

氏 名(本籍) 森 松 文 毅

学位の種類 博 士 (農 学)

学位記番号 農 第 467 号

学位授与年月日 平 成 5 年 3 月 11 日

学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当

学位論文題目 食肉タンパク質の栄養生理学的研究

論文審査委員(主査) 教 授 木 村 修 一

教 授 山 内 文 男

教 授 目 黒 熙

論文内容要旨

序論

第二次世界大戦後、食生活の欧米化や生産・流通形態の近代化、GNPの増大に伴い食肉及びその加工品の消費量は激増した。しかしながら、飽食の時代を迎えて消費者の健康への関心が高まり、過剰摂取による弊害、とりわけ獣脂悪者説に代表される動物性脂肪・タンパク質摂取と高血圧症・高脂血症・脳卒中・心臓病・発癌などの成人病発症との関連が議論されるようになった。近年、食肉の大量消費国であるアメリカ・カナダ・オーストラリアでは、食肉の摂取そのものを全く否定する極端な運動の影響を受けて畜産大手メーカーの倒産、縮小が相次いでおり、いまだに欧米の半分しか食肉摂取量のない我が国でも、食肉が健康に害を及ぼすかのような風潮さえ見られる。

一方、食肉はタンパク質及び、動物性脂肪の供給源として重要な食品でありながら、その複雑で不均一な成分組成や構造、さらには飼料組成や部位により成分が大きく変動することなどから、栄養学的に系統的な研究は殆どなされておらず、必須アミノ酸を供給する為の良好な動物タンパク質食品としてのみ利用されているに過ぎない。このような状況の中で、特に成人病との関連に着目して食肉の栄養生理学的な意味や効果を明らかにし、更にこれを食生活に応用することは重要かつ意義のあることである。

本研究は、これらの背景のもとで食肉タンパク質を取り上げ、その栄養生理学的な検討を試みたものである。まず第一章では、食塩及びアルコールに対する嗜好を修飾することによる間接的な食肉タンパク質の影響について、また第二章では、血漿コレステロール濃度に及ぼす食肉タンパク質酵素加水分解物の上昇抑制作用に関する基礎的研究と、これを畜肉加工品に利用するための応用技術の確立を目的として行ったものである。

第一章

嗜好に及ぼす栄養条件としての食肉タンパク質の影響

食塩の過剰摂取は高血圧症や脳卒中発症の重要な要因であり、またアルコールが肝障害のリスクファクターであることはよく知られている。これまで木村らは、栄養条件としてのタンパク質レベルが食塩嗜好やアルコール嗜好に影響を及ぼすことを報告している。食肉タンパク質の栄養生理学的研究を始めるにあたって、食肉タンパク質が、卵タンパク質のように食塩やアルコールに対する嗜好や摂取量を修飾するか否か、更に植物タンパク質と比較してどの様に変動するかについて検討した。

第一節 食塩嗜好に及ぼす食肉タンパク質の影響

4週令の雄性SHR及びWistar系ラットに、全卵タンパク質(PEP)、豚肉(MP)、分離大豆タンパク質(SPI)、分離大豆タンパク質+メチオニン(Met)を与えて、蒸留水と0.5%,0.9%,1.4%,2.0%食塩水を自由に選択摂取させた。その結果、豚肉を摂取した場合に食塩嗜好は弱まり(Fig.1)、摂取量も減少することが明らかとなった。また、大豆タンパク質もアミノ酸組成を改善することによって、食塩摂取量が減少したことから、タンパク質は食塩に対する嗜好を修飾し、バランスのとれたタンパク質を食べることにより食塩嗜好及び、食塩摂取量が減少することが判った。

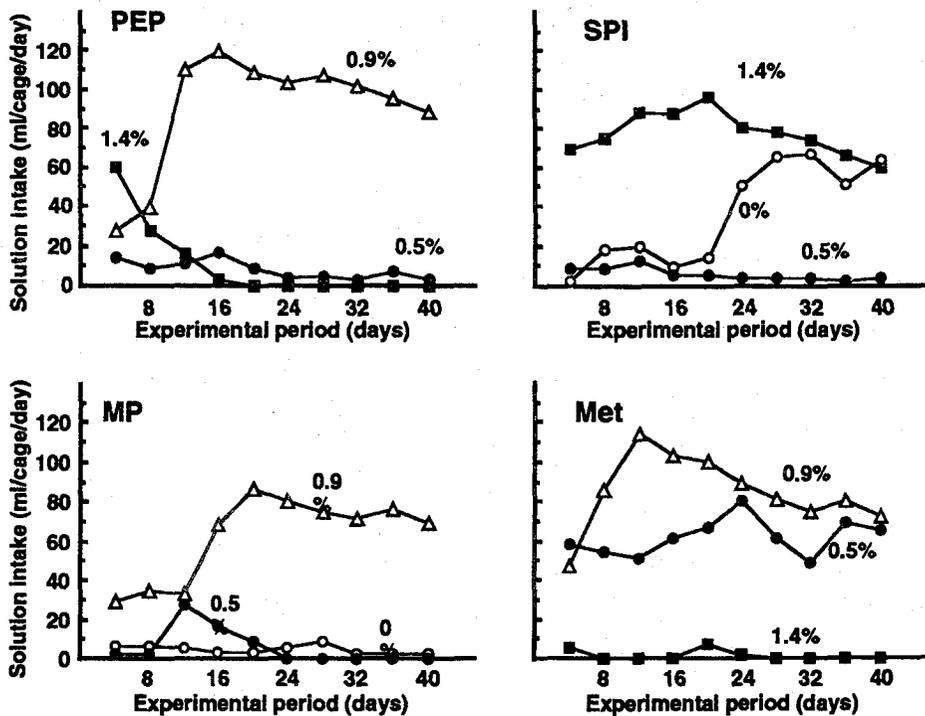
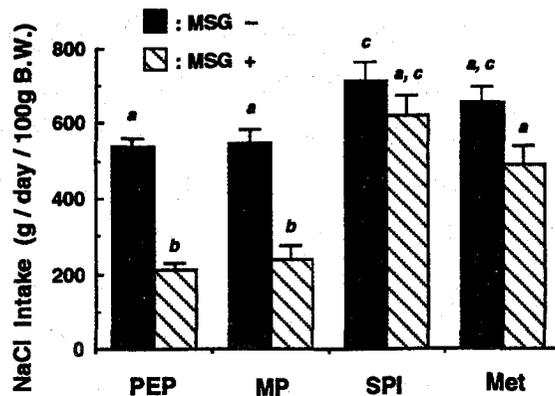


Fig. 1 The time course of preference for various concentration of aqueous NaCl solutions in SHR.

更に、旨味成分としてMSG (Monosodium glutamate)溶液が共存した場合、豚肉摂取群は高濃度の旨味溶液を好み、それに伴って積算の食塩摂取量も減少した。しかし、大豆タンパク質ではMSG溶液を嗜好せず、高濃度の食塩水だけを摂取していた(Fig.2)。

日本の本態性高血圧者が多い東北地方では食塩摂取量が多く、反対に卵、肉の摂取量が少ないという報告がある。今回の結果は疫学的調査を裏付けるものであり、動物タンパク質を摂取する事により食塩嗜好は弱まり、生理的に減塩が可能になること、更に旨味物質の共存でその減塩効果は強くなることが示唆された。



Superscript letter are significantly different at $p < 0.05$.

Fig. 2 Intake situation of NaCl in SHR with and without the use of the MSG solution.

第二節 アルコール嗜好と食肉タンパク質

2-1 アルコール溶液の選択行動

食塩嗜好の実験と同様に、アルコール溶液の選択実験を行った。動物性タンパク質を摂取した場合は、植物性タンパク質摂取時に比べてエタノール溶液、特に3%のエタノール溶液を嗜好し、摂取量も増加した。また、血中のトランスアミナーゼ活性は、エタノール溶液の摂取量が少ないにも関わらず大豆タンパク質で有意に上昇した。このことから、アルコールに対する嗜好もタンパク質の種類によって修飾され、豚肉を食べた場合には肝機能は障害を受け難く、多くのアルコールを飲むことが可能となることが判った。

2-2 肝機能に及ぼす食肉タンパク質の影響

豚肉摂取により、大量のアルコールが処理できるメカニズムを調べる目的で、エタノール溶液を経口投与し、経時的に尾静脈中のエタノール・アセトアルデヒド濃度を測定した。豚肉を摂取した場合に、血中エタノール濃度は、投与後30分で最大値となり、その後速やかに低下するのに対して、大豆タンパク質摂取群ではその消失速度は遅くなった(Fig.3)。また豚肉摂取時の血中アセトアルデヒド濃度は、大豆タンパク質群に比べて有意に低く、血中からの消失も早かった(Fig.4)。

これらのことは、食肉タンパク質の摂取により、血中エタノール、アセトアルデヒド濃度の消失速度が早くなり、エタノールの処理能力が高まることにより、多量のアルコールが処理できるようになることを示唆している。これらは良質のタンパク質源である豚肉の、アミノ酸組成に依存していると考えられる。

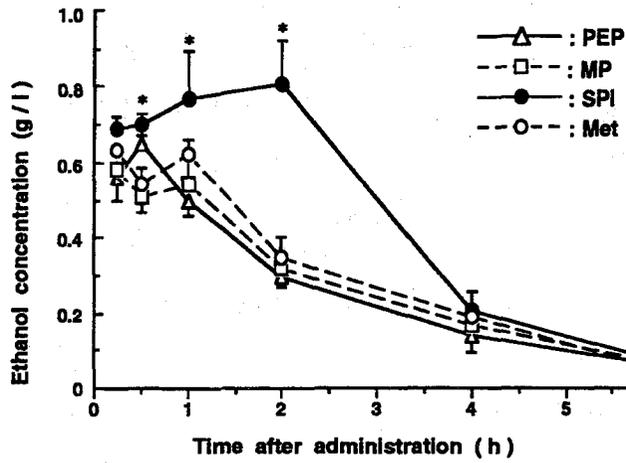


Fig. 3 The changes with passage of time in blood acetaldehyde concentrations.

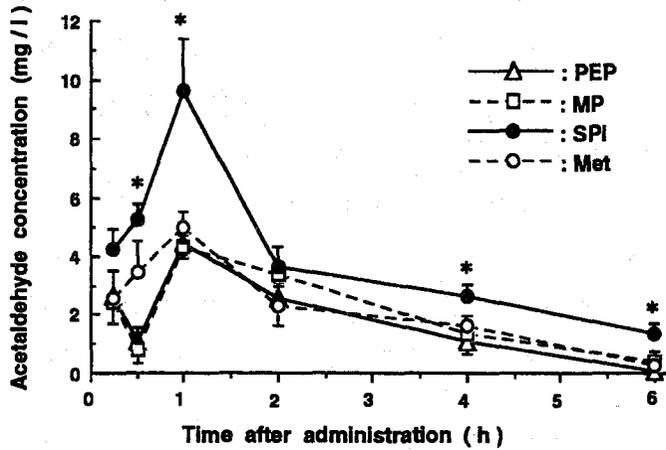


Fig. 4 The changes with passage of time in blood alcohol concentrations.

第二章

食肉タンパク質酵素加水分解物の 血漿コレステロール上昇抑制効果

高コレステロール血症は冠動脈性心疾患の危険因子であり、一般に動物性タンパク質は植物性タンパク質に比べ血漿コレステロール濃度を上昇させることはよく知られている。しかし、カゼインと分離大豆タンパク質に関する比較研究が大半を占め、豚肉タンパク質についての系統的な検討はあまりなされていない。一方、近年消費者の血漿コレステロール濃度に対する関心は急速に高まり、畜肉製品においてもコレステロールの低減化を図るために低脂肪の製品が試みられている。しかし、脂肪含有量を少なくした場合には畜肉本来の柔軟な歯応えや肉の味が劣化するなどの問題点が指摘されている。そこで第二章では、食肉タンパク質のタンパク質分解酵素加水分解ペプチドに着目して、その血漿コレステロール濃度に対する効果を検討し、その有効成分、作用機作を明らかにすると共に、畜肉製品に利用するための基礎及び応用技術の研究を行った。

第一節 食肉タンパク質の酵素加水分解物の血漿 コレステロール上昇抑制効果

1-1 タンパク質加水分解酵素の検討

食肉タンパク質の酵素加水分解物が血漿コレステロール上昇抑制効果を有するか否かを検討するため、豚肉のペプシン、トリプシン、パパイン加水分解物を用いて飼料を作成し、Wistar系ラットに投与した。その結果パパイン処理豚肉を摂取した場合に、血漿コレステロール濃度の上昇は豚肉に比べて有意に抑制されることが明らかとなった(Table 1)。

Table 1 Concentration of plasma total cholesterol, free cholesterol, triglyceride and phospholipids. (mg/dl)

	Total cholesterol	Free cholesterol	Triglyceride	Phospholipid
Pork (MP)	226 ± 9 ^a	29.8 ± 1 ^a	89.1 ± 2 ^a	162 ± 4 ^a
Pepsin (PE)	215 ± 8 ^{ab}	25.5 ± 1 ^b	86.3 ± 2 ^a	146 ± 5 ^b
Trypsin (TR)	209 ± 8 ^{ab}	23.0 ± 1 ^b	86.6 ± 2 ^a	143 ± 4 ^b
Papain (PA)	192 ± 11 ^b	22.3 ± 1 ^b	77.2 ± 2 ^b	132 ± 3 ^c

^{a,b,c} Value in the same column not sharing a common superscript letter are significantly different at $p < 0.05$

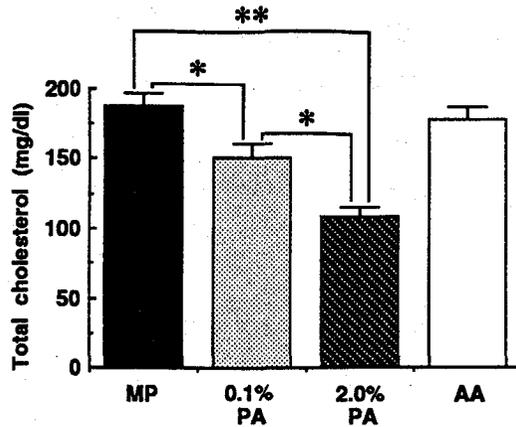


Fig. 5 Concentration of plasma total cholesterol

更にパイン添加量を増加させるとペプチドの生成量は増加し、それに伴い血漿コレステロール値も低値を示した(Fig.5)。しかし、豚肉を酸加水分解してアミノ酸混合物とした場合に、血漿コレステロール濃度は豚肉摂取時と同程度に上昇したことから、この効果はパイン酵素処理によって生成したペプチドによることが示唆された。

1-2 食肉タンパク質の種類を検討

この血漿コレステロール上昇抑制作用が、豚肉に特異的な効果であるか否かを検討するため、豚肉、牛肉、鶏肉を用いてパイン加水分解物の効果を調べた。インタクトの鶏肉は豚肉・牛肉に比べて血漿コレステロール濃度を低値に保った。各加水分解物による効果を比較すると、牛肉加水分解物は豚肉加水分解物と同様に有意に血漿コレステロールの上昇を抑制した。しかし、鶏肉加水分解物では血漿コレステロール上昇抑制効果は見られないことから、食肉タンパク質でも畜種によって作用が異なることが判った (Fig.6)。

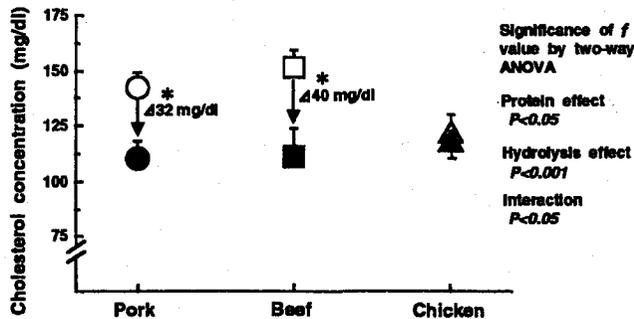


Fig.6 Effect of various meat protein and hydrolytic treatment on plasma cholesterol concentration.

第二節 血漿コレステロール上昇抑制ペプチドの分画とその効果

これまでに豚肉パイン加水分解ペプチドにラットの血漿コレステロール上昇抑制効果のあることが明らかとなった。そこで有効画分を検索するために、パイン加水分解物を遠心分離・限外濾過して(1)不溶性画分、(2)高分子画分、(3)低分子画分に分画して各分画物の血漿脂質への影響をSDラットを用いて検討した。酵素加水分解物からの収率はそれぞれ50.3%、3.6%、46.1%であった。

低分子画分は飼料摂取量が多いにもかかわらず体重増加は少なく、体重当たりの肝臓重量は有意に抑制された(Table 2)。血漿コレステロールは一週間目から低分子画分で有意に低下し、3週間目も低値を維持した(Fig.7)。また、肝臓中のコレステロールも低分子画分で有意に抑制され、更に不溶性画分・大豆タンパク質でも豚肉より低値を示した。このことから血漿・肝臓コレステロール上昇抑制効果は、主に低分子画分に依存していることが明らかとなった。

Table 2 Growth performance and liver weight of rats.

Group	Body weight (g)		Food intake (g/day)	Relative liver wt. (g/100g body wt.)
	Initial	Gain		
MP	79 ± 3	150 ± 4 ^a	18.5 ± 1.6	5.91 ± 0.12 ^{ab}
ISF	80 ± 3	145 ± 5 ^{ab}	18.8 ± 1.0	6.25 ± 0.19 ^b
LM	81 ± 3	133 ± 3 ^b	19.3 ± 0.9	4.96 ± 0.06 ^c
SPI	80 ± 2	137 ± 3 ^{ab}	18.4 ± 1.1	5.51 ± 0.14 ^a

^{a,b,c} Value in the same column not sharing a common superscript letter are significantly different at $p < 0.05$

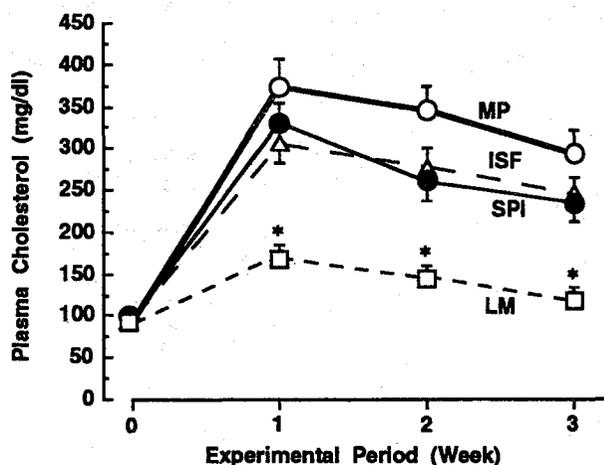


Fig. 7 The time course of plasma total cholesterol of rats fed each fraction.

上昇抑制のメカニズムを解析するために、血漿リポタンパク質の分布及び糞中ステロイド排泄について検討した。リポタンパク質のコレステロール分布は、低分子画分のVLDL、LDL画分で顕著に低下しており、HDL画分での低下は見られなかった(Fig. 8)。これは生体に対しては好都合であり、Chylomicron からHDLへの異化の促進や、VLDL、LDL放出の低下等が考えられるが、いずれにしても低分子画分はリポタンパク代謝にも大きな影響を与えている。また、糞中の中性・酸性ステロイドは、低分子画分で有意に多く排泄されていた。このことは、低分子画分の血漿・肝臓コレステロール上昇抑制効果はステロイドの排泄増加が主要因であることを示唆している。

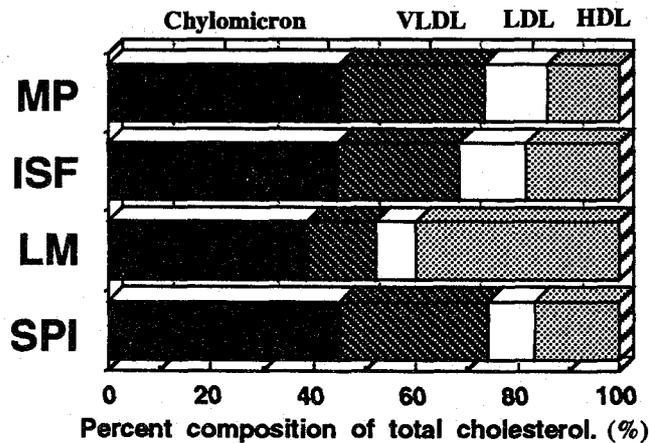


Fig. 8 Percent composition of cholesterol on plasma lipoprotein.

第三節 生理活性ペプチドの分離と分子量の推定

次に、低分子画分中の生理活性ペプチドを分離・精製して分子量の測定を試みた。TSKgel G2000SWでゲル濾過をおこなったところ、低分子画分には約9種のPeakが確認され、分子量は2,000~300程度であることが判った。また、血漿コレステロール上昇抑制効果の見られなかったペプシン・トリプシン分解物には、パパイン分解物で見られる分子量1,000前後のペプチドは確認されなかった(Fig. 9)。このことからこれらのペプチド群はパパイン加水分解によって特異的に産出されるペプチドであり、これらが血漿・肝臓コレステロール上昇抑制効果に重要な役割を果たしていることが示唆された。また、アミノ酸分析の結果からこのペプチド群は、豚肉に比べて疎水性アミノ酸の含有量が高いことが判った(Fig. 10)。

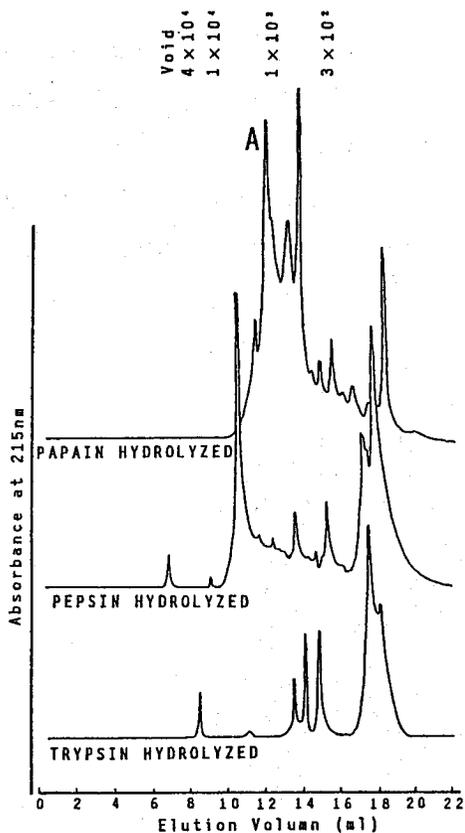


Fig. 9 Gel-filtration profiles of papain, pepsin trypsin hydrolyzed pork meat.

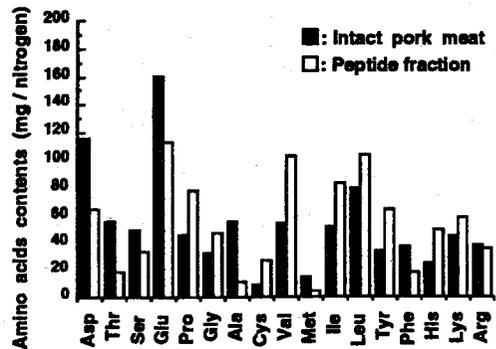


Fig. 10 Comparison of amino acids composition between peptide fraction and pork meat.

低分子画分は高い収率で得られ、また酵素加水分解後、濾過・遠心分離、及びフアウリングの少ない限外濾過など、簡易な分画法で得られるため実製品への応用に関してはこの粗低分子画分が非常に効果的であると考えられる。

第四節 低分子ペプチド画分の作用条件

更に、低分子画分の血漿・肝臓コレステロール上昇抑制作用に関する作用条件と作用機作の検討を行った。

4-1 低分子画分の用量依存性の検討

低分子画分の作用必要量及び、用量依存性を検討する目的で、飼料中20%の豚肉タンパク質のうち、50%、25%、5%を低分子画分と置き換えて実験した。低分子画分は5%の添加量で豚肉に比べて有意に血漿コレステロールの上昇を抑制し(Fig.11)、肝臓への蓄積も低下させた。この低添加量による効果は、製品に応用する場合にコストだけでなく味・香り・色調への影響を小さくできることから、非常に有効であると考えられる。

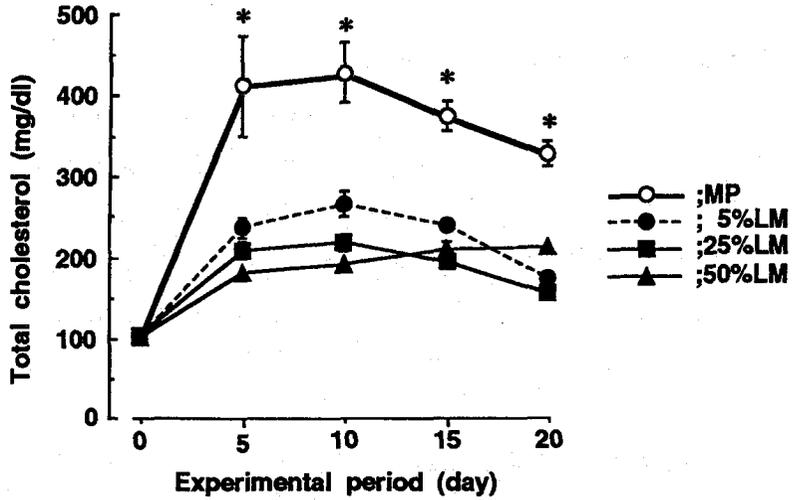


Fig. 11 Effects of different additional volume of low molecular fraction on plasma total cholesterol concentrations.

4-2 血漿コレステロール低下効果

既に上昇した血漿コレステロールに対する低下効果を調べるため、カゼイン、豚肉、低分子画分でコレステロール上昇の違いを検討した後、最もコレステロールの上昇したカゼイン群を同様の3群に再編成して血漿脂質成分への影響を検討した。上昇過程では低分子画分はカゼインに対しても有意に血漿・肝臓コレステロールの上昇を抑制し、再編成後も既に上昇したコレステロールを速やかに低下させたことから、低分子画分はコレステロール上昇抑制効果だけではなく、低下効果も有していることが明らかになった(Fig.12)。

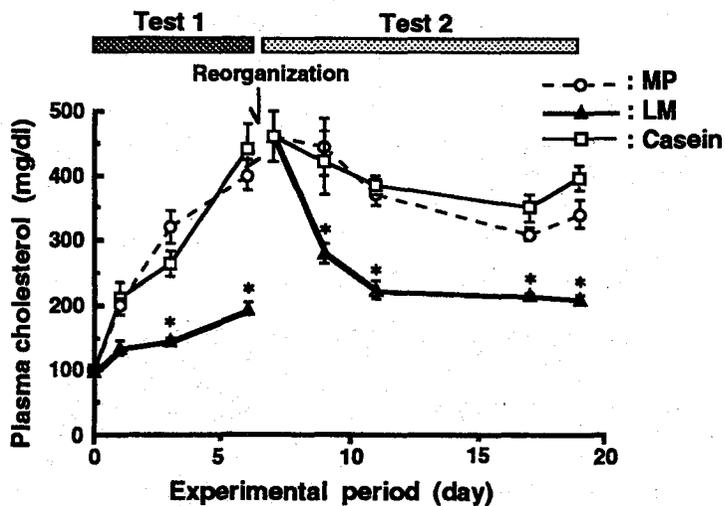


Fig. 12 Plasma cholesterol lowering effects of low molecular fraction.

4-3 コレステロール無添加食での影響

これまで、コレステロール添加食での低分子画分の血漿・肝臓コレステロール低下作用を明らかにしたが、次にコレステロール無添加食での効果を豚肉と比較検討した。

その結果、添加食摂取時のような大きな差は見られなかったが、低分子画分を摂取した場合に、血漿コレステロールは有意に低下した(Table 3)。また、糞中の胆汁酸の排泄は豚肉に比べて有意に増加した(Fig.13)。このことは、低分子画分は胆汁酸の排泄を促進して、コレステロール代謝に影響を及ぼしていることを裏付けている。

Table 3 Concentration of plasma and liver lipids of rats fed cholesterol free diets.

	Dietary groups (Number of rats)	
	MP (5)	LM (5)
Plasma (mg/dl)		
Cholesterol		
Total	143 ± 8	103 ± 5 *
Free	13.5 ± 1.1	9.2 ± 0.8 *
Triglyceride	153 ± 9	131 ± 8.6
Phospholipide	249 ± 48	177 ± 29
Liver (mg/g tissue)		
Cholesterol	23.1 ± 0.6	19.4 ± 0.5 *

* : significantly difference at $p < 0.05$ from MP.

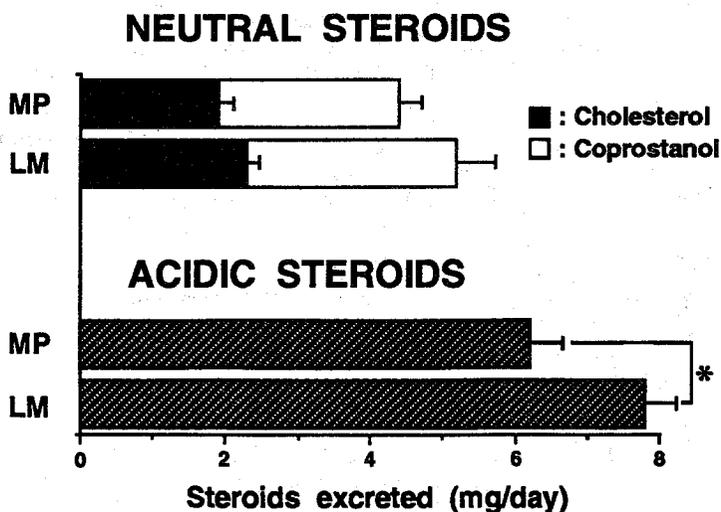


Fig. 13 Fecal excretion of neutral and acidic steroids.

4-4 低分子画分の胆汁酸結合能

低分子画分の胆汁酸排泄促進作用を調べるため、 ^{14}C でラベルしたタウロコール酸を用いて、*in vitro*での低分子画分との結合性を測定した。パパイン加水分解ペプチドは、ペプシン・トリプシンによる加水分解物よりも強い Bile acid binding activity を持つことが判った (Fig.14)。これは、低分子画分が胆汁酸と結合することによって、その排泄を促進することを示唆している。

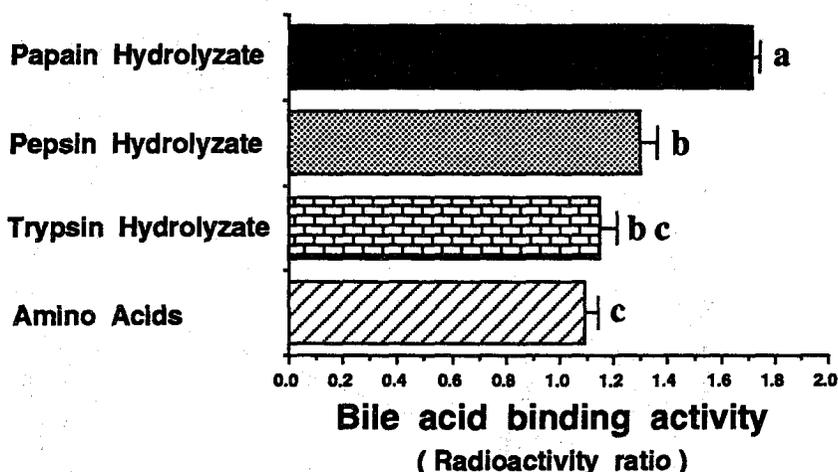


Fig. 14 Bile acid binding activity of peptide hydrolyzed various enzyme *in vitro* .

第五節 コレステロール吸収・排泄機構と作用機作

低分子画分の食餌コレステロールの吸収・排泄に及ぼす影響、及びコレステロール代謝に対する作用機作の検討を試みた。豚肉と低分子画分で飼育したラットに $[4-^{14}\text{C}]$ -Cholesterol を投与して、血液・糞・肝臓・消化管内の放射活性を経時的にトレースした。

血中の放射活性は、両群とも投与後6時間で最大となり、その値に差は見られなかったが、低分子画分では急速に低下し、24時間後には有意に低値を示した (Fig.15)。また低分子画分の摂取により糞中のコレステロールは速やかに排泄され、排泄量も投与24時間以降有意に高くなった (Fig.16)。同様に小腸内のコレステロールも24時間で低下したことから、低分子画分ではコレステロールの小腸内通過速度が速くなっていることが示唆された。

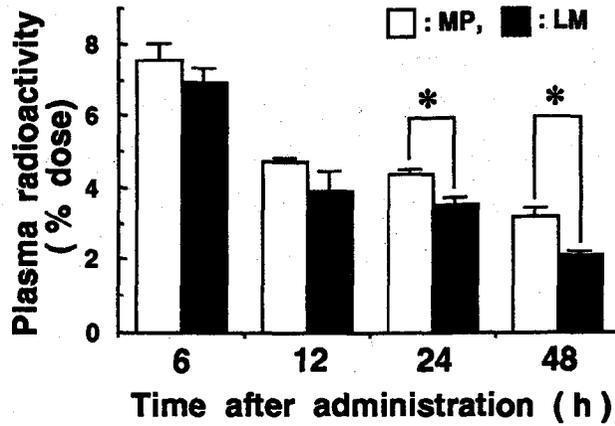


Fig. 15 Change of radioactivity in plasma after oral administration of [4-¹⁴C]-cholesterol in rats.

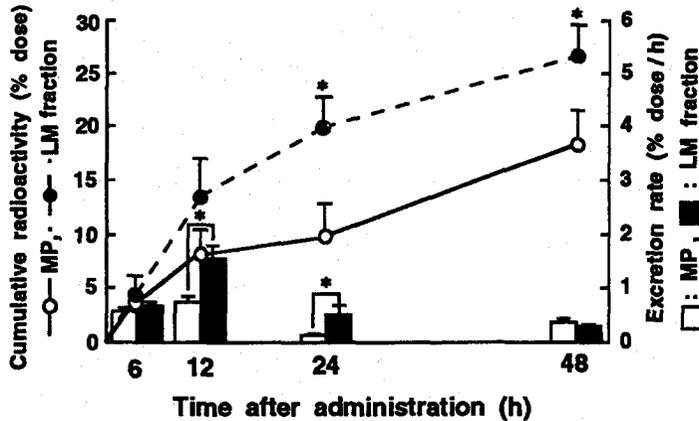


Fig. 16 Cumulative ¹⁴C excretion and ¹⁴C excretion rate in feces after oral administration of [4-¹⁴C]-cholesterol in rats.

これまでの結果を総合的に判断すると、低分子画分の血漿・肝臓コレステロール上昇抑制の作用機作は、

- (1) コレステロールの排泄量を増加して、体内への取り込みを減少させる、直接的なコレステロール吸収阻害作用と、
- (2) 胆汁酸と結合して排泄を促進することにより、肝臓におけるコレステロールの胆汁酸への異化を増加させる代謝的な作用、

による、少なくとも2つのメカニズムよることが示唆された(Fig.17)。

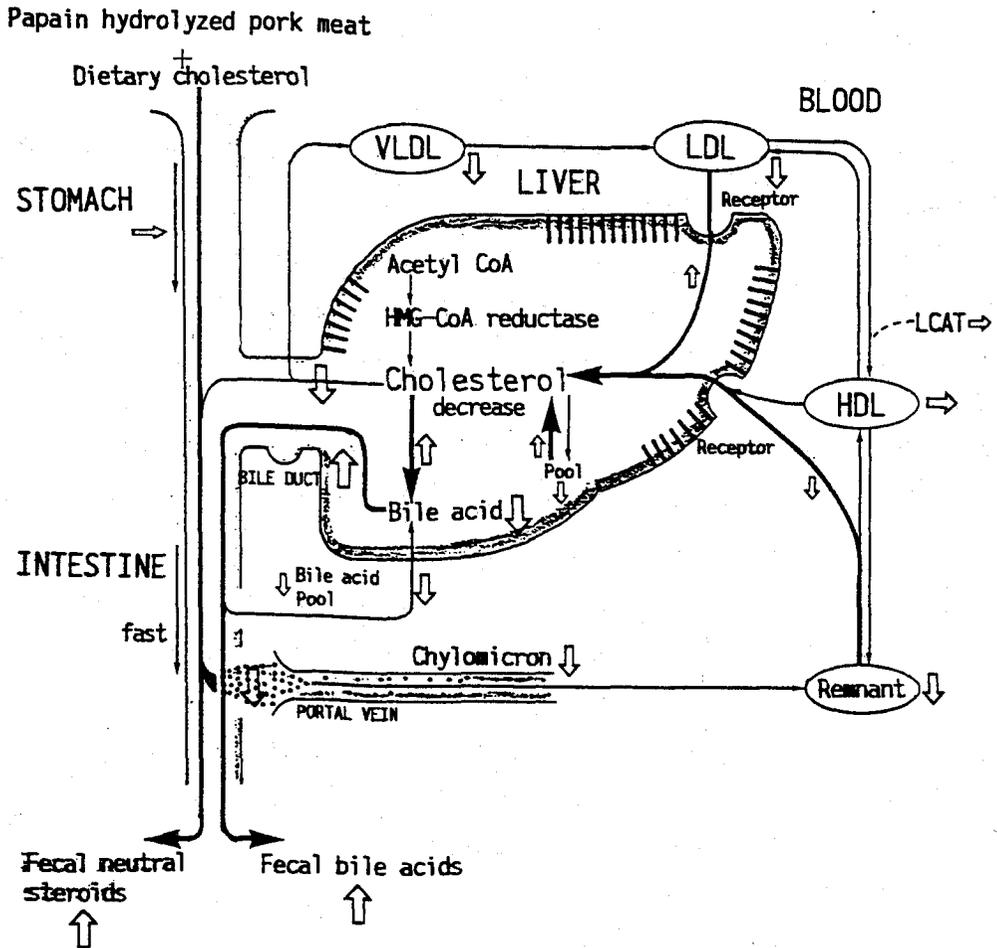


Fig. 17 Scheme of plasma and liver cholesterol reducing mechanism in rats fed papain hydrolyzed pork meat.

第六節 畜肉加工品への応用

低分子画分は水溶性であるため非常に利用し易く、ソーセージ・ウインナーには原料肉に直接添加、ハム・ベーコンではピクル液に溶解しての使用が可能であった。また、この低分子画分添加ソーセージをWistar-STラットに摂取させた場合、無添加製品に対して有意に血漿コレステロール濃度の上昇は抑制された。これらの畜肉製品は、低脂肪の製品とは異なる観点から血漿コレステロールの低減化を試みたものであり、食物繊維や植物性副材料を添加した場合の様に純粋な豚肉またはその加工品としての商品価値を失うことなく、畜肉本来の柔軟な歯応えや肉の味を発現したものである。

要 約

現代の我々にとって、食肉は毎日の食事に欠くことの出来ない食品である。本研究は高齢化社会を迎えて成人病への関心が高まる中、食肉タンパク質の疾病への影響、及びそれを予防するための生体調節機能について、栄養生理学的な観点から検討を加えたものである。まず第1章では、高血圧症の危険因子である食塩や、肝障害を引き起こすアルコールに対する食肉タンパク質の嗜好を介しての間接的な関与について検討し、以下のことを明らかにした。

(1) 動物性タンパク質を摂取した場合、食塩への嗜好が弱まり、食塩摂取量は減少した。これは食肉の摂取により、生理的に減塩が可能となることを示唆している。また、旨味溶液の共存によって食塩摂取量は更に減少した。

(2) 優れたアミノ酸組成を持つ食肉タンパク質の摂取により、血中エタノール・アセトアルデヒド濃度の消失が速くなり、アルコール代謝が促進された。その結果、エタノールの処理能力が高まり、多量のアルコールを飲むことが可能になった。

更に第2章では、一般に期待されていない豚肉パイン加水分解物の低分子画分が、高脂血症のリスクファクターである血漿コレステロール濃度を低下させることを見出し、その有効成分・作用機作を検討し、以下の知見を得た。

(1) この低分子画分の有効成分は、分子量2,000～300程度の疎水性アミノ酸を多く含む水溶性の生理活性ペプチドであった。

(2) 低分子画分は少量で、速やかに血漿・肝臓コレステロールの上昇を抑制し、更に一度上昇した血漿コレステロール濃度をも低下させた。

(3) コレステロール無添加食でもその作用は認められた。低分子画分の作用機作は、コレステロールの吸収阻害、及び胆汁酸と結合して排泄を促進することにより、肝臓コレステロールの胆汁酸への異化を促進させる作用であると考えられた。

(4) この技術の利用により、味や歯応えを損なうことなく、血漿コレステロールの上昇を抑制し得る畜肉製品を作ることが出来た。

(5) 本研究の発表後、カゼインやラクトアルブミンなどの動物性タンパク質の酵素加水分解物での同様の効果が報告されつつあり、新規性の高い研究であった。

この様に、本研究は新しい観点から食肉タンパク質の栄養生理学的な意味や機能を明らかにし、更に食品への応用の可能性も示した、意義のある研究であった。

審査結果の要旨

食肉はタンパク質及び、動物性脂肪の供給源として重要な食品でありながら、その複雑で不均一な成分組成や構造、さらには飼料組成や部位により成分が大きく変動することなどから、栄養学的に系統的な研究は殆どなされておらず、必須アミノ酸を供給する為の良好な動物タンパク質食品としてのみ利用されているに過ぎない。

本研究は、これらの背景のもとで食肉タンパク質を取り上げ、その栄養生理学的な検討を試みたものである。

本論文は2章からなっている。

まず第1章では、高血圧症の危険因子である食塩や、肝障害を引き起こすアルコールに対する食肉タンパク質の嗜好を介しての間接的な関与についてラットを用いて検討し、以下のことを明らかにした。

(1)これまで食餌中タンパク質レベルが高いほど、食塩嗜好が薄まり、食塩摂取量が減ることが分かっているが、タンパク質の種類によって異なるか否かを検討するため、動物性タンパク質としての食肉と大豆タンパク質を比較したところ、動物タンパク質の食肉の方がその減塩効果が強いことを明らかにした。また、うま味溶液の共存によって食塩摂取量は更に減少させることができた。

(2)高タンパク質食のラットがアルコール摂取量が多く、しかも血中アルコール濃度の減少速度が早いことが分かっているが、優れたアミノ酸組成を持つ食肉タンパク質の摂取も同様な効果があることを確かめ、血中アセトアルデヒド濃度の消失も早いことを見いだした。

第2章では、豚肉をパパインで加水分解した画分のなかに、高脂血症のリスクファクターである血漿コレステロール濃度を低下させる作用のあることを見つけ、その有効成分・作用機作を検討し、以下の知見を得た。

(1)この低分子画分の有効成分は、分子量2,000-300程度の疎水性アミノ酸を多く含む水溶性の生理活性ペプチドであった。

(2)この低分子画分の作用機作は、コレステロールの吸収阻害、及び胆汁酸と結合して排泄を促進することにより、肝臓コレステロールの胆汁酸への異化を促進させる作用であると考えられた。

以上のように、これまであまり研究の進んでいない食肉についての研究で、栄養生理学的検討を加え新しい知見を提出したことは、食品栄養学の領域での研究の進展に、先駆的な働きをしたものである。よって、著者は博士（農学）の学位を授与されるに十分な資格があると判定した。