

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。今年度は初年度ということで、4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 幼牛におけるタンパクの吸収とパイエル板の発達
東京大学 大学院農学生命化学研究科 教授 眞鍋 昇 …………… 3

- 2 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
宮崎大学農学部 食品機能化学講座 教授 六車 三治男 …………… 15

- 3 牛肉の味に及ぼす筋繊維型の効果の検証
独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構
畜産草地研究所 食肉プロテオーム研究チーム長 千国 幸一 …………… 37

- 4 食肉由来食欲／エネルギー消費調節成分による高脂血症予防法開発
神戸大学 大学院農学研究科 栄養代謝学 教授 長谷川 信 …………… 53

- 講評…………… 63

幼牛におけるタンパクの吸収とパイエル板の発達

調査研究組織

研究代表者：眞鍋 昇・教授

共同研究者：小野 憲一郎・教授

李 俊佑・助教

所属機関：東京大学 大学院農学生命科学研究科

〒319-0206茨城県笠間市安居 3145

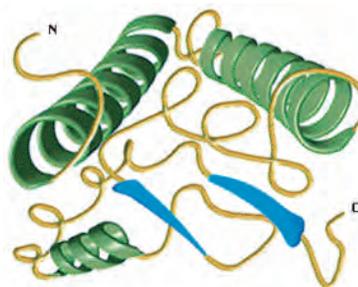
電話：0299-45-2606・FAX：0299-45-5950

E-mail:amanabe@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

研究の目的

牛海綿状脳症 (bovine spongiform encephalopathy : BSE) は、牛の脳の神経細胞が変性、脱落して、スポンジ状に変化し、運動のコントロールができなくなって、しだいにやせおとろえて死亡する病気で、これの病因は、牛の飼料に混入された動物由来の肉骨粉中の異常プリオンにあると考えられている。1986年に英国イングランド南部で発見され、その後ヨーロッパ諸国、カナダなどで見つかった。2003年12月にはアメリカ合衆国、でも感染牛がみつきり、日本、大韓民国など複数の国がアメリカ合衆国からの牛肉の輸入規制をおこなった。我が国では、2001年(平成13)9月にはじめて千葉県でBSE罹患牛が発見された。この直後の10月に法律が改正されて食肉として市場に出まわる前にすべての牛についてBSEの検査をおこなうようになった。この検査の結果2001年中に2頭(北海道と群馬県)の罹患牛がみつかった。2002年には北海道、神奈川県で各1頭宛、2003年には和歌山県、北海道、茨城県、広島県で罹患牛が検出された。そこで2003年11月に、脊髄などくらべると少ないものの背骨の背根神経節にもプリオンが蓄積するとされているので、BSE発生国の牛の背骨、Tボーンステーキなど背骨がついた肉、背骨を材料にした食品などの販売・製造が禁止となった。様々な対策がとられるなか、2004年には九州でも発生し、2005年12月末までに合計21頭の感染が確認され、その後も散発的に発生が報告されている。これらの罹患牛のなかで、8と9頭目は各々23と21月齢で、それまで安全と思われていた24月齢(2歳)に満たない若い牛だった。加えて8頭目の罹患牛では従来の異常プリオンタンパクと糖鎖パターンなどがことなることが分かった。またこの罹患牛は、感染源として疑われてきた肉骨粉の製造や販売を禁止後に誕生した牛の感染例でもあり、感染ルートの一層の解明が重要な課題となった。

このようにBSE罹患牛の発見と併行して、BSEの病原となる異常プリオン(右図)が人間にも感染することが分かってきた。1996年3月、英国でクロイツフェルト=ヤコブ病(Creutzfeldt-Jakob Disease : CJD)に似ているが臨床経過や病理像がことなる変異型クロイツフェルト=ヤコブ病(variant CJD : vCJD)が発見され、その原因がBSE由来の異常プリオンであることが明らかにされた。英国では100人以上がvCJDで死亡している。これらの患者はBSE罹患牛



の脳や脊髄、眼、小腸(回腸)などを食べたために感染したものと推測されている。これまでにヨーロッパを中心に160人程度がvCJDに感染したと考えられており、我が国でも2005年2月にはじめてvCJD患者の発生と死亡が確認された。vCJDは、異常プリオンに感染してから発病までには数年かかり、不安、感覚障害ではじまり、認知症・痴呆、妄想、運動障害などの病状を呈した。発症の約1年後には起立、歩行が不能になり、無動無言状態になり、死に至る。生前には臨床症状やCTなどの画像から診断する以外方法はないが、髄液中にあらわれた異常プリオンタンパク質の検出が有効との報告もある。残念ながら未だに治療法は確立されていないが、プルジナー博士ら(米国)はキナクリン(抗マラリア薬)、クロルプロマジン(向精神薬)などが有望だとして研究が進められている。ペリッツら(米国)は、異常プリオンタンパク質と正常プリオンタンパク質の結合を阻止する抗体とワクチンの開発を進めている。

牛においては幼若期に異常プリオンに暴露することでBSEに感染すると考えられているが、この感染の詳細には不明な点が多い。これまでBSE感染の年齢感受性に関しては、ヨーロッパ食品安全機構(EFSA)が示した「1歳齢までは一定の感受性があり、1歳を過ぎると感受性が消失する」というモデルが世界的に用いられている。他方、初乳時の新生牛が免疫グロブリンのような高分子タンパクをそのままの形で吸収することはよく知られているが、その後の加齢に伴う腸管吸収能の変化に関する詳細

な情報がほとんどない。さらに異常プリオンの体内取り込みに関わる可能性が指摘されているパイエル板 [Peyer's patches : 反芻動物の消化に関する研究を進めたJohann C. PEYERは、消化管粘膜に存在する集合リンパ組織の存在を発見した(1685年)。腸から体内に侵入しようとする微生物に対する最前線として腸管壁には多くのリンパ組織が散在する。主要な反芻家畜である牛の場合、粘膜内にリンパ球が集まった小節が散在する「孤立リンパ小節」に加えて、回腸遠位部を中心に粘膜内であって粘膜表面からも数ミリメートルのボタン状や25センチメートルを越える帯状の不規則な隆起として観察されるパイエル板が、微生物に対する前衛として重要な役割を担っている。] については、1928年に牛パイエル板の発達に関する形態学的調査が行われた以外に加齢性の変化を科学的に調べた研究がない。代用乳、人工乳、配合飼料などに含まれるプリオンに対する感受性に仔牛が同一の感受性を示し続けるのか、それとも加齢に伴って変化するのかを明らかにするためには、腸管の吸収能の変化を実証的に明らかにする必要がある。本研究では従来不明な点が多い仔牛の加齢に伴う回腸遠位部を中心にパイエル板の形態的变化を検索しながら、経口投与したタンパク、核酸などの腸管からの吸収能の推移を明らかにし、BSE感染ルートの解明のための基盤となる情報を提供することが目的である。

研究の方法

(1) 供試動物

東京大学附属牧場あるいは近隣酪農家にて出産した雄性ホルスタイン種牛を用いた。初乳を4日間哺乳させた後母牛から隔離して代用乳にて人工哺乳し、新生牛(5日齢:体重 $36.3 \pm 3.3\text{kg} \cdot n=4$)、幼牛(3月齢体重 $113.7 \pm 11.2\text{kg} \cdot n=3$)、若牛前期(6月齢・去勢前体重 $236.5 \pm 4.9\text{kg} \cdot n=2$)および若牛後期(12月齢・但し6月齢にて去勢体重 $437\text{kg} \cdot n=1$)で供した。これらの年齢選択の理由は以下のとおりである。新生牛は代用乳を摂取している時期(代用乳給与期)、幼牛はカーフスタータに切り替えた時期(カーフスタータ給与期:英国、ドイツ、日本等で異常プリオンの経口感染試験に用いる通常の月齢)である。若牛前期は、ウシでパイエル板が発達し始める時期と考えられている。若牛後期は、パイエル板が最も発達する時期と考えられているとともに、異常プリオンの経口感染に感受性を失う時期である(ヨーロッパ食品安全機構)とも考えられている。6および12月齢は配合飼料給与期である。

供試動物の健康状態を診断するために採血時にヘマトクリット値、ヘモグロビン濃度、血中カルシウム濃度、無機リン濃度、グルコース、総タンパク、アルブミン、トリグリセライド、総コレステロール、尿素態窒素、クレアチニン、クレアチニンリン酸キナーゼ、総ビリルビン、乳酸脱水素酵素、アルカリフォスファターゼ、アミノ酸転移酵素・GOTおよびアミノ酸移転酵素・GPTを測定した。加えてホルモン、アミノ酸濃度についても検討した。

なお、この研究における動物の取り扱いについては、東京大学実験動物倫理規定に則って行った。

(2) 腸管吸収能の変化

A. 経口投与液の調製: 代用乳(用時に125g粉末を1リットルの42℃の湯で溶解して調製)にマーカートンパク(卵白アルブミンと豚免疫グロブリン・各々100mg/kg体重)、トウモロコシ全粒粉(100 mg/kg体重)、カーボンブラック微粒子(市販の墨汁液を生理食塩水で5倍希釈したもの・5 ml/kg体重)を混合し、ゴム製胃ゾンデを用いて10ml/kg体重の割合で1日1回強制経口投与した(図1A: 3月齢幼牛への投与風景)。

B. 末梢血の採血と血清の調製: 予めマーカートンパク等を含む代用乳を経口投与する1日前および直前に頸静脈から採血し、無投与対照とした。その後、代用乳投与開始1(1回投与し、その24時間後)、

3(3回投与し、その24時間後)、5(5回投与し、その24時間後)および7日(7回投与し、その24時間後)後に頸静脈から採血した。採血後血清を遠心分離(3,000rpm、15分間)した。

C. マーカータンパクの検出：経口的に投与した卵白アルブミンの末梢血中への移行を、Western blot法にて血清中のマーカータンパクを定量することで定量的に調べた。すなわち、定量標準用標本(無投与対照の血清標本に最終濃度が0.001~1,000 $\mu\text{g/ml}$ ・公比10となるように鶏卵白アルブミンと豚免疫グロブリンを添加)および測定標本(無投与対照群と各投与群の血清)にトリクロロ酢酸を10%となるように加えてタンパクを沈殿させた後、この沈殿を遠心法(8,000rpm、30分間)にて分離した。沈殿をUTD溶液(9 M尿素・2% Triton X-100・1% dithiothreitol)にて溶解した。この溶解したタンパク(30 $\mu\text{g/lane}$)を10-20% gradient sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)法(アトー)にて分離した後、PVDF膜(Immobilon Transfer Membrane; Millipore)にて転写した。これらのmembrane上のタンパクを可視化するために0.2%Ponceau S液(Serva Electrophoresis)で染色し、その後ブロッキング溶液(50mM Tris-HCl・150mM NaCl・0.5%山羊血清)で前処理後、1次抗体(ブロッキング溶液で200倍希釈した兔抗卵白アルブミンポリクローナル抗体および兔抗豚免疫グロブリンポリクローナル抗体;Santa Cruz Biotechnology)と反応させた。続いて2次抗体(ブロッキング溶液で1,000倍希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ標識山羊抗兔IgGポリクローナル抗体;Dako)と反応させた後、ECL化学発光法(Amersham Pharmacia)にて標的タンパクの存在を可視化させ、これをデジタル蛍光記録システム(LAS-1000・Image-Gauge;フジフィルム)にて記録・測定し、卵白アルブミン量を算出した。

D. トウモロコシDNAの検出：経口的に投与したトウモロコシ全粒粉中に含まれるトウモロコシDNAの末梢血中への移行を、polymerase chain reaction (PCR)法にて血清中のマーカータンパクを定量することで定量的に調べた。なお予めトウモロコシ全粒粉からDNAを調製して、回収率の見積、PCR条件の決定などを行ったが、その際にはコメDNA抽出キット(タカラバイオ)を流用した。血清からの全DNAの回収にもこのキットを用いた。すなわち、トウモロコシ粒をホモジナイザーで搗潰した標本あるいは血清標本をマイクロチューブに取ってLysis Bufferと混和後タンパク質分解酵素(Proteinase K;Promega)とRNA分解酵素(RNase A;Qiagen)を加え、十分に混和した後Precipitation Bufferを加えて混和した。これを遠心分離してDNAの含まれる水層を回収した。これにDNA吸着剤を粒子表面にコートしたものを含むMiniprep Spin Columnに加えてDNAを吸着させた後、Elution Bufferを加えて余分な液体を捨て、70%エタノールで粒子表面のDNAを洗いとり、滅菌 Milli Q水を加えてDNA溶液として回収した。この標本中のDNAをサーマルサイクラー(GeneAmp PCR System 9700;PE Applied Biosystems)を用いてPCR反応を行って増幅し、トウモロコシDNAを半定量的に検出した。PCR用プライマーとしては、トウモロコシ特異的な遺伝子ツェイン(Ze1: 570 bp)を検出しかつPCR産物の分子量が小さなZEn1-5'-ZE02プライマーセット(Forward: 5'-TGC TG T CCT CTG AGC TCT CC-3'、Reverse: 5'-AGA ATG CAG GAA CCC TAG ACG-3'・想定されるPCR産物: 242 bp)(以下、トウモロコシプライマー)および広範に植物体に含まれる葉緑体遺伝子rubisco large subunit(1,431 bp)を検出しかつPCR産物の分子量が小さなrbcL02-5'-rbcL02-3'プライマーセット(Forward: 5'-GGA CTC ATG ACC ACG GTC CAT-3'・Reverse: 5'-TCA GAT CCA CAA CCG ACA CGT-3'・想定されるPCR産物: 231 bp)(以下、葉緑体プライマー)を用いた。ホットスタートPCR cyclesは次のとおりである: 94°C 5分間・続いて94°C 30秒・57°C 30秒・72°C 30秒のサイクルを28回・その後72°C 5分間。PCR産物はアガロースゲル電気泳動(Cambrex Bio Science)にて分離後、沃化エチジウムにて染色して核酸バンドを可視化さ

せ、これをデジタル蛍光記録システムにて記録・測定して半定量化した。併せて、一部のPCR産物については、塩基配列を自動DNAシーケンサー (ABI Prism 310) にて決定し、PCR産物が標的DNAか否か確認した。

(3) 腸管の組織学・パイエル板の形態変化

A. 標本の採取：新生牛(5日齢・38kg・n=1)、幼牛(3月齢・118kg・n=1)、若牛前期(6月齢・240kg・n=1) および若牛後期(12月齢・437kg・n=1) にマーカータンパクなどを混入した代用乳を経口投与した後7日間にわたって反復採血し、最期の採血の24時間後に頸静脈からセラクターを注射して鎮静した後プロポフォールで麻酔後、安楽屠殺した(図1B：・3月齢幼牛の屠殺風景)。屠殺後速やかに開腹し、消化器系 [第一胃、第二胃、第三胃、第四胃、小腸(十二指腸、空腸、回腸)大腸(盲腸、結腸、直腸および肝臓)] を摘出し(図1C：・3月齢幼牛の採材風景)、管腔内面におけるカーボンブラック微粒子の取り込まれ状況やパイエル板の構造、発達度、分布について肉眼的に検索した後、臓器を細切した。特に、回腸は盲腸より50cm~2mの遠位部に注目して採材した(図1D：・3月齢幼牛の採材風景)。

B. 組織学的検索：細切した各組織標本を10%中性緩衝ホルマリン溶液で浸漬固定し、常法によりパラフィン包埋を施し、厚さ4mmの組織切片とした。これにヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色を施し、カーボンブラック微粒子の取り込まれ状況を観察するために作製した未染色のプレパラートと共に光学顕微鏡にて観察した(図1E：・3月齢幼牛の回腸組織にHE染色を施した切片・*はパイエル板部)。

(4) 統計学的有意差検定

統計学的有意差検定はStatView-4.5 program - Macintoshを用いて行った。生化学的データは、検定に先立って正規分布性について検定した後ANOVA with Fisher's least significant differences testにて検定した。組織学的データは、Wilcoxon's signed-rank testにて検定した。いずれの場合も、Differences at $P < 0.05$ であった場合に有意差があると判定した。

研究の成果

(1) 供試動物の血液検査

表1に示すように、供試動物においては特段の異常は検出されず、健常な個体を供したと判断できた。なお、ホルモン、アミノ酸の血中濃度の測定は委託研究期間中に測定を終えられなかった。

表1. 供試動物の血液検査の成績

| 項目 | 5日齢 | 3月齢 | 6月齢 | 12月齢 |
|-------------------|------|------|------|------|
| ヘマトクリット値(%) | 25* | 26 | 24 | 27 |
| ヘモグロビン濃度(mg/dl) | 8 | 8 | 9 | 10 |
| カルシウム濃度(mg/dl) | 9.2 | 9.6 | 10.2 | 9.3 |
| 無機リン濃度(mg/dl) | 5.4 | 5.4 | 5.7 | 6 |
| グルコース(mg/dl) | 49 | 46 | 46 | 48 |
| 総タンパク(/dl) | 6.5 | 6.6 | 6.5 | 6.7 |
| トリグリセライド(mg/dl) | 20.1 | 22.4 | 19.8 | 26.9 |
| 総コレステロール(mg/dl) | 186 | 190 | 185 | 185 |
| アルブミン(mg/dl) | 44 | 41 | 46 | 47 |
| 尿素態窒素(mg/dl) | 12 | 12 | 14 | 12 |
| 総ビリルビン(mg/dl) | 1.3 | 1.2 | 1.4 | 1.4 |
| クレアチニン(mg/dl) | 136 | 137 | 162 | 163 |
| クレアチンリン酸キナーゼ(U/I) | 274 | 278 | 305 | 296 |
| 乳酸脱水素酵素(U/I) | 394 | 433 | 430 | 524 |
| アルカリフォスファターゼ(U/I) | 145 | 144 | 179 | 148 |
| アミノ酸転移酵素・GOT(U/I) | 65 | 70 | 50 | 40 |
| アミノ酸移転酵素・GPT(U/I) | 13 | 20 | 20 | 25 |

*供試動物数が少ない(12月齢の場合は1頭)ので、平均値を示した。

(2) 腸管におけるタンパクと核酸の吸収能の変化

新生牛、幼牛、若牛前期および若牛後期(各々5日齢、3月齢、6月齢、12月齢)の雄ホルスタイン牛に代用乳にタンパク(卵白アルブミンと豚免疫グロブリン・各々100mg/kg体重)、トウモロコシ全粒粉(100mg/kg体重)およびカーボンブラック微粒子を混合して7日間反復経口投与し、経口投与1日前と直前および投与開始1(1回投与し、その24時間後)、3(3回投与し、その24時間後)、5(5回投与し、その24時間後)および7日(7回投与し、その24時間後)後に頸静脈採血して、末梢血中血清に現れたタンパクと核酸を検索した。

A. タンパクの吸収

卵白アルブミンおよび豚免疫グロブリンともに5日齢新生牛および3月齢幼牛において投与開始1日後から末梢血血清中に検出された(表2および図2AとB)。これらの末梢血中濃度は、若齢牛で高く、加齢に伴って低下し、6月齢若牛前期および12月齢若牛後期では検出できない低レベルであった。投与回数には影響されなかった。このように、幼若期の牛の場合比較的分子量の小さな可溶性タンパクは経口投与されても容易に末梢血中に移行することが分かった。

本最終報告書にはまとまった成果として挙げられなかったのだが、委託研究期間中に申請者らは可溶性タンパクである卵白アルブミンおよび豚免疫グロブリン以外に難溶性タンパクとして鶏ケラチン、鮭I型コラーゲンおよび組換え牛 β アミロイド(株式会社プロテイン・エクスプレスに委託して無細胞系にて生産)の末梢血中への移行をも検索できる手法を5日齢新生牛を用いて懸命に確立しようと努めた。すなわち、投与ルートも経口投与以外にも静脈、筋内、皮下注射にてこれらのタ

表2. 雄ホルスタイン牛5日齢、3月齢、6月齢、12月齢に代用乳に卵白アルブミンと豚免疫グロブリンを混合して7日間反復経口投与し、経口投与1日前と直前(0日後)および投与開始1、3、5、7日後に末梢血中血清に現れたタンパクを検索した。卵白アルブミンおよび豚免疫グロブリンともに5日齢新生牛および3月齢幼牛において投与開始1日後から末梢血血清中に検出され、投与回数には影響されなかった。末梢血中濃度は、若齢牛で高く、加齢に伴って低下して6月および12月齢では検出できない低レベルであった。

| | | 供試数 (頭) | 投与前(日) | | 投与後(日) | | | |
|----------------------------|------------|------------|--------|---|--------|------|------|------|
| | | | 1 | 0 | 1 | 3 | 5 | 7 |
| 卵白アルブミン (microgram/ml) | 新生牛(5日齢) | 4 | 0 | 0 | 13.3 | 21.5 | 11.2 | 16.8 |
| | 幼牛(3月齢) | 3 | 0 | 0 | 2.8 | 2.2 | 3.2 | 1.6 |
| | 若牛前期(6月齢) | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 若牛後期(12月齢) | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 豚免疫グロブリン (microgram/ml) | 新生牛(5日齢) | 4 | 0 | 0 | 8.9 | 6.2 | 4.3 | 4.5 |
| | 幼牛(3月齢) | 3 | 0 | 0 | 0.9 | 1.2 | 1.3 | 0.5 |
| | 若牛前期(6月齢) | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 若牛後期(12月齢) | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

ンパクを投与し、末梢血中の存在を定量解析するためにWestern blot法以外により一層感度の高いenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA法)の利用も試みた。加えて、単回経口投与した後、経時的(30分、1、3、6、9、12、24、28、36、48、72、96、120時間後)に経静脈より反復採血し、末梢血中にこれらの経口投与した物質が検出できるか否かも詳細に検討した。しかし残念ながら、難溶性タンパクの場合は再現性が高く申請者らが自信をもって信頼できるデータであると言い得る検出法を確立するに至らず、BSEの病因であると考えられるプリオンタンパクは難溶性タンパクの範疇に含まれるものなので、これを経口投与した場合に末梢血中に移行するか否か見極める研究を遂行するためには、この難溶性タンパクの動態検索法の確立が今後の大きな課題として残ることとなった。

B. 核酸の吸収

トウモロコシ特異的な遺伝子ツェイン(トウモロコシ遺伝子・想定されるPCR産物の分子量: 242bp)および広範に植物体に含まれる葉緑体遺伝子rubisco large subunit(葉緑体遺伝子・想定されるPCR産物の分子量: 231bp)を検出するためのプライマーによって増幅されたDNAは、自動DNAシーケンサーを用いた各々のPCR産物の分子量と塩基配列から、標的遺伝子であることを確認した。

トウモロコシ遺伝子および葉緑体遺伝子ともに5日齢新生牛、3月齢幼牛および6月齢若牛前期において投与開始1日後から末梢血血清中に検出された(表3および図2CとD)。若牛後期12月齢ではトレースレベルで検出される例があった。しかしこれは1頭だけのデータであり、例数を増やして再現性を確認する必要がある。これらの末梢血中濃度は、若齢牛で高く、加齢に伴って低下した。また、投与回数に有意に影響されることはなかった。このように、幼若期の牛の場合比較的分子量の小さな飼料由来の核酸は経口投与されても容易に末梢血中に移行することが分かった。

表3. 雄ホルスタイン牛5日齢、3月齢、6月齢、12月齢に代用乳にトウモロコシ全粒粉を混合して7日間反復経口投与し、経口投与1日前と直前(0日後)および投与開始1、3、5、7日後に末梢血中血清に現れたトウモロコシ特異的な遺伝子ツェイン(トウモロコシ遺伝子・想定されるPCR産物の分子量: 242 bp)および広範に植物体に含まれる葉緑体遺伝子rubisco large subunit(葉緑体遺伝子・想定されるPCR産物の分子量: 231 bp)の断片を検索した。トウモロコシ遺伝子および葉緑体遺伝子ともに5日齢、3月齢および6月齢において投与開始1日後から末梢血血清中に検出され、投与回数には影響されなかった。12月齢ではトレースレベルで検出される例があった。これらの末梢血中濃度は、若齢牛で高く、加齢に伴って低下した。反復経口投与し、経口投与1日前と直前(0日後)および投与開始1、3、5、7日後に末梢血中血清に現れたタンパクを検索した。卵白アルブミンおよび豚免疫グロブリンともに5日齢新生牛および3月齢幼牛において投与開始1日後から末梢血血清中に検出され、投与回数には影響されなかった。末梢血中濃度は、若齢牛で高く、加齢に伴って低下して6月および12月齢では検出できない低レベルであった。

| | | 供試数 (頭) | 投与前(日) | | 投与後(日) | | | |
|------------------------------|------------|------------|--------|---|--------|------|------|------|
| | | | 1 | 0 | 1 | 3 | 5 | 7 |
| トウモロコシ遺伝子 (relative unit) | 新生牛(5日齢) | 4 | 0 | 0 | 0.33 | 0.24 | 0.13 | 0.42 |
| | 幼牛(3月齢) | 3 | 0 | 0 | 0.11 | 0.09 | 0.14 | 0.21 |
| | 若牛前期(6月齢) | 2 | 0 | 0 | 0.08 | 0.04 | 0.08 | 0.13 |
| | 若牛後期(12月齢) | 1 | 0 | 0 | 0 | 0.01 | 0 | 0.01 |
| 葉緑体遺伝子 (relative unit) | 新生牛(5日齢) | 4 | 0 | 0 | 0.44 | 0.51 | 0.42 | 0.48 |
| | 幼牛(3月齢) | 3 | 0 | 0 | 0.22 | 0.24 | 0.31 | 0.14 |
| | 若牛前期(6月齢) | 2 | 0 | 0 | 0.11 | 0.13 | 0.09 | 0.13 |
| | 若牛後期(12月齢) | 1 | 0 | 0 | 0 | 0.03 | 0 | 0 |

2006年に動物衛生研究所でトウモロコシを44%含む飼料を3月齢去勢仔牛に3か月給与し、トウモロコシに由来するDNAの消化管や組織における動態についてPCR法で検討し、トウモロコシ由来のDNAが約200塩基対の断片として末梢血中の単核細胞に移行するとの知見がある。今回申請者が行った実験では採血後に血液を3,000rpm15分間遠心分離して血清を得て、これを標本として用いており、単核細胞に移行したものが検出されたのではないと考えている。トウモロコシ由来のDNA小断片は消化管から血清中に移行して末梢まで達していると考えられる。

タンパクも多量に末梢血清中に移行していることと併せて考えると、幼若牛の消化管における物質移行は、教科書的に考えられているより容易かつ多量に生じている現象であることが本研究から分かったことは意義深い。

(3) 腸管の組織学・パイエル板の形態変化

A. 肉眼および組織学的観察：肉眼的に回腸遠位部(図3・11)に明瞭にパイエル板が観察されるのは6月齢以降であるが、組織切片を顕微鏡で観察すると3月齢の消化管粘膜中に多数観察された(図1E)。より詳細なパイエル板の形態学的検索のために、特に樹状突起細胞(FDC)を免疫組織学的染色し、これを指標として詳細な検索を行うとともにパイエル板の神経支配に関して形態学的検索を行う必要がある。またパイエル板の推移を量的に把握するために画像解析を行わなくてはならないが、本委託研究期間では十分な時間がなくて実施できなかった。

B. カーボンブラック微粒子の動態：カーボンブラック微粒子は、前胃、第四胃および上部小腸では内腔にみとめられたが取込まれず、主にパイエル板が発達している回腸の絨毛上皮組織により取込まれ、一部は空腸の上皮組織でも取込まれた(図4~10)。この取り込みは6月齢と12月齢で顕著であり、パイエル板の発達に対応していることが推測できるが、上述のタンパクや核酸の血中移行とは関連性が低いものと考えられる。なお、5日齢と3月齢の仔牛に予備的にカーボンブラック微粒子を経口的に単回投与した場合には投与24時間で結腸までに達することを確認している。

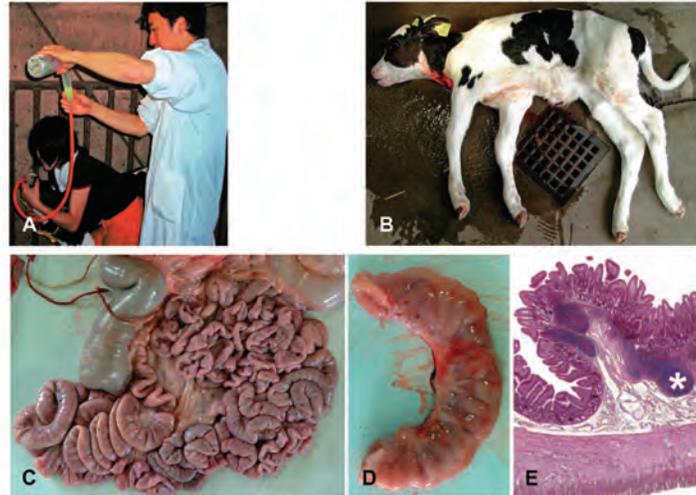


図1 A: 3月齢幼牛への投与風景・B: 3月齢幼牛の屠殺風景・C: 3月齢幼牛の採材風景・D: 3月齢幼牛の採材風景 E: 3月齢幼牛の回腸組織にHE染色を施し切片・*はパイエル板部

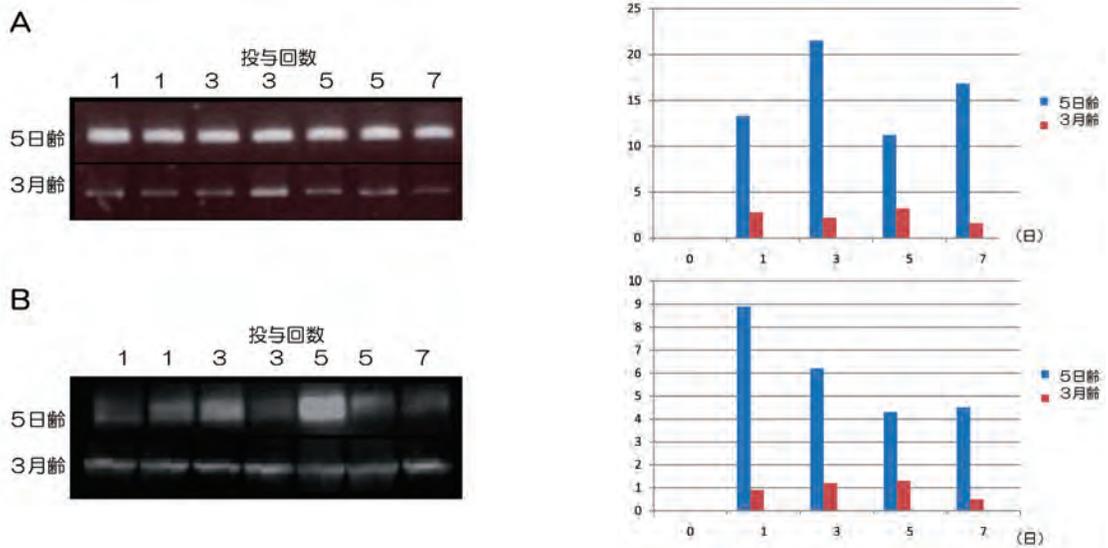


図2-1: 5日齢牛の末梢血血清中の卵白アルブミン(A)と豚免疫グロブリン(B)を検出するために行ったWestern Blotの典型的な電気泳動像

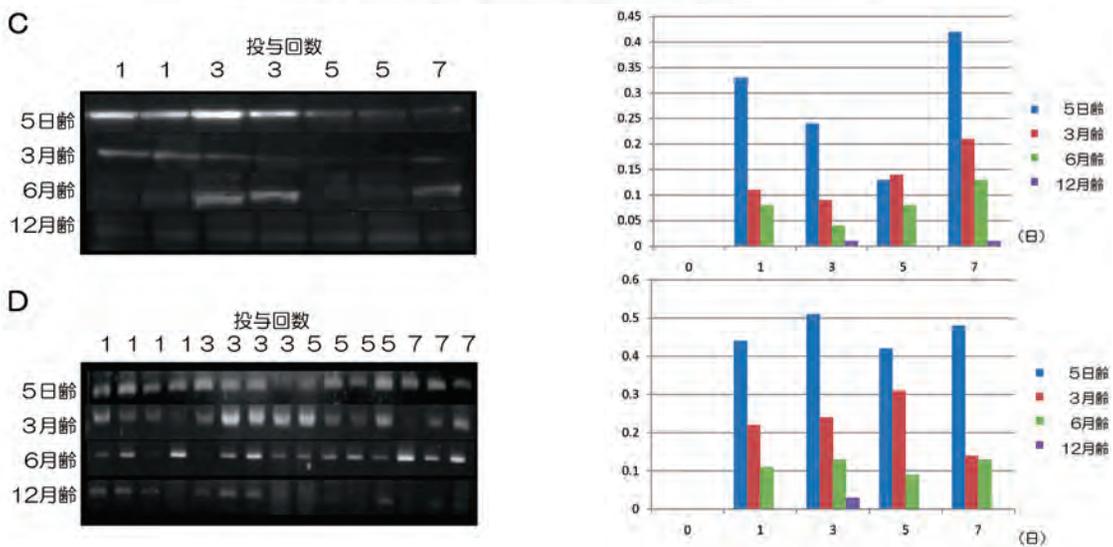


図2-2: 5日齢牛の末梢血血清中のトウモロコシ遺伝子(C)および葉緑体遺伝子(D)を検出するために行ったPCRの典型的な電気泳動像



図3. 3月齢の雄仔牛に墨汁を含んだ投与液を7日間反復経口投与し、最終投与の24時間後に屠殺し、消化器標本を摘出し、10%緩衝ホルマリンにて固定して組織学検索に供した。

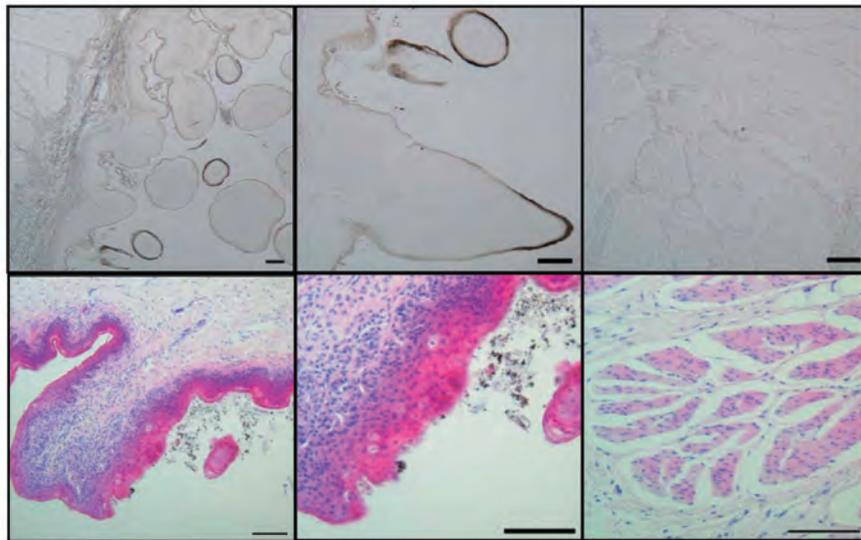


図4. 3月齢の雄仔牛に墨汁を含んだ投与液を7日間反復経口投与し、最終投与の24時間後に解剖して採集した第一胃の組織像(線：100ミクロン)

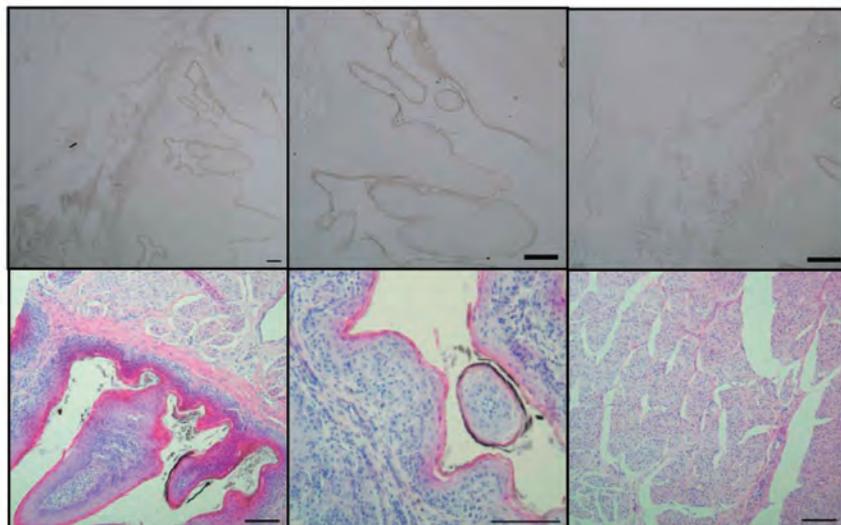


図5. 3月齢の雄仔牛に墨汁を含んだ投与液を7日間反復経口投与し、最終投与の24時間後に解剖して採集した第二胃の組織像(線：100ミクロン)

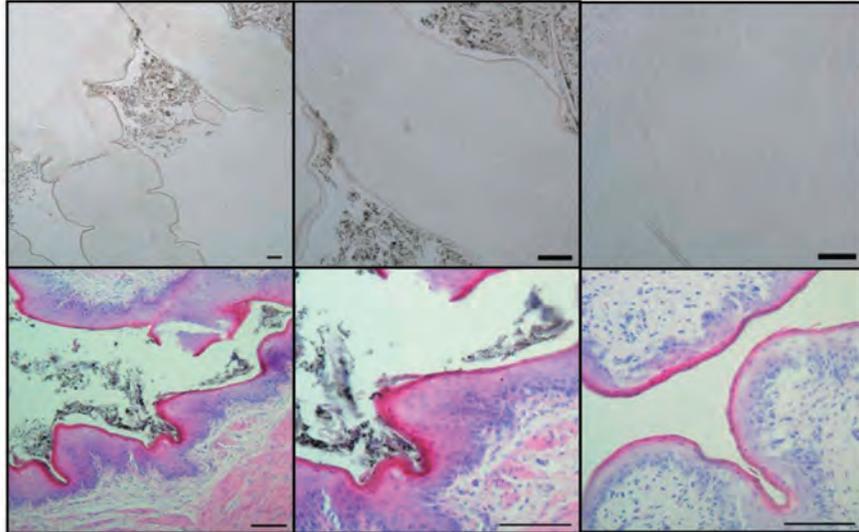


図6. 3月齢の雄仔牛に墨汁を含んだ投与液を7日間反復経口投与し、最終投与の24時間後に解剖して採集した第三胃の組織像（線：100ミクロン）

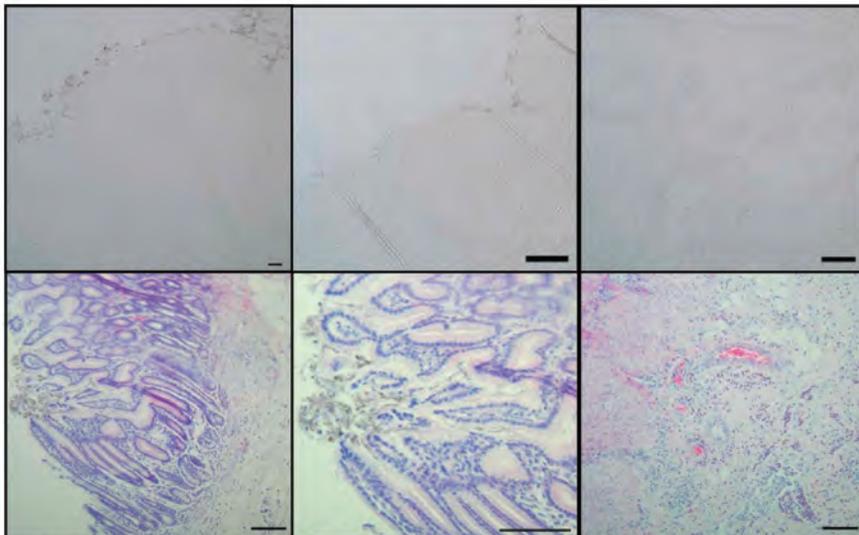


図7. 3月齢の雄仔牛に墨汁を含んだ投与液を7日間反復経口投与し、最終投与の24時間後に解剖して採集した第四胃の組織像（線：100ミクロン）

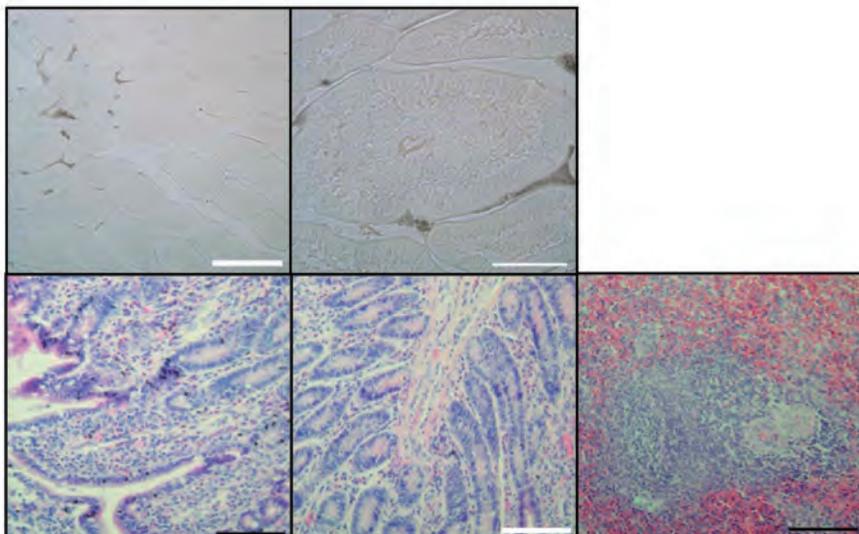


図8. 3月齢の雄仔牛に墨汁を含んだ投与液を7日間反復経口投与し、最終投与の24時間後に解剖して採集した空腸の組織像（線：100ミクロン）

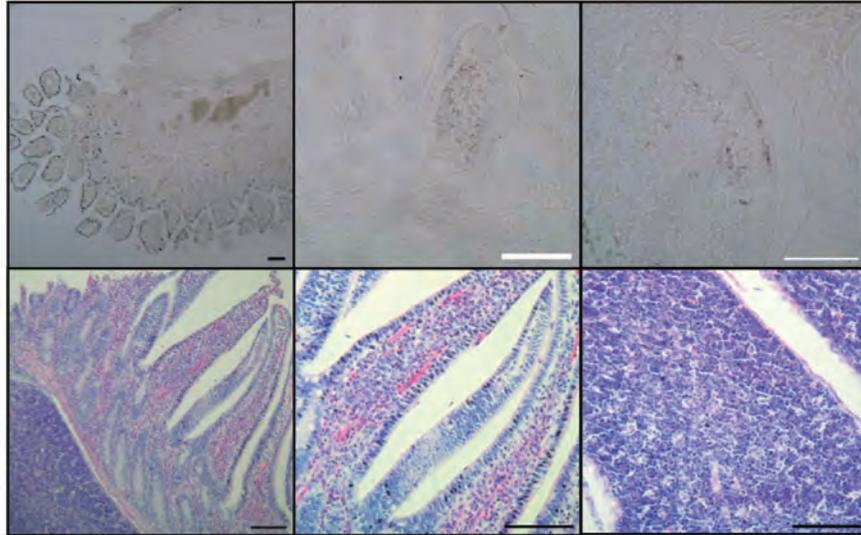


図9. 3月齢の雄仔牛に墨汁を含んだ投与液を7日間反復経口投与し、最終投与の24時間後に解剖して採集した回腸の組織像（線：100ミクロン）

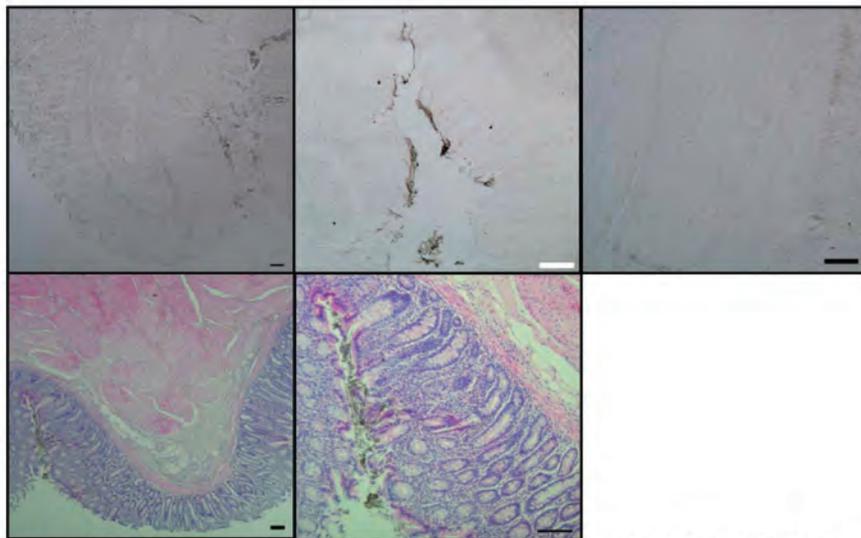


図10. 3月齢の雄仔牛に墨汁を含んだ投与液を7日間反復経口投与し、最終投与の24時間後に解剖して採集した結腸の組織像（線：100ミクロン）

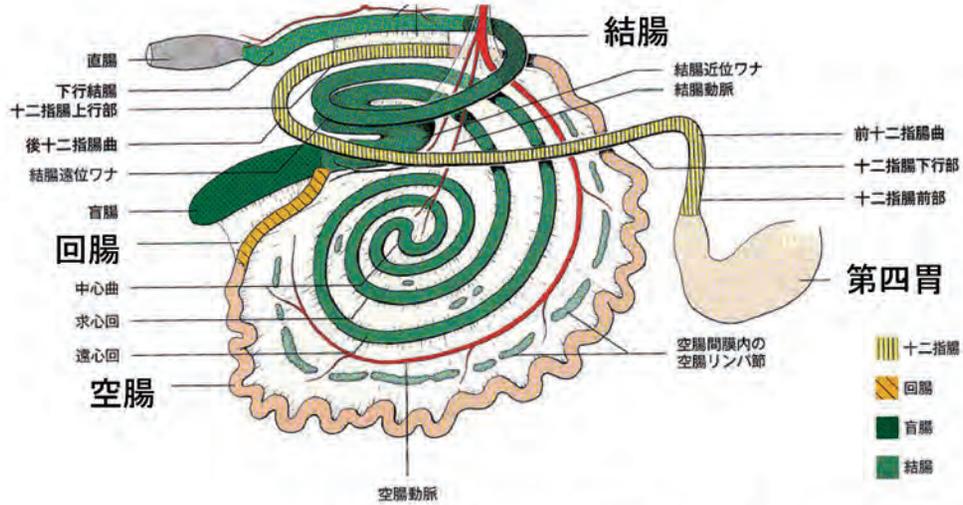


図11. 牛消化管の模式図・カラーアトラス獣医解剖学（橋本監修）2008より

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

| | | | | |
|-----------|----------|------|----|-----|
| 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】

本調査研究の目的は生活習慣病発症の予防に食肉および、その消化過程で産生される生理活性ペプチドが与える影響を検討するものである。

そこでまず、国産豚ロース肉ミオシンBを加熱変性させた後、ペプシンで消化し、アンギオテンシン変換酵素(ACE)阻害活性を持つ新規ペプチドを同定するために各種クロマトグラフィーにて精製した。その結果、非常に高いACE阻害活性を持つペプチド二種類が単離された。これらのペプチドのアミノ酸配列はLys-Arg-Val-Ile-Gln-Tyr(ペプチドM6)およびVal-Lys-Ala-Gly-Phe(ペプチドA5)であり、ペプチドM6はこれまでに報告のない新規なペプチドであった。ホモロジー検索の結果、ペプチドM6はミオシン由来、ペプチドA5はアクチン由来であった。合成して得られた両ペプチドのIC₅₀はペプチドM6で6.1fM(4.9μg/ml)、ペプチドA5で20.3μM(10.6μg/ml)であった。既知のACE阻害オリゴペプチドと比べると、同等かやや強い活性であった。ACE阻害様式はペプチドM6および、ペプチドA5ともに競合阻害であった。ACEとの反応による活性の増減から、両ペプチドの阻害型を分類したところ、ペプチドM6はprodrug型、ペプチドA5はsubstrate型であった。両ペプチドとも高血圧自然発症ラットに経口投与されると、摂取後6時間で有意な降圧作用を示した。これらのことから、降圧食品としての食肉の可能性が期待された。

次に、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。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た。

【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、日本人の4人に1人は高血圧症であると言われている。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^{1,2)}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ことがわかってきた³⁾。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⁴⁾。したがって、ACE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⁵⁾や、他の降圧薬よりも副作用が少ないことが明らかになったこと⁶⁾や、ACE阻害剤単独で本態性高血圧患者の約70%に効果を示していること⁴⁾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⁷⁾、一過性の腎機能低下、発疹、目まいなど

の副作用の問題も指摘されている⁸⁾。そのため、日々の食事成分中に天然のACE阻害活性物質が含まれていれば、副作用もなく、自然に高血圧症の予防、あるいは治療に結びついてくることが期待される。

食品成分中のACE阻害活性物質については、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⁹⁾。これらの中にはカゼインのトリプシン分解物、かつお節のサーモライシン分解物、乳酸由来ペプチドなどのように、*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(生活習慣病の一次予防として食生活の改善に役立つと認められた食品)として厚生省の認可を受けているものも存在する¹⁰⁻¹²⁾。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阻害ペプチドの研究報告は少ない。

日本における一年間の食肉消費の割合は、最も高いのが豚肉、次に鶏肉、牛肉の順である¹³⁾。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¹⁴⁾。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ことが予想され、食肉全体の消費回復・向上のためにも安全性の確保とともに、食肉中の機能性因子の解明は重要になっている。既に我々の研究室も含めて食肉からいくつかのACE阻害ペプチドが検出されている¹⁵⁻²⁰⁾が、まださらに研究が必要とされている。

一方、食品から単離されたACE阻害ペプチドが*in vivo*で降圧作用を発揮するためには、いくつかの条件がある。すなわち、消化管での消化耐性を有していること、腸管での吸収性を有していること、ACEの非競合的阻害剤であることなどである。食品を消化管酵素で消化して残渣として得られるペプチドは消化耐性が高いと考えられ、腸管内に長時間滞留するため、オリゴペプチドであっても腸管吸収を受ける可能性は高い。消化管酵素での消化は、生体外だけでなく、腸管内でもACE阻害ペプチドを得るための、良い方法の一つである。ACE阻害ペプチドが競合的基質であればACEにより分解されるため短時間で降圧作用が終了するが、ペプチドのアミノ酸配列によっては分解された後にさらに強い非競合的阻害剤が得られ、結果的に降圧作用が長続きすることもあり得る。こういったペプチドを藤田ら²¹⁾はプロドラッグ型と称しており、ACE阻害ペプチドの有効な形態の一つと考えられる。

そこでまず、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、ペ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ので報告する。

次に、本調査研究のさらなる目的は、生活習慣病の予防に食肉およびその消化過程で産生される生理活性ペプチドが与える影響を検討するものである。生活習慣病の予防は、日本の保健および財政にとって重要な課題となっている。疾病予防の原点は食にあると考えられ、食品による生活習慣病の予防に関する研究は、日本人の健康的な生活の実現のために必要不可欠であり、食肉の消費拡大にも多大な貢献が期待できる。

そこでさらに、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ので、得られた結果について報告する。

【実験材料および方法】

A. 豚肉由来新規ACE阻害ペプチドの単離精製と阻害様式の検討実験

ミオシンBの調製

国産の豚ロース肉よりミオシンBをSzent-Györgyiの方法²²⁾により抽出した。すなわち、ひき肉にした豚ロース肉を100g計り取り、肉に対し3倍量のWeber-Edsall solutionを加え、抽出を開始した。Weber-Edsall solutionは、塩化カリウム、炭酸水素ナトリウム、炭酸ナトリウムをそれぞれ、600mM、40mM、10mM含む。抽出は溶液を時折攪拌しながら4℃で40時間静置した後、2倍量の600mM塩化カリウム水溶液を加えて塩溶性タンパク質を抽出しやすい状態にした。得られた水溶液は16,000rpm、4℃、60分間の遠心分離を行い、塩溶性タンパク質以外のものを沈殿させた。上清に14倍量の冷蒸留水を加え、よく攪拌した。蒸留水で希釈した上清を8,000rpm、4℃、30分間の遠心分離を行うことで塩溶性タンパク質を沈殿させた。沈殿に4M塩化ナトリウム水溶液、100mMアザイド水溶液をそれぞれ、600mM、2mMとなるように加え、ミオシンB水溶液とした。得られたミオシンB水溶液は各実験の使用時に必要に応じて600mMの塩化ナトリウム水溶液で希釈した。

タンパク質の定量

抽出したタンパク質の定量はBiuret法²³⁾により行った。スタンダードはBSA(牛血清アルブミン)を用いた。タンパク質の各種酵素による分解物についてはUV法²⁴⁾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215nmでの吸光度から225nm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。

ミオシンBのペプシンによる消化

ミオシンBの酵素分解には、ペプシン(シグマ社製)を使用した。PBS(pH7.5)に懸濁したミオシンB(5mg/ml)を98℃で10分間の加熱変性処理した後に冷却して、タンパク質とペプシンがタンパク質濃度を基準に100:1の割合になるようにペプシンを添加した。反応温度37℃、反応時のpH2.0で反応を行った。pHの調整は0.1および0.01Nの塩酸で行い、反応後に0.1および0.01Nの水酸化ナトリウムでpH7.5に戻した。反応終了後、98℃10分間の加熱により酵素を失活させ、氷水で冷却した。得られた分解物を18,000 g、20分間遠心し、得られた上清を実験に使用した。

ACE阻害活性の測定

ACEはウサギ肺由来アンギオテンシンI変換酵素(ACE,Peptidyl-dipeptidase A,EC 3.4.15.1,シグマ社製)を0.25Mホウ酸緩衝液で1unit/mlに調整し、使用時まで冷凍保存した。測定時には0.25Mホウ酸緩衝液にて60m unit/mlに希釈して使用した。ACEとの反応基質としては合成基質であるヒプリル-L-ヒスチジル-L-ロイシン(HHL,ナカライテスク社製)を使用した。HHL、塩化ナトリウムおよび、0.25Mホウ酸緩衝液をそれぞれ、終濃度7.6mM、0.608Mおよび、0.1Mになるように蒸留水で調製したものをHHL溶液とした。

測定はCushmanらの方法²⁵⁾に準じて行った。すなわち、阻害物質溶液6 μ lに60m unit/ml ACE溶液20 μ lおよび、7.6mM HHL溶液50 μ lを添加し、37℃で30分間反応させた。反応は0.1N塩酸554 μ lを加えて停止させた。反応液に酢酸エチル(ナカライテスク社製)1.5ml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、2,500rpm、15分間の遠心分離を行った。上清の酢酸エチル層を1ml分取し、100℃、10分間の加熱により、蒸発乾固させた。乾固した馬尿酸は1M塩化ナトリウム水溶液1ml

に溶解し、吸光度を228nmで測定した。阻害率は阻害物質添加時の吸光度をS、阻害物質の代わりにPBSを加えて同様に反応させたときの吸光度をC、あらかじめACEの反応を停止させてから反応させたときの吸光度をBとして、次式により求めた。

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

上式により求められる阻害活性が50%を示すときのタンパク質濃度 IC_{50} を計算した。

ゲルろ過クロマトグラフィーによる精製

ゲルろ過クロマトグラフィーの溶離液として、20mM酢酸緩衝液を用いた。1M酢酸緩衝液、4M塩化ナトリウム水溶液、100mMアザイド水溶液をそれぞれ、20mM、150mM、0.5mMとなるように蒸留水を加えて20mM酢酸緩衝液を調製した。

ミオシンBのペプシン分解物をゲルろ過カラム (SuperdexTM30 prep grade, アマシャムバイオサイエンス社製) を用いて精製した。溶出は上記で調製した20mM酢酸緩衝液を用い、流速0.45ml/minで行った。溶出物は6分毎に分画収集した。分子量マーカーとしてアプロチニン (分子量6,500 Da)、オキシトシン (分子量1,007 Da) および、リボフラビン (分子量376 Da) を使用した。収集した画分を真空遠心エバポレーター (CVE-100、東京理科機械社製) を用いて乾燥させた。蒸留水で再溶解した後、UV法でタンパク質濃度を求めた。

逆相高速液体クロマトグラフィーによる精製

ゲルろ過クロマトグラフィーにより収集した画分でACE阻害活性の高い画分をODSカラム (Inertsil ODS-2, GL-science社製) にて二回の精製を行った。溶出は0.1%TFA含有80%アセトニトリル溶液および、0.1%TFA溶液を用い、一回目の精製はアセトニトリル濃度0~50%のグラジエント溶出で行った。送液は流速0.5ml/minで行った。溶出物は1分毎に分画収集を行った。収集した画分を乾固し、タンパク濃度を測った後、ACE阻害活性を測定した。阻害活性の高かった画分はさらに、アセトニトリル濃度10~24%のグラジエント溶出で二回目の分画を行った。このとき、溶出条件はアセトニトリル濃度0~50%のときと同様に行った。収集画分は上記と同様にACE阻害活性を測定した。

ODSカラムでの二回目の精製画分でACE阻害活性の高かった画分をフェニルカラム (COSMOSIL 5PE-MS、ナカライテスク社製) で精製を数回行った。溶出はアセトニトリル溶液のイソクラティック溶出で行ったが、精製を繰り返すごとにアセトニトリル濃度を徐々に下げていき、ペプチドを単離した。アセトニトリル濃度以外の精製条件はODSカラムのときと同様に行った。精製の都度、ACE阻害活性を測定し、単離したペプチドの IC_{50} を求めた。

アミノ酸配列の解析

各種クロマトグラフィーにより得られたACE阻害活性画分のアミノ酸配列は、G1000A型プロテインシーケンサー (Hewlett Packrd社製) を用いて分析した。

ペプチドの合成

同定したACE阻害ペプチドの特性を評価するために、シグマジェノシスジャパンから合成ペプチドを購入した。

Lineweaver-Burk Plot の作成

反応系中で IC_{50} の濃度になるように蒸留水で調製した合成ペプチドを、0~7.6mMの様々な濃度のHHLとともにACEと反応させた。ACE濃度や反応条件はACE阻害活性測定時と同様に行った。種々

の基質濃度[S] (mM) において、反応速度 v (nmol/min) を測定した結果について、 $1/[S]$ (mM⁻¹) に対する $1/v$ (min/nmol) をプロットして、ペプチド無添加およびペプチドを添加したそれぞれの系での直線を得た。反応速度 v は本実験において、ACEの作用より1分間に遊離する馬尿酸量 (nmol) として、馬尿酸標準液より作成した検量線から求めた値で示した。馬尿酸の検量線は馬尿酸 (ナカライテスク社製) を蒸留水で0.6~120nmol/mlの濃度になるように調製した馬尿酸標準液から、分光光度計で求めた228nmの吸光度を用いて作成した。

合成ペプチドとACEとの反応

Fujitaらの方法²¹⁾ を参考にして、合成ペプチドにACEを反応させた。すなわち、合成ペプチドM6またはA5、ホウ酸バッファー、および塩化ナトリウムを反応系での濃度がそれぞれ、1mg/ml、75mM、400mMになるように添加し、ACEを終濃度が20mU/mlになるよう添加して反応を開始した。反応は37℃、3時間で行い、95℃、20分間の加熱によって酵素を失活させた。

合成ペプチドのSHRへの経口投与試験

8週齢雄性ラット (自然発症高血圧ラット: SHR) を日本チャールズ・リバー社 (横浜) より購入し使用した。動物は室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、相対湿度 $50 \pm 10\%$ 、照明時間12時間/日の条件下で、日本チャールズ・リバー社の固形試料CRF-1を与えて飼育し、飲料水は水道水を $0.2 \mu\text{m}$ のメンブラ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。12週齢になってから試験に用いた。

コントロール群4匹、試験区群2匹を使用した。精製水で10mg/mlに調製したペプチドを、10mg/kg体重となるようにゾンデを用いて経口投与した。コントロール群には、同じ量の精製水を経口投与した。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 (38.7°C) を施した後、非観血式血圧測定装置 (BP-98A, ソフトロン, 東京) を用いて尾静脈圧を測定した。いずれも試料は単回経口投与における効果作用を検討した。

B. 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

試験区の設定

病態モデルラットを用いた動物実験の試験区を以下のように設定した。

A; 食肉区 (SHR 6匹)、B; 連続酵素処理区 (SHR 6匹)、C; ペプシン処理区 (SHR 6匹)、a; 食肉区 (GK rat 6匹)、b; 連続酵素処理区 (GK rat 6匹)。

飼料の調製方法

①食肉区

Aおよびaの食肉区の飼料は粉末試料MF (オリエンタル酵母工業株式会社) の5%を、豚モモミンチ肉を凍結乾燥し粉砕したものを粉末飼料5%に代替して調製した。

②連続酵素処理区

Bおよびbの連続酵素処理区の飼料の調製は以下の通りである。

豚モモミンチ肉1kgに1.5 lの蒸留水を添加し、インキュベート (70°C 、30min) した。その後、フードプロセッサー (30秒間、2回) (TM3 TESCOM) にかけて、0.5 lの蒸留水を添加し、HClでpH1.8に調整した。pH調整後、ペプシンを0.2g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でpH6.8に調整し、10分間煮沸した。溶液温度を約40℃まで下げた後、パンクレアチン、トリプシンをそれぞれ0.2g添加し、再び攪拌しながらインキュベートした(37℃、2時間)。最後に10分間煮沸して凍結乾燥し、粉碎したものを粉末飼料MFに5%代替して調製した。

③ペプシン処理区

Cおよびcのペプシン処理区の飼料は、豚モモミンチ肉1kgに1.5ℓの蒸留水を添加し、インキュベート(70℃、30分間)した。その後、フードプロセッサー(30秒間、2回)(TM3 TESCO)にかけ、0.5ℓの蒸留水を添加し、HClでpH1.8に調整した。pH調整後、ペプシンを0.2g添加し、攪拌しながらインキュベートした(37℃、2時間)後、凍結乾燥し粉碎したものを粉末飼料MFに5%代替して調製した。

ラットの飼育条件

6週齢雄性のSHR/NDmc-cpラット{自然発症高血圧ラット}(高血圧症、肥満、2型糖尿病)を18頭、6週齢雄性のGK/Slcラット{自然発症糖尿病ラット}(非肥満、2型糖尿病)を12頭、それぞれ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0.2mmのメンブランフィルターで自由摂取させ、飼料も自由摂取させた。1つのケージに1頭入れて飼育した。また、購入後1週間新しい環境に馴染ませ、その期間は粉末試料MFを全頭与えた。実験期間はSHR/NDmc-cpラット(以後SHRと呼ぶ)は3ヶ月行い、GK/Slcラット(以後GK ratと呼ぶ)は4ヶ月行った。

測定項目および方法

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、同量になるよう飼料を補充した。2日に一度測定した。

体重の測定

SHRラットは3週間に一度測定し、GKラットは4週間に一度測定した。

収縮期血圧および拡張期血圧の測定

血圧は日内変動が大きいので、測定時間を一定にするために午前9時より測定を行った。測定を行う前に16時間の絶食を行った。ラットに前保温(36℃)を施した後、非観血式血圧測定装置(株)ソフトロン製、BP-98A)を用いてtail-cuff法で尾動脈圧を測定した。一度に5回計測し、その平均値を測定血圧とした。SHRラットは3週間に一度測定し、GKラットは4週間に一度測定した。

空腹時血糖値の測定

測定を行う前に16時間の絶食を行った。ラットに前保温(36℃)を施した後、ラットの尾静脈に27Gサイズの針を刺し、出血後、メディセーフミニ血糖セット(テルモ株式会社)にて測定した。一度に3回計測し、その平均値を測定血糖値とした。

測定原理として、血液中のグルコースが試験紙に含まれるグルコースオキシダーゼの作用により、過酸化水素とグルコン酸を生成する。更に生成した過酸化水素はペルオキシダーゼの作用により、反応試験部に含まれる4-アミノアンチピリンとN-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-トルイジンと反応し、キノン色素が生成される。この赤紫色の呈色を比色定量した。SHRラットは3週間に一度測定し、GKラットは4週間に一度測定した。

糖化ヘモグロビン(HbA_{1c})の測定

測定を行う前に16時間の絶食を行った。ラットに前保温(36℃)を施した後、ラットの尾静脈に27Gサイズの針を刺し、出血後、DCA2000 HbA_{1c}カートリッジ(バイエル メディカル株式会社)にて測定した。

HbA_{1c}値は総ヘモグロビン(Hb)濃度とHbA_{1c}濃度とを測定し、総Hb濃度に対するHbA_{1c}濃度の百分比から得られる。総Hbはチオシアンメトヘモグロビン法により測定し、HbA_{1c}はラテックス凝集阻止反応により測定した。検体中のHbA_{1c}値は次の式で算出した。²⁶⁾

$$\text{HbA}_{1c}\text{値}(\%) = \{(\text{HbA}_{1c}\text{濃度}) / (\text{総Hb濃度})\} \times 100$$

SHRラットは3週間に一度測定し、GKラットは4週間に一度測定した。

経口糖負荷試験による血糖値の測定

12週間飼育したSHRラットにD-Glucose溶液(0.75g/ml)をゾンデを用いて経口投与した(1.5g/kg)。投与量は体重1kg当たり2mlとした。投与前、投与後30分、60分、90分、120分の計5回、血糖値の計測を行った。測定方法は、空腹時血糖値の測定と同様の方法で行った。測定前日より16時間の絶食をし、実験中も絶食させ、水だけを与えた。

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】

A. 豚肉由来新規ACE阻害ペプチドの単離精製と阻害様式の検討実験

豚ミオシンBのペプシン分解物のACE阻害活性

ミオシンBのペプシン分解物のIC₅₀は、47 μg/mlだった。加熱変性基質を使用したことから、食肉を摂食する場合に調理を施した後でも、このような活性が表れることが示唆された。ペプシンは主に芳香族アミノ酸残基のN末端側を切断することから、分解物に存在する多くのペプチドのC末端には芳香族アミノ酸残基が存在すると考えられる。高いACE阻害活性を持つペプチドはC末端のアミノ酸残基が芳香族アミノ酸残基であることが多い²⁷⁾。本研究でのミオシンBのペプシン分解物は既知の食品由来タンパク質の酵素分解物^{21,28,29)}に比べても、IC₅₀が同等か低く、阻害活性が非常に高かった。そのため、この活性は芳香族アミノ酸に由来する可能性が高いものと想定された。

豚ミオシンBのペプシン分解物からのACE阻害ペプチドの単離

ミオシンBのペプシン分解物をゲルろ過クロマトグラフィーにて分画した(図1)。その結果、分子量300~2000の範囲のNO.49~75の画分で高いACE阻害活性が認められ、中でも最も活性の高かった、分子量約1000Daと推定されるNO.55画分および、NO.56画分の二つの画分をODSカラムでの精製に供した。ODSカラムでの一回目の精製はアセトニトリル濃度0~50%のグラジエント溶出で行い、NO.55および、NO.56の系ともにアセトニトリル濃度約20%で活性画分が得られた(図2、図3)。次に、アセトニトリル濃度10~24%のグラジエント溶出でアセトニトリルの濃度勾配を一回目より下げて、二回目の精製を行った。NO.55の系ではアセトニトリル濃度約16%付近に(図4)、NO.56の系ではアセトニトリル濃度約15%付近に(図5)、それぞれ活性画分が得られた。

続いて、ODSカラムより相対的に芳香族化合物の保持が大きい性質を有しているフェニルカラムで精製を行った。NO.55の系では、まずアセトニトリル濃度13%のイソクラティック溶出(流速0.1ml/min)を行い、活性の高い画分を得た。さらに、アセトニトリル濃度10%(流速0.1ml/min)、8%(流速0.3ml/min)、7%(流速0.5ml/min)、6%(流速0.5ml/min)と段階的に低い濃度でイソクラティック溶出を行っていくことで、M6という非常に高い活性を持つ画分が単離された(図6)。NO.56の系ではまず、アセトニトリル濃度13%(流速0.5ml/min)で分画した。その後、10、7、6%(それぞれ流速0.5ml/min)と段階的に低い濃度でイソクラティック溶出を行っていくことで、A5という高い活性を持つ画分が

単離された(図7)。M6およびA5の、アセトニトリル濃度6%での溶出時間はそれぞれ30.8および、20.7分であった(図6D、図7C)。このことから、M6は疎水性が比較的高く、A5はM6ほどでもないがやや疎水性が高いことが示唆された。高いACE阻害活性を持つ既知のペプチドは疎水性アミノ酸残基を多く含み²⁶⁾、強い疎水性を示すものが多く、それらと同じ結果であった。

単離されたACE阻害ペプチドのアミノ酸配列

アミノ酸配列の分析結果から、画分M6は分子量805.97でLys-Arg-Val-Ile-Gln-Tyr (KRVITY) 画分A5は分子量520.62でVal-Lys-Ala-Gly-Phe (VKAGF) であることが確認された。また、ホモロジー検索の結果から、ペプチドM6はミオシン重鎖の191~196番目の残基に相当し、ペプチドA5はアクチンの19~23番目の残基に相当することがわかった。ペプチドA5は、既に報告されているイワシ由来アクチンのペプシン分解物中に含まれていたペプチド²⁹⁾とアミノ酸配列が全く同じものであったが、ペプチドM6は今までに報告のない新規なペプチドであった。

一般的に強い競合阻害作用を持つACE阻害ジペプチドはC末端にプロリンや芳香族アミノ酸残基を持ち、N末端に疎水性アミノ酸残基か、塩基性アミノ酸残基を持つとされている²⁷⁾。ペプチドM6および、A5ともにその条件を満たしているため、これら二つのペプチドの活性発現には両端のアミノ酸残基が重要な役割を担っていると示唆された。しかし、生体内での消化を考えた場合、これら二つのペプチドは消化管酵素により、さらに分解されることが予想される。特にペプチドのACE阻害活性発現に重要だと思われるC末端の芳香族アミノ酸残基が切断され、脂肪族アミノ酸残基あるいは、塩基性アミノ酸残基でできたジペプチドもしくはトリペプチドが生成すると考えられ、その活性が低下してしまう可能性がある。しかし、豚血しょう由来Leu-Val-Leuやホエータンパク質由来Ile-Leuのように脂肪族アミノ酸のみで構成されたACE阻害活性の非常に高いペプチドの報告もある³¹⁾ため、本ペプチドも経口摂取後の活性発現の可能性が期待された。そこで、ペプチドM6およびペプチドA5を合成し、その特性を評価した。

合成ペプチドM6およびA5のACE阻害

これらのペプチドの IC_{50} を測定した結果、ペプチドM6は $6.1 \mu M$ ($4.9 \mu g/ml$)、ペプチドA5は $20.3 \mu M$ ($10.6 \mu g/ml$)であり、これまで報告されている食肉由来のACE阻害オリゴペプチド^{17,21,32)}と同等かやや高い活性を有していた。ペプチドA5と同じ配列を持つイワシ由来アクチンのペプシン分解物中に存在するVKAGFの IC_{50} は $83 \mu M$ と報告されており³⁰⁾、本実験での活性はおよそ4倍高かった。この違いは、実験系の差、すなわち使用したACEの起源やロット差、基質・バッファーなどの濃度差などに起因すると考えられ、基本的には同等の活性と考えて差し支えないと考えられた。

二つの合成ペプチドのACE阻害機構を推定するため、Lineweaver-Burkの逆数プロットを行った(図8)。このとき、ペプチドM6は終濃度 $5.2 \mu g/ml$ 、 $11.2 \mu g/ml$ で反応させた。その結果、両ペプチドともに競合阻害の特徴を示した。既知のACE阻害ペプチドである、カルノシンはその血圧降下作用が動物試験で明らかにされているが³³⁾、このカルノシンも競合阻害を示すことが知られており、M6やA5にも*in vivo*で降圧作用を示すことが期待された。さらに、競合阻害ペプチドでも、ACEの作用により分解された後に強く持続性のある阻害ペプチドを生じる可能性があることから、ACEによる分解物を評価する必要があると考えられた。

合成ペプチドM6およびA5のACEによる分解と分解物のACE阻害活性

*in vivo*でのペプチドのACE阻害効果を推定するため、合成ペプチドとACEを反応させて、阻害活性の変化を調べた。その結果、ペプチドM6では IC_{50} が $4.9 \mu g/ml$ から $1.5 \mu g/ml$ に低下し、ACE阻害

活性が増加していた。ペプチドA5ではIC₅₀が10.6 μg/mlから17.7 μg/mlに増加し、ACE阻害活性が低下していた。FujitaらはACE阻害ペプチドをACEでの分解後の活性の増減から3種類に分類している²¹⁾。分解後、活性が低下するペプチドをsubstrate type、活性があまり変化しないペプチドをinhibitor type、活性が増加するペプチドをprodrug typeとした。さらに彼らは、SHRにそれらのペプチドを経口投与させた結果、substrate typeはSHRの血圧に影響を示さないが、inhibitor typeおよび、prodrug typeは血圧降下作用を示したことを報告している。この分類に基づくと、ペプチドA5はsubstrate typeであると考えられ、ペプチドM6はprodrug typeであることから、ペプチドM6の方が*in vivo*においての抗高血圧作用を有効に発現することが期待された。

SHRに経口投与された合成ペプチドM6およびA5の降圧作用

二つのACE阻害ペプチドをSHRに経口投与したときの収縮期血圧の変化を図9に示す。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降下した。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と考えられた。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。

M6と同じprodrug typeのACE阻害ペプチドであるLKPNM²¹⁾の血圧降下作用は、60mg/kgの経口投与により6時間後に最大23mmHgの降圧を認めている。投与量から判断すると、M6の降圧作用はLKPNMの6倍に相当すると考えられ、非常に強い活性を有するペプチドと認められた。一方、substrate typeのACE阻害ペプチドは一般的に、SHRへの経口投与では血圧降下作用を示さないと考えられる²¹⁾。しかし、A5はM6に近い降圧作用を示したことから、単純な切断されやすい基質ではなく、切断に時間を要するペプチドであり、切断が完了するまでの間に競合阻害を示したと考えられた。

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のではないかと考えられた。

B. 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

まず、各試験区で5%代替した食肉サンプルについてSDS-PAGEによるタンパク質の分子量分布を測定した(図10)。食肉をペプシン処理することによりミオシン重鎖はほぼ分解し、またアクチンも低分子化し、小さなペプチドに分解されていた。さらに連続酵素処理により筋肉構造タンパク質の殆どが分子量6,500以下に分解されていた。それら分解処理標品のACE阻害活性を測定し、IC₅₀値を求めたところ両酵素処理区ともに高いACE阻害活性を有していた(図11)。

酵素処理した食肉の生理活性機能を確認するために、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。

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としてSHR/NDmc-cpおよび2型糖尿病患者の病態モデルとしGK/Slcを用いて酵素処理した食肉が及ぼす影響(血圧、空腹時血糖値、糖化ヘモグロビン[HbA1c]、経口糖負荷試験による血糖値の上昇抑制効果)の効果について検討した。

まず図12に測定項目および実験期間を分かりやすく図示した。また、今回投与したラット飼料の一般成分を表1に示した。

1週間毎の飼料の摂取量の変化を比較した。得られた結果をSHRは図13に、GK ratは図14に示した。SHRおよびGK ratの各区間に有意な差は認められなかった。

次に体重の変化を比較した。結果をSHRは図15に、GK ratは図16に示した。SHRでは飼料の摂取量の変化において、A区およびB区間に有意な差がなかったことから推察されるように、体重の変化にも有意な差異は認められなかった。一方、GK ratにおいては、a区よりb区で体重が重いものの有意な差はなかった。よって、飼料の成分(表1)、飼料の摂取量(図13、14)、体重の変化(図15、16)に有意な差が認められなかったことは、両区共に同条件で飼育されていたことが確認され、以後の実験データが比較可能なものであると考えられる。

続いて、収縮期血圧および拡張期血圧の測定を行った。血圧の測定結果をSHRは図17に、GK ratは図18に示した。SHRでは、7週齢、10週齢時の計測時にはA、BおよびC区間に有意な差はなかったが、13週齢においてA区に比べ、BおよびC区の拡張期および収縮期血圧が有意に低下した($P<0.05$)。しかし、16週齢ではC区の拡張期および収縮期血圧が有意に増加した($P<0.05$)。また、全ての週齢においてB区はA区よりも収縮期血圧が低かった。GK ratは19週齢においてb区の拡張期血圧がa区より有意に増加しているが($P<0.05$)、そのほかの有意な変化は見られなかった。この血圧測定の実験から、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が明らかになった。

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³⁴⁾や米国合同委員会第6次報告³⁵⁾、日本高血圧学会高血圧治療ガイドライン³⁶⁾等により、さらに細かく分類されている。WHO並びにISHの1999年の報告によると、収縮期血圧が140mmHg、拡張期血圧が90mmHg以上の高血圧症の方は全国で約3000万人と推定され、日本人の4人に1人、更に50歳以上では2人に1人が高血圧症とされ、まさに国民病とも言われている。今回のSHRにおける血圧測定の結果により、ヒトの日常の食事として食肉由来のペプチドを摂取することで、血圧の上昇を抑制し、生活習慣病の予防や改善に効果的であるという可能性が考えられる。

続いて空腹時血糖値を測定した。WHOによると、2006年の時点で世界には少なくとも1億7100万人の糖尿病患者がいるという。患者数は急増しており、2030年までにこの数は倍増すると推定されている。日本にも740万人の患者がいて、さらに予備軍と呼ばれる患者は880万人に上るといふ。

結果をSHRは図19に、GK ratは図20に示した。空腹時血糖値の測定は実際の糖尿病患者に対しても導入されている測定項目である。図を見てわかるように、SHRの全ての週齢において、有意ではないがA区の血糖値よりもB区の血糖値が低かった。C区の血糖値はA区の血糖値と有意な差は見られなかった。また、GK ratにおいても投与開始後の11、15、19週齢において、有意ではないがa区の血糖値よりもb区の血糖値が低くなる傾向が見られた。また、GK ratにおいては、19週齢のときにC区に比べD区はおよそ23.28mg/dl低下していたが、ばらつきがあったため有意な差は生じなかった。19週齢以外の週齢でも有意な差が認められなかったことから、さらに飼育期間を延長して効果があるかどうか観察する必要がある。

しかし、これらの結果により、連続酵素処理した食肉がSHRおよびGK ratの糖尿病発症を抑制する可能性が認められた。本研究で得られた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。つまり、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。

次に糖化ヘモグロビン(HbA_{1c})を測定した。HbA_{1c}は赤血球のヘモグロビンにブドウ糖が結合したもので、検査を受けるときから約1~2ヶ月前の平均的な血糖状態を反映し、血糖値に比例すると言わ

れている。また、血糖値が高値でも、HbA_{1c}が基準値であれば、糖尿病の可能性は低いと言われていることにより、HbA_{1c}の測定結果に有意な差が出れば、麩による脱脂粉乳分解物の生理活性機能は効果的であるという結論に結びつくだろう。

SHRの結果を図21に、GK ratの結果を図22に示した。SHRでは投与開始後の11、15、19週齢においてBおよびC区のHbA_{1c}の値がA区のHbA_{1c}の値よりも有意ではないが低かった。また、GK ratにおいても有意ではないがa群のHbA_{1c}の値よりもb区のHbA_{1c}の値が低かった。

次に経口糖負荷試験による血糖値の測定を行った。経口糖負荷試験とは空腹時にブドウ糖を摂取し、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。SHRの結果を図23に示した。BおよびC区の経口投与後の血糖値の上昇がA区に比べて有意ではないが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ギオテンシンII³⁷⁾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た。

【参考文献】

- 1) 田中繁道, 飯村政. *日本臨床(増刊)高血圧(下巻)*, 623-629 (1992)
- 2) 尾前照雄, 河野雄平. *日本臨床(増刊)高血圧*, 623-630 (1992)
- 3) 日和田邦夫, 安部陽一. *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)
- 4) 松尾寿之, 鹿取信, 大石幸子, 加藤久雄, 三宅可浩. *キニンとアンギオテンシン 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)
- 5) Kostis J.B. *Am. J. Hypertens.*, 8, 909-914 (1995)
- 6) 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)
- 7) Irali Z.H, Hall W.D. *Ann. Intern. Med.*, 117, 234-242 (1992)
- 8) 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)
- 9) Dziuba J, Minkiewicz P, Nalecz D. *Nahrung-Food*, 46, 190-195 (1999)
- 10) 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)
- 11) 藤田裕之, 安本良一, 長谷川昌康, 大嶋一徳. *薬理と治療* 25, 2161-2165 (1997)
- 12) Hata Y, Yamamoto M, Ohni M, Nakajima K, Nakamura Y. *Am. J. Clin. Nutr.*, 64, 767-771 (1996)
- 13) *食生活データブック2002*, 財団法人農林統計協会, 24-27 (2002)
- 14) 森田重廣. *食肉の科学*, 学窓社, 25-28 (1992)
- 15) Arihara K, Nakashima Y, Mukai T, Ishikawa T, Itoh M. *Meat Sci.*, 57, 319-324 (2001)
- 16) Katayama K, Fuchu H, Sakata A, Kawahara S, Yamauchi K, Kawamura Y, Muguruma M. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 16, 417-424 (2003)

- 17) Katayama K, Tomatsu M, Fuchu H, Sugiyama M, Kawahara S, Yamauchi K, Kawamura Y, Muguruma M. *Anim. Sci. J.*, 74, 53-58 (2003)
- 18) Katayama K, Tomatsu M, Kawahara S, Yamauchi K, Fuchu H, Sugiyama M, Kawamura Y, Muguruma M. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 771-775 (2004)
- 19) Katayama K, Jamhari, Mori T, Kawahara S, Miake K, Kodama Y, Sugiyama M, Kawamura Y, Nakayama T, Maruyama M, Muguruma M. *J. Food Sci.*, 72, S702-S706 (2007)
- 20) 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)
- 21) Fujita H, Yokoyama K, Yoshikawa M. *J. Food Sci.*, 65, 564-569 (2000)
- 22) Szent-Györgyi, A. *Chemistry of Muscular Contraction 2nd, Academic Press*, (1951)
- 23) Gornall A.G, Bardawill C.J, David M. M. *J. Biol. Chem.*, 177, 751-766 (1949)
- 24) Murphy J.B., Kies M.W. *Biochem. Biophys. Acta*, 45, 382-384 (1960)
- 25) Cushman D.W, Cheung H.S, *Biochem. Pharmacol.*, 20, 1637-1648 (1971)
- 26) 高加国夫、武田裕子、渥美義仁、他：HbA_{1c}測定用DCA2000システムの概要と標準化への対応－JDS Lot2変更の検証－*医療と検査機器・試薬*、26, 485-489 (2003)
- 27) Cheung H.S, Wang M.A, Ondetti E, Sabo F, Cushman D.W, *J Biol.Chem.*, 225, 401-407 (1980)
- 28) 松井利郎,川崎晃一. *日本栄養・食糧学会誌*, 53,77-85 (2000)
- 29) Yokoyama K, Chiba H, Yoshikawa M. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56, 1541-1545 (1992)
- 30) 千葉英雄,吉田眞次, 箆島豊. *食品の生体調節機能*,学会出版センター, 112-121, (1992)
- 31) Hazato T, Kase R. *Biochem. Biophys. Res. Commum.*, 139, 52 (1986)
- 32) Nakashima Y, Arihara K, Sasaki A, Mio H, Ishikawa S, Itoh M. *J. Food Sci.*, 67, 434-437 (2002)
- 33) Ishikawa N, Yamashita S, Omiya S. *Yakugaku Zasshi*, 92, 1423-1425 (1972)
- 34) Guidelines Subcommittee ; 1999 World Health Organization- International Society of Hypertention guidelines for the management of hypertention. *J. Hypertens.*, 17, 151-183 (1999)
- 35) 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)
- 36) 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)
- 37) 堀内正嗣. *血管医学*, 5, 7-16 (2004)

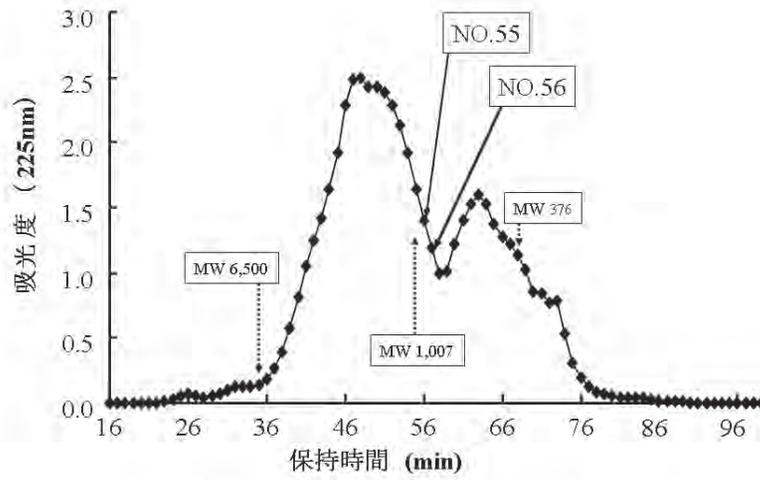


図1 ミオシンB加水分解物のゲルろ過クロマトパターン

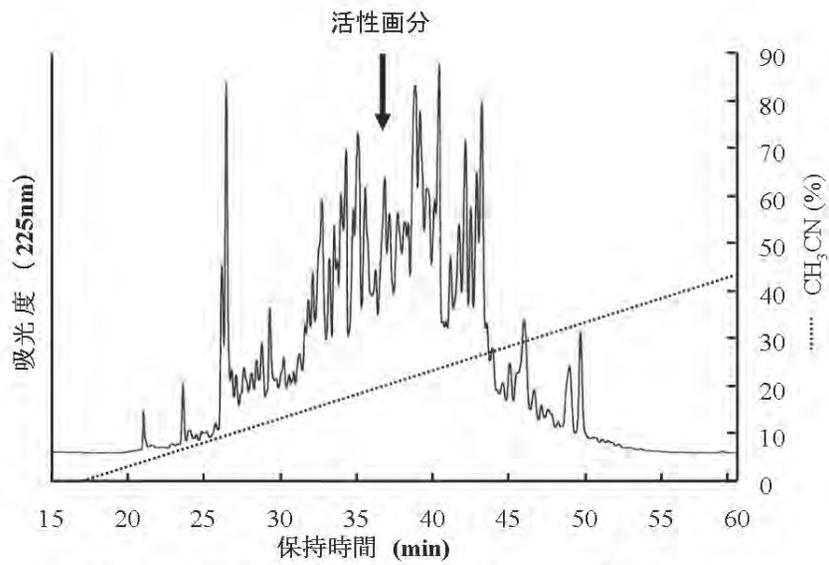


図3 No. 56画分の逆相HPLC2次カラムクロマトパターン

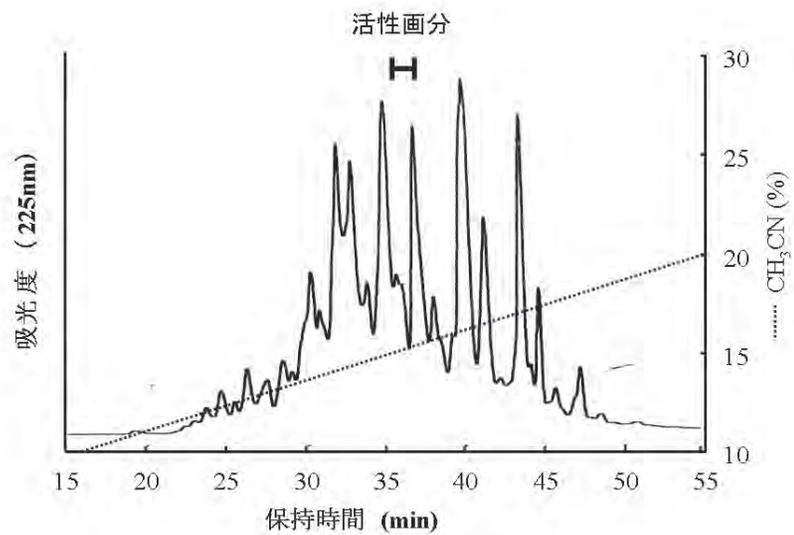


図5 No. 56画分の逆相HPLC2次カラムクロマトパターン

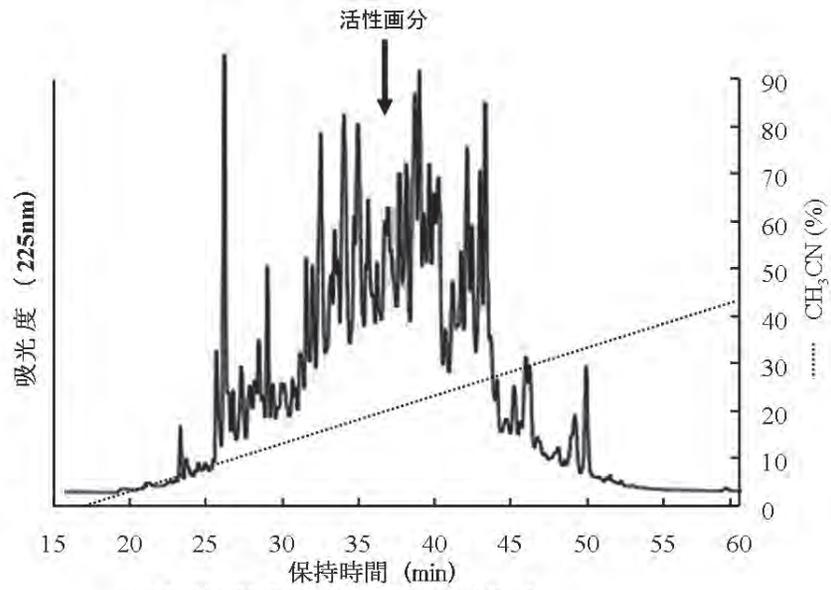


図2 No. 55画分の逆相HPLCパターン

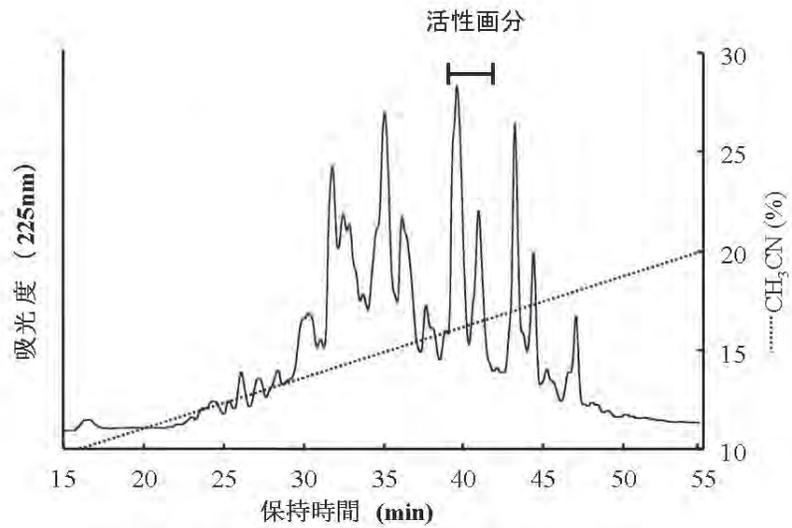


図4 No. 55画分の逆相HPLC2次カラムクロマトパターン

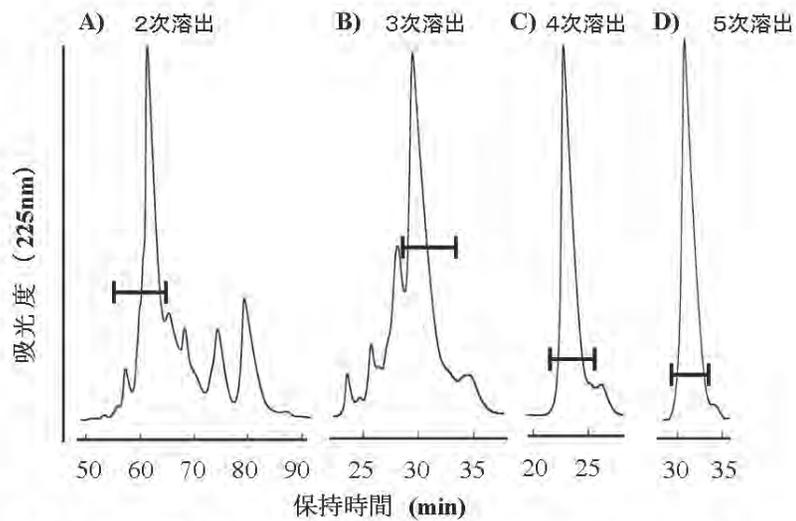


図6 PE-MSカラムにより分離したNo.55画分の逆相HPLCクロマトパターン

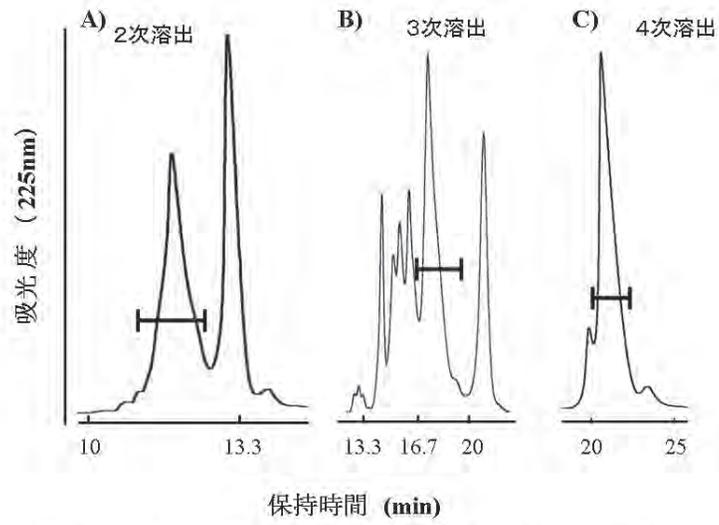


図7 PE-MSカラムにより分離したNo.56画分の逆相HPLCクロマトパターン

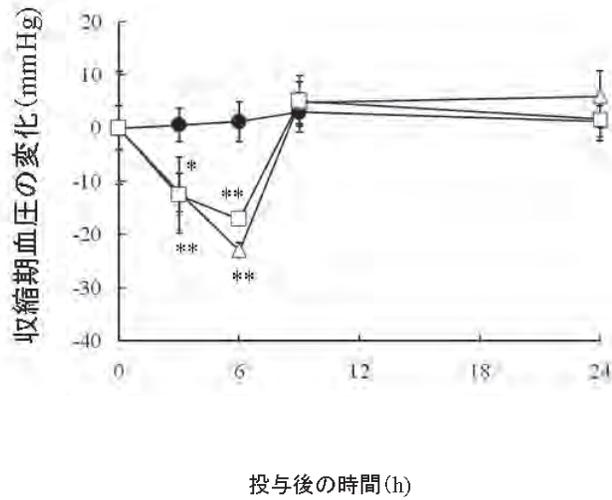


図9 自然発症高血圧ラット (SHR) の収縮期血圧の変化に及ぼすペプチド投与の効果

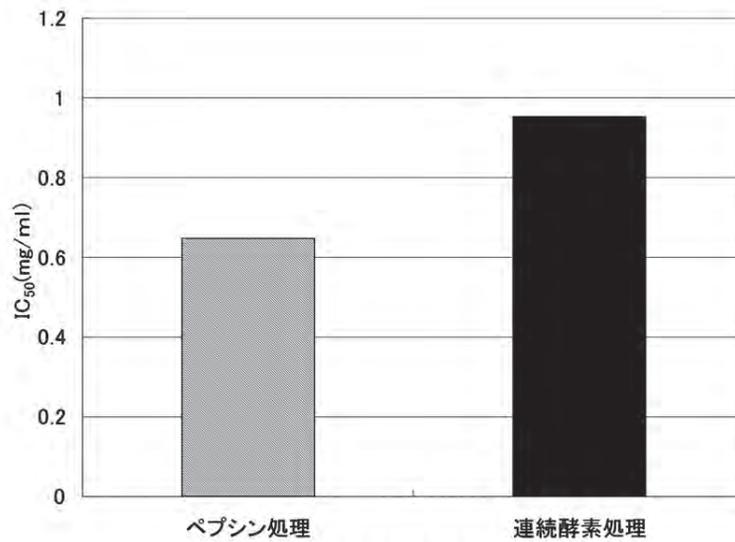


図11 各酵素処理をした豚モモ肉の IC_{50}

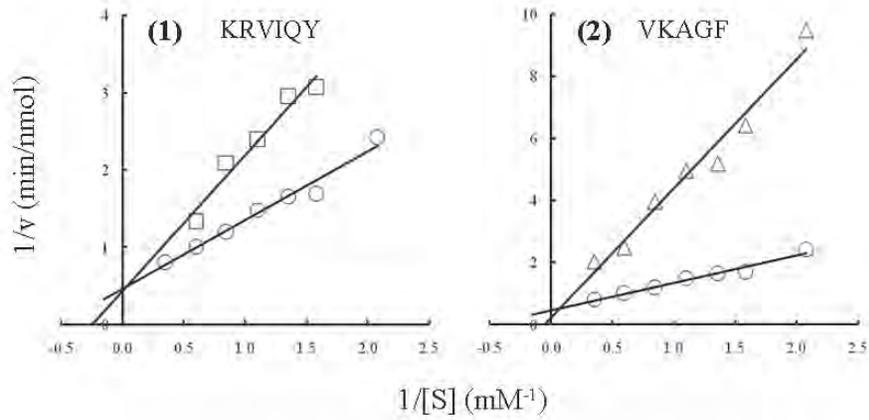
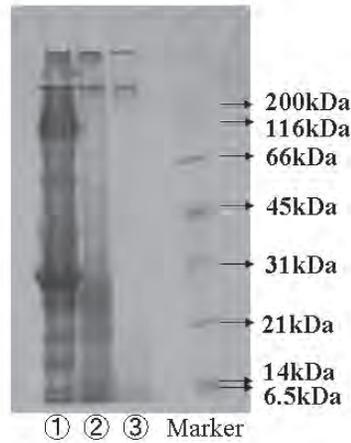


図8 ACE阻害ペプチドのLineweaver-Burk逆数プロット



① 食肉 ② ペプシン処理③ 連続酵素処理

図10 各酵素処理をした豚モモ肉のSDS-PAGE



図12 測定項目および実験期間

表1 ラット飼料の一般成分

| | 粉末飼料 | 食肉区飼料 | 連続酵素処理区飼料 | 測定方法 |
|--------|-------|-------|-----------|-----------|
| 水分含量 | 7.2% | 7.0% | 7.1% | 常圧加熱乾燥法 |
| 粗タンパク質 | 23.7% | 25.3% | 26.1% | ケルダール法 |
| 粗脂肪 | 5.2% | 6.6% | 5.8% | ジエチルエーテル法 |
| 粗繊維 | 2.7% | 2.6% | 2.5% | ろ過法 |
| 粗灰分 | 5.8% | 5.6% | 6.1% | 直接灰化法 |

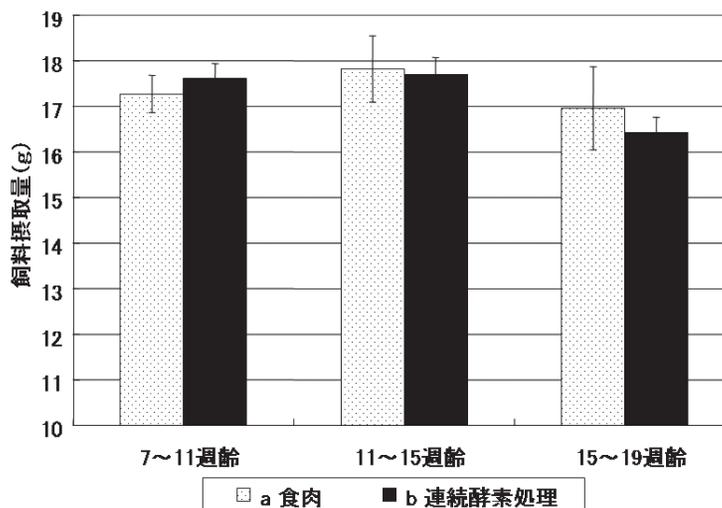


図14 各週齢間のラットの飼料摂取量 (g) (GK rat)

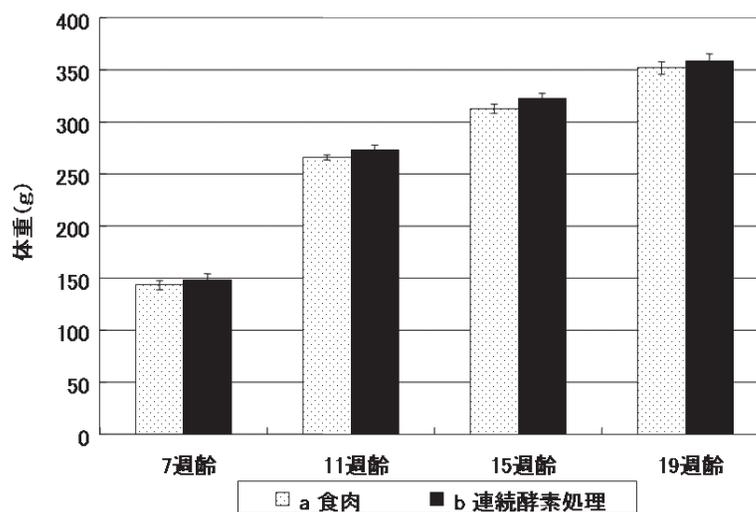


図16 各週齢のラットの体重変化 (GK rat)

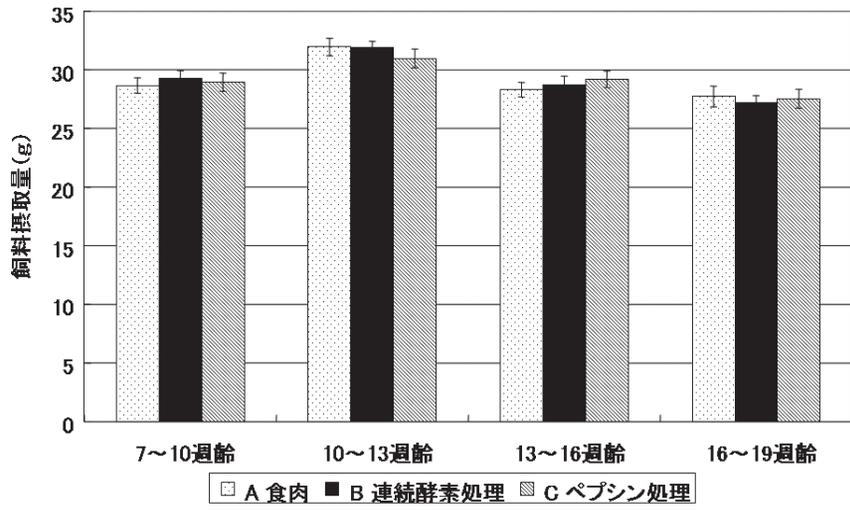


図13 各週齢間のラットの飼料摂取量(g) (SHR)

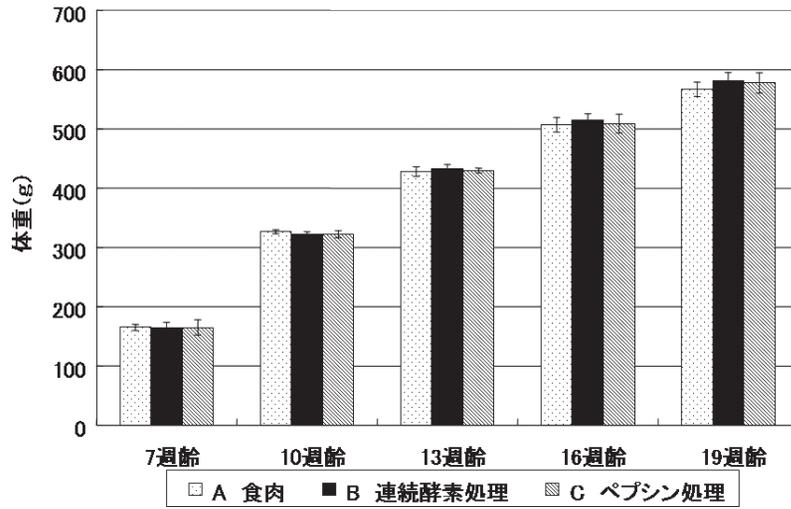


図15 各週齢のラットの体重(SHR)

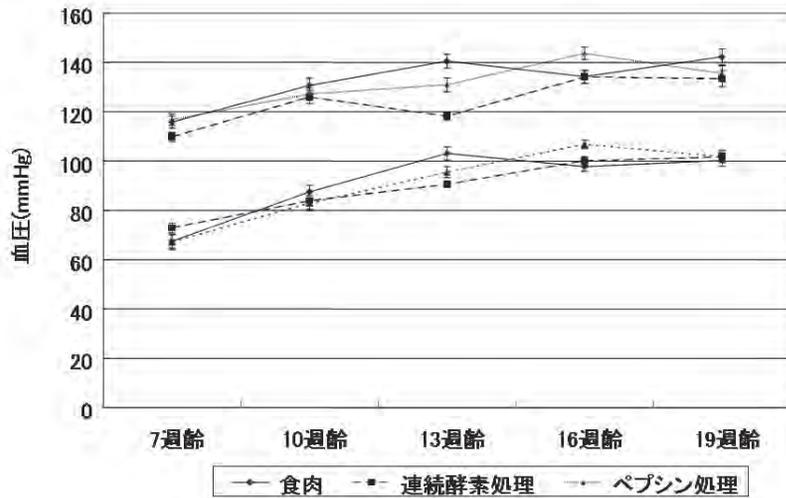


図17 各週齢のラットの拡張期および収縮期血圧(SHR)

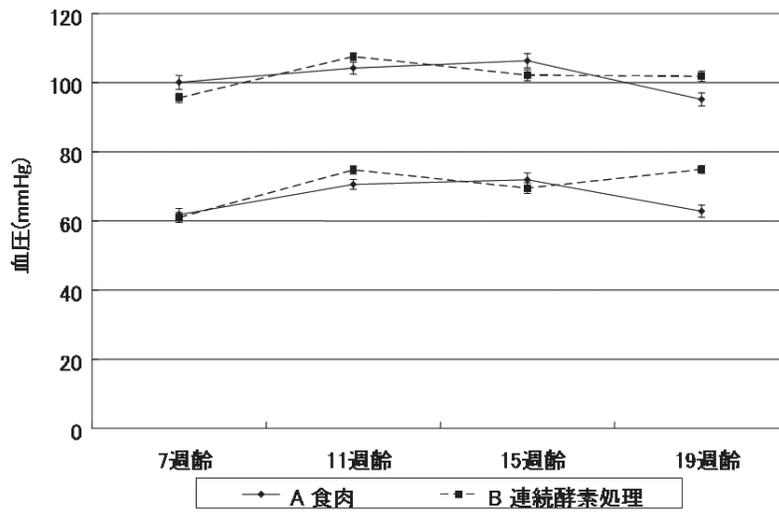


図18 各週齢のラットの収縮期および拡張期血圧(GK rat)

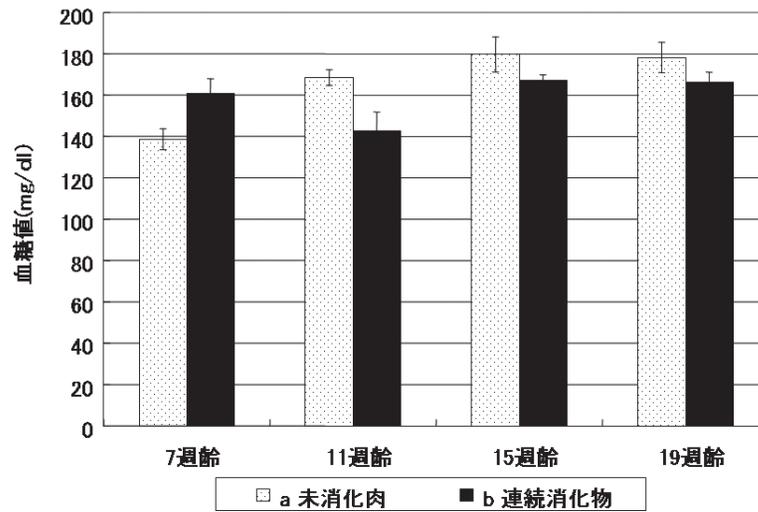


図20 各週齢のラットの血糖値(GK rat)

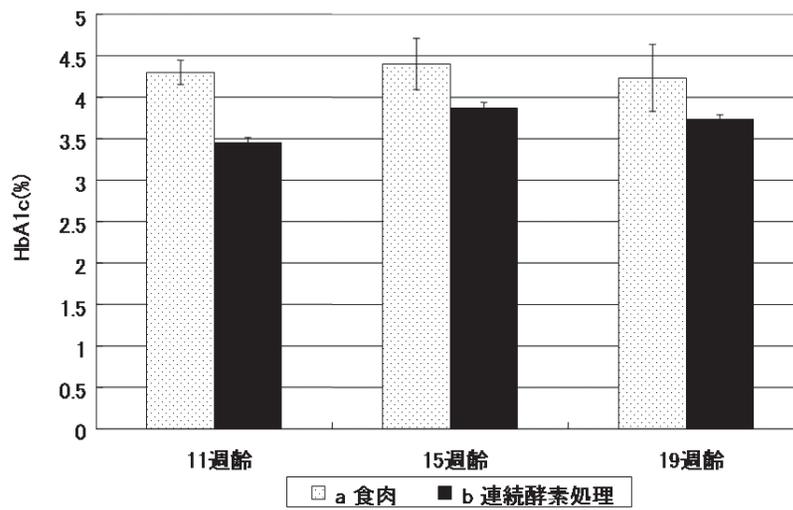


図22 各週齢のラットのHbA_{1c}(%)(GK rat)

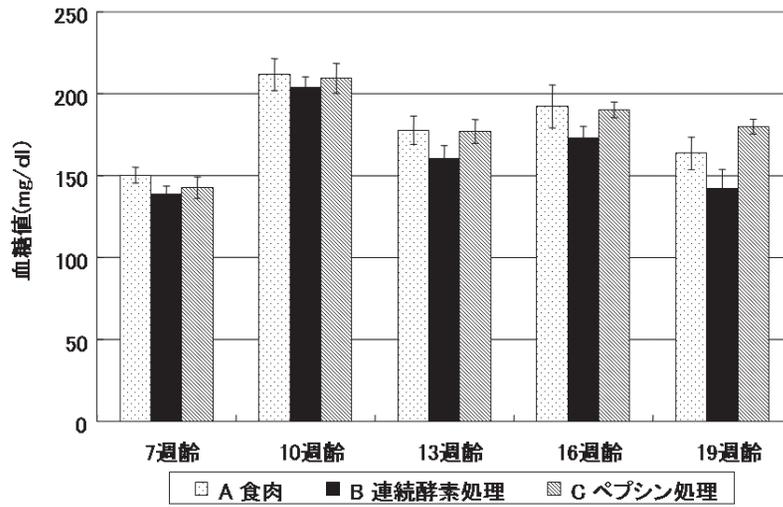


図19 各週齢のラットの血糖値(SHR)

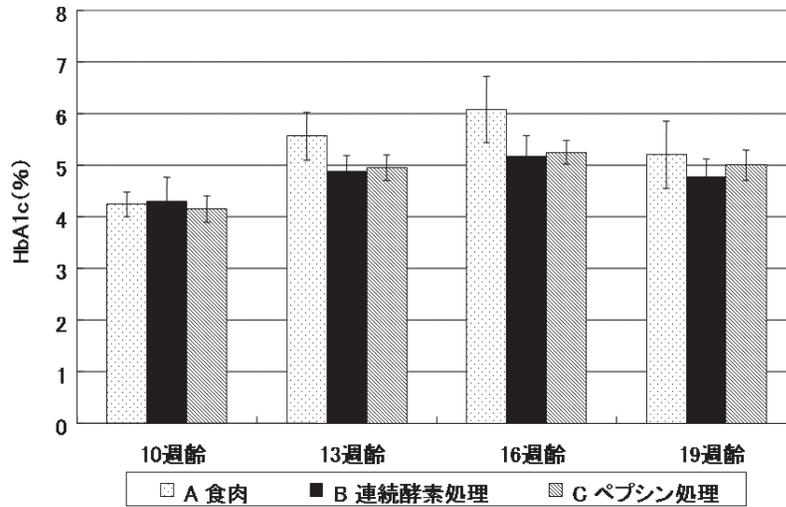


図21 各週齢のラットのHbA^{1c}(SHR)

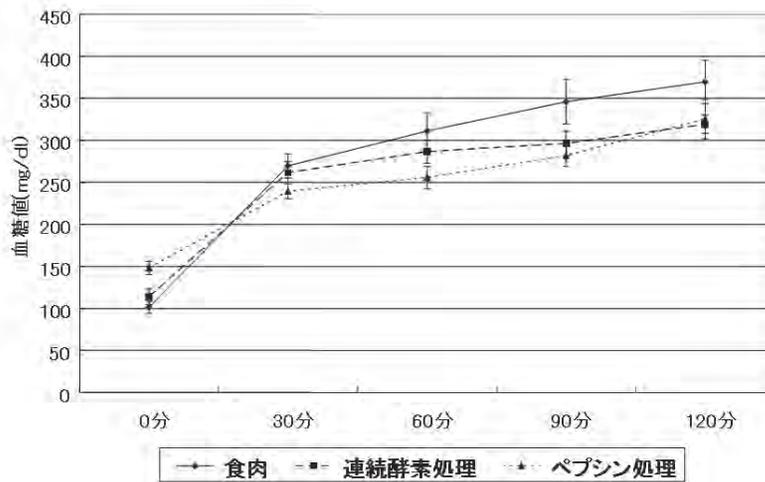


図23 耐糖負荷試験結果(SHR)

牛肉の味に及ぼす筋線維型の効果の検証

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究所
食肉プロテオーム研究チーム長 千国幸一

要約

和牛の筋肉には遅筋型筋線維が多く存在し、和牛の食味が優れている理由の一つであるといわれている。しかしながら、品種の違いによる筋線維型構成の違いを定量的に比較検討した研究は少なく、牛肉の筋線維型と味との関係を直接に調べた研究は皆無である。もし、筋線維型と味との関係が明らかになれば、牛肉品質の判定や改良にも筋線維型を指標とする新しい観点が開けてくる。

本研究では、市場から和牛(特選)10試料、和牛(普通)10試料、交雑牛11試料、乳用牛7試料、輸入牛10試料のサーロイン牛肉を購入し、各種の分析に供した。筋線維型は抗ミオシン重鎖(slow)抗体を用い、ELISAによって遅筋型ミオシン重鎖の定量を行った。その結果、和牛(特選)の遅筋型ミオシン重鎖が乳用牛、輸入牛よりも有意に高い値を示した。平均値は和牛(特選)28.6%、和牛(普通)24.1%、交雑牛22.3%、乳用牛16.0%、輸入牛17.5%であった。また、和牛(特選)、交雑牛、乳用牛、各6頭についてプロテオーム解析を実施し、全タンパク質の違いを検討した。その結果、和牛(特選)は乳用牛と比べて遅筋型ミオシン軽鎖やミオグロビンが多く、乳用牛は逆に速筋型ミオシン軽鎖や解糖系の酵素が多い傾向を示した。このことは筋線維型を決定しているミオシン重鎖のアイソフォーム型だけでなく、筋線維型の構成割合が違えば多くのタンパク質の構成割合にも違いの生じることを示している。

牛肉食味の測定には味認識装置((INSENT、SA402)を用いた。本装置は溶液中に含まれる味成分をタイプの異なる5種類のセンサーで検出し、「旨味」「塩味」「酸味」「苦味雑味」「渋味刺激」「旨味コク」「苦味」「渋味」として食品の特徴を数値化するものである。試験には牛肉をハンバーグ状に整形し、ホットプレートで加熱したものを用いた。加熱調理試料肉から15%エタノール溶液で成分を抽出し、味認識装置で測定を行った。その結果、「旨味」「塩味」「苦味雑味」「渋味刺激」「旨味コク」「苦味」の6項目で牛肉グループ間の有意差が認められた。主成分分析を行うと、第1主成分として(旨味/渋味刺激、苦味雑味)、第2主成分として(塩味/酸味)が抽出された。各グループの違いは第1主成分にあり、グループは「旨味」「渋味刺激」「苦味雑味」の3項目で特徴づけることができた。和牛、交雑牛のグループは乳牛、輸入牛のグループよりも「苦味雑味」と「渋味刺激」の値が高く、「旨味」が低いことが特徴であった。重回帰分析では「渋味刺激」と「旨味」に対して脂肪含量と遅筋型ミオシン重鎖が有意な因子となり、「苦味雑味」に対しては脂肪含量のみが有意な因子となった。

各グループ間の脂肪含量は大きな違いが見られ、味認識装置の測定値に影響していることが考えられた。脂肪の効果を除去し、筋線維型の効果だけを評価するため、クロロホルム抽出による脂肪除去肉を作成し、それに均一組成の牛脂を一定量加えた試験試料を作成した(再構成肉)。再構成肉について味認識装置で測定を行うと、「渋味刺激」と「旨味」でグループ間の有意差が認められ、「苦味雑味」での差は認められなかった。

以上の結果から、筋線維型の効果は「渋味刺激」と「旨味」に表れ、これは脂肪との相互作用によって生じる効果であると考えられた。

緒言

わが国で生産される肉牛は和牛、肥育乳用牛および和牛と乳用牛の交雑種が主体となっている。黒毛和種で代表される和牛は筋肉内に高度の脂肪交雑を持ち、その美味しさは高く評価される。また、乳用牛の肥育牛肉は、脂肪交雑が少ないものの赤肉部分の食味に優れ、輸入牛肉よりも良食味であるといわれている。これら国産牛肉の美味しさに対する評価は定着しているものの、美味しさの原因となる成分についての研究は進んでいない。

和牛の美味しさについては、一般に脂肪交雑の多寡から説明がなされている。しかし、調理した食

肉の風味は脂身と赤身の反応から生じることはよく知られており、松石ら¹⁾の一連の研究から、和牛特異的な香りは酸素との接触、脂身と赤身の共存が必要であることも示されている。また、輸入牛肉と国産牛肉の比較で、牛肉風味に違いのあることは明確である。これらのことは赤身の成分も食肉の味に影響を与え、赤肉成分を変えることで食味の品質向上が図れることを示している。海外での品質評価においても、柔らかさ等の物性の違いが主な評価基準であったが、近年になって食肉の風味に関連する成分が研究されはじめている²⁾。脂肪交雑だけで牛肉を評価する従来の研究だけでなく、赤肉部分から食味にアプローチする研究を推進することは、わが国の牛肉品質をさらに向上させることに貢献するものと考えられる。

我々は赤身の部位でも特に筋線維型の違いに注目し、本研究で遅筋型筋線維と速筋型筋線維の割合の違いが牛肉ロースの味に及ぼす影響を検証する。これは和牛と他品種で筋線維型の割合が違うこと³⁾、および筋肉別に味を調べた我々の予備試験の結果⁴⁾から計画された試験である。予備試験では遅筋型筋線維の多い筋肉と速筋型筋線維の多い筋肉の味を味認識装置(インセント味認識装置SA402)で比較し、筋肉タイプの違いで明確に味の異なることを明らかにしている。

本研究は、和牛や輸入牛など各種のタイプの同一筋肉部位(サーロイン)を試験対象とし、品種等の違いによって筋線維型の割合が違い、食味にも違いが生じているかを検討する。分析は筋線維型を決定しているミオシン重鎖アイソフォームのELISA測定、及び筋線維を構成する各種タンパク質のプロテオーム解析を行い、味認識装置による測定値と比較することで、牛肉の味に対する筋線維型の効果を明らかにする。

試験方法

1) 牛肉試料

市販牛肉の各サーロイン部分約1kgを和牛(特選)10試料、和牛(普通)10試料、交雑牛10試料、国産牛10試料、輸入牛10試料購入した。購入した牛肉のウシ個体番号を確認したところ、国産牛肉の7試料は乳用牛、1試料は交雑牛、2試料は輸入子牛肥育牛であることが判明した。輸入子牛肥育牛は品種等の背景が不明なため、解析に含めず、データは5グループ48試料について解析を行った。それぞれのグループはグループA(和牛特選n=10)、グループB(和牛普通n=10)、グループC(交雑牛n=11)、グループD(乳用牛n=7)、グループE(輸入牛n=10)である(表1)。

プロテオーム解析および再構成牛肉の試験は、筋線維型の効果を明確に解析するため、月齢やミオシン重鎖アイソフォーム含量を考慮し、A、C、Dのグループより各6試料を選択した(試験個体:A3, A4, A5, A6, A7, A8, C3, C4, C5, C7, C9, C11, D1, D3, D4, D5, D6, D7)。

試料牛肉は、脂肪や他筋肉部分を除去し、胸最長筋のみとした。この胸最長筋を適当な小片とし、直径3mmのプレートをつけた電動チョッパーによって挽肉試料とした。この挽肉試料は分析に供すまで-30℃の冷凍庫で冷凍保存した。

2) 味認識装置による測定

(1) 市販牛肉試料の調製

挽肉試料を解凍後、40gを分取し、食塩400mg(1%相当)を加えて混合した。この肉を直径70mm、厚さ10mmのハンバーグ様に整形し、-4℃で一晩静置した。翌日、ホットプレートを用い、200℃片面3分で両面の加熱を行った。冷却後、表面部分を含む5gの肉片を試料中央部分から切り取り、分析用試料とした。

50mlのプラスチックチューブに入れた5gの肉片に15%エタノール30mlを加え、ホモジナイズを行っ

た。30分の振とう抽出後、3,000rpm、10分、20℃の遠心分離を行い、上清部分得た。この上清15mlに15%エタノール60mlを加えて攪拌し、味認識装置用測定試料とした。

(2)再構成牛肉試料の調製

挽肉試料5gにクロロホルム20mlを加え、ホモジナイズを行った。30分の振とう抽出後、抽出残渣を吸引濾過によって得た。さらに抽出残渣をドラフト内で一晩乾燥し、クロロホルムの除去を行った。乾燥によって水分も除去されるため、400mgの乾燥肉粒に対し、水1.2g (50%)、食塩24mg (1%)、トリグリセライド800mg (33%)を加えて混合し、合計2.4gのハンバーグ様試料とした。-4℃で一晩静置後、ホットプレートを用い、200℃片面30秒で両面の加熱を行った。冷却後、全量を分析用試料とした。15%エタノール30mlによる抽出以降の過程は市販牛肉試料と同様である。

(3)味認識装置による試料溶液の測定

株式会社インテリジェントセンサーテクノロジー (INSENT) の味認識装置SA402を用いた。使用したセンサーはAAE、CT0、CA0、C00、AE1の5種類でそれぞれ旨味、塩味、酸味、苦味雑味、渋味刺激に反応するセンサーである。センサー出力は付属の解析ソフトを用いて各味の推定値に換算し、その値から解析を実施した。なお、分析の基準液として付属の基準液および0.1%Peptone (SIGMA) の15%エタノール溶液を用いた。

測定値は基準物質に対する相対値として数値化されるが、センサー膜の状態等による各分析ごとの変動が認められたため、各分析ごとの平均値を0とするノーマライズを行い、その値から解析を行った。

3) ミオシン重鎖アイソフォームのELISA

(1) 試料溶液の調製

挽肉試料200mgに20mlの溶解液 (8M尿素、5mMDTT、500mMリン酸カリウム緩衝液pH6.5)を加え、ホモジナイズを行った。30分の静置後、3,000rpm、20分、20℃の遠心分離を行い、上清を得た。この上清10 μ lに190 μ lの 500mMリン酸カリウム緩衝液pH6.5を加え、タンパク質定量用試料 (1/20希釈試料)とした。この1/20希釈試料にリン酸カリウム緩衝液を加えて1/5,000とし、ELISA用試料とした。

(2) タンパク質の定量

定量はタンパク質定量キット (Bio-Rad, Protein Assay Kit)を用いた。96穴プレート (Nunc 467679)に1/20希釈試料10 μ lをとり、キットの1/5希釈色素液200 μ lを加えた。混合後、プレートリーダー (TECAN, GENios) で595nmの吸光度を測定した。検量線用の標準タンパク質試料はIgG溶液を用いた。

(3) ELISA

96穴プレート (Nunc 467466)に1/5,000希釈試料100 μ lをとり、一晩4℃で静置した。一次抗体として anti-Skeletal Myosin Slow, clone NOQ7.5.4D (SIGMA, M-8421) の1/1,000希釈溶液および anti-Skeletal Myosin Fast, clone MY-32 (SIGMA, M-4276) の1/10,000希釈溶液を用い、二次抗体は anti-Mouse IgG Peroxidase conjugate (SIGMA, A-2554) の1/2,000希釈溶液を用いた。発色は TMB (NEOGEN, Enhanced K-Blue TMB Substrate) を用い、15分間の発色反応後50 μ lの1M H₂SO₄を加え、450nmの吸光度をプレートリーダーで測定した。

結果はタンパク質量で補正した抗slow抗体のシグナルから求めたslow (%) およびslow/fast (シグナル比) の両者の値を得た。slow (%) はウシ咬筋に対するシグナル強度を100%とする検量線から算出した。

4) プロテオーム解析

(1) 試料溶液の調製

挽肉試料200mgに4mlの溶解液(8M尿素、30mM Tris-HCl、4% (w/v) CHAPS、pH8.5)を加え、ホモジナイズを行った。30分の振とう後、3,000rpm、10分、4℃の遠心分離を行い、上清を得た。この上清を12,000rpm、30分、4℃で遠心分離し、得た上清を解析用試料とした。

(2) タンパク質の濃度測定

解析用試料の濃度測定は、タンパク質量定量キット(PIERCE, BCA Protein Assay Kit)を用いた。96穴プレート(Nunc 467679)に1/10および1/20希釈試料25 μ lをとり、反応液200 μ lを加えた。37℃の恒温槽中で30分間反応させた後、プレートリーダーで560nmの吸光度を測定した。検量線の標準タンパク質試料はBSA溶液を用いた。

(3) 蛍光標識二次元ディファレンシャルゲル電気泳動

標識色素はCyDye DIGE Fluors (GE healthcare)を用いた。試料タンパク質25 μ gに対し、400pmol/ μ lの濃度の色素0.5 μ lを反応させ標識を行った。18サンプルのうち9サンプルについてはCy3、残りの9サンプルについてはCy5で標識した。異なる色素で標識したサンプルを混合し、IPGストリップ(Bio Rad, Ready Strip, 11cm, pH3-10)を用いて等電点電気泳動を行った。等電点電気泳動後、Criterion cell(BioRad)を用いてSDS-PAGE(12.5%ゲル、200V、1時間)を行った。SDS-PAGE後、Ettan DIGE Imager (GE healthcare)を用いてスキャンを行った。各タンパク質スポットの検出および定量は、PDQuest Advanced Version 8.0 (Bio Rad)ソフトウェアで行った。検出したスポット量の総和を100%として各スポットの割合を計算した。

5) 脂肪含量の測定

挽肉試料5gにクロロホルム20mlを加え、ホモジナイズを行った。無水Na₂SO₄を約5g加えて60分の振とう抽出後、1,000rpm、10分、20℃の遠心分離を行った。クロロホルム層1mlをガラスチューブに取り、N₂を吹き付けながら55℃に加熱してクロロホルムを除去した。残渣の重量を測定し、脂肪量とした。

6) pHの測定

挽肉試料2gに水20mlを加え、ホモジナイズを行った。3,000rpm、10分、20℃の遠心分離を行い、得られた上清のpHをpHメーターで測定した。

7) 乳酸含量の測定

定量は分析キット(Boehringer Mannheim, L-Lactic acid kit)のプロトコルを一部改変し、プレートリーダーで行った。味認識装置用15%エタノール抽出液100 μ lをメンブランフィルターつき遠心チューブ(Millipore, Ultrafree-MC, NMWL10,000)で濾過し、これによって高分子成分を除去した濾液を分析試料とした。反応終了後、プレートリーダーで340nmの吸光度を測定し、標準L-乳酸の検量線より試料中濃度を計算した。

8) 遊離グルタミン酸含量の測定

定量は分析キット(Boehringer Mannheim, L-Glutamic acid kit)のプロトコルを一部改変し、プレートリーダーで行った。味認識装置用15%エタノール抽出液100 μ lをメンブランフィルターつき遠心チューブ(Millipore, Ultrafree-MC, NMWL10,000)で濾過し、これによって高分子成分を除去した濾液を分析試料とした。反応終了後、プレートリーダーで492nmの吸光度を測定し、標準L-グルタミン酸

の検量線より試料中濃度を計算した。

9) 統計処理

データはExcelの分析ツールを用い、一元配置型分散分析、回帰分析、重回帰分析を行った。主成分分析にはSASプログラムを用いた。

結果

1) 味認識装置による測定

(1) 市販牛肉

味認識装置は5種類のセンサーを用い、「旨味」「塩味」「酸味」「苦味雑味」「渋味刺激」の先味と「旨味コク」「苦味」「渋味」の後味を食品の特徴として表現する。本試験の牛肉では「旨味」「塩味」「苦味雑味」「渋味刺激」「旨味コク」「苦味」の6項目で有意差が認められ、牛肉グループ間の違いを多面的に検出できたものと考えられる(図1)。

「旨味」は乳牛、輸入牛のグループが和牛A、和牛B、交雑牛のグループよりも高い値を示した。「塩味」は和牛Bが輸入牛よりも高い値を示した。「苦味雑味」は和牛A、和牛B、交雑牛が輸入牛よりも高い値を示した。「渋味刺激」は和牛A、和牛B、交雑牛が乳用牛、輸入牛よりも高い値を示した。「旨味コク」は乳用牛が和牛A、和牛B、交雑牛よりも高い値を示した。「苦味」は和牛Bが輸入牛よりも高い値を示した。「酸味」「渋味」ではグループ間で有意な違いが認められなかった。

これらの結果を主成分分析からまとめると、第1主成分として(旨味/渋味刺激、苦味雑味)、第2主成分として(塩味/酸味)が抽出された。各グループの違いは第1主成分の軸にあり、「旨味」「渋味刺激」「苦味雑味」でグループを特徴づけることができた(図2)。

(2) 再構成牛肉

和牛A、交雑牛、乳用牛より各6試料を選択し、脂肪を除去した後に同一組成のトリグリセライドを添加することで、調理時における脂肪の効果を均質化した試料の測定を行った。その結果「旨味」と「渋味刺激」でグループ間に有意差が認められ、「旨味」は乳用牛>交雑牛>和牛の順に高く、「渋味刺激」は和牛A、交雑牛>乳用牛であった。また、「旨味」および「渋味刺激」について再構成肉と無処理肉の測定値を比較すると、両者の間でよい相関関係が認められた(図3)。

2) 筋線維型関連タンパク質

(1) ミオシン重鎖アイソフォームの構成

抗ミオシン重鎖のモノクローナル抗体を用いたELISAにより牛肉試料における遅筋型線維の割合を推定した。使用した抗体の特性による誤差を避けるため、抗ミオシン重鎖slow抗体と抗ミオシン重鎖fast抗体による測定を平行して行い、結果はslow(%)およびslow/fast(シグナル比)の両者を求めた。これらによる測定値の相関を求めると両測定値は良い相関関係を示し、どちらを用いても解析可能であると考えられた。そのため、解析にはslow(%)のみを用いた。

牛肉グループのslow(%)には有意な差異が認められ、和牛Aが乳用牛、輸入牛よりも有意に高い値を示した。平均値は和牛Aが28.6%、和牛Bが24.1%、交雑牛が22.3%、乳用牛が16.0%、輸入牛が17.5%であり、質の良いウシほどslow(%)が高い傾向が認められた(図4)。

(2) プロテオーム解析

二次元電気泳動によって得られた96スポットについて定量を行い、和牛A、交雑種、乳用牛でタンパク質構成に違いがあるかを検討した。その結果、乳用牛では筋構造タンパク質である速筋型ミオシ

ン軽鎖 (MyLCfast) や速筋型トロポミオシン (TPM1) の含量が和牛Aよりも高く、また解糖系の酵素であるエノラーゼ、アルドラーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼも高い値を示した。一方、和牛Aは遅筋型ミオシン軽鎖 (MyLC2slow) が乳用牛よりも高く、ミオグロビンやヘモグロビンも高い値を示した(表2、図5)。これらの結果は筋線維型の違いがミオシン重鎖のアイソフォーム型だけではなく他の筋構造タンパク質や代謝系のタンパク質にも表れていることを示している。

3) 化学成分

(1) 脂肪含量

脂肪含量はグループ間で大きな違いがあり、平均値は和牛Aが41.7%、和牛Bが37.7%、交雑牛が29.8%、乳用牛が9.6%、輸入牛が8.0%であった(表3)。

(2) pH

pHは生肉と加熱調理後に分けて測定した。その結果、両者ともグループ間に有意差が認められたが、差異の傾向は異なっていた。特に輸入牛肉は生肉の時点で最も低いpHを示していたにもかかわらず、加熱終了時には最も高いpHとなっていた(表3)。

(3) 乳酸含量

乳酸含量は加熱処理後の試料について分析したが、その結果は乳用牛、輸入牛>交雑牛、和牛B>和牛Aであり、生肉でのpH測定値と同様の傾向を示した(表3)。

(4) グルタミン酸含量

グルタミン酸含量は輸入牛が和牛A、和牛B、交雑牛よりも有意に高い値を示し、乳用牛は中間的な値を示した(表3)。

考察

本調査研究は、骨格筋における筋線維型の違いが生産される牛肉の味に対してどのような影響をあたえているか、調べることを目的としている。したがって、その前提としてはウシの品種によって筋線維型が異なっていなければならない。

骨格筋の筋線維型は主に組織化学的手法によって決定されており、ウシの骨格筋は各種染色方法における染色度の違いから、I型、IIA型、IIB型筋線維に分類される。I型は遅筋型筋線維であり、IIAとIIB型は速筋型筋線維である。Gotohら³⁾は組織化学的手法を用い、黒毛和種では遅筋型筋線維の多いことを報告している。しかし、和牛と他の品種で筋線維型の定量的な比較を行った報告は少ない。そのため、本研究では、ミオシン重鎖に対する抗体を用い、各グループ間の比較を実施した。組織化学的手法は骨格筋ミオシン重鎖のATPアーゼ活性の違いに基づくものであり、その違いはミオシン重鎖のアイソフォームの違いから来ている。そのため、ミオシン重鎖のアイソフォーム型を調べることは筋線維型を調べることに直結する。また、抗体による反応はELISAを用いることで迅速かつ定量的に測定できる利点を有している。

本研究で実施したELISAによる測定結果は明確に筋線維型における品種間差を示していた(図4)。試験に用いたサーロインは胸最長筋の一部であり、速筋型に分類される筋肉である。そのため遅筋型ミオシン重鎖の割合は最も多い和牛Aでも28.6%であったが、乳用牛16.0%、輸入牛17.5%に比べ有意に高い割合であった。また、有意ではないものの交雑牛は22.3%と両者の中間的な値を示し、これら筋線維型の違いには遺伝的な背景があることを示唆していた。

筋線維型の違いは単にミオシン重鎖の違いだけではなく、筋肉の運動機能の違いでもある。そのためミオシン重鎖以外のタンパク質構成においても品種間差の表れている可能性がある。図5(上)は

100%遅筋型筋線維で構成される咬筋と速筋型筋線維が90%近くを占める半腱様筋を比較したものであるが、多くのタンパク質で違いのあることを明確に見ることができる。胸最長筋は速筋型の筋肉であるため、各グループにおいても速筋型の筋タンパク質が多く、違いは筋肉間の違いほど明確ではない。しかし、遅筋型ミオシン軽鎖(MyLC2slow)やミオグロビン、ヘモグロビンなど遅筋型で多いタンパク質が和牛Aで多く、エノラーゼやアルドラーゼなど解糖系の酵素は速筋型の多い乳用牛で高い値を示している。

味認識装置の測定値をウシグループ間で比較すると、多くの項目で有意な違いがあり、実際の味にも違いのあることが推定される。試料ごとの味認識装置の値と遅筋型ミオシン重鎖%を比較すると、「渋味刺激」「苦味雑味」「旨味」では何らかの相関があるように見られ、遅筋型ミオシン重鎖が増えるほど「渋味刺激」と「苦味雑味」が増加し、「旨味」が減少している(図6)。しかし、試験に用いた牛肉試料では脂肪含量に大きな違いがあり、その差異は遅筋型ミオシン重鎖%と同様の方向を示している。そのため、「渋味刺激」「苦味雑味」「旨味」と脂肪含量の相関を見ると、遅筋型ミオシン重鎖と同様な相関関係が認められる(図7)。

このような脂肪の質と量の効果を除去し、筋線維型の効果だけを検討するため、和牛A、交雑種、乳用牛から各6試料を選び、クロロホルムを用いて脂質を除去した肉粒を調製した。この肉粒に同一組成の牛脂を同量加えることで脂肪の効果を均質化し(再構成肉)、味認識装置による測定を行った。その結果、「渋味刺激」と「旨味」はグループ間で有意差があり、「渋味刺激」では和牛Aと交雑牛が乳用牛より高く、「旨味」では乳用牛が和牛Aよりも高い値であった。また、個々の値について、無処理肉の測定値と再構成肉の測定値を比較すると、明確な相関が認められた(図3)。したがって、脂肪の効果を除いても遅筋型筋線維の割合は「渋味刺激」「旨味」の差異に影響を与えているものと考えられた。

遅筋型ミオシン重鎖%と脂肪含量%を説明変数とする重回帰分析を行うと、両因子とも有意な効果を示し、「渋味刺激」では $R^2=0.699$ 、「旨味」では $R^2=0.502$ であった。以上のことは、牛肉における「渋味刺激」と「旨味」の差異に対し、筋線維型と脂肪含量の両因子が関与していることを示している。一方、「苦味雑味」は再構成肉で有意差が無くなり、また重回帰分析でも脂肪含量%のみ有意となることから、主に脂溶性成分の違いによるものであると考えられる。

味認識装置では「渋味刺激」の標準物質としてキニーネを用いている。キニーネが牛肉成分として含まれている可能性は少なく、センサーは似たような化学特性を持つ物質に反応しているものと考えられる。これらの物質は低濃度で刺激味を与え、一種の隠し味として牛肉の味に深みを与えていると思われる。遅筋型筋線維ではミオグロビンなどの鉄含有タンパク質が多く、脂肪の酸化分解において重要な役割を果たし、匂い物質の形成に関与することが知られている。味認識装置のセンサーは牛肉で知られている匂い物質には反応しないため、「渋味刺激」は匂い物質によるものではないが、鉄タンパク質を触媒とする同様の反応で生じた化学物質である可能性も考えられる。

「旨味」の標準物質はグルタミン酸ナトリウムである。遊離グルタミン酸の含量は輸入牛肉や乳用牛で高く、和牛や交雑牛で低い。また「旨味」と遊離グルタミン酸量の間に関係が認められることから、「旨味」の違いは遊離グルタミン酸含量の違いを反映していると考えられた。遊離アミノ酸はタンパク質が分解することによって生成する。筋線維型がこの過程でどのような影響を与えるかは現時点では不明である。

筋線維型構成が明らかに違う筋肉部位間で比較を行った予備試験では、「酸味」に明確な違いが認められ、遅筋型筋肉は速筋型筋肉に比べて高いpHを示していた。しかしながら、本研究では「酸味」にグループ間の有意差が認められなかった。生肉でのpHや乳酸含量を見ると筋線維型と関連する差異が認められ、遅筋型ミオシン重鎖の多い和牛肉は乳酸が少なくpHが高く、輸入肉は乳酸が多く低いpHであった。加熱後のpHを見ると、輸入牛は最も高いpHとなり、加熱によって何らかの成分変化

があったことを示していた。このような変化は輸入牛肉と和牛の味の違いに何らかの関与をしているかもしれない。

結論

和牛肉は輸入牛肉や乳用牛肉と比べて遅筋型筋線維が多く、その効果は味認識装置で「渋味刺激」「旨味」の違いとして検出される。遅筋型筋線維を構成するタンパク質と脂肪が反応することで、これらの違いを生じさせているものと考えられた。

引用文献

- 1) 松石昌典(2004)日本味と匂学会誌 11, 137-146.
- 2) Yancey et al.(2006)Meat Science 73, 680-686.
- 3) Gotoh et al.(1999)Animal Science Journal 70, 497-509.
- 4) 千国幸一他(2007)日本畜産学会108回大会発表、講演要旨 p83.

表 1. 試験に用いた牛肉試料

| グループ | 試料番号 | 個体番号 | 生産地 | 品種 | 性 | 月齢 |
|-------|------|------------|---------|------|----|----|
| 和牛、特選 | A1 | 1054905389 | 茨城 | JB | ♂ | 31 |
| 和牛、特選 | A2 | 1178830383 | 茨城 | JB | ♂ | 35 |
| 和牛、特選 | A3 | 1190140286 | 栃木 | JB | ♂ | 33 |
| 和牛、特選 | A4 | 1190144802 | 茨城 | JB | ♂ | 32 |
| 和牛、特選 | A5 | 1207966991 | 栃木 | JB | ♂ | 31 |
| 和牛、特選 | A6 | 1208790823 | 茨城 | JB | ♂ | 30 |
| 和牛、特選 | A7 | 1209584551 | 鹿児島 | JB | ♂ | 31 |
| 和牛、特選 | A8 | 1210501790 | 茨城 | JB | ♂ | 31 |
| 和牛、特選 | A9 | 1212421805 | 茨城 | JB | ♀ | 33 |
| 和牛、特選 | A10 | 1215610794 | 鹿児島 | JB | ♀ | 28 |
| 和牛 | B1 | 1080136849 | 群馬 | JB | ♂ | 25 |
| 和牛 | B2 | 1146910604 | 宮崎 | JB | ♀ | 46 |
| 和牛 | B3 | 1207570624 | 北海道 | JB | ♀ | 30 |
| 和牛 | B4 | 1209822219 | 宮崎 | JB | ♂ | 29 |
| 和牛 | B5 | 1210041982 | 茨城 | JB | ♂ | 29 |
| 和牛 | B6 | 1211157446 | 佐賀 | JB | ♂ | 30 |
| 和牛 | B7 | 1213048377 | 北海道 | JB | ♀ | 31 |
| 和牛 | B8 | 1213589825 | 茨城 | JB | ♂ | 35 |
| 和牛 | B9 | 1213985276 | 茨城 | JB | ♂ | 31 |
| 和牛 | B10 | 1237903706 | 宮崎 | JB | ♂ | 28 |
| 交雑牛 | C1 | 0220009388 | 栃木 | 肉×乳 | ♂ | 27 |
| 交雑牛 | C2 | 0498002937 | 青森 | 肉×乳 | ♂ | 26 |
| 交雑牛 | C3 | 1204786479 | 千葉 | 肉×乳 | ♀ | 35 |
| 交雑牛 | C4 | 1204834590 | 鹿児島 | 肉×乳 | ♀ | 32 |
| 交雑牛 | C5 | 1205062428 | 宮崎 | 肉×乳 | ♀ | 29 |
| 交雑牛 | C6 | 1205682091 | 愛媛 | 肉×乳 | ♂ | 26 |
| 交雑牛 | C7 | 1206652307 | 長野 | 肉×乳 | ♀ | 28 |
| 交雑牛 | C8 | 1212330855 | 栃木 | 肉×乳 | ♂ | 27 |
| 交雑牛 | C9 | 1215150610 | 長野 | 肉×乳 | ♀ | 28 |
| 交雑牛 | C10 | 1236182850 | 千葉 | 肉×乳 | ♂ | 27 |
| 交雑牛 | C11 | 1237159516 | 北海道 | 肉×乳 | ♀ | 29 |
| 乳用牛 | D1 | 0110505433 | 北海道 | Hols | ♂ | 20 |
| 乳用牛 | D2 | 0197705528 | 大阪 | Hols | ♀ | 58 |
| 乳用牛 | D3 | 0216318616 | 北海道 | Hols | ♂ | 21 |
| 乳用牛 | D4 | 0473504173 | 北海道 | Hols | ♂ | 20 |
| 乳用牛 | D5 | 1147256732 | 北海道 | Hols | ♂ | 20 |
| 乳用牛 | D6 | 1204051218 | 熊本 | Hols | ♂ | 20 |
| 乳用牛 | D7 | 1219705618 | 青森 | Hols | ♂ | 21 |
| 輸入牛 | E1 | ---- | オーストラリア | 不明 | 不明 | 不明 |
| 輸入牛 | E2 | ---- | オーストラリア | 不明 | 不明 | 不明 |
| 輸入牛 | E3 | ---- | オーストラリア | 不明 | 不明 | 不明 |
| 輸入牛 | E4 | ---- | オーストラリア | 不明 | 不明 | 不明 |
| 輸入牛 | E5 | ---- | オーストラリア | 不明 | 不明 | 不明 |
| 輸入牛 | E6 | ---- | オーストラリア | 不明 | 不明 | 不明 |
| 輸入牛 | E7 | ---- | オーストラリア | 不明 | 不明 | 不明 |
| 輸入牛 | E8 | ---- | オーストラリア | 不明 | 不明 | 不明 |
| 輸入牛 | E9 | ---- | オーストラリア | 不明 | 不明 | 不明 |
| 輸入牛 | E10 | ---- | アメリカ | 不明 | 不明 | 不明 |
| 輸入肥育 | F1 | 1205272216 | 栃木 | 肉専用 | ♀ | 32 |
| 輸入肥育 | F2 | 1236947817 | 福岡 | 肉専用 | ♀ | 32 |

表 2. 主要筋タンパク質の%割合 (プロテオーム解析)

| Spot 番号 | 蛋白質名 | 和牛A | 交雑牛 | 乳用牛 |
|---------|---------------------------|-------|-------|-------|
| 1 | actin | 20.23 | 18.35 | 18.20 |
| 2 | myoglobin | 13.81 | 10.25 | 10.69 |
| 3 | creatin kinase | 11.69 | 12.68 | 11.73 |
| 4 | enolase | 7.50 | 8.12 | 8.86 |
| 5 | MyLC1(fast) | 6.82 | 7.39 | 7.27 |
| 6 | aldolase | 6.10 | 7.08 | 8.95 |
| 7 | MyLC2(fast) | 5.78 | 6.52 | 5.81 |
| 8 | TPM1 | 2.51 | 3.15 | 2.72 |
| 9 | TPM2 | 2.27 | 2.90 | 2.42 |
| 10 | albumin | 2.13 | 1.83 | 1.29 |
| 11 | | 1.64 | 1.51 | 1.76 |
| 12 | | 1.15 | 1.50 | 0.89 |
| 13 | triosephosphate isomerase | 1.10 | 1.17 | 1.36 |
| 14 | | 1.03 | 1.01 | 0.74 |
| 15 | GDPH | 1.00 | 1.38 | 1.26 |
| 16 | | 0.80 | 0.78 | 0.71 |
| 17 | MyLC2(slow) | 0.78 | 0.57 | 0.68 |
| 18 | | 0.66 | 0.18 | 0.67 |
| 19 | MyLC3 | 0.59 | 0.49 | 0.59 |
| 20 | | 0.53 | 0.32 | 0.58 |
| 21 | hemoglobin | 0.44 | 0.33 | 0.26 |
| | 合計 | 88.56 | 87.51 | 87.45 |

和牛Aで0.4%以上のタンパク質を示す。

遅筋型筋線維で多いタンパク質を青字、速筋型筋線維で多いタンパク質を赤字で示す。スポット番号は図5と共通する。

表3. 牛肉の化学成分

| | 和牛A | 和牛B | 交雑牛 | 乳用牛 | 輸入牛 |
|--------------------------------|----------|----------|----------|----------|---------|
| 脂肪(%) | 41.7 a | 37.7 a,b | 29.8 b | 9.6 c | 8.0 c |
| pH(生) | 5.62 a | 5.64 a | 5.54 a,b | 5.52 a,b | 5.43 b |
| pH(加熱) | 5.63 a,b | 5.68 a,b | 5.71 a,b | 5.59 b | 5.73 a |
| 乳酸(mg/g meat) | 7.60 c | 9.23 b | 9.30 b | 11.24 a | 10.63 a |
| グルタミン酸($\mu\text{g/g meat}$) | 267 b | 211 b | 210 b | 338 a,b | 489 a |

a, b, c 異符号間で有意差 (p<0.05)

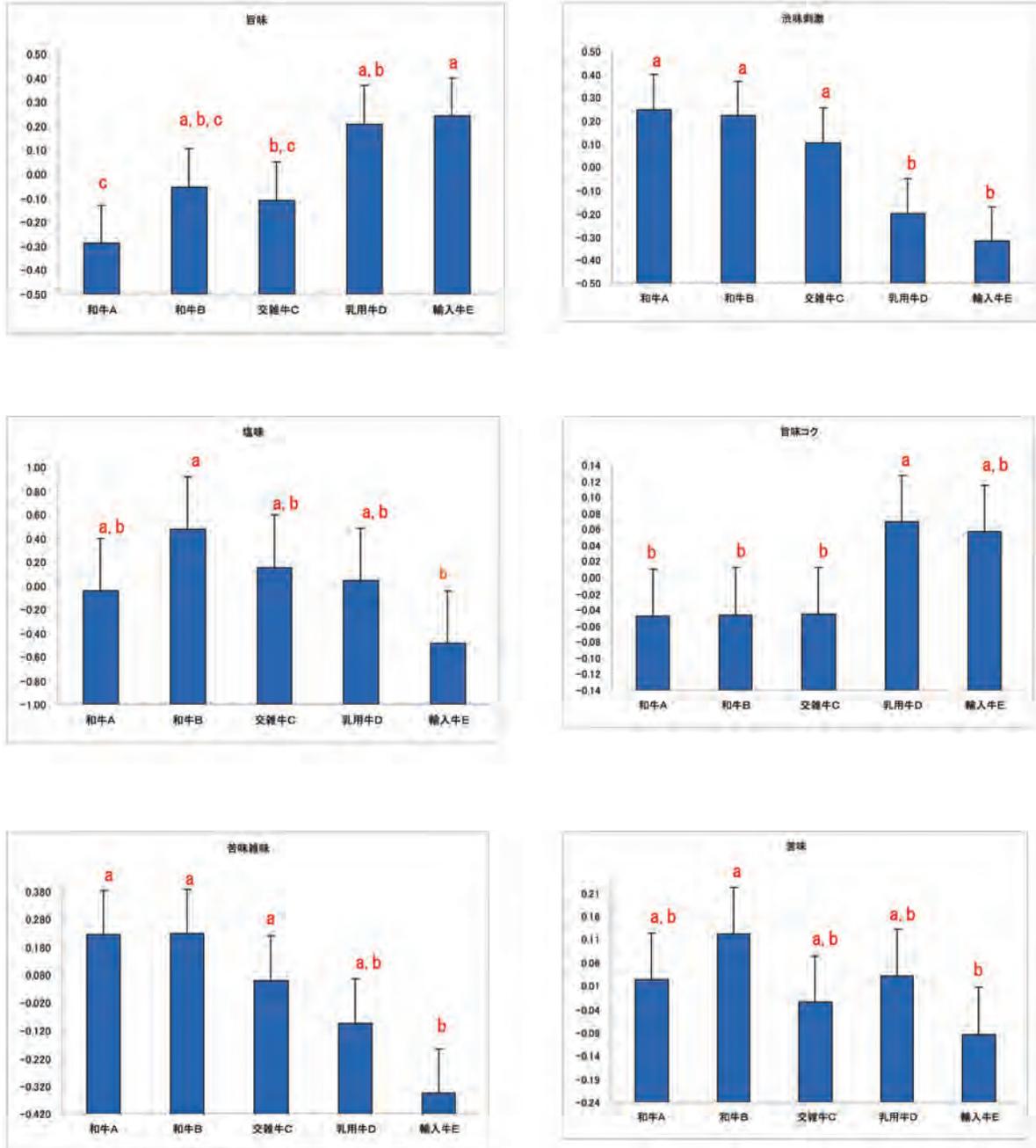


図1. 味認識装置による測定

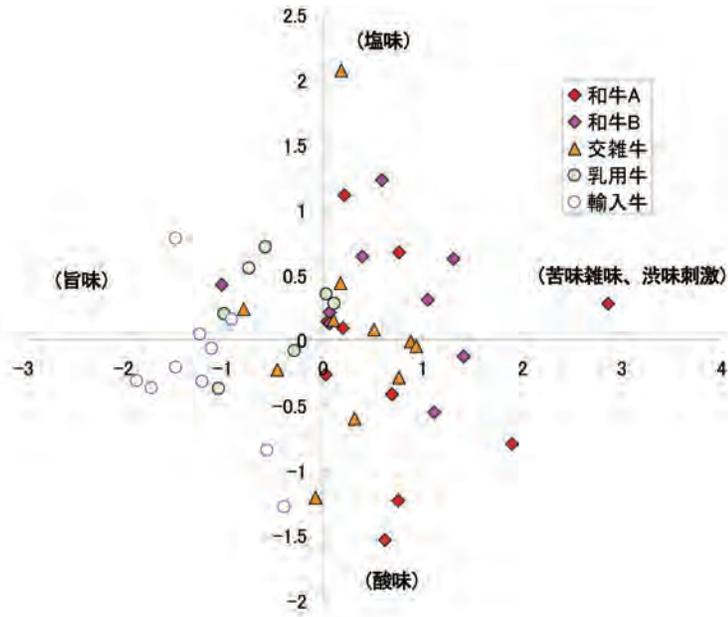


図2. 味認識装置による測定値の主成分分析

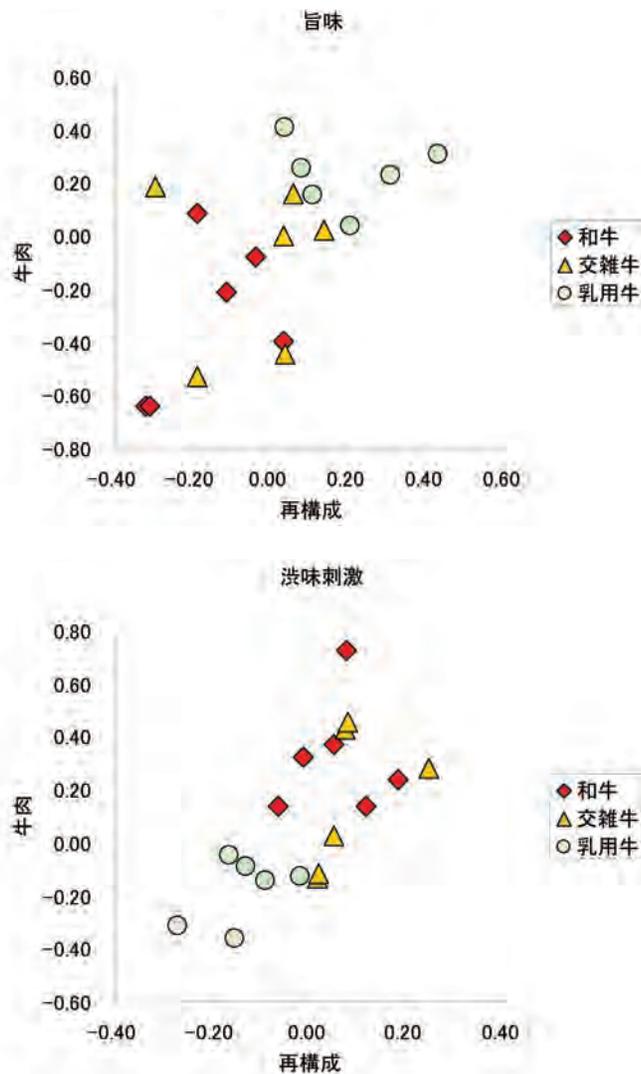


図3. 再構成肉と無処理肉の味認識装置データの比較

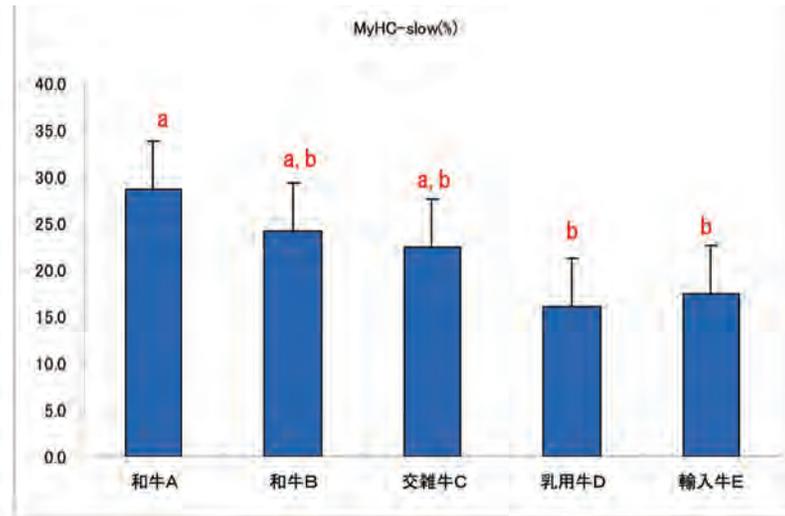


図4. 遅筋型ミオシン重鎖の割合

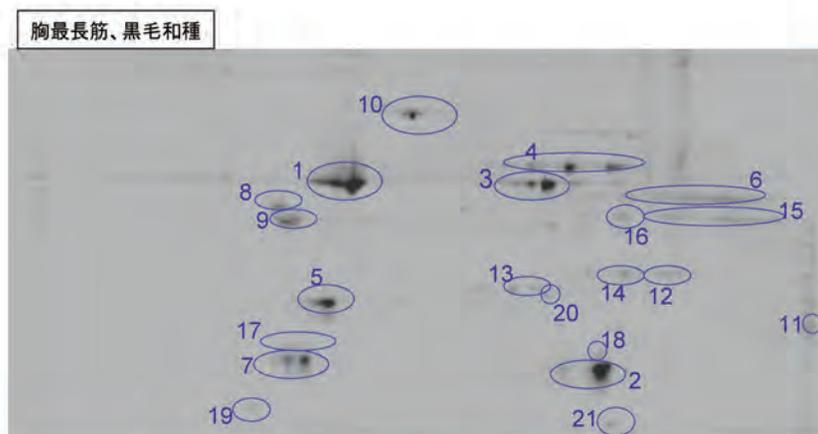
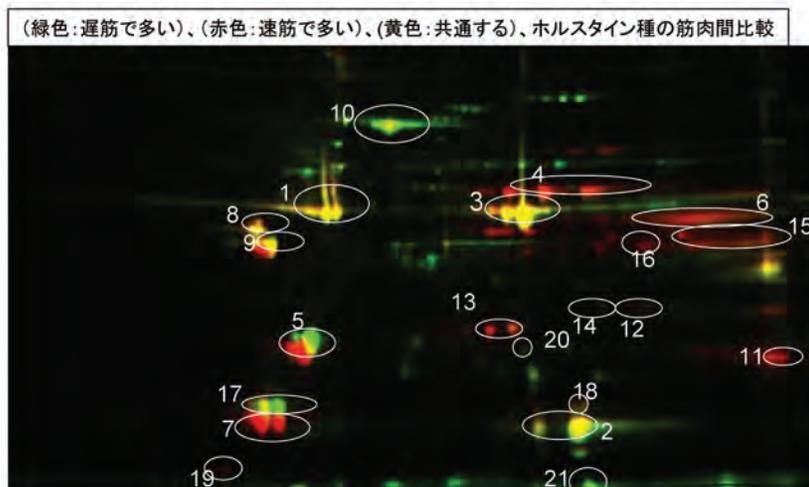


図5. 牛肉の二次元電気泳動図 (プロテオーム解析)

* スポット番号は表3と共通する。

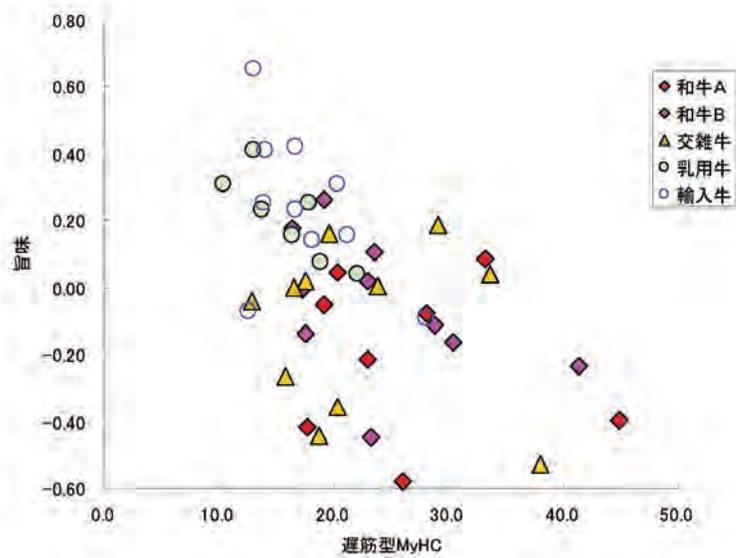
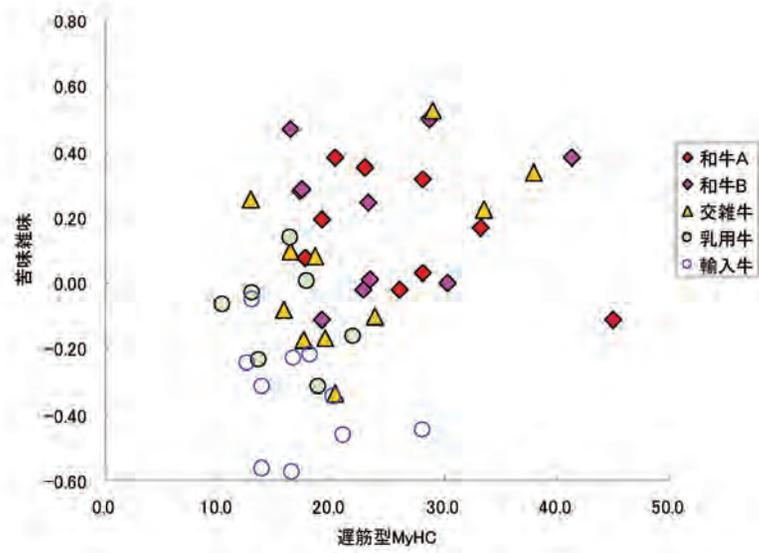
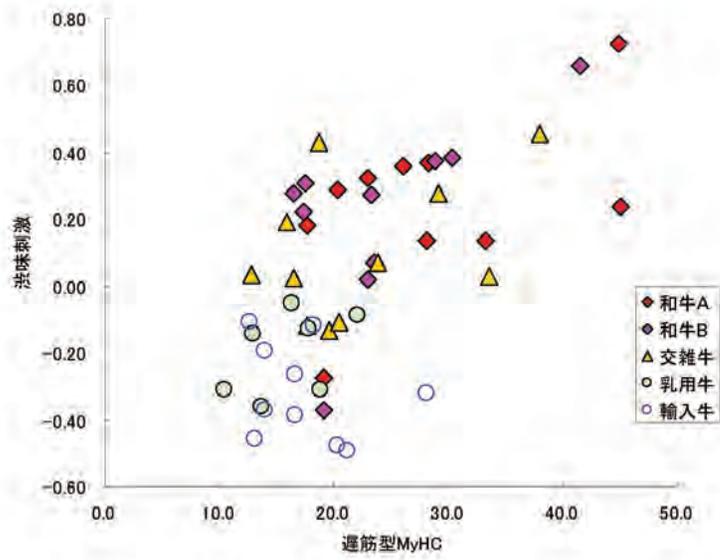


図6. 遅筋型ミオシン重鎖%と味認識装置の測定値

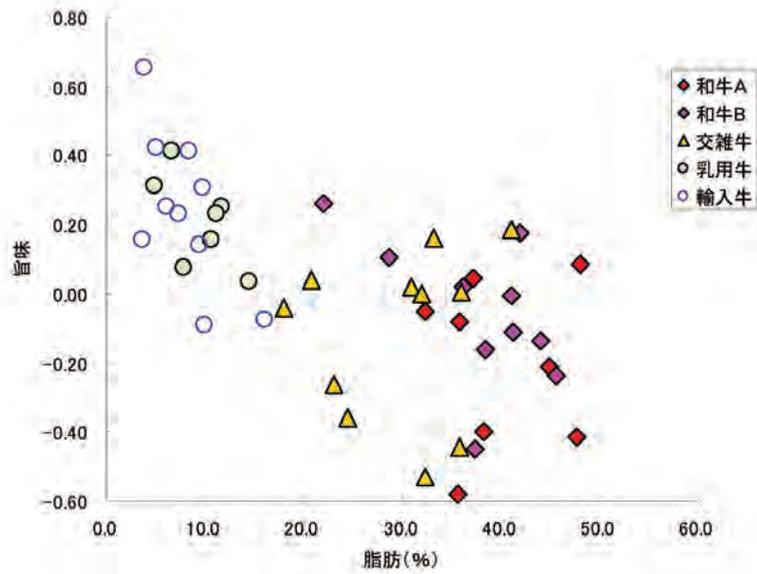
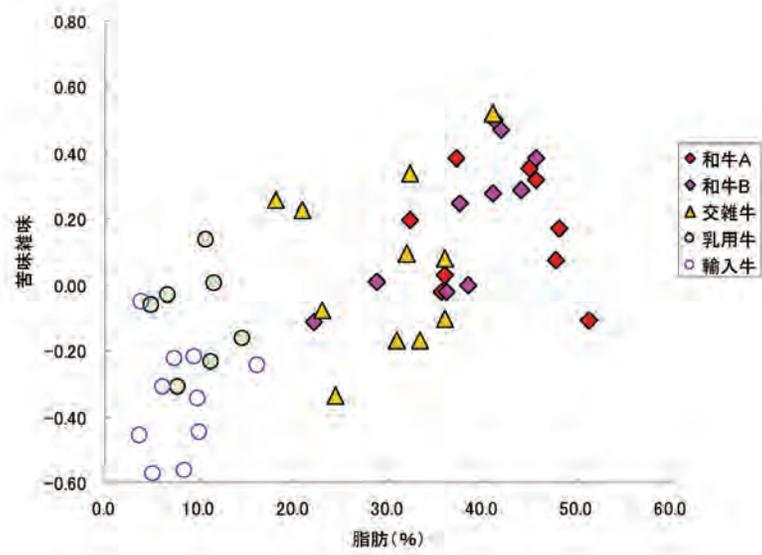
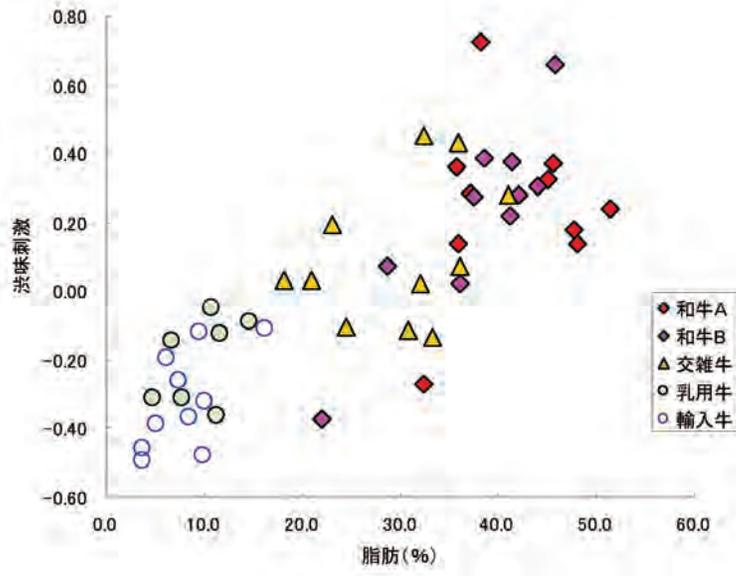


図7. 脂肪%と味認識装置の測定値

食肉由来食欲／エネルギー消費調節成分による 高脂血症予防法開発

研究期間 平成19年8月1日～平成20年3月10日

研究担当者 神戸大学大学院農学研究科 栄養代謝学 教授 長谷川 信

要約

本研究では、食肉成分を用いた、中枢での食欲抑制と末梢でのエネルギー消費促進の両面からの、ヒトの高脂血症の予防法の開発を最終目的として、牛肉エキスのHPLC分画物について、先ず、鶏の脳室内への投与に基づいて食欲抑制因子の特定とその作用機構を解明し、次に、エネルギー消費関連組織(肝臓、脂肪組織及び筋肉)の培養細胞系への添加に基づいてエネルギー消費促進因子の特定とその作用機構を解明し、最後に、両因子をラットに給与して血中脂質成分低下作用を確認することを試みた。その結果、牛肉エキスの逆相クロマトグラフィー分画物を種々の品種の鶏(卵用種雛、肉用種雛及び卵用種成鶏)の側脳室内に投与し、飼料摂取量に及ぼす影響について調べたが、いずれの画分も実験に用いた総ての品種の鶏の摂食量に影響を及ぼさなかった。又、牛肉エキス及びその逆相クロマトグラフィー分画物の、培養肝細胞、培養脂肪細胞及び培養筋肉細胞におけるミトコンドリア脂肪酸酸化関連酵素群、ミトコンドリア熱産生タンパク質、ペルオキシソーム脂肪酸酸化関連酵素及び脂肪分解関連遺伝子転写調節因子群の各遺伝子発現に及ぼす影響を調べ、牛肉エキスの添加のみが、培養肝細胞におけるミトコンドリア脂肪酸酸化関連酵素であるカルニチンパルミトイルCoA転移酵素1(CPT1)及び長鎖脂肪酸アシルCoA脱水素酵素(LCAD)の遺伝子発現量を有意に増加させたことから、牛肉エキスは肝臓の脂肪酸酸化を促進することが示唆された。更に、牛肉エキスの給与がラットの血中脂質成分と肝臓CPT1及びLCAD遺伝子の発現に及ぼす影響について調べ、牛肉エキスが血中総コレステロール濃度を有意に低下させること、及び、肝臓CPT1及びLCAD遺伝子の発現を促進させることが明らかになったことから、牛肉は血中コレステロール低下作用及び脂肪酸酸化促進作用を有することが示唆された。これらのことから、食肉由来成分による高脂血症予防法を確立できる可能性が極めて高いと判断された。

キーワード： 牛肉, 高脂血症, 脂肪酸酸化, 肝臓, CPT1, LCAD

1. 緒論

高齢化社会を迎えつつある我が国では、極く近い将来において介護医療に掛かる費用の急激な増大が避け得ないことから、これを可能な限り抑制することが社会的緊急課題となっている。厚生労働省の調査に拠れば、介護医療が必要となる疾患の主要なものとして脳血管疾患、心疾患及び痴呆症があり、これらの全体に対する割合は40%にも及ぶことが明らかとなっていることから、これら疾患を引き起こす主因とされている動脈硬化を予防することが、上述の課題を解決する為の極めて有効な手段となり得る。この動脈硬化と高脂血症[高コレステロール/高トリグリセリド(TG)血症]との間には高い相関が認められることから、これを予防するべく、血中脂質低下が極めて重要な課題となりつつある。

ここで、長寿国である我が国の中でも最も平均寿命の長い沖縄県人の食生活と長寿に関する疫学的調査に基づき、意外にも、動脈硬化などの予防に対する食肉摂取の有効性が明らかにされつつあるが、その機構の詳細については不明である。また、最近、牛肉エキスの給与が高脂肪食肥満ラットの内臓脂肪重量を減少させることが明らかにされ、その機構として、脂肪酸酸化の促進が示唆された(Yoshihara et al., 2006)。このことから、牛肉中にはエネルギー消費促進因子が存在することが推察される。しかしながら、内臓脂肪の蓄積は高脂血症の危険因子として知られているが(Després and Lemieux, 2006)、牛肉エキスの給与が血中脂質成分に及ぼす影響については明らかになっていない。

最近、動物の中枢における食欲調節と末梢におけるエネルギー代謝調節が密接に関連すること、具体的には、中枢への摂食抑制シグナルの入力が食欲を抑制し、又、末梢におけるエネルギー消費を促進し(Schwartz and Porte, 2005)、結果として、摂食量の減少は食餌由来血中脂質濃度の低下を、エネルギー消費の促進は血中TG濃度の低下をそれぞれ引き起こすことが明らかにされた。そして、実際に、中枢においては食欲を抑制し、末梢においてはエネルギー消費を促進する、新たな高脂血症予防剤の開発が進められつつある(Bray and Tartaglia, 2000)。また、食品の中でも、最近、中枢へのシグナルの入力が末梢組織におけるエネルギー消費を促進し得ることが明らかにされている(Shen et al., 2005a; 2005b)。ここで、我々は、分離大豆蛋白質に比べ、牛肉の摂取が摂食抑制ペプチドに対する感受性を高めること、及び、牛肉エキスの給与は、鶏の体重に影響を与えずに摂食量を減少させることから、牛肉中には食欲抑制因子が存在することを示唆している(Honda et al., 2000a, 2000b)。これらのことから、牛肉中に存在する食欲抑制因子がエネルギー消費促進にも関与している可能性も考えられる。

そこで、本研究では、食肉成分を用いた、中枢での食欲抑制と末梢でのエネルギー消費促進の両面からの、ヒトの高脂血症の予防法の開発を最終目的として、牛肉エキスのHPLC分画物について、先ず、鶏の脳室内への投与に基づき食欲抑制因子の特定とその作用機構を解明し、次に、エネルギー消費関連組織(肝臓、脂肪組織及び筋肉)の培養細胞系への添加に基づきエネルギー消費促進因子の特定とその作用機構を解明し、最後に、両因子をラットに給与して血中脂質成分低下作用を確認することを試みた。

尚、本研究は、これまでそれぞれ別の専門領域として捉えられてきた食欲と脂質代謝を、エネルギー代謝の一環として統合し、日常的に食されている安全・安心な食品素材である食肉成分を用い、末梢におけるエネルギー消費促進と中枢における食欲抑制の両面から、ヒトの高脂血症の予防法を確立しようとする極めて独創的なものである。そして、この様な食肉成分を用いた高脂血症の予防法が確立されれば、我が国にとって緊急の課題となっている医療費の低減に現実的な改善法を提供できることになる。加えて、食欲調節とエネルギー消費の両機構は多くの動物種間においてほぼ共通することが知られており、本研究の結果、これらの両機構の密接な相互関係の一端が明らかにされれば、動物(家

畜・家禽)生産における生産性向上(例えば、食欲抑制とエネルギー代謝促進に基づく、乳牛、肥育豚及びブロイラーにおける余剰脂肪蓄積の解消による飼料効率の改善)にも大きく寄与できることから、本研究の社会的意義は極めて高いと言える。又、本研究の結果、牛肉がエネルギー消費促進と食欲抑制の両機能を有することが明らかにされれば、未だ不明の点が多い食肉と長寿の関係を解明する為の新しい糸口を提示できることになり、高い学術的評価を受けるものと期待される。

2. 研究計画

1) 牛肉からの食欲抑制因子の分離・精製とその食欲抑制機構の解明……………実験1

牛肉エキスの逆相クロマトグラフィー (HPLC) 分画物を、種々の品種の鶏 (卵用種雛、肉用種雛及び卵用種成鶏) の側脳室内に投与し、投与後2時間に渡り飼料摂取量を測定する。投与2時間後に鶏を断頭屠殺し、食欲抑制が認められた鶏の視床下部における種々の食欲調節関連神経ペプチド [神経ペプチドY (NPY)、アグーチ関連蛋白質 (AgRP)、プロオピオメラノコルチン (POMC)、コカイン-アンフェタミン関連転写物 (CART) 及び副腎皮質刺激ホルモン放出因子 (CRF)] の遺伝子発現を調べることに基づき、食欲抑制因子を分離・精製すると共に、その食欲抑制機構を明らかにする。尚、鶏における種々のペプチドホルモンによる食欲調節機構に関する申請者らによる一連の研究から、鳥類や哺乳類等の脊椎動物種間で中枢食欲調節機構が高度に保存されていること (Honda *et al.*, 2007; Kamisoyama *et al.*, 2007)、哺乳類に比べ鳥類は摂食抑制ペプチドに対する感受性が数倍～数十倍高いこと等が明らかにされている (Furuse *et al.*, 1997)。それ故、本研究のモデル動物として、従来からの実験動物であるマウスやラットではなく、鶏を用いることとした。

2) 牛肉からのエネルギー消費促進因子の分離・精製とそのエネルギー消費促進機構の解明……………実験2

実験1の分画物について、培養肝細胞 (Fao)、培養脂肪細胞 (3T3-L1) 及び培養筋肉細胞 (C₂C₁₂) を用い、ミトコンドリア脂肪酸酸化関連酵素群 [カルニチンパルミトイルCoA転移酵素1 (CPT 1)、長鎖脂肪酸アシルCoA脱水素酵素 (LCAD) 及び中鎖脂肪酸アシルCoA脱水素酵素 (MCAD)]、ミトコンドリア熱産生タンパク質 [脱共役蛋白質 (UCP) 1、2及び3]、ペルオキシソーム脂肪酸酸化酵素 [アシルCoA酸化酵素 (ACO)] 及び脂肪分解関連遺伝子転写調節因子群 [ペルオキシソーム増殖活性化受容体 (PPAR) α 及び δ] の各遺伝子発現を指標に、エネルギー消費促進因子の分離・精製を行なうと共に、そのエネルギー消費促進機構を明らかにする。

3) 高脂血症予防法の開発……………実験3

実験1及び2で牛肉エキスから分離・精製された2因子、即ち食欲抑制因子とエネルギー消費促進因子を種々の濃度で添加した高脂肪食をラットに給与し、飼料摂取量及び血中脂質成分 (総コレステロール、LDL-コレステロール、VLDL-コレステロール、HDL-コレステロール及びトリグリセリド) 濃度を指標に、それらの最適添加量を検討することに基づき、ヒトの高脂血症の予防法を開発する。

3. 結果及び考察

牛肉からの食欲抑制因子の分離・精製とその食欲抑制機構の解明 (実験1) については、牛肉エキスを逆相クロマトグラフィーにより8つの画分に分画し (図1)、これを、種々の品種の鶏 (卵用種雛、肉用種雛及び卵用種成鶏) の側脳室内に投与し、飼料摂取量に及ぼす影響について調べた。しかしながら、いずれの画分も鶏の摂食量に影響しなかった (図2~4)。それ故、視床下部における食欲調節関連神経

ペプチド群の遺伝子発現を調べるまでには至らなかった。ここで、哺乳類と鳥類における主要な摂食抑制ペプチドとして知られるグルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) による摂食抑制効果が牛肉摂取により高められたこと (Honda *et al.*, 2000a)、又、牛肉エキスの給与が鶏 (白色レグホーン種) の体重に影響を与えることなく摂食量を減少させること (Honda *et al.*, 2000b) から、牛肉中には未知の食欲抑制因子が含まれる可能性が高いと推察されていた。加えて、鶏においては、種々の食欲調節ペプチドに対する感受性が品種或いは日齢によって異なることが報告されている (Tachibana *et al.*, 2001a, 2001b ; Denbow *et al.*, 2000)。そこで、本研究において、複数の品種と日齢の鶏 (卵用種雛、肉用種雛及び卵用種成鶏) を用いて牛肉エキス分画物の中枢投与が鶏の摂食に及ぼす影響を調べたが、いずれの画分も食欲抑制作用を示さなかったことから、牛肉エキスに含まれる未知の食欲抑制因子は、直接中枢に作用するのではなく、例えば、食欲調節に関与する消化管ホルモンの分泌や消化管から中枢への迷走神経系を介したシグナル伝達に影響を及ぼすことにより食欲抑制ペプチド (例えばGLP-1) に対する感受性を高めることにより、間接的に食欲を抑制する可能性が推察された。

牛肉からのエネルギー消費促進因子の分離・精製とそのエネルギー消費促進機構の解明 (実験2) については、実験1で調製した牛肉エキスの各画分を含む培養液で、肝細胞、脂肪細胞及び筋肉細胞を培養し、ミトコンドリア脂肪酸酸化関連酵素群、ミトコンドリア熱産生タンパク質、ペルオキシソーム脂肪酸酸化関連酵素及び脂肪分解関連遺伝子転写調節因子群の各遺伝子発現に及ぼす影響を調べた。しかしながら、牛肉エキスの各画分の添加は、総ての培養細胞 (肝細胞、脂肪細胞及び筋肉細胞) において、いずれの遺伝子の発現にも影響を及ぼさなかった。そこで、分画前の牛肉エキスを用いて同様の実験を行なった結果、脂肪細胞及び筋肉細胞におけるいずれの遺伝子の発現にも影響しなかったが、培養肝細胞におけるミトコンドリア脂肪酸酸化関連酵素 (CPT1及びLCAD) の遺伝子発現量を有意に増加させることを見出した (図5)。これらの結果から、牛肉エキスは肝臓の脂肪酸酸化関連遺伝子の発現を促進するが、その効果は特定の因子によるものではなく複数の因子の相加的或いは相乗的効果であることが推察された。ここで、Yoshiharaらは、牛肉エキスがラット肝臓におけるカルニチンパルミトイルCoA転移酵素2 (CPT2) の活性上昇をもたらすことから、脂肪酸酸化促進能、即ちエネルギー消費促進能を有すると示唆したが (Yoshihara *et al.*, 2006)、ミトコンドリアへの脂肪酸の輸送にはCPT1とCPT2の両酵素が関与しており、その輸送量の調節は主としてCPT1により調節されるとされていることから (Bonfont *et al.*, 2004)、CPT2活性の上昇のみで牛肉エキスが脂肪酸酸化促進能を有するとすることに無理があった。しかし、本研究において、培養肝細胞を用いた *in vitro* 条件下においては、脂肪酸分解経路の律速酵素であるCPT1、及びミトコンドリアにおける脂肪酸酸化の律速酵素であるLCADの遺伝子発現が共に増加することが確認されたことから、ここに初めて牛肉エキスが脂肪酸酸化促進能、即ちエネルギー消費促進能を有することが証明されたことになる。

高脂血症予防法の開発 (実験3) については、牛肉エキスの高脂血症予防効果とその機構解明を目的に、実験1及び2で分離・精製された牛肉エキス中の2因子、即ち食欲抑制因子とエネルギー消費促進因子の給与がラットの飼料摂取量及び血中脂質成分に及ぼす影響について調べる予定であったが、実験1において何れの牛肉エキス画分も摂食抑制効果を示さず、又、実験2において分画前の牛肉エキスのみが肝臓の脂肪酸酸化関連遺伝子の発現を促進することが *in vitro* 条件下で明らかになったことから、牛肉エキスの給与がラットの飼料摂取量、血中脂質成分及び肝臓CPT1及びLCADの遺伝子発現に及ぼす影響について調べることにした。その結果、牛肉エキスの給与は、血中コレステロール濃度を有意に低下させたが (図6)、その他の血中脂質成分や飼料摂取量に影響を及ぼさなかった。この血中コレステロール低下の原因としては、肝臓におけるコレステロールの合成抑制、コレステロールの胆汁酸への異化促進、或いは、LDL受容体を介した血中コレステロールの肝臓への取込促進が推察さ

れる (Duval *et al.*, 2007)。それ故、今後、これらの点について検討することにより、牛肉エキスの血中コレステロール低下機構の全容を解明する必要があると考えられた。又、牛肉エキスの給与は、肝臓CPT1及びLCAD遺伝子の発現を促進させた(図7)。実験2で明らかになった様に、牛肉エキスは*in vitro*条件下において肝細胞のCPT1及びLCAD遺伝子の発現を促進したことから、牛肉エキス中に存在するこれらの脂肪酸酸化関連酵素の遺伝子発現を促進する因子が*in vivo*条件下においても肝臓の脂肪酸酸化を促進させたと考えられた。ここで、肝臓の遊離脂肪酸は血中TGの原料となるが (Duval *et al.*, 2007)、今回、牛肉エキス給与により肝臓の脂肪酸酸化関連酵素であるCPT1及びLCADの遺伝子発現が促進されたことから、肝臓の遊離脂肪酸量が減少し、結果として、血中TG濃度の低下が予想された。しかしながら、本研究においては、牛肉エキス給与により血中TG濃度は低下する傾向を示したものの、その効果は有意なものではなかった(図8)。この原因については不明であるが、肝臓から血中へ放出されるTGが減少している可能性が高いこと、及び、本研究においては屠殺前にラットを24時間絶食しており、食餌から血中へ吸収されたTGが血中TG濃度に寄与している可能性は低いことから、血中から脂肪組織を始めとする末梢の臓器組織へのTGの取込量が減少している可能性が推察された。ここで、Yoshiharaらはラットへの牛肉エキスの給与が脂肪組織重量を減少させたことを報告しており (Yoshihara *et al.*, 2006)、今回の我々の結果を考え合わせると、このような脂肪蓄積抑制に、脂肪組織への血中TGの取込量減少が関与している可能性もあり、今後、この点について検討することにより、牛肉エキスによる新たな脂肪蓄積抑制機構が明らかにされる可能性もあると考えられた。又、今回、飼料の総エネルギーの20%を脂肪で給与するという高脂肪食としては比較的低めの脂肪含有率の飼料を用いた為、対照群の血中TGの値(約50mg/dl)が標準食給与ラットのそれ(約40mg/dl)に比べ著しくは上昇しなかった。今後、より脂肪含有率の高い高脂肪食を給与することにより血中TG濃度を、例えば70mg/dl程度にまで高めることができれば、牛肉エキスの血中TG濃度低下効果がより顕著に表れる可能性もあると考えられた。更に、今回、牛肉エキスの給与がラットの飼料摂取量に影響を及ぼさなかった原因は不明であるが、高脂肪食を給与したラットにおいて、中枢の主要な摂食抑制ニューロンであるメラノコルチンニューロンがレプチン抵抗性となることによって、末梢からの食欲抑制シグナルが中枢に伝達しなくなることが示唆されていることから (Enriori *et al.*, 2007; Honda *et al.*, 2000a)、例えば、今回の様な高脂肪食給与条件下においても牛肉エキスによる食欲抑制が中枢で遮断されている可能性も考えられた。

本研究の結果、牛肉の新たな機能性として、肝臓における脂肪酸酸化関連酵素の遺伝子発現の促進と血中コレステロールの低下を見出したことから、食肉由来成分による高脂血症予防法を確立できる可能性が極めて高いと判断された。

4. 参考文献

Bonnefont JP, Djouadi F, Prip-Buus C, Gobin S, Munnich A, Bastin J : Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2 : biochemical, molecular and medical aspects. *Mol Aspects Med*, 25, 495-520, 2004.

Bray GA, Tartaglia LA : Medicinal strategies in the treatment of obesity. *Nature*, 404, 672-7, 2000.

Denbow DM, Meade S, Robertson A, McMurtry JP, Richards M, Ashwell C : Leptin-induced decrease in food intake in chickens. *Physiol Behav*, 69, 359-62, 2000.

- Després JP, Lemieux I : Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature*, 444, 881-7, 2006.
- Duval C, Muller M, Kersten S : PPAR α and dyslipidemia. *Biochim Biophys Acta*, 1771, 961-71, 2007.
- Enriori PJ, Evans AE, Sinnayah P, Jobst EE, Tonelli-Lemos L, Billes SK, Glavas MM, Grayson BE, Perello M, Nillni EA, Grove KL, Cowley MA : Diet-Induced Obesity Causes Severe but Reversible Leptin Resistance in Arcuate Melanocortin Neurons. *Cell Metab*, 5, 181-94, 2007.
- Furuse M, Matsumoto M, Okumura J, Sugahara K, Hasegawa S : Intracerebroventricular injection of mammalian and chicken glucagon-like peptide-1 inhibits food intake of the neonatal chick. *Brain Res*, 755, 167-9, 1997.
- Honda K, Kamisoyama H, Saito N, Kurose Y, Sugahara K, Hasegawa S : Central administration of glucagon suppresses food intake in chicks. *Neurosci Lett*, 416, 198-201, 2007.
- Honda K, Suzuki M, Kamisoyama H, Motoki T, Kano K, Yagi K, Sugahara K, Furuse M, Hasegawa S : Influences of dietary protein types on the suppressive food intake induced by intracerebroventricular administration of glucagon-like peptide-1 in chicks. *Jpn Poult Sci*, 37, 251-7, 2000a.
- Honda K, Suzuki M, Kamisoyama H, Kato H, Iba S, Motoki T, Kano K, Yagi K, Sugahara K, Hasegawa S : Effects of dietary de-fatted beef and its fractions on plasma and hepatic triglyceride contents in chicks. *Jpn Poult Sci*, 37, 245-250, 2000b.
- Kamisoyama H, Honda K, Saneyasu T, Sugahara K, Hasegawa S : Central administration of neuromedin U suppresses food intake in chicks. *Neurosci Lett*, 420, 1-5, 2007.
- Schwartz MW, Porte D Jr : Diabetes, obesity, and the brain. *Science*, 307, 375-9, 2005.
- Shen J, Niijima A, Tanida M, Horii Y, Maeda K, Nagai K : Olfactory stimulation with scent of grapefruit oil affects autonomic nerves, lipolysis and appetite in rats. *Neurosci Lett*, 380 : 289-94, 2005a.
- Shen J, Niijima A, Tanida M, Horii Y, Maeda K, Nagai K : Olfactory stimulation with scent of lavender oil affects autonomic nerves, lipolysis and appetite in rats. *Neurosci Lett*, 383 : 188-93, 2005b.
- Tachibana T, Sugahara K, Ohgushi A, Ando R, Sashihara K, Yoshimatsu T, Furuse M : Intracerebroventricular injection of exendin(5-39) increases food intake of layer-type chicks but not broiler chicks. *Brain Res*, 915, 234-7, 2001a.

Tachibana T, Sugahara K, Ohgushi A, Ando R, Kawakami S, Yoshimatsu T, Furuse M : Intracerebroventricular injection of agouti-related protein attenuates the anorexigenic effect of alpha-melanocyte stimulating hormone in neonatal chicks. *Neurosci Lett*, 305, 131-4, 2001b.

Yoshihara H, Wakamatsu J, Kawabata F, Mori S, Haruno A, Hayashi T, Sekiguchi T, Mizunoya W, Tatsumi R, Ito T, Ikeuchi Y : Beef Extract Supplementation Increases Leg Muscle Mass and Modifies Skeletal Muscle Fiber Types in Rats. *J Nutr Sci Vitaminol*, 52 183-193, 2006.

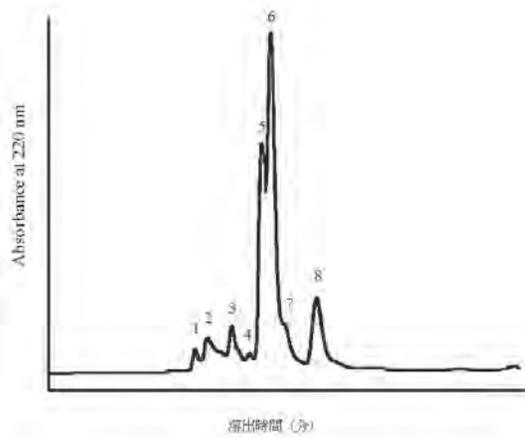


図1 逆相カラムクロマトグラフィーによる牛肉エキスの分画

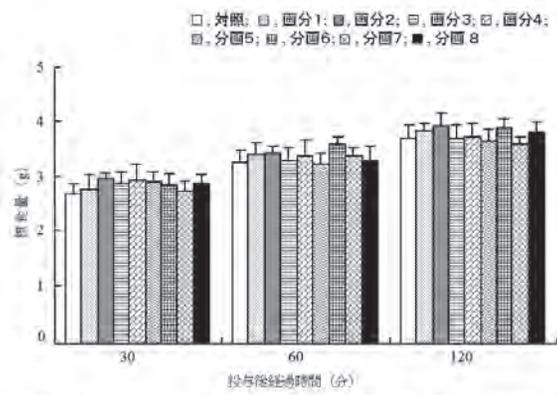


図2 牛肉エキスの分画物の中枢投与が卵用種鶏の摂食量に及ぼす影響

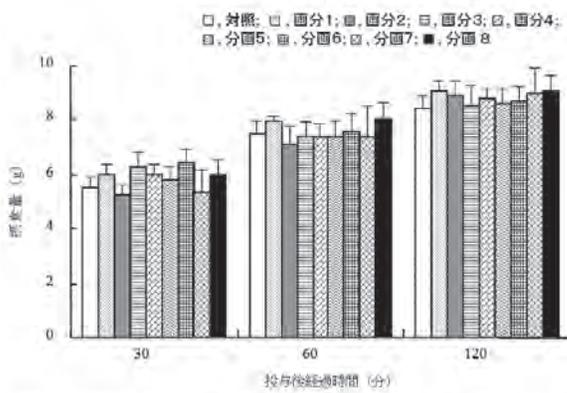


図3 牛肉エキスの分画物の中枢投与が肉用種鶏の摂食量に及ぼす影響

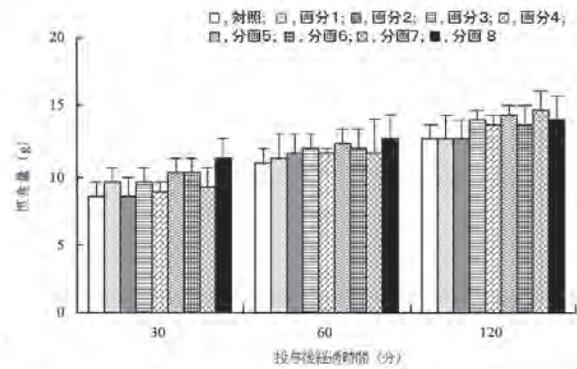
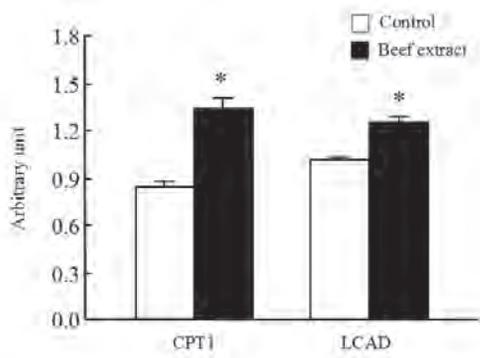
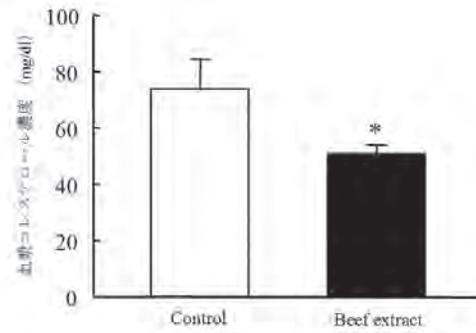


図4 牛肉エキスの分画物の中枢投与が卵用種鶏の摂食量に及ぼす影響



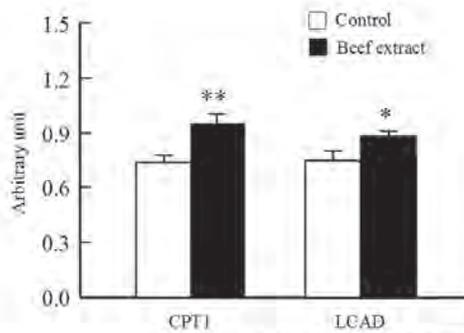
*. コントロールに対して有意差有り (p<0.05)

図5. 牛肉エキスが培養肝細胞のCPT1及びLCAD mRNAレベルに及ぼす影響



*. コントロールに対して有意差有り (p<0.05)

図6. 牛肉エキスの給与がラットの血漿コレステロール濃度に及ぼす影響



*. コントロールに対して有意差有り (p<0.05)

** . コントロールに対して有意差有り (p<0.01)

図7. 牛肉エキスの給与がラット肝臓のCPT1及びLCAD mRNAレベルに及ぼす影響

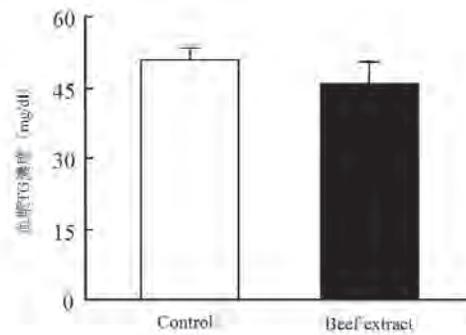


図8. 牛肉エキスの給与がラットの血漿TG濃度に及ぼす影響

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などを検証するため、大学など学術研究機関の研究者から一般公募により選考した委託研究の成果である。

眞鍋昇教授の「幼牛におけるタンパクの吸収とパイエル板の発達」は、子牛の加齢に伴うパイエル板の形態的变化、経口投与したタンパク質、核酸などの腸管からの吸収能の推移を明らかにし、BSE感染ルート解明の基盤情報を与えるもので、パイエル板の発達に関係なく腸管からの取り込みが予想以上に活発に行われていることを明らかにするなど、1年以内の短期間に注目すべき結果の得られたことは特筆に値する。

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」は、今回活性物質の同定で終わっているが、食肉の摂取で作用がどの程度発現するか、どう作用するかなど実際の効果の発現との関係で、今後の研究に待つところである。しかし、血圧降下、血糖値低下傾向の発現は大いに注目されよう。

千国幸一博士の「牛肉の味に及ぼす筋繊維型の効果の検証」は、味覚認識装置のデータを合わせて主成分分析を行い、アプローチとしてはおもしろい。和牛に遅筋の多い点を考慮しての研究と思われるが、成果は十分でないにしても、味を含めて和牛肉の優秀性を明らかにする研究は今後更に続ける必要が痛感される。

長谷川信教授の「食肉由来食欲／エネルギー消費調節成分による高脂血症予防法開発」は、同教授が実験技術の堪能な研究者として知られているので、表題の研究を今後も遂行されることが期待される。

以上本年度の研究成果を通じて1年未満の短期間にもかかわらず、その成果は十分評価されるし、更にテーマを絞り込み、本制度を活用してさらなる食肉研究が社会貢献に大いに資することを期待したい。

委託研究選考委員会