

平成20年度
食肉に関する機能成分等の調査研究事業
委託研究報告書

平成 21 年 3 月

財団法人 日本食肉消費総合センター

はじめに

当センターは、米・野菜・魚を中心とした伝統的な食生活に、肉・牛乳・果実等を加えた多様でバランスのとれた日本型食生活の定着が望ましいとされた「80年代の農政の基本方向」の中で、昭和57年(1982年)3月に設立されました。

食肉の利用法や栄養と食肉成分の健康への関わりなどについて、消費者の方々に正しい知識を提供して、食生活の向上を図るとともに、食肉の生産・流通・販売に携わる方々にも、有用な情報提供その他の支援を行い、食肉の消費普及に資することを目的としてきました。

様々な食肉の栄養・機能等が明らかになってきている中で、最近では、食肉のマイナス面であると言われてきた成分が、人体にとって有用な機能を持つことが次々と解明されています。食肉の持つ栄養・機能等未だ明らかになっていない人体への効用を積極的に調査研究をしていただくため、平成19年度から大学等の学術研究機関への委託研究を開始いたしました。今年度は7編の研究が採択され、この度、研究成果がまとまりましたので、ここに取りまとめ、今後の研究のためのヒントなど、食肉にとっての更なる有用な研究に活用していただきたいと存じます。

おわりに、本委託研究に鋭意取り組まれた諸先生方、委託研究テーマを選考・講評いただきました委託研究選考委員会には、心から感謝の意を表します。

財団法人 日本食肉消費総合センター
理事長 田 家 邦 明

目 次

- 1 海藻、甘草の飼料添加給与が豚肉の保水性に及ぼす効果の原因解析
東北大学大学院農学研究科資源生物科学専攻 教授 鈴木啓一 3
- 2 たんぱく質の上限量は運動時の摂取タイミングによって上昇するか
大阪体育大学大学院スポーツ科学研究科 教授 岡村浩嗣 13
- 3 食肉由来生理活性ペプチドの生活習慣病予防効果について そのⅡ
宮崎大学農学部 食品機能化学講座 教授 六車三治男 35
- 4 バイオ燃料副産物からの食肉抗酸化ペプチドの開発
京都府立大学生命環境学部 食保健学科助手 朴恩榮 53
- 5 ヒスチジン含有ジペプチドによる脳神経機能に関する研究
静岡県立大学食品栄養科学部及び同大学院生活健康科学研究科 教授 横越英彦・・69
- 6 高齢者の蛋白質と葉酸の栄養改善
女子栄養大学 副学長 香川靖雄 83
- 7 新規形態食肉商品（飲む食肉）の開発とその機能性に関する研究
北海道大学大学院農学研究院 准教授 西邑隆徳 103
- 講評 109

海藻、甘草の飼料添加給与が豚肉の 保水性に及ぼす効果の原因解析

東北大学大学院農学研究科資源生物学専攻

動物生産科学講座 動物遺伝育種学分野

鈴木啓一

1. はじめに

食肉の保水性は食味の多汁性に関連する重要な肉質形質の一つであり、加工製品の肉重量の損失、店頭での見栄えとも密接に関連する重要な形質である。国外では加工豚肉が多く、保水性が高いと歩留まりが悪く経済的損失も大きい。そのため、特に保水性に関与する単一の遺伝子である *ryr1* 遺伝子や RN 遺伝子との関連で保水性の研究が行われている。しかし、一般に肉の保水性は遺伝率が低く、遺伝的影響よりも環境条件により左右される形質であることが明らかにされている (Suzuki ら 2005)。海藻添加給与により保水性が高まる報告 (鈴木、2002) があるが、保水性に関する研究は少ないのが現状である。

われわれはこれまで海藻 (乾燥ワカメ茎) の添加給与が肉の保水性を高めること (鈴木ら、2002)、また、免疫機能を高める効果もあることを明らかにした (鈴木ら、2009)。一方、甘草は、マメ科・グリチリザ属の植物で、薬用や食品として使われている。甘草の成分であるグリチルリチンの機能としての界面活性作用、抗炎症作用や、ステロイドなどのホルモンバランスを整える作用、免疫応答の改善作用、免疫能や肝機能を高める効果があることが知られている (寺田 2003)。そこで本研究では、海藻、甘草を飼料に添加給与した豚の免疫能、豚肉の保水性や物理的特性、血液一般成分と保水性との関連を調査し、保水性を高める機構を解明することを目的とした。

2. 材料と方法

豚ランドレース種去勢子豚を 24 頭導入した。これらの豚は、宮城県及び福島県で系統造成された豚それぞれ 12 頭ずつである。体重 20kg 前後で導入後、通常の飼料添加区 (対照区)、海藻 0.8% 添加給与区 (海藻区)、甘草 0.15% 添加給与区 (甘草区) の 3 群に分け群飼した。体重 40kg から海藻、甘草を飼料に添加して給与し、110kg まで肥育し、その後食肉市場に出荷した。なお、本試験に用いた海藻は褐藻類ヒバマタ目ヒバマタ科ヒバマタ属に属するアスコフィラムノドサム (*Ascophyllum nodosum*) を主成分とするアルギフローラと呼ばれる栄養補給飼料である。また、甘草は、株式会社田村薬草グループより提供されたものである。この間、体重 70kg 前後まで定期的に採血し、各種免疫能と血液一般成分を測定した。

免疫形質は、総白血球、顆粒球・リンパ球比率、食細胞活性、補体別経路活性、羊赤血球特異的抗体産生能、末梢血リンパ球の CD4⁺、CD8⁺割合、コルチコイド濃度である。試験開始 30 日後 (121 日齢) に一度目、さらにその一週間後 (128 日齢) に二度目の羊赤血球 (sheep red blood cell : SRBC) を 10⁹ 個/mL を 0.1mL 耳介部の皮内に注射した。採血は、試験開始時点 (海藻および甘草添加飼料給与開始時点 : 87 日齢) と、一度目の SRBC 接種時 (121 日齢)、さらに二回目の SRBC 接種 1 週間後 (128 日齢) と、翌日、翌々日および 1 週間後 (135 日齢) の計 6 回行った。SRBC を二度接種したのは、抗原刺激後の二次応答における抗体産生は、最初の抗原刺激後の抗体産生と比較すると産生される抗体の抗体価が高く、IgG が主に産生されるため (小端と奥村 2000) である。採血後の全血は総白血球数測定用として EDTA2 ナトリウム入り真空採血管、その他の免疫形質測定用にヘパリンナトリウム入り真空採血管に分注し、分注後は穏やかに攪拌し、氷冷した。ヘパリンナトリウム入り真空採血管の全血は貪食能活性と総白血球数の測定、また顆粒球とリンパ球の比率を測定するための塗沫標本作りに使用した。全血による免疫形質の測定後、血液は 720xg、4°C の条件下で 10 分間遠心し、分離した血漿を -80°C で保存した。血漿を使用する際は常温で溶解させ、溶解後は速やかに測定に用いた。免疫能の測定は次のとおりである。総白血球数は自動血球計測器を用いて測定した。また、末梢血の好中球、マクロファージなどの貪食細胞がザイモザンを貪食し、破壊しようとする時に発

生ずる活性酸素種によって起こる発光をルミノールで増幅し、ケミルミネセンスディテクターを用いてその相対発光総量 (Relative Light Unit : RLU) を測定し食食能とした。顆粒球とリンパ球比率は血液塗抹標本を作製し、リンパ球数に対する顆粒球数の割合を算出した。補体第二経路活性はウサギ赤血球に対する溶血反応を用いて評価した。まず EGTA-GVB を試験管に 300 μ L ずつ入れ、血漿を 100 μ L 加え、さらにウサギ赤血球浮遊液を 150 μ L 加える。37°C で 40 分間インキュベートした後、氷冷された EDTA-GVB を 4.05mL 加え、2000rpm で 10 分間遠心分離し、413nm で吸光度を測定した。抗体産生能の測定は SRBC を抗原として、血漿中の抗 SRBC 抗体の濃度を酵素抗体法 (ELISA 法) によって測定し、抗体産生能の強さ (SIgG) とした。その際、単位は力価 (Titer) として表した。また、リンパ球 T 細胞に占める CD4+、CD8+ はフローサイトメーターを使い測定した。

血液一般成分の分析のうち、肝臓機能の指標としての γ GTP、GOT、GPT の測定は (株) SRL 社に依頼した。また、他の血液成分は携帯型簡易生化学システム機器を使い測定した。測定した形質は、アルカリフォスファターズ、アラニンアミノトランスフェラーズ、アミラーズ、クレアチニン、グルコース、ビリルビン、総タンパク質、尿素態窒素、アルビミン、カルシウム、ナトリウム、カリウム、リン濃度である。

体重 70kg (約 135 日齢) 以降も海藻及び甘草を添加給与し、体重が 110kg を越えた時点で食肉市場に出荷した。翌日と殺し、さらに 24 時間後に最後胸椎部位のロース肉 15cm 程度を引き取り、大学内で肉質の分析を行った。まず、ロース肉の約 100g スライスし、ドリップロス測定に用いた。重量を正確に測定後、針金に吊した肉片をプラスチックの標本ケースに入れ 4°C の冷蔵庫内に下げて 24 時間、48 時間後の生肉重量を測定し、減少量からドリップロスを算出した。さらに、スライス肉を採材後の胸最長筋から筋線維と平行に 2cm \times 2cm \times 6cm の肉片を 2 個採取し、それぞれの重量を正確に測定後ビニール袋に入れて 70°C の温湯に 30 分間入れて加熱した。さらに室温まで保冷後、水分を除去して再度重量を測定した。加熱前後の重量差を加熱前の重量で除して加熱損失率 (クッキングロス) とした。加熱後の肉片を筋線維の方向に沿って 1 \times 1 \times 5cm の長さに整形しタケトモ電機社製テンシプレッサーを用い肉の Tenderness (軟らかさ)、Pliability (柔軟性) と Toughness (ねばりづよさ) を測定した。測定は 1 つの肉片について 5 回、計 10 回行った。このテンシプレッサーでは外径 5.5mm、内径 5mm の中空丸形のプランジャーを用い、試料肉の筋線維方向に対し直角に 0.5mm の振幅で 0.04mm ずつ進入させ、約 10mm の試料肉に対し 250 回の動的粘弾性測定を繰り返しながら、少しずつ振幅中心を移動することにより試料を圧縮し、最終的には試料を破壊する積算微小変位測定法により食肉の物性を測定する。測定により得られた Tenderness (軟らかさ) は瞬間最大歪み応力であり、値が小さいほど軟らか肉であることを示す。また、Pliability (柔軟性、しなやかさ) はバネ応力面積値を変形応力面積値で割って得られる値であり、この値が大きいほど肉の柔軟性が優れることを示す。さらに、荷重と時間の積として計算される仕事量である Toughness は値が大きいほどねばりづよさ・噛みごたえがあることを示す。

得られたデータについて SAS の GLM プロシジャーを用い、ランドレース種の系統 (2 系統) と飼料区 (3 区) を要因とした分散分析と多重比較検定、形質間の相関解析を行った。

3. 結果及び考察

表 1 に対照区と海藻、甘草飼料添加給与区の体重、日齢、一日平均増体量、ロース肉のドリップロス及びクッキングロスを示した。甘草区は発育が優れる傾向が認められたが、いずれの形質とも統計的に有意な差は認められなかった。鈴木ら (2002) は、LWD 三元交雑豚を使い乾燥ワカメ茎 0.3% を飼料に添加し、体重 70kg から 105kg まで給与した結果、ドリップロスは差が認められなかった

が、クッキングロスが対照区の27.90%に対し、25.16%と2.7%も低下したことを報告した。また、鈴木らはデユロック種を使い、乾燥海苔を2%飼料に添加し体重70kgから105kgまで給与した結果、クッキングロスが対照区の26.0%に対し、24.4%と有意に低下したことを確認している(未発表)。これらの結果から海草に含まれる何らかの成分が保水性を高める効果を持つことが考えられたが、今回の試験では、クッキングロスについては有意な差が認められなかった。ワカメ茎や今回用いた海藻であるアスコフィラムノドサムには、アルギン酸やフコイダンなどの成分が含まれていること、海苔には葉酸、カロチンやEPAが多量に含まれているが、海藻の種類によりそれらの成分割合が異なることが明かとなっている(山田信夫、2004、2006)。ワカメ茎は通常メカブを採取した残りが廃棄されるためこれ入手して用いたが、大量に乾燥粉碎することは困難である。そこで、今回は、すでに飼料添加剤として販売されているアスコフィラムノドサムを主原料とするアルギフローラを用いた。しかし、海藻の種類により成分が異なりその違いが、保水性への影響の違いをもたらしていると考えられる。

表2には対照区と海藻、甘草飼料添加給与区のロース肉の物理的特性値であるTenderness(軟らかさ)、Pliability(柔軟性)、Toughness(頑強性)、Brittleness(もろさ)を示した。いずれの形質とも区間に有意な差は認められなかった。また、これらの物理的特性形質とドリップロス、クッキングロスとの間には有意な相関は認められなかった。Suzukiら(2006)は軟らかさとドリップロスおよびクッキングロスとの相関は0.02および0.19と報告しているが、肉の軟らかさは保水性と関連しないことが確認された。

表3には体重40kg前後(87日齢)から体重70kg前後(135日齢)までの対照区、海藻添加区、甘草添加区の各種免疫能を示した。海藻添加給与区は二度目の羊赤血球摂取後1週間目のIgG濃度が対照区比有意に高く、海藻添加給与により獲得免疫能が高まることが確認できた。海藻添加給与により獲得免疫能が高まることをすでに報告(鈴木ら、2009)しているが、本実験でも確認できた。また、甘草添加給与区ではコルチゾール濃度が全体として高い傾向が認められた。これは、甘草に含まれているグリチルリチン酸の化学構造がステロイドの構造とよく似ているため、ホルモン濃度を高めた可能性が示唆される。

表4にはIgA、IgMおよびリンパ球のCD4⁺、CD8⁺、CD3⁺割合を示した。甘草添加により二度目のSRBC接種後2日後にIgAが有意に高くなることが確認され、海藻添加区では、二回目のSRBC接種1週間後に対照区、甘草区と比べ有意に高い値を示した。さらに、甘草区は二回目のSRBC接種1、2日後にCD8⁺の割合が対照区、海藻区と比べ有意に低下した。甘草に含まれるグリチルリチン酸はIgE抗体の産生や炎症を促進する細胞の働きを抑える作用があると指摘されている(寺田、2003)。海藻、甘草添加給与した豚に異物としてSRBCを接種した際の各種免疫能の応答の詳細を検討するため、現在、白血球から抽出したRNAを用い各種サイトカインの遺伝子レベルでの発現解析を検討中である。

表5には、血液成分のうち、肝機能の指標である γ GTP、GOT、GPTおよびGOT/GPTの割合の変化を示した。対照区及び海藻区では羊赤血球摂取後、GOTが有意に高くなったが、甘草区では、変化が無く、肝機能を正常に保っていることが示唆された。またGOT/GPT割合は甘草区が対照区と比べ、有意に低い値を示した。甘草に含まれるグリチルリチン酸の作用としてC型ウイルス性肝炎の炎症を抑え、GPT(肝細胞障害の指標)の数値を低下させること、グリチルリチン酸は生体防御能を高め、抗腫瘍免疫を増強する(1型ヘルパーT細胞を活性化すること)などが指摘されている(Daiら2001)。豚の肝機能を高める効果が甘草の成分に含まれることを本研究の結果は示唆している。

肉の保水性と各種免疫能、血中成分濃度との相関を計算した。その結果、免疫能の血中コルチゾール濃度との間で有意な相関が認められた(表6)。全体として、ドリップロスとの間に正の相関

を示し、特に試験開始時点と羊赤血球接種2日目のコルチゾール濃度と、ドリップロス48時間との間では有意であった。その他、表には示さなかったが、羊赤血球2回目接種2日後の血中ナトリウム濃度とDR24、DL48と間に-0.42、-0.42の有意な相関が得られた。さらに、加熱損失率と羊赤血球2回目接種1日目のグルコース濃度との間にも0.49の有意な相関が得られた。しかし、保水性とナトリウム、グルコース濃度との相関係数からは一貫した傾向は得られなかった。

以上、本研究では、飼料に添加給与する海藻や甘草の成分が豚の体内の各種免疫能などを高め、その結果として肉の保水性などが高まるとの仮説のもとに、各種免疫能や血液成分、肉の保水性などを調べた。免疫能に及ぼす海藻、甘草の効果は確認できたが、肉の保水性まで影響することは確認できなかった。すでに行った試験とは海藻の種類が異なることも期待した効果が得られてなかった原因と思われる。しかし、体重70kg前後までの血液を採材し、各種免疫能と血液成分を調べこれと肉の保水性との関連をスクリーニング的に調べた結果、いくつかの免疫学的、生理学的血液成分と保水性との関連が示唆された。出荷直前の血液成分、免疫形質を測定しなかったので血液成分及び免疫形質との直接的な関連とは言えない。しかし、特にコルチゾール濃度はストレスの指標として使われるので、ストレスを受けているブタの保水性が劣ることをこの結果は示唆している。豚の免疫学的、生理学的状態がと殺後の肉の保水性にどのような影響を及ぼすかを明らかにできる手がかりを今回の調査から得ることができたといえる。今後更に、出荷直前までのこれらの血液成分や免疫能と保水性との関連を比較検討すべきであると考えられる。

4. 引用文献

- Dai JH, Iwatani Y, Ishida T, Terunuma H, Kasai H, Iwakura Y, Fujiwara H, Ito M., Glycyrrhizin enhances interleukin-12 production in peritoneal macrophages. *Immunology* 2001 Jun;103(2):235-243
- 小端哲二, 奥村康. 2000. 抗体産生における細胞間相互作用, 多田富雄監訳, 免疫学イラストレイテッド, pp.150-151. 南江堂, 東京
- Suzuki, K., M. Irie, H. Kadowaki, T. Shibata, M. Kumagai, and A. Nishida, Genetic parameter estimates of meat quality traits in Duroc pigs selected for average daily gain, longissimus muscle area, backfat thickness, and intramuscular fat content. *Journal of Animal Science*. 2005. 83: 2058-2065.
- 鈴木啓一、清水ゆう子、門脇宏. 乾燥ワカメ茎とパン屑添加飼料給与が豚の産肉・肉質形質に及ぼす影響、日本養豚学会誌. 2002. 39(2):66-70.
- 鈴木啓一・小野寺渉・熊谷佳子・加地拓己・清水ゆう子・吉野淳良・須田義人・小林仁、海藻、 β グルカン、酵母の飼料添加給与が育成豚の発育、免疫能に及ぼす影響、日畜会報、2009. 80:27-34.
- 寺田澄男、生薬の王様甘草、全薬Journal、平成15年7月号12-15.
- 山田信夫. 2004. 海藻利用の科学改訂版. 成山堂書店, 東京.
- 山田信夫. 2006. 海藻フコイダンの科学. 成山堂書店, 東京.

表 1. 海藻および甘草の飼料添加と発育、肉質との関連 (平均値±標準偏差)

	頭数	終了体重 kg	終了日齢 日	一日平均増体量	DL24 %	DL48h %	CL %
対照区	8	103.4±5.6	155.1±3.7	952.7± 81.4	3.7±1.2	5.6±1.8	25.0±1.0
海藻区	8	105.7±5.9	153.4±5.8	961.0±111.3	3.2±1.3	5.4±1.7	24.4±1.7
甘草区	8	107.5±5.4	151.3±4.9	1018.8± 74.3	3.5±1.3	6.2±1.5	24.7±2.0

DL24、DL48 : 24 時間後、48 時間後のドリップロス、CL : クッキングロス

表 2. 海藻及び甘草飼料添加給与が肉質の物理的特性に及ぼす影響 (平均値±標準偏差)

区	頭数	Tenderness gw/cm ²	Pliability	Toughness gw·cm/cm ²	Brittleness
対照区	8	82721±12947	1.56±0.07	24300±5434	1.34±0.07
海藻区	8	88905± 4807	1.59±0.10	27000±2692	1.32±0.07
甘草区	8	87406±18080	1.59±0.11	25774±6514	1.30±0.08

表3 免疫形質に及ぼす海藻及び甘草飼料添加の効果

形質	区分	頭数	測定日齢 (日)						
			87	121	128	129	130	135	
PA ×10 ⁶ RLU	対照区	8	4.39±4.29	4.79±1.52	4.93±3.53	5.70±2.25	3.08±2.00	4.60±2.14	
	海藻区	8	1.79±1.17	5.47±2.35	2.83±1.30	3.88±2.07	2.88±2.09	4.08±1.97	
	甘草区	8	1.78±1.47	4.69±2.78	2.15±0.39	4.70±1.95	2.54±0.98	4.16±1.31	
CAPA O.D.	対照区	8	2.99±1.40	1.42±2.46	0.55±0.72	0.45±0.59	0.79±1.00	1.04±1.21	
	海藻区	8	4.07±1.89	1.281.67±	0.81±0.73	1.30±1.47	0.18±0.28	0.65±0.93	
	甘草区	8	4.15±2.44	0.89±0.89	0.62±0.67	1.14±1.29	0.07±0.12	0.69±1.05	
RGL	対照区	8	0.49±0.16	0.54±0.18	0.65±0.17	0.48±0.13	0.48±0.14	0.48±0.11	
	海藻区	8	0.48±0.14	0.47±0.11	0.48±0.12	0.43±0.12	0.54±0.12	0.41±0.13	
	甘草区	8	0.50±0.25	0.64±0.12	0.59±0.13	0.53±0.16	0.49±0.13	0.58±0.20	
WBC ×10 ⁴ /μL	対照区	8	221±47	210±22	223±45	201±30	193±38	186±28	
	海藻区	8	192±26	194±47	175±29	158±35	162±36	168±22	
	甘草区	8	213±29	202±24	184±29	205±31	185±27	178±24	
SIgG Titer	対照区	8	0.90±0.18	0.91±0.38	1.60±0.65	2.87±1.13	1.57±0.67	2.53±1.32 ^b	
	海藻区	8	0.57±0.08	1.11±0.27	1.60±0.47	3.10±1.36	1.84±0.77	4.84±5.30 ^a	
	甘草区	8	0.57±0.20	1.43±0.72	1.63±0.58	1.61±0.64	2.04±0.90	2.14±0.85 ^b	
コルチゾール	対照区	8	5.51±2.51	6.25±3.96	5.19±5.00	3.55±4.27 ^{ab}	7.51±4.66	4.42±2.28	
	海藻区	8	9.48±8.26	5.20±2.73	6.58±2.98	2.72±1.45 ^b	9.54±4.82	6.86±5.58	
	甘草区	8	5.85±3.04	4.77±2.21	9.50±6.05	5.80±2.47 ^a	11.84±6.52	4.84±2.82	

a, b: 異なる符号間に5%水準で有意差有り

表4 免疫形質 (IgA、IgMおよびリンパ球のCD4+、CD8+、CD3+) に及ぼす海藻及び甘草飼料添加の効果

形質	区分	頭数	測定日齢 (日)					
			87	121	128	129	130	135
IgA	対照区	8	1.04±0.71	0.45±0.41	0.26±0.13	0.49±0.15	0.43±0.24 ^b	0.40±0.27 ^b
	海藻区	8	1.53±1.79	0.67±0.48	0.68±0.80	0.46±0.44	1.02±1.11 ^b	1.85±2.67 ^a
	甘草区	8	1.63±1.21	0.61±0.31	0.82±0.87	1.25±1.11	2.10±1.97 ^a	0.48±0.57 ^b
IgM	対照区	8	2.26±0.68	6.04±1.56	5.44±2.32	6.81±2.82	5.63±2.77	5.92±3.57
	海藻区	8	1.95±0.90	3.52±2.81	3.70±3.34	4.47±5.29	3.99±4.58	4.20±3.93
	甘草区	8	2.02±1.04	4.53±1.26	4.81±1.36	5.23±2.34	4.35±1.42	4.12±1.12
CD4+ %	対照区	8	-	40.8±9.0 ^b	43.1±6.1	39.3±9.7	41.4±5.7	39.7±5.5
	海藻区	8	-	46.8±7.9 ^{ab}	48.8±4.3	41.1±15.2	46.6±9.6	43.4±5.2
	甘草区	8	-	51.1±7.1 ^a	48.9±10.0	38.1±5.0	40.2±10.1	41.6±7.1
CD8+ %	対照区	8	-	40.2±7.7	37.1±11.1	48.2±8.9 ^a	40.1±12.5 ^{ab}	39.3±13.4
	海藻区	8	-	41.6±7.1	35.2±4.0	45.6±9.8 ^{ab}	42.7±9.3 ^a	37.1±11.8
	甘草区	8	-	39.5±4.0	35.9±8.1	39.6±4.3 ^b	34.0±6.9 ^b	36.2±4.9
CD3+ %	対照区	8	-	14.1±8.3	19.1±6.2 ^a	18.7±7.7	22.0±4.4	24.4±9.7
	海藻区	8	-	12.6±6.2	13.4±2.2 ^b	18.8±10.2	21.9±8.1	22.1±8.2
	甘草区	8	-	15.4±7.9	17.2±6.7 ^{ab}	27.3±8.3	24.9±7.8	24.1±11.2

a, b: 異なる符号間に5%水準で有意差有り。

表5 血液成分 (肝機能) に及ぼす海藻、甘草飼料添加与の影響

形質区分	頭数	測定日齢 (日)						
		87	121	128	129	130	135	
γGTP IU/L	対照区	8	52.3±27.4	36.6±15.1	40.3±18.9	33.3±13.3	39.0±16.6	37.6±17.2
	海藻区	8	57.1±19.8	40.3±17.1	45.8±16.0	35.6±13.5	40.4±18.0	42.8±24.9
	甘草区	8	67.6±46.3	39.0±12.5	40.9±11.3	32.5±10.8	38.6±14.2	35.3±12.3
GOT IU/L	対照区	8	27.1±4.9	32.6±8.2	39.4±12.2	33.5±7.9	35.9±11.0 ^a	46.5±30.1
	海藻区	8	30.6±4.5	32.8±4.6	38.8±17.8	35.0±11.8	31.5±7.9 ^{ab}	38.0±28.0
	甘草区	8	28.8±5.0	28.9±3.5	29.1±7.2	26.0±9.8	24.6±4.6 ^b	28.1±10.5
GPT IU/L	対照区	8	24.1±3.6	31.5±7.2	32.3±6.6	33.0±6.3	33.9±7.7	41.5±12.9
	海藻区	8	28.3±3.6	37.1±5.3	39.8±9.6	39.6±8.9	36.9±6.5	39.3±6.7
	甘草区	8	29.0±8.6	35.9±6.3	37.1±3.9	36.8±3.9	36.0±3.9	37.1±2.2
GOT/GPT	対照区	8	1.14±0.26	1.07±0.31	1.22±0.26 ^a	1.03±0.20 ^a	1.06±0.21 ^a	1.06±0.32
	海藻区	8	1.11±0.15	0.91±0.14	1.03±0.22 ^{ab}	0.93±0.17 ^{ab}	0.93±0.18 ^{ab}	0.93±0.54
	甘草区	8	1.05±0.25	0.82±0.10	0.79±0.20 ^b	0.71±0.24 ^b	0.69±0.13 ^b	0.77±0.34

a, b: 異なる符号間に5%水準で有意差有り。

表 6. 血中コルチゾール濃度と肉の保水性との相関係数

測定日齢	血中コルチゾール濃度					
	87	121	128	129	130	135
DL24	0.46*	0.12	0.32	0.31	0.32	0.37
DL48	0.40*	0.00	0.37	0.47*	0.18	0.28
CL	0.04	0.19	0.20	0.01	0.33	0.32

DL24、DL48 : 24 時間後、48 時間後のドリップロス、
 CL : クッキングロス、* $p < 0.05$

たんぱく質の上限量は運動時の 摂取タイミングによって上昇するか

岡村浩嗣、井上なぎさ、近藤衣美

(大阪体育大学大学院スポーツ科学研究科)

小清水孝子

(福岡大学大学院スポーツ健康科学研究科)

トレーニングによる筋肥大に効果的な たんぱく質の上限摂取量と摂取タイミング

【要旨】

トレーニングによる筋肥大に有効なたんぱく質の上限量とされている 2.0g/kg 体重/日は、摂取タイミングの重要性が明らかになる以前の研究に基づいている。本研究は、この上限量以上のたんぱく質でも筋肥大に効果的な運動に近接したタイミングで摂取すると、筋肥大をさらに促進するかどうか検討することを目的とした。食事からのたんぱく質摂取量が 1.4–1.5g/kg 体重/日で筋力トレーニング時の必要量を満たしていない男子スポーツ選手に、食肉加工品で 0.5g/kg 体重/日のたんぱく質を、筋力トレーニングの前後 (E 群) あるいは筋力トレーニングから 2 時間以上離れたタイミングで摂取 (L 群) させた。8 週間の介入後に筋肉量及び筋力の増大には群間に差はなかったが、体脂肪は L 群では有意に増大したのに対して E 群では変化しなかった。尿量、尿中への尿素およびカルシウム排泄量、血漿中の尿素およびクレアチニン濃度は両群ともに 8 週後に変化はなかったことから、たんぱく質の過剰摂取による健康被害は認められなかった。以上のことから、食肉加工品は筋力トレーニングを行う場合に必要なたんぱく質の摂取に有用なことが示され、上限量以上のたんぱく質は運動に近接したタイミングで摂取しても筋肥大は促進されなかったが体脂肪の蓄積が少なかった。

【目的】

たんぱく質は骨格筋の主要な構成成分であり、スポーツ選手にとって関心の高い栄養素の筆頭である。筋肉合成のためには 2.0g/kg 体重/日が上限とされている。国際陸上競技連盟は陸上競技選手の栄養についての声明 (IAAF) で、すべての陸上競技選手にとって 1.7g/kg 体重/日以上なたんぱく質は必要ないとしている。陸上競技には筋肉量の多い投擲競技も含まれているので、すべてのスポーツ選手にとっても 1.7g/kg 体重/日以上は必要ないことが示唆される。しかし、これは筋肉合成にはたんぱく質の摂取タイミングが重要なことが明らかにされる (Esmarck, Levenhagen, Okamura, Suzuki) 以前の研究に基づいている。

Cribb らは 1 日当たりのたんぱく質摂取量が 2.8g/kg 体重/日であっても、運動に近接したタイミングで摂取すると、運動から離れたタイミングで摂取するよりも除脂肪組織量、筋肉量、最大筋力の増大が大きかったことを報告している (Cribb)。しかし、この著者らはこの研究で摂取したたんぱく質量が一般に認識されている上限を超えていることには言及していない。この研究では食事以外に 0.8g/kg 体重のたんぱく質をサプリメントで摂取させているが、このサプリメントには筋を肥大させる可能性が報告されているクレアチンも含まれており、その摂取量は約 0.6g/kg 体重である。

本研究では日常の食品である食肉加工品を用いて、現時点で上限と見なされている以上のたんぱく質であっても、筋肥大に効果的な運動に近接したタイミングで摂取すると、筋肥大をさらに促進するかどうか検討することを目的とした。

【方法】

被験者と実験の概要

日常的に競技スポーツのトレーニングを行なっている男子大学生 20 名を被験者とした。被験者の平均年齢は 20.8 歳（標準偏差 1.7、範囲 18～26）、平均体重は 70.6kg（10.5、51.4～86.4）であった。被験者には実験内容を説明し事前に同意書を得た。本研究計画は大阪体育大学研究倫理審査委員会の承認を得た。

試験群及び試験方法

被験者は、食肉加工品を筋力トレーニングを主とする運動の前後 30 分以内に摂取する群（E 群、10 名）と運動から少なくとも 2 時間以上離れた時点で摂取する群（L 群、10 名）に分けた。

すべての被験者の消費エネルギー量を要因加算法で算出し、主として主食（飯）の量を調節することで摂取エネルギー量が不足しないようにした。

1 日当たりのたんぱく質摂取量は 3 食の食事から目標量を 2.0g/kg 体重とした。その食生活を 8 週間の実験期間中、維持した。筋力トレーニングを週 3 回実施し、このトレーニングを実施した日は補食として食肉加工品を用いて、1 日当たり 0.5g/kg 体重のたんぱく質を付加した。補食は、E 群では筋力トレーニングの前後それぞれ 30 分以内に摂取させ、L 群ではトレーニングの前後、少なくとも 2 時間以上離れたタイミングで摂取させた。部活動の練習メニューには特に指示を与えず普段通り行うように指示した。

補食には、ポールウインナー（伊藤ハム）またはチキンウインナー（クワムラ食品株式会社）を用いた。

筋力トレーニング

普段の運動部でのトレーニングの他に、筋力トレーニングを週 3 回実施させた。筋力トレーニングの種目はアームカール、リストカール、ダンベルベンチ、ダンベルフライ、プルダウン、ローイングとした。各種目を 15 回ずつ 3 セット行い、セット間にはほとんど休憩させなかった。試合や健康上の理由で週 3 回を確保できない場合は翌週に追加で行わせ、実験期間中の筋力トレーニングの平均回数が週 3 回になるように調整した。

食事・生活活動調査

食事・生活活動調査は、介入前（0 週）、介入 1 週間後（1 週）および介入終了直前（8 週）で実施し、それぞれ連続した 3 日間で行った。

食事調査は、摂取した食品とその概量および摂取時刻を自分で記入する目安量記録法を用いて行なった。食品の種類と摂取量を確認するために、被験者らに摂取した食品をデジタルカメラで撮影するよう依頼し、記録表とともに管理栄養士が被験者と面接して内容を確認した。栄養計算には栄養計算ソフト「フーズサポーター ver. 2.1」を用いた。

生活活動調査には要因加算法を用いた。

採尿

採尿は食事・生活活動調査と同時に行なった。食事調査開始日の 1 食目の摂取前に排尿させ、その後の尿から翌日の 1 食目の摂取前に採取した尿を 1 日目の尿とした。2 日目以降も同様に実施し、3 日分の尿を採取した。採尿にはアリコートカップ（株式会社泉製作所、大阪）を用いた。

採血

介入前後の 2 回、早朝空腹時の静脈血を採取した。

血圧測定

介入前後の採血前に 3 分間の座位安静後に 1 分間隔で 3 回測定し、3 回の測定の測定の平均値

を測定値とした。

上肢及び下肢の周径囲

介入前後で上腕と大腿の周径囲を測定した。上腕の測定位置は肩峰点から橈骨点までの中間点とした。大腿は大腿転子点から大腿骨外側上顆の最外側突起点までの直線距離の、最外側突起点から30%の位置で測定した。上腕も大腿も左右両側を測定した。

上肢及び下肢の筋厚と皮脂厚

介入前後で Nemio 20 ultrasound system (TOSHIBA) を用いて上腕部と大腿部の筋厚と皮下脂肪厚を測定した。上腕では周径囲を測定した位置で、上腕二頭筋と上腕三頭筋を測定した。大腿でも周径囲を測定した位置の前部、すなわち大腿直筋と中間広筋を測定した。これらの測定も左右両側について実施した。

体組成

介入前後の採血の前に、体組成計 (TANITA, Model BC-118) を用いて測定した。

筋力測定

介入前後で上肢と下肢の等尺性膝伸展 (主動筋) と等尺性肘伸展 (主動筋、拮抗筋) による筋力を、BIODEX SYSTEM 3 (BIODEX MEDICAL) を用いて測定した。測定時には、椅座位姿勢で胸部および大腿部をベルト固定した。

等尺性膝伸展 (主動筋: 脚大腿四頭筋) の測定角度は 90 度とした。1 回の測定時間を 5 秒間として 3 回行なった。各測定間の休憩は 20 秒とした。3 回の測定での最大値を測定値とした。椅子の位置はダイナモメーターの回転軸と外側上顆が一致するように固定した。

等尺性肘伸展 (主動筋: 上腕二頭筋, 拮抗筋: 上腕三頭筋) の測定角度は 90 度とした。1 回の測定時間を 5 秒として 2 回測定した。各測定間の休憩は 20 秒とした。2 回の測定のうち大きなほうを測定値とした。肘は屈曲角度が 90 度になるように固定した。

生化学分析

尿中及び血漿の、尿素窒素濃度はウレアーゼ・インドフェノール法 (尿素窒素 B-テストワコー, 和光純薬, 大阪)、クレアチニン濃度は Jaffé 法 (クレアチニンテストワコー, 和光純薬) で測定した。尿中カルシウム濃度は MXB 法 (カルシウム E-テストワコー, 和光純薬) で測定した。

統計処理

各測定時点の群間の比較は t 検定で行った。0 週, 1 週及び 8 週の比較には一元配置分散分析と Fisher の PLSD 法を用いた。危険率 5%未満を統計的に有意とした。統計計算には Stat View, ver 5.0 (SAS Institute Inc.) を用いた。

【結果】

食事摂取状況を表 1 に示した。エネルギー摂取量は介入後の 1 週と 8 週で介入前の 0 週よりも有意に増大していた。消費エネルギー及び摂取量と消費量のバランス も 1 週と 8 週で 0 週よりも増大していた。たんぱく質摂取量も介入後に介入前よりも増大し、8 週では L 群で 2.3g/kg 体重/日、E 群で 2.1g/kg 体重/日であった。L 群と E 群で差はなかった。その他の調査した栄養成分の摂取量も介入後で増加していた。三大栄養素のエネルギー比率は試験期間を通して適正範囲内にあった。

表 2 には血漿尿素窒素及びクレアチニン濃度の結果を示した。0 週および 8 週ともに群間に差は見られず、試験前後の変動も見られなかった。

表 3 は尿量及び尿中成分の排泄量を示している。尿量と尿素窒素排泄量は両群で 0 週よりも 8

週で 20～30%増加しているが統計的な有意差はなかった。尿量と尿素窒素排泄量には、いずれの測定時点でも群間に差はなかった。尿中クレアチニン排泄量には両群で試験前後で変化はなく、群間にも差はなかった。尿中カルシウム排泄量は 8 週で 0 週と 1 週よりも有意に増大していたが、群間に差はなかった。

表 4 には安静時の血圧と脈拍数を示した。血圧は収縮期及び拡張期ともに試験前後で変化はなく、いずれの時点でも群間に差もなかった。脈拍にも試験前後の差はなく、群間の差もなかった。

表 5 には体重と体脂肪に関する結果を示した。体重は両群で試験前後で有意な変化はなかった。体脂肪率と体脂肪量は L 群で試験後に有意に増大したが E 群では変化は見られなかった。

表 6 には右側上腕及び大腿の筋厚と皮下脂肪厚の結果を示した。上腕の周径囲と上腕二頭筋の筋厚は、両群で有意に増大したが群間に差はなかった。上腕二頭筋の皮下脂肪厚には試験前後で変化はなく群間の差もなかった。上腕三頭筋の筋厚も両群で 8 週で増大したが群間に差はなかった。上腕三頭筋の皮下脂肪厚には変化はなく群間の差もなかった。大腿の周径囲は E 群で試験後に有意に増大したが、L 群では変化は見られなかった。大腿の周径囲と大腿前部の筋厚の試験前後の変化率に E 群で大きな傾向があった。

表 7 には左側上腕及び大腿の筋厚と皮下脂肪厚の結果を示した。上腕の変化は右側と同様であった。上腕三頭筋の皮下脂肪厚は L 群で試験後に有意に減少し、変化率は E 群で有意に大きかった。大腿の周径囲と筋厚は L 群で有意に増大したが、E 群では有意な変化は認められなかった。

表 8 には筋力の結果を示した。右側では膝関節の主働筋の筋力が、L 群で試験後に有意に増大したが E 群では有意な変化は認められなかった。右側の肘関節の主働筋と拮抗筋には、両群で試験前後で有意な変化はなく群間にも差はなかった。左側では膝関節の主働筋、肘関節の主働筋と拮抗筋の筋力が、いずれも試験後に両群で増大した (L 群 $p < 0.05$ 、E 群 $p < 0.1$) が、群間に差はなかった。

【考察】

今回の被験者の実験前のたんぱく質摂取量は 1.4～1.5g/kg 体重/日であり、筋力トレーニングを行なう場合の摂取量としては十分とはいえなかった。実験開始後に食肉加工品を摂取することで、たんぱく質摂取量は 2.1～2.3g/kg 体重/日となり、無理なくたんぱく質摂取量を追加することが出来た。

本研究では 8 週間の実験で、体重は有意ではなかったものの E 群で 0.5kg、L 群で 0.9kg 増加した。このうち体脂肪量の増加は E 群で 0.3kg であったのに対して L 群では 0.7kg だった。したがって、除脂肪組織量の増加は両群で 0.2kg と差のなかったことが示唆される。除脂肪組織量の増加に群間で差のなかったことは、測定した上腕や大腿の周囲径や筋厚に群間に差のなかったことから支持される。また、筋力も右側肘関節以外では 8 週間後に増大していたが群間に差は認められなかった。筋力は筋量の増加に先立って増大することが多い。したがって、筋量の増加に差が認められなかった本研究でも筋力に差がなかったものと考えられる。

本研究では、筋肥大に効果的なタイミングで摂取すると、運動による筋肥大に有効なたんぱく質摂取量の上限とされている以上の量でも、筋肥大をさらに促進するかどうか検討することを目的とした。その結果、上限以上のたんぱく質は、筋肥大に効果的なタイミングで摂取しても筋肥大をさらに促進する作用は認められなかったものの、体脂肪の蓄積は少ないことが示唆された。

以上のことは、筋力トレーニングを行う場合に必要なたんぱく質を摂取するために食肉加工品

が有用であったこと、摂取タイミングとしては運動に近接したタイミングで摂取するほうが望ましいことを示唆している。

我が国の食事摂取基準では、たんぱく質の目標量はエネルギー比で 20%未満である。本研究の被験者のたんぱく質摂取量は 2.0g/kg 体重以上と、食事摂取基準の 2 倍以上だったが、エネルギー摂取量も約 4,000kcal/日と多かった。このため、本研究でのたんぱく質のエネルギー比は約 15%であり、食事摂取基準での目標量の 20%は超えなかった。

たんぱく質の摂取量を増加させると体内での尿素の生成が増大する結果、尿量が増えることが知られている。過剰な尿量の増加は腎臓に過濾過という負担をかけることになる。本研究では、実験前後で尿量と尿素排泄量に有意な変化は認められず、血漿中の尿素濃度やクレアチニン濃度も上昇していなかった。これらのことから、本研究ではたんぱく質の摂取量を増大したことによる腎への負担は問題となるほど大きくはなかったと考えられる。

たんぱく質の大量摂取はカルシウムの尿中排泄を増大することで、骨密度の低下をもたらすことも懸念されている。本研究でも介入後にカルシウムの尿中排泄量が増大した。一方、本研究の被験者の介入前のカルシウム摂取量は必要量を満たしていなかった。このため、実験期間中は乳製品等でカルシウム摂取量を 1,000mg/日程度に増やした。本研究では摂取量を 500mg/日以上増大したにも関わらず排泄量の増加は 70mg/日程度であり、カルシウム出納は負にはなっていなかった。

これらのことから、本研究ではたんぱく質摂取量を増大したことによる健康上の問題はなかったと考えられる。

食肉加工品は食塩を含んでいるので、大量に摂取する場合に食塩摂取量が増加することの健康への影響を懸念することがある。本研究での塩分摂取量は 13-14g/日であり極端に多いというほどではなかった。また、エネルギー摂取量が 4,000kcal/日以上で一般の人の 1.5-2 倍程度だったこと、トレーニングでの発汗で塩分が失われることを考えると、食塩摂取量はそれほど過剰とみなさなくてもよいのではないかと考えられる。本研究では 8 週後で血圧が上昇することもなかったため、食塩の過剰摂取の問題はなかったと考えられる。

【文献】

- ・ Cribb PJ, Hayes A. Effects of supplement timing and resistance exercise on skeletal muscle hypertrophy. *Med Sci Sports Exerc.* 2006; 38: 1918-25.
- ・ Esmarck B, Andersen JL, Olsen S, Richter EA, Mizuno M, Kjaer M. Timing of postexercise protein intake is important for muscle hypertrophy with resistance training in elderly humans. *J Physiol.* 2001; 535: 301-11.
- ・ Levenhagen DK, Gresham JD, Carlson MG, Maron DJ, Borel MJ, Flakoll PJ. Postexercise nutrient intake timing in humans is critical to recovery of leg glucose and protein homeostasis. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001; 280: E982-93.
- ・ Nutrition for athletics: The 2007 IAAF Consensus Statement. <http://www.iaaf.org/mm/Document/imported/38451.pdf>
- ・ Okamura K, Doi T, Hamada K, Sakurai M, Matsumoto K, Imaizumi K, Yoshioka Y, Shimizu S, Suzuki M. Effect of amino acid and glucose administration during postexercise recovery on protein kinetics in dogs. *Am J Physiol.* 1997; 272: E1023-30.

- Suzuki M, Doi T, Lee SJ, Okamura K, Shimizu S, Okano G, Sato Y, Shimomura Y, Fushiki T. Effect of meal timing after resistance exercise on hindlimb muscle mass and fat accumulation in trained rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 1999; 45: 401-9.

表1 食事摂取状況

		0週		1週		8週	
		mean	SD	mean	SD	mean	SD
エネルギー摂取量(kcal/日)	L	3151 ^a	1031	4232 ^b	715	4371 ^b	695
	E	2992 ^a	778	4014 ^b	572	4089 ^b	707
エネルギー消費量(kcal/日)	L	2789 ^a	342	4232 ^b	715	3463 ^a	431
	E	2814 ^a	489	4014 ^b	572	3401 ^a	487
エネルギーバランス(kcal/日)	L	362 ^a	1098	770 ^a	764	909 ^a	810
	E	178 ^a	648	613 ^a	495	689 ^a	559
たんぱく質摂取量(g/日)	L	106.7 ^a	33.8	137.4 ^b	20.6	161.9 ^c	21.2
	E	99.3 ^a	29.7	131.4 ^b	20.6	152.5 ^c	36.0
たんぱく質摂取量(g/kg体重/日)	L	1.5 ^a	0.5	1.9 ^b	0.3	2.3 ^c	0.4
	E	1.4 ^a	0.5	1.9 ^b	0.3	2.1 ^b	0.3
脂質摂取量(g/日)	L	94.8 ^a	32.5	115.9 ^b	23.5	137.4 ^c	24.3
	E	93.2 ^a	28.2	109.1 ^b	21.2	126.5 ^b	29.8
炭水化物摂取量(g/日)	L	438.4 ^a	144.4	643.1 ^b	137.1	584.9 ^b	104.1
	E	420.9 ^a	116.1	606.4 ^b	104.3	557.4 ^b	78.4
カルシウム摂取量(mg/日)	L	540 ^a	256	1193 ^b	194	1364 ^c	233
	E	392 ^a	211	1135 ^b	288	1190 ^b	292
食塩摂取量(g/日)	L	12.0 ^a	3.6	11.3 ^a	2.2	14.1 ^b	1.9
	E	9.9 ^a	3.6	11.2 ^a	1.5	12.9 ^b	3.1
たんぱく質エネルギー比(%)	L	14.0 ^a	2.5	13.0 ^a	0.8	14.9 ^b	0.9
	E	13.4 ^a	1.7	13.2 ^a	1.4	14.8 ^b	1.3
脂質エネルギー比(%)	L	26.8 ^a	3.6	24.1 ^a	3.7	28.5 ^b	2.1
	E	27.2 ^a	4.2	23.7 ^a	3.2	27.8 ^b	2.5
炭水化物エネルギー比(%)	L	55.8 ^a	4.9	61.5 ^b	4.5	53.3 ^a	3.0
	E	56.8 ^a	3.9	61.4 ^b	4.3	54.7 ^a	3.4

^{***}異なるものに有意差があることを示す。

表2 血漿尿素窒素濃度

		0週		8週	
		mean	SD	mean	SD
血漿尿素窒素 (mg/100 mL)	L	17.0	4.6	17.4	4.5
	E	16.0	2.6	15.1	5.6
血漿クレアチニン (mg/100 mL)	L	0.9	0.1	0.9	0.1
	E	0.9	0.1	0.9	0.1

表3 尿量及び尿中成分排泄量

		0週		1週		8週	
		mean	SD	mean	SD	mean	SD
尿量 (g/日)	L	952	317	1041	305	1251	286
	E	1044	448	1165	436	1255	596
尿素窒素排泄量 (g/日)	L	9.9	2.7	10.6	2.9	13.5	4.0
	E	10.2	4.5	11.5	4.3	12.7	8.2
尿中クレアチニン排泄量 (g/日)	L	1.7	0.3	1.5	0.3	1.7	0.4
	E	1.7	0.9	1.5	0.5	1.8	1.1
尿中カルシウム排泄量 (mg/日)	L	136.1 [*]	48.8	152.5 [*]	53.7	197.1 [*]	92.8
	E	149.3 [*]	102.1	144.9 [*]	97.3	233.4 [*]	184.4

*異なるものに有意差があることを示す。

表4 安静時の血圧及び脈拍数

		0週		8週		変化率 (%)	
		mean	SD	mean	SD	mean	SD
収縮期 (mmHg)	L	121.2	9.8	118.2	9.8	-2.3	5.8
	E	119.0	6.3	118.9	11.4	-0.1	6.3
拡張期 (mmHg)	L	66.4	5.2	67.9	7.1	2.6	11.7
	E	69.5	5.8	67.8	6.7	-2.3	7.3
脈拍数 (bpm)	L	66.5	11.4	67.3	13.8	1.1	8.3
	E	64.2	8.6	63.8	12.4	-0.6	15.2

表5 体重及び体組成

		0週		8週		変化率 (%)	
		mean	SD	mean	SD	mean	SD
体重 (kg)	L	70.7	9.8	71.6	9.7	1.3	2.9
	E	70.5	11.6	71.0	11.9	0.8	1.8
体脂肪率 (%)	L	13.8	5.3	14.7 **	4.8	9.2	12.7
	E	13.9	4.1	14.1	4.4	1.7	5.3
体脂肪量 (kg)	L	10.2	5.2	10.9 **	4.8	11.4	16.6
	E	10.2	4.4	10.5	4.7	2.8	6.3

** p < 0.05, 0週 vs 8週。

表6 右側上腕及び大腿の筋厚及び皮下脂肪厚

		0週		8週		変化率 (%)	
		mean	SD	mean	SD	mean	SD
上腕周囲径 (cm)	L	31.1	3.3	31.7 *	3.4	2.1	3.0
	E	31.1	3.4	31.8 **	3.4	2.3	1.5
上腕二頭筋							
筋厚 (mm)	L	30.0	3.6	30.5 **	3.6	1.6	1.7
	E	28.3	6.1	28.6 *	6.3	1.0	1.6
脂肪厚 (mm)	L	1.6	0.6	1.6	0.6	2.1	17.5
	E	1.9	0.7	1.9	0.8	1.8	16.5
上腕三頭筋							
筋厚 (mm)	L	27.2	2.4	27.4 **	2.3	0.9	1.0
	E	28.3	5.7	28.6 **	5.7	1.2	1.2
脂肪厚 (mm)	L	3.8	2.1	3.8	2.2	-0.3	17.6
	E	4.7	1.9	4.7	1.8	0.6	8.1
大腿周囲径 (cm)	L	48.6	3.7	48.5	3.3	-0.2	2.2
	E	48.1	4.6	49.3 *	5.9	2.3 †	3.8
大腿前部筋厚 (mm)	L	21.6	2.6	21.7	2.5	0.6	3.4
	E	21.5	4.5	22.2	4.7	3.3 †	3.2
大腿前部脂肪厚 (mm)	L	6.1	1.8	6.0	1.6	0.5	9.3
	E	6.0	1.8	6.0	1.7	0.2	7.3

* p < 0.1, ** p < 0.05, 0週 vs 8週; † p < 0.1, L vs E。

表7 左側上腕及び大腿の筋厚及び皮下脂肪厚

		0週		8週		変化率 (%)	
		mean	SD	mean	SD	mean	SD
上腕周囲径 (cm)	L	30.7	3.1	31.4 **	2.8	2.3	1.8
	E	30.6	3.3	31.6 **	3.4	3.2	1.6
上腕二頭筋							
筋厚 (mm)	L	28.6	3.5	29.0 **	3.5	1.5	1.0
	E	25.6	7.4	26.1 **	7.3	2.3	2.6
脂肪厚 (mm)	L	1.8	0.7	1.8	0.7	0.5	13.2
	E	2.3	1.5	2.4	1.5	7.8	13.7
上腕三頭筋							
筋厚 (mm)	L	26.6	2.2	26.8 **	2.3	0.8	0.5
	E	26.3	8.3	26.6 **	8.3	1.4	1.3
脂肪厚 (mm)	L	4.0	2.3	3.8 **	2.2	-3.7	4.9
	E	4.6	1.9	4.7	1.8	4.4 †	7.6
大腿 周囲径 (cm)	L	48.0	4.1	48.9 *	3.3	2.0	2.6
	E	48.0	5.1	48.7	5.6	1.4	2.3
大腿前部筋厚 (mm)	L	21.0	3.1	21.7 **	3.1	3.1	3.4
	E	21.9	5.7	22.2	5.8	1.3	3.5
大腿前部脂肪厚 (mm)	L	5.5	1.8	5.5	1.7	0.9	3.0
	E	6.4	2.1	6.3	2.2	-1.9	5.2

* p < 0.1, ** p < 0.05, 0週目 vs 8週目; † p < 0.05 L vs E.

表8 筋力

			0週		8週		変化率 (%)	
			mean	SD	mean	SD	mean	SD
右側								
膝関節								
主働筋 (n-m)	L		250.3	48.1	268.1 *	43.9	8.5	14.0
	E		266.0	56.6	274.3	38.8	6.2	20.9
肘関節								
主働筋 (n-m)	L		58.2	13.6	61.7	14.6	6.6	12.0
	E		64.7	19.6	64.3	13.2	3.2	19.8
拮抗筋 (n-m)	L		66.6	14.4	62.3	15.0	-5.1	17.8
	E		63.6	10.0	64.6	10.9	4.4	28.6
左側								
膝関節								
主働筋 (n-m)	L		241.1	34.1	284.2 **	60.9	17.3	13.6
	E		242.1	38.0	286.6 **	46.5	18.7	11.0
肘関節								
主働筋 (n-m)	L		59.5	12.6	78.1 **	15.6	32.9	17.8
	E		59.3	12.7	71.5 *	18.5	24.2	34.3
拮抗筋 (n-m)	L		61.5	10.2	70.9 **	12.6	16.0	15.5
	E		66.1	11.7	72.8 *	12.0	11.8	20.5

* $p < 0.1$, ** $p < 0.05$, 0週 vs 8週。

たんぱく質の摂取量と摂取タイミングが グルココルチコイド誘発性筋萎縮に及ぼす影響

【要旨】

筋たんぱく質合成に効果的な運動直後というタイミングで高たんぱく質食を与えて血中アミノ酸濃度を高めると、通常のとたんぱく質レベルの食餌を与えるよりも筋肥大に有効かどうかを、グルココルチコイドを投与することで筋萎縮を刺激した高齢モデルラットで検討した。たんぱく質のエネルギー比が15%の普通食あるいは25%の高たんぱく質食を、運動5時間後または運動直後に与えて8週間飼育した。体重と脂肪組織重量は高たんぱく質食で重い傾向が認められた。小腸の重量は、運動後の食餌までの時間の長いほうが重い傾向があった。その他の採取した骨格筋及び内臓の重量には、食餌たんぱく質量の影響も食餌タイミングの影響も認められなかった。屠体のたんぱく質量にも群間に差はなかった。肝臓のたんぱく質がHで高値であった。本研究のモデルラットに、筋たんぱく質合成に効果的な運動直後というタイミングで高たんぱく質食を摂取させても、筋肉を肥大させることはなかったが、高たんぱく質食は肝臓のたんぱく質を増加し体脂肪の減少を防止することが示唆された。

【目的】

筋肉量を維持することは高齢者の自活に重要である。習慣的な運動は高齢者の筋萎縮を抑制する (Goodpaster)。筋肉トレーニングによる筋肥大には、通常の食事からのたんぱく質で十分とされているが、これはトレーニング効果に対する摂取タイミングの重要性が明らかになる以前の研究によっている。高齢者の筋力トレーニングによる筋肥大や筋力増強は、トレーニング後に速やかに栄養補給するほうが2時間後に補給するよりも大きいことが報告されている (Esmarck) ように、摂取タイミングが重要である。

一方、血中アミノ酸濃度を上昇させることは筋たんぱく質合成を亢進する要因の一つである。高齢者の筋肉も血中アミノ酸濃度を高めるとたんぱく質合成が亢進する (Paddon-Jones, Volpi 1998, 1999)。しかし、高齢ラットの筋肉たんぱく質合成を高めるには若齢ラットの筋肉にくらべて、アミノ酸濃度を高濃度にする必要のあることが報告されている (Dardevet 2000, 2002)。

そこで本研究では、筋たんぱく質合成に効果的な運動直後というタイミングで高たんぱく質食を与えて血中アミノ酸濃度を高めると、通常のとたんぱく質レベルの食餌を与えるよりも筋肥大に有効かどうかを、グルココルチコイドを投与することで筋萎縮を刺激した高齢モデルラットで検討した。

【方法】

動物

9週令のSprague-Dawley系雄ラット28匹を用いた。全てのラットに、筋萎縮を誘発することが観察されている1%カルボキシメチルセルロース溶液に溶解した2mg/kg体重のプレドニゾロン (Matsuo) を毎日10:00に皮下投与した。本研究計画は、実施前に大阪体育大学動物実験委員会で承認された。

試験群及び試験手順

食餌はたんぱく質のエネルギー比が 15%の普通食 (N) と 25%の高たんぱく質食 (H) とした。それぞれの食餌はAIN93Gに基づき、カゼイン、コーンスターチ、 α コーンスターチ、そしてグラニュー糖の含量を調節して調製した。

飼育室は08:00-20:00を暗期とする12時間の明暗サイクルとし、食餌は08:00-10:00と20:00-22:00に与えた。この給餌時間中は自由に摂食させた。それぞれの食餌を摂取する動物を、運動から食餌までの時間の異なる2群に分けた。Fig. 1に運動実施日のスケジュールを示した。運動は5分×6セットのクライミング運動を、各セット間に5分の休憩を入れ週3回、隔日で行なわせた。この運動を14:00-15:00に行い、その後の食餌までの時間が5時間の群をL群、運動を19:00-20:00に行い、その直後に食餌を与えたE群に分けた。すなわち、運動5時間後にN食を摂取した群をLN群、運動5時間後にH食を摂取した群をLH群、運動直後にN食を摂取した群をEN群、運動直後にH食を摂取した群をEH群の4群を設けた。この条件で8週間飼育した。飼育7週目には代謝ケージで3日間の全尿を採取した。

飼育最終日は運動はさせず、一夜絶食後にエーテル麻酔下で回復し、下大静脈から採血することで安楽死させた。その後、臓器を速やかに採取、秤量した。内臓組織と腹腔内及び睾丸周囲の脂肪組織を除いたものを屠体として秤量した。

測定項目

体重と摂食量は毎日測定した。採取した組織と屠体は凍結乾燥法によって水分量を定量した後、たんぱく質含量 (Kjeldahl 法) と総脂質含量 (Folch 法) を定量した。血液は遠心分離後、血漿中の総たんぱく質、アルブミン、尿素窒素、クレアチニン濃度を測定した。

統計処理

食餌たんぱく質量と食餌タイミングを要因とする二元配置分散分析を行い、4群の比較にはTukey-Kramer法を用いた。

【結果】

表1に8週間の実験期間中の摂食量、摂取たんぱく質量、及び摂取エネルギー量を示した。摂取たんぱく質量が高たんぱく質食を摂取した群で多かった以外には差はなかった。

表2に体重、屠体及び採取した組織の重量を示した。二元配置分散分析の結果、体重は高たんぱく質食で重い傾向 ($P = 0.090$) が認められた。しかし、食事タイミングの影響は認められなかった。脂肪組織重量も高たんぱく質食で重い傾向 (腎周囲脂肪組織、 $P = 0.086$; 腸間膜脂肪組織、 $P = 0.063$; 採取した脂肪組織重量の合計、 $P = 0.081$) が認められたが、食餌タイミングの影響はなかった。小腸の重量は、運動後の食餌までの時間の長いほうが重い傾向があった ($P = 0.054$)。その他の採取した骨格筋及び内臓の重量には、食餌たんぱく質量の影響も食餌タイミングの影響も認められなかった。

表3には屠体と組織の水分量の結果を示した。屠体の水分%は高たんぱく質食で有意に少なかった ($P = 0.047$)。小腸の水分含量は運動後の食餌までの時間の長いほうが多い傾向があった ($P = 0.084$)。二つの骨格筋、肝臓、腎臓の水分量及び水分%には、食餌たんぱく質量の影響も食餌タイミングの影響も認められなかった。

表4には屠体と肝臓のたんぱく質量の結果を示した。肝臓のたんぱく質の含量と%が高たんぱく質食を摂取した場合に有意に高値であった (たんぱく質含量、 $P = 0.047$; たんぱく質%, $P = 0.031$)。

表5には屠体の総脂質の含量と%を示した。屠体の総脂質には食餌たんぱく質量の影響も食餌タイミングの影響も認められなかった。

表6には実験7週目の飲水量、尿量及び水分出納を示した。いずれの項目にも食餌たんぱく質量、運動から食餌までのタイミングの影響は見られなかった。

【考察】

本研究では、グルココルチコイドを投与することで筋萎縮を刺激した高齢モデルラットで、筋たんぱく質合成に効果的な運動直後というタイミングで高たんぱく質食を与えると、通常の高たんぱく質レベルの食餌を与えるよりも筋肥大に有効かどうかを検討した。しかし、高たんぱく質食を運動直後に摂取させても、筋肉を肥大させることはなかった。

表7は著者らが以前、プレドニゾロンを投与していない成長期のラットを用いて、本研究と同様の群構成で行なった研究結果と本研究結果を、いくつかの項目について比較したものである。両実験で用いたクライミング運動は長母趾屈筋 (FHL) を肥大させる (近藤)。FHLの重量及び体重当たり換算した値には二つの研究で差が認められない。このことは、本研究では運動によってプレドニゾロンによる筋萎縮が防止されたことを示唆するものかもしれない。

著者らは成長期のラットを用いた研究で、高たんぱく質食 (エネルギー比 35%) で飼育したラットのほうが普通たんぱく質食 (エネルギー比 20%) を摂取した場合よりも骨格筋重量が小さいことを観察している (Kondo)。Priceらは普段の高たんぱく質の摂取量が多いと、摂食後の体たんぱく質合成が亢進するとともに絶食時の体たんぱく質分解も亢進することを報告している (Price)。また、Juilletらは内臓でのたんぱく質の分解が亢進し、筋肉等の末梢組織のたんぱく質合成に利用できる窒素源が減少することを報告している (Juillet)。これらのことは、著者らの観察した成長期のラットで高たんぱく質食を摂取した場合に筋肉量が減少したことのメカニズムだったことが推察される。

高齢者の筋たんぱく質合成は血中へ投与されたアミノ酸によって亢進する (Paddon-Jones, Volpi 1998, 1999)。しかし、高齢ラットの筋肉合成を高めるには若齢ラットの筋肉よりもアミノ酸濃度を高くする必要があることが報告されている (Dardevet 2000, 2002)。これらのことは、筋たんぱく質合成を高めるためには、高たんぱく質食を摂取して血中アミノ酸濃度を上昇させることが効果的なことを示唆している。しかし、上述のように食事たんぱく質が多すぎると、筋肉合成には却って不利なこともある。そこで、本研究では食餌たんぱく質のエネルギー比を、著者らが成長期ラットでの研究で用いた 35% から 25% へ含量を減少させた。著者らはまた、筋肉量を減少させた高たんぱく質食でも、筋合成を高めるのに効果的な運動直後というタイミングで摂食させることで、筋肉量の減少を軽減出来たことを観察している (Kondo)。表7に示した previous: young は著者らが先に行なった研究での結果である。FHLの重量は、運動から食餌までの間隔の長かった場合は高たんぱく質食を摂取した LH が普通たんぱく質食を摂取した LN よりも 6.3% 軽かったのに対して、運動直後から摂食した場合は高たんぱく質食を摂取した EH と普通たんぱく質食を摂取した EN との差は 0.7% だった。本研究では高たんぱく質食を運動直後に摂取させた。しかし、本研究では、高たんぱく質食を運動直後から摂取させても筋肉重量を増大させることはなかった。

最近、高齢者は若齢者よりも筋力トレーニングによって筋たんぱく質合成が刺激されにくいこと (Kumar)、適切な量のたんぱく質を摂っている高齢者では、運動前後という筋合成に有効なタイミングで 10g ずつのたんぱく質サプリメントを摂取しても、運動による筋たんぱく質合成をさらに亢進することはない (Verdijk) ことが報告された。本研究ではラットを対象にしているが、運動直後には食餌を与えたので Verdijk らが被験者に運動前後にサプリメントで摂取させたたんぱく質よりも、量的には多いと考えられる。しかし、本研究でも高たんぱく質食で筋肥大が促進さ

れなかったことは、運動の強度や時間などの条件を変更することで、筋肥大を促進できる可能性を示唆している。

本研究では、高たんぱく質食で体重が重い傾向にあった。高たんぱく質食で採取した脂肪組織重量が重い傾向にあったことから、体重が重いのは体脂肪が多いことによるものと推察された。屠体の総脂質を測定したところ、高たんぱく質食で有意ではなかったが13%多かった(屠体の総脂質：普通食群の平均は29.8g、高たんぱく質食群の平均は33.8g)。体脂肪が過剰な状態は健康にとって望ましくない。しかし、体格指数(BMI)が低すぎるのも健康にとって望ましくない。本研究で高たんぱく質食を摂取したラットの屠体の体脂肪率は10%前後だったが、健康に望ましくないほど多いのかそれとも健康にとってはむしろ望ましいのかは検討の余地があるかもしれない。腎周囲脂肪組織重量を、表7に示した成長期のラットで行なった研究と本研究で比較してみると、体重当たりの重量は本研究でのラットで少なかったことから、本研究のラットはむしろ低栄養状態だったのかもしれない。そして、本研究で高たんぱく質食を摂取したラットのほうが、腎周囲脂肪組織の体重当たりの重量が成長期のラットのそれに近かったことは、高たんぱく質食で脂肪組織の多かったことが健康には良かったことを示唆するものかもしれない。

本研究では組織の水分量を測定した。総脂質の多い傾向にあった屠体では水分%は少なかった。一方、小腸は運動から食餌までの時間の長かったLで水分が多く重量が重かった。水分は除脂肪組織で多く脂肪組織では少ない。今回は小腸のたんぱく質は測定していないが、Lでたんぱく質が多かった可能性が示唆される。運動は腸管のたんぱく質分解を高める(Hamada)。運動直後に摂取すると、摂取したたんぱく質が腸管たんぱく質の合成に利用されるのに対して、Lでは運動後から食餌までの間に運動で分解した腸管たんぱく質の補修が行なわれた結果、食餌で摂取したたんぱく質は腸管たんぱく質の合成に利用されたのかもしれない。

著者らが先に行なった成長期のラットを対象にした研究で、高たんぱく質食を摂取した動物では肝臓のたんぱく質量が多かった。そこで、今回も肝臓のたんぱく質量を測定したところHが多かった。本研究では、組織たんぱく質量はケルダール法で測定した窒素量に6.25を乗じて求めている。このため、どのような形態で肝臓に窒素が蓄積しているのかは現時点では明らかでない。しかし、高たんぱく質食によって多く摂取した窒素は肝臓に貯留されたことが推測される。

腎臓重量は成長期ラットを用いた先の研究では、表7に示したようにHで重く、表8に示したように飲水量も尿量もHが多かった。今回の研究で用いたグルココルチコイド誘発筋萎縮モデルのラットでも腎臓重量はHでやや重かったが(P=0.114)、飲水量も尿量もHが多いということとはなかった。このように、高齢モデル動物として用いた今回のラットと成長期のラットでは、高たんぱく質食に対する反応が異なっていた。今回は糞中への窒素排泄量は測定していないが、腎臓重量及び尿量に対する反応に見られた差が、たんぱく質の消化・吸収率の差によるのかどうかは検討する必要があると考えられる。消化・吸収率が今回的高齢モデルで低下していたら、このことが運動直後から高たんぱく質食を摂取させても筋肥大を刺激しなかった一因と考えられる。

【文献】

- ・ Dardevet D, Sornet C, Bayle G, Prugnaud J, Pouyet C, Grizard J. Postprandial stimulation of muscle protein synthesis in old rats can be restored by a leucine-supplemented meal. *J Nutr.* 2002;132:95-100.
- ・ Dardevet D, Sornet C, Balage M, Grizard J. Stimulation of in vitro rat muscle protein synthesis by leucine decreases with age. *J Nutr.* 2000;130:2630-5.

- Esmarck B, Andersen JL, Olsen S, Richter EA, Mizuno M, Kjaer M. Timing of postexercise protein intake is important for muscle hypertrophy with resistance training in elderly humans. *J Physiol.* 2001;535:2.
- Goodpaster BH, Chomentowski P, Ward BK, Rossi A, Glynn NW, Delmonico MJ, Kritchevsky SB, Pahor M, Newman AB. Effects of physical activity on strength and skeletal muscle fat infiltration in older adults: a randomized controlled trial. *J Appl Physiol.* 2008;105:1498–503.
- Hamada K, Matsumoto K, Okamura K, Doi T, Minehira K, Shimizu S. Effect of amino acids and glucose on exercise-induced gut and skeletal muscle proteolysis in dogs. *Metabolism.* 1999;48:161–6.
- Juillet B, Fouillet H, Bos C, Mariotti F, Gausserès N, Benamouzig R, Tomé D, Gaudichon C. Increasing habitual protein intake results in reduced postprandial efficiency of peripheral, anabolic wheat protein nitrogen use in humans. *Am J Clin Nutr.* 2008;87:666–78.
- Kondo E, Inoue N, Okada S, Yaji K, Hirota A, Okamura K. Post-exercise meal timing alleviates decreased protein efficiency for skeletal muscle growth in rats fed high-protein diet. *Experimental Biology 2008.* 2008.
- 近藤衣美、田井伸二、廣田あゆみ、岡田佐知子、今井康貴、岡村浩嗣. クライミング運動はラットの長母趾屈筋、浅指屈筋及び深指屈筋を肥大させる. 日本体力医学会第23回近畿地方会. 2009.
- Kumar V, Selby A, Rankin D, Patel R, Atherton P, Hildebrandt W, Williams J, Smith K, Seynnes O, Hiscock N, Rennie MJ. Age-related differences in the dose-response relationship of muscle protein synthesis to resistance exercise in young and old men. *J Physiol.* 2009;587:211–7.
- Matsuo T, Nozaki T, Okamura K, Matsumoto K, Doi T, Gohtani S, Suzuki M. Effects of voluntary resistance exercise and high-protein snack on bone mass, composition, and strength in rats given glucocorticoid injections. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2003;67:2518–23.
- Pacy PJ, Price GM, Halliday D, Quevedo MR, Millward DJ. Nitrogen homeostasis in man: the diurnal responses of protein synthesis and degradation and amino acid oxidation to diets with increasing protein intakes. *Clin Sci (Lond).* 1994;86:103–16.
- Paddon-Jones D, Sheffield-Moore M, Zhang XJ, Volpi E, Wolf SE, Aarsland A, Ferrando AA, Wolfe RR. Amino acid ingestion improves muscle protein synthesis in the young and elderly. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2004;286:E321–8.
- Verdijk LB, Jonkers RA, Gleeson BG, Beelen M, Meijer K, Savelberg HH, Wodzig WK, Dendale P, van Loon LJ. Protein supplementation before and after exercise does not further augment skeletal muscle hypertrophy after resistance training in elderly men. *Am J Clin Nutr.* 2009;89:608–16.
- Volpi E, Ferrando AA, Yeckel CW, Tipton KD, Wolfe RR. Exogenous amino acids stimulate net muscle protein synthesis in the elderly. *J Clin Invest.* 1998;101:2000–7.
- Volpi E, Mittendorfer B, Wolf SE, Wolfe RR. Oral amino acids stimulate muscle protein anabolism in the elderly despite higher first-pass splanchnic extraction. *Am J Physiol.* 1999;277:E513–20.

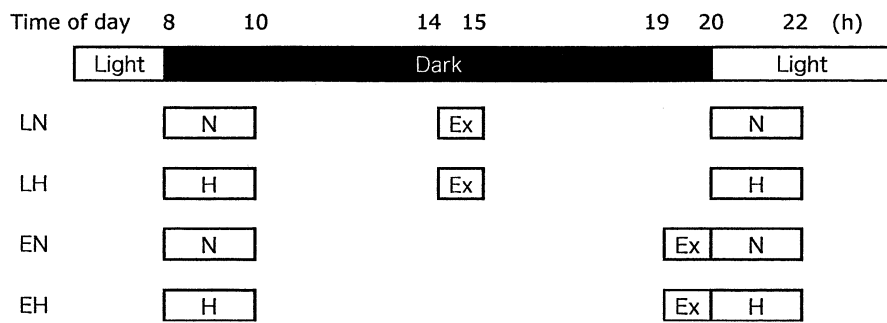


Fig. 1 Outline of the schedule of the exercise day.
N, normal protein diet; H, high protein diet; Ex, exercise

Table 1 Food, protein and energy intake during the 8 week study

									Two-way ANOVA, P		
	LN		LH		EN		EH		meal	timin g	meal x timing
	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD			
Food (g/8 weeks)	1183	38	1182	43	1182	36	1182	35	0.969	0.98 4	0.971
Protein (g/8 weeks)	177	6	295	11	177	5	295	9	< 0.001	0.99 2	0.976
Energy (g/8 weeks)	4572	148	4593	169	4569	138	4594	138	0.679	0.98 4	0.971

Table 2 Body and tissue mass (g)

	LN		LH		EN		EH		Two-way ANOVA, P		
	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	meal	timing	meal x timing
Body weight	393	15	411	24	398	26	410	25	0.090	0.814	0.739
Carcass	305	11	315	17	308	19	315	19	0.197	0.879	0.797
Skeletal muscle											
FHL	1.30	0.07	1.32	0.11	1.32	0.08	1.34	0.08	0.532	0.511	0.943
Soleus	0.29	0.03	0.30	0.04	0.30	0.02	0.30	0.04	0.734	0.774	0.835
Visceral tissue											
Liver	14.49	1.47	15.78	1.07	14.78	1.73	14.50	1.19	0.332	0.346	0.137
Small intestine	3.76	0.29	3.80	0.33	3.56	0.32	3.54	0.33	0.950	0.054	0.799
Kidney	2.51	0.15	2.62	0.12	2.52	0.17	2.58	0.14	0.114	0.745	0.616
Adrenal	0.02	0.01	0.02	0.01	0.02	0.01	0.03	0.01	0.488	0.518	0.402
Adipose tissue											
Perirenal	6.85	3.24	8.60	2.75	7.23	1.51	8.97	2.96	0.086	0.703	0.998
Epididymal	7.04	2.38	8.40	2.17	7.86	1.86	8.71	2.75	0.204	0.510	0.766
Mesenteric	8.64	3.60	11.14	3.34	10.17	2.25	12.26	3.61	0.063	0.270	0.864
Total	22.56	8.98	28.16	7.78	25.29	5.01	29.98	8.79	0.081	0.430	0.872

Table 3 Tissue water

										Two-way ANOVA, P		
		LN		LH		EN		EH		meal	timin g	meal x timing
		mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD			
Carcass	g	196	9	197	10	196	12	199	14	0.649	0.820	0.931
	%	64.1	1.7	62.6	1.2	63.8	0.9	63.1	1.6	0.047	0.849	0.424
Skeletal muscle												
FHL	g	0.978	0.055	0.990	0.076	0.994	0.059	1.008	0.061	0.571	0.464	0.955
	%	75.1	0.3	75.0	0.2	75.2	0.2	75.1	0.1	0.130	0.126	0.589
Soleus	g	0.220	0.023	0.224	0.028	0.223	0.017	0.227	0.026	0.641	0.752	0.938
	%	74.8	1.3	74.9	0.9	74.5	0.1	75.3	0.5	0.227	0.830	0.316
Visceral tissue												
Liver	g	9.815	0.836	10.53 1	0.729	10.04 0	1.109	9.860	0.723	0.407	0.490	0.171
	%	67.8	1.5	66.8	1.1	68.0	1.5	68.0	1.0	0.275	0.137	0.236
Small intestine												
Small intestine	g	3.025	0.242	3.071	0.277	2.877	0.261	2.867	0.287	0.857	0.084	0.779
	%	80.4	0.6	80.8	0.5	80.9	0.7	81.1	0.7	0.189	0.117	0.658
Kidney	g	0.953	0.054	1.012	0.082	0.961	0.051	0.970	0.044	0.121	0.437	0.252
	%	75.5	0.6	75.4	0.6	75.4	0.5	75.1	0.4	0.260	0.176	0.565

Table 4 Tissue protein

										Two-way ANOVA, P		
		LN		LH		EN		EH		meal	timin g	meal x timing
		mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD			
Carcass	g	72.5	3.5	74.6	4.8	72.1	4.1	75.0	6.5	0.180	0.990	0.827
	%	23.7	0.9	23.7	0.6	23.4	0.6	23.8	1.1	0.622	0.778	0.435
Liver	g	2.484	0.243	3.094	0.268	2.830	0.290	2.991	0.260	0.047	0.542	0.668
	%	19.7	1.0	19.6	0.7	19.2	0.7	20.6	0.8	0.031	0.389	0.014

Table 5 Tissue total lipid

			LN		LH		EN		EH		Two-way ANOVA, P		
											meal	timin	meal x timing
			mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD		g	
Carcass	g	30.6	9.5	33.8	7.9	28.9	4.4	33.7	7.4	0.152	0.745	0.786	
	%	10.0	3.1	10.7	2.3	9.4	1.2	10.7	2.5	0.236	0.732	0.702	

Table 6 Water intake, urine volume and water balance at week 7

			LN		LH		EN		EH		Two-way ANOVA, P		
											meal	timin	meal x timing
			mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD		g	
Water intake (g/day)		21.8	7.7	22.8	4.0	26.3	8.5	23.7	3.4	0.727	0.242	0.445	
Urine volume (g/day)		12.6	3.3	15.2	3.2	17.1	7.2	15.3	3.5	0.828	0.221	0.239	
Balance (g/day)		9.2	3.3	7.5	1.8	9.2	1.9	8.4	1.8	0.158	0.580	0.623	

Table 7 Comparison of body and tissue mass in the current study and the previous study investigated in young rats.

	study	LN	LH	EN	EH	mean of N	mean of H	mean of 4 groups
Body mass	current	393	411	398	410	396	411	403
	previous	392	383	392	395	392	389	391
FHL								
Mass (g)	current	1.30	1.32	1.32	1.34	1.31	1.33	1.32
	previous	1.28	1.20	1.35	1.34	1.32	1.27	1.29
Body mass %	current	0.331	0.321	0.332	0.327	0.331	0.324	0.328
	previous	0.327	0.313	0.344	0.339	0.335	0.326	0.331
Kidney								
Mass (g)	current	2.51	2.62	2.52	2.58	2.52	2.60	2.56
	previous	2.79	2.93	2.74	2.97	2.77	2.95	2.86
Body mass %	current	0.639	0.637	0.633	0.629	0.636	0.633	0.635
	previous	0.712	0.765	0.699	0.752	0.705	0.758	0.732
Perirenal adipose								
Mass (g)	current	6.85	8.60	7.23	8.97	7.04	8.79	7.91
	previous	9.38	9.90	7.86	9.23	8.62	9.57	9.09
Body mass %	current	1.74	2.09	1.82	2.19	1.78	2.14	1.96
	previous	2.39	2.58	2.01	2.34	2.20	2.46	2.33

Rats of the current study were 17 weeks of age and administered with prednisolone daily throughout the 8 week study, while rats of the previous study were 13 weeks of age and prednisolone was not administered. Values are means of each group.

Table 8 Comparison of water intake and urine volume in the current study with the previous study investigated in young rats.

	LN		LH		EN		EH	
	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD
Water intake (g/day)								
current	21.8	7.7	22.8	4.0	26.3	8.5	23.7	3.4
previous	26.8	7.4	39.1	11.3	32.4	5.2	50.7	8.9
Urine volume (g/day)								
current	12.6	3.3	15.2	3.2	17.1	7.2	15.3	3.5
previous	16.5	6.3	30.1	10.3	22.2	4.5	41.1	10.3

See legend to Table 7 for the details.

食肉由来生理活性ペプチドの 生活習慣病予防効果について その II

宮崎大学農学部	食品機能化学講座	教授	六車	三治男
宮崎大学農学部	食品機能化学講座	修士課程	難波	靖
宮崎大学医学部	応用生理学講座	教授	丸山	眞杉
株式会社ユニカフェ	R&D センター長		中村	豊郎

【要 約】

本研究は、食肉に含まれる高血圧、高血糖の改善に有効なペプチドを探索することを目的とし、食肉由来ペプチドの血圧降下作用および血糖値の上昇抑制効果について、昨年度に引き続き検討した。

実験材料は豚モモ肉を用い、ペプシン、トリプシンなどのプロテアーゼによる処理を行い、食肉由来ペプチドを調製した。その分子量分布を求めたところ、食肉タンパク質のほとんどが 6500 Da 以下に分解されていることが確認された。また、アンギオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害活性を測定した結果、 IC_{50} (50%阻害濃度) が 3.69 mg/ml と求まり、食肉由来ペプチドの ACE 阻害活性が認められた。さらに、自然発症高血圧ラット (SHR) と Wistar ラットへの経口投与試験を行ったところ、ラットの血圧および血中アンギオテンシン II 濃度が有意に低下した ($p < 0.01$)。

自然発症高血圧ラット (SHR/NDmc-cp) および自然発症糖尿病ラット (GK/Slc) を用いた酵素処理食肉持続投与実験の結果、連続酵素処理食肉を投与した SHR ラットおよび GK ラットにおいて血圧降下するのみならず、血糖値も低下する傾向も認められた。3ヶ月投与試験の結果、有意ではないがラットの血圧および血中アンギオテンシン II 濃度が低下した。

2週間経口投与後のラットのインスリン、GIP、Secretin、GH 濃度の測定を行ったが、すべての試験で有意な差は認められなかった。よって、食肉由来ペプチドの血糖値上昇抑制効果はインスリンの亢進作用によるものではないことが考えられ、今後さらに研究する必要がある。

以上の結果から、食肉タンパク質中に血圧降下作用および血糖値上昇抑制効果を持つペプチドが存在することが示された。食肉はもともと栄養価や嗜好性に優れた食品である。本研究において、生活習慣病を改善する効果を持つペプチドの存在が示されたことは、食肉のさらなる付加価値向上に繋がると考えられた。今後は同定されたペプチドの機能性についてさらなる研究をするとともに、食肉由来ペプチドの利用法について検討していく必要があると考えられる。

【キーワード】

豚肉、酵素分解物、血圧降下作用、ACE 阻害活性、ACE 阻害ペプチド、アンギオテンシン II、生活習慣病予防、糖尿病予防効果、臓器障害予防

【緒 言】

現在、心疾患や脳血管疾患などの病気は日本人の主要な死因を占めている。それらの病気は高血圧症や糖尿病といった、いわゆる生活習慣病が原因となって発症する場合が多い。高血圧とは、収縮期血圧が 140mmHg 以上、または拡張期血圧が 90mmHg 以上の状態と定義され、世界保健機関 (WHO) と国際高血圧学会 (ISH) のガイドライン¹⁾ や米国合同委員会第 6 次報告²⁾、日本高血圧学会高血圧治療ガイドライン³⁾ 等により、さらに細かく分類されている。高血圧症は脳、心臓など各種臓器障害、血管性疾患の危険因子であり、主要死因の上位を占めている脳卒中や心不全あるいは腎臓病などの合併症を引き起こす^{4,5)} ため、高血圧をいかに抑制するかが重要である。高血圧症は原因の明らかな二次性高血圧と、約 90%以上を占めるといわれている本態性高血圧に分類される。本態性高血圧はこれまで原因が不明であったが、最近の研究により、生活習慣が大きな要因である事が分か

ってきた⁶⁾。生体内で昇圧調節を中心的に担っているのはレニン-アンギオテンシン系であり、アンギオテンシンⅠがアンギオテンシン変換酵素（ACE）の作用によって、昇圧物質であるアンギオテンシンⅡへと代謝される。このアンギオテンシンⅡは生体内で最も強力な昇圧物質であり、血管平滑筋を収縮させる直接的昇圧作用を有しているだけでなく、副腎でのアルドステロン分泌を刺激し、ナトリウムや水の貯留量増大を引き起こし、間接的な血圧上昇にも関与する⁷⁾。したがって、ACEの阻害薬は血圧上昇抑制に有効であるとされており、臨床的にも心臓系疾患の改善⁸⁾や、他の降圧薬よりも副作用が少ない事が明らかになったこと⁹⁾や、ACE阻害剤単独で本態性高血圧患者の70%に効果を示していること¹⁰⁾などから、薬物療法において高血圧治療の第一選択薬の一つとして現在広く使用されている。

しかしながら、一般的に降圧療法は過度の血圧低下、空咳、一過性の腎機能低下、発疹、めまいなどの副作用の問題も指摘されている¹¹⁾。そこで、薬物ではなく食品に含まれるACE阻害物質を摂取することで、副作用がない高血圧の改善を行うことが研究されている。

食品成分中のACE阻害物質については、今までに多くの研究が行われており、主としてタンパク質派生ペプチドの検索が行われている。これまでに30種以上のタンパク質から少なくとも400種類以上のACE阻害ペプチドが単離・同定されてきた¹²⁾。これらの中にはカゼインのトリプシン分解物、鰹節のサーモライシン分解物および、カルピス酸乳などのように、*in vivo*においてACE阻害活性を有し、ヒト臨床試験でも血圧降下作用が認められ、特定保健用食品（生活習慣病の一時予防として食生活の改善に役立つと認められた食品）として厚生労働省の認可を受けているものも存在する¹³⁻¹⁵⁾。

糖尿病は、糖代謝の異常によって起こるとされ、血糖値（血液中のブドウ糖濃度）が病的に高まることによって、様々な特徴的な合併症をきたす危険性のある病気である。未だに、糖尿病の原因は完全に解明されていないが、膵臓のランゲルハンス島でのインスリン分泌促進に関与しているペプチドが報告されており¹⁶⁾、血圧と同じく食品に含まれる成分による高血糖の改善が期待されている。

しかし、畜産食品に関する研究報告は少なく、特に食肉由来のACE阻害ペプチド、血糖値降下作用のあるペプチドの研究報告は少ない。日本における一年間の食肉の消費の割合は、最も高いのが豚肉、続いて鶏肉、牛肉である¹⁷⁾。豚肉や鶏肉は国内での生産量も高く、これからもコンスタントに需給が続いていくものと考えられる。牛肉に関しては国内での生産量は低く、輸入量は国内生産量を2倍近く上回っており、これからも輸入に依存した形態が続いていくものと考えられてきた¹⁸⁾。しかし、近年では海外での牛海綿状脳症（BSE）の影響から、輸入量が減り、牛肉価格の高騰を招いており、国内でもBSEが発生しているために、牛肉のみならず食肉全体の消費量が低迷している。したがって、豚肉や鶏肉の要求度が上がる事が予想され、食肉全体の消費回復・向上のためにも安全性の確保と共に、食肉中の機能性の解明は重要になっている。既に食肉からいくつかのACE阻害ペプチドが検出されている¹⁹⁻²⁶⁾が、まださらに研究が必要とされている。

昨年度の本研究では、新規ACE阻害ペプチドを検索することを目的に、トリプシン分解した豚肉タンパク質から血圧調節に関与するACE阻害ペプチドを単離・同定し、その特性を評価した。その結果、高血圧自然発症ラットへの経口投与で、有意に降圧作用を示すプロドラッグ型のACE阻害ペプチドを新たに見いだした²⁷⁾。さらに、食肉をトリプシンなど

の消化酵素により処理し、得られた凍結乾燥標品を含有する飼料を病態モデルラットに投与し、1生活習慣病病態モデル動物を用いて、食肉由来ペプチド画分が、II型糖尿病および高血圧の発症抑制効果を有するかを検討した²⁸⁾。

そこで本年度の研究では、食肉に含まれる高血圧、高血糖の改善に有効なペプチドを探索することを目的とし、食肉をペプシン、トリプシンなどのプロテアーゼにより処理して得た食肉由来ペプチドの血圧降下作用および血糖値の上昇抑制効果についてさらに検討を行ったので報告する。

【実験材料および方法】

食肉由来ペプチドの調製

豚モモミンチ肉 1 kg に 1.5 l の蒸留水を添加し、インキュベート (70°C, 30 min) した。その後、フードプロセッサ (30 sec, 2 回) (TM3, 株式会社テスコム) にかけて、0.5 l の蒸留水を添加し、HCl (和光純薬工業株式会社) で pH1.8 に調整した。pH 調整後、胃粘膜由来ペプシン (1:10000) (和光純薬工業株式会社) を 0.2 g 添加し、攪拌しながらインキュベートした (37°C, 2 時間)。インキュベート後、NaOH (和光純薬工業株式会社) で pH6.8 に調整し、10 分間煮沸した。溶液温度を約 40°C まで下げた後、パンクレアチン (和光純薬工業株式会社)、トリプシン (和光純薬工業株式会社) をそれぞれ 0.2 g 添加し、再び攪拌しながらインキュベートした (37°C, 2 時間)。最後に 10 分間煮沸したものを食肉由来ペプチドとした。1-2, 1-3 および 1-5 では 0.45 μ m セルロースアセテートメンブレンフィルター (東洋濾紙株式会社) にてろ過したサンプルを実験に供した。

ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) による分子量分布の測定

得られたサンプルの分子種やそれらの酵素反応による分解程度を調べるためにドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を Laemmli の方法²⁹⁾で行った。アクリルアミド濃度 7.5~17.5% のグラジエントゲルを用いてスラブ型の泳動槽で行った。ゲルバンドの染色はクーマシーブリリアントブルー R-250 (BIO-RAD Laboratories) により行い、脱色は 10% 酢酸を用いた。また、分子量マーカーとして SDS-PAGE Molecular weight standards, Broad Range 161 -031 7 (BIO-RAD Laboratories) を使用した。

ゲルろ過高速液体クロマトグラフィーによる分子量分布の分析

ゲルろ過高速液体クロマトグラフィーの溶離液として、0.05 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0, 0.4 M) を作製した。作製した溶離液は、超音波洗浄装置 (SILENT SONIC, SHARP) を用いて 30 分間の脱気を行ってから分析に使用した。上記に従って作製したサンプルに等量の溶離液を加えたものを分析に供した。

分析には Shodex PROTEIN KW803 カラム (8×300 mm) (昭和電工株式会社) を用いた。送液ポンプは LC-10AD (島津工業株式会社) を用い、流速 0.5 ml/min、注入量 20 μ l で行った。分析中は溶離液を脱気装置 (DGU-14A, 島津工業株式会社) に通しペプチドの検出は検出器 (SPD-10AVP, 島津工業株式会社) を用い、検出波長 280 nm で行った。

タンパク質の定量

プロテアーゼ処理をしていない食肉タンパク質の定量は Biuret 法³⁰⁾ により行った。タンパク質の酵素分解物である食肉由来ペプチドについては UV 法³¹⁾ を用いてタンパク質を定量した。すなわち、タンパク質溶液の 215 nm での吸光度から 225 nm での吸光度を差し引き、144 倍したときの数値をタンパク質濃度とした。測定には上記と同じ分光光度計を使用した。

ACE 阻害活性の測定

Cushman ら³²⁾ の方法に準じて、ACE、HHL を用いて測定した。ACE はウサギ肺由来アンギオテンシン I 変換酵素 (ACE, Peptidyl dipeptidase, EC3.4.1.5.1, シグマ社) を用い、0.25 M ホウ酸緩衝液で 1 unit/ml に調整し、測定時には 0.25 M ホウ酸緩衝液で 60 unit/ml に希釈し使用した。ACE との反応基質としては合成基質であるヒプリル-ヒスチジル-ロイシン (HHL, ナカライテスク株式会社) を使用した。HHL は NaCl (和光純薬工業株式会社)、0.25 M ホウ酸緩衝液をそれぞれ 0.608 M、0.1 M になるように MilliQ water を用いて調整した溶液で溶解した。サンプル 6 μ l に 60 unit/ml の ACE 溶液 20 μ l および 7.6 mM HHL 溶液 50 μ l を添加し 37°C で 30 分間反応させた。反応は 0.1 NHC 1 (和光純薬工業株式会社) 554 μ l を加えて停止させた。反応後には酢酸エチル (ナカライテスク株式会社) 1.5 ml を加えて ACE の作用により遊離した馬尿酸を振とう抽出し、2500 rpm (1000 \times g)、15 分間遠心分離を行った。上清の酢酸エチル層を 1 ml 分取し、100°C、10 分間の加熱により蒸発乾固させた。乾固した馬尿酸を回収するために 1 M の NaCl 溶液を 1 ml 加えボルテックスを行った。溶解した馬尿酸吸光度を 228 nm で測定した。

阻害率はサンプルを加えた吸光度を S、サンプルの代わりに MilliQ water を加えた時の吸光度を C、あらかじめ ACE を失活させてから反応させた時の吸光度を B として次式より求めた。

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

上式により求められる阻害活性が 50% を示す時の阻害物質濃度 (反応液 1 ml 当りのタンパク質量、IC₅₀) を計算した。

自然発症高血圧ラット (SHR/NDmc-cp) を用いた経口投与実験

血圧の 24 時間変動測定

自然発症高血圧ラット (SHR/NDmc-cp) (以後 SHR とする) を日本エスエルシー株式会社より購入し使用した。動物は 23 \pm 1°C、相対湿度 50 \pm 10%、照明時間 12 時間/日の条件下で、固形飼料 CRF-1 (日本チャールズリバー株式会社) を与えて飼育し、飲料水は水道水を 0.2 μ m のメンブレンフィルターでろ過除菌後自由に摂取させた。また、飼料も自由摂取させ、購入後 1 週間は新しい環境に馴染ませた。各群 4 匹とし、ゾンデを用いて 3 ml 経口投与した。コントロールには蒸留水を同様に経口投与した。投与前と投与後の 3, 6, 9 および 24 時間後、測定前に 15 分間の前保温 (37°C) を施した後、非観血式血圧測定装置 (BP-98A, 株式会社ソフトロン) を用いて tail-cuff 法³³⁾ で尾動脈圧を測定した。

Wistar ラットを用いた経口投与実験

ラットの飼育および経口投与方法

9 週齢雄性ラット (Wistar ラット) を日本エスエルシー社より購入し使用した。動物は $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 $50 \pm 10\%$ 、照明時間 12 時間/日の条件下で、固形飼料 CRF-1 を与えて飼育し、飲料水は水道水を $0.2 \mu\text{m}$ のメンブレンフィルターでろ過除菌後、自由に摂取させた。また、飼料も自由摂取させた。各群 4 匹を使用し、購入から 2 週間継続して、ゾンデを用いてサンプルを 3 ml 経口投与した。コントロールには蒸留水を同様に経口投与した。投与後ラットの血液を採取し、2-2-2、2-2-3 の方法に従って、ラットの血中アンギオテンシン II 濃度の測定を行った。

インスリン, GH, Secretin, GIP の測定

ELISA 法により 2 週間経口投与後のラットのインスリン, GIP, Secretin, GH 濃度の測定を行った。

血中アンギオテンシン II 濃度の測定

アンギオテンシン II 濃度の測定は Porstmann, T らの方法³⁴⁾ に準じて行った。初めに 1%トリフルオロ酢酸(TFA)緩衝液 (ナカライテスク株式会社) (Buffer A とする) および 1%TFA 含有 60%アセトニトリル緩衝液(HPLC 用, 和光純薬株式会社) (Buffer B とする) を調製した。採取した血漿 1 ml に Buffer A を 1 ml 加え、遠心分離機 (LC-200, 株式会社トミー精工) により $10000 \times g$ 、 4°C 、20 分の条件で遠心分離した。その後、SEP-COLUMN (Code RK- SEPCOL-1, Phoenix Pharmaceuticals 社) に Buffer B を 1 ml 加え洗い流し、続いて Buffer A で (3 ml, 3 回) SEP-COLUMN を平衡化した。遠心分離をした血漿を平衡化した SEP-COLUMN に入れ、Buffer A でゆっくり洗い流した後 (3 ml, 3 回)、Buffer B で目的のペプチドを溶出し、ポリプロピレンチューブに集めた。(3 ml, 1 回)。その後、遠心濃縮機 (CVE-2000D, 東京理科器械株式会社) で Buffer B を揮発させた。次に、Assay buffer concentrate 50 ml を Milli Q water 950 ml に溶かし、Assay buffer を調製した後、遠心濃縮した血漿に $200 \mu\text{l}$ の Assay buffer を加えたものを分析サンプルとした。さらに 2 倍、5 倍に希釈した分析サンプルを調製した。

血中アンギオテンシン II 濃度の測定

Standard peptide に Assay buffer を 1 ml 加え、 1000 ng/ml の Standard solution を調製した。さらに、 25 ng/ml 、 5 ng/ml 、 1 ng/ml 、 0.2 ng/ml 、 0.04 ng/ml に希釈した Standard solution を調製した。次に Primary antibody および Biotinylated peptide に Assay buffer を 5 ml 加え、96 穴ウェルプレートの指定した箇所に Standard solution, サンプルを $50 \mu\text{l}$ ずつ加えた。その後、 $25 \mu\text{l}$ の Primary antibody および $25 \mu\text{l}$ の Biotinylated peptide を Blank 以外に加え、2 時間室温で放置した。次に SA-HRP vial を 1000 rpm 、 15 sec 、 4°C で遠心分離し、SA-HRP $12 \mu\text{l}$ を 12 ml の Assay buffer に加えた。1 時間後、Blot-dry を 5 回繰り返した。その後、 $100 \mu\text{l}$ の SA-HRP 溶液を Blank 以外に加えた。1 時間後、Blot-dry を 6 回繰り返した。次に $100 \mu\text{l}$ の Substrate solution を Blank も含めて加えた。1 時間後、 $100 \mu\text{l}$ の 2 N HCl を Blank も含めて加え反応を止

めた。96 穴ウェルプレートの底を 70%エタノールで拭き、マイクロウェルプレート測定用全自動比色計 (Immuno mini NJ-2300, 株式会社マイクロテックニチオン) に入れ、450 nm の吸光度を測定した。

その後、Standard solution の吸光度を縦軸、濃度を横軸にプロットし、求めた数式から、サンプルの吸光度を代入し、アンギオテンシン II の濃度を求めた。

SHR を用いた 3 ヶ月投与実験

飼料の調製

① 食肉区

食肉区の飼料は粉末飼料 MF (オリエンタル酵母工業株式会社) に凍結乾燥後粉砕した豚モモミンチ肉を 5%代替して調製した。

② 食肉由来ペプチド区

1-1 に従って調製したサンプルを凍結乾燥し、粉砕したものを粉末飼料 MF に 5%代替して調製した。

SHR の飼育条件

6 週齢雄性の SHR 18 匹を日本エスエルシー株式会社より購入し使用した。ラットには各試験区の飼料を与え、室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、相対湿度 $50 \pm 10\%$ 、照明時間 12 時間/日の条件下で飼育した。飲料水は水道水を $0.2 \mu\text{m}$ のメンブランフィルターでろ過除菌後自由摂取させ、飼料も自由摂取させた。1 つのケージに 1 匹入れて飼育した。また、購入後 1 週間新しい環境に馴染ませ、その期間は粉末飼料 MF を与えた。実験期間は 3 ヶ月とした。投与実験全体のスケジュールは (図 5) に示した。

測定項目および方法

① 飼料摂取量の測定

同一時刻で測定するため、午前 9 時より飼料の摂取量を測定し、同量になるように飼料を補充した。2 日に一度測定した。

② 体重の測定

体重は 3 週間に一度測定した。

⑦ 血中アンギオテンシン II 濃度の測定

上記実験方法に従って血中アンギオテンシン II 濃度の測定を行った。

有意差検定

有意差検定はチューキー検定を用いた。また、数値は全て平均値±標準誤差で示した。

【結果および考察】

これまでの食品素材からの ACE 阻害物質の研究は、タンパク質派生ペプチドの検索が中心であることや、Stamler らの報告³⁵⁾ からタンパク質摂取量の増加は血圧降下に有効であるとされることなどから、本実験においても食肉を複数のプロテアーゼによって処理したペプチドを調製し、ACE 阻害活性を測定した。

まず SDS-PAGE によるサンプル全体のタンパク質の分子量分布およびゲルろ過 HPLC によ

るる過後のタンパク質の分子量分布を分析した（図 1, 2）。SDS-PAGE によって抽出した食肉にミオシン重鎖（分子量 200 KDa）やアクチン（分子量 42 KDa）などの筋原線維タンパク質の存在が確認された。食肉を連続的に酵素処理することで、食肉由来ペプチドの食肉タンパク質のほとんどが 6500 Da 以下に分解されており、各種プロテアーゼとの反応による高分子タンパク質の低分子化が確認された。さらに、タンパク質濃度および ACE 阻害活性を測定したところ、 IC_{50} 値は 3.69 mg/ml と求まった（表 1）。したがって、食肉を連続的にプロテアーゼ処理することで、食肉には見られなかった ACE 阻害活性を有することが確認された。

本試験において 2 型糖尿病患者、高血圧患者、肥満者の病態モデルである自然発症高血圧ラット（SHR/NDmc-cp）と Wistar ラットを用いた食肉由来ペプチドの経口投与試験および 3 ヶ月投与試験を行い、食肉由来ペプチドが血圧、アンギオテンシン II 量、空腹時血糖値、 HbA_{1c} 、耐糖能に及ぼす影響を検討した。

まず、SHR を用いた食肉由来ペプチドの経口投与実験（血圧の 24 時間変動測定）の結果、投与から 6 時間後の SHR の収縮期血圧がコントロールに比べ、食肉由来ペプチド区の方が有意に低かった（ $p < 0.01$ ）（図 3）。また、食肉由来ペプチドの経口投与による実験では、Wistar 系ラットのアンギオテンシン II 量への影響を検討した。アンギオテンシン II は非常に強力な昇圧物質であり、動脈硬化症および高血圧症の増悪因子となる。したがって、アンギオテンシン II の増加を抑えることが日々の生活習慣病予防において重要である。2 週間の投与の結果、水、食肉区に比べ、食肉由来ペプチド区のアンギオテンシン II 量が有意に低下した（ $p < 0.01$ ）（図 4）。以上の結果から、食肉由来ペプチドの血圧降下作用が認められ、それはアンギオテンシン II の生成を抑制することによって起こることが示唆された。

次に ELISA 法により 2 週間経口投与後のラットのインスリン、GIP、Secretin、GH 濃度の測定を行った。

GIP は当初十二指腸の K 細胞から糖質あるいは脂質の刺激を受けて分泌されて、胃の運動を抑制すると考えられていたペプチドであるが、後にインスリンの分泌を促すホルモンであることが判明したペプチドである。セクレチンは十二指腸の S 細胞から分泌されて、膵液の分泌を亢進させるホルモンである。GH は成長ホルモンである。インスリン濃度を図 5 に、GPI 濃度を図 6 に、Secretin 濃度を図 7 に、GH 濃度を図 8 に示した。すべての試験で有意な差異は認められなかった。したがって、食肉由来ペプチドの血糖値上昇抑制効果はインスリンの亢進作用によるものではないことが考えられ、今後さらに研究する必要がある。

3 ヶ月の投与試験における飼料の一般成分分析および食肉由来ペプチドの病態モデルラットへの投与実験スケジュールを表 2 および図 9 に示した。次に、1 週間毎の飼料の摂取量を図 10 に示した。各区間に有意な差はなかった。さらに、体重の変化を比較した結果を 図 11 に示した。飼料の摂取量の変化において、両区間に有意な差がなかったことでの推察からもわかるように、体重の変化にも有意な差はなかった。よって、飼料の成分、飼料の摂取量、体重の変化に有意な差が認められなかったということは、各試験区で得られた実験データは比較可能なものであると考えられる。

3 ヶ月の投与試験における食肉由来ペプチド投与によるアンギオテンシン II 量の変化を調べたところ、有意ではないが、食肉区に比べ食肉由来ペプチド区のアンギオテンシン

II量が低下していた（図12）。したがって、経口投与試験および3か月投与試験の結果から、食肉由来ペプチドの血圧降下作用が認められ、それはアンジオテンシンIIの生成を抑制することによって起こることが示唆された。

昨年、食肉由来ペプチド区の経口投与後の血糖値の上昇が食肉区に比べて有意に抑制される結果を得た²⁸⁾。したがって、3ヶ月の投与試験と経口糖負荷試験による糖化ヘモグロビン(HbA1c)および耐糖能の結果から、食肉由来ペプチドの摂取による血糖値上昇抑制効果が示唆された。血糖値の上昇を抑制した理由として、ACE阻害ペプチドによる血中アンジオテンシンII濃度の低下があげられる。アンジオテンシンIIは副腎でのアルドステロンの分泌を促進する。アルドステロンは低カリウム症を引き起こし、インスリンの分泌を低下させる。加えて筋肉および脂肪組織のグルコトランスポーターを減らし、血液から細胞膜へのグルコースの取り込みを減少させる。さらにアルドステロンは活性酸素種を産生することでインスリン受容体基質の劣化を引き起こし、インスリン抵抗性を上昇させる³⁶⁾。したがって、ACE阻害ペプチドが血中アンジオテンシンII濃度を低下させることで、インスリン分泌の低下およびインスリン抵抗性の増加に關与するアルドステロン産生を抑制し、血糖値の上昇が抑えられたと考えられる。

昨年度の本研究により同定した新規ACE阻害ペプチドA5はsubstrate typeであり、ペプチドM6はprodrug typeであることを明らかにした^{27,28)}。さらに、二つのACE阻害ペプチドをSHRに経口投与したペプチドM6を経口投与すると、収縮期血圧が3時間後に12mmHg降下することを認めた。さらに、6時間後には23mmHgの降圧が認められ、かなり強い活性があることを明らかにした。ペプチドM6はprodrug typeであることから、3時間後から6時間後への降圧幅の広がり、より活性の強いペプチドが得られたために生じた可能性が考えられた。一方、ペプチドA5を経口投与すると、収縮期血圧は3時間後に12mmHg降下し、ペプチドM6と同様の活性と見られた。6時間後にはさらに血圧が低下し、17mmHgの降圧が確認されたが、ペプチドM6よりもその降圧幅は小さかった。

以上のように、本実験で単離されたACE阻害ペプチドは*in vivo*で血圧降下作用があることが認められ、生活習慣病予防につながる効果を食肉に期待できると考えられる。

また、酵素処理した食肉の生理活性機能を確認するため、自然発症高血圧ラット(SHR/NDmc-cp)および自然発症糖尿病ラット(GK/Slc)を用いて投与試験を行った結果、SHRに連続酵素処理した食肉を投与することで、収縮期血圧を有意に低下することを明らかにした。さらに、SHRおよびGK ratの結果により、酵素処理した食肉を食べることで、断定はできないものの血糖値が有意に下がることが明らかになったことから、ヒトの日常の食事摂取により血糖値の上昇を抑制し、生活習慣病の予防や治療に効果的である可能性が示唆された。

次に経口糖負荷試験による血糖値の測定を行った。経口ブドウ糖負荷試験とは空腹時のブドウ糖を摂取し、その後、決められた時間に血糖値の測定を行い、血糖値の変動により糖尿病か否かがわかる、糖尿病の診断に有効な試験である

³⁷⁾。経口投与後の血糖値の上昇が食肉ペプチドの摂取により抑制される傾向が認められた。今後、糖尿病、動脈硬化症および高血圧症の増悪因子であることが判明したアンジオテンシンII³⁸⁾の抑制作用との関係で、食肉由来ペプチドの効果をさらに詳細に検討する必要がある。

以上の結果から、本実験で単離されたACE阻害ペプチドは*in vivo*で血圧降下作用があることが認められ、さらに、酵素分解ペプチドを自然発症高血圧ラットおよび自然発症糖尿病ラットを用いた持続投与試験を行った結果、連続酵素処理食肉を投与したSHRラットおよびGKラットにおいて血圧降下作用を示すと共に、血糖値を低下させる傾向も認められた。これらのことは生活習慣病予防につながる効果を食肉に期待できるのではないかと考えられ、食肉全体の価値を高めることにつながる結果であり、食肉消費の拡大に貢献していくことが期待される。

【参考文献】

- 1) Guidelines Subcommittee; *World Health Organization*, (1999)
- 2) International Society of Hypertension guidelines for the management of hypertension. *J. Hypertens.*, 17, 151-183 (1999)
- 3) The sixth report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and treatment of High Blood Pressure. *Arch Intern. Med.*, 157, 2413-2445 (1997)
- 4) 日本高血圧学会高血圧治療ガイドライン作成委員会;高血圧治療ガイドライン 2000年版 (JSH2000) *日本高血圧学会*, (2000)
- 5) 田中繁道, 飯村政. *日本臨床 (増刊) 高血圧 (下巻)*, 623-629 (1992)
- 6) 尾前照雄, 河野雄平. *日本臨床 (増刊) 高血圧*, 623-630 (1992)
- 7) 日和田邦夫, 阿部陽一. *高血圧の予防と管理*, 学会センター関西学会出版センター, 12, 9-27 (2001)
- 8) 松尾寿之, 香取信, 大石幸子, 加藤久雄, 三宅可浩. *キニンとアンジオテンシン生体調節の分子機構*, 講談社サイエンティフィック, 2, 4-7, 23-24 (1994)
- 9) Kostis J.B, Am. *J. Hypertens.*, 8, 909-914 (1995)
- 10) 金子好宏, 山田和生, 池田正男, 尾前照雄, 武田忠直, 塩之入洋, 増山義明, 熊原雄一, 国府達郎, 荒川規矩男, *医学のあゆみ*, 122, 62-85 (1982)
- 12) Irali Z.H, Hall W.D, *Ann. Intern. Med.*, 117, 234-242 (1992)
- 13) 塩之入洋, 杉本孝一, 高崎泉, 安田元. *日本臨床 (高血圧)*, 50, 743-752 (1992)
- 14) Dziuba J, Minkiewicz P, Nalecz D, *Nahrung-Food*, 46, 190-195 (1999)
- 15) 関屋宗一郎, 小林義雄, 喜多英一, 今村吉水, 戸山靖一, *日本栄養・食糧学会誌*, 45, 513-517 (1992)
- 16) 藤田裕之, 安本良一, 長谷川昌康, 大島一徳, *薬理と治療*, 25, 2161-2165 (1997)
- 17) Hata Y, Yamamoto M, Ohni M, Nakajima K, Nakamura Y. *Am. J. Clin. Nutr.*, 64, 767-771 (1996)
- 18) Yasuda H, Tada Y, Hayashi Y, Jomori T, Takaiwa F. *Transgenic Res.*, 14 (5), 677-84. (2005)
- 19) 食生活データブック 2002, *財団法人農林統計協会*, 24-27 (2002)
- 20) 森田重廣. *食肉の科学*, 学窓社, 25-28 (1992)
- 21) Arihara K, Nakashima Y, Mukai T, Ishikawa T, Itou M. *Meat Sci.*, 57, 319-324 (2001)

- 22) Katayama K, Fuchu H, Sakata A, Kawahara S, Yamauchi K, Kawamura Y, Muguruma M. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 16, 417-424 (2003)
- 23) Katayama K, Tomatsu M, Fuchu H, Sugiyama M, Kawahara S, Yamauchi K, Kawamura Y, Muguruma M. *Anim. Sci. J.*, 74, 53-58 (2003)
- 24) Katayama K, Tomatsu M, Kawahara S, Yamauchi K, Fuchu H, Sugiyama M, Kawamura Y, Muguruma M. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 771-775 (2004)
- 25) Katayama K, Jamhari, Mori T, Kawahara S, Miake K, Kodama Y, Sugiyama M, Kawamura Y, Nakayama M, Mayuyama M, Muguruma M. *J. Food Sci.*, 72, S702-S706 (2007)
- 26) Katayama K, Anggraeni H.E, Mori T, Ahhmed A. M, Kawahara S, Sugiyama M, Nakayama T, Maruyama M, Muguruma M. *J. Agric. Food Chem.*, 56, 355-360 (2008)
- 27) Muguruma M, Ahhmed A.M, Katayama K, Kawahara S, Maruyama M, Nakamura T. *Food Chem.*, 114, 516-522 (2009)
- 28) 六車 三治男, 難波 靖, 丸山真杉, 中村豊郎; **食肉に関する成分等の調査研究事業報告書、日本食肉消費総合センター**, (2008)
- 29) Laemmli U. K, *Nature* 227, 680-685 (1970)
- 30) 岡田雅人, 宮崎香; **タンパク質実験ノート 抽出と分離精製**, 羊土社, 29 (1996)
- 31) Murphy J.B, Kies M.W. *Biochim. Biophys. Acta*, 45, 382-384 (1960)
- 32) Cushman D.W, Cheung H. S. *Biochem. Pharmacol.*, 20, 1637-1648 (1971)
- 33) Ikeda K, Nara Y, Yamori Y. *Lab. Anim. J.*, 25(1), 26-9. (1991)
- 34) Enzyme Immunoassay Techniques, An Overview. Porstmann, T. Kiessig, S.T. *J. Immun. Met.*, 150, 5-21 (1992)
- 35) Stamler J, Elliott P, Kesteloot H, Nichols R, Claeys G, Dyer A.R, Stamler R, *Circulation* 94, 1629-1634 (1996)
- 36) Lastra-Lastra G, Sowers J. R, Restrepo-Eraza K, Manrique-Acevedo C, Lastra-Gonzalez G, *Clin. Endocrinol.*, (2008)
- 37) Harris, M. I., Flegal, K.M., Cowie, C.C., Eberhardt, M.S., Goldstein, D.E., Little, R.R., Wiedmeyer, H.-M., Byrd-Holt, D.D. *Diabetes Care*, 21(4), 518-524 (1998)
- 38) Talpur N. A, Echard B. W, Fan A. Y, Jaffari O, Bagchi D, Preuss H. G. *Mol. Cell. Biochem.*, 237(1-2), 129-36 (2002)

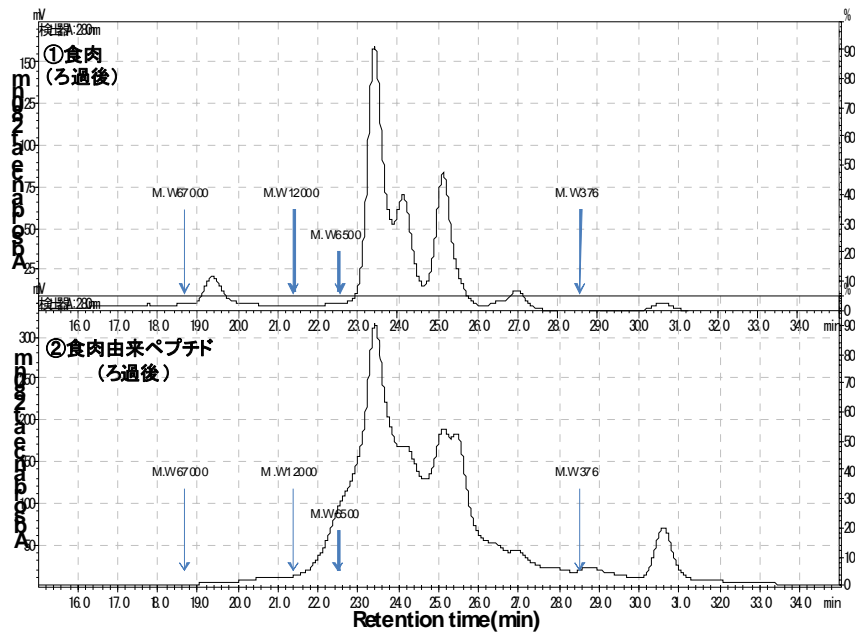


図1 食肉由来ペプチドHPLCパターン(ゲルろ過)

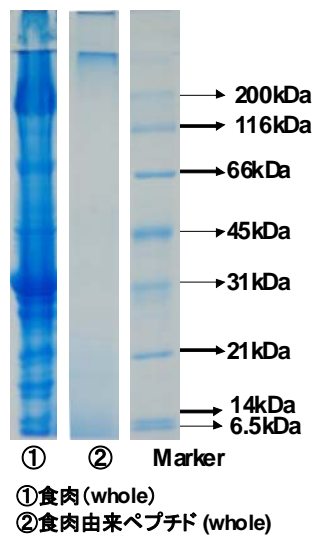


図2 食肉由来ペプチドのSDS-PAGEパターン

表1 食肉由来ペプチドのタンパク質濃度およびIC₅₀

	タンパク質濃度 (mg/ml)	IC ₅₀ (mg/ml)
食肉	3.76	2000<
食肉由来 ペプチド	67.68	3.69

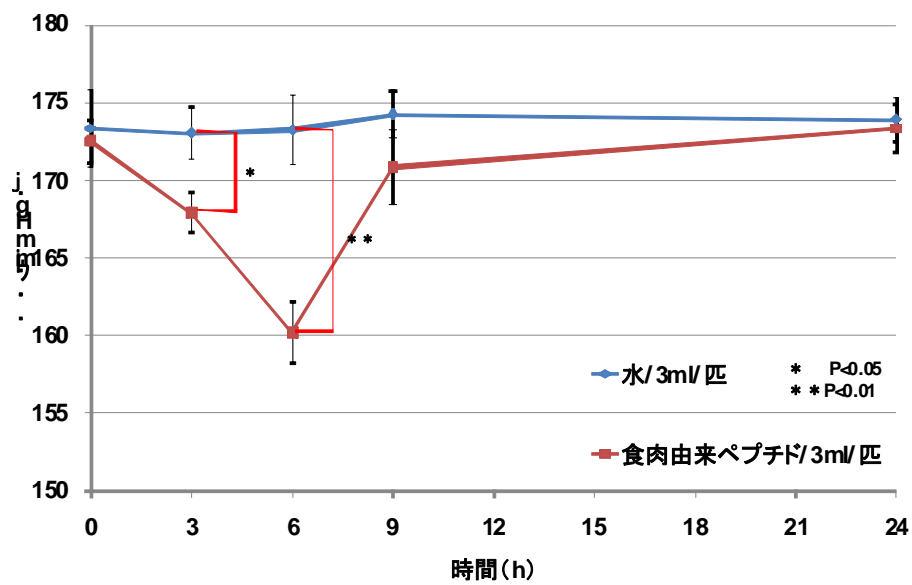


図3 経口投与によるSHRの24時間の血圧変化

数値は平均値±標準誤差で示した。(n=4)

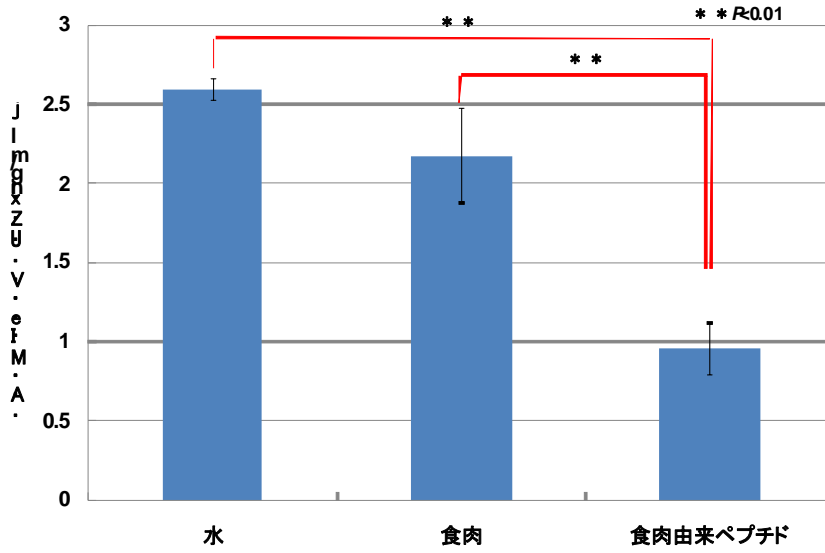


図4 Wistarラットの血中アンギオテンシン II 濃度 (ng/ml)
 数値は平均値±標準誤差で示した。(n=4)

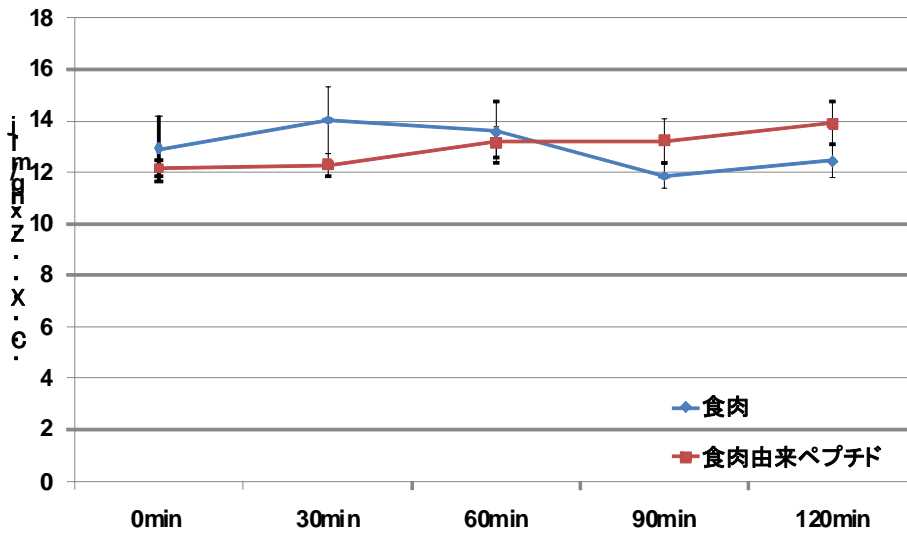


図5 インスリン濃度 (ng/ml)

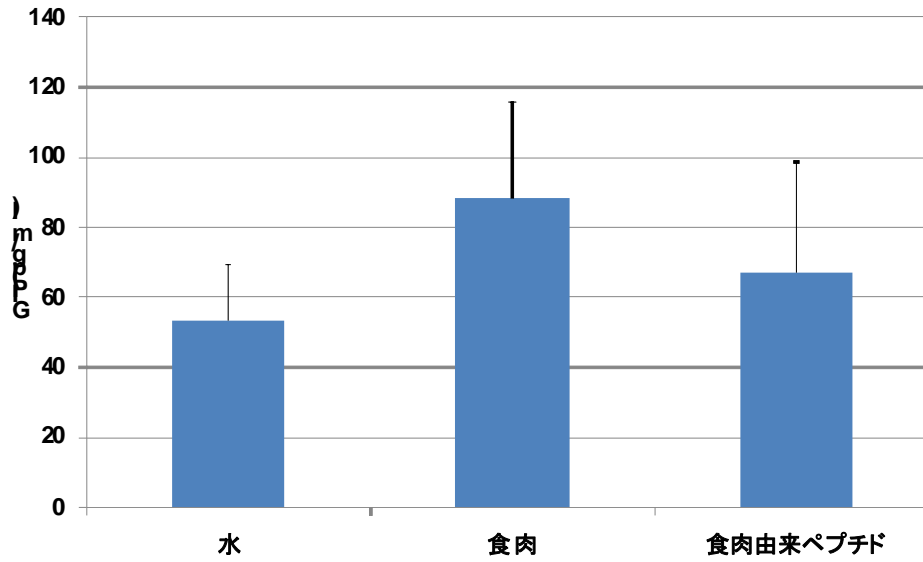


図6 GP濃度(pg/ml)

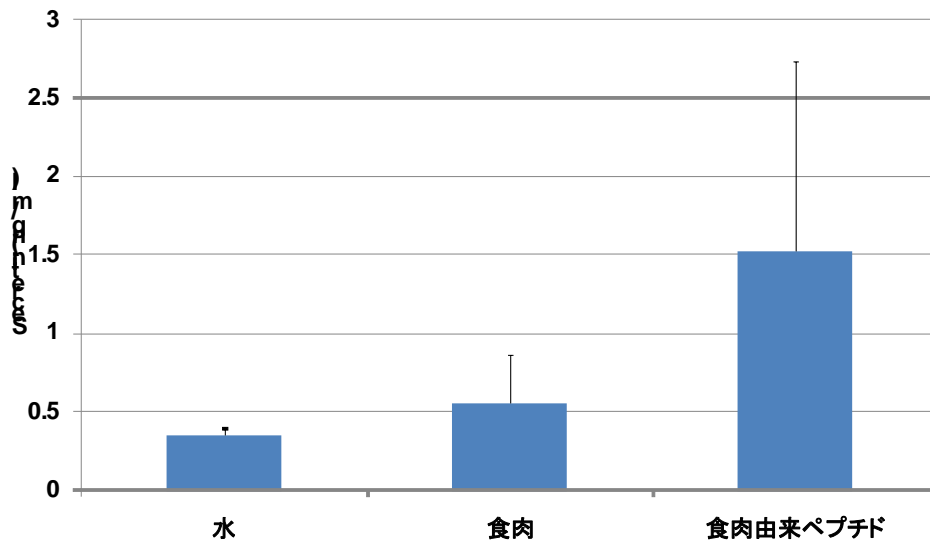


図7 Secretin(ng/ml)

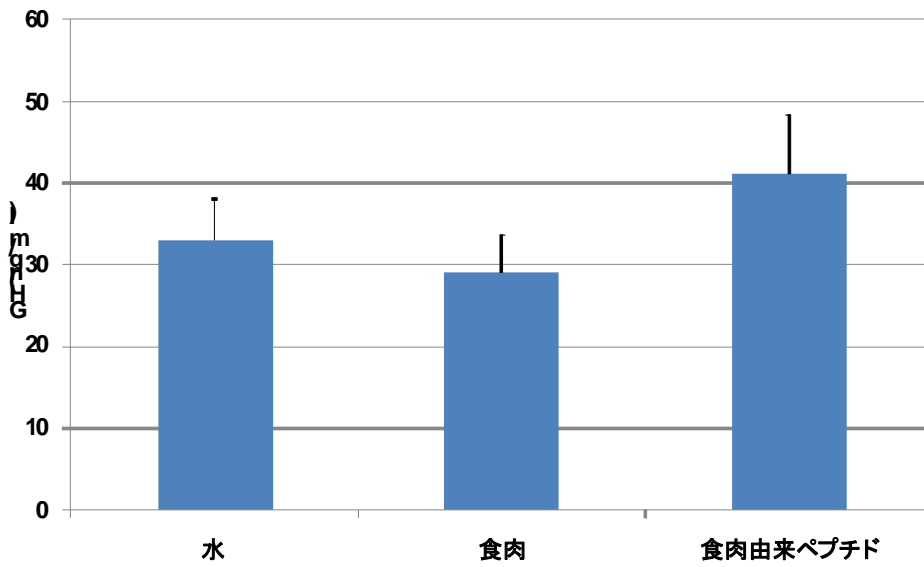


図8 GH(ng/ml)

表2 飼料の一般成分(粉末飼料の5%をサンプルに代替)

	食肉区飼料	食肉由来ペプチド区飼料	測定方法
水分含量	7.0%	7.1%	常圧加熱乾燥法
粗タンパク質	25.3%	26.1%	ケルダール法
粗脂肪	6.6%	5.8%	ジエチルエーテル法
粗繊維	2.6%	2.5%	ろ過法
粗灰分	5.6%	6.1%	直接灰化法

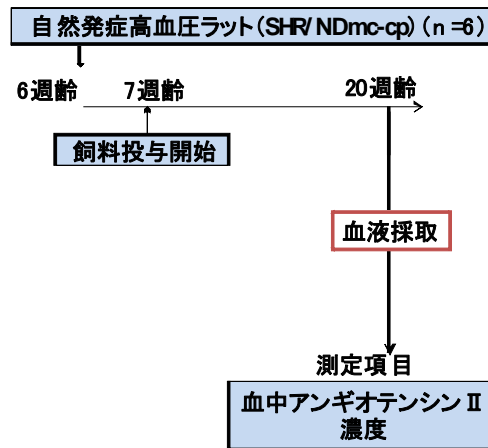


図9 食肉由来ペプチドの病態モデルラットへの投与実験スケジュール

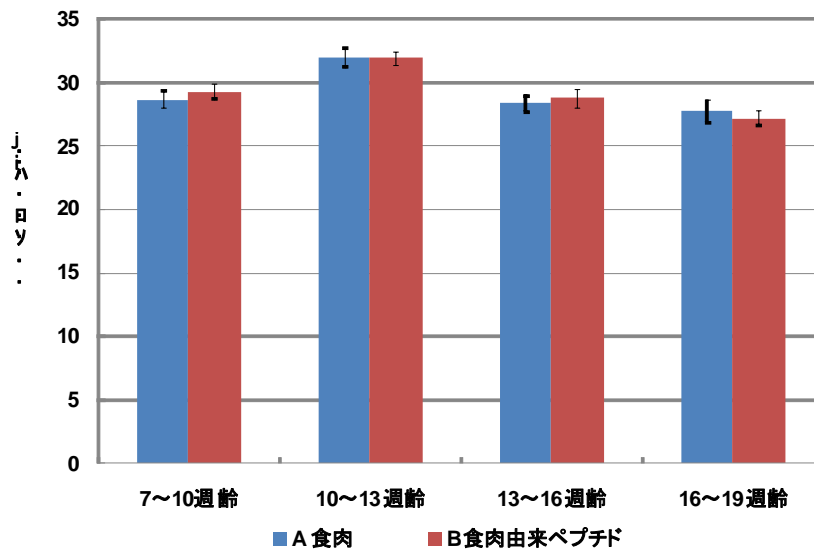


図10 各週齢間のラットの飼料摂取量(g)

数値は平均値±標準誤差で示した。(n=6)

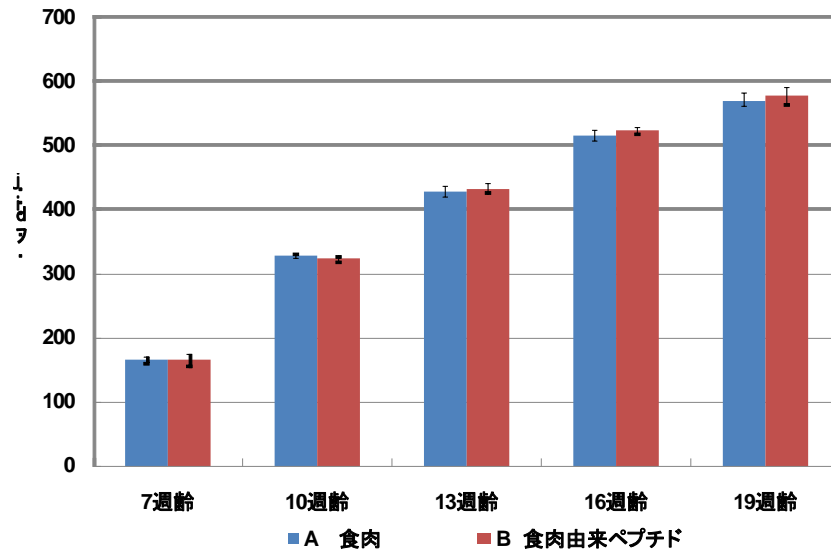


図11 各週齢のラットの体重(g)

数値は平均値±標準誤差で示した。(n=6)

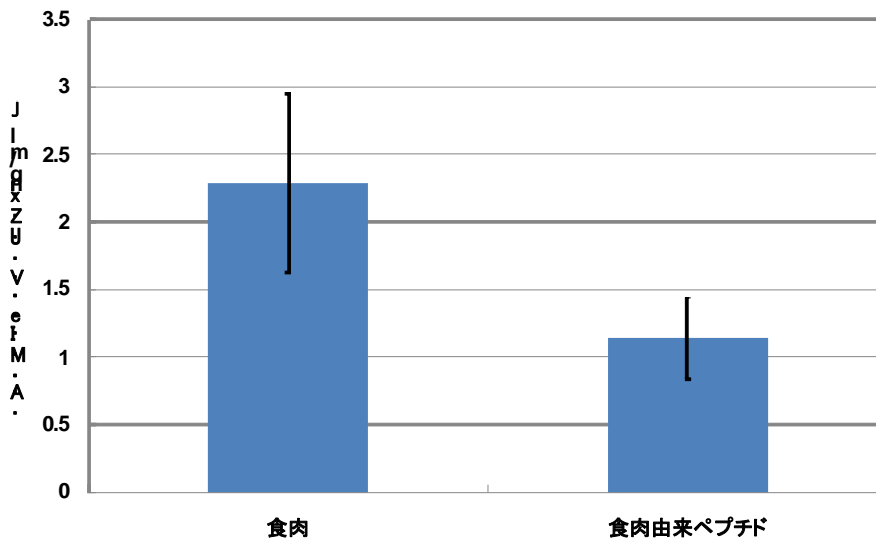


図12 ラットの血中アンギオテンシン II 濃度 (ng/ml)

数値は平均値±標準誤差で示した。(n=6)

バイオ燃料副産物からの
食肉抗酸化ペプチドの開発

京都府立大学生命環境学部食保健学科助手

朴恩榮

調査研究成果の報告書

研究テーマ：バイオ燃料副産物からの食肉抗酸化ペプチドの開発

報告者：京都府立大学生命環境学部食保健学科助手朴恩榮

1. はじめに

食品の加工、保存において脂質の酸化は品質の劣化や毒性の発現と関連することが明らかとなっている。活性酸素やフリーラジカルは、食品中の不飽和脂肪酸と反応して過酸化物を生成し、食品の風味や栄養価などを損ない品質の劣化を引き起こす。さらに、生体内での不飽和脂肪酸の酸化により生ずる過酸化脂質やラジカルが引き金となり生体内のタンパク質、脂質、核酸などの酸化が誘発され、これらが生活習慣病や加齢に伴って増える疾患である動脈硬化、心筋梗塞、糖尿病の合併症、老化、発ガンの要因となることが明らかにされつつある。これらのことから、近年生体に関わる酸化に対する関心が高まっている¹⁻⁴⁾。

抗酸化物は食品の保存性の向上及び、酸化ストレスによる疾患を予防、抑制する効果があると考えられている。食品成分の中には高い抗酸化活性を持つものがあり、食品中及び生体内での抗酸化機能が期待されている。食品分野では酸化防止の目的でブチルヒドロキシアニソール(BHA)やジブチルヒドロキソトルエン(BHT)等の有機合成化合物やトコフェロール、アスコルビン酸やβ-カロテン等の天然物が使用されている。しかし、BHTやBHAなどの合成抗酸化剤は、トコフェロール、アスコルビン酸などの天然抗酸化剤に比べて優れた酸化防止作用を示すが、消費者が好まない傾向が見られる。一方、天然物由来の抗酸化成分は、食品添加物としての効果の面で合成抗酸化剤には劣っている場合があるが、健康増進作用が期待されている。食品中の抗酸化物質には、お茶やワインなどに含まれるポリフェノール類、緑黄色野菜に含まれるカロテノイド類などが知られている⁵⁻¹²⁾。

食品タンパク質・アミノ酸・食品タンパク質の酵素分解物にも抗酸化機能があることが知られており、この様なタンパク質分解物中からいくつかの抗酸化ペプチドが分離されている¹³⁻¹⁹⁾。タンパク質分解物中から活性画分を分離するためには、タンパク質分解物を逆相カラムの用いた高性能液体クロマトグラフィー(HPLC)が汎用されている。構造を決定するためにペプチドを分離することはHPLCの開発により容易になっている²⁰⁾。しかし、食品素材に利用できる量のペプチドを液体クロマトグラフィーにより分離するには装置、分離剤が高価であり経済的に困難である。さらに、ペプチドの分画に汎用する溶媒(メタノール、アセトニトリルなど)は、食品の製造に用いることは現状では困難である。そのため、食品や生体に投与可能なペプチド分画物の抗酸化機能についてはほとんど報告例がない。そこで、本研究では、これらの問題を解決するため、水のみを溶媒に用い、大量分画が可能である自己等電点電気泳動(Autofocusing)装置²¹⁻²³⁾を使用し、多量に入手可能なバイオ燃料副産物であるタンパク質、特に食品タンパク質由来ペプチドである大豆ペプチド

とグルテンペプチドを分画し、分画物の試験管内での抗酸化活性と食肉へ添加した場合の抗酸化活性を比較し、高い抗酸化性を持つペプチド画分を調製することを目的とした。

2. 分画前の食品タンパク質分解物の抗酸化活性

(1) 安定なラジカルである 1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドロラジカル (DPPH) を用いて食品タンパク質の酵素分解物の水溶液中でのラジカル消去能を検討した。工業的に調製された市販のカゼイン、分離大豆タンパク質、グルテンの酵素分解物を用いた。以後カゼインペプチド、大豆ペプチド、グルテンペプチドと呼ぶ。DPPH は 517nm で吸収を示すが、ラジカル消去能を持っているものと反応するとその吸光度が減少する。つまり、吸光度の値が低いほどラジカル消去能が高いことになる²⁴⁾。図 1 は試料濃度 10 mg/mL で測定した結果である。これらのペプチドの中ではカゼインペプチド、ミルク乳清タンパク質と比較してグルテンペプチド、大豆ペプチドに高い DPPH ラジカル消去活性があり、特にグルテンペプチドは抗酸化剤として用いられている BHT とビタミン C に近い値を示すことを確認した。

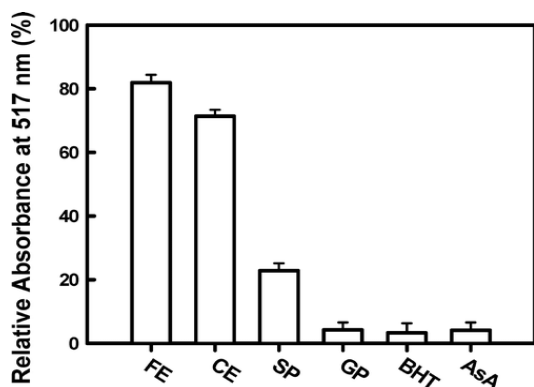


図 1. ペプチドの DPPH ラジカル消去能 (各サンプルの濃度は 1%、BHT の濃度は 0.1%、アスコルビン酸の濃度は 0.01%である。(FE および CE, カゼインペプチド; SP, 大豆ペプチド; GP, グルテンペプチド)

(2) ペプチドの β カロテン退色法によるリノール酸の酸化抑制効果

図 1 で高い DPPH ラジカル消去能を示したグルテンペプチドと大豆ペプチドを用い β -カロテン退色法²⁵⁾によるリノール酸の抗酸化活性について検討した。図 2 に示してあるように、グルテンペプチドには特に 0.5%以上の濃度で抗酸化能が高いことが分かった。大豆ペプチドの場合でもグルテンペプチドと同様に 0.5%以上の濃度で高い抗酸化能を示した。

(3) ペプチドの乳化状態での脂質酸化抑制効果

ペプチドを添加して調製したリノール酸乳化物にラジカル発生剤であるアゾビス (2-アミジノプロパン) AAPH を添加し、ペルオキシラジカルを発生させた²⁶⁾。これらを 40°C で

450 分間保存し、フェリックチオシアネイト (FTC) 法^{26,27}により過酸化脂質を測定した。吸光度が高くなるほど過酸化脂質が形成されたことを示す。図 3 に示すように高濃度 (1.5% および 3%) ではグルテンペプチド、大豆ペプチドの場合とも対照群に比べて酸化抑制効果が見られた。特にグルテンペプチドは低濃度でも高濃度でも高い酸化抑制効果を示した。

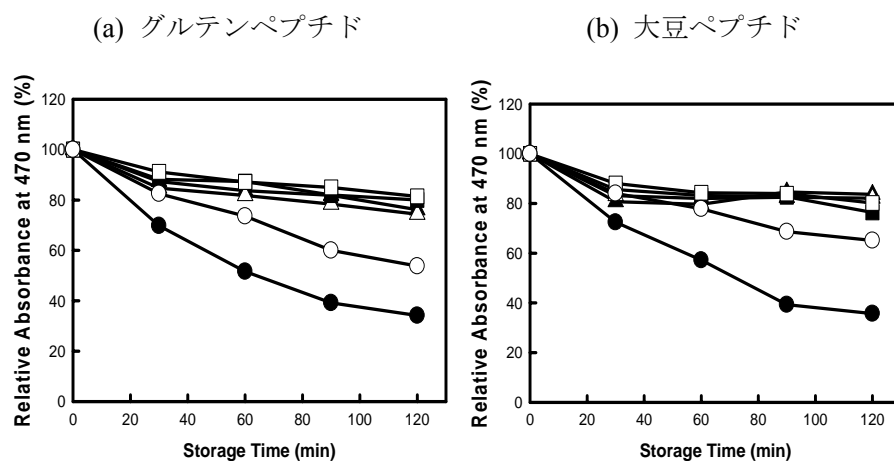


図 2. ペプチドのβカロテン退色法によるリノール酸の酸化抑制効果 (●), 対照群 ; (▲), 10% ; (△), 5% ; (■), 1% ; (□), 0.5% ; (○), 0.1%

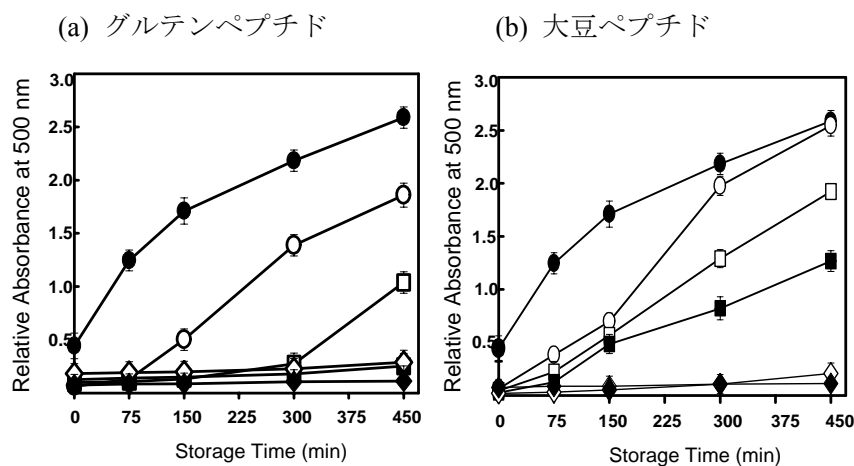


図 3. 乳化系でのリノール酸の酸化に及ぼすグルテンおよび大豆ペプチドの影響 (●), 対照群 ; (○), 0.3% ; (□), 0.75% ; (■), 1.5% ; (◇), 3.0% ; (◆), BHT (0.03%) at 40°C

(4) 食品への応用

(A) グルテンペプチドの抗酸化活性

次に、食品中に添加したグルテンペプチドの抗酸化活性を評価した。評価方法は脂質量 10% になるように調製した豚挽肉にグルテンペプチドを重量の 10% 添加した GP 群と何も添加しない対照群を用意し、パテ状に成形した後加熱せずに生の状態で、または両面を加

熱後 4℃、20℃で数日間保存した。その間、脂質酸化により生じるマロンジアルデヒド(MDA)濃度を 3,5 チオバルビツール酸(TBA)法^{28, 29)}で測定することにより抗酸化活性を評価した。図 4 に示してあるように 4℃で冷蔵保存した場合、非加熱のものでは対照群、GP 群で MDA 生成量に差が見られなかった。加熱した場合、対照群と比較して GP 群で MDA 生成が少なかったことが示された。図 5 に示してあるように 20℃で保存した場合の結果では非加熱、加熱の両方で対照群より GP 群において MDA 生成が少なかったことが示された。

以上の結果より、大豆ペプチド、グルテンペプチドは試験管内のモデル系、または食品系で抗酸化作用を持つことが明らかとなった。そのため、これらの調製物中のペプチドを分画し、どの様なペプチドが抗酸化作用を持つかを検討した。

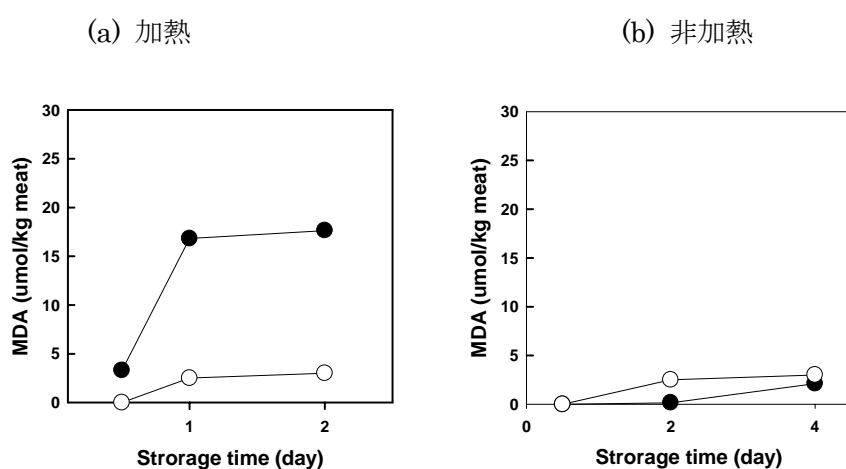


図 4. ミートパテ中の脂質酸化に対するグルテンペプチドの添加効果 (4℃保存)
 (●), 対照群 ; (○), GP 群 10%

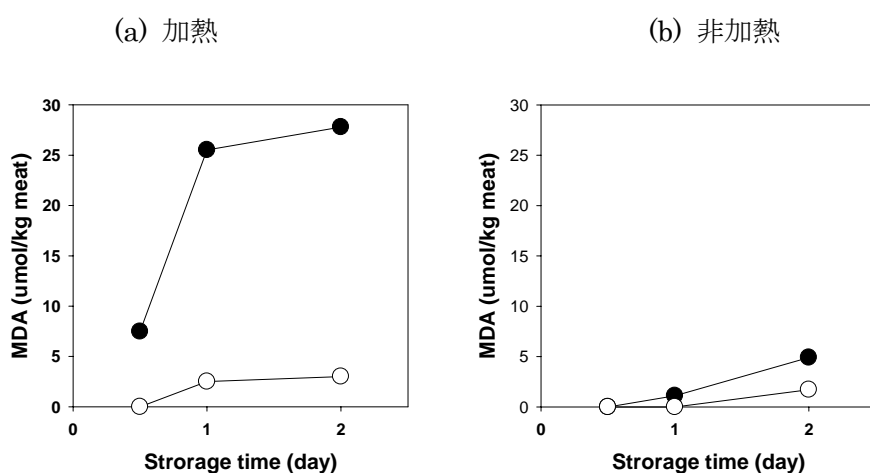


図 5. ミートパテ中の脂質酸化に対するグルテンペプチドの添加効果 (20℃保存)
 (●), 対照群; (○), GP 群 10%

(B) 官能評価

1. 試料の調製

豚挽肉を 30 秒間ミキサを用いてペースト状態にし、さらにペプチドを添加し 30 秒間ミキサを使用し直径 5 cm、厚さ 3~4 mm の大きさ (10 g) に成形し、150℃で 3 分間両面を加熱調理し官能検査に用いた。食塩を 0.5 または 1 % 添加し、グルテンまたは大豆ペプチドをそれぞれ 0.5、1、5、10 % 添加し成形した豚挽肉を加熱調理し、官能評価に用いた。

2. パネル

官能評価を行う前に 3 回訓練された健康な当研究室の大学院生、学部生、教員をパネルとし、評価に影響を及ぼす様々な要因をできる限りコントロールしながら実施した。検査には 12 人が 8 回行い、すべて同じメンバーで実施した。

3. 官能評価方法

検査は、午後 3~5 時に研究室で行い、各検査ごとの検査の間には、ミネラルウォーターで口腔内を洗浄した。訓練されたパネルを対象にし、グルテンおよび大豆ペプチドを豚挽肉に添加した場合の嗜好型官能評価を行った。各試験区について、評点法で、検査員に見た目 (外観)、香り、味、食感、総合的な評価の 5 つの項目でそれぞれ点数 (-3 から 3 まで) を付けてもらい、また、強制選択法の 2 点嗜好試験方法も用い上記の二つの方法で官能評価を行った。

4. 官能評価の結果

官能評価の結果は表 1 に示した。10%添加群はパネルの評価が非常に低かったため、さらに評価しなかった。グルテンおよび大豆ペプチドは、どちらも食塩 1% 添加、ペプチド 1% の添加が添加群では一番高い効果が得られた。それらの結果から、グルテンまたは大豆ペプチドおよび食塩をそれぞれ 1% 添加したペプチド添加群と何も添加してない対照群に絞って官能評価を行った。表 2 に示したように、グルテンおよび大豆ペプチドいずれも総合的には対照群と比べペプチド添加群に有意な差は見られなかった。これらの結果から、ペプチドの苦味などが嗜好性に悪い影響を与えてないことが示唆された。しかし、香りの評価ではどちらのペプチドの場合でも対照群と比べ好まない傾向が見られたことから、ペプチドをそのまま肉に添加することは香りの面では難しいと判断された。この問題点を解決するためにはペプチドを **Autofocusing** で分画することにより、匂いや苦味成分が含まれている画分を取り除く方法が考えられる。この方法により分画したペプチド画分を食品に添加することで抗酸化効果も高く嗜好性の面でも悪い影響を与えない食品が開発できると考えられる。

表 1. 評点法による官能評価の検定表 (表の数字は評点を表す)

試料	見た目	香り	味	食感	総合
対照群 (食塩 1%添加群)	-0.267	0.233	0.500	0.333	0.233
対照群 (食塩 0.5%添加群)	0.133	0.233	0.600	0.533	0.533
GP 5% (食塩 1%添加群)	0.600	-0.300	0.200	0.750	0.100
GP 1% (食塩 1%添加群)	0.633	0.500	1.000	1.033	1.033
GP 1% (食塩 0.5%添加群)	0.533	0.067	0.367	-0.133	0.167
SP 5% (食塩 1%添加群)	-0.350	-0.600	-1.100	-0.600	-1.100
SP 1% (食塩 1%添加群)	0.333	0.733	1.400	0.800	1.033
SP 1% (食塩 0.5%添加群)	0.300	0.700	0.833	0.100	0.567

表 2-1. 2点嗜好試験方法による大豆ペプチド添加に対する官能評価の検定表 (表の数字は検査員数を表す)

試料	見た目	香り	味	食感	総合
対照群 (食塩 1%添加群)	7	7	6	9	6
SP 1% (食塩 1%添加群)	5	5	6	3	6

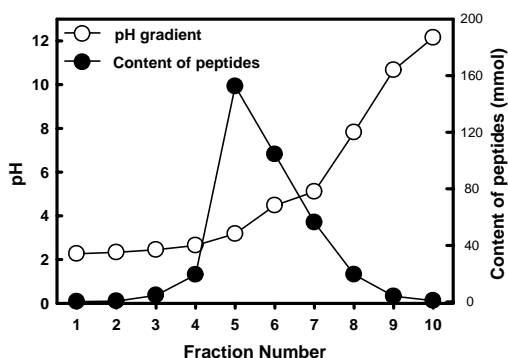
表 2-2. 2点嗜好試験方法による大豆ペプチド添加に対する官能評価の検定表 (表の数字は検査員数を表す)

試料	見た目	香り	味	食感	総合
対照群 (食塩 1%添加群)	5	9	5	5	6
GP 1% (食塩 1%添加群)	7	3	7	7	6

3. Autofocusing によるペプチドの分画

以上の結果から *in vitro* および食品系で高い抗酸化活性を示したグルテンペプチドおよび大豆ペプチドを用いこれらの活性ペプチドを同定するため、Autofocusing 装置で分画した。Autofocusing は試料の両性担体としての性質を利用し等電点電気泳動により分画する方法である。この方法により合成アンフォラインを加えることなく、pH 勾配が生じてペプチドがそれぞれの等電点に移動し分画できる。今回は橋本ら²⁴⁾が開発した 5L の装置を使用した。サンプルコンパートメント 5、6 に 10% に調製した試料を、他のサンプルコンパートメントにはイオン交換水を 500 mL 注入し、500 V 定電圧で 24 時泳動した。Autofocusing 装置により試料が分画されたか確認するためにアミノ酸分析^{30,31)}を行った。Autofocusing により分画したグルテンおよび大豆ペプチドの pH 勾配とアミノ酸組成を図 6 および図 7 に示した。

(a) グルテンペプチド



(b) 大豆ペプチド

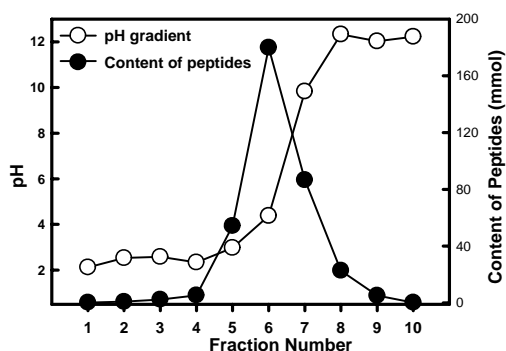
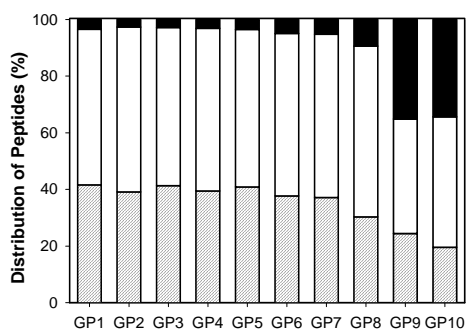


図 6. グルテン(a)および大豆(b)ペプチドの Autofocusing 画分の pH 勾配およびペプチド含有量.

(a) グルテンペプチド



(b) 大豆ペプチド

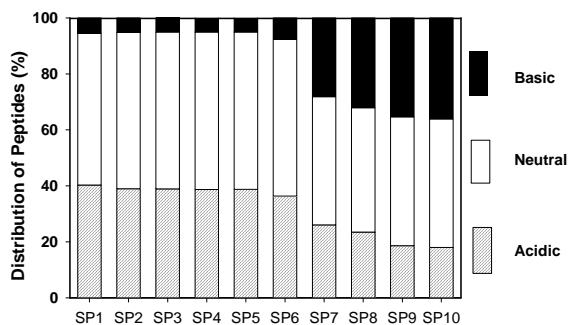


図 7. グルテン(a)および大豆(b)ペプチドの Autofocusing 画分のアミノ酸組成

図 7 は各フラクションのアミノ酸組成を示したものである。まず、グルテンペプチドの場合、Fr. 1～7 の酸性の画分では酸性のアミノ酸の割合が多く、Fr. 8～10 の塩基性の画分では塩基性のアミノ酸が多くなっている。大豆ペプチドの場合も同様の結果を示した。このことから試料が等電点に基づき酸性から塩基性に分画されたことが確認できた。

4. 分画後のペプチド画分の抗酸化活性

(1) Autofocusing ペプチド画分の DPPH ラジカル消去能

図 8 は各ペプチドの分画後の DPPH ラジカル消去能の結果である。まず、グルテンペプチドの分画後の DPPH ラジカル消去能はいずれも酸性の画分で高い活性を示した。大豆ペプチドの場合もグルテンペプチドと同じく塩基性画分より酸性画分で高い DPPH ラジカル

消去能を示した。

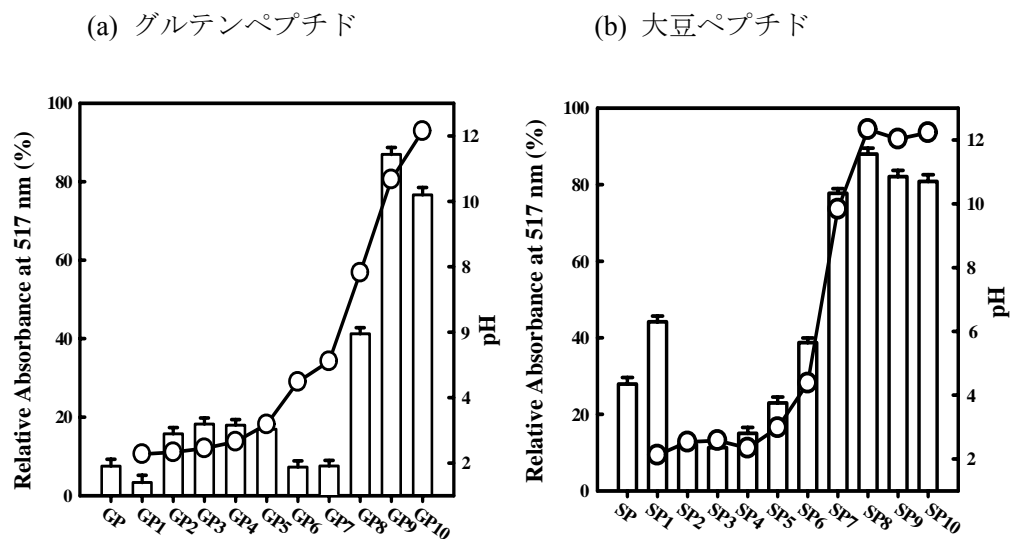


図 8. Autofocusing によるグルテン(a)および大豆(b)ペプチド画分の DPPH ラジカル消去能

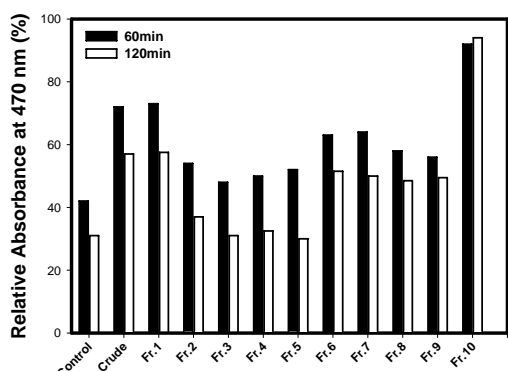
(2) ペプチド画分のβカロテン退色法によるリノール酸の酸化抑制効果

Autofocusing で分画したグルテンペプチドの抗酸化活性をβ-カロテン退色法により測定した結果である。図9に示してあるように特に塩基性画分であるFr.10において初期酸化抑制効果が高いことが示された。大豆ペプチドの場合は、特に塩基性画分であるFr.9、10で初期酸化抑制効果が高いことが示された。また、全体的にグルテンペプチドより酸化が抑制されていることが示された。

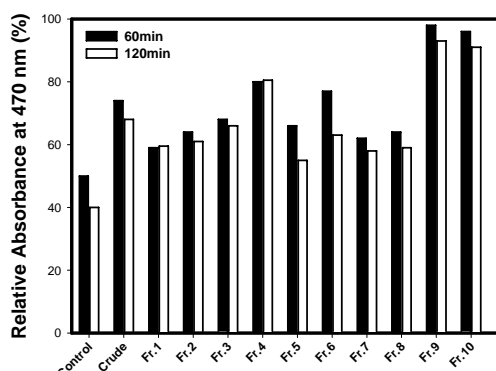
(3) 化学発光法によるOHラジカル消去活性

図10は化学発光法によるOHラジカル消去活性³²⁾のIC50値を表したものである。グルテンペプチド、大豆ペプチドの両方で、酸性、中性画分において抗酸化活性が高いことが示された。特に、大豆ペプチドにおいて抗酸化活性が強いことが分かった。一方、リノール酸の酸化を抑制する効果が強いFr.10は、OHラジカル消去能は低いことが明らかとなった。

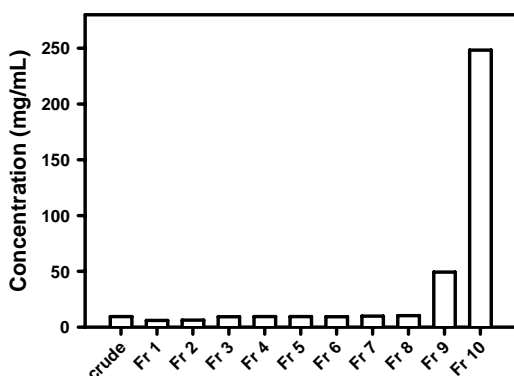
(a) グルテンペプチド



(b) 大豆ペプチド

図 9. β カロテン退色法によるリノール酸の酸化抑制効果

(a) グルテンペプチド



(b) 大豆ペプチド

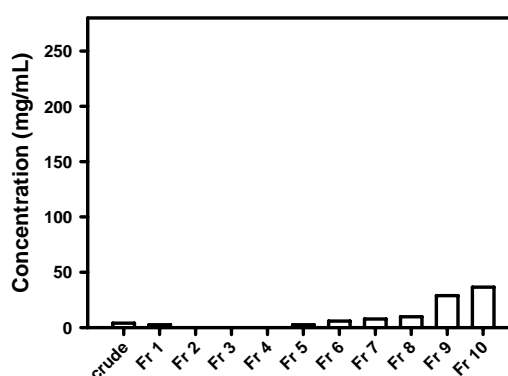


図 10. Autofocusing によるペプチド画分の OH ラジカル消去活性 (IC50)

(4) ペプチド画分の乳化状態でのリノール酸の酸化抑制効果

グルテンペプチドの分画後のリノール酸の酸化抑制効果について調べた。図 11 に示したように、Fr. 5 と 6 は、Autofocusing 後のアミノ酸分析の結果から数量的に多いメイン画分となり、これらの脂質酸化抑制効果と分画前のグルテンペプチドとの結果を比較した結果、分画前のグルテンペプチドの方が高い酸化抑制効果を示したことから各分画の混合による相乗効果があったことが考えられる。一方、塩基性分画である Fr. 9 では分画前のグルテンペプチドの結果と比べ、かなり高い脂質酸化抑制が認められ、分画することによって、高い酸化抑制効果を持つ画分が得られたことが分かった。分画後の大豆ペプチド画分による脂質酸化抑制効果について調べた結果では、図 11 に示してあるように、分画前の大豆ペプチドと Fr. 6 以外の分画後の各画分はいずれも対照群と比べ酸化抑制効果の上昇が見られた。大豆ペプチドの場合は、Autofocusing のメイン画分である Fr. 6 を除去することによって酸化抑制効果が高まるのが期待される。また、量的にもかなりの量が取れるので、大豆ペ

プチドの場合は Autofocusing の分画によって回収量も多く、リノール酸の酸化を抑制する高い活性の画分が得られると考えられる。

(5) 混合されたペプチド画分の抗酸化作用

活性の高い Autofocusing 画分をいくつか混合し、抗酸化性を調べた。図 12 は Autofocusing で分画したグルテンペプチドの抗酸化活性をβ-カロテン退色法により測定した結果である。図 12 より、中性 (Fr. 5, Fr. 6-7)、塩基性画分 (Fr. 8-10) で抗酸化活性が高いことが示された。

次に、同じ混合物を用いて化学発光法による OH ラジカル消去活性を評価した。図 13 より、混合物では中性画分で OH ラジカル消去活性が高いことが分かった。

(a) グルテンペプチド

(b) 大豆ペプチド

Fraction	300 min	600 min
Con	3.0	2.9
Crude	0.3	1.9
Fr. 1	1.0	2.1
Fr. 2	1.6	2.3
Fr. 3	1.5	2.3
Fr. 4	1.9	2.6
Fr. 5	2.1	2.9
Fr. 6	0.3	2.6
Fr. 7	0.3	2.3
Fr. 8	1.4	2.8
Fr. 9	0.3	0.3
Fr. 10	1.0	1.1

Fraction	300 min	600 min
Con	3.0	2.6
Crude	1.3	2.5
Fr. 1	0.5	1.1
Fr. 2	0.1	0.1
Fr. 3	0.1	0.8
Fr. 4	0.2	1.1
Fr. 5	0.5	1.3
Fr. 6	1.1	2.5
Fr. 7	0.1	0.6
Fr. 8	0.1	0.1
Fr. 9	0.1	0.1
Fr. 10	0.1	0.2

図 11. 乳化系でのリノール酸の酸化に及ぼすグルテン(a)および大豆(b)ペプチドの Autofocusing 画分の影響

Storage Time (min)	Control (●)	Fr. 1-4 (▲)	Fr. 5 (△)	Fr. 6-7 (■)	Fr. 8-10 (□)
0	100	100	100	100	100
20	68	78	85	85	85
40	50	70	80	80	80
60	40	65	75	75	75
80	35	60	70	70	70
100	30	55	65	65	65
120	25	50	60	60	60

図 12. Autofocusing によるペプチド混合画分のβカロテン退色法によるリノール酸の酸化抑制評価

(●), 対照群 ; (○), 分画前 ; (▲), Fr. 1-4 ; (△), Fr. 5 ; (■), Fr. 6-7 ; (□), Fr. 8-10

-63-

乳化系での脂質酸化抑制効果について検討した結果を図 14 に示す。いくつかのグルテンペプチド Autofocusing 画分をまとめ、混合物の抗酸化能を評価した。グルテンペプチドでは塩基性画分にリノール酸の酸化抑制効果が見られ、大豆ペプチドでは中性画分を除いた画分に強い抗酸化活性が見られた。

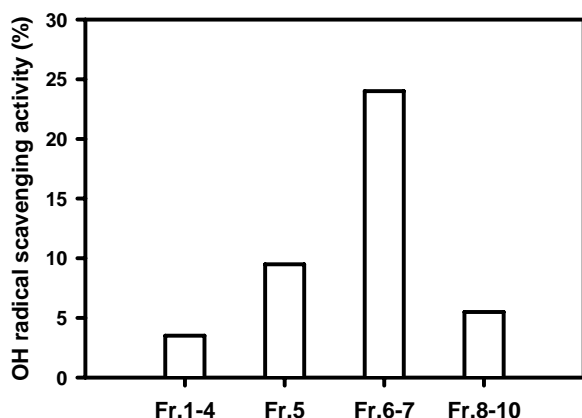


図 13. ペプチド混合画分の OH ラジカル消去活性

(a) グルテンペプチド

(b) 大豆ペプチド

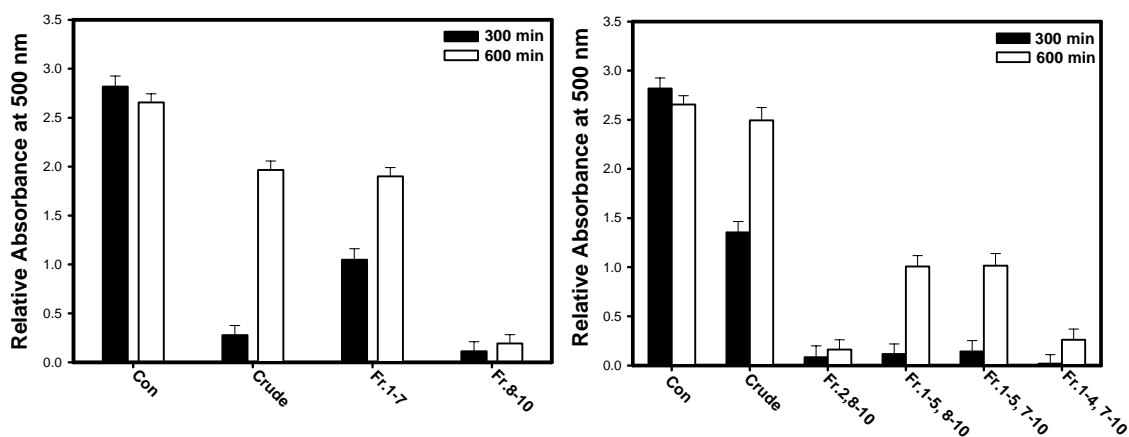


図 14. 乳化系でのリノール酸の酸化に及ぼすグルテン(a)および大豆(b)ペプチドの Autofocusing 混合画分の影響

(6) ペプチド画分の食品への応用

図 15 は Autofocusing により分画したグルテンペプチドを豚挽肉中に添加した時の抗酸化活性評価の結果である。酸性、中性、塩基性画分のいずれの画分でも対照群と比較して MDA 生成が抑制された。4℃では 20℃に保存した場合と比べ酸性画分(Fr.1-4)および塩基性画分(Fr.8-10)で比較的高い抗酸化活性が見られた。分画前のグルテンペプチド添加(10%添加)の結果と比べると分画後の添加(1%添加)では 1/10 の量でも高い酸化抑

制効果を示したことから、Autofocusing で分画することにより、より高い活性画分が得られたことが示唆された。

(a) 4°C

(b) 20°C

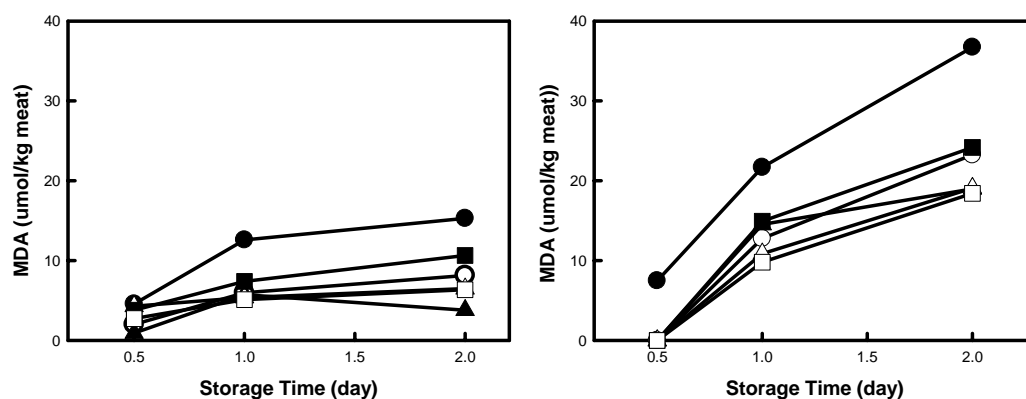


図 15. ミートパテ中の脂質酸化に対するグルテンペプチドの添加効果（1%）

(●), 対照群 ; (○), 分画前 ; (▲), Fr. 1-4 ; (△), Fr. 5 ; (■), Fr. 6-7 ; (□), Fr. 8-10

5. 考察

グルテンペプチドを豚挽肉に添加した場合、加熱肉・非加熱肉の両方の場合でグルテンペプチド添加により脂質酸化抑制効果が示された。これよりグルテンペプチドは食品に添加した場合にも抗酸化活性を示すことが分かった。非加熱肉より加熱肉で MDA 生成量が増加した理由として、加熱調理後保存中に脂質の酸化が促進したためと考えられる。

リノール酸の酸化抑制では、塩基性のペプチドがエマルジョンを保護し、抗酸化効果を発揮したと考えられる。一方、DPPH および OH ラジカル消去能は酸性画分で高い活性を示し、β-カロテン脱色法では塩基性画分で高い酸化抑制効果がみられた。豚挽肉に添加した場合では酸性、中性、塩基性、いずれの画分でも MDA の生成を抑制する傾向が見られた。官能評価の結果、ペプチドの添加による嗜好性には対照群と添加群に有意な差は見られなかった。In vitro で高い抗酸化活性を示した画分以外でも酸化が抑制されたことから、食品中では複数メカニズムの相互作用による抗酸化が生じていることが示唆された。また、1%ペプチド添加による嗜好性への悪影響は少ないことが示唆された。

分画混合物の in vitro 実験結果より、各画分に相互作用や抑制作用があることも示唆された。そのため、単独の in vitro での評価で決定したペプチド画分の活性と食品中での抗酸化活性は一致しないことが示唆される。In vitro での抗酸化スクリーニングが必ずしも食品中での抗酸化活性を示さないことが示唆されたため、食品系で抗酸化能を示すタンパク質分解物を再スクリーニングし、食品系での評価により、さらに高い抗酸化作用を持つ調製物を得るべきであると考えている。これには Autofocusing が有用であると考えられる。また、大豆ペプチドについても検討中であり、Autofocusing 画分の官能評価および他の食品系での抗酸化活性についても検討していく予定である。

6. 参考文献

- 1) Sakanaki, S.; Tachibana, Y.; Ishihara, N.; Juneja, L. R. Antioxidant properties of casein calcium peptides and their effects on lipid oxidation in beef homogenates. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 464-468.
- 2) Jadhav, S. J.; Nimbalkar, S. S.; Kulkarni, A. D.; Madhavi, D. L. Lipid oxidation in biological and food systems. In *Food Antioxidants*, Madhavi, D. L., Deshpande, S. S., Salunkhe, D. K., Eds.; Dekker: New York, 1996; pp 5-63.
- 3) Nawar, W. W. Lipids. In *Food Chemistry*, 3rd ed; Fennema, O. R., Ed.; Dekker: New York, 1996; pp 225-319.
- 4) Frankel, E. N. Chemistry of autoxidation: mechanism, products and flavor significance. In *Flavor Chemistry of Fats and Oils*; Min, D. B., Smouse, T. H., Eds.; American Oil Chemists' Society: Champaign, IL, 1985; pp 1-34.
- 5) Hattori, M.; Yamaji-Tsukamoto, K. A.; Kumagai, H.; Feng, Y.; Takahashi, K. Antioxidative activity of soluble elastin peptides. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 2167-2170.
- 6) Mendis, E.; Rajapakse, N.; Kim, S. K. Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 581-587.
- 7) Hagerman, A. E.; Riedl, K. M.; Jones, G. A. High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 1887-1892.
- 8) Gil, M. I.; Tomas-Barberan, F. A.; Hess-Pierce, B.; Kader, A. A. Antioxidant capacities, phenolic compounds, carotenoids, and vitamin C contents of nectarine, peach and plum cultivars from California. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *50*, 4976-4982.
- 9) Soares, D. G.; Andrezza, A. C.; Salvador, M.; Sequestering ability of butylated hydroxytoluene, propyl gallate, resveratrol, and vitamins C and E against ABTS, DPPH, and hydroxyl free radicals in chemical and biological systems. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 1077-1080.
- 10) Graf, E.; Eaton, J. W. Antioxidant functions of phytic acid. *Free Radical Biol. Med.* **1990**, *8*, 61-69.
- 11) Hertog, M. G. L.; Feskens, E. J. M.; Hollman, P. C. H.; Katan, M. B.; Kromhout, D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. *Lancet* **1993**, *342*, 1007-1011.
- 12) Wang, H.; Cao, G. H.; Prior, R. L. Total antioxidant capacity of fruits. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 701-705.
- 13) Kanazawa, K.; Ashida, H.; Nataka, M. Autoxidizing process interaction of linoleic acid with casein. *J. Food Sci.*, **1987**, *52*, 475-478.
- 14) Wang, J. Y.; Fujimoto, K.; Miyazawa, T.; Endo, Y. Antioxidative mechanism of maize zein in powder model systems against methyl linoleate: Effect of water activity and coexistence of

- antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* **1991**, *39*, 351-355.
- 15) Chen, H. M.; Muramoto, K.; Yamauchi, F. Structural analysis of antioxidative peptides from soybean β -conglycinin. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 574-578.
 - 16) Park, E. Y.; Murakami, H.; Mori, T.; Matsumura, Y. Effects of protein and peptide addition on lipid oxidation in powder model system. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 137-144.
 - 17) Park, E. Y.; Murakami, H.; Matsumura, Y. Effects of the addition of amino acids and peptides on lipid oxidation in powdery model system. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 8334-8341.
 - 18) Kim, S. K.; Kim, Y. Y.; Byun, K. S.; Nam, D. S. J.; Shahidi, F. Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatin hydrolysate of Alaska pollack skin. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1984-1989.
 - 19) Tsuge, N.; Eiwaka, Y.; Nomura, Y.; Yamamoto, M.; Sugisawa, K. Antioxidative activity of peptides prepared by enzymatic hydrolysis of egg-white albumin. *Nippon Nogei Kagaku Kaishi* **1991**, *65*, 1635-1641.
 - 20) Mant, C. T.; Zhou, N. E.; Hodges, R. S. Amino acids and peptides. In *Chromatography Part B: Applications*; Heftman, E., Ed.; Elsevier Science Publishers: Amsterdam, The Netherlands, 1992; pp 75-150.
 - 21) Akahoshi, A.; Sato, K.; Nawa, Y.; Nakamura, Y.; Ohtsuki, K. Novel approach for large-scale, biocompatible, and low-cost fractionation of peptides in proteolytic digest of food protein based on the amphoteric nature of peptides. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 1955-1959.
 - 22) Yata, M.; Sato, K.; Ohtsuki, K.; Kawabata, M. Fractionation of peptides in protease digests of proteins by preparative isoelectric focusing in the absence of added ampholyte: a biocompatible and low-cost approach referred to as autofocusing. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 76-79.
 - 23) Hashimoto, K.; Sato, K.; Nakamura, Y.; Ohtsuki, K. Development of continuous type apparatus for ampholyte-free isoelectric focusing (autofocusing) of peptides in protein hydrolysates. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 650-655.
 - 24) Blois, M. S. Antioxidant determinations by the use of stable free radical. *Nature* **1958**, *181*, 1199-1200.
 - 25) Kauer, C.; Kapper, H. C. Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2002**, *37*, 153-161.
 - 26) Liegeois, C.; Lermusieau, G.; Collin, S. Measuring antioxidant efficiency of wort, malt, and hops against the 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride-induced oxidation of an aqueous dispersion of linoleic acid. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 1129-1134.
 - 27) Mitsuda, H.; Yasumoto, K.; Iwami, K. Antioxidative action of indole compounds during the autoxidation of linoleic acid. *Eiyo to Shokuryo* **1966**, *19*, 210-214.

- 28) Osawa, T.; Namiki, M. Natural antioxidants isolated from eucalyptus leaf waxes. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 2992-2997.
- 29) Shnnhuber, R. O.; Yu, T. C. The 2-thiobarbituric acid reaction, an objective measure of the oxidative determination occurring in fats and oils. *J. Jpn. Soc. Fish Sci.* **1977**, *26*, 259-267.
- 30) Bidingmeyer, B. A.; Cohen, S. A.; Tarvin, T. L. Rapid analysis of amino acids using pre-column derivaization. *J. Chromatogr.* **1984**, *336*, 93-104.
- 31) Sato, K.; Tsukamasa, Y.; Imai, C.; Ohtsuki, K.; Shimizu, Y.; Kawabata, M. Improved method for identification and determination of ϵ -(γ -glutamyl)lysine cross-link in protein using proteolytic digestion and derivatization with phenyl isothiocyanate followed by high-performance liquid chromatography separation. *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, 806-810.
- 32) Harada, K.; Ando, M.; Kitao, S.; Okano, C.; Tamura, Y. Changes in antioxidative capacity by the chemiluminescence method and K value as freshness indicator of squids captured from Senzaki fishing seaport in Yamaguchi prefecture. *J. Integr. Stud. Diet. Habits*, **2004**, *15*, 92-97.

ヒスチジン含有ジペプチドによる 脳神経機能に関する研究

静岡県立大学食品栄養科学部及び

同大学院生活健康科学研究科

栄養化学研究室

教授 横越英彦

研究員 小井土幸恵

略語一覽

NAD	Nicotinamide adenine dinucleotide
LDH	Lactate dehydrogenase
CPK	Creatine phosphokinase
ISO	dl-Isoproterenol hydrochloride
PCA	Perchloric acid
DA	Dopamine (3-hydroxytyramine)
DOPA	3,4-Dihydroxyphenylalanine
DOPAC	3, 4-dihydroxyphenylacetic acid
HVA	Homovanillic acid (4-hydroxy-3-methoxy-phenylacetic acid)
5HT	5-hydroxytryptamine
5HIAA	5-hydroxyindole-3-methoxy-phenylacetic acid
E	Epinephrine
NE	Norepinephrine
3-MT	3-Methoxytyramine
Hyp	Hypothalamus
CC	Cerebral cortex
Hip	Hippocampus
St	Striatum
Amy	Amygdala
Ce	Cerebellum
RN	raphe nucleus

第1章

【目的】

ヒスチジン含有ジペプチドのアンセリン (β -アラニル-1-メチル-ヒスチジン) は、特に、大型回遊魚に多く含まれており、これまでに、生体緩衝作用、抗酸化作用などが報告されている。また、近年の高ストレス社会に対するメリットとして、抗疲労効果が言われているが、その生理調節機能は必ずしも明確ではない。そこで、今回は、基礎的なエビデンスを確立するために、アンセリンが腸管から吸収されるか、その後の体内での動態、血液脳関門を介して脳内に取り込まれるか、脳内神経伝達物質は変動するか、不安行動への影響があるかなどを解析する。すなわち、疲労感、脳機能の一つの発現であり、また、ヒスチジン含有ジペプチドについては、類似化合物にカルノシンがあり、それについては多くの研究があるが、アンセリンについては殆ど無い。また、これらのジペプチドは、大型魚類だけでなく畜肉、鶏肉などにも多く含まれている。

【実験方法】

アンセリンの腸管吸収と体内の動態

アンセリンの経口投与後の門脈血へのアンセリンの吸収を調べた。アンセリンが、そのままの形で血液中を移動するかについても検討した。測定は主に、アミノ酸自動分析装置を用いた。

アンセリンの血液脳関門との関連

アンセリンが体内に取り込まれることが分かったので、次に、ラットにおける脳内へのアンセリンの取り込みを調べた。一般的には、ある成分が、血液脳関門を介して取り込まれるか、取り込まれないかを正確に測定する手法はない。放射性物質のダブルラベル法を用いたりするが、今回はアンセリンを脳への血管内に灌流させた後、生理食塩水を灌流させ脳内毛細血管内のアンセリンを除去した。このラットの脳組織中アンセリン量を測定することにより、脳内への取り込みを検討した。

アンセリン投与と脳内神経伝達物質との関連

脳内へ取り込まれたアンセリンが脳内神経伝達物質にどのような影響を及ぼすかを検討した。実験は *in vivo* ではなく、ラットの脳切片を用いて行った。アンセリンを含む浸漬液に脳切片を一定時間浸漬させ、浸漬液中への脳内神経伝達物質の放出量を HPLC-ECD で測定した。

アンセリンと脳神経機能、特に運動後の情動に関する研究

運動を负荷した動物において、アンセリンの経口投与が、情動に関係する脳部位の神経伝達物質、及び行動に影響を及ぼすか調べた。アンセリンの経口投与後、運動としてトレッドミルを用いた走行负荷と水泳（水浸）を负荷した。運動负荷後に情動に関係する脳部位の脳内神経伝達物質と、自発行動量を測定した。

【結果】

アンセリンの腸管吸収と体内の動態

アンセリンをラットの体重 1kg あたり 200mg 経口投与した後の門脈血中のアンセリン濃度は、

投与後 5 分から 15 分の間に有意に上昇し、120 分後まで高値を保った。また、アンセリンを構成するアミノ酸である β -アラニンおよび 1-メチル-L-ヒスチジンの濃度は投与後 5 分から 120 分まで上昇傾向にあった。以上のことから、吸収されたアンセリンの一部は体内で時間の経過とともに分解されるものの、そのままの形でも血液中を移動することが認められた。

Free amino acid and dipeptide contents (nmol/g wet tissue) in rats.

	control	anserine
Cerebral cortex		
Anserine	0.16 ± 0.10	118.86 ± 66.18
1-Methylhistidine	2.99 ± 1.01	10.13 ± 2.01
β -Alanine	33.27 ± 9.95	45.30 ± 6.17
Hippocampus		
Anserine	2.07 ± 1.97	145.44 ± 78.46
1-Methylhistidine	1.66 ± 0.45	8.97 ± 2.28
β -Alanine	46.05 ± 12.39	30.82 ± 5.93
Hypothalamus		
Anserine	1.65 ± 0.62	356.05 ± 160.83
1-Methylhistidine	0.37 ± 0.22	6.94 ± 1.61
β -Alanine	73.21 ± 6.16	77.55 ± 2.02
Cerebellum		
Anserine	0.76 ± 0.05	135.87 ± 70.40
1-Methylhistidine	2.54 ± 0.31	8.94 ± 1.79
β -Alanine	41.65 ± 4.84	38.60 ± 3.22

Values are mean \pm SEM (n=3).

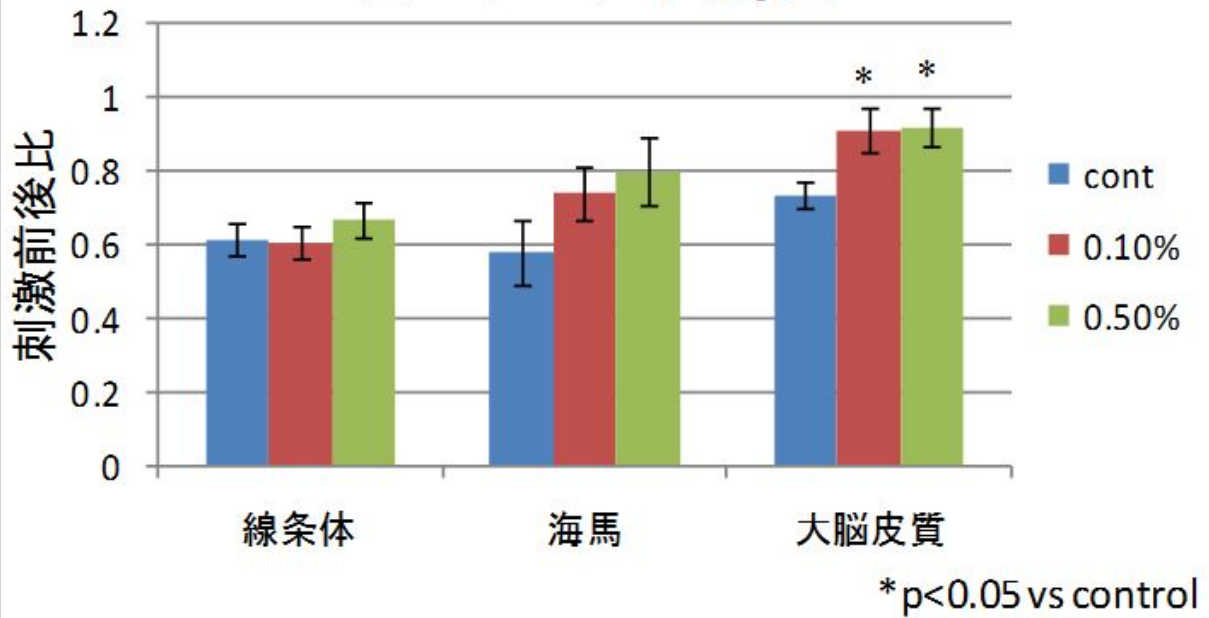
アンセリンの血液脳関門との関連

アンセリン 0.5%を含む生理食塩水 100ml で灌流した群（アンセリン群）では、生理食塩水で灌流した群（コントロール群）に比べ、脳組織の各部位でのアンセリン含量が増量した。また、アンセリンの構成成分である β -アラニンおよび 1-メチル-L-ヒスチジンの濃度においても変化が見られた。この結果より、体内に吸収されたアンセリンは血液脳関門を通過して脳内に取り込まれることがわかった。

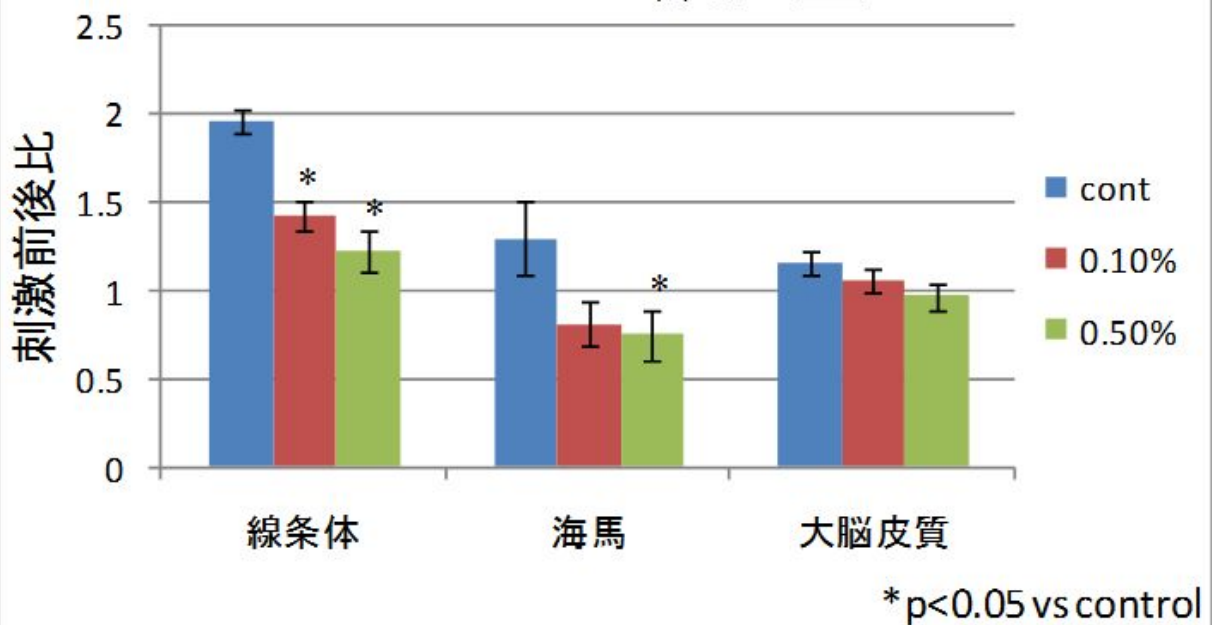
アンセリン投与と脳内神経伝達物質との関連

屠殺直後のラットをから脳を摘出し、その脳切片（線条体、海馬、大脳皮質）を用いて、浸漬液中に 0.1%および 0.5%のアンセリンを添加した群（アンセリン 0.1%群および 0.5%群）では、コントロール群に比べ、線条体および海馬でのドーパミン放出量が抑制された。また、大脳皮質でのセロトニン代謝率（SHIAA/5HT）が亢進した。以上のことより、アンセリンが脳内に取り込まれることにより脳内神経伝達物質の放出に何らかの影響を及ぼす可能性のあることが示唆された。

セロトニン代謝率



ドーパミン放出量



第2章

【目的】

アンセリンと脳神経機能、特に運動後の情動に関する研究

運動は、爽快感を伴うときもあれば、強度になれば疲労感やがっかりとなり行動への影響が現れる。これらの情動に関しては、脳が重要な役割を果たしている。情動に関する脳部位である大脳皮質や大脳辺縁系において、運動に伴うドーパミン代謝率 ((DOPAC+HVA)/DA) の上昇を、アンセリンが有意に抑制した。また、水泳後に自発行動量を測定したところ、アンセリンにより有意に自発行動量が減少した。さらに水泳 30 分後において、脳の全部位でアンセリンによるセロトニン代謝率の上昇が認められた。

強制水泳は水を入れた水槽にラットを浮かべ、強制的に水泳を負荷する動物行動実験方法である。ラットは水に浮くため、その浮いている間の無動時間が鬱の指標として用いられることが多い。しかし、体重の数%の重りをつけると常に沈むようになり、それを回避することで泳ぎ続けるようになるために、単純な運動負荷としても用いられている。

自発行動量は多くの行動実験の基礎的な数値として用いられ、運動後の自発行動量の減少は、疲労の指標としても用いられている。そのため、自発行動量の変動は精神的変化及び情動に深く関係していると考えられている。

運動に伴い変動するエネルギー代謝関連物質として、乳酸以外に遊離脂肪酸及びケトン体がある。遊離脂肪酸は長期的にエネルギーが必要となった場合や空腹時などに脂肪細胞から放出され、 β 酸化されることでアセチル CoA となりエネルギー源として働く。また遊離脂肪酸がエネルギー源として優位の状態でクエン酸回路の中間体が不足するとケトン体が生成されやすくなる。運動にとともに増加するとされる遊離脂肪酸とケトン体が、疲労関連物質のひとつである TGF- β の受容体阻害剤を脳内投与することにより低下したとの報告もあり、疲労及びエネルギー代謝に深く関連している。

そこで本節ではラットに強制水泳を負荷し、血中乳酸濃度を測定すると共に、血中の遊離脂肪酸、ケトン体を測定した。また運動後の自発行動量を測定する事で、アンセリンの運動後の行動への影響も合わせて検討した。

【実験方法】

1) 実験動物

実験動物には、Wistar 系雄性クリーンラット (日本 SLC) 10 週齢を用いた。ラットは室温 24 ± 1 °C、湿度 55.5 %、12 時間明暗サイクル (7:00~19:00) の条件下で 6 匹ずつプラスチックケージに入れて飼育し、水道水及び市販の精製固形飼料 (CE-2;クレア) を自由摂取させた。予備飼育として 4 日間飼育した後、実験に用いた。いずれも運動負荷の 1 時間前に生理食塩水及びアンセリン生理食塩水溶液 (200 mg/kg B.W.) を経口投与して、運動を負荷させた。

ラットは、運動負荷をさせない群、運動負荷直後に屠殺した群、運動直後に自発行動量を 30 分間測定し、その直後に屠殺した群に分けた。断頭後に血清、脳を採取して測定に用いた。脳は Hyp、CC、St、Hip、Amy、RN の 6 部位に分けた。

2) 運動負荷

運動負荷として、強制水泳試験を行った。強制水泳試験は、直径 19 cm、高さ 44 cm のアクリル製の透明な筒に水を入れた物を使用した。水は 34 cm まで入れ、上 10 cm を残すことでラットが飛び出すのを防止した。また、ラットが浮いて動きを止めて休んでしまうことを防止するために、体重の 6 % の重りを身体に付けた。負荷時間は 15 分、水温は 26 ± 1 °C とした。

3) 行動試験

自発行動量を AUTOMEX 装置 (AUTOMEX II : COLUMBUS INSTRUMENTS) にて測定した。AUTOMEX 装置は箱状の閉鎖空間内における磁場の变化をカウントすることで、内部に入れた対象の行動量を測定する装置である。箱は高さ 16 cm、幅 47.5 cm、奥行き 30 cm で構成されており、測定中には同材質の蓋をする。

・測定条件

AUTOMEX 装置の SENSITIVITY (測定感度) は 7 とした。強制水泳後、筒から取り出したラットは、すぐにタオルで全身の水を拭き、別室の AUTOMEX 装置に運んだ。ラットは決まった方向に向け、静かに箱内部に入れ、蓋を閉めた。蓋を閉めた後は 1 分ごとに count を記録し、30 分間測定した。測定中は部屋への入室を禁止し、音による影響を排除した。

・自発行動量の試算

1 分ごとに記録した count を順に足していき、行動量の時間変化とした。また、全ての count を足したものを総行動量とした。

4) 血中乳酸濃度

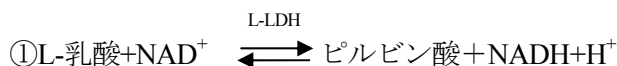
・サンプル調製

血液は断頭後、PP チューブに採り、氷中に 1 時間以上放置した後、遠心分離機 (HITACHI CR5B) で 4 °C、3,000 rpm で 15 分間遠心し、得られた上清 (血清) を分析まで -80 °C で保存した。

乳酸の測定には「F-キット L-乳酸」(J.K. インターナショナル INC.) を用いた。

・測定原理

試料中の L-乳酸と加えられた β -NAD から、L-LDH によってピルビン酸と NADH が生成される。この生成された NADH の量は L-乳酸の量に相当するため、340 nm での吸光度の増加により定量する。



・キットの構成

溶液 I .	glycylglycine buffer	pH10.0
	L-Glutamic acid	440 mg
溶液 II .	β -NAD	約 210 mg
溶液 III .	glutamate-pyruvate-transaminase	1100 U

- ・ 試液の調整

溶液Ⅰ. そのまま使用した。

溶液Ⅱ. 内容物を 6 ml の蒸留水で融解して用いた。

溶液Ⅲ. そのまま使用した。

溶液Ⅳ. そのまま使用した。

- ・ 測定手順

血清 150 μ l に 0.6 mol/l の過塩素酸 150 μ l を加え混和して 10 分間氷中放置した後、遠心分離して除タンパクを行った。上清 200 μ l に 3 M の水酸化カリウムを 8.5 μ l 加え中和後、氷中にて 15 分冷却後、遠心して上清を採り不純物を除いた。得られた上清を 5 倍希釈してサンプルとした。

乳酸はキットを 10 分の 1 にスケールダウンして測定した。溶液Ⅰ : 溶液Ⅱ : 水 : 溶液Ⅲ = 100 : 20 : 90 : 2 の割合で混合した溶液を 96well のマイクロプレートに 199.3 μ l ずつ分注し、そこへサンプルを 9.4 μ l 加え混和し、5 分後に波長 340 nm における吸光度をプレートリーダー (SPECTRA MAX 190 : Molecular Devices) で測定し、 E_1 とした。その後、溶液Ⅳを 1.88 μ l 加え混和し、2 時間後に吸光度を測定し E_2 とした。

スタンダードとして同封されている L-乳酸標準液 (2.22 M) を用いた。

- ・ 計算方法

乳酸値 $\Delta E = (E_2 - E_1) \text{ sample} - (E_2 - E_1) \text{ blank}$

5) 血中遊離脂肪酸濃度

- ・ サンプル調製

血液は断頭後、PP チューブに採り、氷中に 1 時間以上放置した後、遠心分離機 (HITACHI CR5B) で 4 $^{\circ}$ C、3,000 rpm で 15 分間遠心し、得られた血清を分析まで -80 $^{\circ}$ C で保存した。

遊離脂肪酸の測定には遊離脂肪酸測定キット「NEFA C-テストワコー」(Wako) を用いた。

- ・ 測定原理

サンプル中の遊離脂肪酸 (NEFA) はコエンザイム A (CoA) とアデノシン-5'-三リン酸二ナトリウム (ATP) の存在下、アシル-CoA シンターゼ (ACS) の作用により、アシル-CoA、AMP およびピロリン酸 (PPi) を生成する。生成したアシル-CoA はアシル-CoA オキシダーゼ (ACOD) の作用により酸化され、同時に 2,3-trans-エノイル-CoA および過酸化水素を生成する。生成した過酸化水素は、ペルオキシダーゼ (POD) の作用により、3-メチル-N-エチル-N-(β -ヒドロキシエチル)-アニリン (MEHA) と 4-アミノアンチピリンを定量的に酸化縮合させ、青紫色の色素を生成させる。この青紫色の吸光度を測定する事によりサンプル中の NEFA 濃度を求める。

- ・ キットの構成

発色剤 A.	溶解時	CoA	0.73 mmol/l
		ATP (Bacteriumu 属由来)	4.5mmol/l
		ACS (Pseudomonas 属由来)	0.27 単位/ml
		4-アミノアンチピリン	1.5 mmol/l

	アスコルビン酸オキシダーゼ (カボチャ由来)	2.7 単位/l
発色剤 A 溶解用試液.	50mmol/l リン酸緩衝液	pH 7.0
発色剤 B.	溶解時 ACDO (Arthrobacter 属由来)	5.5 単位/ml
	POD (西洋ワサビ由来)	6.8 単位/ml
発色剤 B 溶解用試液.	MEHA	1.2 mmol/l
基準液.	オレイン酸	1 mEq/l

・試液の調整

発色試液 A. 発色剤 A1 ビンを発色剤 A 溶解用試液 10 ml で融解した。

発色試液 B. 発色剤 B1 ビンを発色剤 B 溶解用試液 20 ml で融解した。

・測定手順

遊離脂肪酸はキットをスケールダウンして測定した。血清 20 μ l に発色試液 A を 400 μ l 加えよく混合し、37 $^{\circ}$ C で 10 分間インキュベートした。その後、発色試液 B を 800 μ l 加えよく混合し、37 $^{\circ}$ C で 10 分間インキュベートした。室温に戻した後、波長 550 nm における吸光度をプレートリーダー (SPECTRA MAX 190 : Molecular Devices) で測定した。

・計算方法

$$\text{NEFA 濃度 (mEq/l)} = \text{Es/Estd} \times 1.0$$

Es : サンプルの吸光度

Estd : スタンドアードの吸光度

6) 血中ケトン体濃度

・サンプル調製

血液は断頭後、PP チューブに採り、氷中に 1 時間以上放置した後、遠心分離機 (HITACHI CR5B) で 4 $^{\circ}$ C、3,000 rpm で 15 分間遠心し、得られた血清を分析まで -80 $^{\circ}$ C で保存した。

血中ケトン体は、アセト酢酸、3-ヒドロキシ酪酸、アセトンの総称である。アセトンは測定が困難なため、臨床の場合においてもアセトンを除いた数値が用いられるのが一般的である。このため、本項では 3-ヒドロキシ酪酸とアセト酢酸の測定法を示す。3-ヒドロキシ酪酸とアセト酢酸の測定には「ケトンテスト A 「三和」リキッド」(三和化学研究所)、「アセト酢酸標準液 (アセト酢酸 500 μ mol/l)」(三和化学研究所)、「ケトンテスト B 「三和」リキッド」(三和化学研究所)、「3-ヒドロキシ酪酸標準液 (3-ヒドロキシ酪酸 500 μ mol/l)」(三和化学研究所)を用いた。

・測定原理

アセト酢酸は NADH と 3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素 (3-HBDH) の存在下で 3-ヒドロキシ酪酸を生成する。その際に還元型の NADH は酸化型の NAD⁺になる。この NADH の減少量を波長 340 nm で測定する事によりアセト酢酸を定量する。

3-ヒドロキシ酪酸は NAD⁺と 3-HBDH の存在下でアセト酢酸を生成する、その際に酸化型の NAD⁺は還元型の NADH になる。この NADH の増加量を波長 340 nm で測定する事により 3-ヒドロキシ酪酸を定量する。

3-HBDH

アセト酢酸+NADH+H⁺

3-ヒドロキシ酪酸+NAD⁺

・キットの構成

ケトンテスト A 「三和」 リキッド.	第一試液	NADH 229.2 μ g/ml
第二試液	3-HBDH 10 単位/l	
ケトンテスト B 「三和」 リキッド.	第一試液	3-HBDH 3 単位/l
第二試液	NAD ⁺ 9.95 mg/ml	

・測定手順

血清は氷上で解凍し、そのままサンプルとした。

サンプル 20 μ l に第一試液を 350 μ l 加え混和し、37 °C で 5 分間インキュベートした。それを 180 μ l ずつ 96well マイクロプレートに分注し、波長 340 nm における吸光度をプレートリーダー (SPECTRA MAX 190 : Molecular Devices) で測定し E1 とした。その後、残った液に第二試液を 51 μ l ずつ加えよく混和し、37 °C で 5 分間インキュベートした。そこから 180 μ l ずつ 96well マイクロプレートに分注し、波長 340 nm における吸光度を測定し、E2 とした。また各標準液を用いて標準直線を引いた。

・計算方法

アセト酢酸は E1-E2 の値を用いた

3-ヒドロキシ酪酸は E2-E1 の値を用いた。

7) 脳内モノアミン濃度

・サンプル調製

脳の各部位のサンプルに 6~36 倍量 (加えた PCA 溶液が 250 μ l 以上になるように調整) の 0.2 M PCA 溶液 (内部標準として ISO 0.1 mg/l、EDTA-2Na 100 \cdot M を含む) を加え、超音波ホモジナイザー (SONIFIER 250 : BRANSON, Danbury, CT) を用いてホモジナイズした。氷中にて 1 時間以上放置した後、遠心分離機 (SCR20B: 日立製作所) で 4 °C、15000 rpm で、15 分間遠心分離を行った。その上清を採取し、上清 : 1M CH₃COONa = 5 : 1 の割合で混合して pH を 3 付近に調製したものを、0.45 μ m のフィルター (DISMIC-25cs: ADVANTEC Tokyo, Japan) を通し、分析用サンプルとした。

・分析装置と条件

デガッサー JASCO DG-980-50 (日本分光, Tokyo, Japan)

ポンプ JASCO PU-1580 ; flow rate 0.50 ml/min

検出器 EICOM ECD-300 (エイコム, Kyoto, Japan)

作用電極 Gc-Ce

参照電極 Ag-Cl

Apply Volt 750 mV

ガスケット GS-25

カラム EICOM SC-50DS (ϕ 3.0 \times 150 mm)

カラム温度 25.0 °C

注入量 50 μ l

・移動相

0.1M 酢酸ナトリウム-クエン酸緩衝液	・・・85%	
メタノール (和光純薬工業,Osaka, Japan)	・・・	15%
1-オクタンスルホン酸ナトリウム (和光純薬工業,Osaka, Japan)	・・・	160 mg/l
EDTA-2Na (和光純薬工業,Osaka, Japan)	・・・	5 mg/l

・標準液調製

DOPA, NE, E, DOPAC, DA, 5HIAA, HVA, 3MT, 5HT (各 1 mM) を 0.2 M PCA (内部標準 : ISO 0.1 mg/l) : 1 M CH₃COONa=5 : 1 の溶液で調製し、100 μl ずつ分注、使用時まで遮光して-80 °C で保存した。使用時は上記調整液で 10 倍、102 倍、103 倍、104 倍、105 倍に希釈し、103 倍、104 倍、105 倍の 3 本を標準液として検量線を引いた。

・標準源液のモノアミン組成

	*mol.wt	mg/10ml (1mM)
DOPA	=201	2.01
NE	=171	1.71
E	=219	2.19
DOPAC	=170	1.70
DA	=194	1.94
5HIAA	=189	1.89
HVA	=180	1.80
3MT	=206	2.06
5HT	=389	3.89

【結果】

1) 血中乳酸濃度

生理食塩水投与群及びアンセリン投与群で、運動に伴い血中乳酸濃度の増加が見られた。しかし、各時間において、アンセリン投与による有意差は認められなかった。

2) 自発行動量

運動後 30 分間の自発行動量は、測定開始直後から両群とも類似した変化をした。総行動量は生理食塩水投与群に比べて、アンセリン投与により有意に減少していた。

3) 血中遊離脂肪酸濃度及び血中ケトン体濃度

血中の遊離脂肪酸、3-ヒドロキシ酪酸、アセト酢酸は各時間において有意な変化は認められなかった。

4) 脳内モノアミン濃度

Hyp における、運動終了 30 分後のセロトニン代謝率は、アンセリン投与で有意に減少した。NE、DA、5HT、ドーパミン代謝率では有意差は認められなかった。

CC における、運動終了 30 分後のセロトニン代謝率は、アンセリン投与で有意に減少した。NE、DA、5HT、ドーパミン代謝率では有意差は認められなかった。

St における、運動終了 30 分後の DA、ドーパミン代謝率、セロトニン代謝率は、アンセリン投与で有意に減少した。NE、5HT では有意差は認められなかった。

Hip における、運動直後のドーパミン代謝率と、運動終了 30 分後の DA、セロトニン代謝率は、アンセリン投与で有意に減少した。NE、5HT では有意差は認められなかった。

Amy における、運動直後の NE、ドーパミン代謝率と、運動終了 30 分後のセロトニン代謝率は、アンセリン投与で有意に減少した。DA、5HT では有意差は認められなかった。

Ce における、運動終了 30 分後の 5HT、ドーパミン代謝率、セロトニン代謝率は、アンセリン投与で有意に減少した。NE、DA では有意差は認められなかった。

RN における、アンセリン投与による有意差は認められなかった。

【考察】

本研究では運動負荷方法に強制水泳を用いた。運動に伴い血中乳酸濃度は有意に上昇し、運動の 30 分後には運動前と同レベルまで低下した。Treadmill 法と比較して、同じ群における運動直後の血中乳酸濃度のばらつきが小さかったため、均一に運動が負荷されたと考えられる。運動による血中乳酸濃度上昇に対し、アンセリンの経口投与による有意差は確認されなかった。そのため、アンセリンは運動負荷による血中乳酸濃度に影響を与えないと考えられる。

血中遊離脂肪酸濃度及び血中ケトン体濃度において、運動負荷及びアンセリン投与による有意な変動は確認できなかった。脂肪酸酸化は、低い強度で長時間の運動の際にはエネルギー消費の 50~60 % を担うが、高強度の運動の際にはエネルギー消費の 10~45 % 程度にしかならない。また、筋運動を 60 分間負荷すると、運動中遊離脂肪酸は増加し、ケトン体は減少するという報告もあり、長時間の運動で代謝が亢進すると考えられる。以上の結果、今回の強制水泳条件は、負荷時間が 15 分であったため脂肪酸酸化が亢進しなかったと考えられる。

これらの結果から、乳酸の有意な増加は認められるが遊離脂肪酸やケトン体に変動が認められない、短時間の運動負荷条件下において、これらが関わるエネルギー代謝にアンセリン投与は影響を与えないことが明らかとなった。ただし、今回の実験条件では、ラットに餌を自由摂取させているため、運動負荷時における生体内のエネルギー代謝レベルが一定でないと考えられる。空腹時や飢餓時などのエネルギー供給が不十分な際には、遊離脂肪酸代謝が亢進することが知られており、運動時の脂肪代謝は餌の消化度合いに影響を受けるという報告もある。またケトン体は糖分解が不活発の場合などに、クエン酸回路の中間体が不足することで生成が促進される。乳酸は糖代謝が急激に亢進された場合に生成される。加えて、餌を自由摂取するラットに比較して、決まった時間のみ餌を食べる Meal-feeding ラットは、食べてない間の遊離脂肪酸濃度が低いという報告もあり、餌の摂取状況は脂肪酸代謝へ影響すると考えられる。すなわち、アンセリンがエネルギー代謝に影響を及ぼすかを厳密に検討するためには、Meal-feeding や絶食などの処理を行い、運動負荷時における生体内エネルギー代謝レベルを一定にする必要があると考えられる。

運動後の行動変化にアンセリンが影響するか検討するため、AUTOMEX 装置を用いて自発行動量を測定した。運動後 30 分間の行動量は、アンセリン群で有意に減少し、アンセリンが行動に影響を与えていることが示された。いくつかの実験において、自発行動量の低下を疲労感の指標として用いている。このことからアンセリンがより疲労感を惹起させた可能性が考えられる。また、アンセリン投与は一種のエネルギー摂取と考えられる。副交感神経はエネルギーを蓄えるように生体に影響する自律神経系である。副交感神経は消化器官の活動促進に働く自律神経であり、さらに副交感神経系の変化は精神の安定を意味するとされる。以上のことから、アンセリンの投与により生体の副交感神経が刺激され、肉体を安静させるよう働いたとも考えられる。よって、自発行動量を行動変化の指標として用いるためには、アンセリンに含まれるアミノ酸の混合液を投与した場合との比較も必要であると考えられる。

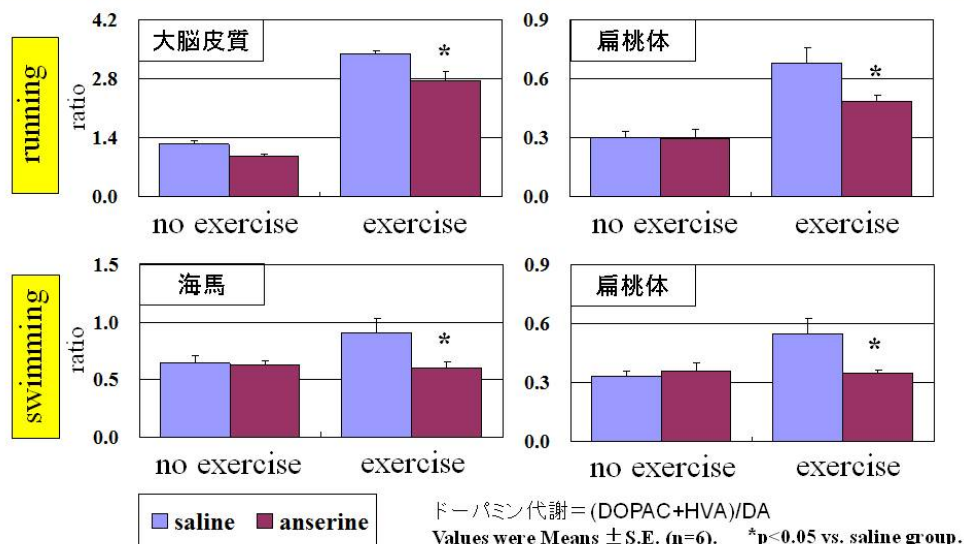
運動直後のドーパミン代謝率において Hip と Amy で、アンセリン投与による有意差が認められた。ドーパミン代謝率は運動により上昇することが知られている。Treadmill 運動負荷と同様に強制水泳負荷においても、アンセリンが運動直後のドーパミン代謝率に影響する事が証明され、運動の種類に関わらず、運動という身体ストレスにアンセリンが影響を及ぼすことがわかった。

St と Ce において、運動負荷終了 30 分後のドーパミン代謝率に、アンセリン投与で有意な上昇がみとめられ、その他の全ての部位で、アンセリン投与で上昇がみとめられた。強制水泳は一般的に水泳後に体温を奪う。DA 再取り込み阻害剤を投与すると、運動後の体温が有意に高くなるため、DA は温度調節に重要な役割を持っているという報告や、体温維持にかかわる褐色脂肪細胞の代謝率に脳内 DA 濃度が関連しているという報告、脳内の DA 受容体が体温調節に関係しているという報告があり、DA は体温調節と深く関わっていると考えられる。強制水泳 30 分後にアンセリン投与で DA 代謝率が上昇したということは、アンセリン投与が体温調節に影響している可能性を示唆する。

Hip と Ce において、運動負荷終了 30 分後の 5-HT が、アンセリン投与で有意に減少した。その他の部位でもアンセリン投与による 5-HT の減少が認められた。脳内のセロトニンが上昇すると疲労感が惹起されるという報告や、個々の運動能力による疲労の開始には 5HT 作動性システムが関与しているとの報告がある。さらにセロトニンの上昇は不安を惹起し、行動の抑制をもたらすという報告もある。アンセリン投与による 5-HT の減少は、アンセリンが疲労感 (意欲の減衰) などの情動に影響を与えることを示唆する。また、RN 以外の 6 部位全てで、運動負荷終了 30 分後のセロトニン代謝率が、アンセリン投与で上昇した。ストレスはセロトニン代謝を亢進させることが知られている。このことから、強制水泳による生体のストレス応答が、アンセリン投与により増強され

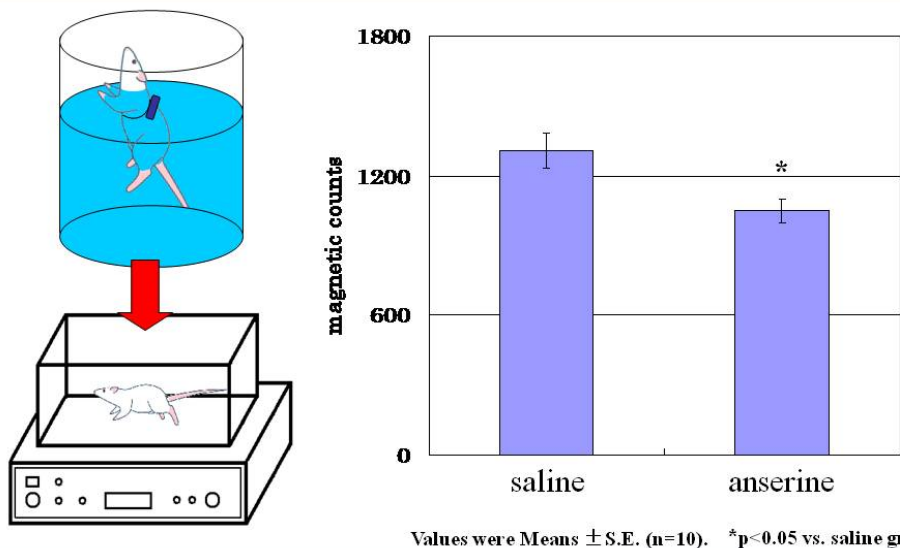
たとえられる。

実験 I 結果 ドーパミン代謝率の変動に及ぼす影響



運動に付随する脳内ドーパミン代謝率上昇をアンセリンが抑制した

実験 I 結果 自発行動量の変動に及ぼす影響



運動後の自発行動量がアンセリンにより減少した
 行動の変化 → 情動変化の可能性

以上の結果、ヒスチジン含有ジペプチドのアンセリンは、摂取された場合、腸管から吸収され、血液循環に乗り体内各部位に運ばれ、一部はそのままの形で脳内にも取り込まれる。脳においては、一部の脳内神経伝達物質の変動が観察され、それを介して、行動などの脳機能に影響を及ぼす可能性を明らかにした。

高齢者の蛋白質と葉酸の栄養改善

実施者：香川靖雄、影山光代

実施協力者：平岡真実

所属：女子栄養大学

1. 序論

食肉は重要な蛋白質源であり、ことに高齢者の栄養には現在よりも多くの食肉の摂取が推奨されている。厚生労働省が策定した日本人の食事摂取基準（2005年度版）(1)では蛋白質の目標量は70歳以上では25%エネルギー未満と18~69歳の20%エネルギー未満よりも高く設定されているにもかかわらず、現実の国民健康栄養調査の食肉の摂取量は図1のように70歳以上では $47.7 \pm 51.2\text{g}$ と50-59歳の $77.6 \pm 66.5\text{g}$ に較べて著しく低く、個人差が大きい。ことに高齢者の蛋白質栄養の低下は筋肉減少(sarcopenia)となって心身の活動、生活の質の低下を招き、また同時に骨質減少(osteopenia)も招き、骨粗鬆症による骨折の原因となる。したがって、70歳以上の高齢者であっても少なくとも1日70gの肉類摂取が、必須アミノ酸のバランスを考へても望ましいと考へる。本研究の対象者に対しては、したがって後述のようにA群対象者には毎日平均約70gの食肉を供給しており、他に主な蛋白質源として、60gの魚介類、豆腐、卵等60gとしている。これに対してB群対象者(C群対象者もほぼ同様)には国民平均の46.5gの食肉を供給した。蛋白質の利用が十分である初期高齢者の心身の活動度の維持には食肉の摂取量増加は役立つが、本研究が目標とする後期高齢者(平均年齢:A群87歳、女性83%;B群86歳、女性85%;C群82歳、女性88%)では摂取量を増加しても、その吸収、利用は簡単には増加しない。本研究では先ず、高齢者に広く見られる蛋白質エネルギー栄養障害(protein energy malnutrition以下PEMと略)が、萎縮性胃炎などの吸収障害による場合が多いことを客観的に明らかにし、それに伴う他の栄養素、ことに重要な葉酸の利用障害を先ず改善するところから始めた。

高齢者施設など特定給食施設等における食事が上記基準(1)に従って提供されているが、それにもかかわらず、2006年のわが国の院内栄養管理サービスに関する研究ででは患者の栄養状態に問題が多くPEM(血清アルブミン濃度 3.5g/dl 以下)が施設内高齢者の約半数にも及んでいる(図2)(2)。PEMにもなって高齢者の栄養に不可欠な葉酸等の利用障害も多く見られ、これが高齢者の心身の活動を大きく阻害しており、その解決は蛋白質栄養、さらに食肉の有効な健康維持作用の解明にも重要である。事実、本研究の先行研究においても浴風会第三南陽園において、約半数の入所高齢者にPEMと葉酸栄養状態の低下が報告されている(3)。さらに、エネルギー、蛋白質摂取量を厳密に測定できる経皮内視鏡的胃瘻造設術の患者を用いた我々の詳細な研究によっても(4,5)、高齢者のPEMの是正には、蛋白質投与量は必要条件ではあっても、十分条件ではなかった。

そこで、高齢者の蛋白質利用低下の原因を探求すると共に、高齢者の介護の最大の問題となっている脳卒中・認知症予防に有用な葉酸栄養の改善を計った。なぜならば、葉酸は補酵素状態で蛋白質に堅く結合しており、蛋白質の消化能力の低下によって吸収が障害されると考へられるからである。本研究で蛋白質代謝に伴う多くの栄養素の中で特に葉酸を選んだ理由は、食事摂取基準では「高齢者についての報告は見あたらないので、その推奨量は中年と同レベルの $240\mu\text{g}$ とする」と誤って定められているからである。しかしながらこれは我々の先行研究の高齢者では葉酸の利用は低下し、 $240\mu\text{g}$ 摂取しても血清葉酸濃度は基準値を下回り、その結果有害な血清ホモシステインが危険水準を上回っているという結論と矛盾している(図3)(3)。葉酸が欠乏するとホモシステインと呼ばれるアミノ酸が血液中に増加し、認知症(6)はじめ、脳梗塞、骨折など要介護状態の大半を占める病態の原因となる(7)。葉酸代謝に関する多くの遺伝子多型の中で特に影響が大きいのがメチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素(MTHFR)C677Tの多型である。そのTT多型の人CC型やCT型の人に比べて、3.5倍も脳梗塞に罹りやすい(図4)(7)。TT多型の人葉酸の利用率が悪く、日本人の15%を占める。しかしながら、厚労省の推奨量はこの多型を無視して策定されている。TT型の遺伝子や野菜嫌いによって、葉酸の相対的な欠乏で神経管障害、脳梗塞、心筋梗塞、認知症、骨折などが起こる。事実、第三南陽園における先行研究では認知症高齢者は特に血清葉酸が低くホモシステインが高いが、TT型でその傾向が著しい(図5)(8)。

日本人の食事摂取基準（2005年度版）の葉酸推奨量は $240\mu\text{g}$ であるが、諸外国は $400\mu\text{g}$ に改めている(7)。米国では、パンをはじめとする穀類に葉酸を強制添加したことで、血清葉酸濃度が約2倍に上昇し、3億人の米国民の脳卒中死亡率は添加をはじめた1998年を境にして急激に低下した(図6)(9)。このことは報告者が $400\mu\text{g}$ /日のモノグルタミン葉酸の負荷実験を100名の日本人に行い、TT型であってもCT型、CC型と同水準の血清葉酸、血清ホモシステインに改善されることとも符合している(10)。

本研究では第三南陽園の入所者（A群対象者）で、食肉を平均1日70gと高齢者に望ましい高水準で投与し、蛋白質、エネルギー、葉酸の代謝の基礎条件を検討して、蛋白質代謝は46%がPEG、葉酸代謝は低葉酸血と、ともに不十分であることを示した。その原因を追及するには百名を越える全対象者の葉酸負荷実験、遺伝子解析実験、消化能測定は、短時間内の対象者の繰り返し採血の倫理的な困難のために、蛋白質消化能のペプシノーゲンIの測定による評価と、モノグルタミン葉酸投与による葉酸代謝改善の実験は、平均年齢、女性割合がA施設と酷似している坂戸市内のB、C施設のB群、C群対象者について行った。

2. 対象及び方法

2-1. 対象者

2-1-1 A群対象者

A群対象者は、東京都杉並区高井戸の浴風会第三南陽園（A施設）に入所している者のうち、食事を経口摂取している者とした。対象者は131名であり、1人あたりの食事摂取量の調査は4日間であった。そのうち、3日以上食事摂取記録が得られなかった者を除外し、最終的な調査人数は112名となった。対象者の83%が女性で、平均年齢 86.5 ± 7.5 歳、平均介護度 4.0 ± 1.0 であった。食事形態は常食33名、粥食18名、粥極刻み食39名、ミキサー食22名で、食肉摂取は1日平均約70gであった。別個に摂取した間食は摂取量に加算できなかった。

2-1-2 B群とC群対象者（消化能測定と葉酸負荷実験）

対象者は、埼玉県坂戸市内にある特別養護老人ホーム（B施設）の入所者27名（B群対象者）と、認知症高齢者グループ（C施設）入所者17名（C群対象者）とした。食事形態は、いずれも常食、粥、刻み、超刻み、ミキサー食となっており、食肉摂取は約47g（C施設は推定）で、個別に総合栄養剤を利用している人もいた。食事形態が変わっても、常食からの展開であって、食肉や葉酸の摂取量に食事形態の影響は極力減らした。

B施設：B群対象者は27名であり、食事摂取量の調査は葉酸添加前後4日間（内、使用した食事調査は3日間）であった。そのうち、血液生化学検査データの得られなかった者は除外した。対象者の85.2%が女性、平均年齢 85.9 ± 8.1 歳、平均介護度 3.6 ± 1.2 であった。

C施設：C群対象者は17名であり、88.2%が女性、平均年齢 81.5 ± 4.1 歳、平均介護度 2.6 ± 1.2 であった。

2-2. 方法

A群対象者をフロアごとに分け4日間、朝・昼・夕の全ての食事について、直接秤量法により料理ごとの残食量を測定した。これは「特定給食施設等における食事計画編」(1)でのモニタリングと評価の方法として「三測表（体温、脈拍、呼吸などの記載された検温表という看護記録のこと）」が食事摂取量を

80%なら「8」等と記載するのと較べてはるかに精密な方法である。本研究では盛り付け作業時に、盛り付け前重量と盛り付け後重量の値から、食器の重量と盛り付け量を算出し、それを提供量として残食量から摂食率を算出した。デジカメによる毎食後の残菜撮影も行われたが、画面に尺度をいれても精度が重量測定に及ばず、画像処理は断念した。第三南陽園の献立は、1日に肉類は60g、魚類60g、その他卵、豆腐などで60g使用する。そのほかに野菜炒めなどにベーコン、ソーセージなど20g位週に3回くらい使用するので、食肉の一日使用量は約70gである。献立表を用いて栄養計算を行い、各自の摂食率を乗じて摂取栄養量を計算した。摂取量調査は直接秤量法で行い、栄養計算ソフトは「建帛社・エクセル栄養君 Ver5.0」を用いた。本施設での食事形態は、常食、粥食、粥極刻み食、ミキサー食となっている。このように食事形態が変わっても、常食からの展開であるために、食肉摂取量、蛋白質摂取量には変化を与えない。3食の他に、間食の提供も行われていたが、フロアごとに喫食時間が異なり、摂取量の把握が困難なため、今回の調査では間食は含めないこととした。

食事調査とSRL社に依頼して分析した血液検査データから、体重(kg)、BMI(kg/m²)、血色素量(g/dl)、エネルギー摂取量(kcal/kg IBW/day)、蛋白質摂取量(g/kg IBW/day)、葉酸摂取量(μ g/day)を介護度で群別し、PEMの指標であるアルブミン(Alb)に着目して血清アルブミン濃度(Alb)3.5g/dl未満(以下①群)と以上(以下②群)における摂取量との関連を検討した。血液検査データは定期健診のものを使用した。本研究では全般的知的機能検査(Mini Mental State Examination; MMSE)を含む精神・神経学的の標準の診断法に加えて、磁気共鳴画像法(MRI)やコンピューター断層画像法(CT)などの画像解析で、脳血管性認知症とアルツハイマー病の鑑別診断を確定している。

更にB群、C群の対象者では、図7のようなスケジュールで米飯100g当たり200 μ gのモノグルタミン酸を添加した食事を負荷した。いずれの施設でも供給された食事の中から、A群対象者の場合と同様に各個人の残菜量を測定して真の摂取量を集計した。B群対象者の実際の食肉摂取量は46.5 \pm 11.0gで、国民健康・栄養調査の70歳以上の摂取量に近かった。ただし、C群対象者の場合、人数も少なく摂取量の一部は委託によったため、精度がA群、B群対象者に劣る。その葉酸摂取量は、B群、C群の負荷以前でも、いずれも厚生労働省の推奨量240 μ gを越えていた。しかし、さらに吸収のよいモノグルタミン酸を負荷しなければ、先に示したように蛋白質消化力の低下した高齢者では血清葉酸値は基準範囲に維持できない。本学の葉酸分子種分別判定法によって吸収のよいモノグルタミン酸と、一般食事中に多いポリグルタミン酸を区別して算出したところ、負荷実験前後でB群は図8、C群は図9のような総葉酸摂取量となった。それぞれの食事調査の最終日に血液検査を行い、蛋白質栄養状態や血清葉酸、血清ホモシステイン、遺伝子多型(CC型・CT型・TT型)を実測し、さらに蛋白質消化力はペプシノーゲンIの測定とペプシノーゲンI/II比率を実測して評価した。

2.3 研究費の内容

委託事業計画書において消耗品として申請した高速液体クロマトグラフカラムとその試薬、内部標準化合物はポリグルタミン酸とモノグルタミン酸の分別定量に不可欠であり、女子栄養大学以外にその定量ができる施設が国内に存在しない。ホモシステインの定量の一部は東京大学附属病院矢富研究室でも行われたが、女子栄養大学で平行確認を行っている。プラスチック用品は採血後の検体の保存、分析並びに輸送に不可欠である。蛋白質栄養状態の判定に必要な血清アルブミン、全血ヘモグロビンをはじめ一般生化学検査は、消化能測定のための血清ペプシノーゲンIならびにペプシノーゲンI/II比率、ピロリ菌抗体検査等はSRL社等に分析を依頼した。交通費は影山光代が高井戸の第三南陽園から女子栄養大学に往復する費用であり、また、実験補助者に支払う交通費も含めて申請した。人件費は現在の教職員では外部委託研究によって生じる新たな実験補助業務を実行するには労働力が不足であることによる。

3. 結果

3. 1 A群対象者の蛋白質、エネルギー、葉酸代謝

対象者は112名中、男性19名、女性93名であった。図10左に示すように女性の割合が圧倒的に多いが、これは全国的に要介護者うち女性の占める割合が男性の3倍以上であることと一致している。対象者の平均年齢は 86.5 ± 7.5 歳というかなり進んだ後期高齢であったため、さらに女性の割合が多かったと思われる。体重は 44.4 ± 7.4 kgで80歳以上の女性の平均値 $46.1 \pm 8.3(11)$ の96.3%であり、BMI 20.7 ± 3.2 kg/m²も85歳以上の女性の平均値 $21.80 \pm 3.40(11)$ の94.9%であった。

図10右のように実に入所高齢者の46%が血清アルブミン3.5g/dl未満で定義されるPEMと判定された。これは図11に示すように蛋白質摂取量を標準体重(IBW=身長 2×22)で補正しても、また介護度で比較しても関係がなく、食事中の蛋白質不足が原因ではない。介護度は 4.0 ± 1.0 と最高の介護度5に近く、食事も、粥極刻み食やミキサー食を受ける者が全対象者の45.5%を占めるなど全介助や様々な程度の摂食介護を要するものが多かった。MMSEは 9.9 ± 9.4 点で、下記のように20点以下を認知症とするので、認知機能の低下が著しいことが判った。

比較的短期の蛋白質栄養状態を示す血清アルブミン濃度(Alb)は 3.45 ± 0.34 g/dlと平均ではPEMの限界値を下回っていた。正規分布よりずれており、下方に少数の極度に血清アルブミンの低い高齢者がいる。これはAlb3.0g/dl以下の対象者に半消化態栄養液リカバリーを併用投与したため、Alb3.5g/dl以上に回復する例が多くで、正規分布曲線が上にシフトしたと考えられる。一方、長期の蛋白質栄養の指標である血液の血色素濃度は 12.4 ± 1.4 g/dlであり、85歳以上の女性の平均値 12.2 ± 1.3 g/dl(11)を僅かに下回った。血清アルブミン濃度と血色素濃度の相関図を描いてみると両者の相関は著しく高く($r = 0.333$)、その相関は著しく有意である($P = 0.0004$)。これは、長期の介護施設に見られる傾向であって、急性期疾患で短期の蛋白質損失の大きい入院患者では、トランスサイレチンなどの急速回転蛋白質の他、アルブミンも大きく減少するのは対照的なデータである。

体重維持に最も影響の大きなエネルギー摂取量と介護度について、血清アルブミンレベルで分割した①②群について検討した(図12)。対象者の体重差を考慮するため、標準体重あたりのエネルギー摂取量と蛋白質摂取量を算出した。介護度2の①群は 24.5 (kcal/IBW/day)、②群は 24.0 (kcal/IBW/day)、介護度3の①群は 24.6 (kcal/IBW/day)、②群は 20.6 (kcal/IBW/day)、介護度4の①群は 24.0 (kcal/IBW/day)、②群 24.5 (kcal/IBW/day)、介護度5の①群 24.1 (kcal/IBW/day)、②群 24.4 (kcal/IBW/day)で、全体で見るとPEMである者と無い者でエネルギー摂取量に有意差はなかった($p = 0.3975$)。介護度1は1名であったため血清アルブミンでの比較はできず、除外した。

先行研究(8)では認知度、MMSEの低下と深い関係のある葉酸の血清濃度低下、血清ホモシステイン濃度増加が確認されており、とくに高齢者では葉酸の吸収が低下している。そこで、対象者の平均葉酸摂取量を調べた。介護度2の①群は 319.3 (μ g/day)、②群は 297.4 (μ g/day)、介護度3の①群は 286.4 (μ g/day)、②群は 303.3 (μ g/day)、介護度4の①群は 324.7 (μ g/day)、②群 347.1 (μ g/day)、介護度5の①群 330.8 (μ g/day)、②群 327.0 (μ g/day)で、全体で見るとPEMである者と無い者でエネルギー摂取量に有意差はなかった($p = 0.7350$) (図13)。高齢者の血清葉酸の低下は、血清葉酸の摂取量が本例のように推奨量(240μ g)を満たしていても、食物中の葉酸摂取量(主にポリグルタミン酸)効果がないことが図3、図5ですでに裏付けられている(8)。

3. 2 B・C群対象者の蛋白質消化能とモノグルタミン酸負荷

B群対象者はB施設の27名(平均年齢 85.9 ± 8.1 歳、平均介護度 3.6 ± 1.2 、女性が占める割合85.2%)

であり、一般に超高齢者といわれるものであった。対象者の食肉摂取量はA群とは異なり、国民栄養調査の高齢者の平均値に近く、 $46.5 \pm 11.0\text{g}$ であり、総蛋白質摂取量は平均で $42.9\text{g}/\text{日}$ であった。しかし、A群対象者の場合と似て、約 20 日間の蛋白質栄養状態を示す血清アルブミン濃度は $3.6 \pm 0.3\text{g}/\text{dl}$ と平均的に PEM のアルブミン境界値 $3.5\text{g}/\text{dl}$ に近く、約半数 (11 人) が PEM であったが、介入後も大きな変化はなかった ($p = 0.1258$)。総蛋白質は $6.6 \pm 0.5\text{g}/\text{dl}$ と 85 歳以上の女性の平均値 $7.4 \pm 0.5\text{g}/\text{dl}$ を下回っており、介入後も差はみられなかった ($p = 0.1650$)。長期の蛋白質栄養の指標である血色素濃度は介入前 $11.8 \pm 1.4\text{g}/\text{dl}$ 、介入後 $12.4 \pm 1.5\text{g}/\text{dl}$ ($p = 0.0003$) と有意に増加したが、85 歳以上の女性の平均値 $12.5 \pm 1.3\text{g}/\text{dl}$ を僅かながら下回っていた。このことから、B施設の対象者の蛋白質栄養状態は低下していたことがわかった。

次に MTHFR C677T の多型別では CC 型 8 名、CT 型 15 名、TT 型 4 名で TT 型は全体の約 14% を占め、TT 型が日本人の 15% を占める割合とほぼ同じであった。葉酸摂取量は介入前の $319 \pm 51.0 \mu\text{g}$ と推奨量を充足していたが、介入によって $562 \pm 89.3 \mu\text{g}$ まで有意に増加した ($p < 0.0001$) (図 8)。蛋白質を含むその他の栄養素については、前後で大きな差はなかった。

C 施設の C 群対象者は 17 名 (平均年齢 81.5 ± 4.1 歳、平均介護度 2.6 ± 1.2 、女性が占める割合 88.2%) である。MTHFR C677T の多型別では CC 型 7 名、CT 型 10 名で TT 型の人はいなかった。葉酸摂取量は介入前の $341 \pm 36.2 \mu\text{g}$ から介入後 $410 \pm 58.7 \mu\text{g}$ となり、有意に増加した ($p = 0.0008$)。その他の栄養摂取量は介入前後で一部差がみられたが、これは食事調査を委託し、正確な栄養摂取量が得られなかったためである。血清アルブミン濃度は $4.0 \pm 0.4\text{g}/\text{dl}$ で、介入後も大きな変化はなかった ($p = 0.0736$)。総蛋白質は $7.2 \pm 0.6\text{g}/\text{dl}$ で、介入後も差はみられなかった ($p = 0.0692$)。血色素濃度は介入前 $12.6 \pm 1.0\text{g}/\text{dl}$ で、介入後も差はみられなかった ($p = 0.9588$)。A 施設と比較して蛋白質栄養状態はよかった。

3-2 a. 血清葉酸濃度の介入前後比較

血清葉酸濃度は $7\text{ng}/\text{ml}$ 以上が認知症予防目標とされている (7)。B 施設全体では、血清葉酸濃度は $4.6 \pm 2.7\text{ng}/\text{ml}$ から $19.2 \pm 5.8\text{ng}/\text{ml}$ と約 4 倍に有意に上昇した ($p < 0.0001$)。遺伝子多型別では、CC 型 $5.7 \pm 3.9\text{ng}/\text{ml}$ から $20.6 \pm 4.3\text{ng}/\text{ml}$ と有意に上昇した ($p = 0.0007$)。CT 型 $4.5 \pm 1.8\text{ng}/\text{ml}$ から $20.0 \pm 6.4\text{ng}/\text{ml}$ と有意差はなかったが ($p = 0.0679$)、全員が認知症予防目標の $7\text{ng}/\text{ml}$ 以上に確実に上昇した。問題の TT 型では、 $2.4 \pm 0.8\text{ng}/\text{ml}$ から $13.2 \pm 1.3\text{ng}/\text{ml}$ と有意に上昇した ($p = 0.0117$) (図 15)。C 施設全体では、血清葉酸濃度は $4.1 \pm 1.7\text{ng}/\text{ml}$ から $12.3 \pm 4.7\text{ng}/\text{ml}$ と約 3 倍に有意に上昇した ($p = 0.0003$) (図 16)。遺伝子多型別では、CC 型 $5.1 \pm 2.1\text{ng}/\text{ml}$ から $14.0 \pm 5.9\text{ng}/\text{ml}$ と有意に上昇し ($p = 0.0180$)、CT 型でも $3.4 \pm 1.0\text{ng}/\text{ml}$ から $11.2 \pm 3.5\text{ng}/\text{ml}$ と有意に上昇した ($p = 0.0051$)。介入後、TT 型の人でも血清葉酸濃度は安全領域の $7\text{ng}/\text{ml}$ を超えていた。

3-2 b. 血清ホモシステイン濃度の介入前後比較

血清ホモシステイン濃度は $10 \mu\text{mol}/\text{L}$ 以下が認知症予防目標とされている (7)。B 施設全体では、血清ホモシステイン濃度は $15.8 \pm 6.4 \mu\text{mol}/\text{L}$ から $10.1 \pm 4.7 \mu\text{mol}/\text{L}$ と約 30% 有意に低下した ($p < 0.0001$) (図 14 右)。遺伝子多型別では、CC 型 $12.4 \pm 4.3 \mu\text{mol}/\text{L}$ から $9.2 \pm 4.2 \mu\text{mol}/\text{L}$ と有意に低下した ($p = 0.0173$)。CT 型 $16.1 \pm 5.8 \mu\text{mol}/\text{L}$ から $10.5 \pm 5.4 \mu\text{mol}/\text{L}$ と有意に低下した ($p = 0.0007$)。問題の TT 型では、 $21.4 \pm 0.2 \mu\text{mol}/\text{L}$ から $10.1 \pm 2.4 \mu\text{mol}/\text{L}$ と有意差はなかったが ($p = 0.0679$)、約半分に低下し認知症予防目標の $10 \mu\text{mol}/\text{L}$ に極めて近づいた。C 施設全体では、血清ホモシステイン濃度は $12.1 \pm 3.5 \mu\text{mol}/\text{L}$ から $10.0 \pm 2.3 \mu\text{mol}/\text{L}$ と有意に低下し

た ($p=0.0049$) (図 16 右)。遺伝子多型別で、CC 型では有意差はなかったが $11.6\pm 4.1\mu\text{mol/L}$ から $9.8\pm 2.4\mu\text{mol/L}$ に低下し ($p=0.1763$)、 $10\mu\text{mol/L}$ 以下であった。CT 型で $12.4\pm 3.3\mu\text{mol/L}$ から $10.2\pm 2.3\mu\text{mol/L}$ と有意に低下した ($p=0.0069$)。介入後、TT 型の人でも血清ホモシステイン濃度は CC 型や CT 型と同濃度まで低下した。

3-2 c. 血清葉酸濃度と血清ホモシステイン濃度の関係

B 施設全体では、血清葉酸濃度と血清ホモシステイン濃度は相関関係を示さなかった ($r=0.196$, $p=0.3317$)。C 施設全体でも、血清葉酸濃度と血清ホモシステイン濃度は相関関係を示さなかった ($r=-0.165$, $p=0.5279$)。B,C 施設ともに遺伝子多型別にみたが、全ての群で相関関係を示さなかった。

3-2 d. ペプシノーゲン I 濃度と同 I/II 比率について

先行研究ならびに今回の A 群、B 群、C 群対象者のデータによると、食事からの蛋白質摂取量と、葉酸摂取量を上げるだけでは PEM を改善することができないという結果が得られ、PEM の対策として慢性萎縮性胃炎の診断を行うことが必要とされたため、慢性萎縮性胃炎の判定に用いられる検査方法のひとつのペプシノーゲン法でペプシノーゲン I の測定とペプシノーゲン I/II 比率 3.0 未満の者と 3.0 以上の者にかけて比較をした。なお、ペプシノーゲン I/II 比率の測定を B 施設のみでの結果を示す。ペプシノーゲン I の正常の限界値である 70ng/ml 以下の者が 82% を占め、蛋白質消化能が極めて低下した慢性萎縮性胃炎と判定された。ペプシノーゲン I/II 比 3.0 未満の者は 9 名、3.0 以上の者は 18 名であった。葉酸摂取量やその他栄養摂取量は 3.0 未満の者と 3.0 以上の者で大きな差はなかった。蛋白質栄養状態は血清アルブミン濃度、総蛋白質、血色素濃度ともに 3.0 未満の者も 3.0 以上の者も A 施設の全体の平均とほぼ同じであった。血清葉酸濃度は 3.0 未満の者が $4.6\pm 1.8\text{ng/ml}$ から $21.1\pm 7.2\text{ng/ml}$ と有意に上昇し ($p=0.0077$)、3.0 以上の者も $4.6\pm 3.1\text{ng/ml}$ から $18.2\pm 4.8\text{ng/ml}$ と有意に上昇した ($p=0.0002$)。一方、血清ホモシステイン濃度は 3.0 未満の者が $16.8\pm 6.8\mu\text{mol/L}$ から $12.2\pm 6.6\mu\text{mol/L}$ と有意に低下し ($p=0.0077$)、3.0 以上の者も 15.3 ± 6.4 から 9.0 ± 3.0 で有意に低下した ($p=0.0002$)。

4. 考察

4.1 A 群対象者の PEM の実態と葉酸利用低下

まず A 群対象者については PEM の実態を把握できた。食肉の摂取量は 1 日約 70g と日本人高齢者の平均値より高く、理想的な数値と考えられる (図 1)。しかしながら全国の施設内高齢者 (図 2) と同様に 46% が PEM であった (図 10)。一方、B 群対象者における食肉摂取量は $46.5\pm 11.0\text{g}$ と低く、国民健康・栄養調査の 70 歳以上の平均値と近いが、血清アルブミン平均値は $3.6\pm 0.3\text{g/dl}$ であり、PEM と判定されたものは 41% と A 群の 46% と近い。このことは摂取した蛋白質の体内利用に、消化管機能の上限が存在することを示唆する。PEM である者となない者の蛋白質摂取量、葉酸摂取量に有意差はみられなかったが、体内における蛋白質・葉酸が不足していた。これらは、単に蛋白質や葉酸の摂取不足ではなく、消化・吸収能や活動量等の問題で引き起こされると考えられる。新しい介護保険法では、介護予防として適切な栄養摂取と運動が推進されるようになったが、その対象者は要支援と介護度 1 が主であり、本研究の対象者 112 名中には介護度 1 の方は 1 名しかおらず、この方法だけで改善は望めない。

本研究では1年以上にわたる長期間に1日平均で蛋白質 1.30g/標準体重 (図 11) エネルギー供給量が 23.8kcal/標準体重 (図 12) を供給しているが、実際の平均体重 (44.4kg) 当たりでは 1056kcal、蛋白質は 57.7g に相当する。これは平成 16 年厚生労働省健康局長通知で 70 歳以上の患者に定めているエネルギー必要量 (男 1850kcal、女 1550kcal) に較べてやや少なく、蛋白質 (男 60g、女 50g) はほぼ充足している。形式的な投与量に較べて、運動量の少ない平均介護度 4 の対象者では筋肉減少 (sarcopenia)、骨質減少 (osteopenia) さらに筋拘縮、筋肉の白筋化も予想されるので、形式的なエネルギー供給量よりは少なくとも、正確なエネルギー代謝の評価においても体重の維持は可能である (4,5)。したがって、本研究で扱う蛋白質エネルギー栄養障害 (PEM) は決してエネルギー不足に由来する蛋白質の分解 (糖新生) に基づく結果ではない。

本研究で調査した葉酸摂取量は、食事摂取基準の葉酸摂取推奨量 240 μ g をはるかに超える 326 μ g であった (図 13)。しかも、血清アルブミン濃度とも関係は持たない。しかし、先行研究でも示されるように、血清葉酸摂取量が充足しているにもかかわらず、血清葉酸濃度は低く、その結果有害なホモシステイン値は高い (図 3, 5) (8)。葉酸は認知症、脳梗塞を予防する重要なビタミンであるが (7)、食品中の葉酸はモノグルタミン酸型やポリグルタミン酸型として蛋白質と結合しており、そのほとんどはポリグルタミン酸型である (7)。さらにモノグルタミン酸型葉酸はそのまま吸収されるが、ポリグルタミン酸型葉酸は空腸刷子縁膜に局在するコンジュガーゼという加水分解酵素によりモノグルタミン酸型葉酸にされてからでないと吸収されない。そのため両者は生体利用率が異なる。また、葉酸を定量するときと同様に葉酸を消化吸収するには必ず蛋白質分解酵素によって葉酸を酵素から遊離させなければならない (7)。

しかしながら、この葉酸代謝の遺伝子多型や萎縮性胃炎による酵素活性の低下、葉酸吸収不足により、血液中のホモシステインを上昇させ、心筋梗塞、本態性高血圧、認知症など現在日本でも深刻な問題となっている病気と関わるということが明らかにされている (7)。高齢者の約 6 割は萎縮性胃炎を持っているため (12)、蛋白質の消化機能が低下しており、蛋白質や葉酸の吸収能力が低下することが考えられる。PEM の対策：胃粘膜萎縮の程度を血液検査で判断することができるペプシノーゲン検査がある。ペプシノーゲン I/II 比率が 3 以下であると、萎縮性胃炎と診断される。よって、消化・吸収が容易な消化態の補助食品やモノグルタミン酸型葉酸を補給するのが望ましいと考えられる。本研究施設でも、半消化態の補助食品 (リカバリー) の投与で、血清アルブミン濃度が 3.0g/dl 以下の被験者にたいして一部 PEM が改善できた。また 2006 年 9 月に厚生労働省から発表された『ヘリコバクターピロリ菌感染と胃がん罹患との関係』の調査より、胃がんでない対照グループでも 75% が *Helicobacter pylori* (以下 *H.pylori*) に感染していることがわかっている (13)。*H.pylori* 感染は、胃体部に広がっており、胃体部を中心に胃炎を生じ、その結果粘膜萎縮が進行する (13)。現在、除菌治療は健康保険適用下で本菌陽性の胃・十二指腸潰瘍に対する抗生物質による除菌治療がされている。最近では、除菌治療により組織学的胃炎が改善し、萎縮性胃炎などが改善することを示した報告が相次ぐことから、*H.pylori* の除菌が望まれる。ただし、超高齢者の場合は進行した萎縮性胃炎の回復は困難が多いので早期の対策が求められる。

また、うまみ物質であるグルタミン酸により、化学的刺激を受け脳は食物摂取を認知し、胃酸分泌を始めとした本格的な消化が始まることが報告されているため (14)、グルタミン酸による消化・吸収能の改善や、直接吸収されるモノグルタミン酸型葉酸の高齢者施設における投与を試行したが、血清アルブミンが 3g/dl 以下の者に改善はみられたものの全体としてはその改善は好くなかった (15)。

4.2. B 群、C 群対象者の蛋白質消化能低下の実態と葉酸代謝改善

B 群対象者における食肉摂取量は A 群対象者の 70g に比して 46.5 \pm 11.0g と低く、国民健康・栄養調

査の70歳以上の平均値と近いが、血清アルブミン平均値は $3.6 \pm 0.3 \text{g/dl}$ であり、PEMと判定されたものは41%とA群の46%に近い。介入前の葉酸摂取量はB施設 $320 \mu\text{g}$ 、C施設 $341 \mu\text{g}$ で70歳以上の女性の葉酸摂取量 $342 \mu\text{g}$ とほぼ同じであった(11)。このように推奨量 $240 \mu\text{g}$ を十分満たしていたが、認知症予防の観点からは、血清葉酸濃度がB群対象者で 4.6ng/ml 、C群対象者では 4.1ng/ml と極めて低い値を示しており、対象者は葉酸欠乏と判定された。さらに、介入前の血清ホモシステイン濃度は認知症予防目標の $10 \mu\text{mol/L}$ 以下はおろか、2005年版の食事摂取基準で葉酸の推定平均必要量を決めるにあたり、基準値内とした $14 \mu\text{mol/L}$ 未満をも大きく上回っていた。介入後、モノグルタミン葉酸の投与で葉酸摂取量を $400 \mu\text{g}$ 以上にすることにより、血中の葉酸濃度を上げ、血清ホモシステイン濃度を確実に下げることができた。高齢者のように吸収が低下した人や、TT型の人でもモノグルタミン葉酸を一定量添加し、葉酸摂取量を $400 \mu\text{g}$ 以上にすることで、葉酸栄養状態を改善できたことは本研究の大きな成果であり、これにより、本研究からも葉酸の推奨量を $400 \mu\text{g}$ に上げる必要があることが改めて明らかになった。また、国民健康栄養調査から特に高齢者では本研究の対象者と同様に血清葉酸濃度が低く、血清ホモシステイン濃度が高くなっていることが予測され、逸早い葉酸推奨量の見直しや国としての対策が望まれる。

本研究の特徴は遺伝子多型に着目した点である。自分自身の遺伝子多型を理解することは大切であるが、TT型だからといって認知症になってしまうのではないかと悲観するのではなく、むしろ知ることによって認知症発症を予防していくことが重要である。

今回、対象の超高齢者はペプシノーゲンIが82%の対象者で、消化限界値の 70ng/ml を大きく下回っていた。これでは食物中の補酵素として蛋白質に固く結合している葉酸の遊離が十分にできず、名目上の推奨量の葉酸摂取量では葉酸の利用はできない。しかし、モノグルタミン葉酸を添加すれば、ペプシノーゲンI/II比率3.0未満の者でも、ペプシノーゲンI/II比率3.0以上の者と同様に血清葉酸濃度は有意に上昇し、血清ホモシステイン濃度は有意に低下した。なぜならば、ペプシノーゲンI/II比率が3未満であっても、これに対し添加したモノグルタミン葉酸は蛋白質消化の影響を受けないからである。この期間中に蛋白質栄養は改善されなかったことが血清アルブミン値、血色素濃度で判定された。蛋白質消化能の低下した高齢者の蛋白質栄養状態の改善には今回のように米飯を中心とした食事ではなく蛋白質半消化態の栄養補助食品が必要であったと思われる。またペプシノーゲンI/II比率3.0未満の者と3.0以上の者の比較では差がみられなかった。理由は全体としてペプシノーゲンI/II比率はわずか3.8であり、蛋白質消化能が高いものでも4.5程度であったことが考えられる。また、確実な慢性萎縮性胃炎の判定には他の検査との併用が必要であり、膵液のトリプシン、キモトリプシン、小腸のペプチダーゼ類の低下も考慮して、消化・吸収と蛋白質や葉酸の栄養状態についての更なる研究が望まれる。

5. 結論

本研究は、高齢者の食肉摂取の増加の必要性(図1)を認め、対象者には国民健康・栄養調査の高齢者の平均食肉摂取量(70歳以上では $47.7 \pm 51.2 \text{g}$)をこえる理想的な約 70g の食肉をA群対象者に摂取させた。しかしながら、全国の施設内高齢者の約40%を占めるPEM(蛋白質エネルギー栄養障害)は、本研究の施設においても図2に示すようにPEMが46%に見いだされた。一方、食肉摂取量が約 47g とほぼ国民平均値に近いB群対象者にあっても、PEMは41%に見いだされた。適正に食肉を含む蛋白質摂取量が 1g/kgIBW (標準体重)以上であれば、図11に示すように蛋白質摂取量はPEMと直接関係はない。これは一定量以上の食肉を摂っても、その利用に上限があることを示す。この高齢者のPEMを解決するには、単に肉類の摂取量を増加するだけでは困難であることを明確に示した。これは蛋白質の消化能力が高齢者の慢性萎縮性胃炎等によって著しく低下していたからである。その指標となるペプシ

ノーゲン I の血清内濃度は 82%の対象者が、限界値の 70ng/ml 以下であった。そのために、脳梗塞、認知症等の予防に重要な栄養素である葉酸は、天然の蛋白質結合状態にある補酵素態では消化できないと考えられる (図 3,5)。しかしながら、モノグルタミン酸を添加することによって、完全に葉酸のレベルは正常化し、ホモシステインレベルも十分に低下した (図 14,16)。これは人口の 15%を占めるメチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素の TT 型多型 (図 4) においても、葉酸レベルの回復に成功した (図 15)。食事摂取基準は高齢者については 70 歳以上として一括した推奨量 (目安量) しか定められていないため、高齢社会にとって本研究のデータは貴重である。「葉酸の利用率について高齢者についての報告は見あたらないので、その推奨量は中高年と同レベルの 240 μ g とする」という現在の厚労省の策定基準は改めなければならない。今後、PEM 自体の解決に向けて、半消化態の蛋白質源や抗老化物質などの応用も視野に入れて研究を推進する予定である。

文献

- 1) 厚生労働省: 日本人の食事摂取基準 (2005 年度版) の活用 特定給食施設等における食事計画編, 第一出版, 東京 pp.51-55 (2005)
- 2) 杉森裕樹、吉田勝美、小山秀夫 他 わが国の院内栄養管理サービス(NCM)に関する研究——公的病院連合加盟病院における実態調査——病院管理 43(2) 157-166, 2006
- 3) 香川靖雄、日笠志津、影山光代 他 ビタミン関連酵素の多型とテイラーメイド栄養 ビタミン 82(3) 185-172 (2008)
- 4) 香川靖雄 佐々木菜美 石黒紀代美 豊田充彦 影山光代 「3. 経腸」「アミノ酸の科学と最新応用技術」監修: 門脇基二、鳥居邦夫、高橋迪雄 シーエムシー出版 pp.203-214. (2008).
- 5) 佐々木菜美、石黒紀代美、香川靖雄: 経皮内視鏡的胃瘻造設術(PEG)施行患者における REE 実測値と BEE 計算値の検討。日本臨床生理学雑誌 37 (2) 93-104 (2007)
- 6) Luchsinger, JA, Tang MX, Millre J, et al.: Relation of higher folate intake to lower risk of Alzheimer disease in the elderly .Arch Neurol.,64: 86-92 (2007)
- 7) 香川靖雄 四童子好廣編著 日本ビタミン学会監修「ゲムビタミン学 遺伝子対応栄養教育の基礎」建帛社 pp.1-222 (2008).
- 8) Kageyama, M., Hiraoka, M., Kagawa, Y.: Relationship between genetic polymorphism, serum folate and homocysteine in Alzheimer's Disease. Asia-Pacific Journal of Public Health.,20 Supplement, 111-117 (2008)
- 9) Yang Q., Botto LD., Erickson JD., et al.: Improvement in stroke mortality in Canada and the United States, 1990 to 2002. Circulation. 113(10): 1335-1343 (2006)
- 10) Hiraoka, M., Kato, K., Saito, Y., Yasuda, K. and Kagawa, Y.: Gene-nutrient and gene-gene interactions of controlled folate intake by Japanese women. Biochem. Biophys. Res. Commun. 316, 1210-1216 (2004)
- 11) 厚生労働省: 平成 17 年度国民健康・栄養調査報告 第一出版 (2008)
- 12) Naylor GM, Gotoda T, Dixon M et al.: Why does Japan have a high incidence of gastric cancer? Comparison of gastritis between UK and Japanese patients. Gut. 55(11):1545-1552 (2006)
- 13) Matsuhisa TM, Yamada NY, Kato SK et al. Helicobacter pylori infection, mucosal atrophy and intestinal metaplasia in Asian populations: a comparative study in age-, gender- and endoscopic diagnosis-matched subjects. Helicobacter. 8(1):29-35 (2003).
- 14) Young RL, Page AJ, O'Donnell TA, et al. Peripheral versus central modulation of gastric vagal

pathways by metabotropic glutamate receptor 5. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 292(2):G501-11 (2007).

15) Kagawa Y, Kageyama M.: Protein Energy Malnutrition in Elderly. *International Congress of Dietetics Symposium on Glutamate* (2008)

図1. 70歳以上は肉類摂取約40gだが70gの摂取が望ましい

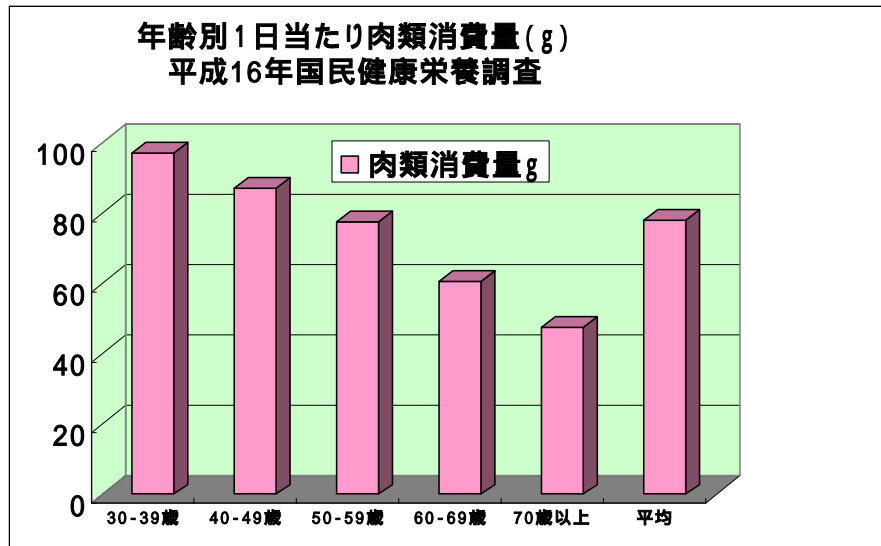
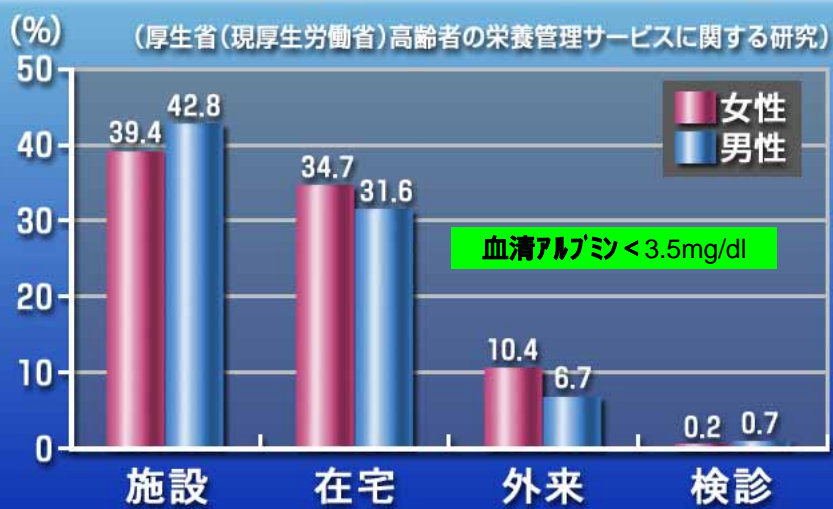
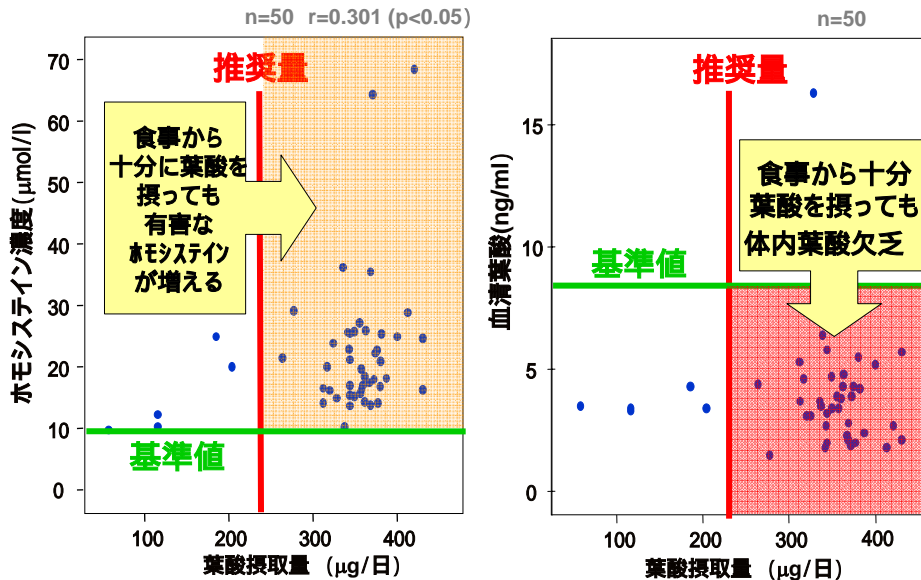


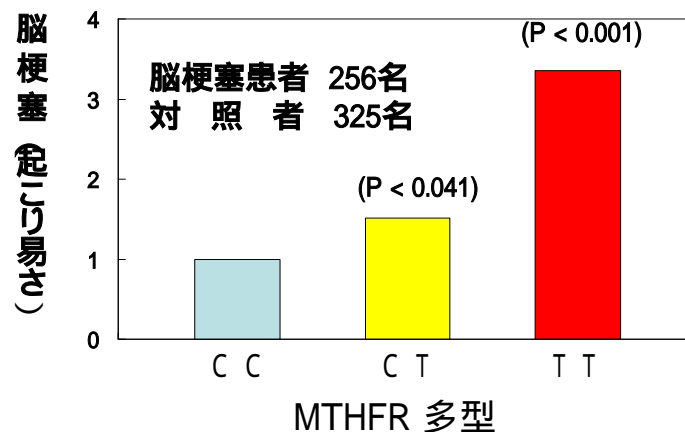
図2 高齢者のPEM出現状況



**図3 . 葉酸摂取量と血清葉酸、血清ホモシステイン濃度の相関
高齢者では食物葉酸を推奨量240 μg摂っても吸収・利用が悪い**



**図4 . 脳梗塞にかかりやすい体質(TT型)の人が15%。
葉酸を400 μg摂れば予防できることが確定。**



森田啓行東京大学医学部准教授 Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1998;18:1465

* Hiltunen MO et al. Vascular Med 2002, 7: 5 DNA epigenetics.

図8 . 認知症高齢者のMTHFR C677T 遺伝子多型別の血清葉酸濃度、血清総ホモシステイン濃度 (香川、影山他: Vitamins 82, 165-172, 2008)

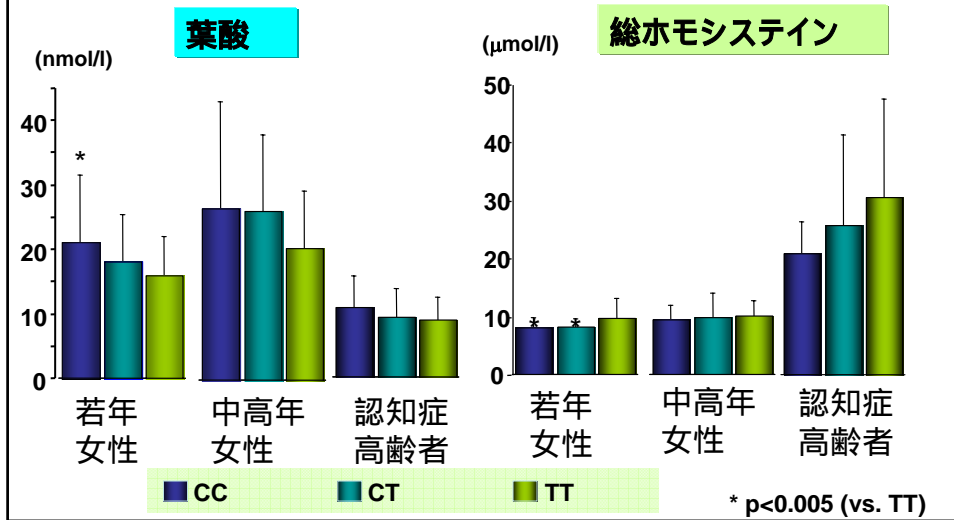
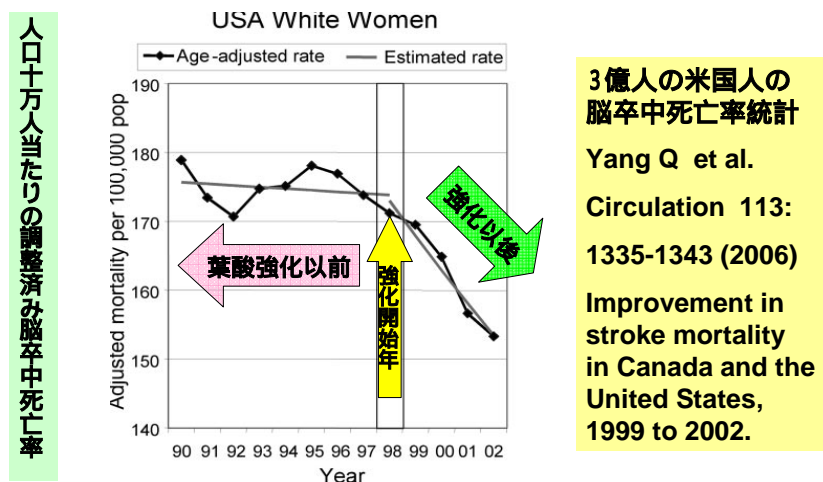


図6 . 穀類の強制的葉酸強化をした1998年を境に脳卒中死亡率が急激に減少した。



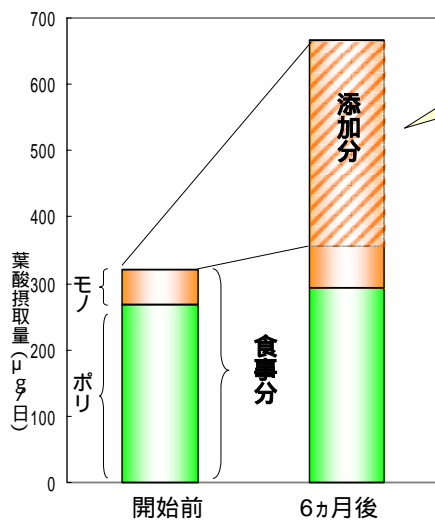
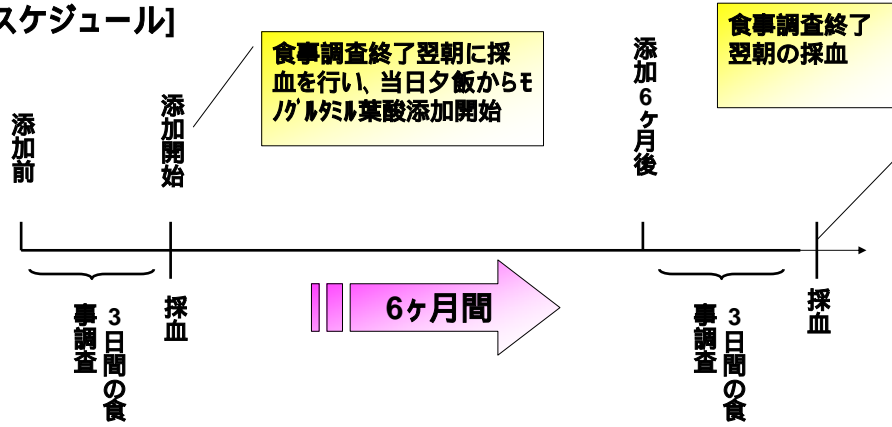
3億人の米国人の脳卒中死亡率統計
 Yang Q et al.
 Circulation 113:
 1335-1343 (2006)
 Improvement in stroke mortality in Canada and the United States, 1999 to 2002.

脳卒中は日本の寝たきり高齢者の4割を占め増加中

図7 B、C対象者のモノグルタミン葉酸負荷スケジュール

食事調査 秤量記録法 献立から残菜重量を引く
 血液検査 血清葉酸・ホモシステイン濃度、ヘプシノーゲン

[スケジュール]



	開始前	6ヵ月
総葉酸 (μg)	322 ± 45	671 ± 97
ポリグルタミン葉酸	267 ± 39	293 ± 32
モノグルタミン葉酸	54 ± 10	373 ± 85
モノグルタミン葉酸含有率 (%)	20 ± 3	55 ± 6

図8 食事と葉酸添加米飯からの葉酸摂取量 (B施設)

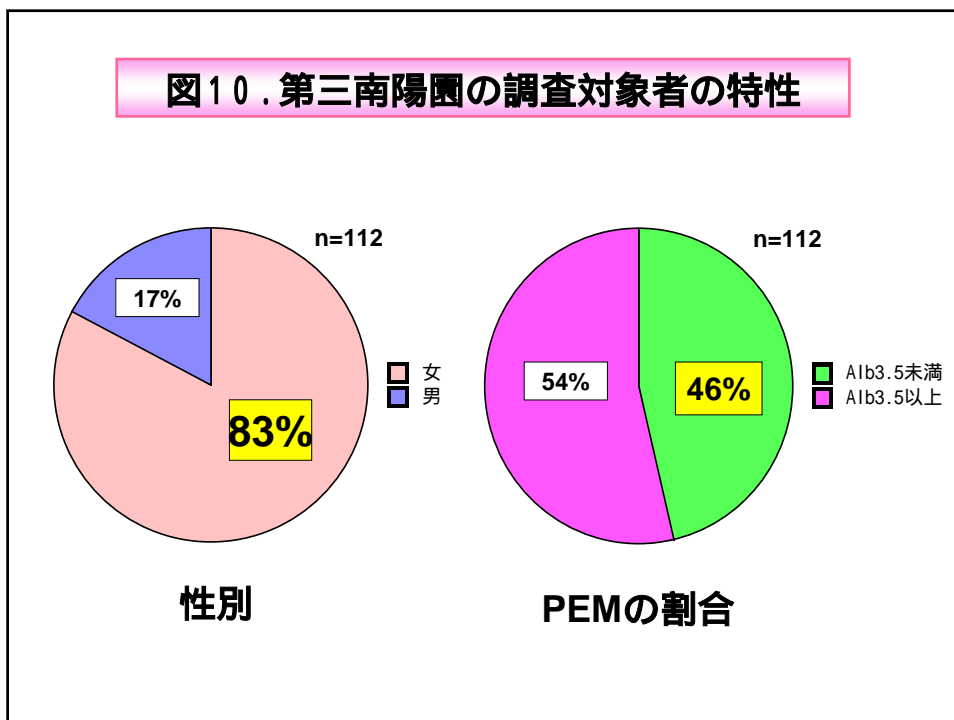
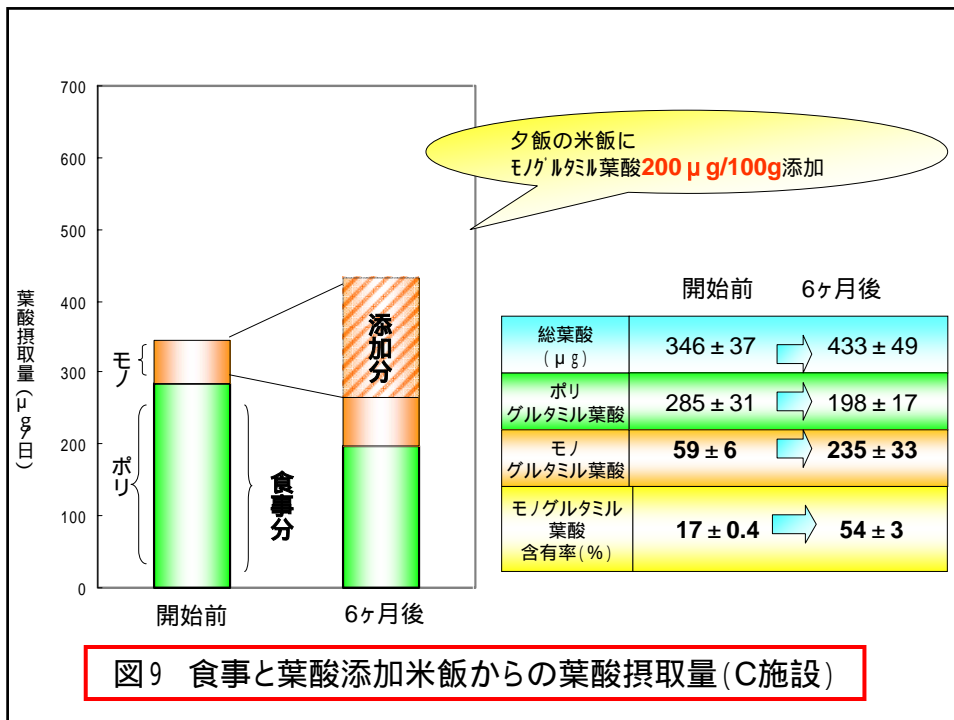


図11. 蛋白質摂取量とPEMと介護度

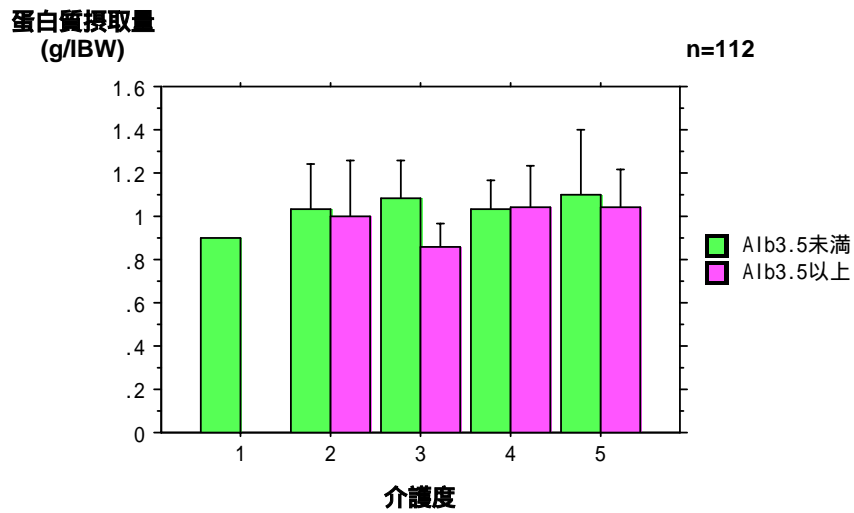


図12. エネルギー摂取量とPEMと介護度

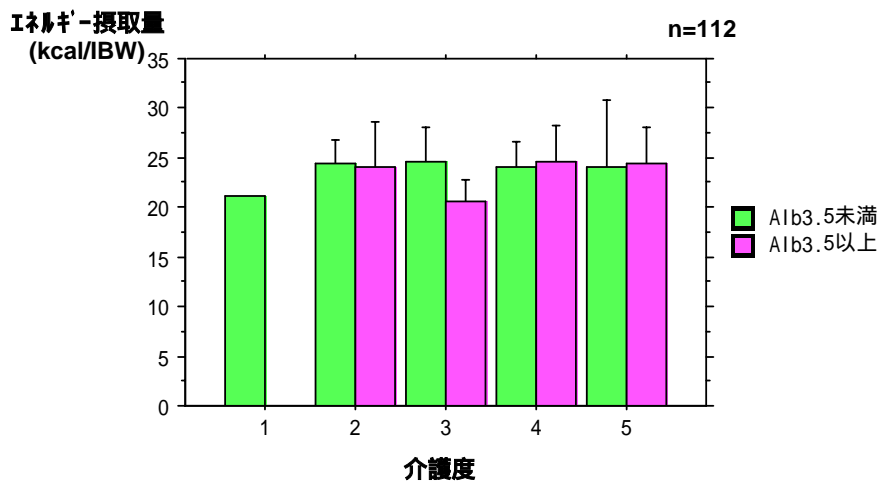
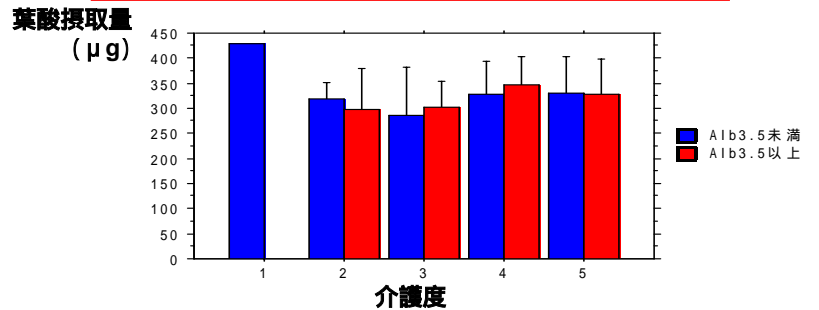


図13. 葉酸摂取量と介護度



記述統計 - 連続変数
分割の除外: データ一覧.svd

	平均	標準偏差	標準誤差	例数	最小値	最大値	欠測値の数
葉酸, 合計	326.270	67.732	6.429	111	139.000	431.000	10
葉酸, Alb3.5未満	326.392	71.534	10.017	51	139.000	431.000	0
葉酸, Alb3.5以上	326.167	64.936	8.383	60	156.000	427.000	0

合計結果は、分割変数の欠測値のため、個々のセルの合計と一致しません。

記述統計 - 名義変数
分割の除外: データ一覧.svd

	群の数	度数	欠測値数	最頻値
介護度, 合計	5	111	10	4
介護度, Alb3.5未満	5	51	0	5
介護度, Alb3.5以上	4	60	0	4

合計結果は、分割変数の欠測値のため、個々のセルの合計と一致しません。

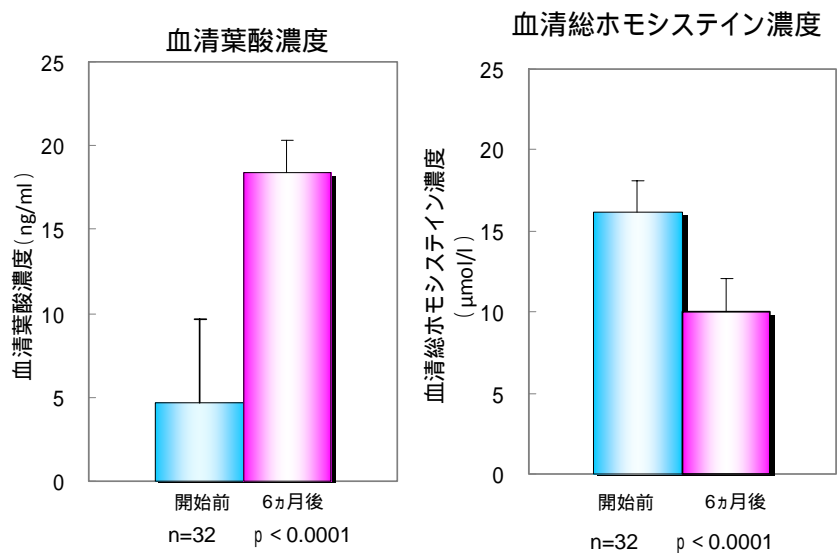


図14 血清葉酸濃度と血清ホモシステイン濃度における前後比較(B施設)

図15. B群対象者の血清葉酸濃度改善

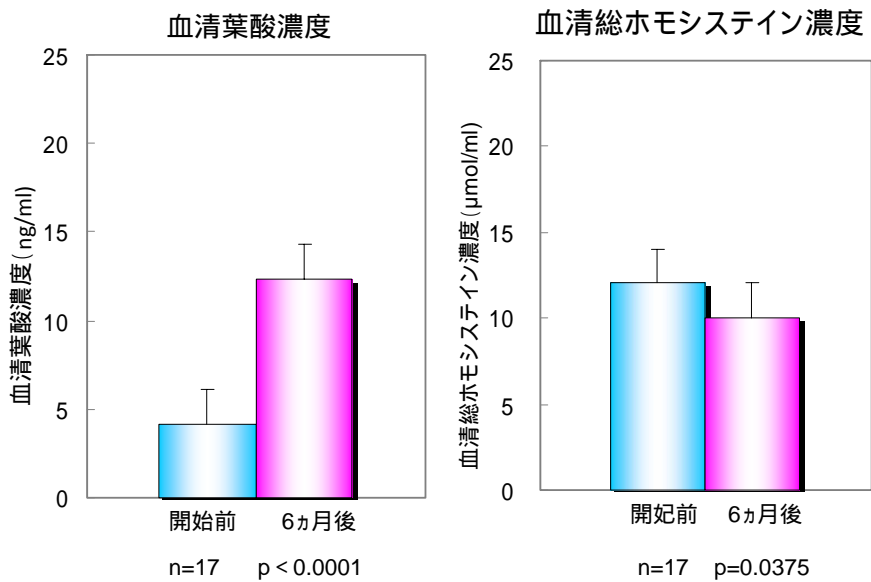
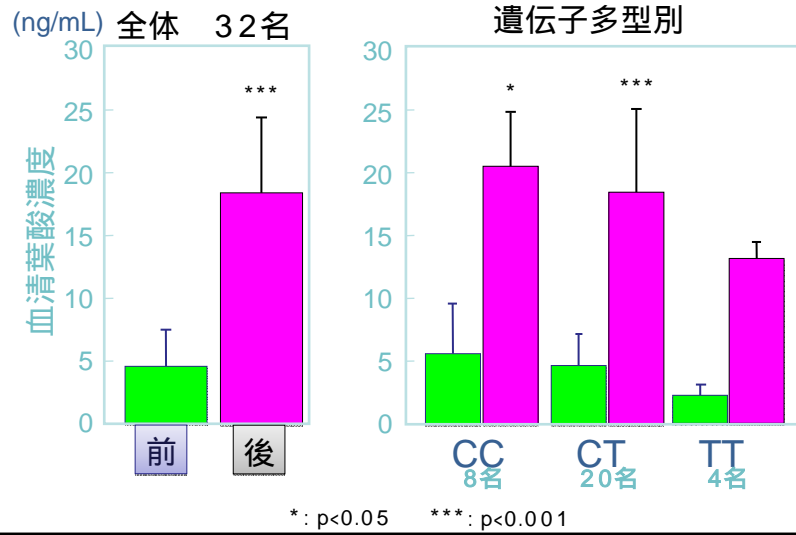


図16. 葉酸濃度と血清ホモシステイン濃度における前後比較(C群対象者)

新規形態食肉製品（飲む食肉）の
開発とその機能性に関する研究

北海道大学大学院農学研究院

西邑隆徳

1. 緒言

食肉は、必須アミノ酸を豊富に含む良質な動物性タンパク質の供給源として、今日の私たちの生活には欠くことのできない食品の一つである。しかし、我が国における食肉の消費量は近年ほとんど増加していない。日本人の食文化・食生活を鑑みると食肉のテーブルミートとしての飛躍的な消費拡大は難しいのが現状である。また、食肉を原材料とする食肉製品についても消費の伸びは低く、新しいタイプの食肉製品が開発されておらず新たな諸費者を開拓できていない。また、咀嚼力の低下した高齢者や病人にとっては、食肉をそのままの形状で摂取することは困難である。

食肉には良質タンパク質が含まれ、また、多くの機能性物質が含まれているにもかかわらず、摂食形態が限定的で消費が拡大していない。食肉の有する栄養価と機能性を十分に活かす新しい形態の食肉製品の開発が必要である。

ところで、ミルクは生乳としてだけでなく食品素材として一般食品や保健機能食品に利用されている。ミルクは液状（水可溶性）で脱脂・乾燥が容易であり、食品素材としての利用性が大きく、様々な食品に素材として利用されている。食肉をミルクのような水可溶化食品（素材）とすることができれば、飲む食肉（食肉飲料）などの新規食肉製品の開発（高齢者・嚥下困難者、乳幼児あるいはアスリート）、栄養機能性食品素材としての利用（メタボリック中年層）、乾燥・粉末化による常温流通が可能な食肉として世界中の飢餓難民に届けることも可能となる。

しかし、主要な食肉タンパク質である筋原線維タンパク質は水に不溶性を示し、これを溶解させるには高濃度の塩溶液（約3%以上）が必要である。塩溶性食肉タンパク質の利用は食味の点や食塩の過剰摂取問題から現実的ではない。また、食品素材として利用する際にも高濃度の塩が邪魔になる。そこで、食肉（筋原線維）タンパク質を「水」（あるいは極めて低塩濃度の塩溶液）に溶解する技術を開発する必要がある。

我々はこれまでに筋原線維タンパク質の低イオン強度溶液への溶解技術の確立について検討し、L-ヒスチジンの添加による中性域の維持と超音波処理による筋原線維タンパク質の高次構造の破壊を施すことで、80%以上の筋原線維タンパク質を低イオン強度溶液に溶解できること¹⁾、そして溶解した筋原線維タンパク質が70℃以上の加熱により高い溶解性を長時間保持できること²⁾を報告した。しかし、商業的な食品生産ラインで超音波処理を行うことは設備的にもコスト的にも非現実的である。また、なぜ、通常は水に溶けないタンパク質が水可溶化するのか、そのメカニズムについては不明である。食肉タンパク質の水可溶化技術を確立するためには、筋原線維タンパク質の水可溶化メカニズムを解明することが極めて重要となる。

筋原線維タンパク質の約40%を占めるタンパク質であるミオシンは、筋肉において筋原線維の「太いフィラメント」を形成している。また骨格筋より抽出したミオシンにおいても、生理的塩濃度溶液では「太いフィラメント」様に自己集合し、それ以下の塩濃度溶液でも重合したままで溶解しないとされている。しかし抽出したミオシンの場合も、上述した筋原線維タンパク質と同じく、L-ヒスチジンの添加と超音波処理によって低イオン強度溶液に溶解することも報告し³⁾、ミオシンの低イオン強度溶液への溶解が、筋原線維タンパク質の低イオン強度溶液への溶解に大きく関与していることが示唆されている。つまり、筋原線維タンパク質の水可溶化機構の解明のためには、ミオシンの水可溶化機構について詳細に検討することが有効であると考えられる。

そこで本研究では、**新規形態食肉製品(飲む食肉)**の開発を目的として、食肉タンパク質の主要成分である筋原線維タンパク質を水可溶化する方法を確立するために、その主要成分であるミオシンに焦点を当てて、ミオシンの低イオン強度下における挙動と低イオン強度溶液に溶解したミオシンの加熱ゲル特性について検討した。

2. 実験材料と方法

2-1 ミオシンの調製

ミオシンの調製はPerryの方法⁴⁾によって行った。屠鳥直後の成鶏から浅胸筋を取り出し、挽肉にした後、改良したGuba-Straub溶液(0.3 M KCl, 0.05 M EDTA, 0.02 M MgCl₂, 0.15 M K-phosphate, pH 6.5)により14分間抽出後、2,800 rpmで10分間遠心分離し、その上清をミルパップで濾過した。濾液を冷蒸留水で15倍に希釈し、一時間静置した。沈澱が形成された後、上清を除き、残りの懸濁液を4,000 rpmで10分間遠心分離した。沈澱を0.5 M KCl溶液になるよう3.0 M KClを加えて溶解し、さらに冷蒸留水で0.3 M KCl溶液とし、0.1 N NaOHでpH 7.0に調整した。一時間、30,000 rpmで超遠心分離し、ミルパップで濾過した後、濾液を冷蒸留水で10倍に希釈した。この溶液を2,800 rpmで30分間遠心分離し、沈澱を回収した。沈澱に0.6 M KClを加え、0.1 N NaOHでpH 6.5とし、溶解した。この溶液を0.6 M KCl, pH 6.5の溶液に一晩透析した。透析後、40,000 rpmで二時間超遠心分離し、この上清をミオシンとした。

2-2 ミオシンの水可溶化

調製したミオシンを、1 mM KCl, 5 mM L-histidine からなる溶液で透析したものを100,000×gで2時間の超遠心分離を行い、得られた上清を中性低イオン強度下に溶解したミオシンとした。

2-3 溶解度の測定

水可溶化の処理過程における透析後の懸濁液および超遠心分離後の上清(水可溶化ミオシン溶液)のタンパク質濃度をBiuret法⁵⁾により測定した。分光光度計(島津製作所UVmini 1240)を用い、波長540 nmでの吸光度を測定し、ミオシンの540 nmにおける吸光係数を0.066 (/mg)として算出した。懸濁液に含まれるタンパク質量に対する上清中のタンパク質濃度の割合を算出し、溶解度とした。

2-4 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

2-4-1 電気泳動用試料の調製

調製したミオシンおよび水可溶化ミオシンはSDSの析出を防ぐため、5 mM Tris-HCl (pH 6.8)、5 mM EDTA からなる溶液に透析した。SDS処理用溶液(16 mM Tris-HCl, 6.2 mM EDTA, 3.1% SDS, 31%グリセロール, pH 8.0)とβ-メルカプトエタノールを、SDSとβ-メルカプトエタノールの最終濃度がそれぞれ3%になるように混合し、この溶液を透析後のミオシン懸濁液の半分量に加え、100℃に設定したドライサーモバスで2分間煮沸後、速やかに冷却した。0.1% ブロモフェノールブルー(BPB)、50%グリセリンからなる溶液を5分の1量加えて、電気泳動用試料とした。使用時まで-80℃で凍結保存した。

2-4-2 SDS-ポリアクリルアミドゲルの調製

分離ゲルには12.5%ポリアクリルアミド(アクリルアミド:ビスアクリルアミド=29.2:0.8)、37.5 mM Tris-HCl (pH 8.7)、0.1% SDS、0.75 mg/ml 過硫酸アンモニウム、および1.67 μl/ml N,N',N'-Tetra methyl-ethylene diamine (TEMED)からなる均一ゲルを用いた。濃縮ゲルには、4.4%ポリアクリルアミド(対ビス比、同上)、12.4 mM Tris-HCl (pH 6.8)、0.1% SDS、0.9 mg/ml 過硫酸アンモニウム、2.0 μl/ml TEMED からなる均一ゲルを用いた。

2-4-3 電気泳動法

凍結保存したSDS処理試料を常温で解凍し、試料のタンパク質濃度に応じて5~10 μlをゲルの

溝に添加し、ゲル1枚当たり 10 mA で約 40 分通電後、20 mA で約 2 時間電気泳動を行った。電気泳動用緩衝液は、25 mM Tris、0.1% SDS、192 mM グリシンからなる Laemmli⁶⁾の泳動用緩衝液を用いた。

2-4-4 ゲルの染色および脱色

泳動後のゲルを 0.1% Coomassie Brilliant Blue (CBB) R-250、50%メタノールおよび 10%酢酸からなる溶液で約 1 時間染色した後、5%メタノール、7.5%酢酸溶液で十分に脱色した。

2-5 透過型電子顕微鏡による観察

2-5-1 ネガティブ染色法

コロジオン膜を張りカーボン補強した銅グリッドに、試料となる各条件下のミオシンを滴下し、3 分間保持して試料を吸着させた。余分な水分を濾紙で吸い取り、2%酢酸ウラン溶液を滴下し、10 秒間程度保持した後、濾紙で余分な染色液を吸い取った。この作業を 3 回繰り返し、風乾した。染色後の試料は、透過電子顕微鏡（日立 H-800）を用いて 75 kv の加速電圧下で観察した。

2-5-2 ロータリーシャドウイング法

試料となる各条件下のミオシンを、タンパク質濃度 10~20 µg/ml、50%グリセリン、0.4 M 酢酸アンモニウムとなるよう懸濁させた。この溶液を噴霧器により雲母板に噴霧した。フリーズレプリカ装置（JEOL 社 JFD-9010）を用い、この雲母板に白金およびカーボンの電子ビーム蒸着を行なった。透過電子顕微鏡を用いて 75 kv の加速電圧下で観察した。

2-5-3 ミオシン尾部長の測定

ロータリーシャドウイング法により観察した電子顕微鏡写真を用いて、ミオシン分子の尾部長を測定した。測定には、画像処理ソフト（Adobe Photoshop 5.5）を用いた。

2-6 加熱ゲルの作製

2-6-1 水可溶性ミオシンの加熱

タンパク質濃度 5 mg/ml に調整した水可溶性ミオシンを 30~70°C に設定した恒温槽内に 10 分間保持し、加熱試料とした。

2-6-2 電子顕微鏡による観察

作製した加熱試料を上述のネガティブ染色法およびロータリーシャドウイング法により透過電子顕微鏡を用いて観察した。

2-7 粘度の測定

加熱試料の粘度を回転粘度計（東機産業 TV-20 形粘度計）により測定した。粘度の測定に限り、加熱試料のタンパク質濃度を 1 mg/ml とした。粘度計を各試料の加熱温度に設定し、測定開始から 10 分後の値をその試料の粘度とした。

3. Results and discussion

3-1 ミオシンの低イオン強度溶液への溶解

これまでに、筋組織を超音波処理することにより、80%以上の筋原線維タンパク質が 5 mM L-ヒスチジンを含む低イオン強度溶液に溶解することを報告している¹⁾。筋原線維タンパク質の溶解の際には、筋原線維の高次構造を破壊させるために、超音波処理が必須であると考えられるが、ミオシンの場合には超音波処理は必須でないと考えられる。したがって、まず、ミオシンが超音波処理を施さずに L-ヒスチジンを含む低イオン強度溶液に溶解するかどうかを検討した。その結果、

80%以上のミオシンが5 mM L-ヒスチジンを含む低イオン強度溶液に溶解したが、L-ヒスチジンを含まない低イオン強度溶液に対しては低い溶解度を示した (Fig. 1)。また、L-ヒスチジン濃度を変えた低イオン強度溶液に対しては、L-ヒスチジン濃度が5 mM までは濃度依存的に溶解度も上昇し、それ以上の L-ヒスチジン濃度では溶解度は変わらなかった (Fig. 2)。これらの結果から、低イオン強度溶液におけるミオシンの溶解には L-ヒスチジンの存在が重要なポイントとなっていることが示唆された。

ミオシンの低イオン強度溶液への溶解において、L-ヒスチジンがどのような役割を果たしているのかを調べるために、この溶解度に対する pH の影響について検討した。低イオン強度溶液に対するミオシンの溶解度は、L-ヒスチジンの有無に関わらず pH の上昇に伴い、上昇したが、いずれの pH においても L-ヒスチジンが存在することで有意に高かった (Table 1)。これらの結果から、L-ヒスチジンがミオシンの低イオン強度溶液への溶解において、何か特別な作用を及ぼしているのではないかと考えることができる。

Fig. 1 または Table 1 で示したように、80%以上のミオシンが L-ヒスチジンを含む低イオン強度溶液に溶解するが、裏を返すと約 20%程度のミオシンは溶解しないことも示している。我々はこの溶解したミオシンと溶解しなかったミオシンに何らかの差があるのではないかと考え、これらのミオシンを SDS-PAGE に供し、その構成ポリペプチド鎖について検討した。しかしながら、いずれのミオシン間も同じ分子量に重鎖および軽鎖を有し、違いは見られなかった (Fig. 3)。つまり、ミオシンの溶解は構成ポリペプチドの分解や欠落により起こるものではないことが示された。

そこで、電子顕微鏡を用いて、L-ヒスチジンを含む低イオン強度下におけるミオシンの形態を観察した。同条件下のミオシン分子の形態は、高イオン強度下におけるミオシン分子の形態と同様に、二つの頭部と長い尾部を有していた (Fig. 4)。しかし、その尾部の長さを測定し、比べてみると、L-ヒスチジンを含む低イオン強度溶液に溶解したミオシンでは有意に長いことが示された (Fig. 5)。また、高イオン強度下において、L-ヒスチジンを含む場合と含まない場合についても、同様に尾部の長さを測定したところ、L-ヒスチジンを含む場合において有意に尾部長が長くなっていた (Fig. 5)。これらの結果から、L-ヒスチジンの存在によりミオシンの尾部が伸長することが示され、L-ヒスチジンによるミオシン尾部の構造変化が示唆された。このような構造変化が生じたために、ミオシンは低イオン強度溶液に溶解するものと考えられる。

3-2 L-ヒスチジンを含む低イオン強度下でのミオシンの加熱ゲル特性

上述のように、L-ヒスチジンを含む低イオン強度溶液に溶解したミオシンは、通常ミオシンと同様に二つの頭部と一本の尾部を有しているものの、その尾部において構造の変化が生じていることが示唆されている。そのため、この溶解したミオシンについては、ミオシンの他の特性においても何らかの変化があるものと考えられる。ミオシンの尾部に関連するいくつかの特性のうち、実際の食品への応用を考えた際に最もよく検討されるべきものは、加熱特性であると思われる。ミオシンは加熱することで白濁しゲルを形成することがよく知られており、その特性はハムやソーセージなどの食肉加工品にも応用され、それらの独特の物性に寄与している。このような背景を踏まえ、低イオン強度下で溶解したミオシンの加熱ゲル特性について検討した。

L-ヒスチジンを含む低イオン強度下においてミオシンは 40°C および 50°C での加熱により半透明のゲルを形成し、60°C 以上の加熱では再び液状となった (Fig. 6)。これは高イオン強度下でのミオシンの加熱ゲルとは異なる傾向であった。低イオン強度下におけるミオシン加熱ゲルの物性について検討するために、各温度における粘度を測定した。ミオシンの粘度は 40°C まで上昇したものの、それ以上の温度では温度の上昇に伴い低下し、60°C 以上では加熱前 (4°C) のミオシンよりも粘度

は低下した (Fig. 7)。この結果からも、低イオン強度下のミオシンが 40°C 付近でゲルを形成することが示された。そこで、この加熱過程において、ミオシン分子にどのような変化が起きているかを確認するために透過型電子顕微鏡を用いて観察した。ネガティブ染色 (Fig. 8) およびロータリーシャドウイング (Fig. 9) の両観察法において、40°C および 50°C では頭部と尾部を介した分子間の凝集がネットワークを形成している様子が確認され、60°C および 70°C では各凝集体が粒状となりネットワークが崩壊している様子が確認された。つまり、低イオン強度下で加熱したミオシンは、分子間でのネットワークを形成できる 40~50°C ではゲル状となり、それ以上の温度では分子が粒状となるために再び液状となると考えられる。加熱時の頭部および尾部を介したネットワークの形成は通常ミオシンのゲル化機構⁷⁾と変わりはないが、ネットワーク形成時の温度帯が低温へと移行している。低イオン強度下においてミオシンは溶解しているものの、イオン強度の影響により分子間の距離が近い状態にあり、比較的低温での加熱によってもネットワークを形成しやすいのかもしれない。このように低イオン強度下でのゲル形成機構は考えられるが、高温加熱での液状化やゲルが半透明であることなど未解明な部分はまだ多くあり、さらなる検討が必要である。

4. 結論

本研究での検討により、ミオシンが超音波処理を施さずとも L-ヒスチジンを含む低イオン強度溶液に溶解し、その尾部が伸長していることが明らかとなった。また、L-ヒスチジンを含む低イオン強度溶液に溶解したミオシンを加熱すると、40°C 付近で半透明なゲルを形成することもわかった。これらの現象は、L-ヒスチジンの添加によりミオシンの構造変化が生じ、低イオン強度下でフィラメントの形成ができなくなったため起こるものと推察された。

5. 参考文献

- 1) Ito, Y., Tatsumi, R., Nishimura, T., & Hattori, A. (2003). *Animal Science Journal*, 74, 417-425.
- 2) Ito, Y., Toki, S., Omori, T., Ide, H., Tatsmi, R., Wakamatsu, J., Nishimura, T., & Hattori, A. (2004). *Animal Science Journal*, 75, 59-65.
- 3) Ito, Y., Tatsumi, R., Nishimura, T., Ito, T., & Hattori, A. (2002). *Proceedings of 48th International Congress of Meat Science and Technology*, vol. 2, 622-623.
- 4) Perry, S. V. (1955). *Methods in Enzymology*, 2, 582-588.
- 5) Gornall, A. G., Bardawill, C. J., & David, M. M. (1949). *Journal of Biological Chemistry*, 177, 751-766.
- 6) Laemmli, U. K. (1970). *Nature*, 227, 680-685.
- 7) 安井勉, 鮫島邦彦. (1985). *New Food Industry*, 27 (6), 81-88

講 評

本委託研究は平成 19 年度から現在課題となっている食肉の機能性等を検討するため、大学等の学術研究機関の研究者から一般公募により選考し、委託した研究成果である。選考に当たっては、当センターに設置された「委託研究選考委員会」が選考し、その研究成果については当該委員会で講評したところである。

鈴木啓一教授の「海藻、甘草の飼料添加給与が豚肉の保水性に及ぼす効果の原因解析」は、甘草の成分であるグリチルリチンが免疫能を高めることなどが知られており、海藻、甘草を飼料に添加給与した豚の免疫能、豚肉の保水性を研究し、免疫能に及ぼす海藻、甘草の効果は確認できたが、肉の保水性までは明らかにできなかった。豚肉の保水性に免疫の及ぼす可能性があるという見解にとどまっている。

岡村浩嗣教授の「たんぱく質の上限量は運動時の摂取タイミングによって上昇するか」は、トレーニングによる筋肥大に有効なたんぱく質の上限量（2 g/kg体重/日）以上のたんぱく質でも筋肥大をさらに促進するかを検討し、食肉加工品は筋肉トレーニングを行う場合に必要なたんぱく質の摂取に有用としながらも、上限量以上のたんぱく質は運動に近接したタイミングで摂取しても筋肥大は促進されないことが判った。

六車三治男教授の「食肉由来生理活性ペプチドの生活習慣病予防効果について そのⅡ」は、食肉由来ペプチドの血圧降下作用、血糖値の上昇抑制効果について、昨年度に引き続き検討したもので、豚モモ肉を用い、ペプシン、トリプシンなどのプロテアーゼ処理によって得られたペプチドに ACE 阻害活性が認められ、ラットの血圧は有意に低下したが、血糖値は低下する傾向が認められたという結果にとどまっている。ヒトの場合の成果までに至っていないことを別にしても、類似の研究成果は既に発表されていて新知見に乏しい感がある。

朴恩榮氏の「バイオ燃料副産物からの食肉抗酸化ペプチドの開発」は、多量に入手可能なバイオ燃料副産物であるたんぱく質、とくに大豆ペプチド、グルテンペプチドを分画し、分画物の抗酸化活性と食肉へ添加したときの抗酸化活性の比較を試みたもので、グルテンペプチドを豚挽肉に添加したとき、加熱肉、非加熱肉いずれの場合も脂質酸化抑制効果が示された。この結果は必ずしも新知見とはいえないが、それにしてもバイオ燃料副産物からのペプチドと称して大豆ペプチド、グルテンペプチドが試料とされているのは理解し難いところである。

横越英彦教授の「ヒスチジン含有ジペプチドによる脳神経機能に関する研究」は、ヒスチジン含有ジペプチドのアンセリンについて摂取された場合、腸管から体内に吸収されたアンセリンは一部そのままの形で血液脳関門を介して脳内にとり込まれ、脳においては脳内神経伝達物質の変動が観察され、それを介して行動などの脳機能に影響を及ぼす可能性を明らかにしたもので、類似化合物のカルノシンについては多くの研究はあるが、大型回遊魚をはじめ畜肉にも含まれているアンセリンについてはほとんど研究はなく、アンセリンが脳中へ移動し、脳に作用することが明らかになっただけでもこの研究はすぐれたものと評価される。

香川靖雄教授の「高齢者の蛋白質と葉酸の栄養改善」は、高齢者の食肉摂取の増加の必要性を認め、高齢者の PEM（タンパクエネルギー栄養障害）解決には肉類の摂取量を増加するだけでは困難で、その原因としてタンパクの消化能力の著しい低下があげられ、その解決にモノグルタミン酸添加の要を明らかにしたものである。

西邑隆徳准教授の「新規形態食肉製品（飲む食肉）の開発とその機能性に関する研究」は、食肉たんぱく質の主要成分である筋原線維たんぱく質を水溶化する方法を確立するため、ミオシンの低イオン強度下における挙動とその加熱ゲルの特性を検討してミオシンが L-ヒスチジンを含む低イオン強度溶液に溶解することを明らかにし、これを加熱すると 40℃ 近くの温度で半透明ゲルを形成することを見出したもので、現象の解明と新しい試みによる食肉製品の開発につながるもので、本研究の成果は高く評価される。

終わりに

委託期間が現実に 1 年未満という短期間に十分な研究成果をあげるには種々困難を伴ったであろうことは容易に推察されるが、半面、研究の目的が充分理解されていない感の研究も見受けられたことは申し訳ない次第であった。

今後は十分な研究期間の下に確固たる目的をもって要望に応え得る研究が実施されるよう配慮いただき、本制度を活用して食肉研究が社会貢献に大いに資するよう期待したい。

委託研究選考委員会