**Fig. 5** Changes in the activities of actomyosin ATPases consisting of myosin plus pressure-treated F-actin from flying fish and sardine muscles.
○：1,000 atm, △：3,000 atm, □：5,000 atm

**Table 1** Volume changes for denaturation of actomyosin, myosin, and F-actin due to pressure treatment.

△V (m *l* /mol)

| | Actomyosin | Myosin | F-actin |
|---|---|---|---|
| Pork | − 6.77 | −5.40 | − 9.19 |
| Flying fish | − 6.94 | −8.12 | −15.67 |
| Sardine | −14.07 | −18.80 | −17.59 |
| Alaska pollack | −21.03 | | −15.79 |

$mol^{-1}$スケトウダラの順に負の大きい値を示した。絶対値として大きい値は，圧力の適応能力を意味しているとすれば，これらは，圧力適応型の順であるのかも知れない。しかし一方，アクチンの△V値は，豚を別とすれば，魚種間に大差のないことを示した。これに加えてアクチンの圧力変性は，F-アクチン→G-アクチンの反応であって，G-ADP-アクチンの存在[7]の可能性を示すものである。このように変性様式について別の角度から論議を可能にしていることは，興味深い。

## 4. 要　約

筋肉肉糊およびミオシンを加圧処理すると，熱ゲル化を促進することが示された。豚および魚類筋肉タンパク質の圧変性に関する知見が重要と考え，各種ATPase面から圧力変性の様式に検討を加えた。アクトミオシンの加圧処理では，Ca-ATPase活性が減少し，Mg-ATPase活性ではさらに急激な減少を示したが，一方EDTA-ATPaseは著しく増大した。これらのことから，アクトミオシン分子内のミオシンとアクチン双方に変性が起こり，同時にミオシン・アクチン間で解離しやすくなると推察した。変性におけるミオシンの△V値は，豚および魚種間で大きく異なったが，ア

© The Ito Foundation

クチンの△V値は，豚を別とすれば，魚種間に変動の少ない傾向を示した。肉タンパク質に対する加圧処理効果は，アクトミオシン→ミオシン＋アクチンやF-アクチン→G-アクチンのように，はじめにタンパク分子相互間の解集合に対し促進効果が考えられるので，このような反応を食品加工の分野に提案してみたい。

## 文　献


1) Hawley, S.A. 1971. Reversible pressure-temperature denaturation of chymotrypsinogen. Biochemistry. 10：2436

2) Zipp, A. and Kauzmann, W. 1973. Pressure denaturation of metmyoglobin. Biochemistry. 12：4217.

3) Mackie, I.A. and Connell, J.J. 1964. Preparation and properties of purified cod myosin. Biochim. Biophys. Acta. 93：544.

4) Spudich, J.A. and Watt, S. 1971. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. J. Biol. Chem. 246：4866.

5) Suzuki, T. and Macfarlane, J.J. 1984. Modification of the heat-setting characteristics of myosin by pressure treatment. Meat Science. 11：263.

6) 藤田道也訳：1978. 環境適応の生化学（by Hochachka, P.W. & Somero, G.N.）. 共立出版㈱, p. 318.

7) Ikkai, T. and Ooi, T, 1966. Actin: Volume change on transformation of G-form to F-form. Science. 152：1756.


© The Ito Foundation

# 加圧による筋肉タンパク質，特にミオシンの機能特性の改善

Effect of High Pressure on the Charactristics of Muscle Protein, especially Myosin

山　本　克　博（酪農学園大学）

Katsuhiro Yamamoto (Rakuno Gakuen University)

Gelation of myosin at 0.1 M KCI and pH 6.0 under high pressure was investigated. The myosin filament suspension formed a gel after 1 min at a pressure of 2.800 kg/cm$^2$ when its protein concentration was abvoe 2 mg/m*l*. The gel strength of the pressure-induced myosin gel increased up to 10 min of pressurization and then it remained constant at all the protein concentration levels. The gel strength was almost proportional to the protein concentration. It took a long period to form a gel at 2,100 kg/cm$^2$ than the gelation at 2,800 kg/cm$^2$ and they were 5, 10, and 15min at 5, 4, and 3 mg/m*l*, respectively. The gel strength continued increasing up to 30 min of pressurization even at the protein concentration was at 5 mg/m*l*. No pressure-induced gelation was observed below 1,400 kg/cm$^2$. There were no marked changes in myosin filaments at 1,400 kg/cm$^2$ ; on the other hand, myosin filaments were associated by the pressurization at 2,100 kg/cm$^2$ where gelation took place. The pressure-induced gel revealed a so-called strand type network structure and this was similar to that of heat-induced gel at low ionic strength. SDS gel electrophoresis indicated that the myosin heavy chain contributed to form a network structure of the gel and light chains 1 and 3 easily dissociated during the formation of gel.

## 1. 目　的

骨格筋筋原線維タンパク質の約50%を占めるミオシンは，加熱によってゲルを形成し，このような加熱ゲル形成能が肉製品，特にソーセージのような細切加熱製品での保水性や結着性の発見の基礎となっている[1]。

ところで，最近，種々の食品素材を高圧処理することによって，各種成分の機能特性の改善や物性の改善，あるいは殺菌効果を得ようとする試みが盛んに行われるようになっている[2]。加圧によって発現する興味ある現象の一つにタンパク質のゲル形成がある。加熱によらない室温ないしは低温で起こるゲル形成は，ゲルの物性的な違いばかりではなく，栄養学的にみても栄養素の破壊を伴わないというような点から，実用的な意義も大きいと考えられる。このようなことから，本研究では，筋肉タンパク質の加熱ゲル形成能発現の基本因子であるミオシンを用い，加圧によるミオシンのゲル形成能を調べるとともに，ゲルの物性や構造についても調べた。

## 2. 実験材料と方法

### 2.1 ミオシンの調製

と殺直後の家兎骨格筋（主として白色筋）より，Offer らの方法[3]に基づいて粗ミオシンを調製し，

© The Ito Foundation

さらにDEAE-Sephadexカラムによってミオシンを分離精製した。ミオシンは55%飽和硫安沈澱として4℃で保存し，透析によって硫安を除去して実験に供した。

2.2　タンパク質濃度の測定

光路長2㎜の石英セルを用い，280nmでの吸光度からタンパク質濃度を測定した。精製ミオシンの280nmでの吸光係数A 1% 1cmは5.2[4]を用いた。

2.3　ミオシンフィラメントの調製

0.5M KCl中に5mg/m$l$のタンパク質濃度で溶解させたミオシンを，20mM K phosphate(pH 6.0)を含む0.1M KCl溶液に対して24時間透析し，供試した。

2.4　加圧の方法

加圧はAminco社（米国）製の耐圧2,800kg/㎠の加圧容器を備えたフレンチプレスによって行った。試料用容器として，ポリアロマ製遠心チューブ3cm程度に切断して用いた。試料溶液を入れた後，シリコン栓でチューブ内に空気が残存しないように密閉し，水を満たした加圧容器に入れた。なお，加圧は室温で行った。

2.5　加圧ゲル強度の測定

加圧ゲルの強度は，直径5㎜のプランジャーを10㎜/minの速さで，ゲル中に5㎜進入させた時の荷重量（g）として表した。

2.6　透過型電子顕微鏡によるミオシンフィラメントの観察

2%酢酸ウランでネガティブ染色したミオシン標品を透過型電子顕微鏡によって観察した。

2.7　加圧ゲルの微細構造の観察

ゲルをグルタールアルデヒド固定，アルコール脱水，臨界点乾燥，金蒸着した後，走査型電子顕微鏡によって微細構造を観察した。

2.8　SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）

SDS-PAGEはWeedsの方法[5]により，7.5%アクリルアミドゲルでミニスラブゲル泳動装置を用いて行った。

## 3.　結果と考察

ミオシンフィラメント懸濁液のタンパク質濃度を変え，2,800kg/㎠で加圧した場合のゲル強度を**図1**に示した。タンパク質濃度が1mg/m$l$では30分までの加圧では完全なゲル化は起こらず，ゾルとゲルとの中間的な様相を呈した。2mg/m$l$以上のタンパク質濃度では加圧1分目でゲルの形成が認められた。加圧1分目でのゲルはいずれのタンパク質濃度でもゲル強度は非常に弱かったが，加圧10分目までは加圧時間に伴ってゲル強度の増加があった。しかし，10分を越えるとゲル強度は一定の値となった。また，ゲル強度はほぼタンパク質濃度に比例した。

2,100kg/㎠で加圧した場合は，2,800kg/㎠での加圧に比べてゲル化するまでの時間が長くかかった（**図2**）。ゲル化に要する時間は，タンパク質濃度5mg/m$l$では5分，4mg/m$l$では10分，3mg/m$l$では15分であった。また，この圧力では，

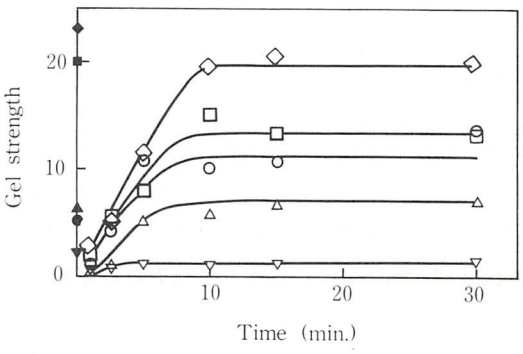



**図1**　ミオシンフィラメントを2,800kg/㎠で加圧した時の加圧時間とゲル強度の関係

ミオシンフィラメントのタンパク質濃度（mg/m$l$）を5（◇），4（□），3（○），2（△），1（▽）に調整して，所定の時間加圧し，形成されたゲルの強度を測定した。なお，黒塗りのシンボルは各々のタンパク質濃度での加熱（65℃，20分間）によって形成されたゲルの強度を加圧ゲルと同様の方法によって測定した値を示している。

© The Ito Foundation

実験を行った30分まで加圧時間に伴ってゲル強度の増加があったが，30分目においてもゲル強度は2,800kg/㎠の時よりも低い値であった。1,400kg/㎠での加圧では，タンパク質濃度が5mg/m$l$であっても30分までの加圧ではゲル化が起こらなかった。

圧力およびタンパク質濃度のいずれもが高ければ，ミオシンフィラメントはゲルを形成することが判ったが，加圧過程中にミオシンフィラメントにどのような形態学的変化が生じているかを調べるために，透過型電子顕微鏡によってフィラメントの観察を行った（**図3**）。1,400kg/㎠での加圧では，前述したようにゲル形成が起こらなかったが，この圧力条件下でのミオシンフィラメントの形態を**図3**—Aに示した。無加圧のミオシンフィラメント(ａ)は視野中にほぼ均一に分散していたが，加圧後の試料(ｂ～ｄ)でも無加圧試料と比べて顕著な違いは観察されなかった。一方，2,100kg/㎠での加圧では，**図3**—Bに示したように，加圧５分目(ｂ)でフィラメントの会合する様子が観察され，会合の程度は加圧時間に伴って増加した。加圧10分(ｃ)と30分(ｄ)の試料では，ほとんどのフィラメントが会合しており，**図2**に示したとおり，ゲルの形成があった。また，個々のフィラメントを観察すると，無加圧の場合にはフィラメント表面は比較的平滑であったが，加圧に伴ってフィラメント表面に突起状の構造が明らかとなった。これは，フィラメント表面から突起しているミオシン頭部が，変性に伴って頭部同士の幾つかが凝集したために生じた変化ではないかと考えられる。

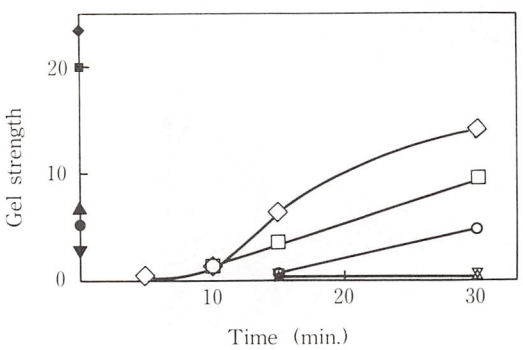



**図2**　ミオシンフィラメントを2,100kg/㎠で加圧した時の加圧時間とゲル強度の関係。
シンボルならびにその他の条件は**図1**と同様。

加圧によって形成されたゲルの微細構造を走査型電子顕微鏡によって観察すると，**図4**に示したように，細かな網目構造が観察された。このようなゲル構造は，ミオシンフィラメントを加熱した際に形成されるゲルでの，いわゆる strand-type network[6~7]と極めて類似していた。

骨格筋ミオシン分子は２本の重鎖と３種類，４本の軽鎖とから構成されており，重鎖は分子の全長に亘って存在し，一方軽鎖はミオシン分子の頭部に局在している。加圧ゲルの形成にあたって，これらミオシン分子のサブユニットがどのように係わっているのかを明らかにするために，ゲルを遠心分離によって上清と沈澱とに分け，その各々をSDS-PAGEによって分析した（**図5**）。lane１は無加圧のミオシン標品で鎖量20万の重鎖と，鎖量2.6万～1.6万の三種類の軽鎖のバンドが観察された。lane ２は加熱（65℃，30分）のみで形成させたゲルで，上清部には軽鎖１と３とが検出され，軽鎖２は検出されなかった。lane ３と４とは加圧のみではゲル化しなかった試料で，加圧後さらに加熱してゲルを形成させた。これらの試料の上清部のタンパク質には，加熱のみでの lane ２の場合と同様，軽鎖１と３とが検出された。一方，加圧のみでゲルを形成した試料の上清部（lane ５～8）では，ミオシン重鎖が検出され，上清部に存在する全タンパク質に占める重鎖の割合は，加圧時間が短いほど高く，加圧時間が長くなるにつれて，重鎖の割合が低下し，逆に軽鎖１と３との割合が高くなった。

以上の結果をまとめると，次のようになる。加

© The Ito Foundation

圧によるゲル形成の初期の段階では個々のミオシンフィラメントが均一に分散した状態で存在するが，加圧時間の進行に伴ってミオシンフィラメントの会合が起こり，ゲルの骨格構造が形成される。また，ゲルの遠心分離後の上清部に軽鎖1と3とが検出されたことから，ゲルの骨格構造の形成は主としてミオシンの重鎖が係わっており，軽鎖の1と3とがゲル形成に伴って解離し易くなるといえる。

ミオシンフィラメントの加熱ゲル形成ではフィ

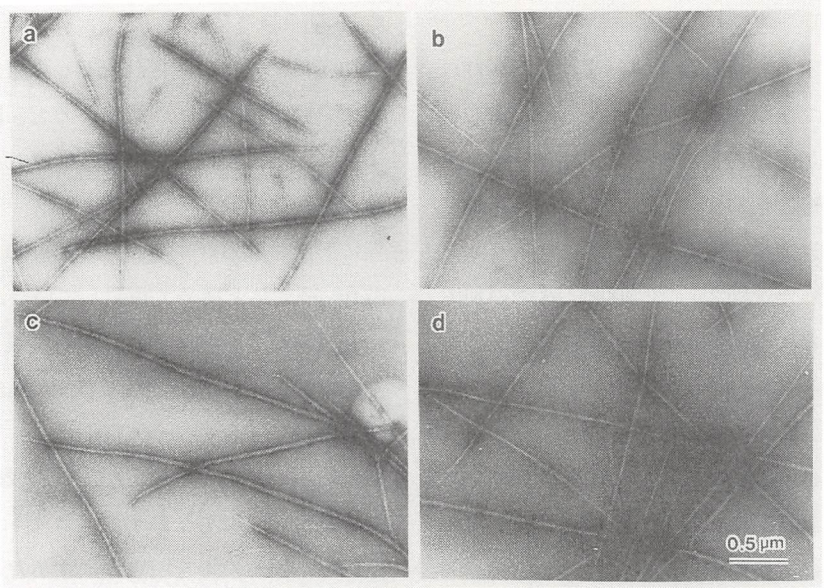



**図3**-A　加圧に伴うミオシンフィラメントの形状変化
タンパク質濃度を4 mg/ml として，1,400kg/cm² で加圧した後のミオシンフィラメント。aは無加圧試料。b，c，dは各々加圧時間が5，10，30分のミオシンフィラメントである。

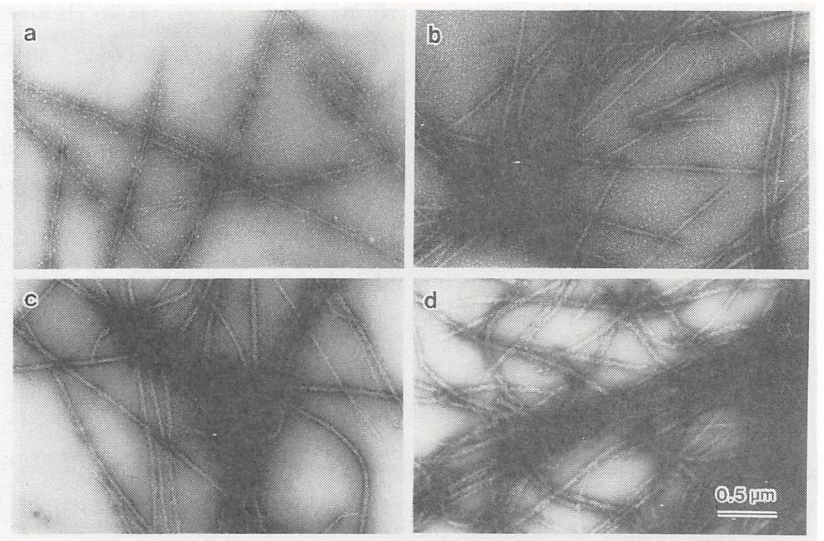



**図3**-B　加圧に伴うミオシンフィラメントの形状変化
タンパク質濃度4 mg/ml, 2,100kg/cm² で加圧したミオシンフィラメント。a，b，c，dは各々加圧時間が2.5，5，10，30分である。

© The Ito Foundation

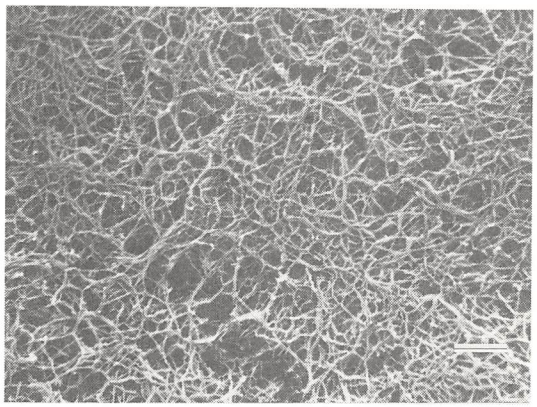


図4　加圧ゲルの微細構造
ミオシンフィラメントを5 mg/m$l$ として 2,800kg/㎠で30分間加圧して形成されたゲルの構造を走査型電子顕微鏡で観察した。図中のスケールは1 $\mu$mを表している。

ラメントの軸部分の相互作用の寄与は小さく，むしろフィラメント表面から突起しているミオシン頭部を介してのフィラメント間相互作用がゲル形成の主要因と考えられている[8]。加圧によるミオシンフィラメントのゲル形成がどのような機構で起こるのかについては現在のところ不明であるが，ミオシン分子のサブフラグメントを用いた実験，あるいは化学修飾や酵素的修飾によって，加圧ゲル形成におけるミオシン分子の頭部や尾部の寄与を明らかにすることができるものと考えられる。

## 4. 要　約

ミオシンフィラメント懸濁液を2,800kg/㎠で加圧すると，2mg/m$l$以上のタンパク質濃度でゲルを形成した。この圧力下では，加圧後1分目でゲル形成が認められ，10分までは加圧時間に伴ってゲル強度が増加したが，それ以降ゲル強度は一定となった。2,100kg/㎠での加圧では，ゲル形成に至るまでの時間が遅くなり，5mg/m$l$では5分，4mg/m$l$では10分でゲル形成が始まり，30分までゲル強度の上昇があった。加圧によって形成されたゲルの強度は，ほぼタンパク質濃度に比例した。1,400kg/㎠以下での加圧ではゲル形成が認められなかった。電子顕微鏡による観察では，加圧によってミオシンフィラメントが会する傾向が認められた。また，加圧ゲルの構造はフィラメントの加熱ゲルの場合と同様に細かな網目状構造を呈していた。

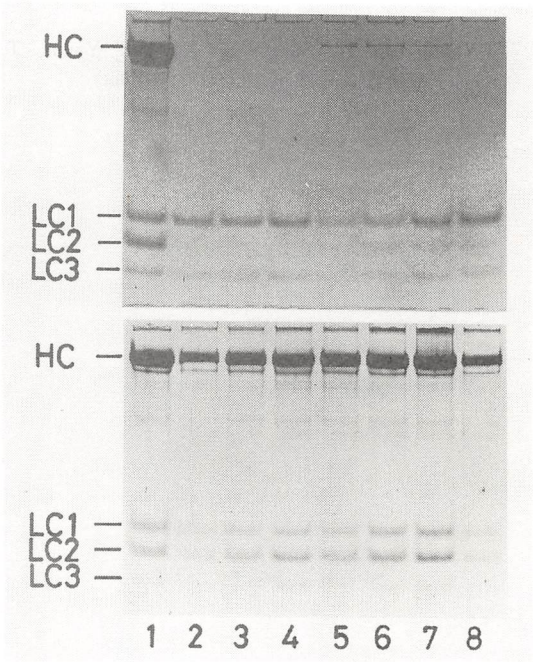



図5　加圧ゲル形成に伴うミオシンサブユニットの変化
タンパク質濃度5 mg/m$l$ のミオシンフィラメント懸濁液を2,100kg/㎠で加圧してゲルを形成させ，ゲルの遠心分離で得られた上清部（上段）と沈澱部（下段）を各々SDS-PAGEにかけてタンパク質の分析を行った。1は上下段とも無加圧のミオシンコントロール，2は加熱（65℃，20分）のみでのゲル，3～8は各々加圧時間，1, 2.5, 5, 10, 15, 30分である。なお，2.5分までの加圧ではゲルを形成しなかったので，加圧後さらに加熱してゲルを形成させた（3と4）。HCはミオシンの重鎖を，またLCは軽鎖を示している。

### 文　献

1) 安井　勉，鮫島邦彦：New Food Industry, 27 (6), 81-88 (1985).
2) 林　力丸：食品への高圧利用，1-30，さんえい出版，京都，(1989).
3) Offer, G., Moos, C., and Starr, R.: J. Mol. Biol., 74, 653-676 (1973).
4) Godfrey, J.E. and Harrington, W.F.: Biochemistry, 9, 894-908 (1970).
5) Weeds, A.G.: Eur. J. Biochem., 66, 157-173 (1976)
6) Harmansson, A-M., Harbitz, O., and Langton, M.:

© The Ito Foundation

J. Sci. Food Agr. 37, 69-84 (1986).
7) Yamamoto, K., Samejima, K., and Yasui, T.: Agric. Biol. Chem., 52, 1803-1811 (1988).
8) 安井 勉, 鮫島邦彦：New Food Industry, 27 (8), 54-65 (1985).

© The Ito Foundation

# 貯蔵温度の違いが真空包装豚肉の呈味成分に及ぼす影響

## Effects of Storage Temperature on the Major Taste Compounds in Vaccum Packed Pork

石　田　光　晴（宮城県農業短期大学）

Mitsuharu Ishida (Miyagi Agricultural College)

The changes of pH, TBA value and free amino acids of vacuum packed pork at the different storage temperature and period were investigated. The storage conditions were −25℃ (frozen), −2℃ (partial freezing or child), +4℃ (refrigeration) and +20℃ (room temperature) for 0, 7, 14 and 21 storage days. The tasty testing was carried out at same day.

The pH did not almost change through the storage period except room temperature. The TBA value was decreased with the storage period except room temperature. In the frozen condition, this value was evidently lower than that of the raw meat (0 storage day).

The concentration of each and total free amino acid at the frozen condition were not different with raw meat through all periods. At the partial freezing condition, the concentration of the most amino acids slightly raised up than that of raw meat. The concentration of the glutamic acid increased to 2-3 times. The preservation of the partial freezing meat was good as same as frozen meat. The tasty testing was continuing good results through all periods. In case of refrigeration, the concentration of all amino acids and the tasty score gradually increased through the storage period.

## 1. 目　的

食肉の主な呈味成分として，ATP代謝物質，有機酸，糖質，ペプチドおよび遊離アミノ酸等が呈味向上に大きく寄与していると考えられている[1]。一方，貯蔵温度では，通常0～5℃の低温貯蔵が主流を占めているが，流通，保存形態等としては，凍結，パーシャルフリージング等もある。また，包装形態には，普通，真空およびガス交換包装などがある。食肉の呈味に関しては，0～5℃の低温普通包装による研究が多く[2~4]，その他の条件による例は少ない。

本研究では，これからの流通，保存方法として，パーシャルフリージング（チルド）と真空包装を組み合わせて，豚肉の呈味性について検討した。冷凍から室温まで貯蔵温度を変えて，真空包装豚肉を0～21日間貯蔵し，その間のpH, TBA値および遊離アミノ酸の変動を測定した。また，随時官能検査を行った。

## 2. 材料および方法

### 2.1 試料の調製

と殺直後の豚ロース2本を入手し，それぞれをクリーンベンチ内で厚さ約1cm程度に切断した。その切断した豚肉を70%アルコールに浸積後，クリーンルーム用ペーパーでふきとってから，塩化

© The Ito Foundation

ビニリデン製真空パック用袋に入れて真空包装した。以下の成績は，この２本のロースから得られた値の平均値である。

真空包装した豚肉を凍結（－25℃），パーシャルフリージング（チルド，－２℃），冷蔵（＋４℃）および室温（＋20℃）にわけて貯蔵した。貯蔵した豚肉を０，７，14，21日後に取り出して開封後，胸最長筋（ロース）部分のみを挽肉とし試料とした。

2.2　pHの測定

試料約10ｇをビーカーにとり，５倍量の蒸留水を加え，よく攪はん後，日立―堀場ガラス電極pHメーターＭ８Ｅで測定した。

2.3　TBA値の測定[5)]

試料約２ｇを精秤し，９倍量の1.15%塩化カリウムを加え，均質化した。そのホモジネートの0.5m$l$に３m$l$の１%リン酸と１m$l$のTBA試薬を加え，沸騰水浴中で45分間加熱後，室温まで急冷した。冷却後，４m$l$のn-ブタノールを加え，振とう抽出し，遠心分離（3,000回転，10分間）後，n-ブタノール層を535および520nmで吸光度を測定し，その差をTBA値とした。

2.4　遊離アミノ酸の定量

試料約５ｇを精秤し，10%過塩素酸40m$l$を加え均質化した。30分間冷蔵庫内に放置した後，3000回転，20分間遠心分離し，その上清をビーカーに写し，１Ｍおよび0.1MKOHを用いて，pH 6.5～7.0に調整した。再び，30分間放置後，3000回転，20分間遠心分離し，その上清を濾過して100m$l$にメスアップした。その一部を0.45$\mu$mメンブランフィルターを通して，日立高速液体クロマトグラフ663型に供し，遊離アミノ酸を定量した。

2.5　官能試験

それぞれの段階で試料調製後，残った挽肉をボイルして官能試験を行った。

## 3.　結果および考察

3.1　pHの変動

pHの変動を**表1**に示した。生肉（０日目）のpHは，5.47であり，室温貯蔵（＋20℃）以外はほとんど変化は認められなかった。20℃貯蔵では，ややpHは低下した。

表１　pHの変動

| | ０日目 | ７日目 | 14日目 | 21日目 |
|---|---|---|---|---|
| 生　肉 | 5.47 | | | |
| 冷　凍 | | 5.51 | 5.39 | 5.53 |
| チルド | | 5.55 | 5.47 | 5.54 |
| 冷　蔵 | | 5.52 | 5.56 | 5.53 |
| 室　温 | | 5.45 | 5.20 | 5.30 |

冷凍；－25℃　チルド(パーシャルフリージング)；－2℃
冷蔵；＋４℃　室温；＋20℃

3.2　TBA値の変動

脂肪酸化の尺度とみなされるTBA値の変動を**表2**に示した。生肉（０日目）のTBA値は0.82 n mol/g湿重量で，室温貯蔵を除き，経時的にやや低下していった。冷凍貯蔵では，生肉よりも値が明らかに低下し，他の貯蔵温度では，冷凍貯蔵ほどの低下ではなかった。これらは，真空包装により，酸素の供給が絶たれて酸素分圧が低下し，過酸化脂質を作り出すことができなかったことによると思われた。

表２　ＴＢＡ値(nmol/ｇ）の変動

| | ０日目 | ７日目 | 14日目 | 21日目 |
|---|---|---|---|---|
| 生　肉 | 0.82 | | | |
| 冷　凍 | | 0.60 | 0.55 | 0.52 |
| チルド | | 0.83 | 0.82 | 0.70 |
| 冷　蔵 | | 0.95 | 0.73 | 0.61 |
| 室　温 | | 0.81 | 0.87 | 0.87 |

冷凍；－25℃　チルド(パーシャルフリージング)；－2℃
冷蔵；＋４℃　室温；＋20℃

3.3　遊離アミノ酸含量の変動

遊離アミノ酸は，食肉の呈味向上に最も寄与する成分と考えられている。特にグルタミン酸

© The Ito Foundation

(Glu)の上昇は，明らかに呈味の向上につながっているとみられ，重要なアミノ酸のひとつである[1]。

**表3**に遊離アミノ酸含量の変動を示した。0日目（生肉）の総アミノ酸量は，21.24 μmol/g およびアンモニア濃度は11.66 μmol/g であった。冷凍貯蔵では，全期間を通じて，各アミノ酸含量は，ほとんど生肉と同様の値を示し，大きな変化は認められなかった。

パーシャルフリージングでは，わずかに総アミノ酸の含量は増加した（約2～5 μmol/g）が，アンモニア含量には差がなかった。各アミノ酸では，セリン，グルタミン酸，グリシン，バリン，メチオニン，ロイシン，チロシンおよびリジン等は経時的にやや増加していった。このような貯蔵温度でもタンパク質の分解は続いていたことが示された。グルタミン酸は0日目0.54 μmol/g から21日目には1.37 μmol/g に上昇し，呈味性向上に貢献していると考えられた。

冷蔵貯蔵では，総アミノ酸含量はさらに増加し，すでに7日目には，生肉よりも10 μmol/g も増加した。ほとんどのアミノ酸が冷凍貯蔵やパーシャルフリージングよりも増加していた。とくにグルタミン酸は生肉よりも4～10倍も増加している。しかも，アンモニア含量は差がなかった。

室温貯蔵では，さらに顕著に最初の7日目から21日目まで遊離アミノ酸，アンモニア共に増加しつづいた。各アミノ酸含量は増加したが，リジンは全期間を通じて痕跡程度であった。

これらの結果の中で，特徴的なのは，ヒスチジン相当ピークの濃度の高さである。これまでの分析例では，もっと低い値が一般的であるが，今回の試料では，もっとも濃度の高いアミノ酸となった。0日目からすでに濃度は高く，室温貯蔵を除いて，貯蔵日数に関係はなく，大きな変化は認められなかった。このヒスチジンの濃度については，その由来について，さらに検討することが必要であると考えられた。

### 3.4　官能試験

室温貯蔵では，すでに7日目から酸化臭が漂い，

**表3**　遊離アミノ酸の変動（μmol/g）

| | 0日目 | 7日目 | | | | 14日目 | | | | 21日目 | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 生肉 | 冷凍 | チルド | 冷蔵 | 室温 | 冷凍 | チルド | 冷蔵 | 室温 | 冷凍 | チルド | 冷蔵 | 室温 |
| Asp | tr. | tr. | tr. | tr. | tr. | tr. | tr. | 0.45 | 0.03 | tr. | tr. | 0.93 | tr. |
| Thr | 2.26 | 2.14 | 2.68 | 4.32 | 6.22 | 2.20 | 2.83 | 5.08 | 5.39 | 2.36 | 3.11 | 6.29 | 5.38 |
| Ser | 0.28 | 0.29 | 0.46 | 1.54 | 3.63 | 0.30 | 0.66 | 2.75 | 4.10 | 0.28 | 0.90 | 3.84 | 3.52 |
| Glu | 0.54 | 0.45 | 0.39 | 2.08 | 6.34 | 0.46 | 0.88 | 3.58 | 6.36 | 0.47 | 1.37 | 4.98 | 5.78 |
| Gly | 1.72 | 1.65 | 1.93 | 2.46 | 4.80 | 1.81 | 2.21 | 2.24 | 7.65 | 1.72 | 2.25 | 4.21 | 13.18 |
| Ala | 3.21 | 3.34 | 3.49 | 4.93 | 8.78 | 3.26 | 3.92 | 5.45 | 13.74 | 3.20 | 4.04 | 7.34 | 16.37 |
| Val | 0.57 | 0.58 | 0.76 | 1.26 | 3.51 | 0.50 | 0.72 | 1.83 | 4.96 | 0.58 | 0.67 | 2.76 | 7.37 |
| Met | 0.44 | 0.46 | 0.36 | 0.70 | 1.05 | 0.35 | 0.61 | 1.00 | 2.42 | 0.39 | 0.69 | 1.55 | 3.03 |
| Ile | 0.45 | 0.45 | 0.53 | 0.89 | 2.52 | 0.47 | 0.64 | 1.22 | 3.71 | 0.44 | 0.58 | 2.09 | 6.24 |
| Leu | 0.54 | 0.50 | 0.59 | 1.39 | 3.62 | 0.56 | 0.87 | 2.14 | 6.15 | 0.54 | 1.03 | 3.46 | 10.28 |
| Tyr | 0.08 | 0.12 | 0.12 | 0.31 | 0.74 | 0.12 | 0.19 | 0.72 | 2.44 | 0.13 | 0.27 | 1.65 | 6.13 |
| Phe | 3.06 | 3.06 | 3.58 | 3.82 | 3.70 | 3.06 | 3.68 | 3.73 | 5.26 | 3.22 | 3.79 | 4.05 | 9.99 |
| Lys | 0.23 | 0.29 | 0.38 | 0.72 | tr. | 0.32 | 0.45 | 1.45 | tr. | 0.31 | 0.53 | 2.47 | tr. |
| His | 7.83 | 7.90 | 7.79 | 8.18 | 8.87 | 7.73 | 8.06 | 8.60 | 9.20 | 7.25 | 7.35 | 8.07 | 9.82 |
| Arg | 0.03 | 0.03 | 0.03 | 0.66 | 2.51 | 0.03 | 0.05 | 1.21 | 1.06 | 0.03 | 0.07 | 1.99 | 0.35 |
| Total | 21.24 | 21.26 | 23.09 | 33.26 | 56.29 | 21.17 | 25.77 | 41.45 | 72.47 | 20.92 | 26.65 | 55.68 | 97.44 |
| $NH_3$ | 11.66 | 11.08 | 11.66 | 13.28 | 17.91 | 11.31 | 12.84 | 12.12 | 28.54 | 11.05 | 10.64 | 11.55 | 40.03 |

tr.；痕跡　冷凍；−25℃　チルド（パーシャルフリージング）；−2℃　冷蔵；+4℃　室温；+20℃

© The Ito Foundation

食用に適さなかった。冷蔵貯蔵では，総遊離アミノ酸は日を追う毎に増加していき，21日目には，55.68 μmol/g まで増加した。しかし，風味の総合成績のもっとも良かったのは，14日目であった。パーシャルフリージングでは，冷凍や冷蔵貯蔵よりもドリップ量はやや少なく，全体的な風味もよく呈味成績は一定しており，全期間評価は変わらなかった。

さらに，ATP 代謝物も食肉の呈味性に大きな影響を持っているが，現在，その消長について検討中である。

以上のことから，今後はコストの点を除いて，保存・流通の面からパーシャルフリージングとともに真空包装の利用をもっと進めるべきであると考えられた。

## 4. 要　約

冷凍（−25℃）から室温（+20℃）まで貯蔵温度を変えて，真空包装豚肉（ロース）を0，7，14および21日間貯蔵し，その間の pH, TBA 値および遊離アミノ酸の変動を測定した。

pH は，室温貯蔵を除いて，全期間を通じて，大きな変動はなかった。室温貯蔵では生肉（0日目）よりもやや低下した。TBA 値は，室温貯蔵を除いて，0日目よりも低下していった。冷凍貯蔵では，顕著に低下した。遊離アミノ酸含量は，冷凍貯蔵において，生肉との間では全期間を通じてほとんど変動はなかった。パーシャルフリージングでは，多くのアミノ酸が生肉や冷凍貯蔵よりもわずかに増加していき，グルタミン酸も2～3倍に増加した。その保存性は，冷凍貯蔵と同様に良く，呈味性も全期間を通じて，官能試験の評価は変わらなかった。冷蔵貯蔵では，すべてのアミノ酸含量が生肉よりも増加し，呈味性も向上した。

本研究に豚ロース肉を提供いただいた滝沢ハム仙台工場に感謝いたします。

### 文　献

1) 西村敏夫，加藤博通，肉の科学，**29**，1（1988）
2) G.C. Smith, G.R. Culpad and Z.L. Carpenter, J. Food Sci., **43**, 823 (1978)
3) F.C. Parrish, Jr., R.E. Rust, G.R. Popenhagen and B.E. Miner, J. Animal Sci., **29**, 398 (1969)
4) J.H. Miller and L.E. Dawson, J. Food Sci. **30**, 406 (1965)
5) 過酸化脂質実験法，82～85（1985），金田尚志，植田伸夫編集，医歯薬出版株式会社

© The Ito Foundation

# 国産牛肉余剰部位の付加価値向上に関する研究

A Study for Implement of the Adding Value on
Unvalued Low Quality Parts of Domestic Beef

田　中　喜代重　・　本　城　英　美（岩手県畜産試験場）

Kiyoshige Tanaka and Hidemi Honjo
(Iwate Prefectural Animal Experimental Station)

A trial to smoke beef using local woods was carried out to increase market value of under-valued cuts of beef carcass. Characteristics of local woods used in smoking were as follows.

1. Yamasakura (Prunus jamasakura) was not much different from Onigurumi (J. sieboldiana).
2. Shirakaba (White birch) gave good appearance to smoked beef, but flavor was not sufficient.
3. Akamatsu (Pinus densiflora) gave good luster and flavor with a nice and a little bitter taste.

Judging from the results, Akamatsu seemed to be a good material for smoking local beef, Japanese Shorthorn beef in particular, as both Akamatsu and the beef breed are typical products of Iwate Prefecture.

## 1. 目　　的

牛肉の輸入自由化にともない部分肉流通が促進され，ロース類の需要拡大に反し，バラ肉・ネック等の余剰肉の発生が懸念される。

岩手県における日本短角種の産直についても，販売契約更新時に，セット流通から部分肉流通への要求が出され，低級部位の余剰が表面化しつつある。

余剰部位の高付加価値加工処理のため，県内に腑存するオニグルミ等を燻煙材として活用し，地域特産品開発の可能性を明らかにする。

## 2. 方　　法

### 2.1　燻煙加工

1)　燻煙加工の実施

㈱岩手畜産流通センターに委託

加工担当　加工課　菊地秀博

2)　供試原料肉

（1）　間接検定供試の日本短角種去勢牛

（2）　と殺・平成元年10月17日，解体・凍結10月19日

（3）　原料肉の官能評価

モモ肉は非常に鮮紅色で柔らかい感じがした。

バラ肉は脂肪が乳白色で良好，特にトモバラは脂肪交雑もあり柔らかであった。各部位とも弾力に富み，テクスチャーも良好な原料肉と思われた。

3)　原料肉の処理

（1）　解凍

室内（16℃）に2日間放置し，自然解凍とした。

（2）　整形

各部位を厚さ1～1.5cmで，はがきサイズくらいに整形

（3）　血絞り

© The Ito Foundation

塩50%，砂糖50%の配合で，肉塊1kg当たり20gをすりこみ，－4℃の冷蔵庫に24時間保管し，その後水温9～10℃の水道水で20分間洗い流した。

（4） 塩漬

乾塩法とし配合は次のとおりとした。

亜硝酸ナトリウム0.52%，硝酸カリウム0.82%，L-グルタミン酸ナトリウム10.21%，食塩50.50%，砂糖20.00%，こしょう17.95%，合計100.00%

この配合物を肉塊1kg当たり，35～40gをまぶしてよくすりこんだ後，4℃の冷蔵庫に7日間保管し，熟成・塩漬した。

（5） 塩抜き

水温9～10℃の水道水を直接ホースでバットに入れ，2～3分間洗い流した。

4） 燻煙材

燻煙材は剝皮後チップ化したヤマザクラ（以下サクラという），オニグルミ（以下クルミという），シラカンバ（以下カンバという），アカマツとし単一材を使用した。

サクラ，クルミ，カンバの3樹種はスモークドビーフに，またアカマツはビーフジャーキーに使用した。

5） 燻煙処理

スモークハウスは，次の型式のものを使用した。

（1） スモークドビーフ

形式　2Gガスハウス

燻煙室容積　1.7×2.8×2.35m＝11.2㎥

（2） ビーフジャーキー

形式　コンクリートブロック積

燻煙室容積　1.55×1.10×1.40m＝2.4㎥

また，樹種別スモーク工程とチップ使用量は表**1**のとおりである。

2.2　食味テスト

5段階嗜好尺度法で，A：＋2，B：＋1，C：0，D：－1，E：－2とし，各項目ごとに合計し平均値を算出した。

サンプルの加工肉は，約8㎜程度にスライスし，疲労効果防止のためジュース等を飲ませ，回復のための因子を入れながらパネラーに供した。

パネラーの構成はスモークドビーフについては，都市部30名，農村部22名で5名の男性を含むが，実際の購買層である主婦が中心であった。また，ビーフジャーキーについては，女性5名を含む当場の職員で実施した。

なお，アロマおよびフレーバーについては，パネラーの十分な理解を前提とするため，事前に各項目の説明をして実施した。

## 3.　結果と考察

3.1　原料肉の処理

血絞りは一般的方法で行ったが，血斑等がまったく見られず，極めてよい仕上がりであった。

3.2　燻煙処理

燻煙付着は，クルミ＞サクラ＞カンバの順で，クルミの燻煙時間は半分でよかった（表**1**）。ま

表1　スモーク工程

| 工程 / 燻煙材 | 乾燥Ⅰ | | スモーク | | スチームボイル | | 乾燥Ⅱ | | 風乾 | | 備考 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 温度 | 時間 | 温度 | 時間 | 温度 | 時間 | 温度 | 時間 | 温度 | 時間 | 燻煙材使用料 | 燻煙量 |
| ヤマザクラ | 65℃ | 30分 | 70℃ | 40分 | 75℃ | 45分 | －℃ | －分 | －℃ | －分 | 7.5kg | 中 |
| オニグルミ | 65 | 30 | 70 | 20 | 75 | 45 | － | － | － | － | 7.5 | 大 |
| シラカンバ | 65 | 30 | 70 | 40 | 75 | 45 | － | － | － | － | 7.5 | 中 |
| アカマツ | 80 | 60 | 85 | 120 | － | － | 60 | 120 | 30～15 | 15 | 10.0 | 大 |

© The Ito Foundation

た，サクラとカンバの煙はインク色であるが，クルミの煙は灰色であった。アカマツの燻煙色は，灰色の淡緑色であった。燻煙量は，サクラなどの2倍くらいを発生し燻煙臭が強いが，予想に反して松脂臭はまったくなかった。ハンガーには，松脂のようなものの付着が明らかに認められた。また，松脂のためか製品の光沢が非常に良かった。

3.3　官能テスト

1）　製品の肉色

（1）　スモークドビーフ

①　モモ肉：都市部ではクルミが，外見・切り口面ともサクラにやや劣るとの評価であったが，農村部では，クルミがややよいとの逆の評価がなされ，全体では，サクラが小差ながら良い評価であった。

カンバは，テスト会場をビーフジャーキーと同じにしたことの影響もあったが，高い評価であった。

②　バラ肉：都市部，農村部ともクルミが劣るとの評価で，特に外見が−0.63（**表2**）と低い評価であった。

（2）　ビーフジャーキー

モモ肉は，黒く仕上がっているため外見の評価は−0.75と低かったが，切り口面の評価は0.34と良かった。

牛タンについては，外見0.31，切り口面0.25とほぼ良い評価であった。（**表3**）

2）　香味

（1）スモークドビーフ

①　モモ肉：サクラとクルミに対する評価は，都市部と農村部では反対に出たが，全体でのアロマは，サクラ1.03，クルミ1.12と，小差ながらクルミが高かった。また，カンバはサクラとクルミよりも低い評価であった。（**表2**）

②　バラ肉：都市部ではクルミの香味をやや良とする評価であるが，農村部ではクルミの評価が

**表2**　スモークドビーフ食味テスト評点の平均値

| 区分 | 項目 樹種 地域 | 肉色 外見 サクラ | 肉色 外見 クルミ | 肉色 外見 カンバ | 肉色 切口面 サクラ | 肉色 切口面 クルミ | 肉色 切口面 カンバ | 香味 アロマ サクラ | 香味 アロマ クルミ | 香味 アロマ カンバ | 香味 フレーバー サクラ | 香味 フレーバー クルミ | 香味 フレーバー カンバ | 食感 サクラ | 食感 クルミ | 食感 カンバ | 総合評価 サクラ | 総合評価 クルミ | 総合評価 カンバ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| モモ肉 | 都市部 | 1.33 | 1.22 | | 1.11 | 1.00 | | 0.89 | 1.19 | | 1.00 | 0.96 | | 1.00 | 0.70 | | 1.22 | 0.70 | |
| モモ肉 | 農村部 | 1.36 | 1.41 | | 1.18 | 1.23 | | 1.18 | 1.05 | | 1.14 | 1.23 | | 1.32 | 1.18 | | 1.14 | 1.18 | |
| モモ肉 | 場内 | | | 1.88 | | | 1.63 | | | 0.69 | | | 0.75 | | | 1.75 | | | 1.44 |
| モモ肉 | 全体 | 1.34 | 1.31 | 1.88 | 1.14 | 1.11 | 1.63 | 1.03 | 1.12 | 0.69 | 1.07 | 1.09 | 0.75 | 1.16 | 0•94 | 1.75 | 1.18 | 0.94 | 1.44 |
| バラ肉 | 都市部 | 0.04 | −0.81 | | 0.56 | 0.30 | | 0.52 | 0.63 | | 0.30 | 0.41 | | 0.91 | 0.30 | | 0.56 | 0.44 | |
| バラ肉 | 農村部 | 0.00 | −0.45 | | 0.46 | 0.18 | | 0.23 | −0.05 | | 0.09 | −0.36 | | 0.14 | 0.00 | | 0.09 | −0.14 | |
| バラ肉 | 全体 | 0.02 | −0.63 | | 0.50 | 0.24 | | 0.37 | 0.29 | | 0.19 | 0.02 | | 0.16 | 0.15 | | 0.33 | 0.15 | |

© The Ito Foundation

良くなかった。全体では，クルミがやや劣るとの評価であって，フレーバーはサクラ0.19，クルミ0.02であった。(表2)

(2)　ビーフジャーキー

モモ肉のアロマ0.63，フレーバーが0.56，また，牛タンはアロマ0.69，フレーバー0.50であったが，モモ肉についての香味の評価を1以上としたものが59%を占め，牛タンについては50%であった。(表5)

3)　食感

(1)　スモークドビーフ

①　モモ肉：都市部では，サクラ1.22，クルミ0.70とサクラを高く評価したが，農村部では，サクラ，クルミとも評価が同じであった。また，カンバの評価は1.44と高かった。(表2)

②　バラ肉：都市部，農村部ともに，サクラがクルミにやや勝るとの評価で，全体ではサクラ0.33，クルミ0.15であった。(表2)

(2)　ビーフジャーキー

モモ肉の評価は0.09と低いが，牛タンは0.56と良い評価であった。(表3)

4)　総合評価

(1)　スモークドビーフ

①　モモ肉：都市部は，サクラ1.22，クルミ0.70とサクラを高く評価したが，農村部では，サクラ，クルミとも評価が同じであった。またカンバの評価は1.44と高かった。(表2)

②　バラ肉：都市部・農村部ともにサクラがクルミにやや優るとの評価で，全体では，サクラ0.33，クルミ0.15であった。(表2)

(2)　ビーフジャーキー

牛タンに対する評価は0.50と良かったが，モモ肉については0.22であった。(表3)

5)　食味テストの評点分布

(1)　スモークドビーフ

モモ肉に対する評点の分布は，フレーバーについて都市部がやや広いが，その他は一般に狭くなっている。(表4)

バラ肉に対する評価は個人差が大きく，特にフレーバーについては，各段階にほぼ均等に分布し，農村部でその傾向が強いようであった。(表4)

カンバは香味に若干かけるが，その他は高い評点域に集中分布している。(表5)

(2)　ビーフジャーキー

外見が黒っぽく仕上がっているために色に対する評価は低いほうによったが，香味・食感・総合評価が高くて，これら3項目についての評価1以上のものはモモ肉で49.2%，牛タンが50.0%である。しかも，最高レベルの2とするものも沢山あり，十分なマーケットの存在をうかがわせるものである。

3.4　まとめ

1)　ヤマザクラ

ヤマザクラの燻煙フレーバーであるフェノールおよび塩基性成分から来る甘い感じのこげ臭が都市部で好まれる傾向にあり，従来から使用されているヤマザクラの良さを再確認した。

2)　オニグルミ

農村部においては，ヤマザクラよりやや好まれる傾向にあり，使い方によっては，ヤマザクラと

表3　ビーフジャーキー食味テスト評点の平均値

| 項目 / 部位 | 肉色 | | 香味 | | 食感 | 総合評価 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 外見 | 切口面 | アロマ | フレーバー | | |
| モモ肉 | −0.75 | 0.34 | 0.63 | 0.56 | 0.09 | 0.22 |
| 牛タン | 0.31 | 0.25 | 0.69 | 0.50 | 0.56 | 0.50 |

© The Ito Foundation

同等に活用できるものと認められた。

3）シラカンバ

シラカンバは，香味の点でやや低い評価を受けたが，その他については高く評価され，燻煙材として好ましいものである。

4）アカマツ

アカマツは，予想に反して松脂臭がまったくなかった。製品の光沢が極めて良く，また，香味も良く，適度の苦味をもっており，日本短角種と南部アカマツを利用した個性豊かな地域特産品として，ただちに商品化に結びつけられる燻煙材と認められた。

**表4**　食味テストの評点分布　その1

| 項目 | | 区分＼評点 | スモークドビーフ モモ肉 サクラ 2 | 1 | 0 | -1 | -2 | モモ肉 クルミ 2 | 1 | 0 | -1 | -2 | バラ肉 サクラ 2 | 1 | 0 | -1 | -2 | バラ肉 クルミ 2 | 1 | 0 | -1 | -2 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 肉色 | 外見 | 都市部 | 14 | 10 | 4 | 2 | | 13 | 9 | 7 | | 1 | 5 | 7 | 6 | 8 | 4 | | 4 | 8 | 10 | 8 |
| | | 農村部 | 13 | 6 | 3 | | | 13 | 7 | 1 | 1 | | 3 | 3 | 8 | 7 | 1 | 1 | 4 | 6 | 4 | 7 |
| | 切口面 | 都市部 | 12 | 11 | 3 | 3 | 1 | 10 | 10 | 8 | 1 | 1 | 8 | 5 | 11 | 6 | | 6 | 7 | 9 | 5 | 3 |
| | | 農村部 | 12 | 3 | 6 | 1 | | 10 | 7 | 4 | 1 | | 5 | 6 | 4 | 5 | 2 | 3 | 7 | 7 | 1 | 4 |
| 香味 | アロマ | 都市部 | 9 | 6 | 15 | | | 15 | 3 | 11 | 1 | | 4 | 9 | 14 | 3 | | 7 | 7 | 12 | 4 | |
| | | 農村部 | 10 | 7 | 5 | | | 8 | 8 | 5 | 1 | | 5 | 3 | 9 | 4 | 1 | 4 | 5 | 5 | 3 | 5 |
| | フレーバー | 都市部 | 11 | 9 | 7 | 2 | 1 | 8 | 8 | 9 | 5 | | 8 | 3 | 6 | 12 | 1 | 7 | 6 | 9 | 4 | 4 |
| | | 農村部 | 11 | 7 | 3 | 1 | | 7 | 12 | 3 | | | 4 | 4 | 5 | 5 | 4 | 3 | 5 | 7 | 5 | 2 |
| 食感 | | 都市部 | 8 | 13 | 7 | 2 | | 8 | 14 | 4 | 4 | | 6 | 4 | 12 | 8 | | 6 | 5 | 13 | 6 | |
| | | 農村部 | 12 | 2 | 7 | 1 | | 11 | 6 | 4 | 1 | | 4 | 5 | 4 | 7 | 2 | 2 | 4 | 5 | 6 | 5 |
| 総合評価 | | 都市部 | 13 | 8 | 8 | 1 | | 4 | 14 | 9 | 3 | | 9 | 4 | 8 | 8 | 1 | 7 | 7 | 11 | 4 | 1 |
| | | 農村部 | 7 | 11 | 4 | | | 7 | 12 | 3 | | | 4 | 3 | 8 | 5 | 2 | 3 | 6 | 5 | 1 | 7 |

注　パネラー（都市部…30名，農村部…22名）

**表5**　食味テストの評点分布　その2

| 項目 | | 区分／部位／評点 | スモークドビーフ カンバ モモ肉 2 | 1 | 0 | -1 | -2 | ビーフジャーキー アカマツ モモ肉 2 | 1 | 0 | -1 | -2 | アカマツ 牛タン 2 | 1 | 0 | -1 | -2 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 肉色 | 外見 | | 14 | 2 | | | | | 1 | 11 | 13 | 6 | 2 | 6 | 4 | 3 | 1 |
| | 切口面 | | 11 | 4 | 1 | | | 3 | 11 | 13 | 4 | 1 | 2 | 3 | 8 | 3 | |
| 香味 | アロマ | | 4 | 5 | 4 | 1 | 1 | 8 | 10 | 9 | 4 | 1 | 3 | 5 | 8 | | |
| | フレーバー | | 6 | 3 | 5 | 1 | 1 | 5 | 15 | 6 | 5 | 1 | 3 | 5 | 5 | 3 | |
| 食感 | | | 12 | 4 | | | | 5 | 7 | 8 | 10 | 2 | 5 | 4 | 3 | 3 | 1 |
| 総合評価 | | | 10 | 4 | 1 | 1 | | 4 | 9 | 10 | 8 | 1 | 4 | 3 | 6 | 3 | |

注　アカマツのモモ肉については試作を2回実施し，2点についての合計である。

© The Ito Foundation

## 4. 要　旨

部分肉流通への移行にともない余剰部位の発生が懸念されるが，県産材を利用した燻煙加工により付加価値を高め，有利に販売するため，適当な燻煙材の検策をした。

ヤマザクラとオニグルミの差は，あまりなかった。

シラカンバは，香味がやや欠ける感があったが，外見等が良かった。

アカマツは，評価が好・悪別れたが，光沢と香味が良く，適度の苦味をもっており岩手の日本短角種と南部アカマツのイメージを持つ，個性豊かな地域特産品として商品化に直結できるものと認められた。

### 文　献

1) R.J. Winger：肉の風味の官能評価のためのパネリストの人選と訓練，16，661（1981）
2) 太田静行：くん製食品とくん煙材料，食品と化学，19（1），102（1977）

© The Ito Foundation

# ブタ筋肉組織中の多価不飽和脂肪酸組成の研究

Composition of Poly-unsaturated Fatty Acid in Pig Muscle

古泉 巖・鈴木嘉彦（麻布大学獣医学部）

Iwao Koizumi and Yoshihiko Suzuki (School of Veterinary Medicine, Azabu University)

It was presumed that composition of fatty acid in muscles of pig and cattle was changed by the feed (the amount of lipid, an additive and hormone in feed) and breeding environment. This studies showed that the composition of fatty acid in muscles depends on the breed.

Fatty acids in muscles of pigs Yorkshire, Touyuen and hybrid pigs between both breeds were fractionated by gas liquid chromatography after preparation of their methyl ester derivatives.

As the result, the poly-unsaturated fatty acid such as linoleic, arachidonic acid became higher content in order Touyuen, hybrid, Yorkshire breeds. In particular, Touyuen and hybrid breeds had a higher content of linolenic acid and eicosapentaenoic acid as compared with that of Yorkshire.

These results suggest that the muscular fatty acid constiuents seem to be hereditarily in part control.

In the cattle, a significant difference was observed in the fatty acids in muscle between the Japanese marbled beef and the imported beef from U.S.A. The Japanese marbled beef had less poly unsaturated fatty acid than the imported beef. The imported beef had a higher content including linoleic, linolenic and arachidonic acid. The Japanese marbled beef had a higher content of oleic, palmitic and stearic acid.

## 1. 目　的

戦後，牛豚肉の畜産食品の普及はめざましく，国民の栄養に貢献することが大であった。

近年は畜産の改良により，短期，少飼料肥育等の経済効率による肉生産を目的とする研究が進められ，品質管理が忘れられて脂肪過多の肉質となり，人体への高コレステロール血症等の障害の原因となって敬遠され，これに代り鶏肉，魚肉の需要が急増しつつある。

L. Tobian ら[7] は食塩による血圧増昇は，リノール酸によって抑制されると報告し，また，Hornster ら[6,4] は飽和脂肪酸であるミリスチン酸，パルミチン酸，ステアリン酸などは血流の血小板凝集を促進する。しかしリノール酸は，これによって起る動脈の血栓形成を著しく抑制すると報告している[1,6]。また，Lewis ら[2] は食餌中の飽和脂肪酸を摂取した場合，血中コレステロールのレベルが増大するが，不飽和脂肪酸，特にリノール酸を摂取すると，そのレベルが低下する等[6]，脂肪酸に関する多くの報告がある。また，この他に J. Dyerberg ら[8] は，グリーンランドのエスキモーは魚類を多く食べており，その脂質から $\omega_3$ 系列の $C_{20:5}$ エイコサペンタエン酸を摂取しているため，心筋硬塞が少いことを示唆し，PG（プロスタグランジン）や TX（トロンボキサン）の前駆体となるのは必須脂肪酸の中でもビスホモ $\gamma$-リノレン酸，アラキドン酸，エイコサペンタエン酸の3種であるが，量的に最も多く存在するアラキドン酸から $PGI_2$ や $TXA_2$ などの強力な活性物

© The Ito Foundation

質が生産される[3,9]。エイコサペンタエン酸から$PGI_3$, $TXA_3$がつくられ，$TXA_3$は$TXA_2$とは逆に血小板凝集を阻害することが知られた[9]。

Holmanら[1]はリノール酸，アラキドン酸等の$\omega_6$系の脂肪酸は$TXA_2$, $PGI_2$を生成し，血小板の凝集を起させ，血栓による心筋硬塞，脳溢血の原因となることを報告している[3]。

$\alpha$-リノレン酸，エイコサペンタエン酸等の$\omega_3$の脂肪酸からは$TXA_3$，$PGI_3$等を生成する。これらの物質は血小板の凝集を阻害し，動脈の血栓形成を著しく抑制して脳，心筋硬塞等の循環障害を防止するといわれている。トリエン（$\omega_6$系）テトラエン（$\omega_6$系）が0.6を越えた場合は必須脂肪酸の欠乏となるとの報告もある[8,11]。

古泉ら[5,12]は洋種ヨークシア豚，台湾在来種桃園種豚およびヨークシア種と桃園種豚による一代雑種豚等の3種類の筋肉組織中の脂肪酸を測定した結果，桃園種の脂質にはリノール酸，リノレン酸，アラキドン酸，エイコサペンタエン酸等の不飽和脂肪酸が多く，ヨークシア種にはパルミチン酸，オレイン酸，ステアリン酸等飽和および不飽和脂肪酸が多く含まれた。

一代雑種の筋肉中の脂肪酸組成は，桃園種に類似し高級不飽和脂肪酸量が増加したことが認識された。

今回は$\omega_3$系（リノレン酸，エイコサペンタエン酸系）$\omega_6$系（リノール酸，アラキドン酸）の脂肪酸を測定して牛肉（アメリカ輸入牛肉および国産霜降牛肉脂質）豚肉（ヨークシア種，桃園種，一代雑種豚肉脂質）等の脂質に検討を加えた。

動物の脂質は飼料による影響のみでなく，動物の品種遺伝，環境（日射，運動）等により組成に変化を生ずることもあると推察した。よって脂質改善の基礎研究として進める。

## 2. 方　法

### 2.1 実験材料

（1） 牛肉：アメリカ輸入牛肉，国産霜降和牛肉等，各牛の大腿筋300ｇを採取し冷凍保存する。

（2） 豚肉：ヨークシア種，台湾在来桃園種，ヨークシア種と桃園種交配の一代雑種等，各豚の大腿筋300ｇを採取し冷凍保存する。

### 2.2 飼　料

養豚飼料：生後1ヵ月間は育成飼料を給与する。その飼料配合は次のとおりである。

トウモロコシ：643.5ｇ，大豆粉：220.0ｇ，炭酸カルシウム：68.0ｇ，ニリン酸カルシウム：16.0ｇ，魚粉：40.0ｇ，油粕：25.0ｇ，塩：5.0ｇ，豚脂：10.0ｇ，硫酸銅：0.5ｇ，無機質：6.0ｇ，生後2ヵ月以後は，トウモロコシ：653.0ｇ，大豆粉：205.0ｇ，ふすま：60.0ｇ，炭酸カルシウム：7.0ｇ，ニリン酸カルシウム：15.0ｇ，魚粉：30.0ｇ，糖蜜：20.0ｇ，塩：5.0ｇ，その他で飼育した。

### 2.3 脂肪酸の分析法

（1） 粗脂肪の採集：ソックスレー法で実施する。

（2） ガスクロマト測定試料の作製[10]：**表1**に示したごとく，脂肪酸をメチルエステル化し，ガスクロマト法で分析し百分率の組成比で表示した。

**表1**　Cas chromatography procedures

Sample
↓
Extraction with chloroform-methanol
↓
Desication
↓
Methyl esterification
↓
Washing with water
↓
Dehydration by $Na_2SO_4$
↓
Evaporation in vacuo
↓
*GLC sample*

© The Ito Foundation

ガスクロマト法使用試料は**表1**に示されるとおり処理した。

（3） ガスクロマト分析条件[5,10]：ガスクロマト測定については**表2**に示した条件で測定した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 実験結果

（1） アメリカ輸入牛肉および国産霜降和牛肉脂質の比較：**表3**，**図1**に示される如く，霜降和牛肉脂質には，パルミチン酸，オレイン酸等の脂肪酸が多く，これに反して輸入牛肉脂質には飽和脂肪酸ではミリスチン酸，高級不飽和脂肪酸では，リノール酸，リノレン酸，アラキドン酸等が多い。飽和，不飽和脂肪酸組成は**表3**に示される如く，霜降和牛脂質は不飽和脂肪酸61.7%，飽和脂肪酸38.1%を示し，輸入牛肉脂質では不飽和脂肪酸59.3%，飽和脂肪酸40.7%等の数値が示された。

霜降牛肉ではオレイン酸量の含有が多く，輸入牛肉脂質はリノール酸，リノレン酸，アラキドン酸等は霜降牛肉の約2倍量含み，エイコサペンタエン酸も約1.3倍量含んでいた。

$\omega_6$系の高級不飽和脂肪酸を比較すると，輸入牛肉は霜降牛肉の約3倍量含有し，$\omega_3$系の脂肪酸についても$\omega_6$系と同様，約4倍量の含有率を示した。輸入牛肉脂質は高級不飽和脂肪酸が多い。

（2） ヨークシア種，桃園種，および1代雑種の肉組織脂肪酸の比較：同一飼料で飼育した，ヨークシア，桃園，一代雑種豚の脂肪酸組成の比較は**表3**，**図2**に示される如くである。ヨークシア種はパルミチン酸，ステアリン酸，オレイン酸等の脂肪酸が多く，桃園種はミリスチン酸，リノール酸，リノレン酸，アラキドン酸が多い。

一代雑種はミリスチン酸が高く，パルミチン酸，パルミトレイン酸等はヨークシア種の組成を示し，リノール酸，リノレン酸，アラキドン酸量の高率含量は桃園種の性質を遺伝した。このように品種差により脂肪酸組成に変動が見られた。

### 3.2 考　察

人の血液中のコレステロールの増加は，循環器障害をもたらすことは勿論であるが，血小板の凝

表2　Oprating condihion of gas-chromatography

| | |
|---|---|
| Model　GC-7A | Carrier Gas $N_2$ |
| Sample　4$\mu l$ | Flow rate　50 m$l$ /min |
| Solvent　p-ether | Inlet press　6 kg/cm² |
| Colume　L. 2m ID 4mm | $H_2$　0.7kg/cm² |
| temp.　195℃ | Air　1.0kg/cm² |
| packing | |
| Diethylene glycol succinate | |
| wt%　15% | Range　32 mV |
| Support celite 545A | Sensitivity　$10^2$ |
| mesh　60～80 | Dector temp.　300℃ |
| Detector　F. I. D. | Injection temp.　300℃ |
| Chart speed　10mm/min | |

表3　Fatty acid composition of muscle from various animals

| | | 14:0 | 16:0 | 16:1 | 18:0 | 18:1 | 18:2 | 18:3 | 20:4 | 20:5 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Marbled | $\bar{X}$ | 3.05 | 24.30 | 5.04 | 9.05 | 44.88 | 3.71 | 0.78 | 1.39 | 0.60 |
| beef | S. E | 0.88 | 3.37 | 1.67 | 2.20 | 4.87 | 1.37 | 0.99 | 1.79 | 0.99 |
| Imported | $\bar{X}$ | 7.26 | 19.24 | 5.76 | 9.33 | 32.53 | 9.49 | 1.70 | 2.86 | 0.98 |
| beef (U.S.A) | S. E | 0.32 | 0.43 | 0.16 | 0.35 | 1.17 | 0.58 | 0.15 | 0.28 | 0.18 |
| Yorkshire | $\bar{X}$ | 1.60 | 24.10 | 4.50 | 12.30 | 47.40 | 8.30 | - | 1.10 | - |
| | S. E | 0.20 | 0.80 | 0.30 | 0.50 | 1.50 | 0.90 | - | 0.20 | - |
| Touyuen | $\bar{X}$ | 2.10 | 19.40 | 3.00 | 7.40 | 29.60 | 29.60 | 1.80 | 6.40 | 0.70 |
| | S. E | 0.30 | 0.20 | 0.10 | 0.70 | 1.40 | 1.20 | 0.10 | 0.80 | 0.20 |
| Crossbreed | $\bar{X}$ | 2.60 | 23.10 | 4.90 | 7.50 | 38.30 | 19.00 | 0.50 | 3.50 | 0.30 |
| (Touyuen) | S. E | 0.30 | 0.70 | 0.20 | 0.60 | 0.80 | 0.40 | 0.10 | 0.10 | 0.10 |

Mean ± S. E (%)

© The Ito Foundation

集により血栓をつくり脳，心筋硬塞等を起すことの影響が脂質にあることは疑うまでもない[8,9]。例えば高級不飽和脂肪酸のリノール酸が血中コレステロールのレベルを低下させ[2]，また食塩による血圧上昇を抑制し[7]，さらに心筋収縮機能に作用し良好なる結果を示した。飽和脂肪酸ミリスチン酸，パルミチン酸，ステアリン酸などは血流の血小板の凝集を促進し血行障害を起す[6]が，リノール酸は動脈の血栓形成を著しく抑制する[2]等々，脂肪酸にかゝわる多くの生理機能障害が発表されている。

牛，豚等の食肉中の脂肪酸を検討した結果，牛豚肉の食肉脂質に共通点があることが示される。例えば霜降和牛肉脂質とヨークシア種豚肉脂質は，パルミチン酸，パルミトレイン酸，オレイン酸量が多く総脂肪酸の約70%を占める。また，これら

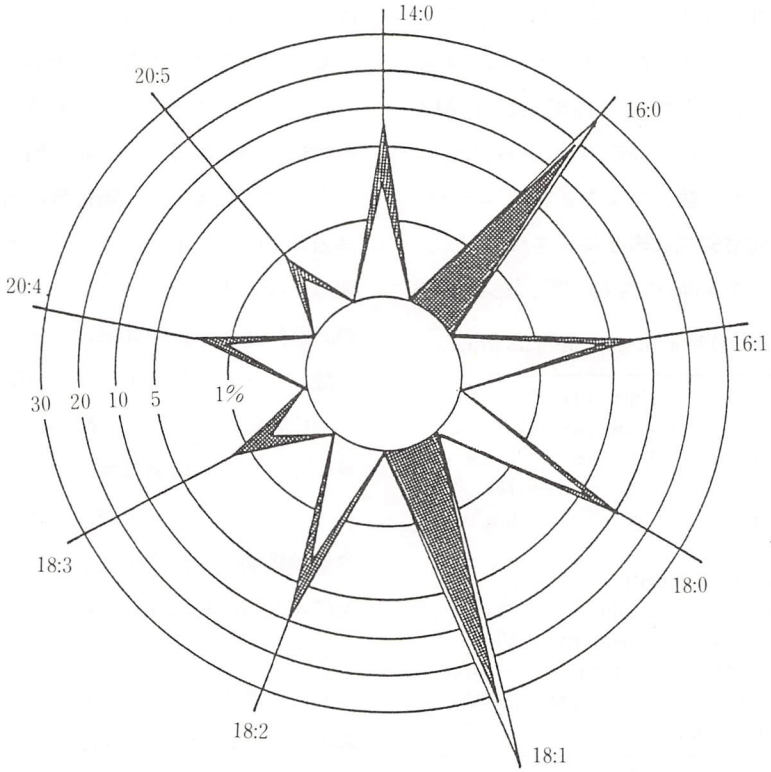
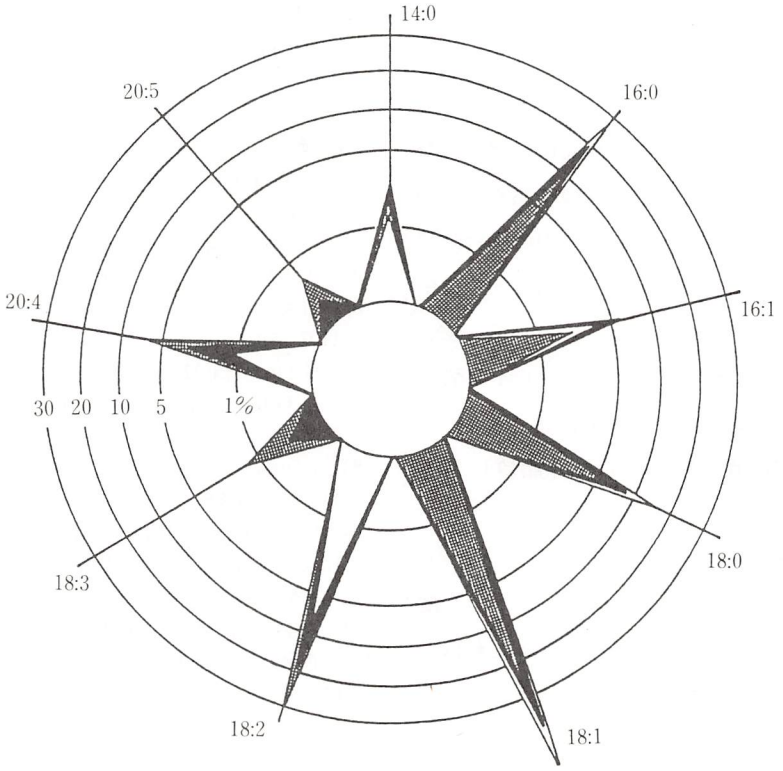



**図1**　Fatty acid composition in the muscles of the beef cattle

© The Ito Foundation

の食肉脂肪にはリノール酸，リノレン酸，アラキドン酸，エイコサペンタエン酸が極度に微量であるかまたは含有しない。これに反して輸入牛肉脂質，桃園種豚肉脂質はミリスチン酸，リノール酸，リノレン酸，アラキドン酸，エイコサペンタエン酸量が比較的多く，特にリノール酸量が多くパルミチン酸，ステアリン酸，オレイン酸が少い。この原因は，肉の生産効率を上げるための品種改良と肥育生産により動物の体脂質は中性脂肪が過多となり，パルミチン酸，ステアリン酸，オレイン酸が増え，これが人体の血小板凝固促進の原因やコレステロールの増加となる。野性飼育，野性品種改良は生体内脂肪が高級不飽和脂肪酸に変わり，例えばリノール酸，リノレン酸，アラキドン酸，



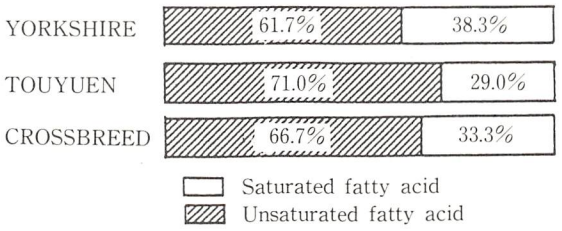




**図2**　Fatty acid composition in the muscles of the pigs

© The Ito Foundation

エイコサペンタエン酸量の多い脂質となって人体に対する影響も良好である。$\omega_3$ 系，$\omega_6$ 系の比も[11] 野性動物はバランス良く，人の健康に役立つ。

## 4. 要　約

牛豚肉が食肉として敬遠される原因はコレステロール過多となり人の循環器障害による疾病にあるとされている。

この原因として人工的に人間の嗜好や経済性を追求することにより，動物の体脂質に変化を示した。霜降牛肉は嗜好性を追求し品種や飼養方法の改善が実施された。ヨークシア種は肉の生産効率を主に品種と飼育に改良が加えられ両者ともに中性脂肪の多い筋肉となった[5,12]。パルミチン酸，ステアリン酸等の飽和脂質，パルミトレイン酸，オレイン酸等の不飽和度の低い脂肪酸が増え，いずれも高級不飽和脂肪酸の低い生体脂質に変じた[5,12]。

輸入牛肉，桃園種豚はともに，リノール酸，リノレン酸，アラキドン酸，エイコサペンタエン酸等不飽和脂肪酸の多い組織脂肪であり，これは必ずしも飼料による影響のみではないことが証明された。現代の畜産は品種的に再度野性に戻す必要を強調する。

品種の改良による脂質の改善は，ヨークシア種に桃園種を交配させた1代雑種豚等，品種を変えることにより動物の体脂質も改善することが可能であることを示唆できた[5,10,12]。

人体に悪影響を与えない健康動物の食肉の生産には良好な品種は勿論のこと，適当なる運動，環境等の影響も考慮して生産する必要がある。

### 文　献

1) R. T. Holman J. Mutr., 70, 405 (1960)
2) B. Lewis, Clin., Sci., 20, 249 (1961)
3) H. J. Thomasson, Natr. Rew. 27, 67 (1969)
4) A. I. Fleis, J. Nutr., 105, 1286 (1975)
5) 古泉，鈴木，山口，荘：獣医畜産新報，65, 1102-1107 (1975)
6) G. Hornsra, Hamostasis, 2, 21 (1976)
7) L. Tobian, M. Odonell, FED, Proc., 35, 2388 (1976)
8) J. Dyerberg, H. O. Bang, S. Moncada, Lancet Ⅱ, 117-119 (1978)
9) W. C. Chang, S. Murota., J. Nakao., H. Orimo., Biochem, Biophys. ACTA, 620, 159-166 (1980)
10) 古泉，鈴木，J. C. B. L. 29, 181-184 (1987)
11) 森本，堀，奥山，J. C. B. L. 29, 417-420 (1987)
12) 古泉，鈴木，荘，Vitamin (Japan) 62 (3) 139-143 (1988)

© The Ito Foundation

# 骨格筋組織の高度不飽和脂肪酸／α-トコフェロールモル比と肉質との関連に関する研究

A Molar Ratio of Polyunsaturated Fatty Acids to α-Tocopherol in Skeletal Muscular Tissue and Its Relationship to Meat Quality

山内　清・村田　寿（宮崎大学農学部）

Kiyoshi Yamauchi and Hisashi Murata (Faculty of Agriculture, Miyazaki University)

The present study was carried out with pigs fed a commercial-type ration supplemented with dl-α-tocopheryl acetate (ATA) (0, 50, 100, 250 and 500 mg/kg of feed) for two months prior to the slaughter at which time the live weight of pigs was 105 kg. Whole muscle and mitochondrion-microsome (MT-MC) fraction from their *longissimus thoracis muscle* were analyzed for the molar ratios of polyunsaturated fatty acids (PUFA or PUFA＞18：2) to α-tocopherol (α-Toc) including analyses for α-Toc contents of the inner layer of backfat and liver.

The oral administaration of ATA lowered the molar ratios of PUFA-or PUFA＞18：2-to-α-Toc of the whole muscle and MT-MC fraction and enhanced the α-Toc contents of the backfat and liver, resulting in the high resistance of the skeletal muscle to lipid peroxidation as measured by 2-thiobarbituric acid (TBA) value. TBA value of the unheated muscle which was refrigerated decreased with decreasing molar ratios of PUFA-or PUFA＞18：2-to-α-Toc with its TBA value being kept less than 0.1 over 5-day storage at 0℃ when fed the diet supplemented with ATA of 250 mg/kg, in whick the resulting molar ratios of PUFA＞18：2-to-α-Toc for the whole muscle and MT-MC fraction were 155 and 165, resdectively. However, it was difficult to prevent the heated muscle from the lipid peroxidation even when fed the diet supplemented with 500 mg of ATA/kg of feed.

## 1. 目　的

食肉の脂質過酸化の進行は，冷凍貯蔵中の品質劣化の要因の一つである[1]。また，食品の過酸化脂質とその酸化分解生成物が各種疾病との関連で浮き彫りになるにつれて，食品の過酸化脂質生成の抑制が重要な研究課題の一つとなっている[2]。われわれは，さきに，鶏肉の脂質過酸化の抑制が，酢酸 *dl*-α-トコフェロール（以下 ATA と略記）添加飼料の給与を通して，骨格筋組織とその細胞内顆粒膜の高度不飽和脂肪酸/α-トコフェロール（以下 PUFA/α-Toc と略記）のモル比を一定値以下に維持できれば可能となることを明らかにしてきた[3]。

本研究では，肉豚を用いて，ATA 添加水準が異なる飼料を給与し，骨格筋組織とその細胞内顆粒（ミトコンドリア・ミクロソーム）の PUFA/α-Toc または PUFA＞18：2（二重結合を3個またはそれ以上有する PUFA)/α-Toc のモル比値と冷蔵生肉および加熱肉の過酸化脂質生成量（2-チオバルビツール酸値：TBA 値）との関係を明確にすることを目的とした。併せて背脂肪および肝臓のα- Toc の蓄積量を調べた。

© The Ito Foundation

## 2. 方　法

### 2.1 供試豚とATA投与水準

供試豚は，約4ヵ月齢の肉豚（LWD）を各区10頭ずつ用いて，5水準（0，50，100，250，500 ppm）のATA添加配合飼料（約3.0kg／日／頭）を生体重約105kgまで2ヵ月間給与後，各区3頭（♀）ずつと殺解体し，それぞれの胸最長筋（*M. Longissimus thoracis*），背脂肪（内層），肝臓を採取し，直ちに分析に供した。

### 2.2 分析方法

胸最長筋からのミトコンドリア・ミクロソーム（以下MT・MCと略記）画分の調製，脂質の抽出・定量，PUFAおよびPUFA＞18：2の定量並びにα-Tocの定量は，さきの山内らの方法[3]に準じて行った。また，豚肉（胸最長筋）は挽き肉とし，あらかじめ滅菌した綿栓付試験管（100 m*l*容）に約30ｇずつ詰め，その生肉と70℃，1時間の加熱処理を施した加熱肉を，それぞれ0℃と4℃で貯蔵し，処理直後，3日目，5日目のTBA値を測定した。TBA値は，さきの山内らの方法[3]に準じて測定した。

## 3. 結果と考察

今回供試した肉豚用配合飼料には，約10ppmのα-Tocを含有していた。この飼料にATAを0，50，100，250，500ppm添加し，2ヵ月間給与した肉豚（♀）の胸最長筋とMT・MC画分，背脂肪（内層）および肝臓のα-Toc含量は，**表1**に示すように，ATA添加量の増大に伴って増加した。胸最長筋の全筋とMT・MC画分の場合，250ppm区と500ppm区との間に，そのα-Toc含量にほとんど差異がなかった。このことは，ATA添加量が高水準の場合，組織へのα-Tocの蓄積効率が顕著に低下することを意味した。Tsaiら[4]も，肉豚を用いて，生体重9～20kgから91kgまでATA添加飼料を給与し，ATA添加水準が50，100，200 ppmと増大するに伴って，皮下脂肪，腎臓脂肪，上腕三頭筋の各組織のα-Toc含量の増加を認めたが，ATA添加水準が200 ppmのとき，α-Tocの組織への蓄積効率が低下する傾向にあったことを報告している。今回のＡＴＡ無添加区の胸最長筋（57.8μｇ/100ｇ）並びにMT・MC画分（38.7 μｇ/ｇ protein）のα-Toc含量は，山内らの豚肉（胸最長筋，51.0～149.5μｇ）[5]とそのミトコンドリア画分（35μｇ）[6]の値に近似していた。

胸最長筋とMT・MC画分のPUFA/α-Toc（またはPUFA＞18：2/α-Toc）のモル比の値は，**表2**に示すとおりであった。ATA添加水準の増大に伴って，胸最長筋とMT・MC画分のPUFA/α-Toc（またはPUFA＞18：2/α-Toc）のモル比の値は250ppm添加水準まで顕著に低下した。これらモル比値の低下，さらには前述したα-Toc含量の増加（**表1**）は，**表3**に示すよう

**表1**　酢酸*dℓ*－α－トコフェロール（ＡＴＡ）投与肉豚の各種組織のα－トコフェロール含量（μｇ/100ｇ）

| 組　織 | ＡＴＡ (ppm) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 50 | 100 | 250 | 500 |
| 胸最長筋 | | | | | |
| 全　筋 | 57.8 | 214.2 | 350.7 | 592.8 | 609.2 |
| MT・MC画分[a] | 38.7[b] | 104.1 | 153.8 | 285.6 | 293.4 |
| 肝　臓 | 364 | 708 | 1,718 | 2,899 | 3,431 |
| 背脂肪（内層） | 341 | 1,312 | 1,795 | 2,288 | 2,694 |

[a] ミトコンドリア・ミクロソーム画分．　[b] μｇ/ｇ protein.

© The Ito Foundation

に，冷蔵生肉および加熱肉のTBA値の減少に反映した。ATA 250ppm添加区の場合，胸最長筋のα-Toc含量は約590μg/100gを与え，冷蔵5日間に亘って，その生肉のTBA値は0.1未満に維持され，このことは冷蔵生肉の脂質過酸化の進行がほぼ完全に抑制されたことを示唆した。また，今回の処理直後の生肉のTBA値の結果は，高水準のATA添加が，生体内の脂質過酸化の進行を抑制していることを示唆した。

一般に，生肉に比較して，加熱肉の脂質過酸化が促進されることがよく知られている[1,7]が，**表3**に示すように，加熱肉でも加熱直後の場合，ATA添加水準が増大し，そのα-Toc含量が高く，またPUFA/α-Toc（またはPUFA＞18：2/α-Toc）のモル比が低い筋肉では，TBA値は顕著に低いレベルに維持され，脂質過酸化の進行が抑制されたことを意味した。しかし，冷蔵中，加熱肉の脂質過酸化は，生肉に比較して顕著に促進され，加熱肉ではα-Tocの抗酸化作用が低下した。この要因の一つは，加熱肉における非ヘム鉄含量の増加による脂質過酸化促進[8]に起因するものと推測できる。

Tsaiら[4]は，ATA添加飼料給与豚の場合，約4.0μg/g筋肉組織のα-Toc含量を与えた100ppm添加水準が，冷蔵（0℃，9日間）ひき肉のTBA値（約0.50～0.60）から推定して最適に近い値であったと報告している。また，Buckley & Connolly[9]は，肉豚に殺前7日間ビタミンE（800mg／日／頭）を給与し，TBA値で測定された過酸化脂質量が冷蔵肉（5℃，10日間）にお

**表2**　酢酸dℓ－α－トコフェロール（ATA）投与肉豚の胸最長筋の全筋とミトコンドリア・ミクロソーム（MT・MC）画分の高度不飽和脂肪酸/α－トコフェロールのモル比[1)]

| 項　　目 | ATA (ppm) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 50 | 100 | 250 | 500 |
| 全　筋 | | | | | |
| PUFA/α-Toc | 6,206 | 1,836 | 1,267 | 560 | 559 |
| PUFA〉18:2/α-Toc | 1,788 | 693 | 492 | 155 | 149 |
| MT・MC画分 | | | | | |
| PUFA/α-Toc | 2,366 | 1,104 | 796 | 411 | 382 |
| PUFA〉18:2/α-Toc | 948 | 522 | 360 | 165 | 138 |

1) PUFAは高度不飽和脂肪酸．PUFA〉18:2は二重結合を3個またはそれ以上有するPUFA．またα-Tocはα－トコフェロールを意味する。

**表3**　酢酸dℓ－α－トコフェロール（ATA）投与肉豚の冷蔵肉（生肉および加熱肉）の2－チオバルビツール酸（TBA）値

| 冷蔵期間（日） | ATA (ppm) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 50 | 100 | 250 | 500 |
| 生　肉（0℃） | | | | | |
| 0 | 0.65 | 0.16 | 0.12 | 0.07 | 0.04 |
| 3 | 1.44 | 0.58 | 0.16 | 0.09 | 0.07 |
| 5 | 2.00 | 0.74 | 0.23 | 0.08 | 0.07 |
| 加熱肉（4℃） | | | | | |
| 0 | 0.78 | 0.33 | 0.18 | 0.08 | 0.06 |
| 3 | 3.11 | 2.96 | 2.67 | 1.14 | 1.15 |
| 5 | 4.54 | 3.48 | 3.43 | 2.16 | 1.61 |

© The Ito Foundation

いて有意に抑制されたことを認めた。最近，Buckley ら[10]は，α-Toc 200ppm 添加飼料を肉豚（3ヵ月齢，生体重40kg）に10週間給与後，半腱様筋のミトコンドリアとミクロソームを用いて，メトミオグロビン／過酸化水素触媒脂質過酸化が有意に抑制されることを明らかにし，これら細胞内顆粒膜構造へのα-Toc の蓄積が筋肉組織の脂質過酸化の抑制に重要な要因となることを示唆した。しかしながら，Buckley & Connolly[9]および Buckley ら[10]の報告では，筋肉組織および細胞内顆粒のα-Toc 含量が測定されていない。さらに，彼ら[9,10]を含め Tsai ら[4]は，PUFA（または PUFA＞18：2）とα-Toc の量的関係と脂質過酸化の進行との関連について言及していない。

さきに，Yamauchi ら[11]は，冷蔵豚肉の TBA 値がα-Toc 濃度（μmol/g PUFA or PUFA＞18：2）に関係し，高いα-Toc 濃度の豚肉では低い TBA 値を与えたことを明らかにした。Kornbrust & Mavis[12]は，ウサギおよびラットの各種組織のミクロソームを用いて，ミクロソームの PUFA ＞18：2/α-Toc のモル比値が約 220 のとき，アスコルビン酸/$Fe^{2+}$ 触媒脂質過酸化が完全に抑制されることを示唆した。また山内らの肉専用鶏の結果[3]によれば，浅胸筋と MT・MC 画分の PUFA ＞18：2/α-Toc のモル比値が，それぞれ190と135のとき，冷蔵生肉の脂質過酸化の進行が完全に抑制された。今回の肉豚の場合も，胸最長筋と MT・MC 画分の PUFA ＞18：2/α-Toc のモル比値がそれぞれ約 160 以下（**表2**）のとき，冷蔵生肉の TBA 値は 0.1 未満（**表3**）に維持され，脂質過酸化がほぼ完全に抑制されたことを意味した。

骨格筋組織において，PUFA（または PUFA＞18：2）は膜構成極性脂質に高濃度に含有され，また膜脂質が脂質過酸化の主要な基質となる[1,7]ことを考えると，ATA 添加飼料の給与を通して，骨格筋のミトコンドリアやミクロソームの膜構造に高濃度のα-Toc を蓄積し，PUFA（または PUFA＞18：2)/α-Toc のモル比をある一定値以下に維持することが脂質過酸化に安定な豚肉の生産に結びつくことを，今回の結果は示した。

## 4. 要　約

肉豚（LWD，約4ヵ月齢，♀）に5水準（0，50，100，250，500ppm）の ATA 添加飼料を2ヵ月間給与し，胸最長筋と MT・MC 画分のα-Toc，PUFA（または PUFA＞18：2）の含量を測定し，冷蔵生肉および加熱肉の TBA 値と PUFA/α-Toc（または PUFA＞18：2/α-Toc）のモル比値との関係を検討した。ATA の投与は，胸最長筋と MT・MC 画分へのα-Toc の蓄積量を増大させ，また，冷蔵生肉および加熱肉の TBA 値を低下させた。ATA 250ppm 区と 500ppm 区では，胸最長筋と MT・MC 画分の PUFA＞18：2/α-Toc のモル比値は約 160 以下を与え，冷蔵生肉の脂質過酸化がほぼ完全に抑制された。

### 文　献

1) Pearson, A.M., Love, J.D. and Shorland, F.B.: Advances in Food Research, **23**, 1-74 (1977).
2) 寺尾純二：油化学，**37**，878-884 (1988).
3) 山内　清，村田　寿，片山英美：(財)伊藤記念財団昭和63年度食肉に関する助成研究調査成果報告書，**7**，293-297 (1989).
4) Tsai, T.C., Wellington, G.H. and Pond, W.G.: J. Food Sci., **43**, 193-196 (1978).
5) 山内　清，知念健次，大橋登美男：日畜会報，**48**，458-462 (1977).
6) 山内　清，知念健次，大橋登美男：栄養と食糧，**31**，102-104 (1978).
7) 山内　清：肉の科学，**28**，165-174 (1987).
8) Igene, J.O., Yamauchi, K., Pearson, A.M., Gray, J.I. and Aust, S.D.: Food Chem., **18**, 1-18 (1985).
9) Buckley, J. and Connolly, J.F.: J. Food Prot., **43**, 265-267 (1980).
10) Buckley, D.J., Gray, J.I., Asghar, A., Price, J.F., Crackel, R.L., Booren, A.M., Pearson, A.M. and Miller, E.R.: J. Food Sci., **54**, 1193-1197 (1989).

© The Ito Foundation

11) Yamauchi, K., Nagai, Y. and Ohashi, T.: Agric. Biol. Chem., **44**, 1061-1067 (1980).

12) Kornbrust, D.J. and Mavis, R.D.: Lipids, **15**, 315-322 (1980).

© The Ito Foundation

# ホットプレート加熱による油脂の劣化とその防止について

Deterioration and its Prevention of Fats and Oils during Hot Plate Heating

広井 勝・金田尚志（郡山女子大学家政学部）

Masaru Hiroi and Takashi Kaneda (Faculty of Home Economics, Koriyama Women's College)

To investigate the deterioration of fats and oils by hot plate heating, several experiments were carried out.

Lard (2 g) and/or vegetable oils (2 g) kept in a beaker (500 m*l*) were heated using hot plate for 5 and 10 min at 200℃. Lard, corn oil and repeseed oil with or without silicone oil (5 ppm) were also heated using a same way. In another experiment, lard (2 g) was heated for 10 min, then meat and cabbage were fried with this lard for 2 min.

The degree of deterioration of the heated oils and fats was estimated POV, COV, AV and absorption of UV.

The results obtained were as follows;

1. POV and COV of heated lard were much higher than those of vegetable oils used as contorol.
2. Addition of silicone oil (5ppm) could suppress the deterioration of heatead fats and oils.
3. To prevent the deterioration of heating lard, a mixture of tocopherols (0.1%) and silicone oil (5 ppm) were added to lard. The results indicated that lard added both tochopherols and silicone oil showed better effect than adding them separately.
4. When meat and cabbage were fried with heated lard, the degree of deterioration of remaining oils in beaker was worse than those of oils sticked to frying materials. Sticking oil of fried cabbage was more deteriorated than that of meat. In the case of meat, original frying oil was probably diluted by the fats which were eluted from meat.

## 1. 目　的

炒め物に用いる程度の少量の油脂をフライパンやホットプレート上で加熱すると，短時間の加熱でも油脂が著しく劣化することが知られている[1,2]。この場合，大豆油やコーン油に比べラードの方が過酸化物やその分解物である二次生成物の生成が多いことが明らかになってきている[3~5]。ラードは飽和酸に富むにもかかわらず，熱安定性が悪いので，ラードの加熱劣化防止について検討した。

ラードが植物油に比べ劣化しやすい理由の1つはラードにはトコフェロールがほとんど含まれていないこと，また市販の大豆油やコーン油には通常シリコーン油が添加されており[6]，これが加熱安定性に役立っていることなどが考えられる。

本研究は家庭での鉄板焼調理を想定し，家庭用ホットプレート上で油脂を加熱し，ラードと植物油の劣化度の比較を行い，さらにラードの加熱劣化防止に対するトコフェロールとシリコーン油の効果を検討した。また実際に肉や野菜を炒めた場合の材料付着油脂の性状についても検討した。

© The Ito Foundation

## 2. 実験材料および方法

### 2.1 実験に用いた油脂

精製ラード（以下ラード）は日本油脂ＫＫ製のもの。シリコーン油添加ラード（以下シリ・ラード）は日本油脂ＫＫ製のラードに信越化学工業ＫＫ製のオイル型ＫＦ96のシリコーン油（粘度100 cstのもの）を5ppm添加した。トコフェロール添加ラード（以下トコ・ラード）は同じく日本油脂ＫＫ製のもので0.1％のミックストコフェロール（エーザイＫＫ製）を添加したものである。また鉄板焼専用オイルデリシイ（以下デリシイ）とナタネサラダ油，中華炒め油はホーネンコーポレーションＫＫ製のもの，コーンサラダ油と純正ゴマ油は味の素ＫＫ製のものである。市販のナタネサラダ油，コーンサラダ油にはあらかじめ消泡剤としてシリコーン油が添加されているので，シリコーン油の効果をみるためには別にシリコーン油無添加のナタネ油，コーン油を上記会社より入手し，これにラードに添加したと同様のタイプのシリコーン油を5ppm添加して用いた。

### 2.2 各油脂の加熱試験

油脂の劣化状態を比較するために用いた家庭用ホットプレートは東芝ホットプレートHGT-154 1200W）で表面がフッ素樹脂加工されたものである。油脂の加熱試験は2ｇの油脂を500m*l*容ビーカー（柴田科学製ハリオ）にとり，ホットプレート上で最高温度目盛200℃で5または10分加熱した。肉やキャベツを炒めた時の油脂の劣化状態を比較するためには，2ｇのラードを500m*l*容ビーカーにとり，ホットプレート（200℃）上で10分加熱したのち，うす切りの豚肉，牛肉，ラムおよび千切りキャベツ20ｇをそれぞれ2分間炒め，材料付着油およびビーカーに残った残油をエチルエーテル100m*l*に溶解し回収した。ビーカーおよび材料に付着した油脂はさらにエーテルで数回洗いろ過後，脱水し，ロータリーエバポレーターでエーテルを除去して試料油とした。

### 2.3 分析方法

油脂の劣化度の測定には過酸化物価（POV），カルボニル価（COV），共役ジエン含量（UV吸収），酸価（AV）を用いた。過酸化物価，酸価は基準油脂分析法[7]，カルボニル価は態沢ら[8]の方法に準じて行った。共役ジエン含量は油脂をシクロヘキサン（スペクトル用特製試薬，半井化学）に溶かし，1mg/m*l*の濃度溶液とし，233nmの吸光度を測定し，この値を共役ジエン含量として示した[9]。新鮮油脂および加熱油脂の脂肪酸組成は塩酸メタノールでメチル化し，ガスクロマトグラフィーにより分析した。ガスクロマトグラフィーの条件はDiasolid ZFを充てん剤とし，内径3mm，長さ2ｍのガラスカラムを使用し，カラム温度208℃でFID検出器を用いて分析した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 市販各油脂の劣化度の比較

市販各油脂2ｇを500m*l*容ビーカーにとりホットプレート（200℃）上で加熱した時の油脂の劣化度を**表1**に示した。ラード，コーン油，ナタネ油，中華炒め油は5分，10分加熱でPOV，COVがともに高い値を示した。特にラードは他の3種の油脂に比べ高値を示した。一方，ゴマ油，デリシイのPOVは5分，10分加熱とも他の4種の油脂に比べ低い値を示した。COVについてはデリシイが他の油脂に比べ著しく低い値を示したが，ゴマ油のCOVは他の油脂に比べ若干低い程度であった。UV吸収はPOV，COVと類似の挙動を示しているので，油脂の劣化度の判定手段として有効と考えられるが，油脂の種類により数値が異なるので，同一種の油脂についてのみ比較する必要がある。

200℃前後の加熱の場合フライ油ではPOVは

© The Ito Foundation

30を越えることはなく，高温で加熱すると過酸化物は不安定なため分解してしまうとされている。しかし薄膜加熱の場合にはPOV，COVともラード，コーン油，ナタネ油などでは高い値を示している。これについてはUsukiら[10]も大豆油をフライパン上で180℃で加熱した実験で同様の現象を認めている。ここで生成する過酸化物は特に熱に安定なものでなく，過酸化物の生成が分解を上まわる結果であるとしている。この現象は200℃前後の加熱に特有の現象で，加熱温度を300℃とした場合には過酸化物の分解が生成を上まわり，POVは低い値を示していた[5]。フライ加熱の場合ゴマ油は植物油の中では最も安定性のよい油とされている[11]。薄膜加熱の場合でもゴマ油のPOVは低い値を示しているが，COVはその割に低くないことを考えると，その安定性はフライ加熱とはいくぶん異なる可能性も考えられた。デリシイは鉄板焼専用油（はねない油）として市販されているもので，コーン油にゴマ油とレシチンが添加されているが，油脂の劣化防止効果も顕著であった。これに対して中華炒め油はナタネ油を主体とし，これに落花生油，ゴマ油，しょうがエキス，ねぎエキスなどを加えた油だが，劣化状態はナタネ油と類似していた。

本実験の結果からもラードは他の植物油に比べ劣化しやすいことが再認された。そこで次にラードの薄膜加熱における劣化防止について検討した。

3.2　シリコーン油の加熱油脂劣化防止効果

現在市販のサラダ油（コーン油，ナタネ油など）には消泡剤としてシリコーン油が2～4ppm程度添加されており，シリコーン油は消泡効果とともに加熱油脂の劣化防止機能を有することが知られている[6]。しかしシリコーン油の効果を薄膜加熱で調べた報告は太田ら[12]，山崎[13]の報告があるにすぎない。そこでシリコーン油を含まないラード，コーン油，ナタネ油にシリコーン油を5ppm添加し，先の実験と同様の方法で劣化度を比較した。その結果**表2**に示すようにいずれの油脂でもシリコーン油添加により加熱油脂劣化の抑制がみられた。しかしこの場合でもラードはコーン油に比べ加熱安定性が劣る結果となった。また薄膜時のシリコーン油の効果は油層の十分ある場合のフライ油と比較し低いように思われるが，この点については現在検討中である。

3.3　トコフェロール，シリコーン油のラードに対する加熱劣化防止効果

先の実験でシリコーン油を添加した場合でもラードはコーン油に比べ加熱安定性の劣ることが確

**表1**　市販各油脂の5分・10分加熱における劣化度の比較

| | POV | | COV | | ABS of UV(233nm) | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 油脂の種類 | 5分 | 10分 | 5分 | 10分 | 5分 | 10分 |
| ラード | 72 | 126 | 56 | 120 | 0.731 | 0.997 |
| コーン油 | 50 | 75 | 49 | 118 | 0.824 | 1.856 |
| ナタネ油 | 55 | 84 | 67 | 129 | 0.815 | 1.607 |
| ゴマ油 | 18 | 35 | 40 | 103 | 1.011 | 1.491 |
| デリシイ | 15 | 31 | 15 | 30 | 0.422 | 0.655 |
| 中華炒め油 | 47 | 83 | 54 | 115 | 0.745 | 1.390 |

条件：各油脂2gを500ml/ビーカーにとりホットプレート（200℃）上で加熱，ラードは日本油脂KK製，コーン油，ゴマ油は味の素KK製，ナタネ油，デリシイ中華炒め油はホーネンコーポレーションKK製を使用

© The Ito Foundation

かめられたが，これはラードにはトコフェロールがほとんど含まれていないことが影響していると考えられたので，ラードにトコフェロール，シリコーン油を単独または混合添加し，劣化度の比較を行った。シリコーン油は5ppm,トコフェロールは0.1％添加した。その結果**表3**に示すように5分加熱まではトコフェロールのみの添加でPOV, COV, UV吸収の上昇抑制にかなり効果が認められたが，10分加熱ではトコフェロールのみの効果は小さく，むしろシリコーン油の効果が大であった。それに対してシリコーン油，トコフェロールの混合添加は10分加熱でも効果が大で，先の実験のシリコーン油添加コーン油とほぼ同様の結果が得られた。

脂肪酸組成の分析（**表4**）でもシリコーン油，トコフェロール混合添加でリノール酸（18：2）の分解が抑制されていることが認められた。

しかしシリコーン油とトコフェロールを混合添加してもデリシイほどの効果は認められず，デリシイと同様の効果を期待するにはさらにレシチンの添加が必要と考えられ，レシチンの添加量については現在引続き検討中である。

3.4　肉およびキャベツを炒めた時の油脂の性状

家庭での鉄板焼ではホットプレート上で油脂が比較的長時間加熱されることが多いと考え，実験方法に記したようにラードをあらかじめ10分間加熱した後，そこに材料を入れ2分間炒め，材料付着油脂およびビーカーに残った油脂の性状を調べた。

その結果**表5**に示したようにいずれの材料でも付着油脂に比べ残油のPOV, COV, AVは高い値

**表2**　加熱油脂劣化防止に対するシリコーン油の効果

| | POV | | COV | | ABS of UV(233nm) | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 油脂の種類 | 5分 | 10分 | 5分 | 10分 | 5分 | 10分 |
| ラード | 76 | 129 | 59 | 124 | 0.678 | 0.933 |
| シリ・ラード | 44 | 74 | 37 | 70 | 0.576 | 0.768 |
| コーン | 61 | 87 | 48 | 106 | 1.080 | 1.931 |
| シリ・コーン | 28 | 56 | 33 | 71 | 0.735 | 1.412 |
| ナタネ | 68 | 109 | 74 | 137 | 0.986 | 1.703 |
| シリ・ナタネ | 46 | 83 | 52 | 128 | 0.834 | 1.664 |

条件：各油脂2 gを500m*l*ビーカーにとりホットプレート（200℃）上で加熱，添加シリコーン油は信越化学製KF96（オイルタイプ）で粘度100cstのもの（5 ppm）

**表3**　トコフェロール，シリコーン油のラードに対する加熱劣化防止効果

| | POV | | COV | | ABS of UV(233nm) | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 油脂の種類 | 5分 | 10分 | 5分 | 10分 | 5分 | 10分 |
| ラード | 76 | 129 | 59 | 124 | 0.678 | 0.933 |
| シリ・ラード | 44 | 74 | 37 | 70 | 0.576 | 0.768 |
| トコ・ラード | 32 | 98 | 26 | 79 | 0.560 | 0.799 |
| トコ・シリラード | 21 | 57 | 23 | 51 | 0.531 | 0.669 |

加熱条件，添加シリコーン油は**表2**と同様，トコフェロールはエーザイKK製ミックストコフェロール0.1%添加

© The Ito Foundation

表4　各種ラードの加熱による脂肪酸組成の変化　(%)

| 油脂の種類 | | 16：0 | 18：0 | 18：1 | 18：2 |
|---|---|---|---|---|---|
| ラード | 非加熱 | 23.8 | 11.6 | 46.2 | 11.3 |
| ラード | 2 g・10分 | 25.5 | 12.6 | 45.6 | 9.0 |
| シリ・ラード | 非加熱 | 23.8 | 11.6 | 46.2 | 11.3 |
| シリ・ラード | 2 g・10分 | 24.4 | 12.0 | 46.4 | 10.4 |
| トコ・ラード | 非加熱 | 24.2 | 13.2 | 44.6 | 10.8 |
| トコ・ラード | 2 g・10分 | 25.2 | 13.2 | 44.8 | 9.7 |
| トコ・シリラード | 非加熱 | 24.2 | 13.2 | 44.6 | 10.8 |
| トコ・シリラード | 2 g・10分 | 24.7 | 13.4 | 44.7 | 10.3 |

＊　主要脂肪酸のみを示した

表5　肉およびキャベツを炒めたときの油脂の性状

| | | POV | COV | AV |
|---|---|---|---|---|
| 豚肩ロース | 付着油 | 56 | 52 | 0.7 |
| | 残油 | 83 | 74 | 1.1 |
| 牛バラ肉 | 付着油 | 43 | 49 | 1.2 |
| | 残油 | 54 | 61 | 1.4 |
| ラムロース | 付着油 | 78 | 66 | 0.7 |
| | 残油 | 89 | 70 | 0.7 |
| キャベツ | 付着油 | 121 | 98 | 0.5 |
| | 残油 | 135 | 105 | - |
| ラードのみ加熱 | | 135 | 112 | 0.5 |

条件：2 gのラードを500m$l$ビーカーにとりホットプレート(200℃) 上で10分加熱後，材料20 gを2分間炒めた

を示していた。ラードのみの加熱に比べ材料を炒めた場合はPOV, COVは低い値を示していたが，AVは逆に高い値を示した。本実験の結果では材料付着油，残油ともPOV, COVはキャベツがもっとも高く，牛肉はもっとも低い値を示しているが，これは用いた材料の脂質含量と関係があるように思われた。すなわち，脂質含量の少ないキャベツでは炒め油（ラード）はキャベツにほとんど付着し，残油はわずかであるのに対し，牛肉では逆に肉の脂質が炒め中に溶出し，残油量が増加している。従って本実験の結果から肉の種類による劣化度の差を判断することは難しく，同一種の肉で脂質含量の異なる部位を用いた検討が今後必要と考えられた。また材料を炒めるまでの予備加熱時における油脂の変敗がそのまま材料付着油脂の変敗につながるので，ホットプレート上に油脂をひいて調理する場合には，材料の投入は早めに行うことが望ましい。

## 4. 要　約

ホットプレート加熱油脂の劣化とその防止を究明するために，以下のごとき実験を行った。

(1)　2 gの油脂を500m$l$容ビーカーにとりホットプレート（200℃）上で5分，10分加熱した場合，ラードは市販コーンサラダ油，ナタネサラダ油に比べ劣化しやすかった。はねない油（デリシイ）は加熱油脂劣化防止効果が大であった。

(2)　ラード，コーン油，ナタネ油に5ppmのシリコーン油を添加すると薄膜加熱の場合でも油脂劣化の抑制が認められた。

(3)　ラードにトコフェロール（0.1%）とシリコーン油（5 ppm）を混合添加すると個別添加の場合に比べ油脂劣化に対する防止効果が大であった。

(4)　2 gの油脂を500m$l$容ビーカーにとり，ホ

© The Ito Foundation

ットプレート（200℃）で10分加熱後，キャベツ，肉20ｇを２分間炒めた場合，ビーカーに残った油脂は材料付着油脂に比べPOV,COVが高かった。また肉に比べキャベツを炒めたときの劣化度は高かったが，これは材料から溶出する油脂量の差が影響しているように思われた。

## 文　献


1) 福井裕美，薄木理一郎，金田尚志：調理科学，11，139～142（1978）
2) 太田静行：油化学，32，245～257（1983）
3) 山崎妙子：広島女子大学紀要，21，103～109（1985）
4) 湯木悦二：調理科学，22，217-220（1989）
5) 広井　勝：郡山女子大学紀要，第26集，15～20（1990）
6) 太田静行：油化学，37，331～342（1988）
7) 日本油化学協会編：基準油脂分析法，2. 4. 1-83，2. 4，12-71，東京（1986）
8) 熊沢　恒，大山　保：油化学，14，167～171（1965）
9) 金田尚志，植田伸夫：過酸化脂質実験法，第１版，63～65，医歯薬出版，東京（1983）
10) R. Usuki，H. Fukui，T. Kaneda: Fette Seifen, Anstrichem., 82，494～497（1980）
11) 福田靖子，並木満夫：日食工誌，35，552～562（1988）
12) 太田静行，永野誠司，野中泰志，本田和教，原寧：油化学，37，185～189（1988）
13) 山崎妙子：広島女子大学紀要，21，111～117（1985）


© The Ito Foundation

# 食肉の結合組織における架橋アミノ酸に関する研究

## Studies on the Crosslinking Amino Acids of Connective Tissue of Meat

須山享三・中村文彦（東北大学農学部）

Kyozo Suyama and Fumihiko Nakamura (Faculty of Agriculture, Tohoku University)

Quantitation and characterization of crosslinking amino acids in connective tissues has been of interest because use as markers of those proteins. In this report, quaternary pyridinium crosslinking amino acids in ligamentum nuchae, aorta, lung, achilles tendon, masseter, quadriceps, dermis, rumen, small intestine, liver and kidney of bovine, porcine and fowl were determined by means of high performance liquid chromatography (HPLC) and were also characterized by thin-layer chromatography (TLC). Bovine lagmentum nuchae, aorta and lung contains highly quantities of desmosine and isodesmosine, major quaternary pyridinium crosslinks, and rumen, masseter, quadriceps, dermis, small intestine, liver and kidney contains significant quantities of these amino acids. Two unknown amino acids, isolated from hydrolyzate of bovine ligamentum nuchae by TLC were characterized by f.a.b./ms and UV absorption spectra. Mass spectral analysis indicated with masses of 411 and 655, respectively.

### 1. 目　的

動物体結合組織タンパク質は筋肉タンパク質についで多いタンパク質であり，細胞間マトリックスとして全ての動物体組織に分布しているが，皮膚，血管，肺，腎臓等の器官の構築にも関わっている[1~2]。食肉に含まれる結合組織中の同タンパク質は食肉の硬さに直接的に関与していることも知られている。この結合組織中にはタンパク質の架橋構造が存在するが，加令に伴って発達し，食肉の硬さの加令による増大，あるいは老化との関連が近年注目されている[3~10]。架橋構造は，架橋アミノ酸と称される非常に代謝回転の遅い含窒素複素環式アミノ酸の生成によって形成される[11]。タンパク質架橋の生成についてはまだ未知の点も多く，構造未決定の架橋アミノ酸の存在が指摘されている[12~13]他，可食部タンパク質の架橋の定量的な知見もほとんど得られていない。

本研究においては，架橋アミノ酸の中核をなすデスモシンあるいはイソデスモシンのような四級のピリジニウム環を有する架橋アミノ酸のカウンターイオンを用いた高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による分析法を検討し，同法による牛可食部組織の結合組織タンパク質を架橋アミノ酸の分析によって行い，さらに，構造未知の架橋アミノ酸の分離を試みることを目的とした。

### 2. 実験方法

#### 2.1 試　薬

試料の調製に用いた全ての試薬はNacalai Tesque製の特級試薬を用いた。HPLC分析において，カウンターイオンとして用いたSDSはPolysciences（U.S.A.）製の電気泳動用特級試薬を用いた。また，HPLCに用いた溶媒はNacalai Tesque製HPLC用溶媒を用いた。デスモシンおよびイソデスモシンは本研究室で牛項靭帯エラスチンの酸加水分解物から，分離調製したものを標準品として用いた。

© The Ito Foundation

2.2　機器分析

F.a.b./ms スペクトルは日本電子 JMS/HX-105 型質量分析機を用いて測定した。溶媒は水，マトリックスはグリセロールを用いた。また，紫外部（UV）吸収スペクトルは日本分光 UVIDEC-505 X型自記分光光度計を用いて測定した。

2.3　共試試料

肥育良好な若令肥育去勢ホルスタイン牛の項靱帯，大動脈，小腸，肝臓，腎臓，肺，アキレス腱，咬筋，およびルーメンを，またブロイラーの真皮，大腿骨および大腿筋を，さらに，肥育豚およびブロイラー鶏の真皮，大腿骨および大腿筋を分析試料とした。

2.4　薄層クロマトグラフィー（TLC）

TLC は Merck 社製アルミコートシリカゲルプレート（Art 5553）を用いた。展開溶媒は酢酸エチル／酢酸／水（2：1：1，V／V）を用い，三重展開を行った。発色試薬には 0.2% ニンヒドリン—ブタノール試薬を用いた。

2.5　HPLC

実験に用いた HPLC の分析装置は全て島津製作所製であり，液送ポンプは LC-6A 型，紫外可視分光光度検出器は SPD-6AV 型である。記録および架橋アミノ酸の定量は同社製クロマトパック C-R 5 A型データー処理装置を用いて行った。分析カラムは Merck 社製 Superspher RP-18(125 × 4 mm) 逆層カラムを用い，カウンターイオンとして 20 mM の SDS を含んだ pH 4.0 の 0.1 M リン酸緩衝液／アセトニトリル（5：1，V/V）を溶出溶媒としてクロマトグラフィーをおこなった。検出はこれらのピリジニウム環式架橋アミノ酸が紫外部に特徴的な吸収（$\lambda_{max}$ (nm)，$\varepsilon$ ；デスモシン：268，4900；イソデスモシン：278，7850）を持つため，UV 検出器を用い，275 nm で検出した。

2.6　試料の処理および分析

試料はサンプリング後，直ちに **Fig. 1** のスキームに示した処理を行った。まず，付着した脂肪を出来るだけていねいに除去し，ついでおよそ 2 g を正確に秤取して試料とした。試料は細切後，生理食塩水で三回洗浄を行って水溶性成分を除き，遠心分離（6000rpm, 20min）によって得られる水不溶性画分はエタノールおよびクロロホルム／メタノール（2：1，V/V）で処理を行って脱脂した。ただし，筋肉組織の場合は脱脂前に氷酢酸中に24時間浸し，氷酢酸可溶性のタンパク質を除く操作を行った。また，大腿骨は 0.5モルの EDTA溶液で48時間 4 回処理して脱灰した。脱脂した試料は減圧乾燥後，テフロンコートスクリュウキャップ付パイレックス試験管に入れ，常法により 6N 塩酸で 110℃，48時間の加水分解を行った。加水分解物は減圧乾燥後，8 m$l$ の水に溶解し，5 $\mu l$ を HPLC の分析に供した。

2.7　前処理

組織によっては結合組織含量が低く，架橋アミ

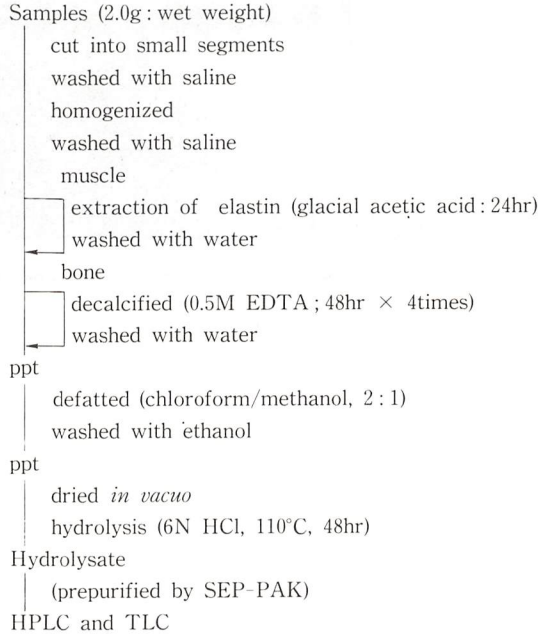



**Fig. 1**　Flow diagram showing the process of preparation of hydrolysate from animal connective tissue.

© The Ito Foundation

ノ酸の分析が不可能である場合もあったので，アミノ酸をSEP-PAK（Waters, U.S.A.）によって前処理を以下のように行って，架橋アミノ酸を含む粗画分を分離した。

五酸化りんを乾燥剤とした真空デシケーター中で乾燥した加水分解物約100mgを正確に秤取し，これを溶出溶媒（酢酸エチル／酢酸／水；2：1：1，V/V）3m*l*に溶解後，SEP-PAKにのせ，ついで5m*l*の同溶出溶媒を通塔した。

同処理によって，中性アミノ酸の大部分は溶出し，定量的にSEP-PAK中に残存した主として架橋アミノ酸からなる画分は，引続いて5m*l*の水で定量的に溶出させた。架橋アミノ酸画分は減圧乾燥後，2m*l*の水に溶解し，HPLCによる分析に供した。

2.8　牛項靱帯から未同定架橋アミノ酸の分離

新鮮な牛項靱帯4.5kgを前述したサンプル処理法に準じて処理を行い，乾燥エラスチン1.82kgを得，ついで6N塩酸を用いて110℃，48時間の加水分解を行った。加水分解物30gはシリカゲルカラム（180×65㎜）に供し，SEP-PAKで行った方法に準じて溶出を行い，架橋アミノ酸の粗画分を

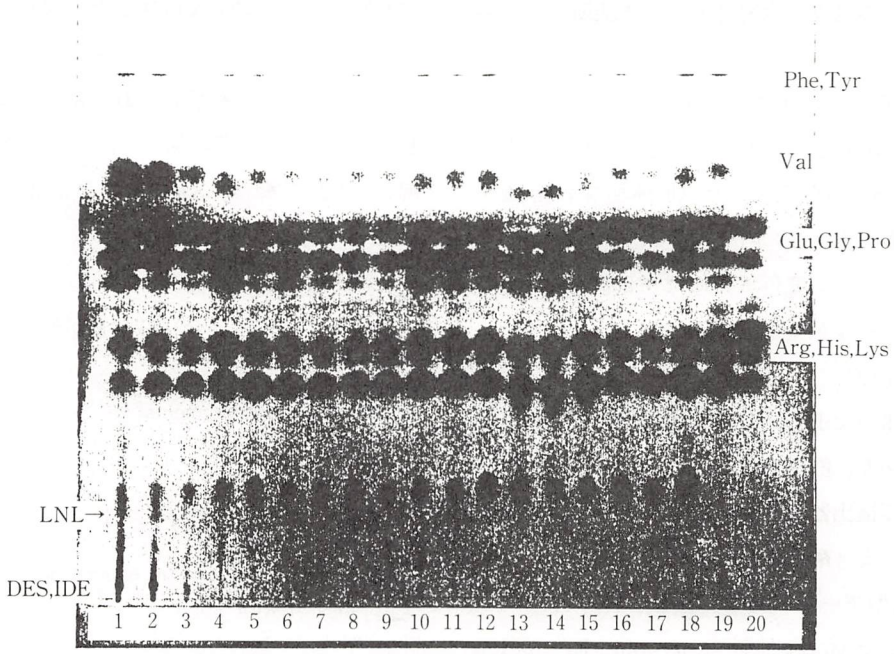



**Fig. 2**　Silica gel TLC of hydrolysate of animal connective tissue
Solvent: ethyl acetate/acetic acid/water (2 : 1 : 1, V/V)
Color reagent: ninhydrin

| | | | |
|---|---|---|---|
| 1. | Ligamentum nuchae | 10. Bovine | Dermis |
| 2. | Aorta | 11. Porcine | |
| 3. | Lung | 12. Fowl | |
| 4. | Achilles tendon | 13. Bovine | Bone |
| 5. | Masseter | 14. Porcine | |
| 6. | Rumen | 15. Fowl | |
| 7. | Samll intestine | 16. Bovine | Quadriceps |
| 8. | Liver | 17. Porcine | |
| 9. | Kidney | 18. Fowl | |
| | | 19. Skim milk | |
| 1-9 ; Bovine | | 20. Standard amino acid + glucose | |

DES, desmosine; IDE, isodesmosine; LNL, Iysinonorleucine

© The Ito Foundation

得た。粗画分は分析用に用いたと同一の TLC プレート10枚に供し，デスモシンに比較してわずかに低い Rf 値を持つスポットおよびわずかに高い Rf 値を持つスポットを三重展開によって分離し，ついでこれらを分取した。分取した画分は再分取 TLC を行って精製を行った。これらの画分は HPLC でほぼ1ピークを，TLC で1スポット与えたので，f.a.b./MS および UV スペクトル測定した。

## 3. 実験結果および考察

### 3.1 組織の架橋アミノ酸の分布

**Fig. 2**は牛，豚およびブロイラーの供試部位の加水分解物の TLC である。本条件によって，疎水性の高いアミノ酸は Rf 値の高い位置（0.90～0.98）に展開され，中性アミノ酸は中間に（0.55～0.85）塩基性アミノ酸のリジンおよびアルギニンは低く（それぞれ0.42および0.47），架橋アミノ酸はさらに低い位置に（リジノノルロイシン；0.17，デスモシンおよびイソデスモシン；0.04）に展開されている。項靱帯，肺，および大動脈はこれらの架橋アミノ酸（未同定の同アミノ酸も含む）が明瞭なスポットとして観察されるが，その他の組織の架橋アミノ酸の含量は低いことが原因で，スポットは明瞭には観察されなかった。

カウンターイオンを用いる，山口らの方法[12]を干若改良して分析した牛項靱帯およびアキレス腱の HPLC のクロマトグラムは，**Fig. 3**に示したとおりである。同時に，今回分離した未同定架橋アミノ酸と考えられる，EPD と ALD と略称した2つの成分のピークも示した。項靱帯にはデスモシンおよびイソデスモシンの明瞭なピークが認められ，さらに数種の未同定のアミノ酸のピークが，EPD と ALD と共に検出されている。275 nm における分子吸光係数はデスモシンとイソデスモシンの間に違いが無いため，ピーク面積からこれらの2つの成分量を比較すると，ほぼ同量含まれていることが明らかである。また，アキレス腱にはこれ等の架橋アミノ酸は検出されなかった。コラーゲンにはデスモシン関連の架橋アミノ酸の含量は低いことが知られているが，アキレス腱にはほとんど含まれていないことを示している。

**Table 1**には，動物体の各供試部位における架橋アミノ酸の分析結果を示した。同時に未同定ピークの成分の相対的なピーク面積もあわせて表示

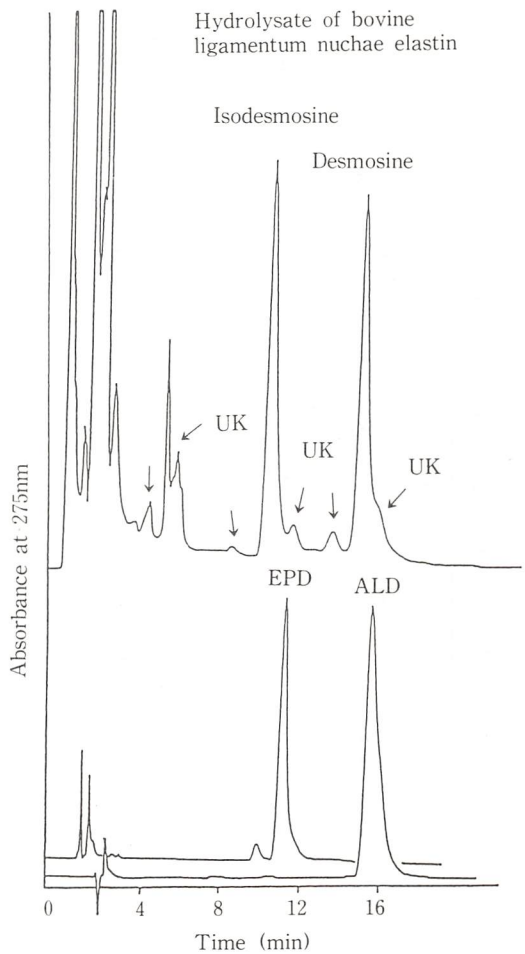



**Fig. 3** HPLC of hydrolysate of bovine ligamentum nuchae elastin, EPD and ALD
Column: Superspher 100 RP-18 125-4
Solvent: 0.1 M phosphate buffer/acetonitrile (5 : 1, V/V) containing 20 mM SDS (pH 4.0)
Flow rate: 1.0 ml/min
UK: unknown compounds

© The Ito Foundation

**Table 1** HPLC analyses of hydrolysates of animal organs

| | | | without SEP-PAK treatment | | | | | | | | | treated by SEP-PAK | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | R T = 4.5 | R T = 6.0 | R T = 7.0 | IDE (278) | EPD (270) | R T = 13.9 | R T = 14.9 | DES (268) | ALD (268) | R T = 24.9 | IDE (278) | EPD (270) | DES (268) | ALD (268) |
| Bovine | Ligamentum nuchae | 1* | | | 281 | 1,140 | 173 | 122 | | 1,233 | 82 | 25 | +++ | + | +++ | + |
| | Aorta | 2 | 8 | | 394 | 614 | 5 | | | 670 | 42 | 37 | +++ | + | +++ | + |
| | Lung | 3 | 3 | 16 | 1,032 | | 13 | | 314 | | | | ++ | + | ++ | + |
| | Achilles tendon | 4 | 58 | 26 | 137 | | | | 15 | | | 76 | ND | ND | ND | ND |
| | Masseter | 5 | 46 | 678 | 251 | | 31 | | 62 | | | 13 | + | + | + | + |
| | Rumen | 6 | | 26 | 358 | | | | | | | | + | + | + | + |
| | Small intestine | 7 | | 7 | 453 | | | | | | | | + | + | + | + |
| | Liver | 8 | | 17 | 833 | | | | 163 | | | 60 | + | + | + | + |
| | Kindney | 9 | 15 | 19 | 653 | | | | 167 | | | | + | + | + | + |
| Dermis | Bovine | 10 | | 12 | 333 | | | | | | | | + | + | + | + |
| | Porcine | 11 | | 18 | 288 | | | | | | | 36 | | | | |
| | Fowl | 12 | 57 | 57 | 1,084 | | | | 18 | | | | | | | |
| Bone | Bovine | 13 | 34 | 56 | | | | | 270 | | | | ND | ND | ND | ND |
| | Porcine | 14 | 117 | 414 | | | | | | | | | | | | |
| | Fowl | 15 | 62 | 581 | | | | | 87 | | | | | | | |
| Quadriceps | Bovine | 16 | | 32 | 114 | | | | 165 | | | | + | + | + | + |
| | Porcine | 17 | | | 213 | | | | 18 | | | 18 | | | | |
| | Fowl | 18 | 170 | 159 | 1,088 | | | | 47 | | | | | | | |
| Skim milk | | 19 | | | | | | | | | | | ND | ND | ND | ND |
| standard | AA + Glu | 20 | | | | | | | | | | | ND | ND | ND | ND |

IDE, isodesmosine ; DES, desmosine ; AA, amino acids ; Glu, glucose ; ND, not detected ; ($\lambda_{max}$ : nm)
The figures indicate the ratios of the peak areas.
+++, 5−8 ; ++, 1 − 5 ; +, 〈1 (mg/dry weight)
HPLC condition
Column : Superspher 100 RP-18 125-4
Solvent : 0.1M phosphate buffer/acetonitrile (5 : 1, V/V)
containing 20mM SDS (pH 4.0)
Flow rate : 1.0 ml/min
*, These numbers correspond to numbers in TLC **(Fig.2)**

© The Ito Foundation

した。また，前処理なしで分析した場合は検出されなかった組織においてはSEP-PAKによる前処理を行うことによって，定量的な結果は得られなかったが，ほとんど全ての組織に架橋アミノ酸が検出された。特に筋肉内における架橋アミノ酸の含量は筋肉内のエラスチン含量に対応していると考えられ，今後さらに検討しなければならない課題であると考えられる。すなはち，筋肉内におけるエラスチンは主として血管を構成していると考えられるが，家畜の老化や筋肉別のエネルギー代謝等の違いによるエラスチンの量的および質的な違いは食肉としての質的な価値に大きく関わっていると考えられる。

3.2　未同定架橋アミノ酸

動物組織におけるエラスチン架橋アミノ酸のHPLCおよびTLCには未同定と考えられる架橋アミノ酸が検出される。これらの中で，今回EPDとALDと略称した2種の化合物を分離した。EPDはf.a.b./msによって分子量が411であることが明らかとなった（**Fig. 4**）。UVスペクトルは270nmに吸収極大のあるピリジニウム環式化合物と考えられた。また，ALDは同msによって分子量が655であり（同図），既知のアミノ酸の中では最大の分子量を示すことが明らかとなった。UVスペクトルは268nmに吸収極大があり，これはデスモシンの同スペクトル（$\lambda_{max}$；268nm）

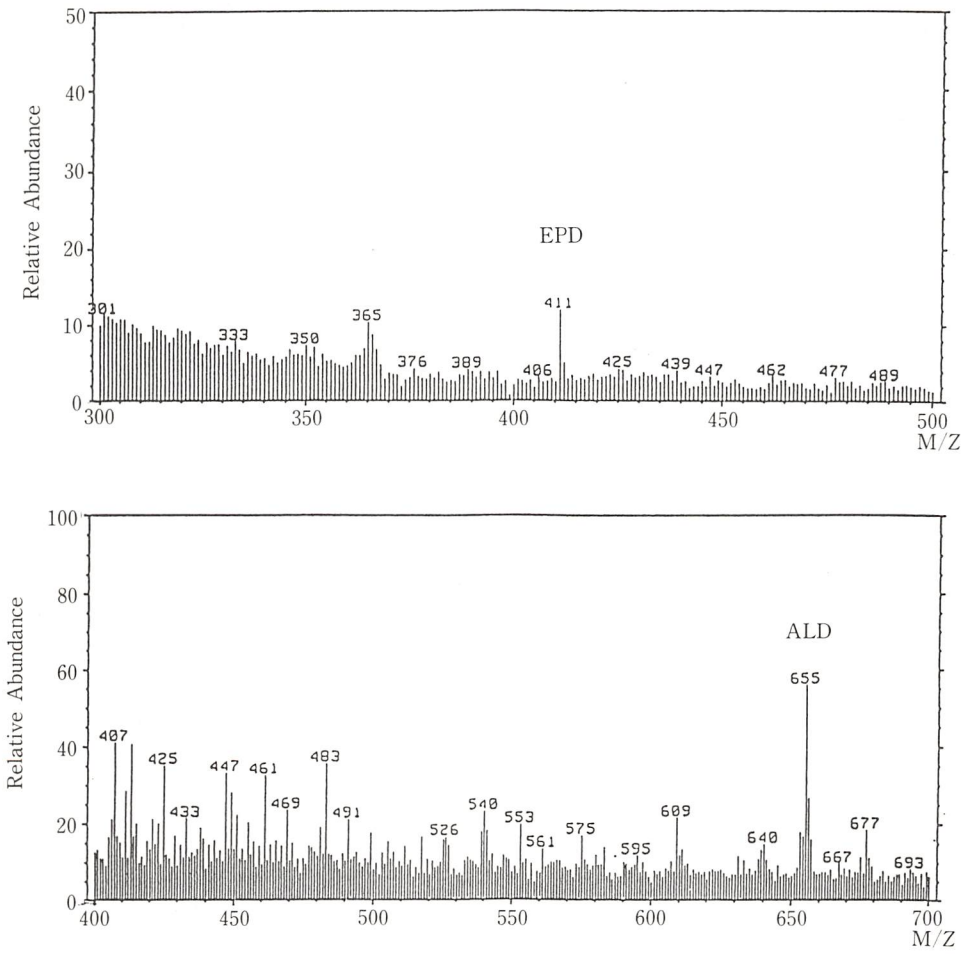



**Fig. 4**　Positive ion FAB mass spectra of EPD and ALD

© The Ito Foundation

と非常によく一致していた。従って，デスモシンと同様に1，3，4，5—位に分岐したピリジニウム架橋アミノ酸と推定された。EPD および ALD 共に今回は構造決定には至らなかったが，架橋アミノ酸の生理的な作用と共に老化や疾病との関連が注目されており，現在構造決定を進めている。また，食肉の品質との関連や，摂取した後の消化吸収や代謝も今後の課題であると考えられる。

## 4. 要　約

牛，豚および鶏の可食部組織および食肉の結合組織におけるピリジニウム環式架橋アミノ酸をカウンターイオンを用いた高速液体クロマトグラフィー（HPLC）によって分析すると共に，薄層クロマトグラフィーによる簡便な検出法の開発を行なった。また，HPLC で分離される構造未決定と考えられる架橋アミノ酸の分離を行なった。その結果，項靱帯，大動脈，肺においては多量のエラスチン由来の架橋アミノ酸が存在すると共に，筋肉部においてもおそらく血管を構成しているエラスチン由来と考えられる同アミノ酸が検出された。構造未知のアミノ酸と考えられる二つのアミノ酸は構造決定には至らなかったが，共にピリジニウム環式であり，分子量は411と655であった。とくに後者のアミノ酸の分子量は既知のアミノ酸では最大の分子量であった。

## 文　献

1) West, E.S. and Todd, W.R.: in Textbook of Biochemistry, 4th ed., 415, The Macmillan Co., London, 1966.
2) Chvapil, M.: in Physiology of Connective Tissue, 62-66, Butterworths, London 1967.
3) Yamauchi, Y. et al: J. Biol. Chem., 262, 11428, 1987.
4) Moriguchi, T. et al: J. Biochem., 84, 944, 1978.
5) Sakamoto, K.: Nippon kohkuhkagaku-kaishi, 29, 724, 1980.
6) Desai, R. et al: Early Hum. Dev., 16, 61, 1988.
7) John, R. et al: Biochem. J., 127, 261, 1972.
8) Bailey, A.J. et al: Biochem. Biophys. Res. Commun., 78, 1403, 1977.
9) Davison, P.F.: J. Biol. Chem., 253, 5635, 1978.
10) Piez, K.A. et al: Biochem. Biophys. Res. Commun., 17, 248, 1964.
11) Partridge, S.M. et al: Nature, 200, 651, 1963.
12) Yamaguchi, Y. et al: J. Chromatogr., 422, 53, 1987.
13) Brennan, M.: J.Biol. Chem., 264, 20953, 1989.

© The Ito Foundation

# エラスチン—コラーゲン複合体膜の創製

Preparation of Elastin-Collagen Hybrid Membrane

和田敬三・高橋幸資（東京農工大学農学部）

Keizo Wada and Koji Takahashi
(Faculty of Agriculture, Tokyo Noko University)

It is desired to utilize insoluble elastin (IE) as food and biochemical materials. In this report, the preparation of the solube elastin and elastin-collagen hybrid membrane was investigated. The pepsin-solubilized elastin (PSE) was prepared by digesting IE (the origin, bovine *Ligamentum nuchae*) with pepsin. The amino acids composition of PSE obtained was similar to that of IE, while the saccharides contents were 2～3 times heigher. The relative molecular weight of PSE was estimated to be about 8,000～640,000 by HPLC. PSE accelerated collagen matrix reconstructin, and lowered the solubility of that matrix to several solvents. The PSE-collagen hybrid membrane was prepared by dehydrating the PSE-collagen matrix with ethanol and air-drying. Differential scanning calorimetry of the PSE-collagen hybrid membrane demonstrated that PSE raised the thermal denaturation temperature of the membrane.

## 1. はじめに

エラスチンは，弾性線維を構成する動物性タンパク質の一種で人体，動脈および消化管等の組織に比較的多量に分布し，弾性に富む力学的特性を付与している。そのアミノ酸組成は，グリシン，アラニン等の非極性アミノ酸が約80%，プロリンが約10%を占め，デスモシン，イソデスモシン等の多官能性架橋アミノ酸を含むことが特徴である。そのためエラスチンは，熱水，希酸，希アルカリおよびタンパク変性剤に対して安定で高度に不溶性を示す。このことが，エラスチンの構造化学および利用化学が非常に立ち遅れている大きな原因となっている。

エラスチンの利用を考えるとき，大別して2つの利用形態を構想しうる。すなわち，不溶性のままで利用する方法と，一度可溶化し可溶性のエラスチンとして利用する方法である。後者の場合，可溶性の状態から再び弾性線維を再構築して利用しうる可能性もあるので，より広範な利用が期待される。そこで，本研究では，ペプシン処理してエラスチンを可溶化し，可溶性のコラーゲンとともに製膜することによってエラスチン－コラーゲン複合体を創製し，エラスチンの利用を図ろうとした。

## 2. 方　法

### 2.1 試料の調製

（1） ペプシン可溶化エラスチン(PSE)：不溶性エラスチン(IE)は，牛項靭帯からPartridgeらの方法[1]にしたがって調製した。すなわち，牛項靭帯を細切し，球状タンパク質および脂質を除去し，オートクレーブ処理を7回繰り返してコラーゲンを除去した後に凍結乾燥した。ドライアイス-アセトンで冷却しながらウィリーミルで粉砕しIEを得た。次にIEを0.5M酢酸に懸濁し，IEの1/100量(w/w)のペプシン（シグマ社製，3,200 U/mg）を加えて攪拌しながら25℃で5～30時間

© The Ito Foundation

処理した。水酸化ナトリウム溶液でpH12以上とした後再び塩酸で中和し，遠心分離した上清を蒸留水に対して透析し，凍結乾燥してPSEを調製した。

（2） ペプシン可溶化コラーゲン(PSC)：PSCは既報[2]にしたがって以下のように調製した。精製不溶性コラーゲンを0.5M酢酸に懸濁し，コラーゲンの1/100量のペプシンを加えて25℃で72時間作用させ，遠心分離後塩析—溶解を3回繰り返して生成し，凍結乾燥してPSCを調製した。

2.2 ＰＳＥによるコラーゲンマトリックス構築

PSCを0.5M酢酸に溶解し，pH8.0の1/15Mリン酸緩衝液で透析後18,000rpmで30分間遠心分離してコラーゲン溶液を得た。同一緩衝液に溶解したPSE溶液を，PSC 0.67 mg/ml, PSE 0.076 mg/mlとなるよう加え，脱気した後液温を37℃に保持してコラーゲンマトリックスを構築し，その過程は310nmの吸光度で追跡した。

2.3 エラスチン－コラーゲンマトリックスおよび複合体膜の調製

PSEとPSCの0.05M酢酸緩衝液（pH 7.0）を1：9または1：2の割合で混合し，脱気後アクリル製プレート（10×10×0.5㎝）に流し込み，33℃で18時間保持して先ずマトリックスを構築した。次に段階的に濃度の異なる40～99.5%エチルアルコールに置換し，脱水・脱塩した。約30℃の温風下で乾燥し，エラスチン-コラーゲン複合体膜を調製した。

2.4 ゲルクロマトグラフィー

PSEの分子量分布をHPLCを用いて次のように調べた。ポンプ，Tosoh CCPM；カラム，TS-Kgel G 3000 Sw 7.8×300mm；移動相，0.3M塩化ナトリウムを含む1/15Mリン酸緩衝液；流速，1.0 ml/min；検出，280 nmの吸光度。

2.5 マトリックスの種々の溶媒に対する溶脱性

PSE-PSCマトリックスを種々の条件で処理したときの溶脱量を調べた。マトリックスを蒸留水で4℃で24時間，45，48または50℃で20分間，0.5M酢酸で4℃で1時間または1%SDS/0.05M酢酸緩衝液（pH 7.0）で25%で48時間それぞれ処理し，18,000 rpm 30分間遠心分離した残渣の110℃乾燥重量を測定して溶脱率を求めた。

2.6 示差走査熱量測定（DSC）

エラスチン－コラーゲン複合体膜の熱変性挙動は，既報[3]に従ってDSCで調べた。

2.7 化学分析

ＰＳＥのアミノ酸組成[4]，全糖量[5]およびウロン酸含量[6]を調べた。タンパク質の定量は，ミク

**Table 1** Amino acid compositions and saccharide contents of pepsin-solubilized elastins.

| Amino acid* | ＩＥ | PSE－5 | PSE－10 | PSE－30 |
|---|---|---|---|---|
| Hyp | 10 | 11 | 11 | 11 |
| Asp | 6 | 19 | 12 | 9 |
| Thr | 9 | 18 | 14 | 9 |
| Ser | 9 | 19 | 14 | 10 |
| Glu | 15 | 23 | 19 | 18 |
| Pro | 115 | 131 | 138 | 131 |
| Gly | 328 | 304 | 315 | 300 |
| Ala | 221 | 166 | 177 | 224 |
| Cys | 0 | 2 | 2 | 〈1 |
| Val | 128 | 133 | 136 | 134 |
| Met | 1 | 2 | 1 | 1 |
| Ile | 25 | 28 | 27 | 24 |
| Leu | 63 | 78 | 71 | 57 |
| Tyr | 10 | 13 | 8 | 11 |
| Phe** | 48 | 39 | 45 | 53 |
| UK | 3 | 2 | 2 | 3 |
| Hyl | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Lys | 3 | 4 | 4 | 4 |
| His | 1 | 1 | 〈1 | 〈1 |
| Arg | 6 | 7 | 7 | 4 |
| Saccharide content (%) | | | | |
| total saccharide as glucose | 0.27 | 0.82 | 0.58 | 0.50 |
| uronic acid as glucronic acid | - | 0.57 | 0.34 | - |

* residues per 1000 residues.
** containes presumably desmosins.

© The Ito Foundation

ロビュレット法[7]によった。

## 3. 結果および考察

### 3.1 PSEの生化学的特徴

PSEの収率は，5時間処理で約11%，10時間処理で約23%，30時間処理で約73%であった。30時間処理でほぼ完全に可溶化された。

アミノ酸組成は**Table 1**に示す。IEを含め，いずれの，PSEもHylを全く含まず，コラーゲンの混入のない標品であることが確認された。全体的に見ると，PSEのアミノ酸組成は，IEと同様の組成を示した。Gly, Ala等の非極性アミノ酸は，1000残基当たり710～740でIEよりやや少なかった。逆に，AspおよびGlu含量は，30～40残基とIEよりやや多く，処理時間の短いPSE程含量が高かった。

PSEの糖含量も**Table 1**に示す。全糖量は，IEの2～3倍で，処理時間の短いものほど高かった。ウロン酸含量も5時間処理のPSEがもっとも高く，同様の傾向があるものと考えられた。

分子量分布をHPLCで調べた結果を**Fig. 1**に示す。いずれのPSEも，高分子の可溶性エラスチンであり，低分子ペプチドを含まないことが特徴であった。その分子量分布は，640,000～8,000と典型的な多分散性を示した。10時間処理PSEは，62,000の分子量成分の存在が明瞭であることが他と異なるものであった。

### 3.2 コラーゲンマトリックス構築促進機能

PSEをPSCに加えて，pH 8.0のリン酸緩衝液中でマトリックスを構築した時の吸光度・時間曲線，すなわち，マトリックス構築曲線を**Fig. 2**に示す。これらの曲線の偏曲点であるマトリックス構築最大速度到達時間（$T_{max}$）を読み取り，対照の$T_{max}$に対する比で表わすと，0.38～0.70を示した。このことは，PSEがコラーゲンのマトリックス構築を促進する機能があることを示すものである。特に，5または10時間処理して得たエラスチンは，$T_{max}$の比が0.38または0.49と小さく，著しく促進機能が高かった。しかし，5時間処理のものは，収率が低いので，以後の実験には，10

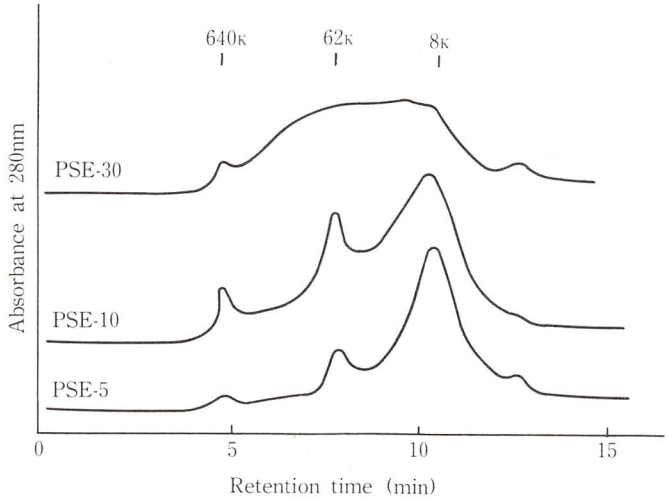



**Fig. 1** HPLC Patterns of pepsin-solubilized elastins.
Conditions: column, TSK gel G 3000 SW (7.8×300mm); mobile phase, 1/15 M phosphate buffer at pH 7.0 containing 0.3 M NaCl; flow rate, 1.0 ml/min; detection, absorbance at 280 nm.
PSE-5, PSE-10 and PSE-30: elastins solubilized with pepsin-digestion at 25℃ for 5, 10 and 30 h respectively.

© The Ito Foundation

時間処理して得たエラスチンを用いることとした。

3.3 エラスチン-コラーゲンマトリックスの溶脱安定性

エラスチン-コラーゲン複合体膜調製の前段階である，マトリックスの溶媒に対する溶脱安定性を種々の条件で調べた。その結果を**Table 2**に示す。水の場合，温度が上昇するといずれも溶脱量は増大するが，エラスチンが存在するマトリックスのそれは，対照に比べて著しく低い。例えば，48℃の溶脱率は，対照の92%に対してPSEを1/9量加えたマトリックスは，81%，1/2量加えたものは75%となり，PSEの関与するマトリックスの安定性が良好であることが確認された。酢酸およびSDS溶液に対する溶脱性も同様であるので，PSEは，エラスチン-コラーゲンマトリックスの安定性に大きく寄与すると判断される。

3.4 エラスチン-コラーゲン複合体膜の熱安定性

先のエラスチン-コラーゲンマトリックスをエチルアルコールで脱水・脱塩し，風乾して複合体膜とした。複合体膜の熱変性挙動をDSCで調べた結果を**Fig. 3**に示す。対照膜は，熱変性ピーク温度が約51℃で肩を約53℃に持つ比較的ブロードな熱変性挙動を示した。PSEを1/9量加えた複合体膜は，対照と同様の吸熱ピークを示したが，ピーク温度は約52と約54℃を示し，かつ後者のピークが大きくなり若干高い熱安定性を示すことを認めた。PSEを1/2量加えた膜は，これらの膜に比べて著しくシャープな吸熱ピークを示し，ピーク温度も約55℃と高い値を示した。熱変性エンタルピーは，対照の約40mJ/mgに対してPSEを加えた膜は，約54～62mJ/mgと増大する傾向を示

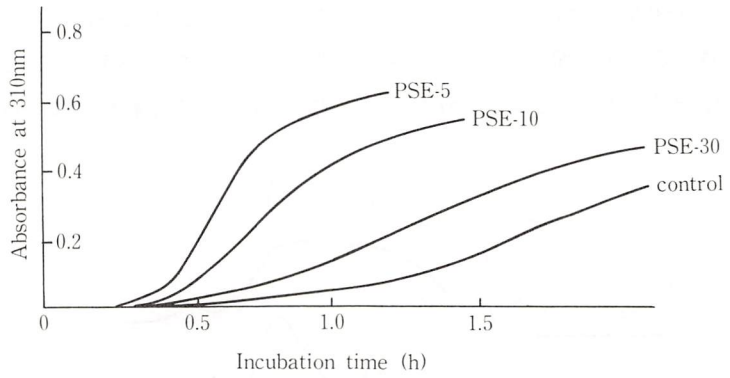



**Fig. 2** Effect of PSE on collagen matrix reoonstruction.
Conditions: collagen (PSC) conc., 0.67 mg/ml, PSE conc., 0.076 mg/ml; incubation temp., 37℃; solvent, 1/15 M phosphate buffer at pH 8.0; monitoring, absorbance at 310 nm.

**Table 2** Solubility of elastin-collagen matrix to some solutions (%).

| Matrix (PSE : PSC) | Water | | | | 0.5M $CH_3COOH$[1] | 1% SDS/0.05M acetate buffer at pH 7.0[4] |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 4℃[1] | 45℃[2] | 48℃[3] | 50℃[1] | | |
| Control | 39 | 14 | 80 | 92 | 83 | 84 |
| 1 : 9 | 19 | 11 | 57 | 81 | 87 | 45 |
| 1 : 2 | 12 | 4 | 31 | 75 | 36 | 36 |

Solubilized conditions : 1), 24 h ; 2), 20 min ; 3), 4℃ for 1 h ; 4), 25℃ for 48 h.

© The Ito Foundation

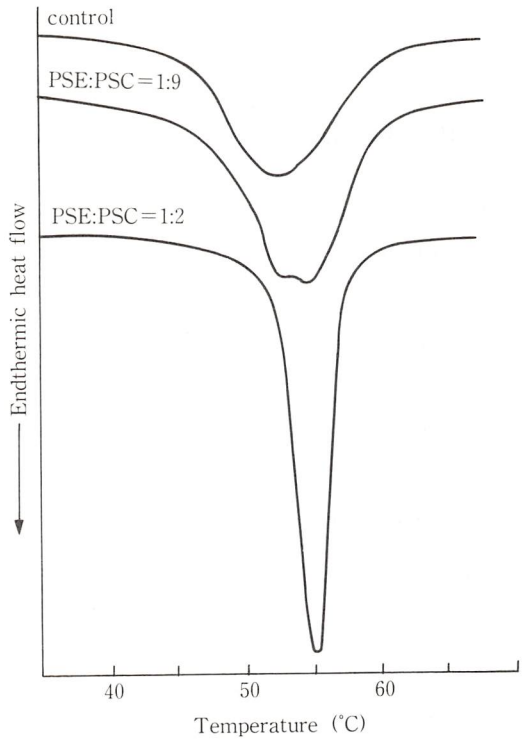



**Fig. 3** DSC curves of elastin-collagen firms.
DSC conditions: DSC, Seiko SSC 5000, DSC-100; heating rate, 2.0 deg/min; cell, Ag; atmosphere, He 40 m*l*/min.

した。以上のことから，PSEを加えることによって，分子間凝集力の比較的強いマクロ構造を持った，分子配向性の均一なコラーゲンフィブリルからなる複合体膜を調製することができると考えられる。

## 4. 要　約

不溶性エラスチンをペプシン処理して可溶性エラスチンを調製し，コラーゲンとの複合体膜を創製し，その性質を調べた。以下に結果の概要を記す。

(1) 不溶性エラスチン（IE）を1/100量のペプシンで25℃，5～30時間処理することによって，収率11～73％で可溶性エラスチン（PSE）を調製できた。PSEのアミノ酸組成はIEと同様であるが，糖含量は2～3倍高かった。分子量は640,000～8,000で，多分散であった。

(2) PSEは，コラーゲンのマトリックス構築を著しく促進するとともに，各種溶媒に対する溶脱安定性を増大する機能があることを認めた。

(3) マトリックスを乾燥することによってPSEを含む複合体膜が調製でき，その熱安定性を高めることができることを認めた。

## 文　献

1) Partridge, S.M., Davis. H.F. and Adair, G.S.: *Biochem, J.*, **61**, 11-30 (1955).
2) 高橋幸資，野村義宏，和田敬三：日食工誌，**36**, 108-113 (1989).
3) 高橋幸資，吉村圭司，白井邦郎，和田敬三：日畜会報，**57**, 497-502 (1986).
4) Takahashi, K., Shirai, K., Wada, K.: Communications of 19 th Congress of International Union of Leather Technologists and Chemists Societies, p. 11-19, Melbourne, Australia (1987).
5) Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F.: *Anal. Chem.*, **28**, 350-(1956).
6) Bitter, T. and Muir, H.M.: *Anal. Biochem.*, **4**, 330-334 (1962).
7) 菅原　潔，副島正美：蛋白質定量法，第3版，東大出版会，pp. 80-91 (1990).

© The Ito Foundation

# 生体内で生成される亜硝酸塩およびニトロソアミン
## ——食肉加工品中の存在量との比較——

Nitrite and N-Nitrosamine Production *in vivo*:
In Comparison with Their Amounts in Meat Products

渡 辺 道 子 ・ *三 輪 操（東京大学農学部，*農林水産省畜産試験場）

Michiko Watanabe and *Misao Miwa
(Faculty of Agriculture, University of Tokyo and *National Institute of Animal Industry)

Macrophages, when activated with lipopolysaccharide, produce a copious amount of intermediate nitric oxide (NO) from L-arginine through enzymatic process, and the oxide then reacts spontaneously with molecular oxygen and water to yield nitrite and nitrate as final products. In order to estimate the amount of nitrite formation *in vivo*, we screened effective foods which activate macrophages to produce nitrite.

The water and ethanol extracts from foods were prepared. They were incubated with macrophages (RAW 264.7, $1\times10^6$ cells/m*l*) and morpholine (0 or 15 mM) at 37 ℃ in a humidified incubator containing 5 % $CO_2$. After 48 hr incubation, nitrite concentrations in the cell culture supernatant were determined by colorimetric method. N-Nitrosomorpholine were extracted by dichloromethane, and the extracts were analyzed by GC-TEA.

Among 64 foods, the water extracts from 18 foods, such as rice, buckwheat, soybeans, asparagus, bracken, had the activity to stimulate macrophages to produce nitrite. The maximum amount of nitrite formation was 100 nmol/$10^6$ cells, that corresponds to 5 ppm. Only rice had the activity to produce N-nitrosomorpholine (0.6 ppm). It is quite possible that nitrite concentration reachs to more than 100 ppm near macrophages, because nitrite produced by macrophages was highly diluted in the cell culture medium.

Collating all the data obtained in this work, we conclude that the macrophage stimulants exist in a wide variety of foods and they are soluble in water. It is also concluded that several of the stimulants strongly activate macrophages to produce higher amounts of nitrite and N-nitrosomorpholine. The concentration of these compounds are estimated to higher than that derived from meat products.

## 1. 目 的

食肉加工品に発色剤として添加されている亜硝酸塩は，肉の色やフレーバーをよくするだけでなく，ボツリヌス菌の生育抑制効果を持つ優れた食品添加物であるが，それ自身変異原性があること，また発癌物質であるN-ニトロソ化合物の前駆体となることからその安全性に不安を感じている消費者も多い。一方，最近，ほ乳類には亜硝酸塩，硝酸塩を生合成する系が存在するという報告がなされており[1,2]，われわれの生体内に存在する亜硝酸塩（あるいは硝酸塩）の由来は多種多様であろうと推察される。この生合成系における主な担当細胞はマクロファージであり[3]，このマクロファージによりN-ニトロソアミンが生成することも明らかである[4]。本研究は，我々の体内でマク

© The Ito Foundation

ロファージによって生成される亜硝酸塩，N-ニトロソアミンの量を推測するため，マクロファージを活性化させ，亜硝酸塩を生成させる食品成分を検索することを目的とした。さらに，マクロファージによって生成しうる亜硝酸塩，N-ニトロソアミンの量を，肉加工品などに由来するこれらの化合物の存在量と比較することを試みた。

## 2. 方　法

### 2.1 食品抽出液の調製

試験に用いた食品はダイズを除き，すべて千葉県下の店で購入した。ダイズは農水省農業研究センター喜多村博士より恵与されたエンレイ種（64年度産）を用いた。64種類の食品可食部を凍結乾燥後，コーヒーミルで粉砕し，粉末をエーテルで脱脂した。この脱脂試料10 g に対し水を20 m*l* 加えて室温で一時間激しく振とう後10,000×g，20分間遠心分離した。この上清を凍結乾燥したものを水抽出物とした。一方，エーテル脱脂試料10 g にエタノール 20 m*l* を加え，一時間攪拌したのち濾過し，真空乾燥したものをエタノール抽出物とした。これらの抽出物は，最終濃度が2000, 200および20 $\mu$g/m*l* になるよう supplemented minimum essential medium[5] に懸濁し，0.22 $\mu$m のフィルターを用いて滅菌した。

### 2.2 細胞の培養

細胞は American Type Culture Collection から購入したマクロファージ様株化細胞（RAW 264.7）を用いた。この細胞を，Dulbecco's modified Eagle's medium に10% のウシ胎児血清（Bocknek Laboratories）と抗生物質（ペニシリン，ストレプトマイシン）を加えた培地を用い，炭酸ガス培養器中37℃で培養した。実験に用いる際は，ピペッティングで細胞をはがした後，細胞数を$1\times10^6$細胞/m*l* に調整し，96ウェルプレートに200 $\mu$*l* ずつまいた。細胞がプレートに接着したのを確認後，培地を吸引除去し，食品抽出物，あるいは食品抽出物とモルフォリン（PBS 溶液，最終濃度 15 mM, pH 7.4）を含む培地と交換し，48時間培養した。

### 2.3 亜硝酸塩の定量

培養上清中の亜硝酸塩濃度は，上清をグリース試薬（1%スルファニルアミド／50%塩酸：0.12%ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩）と反応させ，生成した赤色色素の 540 nm の吸光度を測定することにより定量した[5]。

### 2.4 N-ニトロソモルフォリンの定量

培養上清 200 $\mu$*l* に等量のジクロロメタンを加え激しく振とう後，遠心分離した。次に，ジクロロメタン層を5 $\mu$*l* とり，ガスクロマトグラフィー（Shimadzu GC-8）—TEA（thermal electron analyser, 502, サーモエレクトロン社）でN-ニトロソモルフォリンを定量した。ガスクロマトグラフィーの条件は，カラム：3.0m×3.0mm（内径）のガラスカラム；充塡剤：10% PEG/クロモソルブW（80～100メッシュ）；温度：180℃とした。

## 3. 結果と考察

### 3.1 マクロファージを活性化し，亜硝酸塩を生成させる食品の検索

**表1** に64種類の食品の水抽出物について，亜硝酸塩生成能を調べた結果を示した。どの食品もエタノール抽出物には亜硝酸塩生成能がなく，また，水抽出物それ自身には亜硝酸塩は含まれていなかった。亜硝酸塩生成能が認められた食品は，コメ，コムギ，トウモロコシ，ソバ，ダイズ，キャベツ，セロリ，パセリ，春菊，レタス，ニンニク，ニラ，アスパラガス，ゴマ，コショウ，茶，マンゴー，ワラビの18種類であり，部位別では，種子に活性があるものが多かった。これらの食品で活性化されたマクロファージが生成する亜硝酸塩量は，既知の活性化剤であるリポポリサッカライド(LPS)

© The Ito Foundation

表1　食品の水抽出物のマクロファージ活性化能*

| 科 | 食品 | 部位 | 抽出物濃度 (μg/ml) | 亜硝酸塩濃度 (nmol/$10^6$ cells) |
|---|---|---|---|---|
| イネ | コメ | 種子 | 2000 | 43.9±0.9 |
| | | | 200 | 42.3±2.4 |
| | | | 20 | 30.6±0.7 |
| | コムギ | 種子 | 2000 | 13.9±2.4 |
| | | | 200 | ND** |
| | トウモロコシ | 種子 | 2000 | 80.7±2.9 |
| | | | 200 | ND |
| タデ | ソバ | 種子 | 2000 | 80.7±0.6 |
| | | | 200 | 39.0±2.9 |
| | | | 20 | ND |
| マメ | ダイズ | 種子 | 2000 | 71.0±5.1 |
| | | | 200 | 10.0±1.6 |
| | | | 20 | ND |
| アブラナ | キャベツ | 葉 | 2000 | 59.6±1.9 |
| | | | 200 | ND |
| セリ | パセリ | 葉 | 2000 | 15.7±0.4 |
| | | | 200 | ND |
| | セロリ | 葉 | 2000 | 33.1±6.2 |
| | | | 200 | ND |
| キク | 春菊 | 葉 | 2000 | 82.2±3.4 |
| | | | 200 | 67.3±1.9 |
| | | | 20 | 16.2±1.1 |
| | レタス | 葉 | 2000 | 62.1±4.4 |
| | | | 200 | 14.6±0.4 |
| | | | 20 | ND |
| ユリ | ニンニク | 鱗茎 | 2000 | 72.0±1.3 |
| | | | 200 | 31.7±3.9 |
| | | | 20 | ND |
| | ニラ | 葉 | 2000 | 15.4±0.7 |
| | | | 200 | ND |
| | アスパラガス | 芽 | 2000 | 22.3±4.5 |
| | | | 200 | ND |
| ゴマ | ゴマ | 種子 | 2000 | 7.9±1.1 |
| | | | 200 | ND |
| コショウ | コショウ | 種子 | 2000 | 24.7±0.3 |
| | | | 200 | 21.2±2.6 |
| | | | 20 | ND |
| ツバキ | 茶 | 葉 | 2000 | 102.3±6.5 |
| | | | 200 | 61.5±0.6 |
| | | | 20 | ND |
| ウルシ | マンゴー | 果実 | 2000 | 22.6±0.4 |
| | | | 200 | ND |
| ウラボシ | ワラビ | 茎 | 2000 | 81.7±3.7 |
| | | | 200 | 61.8±2.2 |
| | | | 20 | ND |

* LPS (10μg/ml)の活性は70±3.5
**検出されず

© The Ito Foundation

で活性化させた場合の最大値（およそ 100 nmol/$10^6$ 細胞）に近い値を示すものもいくつかみられた。

3.2　食品成分で活性化されたマクロファージによるN-ニトロソモルフォリンの生成

活性化マクロファージが亜硝酸塩，硝酸塩を生成する経路については，まず，L-アルギニンから酵素反応により一酸化窒素（NO）が生成するが，このNOは非常に不安定な化合物であるため，酸素や水とただちに反応して亜硝酸塩，硝酸塩を生成すると説明されている[6]。したがって，マクロファージの存在する環境中に適当なアミンがあれば，NOはアミンと反応してN-ニトロソアミンが生成される[4]。そこで次に，亜硝酸塩生成能が認められた食品にN-ニトロソ化反応も認められるかどうかを調べるため，**表1**で亜硝酸塩生成能の認められた18種類の食品中，活性が高かったコメ，ソバ，ダイズ，アスパラガス，ワラビの水抽出物をマクロファージ，モルフォリンとともに培養し，N-ニトロソモルフォリン生成量を測定した。**表2**にその結果を示すが，5種類の食品中，コメのみにN-ニトロソモルフォリンの生成が認められた。生成量は 4.5 nmol/$10^6$ 細胞であり，LPS（10 μg/ml）で活性化した場合よりも高かった。

3.3　生体内で生成しうる亜硝酸塩とN-ニトロソアミン

**表2**　食品抽出物で活性化されたマクロファージによるN-ニトロソモルフォリンの生成

| 食　品 | N-ニトロソモルフォリン* (nmol/$10^6$ cells) |
|---|---|
| コメ | 4.5±0.2 |
| ソバ | ND |
| ダイズ | ND |
| アスパラガス | ND |
| ワラビ | ND |

＊ LPS（10 μg/ml）の活性は2.6±0.1

本研究の結果，食品成分によって活性化されたマクロファージが生成しうる亜硝酸塩量は，最大100 nmol/$10^6$ 細胞であった。この量を濃度で表すと100 μM，およそ5 ppm（亜硝酸根として）となる。マクロファージが生成・分泌した亜硝酸塩は培地中でかなり希釈されているので，局部的には，亜硝酸塩濃度は 100 ppm 以上に達する場合もあると考えられる。

N-ニトロソアミンについては，存在するアミンの種類，濃度によって大きく左右され，推測が非常に難しい。本実験の結果から，培地中のN-ニトロソモルフォリン濃度は0.6 ppm であった。アミンのN-ニトロソ化の速度はアミンの pKa が低いほど速い[4]ので，pKa から単純に計算すると，N-ニトロソジメチルアミンでは，数 ppb 程度と思われる。しかし，アミンのニトロソ化の速度はアミン濃度に比例するので，生体内で生成しうる値は，これらよりかなり低いと思われる。

一方，ハム，ベーコン等の肉製品に残存する亜硝酸塩は，10数 ppm 程度である。N-ニトロソアミンは，N-ニトロソジメチルアミンで最大 10 ppb 程度，通常は1 ppb を越えないと報告されている[7]。生体内で生成しうる亜硝酸塩，N-ニトロソアミンを総量として肉製品由来のものと比較することは非常に困難である。しかし，生体がこれらの化合物に暴露される局部での濃度で考えるならば，生体内で生成される場合の方がはるかに高い場合があると言えよう。いずれにせよ，疫学調査も含めた様々の角度からのデータの蓄積が必要と思われる。

## 4.　要　約

マクロファージは活性化されると中間体として一酸化窒素（NO）を生成し，NOは最終産物の亜硝酸塩となる。本研究では，生体内での亜硝酸塩生成量を推測する一助とする目的で，マクロファ

© The Ito Foundation

ージを活性化し，亜硝酸塩を生成する成分を含む食品を検索した。64種類の食品中で，コメ，ソバ，ダイズ，アスパラガス，ワラビなど18種類の食品の水抽出物に活性が検出された。コメでは，中間体のNOによりモルフォリンが効率よくN-ニトロソ化された。これら食品成分で活性化されたマクロファージによって生成された亜硝酸塩は，およそ5ppm，N-ニトロソモルフォリンは0.6ppmであり，局部的には亜硝酸塩濃度が100ppm以上に達する場合もあると考えられた。また，これらの値は，肉製品由来の亜硝酸塩，N-ニトロソ化合物と比べ，同等以上であった。

**文　献**


1) Green, L.C., Wagner. D.A., Ruiz de Luzuriaga. K., Istfan, N., Young, V.R. and Tannenbaum, S.R.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 7764-7768 (1981)

2) Wagner, D.A., Young, V.R. and Tannenbaum, S.R.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 4518-4521 (1983)

3) Stuehr, D.J. and Marletta, M.A.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 7738-7742 (1985)

4) Miwa, M., Stuehr, D.J., Marletta, M.A., Wishnok, J.S. and Tannenbaum, S.R.: Carcinogenesis 8, 955-958 (1987)

5) Miwa, M., Tsuda, M., Kurashima, Y., Hara, H., Tanaka, Y. and Shinohara, K.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 159, 373-378 (1989)

6) Marletta, M.A.: Chem. Res. Toxicol., 1, 249-255 (1988)

7) Searle, C.E.編, Chemical Carcinogens, 第2版, 2巻, p. 829-868, アメリカ化学会, ワシントン, 1984.


© The Ito Foundation

# 免疫化学的手法による牛肉中のタンパク同化ステロイドおよびその関連化合物の一斉分析

## A Method for Immunochemical Simultaneous Determination of Anabolic Steroids and Their Related Compounds in Beef

安生　孝子・伊東　富晴・松木　容彦
((財)食品薬品安全センター，泰野研究所)

Takako Anjo, Tomiharu Ito and Yasuhiko Matsuki
(Food and Drug safety Center, Hatano Research Institute)

An enzyme immunoassay (EIA) of zeranol and gas chromatography/mass spectrometric method for determination of several anabolic steroids included zeranol in beef were progressed.

EIA was carried out using horse raddish peroxidase as a labelled enzyme in micro-titer plate coated with second antibody. Antiserum against zeranol was prepared by using 7-hemisuccinoyloxyzeranol-BSA conjugate as an immunogen. Enzyme conjugates were prepared from 7-hemisuccinoyloxyzeranol or zearalanone 7-(O-carboxymethyl) oxime and peroxidase. The clean-up of zeranol in beef was efficiently attained by a combination of extraction method and solid-phase extraction method. Standard curve was constructed in the range of 10–1000 pg/well for zeranol in the buffer added beef extract and quantitaion limit of zeranol is estimated about 800 pg/g of beef.

In addition, a GC/MS method for validation of accuracy and precision in the avove immunoassay of anabolic steroids was examined in their TMS derivatives using DB-5 as a capillary column. An additional purification steps using two kinds of solid-phase extraction to the clean-up procedure described above succeeded in determining these steroids in beef simultaneously by a capillary GC/MS. The calibration curves for seven authetic compounds could be constructed in the range of50–1000 pg when injected with beef extract.

### 1. 目　的

近年，国内外において肉牛の生産性向上の目的で種々のタンパク同化ステロイドが使用されているが，それらの市販牛肉への残留の危険性およびこれら牛肉の摂取によると思われる小児の性的発達異常等の報告がなされており，これらステロイドの検出，定量法[1~4]の確立が急務とされている。

我々は，数種のタンパク同化ステロイドについて，第1に簡便かつ高感度な酵素免疫測定法(EIA)による一斉分析法の確立を，第2に本法の信頼性の確認と微量一斉分析を目的とするキャピラリー GC/MS による分析法の確立を企てた。昨年度はこれらの測定法を確立するために必要な抗血清を調製するとともに，キャピラリー GC/MS による数種のタンパク同化ステロイドの各標準品の分析条件とこれらの牛肉からの clean-up 法について基礎的な検討をした[5]。今年度はさらに clean-up 法などに検討を加え，また，特に外国で汎用されているタンパク同化ステロイドに着目し，EIA 法を組み立てることを試みた。

© The Ito Foundation

## 2. 方　法

### 2.1 試　薬

西洋ワサビペルオキシダーゼ（EC 1. 11. 1. 7）（HRP ; type VI, 300 units/mg solid）は Sigma 社製を，第2抗体（抗ウサギ IgG（ヤギ）IgG）は生化学工業㈱製をそれぞれ用い，また，マイクロプレート（MS 3596 F/H）は住友ベークライト㈱製を用いた。Estrone（$E_1$）は三菱化成工業㈱より，内標（IS）の diethylstilbestrol-$d_8$（DES-$d_8$）は MSD Isotopes 社（CANADA）よりそれぞれ購入し，ethynylestradiol（ET-$E_2$）は帝京大医・神戸川博士より供与された。Zearalanone（ZER）は zeranol（α-ZLA）から，またβ-zearalanol（β-ZLA）と Zearalanone 7-(O-carboxymethyl)oxime（ZER 7-CMO）は ZER から，各々常法に従って当研究室で合成した。Bond Elut SI と Bond Elut $NH_2$ は Analytichem International 社製を用い，あらかじめ，前者については酢酸エチル／n-ヘキサン（5：95，4m$l$）で，また後者についてはクロロホルム／イソプロパノール（3：1，4m$l$）とn-ヘキサン（10m$l$）で洗浄して使用した。また，Sep-pak Silica は Waters 社製を用い，あらかじめ酢酸エチル（10m$l$）とベンゼン（20m$l$）で洗浄して使用した。ウサギ抗α-ZLA 抗血清は昨年度調製したものを使用し，その他の試薬類は昨年度と同様の，または市販の試薬特級を用いた。

### 2.2 GC/MS 測定条件

装置：Shimadzu GC/MS QP 1000

カラム：DB-5 ヒューズドシリカキャピラリー（0.25mmi.d.×30m，0.1μm df）

インジェクター：ソルベントレスムービングニードル

インジェクター温度：290℃

オーブン温度：160℃（1min）→15℃/min（4min）→10℃/min（4min）→5℃/min（6min）→290℃（10min）

セパレータ温度：250℃

イオン源温度：250℃

イオン化電圧：70eV

### 2.3 TMS 化条件

試料に20% BSTFA-MeCN（0.1m$l$）を加え，60℃で17時間加温して TMS 化した。この反応液を直接 GC/MS に付した。

### 2.4 HRP 標識体の調製

7-Hemisuccinoyloxyzeranol（α-ZLA 7-HS）または ZER 7-CMO をそれぞれジオキサンに溶解し，1-ethyl-3-(3-dimethylamiopropyl) carbodiimide・HCl および N-hydroxysuccinimide（いずれも2～4培モル量）を加えて37℃に加温。AcOEt で希釈して水洗し，$Na_2SO_4$ で乾燥，溶媒を留去して活性エステルを得。得られた活性エステルをジメチルホルムアミド（DMF）に溶解し，計算量の活性エステルの DMF 溶液（HRP に対して5倍モル量）を HRP（1.8mg）の 50mM リン酸緩衝溶液（pH 7.4）に徐々に攪拌しながら加えた後4℃で一夜放置。反応液を PD-10を用いるゲル濾過に付し，タンパク溶出画分を凍結乾燥した後，0.1M NaCl と0.1% BSA を含有する 50mM ホウ酸緩衝液（pH 7.0）でタンパク 1mg/m$l$ の濃度に溶解し，−20℃に保存。

### 2.5 EIA の方法

第2抗体を固相化したマイクロプレートの各ウェルに，標準溶液または試料，抗血清および酵素標識体の各 50μ$l$ を入れて室温で一夜インキュベート。各ウェルを生理食塩液で洗浄した後，o-phenylenediamine-$H_2O_2$ 溶液（50mM クエン酸緩衝液，pH 4.5, 150μ$l$）を入れてインキュベート。6N $H_2SO_4$（50μ$l$）を添加して酵素反応を停止した後，490nm における吸光度を測定した（マイクロプレートリーダー MR 600，A Dynatech Product）。

© The Ito Foundation

2.6　試料溶液の調製

牛ひき肉（20g）にメタノール（50 ml×2）を加えてホモジナンズ後，遠心分離して上清を得。上清をn-ヘキサン（30 ml）で洗浄した後，水35 mlを加えジクロロメタン（120，100，80 ml）で抽出。ジクロロメタン層を20% NaCl水溶液50 mlで洗浄後，無水$Na_2SO_4$で乾燥し，減圧下溶媒留去した。得られた残渣をジクロロメタン（4 ml）に溶解後，その1 mlをとり再度濃縮した。この残渣に1M炭酸緩衝液（pH 10.5，1 ml）を加え，酢酸エチル（4 ml）で抽出，溶媒留去後，酢酸エチル／n-ヘキサン（5：95，1 ml）に溶解し，Bond Elut SIカラムに通導した。酢酸エチル／n-ヘキサン（5：95，4 ml）で洗浄後，クロロホルム／イソプロパノール（3：1，4 ml）で溶出。溶媒を留去後n-ヘキサン（1 ml）に再溶解し，Bond Elut $NH_2$に通導した。n-ヘキサン（4 ml）で洗浄後，クロロホルム／イソプロパノール（3：1，10 ml）で溶出し，溶媒を留去して得られる残渣を2.3の操作に従ってTMS化した。

また，別にジクロロメタン溶液（1 ml）を濃縮後，その残渣をベンゼン（0.5 ml）に再溶解し，Sep-pak Silicaカラムに通導した。ベンゼン（5 ml）で洗浄後，酢酸エチル（5.5 ml）で溶出し，溶媒を留去してEIAの試料とした。

## 3.　結果と考察

まず，α-ZLA 7-HSまたはZER 7-CMOのHRP標識体をN-ヒドロキシコハク酸イミド法により調製した。すなわち，各ハプテンをジオキサン中，1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide 塩酸塩の存在下，N-ヒドロキシコハク酸イミドと縮合させて，対応するN-succinimidyl esterに導いた。ついで，この活性エステルにHRPにリン酸緩衝溶液を加えて4℃で反応させ，ゲル濾過に付して目的とする酵素標識体を得た。

EIAは，第2抗体を固相化したマイクロプレートを用い，二抗体法によりB/F分離を行い，結合型酵素活性をo-phenylenediamine-$H_2O_2$を基質とする吸光光度法により測定した。α-ZLA 7-HS-BSAをウサギに免疫して得た抗血清は，希釈率数万倍の抗体価の高いものであり，また，EIAの方法により標準曲線を作成することにより検討した抗血清と近縁化合物との交差反応性は，ZERに対して300%以上と高い値を示したが，α-ZLAの異性体であるβ-ZLAに対して数%，$E_1$などの他のステロイドに対してはほとんど反応性を示さなかった。EIA測定系は，酵素標識体としてα-ZLA 7-HS-HRPまたはZER 7-CMO-HRPを用いたとき，各々の標準曲線を2～250 pg/wellの範囲で作成することができ，ブリッジホモロガスEIA系よりもヘテロロガス系の方が若干高感度な標準曲線を与えた（**Fig. 1**）。

つぎに，牛肉抽出物のEIAの検出レベルに及ぼす影響について検討した。すなわち，ジクロロメタン抽出，ジクロロメタン抽出—アルカリ洗浄およびジクロロメタン抽出—Seppakカラムなど異なる精製操作により得られる抽出物を用いて，これらの共存下での検出レベルの比較を行った。その結果，いずれの抽出物を用いた場合にも，各ウェルに使用する試料50 μl中に存在する抽出物の量が，牛肉12.5 mgに相当する量以下では比較的良好な標準曲線の作成が可能であったが，それ以上の抽出物の共存下では抗原抗体反応あるいは酵素反応が阻害され，標準曲線を作成することは困難であった。各ウェル当たり牛肉12.5 mgに相当する抽出物が共存するときの標準曲線はほぼ10～1000 pg/wellの範囲で作成することができた（**Fig. 2**）。因みに牛肉1g当たりに換算すると，その検出感度は800 pgであった。

一方，EIAの方法による測定結果の信頼性の

© The Ito Foundation

確認と数種のタンパク同化ステロイドの微量一斉分析を目的として，キャピラリーGC/MSによる分析法を昨年度にひき続き検討した。今年度は，昨年度検討したHEX, DES, $E_2$ およびZERに，さらに $E_1$，ET-$E_2$ および $\alpha$-ZLAを追加し，モニタリングイオンの質量差の大きいこれら7種の化合物について，四重極型GC/MSを用いて検討した。その結果，カラムにDB-5（5％フェニルメチルシリコン）を用いた時，これらのTMS誘導体の相互分離は良好であり，各々のピーク形状も優れていた。また，四重極型のMSを用いたため，m/z 207（HEX）から449（ZER）までの広範囲のフラグメントイオンを使用しても一斉分析が可能となり，標準品の測定においては，再現性の

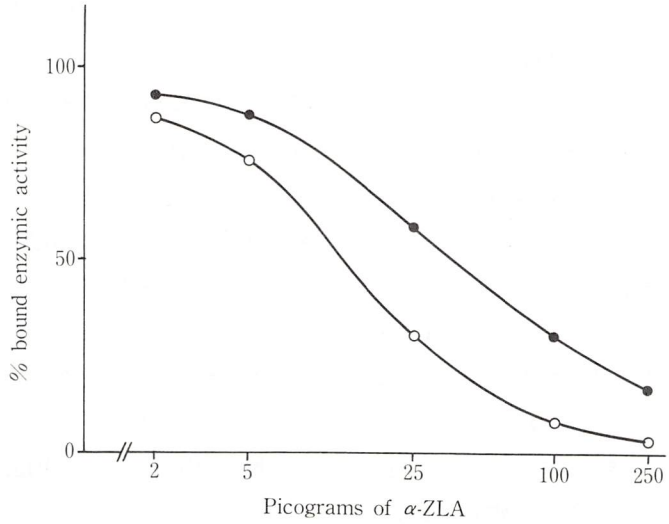



**Fig. 1** Standard curves for enzyme immunoassay of $\alpha$-ZLA using different hapten-enzyme conjugate in buffer.
● $\alpha$-ZLA 7-HS-HRP; ○ ZER 7-CMO-HRP

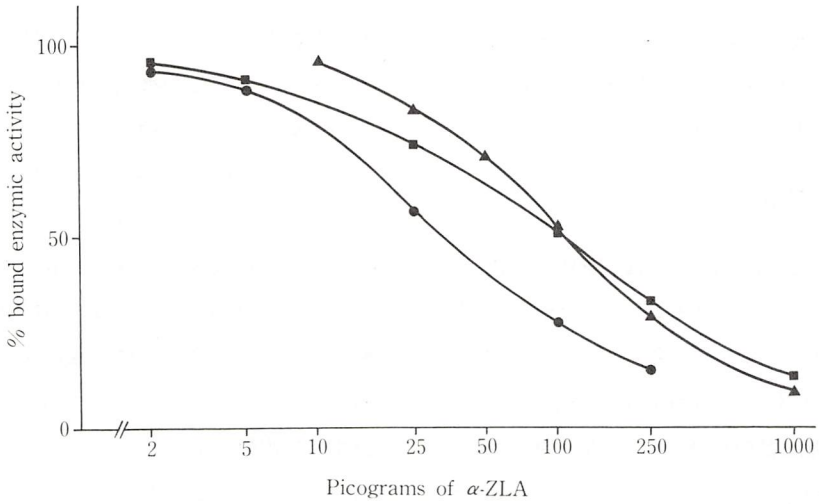



**Fig. 2** Standard curves for enzyme immunoassay of $\alpha$-ZLA in buffer added or not added to beef extract.
● not added beef extract; ▲ added $CH_2Cl_2$ extract; ■ added $CH_2Cl_2$ extract followed by solid-phase extraction

© The Ito Foundation

高い結果が得られた。

つぎに，牛肉からのこれらの抽出精製法について検討した。その結果，測定法を確立するうえで，牛肉中に含まれる脂質関連物質が測定対象物質の相互分離やピーク形状に与える影響が大きく，脂質除去法として一般的に用いられるn-ヘキサン—メタノールによる分配とジクロロメタンによる逆抽出の液—液分配法のみでは，これらの夾雑物の除去は困難であった。そこで，さらに液—液分配により得られるジクロロメタン層を炭酸緩衝液（pH 10.5）で洗浄し，つづいて Bond Elut SI および Bond Elut $NH_2$ カラムを用いて精製したところ，脂質関連物質の残渣が大幅に減少した。その結果，クロマトグラム上の妨害ピークが除去され，また各測定対象物質の相互分離および各々の保持時間の再現性も良好となった（**Fig. 3**）。

吸着や揮散性などの物理化学的性質の異なる多成分の微量分析においては各成分すべてについての安定したピーク高を得ることは困難であったが，標準品を牛肉の抽出精製後の残渣とともに注入すると，各成分ともほぼ50 pg まで定量が可能となり，インジェクションポートでのこれら抽出物の各成分に対する保持効果によると考えられた（**Fig. 3**）。そこで，牛肉の抽出精製後の残渣の TMS 化物に7種の標準品の TMS 誘導体を加えて検量線を作成したところ，いずれも50～1000 pgでほぼ満足すべき直線性が得られた。現在，より精度の高い汎用性のある測定系を確立するため，

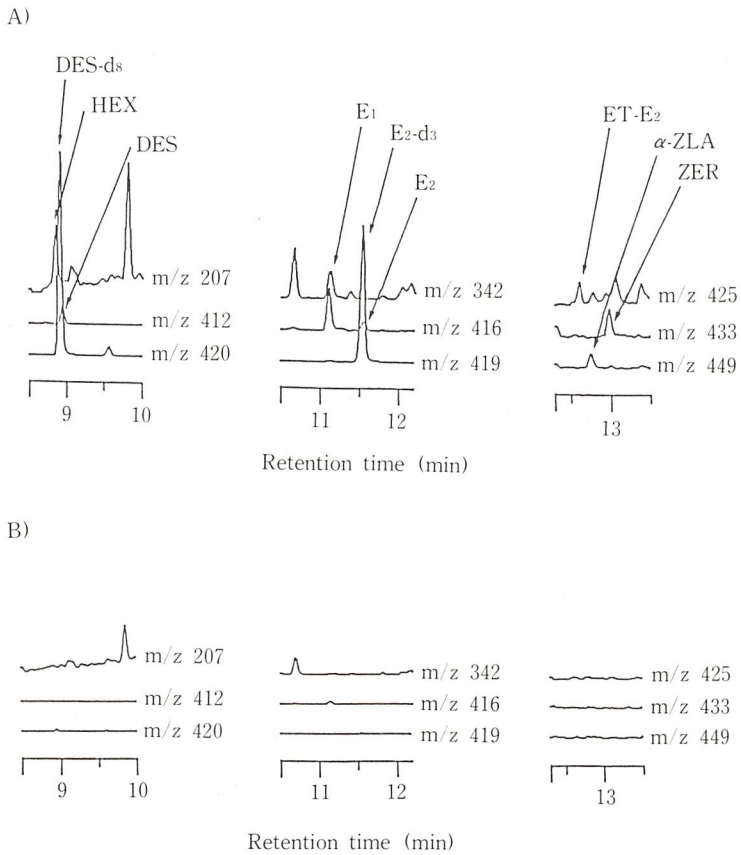
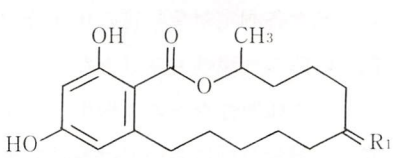



**Fig. 3**　Typical chromatograms of TMS derivatives of seven anabolic steroids obtained by selected ion monitoring.
A）Standard compounds＋beef extract
B）Beef extract

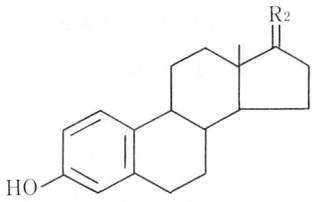
© The Ito Foundation




Zeranol (α-Zearalanol) : $R_1$=

β-Zearalanol : $R_1$=

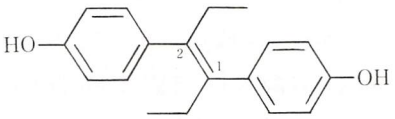
Zearalanone : $R_1$=O




Estrone : $R_2$=O

Estradiol : $R_2$=

Ethynylestradiol : $R_2$=




Diethylstilbestrol : $C_1-C_2$=trans

Hexestrol : $C_1-C_2$ saturated

**Chart** Structures of anabolic steroids and their related compounds

抽出残渣中での誘導体化や精製法について検討中である。

## 4. 要　約

昨年度作製したウサギ抗α-ZLA抗血清を用い，第2抗体を固相化したマイクロプレートを用いるEIA法を検討した。標識酵素としてHRPを用い，二抗体法によりB/F分離を行い，測定系とそれらの条件および牛肉からのclean-up法などを検討した。その結果，緩衝液中では2～250 pg/well，牛肉抽出液共存下ではおよそ10～1000 pg/wellの範囲でそれぞれ標準曲線を作成することができた。因みに牛肉中での濃度に換算すると，α-ZLAの検出限界は0.8 ng/gである。今後，測定法としての精度や再現性等を確認し，定量法の確立を図るとともに，すでに抗血清を作製した他のタンパク同化ステロイドについてもEIA法を組み立て，しいては一斉分析法としての確立を試みる予定である。

一方，キャピラリーGC/MSによるこれらタンパク同化ステロイドの微量一斉分析法では，種々検討の結果，カラムにDB-5を用いるとき，各標準品のTMS誘導体は良好な相互分離とピーク形状を示した。牛肉からのこれらの抽出精製を，EIA法に供する試料をさらにカートリッジカラムに通導して行った結果，クロマトグラム上に試料由来の夾雑ピークもほとんど認められず，再現性も良好であった。これら牛肉抽出物の共存下に各標準品をGC/MSに付すと，いずれも注入量で50 pgを検出することが可能であった。今後，回収率等を確認して測定法を確立する予定である。

### 文　献

1) H-J. Stan and B. Abraham, J. Chromatogr., **195**, 231-241 (1980)
2) 渡部健二朗，木川　寛，河村太郎，宮崎泰之，分析化学，**38**，712-717 (1989)
3) T. R. Covey and D. Silvestre. Biomed. Environ. Mass Spectrom., **15**, 45-56 (1988)
4) 宮崎泰之，橋本常生：第56回日本食品衛生学会講演要旨集 p. 55 (1988)
5) 安生孝子，伊東富晴，松木容彦：伊藤記念財団，食肉に関する助成研究調査成果報告書，**7**，210-214 (1989)

© The Ito Foundation

# 畜産食品中の残留抗菌性物質の系統的分析法の確立に関する研究

A Study on the Systematic Analysis of Residual Antibacterials Agents in Livestock Products

堀江　正一・斉藤　貢一・星野　庸二
能勢　憲英・方波見　重兵衛（埼玉県衛生研究所）

Masakazu Horie, Kouichi Saito, Youji Hoshino, Norihide Nose and Jubei Katabami (Saitama Prefectural Institute of Public Health)

High-performance liquid chromatography (HPLC) with UV detection and microbiological assay were applied to detect the residual antibacterial agents in livestock products.

The drugs were extracted with 0.2% metaphosphoric acid-methanol (7 : 3), followed by a Bond Elut $C_{18}$ clean-up procedure. The extracts were analyzed by HPLC and TLC-bioautography using *Micrococcus luteus* ATCC 9341. The HPLC separation was carried out on a TSK-gel ODS-80 $T_M$ (15 cm × 4.6 mm i. d.) using 5 mM aqueous oxalic acid solution-acetonitrile (60 : 40) as a mobile phase at flow-rate of 0.5 ml/min, and detected at 275 nm. The recoveries of each drug added to pork were 74.8-91.2%. The limits of detection were below 0.05 μg/g for tetracyclines, penicillins, sulfa drugs and erythromycin, 0.1 μg/g for kitasamycin, oleandmycin and tylosin, 1.0 μg/g for spiramycin.

## 1. 目　的

近年，日本人の食生活の欧米化に伴い，畜産物の需要は年々増加傾向にある。これに伴い畜産動物の飼養形態も著しく変貌し，多頭羽集団飼育へと変化を遂げてきた。一方，畜産動物の過密飼育に伴う感染症の予防と治療のため，数多くの抗生物質および合成抗菌剤が使用されており，これら医薬品の濫用による畜産物への薬物の残留が懸念されている。このことから，畜産物の安全性を確保するため，迅速で汎用性の高い分析法の開発が要求されている。

従来，畜産物中に残留する抗菌性物質の分析は個別あるいはグループ別に行われており，残留の可能性の高い多くの抗菌性物質を検査するには多くの労力と長時間を必要とした。

今回著者らは，$C_{18}$ カートリッジを用いた簡易な試料調製法と検出に高速液体クロマトグラフィー（HPLC）とバイオアッセイを伴用した簡易且つ迅速で多くの抗菌性物質を分析できる方法について検討したので報告する。

## 2. 実験方法

### 2.1 試料および試薬

試料は埼玉県内で市販されていた豚肉，牛肉，鶏肉および埼玉県食肉衛生検査センターで行われたと畜検査において抗菌性物質の残留が疑われた食肉を使用した。

（1） 標準抗菌性物質：実験に用いた抗生物質および合成抗菌剤は，動物用医薬品として比較的

© The Ito Foundation

使用量の多い下記のものを使用した。

テトラサイクリン系抗生物質（TCs）

テトラサイクリン（TC），オキシテトラサイクリン（OTC），クロルテトラサイクリン（CTC），ドキシサイクリン（DOXY）。

ペニシリン系抗菌物質（PCs）

ペニシリンG（PC-G），アンピシリン（ABPC）。

マクロライド系抗生物質（MLs）

エリスロマイシン（EM），タイロシン（TS），スピラマイシン（SPM），キタサマイシン（KT），オレアンドマイシン（OM）。

サルファ剤

スルファモノメトキシン（SMMX），スルファジメトキシン（SDMX）。

（2）標準溶液：各10mgを精秤し，MLsおよびサルファ剤はメタノール100m*l*に，TCsおよびPCsは蒸留水100m*l*に溶解して標準溶液を調製し，適宜30%アセトニトリルで希釈して標準溶液とした。

（3）除タンパク・抽出用溶液：0.2%メタリン酸とメタノールを（7：3）の割合に混合したものを用いた。

（4）薄層クロマト板：シリカゲル60 $F_{254}$ プラスチックシート Art. 5735（Merck社製）

（5）プラスチック製角型ペトリ皿：日水製薬製（230mm×80mm×15mm）

（6）展開溶媒：（A）クロロホルム-メタノール（9：1），（B）クロロホルム-メタノール（1：3）

その他の試薬はすべて特級品あるいはHPLC用を使用した。

2.2　装置およびHPLC測定条件

（1）高速液体クロマトグラフ：使用したHPLC装置はすべて島津製作所製であり，LC-6AにSPD-6A型紫外分光光度計を接続，測定波長は275nm，感度 0.04 AUFSに設定し，データはクロマトパックC-R3Aで処理した。

分析カラムはTSK-gel ODS-80$T_M$（15cm×4.6mm I.D.，東ソー）を用いた。移動相は5mMシュウ酸水溶液-アセトニトリル（60：40）を用い，流速を0.5 m*l*/minに設定した。注入量は10$\mu l$とした。

（2）自記分光光度計：日立製作所製330型

2.3　試験溶液の調製

前報[1]に準拠し，次のとおり調製した。試料5gを採り，除タンパク・抽出溶液100m*l*を加えて，2分間ホモジナイズした後，濾過補助剤ハイフロスーパーセルを厚さ約1mmに敷いた吸引濾過器（桐山ロート）を用いて濾過した。濾液を40℃の水浴中で約20 m*l*に減圧濃縮した後，Bond Elut $C_{18}$（500 mg）に負荷し，蒸留水20 m*l*で洗浄した後，メタノール10 m*l*で溶出した。溶出液を減圧乾固した後，残留物を30% アセトニトリル 1 m*l*に溶解して試験溶液とし，その10$\mu l$をHPLCおよびTLC-バイオオートグラフィーに供した。

2.4　TLC-バイオオートグラフィー

試験菌として*Micrococcus luteus* ATCC 9341を用いた。試験菌液の調製は「動物用抗生物質製剤検定一般基準」[2]に従い調製した。検査用培地にはAntibiotic medium 5（Difco社製）を用い，検査用角型平板培地の調製は「畜水産食品中の残留物質検査法第1集の3」[3]に準拠した。

薄層板の下端より2cmの位置に各抗生物質標準溶液および試料溶液10$\mu l$をスポットし，これを上昇法により10cm展開後風乾し，検査用角型平板培地に貼付した。30分間放置後薄層板を取り除き，これを30℃，17±1時間培養した。得られたバイオオートグラムからRf値および阻止円直径を測定した。

2.5　フォトダイオードアレイ検出HPLCによる抗菌性物質の確認

LC-6Aに島津製作所製SPD-M6A型フォトダイオードアレイ検出器を接続，データはNEC

© The Ito Foundation

PC-9801 VX-4 パーソナルコンピューターで処理した。

## 3. 結果および考察

### 3.1 前処理法の検討

残留抗菌性物質の分析は，各薬物の理化学的性質が異なることから様々な前処理法が報告されている。しかし，畜産物中に残留する数多くの抗菌性物質を迅速に分析し，汎用性のある方法を確立するためには，抽出-クリーンアップ操作は可能な限り統一された手法が要求される。そこで，先に著者らが報告した[1,4,5] メタリン酸-メタノール混液で除タンパクと同時に抽出し，$C_{18}$カートリッジでクリーンアップを行う方法を応用することにした。

先に著者らは，市販されている$C_{18}$ カートリッジのサルファ剤に対する保持能力を比較し，Baker $C_{18}$(500mg)が最も優れていることを報告した[1]。そこで，Baker $C_{18}$ (500 mg) を用いて各抗菌性物質の保持能力を調べた。Baker $C_{18}$ カートリッジは **Table 1** に示すとおりTCsに対する保持が強すぎ，約80%が溶出されなかった。

TCsは2価の金属イオンとキレートを形成することが知られており[6,7]，このことが保持能力に影響を及ぼしているものと思われる。金属イオンとのキレート形成を防ぐため，マスキング剤としてEDTA[8,9]が用いられている。そこで，EDTA処理を試みたが回収率は満足できるものでなかった。このことから，他のカートリッジを検討したところ，**Table 1** に示すとおり Bond Elut $C_{18}$ (500 mg) を用いることにより満足できる結果を得ることができた。

他の抗菌性物質はいずれのカートリッジを用いても80%以上の回収率を得ることができた。以上の結果から，クリーンアップ用カートリッジにはBond Elut $C_{18}$ (500 mg) を用いることにした。

次に，除タンパク・抽出用溶液を検討した。マクロライド系抗生物質は一般に酸性水溶液中では不安定であるとされている[10]。そこで，除タンパク・抽出溶液中のメタリン酸の濃度を0.1～1.0%の範囲で変えて回収率に及ぼす影響を調べたところ，メタリン酸濃度が高くなるに従い回収率は顕著に減少した。なお，0.1% では除タンパク効果が幾分不十分であった。以上の結果から，除タンパク・抽出溶液には0.2%メタリン酸-メタノール (7：3) を用いることにした。

本法による豚肉に対する回収率を **Table 2** に示す。なお，PCs および MLs の回収率はディスク法を用いた。

### 3.2 TLC-バイオオートグラフィー

#### 1) Rf値による同定

微量分析法としてHPLC法は極めて有効な手法である。しかし，PC-G, ABPC, EM, OMのように紫外部吸収も蛍光も有しない物質や，KT,

**Table 1** Comparison of Disporsable Reversed-Phase $C_{18}$ Cartridge

| Drugs | Recovery (%) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Bond-Elut $C_{18}$ | | Sep-Pak $C_{18}$ | | Bakerk $C_{18}$ | |
| | untreated | treated[a)] | untreated | taeated | untreated | treated |
| OTC | 95.6 | 96.1 | 90.4 | 92.9 | 15.8 | 44.3 |
| TC | 93.7 | 95.5 | 81.3 | 88.7 | 6.0 | 27.2 |
| CTC | 90.2 | 91.8 | 78.5 | 87.7 | 6.7 | 28.1 |
| DOXY | 91.2 | 89.5 | 71.5 | 76.7 | 7.0 | 28.2 |

Recovery of tetracyclines from 20m*l* of pork extract. Samples were added with 0.25 μg/m*l* of each drug. Results of three replicates.
a)： pretreated with 10m*l* of 0.2M EDTA.

© The Ito Foundation

SPMのように短波長領域に紫外部吸収を有するものの，複数の成分から成る物質の微量分析にHPLC法を応用するには困難な点が多い。そこで，PCsおよびMLsの分析にはTLC-バイオオートグラフィーを用いることにした。TLC-バイオオートグラフィーによって得られたPCsおよびMLsのRf値を**Table 3**に示す。EMとOLを除きRf値を比較することにより同定が可能であった。EMとOLは他の溶媒系を用いた報告でもRf値が近似しており[11,12]，分離・同定は困難と思われる。

2)　検量線および検出限界

PC-GおよびABPCは2～40ng/spot, EMは5～200ng/spot, KT, OLおよびTSは20～200ng/spot, SPMは200～1000ng/spotの範囲で良好な直線性を示した。各抗生物質の検出限界はPC-GおよびABPCは2 ng/spot, EMは5 ng/spot, KT, OLおよびTSは20 ng/spot, SPMは200 ng/spotであった。これを食肉中濃度に換算すると，PC-G, ABPCおよびEMは0.05μg/g, KT, OLおよびTSは0.1μg/g, SPMは1μg/gであった。

3)　他の抗菌性物質の影響

分析対象薬物として取りあげているTCsおよびサルファ剤の他，動物用医薬品として比較的多用されているアミノグリコシド系抗生物質およびクロラムフェニコール（CP）について，PCsおよびMLsを分析するうえでの妨害の有無を検討した。

アミノグリコシド系抗生物質は水溶性塩基性化合物であることから，本試料調製法では全く回収されず，問題とはならない。TCs，サルファ剤およびCPは80%以上回収されるが，**Table 3**に示すとおりRf値が異なること，およびサルファ剤は試験菌に対して抗菌活性が弱く問題とはならなかった。

3.3　HPLC測定条件の検討

TCsおよびサルファ剤は270nm付近にかなり強い紫外部吸収を有していることから，HPLCを用いて検出することにした。

TCsの分離は一般にODSカムラを用いた逆相クロマトグラフィーで行われているが，カラムに吸着され易く，ピークがテーリングを示すなどの点が問題とされている。これは，TCsがカラム充

**Table 2**　Recoveries of antibiotics and sulfa drugs from pork

| DruGs | Added (μg/g) | Recovery (%) |
|---|---|---|
| PC-G | 0.1 | 90.2±5.9[a)] |
| ABPC | 0.1 | 82.5±7.5[a)] |
| EM | 0.1 | 81.2±9.3[a)] |
| OL | 0.2 | 91.2±4.3[a)] |
| KT | 0.2 | 88.7±6.5[a)] |
| SPM | 0.2 | 89.5±7.7[a)] |
| TS | 0.2 | 89.3±8.3[a)] |
| OTC | 1.0 | 83.6±4.1[b)] |
| TC | 1.0 | 82.3±2.5[b)] |
| CTC | 1.0 | 75.8±2.2[b)] |
| DOXY | 1.0 | 74.8±3.7[b)] |
| SMMX | 1.0 | 85.8±3.2[b)] |
| SDMX | 1.0 | 83.8±2.6[b)] |

Values are mean ± S.D. (n = 5).
a) Bioassay method.　b) HPLC method.

**Table 3**　Rf values of Antibiotics on TLC-Bioautography

| Antibiotics | Solvent system[a)] A | B |
|---|---|---|
| PC-G | 0.02 | 0.84 |
| ABPC | 0.02 | 0.64 |
| EM | 0.05 | 0.17 |
| OL | 0.09 | 0.24 |
| KT | 0.65 | 0.90 |
| SPM | 0.11 | 0.42 |
| TS | 0.38 | 0.81 |
| OTC | 0.00 | 0.00 |
| TC | 0.00 | 0.00 |
| CTC | 0.00 | 0.00 |
| DOXY | 0.00 | 0.00 |
| CP | 0.47 | 0.93 |

a) A ; $CH_3Cl$ : MeOH = 9 : 1
　B ; $CH_3Cl$ : MeOH = 1 : 3

© The Ito Foundation

塡剤中に僅かに存在する金属イオンとキレートを形成するためとされている。これを防ぐため，クエン酸[13,14]やシュウ酸[8,9]を移動相に加え，金属イオンをマスキングする方法が報告されている。

そこで，移動相にシュウ酸水溶液-アセトニトリル系，カラムにInertsil ODSをもちいて至適分離条件を検討した。その結果，移動相に5 mMシュウ酸水溶液-アセトニトリル（60：40）を用いることにした。このHPLC条件によって得られた混合標準溶液のクロマトグラムを**Fig. 1**に示す。

3. 4　市販食肉の残留調査

本法を用いて埼玉県内で市販されている豚肉80検体，鶏肉80検体および牛内15検体について残留調査を実施したが，いずれの抗菌性物質も検出されなかった。

そこで，埼玉県食肉衛生検査センターで行われた畜検査において，抗菌性物質の残留が疑われた食肉を用いて本法の有用性を検討した。と畜検査時の簡易検査法[15]で抗菌性物質の残留が疑われた食肉23検体について本法を適用したところ，7検体からOTCが，1検体からSDMXが検出された。

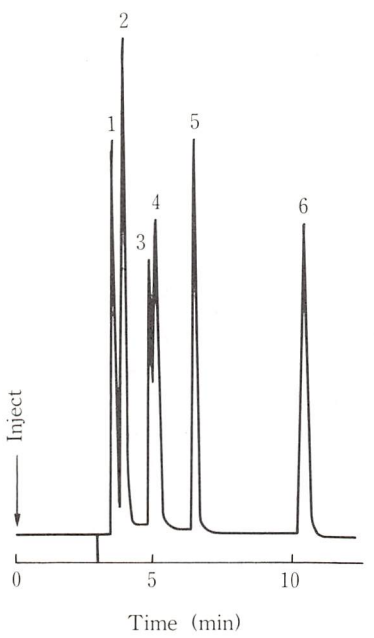



**Fig. 1**　Typical chromatogram of standard mixture. Peaks: 1=OTC, 2=TC; 3=CTC; 4=DOXY; 5=SMMX; 6=SDMX (each 20 ng).

検出された物質がOTCおよびSDMXであることを確認するため，先に報告したフォトダイオードアレイ検出器付高速液体クロマトグラフ法[5]で同定を行った。**Fig. 2**-AにSDMXが1.0 μg/g検出された牛肉のクロマトグラムを示す。保持時間が10. 9分とSDMX標準品と同じであるピーク成分について，その吸収スペクトルを標準品と比較したところ，スペクトルパターンは**Fig. 2**-Bに示すとおりほぼ一致していた。このことから，10. 9分に溶出されているピーク成分をSDMXであると確認した。

**Fig. 2**-Aに示した牛肉抽出液のクロマトグラムの中で，SDMXより早く溶出（8. 7分）されているピークを同様の手法を用いて調べた結果，ピーク成分はSDMXの主代謝産物である$N^4$-アセチル体であることが判明した。

なお，**Fig. 2**-Bおよび**Fig. 2**-C中のsimilarity indexとは，吸収スペクルト間の類似度を数量的に評価したものである。

同様にしてOTCも確認することができた。

## 4. 要　約

動物用医薬品として比較的汎用されているペニシリン系抗生物質（PC-G, ABPC），テトラサイクリン系抗生物質（OTC, TC, CTC, DOXY），マクロライド系抗生物質（EM, OL, KT, SPM, TS）およびサルファ剤（SMMX, SDMX）の系統的分析法の開発を検討した。

(1)　試料の前処理は0. 2%メタリン酸-メタノール（7：3）で除タンパクと同時に抽出し，Bond Elut $C_{18}$（500 mg）によりクリーンアップを行った。

(2)　検出には，UV吸収を有している抗菌性物

© The Ito Foundation

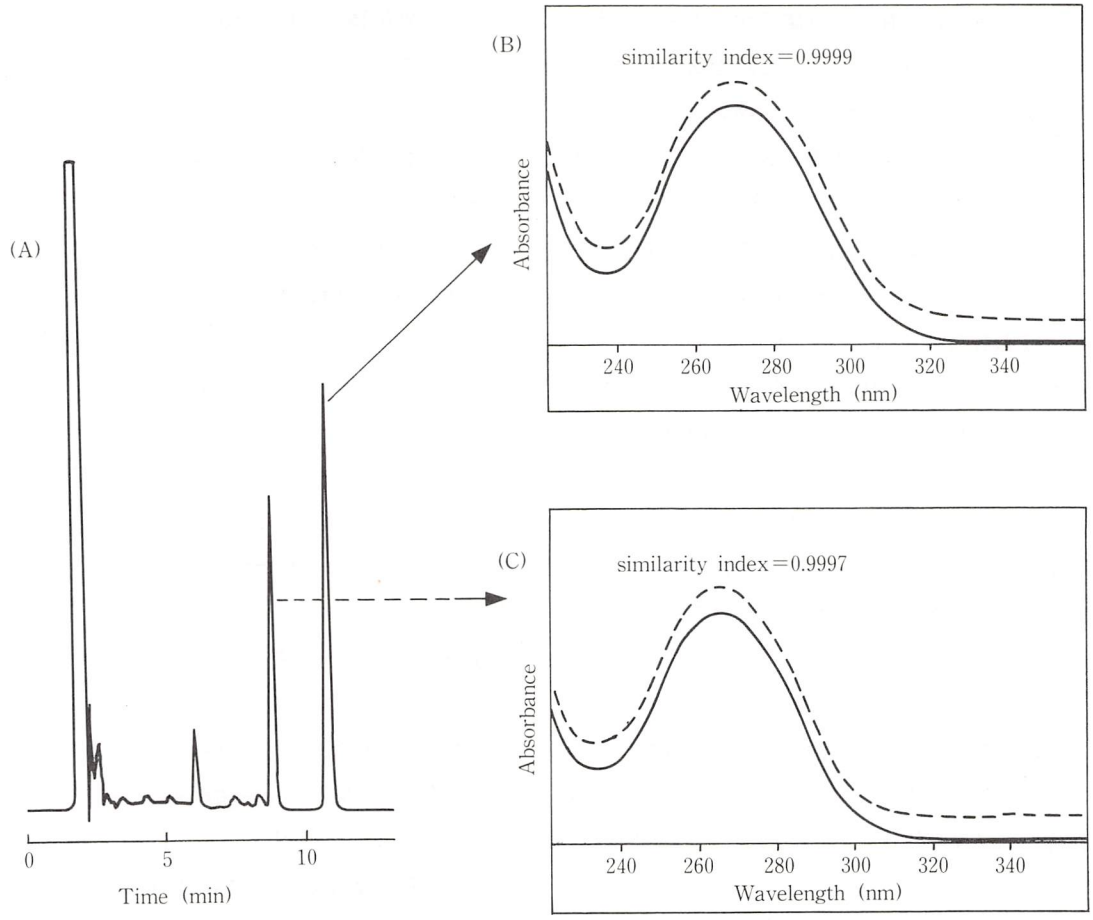



**Fig. 2** (A) Chromatogram of beef sample in which sulfadimethoxine was detected 1.0 μg/g, plotted at 275 nm. (B) Normalized spectra of the peak (at 10.9 min) obtained from beef sample (----) and standard sulfadimethoxine (——). (C) Normalized spectra of the peak (at 8.7 min) obtained from beef sample (----) and standard $N^4$-acetylsulfadimethoxine (——).

質（OTC, TC, CTC, DOXY, SMMX, SDMX）はHPLCを，UVも蛍光吸収もない抗菌性物質（PC-G, ABPC, EM, OL, KT, SPM, TS）はTLC-バイオオートグラフィーを用いた。

(3) HPLC測定条件は，カラムにInertsil ODS（15 cm×4.6 mm i.d.），移動相に5mMシュウ酸水溶液-アセトニトリル（60：40）を用い，検出波長は275nmとした。

(4) 本法における添加回収率は一部の抗菌性物質を除き80%以上であった。検出限界はSPMを除き0.1μg/gまで十分検出が可能であった。

## 文 献

1) 堀江正一，斉藤貢一，星野庸二，能勢憲英，方波見重兵衛：食肉に関する助成研究調査成果告書，7, p. 215-220，伊藤記念財団，東京（1989）

2) 動物用抗生物質製剤検定一般基準，農林水産省告示第1437号，昭和54年10月17日

3) 厚生省環境衛生局乳肉衛生課編：「畜水産物中の残留物質検査法第1集の3」（1981）

4) M. Horie, K. Saito. Y. Hoshino N. Nose, E. Mochizuki, H. Nakazawa: *J. Chromatogr.*, 402, 301-308（1987）

5) M. Horie, K. Saito, Y. Hoshino, N. Nose, N. Hamada, H. Nakanawa: *J. Chromatogr.*, 502, 371-378（1990）

6) T. Sakaguchi, M. Toma, T. Yoshida, H. Omura, H. Takatsu: *Chem. Pharm. Bull.*, 6, 1-8（1958）

© The Ito Foundation

7) 石野正蔵，坂口武一，森本功，興津知明：薬学雑誌，101，118-124（1981）
8) 岡　尚男，宇野圭一，原田健一，鈴木真言：薬学雑誌，103，531-537（1983）
9) H. Oka, H. Matsumoto, K. Uno, K. Hayada, K. Kadowaki, M. Suzuki: *J. Chromatogr.*, 325, 265-274（1985）
10) 二宮喜代治編「家畜の抗生物質と化学療法」，養賢堂，p. 95-124
11) R. Bossuyt, R. Renterghen, G. Waes: *J. Chromatogr.*, 124, 37-42（1976）
12) H. Vanderhaeghe, L. Kerremans: *J. Chromatogr.*, 193, 119-127（1980）
13) 寺田久屋，麻野間正晴，坂部美雄：衛生化学，30，138-143（1984）
14) 竹葉和江，神崎政子，村上文子，松本昌雄：東京都衛研年報，35，187-191（1984）
15) 厚生省環境衛生局乳肉衛生課編：「畜水産物中の残留物質検査法1集の5」（1983）

© The Ito Foundation

# タンパク質に結合した蛍光物質の定量による畜肉およびその加工品の酸化的劣化の評価

Evaluation of Oxidative Deterioration in Meats and Meat Products by Determination of Protein-Bound Fluorescence

藤　本　健四郎（東北大学農学部）

Kenshiro Fujimoto (Faculty of Agriculture, Tohoku University)

Oxidative deterioration of stored pork, egg yolk and sardine was investigated by solid sample spectrofluorometry in comparison with some conventioanl methods. Formation of fluorescence (excitation maximum 425-455 nm, emmision maximum 500-520 nm) was observed during storage of all these lipid foods at 25℃ in the dark, and it was retained mainly in an organic solvent-insoluble fraction suggesting that fluorescent substances are bound to proteins. Its intensities gave a fairly good correlation with oxygen uptake.

Peroxide values, thiobarbituric acid (TBA) values, and fluorescence intensities of organic solvents extracts increased commonly in three foods in the early stage of storage, however, they decreased in egg yolk and sardine after they reached a maximum at 5-7 days of storage. On the other hand, both peroxide values and fluorescence intensities of organic solvent extracts continuously increased in pork throughout the storage period, while TBA values decreased in the latter stage similar to other foods. The instability of hydroperoxides in egg yolk and fish was suggested to be due to their high content of phospholipids and highly unsaturated fatty acids such as arachidonic acid and eicosapentaenoic acid.

The reaction mechanism for formation of protein-bound fluorescence was investigated using the model systems consisting of lysozyme and fish oil. Lysine, methionine and histidine were preferentially decomposed under incubation with fish oil or aldehydes commonly found in oxidized oils. And of all, lysine was found to be most important in fluorescence formation, because acetylation of free amino groups in lysozyme resulted in the complete inhibition of fluorescence formation.

Present studies suggested that measurement of protein-bound fluorescence is most useful for the assessment of lipid oxidation in various types of lipid foods in any stage of oxidation.

## 1. 目　的

脂質を多く含む食品において，加工・貯蔵中の脂質酸化反応が大きな問題となっている。脂質酸化が起こると，風味が劣化するだけでなく，天然色素の退色や褐変による変色，必須アミノ酸の減少，タンパク質の消化率の低下，さらには毒性の発現などの栄養学的な諸問題も生じてくる。

脂質酸化反応は，脂質に含まれる多価不飽和酸の活性メチレン基からの水素の引き抜きに始まる連鎖的なフリーラジカル反応である[1)]。本反応で生成する中間生成物であるフリーラジカルは，通常の条件では短寿命のため，定常状態での濃度は極めて低い。そこで食品中の脂質劣化を評価する

© The Ito Foundation

には，第一次の安定生成物であるヒドロペルオキシドの定量，すなわち過酸化物価が一般的である。その方法としては，ヨウ素滴定法が常法であるが，最近感度のよい新しい定量法が開発され，極微量のヒドロペルオキシドの定量も可能となった[2]。しかし，食品中に生成したヒドロペルオキシドは必ずしも安定ではなく，とくに肉類に多いヘムタンパク質や遷移金属は容易にヒドロペルオキシドを分解して種々の二次酸化生成物を生成する。こうした酸化生成物は，さらに各種の食品成分，なかでもアミノ化合物と反応して，褐変をひき起こすが，その際に複合体も形成するため，有機溶剤で抽出されにくくなる。したがって，このような食品中の脂質劣化の評価においては，過酸化物価は必ずしも適当な指標ではないことが推定され，事実われわれは水産食品においては過酸化物価で表わされる酸素は，全吸収酸素の２分の１以下で，とくに酸化が進んだ段階ではその比率はさらに低くなることを見出している[3]。これに代る方法としては，チオバルビツール酸（TBA）値やカルボニル価などの酸化二次生成物の定量があるが，これら二次生成物もまた反応性に富むため，その定量が必ずしも適当とは考えられず，むしろ安定な最終生成物の定量が望ましい。しかしながら，こうした生成物はタンパク質と結合するため，有機溶剤に不溶な成分を含み，従来適当な定量方法がなかった。そこで本研究では，脂質酸化によって生成するカルボニル化合物がアミノ化合物と反応すると，蛍光物質を形成することに着目し，今までほとんど検討されてこなかったタンパク質結合型の蛍光物質の定量に焦点を当てて調べた。さらに蛍光形成の機構を明らかにする目的で，本反応に関与する脂質酸化物の検索や，タンパク質中のアミノ酸の反応性についても検討した。

## 2. 方　法

### 2.1 試　料

畜肉としては市販の豚肉（ロース）を用い，またリン脂質に富む食品の例として乾燥卵黄粉末を用いた。豚肉はミンチ後，加熱調理（100℃，５分）し，さらに凍結乾燥した。また，酸化的劣化の進みやすい食品の例として魚肉を取り上げ，マイワシから調製した魚粉をクロロホルム／メタノール（２：１）で脱脂し，これに10％（W/W）の魚油を再添加してモデル系とした。

### 2.2 食品の貯蔵中の酸化的劣化の評価

豚肉を始めとする各種食品試料２ｇを500m$l$容のガラス容器に入れてゴム栓で密栓し，25℃の暗所で保存した。

保存中の脂質酸化に基づく酸素吸収は TCD 検出器付ガスクロマトグラフィー（島津 GC-4C）を用い，モレキュラーシーブ５Ａカラムにより，ヘリウムをキャリアガスとして測定した。

食品からクロロホルム／メタノール（２：１）で抽出した脂質について，過酸化物価[4]，TBA値[5]を測定した。

蛍光測定は，有機溶剤抽出前（粉末），抽出画分（溶液）および抽出後の残渣について行った。また，あらかじめ脱脂後，保存した試料（粉末，対照）についても測定した。粉末試料については，日本分光 FD-1060 型固体試料測定装置のセル内に試料を直接入れ，表面の蛍光を測定した。溶液試料については角型石英セルを用いた。いずれの試料も日本分光 FP-770 型分光蛍光光度計を用いて分析を行った。

### 2.3 タンパク質結合型蛍光物質の生成機構

食品タンパク質のモデルとして，構造のよく知られている卵白リゾチームを選び，脂質としては酸化が進みやすい魚油を用いて両者を混合し（10：1，W/W），2.2と同様に保存試験に供した。

© The Ito Foundation

経時的に蛍光強度を測定すると共に，酸素吸収量，過酸化物価，塩酸加水分解後のアミノ酸組成，有効性リジン量[6]の測定を行った。

### 3. 結果および考察

保存した豚肉および卵黄からは，両者共に固体試料測定装置によって蛍光が検出された。そのスペクトルは **Fig. 1** に示すように豚肉（ex. mox. 455nm, em. max. 520nm）と卵黄（ex. max. 425 nm, em. max. 525nm）とではやゝ異なっていた。魚肉からも類似したスペクトル（ex. max. 450nm, em. max. 500nm）が観察されたことから，このような蛍光は，脂質を含むタンパク質食品に共通したものと推定された。蛍光スペクトルの差は，主として脂質，とくに脂肪酸組成に依存するものと思われる。

本蛍光の経時的変化を豚肉について調べると，**Fig. 2** に示したように，保存時間の経過と共に増大した。一方，あらかじめ脱脂した試料では保存中に蛍光がほとんど変化しなかったことから，本蛍光は脂質酸化に伴って生成することが示唆された。保存した試料をクロロホルム／メタノールで脱脂してから同様に蛍光を測定すると，その蛍光強度は図に示すように脱脂前より強くなった。このことは，本蛍光物質はタンパク質と結合しており，有機溶剤には不溶性であることを示しており，また表面に滲出した脂質が，蛍光の測定を妨害していることがわかった。全く同様な現象が魚肉でも観察されたが，その蛍光強度は豚肉よりも強く，これは魚肉中の脂質酸化が速いことの反映と推定される。一方，卵黄では保存前から同様の蛍光が観察され，脱脂試料でも蛍光にほとんど差がなかったことから，実験供試前にすでに脂質酸化がある程度進んでいたものと思われ，また，大量に存在するカロチノイド色素の影響も考えられる。

保存中の脂質酸化を他の指標によって調べると，過酸化物価は豚肉では保存期間を通じて漸増したのに対し，卵黄ではほとんど増加せず，一方，魚肉では急増後，極大値を経て減少した。このような過酸化物価の経時変化の大きな相異は，含まれ

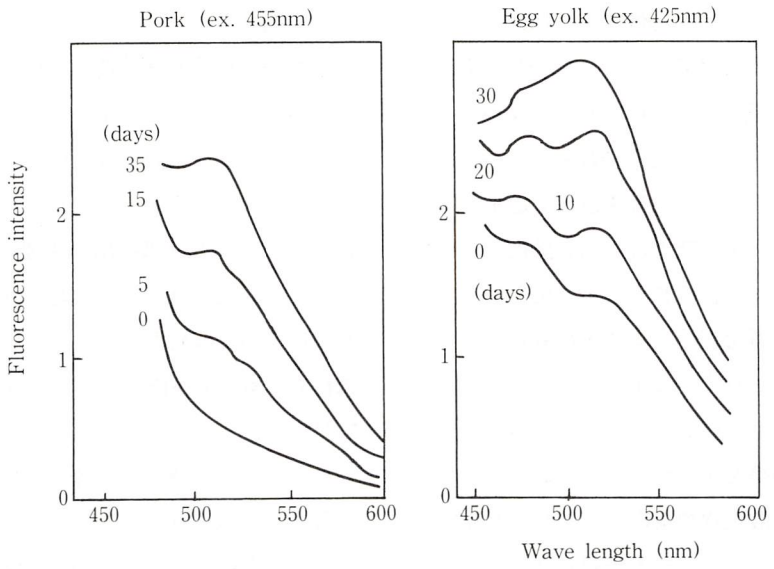



**Fig. 1** Emission spectra of freeze-dried pork and egg yolk stored at 25℃ in the dark determined by solid sample spectrofluorometry.

© The Ito Foundation

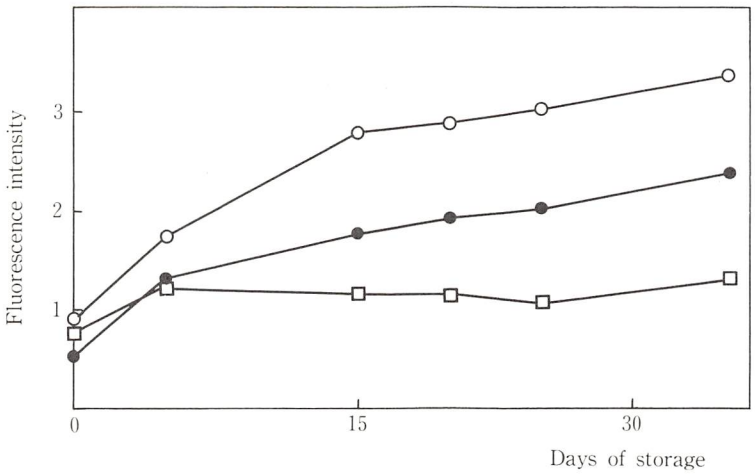



**Fig. 2** Time course of fluorescence intensity (ex. 455 nm, em. 510nm) by solid sample spectrofluorometry of freeze-dried pork stored at 25℃ in the dark.
O After extraction, ● Before extraction, □ Control

ている脂質組成に依存していると思われる。すなわち，卵黄ではリン脂質の比率が高く，こうした食品では酸素吸収から見て脂質酸化が進行しているにもかかわらず，ヒドロペルオキシドがほとんど蓄積しない例が知られている[7]。豚肉と魚肉での過酸化物価の相異は，前者ではオレイン酸，リノール酸が主要不飽和脂肪酸であるのに対し，後者では反応性の高い高度不飽和酸が多いことに起因している。また，TBA値は，いずれの食品でも保存期間が長くなると減少したが，これはTBAとの反応基質が，マロンアルデヒドを始めとする反応性に富む酸化二次生成物であることによると考えられる。このような各種の脂質酸化劣化指標と，脂質酸化に基づく酸素吸収との相関を示したのが**Table 1**である。豚肉，卵黄共に固体試料測定装置で測定した蛍光強度と酸素吸収の相関係数はいずれも0.9以上と高く，魚肉（0.97）やリゾチーム系（0.98）でも同様の結果が得られたことから，本法がタンパク質食品の脂質酸化による劣化を判定する指標として優れていることを示唆している。一方，過酸化物価やTBA値は，食品の種類によっては保存期間が長くなると逆に低下することがあり，こうした場合には不適当なことが明らかになった。

**Table 1** Correlation coefficients between oxygen uptake and fluorescence intensity, peroxide value and TBA value for freeze-dried pork and egg yolk stored at 25℃ in the dark for 30 days.

| | Pork | Egg yolk |
|---|---|---|
| Fluorscence intensity | | |
| Whole* | 0.913 | 0.902 |
| Defatted* | 0.919 | 0.744 |
| $CHCl_3$/MeOH (2:1) extract | 0.973 | 0.834 |
| Peroxide value | 0.907 | 0.669 |
| TBA value | 0.255 | 0.668 |

*Determined by solid sample spectrofluorometry.

タンパク質結合型の蛍光物質の生成機構を明らかにするため，リゾチームと魚油からなるモデル系を用いて，脂質酸化に伴う化学変化について調べた。その結果，前述のように酸素吸収と蛍光強度の間には密接な相関が認められ，またアミノ酸の中では，メチオニン，リジン，ヒスチジンの損失が著しかった（**Table 2**）。しかし，アミノ基の

© The Ito Foundation

**Table 2** Amino acid composition of lysozyme reacted with oxidized lipids

| Amino acids | Control lysozyme (g/gN) | Reacted lysozyme[a)] (g/gN) | Loss (%) |
|---|---|---|---|
| Asp | 1.02 | 0.93 | 8.8 |
| Thr | 0.31 | 0.28 | 8.2 |
| Ser | 0.37 | 0.34 | 6.8 |
| Glu | 0.28 | 0.25 | 9.1 |
| Pro | 0.09 | 0.09 | 0 |
| Gly | 0.34 | 0.31 | 8.8 |
| Ala | 0.40 | 0.37 | 7.5 |
| Cys | 0.33 | 0.30 | 9.1 |
| Val | 0.23 | 0.21 | 8.7 |
| Met | 0.11 | 0.09 | 18.2 |
| Ile | 0.26 | 0.23 | 9.8 |
| Leu | 0.39 | 0.35 | 9.1 |
| Tyr | 0.21 | 0.19 | 7.3 |
| Phe | 0.18 | 0.18 | 0 |
| Lys | 0.33 | 0.28 | 13.8 |
| His | 0.08 | 0.07 | 12.5 |
| Arg | 0.70 | 0.64 | 7.9 |

a) Lysozyme was incubated with fish oil (10%, w/w) at 25℃, RH 79% for 30 days.

保護で蛍光形成が完全に抑えられ，また有効性リジンの低下も著しかったので，蛍光形成にはリジンが最も重要な反応基質であることが明らかになった。また，酸化脂質中の成分としては，不飽和アルデヒドが同じスペクトルの蛍光をアミノ酸との反応で生ずることから，蛍光形成に関与していることが示唆された。本蛍光物質の構造については，塩基性条件や水素化ホウ素ナトリウム還元により蛍光強度を減衰する特徴から，共役シッフ塩基型の発色団の存在が示唆された。

## 4. 要　約

凍結乾燥豚肉を始めとする，脂質含量の多い動物性タンパク質食品の保存中の脂質劣化評価法について検討した。脂質劣化を酸素吸収で判定し，酸素吸収量と各種脂質劣化評価法との相関を比較したところ，固体試料測定装置で測定した食品の表面の蛍光強度が最も優れていた。本蛍光はタンパク質に結合しており，有機溶剤に不溶であった。一方，従来から用いられてきた反応性の高い中間生成物は，長期間の保存では減少し，不適当だった。

### 文　献

1) E.N. Frankel, Prog. Lipid Res., 19, 1-22 (1980).
2) 藤本健四郎編，農化，62，1479-1482 (1988)
3) S.Y. Cho, Y. Endo, K. Fujimoto and T. Kaneda, Nippon Suisan Gakkaishi, 55, 545-552 (1989).
4) 日本油化学協会基準油脂分析試験法，2. 4. 12-71.
5) T.C. Yu and R.O. Sinnhuber, J. Am. Oil Chem. Soc., 44, 256-258 (1967).
6) K.J. Carpenter, Biochem. J., 77, 604-610 (1960).
7) J.H. Lee, K. Fujimoto and T. Kaneda, Nippon Suisan Gakkaishi, 47, 881-888 (1981).

© The Ito Foundation

# 微生物の抗酸化性物質の生産能に関する研究

Studies on the Producibility of Antioxidative Materials by Microorganisms

石 川 行 弘 (鳥取大学教育学部)

Yukihiro Ishikawa (Faculty of Education, Tottori University)

Attempts to develop new types of antioxidants have been done. During screening of molds that grow in a malt extract medium, one of *Penicillium* species was found to produce a potent synergist for tocopherol (Toc). A substance was isolated from acetone extract of mycelial mats and purified by solvent fractionation and recrystallization. It was a phenolic compound and identified as atrovenetin (40-3M) on the basis of elementary analysis and spectral data.

Lard with 0.04% Toc and various concentrations of 40-3M was autoxidized via active oxygen method (AOM). 40-3M (0.1%) was an excellent antioxidant and a potent synergist for Toc in lard, the AOM stabilities of which were 406 and 818 hr, respectively. And it remarkably enhanced the stability of vegetable oils, especially rapeseed oil.

As one of safety inspection, Ames test was carried out using *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 with and without S9 mix. 40-3M showed no mutagenicity toward the two strains. However, 40-3M concentrations greater than 100 μg/plate were weakly inhibitory to the growth of the strains.

Molds which can grow in a semi-defined medium containing autoxidized methyl linoleate as a sole carbon source have been isolated. Screening for their abilities to produce superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) was accomplished by using each medium containing malt extract, wheat bran, or autoxidized methyl linoleate. A strain grown in a malt extact medium showed an excellent SOD activity. There was another strain showing high GSH-Px activity when grown on wheat bran medium. No enzyme activities were detectable in an autoxidized linoleate medium. And no relationship between SOD and GSH-Px activities and the producibility of antioxidants can be observed.

## 1. 目 的

食品や生体を構成している脂質を酸素分子による酸化から保護することは，正常な生命活動を維持するうえで大変重要なことである。過酸化脂質は生体内で生成するばかりでなく，食品の味覚，栄養，安全性に悪影響を及ぼして食物として摂取され，そのままの形で，あるいは代謝分解された形で吸収されている。多くの退行性疾患に関与し，その変異原性による発ガン，さらには老化や寿命にも関係していると考えられている。生体内では抗酸化剤や抗酸化酵素が働き，過酸化脂質に対する防御機構を備えている。

本研究では，抗酸化剤であるトコフェロール(Toc)と相乗効果を示す天然抗酸化剤を微生物起源に求め，糸状菌について検討した。これは新しいタイプの抗酸化剤や相乗剤を発見できる可能性が高いからである。今までに，細菌，酵母，放線菌，糸状菌などの生産する抗酸化剤について研究されたが，顕著な効果を示すものはほとんど見いだされておらず研究例も比較的少ない。わずかに *Penicillium herquei*[1] や *Penicillium* 属[2] の野

© The Ito Foundation

生株が強力な抗酸化剤・相乗剤を生産することが認められているにすぎない。糸状菌の培養抽出物とTocとの相乗効果を指標としてスクリーニングを行い，高い相乗性を示した1菌株について有効成分の単離・同定を行った。

また，これまで糸状菌のスクリーニングには麦芽培地を用いてきたが，菌株の分離条件を変えることにより新しいタイプの菌株が得られるものと考え，酸化油を用いた培地によって分離を試みた。酸化油には殺菌力もあり，微生物にとって生育するには非常に厳しい条件下に置かれることになる。しかし，酸化油をあえて培地の主成分とし，その厳しい条件の下で生育した糸状菌は新しいタイプの抗酸化剤の生産能を有するとか，あるいは抗酸化酵素を備えているといった生体防御機能を発揮するものと予想される。それゆえ，酸化油資化性菌を分離し，その抗酸化剤生産能並びにSOD(スーパーオキシドジスムターゼ)，GSH-Px(グルタチオンペルオキシダーゼ)等の抗酸化酵素生産能についても検討した。

## 2. 実験方法

供試土壌：鳥取・岡山県内および九州地方の表層土壌から採取したものを使用した。

抽出物の相乗性試験：通常の測定はAOM改変法で行った。試験管(φ17.5mm)にラード(0.04% Toc含有)7gを入れ，糸状菌の代謝産物20mgを添加して100℃の恒温槽にいれた。空気を30ml/minの割合で吹き込んで酸化させ，POV(過酸化物価)が100に至るまでに要する時間を誘導期とした。

SOD活性の測定：キサンチンがXODによって酸化されてできたスーパーオキシドアニオンがヒドロキシルアミンを酸化し，亜硝酸イオンを生成することを利用する亜硝酸キット法によった。

GSH-Px活性の測定：GSH-Pxが過酸化物(t-Butyl bydroperoxide)をアルコールに還元するとき，GSHは酸化されてGSSGとなる。GR(グルタチオンレダクターゼ)はGSSGを還元し，それと同時にGRの補酵素であるNADPHが酸化されて340nmにおける吸光度が減少することを利用する方法によった。

酸化油資化性菌の分離：自動酸化リノール酸メチルを炭素源とする培地に乳化剤，麦芽，無機窒素源の添加効果ならびに培養方法等について種々検討した後，自動酸化リノール酸メチル0.2%，酵母エキス0.01%およびTween 20 0.1%，塩化アンモニウム(C)，硝酸アンモニウム(N)等(数種類)0.4%を基本培地とした。1次培養は無菌水に土壌粒を加えて懸濁した後，上澄み液100μlを培地に加え，30℃で5日間回転振盪培養した。2次培養としては分離用麦芽培地を灼熱したニクロム線で2～6等分し，1次培養液を白金耳で塗抹した。発生した菌株のコロニーを保存用培地に移した。

## 3. 実験結果および考察

### 3.1 *Penicillium*属の生産する抗酸化剤・相乗剤

土壌中より糸状菌を分離し86株を得た。麦芽培地に培養(24℃，2週間)して菌体のアセトン抽出物とろ液の酢酸エチル抽出物を得た。各々の相乗効果について試験した結果，顕著な効果を示す数種類の菌株が認められたが，その中，*Penicillium*属の1株の有効成分の単離同定を行った。麦芽培地(6l)に培養して菌体抽出物を得た。少量のアセトンを添加してろ別し，アセトン不溶部にメタノールを添加して加熱した後，メタノール可溶部を集めた。濃縮した後メタノールから再結した。黄褐色の微小針状晶(40-3M, ca. 1g)が得られた。TLCを行うとRf0.2付近にUVランプで濃いスポットが認められ，Emmerie-Engel (E

© The Ito Foundation

E）試薬で緑褐色を呈した。

40-3Mの分子量は元素分析およびマススペクトルの結果から，342（$C_{19}H_{18}O_6$）であった。$^1$H-NMRスペクトル（DMSO-$d_6$）の測定結果は次のとおりである。

1.15(3H, s), 1.26(3H, s), 1.44(3H, d, J=6.7Hz), 2.75(3H, s), 4.68(1H, q, J=6.7Hz), 6.84(IH, s)

プロトン数は14であり，分子式で示されるプロトン数18と異っている。本物質はEE試薬の呈色からキレートOH基を有しており，また，抗酸化性を示すことからフェノール性OH基を有しているものと考えられるので，まずメチル化した。ジアゾメタン（エーテル中）でメチル化するとTLC上に多くのスポットが認められ，40-3Mが分解するものと思われる。それゆえ，ヨウ化メチルでメチル化した。TLC上，Rf 0.65付近に黄色のスポットが認められた。HPLC（LiChrosorb SI-60, $CHCl_3$, $\phi$4× 250mm, 280nm）で精製した後，$^1$H-NMRを測定すると，4.018と4.021ppmに新たにメチル化物によるピークが認められ，それぞれ6 Hおよび3 Hのプロトン数に相当した。また，18.12ppmにキレートしたOH基によるピークが認められた。40-3Mを無水酢酸-ピリジン混液でアセチル化してTLC（$CHCl_3$）にかけると，Rf 0.2と0.03にスポットが認められた。アセチル化物（Rf 0.03）の$^1$H-NMRにおいて，2.35，2.37，2.38，2.52ppmにピーク（3H, s）が認められた。

これらの事実は，40-3Mには4個のOH基が存在することを示す。

次に，$^{13}$C-NMRの測定結果は次のとおりである。

14.6； 20.8； 23.3； 25.6； 43.0； 90.9； 104.3； 104.8； 107.5； 116.0； 118.3； 124.1； 131.7； 144.0； 162.1； 165.0； 169.3

炭素数は17であるが，165.0ppmのピークは162.1ppmのピークに比して2倍の高さがあるため，2本のピークが重なったものと思われる。また，169.3ppmのピークはブロードであるため，2本のピークが重なったものと思われ，総計19本のピークが観察される。

40-3M分子内の酸素数について，OH基4個，カルボニル基1個の計5個が$^1$H-NMRから帰属できる。他の1個はIRにおいて1140, 1170cm$^{-1}$に吸収が認められるため環状エーテルの酸素が存在すると思われる。以上の結果から分子式$C_{19}H_{18}O_6$の各元素の帰属ができた。

本物質のデータを既知文献と比較し，Suga *et al.*[3]が単離したdeoxyherqueinoneのものとほとんど一致していた。分子量から考え本物質はatrovenetin[4]またはdemethylherqueichrysin[5]である。両物質の構造を**Fig. 1**に示す。両者の大きな違いはatrovenetinがカルボニル基とOH基の間でキレートしていることである。前述のように40-3Mのtrimethyletherにはキレートしたが基1個が認められるのでatrovenetinと推定される。純品（MITのProf. G. Büchiより恵与）の$^1$H-NMRおよび$^{13}$C-NMRと完全に一致するので，40-3Mはatrovenetinと同定した。

（1） 自動酸化条件における抗酸化試験

Toc 0.04%と種々の濃度の40-3Mを含むラードをAOM条件で自動酸化させ，抗酸化性と相乗効果の試験を行った。**Fig. 2**に示すように40-3MはTocなどに比較してはるかに優れた抗酸化剤で

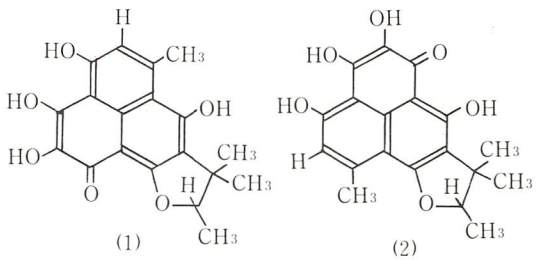



**Fig. 1** Structures of Demethylherqueichrysin (1) and Atrovenetin (2)

© The Ito Foundation

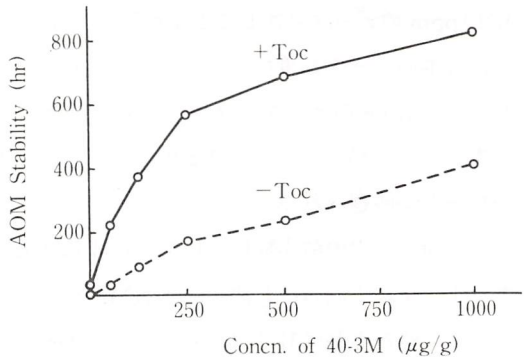



**Fig. 2** Effect of 40-3M on Antioxidative Activity of Tocopherol in Lard

あり，添加量に比例して抗酸化性が著しく増加した。また，Tocとの顕著な相乗効果も示した。植物油に対する添加効果について試験した結果を**Table 1**に示す。いずれの場合にもAOM時間は著しく増加し，特にナタネ油への添加効果が高いことがわかった。

（2） 変異原性試験

40-3Mの濃度を1プレート当たり，1～1000μgの範囲で変化させて *Salmonella typhimurium* TA100, TA98を用いてエームステストした結果，全ての系において変異原性は認められなかった。また，100μg以上添加すると弱い抗菌性が認められた。

3.2 抗酸化酵素活性による糸状菌のスクリーニング

酸化油を唯一の炭素源とする培地に培養して分離した糸状菌43株を用いた。

**Table 1** Effect of 40 - 3M on the Stability of Vegetable Oils

| Oil | AOM stability (hr) | |
|---|---|---|
| | −40− 3 M | +40− 3 M |
| Soybean | 12.9 | 241 |
| Rapeseed | 13.8 | 370 |
| Corn | 16.5 | 250 |

Concn. of 40-3M : 0.05%

(1) 麦芽培地に植菌し，30℃で3日間往復振盪培養した後，ろ液を得る。

(2) ふすま培地に植菌し，30℃で10日間静置培養した後，温水抽出してろ液を得る。

(3) 酸化油培地に植菌し，30℃で5日回転振盪培養した後，ろ液を得る。

上記方法により77種のろ液を得た（生育が悪いものは廃棄した）。

（1） SOD活性を示す糸状菌のスクリーニング

ろ液のSOD活性について検討した結果を**Table 2**に示す。603Nを麦芽培地で培養したものなどに特に強い活性がみられた。酸化油培地のろ液のものにはほとんど活性が認められなかった。これは菌株がSODを生産しないか，菌体内に酵素を生成しているためと考えられるが，SOD活性を有する糸状菌を選択するには酸化油培地での培養は適当でないと思われる。

微生物を起源とするSOD生産菌の探索について，*Bacillus*や*Gluconobacter*などの細菌はMn-SODやFe-SODを生産することが報告されている。しかし，糸状菌起源のSODに関して，Misra and Fridovich[6]が*Neurospora crassa*からのCu, Zn-SODについて報告しているが極めて少ない。SOD活性と抗酸化剤の生産能との関係を見てみると，**Table 2**に示すように，AOM試験で弱い活性がみられた604NのSOD活性はふすま培地で培養したときに比較的強かった。しかし，SOD活性が最も強かった603Nは抗酸化剤の生産能がみられなかった。

（2） GSH-Px活性を示す糸状菌のスクリーニング

**Table 2**に示すように，599Cをふすま培地で培養したものに強い活性がみられたものの，ほとんどのろ液について活性がなく，GSH-Pxと抗酸化剤の生産能との関係も認められなかった。

© The Ito Foundation

**Table 2** Activities of Superoxide Dismutase and Glutathione Peroxidase of Autoxidized Methyl Linoleate-Assimilating Fungi

| Fungal No. | Malt med. | Ox. oil med. | Bran med. |
|---|---|---|---|
| 511C | | | ○GG |
| 513C | ○ | | ○G |
| 516-1C | ◎ | | ◎ |
| 516-2C | ◎ | | ◎ |
| 520C | | ○ | ◎ |
| 522C | ◎ | ◎ | ◎ |
| 524N | S◎ | ◎ | S◎ |
| 530C | | | ◎ |
| 538C | S◎ | | ◎ |
| 543C | | ○ | |
| 547C (M28) | ◎ | | |
| 547N | S◎ | ◎ | ○ |
| 556N | ◎ | | ○G |
| 558C | ○ | | ○G |
| 561C | | | S○G |
| 562N | | | ○ |
| 576N (M27, B50) | | | ◎ |
| 590C | S◎ | ◎ | ◎ |
| 591C (M29, B68) | S◎ | ◎ | S◎ |
| 591N | ◎ | ◎ | ◎G |
| 593C | SS◎ | ◎ | S◎ |
| 595C | S◎ | ◎ | ◎ |
| 595N | ◎ | ◎ | ◎ |
| 596N (M30) | ◎ | ◎ | ◎G |
| 598C | ◎ | ◎ | ◎ |
| 599C | ◎G | ◎ | S◎GGG |
| 599N | S◎ | ◎ | ◎ |
| 603N | SSS◎ | ◎ | ◎ |
| 604C | ◎ | ◎ | S◎ |
| 604N (M87, B73) | S◎ | ◎ | SS◎ |
| 607N | S◎ | ◎ | SS◎ |
| 608N | S◎ | ◎ | S◎ |
| 609C | S◎ | ◎ | SS◎ |

S : SOD activity (S〈SS〈SSS) ; G : GSH - Px activity (G〈GG〈GGG) Growth of fungi : ◎, very good ; ○, good ; Nosign, poor. Figures in parentheses show induction period (hr) of lard on simulated AOM conditions, and M and B are the respective extracts of mycelial mats and culture broth.

© The Ito Foundation

GSH-Pxと類似した抗酸化酵素であるグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)について，微生物起源の研究例がいくつか報告されている。しかし，微生物起源のGSH-Pxに関する研究例は探索した限りではなく，活性測定方法の検討も含め，微生物起源のGSTとGSH-Pxの関連等について研究の余地があるように思われる。

「SOD様作用食品」[7]の例からもわかるように，抗酸化酵素はわれわれの生体において有用なものであり，有用物質を生産する可能性の高い多種多様な微生物を起源としたこれらの酵素のスクリーニングは非常に有意義なことと思われる。

## 4. 要　約

(1) Tocと相乗効果を示す物質を生産する糸状菌のスクリーニングを行った。*Penicillium*属の1株の菌体アセトン抽出物が顕著な効果を示した。有効成分を溶媒分別，再結で単離精製し，元素分析やスペクトル分析によってatrovenetin(40-3M)と同定した。

(2) 40-3Mはラードを基質とするAOM条件下で強い抗酸化性とTocとの相乗性を示した。また，植物油，特にナタネ油の安定性を著しく増大させた。

(3) エームステストによって，40-3Mには変異原性は認められなかったが，100 μg以上添加するとわずかに抗菌性を示した。

(4) 酸化油を唯一の炭素源とする培地を用いて分離した糸状菌のSOD, GSH-Px活性についてスクリーニングした。それぞれの強い活性を示す菌株が認められたが，抗酸化剤生産能との関連は認められなかった。

### 文　献

1) K. Morimoto, T. Yoshiwa, Y. Ishikawa, and T. Hamasaki, J. Jpn. Oil Chem. Soc., 36, 10～15, 1987.
2) 石川，守本，濱崎，油化学講演要旨集，95，1986.
3) T. Suga, T. Yoshioka, T. Hirata, and T. Aoki, Bull. Chem. Soc. Jpn., 56, 3661～3666, 1983.
4) W.A. Ayer, M.S. Pedras, and D.E. Ward, Can. J. Chem., 65, 760～764, 1987.
5) D.A. Frost, D.D. Halton, and G.A. Morrison, J. C. S. Perkin I, 2443～2448, 1977.
6) H.P. Misla and I. Fridovich, J. Biol. Chem., 247, 3410～3414, 1972.
7) 伊藤，丹羽，フリーラジカルの臨床，Vol.1，103～110，日本医学館，東京，1987.

© The Ito Foundation

# 鶏卵法による毒性評価法の検討，特に鶏胚およびラット胎仔に対するエタノールと Cycrophosphamide の影響

Use of Chick Embryo in Screening for Toxicity 1. Effects of Ethanol and Cycrophosphamide on Chick Embryos and Rat Fetuses

中村　経紀 ・ 二宮　博義 ・ 猪股　智夫（麻布大学獣医学部）

Tsunenori Nakamura, Hiroyoshi Ninomiya and Tomoo Inomata
(School of Veterinary Medicine, Azabu University)

Ethanol and cycrophosphamide (CA) were used in this study to compare the toxicity of these on the developing chick embryos and rat fetuses. In chick embryo, ethanol (10%, 0.1m*l*/egg) was injected into a large vessel of superficial yolk sac at day 11 of incubation. CA (0.05mg/0.04m*l*/egg) was injected into the yolk sac at day 5 of incubation. The eggs were opened at day 19 of incubation. In rat, 10% ethanol were feeded to the mothers during 2 weeks before prengnancy and 19 days after pregnancy. CA (12mg/1m*l*/kg) was injected into pregnant mothers intraperitoneally at day 13 of pregnancy. They were sacrificed at day 19 of pregnancy.

Death rate in the chick embryo was 26.7% in ethanol, 16.2% in CA, 12.7% in saline and 6.5% in intact groups. Malformation ratio was 7.0% in CA, 3.8% in saline and, 0% in both ethanol and intact groups. In histologically, the germ cells in the testes and ovaries were not or slightly observed in both ethanol and CA groups. Accordingly, in the testes the seminiferous tubules were not developed well, and in the ovaries the cortex was strikingiy thin. In the rat, dead and absorped fetuses were not observed in ethanol, CA and saline groups. Malformation was only observed in CA group. The ratio was 68%. In histologically, the germ cells in overies were fewer in both ethanol and CA groups than that in saline group. However, in the testes histological difference was not observed among these groups.

In present study, incidence of the external malformation induced by CA was higher in rat fetuses than that in chick embryos. However, abnormality of the gonads was clearly defined in chick embryos compared with that in rat fetuses. In this result, the chick gonad seems to have a sensitivity to chemicals. Thus, it suggests that the use of chick embryo may have some advantage to evaluate the embryo toxicity of the drugs and food additives.

## 1. 目　的

医薬品，食品添加物などの化学物質の開発は，ヒトへの有害な作用を潜在的に増加させつつある。このため，これらの化学物質のヒトに対する作用を予測するうえで，動物モデルによる安全性試験が実施されている。しかし，実験動物の使用は動物福祉に欠けるとの理由から，Russel (1957) の提唱した**3 R**法 (1. Replacement：ホ乳動物から細菌・培養細胞・両性類・魚類・鳥類などへの代替，2. Reduction：使用動物数の制限または縮小，3. Refinement：使用動物の質の向上) に基づいた試験方法，つまり，従来の動物実験に代わる，または，従来の動物実験を改良した試験方法の研

© The Ito Foundation

究開発がすすめられている。このように代替の開発が急がれている中で鶏胚の有用性が注目されつつある。

鶏胚は，卵殻により外界と隔離された環境で発達する。すなわち，鶏胚は母体と受胎産物との間に解剖学的，また，生理学的関連のないまま発生するという点で，ホ乳動物と大きく異っている。これらのことから，通常行われている薬物などの安全性試験には鶏胚は用いられていない[18]。しかし，鶏胚は大量入荷が可能で，安価であり，孵卵中の維持管理も容易である。さらに，鶏胚は広範囲の化学物質に対して感受性が高いといわれている[17]。そこで，ゲッ歯類などを用いて行う医薬品，食品添加物などの化学物質の毒性試験に先行する試験として，鶏胚を用いることが可能であるかどうかについて検討した。

本実験では，エタノールと比較的催奇形性が高いと言われている cyclophosphamide（CA）を用い，鶏胚およびラットに対する影響について調べ，両者を比較検討した。

## 2. 材料と方法

鶏卵は，白色レグホン種の有精卵（50～60ｇ）で，形態に異常のないものを用いた。孵卵は温度37.6±0.1℃，湿度70±５％とした。孵卵開始後５日目に検卵を行い，血管の発生の認められないものは無精卵として除去した。

10％エタノールを0.1m*l*/eggの割合で孵卵11日目に血管内に１回投与した。投与方法は，卵殻約１cmを卵殻膜を傷つけないように除去し，卵殻膜を通して気室に向う太い血管を選んで行った。対照群には同量の生理食塩水を投与した。CA は生理食塩水に溶解し，0.05mg/0.04m*l*/eggの割合で孵卵５日目の卵黄嚢内に１回投与した。対照群には同量の生理食塩水を投与したものと，未投与のものを設けた。

鶏胚は孵卵19日目に剖検し，生死を確認し，生存していた胚は体重を測定の後，外部奇形の有無について調べた。その後，精巣，卵巣を摘出し，ブアン液で固定した。次に，鶏胚は骨格奇形を観察するためアルコール固定し，アリザリンレッド染色を施した。ブアン固定した精巣および卵巣については，パラプラスト包埋し，病理組織学的に観察した。

ラットはウィスター系（体重170～200ｇ）のものを用いた。飼育環境は温度23±１℃，湿度55±５％，12時間照明，12時間消灯とし，飼料および水は自由給餌，自由給水とした。雌雄を同居させ，翌日膣スメア中に精子が確認された日を妊娠０日目とした。

エタノール投与群には10％エタノールを交配の２週間前から妊娠19日目まで飲料水として与えた。CA 投与群には CA を生理的食塩水に溶解し，12mg/1m*l*/kgの割合で妊娠13日目の母体腹腔内に１回投与し，対照群には同量の生理食塩水を投与した。妊娠19日目に剖検し，胎仔の死亡および吸収を確認した後，鶏胚と同様の観察を行った。

## 3. 結　果

鶏胚の死亡はエタノール投与群では28.6％，その対照群の生理食塩水投与群では０％，CA 投与群では16.2％，その対照群の生理食塩水投与群では12.3％で，未処置群では6.5％認められた。奇形の発生は，エタノール投与群および，その対照群と CA 投与群の未処置群には認められず，CA 投与群では7.0％，生理食塩水投与群では3.8％認められた（**Table 1**）。観察された主な奇形は，全身性浮腫，嘴湾曲，眼球突出，趾骨湾曲，肋骨異常（欠損，癒合，波状）などであった。

病理組織学的所見については，エタノール投与群の精巣，卵巣において生殖細胞数の著しい減少，または欠損が認められ，これに伴なって，精細管

© The Ito Foundation

**Table 1** Lethal and teratogenic effects of chick embryos following 10% ethanol (0.1m*l*/egg) and cyclophosphamide (CA ; 0.05mg/0.04m*l*/egg) treatment.

| Type of experiment | Day at treatment | Day at autopsy | No. of eggs | Dead embryos (%) | Living embryos Normal (%) | Living embryos Malformed (%) | Body weight g |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ethanol | 11th | 19th | 30 | 8(26.7) | 22(73.3) | 0( 0) | 25.69±1.11 |
| Saline | 11th | 19th | 20 | 0( 0) | 20( 100) | 0( 0) | 26.82±0.82 |
| CA | 5th | 19th | 142 | 23(0.62) | 109(76.8) | 10(7.0) | 23.69±1.45* |
| Saline | 5th | 19th | 79 | 10(12.7) | 66(83.5) | 3(3.8) | 26.37±1.04 |
| Intact | – | 19th | 120 | 8( 6.5) | 112(93.5) | 0( 0) | 27.01±0.44 |

*= Statistically significant from intact control.

は細く，その数も少なかった。また，卵巣皮質の発達も悪く，薄くなっていた（**Fig. 1**-a，b，c，d）。CA 投与群ではこれらの生殖腺の異常がさらに強く現れていた。

ラット胎仔の死亡または，吸収は，エタノール投与群，CA 投与群，対照群ともに観察されなかった。体重についてはエタノール投与群，CA 投与群において対照群に比べて低い値を示した。奇形の発生については CA 投与群において69.2%で，エタノール投与群，対照群には認められなかった（**Table 2**）。観察された主な奇形は，全身性浮腫，脳ヘルニア，眼球突出，短尾，波状肋骨などであった。

病理組織学的所見については，精巣についてはエタノール投与群は対照群とほぼ同様な所見を示した（**Fig. 2**-a，b）。しかし，卵巣については鶏胚ほどではないが卵巣において生殖細胞数の減少が認められた（**Fig. 2**-c，d）。CA 投与群で

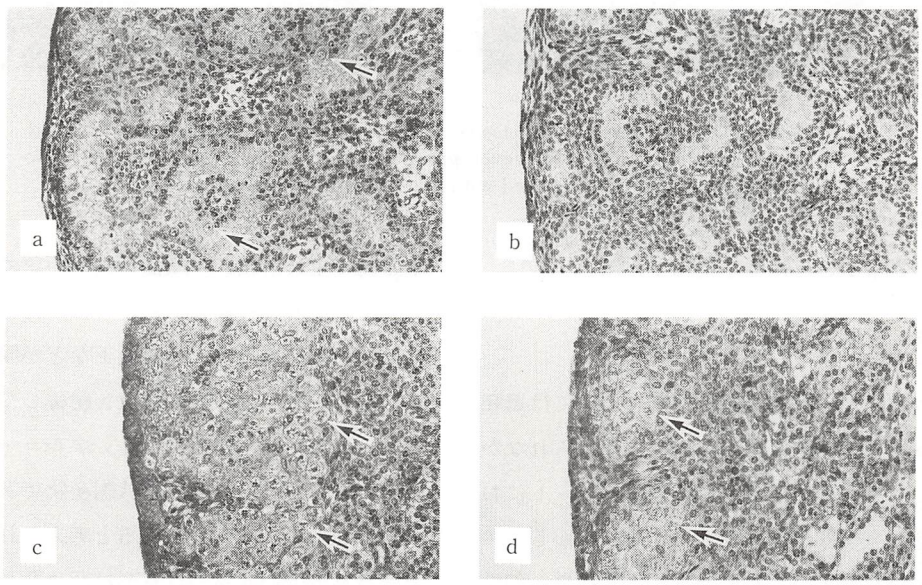



**Fig. 1** Germ cells (see arrows) in testes (b) and ovaries (d) of chick embryos were not or slightly present in ethanol injected group compared with intact control testes (a) and ovaries (c). In the testes the seminiferous tubules were not developed well (b). and in the ovaries the cortex was strikingly thin (d).

© The Ito Foundation

**Table 2** Lethal and teratogenic effects of rat fetuses in 10% ethanol feeded and cyclophosphamide (CA ; 12mg/1m*l*/kg) injected pregnant mothers.

| Type of experiment | Day at treatment | Day at autopsy | No. of fetuses (litters) | Dead fetuses (%) | Living fetuses | | Body weight g |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Normal (%) | Malformed (%) | |
| Ethanol | | 19 | 49(5) | 0( 0) | 49( 100) | 0( 0) | 1.98±0.28 |
| CA | 13 | 19 | 45(5) | 0( 0) | 14( 32) | 31( 68) | 1.70±0.06* |
| Intact | 13 | 19 | 23(2) | 0( 0) | 23( 100) | 0( 0) | 2.43±0.05 |

*= Statistically significant from intact control.

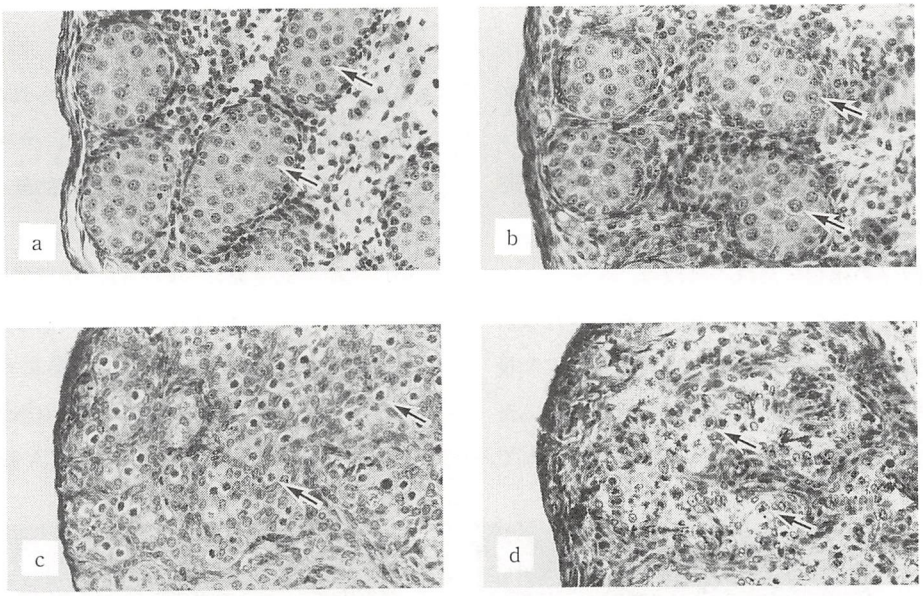



**Fig. 2** Histological difference in rat testes was not observed in both ethanol (b) and intact control group (a). However, germ cells (see arrows) in overies were few in ethanol group (d) compared with that in intact control group (c).

は卵巣の異常がさらに強く現れていた。

## 4. 考　察

今回の実験からエタノール投与については鶏胚およびラットの両方に奇形の発生は認められなかったが，CA投与について見た場合，ラットにおいて奇形の発現率が高く認められた。しかし，エタノール投与および，CA投与による精巣，卵巣への影響，特に生殖細胞に対する影響について見た場合，ラットよりも鶏胚のほうに強く現れた。

慢性アルコール中毒の母体から出生した子供は未熟児で生れ，頭部，顔面の異常が認められ，また，その後の成長過程においては，発育遅延，精神運動面の発達障害，知能低下などが観察されるという[1, 5, 7]。これらの症状を総称して胎児性アルコール症候群と呼んでいる。アルコールの毒性については，アルコールの代謝産物であるアセトアルデヒドによるものであると考えられており，今回ラットでの観察では奇形は認められなかったが，胎児性アルコール症候群の特徴のひとつである体重の著しい減少が観察された。しかし，鶏胚に対してはアルコール投与の影響は認められなか

© The Ito Foundation

った。この理由としては，鶏胚では静脈内投与が可能な程度に血管が発達するのは，孵卵10日目以降であり，その時期にはすでに器官発生は終了していることが考えられる。また，アルコールによる障害を見る場合には，アルコールの投与期間が長い程胎児の体重の減少が強く現れ，奇形の発生率も高くなるという[16]。これらのことを考慮すると，今回の実験ではエタノールは一回投与であったために，鶏胚における体重の減少や，奇形発生が観察されなかったものと考えられる。

一方，CA の催奇形性については，マウス，ラットなどを用いて調べられており，今回観察されたものと同様で，胚の死亡や吸収，胎仔重量の減少，脳ヘルニア，全身性浮腫，眼球突出，短尾，波状肋骨などの外部奇形，内臓奇形，骨格奇形，などが認められている[2, 6, 9, 10, 13, 14]。また，鶏胚についてもこれまで報告されたものとほぼ同様の傾向を示しており，全身性浮腫，嘴湾曲，趾骨湾曲，眼球突出，肋骨の異常（欠損，癒合，波状）などが観察された[3, 4, 15]。

エタノール投与，およびCA 投与による生殖腺への影響について見た場合，これまで鶏胚の生殖腺に対するエタノールおよびCA の影響について言及している報告を見ていない。CA に関してはラットは，母体に CA を投与した場合，胎仔の精巣，卵巣には影響は認められなかったと報告されている[1, 14]。しかし，今回，著者らの実験では，ラットの生殖腺，特に卵巣に僅かであるが生殖細胞数の減少が認められた。鶏胚では精巣および卵巣の生殖細胞数の著しい減少，または，欠損が認められた。すなわち，鶏胚の生殖腺のほうがラットのそれに比べてエタノールや CA に著しく影響されることが観察され，鶏胚の薬物に対する感受性の高さを示唆するものと思われた。

一般に，鳥類の肝臓における S-9 ミクロソーム分画は，催奇形性物質を活性化する酸化酵素がラットのそれよりも多く，このため，肝臓において薬物が代謝され催奇形性物質に変化する場合，鶏胚の肝臓で代謝されたほうが，ラットの肝臓で代謝されるより，薬物の催奇形性作用が強くなると報告されている[11]。また，鶏胚の場合は，胎盤がないことから胎盤のもつ代謝酵素や血液-胎盤関門などの点でラットと大きく異っている。このような代謝機能の相違が本実験における鶏胚の生殖腺にラットのそれよりも強い影響が現れたものと推測される。

いずれにしても今回の実験ではエタノール投与，CA 投与による鶏胚およびラット胎仔に対する影響，特に精巣，卵巣の生殖細胞に対する影響については，ラットよりも鶏胚のほうに強く現れた。このことからヒトや家畜について見た場合，化学物質などによる外部奇形や骨格奇形などの催奇形性を調べることも重要であるが，生殖機能に対する影響をみることも極めて重要な問題点となる。特に，生殖腺に対する薬物の毒性を見る場合には，鶏胚のほうがラットよりもかなり鋭敏であり，薬品や食品添加物の生殖毒性をみる場合に，鶏胚利用が可能であることを強く示唆するものと思われた。

## 5. 要　約

エタノールおよびCyclophosphamide(CA) を用い，鶏胚およびラット胎仔に対する影響について比較した。

鶏胚には，10%エタノールを 0.1m*l*/egg の割合で孵卵11日目に血管内に 1 回投与し，CA については 0.05mg/0.04m*l*/egg の割合で孵卵 5 日目の卵黄嚢内に 1 回投与した。鶏胚は孵卵19日目に剖検した。

ラットには10%エタノールを交配の 2 週間前から妊娠19日目まで飲料水として与え，CA については 12mg/1m*l*/kg の割合で妊娠13日目の母体腹

© The Ito Foundation

腔内に１回投与した。妊娠19日目に母体より胎仔を取り出し剖検した。

鶏胚の死亡はエタノール投与群では26.7%，その対照群では０%，CA 投与群では16.2%，その対照群の生理食塩水投与群では12.3%，未処置群では6.5%であった。奇形の発生は，CA 投与群で7.0%，生理食塩水投与群で3.8%で，エタノール投与群，未処置群には認められなかった。病理組織学的所見についてはエタノール投与群，CA 投与群の精巣，および卵巣の生殖細胞数の著しい減少，または欠損が認められた。これに伴って，精細管の発達は悪く，卵巣皮質も薄かった。

ラット胎仔の死亡または，吸収は，エタノール投与群，CA 投与群，対照群ともに観察されなかった。奇形発生率は CA 投与群において69.2%であった。病理組織学的所見については，精巣には CA 投与群と対照群との間に差は認められなかったが，卵巣については僅かに生殖細胞数の減少が認められた。

今回の実験から鶏胚およびラット胎仔に対するエタノール投与，CA 投与の影響は，外表奇形と骨格奇形に関しては，ラットのほうが奇形の発現率が高かった。しかし，精巣，卵巣への影響，特に生殖細胞に対する影響は，ラットよりも鶏胚のほうに強く現れた。このことは生殖腺に対する薬物の毒性を見る場合には，鶏胚のほうがラットよりも鋭敏であり，鶏胚利用の可能性を示唆するものと思われた。

**文　献**


1) Clarren S.K. and Smith D.W.: N. Engl. J. Med. 298：1063-1067（1978）
2) Gibon J.E. and Becker B.A.: Cancer Res. 28：475-480（1968）
3) Greenaway J.C., Fantel A.G., Shepard B.A. and Juchau M.R.: Teratology 25：335-343（1982）
4) Hales B.F.: Biochem. Pharmacol. 29：256-259（1980）
5) Hanson J.W., Jones K.L. and Smith D.W.: J. Am. Med. Asss. 235：1458-1460（1976）
6) Haskin D.: Anat. Rec. 102：493-509（1948）
7) Lemoine P., Tarousseau H., Borteryru J. and Monuet J.C.: Quest. Med. 25：476-482（1968）
8) Malik M. and Singh S.: Cong. Anom. 16：29-39（1976）
9) Padmanabhan R. and Singh S.: Cong. Anom. 20：365-373（1980）
10) Raju B., Singh S., and Sanyual A.K.: Cong. Anom. 15：99-106（1975）
11) Rosanoff K.A., Jones D.H. and Sawyer T.W.: Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 44：131-139（1984）
12) Russel W.M.S.: Lab. Anim. 6：23-25（1957）
13) Shoji R. and Ohzu E.: J. Fac. Soci. Hokkaido Univ. Ser. Ⅳ 15：662-668（1965）
14) Singh S. and Raju B.: Indian J. Exp. Biol. 12：406-409（1974）
15) Singh S., Sanyal A.K. and Kar A.K.: Anat. Rec. 178：127-138（1973）
16) 田中晴美，鈴木伸幸，有馬正高：医学の歩み110：517-523（1979）
17) Wilson, J.G., and Fraser, F.C.: Handbook of Teratologhy. Vol. 4, 135-153.（1987）
18) World Health Organization Scientific Group Techn. Rep. Ser. 364：(1967)


© The Ito Foundation

# 食肉および食肉製品のリステリア菌汚染とその制御に関する研究

Presence and Behavior of *Listeria monocytogenes* in Meats and Meat Products

山内　邦男・木村　貞司・*小久保　彌太郎
（日本大学農獣医学部，*東京都立衛生研究所）

Kunio Yamauchi, Teiji Kimura and *Yataro Kokubo
(The College of Agriculture and Veterinary Medicine, Nihon University and
*Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health)

In order to detect *Listeria monocytogenes* which contaminates meats and meat products, combinations of two kinds of enrichment media, EB medium and UVM medium respectively prescribed in the FDA and USDA method, with two kinds of selective plating media, Oxford medium (Oxoid) and LPM medium (Difco) were studied by 105 samples of commercial meat. EB medium was superior to UVM medium in selective enrichment performance, and could easily isolates *L. monocytogenes* in meats when used in combination with Oxford medium. *Listeria* species was detected from 92 (87.6%) with all the combinations, 65 (61.5%) which identified as *L. monocytogenes*. From among a total of 32 uncooked meat product samples, *L. monocytogenes* was detected from one sample of raw ham. As for serotypes of isolated *L. monocytogenes*, 1/2c was found most frequently, and more than half of them being 1/2a, 1/2b and 4b which are described to be isolated from patients clinical materials at higher incidences.

In order to learn the behavior of *L. monocytogenes* during manufacture and storage of Vienna sausages, serotype 4b strains was experimentally inoculated into the paste-like raw material in a concentration of 10/g level. When the samples were heated under three different temperatures, 63, 70 and 75℃, *Listeria* count decreased to the detection limit or below after 5 minutes under any of these temperature conditions. Vacuum packed and non-vacuum packed Vienna sausages inoculated experimentally with <10/g of *L. monocytogenes* were kept at 2, 10 and 25℃ respectively. The growth of *Listeria* was observed at all temperatures irrespective of the package conditions, although proliferation was suppressed in the vacuum packed condition.

## 1. 目　的

最近，欧米諸国で *Listeria monocytogenes* を原因とした野菜あるいは牛乳やチーズなどの畜産物の摂食によるヒトのリステリア症の集団発生が相次いで報告された[1]。その後の調査研究により，本菌は乳，食肉，魚介類などを主原料とする広範囲の食品により媒介される可能性が示唆され，食品衛生の分野で大きくクローズアップされている[2,3]。特に，本菌は4℃以下の低温，6%以上の食塩濃度，pH 5.0～9.6の広いpH域で増殖し，亜硝酸塩にも抵抗するなどの性状を有し，食肉にも広く分布することが知られている[4]。また，1988年に，WHOから緊急的に発表された「食物媒

© The Ito Foundation

介リステリア症」と題する報告書[5]の中でも，食肉衛生分野における検査法の確立，食肉および食肉製品の *L. monocytogenes* による汚染防止が重要な課題として指摘されている。

本研究では，先ず食肉を対象に *L. monocytogenes* を日常検査で的確に検出するための増菌ならびに分離培地の組み合わせ法を検討するとともに，市販食肉および非加熱製品における本菌の汚染状況を調査した。次いで，食肉製品の加熱加工や保存条件下での *L. monocytogenes* の挙動を実験的に調べた。

## 2. 材料および方法

### 2.1 供試食肉および食肉製品

都内の食肉販売店で購入した牛肉42例（モモ肉およびステーキ用ロース肉各21例），豚モモ肉21例および鶏肉（モモ肉およびササミ各21例）から成る食肉計105例，およびラックスハム，サラミソーセージなどの非加熱食肉製品計32例である。

### 2.2 使用培地

（1） 増菌培地：2種類の市販粉末培地を使用した。その一つは米国のFDA法[6]として国際的にも広く採用されている Listerca Enrichment Broth（Difco；以下EB培地）で，0.6%酵母エキス加 Tryptic Soy Broth 1,000m*l*に，アクリフラビン15mg，ナリジキシン酸40mgおよびサイクロヘキサミド50mgを添加したものである。他の一つはUSDA法[7]として知られているUVM培地を改良した UVM Modified Listeria Enrichment Broth（Difco；以下UVM培地）で，トリプトース，牛肉エキス，酵母エキス，リン酸塩などから成る基礎培地，1,000m*l*に，アクリフラビン12mg，ナリジキシン酸20mgを添加したものである。これらは，いずれも処方にしたがって調製後121℃で15分間高圧滅菌してから使用した。

（2） 分離培地：2種類の市販粉末培地を使用した。その一つは Curtis ら[8]により開発された Oxford Formulation（Oxoid；以下OX培地）で，Columbia寒天培地にエスクリン，塩化リチウムなどを添加した基礎培地1,000m*l*を121℃で15分間高圧滅菌後，アクリフラビン5mg，サイクロヘキサミド400mg，コリスチン20mg，セフォテタン2mg，フォスフォマイシン10mgから成るサプリメントを添加して平板とした。他の一つは，FDAやUSDA法などで採用されているLPM培地（Difco）で，Phenylethanol寒天培地に無水グリシン，塩化リチウムを加えた基礎培地1,000m*l*を121℃で15分間高圧滅菌後にモクサラクタム（塩野義製薬；ラタモキセフナトリウム）20mgを添加して平板とした。

### 2.3 *L. monocytogenes* の検出および同定の手順

手順の概略は**Fig. 1**に示したとおりである。すなわち，検査材料の各10gをEBならびにUVM培地50m*l*に接種して，ストマッカー処理後にいずれも30℃で増菌培養し，2および7日目の2回にわたってそれぞれOXならびにLPM培地で分離培養を行った。各分離培地平板上に発生した定型的集落は，0.6%酵母エキス加 Trypticase Soy agar（BBL）平板に再分離して，実体顕微鏡を使用して45度の反射光による真珠様青緑色の特有の集落所見（Henryの斜光手法）を示したものについて生物化学的性状を調べて *L. monocytogenes* を同定した。さらに，*L. monocytogenes* と同定された菌株は，自家製の抗血清を用いて血清型別を行った。

菌数を測定する場合は，検体10gに滅菌リン酸緩衝生理食塩水90m*l*を加えて作成した試料原液またはその10倍段階希釈試料液1m*l*をOX培地とともに混釈培養し，発生したエスクリン分解陽性集落について前記同様の確認試験を行った。

© The Ito Foundation

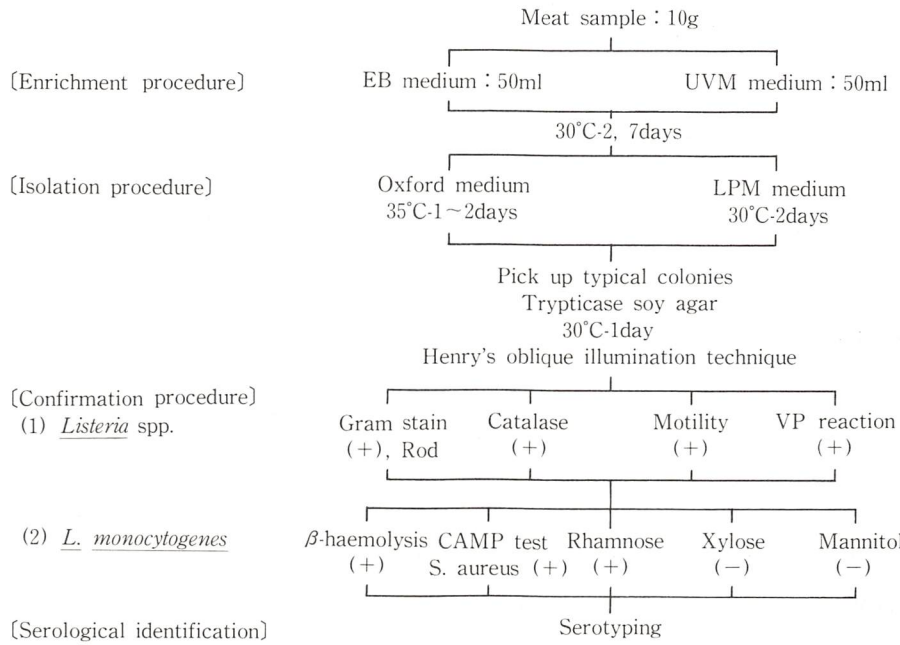



**Fig. 1**　Schematic Outline of Procedure for Isolation of *L. monocytogenes* in Meat

2.4　ソーセージ中の *L. monocytogenes* の挙動実験

（1）　加熱実験：羊腸充塡前のウインナーソーセージのペースト状原料に食品由来の4b株を$10^4$/gレベルに接種してP.Tパウチ（酒見医科器機舗）に15gずつ分注した。これらを63，70および75℃の3通りの温度の恒温水槽に入れて，それぞれ30分間加熱し，その間経時的に *L. monocytogenes* 菌数および好気性菌数を測定した。

（2）　保存実験：製造直後のウインナーソーセージを，4b株を$10^4$/gレベルに浮遊させた生理食塩水中に5分間浸漬してソーセージ表面に菌を付着させた。次いで，これらソーセージは1本ずつ真空包装したものとしないものに分けて，それぞれ2℃で40日，10℃で20日および25℃で5日間保存し，その間，経日的に1本ずつ取り出して，*L. monocytogenes* 菌数および好気性菌数を測定した。

## 3.　結果および考察

3.1　使用培地による *Listeria* 属菌の検出能の比較

食品を対象とした *L. monocytogenes* の検出培地については多数の報告[9~11]があり，食肉検査には増菌培地としてEBあるいはUVM培地，分離培地としてLPM培地が国際的に広く採用されている。今回，市販食肉を対象にEB培地とUVM培地の選択増菌能を比較したところ，**Table 1** に示したようにEB培地は培養2日目ではUVM培地よりも明らかに優れた増菌能を示し，全般的にみても *L. monocytogenes* の検出率は高かった。EB培地の増菌期間は7日間であり，その間2および7日目の2回にわたって分離培養を行う必要のあることはすでに指摘されているが[12]，UVM培地では一層この必要性が認められた。

一方，分離培地については，EB培地で増菌培養した場合はOX培地とLPM培地の分離能にあ

© The Ito Foundation

**Table 1** Comparison of the Recovery of *Listeria* spp. from 105 Samples of Retail Meats Using Several Different Procedures.

| Enrichment procedures | | Number (%) of positive samples on | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Oxford medium | | LPM medium | |
| | | All *Listeria* spp. | *L. monocytogenes* | All *Listeria* spp. | *L. monocytogenes* |
| EB medium | 30℃ −2 days | 84 (80.0) | 42 (40.0) | 83 (79.0) | 42 (40.0) |
| | 30℃ −7 days | 83 (79.0) | 44 (42.0) | 83 (79.0) | 41 (39.0) |
| | Total | 87 (82.9) | 50 (47.6) | 85 (81.0) | 47 (44.8) |
| UVM medium | 30℃ −2 days | 76 (72.4) | 27 (25.7) | 50 (47.6) | 20 (19.0) |
| | 30℃ −7 days | 84 (80.0) | 38 (36.2) | 78 (74.3) | 33 (31.4) |
| | Total | 85 (81.0) | 43 (41.0) | 82 (78.1) | 38 (36.2) |

まり差は認められなかったが，UVM培地では明らかにOX培地の分離能が優れていた。しかも，OX培地では発生した*Listeria*属菌はその特異的性状であるエスクリン分解による周囲集落の褐色化により他の集落との識別が肉眼的に容易であった。

従って，日常検査で食肉から *L. monocytogenes* を検出するには，増菌培地はEB培地，分離培地はOX培地の組み合わせがよいと考えられる。

3.2 市販食肉および非加熱食肉製品における *Listeria* 属菌の汚染状況

調査した食肉中，前記いずれかの検査法で *Listeria* 層菌の認められた検体は，**Table 2** に示したように105例中92例（87.6%）であった。このうち65例（61.5%）から *L. monocytogenes* が検出され，牛のロース肉や鶏のささみのような十分な加熱処理をせずに食されることもある食肉もほぼ半数が陽性であった。しかし，これらの菌数はほとんどが100/g以下であった。これらの成績から，わが国で流通している食肉も，欧米諸国における報告[13]と同様に高率に *L. monocytogenes* により汚染されていることがわかった。

一方，非加熱製品ではラックスハムの1例のみから *L. monocytogenes* が検出された。欧米でも，生ハムや発酵ソーセージなどから本菌が検出[13]されており，実験的にもこれら未加熱製品の製造過程で本菌が残存することが証明されている。従って，今後非加熱製品からの *L. monocytogenes* の排除は食肉衛生上の重要な課題と考えられる。

市販食肉から分離された *L. monocytogenes* の

**Table 2** Occurrence of *Listeuia* spp. in Retail Raw Meats and Uncooked Meat Products

| Specimen | | | Number of samples | Number (%) of positive samples | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | All *Listeria* spp. | *L. monocytogenes* |
| Raw meat : | Beef | ; round | 21 | 17 (81.0) | 9 (42.9) |
| | | ; loin | 21 | 16 (76.2) | 12 (57.1) |
| | Pork | ; ham | 21 | 19 (90.5) | 14 (66.7) |
| | Chicken | ; leg | 21 | 20 (95.2) | 18 (85.7) |
| | | ; breast | 21 | 20 (95.2) | 12 (57.1) |
| | Total | | 105 | 92 (87.6) | 65 (61.5) |
| Uncooked meat product | | | 32 | 3 ( 9.4) | 1 ( 3.1) |

© The Ito Foundation

**Table 3** Serotypes of *L. monocytogenes* Isolated from Retail Meats

| Meat of origin | Number of strains | Number of strains with serotypes on | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1/2 a | 1/2 b | 1/2 c | 4 b | 5 |
| Beef | 21 | 2 | 5 | 11 | 3 | |
| Pork | 14 | 3 | 4 | 6 | 1 | |
| Chicken | 30 | 11 | 10 | 4 | 4 | 1 |
| Total | 65 | 16 | 19 | 21 | 8 | 1 |

血清型は，**Table 3** に示したように1/2 c が最も多かったが，臨床例から高い頻度で検出される1/2 a，1/2 b および 4 b に型別される菌株も65株中43株（66.2%）に認められたことは注目すべきことである。なお，非加熱製品から分離された1菌株は1/2 a であった。

3.3　ソーセージ原料中の *L. monocytogenes* の加熱時の挙動

ペースト状の原料中に実験的に接種された *L. monocytogenes* は，63℃では加熱5分後，70および75℃では加熱2.5分後にいずれも10/g以下となった。本菌の熱抵抗性に関する報告[4]を見ても，$10^8$/g以上の大量菌もわが国の食肉製品の製造基準に規定されている63℃で30分間の加熱条件により十分に死滅させることが可能であることが示されている。なお，同時に測定した好気性菌数は当初$10^6$/g レベルであり，63，70および75℃の加熱で10/g以下の菌数になるにはそれぞれ20，15および10分間を要した。

3.4　ウィンナーソーセージを汚染する *L. monocytogenes* の保存時の挙動

*L. monocytogenes* は，**Table 4** に示したようにいずれの保存温度でも発育し，当初10/g以下であった菌数は25℃保存で3日目，わが国の食肉製品の保存基準である10℃保存では10日目にほぼ$10^6$/g レベルに達した。2℃保存でも10日目まで

**Table 4** Log Plate Conts of Total Aerobe and *L. monocytogenes per* Gram of Vienna Sausages Stored at 2, 10and 25 ℃

| Temperature (℃) | period (days) | Film overwrapped | | Vaccum packed | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Total aerobe | *L. monocytogenes* | Total aerobe | *L. monocytogenes* |
| | 0 | <10 | <10 | <10 | <10 |
| 2 | 5 | 1.48 | <10 | 1.30 | <10 |
| | 10 | 2.53 | 1.78 | 2.00 | 1.30 |
| | 20 | 3.90 | 3.74 | 3.71 | 3.40 |
| | 30 | 5.51 | 4.96 | 5.08 | 4.63 |
| | 40 | 6.80 | 6.15 | 5.76 | 5.54 |
| 10 | 2 | 3.00 | 2.38 | 2.30 | 2.00 |
| | 5 | 5.42 | 4.26 | 4.49 | 4.11 |
| | 10 | 7.76 | 6.15 | 6.56 | 5.65 |
| | 15 | 8.30 | 7.30 | 7.52 | 6.62 |
| | 20 | 8.88 | 7.53 | 7.78 | 6.95 |
| 25 | 1 | 6.62 | 3.08 | 6.11 | 2.90 |
| | 2 | 8.18 | 5.23 | 7.48 | 4.72 |
| | 3 | 9.11 | 6.72 | 8.20 | 6.18 |
| | 5 | 9.43 | 7.92 | 8.95 | 7.45 |

© The Ito Foundation

は菌数の増加は僅かであったが，20日目に$10^3$/gレベル，40日目には$10^5$～$10^6$/gレベルに達した。しかし，Harrisonら[14]も報告しているように，真空包装品では非真空包装品に比較して増殖が抑制される傾向が認められた。一方，好気性菌数は25℃保存で2日目，10℃保存でも10日目にはほゞ$10^7$/gレベルとなり，2℃保存における増殖菌の大半が*L. monocytogenes*であった。

*L. monocytogenes*は0℃でも発育可能であることが知られているが[1]，今回の実験成績によっても食肉製品を汚染した場合の本菌の低温発育性が確認された。

3.5 食肉製品を対象とした*L. monocytogenes*の制御

現在まで，食肉あるいは食肉製品を介したリステリア症は未だ確認されていない。しかし，わが国で流通している食肉は，菌数は低いが*L. monocytogenes*により高率に汚染されており，米国で報告[15]されているように，これが食肉製品工場の環境を汚染する主な原因になっていると考えられる。今回の加熱実験の成績で認められたように，わが国の食肉製品では製造基準を厳守すれば原料に由来する*L. monocytogenes*を十分に排除することができることから，WHOの報告書[5]でも指摘されているように加熱後の二次汚染防止が本菌の制御の最も重要なポイントになると考えられる。このことは，わが国の食肉製品の保存基準に規定されてた10℃あるいはそれ以下の温度で*L. monocytogenes*を効果的に制御できなかったことからも裏付けられた。

## 4. 要　約

食肉および食肉製品を対象とした*L. monocytogenes*の日常検査法の確立，汚染実態の把握および加工や製品保存時の本菌の挙動など一連の調査研究を行い次の成績を得た。

(1) EB培地とUVM培地の2種類の増菌培地およびOX培地とLPM培地の2種類の分離培地の組み合わせ法を市販食肉を対象として検討したところ，EB培地とOX培地との組み合わせにより*L. monocytogenes*を的確かつ容易に分離できた。

(2) 市販食肉計105例中92例（87.6%）から*Listeria*属菌が検出され，このうち65例(61.5%）は*L. monocytogenes*であった。非加熱製品では計32例中1例から*L. monocytogenes*が検出されたが，これらの菌数は大部分100/g以下であった。分離された*L. monocytogenes*の血清型は1/2cが最も多かったが，臨床例から高頻度に認められる1/2a，1/2bおよび4bも合わせて半数以上を占めた。

(3) ウィンナーソーセージ原料を63，70および75℃の3通りの温度条件で加熱したところ，実験的に接種された$10^4$/gレベルの*L. monocytogenes*は，5分後にはいずれも10/g以下に減少した。

(4) ウィンナーソーセージを真空または非真空包装後2，10および25℃に保存したところ，*L. monocytogenes*は全ての温度で包装条件の別なく発育が認められたが，真空包装品では増殖が抑制された。

### 文　献

1) 丸山　務：食品と微生物，6(1)，3～13（1989）
2) McLauchlin, J.: J. Appl. Bact. 63(1), 1～11 (1987)
3) 勝部泰次，丸山総一：食衛誌，30(6)，479～490 (1989)
4) Doyle, M.P.: Food Tech. 42(4), 169～171 (1988)
5) WHO working group: Bull. WHO 66, 421～428 (1988)
6) FDA: Federal Register, 53 (211), (1988)
7) McClain, D. and Lee, W.H.: J. AOAC 71(3), 660～664 (1988)
8) Curtis, G.D.W., Mitchell, R.G., King, A.F. and

© The Ito Foundation

Emma, J.: Lett. Appl. Microbiol., 8, 95～98 (1989)
9) Lovett, J.: Food Tech., 42(4), 172～175 (1988)
10) Donnelly, C.W.: J. AOAC 71(3), 644～646 (1988)
11) Cassiday, P.K. and Brackett, R.E.: J. Food Protec., 52(3), 207～214 (1989)
12) 小久保彌太郎, 飯田 孝, 金子誠二, 丸山 務: 食衛誌, 31(1), 51～56 (1990)
13) Ralovich, M.D.: 10th International Symposium on WAVFH, Stokholm (1989)
14) Harrison, M.A. and Carpenter, S.L.: J. Food Protec., 52(6), 376～378(1989)
15) Am. Meat Inst.: Washington D. C. (1987)

© The Ito Foundation

# 肉および肉製品におけるボツリヌス中毒危険性の評価と制御
## ——各種食品中のボツリヌス毒素の安定性に影響する因子について——

Evaluation of Potential Hazards and Control of Botulism in Meat and Meat Products
—Factors Influencing Heat Stability of Botulism Toxin in Various Foods—

中野 宏幸 ・ 福田 哲夫 ・ 橋本 秀夫 (広島大学生物生産学部)

Hiroyuki Nakano, Tetsuo Fukuda and Hideo Hashimoto
(Faculty of Applied Biological Science, Hiroshima University)

Thermal inactivation of *Clostridium botulinum* toxins produced in various food samples and factors influencing heat stability were determined using time-to-death method by iv injection into mice. Generally, botulinum toxin produced in meat was labile when compared to that in vegetables or cheeses. Type B (strain okra) toxin was more stable than type A (62A). Strain okra (type B) toxin produced in string beans was especially resistant following in cheddar cheese. The activities could be detected even after 80℃ for 30min and heating at 90℃ for 10min was necessary for complete inactivation. Type B toxins other than strain okra were not so stable in string beans. High stability of the toxin in string beans was shown by the cell-bound-toxin which had not completely been activated. By heating purified toxin in some menstrua, string beans extract was protective against heat to some extent. The protection afforded by reduced pH (pH 4) was more prominent for type A toxin than type B. Heat stability of botulinum toxin was promoted moderate protein concentration (0.5%), but concentrated protein (5%) was not effective in the stability of botulinum toxin.

## 1. 目 的

ボツリヌス中毒の発生は食品の製造および保蔵技術の進歩により減少した。しかし，近年の消費者の健康志向，流通の拡大化などにより，予期せずに発生することの多い本中毒には十分に注意しておく必要がある。これまでボツリヌス菌の芽胞の殺菌や発芽抑制に関する研究は多いが[1]，本毒素に関しては易熱性であることから，加熱に対する挙動についての報告は少ない。著者ら[2]は前報で野菜中で産生した毒素の方が食肉中におけるよりも熱に対する安定性は高かったことを示した。本報では耐熱性に関与する因子についてさらに明らかにしたので報告する。

## 2. 実験方法

### 2.1 使用菌株および毒素

*Clostridium botulinum* のB型菌（Okra株）を中心として検討を行い，常法とおり作製した芽胞懸濁液を希釈して使用した。さらに，A型菌（62A株），B型菌（食肉由来の407-1株および蜂蜜由来の7H-215株）を用いて耐熱性を比較した。Okra 株毒素の精製は常法どおり大量培養，酸沈澱，抽出，プロタミン処理，SP-セファデックス・

© The Ito Foundation

クロマトにより行った。

2.2 加熱試料の調製

市販の豚赤身肉，ナチュラルチーズ2種（レッドチェダー，サムソー），野菜5種（サヤインゲン，アスパラガス，オクラ，ソラマメ，スィートコーン）およびクックトミート培地を使用した。それぞれの試料40gを細切し，等量のリン酸緩衝生理食塩水を加え高圧滅菌して毒素産生用の培地とした。これらに芽胞液を約$10^3$/m$l$になるよう接種し，30℃，10日間嫌気培養した検体を次の加熱試験に用いた。

サヤインゲンについてはOkra株を培養後，この検体をさらに遠心分離（12,000rpm, 15分）したものや，ろ紙により固形物を除いた液体試料中で培養したものについても検討した。さらに，サヤインゲン試料とクックトミート培地（3日培養）における培養液を，pH 4の酢酸緩衝液で一夜透析した検体との比較も行った。精製B型毒素（L毒素とM毒素を混合）をサヤインゲン抽出液で希釈した場合や，ゼラチン溶液を用いて，タンパク濃度の耐熱性に及ぼす影響についても試験した。

2.3 加熱および毒性残存試験

各検体の培養上清や調製した試料を小試験管に2m$l$ずつ分取し，60℃，80℃など所定の温度と時間で加熱処理後，急冷して以下の毒性試験を行った。それぞれの検体の遠心上清の3倍希釈液0.1m$l$をマウス尾静脈に正確に注射し，致死時間を求め，標準曲線よりマウスip $LD_{50}$/m$l$に換算して毒素の定量を行った[3]。なお，B型毒素の場合，トリプシンによる活性化前後の毒力も算出した。

## 3. 結　果

### 3.1 食品中で産生したボツリヌスB型毒素の熱安定性

種々の食品中で産生したOkra株毒素の加熱試験を行ったところ，**Table 1**に示すように，サヤインゲン試料では80℃，30分の加熱でもかなりの毒素が残存し，完全な失活には90℃，10分の加熱を必要とした。チェダーチーズでも80℃，30分でマウスは長時間後ではあるが死亡したのに対し，サムソーチーズではこの条件で失活した。他の野菜では80℃，10分の加熱ですでに失活し，食肉や培地ではさらにこれより弱く，60℃，30分で2～3オーダーの毒力減少がみられた。他の菌株につ

**Table 1** Effect of heating on botulium type B (Okra) toxin produced in some foods

| Samples | pH | Results of toxicity test (mouse ip $LD_{50}$/m$l$) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Before heating | 60℃ | | 80℃ | | 90℃ |
| | | | 10 min | 30 min | 10 min | 30 min | 10 min |
| String beans | 5.8*→6.3** | $2.4\times10^6$ | $2.3\times10^6$ | $1.6\times10^6$ | $D_1$ | $D_1$ | S |
| Asparagus | 5.7 →6.0 | $1.4\times10^6$ | $1.2\times10^5$ | $1.4\times10^4$ | S | S | S |
| Okra | 6.0 →6.1 | $5.3\times10^4$ | $9.2\times10^4$ | $8.3\times10^4$ | S | S | S |
| Broad bean | 6.4 →7.0 | $7.8\times10^5$ | $2.8\times10^5$ | $5.6\times10^4$ | S | S | S |
| Sweet corn | 6.3 →6.8 | $9.1\times10^5$ | $1.6\times10^4$ | $1.1\times10^4$ | S | S | S |
| Cheddar cheese | 5.8 →5.1 | $3.7\times10^5$ | $5.0\times10^5$ | $1.2\times10^5$ | $D_1$ | $D_2$ | S |
| Samsoe cheese | 5.8 →5.4 | $5.4\times10^5$ | $5.0\times10^5$ | $5.0\times10^5$ | $D_2$ | S | S |
| Pork | 6.3 →7.0 | $6.2\times10^5$ | $5.1\times10^3$ | $9.8\times10^2$ | S | S | S |
| CMM *** | 7.0 →7.0 | $9.1\times10^5$ | $1.3\times10^4$ | $2.9\times10^3$ | S | S | S |

$D_1$ : Mouse died in 6-12 h (Dilution : × 3).
$D_2$ : Mouse died in 36-48 h (Dilution : × 3).
S : Survived.
* Before incubation ** After incubation *** Cooked meat medium

© The Ito Foundation

いて同じサヤインゲン試料を用いて試験したところ，B型菌の407-1株，6H-215株とも60℃加熱では安定であったが，80℃，10分の加熱では失活した。A型菌（62A株）はこれよりさらに弱く，60℃，10分で2オーダーの毒力減少がみられた（**Table 2**）。

3.2　食品中のボツリヌス毒素の耐熱性に影響する因子

**Table 3** に示すようにサヤインゲンの試料中における培養後のpHは62A株で6.2，Okra株で6.4，クックトミート培地の3日培養ではそれぞれ6.0，6.1であった。これらを一夜透析してpH 4に修正したものと無修正のもので加熱試験を行ったところ，62A株ではpH 4.0で耐熱性は上昇し，とくにクックトミート培地では80℃，10分の加熱でも毒素が残存した。Okra株の場合は，サヤインゲン試料ではpHによる差はさほどみられなかったのに対し，培地ではpHの低い方でより安定となった。

次にB型毒素を産生させたサヤインゲン試料をその全体と遠心上清に区分して加熱試験を行った。その成績は**Table 4**に示すように，上清部分，すなわち遊離状態の毒素ではすでに活性化していたが，80℃，10分の加熱で失活した。サヤインゲン試料のろ液中で産生した毒素は，全体の試料と同様に，80℃，30分の加熱でも毒素は残存し耐熱性であった。次に，精製B型毒素を緩衝液とサヤインゲン抽出液で希釈して60℃，30分加熱を行い比

**Table 2**　Heat stability of various botulinum toxins in string beans

| Strains | Type | Results of toxicity test (mouse ip $LD_{50}$/m*l*) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Before heating | 60℃ 10 min | 60℃ 30 min | 80℃ 10 min | 80℃ 30 min |
| 62A | A | $2.8\times10^5$ | $4.3\times10^3$ | D | S | S |
| 407-1 | B | $1.8\times10^6$ ($4.7\times10^5$)* | $2.5\times10^5$ | $1.3\times10^5$ | S | S |
| 6H-215 | B | $4.4\times10^5$ ($1.9\times10^5$) | $4.3\times10^5$ | $3.7\times10^3$ | S | S |

D：Mouse died in 3-6 h　(Dilution：×3).
*Before activation

**Table 3**　Influence of pH on the heat stability of botulinum toxin in string beans and cooked meat medium

| Condition | Type A (62A) | | | | Type B (Okra) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | String beans (pH) | | CMM (pH) | | String beans (pH) | | CMM (pH) | |
| | 6.1 | 4.0 | 6.0 | 4.0 | 6.4 | 4.0 | 6.1 | 4.0 |
| Before heating | $2.8\times10^5$* | $1.7\times10^5$ | $1.1\times10^5$ | $2.9\times10^5$ | $2.4\times10^6$ | $1.0\times10^6$ | $2.0\times10^6$ | $1.8\times10^6$ |
| 60℃, 10 min | $4.3\times10^3$ | $1.4\times10^5$ | $5.4\times10^3$ | $3.9\times10^5$ | $2.3\times10^6$ | $9.4\times10^5$ | $5.4\times10^3$ | $3.5\times10^5$ |
| 60℃, 30 min | $D_1$ | $1.3\times10^5$ | $D_1$ | $1.0\times10^5$ | $1.6\times10^6$ | $7.4\times10^5$ | D | $6.3\times10^4$ |
| 72℃, 10 min | ND | ND | $D_2$ | $D_2$ | ND | ND | S | $D_1$ |
| 72℃, 30 min | ND | ND | $D_2$ | $D_2$ | ND | ND | S | $D_2$ |
| 80℃, 10 min | S | S | S | $D_3$ | $D_1$ | $D_1$ | ND | S |
| 80℃, 30 min | S | S | ND | S | $D_1$ | $D_1$ | ND | ND |

* Results of toxicity test (mouse ip $LD_{50}$/m*l*).
D：Mouse died in 3-6 hr.　$D_1$：6-12 hr.　$D_2$：12-24 hr.　$D_3$：24-48 hr.　S：Survived.
ND：Not done.

© The Ito Foundation

**Table 4** Heat stability of type B (strain Okra) toxin in various mixture of string beans

| Samples | Part | Results of toxicity test (mouse ip $LD_{50}$/m*l*) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Before heating | 60℃ | | 80℃ | |
| | | | 10 min | 30 min | 10 min | 30 min |
| String beans (homogenate) | Whole | $2.4\times10^6$ ($3.1\times10^5$)* | $2.3\times10^6$ | $1.6\times10^6$ | $D_1$ | $D_1$ |
| | Supernatant | $1.3\times10^6$ ($1.3\times10^6$) | $9.0\times10^5$ | $6.9\times10^5$ | S | S |
| String beans (filtrate) | Whole | $4.9\times10^6$ ($2.5\times10^5$) | $2.7\times10^4$ | $2.8\times10^4$ | $D_1$ | $D_1$ |

* Before activation. Refer **Table 1** for abbreviation.

**Table 5** Effect of protein on heat stability of botulinum type B toxin

| Condition | Results of toxicity test (mouse ip $LD_{50}$/m*l*) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Concentration of gelatin (%) | | | |
| | 0 | 0.5 | 1.0 | 5.0 |
| Before heating | $1.6\times10^6$ | $2.7\times10^6$ | $1.4\times10^6$ | $1.5\times10^6$ |
| 60℃, 10 min | $1.8\times10^6$ | $1.5\times10^6$ | $7.7\times10^5$ | $6.4\times10^5$ |
| 60℃, 30 min | $7.6\times10^5$ | $2.3\times10^6$ | $1.3\times10^6$ | $7.5\times10^5$ |
| 80℃, 10 min | S | $D_1$ | $D_2$ | S |
| 80℃, 30 min | S | $D_2$ | S | S |

Refer **Table 1** for abbreviation.

較したところ，pH6において前者は最初の数%に減少したのに対し，後者では元の50%の毒力を維持した。さらに，ゼラチンを溶媒としてB型精製毒素の加熱試験を行ったところ，**Table 5**に示すように0.5%濃度では80℃，30分の加熱でも毒素は残存したのに対し，対照，1%および5%濃度では失活した。

## 4. 考　察

ボツリヌス菌は耐熱性の高い芽胞を形成するため，食品製造においては完全な滅菌が要求される。産生された本毒素については易熱性で余り問題にされることはないが，前報[2]で我々は食品や菌株によっては高い耐熱性がみられたことを報告した。食品は含まれる栄養成分やpH等の物理的条件がそれぞれ異なり，本菌の増殖性には差がみられるため，培地に匹敵するほど多く毒素が産生された食品についてのみ加熱試験を行った。従来の概念では完全に本毒素が失活するとされる80℃，30分でもサヤインゲンとチェダーチーズで毒素は残存したが，マウスの死亡に要した時間から推定して，前者における方がその安定性は高いと考えられた。他の野菜類ではサヤインゲンほどの耐熱性はみられなかったが，もう一方のチーズにおいても80℃，10分の加熱で毒力が残ったことから，一般にチーズ類は加熱に対して保護作用を示す食品と推測された。しかし，食肉中のそれは60℃，10分の加熱で2オーダー毒力は減少し易熱性を示した。本来，食肉が原因となることの多かった本中毒も，米国では野菜によるものが中心であり，またチーズが多く含まれるピツァによる加熱不十分が疑われる中毒も発生しているが[4]，これらの事例は今回の成績を裏付けるものかもしれない。

さて，毒素の免疫学的な型による熱に対する態

© The Ito Foundation

度の差について，Scott ら[5]のようにB型よりA型の方が強かったとする報告もあるが，現在では，Smart ら[6]が述べているように，ボツリヌス毒素の耐熱性は菌株により多少異なるけれども，毒素型によって特定できるものではないと考えられるようになってきている。今回，Okra 株以外のB型菌2株では**Table 2**に示したように比較的易熱性であったことからも判明するように，毒素型による差よりも菌株による差が観察された。今回の成績のように Okra 株とサヤインゲンのような組み合わせで高い耐熱性が観察されたことから，他にもこのような組み合わせ次第で，耐熱性が向上する場合があることも予想された。

ボツリヌス毒素は一般的に低い pH で安定である。Sugii ら[7]は毒素の分子サイズに注目しL毒素の方がM毒素よりも消化酵素や酸に対して耐性があると報告しているが，我々の成績では前報[2]で述べたように加熱に対しては両者で差がみられなかった。しかし，弱アルカリ性下では毒素の安定性を担っている無毒成分が解離し，毒性成分（S毒素）単独では急速に失活する。従って，アミノ酸に富む食肉や培地ではアミン類の生成により pH が野菜類に比べて高くなることから，pH を 4.0 に修正したものと比較を行った。その結果，A型菌はB型菌よりも pH の低い方で耐熱性の上昇がみられた。精製毒素を用いた従来の報告ではA型毒素の方がB型よりも低い pH で安定とされており，A型毒素に関しては pH の影響と思われる。しかし，Okra 株の低い pH の培地中での耐熱性の上昇については，pH 4 では一部の毒素は酸沈澱が起こって菌体に結合したことも考えられ，直接的な pH の影響か否かは不明であった。また，Okra 株をサヤインゲン中で培養後の pH は6.3～6.4で，これは毒素の安定な pH 域ではあるが，クックトミート培地においても3日間の短い培養では同程度の pH であるため，とくにサヤインゲン中での本毒素の耐熱性の向上を説明する因子とはならなかった。

さて，タンパク非分解性であるボツリヌスⅡ群菌は純培養液の毒力は低いけれども，トリプシンなどにより活性化することが知られている。今回，耐熱性のみられた Okra 株はタンパク分解性のB型菌であるにもかかわらず，通常の培養で完全には活性化せず，部分的に未活性の状態である。Okra 株を培養したサヤインゲン試料を分画して加熱を行ったところ，培養液の上清に遊離してきたものはすでに活性化しており，これの耐熱性は低かった。サヤインゲン試料全体の場合は活性化がみられたが，これは菌体から遊離していない毒素，あるいは菌体や食品と結合した毒素と考えられる。Okra 株毒素のサヤインゲン中での耐熱性は未活性化毒素に由来するものか菌体の関与したものかは明らかではなかった。また，B型精製毒素を用いた実験でサヤインゲン抽出液は熱に対して保護作用を示したことから，耐熱性に係わる因子についてはサヤインゲン中の特定の成分との結合や毒素の荷電状態などの点から総合的に検討する必要があると考えられた。

また，溶媒のタンパク濃度の及ぼす影響について，血清アルブミンを用いて試験したところ，加熱により凝固して正確な毒力測定ができなかった。そこで，ゼラチン溶液を用いて加熱すると，0.5％濃度では耐熱性がみられたものの，1％以上では再び耐熱性は失われた。サヤインゲンよりさらにタンパク量が多いと考えられる食品であまり耐熱性がみられなかったことと考えあわせて，毒素の耐熱性に及ぼすタンパク質の影響はそれほど大きくないと考えられた。

以上，食品中で産生したボツリヌス毒素の加熱に対する挙動について検討した結果，食肉においては従来の報告どおり易熱性であった。しかし，サヤインゲンやチーズ中におけるB型（Okra 株）

© The Ito Foundation

毒素のように，加熱不十分の場合には毒素が残存する例もみられたことから，本中毒の予防において喫食直前の確実な加熱が必要であることを再認識した。

## 5. 要　約

食肉，チーズ，野菜の各種食品や培地中で産生したボツリヌス毒素に対して加熱試験を行って毒性の残存を比較し，耐熱性に関与するいくつかの因子について検討した。食肉や培地中で産生した毒素が易熱性であったのに対し，チーズや野菜の方で耐熱性がみられた。とくに，サヤインゲン中のB型（Okra株）毒素は80℃，30分の加熱でも残存し，完全な失活には90℃，10分の処理を必要とした。この場合，菌体と結合した未活性の毒素区分で高い耐熱性がみられた。B型毒素の耐熱性に及ぼすpHの影響はA型の場合に比べてみられなかったが，適度のタンパク濃度は耐熱性を上昇させた。

### 文　献

1) 伊藤　武，坂井千三：微生物，1(2)，31-42（1985）
2) 中野宏幸，橋本秀夫：食肉に関する助成研究調査成果報告書，7，424-429（1989）
3) 阪口玄二：食品衛生研究，24，452-453（1974）
4) 阪口玄二：私信
5) Scott, W.J. and Stewart, D.F.: Aust. J. Appl. Sci., 1, 189-199 (1950)
6) Smart, J.L. and Rush, R.A. J.: Int. J. Food Sci. Technol., 22, 293-298(1987)
7) Sugii, S., Ohishi, I. and Sakaguchi, G.: Infect. Immun., 16, 910-914 (1977)

© The Ito Foundation

# 食肉タンパク質より精製タンパク質およびペプチド標品の調整およびその栄養学的評価

Preparation of Purified Protein and Peptide Mixture from Meat and Evaluation of their Nutritional Value

野口　忠・金　鍾姫（東京大学農学部）

Tadashi Noguchi and Jong Hee Kim (Faculty of Agriculture, The University of Tokyo)

A purified protein was prepard from ground pork meat. The product was consisted of 0.5% moisture, 3.0% ash, 5.5% ether extract and 87.7% crude protein. A peptide-amino acid mixture was prepared from a pepsin digest of the protein preparation. These two preparations were colorless powder with low fat content. The digestibility of the protein preparation was estimated by two methods, one using unlabeled meat protein and the other empolying a labeled model protein which was prepared from [$^3$H]-valine-injected rat muscle by a similar procedure to the preparation of the purified pork protein. The true digestibility of the purified protein was more than 95% by both methods, showing that the purified protein is an excellent material as food protein for many purposes.

## 1. 目　的

食肉が世界の人々の優れたタンパク質源，エネルギー源であることは言を俟たない。そのタンパク質の栄養価は，従来の成長試験，窒素出納法等で繰り返し評価され，優れていることが明らかにされている。

さて，近年，経腸輸液，経管輸液の進歩が著しく，それに伴って諸種の疾病の際の望ましい食物，栄養素摂取法の開発，より深い生理的基礎に基づいた栄養状態の評価，食品の栄養価の評価に対する要求が大きくなってきた。われわれは近年，尿へのペプチド排泄量から，ヒトを含めた動物一般のタンパク質栄養状態を評価する新方法を開発するとともに[1]，内分泌学的見地からも，インスリン様成長因子Ⅰのタンパク質同化における重要性に注目し，食餌タンパク質の栄養価とこのホルモンの血中濃度との関連を明らかにしてきた[2]。今回の実験では，まず，食肉の精製タンパク質を調整し，また，それを素材とするペプチド混合物を調整し，さらに時間的に可能であれば，それらの標品について，上に記したわれわれの新しい方法を用いて，栄養価の評価を行いたいと考えた。

さてここで，精製食肉タンパク質だけでなく，ペプチド標品をも調整しようとする理由に触れておきたい。上述のように，近年の経管輸液，経腸輸液の進歩は著しく，これらの栄養源のみで，長期にわたり生命を維持できる状況にまで到達している。今後の高齢化社会を考えると，この需要はますます大きくなると考えられる。さらに，これらの知見に基づいた健康な高齢者用の食餌素材の開発も要求されよう。このように考えると，精製タンパク質はもとより必要であろうが，溶解性，消化性，などを考えると，ペプチドにも多くの利

© The Ito Foundation

点があり，ペプチド素材を開発することは，おそらくは，今後一層重要性を増すと考えられる。このような観点から，今回の研究では，ペプチド素材の開発に大きな比重をおいた次第である。

## 2. 方　法

### 2.1 精製食肉タンパク質の調整

脂質，無機質を極力除いた精製食肉タンパク質を調整する目的で，山口らが鶏卵から全卵タンパク質を調整した方法によって，次のように精製タンパク質を調整した。素材としては，市販のブタ肉を用いた。まずひき肉を作り，約10倍量の熱エタノール中でタンパク質を変性・不溶化するとともに，脂質を抽出除去した。この操作を2度行った後，さらに，エタノールにほぼ匹敵する量の熱水で2度抽出を行い，可溶性の無機質および低分子有機化合物を抽出除去した。こうして得た標品をアセトンで脱水するとともに，残存しているわずかな量の脂質をさらに抽出した。標品を風乾し，精製ブタ肉タンパク質とした。

### 2.2 ブタ肉ペプチドの調整

上記の精製ブタ肉タンパク質を用いて，ブタ肉ペプチドを調整した。まず，消化管内での消化をシミュレートすることを考え，ペプシン消化を行うこととした。精製ブタ肉タンパク質を水に懸濁し，塩酸でpHを2に調整した。タンパク質標品100に対し，1.65のウシペプシン（Sigma社製）を加え，37℃で消化させた。消化過程を，トリクロロ酢酸可溶性のアミノ酸量で追跡し，それ以上消化が進まない点をもって，終点とした。通常6～8時間であった。消化後，試料液の4倍量のエタノールを加え，濾過して沈澱を除去した。濾液中のエタノールと塩酸をロータリーエバポレーターを用いて十分除去し，さらに，標品を凍結乾燥して最終標品とした。以下この標品をブタ肉ペプチドと呼ぶ。

### 2.3 試験用標識肉タンパク質の調整

消化試験を行うにあたり，ラジオアイソトープで標識した肉タンパク質を調整した。ブタ肉を実際に標識アミノ酸で標識することは困難であるので，試験用にラットの肉タンパク質を標識することにした。まず，ラットに[$^3$H]-バリンを注射し，4時間後にラットをと殺し，後肢および背部の筋肉をとり，液体窒素で凍結し，細かく砕いた後，−20℃に冷却した75％メタノール中でホモゲナイズした。遠心分離により上澄を除き，再び同様の抽出を行い，遠心分離して得た沈澱をアセトンで抽出し，風乾したものを粉砕して，標識肉タンパク質とした。この標品は，遊離のバリンをほとんど含んでいなかった。

また，対照となる非標識肉タンパク質も必要であったので，標識バリンを投与しないラットの肉を同様に処理して非標識肉タンパク質とした。

### 2.4 分析の方法

試料の水分は，105℃常圧乾燥法，粗灰分は550℃灰化法，粗タンパク質はケルダール法，粗脂肪は，エーテル抽出法によった。アミノ酸組成は，試料を定沸点塩酸（6 N），封管下，脱気した状態で，105℃，24時間加水分解した後，ロータリーエバポレーターを用いて塩酸を除去し，得られたアミノ酸混合物を0.02Nの塩酸に溶解し，0.2$\mu$mのフィルターを通した後，日立835型アミノ酸分析計で分析した。

### 2.5 消化試験

消化試験には，体量100g前後の雄Wistar系のラットを用いた。飼料は，肉タンパク質20％，ポリエチレングリコール（PEG）2％を含むほか，ビタミン混合物0.7％，ミネラル混合物5％，セルロース粉3％，大豆油5％，トウモロコシデンプン64.3％を含んでいた。また，内因性のタンパク質・アミノ酸の量を推定する目的で，無タンパク質食を与えるラットも用意したが，この無タン

© The Ito Foundation

パク質食は，肉タンパク質をトウモロコシデンプンで置き換えて調整した。

ラットに１週間試験食を毎日10時から18時まで与え，ミールフィーディング訓練をした。この訓練により，ラットは１日の食事の約半量を10時から11時の間にとるようになった。食事開始2.5時間後，すなわち12時30分にラットをと殺し，腸の内容物を生理的食塩水で洗いだし，その試料について，PEG量，トリクロロ酢酸不溶性および可溶性アミノ酸，を定量するとともに，標識肉タンパク質を投与したラットの腸の内容物については，放射能を測定した。

アミノ酸の真の消化率は，その時点で腸に到達したタンパク質・アミノ酸をPEGの量から計算し，内因性タンパク質・アミノ酸の量を無タンパク食区のラットのPEG量に対する腸内のタンパク質・アミノ酸の量から算出し，次式で計算した。

$$100\times\left(1-\frac{\dfrac{\text{試験区の各アミノ酸}}{\text{PEG}}-\dfrac{\text{無タンパク質食区のアミノ酸}}{\text{PEG}}}{\dfrac{\text{食餌中の各アミノ酸}}{\text{PEG}}}\right)$$

また，標識タンパク質を用いた消化試験でも，原理は同様であるが，内因性のタンパク質の評価法に工夫をした。ここでは，その詳細は省略するが，内因性のタンパク質・アミノ酸の量は，消化率に影響を与えるとしてもたかだか２％程度であり，全体の消化率95％にはほとんど影響を及ぼさなかった。

## 3. 結　果

### 3.1 精製ブタ肉タンパク質およびブタ肉ペプチドの外観

外観は**図1**のようである。図から明らかなように，これらの標品は，ほとんど着色しておらず，白色の粉末である。

本標品の粗タンパク質含量，粗脂肪含量，粗灰分含量を示したのが**表1**である。精製ブタ肉タンパク質の段階ですでに，脂肪含量が５％になっている。これを，原料であるブタひき肉の脂肪量（乾物中47％）と比較すると，原料の脂肪の90％程度が除去されたことが明らかである。また，無機質含量も３％と低く，原料中のミネラル類が30％程度除去され，タンパク質として十分純度の高い標品が得られたと判断した。

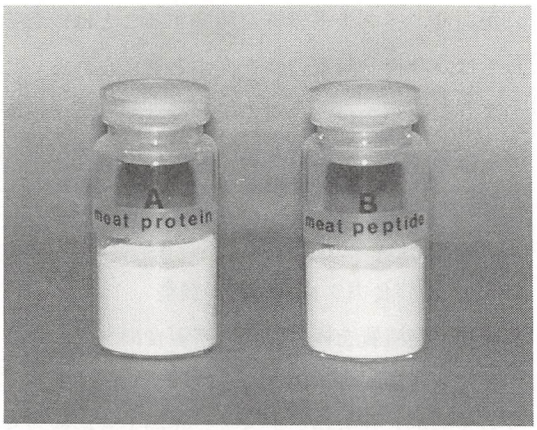



**図1**　精製ブタ肉タンパク質およびブタ肉ペプチド
A：精製ブタ肉タンパク質
B：ブタ肉ペプチド

**表1**　精製肉タンパク質の組成

| | |
|---|---|
| 水　分 | 0.5 % |
| 粗タンパク質 | 87.7 |
| 粗脂肪 | 5.5 |
| 粗灰分 | 3.0 |

### 3.2 ブタ肉タンパク質，ブタ肉ペプチドのアミノ酸組成

**表2**に，ブタ肉タンパク質標品，ブタ肉ペプチド標品のアミノ酸組成を示した。両者が良く一致していることから，今回調整したタンパク質，ペプチドは，もとのペプチドをよく代表しているものと判断した。ペプチドとしての窒素の回収率は，精製ブタ肉タンパク質に対して40％であり，回収率をあげるべく改良する余地があると考えている。

© The Ito Foundation

表2　精製肉タンパク質およびブタ肉ペプチドのアミノ酸組成

| | 製品100 g中の各アミノ酸のg数 | |
|---|---|---|
| | 精製肉タンパク質 | ブタ肉ペプチド* |
| Asx | 12.48 | 19.06 |
| Thr | 4.02 | 6.00 |
| Ser | 2.94 | 4.52 |
| Glx | 14.42 | 18.76 |
| Gly | 3.76 | 6.16 |
| Ala | 5.28 | 7.78 |
| Val | 5.78 | 7.48 |
| Met | 2.68 | 2.76 |
| Ile | 4.86 | 6.50 |
| Leu | 7.74 | 11.06 |
| Tyr | 3.06 | 3.66 |
| Phe | 3.80 | 5.32 |
| Lys | 8.88 | 12.00 |
| His | 2.48 | 3.54 |
| Arg | 6.04 | 8.34 |
| Pro | 3.94 | 4.54 |
| Cys⁺ | 0.74 | 0.88 |
| 合　計 | 90.44 | 123.82 |

⁺ システィン酸に変換して別個に定量していないので，値が低い可能性がある。

* 加水分解による水の量が加わり100を越える。しかし，その分を考慮してもやや回収率が高い。いずれにしても，ブタ肉ペプチドはほぼ全量がペプチドで構成されていることがうかがわれる。

### 3.3　非標識および標識肉タンパク質を用いた肉タンパク質標品の消化試験

消化試験の結果，大部分のアミノ酸について，95%以上の消化率であることがあきらかになった。すなわち，今回の方法で調整した肉タンパク質は，きわめて消化性のよいことが証明された。若干の不消化物のアミノ酸組成をみると，グリシン，プロリンなどが多く，肉タンパク質では，コラーゲン部分が比較的不消化であることをうかがわせた。

一方，標識肉タンパク質を用いた肉タンパク質の消化試験の結果も，バリンについての消化率が，97%であった。

## 4.　考　　察

今回の実験で，市販の肉から，無色の精製肉タンパク質と肉タンパク質由来のペプチド標品を調整することができた。この製品は，いずれも脂肪含量が低かった。またアミノ酸組成は，肉に極めて近かった。精製肉タンパク質標品そのものの消化試験は期日に間にあわなかったが，ほぼ同様の方法で調整した肉タンパク質標品の消化率がきわめて良好であったことから，今回調整した肉タンパク質標品も，高い消化率を示すものと推定している。

精製肉タンパク質は，溶解度が低いが，それをもとに調整したペプチド標品は，ほぼ完全に溶解する。しかも，この標品のアミノ酸組成も肉とほとんど同一で，栄養価の高さを推定させる。この特色を生かし，このペプチド標品は，今後，経腸輸液，経管輸液の素材として，有用度の高いものであると考えている。

現今，多種類の経腸輸液が用いられているが，その大部分は，卵や牛乳のタンパク質が用いられている。通常の場合，特に問題はおこらないであろうが，これらの素材には，食品アレルギーにみられるように，異物として認識される場合があることを忘れてはならない。その点，精製肉タンパク質は，上記の2者に比べれば，アレルギー原性が小さいものと考えられる。また，万一，部分消化をうけたペプチドが吸収されることがあっても，自己の筋肉タンパク質との類似性が高いと推定されることから，安全性は上記2者に比べ，格段に高いものと推定される。今後さらに，これらの知見をもとに，より優れたペプチド混合物を調整し，消化性，安全性ばかりか，味液，スープベース等としても有用な製品を開発していきたいと計画している。

このような発展の基礎を築くことを可能にしていただいた今回の助成に対し，伊藤記念財団に深く感謝申しあげる次第であります。なお，実験の一部は河村直人氏が担当された。記して謝意を表する。

© The Ito Foundation

**文 献**

1) T. Noguchi, T.J. Nam. H. Kato and H. Naito, Br. J. Nutr., 60, 321-337 (1988)

2) S. Takahashi, M. Kajikawa, T. Umezawa, S.-I. Takahashi, H. Kato. Y. Miura, T.J. Nam, T. Noguchi and H. Naito, Br. J. Nutr., 63, 521-354. (1990)

© The Ito Foundation

# 個体発生途上の家畜脳から分泌される抗癌因子，神経系作用因子と細胞増殖促進物質

Carcinostatic Factor, Neurotrophic Factor and Proliferation-Promoting Factor Secreted from the Animal Brain during the Ontogeny

三羽　信比古 ・ 土井　澄江 ・ *松野　哲也
（広島県立大学生物資源学部，*国立予防衛生研究所）

Nobuhiko Miwa, Sumie Doi and *Tetsuya Matsuno
(School of Bioscience, Hiroshima Prefectural University and *National Institute of Health)

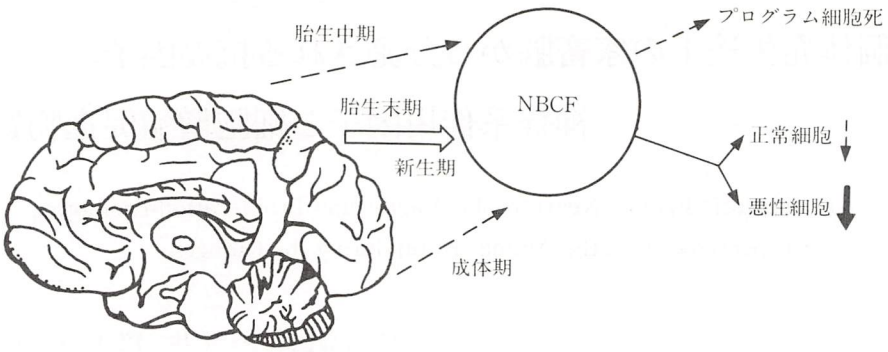
A cell growth-inhibitory factor (pCIF) and a cell growth-promoting factor (pCPF) were purified from conditioned medium of the neonatal porcine cerebrum except the pituitary by gel filtration-and anion exchange-HPLC. pCIF is suggested to inhibit at the signaling pathway of DNA synthesis triggered by pCPF, which promotes DNA synthesis through action at the $G_1 \rightarrow S$ stage. pCIF is shown to block the shift to the S stage via action at the early and middle $G_1$ stage, but to block nolonger at the last $G_1$ atage.

## 1. 目　的

家畜の臓器は従来より各種生理活性物質の抽出源として用いられてきた。しかし，これは成体の家畜であり，個体発生過程の家畜の臓器は生理活性物質の抽出源として従来殆ど検討されなかった。成体では発現を停止した遺伝子（眠った遺伝子：dormant gene)が個体発生途上では一過程に発現されていることがあり，これらの遺伝子の産物が胎仔特異的な生理活性物質として検出されつつあり，家畜胎仔は生理活性物質の未発堀の宝庫と言える。

哺乳動物の胎仔の脳では特定の時期に一定数の細胞が必然的に死滅するプログラム細胞死が起こる。これは脳神経の発生・機能発現に寄与するところが大きい。プログラム死は視峡核，三叉神経中脳核，滑車神経核，脊髄外側運動柱など脳神経系の多くの領域で起こり，各領域の30～65％もの大量の神経細胞が急激に変性死する。哺乳類の生殖器官や無尾類の尾のプログラム死ではキラー液性因子で引き起こされるが，脳のプログラム死は作用機構が解明されていない。我々は脳のプログラム死を誘発する液性因子を検索すべく，個体発生途上のマウス脳の産生物質を検索し，プログラム死が顕著な新生期と胎生末期にのみ分泌される細胞増殖抑制性タンパク質を見出した（**Fig. 1**)。マウス脳は新生期に分子量6.2万，等電点9.1の細胞増殖抑制性タンパク質を分泌し，これが成熟期・胎生中期など他の時期や肝・腎・皮膚など他の組織では産生されないので，新生期脳由来抗癌因子 NBCF と命名した。マウス由来 NBCF（mNBCF）は各種 HPLC で精製し SDS/PAGE と IEF で単一であり，その物性と生物学的特異性から既知の脳由来物質とは異り，正常細胞よりも

© The Ito Foundation




NBCFは各種正常細胞よりも悪性細胞の増殖とDNA合成を選択的に抑制する

**Fig. 1**　脳のプログラム細胞死と NBCF の分泌

癌細胞選択的に増殖抑制作用を示す。

著者らはmNBCFと同様な物質が新生期ブタ脳からも産生されるかを調べ，次の重要な知見を見出した：①新生期ブタの下垂体と嗅球を除いた大脳からも，癌細胞増殖抑制因子 pCIF（porcine cerebrum-derived growth inhibitory factor, 12KDa，酸性）が分泌される。新生期にプログラム死を起こさない小脳からは増殖抑制因子は分泌されなかった。②pCIF は非神経系癌細胞よりも神経芽腫細胞の DNA 合成と増殖を顕著に抑制する。③pCIF と物性の類似した細胞増殖促進因子 pCPF（porcine cerebrum-derived growth promoting factor, 15KDa，酸性）も同時に新生期ブタ脳から産生され，その作用は抑制因子と相互に拮抗する。④pCPF は DNA 合成だけでなく細胞増殖をも顕著に促進し，その効果は既知の成長因子に遜色なかった。促進因子による神経芽腫細胞の DNA 合成は $G_1$-S 期に作用点がある。

これらの結果を踏まえ今回は次の項目を実施した。（1）pCPF と pCIF の各々精製，（2）pCIF の各種成長因子に対する拮抗様式，（3）無血清培養の神経芽腫細胞での DNA 合成を指標にした pCIF の高感度アッセイ系の確立，（4）pCIF の細胞周期での作用点の解析。

## 2. 方　　法

（1）　新生期ブタ脳：ブタ L（ランドレース）×W（大ヨーク）系メスに D（デュロック）系オスを交配させ，概ね出産予定日に出生した新生子ブタを初乳を与えずに 4 時間以内に断頭し，無菌下に大脳と小脳を得た。

（2）　新生期ブタ脳 CM（培養後液）：新生期ブタを摘出直後無菌血清のダルベッコ改変イーグル最少培地（DME）に浸漬し，新生期マウス脳 CM と同様にして得る：DME 中で細切した脳を 2 回洗浄し，無血清 DME で24時間培養し，得た培地を限外濾過膜ダイアフロー YM-5（分子量 5,000）で濃縮する。

（3）　細胞増殖抑制活性：対数期のマウス神経芽腫 NAs-1 細胞またはエールリッヒ腹水癌細胞を直径 16㎜ ウエルに 1000 個播種し DME-10％ウシ胎児血清中検体を添加し 4 ～ 5 日培養する。細胞数をコールターカウンタ ZBII で計測し，検体に対する対照の細胞数の比の常用対数の 100 分の 1 を 1 unit の増殖抑制活性と定める。

（4）　高性能液体クロマトグラフィ(HPLC)による精製：ブタ脳 CM を東ソーの G3000SWXL カラムでサイズ排除 HPLC で分画し，この活性成分を DEAE-3SW カラムでアニオン交換 HPLC

© The Ito Foundation

で精製した。ギルソン社の自動分取HPLC装置を用い，展開液は25mM Na-Hepes緩衝液/pH7.25または50mM Na-リン酸緩衝液/pH7.0で行った。

（5） DNA合成抑制活性と促進活性；対数期のNAs-1細胞を直径16㎜ウエルに5,000個播種しDME中の検体を添加し23時間培養する，促進活性を定量する場合は無血清で培養し，抑制活性では1％ウシ胎児血清で培養する。次いで，メチル-[$^3$H]-サイミジンで3時間パルスラベルし，酸不溶画分への放射活性をアロカ液体シンチレイションカウンタLSC-700Rで計測した。

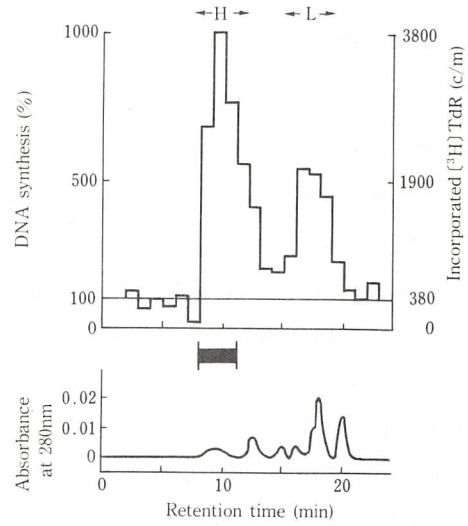



**Fig. 2a** Fractionation of pCM-NB by G3000SWXL/HPLC

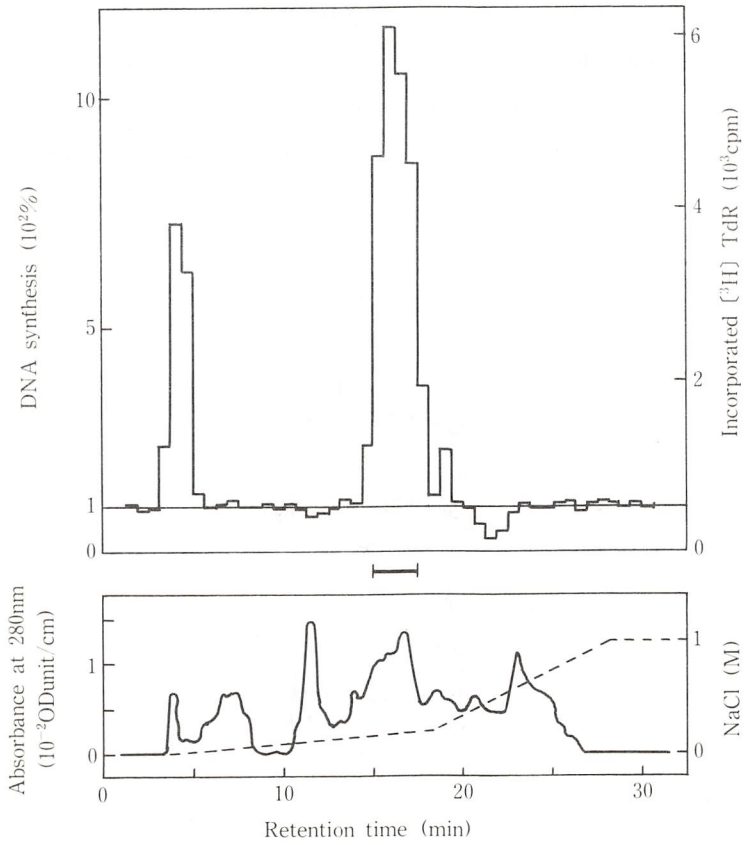



**Fig. 2b** Purification of G3000SWXL-purified pCPF (the bar indicated in **Fig. 2a**) by DEAE-3SW/HPLC

© The Ito Foundation

## 3. 結果と考察

### 3.1 pCPF の精製（**Fig. 2 a, b**）

新生期ブタ脳 CM を G3000-SWXL のゲル濾過 HPLC で分画し，無血清培養したマウス神経芽腫 NAs-1 細胞の DNA 合成を促進させる活性を調べた。この結果，DNA 合成の促進因子は 2 種あったが，高分子量（15KDa）の方が収量が多かったので，porcine cerebrum-derived growth promoting factor（pCPF）と命名し，引き続き DEAE-3SW/HPLC で精製した。活性成分は 2 種あり，各々0.02M と 0.18M NaCl で溶出した。このうち等電点の低い方が収量が多く，DNA 合成を12倍に促進した。この成分を pCPF として以下の実験に用いた。

### 3.2 抑制の精製（**Fig. 3 a, b**）

pCPF の精製と同様に新生期ブタ脳 CM を G 3000-SWXL のゲル濾過 HPLC で分画し，この後無血清培養ではなく 0.8% 透析ウシ胎仔血清を添加した NAs-1 細胞の DNA 合成に対する抑制活性を調べた。この結果，DNA 合成の抑制因子は0.54M の NaCl で溶出されたが，この成分を透析脱塩して活性測定しても同様に活性を示したので，pCIF は pI が小さいと思われる。

### 3.3 各種栄養因子で促進された DNA 合成に対する pCIF の抑制効果（**Fig. 4**）

10% ウシ胎仔血清存在下で神経芽腫 NAs-1 細胞の DNA 合成は飽和密度の 1/3（$3\times10^4$/cm²）まで増加するが，細胞 1 個当たりの DNA 合成量は，10の 3 ～ 4 乗という低い細胞密度で最大となるが，この細胞密度では血清への反応が良好と考えられる。従って，この細胞密度の範囲で DNA，合成各種栄養因子の投与効果を調べた。無血清培養したマウス神経芽腫 NAs-1 細胞に各種栄養因子を添加して DNA 合成を促進させ，この DNA 合成を pCIF がどんな様式で抑制するかを調べた。

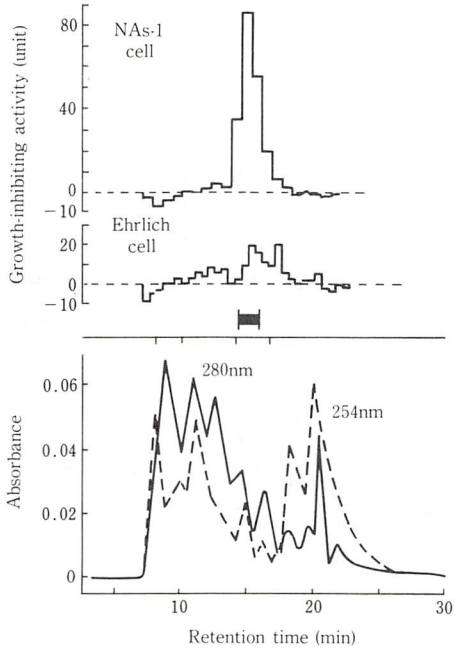



**Fig. 3a** Fractionation of pCM-NB by G3000-SWXL/HPLC

© The Ito Foundation

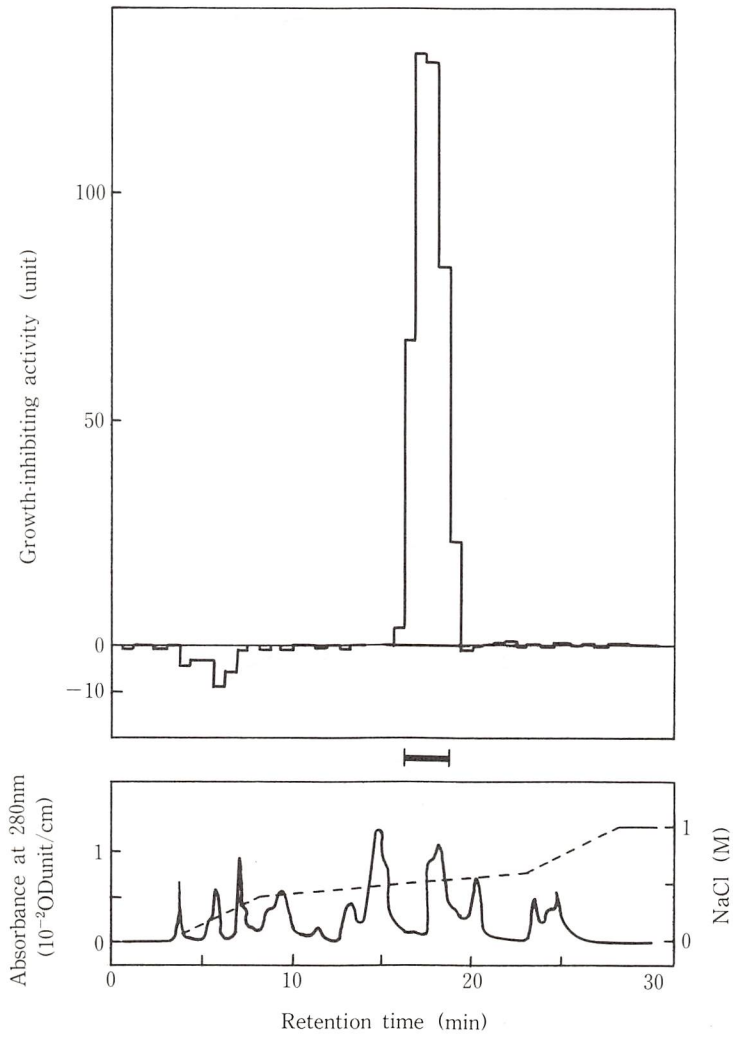



**Fig. 3b** Purification of G3000SWXL-purified pCIF (the bar indicated in **Fig. 3a**) by DEAE-3SW/HPLC

(a)透析ウシ胎仔血清(FCS)によるDNA合成促進はpCIFでは抑制されにくく，低濃度のpCIFにはほとんど反応しないし，高濃度pCIFでも抑制効果は小さかった。(b)3T3細胞で$G_1$→S期に作用点があるインスリン(Ins)とデキサメサゾン(Dex)をpCPFと共に添加してもDNA合成は変わらなかったが，このことはpCPFは単独でS期へ移行させることを示す。NAs-1細胞はInsやDexに対しては反応性が大きく，低濃度のpCIFでも高感度にDNA合成が抑制され，高濃度pCIFではほぼ完全に抑制された。(c)3T3細胞で$G_2$→M期に作用点があるウシ血清アルブミン(Alb)とトランスフェリン(Tf)はpCPFと協同的にDNA合成を促進させたが，単独では効果は小さかった。これら2種の既知ホルモンとInsとDexに加え高用量のpCPFとを同時添加するとDNA合成は顕著に促進された。AlbとTfもFCSタイプで，低濃度pCIFにはほとんど反応しなかった。(d)pCPFはIns/Dexタイプでより顕著な反応を示し，低濃度pCIFでも高感度に抑制

© The Ito Foundation

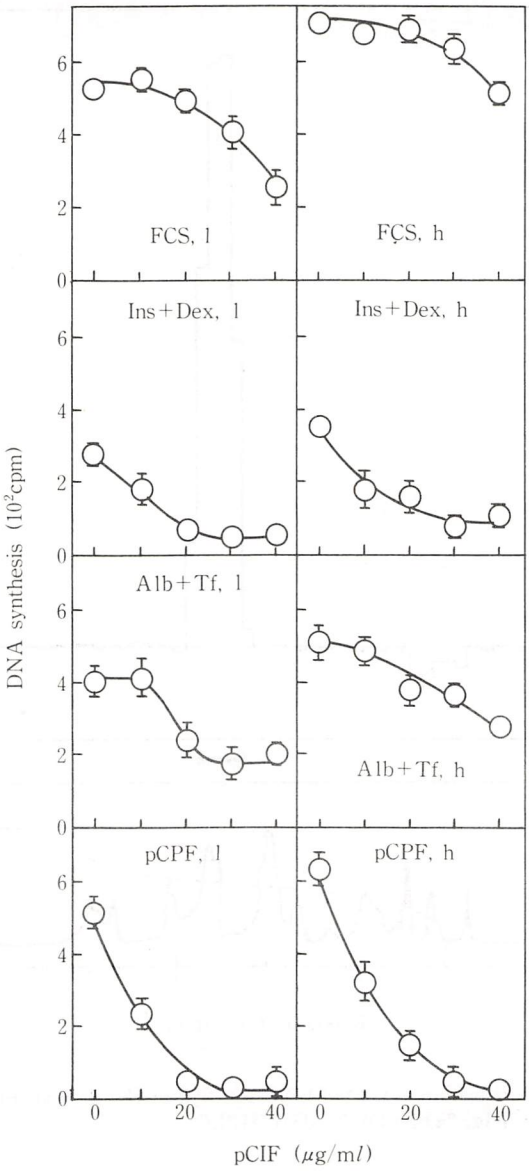



**Fig. 4** Dose-response of pCIF to inhibition of growth factor-enhanced DNA synthesis in NAs-1 cells (See text)

され，高濃度 pCIF では，DNA 合成は完全に抑制された。傷口の細胞分裂を促進する PDGF なる細胞増殖促進因子と，傷が治癒するとその分裂を抑制する TGF $\beta$ なる増殖抑制因子が同じ血小板に含有され，両者の巧妙なバランスで細胞分裂が制御されているが，これと類似して，新生期ブタ脳という同一の組織から産生される２種のサイトカインのうちの pCIF が抑制活性を示し pCPF が促進活性を示し，かつ，相互に作用が拮抗するということは細胞増殖の制御の観点から興味深い。これらの結果は pCIF による DNA 合成抑制は FCS や作用が32→M期の Alb/Tf とは独立の作用機構により，また，作用点が $G_1$→S期の Ins/Dex や pCPF とは共通の作用機構に含まれることを示唆する。また，同一細胞から分泌される pCPF と pCIF とは互いに相反する効果を及ぼし，かつ，

© The Ito Foundation

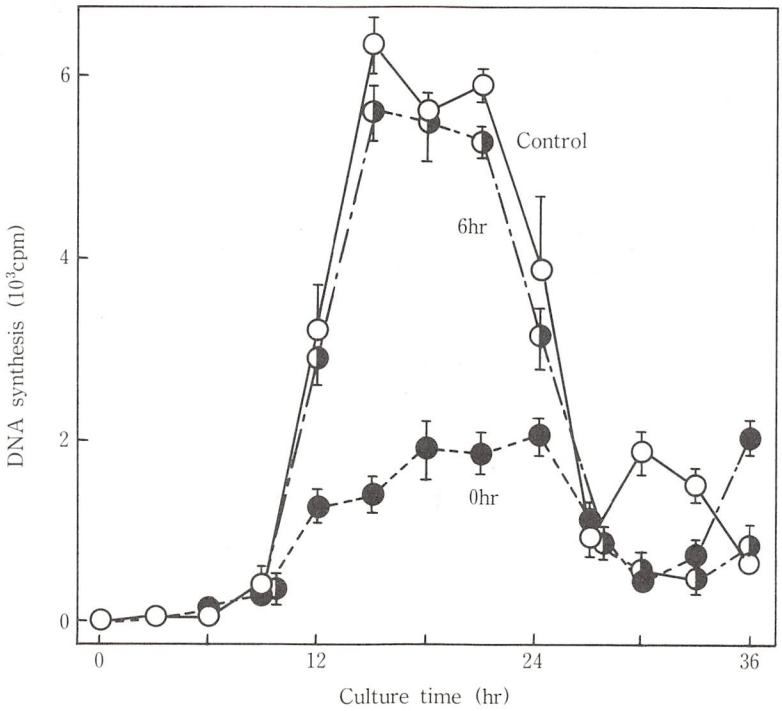



**Fig. 5** Effect of timing of pCIF addition on DNA synthesis resumed by pCPF in NAs-1 cells synchronously cultured to the $G_1$ stage. Control: no addition of pCIF. 0.6 hr: time of pCIF addition after pCPF addition.

相互に拮抗するので，共通の DNA 合成シグナリング経路で促進と抑制に作用することを示唆する。

3.4　pCIF の細胞周期での作用点（**Fig. 5, 6**）

$G_1$期に同調培養した神経芽腫 NAs-1 細胞に pCPF を添加する。(a)この時，pCIF を添加しないと，9時間から DNA 合成を再開し始め，15時間でピークに達する。その後6時間ほど DNA 合成の高いレベルを保持し，急速に下降した。(b)pCIF の添加を pCPF 添加の時に同時に行うと，DNA 合成は抑制され，ピーク時でも無添加のレベルの 1/3 となった。(c)pCPF を添加してから6時間後に pCIF を添加すると，pCIF 添加効果はほとんどなく pCIF 無添加と同程度の DNA 合成レベルを保持した。ただし，pCIF 無添加の

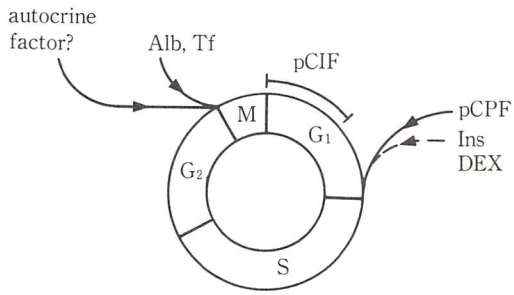



**Fig. 6** Speculation concerning the action mode of factors affecting cell cycle of NAs-1 cells

時に現れる30時間目のピークが消失した。これらの結果より，$G_1$期に停止した細胞が pCPF によって DNA 合成を再開する時に，pCIF が DNA 合成を妨げる時期は $G_1$期の初期から中期にかけてであり，$G_1$期の後期では最早無効であることを

© The Ito Foundation

示す。

3.5　pCIF と mNBCF の細胞増殖抑制スペクトラム（**Fig. 7**）

pCIF の細胞増殖抑制効果は非神経系の腫瘍細胞には小さく，神経芽腫細胞には顕著であったが，mNBCF も各種正常細胞よりも癌細胞に選択的に増殖抑制作用を示し，特に神経芽腫細胞に対しては顕著な抑制作用が認められ，次いで髄管芽腫細胞がグリア（芽）腫細胞上衣腫細胞などの脳腫瘍細胞をも種特異性の限定なく抑制した。

3.6　mNBCF と pCIF 産生量のグルタミン依存性と細胞内グルタミン代謝（**Fig. 8**）

mNBCF や pCIF の産生量が脳培養液中のグルタミン濃度に依存する原因は，グルタミンのアミド基転移を担うグルタミン-PRPP-アミドトランスフェラーゼや GMP シンセターゼに大部分依存し，その細胞内生合成を担うグルタミンシンセターゼにも部分的に依存していることにある。この理由は，新生期脳では細胞質のグルタミンシンセターゼ活性が低く，グルタミン分解酵素であるプリン塩基生合酵素グルタミン-PRPP-アミドトランスフェラーゼも GMP シンセターゼも活性が高く，グルタミン不足状態が成立しているためと考えられる。

3.7　神経芽腫細胞の分化状態の mNBCF 感受性に対する影響

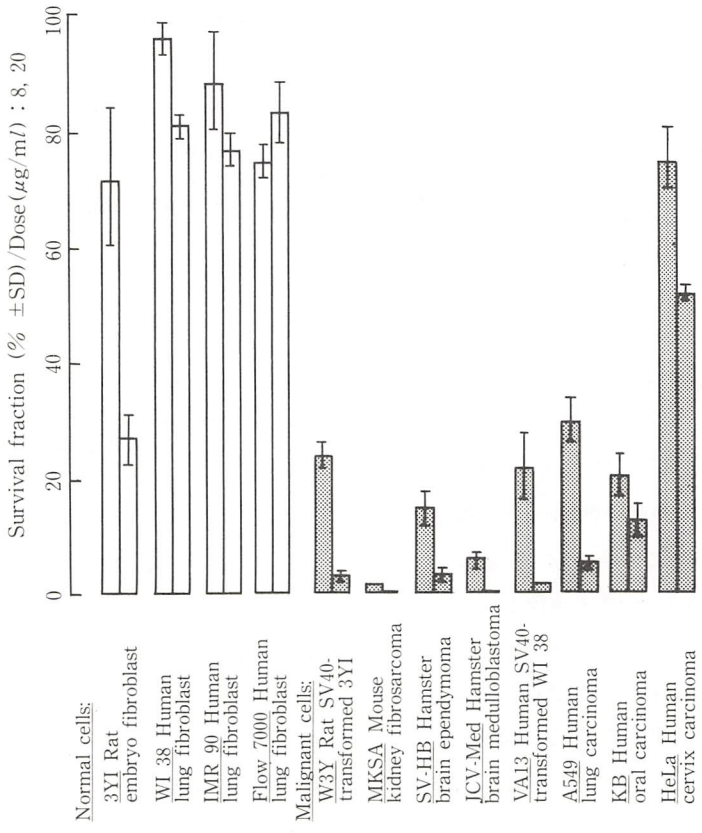



**Fig. 7**　NBCF の細胞増殖抑制スペクトル
正常細胞と悪性細胞に対する抑制は I-125/HPLC 部分精製 NBCF を用いクローン増殖で測定した。

© The Ito Foundation

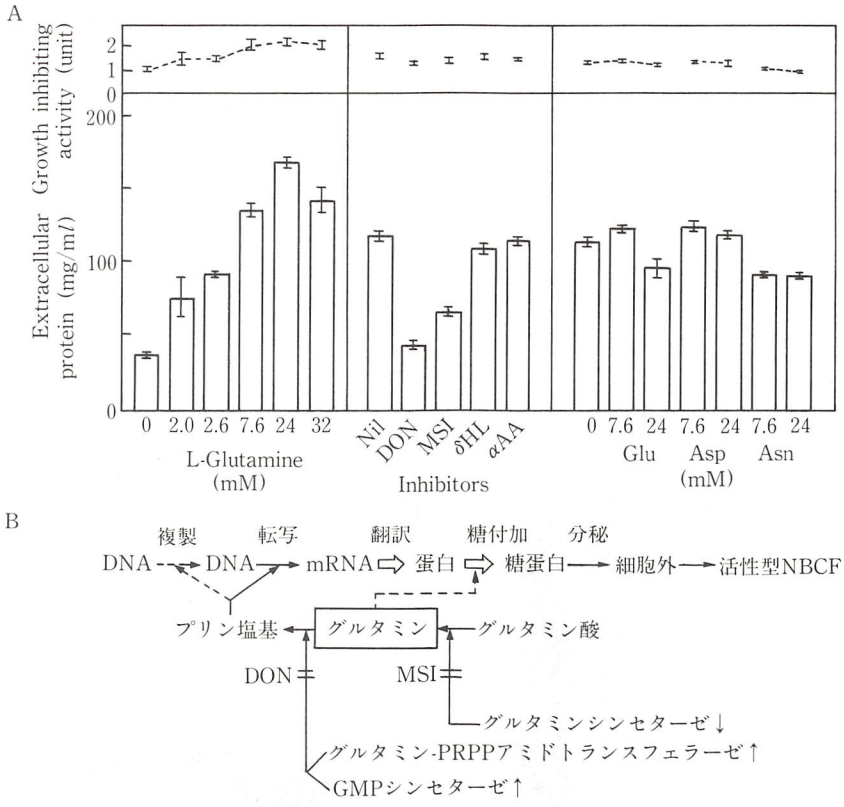



**Fig. 8**　NBCF 産生におけるL-グルタミンの役割
A：新生期マウス脳培養系へのL-グルタミンなどの添加による NBCF 産生量への影響.
DON：6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン
MIS：L-メチオニンサルフォキシミン
（Miwa, N. et al.: J. Cell. Physiol. 132, 1987 より）
B：L-グルタミンのアミド基転移による NBCF 合成・分泌への影響。
＝：阻害　NBCF 産生への影響：大きい順に⇨，→，…
酵素活性：↑大，↓小

神経突起を指標にした分化促進の程度と，そのNBCF感受性とは反比例しこの分化促進に伴う感受性低減は予め新たなタンパク質合成が必要で，糖リピド中間体の合成も幾分必要だが，DNA・RNA合成は直接関与しなかった（**Fig. 9～11**）。

## 4. 要　約

下垂体と嗅球を除いた新生期ブタ大脳の分泌物質から細胞増殖促進因子 pCPF と細胞増殖抑制因子 pCIF をゲル濾過とアニオン交換 HPLC で精製した。

無血清培養した神経芽腫細胞で各種栄養因子で促進した DNA 合成に対して pCIF の抑制効果を調べた結果，細胞周期の $G_2$→M期に作用する血清アルブミンやトランスフェリンとウシ胎仔血清に対する dose-response によると DNA 合成の抑制効果は小さく，逆に，$G_1$→S 期に作用するインスリンやデキサメサゾンと pCPF に対しては顕著な DNA 合成抑制効果を示したので，pCPF は $G_1$→S期に作用すると共に，pCIF は pCPF と同一の DNA 合成シグナリング経路で拮抗すると示唆された。

© The Ito Foundation

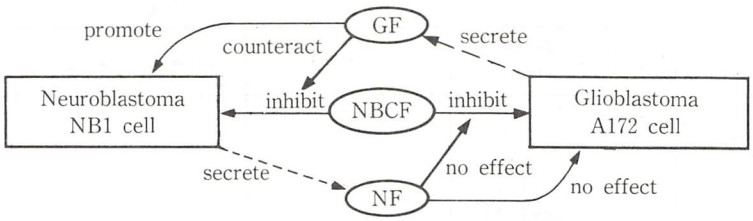



**Fig. 9** Effects of GF or NF on growth-inhibitory action of NBCF to human cells

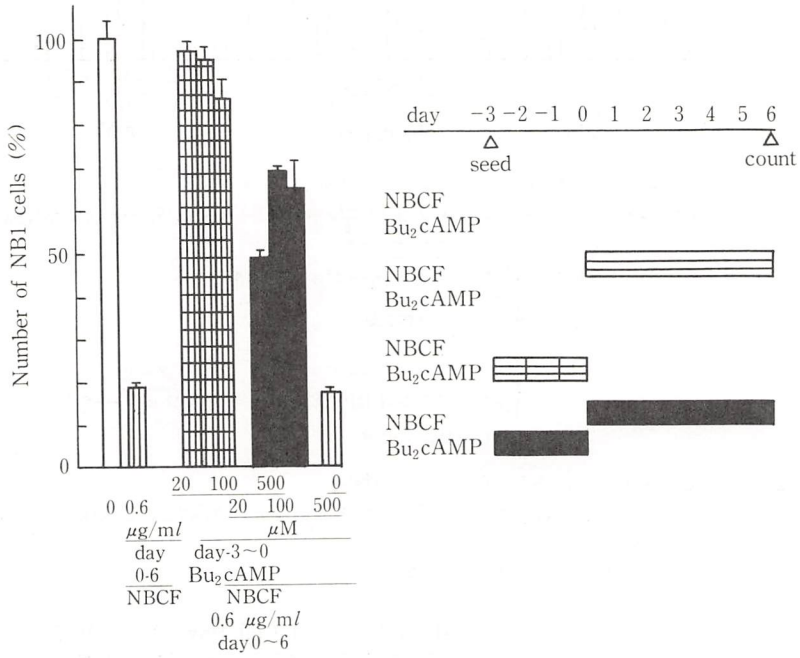



**Fig. 10** Decrease in susceptibility of NB1 cells to NBCF after treatment with dibutyryl cyclic AMP

$G_1$期に同調培養した神経芽腫細胞にpCPFを投与すると9時間後にDNA合成を再開し始め15～21時間高いDNA合成レベルを保持したが，この時pCIFをpCPFと同時添加するとDNA合成は顕著に抑制され，また，pCPF添加後6時間にpCIFを添加すると殆どDNA合成は抑制されなかった。従って，pCIFは$G_1$期の初期から中期にかけて作用してS期への移行を阻止するが，$G_1$期の後期ではもはや阻止しないことが示された。

**文 献**

1) Miwa, N. and Mizuno, S: Inhibition of tunor cell growth by proteinic factors derived from the developing mouse brain J. Cancer Pes. Clin. Oncol. 110, 196-202, 1985.

2) Miwa. N., Mizuno, S. and Okamoto, S: Differential cytotoxicity to human lung normal diploid, virus-transformed and carcinoma cells by the antitumor antibiotics auromomycin and macromonycin, and their non-protein chromophores J. Antibiotics 36, 715-720, 1983.

3) Miwa. N., Mizuno, S. and Okamoto, S: Role of pronase-resistant peptide segments of the antitumor protein antibiotics, auromo mycin and macromomycin, in stabilizing cytocidal activity

© The Ito Foundation

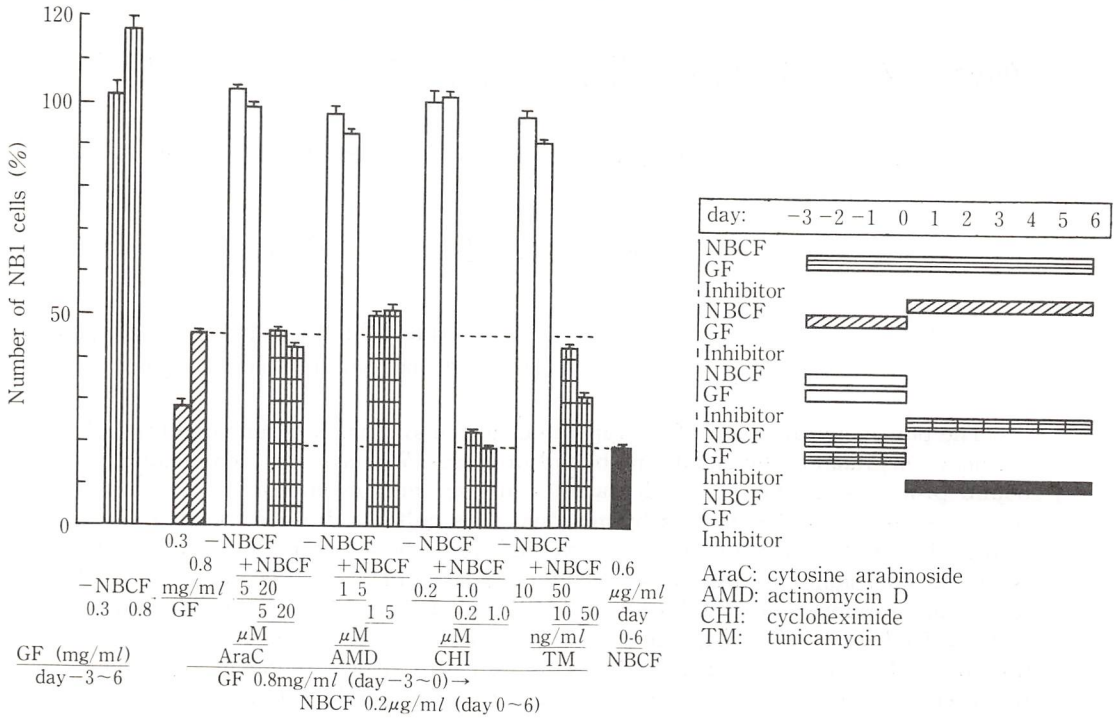



**Fig. 11** Inhibition of protein synthesis in NB1 cells restores cytotoxic ability of NBCF from partial rescue by GF.


of the chromophore moieties to carcinoma ceiis. J. Antibiotics 36, 715-720, 1983.

4) 水谷祥彦　三羽信比古，水野左敏ら：新生期ブタ脳由来増殖抑制因子の精製と性質．日本薬学会講演要旨，108. 427, 1988.

5) 三羽信比古，松野哲也，水野左敏：食肉家畜脳由来の細胞分化誘導物質および抗癌物質．食肉に関する助成研究調査成果報告書，6. 430-437, 1988.

6) Miwa. N., Matsuno, T. and Mizuno, S.: The production of tumor growth-inhibiting protein from the reonatal mouse brain: dependence on intracellular glutamine metabolism, J. Cell. Physiol. 132, 538-544, 1987.

7) Miwa. N., Mizuno. S. and Suitani, Y.: Tumor growth-inhibitory glycoprotein secreted from the mouse hrain at the termiral stage of the ontogenesis: molecular homogneity and requirement of the retained protein conformation for exhibition of the cytotoxic action in prepn, 1989.

8) Ishida, A, Miwa. N. and Mizuno, S.: Differential enhancemet of cytotcxicity ferential erhancemet of cytotoxicity by combinati on of the carcinostatic agent benzaldehyde ardhvpertemia in simiam virus 40-transformel and normal cell lines. Cancer Pes. 43, 4216-4220, 1983.

9) 三羽信比古，水谷祥彦，松野哲也ら：個体発生途上産生される新生期脳由来抗癌因子 NBCF．生化学 60. 973, 1988.

10) 三羽信比古，水谷祥彦　松野哲也ら：個体発生途上のマウスとブタ脳由来の細胞増殖抑制因子，日本癌学会総会記事 47, 64, 1988.

11) Matsuno, T. and Miwa, N.: Age-related chnges in. glutamine, metabolism of mouse brain, Med. Sci. Res. 17, 425-426, 1989.

12) 三羽信比古：新生期マウス脳抗癌因子 NBCF, Biotherpy 2, 311-317, 1988.

13) 三羽信比古：生命を支える死のプログラム死，pp. 1-240　NTT 出版　1990

14) 三羽信比古：新しいサイトカイン：非免疫系の抗腫瘍因子，pp. 111-128, 金芳堂1990

15) 三羽信比古：新生期脳由来抗がん因子NBCF：神経芽細胞腫への障害作用と糖蛋白質としての分子特性：Human Cell, 3　印刷中　1990

16) 三羽信比古ら：家畜脳から分泌される抗癌物質と細胞増殖促進物質．食肉に関する助成研究調査成果報告書，7, 483-490, 1989

17) 三羽信比古ら：新生期脳由来の癌細胞増殖抑制因子 NBCF．生化学　61. 1160, 1989.

18) 三羽信比古ら：新生期脳由来の癌細胞増殖抑制因子NBCF：作用様式と産生細胞からの分泌日本癌学会 48, 192, 1989.


© The Ito Foundation

# 神経ペプチドの代謝に関与する脳内プロテアーゼの研究

Studies on Brain Proteases Functioning in Neuropeptide Metabolism

横沢英良・石井信一（北海道大学薬学部）

Hideyoshi Yokosawa and Shin-ichi Ishii
(Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University)

The physiological action of neuropeptides at the synapse is terminated through enzymatic degradation by membrane-bound proteases. We have analyzed membrane-bound proteases functioning in degradation of four neuropeptides. 1. The initial stage of substance P-degradation by neuronal cells cultured from rat fetal brain is mediated by a phosphoramidon-insensitive metallo-protease, while that by glial cells is by phosphoramidon-sensitive one (endopeptidase-24.11). 2. the degradation of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) by neuronal and glial cells cultured from rat fetal brain takes place mainly through the cleavage between Tyr5-G1y6 by thiol-dependent metallo-protease. The enzyme called LHRH fragment (1-5)-generating enzyme purified from neuroblastoma cells or rat brain synaptic membranes shows properties similar to those of endopeptidase-24.15. 3. A dynorphin-degrading cysteine protease I purified from neuroblastoma cells shows strict specificity toward the Arg-Arg doublet among four paired basic residues (Arg-Arg, Arg-Lys, Lys-Arg. and Lys-Lys). 4. The degradation of somatostatin in the rat hippocampal synaptic membranes is initially triggered by the action of endopeptidase-24.11.

## 1. 目　的

脳内に存在する神経ペプチドが神経伝達やその調節の因子として作用していることが明らかにされつつある。神経ペプチドの生成と分解はその作用発現との関連において巧妙に制御されており，その機構解明は極めて重要な問題である。神経ペプチドはシナプス膜に存在する膜結合性プロテアーゼにより分解され，その作用を停止すると考えられているが，その分解をつかさどるプロテアーゼについての研究はまだ緒についたばかりといえる。

本研究では，本申請者らのアンギオテンシン変換酵素の新しい機能の発見[1]と，ニューロンのモデルとして用いたニューロブラストーマ細胞によるP物質[2]，黄体形成ホルモン放出ホルモン(LHRH)[3]およびダイノルフィン[4]の分解の解析結果とを踏まえて，ニューロブラストーマ細胞よりもin vivoに近い系としてラット脳初代培養細胞をとりあげてP物質やLHRHの分解に関与するプロテアーゼを解析すること，LHRHの分解に関与する新しいプロテアーゼ（フラグメント(1-5)生成酵素）を単離して特徴づけを行うこと，ダイノルフィンの分解に関与する塩基性アミノ酸対を認識する新しいプロテアーゼ（システインプロテアーゼⅠ）の基質特異性を明らかにすること，アルツハイマー病患者の海馬で減少が報告されているソマトスタチンの分解に関与するプロテアーゼを海馬シナプス膜を用いて解析すること，以上の課題の究明を通じて，それら脳内プロテアーゼの生理機能を解明することを目的とした。

© The Ito Foundation

## 2. 方　法

ラット脳初代培養細胞の調製は Arimatsu と Hatanaka の方法[5] に従って行った。培養3日目にアラビノシルシトシンC処理し，7～8日培養することでニューロンを得た。また，細胞がコンフルエントになった状態でサブカルチャーすることでグリア細胞を得た。それぞれの細胞のホモジネートを得，2回の遠心（800×g，20分と9000×g，20分）で得られる沈澱画分を膜標品として用いた。

ニューロブラストーマ細胞の培養およびその細胞膜の調製は既報の方法[2] に従って行った。

シナプス膜の調製は Jones と Matus の方法[6] に従って行った。

初代培養細胞および膜標品によるP物質や LHRH の分解反応あるいはシナプス膜によるソマトスタチンの分解反応は37℃，pH7.4 で行い，熱処理（100℃，5分）することで反応を停止し，分解産物を逆相カラムを用いた HPLC で分析した。分解産物の分離はアセトニトリルの直線濃度勾配（1-65%）を用いた溶出方法で行い，各分解産物の同定は分取した各ピークに由来するペプチドのアミノ酸組成分析により行い，一部はN末端アミノ酸分析および部分アミノ酸配列分析も行った。

LHRH フラグメント（1-5）生成酵素活性の測定は pH7.5 における LHRH の分解で生成するフラグメント（1-5）の生成量を指標にして行い，また，システインプロテアーゼ I 活性の測定は pH 8.1 におけるダイノルフィンの分解で生成するフラグメント（1-6）の生成量を指標にして行った。

ニューロブラストーマ細胞膜からのシステインプロテアーゼ I の精製は既報の方法[7] に従って行った。

ダイノルフィン(1-13)の Arg 6-Arg 7 対を他の塩基性アミノ酸対に置換した誘導体は，ペプチド合成機で合成してレジンからの切り出しと脱保護を行った後，逆相カラムを用いた HPLC で精製して用いた。

## 3. 結果と考察

### 3.1 P物質分解酵素

ラット脳初代培養細胞から得たニューロンとグリア細胞によるP物質の分解[8] は，いずれも EDTA と o-フェナントロリンで強く阻害されたが，ホスホラミドンではニューロンでの分解に対するよりもグリア細胞での分解を強く阻害した。ニューロンの場合，EDTA 存在下で生成が抑制され

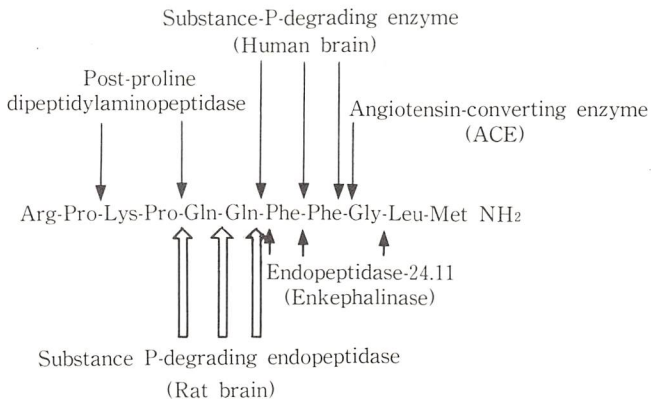



**Fig. 1**　Membrane-Bound Proteases Capable of Degrading Substance P.

© The Ito Foundation

るフラグメントの解析結果から，P物質の分解に関与する主酵素はEDTA感受性（ホスホラミドン非感受性）のメタロプロテアーゼであり，Pro 4-Gln 5, Gln 5-Gln 6 および Gln 6-Phe 7 結合の3ヵ所でP物質を切断すると推論した。一方，グリア細胞の場合，ホスホラミドン存在下で生成が阻害されるフラグメントの解析結果が従来報告されていたエンドペプチダーゼ-24.11（エンケファリナーゼ（**Fig. 1**）による切断部位と同一であることから，ホスホラミドン感受性の本酵素が分解の主酵素であり，Gln 6-Phe 7, Phe 7-Phe 8 および Gly 9-Leu 10 結合の3ヵ所を切断とすると推論した。前者のニューロンでの推論はニューロブラストーマ細胞での結果からの推論[2]と一致し，また，推論された酵素の性質はすでにラット脳からの単離に成功しているP物質分解酵素（**Fig. 1**）の性質[9]とよく一致した。

以上の結果から，ニューロンとグリア細胞でのP物質の分解に主要な役割をはたすプロテアーゼは異なると結論した。

3.2 LHRH分解酵素

初代培養ニューロンとグリア細胞による分解ではいずれの場合もLHRHの主な切断は5位と6位の間でおき，さらに，二次的あるいは副次的切断が3位と4位，4位と5位および6位と7位のそれぞれの間でもおき，また，それらのいずれの分解産物の生成も金属キレート剤とチオール阻害剤で強く阻害された。また，基質LHRHの減少に対する阻害剤の阻害効果も同様の結果を与え，LHRHの最初の切断にチオール依存性メタロプロテアーゼが関与することを示唆している。以上の結果はニューロブラストーマ細胞を用いたLHRHの分解の結果[3]とほぼ一致した。

次に，LHRHの最初の切断に関与すると推定されたフラグメント(1-5)生成酵素（**Fig. 2**）のニューロブラストーマ細胞膜およびラット脳シナプス膜からの単離を試みた[10]。得られた精製酵素の性質はエンドペプチダーゼ-24.15の性質とよく一致した。

以上の結果から，ニューロブラストーマ細胞あるいは初代培養ニューロンとグリア細胞でのLHRHの分解にチオール依存性メタロプロテアーゼ，おそらくエンドペプチダーゼ-24.15が主要な役割を果していると考えられる。

3.3 ダイノルフィン分解酵素

ダイノルフィンの分解に関与する2種類のチオールプロテアーゼ[7]のうち，塩基性アミノ酸対を特異的に認識するチオールプロテアーゼIの基質特異性を明らかにするために，ダイノルフィン(1-13)の6位と7位のArg-Arg対をArg-Lys, Lys-Arg, Lys-Lysのそれぞれの対に置換した誘導体を合成して本酵素の作用を調べた。その結果，本酵素はダイノルフィンのArg-Arg結合のみを切断し，他の3種類のペプチドを切断しなかった。一方，コントロールとして用いたトリプシンはいずれのペプチドも切断し，また，アルギニルエンドペプチダーゼはArg-Arg結合間とArg-Lys結合間のみを切断した。

今後，Arg-Arg対を有する生理活性ペプチド前駆体のプロセシングへの本酵素の関与を明らか

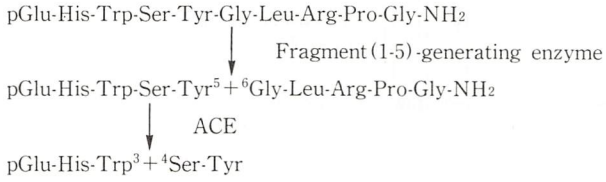



**Fig. 2** Degradation of LHRH by Neuroblastoma Cells.

© The Ito Foundation

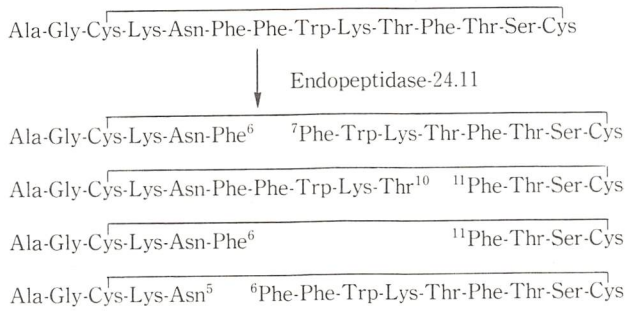



**Fig. 3** Degradation of Somatostatin by Rat Hippocampal Synaptic Membranes.

にすることが課題である。

3.4　ソマトスタチン分解酵素

ラット海馬シナプス膜によるソマトスタチンの分解で検出される主要な分解産物はPhe6-Phe7結合とThr10-Phe11結合との両者およびいずれかの切断で生成するフラグメントで，副次的にAsn5-Phe6結合の切断もおきる（**Fig. 3**）[11]。基質ソマトスタチンの減少あるいはいずれの分解産物の生成もEDTA，o-フェナントロリン，さらにホスホラミドンやチオルファンで強く阻害された。さらに，ラット脳から精製したエンドペプチダーゼ-24.11が海馬シナプス膜での分解で推定された切断部位でソマトスタチンを分解した。

以上の結果はエンドペプチダーゼ-24.11がシナプス膜でのソマトスタチンの分解に主要な役割を果していることを示唆している。今後，本酵素の特異的阻害剤がアルツハイマー病の治療薬として有効か否かを明らかにすることが課題である。

以上，4種類の神経ペプチドの分解に関与するプロテアーゼを解析し，あるものについてはラット脳あるいは培養細胞からの単離を行い，目的とする酵素が新しいプロテアーゼであることを明らかにした。しかし得られた精製酵素は極く微量でしかなく，諸性質の解析が十分とはいえない。次の段階として食肉原料となる大動物の脳を対象とすることが必須と考えて本研究でも計画したが，結果を得るに至っていない。今後，本研究の成果をその方向に発展させる研究は畜産副生物の効率的利用を志向する価値ある研究と言えよう。

## 4. 要　約

4種類の神経ペプチド（P物質，LHRH，ダイノルフィンおよびソマトスタチン）の分解に関与する脳内プロテアーゼについて以下の点が明らかになった。

(1) ニューロンでのP物質の分解にホスホラミドン非感受性のメタロプロテアーゼが関与し，グリア細胞での分解にはエンドペプチダーゼ-24.11が関与する。

(2) ニューロンとグリア細胞でのLHRHの分解にフラグメント(1-5)生成酵素おそらくエンドペプチダーゼ-24.15が関与する。

(3) ダイノルフィンの分解に関与するシステインプロテアーゼIは塩基性アミノ酸対の中でArg-Arg対のみを認識する。

(4) シナプス膜でのソマトスタチンの分解にエンドペプチダーゼ-24.11が関与する。

### 文　献

1) H. Yokosawa, S. Endo, Y. Ogura, S. Ishii, Biochem. Biophys. Res. Commun., 116, 735-742 (1983).
2) S. Endo, H. Yokosawa, S. Ishii, Biochem. Bio-

© The Ito Foundation

phys. Res. Commun., 129, 694-700 (1985).
3) H. Yokosawa, Y. Fujii, S. Ishii, J. Neurochem., 48, 293-298 (1987).
4) M. Satoh, H. Yokosawa, S. Ishii, Biochem. Biophys. Res, Commun., 140, 335-341 (1986).
5) Y. Arimatsu, H. Hatanaka, Dev. Brain Res., 26, 151-159 (1986).
6) D.H. Jones, A.I. Matus, Biochim. Biophys. Acta, 356, 276-287 (1974).
7) M. Satoh, H. Yokosawa, S. Ishii, J. Neurochem., 52, 61-68 (1989).
8) S. Endo, H. Yokosawa, S. Ishii, Neuropeptides, 14, 31-37 (1989).
9) S. Endo, H. Yokosawa, S. Ishii, J. Biochem., 104, 999-1006 (1988).
10) C. Sakurada, Y. Ohgaki, H. Yokosawa, S. Ishii, Neuropeptides, 16, 187-194 (1990).
11) C. Sakurada, H. Yokosawa, S. Ishii, Peptides, 11, 287-292 (1990).

© The Ito Foundation

# マウス神経冠細胞の増殖・分化に及ぼすブタ・フィブロネクチンの作用

Studies on the Effect of Porcine, Fibronectin on the Growth and Differentiation of Mouse Neural Crest Cells

竹内　拓司・川瀬　栄八郎・佐藤　滋・*濱中　和也
*吉原　忠志（東北大学理学部，*伊藤ハム株式会社中央研究所）

Takuji Takeuchi, Eihachiro Kawase, Shigeru Sato, *Kazuya Hamanaka and *Tadashi Yoshihara

(Faculty of Science, Tohoku University and *Ito Ham Inc., Central Research Institute)

In order to identify domains responsible for cell growth and adhesion in porcine fibronectin, trypsin digestion was performed. Fibronectin preparations were obtained fromboth porcine blood and human materials, and were digested with trypsin (0.2%-2% E/S) for 10 min. −180 min. The trypsin-digested samples were tested for their abilities to stimulate growth and adhesion using a cell line established from mouseneural crest cells which has been shown to be sensitive to fibronectin. There was no significant difference in growth between intact fibronectin and digested fibronectin. On the other hand, trypsin-digested fibronectin was shown to stimulate cell adhesion better than intact fibronestin. Therefore, it seems that tryptic fragments from porcine fibronectin retain adhessive function and that some of these fragments contains domains responsible for adhesion. Further studies with tryptic fragments of porcine fibronectin are awaited.

## 1. 目　的

動物細胞の機能を研究するために，細胞培養や器官培養の技術は不可欠の武器となっている。その細胞培養の条件での増殖を支持するための培養液が種々開発，改良されて来たが，多くの場合細胞を健全な状態で培養するという目的を達成するためにはEagle等の培養液に，さらにウシ，ウマ等の血清を加えることが必要とされて来た。しかし，近年細胞に対する情報伝達因子の研究等からの要望で無血清培養液の開発が進み，同時に血清（血漿）成分の作用についての詳細な研究が行われるようになった。

フィブロネクチンは結合組織や基底膜に含まれる糖タンパク質であるが，血液中からも検出される。この血液成分は培養条件において，細胞の増殖のみでなく，細胞間接着，基質への接着，移動，分化等種々の細胞機能を促進することが明らかになり（Kleinman et al.[1]），さらにそれらの作用との関連においてフィブロネクチンの各ドメインの他の物質への結合能も解明されつゝある（Sekiguchi et al.[2]；Dufour et al.[3]）。これまでの研究の多くはヒト血液成分を用いているが，我々はブタとヒトの血液に含まれるフィブロネクチンの夫々のドメインについての機能を比較するため，分画の第一歩としてトリプシン分解がどのようにフィブロネクチンの培養細胞への作用に影響するか，検討を行った。

© The Ito Foundation

## 2. 材料と方法

### 2.1 フィブロネクチンの調整

ブタ・フィブロネクチンはブタと血の血漿より Hayashi and Yamada[4] の方法で精製した。Sephadex G-25 でバッファー交換し，酵素分解用のバッファー（5mM Tris-HCl(pH7.0)/1mM $CaCl_2$/30mM NaCl）に溶かし最終濃度 1mg/m$l$ とした。ヒト・フィブロネクチンは岩城硝子より入手したものであり，酵素分解用バッファーに対して透析し，凍結乾燥した後水を加えて1mg/m$l$溶液とした。

酵素分解にはトリプシン（bovine pancreas, Worthington）を0.001M HCl に溶かし，2mg/m$l$ あるいは0.2mg/m$l$溶液を調整した。トリプシン・インヒビターとしてはSBTI(soybean, Sigma)を用い，酵素分解用バッファーに溶かして2mg/m$l$あるいは0.2mg/m$l$溶液とした。種々の酵素—基質比と時間でトリプシン分解を行い，トリプシン・インヒビターを1：1の比で加えて反応を停止させて，下記の試料を調整した。

A：ヒト・フィブロネクチン，未分解
B：ヒト・フィブロネクチン，0.2%，10分
C：ヒト・フィブロネクチン，2%，45分
D：ブタ・フィブロネクチン，未分解
E：ブタ・フィブロネクチン，0.2%，30分
F：ブタ・フィブロネクチン，2%，45分
G：ブタ・フィブロネクチン，2%，180分
H：ブタ・フィブロネクチン，2%，180分（但し，トリプシンとトリプシン・インヒビターを同時に加えた）
I：対照，トリプシンとトリプシン・インヒビターのみ）

### 2.2 細 胞

マウス（C57BL/6J 系）の9.5日胚から神経管を切り出して，Ito and Takeuchi[5] の方法で初代培養し，遊走して来た神経冠細胞と判断される細胞を継代培養し，10mg/m$l$ PMA（phorbol 12-myristate 13-acetate, Sigma）および10mM コレラトキシン（Sigma）を加えた培養液（15%ウシ胎児血清を含む Eagle MEM）でさらに継代培養して株化したものであり，MNCK と名付けた。

### 2.3 細胞増殖

MNCK細胞を3.5cm培養ディッシュ（Falcon3001）に$5\times10^4$細胞播き，これに20$\mu$g/m$l$のフィブロネクチン試料と10%ウシ胎児血清を含む Eagle MEM を加えて培養した。3日間 $CO_2$ インキュベーターで培養後，細胞数を計測した。1試料につき10枚の検体を用いた。

### 2.4 細胞接着の検定

10cmディッシュ（Falcon 3003）の裏側にマジックインクで目印をつけて区画を作り，各区画に上記のフィブロネクチン試料（A～I）を20$\mu l$(20$\mu$g/m$l$-PBS（$Mg^{++}$, $Ca^{++}$-free-phosphate buffered saline)) 加えて37℃，1時間加温した。そのフィブロネクチン試料を除いてから熱処理（80℃，30分）した BSA（bovine serum albumin, 1mg/m$l$-PBS）で37℃，30分加温した。さらに，BSA を除いた後，-PBS で3回洗浄した。

各区画に20$\mu l$の細胞懸濁液（$10^3$細胞）を播き，37℃で15～120分，$CO_2$ インキュベーターで培養した。培養後 5m$l$の-PBS で3回洗い，4%パラフォルムアルデヒドで30分固定し，-PBSで3回洗ったうえで，-PBS 中位相差顕微鏡で観察した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 フィブロネクチンのトリプシン分解と細胞増殖

ヒトおよびブタのフィブロネクチンとトリプシン分解を行ったフィブロネクチンの細胞増殖に対する影響を検討した結果を**図1**に示している。この結果どの実験区の間でも有意差は見られず，特

© The Ito Foundation

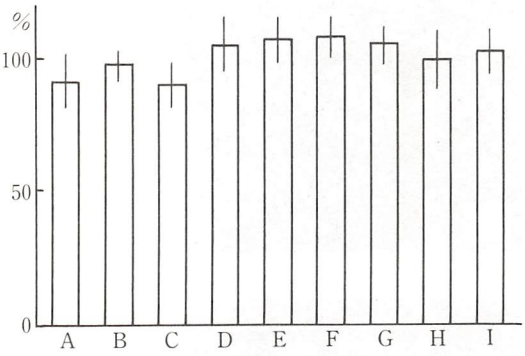



**図1**　ヒト，ブタ血液由来フィブロネクチンとトリプシン分解フィブロネクチンの細胞増殖に対する影響，百分率はブランク（培養液のみ）を100としている。A，ヒト・フィブロネクチン，未分解；B，ヒト・フィブロネクチン，0.2%，10分処理；C，ヒト・フィブロネクチン，2%，45分処理；D，ブタ・フィブロネクチン，未分解；E，ブタ・フィブロネクチン，0.2%，30分処理；F，ブタ・フィブロネクチン，2%，45分処理；G，ブタ・フィブロネクチン，2%，180分処理；H，ブタ・フィブロネクチン，2%，180分処理，トリプシン・インヒビターを含む；I，対照，フィブロネクチンを含まず，各実験区のバーは10実験例の標準誤差。

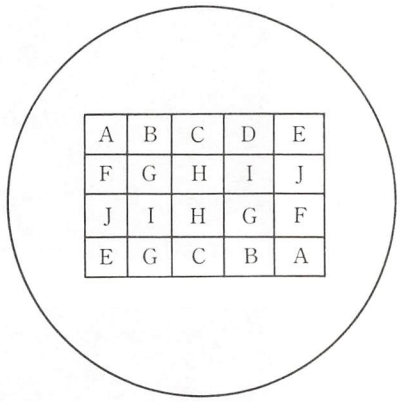



**図2**　ペトリ・ディッシュ上の実験区画

にブタ・フィブロネクチンにおいてトリプシン処理の際に濃度を高くしても，また時間を長くしても，対照やヒト・ファイブロネクチンよりもやゝ増殖が早くなくなる程度であり，有意に変化するという現象は認められなかった。

### 3.2　トリプシン分解フィブロネクチンの接着に及ぼす影響

ヒトおよびブタのフィブロネクチンとトリプシン処理した試料A～Iにブランクを加えて10試料とし，これを10cmディッシュに**図2**のように20区画を作って，同一ディッシュ上での接着性の比較を行った。その結果は**図3**および**表1**に示すように，ヒト・フィブロネクチンにおいてもブタ・フィブロネクチンにおいても，トリプシン分解を行った方が接着を促進していると判断された。また，トリプシン処理の時間を長くしても接着促進の作用には影響は見られなかった。一方，トリプシン・インヒビターの効果は特に認められず，今後濃度の再検討を行う必要がある。対照（フィブロネクチンを含んでいないが，トリプシンとトリプシン・インヒビターを含む）およびブランク（培養液のみ）においては全く細胞が接着していない。これは細胞のプラスチックディッシュ基質への接着にはフィブロネクチンの介在が必要であり，それはトリプシン分画によって生じたフラグメントのいづれかに保有されていることを示している。

すでにブタ・フィブロネクチンをトリプシンで分解し（2%，180分），SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動した場合，比較的低分子量のフラグメント（分解前は200kdであるのに対し，66kd

**表1**　神経冠細胞の接着性に対するフィブロネクチンのトリプシン分解による影響，$^{+}$～$^{+++}$，接着の強さ。

| | フィブロネクチンの種類 | 接着性 |
|---|---|---|
| A | ヒト，未分解 | + |
| B | ヒト，0.2%，10分処理 | +++ |
| C | ヒト，2%，45分処理 | +++ |
| D | ブタ，未分解 | ++ |
| E | ブタ，0.2%，30分処理 | +++ |
| F | ブタ，2%，45分処理 | +++ |
| G | ブタ，2%，180分処理 | +++ |
| H | ブタ，2%＋インヒビター，180分 | +++ |
| I | 対照（Hからフィブロネクチンを除く） | − |
| J | ブランク（培養液のみ） | − |

© The Ito Foundation

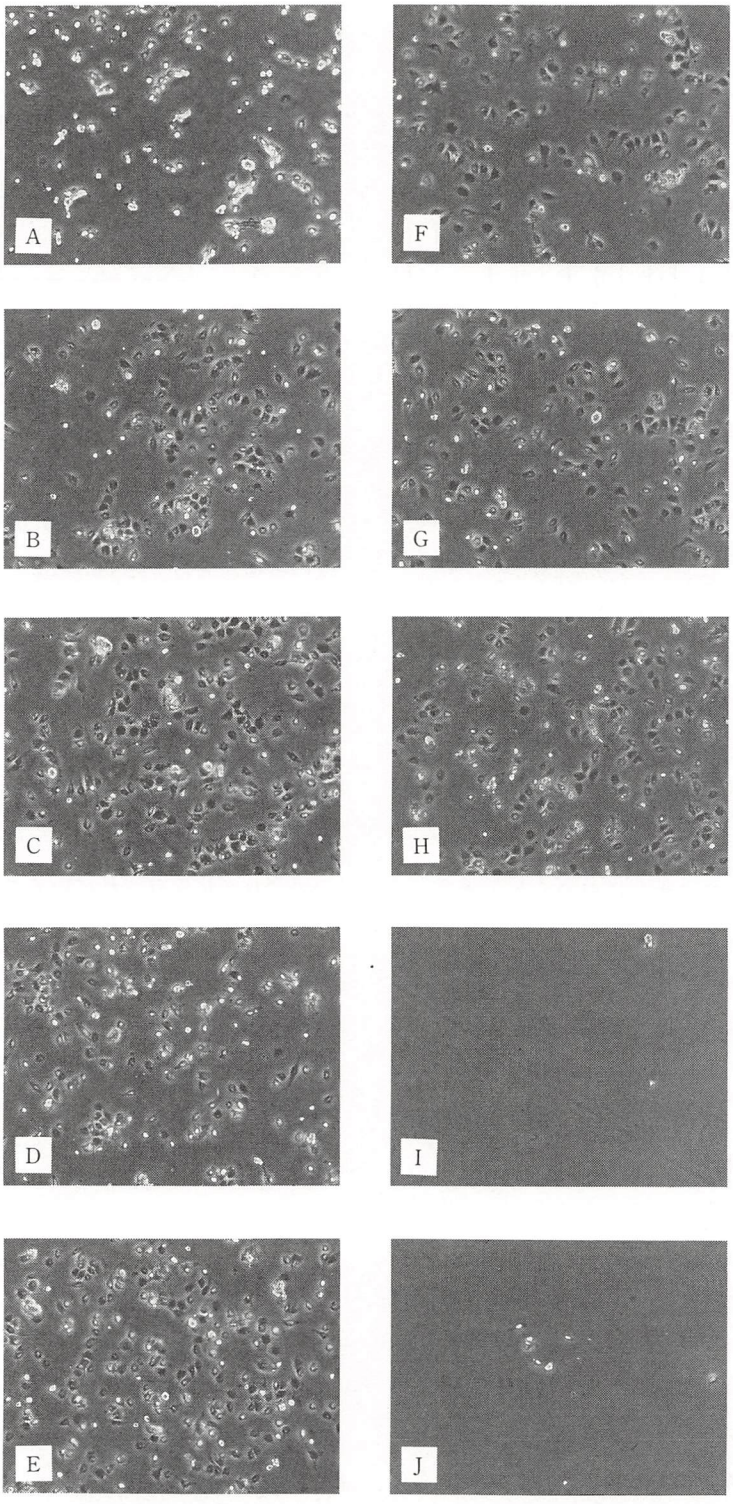



**図3** 神経冠細胞の接着性に対するフィブロネクチンのトリプシン分解による影響。
約60倍，A～Iの記号は**図1**と同じ。Jはブランク（培養液のみ）。

© The Ito Foundation

以下）が6本以上認められている（吉原ら未発表）。今回の実験結果から，それらのフラグメントのいづれかに接着に関与するドメインが含まれていると考えられ，今後の各画分を用いた実験に期待される。

## 4. 要　約

ブタ・フィブロネクチンの細胞接着に関与するドメインを同定するための最初の段階として，ブタフィブロネクチンを種々の濃度と時間でトリプシン分解し，その細胞増殖と基質への接着促進効果をヒト・フィブロネクチンと比較しながら検討した。用いた細胞はフィブロネクチンに良く反応することが知られている神経冠細胞（マウスC57 BL/6J系由来）を株化したものである。その結果，ブタ・フィブロネクチンをトリプシンで処理した場合に，より基質への接着が促進されることが認められた。

### 文　献

1) H.K. Kleinman, R.J. Klebe and G.R. Martin, J. Cell Biol., 88：473-485 (1981)
2) K. Sekiguchi, M. Fukuda and S. Hakomori, J. Biol. Chem., 256：6452-6462 (1981)
3) S. Dufour, J-L. Duband, M.J. Humphries, M. Obara, K.M. Yamada and J.P. Thiery, Embo J., 7：2661-2671 (1988)
4) M. Hayashi and K.M. Yamada, J. Biol. Chem., 257：5263-5267 (1982)
5) K. Ito and T. Takeuchi, J. Embryol. exp. Morph., 84：49-62 (1984)

© The Ito Foundation

# 家畜由来の細胞接着性タンパク質の生理化学的研究
## ——血清ビトロネクチンのコラーゲン結合性——

Biochemistry and Cell Biology of Cell Adhesion Proteins from Domestic Animals
——Binding of Serum Vitronectin to Collagen——

林　正男・石川総子（お茶の水女子大学理学部）

Masao Hayashi and Michiko Ishikawa (Faculty of Science, Ochanomizu University)

The present study describes that the collagen-binding activity of vitronectin in human serum increases by treatments with heparin and urea. Vitronectin purified from human serum is known to bind to native collagen, whereas vitronectin in the serum could not bind. We have examined this discrepancy. The amount of vitronectin bound to type I collagen immobilized on 96-well microtiter plates was measured by ELISA using horseradish peroxidase-conjugated anti-vitronectin.

Vitronectin in human serum considerably bound to collagen when the serum was boiled in 8 M urea for 5 min and mixed with heparin. Each treatment of urea, boiling, or heparin alone inefficiently activated the binding. The effective concentrations were 2 M to 8 M of urea and 0.05 to 1.5 $\mu g/ml$ of heparin. Dextran sulfate and dermatan sulfate could substitute for heparin, but keratan sulfate, chondroitin sulfate A and C, heparan sulfate, and hyaluronate could not.

### 1. 目　的

1940年代にアメリカを中心として確立された動物細胞培養法を利用して，現在，私たちはいろいろな動物細胞を実験室の片隅で容易に培養することができる。この細胞培養では，培地成分の一つとして，いまだに動物の血清が必須である。ウシ胎児血清が最も良いとされるが，仔ウシ血清，ウマ血清，ヒト血清なども使われている。血清は多くの有効成分を供給するが，その一つは，細胞を培養容器に接着させる因子であり，その接着因子の本体は，細胞接着性糖タンパク質として1983年にアメリカで発見されたビトロネクチンである[1,2]。

ビトロネクチンは，細胞接着活性ばかりでなく，細胞外マトリックス成分のヘパリン，血液凝固因子のトロンビン・抗トロンビンⅢ複合体，補体の膜侵襲複合体 C5b-9 などに結合する活性ももっている。生体内でビトロネクチンがどのような役割を担っているか不明であるが，上記の活性から推定すると，外傷時におこる一連の生体反応（つまり血液凝固，細菌感染防御，免疫反応，細胞接着，組織修復，細胞増殖など）に総合的に関与していそうである。この観点にたつと，外傷時に血液が接触する主要な場である細胞外マトリックスとの相互作用がきわめて重要である。そこで，私たちは細胞外マトリックスの主成分であるコラーゲンに注目した。

ビトロネクチンとコラーゲンとの相互作用の研究は，いままで1986年の Gebb ら[3]の研究と1988年の私たち[4]の研究の２報しか報告されていない。この２報には，ビトロネクチンとコラーゲンが結合することと，ビトロネクチンの結合部位が

© The Ito Foundation

推定できたことが報告されているにすぎない。従って，今後解決すべき重要な問題は，ビトロネクチンのコラーゲン結合メカニズムである。精製ビトロネクチンはコラーゲンに結合できるのに，未精製の血清中ビトロネクチンはコラーゲンに結合できないことを私たちが発見した。これを契機に，ビトロネクチンのコラーゲン結合活性調節の研究を行った。

## 2. 方　法

### 2.1 材　料

ビトロネクチンは，私たちの開発した新方法[5,6]，つまり8M尿素存在下のヘパリン親和性カラム法，によりヒト血清から精製した。コラーゲンは，新田ゼラチン社のブタ由来ペプシン可溶性I型コラーゲン（Cell matrix I・P）を用いた。ゼラチンは，このI型コラーゲンを5分間煮沸したものである。

コラーゲン結合活性の測定では，特にことわらない限り未凍結ヒト血清を出発材料とした。採血した全血液を室温で2時間静置して凝固させ，さらに4℃に一晩放置した後，3,000rpm，10分間遠心した。上清を4℃に保存し，3週間以内に使用した。

### 2.2 ビトロネクチンのコラーゲン結合活性測定法

I型コラーゲン，ゼラチン，あるいはウシ血清アルブミンを100mM炭酸ナトリウム緩衝液（pH 9.6）中に10μg/mlの濃度にし，エライザ用プレート（住友ベークライト社，MS-3496F）に50μlずつまいて，37℃で1時間保温した。このプレートに0.2%（w/v）スキムミルク250μlを加え，37℃で1時間保温しブロッキング処理した。洗浄液〔0.05%（w/v）Tween 20, 10mMナトリウムリン酸緩衝液（pH7.4）〕でプレートを洗った後，検定液を50μlずつまき，37℃で1時間保温した。洗浄液でプレートを洗い，洗浄液中に1/1,000に希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗ヒトビトロネクチン抗体を50μlずつまき，37℃で1時間保温した。洗浄した後，基質として0.4mg/ml o-フェニレンジアミン，2.5mM $H_2O_2$，0.1Mクエン酸，0.2Mリン酸水素二ナトリウム溶液を100μlずつまき，室温で10分間放置した。492nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダー（コロナ，MTP-32）で測定した。この吸光度をコラーゲン（あるいはゼラチン，ウシ血清アルブミン）に結合したビトロネクチンの量とした。

### 2.3 検定液の作製

ビトロネクチンの結合活性を測定するための検定液は，次の方法により作製した。ヒト血清5μlに，8M尿素，0.13M塩化ナトリウム，10mMナトリウムリン酸緩衝液（pH 7.7），5mM EDTA，1mM PMSF溶液を血清の10倍量の50μl加え，5分間煮沸した。ここに，0～1.5mg/mlのヘパリン溶液，あるいはその他のグリコサミノグリカン溶液を6μl加えて終濃度で0～150μg/mlになるようにし，37℃で1時間保温した。8M尿素処理のみを行う場合には，上記の尿素溶液を血清に加え，37℃に1時間保温した。尿素・煮沸処理は，同様に尿素溶液を加えてから，5分間煮沸した。また，尿素・ヘパリン処理の場合は，尿素溶液を加え37℃で保温した後に1.5mg/mlのヘパリン溶液を6μl加え，さらに37℃に1時間保温した。8M尿素処理を行わない場合は，血清5μlに0.13M塩化ナトリウム，10mMナトリウムリン酸緩衝液（pH7.7），5mM EDTA，1mM PMSF溶液を50μl加え，その後煮沸処理，あるいはヘパリン溶液を加え，37℃に1時間保温した。上記のように処理した血清61μlのうち10μlを洗浄液190μlで20倍に希釈し検定液とした。

精製ビトロネクチンは，特に記述しない限り尿素，煮沸，ヘパリン処理のいずれも行わなかった。

© The Ito Foundation

2.4　ビトロネクチンの濃度測定法

精製ビトロネクチンは，1.00mg/m$l$溶液の280 nmの吸光度が1.38であるとした。血清中ビトロネクチンの濃度は，ELISA-SDS法[7]により測定した。

## 3.　結果と考察

3.1　血清中ビトロネクチンはコラーゲンに結合できない

ビトロネクチンのコラーゲン結合量を測定したところ，**図1**○印で示すように，精製ビトロネクチンは濃度依存的にコラーゲンに結合した。一方，無処理のヒト血清中ビトロネクチンは，**図1**●印で示すようにコラーゲンに結合しない。ビトロネクチンモノクローナル抗体を用いても同じ結果が得られた。さらに，ヒト血漿を用いても同様に，未精製のビトロネクチンはコラーゲンに結合しなかった。

この結果の解釈として私たちは，次の2つの可能性を考えた。第1は，ビトロネクチンのコラーゲン結合に対する阻害因子が血清中に存在しているという可能性である。これによれば，ビトロネクチンの精製過程で阻害因子が除かれるため，精製ビトロネクチンはコラーゲンに結合できる。第2の可能性は，ビトロネクチン分子の構造変化である。私たちが用いているビトロネクチンの精製法[5,6]は，8M尿素を用いるので，ビトロネクチンの立体構造が変化しても不思議はない。もし，コラーゲン結合部位が分子の内部に隠れていれば，この部位が分子表面に現れてくるかもしれない。

いずれにせよ，ビトロネクチンがコラーゲンに結合しない状態から，結合する状態に変化するという過程を解析することは，ビトロネクチンのコラーゲン結合性とその調節のメカニズムを解明するという点で重要である

3.2　血清中ビトロネクチンのコラーゲン結合能活性化

血清中ビトロネクチンをコラーゲンに結合させ

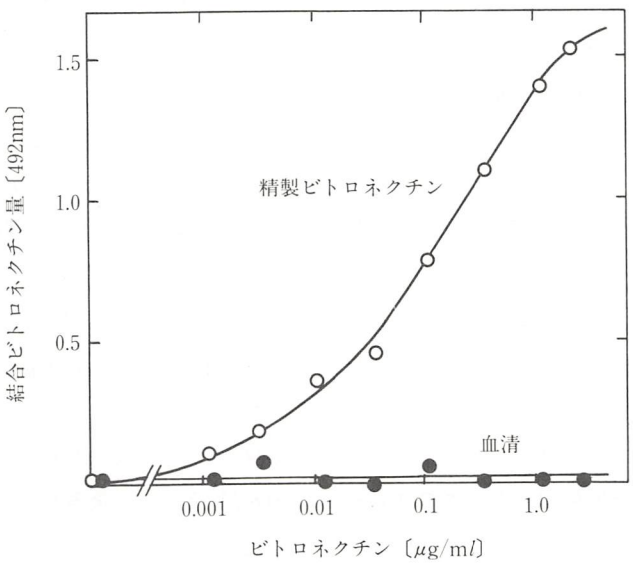



**図1**　ビトロネクチンのコラーゲン結合能[9]
精製ビトロネクチン（○印）とヒト血清中ビトロネクチン（●印）のコラーゲン結合量を測定した。試料は特別な処理をしていない。

© The Ito Foundation

る条件を検討した。その結果，血清に終濃度8Mになるように尿素を加え5分間煮沸し，ヘパリンを加えると，血清に含まれたままの未精製のビトロネクチンがコラーゲンに結合した。**図2**○印に示すように，この結合の活性化は，加えるヘパリンの濃度が0.05 μg/ml までは全く効果がなく，0.5 μg/ml の時に最大でそれ以上加えると結合量は減少した。しかし，15 μg/ml 以上150 μg/ml でも一定の結合が見られた。一方，尿素および煮沸処理により，血清中ビトロネクチンのゼラチンへの結合も若干活性化されたが，この結合はヘパリンによって増強されることはなかった（**図2**△印）。なお，血清に加える尿素溶液の濃度は2～8Mが有効だった。

さて，煮沸，尿素，ヘパリンの効果はどうだろうか。煮沸，尿素，ヘパリンをそれぞれ単独で，またはこの内の2つを組み合せて処理した血清を用いた。すると血清中ビトロネクチンのコラーゲン結合量は，3つ組み合せて処理した場合の15～55%であった（**表1**）。それぞれの処理効果がある程度相加的に思えるが，統一的に解釈するのは難しい。

**表1**　血清中ビトロネクチンのコラーゲン結合能[9]

8M尿素処理，5分間煮沸処理あるいは，0.5 μg/ml ヘパリン処理をそれぞれ組み合せて行った血清中のビトロネクチン（推定1 μg/ml 相当）のコラーゲン結合量を測定した。ビトロネクチン結合量は492nmの吸光度を100倍して示した。

| 血清の処理方法 | ビトロネクチン結合量 |
|---|---|
| 無処理 | 0 |
| 煮沸 | 12 |
| 尿素 | 38 |
| ヘパリン | 25 |
| 尿素，煮沸 | 29 |
| 煮沸，ヘパリン | 35 |
| 尿素，ヘパリン | 43 |
| 尿素，煮沸，ヘパリン | 78 |

3.3　各種グリコサミノグリカンの効果

ヘパリンの効果は，ヘパリン特異的だろうか。グリコサミノグリカンをヘパリンの代りに用いて，コラーゲン結合能に対する効果を調べた。デキストラン硫酸は1.5 μg/ml 以上で血清中ビトロネクチンのコラーゲン結合能を活性化した(**図3**○印)。

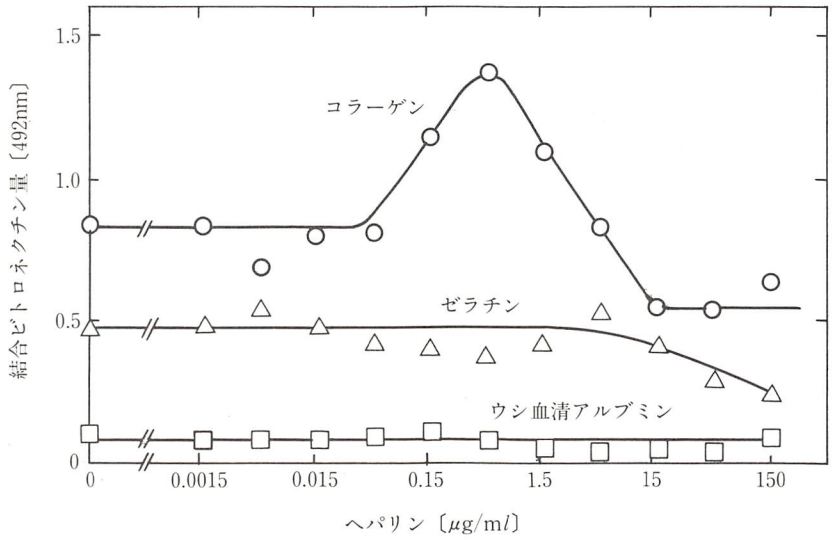



**図2**　コラーゲン結合能のヘパリン濃度依存性[9]

血清を尿素および煮沸処理し，ヘパリン濃度をかえて，血清中ビトロネクチンのコラーゲン（○），ゼラチン（△），ウシ血清アルブミン（□）への結合量を測定した。

© The Ito Foundation

コラーゲン結合量は，デキストラン硫酸濃度が150μg/mlまで濃度依存的に上昇した。ヘパリンでは高濃度で結合量が減少してくるのに比べ対照的である。また，さらにヘパリンの効果と異る点はコラーゲンだけでなく，ゼラチンへの結合も活性化する（図3△印）。デキストラン硫酸と同じ効果は，デルマタン硫酸にも見られた。しかし，ケラタン硫酸，コンドロイチン硫酸AおよびC，ヒアルロン酸，ヘパラン硫酸はどれも効果がなかった。

以上のように，精製することなく血清に含まれたままのビトロネクチンをコラーゲンに結合させることができるようになった。この知見は，ビトロネクチンのコラーゲン結合性とその調節メカニズムを解明するという点で重要であるばかりでなく，いろいろと応用できる点でも価値が高い。例えば，コラーゲンを組み込んだ人工皮膚や細胞培養皿にさらにビトロネクチンを結合させ，細胞接着性を高める。また，ビトロネクチンのコラーゲン結合性の血清検査をすることで疾患の診断をする。さらに，ビトロネクチンのコラーゲン結合性を高めた組織修復剤としてヘパリン処理血清を用いる，などである。本研究では，ヒト血清を材料に用いたが，ブタ血清，ウシ血清にもヒト血清と同じビトロネクチンが含まれている[6]。ブタ血清，ウシ血清を材料にしても本研究と同じ知見が得られるに違いない。

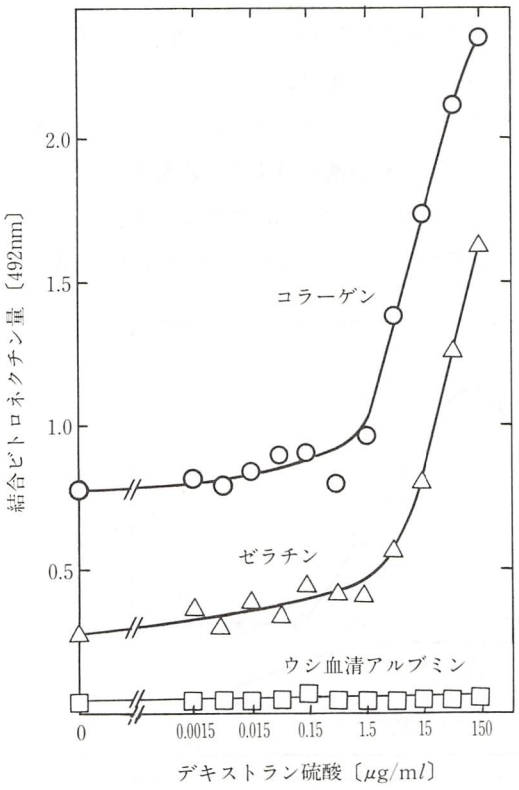



**図3**　コラーゲン結合能のデキストラン硫酸濃度依存性[9]

図2と同様だが，ヘパリンの代りにデキストラン硫酸を用いて，コラーゲン（○），ゼラチン（△），ウシ血清アルブミン（□）への血清中ビトロネクチンの結合量を測定した。

## 4. 要　約

精製ビトロネクチンはコラーゲンに結合できるのに，血清中のビトロネクチンはそのままではコラーゲンに結合できない。血清に尿素を加え，煮沸し，ヘパリンを添加すると，血清中ビトロネクチンもコラーゲンに結合するようになる。デキストラン硫酸やデルマタン硫酸はヘパリンの代りになった。

本研究の成果は，第3回ヨーロッパ細胞生物学会（1990年9月2日～7日，イタリア，フィレンツェ市）で発表し[8]，また原著論文[9]としても発表予定である。

最後になりましたが，伊藤ハム株式会社の中村豊郎，吉原忠志両氏のご支援に心より感謝申し上げます。

### 文　献

1）Hayman, E.G., Pierschbacher, M.D., Ohgren, Y. and Ruoslahti, E.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 4003-4007, 1983

2）石川総子・林　正男：組織培養　15, 464-467, 1989

© The Ito Foundation

3) Gebb, C., Hayman, E.G., Engval, E. and Ruoslahti, E. :J. Biol. Chem. 261, 16698-16703, 1986
4) Izumi, M., Shimo-Oka, T., Morishita, N., Ii, I. and Hayashi, M.: Cell Struct. Funct. 13, 217-225, 1988
5) Yatohgo, T., Izumi, M., Kashiwagi, H. and Hayashi, M.: Cell Struct. Funct. 13, 281-292, 1988
6) Kitagaki-Ogawa, H., Yatohgo, T., Izumi, M., Hayashi, M., Kashiwagi, H., Matsumoto, I. and Seno, N.: Biochim. Biophys. Acta 1033, 49-56, 1990
7) Akama, T., Yamada, K.M., Seno, N., Matsumoto, I., Kono, I., Kashiwagi, H., Funaki, T. and Hayashi, M.: J. Biochem. 100, 1343-1351, 1986
8) Hayashi. M. and Ishikawa, M.: Cell Biol. Int. Rep. 14, 121, 1990
9) Ishikawa, M. and Hayashi, M. : 論文準備中, 1990

© The Ito Foundation

# ヒト血小板由来成長因子 (Platelet-Derived Growth Factor : PDGF) に対する固相サンドイッチ酵素免疫測定法 (EIA) の検討

Studies on Development of Solid-Phase Sandwich Enzyme Immunoassay Method for Human Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)

林　恭三・*黒部真章 (岐阜薬科大学, *岐阜医療技術短期大学)

Kyozo Hayashi and *Masayuki Kurobe
(Gifu Pharmaceutical University and *Gifu College of Medical Technology)

Using rabbit antibody against human platelet-derived growth factor (PDGF) raised by immunization of the emulsion of PDGF in Rivi-adjuvant, we developed a relatively sensitive sandwich enzyme immunoassay (EIA). Its discriminatory sensitivity was as low as 0.5ng/m$l$ when a 100$\mu l$ aliquot of samples was used. The preliminary evaluation of the resulting method revealed that the procedures are acceptable in regard with linearity and reproducibility of within-assay series. However, it seems that both sensitivity and recovery from normal serum were not enough to further investigations on plysiological function of PDGF in vivo and to measure PDGF level in conditioned medium.

## 1. 目　的

血小板由来成長因子(Platelet-Derived Growth Factor : PDGF) は平滑筋細胞や線維芽細胞などの中胚葉由来の細胞，およびグリア細胞などの増殖を促進する塩基性糖タンパク質で，還元により分子量約 18kDa (A鎖) と 14kDa (B鎖) のサブユニットに解離しその生物学的活性を失う[1]。ヒト血小板の PDGF はその多くが AB ヘテロダイマーであり[2,3]，ブタのそれは BB ホモダイマーである[4]。A鎖とB鎖のアミノ酸残基配列は，相互に約60%の相同性を有し，相対応する位置に7つの Cys 残基が存在する[1]。ヒト PDGF B鎖をコードする遺伝子は第22染色体上にあり[5]，サル肉腫ウイルス SSV の発癌遺伝子，v-sis と97%の高い相同性を有す[6,7]。このことから，B鎖をコードする遺伝子は，正常人の遺伝子中の発癌遺伝子，c-sis である[8~10]と考えられている。一方，近年血小板以外の正常組織や多くの腫瘍細胞および培養形質転換細胞から PDGF 類似因子が見い出された[1]。しかし，PDGF および PDGF 類似因子の生体内での生理的役割やその作用機序などについては明らかでない。これらの諸問題を検討するためには，高感度で特異性も高い PDGF の測定系が必要である。

著者らはすでに比較的簡便なヒト PDGF の精製法を確立した[11,12]。そこで今回は，従来作製することが難しいといわれていた抗ヒトPDGF抗体の調製とこの抗体を活用した固相サンドイッチ酵素免疫測定法の開発を目的として検討した。

## 2. 方　法

本研究で使用したヒト PDGF は，昨年の本財団報告書に記載した方法[12]に従って精製した。

© The Ito Foundation

ウシ血清アルブミン（BSA）はArmour社，ペプシンはCalbiochem-Behring社から購入した。N-Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate（SMCC）はPierce，3-(p-hydroxyphenyl) Propionic acidはAldrich社から購入したRivi-adjuvantはリビ免疫化学研究所より購入した。

抗ヒトPDGF抗体は，75μgのヒトPDGFとRivi-adjuvantとのエマルジョンをマニュアルに準じて調整したのち，ウサギ背部皮下に10日間隔で6回追加免疫して作製した。追加免疫5日目に耳朶静脈より部分採血し，その抗体価をELISA法で測定した。抗ヒトPDGF IgG画分は抗ヒトPDGF抗血清からProtein A Sepharose CL-4Bカラムを用いて精製した。

抗ヒトPDGF Fab'-peroxidase複合体はIshikawaらの方法[13]に従ってSMCCを用いるマレイシド法で調整した。調整法のプロトコールを**Fig. 1**に，また，抗ヒトPDGF Fab'-peroxidase複合体の最終精製に用いたUltrogel AcA 44カラムクロマトの溶出曲線を**Fig. 2**に示した。

抗ヒトPDGF IgG抗体によるbeadの被覆は以下の方法に従った。直径3.2mmのpolystyrene beadsを0.05M Tris-HCl buffer, pH 8.5中に0.05μg/mlの濃度に溶解した抗ヒトPDGF IgG抗体の溶液に浸し室温で3時間，あるいは4℃で1夜放置した。過剰の抗体溶液を除去し，beadsをbuffer A（=0.3M NaCl, 0.1% BSA, 0.1% $NaN_3$, 1 mM $MgCl_2$ を含む0.1 M phosphate buffer, pH 7.0）で3回洗浄した。beadsはbuffer

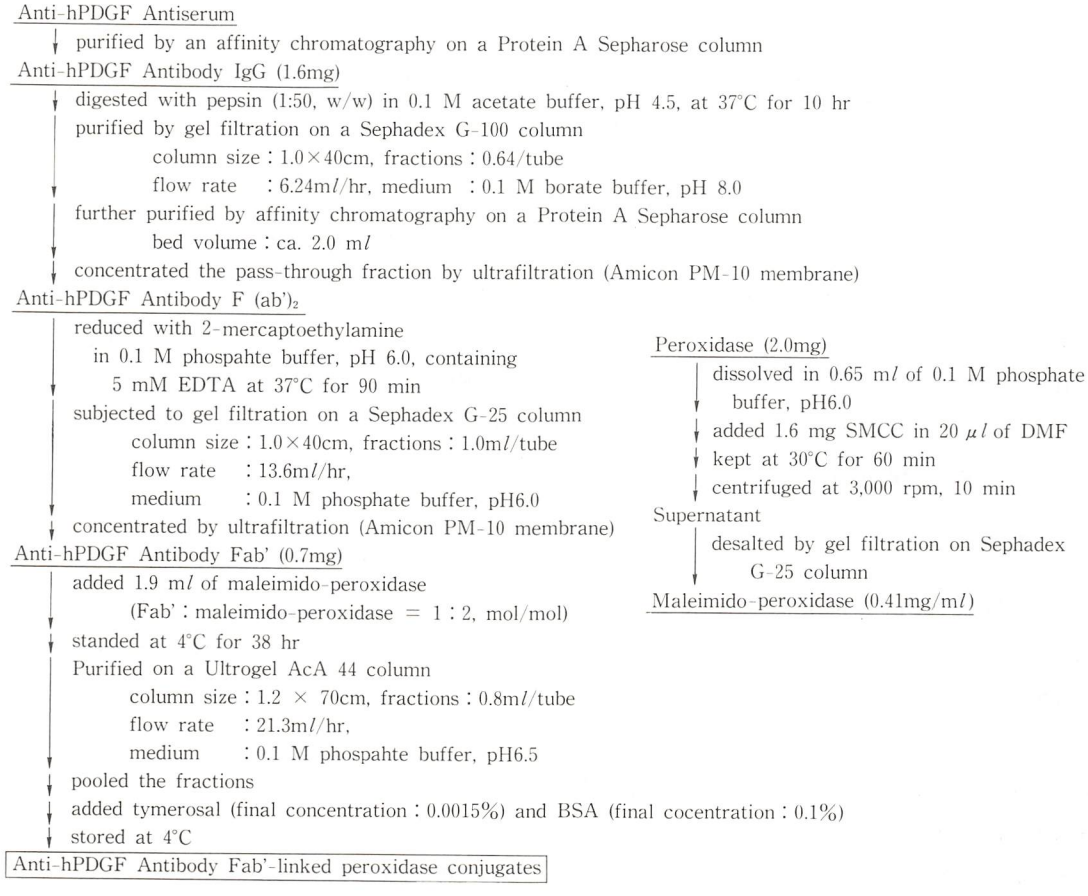



**Fig. 1** Protocol for Preparation of Anti-hPDGF Fab'-linked Peroxidase Complexes

© The Ito Foundation

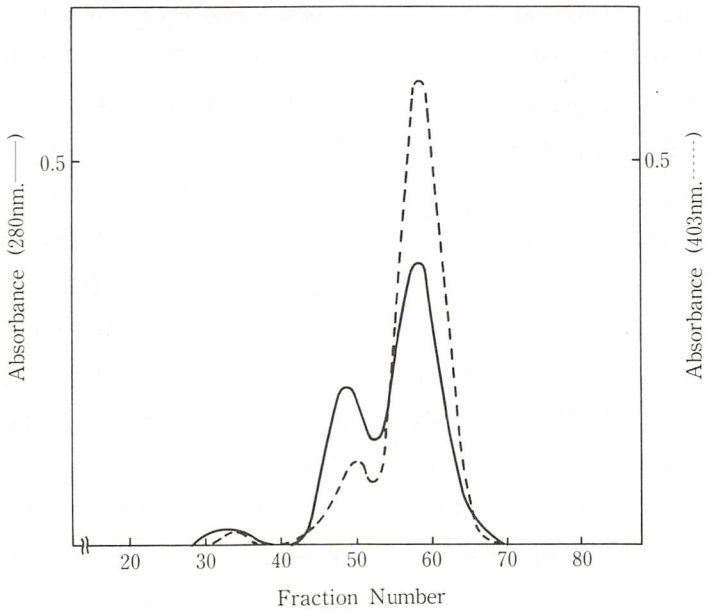



**Fig. 2** Chromatographic Profile of Anti-hPDGF Fab'-Iinked Peroxidase Complexes on a Column of Ultrogel AcA 44

The coupling products of anti-hPDGF antibody Fab'fragment and maleimido-peroxidase (described in **Fig. 1**)were applied on a column of Ultrogel AcA 44 (1.2×70cm) and developed with 0.1 M phosphate buffer, pH 6.5. Fractions of 0.8 m*l* each were collected at a flow rate of 21.3 m*l*/hr.

Aに浸し4℃で保存した。

two-site 固相酵素免疫測定法(EIA)は，すでに著者らが報告しているマウス EGF[14]，ヒト EGF[15]，あるいは PSTI(膵分必型トリプシンインヒビター)[16] の EIA 系に準じて組みあげた。操作法の概要を **Fig. 3** に示した。

### 3. 結果と考察

ヒト PDGF に対する抗体は，フロイントの完全および(あるいは)不完全アジュバントを用いて調整しても十分な抗体価をもつ抗血清を作製しにくいといわれていた。そこで著者らは，フロイント完全(不完全)アジュバントとは乳化型の異なる Rivi-adjuvant を活用して抗ヒト PDGF 抗体の作製を試みた。

Rivi-adjuvant で乳化したヒト PDGF を1回投与あたり 75$\mu$g ウサギ脊部皮下に投与した。10日間隔で同様に追加免疫した。追加免疫5日後に耳朶静脈より部分採血し，その抗体価を ELISA 法で測定した。抗体価は，0.05M Tris-HCl buffer, pH 8.5 の中に 10ng/m*l* の濃度に溶解したヒト PDGF 溶液 100$\mu$*l* でコートした96穴マルチウェルプレートとの抗原を50%免疫中和するのに必要な抗血清の希釈倍率の逆数で表示した。その結果を **Fig. 4** に示した。**Fig. 4** から明らかなように，3回追加免疫したときの抗体価は約2,500であり，それ以上免疫感作しても抗体価は上昇しなかった。

抗ヒト PDGF 抗血清より Protein A SepharoseCL-4B カラムで精製した抗ヒト PDGF IgG，および市販のヤギ由来抗ヒト PDGF IgG をそれぞれ 1/50(w/w)のペプシンで37℃，13時間消化した。ついで，これらのペプシン消化物を Sepha-

© The Ito Foundation

Polystyrene Beads in Assay Tube
↓ coated with anti-hPDGF antibody IgG (50 $\mu$g/m$l$)
↓ washed with 0.5 m$l$ of buffer A[1], three times
↓ Standard hPDGF or sample solution (250 $\mu l$) was added.
↓ incubated at 4°C for one day
↓ washed with 0.5 m$l$ of buffer B[2], three times
↓ Rabbit anti-hPDGF antibody Fab'-POD conjugate was added.
↓ incubated at 4°C for one day
↓ washed with 0.5 m$l$ of buffer B, three times
↓ The beads were transferred to new assay tubes.
Peroxidase-Bound Polystyrene Beads
↓ 0.6% of HPPA[3] (150 $\mu l$) and 0.015% of $H_2O_2$ (100 $\mu l$) were added.
↓ incubated at room temprature for 60 min. with gentle shaking
↓ The reaction was terminated by adding 0.1 M Glycine-NaOH, pH 10.3 (2 m$l$).
↓ The immunofluorescence was measured. (Excitation 320 nm, Emission 405 nm)

1) buffer A : 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0, containing 0.3 M NaCl, 0.1% BSA, 0.1% $NaN_3$ and 1 mM $MgCl_2$
2) buffer B : 10 mM phosphate buffer, pH 7.0, containing 0.1% BSA
3) HPPA : 3-(p-hydroxyphenyl) propionic acid

**Fig. 3** Protocol for a Proposed EIA

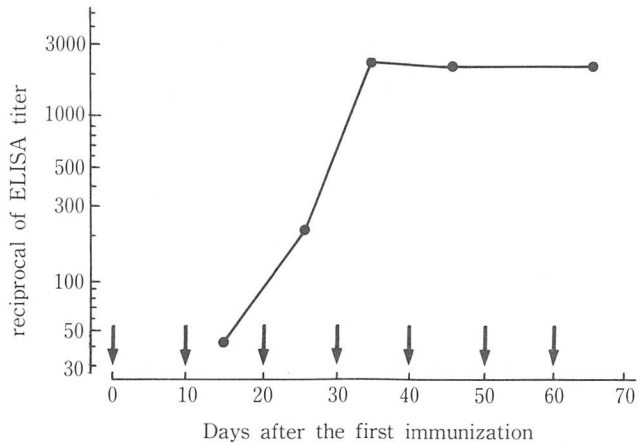



**Fig. 4** Antibody Responses of Rabbit Immunized with hPDGF in Rive-adjuvant
Rabbit was immunized with 0.75 $\mu$g of hPDGF emulsified with Rivi-adjuvant. Each antibody response of the sera collected at 5 days after booster injections from ear vein was measured with ELISA method as described in Text.

dex G-100 カラムでゲルろ過したときの溶出曲線を**Fig. 5** に示した。ウサギ由来の抗体ではフラクション20番目附近に明らかな pFc' フラグメントの溶出が認められるが，ヤギ由来の抗体ではこのピークを検出することができなかった。ヤギ由来の市販抗ヒト PDGF IgG を1/10(w/w)のペプシンで消化したり，消化時間を48時間に延長してもpFc'のピークは認められなかった。これらのこと

© The Ito Foundation

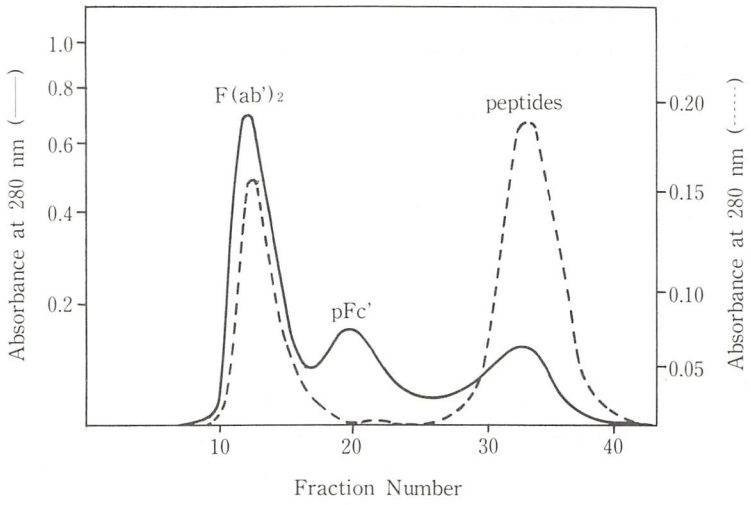



**Fig. 5** Elition Profiles of Pepsin-digests of Rabbit and Goat Antibody IgGs on a Column of Sephadex G-100

Rabbit antibody IgG (3.5 mg, ——) and goat antibody IgG (1.0 mg. ·····) were digested with pepsin (1:50, w/w) at 37℃ for 13 hr. Each pepsin digest was applied on a column of Sephadex G-100 (0.8×45 cm)and developed with 0.1 M borate buffer, pH 8.0. Fractions of 1.0 m*l* each were collected at a flow rate of 15 m*l*/hr.

から，市販ヤギ抗ヒトPDGF IgGのペプシン感受性は極めて弱く，$F(ab')_2$ フラグメントに誘導しにくいことが明らかとなった。IgGのペプシン感受性は種属間であるいは同一種属でもそのサブクラスの相異によって著しく異ることはよく知られている。

このようにして調整したウサギ抗ヒトPDGF $F(ab')_2$ を2-メルカプトエチルアミンで還元したのち，マレイミド化ペルオキシダーゼと反応後，Ultrogel AcA 44カラムで精製してペルオキシダーゼ標識抗体を調整した（**Fig. 1**，**Fig. 2**）。

**Fig. 6** は今回組み上げたtwo-site固相サンドイッチ酵素免疫測定法のdose-response curveである。操作法の概要は**Fig. 3**に示した。検体100$\mu l$を用いたとき，0.5ng/m*l*から200ng/m*l*の間で直線関係のdose-responseが得られ，その検出限界はアッセイチューブあたり約20pgと高感度であった。しかし，PDGFの生体内での生理的役割や各種培養細胞の培養上清中のレベルなどを検討するためには未だ十分な感度とはいえず，今後さらに高感度化する必要があると思われた。

本EIA系の精度を予備検討した。同一検体を10回同時測定した群内再現性は，高・中・低濃度のいずれの場合でもその変動係数（coefficent variation : C.V.）は10%前後であった。しかし，健常者の血清中に等容量のヒトPDGF溶液を添加後4℃で1夜放置したあとの添加回収率はきわめて低く（10%以下），また，ほとんど回収できなかった血清もあった。このことから，血中には本EIA系を妨害する妨害物質の存在が示唆された。

血液中には$\alpha_2$-マクログロブリン[17]をはじめとするPDGF結合タンパク質が存在し，またPDGFは結合タンパク質と結合するとその細胞増殖活性が減弱される[1]ことから，同時にその抗原活性も減弱あるいは消失されると考えられた。創傷の治癒や局所的な慢性の炎症が即全身の線維化を引き起こしてはまずいので，これらのPDGF結合タンパク質が流血中でのPDGFの活性発現

© The Ito Foundation

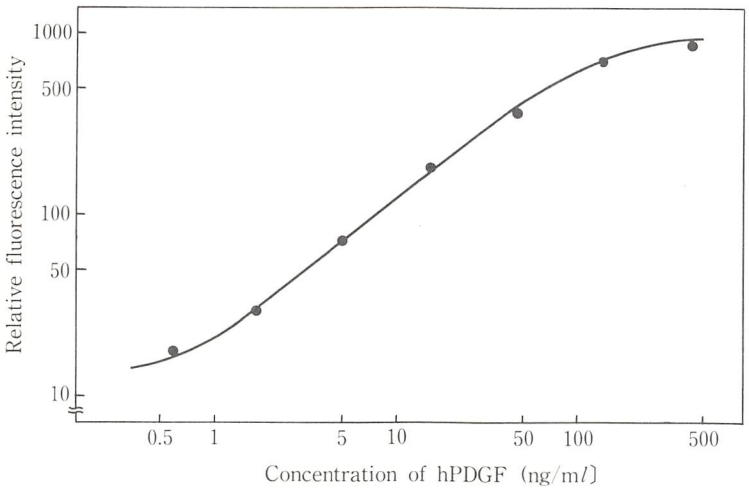



**Fig. 6** Dose-Respnse Curve of PDGF by a Proposed EIA

Fluorescence intensity for peroxidase activity specifically bound was calculated by subtracting fluorescence intensity in the absence of PDGF (background) from that in its presence. Each point indicates the mean of duplicate assays.

を制御している可能性が示唆された。

## 4. 要　約

比較的簡便な高純度ヒト PDGF の精製法が確立できたので，ウサギにこの方法で精製したヒト PDGF と Rivi-adiuvant を免疫，抗ヒト PDGF 抗体を作製した。その結果，市販のヤギ抗体では合成できなかったペルオキシダーゼ標識抗体を調整することができ，さらに固相サンドイッチ EIA 系を組みあげることができた。本 EIA 系の検出限界はチューブあたり 20pg と高感度であったが，ヒト PDGF の生体内での生理的役割を検討したり，培養上清中の PDGF レベルを測定するためには十分でなく，さらに高感度化する必要がある。また，血清中からの添加回収率は極めて悪く，血中には PDGF と結合しその抗原活性を減弱あるいは消失させる因子の存在することが示唆された。これら因子の本態やその結合様式，さらにその生体内での存在意義などは今後検討しなければならない研究課題と考えている。

### 文　献

1) Ross, R., Raines, E.W., and Bowen-Pope, D.F., Cell, 46, 155-169 (1986).
2) Heldin, C.-H., Westermark, B., and Wasteson, A., Biochem. J., 193, 907-914 (1981)
3) Antoniades, H.N., Rroc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 7314-7317 (1981)
4) Stroobant, P., and Waterfield, M. D., EMBO J., 3, 2963-2967 (1984)
5) Gazit, A., Igarashi, H., Srinivasan, A., Vaniv, A., Tronick, S.R., Robbins, K.C., and A Aronson, S., Cell, 39, 89-97 (1984)
6) Waterfield, M.D., Scrace, G.T., Whittle, N., Stroobant, P., Johnsson, A., Wasteson, A., Westermark. B., Heldin, C.-H., Huang, J.S., and Deuel, T., Nature, 304, 35-39 (1983)
7) Doolittle, R.F., Hunkapiller, M.W., Hood, L.E., Devare, S.G., Robbins, K.C., Aaronson, S.A., and Antoniades, H.N., Science, 221, 275-277 (1983)
8) Johnsson, A., Heldin, C.-H., Wasteson, A., Westermark, B., Deuel, T., Huang, J.S., Seeburg, P. H., Gray, A., Ullrich, A., Scrace, G., Stroobant, P., and Waterfield, M., EMBO J., 3, 921-928 (1984)
9) Josephs, S.F., Guo, C., Ratner, L., and Wong-Staal, F., Science, 223, 487-491 (1984)
10) Dalla Favera, R., Gelmann, E.P., Gallo,, R.C., and Wong-Staal, F., Nature, 292, 31-35 (1981)
11) Hayashi. K., Itoh, M., and Hurobe, M., J. Clin.

© The Ito Foundation

Biochem. Nutr., 7, 81-89 (1981)
12) 林 恭三, 伊藤雅司, 黒部真章：ヒト血小板由来成長因子（PDGF）の精製法, 昭和63年度食肉に関する助成研究調査成果報告書, Vol. 7 467-473 (1989)
13) Ishikawa, E., Yoshitake, S., Imagawa, M., and Sumiyoshi, A., Ann. N.Y. Acad. Sci., 420, 825-832 (1985)
14) Kurobe, M., Tokida, N., Furukawa, S., Itoh, K., and Hayashi, K., Biochem. Inter., 11, 825-832 (1985)
15) Kurobe, M., Tokida, N., Furukawa, S., Ishikawa, E., and Hayashi, K., Clin. Chim, Acta, 156, 51-60 (1986)
16) Kurobe, M., Kohno, M., Yoshida, N., and Hayashi, K., Clin. Chim. Acta, 178, 205-214
17) Huang, J.S., Huang, S.S., and Deuel, T.F., Proc, Natl. Acad. Sci. USA., 81, 342-346 (1984)

© The Ito Foundation

# ラットの実験的高脂血症および糖尿病に対するブタプラズマペプチドの作用

Effect of Peptides Originating from Pig Plasma on Experimental Hyperlipidemia and Diabetes Mellitus in Rats

末綱　邦男・石井　睦実・*岡　周作・*吉原　忠志
*中村　豊郎・**梶原　茂雄
（農林水産省水産大学校，*伊藤ハム株式会社中央研究所，**㈱実験生物医学研究所）

Kunio Suetsuna, Mutsumi Ishii, *Shusaku Oka, *Tadashi Yoshihara, * Toyoo Nakamura and ** Shigeo Kajiwara
(Shimonoseki University of Fisheries, *Ito Ham Inc., Central Research Institute and ** Experimental Biomedical Research Inc.)

Effect of the feeding peptide originating from pig plasma on the development of experimental hyperlipidemia and diabetes mellitus was observed in rats. Hyperlipidemic rats were induced by a feeding of 1% of cholesterol and 0.5% of cholic acid diet. When 1 and 2 g/kg of plasma peptide were fed to hyperlipidemic rats for 14 days, serum total cholesterol and phospholipid of rats were decreased and HDL-cholesterol of rats was increased. Therefore, it was suggested that plasma peptide improved the atherogenic index (AI) and artheriosclerosis of hyperlipidemic rats. Diabetic rats were induced by a venous blood injection of streptozotocin〔45mg/g〕after 8 days. When 2 and 4 g/kg of plasma peptide were fed to diabetic rats for 7 days, the diabetes mellitus condition and hypertriglyceridemia of rats were improved.

## 1. 目　的

食品タンパク質由来の外来性ペチプドが，多くの生理活性機能を持つと考えられてきた[1]。先に著者らはアンジオテンシンⅠ変換酵素阻害作用を持つイワシ筋肉由来ペチプドの精製を行い，イワシペプチドの *in vivo* における血圧降下作用，血管拡張作用を観察してきた[2]。また，脂質代謝改善作用を有する物質の一次スクリーニングとして，実験動物を用いた抗糖尿病，抗肥満症および抗高脂血症におけるイワシペプチドの脂質低下作用をみてきた[3]。

一方，近年疫学的研究により血清高密度リポタンパク（以下HDLと略す）—コレステロールが動脈硬化症の頻度に逆相関することが指摘されてきた[4]。これらのことから脂質代謝改善は，血清総コレステロールを低下させる作用のほか，HDL-コレステロールの上昇とその他の脂質成分を低下させる作用が重視されてきた。今回著者らは，ブタプラズマを酵素分解によりペプチドレベルまで分解，脱色して分子量1,000～2,000のペプチド（以下プラズマペプチドと略す）の精製を行った。

© The Ito Foundation

これらプラズマペプチドの高脂血症に対する予防効果を知るために高コレステロール食誘発高脂血症ラットを用いて検討した。さらに，ストレプトゾトシン投与によりインスリン欠乏型の糖尿病を作製し，高脂血症（高グリセライド血症）を二次的に発生させた実験的ラットを用いてプラズマペプチドの脂質代謝改善作用をみたのでその結果を報告する。

## 2. 方　法

### 2.1 被検試料

ブタプラズマを酵素分解した後，限外濾過，陽イオン交換樹脂カラムクロマトグラフィー，さらにゲル濾過を繰り返してペプチド粉末を得，被検試料プラズマペプチドとした。

### 2.2 実験動物ならびに飼育方法

F344/NSIc（Fisher），近交系，SPF，4週齢，雄性を静岡県実験動物協同組合より購入し，1週間予備飼育を行ったのち，体重115～122ｇの健常なものを一群六匹とし試験に供した。試験期間中に温度23±3℃，湿度50±10％に保った飼育室でステンレス製金網ゲージにて個別に飼育した。予備飼育期間中，飼料は市販粉末飼料（日本クレアCA-1）を，水は水道水を自由に摂取させた。

### 2.3 高コレステロール食誘発高脂血症ラットに対する作用

粉末飼料（日本クレアCA-1）を基礎飼料群とし，これにコレステロール（半井化学製），コール酸（国産化学製）をそれぞれ1％，0.5％添加混合して実験飼料群（Control）とした。投与群には14日間実験飼料を自由に摂取させ，同時に蒸留水に溶解したプラズマペプチド1,000および2,000 mg/kg を金属製胃ゾンデを用いて1日1回午前10時～11時にかけて連続経口投与した。投与期間終了後，エーテル麻酔下に心臓穿刺により採血し，血液を遠心分離（25,000rpm，10分間）して血清を採取，生化学検査に供した。生化学検査は，日立73660型自動分析装置により，脂質成分（総コレステロール，HDL-コレステロール，リン脂質，トリグリセライド，遊離脂肪酸），血糖値を測定した。試験期間中，ラットの体重，摂餌量を毎日測定し一般症状を観察した。

### 2.4 ストレプトゾトシン（STZ）誘発糖尿病ラットに対する作用

糖尿病惹起化学物質としてStreptozotocin（Sigma社製）を用いた。STZは少量の生理食塩水（光製薬製）で懸濁混合したのち，クエン酸緩衝液（pH4.5）に溶解し，さらに生理食塩水を加えて濃度を調製した。予備飼育後一夜絶食させたラットにSTZを調製後5分以内に45mg/gを頸静脈より投与した。STZ投与後より7日間，蒸留水に溶解したプラズマペプチド2,000および4,000mg/kgを金属製胃ゾンデを用いて1日1回10時～11時にかけて連続経口投与した。投与期間終了後頸静脈より採血し，血液を遠心分離（2,500rpm，10分間）して血清を採取，生化学検査に供した。生化学検査は血糖値，インスリンおよび脂質成分（総コレステロール，リン脂質，トリグリセライド，遊離脂肪酸）を測定した。試験期間中，ラットの体重，摂餌量を毎日測定し，一般症状を観察した。

### 2.5 統計学的処理

すべての測定値について平均および標準誤差を求め，Student's t-検定を行った。いずれの場合も有意水準5％以下を有意差ありとした。

## 3. 結　果

### 3.1 ブタプラズマ由来ペプチドの調製

**Fig. 1** に示す精製方法によりブタプラズマ500 m*l* を酵素分解した後，限外濾過，陽イオン交換樹脂カラムクロマトグラフィー，さらにゲル濾過を繰り返してペプチド粉末15ｇを得た。プラズマペプチドの分子量は1,000～2,000程度と推測され，

© The Ito Foundation

Pig plasma 500g
- Added deionized water 1*l*
- Homogenized
- Added pepsin, 10g
- pH 2.0 adjusted
- Incubated for 20 h at 37 ℃

Hydrolyzate
- Ultrafitrated by Diaflow-menbrane(YM-10)

Filtrate
- Column chromatographed on Dowex 50-W ($H^+$)
- Washed with deionized water
- Eluted with 2N-$NH_4OH$
- Concentrated

Elute
- Column chromatographed on Sephadex G-25

Peptide fractions
- Freeze-dried

Powder of plasma peptide, 15g

**Fig. 1** Preparation procedure for plasma peptide

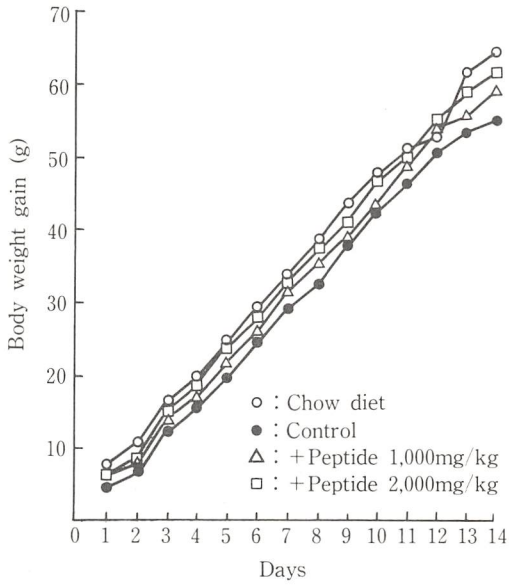



**Fig. 2** Effect of plasma peptide on body weight gain in cholesterol-fed rats

また，アミノ酸組成としてアスパラギン酸，グルタミン酸，プロリン，ロイシンフェニルアラニン，リジン等を多く含んでいた[5]。

3.2 高コレステロール食誘発高脂血症ラットに対する作用

各群の14日間におけるラットの経日的平均体重増減および経日的摂餌量を **Fig. 2, 3** に示す。基礎飼料群(Chow diet)，実験飼料群(Control)，実験飼料＋プラズマペプチド投与群（1,000および2,000mg/kg）との間に有意差は認められなかった。各群の14日間におけるラットの総コレステロール，HDL-コレステロール，トリグリセライド，リン脂質，遊離脂肪酸，グルコースおよび動脈硬化予防の指数として Atherogenic index（AI：動脈硬化指数）を **Table 1**に示した。この結果，総コレステロールおよびリン脂質は基礎飼料群と実験飼料群との間に有意差を認め，プラズマペプチド投与群は用量依存的に有意な低下を示した。HDL-コレステロールに関しては，実験飼料群に対しプラズマペプチド投与群（1,000および2,000mg/kg）は有意な上昇を示した。この結果，動脈硬化

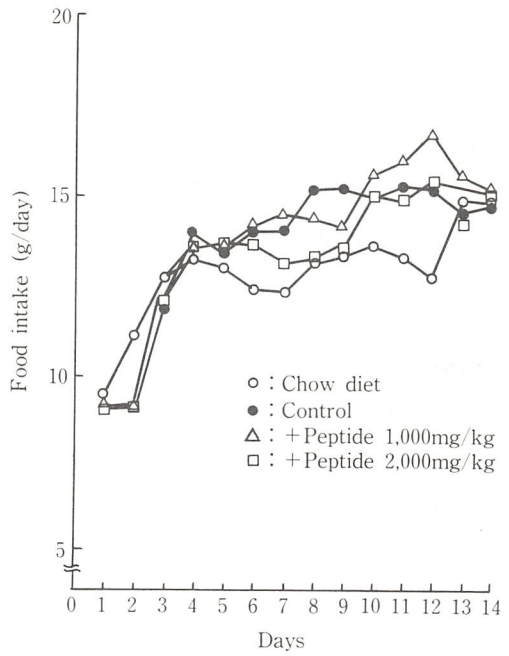



**Fig. 3** Effect of plasma peptide on food intake in cholesterol-fed rats

© The Ito Foundation

**Table 1** Effect of plasma peptide on serum lipid and glucose level in high cholesterol diet male

| Groups | Dose (mg/kg) | Total cholesterol (mg/dl) | HDL-cholesterol (mg/dl) | AI ratio[a)] | Triglyceride (mg/dl) |
|---|---|---|---|---|---|
| Chow diet | —— | 84.7± 2.89[b)], *** | 24.5±3.15* | 2.7±0.39* | 68.0±4.31 |
| Control[c)] | —— | 226.2±11.7 | 39.2±4.60 | 5.2±0.87 | 55.5±4.22 |
| + Peptide | 1,000 | 181.8±10.15* | 55.0±2.79* | 2.3±0.30** | 53.0±3.96 |
| + Peptide | 2,000 | 145.5±10.57*** | 56.4±3.35* | 1.6±0.24** | 54.3±6.44 |

**Table 1** (Continued)

| Groups | Dose (mg/kg) | Phospholipid (mg/dl) | Free fatty acid (mEq/l) | Glucose (mg/dl) |
|---|---|---|---|---|
| Chow diet | —— | 148.0± 5.03[b)], * | 0.35±0.05** | 135.8±4.66 |
| Control[c)] | —— | 167.0± 5.43 | 0.56±0.03 | 149.0±9.14 |
| + Peptide | 1,000 | 135.8±12.28* | 0.51±0.08 | 147.7±3.68 |
| + Peptide | 2,000 | 126.8± 9.71** | 0.50±0.06 | 136.3±8.24 |

a) : Atherogenic index is indicated by the value of (total cholesterol - HDL - cholesterol)/HDL-cholestrol

b) : Values are expressed as the mean ± S.E., n = 6
Significantly different from the control group (* : $p<0.05$, ** : $p<0.01$, *** : $p<0.001$)

c) : Chow diet supplemented with 0.5% of cholic acid and 1% of cholesterol

指数A I はプラズマペプチド投与による総コレステロールの漸減とHDL-コレステロールの増加で，実験飼料群との間に有意差が認められた。トリグリセライド，遊離脂肪酸およびグルコースに関しては低下傾向を示したものの有意差は認めなかった。

3.3 STZ誘発糖尿病ラットに対する作用

各群の14日間におけるラットの経日的平均体重増減および経日的摂餌量を**Fig. 4**, **5** に示した。体重増減において基礎飼料群（Chow diet）とSTZ投与対照群（Control）ならびにプラズマペプチド投与群（2,000および4,000mg/kg）との間に有意差を認めたが，摂餌量の有意差は認められなかった。プラズマペプチドをSTZ投与糖尿病モデルラットに7日間経口投与した後グルコース，血清インスリン，総コレステロール，トリグリセライド，リン脂質および遊離脂肪酸量を**Table 2**に示した。この結果，グルコースは基礎飼料群とSTZ投与対照群との間に有意差を認め，STZ投与対照群に対してプラズマペプチド投与群（2,000および4,000mg/kg）は有意な低下を示した。血清インスリンは基礎飼料群とSTZ投与対照群との間に有意差を認め，STZ投与対照群に対してプラズマペプチド投与群（2,000および4,000mg/kg）は用量依存的に有意に低下し，また，総コレステロールと遊離脂肪酸は基礎飼料群とSTZ投与対照群との間に有意差を認め，STZ投与対照群に対しプラズマペプチド投与群（2,000および4,000mg/kg）は低下傾向は示したが有意差は認められなかった。

## 4. 考　察

近年食生活の近代化に伴い，動脈硬化症が成人病として増加しつつあり，血中コレステロール値が粥状動脈症と密接な関連があるとされている。したがって，抗高脂血症作用については，単に血

© The Ito Foundation

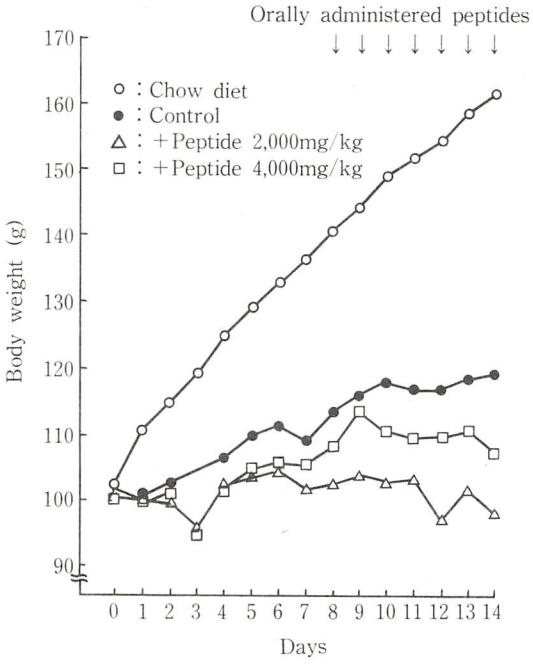



**Fig. 4** Effect of plasma peptide on body weight gain in streptozotocin-induced rats

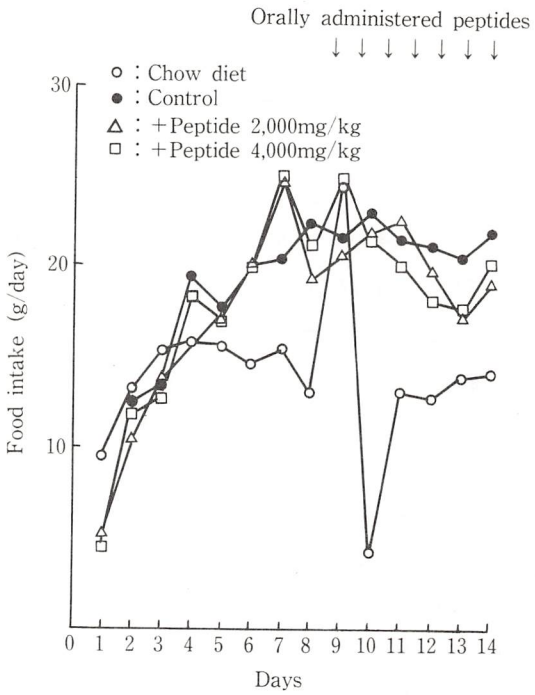



**Fig. 5** Effect of plasma peptide on food in-take in streptozotocin-induced rats

**Table 2** Effect of plasma peptide on serum and glucose lipid levels is streptozotocin-induced diabetic rats

| Groups | Dose (mg/kg) | Glucose (mg/dl) | Immunoreactive insulin (μU/ml) | Total cholesterol (mg/dl) |
|---|---|---|---|---|
| Chow diet | —— | 133.0± 8.88[a), ***] | 22.8± 3.06*** | 84.0± 5.51* |
| Control [b)] | —— | 592.8±59.82 | 5.2± 1.44 | 140.3±23.70 |
| + Peptide [c)] | 2,000 | 348.0±28.71** | 13.6± 2.60* | 101.5±14.08 |
| + Peptide | 4,000 | 305.5±35.11** | 14.8± 3.05* | 107.0±19.03 |

**Table 2** (Continued)

| Groups | Dose (mg/kg) | Triglyceride (mg/dl) | Phospholipid (mg/dl) | Free fatty acid (mEq/l) |
|---|---|---|---|---|
| Chow diet | —— | 68.0±4.31[a),*] | 146.7± 7.09* | 0.35±0.03** |
| Control [b)] | —— | 238.8±30.64 | 173.0± 7.44 | 0.60±0.08 |
| + Peptide [c)] | 2,000 | 147.2±19.83* | 128.7±11.86* | 0.47±0.09 |
| + Peptide | 4,000 | 138.8±24.76* | 118.7±10.09** | 0.43±0.07 |

[a)] : Values are expressed as the mean ± S.E., n = 6
Significantly different from the control group (* : $p<0.05$, ** : $p<0.01$, *** : $p<0.001$)

[b)] : Diabetic rats were induced by a venous injection of streptozotocin (45mg/g)

[c)] : The plasma peptide was orally administered for 7 days to the diabetic rats

© The Ito Foundation

清脂質を下げるばかりでなく高脂血症が増悪因子となっているところへの動脈硬化性症患の発生，進展を食い止めることが究極的には期待されているわけである。そのため血中コレステロール低下作用を有する物質の研究が数多くなされているが[6,7]，その作用や有効成分についてはまだ不明な点が多い。抗高脂血症作用の点から普通飼料飼育時より高コレステロール飼料負荷時において，より著明な血清脂質低下作用が発現するという大豆タンパク質[8]やクロレラ[9]についての報告はあるが，各種タンパク質の酵素分解によって生ずるペプチドの抗高脂血症作用については報告が少ない。著者らは前報[3]で高コレステロール飼料を負荷し実験的高脂血症を起こさせたラットに対して，イワシ筋肉由来ペプチドを投与し抗高脂血症作用を有することを報告した。

今回，と畜血液の有効利用の一環としてブタプラズマ由来ペプチド（分画分子量1,000～2,000）の脂質低下作用を高コレステロール食誘発高脂血症ラットおよびSTZ誘発糖尿病ラットにおいて確認した。すなわち高コレステロール食誘発高脂血症ラットにおいてプラズマペプチド投与は，血清総コレステロールおよびリン脂質の用量依存的低下傾向を示しHDL-コレステロールは有意な上昇を示した。この結果，Atherogenic index（AI）に対して明らかな作用がみられ抗動脈硬化作用を示した。なお，今回の実験では基礎飼料群（Chow diet）でのHDL-コレステロール値が低かったが，これはHDL-コレステロール測定上に問題があったと思われた。また，STZ誘発糖尿病ラットにおいてプラズマペプチド投与は，血糖値を下げインスリン値を上昇させ糖尿病病態の緩和が起こった。さらにSTZ誘発糖尿病ラットは明らかに高トリグリセライド血症を引き起こしていたが，プラズマペプチド投与によりトリグリセライドの用量依存的低下を示し，高トリグリセライド血症を改善した。

## 5. 要　約

(1) ブタプラズマを酵素（ペプシン）分解した後，限外濾過，陽イオン交換樹脂カラムクロマトグラフィーさらにゲル濾過を繰り返して，分子量1,000～2,000のプラズマペプチドを得た。

(2) プラズマペプチドはコレステロール投与高脂血症ラットへの1,000および2,000mg/kg，14日間経口投与で血清総コレステロールおよびリン脂質を低下させた。HDL-コレステロールを上昇させ動脈硬化指数（AI）を改善して抗動脈硬化作用を発現する可能性を示唆した。

(3) プラズマペプチドはSTZ糖尿病モデルラットへの2,000および4,000mg/kg，7日間経口投与で血糖値を低下させ，インスリン値を上昇させた。糖尿病発症によって起きる二次性高脂血症，特に高トリグリセライド血症を改善した。

### 文　献

1) 千葉英雄ほか：化学と生物，**26**，34，1988
2) 末綱邦男ほか：日本栄養・食糧学会誌，**42**，47，1989
3) 末綱邦男ほか：基礎と臨床，**22**(14)，4739，1988
4) Miller, G.T. et al.: Lancet, **i**. 16, 1975
5) 末綱邦男ほか：日本水産学会誌，**54**，1853，1988
6) 加地喜代子ほか；日薬理誌，**83**，451，1984
7) 吉峯徳ほか：動脈硬化，**8**，737，1981
8) 菅野道廣：日本栄養・食糧学会誌，**40**，93，1987
9) 佐野利彦ほか：動脈硬化，**10**，375，1982

© The Ito Foundation

# 血中物質と免疫応答細胞を利用した癌化学療法開発の試み

Development of a New Combination Chemotherapy Utilizing Blood Substances and Immune-response Cells

松野　哲也・*藤本　大三郎・**吉原　忠志・**渡辺　重明・**中村　豊郎
((財)腫瘤研究所，*東京農工大学農学部，**伊藤ハム株式会社中央研究所)

Tetsuya Matsuno, *Daisaburo Fujimoto, **Tadashi Yoshihara, **Shigeaki Watanabe and **Toyoo Nakamura
(Tumour Laboratory, The Foundation for Basic Research of Oncology, *Tokyo University of Agriculture and Technology and **Ito Ham Inc., Central Research Institute)

Cell-adhesive immunoglobulin M-like protein (CA-IgM) was purified from human plasma by affinity chromatography with elastin-Sepharose and ion-exchange chromatography with mono Q column. This protein seemed to have physico-chemical structure similar to that of authentic human IgM.

However, CA-IgM had cell-adhesive property which was suppressed by human anti-IgM $\mu$ chain and Fc antibody. Furthermore, the cell-adhesion was competitively inhibited by GRGDS peptide. These results suggest that CA-IgM is a variant of IgMf amily. The similar protein (s) seemed to exist both in bovine and porcine plasma.

## 1. 目　的

私達は各種の腫瘍細胞が高いグルタミン要求性を示すことを見出し，その代謝機序を引き続き調べてきた[1~6]。

ヒト血漿中には細胞接着活性をもつ免疫グロブリンM様タンパク質(Cell-adhesive immunoglobulinM, CA-IgM) が存在している[7,8]。昨年度の報告で本誌にも記載したように，CA-IgMはグルタミン代謝拮抗剤処理した腫瘍細胞に対し損傷作用を示す[9~11]など興味深いタンパク質と考えられるが，その構造や機能の詳細に関してはほとんど明らかでない。また，他の動物血中に類似タンパク質が存在するかどうかについても，全く不明である。そこで本年度は上記タンパク質の性状に関する知見を得ることを主目的とし，実験を行った。

## 2. 方　法

ヒト血漿をセファロース・カラムに通してから，エラスチンーセファロース・カラムにかけた。エラスチンカラムを0.1M NaCl-0.05Mトリス塩酸緩衝液（pH 7.4）で洗浄後，4M尿素で溶出を行った。尿素溶出液を0.16M $Na_2HPO_4$-$KH_2PO_4$（pH 6.5）に透析したのち，Mono Q カラムによるクロマトグラフィー（NaCl濃度勾配による溶出）でCA-IgMを得た。

細胞接着活性の測定は以下のように行った。検

© The Ito Foundation

体をポリスチレン・マイクロプレートに固定し，ラット胚由来線維芽細胞3Y1の懸濁液を加え，2時間培養したのち，未接着細胞を洗浄除去し，残存細胞を染色・定量した。

### 3. 結果と考察

エラスチン・カラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーとMono Qイオン交換クロマトグラフィーによってヒト血漿から細胞接着性タンパク質（CA-IgM）を精製することができた。SDS-ポリアクリルアミド電気泳動によると，このタンパク質は免疫グロブリンM（IgM）と同一の分子量をもち，またサブユニット構造も似ていることが判明した（**図1**）[12]。また，同タンパク質はヒトIgM抗体とも反応した。一方，このタンパク質は通常のIgMにはみられない細胞接着活性を示した。細胞接着活性はヒト抗IgM-$\mu$鎖および抗IgM-Fc抗体によって阻害された。

フィブロネクチン，ビトロネクチンなどの細胞接着タンパク質は細胞接着部位にRGD配列を含んでおり，細胞接着活性はGRGDSなどのペプチドにより阻害されることが知られている[13~15]。

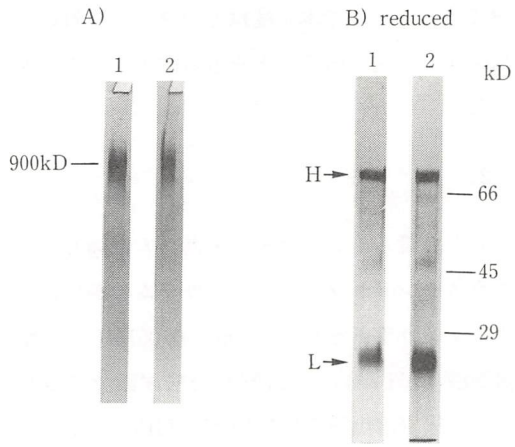



**図1**　SDS-ポリアクリルアミド電気泳動
A）非還元条件下
B）還元条件下
lane 1：CA-IgM
lane 2：IgM

CA-IgMの細胞接着活性もGRGDSにより阻害された[12]。RGD配列は通常のIgMの既知のアミノ酸配列中にはみつかっていない。そこで，CA-IgMはIgMの特殊なバリアントであって，そのFc領域にRGD配列をもった細胞接着部位が存在することが示唆された。

CA-IgM分子中のジスルフィド結合をメルカプトエタノールで還元・切断し，ヨードアセトアミドによりアルキル化した。これをプレートにコーティングすると，細胞接着活性はみられるものの，不安定で，4℃にプレートを保存しても速やかな活性の消失がみられた。

CA-IgMをSDS-ポリアクリルアミド電気泳動後，ニトロセルロース膜にトランスファーし，3Y1細胞懸濁液とインキュベートすると，CA-IgMのバンドの位置に細胞が付着する。しかし，CA-IgMを還元条件下で泳動すると，細胞接着は認められなかった。

CA-IgMをパパインで消化したのち，Fc領域に相当する分画を得たが，細胞接着活性は認められなかった。但し，この断片はCA-IgMによる細胞接着を阻害した。

従って，これらの成績は以下のことを示唆するものと考えられる。1）CA-IgMの細胞接着部位はFc領域にあるらしいが，細胞を強力に接着し，更に伸展させるにはCA-IgMが5量体構造を保っていることが必要であること。2）細胞接着活性にはFab部位も必要かも知れない。ちなみに，IgM分子は非共有結合によって5量体構造をつくり得るといわれている。

前回報告したようにCA-IgMの腫瘍細胞破損活性は抗ヒトIgM-$\mu$鎖抗体により阻害されるものの，抗Fc抗体による顕著な阻害はみられない。しかし，細胞接着活性の弱いCA-IgM標品は腫瘍細胞破損活性も弱い。CA-IgMの構造と活性との関連性については，今後，更に検討を加える必

© The Ito Foundation

要があるものと思われる。

近年，免疫グロブリン・スーパーファミリーと呼ばれる一群のタンパク質があって，細胞認識，免疫応答，レセプターなどの機能をもつことが明らかにされている[16,17]。CA-IgM もその１つかも知れない。免疫グロブリン・スーパーファミリーの成り立ちや進化を考える上からも興味あるタンパク質である。

CA-IgM は，線維芽細胞 3Y1 やヒト血管内皮細胞 HIVE 24 などの細胞を接着し，よく伸展させた（**図２**）[12]。トランスフォームした細胞は一般に接着性が弱かったが，メラノーマB16はよく接着した。

CA-IgM は細胞外マトリックス諸成分のうち，エラスチン以外にはラミニンと結合したが，コラーゲンやフィブロネクチンとは結合しなかった。エラスチンやラミニンと結合すること，血管内皮細胞をよく接着することなどから，同タンパク質は血管の構築に関わっている可能性も示唆される。また，血液中に存在することを考えると，血小板，白血球などの血液細胞との関係，動脈硬化，がんの転移などの関わりあいの有無も将来の興味ある課題といえよう。

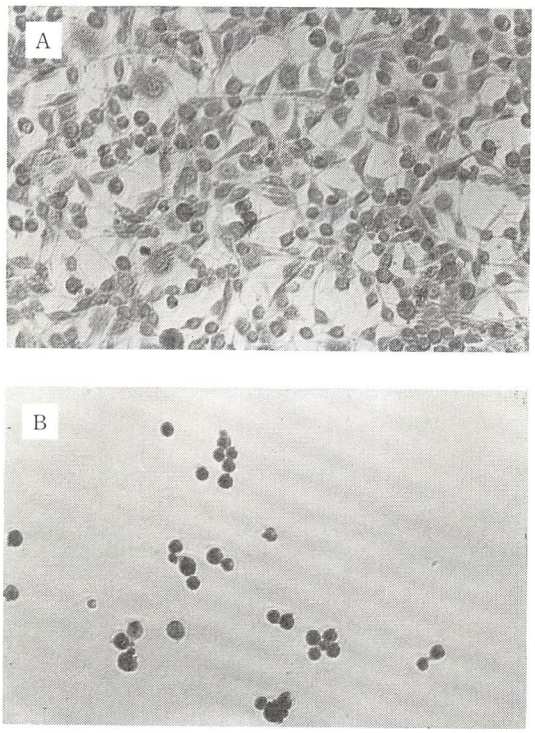



**図２**　線維芽細胞　3Y１の接着
A：CA-IgM をコートしたプレートへの接着
B：コントロール（ウシ血清アルブミンをコートしたプレート）

CA-IgM はヒト血漿 100 m$l$ から通常，約 0.2 mg 程度得られる。ヒト血液の入手が比較的困難な現状では，このタンパク質を大量に調製するのは難かしい。そこで，量的に得やすい食肉動物の血液中にも CA-IgM 類似タンパク質があるかどうか検討した。

ブタの血漿をヒト血漿と同じようにエラスチン・カラムにかけ，４M尿素で溶出すると，溶出液に細胞接着活性が見出された。ウシの血漿を同様に処理すると，やはり４M尿素溶出液に細胞接着活性が見出されたが，ウシの場合，洗浄液（0.1M NaCl-0.05Mトリス塩酸緩衝液，pH 7.4）の後半部分にも接着活性が認められた。細胞接着活性のある分画を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動にかけると，IgM の存在が認められたが，他のタンパク質も混在していた。まだ，ヒトと同じような CA-IgM がこれら食肉動物の血漿中に存在すると断定するには至っていないが，その可能性が高いことは示唆された。これらの動物の血液を利用すれば，CA-IgM を大量に調製することが期待できるので，更に研究を進める予定である。

## 4. 要　約

ヒト血漿には免疫グロブリンM様の構造をもつ細胞接着活性タンパク質が存在している。このタンパク質をエラスチンーセファロース・カラムと Mono Qカラムによるクロマトグラフィーにより精製した。同タンパク質はSDS-ポリアクリルアミド電気泳動，抗 IgM 抗体との反応性等から，IgM と似た構造をもことが示された。その細胞接

© The Ito Foundation

着活性は抗μ鎖および抗 Fc 抗体ならびに GR-GDS ペプチドにより阻害された。上記タンパク質(CA-IgM)は Fc 部位に細胞結合部位をもつ特殊な IgM バリアントであることが示唆された。

一方，ウシおよびブタの血漿中にも類似タンパク質の存在が示唆された。

## 文 献


1) Matsuno, T., Biochem Med. Metabolic Biol. **42**, 125-131 (1989)
2) Matsuno, T., Cell Biol. Int Rep. **13**, 739-745 (1989)
3) Matsuno, T., and Hirai, H., Biochem. Int. **19**, 219-225 (1989)
4) Matsuno, T., Suzuki, H., Nitta, K., Aoki, T. and Iriyama, K., Jikei Med J. **36**, 241-3249 (1989)
5) 松野哲也，平井秀松：Oncologia **22**, 121-127 (1989)
6) Matsuno, T., Fujimoto, D. and Hirai, H., Therapy with amino acids and analogues: Ist International Congress, Vienna, August 7-12 th (1989)
7) Ohori, K., Fukamizu, H., Matsushita, K., Horiuchi, K. and Fujimoto, D., J. Biochem. **100**, 837-842 (1986)
8) Fukamizu, H., Ohori, K., Naito, Y., Horiuchi, K. and Fujimoto, D., J. Biochem. **100**, 843-848 (1986)
9) 松野哲也：昭和63年度食肉に関する助成研究調査成果報告書，**7**, 491-494
10) 松野哲也，倉石知亜，藤本大三郎：生化学，**61**, 957 (1989)
11) 松野哲也，倉石知亜，藤本大三郎：日本癌学会総会記事，**401** (1989)
12) Takahashi, S., Kuraishi, C., Sakamoto, M., Tanabe, T., Nakajima, T., Kosuga, T., Sakano, Y. and Fujimoto, D., Biochemistry **28**, 7623-7629 (1989)
13) Pierschbacher, M. D. and Rouslahti, E., Nature **309**, 30-33 (1984)
14) Hayman, E. G., Pierschbacher, M. D. and Rouslahti, E., J. Cell Biol. **100**, 1948-1954 (1985)
15) Dedher, S., Rouslahti, E. and Pierschbacher, M., J. Cell Biol. **104**, 585-593 (1987)
16) Williams, A.F., Nature **308**, 12-13 (1984)
17) Hunkapiller, T. and Hood, L., Nature **323**, 15-16 (1986)


© The Ito Foundation

# 食肉に含まれるポルフィリン誘導体の血液細胞分化・増殖に及ぼす影響

Studies on the Effect of Porphyrin Derivatives from Meat on Hematopoiesis

前出　吉光・稲葉　睦・佐川　真由美・池田　富夫（北海道大学獣医学部）

Yoshimitsu Maede, Mutsumi Inaba, Mayumi Sagawa and Tomio Ikeda
(Faculty of Veterinary Medicine Hokkaido University)

In order to clarify the hematopoietic effects of porphyrin derivatives from meat, we investigated the hematological changes of mouse administered hemin, a porphyrin derivative.

The experimental animals were given orally with 10mM hemin daily for 3 days, or 20 days. After the administration, red cell count, reticulocyte count, packed cell volume, hemoglobin concentration and serum erythropoietin level were estimated in these animals. The cytological examinations of bone marrow were also carried out in those animals.

As the results, no significant changes of those hematological parameters were found in those animals. This may suggest that hemin administrered orally could not be absorbed from intestine of those animals, or that it might be breakdown by some bacteria in the intestine.

## 1. 目　的

食肉中には，鉄イオンを含むポルフィリン誘導体，特に2価鉄錯塩であるヘミン（hemin）が多量に含有されている。生体内でのその代謝は，生体の鉄利用—血液産生系と密接に関連しており，生理的条件下における赤血球造血の制御因子として重要な役割を果していると考えられている[1]。一方，食肉摂取に伴い，外来的に体内に取込まれたヘミンについてはその代謝動態および造血への影響等はほとんど知られていない。しかし，その解明は単に血液学的見地からのみではなく，栄養学的見地からも重要である。

本研究の目的は，従来タンパク質の供給源として捉えられてきた食肉および肉製品について，新たに外来性ポルフィリン誘導体，特にヘミンの供給源としての意義を明らかにすることである。このために，今回はヘミン摂取により最も影響を受けると考えられる赤血球産生系の変化について検討を行ったので，その概要を報告する。

## 2. 材料および方法

### 2.1 ポルフィリン誘導体

実験にはヘミン（Bovine Type 1, Sigma）を使用した。

### 2.2 実験動物

マウス（BALB/C, 4～7週齢）80匹を使用した。

### 2.3 ヘミン投与法

ヘミンは短期および長期連続投与とした。すなわち，1N-NaOH の1容と 0.1Mリン酸緩衝液（pH 6）9容の混合液にヘミンを溶解し，10mM ヘミンを作成した。マウス1匹当たり 300$\mu l$ の

© The Ito Foundation

10mMヘミンを，ネコ用導尿カテーテルにより経口的に投与した。

1) 短期投与群—マウス20匹に上記ヘミンを3日連続投与した。他の20匹は対照としてヘミンを含まない上記混合液を同様に投与した。

2) 長期投与群—マウス20匹に10mMヘミンを20日連続投与した。対照として20匹にはヘミン無添加の混合液を同様に投与した。

2.4 観察項目

短期投与群については最終投与後6時間，1日，3日，5日および7日目に，それぞれ5匹づつを心採血し，以下の項目について検査した。また長期投与群は投与終了後6時間で同様の検査を行った。

1) ヘマトクリット値—ミクロヘマトクリット法により測定した。

2) ヘモグロビン量—シアンメトヘモグロビン法により測定した。

3) 網赤血球数—1％ニューメチレン青による超生体染色法により算定した。

4) 骨髄像—短期，長期投与群とも心採血後直ちに大腿骨々髄を採取し，リン酸緩衝液に骨髄細胞を浮遊させた。この細胞浮遊液をサイトスピン（Gytospin, 2, Shandon）により，550rpm, 5分間遠心後，固定，ギムザ染色を行い，細胞成分を観察した。採材した骨髄の一部は10％中性ホルマリン固定，パラフィン包埋後，薄切標本を作成して骨髄の細胞構成を観察した。

5) 血清エリスロポエチンの測定—両群とも心採血後血清を分離し，−20℃に保存してエリスロポエチン（EPO）測定用試料とした。

EPOの測定は，Krystalの方法[2]を一部改変した貧血マウス脾細胞法により実施した。すなわち，塩酸フェニルヒドラジン投与により溶血性貧血を起こさせたマウスの脾臓を摘出，細切して脾細胞浮遊液（脾細胞数$8\times10^6$個/m$l$）を作成した。この浮遊液50$\mu l$に被検血清5$\mu l$を含むα-MEM50$\mu l$を加え，炭酸ガス培養器（37℃，5％ $CO_2$）で培養した。培養開始18～19時間後，1$\mu$Ciの$^3$H-チミジンを加え，さらに2時間培養を行った。培養終了後，脾細胞内に取込まれた$^3$H-チミジンを液体シンチレーションカウンターにより測定し，cpmで表示した。別に，リコビナント・ヒトEPOを使用して標準曲線を作成し，これより被検血清中のEPO値を算出した。

6) 病理学的検査—心採血および骨髄採取後のマウスは解剖して，各臓器の肉眼的観察を行うとともに，各々をホルマリン固定，パラフィン包埋後，薄切標本を作成して病理組織学的検索を行った。

## 3. 成　績

3.1 短期投与群

（1） ヘマトクリット値およびヘモグロビン量：両値は，ヘミン投与終了6時間および24時間において，対照群よりも高い傾向を示したが，5日目および7日目においては逆に低値を示す傾向がみられた。しかし，いずれの場合も，対照群との統計学的な有意差は認められなかった。

（2） 網赤血球数および骨髄像：末梢血中の網赤血球数は2～4％の範囲にあったが，対照群との間に有意差は認められなかった。また骨髄細胞の構成においても対照群との差は明らかではなかった。

（3） 血清EPO値：投与群，対照群とも血清EPO値は800～1000（mU/m$l$）であり，他の動物種にくらべ著しく高値を示した。しかし，投与，非投与群間の差はみられなかった。

（4） 病理学的変化：ヘミン投与マウスの体内各臓器には肉眼的な変化は認められはかった。回腸にはヘミンで着色された内容物の存在するものがみられた。病理組織学的には特に異常がみられ

© The Ito Foundation

なかった。

3.2　長期投与群

（1）　ヘマトクリット値，ヘモグロビン量および網赤血球数：ヘミンを20日連続投与したマウスの，投与終了後のヘマトクリット値は50.7±0.47％（平均値± S.D），ヘモグロビン量は11.8±0.13 g/d$l$および網赤血球数2.3±1.9％であった。対照群のそれらは，それぞれ52.0±0.51％，12.1±0.67g/d$l$および2.4±0.9％であった。ヘマトクリット値およびヘモグロビン量は投与群において対照群よりもやや低値を示したが，統計学的な有意差は認められなかった。

（2）　骨髄像：ヘミン投与群では対照群にくらべ，骨髄巨核球がやや増加していた。一方，赤芽球の増殖状態には変化がみられなかった。

（3）　血清EPO値：ヘミン短期投与群と同様のレベルであり，対照群との差はみられなかった。

（4）　病理学的変化：ヘミン投与マウスの各臓器には肉眼的変化は認められなかった。病理組織学的に，投与マウスの一部に，肝細胞の膨化および尿細管上皮の顆粒性変化が認められた以外に著変はみられなかった。

## 4.　考　　察

ヘミンはin vitroの実験で網赤血球ライセート中のタンパク質合成を亢進させることが知られている[3]。さらにヘミンがヘモグロビン合成を促進し，赤芽球系細胞の分化を誘導することも報告されている[4]。したがって，細胞内のヘミンが不足すると赤芽球系細胞のタンパク合成が低下し，その結果，細胞成熟の阻害と細胞死が起きると考えられる[1]。また細胞外のヘミンはトランスフェリンの細胞内取込みを調節することによりヘモグロビン合成に影響を及ぼしている[5]。このようにヘミンが赤血球系細胞の増殖に深く関与していることは明らかであるが，その作用機序はほとんど不明である。一方，ヘミンは赤血球膜のスペクトリンと4.1タンパクの結合を阻害すること[6]や，膜脂質と結合して溶血の原因となるなど，赤血球に対する障害因子としての側面もある[7]。さらに興味あることに，ヘミンは抗マラリア薬剤に作用して，それらの薬剤の抗マラリア作用を増強するばかりか，ヘミン自体にもマラリア原虫を溶解する作用が認められている[8]。以上のように生体内でのヘミンは重要な役割を果しているが，その代謝も不明点が多い。

ヘミンは生体内では様々な病的状態で酸化変性したり分解されたヘモグロビンから遊離してくる[9]。しかし，食肉や肉製品中に含有されたヘミンの体内摂取後の動態は全く知られていない。上述したようなヘミンの様々な作用を考えれば，ヘミンの径口摂取は単なる鉄の供与体としてのみならず，生体の活性化物質としての役割も期待される。今回の実験はこのような観点から，マウスに対するヘミンの径口投与の影響を調べた。しかし，今回の成績からはヘミン投与の直接的な影響と考えられる所見は得られなかった。この原因として，ヘミンが腸管から吸収されなかったか，又は腸内で分解された可能性が考えられる。マウスは元来草食性動物であることから，血液由来のヘミンの吸収機構が存在しないこと，また，植物中にはヘミン類似のポルフィリン構造をもつ化合物も多いことから[10]，マウス腸内にはそれらを分解する微生物が存在することなどが考えられる。したがって，ヘミンの径口投与実験には，草食性動物よりも，肉類の消化・吸収機能に優れたイヌやネコを使用する必要があるものと推測される。イヌやネコであればヘミン投与後のその血中濃度の推移をみることは容易であり，また骨髄細胞や血液の採取も容易であることから，今後はこれらの動物を用いての検討が重要であると考えられた。

© The Ito Foundation

## 5. 要　約

食肉中に含有されるポルフィリン誘導体であるヘミンについて，体内摂取後のその栄養学的意義を明らかにするために，マウスにヘミンを投与して赤血球産生系への影響を検討した。ヘミン（10 mM）を3日および20日間連続経口投与後，赤血球数，網赤血球数，ヘマトクリット値，ヘモグロビン量，血清エリスロポエチンの測定および骨髄の細胞構成を観察した。その結果，いずれの項目についても対照群との間に統計学的に有意差は認められなかった。このことから，マウスでは腸管からのヘミンの吸収が行われないか，または腸管内微生物によって分解された可能性が考えられ，今後はイヌやネコなどの肉食動物を使用して実験を行うことが重要と思われた。

## 文　献

1) Schmidt J. A., Marshall, J., Hayman, M. J., Ponka, P.and Beug, H. *Cell*, 46：41-51, 1986
2) Krystal, G. *Exp. Hematol.*, 11：649-660, 1983
3) Datta, A., De Havo, C. and Ochoa, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75：1148-1152
4) Bonanov-Tzedaki, S. A., Sohi, M. and Arnstein, H. R. V. *Cell Diff.*, 10：267-279, 1981
5) Cox, T. M., O'Donnell, M. W., Aisen, P.and London, I. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82：5170-5174, 1985
6) Liu, S-C., Zhai, S., Lawler, J.and Palek, J. *J. Biol. Chem.*, 260：12234-12239, 1985
7) Chau, A. C. and Fitch, C. D. *J. Clin. Invest.*, 66：856-858
8) Chau, A. C. and Fitch, C. D. *J. Clin. Invest.*, 68：672-677
9) Jacob, H. S. and Winterhalter, K. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 65：697-701, 1970
10) Stoll, A. *Experientia*, 41：6-23, 1948

© The Ito Foundation

# グロビンの化学修飾と修飾タンパク質の機能特性

Chemical Modification of Globin and Functionarity of the Modified-protein

宮口右二・堤　将和（茨城大学農学部）

Yuji Miyaguchi and Masakazu Tsutsumi (Faculty of Agriculture, Ibaraki University)

Porcine globin was succinylated and some properties of the resulting succinylated globin were investigated.

A succinylated globin solution adjusted to below pH 2.5 formed gel by heating above 70℃ for 10 min., Gel strengths (Breaking stress, Breaking intension, Young's modulus, Yield value) of the gel reached maximum value when the solution was heated at 80–90℃.

The effects of various reagents on the gel strengths of heat-induced gel were investigated. The addition of glucose, sucrose, citric acid, acetic acid and agar increased the gel strengths. However, the salt (sodium chloride, calcium chloride) or gelatin inhibited the gelation of succinylated globin.

Succinylated globin gel was stable in acidic solution at 30℃ though it was dissolved in alkaline solution at the same temperature. Furthermore, the gel was broken up when it was heated at 100℃ in acidic solution but it was not dissolved under the same conditions.

The preparation of the hybrids from succinylated globin and edestin, and the fractionation of the hybrids by gel filtration chromatography were tried. As a consequence, the formation of the hybrid protein by disulfide bond was suggested.

## 1. 目　的

本研究は，豚血液の血球部の有効利用を目的として企画された。

血液のヘモグロビン画分は，ヘム色素による着色のためその利用は低いのが実情であり，これを打開するため各方面で精力的な研究が行われてきた。その中の一つとして，ヘモグロビン画分からグロビンを調製し，グロビンとしての利用法が検討された[1~3]。得られたグロビンは白色粉末であるため着色の問題は解決されたが，他の食品タンパク質にくらべ食品加工上特に優れた特性をもつものではなかった。そこでグロビンの加工特性の向上を目的として，グロビンの化学修飾が試みられ，若干の興味ある結果が得られた[4]。著者らもサクシニル化グロビンを調製し，その性状を検討したところ，グロビンとは異なる性状を示すことを明らかにした[5]。特にサクシニル化グロビンは強い酸性域で強固なゲルを形成することを確認した。

本報告では，得られたサクシニル化グロビンのゲル形成能ならびにゲル安定性をまず明らかにした。さらに，サクシニル化グロビンと植物タンパク質であるエデスチンとのハイブリッド形成を試みたので，これについても報告する。

## 2. 実験材料および方法

### 2.1 グロビンならびにサクシニル化グロビンの調製

豚血液の血球部を溶血させた後，遠心分離を行

© The Ito Foundation

って膜質部を除き，ヘモグロビン液を調製した。ヘモグロビン液は塩酸-アセトン法によりヘム部を除去した後グロビンを調製した[6]。グロビンのサクシニル化は，pH 8.0～9.0の間で無水コハク酸を作用させて調製し，精製した[5]。

2.2　サクシニル化グロビンゲルの調製

サクシニル化グロビンを水に溶解後，指定のpHあるいは濃度となるようにした。この溶液を内径37.5㎜，高さ60㎜の秤量ビンに入れ，液の高さを20㎜とした。これを指定の温度で10分間加熱した後，15℃の水中で30分間冷却してゲルを調製した。なお，サクシニル化グロビンゲルに対する各種添加物の影響を調べる実験では，加熱する前にこれらの添加物を添加し，その後は前述と同様にゲル化を行って，ゲルの強度を測定した。

2.3　ゲルの安定性

2.2の条件で形成されたゲルを用い，pH安定性ならびにゲルの溶解性を検討した。まず，ゲルを1㎤に切り，これをpHが5.0（酢酸緩衝液），7.0（リシ酸緩衝液），9.0（Atkins & Pantin緩衝液）の緩衝液100m$l$にそれぞれ入れ，沸騰水中で加熱し，ゲルの溶解時間を測定した。また，別に同様のゲルを同じ緩衝液100m$l$に入れ，30℃でゆっくり振とう（振幅20㎜，速度60$min^{-1}$）し，ゲルの溶解時間を測定した。

2.4　ゲル強度の測定

ゲル強度はレオメータ（不動工業ＫＫ製，NRM 2003Ｊ型）を用い，レオプロッター（不動工業ＫＫ製，FR-801型）による演算値で表示した。なお，測定条件は，ゲルを秤量ビンに入れたままの状態で，レンジ180ｇ，テスト速度2cm/min，丸型平板プランジャー（径15㎜）を用い，10㎜進入とした。

2.5　サクシニル化グロビンとエデスチンとのハイブリッドタンパク質の調製

三角フラスコ（200m$l$）中にサクシニル化グロビン1.0ｇをとり，水15.0m$l$を加えて溶解後トリス緩衝液（pH 8.60）30.0m$l$，5％ EDTA 3.0m$l$を加え，さらに尿素36.10ｇを溶解させ，全量を75.0m$l$にした。これに$N_2$ガスを約10分間吹き込んでガス置換を行った後，2-メルカプトエタノール1.0m$l$を添加，混合し，再び$N_2$ガス置換を行った後密封して，室温で2時間放置した。一方，エデスチンも同様に処理した。2時間後，これらのタンパク質溶解を混合し，再び$N_2$ガス置換を行った後，密封して室温に1時間放置した。その後，3％過酸化水素を20.0m$l$添加して，ゆるやかに1時間攪拌後，透析を行った。透析終了後，稀塩酸でpHを5.0とし，80％となるようにアセトンを添加，24時間放置した。沈澱したハイブリッドタンパク質を濾別し，アセトンで脱水後アセトン粉末として保存した。

2.6　ハイブリッドタンパク質の高速ゲル濾過

ハイブリッドタンパク質を0.1Mリン酸緩衝液（pH 7.0）に溶解後，高速液体クロマトグラフでハイブリッドタンパク質中に含まれる分子種を分離した。高速液体クロマトグラフは日立製作所のＬ6000型を，カラムは東洋曹達ＫＫのTSK-gel G 2000 SW（7.5×300㎜）を用いた。流速は1.0 m$l$/min，圧力は28kg/㎠で分離を行い，UV（280nm）で各分子種の検出を行った。

## 3.　結　　果

3.1　サクシニル化グロビンの形成に対するpHの影響

pHの違いによるゲル強度の違いを**図1**に示した。

**図1**から明らかなように，サクシニル化グロビンはpH 2.5以上でゲルを形成しなかった。また，3％濃度ではゆるやかな糊状となり，四つの物性パラメータ（破断応力，破断強度，ヤング率，降伏値）とも0に近い値であった。濃度が5％と7

© The Ito Foundation

%では四つの物性パラメータの値としては近い値であったが，9%濃度では非常に高い値を示した。特に，pHが1.5の場合は強いゲル強度を示した。すなわちサクシニル化グロビンの場合，酸性下で強いゲル形成が行われることが判った。

### 3.2　サクシニル化グロビンのゲル形成に対する加熱温度の影響

サクシニル化グロビンのゲル形成に対する加熱温度の影響を**図2**に示した。

**図2**から明らかなように，いずれの物性値も80～90℃で高い値を示した。100℃（沸騰状態）で加熱したものは液内に小さな気泡が生じるため，物性値はいずれも低い値となった。液の内部に気泡が生じない実験条件で加熱すれば，違った値となるかもしれない。なお，ゲルの透明度は高温加熱になるにしたがって高くなる傾向を示した。

### 3.3　サクシニル化グロビンのゲル形成に対する各種添加物の影響

サクシニル化グロビンのゲル形成に対するタンパク質，糖，有機酸，塩類の影響を検討し，その

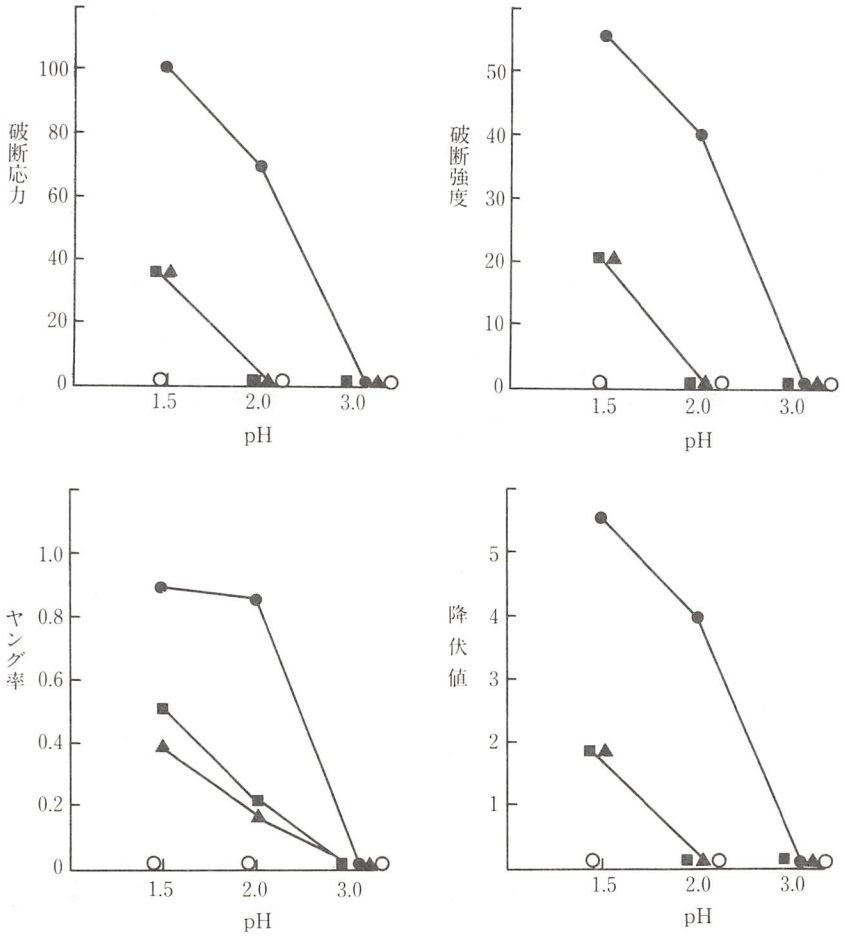



**図1**　サクシニル化グロビンのゲル形成に対するpHの影響
- ● 9%サクシニル化グロビン
- ■ 7%サクシニル化グロビン
- ▲ 5%サクシニル化グロビン
- ○ 3%サクシニル化グロビン

単位：破断応力（g）　破断強度（g/cm²）
ヤング率（$\times 10^5$ dyn/cm²）　降伏値（$\times 10^5$ dyn/cm²）

© The Ito Foundation

結果を**表1**に示した。

その結果，ゼラチンの添加はサクシニル化グロビンのゲル形成を低下させた。糖としてシュウクロースとグルコースを添加した場合，いずれも高濃度(10%)で物性値を上昇させ，ゲル強度は増加した。有機酸(クエン酸と酢酸)の場合も，高濃度になるとゲル強度は著しく増強された。特に，酢酸添加の場合高い物性値がえられた。塩類としては塩化ナトリウムと塩化カルシウムについて検討したが，いずれもサクシニル化グロビンのゲル形成を強く抑制し，ゲルの形成は認められなかった。

**表2**にはサクシニル化グロビンのゲル形成に対する寒天の影響を示した。

**表2**から明らかなように，寒天はサクシニル化グロビンのゲル強度を増加した。

以上の結果から，グルコース，酢酸，寒天はサクシニル化グロビンのゲル強度を増強させることが明らかになったので，次にゲル形成に対するこ

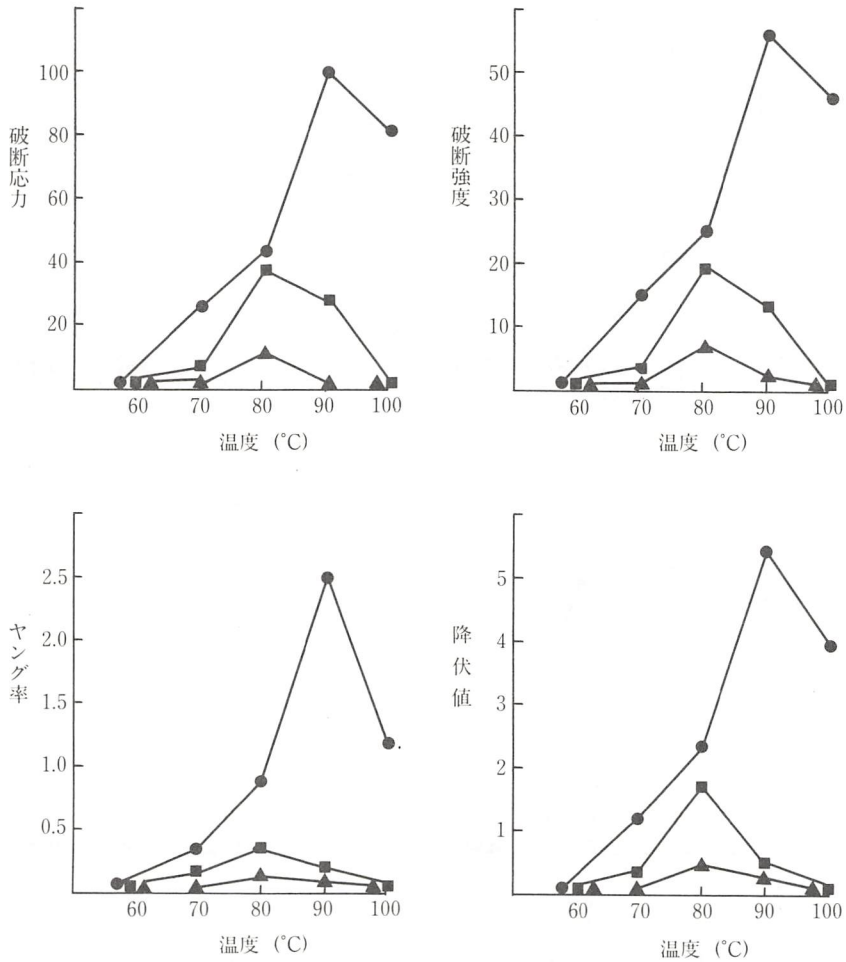



**図2**　サクシニル化グロビンのゲル形成に対する温度の影響
● 9%サクシニル化グロビン
■ 7%サクシニル化グロビン
▲ 5%サクシニル化グロビン
単位：**図1**と同じ

© The Ito Foundation

れらの三者の影響について検討した（**図3**）。

その結果，寒天，グルコース共存下で酢酸を8%以上添加すると，すべての物性値は急速に上昇し，強いゲル強度を示すようになることが明らかになった。

3.4　サクシニル化グロビンゲルの安定性

サクシニル化グロビンゲルの安定性をPH，温度をかえて測定し，その結果を**表3**に示した。**表3**から明らかなように，サクシニル化グロビンゲルは酢性域で安定であり，また高温よりも室温で安定であった。特にpH 5.0, 30℃ではほとんど変化が見られなかった。寒天やグルコース，酢酸を添加したゲルは添加しなかったゲルよりも安定性はよく，この傾向は安定性の悪い中性，アルカリ性域でも認められた。

3.5　ハイブリッドタンパク質の形成

サクシニル化グロビンとエデスチンとのSS結合によるハイブリッド形成を試み，高速ゲル濾過法によりハイブリッドの形成を検討した。その結果，エデスチンはSS結合を解裂させた後再酸化すると，水に対する溶解性が著しく低下し，透析中に沈澱した。一方，サクシニル化グロビンとエデスチンのハイブリッドタンパク質はエデスチンに比べ溶解性は高く，沈澱の生成は認められなかった。

高速ゲル濾過法でハイブリッドタンパク質中に含まれる分子種の分子量を求めた。再酸化サクシニル化グロビンの場合は183000, 70000, 15000, の分子量を示す分子種が，再酸化エデスチンの場合は186000, 27000, 11000, 4900の分子種が確認

**表1**　サクシニル化グロビンのゲル強度に対する添加物の影響

| 添加物 | 破断応力 (g) | 破断強度 (g/cm²) | ヤング率 ($\times10^5$ dyn/cm²) | 降伏値 ($\times10^5$ dyn/cm²) |
|---|---|---|---|---|
| 7%サクシニル化グロビンゲル（対照） | 2.7 | 1.0 | 0.10 | 0.15 |
| +3%ゼラチン | 1.2 | 0 | 0.05 | 0.15 |
| +5%ゼラチン | 0.7 | 0 | 0.06 | 0.04 |
| +1%サッカロース | 4.9 | 2.0 | 0.06 | 0.27 |
| +10%サッカロース | 9.6 | 5.0 | 0.36 | 0.53 |
| +1%グルコース | 0.9 | 0 | 0.05 | 0.08 |
| +10%グルコース | 26.9 | 14.0 | 0.33 | 0.45 |
| +1%クエン酸 | 1.2 | 0 | 0.08 | 0.07 |
| +10%クエン酸 | 5.4 | 3.0 | 0.15 | 0.03 |
| +1%酢酸 | 2.2 | 1.0 | 0.07 | 0.12 |
| +10%酢酸 | 56.9 | 32.0 | 0.94 | 3.16 |
| +1%食塩 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| +10%食塩 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| +1%塩化カルシウム | 0 | 0 | 0 | 0 |
| +10%塩化カルシウム | 0 | 0 | 0 | 0 |

**表2**　サクシニル化グロビンと寒天との混合ゲルのゲル強度

| ゲル | 破断応力 (g) | 破断強度 (g/cm²) | ヤング率 ($\times10^5$ dyn/cm²) | 降伏値 ($\times10^5$ dyn/cm²) |
|---|---|---|---|---|
| 7%サクシニル化グロビンゲル | 2.7 | 1.0 | 0.10 | 0.15 |
| 0.4%寒天ゲル | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 両者の混合ゲル | 5.5 | 3.0 | 0.07 | 0.31 |

© The Ito Foundation

された。ハイブリッドタンパク質中の分子種は250000, 189000, 62000, 15000, 49000であった。この中で250000の分子量を持つ分子種が最も多く，全体の83％を占めた。なおハイブリッドタンパク質中でどの分子種が異種タンパク質のハイブリッドであるか，分子間のSS結合はどの程度か，ハイブリッドタンパク質は食品タンパク質としてどのような加工特性を有するのか，また食品として消化された後生成するペプチドの安全性，機能特性はどうか，などについては現在検討中である。

## 4. 考　察

食品が持っているべき基本的特性の中には，栄養性，安全性，経済性，保存性などがあるが，その他にも感覚要素といわれる機能特性がある。この感覚要素の一つにテクスチャーと呼ばれる物理的な要素がある。この要素は食品が《おいしさ》を発現するうえからも重要な要素であり，この感覚を形成する食材は食品工業界でも広く求められている。

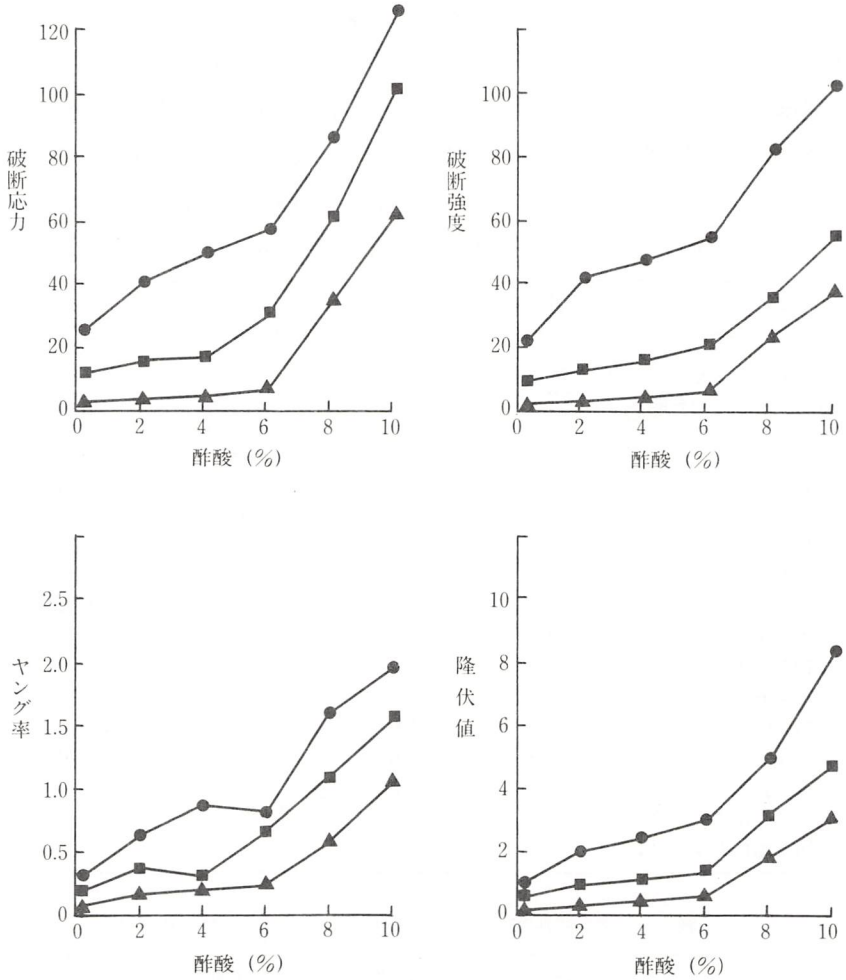



**図3**　サクシニル化グロビンゲルの強度に及ぼす添加物の影響
▲　7％サクシニル化グロビン
■　7％サクシニル化グロビン＋1％寒天
●　7％サクシニル化グロビン＋1％寒天＋10％グルコース
単位：**図1**と同じ

© The Ito Foundation

表3　サクシニル化グロビン，寒天，グルコース，酢酸の混合ゲルの安定性

| ゲル | pH | 溶解性(min) 100℃ | 30℃ |
|---|---|---|---|
| 9%サクシニル化グロビンゲル | 5.0 | 崩壊・不溶 | 変化せず |
| 9%サクシニル化グロビンゲル＋寒天 | 5.0 | 崩壊・不溶 | 変化せず |
| 9%サクシニル化グロビンゲル＋寒天＋10%グルコース＋10%酢酸 | 5.0 | 崩壊・不溶 | 変化せず |
| 9%サクシニル化グロビンゲル | 7.0 | 2.5 | 8.0 |
| 9%サクシニル化グロビンゲル＋寒天 | 7.0 | 3.5 | 8.4 |
| 9%サクシニル化グロビンゲル＋寒天＋10%グルコース＋10%酢酸 | 7.0 | 5.5 | 18.2 |
| 9%サクシニル化グロビンゲル | 9.0 | 2.0 | 0.8 |
| 9%サクシニル化グロビンゲル＋寒天 | 9.0 | 2.5 | 1.0 |
| 9%サクシニル化グロビンゲル＋寒天＋10%グルコース＋10%酢酸 | 9.0 | 3.0 | 5.2 |

豚血液中に大量に含まれているヘモグロビンは栄養性，安全性，経済性の点では優れた食材であるが，特に優れた加工特性がないため，その利用性は低く，大部分は廃棄されているのが実情である。そこで著者らはヘモグロビンからグロビンを調製し，グロビンの加工特性を検討したが，特に他の食品タンパク質と比べ特記する程の特性を見いだすことはできなかった。そこでグロビンのサクシニル化を試み，サクシニル化グロビンを調製した。調製されたサクシニル化グロビンはグロビンと比べ，中性付近での溶解性の増大やオボアルブミンの加熱凝集防止効果などいくつかの特性が見いだされたが，中でも酸性域で明瞭なゲルを形成した点が注目された。

ゲル形成能を有する食材として寒天，ゼラチンなどは広く食品加工で用いられているが，ゲルの特性は異なっている。またこれらのゲルは種々の処理を行うことによってその性状も変ることが知られている。例えば，寒天はアルカリ処理によってゲルの弾性は増加する[7]。また，タンパク質の中にはサクシニル化によって物性が改良される場合もある[8~9]。サクシニル化グロビンのゲル形成はpH 2.0以下で強く，pHが2.5以上ではゲル化しなかった。このことから，サクシニル化グロビンゲルは耐酸性ゲルとして有効に利用できることが示唆された。例えば，フルーツゼリーなどのデザート類のゲル化剤として現在ゼラチンやカラゲーナンが用いられているが，これらのゲル化剤は耐酸性が弱く，代替品が強くのぞまれているのが現状である。

サクシニル化グロビンゲルは耐酸性であるという特性の他に，食品に添加される種々の添加物によって，ゲル強度は著しく増強した。特にグルコースや酢酸の添加は効果的であった。また寒天は酸性に弱いゲル化剤であるが，サクシニル化グロビンとの混合物は，これらの単独使用よりも強いゲル強度を示した。このことからサクシニル化グロビンは寒天ゲルの耐酸性を増強させる効果を持つことが示された。また，サクシニル化グロビンゲル或いはこれにグルコースと酢酸を添加したゲルは，酸性溶液中で極めて安定であった。多くの食品が酸性域に分布していることを考えると，このような性状は食品加工上好ましいものと思われる。一方，サクシニル化グロビンはゼラチンのゲル形成能を阻害した。このことはサクシニル化グロビンがオボアルブミンの加熱凝集防止効果を

© The Ito Foundation

示すことを考えると，興味ある現象である[3,5]。すなわち，サクシニル化グロビンが広く他のタンパク質の加熱凝集防止効果を有するとすれば，別の観点からサクシニル化グロビンの用途開発の道が開かれるかもしれない。

グロビンは pH 2.0 以下で溶解する。この性質はグロビンと他のタンパク質とを化学結合で結合させる場合，実験条件として都合の悪いことが多い。一方，サクシニル化グロビンは中性～アルカリ性での溶解性が優れているので，他のタンパク質とのハイブリッド形成に好都合である。著者らも今回植物タンパク質であるエデスチンとのハイブリッド形成を試みた。その結果，エデスチンとサクシニル化グロビンとのハイブリッド形成を示唆する結果が得られた。またエデスチンはサクシニル化グロビンとハイブリッドを形成することによって，水に対する溶解性が著しく増大した。しかし，それ以外の特性については現在検討中である。今後ハイブリッドタンパク質の合成，分画を進め，食材としての加工特性を明らかにしていきたいと思っている。

以上，サクシニル化グロビンゲルに関する結果は，豚血液の有効利用および新しいゲル化剤の開発にも直結し，食品工業上大きな意味をもつものと考える。

## 5. 要　約

豚のグロビンをサクシニル化してサクシニル化グロビンを調製し，その性状について検討した。

(1) サクシニル化グロビンは３％以上の濃度，pH 2.5 以下で加熱するとゲル化した。加熱温度80～90℃で高い物性値（破断応力，破断強度，ヤング率，降伏値）が得られた。

(2) サクシニル化グロビンのゲル強度はグルコース，シュウクロース，クエン酸，酢酸，寒天の添加によって著しく増強されたが，ゼラチンや塩類の添加はサクシニル化グロビンのゲル化を抑制した。

(3) サクシニル化グロビンゲルは室温，酸性域（pH 5.0）で安定であったが，アルカリ性域（pH 9.0）では不安定であった。なお，酸性域で沸騰水中に放置した場合，ゲルは崩壊したが，溶解することはなかった。

(4) サクシニル化グロビンとエデスチンとのSS結合によるハイブリッド形成を試みた。高速ゲル濾過法により，ハイブリッドタンパク質を分画した結果，ハイブリッドの形成が示唆された。

### 文　献

1) 斉藤昌義，清水誠，山内邦男：日食工誌，**34**，223-228（1978）
2) Crenwelge D. D., Dill C. W., Tybor P. T. and Landman L. A.: J. Food Sci, **39**, 175-177（1974）
3) Hayakawa S., Ogata T. and Sato T.: J. Food sci. **47**, 1415-1418（1982）
4) 中村豊郎：学位論文（1988）
5) 宮口右二，境久美子，米倉政実，堤将和：日食工誌 **36**，720-725（1989）
6) Tybor P. T., Dill C. W. and Landman W. A.: J. Food Sci. **40**, 155-159（1975）
7) Watase M. and Nishinari K.: Food Hydrocolloids **1**, 25（1986）
8) 芳賀聖一，大橋登美男，山内清，藤代宣彦，清水勝利：日食工誌**35**，691-696（1988）
9) Paulson A. T. and Tung M. A.: J. Food Sci. **53**, 817-825（1988）

© The Ito Foundation

# 食品素材としての家畜血液の三次機能に関する研究
## ——ウシ血清アルブミン由来のオピオイドペプチドの単離——

Studies on the Physiological Functions of Blood from Livestocks as Food Resources
: Isolation of an Opioid Peptide from a Peptic Digest of Bovine Serum Albumin

吉川　正明・塩田　明・谷　史人（京都大学農学部）

Masaaki Yoshikawa, Akira Shiota and Fumito Tani (Faculty of Agriculture, Kyoto University)

In order to seek for an effective method for the utilization of blood from animals as food resources, biologically active peptides were searched for in the enzymatic digest of blood proteins.

An opioid peptide was isolated from a peptic digest of bovine serum albumin by three steps of reverse-phase liquid chromatography. The structure of the peptide was Tyr-Gly-Phe-Gln-Asn-Ala, which corresponds to the 399-404th residues of the albumin. The peptide was named serorphin. Serorphin was an opioid peptide selective for $\delta$-receptor.

### 1. 緒　言

食品中には，従来のいわゆる栄養素ではないが，摂食する側の生体調節機構に作用し，多様な生理活性を示し得る物質の存在する例が見い出され，食品の生体調節機能という概念が形成された[1,2]。これは食品の栄養性に関する一次機能，味覚や物性に関する二次機能に対比して，三次機能と呼ばれるものである。食品の三次機能を担う因子のうち，ペプチドはその構造と活性が多様である点で興味深い物質である。とりわけ不活性な食品タンパク質の限定水解によって生じたオリゴペプチドが種々の生理活性を示す事実は，生体内の生理活性ペプチドのすべてが，一旦，不活性な前駆体タンパク質として生合成された後，限定水解によって活性を発現することと対比しても重要な事実である。一般的にペプチドは腸管吸収され難く，また消化管や血中で分解され易いという，生理活性物質としては不利な性質を持っている。しかしながらペプチドが他の物質では見られないような多様な生理活性を示す事実や，それらの有効性を高めるための食品形態としての機能性食品という形態を考慮するならば，三次機能性因子としてのその重要性は増大しつつある。

摂食されるために生合成された物質である乳タンパク質からはオピオイドペプチド[3,4]アンジオテンシン変換酵素阻害ペプチド[5]等の多くの生理活性ペプチドが派生する。我々は乳タンパク質からオピオイドアンタゴニストペプチド[6~8]や平滑筋作動性ペプチド[9]等の新しい生理活性ペプチドを多数単離してきた。本来，血液は食品ではないが，乳にも増して多くの生理活性物質を含んでいる。血液由来のタンパク質を経口摂取しても，もとの活性を持ったまま腸管吸収されることはほとんど期待できない。しかしながら，血液タンパク質の限定水解によって生理活性を持ったオリゴペ

© The Ito Foundation

プチドが生成するならば，それらは腸管吸収され，生理作用を発現される可能性がある。血液タンパク質から有用な生理活性タンパク質が派生するならば，畜産副生物としての血液の有効利用に連なることが期待できる。このような観点から，血液タンパク質の酵素分解物中についで種々の生理活性のスクリーニングを行い，血清アルブミンのペプシン水解物から，乳タンパク質由来のものとは異ったタイプのオピオイドペプチドを単離した。

## 2. 方　法

2.1　ウシ血清アルブミンのペプシン分解

1gのウシ血清アルブミン(Sigma社, Fraction V)を50 m*l*の純水に溶解し，濃塩酸にてpHを2.0とした後，20mgのブタ胃ペプシン（Sigma社，1：60,000）を添加し，37℃にて2時間おだやかに振盪した。1 N-水酸化ナトリウムで中和の後，反応液を沸騰水中で10分間加熱，10,000 rpm, 5分の遠心によって得た上清をアルブミンのペプシン消化物として以下の精製に供した。

2.2　ペプチドの単離

高速液体クロマトグラフ（ウオーターズ社, 510型）にオクタデシルシリカカラム（ナカライテスク製，Cosmosil 5 $C_{18}$，20×250㎜）を装着し，アルブミンのペプシン消化物を0.1%トリフルオロ酢酸を含む0～50%/50分のアセトニトリルの直線的濃度勾配（流速 8m*l*/分）にて展開した。各フラクションを濃縮遠心機（トミー精工，EC-10）にて乾燥の後水に溶解しマウス輸精管によるオピオイド活性の測定に供した。活性を有する画分をフェニルシリカカラム（ナカライテスク，Cosmosil 5Ph, 4.6×250㎜）に添加し，0.1%トリフルオロ酢酸を含む0～40%/40分アセトニトリルの直線的濃度勾配（流速 1m*l*/min），にて展開した。活性画分を回収し，さらにシアノプロピルシリカカラム（ナカライテスク，Ccsmosil 5CN, 4.6×250㎜）に添加し，フェニルカラムの場合同様に展開した。

2.3　オピオイド活性の測定

マウス輸精管摘出標本およびモルモット回腸縦走筋神経叢摘出標本によるオピオイド活性の測定は以前記述した方法に従った[10]。

2.4　ペプチド合成

ペプチド合成は自動合成装置（バイオサーチ社，Sam 2型）の標準プロトコルに従って，t-Boc-ジイソプロピルカルボジイミド法により行った。ペプチドの脱保護はアニソール-フッ化水素中で行い，前述のオクタデシルシリカカラムにて精製した。

2.5　アミノ酸分析および一次構造解析

ペプチドを6 N-塩酸の気相中にて110℃，24時間加水分解した後，PICO TAG法（Waters社）にてアミノ酸分析を行った。ペプチドの一次構造はプロテインシーケンサ（Applied Biosystems社，477-A型）にて解析した。

## 3. 結果と考察

3.1　ウシ血清アルブミンのペプシン分解物からのオピオイドペプチドの単離

ウシ血清アルブミンのペプシン消化物はマウス輸精管摘出標本の電気刺激による収縮反応に対し，オピオイドペプチドに特有の抑制効果を示した。この効果はオピオイドアンタゴニストであるナロクソンにより抑制された。一方，血清アルブミンのペプシン消化物はモルモット回腸縦走筋摘出標本においてはきわめて弱いオピオイド活性を示した。なおウシ血清アルブミンのトリプシン消化物，キモトリプシン消化物はいづれのアッセイ系においてもオピオイド活性を示さなかった。

血清アルブミンのペプシン消化物をオクタデシルシリカカラムによる逆相クロマトグラフィーにより分画し，マウス輸精管摘出標本のアッセイ系

© The Ito Foundation

で検討したところ，**Fig. 1** に示すごとく，■で示した画分に強いオピオイド活性が認められた。□で示した画分にも弱いオピオイド活性が認められた。この強い活性画分をさらにフェニルシリカカラムによる逆相クロマトグラフィーにより分画した。その結果，**Fig. 2** に示したごとく■の画分にオピオイド活性は回収された。この画分は複数のペプチドを含むことが判明したので，さらにシアノプロピルカラムによる逆相クロマトグラフィーによる精製を行った（**Fig. 3**）。その結果，オピオイド活性は最も大きいピークに回収された。このピークをプロティンシーケンサにより解析したところ Tyr-Gly-Phe-Gln-Asn-Ala という配列が得られた。アミノ酸分析の結果も本配列に一致す

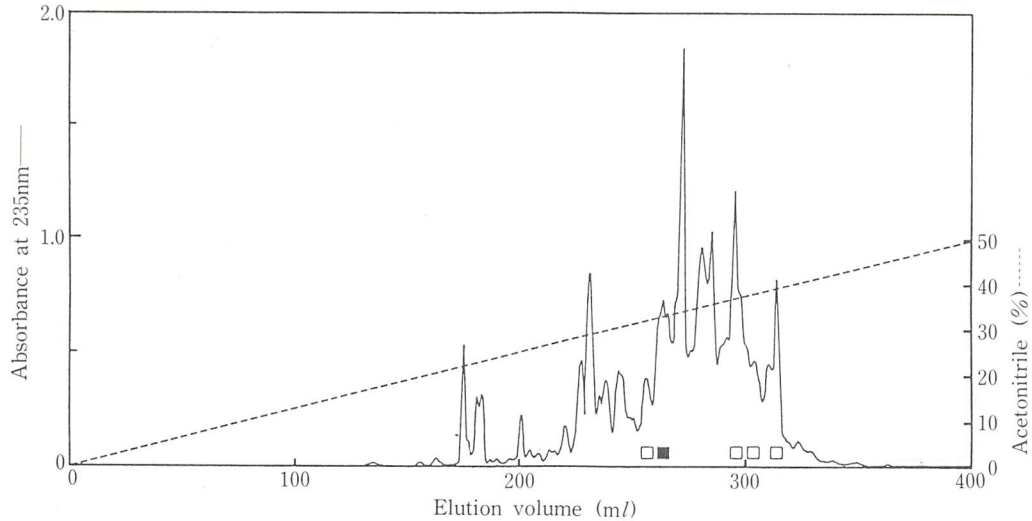



**Fig. 1** Purification of opioid peptide from peptic digest of bovine serum albumin on octadecyl silica column. A 20 mg of portion of the digest as applied on Cosmosil 5$C_{18}$ column (20×250mm, Nacalai Tesque). The column was developped with a linear gradient of acetonitrile (0–50%/50min, 8ml/min) containing 0. 1% trifluoroacetic acid.

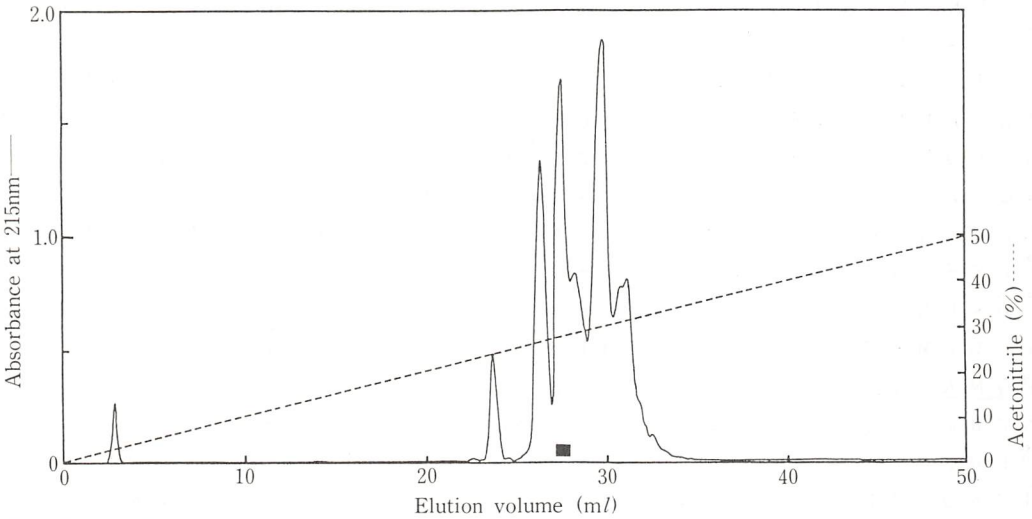



**Fig. 2** Purification of opioid peptide on phenyl silica column. Active fraction from octadecyl silica column was applied on a Cosmosil 5 Phenyl column (4. 6×25mm, Nacalai Tesque). The column was developed with a linear gradient of acetonitrile (0–50%/50min, 1ml/min) containing 0. 1% trifluoroacetic acid.

© The Ito Foundation

るものであった。本ペプチドはウシ血清アルブミンの一次構造中で第399-404残基に相当することが判明した(**Fig. 4**)[11]。本ペプチドをserorphinと命名した。固相合成によって得られたペプチドは液体クロマトグラフィーにおいて，天然品と同じ挙動を示した。また両者のオピオイド活性は一致した。

### 3.2　ウシ血精アルブミン由来の新オピオイドペプチドserorphinの性質

serophin はマウス輸精管摘出標本の電気刺激による収縮をロイシン－エンケファリン同様に抑制することから典型的なオピオイドペプチドである(**Fig. 5**)。またロイシン－エンケファリン同様，その効果はオピオイドアンタゴニストであるナロ

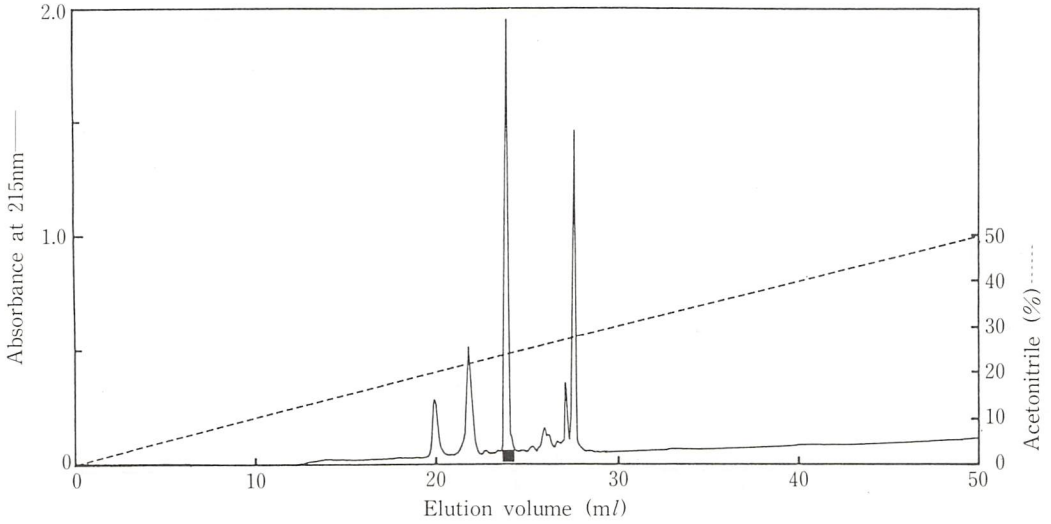



**Fig. 3**　Purification of opioid peptide on cyanopropyl silica column. Active fraction from phenyl silica column was applied on Cosmosil 5 CN column (4.6×25mm, Nacalai Tesque). The column was developed with the same gradient as the phenyl column.

```
1   D T H K S E I A H 10 R F K D L G E E H F 20 K G L V L I A F S Q 30 Y L Q Q C P F D E H 40 V
41  K L V N E L T E F 50 A K T C V A D E S H 60 A G C E K S L H T L 70 F G D E L C K V A S 80 L
81  R E T Y G D M A D 90 C C E K E Q P E R N 100 E C F L S H K D D S 110 P D L P K L K P D P 120 N
121 T L C D E F K A D 130 E K K F W G K Y L Y 140 E I A R R H P Y F Y 150 A P E L L Y A N K Y 160 N
161 G V F Q E C C Q A 170 E D K G A C L L P K 180 I E T M R E K V L T 190 S S A R Q R L R C A 200 S
201 I Q K F G E R A L 210 K A W S V A R L S Q 220 K F P K A E F V E V 230 T K L V T D L T K V 240 H
241 K E C C H G D L L 250 E C A D D R A D L A 260 K Y I C B B Z B T I 270 S S K L K E C K D P 280 C
281 L L E K S H C I A 290 E V E K D A I P E D 300 L P P L T A D F A E 310 D K D V C K N Y Q E 320 A
321 K D A F L G S F L 330 Y E Y S R R H P E Y 340 A V S V L L R L A K 350 E Y E A T L E E C C 360 A
361 K D D P H A C Y T 370 S V F D K L K H L V 380 D E P Q N L I K Z B 390 C B Z F E K L G E 400 Y G
401 F Q N A L I V R Y 410 T R K V P Q V S T P 420 T L V E V S R S L G 430 K V G T R C C T K P 440 E
441 S E R M P C T E D 450 Y L S L I L N R L C 460 V L H E K T P V E S 470 K V T K C C T E S L 480 V
481 N R R P C F S A L 490 T P D E T Y V P K A 500 F D E K L F T F H A 510 D I C T L P D T E K 520 Q
521 I K K Q T A L V E 530 L L K H K P K A T E 540 E Q L K T V M E N F 550 V A F V D K C C A A 560 D
561 D K E A C F A V E 570 G P K L V V S T Q T 580 A L 582 A
```

**Fig. 4**　Primary structure of bovine serum albumin[11]
Boxed sequence is the serorphin, an opioid peptide released by the action of pepsin.

© The Ito Foundation

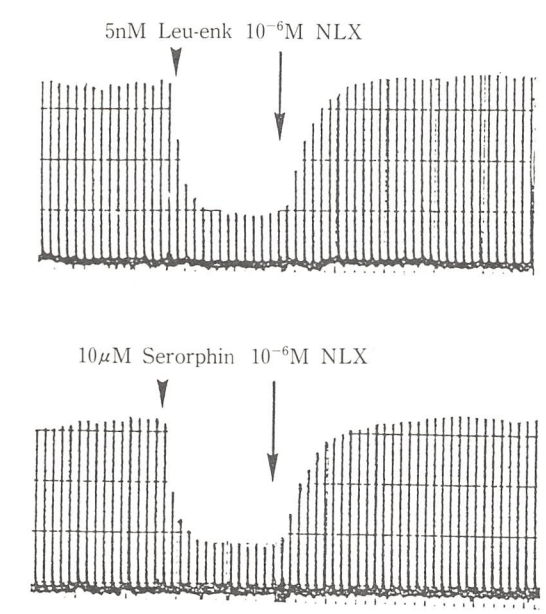



**Fig. 5** Opioid activity of serorphin in isolated preparations of mouse vas deferens and myenteric plexus of guinea-pig ileum longitudinal muscle.

クソンによって打ち消される。マウス輸精管における serorphin の $IC_{50}$ 値は 8.5 $\mu$M であり，ロイシン-エンケファリンと比較して数百分の1に相等する活性である。しかしながら serorphin は以前我々が人乳 $\beta$-カセイン中に見い出した類似構造のオピオイドペプチド Tyr-Gly-Phe-Leu-Pro よりも強力なオピオイドペプチドであり，食品タンパク質由来のオピオイドペプチドとしては決して弱いものではない。これら Tyr-Gly-Gly-Phe という配列を持つオピオイドペプチドの活性が Tyr-Gly-Phe という構造を持つエンケファリンよりも弱い理由の一つは，活性に必須の Tyr と Phe の距離がエンケファリンよりも短いことによるものと考えられる。

**Fig. 5** に示したように serorphin はモルモット回腸縦走筋神経叢標本においてもオピオイド活性を示すが，その活性はマウス輸精管における場合より小さい（$IC_{50}$＝230 $\mu$M）。オピオイドレセプターには $\mu$-，$\delta$-および $\kappa$-レセプターという三種類のサブタイプがあり，それぞれ存在部位や分担する機能が異っている。例えばマウス輸精管では $\delta$-レセプターが，モルモット回腸では $\mu$-レセプターが，またウサギ輸精管では $\kappa$-レセプターが優勢である。serorphin はモルモット回腸よりもマウス輸精管において約27倍強力であることから，$\delta$-レセプターに選択的なリカンドであることがわかる。なお $\delta$-レセプターに選択的な天然リカンドとしてはロイシン-エンケファリンがある。従来，食品タンパクより得られているオピオイドペプチドは $\beta$-カゼイン由来の $\beta$-casomorphin や morphiceptin のように $\mu$-レセプターに対し選択性を示すものが多いことから，serorphin はこの点において特徴的なオピオイドペプチドと言える。

今後 serorphin の in vivo での生理作用を明らかにする必要がある。その場合には serorphin が経口摂取した血清アルブミンのペプシン分解によって消化管内で生成する経路ばかりでなく，血中に本来存在するアルブミンが組織中のプロテアーゼにより分解され，体内で serorphin が生成する系路も考慮せねばならない。

## 4. 要　約

ウシ血精アルブミンのペプシン消化物中に，マウス輸精管摘出標本のオピオイドアッセイ系を用いてオピオイド活性を見い出し，三段階の逆相液

© The Ito Foundation

体のクロマトグラフィーにより活性ペプチドを単離した。本ペプチドは Tyr-Gly-Phe-Gln-Asn-Ala という構造を有し，ウシ血清アルブミンの第399-404残基に相当するペプチドであり，serorphin と命名した。serorphin はオピオイドレセプターサブタイプのうち，δ-レセプターに選択的なリガンドであることが判明した。

## 文 献


1) 千葉英雄，吉川正明，化学と生物，25，396-405（1987）
2) 千葉英雄，荒井綜一，化学と生物，26（1988）
3) V. Brantl, H. Teschemacher, A. Henschen and F. Lottspeich, Hoppe-Seyler's Z, Physiol. Chem., 360, 1211-1216 (1979)
4) S. Maruyama and H. Suzuki, Agric. Biol. Chem., 46, 1393-1394 (1982)
5) M. Yoshikawa, T. Yoshimura and H. Chiba, Agric, Biol. Chem 48, 3185～1387 (1984)
6) M. Yoshikawa, F. Tani, T. Ashikaga, T. Yoshimura and H. Chiba, Agric. Biol chem., 50, 2951-2954 (1986)
7) H. Chiba, F. Tani and M. Yoshikawa, J. Dairy Ros., 56, 363-366 (1989)
8) F. Tani, K. Iio, H. Chiba and M. Yoshikawa, Agric. Biol. Chem., 54, 1803-1810 (1990)
9) 吉川正明，谷史人，千葉英雄，日本農業化学会誌，64，294-294（1990）
10) M. Yoshikawa, F. Tani, T. Yoshimura and H. Chiba, Agric. Biol. Chem., 50, 2419-2421 (1986)
11) R. G. Reed, F. W. Putnam, T. Petes Jr., Biochem, J., 191, 867-868 (1980)


© The Ito Foundation

# 家畜血液の有効利用に関する基礎的研究
## —— PEG-ヘミンを触媒とし，化学発光法による過酸化物の定量——

Basic Studies on Efficient Utilization of Domestic Animal Blood
— Determination of Peroxide by Chemiluminescence with Polyethylen Glycol-modified Hemin —

二見（松島）瑞子 ・ 木村 香代子 ・ 小寺 洋 ・ 稲田 祐二（桐蔭学園横浜大学）

Ayako (Matsushima) Futami, Kayoko Kimura, Yoh Kodera and Yuji Inada
(Toin University of Yokohama)

Hemin, that is obtained in quantity from red blood cell and has two carboxyl groups, was coupled with α-(3-aminopropyl) ω-methoxypoly (oxyethylene) through the acid-amide bond formed with carbodiimide. The modified hemin (that we called polyethyleneglycol-modified hemin: PEG-hemin) was markedly soluble in aqueous solution and catalyzed the peroxidase reaction; peroxides as the oxygen donnor and luminol as the oxygen acceptor. The intensity of chemiluminescence, derived from oxidation of luminol, was monitored against time. The initial velocity of the intensity change by the reaction was increased linearly with the concentration of benzoyl peroxide, as a model of peroxide. It was discussed the possibility of a quantative analysis of peroxide.

The utilization in organic synthesis with peroxidase reaction by PEG-hemin was also tried. 4, 4'-Tetramethyldiaminodiphenylmethanol, which has been widely used as an intermediate of dye stuffs, was formed in good yield by oxidizing Tetrabase with PEG-hemin and hydrogen peroxide at 4℃ in 80% acetic acid.

## 1. 目　的

血液成分中含量の最も多いヘモグロビンの補欠分子族であるヘミンに焦点を合せ，その有効利用法について検討する。

さきにと畜血液よりヘミンを単離し，両親媒性高分子化合物，ポリエチレングリコール(PEG)をヘミンに結合させPEG-ヘミンを合成した。PEG-ヘミンは水および有機溶媒に可溶な性質を利用し，有機溶媒中でロイコクリスタルバイオレットを電子供与体とするヘミンのペルオキシダーゼ作用による過酸化脂質の定量に成功している[1]。しかし，本法は吸光度測定によるため感度の点で限界があるので，今回はルミノール等の化学発光試薬を用い，化学発光法による過酸化物の定量を検討した。

## 2. 方　法

ヘミンおよび，ミクロペルオキシダーゼ（MP-11）はシグマ社より，ルミノールは東京化成工業(株)より購入した。ポリエチレングリコール誘導体[α-(3-aminopropyl)-ε-monomethoxypoly (oxyethylene)]（PEG-$NH_2$ と略）および各種過

© The Ito Foundation

酸化物［過酸化ベンゾイル（benzoyl peroxide），t-ブチルハイドロペルオキシド（t-butylhydroperoxide），t-ブチルペルオキシベンゾエイト（t-butyl peroxybenzoate）およびクメンヒドロペルオキシド（cumenehydroperoxide）］は日本油脂(株)より恵与していただいたものを使用した。

化学発光量はアロカ社製ルミネッセンスリーダー（model BLR-201）にペンレコーダー（理化電気 model R-001D）を接続したものを用いて測定した。

2.1　PEG-ヘミンの合成

PEG-ヘミンは安島らの方法[1]を改良して合成した。すなわち，ヘミンのピリジン溶液（6mg/m$l$）1m$l$と3m$l$のジクロロメタンの混合溶液に100mgのPEG-$NH_2$（平均分子量4,300）と41mgのジシクロヘキシルカルボジイミドを加えて遮光し，室温にて攪拌下に反応させる。6時間後同上のヘミン溶液0.2m$l$と10mgのジシクロヘキシルカルボジイミドを追加し，さらに18時間反応させた後乾固する。残留物に15m$l$の水を加えて溶解させ，遠心（12,000rpm, 5min）にて不溶物を除き，さらにNo.4の濾紙を用いて吸引ろ過後，濾液を凍結乾燥する。乾燥物を再び20m$l$の水にて抽出後，0.2$\mu$mのセルロースアセテート膜にてろ過，凍結乾燥を行いPEG-ヘミンを得た。

2.2　過酸化物の定量

ペルオキシダーゼの触媒作用によって過酸化水素より発生する活性酸素によってルミノールは発光する[2]。本実験では触媒としてペルオキシダーゼの代りにPEG-ヘミンを用い，過酸化水素の代わりに各種過酸化物を用いた。その方法は0-5$\mu l$のPEG-ヘミン溶液（1.5mM）に780$\mu l$の0.1Mトリス塩酸緩衝液（pH 8.0）を加え，その混合溶液に0.4mMルミノール溶液250$\mu l$と10$\mu l$の過酸化物のジメチルスルフォキシド溶液（0-5$\mu$M）とを加え次式に従って生ずる化学発光（h$\nu$）をルミネッセンスリーダーによって測定する。

luminol + peroxide(or $H_2O_2$)
↓ PEG-hemin
(or peroxidase)
$N_2$ + 3-aminophthalate + h$\nu$

## 3.　結果と考察

ラジカル反応の重合開始剤として用いられる過酸化ベンゾイル（benzoyl peroxide）を過酸化物のモデル物質とし，PEG-ヘミンの過酸化物によるルミノールの発光の時間的変化を測定した。図1曲線A，B，CおよびDはそれぞれ0，0.5，1.5および2.5$\mu$Mの過酸化ベンゾイルを含むトリス塩酸緩衝液にPEG-ヘミンを添加した際の発光量を時間に対しプロットしたものである。その結果過酸化物濃度の増加にともない，初速度（反応の初期における単位時間当たりの発光量）は増加し，また発光の極大値も増加する。対照として，PEG-ヘミンを添加しない場合には，5$\mu$Mの過酸化ベンゾイル存在下においてルミノールによる化学発光は全く観察されない。これらの結果はPEG-ヘミンを触媒とし，過酸化物の濃度変化に伴いルミノールの初速度および発光強度が増加することを示している。

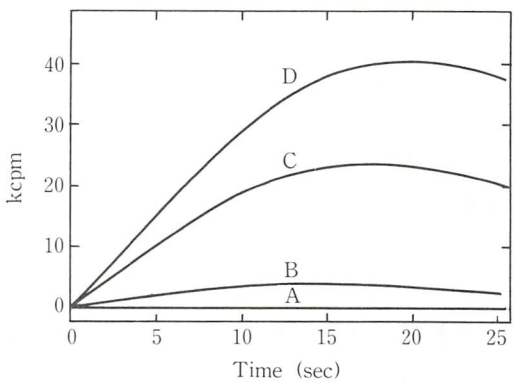



**図1**　過酸化ベンゾイルによるルミノールの発光パターン
過酸化ベンゾイル濃度はA：0$\mu$M.
B：0.5$\mu$M.　C：1.5$\mu$M.　D：2.5$\mu$M

© The Ito Foundation

次に上記反応において，PEG-ヘミンの濃度を変化させた際の発光の初速度を調べた。その結果**図2**に示すようにPEG-ヘミンの濃度の増加に比例して初速度は増加する現象が観察される。すなわち過酸化ベンゾイルはPEG-ヘミンの触媒作用によってルミノールの発光を誘起していると思われる。またPEG-ヘミン4.5μM以上の濃度において初速度は一定値を示すことより，この系においてPEG-ヘミンは触媒として十分量存在するため以下の実験は4.5μMのヘミンをいた。

**図3**はルミノール発光に関与する過酸化ベンゾイルの濃度変化を調べたものである。過酸化ベンゾイルの濃度の増加に伴い初速度は直線的に増加する。以上の結果より，濃度未知の過酸化ベンゾイルはその初速度を測定することにより定量が可能である。また，測定し得る過酸化物の濃度はさきに発表した発色色素としてロイコクリリスタルバイオレットを用いた吸光度測定による場合の約10分の1と感度も高く，測定に要する時間も短縮される（1分）。

以上過酸化ベンゾイルを用いて基礎的研究を行ったが，他の過酸化物についてもPEG-ヘミンがルミノール発光の触媒になるか検討した。**表1**は1μMの過酸化物（t-ブチルハイドロペルオキシド，t-ブチルペルオキシベンゾエイト，過酸化ベンゾイルおよびクメンヒドロペルオキシド）を用いた場合のルミノール発光の初速度を測定した結果である。t-ブチルペルオキシベンゾエイト以外はいずれもほぼ同様な初速度を示すことより，PEG-ヘミンは過酸化ベンゾイルの場合と同様に触媒となる。

近年ルミノール発光による過酸化物の微量定量法の触媒としてミクロペルオキシダーゼ（チトクロームCの酵素分解物であり11～21のアミノ酸残基を含む。）を用いた多くの報告があり[3]，nM-オーダーで過酸化物の定量が可能と言われている。しかし，本実験で用いた過酸化ベンゾイルを過酸化物とした場合，ミクロペルオキシダーゼによる発光量はPEG-ヘミンの場合の1/10以下であった。

ここではPEG-ヘミンの触媒作用の1例として，過酸化物によるルミノール発光の例を紹介したが，

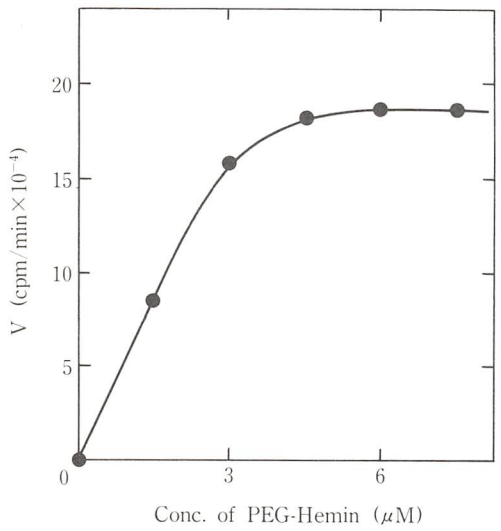



**図2** ルミノール発光の初速度に及ぼすPEG-ヘミン濃度変化
過酸化ベンゾイル濃度：2.5μM

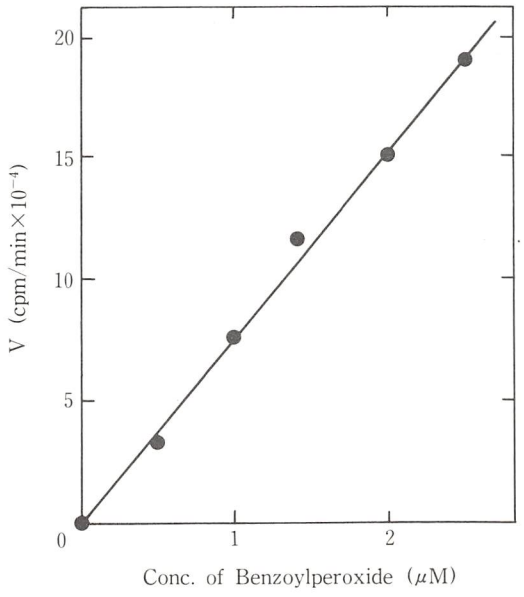
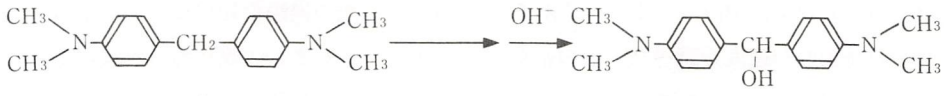



**図3** ルミノール発光の初速度と過酸化ベンゾイル濃度との関係

© The Ito Foundation




Tetrabase　　Michler's Hydrol

表1　過酸化物の種類と発光の初速度

| 過酸化物名 | 初速度 (kcpm/min) |
|---|---|
| 過酸化ベンゾイル | 75 |
| t－ブチルハイドロペルオキシド | 53 |
| クメンヒドロペルオキシド | 83 |
| t－ブチルペルオキシベンゾエイト | 9 |

過酸化物濃度：1μM

PEG-ヘミンはその他の酸化反応の触媒にもなる。例えば，染料中間体として広く利用されている4,4'-テトラメチルジアミノジフェニルメタノール(4,4'-tetramethyl-diaminodiphenylmethanol, Michler's Hydrol)はヘミン（またはPEG-ヘミン)の触媒作用によってテトラベース(Tetrabase)から効率よく合成される（上図)。モデル実験の結果，80%の酢酸中において，4℃，10分間反応させるとMichler's Hydrolが90%以上の収率で得られた。

現在のところPEG-ヘミンの利用法として多くを記載できる状態ではないが，このようにPEG-ヘミンは水にも有機溶媒にも可溶なため，さらにそれらの中でペルオキシダーゼ活性を発現することを踏まえ，各種過酸化物の定量，あるいは有機物質の合成が可能である。

## 4. 要　約

ヘミンにポリエチレングリコールを結合させたPEG-ヘミンは過酸化ベンゾイル等の過酸化物によるルミノール発光を触媒することを明らかにした。また，過酸化物濃度と発光の初速度とのあいだに直線関係が得られることより，過酸化物の定量が可能である。さらに，PEG-ヘミンの触媒作用を利用して染料中間体等の有機合成に利用できることを示した。

### 文　献

1) A.Ajima, S.G. Cao, K.Takahashi, A.Matsushima, Y.Saito and Y.Inada, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **9**, 53-57 (1987)
2) K.Puget, A.M.Michelson and S.Avrameas *Anal. Biochem..*, **79**, 447 (1977)
3) N.J.Feder, *Hisytochem. Cytochem.*, **18**, 911(1970)

© The Ito Foundation

# 高タンパク質食事が人のカルシウム，リンおよびマグネシウム代謝に及ぼす影響
## ——動物と人の比較——

Effects of High Protein Diet and Exercise on Calcium,Phosphorus and Magnesium Metabolism in Man
——Comparison between Animal and Man——

江指　隆年・*中嶋　洋子・西牟田　守・**阿左美　章治
(国立健康・栄養研究所，*聖徳大学，**聖徳栄養短期大学)

Takatoshi Esashi, *Yoko Nakashima, Mamoru Nishimuta and **Shoji Azami
(National Institute of Health and Nutrition, *Seitoku University and **Seitoku Junior College of Nutrition)

Twenty-four 4 weeks old male rats of Fischer strain were used to examine the effect of high protein diet on calcium (Ca) and magnesium (Mg) balance.

Two levels of protein, control (20% milk casein diet) and/or high (40% milk casein diet), and two kind of carbohydrate, corn starch or sucrose, diets were given for 21 days. Feces and urine were collected the last 4 days. At the end of the experiment, the rats were sacrificed and the kidney Ca and Mg content were analyzed.

The results obtained were as follows;

1. High protein diets increased urinary Ca excretion. But, all of the diets indicated no negative Ca balance and there were no difference between the four diets.
2. High protein diets increased Mg absorption and urinary Mg excretion. But, all of the diets indicated positive Mg balance.
3. There were no difference between urinary Ca, Mg excretion and carbohydrate source.
4. High protein diets prevents kidney Ca accumulation 1 to 10 compared to the control diet.
5. Sucrose diets increased kidney Ca content about 2-fold than the starch diets.
6. All of the results showed that the study of the Ca balance should expand over the Ca balance test.

## 1. 目　的

動物性タンパク質の過剰摂取が人の尿中カルシウム排泄量を増加させることはよく知られている[1~4]。

カルシウムの尿中排泄量増加は，カルシウム出納を負にし，骨粗鬆症などの疾病を惹起する恐れがあるため，カルシウム出納が負にならないような方策が検討されている[5]。

一方，マグネシウムの摂取不足が虚血性心疾患を増加させることが明らかにされつつあり，わが国の「第四次改訂，日本人の栄養所要量」においても，マグネシウムの目標摂取量が示された[6]。

高タンパク質食とマグネシウム出納との関係に

© The Ito Foundation

関する研究はほとんど見あたらないが，本助成研究によって一定の成果をあげつつあり，とくに昨年の研究においては，高タンパク質食が成熟シロネズミのマグネシウム出納を正に保つうえで有効であることを認めている。

そこで今年はひき続き実験動物による高タンパク質食給与実験を実施し，カルシウム，マグネシウム代謝に及ぼす影響を調べた。

## 2. 実験方法

### 2.1 実験動物

実験動物には，フイッシャー系，3週齢の雄シロネズミ（日本チャルスリバー社）を用いた。

### 2.2 飼料組成

飼料は米国栄養学会が提案した，シロネズミ用標準精製飼料組成[7]を基本とし，本実験目的などを考慮して，**表1**のような四種類の飼料を調製した。

すなわち，20%のミルクカゼインをタンパク質源とし，糖質源としてとうもろこし澱粉を用いる飼料（20ST）を対照とし，40%のミルクカゼインを含む飼料を高タンパク質飼料とした。また，糖質源としてグラニュー糖（蔗糖）を用いる飼料を調製し，糖質源の差によるカルシウム，マグネシウム代謝への影響を調べた。

**表1**　飼料組成　　g/100 g

| | 標準タンパク質食 | | 高タンパク質食 | |
|---|---|---|---|---|
| 原料　略記号 | 20 ST | 20 SC | 40 ST | 40 SC |
| ミルクカゼイン | 20 | 20 | 40 | 40 |
| L－メチオニン | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.3 |
| コーンスターチ | 63.3 | 0 | 43.3 | 0 |
| 蔗　糖 | 0 | 63.3 | 0 | 43.3 |
| センイ | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 大豆油 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| ビタミン混合 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| ミネラル混合 * | 3.5 | 3.5 | 3.5 | 3.5 |
| 燐酸水素 Ca ** | 1.77 | 1.77 | 1.77 | 1.77 |
| 酸化 Mg ** | 0.083 | 0.083 | 0.083 | 0.083 |

*：Ca 1/3量，Mg 1/10量添加 AIN-76ミネラル混合
**：正常量になるよう Ca，Mg を添加した

なお，飲料水には蒸留水を与えた。

### 2.3 飼育条件

実験動物の飼育は温度23±1℃，湿度55±5％のSPF条件下の動物実験室で行った。午前7時から午後7時までを明期とする12時間サイクルの明暗条件のもとで，毎日午前10時から12時の間に給餌給水，糞尿分離採取などの作業を行った。

### 2.4 糞尿分離採取

糞尿の分離採取は，シナノ製作所製の全ステンレス製代謝ケージを6連型にした栄研型代謝ケージによって行った。尿採取用の三角フラスコ中には5N塩酸 10 m*l* を添加した。

### 2.5 実験計画

実験動物を購入後1週間，20ST飼料で予備飼育し，以後四群に群別してそれぞれ**表1**の飼料で2週間飼育した。最後の4日間の糞尿を分離採取し，各シロネズミの4日間分を合わせて試料とした。

### 2.6 分析試料の調整

糞は凍結乾燥後，付着している体毛などを除去し小型コーヒーミルにて粉砕し，さらに80メッシュの全ステンレス製ふるいを通過した粉末をポリエチレン製袋に集め，分析時までデシケーターで保管した。

尿は 250 m*l* に蒸留水で定容とした後，東洋濾紙 No. 7 にてポリエチレン瓶に濾過した。

上記糞尿および飼料の一定量を硬質分解管に精秤し，一定量の重金属分析用硝酸を加えて湿式灰化した。その後 0.5 N 塩酸5～10 m*l* を加え80～90℃で乾固，さらに5～10 m*l* の 0.5 N 塩酸を加え超音波処理，混合操作して分析試料とした。

### 2.7 分析方法

カルシウムおよびマグネシウムは，ストロンチュウムを添加する原子吸光法で分析した。

### 2.8 統計処理

© The Ito Foundation

結果はすべて等分散性の検定後 t 検定した。等分散性を示さぬものは，ウエルチの t 検定により比較した。

## 3. 結果および考察

### 3.1 カルシウム出納

**表2**に示したように，高タンパク質飼料給与により尿中カルシウム排泄量が増加した。しかし，対照飼料（20 ST）のコーンスターチの代りに蔗糖を加えた飼料を与えた群（20 SC）の尿中カルシウム量はわずかに増加したにとどまり，有意差が見られるほど増加しなかった。昨年の実験で，成熟シロネズミの尿中カルシウム排泄量が蔗糖によって増加したことを考えると，蔗糖に対する感受性に月齢差があることを示していると思われる。

一方，カルシウムの吸収率，吸収量などをみると高タンパク質，高蔗糖飼料が高い値を示し，尿中へのカルシウム排泄量の増加を補っているような結果であった。

カルシウムの体内保留量，保留率にはいずれの群間にも有意差は見られなかった。本実験で用いた成長期のシロネズミでは，高タンパク質食によりカルシウム出納が負を示さず，高タンパク質食に対する反応に月齢差のあることが示された。

### 3.2 マグネシウム出納

**表2**に示したように，高タンパク質飼料給与は尿中マグネシウム排泄量を増加させた。昨年の結果では，高タンパク質食はマグネシウムの尿中排泄量を減少させているから，本結果は高タンパク質食に対するマグネシウム代謝の月齢差を示していると考えられる。

一方，マグネシウムの吸収量，吸収率は高タンパク質食で高く有意差が認められた。その結果，マグネシウムの体内保留量はいずれの群間にも有意差が認められなくなった。成長期のシロネズミのマグネシウム代謝が巧妙に調節されていることを示していると考えられる。

糖質源による大きな差は認められなかった。

### 3.3 腎臓のカルシウムおよびマグネシウム量

**表3**に示したように，腎臓に蓄積されるカルシウム量は高タンパク質飼料によって10分の1以下に減少していた。

また，蔗糖を糖質源とした群の腎臓のカルシウム量は，飼料中のタンパク質量にかかわりなく澱粉を糖質源とした群と比較しておよそ2倍多かった。

カルシウムの見かけの出納では四群間に差が見られないような本実験結果であっても，体内に保留されたカルシウムの行方は，高タンパク質食群と標準食群間で大きく異っていることを，この結果は示している。

腎臓に多量のカルシウムが蓄積することは，腎

**表2**　カルシウムおよびマグネシウムの出納

| ミネラル | 飼料 | 摂取量 mg | 糞中量 mg | 尿中量 mg | 吸収率 % | 保留率 % |
|---|---|---|---|---|---|---|
| カルシウム | 20 ST | 76.4±5.5 | 34.7±2.8 | 1.09±0.25[a]* | 54.6±3.0 | 53.2±2.8 |
| | 20 SC | 76.3±8.4 | 38.5±6.7 | 1.21±0.10[b] | 49.7±5.5[c] | 48.1±5.5 |
| | 40 ST | 79.2±8.3 | 35.2±5.0 | 4.37±0.64[a] | 55.7±3.6 | 50.2±3.8 |
| | 40 SC | 76.4±3.1 | 32.9±1.9 | 3.74±0.62[b] | 56.9±2.4[c] | 52.0±2.5 |
| マグネシウム | 20 ST | 6.83±0.49 | 2.71±0.45 | 1.92±0.25[a] | 60.3±5.5[c] | 32.0±4.7 |
| | 20 SC | 6.53±0.72 | 2.81±0.48 | 1.84±0.16[b] | 57.0±4.8[d] | 28.7±3.9 |
| | 40 ST | 6.73±0.70 | 2.26±0.30 | 2.60±0.34[a] | 66.3±2.5[c] | 26.8±3.7 |
| | 40 SC | 6.46±0.26 | 2.20±0.17 | 2.34±0.12[b] | 65.9±2.2[d] | 29.5±2.1 |

*同一アルファベット文字を付してある群間は有意差があることを示す（$p < 0.05$）

© The Ito Foundation

表3 腎臓中のCa, Mg量

| 群 | Ca mg/g organ | Mg μg/g organ |
|---|---|---|
| 20 ST | 1.71±1.17[a]* | 211±31[d] |
| 20 SC | 3.64±0.77[ab] | 239±18[e] |
| 40 ST | 0.12±0.04[ac] | 164±3[df] |
| 40 SC | 0.23±0.06[bc] | 167±2[ef] |

*同一アルファベット文字を付した群間には有意差のあることを示す（$p<0.05$）

臓の機能を正常に保つうえから好ましくないことである。

これまでの実験においては，カルシウムの出納のみに注目し，出納が正に保たれることを善しとしてきたが，本実験結果はカルシウムの出納実験のみからカルシウム代謝に対する高タンパク質食の影響を論ずることの難しさを示していると考えられる。

高タンパク質食が示した腎臓へのカルシウム蓄積抑制作用の生理的意味については，今後の研究にまたなければならないが，加齢による腎臓機能の低下や腎臓の石灰化の増加などが見られることを考慮すると，本実験結果のもつ意義に関して早急に研究を深めることが必要であると思われる。

一方，腎臓のマグネシウム量も高タンパク質飼料で低値を示した。しかし，その程度はカルシウムに比較するとわずかであった。この結果の意味するところに関しても，今後検討しなければならない。

## 4. 要　約

フイッシャー系4週齢の雄シロネズミにタンパク質源として20または40%ミルクカゼイン，糖質源としてトウモロコシ澱粉または蔗糖を含む4種類の飼料を3週間給与し，カルシウム（Ca），マグネシウム（Mg）の出納を調べた。また，腎臓のカルシウム，マグネシウム量を測定し，出納試験以外の方法でカルシウム代謝を検討することの重要性を指摘した。その大要は以下のようであった。

(1) 高タンパク質食は，尿中Ca排泄量を増加させた。しかし，Ca出納はいずれの群も正を示し，四群間に有意差を認めなかった。

(2) 高タンパク質食は，尿中Mg排泄量を増加させた。しかし，Mg出納はいずれの群も正を示した。

(3) 糖質源による尿中Ca, Mg排泄量の差は認められなかった。

(4) 高タンパク質食は，腎臓のCa量を対照群の10分の1以下に減少させた。

(5) 腎臓のCa量は，飼料中のタンパク質量にかかわりなく，糖質源を蔗糖とした群がおよそ2倍量であった。

(6) 以上の結果は，Ca代謝をCa出納以外の側面からも検討することの重要性を示していると考えられる。

## 文　献

1) 江指隆年・五島孜郎・鈴木一正・西牟田守・北野隆雄・中嶋洋子・阿左美章治：食肉に関する助成研究調査成果報告書，**3**，369-376（1985）伊藤記念財団
2) 同上，**4**，1～6（1986）
3) 江指隆年・五島孜郎・鈴木一正・西牟田守・中嶋洋子・阿左美章治・寺となみ：食肉に関する助成研究調査成果報告書，**5**，398-404（1987）
4) 江指隆年・五島孜郎・鈴木一正・西牟田守・中嶋洋子・阿左美章治：食肉に関する助成研究調査成果報告書，**6**，324-328（1988）
5) National Research Council: Diet and Health, National Academy Press, Washington, D.C., U.S.A（1989）
6) 厚生省保健医療局健康増進栄養課：第四次改訂，日本人の栄養所要量，第一出版，東京（1989）
7) Council of the American Institute of Nutrition, adhoc Commitee on Standard for Nutritional Studies: J.Nutr., **107**, 1340-1348（1977）

© The Ito Foundation

# 肉用牛大規模一貫経営の成立条件に関する技術的・経営的研究

The Technical and Management Study on the Possibility of Large-scale Cow-calf, Fattening Beef Operation

宮崎 昭・新山 陽子・石田 直彦（京都大学農学部）

Akira Miyazaki, Yoko Niyama and Naohiko Ishida
(Faculty of Agriculture, Kyoto University)

Beef production of Japan is undergoing through a new state of development at import liberalization of beef is scheduled to start in April, 1991. For this, several empirical survey were carried out on the large-scale cow-calf, fattening beef operation.

In Hokkaido, we analyzed the case of a dairy farm which had combined with beef fattening operation. This operation consists of 200 milk cows, 400 heifers and dairy steers, and 300 fattening cattle of beef breeds. A lot of maure from this operation is spread into the field, of which the fertility is raised and the roughage production is increased considerably. The productivity of dairy cows is also increased due to the grazing in the pasture and hay-feeding. New-born calves are rearedin calf-hatches, which has lowered the death loss to 1.0% or less.

In addition, the daily gain of feeding cattle has been increased because of the improvement of nutritional condition resulting from the extensive use of whole crop corn silage.

In essence, this example of Hokkaido has made it clear that raising land productivity is the key factor for a successful cow-calf, fattening operation.

Next, from Kagoshima prefecture, the case of beef-breed cow-calf, fattening was analyzed. The operation keeps 23 breeding cows, 17 calves, and 79 fattening cattle. Here again, roughage production is very important; a total of 6 hectares of land including rented land is put into for roughage production. This has enabled to provide sufficient roughage to feeding cattle, and the calving rate has become very high. Also, feeding cattle, being fed with whole crop corn silage, take more feeds than otherwise during a long period of feeding. Here again, enhancement of land productivity has resulted in a good result.

## 1. 目　的

わが国の牛肉生産は，自由化を目前にして厳しい国際環境にさらされ，低コスト生産を模索している。一方，国内的には農山村の土地利用，保全の担い手として，土地利用型生産の基盤確立も強く求められている。しかし，土地利用型生産の中心となる繁殖経営は経営規模の零細性から経営者の高齢化がすすみ，将来の再生産が危ぶまれる状況にある。そのため青壮年の専従経営者をいかにして確保，育成するかが大きな関心を呼んでいる。こうした中で，近年各地にその萌芽のみられる比較的大規模な肉用牛繁殖・肥育一貫経営はわが国の将来の肉牛生産の担い手として期待されている。しかしその成立条件についてはほとんど明らかにされていない。そのため，本研究では，大規模一

© The Ito Foundation

貫経営の事例を乳用種と肉専用種について選定し，その飼養管理あるいは経営技術の特長を調査し，わが国の牛肉生産の低コスト化と土地利用活性化の可能性を探ることとした。

## 2. 方　法

北海道千歳市近郊の乳用種および鹿児島県高尾野町の肉専用種の繁殖・肥育一貫経営について，現地聞き取り調査を行った。そのため，地域の概要，個別経営の経営状況を詳しく調べ，とくに飼養管理技術体系と経営者の経営に対する取り組み姿勢をまとめ，将来のわが国の大規模経営成立のための基本的な条件を明らかにしようとした。

## 3. 結果と考察

1) 北海道の大規模一貫経営は，酪農に肥育部門を結合したものであった。農用地面積は150haで，その内訳は採草放牧用草地78ha，飼料用とうもろこし畑37ha，そして小麦畑78haであった。労働力は，経営者とその家族および実習生，合計8人であった。飼養家畜は搾乳牛200頭，哺育，育成もしくは肥育中の牛が，400頭であった。そのほか，肉専用種の肥育牛が300頭飼育されていた。

この経営では土つくりに最大の関心が払われている。肥育部門を取り入れたのも，実は土壌の肥沃度を高めるために厩肥を必要としていたからである。その甲斐があって，今では飼料用とうもろこしを栽培した後に，ルーサン，オーチャードグラス，白クローバーを混播し，採草放牧地として3年間利用したり，あるいは秋播き小麦を翌年にかけて作付している。その小麦が翌年8月に収穫されると，その跡地には飼料カブを栽培する。この結果，2年3作付体系となっている。ルーサンは年間4，5回刈取り10a当たり6.5t程度収穫している。飼料用とうもろこしは穀実生産とせず，すべてホールクロップサイレージとする。またルーサンもその多くをサイレージとして保存する。そのため7基のバンカーサイロの容量は合計7,000㎥におよび，その結果，端境期にもつねに6ヵ月分の飼料の備蓄をもっている。

近年，耕起を始めるとカラスが40～50羽も集まって，掘起こしたばかりの土の中からミミズや虫を食べるのは，土つくりが成功した証拠と経営者は満足気である。農民が貯金する場所は農協でなく，土地なのだともいう。

搾乳牛が200頭もいるので，牛舎の外に48個のカーフハッチがあり，常時新生子牛が飼育されている。新生子牛はそこで初乳を与えられ，その後生乳を1ヵ月間，ついでカーフミルクを給与される。カーフハッチの中には，生後1ヵ月まで収容される。その後4頭を一群とし，さらに1.5ヵ月間飼育する。その間に乾草と配合飼料に慣れさせ，その後は20頭を一群として，さらに2，3ヵ月間飼育する。5ヵ月齢になると，雄子牛は去勢され，肉牛舎へ，そして雌子牛は共同放牧場へ移される。この間の子牛の死廃率は1％である。以前カーフハッチを利用しない時には，それが30％にもおよんだという。

肉牛舎に入った子牛はホールクロップサイレージを飽食し，さらに乾草と配合飼料が与えられる。配合飼料給与量は肥育が進むにつれて多くなるが，出荷直前でもサイレージを1日当たり少なくとも2kg給与する。肥育牛の出荷は枝肉重量で400kgとなる時点を目標としている。月齢にして17ヵ月である。ここでは生産された子牛がすべて育成されるから，頭数が増えすぎるほどである。そこで若くて発育のよい雌牛が分娩すると，経産牛の中から能力の低いもの，乳房炎を起こしたもの，あるいは種付きの悪いものを肥育にまわし搾乳牛を淘汰，更新する。その時点で，淘汰牛が1，2産の雌牛であれば，短くて2，3ヵ月間，長くて5，

© The Ito Foundation

6ヵ月間の肥育によって50万円近くで販売できる。一方，この新しい若雌が搾乳牛群に加えられることや，土つくりが効を奏したこともあって，この経営では産乳量がこの数年間に1頭当たり年間平均で1t近く増加している。

なお，肉専用種の肥育牛は，もともと乳用牛を放牧していたので，採草地や畑地への厩肥供給の目的に導入されたのであるが，今ではこれだけの土地から生産されるホールクロップサイレージや乾草を換金するため，あるいは当地で安く手当できるビール粕の利用のために導入しているうちに，大きな頭数になったわけである。肥育牛の普段の給餌は80才を超えた老人が楽しみながら行っていた。

農具舎の中には，作業用機械が整然と並べられ，いつでも使える状態で整備されている。播種機にしても，雪が残る早春の作業に役立つキャタピラ付きのものと，一般の車輪のものが準備され，雪国での作業の遅滞を避けられる態勢である。このように経営者は農業の勘どころを押えて，大規模経営を行っており，牛肉輸入自由化に対しても十分対応しうるとの自信を持っているのは，借金ゼロという経営状態からうなづけることであった。

2) 鹿児島県の一貫経営は，肉専用種を飼養しているので，規模は小さいが，わが国の家族経営としては頭数は多いことで注目されている。農用地面積は7.3haで，その内訳は水田0.9ha，畑地0.4ha，そして飼料畑6.0haである。飼料畑は大部分が借地であり，そこにとうもろこしやイタリアンライグラスを栽培している。とうもろこしは10a当たり7～8tの収量であり，青刈およびホールクロップサイレージとして利用されている。労働力は経営主と妻，そして人工授精師として働きつつ，肉用牛部門を手伝う長男の3人である。

飼養家畜は，合計119頭である。そのうち，繁殖部門は40頭で，母牛23頭と子牛17頭，肥育部門は79頭で，自家産24頭，預託牛55頭であった。この農家は，昭和45～46年ごろに繁殖牛2頭と預託の肥育牛5～6頭を同時に導入し，肉用牛飼育を始めた。繁殖牛を導入したのは財産形成を志したからである。預託牛をこの程度肥育するだけでは収入も少ないとの自覚もあったわけである。やがて10年が経過すると，繁殖母牛は20頭になり，その後も安定的にその頭数を維持している。当時，肉牛団地がこの地域に作られ，そこへの入植を契機として肉用牛経営を始めたが，なお飼養スペースが広いので，繁殖は現状程度，肥育はあと20頭ぐらい増頭して，100頭としたいと希望している。なお肥育を拡大するためには団地に続く土地を確保する必要があるとのことであった。一方，繁殖は運動用パドックの面積がこれ以上拡大できないので，増頭が無理だという。もし，それが解決されるならば，飼料用地の確保は将来も見込めるので，母牛30頭までは拡大できるはずだと考えている。

繁殖牛に対する飼料は，ワラの通年給与，冬のイタリアンライグラス乾草とサイレージの利用，夏のとうもろこし青刈が中心である。このように十分な粗飼料を給与していることもあって，受胎率は100％で，分娩間隔は12ヵ月以下である。一方，肥育牛に対しては，生後7～8ヵ月齢から15～16ヵ月齢まで，ホールクロップサイレージを1日当たり8～9kg与え育成する。その後はホールクロップサイレージに加え，徐々に濃厚飼料を多給する。濃厚飼料の給与量は全期間平均で6kgとしている。それに加えて，ワラも給与されている。その結果，肥育牛は520日間肥育で，体重620kgとなる。

一般的に，一貫経営開始の動機は，子牛価格の暴落が多いが，ここでは土地条件や労働条件を考えて，収入の増加を図るため，繁殖・肥育一貫経営が目指されたようであった。しかし，繁殖牛と

© The Ito Foundation

肥育牛は飼養技術にかなり差異があるので，次のようなことを注意しながら，経営を続ける所存であるという。(1)繁殖牛に十分な自給飼料を与えるため，飼料作付面積を考えて頭数を決める。(2)子牛には十分な量の良質の粗飼料を与え，また日光の下で運動できるスペースを確保する。(3)牛舎への投資を抑えるが，作業し易いように最小限の改築をする。(4)肥育牛は共同で出荷できるよう地域で協力しながら仕上げる。(5)肥育牛は育成時にホールクロップサイレージを多給し，将来の本格的な穀物多給時に十分な飼料の食い込みができるようにする。(6)繁殖牛，子牛，肥育牛のそれぞれを育成するとき，養分要求量について栄養学的知識を持ち，繁殖牛は肥らせず，子牛は十分に発育させ，肥育牛は出荷目標に仕上げるため濃厚飼料給与量を時期ごとに変化させる。

このように，肉専用種の一貫経営を成立させるためには，経営者が土地，労働力の利用の面において，無理のないように繁殖牛，肥育牛をバランスをとりながら増やすことが好ましいことが明らかにされた。

## 4. 要　約

わが国の将来の牛肉生産を安定的に，しかも低コスト化を目指して行うための条件を検討する目的で，乳用種と肉専用種について，大規模一貫経営を現地調査した。北海道では酪農に肥育部門を加えた経営で，搾乳牛 200 頭，哺育，育成もしくは肥育中の乳用種が 400 頭，そのほか肉専用種肥育牛 300 頭を飼育していた。飼料生産については，十分な厩肥を投入して，土壌の肥沃度を高め，自給飼料を大量に生産し，肥育牛に対しても，とうもろこしホールクロップサイレージを多給していた。新生子牛の育成はカーフハッチを用いて死廃率を１％まで低下させ，また若雌のうち，発育の良いものを能力の低い経産牛とおきかえることにより，酪農部門の平均乳量を高めていた。そして，更新する経産牛を短期間肥育し，高く販売していた。このように，酪農経営の中で土地生産力の豊かなところでは，大規模な一貫経営が成立する可能性が大きいことが明らかにされた。

鹿児島県では，肉専用種の一貫経営を調べたが，繁殖部門で40頭，母牛23頭と子牛17頭，肥育部門では79頭が飼育されていた。ここでは，繁殖牛は粗飼料のみ，肥育にも生後15～16ヵ月齢まではとうもろこしホールクロップサイレージを与えるなど，自給飼料多給につとめていた。そのため 6.0 ha を活用して飼料作りを行っていたが，その多くは借地であった。一方，繁殖牛の増頭は，運動用パドックの面積を考えながら，無理のないように心がけていた。そして，繁殖牛と肥育牛の飼養技術のちがいを心得て，繁殖成績を良好に保っていた。さらに，育成時の粗飼料多給によって肥育時の飼料の食い込みを十分にさせるなど，繁殖，肥育の両面に飼料生産用地確保による好影響がでるように配慮していた。

この調査で大規模一貫経営は自由化後のわが国の牛肉生産にとって，ますます重要となるものと示唆された。

© The Ito Foundation

# 食肉需要の安定性に関するノンパラメトリック分析

Non-Parametric Analysis of the Stability of Meat Demand

澤　田　　学（帯広畜産大学）

Manabu Sawada (Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine)

In this study, Japanese household's data per capita on fresh fish and meat consumption are examined to analyse two issues: the stability of the demand for meat over the past two decades and the seasonality of preferences. The traditional approach to these issues is familiar one. A functional form is chosen for demand curves and the parameters are estimated. Statistical significance of the shift parameters other than price and income parameters are then used to detect structural or seasonal changes in the estimated system. Such tests are conditional on the functional form's being correct. Specification errors may suggest a shift where none has occured. A nonparametric alternative to the traditional approach make it possible to test stable preferences without reliance on any assumptions about the functional forms.

Using nonparametric demand analysis, It is found that meat consumption patterns in Japanese households over the period 1963-1984 can be explained using only the prices of goods in fresh fish and meat group and the expenditure on the group as a whole. It may interpret previous works as rejecting the stability of particular functinoal forms of the demand curves rather than as an indication of structural changes. And further, the seasonality of meat preference is also tested and several patterns of seasonal variation in preferences are found.

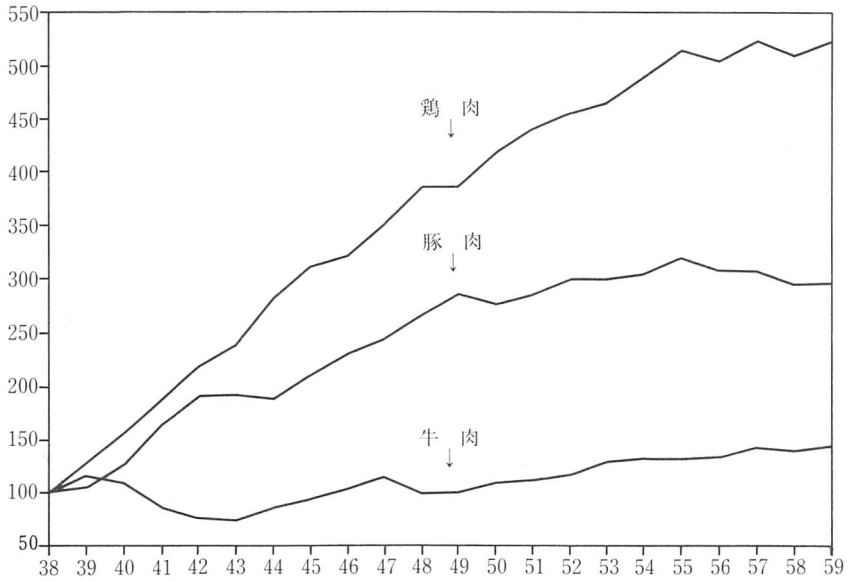
## 1. 目　的

高度経済成長期から近年に至るわが国家計の食肉需要動向を図1によってみると，鶏肉消費の急増と牛肉消費の伸びの低さが特徴的である。昭和50年代半ばまでの動向に関しては，食肉消費は所得および相対価格変動に影響されると同時に消費習慣の形成にともない持続的に構造変化を遂げてきたとする見解が有力である[1,2]。図1から読み取れるもう一つの特徴は昭和55年を境に豚肉消費が減少に転じ，鶏肉消費も停滞基調に入った点である。これは食肉需要の新たな構造変化を示唆するものであろうか。

図2は最近10年間における家計食肉消費の月次動向である。図1に対応した趨勢変動に加え，消費の季節性が明瞭に現れていることが確認される。すなわち，食肉全体として12月に消費は大幅に増加し（牛肉，鶏肉需要は著増），1月に需要が大きく落ち込んでいる。また鶏肉，牛肉はそれぞれ7・8月，4・5月に相対的に消費が少ない。このような需要の季節性は消費支出や価格の季節変動に由来するだけでなく，消費者の嗜好上の季節性をも反映しているのだろうか。

これらの設問に答えるために採られた既往の方法は，或る特定の関数型に定式化した需要関数を計測し，価格や所得以外の需要シフト変数の係数値がゼロと有意な差があるか否か吟味するものであった。しかし，そのようなパラメトリック・アプローチでは，構造変化あるいは嗜好に由来する季節性が確認されたとしても，それが果たして嗜

© The Ito Foundation




出所）総務庁「家計調査」、「消費者物価指数」より作成。

**図1**　食肉種類別1人当たり実質購入金額指数の推移—昭和38年～59年—
（全国全世帯，昭和38年＝100）

好が実際に変位したことによるものなのか，あるいは嗜好は不変であったにもかかわらず，誤った需要関数型の採用から生じた見かけ上のものなのか識別することは困難である。

そこで本研究は，従来の接近方法の反省にたち，特定の関数型の需要関数を前提せずに観察されたデータから需要構造の安定性を直接的にテストするノンパラメトリック・アプローチ[5]を用いて，①昭和30年代末から近年に至る間に家計食肉需要に構造変化があったか否か，②消費者の嗜好に固有の食肉需要の季節性が存在するかどうか，について検証することを目的とした。

## 2. 方　法

牛肉（BF），豚肉（PK），鶏肉（CN），生鮮漁介（FH）は消費者の嗜好において弱分離可能[3]な財グループを構成することが確かめられている[4]。そこで本研究では**図1**および**図2**の食肉消費動向は，消費者による FH, BF, PK, CN に関して定義された効用関数の予算制約のもとでの極大化行動から生成されたものと前提して課題の検討を行った。

いま一人当たり購入量と価格に関するT期に渡る観察データ $\{(q^1, p^1), (q^2, p^2), \cdots, (q^T, p^T)\}$ が与えられているものとする。ここで $q^t = (q_{BF}{}^t, q_{PK}{}^t, q_{CN}{}^t, q_{FH}{}^t)$, $p^t = (p_{BF}{}^t, p_{PK}{}^t, p_{CN}{}^t, p_{FH}{}^t)$ である。$p^t q^s$ を第s期で観察された数量を第t期の価格で購入するときの費用として

$$p^t q^t \geqq p^t q^r,\ p^r q^r \geqq p^r q^v \quad \cdots,\ p^z q^z \geqq p^z q^s \qquad (1)$$

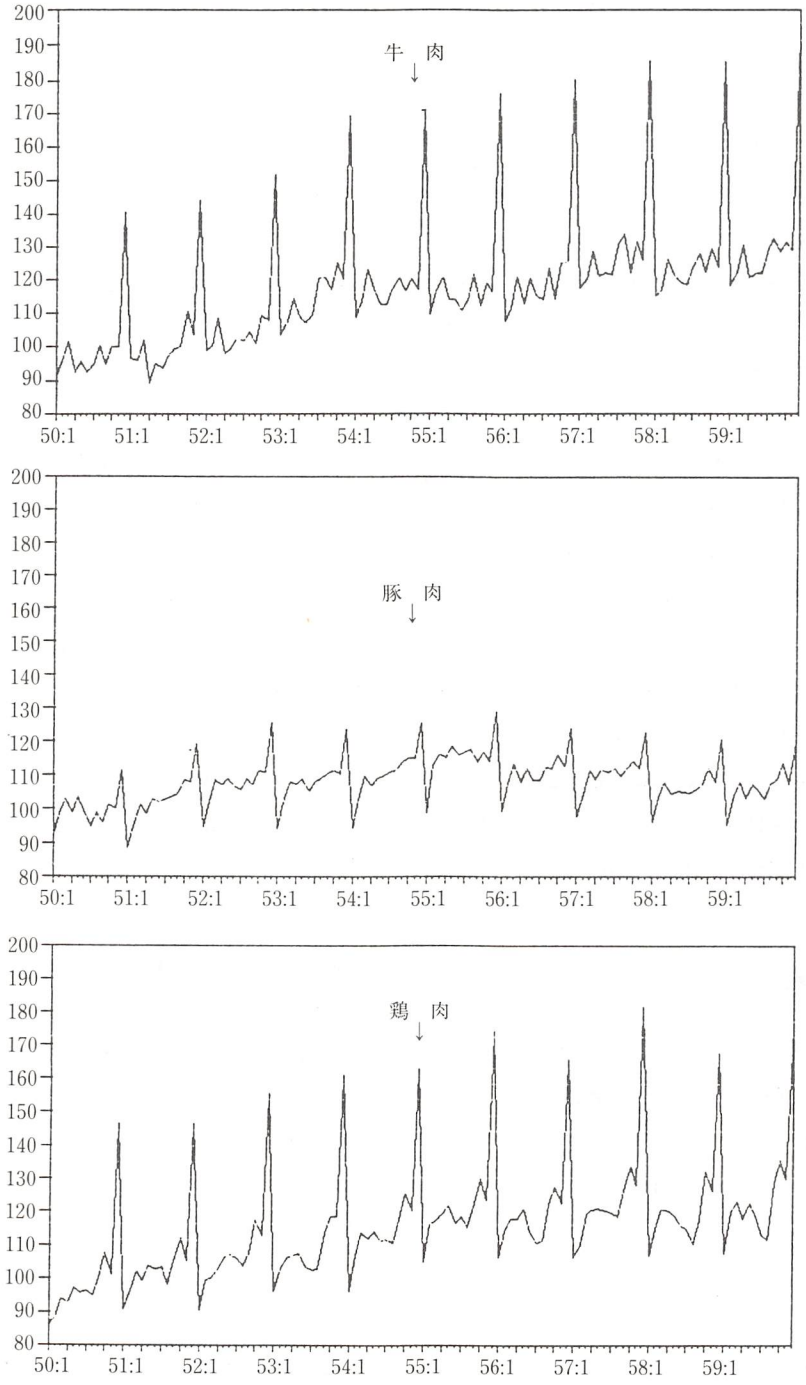
となるような，或る購入量ベクトルの系列 $\{q^r, q^v, \cdots, q^z\}$ が存在するなら，数量ベクトル $q^t$ は $q^s$ に対して選好されることが顕示されたと定義し，$q^t R q^s$ と表記する。

このとき，データが顕示選好の一般化公理（Generalized Axiom of Revealed Preference）：GARP）

$$q^t R q^s \Rightarrow p^s q^s \leqq p^s q^t \qquad (2)$$

を該当する全てのオブザベーションにおいて満たすならばデータを理論的に根拠づける或る安定的

© The Ito Foundation




出所）総務庁「家計調査」、「消費者物価指数」より作成。

**図2**　食肉種類別1人当たり実質購入金額指数の月次系列—昭和50年1月～59年12月—
（全国全世帯，昭和50年平均＝100）

© The Ito Foundation

な効用関数が存在することが知られている[6]。したがって，公理(2)を破る観察値が全くなければ需要構造は安定的であることが確かめられる。もし第t期と第s期の間でGARPが成立しないとすれば，それは消費者の嗜好がこの期間に変化した兆候と解釈される。

課題①，②の検証に供したデータ・セットはそれぞれ，昭和38年～59年に渡る年次データ，昭和50年1月～59年12月に渡る月次データである。いずれのデータ・セットも総務庁統計局『家計調査年報』(品目分類・全国全世帯平均)および『消費者物価指数年報』の各年版から数量・価格系列を作成した。価格系列には『消費者物価指数』の昭和55年を1とする品目別価格指数を用い，購入量系列には世帯員一人当たり支出金額を価格指数で除した実質支出金額を採用した。なお，分析期間の最終年を昭和59年としたのは，家計調査において昭和60年以降，生鮮肉類の支出調査項目に「合いびき肉」が新設されたことにともない牛肉，豚肉に関する支出金額・購入量系列にそれ以前の統計数字と不連続が生じていることによる。

### 3. 結果と考察

データの各期の数量ベクトル間の顕示選好関係RをVarian[6]のアルゴリズムを用いて確定したのち，顕示選好の一般化公理(GARP)を満たさないオブザベーションが存在するかどうかチェックした。

その結果，年次データではGARPを満たさないオブザベーションは一つも検出されなかった。このことは昭和38年から59年の期間において需要構造が安定していたことを意味する。つまり，当該期間の食肉消費パターン変化は相対価格と予算(牛肉，豚肉，鶏肉，生鮮魚介に対する総支出額)の変動だけで完全に説明できる。月次データにおいてもGARPを破るオブザベーションは検出されなかった。換言すれば対象とした期間では消費者の嗜好に起因する食肉需要の季節性は顕示されなかった。

われわれの得た検証結果は，年次間ならびに月間需要構造の安定性を支持するものであったが，観察データがGARPを破らなくとも嗜好が実際に変位している可能性はないのだろうか。この点については，各観察時点でそれ以前の観察時点で購入された財のどの組合せも購入可能であるようなデータでは，ノンパラメトリック・テストの検出力は一般に小さいことが指摘されている[7,8]。本分析に供したデータは相対価格の変化率に比べ実質予算(牛肉，豚肉，鶏肉，生鮮魚介に対する実質総支出額)の成長率がかなり高いので，実際に生じたかもしれない需要構造変化を検出しえてない可能性がありうる。

そこで実質予算変化の効果を補整した場合に結果がどうなるか検討するためめ，実質予算額をサンプル平均水準に固定した消費系列を推計し，推計データにノンパラメトリック・テストを適用してみた。実質予算効果補整済み数量$q_{i*}^t$は，相対価格一定のとき各財支出額と実質予算の間に線型の関係があると仮定し，

$$q_{i*}^t = q_i^t \times (1 - \beta_i DM^t / w_i^t) \qquad (3)$$

$$i = BF, PK, CN, FH, \quad t = 1, \cdots, T.$$

として推計した。ここに，$DM^t$は第t期の実質予算のサンプル平均実質予算からの変動率，$w_i^t$は第t期における第i財のグループ内支出比率，$\beta_i$はグループ内限界支出性向パラメータである。$\beta_i$には，分析に供した年次データと月次データの価格および数量の対前年変化率系列をプールし，条件付きRotterdam Demand System[9]を計測して推定された限界支出比：$\beta_{BF}=0.2679$，$\beta_{PK}=0.1044$，$\beta_{CN}=0.0690$，$\beta_{FH}=0.5587$を充てた。

実質予算効果補整済み数量の変動と顕示選好公理(2)とのconsistencyをテストしたところ，年

© The Ito Foundation

次データではGARPを満たさないオブザベーションは一つも検出されず，データを理論的に根拠づける安定的な効用関数が存在するとする仮説が再び支持された。したがって，**図1**より看取される家計食肉消費パターンのシフトを説明するものは，消費者の嗜好変化ではなく，相対価格と実質予算の水準であると判断してよい。

これに対し実質予算効果補整済み月次データに関し，相異なる2ヵ月のオブザベーションをプールしたデータ・セットをテストした結果は**表1**のとおりであった。表より1月は5月あるいは9月と同じ需要構造であるが，それ以外の月とは消費者の嗜好パターンが異なること，同様の嗜好の月間変異が各月にあること，そして12月は他の月と需要構造を異にすることが判る。月次データでは行事や生活習慣から魚介・肉類総支出額の月間変動が大きいため，実質予算効果を補整しなければ消費者の嗜好に固有な需要の季節性は顕示されなかったのであろう。

プールする月の組合せをいろいろ変えてテストしたところ，GARPを破るオブザベーションが一つもない組合せ，すなわち同一の需要構造を有するとみなせる月の組合せは以下のようになった。

(Feb., Mar., Jun., Aug., Nov.)
(Mar., Jun., Jul., Aug., Nov.)
(Feb., Mar., May, Aug.)
(Mar., May, Jul., Aug.)
(Jan., May, Sep.)
(Feb., May, Sep.)
(Feb., Sep., Nov.)
(Apr., Jun., Aug.)
(May, Jul., Sep.)
(Jul., Sep., Nov.)
(Feb., Oct.), (Apr., Sep.)
(Jul., Oct.)

組合せをみると部分的に特定月が重複しており，データの顕示する嗜好の季節的変位は12月を別とすれば，必ずしも明瞭なパターンを表していない。

## 4. 要　約

家計食肉需要の構造変化および消費者の嗜好変位による需要の季節性の計量経済学的研究は，これまで，或る特定の関数型の需要関数を設定したうえで，そのパラメータを計測し，価格・所得係数以外の推定値を統計学的に検定するというパラメトリック・アプローチを共通して採用しているため，そこでの分析結果は果たして実際に生じた嗜好変化を実証したものなのか，あるいは需要関数モデルの特定化の誤りから生じた見かけ上のものなのか，識別不可能であるという問題があった。

**表1**　食肉需要構造の月間安定性のテスト結果

| | Feb. | Mar. | Apr. | May | Jun. | Jul. | Aug. | Sep. | Oct. | Nov. | Dec. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Jan. | 8 | 7 | 4 | 0 | 4 | 1 | 6 | 0 | 31 | 5 | 1 |
| Feb. | | 0 | 2 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| Mar. | | | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 0 | 2 |
| Apr. | | | | 1 | 0 | 3 | 0 | 0 | 6 | 1 | 3 |
| May | | | | | 1 | 0 | 0 | 0 | 5 | 3 | 9 |
| Jun. | | | | | | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 | 8 |
| Jul. | | | | | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 15 |
| Aug. | | | | | | | | 2 | 5 | 0 | 10 |
| Sep. | | | | | | | | | 1 | 0 | 5 |
| Oct. | | | | | | | | | | 1 | 16 |
| Nov. | | | | | | | | | | | 13 |

注）表中の数字は表頭の月と表側の月をプールしたデータにおいてGARPを満たさないオブザベーション数.

© The Ito Foundation

本研究では，需要関数型について全く前提を置かないノンパラメトリック・アプローチに基づいて，昭和38年～59年の期間にわが国家計の生鮮肉需要に構造変化があったかどうか，また昭和50年代の月次消費動向に消費者の嗜好に固有の食肉需要の季節性が存在するかどうかについて分析した。

分析結果は次のように要約される。

(1) 対象期間における食肉消費パターンのシフトは消費者の嗜好変化に誘発された需要構造の変化によるものではなく，安定的需要構造のもとでの相対価格と実質予算の変化から生じたものである。嗜好変化を検出した既往研究の結果をわれわれの結果に照らして解釈するならば，安定的な真の嗜好のタイプが，そこで採用された需要関数型でうまく捉えられなかったものといえるだろう。

(2) 月次データは実質予算の変動が大であるため，そのままでは嗜好の季節的変位を検証することは困難であった。実質予算の変動効果を補整して再検証した結果，嗜好に固有の食肉需要の季節性が存在することが確められた。なかでも12月は実質予算の増加だけでなく，他の月と需要構造を異にすることによっても特有の食肉需要パターンを示すことが明らかにされた。

## 文 献

1) 内山敏典：農業経済研究，51，127-135，1979.
2) 門間敏幸：牛肉の需給構造と市場対応，第1版，55-65，明文書房，東京，1984.
3) A.S. Deaton and J.Muellbauer: Economics and Consumer Behaviour, 1st edition, 122-128, Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1980.
4) 澤田 学：日本農業経済学会1990年度大会個別報告，1990.
5) S.N. Afriat: Internatinoal Economic Review, 8, 67-77, 1967.
6) H.R. Varian: Econometrica, 50, 945-973, 1982.
7) W.N. Thurman: American Journal of Agricultural Economics, 69, 30-37, 1987.
8) J.A. Chalfant and J.M. Alston: Journal of Political Economy, 96, 391-410, 1988.
9) 澤田 裕：農業経済研究，52，101-109，1980.

© The Ito Foundation

# 食肉卸売市場における牛肉流通の課題

The Problems and Beef Distribution at the Meat Wholesale Markets

宮 田 育 郎 (鹿児島大学農学部)

Ikuro Miyata (Faculty of Agriculture, Kagoshima University)

This report is ready now to analyqe the problems and the facts of beef distribution in the meat wholesale markets. Now, about 60 per cent of the beef that we consume in Japan is produced in the country and about 40 per cent of the beef is imported from other countries.

The meat wholesale markets now handle about 44 per cent of the total carcass of beef which are slaughtered in Japan. About two-thirtds of the beef flowed in the meat wholesale markets are the domestic beef, the remaining one-third are the imported-beef, Fewer the domestic beef flowed through those meat wholesale markets, the imported-beef conversaly is increasing.

Now, the relative stability of the meat wholesale market's management because wholesale price of beef have been rising and quantity of imported beef have been increasing.

If the imported-beef were increasing more rapidly than the domestic demand of beef by the liberalization of the Japanese beef market, the price of domestic beef would go down, and this may affect the management of meat wholesle markets.

Therefore, the meat wholesale market members have to be examined the import system to increase of the import beef and the some unity plan to stabilize to the management of the meat wholesale markets.

## 1. 目　的

わが国の牛肉自由化は，1991年度から始まるが早晩，国内の牛肉流通においても牛肉の商品形態および牛肉流通機構に大きな変化を与えるものと考えられる。現在，牛肉流通の商品形態は牛肉供給地側からみると，生体・枝肉による出荷が主体をなしているが，輸入牛肉は輸送コスト等を考えても部分肉流通が主体をなしてゆくことは当然であり，輸入牛肉の影響を受けて，国産牛肉の商品形態も大部分が部分肉流通に変ってゆき，国産牛肉と輸入牛肉の競争が起ってくるものと考えられる。このように牛肉流通の商品形態が変ってくると，現在，わが国の牛肉流通機構の中で重要な流通チャンネルになっており，また，牛肉の価格形成機能をもっている食肉中央卸売市場の構造が変貌してくるものと考えられる。食肉中央卸売市場の変貌に伴う課題について，現在の食肉中央卸売市場における牛肉流通の実態をふまえながら明らかにしたい。

## 2. 方　法

東京，大阪，京都等の食肉中央卸売市場における牛肉流通の実態と課題解明について収集資料の統計的分析と開設者のヒヤリングによる方法を用いた。

## 3. 結果と考察

### 3.1 食肉卸売市場における牛肉流通

国産牛肉の流通チャンネルは，肉用牛生産者か

© The Ito Foundation

ら集出荷者（主に家畜商等）および集出荷者団体（主に系統農協等）等を経て，大別すると，食肉卸売市場，食肉センター，その他と畜場の３つのと畜場に出荷され，そこから，枝肉・部分肉の形態になって，食肉問屋，食肉量販店，食肉加工業者，全農等によって流通し，さらに食肉専問店，スーパー，生協，Ａコープ，外食企業等を経て消費者へ流通する。肉牛集出荷者および集出荷団体等を経由して出荷された肉牛総出荷量のうち，食肉卸売市場を経由する割合は約34％である。この他に，食肉卸売市場には他のと畜場でと畜されて枝肉になったものが搬入されるので，この般入枝肉を加えると食肉卸売市場の流通シェアは約44％になる。食肉卸売市場には中央卸売市場と指定卸売市場があり，流通シェア約44％のうち23.7％は中央卸売市場，20.4％は指定卸売市場を経由して流通する。食肉中央卸売市場のなかで最大規模の市場は東京都中央卸売市場であり，その市場流通シェアは9.9％ともっとも大きく，次が大阪市中央卸売市場でその流通シェアは4.4％である。

輸入牛肉の流通チャンネルは，現在畜産振興事業団枠ルートと民間貿易枠に基づくルートがあり，事業団ルートの流通量が全体の約９割弱を占める。事業団ルートの輸入牛肉は，食肉卸売市場委託売渡しとSBS等その他売渡しの経路を通じて食肉実需者・団体等へ流通している。現在，輸入牛肉のうち食肉卸売市場を経由する流通量は全体の約30％であり，輸入牛肉の流通のなかでは，もっとも大きなチャンネルになっている。食肉卸売市場を経由する輸入牛肉流通量のなかで東京市場のシェアが23％，大阪市場のシェアが11％を占めており，この両市場のシェアは34％であり，このシェアは両市場の国産牛肉の取扱シェアとほぼ同じである。

3.2　主要な食肉中央卸売市場および部分肉センターにおける牛肉流通

（１）　東京都中央卸売市場食肉市場：東京食肉市場における平成元年の取扱高は約1,418億4,136万円であり，畜種別にその内訳を示すと，牛が87.7％，豚が12.2％であり，この他に馬（81頭），子牛（924頭）が含まれるが，食肉市場の経営・運営は牛が中心になっており，年々牛の比重は高まってきている。牛の取扱高の内訳をみると，生体51.5％，搬入枝肉17.2％，国内部分肉0.5％，輸入部分肉29.5％，副生物1.3％になっており，取扱高では生体，輸入部分肉，搬入枝肉の順序になる。生体取扱高では和牛が約81％を占め，搬入枝肉取扱高では乳牛が約59％を占めており，牛全体の取扱高のなかでも和牛のシェアは49.5％であり，国産牛肉だけの取扱高のなかでは約70％のシェアがある。このように，牛全体の取扱高では和牛，輸入牛肉，乳牛の順序になり，乳牛の取扱高は輸入牛肉の取扱高の約67％である。牛（生体，搬入枝肉）の取扱頭数は，昭和62年をピークに減少しているにもかかわらず，食肉市場の経営・運営にそれほどの問題が発生していないのは，輸入牛肉の取扱増加と60年以降の国産牛肉卸売価格の騰貴によるものである。だから，輸入牛肉の取扱高と国産牛肉の卸売価格の変動は食肉市場の経営・運営にとって重要な要因になっている。

（２）　大阪市中央卸売市場南港市場：大阪食肉市場における昭和63年の取扱高は約548億803万円であり，畜種別にその内訳を示すと，牛が88.8％，豚が11.2％であり，その他に子牛（12頭），馬（１頭）を含んでいるが，牛の取扱いが主体の市場である。牛の取扱高の内訳をみると，国産牛肉が72.2％，輸入牛肉が27.8％であり，国産牛肉は生体取扱いが91.2％，搬入枝肉が8.2％，部分肉が0.7％，輸入牛肉は生体取扱いが2.2％，搬入枝肉が33.5％，部分肉が64.3％である。国産牛肉は生体，輸入牛肉は部分肉，枝肉の商品形態が主体になっているが，最近，国産牛肉では搬入枝肉の取

© The Ito Foundation

扱いが増加しており，輸入牛肉は部分肉の取扱い増加とともに，特に搬入枝肉の取扱いが著しく増加傾向にある。以上の動向をもう少し詳しくみると次のごとくである。和牛は，昭和60年から63年に生体取扱頭数が11%減少したが，卸売価格の騰貴によって，取扱金額は逆に17.6%増加し，搬入枝肉頭数は同期間に3.6倍増加して取扱金額も3.7倍に増加した。乳牛は，同期間の生体取扱頭数にはほとんど変化がなかったが，卸売価格の騰貴によって取扱金額は7.4% の増加になり，搬入枝肉頭数は同期間に3.5倍に増加して取扱金額も3.8倍に増加した。輸入牛肉は，搬入枝肉が61年の884頭から63年には11,009頭と約12.4倍に増加し，その取扱金額は同期間に12.7倍に増加した。部分肉も同期間に重量ベースで2.4倍に増加したが，取扱金額は1.8倍にとどまった。この期間の円高進行の影響を部分肉の取扱金額は示しているが，枝肉は取扱頭数の増加率よりも取扱金額の増加率が大きいので，品質評価のかなり高い枝肉が輸入されていることが判かる。

（3） 京都市中央卸売市場第二市場：京都食肉市場における63年度の取扱高は約178億814万円であり，畜種別にその内訳を示すと牛が91.8%，豚が6.2% 等であり，牛中心の市場である。牛取扱高の内訳をみると，国産牛肉が75.2%，輸入牛肉が24.8%であり，重量ベースでは国産牛肉が63.1%，輸入牛肉が36.9%になる。昭和60年度から63年度の期間に，国産牛肉の取扱頭数は11.8%減少したが，取扱金額は同期間に8.5% 増加した。輸入牛肉の取扱重量は同期間に2.2倍増加したが，取扱金額は円高の影響を受けて約1.9倍にとどまった。国産牛肉の取扱高割合の高い市場であるが，その国産牛肉の内訳を取扱金額でみると和牛が84.8%，乳牛が15.2%となっており，和牛取扱いの高い市場である。

（4） 日本食肉流通センター：通称部分肉センターにおける平成元年の総流通量は18万1,289tであり，その流通量は60年と比較して29.6%増である。畜種別にその内訳を示すと，総流通量の35.3% は国産牛部分肉，31% は国産豚部分肉，33.7%はその他である。牛部分肉は豚部分肉の約3.3倍の価格であるので，取引額からみると牛が主体である。昭和60年から平成元年に至る取引量の推移をみると，牛肉は1.6倍増加し，輸入牛肉の割合が15.4%から19.9%に上昇した。これに対して，豚肉の取引量も1.6倍増加したが，輸入豚肉の割合は13.9%から9.5%に低下した。鶏肉の取引量は1.5倍増加し，輸入割合は3%から4.9%に上昇した。以上のごとく，部分肉センターの食肉流通量即ち牛肉，豚肉，鶏肉等の取引量は著しく増加してきたが，その中でも特に輸入牛肉の取引量が増加傾向にある。

3.3 牛肉の輸入自由化段階における牛肉流通

（1） 牛肉輸入チャンネルの変化予測：わが国の牛肉需給量の約40%（昭和63年）は輸入牛肉に依存しており，今後国産牛肉の供給量はそれほど期待できないから，輸入牛肉への依存度は高まるものと考えられる。輸入牛肉が国の管理制度下にある現在は，牛肉の輸入量が増加してもその流通チャンネルのパイプが太くなるだけであって，流通チャンネルの変化までには到らない。しかし，牛肉の輸入障壁がなくなり，輸入が自由化されるとその流通チャンネルも変化してくることは当然である。先ず，畜産振興事業団によってコントロールされていた牛肉輸入について，輸入商社間の競争が起ってくることになる。今まで現地パッカーとの単なる取引であったものから，日本企業の海外投資・進出による現地での直接生産，開発輸入という段階にはいっており，輸入商社間の競争は激化することになる。海外に投資・進出している日本企業の競争を通じて，輸入牛肉の流通チャンネルは変化する。その変化の第一は，海外投資

© The Ito Foundation

・進出企業と国内の牛肉流通機構との間に新たなパイプが付設され，既存の輸入牛肉の流通チャンネルに変化が起ると予想される。その変化は，現在，畜産振興事業団から特別の割当てを受けている食肉卸売市場と食肉専門店の団体等の輸入牛肉流通で起ってくるものと考えられる。

（2） 牛肉流通への対応：牛肉流通量は国民の牛肉消費量の増加に伴って今後増加してくることになるが，その増加部分の大部分は輸入牛肉に依存することになる。国産牛肉と輸入牛肉との品質格差を現状のままだと仮定した場合，輸入牛肉への依存割合が高まれば高まるほど，国産牛肉の差別化商品としての評価は高まることになる。そこで，次の2つの対応が現われる。1つは牛肉の販売店における差別化戦略として，国産牛肉の需要が増加する。国産牛肉への需要増加が起ると，国産牛肉の卸売価格を押し上げることになる。特に，和牛牛肉は差別化商品として高い卸売価格水準を形成する。2つは，国産牛肉と輸入牛肉の卸売価格の格差の拡大即ち品質格差を縮小するために，国産牛肉になるべく接近した肉質の輸入牛肉を輸入しょうとする試みである。その試みの背景に企業の海外投資の進出があると考えてよい。国産牛肉と輸入牛肉の品質格差があり，国産牛肉の差別化戦略がとりうる限り，国産牛肉と輸入牛肉の流通チャンネルが融合することは困難である。しかし，輸入牛肉の品質向上は時間の問題であり，早晩，輸入牛肉の流通チャンネルに国産牛肉の流通チャンネルは併合されてゆくものと考えられる。その時間の問題は牛肉生産における国内と輸出国の開発技術の進歩の速度にかかってくるだろう。

## 4. 要　約

——食肉卸売市場における課題——

わが国の食肉卸売市場は豚肉生産のインテグレーションの発達に伴って，豚肉市場から牛肉市場へ転換した。豚肉流通は市場外流通が主流になっているが，牛肉流通は市場流通が未だ大きなウエイトを占めている。そして，食肉卸売市場の運営・経営は牛肉の取扱量如何にかかっているといっても過言でない。食肉卸売市場における牛肉取扱量は国産牛肉約7割，輸入牛肉約3割の構成になっているが，次の問題をかかえている。1つは，国産牛肉の取扱量が供給量の減少に伴って減少しつつあり，市場間の取扱量に格差が生じてきていることである。2つは，国産牛肉の取扱量が減少しているにもかかわらず，卸売価格の騰貴によって取扱額が増加し，市場経営の脆弱性を陰蔽していることである。3つは，国産牛肉のなかで，将来，輸入牛肉と競合する乳牛牛肉の取扱量の多い市場と少ない市場の格差が生じていることである。4つは，輸入牛肉の流通量が価格安定制度下において自動的に配分され安定していることである。

以上の諸問題に対する課題をあげると次のごとくである。1つは，食肉卸売市場における国産牛肉の取扱量の増加は，基本的には国産牛肉の供給量の増加に期待しなければならないが，当面の課題として，肉牛生産者・団体等との取引安定化を企るために契約相対取引等の方法を考える必要があり，市場が産地を育成するというシステムの構築である。2つは，国産牛肉の取扱量にそれほど期待がもてないことを前提にすると，牛肉取扱量の増加は輸入牛肉の取扱量増加にかかっているといえる。ところが，輸入牛肉の輸入は企業の海外投資・進出によって市場外流通として進行することが考えられる。輸入牛肉の市場流通を拡大するためには，市場運営者独自の海外投資・進出による輸入が必要である。しかしそれも，国産牛肉の市場流通を安定的に確保しているという条件が不可欠である。3つは，国産牛肉の供給量の不安定性と輸入牛肉への積極的な取組みのなかで，食肉卸

© The Ito Foundation

売市場間に経営的な格差が発生することになり，牛肉の市場流通の拡大と市場経営の安定化を企るためには，既存の食肉卸売市場の統廃合が必要になってくる。食肉卸売市場の整備計画が課題になるだろう。

© The Ito Foundation

# 北海道における乳用種肉牛の流通と経済性に関する研究

The Research on Currency and Economy of Dairy Cattle for Beef in Hokkaido

岩崎 徹・*萬田 富治・**荒木 和秋・***長沢 真史・****須藤 純一
(札幌大学, *北海道農業試験場, **酪農学園大学, ***東京農業大学, ****北海道畜産会)

Tohru Iwasaki, * Tomiharu Manda, **Kazuaki Araki,
***Masashi Nagasawa and ****Junichi Sudoh
(Sapporo University, *Hokkaido National Agricultural Experiment Station,
**Rakuno Gakuen University, ***Tokyo University of Agriculture and
****Hokkaido Livestock Industry Association)

In this survey' we made clear the setup of dairy steer fattening farms in Hokkaido which will be influenced directly by liberalization of beef importation and also made clear the struggle of dairy farms to the liberalization.

Dairy steer fattening farms are influenced by production enuiroment and beef prices. Recently, it is clear that their income have fallen by high price of feeder cattle.

So it is necessary for the stabilization of their management, that feeder cattle and commercial feed are supplied securely. On the other hand it is important that they must make effort to lower the ratio of accidents of feeder cattle and to make effort to raise the ratio of their feed efficiency and the ratio of fattening.

## 1. 目 的

1919年4月から実施される牛肉自由化の影響をストレートに受けると予測されるのが乳用種肥育経営である。しかるに，ここ数年来肉牛市場でのもと畜の高騰が続いており，肥育経営の収益性に大きく影響している。自由化への対応方策やもと畜市場での高値という二重の圧迫が乳用種肥育経営をゆるがしている。以上のことから，乳用種経営の生産構造とその生産環境の影響等を調査し，今後の自由化に向けての対応策を明らかにする。更に，もと畜生産を担う酪農経営サイドでの近年の交雑種生産への取り組みと流通等を調査し，今後の課題等を明らかにする。

## 2. 方 法

調査研究方法は，農協における農家取引調査，更に農家面談聞き取り調査によりその経営内容を把握した。調査対象地は，北海道十勝支庁管内足寄町4戸，および根室支庁管内別海町（中春別農協管内）7戸である。足寄町（開拓農協）は乳用種肥育経営，別海町は酪農経営でもと畜生産を担っている経営を選定した。乳用種経営はその生産構造と収益性を明らかにするため，経営分析を行い，一方酪農経営は単年度の総経営収支把握ともと畜生産（主として$F_1$生産）の現況を調査した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 北海道における乳用種経営の類型

北海道は従来より，広大な飼料基盤を有する酪

© The Ito Foundation

農専業地帯が多いということから，本州都府県への乳用および肉用もと畜の供給基地としての役割を担い今日に至っている。従って，乳用種経営はもと畜生産経営を主体に展開している。最近時での乳用種経営のタイプ別割合を見ると以下のとおりである。（北海道酪農畜産課「肉畜等に関する調査」平成元年２月１日による）

①哺育・育成経営（初生子牛導入，６ヵ月令仕上げ）67.4%（専業比率16.4%）②肥育経営（もと畜導入10ヵ月肥育）20.5%（専業比率28.9%）③一貫経営（初生導入，16～17ヵ月仕上げ）12.0%（専業比率60.8%）の３タイプであるが，①と③の中間型も存在する。近年は哺育・育成経営が減少して一貫経営が増加の傾向を示している。（過去２ヵ年で５%増）

更に注目できるのは，一貫経営が圧倒的に専業比率が高く，頭類シェアーも高い（32%）ことである。したがって，自由化等の影響も深刻である。このようなことから，今度の調査対象も一貫経営に限定した。

### 3.2　足寄町における乳用種経営の生産構造と収益性

（１）　足寄町の概況　足寄町は十勝支庁の東北部に位置する山村地帯で14万 ha という広大な面積を誇っている。しかし，その地形は３本の川によって分断されて山ろく丘陵地が形成されているため，耕地可能地（現在の耕地は１万３千 ha）が少い。河川流域の平坦地で畑作や畑肉が営まれ，戦後開拓された丘陵地に酪農，肉牛経営が展開している。開拓農家が多く，現在でも一般農協と開拓農協がある数少い町村である。

乳用種経営は，開拓農協が先がけて昭和40年頃より開始され，立地条件が悪く耕地の少い開拓農家に導入された。乳用種の他アンガス種，黒毛和種も飼養されている。

今回の調査は，肉牛専業22戸のうち飼養規模大中小，地域の代表的農家４戸を選定して実施した。全戸一貫生産方式で内１戸はアンガス種の繁殖と肥育も行っている。

（２）　調査農家の経営概要　**表１**に調査農家の経営概要を示した。経営装備と投資額は**表２**に整理した。

**表１**では近年の肉牛市場や濃厚飼料価格等の生産環境が大きく変動しているので，その肉牛経営への影響をみるため，61年時と平成元年次の収益性比較を行った。

Ａ農家は中規模に属しているが，地域でも先がけて40年代に乳用種経営を開始している。モデル経営として安定している経営体で，現在２代目に経営委譲されている。Ｂ農家は50年頃からの開始で規模も小さく，運転資金（もと畜導入と飼料購入費）はほとんど借入金に依存している。Ｃ農家は当地域では大規模クラスに位置づけられるが，最近かなり収益性が向上して安定経営にありつつある。Ｄ農家も大規模クラスに入るが，アンガス種の繁殖20頭をも飼養しているため，労働力に余裕がなく飼養管理上問題があると思われ，なお経営経済は安定していない。

各経営とも飼料用地を確保しており，採草利用による乾草を調整してほとんど自給している。**表２**の経営装備にみるように各経営ともトラクターを１～２台所有し，ヘイベーラも自己所有している。ロールベーラーも３戸が所有して近年はほとんどロールに乾草調整されている。

（３）　収益性の年次推移　**表１**の各経営の近年の２ヵ年次の収益性を検討してみる。２ヵ年の単位当たり収益性は，昭和61年に比較して平成元年では大小の差はあるもののいずれの経営でも収益の低下が認められる。

所得の落ち込みは４～６割となって収益性はかなり悪化している。利益率，所得率でみても明らかである。肥育牛１頭当たりでの売上高ではいず

© The Ito Foundation

れも向上しているが，それにもまして費用が増大しており，肥育牛1頭当たりの売上原価でみると1～3割の上昇である。

以上のように生産環境の変化によって短期間での収益性の急速な悪化が乳用種経営にもたらされている。言い換えれば，これほど乳用種経営というものが生産条件に左右され，経営内努力を発揮できる部分の小さい経営体であることを示しているとも言えよう。

（4）　生産構造と収益性要因　では次に，乳用

表1　足寄町農家の経営規模と収益性

| | 年次・農家 / 項目 | 昭和61年 A | 昭和61年 B | 昭和61年 C | 昭和61年 D | 平成元年 A | 平成元年 B | 平成元年 C | 平成元年 D |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 経営規模 | 労働力（人） | 1.8 | 2.0 | 2.8 | 1.4 | 1.8 | 2.0 | 2.8 | 1.4 |
| | 肥育牛飼養頭数（頭） | 296 | 181 | 357 | 337 | 273 | 214 | 342 | 346 |
| | 肥育牛販売頭数（頭） | 203 | 99 | 259 | 11<br>218 | 195 | 135 | 237 | 19<br>225 |
| | 飼料用地（ha） | 16.6 | 9.5 | 13.5 | 27.6 | 16.3 | 9.5 | 15.4 | 33.0 |
| 収益性（単位当たり） | 家族労働力1人当たり所得（千円） | 17,546 | 4,097 | 9,111 | 18,503 | 9,517 | 3,281 | 7,378 | 7,243 |
| | 肥育牛1頭当たり所得（円） | 106,628 | 45,273 | 71,459 | 70,583 | 62,589 | 30,653 | 60,476 | 27,585 |
| | 肥育牛1頭当たり売上高（円） | 356,598 | 298,832 | 372,125 | 328,743 | 374,148 | 341,882 | 382,962 | 353,431 |
| | 肥育牛1頭当たり売上原価（A） | 229,202 | 241,531 | 278,412 | 232,649 | 295,655 | 301,735 | 313,296 | 305,792 |
| | 肥育牛1頭当たり支払利息（円） | 2,152 | 21,411 | 15,662 | 12,643 | 8,969 | 22,278 | 5,297 | 12,457 |
| | 利益率（%） | 21.2 | 6.2 | 15.5 | 19.4 | 12.8 | 0.7 | 11.1 | 5.4 |
| | 所得率（%） | 23.6 | 15.2 | 19.2 | 21.5 | 16.7 | 9.0 | 15.8 | 7.8 |
| 収益性と負債 | 粗収入（売上高） | 105,553 | 54,089 | 132,849 | 110,786 | 102,142 | 73,163 | 130,973 | 122,287 |
| | 総生産費用（千円） | 67,844 | 43,717 | 99,393 | 78,403 | 80,714 | 64,571 | 107,147 | 105,804 |
| | 所得額（千円） | 31.562 | 8,194 | 25.511 | 23,786 | 19,269 | 6,560 | 20,683 | 9,544 |
| | 負債残高 ┌長期（千円） | | | | | 12,231 | 41,269 | 28,971 | 52,916 |
| | 負債残高 └短期（千円） | | | | | 34,479 | 46,097 | 60,923 | 41,455 |
| | 年償還額 ┌元金（千円） | | | | | 5,103 | 3,494 | 11,789 | 12,193 |
| | 年償還額 └利息（千円） | | | | | 2,455 | 4,770 | 1,809 | 4,579 |

表2　経営装備と投資額　　（単位：万円）

| 装備 / 農家 | 建物施設（ ）内は面積 哺育 | 育成 | 肥育 | 草舎 | 農舎 | トラクター 1 | 2 | ショベルローダー | 作業機 ロールベーラー | コンパクトベーラー | 投資額（年償却費） その他 | 建物 | 機械 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | 木造<br>2棟<br>(178) | 軽鉄<br>3棟<br>(673) | 木造<br>4棟<br>(1,295) | D型<br>2棟<br>(396) | 軽鉄<br>1棟<br>(475) | PS<br>75 | PS<br>55 | 有 | 556 | 552 | 8台 | 2,040<br>(167) | 2,133<br>(116) |
| B | 木造<br>2棟<br>(100) | 木造<br>3棟<br>(216) | 木造<br>1棟<br>( 396) | 木造<br>1棟<br>(198) | 木造<br>1棟<br>(100) | 75 | | 有 | (賃料)<br>— | 552 | 3台 | 445<br>(12) | 320<br>(39) |
| C | 木造<br>2棟<br>(356) | 軽鉄<br>2棟<br>(778) | 木造<br>2棟<br>(1,089) | D型<br>2棟<br>(294) | D型<br>3棟<br>(427) | 55 | 79.5 | 有 | 557 | — | 10台 | 5,845<br>(167) | 2,625<br>(116) |
| D | 軽鉄<br>1棟<br>(318) | D型<br>2棟<br>(598) | 軽鉄<br>2棟<br>( 894) | 木造<br>1棟<br>(234) | 木造<br>1棟<br>(100) | 75 | 79.5 | 有 | 555 | 550 | 7台 | 2,625<br>(124) | 2,401<br>(145) |

© The Ito Foundation

表3　売上原価，生産費用内訳と年次推移（肥育牛1頭当たり）

（金額単位：千円）

| 経営 | | | A農家 | | | | | | | | | B農家 | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 年次 | | | 61 | | 62 | | 63 | | H1 | | H1/61 | 61 | | 62 | | 63 | | H1 | | H1/61 |
| | | | 金額 | 比率 | 金額 | 比率 | 金額 | 比率 | 金額 | 比率 | 比率 | 金額 | 比率 | 金額 | 比率 | 金額 | 比率 | 金額 | 比率 | 比率 |
| 売上原価 | 期首飼養牛評価額 | | 152 | | 167 | | 202 | | 217 | | 143 | 149 | | 181 | | 192 | | 190 | | 128 |
| | 当期生産費用 | 種付料 | 0 | | | | | | | | | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | | |
| | | もと畜費 | 60 | 24.7 | 108 | 39.3 | 87 | 34.1 | 137 | 44.5 | 228 | 53 | 19.2 | 96 | 31.9 | 106 | 34.3 | 123 | 40.7 | 232 |
| | | 購入飼料費 | 141 | 58.0 | 116 | 42.2 | 121 | 47.5 | 124 | 40.3 | 88 | 145 | 52.5 | 130 | 43.2 | 136 | 44.0 | 147 | 48.7 | 101 |
| | | 自給飼料費 | 1 | | 1 | | 1 | | 1 | | | 3 | | 3 | 1.0 | 2 | | 4 | | 133 |
| | | 敷料費 | 13 | 5.3 | 13 | 4.7 | 22 | 8.6 | 16 | 5.2 | 123 | 15 | 5.4 | 15 | 5.0 | 26 | 8.4 | 25 | 8.3 | 167 |
| | | 労働費 雇用家族 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | 労働費 雇用家族 | 11 | | 11 | | 11 | | 14 | | | 27 | | 26 | | 25 | | 28 | | |
| | | 労働費 計 | 11 | 4.5 | 11 | 4.0 | 11 | 4.3 | 14 | 4.5 | 127 | 27 | 9.8 | 26 | 8.6 | 25 | 8.1 | 28 | 9.3 | 104 |
| | | 診療・医薬品費 | 2 | 0.8 | 2 | 0.7 | 1 | 0.4 | 4 | 1.3 | 200 | 3 | 1.1 | 3 | 1.0 | 3 | 1.0 | } 4 | 1.3 | } 100 |
| | | 電力・水道費 | } 2 | | } 1 | | } 1 | | } 1 | | | 1 | | | | | | | | |
| | | 燃料費 | | 0.8 | | | | | | | 50 | 3 | 1.1 | 4 | 1.3 | } 1 | | 2 | 0.7 | 67 |
| | | 減価償却費 建物・構築物 | 4 | 1.6 | 4 | 1.5 | 4 | 1.6 | 3 | 1.0 | 75 | | | } 3 | | } 3 | | } 2 | | |
| | | 減価償却費 機器具・車輌 | 3 | 1.2 | 3 | 1.0 | 3 | 1.2 | 3 | 1.0 | 100 | 2 | 0.7 | | 1.0 | | 1.0 | | 0.7 | |
| | | 減価償却費 家畜 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | 減価償却費 草地 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | 減価償却費 計 | 7 | 2.9 | 7 | 2.5 | 7 | 2.7 | 6 | 1.9 | 86 | 2 | | 3 | 1.0 | 3 | 1.0 | 2 | 0.7 | 100 |
| | | 修繕費 | 1 | | 3 | 1.0 | 1 | 0.4 | } 1 | | | 3 | 1.1 | } 1 | | 2 | 0.6 | } 3 | 1.0 | |
| | | 小農具費 | | | | | | | | | | | | | | } 1 | | | | |
| | | 消耗諸材料費 | | | | | | | | | | 1 | | | | | | 1 | | |
| | | 賃料料金その他 | 5 | 2.1 | 13 | 4.7 | 4 | 1.6 | 3 | 1.0 | | 20 | 7.2 | 20 | 6.6 | 4 | 1.3 | 3 | 1.0 | 15 |
| | | 当期生産費用合計 | 243 | 100.0 | 275 | 100.0 | 255 | 100.0 | 308 | | 127 | 276 | 100.0 | 301 | 100.0 | 309 | 100.0 | 342 | 100.0 | 130 |
| | 期中成牛振替額 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 期末飼養牛評価額 | | 167 | | 202 | | 217 | | 229 | | 137 | 184 | | 202 | | 210 | | 230 | | 125 |
| | 売上原価 | | 229 | 64.2 | 243 | 75.7 | 252 | 81.0 | 296 | 79.1 | 129 | 242 | 81.0 | 279 | 82.1 | 292 | 87.5 | 302 | 88.3 | 125 |

© The Ito Foundation

表4　収益性要因分析および安全性

| 要因項目＼経営別年次 | A農家 61 | A農家 62 | A農家 63 | A農家 H1 | B農家 61 | B農家 62 | B農家 63 | B農家 H1 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 労働力1人当たり肥育牛飼養頭数 (頭) | 164 | 161 | 153 | 152 | 91 | 92 | 97 | 107 |
| 肥育牛1頭当たり年間労働時間 (時間) | 17.0 | 16.8 | 14.3 | 14.5 | 24.7 | 24.3 | 23.0 | 20.9 |
| 肥育牛1頭当たり年間飼養管理労働時間 (時間) | 14.0 | 14.8 | 13.2 | 13.3 | 22.9 | 22.5 | 20.0 | 18.1 |
| 飼料生産のべ10a当たり労働時間 (時間) | 1.9 | 1.9 | 2.0 | 2.0 | 2.4 | 4.7 | 4.6 | 4.6 |
| 肥育牛1頭当たり販売価格 (円) | 513,236 | 476,511 | 454,128 | 497,372 | 529,937 | 505,102 | 493,125 | 524,369 |
| 肉牛生体1kg当たり販売価格 (円) | 746 | 694 | 664 | 723 | 742 | 707 | 689 | 731 |
| 実際販売単価（枝肉出荷の場合） (円) | 1,321 | 1,241 | 1,157 | 1,250 | 1,313 | 1,214 | 1,186 | 1,279 |
| 肥育牛1頭当たり出荷時体重 (kg) | 688 | 687 | 684 | 688 | 714 | 714 | 716 | 718 |
| もと牛1頭当たり購入・保留価格 (円) | 67,336 | 80,230 | 120,637 | 149,896 | 79,711 | 72,505 | 110,880 | 136,736 |
| もと牛生体1kg当たり導入価格 (円) | 1,295 | 1,543 | 2,280 | 2,656 | 1,563 | 1,394 | 2,112 | 2,570 |
| 導入時平均もと牛体重 (kg) | 52.0 | 52.0 | 52.9 | 52.6 | 51.0 | 52.0 | 52.5 | 53.2 |
| 年間肥育回転率 (回) | 0.69 | 0.67 | 0.70 | 0.71 | 0.55 | 0.67 | 0.65 | 0.63 |
| 平均肥育日数 (日) | 521 | 519 | 519 | 535 | 519 | 522 | 526 | 523 |
| 販売肥育牛1頭1日当たり増体重 (kg) | 1.22 | 1.22 | 1.21 | 1.19 | 1.25 | 1.27 | 1.26 | 1.27 |
| 対導入頭数事故率 (%) | 7.7 | 13.7 | 11.2 | 9.3 | 10.0 | 6.3 | 11.3 | 2.7 |
| 対常時頭数事故率 (%) | 5.7 | 10.7 | 7.2 | 8.8 | 6.1 | 6.5 | 8.8 | 4.2 |
| 肥育牛1頭当たり施設機器具平均投資額 (円) | 34,459 | 57,020 | 61,108 | 59,542 | 17,891 | 26,534 | 32,756 | 27,286 |
| 肥育牛1頭当たり資金借入残高 (円) | 194,946 | 183,298 | 194,613 | 164,808 | 432,982 | 424,672 | 427,853 | 403,559 |
| 肥育牛1頭当たり借入金償還負担額 (円) | 26,651 | 17,726 | 18,623 | 18,641 | 36,234 | 7,883 | 34,053 | 39,680 |
| 経常所得対借入金償還額比率 (%) | 25.0 | 25.6 | 38.9 | 29.8 | 78.2 | 17.9 | 118.4 | 129.5 |
| 自己資本比率 (%) | 47.6 | 54.8 | 58.9 | 73.2 | - | - | - | △40.7 |

© The Ito Foundation

種経営の生産構造とその収益性に係る要因について，A，B経営を対比しながら詳しく検討する。

**表3**に売上原価の費用構成とその4ヵ年推移を示した。A経営の4ヵ年の飼養規模はほとんど変化なく，B経営では除々に拡大している。最初に当期生産費用の構成比率についてみると，A農家の平成元年次ではもと畜費で45%，購入飼料費で40%両費目で実に全体の85%を占めている。次いで敷料費，労働費，減価償却費である。このように乳用種一貫経営では，費用の9割近くはもと畜費と購入飼料費で占められているというのが大きな特徴である。同時に，これらの費用は経営外の市場条件に大きく支配される費用である。

次に同表により費用の年次推移をみると，もと畜費の上昇率が大きく平成1年では昭和61年の2倍以上の金額となっている。一方，購入飼料費は減少の傾向であるが12%程度の減少率である。なお，当期の生産費用と売上原価では約3割の上昇である。更に売上原価の売上高に対する比率では，昭和61年の64%に対し，平成元年では，79%と15%の上昇となり収益性の低下要因になっている。

**表4**は，A・B農家の4ヵ年の収益性要因と安全性を検討したものである。収益性の低下要因がより鮮明に示されている。第1には，販売価格の減少であり生体kg当たりで3%，枝肉で5.4%の減少となっている。平成元年でやや持ち直しているものの63年での低下が大きい。一方，もと牛の購入価格では生体で約2倍となっている。生産技術的にはA・B農家とも出荷体重，肥育日数，DGおよび肥育回転率等には大きな変化はなく，生産技術は安定していると判断できる。事故率に若干変動が認められるが，これは初生牛の導入時点での子牛の状態（初乳を十分給与され耐病性抗体が備わっているかどうか）に大きく影響されている。一貫経営や哺育育成経営では，この哺育事故率をいかに低く抑えるかが，生産性向上のキーポイントとされている。事故率は5%程度が一応の目標とされているが，供給する酪農家側の管理の問題もあって難しい。

次に安全性にかかわる数値をみる。肥育牛1頭当たりの施設，機械投資額は経営により格差が見られ，資金借入額および償還負担等も同様である。A農家では収益性の低下の中でも自己資本率が着実に向上して安定度を強めている。しかし，B農家では償還負担が上昇して自己資本率はマイナスの状態にある。このように経営間格差の広がりも

**表5**　交雑種肉用牛生産の年次推移　（単位:頭）

| 交雑種区分 | 生産実績 | | | | 63年交配実績 | 元年交配予定 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 60年 | 61年 | 62年 | 63年 | | |
| 乳用×肉専 | 577 | 979 | 1,860 | 7,190 | 9,478 | 9,649 |
| $F_1$クロス | 22 | 29 | 77 | 128 | 308 | 575 |
| 肉専×肉専 | 239 | 232 | 324 | 430 | 468 | 641 |
| 合　計 | 838 | 1,240 | 2,261 | 7,748 | 10,254 | 10,838 |

**表6**　交雑種牛生産の地域区分　（単位：頭）

| 生産＼地域 | 十勝 | 網走 | 釧路 | 根室 | 全道 |
|---|---|---|---|---|---|
| 63年度生産実績 | 1,329 | 1,275 | 1,223 | 1,692 | 7,748 |
| 63年度交配実績 | 1,706 | 1,700 | 1,353 | 2,578 | 10,254 |
| 元年度交配予定 | 1,788 | 1,707 | 1,224 | 2,8943 | 10,838 |

© The Ito Foundation

認められている。

3.3　北海道における交雑種肉牛生産の取り組み状況

肉牛生産振興の１つの柱として進められているのが交雑種生産である。**表5**に過去４ヵ年の北海道における交雑種肉用牛生産の状況を示した。生産は63年に急速に増加しており，63年の交配実績からみて元年以降は一万頭を越える見込みである。これは，行政サイドでの支援体制（補助事業）の影響も大きいが，牛肉自由化に備えた差別化牛肉生産への肉牛生産者側からの要望と，生産を担う酪農家側での高価格販売という両者の利益が一致して意欲的な取り組みが行われているものと考えられる。

交雑種は圧倒的に乳用種×専用種による生産で酪農家がほとんどその生産を担っている。肉専用種では当初は外国種（ほとんどアンガス種）との交配も行われていたが，最近では需要者側での要望もあって黒毛和種が主流となっている。

交雑種生産の地域区分では**表6**にみるとおり，酪農専業地域が多く中でも根室地域での生産頭数の伸びが顕著である。よって，その具体的取り組みを根室地域の中でも積極的に行っている別海町の中春別農協管内での実態を調査した。

（１）　中春別地域の概要と交雑種生産　別海町の中春別地域は，昭和30年代から開始されたいわゆるパイロットファームによる酪農経営が開始された中心地であり，北海道でも有数の酪農専業地

**表7**　中春別農協管内交雑種飼養状況

| 年次 | 戸数 | 頭数 | 内訳 | | | 備考 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | アンガス | 和牛 | クロス(和牛) | |
| 61年 | 4 | 30 | 25 | 5 | | |
| 62 | 9 | 70 | 50 | 20 | | |
| 63 | 30 | 150 | 80 | 70 | | |
| 元 | 53 | 270 | 140 | 130 | | |
| 2 | 72 | 402 | 120 | 200 | 82 | クロスは2戸 |

**表8**　中春別農協管内調査農家の概要

| | 乳牛頭数（頭） | | | | 肥育もと牛 | | 耕地面積（ha） | | | | 労働力（才） | 建物（施設） | | トラクター | | | | 梱包機 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 経産 | 未経産 | 育成 | 計 | ホル種 | 交雑種 | 雑草 | 兼用 | 放牧 | 計 | 男－女 | 牛舎 育成 | 草サイロ 舎 | 1 | 2 | 3 | 4 | ロベールラ | Rシ・ールマン |
| A | 72 | 23 | 60 | 155 | | A5 | 30.7 (9) | 7.5 | 14.8 | 53.0 (62.0) | 48－40 | 650 634 | 300 844 | 80 | 64 | | | － | － |
| B | 70 | 14 | 78 | 148 | | B7 | 50 (6.75) | － | － | 50 (6.75) | 51－45 | | | 79 | | | | S54 | － |
| C | 63 | 7 | 31 | 101 | | A5 | 30 | 10 | 8 | 48 | 43－41 | 847 | 632 | 79 | 79 | 75 | 75 | S59 | － |
| D | 62 | 7 | 40 | 109 | | A B10 | 26 | 12 | 10 | 48 | 38－35 | 847 100 | 100 632 | 79 | 79 | 75 | 75 | S59 | － |
| E | 60 | 10 | 53 | 123 | 18 | | 47.4 | 9.3 | － | 56.7 | 48－47 26－25 | 627 337 | － ×840 | 95 | 70 | － | － | S61 | S63 |
| F | 60 | 6 | 50 | 110 | | B5 | 38 | － | 20 | 58 | 56－54 20－30 | 700 297 | 198 | 79 | 95 | － | － | S52 | S63 |
| G | 48 | 7 | 40 | 95 | | A10 | 20 | 20 | 10 | 50 | 55－53 | 648 297 | 2棟1427 | 90 | 70 | 70 | 87 | S52 | H1 |

注）交雑種，Aはアンガス種，Bは黒毛和種である。

© The Ito Foundation

域である。

中春別農協での交雑種牛生産は**表7**に示すとおりで，61年より自由化への対応として開始された。63年から北海道チクレンとの委託生産契約を結んで計画的な生産が開始されてその伸びも著しい。現在72戸が実施して400頭の交雑種が生産され育成されている。その生産方式は次のとおりである。

① 乳牛では初産牛と後継対象外の牛で生産する。

② $F_1$ ♂は3～6ヵ月令で販売（経営の条件により生まれ落ち販売と3～6ヵ月令育成販売とがある。）

③ $F_1$ ♀は種付後分娩2ヵ月前に販売される。

④ $F_1$ 対象牛はアンガス種と黒毛和種とし難産防止を基本とする。

（2） 肉牛生産農家の経営概要　**表8，9**に調査農家の経営概要と生産状況および収支概要を示した。7戸のうち1戸のみ乳用種の肥育もと牛生産であり，他は交雑種生産を行っている経営である。7戸は全戸新酪農村により入植あるいは規模拡大移転した経営であり，地域の大規模経営に属している。しかし，各経営とも頭数規模に比較して耕地面積が少いという近年の北海道酪農の特徴も示されている。元年時での出荷乳量は300ｔ以上で5戸が400ｔを越えている。粗収入では経営により格差があり，2,500万から5,000万と差がつき，所得でも650万から，1,500万と大きな格差が現われている。

また，負債も多額かつ経営によってかなりの差が認められる。これが，年間の元利償還額の差となっている。多少の差はあるものの，負債の償還が経営経済を圧迫していることは明らかであり，苦しい経営内容が高付加価値による個体販売に意欲的に取り組む契機となっていると考えられる。

草地酪農地帯における交雑種牛生産の今後の課題としては次のように整理される。

**表9**　中春別農協管内調査農家の生産と収益性の状況

| | 出荷乳量(t) | | | 個体販売（S63，頭） | | | | | 粗収入 | | 支出 | | | 償還額(年間万) | | 負債額(万) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 61 | 62 | 63 | 1 | 乳雄 | 経産孕み | 廃用 | 初妊 | 育成 | もと牛 | うち生乳 | 計 | うち飼料費 | うち賃料費 | 計 | 所得 | 元金 | 利息 | 63年始 |
| A | 366 | 393 | 368 | 410 | 28 | — | 11 | 5 | 3 | — | — | — | — | — | — | — | | | |
| B | 376 | 435 | 362 | 452 | 30 | — | 6 | 3 | 8 | — | 3,731 | 5,161 | 1,461 | 644 | 4,406 | 755 | 894 | 343 | 11,000 |
| C | 331 | 342 | 341 | 420 | 30 | — | 5 | — | — | — | 2,713 | 3,283 | 704 | 408 | 2,233 | 1,050 | 684 | 467 | 12,293 |
| D | 293 | 305 | 286 | 375 | 23 | — | 2 | — | — | — | 3,025 | 3,416 | 805 | 430 | 2,292 | 1,124 | 687 | 342 | 15,000 |
| E | 356 | 404 | 384 | 462 | 40 | — | 20 | 12 | — | 180 | 3,722 | 5,213 | 1,147 | 251 | 3,705 | 1,508 | 1,110 | 1,259 | 8,500 |
| F | 310 | 312 | 338 | 361 | 20 | — | 20 | — | — | — | 2,984 | 3,511 | 695 | 355 | 2,631 | 880 | 414 | 1,291 | 5,524 |
| G | 366 | 393 | 368 | 410 | 20 | 7 | 5 | — | 16 | — | 1,947 | 2,477 | 1,826 | 198 | 1,826 | 651 | 688 | 432 | 7,459 |

注）支出の中に組勘分支払利息を含む。

© The Ito Foundation

表10　牛肉自由化が一貫経営の収益性に及ぼす影響（肥育牛1頭当たり）（単位：千円）

| 経営・影響 / 損金 | | A農家 元年実績 | A農家 影響① | A農家 影響② | A農家 対応 | B農家 元年実績 | B農家 影響① | B農家 影響② | B農家 対応 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 売上高 | | 374 | 318 | 299 | 299 | 342 | 291 | 274 | 274 |
| 売上原価 | もと畜費 | 137 | 116 | 110 | 60 | 123 | 105 | 98 | 58 |
| | 購入飼料費 | 124 | 124 | 124 | 124 | 147 | 147 | 147 | 147 |
| | その他 | 47 | 47 | 47 | 47 | 52 | 52 | 52 | 52 |
| | 当期費用合計 | 308 | 287 | 281 | 231 | 334 | 304 | 297 | 257 |
| | 売上原価 | 296 | 276 | 270 | 222 | 294 | 268 | 261 | 226 |
| 売上総利益 | | 78 | 42 | 29 | 77 | 48 | 23 | 13 | 48 |
| 経常利益 | | 48 | 26 | △1 | 47 | 10 | △15 | △25 | 10 |
| 経常所得 | | 63 | 40 | 15 | 62 | 30 | 5 | △5 | 30 |

注）①影響①は売上高が15%減少し，同時にもと畜費も15%低下した場合
②影響②は売上高が20%減少し，同時にもと畜費も20%低下した場合
③対応は影響②の場合に元年実績並の所得を得るためのもと畜費を通算した場合
④損益計算の購入飼料費とその他費用および事業外収支は元年実績並に固定して所得を計算した。

① 粗飼料基盤の有効活用という視点からアンガス種を重点としていたが，最近の黒毛和種の需要によって，その生産体系を考えなければならなくなっている。

② アンガスの$F_1$は粗飼料の利用性が高いが，和牛$F_1$は低く，また病気等にも弱いため事故の発生がある。

③ 価格体系の構築が難しい。もと畜の価格は肥育販売価格を予測して設定せざるを得ない。とくに，粗飼料主体の牛肉生産の場合には流通面での問題が大きく，付加価値評価が一定しない。

3.4　自由化の影響

自由化の影響を前項乳用種一貫経営のA，B農家をモデルに試算したものが**表10**である。A農家はほぼ安定した経営状態にあるが，B農家はなお負債も多く自己資本率がマイナスで運転資金はほとんど借入によっている。自由化の影響①は売上高が15%減少した場合であるが，A農家の場合には元年実績の63%の所得に減少し，B農家では実に20%以下に減少する。更に影響②では売上高が20%減少した場合であるが，A農家では，24%に所得が減少したが，B農家は欠損である。以上の対応としては，一貫経営の場合の生産費用の約4～5割を占めるもと畜の購入価格が問題であるので，影響②の場合に元年実績並の所得を得るためのもと畜費への支出可能額を逆算した。この試算では両経営とも6万程度のもと畜費であれば自由化によって売上高が20%減少しても元年水準の所得が得られることが示唆された。

## 4. 要　約

牛肉の自由化の影響をストレートに受けると予測される北海道における乳用種肥育経営の生産構造と，酪農経営における自由化への対応策の取り組みについて調査を実施した。

乳用種一貫経営の生産構造は，生産還境や取引条件（市況）の変動に大きく影響を受けるという特徴を持っている。とくに，近年のもと畜費の高値が大きく経営に影響しており，収益性を悪化させていることは明らかである。乳用種肥育経営の安定化のためには，もと畜と飼料の安定した供給

© The Ito Foundation

が不可欠であり，経営内努力としては事故率の抑制と増体効率の向上更には肥育回転率の適正化（一貫経営の場合には０７程度）が重要である。

© The Ito Foundation

# 豚枝肉出荷成績の要因分析

Multiple Regression Analysis on the Shipping Ratings of Pork Carcass

石岡宏司・新井肇（東京農業大学）

Hiroshi Ishioka and Hajime Arai (Tokyo University of Agriculture)

The original data on pork carcass we collected in 1987 came from thirty local hog farms including twelve items for each carcass: for example unit price, average weight, standard deviation of average weight, unit price of excellent (Jo) quality meat on shipping day, average loss of market unit price and so on.

These items can be classified into three categories;

① Marketing techniques to cope with market conditions; ② Quality control techniques to get better prices; and ③ Carcass weight control techniques, and these groups are independent of each other.

In order to define the factors affecting the unit price, we computed multiple regression equation (forward selection method) of which the response variable (Y) was the unit price and the rest of items were explanatory variables. These computations resulted in the identification of three most effective factors. The following conclusions were obained:

1. The multiple regression equation was as follow:

$$\hat{Y} = -60.563 + 1.067X_1 + 0.323X_2 - 1.211X_3$$
$$(0.046)\quad (0.033)\quad (0.340)$$

Where, $X_1$ was the unit price of "Jo" on shipping day, $X_2$ the proportion of "Jo" meat to the total amount shipped, and $X_3$ the standard deviation of the average weight.

2. The adjusted coefficient of multiple determination ($\bar{R}^2$) was 0.967, indicating that 96.7% of the total variations in the unit price could be explained by the three variables included in the equation. and the standard error 0.963.

3. Standardized regression coefficients were 0.833, 0.439 and −0.158 respectively for the variables $X_1$, $X_2$, $X_3$.

As the result of these coefficients, the unit price of "Jo" on shipping day was the most important factor for the improvement of the unit price.

## 1. 目　的

養豚経営の収益性の最大の要因は生産コストであるが，販売単価の差もそれに次いで大きく，これに対応するためには出荷技術の改善が課題で，その具体的な改善方法を得るためには肥育豚出荷時に得られる各種の技術指標を分析する必要がある[1,2]。出荷成績各指標間にはそれぞれ因果関係，相関，代替性等があるが，出荷成績の最終的な指標を平均枝肉単価とし，それを構成する要因を個々の指標間の相関関係からではなく，各指標の総合的な成果として捉えて枝肉単価の要因分析を試み，出荷技術の具体的な改善方法に接近する。

## 2. 方　法

分析対象は，1987年におけるA県の一貫経営30戸の肉豚枝肉成績の農家別集計値である。なお，出荷豚はすべて同一市場に出荷され，その出荷総頭数は25,968頭で，繁殖豚の廃用は含まれていない。対象とした出荷成績を示す指標は出荷頭数の

© The Ito Foundation

他に，１頭当たり平均販売額，平均枝肉単価，平均枝肉重量，平均枝肉重量の標準偏差，出荷日上物単価，高値月出荷頭数割合，平均格落額，上物率（極上含），中物率，並物率，等外物率の11項目である。これらの各指標をその因果関係によって整序すると１頭当たり平均販売額を構成する技術指標は，**図１**に示すように出荷のタイミングを示す①市場対応技術，製品の品質を示す②品質管理技術，出荷適期を示す③狭義出荷技術（出荷適期決定技術）の３つの独立した指標群（カテゴリィ）に分けられる[2)]。これら独立した指標群の中から，出荷成績の最終的な目標である「平均枝肉単価」を構成し，これに影響を与える要因で，経営者が管理し得る（operationalな）指標を分析対象として重回帰分析の適用を試みた。

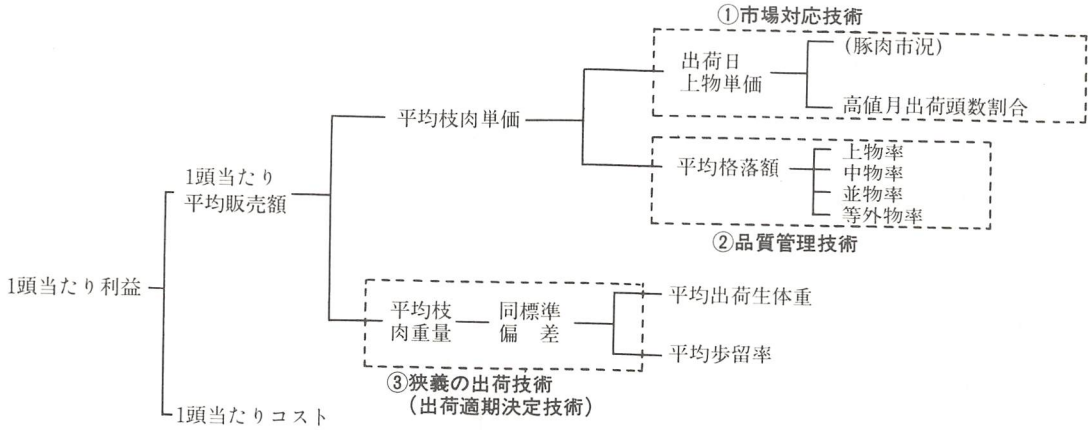



**図１**　出荷成績を構成する各指標の因果関係

**表１**　出荷成績の概況

| | 平均値 | 最大値 | 最小値 | 標準偏差 | 変動係数 |
|---|---|---|---|---|---|
| ⑴出荷頭数（頭） | 865.6 | 1,900.0 | 407.0 | 406.9 | 0.47 |
| ⑵１頭当たり販売額（円） | 33,399.7 | 34,453.0 | 31,611.0 | 620.4 | 0.02 |
| ⑶平均枝肉単価（円） | 477.6 | 486.8 | 464.3 | 5.3 | 0.01 |
| ⑷平均枝肉重量（kg） | 69.9 | 71.8 | 67.3 | 1.1 | 0.02 |
| ⑸同標準偏差（kg） | 4.6 | 6.2 | 3.2 | | |
| ⑹出荷日上物単価（円） | 494.9 | 501.8 | 486.5 | 4.0 | 0.01 |
| ⑺高値月出荷頭数割合（%） | 55.3 | 64.0 | 41.1 | 5.3 | 0.10 |
| ⑻平均格落額（円） | 17.1 | 23.1 | 12.5 | 3.1 | 0.18 |
| ⑼上物率（%） | 49.1 | 60.6 | 32.2 | 7.1 | 0.14 |
| ⑽中物率（%） | 40.4 | 55.9 | 30.9 | 5.3 | 0.13 |
| ⑾並物率（%） | 8.5 | 14.4 | 3.5 | 2.5 | 0.30 |
| ⑿等外物率（%） | 2.0 | 5.5 | 0.7 | 1.0 | 0.49 |

注）A県一貫経営30戸を集計，年間出荷頭数25,968頭（1987年）

© The Ito Foundation

## 3. 結果および考察

### 3.1 出荷成績の概要

一貫経営30戸の出荷成績の概要は次のとおりである(**表1**)。出荷総頭数は25,968頭で，最大1,900頭，最小407頭，平均865.6頭となっている。

「1頭当たり販売額」の平均は33,399.7円であるが，最大値と最小値の差は2,842円ある。

「平均枝肉単価」の平均値は477.6円で，最大値と最小値に22.5円の差がある。これは，市場対応と品質管理の技術格差の表れである。

「平均枝肉重量」の最大値と最小値には4.5kgの差があり，「平均枝肉重量の標準偏差」も最大値6.2kg，最小値3.2kgで，枝肉重量にかなりのバラツキがある。

「出荷日上物単価」は，出荷日にこれが高いほど有利な市場対応をしたことを示す。平均値は494.9円で，最大値，最小値の差は15.3円ある。したがって，この差額と平均枝肉重量を用いて1頭当たりの差額を求めてみると1,069.5円となり，市場対応の如何によってこれだけの差がでることになる。

「高値月出荷頭数割合」の最高は64%で，全出荷頭数の64%を「高値月」に出荷していることを表している。最小値は41.1%で，農家間に格差がみられるが，平均値は55.3%，標準偏差が5.3%と，過半数の肉豚が高値月に出荷されている。なお，高値月出荷頭数割合とは当該食肉市場における月別平均価格（上物）が年間平均価格（上物）を上回った月に出荷した頭数の割合（各農家の年間出荷頭数に対する）である。因みに，当年度の出荷市場の年間平均価格は498.7円[3)]であった。

「平均格落額」は，品質管理技術に属し，最大値と最小値の格差は10.6円で，変動係数も0.18と他の指標と比べると比較的高く，バラツキの大きさを示している。

表2　出荷成績各指標間の単純相関係数

| | (1)出荷頭数 | (2)1頭当たり平均販売額 | (3)平均枝肉単価 | (4)平均枝肉重量 | (5)同標準偏差 | (6)出荷日上物単価 | (7)高値月出荷頭数割合 | (8)平均各落額 | (9)上物率 | (10)中物率 | (11)並物率 | (12)等外物率 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| (1)出荷頭数 | 1.000 | | | | | | | | | | | |
| (2)1頭当たり販売額 | -0.116 | 1.000 | | | | | | | | | | |
| (3)平均枝肉単価 | 0.057 | 0.533** | 1.000 | | | | | | | | | |
| (4)平均枝肉重量 | -0.185 | 0.801** | -0.079 | 1.000 | | | | | | | | |
| (5)同標準偏差 | 0.157 | -0.628** | -0.574** | -0.338 | 1.000 | | | | | | | |
| (6)出荷日上物単価 | -0.058 | 0.288 | 0.819** | -0.242 | -0.177 | 1.000 | | | | | | |
| (7)高値月出荷頭数割合 | 0.098 | 0.105 | 0.722** | -0.393* | -0.182 | 0.816** | 1.000 | | | | | |
| (8)平均格落額 | -0.174 | -0.549** | -0.666** | -0.178 | 0.763** | -0.118 | -0.188 | 1.000 | | | | |
| (9)上物率 | 0.205 | 0.418* | 0.513** | 0.131 | -0.629** | -0.025 | 0.115 | -0.921** | 1.000 | | | |
| (10)中物率 | -0.213 | -0.423* | -0.311 | -0.278 | 0.529** | 0.177 | -0.037 | 0.769** | -0.912** | 1.000 | | |
| (11)並物率 | -0.132 | -0.231 | -0.595** | 0.147 | 0.549** | -0.161 | -0.161 | 0.820** | -0.785** | 0.480** | 1.000 | |
| (12)等外物率 | 0.014 | -0.153 | -0.513** | 0.180 | 0.298 | -0.356 | -0.218 | 0.425* | -0.314 | -0.015 | 0.533** | 1.000 |

注）A県一貫経営30戸を集計，年間出荷頭数　25,968頭（1987年）　*P<0.05　**P<0.01

© The Ito Foundation

「上物率」「中物率」「並物率」「等外物率」も品質管理技術に属し，「上物率」の最大値60.6%，最小値32.2%，「中物率」の最大値55.9%，最小値30.9%と農家間にかなりの差があり，これらの格付等級が格落額に大きく影響する。

3.2　各指標間の相関（**表2**）

出荷成績を構成する3つの独立した指標群の内，①市場対応技術の指標である出荷日上物単価は，これが高ければそれだけ市場価格の高い日に出荷したことを示している。この指標と平均枝肉単価は0.819，高値月出荷頭数割合とは0.816と強い相関関係を示し，品質と共に高値時出荷が高値販売に結びついていることを示している。②品質管理技術に属する平均格落額は少ないほど品質の良いことを示し，この指標の原因指標である上物率と−0.921，中物率と0.769，並物率と0.820の強い相関関係を示しているが，結果指標である平均枝肉単価と−0.666，同標準偏差と0.763の相関関係が認められ，出荷枝肉重量の管理が収益性に強く影響することを示している。③狭義出荷技術（出荷適期決定技術）を表す平均枝肉重量は，1頭当たり平均販売額と0.801の強い相関関係がある。しかし，同標準偏差は平均格落額と0.763，上物率と−0.629と相関関係が認められるので，枝肉重量のバラツキ度合が格付等級を介して格落額に影響することを示している。

3.3　枝肉単価の要因分析

養豚経営の最終的目標を1頭当たり利益とするのか，1頭当たり販売額に置くかという問題はあるが，本稿では出荷成績から得られたデータの中から「平均枝肉単価」を目標指標とする。これに影響を与える要因で，経営者が管理し得る指標として3つの独立した指標群の中から，説明変数として①市場対応技術から「出荷日上物単価」を$X_1$，「高値月出荷頭数割合」を$X_4$，②品質管理技術から「上物率」を$X_2$，③狭義出荷技術（出荷適期決定技術）から「平均枝肉重量」を$X_5$，「平均枝肉重量の標準偏差」を$X_3$として，「平均枝肉単価」を目的変数Yとする推計式を求めた。また技術指標を推計式へ組込むに当たって，各指標の推計値への寄与を評価するために，これらを対象として重回帰分析の手法を適用した[4~6]。なお，重回帰式の推計に当たっては変数増加法を用いた。

3.4　回帰からの残差平方和

説明変数の増加にともなう回帰からの残差平方和は，**表3**に示すように説明変数を$X_1$から$X_5$まで増加させると268.342から23.792へ減少しているが，$X_4$，$X_5$の組込みによる減小は極めてわずかである。決定係数は説明変数を組込むにともない，0.671から0.971へ増加しているが，$X_4$，$X_5$の組込みによる増加は余り顕著ではない。自由度調整済決定係数は，説明変数$X_1$，$X_2$，$X_3$を組込

**表3**　説明変数の増加による残差平方和

| 説明変数 | 回帰からの残差平方和 $\sum(y_1-\hat{y}_1)^2$ | 決定係数 $R_2$ | 自由度調整済決定係数 $\bar{R}_2$ | 回帰からの分散 $S'e^2$ | 回帰からの標準誤差 Se | 左の自由度 (n-p-1) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| $X_1$ | 268.342 | 0.671 | 0.660 | 9.584 | 3.096 | 28 |
| $X_1$, $X_2$ | 35.932 | 0.956 | 0.957 | 1.331 | 1.154 | 27 |
| $X_1$, $X_2$, $X_3$ | 24.131 | 0.970 | 0.967 | 0.928 | 0.963 | 26 |
| $X_1$, $X_2$, $X_3$, $X_4$ | 23.798 | 0.971 | 0.966 | 0.952 | 0.976 | 25 |
| $X_1$, $X_2$, $X_3$, $X_4$, $X_5$ | 23.792 | 0.971 | 0.965 | 0.991 | 0.996 | 24 |

但し，説明変数　$X_1$：出荷日上物単価，$X_2$：上物率，$X_3$：平均枝肉重量の標準偏差
$X_4$：高値月出荷頭数割合，$X_5$：平均枝肉重量

© The Ito Foundation

むにともない0.660から0.967へ増加しているが，$X_4$，$X_5$の組込みによって逆に0.965へ減少している。

3.5　残差分散の変動比

説明変数を取込むにしたがって残差平方和がどの程度減少するのかを，回帰からの残差平方和と回帰からの分散を用いて残差分散の変動比$F_j$で求めてみると，$X_1$に$X_2$を取込んだ段階では174.613，$X_1$，$X_2$に$X_3$を組込むと12.716，$X_1$，$X_2$，$X_3$に$X_4$を組込むと0.350，$X_1$，$X_2$，$X_3$，$X_4$に$X_5$を組込むと0.006になる。この変動比の計算結果をF分布に基いてF検定すると，$X_1$に$X_2$を取込んだ場合の変動比は174.613で，$f_1=1$，$f_2=27$であるから$F_0(\alpha=1\%)=7.68$である。有意水準$\alpha$での回帰の有意性は，

$$F_j \geqq F^1_{n-k-1}(\alpha)$$

であるので，説明変数$X_2$の取込みは有意である。同様に，$X_1$，$X_2$に$X_3$の組込みも変動比が12.716で，$f_1=1$，$f_2=26$，$F_0(\alpha=1\%)=7.72$であるから有意である。しかし，$X_1$，$X_2$，$X_3$への$X_4$の組込みは変動比0.350，$f_1=1$，$f_2=25$，$F_0(\alpha=1\%)=7.77$，$X_1$，$X_2$，$X_3$，$X_4$への$X_5$の組込みは変動比0.006，$f_1=1$，$f_2=24$，$F_0(\alpha=1\%)=7.82$となり，説明変数の追加は有効でない。したがって，「出荷日上物単価」「上物率」「平均枝肉重量の標準偏差」までが1％水準では有効と判断され，推計式に説明変数として組込まれる。

3.6　標準回帰係数

また，各説明変数の寄与を評価するために説明変数$X_1$，$X_2$，$X_3$，$X_4$，$X_5$，目的変数Yを平均0，分散1の標準化したうえで標準回帰係数を求めると，$X_1$：出荷日上物単価＝0.833，$X_2$：上物率＝0.439，$X_3$：平均枝肉重量の標準偏差＝－0.158，$X_4$：高値月出荷頭数割合＝－0.038，$X_5$：平均枝肉重量＝－0.003となる。したがって，説明変数として高値月出荷頭数割合，平均枝肉重量を取込んだとしても目的変数Yへの寄与は非常にわずかである。

3.7　平均枝肉単価の推計式

以上，回帰からの残差平方和，自由度調整済決定係数，残差分散の変動比，標準回帰係数の計算結果から平均枝肉単価を目的変数Yとした推計式には，説明変数$X_1$：出荷日上物単価，$X_2$：上物

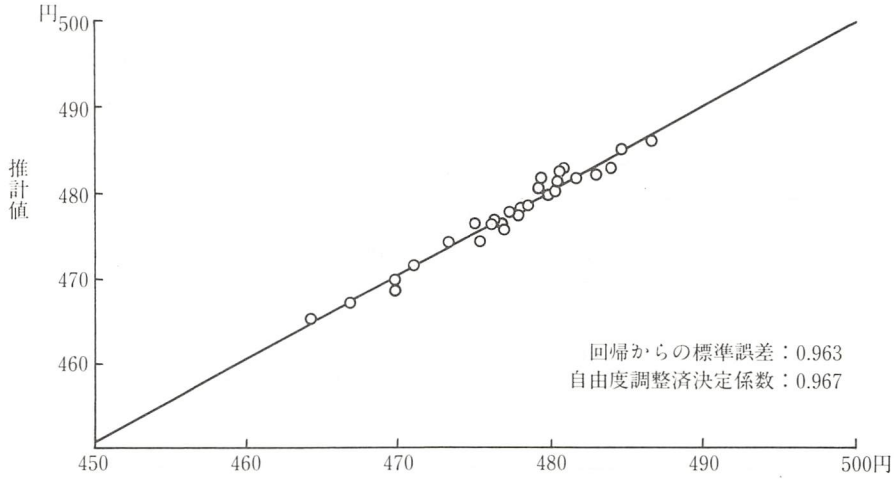



**図2**　平均枝肉単価と推計値の関係

但し，$Y=-60.563+1.067X_1+0.323X_2-1.211X_3$

（0.046）　（0.033）　（0.340）

© The Ito Foundation

率，$X_3$：平均枝肉重量の標準偏差が取込まれる。この推計式の定数項，回帰係数を求めると，定数項：−60.563，$X_1$ の回帰係数：+1.067，$X_2$ の回帰係数：+0.323，$X_3$ の回帰係数：−1.211となる。したがって，推計式は次のようになる。なお，括弧内の数字はそれぞれの標準誤差である。

$$\hat{Y}=-60.563+1.067X_1+0.323X_2-1.211X_3$$
$$(0.046)\quad(0.033)\quad(0.340)$$

$R^2=0.970$，$\bar{R}^2=0.967$

$Se=0.963$，$d.f=26$

平均枝肉単価とこの求められた推計式によって計測された推計値の関係は**図2**のとおりで，回帰からの標準誤差は0.963円とあてはまりが良い。

以上，標準回帰係数の計測結果から，平均枝肉単価を高めるためには，上物単価の比較的高い（枝肉市況の良い）時期に出荷する市場対応技術が一番重要で，次いで上物率を高めるという品質管理技術，更に枝肉重量のバラツキを小さくする狭義の出荷技術が重要で，いずれの指標も経営者がコントロールし得るものである。

また，重回帰式による推計式が実際値とよく一致することから，この推計式を用いて出荷時期，出荷技術の格差やその変動に対応して枝肉販売単価がどのように変動するかの予測が可能である。

## 4. 要　約

(1) 平均枝肉単価を構成する要因としては出荷日上物単価，上物率，平均枝肉重量の標準偏差の3つが説明変数として有効である。

(2) これら3つの説明変数の平均枝肉単価に対する寄与を標準回帰係数により求めると，その値の高いのは出荷日上物単価（0.833）で，次いで上物率（0.439），平均枝肉重量の標準偏差（−0.158）の順となる。

(3) これらの説明変数からなる重回帰式の自由度調整済決定係数は0.967，回帰からの標準誤差は0.963円である。

(4) この推計式から出荷時期，出荷技術格差やその変動に対応した枝肉販売単価の予測が可能である。

### 文　献

1) 新井　肇・石岡宏司：昭和63年度食肉に関する助成研究調査成果報告書 Vol. 7，509-515，伊藤記念財団，1989
2) 新井　肇・石岡宏司：日養会誌，26-3，225-231，1989
3) 農林水産省：食肉流通統計，1987
4) 堀内徳高：統計調査の理論と方法，農林統計協会，1979
5) 堀内徳高：統計情報入門，農林統計協会，1988
6) 田中　豊・垂水共之・脇本和昌編：パソコン統計解析ハンドブックⅡ多変量解析編，共立出版，1984

© The Ito Foundation

# 国際化時代の牛肉の生産・流通・消費に関する計量経済的研究

Econometric Studies on Beef Production, its Distribution and Consumption in an Internationalizing Period

甲 斐 諭（九州大学農学部）

Satoshi Kai (Faculty of Agriculture, Kyushu University)

The Japanese Government decided to open the door on beef imports to exporters in April 1991. This decision shook the Japanese beef industry. One of the main survival strategies for Japanese beef industry is to expand the production of high quality beef at a low cost.

The purpose of this study is to analyze beef production, its distribution and consumption in an internationalizing period. For this purpose, surveys of producers, retailers and consumers of beef by interview method were made at kyushu region and Okinawa prefecture. Especially, a questionnaire was held involving 361 consumers in Fukuoka city and Naha city.

The 361 consumers were divided into two groups, depending on the purchasing circumstances of imported beef; 206 consumers in Fukuoka city under a circumstance of non-liberalized import system, and 155 consumers in Naha city where consumers can purchase imported beef under a circumstance of semi-liberalized import system. Once collected, the questionnaires weres analyzed with econometric methods by the aid of a large-sized electronic computer:

The main results of this study are summarized as follows.

1. An imported beef was welcomed by the majority of consumers in Naha city. In contrast, in Fukuoka city most consumers did not want to buy more imported beef.

2. A retail margin of a domestic beef at super markets computed about 31～34 %.

3. A retail margin of an imported beef at department stores computed about 34 ～40%.

4. Earnings of one labor day in fattening cattle farm depended entirely on prices of a feeder cattle purchased and a carcass sold.

5. We estimated that a future price of a feeder calf after the liberalization of beef import system would be about 350,000 yen per head.

6. Therefore it is very important for Japanese beef industry to reduce the production cost of feeder calf to 350,000 yen per head.

## 1. 目 的

平成３年４月から牛肉の輸入が自由化されるが，現在，既に輸入牛肉は11万トン程度の滞貨があると聞く。輸入牛肉はなぜ売れ残るのか。流通段階でのマージン率はどの程度か。高い子牛を購入した肥育牛経営は大丈夫か。子牛価格と枝肉価格とはどのような関係になっており，どの程度まで下落すると考えられるのか。また，子牛の生産費はどの程度まで節減する必要性があるのかなどにつ

© The Ito Foundation

いて，消費者段階，小売段階，肥育牛経営段階，繁殖牛経営段階と牛肉供給システムの流れを消費者の方から繁殖牛経営段階までさかのぼりながら検討することにする。

## 2. 方　法

牛肉輸入自由化前後の消費者ニーズを検討するために消費者調査を実施した。自由化前の状況把握のために福岡市内の消費者206人に対して食肉購買行動に関するアンケート調査を実施した。また，自由化後の消費者ニーズの変化を予測するために沖縄県の消費者155人に対してアンケート調査を実施した。沖縄は復帰特別措置によって既に牛肉消費量の90%が輸入牛肉である。従って，沖縄の消費者の輸入牛肉に対する意向を調査すれば，輸入自由化後の消費動向を若干でも把握できると考えた訳である。もちろん，沖縄では伝統的に豚肉を多く食べていることや本土との所得格差があること，また，現在，沖縄では本土よりも高品質の牛肉が輸入されているという多くの背景の違いがあることを認識しておく必要がある。

## 3. 結果および考察

### 3.1 輸入自由化後の消費者ニーズの予測

輸入牛肉についての感想を示した**表1**を検討してみよう。味については，沖縄では35%の消費者が「おいしい」と回答し，「まずい」と回答した人は1.7%に過ぎない。一方，福岡の場合は「おいしい」が14.7%，「まずい」が20%に達していた。

品質については，沖縄では「良い」が22.9%，「悪い」は3.4%に過ぎないが，福岡では「良い」が13.3%，「悪い」は12%であった。しかし，価格については沖縄では「高い」が11.9%あり，福岡の8%より高くなっている。

以上のように，牛肉の輸入については既に自由化状態になっている沖縄では，福岡より輸入牛肉の味，品質に対してかなり好意的な回答をしており，また，本土からみればかなり安く購入できているにもかかわらず，輸入牛肉に対して「高い」という回答が多くなっていた。

**表1**　輸入牛肉についての感想

味について　（単位：%）

| | おいしい | まずい | 普通 | わからない | 合　計 |
|---|---|---|---|---|---|
| 沖　縄 | 35.0 | 1.7 | 60.8 | 2.5 | 100.0 |
| 福　岡 | 14.7 | 20.0 | 54.7 | 10.7 | 100.0 |

品質について

| | 良い | 悪　い | 普通 | わからない | 合　計 |
|---|---|---|---|---|---|
| 沖　縄 | 22.9 | 3.4 | 66.9 | 6.8 | 100.0 |
| 福　岡 | 13.3 | 12.0 | 57.3 | 17.3 | 100.0 |

価格について

| | 高い | 安　い | 普通 | わからない | 合　計 |
|---|---|---|---|---|---|
| 沖　縄 | 11.9 | 16.1 | 64.4 | 7.6 | 100.0 |
| 福　岡 | 8.0 | 38.7 | 46.7 | 6.7 | 100.0 |

現在，本土に輸入されている牛肉は沖縄より品質が劣っているが，我が国の各商社が米国や豪州で展開している日本人向けの牛肉が輸入されることになれば，本土の消費者も現在の沖縄のような輸入牛肉に対して好意的な回答をするものと推測される。

### 3.2 消費者の要望

将来，価格が安くなった場合の牛肉の購入量の変化をみたのが**図1**である。将来，価格が安くなった場合に消費者が購入量を「増やしたい」と思っているのはやはり国産牛肉であり，輸入牛肉については60～70%が購入量は「変わらない」と回答している。

しかし，輸入牛肉についてみると「増やしたい」という意向は福岡が18.1%であるのに対して，沖縄では30.8%になっている。ここでも輸入牛肉に対する認識の格差が大きいといえよう。

安くなったら国産牛肉を「増やしたい」という

© The Ito Foundation

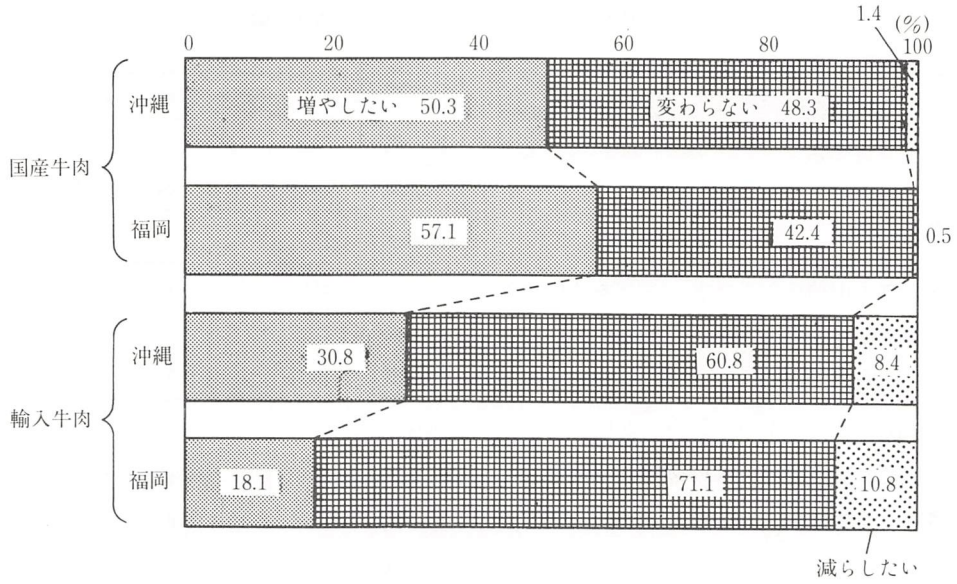



**図1**　安くなった場合の購入量の変化

意向が多かったので，国産牛肉を低コストで供給することが今後の課題であることがわかる。では，消費者はどの程度の価格の引き下げを期待しているのであろうか。現在の国産牛肉の100ｇ当たり購入価格は350円前後が多いが，将来は200円前後の価格を期待していることがわかる。それは，ちょうど現在の輸入牛肉の価格水準であり，それが一応の努力目標となっているといえよう。

消費者が生産者に対して要望していることをみると安全性に関する意見が最も多く，成長ホルモン剤や害のある飼料の使用を中止してほしいと具体的に回答している。これはマスコミによって報道されたECとアメリカとの間で展開された女性ホルモン入り牛肉の輸入論争が多分に影響しており，輸入牛肉の安全性に不安を感じている消費者が多いことを示している。

以上の消費者に関するアンケート調査から，国産牛肉が生き残っていくためには，安全な牛肉を低コストで供給していくことが重要であることが明らかになった。

では次に，牛肉流通の流れを川上に一段さかのぼり，牛肉小売店について検討しよう。

### 3.3　スーパーの仕入れ価格と販売価格および値入れ率

牛肉の小売段階における実態はあまり明らかではない。**表2**に示す小売店の仕入れ価格と販売価格およびマージン率（スーパーの場合は値入れ率）は福岡市に立地している地元大手資本のAスーパーとBデパートの実態である。Aスーパー，Bデパートともここ2～3年，牛肉の販売額が増加し，豚肉，鶏肉の比重が急速に低下している。

Aスーパーの仕入れ価格と販売価格および値入れ率をみてみよう。和牛肉の仕入れ価格は部分肉で1キログラム当たり2,650円である。部分肉から精肉への歩留まり率は81.5％であるので，精肉1キログラム当たりの販売原価は3,250円となる。この精肉を1キログラム当たり4,750円で販売するように本部は各店舗に指示しているので，値入れ率は31.5％となる。乳用種牛肉の場合は1,970円の部分肉を仕入れ，それを86.2％の歩留まりで精肉に仕上げ，1キログラム当たり3,440円での販売を指示しているので，値入れ率は33.5％である。

© The Ito Foundation

表2　小売店の仕入れ価格と販売価格およびマージン率

（単位：円／kg，％）

| | | | 仕入れ価格 | 販売原価 | 販売価格 | マージン率 | 備　考 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| スーパー | 国産牛肉（部分肉購入） | 和　牛 | 2,650 | 3,250 | 4,750 | 31.5 | セット |
| | | 乳用種 | 1,950 | 2,285 | 3,440 | 33.5 | セット |
| デパート | 国産牛肉（枝肉購入） | 和　牛 | 2,100 | 3,818 | 5,000 | 23.6 | スライス |
| | | 乳用種 | 1,350 | 2,455 | 3,500 | 29.9 | スライス |
| | 輸入牛肉（部分肉購入） | 米国産 | 2,700 | 3,176 | 4,800 | 33.8 | ステーキ |
| | | 豪州産 | 1,500 | 1,807 | 3,000 | 39.8 | ステーキ |

注：スーパーの場合のマージン率は値入れ率である。

### 3.4　デパートの仕入れ価格と販売価格およびマージン率

Bデパートでは国産牛肉は枝肉で購入し，輸入牛肉は部分肉で購入している。国産の和牛のマージン率は23.6％で，乳用種は29.9％である。また，米国産輸入牛肉のマージン率は33.8％で，豪州産は39.8％になっている。このように仕入れ価格の安い牛肉の方が高いマージン率を達成できるのである。

輸入牛肉の増加に伴い，消費者の間に牛肉に対する安値感が定着し，国産牛肉の小売価格にも，高級牛肉を除けば，一定程度の上限が設定されたような形になり，枝肉市況の上昇に連動して小売価格を高く設定できなくなった結果，国産牛肉のマージン率はあまり高くできなくなったのである。

一方，現在のところ輸入牛肉の場合は輸入量が制限されているため，小売段階では和牛価格に連動して小売価格を比較的高く維持でき，仕入れ価格の安い輸入牛肉ほど高いマージンを確保することができたものと理解できる。

このように輸入牛肉の方が利益率が高いことが明らかになったが，このマージン率の高さが輸入牛肉の滞貨の1つの原因と考えられる。

### 3.5　肥育牛経営におけるもと牛価格と枝肉価格および収益性の関係

子牛価格が高値で推移している。平成2年2月の宮崎市の子牛市場では若干低下したものの平均50万円であった。子牛価格は，県外の大口需要者や県外の高値子牛購入者が来場しなかったり，早く帰ってしまうと安くなる傾向にある。

さて，高いもと牛を購入した肥育牛経営の収益性はどうなるのか心配になる。現在（平成2年3月）購入されている子牛は平成3年の9月前後に出荷されるので，自由化後の出荷であり，そのときの経営状況が気掛かりである。そこで肥育牛経営におけるもと牛価格，枝肉価格，収益性との関係を明示したのが**図2**である。分析の前提は現在肥育されている肥育牛の生産費はもと牛価格を除いて昭和63年の生産費と同じであるという仮定が設けられていることに注意する必要がある。50万円という高いもと牛を導入し，しかも枝肉価格が1キログラム当たり2,000円でしか出荷できなければ1日当たり家族労働報酬は8,000円程度にしかならないものと推測される。もし，2,200円で出荷できれば約2万円の収益にはなると予想される。和牛の場合2,000円の枝肉価格はA—3の格付けであろう。この格付けでは収益性は低いので，A—4で2,200円以上の枝肉を生産すれば50万円の高いもと牛を導入しても収益性は確保される。高品質牛肉の生産が不可欠の条件である。また，もと牛価格が40万円と60万円の場合の枝肉価格と1日当たり家族労働報酬との関係を図示しておいた。

### 3.6　子牛価格の趨勢予測

© The Ito Foundation

現在高値が続いている子牛価格はどのように変化するのか，**図3**を用いて検討しよう。まず精肉価格，枝肉価格，もと牛適正購入価格の関係を検討する。この図の作成には次のような仮定が設定されている。①卸売段階と小売段階との合計マージン率は27パーセント，②枝肉から精肉への歩留まり率は60パーセント，③肥育牛経営は最低6,000円の1日当たり家族労働報酬を確保するよう肥育もと牛を購入するものとする。

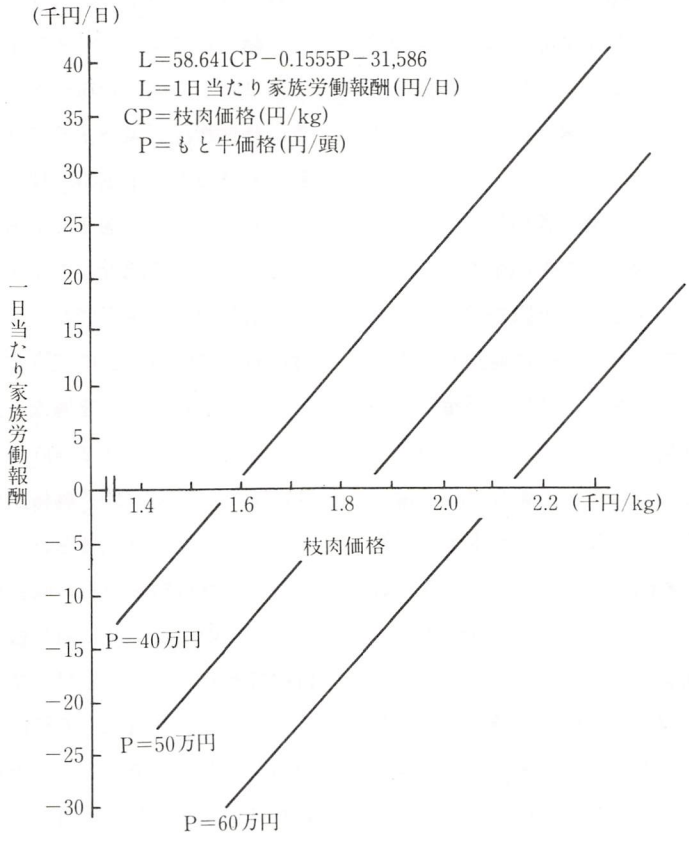
和牛の牛肉は小売価格で100グラム当たり457円程度であるが，これを枝肉価格に換算すると1キログラム当たり2,000円になる。もし，この枝肉価格で肥育牛が販売可能であれば，肥育牛経営は子牛を1頭当たり50万円程度で購入するのが適正である。

もし精肉価格が20％下落するなら，小売価格は365円まで下落し，それに対応して枝肉価格は1,600円に低落するであろう。この水準でしか枝肉が販売できないとすると肥育牛経営は子牛1頭を35万で購入しなければ自分の収益（6,000円の1日当たり家族労働報酬）が確保できなくなる。

現在，50万円程度で推移している子牛価格は，輸入自由化によって精肉価格が20％下落すれば，35万円まで下落する危険性がある。

3.7　子牛生産費の節減

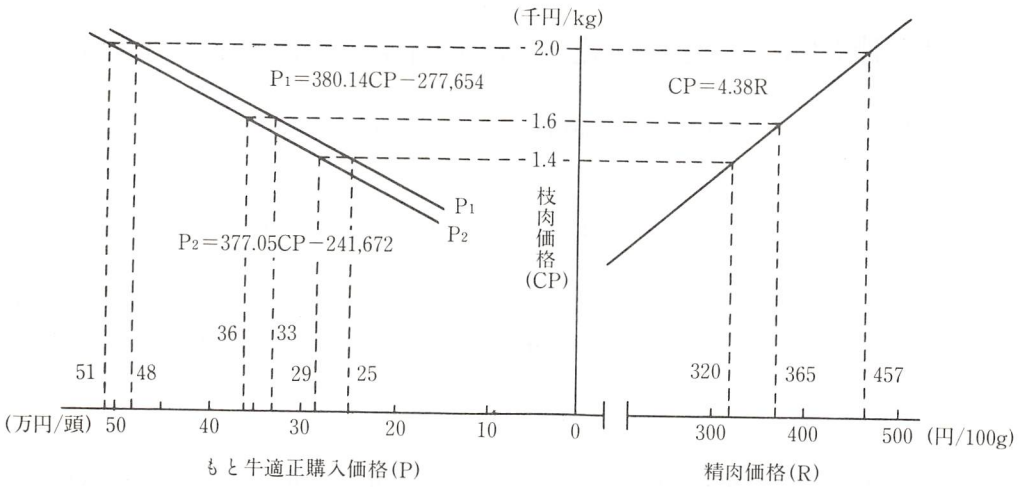
和子牛の第2次生産費（昭和63年度）は農林水




資料：農水省『昭和63年畜産物生産費調査報告』1989年より作成。

**図2**　和牛大規模肥育経営（68.8頭）におけるもと牛価格，枝肉価格，1日当たり家族労働報酬との関係

© The Ito Foundation




注：肥育牛経営の規模は$P_1$(平均規模) が14頭、$P_2$(大規模) が68.8頭である。
図は、肥育牛経営が1日当たり家族労働報酬を最低6,000円確保するためのもと牛適正購入価格を示す。
資料：農水省『昭和63年畜産物生産費調査報告』1989年より作成。

**図3**　和牛肉の精肉，枝肉，子牛の価格関係

産省統計情報部の『畜産物生産費調査報告』によれば，全国平均で42万33円であるが，これを繁殖牛の頭数規模別にみると，2～4頭層（2.8頭）では42万7,347円，15頭以上層（25.9頭では34万3,665円になっている。この最大規模層と最小規模層との生産費格差は，主に労働時間の格差に起因する飼育労働費の格差，および自給飼料費の格差に基いていると考えられる。多頭化による労働時間の省力化と自給飼料増産による飼料費の節減が和子牛生産費節減のキーポイントといえよう。従って，繁殖牛経営の多頭化には粗飼料生産基盤の拡充が不可欠で，そのためには通年舎飼い地帯では耕地面積の集積が必要である。

そのような事例として南九州のC経営を紹介しよう。和牛の成雌牛37頭，育成牛21頭，子牛32頭の計90頭が飼養されているが，経営耕地面積は598a（うち借地190a）であり，牛舎は中古鉄骨材，間伐材などを利用して，減価償却費の引き下げに努め，運動場は広くとり，運動を良くさせているので，繁殖成績も良好（平均分娩間隔は11.7ヵ月）で，子牛1頭当たり生産費は25万5,062円に節減されていた。

このような多頭化による子牛生産費の節減を図ることが重要である。

## 4. 要　約

既に自由化状態にある沖縄の消費者に対して輸入牛肉に関する意向を調査したところかなり好意的な回答がえられ，将来は本土においてもこのような状況が発生するものと考えられる。また50万円する高いもと牛を導入した肥牛経営は2,200円以上の枝肉価格を維持しなければ経営危機に直面することを明示した。

従って，輸入牛肉との競争を回避するには高品質の牛肉を低コストで生産し，輸入牛肉との製品差別化を図ることが重要な課題となる。また，最悪の場合，子牛価格が35万円程度に下落する危険性があるので，土地集積を図り，多頭化により35万円程度まで子牛生産費の節減を図ることが重要である。

© The Ito Foundation

# 牛肉輸入自由化が東北地帯の牛肉生産に及ぼす影響

The Effect of Beef Liberalization on Beef Production at Tōhoku Area

堀田和彦・*植野歩未（東北大学農学部，*岩手県庁）

Kazuhiko Hotta and *Ayumi Ueno
(Faculty of Agriulture, Tohoku University and *Iwate Prefectural Office)

The effects of trade liberalization on the demand, supply and trade of beef in Japan recieved increaseing attention during the last decade, as the U.S. and Japan engaged in heated and tense negotiations on beef trade issues. One of the most important findings rests on the realization that continuation of a rise in Wagyu female calf price is caused by changing the Wagyu female calf supply structure. According to the investigation of the Isawa Town, where is one of the most typical Wagyu female calf production areas in Iwate Prefecture, recently, in spite of rising the Wagyu female calf price, farmers who produce middle (5-10 heads) and samll (1-5 heads) class Wagyu female calf can not increase the supply of female calves. The main reasons are as follows. (1) A lot of farmers feel anxious about beef trade liberalization and they become pessimistic to increase their production a scale. (2) Many of small class farmer's age are old and some of them have retired every year. (3) Wagyu female calves are bought by feeding operation farmers for feeding. As a result, Wagyu female calf can not remain for breeding.

## 1. 目　的

米の生産調整等，主要農産産物が過剰局面にある現時点において，牛肉生産が農家経済レベル，国民経済レベルに占める重要性は益々高まると考えられる。しかし，1991年に牛肉完全自由化を控えており，まさに現在わが国の畜産経営は重大な岐路にたたされている。特に黒毛和種繁殖経営は，その経営の零細性，飼料基盤の脆弱性と相まって，自由化後に予測される枝肉価格，子牛価格の下落により大きな影響を受けるものと思われる。本研究の課題は，繁殖経営および子牛価格の分析を通じて現時点における自由化の影響を明らかにし，さらに自由化以降の展望を個別経営的対応と地域的対応にわけ探るものである。

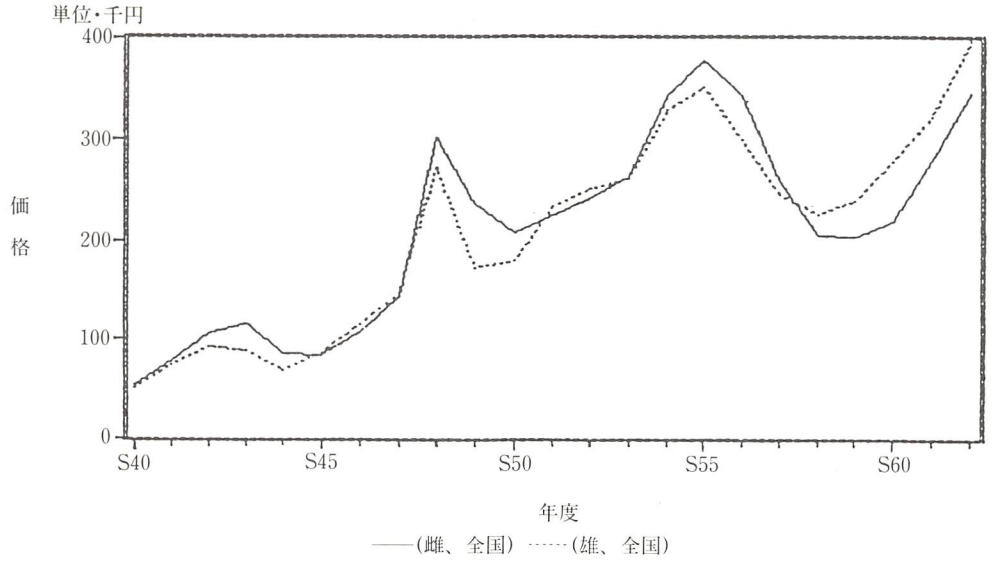
## 2. 分析方法

価格分析においては統計的手法を用い，経営分析においては岩手県胆沢郡胆沢町で行った事例分析を基に論を進める。

## 3. 結果と考察

和子牛価格の変動には一定の周期が存在しており，これは一般にはビーフサイクルといわれる（図1）。わが国の牛肉経済は肉用牛では，和牛の子牛は繁殖農家によって9～10ヵ月齢程度育成され雌牛の一部は将来の繁殖用母牛として残されるが，大部分は農協等が開いている地域の子牛市場に出荷される。その市場における需要者は牛の性別によって異り雄牛は肥育農家，雌牛は繁殖農

© The Ito Foundation



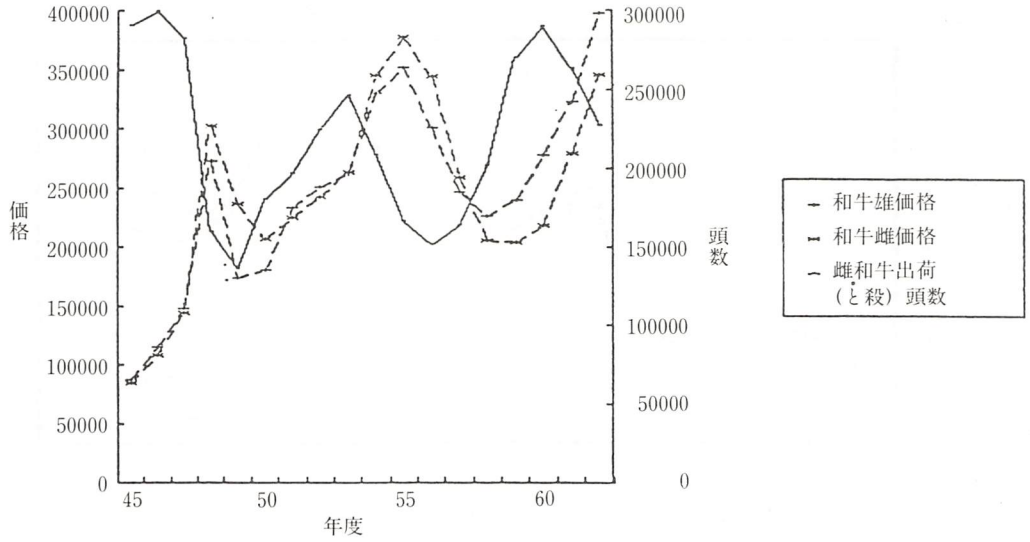

資料）農村物価賃金統計

**図 1**　和子牛価格の推移

家となる。肥育農家が購入した雄牛は29ヵ月齢程度まで肥育され，家畜市場，家畜商，農協等集出荷業者によって販売される。一方繁殖農家によって購入された雌牛は，16ヵ月齢になると最初の種付けができその妊娠期間は約９ヵ月，分娩後１～３ヵ月ほどの空胎期間の後次の種付けが行われる。これを繁殖雌牛は繰り返し，およそ６産か７産で廃用となり，３ヵ月ほどの肥育の後，肉用牛として出荷される。このように牛肉経済内部には繁殖経営，肥育経営という２つのタイプの経営が存在し（一部に一貫経営が存在するものの），牛肉市場にも29ヵ月齢の肥育牛と雌廃用牛の２種が存在している。繁殖経営の肥育経営に対する等質点は，いま述べたように子牛市場の供給者であり需要者である点，牛肉市場に占める廃用牛の割合が決して小さくない点，また飼養頭数が零細で飼養管理も高齢者や婦人に依存している点等があげられる。以上概観したようにこの牛肉経済内部において，牛肉や子牛の供給量の調整に関し牛の生理的特性に起因して技術的に一定の時間が要求されること，および農家の生産の拡大や縮小が将来ではなく現時点での価格に基いて決定されること，この点がビーフサイクル発生のメカニズムであるといわれる。このメカニズムを簡単にあらわすと，①価格の下落→（数年間のタイムラグ）→繁殖農家の母牛の濁汰→枝肉供給量の増大，②価格の下落→母牛の濁汰→（19ヵ月のタイムラグ）→子牛生産の減少→子牛価格の回復，③子牛生産の減少→（38ヵ月のタイムラグ）→枝肉供給量の減少→枝肉価格の回復，というふうな３つのルートを通じてビーフサイクルとして発現する（**図2**）。この前提には，農家の価格に対する鋭敏な反応が措定されている。わが国におけるビーフサイクルの周期は，騰貴４～５年，下落３～２年の７年周期を示してきたことが種々の研究によって明らかにされている。

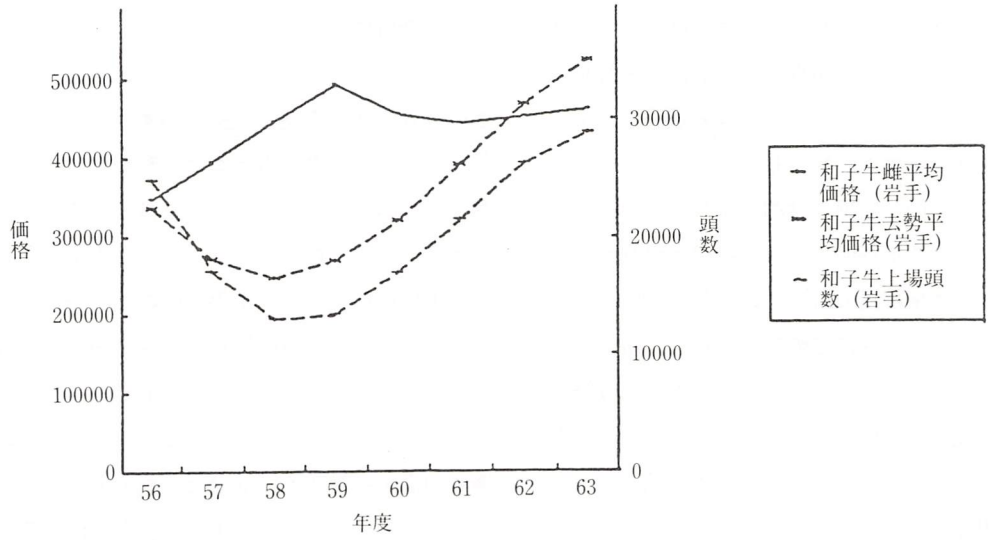
だが現在，子牛価格は高騰を呈してから６年目という上昇過程を持続しており，従来のビーフサイクル理論にはないある種の要因が牛肉経済内に存在していることを示唆している（**図3**）。高子牛価格の要因を需要面と供給面に分け考えてみると，まず需要面では現在の堅調な枝肉価格に支えられた肥育農家の飼養意欲の向上があげられる。

© The Ito Foundation




資料）食肉流通統計，農村物価賃金統計

**図 2**　和子牛価格と雌牛出荷頭数の変化（全国）




資料）岩手県経済連「和子牛市場取引成績書」

**図 3**　和子牛価格と上場頭数の変化（岩手）

一方供給面では，昭和50年代後半から盛りあがってきた牛肉自由化論議のために繁殖農家が将来への不安から繁殖母牛の濁汰の時期を早めたため，59年以降繁殖母牛の頭数が急減したことがあげられる。しかし子牛価格が高騰している現在においても，子牛上場頭数が増加していないことは，供給面，つまり繁殖農家になんらかの供給阻害要因が存在していると考えられる。この供給阻害要因を，岩手県胆沢郡胆沢町の事例分析を基に明らかにしていく。

岩手県の肉用牛生産は，昭和61年時点において鹿児島，北海道，宮崎に次いで全国４位の地位を

© The Ito Foundation

確立している。このうち黒毛和種の繁殖部門だけをみても，江差市，胆沢町等の胆沢市場を中心とした資質型地域，北上市等花北市場を中心とした増体型地域，紫波町等中央市場を中心とした資質・増体混合型地域，一関市等磐井市場を中心とした増体・資質混合型地域，遠野市等遠野市場を中心とした放牧牛を含む地域等とその地域の市場によって特色が出ており，多様性に富んでいる。こうした地域性はその地域毎に改良方針の違いが大きく現れている。調査地点の胆沢町は，胆沢市場を中心とした資質型の子牛を生産する地域で，子牛価格も県全体を大きく上回り，将来高級牛肉となる子牛が多い（図4）。この胆沢町でも，現在子牛価格は上昇過程にあるが，市場の上場頭数は増えず逆に減少している。そのため子牛価格はビーフサイクルには適合せず，全国と同様上昇過程が持続しており調査地として適当であると思われる（図5）。岩手県の南西部に位置する胆沢町の農業生産の中心は米で，農業粗生産額の約6割を占めるに至っている。ついで畜産部門の子牛，肉牛，肉豚，そして野菜等と続いている。繁殖経営をみると，最近の子牛高を反映して粗生産額に占める割合は高まってきているものの，その規模は一戸当たり3.09頭という飼養頭数で，全国平均3.3頭に比べ少し零細であることが確認できる。また飼養戸数は年々減少傾向にあり，飼養頭数も

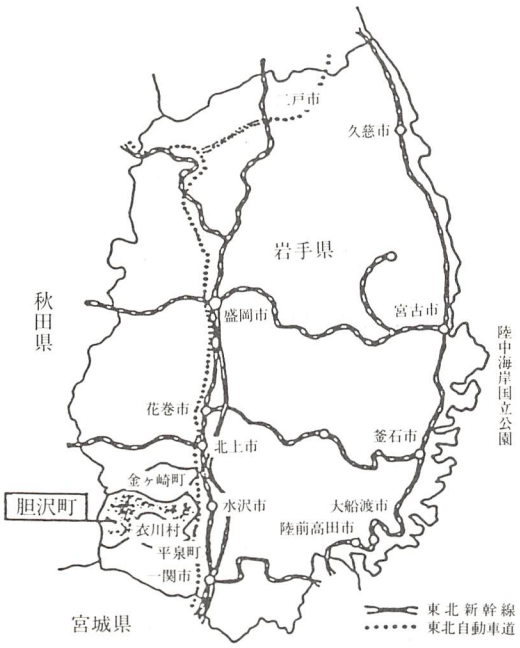
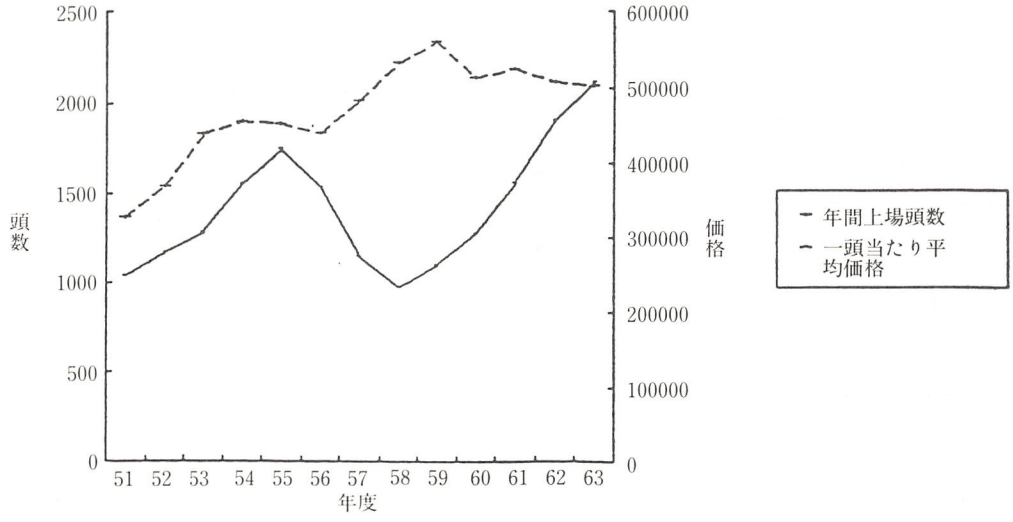



図 4




資料）胆江和牛育種組合発会式正基礎牛調査関係資料

図 5　和子牛市場（胆沢町）の上場頭数と価格のサイクル

© The Ito Foundation

微減している。胆沢町では昭和34～35年頃より役牛として黒毛和種が飼育開始された。子牛生産が増えてきた昭和38年から将来の和牛の取引は，斉一性，品質，多頭数が条件になるとして，産地の拡充を期すべく，江差市，胆沢町を中心として生産される子牛を「陸中牛」と命名して銘柄の確立に努めてきた。昭和50年には3農協が合併し，現在の胆沢町農協が誕生，54年には胆沢町原種牛規定が制定され，胆沢町でも本格的に原種牛事業が開始された。それまでは，隣の江差市と子牛の一頭当たりの平均価格に大きな差があったが，55年以降その価格差は縮まり，価格の底から上昇過程に入った58年以降わずかながらも江差市を上回っている。また平成元年より，5年ぶりに島根から繁殖素牛を導入し，兵庫系で確立された資質型の牛に，肉質もいいが増大型でもある島根系の牛をかけて肉質もよく体重もある新たな子牛の品質の確立を目指している。これは自由化の影響を多分ににらんでのものと思われる。

最近の胆沢町の繁殖経営の飼養戸数の規模（飼養頭数）別の動向は，価格の動きに関連させると二つの新たな流れというべき変化が観察される（**表1**）。一つは，最近の価格の上昇に関係なく毎年一定数の脱落・離農していく経営が存在しているということである。この脱落農家は，大多数が1～2頭の小規模層であることが確認された。いまだ1～4頭の小規模層の牛が全体の約2/3を占めており，小規模層の価格支持力が強いことを考えると，この動きは牛肉経済に大きな影響を与えていると考えられる。二つ目として全階層の動きとして，価格上昇過程にもかかわらず規模縮小の動きが観察できた。これは，価格が上昇し始めた時期では農家は雌牛を増やそうと試みるが，価格が高くなりすぎると雌牛の更新をひかえる農家がある程度存在していると考えられる。従来の理論では，価格が上昇すれば繁殖農家は飼養意欲が高

**表1**　胆沢町の子取り用雌牛の飼養戸数と飼養頭数の動向

| 飼養戸数 | S58 | S59 | S60 | S61 | S62 | S63 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1-2頭 | 603 | 11 | 50 | 50 | 22 | 31 |
| | | 545 | 513 | 513 | 473 | 416 |
| 3-4頭 | 397 | 47 | 18 | 50 | 18 | 26 |
| | | 442 | 411 | 365 | 383 | 425 |
| 5-9頭 | 134 | 2 | 13 | 4 | 16 | |
| | | 135 | 144 | 140 | 139 | 125 |
| 10頭以上 | 25 | 1 | 4 | 1 | 2 | |
| | | 26 | 30 | 30 | 31 | 29 |
| 計 | 1159 | 1148 | 1098 | 1048 | 1026 | 995 |

| 飼養頭数 | S58 | S59 | S60 | S61 | S62 | S63 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1-4頭 | 2082 | 2083 | 2006 | 1898 | 1890 | 1999 |
| 5-9頭 | 749 | 767 | 845 | 821 | 834 | 728 |
| 10頭以上 | 294 | 324 | 364 | 356 | 371 | 347 |
| 計 | 3125 | 3174 | 3215 | 3075 | 3095 | 3074 |

資料）胆沢町農協内部資料より作成

© The Ito Foundation

まり，供給過剰になり価格が下がり出すまで繁殖雌牛は増加し，子牛の生産も進むはずであった。しかし，上述の動きによって，市場への供給が減っており，さらなる子牛価格の上昇を生んでいる。総括すると，いまだ価格支持力の強い小規模農家の離農，価格上昇時における雌牛更新の手控え，この二つの動きが和子牛の上場頭数の増加を妨げ，現在の子牛高を招いている。それぞれに，供給阻害要因というべきものの存在が対応しており，その要因は従来の理論には存在しない新たな変化であろう事が，推測できる。

まず，小規模層の変化を考察する。元来繁殖牛飼養には，子牛生産の他にも様々な機能が存在する。農地として利用できない山林原野等の資源の有効活用，堆厩肥生産と稲藁の利用という交換体系等の役割が，小規模経営にとっては子牛生産に優るとも劣らない機能であり，これを抜きにはわが国の規模の零細性云々を語ることはできない。また，高齢者，婦人の飼養管理者に占める割合が大きく，高齢者，婦人の就業機会の確保という性格も繁殖経営はもっている。胆沢町のある集落の事例調査では，小規模農家（１～３頭）の世帯主並びに後継者は，近隣の水沢市に恒常的な兼業先をもっており，飼養管理者はほとんどが高齢者である（**表２**）。子牛生産を目的とした繁殖経営というよりも，就業機会確保等先に述べた他の役割が，この集落の繁殖経営では重要であると考えられる。しかも，この高齢飼管理者は現在引退の時期にきているのだが，引き継ぐべき後継者が恒常的勤務者でありまたその経営の零細性等の理由で存在しておらず，飼養管理者の引退＝繁殖経営からの撤退という構図で，現在の小規模層の離農が進行していることがこの調査で確認された。全国レベルにおいても，小規模農家が和子牛供給に占める割合は高く，しかも小規模階層において高齢化の進行が急速であることが統計的に確認でき，全国レベルにおいても同様の事態が進んでいることが推測される。

一方，価格上昇過程時における雌牛更新の手控えという現象は，胆沢町に存在する大規模繁殖経営（常時15頭以上）の動向で説明していきたい。この大規模層は価格上昇過程にある現在，拡大農家と縮小農家の２つのタイプに分化し始めている（**表３**）。20頭以上の農家は拡大に向かい，それ以下の農家は逆に経営を縮小し10頭前後に向かう傾向が顕著に認められた。この傾向が現れてきた61

**表２**　胆沢町若柳Ｓ集落における黒毛和種繁殖農家の経営概況

| 農家（世帯主年齢） | 飼養管理者（年齢） | 飼養頭数 | 水田面積(ａ) | 兼　業 | 備　　考 |
|---|---|---|---|---|---|
| ①　(62) | 世帯主　(62) | 1 | 88 | × | 息子他出 |
| ②　(58) | 妻　(60) | 1 | 132 | ○ | 息子兼業 |
| ③　(42) | 父　(70) | 1 | 214 | × | 野菜主体（ピーマン） |
| ④　(53) | 世帯主　(53) | 1 | 188 | ○ | 夫婦，娘兼業 |
| ⑤　(47) | 父　(72) | 1 | 236 | ○ | 本人兼業 |
| ⑥　(53) | 父　(77) | 1 | 331 | ○ | 本人兼業 |
| ⑦　(56) | 世帯主　(56) | 2 | 94 | ○ | 夫婦，息子兼業 |
| ⑧　(49) | 父　(69) | 1 | 120 | ○ | 本人兼業 |
| ⑨　(40) | 世帯主　(40) | 1 | 150 | × | 水稲拡大志向，妻兼業 |
| ⑩　(39) | 母　(58) | 1 | 210 | ○ | 夫婦兼業 |
| ⑪　(59) | 世帯主　(59) | 1 | 89 | ○ | 本人100日兼業，息子自営 |
| ⑫　(35) | 父　母　(67) | 2 | 175 | ○ | 夫婦兼業 |
| ⑬　(37) | 父　(63) | 3 | 170 | ○ | 本人兼業 |

（兼業は⑪を除き恒常的勤務）

© The Ito Foundation

表3　胆沢町における大規模繁殖農家の子取り用雌牛の頭数変化

| 農家No.（年齢） | 専兼別 | 後継者の有無 | 経営開始年 | S58 | S59 | S61 | S62 | S63 | 備考 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1　(40) | 専業 | | S49 | 20 | 20 | 20 | 23 | 24 | | 増加傾向 |
| 2　(　) | 専業 | ○ | S41 | 14 | 14 | 20 | 22 | 23 | S59～60に経営委譲 | 増加傾向 |
| 3　(64) | 専業 | ○ | S42 | 15 | 14 | 15 | 18 | 19 | | 増加傾向 |
| 4　(55) | 専業 | ○ | S38 | 18 | 19 | 19 | 19 | 18 | S61～62に経営委譲 | |
| 5　(46) | 専業 | | S40 | 17 | 17 | 17 | 18 | 17 | | |
| 6　(38) | 専業 | | S50 | 12 | 11 | 12 | 11 | 14 | | |
| 7　(54) | 専業 | ○ | S45 | 12 | 11 | 12 | 14 | 13 | | |
| 8　(53) | 専業 | ○ | S46 | 11 | 11 | 11 | 12 | 12 | | |
| 9　(60) | 兼業 | | S40 | 15 | 14 | 15 | 13 | 12 | | 減少傾向 |
| 10　(30) | 専業 | | S48 | 11 | 10 | 11 | 10 | 10 | | 減少傾向 |
| 11　(39) | 専業 | | S42 | 11 | 11 | 11 | 12 | 10 | | 減少傾向 |
| 12　(58) | 専業 | ○ | S37 | 13 | 13 | 13 | 12 | 10 | | 減少傾向 |
| 13　(79) | 専業 | ○ | S38 | 10 | 10 | 11 | 9 | 9 | | 減少傾向 |
| 14　(58) | 兼業 | ○ | S37 | 11 | 16 | 10 | 8 | 9 | | 減少傾向 |
| 15　(54) | 兼業 | | S40 | 11 | 12 | 11 | 9 | 9 | | 減少傾向 |
| 16　(37) | 兼業 | | S42 | 11 | 11 | 11 | 10 | 8 | | 減少傾向 |

資料：岩手県畜政課大規模畜産経営動向調査表，および聞き取り調査にて補足

年は，雌牛を更新して子牛を出荷し始める時期が自由化前後とちょうど重なるため，相対的に経営規模の脆弱な10～15頭規模層の農家が雌牛更新を手控えたと考えられる。繁殖農家が雌和子牛市場においては，供給者であり需要者でもあるとは述べたが，その繁殖経営は子牛高の現在においては供給時においてはメリットを享受するが，子牛購入時においては高い子牛，それも銘柄が良いほど高い子牛を購入しなければならない。ビーフサイクル理論においては，農家は将来の価格ではなく現在の価格に反応するのだが，中規模農家では現在の高雌和子牛価格と将来の自由化後の響を鑑みて雌牛更新を手控えているので，ビーフサイクル理論とは一致しないのも当然といえる。この自由化の影響を確認する事は，個々の農家の対応をすべて聞き取り調査しなければならないのだが，種々の制約上少数の農家に限定して聞き取りにするにとどめた。ここで雌和子牛の自家保留が問題となるが，良銘柄の子牛の確保，出荷すると高子牛価格のもとある程度の現金収入が約束されるなどの理由で，自家保留している農家は少なかった。

このように，和子牛の供給阻害要因として，小規模農家の飼養管理者の高齢化とそれによる離農，中規模農家の経営対応が現時点の価格ではなく自由化後の将来の価格によっている事の二つが確認された。この状況における，産地の対応と行政，農協の対応について簡単に触れたい。胆沢町では町と農協が協力して畜産振興対策補助事業の名のもと，各種の補助事業が行われている。自家保留の振興，無家畜農家への導入事業，品種改良の強

© The Ito Foundation

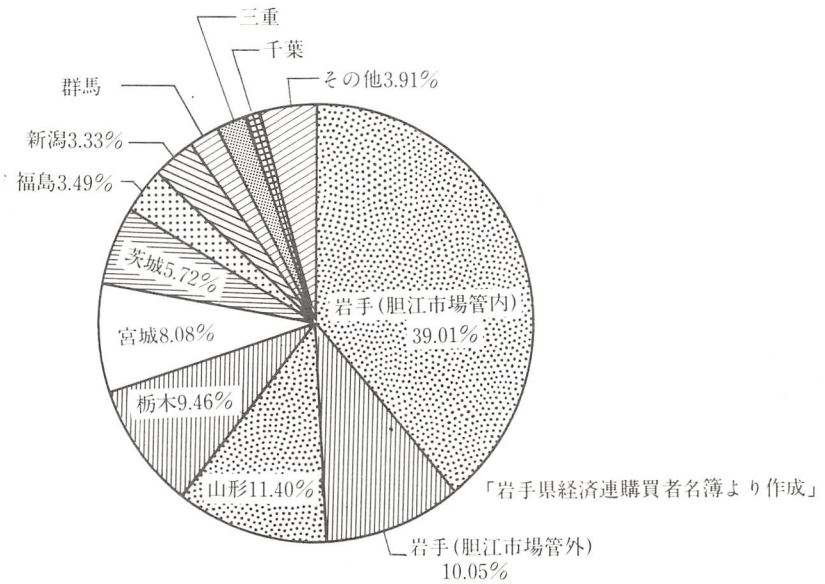



**図 6**　胆沢市場出荷先割合（S63）

化，集落単位での増頭化等，将来予測される産地間競争の激化に対応する形で，産地の再編，育成，具体的には銘柄の確立と他産地への和子牛の流出の防止がなされている。しかしながら胆沢市場管内において生産された子牛の半数以上は県外に出荷されており，ある意味で産地の弱体化が懸念されるところであり，前述の対策がそれほど効力を発揮しているとはいえない（**図 6**）。しかも統計的に捉えることはできないのだが，雌和子牛の肥育用仕向が増加している傾向が以前から指摘されている。肉付きは去勢牛ほど良くないものの，肉質でさほど変わらず，しかも去勢子牛価格より10万円ほど安い雌和子牛は，肥育農家にとっては魅力的であり，事実肥育農家の雌和子牛購入のケースが各市場で報告されている。しかし，これは将来の子牛生産の減少と不安定を生み出し，まさに牛肉経済における再生産構造を揺るがす事態であると思われる。この事実に関しては資料の制約上，これ以上の詳論は避けるが，憂慮すべき事態であり今後の課題としたい。

現在日本農業を取り巻く環境は厳しく，畜産経営，そして本論で対象とした繁殖経営でもそれは同様である。ビーフサイクルとは異なる価格変動をもたらしている供給阻害要因，つまり高齢化＝後継者・担い手問題も経営の自由化影響を見越した将来的対応も，まさにその環境の厳しさをそれぞれに表現しているわけである。このような中で，規模の経済の追求の余り，大規模経営の導入・育成という思考に流れることが危険であるのは，酪農経営等にみられる負債問題が証明している。国内における産地間競争がさらに激化すると予測される現在，各産地での方向性の確立とその方向に沿った現実的な経営の育成，特に後継者問題の緊要な対策の確立を強調して本論を終わりたい。

© The Ito Foundation

# 新技術の主要牛肉生産国の経営に及ぼす影響に関する研究

Study of the Effect of Biotechnology on Beef Farming in Developed Countries

渋 谷 佑 彦 (麻布大学獣医学部)

Sukehiko Shibuya (School of Veterinary Medicine, Azabu University)

It is the most important problem of present beef industry in Japan to reduce production cost of feeder cattle as free beef trade is close at hand. There are several ways to reduce production cost, however, from the point of view of technics the most effective method seems to be introducing of biotechnology, such as multiple ovulation and embrio trasnsfer (MOET). There are problems of introducing of these technics, such as shortage of technicians, cost of technic snd so on. So it seems quite necessary to know the way to do MOET on farm. United Kingdom is one of the most progressive country in the research of MOET and it has been said that they are doing not only internal embrio transfer (in vivo) but also external transfer (in vitro) commercially.

In United Kingdom there is no special regulation to do MOET except ordinary health control, and embrio transfer has been promoted by AI centers and farmers themselvs. Two AI centers were chosen. One is the biggest center in UK, Milk marketing board, monopolious system of dairy farmers cooperation and another is Avon Croft Cattle Breeders Ltd. which is exporting semen to Japan.

There are several MMBs in UK and they have set up nationwide network for MOET promotion including Republic of Ireland, however, their main job is to increase pure bred of Holsteins imported from Canada and USA to cross them with domestic British Friesian. MOET technicians are consisted of veterinarians and special technicians trained by MMB institutions. MMB has also set up special firm for in vitro fertilization called Animal Biotechnology Cambridge (ABC) corporatively with Cambridge University. ABC aims to promote commercial feeder stock of cross bred of dairy and beef breeds for fattening in vitro fertilization. Hawever, this firm has not yet been working at the moment as there are several problems to be solved such as different conditions between abattoir and lavolatory, difficult identification of ova at abattoir, etc..

Avon Croft Cattle Breeders Ltd, is not yet working on MOET field, it is doing embrio transfer as the progeny test on farm by the contracted veterinary practitioners.

Beef cattle farmers utilized MOET to increase their imported pure breed and veterinary practitioner did all process of MOET on farm side including fertilized egg test.

In conclusion there is not much difference MOET practice and level of technics between Japan and UK, haowever, it can be said that the most important factor to promote MOET on farm is the presence of able veterinarians and technicians.

© The Ito Foundation

## 1. 目　的

1991（平成３）年４月以降の牛肉輸入自由化を控え，早急に経営の体質強化が必要とされるが，子牛価格の変動幅が大きく，重要な経営不安定要因とされている。しかし最近の子牛価格の高値は，諸外国とくに先進国からの牛肉輸出意欲を一層盛んにすると思われ，さらに最近における新技術とくに受精卵移植を中心とするバイテク技術の進歩は，国外での黒毛生産性の可能性を示すものである。

この研究は，1988年度に実施した研究[1]で，かなりの和子牛生産者が将来受精卵の導入を考えていたので，導入時の経営的，技術的問題点を先進国の実態から解明して，牛肉生産の対策樹立に資することを目的としている。

## 2. 方　法

英国，豪州，カナダ，米国等では商業的ベースで受精卵の移植が行われ，農家段階にまで普及しているとのことである。そこで受精卵の移殖研究では従来から世界の先端に立っており，さらに体外受精卵が商業ベースで行われようとしている英国の受精卵移植の経営に及ぼす影響と普及の現状並びに問題点を解明するため，英国を調査した。

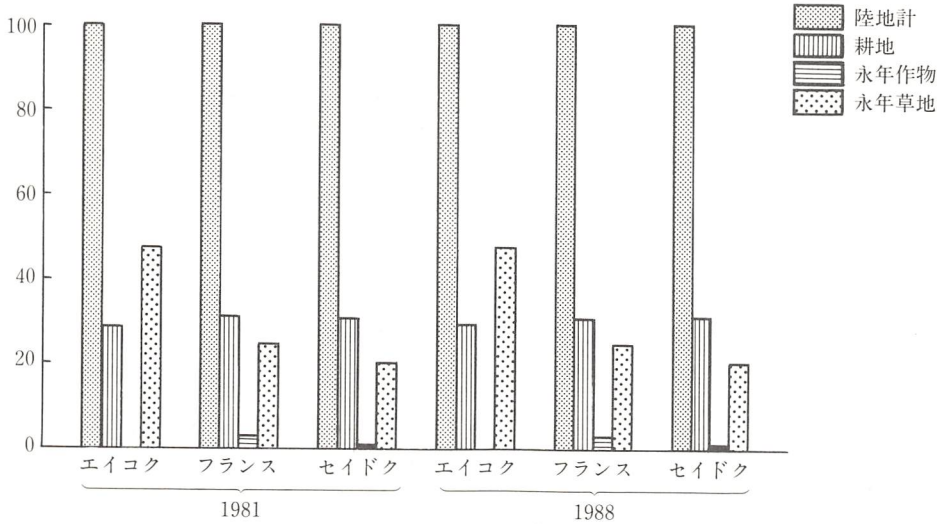
調査方法は，実際に受精卵移植を行っている経営者に面接して，移植の現状と問題点を調査するとともに，移植の指導的役割をしている家畜人工受精機関，政府関係機関，登録協会，経営者協会について面接並びにアンケート調査を行なった。

## 3. 結果と考察

### 3.1 英国の農畜産業の概況

（１） 英国の農畜産業の近況

英国の農業の特色は，その土地利用状況によく表れている。**図１**から判るように，EC諸国のなかでも，草地の占める比率が高い。農産物の構成比率をみても，牛乳22%，牛肉13%，豚鳥肉13%，穀物19%，果実野菜10%，その他23%となっており，畜産の占める比率が大きい（1986年度）。また乳肉牛の比率も高いので，受精卵移植




注：1. FAO Production Yearbook, 1981, 88
2. 陸地計：英国24177千ha，フランス55010千ha，西独24412千ha
3. 陸地計に対する百分比

**図１**　英国の土地利用状況

© The Ito Foundation

表1　農業就業人口（総就業人口対比）

| | 1960 | 1970 | 1980 | 1988 |
|---|---|---|---|---|
| フランス | 22.1* | 13.7 | 7.7 | 5.8 |
| 西独 | 14.2 | 7.5 | 5.2 | 3.9 |
| デンマーク | 17.5 | 11.2 | 7.3 | 5.1 |
| オランダ | 11.3 | 7.1 | 5.5 | 4.0 |
| 英国 | 4.0 | 2.8 | 2.8 | 2.1 |
| 米国 | 6.6 | 3.7 | 3.5 | 2.5 |
| 日本 | 32.4 | 19.7 | 11.2 | 7.2 |

注：FAO Production Yearbook, 1975.81.88

表2　農業総生産指数（1961/65＝100）

| | 1970 | 1975 | 1980 | 1985 | 1988 |
|---|---|---|---|---|---|
| フランス | 114 | 112 | 128 | 138 | 134 |
| 西独 | 115 | 121 | 132 | 140 | 145 |
| デンマーク | 94 | 106 | 119 | 143 | 140 |
| オランダ | 128 | 149 | 159 | 183 | 196 |
| 英国 | 116 | 129 | 152 | 172 | 167 |

注：**表1**に同じ。

等の新技術の重要性も高い。一方，英国農業の特徴の一つは，総就業者数に比較して，農業就業者数が**表1**にみるように対総就業者比率は世界で一番少ないことである。他方，英国の農業経営面積は，1987年の農業経営総数22万2千戸の平均54.1haで，フランス29.2ha等に比較してずば抜けている。農業の生産性は，**表2**，**表3**にみるように，他のEC諸国に比較してもかなり高いといえるので，少ない農業者で高い成績を挙げているといえよう。乳牛，肉牛の成雌頭数は，1970年代以降漸減傾向を示しているが，牛1頭当たりの生産量は，増大が著しく能力の向上を示している（**表4**参照）。

（2）　牛の品種の変遷

牛飼養では，乳用肉用ともに品種の変換が著しい。周知のとおり，英国は古来から種畜生産国と

表3　総穀物単位面積当たり生産量（kg/ha/年）

| | 1969/71 | 1979/81 | 1985/87 | 1960 | 1970 | 1969/71 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| フランス | 3.60 | 4.70 | 6.05 | 100.0 | 130.6 | 168.1 |
| 西独 | 3.67 | 4.42 | 5.72 | 100.0 | 120.4 | 155.9 |
| デンマーク | 3.85 | 4.04 | 5.09 | 100.0 | 104.9 | 132.2 |
| オランダ | 4.02 | 5.70 | 6.20 | 100.0 | 141.8 | 154.2 |
| 英国 | 3.72 | 4.79 | 5.35 | 100.0 | 128.8 | 143.8 |

注：**表1**に同じ。

表4　英国の年次別生産量，頭数

| | 1969/71 | 1979/81 | 1988 |
|---|---|---|---|
| 年間生産量（単位：万トン） | | | |
| 牛乳 | 1,301 | 1,592 | 1,498 |
| 牛枝肉 | 92 | 106 | 96 |
| 成雌牛頭数（単位：1,000頭） | | | |
| 乳牛 | 331 | 323 | 291 |
| 肉牛 | 148 | 147 | 137 |
| 1頭生産量（単位：キロ） | | | |
| 牛乳 | 3,931 | 4,755 | 4,909 |
| 牛枝肉 | 235 | 260 | 280 |

注：(1)　年間生産量はFAO Production Yearbook, 1981, 85, 88. 牛枝肉には子牛肉を含む。
(2)　成雌牛頭数，1頭生産量はUK Dairy Facts & Figures, MMB. 1981, 88.

して知られていたが，最近は欧州大陸からの輸入品種が増加し，固有の品種は漸減する傾向にある。乳牛ではブリティッシュフリージャンが依然多いものの，北米系のホルスタインが漸次増加し，英国のホルスタインフリージャンの約30%といわれる。肉牛はとくに変化が著しく，固有の品種を凌いでいる。**表5**はこれらの品種の変化を概括的に示している。このような品種の変換は，受精卵移植技術の目標の一つで，その適用には好都合である。

3.2　受精卵移植の人工授精センターにおける実態

受精卵移植技術には，通常の受精卵移植，受精

© The Ito Foundation

表5　英国の牛品種の変遷（種雄牛関係）

| 品種名 | 1965 | | 1980 | | 1988 | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 実数 | 比率 | 実数 | 比率 | 実数 | 比率 |
| Ayrshire | 166 | 20.3 | 10 | 1.2 | 6 | 0.8 |
| Dairy Shorthorn | 32 | 3.9 | | | | |
| Friesaian/Holstein | | | 849 | 98.6 | 705 | 99.2 |
| Frisian | 488 | 59.6 | | | | |
| Guernsey | 64 | 7.8 | 1 | 0.1 | | |
| Jersey | 50 | 6.1 | 1 | 0.1 | | |
| その他乳用種 | 19 | 2.3 | | | | |
| 乳用牛　計 | 819 | 100.0 | 861 | 100.0 | 711 | 100.0 |
| | | (76.1) | | (83.3) | | (78.5) |
| Aberdeen Angus | 71 | 27.6 | 13 | 7.5 | 2 | 1.0 |
| Beef Shorthorn | 15 | 5.8 | 1 | 0.5 | | |
| Belgian Blue | | | | | 13 | 6.7 |
| Blonde d'Aquitain | | | 1 | 0.5 | 5 | 2.6 |
| Charolais | 19 | 7.4 | 34 | 19.8 | 54 | 27.7 |
| Devon | 16 | 6.2 | 1 | 0.5 | | |
| Highlnd | 1 | 0.3 | | | | |
| Hereford | 119 | 46.3 | 93 | 54.1 | 49 | 25.1 |
| Limousin | | | 8 | 4.7 | 55 | 28.2 |
| Murray Grey | | | 1 | 0.5 | | |
| Romagnola | | | 1 | 0.5 | 1 | 0.5 |
| Sinmmental | | | 17 | 9.9 | 13 | 6.7 |
| South Devon | 3* | 1.2 | | | 1 | 0.5 |
| Sussex | 3 | 1.2 | 1 | 0.5 | | |
| Welsh Black | 7* | 2.7 | 1* | 0.5 | 1 | 0.5 |
| Other Beef | 3 | 1.2 | | | | |
| 肉用牛　計 | 257 | 100.0 | 172 | 100.0 | 195 | 100.0 |
| | | (23.9) | | (16.7) | | (21.5) |
| 総　計 | 1,076 | (100.0) | 1,033 | (100.0) | 906 | (100.0) |

注：1)　イングランドウエールズとスコットランドMMBのＡＩセンター飼養の種雄牛の合計
2)　（　）内は総計に対する比率
3)　U. K. Dairy Facts & Figurees. UK MMBs., 1966.81.88

卵分割，体外受精等があるが，現在英国で実用の段階にあるのは，受精卵移植と体外受精によるそれといわれている。

政府による授精卵関連規制は，英国農漁業食糧省の担当官によれば，一般的な家畜衛生の規制で行われ，特別の規制はないとのことで，したがって現場での事業は，民間組織とくにAIセンターとそれとの契約開業獣医師により推進され，年間移植頭数は４～６千頭程度とのことである。

（１）　牛乳販売委員会（ミルクマーケッティングボード）での実態

牛乳販売委員会（Milk Marketting Board：MMB）は，英国の牛乳生産者の構成する強力な協同組合類似団体で牛乳の一手販売のほか，乳牛の能力検定，人工授精等の実施，技術指導等も積極的に行っている。受精卵移植もまたMMBが強力に推進している。

MMBの授精卵移植業務の実態：MMBは，1974年以降受精卵移植を実用的に行うようになった。現在は受精卵移植会社（MMB Embrio Transfer Services）を設立し，英国のみでなく，アイルランド共和国でも活動しており，英国に中

© The Ito Foundation

心センター3，サブセンター5，アイルランド共和国に中心センター1を置いている。

受精卵移植の目的：現段階では**図2**にみるとおり，優良雌牛の増殖，とくに北米系ホルスタインの増殖におかれている。また雄牛については人工授精を推進するので，後代検定用にも移植の目的がおかれている。移植頭数は年間約100～1000頭の間とのことで，かなり幅があるようであった。

移植の経費：複数排卵処置に1頭当たり300ポンド，移植が1頭100～150ポンドとのことであった。1ポンド＝250円として換算すると，1頭当たり排卵処置7万5千円，移殖2万5千円乃至3万7千円程度で，わが国の場合とあまり差異がないことになる。

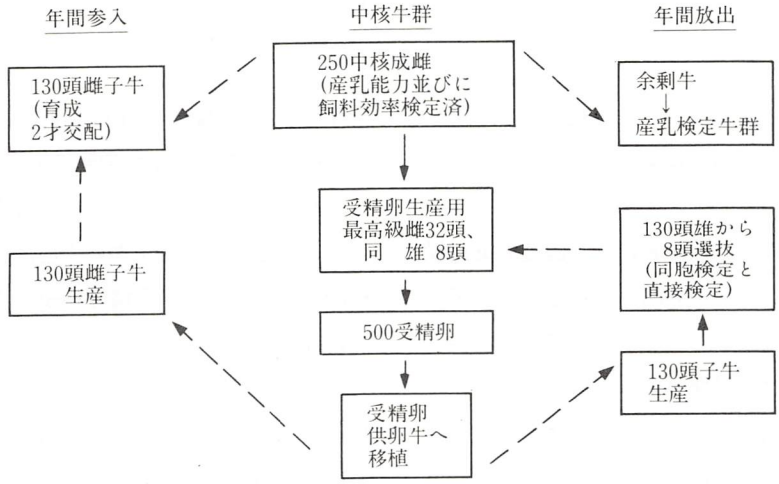
ABCの現状：移植用経費は，現在かなり割高とされ，用途が優良牛増殖に限定されている。しかし，最近導入した欧州大陸系新品種中心の交雑種を作成普及しようとして，ブルマスター（bull master）計画を進めているが，そのため体外授精を活用しようとして，MMBとケンブリッジ大学の家畜バイテク研究所との共同機関として Animal Biotechnology Cambridge（ABC）会社設立により，交雑種生産のための移植を行おうとしている。

報道によれば，1989年中にはABCの活動が開始されるはずであったが，実際には商業的ベースでの活動には，今暫く時間がかかるようである。その理由としては，第1に畜場での条件と実験室の条件に差があり成果に難点があること，第2に畜場で卵巣採取に際し個体識別が困難なことが挙げられていた。

移植技術の実施担当：ETの技術担当者は，獣医師と技術者で，技術者はMMBで養成している。獣医師と技術者の構成比は，獣医師1人に対し技術者3人程度となっている。ABCの場合では，獣医師3人と技術者30人で構成されている。

（2）　エイヴォンクロフト人工授精センターの実態

エイヴォンクロフト人工授精センター（Avon Croft Cattle Breeders Lmt.）は，イングランドのバーミングァムから約60kmブロームスグローブにセンターをおき，サブセンター3とともに西中央地帯の4州を主に，人工授精等を行ってその地帯の乳牛，肉牛の改良の中心となっている。1944年




注：MMBの北米系ホルスタインの中核群構成計画図（MMB MOET Nucreus herd）による。

**図2**　中核牛群の作成計画

© The Ito Foundation

設立の英国でもっとも古い人工授精センターで，MMB とは別箇の組織である。別組織として精液輸出会社を経営し，日本にも輸出している。センター自身は未だ受精卵移植業務はしていないが，後代検定用の移植を，開業獣医師との契約により行っている。

移植の経費：同センターの技術責任者によれば，移植の所要経費は受胎確認まで約 190 ポンド，他に諸経費として約120ポンド計310ポンド程度とのことであった。

3.3　経営における調査

（1）　乳牛における実態

調査した酪農経営はエイヴォン人工授精センターに近い Worcester に所在して，経営耕地1300エーカー，草地279エーカー，従事者 5 人，搾乳牛頭数 290 頭の大経営である。品種はフリージャンとホルスタインで，1頭平均乳量は6300kgとかなり高い。ET は昨年度 2 頭行ったが，いずれもエイヴォンの後代検定用であった。依頼される以外とくに ET を行う気持はないそうで，その理由はすでに乳量水準がかなり高いので，無理に新技術を導入する必要はないとのことであった。

（2）　肉牛における実態

調査した肉牛飼養経営は Hereford 近傍に位置し，肉牛専門の家族経営で繁殖雌牛 30 頭，肥育牛が約 250 頭を飼養している。肥育牛はほとんど Blonde d'Aquitaine の交雑種である。ET の目的は，登録の純粋種の増加である。

調査当日は，Bronde d'Aquitaine の多排卵処置済みの経産牛から，受精卵の回収を行っていた。多排卵処置並びに受精卵回収を行ったのは，開業獣医師 1 名と助手 1 名であった。多排卵処置，受精卵回収の方法は通常の方法で，当日は農家の庭先で，**写真 1** のように保定し，回収を行っていた。灌流は，トゥウェイ方式によっていた。回収に要した時間は，およそ 1 時間であった。

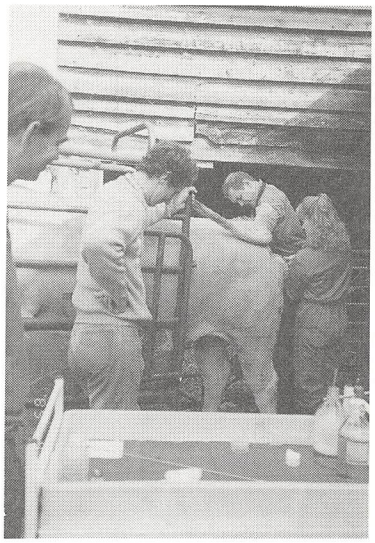


**写真 1**　肉牛経営現場での受精卵の回収状況

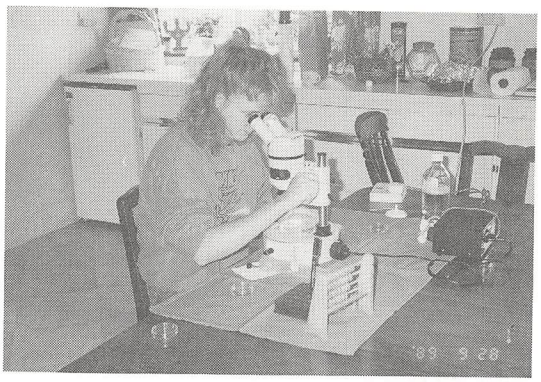


**写真 2**　同上受精卵の検査状況

また，受精卵回収終了後に検査を行ったが，その検査も**写真 2** にみるように，農家の台所に双眼顕微鏡を設置し，その場で検査を行っていた。当日の結果は，3 箇の正常受精卵が回収された。回収された卵は，獣医師の実験室に持ち帰り，所定の処置後移植される。これも，開業獣医師の行う移植の通常の方式である。なおこの獣医師は，通常 1 週間に10～20頭の経産牛に複数排卵回収処置をするが，1 回の受精卵回収数は 1-4箇～5-10 箇の間で，受胎率は60％強とのことでかなり高い。凍結受精卵は，扱っていないそうであった。

以上は，いずれの開業獣医師も行っている通常の方法とのことである。

© The Ito Foundation

表6　受精卵移植による生産牛の登録状況

| 品種名（登録協会） | 雌 | | | 雄 | | | 登録の条件 | ETの推進者 | 推定経費（£） |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1980 | 1985 | 1988 | 1980 | 1985 | 1988 | | | |
| （英　国） | | | | | | | | | |
| ホルスタインフリージアン | 305 | 579 | 703 | - | - | - | 獣医証明，血液型 | 農家，農協，AIセンター | 1,000 |
| (1977) | (0.002) | (0.003) | (0.004) | | | | | | |
| エアシャ | - | 8 | 3 | - | 6 | 6 | 同上 | AIセンター | 250 |
| (1982) | | (0.000) | (0.000) | | (0.03) | (0.04) | | | |
| チャージー | 1 | 4 | - | - | - | 4 | 同上，人工授精師証明 | 農協 | 150 |
| (1980) | (0.000) | (0.001) | | | | (0.03) | | | |
| ウェールズ・ブラック | - | - | - | - | - | - | 大学 | | |
| (1989) | | | | | | | | | |
| アンガス | 1 | 6 | 12 | - | 2 | 22 | ジャージーに同じ | 農家 | |
| (1981) | | (0.003) | (0.007) | | (0.002) | (0.02) | | | |
| ヘレフォード* | - | - | - | - | - | - | 同上 | 農家 | |
| (1978) | | | | | | | | | |
| デボン | - | - | - | - | - | - | 同上 | | |
| ガロウエィ | - | - | - | - | - | - | 同上 | | |
| リムジン | 122 | 150 | 267 | 110 | 171 | 280 | 同上 | 会社 | |
| (1975) | (0.115) | (0.051) | (0.074) | (0.286) | (0.087) | (0.084) | | | |
| マリグレー | - | - | - | - | - | - | 同上 | 農家，農協 | |
| (1989) | | | | | | | | | |
| ピエモンテーズ | - | - | - | - | - | - | | | |
| （日　本） | | | | | | | | | |
| 日本ホルスタイン | 9 | 108 | 494 | - | 23 | 66 | 人工授精師証明，血液型 | 会報等 | |
| (1978) | (0.000) | (0.000) | (0.002) | | (0.01) | (0.26) | | | |
| 日本ジャージー | - | - | 9 | - | - | 2 | 同上 | 同上 | |
| (1985) | | | (0.01) | | | (0.67) | | | |
| 黒毛和種 | - | 117 | 646 | - | 83 | 561 | 同上 | | |
| (1983) | ** | ** | ** | ** | ** | ** | | | |

注：1)　面接およびアンケート回答による。
2)　品種名の下欄の（　）は開始年，登録頭数の下欄の（　）はその年度の総登録頭数対比。
3)　*　はとくに区分していないため不明，**は子牛登記の雌雄が区別していないため。

© The Ito Foundation

3.4　受精卵移植による生産子牛の普及

英国における受精卵移植は，現状では後代検定あるいは純粋種の増殖に利用されていることが，これまでの調査で判明したので，これらの生産された子牛の登録状況をみれば，技術の普及状況を推定できるので，家畜登録協会で面接並びにアンケート調査を行った。

英国には牛の登録協会は現在41あるが，うち回答を得たのは11であった。回答を得た登録協会のMOETにより生産された牛の登録状況は，**表6**のとおりである。

この表によれば，英国でETによる生産牛が登録されるようになったのは，1970年代半ばからであり，研究の進展速度との比較でみると，やや遅い感じがするが，頸管経由の非手術的手法の一般化からみれば，逆に急速に普及したという見方もできよう。わが国の場合では，登録が開始されたのは1978年であるから，それ程遅れをとったわけではない。

登録協会の数と品種が少ないので必ずしも断言できないが，ET生産牛登録の開始時期と，登録頭数と総登録頭数対比からみると，欧州大陸から導入された肉用品種のリムジンが一番早く，また登録頭数とくに雄の登録頭数の多いのが特徴的である。このことは英国の品種の変遷と軌を一つにしており，ET技術の特徴を表しているといえる。また，乳用種のうちホルスタインフリージャンが多いのは，北米系のホルスタインが多いためとのことである。

ET生産牛の登録の条件は，ほとんどわが国と同様であり，ほぼ世界的に同一といえよう。

またET生産については，農家，農業団体（農協），AIセンターが推進し登録協会が推進することはないようである。

以上のような調査結果から，英国におけるET技術の実用化は，純粋種とくに導入品種の増殖に利用されている段階であるが，経営の現場ではAIセンターと契約した開業獣医師と団体により養成された技術者により，主としてされているといえよう。

また，所要経費については，かなりの差がみられたが，多排卵処置，受精卵回収では通常200ポンド前後（250円レートで約5万円），移植には約100～200ポンド（2万5千円～5万円）程度のようで，わが国とそれ程の差はないと思われた。

## 4. 要　約

受精卵移植技術の活用が，子牛生産の合理化上有益と考えられるので，受精卵移植技術の研究では世界的に進んでいる英国における技術の実用化状況を調査した。英国では純粋種，とくに導入された肉用種の純粋種の増殖が，人工受精センターとそれらと提携した開業獣医師により経営の現場で推進されている。受胎率も高く，技術水準は高いといえる。技術料については，100～3000ポンドとかなり変動がある。牛肉生産のための体外受精技術は，未だ技術的制約もあり経済的に実用化される段階にはない。いずれにしても技術的にはわが国の水準は英国と同程度であり，経費的にも邦貨換算でそれ程差はないようだが，技術の実施者の層に差があり，今後技術者養成に力をいれることが，とりあえずわが国で実用化するうえに必要であろう。

### 文　献

1）渋谷，栗原，四方「肉牛生産における繁殖・肥育経営の地域一貫化に関する研究」昭和63年度食肉に関する助成研究調査成果報告書，Vol. 7，500～508.（財）伊藤記念財団，東京，1989.
2）Report of the Breeding & Production Organization, No. 38, UK MMB. 1987/88.
3）Better Breeding, UK MMB in ET Breakthrough, MMB, Summer 1988.
4）矢内「アメリカ・カナダにおけるET牛の登録の現状」ETニュースレター，家畜改良事業団，No. 5，1989. P 42-46.

© The Ito Foundation

# タイ国のブロイラー産業の実態並びに わが国のブロイラー産業への影響に関する調査

Broiler Industry in Thailand and the Effect on Broiler Production in Japan

國松 豊・*矢野 秀雄・**中嶋 隆
(京都府立大学, *京都大学農学部, **滋賀県立短期大学)

Yutaka Kunimatsu, *Hideo Yano and **Takashi Nakajima
(Kyoto Prefectural University, *Faculty of Agriculture, Kyoto University and **Shiga Prefectural College)

The research survey was conducted to elucidate broiler industry in Thailand including the possibility and the problem of this industry. The effect of import of broiler meat in Japan was also studied.

Broiler industry in Thailand has been established to export "frozen chicken meat" to Japan on the basis of integrated operation. Thailand exported approximately 110,000 tone of poultry meat in 1989, which earned export income SUS 195 million. The Japanese market accounts for 87% of all exports. Poultry meat processing factories are likely to prepare more laborious products like Yakitori and other dishes involving chiken meat. This direction will extend because of a high profit. Additionally, the poultry processing companies get a profit by selling internal organs and other parts which are not exported to oversea countries into domestic market.

Owing to good and cheap labor force, broilers can be produced 30 percent cheaper in Thailand than in Japan. However, broiler industry in Thailand have to compete with broiler companies in other countries for selling frozen chicken meat. In these years, prices of feed and land, and labor cost have jumped up in Thailand. Thereore, broiler companies face to make rationalization in terms of production and processing.

On the other hand, in Japan, the amount of chicken meat which is imported will inevitably increase in future. In order to survive, broiler industry have to make a technical innovations as follows; 1. improvement of meat quality, 2. hygienic safety of chicken meat, 3. innovation of production process, 4. cutting down of production-cost of chiken meat, 5. making other commercial products.

## 1. 目 的

わが国のブロイラー産業は，近年鶏肉需要の伸び悩みの中で，価格の低迷が続き順調とはいえない。一方，タイ国の家禽肉生産は近年著しい進展を見せ，今日アジアでは中国，日本に次ぐ生産国となってきた。1988年のわが国の輸入家禽肉量は，正肉換算で約27万トンと史上最高の輸入量となり，全需要量の30%を占める事態となった。また，輸入先国としては全体の80%をタイ国とアメリカが占め，その内訳は約半々と言われている。

また，タイ国でのブロイラー産業は年間数十億

© The Ito Foundation

バーツ（１バーツは約６円）の外貨を稼ぎ，農産品部門の高収益事業の中で第６位に位置付けられており，その国の経済に対する重要性はますます大きくなっている。これは，タイ国内で先進国に輸出可能な水準のブロイラー飼育技術および処理工場があることや安価で良質の労働力があることがあげられる。

本調査研究は，タイ国におけるブロイラー産業の実態の一端を知り，この産業の今後の可能性と問題点を明らかにするとともに，冷凍鶏肉の輸入がわが国のブロイラー産業に与える影響について検討することを目的とした。

## 2. 調査地と調査方法

① わが国における調査

わが国の大手インテグレイターを２ヵ所選び1989年９～10月に，おもに生産費ならびに，今後の鶏肉消費の動向について調査した。

② タイ国における調査

1989年12月に，バンコク市内の２大学，大手インテグレイター２ヵ所，一般のブロイラー生産農家，国際連合食糧農業機構（FAO）のアジア・大平洋地域局，日本商工会議所タイ国駐在所，日本貿易振興会（JETRO）において，ブロイラー産業の実態および食鳥の日本への輸出状況について，聞き取り調査および資料の収集を行った。

表１　ブロイラー養鶏の経営形態

| 農場の種類 | 農場数 | 割合（%） |
|---|---|---|
| 独立農場 | 568 | 57.8 |
| 企業直営農場 | 97 | 9.9 |
| 子会社直営農場 | 67 | 6.8 |
| 賃金方式農場 | 99 | 10.0 |
| 契約農場 | 152 | 15.5 |
| 合　計 | 983 | 100.0 |

出所：Office of Agricultual Economic より

## 3. 結果および考察

### 3.1 タイ国のブロイラー産業の実態

（１） 経営形態と規模

1987年のタイ国農業経済事務局の調査によると3,827ヵ所のブロイラー生産農場が存在しているが，そのうち農業組合省に登録している983ヵ所の養鶏場の経営形態は**表１**に示すとおりである。過半数の養鶏場は独立農場であり，子会社直営農場は最も少ない。しかし，ブロイラー価格の変動リスクを軽減するために，今後は独立農場から契約農場への転換が予想される。現在では大規模農場（１万羽以上の飼養規模）の多いバンコク市近郊のチョンブリ県では契約農場が大部分を占めている。

（２） 生産技術

**表２**は，日本とタイ国におけるブロイラーの生産技術を比較したものである。

表２　日本とタイ国におけるブロイラー生産技術の比較

| 項　　目 | 日本[1]（インテ）ウインドレス | 日本[2]（インテ）開放式 | タイ[3]開放式 |
|---|---|---|---|
| 鶏舎回転率（回／年） | 4.5 | 4.5 | 5～6 |
| 飼養密度（羽／3.3m²） | 57～60 | 49 | 15～20 |
| 平均飼養日数 | 59～61 | 60 | 46～50 |
| １羽当たり出荷重量（kg） | 2.7～2.9 | 2.7 | 1.9～2.0 |
| 育成率（%） | 96～98 | 97 | 96～97 |
| 飼料要求率 | 2.2～2.3 | 2.2 | 1.9～2.0 |

1)　大手インテグレイダー２社の平均値
2)　大手インテグレイダー１社の平均値
3)　大手インテグレイダー２社と一般農家１戸の平均値

© The Ito Foundation

タイにおけるブロイラー養鶏は暑さとの戦いで，いかにして鶏舎内温度を下げるかにかかっている。したがって，各種工夫された鶏舎が建設されている。一般に多く見られるのが，鶏舎の両側にクリークを作り通風を良くした鶏舎と，水上鶏舎である。この水上鶏舎は通風性が良く舎内温度も下がり，このタイプの鶏舎は今後も増加するものと思われる。その理由としては，鶏舎環境の改善のほかに，表土が販売できること，そして池でもって鶏糞を餌として養魚が可能になることである。インテの傘下にない一般農家では，昨今の飼料および素ビナ代の高騰時期では，安定性の少ないブロイラー経営よりも養魚による収益が生活の支えになっているという。

そのような環境で飼育されるブロイラーの生産能力を日本と比較してみると，表に示すように出荷日齢は48日前後で出荷体重は2kg前後，飼料要求率は2.0，鶏舎回転率が年6回と，日本より生産性は高いものの，高温のため単位面積当たりの飼育羽数は少なく6羽／㎡であった。なお，素ビナ，飼料の質や内容は，日本とほとんど差はなかった。

（3）　ブロイラーの生産コスト

**表3**および**表4**は，ブロイラーの生産費を示したものであるが，従来タイ国は日本の約2/3の経

**表3**　タイ国におけるブイラーの生産費（バーツ／kg）

| 項　　目 | 1981 | 1982 | 1983 | 1984 | 1985 | 1986 | 1987 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 変　動　費 | 18.44 | 17.99 | 17.56 | 18.28 | 16.15 | 16.96 | 18.66 |
| 素ビナ費 | 3.32 | 2.84 | 3.02 | 3.05 | 2.78 | 3.44 | 3.88 |
| 飼　料　費 | 13.84 | 13.87 | 13.17 | 13.86 | 11.85 | 12.32 | 13.23 |
| その他の費用[1] | 1.28 | 1.28 | 1.37 | 1.37 | 1.52 | 1.20 | 1.55 |
| 固　定　費[2] | 0.34 | 0.43 | 0.42 | 0.38 | 0.38 | 0.37 | 0.30 |
| 総　費　用 | 18.78 | 18.42 | 17.98 | 18.66 | 16.53 | 17.33 | 18.96 |
| 農場出荷価格 | 17.10 | 16.75 | 20.04 | 17.68 | 18.68 | 18.85 | 19.34 |
| 利益（損失） | −1.69 | −1.66 | 2.07 | −0.99 | −1.87 | 1.52 | 0.36 |

1)　労務費，疾病予防・治療費，光熱水費，機械修理費，投資の機会費用を含む
2)　土地利用，減価償却，農場・機械の機会費用を含む
出所；Office of Agricultual Economic より

**表4**　日本とタイ国におけるブロイラー生産費[3]の比較

| 科　　目 | 日本[4]（インテ）円／kg | タイ[5]（インテ）円／kg | タイ[6]（一般農家）円／kg |
|---|---|---|---|
| 変　動　費 | | | |
| ひな購入費 | 29 | 27 | 29 |
| 飼　料　費 | 84 | 79 | 82 |
| その他の費用[1] | 29 | 8 | 8 |
| 合　　計 | 142 | 114 | 119 |
| 固　定　費[2] | 8 | 4 | 4 |
| 総　合　計 | 150 | 118 | 123 |

1)　労務費，疾病予防・治療費，光熱水費，機械修理費，投資の機会費用を含む
2)　土地利用，減価償却，農場・機械の機会費用を含む
3)　タイの生産費は，1バーツを日本円6円で換算
4)　大手インテグレイダー2社の平均値
5)　大手インテグレイダー2社の平均値
6)　一般農家1戸の値

© The Ito Foundation

費で生産できるといわれてきたが，今回の調査時点では飼料および素ビナ代の高騰から，約3/4となっていた。

また，タイでは生産費の中では，飼料代が最も高く全体の70%前後を占め，価格変動も大きい。通常飼料は国内で調達でき不足を来すことはないが，飼料会社の多くは一環ビジネスとして関連事業を行っており，飼料の生産のみではなく飼育事業も手掛けている。したがって，飼料の生産業者は価格を値上げすることもあり，インテグレイション外の養鶏農家は大きな打撃を被ることとなる。

また，1989年以降飼料の需要が強いため飼料費が高騰し，前年度の20%もの値上がりをした。タイはトウモロコシなど穀類を大量に輸出してきたが，1989年のトウモロコシの輸出は50万トン以下に落ち込むとともに，この年間政府は国内の飼料価格高騰をおさえるため，家畜用飼料としての大豆粕，魚粕，トウモロコシの輸入自由化を決めている。

次のコストは素ビナ費で，全生産費の17～20%を占めている。また，原種の輸入費に左右されやすく，ここ数年値上がり傾向にある。

（4） ブロイラーの価格

(1) 農場出荷価格

生鳥の価格を決定する要因としては，市場における出荷量，消費量，そして外国への冷凍鶏肉の輸出量などがあげられる。タイでは，生鳥の農場出荷価格として，契約価格および市場価格の2通りの決め方が行われている。

① 契約価格は，生産者の種類により，以下の2つに分類されている。

ア．賃金払い飼育の契約生産者

この生産者は雇用主あるいは企業から土地，鶏舎，器具，ヒナ，飼料，薬品などの提供を受けた場合，報酬はブロイラーの出荷羽数に対して，1羽当たり約1～3バーツの定額報酬が雇用主から支払いされる。したがって，鶏肉価格の変動に左右されない。

イ．価格保証飼育の契約生産者

この生産者は，契約会社が生産者に対して，一定期間の出荷量と契約価格で報酬を受けるため，価格は市場での鶏肉やひなの価格，輸出価格などによって変動する。

② 市場価格は，概して独立の生産者用で，市場の鶏肉の需要と供給によって決定され，ほとんど毎日のように変動している。1984年から1987年の価格を表5に示したが，市場価格が輸出量（表6）の変動に左右されている。1984年は輸出量が1983年の79%増にもかかわらず，国内の生産量が需要量よりも上回ったため，過剰供給となり価格が低下した。1985年は不景気のため購買力の低下が価格を下げた。その後は回復し，1987年には19.34バーツと上昇した。これは，日本が鶏肉の輸入関税を18%から14%に引き下げたのと，円高の影響により購買力が増加し，その結果外国市場への輸出が65%の伸びを見たためである。

また，契約生産と独立生産の生鳥価格を比較してみると，不景気の時に独立生産者の方が契約生産者よりも平均価格が低くなるが，好況の時は独立生産者の方がよい価格で売ることができる。今回の調査時点では，大手インテグレーターは契約農家に対しては約20バーツで買取ってはいたものの，一般農家では18.5バーツということであった。

表5　生鳥の価格（農場渡し）

単位：バーツ／kg

| 年度 | 契約生産価格 | 独立生産価格（市場価格） | 差 |
|---|---|---|---|
| 1984 | 18.22 | 17.48 | +0.74 |
| 1985 | 17.51 | 15.89 | +1.53 |
| 1986 | 17.32 | 18.29 | −0.97 |
| 1987 | 17.33 | 19.34 | −2.01 |

出所：日本貿易振興会の資料より

© The Ito Foundation

(2)　と殺・処理加工経費

タイにおける冷凍鶏肉の生産費は，全体の85％が原料費（生鳥費）で残りの15％が労働費，減価償却費，工場経費，流通・管理費などといわれている。ある大手業者の話では，処理費用は10年前は売値の５％が，現在では10％ということであった。これは，最近の国全体の賃金の高騰や，輸出向けとなると製品の衛生管理（各種の分析検査も含む）などに要する費用が加算するためであり，今後はより以上の工場での合理化が要求されるものと考えられる。

(3)　輸出価格

鶏肉の輸出価格は，国外での鶏肉の需要，とくに日本での需要に応じて変動する。日本は冷凍鶏肉の大手国外市場であり，1986年から1987年にかけては，タイより輸出された冷凍鶏肉のうち，90％が日本向けであった。輸出価格は円高の影響に加え，日本政府が冷凍鶏肉の輸入関税を18％から14％に引き下げたため，1987年には平均48,870バーツ／トンと以前に比較して価格が上昇した。

（５）　冷凍鶏肉の輸出

タイからの冷凍鶏肉の輸出は品質向上もあって，表6に示すように年々拡大している。近年ヨーロッパ諸国への輸出が伸びてきているが，やはり輸出量の約90％は日本向けである。先進国への輸出が盛んになっている理由として，タイ国内における生産コストが輸入国に比較して安価であることと，冷凍鶏肉の品質向上が海外市場に認められたことなどが考えられる。

一方，日本との関係でいえば，タイは冷凍鶏肉のみでなく，切身やヤキトリのような加工品も輸出してきた。今後もタイにおいて良質でかつ安い労働力があれば，技術力の向上とあいまって加工品分野の輸出がより一層増加する可能性がある。

## 4.　タイ産ブロイラーの今後の見通し

タイの輸出業者が安い価格で日本向けに輸出する理由は，日本の市場は非常に大きく，しかもこれにかわる市場は今のところ世界には存在しないということである。したがって，タイの輸出業者は操業を継続する限り，日本の国産ブロイラーの市場価格に見合った価格で輸出せざるを得ないだろう。

タイにおける飼料，ブロイラーそのものの価格

表6　タイの冷凍鶏肉の輸出国ならびに輸出量

単位：トン

| 国　　名 | 1985 | 1986 | 1987 | 1988 | 1989 |
|---|---|---|---|---|---|
| 日　　本 | 41,746 | 71,241 | 86,682 | 88,158 | 95,731 |
| シンガポール | 3,817 | 4,617 | 2,672 | 2,702 | 3,180 |
| 香　　港 | 886 | 1,802 | 983 | 2,499 | 4,162 |
| 西ドイツ | 92 | 947 | 618 | 1,251 | 3,465 |
| オランダ | - | - | 115 | 562 | 1,254 |
| クエート | 226 | - | 601 | 316 | 893 |
| スイス | - | - | - | 24 | 555 |
| サウジアラビア | - | - | 116 | 184 | 225 |
| ブルネイ | - | - | - | 82 | 90 |
| ドバイ | 13 | - | 47 | 35 | 35 |
| スリランカ | - | 7 | 6 | 14 | 22 |
| 合　　計 | 46,780 | 78,614 | 91,840 | 95,827 | 109,625 |

出所：Department of livestock development より（統計により数値にいくらかの差異がある）。

© The Ito Foundation

は，国際的にみると必ずしも安くはなく，ブロイラー輸出企業は，低賃金と良質の労働力に支えられ，製品の処理・加工・輸出だけでなく，配合飼料から生鳥の生産，処理加工まで，一貫したインテグレーションを組織している。したがって，正肉の加工だけでなく，手間はかかるものの付加価値の高いヤキトリやファーストフーズレストラン向けの製品作り，および国内向けと輸出用部位の組合せでもって利益を上げている。

しかしながら，アメリカ，ブラジルそして中国などの輸出国との価格競争もあり，さらに日本のブロイラー産業の生産性の向上を考えると，タイのブロイラー産業も一段の合理化が迫られている。

## 5. わが国における今後のブロイラー産業について

以上のように，タイのブロイラー産業は日本向け輸出を前提に構築された産業であり，今後も輸出量は増加するものと考えられる。

したがって，冷凍鶏肉の輸入に対して，わが国が対抗するには，次のようなことが挙げられる。

① 肉質の向上

従来，ブロイラー肉についてはあまり肉質を問わなかったが，フレッシュもの，歯ごたえのあるものの生産として，最近の特殊鶏の作出すなわちブランド化が必要である。生産量としては多くは望めないが，商品の多用化の傾向に便乗する必要がある。

② 鶏肉の安全性

消費者は，素性のわかったもの，農薬や抗生物質の含まれていないもの，細菌数の少ないものを望んでいるため，生産・処理を通じて衛生管理の徹底が要求される。

③ 生産技術の高度化

上記特殊鶏生産のための生産技術の確立，ブロイラー専用種の肉質改善，腹腔脂肪や皮下脂肪の低減化などの技術開発が必要である。

④ 生産コストの削減

今回の調査からも，わが国でのインテグレーション傘下の生産費は，一般農家における生産費よりも安価であり，今後のブロイラー生産はインテの拡大が増加するものと考えられる。同時に一層の生産性の向上が望まれる。

⑤ 売れるものの商品化

消費者は，輸入ものに見られるように使いやすさを望んでいる。そのためにも，使いやすい，見た目においしい，きれいさなどの製品の開発が必要である。

## 6. 要　約

本調査研究は，タイ国におけるブロイラー産業の実態の一端を知り，この産業の今後の可能性と問題点を明らかにするとともに，冷凍鶏肉の輸入がわが国のブロイラー産業に与える影響について検討することを目的とした。

タイ国は，最近の飼料および素ビナ費の高騰にもかかわらず良質で安価な労働費によって，わが国の約70％の生産コストでブロイラーを生産している。また，タイのブロイラー産業は冷凍鶏肉の日本向け輸出を前提にインテグレイションのもとで構築された産業であり，正肉の加工だけでなく，付加価値の高いヤキトリやファーストフーズレストラン向けの材料などの製品作り，および国内向けと輸出用部位の組合せでもって利益を上げている。しかし，タイ国においても土地の高騰，賃金の上昇，また他の鶏肉輸出国との価格競争などからブロイラー生産には一層の合理化と生産性の向上は無視できない状況に来ている。

そのような中で，わが国への冷凍鶏肉の輸出量は，今後も増加するものと考えられ，わが国のブロイラー産業がそれに対抗するには，次のような技術改革を行う必要がある。

© The Ito Foundation

①肉質の向上　②鶏肉の安全性　③生産技術の高度化　④生産コストの削減　⑤売れるものの商品化

**文　献**

1) 日本貿易振興会，タイ農産物の対日輸出品目事例実態調査，ブロイラー，1988年3月
2) バンコク日本人商工会議所，タイ国経済概況，1988～1989年版
3) 杉山道雄，日本家禽学会誌，23，1，1986
4) 杉山道雄，日本家禽学会誌，23，2，1986
5) 川口　勉，鶏の研究，64，1，1989

© The Ito Foundation

# 食肉の生産，処理，加工技術に関するパテント調査（III）と殺，加工，食肉製品の出願公開状況

Survey on the Patents Related to the Production, Treatment and Processing Techniques of Meats (III)
Present State on Application and Public Notice in Field of Slaughtering, Precessing and Meat Products

中　島　健　次（中島技術士事務所）

Kenji Nakajima (Dr. Nakajima Consulting Office)

A survey on the patents related to meat animal industry in Japan was carried out. It has been tried to make clear the situation on applicatio and public notice of the patents in the slaughter of meat animals, the processing of meat and meat products.

From the results, we could know that the number of cases accepted as patents show the falling tendency in recent years, and that there are a few in finding of new invention concerned with the fat adding for the imported beef.

I am sure that we will not be able to progress the technological level of animal industry without useful patents. A technical innovation should be hard pressed as quick as thought, and a large number of powerful patents will be indispensable condition for further development of meat animal industry, especially so it is from a view point of international obligation.

## 1. 目　的

表記一連の調査により，畜産ハードウェア（飼育用具と装置）および畜産ソフトウエア（飼料，飼料添加物，動物薬，獣医療具）のパテント出願公開，公告状況を明らかにした。最後の仕上げとして，本報では，食肉動物のと殺技術，食肉の加工技術，および食品としての肉製品に関する特許と実用新案について，それらの出願公開状況を報告する。

技術情報にはいろいろあるが，産業界における利用度は，おおよそ，パテント公報３＞専門誌２＞学会誌1.5＞その他（他社製品，製品カタログ，業界誌など）3.5の割合とされている（発明協会「特許情報の活用法」，63年12月発行）。

産業界でパテント公報が最重視されているのは，これが最先端技術の宝庫であるからである。しかも，出願後１年半で公開されるので，速報性をも兼ね備えている。故に，パテント公報の活用如何が，企業の存亡にかかわると言っても過言でない。

当然，食肉加工メーカーなら，ウの目タカの目，各社いずこもパテントウォッチングを怠らず，各種パテントマップも完備していることであろう。しかし，パテント調査の狙いが細分化されすぎていないか，分析が特殊になりすぎていないか。たまには，バカバカしいと思われることでも，やっ

© The Ito Foundation

てみて損はあるまい。よって，ごく初歩的な分析手法，すなわち，出願公開件数の量的把握から，上記3部門のマクロ的な動向を眺めてみる。

## 2. 方　法

平成元年6月に特許庁の新庁舎が完成し，ペーパーレスシステム導入に備えホストコンピューターが動きはじめた。おかげで公報閲覧所にも端末機20台が配備され，先願検索に利用できるようになった。

そこで，早速，従来の手めくり調査に代わり，端末機を利用することにした。紙に印刷した従来のいわゆる紙公報は，昭和54年度まで日本独自の旧分類で整理されており，55年から実施された国際特許分類(IPC)との連結性が乏しかった。そのため，一つのテーマを過去にさかのぼって調べるとき，旧分類の厄介な壁にはばまれがちであったのであるが，この点，コンピューターには古い公報も新分類で入力されており，チェック洩れの心配がなくなった。

国際特許分類の記号は簡単であり，われわれに馴染みの生物分類にたとえれば理解しやすい。すなわち，個々の公報を生物の〈種〉に見立てれば，右に示す如く，A22B 1/02という分類記号の頭のアルファベットが〈門〉に相当する。A門は，人間，動物，植物に関するパテントを包括するもので，以下H門まで8グループに大別されている。次の2桁の数字が〈綱〉に相当し，A01が農業，畜産，水産など，A61なら医療関係で，A22は「と殺，肉処理，家畜または魚の処理」を示す。数字の次のアルファベットが〈目〉であり（Aは欠番），A門22綱B目という記号で，「と殺技術」のパテントが分類されているわけである。端末機のキーを叩くとき，ここで1字分空けてから数字を打つ。スラッシュの前の数字が〈科〉に相当し，たいてい奇数番号であるが，食品など一部に偶数番号も使われている。スラッシュの後ろに続く02以下2桁の偶数番号（稀に奇数も使用）が〈属〉であり，3桁の数字は〈亜属〉とみなしてよい。00番はちょっと変っていて，まだ公報が少なく〈属〉を設ける必要がない場合，もしくは既設の〈属〉に分類できない新種は，みんなここに押し込められる。そして，分類表が5年ごとに改版され，第3版(1979)，第4版(1984)，第5版(1989年10月5日発行）と続いている。この間，廃止された〈科〉や〈属〉はごく少なく，新科，新属，新亜属の追加は数万件に達する。

| A | 22 | B |
|---|---|---|
| 門 | 綱 | 目 |

| 1 | ／ | 02 |
|---|---|---|
| 科 | | 属 |

食肉の処理，加工技術に関するパテントは，次の5目に含まれる。

1）［A22B］と殺
2）［A22C］食肉，家禽の加工
3）［A23B］食肉，魚の保存
4）［A23J］タンパク質の採取
5）［A23L］肉類の製品

当初，これらをすべて調査する計画であったが，紙公報を偵察したところ，保存技術［A23B］の大半が魚のものであり，また［A23J］の中心が人造肉であったので，この2目を割愛した。出願公開制度は，昭和46年度から施行され，46年1月に出願されたものが，1年半後の47年7月に公開される。従って，47年度の公開件数は，半年分ということになる。なお，外国から出願されたものの一部は，46年度中に公開されているので，便宜上，これらを47年度のデータに含めた。

## 3. 結果と考察

### 3.1 と殺技術［A22B］（表1）

〈と殺目〉は，次の4科16属に分類されている。

© The Ito Foundation

1/00　と殺される動物を束縛するための装置
3/00　と殺または気絶の方法
　3/02　と殺用ピストル，ボルト
　3/04　気絶用ガスマスク
　3/06　電流によると殺または気絶
　3/08　と殺用ペンチ，大ばさみ
　3/10　と殺用ナイフ
　3/12　清浄なと殺器具
5/00　と殺中またはと殺後に使用する付属具
　5/02　と殺囲い
　5/04　採血装置，血液攪拌具
　5/06　牛のためのと殺台，スプレッター
　5/08　湯剝ぎ，こすり道具，脱毛，毛焼具
　5/10　湯剝ぎなどの手動器具
　5/12　湯剝ぎ釜
　5/14　舌ばさみ，のどを閉める装置
　5/16　皮を剝ぐ器具またはナイフ
　5/18　と殺動物の胃の洗浄
　5/20　分割器具
7/00　と殺場の装備

国際特許分類表を作ったのは欧米人であり（上記訳語は特許庁の翻訳，以下同じ），われわれといささか感覚が違う。魚や実験動物の殺し方，捨て犬猫の処分まで含まれているので，これらをデータから除外した。

それにしても，かつて欧米では，20項目に分類するほどと殺技術の開発が盛んであったらしい。だが，第3版以後10年間，新属の追加は全くなく，どうやら頭打ち，と殺技術の“成熟”がうかがわれる。

一方，日本ではどうか。端末機のキーをいくら叩いても，ほとんどの応答は該当公報なし。ゼロで埋ったデータ記入用紙を眺めていると，突拍子もなく，飢餓ですかすかの肝臓切片が想い浮かんだ。まぎれもなく“萎縮”の鏡検像に他ならない。よって，20分の1に萎縮させて**表1**に示した。

萎縮すなわち退行性変化，これが日本におけると殺技術の実情を，余さず伝えていると思われる。冷凍肉を輸入した方が安上りというわけなのであろうか。

**表1**　と殺技術〔A22B〕の年度別出願公開件数

| 公開年度（昭和） | 特　許 | 実用新案 | 計 |
|---|---|---|---|
| 47 | 1 | 2 | 3 |
| 48 | 4 | 2 | 6 |
| 49 | 7 | 13 | 20 |
| 50 | 7 | 9 | 16 |
| 51 | 5 | 7 | 12 |
| 52 | 8 | 3 | 11 |
| 53 | 6 | 4 | 10 |
| 54 | 11 | 8 | 19 |
| 55 | 8 | 6 | 14 |
| 56 | 7 | 3 | 10 |
| 57 | 10 | 5 | 15 |
| 58 | 8 | 0 | 8 |
| 59 | 1 | 1 | 2 |
| 60 | 2 | 4 | 6 |
| 61 | 5 | 4 | 9 |
| 62 | 5 | 2 | 7 |
| 63 | 9 | 11 | 20 |
| 平1 | 5 | 3 | 8 |
| 計 | 109 | 87 | 196 |

### 3.2　食肉・家禽の加工技術〔A22C〕（表2）

**表2**に示すとおり，〈食肉家禽加工目〉は9科18属，計27項目の多岐に及ぶ。しかし，第3版後10年間，新科，新属の追加なし。年度別公開件数の消長を見ると，近年めっきり減少の傾向にある。多品種少量生産の今日，ハムやソーセージの大量製造技術は，いささかトレンディでなくなったのかもしれない。

それにしても，超電導5000件，ペットでさえ200件という時代に，たった60件では如何なものか。パテントの質は量に相関し，量は質の絶対条件である。出願件数激増の奔流の中にこそ，玉石混交，ピカッと光る革新技術が出てくるのであり，淀みに浮かぶうたかたは，すぐに消え去る。

こういうときの“再生”に，他の業界からの新技術借用が有効である。別分野のパテントにヒントを探す。例えば，凍結磨砕。冷凍ホーレン草に水をかけてペースト化［A23B］に着目し，すかさず，スジ肉磨砕—ハンバーグ材，とひらめくか

© The Ito Foundation

表2　食肉・家禽加工技術〔A22C〕の年度別出願公開件数

| 分類番号 | 5/00 | | 7/00 | | 9/00 | | 11/00 | | 11/02 | | 11/04 | | 11/06 | | 11/08 | | 11/10 | | 11/12 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 公開年度 | 混合装置 食肉、ソーセージ肉または肉製品の | | ス用装置 製品のすりつぶし、成形またはプレ 食肉、ソーセージ肉またはその他肉 | | 装置 食肉、ハムをやわらかくする | | ソーセージの製造 | | ソーセージ充填機 | | るもの 機械的に前後可動するピストンによ | | 作をさせるもの 液体または気体を用いてピストン操 | | ス装置を有するもの らせん式プレスまたは他の回転プレ | | ソーセージねじり装置 | | ソーセージスキンの結束装置 | |
| | 特 | 実 | 特 | 実 | 特 | 実 | 特 | 実 | 特 | 実 | 特 | 実 | 特 | 実 | 特 | 実 | 特 | 実 | 特 | 実 | |
| 昭47 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 6 | 0 | 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | |
| 48 | 2 | 4 | 3 | 2 | 1 | 1 | 15 | 1 | 9 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | |
| 49 | 0 | 3 | 2 | 6 | 1 | 2 | 17 | 0 | 9 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | |
| 50 | 6 | 8 | 11 | 16 | 6 | 3 | 24 | 12 | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | |
| 51 | 2 | 1 | 16 | 18 | 1 | 2 | 34 | 8 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | |
| 52 | 3 | 1 | 7 | 11 | 2 | 5 | 10 | 1 | 7 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | |
| 53 | 1 | 4 | 3 | 2 | 3 | 5 | 8 | 16 | 5 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | |
| 54 | 0 | 0 | 7 | 13 | 1 | 5 | 22 | 4 | 8 | 5 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | |
| 55 | 0 | 1 | 6 | 19 | 1 | 11 | 18 | 6 | 5 | 4 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 56 | 0 | 0 | 4 | 12 | 3 | 5 | 27 | 8 | 4 | 1 | 4 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | |
| 57 | 0 | 0 | 7 | 13 | 1 | 0 | 16 | 6 | 9 | 1 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | |
| 58 | 0 | 0 | 4 | 11 | 1 | 3 | 18 | 10 | 7 | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | |
| 59 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 2 | 21 | 2 | 6 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 60 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 6 | 3 | 6 | 2 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | |
| 61 | 4 | 0 | 4 | 3 | 2 | 2 | 3 | 8 | 6 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | |
| 62 | 0 | 1 | 4 | 5 | 3 | 1 | 5 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | |
| 63 | 1 | 0 | 18 | 4 | 4 | 0 | 1 | 1 | 7 | 2 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 4 | 1 | |
| 平1 | 0 | 1 | 4 | 1 | 0 | 1 | 2 | 2 | 5 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 4 | 1 | |
| 小計 | 19 | 24 | 103 | 137 | | 48 | 253 | 88 | 111 | 44 | 7 | 7 | 2 | 1 | 1 | 2 | 4 | 3 | 26 | 3 | |
| 計 | 43 | | 240 | | 80 | | 341 | | 155 | | 14 | | 3 | | 3 | | 7 | | 29 | | |
| 比率 | 2.4 | | 13.4 | | 4.5 | | 30.8 | | | | | | | | | | | | | | |

© The Ito Foundation

| | 13/00 | | 13/02 | | 15/00 | | 17/00 | | 17/02 | | 17/04 | | 17/06 | | 17/08 | | 17/10 | | 17/12 | | 17/14 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ソーセージ用ケーシング | | いソーセージ用ケーシングのくくり縫 | | 食肉またはソーセージ用吊下げ装置 | | 食肉または骨の他の加工機具 | | 食肉、骨切断時の保持装置 | | 骨清浄装置 | | 骨截断、粉砕装置 | | 肉あるいはソーセージの清浄化 | | 食肉またはソーセージのマーキング | | 皮の切りとり装置 | | ための腸引張装置 腸の加工、腸切断装置、断片にする | |
| | 特 | 実 | 特 | 実 | 特 | 実 | 特 | 実 | 特 | 実 | 特 | 実 | 特 | 実 | 特 | 実 | 特 | 実 | 特 | 実 | 特 | 実 |
| 11 | 2 | | 0 | 0 | 2 | 4 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 20 | 1 | | 0 | 0 | 0 | 2 | 3 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| 22 | 1 | | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 20 | 8 | | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 23 | 2 | | 0 | 0 | 1 | 1 | 8 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 18 | 4 | | 0 | 1 | 0 | 2 | 6 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 15 | 2 | | 0 | 0 | 1 | 2 | 5 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 1 |
| 22 | 0 | | 0 | 1 | 0 | 1 | 3 | 4 | 0 | 8 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| 14 | 1 | | 0 | 1 | 2 | 3 | 9 | 12 | 0 | 9 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 13 | 0 | | 4 | 0 | 1 | 2 | 8 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 16 | 4 | | 4 | 0 | 0 | 2 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 1 | 2 |
| 17 | 3 | | 1 | 0 | 0 | 1 | 8 | 3 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 0 | 0 |
| 24 | 4 | | 5 | 0 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| 18 | 4 | | 3 | 0 | 1 | 1 | 16 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 13 | 8 | | 2 | 0 | 3 | 0 | 3 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 3 | 0 | 0 | 1 | 2 | 0 | 0 |
| 12 | 3 | | 0 | 0 | 4 | 3 | 4 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 1 |
| 10 | 5 | | 1 | 0 | 5 | 1 | 8 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 9 | 1 | | 1 | 0 | 0 | 6 | 4 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| 297 | 53 | | 21 | 3 | 20 | 31 | 107 | 51 | 3 | 18 | 0 | 1 | 6 | 7 | 2 | 10 | 2 | 0 | 20 | 10 | 5 | 4 |
| 350 | | | 24 | | 51 | | 158 | | 21 | | 1 | | 13 | | 12 | | 2 | | 30 | | 9 | |
| 20.8 | | | | | 2.8 | | 14.2 | | | | | | | | | | | | | | | |

© The Ito Foundation

表2のつづき

| 17/16 腸清浄、腸から脂肪あるいは粘液物を除去するための装置 | | 18/00 食肉処理用工場製造所 | | 21/00 家禽肉加工 | | 21/02 羽毛むしり取り | | 21/04 家禽湯剝、毛焼、ワックシング、ワックス抜き | | 21/06 家禽用内臓抜き装置 | | 小計 | | 計 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 特 | 実 | 特 | 実 | 特 | 実 | 特 | 実 | 特 | 実 | 特 | 実 | 特許 | 実用新案 | |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 4 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 39 | 11 | 50 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 2 | 0 | 1 | 1 | 0 | 3 | 0 | 64 | 19 | 83 |
| 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 2 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 60 | 26 | 86 |
| 0 | 0 | 1 | 0 | 9 | 1 | 0 | 2 | 1 | 0 | 2 | 0 | 87 | 59 | 146 |
| 1 | 1 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 95 | 40 | 135 |
| 0 | 0 | 0 | 2 | 4 | 3 | 2 | 4 | 0 | 0 | 1 | 2 | 65 | 45 | 110 |
| 0 | 0 | 1 | 0 | 5 | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 0 | 53 | 40 | 93 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 70 | 50 | 120 |
| 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 58 | 78 | 136 |
| 0 | 2 | 2 | 2 | 6 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 | 84 | 38 | 122 |
| 0 | 1 | 0 | 0 | 3 | 3 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 71 | 36 | 107 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 2 | 0 | 0 | 1 | 1 | 2 | 0 | 69 | 46 | 115 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 2 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 74 | 14 | 88 |
| 0 | 1 | 1 | 0 | 16 | 7 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 | 70 | 28 | 98 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 50 | 35 | 85 |
| 0 | 0 | 1 | 0 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 53 | 17 | 70 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 73 | 17 | 90 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 43 | 17 | 60 |
| 2 | 6 | 9 | 4 | 96 | 38 | 7 | 12 | 7 | 4 | 16 | 7 | 1178 | 616 | |
| 8 | | 13 | | 134 | | 19 | | 11 | | 23 | | | | 1794 |
| | | 0.7 | | 10.4 | | | | | | | | 100 | | |

© The Ito Foundation

**表3**　食品〔A23L〕のうち肉製品の年度別出願公開件数

| 分類番号 | 1/31 | | 1/311 ④ | | 1/312 ④ | | 1/313 | | 1/314 ④ | | 1/315 | | 1/317 ④ | | 1/318 ④ | | 小計 | | 計 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 公開年度 | 肉類の製品 | | ミートミールまたはフレーク | | 非食肉部分からのもの 皮、骨、髄、胃壁、耳、足、鼻など | | 肉類の抽出物、内臓エキス | | 添加物を含有するもの | | 家禽製品 | | した肉類製品 ソーセージを包含、粉砕または乳化 | | た肉片 やわらかく処理または風味付与され | | | | |
| | 特 | 実 | 特 | 実 | 特 | 実 | 特 | 実 | 特 | 実 | 特 | 実 | 特 | 実 | 特 | 実 | 特許 | 実用新案 | |
| 昭47 | 28 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 30 | 3 | 33 |
| 48 | 77 | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 84 | 8 | 92 |
| 49 | 66 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 11 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 77 | 6 | 83 |
| 50 | 37 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 45 | 5 | 50 |
| 51 | 55 | 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 61 | 15 | 76 |
| 52 | 71 | 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 75 | 21 | 96 |
| 53 | 60 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 11 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 71 | 7 | 78 |
| 54 | 78 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 18 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 96 | 7 | 103 |
| 55 | 50 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 13 | 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 65 | 15 | 80 |
| 56 | 42 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 9 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 51 | 5 | 56 |
| 57 | 63 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 11 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 75 | 14 | 89 |
| 58 | 52 | 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 17 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 69 | 11 | 80 |
| 59 | 40 | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 | 8 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 53 | 10 | 63 |
| 60 | 39 | 3 | 2 | 1 | 11 | 0 | 5 | 0 | 5 | 0 | 8 | 4 | 15 | 1 | 4 | 0 | 89 | 9 | 98 |
| 61 | 46 | 11 | 6 | 0 | 10 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 20 | 2 | 18 | 1 | 7 | 0 | 109 | 14 | 123 |
| 62 | 45 | 9 | 4 | 0 | 14 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 12 | 3 | 29 | 3 | 10 | 1 | 114 | 16 | 130 |
| 63 | 52 | 11 | 4 | 0 | 11 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 | 18 | 2 | 15 | 3 | 5 | 0 | 109 | 16 | 125 |
| 平1 | 62 | 11 | 3 | 0 | 9 | 0 | 1 | 0 | 4 | 0 | 21 | 1 | 28 | 9 | 10 | 0 | 138 | 21 | 159 |
| 小計 | 963 | 143 | 19 | 1 | 55 | 0 | 15 | 0 | 14 | 0 | 204 | 41 | 105 | 17 | 36 | 1 | 1411 | 203 | |
| 計 | 1106 | | 20 | | 55 | | 15 | | 14 | | 245 | | 122 | | 37 | | 1614 | | |

© The Ito Foundation

否か。接着性動物細胞の培養方法［C12N］から，ひょっこり，タンク培養—正真正銘の人造肉，というイメージを展開できるか否か。それがパテントウォッチャーの役目である。

3.3　肉類の製品［A23L］（**表3**）

〈食品目〉〈食品科〉〈肉類製品属〉は，7亜属に細分されている。このうち5亜属が第4版（昭和60年1月1日発効）で追加されたものである。だが第5版での追加はなく，西側先進国でのグルメ志向に，一段落の気配がうかがわれた。

それはそれとして，**表3**に示すとおり，日本での肉類製品に関するパテント出願は，今までのところ，ほぼ順調な上げ潮ムードである。組織切庁になぞらえれば，**表3**の印象は“部分的肥大”。まさしく，進行性変化（生活細胞が諸種の障害に対して，積極的に抵抗し，正常に近い生活を営まんとする活動的な生体反応）の様相を呈している。

こういう活気のあるところには，オヤッと意表を突くような発明がボンボン飛び出す。霜降り肉製造法（脂肪乳化液を注射して機械でもみほぐす）は，輸入牛肉のグレードアップに欠かせぬ技術となろう。ビーフジャーキーの軟化に黒砂糖，というのも面白い。イギリスから出願の粒状食肉片も秀抜である。肉そば，肉入りせんべい，血粉入りパン……，枚挙のいとまがない。

## 4.　結　　言

3年間の継続助成によるパテント調査で，川上（畜産）から川下（肉類製品）まで，食肉関連産業のほぼ全容を把握することができた。技術士としての所見を率直に述べれば，年間出願件数70万件，全世界の40数％を占める発明大国日本において，この分野のパテント出願状況は，惨めなほど極めて貧弱である。

パテントの出願は明白な経済行為であり，利益還元の期待できないところに無駄な投資は起こり得ない。故に，畜産衰微？　どうも違う。この分野に工業界のセオリーを当てはめるのは，間違いのような気がする。もっと素朴な問題，無知が根本的な原因のように思われる。

工学部の学生が工業所有権の重要さを頭に叩き込まれて卒業するのに対し，農学部の学生にはこれがない。パテントのパの字も教えられずに巣立つから，メーカーに就職した者以外，パテントに無縁のまま技術者生涯を終ってしまう。本人にとっても，業界にとっても，国家にとっても，大きな損失である。

だとしたら，畜産業，食肉産業の振興は，何よりもまず，農学部学生のパテント教育と発明奨励，これから着手せねばなるまい。この調査報告が文字どおり，「啓蒙」の一助になれば幸いである。

パテント調査の意義を認知され，これの遂行をご督励下さった近畿農政局長浅野九郎治先生並びに九州大学農学部教授深沢利行先生に，心より感謝の意を表します。また，調査助成を賜った伊藤記念財団に対し，心から厚く御礼申し上げます。

© The Ito Foundation

# 日本古代の食肉文化の再検討

The Reconsideration of Meat Comsumption on Japanese History

佐原　真・沢田　正昭・松井　章（奈良国立文化財研究所，埋蔵文化財センター）

Makoto Sahara, Masaaki Sawada and Akira Matsui
(Nara National Cultural Properties Research Institute, Center for Archaeological Operations)

It has been said that the people in Japanese islands did not depend on meat protein so much since the introduction of Buddhism or before Meiji. This project aims to reconsider if this fixed theory is still available. For, curent archaeological results have made it possible to show the wide range of animal utilization which was taken by prehistoric and historic people in this country since the ancient period.

The Iand of Japan was mostly covered with acid soil which was caused by mostly volcanic ash. This peculiarity made it difficult to preserve the animal bones in the archaeological sites, which they are consisted calcium and easily decomposed under the acid condition. In order to recover these fragile remains properly, special treatment should be taken in the archaeological context by means of conservation scientific method. The methods are as follows; The weak remains should be treated by aclyl body which can penetrate in bone tissue in order to reinforce the bone itself. The experimental examinations are done and good results are reported.

Owing to these proper treatment for recovering the animal bones, the number of the sites which preserve the animal bones are increasing. These sites are not only Jomon and YaYoi periods, but almost of every period, that is, even after the introduction of Buddhism. It has been clear that the people in this country maintained the custom of meat comsumption during all through the historical periods. This does not accord with Iiterary avidence or the common sense of Japanese history. Even the people of these periods wanted to conceal their habit of meat comsumption at the offical occations or literal records, only archaeology can uncover the real history.

## 1. 目　的

従来，日本の食肉文化の歴史は仏教伝来以来，明治時代になって西洋文化が入って来るまで低調であったと言われていた。事実，さまざまな文献史料はこの説を裏付けている。

しかし，近年の考古学の発掘によって多くの遺跡で当時の人々の食料となった動物の骨（動物遺存体）が報告されるようになり，上記の説の再検討が必要となった。本研究は，（1）保存条件に恵まれない日本の考古学遺跡において動物遺存体をいかにして原形を損わないで取り上げるか，（2）近年の発掘で出土した動物遺存体の分析，（3）文献史料にみえる動物関係記事の集成，などを目的としたものである。

## 2. 方　法

上記（1）については保存科学を専攻とする沢田正昭が，（2），（3）については，動物考古学を専攻とする松井章が実際の出土遺物の分析，文献史料のカード化などを主として担当し，佐原真が統括にあたった。

© The Ito Foundation

### 3. 結果と考察

（1） 動物遺存体の取り上げ方法の研究

日本の土壌は大部分が酸性を呈している。それは火山灰などが広く国土を覆っていることが最大の原因である。また，骨の主成分はカルシウムであるので，骨が土中に埋没すると短時間でカルシウムが酸性土壌の中で分解をはじめるのである。そのため，従来の考古学の遺跡で動物の骨が報告されたきたのは縄文時代の貝塚がほとんどで，そのほかの遺跡からの出土例は大変少なかった。しかし，近年，大規模な発掘が数多く行われるようになり，土中深く埋もれた堆積層から，安定した地下水に守られた動物遺存体（大部分が骨）が報告されるようになった。また，沖積地の遺跡においても，これまでの発掘技術では取り上げ下可能であった，なかば土に帰りかけた骨の取り上げも可能になり，考古学的に見た古代人の動物利用の歴史も多様な研究が可能になりつつある。本研究では，そうした脆弱遺物をどのように扱うべきかの研究を行ったものである。

a.現位置で，合成樹脂などを用いて遺物を強化して取り上げる。これだけでは，安全に取り上げができない場合，たとえば，遺物が大型の場合には，b.石膏などでサポートしてから取り上げる。しかし，実際には，発泡性のウレタンン樹脂で梱包すれば，軽量なので取り上げは，より能率的である。しかし，試料が発見されたところがヘドロ状に柔軟な場合には，c.液体窒素を利用して，試料を土壌ごとすばやく凍結すれば，支持材などを使わずに，容易に取り上げることができる。

a.試料が骨などの場合，再溶解が可能なアクリル系合成樹脂を利用するのがよい。b.では，従来の石膏では，取り上げた後，梱包を解除するときに遺物に余分の振動を与えることになるので，ここでは，発泡スチールようの硬質ウレタン樹脂を使ってみた。石膏に比べ，重量もかさばらず，合理的であった。この手法によれば，劣化が激しい各種遺物に適用できるほか，遺物を含む遺構をそのまま，一部切りとって室内に搬入することもできる。硬質ウレタンフォームは，軽量で，硬化後も容易にナイフ等による切り離しなどの作業が可能である。

2. 取り上げた遺物の処置法について

水分を過飽和に含む動植物遺体は，何らの処置無しに，自然に放置すると，収縮・変形がおこり，やがて元の形状が失われてしまうものが少なくない。これまでの研究では，木製遺物を対象にして，たとえば，「凍結真空乾燥法」などが利用されてきた。しかしながら，この方法では，処理期間が余りにも長くかかりすぎた。また，遺物の種類によっては，ある程度の柔難性をもたらす処理方法が望ましい。本研究では，これらの欠点を補う新しい手法を検討した。そして，ある程度の見通しを得たので報告する。研究の主なねらいは，次の3点である。

・遺物が出土した時点の，新鮮な状態を維持するためには，保存処理の期間を大幅に短縮すること。

・本来，柔難性を持つ遺物をそれなりに仕上げられること。

・保存処理後の遺物が，取扱いやすく，しかも耐候性に優れていること。

処理方法は，低粘度のシリコン樹脂を使用して，その重合反応が始まる前にすみやかに遺物にしみこませるようにする。そのために，低温のもとで，緩やかな減圧—加圧をサイクル化してこれを繰り返すことによって，短時間のうちに樹脂含浸させる方法を考案した。

この処理方法を平城宮跡出土の木材をはじめとする各種遺物について処理実験を試みた。まず，シリコン樹脂を含浸する前に，遺物に含まれる水

© The Ito Foundation

分をアルコールに置き換えて脱水することからはじめる。動植物遺存体（骨，布製品，縄製品，竹製品）の場合には，アルコール脱水するのに２～３日を要した。さらに，シリコン樹脂をしみこませるのに一日を要した。これは，従来の処理方法に比べると10倍以上のスピードアップをしたことになる。しかも，処理後の結果も，きわめて良好であった。今回は，動物の骨などに有効であることを確認したが，今後の課題は，動物の肉皮にいたるまで，安全に保存処理することである。

（沢田正昭）

（２） 各地から出土した動物遺存体の分析例

本研究期間中に行った遺跡出土の動物遺存体の整理，分析，報告は，ａ.広島県草戸千軒町遺跡（平安末～戦国初頭），ｂ.千葉県大作古墳（６世紀），ｃ.山口県延行条里遺跡（10世紀）などであった。以下に概要を述べる。

ａ．広島県草戸千軒遺跡

この遺跡は福山市の郊外を流れる芦田川の河床にいちする中世の港町で，長期間に渡って広島県教育委員会，広島県立草戸千軒町調査研究所が主体となって継続調査が行われてきた。遺跡全体が水漬けの状態であるので動物遺存体など有機質遺物の保存に適しており，発掘当初から多くの動物遺存体が出土してきた。松井は出土した動物遺存体のうち，一部の固定，集計作業を行った。その結果，中世の人々もまた，従来文献史から知られていた以上の食肉文化を持っていたことがわかった。その成果の一端はすでに発表済であるが（松井 1989），要約すれば次のようになる。

・出土した動物遺存体のうち，哺乳類で最も多いのはイヌで，2/3を占める。他には，ニホンジカ，ウマ，ウシが主要である。

・これらのイヌが食用にされていたことは，出土したイヌの頭蓋骨，四肢骨に刃物の切傷があることから明白である。

・同じごみ捨て穴に捨てられるイヌの部位が，前足，後足などが複数本まとまっていることから，自宅で１頭のイヌをと殺，調理したというよりは，市場の様な場所で購入した可能性が強い。

イヌ食いは今でこそ奇異に思えるかも知れないが，東アジアから東南アジア，オセアニアにひろく見られる習俗なので，中世の日本人もまた，考古学的に見てアジアの諸民族となんら変わるところがなかったことがわかる。

ｂ．千葉県大作古墳

この古墳は佐倉市所在の墳丘を完全に削平された円墳で，千葉県文化財センターが発掘を行ったものである。この円墳の周濠に切れ込む形で長さ約２メートルの楕円形の堀込みが２か所検出され，そのうちの一つから生前の位置をとどめたウマの歯と，馬具が出土したのである。上下の顎歯の間には銜が存在し，轡や鏡板などと鞍金具との位置関係から，このウマがこの穴の側で首を落され，胴体を逆さに落し込まれた後，首から上が尻の位置に投げ込まれたことが判明した。『日本書紀』の646年，「大化の薄葬令」に次のような記載がある。「およそ，人死亡ぬる時に，若しは自を経きて殉ひ，或は人を絞りて殉はしめ，強に亡人の馬を殉しめ，或は亡人の為に宝を墓に蔵し，或は亡人の為に髪を切り股を刺して誄す」ことなどを禁止する。この記事から，人が死んだときに，馬を犠牲にして墓に埋めることがあったことがわかっていた。しかし，実際に古墳に馬が殉葬されたことがわかる出土例は大変少なく，この資料によって古墳の喪葬儀礼において馬具を付け正装させた馬の首を斬り落して古墳の傍らに掘られた土坑に落し込んだことがわかったのである。このような儀礼は朝鮮半島の新羅にも見られ，新羅皇南堂古墳群の３号墳の周囲に馬墳とよばれる楕円形の馬を葬った遺構が報告されている。また，日本列島ではこのような例は，鳥取県長瀬高浜遺跡の円墳

© The Ito Foundation

で知られるが他には例を見ない。そのことから，この例も朝鮮半島の喪葬儀礼を継承する人々によって築かれた可能性が強いだろう。本例は日本においても喪葬時に動物犠牲が伴った明白な例として貴重な例となる。

c．延行条里遺跡

本資料は，下関市の北部に立地する平安時代から鎌倉時代にかけての条里遺跡から出土した。そのなかから浅い土坑に仰向けにされていれられたウマの頭蓋骨が出土したのである。土坑の大きさ，深さからこの土坑には最初からウマの首だけが収められていたことは確実であった。また，草戸千軒町遺跡でも，ウシの前肢，後肢を足首でしばった後，首を落して胴体だけを池のなかに投棄した例があった。このようにウマやウシの首をなんらかの祭祀に利用したことがわかった。（松井章）

（3）　文献史から見た食肉文化

a．動物関係記事データベースの作成

日本の代表的文献史料である『風土記』，『日本書紀』などの『六国史』，『日本霊異記』や中近世の諸文献から動物関係記事を選び，記事ごとにキーワードをつけてデータベース化を試みた（参考資料参照）。このデータベースは現在，着手したばかりで今後一層の仕事量を必要とする。

b．動物関係記事からみた食肉文化

上記の作業によって，従来から考えられてた以上に，古代の日本人の固有文化に食肉文化が深く根付いていたことがわかりつつある。例を示すと，天武天皇４年４月に次のような詔勅がでている。「今より以後，もろもろの漁猟者をいさめていわく，檻槍（おとしあな）および，機槍の類を置くこと莫れ。また，４月朔以後，９月卅日以前，比弥沙理の梁を置くこと莫れ。また，牛馬犬猿鶏の宍を食うこと莫れ。以外は禁例にあらず。もし犯すものあらば罪せむ。」この記事からわかるように，殺生肉食の禁止例も期限を切ってのもので，わざわざ以外はかまわないこと断っているのである。

また，聖武天皇の詔勅にも次のような記事がある。「天平４年７月　丁未　詔して　畿内の百姓らの私に飼いたる猪40頭を和買いして山野に放ち，性を遂げさしむ。」この記事からも近畿地方の農民が個人ごとに猪を飼っていたことがうかがえるのである。豚という漢字はもともとは無く，ここにみえる「猪」というものが大陸からもたらされた家猪（豚）かどうかはわからない。しかし『日本書紀』巻18，安閑天皇２年の紀事に「猪飼部」を設置する記事があるうえ，『播磨風土記』「賀毛の条」に次の記事が見られる。「猪養野　右，猪飼いと号くるは，難波の高津の宮に御宇しめしし天皇のみ世，日向の肥人，朝戸君，天照大神の座せる舟の於に，猪を持ち参来て，進りき。飼うべきところを，求ぎ申し仰ぎき。」

このように，古代においても殺生禁止例が時限立法であったこと，他にも「猪」を飼ったことを示す記載があり，当時の百姓が猪を飼っていたことなどがわかり，古代における食肉風習は一般に考えられていたよりもはるかに普及していたことがわかった。ただし，一方，『古事記』『日本書紀』には，鹿とならんで「猪」が狩猟としての対象としても記載されており，野獣としてのイノシシ，家畜としての豚の両義をもっていたことも事実である。なお，ここで近年の考古学的事実にも触れておくと，水分市下郡桑苗遺跡の動物遺存体の中に，ブタに属するものがあることが，西本豊弘によって明らかにされた。その後，佐賀県菜畑・吉野ガ里，大阪府池上・亀井，奈良県唐古，愛知県朝日遺跡などの弥生遺跡でもその存在が明らかにされた。

これによって，古墳時代の「猪」の埴輪がブタになる可能性も生じてきた。　（松井章）

© The Ito Foundation

## 4. まとめ

日本古代の食肉文化史の研究は，従来，そう活発であったとは言えない。一方，食用植物や，魚介類の研究は盛んであった。これは，一つには日本人の食の趣向がそのまま研究にも反映したからであろう。食肉文化の考古学的研究は欧米ですすんでおり，これに学ぶところが大きい。この動物考古学の方法と文献の動物関連記事の集成とを総合することによって初めて，日本の食肉文化史は正しく叙述出来ることになるだろう。遺存状態の劣悪な動物遺存体を保存科学的に安全に取り上げ，観察，計測に堪える資料として活用できるようにする技術の向上もまた急務である。

今回のデータベース化を開始した古代からの文献史料の動物関係記事は，およそ，全体の約3分の1を収集したに過ぎず，この作業を一層すすめることが，日本の食肉文化の実態を再検討する基本資料となるだろう。

**文　献**

1) 松井　章　1989「中世の動物資源」『草戸千軒』第17巻6号　広島県草戸千軒遺跡調査研究所　pp. 45-47.

2) 佐原真　1989「食から見た日本史　古代の食三項一「料理」・ブタ・縄文食」*VESTA* NO.1 pp. 17-35.

3) 1989b「食から見た日本史　古代の食2—食物と心臓」*VESTA* NO.2 pp. 33-35.

© The Ito Foundation

# 第7回国際反芻動物生理学シンポジウム

## Ⅶ International Symposium on Ruminant Physiology

津田 恒之・*佐々木 康之・**川島 良治・***柴田 章夫・*堀口 雅昭
*星野 忠彦・*正木 淳二・*庄司 芳男
(東京農業大学, *東北大学農学部, **京都大学農学部, ***日本大学農獣医学部)

Tsuneyuki Tsuda, *Yasuyuki Sasaki, **Ryoji Kawashima, ***Fumio Shibata,
*Masaaki Horiguchi, *Tadahiko Hoshino, *Junji Masaki and *Yoshio Shoji
(Tokyo University of Agriculture, *Tohoku University,
**Kyoto University and ***Nihon University)

The Seventh International Symposium on Ruminant Physiology was took place at Sendai Civic Auditorium from 28 August to 1 September, 1989. About 500 participants from 33 countries gathered in Sendai, Japan.

The objectives of the Symposium was to present recent findings and opinions for further development of ruminant physiology and for new challenges to more efficient ruminant production.

Ruminants, world wide distributed animals, can produce high quality food for human being by digesting corse feedstuffs which can not be utilized by human. The theme of the present Symposium was "Physiological Aspects of Digestion and Metabolism in Ruminants".

The scientific programme included main sessions and short communications. In the main sessions, 30 speakers were invited to present their new works and ideas in their special fields of studies. They were grouped 3 or 4 each corresponding to following 8 subthemes. The titles of subthemes were 1. Physiology of the Digestive Tract 2. Secretion and Absorption 3. Regulation of Intermediary Metabolism 4. Water and Mineral Metabolism 5. Comparative Physiology of Digestion 6. Digestion 7. Microbiology 8. New Challenges in Ruminant Physiology.

The Proceedings of the Symposium will be published soon in the form of a book and will contain the full text of the invited papers.

The short communications, 185 in total, from 30 countries were presented in the poster sessions. They were all concerned to new and important developments relating main session topics and formed part of the background information at the Symposium. They were published in the "Asian-Australasian Journal of Animal Sciences", Vol.2, No.3, the official publication of the Asian-Australasian Association of Animal Production Societies.

The Symposium resulted in good success, not by the large number of participants or quite well arranged management of the Meeting but by the presentations in both main and poster sessions which gave valuable impressions to the audience. It was believed the results of the Symposium contributed to the new progress of ruminant physiology and served to the further development of ruminant production in the world.

© The Ito Foundation

## 1. 目　的

食料生産体系のなかにあって草食家畜は不可欠な存在である。なかでも反芻家畜は，長い進化の過程で発達した独特の生理機能を備えることにより，人類が直接利用することのできない粗剛な草類を栄養として自らの生命活動を営むと同時に，穀類生産には不適な広大な地域において良質な食物を人類に供給できる唯一の生物である。反芻家畜は各種の環境ならびに飼料に対する適応力がきわめて高いため，地球上のいたるところに広く分布しており，その生産する食料は莫大な量に達している。

今後予想される世界人口の爆発的増加に対応し良質の食料を生産するために，反芻家畜の重要性はますます増大してゆくものと考えられる。このような背景のもとに第一回国際反芻動物生理学シンポジウムが開催されたのは1960年，イギリスのノッチンガム大学においてであった。以後，5年毎に世界の各国で開催され，第七回が我が国で開催されることとなった。

反芻動物の生理を理解するためには，狭い意味での生理学のみならず，広く形態，生化学，薬理，微生物，内分泌，飼料，栄養学者などの協力が必要である。したがって，この会議ではテーマの選定に留意し，世界の第一線の科学者に参集を願い，最新の研究成果を発表しあうと同時に参会者相互が活発な討論を行うことにより，反芻家畜生産の一層の発展を期待して開催されたものである。

## 2. シンポジウムの概要

会期は平成元年8月28日より9月1日までの5日間，会場を仙台市市民会館として開催された。世界34国より約500人の参会者があった。

メインテーマは「人類の福祉と発展のために反芻家畜の生産向上を図る新戦略」とした。この主題のもとに8つの分科会が設定され，各分科会ごとに3～4人の招待講演者が選定され，計30人の科学者が講演を行った。また，ポスター展示による単報の発表も行われ，9つの分科会が設定された。

### 2.1 招待講演（メイン・セッション）

第1セッション：消化の生理学

このセッションでは消化管の運動調節についての話題が提供された。Cottrell博士（英国）は第四胃や十二指腸に刺激を与えると消化管運動が変化することについて，刺激の受容器の存在位置と運動変化の関係について述べ，またReid博士（オーストラリヤ）は第二・三胃口運動の調節機構について言及した。Galfi博士（ハンガリー）は第一胃上皮細胞の分裂機構についての知見を発表した。

第2セッション：分泌と吸収

ガストリンは胃酸分泌を刺激するホルモンであるが，Reynold博士（ニュージーランド）は十二指腸下部から分泌されるガストリンの種類について述べ，加藤博士（日本）は膵外分泌が反芻動物特有の短鎖脂肪酸によって刺激されることを発表した。またWebb博士（アメリカ）はアミノ酸が小ペプチドの形で吸収されるものが相当量をしめることを発表し，注目された。さらにGaebel博士（西ドイツ）は前胃からの電解質の吸収は短鎖脂肪酸によって促進されることを述べた。

第3セッション：中間代謝調節

この分野は最近の進歩が著しく，注目をあびている研究が多い。Vernon博士（イギリス）は組織のホルモンに対する反応性は，生体の状態（妊娠，疾病など）で変化する事実を述べ，その機構を推論した。Weekes博士（イギリス）はインスリンを含む糖代謝調節ホルモンの作用機序について，Harris博士（ニュージーランド）は新たに開発した研究法を駆使して，皮膚におけるアミノ酸

© The Ito Foundation

とエネルギー代謝の関連について述べた。また，Annison博士（オーストラリヤ）は各種条件（成長，妊娠，泌乳など）下の動物におけるエネルギー物質とアミノ酸代謝のホルモン性調節を中心に述べた。

第4セッション：水とミネラル代謝

Olsson博士（スエーデン）は心房より抽出したペプチドにあるナトリウム利尿効果について山羊を用いて実験した結果を，また矢野博士（日本）は重要なマクロミネラルであるCaとPについて，吸収の機構とホルモンによる調節について論じた。Chaiyabutr博士（タイ）はタイにおける水牛の環境生理学的研究を特に腎機能を中心に述べた。さらにGrace博士（ニュージーランド）は各微量ミネラルの代謝や欠乏について必要量や許容範囲を示した。

第5セッション：消化の比較生理学

反芻動物の消化機能を形態学的観点から他動物と比較しつつLanger博士（西ドイツ）が，また我が国でも最近盛んになりつつあるシカの飼育について，生理学的および生態学的観点から，Barry博士（ニュージーランド）とLoudon博士（イギリス）が，さらに広い範囲の草食動物について摂取飼料と消化管形態についてHume博士（オーストラリヤ）がそれぞれ視点を変えつつ，各自の研究を中心に論述した。

第6セッション：消化

全セッションのなかでも最も関心を集めたものの一つである。飼料粒子の通過あるいは消化速度に関する研究は最近，活発に行われている研究分野である。Lechner-Doll博士（西ドイツ）は粒子の通過速度はその大きさだけでなく，密度が影響するとし，またGalyean博士（アメリカ）は第一胃と腸で行われる消化の程度を知る実験手法を紹介しつつ，その成果について述べた。小原博士（日本）は蔗糖添加の影響が消化，特にN代謝に及ぼす影響をNの安定同位元素を駆使して解明した。また，Broderick博士（アメリカ）はタンパク質の分解速度と程度に及ぼす種々の要因について詳しく論及した。

第7セッション：微生物

反芻動物の消化を特徴づける第一胃発酵の中心的課題は微生物に関するものである。Cheng博士（カナダ）は第一胃細菌が飼料片に付着して消化してゆく機構を顕微鏡写真などを駆使しながら解説した。牛田博士は従来からの論争点である第一胃プロトゾアの存否の消化性に及ぼす影響を論議した。Fonty博士（フランス）は，最近特に注目を集めつつある真菌の性状や飼料消化に及ぼす影響について論議した。Russel博士（アメリカ）は第一胃発酵時におけるアンモニア産生の機構について最新の知見を発表した。

第8セッション：新しい反芻動物生理学にむけての挑戦

このセッションは将来の反芻動物生産にむけて，生理学の貢献しうる範囲と可能性を探る重要な分科と位置づけた。Teather博士（カナダ）は第一胃セルロース分解菌の遺伝子解析を行い，これを大腸菌に移して機能発現に成功し，リグノセルロース分解能の遺伝子操作が可能であることを示した。Gregg博士（オーストラリア）は第一胃細菌に植物の有する毒素に対する解毒能を付与する手法について報告した。Armstrong博士（イギリス）は畜産におけるバイオテクノロジーの応用とその展望について，単に遺伝子工学的手法のみならず，ホルモン操作，新飼料開発などの諸方策について述べ，全セッションを締めくくった。

すべての演者の講演内容は，いずれも広く現在の知見を総括し，あわせて演者自身の実験結果を中心に新たに得られた進展について述べたものであり，全聴衆に多くの感銘を与えた。

なお，この講演内容はまとめて「Physiological

© The Ito Foundation

Aspects of Digestion and Metabolism in Ruminants」としてAcademic Press社より近々出版される。

2.2　ポスター・セッション

メイン・セッションに対応する8分科および「その他」を加えて計9分科についてポスター・セッションが行われた。世界の30ヵ国から185題に及ぶ発表申込みがあり，その抄録はアジア・太平洋家畜生産会議の機関誌である「Asian-Australasian Journal of Animal Sciences」の第2巻，3号に発表された。

このセッションは各メイン・セッションが終了するごとに会場前の展示室で各50分ずつ行われた。ポスターによる展示は，最新の研究成果を発表し，関心を持つ人と個人的に十分な討議ができることに利点がある。ことに英語の不得意な日本人にとっては，世界の一流の学者と直接会話することによって，相互理解を深めうる効果があった。発表予定者の欠席数（12人）も少なく，常に活況を呈していた。

2.3　社交行事

シンポジウムの期間中にいくつかの社交行事が行われた。会議の前日の夜には歓迎レセプション，最終日にはバンケット，また第3日目には10台のバスを仕立ててテクニカル・ツアーが行われた。このツアーでは宮城県畜産試験場，有備館（旧伊達藩校），日本こけし館，東北大学付属農場を見学し，同農場で野外パーティを行った。また会議期間中は連日，同伴者のためのプログラムが組まれた。どの行事も大変好評で，世界各国からの500人近い参加者が相互に親善を深め得たことは，今後の学術を含めた交流増進に大いに役立つことであろう。

また会議中に学術委員会が行われ，次回の本シンポジウムは1994年にドイツで開催されることが決定され，公表された。

## 3.　サテライト・シンポジウム

主シンポジウムの前後に計6つのサテライト・シンポジウムが行れた。

(1)　Hindgut Club, 8月27日，エルパーク　仙台

(2)　アジアにおける反芻家畜の生理と栄養。8月28日　仙台市民館

(3)　国際シカ・シンポジウム，9月23日　仙台市民会館，岩手県三陸町

(4)　反芻動物のミネラル栄養と要求に関する国際研究集会，9月3日　京都ルネッサンスビル

(5)　寒冷地の農業技術に関する国際シンポジウム，9月3日～6日　帯広畜産大学，帯広市民文化ホール

(6)　ルーメン微生物シンポジウム。9月4，5日　箱根アルパイン・ハウス

これらのシンポジウムはいずれも，それぞれの代表者が，会場設定，プログラム構成，資金確保，会議運営などの業務を責任をもって処理された。ただ，アジアにおける反芻家畜の生理と栄養に関しては代表者の一人が外国人であったことから例外とした。

サテライト・シンポジウムはおよそ50～100人程度の集会であったが，それだけに，そのテーマに特別の関心を有する科学者の集まりであるので，より深い討議ができ，より親密な交流が出来る利点があった。若い科学者にとっても名前のみを知っている世界の学者と直接対話できたことは有益であったであろう。資金面，労力面で本シンポジウムと競合しなければサテライト・シンポジウムは有効な集会形態と云えよう。

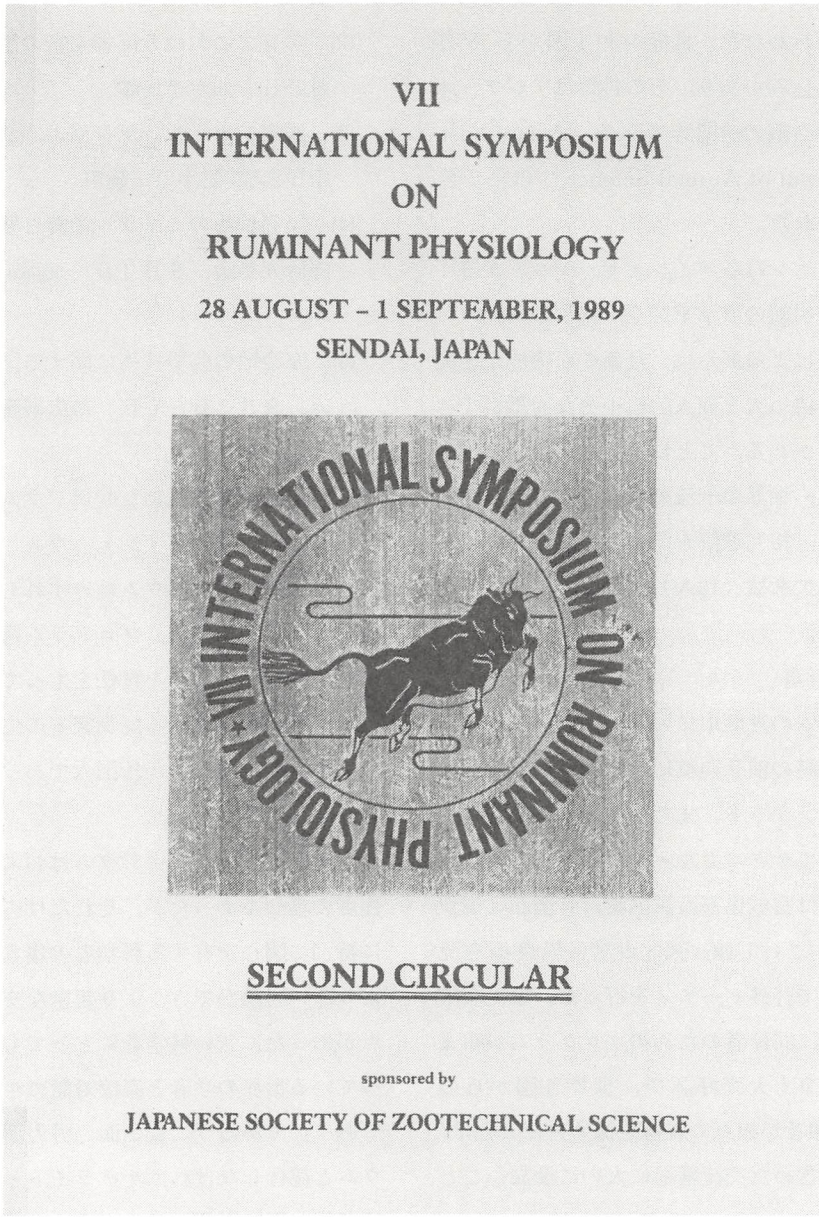
## 4.　結　　語

国際シンポジウムの開催は著者らにとっては初

© The Ito Foundation

めての経験であり，いささかの不安も伴ったが，幸い，結果的に大きな成功を収めることができた。単なる参加者の数や，運営上の完全さによるのみでなく，会議における諸発表が参加者に大きな刺激を与え，日本を含む世界各国の反芻動物生理学の一層の発展に貢献し，ひいては畜産業の発展に寄与し得たと信ずるからである。

ここに本シンポジウムの開催に快く財政的援助を与えてくださり，成功に導いて下さった伊藤記念財団に衷心より謝意を表する。




第7回国際反芻動物生理学シンポジウムの
セカンド・サーキュラーの表紙

© The Ito Foundation

# 第35回国際食肉科学技術会議の概略

An Outline of Research Presentation in the 35th International Congress of Meat Science and Technology

日本食肉研究会

The Japanese Research Society of Meat and Meat Products

The 35th Internationel Congress of Meat Science and Technology was held in Copenhagen, Denmark at Ausust 20 to 25th, 1989. Four hundred and eighty three scientists of research and industry organization, related to meat investigation, participated in this congress from 38 countries of the world.

The Japanese Society of Meat and Meat Products sends a limited membership to this congress, every year, and this activity is supported with a research grant by the Ito Foundation. Appreciation for this support is expressed to the Ito Foundation.

This congress was composed of 6 sessions and seminars. Various theme, regarding to meat quality, storage, hygiene, evaluaticn, safety, production, starter cultures, bacteriology processing technology, additives, packaging, and the others, were reported and discussed.

第35回国際食肉科学技術会議（35th International Congress of Meat Science and Technology, 略称, ICOMST-89）は1989年８月20日より同25日まで，デンマーク国，コペンハーゲン市において開催された。デンマーク国は北緯55°付近にあり，首都コペンハーゲンは人口約50万人の田園都市であり，会議は市内のスカンジナビアホテルを会場として行われた。この会議への参加国はソ連，東欧諸国も含めて38ヵ国におよび，参加者数は483名，発表演題数は196題であった。

発表は６つのセッションに分れ，ポスターセッションもまじえて連日分科会別に同時実施された。また関連セミナーも行われた。

セッション１では，オンライン法による正肉と枝体の品質評価がテーマとなり，16の発表がなされた。すなわち，基調講演としてデンマークのS.E. Sørensen氏が実際にデンマークにおいて行われているオンライン法を例示して，このオンライン法が将来どこまで発展し得るかについて述べた。現在はブタ枝体中の正肉量およびモモ，カタ，ミドル，バック，ベリーの赤肉量についてオンライン法が実用化されており，保水力，筋肉中の脂肪量（霧降り率）についても既に実験段階にきているとのことであった。なお1995年頃までには，筋肉中のタンパク質量についてもオンライン化によって瞬時の測定が可能と予測されている。

また，関連セミナーとして２日間にわたって11題の特別講演が行われ，第１日目は現在使用されているコンピューターを最大限利用した最新のオンライン測定法ならびにその装置のシステムについて，それらの長所および短所も含めて詳細な説明がなされた。ついで２日目は，アイルランド，オランダ，スエーデン，フランス，アメリカ，カナダおよびデンマークの代表者が，それぞれの国で現在使用されているオンライン法とその普及状況について解説を行った。

© The Ito Foundation

一方，一般講演はすべてポスターで行われたが，13題の発表はオンライン法のパラメーターおよび装置に関するもので，PSE豚の検出，肉色，肉脂率等に関するオンライン法によるデータの報告が行われた。その他馬肉のと体特性，鴨肉の除骨後の収量について発表があった。

セッション2では，細菌学，衛生，保存性と食品の安全性がテーマとなり，41の発表があった。基調講演としてスイスのM. Van Schothorst氏が，最近多く発現のみられるリステリアやカンピロバクター等の肉と肉製品中の病原性細菌について講演をした。すなわち，その原因は食中毒の発症例ばかりでなく，消費者側の食生活の変化による細菌相の変化にあることを紙摘し，これに対する企業側の対応の仕方を取りあげたもので，非常に関心を集めた。また当セッションの関連セミナーとして，2日間にわたって6題の特別講演があり，第1日目は2人の演者により，現在企業で実際に利用されている迅速な細菌検査法および細菌の分離，同定法が紹介された。第2日目は，4人の演者により，低温輸送中における肉と肉製品の実際の温度変化その他について例示して，輸送中の細菌増殖の状態等に関して詳細な発表が行われた。また今後予想されるヨーロッパを中心とした法的な規制についても付言された。一般講演は，肉と肉製品の細菌汚染に関する発表が6題，$CO_2$ガス等を用いた細菌コントロールに関する発表が8題あった。また，発酵ソーセージなどのスターター関係の発表が7題あり，そのうち4題が乳酸菌に関連するものであった。なお，放射線殺菌や，変異原性についての発表も若干みられた。

セッション3では，分析方法がテーマであり，基調講演としてデンマークのK. Voldum-Clausen氏が，食品中の有機および無機物質の残留の最近の現状とそのコントロールについて発表した。特に肉と肉製品において重大な問題となっている殺虫剤，重金属，ホルモン剤，マイコトキシン，エチレンオキシド等の残留物質に焦点を絞り，法的規制も含めて講演が行われた。また話題提供者としてアメリカのR.L. Ellis氏によるアメリカ農務省で実際に使用されている残留物質コントロールのためのプログラムの紹介がなされた。またセッション3の特別講演は5日間に分れて4題の講演があり，第1日目は，肉種鑑別および異種タンパク質の検出についてその有効性と検出限界について最近の技術が紹介され，第2日目は，マススペクトロメーターを用いた肉中の多岐にわたる残留物質の検出方法が述べられた。セッション3の一般講演は，29題の発表がありその内容は多岐にわたった。すなわち，電気泳動法の違いや，染色方法の違いによる肉種鑑別法，総窒素量の迅速測定法，ミオシンゲルやコラーゲンの測定法，ニワトリの可溶性タンパク質の精製法，肉色の測定方法等が報告された。また，脂質関係では，DSC法による脂肪の違いに基づく熱特性の差異，組織脂肪中のコレステロール量，$^{1}H$と$^{13}C$とを用いたNMRによる筋肉中の脂肪の蓄積状態などが報告された。また，特異な報告としては，エジプトから，ラグダ，ヤギ，マトン，バッファローのタロー中に混入されたラードの検出方法が3題報告され，エジプトではこのラードの混入が大きな社会問題となっているとのことであった。そのほか，肉中のBHCとDDT等の農薬の残留物質関係，デンプン混合ソーセージの電子顕微鏡による観察などの発表があった。またノルウェーからは，トナカイ肉中の放射性物質の検出についての報告があり，なお今日でもソ連のチェルノブイリ事故の影響がみられるとのことであった。

セッション4では，と殺と食肉加工における情報工学がテーマであり，基調講演としてデンマークのClaus Hagdrup氏により「と畜工業のためのCIM（Computer Intergrated Manufacturing）

© The Ito Foundation

の考え方」と題して行われた。すなわち，と畜—解体—除骨というプロセスのなかで，ブタごとに生体から製品までに得られる利益を最大にすることが目的であり，そのためには品質規格の変化に如何に対応するかが重要であるとのことであった。またGIMについてほかに2題の講演が行われた。ポスターによる発表は4題と少く，食肉工業における情報処理や食肉加工ラインにおける自動制御，と殺場の管理のためのデータベースシステムの利用などのテーマについて発表がなされた。

セッション5では，新しい製造技術と製品開発がテーマであり，49題の発表が行われた。基調講演としてイギリスのN.V. Ashley氏により，「食肉加工技術の研究開発の挑戦」というテーマで行われた。すなわち，酵素を利用した食肉加工技術，バイオセンサーによる工程管理のオンライン化，そして肉質や産肉量の向上した病気に抵抗力のある家畜の遺伝子組替えによる作出技術が，今後非常に注目されるという内容であった。ポスターによる発表は，演題数が多く，各国の独特の製品について，技術的な改良に関する報告が目立ち，大基模な自動製造ライン化に関するものから，サラミソーセージに添加するスターターカルチャーに関する報告まで，多岐にわたった。と畜血液の利用に関する発表が3題，ダイエット食肉製品に関する発表が2題，酵素に関する発表が若干みられた。なお「亜硝酸を使用しない塩漬システムの開発」は，添加物の問題を考えてゆくうえで，興味深いテーマであった。

セッション6では，筋肉の生物学，食肉の生化学がテーマであり，西ドイツのK.O. Honikel氏により「肉のと殺後の経過と品質—研究ニーズの予測」という演題で行われた。と殺後の肉の変化について解説があり，保存期間を延ばし，消費者の求める品質を達成するための研究の一層の進展が必要であることを述べている。ポスター発表は，57題と多くの演題があり，と殺までの輸送や管理の肉質への影響，ビタミンや成長ホルモンの投与による肉質への影響などのテーマが注目された。電気刺激による肉質の改良に関するテーマは4題あり，その内容もハンバーガーにしたときの色とその安定性についてのものがあるなど，一層具体性の増したものになっていた。

なお，8月22日，会議の間に代表者会議が昼食会をかねて開催された。ここでは会議事務局からの総務・会計報告と質疑がなされ，ついで次回のキューバで予定されている第36回本会議の案内が担当者からあった。そして今後の会議の開催予定地として，'91：西ドイツ，'92：フランス，'93：カナダ，'94：オランダの順に決定された。

最後にこの事業は，(財)伊藤記念財団よりの研究助成による日本食肉研究会の海外派遣事業として実施されたことを付記し，伊藤理事長はじめ関係各位へ深甚なる謝意を表する次第である。

© The Ito Foundation

## 第35回国際食肉科学技術会議発表テーマ一覧

（1989年8月20日～25日，デンマーク，コペンハーゲン）

**総説講演 Ⅰ.**

デンマーク食肉産業と今後の食肉の研究および発展との関連の見とおし

A .Toft Fensvig（デンマーク）

**総説講演 Ⅱ.**

食肉・肉製品産業に対する小売業者の期待

E. Schulz（デンマーク）

**セッション 1. オンライン法による正肉と体の品質評価**

基調講演

オンライン法のと体品質評価測定への利用—その将来と展望—

S. E. Shrensen（デンマーク）

1. 豚肉の品質測定における反射測色計の評価

A. C. Murray ら（カナダ）

2. 測色計による野外での PSE 豚の検査

A. Fortin（カナダ）

3. 異なる年齢のブタのと殺後の pH の低下速度—2つの pH 測定法の比較—

R. Kivikari ら（フィンランド）

4. 豚肉固有の肉色測定に基づくオンラインシステム

J. R. Andersen（デンマーク）

5. 保水力と筋肉内脂肪量のオンライン測定法における MQM（Meat Quality, Marbling）測定装置の将来性

C. Borggaard ら（デンマーク）

6. 子牛肉の格付けにおける肉色測定の意義

G. Eikelenboom ら（オランダ）

7. 包装牛肉の赤肉量のオンラインモニター法

I. J. Eustace ら（オーストラリア）

8. 選抜されたウシのと体の正肉歩留りに及ぼすと体等級の影響

L. Muller ら（アメリカ）

© The Ito Foundation

9. 形態測定に基づくモモ肉の骨と筋肉比の評価

B. L. Dumont（フランス）

10. ブタの格付けの非破壊測定法　格付け装置による算出の確実性

W. Bransheld ら（西ドイツ）

11. 9—10—11助骨カット牛肉の筋肉，脂肪および骨の含量と11助骨カット牛肉の断面積の相関関係

R. Rddovanovic ら（ユーゴスラビア）

12. ブタのと体と部分肉の組成および重量測定のための電磁走査法

C. H. Kuei ら（アメリカ）

13. と体格付け計画における超音波ビデオイメージ解析と反射光測定の意義

A. V. Fisher ら（イギリス）

14. ウシのと体の骨格の成熟および年齢との関係の変動

B. L. Dumont（フランス）

15. ウマの枝肉歩留りおよびと体の特性

M. Mandfredini ら（イタリア）

16. 調理済カモの収量に及ぼす給餌制限および性の影響

M. R. Abbas ら（イラク）

**セッション　2.　細菌学，衛生，保存性および食品の安全性**

基調講演

肉および肉製品の最近の病原性細菌

M. Van Schothorst（スイス）

1. 生肉の総生菌数の５分間テスト法

B. Eriksen（デンマーク）

2. 免疫学的手法に基づく迅速細菌検出法における細胞壁抗原の選定

J. Labadie（フランス）

3. 傷んだ真空パック冷蔵半肉からの Clostridium SPP の分離および Pediococcus acidilactici に対する感受性

B. Ray ら（アメリカ）

4. 清潔にと殺されたスペインブタの口腔中の Yersinia SP. のリストアップ

E. Bermudez ら（スペイン）

© The Ito Foundation

5. $CO_2$ 充てん包装・高 pH 牛肉の好冷病原菌の生育

C. O. Gill ら（ニュージーランド）

6. 肉の 2，3 の乳酸菌の同定

M. C. Montel ら（フランス）

7. 調節された雰囲気または血液によるボツリヌス菌の生育と毒の産生の調整

A. J. Miller ら（アメリカ）

8. スペインのドライ発酵ソーセージから分離された乳酸菌の抗菌性

J. M. Rodriguez ら（スペイン）

9. ドライソーセージ生産に対する Micrococci と Lactobacili の影響

D. Obradovic ら（ユーゴスラビア）

10. ミートスターターの脂肪分解能

H. Nielsen ら（デンマーク）

11. ドライ塩せきハムから分離した微生物の脂肪分解能

P. Nieto ら（スペイン）

12. インピーダンス的方法によるスターターの特性

A. Olsen ら（デンマーク）

13. 2 種類の食肉（ブタとウシ）における乳酸発酵

I. Guerrero ら（メキシコ）

14. 細切肉工業における $CaCl_2$ 使用の技術的，細菌学的展望

N. N. Lipatov ら（ソ連）

15. と場における細菌学的監視プログラム

F. A. Stolle（西ドイツ）

16. と殺の間にブタの受ける細菌学的汚染

E. Nerbrink ら（スエーデン）

17. と殺およびチルド処理間の腐敗細菌による牛と体の汚染

P. Gustavsson ら（スエーデン）

18. と殺技術との関連におけるブタのと体の Yersinia 菌汚染

R. Shrensen ら（デンマーク）

© The Ito Foundation

19. サウジアラビアに輸入されたニュージーランド産の包装チルド羊肉（真空および$CO_2$充てん）の貯蔵性

A. M. Carout ら（アラビア）

20. 非均一で準温と体の輸出後の細菌学的品質

A. E. Olsen（デンマーク）

21. 加熱，スライスして包装されたハムの賞味期間

G. Bertelsen ら（デンマーク）

22. 真空パックボロニアソーセージの酸素充満性，初期の細菌数および貯蔵温度による賞味期間の差異

F. Andersen（デンマーク）

23. 乾燥，塩づけした羊肉の貯蔵安定性

J. F. F. Zapata ら（イギリス）

24. 温除骨したブタのと体のガス置換と真空包装の比較

R. A. J. M. Van Laack ら（オランダ）

25. フリーザーが働かなくなった場合の凍結肉の結末

H. W. Ockerman ら（アメリカ）

26. Salpicao（ポルトガルの伝統的なスモークドライソーセージ）の化学的および細菌学的性質に及ぼす亜硝酸ソーダの影響

C. Martins ら（ポルトガル）

27. Oleoresin roesmary（液体香辛料の一種）の肉製品における抗酸化作用

S. M. Stoick ら（アメリカ）

28. フライドビーフステーキにおける Nutagenic 活性とフレーバーの発生との関係

A. Laser ら（スエーデン）

29. フライドビーフの Mutagenicity に及ぼす脂肪含量の影響

C. Chen ら（アメリカ）

30. 食肉残留物の毒物的評価—Ochratoxin A—

J. F. Gremmele ら（西ドイツ）

31. 新鮮肉の色の改善策

C. Faustman ら（アメリカ）

© The Ito Foundation

32. 肉色素の光酸化—モデル系と貯蔵条件下の肉色素酸化における波長の関連性

H. J. Andersen ら（デンマーク）

33. チルド食肉・家畜肉における時間と温度の分布

M. Gunvig ら（デンマーク）

34. ビーフバーガーの細菌学的品質に及ぼすガンマー線照射の影響

M. A. Elbaki ら（エジプト）

35. 真空またはコントロール気中に貯蔵されたエマルジョンソーセージの賞味期間

E. Brorck ら（スエーデン）

36. チャイナスタイルソーセージの菌叢

S. L. Guo ら（台湾）

37. 肉の防腐における Monascas 菌の産生する抗菌性物質の効率

M. T. Chen ら（台湾）

38. Kofta および Kapab（エジプト風ミンチ）の品質改良の試み

T. El-Khateib ら（エジプト）

39. エジプト産肉製品の細菌学的な現状

T. El-Khateib ら（エジプト）

40. Nan-An 塩せきアヒルの貯蔵

T. El-Khateib ら（エジプト）

41. 異なる貯蔵条件下におけるボロニアソーセージの亜硝酸塩と肉色安定性の展開

J. Colmenero（スペイン）

**セッション 3. 分析方法**

基調講演

残留物質の分析方法

K. V. Clausen（デンマーク）

残留物質規制プログラムのための迅速テスト

R. L. Ellis（アメリカ）

1. 肉および肉製品中の総窒素の新定量法

H. Berg（スエーデン）

2. 肉の種類の鑑別のための電気泳動法と Stain 法との比較

F. Bauer ら（オーストラリア）

© The Ito Foundation

3. 加熱肉製品の肉種の同定

R. L. S. Patterson ら（イギリス）

4. 肉の品質測定における生化学的手法

Shi-Yuan Zeng（中国）

5. 免疫吸着クロマトグラフィーによるニワトリの特殊筋肉タン白質の部分精製

R. Martin ら（スペイン）

6. 山羊脂および羊脂へのラードの混合の見分け方と意識

M. K. E. Youssef ら（エジプト）

7. 水牛脂へのラードの混合の液体クロマトグラフによる見分け方と評価

M. K. E. Youssef ら（エジプト）

8. ラクダとブタの混合脂の特性と品質の測定に対する赤外線光度法および液体クロマトグラフィーの適用

M. K. E. Youssef ら（エジプト）

9. 塩せき肉製品の酸敗における TBA テストの意識

F. Shahidi（カナダ）

10. 肉製品の総コレステロール測定法の評価

N. J. Engeseth ら（アメリカ）

11. DSC 分析法によるブタとウシの組織脂質の温度的挙動

D. Skala ら（ユーゴスラビア）

12. ウシの組織脂質中の脂肪酸，コレステロールおよびその誘導体

M. Bastic ら（ユーゴスラビア）

13. ブタおよびウシの中性脂質の炭化水素含量

Li. Bastic ら（ユーゴスラビア）

14. 肉製品中の脂肪のＮＭＲによる研究

J. Kopp ら（フランス）

15. 筋肉の粘弾性測定の基礎としての肉の新鮮度の意義

V. I. Ivashov ら（ソ連）

16. SDS-PAGE と Immunoblting 手法の組合せによるウシ筋肉のメトシオグロビンの測定

K. Arihara ら（日本）

© The Ito Foundation

17. ウシの筋肉の反射測定における肉色要因間の関係

G. Johansson（スエーデン）

18. 肉色素の測定—総鉄含量

I. E. Anderson ら（デンマーク）

19. 肉のような半透明なものの測定に及ぼす彩色と観察の影響

P. Stenenburg（オランダ）

20. 肉の品質に対する消費者の評価

J. R. Romans（アメリカ）

21. 肉と肉製品，それらの成分の acoustic 特性

S. A. Yevelev（ソ連）

22. 肉製品の細切処理間の肉色の明るさの変化の動力学的分析

R. Palombo ら（オランダ）

23. ウシの半膜様筋の perimesium における proteoglycan の同定

K. H. Eggen ら（イギリス）

24. デンプン粒およびデンプンソーセージのウルトラ構造学的研究

S. L. Zhao ら（中国）

25. ブタのスルファメタジン測定のための２，３の方法の比較

H. Holmsberg ら（デンマーク）

26. 肉・肉製品中の BHC と DDT の残留物の液体クロマトグラフによる測定

Lu H. Jun ら（中国）

27. エジプト産塩せき肉製品中のニトロソアミン

F. A. Khazbak（エジプト）

28. Reindeer meat

G. B. Bengtsson ら（ノルウェー）

29. ミオシンゲルのゲル強度測定における改良のための考案と応用

K. Yamamoto（日本）

30. 筋肉中のコラーゲンの熟成におけるモデルとしてのウシおよび皮のコラーゲンの熟成

S. Vanderhageghe ら（ベルギー）

© The Ito Foundation

**セッション 4. と殺および食肉加工における情報工学**

基調講演

と畜工業のための CIM(Computer Integrated Manufacturing)の概念

C. Hagdrup(デンマーク)

基調講演

食肉工業においていかに CIM 適応できるか?

T. Bishop(イギリス)

基調講演

TULIP-VEJLE NORD PLANT の紹介

L. C. Nielsen(デンマーク)

1. 食肉工業におけるデータ処理

T. T. Christiansen(デンマーク)

2. と畜場管理のためのデータベース指針

G. Lorenz ら(西ドイツ)

3. 肉の集荷と混合製造ラインの自動コントロール

M. W. H. Den Reijer(オランダ)

4. 品質と rentability 測定のための Meat Value 概念の有用性

Z. Erdos ら(ハンガリー)

5. デンマーク食肉工業における労働条件に対する機械化と自動化の影響

M. S. Jørgensen(デンマーク)

**セッション 5. 新しい製造技術と製品開発**

基調講演

食肉加工技術の研究開発挑戦

N. V. Ashley(イギリス)

1. スペイン産ハムの塩せき後の時期における物理化学的変化

J. Ventanas(スペイン)

2. 正常および DFD ブタの塩せきしたカタ肉の肉色

Th. Croegaert ら(ベルギー)

3. スペイン産生ハムにおけるチロシン沈でんに及ぼす凍結の影響

J. Arnau ら(スペイン)

4. スペイン産ハムの仕上げ工程間における皮下脂肪と筋肉中の中性脂質組成の変化

J. A. Garcia-Regueiro ら(スペイン)

© The Ito Foundation

5. 乾塩せき間のハムへの食塩の浸透

M. Roca ら（キューバ）

6. 減塩ハムにおける処理工程の役割

G. S. Mittal ら（カナダ）

7. スペイン産乾塩せきハムのプロテアーゼ活性

M. Gill ら（スペイン）

8. 鶏肉と乳タン白濃縮物から製造されたソーセージの加工間における適正化と細切処理

K. Wassilev ら（ブルガリア）

9. タン白混合材料からタン白—脂肪のエマルジョンをつくる際の乳化処理の数学的シミレーション

K. Wassilev ら（ブルガリア）

10. ハンバーガーとエマルジョンソーセージの脂肪の保持性の比較

E. Tornberg ら（スエーデン）

11. 肉エマルジョン製造のためのタン白質の機能的特性

C. Santos ら（ポルトガル）

12. 鶏肉練粉の凝固および流動性に及ぼす凍結速度の影響

G. S. Mittal ら（カナダ）

13. 加熱の動力学的要因に基づく meat batter filler の選定

G. S. Mittal ら（カナダ）

14. 肉の生原材料の血絞り

A. M. Hermansson（スエーデン）

15. ソーセージ製造における肉の保水性改善

L. Min ら（中国）

16. 上級ソーセージ製造におけるブタの頭部の利用技術

E. Tuleuov ら（ソ連）

17. フランクフルトソーセージ製造における高度の自動化技術の改善

V. I. Ivashov ら（ソ連）

18. 生乾燥サラミの組成に及ぼす肉の細切処理の影響

M. Zhikov ら（ブルガリア）

© The Ito Foundation

19. ブタのヒレ肉の乾燥間の筋肉タン白質の変化に及ぼすスターターの影響

T. Tsvetkov ら（ブルガリア）

20. ハンガリー産ドライサラミソーセージの理化学的性質に及ぼす大豆タン白濃縮物の影響

L. H. Beck ら（アメリカ）

21. ドライソーセージの熟成間のタン白分解

A. Verplaetse ら（ベルギー）

22. 発酵ソーセージのための新しいスターター

M. Sutic ら（ユーゴスラビア）

23. ドライソーセージの熟成と品質に及ぼす天然または人工ケーシングの影響

P. Roncales ら（スペイン）

24. TASAJO（代表的な中間水分肉製品）の加工法と化学組成

G. Andujar ら（キューバ）

25. サラミソーセージの光による退色の評価

A. Ohlen ら（デンマーク）

26. 発酵肉製品の SUCUK における鶏肉と亜硝酸ソーダ量の利用

S. O. Tomek ら（トルコ）

27. ソーセージ形成間のひき肉の圧縮特性

S. N. Tumenov ら（ソ連）

28. 食餌療法用肉製品の理化学的性質とアミノ酸組成についての数学的シミレーション

M. Popivanova ら（ブルガリア）

29. 食事療法用肉製品の医学・生物学的評価

M. Popivanova ら（ブルガリア）

30. ヒトの消化に及ぼす肉中の生の原材料中に含まれる結合組織成分の生理学的影響

I. A. Rogov ら（ソ連）

31. 肉製品のための新しい栄養学的改善された方策の展開

K. Krajewska ら（ポーランド）

32. 食事療法用食品工業における食肉の生原材料の処理

A. V. Ustinova ら（ソ連）

© The Ito Foundation

33. 乾燥した酵素血液水和物の製造の際の技術の適正さ

V. Grigorov ら（ブルガリア）

34. 血液プラズマ製造における技術的有用性に及ぼすプラズマ生産法の影響

W. Uchman ら（ポーランド）

35. white livex 製造における血液プラズマの凝固に及ぼす動物組織のホモジネイトの影響

Z. Duda ら（ポーランド）

36. 亜硝酸塩を使用しない肉の塩せきシステムの現状

F. Shahidi（カナダ）

37. 肉脂質とヘム色素の亜硝酸塩安定作用の機作

A. M. Booren ら（アメリカ）

38. 筋肉タン白質の溶解性と電気泳動的特性に及ぼす微生物学的酵素作用の影響

K. Valkova ら（ブルガリア）

39. ALGINATE/CALCIUM システムにより処理された hot boned beef の脱気保蔵

R. I. Richardson ら（イギリス）

40. 組成と生の原材料の処理工程に基づく肉製品の品質の定量的評価

V. I. Klebrikov ら（ソ連）

41. 塩せき成分による筋肉カテプシンDの阻害作用

L. S. Kudryashov ら（ソ連）

42. 加熱間の塩せきした豚肉の筋肉タン白質の構造と保水状態の変化

E. F. Oreshkin ら（ソ連）

43. セミ湿潤ペートフード製造のためのと場

A. S. F. H. Barreto ら（ポルトガル）

44. 酸性食塩水中でのケーシングの塩づけによる廃水汚染の低減

B. Skenderovic ら（ユーゴスラビア）

45. 廃水汚染低減のための準工業的なケーシン塩せき法

B. Skenderovic ら（ユーゴスラビア）

46. ミンチの刃に及ぼす肉成分の影響

P. Jakob（東ドイツ）

© The Ito Foundation

47. 酵素的な骨のクリーニング法とくず肉の収量

N. H. sørensen ら（デンマーク）

48. 山羊肉の保蔵技術

M. Xianmin ら（中国）

49. ミトコンドリアとミクロソームを伴ったまたは伴わない死後硬直前後の牛肉から得た筋しょう抽出物のミオグロビン誘導体に及ぼす食塩の影響

A. Ashgar ら（アメリカ）

**セッション　6.　筋肉の生物学および食肉の生化学**

基調講演

食肉のと殺後の変化および品質—研究動向の予測

K. Honikel（西ドイツ）

1. 制限飼育されたブタにおける興奮性低減のための環境条件の強化

T. Grandin（アメリカ）

2. と殺前の取扱いのちがいによるブタの血しょう中のアドレナリン量

K. Troeger（西ドイツ）

3. ブタのと殺前の管理法と枝肉の品質（PSE や DFD）に及ぼす影響

A. Fortin（カナダ）

4. ブタの肉質に及ぼす育種と育成の影響

Ph. Berge ら（フランス）

5. ブタの血液とロース肉の性質の変化に及ぼすと殺前の休息の影響

B. Dzierzynska-Cybulko ら（ポーランド）

6. ブタの肉質と収量に及ぼす輸送前の絶食の影響

G. Eikelenboom ら（オランダ）

7. 屋外飼育のブタの行動と肉質についての予備的観察

P. Barton-Gade ら（デンマーク）

8. と殺時の遺伝形質，生体重，季節の異なるブタの筋肉の死後変化速度の比較

B. Dzierzynska ら（ポーランド）

9. オランダにおける輸送条件に影響された牛肉の DFD の出現

R. L. J. M. Van Laack ら（オランダ）

© The Ito Foundation

10. ホルスタイン・フリージアン種の交配による雄子牛の肉質

V. Nosal ら（チェコスロバキア）

11. ウシの DFD についての発生，防止と観察

I. Ingr ら（チェコスロバキア）

12. 徹底的な技術により成長し肥育されたウシの肉質

V. I. Ivashov ら（ソ連）

13. 豚肉に関する英国の施策の近況

J. D. Wood ら（イギリス）

14. 雄ブタ肉質—去勢と Trenbolone acetate 注入の影響

C. Lopez-Bote ら（スペイン）

15. ブタのスカトールとインドールの分布：給餌要因の影響

M. Hawe ら（北アイルランド）

16. B-Agonist Cimaterol 処理した雄牛における肉質と筋原繊維タン白フラグメント

L. O. Fiems ら（ベルギー）

17. 大型ブタの成長，と体の品質と肉質に及ぼす Salbutamol(GAH034) の影響

R. Chizzolini ら（イタリア）

18. 飼料効率と体重増の強化のためプロゲストロン注入を受けたヒツジの組織のホルモン残留物

A. H. Hamra ら（イラク）

19. 成長ホルモンを与えたブタの肉質，と体の組成，成長

C. Herztzman ら（オーストラリア）

20. ブタの成長と肉質に及ぼす給餌中のビタミンの影響

A. Ashgar ら（アメリカ）

21. ブタのトコフェロール含量とブタ肉製品の脂質酸化に及ぼす給餌中のトコフェロール供与量の影響

F. J. Monahan ら（アイルランド）

22. pST 処理したブタの Giant fiber と PSE の発生

M. B. Solomon ら（アメリカ）

23. 若雄ウシの肉質に及ぼす筋肉繊維組成の影響

P. Batjoens ら（ベルギー）

© The Ito Foundation

24. 牛肉から再製されたコラーゲンに及ぼす有機酸の影響

N. G. Marriot ら（アメリカ）

25. 亜鉛によると殺後の肉の軟化に対する阻害

M. Koohmaraie（アメリカ）

26. 収縮の速さの異なるウシの骨格筋の筋しよう網状組織の活性

E. J. Abdul Wahab（イラク）

27. MQM 装置を用いた PSE と筋肉内脂肪の早期死後硬直の検出

P. Barton-Grade ら（デンマーク）

28. と殺時の筋肉における PSE・急速な死後の解糖または低ｐＨの展開

A. C. Sjoblom ら（スエーデン）

29. ブタの有害な高体温：肉質との関連における pathophysiology への洞察

H. M. Eichinger ら（西ドイツ）

30. 肉タン白質の品質に及ぼす熟成の影響

M. B. Al-Aswad ら（イラク）

31. 生体内の試料として測定された大ホワイト種のブタの背最長筋の解糖力

A. Talmant ら（フランス）

32. 筋肉の biopsy に対する NMR 測定による豚の筋肉のと殺後の pH 低下速度の予測

A. Mirl ら（フランス）

33. と殺後のグリコーゲン分解とブタの肉質

M. Severini ら（イタリア）

34. 熟成間の牛肉のテクスチャーに及ぼすカルシウムイオンの影響

A. Alarcon-Rojo ら（イギリス）

35. 気絶処理に伴うブタの反射光肉色のと殺45分後の変動範囲

A. J. von Zweigbergt ら（スエーデン）

36. 温と体処理されたブタロイン肉に及ぼす低電圧電気刺激

A. J. Møller ら（デンマーク）

37. と体の収縮力の測定との関連における電気刺激効率の評価

D. Tsankov ら（ブルガリア）

© The Ito Foundation

38. ブタのと体の電気刺激と急速チリング

A. A. Taylor ら（イギリス）

39. ブタの部分肉の品質に及ぼす温除骨対冷除骨の影響

R. L. J. M. van Laack ら（オランダ）

40. 電気刺激を与えて温除骨した牛肉と冷除骨後直ちに整形した牛肉の両者から調製されたハンバーガーの色とその安定性

R. L. J. M. van Loack ら（オランダ）

41. ウシの背最長筋の軟らかさと Troponin-T,30KDa-Titin 濃度に及ぼす冷部条件の影響

B. Buts ら（ベルギー）

42. ブタの骨格筋から得たクレアチンキナーゼの精製と特性

Shin-Yuan Zeng（中国）

43. 肉質の酵素的研究

Shi-Yuan ら（中国）

44. Awassi ラムの肥育用大麦のための DDP(Date Pulp) 置換されたと体の特性

S. A. Hasan ら（イラク）

45. 肥育された Awassi ラムのと体組成に及ぼす濃厚飼料中の大麦含量の影響

A. N. Al-ani ら（イラク）

46. 筋肉と栄養のタイプ別の Awassi ラムと Desert ラムの特色

E. J. Abdul ら（イラク）

47. 給餌を最大限利用した大重量ラムの生産

R. F. Kelly ら（アメリカ）

48. 異なる年齢のラム肉の軟らかさと熟成に及ぼすと殺後の温度の急激な低下の影響

I. Jaime ら（スペイン）

49. Arabi ラムの化学組成と特性に及ぼす凍結の影響

H. H. Mohammes（イラク）

50. ラムの貯蔵脂肪酸組成

V. Banskaliva ら（ブルガリア）

51. ウサギ肉の品質に及ぼす remating interal とタン白質含量の影響

F. Nicastro ら（イタリア）

© The Ito Foundation

52. ウサギの背最長筋のと殺後のタン白分解作用に及ぼす内因性プロテナーゼの影響
A. S. Babiker ら（アメリカ）

53. ブロイラーの枝肉歩留りと部分肉別の収量に及ぼす年齢と性の影響
S. A. Naji ら（イラク）

54. アヒル肉の生化学的および組織学的特性に及ぼすと殺前の絶食時間と貯蔵温度の影響
Deng-Cheng Liu ら（台湾）

55. アヒル肉の生理学的，生化学的および物理学的特性に及ぼすと殺前のストレスの影響
Ming-Tsao Chen ら（台湾）

56. 子牛のと体の体型と特色に及ぼす単細胞タン白質と尿素を加えた給餌の影響
A. H. Alwash ら（イラク）

**代表者会議**（Meeting of contact persons）

8月22日会場内の Top of Town レストランにおいて昼食会をかねて代表者会議が開かれ，玉手が参加した。ここでは大会事務局からの総務と会計に関する諸報告と質疑，次回のキューバで予定されている第３６回大会の案内，今後の大会の開催地（'91：西ドイツ，'92：フランス，'93：カナダ，'94：オランダ）の決定がなされた。

© The Ito Foundation

# 平成元年度研究調査助成一覧

| 整理番号 | 研究調査のテーマ | 代表研究者 | 助成金額 |
|---|---|---|---|
| | | | 円 |
| 研 4 | マウス神経冠細胞の増殖・分化に及ぼすブタ・フィブロネクチンの作用 | 東北大・理 竹内 拓司 | 1,000,000 |
| 研 11 | 家畜由来の細胞接着性タンパク質の生理化学的研究<br>—血清ビトロネクチンのコラーゲン結合性— | お茶の水女子大・理 林 正男 | 1,300,000 |
| 研 26 | ラットの実験的高脂血症および糖尿病に対するブタプラズマペプチドの作用 | 農林水産省水産大 末綱 邦男 | 1,200,000 |
| 研 28 | ヒト血小板由来成長因子(Platelet-Derived Growth Factor : PDGF)に対する固相サンドイッチ酵素免疫測定法(EIA)の検討 | 岐阜薬科大 林 恭三 | 1,300,000 |
| 研 30 | 血中物質と免疫応答細胞を利用した癌化学療法開発の試み | 腫瘤研究所 松野 哲也 | 1,500,000 |
| 研 39 | 食肉タンパク質より精製タンパク質およびペプチド標品の調整およびその栄養学的評価 | 東京大・農 野口 忠 | 1,300,000 |
| 研 62 | 家畜血液の有効利用に関する基礎的研究<br>—PEG-ヘミンを触媒とし,化学発光法による過酸化物の定量— | 桐蔭学園横浜大 二見 瑞子 | 1,000,000 |
| 研 110 | 高タンパク質食事が人のカルシウム，リンおよびマグネシウム代謝に及ぼす影響<br>—動物と人の比較— | 国立健康・栄養研究所 江指 隆年 | 700,000 |
| 研 135 | 食肉に含まれるポルフィリン誘導体の血液細胞分化・増殖に及ぼす影響 | 北海道大・獣 前出 吉光 | 1,200,000 |
| 研 146 | 神経ペプチドの代謝に関与する脳内プロテアーゼの研究 | 北海道大・薬 石井 信一 | 800,000 |
| 研 169 | 個体発生途上の家畜脳から分泌される抗癌因子，神経系作用因子と細胞増殖促進物質 | 広島県立大生物資源 三羽信比古 | 1,500,000 |
| | 栄養価値関連部門計 | (11件) | 12,800,000 |
| 研 3 | 牛初期胚（16～32細胞期）の体外発生能に及ぼす栄養塩類とサイクリックＡＭＰの効果について | 広島農業短大 堀内 俊孝 | 400,000 |
| 研 5 | 離乳期前後における飼料条件の肉用家畜の消化管成長に及ぼす影響（Ⅱ） | 日本獣畜大 尼崎 肇 | 1,000,000 |
| 研 12 | 肉豚用飼料原料としての焼酎粕の有効利用：発育成績，枝肉形質および肉質について | 宮崎大・農 大橋登美男 | 750,000 |
| 研 18 | 雌牛の性現象に及ぼす雄牛の行動的影響 | 宮崎大・農 佐藤 衆介 | 1,850,000 |
| 研 23 | ブタ生殖腺刺激ホルモン遺伝子の構造 | 群馬大内分泌研究所 加藤 幸雄 | 850,000 |
| 研 27 | 乳用雄肥育素牛の哺育・育成期における生産費と離乳飼料の調製に関する研究 | 国際酪農研究センター 大原 久友 | 500,000 |
| 研 29 | 褐毛和種集団の繁殖構造に関する研究 | 熊本県農業研究センター 木場俊太郎 | 500,000 |
| 研 41 | 受精卵移植による新めん羊資源の開発に関する研究<br>—メラトニンによるめん羊季節外繁殖の誘起— | 東京大・農 澤崎 徹 | 700,000 |
| 研 46 | 大麦稈の乾物消化率とそのアンモニア効果の品種間差異に関する植物形態学・組織化学的研究 | 三重大生物資源 後藤 正和 | 850,000 |
| 研 47 | 体外成熟・体外受精由来ウシ８細胞期胚単一割球と除核未受精卵との融合胚の発生能に関する研究 | 京都大・農 入谷 明 | 1,300,000 |

© The Ito Foundation

| 整理番号 | 研究調査のテーマ | 代表研究者 | 助成金額 |
|---|---|---|---|
| | | | 円 |
| 研 48 | 牛，豚およびイノブタ卵巣の効率的利用，とくに卵胞卵の保存法の開発に関する研究 | 京都大・農 宮本 元 | 850,000 |
| 研 63 | 放牧利用による肉用牛（黒毛和種）の低コスト生産技術の開発<br>2. 肥育用素牛の育成過程の違い（放牧および舎飼）が肥育成績に及ぼす影響 | 九州大附属農業実習場 梅津頼三郎 | 500,000 |
| 研 64 | 生検筋肉材料を用いて牛骨格筋の筋線維の特質を検索する方法についての検討 | 九州大・農 岩元 久雄 | 600,000 |
| 研 72 | 植物の冷害と塩害に関するＮＭＲ分光法による研究 | 慶應大・理 坂田 亮 | 500,000 |
| 研 75 | 内部細胞塊の細胞数ならびに形態を指標とした牛胚盤胞期胚の品質評価 | 東京農大 岩崎 説雄 | 1,150,000 |
| 研 88 | 国産牛肉余剰部位の付加価値向上に関する研究 | 岩手県畜試 田中喜代重 | 1,150,000 |
| 研 95 | ブタ卵胞液中の卵成熟促進物質の単離と諸性質 | 静岡大・農 河岸 洋和 | 500,000 |
| 研 109 | 鶏肉の評価に関する研究 | 鹿児島県養鶏試験場 松岡 尚二 | 800,000 |
| 研 121 | 副産物の飼料化による低コスト牛肉生産に関する研究<br>—とくにわらのアルカリ処理について— | 九州東海大 飛岡 久弥 | 700,000 |
| 研 124 | 食鳥における各種人畜共通伝染病原体の浸潤調査並びにそれらの迅速診断法の確立 | 岐阜大・農 源 宣之 | 900,000 |
| 研 127 | ブラーマン種およびサンタガートルデイス種の遺伝的性能の日本における有用性の検証 | 東北大・農 水間 豊 | 1,100,000 |
| 研 128 | ニホンジカにおける飼料の通過速度と消化率の季節変動に関する研究 | 東北大・農 佐々木康之 | 500,000 |
| 研 134 | 食鳥処理場で認められる疾患の調査・研究<br>—食鳥検査制度実施のために— | 北海道大・獣 板倉 智敏 | 1,450,000 |
| 研 136 | 家畜の腸管免疫強化法 | 北海道大・獣 清水悠紀臣 | 850,000 |
| 研 140 | 人工哺乳初生豚に対する豚血清γ-globulin経口投与の効果 | 酪農学園大 楢崎 昇 | 1,500,000 |
| 研 144 | 豚枝肉の評価方法に関する研究<br>—赤肉歩留推定回帰式の検証— | 全国食肉学校 古澤 栄作 | 500,000 |
| 研 153 | 豚卵胞卵の体外成熟と体外受精に関する研究 | 東京大医科学研究所 豊田 裕 | 900,000 |
| 研 160 | 牛の生産性に及ぼす騒音の影響に関する研究<br>—特に，繁殖機能について— | 岩手県立農業短期大 阿部 和司 | 600,000 |
| 研 170 | ミモシン含量を減少させたギンネムの豚に対する給与試験と体成績および肉質に関する研究 | 琉球大・農 本郷富士弥 | 850,000 |
| 研 172 | 豚における背脂肪厚への選抜が枝肉の脂肪組織蓄積部位に与える影響 | 宮城県畜試 西田 茂 | 750,000 |
| 研 173 | 子牛から得た卵胞卵子の体外受精について | 丸紅飼料 梶原 豊 | 2,000,000 |
| 研 174 | 牛枝肉の規格格付に関する研究<br>（全国和牛登録協会ほか３大学共同研究） | 和牛登録協会 並河 澄 ほか３ ほか３ | 4,000,000 |
| 家畜生産関連部門計 | | （32件） | 31,350,000 |
| 研 7 | 食肉の生産，処理，加工技術に関するパテント調査（Ⅲ）と殺，加工，食肉製品の出願公開状況 | 中島技術士事務所 中島 健次 | 500,000 |

© The Ito Foundation

| 整理番号 | 研究調査のテーマ | 代表研究者 | 助成金額 |
|---|---|---|---|
| | | | 円 |
| 研 15 | 骨格筋組織の高度不飽和脂肪酸/α-トコフェロールモル比と肉質との関連に関する研究 | 宮崎大・農 山内 清 | 500,000 |
| 研 25 | 高圧処理が筋肉タンパク質に及ぼす影響 | 新潟大・農 鈴木 敦士 | 600,000 |
| 研 34 | 電気刺激による食肉のプロテアーゼ活性について | 帯広畜産大 三上 正幸 | 500,000 |
| 研 53 | 食品素材としての家畜血液の三次機能に関する研究<br>—ウシ血清アルブミン由来のオピオイドペプチドの単離— | 京都大・農 吉川 正明 | 1,200,000 |
| 研 56 | 食肉熟成の調節へのオリザシスタチンの応用 | 東京大・農 荒井 綜一 | 1,200,000 |
| 研 57 | 食肉貯蔵中におけるアミノ酸の消長 | 東京水産大 山中 英明 | 1,200,000 |
| 研 58 | ブタ筋肉組織中の多価不飽和脂肪酸組成の研究 | 麻布大・獣 古泉 巖 | 700,000 |
| 研 61 | ホットプレート加熱による油脂の劣化とその防止について | 郡山女子大家政 広井 勝 | 700,000 |
| 研 66 | 家畜・家禽の死後硬直に関する生理学的研究<br>—各種ガス処理の影響— | 九州大・農 田中 耕作 | 500,000 |
| 研 71 | 貯蔵温度の違いが真空包装豚肉の呈味成分に及ぼす影響 | 宮城県農業短大 石田 光晴 | 500,000 |
| 研 77 | 生体内で生成される亜硝酸塩およびニトロソアミン<br>—食肉加工品中の存在量との比較— | 東京大・農 渡辺 道子 | 800,000 |
| 研 80 | 肉用牛の成長に伴う筋原線維および筋肉中結合組織の変化 | 北海道大・農 大杉 次男 | 800,000 |
| 研 81 | 筋原線維タンパク質，ネブリンの死後変化に関する研究（第3報） | 北海道大・農 高橋 興威 | 500,000 |
| 研 86 | エラスチン—コラーゲン複合体膜の創製 | 東京農工大・農 和田 敬三 | 1,000,000 |
| 研 93 | 食肉熟成へのプロリン特異性ペプチダーゼ類の役割 | 長崎大・薬 芳本 忠 | 1,000,000 |
| 研 97 | 畜産食品中の残留抗菌性物質の系統的分析法の確立に関する研究 | 埼玉県衛生研究所 堀江 正一 | 900,000 |
| 研 98 | 鶏卵法による毒性評価法の検討，特に鶏胚およびラット胎仔に対するエタノールと Cycrophosphamide の影響 | 麻布大・獣 中村 経紀 | 600,000 |
| 研 99 | 食肉および食肉製品のリステリア菌汚染とその制御に関する研究 | 日本大・農獣 山内 邦男 | 900,000 |
| 研 108 | 微生物の抗酸化性物質の生産能に関する研究 | 鳥取大・教 石川 行弘 | 500,000 |
| 研 113 | 加圧による筋肉タンパク質，特にミオシンの機能特性の改善 | 酪農学園大 山本 克博 | 500,000 |
| 研 115 | 免疫化学的手法による牛肉中のタンパク同化ステロイドおよびその関連化合物の一斉分析 | 食品薬品安全センター 松木 容彦 | 600,000 |
| 研 120 | 肉および肉製品におけるボツリヌス中毒危険性の評価と制御<br>—各種食品中のボツリヌス毒素の安定性に影響する因子について— | 広島大生物生産 橋本 秀夫 | 800,000 |
| 研 129 | タンパク質に結合した蛍光物質の定量による畜肉およびその加工品の酸化的劣化の評価 | 東北大・農 藤本健四郎 | 1,200,000 |
| 研 131 | 食肉の結合組織における架橋アミノ酸に関する研究 | 東北大・農 須山 享三 | 500,000 |
| 研 158 | 高圧処理による筋肉タンパク質の変性と熱ゲル化特性 | 東京水産大 田口 武 | 500,000 |
| 研 162 | グロビンの化学修飾と修飾タンパク質の機能特性 | 茨城大・農 堤 将和 | 800,000 |

© The Ito Foundation

| 整理番号 | 研究調査のテーマ | 代表研究者 | 助成金額 |
|---|---|---|---|
| | | | 円 |
| 研 166 | 食肉の熟成に関する膜酵素の活性と核磁気共鳴（NMR）分光法による研究 | 山口大・農 萬場 光一 | 1,000,000 |
| 製造技術関連部門計 | | （28件） | 21,000,000 |
| 研 36 | 食肉需要の安定性に関するノンパラメトリック分析 | 帯広畜産大 澤田 学 | 200,000 |
| 研 38 | 日本古代の食肉文化の再検討 | 奈良国立文化財研究所 佐原 真 | 2,400,000 |
| 研 51 | 肉用牛大規模一貫経営の成立条件に関する技術的・経営的研究 | 京都大・農 宮崎 昭 | 500,000 |
| 研 60 | タイ国のブロイラー産業の実態並びにわが国のブロイラー産業への影響に関する調査 | 京都府大・農 國松 豊 | 1,000,000 |
| 研 65 | 国際化時代の牛肉の生産・流通・消費に関する計量経済的研究 | 九州大・農 甲斐 諭 | 300,000 |
| 研 74 | 豚枝肉出荷成績の要因分析 | 東京農大 新井 肇 | 300,000 |
| 研 102 | 食肉卸売市場における牛肉流通の課題 | 鹿児島大・農 宮田 育郎 | 300,000 |
| 研 132 | 牛肉輸入自由化が東北地帯の牛肉生産に及ぼす影響 | 東北大・農 堀田 和彦 | 200,000 |
| 研 149 | 新技術の主要牛肉生産国の経営に及ぼす影響に関する研究 | 麻布大・獣 渋谷 佑彦 | 500,000 |
| 研 171 | 北海道における乳用種肉牛の流通と経済性に関する研究 | 札幌大 岩崎 徹 | 300,000 |
| 流通関連部門計 | | （10件） | 6,000,000 |
| 研 73 | 第7回国際反芻動物生理学シンポジウム | 東京農大 津田 恒之 | 1,100,000 |
| 研 96 | 第35回国際食肉科学技術会議の概略 | 日本食肉研究会 安井 勉 | 2,000,000 |
| その他の部門計 | | （2件） | 3,100,000 |
| 合計 | | （83件） | 74,250,000 |

© The Ito Foundation

# お わ り に

このたび，平成元年度「食肉に関する助成研究調査成果報告書(第８巻)」を発刊いたす運びと相成りました。

本書の巻頭に述べられております本財団設立者故伊藤傳三創業社長のご遺志も，着々と実現されてきておられるように感じられる次第に存じます。本財団は，昭和56年７月３日に農林水産大臣により設立のご許可をいただき，昭和57年度に，本報告書の第１巻を刊行いたした次第です。従いまして明年は，本財団設立10周年を迎えることに相成ります。

ここに至りますまでの伊藤研一理事長並びに創業社長夫人伊藤きぬゑ様，理事，評議員はじめ関係各位の深いご理解とご支援に心より感謝申し上げる次第です。また，関係省庁はじめ，本財団の育成にご指導とご尽力を賜わっております関係諸機関並びに貴重なご研究を本報告書にご掲載賜わりました諸先生に対し，厚くお礼申し上げます。

私見で恐縮に存じますが，既刊の本報告書第１巻から第８巻までを概読させていただきますと，家畜生産から食肉流通・消費までのダイナミズム，わが国の食肉をめぐる概略的な全体像，構造，仕組み，関係，流れなどが多少とも把握できるように感じられる次第でございます。そして，そのことが私一人の勝手な判断に終らないよう内容の一層の充実向上を図りまして，一段と普遍化して参りたいと願うものであります。

食肉生産の過程で得られます諸器官が，生理活性物質を豊富に含有していることを多くの研究が示唆しております。食肉や副生物が保持・発現する機能性を踏まえた本質的な食品価値も，次第に明確にされて参るものと予測され，近未来的にも食肉研究の一つの根幹になる領域と申せるほど緊要と考えられる次第です。それは，体調と人体健康と良質タンパク質，特に食肉摂取との関係を明確にすることにつながって参ります。そこでは年齢と病態などに対応して，質を考慮に入れた食肉摂取量と，摂取法などが重要な課題の一つであろうと想定される次第です。

なお，本報告書は世界各国の食肉関係の研究者に贈呈させていただいていることを申し添える次第です。わが国の畜産や食肉に関連する研究の現状を多少ともご理解いただくための情報の一部になればと願っております。外国研究者や，食肉

© The Ito Foundation

関連の外国人技術者との交流の今後の益々の発展が期待されるところであります。

末筆になりまして恐縮に存じますが，今までも本財団が極めて多くの皆様方に支持されて参り，ご育成いただいたことを痛感いたす次第です。本財団の益々の発展のため，今後とも一段のお力添えを賜わりますよう心よりお願い申し上げます。

本報告書の発刊に際し，取りまとめなどにご尽力いただいた専門委員会委員の各位に厚くお礼申し上げます。

平成２年12月

専門委員会委員長
九州大学農学部教授　深　沢　利　行

© The Ito Foundation

# 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」

平成元年度（Vol. 8）

1990年12月　発行

編集・発行——財団法人伊藤記念財団
THE ITO FOUNDATION
東京都港区虎ノ門5丁目3番20号　〒105
仙石山アネックス501
5-3-20　Toranomon, Minato-ku,
(Sengokuyama-Annex 501)
TOKYO JAPAN　105
TEL：03（434）1186
FAX：03（434）1256

印刷・製本——株式会社　三　恭　社

＜非売品：無断禁転載＞

© The Ito Foundation

財団法人
伊藤記念財団