

財団法人伊藤記念財団 保存版

財団法人 伊藤記念財団
平成6年度委託事業

「食肉の機能性に関する
予備調査研究委託事業Ⅱ」

実績報告書

平成7年3月

食肉の機能性研究会

目的：多くの食品の中で食肉には栄養機能、嗜好機能以外にも特有な活力・精力の増強あるいは疲労回復など生体機能への影響、いわゆる食品の第三次機能のあることが期待される。

昨年度の予備調査においては、鶏肉、豚肉、牛肉の三種類を食肉試料群とし、ラットを用いた運動生理学及び免疫学的なスクリーニング試験を実施した。しかし、試験区数が多いことから各試験における実験動物個体数が制限され、対照群（カゼイン）との比較検討を行う上で十分な量のデータが得られなかった。

今回は試料として食肉の中でも活力イメージの高い牛肉に絞ることにより十分なラット個体数を確保した上で、ストレス負荷後の疲労回復及びエネルギー代謝、免疫機能に及ぼす牛肉の影響について検討を行った。

材料および方法：

1. 試料：Table 1に示す各飼料成分（オリエンタル酵母精製飼料）を配合し試験試料とした。この配合表においては、カゼイン混餌群のカゼイン（蛋白含量84.3%）25部中の蛋白量は21.1部であり、この蛋白量に相当する牛肉粉末（蛋白含量69.2%）を31部とした。また、牛肉粉末（脂肪含量22.5%）31部中の脂肪量は7部であり、この脂肪量に相当する牛肉混餌群の植物油6部をゼロとしてカロリー調整を行ったが、両群の差分1部については、試験全体に及ぼす影響は少ないと考え、他成分の補正は行わなかった。なお、牛肉は国産ホルスタインのリブローズから脂肪及び結合組織を極力除去したものを使用した。牛肉は細挽きして真空パックし、湯水中で80℃ 30分間加熱殺菌後、氷水中で冷却し-30℃で急速凍結した。凍結した牛肉は0.45~0.6 Torrの真空度で20時間、真空凍結乾燥して試験に供した。この凍結乾燥牛肉及び予めUV照射滅菌された市販の飼料成分は乳鉢を用いて粉末化し、V型混合機（ダルトン社製）にて混合し、試験飼料を調整した。

2. 動物：実験には、日本チャールス・リバー株式会社厚木飼育センター生産のCrj:CD (Sprague-Dawley) ラットを、雌雄いずれも3週齢で購入（雌40匹、雄20匹）し、使用した。入荷した動物は馴化のため1週間予備飼育し、その間粉末飼料（カゼイン対照群飼料）および水道水を自由に摂取させた。動物は、温度24 ± 1℃、相対湿度55 ± 5%、照明12時間（午前7時~午後7時）に条件設定されたバリアーシステムの飼育室で個別に飼育し、予備飼育後は、それぞれの試料配合飼料および水道水を自由に摂取させた。なお、予備飼育後、体重別層化無作為抽出法を用いて、各群に雌20匹、雄10匹のラットを配分した。

3. 検査・測定：

3-1. 体重および摂餌量：試験期間中、毎週2回、体重および摂餌量を測定した。なお、摂餌量は給餌量と残餌量の差として求め、1匹あたりの24時間の飼料摂取量とした。

3-2. 回転棒テスト(ROTA-ROD)：6週齢（試料供給開始後10日）に実施した。水温23℃の水槽で3分間強制遊泳させ、5分間の休息後、回転棒（直径 10 cm、7.5 回転/分）上を歩かせた。5分間を限度とし、その間の落下回数および落下までの時間を観察した。

3-3. 懸垂テスト：水温23℃の水槽で3分間強制遊泳させた後、直ちに、直径3 mm の針金に懸垂させ、30秒を限度として落下までの時間および休息態勢の可否を観察した。

3-4. 腹腔マクロファージの貪食能検査：腹腔滲出細胞 (PEC) は、ラットをエーテル吸入により致死させた後、腹腔内にハンクス液 20 ml を注入し、腹壁をマッサージした後回収し、さらにハンクス液で2回腹腔内を洗浄して採取した細胞を合わせて用いた。貧食の対象物として、抗ヒツジ赤血球抗体（抗 SRBCIgG）で感作したヒツジ赤血球 (EA) を用いた。SRBCを凝集しない最低希釈倍率にゼラチンベロナール緩衝液で希釈した抗SRBCIgG 1容と、2% SRBC 1容を37℃で30分間反応させ、3回洗浄したものをEAとして用いた。貪食能の測定の目的で、滅菌したカバーガラスが挿入されているペトリディッシュに上記PEF の 1×10^6 /mlハンクス液浮遊液を2 ml注ぎ、5%CO₂インキュベータ内で37℃30分間培養した後、温ハンクス液で非付着細胞を除去し、付着細胞を得た。RPMI-1640 培地に懸濁した1%EA浮遊液を2.5 ml各ディッシュに注ぎ、5%インキュベータ内で37℃60分間培養し、貧食させた。培養終了後、貪食されなかったEAを洗浄除去した。つぎに、カバーガラスを無水メタノールに漬けて付着細胞を固定した後、風乾してギムザ染色後スライドガラスにカバーガラスを封入固定し、鏡検した。各個体のマクロファージ1個あたりに貪食されたEA数を求めた。

3-5. 抗体産生細胞の測定 (Plaque forming cell, PFC)：ヒツジ赤血球 (SRBC) に対する一次応答性の脾内抗体産生細胞をJerneの方法に準じてプラーク産生細胞PFCとして測定した。SRBC（日本バイオテスト株式会社）を生理食塩液で洗浄後、1%浮遊液としラットに0.5 ml 静脈内投与し感作した。感作4日後にエーテル吸入により致死させた後、脾臓を摘出しピンセットを用いてRPMI-1640 培地に脾細胞を浮遊させた。 2×10^6 個/ml に調整した脾細胞浮遊液 0.5 ml、洗浄した50% SRBC 浮遊液0.05 ml および2倍希釈したモルモット補体0.05 ml を混合し、カニングム溶血斑形成チェンバーの各室に約0.035 ml注入した。溶融したパラフィンでチェンバーを封入後、37℃に設定したインキュベータ内で60分間反応させた。反応終了後、各室のPFCを数え、6室の平均値を求

めた。さらに脾細胞10⁶個当たりのPFC数に換算した。

3-6. グルコースおよびトリグリセライド濃度測定：最終飼料供給の週に、強制遊泳の前後で、尾静脈よりヘパリンを抗凝固剤として採血し、遠沈後、plasma中のグルコースおよびトリグリセライド濃度を測定した。

3-7. 細胞内ATP量の測定：最終飼料供給の週に、強制遊泳の前後で、尾静脈よりヘパリンを抗凝固剤として採血し、1300 rpmで5分間遠心後、沈殿層から赤血球を回収し、生理食塩水で1000倍に希釈後、血球計算板により血球数を計測し、培養液で5x10⁶ cells/mlに調整した。小ガラス管に1 mlの血球浮遊液を分注し、CO₂ インキュベーター内にそれぞれ24, 48, 72時間静置した。培養した血球浮遊液 50 μlのATP放出試薬(NRS; ルーマック社)を加え、15秒攪拌した後、50 μlの発光試薬(ペーリンガー社)を加えて攪拌し、バイオカウンターM1500(ルーマック社)を用いてATPを定量した。

3-8. 器官重量：採血後に、剖検し、胸部および腹部の主要器官の異常の有無を調べた。さらに、心臓、肺、肝臓、脾臓、副腎および腎臓の重量を測定した。

実験の結果：

1. 体重：雌動物では、牛肉混餌群において飼料供給開始後3日から剖検まで継続して、対照群(カゼイン混餌群)と比較して有意に増加した(Table 2)。雄動物では、両群は、ほぼ同様に推移し、両群間に統計学的有意差は認められなかった(Table 3)。

2. 摂餌量：1日あたりの飼料摂取量を測定したところ、雌動物では牛肉混餌群において試料供給開始後7~8日以降21~22日までの間に、対照群と比較して有意に増加した(Table 4)。雄動物では、牛肉混餌群の試料摂取量は、対照群と比較して、やや低値で推移した(Table 5)。

3. 回転棒テスト(ROTA-ROD)：雌動物について実施したテストでは、強制遊泳後、回転棒を歩行できた動物の頻度は、対照群72.2%(13/18匹)、牛肉混餌群86.4%(19/22匹)、平均落下回数は、対照群1.8回、牛肉混餌群1.3回で、いずれも牛肉混餌群の方が成績が良好であった(Table 6)。

4. 懸垂テスト：雌動物については、3および4週に、雄動物については毎週実施した。雌動物では、いずれの検査週においても、落下までの時間(秒)および休息姿勢を示した動物の頻度とも、牛肉混餌群の方が対照群より成績が良好であった(Table 7)。雄動物では、試料供給開始後、いずれの検査週においても牛肉混餌群の方が、落下までの時間

および休息姿勢を示した動物の頻度とも良好であった (Table 8)。

5. 腹腔マクロファージの貪食能検査および抗体産生細胞の測定：腹腔マクロファージの貪食能の検査では、牛肉混餌群では1細胞当たり平均25個以上のE. coli Bを貪食したマクロファージの数が対照群と比較してやや増加したが、統計学的有意差は認められなかった。抗体産生細胞の測定では、牛肉混餌群において脾細胞 10^6 個当たりのPFC数が明らかに減少した (Table 9, 10, Fig. 1)。

6. グルコースおよびトリグリセライド濃度の測定：遊泳前後での血糖およびトリグリセライド値の変化に及ぼす牛肉混餌の影響を検討したところ、血糖値に関しては、牛肉混餌群と対照群との間に差は認められなかった。トリグリセライドについては、遊泳前および遊泳後の値は、いずれも牛肉混餌群が対照群より高く、低下の程度は、対照群の16.0 mg/dl に対し、牛肉混餌群は85.4 mg/dl であった (Table 11)。

7. 細胞内ATP量の測定：強制遊泳前後における赤血球中のATP含量の増加は、カゼイン混餌群の40 nmol/mlに比較して、牛肉混餌群で110 nmol/mlと高値であったが、両群間に統計学的有意差は認められなかった (Table 12)。

8. 剖検および器官重量の測定：剖検では、いずれの器官にも異常は認められず、また測定したいずれの器官の比体重値にも、カゼイン混餌群と牛肉混餌群との間に有意差は認められなかった (Table 13)。

結語

1. 牛肉混餌により、雌ラットではカゼイン混餌より体重は有意に増加した。雄ラットでは、先の予備検討 (平成6年度) の結果と同様、牛肉混餌群はカゼイン混餌群と同様に推移した。また、摂餌量の体重推移と同様、雌ラットの場合、牛肉混餌群はカゼイン混餌群より増加したが、雄ラットでは、逆にカゼイン混餌群のほうが高値で推移した。

2. 強制遊泳後、疲労回復の指標として行った回転棒テストおよび懸垂テストでは、雌雄ラットとも、牛肉混餌群のほうが成績は良好であったことから、牛肉に抗疲労作用のあることが認められた。

3. 腹腔マクロファージの貪食能の検査では、牛肉混餌群とカゼイン混餌群との間に明らかな相違は認められなかった。抗体産生細胞の測定 (PFC) では、牛肉混餌群においてPFC数が減少したことから、牛肉混餌により免疫機能が抑制された可能性が示唆された。しかしながら、PFCのコントロールデータは通常、200~1000 / 10^6 の範囲である

ことから、本実験においてはカゼイン混餌群の値が高く、牛肉混餌群の値が正常値に近いと考えられる。

4. 強制遊泳前後の血糖およびトリグリセライドの変化を検討したところ、血糖については、遊泳前後とも牛肉混餌群とカゼイン混餌群との間に差は認められなかった。トリグリセライドについては、遊泳前後とも牛肉混餌群の方がカゼイン混餌群より高値であり、遊泳による低下も牛肉混餌群の方が著しかった。

5. 細胞内ATP量については、カゼイン混餌群と比較して牛肉混餌群のほうが強制遊泳による増加は高値であったが、両群間に有意差は認められなかった。

6. 内部器官には、カゼイン混餌群および牛肉混餌群とも異常は認められなかった。

本実験から牛肉の抗疲労効果を、行動薬理学的に確認できた。しかし、牛肉の、エネルギー代謝に及ぼす影響ならびに免疫機能の強化の有無については確認されなかった。

Table 1. 試料成分

成分	牛肉混餌群	カゼイン混餌群
コーンスターチ	38	38
カゼイン	–	25
牛肉（赤肉部）粉末	31	–
アルファー澱粉	10	10
セルロースパウダー	8	8
植物油	–	6
ミネラル類	6	6
グラニュー糖	5	5
ビタミン類	2	2
計	100	100

Table 2. 雌の体重推移 (g, mean ± S. D.)

群	試料供給 開始時	3日	7日	10日	14日	17日	21日	25日
カゼイン N=23	99.3 4.9	112.3 5.4	128.5 6.8	136.3 8.1	148.5 9.2	152.9 9.9	163.8 10.8	173.9 12.0
牛肉 N=22	100.0 4.6	116.4* 5.9	135.0** 7.6	145.5** 10.5	158.7** 11.8	166.1** 12.4	178.3** 14.1	188.9** 14.6

* : Significant difference from control, $p < 0.05$ ** : Significant difference from control, $p < 0.01$

Table 3. 雄の体重推移 (g, mean ± S. D.)

群	試料供給 開始時	3日	7日	10日	14日	17日	21日	24日	28日	31日	35日	43日
カゼイン N=10	134.6 8.9	144.7 11.1	175.5 12.7	197.6 15.1	228.0 16.2	251.3 18.7	284.2 20.2	303.2 20.8	321.4 18.9	342.7 24.2	362.6 25.6	391.6 28.8
牛肉 N=10	130.7 11.5	145.6 12.5	173.5 15.3	196.9 18.1	224.4 19.6	244.4 19.9	271.3 21.0	290.4 24.6	305.4* 23.7	318.1* 24.5	340.4 28.7	361.9 36.5

* : Significant difference from control, $p < 0.05$

Table 4. 雌の試料摂取量 (g, mean ± S. D.)

群	0～1日	3～4日	7～8日	9～10日	14～15日	16～17日	21～22日	24～25日
カゼイン N=23	11.8 1.8	13.8 1.2	10.7 2.4	12.4 1.6	13.2 1.7	10.7 2.1	13.7 1.9	14.0 2.3
牛肉 N=22	11.2 2.5	15.3 1.3	12.8** 2.6	14.1* 2.7	14.5** 1.4	13.3** 1.9	16.0* 3.5	14.9 1.7

* : Significant difference from control, $p < 0.05$

** : Significant difference from control, $p < 0.01$

Table 5. 雄の試料摂取量 (g, mean ± S. D.)

群	0～1日	3～4日	7～8日	10～11日	14～15日	17～18日	21～22日	24～25日	28～29日
カゼイン N=10	15.9 1.3	17.5 1.4	18.4 1.4	20.6 3.0	22.6 2.4	22.4 1.3	23.0 1.0	22.4 2.2	24.3 2.3
牛肉 N=10	15.6 1.2	17.3 1.5	18.8 1.9	20.3 1.3	20.1 1.6	20.6 2.2	22.7 3.3	19.2 2.2 (N=9)	24.2 2.6 (N=9)

Table 6. 回転棒テスト

試験項目	カゼイン混餌群	牛肉混餌群
回転棒を歩行できた動物の頻度 (%)	72.2 (N=18)	86.4 (N=22)
5分以上歩行を継続した動物の頻度	69.2 (N=13)	63.2 (N=19)
平均落下回数	1.8 (N=13)	1.3 (N=19)

水槽（水温23℃）中で、3分間遊泳させ5分間の休息後、一定速度で回転する棒上にラットを乗せ、落下するまでの時間と落下動物の頻度、また落ちたらすぐに乗せることを繰り返して、一定時間内に回転棒上から落下する回数を測定した。但し1試行を5分とした。

Table 7. 雌の懸垂テスト

雌 試験項目	試料供給	
	3週	4週
平均落下時間 (sec)		
カゼイン混餌群	22.4 ± 8.0	18.4 ± 10.8
牛肉混餌群	24.6 ± 8.9	20.3 ± 10.6
休息姿勢を示した動物の頻度 (%)		
カゼイン混餌群	60.0	56.5
牛肉混餌群	86.7	59.1

水槽 (水温23℃) 中で、3分間遊泳させた後、直ちに針金 (直径3mm) に懸垂させ、休息姿勢の可否および落下時間を観察した。但し、観察時間は30秒とした。

Table 8. 雄の懸垂テスト

雄 試験項目	試料供給				
	0週*	1週	2週	3週	4週
平均落下時間 (sec)					
カゼイン混餌群	18.10 ± 8.32	11.93 ± 7.75	8.00 ± 4.70	9.35 ± 5.88	12.62 ± 7.52
牛肉混餌群	13.37 ± 5.73	15.05 ± 9.73	8.87 ± 6.06	11.62 ± 10.38	14.84 ± 11.35
休息姿勢を示した動物の頻度 (%)					
カゼイン混餌群	60	10	10	10	20
牛肉混餌群	20	40	20	20	40

*：試料供給開始前に遊泳による負荷をかけず懸垂テストをおこなった。

水槽 (水温23℃) 中で、3分間遊泳させた後、直ちに針金 (直径3mm) に懸垂させ、休息姿勢の可否および落下時間を観察した。但し、観察時間は30秒とした。

Table 9 Phagocytosis of EAs by macrophages in SD rats fed with beef diet for 4 weeks.

Diet	N	Percent of total macrophages			
		0	1-9	10-24	>25
Control	10	26	49	5	20
Beef diet	10	23	41	4	32

Examined by immunotoxicological lab.

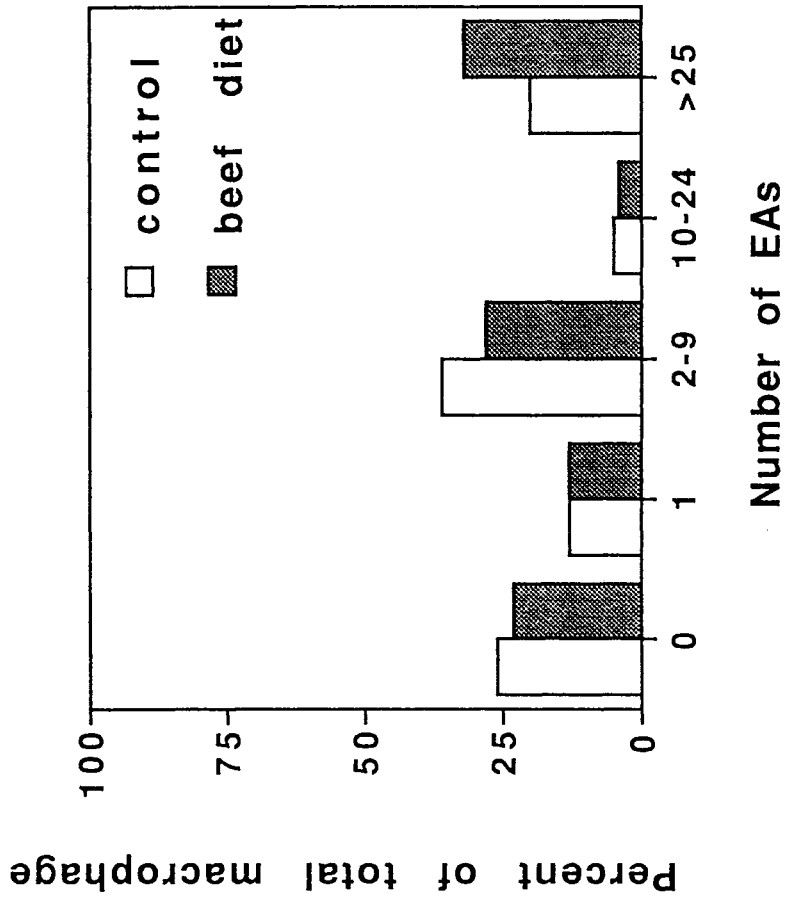


Fig. 1 Phagocytosis of EAs by macrophages in SD rats fed with beef diet for 4 weeks

Examined by immunotoxicological lab.

Table 10 Primary PFC response to SRBC in SD rats fed with beef diet for 4 weeks.

Diet	N	Spleen weight (mg)	PFC/10 ⁶
Control	13	491 ± 80.8	2086 ± 793
Beef diet	12	450 ± 70.3	972 ± 510**

Mean ± S.D. ** Significant difference from control (p < 0.01).

Examined by immunotoxicological lab.

Table 11. 強制遊泳前後におけるグルコースおよびトリグリセライド値

	遊泳前	遊泳後
グルコース (mg/dl)		
牛肉混餌群	127.5 ± 2.3	96.6 ± 5.9
カゼイン混餌群	128.9 ± 2.6	103.4 ± 6.1
トリグリセライド (mg/dl)		
牛肉混餌群	238.3 ± 38.2	152.9 ± 27.0
カゼイン混餌群	148.4 ± 12.2	132.4 ± 18.1

Table 12. 強制遊泳前後における赤血球中のATP含量

	遊泳前 (nmol/ml)	遊泳後 (nmol/ml)
カゼイン混餌群	218.7 ± 33.6	258.2 ± 31.0
牛肉混餌群	184.4 ± 41.6	294.8 ± 91.5

Table 13. Organ weight of males

	カゼイン混餌群	牛肉混餌群
Terminal body weight (g)	391.6 ± 28.8 a)	361.9 ± 36.5
Heart (g)	1.09 ± 0.06 b) 0.28 ± 0.02 c)	1.04 ± 0.11 0.29 ± 0.03
Lung (g)	1.30 ± 0.08 0.33 ± 0.03	1.19 ± 0.21 0.33 ± 0.06
Liver (g)	17.6 ± 1.9 4.49 ± 0.27	14.7 ± 1.8 4.07 ± 0.31
Kidney (g)	3.43 ± 0.31 0.88 ± 0.05	2.95 ± 0.31 0.82 ± 0.06
Adrenal (mg)	54.1 ± 9.3 13.8 ± 1.8	52.5 ± 6.0 14.6 ± 2.3
Spleen (g)	0.75 ± 0.11 0.19 ± 0.02	0.65 ± 0.10 0.18 ± 0.02

a): Mean±S.D.

b): Absolute weight

c): Relative weight (g or mg per 100g body weight)