

平成19年度

食肉に関する

助成研究調査成果報告書

VOL. 26

財団法人

伊藤記念財団

平成19年度

食肉に関する
助成研究調査成果報告書

VOL. 26

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榮譽に浴したのでありますが、受章に際し私自身の過ぎ来し方を振り返り、食肉及び食肉加工業界の行く末に思いを致し、2つの事柄を決意致しました。

第1は、食肉加工団体の指導体制の若返りであり、

第2は、食肉加工業の基礎的研究の充実であります。

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

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

Philosophy Behind the Establishment of the Ito Foundation

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

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

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

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

Denzo Ito, Founder
June 1981

事業のあらまし

(目的)

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

(事業)

本財団は、上述の目的を達成するため、次の事業を行う。

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

(事業実績)

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

ご 挨拶

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

おかげ様で当財団は去る7月3日をもちまして、創立27周年を迎えましたが、この間、次第に研究調査助成事業の存在が畜産関係の方々の中に浸透いたし、事業内容も逐次充実して参りつつあります。

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

本書は、第26回（平成19年度）助成事業における12件の研究調査助成対象研究者の皆様からいただいた研究成果報告をとりまとめたものでありますが、以上の目的にしたがって、食肉産業の基礎的研究等に携わる諸氏の研究の一助ともなれば幸甚でございます。

平成20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.26 enclosed here. We appreciate any interest you may have in our research efforts.

Sincerely yours,
Dec. 2008
Kenichi Ito
The chief director
The Ito Foundation



目 次

| | |
|---|----|
| ブタ軟骨コラーゲンの経口摂取が成長期マウスの骨成長に及ぼす影響 福永 重治・*関口 健 (北海道大学大学院農学研究院, *伊藤ライフサイエンス株式会社) | 1 |
| 食肉製品による認知能改善メカニズムの解明：亜鉛の効果横井 克彦・鈴木 由美 (聖徳大学大学院) | 6 |
| 動脈硬化予防能を有する機能性食肉の開発上曾山 博・本田 和久・元木 徹・長谷川 信 (神戸大学大学院農学研究科) | 11 |
| L- カルニチン摂取の癌性悪液質に及ぼす影響 福永 健治・吉田 宗弘・*関口 健 (関西大学化学生命工学部, *伊藤ライフサイエンス株式会社) | 15 |
| 牛肉エキスに含まれる筋肥大因子に関する研究 水野谷 航・馬場 研斗・辰巳 隆一 池内 義秀・*関口 健 (九州大学大学院農学研究院, *伊藤ライフサイエンス株式会社) | 22 |
| 異常プリオン分解酵素（プリオナーゼ）阻害剤の検索とソーセージ製造への応用岡 達三・岡部 正明 (鹿児島大学農学部) | 28 |
| 食肉タンパク質のS-ニトロシル化と量的変化に及ぼす発色剤の影響について 若松 純一 (北海道大学農学研究院) | 32 |
| 食肉製品のテクスチャーと食肉タンパク質ゲル物性との関連性について芳賀 聖一・林 利哉 (名城大学農学部) | 37 |
| 低温増殖性乳酸菌を接種した豚肉におけるタンパク質分解挙動 林 利哉・和栗 伸伍・*小川 幸彦・芳賀 聖一 (名城大学農学部, *名城大学農学部附属農場) | 44 |

| | |
|---|----|
| 筋肉色素ミオグロビンのアイソフォームの性状解明に基づいた食肉の変色抑制に関する研究 ……………Muhammad Mehedi Hasan・池上 茂・*朝賀 一美・*関口 健 落合 芳博 (東京大学大学院農学生命科学研究科, *伊藤ライフサイエンス株式会社) …………… | 50 |
| 食肉・食肉製品のトランス脂肪酸含量調査 ……………河原 聡・六車 三治男 (宮崎大学農学部) …………… | 57 |
| 食肉の栄養価, 食味性に関する脂肪交雑, 脂肪含量の迅速非破壊評価法 ……………入江 正和 (宮崎大学農学部) …………… | 65 |

CONTENTS

| | |
|--|----|
| Effects of Oral Administration of Porcine Cartilage Collagen on Growing Mouse Bone Formation Shigeharu Fukunaga and *Takeshi Sekiguchi (Graduate School of Agriculture, Hokkaido University and *Ito Life Sciences Inc.) | 1 |
| Mechanistic Study on Improvements of Cognitive Function by Meat Products: Effect of Zinc Katsuhiko Yokoi and Yumi Suzuki (Seitoku University Graduate School) | 6 |
| Development for Functional Meat with an Ability to Prevent Arteriosclerosis Hiroshi Kamisoyama, Kazuhisa Honda, Tohru Motoki and Shin Hasegawa (Graduate School of Agricultural Science, Kobe University) | 11 |
| Effect of L-carnitine Intake on Cancerous Cachexia Kenji Fukunaga, Munehiro Yoshida and *Takeshi Sekiguchi (Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, Kansai University and *Ito Life Sciences Inc.) | 15 |
| Skeletal Muscle Hypertrophic Factors Present in the Beef Extract Wataru Mizunoya, Kento Baba, Ryuichi Tatsumi, Yoshihide Ikeuchi and *Takeshi Sekiguchi (Faculty of Agriculture, Kyushu University and *Ito Life Sciences Inc.) | 22 |
| Screening of Prionase-inhibitor and its Application to Sausage Manufacture Tatsuzo Oka and Masaaki Okabe (Faculty of Agriculture, Kagoshima University) | 28 |
| Effects of Curing Agents on S-nitrosylation and the Amount of Meat Proteins Jun-ichi Wakamatsu (Hokkaido University, Research Faculty of Agriculture) | 32 |
| The Correlation between the Texture of Meat Products and the Physical Properties of Heat-induced Gels of Myofibrillar Protein Seiichi Haga and Toshiya Hayashi (Meijo University, Faculty of Agriculture) | 37 |
| Muscle Protein Degradation in Pork Meat Fermented by Psychrotrophic Lactic Acid Bacteria Toshiya Hayashi, Shingo Waguri, *Yukihiko Ogawa and Seiichi Haga (Faculty of Agriculture, Meijo University and *Experimental Farm, Meijo University) | 44 |

Studies on the Inhibition of Meat Discoloration Based on the Characterization of Myoglobin Isoforms

Muhammad Mehedi Hasan, Shigeru Ikegami, *Kazumi Asaka,

*Takeshi Sekiguchi and Yoshihiro Ochiai

(Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo and *Ito Life Sciences Inc.)50

Survey of Content of *Trans*-fatty Acids in Meats and Meat Products

Satoshi Kawahara and Michio Muguruma

(Faculty of Agriculture, University of Miyazaki)57

Speed and Non-destructive Evaluation Methods for Marbling and Ether Extract of Meat Regarding with Nutrition and Acceptability

Masakazu Irie (Faculty of Agriculture, University of Miyazaki)65

ブタ軟骨コラーゲンの経口摂取が 成長期マウスの骨成長に及ぼす影響

Effects of Oral Administration of Porcine Cartilage Collagen
on Growing Mouse Bone Formation

福永重治・*関口健

(北海道大学大学院農学研究院, *伊藤ライフサイエンス株式会社)

Shigeharu Fukunaga and *Takeshi Sekiguchi

(Graduate School of Agriculture, Hokkaido University and *Ito Life Sciences Inc.)

We investigated the effect of dietary cartilage derived collagen to mouse bone formation. Mouse were divided into two groups and one was control group that given basal diet (AIN-93G). Experimental group was given cartilage derived collagen containing diet in which 50% protein (as nitrogen content base) replaced by that collagen. From 3 to 19 weeks old, mice were killed biweekly and morphology, physical property and composition of femora were analyzed. Morphologically, there was no difference between two groups, but bone strength was tend to higher in experimental group than control. Although there were no differences in water, protein and calcium content of femora between two groups, collagen content and proportion of collagen in total protein were higher in experimental group than control. These results suggest that oral administration of cartilage collagen increase collagen synthesis and accumulation in bone, then increase bone strength than those of control. In addition, cartilage collagen have a possibility as a functional food stuff.

1. 目的

骨は関節軟骨を介して連結することで骨格系を構成し支持組織としての機能を果たしている。一部を除き骨の初期形成とその後の量的増大においては、骨組織内の骨端部分で一旦軟骨が形成された後に、石灰化した骨へと置換される。このとき主要な構成成分も大きく変化しており、軟骨ではII型コラーゲンとプロテオグリカンからなるが、骨ではI型コラーゲンと石灰化による多量のカルシウムとリンが沈着している。生体のボディサイズが大きくなるには、必然的に骨サイズも増加することになるが、先行して軟骨も形成されること

となる。体成長の著しい若齢期から、適切な栄養成分を摂取することで骨密度・骨塩量を増加させ、いわゆるしっかりした骨を形成させることは、骨粗鬆症等の加齢に伴う老化変成のリスクを低減させることが知られている。カルシウムやI型コラーゲンにはこのような栄養学的効果があると報告されている。一方軟骨構成成分であるII型コラーゲンやプロテオグリカンを経口摂取することで、関節リウマチ等の疾患において症状を改善することが報告されている¹⁾。骨の形成機序を考えれば、軟骨成分の経口摂取は関節軟骨だけではなく、骨へと置換される骨端軟骨へも影響を及ぼしていることが考えられる。

そこで本研究は、軟骨由来コラーゲンの経口投与が、成長期の骨形成に及ぼす影響を検討することを目的とした。

2. 方法

離乳直後の3週齢ICR系マウスを購入し、成長期であり体成長および骨形成の盛んな時期から実験を開始する。マウスを2群に分け、対照群には標準飼料（AIN-93G）を自由摂取させた。実験群にはブタ軟骨より粗精製したコラーゲンを飼料に添加し、自由摂取させた。軟骨由来コラーゲンの飼料への添加量はAIN-93Gにおけるタンパク質含量のうち、窒素換算で50%を粗精製コラーゲンに置換した。

実験開始後は体重を経時的に測定し、増体量の比較からコラーゲン添加群で、体成長へ負の影響がないかを検討した。飼料摂取開始後から1週間おきに19週齢までマウスをと殺し、後肢両側の大腿骨をサンプリングした。採取した大腿骨の重量とサイズを測定後、以下の形態観察および生化学的分析に供した。

2.1 形態観察

実験開始時の3週齢と中間の11週齢、実験終了時の19週齢で、各群のマウスをと殺し、アリザリンレッドとアルシアンブルーを用いた骨・軟骨二重染色法²⁾により全身骨格標本を作製した。

各サンプリング時点で採取した大腿骨は、0.5 M EDTAによる脱灰後、凍結切片を作成しHE染色と主要な骨構成成分に特異的な抗体を利用した間接蛍光抗体染色を行った。また、脱灰後、細胞消化法³⁾による走査型電子顕微鏡用試料を作製しコラーゲン線維の状態を観察した。

2.2 骨強度測定

採取した大腿骨の湿重量を測定した後、Bone Strength Tester (TK-252C, 室町機械)による3

点曲げ試験を行い、破断強度を測定した。試験後の骨は次項の生化学的分析に供した。

2.3 生化学的分析

破断試験後の骨を凍結乾燥し乾燥重量を測定後、6 N塩酸中で110℃、24時間の加水分解を行った。ロータリーエバポレーターを用いて塩酸を除去後、加水分解物を超純水に再溶解しOCPC法によりカルシウム量を、ニンヒドリン法により総タンパク質量を、そしてBergmanとLoxleyの方法⁴⁾によりヒドロキシプロリン量を測定した。コラーゲン含量はヒドロキシプロリン量に係数7.52を乗じて算出した。

3. 結果と考察

体重は両群ともに13週齢まで緩やかに増加し、7週齢以降は実験群で対照群よりもやや高い傾向を示した (Fig.1)。一方、骨重量は7週齢まで急激に増加し、以降はほぼ一定の値となった (Fig.1)。両群間に差は認められなかった。骨重量の増加は体重の増加に先行しており、成長期にはまず骨格系の形成が行われていることが示された。また、飼料は自由摂取としており採食量は測定していないが、実験群で多い傾向にあった。採食量の測定も含めた、栄養学的な検討も今後の検討課題といえる。

全身骨格標本では骨が赤染、軟骨が青染されたが、両群間に明確な相違は認められなかった (図示せず)。大腿骨横断面のHE染色像でも皮質骨の厚みや染色強度等には差が認められなかった。骨の主要構成成分であるI型コラーゲンの抗体染色像でも皮質骨が強染されたが群間に差は認められなかった。また、細胞消化法によるSEM像でも、コラーゲン線維の配向に差異は認められなかった (図示せず)。いずれの形態像からも両群間に差は認められず、軟骨コラーゲンの摂取は骨の主要な構造には影響を及ぼしてはいないものと考えられ

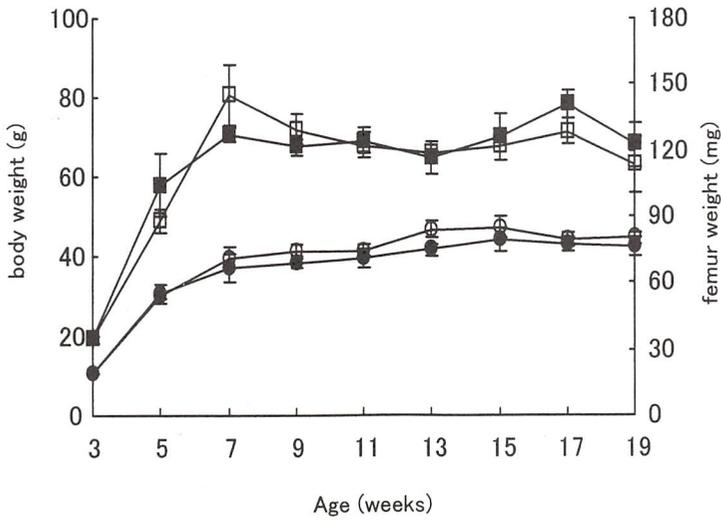


Fig.1 Age-related changes in bone (○, ●) and femur (□, ■) weight of growing mouse (mean ± SD). Control group (●, ■) and experimental group (○, □).

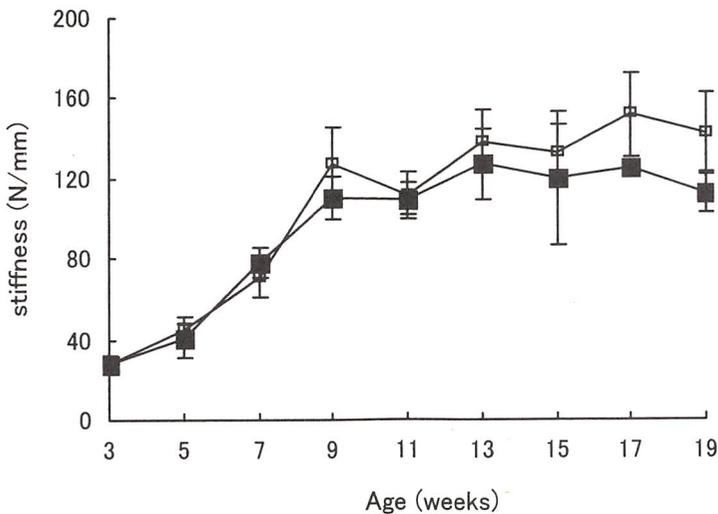


Fig.2 Age-related change in bone strength of growing mouse (mean ± SD). control group (■) and experimental group (□).

た。本実験では主として脱灰後の形態像の観察を行ったが、未脱灰標本での軟X線像等が得られれば骨密度の算出が可能となり、より詳細な解析を行うことができると考えられる。

骨強度は9週齢まで急激に増加し、その後は徐々に増加した (Fig.2)。骨重量の増加が止まった後も骨強度は増加しており、成長期にはまず骨サイズの獲得が起り、その後、内部構造の変化等

によって、強度に変化が起るものと考えられる。この間、体重は緩やかに増加しており、支持組織として機能するためにも強度の増加は必要なものと考えられる。両群を比較すると、7週齢までは差はほとんど認められなかったが、9週齢以降、有意差は無いものの実験群が対照群よりも高い値を示した。形態観察では差異はみられなかったが、構成成分・組成の変化が骨強度に反映されたもの

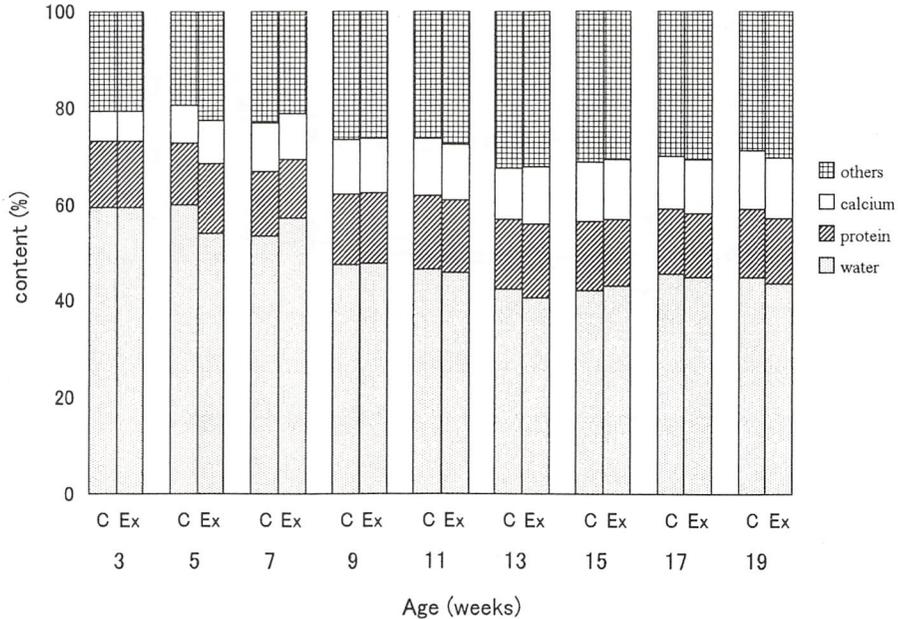


Fig.3 Age-related changes in water (□), protein (▨) and calcium (□) contents in mouse femur. C : control group, Ex : experimental group.

と考えられた。

骨の組成変化では、成長に伴い水分が減少し、逆にカルシウムは成長に伴い増加していた (Fig.3)。ウシ、ウマやブタでも、成長に伴い同様の成分変化が起ることが知られており、マウスにおいても正常成長時には他の動物種と同じ変化をすることが示された。カルシウム量の増加は骨無機質の主成分であるヒドロキシアパタイト量の増加と捉えることができ、骨強度の上昇に反映されているものと考えられる。また、タンパク質含量は骨強度の変化と同様に、9週齢までは増加し以後はほぼ一定の値となった。ヒドロキシアパタイトが沈着する足場となるタンパク質も量的に増加し、骨強度の上昇に寄与していると考えられる。しかし、両群間で水分、カルシウムそしてタンパク質含量に明瞭な差異は認められなかった。

一方、骨中のコラーゲン含量は、実験期間を通してほぼ一定であり、顕著な変化は認められなかった。また、タンパク質に占めるコラーゲンの割合は、実験開始時の3週齢では約50%であったも

のが、実験終了時には55~60%となり漸増傾向にあった (Fig.4)。両群間で比較すると、有為差は無いもののコラーゲン含量、タンパク質中のコラーゲンの割合ともに、実験群で高い傾向を示していた、緻密骨ではコラーゲン線維が構造的主体となり、線維間隙にヒドロキシアパタイトが沈着するが、実験群における骨強度の増加傾向は、タンパク質中に占めるコラーゲンの割合が高いことを反映したものと考えられる。軟骨コラーゲンの摂取がコラーゲンの合成/蓄積に影響を及ぼし、コラーゲン量と骨強度の増加させたものと推察されるが、代謝試験等によるより詳細な検討が必要であろう。また、コラーゲン分子間の架橋分析を行うことで、量的変化だけではなく、質的变化も把握していく必要があると考えられる。

今後は、飼料組成の検討や消化/代謝試験、あるいは細胞培養実験を組み合わせることで、摂取した軟骨コラーゲンが骨形成にどのような影響を与えているかを、より詳細に解析することが出来ると考えられる。

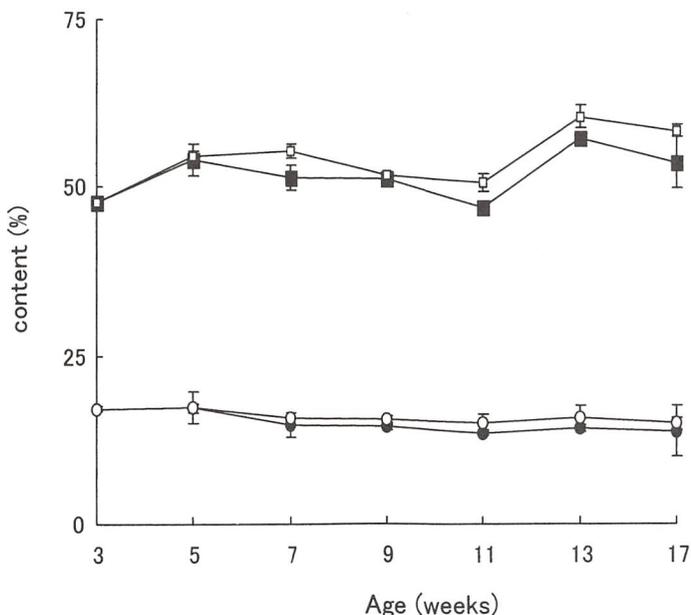


Fig.4 Age-related changes in collagen content (○, ●) and proportion of collagen in total protein (□, ■) of mouse femur (mean ± SD). Control group (●, ■) and experimental group (○, □).

4. 要 約

成長期マウスにおける骨成長にブタ軟骨コラーゲンの経口摂取が及ぼす影響について、大腿骨の形態、強度そして組成の変化から検討した。飼料中タンパク質の50%をブタ軟骨由来コラーゲンに置き換えた飼料を16週間摂取させた後、大腿骨を採取し形態観察、骨強度測定、組成分析を行った。両群間で形態学的な差異は認められなかったが、骨強度は軟骨コラーゲン摂取群が高い値を示した。また、骨構成成分のうち、水分、カルシウムとタンパク質含量は、両群間に差異はなかったが、コラーゲン含量とタンパク質中でコラーゲンの占める割合は、コラーゲン摂取群で高い傾向を示した。機序は不明であるが軟骨コラーゲンの摂取は、骨

中コラーゲン量を増加させ、その結果骨強度を増加させるものと推察された。

文 献

- 1) Uebelhart, D., Thonar, E. J. M. A., Delmas, P. D., Chantraine, A., Vignon, E. Effects of oral chondroitin sulfate on the progression of knee osteoarthritis : a pilot study. *Osteoarth. Cartil.* 6, 39-46, 1998.
- 2) 河村功一, 細谷和海. 改良二重染色法による魚類透明骨格標本の作製. *Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture* 20, 13-18, 1991.
- 3) Otani, O., Ushiki, T., Taguchi, T., Kikuta, A. Collagen fibrillar networks as skeletal frameworks : a demonstration by cell-maceration/scanning electron microscope method. *Arch. Histol. Cytol.* 51, 249-61, 1988.
- 4) Bergman, I., Loxley, R. Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline. *Anal. Chem.* 35, 1961-1965, 1963.

食肉製品による認知能改善メカニズムの解明：亜鉛の効果

Mechanistic Study on Improvements of Cognitive Function
by Meat Products: Effect of Zinc

横井克彦・鈴木由美

(聖徳大学大学院)

Katsuhiko Yokoi and Yumi Suzuki

(Seitoku University Graduate School)

Iron and zinc deficiencies are leading global nutritional problems that might affect neuropsychological performance. The depressed student learning performance assessed by OECD gave a strong impact to our society. In the previous study, we found significant improving effects of meat products on cognitive function in young women. We tested the hypothesis that zinc, which is rich in meat products, is beneficial for cognitive function in humans. To investigate a mechanism of beneficial effect of meat products on cognition, a double-blind randomized controlled trial of zinc supplementation was performed. Subjects were 36 women aged 18 to 28. The intervention consisted of 12 weeks supplementation of multiple vitamins alone (MV) or MV plus 6 mg zinc as zinc gluconate (MV + Zn). Cognitive performances were measured using Kyoto University NX15- Intelligence Test (NX15-) before and after interventions. Consumption of MV + Zn significantly improved verbal intelligence including complex verbal reasoning and prose memory and recall. The findings suggest that zinc is beneficial for improving cognitive performance of women and that a part of promotive effects of meat products is attributable to bioavailable zinc contained in the products. Further investigation is needed to determine the feasibility of improving cognitive function by meat products in the society.

1. 目的

IEA（国際教育到達度評価学会）のTIMSS（国際数学・理科教育動向調査）とOECDのPISA（国際的な生徒の学習到達度調査）によれば、我が国の学生・生徒の学力低下は著しい¹⁾。亜鉛と鉄は、学習と意欲を司る大脳辺縁系機能に必須であり、その欠乏によって動物では学習・記憶障害を起す²⁾。昨年度までに、伊藤記念財団の研究助成を受け、食肉製品摂取によって記憶を含む認知能が改善されることを明らかにし^{3~6)}、食肉中の鉄が

有効であるだけでなく、亜鉛もその改善効果に関与することを示唆する結果を得た⁷⁾。今年度は、昨年度の研究を継続し、食肉製品に多く含まれる亜鉛の摂取によって認知能がどのように回復するのか検討し、食肉製品の認知能改善メカニズムの解明を試みた。

2. 方法

2.1 群の割付

被験者は、18から28歳の女性であり、コントロール群 (MV alone)、亜鉛サプリメント群

Table 1 Composition of Supplements

| Ingredient | Multiple vitamin (MV) | Multiple vitamin + Zinc (MV + Zn) |
|---|-----------------------|-----------------------------------|
| Zinc gluconate, Zn mg/capsule | 0 | 6 |
| Vitamin A, IU/capsule | 900 | 900 |
| Vitamin D, IU/capsule | 50 | 50 |
| Vitamin B ₁ , mg/capsule | 0.4 | 1.4 |
| Vitamin B ₆ , mg/capsule | 0.6 | 0.6 |
| Vitamin B ₁₂ , mg/capsule | 0.5 | 0.5 |
| Niacin, mg/capsule | 6.5 | 6.5 |
| Folic acid, μ g/capsule | 100 | 100 |
| Vitamin B ₁₃ , μ g/capsule | 1.2 | 1.2 |

(MV+Zn)に無作為に割り付けた。以下に示す事前事後の心理検査を実施した被験者は各コントロール群18名、亜鉛サプリメント群18名であった。

2.2 事前検査

被験者が研究に応募後、サプリメントを与える前に、下記に示す心理検査を実施した。早朝空腹時に採血し、ヘモグロビン濃度、平均赤血球体積(MCV)、血清鉄濃度、血清フェリチン濃度、血漿亜鉛濃度等を測定した。

2.3 サプリメントの摂取

コントロール群には、ビタミンサプリメント(multiple vitamins;MV)、亜鉛サプリメント群には、亜鉛サプリメント(Zn+MV)を与えた。なお、サプリメントは外形を同じくし、二重盲検法を適用した。また、1日に1カプセルを時間を指定せず摂取させた。コントロール群、亜鉛サプリメント群ともにビタミン欠乏の影響を除くため、Table 1に示すように、投与したサプリメントはすべて各種ビタミンを同量ずつ含んでいる。なお、亜鉛サプリメントは、各種ビタミンに加えてグルコン酸亜鉛として亜鉛を元素量で6mgを含んでいる。

2.4 事後検査

サプリメントを継続摂取させ、12週間以降に心理検査を実施した。早朝空腹時に採血し、事前検査と同じ項目を測定した。

2.5 心理検査の内容

心理検査として新訂京大NX15-知能検査(Kyoto University New NX15-Intelligence Test, 大成出版牧野書房, 神戸)を実施し、知能指数ならびに各下位項目の結果を得た。NX15-の下位項目は、1:類似反対語(Verbal synonym/antonym), 2:重合板(Spatial relationship with overlapping boards), 3:計算法(Mathematics), 4:マトリックス(Complex verbal reasoning with word matrix), 5:文章完成(Sentence completion), 6:日常記憶(Prose memory and recall), 7:折り紙パンチ(Spatial reasoning by folded paper punching), 8:符号交換(Mathematical reasoning with arithmetic sign exchange), 9:図形分割(Geometry with figure division), 10:乱文構成(Sentence assembly), 11:ソシオグラム(Spatial reasoning using sociogram), 12:単語完成(Word completion)である。

2.6 統計処理

データはすべて平均値 \pm 標準偏差で示し、各群における処置の前後の差は、Paired t testで検定した。危険率1%を有意とした。

3. 結果と考察

被験者の特性はTable 2に示した。年齢、身長、体重、BMIに群間の差はなかった。また、Table 3に示すように、血清鉄、ヘモグロビン、MCV、血清フェリチン濃度に処置による効果は認められ

Table 2 Characteristics of Subjects

| Ingredient | MV alone | MV + Zinc |
|------------------------|-------------|-------------|
| n | 18 | 18 |
| Age, years | 19.4 ± 1.1 | 19.9 ± 2.1 |
| Stature, cm | 157.3 ± 4.8 | 158.6 ± 5.4 |
| Body weight, kg | 56.4 ± 8.9 | 55.3 ± 7.8 |
| BMI, kg/m ² | 22.8 ± 3.6 | 21.8 ± 2.7 |

Data are Mean ± SD.

なかったが、血漿亜鉛濃度は亜鉛サプリメントの投与によって増加する傾向があった (Fig.1)。

亜鉛サプリメント群では、京大NX15- 知能検査の各下位項目でpaired t検査を行った結果、4 :マトリックス (Complex verbal reasoning with word matrix) と6 :日常記憶 (Prose memory and recall) が有意に改善した (Table 4)。一方、10 :乱文構成 (Sentence assembly) は、MV単独では

有意な効果が認められたものの、MV+Znではその効果は認められなかった。

助成対象者である横井の共同研究者であるSandsteadとPenlandらが行った研究では、亜鉛サプリメントの投与が、中国人やメキシコ系アメリカ人児童の注意attentionや理由付けreasoningを向上させた⁸⁻⁹⁾。今回の研究では、亜鉛サプリメントの摂取によって血漿亜鉛が上昇する傾向があり、同時に文章の日常記憶が有意に改善していた。前回食肉製品を用いて行った研究では、ビーフジャーキー群の文章記憶は向上したが、鉄サプリメント群やコントロール群では、文章記憶は改善せず⁷⁾、食肉中の認知能改善因子として亜鉛が重要な役割を果たしていることが示唆された。申請者が米国で行った研究では食肉の摂取が鉄・亜鉛

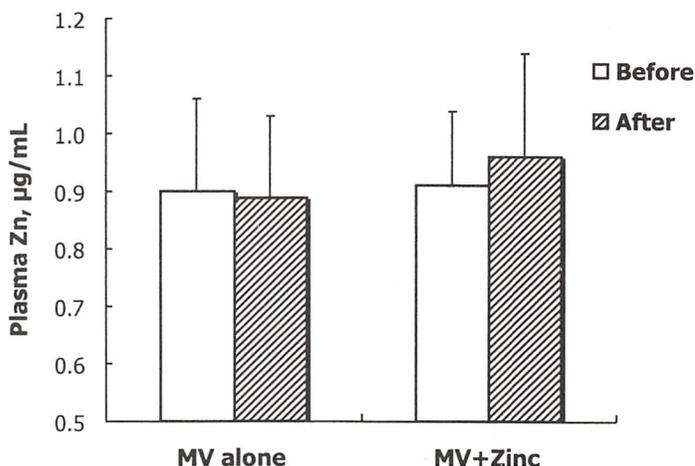


Fig.1 Effect of supplements containing multiple vitamins alone (MV alone) or multiple vitamins plus zinc (MV + Zinc) on plasma zinc concentration

Table 3 Blood chemistry before and after supplementation

| Ingredient | MV alone (n = 18) | | MV + Zinc (n = 18) | |
|-----------------------|-------------------|-------------|--------------------|-------------|
| | Before | After | Before | After |
| Serum Fe, µg/dL | 85.2 ± 51.6 | 88.9 ± 40.9 | 106.3 ± 37.4 | 81.4 ± 60.7 |
| Hemoglobin, g/dL | 13.3 ± 1.3 | 12.9 ± 1.4 | 13.4 ± 0.9 | 13.2 ± 1.0 |
| MCV, fL | 93.3 ± 8.2 | 92.5 ± 9.8 | 94.6 ± 6.5 | 93.2 ± 7.3 |
| Serum ferritin, ng/mL | 34.8 ± 25.9 | 28.5 ± 29.5 | 38.6 ± 21.7 | 39.2 ± 26.9 |

Data are Mean ± SD.

Table 4 Subtests of Kyoto University New NX15-Intelligence Test before and after supplementation[§]

| No. | | MV alone (n=18) | | MV + Zinc (n=18) | |
|-----|-----------------------------------|-----------------|----------|------------------|----------|
| | | Before | After | Before | After |
| 1 | Verbal synonym/antonym | 6.7±2.1 | 8.3±2.4 | 6.2±2.8 | 8.2±2.3 |
| 2 | Spatial relationships | 4.9±1.0 | 5.4±1.5 | 5.4±1.9 | 6.2±2.5 |
| 3 | Mathematics | 2.6±1.1 | 2.7±1.3 | 1.8±1.2 | 2.2±1.0 |
| 4 | Complex verbal reasoning | 5.6±1.2 | 6.0±2.2 | 4.4±1.0 | 5.5±1.2* |
| 5 | Sentence completion | 10.6±3.0 | 12.9±3.0 | 10.1±3.1 | 10.8±3.3 |
| 6 | Prose memory and recall | 6.7±2.1 | 7.8±1.3 | 6.4±2.5 | 8.3±1.1* |
| 7 | Spatial reasoning | 5.3±1.5 | 5.7±2.0 | 5.1±1.0 | 6.0±1.4 |
| 8 | Mathematical reasoning | 5.7±1.6 | 5.9±1.7 | 5.4±1.5 | 5.6±1.2 |
| 9 | Geometry | 4.6±2.5 | 6.3±3.2 | 4.4±2.8 | 5.6±4.1 |
| 10 | Sentence assembly | 4.1±1.3 | 5.2±1.0* | 4.5±0.8 | 4.9±1.3 |
| 11 | Spatial reasoning using sociogram | 4.1±1.6 | 4.2±1.3 | 4.4±1.6 | 4.6±1.2 |
| 12 | Word completion | 16.5±4.8 | 19.2±5.3 | 14.7±5.9 | 18.3±6.1 |

Data are Mean ± SD. *Significantly different from values before supplementation (P<0.01).

[§]Developed by Laboratory of Educational Psychology, Faculty of Literature, Kyoto University

栄養状態の低下に繋がっており¹⁰⁾、我が国における食肉摂取と認知能の関係を検討する必要性がある。

4. 要 約

亜鉛と鉄の欠乏は、ヒトの神経心理学的機能を低下させる可能性が高い、世界的に重要な栄養学的問題である。OECDの調査で明らかになった学生・生徒の学力低下は我々の社会に対して大きな衝撃を与えた。前回の研究では、食肉製品の摂取が若い女性の認知能を改善することを示唆する結果を得た。食肉製品に豊富である亜鉛の摂取は認知能改善に有効であると仮説を検討した。食肉製品の認知能改善メカニズムを明らかにするため、亜鉛サプリメントを用いた二重盲検無作為化比較試験を実施した。被験者は、36名の18から22歳の女性である。介入は12週間のマルチプルビタミン(MV) 単独あるいはグルコン酸亜鉛として6 mgの亜鉛とMVを含むサプリメントの摂取である。介入前後に京大NX15- 知能検査を用いて認知能を計測した。MVと亜鉛の同時摂取は、言語性知能下位検査項目、すなわちマトリックスと日常記

憶を有意に向上させた。これらの知見から、亜鉛の摂取は女性の認知能を改善すること、ならびに、食肉製品の改善効果は、食肉製品に含まれる利用効率の高い亜鉛である程度説明できることが示唆された。実社会における食肉摂取による認知能改善の有効性を確定するため、さらなる研究が必要である。

文 献

- 1) 文部科学省. PISA (OECD生徒の学習到達度調査) 2000年調査・2003年調査・2006年調査 (PDF); IEA 国際数学・理科教育調査 2000年調査・2003年調査. http://www.mext.go.jp/b_menu/toukei/main_b8.htm accessed on 4/16/2007.
- 2) Halas ES, Eberhardt MJ, Diers MA, Sandstead HH. Learning and memory impairment in adult rats due to severe zinc deficiency during lactation. *Physiol. Behav.* 30:371-81, 1983.
- 3) Yokoi K, Suzuki Y, Konomi A and Esashi T. A preliminary report: effect of supplemental beef product on cognitive performance in premenopausal women. *FASEB J.* 19: A457, 2005.
- 4) 横井克彦, 鈴木由美, 江指隆年. 食肉製品による認知能改善, 平成15年度食肉に関する助成研究調査結果報告書, 伊藤記念財団 22: 260-263, 2004.
- 5) 横井克彦, 鈴木由美, 江指隆年. 食肉製品による認知能改善, 平成16年度食肉に関する助成研究調査結果報告書, 伊藤記念財団, 23: 263-268, 2005.

- 6) 横井克彦, 鈴木由美, 江指隆年. 食肉製品による認知能改善, 平成17年度食肉に関する助成研究調査結果報告書, 伊藤記念財団, 24: 266-270, 2006.
- 7) 横井克彦, 鈴木由美. 食肉製品による認知能改善メカニズムの解明: 亜鉛の効果, 平成18年度食肉に関する助成研究調査結果報告書, 伊藤記念財団, 25:12-16, 2007.
- 8) Sandstead HH, Penland JG, Alcock NW, Dayal HH, Chen XC, Li JS, Zhao F, Yang JJ. Effects of repletion with zinc and other micronutrients on neuropsychologic performance and growth of Chinese children. *Am. J. Clin. Nutr.* 68: 470S-475S, 1998.
- 9) Penland JG, Sandstead HH, Alcock NW, Dayal HH, Chen XC, Li JS, Zhao F, Yang JJ. A preliminary report: effects of zinc and micronutrient repletion on growth and neuropsychological function of urban Chinese children. *J. Am. Coll. Nutr.* 16: 268-272, 1997.
- 10) Yokoi K, Sandstead HH, Egger NG, Alcock NW, Sadagopa Ramanujam, VM, Dayal HH, Penland JG. Association between zinc pool sizes and iron stores in premenopausal women without anaemia. *Br J Nutr* 98, 1214-1223, 2007.

動脈硬化予防能を有する機能性食肉の開発

Development for Functional Meat with an Ability to Prevent Arteriosclerosis

上曾山 博 ・ 本田 和久 ・ 元木 徹 ・ 長谷川 信

(神戸大学大学院農学研究科)

Hiroshi Kamisoyama, Kazuhisa Honda, Tohru Motoki and Shin Hasegawa

(Graduate School of Agricultural Science, Kobe University)

To develop a functional meat with an ability to prevent arteriosclerosis, the effects of beef ethanolic extract-derived fractions (anion exchanger-binding, cation exchanger-binding and ion exchanger-non-binding fraction) on body weight, liver weight, muscle weight, abdominal adipose tissue weight and hepatic triglyceride content in rat were determined. All fractions did not influence body weight, feed intake, feed efficiency, muscle weight and hepatic triglyceride content in rats. Cation exchanger-binding fraction significantly increased liver weight and significantly decreased abdominal adipose tissue weight. These results suggest that one of the beef ethanolic extract-derived fraction, cation exchanger-binding fraction, contains anti-obesity factors.

1. 目 的

高齢化社会を迎えつつある我が国では、極く近い将来において介護医療に掛かる費用の急激な増大が避け得ないことから、これを可能な限り抑制することが社会的緊急課題となっている。ここで、厚生労働省の調査に拠れば、介護医療が必要となる疾患の主要なものとして脳血管疾患、心疾患および痴呆症があり、これらの全体に対する割合は40%にも及ぶことが明らかとなっていることから、これら疾患を引き起す主因とされている動脈硬化を予防することが、上述の課題を解決するための極めて有効な手段となり得る。この動脈硬化を引き起す代表的な疾病として、高血圧、糖尿病および高脂血症があり、これらの疾病は総て内臓脂肪の増加により引き起され得ることが広く知られて

いる¹⁾。このようなことから、我国においては、内臓脂肪型肥満に高血糖、高血圧および脂質異常の内の何れか二つが伴う状態、すなわち、メタボリックシンドロームの改善が極めて重要な課題となりつつある²⁾。

ここで、申請者らは、種々の食品素材中の抗肥満因子の検索に関する一連の研究(研究成果^{3~6)})によって、脱脂牛肉画分は大豆タンパク質をも凌ぐ強力な抗肥満作用を示すが、牛肉に含まれる既知の低分子成分(クレアチニン、カルニチン、クレアチン、カルノシンおよびアンセリン)の給与は抗肥満作用を示さなかったことから、牛肉中に未報告の抗肥満因子が存在する可能性が極めて高いことを示唆した。

そこで、本研究では、動脈硬化予防能を有する機能性食肉の開発を最終目的に、牛肉のエタノー

Table 1 Composition of experimental diets (g/100g diet)

| | Control | (+) fraction | (-) fraction | (+/-) fraction |
|------------------------------------|---------|--------------|--------------|----------------|
| Casein | 20.99 | 20.98 | 20.98 | 20.96 |
| Cation fraction ¹⁾ | - | 0.57 | - | - |
| Anion fraction ²⁾ | - | - | 1.10 | - |
| Non-binding fraction ³⁾ | - | - | - | 1.24 |
| DL-Methionine | 0.31 | 0.30 | 0.30 | 0.30 |
| L-Arginine | 0.97 | 0.97 | 0.96 | 0.94 |
| Glycine | 0.36 | 0.36 | 0.35 | 0.35 |
| Glucose | 53.1 | 52.6 | 52.1 | 52.0 |
| Soybean oil | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Cellulose | 14.5 | 14.5 | 14.5 | 14.5 |
| Vitamin mixture ⁴⁾ | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.5 |
| Mineral mixture ⁵⁾ | 6.05 | 6.05 | 6.05 | 6.05 |
| Choline-HCl | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 |
| BHT | 0.012 | 0.012 | 0.012 | 0.012 |

¹⁾ Cation exchanger-binding fraction

²⁾ Anion exchanger-binding fraction

³⁾ Ion exchanger-non-binding fraction

⁴⁾ mg per kg diet : thiamine-HCl 6.0 ; riboflavin 9.0 ; niacin 50.0 ; Ca-D-pantothenate 20.0 ; pyridoxine-HCl 8.0 ; biotin 0.3 ; folic acid 2.0 ; menadione sodium bisulfite 2.0 ; inositol 1,000 ; vitamin B₁₂ 20 μ g ; vitamin A palmitate 25,000 USP units ; vitamin D₃ 1,200 ICU ; d- α -tocopheryl acetate 17.6 IU.

⁵⁾ g per kg diet : CaCO₃ 19.1 ; Ca(H₂PO₄)₂ · 2 H₂O 21.15 ; K₂HPO₄ 11.2 ; NaCl 6.0 ; MgCO₃ 2.08 ; FeSO₄ 0.2 ; ZnCO₃ 0.18 ; CuSO₄ · 5H₂O 0.51 ; MnSO₄ · H₂O 0.51 ; KI 0.04 ; NaMoO₄ · 2H₂O 0.0025

ル抽出画分をイオン交換クロマトグラフィーを用いて細分画した画分をラットに給与して、体重、飼料摂取量、肝臓重量、筋肉重量、内臓脂肪組織重量および肝臓トリグリセリド含量に及ぼす影響を調べた。

2. 材料および方法

5週齢のSprague-Dawleyラット〔日本チャールス・リバー(株)〕雄を、ステンレス製5室ケージ(KN-615, 夏目製作所)に収容し、室温25 \pm 2 $^{\circ}$ C、明期2:45~14:45、飼料および水は自由摂取の条件下で7日間飼育した。この順応期間中は市販飼料〔MF, CP18.0%, ME 295kcal/100g, オリエンタル酵母工業(株)〕を給与した。牛肉エタノール抽出画分を陰イオン交換樹脂(DEAE Sephacel) 或いは陽イオン交換樹脂(CM Sepharose CL-6B)を用いて、陰イオン交換樹脂吸着画分、陽イオン交換樹脂吸着画分および非吸着画分を調製した。8日後、各区の平均体重が等し

くなるように1区8頭ずつ、4区に分けた。陰イオン交換樹脂吸着画分、陽イオン交換樹脂吸着画分および非吸着画分を添加した、カゼインを唯一のタンパク質源とする試験飼料(CP18.0%, ME 285kcal/100g, Table 1)を21日間給与後、断頭と殺した。また、肝臓、内臓(腎周囲、精巣上体および腸間膜)脂肪組織およびヒラメ筋を摘出し、それぞれ重量を測定後、肝臓を液体窒素で凍結し、分析に供するまで-80 $^{\circ}$ Cで保存した。肝臓トリグリセリド含量は、Folchら⁷⁾の方法による肝臓からの総脂質抽出液を、トリグリセライドE-テストワコー(和光純薬工業株式会社)で測定した。得られた結果については分散分析により解析し、各区の平均値間の有意差検定はStudent'sのt-testによって行った(StatView, SAS Institute, 1998)。

3. 結果および考察

ラットへの牛肉のエタノール抽出画分の細分画画分(陰イオン交換樹脂吸着画分、陽イオン交換

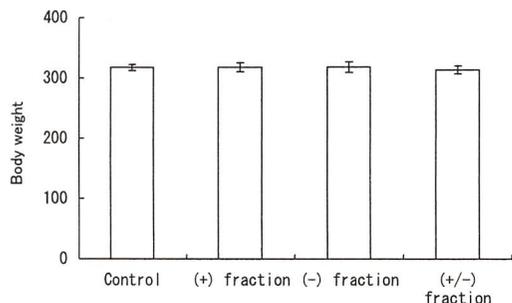


Fig.1 Effects of fractions of beef ethanolic extract on body weight of rat

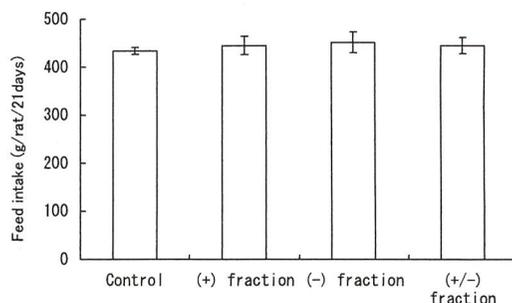


Fig.2 Effects of fractions of beef ethanolic extract on feed intake of rat

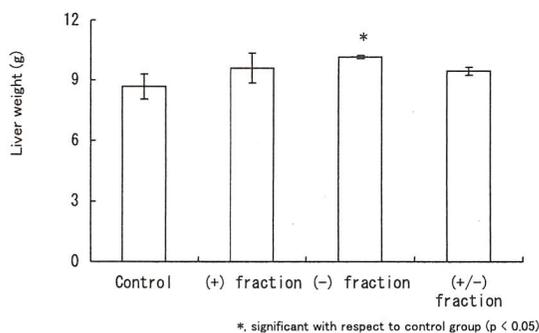


Fig.3 Effects of fractions of beef ethanolic extract on liver weight of rat

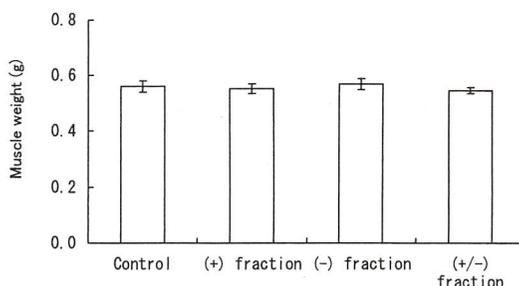


Fig.4 Effects of fractions of beef ethanolic extract on muscle weight of rat

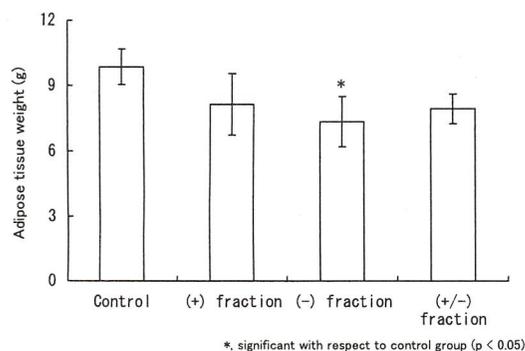


Fig.5 Effects of fractions of beef ethanolic extract on adipose tissue weight of rat

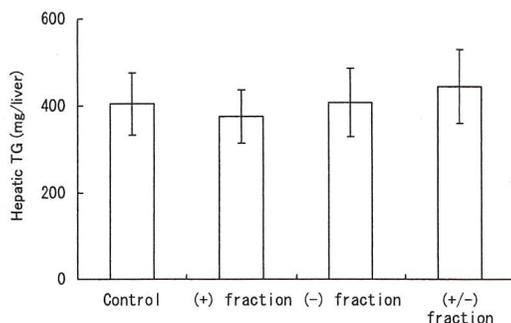


Fig.6 Effects of fractions of beef ethanolic extract on hepatic TG content of rat

樹脂吸着画分および非吸着画分)の給与が、体重、飼料摂取量、肝臓重量、筋肉重量、内臓脂肪組織重量および肝臓トリグリセリド含量に及ぼす影響を調べた。

その結果、体重および飼料摂取量については、細分画画分物給与による影響は認められなかった (Fig.1, 2)。肝臓重量は陽イオン交換樹脂吸着画分の給与により有意 ($p < 0.05$) に増加した (Fig.3) が、筋肉重量については、細分画画分物給与に

よる影響は認められなかった (Fig.4)。また、内臓脂肪組織重量は、陽イオン交換樹脂吸着画分給与により有意 ($p < 0.05$) に減少した (Fig.5)。肝臓トリグリセリド含量については、細分画画分物給与による影響は認められなかった (Fig.6)。

これらの結果から、牛肉のエタノール抽出画分の陽イオン交換樹脂吸着画分に抗肥満因子が存在していることが示唆された。

今後、この抗肥満因子を分離・精製してその化

学的構造を同定し、このことに基づき機能性食肉を開発するためには、まず、牛肉エタノール抽出画分の陽イオン交換樹脂吸着画分をHPLC等を用いて更に細かく分画する必要があると考えられるが、その分離・精製の過程において得られる極めて数多くの画分から、ラットにおける内臓脂肪蓄積抑制効果を指標に抗肥満因子を*in vivo*条件下で検索することは極めて大きな困難が伴い、現実的ではないと考えられる。それ故、牛肉エタノール抽出画分の陽イオン交換樹脂吸着画分給与による内臓脂肪蓄積抑制機構を明らかにし、その明らかにされた機構（例えば、肝臓における脂肪酸酸化促進）を元に*in vitro*の検索系（例えば、培養肝細胞を用いて脂肪酸酸化酵素の遺伝子発現測定系）を開発・活用することにより、牛肉中の抗肥満因子を同定、延いては機能性食肉を開発することができると考えられた。

4. 要 約

本研究は、動脈硬化予防能を有する機能性食肉の開発を最終目的として、牛肉のエタノール抽出画分の細分画画分の抗肥満作用について明らかにすべく、細分画画分（陰イオン交換樹脂吸着画分、陽イオン交換樹脂吸着画分および非吸着画分）の給与が体重、飼料摂取量、肝臓重量、筋肉重量、内臓脂肪組織重量および肝臓トリグリセリ

ド含量に及ぼす影響について調べた。その結果、ラットへの陽イオン交換樹脂吸着画分の給与は、内臓脂肪組織重量を有意に減少させた。これらの結果から、牛肉のエタノール抽出画分の細分画画分である陽イオン交換樹脂吸着画分中に抗肥満因子が存在する可能性が高いことが示唆された。

文 献

- 1) Després, J.P. and Lemieux, I.: Abdominal obesity and metabolic syndrome, *Nature*, 444, 881-887, 2006.
- 2) 中村 正: メタボリックシンドロームの定義と診断基準, *Adiposience*, 2,11-15, 2005.
- 3) Honda, K., Kamisoyama, H., Kato, H., Furuya, N., Ishiwata, H., Motoki, T., Saito, N. and Hasegawa, S.: Comparative effect of isolated soybean protein and casein on body fat deposition in chicks, *The Journal of Poultry Science*, 37, 366-373, 2000.
- 4) Honda, K., Suzuki, M., Kamisoyama, H., Kato, H., Iba, S., Motoki, T., Kano, K., Yagi, K., Sugahara, K. and Hasegawa, S.: Effects of dietary de-fatted beef and its fractions on plasma and hepatic triglyceride contents in chicks. *The Journal of Poultry Science*, 37, 245-250, 2000.
- 5) 長谷川信, 加藤宏尚, 伊庭早苗, 元木 徹: 食肉成分の摂取が代謝調節因子に及ぼす影響, 平成11年度食肉に関する助成研究調査成果報告書, 18, 178-182, 2007
- 6) 上曾山博, 本田和久, 元木 徹, 長谷川信: 動脈硬化予防能を有する機能性食肉の開発, 平成18年度食肉に関する助成研究調査成果報告書, 25, 7-11, 2007
- 7) Folch J., Lees M. and Sloane-Stanley G.A.: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, *J. Biol. Chem.*, 226, 497-509, 1957.

L-カルニチン摂取の癌性悪液質に及ぼす影響

Effect of L-carnitine Intake on Cancerous Cachexia

福永 健治・吉田 宗弘・*関口 健

(関西大学化学生命工学部, *伊藤ライフサイエンス株式会社)

Kenji Fukunaga, Munehiro Yoshida and *Takeshi Sekiguchi

(Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, Kansai University and
*Ito Life Sciences Inc.)

In our previous study, we demonstrated that L-carnitine (LC) could play an important role in inhibiting the incidence of aberrant crypt foci in the colon of mice with immune activation or an increase in antineoplastic cytokines. These observations indicate for the first time that LC suppresses the initial stage of colon tumorigenesis. However, cachexia involves progressive loss of adipose tissue and skeletal muscle mass and is common in a number of end-stage diseases. Cachexia causes weakness and immobility, reduces the quality of life (QOL) of the patient, and eventually results in death. Most of patients with cancer easily develop a tendency to consume a vegetable diet based on incorrect dietary information and the intake of meat often decreases. In the present study, therefore we used a mouse experimental model of the cachectic state to demonstrate improvement of the physiological and immune status following administration of LC. The experimental groups designed for sp 2 tumor bearing BALB/c nu/nu mice were administered LC; 0 (control), 0.05%, 0.25% and 1.00%. When sp 2 tumor-bearing mice were administered LC, improvements of the immune status demonstrated by an increased Th 1/Th 2 ratio and inhibition of tumor enhancement were confirmed. LC administration facilitates energy production smoothly by promoting lipid metabolism in the liver mitochondria in the cachectic state, and the immune system is promoted. Furthermore, it is thought that tumor growth is inhibited in a dose-dependent manner and dietary LC has been shown to be effective in preventing progressive weight loss in cachexia. Therefore, it is thought that the LC intake by patients with cancer has a tumor inhibitory effect as well as promoting physical strength maintenance and immune activity. To improve QOL of the patient, particularly those with terminal cancer, promoting LC intake is expected to the increase of the effect of treatment and intake of LC should be added as one of the supplemental treatment choices.

1. 目的

L-カルニチン (LC) は、体内で生合成されるほか、畜肉食品に豊富に含まれ、生体の脂質代謝に関与するヒドロキシアミノ酸である。LCは、脂肪酸をミトコンドリア内膜より β 酸化が行われる

マトリックスへ運搬する働きを有することから、脂肪燃焼効果が期待されている¹⁾。LCは、一般に加齢とともに生合成される割合は低下することから、食事による補給が望まれる、しかし、一方でLCを豊富に含有する畜肉の摂取は同時に脂肪を摂取することでもある²⁾。過体重、肥満状態のヒ

トは、畜肉摂取を避ける傾向にあるため、LCの不足も考えられる。また、高齢者では、嗜好性からその十分量を食事から摂取することは難しく、メタボリックシンドロームの抑制、健康の維持・増進の観点からも、畜肉の摂取はむしろ重要である。

わが国における死因別死者数をみてみると、悪性新生物（癌）が1位になって四半世紀以上が経過し、毎年100万人以上が死亡している。欧米先進諸国で多くみられる癌の発症要因のうち、重要なものに脂肪摂取量がある。脂肪摂取量が過剰な場合、疫学調査、動物実験実験においても発癌の危険性が高まることが知られている³⁾。LCを適量摂取した場合、脂肪が積極的にエネルギー産生に使われ、白色脂肪組織（WAT）が減少する。その結果、WATから分泌される癌促進的に作用するサイトカインの産生を抑制することで、癌抑制的に作用することが予想される。一方、癌患者はその末期においては、癌性悪液質とよばれる状態に陥り、著しく生活の質（QOL）が低下することが知られている。癌患者の多くは、誤った情報から菜食傾向になり易く、しばしば畜肉の摂取を敬遠することがみられる。化学抗癌剤治療期間をはじめ、癌患者が訴える倦怠感や体力低下に、体内でのLC不足が考えられる。LCの補給によって、悪液質を改善することができれば、QOLの向上、延命につながると考えられる。そこで本研究では、悪液質状態におけるLCの栄養状態、免疫状態への影響についてマウスを実験動物に用い、評価を行った。

2. 方法

本研究では、マウスに癌細胞を移植して癌末期における癌性悪液質状態を作出した。マウスは、癌細胞移植後の観察が容易なBALB/c nu/nuマウスを用いた。マウスに骨髓細胞腫瘍（SP2）を移植して癌末期の悪液質状態に誘導した。対照群用

の餌料はAIN-93Gを基本とし、脂質原をコーン油として脂質含量10%に改変して調製した。LC給餌量は、これまでの動物実験の報告の多くで餌料中含有量が0.1–0.5%（w/w）の範囲であることを参考にして、0.05、0.25および1.0%（w/w）となるように調製した。マウス110匹を離乳直後から対照群用餌料（AIN93G）で6週齢に達するまで馴化飼育し、6週齢時点で全個体平均体重の0.5×標準偏差の個体を選出した。マウスの右腰部にSP2マウス骨髓腫瘍細胞（ $2 \times 10^6/0.1\text{ml}/\text{個体}$ ）をマウス80匹に対して腫瘍を移植した。腫瘍移植後7日経過時点で、移植細胞がマウスに定着していることを確認し、腫瘍長径、短径をノギスで測定し、ともに4mm以上ある個体60匹を選出した。各群20匹とし、無作ために3群に分割した。試験餌料給餌開始後28日まで体重、腫瘍重量の変化を記録した。また、増殖抑制率を以下の式に従って算出した。

$$\text{腫瘍増殖抑制率 (\%)} = 100 (1 - L/C)$$

L: L-カルニチン給餌群平均腫瘍重量

C: 対照群平均腫瘍重量

2.1 血液生化学指標の測定

一般的な栄養状態を確認するため、解剖時に下行静脈から採血し、2,500rpm、4℃、20minで遠心分離し、血清を得た。血清は自動分析計に供し、総タンパク質（Pro）、総コレステロール（Chol）、中性脂肪（TG）、ヘモグロビン（Hb）を定量した。

2.2 肝臓脂質代謝関連酵素活性の測定

担癌状態における脂肪酸代謝は著しく変化することが知られていることから、以下に示す肝臓における脂質代謝関連酵素活性を測定した。カルニチンパルミトイルCoAトランスフェラーゼII（CPT II）⁴⁾、は長鎖脂肪酸アシルCoAをミトコンドリア内に輸送するための律速段階酵素で、アシルカルニチンからCoAへのアシル基転移を触媒する。脂肪酸合成酵素（FAS）⁵⁾は脂肪酸の合成に関

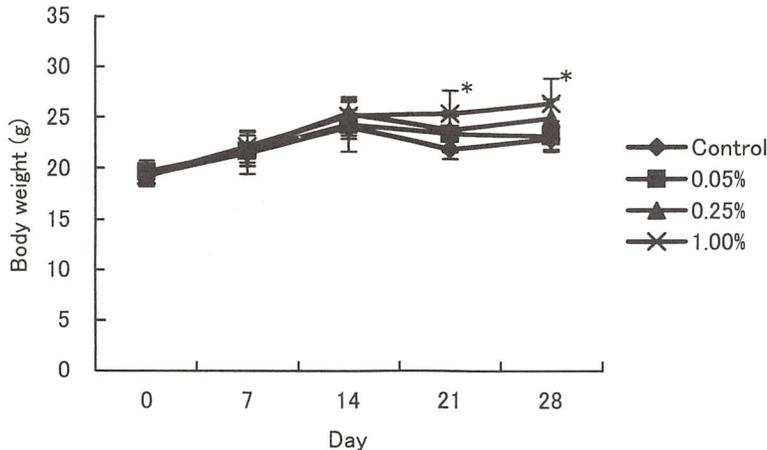


Fig.1 Effect of L-carnitine administration on the body weight of myeloma sp2 bearing Balb/c/nu/nu mice. Data are means \pm SD. Asterisks indicate significant difference as compared to control * $p < 0.05$.

わる律速段階酵素である。LC給餌によって脂肪酸減少が予測されるので、合成活性が上がる可能性があるため測定した。アシルCoAデヒドロゲナーゼ (ACD)⁶⁾は β 酸化における律速段階酵素である。LC給餌によってミトコンドリア内に脂肪酸輸送が行われ、ACD活性が上がっている可能性があるため測定した。

2.3 脾臓サイトカインの測定

サイトカインは、リンパ球より産生される低分子量タンパク質で、細胞上のレセプターに作用することによって細胞の増殖や分化、アポトーシスを誘導することから免疫状態を制御する重要な因子である。本研究では、脾臓由来サイトカインとしてTNF- α 、IFN- γ およびIL-4を市販の測定キット (EndogenInc, Woburn, MA, USA) を用いてELISA法にて測定した。

マウスの脾臓細胞をHanks液 (大日本住友製薬, 大阪) で清浄し、細胞浮遊液を調製した。脾臓細胞を 3.0×10^6 個/mlになるように10% FCSを含むRPMI 1640培地で調整した。この細胞浮遊液を96穴培養プレート (n=3) に分注後、37°C のCO₂インキュベータ内に72時間培養し、遠心後の培養上清をサイトカイン測定に供した。

2.4 統計処理

得られたデータは、平均値 \pm 標準偏差で表した。有意差は、t-検定によって評価し $p < 0.05$ 以下を有意差ありとした。すべての演算はStatview5.0によって行った。

3. 結果および考察

担癌状態のマウス飼育期間中における体重の変化をFig.1に示した。14日以降LC1.00%群をのぞき体重の減少がみられた。LCは脂肪燃焼を促進する作用を有するが、むしろ積極的に脂肪燃焼を促進し、タンパク質の異化を抑制していることが考えられる。また、LC給餌群における腫瘍体積はControl群に対して増殖抑制されていた (Fig.2)。とくにLC1.00%群はControl群に対して飼育開始14日の測定から有意な増殖抑制がみられた。LC0.05%群およびLC0.25%群は有意な差はみられないものの、増殖抑制されていた (Fig.3)。さらに、解剖時における腫瘍を除いた体重はLC0.5%群、LC1.00%群で有意な差が認められた (Fig.4)。

担癌動物は癌性悪液質の影響により、著しい痩せの結果、体力がかなり低下する。このような痩せの亢進状態にあるときに脂肪燃焼効果のあるLC給餌を行うと、さらに痩せと腫瘍増殖が亢進し体力が低下すると思えたが、実際は逆に体重を

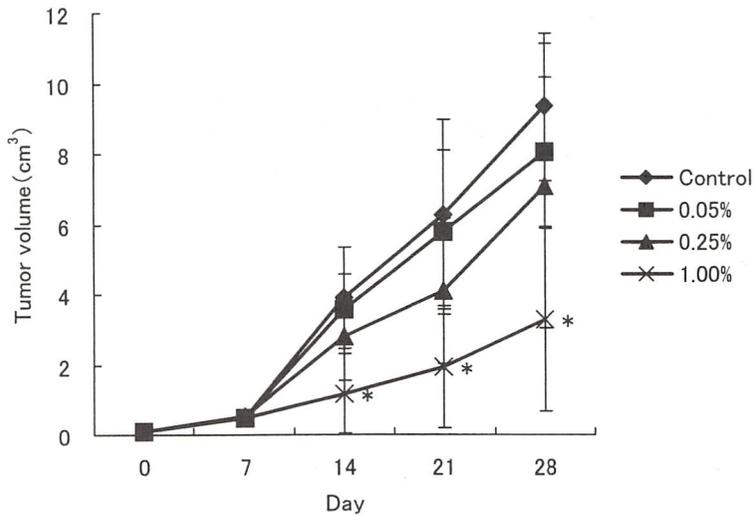


Fig.2 Effect of L-carnitine administration on the tumor volume of myeloma sp2 bearing Balb/c/nu/nu mice. Data are means \pm SD. Asterisks indicate significant difference as compared to control * p <0.05.

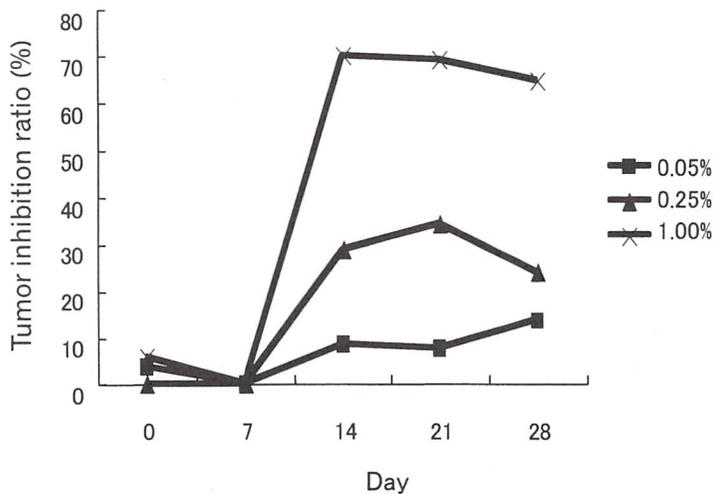


Fig.3 Effect of L-carnitine administration on the tumor inhibition ratio of myeloma sp2 bearing Balb/c/nu/nu mice.

維持し腫瘍増殖を抑制していた。ヌードマウス (BALB/c nu/nu) は脂肪がほとんどなく、LC給餌で体脂肪が燃焼するとは考え難い。よって、LC給餌によって体脂肪の燃焼が円滑になり、むしろ先に起る筋肉の退縮あるいは糖原性アミノ酸の消費を抑制しているためではないかと考える。

つぎに血清成分およびヘモグロビンHb濃度に及ぼすLC給餌の影響を検討した。その結果を

Table 1にまとめた。血清タンパク質はLC給餌群において有意に減少抑制が認められた。血中Chol値は高すぎると動脈硬化の原因となるが、Cholは様々な生理機能を調節するステロイドホルモンの前駆体であり、炎症反応やストレスに対する抵抗力などに影響し、Cholが少な過ぎると、血管が脆弱になり、免疫能の低下がみられる。本結果では、LC給餌によって正常な値が維持され、

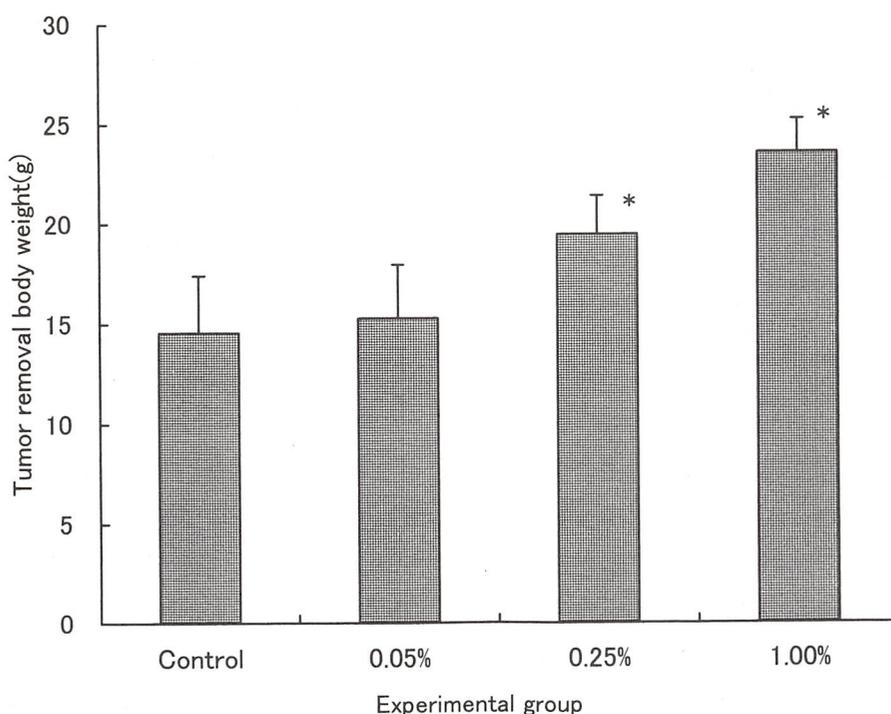


Fig.4 Effect of L-carnitine administration on the tumor removal body weight of myeloma sp2 bearing Balb/c/nu/nu mice.

Data are means \pm SD. Asterisks indicate significant difference as compared to control * p <0.05.

Table 1 Effect of L-carnitine administration on the serum constituent and Hb content of myeloma sp2 bearing Balb/c/nu/nu mice.

| | Serum constituent and Hb content (mg/dl) | | | |
|---------|--|-------------------|-------------------|-------------------|
| | Pro | Chol | TG | Hb |
| Control | 4.04 \pm 0.41 | 74.4 \pm 9.77 | 52.57 \pm 10.8 | 12.04 \pm 1.28 |
| 0.05% | 4.51 \pm 0.50* | 75.0 \pm 12.02 | 50.83 \pm 22.8 | 12.21 \pm 1.64 |
| 0.25% | 4.81 \pm 0.38* | 79.2 \pm 12.51 | 45.69 \pm 19.31 | 14.01 \pm 1.93 |
| 1.00% | 5.19 \pm 0.21* | 91.3 \pm 11.86* | 34.60 \pm 20.15 | 16.62 \pm 1.91* |

Data are means \pm SD. Asterisks indicate significant difference as compared to control * p <0.05.

免疫力を保ち、腫瘍抑制に影響していると考えられる。

担癌動物は癌性悪液質によって、高脂血症となることが知られている。血清TG値測定の結果、有意な差はみられないもののLC給餌量に比例して減少傾向にあった。つまり、LC給餌によって脂質代謝に血中脂肪酸が積極的に利用され、エネルギー産生を円滑にしていると考えられる。

Hbは赤血球に含まれ、組織に酸素を供給する

タンパク質である。今回の結果、LC給餌群においてHbは減少は抑制されており、とくにLC1.00%群においては有意差が認められた。つまり、LC給餌群において組織に酸素供給が円滑に起っていたと考えられる。

肝臓における脂質代謝関連酵素活性に及ぼすLC給餌の影響について検討した結果をTable 2に示した。脂肪酸は単独ではミトコンドリア内に入り込むことが不可能であり、LCと結合すること

Table 2 Effect of L-carnitine administration on the lipid metabolism-related enzyme activity of myeloma sp2 bearing Balb/c/nu/nu mice.

| | enzyme activity (nmol/min/mg protein) | | |
|---------|---------------------------------------|-------------|--------------|
| | CPT II | FAS | ACD |
| Control | 1.34 ± 0.66 | 4.00 ± 0.63 | 3.03 ± 0.94 |
| 0.05% | 1.55 ± 0.49 | 4.07 ± 0.62 | 3.11 ± 1.13 |
| 0.25% | 2.03 ± 0.56 | 4.30 ± 0.71 | 4.40 ± 1.71 |
| 1.00% | 2.53 ± 0.96* | 4.04 ± 0.70 | 6.92 ± 2.49* |

Data are means ± SD. Asterisks indicate significant difference as compared to control * $p < 0.05$.

によってそれが可能になる。CPT IIは、脂肪酸をミトコンドリア内に運搬するための重要な酵素である。CPT II活性はLC給餌量に比例して高く、LC1.00%群においては有意差がみられた。また、脂肪酸合成に重要な酵素であるFAS活性はすべての群間において有意な差はみられなかった。そして、 β 酸化の律速段階酵素であるACD活性はLC給餌量に比例して高く、LC1.00%群においては有意差がみられた。以上より、LC給餌によって肝臓における脂質代謝が亢進していると考えられる。LC給餌によって、肝臓の脂質代謝が上がったため、血中のTG値も下がったと考えられる。

さらに、免疫において重要な働きをする脾臓サイトカイン量の測定結果をTable 3に示した。

サイトカインは、リンパ球より産生される低分子量タンパク質で、細胞上のレセプターに作用することによって細胞の増殖や分化、アポトーシスを誘導する。また、ヘルパー T細胞は抗原刺激に

対しすばやく反応し、非常に高濃度のサイトカインを産生することができる。サイトカインの産生パターンからヘルパー T1 (Th1) とヘルパー T2 (Th2) に分類することができ、異なる免疫反応を制御している⁷⁾。Th1細胞は炎症反応を制御するIFN- γ 、TNF- α などのサイトカインを産生する。これに対し、Th2細胞はB細胞による抗体産生制御に関するサイトカインIL-4などを産生する。この二つの細胞集団は産生するサイトカインの違いを反映して、免疫反応において異なる機能を有し、相互のバランスにより感染防御や免疫性疾患を制御している⁸⁾。本研究ではTh1細胞から産生されるIFN- γ およびTNF- α を腫瘍抑制の指標とし、Th2から産生されるIL-4はTh1細胞活性とTh2細胞活性のバランスの指標とした。サイトカイン値はばらつきが大きく有意差は確認できなかったが、LC給餌群においてIFN- γ は増加傾向にあり、IL-4は減少傾向にあった。つまり、LC給餌によってTh1細胞に活性が傾き、腫瘍抑制に貢献したのではないかと考える。

4. 要 約

マウス末期癌モデルにLC給餌した場合、悪液質の改善、腫瘍抑制が確認できた。LC給餌は悪液質状態においても肝臓ミトコンドリアにおける脂質代謝を亢進することによってエネルギー産生を円滑にし、免疫力を高め、腫瘍抑制していると

Table 3 Effect of L-carnitine administration on the lienal cytokine of myeloma sp2 bearing Balb/c/nu/nu mice.

| | cytokine contents (pg/ml) | | |
|---------|---------------------------|-----------------|---------------|
| | TNF- α | IFN- γ | IL-4 |
| Control | 36.99 ± 15.20 | 426.80 ± 205.59 | 52.57 ± 10.80 |
| 0.05% | 53.77 ± 19.27 | 384.92 ± 181.04 | 50.83 ± 22.80 |
| 0.25% | 48.13 ± 17.96 | 616.75 ± 253.62 | 45.69 ± 19.31 |
| 1.00% | 32.44 ± 15.43 | 660.07 ± 260.23 | 34.60 ± 20.15 |

Data are means ± SD. Asterisks indicate significant difference as compared to control * $p < 0.05$.

考えられる。従って、癌罹患者のLC摂取は体力維持および免疫活性によって腫瘍抑制効果があると考えられる。とくに末期の癌患者のQOL向上、治療効果の増大を期待するとき、LCの摂取を選択肢の一つに加えることが望まれる。

文 献

- 1) Yonei Y, Takahashi Y, Hibino S, Watanabe M, Yoshioka T. *J Clin Biochem Nutr.* **42** (2) : 89-103 (2008)
- 2) Bartlett K, Eaton S. *Eur J Biochem.* **271** (3) : 462-469 (2004)
- 3) McCullough ML, Giovannucci EL. *Oncogene* **23** (38) : 6349-6364 (2004)
- 4) Mujahid A, Akiba Y, Warden C.H, Toyomizu M. *FEBS Letters.* **581** (18) 3461-3467 (2007)
- 5) Laux T, Schweizer M. *Biochem J.* **266**(3) : 793-797 (1990)
- 6) Ide T. *Biofactors.* **13** (1 - 4) : 9-14 (2000)
- 7) Mosmann, T.R. *Ann.NY Acad.Sci.* **664**:89-92 (1992)
- 8) Naldini A, Pucci A, Bernini C, Carraro F. *Curr Pharm Des* **9** (7) : 511-519 (2003)

牛肉エキスに含まれる筋肥大因子に関する研究

Skeletal Muscle Hypertrophic Factors Present in the Beef Extract

水野谷 航 ・ 馬場 研斗 ・ 辰巳 隆一 ・ 池内 義秀 ・ *関口 健

(九州大学大学院農学研究院, *伊藤ライフサイエンス株式会社)

Wataru Mizunoya, Kento Baba, Ryuichi Tatsumi, Yoshihide Ikeuchi and
*Takeshi Sekiguchi

(Faculty of Agriculture, Kyushu University and *Ito Life Sciences Inc.)

We had previously reported that 6% beef extract supplement to rats for four weeks increased muscle mass. The goal of this research was to elucidate the hypertrophic component present in beef extract and its mechanism. We studied the direct effects of beef extract to the cultured mouse skeletal muscle C2C12 cells in each stage of cell proliferation, differentiation and myotube growth. Treatment of undifferentiated C2C12 myoblast cells with 10^{-3} to 1% of beef extract induced a significant increase in cell number. For differentiation assay, C2C12 myoblast cells treated with 10^{-1} to 1% of beef extract in differentiation medium showed a significant decrease in creatine kinase activity. Then, treatment of differentiated C2C12 myotubes with beef extract induced a significant increase in myotube diameter and protein synthesis measured by [3 H] leucine incorporation. Finally, we showed by western blotting that beef extract did not increase Akt phosphorylation level in myotubes, indicating that beef extract might increase myotube growth via other signaling pathways. Therefore, our present results revealed that there is (are) some skeletal muscle hypertrophic factor(s) in beef extract and it stimulates myoblast cell proliferation and myotube growth in vivo.

1. 目 的

骨格筋は、我々の運動機能を支える最も重要な臓器である。骨格筋は、運動トレーニングにより緩やかに肥大し、寝たきりや宇宙遊泳などの不活動により速やかに萎縮する。加齢によっても骨格筋量は減少する¹⁾。加齢に伴う筋萎縮・筋力低下は特にサルコペニア（筋肉減弱症）と呼ばれ、サルコペニアが進行することで、転倒や骨折の危険が増加し、結果として高齢者のQOL低下につながる。従って、いかに高齢者の筋力の低下を防止

(サルコペニアを低減)するかが重要な課題となっている。さらに、骨格筋は筋力を決定する組織であると同時に血糖や脂肪酸を取り込み消費する組織でもあり、近年先進諸国で増加している肥満・生活習慣病・メタボリックシンドロームなどの代謝関連疾患の予防にとっても、骨格筋量の維持・増加は非常に重要な課題となっている。

加齢に伴う筋萎縮機序も含め、筋線維の肥大・増殖や筋力の増強機構は、いまだに十分に解明されていない。これまでのところ、筋肥大を誘導するには筋力トレーニング、特にレジスタンス運動

が最も有効であると言われている^{2,3)}。運動との関りは不明な点も多いが、いくつかのホルモン、成長因子が筋肥大に関与していることが分かっている。タンパク同化ステロイド⁴⁾や成長ホルモン⁵⁾、インスリン様成長因子(IGF)-1⁶⁾が正の調節因子、マイオスタチン⁷⁾が負の調節因子としてよく知られている。これらの因子は、外因的な投与により筋量を調節できることも分かっている。しかしながら、多くの場合、他の臓器への副作用(悪影響)が観察される。我々が通常摂取する栄養成分により副作用なく骨格筋の肥大を誘導することは可能であろうか。

我々はこれまでに、牛肉加熱水溶性画分である牛肉エキス(カルニッチ5, 伊藤ライフサイエンス)を粉末飼料中に6%配合し、ラットへ4週間給餌した結果、骨格筋重量が対照群に対し有意に増加することを明らかにした⁸⁾。この結果は、牛肉エキスに筋肥大因子が含まれていることを示唆している。そこで本研究では、牛肉エキスの筋肥大効果が筋組織に直接的に作用して生じたのかを、培養筋細胞株の増殖・分化速度、形態的観察およびタンパク質の合成能から評価することを目的とした。具体的には筋芽細胞株(C2C12)の培養液に牛肉エキスを様々な濃度で添加した後、筋芽細胞の増殖速度、分化速度、分化後の筋管の直径を測定するとともに、放射性同位体ラベルされたアミノ酸の筋管細胞への取込量からタンパク質合成量を調べた。

2. 材料および方法

2.1 実験材料

(1) 培養細胞

マウス由来筋芽細胞株C2C12を実験に用いた。培養はコラーゲンコートしたプレートを用いて、CO₂インキュベーター内で37℃、5% CO₂の条件下で行った。

(2) 細胞アッセイ用試薬

牛肉加熱抽出水溶性画分(牛肉エキス)としてカルニッチ5(伊藤ライフサイエンスより供与)を用いた。各アッセイのポジティブコントロールとして、R3-インスリン様成長因子(IGF)-1(Sigma)を用いた。

(3) 培地

Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM, Invitrogen) にNaHCO₃ (3.7 g/l) を加えた。DMEMにAA-mix とゲンタマイシン(Gibco)を終濃度各1.0%, 0.5%で添加した。実験に応じDMEMに、ウシ胎児血清(FBS, BioSource International), ウマ血清(HS, Sigma), 血清代替物Knock-Out serum replacement(KSR, Invitrogen)を添加した。

(4) ウェスタンブロットング用試薬

1次抗体は, rabbit anti-phospho-Akt (pSer⁴⁷³, Sigma), mouse monoclonal anti-Akt (Sigma), 2次抗体はビオチン化goat anti-rabbit IgG (Vector, BA-1000), rabbit anti-mouse IgG (Vector, BA-2000)を用いた。検出にはVECTASTAIN Elite ABC kit (Vector), ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare)を用いた。

2.2 細胞アッセイ

(1) 細胞増殖アッセイ

96穴プレートにC2C12を3000 cells/wellで播き、10% FBS-DMEMで24時間培養しプレートに接着させた。その後、0.1% KSR-DMEMを基本培地とし、牛肉エキスを10⁻¹⁰ - 1%添加した。培養72時間後、DMEMとCell Counting Kit-8 (Dojindo, CCK-8)を9:1に混合した試薬を各ウェル100 μlずつ添加し、インキュベーター内で2時間反応させた。その後、プレートリーダーにて450 nmの吸光度を測定し、細胞数を算出した。

(2) 分化誘導アッセイ

24穴プレートにC2C12を播き、サブコンフルエ

ントになるまで10%FBS-DMEMで増殖させた後、2%HS-DMEMを基本培地とし牛肉エキスを 10^{-6} –1%添加した。培養72時間後、M-PER (Pierce) にプロテアーゼインヒビターカクテルとホスファターゼインヒビターカクテル (Nacalai Tesque) を100:2:1で加え細胞を溶解した (100 μ l/well)。関東化学のシカリキッドCKによる測定値と、BCA法によって求めたタンパク質濃度から、クレアチンキナーゼ活性を unit/mg protein で算出した。

(3) 筋管直径測定

24穴プレートにC2C12を播き、増殖および6日間の分化誘導を行い、筋管を形成させた後、2%HS-DMEMを基本培地とし牛肉エキスを 10^{-6} –1%添加した。培養72時間後、各ウェルで無作為に筋管10本を写真に撮影し、Image J (NIH) にて筋管の最も太い部位を直径として計測し、その平均値をウェルの測定値とした。

(4) 筋管タンパク質合成能測定

24穴プレートにC2C12を播き、増殖および6日間の分化誘導を行い、筋管を形成させた後、 $[^3\text{H}]$ leucine を2 μ Ci/ml含むDMEMを基本培地とし牛肉エキスを 10^{-4} –1%添加した。培養24時間後、冷5% TCA溶液で酸可溶性画分を除去後、細胞溶解液 (0.3 N NaOH, 1% SDS) 250 μ lを加え、30分間振とうした。細胞溶解液中の放射活性を、液体シンチレーションカウンターにて測定した。これをBCA法にて測定したタンパク濃度を基に補正し、 $[^3\text{H}]$ leucine 取込量 (dpm/mg protein) を算出し、タンパク質合成能の指標とした。

2.3 ウェスタンブロッティング

24穴プレートにC2C12を播き、増殖および6日間の分化誘導を行った。その後、牛肉エキスを 10^{-2} %添加した2%HS-DMEMで15分間培養後、細胞溶解液 (M-PER, プロテアーゼインヒビターカクテル, ホスファターゼインヒビターカクテル

を100:2:1で混合) 250 μ lにて細胞を溶解した。細胞溶解液と2×サンプルバッファーを1:1で混合後、湯浴中で3分間煮沸し、SDS-PAGEにて分離したタンパク質を、ニトロセルロース膜に転写した。転写膜をanti-phospho-Aktあるいはanti-Akt, およびビオチン化2次抗体とペルオキシダーゼ標識アビジンで処理した後、ECL検出試薬を用いて免疫反応像をX線フィルムに出力した。

2.4 統計処理

対照区と処理区の有意差検定 (危険率5%) にはStudent's t-testを用いた。値は3–4ウェルの平均値±標準誤差で表した。

3. 結果と考察

3.1 細胞アッセイ

(1) 細胞増殖アッセイ

牛肉エキスを 10^{-3} –1%の濃度で添加した処理区では、無添加の対照区と比較して、細胞数の有意な増加がみられた (Fig. 1)。このことから牛肉エキスには筋芽細胞の増殖を促進する因子が含まれることが示唆された。

(2) 分化誘導アッセイ

筋管分化の指標であるクレアチンキナーゼ活性は牛肉エキスを 10^{-1} –1%の濃度で添加した処理区で無添加の対照区と比較して有意に低下した (Fig. 2)。従って、高濃度の牛肉エキスは筋管の分化を阻害することが分かった。

(3) 筋管直径

筋管細胞の直径を形態学的に解析した結果、牛肉エキスを 10^{-4} – 10^{-2} %の濃度で添加した処理区で、無添加の対照区と比較して、筋管直径の有意な増加がみられた (Fig. 3)。

(4) 筋管タンパク質合成能測定

$[^3\text{H}]$ leucine 取込量から算出した筋管のタンパク質合成能は、牛肉エキスを 10^{-3} – 10^{-2} %の濃度で添加した処理区で、無添加の対照区と比較して、

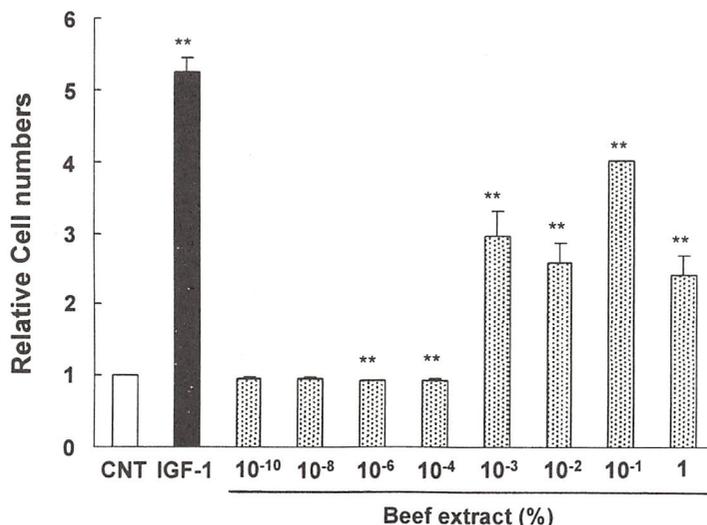


Fig. 1 Effect of beef extract on proliferation in C2C12 myoblasts. Cells were incubated in the presence or absence of beef extract (10^{-10} –1%) or 30 ng/ml R3-insulin-like growth factor (IGF)-1 for 72 h. The proliferation of C2C12 cells was analyzed with Cell Counting Kit-8(Dojindo). Values are means \pm SE for 4 wells of each treatment. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. CNT (control) group.

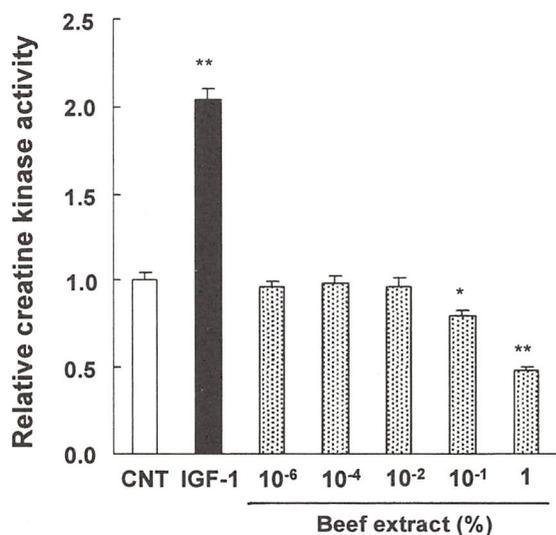


Fig. 2 Effect of beef extract on creatine kinase (CK) activity, a differentiation marker, in C2C12 cells. Sub-confluent myoblast cells were incubated in the presence or absence of beef extract (10^{-6} –1%) or 30 ng/ml R3-insulin-like growth factor (IGF)-1 for 72 h. CK activity was analyzed with Cica Liquid CK kit (Kanto Chemical). Values are means \pm SE for 3 wells of each treatment. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. CNT (control) group.

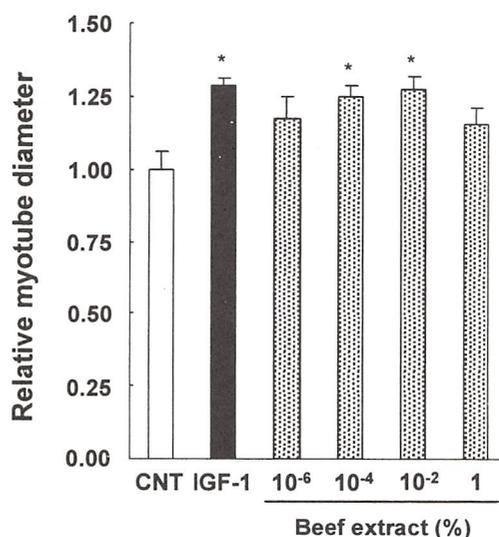


Fig. 3 Effect of beef extract on C2C12 myotube diameter. Myotubes were incubated in the presence or absence of beef extract (10^{-6} –1%) or 30 ng/ml R3-insulin-like growth factor (IGF)-1 for 72 h. Diameters were measured with the thick of 10 large myotubes per well. Values are means \pm SE for 3 wells of each treatment. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. CNT (control) group.

有意に増加した。一方、1%添加区では有意に低下していた (Fig. 4)。従って、牛肉エキスが筋管のタンパク質合成促進作用を有すること、および

1%以上の濃度ではタンパク質合成を阻害することが示唆された。また筋管直径の増加はタンパク質合成の増加に起因することが示唆された。

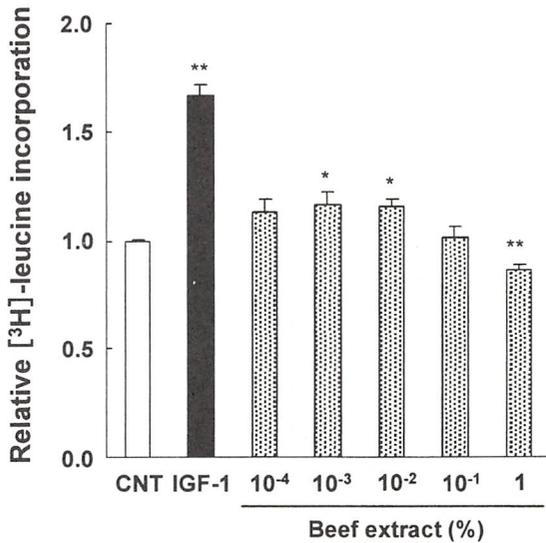


Fig. 4 Effect of beef extract on [³H] leucine incorporation into C2C12 myotubes. Myotubes were incubated in the presence or absence of beef extract (10⁻⁴–1%) or 30 ng/ml R3-insulin-like growth factor (IGF)-1 for 24 h in the medium including 2 μCi/ml [³H] leucine. The protein synthesis level was determined by measuring radioactivity incorporation into the cell proteins (dpm/mg protein). Values are means ± SE for 3 wells of each treatment. *P<0.05, **P<0.01 vs. CNT (control) group.

3.2 牛肉エキスがAktのリン酸化レベルに及ぼす影響

Fig. 5に、ウェスタンブロットティングによる p-Akt, Aktのバンドをデンストグラム解析した結果を示した。ポジティブコントロールであるIGF-1添加区で p-Akt レベルが対照区と比べ約5倍に増加しているのに対し、牛肉エキスを10⁻²%添加した区では対照区と同レベルであった。

以上の結果から、牛肉エキスには筋芽細胞の増殖促進作用と筋管の肥大作用（直径の増加作用）および筋管のタンパク質合成促進作用があることが明らかとなった。筋管のタンパク質合成促進作用が観察された10⁻³–10⁻²%濃度では、筋管の分化に対し促進的な作用はみられなかったことから、筋管肥大作用およびタンパク質合成促進作用は、周囲の単核細胞の融合によるものではないと推察

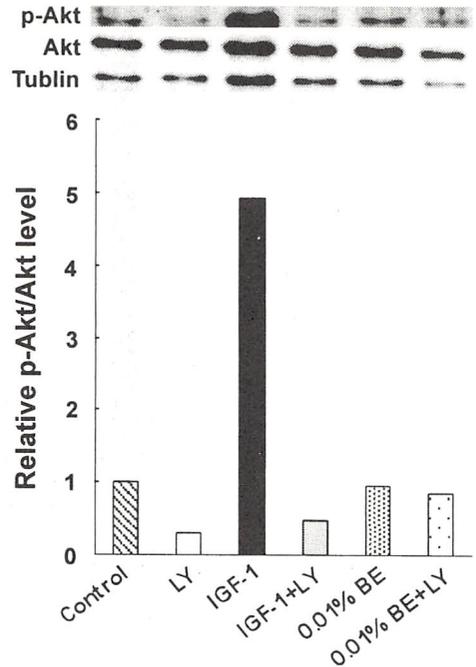


Fig. 5 Western blot analysis showing the effect of beef extract on Akt phosphorylation level. Myotubes were incubated in the presence or absence of beef extract (10⁻²%) or 30 ng/ml R3-insulin-like growth factor (IGF)-1 and/or 10 μM LY294002 (LY) for 15 min. Data were quantitated by densitometry. The signal of p-Akt was normalized by total Akt level. LY is a specific inhibitor of PI3K activity.

された。これらの結果を考慮すると、牛肉エキス摂取によるラット骨格筋重量の増加は、筋芽細胞の増殖促進作用および筋管タンパク質合成促進作用に起因したと考えられた。つまり、筋芽細胞の増殖促進は、活性化衛星細胞の増殖を、筋管細胞の肥大は既存の筋線維一本一本の肥大を意味し、これらの複合的な作用が、最終的な結果である生体の筋肥大を誘導したと我々は考えている。

これまでの研究で、ラット成体において筋重量の増加が観察されたことから、我々は筋管におけるタンパク質合成促進がより重要であると考え、牛肉エキスによるタンパク質合成促進がどのような経路を介して起っているのかを検討した。IGF-1やインスリンなどのシグナル経路であるPI3K/Akt経路について、牛肉エキスの影響を調

べたところ、Aktのリン酸化は対照区と差がないことが分かった。従って、牛肉エキスはPI3K/Akt経路以外の経路で筋タンパク質の合成を促進したと考えられた。今後はERK1/2経路の関与を調べる予定である。

一方で1%濃度の牛肉エキスには筋管分化阻害作用、タンパク質合成阻害作用がみられた。従って、牛肉エキスには骨格筋肥大の促進因子と阻害因子の両方が含まれていると考えられた。ただし、これら阻害作用が観察された牛肉エキス濃度は1%程度と非常に高濃度であったことから、牛肉エキスを経口摂取する限りは、生体における影響は、ほぼ無視できるのではないかと考えている。

牛肉エキスに含まれる筋肥大因子は、現在まで明らかではない。牛肉自体が骨格筋組織であるため、筋に含まれる成長因子はその候補物質として挙げられる。骨格筋が産生する代表的な筋肥大因子としてはIGF-1が知られている。しかしながら本実験の結果がIGF-1によるものではないことを示す結果がいくつか得られている。まず、分化誘導アッセイにおいてIGF-1は分化を促進したが、牛肉エキスは促進しなかった (Fig. 2)。また、IGF-1はAktのリン酸化を誘導したが、牛肉エキスは誘導しなかった (Fig. 5)。さらに牛肉エキスと同時にIGF-1の中和抗体を添加しても、牛肉エキスの筋管肥大作用は阻害されないことが我々のこれまでの実験から明らかとなっている。近年、分岐鎖アミノ酸のロイシンに筋タンパク合成促進作用があることが明らかにされつつある。そこで牛肉エキス中に含まれる遊離ロイシン濃度を解析した。その結果タンパク質合成促進作用が見られた牛肉エキス $10^{-2}\%$ にはロイシンが $2.5 \mu\text{M}$ 含まれていた。この濃度は、これまでの報告で示されるロイシンの作用濃度 $0.1-2.0 \text{ mM}^{9-11)}$ より約50-1000倍低い。従って、本研究の結果はロイシンの

作用ではないと考えられた。以上の点から、牛肉エキスには未知の筋肥大因子が含まれていると予想された。

4. 要 約

本研究では培養筋細胞の増殖・分化・成熟のステージごとに牛肉エキスの影響を検討した。牛肉エキスの添加により増殖期の筋芽細胞で増殖が促進された。しかし、分化誘導初期において筋管への分化は促進されなかった。一方、筋管成熟期におけるタンパク質合成能の増加、および筋管直径が増加した。これらの結果は、牛肉エキスには筋細胞に直接的に作用する筋芽細胞増殖促進因子および筋管タンパク質合成促進因子が含まれていることを示している。

文 献

- 1) Rogers, M. A., and Evans, W. J., *Exerc Sport Sci Rev*, **21**, 65-102, 1993.
- 2) Abe, T., Kojima, K., Kearns, C. F., Yohena, H., and Fukuda, J., *Br J Sports Med*, **37**, 543-545, 2003.
- 3) Chilibeck, P. D., Calder, A. W., Sale, D. G., and Webber, C. E., *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, **77**, 170-175, 1998.
- 4) Taylor, D. C., Brooks, D. E., and Ryan, J. B., *Am J Sports Med*, **27**, 718-727, 1999.
- 5) Goldberg, A. L., and Goodman, H. M., *J Physiol*, **200**, 655-666, 1969.
- 6) Musaro, A., McCullagh, K., Paul, A., Houghton, L., Dobrowolny, G., Molinaro, M., Barton, E. R., Sweeney, H. L., and Rosenthal, N., *Nat Genet*, **27**, 195-200, 2001.
- 7) McPherron, A. C., Lawler, A. M., and Lee, S. J., *Nature*, **387**, 83-90, 1997.
- 8) Yoshihara, H., Wakamatsu, J., Kawabata, F., Mori, S., Haruno, A., Hayashi, T., Sekiguchi, T., Mizunoya, W., Tatsumi, R., Ito, T., and Ikeuchi, Y., *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, **52**, 183-193, 2006.
- 9) Dardevet, D., Sornet, C., Balage, M., and Grizard, J., *J Nutr*, **130**, 2630-2635, 2000.
- 10) Du, M., Shen, Q. W., Zhu, M. J., and Ford, S. P., *J Anim Sci*, **85**, 919-927, 2007.
- 11) Peyrollier, K., Hajduch, E., Blair, A. S., Hyde, R., and Hundal, H. S., *Biochem J*, **350 Pt 2**, 361-368, 2000.

異常プリオン分解酵素(プリオナーゼ) 阻害剤の検索とソーセージ製造への応用

Screening of Prionase-inhibitor and its Application to Sausage Manufacture

岡 達 三 ・ 岡 部 正 明
(鹿児島大学農学部)

Tatsuzo Oka and Masaaki Okabe
(Faculty of Agriculture, Kagoshima University)

Prionase-inhibiting protein was isolated from garlic. N-terminal amino acid residues of this protein was GNILMNDEGLYAGQSL, which showed the similarity to the lectin. The molecular weight and N-terminal amino acid residues of the lectin isolated from garlic was same with those of the inhibitor. The lectin cross-reacted with antibody against the inhibitor and the lectin inhibited the activity of Prionase. These results suggest that the Prionase-inhibitor is lectin.

1. 目 的

わが国において海綿状脳症 (BSE) に罹患した牛が平成20年1月までに34頭確認されており、BSEをはじめとするプリオン病発症機序の解明および治療・予防法の開発は重要課題である。一方、我々は、ラット肝臓から進化的に高度に保存された新規なタンパク質を世界に先駆けて発見し、これをPSPと名付けた¹⁾。PSPの立体構造は2個の α ヘリックスと6個の β シートからなり、異常プリオンタンパク質と α ヘリックスおよび β シートの配置を含め極めて類似した立体構造を示した²⁾。また、Proteinase K や熱に対する耐性も異常プリオンタンパク質と同様の性質を示したことから、PSPは異常プリオンタンパク質のモデルとなり得るとの着想に至った。PSPを基質として異常プリオンタンパク質を分解する酵素をスクリーニングした結果、ある種の放線菌が分泌する酵素

(プリオナーゼ)が異常プリオンタンパク質を分解することを明らかにした³⁾。

一方、ソーセージの皮は天然ケーシングとして羊腸から生成される。EUでは実験的にBSEが羊へ感染し得ることが確認されている⁴⁾。仮に自然界でBSE罹患羊が確認された場合、食の安全に深刻な影響を与えることになる⁵⁾。本研究では、既にプリオナーゼの性質を明らかにするとともに、本酵素を天然ケーシング加工過程に導入し、天然ケーシングの異常プリオンタンパク質からの浄化を試みてきた。スクレイパー由来の異常プリオンタンパク質を混在させたモデルケーシングをプリオナーゼで処理すると、わずか15分で羊腸から異常プリオンタンパク質を検出限界以下にまで浄化できることを明らかにした。また、プリオナーゼは羊腸の異常プリオンタンパク質を浄化できるだけでなく、羊腸をコラーゲンのみの理想的なケーシングに仕上げる酵素であることが明らかにされ

た。過去にオーストラリアで同様の酵素が見い出され、ソーセージの製造過程に応用されたが、酵素の活性があまりに強力であったため、加工の過程でケーシングが破損したという経緯が報告されている。そこで、プリオナーゼに対する阻害剤を安全な食品素材より検索したところ、ニンニクよりプリオナーゼ阻害活性を有する分子量約12 kDaのタンパク質が見い出された。この阻害タンパク質は100℃で20分間加熱してもその阻害活性が保たれており、耐熱性を有することが明らかになった。本研究では、本阻害タンパク質の性質について検討した。

2. 方法

2.1 豚肝臓PSPの精製および検出

豚肝臓を2倍量の0.25 M sucrose (50 mM Tris-HCl buffer pH 7.4, 25 mM KCl, 10 mM MgCl₂)でホモゲナイズし、ミトコンドリア上清(PMS)を得た。PMSに60%過塩素酸を最終濃度5%になるように加えて攪拌し、再び10,000×gで10分間遠心した。得られた上清にトリクロロ酢酸を最終濃度25%になるように加え、遠心によって沈殿を回収した。沈殿を冷アセトンによって3回洗浄した後乾燥した。乾燥した沈殿を0.9%酢酸に溶解した後0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.3にて一晚透析した。更に透析したタンパク質画分を30~50%硫酸分画した。沈殿を0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.3に溶解した後、同じbufferで透析した。透析後、サンプルをCM-sephadex C-25にアプライし、素通り画分に精製PSPが得られた。最後に、得られたPSPはウエスタンブロッティングによって確認した。すなわちタンパク質画分をSDS-PAGE後、ゲル上のタンパク質をニトロセルロース膜に転写し、抗PL-PSP抗体を用いてPSPの検出を行った。

2.2 プリオナーゼの精製

培地を10,000×gで30分間遠心後、上清を50%硫酸によって分画した。10,000×gで15分間遠心し得られた沈殿を25 mlのbuffer A (20 mM acetate buffer containing 2 mM calcium acetate, pH 6.0)で溶解した後、同じbufferで一晩透析した。透析後、buffer Aで平衡化したCM-Sephadex C-50カラムにアプライし0.5 M NaClを含む緩衝液で溶出した。溶出したサンプルをSephadex G-50カラムにアプライし、得られた画分を精製酵素とした。

2.3 ニンニク中プリオナーゼ阻害画分の抽出

皮を取り除いたニンニク球根を5倍量の0.05% L-アスコルビン酸含有50 mM Tris-HCl (pH 7.6)でホモジナイズし、14,000×gで20分間遠心した。上清を80%硫酸分画し、14,000×gで20分間遠心した。得られた上清を50 mM Tris-HCl (pH 7.6)に再溶解し、一晚透析した後14,000×gで20分間遠心して得られた上清をサンプルとした。この上清を100℃で20分間加熱し、14,000×gで20分間遠心して上清を得、これを加熱サンプルとした。

3. 結果と考察

3.1 プリオナーゼ阻害タンパク質の部分アミノ酸配列

ニンニクの加熱サンプルをNative-PAGEによって分離し、精製タンパク質を得た。精製タンパク質のN末端アミノ酸配列をアミノ酸シーケンサーにより解析した結果、GNILMNDEGLYAGQ-SLを示した。更にデータベースにより詳細に比較した結果、植物由来レクチンと極めて高い相同性を示した (Table 1)。

3.2 プリオナーゼ阻害タンパク質の抗体作製

精製サンプルを抗原として用い、抗プリオナーゼ阻害タンパク質抗体を作製した。免疫動物にはウサギを用い、2週間おきに3回感作を行った。最後の感作より1週間後に採血を行い、抗血清を得た。ウエスタンブロッティング法により本阻害

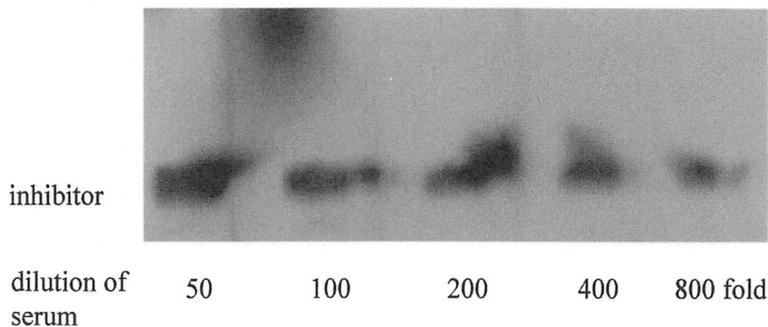
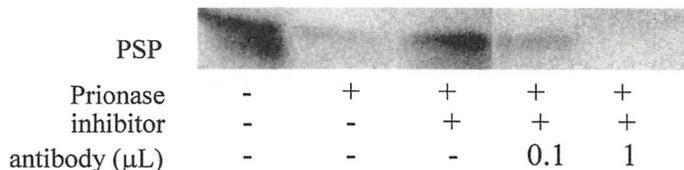
Table 1 N-terminal amino acid residues of Prionase-inhibitor and Plants

| | 1 | 10 |
|-------------------------------|--|--------------------|
| garlic inhibitor ¹ | G <u>N</u> I <u>L</u> M N D E G <u>L</u> | Y A G Q S <u>L</u> |
| neoregelia lectin* | D <u>N</u> I <u>L</u> Y T N D K <u>L</u> | S G R Q S <u>L</u> |
| snowdrop lectin* | D <u>N</u> I <u>L</u> Y S G E T <u>L</u> | S T G E F <u>L</u> |
| shallot lectin* | R <u>N</u> V <u>L</u> V N N E G <u>L</u> | Y A G O S <u>L</u> |
| twayblade lectin* | S <u>N</u> T <u>L</u> G G G E R <u>L</u> | N S G E S <u>L</u> |
| arum lectin* | V G S <u>N</u> Y <u>L</u> L S S E T <u>L</u> | N T D G R <u>L</u> |
| garlic lectin ² | R <u>N</u> I <u>L</u> T N G E G <u>L</u> | Y A G Q S <u>L</u> |

*Data are cited from the paper of Yagi *et al.* (1996).

¹Extracted according to the method written in this paper.

²Extracted by the method of Yagi *et al.* (1996).

**Fig.1** Western blot analysis of Prionase-inhibitor isolated from garlic.**Fig.2** Effect of anti-Prionase inhibitor antibody on the activity of Prionase-inhibitor.

タンパク質の検出した結果、抗血清は阻害タンパク質を特異的に認識した (Fig.1)。更にプリオナーゼ阻害活性に及ぼす抗血清の効果を検討した結果、抗血清によりプリオナーゼ阻害活性は抑制された (Fig.2)。

3.3 レクチン抽出法によるプリオナーゼ阻害タンパク質の抽出

プリオナーゼ阻害タンパク質は、ホモロジー検索によりレクチンである可能性が示されている。そこで、Yagi *et al.*の方法⁶⁾に従ってニンニクより抽出したレクチンと本阻害タンパク質の分子量およびN末端アミノ酸配列を比較した (Fig.3)。その結果、同様の分子量を示し、また、N末端配列

もRNILTNGEGLYAGQSLという極めて類似した配列を示した (Table 1)。プリオナーゼ阻害タンパク質に対する抗血清はニンニク由来のレクチンを認識し、ニンニク由来のレクチンはプリオナーゼ活性を阻害した (Fig.4, 5)。これらの結果は、プリオナーゼ阻害タンパク質がレクチンであることを示唆している。

3.4 ニンニクにおけるプリオナーゼ阻害タンパク質発現部位の確認

ニンニクの各組織におけるプリオナーゼ阻害タンパク質の発現部位について検討した。ニンニクの根、球根中心部、球根外円部、茎ならびに葉について検討した結果、球根外円部に最も高濃度の

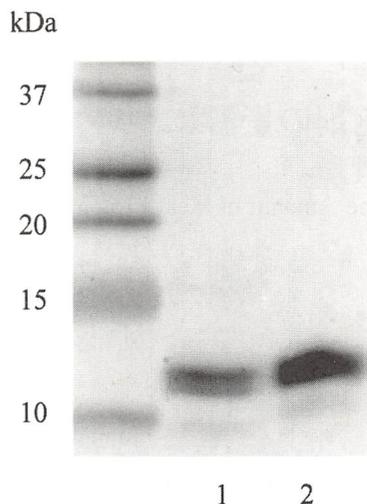


Fig.3 The molecular weight of Prionase-inhibitor and lectin isolated from garlic.

¹Lectin extracted by the method of Yagi *et al.* (1996). ²Prionase inhibitor.

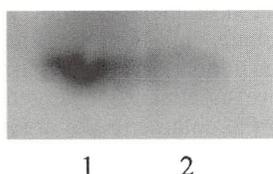


Fig.4 Western blot analysis of lectin isolated from garlic.

Anti-Prionase inhibitor antibody was used for western blot analysis. ¹Lectin extracted by the method of Yagi *et al.* (1996). ²Prionase inhibitor.

プリオナーゼ阻害タンパク質が存在することが明らかにされた。また、球根中心部にはわずかであるがプリオナーゼ阻害タンパク質が検出された。他の組織については検出限界以下であった (**Fig.6**)。

4. 要 約

異常プリオン分解酵素プリオナーゼの活性を阻害するタンパク質をニンニクより見出し、その性質を検討した。N末端アミノ酸配列はGNILM-NDEGLYAGQSLであり、レクチンと高い相同性を示した。ニンニクよりレクチン画分を抽出し、プリオナーゼ阻害タンパク質と性質を比較した結

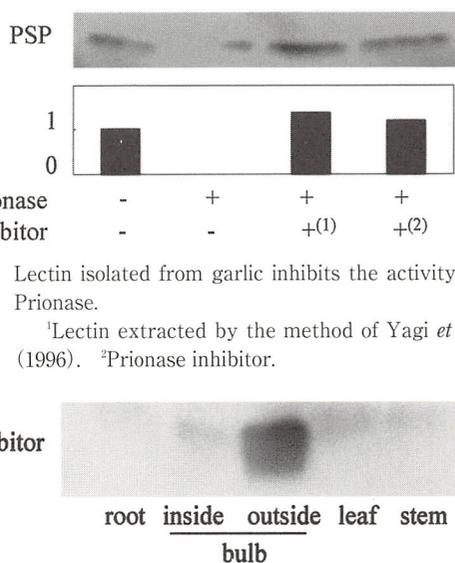


Fig.5 Lectin isolated from garlic inhibits the activity of Prionase.

¹Lectin extracted by the method of Yagi *et al.* (1996). ²Prionase inhibitor.

Fig.6 Distribution of Prionase-inhibitor in the tissues of garlic.

果、分子量、N末端アミノ酸配列ともに極めて類似した結果を示した。また、プリオナーゼ阻害タンパク質に対する抗体はニンニク由来のレクチンを認識し、ニンニク由来のレクチンはプリオナーゼの活性を阻害した。これらの結果は、プリオナーゼ阻害タンパク質がレクチンであることを示唆している。ニンニク中におけるプリオナーゼ阻害タンパク質の分布を検討した結果、球根の外円部に特異的に存在することが明らかにされた。

文 献

- 1) Oka T, Tsuji H, Noda C, Sakai K, Hong YM, Suzuki I, Munoz S, Natori Y. *J. Biol. Chem.* 270 30060-30067 (1995)
- 2) K. D. Carugo, M. Sarase, T Oka. *Acta Cryst.* D55 667-668 (1999)
- 3) Hui Z, Doi H, Kanouchi H, Matsuura Y, Mouri S, Nonomura Y, Oka T. *Biosci Biophys Res Commun.* 13 321 45-50 (2004)
- 4) Foster JD, Bruce M, McConnell I, Chree A, Fraser H. *Vet Res.* 138 546-548 (1996)
- 5) Declan B. *Nature.* 414 576-577 (2001)
- 6) Yagi F, Hidaka M, Minami Y, Tadera K. *Plant Cell Physiol.* 37 1007-1012 (1996)

食肉タンパク質のS-ニトロシル化と 量的変化に及ぼす発色剤の影響について

Effects of Curing Agents on S-nitrosylation and the Amount of Meat Proteins

若松 純一
(北海道大学農学研究院)

Jun-ichi Wakamatsu
(Hokkaido University, Research Faculty of Agriculture)

We examined whether the curing agent affects S-nitrosylation of meat protein and the quantitative change in meat proteins after curing. The degree of S-nitrosylation in meat proteins was different among proteins. S-nitrosylated proteins were detected in control and there was no difference between the amount of S-nitrosylated protein in control and in the other three experimental groups in addition of curing agents. There tended to be few S-nitrosylated proteins in *the nitrite group* and high molecular S-nitrosylated protein were existed in the experimental groups added nitrate (*nitrate group; nitrite & nitrate group*). The amounts of fifteen proteins were significantly changed after curing with different curing agents. Nitrite contributed to the change in the amount of protein after curing more than nitrate. All fifteen spots in *the nitrate & nitrite groups* were changed more than 10% as compared to the control. Since none of the protein spot was identified, further examination will be needed.

1. 目的

食肉製品の加工において、発色剤は色調の改善だけでなく、風味の醸成、不快臭の矯臭作用、ボツリヌス菌の生育阻害など多彩な機能を有している。発色剤として硝石や亜硝酸塩が一般的に使用され、塩漬中に発生した一酸化窒素がミオグロビン（ヘム）と結合して、安定な鮮赤色のニトロシルミオグロビンが形成される（阿久澤，坂田，島崎，服部；2005）¹⁾。一方、一酸化窒素はフリーラジカルであると同時に、酸化や還元を受け易く、さらに反応性に富むことが知られており、近年では、血管の拡張作用やマクロファージのバクテリア殺傷能、脳内神経細胞における神経伝達作用な

ど、一酸化窒素は生体における重要な生理機能を有することが明らかになっている。また、一酸化窒素がタンパク質のチオール基と結合してS-ニトロソチオール（S-NO）を形成し、このS-ニトロシル化は可逆的かつ特異的な翻訳後修飾として、代謝や細胞骨格、シグナリングなどに関する因子を調節することも知られている。

これらのことから、食肉製品においても塩漬時に発生した一酸化窒素は、ミオグロビンと結合するだけでなく、他の多くの物質と結合すると考えられる。さらに、一酸化窒素は金属高親和性を有し、いくつかの金属酵素を阻害することやアポトーシスとも関連すること（Kim, Zamora, Petrosko and Billiar; 2001）²⁾ が知られている。こ

のため、塩漬中のタンパク質の分解様相なども、発色剤の有無や種類により異なることも推測される。死後の軟化に及ぼす各種酵素に、と畜前に放出された一酸化窒素が影響を及ぼすという報告があるものの (Warner, Dunshea, Ponnampalam, and Cottrell;2005)⁴⁾、塩漬中に発生した一酸化窒素に関する報告は一切ない。また、タンパク質以外のニトロシル化物も、食肉製品における発色剤の様々な効能の原因と考えられるが、ほとんど特定されていない。発色剤への硝石の使用は、塩漬期間 (加工期間) の延長と残存亜硝酸根の制御問題の観点から、食肉加工業においては敬遠されているが、塩漬フレーバーの醸成のためには硝石は不可欠であると主張する技術者もいる。しかしながら、その原因についても科学的には解明されていないし、塩漬剤の種類による塩漬後の食肉タンパク質の変化についても不明のままである。さらにはミオグロビン以外のニトロシル化物質の同定は、亜硝酸の有害性のみが取りざたされる現状を打開し、食肉製品への発色剤の必要性の説明の一端を担えるかもしれない。

そこで本研究では、Biotin-switch法を用いて異なる塩漬剤で塩漬した後にS-ニトロシル化したタンパク質について比較検討することと、さらには発色剤の有無および異なる塩漬剤により塩漬した食肉タンパク質の量的変化を蛍光標識二次元ディファレンシャル電気泳動 (2D-DIGE) により明らかにすることにより、塩漬剤の種類により、食肉タンパク質はどのような影響を受けているのか検討した。

2. 方 法

脂肪組織と結合組織を切除した豚胸最長筋 (ロース芯) を約 3 cm角に切り、食塩2.5%と発色剤 (硝石0.1%のみ (硝石区)、亜硝酸塩0.01%のみ (亜硝酸塩区)、ならびに硝石0.1%および亜硝酸塩

0.01% (硝石&亜硝酸塩区)) を加えてよく混合した。対照区は食塩のみにて塩漬した。塩漬剤とよく混合した後、酸素不透過袋に入れて真空包装し、4℃で4日間 (約96時間) 塩漬した。塩漬した豚肉をミンチし、100mgをテフロンホモジナイザーに量り取り、1mlのサンプル溶解液 (30mMトリス、7M尿素、2Mチオ尿素、1% CHAPS、1% NP-40、1% DTT) を加えて、タンパク質を溶解した。超遠心分離 (50,000rpm, 30分間, 4℃) を行い、得られた上清を2-D Clean-up kit (GEヘルスケアバイオサイエンス) を用いて脱塩したものをサンプルとした。

S-ニトロシル化タンパク質の検出は、S-Nitrosyl Protein Detection Assay Kit (Cayman Chemical) を用いて行った。S-ニトロシル基をHRP標識した後、DTTが40mM、両性担体 (フェルマライトpH 3-10, GEヘルスケアバイオサイエンス) が0.5%となるように添加して、一次元電気泳動用プレキャストゲル (Immobiline DryStrip pH 3-10 NL, 7cm, GEヘルスケアバイオサイエンス) を用いて等電点電気泳動を供した (膨潤時間10時間, 300Vで4時間, 1000Vで0.3kVhrs, 5000Vで4kVhrs, 5000Vで2.0kVhrs)。等電点電気泳動後、直ちにSDS平衡化処理し、分離ゲル (12.5%) でSDS-PAGEを行った。ウェスタンブロッティング法によりニトロセルロース膜に転写し、ボンソーS染色でタンパク質の検出を行った。その後S-ニトロシル化タンパク質を化学発光法 (ケミルミワンL, ナカライテスク) により検出した。

発色剤の有無や添加量によるタンパク質の量的差異の比較は蛍光標識二次元ディファレンシャル電気泳動法 (2D-DIGE) (Tannu and Hemby; 2006)³⁾ で行った。2-D Clean-up kitで脱塩したサンプルをCyDye Fluorで標識した。4サンプルから等量ずつ混合したものを内部標準として使用し

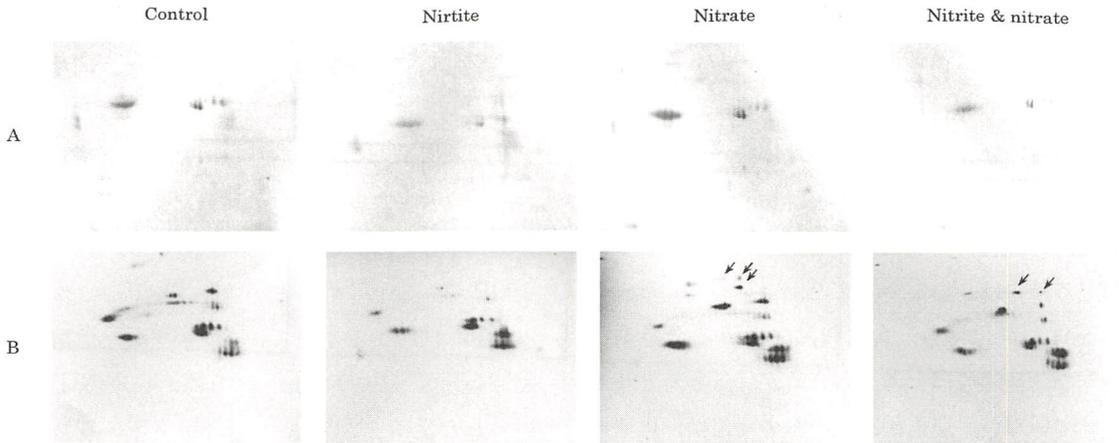


Fig.1 S-nitrosylated protein in meat after curing

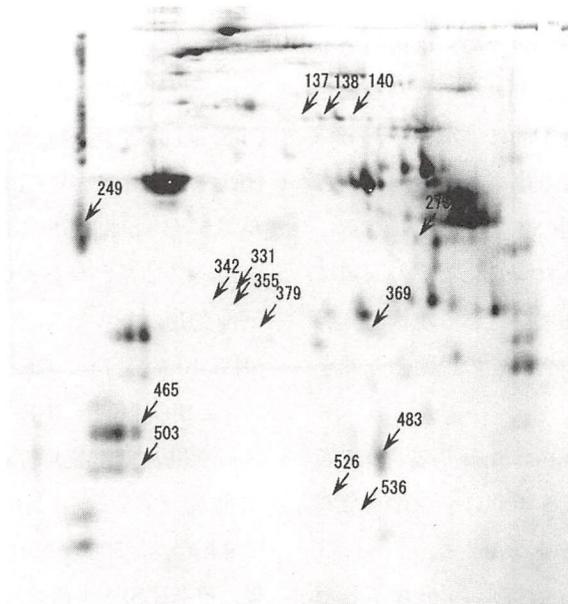


Fig.2 Quantitative differentiation of meat protein after curing with the various curing agents

た。同様に、一次元電気泳動用プレキャストゲルでの等電点電気泳動、ならびにSDS平衡化処理後に分離ゲル(12.5%)でSDS-PAGEを行った。その後、直ちにTyphoon Trio(GEヘルスケアバイオサイエンス)で蛍光を検出し、DyCyder 2 Dソフトウェア(GEヘルスケアバイオサイエンス)により定量的に解析した。

3. 結果と考察

3.1 塩漬剤による塩漬後のニトロシル化タンパク質の違い

異なる塩漬剤で塩漬した食肉タンパク質を2次元電気泳動で分離して、ウェスタンブロッティング法にてニトロセルロース膜に転写し、ボンソーS染色像(Fig.1A)とS-Nitrosyl Protein Detection Assay kitで検出した像(Fig.1B)を示す。ボンソーS染色でほとんど検出されなかったタンパク質でも、強くS-ニトロシル化したタンパク質は存

Table 1 Relative amount of meat proteins in meat cured with the various curing agents

| No. | Relative amount of meat protein | | | | 1 way ANOVA |
|-----|---------------------------------|-------------|-------------|-------------------|-------------|
| | Control | Nitrite | Nitrate | Nitrite & Nitrate | |
| 137 | 1.00 ± 0.08 | 1.12 ± 0.06 | 1.02 ± 0.05 | 1.14 ± 0.07 | 0.046 |
| 138 | 1.00 ± 0.10 | 1.10 ± 0.05 | 0.94 ± 0.03 | 1.14 ± 0.04 | 0.013 |
| 140 | 1.00 ± 0.06 | 0.92 ± 0.04 | 0.96 ± 0.07 | 1.14 ± 0.09 | 0.013 |
| 249 | 1.00 ± 0.07 | 0.94 ± 0.08 | 1.01 ± 0.11 | 0.86 ± 0.03 | 0.043 |
| 273 | 1.00 ± 0.07 | 1.07 ± 0.06 | 0.94 ± 0.02 | 1.10 ± 0.01 | 0.044 |
| 331 | 1.00 ± 0.08 | 0.81 ± 0.03 | 0.70 ± 0.02 | 0.59 ± 0.01 | <0.001 |
| 342 | 1.00 ± 0.11 | 1.03 ± 0.05 | 1.09 ± 0.07 | 0.89 ± 0.09 | 0.032 |
| 355 | 1.00 ± 0.09 | 1.06 ± 0.11 | 0.94 ± 0.04 | 0.84 ± 0.03 | 0.011 |
| 369 | 1.00 ± 0.03 | 1.24 ± 0.05 | 1.12 ± 0.06 | 1.11 ± 0.04 | <0.001 |
| 379 | 1.00 ± 0.08 | 0.76 ± 0.03 | 0.93 ± 0.03 | 0.86 ± 0.03 | <0.001 |
| 465 | 1.00 ± 0.04 | 1.15 ± 0.07 | 0.94 ± 0.02 | 0.89 ± 0.04 | <0.001 |
| 483 | 1.00 ± 0.15 | 0.69 ± 0.02 | 1.00 ± 0.05 | 0.73 ± 0.06 | <0.001 |
| 503 | 1.00 ± 0.06 | 1.12 ± 0.10 | 0.97 ± 0.08 | 0.89 ± 0.10 | 0.025 |
| 526 | 1.00 ± 0.05 | 1.70 ± 0.47 | 1.13 ± 0.08 | 1.40 ± 0.33 | 0.017 |

Values were shown with means ± SD.

在しており、食肉タンパク質のS-ニトロシル化の程度はタンパク質の種類により大きく異なることが示された。食塩のみで塩漬した区（対照区）でも、S-ニトロシル化したタンパク質は多く検出され、発色剤を添加した3つの試験区と大きな差はみられなかった。本方法では厳密には定量的に比較できないものの、亜硝酸塩区はS-ニトロシル化したタンパク質が少ない傾向を示し、硝石を使用した区（硝石区と亜硝酸&硝石区）では高分子のタンパク質でS-ニトロシル化したものがみられた（Fig.1矢印）。しかしながら、いずれのタンパク質も同定していないため、今後更なる検討が必要である。

3.2 塩漬剤による塩漬後のタンパク質の量的差異

次に、塩漬剤の種類による塩漬後のタンパク質の量的変化を検討した。内部標準として塩漬後の全試験区の食肉タンパク質を混合して2次元電気泳動に供したものがFig.2であり、タンパク質量が有意に異なったタンパク質は15スポット検出された。対照区のそれぞれのタンパク質スポットを1として、相対的にタンパク質量を示したのが

Table 1 である。塩漬剤を使用して塩漬するすべての群で、対照区よりも1割以上増加したスポットはNo.369とNo.526の2つであり、逆に塩漬剤の使用によりすべての群で1割以上減少したスポットはNo.331の1つだけであった。これらはいずれもスポットがほとんど見ることのできない微量タンパク質であった。硝石を使用したものよりも、亜硝酸塩を使用したものの方が変動が大きく、亜硝酸塩区と硝石&亜硝酸塩区のみでともに1割以上増加したスポットはNo.137とNo.138の2つで、ともに1割以上減少したスポットはNo.379とNo.503の2つであった。硝石よりも亜硝酸塩の方が量的変動に大きな差が認められ、硝石&亜硝酸塩区は15スポットいずれにおいても、対照区と比べて1割以上の増減が認められた。塩漬剤の使用により、タンパク質の量的変化に違いが認められることが明らかになった。塩漬剤には硝酸塩と亜硝酸塩が使用される。硝酸塩は食肉中の硝酸還元細菌などの働きにより亜硝酸に還元されて、発色効果がみられる。亜硝酸塩は反応性に富むことから、亜硝酸塩は塩漬剤の違いによるタンパク質の量的変化に違いをもたらしたのかもしれない。

変化のみられた15のスポットはいずれも同定できていないため、今後詳細に検討する必要がある。

4. 要 約

塩漬剤の違いにより食肉タンパク質のS-ニトロシル化の違いがあるかどうかをBiotin-switch法を用い、食肉タンパク質の量的変化の違いを2D-DIGE法で検討した。食肉タンパク質のS-ニトロシル化の程度はタンパク質の種類により異なり、対照区でも、S-ニトロシル化したタンパク質は多く検出され、塩漬剤を添加した3つの試験区と大きな差はみられなかった。亜硝酸塩区はS-ニトロシル化したタンパク質が少ない傾向を示し、硝石を使用した区（硝石区と亜硝酸&硝石区）では高分子のタンパク質でS-ニトロシル化したものがみられた。塩漬剤の違いにより、タンパク質量が有意に異なったタンパク質は15スポット検出された。

硝石よりも亜硝酸塩の方がタンパク質量に大きな変動をもたらし、硝石&亜硝酸塩区では、15スポットすべてにおいて対照区と10%以上の変動が認められた。スポットはいずれも同定できていないため、今後詳細に検討する必要がある。

文 献

- 1) 阿久澤良造, 坂田亮一, 島崎敬一, 服部昭仁編著 (2005). *乳肉卵の機能と利用*. 川崎, アイ・ケイコーポレーション.
- 2) Kim, P. K. M., Zamora, R., Petrosko, P., and Billiar, T. R. (2001). "The regulatory role of nitric oxide in apoptosis." *Int. Immunopharmacol.* **1** (8): 1421-1441.
- 3) Tannu, N. S. and Hemby, S. E. (2006). "Two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis for comparative proteomics profiling." *Nat. Protocols* **1** (4): 1732-1742.
- 4) Warner, R. D., Dunshea, F. R. Ponnampalam, E. N. and Cottrell, J. J. (2005). "Effects of nitric oxide and oxidation in vivo and postmortem on meat tenderness." *Meat Sci.* **71** (1): 205-217.

食肉製品のテクスチャーと食肉タンパク質 ゲル物性との関連性について

The Correlation between the Texture of Meat Products and the
Physical Properties of Heat-induced Gels of Myofibrillar Protein

芳賀 聖一 ・ 林 利哉

(名城大学農学部)

Seiichi Haga and Toshiya Hayashi

(Meijo University, Faculty of Agriculture)

In order to verify whether physical properties of heat-induced gel of the myofibrillar protein (natural actomyosin : NAM) is reflected by that of model sausage, the physical properties and microstructure of both samples were examined.

As the result, it was proven that there was the high correlation between physical property of sausage and that of protein gel. The differences of micro-structure were shown by difference of heating temperature. Especially, the model sausage and heat-induced gel of NAM by retort processing showed the characteristic structure. And then, it was suggested that values of physical properties of heat-induced gel were decreased by forming aggregated-type gel. In addition, the microstructure of heat-induced gel of NAM was digitized by image analysis, and then we tried multiple regression analysis of image analytic values and physical property values of heat-induced gels. As a result, it became clear that breaking energy, rupture elastic modulus and syneresis rate could significantly estimate from image data of microstructure, and that physical property of protein gel was controlled by continuity of the filament and minuteness of the gel network.

1. 目 的

食肉製品は多くの成分が共存している多成分複雑系であるため、様々な系が相互に作用し合うことによって惹起される成分変化、および物性変化は非常に複雑なものとなる。そのため、成分を単純化し、製品中で生じる変化をより検討し易くすることが重要とされている。しかしながら、単純な系で評価された化学的性質および物理的性質が、製品レベルの複雑な系においてどれほど通用するか否かは、非常に難しい問題であり、両実験レベルの関連性に関する知見の集積は重要である。

食肉製品の単純系としては、食肉の主要タンパク質である、ミオシンおよびアクトミオシン (Natural Actomyosin : 以下、NAMと略す) などの筋原線維タンパク質がよく利用されている。この筋原線維タンパク質は、加熱によってゲル化するため、食肉製品の肉粒子間の結着性や保水性の発現において重要な役割を果たしている。そのため、筋原線維タンパク質の加熱ゲル形成挙動と、ゲル化食肉製品の食感変化は、高い相関関係にあることが示唆されている。しかし、タンパク質レベルの物性変化と製品レベルの物性変化に関する相関性についてのデータは多いとはいえない。そ

ここで、本研究では、製品レベルに極めて近い系としてモデルソーセージ（全筋レベル）を調製し、その単純系としてNAM加熱ゲル（タンパク質レベル）を調製し、これらの物性変化、ならびに物性に大きな影響を与えるとされる組織構造の変化に関して、両実験レベルにおける相同性を検証した。

2. 方法

2.1 モデルソーセージの調製

豚もも肉より、できる限り脂肪と結合組織を取り除き、約5 cm角のブロック肉とし、2.0%食塩、0.3%トリポリリン酸ナトリウム、0.02%亜硝酸ナトリウム、0.05%硝石、0.05%アスコルビン酸ナトリウムおよび2.0%グルコースを加えた。3日間塩漬後、続いてカッティング（大全産業株式会社、GK-1）、充填した（折り径4 cmの塩化ビニリデンケーシングに、1本当たり100g）。充填後、すべての試料について、プログラム精密恒温槽プロサーモバスを用いて、所定温度（65℃、75℃、85℃および95℃）に達するまで1℃/minの速度で昇温させた。さらに、レトルト加熱は圧力殺菌釜（花木製作所、HC-VA型）を用いて、120℃（絶対圧力；2.0kg/cm²）に到達後15分間保持した。

2.2 NAM加熱ゲルの調製

NAMは豚もも肉より、できる限り脂肪と結合組織を取り除き、挽き肉にしたものからSzent-Györgyiの方法¹⁾を用いて調製し、0.6M-NaCl/50mM-Naリン酸緩衝液（pH6.0）に透析した。その後、終濃度が15mg/mlになるように0.6M-NaCl/50mM-Naリン酸緩衝液（pH6.0）で希釈した。

調製したNAM試料を、ねじ口平底試験管に3mlずつ分注し、前述のソーセージと同様に、所定温度（65℃、75℃、85℃および95℃）に達するまでの昇温加熱およびレトルト加熱処理を行った。

2.3 モデルソーセージおよびNAMゲルの物性測定

物性はレオナー（山電株式会社、RE-3305）によるクリープ解析および破断強度解析、さらにソーセージの加熱損失率と保水率およびNAMゲルの離水率を測定することによって求めた。クリープ解析における測定荷重は、線形領域内の荷重をあらかじめ求めた。すなわち、NAMゲルの場合は0.50g（歪率7～8%）に、モデルソーセージの場合は350g（歪率8～10%）に設定した。また、モデルソーセージの保水性に関するパラメーターとして求めた加熱損失率（クッキングロス）および保水率も求めた。保水率はレオナーによる加圧濾紙法を用いた。また、NAMゲルの離水率は、遠心法による離水の程度を測定する方法をとったが、あらかじめ測定値の統計学的な安定性、かつ明確な離水率の差異が得られる測定条件の検討を実施した後に行った。

2.4 走査型電子顕微鏡による微細構造の観察

加熱ゲル試料およびモデルソーセージ試料を、10×5×5 mm程度の大きさに切り、Hagaらの方法²⁾により固定、洗浄、脱水置換し、走査型電子顕微鏡（日立計測機サービス株式会社、S-3000H）（以下、SEMと略す）を用いて加速電圧25kVで観察した。

2.5 画像解析

電子顕微鏡より得られた画像を、既報³⁾に基づき二値化処理を行い、画像解析装置（株式会社ライブラリー、Cosmos32）を用いて、item 1；全処理面積に対する空洞領域の面積の割合、item 2；全処理面積に対する空洞領域の総周囲長の割合、item 3；空洞領域の平均面積、item 4；空洞領域の平均周囲長、item 5；空洞領域の楕円の度合い、item 6；空洞領域の重心の位置、item 7；空洞領域の円の形状係数（※円=1、楕円>1、不規則形>1）を計測した。

Table 1 Changes of physical properties values of the sausage and natural actomyosin by heat treatment

| Sausages | 65°C *1 | 75°C *2 | 85°C *3 | 95°C *4 | 120°C *5 |
|--|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | Ave. ± SD |
| Instantaneous modulus (10 ⁵ Pa) | 2.70 ± 0.32 a | 2.70 ± 0.71 ab | 2.36 ± 0.36 b | 1.82 ± 0.23 c | 2.29 ± 0.38 b |
| Retarded elastic modulus 1 (10 ⁶ Pa) | 1.02 ± 0.76 a | 1.00 ± 0.24 a | 1.19 ± 0.10 b | 0.78 ± 0.08 c | 0.68 ± 0.09 d |
| Retarded elastic modulus 2 (10 ⁶ Pa) | 1.10 ± 0.15 a | 1.06 ± 0.26 a | 1.19 ± 0.10 b | 0.92 ± 0.09 c | 0.87 ± 0.10 d |
| Coefficient of retarded viscosity 1 (10 ⁶ Pa·s) | 9.73 ± 1.03 a | 9.43 ± 2.26 a | 10.8 ± 1.03 b | 7.62 ± 0.81 c | 6.51 ± 0.77 d |
| Coefficient of retarded viscosity 2 (10 ⁶ Pa·s) | 1.33 ± 0.27 ab | 1.24 ± 0.33 ab | 1.40 ± 0.24 b | 1.18 ± 0.22a | 1.01 ± 0.26 c |
| Newtonian viscosity (10 ⁷ Pa·s) | 6.25 ± 0.61 a | 6.60 ± 1.64 a | 7.51 ± 0.45 b | 5.18 ± 0.56 c | 4.78 ± 0.45 d |
| Hardness (10 ³ Pa) | 2.63 ± 0.23 ac | 2.81 ± 0.14 b | 2.64 ± 0.17 ac | 2.73 ± 0.22 c | 2.59 ± 0.19 a |
| Cohesiveness | 0.15 ± 0.03 b | 0.18 ± 0.03 ab | 0.16 ± 0.03 b | 0.17 ± 0.07 ab | 0.20 ± 0.09 a |
| Gumminess (10 ⁴ Pa) | 3.94 ± 0.80 b | 5.87 ± 0.90 a | 4.10 ± 0.80 b | 4.67 ± 2.21 ab | 4.48 ± 0.87 ab |
| Cooking loss (%) *6 | 1.34 ± 0.15 a | 2.97 ± 0.21 b | 3.34 ± 0.24 b | 9.72 ± 0.46 c | 13.92 ± 0.88 d |
| Water holding capacity (%) *7 | 63.8 ± 0.29 a | 64.6 ± 0.43 b | 66.2 ± 0.33 b | 62.7 ± 0.28 c | 59.8 ± 0.51 c |

| NAM Heat-induced gels | 65°C *1 | 75°C *2 | 85°C *3 | 95°C *4 | 120°C *5 |
|--|---------------|----------------|----------------|----------------|---------------|
| | Ave. ± SD | Ave. ± SD | Ave. ± SD | Ave. ± SD | Ave. ± SD |
| Instantaneous modulus (10 ³ Pa) | 2.42 ± 0.20 a | 3.50 ± 0.30 a | 3.76 ± 0.32 a | 2.59 ± 0.21 a | 0.80 ± 0.06 b |
| Retarded elastic modulus 1 (10 ⁴ Pa) | 0.90 ± 0.09 a | 1.05 ± 0.08 a | 0.92 ± 0.07 a | 0.72 ± 0.05 a | 0.15 ± 0.01 b |
| Retarded elastic modulus 2 (10 ⁴ Pa) | 1.38 ± 0.19 a | 2.23 ± 0.48 a | 1.78 ± 0.47 a | 1.63 ± 0.34 a | 0.30 ± 0.02 b |
| Coefficient of retarded viscosity 1 (10 ⁴ Pa·s) | 9.49 ± 1.85 a | 9.67 ± 1.05 ab | 8.26 ± 1.08 b | 5.41 ± 0.84 b | 1.53 ± 0.13 c |
| Coefficient of retarded viscosity 2 (10 ⁴ Pa·s) | 1.82 ± 0.39a | 5.10 ± 2.50 a | 2.95 ± 1.47 bc | 1.46 ± 0.57 ac | 0.34 ± 0.04 b |
| Newtonian viscosity (10 ⁴ Pa·s) | 7.00 ± 0.50 a | 6.57 ± 0.44 a | 5.80 ± 0.42 a | 5.00 ± 0.37 a | 0.99 ± 0.58 b |
| Breaking energy (J/m ³) | 394 ± 41 a | 342 ± 55 d | 530 ± 57 c | 476 ± 57 b | 85 ± 23 e |
| Modulus of breaking elasticity (N/m ²) | 22.2 ± 3.0 a | 48.6 ± 6.0 c | 33.3 ± 4.2 b | 31.6 ± 3.2 b | 11.3 ± 1.3 d |
| Rate of released water (%) *8 | 50.9 ± 1.1 a | 56.4 ± 1.4 c | 59.7 ± 2.7 b | 57.2 ± 1.8 bc | 77.7 ± 1.6 d |

There is the significant difference (p<0.05) between different alphabetic characters in the same line. n; *1 (16), *2 (17), *3 (16), *4 (16), *5 (19), *6 (10), *7 (20), *8 (6)

3. 結果と考察

3.1 モデルソーセージとNAM加熱ゲルの物性

所定条件で処理したモデルソーセージの物性について、クリープ解析、破断試験、加熱損失率および保水率を求めることにより検討した。その結果、Table 1 (上段) に示すように、クリープ試験においては、75°Cあるいは85°Cで処理したソーセージの物性値が高い傾向にあり、高温域になるに従って低下していった。特に、120°C加熱処理区では瞬間弾性率を除くすべての物性が有意に (p<0.05) 低い値を示し、加熱損失率や保水率も有意に (p<0.05) 変化した。一方、破断試験の結果においては必ずしも明確な差異は認められなかった。以上の結果は、ソーセージ製造において加熱処理条件が製品の物性に、すなわち、食感に反映

することを意味し、かつ、それは製品嗜好の重要因子になるものである。次に、ソーセージの結着性や保水性の直接要因となるNAMの加熱ゲル物性も調べTable 1 (下段) に示した。その結果、モデルソーセージと同様、75°Cあるいは85°Cの温度域で強固なゲルを作ることが認められたが、有意性を認めるほどの違いはなかった。しかし、120°C加熱ゲルは、65~95°C加熱 (1°C/min) で処理された加熱ゲルと比較すると、ほぼすべての物性が有意に (p<0.05) 低い値を示し、かつ離水は極めて多くなることが明らかであった。

以上、両実験レベルの物性変化を比較すると、NAM加熱ゲルのクリープ測定および破断強度測定結果の傾向は、モデルソーセージのクリープ測定結果の傾向とよく対応しており、また離水率に関しては、加熱損失率および保水率の結果とよく

Table 2 A correlation of the physical properties between sausages and heat-induced gels of NAM

| Heat-induced gel of NAM | Model sausage | | | | | | | | | | |
|-------------------------------------|-----------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|---------------------|----------|--------------|-----------|--------------|------------------------|
| | Instantaneous modulus | Retarded elastic modulus 1 | Retarded elastic modulus 2 | Coefficient of retarded viscosity 1 | Coefficient of retarded viscosity 2 | Newtonian viscosity | Hardness | Cohesiveness | Gumminess | Cooking loss | Water holding capacity |
| Instantaneous modulus | 0.751 | 0.946 | 0.945 | 0.944 | 0.929 | 0.883 | 0.401 | -0.636 | - | -0.997 | 0.956 |
| Retarded elastic modulus 1 | 0.841 | 0.883 | 0.883 | 0.881 | 0.867 | 0.802 | 0.432 | -0.611 | - | -0.995 | 0.974 |
| Retarded elastic modulus 2 | 0.916 | 0.769 | 0.759 | 0.761 | 0.701 | 0.719 | 0.716 | - | - | -0.927 | 0.843 |
| Coefficient of retarded viscosity 1 | 0.801 | 0.867 | 0.871 | 0.868 | 0.878 | 0.762 | - | -0.723 | - | -0.978 | 0.997 |
| Coefficient of retarded viscosity 2 | 0.916 | 0.586 | 0.591 | 0.587 | 0.604 | 0.438 | - | -0.591 | - | -0.841 | 0.918 |
| Newtonian viscosity | 0.766 | 0.938 | 0.933 | 0.933 | 0.896 | 0.897 | 0.527 | -0.514 | - | -0.987 | 0.908 |
| Breaking energy | 0.564 | 0.974 | 0.967 | 0.969 | 0.923 | 0.981 | 0.492 | -0.467 | - | -0.915 | 0.791 |
| Modulus of breaking elasticity | 0.452 | 0.911 | 0.899 | 0.903 | 0.832 | 0.961 | 0.577 | - | - | -0.806 | 0.631 |
| Rate of released water | -0.853 | -0.857 | -0.858 | -0.855 | -0.849 | -0.761 | -0.394 | 0.637 | - | 0.987 | -0.984 |

A coefficient of correlation ; $P < 0.05$ ($n = 27$)

対応していた。そこで、両実験レベルの物性変化の相関性を、単相関によって統計学的に評価し **Table 2** に示した。

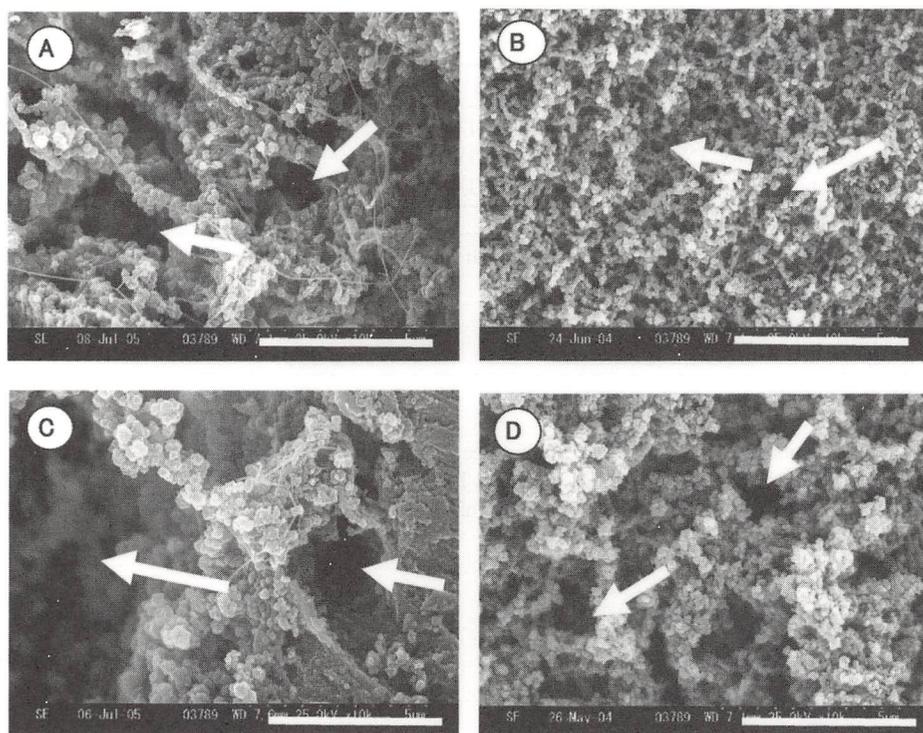
その結果、ほとんどすべての物性値において、ソーセージとNAM加熱ゲル間に有意に ($p < 0.05$) 高い相関性のあることが示された。このことは本実験で作製したモデルソーセージ物性が、食肉中に含まれる筋原線維タンパク質とりわけミオシンやアクトミオシンに支配されていることを示すものであり、タンパク質レベルでの物性評価の有用性を強く支持するものであった。実際レベルでは脂肪含量や添加物により大きく影響を受けるのであるが、本質的な決定因子はミオシンやアクトミオシンであるといえる。

3.2 モデルソーセージとNAM加熱ゲルの物性と微細構造の関係

先に示したように、ソーセージとNAM加熱ゲルの物性変化は、高い相関関係にあることが明白となったが、物性と密接な関係にあるとされる微細構造の変化についても、両者には高い相関性が認められると推測される。**Fig.1**に代表的なSEM

画像 (75°Cおよび120°CのソーセージとNAMゲル) を示したが、65°C~95°C加熱 (1 °C/min) の微細構造の様子は、全筋およびタンパク質の両実験レベルともにフィラメントの連続性や三次元ネットワークの緻密性に差異はあるものの、細い繊維状構造から成るstrand-typeの構造を呈し、処理温度の違いにより、ネットワークの太さや連続性に差異がみられた。一方、120°Cの加熱処理による微細構造は、両者共に、大きな球状の凝集体から成るaggregated-typeの構造を呈しており、両実験レベルの微細構造変化は大変よく類似していた。以上の結果より、NAM加熱ゲルの微細構造は、モデルソーセージによく反映されたもので、この両者の微細構造の高い相関性が、ひいては両者の物性変化の高い相関性に寄与しているものと推察された。

そこで、モデルソーセージとNAM加熱ゲルのSEM画像間の相関性、また、これら微細構造と物性の変化の関連性をより客観的に評価するため、SEM画像を二値化処理し、得られた画像パラメータから、単相関によって両実験レベルの画像の



A scale bar; 5 μm

Fig.1 Scanning Electron Micrographs of sausage and heat-induced gel of NAM
 A and B, The sausage and heat-induced NAM gel were heated at 75°C.
 C and D, The sausage and heat-induced NAM gel were heated at 120°C.

Table 3 A correlation of the image data between sausages and heat-induced gels of NAM

| | item1 | item2 | item3 | item4 | item5 | item6 | item7 |
|---------------------------|--------|-------|---------|--------|-------|--------|-------|
| A correlation coefficient | -0.381 | 0.513 | 0.996** | 0.919* | 0.684 | -0.773 | 0.201 |

[**], p<0.01; [*], p<0.05 (n=5)

item1; Ratio of cave area to all processing area.

item2; Ratio of total surrounding length of cave territory to all processing area

item3; Average area of cave territory

item4; Average length of surroundings of cave territory

item5; Oval degree of cave territory

item6; A center of cave territory

item7; A form factor of cave territory

相同性を、重回帰分析により画像から物性評価の推定を試みた。Table 3に相関性について示したが、item 3, 4において両実験レベルの有意な相関性が示された。すなわち、item 3 (空洞領域の平均面積) および item 4 (空洞領域の平均周囲長) における相関は、Fig.1に示すような、空洞領域(矢印)の大きさや分布状況が反映して、両者とも

に加熱温度が上昇するに従って、球状で小さな空洞領域が多々存在する構造となって緻密性を保持するものであった。一方、120°C加熱処理の場合は、複雑で大きな空洞領域が存在する構造であることが示され、両温度域それぞれがstrand-typeとaggregated-typeのゲル構造で代表されることで相関性を高めたものと推察される。以上のように、

Table 4 Multiple regression analysis between image analytic values and physical properties value obtained from the heat-induced gels of natural actomyosin.

| | item1 | item2 | item4 | item5 |
|--|------------|------------|------------|-----------|
| Breaking energy (J/m ³) | 0.59 (X1) | | -0.41 (X2) | |
| Modulus of breaking elasticity (N/m ²) | 0.77 (X1) | | | 0.21 (X2) |
| Rate of released water (%) | -0.68 (X1) | -0.26 (X2) | | |

| | Contribution rate (%) | Significant level | Multiple regression equation |
|--|-----------------------|-------------------|------------------------------|
| Breaking energy (J/m ³) | 62.76 | p<0.01 | Y=38.20X1 - 1.02X2 - 1186.61 |
| Modulus of breaking elasticity (N/m ²) | 63.41 | p<0.01 | Y=5.00X1 + 88.88X2 - 383.76 |
| Rate of released water (%) | 81.38 | p<0.01 | Y=-2.71X1 - 1.79X2 + 226.10 |

The upper table ; Selected items for calculate each physical properties value and the standard partial regression coefficient.

The lower table ; Calculated contribution rate, significance level and multiple regression equation.

item1 ; Ratio of cave area to all processing area, item2 ; Ratio of total surrounding length of cave territory to all processing area, item4 ; Average length of surroundings of cave territory, item5 ; Oval degree of cave territory

客観的な側面からも両実験レベルの微細構造には高い相関性があることが強く支持された。

続いて、画像解析値から物性値の推定を重回帰分析により試みた。ここではより正確な分析結果を得るために、三次元ネットワーク構造の明瞭なタンパク質レベルでのデータを利用することとした。すなわち、NAM加熱ゲルの物性値を目的変数、NAM加熱ゲルの画像解析値を説明変数として用いた。

その結果、Table 4に示すように破断エネルギーは、item 1 と item 4 が重要な項目として選択され、寄与率62.76%で有意な (p<0.01) 重回帰式を作成できた。この重回帰式より、より高い破断エネルギーを示す構造とは、75℃加熱 (1℃/min) ゲル (Fig.1上段) に代表されるような空洞領域の小さい、細く緻密なネットワーク構造を示唆するものと思われた。また破断弾性率は、item 1 と item 5 を説明変数として、寄与率63.41%で有意な (p<0.01) 重回帰式が作成でき、連続性のある細く長いフィラメント構造を示唆するものであった。また、離水率は、item 1 と item 2 を説明変数として、81.38%の高い寄与率で有意な (p<0.01) 重回帰式が作成できた。このことにより空洞領域の面

積、総周囲長がともに小さい値を示す構造が離水率を低下させるのに必要であることが示唆された。以上の結果より、球状の凝集体による微細構造 (aggregated-type) は、細い繊維状の微細構造 (strand-type) と比べて低い物性を示す原因となることが、また、95℃以下のstrand-typeの構造は連続性のあるフィラメントとネットワークの緻密性が大きな要因になることが、画像解析を用いた客観的な評価からも強く支持された。

4. 要 約

食肉の筋原線維タンパク質のゲル物性がソーセージの物性に反映されるかどうかを検証するため、両者の物性、微細構造を調べた。その結果、ソーセージとタンパク質ゲルの物性間には高い相関関係が認められた。また、両者の微細構造は処理温度によって差異がみられ、特に、レトルト処理を施したソーセージもNAM加熱ゲルも特徴的な構造を呈し、aggregated-typeのタンパク質ゲルを形成することにより、物性値を低下させることが示された。さらにNAMの微細構造を画像解析により数値化し、画像と加熱ゲルの物性値の重回帰分析を試みたところ、破断エネルギー、破断

弾性率および離水率が画像から有意に推定でき、タンパク質ゲルの物性がフィラメントの連続性やネットワークの緻密性により支配されていることが明らかとなった。

文 献

- 1) Szent-Györgyi, Y., "Chemistry of muscular contraction, 2nd ed." (Academic Press, New York) (1951).
- 2) Haga, S. and Ohashi, T., Heat-induced gelation of a mixture of myosinB and soybean protein, *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 1001-1007 (1984).
- 3) 芳賀聖一, 岩切鉄也, 水野達也, 食肉タンパク質ゲル微細構造の画像解析とゲル物性に関する研究, 名城大農学報, **37**, 89-94 (2001).

低温増殖性乳酸菌を接種した豚肉におけるタンパク質分解挙動

Muscle Protein Degradation in Pork Meat Fermented by
Psychrotrophic Lactic Acid Bacteria

林 利哉・和栗 伸伍・*小川 幸彦・芳賀 聖一

(名城大学農学部, *名城大学農学部附属農場)

Toshiya Hayashi, Shingo Waguri, *Yukihiko Ogawa and Seichi Haga
(Faculty of Agriculture, Meijo University and *Experimental Farm, Meijo University)

We examined muscle protein degradation in cured pork meat that was fermented using psychrotrophic lactic acid bacteria.

The amount of salt-soluble protein extracted from fermented meat was significantly lower than that extracted from non-fermented meat. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis pattern of a salt-soluble protein fraction from the fermented meat showed that the band corresponding to myosin heavy chain and α -actinin disappeared, and the intensity of the actin band decreased after 10 days of fermentation. On the other hand, the peptide content of the fermented meat showed a significant increase after cold fermentation. Almost no change was detected in the protein distribution and peptide content in non-fermented meat. Furthermore, it was observed that the extent of myofibril fragmentation in the meat sample increased on fermenting with psychrotrophic lactic acid bacteria at cold temperature.

Therefore, it is possible that the protein degradation behavior of the lactic fermented meat is closely related to myofibril fragmentation.

These results suggested that the lactic fermentation at cold temperature can contribute to the improvement in functionalities of meat products.

1. 目 的

昨今の食の多様化に伴い、安全性・利便性に優れた食品や、機能性を有する食品の需要が高まっている。発酵食肉製品は、元来栄養的にも嗜好的にも優れた食品であることに加え、乳酸発酵による食肉の色調改善や物性改善、さらには低分子ペプチド生成に伴う機能改善が大いに期待できる食肉製品として注目されている¹⁻³⁾。発酵食肉用スターターとして利用される重要な微生物として乳酸菌が挙げられる。しかしながら、一般的な乳酸

菌の増殖至適温度(30~37℃)は、食中毒菌等の有害微生物の増殖にも適しているため、より安全に乳酸発酵を導入する方策として、低温増殖性の乳酸菌スターターを開発および利用することが極めて重要である。著者らは、16種類の低温増殖性を有する未同定乳酸菌株を保有しており、それらの菌株について生理・生化学的性状試験やマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析(MALDI-MS)による同定試験を行い、いずれの菌株も*Lactobacillus sakei*であり、かつ株レベルで分類できることを見出した⁴⁾。現在のところ、食

肉の機能改善を趣旨とした低温発酵の導入に関する研究報告例は少なく^{1,5)}、早急に基礎的知見を集積する必要がある。

そこで本研究では、食肉の低温発酵による機能改善の可能性を探る手始めとして、数種類の低温増殖性乳酸菌を接種した塩漬豚肉における食肉タンパク質の分解挙動について種々検討を行った。

2. 方法

2.1 試料調製

新鮮な市販豚モモ肉から、脂肪と結合組織をできるだけ取り除き、およそ1 cm角に整形した赤肉に、塩漬剤（塩化ナトリウム；2.0%，亜硝酸ナトリウム；0.02%，硝酸カリウム；0.05%，トリポリリン酸ナトリウム；0.3%）および2%グルコースを加え、低温増殖性乳酸菌を 10^6 log CFU/g接種したものと、そうでないものについて、低温下（4℃）にて10日間静置した。1, 5および10日目に試料を採取し、乳酸菌数およびpHを測定するとともに、以下の実験に供した。なお、本研究で用いた低温増殖性乳酸菌は市販の発酵食肉用スターターである*Lactobacillus sakei* D-1001 (*Lb.* D-1001；サンエイ糖化株式会社)と、著者らが保有する16種類の未同定乳酸菌株のうち、*Lb.* D-1001と近縁であると考えられる*Lactobacillus sakei* No.3とNo.5 (*Lb.* No.3, *Lb.* No.5)を用いた⁴⁾。

2.2 塩溶性および水溶性タンパク質画分の調製

各塩漬・発酵試料をジエチルエーテルで脱脂後、6倍量の2.0%塩化ナトリウム-0.30%トリポリリン酸ナトリウム溶液あるいは蒸留水中でホモジナイズし、それらを遠心分離（35,000×g, 15分, 4℃）して得られた上澄画分をそれぞれ塩溶性タンパク質、水溶性タンパク質画分とした。

2.3 塩溶性タンパク質およびペプチド量の測定

(1) 塩溶性タンパク質抽出量：塩溶性タンパク質画分のタンパク質濃度を、ビウレット法（波長：550nm）により定量し、肉試料1 g当たりのタンパク質量を算出した。

(2) ペプチド量：上述の水溶性タンパク質画分から2%トリクロロ酢酸（TCA）可溶性画分を調製し、三上らの方法⁶⁾に準じてペプチド量を測定した。

2.4 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）

上記の塩溶性タンパク質画分のタンパク質分布をSDS-PAGE⁷⁾（アクリルアミド濃度：7.5~20%）により調べた。

2.5 筋原線維の小片化率の測定

発酵あるいは塩漬1~5日目の豚肉試料を用いて、PerryとGreyの方法⁸⁾を一部改変して調製した筋原線維を位相差顕微鏡で観察し、倍率が1,000倍の視野中における筋原線維の総数に対する小片化筋原線維（4つ以下の筋節からなる筋原線維）の割合を小片化率（%）とした。

3. 結果と考察

著者らが保有している低温増殖性乳酸菌と市販の*Lb.* D-1001について、MALDI-MSによって観測されたりボソームタンパク質群の質量分布を基に系統分類した全16種類の菌株のうち、*Lb.* D-1001と、それと極めて近縁の*Lb.* No.3とNo.5の3菌株を選抜して使用した。これらの乳酸菌の塩漬豚肉中における低温下での生育挙動を調べたところ、いずれの乳酸菌も発酵日数の経過に伴い漸次増加し、特に、*Lb.* D-1001とNo.3がNo.5と比較してより高い菌数で推移した（**Fig.1**）。pHについても、いずれの乳酸菌を接種した場合も日数経過に伴って低下し、特に高い菌数で推移した*Lb.* D-1001とNo.3接種区がより顕著であった（**Fig.1**）。

塩溶性タンパク質の抽出性は食肉製品の結着性

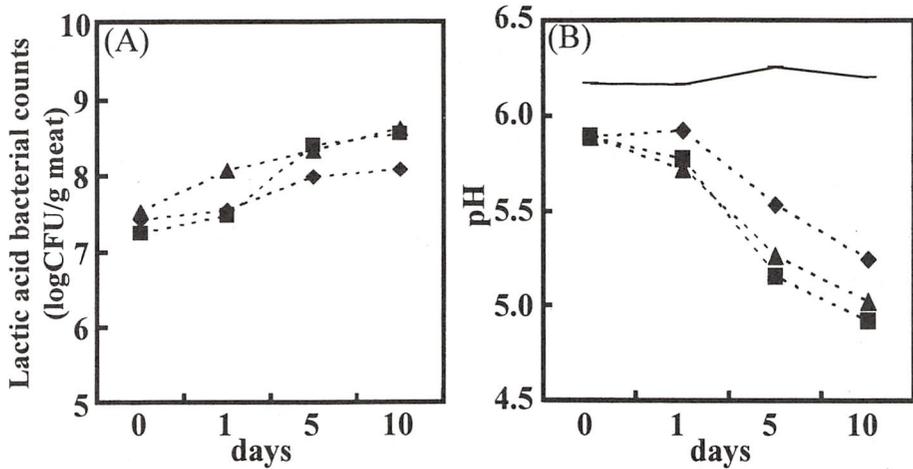


Fig.1 Changes in lactic acid bacterial counts (A) and pH (B) during lactic acid fermentation of cured pork meat at 4°C.

—, Control (non-fermentation) ▲, *Lb. D-1001* ■, *Lb. No.3* ◆, *Lb. No.5*

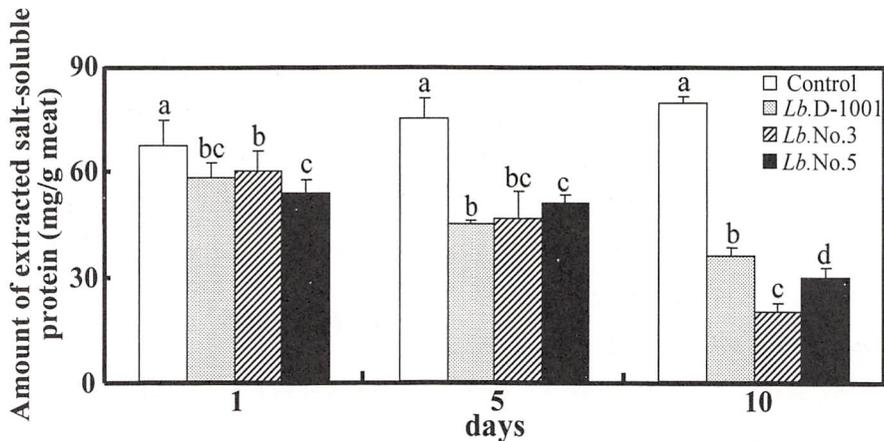


Fig.2 Changes in the extractability of salt-soluble protein from cured meat during lactic acid fermentation.

The data represent the means \pm SD of four independent experiments.

Mean value with different superscripts of each day were significantly different ($p < 0.05$).

・保水性とった重要な機能特性の発現と密接な関係がある⁹⁾ことから、低温発酵による塩溶性タンパク質の抽出量あるいはその分布の変化について検討を行った。乳酸菌を接種していない非発酵区(control)では、塩溶性タンパク質の抽出量が10日間の塩漬期間を通して僅かではあるが増加傾向にあるのに対し、発酵区では、いずれの乳酸菌を接種した場合も日数経過に伴って低下する傾向が認

められ、特に、発酵10日目で最も低いpH (4.92)を示した*Lb. No.3*摂取区が最も低値を示した(Fig.2)。

このような発酵に伴う塩溶性タンパク質抽出量の変化における成分変化の詳細を知るために、同画分をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)に供した(Fig.3)。発酵を施さない非発酵区では、ミオシン重鎖(MHC)、 α -アクチニンおよびアクチンといった筋原線維タンパク質

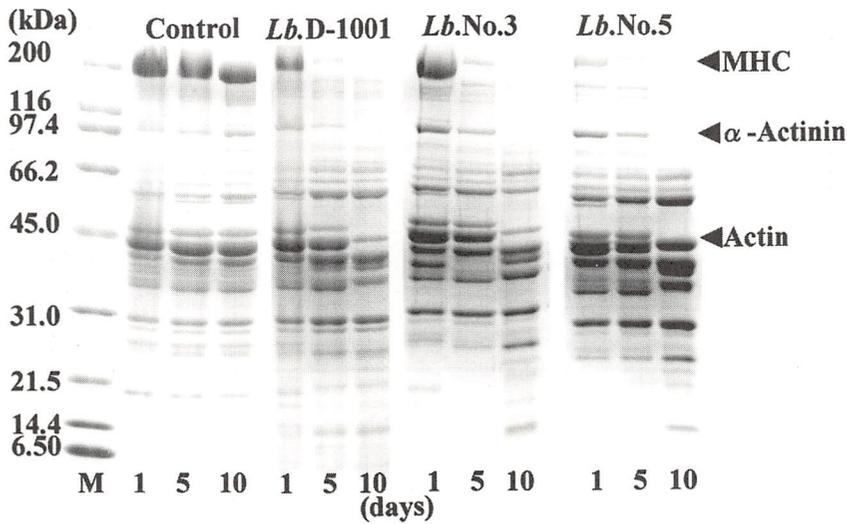


Fig.3 Changes in the SDS-PAGE patterns of salt-soluble protein from cured meat during lactic acid fermentation.
M ; molecular weight marker
MHC ; myosin heavy chain

の主要バンドが全塩漬期間を通じて明瞭に観察され、10日目におよそ66~95 kDaの領域のバンドの染色強度が若干強くなった以外は、特に大きな変化はなかった。それに対して、発酵区ではいずれの乳酸菌を接種した場合も、発酵5日目にはMHC、 α -アクチニンおよびアクチンに相当するバンドが減少し、特に、MHCと α -アクチニンについては、10日目で消失した (Fig.3)。発酵10日目のアクチンについては、その時のpHが最も高かったLb. No.5接種区において、他菌株接種区と比較して多量の残存が認められた。また、このような発酵による主要バンドの減少および消失に加えて、非発酵区と比較して、分子量約30 kDa以下の領域における新たなバンドの出現や既存バンドの増加等がみられたことから、発酵によってタンパク質の分解が生じていることが示唆された。

そこで、タンパク質分解の程度を定量的に把握するために、ペプチド量の測定を行った (Fig.4)。その結果、日数経過に伴いさほど大きな変化がみられなかった非発酵区に対して、Lb. D-1001およびNo.3接種区では、発酵に伴う著しいペプチド量

の増加がみられ、その程度はpHが最も低下したLb. No.3接種区で最も顕著であった。一方、Lb. No.5接種区は発酵に伴い僅かではあるが増加傾向にあり、かつペプチド量の値は非発酵区と比較して高く推移したものの有意な差ではなかった。これらのことより、タンパク質分解の程度を表すペプチド量の変化は、pH低下の程度と密接に関係している可能性が示唆された。このことについて、Sunders¹⁰⁾ は、牛肉のpHを有機酸で人為的に下げた場合、pH 4.5以下で明瞭なタンパク質分解が生じ、これにはカテプシン等の筋肉内在性プロテアーゼが関与していることを報告している。本実験系では、最もペプチド量の増加したLb. No.3接種区の10日目のpHが4.92であり、また、発酵1日目 (pH 5.5以上) においても、非発酵区と比較して有意にペプチド量が増加 (Fig.4) していることから、発酵によるタンパク質分解の昂進は、pH低下のみでは説明できないものと考えられる。

先述の塩溶性タンパク質の量的・質的变化に関する検討において、発酵によって、MHCやアクチンだけでなく、筋原線維のZ線構成タンパク質で

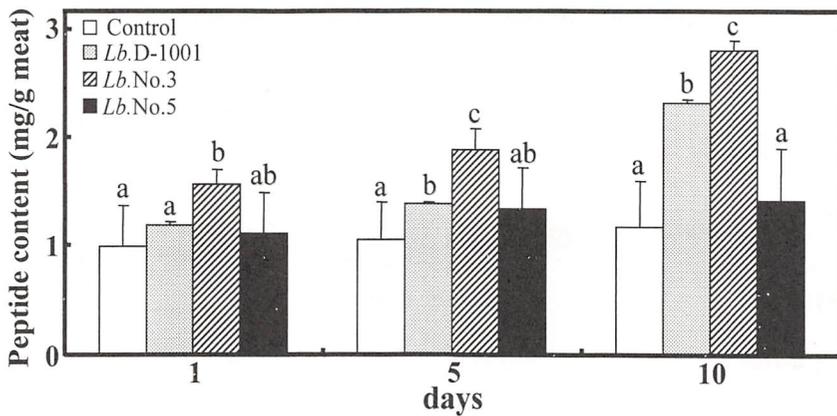


Fig.4 Changes in peptide content of cured meat during lactic acid fermentation. The data represent the means \pm SD of four independent experiments. Mean value with different superscripts of each day were significantly different ($p < 0.05$).

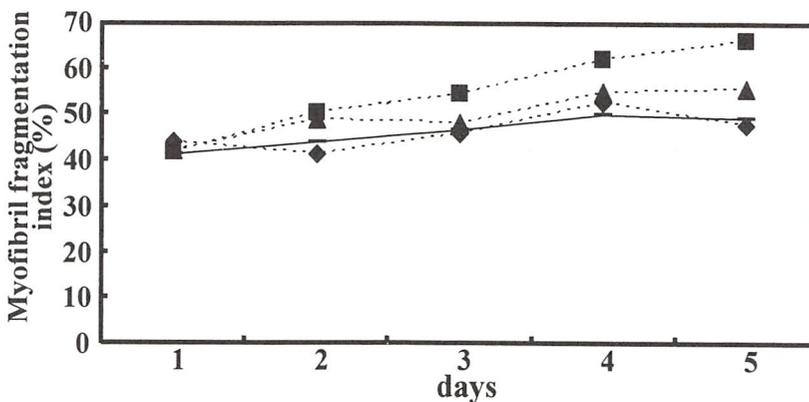


Fig.5 Changes in extent of myofibril fragmentation during lactic acid fermentation of cured pork meat.

—, Control (non-fermentation) ▲, Lb. D-1001 ■, Lb. No.3 ◆, Lb. No.5

ある α -アクチニンが減少・消失することを述べた。従って、発酵が進行する過程で α -アクチニンの分解や変性が生じ、その結果として筋原線維の構造的な脆弱化が起る可能性は十分に考えられ、かつこれに関する検討はこれまでまったくなされていない。そこで、低温発酵が筋原線維の脆弱化に及ぼす影響について明らかにするために、筋原線維の小片化率の測定を行った (Fig.5)。その結果、非発酵区の小片化率は、日数経過に伴い僅かに上昇していく傾向にあったが、発酵区ではLb. No.5

接種区を除いてよりその上昇傾向が強く、特にLb. No.3接種区で最も顕著であった。この接種乳酸菌株の違いによる小片化率の差は、ペプチド量の違いと対応がみられた。従って、発酵による α -アクチニンの変化に伴う筋原線維の脆弱化の変化は、発酵によるタンパク質分解の昂進と密接に関連していることが示唆された。

以上より、低温増殖性乳酸菌による食肉の発酵は、安全にpHを低下させるだけでなく、筋原線維の脆弱化ならびに筋肉タンパク質の分解や変性を

促すことから、食肉製品の物性から機能性まで多様な機能改善をもたらす可能性が強く示された。著者らは既に、ミオシン溶液に*Lactobacillus fermentum* IFO-3954や*Lactococcus lactis subsp. lactis* IFO-12007を接種して生育至適温度で発酵させた際に生ずる低分子ペプチド群から強力なアンジオテンシンI変換酵素 (ACE) 阻害活性を有するペプチドを単離・同定しており^{3,11)}、また、低温発酵食肉由来タンパク質成分に培養骨芽細胞の増殖あるいは分化を促進する成分が存在する可能性も見出ししている。今後、これら機能性指標も含め、多面的に低温発酵食肉の機能性評価を実施し、さらに二次機能の改善に関する研究も併せて推進していくことで、昨今の消費者ニーズに符合したより高付加価な発酵食肉製品の開発に貢献できるものと考えられる。

4. 要 約

低温増殖性乳酸菌を接種した豚肉における豚肉タンパク質の変性・分解挙動を明らかにするため、低温発酵が、塩溶性タンパク質の抽出性とその分布、ペプチドの生成量および筋原線維の小片化率に及ぼす影響について検討を行った。

その結果、低温発酵を施すことにより、塩溶性タンパク質の抽出量が非発酵区と比較して有意に低下し、成分としては、主要な筋原線維タンパク質であるミオシンの重鎖やアクチン、さらには α -アクチニンが不溶化、あるいは分解したことがSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動パターンにより示された。タンパク質分解度の一指標であるペプチド量については、発酵によって増加する傾向が認められ、特に、pH低下が比較的速い乳酸

菌株ではそれが顕著であった。

次に、低温発酵処理が筋原線維の小片化率に及ぼす影響について調べたところ、発酵日数の経過に伴い筋原線維の小片化率が上昇し、かつその値は非発酵区よりも高く推移することが明らかとなった。

これらのことより、発酵による筋肉タンパク質の分解と筋原線維の脆弱化との間には密接な関係があることが示された。

本研究の遂行に当たり助成いただきました伊藤記念財団に心より感謝申し上げます。また、乳酸菌株を提供下さいましたサンエイ糖化株式会社に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) 芳賀聖一, ミートジャーナル, 36 (1), 107-113 (1999)
- 2) 寺本華奈江・朱政治・林 利哉・芳賀聖一, New Food Industry, 44, 25-32 (2002)
- 3) 加藤久美子・林 利哉・芳賀聖一, 名城大学総合研究所 総合学術研究論文集, 4, 87-95 (2005)
- 4) 寺本華奈江・佐藤浩昭・孫 麗偉・鳥村政基・田尾博明・和栗伸伍・林 利哉・芳賀聖一, 分析化学, 56 (12), 1063-1070 (2007)
- 5) Kato, T., Matsuda, T., Tahara, T., Sugimoto, M., Sato, Y. and Nakamura, R., Biosci. Biotech. Biochem., 58, 408-410 (1994)
- 6) 三上正幸・長尾真理・関川三男・三浦弘之, 日本畜産学会報, 66, 630-638 (1995)
- 7) Laemmli, U.K., Nature, 227, 680-685 (1970)
- 8) Perry, S.V. and Grey, T. C., Biochem. J., 64, 184-192 (1956)
- 9) Asghar, A., Samejima, K. and Yasui, T., CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutri., 22, 27-106 (1985)
- 10) Sanders, A.B., Meat Sci., 37, 271-280 (1994)
- 11) Hayashi, T., Kato, K. and Haga, S., J. Res. Inst. Meijo Univ., 7, 71-80 (2008)

筋肉色素ミオグロビンのアイソフォームの性状解明に 基づいた食肉の変色抑制に関する研究

Studies on the Inhibition of Meat Discoloration Based on the Characterization
of Myoglobin Isoforms

Muhammad Mehedi Hasan · 池上 茂 · *朝賀 一美 · *関口 健
落合 芳博

(東京大学大学院農学生命科学研究科, *伊藤ライフサイエンス株式会社)

Muhammad Mehedi Hasan, Shigeru Ikegami, *Kazumi Asaka, *Takeshi Sekiguchi and
Yoshihiro Ochiai

(Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo and *Ito Life Sciences Inc.)

It has been believed for a long time that one of the pigment proteins, myoglobin, has no isoform, but the recent studies on fish myoglobin showed that myoglobin is expressed not only in muscle but in other non-muscle tissue and that two kinds of isoforms are present. So far, no report on the presence of myoglobin isoform in higher vertebrates is available, but it is likely that the observation is true for higher vertebrates. This study was undertaken to examine the presence of myoglobin isoforms in different parts of beef, in relation with the discoloration rate during chilled storage. The parameters of color, namely, L^* , a^* and b^* values were measured during the ice storage of the water-soluble extract. Generally, the a^* value tended to decrease during the storage, while the L^* value gradually increased and finally decreased slightly. The b^* value did not show a clear tendency. The pattern of color change was specific to each part of muscle. The color change was the fastest for the top side and the slowest for the chunk. SDS-PAGE of the water-soluble fractions of muscle gave clearly different patterns. In addition, the results of two-dimensional gel electrophoresis of the same fraction strongly suggested the presence of myoglobin isoforms, and the ratio of isoforms was considered to be variable among the different parts. Attempts were made to isolate myoglobin isoforms from beef by a combination of column chromatography. Two isoforms were considered to possess different isoelectric points with very similar molecular weight, resulting in complete separation by ion-exchange chromatography. However, the oxidation rate of these isoforms hardly differed from each other. Based on the present study, it was suggested that the discoloration speed of meat is based on the myoglobin content and fat content rather than the composition of myoglobin isoforms.

1. 目 的

ミオグロビンは筋肉細胞中に存在する分子量約17,000の水溶性で球状のタンパク質である。1分子当たり1つのヘムを結合し、ここに分子状酸素が脱着する。ミオグロビンの酸化還元状態は食肉

の色調に直接反映されるため、品質を左右する重要な要素である。とくにヘム鉄が酸化されメトミオグロビンが生じると肉色が褐変してしまうため、食肉の外観を損ない商品価値を著しく低下させる。これは事実上不可逆的変化であり、肉片レベルで色を復元する技術はいまだ開発されていない。

最近、ミオグロビンがこれまで考えられていたように単一成分ではなく、ウシやウマを含めいくつかの生物種において複数成分が存在するのを見出した。これらのアイソフォーム（構造や機能を同じくするタンパク質群）は、分子量はほぼ同じであるが、等電点が酸性から塩基性まで幅広く分布しており、同一のタンパク質が翻訳後修飾を受けたものか、あるいは異なる遺伝子によりコードされているものと考えている。これらの性状が異なるミオグロビン・アイソフォームは、他の性状、すなわち、肉色の変化に直接関するミオグロビンの自動酸化速度や構造安定性において異なることが予想される。また、ミオグロビン・アイソフォーム間でタンパク質部分のアミノ酸配列に差があれば、各アイソフォームの安定性の違いについて検証することが可能となり、食肉の貯蔵中における各々の挙動が明らかとなるものと考えられる。ミオグロビン分子構造に基づいて肉の色調変化を制御する方法が考案されれば、より高品質の食肉の提供が可能になることが期待される。

そこで本研究では、食肉の色調変化とミオグロビン・アイソフォーム各々の挙動との関連性を明らかにすることにより、変色防止条件を新たな観点から検証することを目的とした。

2. 材料と方法

2.1 試料

IHミートパッカー株式会社東京ミートセンターから提供されたと殺後2日目のホルスタイン（個体識別番号1220966084）の13部位（外モモ、友スネ、ランイチ、肩ロース、内モモ、シントマ、リブロース、サーロイン、ヒレ、ウデ、中バラ、カタバラ、ネック）を用いた。以下の図に示す番号も、この配列順に対応している。試料肉はと殺後、4℃にて当研究室に配送された。直ちに、一部をミオグロビン調製用に-80℃のフリーザー中に

保管し、残りは貯蔵試験に付した。なお、入手時におけるpHは各部位で順に、

5.36±0.10, 5.60±0.01, 5.38±0.01, 6.07±0.07,

5.58±0.10, 5.72±0.02, 5.71±0.34, 5.37±0.14,

5.84±0.04, 5.75±0.01, 5.90±0.05, 5.74±0.08

および5.87±0.17であり、外モモで最も低く、肩ロースで最も高かった。なお、筋肉pHの測定は、堀場製作所D-51突刺し型pH計を用いて測定した。

2.2 試料液の調製

筋肉に3倍量の氷冷蒸留水を加えて穏やかに磨砕し、5,000×g、10分間の遠心分離で得られた上清を、ろ紙（アドバンテック、No.2）でろ過したものを試料液とした。静菌のため、0.1%アジ化ナトリウムを加えた。

2.3 貯蔵試験

各部位の筋肉水抽出液を50 mlのプラスチックチューブに入れ、栓をして氷蔵し、二、三日おきに可視部吸収スペクトル（380~750 nm）を測定し、このデータに基づきL*値、a*値、b*値を計算した。

2.4 SDS-PAGE (SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動)

Laemmliの方法に従い、15%ゲルを用いて行った。分子量マーカーとしてSDS-6HあるいはSDS7（シグマ）を用いた。後者の分子量組成は66, 45, 36, 29, 24, 20.1および14.2である。タンパク質染色はコマジブリリアントブルー250Rを用いて行った。

2.5 二次元電気泳動分析

一次元目はイモビライン・ドライストリップゲル（pH 6-11, 11 cm, GEヘルスケア）を用いた等電点電気泳動を行った。泳動後、SDS処理を行い、二次元目のSDS-PAGEに付した。15%ゲルを使用した。タンパク質染色は2.4項に準じた。

2.6 ミオグロビンの精製

脂肪塊を除去した筋肉の水抽出液をまず硫酸塩

析に付し、50-80%飽和画分の沈殿を0.1 M NaClを含むTris-phosphate (pH 7.0) で平衡化したSuperdex 200 16/60カラム (GEヘルスケア) を用いるゲルろ過に供した。ミオグロビン画分をさらにMonoSカラム 5/50 GL (同社) を用いる陽イオン交換クロマトグラフィーに付し、5 mM~0.15 M Tris-phosphate (pH 7.0) のリニアグラジエントにより溶出し、ミオグロビン精製画分を得た。

2.7 ミオグロビン酸化速度の測定

ミオグロビン標品を0.1 M Na-phosphate (pH7.0) に1 mg/mlとなるように溶解し、25°Cの水浴中に一定時間放置後、可視部吸収スペクトルを測定した。酸化速度は単位時間におけるメト化率の増分から求めた。

3. 結果と考察

筋肉色素ミオグロビンはこれまで、単一成分として取り扱われてきた。その理由は、単一成分であるという常識に長い間とらわれていたことと、ミオグロビンを精密に分析する方法の開発ないしは挑戦が行われなかったことにあると考えられる。著者らは近年、筋肉タンパク質のプロテオミクスの解析の過程で、ミオグロビンが必ずしも単一成分でないことを見出した。この事実に基づき、食肉の貯蔵中におけるミオグロビン・アイソフォームの振舞いを検討し直すことが、適正な肉色保持の条件設定に重要であると考えられた。このような試みは、これまでまったく行われてこなかった。

(1) 氷蔵中における筋肉水抽出液の色調の経時的変化

水抽出液を氷蔵し、二、三日おきに可視部吸収スペクトルを測定した。このデータをもとに、色彩計算プログラム (日本分光) を用いて、褐変と関連の深いL*値、a*値、b*値を算出した (Fig.1)。

筋肉pHの低下は外モモで最も速く、肩ロースで最も遅かった。pHの低下の程度はコラーゲン含量の差に大きく依存し、その含量が高いほど嫌氣的に生成する乳酸量が多くなり、pHの低下をもたらすものと考えられた。これらの結果から、pHが下がり易い部位ほど、変色が速やかであることが示唆された。ミオグロビンの酸化速度はpHの影響を大きく受けるため^{1,2)}、本実験においては、筋肉抽出液を用いることで、肉の貯蔵中におけるミオグロビンの不溶化³⁾を避けることができた。そのため、ミオグロビン全体の酸化を観察できたと考えられるが、抽出の過程で脂質も除去されているため、脂質酸化に伴うメト化⁴⁾についてはカウントしていないことになる。一方、実験に用いた抽出液にはアジ化ナトリウムを加えておいたため、細菌の増殖によるメト化への影響はないものと考えられた⁵⁾。生筋中ではメト型の還元系が作用し、メト型が蓄積しない。死後はこのシステムが作動しなくなるため、貯蔵中にメト型が一方向的に増加する。

(2) ミオグロビン・アイソフォームの分析

ウシの各筋肉部位から調製した水溶性画分につき、SDS-PAGEおよび二次元電気泳動により分析したところ、本タンパク質が複数成分に分離されることを見出した。SDS-PAGEパターンをみると、筋肉部位によりミオグロビン以外の成分が大きく異なっていることが判明した (Fig.2)。また、二次元電気泳動分析の結果から、主要成分の他に1-3成分のアイソフォームが存在することが明らかにされた (Fig.3)。このようなアイソフォームの存在については、ウシ・ミオグロビンではこれまでに報告がない。これらのアイソフォームが同一の遺伝子にコードされているのか、異なる遺伝子の産物であるかどうかは明らかにされていない。等電点が異なれば自動酸化速度にも差があることが予想されるため、肉色の劣化速度との因果

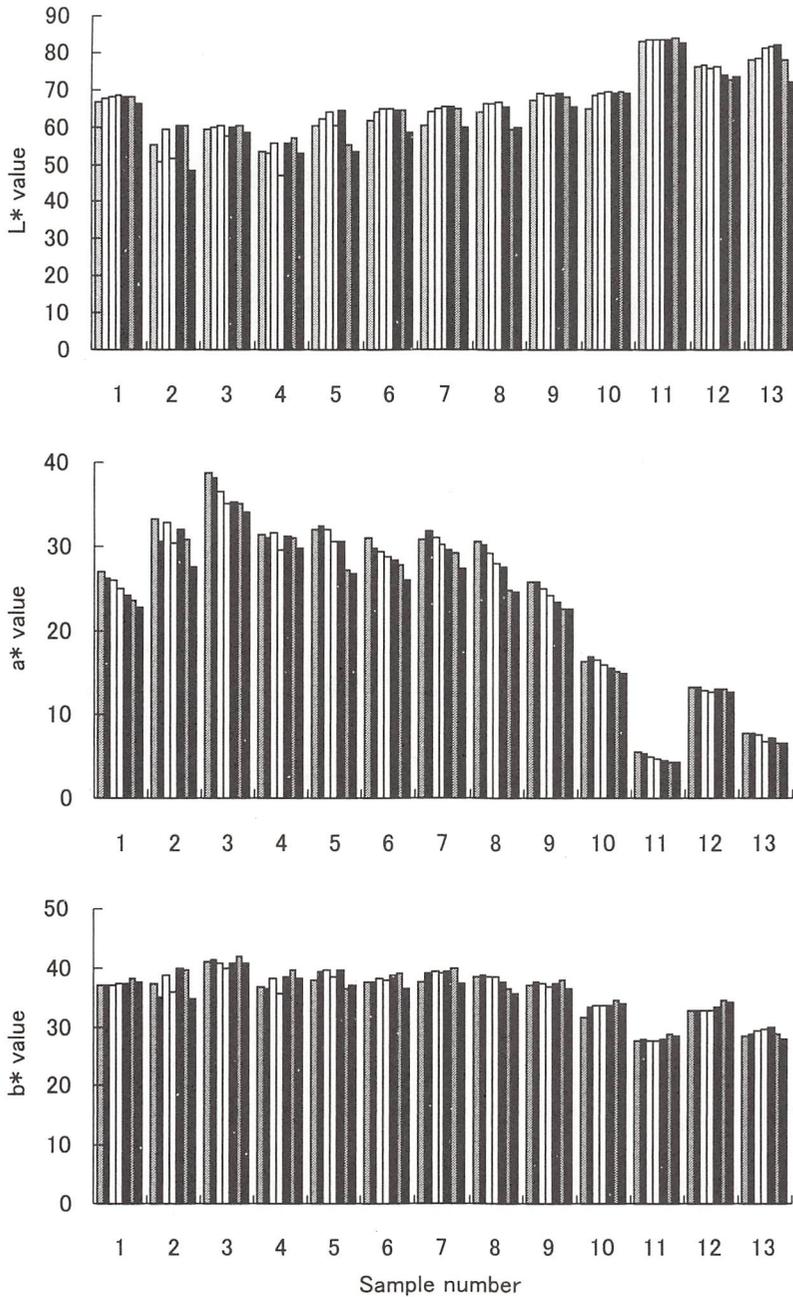


Fig.1 Changes in L*, a* and b* values of the water extract from various parts of beef during ice storage. 1, topside; 2, leg; 3, rump; 4, chuck; 5, silverside; 6, thick flank; 7, rib; 8, sirloin; 9, tenderloin; 10, thick rib; 11, flank; 12, brisket; 13, neck. The values measured after 0, 3, 6, 9, 12, 15 and 18 days of ice storage are shown from left to right sequentially for each part of muscle (1-13).

関係が存在することが予想された。

いずれの電気泳動においても、筋肉部位によるタンパク質成分の多様性がみられた。このような

違いは、各部位の運動様式に深く関わっているものと考えられた。ミオグロビン還元系にはシトクロムb₅が関与することが明らかにされているが⁶⁾、

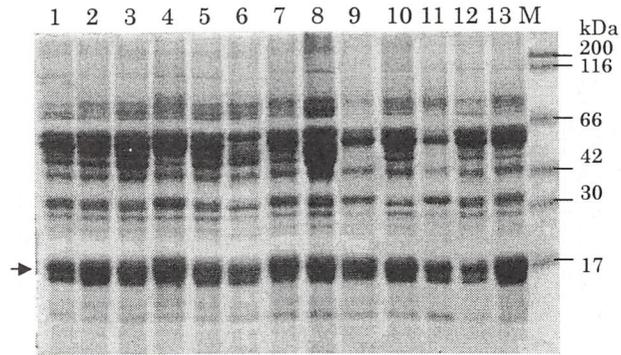


Fig.2 SDS-PAGE patterns of the water extracts from different parts of beef. Lane 1, topside; 2, leg; 3, rump; 4, chuck; 5, silverside; 6, thick flank; 7, rib; 8, sirloin; 9, tenderloin; 10, thick rib; 11, flank; 12, brisket; 13, neck. The letter M stands for molecular weight markers. 15% gel. The arrowhead indicates myoglobin.

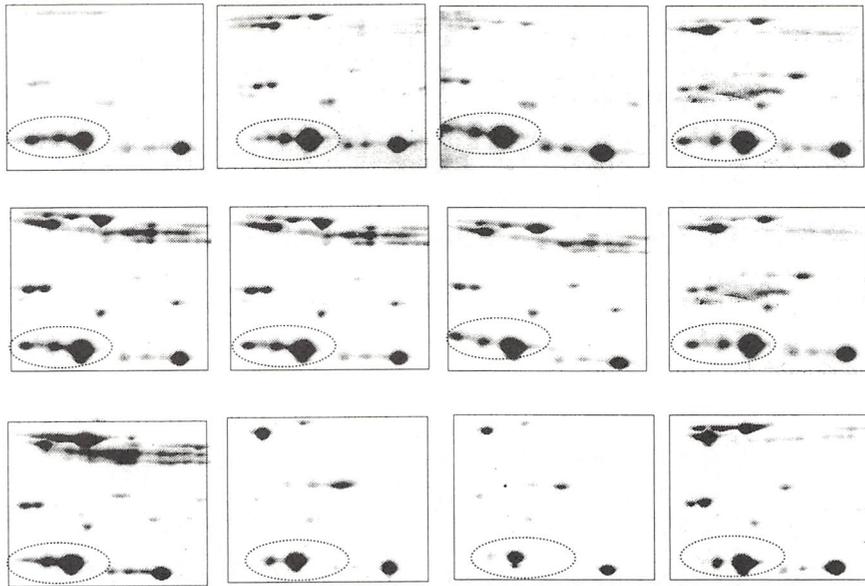


Fig.3 Two-dimensional gel electrophoretograms of the water-soluble fraction from each part of beef. Top lane from left to right: topside, leg, rump, chuck. Middle lane from left to right: silverside, thick flank, rib, sirloin. Bottom lane from left to right: tenderloin, thick rib, flank, brisket. For the first dimension, Immobiline Dry Gel Strip (pH 3-11, 11 cm) was used. For the second dimension, SDS-PAGE using 15% gel was carried out. Only the regions of pI range from 7.0 to 9.5 are shown. Acidic side on the left. Myoglobin regions are circled.

当該成分はゲル上で確認できず、この系の活性の部位による相違については、本研究の結果からは明らかにされなかった。

(3) 各アイソフォームの精製と性状の比較
各種クロマトグラフィーを用いてミオグロビン・アイソフォームの単離を行った (Fig.4)。精製

アイソフォームについて自動酸化速度の温度およびpHに対する依存性を詳細に検討した。第1段階のゲルろ過クロマトグラフィーでは可視部吸収を示すピークが1つだけ認められたが (Fig.4上)、この画分をイオン交換クロマトグラフィーに付したところ、2成分に分離された (Fig.4下)。これら

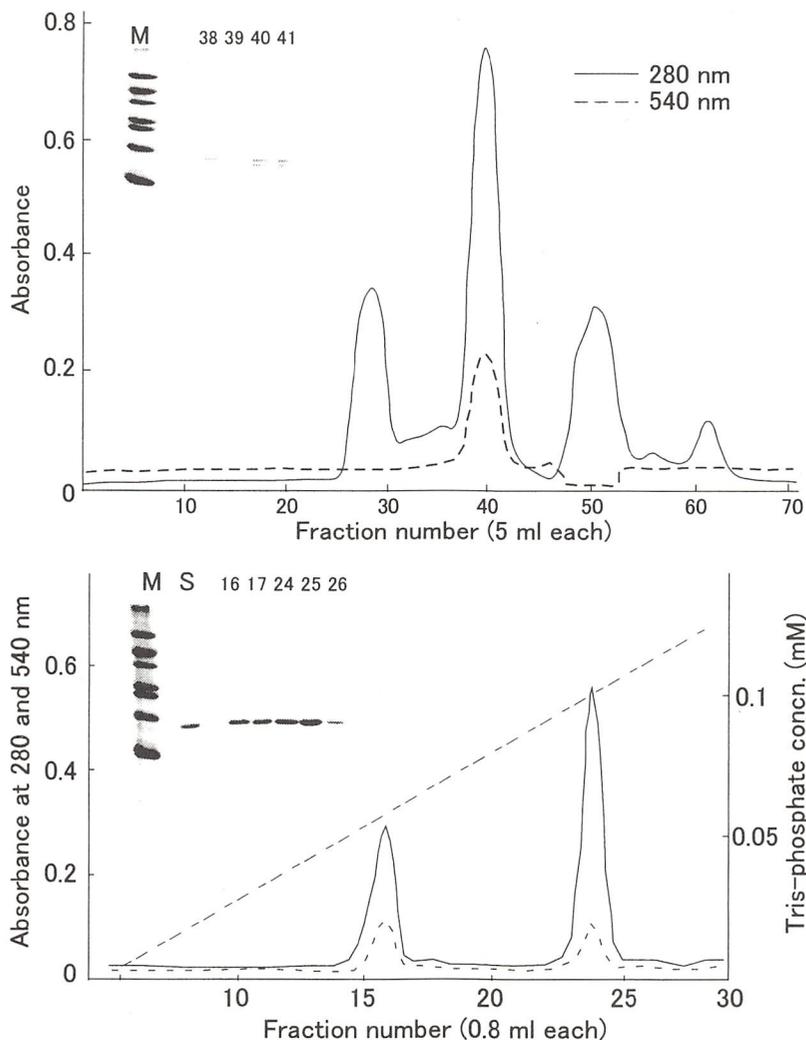


Fig.4 Purification of myoglobin from tenderloin. Upper chromatogram: gel filtration using a Superdex 200 16/60 column equilibrated with Tris-phosphate (pH 7.0) containing 0.1 M NaCl. Lower chromatogram: anion exchange chromatography using a MonoS 5/50 GL column. Myoglobin fraction obtained by the gel filtration was subsequently applied to anion-exchange chromatography. The inserted figures are the SDS-page patterns (15% gel) of the corresponding fractions (fraction numbers are shown on the top of each lane). The letters M and S stand for marker proteins and the applied sample.

の成分は2次元電気泳動上で区別されることから、ミオグロビンのアイソフォームであると考えられた。

著者らは、ミオグロビンに関する一連の研究において、cDNAクローニングによるアミノ酸配列の演繹、組換えDNAによる大腸菌を用いたミオグロビン変異体の作出し、わずか1つのアミノ酸を置換しただけで安定性が大きく変化するケース

を観察した⁷⁾。従って、等電点の異なるアイソフォームでは安定性に差があることが予想される。メト化速度はグロビンの構造安定性と密接な関係があるため⁸⁾、アイソフォーム間での酸化速度の違いが予想されたが、それは検出限界以下であった(図省略)。

以上で得られた結果から、色調の変化を抑制するための条件は筋肉部位ごとに設定する必要がある

り、とくに筋肉pHが下がり易い部位、すなわち、外モモ、ランイチ、肩ロースなどでは、温度管理を注意深くする必要がある。脂質含量ないし脂質酸化についても配慮する必要がある。保蔵条件についても、冷蔵のみならず、冷凍貯蔵する場合も検討が必要である⁹⁾。

血色素ヘモグロビンについては、魚類において多形性を示すことが以前から指摘されていた。しかしミオグロビンの多形性は、ごく最近になって、コイで2種類のアイソフォームが遺伝子レベルで存在することが明らかにされた¹⁰⁾。しかし、実際にタンパク質としてどの程度発現しているのかは不明である。

食肉の変色におけるミオグロビンの酸化が、各アイソフォームの酸化率の単純な足し算になるのか、相乗的であるのか、条件次第では特定のアイソフォームが酸化速度を増したり、あるいは減じたりするのか、など、本研究に関連して未解決の部分が残されている。これらの問題点は、アイソフォームの遺伝子解析、アミノ酸配列の決定、翻訳後修飾の有無などを調べることにより解決される。

4. 要 約

食用牛の筋肉13部位から調製した水溶性画分につき、氷蔵中における可視部吸収スペクトル、および同スペクトルから換算した色調の変化を調べたところ、部位により変色速度に明確な差があることを認めた。同画分のSDS-PAGE分析により、部位による成分組成に明確な差が観察された。さらに、同画分の二次元電気泳動分析によりミオグロビン・アイソフォームの組成について分析した結果、部位により1-3成分に分離されることを見出した。カラムクロマトグラフィーなどにより

アイソフォームの精製を試みた結果、等電点が明らかに異なる2種のタンパク質成分に分離された。両アイソフォームの酸化速度については明確な差は認められず、部位による変色速度の違いは脂質酸化、ミオグロビン含量など、他の要因の影響の方が大きいことが示唆された。

文 献

- 1) Ueki, N., Chow, C.-J., Ochiai, Y. Characterization of bullet tuna myoglobin with reference to thermostability-structure relationship. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 4968-4975 (2005).
- 2) 落合芳博: 魚類ミオグロビンの構造安定性、「水産物の色素—嗜好性と機能性」(平田 孝, 菅原達也編, 恒星社厚生閣, pp.19-31 (2008).
- 3) Chaijan, M., Benjakul, S., Visessanguan, W., Lee, S., Faustman, C. The effect of freezing and aldehydes on the interaction between fish myoglobin and myofibrillar proteins. *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 4562-4568 (2007).
- 4) Suman, S.P., Faustman, C., Sramer, S.L., Liebler, D.C. Proteomics of lipid oxidation of porcine and bovine oxymyoglobins. *Proteomics*, **7**, 628-640 (2007).
- 5) Robach, D.L., Costilow, R.N. Role of bacteria in the oxidation of myoglobin. *Appl. Microbiol.*, **9**, 529-533 (1961).
- 6) Livingston, D.J., MaLachlan, S.J., La Mar, G.N., Brown, W.D. Myoglobin: cytochrome *b₅* interactions and the kinetic mechanism of metmyoglobin: dependence on the electron transport chain. *J. Biol. Chem.*, **260**, 15699-15707 (1985).
- 7) Ueki, N., Ochiai, Y. Effect of amino acid replacements on the structural stability of fish myoglobin. *J. Biochem.*, **140**, 649-656 (2006).
- 8) Chow, C.J. Relationship between the stability and autoxidation of myoglobin. *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 22-26 (1991).
- 9) Chow, C.-J., Ochiai, Y., Watabe, S. Effect of frozen temperature on autoxidation and aggregation of bluefin tuna myoglobin in solution. *J. Food Biochem.*, **28**, 123-134 (2004).
- 10) Frazer, J., de Mello, L.V., Ward, D., Rees, W.H., Williams, D.R., Fang, Y., Brass, A., Gracey, A.Y., A.R. Hypoxia-inducible myoglobin expression in nonmuscle tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 2977-2981 (2006).

食肉・食肉製品のトランス脂肪酸含量調査

Survey of Content of *Trans*-fatty Acids in Meats and Meat Products

河原 聡 ・ 六車 三治男

(宮崎大学農学部)

Satoshi Kawahara and Michio Muguruma

(Faculty of Agriculture, University of Miyazaki)

Excess intake of *trans*-fatty acids increases the risk of cardiovascular disease. Much attention is drawn to the consumption of *trans*-fatty acids in the world and Japan, and regulations or compulsory claims for *trans*-fatty acids are established in several countries.

This awareness of *trans*-fatty acids requires suitable methods for analysis of commercial foods. However there is not any standard method for determination of *trans*-fatty acids in meats and meat products. Therefore this study were carried out to develop a precise and convenient method using gas chromatography and to determine the content of *trans*-fatty acids in meats and meat products by a proposed method. The results were as follows:

- 1) *Trans*-fatty acids in foodstuffs were successfully separated and determined using a gas chromatography column, SP-2560, and an internal standard within 70 minutes.
- 2) Solid phase extraction using a cartridge column, Discovery Ag-Ion, prior to gas chromatography improved accuracy in determination of *trans*-monoenoic acids.
- 3) Fats derived from ruminant animals such as bovine and sheep contained higher levels of *trans*-fatty acids than those from non-ruminant animals. However the contents in animal fats was quite lower than those in hydrogenated oils.
- 4) It was suggested that processing of animal foods might increase their contents of *trans*-fatty acids.

1. 目 的

構造中にトランス形の二重結合をもつ不飽和脂肪酸はトランス脂肪酸と呼ばれる。トランス脂肪酸はLDL-コレステロールの増加を介してヒト血清コレステロール濃度を増加させ、HDL-コレステロールを低下させることが報告されている。このことから、食事由来のトランス脂肪酸の過剰摂取は心疾患のリスクを高めると考えられている¹⁾。諸外国では、トランス脂肪酸の摂取基準を設ける、あるいは食品中のトランス脂肪酸含量の表示を義

務付ける国が増加している。このような情勢の中、日本においてもトランス脂肪酸に関する消費者の関心が高まっており、今後、トランス脂肪酸含量の表示義務化や摂取基準が設定されることが予測される。

食品においては、マーガリンやショートニングなどの加工油脂がトランス脂肪酸の主要な摂取源であると考えられている。加工油脂では、融点調節や酸化安定性の付与を目的として、多価不飽和脂肪酸を多く含有する植物油や魚油に水素添加を行うが、この加工工程において原料油中の多価不

飽和脂肪酸の一部がトランス脂肪酸に変換される。水素添加された加工油脂はパン・菓子類の製造や加工食品の揚げ湯として汎用されるため、日本における近年の食習慣の傾向を勘案すると、トランス脂肪酸の摂取機会と摂取量は増加していると推測される。

一方、天然には、種々の油脂中において微量に検出されるほか、反芻動物に由来する肉や乳に比較的多量のトランス脂肪酸が含有されることが知られている²⁾。ウシやヒツジなどの反芻動物では、第一胃内に生息する微生物の作用により多価不飽和脂肪酸の水素添加が起り、その中間生成物としてトランス脂肪酸が生成し³⁾、これらの動物を起源とする肉や乳の脂肪の2~5%がトランス脂肪酸であることが報告されている。天然のトランス脂肪酸としてはオレイン酸 (C18:1n9c) の異性体であるエライジン酸 (C18:1n9t) や*trans*-バクセン酸 (C18:1n7t) が主要なものであると報告されている²⁾。今後、食品においてトランス脂肪酸含量の表示が義務化された場合、加工油脂のみならず、食肉や乳についても含量表示が適応される可能性が高いと推測される。

トランス脂肪酸含量の表示に当たっては、正確で精度が高く、また日常分析に耐えられるような比較的簡便な分析法の確立が求められる。トランス脂肪酸の分析方法としては赤外吸収、高速液体クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー (GC) などが知られているが、分析精度・簡便性などの観点から、総脂肪酸メチルエステルのGC分析によりトランス脂肪酸脂肪酸を定量する直接GC法が主流となりつつある。しかし、直接GC法では、クロマトグラム上のトランス脂肪酸の各ピークが近接するため、安定した分離状態の維持、ピークの同定および積分条件決定など、技術的に難しい要素を含む。

そこで本研究では、GC分析条件の最適化およ

び分析試料のクリーンアップを組み合わせることにより、より正確なトランス脂肪酸の分析法を確立することを第一の目的として実施した。また、確立した定量方法を用いて市販の食肉、食肉加工品等のトランス脂肪酸含量の測定を行った。

2. 材料および方法

2.1 試薬

内部標準物質およびスパイクとして用いたトリコサン酸 (C23:0) およびヘネイコサン酸 (C21:0) はSigma社製のものを用いた。定性・分離確認に用いた脂肪酸メチルエステル混合物はスペルコ37種FAMEミックス (スペルコ社製) を用いた。牛脂脂肪酸メチルエステルは、市販の牛脂 (背脂肪外層) から抽出した総脂質を使用して調製した。水素添加を施して調製されたマーガリンは某油脂加工メーカーより提供された。

2.2 装置および条件

ガスクロマトグラフ装置はオートインジェクターを装着した島津製作所製GC-2010を用い、検出器は水素炎イオン化検出器 (FID) を用いた。キャピラリーカラムはSpelcowax-10 (0.32mm I.D.×60m, 膜厚0.25 μ m, スペルコ社製) およびSP-2560 (0.25 mm I.D.×100m, 膜厚0.20 μ m, スペルコ社製) を使用した。カラム温度は170 $^{\circ}$ C, 23分間保持後, 220 $^{\circ}$ Cまで1 $^{\circ}$ C/分で昇温させた。注入部および検出部温度はそれぞれ240 $^{\circ}$ Cおよび250 $^{\circ}$ Cとした。キャリアーガスにはヘリウムを用い, 1ml/minの流速で分析を行った。

2.3 操作

食肉および食肉製品からの総脂質抽出はFolchらの方法⁴⁾ に準じて、また、乳および乳製品からの総脂質抽出はレーゼゴットリーブ法⁵⁾ により行った。脂肪酸メチルエステルの調製はTakenoyamaらの方法⁶⁾ に準じて行った。固相抽出 (SPE) による脂肪酸メチルエステルの分画は、

ヘキサンに溶解した約 1 mg の脂肪酸メチルエステルを、あらかじめヘキサンにて平衡化した Discovery Ag-Ion カートリッジ (スベルコ社製) にロードし、6 ml のヘキサン/アセトン混合液 (96:4, v/v) で溶出することでフラクション A (飽和脂肪酸および *trans*-モノエン酸画分) を得た。次いで 4 ml のヘキサン/アセトン混合液 (90:10, v/v) でフラクション B (*cis*-モノエン酸および *trans*-ジエン酸画分) を溶出した。次いで、4 ml のアセトンでフラクション C (*cis/trans*-ポリエン酸画分) を溶出し、最後にアセトン/アセトニトリル (80:20, v/v) でフラクション D (*cis*-ポリエン酸画分) を溶出した。得られた全画分は、20 μ g のヘネイコサン酸あるいはトリコサン酸メチルエステルによりスパイクした後、すべて N₂ 気流下にて乾燥し、0.5 ml のヘキサンに再溶解してガスクロマトグラフィーに供した。

2.4 含量測定

トランス脂肪酸の含量測定は内部標準法により定量した。なお、固相抽出の操作により内部標準脂肪酸メチルエステルはすべてフラクション A に溶出されるため、フラクション B 以降の画分についてはスパイク脂肪酸メチルエステルのピーク面積を用いて補正し、以下の計算式にて定量計算を行った。

〈計算式〉

トランス脂肪酸含量 (mg/100 g)

$$= A \times (F/E \times B) \times C/D / 100$$

A: トランス脂肪酸のピーク面積の合計

B: 内部標準メチルエステルのピーク面積

C: 分画に供した脂肪酸メチルエステル溶液
1 ml 中の内部標準メチルエステル量 (mg)

D: 脂肪酸メチルエステル溶液 1 ml 分に相当する試料重量 (g)

E: フラクション A のスパイク脂肪酸メチルエステルのピーク面積

F: フラクション B 以降のスパイク脂肪酸メチルエステルのピーク面積

3. 結果と考察

3.1 分析用 GC カラムの検討

脂肪酸メチルエステルの分離に一般的に用いられている中極性カラム (Supelcowax-10) および液相に cyanopropyl polysiloxane を修飾した強極性カラム (SP-2560) を用いて、トランス脂肪酸メチルエステルを含有する市販脂肪酸メチルエステル混合物を分析した結果を Fig.1 に示す。中極性カラムを用いた場合、炭素数や二重結合の位置に基づいた分離は良好であったが、*cis/trans* の構造異性体の分離は困難であり、トランス脂肪酸の定量には適さないと考えられた。一方、強極性カラムを用いた場合には、*cis/trans*-C18:1 および *cis/trans*-C18:2 が完全に分離された。データは示していないが、同一サンプルの繰返し分析実験において相対標準偏差 $\leq 0.5\%$ であり、日常分析に十分用いることができる繰返し精度を得た。

そこで、SP-2560 を用いて調製時に水素添加を施したマーガリンの総脂肪酸の分析を行ったところ、Fig.2 に示すように、種々の C18:1 異性体が検出された。また、マーガリンにおける主要なトランス脂肪酸は炭素数 18 のモノエン酸であり、特にエライジン酸 (C18:1 n9t), *trans*-C18:1 n11/12, およびオレイン酸 (C18:1 n9c) の含量が高かった。これら脂肪酸メチルエステルの溶出時間が近接しており、ピーク同定や面積計算に少なからず影響を及ぼすことが推測された。同様にして、牛脂脂肪酸メチルエステルを分析した際には、オレイン酸の含量が非常に高く、特に *trans*-バクセン酸 (C18:1 n7t) のピークがオレイン酸のピークと重なる場合が認められた (データ示さず)。このような場合においては、ピーク面積の積分条件に依存して各脂肪酸の定量結果が異なる

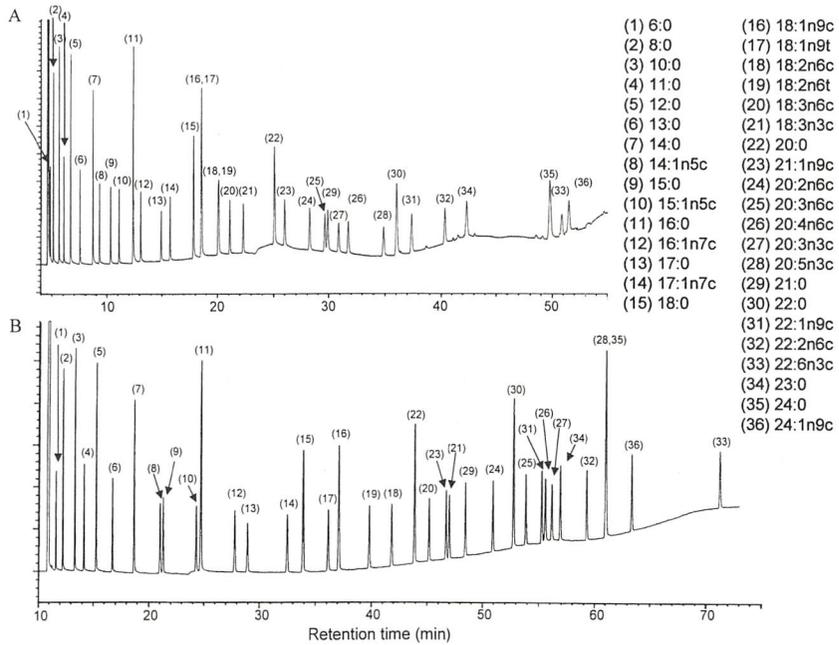


Fig.1 Gas Chromatogram of a commercial mixture of fatty acid methyl esters (FAME) on fused capillary columns coated with (A) Supelcowax 10™ (60 m × 0.32-mm i.d. × 0.25 μm film) and (B) with Supelco SP-2560™ (100 m × 0.25-mm i.d. × 0.2 μm film).

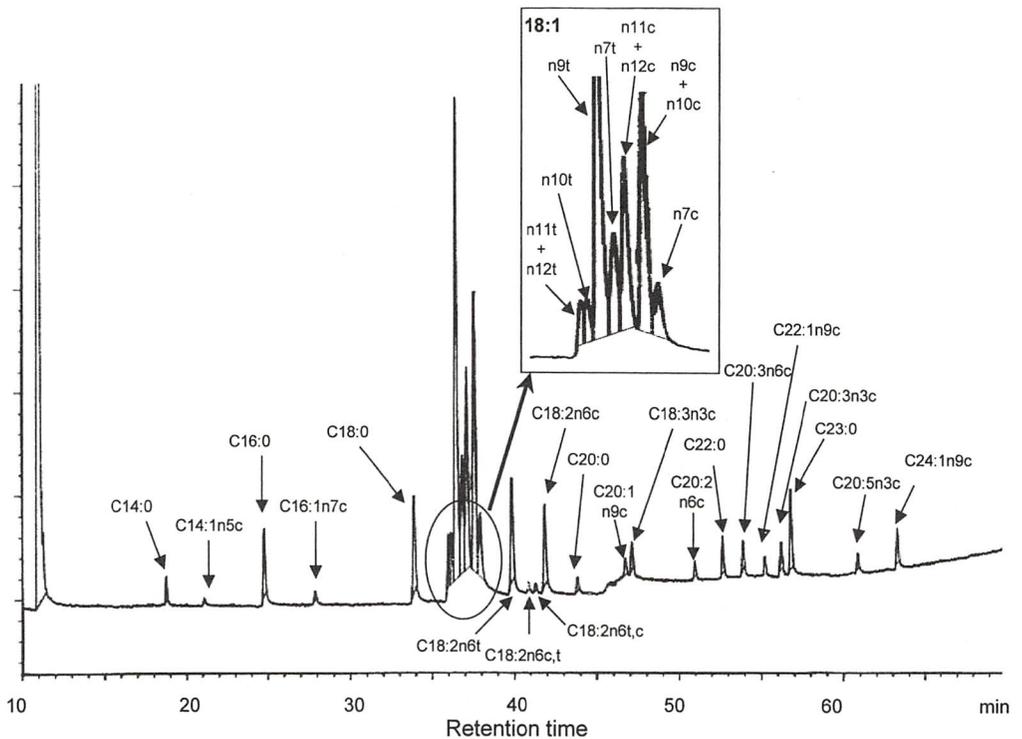


Fig.2 Gas chromatogram of fatty acid methyl esters from a margarine sample.

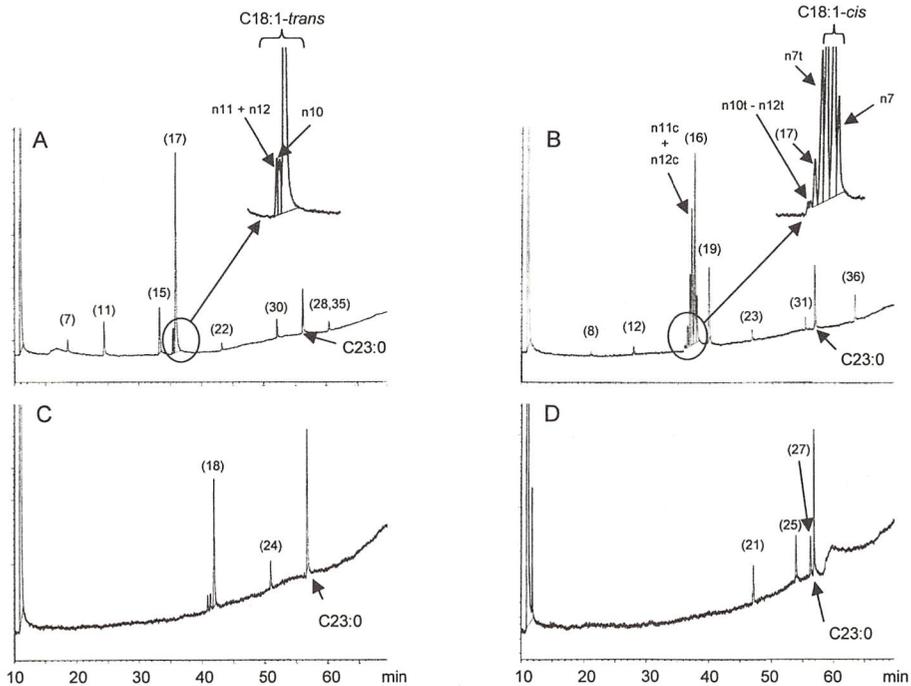


Fig.3 Gas chromatograms of FAME from a beef fat sample isolated by solid phase extraction with a Discovery Ag-Ion column. A, saturated fatty acids and *trans* monoene fraction; B, *cis* monoene and *trans* diene fraction; C, *cis/trans* polyene fraction; D, *cis* polyene fraction. C23:0 was added as a spike FAME. Peak identifications are as in Fig.1.

る傾向が認められた。ガスクロマトグラフの昇温条件について種々の検討を行ったが、これらのピークの分離を改善することは困難であった。

3.2 固相抽出法の検討

上述のことから、GC分析に先立ち、何らかの方法で総脂肪酸メチルエステル中の*cis/trans*異性体を分離する必要性が認められた。従来より、脂肪酸メチルエステルの*cis/trans*異性体分離にはAgイオンを吸着させた薄層クロマトグラフィーが用いられている。しかし、薄層クロマトグラフィーにおける操作の煩雑さや定量性の観点から、本研究においては、Agイオンを固相に導入した固相抽出カートリッジカラム (Supelco社製, Discovery Ag-Ion) を用いた異性体の粗分画を検討した。

固相抽出カートリッジを用いて牛脂の総脂肪酸メチルエステルを4画分に分画した後、GC分析

を行った結果をFig.3に示す。低極性の溶媒から溶出を開始し、溶出溶媒の極性を順次上げていくと、最初に飽和脂肪酸およびトランス形モノエン酸が溶出し、次いで、シス形モノエン酸およびトランス形ジエン酸、シス形ジエン酸、シス形ポリエン酸が溶出された。しかし、複数の画分に同一の脂肪酸メチルエステルが溶出され、回収率にばらつきが生じる場合があり、定量性を確保するためには溶出条件の最適化が必要であることが示唆された。また、4画分に分画することは分析検体が4倍になることを意味しており、日常分析により適した分画方法を検討する必要性が認められた。

そこで、分画数をA, 飽和脂肪酸およびトランス形モノエン酸; およびB, その他の脂肪酸の2画分に減じ、高い回収率と再現性を得られるような分画条件を検討した。その結果、最初の溶出を8 mlのヘキサン:アセトン混合液 (96:4, v/v)

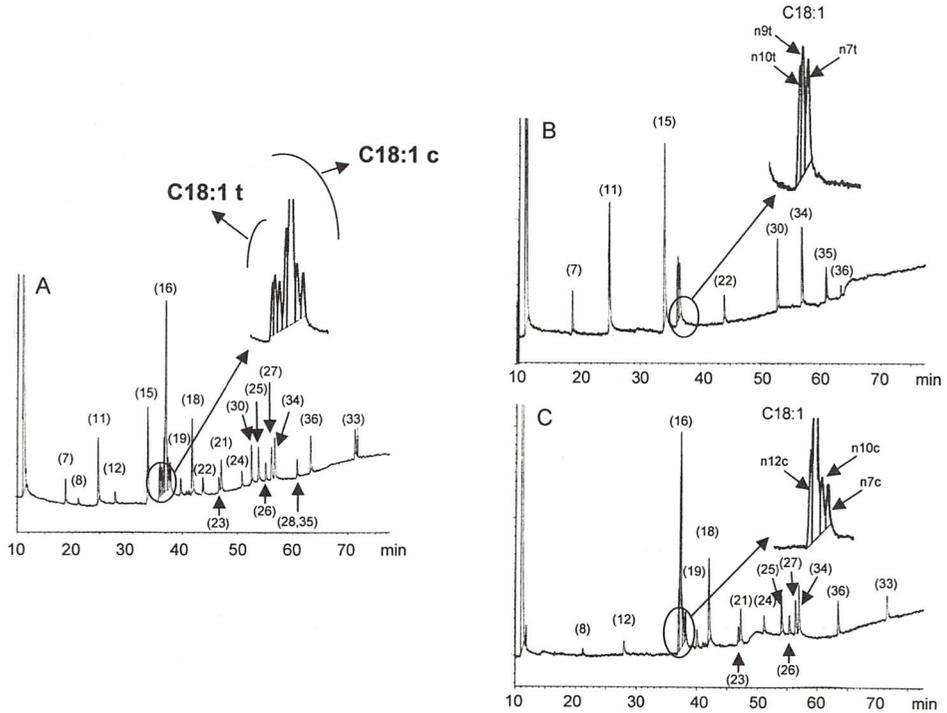


Fig.4 Gas chromatogram of FAME from a beef fat sample (A) and its *trans* (B) and *cis* (C) 18:1 isomer fractions isolated by solid phase extraction. Peak identifications are as in **Fig.1**.

Table 1 Recovery of *trans* fatty acid methyl esters in a margarine sample using Discovery-Ag cartridge.

| Fatty acid | Amount of spiked/ g 100g ⁻¹ | Recovery (%) Means (S.D.), n=8 | Coefficient of deviation |
|---------------------|---|-----------------------------------|--------------------------|
| 18 : 1 <i>trans</i> | 19.0 | 99.0 (0.3) | 0.342 |
| <i>cis</i> | 10.5 | 99.1 (0.6) | 0.637 |
| 18 : 2 <i>trans</i> | 20.0 | 99.5 (0.8) | 0.792 |
| <i>cis</i> | 2.14 | 99.2 (1.0) | 1.00 |

で行い、次いで10 mlのアセトン:アセトニトリル混合液 (75 : 25, v/v) で溶出することにより、C18 : 1 脂肪酸の構造異性体を完全に分離することが可能となった (**Fig.4**)。このことにより、特に動物性脂肪に多量に含有されるオレイン酸によるトランス脂肪酸の定量への妨害は最小限に止めることができると推測された。また、トランス形ジエン酸やトランス形トリエン酸の定量結果に画分数の減少は明確な影響を及ぼさず、2画分のみ画分においても、トランス形のジエン酸および

トリエン酸の定量が可能であった。さらに、適当な脂肪酸メチルエステルを各画分にスパイクすることにより、良好な回収率と定量性を保証できることが明らかになった (**Table 1**)。

3.3 種々の食品中のトランス脂肪酸含量測定

本研究にて確立した分析方法を用いて、種々の市販食品中に含有されるトランス脂肪酸含量を測定した結果を**Table 2**に示す。加工油脂と比較して、食肉や乳製品のトランス脂肪酸含量は桁違いに低かった。疫学調査の結果から、食事から摂取

Table 2 Concentrations of *trans* fatty acids in food samples by the analytical method established in this study (mg 100 g⁻¹).

| | 18 : 1 <i>trans</i> | 18 : 2 <i>trans</i> | Total amount of <i>trans</i> fatty acids |
|------------------------|---------------------|---------------------|--|
| Beef | | | |
| Loin (n=3) | 20.8 ± 8.2 | n.d. | 20.8 ± 8.2 |
| Tallow (n=1) | 20.0 | n.d. | 20.0 |
| Thin skirt (n=1) | 148 | n.d. | 148 |
| Tongue (n=1) | 74.7 | n.d. | 74.7 |
| Sheep | | | |
| Shoulder (n=1) | 28.1 | n.d. | 28.1 |
| Pork | | | |
| Loin (n=3) | 4.62 ± 2.08 | n.d. | 4.62 ± 2.08 |
| Lard (n=3) | 6.41 ± 0.56 | n.d. | 6.41 ± 0.56 |
| Chicken | | | |
| Thigh (n=1) | 5.40 | n.d. | 5.40 |
| Meat products | | | |
| Sausage (n=2) | 7.04 ± 0.17 | n.d. | 7.04 ± 0.17 |
| Bacon (n=1) | 2.36 | n.d. | 2.36 |
| Milk (n=7) | | | |
| Processed cheese (n=2) | 21.7 ± 3.9 | n.d. | 21.7 ± 3.9 |
| Natural cheese (n=5) | 455 ± 8 | n.d. | 455 ± 8 |
| Margarine (n=2) | 135 ± 117 | n.d. | 135 ± 117 |
| | 20000 ± 1410 | 21500 ± 2120 | 41500 ± 3540 |

Values are expressed as mean ± standard deviation.

する総カロリー数に占めるトランス脂肪酸のカロリー数が2%を超えると心疾患のリスクが急激に高まると推測されている¹⁾。このことから、食肉・食肉製品の摂取に由来するトランス脂肪酸が、直接的に疾病のリスク要因になる可能性は低いと推測された。しかし、パン食やファストフードの普及に伴う日本人の食習慣の変化を考慮すると、食事全体に占めるトランス脂肪酸の摂取割合に関する検討は今後重要となる課題であると推察された。

これまでにも報告されているように、反芻動物に由来する食肉は、単胃動物に由来する食肉と比較して、多量のトランス脂肪酸を含有していた。また、食品重量当たりのトランス脂肪酸含量は脂肪含量に正相関する傾向が認められ（データ示さず）、その含量の分布は20 mg/100 g~148 mg/100 gと非常に広範囲に亘っていた。今後、分析

例数を増やし、より実体を反映した数値データを蓄積していくことが重要である。

豚肉を原料とした食肉加工品で、わずかではあるが、トランス脂肪酸含量が増加する傾向が認められた。これは代表的な乳加工品であるプロセスチーズにおいても同様であった。食品加工の際に行われる加熱工程において、脂質の酸化に伴い、トランス脂肪酸が生成する可能性が指摘されている⁷⁾。トランス脂肪酸に対する消費者の関心が高まっている昨今、食肉製品の安全性を担保し、消費者に正確な情報を提供するために、食肉製品の加工とトランス脂肪酸の生成との関係についての知見を集めることは早急な課題であると考えられた。

4. 要 約

食肉・食肉製品のトランス脂肪酸含量を迅速、

正確に測定するための、ガスクロマトグラフによる分析法方法を検討した。種々の検討の結果、強極性キャピラリーカラムを用いたガスクロマトグラフ分析により脂肪酸メチルエステルを分離することにより、トランス脂肪酸の定量分析が可能であることが確認された。また、GC分析に先立ち、固相にAgイオンを導入したカートリッジカラムを用いて固相抽出を行い、炭素数18のモノエン酸の幾何異性体のシス異性体とトランス異性体を分離すると、定量性が向上することが示された。本研究において確立した分析方法を用いて、いくつかの食品のトランス脂肪酸含量を測定した結果、食肉および食肉製品のトランス脂肪酸含量は加工油脂の1/100程度であった。一方で、食肉の加

工に伴いトランス脂肪酸含量が増加することを示唆する結果が得られた。

文 献

- 1) Aro, A., *In Trans Fatty Acid in Human Nutrition* (eds. by J. L. Sebedio, W.W. Chistie), pp235-260, The Oily Press, Scotland (1998).
- 2) Lanza, E., Slover, H.T., *Lipids*, **16**, 260-267 (1981)
- 3) Kawahara, S., Sakka, K., Niimi, M., Kawamura, O., Muguruma, M., *Bull. Fac. Agric. Univ. Miyazaki*, **53**, 101-106 (2007).
- 4) Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G.H., *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-509 (1957) .
- 5) Jensen, R. G., Clark, R. M., *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, **3**, 296-299 (1984).
- 6) Takenoyama, S., Kawahara, S., Murata, H., Yamauchi, K., *Anim. Sci. J.*, **70**, 336-342 (1999).
- 7) Ackman, R.G., Hooper, S.N., Hooper, D.L., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **51**, 42-49 (1974).

食肉の栄養価，食味性に関連する 脂肪交雑，脂肪含量の迅速非破壊評価法

Speed and Non-destructive Evaluation Methods for Marbling and Ether Extract of Meat Regarding with Nutrition and Acceptability

入江 正和 (宮崎大学農学部)

Masakazu Irie (Faculty of Agriculture, University of Miyazaki)

To establish objective, prompt evaluation methods of the marbling score and the ether extract content for beef and pork, the image analysis methods with cheap picture devices and software on the market were examined. The images on the 82 beef carcasses at the two meat markets were obtained with a digital camera. Smoothing process was done to four muscles by using image analysis software (Image-Pro PLUS), the fat area was extracted, and the area ratio of fat to muscle and the muscular area were measured in the image. The whole method that traced around muscle was compared with the spot method that measured parts in the muscle. The 1-5 places of *M. longissimus thoracis*, *M. semispinalis dorsi*, *M. semispinalis capitis* and *M. trapezius* were pulled out to the circle images. The cuttings of *M. longissimus thoracis* at 5-6 ribs and 1/2 body length were obtained from 50 cross-bred pigs. The images for pork were obtained with a scanner. The marbling score and the content of ether extract for pork were measured. Suitable images of making to binary for beef and pork was obtained by the image analysis method (especially, containing smoothing process) with small general-purpose picture devices -- a digital camera or a thin scanner. Correlation coefficients between *M. longissimus thoracis* and four muscles were 0.69–0.73 for beef marbling. The correlation coefficients between the whole method and the spot method were 0.89–0.97 for beef marbling. The correlation coefficients between the area ratio of fat to muscle and the ether extract content & the marbling score for pork were 0.74 and 0.71, respectively, in the whole method. These results showed that the image analysis method to exert one's ingenuity in processing was a simple, practicable method of estimating marbling or fat content for meat, that a simple spot method was able to substitute for the whole method for beef marbling, and that a simple method with a scanner was a good method of estimating the marbling and fat content for pork.

1. 目的

食肉において脂肪交雑は経済性のみならず，栄養価や食味性に重要な影響を与える要因であるが，その評価の客観性がたびたび議論されている。さらに最近では和牛肉において筋内脂肪含量が50%を超えるものがあるなど，逆に脂っこく感じたり，カロリーが多すぎるといった問題点も生じている。

他方，豚肉は欧米において赤身性を増大させてきたが，食味性の低下が問題となった。その理由は筋内脂肪量の低下にあり，既に欧米では豚肉の筋内脂肪は向上方向に進みつつあり，米国では豚脂肪交雑基準スコアや目標値（2～4%）が出されている。

脂肪交雑の判定は見た目で行なわれるのが一般的であり，主観性に左右される。また，低い融点の

脂肪も脂肪交雑として同様に評価できる客観的かつ迅速な評価方法があれば、流通面で役立つことになる。

さらに、見た目の脂肪交雑値だけでは栄養価、特に摂取カロリーとの関係もはっきりしない。もし、消費段階で脂肪含量などに関してある程度の数値が表示できれば、果物の糖度のように消費者情報として役立つことになる。そのため流通ライン上で、脂肪交雑を客観的に評価する方法や、カロリーに関連する脂肪含量を瞬時に評価する方法があれば、食肉の栄養価の評価や食味性の向上につなげることができる。

脂肪交雑や脂肪含量の推定法としては、画像解析法が期待され、一定の成果を挙げている。しかしながら、機器が高価であったり、マニュアル操作を必要としたり、ソフトが特殊であったり、薄い豚肉では難しいなどの種々の問題がある。

そこで、本研究では、画像解析法として汎用的なハードとソフトを組み合わせ、また色が淡く、融点が低いことから画像解析が困難であった豚肉を主に用いて、経済性や食味性に関連した脂肪交雑、さらには栄養価に関連した脂肪含量を客観的かつ迅速に評価する方法を確立することを目的とした。

2. 方法

2.1 供試サンプル

牛肉サンプルとしては、宮崎県の食肉市場 (n=13) と兵庫県の食肉市場 (n=69) で撮影した牛枝肉の6-7肋骨間切開面画像、計82枚を用いた。汎用デジタルカメラを用いて、枝肉切開面の第6肋骨側りブロス全体が収まるように撮影した。なお、フラッシュによる乱反射等を防ぐため、フラッシュ無し撮影あるいはLEDタイプの白色蛍光灯を用いた。また、スケールを枝肉切開面と同一深度で同時撮影し、写真からの測定値を画像解

析時に実測値換算した。

豚肉の供試サンプルは、LWD三元交雑種の豚50頭由来する体長1/2部位、5-6胸椎間における胸最長筋を使用した。豚胸最長筋の両部位においてマープリング(脂肪交雑)をNational Pork Producers Councilの方法¹⁾で評価し、さらに、汎用スキャナー(GT8700F, EPSON社製)上に豚肉を乗せ、画像を撮影した。

2.2 画像解析

牛肉での画像解析部位は胸最長筋、背半棘筋、頭半棘筋、僧帽筋とした。各筋肉に対して肉面全体を測定する全面法と筋肉面の一部を測定するスポット法を適用した(Fig.1)。全面法では、画像解析ソフト(Image-Pro PLUS)で各筋肉の輪郭線を自動描画したが、一部誤認識された部分は手動補正を行った。スポット法は、手動補正を必要とせず、現場で簡易に実施でき、方法としては、胸最長筋3~5カ所と背半棘筋2カ所を直径3cm、頭半棘筋1カ所、僧帽筋2カ所を直径2.5cmで円形に画像を自動抽出した。

各筋肉画像は上記ソフトにより色むら補正のために平坦化処理を行った。さらに、二値化処理により脂肪交雑を画像抽出し、筋肉面積と、筋肉面積あたりの脂肪面積比を計測した。

豚肉での画像解析部位は胸最長筋とした。面積当たりの脂肪面積比の測定は、胸最長筋をその輪郭で抽出した全面法とスポット法を適用した(Fig.2)。スポット法では豚胸最長筋の大きさを考慮し、ロース芯の一部を直径4cmで3カ所、5.5cmで1カ所を抜き出した。

筋肉はそれぞれ、照明、色むら補正のために平坦化処理を行い、二値化処理により筋肉領域から脂肪領域を抽出した。肉色が薄い豚肉は、画像の色ムらを補正し、画像の凹凸をなくす平坦化処理の度合いにより、二値化処理後の脂肪面積比の値に影響を及ぼすことが分かった。そこで、予備試

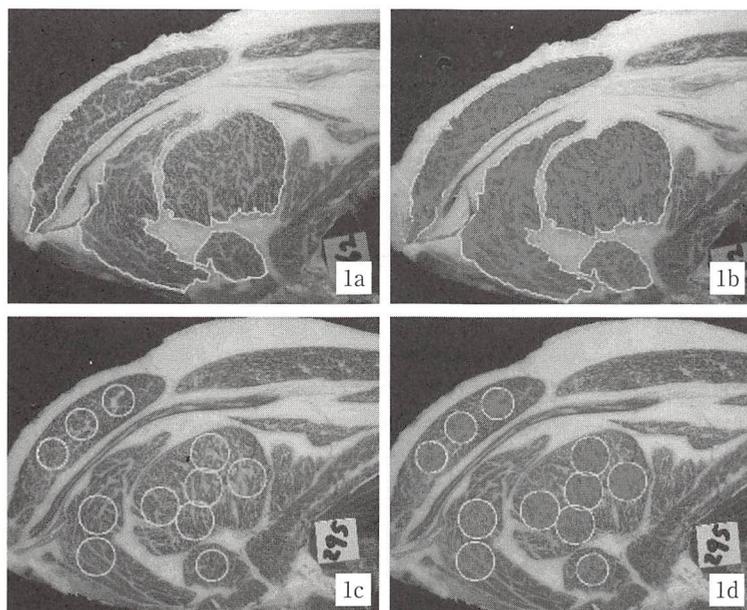


Fig.1 a-d Image analysis of muscle area and marbling for beef cut (a and b, Whole method ; c and d, Spot method). 1 a, Muscle areas surrounded in the green boundary line which was traced semi-automatically by image analysis method ; 1 b, Example of a red-rendered image of cross-section with marbling flecks on **Fig.1a** ; **1c**, Target area of image analysis. The areas were selected in 3 and 2.5 centimeters in diameter for *M. longissimus thoracis*, *M. trapezius*, *M. semispinalis dorsi* and *M. semispinalis capitis* ; 1 d, Example of a red-rendered image of a cross-section with marbling flecks on **Fig.1c**.

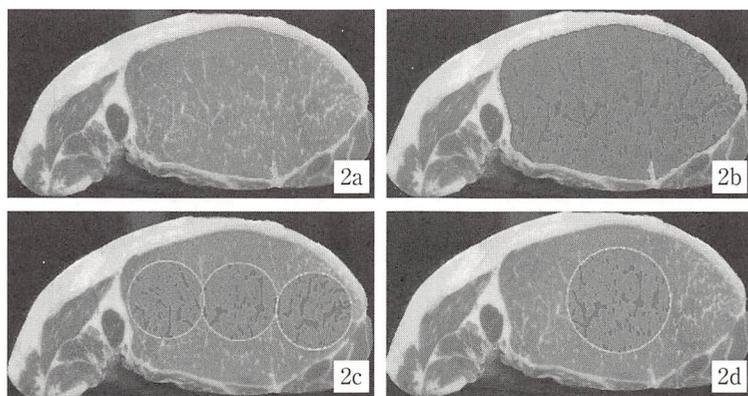


Fig.2 a-d. Image analysis of marbling for pork cut (a and b, Whole method ; c and d, Spot method). **2a**, Target area traced semi-automatically by image analysis for *M. longissimus thoracic*. ; **2b**, Target area of image analysis, the area surrounded by the boundary line which was traced semi-automatically in the *M. longissimus thoracic*, and an example of a red-rendered image of a cross-section with marbling flecks ; **2c**, Target area of image analysis, the area surrounded by three circle of 4 centimeters in diameter which was extracted in the *M. longissimus thoracic*, and an example of a red-rendered image of a cross-section with marbling flecks ; **2d**, Target area of image analysis, the area surrounded by a circle of 5.5 centimeters in diameter which was extracted in the *M. longissimus thoracic*, and an example of a red-rendered image of a cross-section with marbling flecks.

験として，最も適切な平坦化処理の強度を検討するために，26頭分の胸最長筋画像を用いて，平坦化強度0，25，50，75，100，125，150，175および

200と実測値との関連性を調査した。平坦化強度は，全面法では100，およびスポット法では75が適切であることが明らかとなったため，本試験では

Table 1 Simple correlation coefficients of beef muscle area between *M. longissimus thoracis*, *M. trapezius*, *M. semispinalis dorsi*, and *M. semispinalis capitis* by computer image.

| | <i>M. longissimus thoracis</i> | <i>M. trapezius</i> | <i>M. semispinalis dorsi</i> |
|--------------------------------|--------------------------------|---------------------|------------------------------|
| <i>M. trapezius</i> | 0.63 | | |
| <i>M. semispinalis dorsi</i> | 0.81 | 0.58 | |
| <i>M. semispinalis capitis</i> | 0.72 | 0.55 | 0.74 |

n = 82

Table 2 Simple correlation coefficients of beef fat area ratio between *M. longissimus thoracis*, *M. trapezius*, *M. semispinalis dorsi*, and *M. semispinalis capitis* by computer image analysis.

| | | <i>M. longissimus thoracis</i> | | | | <i>M. trapezius</i> | | <i>M. semispinalis dorsi</i> | | <i>M. semispinalis capitis</i> |
|--------------------------------|--------|--------------------------------|--------|--------|--------|---------------------|--------|------------------------------|--------|--------------------------------|
| | | whole | 5 spot | 4 spot | 3 spot | whole | 3 spot | whole | 2 spot | whole |
| <i>M. longissimus thoracis</i> | 5 spot | 0.97 | | | | | | | | |
| | 4 spot | 0.97 | 1.00 | | | | | | | |
| | 3 spot | 0.96 | 0.99 | 0.99 | | | | | | |
| <i>M. trapezius</i> | whole | 0.70 | 0.68 | 0.69 | 0.67 | | | | | |
| | 3 spot | 0.74 | 0.74 | 0.74 | 0.73 | 0.89 | | | | |
| <i>M. semispinalis dorsi</i> | whole | 0.73 | 0.75 | 0.76 | 0.74 | 0.68 | 0.66 | | | |
| | 2 spot | 0.68 | 0.69 | 0.70 | 0.70 | 0.65 | 0.64 | 0.93 | | |
| <i>M. semispinalis capitis</i> | whole | 0.69 | 0.72 | 0.73 | 0.72 | 0.53 | 0.58 | 0.74 | 0.79 | |
| | 1 spot | 0.65 | 0.69 | 0.70 | 0.69 | 0.55 | 0.57 | 0.72 | 0.78 | 0.93 |

n = 82

それらを使用した。

2.3 粗脂肪含量の測定と統計解析

豚肉についてのみ粗脂肪含量をエーテル抽出法で測定した。粗脂肪含量とマーブリングスコアは脂肪面積比から推定した粗脂肪含量の相関を検討した。

3. 結果と考察

3.1 牛枝肉における筋肉面積の画像推定

牛枝肉における筋肉面積における各部位の相関関係をTable 1に示した。胸最長筋と背半棘筋、頭半棘筋および僧帽筋の面積における相関係数は、0.81, 0.72, 0.63と比較的強い相関を示した ($P < 0.05$)。すなわち、胸最長筋のものは他の筋肉も大きいことを示しており、現在の肉量予測式には胸最長筋面積が使われているが、それを支持する結果となった。

一方、画像解析法ではトレースしなくても赤肉部分を瞬間的に捉え、面積を瞬時に計測できる。総筋肉面積の方がより正確であることが報告されており²⁾、画像解析法が赤肉量をより正確に予測するには適しているだろう。

3.2 牛枝肉の各筋肉部位における脂肪交雑の関連性

牛枝肉を用いて、全面法における胸最長筋と背半棘筋、頭半棘筋および僧帽筋の脂肪交雑相関係数は0.73, 0.69, 0.70となった (Table 2)。これらの相関は必ずしも高くはないが、肋骨部の枝肉断面においては1カ所だけの脂肪交雑測定でも他の部位をある程度反映しているといえる。しかしながら、モモ部などの脂肪交雑は必ずしも胸最長筋部を反映していないと現場で指摘されており、複数箇所のデータをとる方がよいだろう。これに関連して、口田ら (2000)³⁾ は、画像解析処理にお

いて胸最長筋のみから筋内脂肪含量を推定するよりも，頭半棘筋と背半棘筋の情報を利用した方が格付員との一致率が高く精度が上がるとしている。

なお，今回の実験では測定していないが，Yangら（2006）⁴⁾は，牛の胸最長筋筋内脂肪含量と筋内脂肪面積との間に $r=0.71$ （ $n=51$ ），Kuchidaら（2000）⁵⁾は， $r=0.98$ （ $n=158$ ）の相関を示し，画像解析値から筋内脂肪含量を予測される可能性を示している。

3.3 牛枝肉切開面の脂肪交雑における画像解析法

全面トレース法とスポット法で測定した脂肪面積比の関係をTable 2に示した。すべての同一筋肉内において全面法と各スポット法は高い相関（最小値 $r=0.89$ ～最大値 $r=0.97$ ）を示した。すなわち，牛枝肉切開面の脂肪交雑測定においてスポット法は全面トレース法に十分代替され得ることが示された。

スポット法と比較し，全面トレース法では面積も測れるというメリットがあるものの，撮像装置が大型で，さらにマニュアル操作が必要で，時間がかかり，現場で即測定することができない。一方，スポット法では，小型化した撮像装置の製作が可能であり，マニュアル操作が不要なので，CPUを撮影装置に一体化させることにより瞬時に画像計測が可能となるだろう。

また，現在枝肉はBSEの観点から切開面が狭くなってきており，専用装置も薄型化が進んでいるものの撮影出来ない状況になりつつある。薄型の汎用スキャナーは，狭い切開面にも適用でき，価格も専用装置に比べて1/100以下である⁶⁾。スキャンに時間がかかるという欠点はあるものの，機器の発達に伴い，高速化が可能であり，高画質画像でなくても，十分対応できることから，今後，高速専用スキャナーの開発が望まれる。

3.4 豚肉の脂肪交雑に対する画像解析法の適用性

豚肉におけるマーブリングスコアと粗脂肪含量の相関係数は0.88であった（ $p<0.01$ ）。この強い相関がみられたのは，このマーブリングスコアの基準自体が，新たに粗脂肪含量をもとに作成されたものであるためであり，そのことを裏付ける結果となった。なお，牛肉においてマーブリングスコアと粗脂肪含量の相関係数を，井上ら（2002）⁷⁾は $r=0.79$ ，Brackebuschら⁸⁾は $r=0.88$ と報告している。ただし，豚肉の脂肪含量は1～10%強であるが，牛肉ではその数倍，和牛肉ではその10倍（最高のもものでは50%を超える）脂肪を含んでいるが，ほぼ同様の結果となった。

全面法（Fig.3）における脂肪面積比と粗脂肪含量およびマーブリングスコアの相関式とその係数は下記に示す通りとなった。なお，スポット法では脂肪面積比との相関が粗脂肪含量で0.49，マーブリングで0.48と低下した。

$$Y(\text{脂肪面積比}) = 0.02 \times (\text{粗脂肪含量}) + 0.10 \quad (n=50, r=0.74)$$

$$Y(\text{脂肪面積比}) = 0.03 \times (\text{マーブリングスコア}) + 0.07 \quad (n=50, r=0.71)$$

Faucitanoら（2005）⁹⁾は，色の淡い豚肉の筋内脂肪量を推定する方法として，ホルムアルデヒドで固定し，オイルレッドで染色した後，画像解析を適用している。その際の脂肪面積と筋内脂肪含量の関係は $r=0.60$ であった。今回は，現場で適用できるように前処置を一切行わなかったが，全面トレース法で0.71～0.74の相関を得た。つまり，汎用スキャナーを用いて良好な画像を得，さらに適切な平坦化強度と全面トレース法を行えば，染色などの前処理なしで，画像解析法により筋内脂肪含量が推定できることが分かった。

なお，豚肉においては，スポット法における相関係数は，3カ所平均値でそれぞれ0.49および0.48

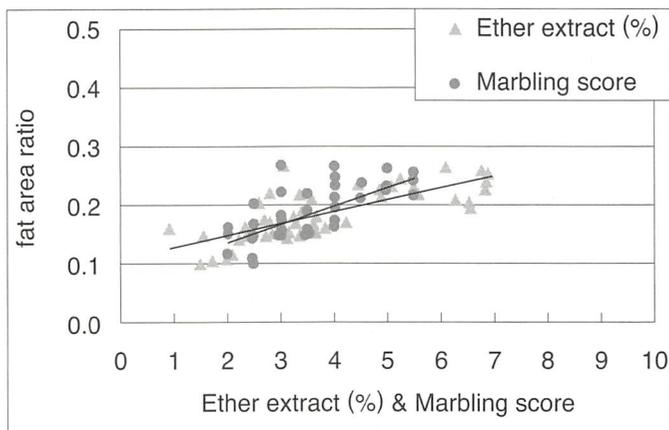


Fig.3 Relationship between ether extract & pork marbling score and fat area ratio calculated with computer image analysis of *M. longissimus thoracis* on whole area.

となり、1カ所スポット法では、それぞれ0.34, 0.34となった。全面法と比較して、スポット法の精度が低下した原因は、特に体長1/2部位の粗脂肪含量が中程度の豚肉は、筋内脂肪が脊柱側に偏って観察される特徴的なものが多かったためではないかと思われる。牛において、胸最長筋の筋内脂肪の沈着は、腹側で優先的に起るとの報告⁴⁾があり、豚でも、脂肪の沈着部位に優先順位があるのだろう。スポット回数が少なくなるにつれ推定精度が低下する傾向にあったので、スポットの直径をやや小さくし、測定カ所を増やせば、精度は向上するのではないかと考えられた。

4. 要 約

牛肉と豚肉を用いて、脂肪交雑と脂肪含量の客観的かつ迅速な評価法を確立するため、安価な汎用撮影装置と市販ソフトを用いた迅速な画像解析法を検討した。2カ所の食肉市場でデジタルカメラを用いて、牛枝肉切開面の画像、計82頭分を得た。画像解析ソフト (Image-Pro PLUS) を用い、胸最長筋、背半棘筋、頭半棘筋、僧帽筋に対して平坦化処理を行い、脂肪領域を抽出し、筋肉面積と、筋肉面積当たりの脂肪面積比を画像計測した。また、筋肉切断面全体をトレースした全面法と切断

の一部分を測定するスポット法を比較検討した。牛肉のスポット法では、胸最長筋3~5カ所、背半棘筋2カ所、頭半棘筋1カ所、僧帽筋2カ所で円形画像を抽出した。次に、LWD三元交雑豚50頭分から体長1/2部位、5-6胸椎間の胸最長筋を採取し、汎用スキャナーで画像を採取し、全面法とスポット法 (直径4cm 3カ所、5.5cmで1カ所) を比較検討した。さらに、豚肉のマーブリングおよび粗脂肪含量を測定し、画像解析値との関係を調査した。安価で小型の汎用撮像装置 (デジタルカメラ、薄型スキャナー) でも画像解析法 (特に平坦化処理) を工夫することによって、牛肉でも豚肉でも良好な2値化画像が得られた。牛の胸最長筋に対する背半棘筋、頭半棘筋、僧帽筋の各相関係数は筋肉面積で0.63~0.81、脂肪交雑で0.69~0.73となった。また、牛脂肪交雑における全面法とスポット法の相関は $r=0.89\sim0.97$ となった。豚肉における全面法における脂肪面積比と粗脂肪含量およびマーブリングスコアの相関係数は、それぞれ0.74および0.71となり、スポット法では低下した。以上の結果は、汎用撮像装置を用い、処理に工夫をこらした画像解析法は食肉の脂肪交雑 (筋内脂肪含量) を予測する簡易で実用的な方法となること、牛肉脂肪交雑では簡易なスポット法は

全面法に代替できること，スキャナーを用いた簡易な方法でも豚肉のマープリングスコアや筋肉脂肪含量を予測するよい方法となることを示した。

本研究を行うに当たりご助力いただいた当研究室（現家畜改良センター）小平貴都子さんに厚く謝意を表します。

文 献

- 1) National Pork Producers Council (NPPC). Procedures to Evaluate Market Hogs. NPPC. Iowa.2001.
- 2) 撫年浩・アーサーボブカヌーア・増田恭久・平原さつき・藤田和久，日本畜産学会報，72, 313-320, 2001.
- 3) 口田圭吾・加藤浩二・鈴木三義・三好俊三. 日本畜産学会報，71, 305-310, 2000.
- 4) Yang XJ, Albrecht E, Ender K, Zhao RQ, Wegner J, Journal of Animal Science, 84, 3251-3258, 2006.
- 5) Kuchida K, Kono S, Konishi K, VanVleck LD, Suzuki M, Miyoshi S, Journal of Animal Science, 78, 799-803, 2000.
- 6) 入江正和・石塚謙，第101回日本畜産学会大会要旨，IX, 28-10, 2002.
- 7) 井上慶一・平原さつき・撫年浩・藤田和久・山内健治，日本畜産学会報，73, 381-387, 2002.
- 8) Brackebusch SA, McKeith FK, Carr TR, McLaren DG, Journal of Animal Science, 69, 631-640, 1991.
- 9) Faucitano L, Huff P, Teuscher F, Garipey C, Wegner J, Meat Science, 69, 537-543, 2005.

平成19年度助成研究調査一覧

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

単位：千円

| 整理番号 | 研究調査のテーマ | 継続年度 | 代表研究者 | | 助成金額 |
|------|---|-------|--------|------------------|--------|
| | | | 代表研究者名 | 所属機関 | |
| 研 3 | 異常プリオン分解酵素（プリオナーゼ）阻害剤の検索とソーセージ製造への応用 | H.18～ | 岡 達三 | 鹿児島大学農学部 | 800 |
| 研 9 | ブタ軟骨コラーゲンの経口摂取が成長期マウスの骨形成に及ぼす影響 | | 福永 重治 | 北海道大学大学院農学研究院 | 800 |
| 研 10 | 食肉タンパク質のS-ニトロシル化と量的変化に及ぼす発色剤の影響について | | 若松 純一 | 北海道大学農学部 | 800 |
| 研 11 | 食肉製品による認知能改善メカニズムの解明・重鉛の効果 | H.18～ | 横井 克彦 | 聖徳大学大学院人間栄養学研究科 | 800 |
| 研 17 | 動脈硬化予防能を有する機能的食肉の開発 | H.18～ | 上曾山 博 | 神戸大学大学院農学研究院 | 800 |
| 研 18 | 食肉製品のテクスチャーと食肉タンパク質ゲル物性との関連性について | | 芳賀 聖一 | 名城大学農学部 | 800 |
| 研 19 | 低温増殖性乳酸菌を接種した豚肉におけるタンパク質分解挙動 | | 林 利哉 | 名城大学農学部 | 1,000 |
| 研 20 | 筋肉色素ミオグロビンのアイソフォームの性状解明に基づいた食肉の変色抑制に関する研究 | | 落合 芳博 | 東京大学大学院農学生命科学研究科 | 800 |
| 研 22 | L-カルニチン摂取の癌性悪液質に及ぼす影響 | | 福永 健治 | 関西大学化学生命工学部 | 800 |
| 研 47 | 食肉・食肉製品のトランス脂肪酸含量調査 | | 河原 聡 | 宮崎大学農学部 | 1,000 |
| 研 52 | 食肉の栄養価、食味性に関連する脂肪交雑、脂肪含量の迅速非破壊評価法 | | 入江 正和 | 宮崎大学農学部 | 800 |
| 研 64 | 牛肉エキスに含まれる筋肥大因子に関する研究 | | 水野谷 航 | 九州大学大学院農学研究院 | 800 |
| 合 | | 計 | 12件 | | 10,000 |

食肉に関する助成研究調査成果報告書

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

平成19年度 (Vol. 26)

2008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 〒105-0001

仙石山アネックス 501

5-3-20 Toranomom, Minato-ku,

(Sengokuyama-Annex 501)

TOKYO JAPAN 105-0001

TEL : 03 (3434) 1186

FAX : 03 (3434) 1256

印刷・製本——株式会社 三 恭 社

<非売品・無断禁転載>

財団法人
伊藤記念財団