

動水圧処理した食品が  
生体調節機能に及ぼす影響

2022 年

小暮 更紗

## 目次

第 1 章 序論 .....	1
第 1 節 動水圧技術について .....	1
第 2 節 動水圧技術の食品への応用 .....	2
第 3 節 研究目的 .....	3
第 2 章 動水圧処理による動物性タンパク質の改質 .....	7
第 1 節 サルコペニアにおけるタンパク質摂取の必要性 .....	7
第 2 節 動水圧処理が鶏ささみ肉の低分子化に与える影響 .....	9
第 1 項 試料調製および実験方法 .....	9
第 2 項 結果および考察 .....	15
第 3 項 小括 .....	26
第 3 節 動水圧処理した鶏ささみ肉が吸収性向上に与える影響 ....	27
第 1 項 生体内におけるタンパク質利用の評価方法 .....	27
第 2 項 飼料組成を決定するための一般成分分析 .....	29
第 3 項 人工消化試験による消化性の評価 .....	35
第 4 項 窒素出納試験によるタンパク質利用率の評価 .....	39
第 5 項 小括 .....	47
第 4 節 酵素・動水圧処理したささみ肉が骨格筋に与える影響 ....	48
第 1 項 サルコペニアと骨格筋 .....	48
第 2 項 実験方法 .....	50
第 3 項 結果および考察 .....	53
第 4 項 小括 .....	60
第 5 節 第 2 章の研究成果 .....	61
第 3 章 酵素・動水圧処理した鶏ささみ肉の調理性 .....	63
第 1 節 タンパク質補助食品の現状 .....	63
第 2 節 酵素・動水圧処理した鶏ささみ肉の焼成による変化 .....	64
第 1 項 実験方法 .....	64
第 2 項 結果および考察 .....	67

第 3 項 小括 .....	74
第 3 節 第 3 章の研究成果 .....	75
第 4 章 動水圧処理による植物性タンパク質の改質 .....	76
第 1 節 背景および目的 .....	76
第 2 節 動水圧処理が大豆の低分子化に与える影響 .....	78
第 1 項 試料調製および実験方法 .....	78
第 2 項 結果および考察 .....	82
第 3 項 小括 .....	86
第 3 節 酵素・動水圧処理した大豆が脂質代謝改善に与える影響 ..	87
第 1 項 実験方法 .....	87
第 2 項 結果および考察 .....	91
第 3 項 小括 .....	106
第 4 項 第 4 章の研究成果 .....	107
第 5 章 総括 .....	109
Summary .....	115
参考文献 .....	119
謝辞 .....	130

## 第1章 序論

### 第1節 動水圧技術について

ホモジナイザーとは、1900年に牛乳中の脂肪分の乳化を目的とし、August Gaulin によって開発された乳化・分散装置である。正式な開発時期は不明だが、1900年のパリ万博には、マントン・ゴーリン社によって出品された記録が残っている。液体もしくはスラリー状の試料をプランジャーポンプで送液し、流路の間隙を急激に狭小化することで液体中の液滴や軟質個体は均一に分散する(Fig.1)。間隙を通る際、一時的に動水圧(Dynamic high pressure : DHP)が上昇し、せん断力、衝撃力、キャビテーション効果といった物理的な力が発生する。これらの物理力は液体中の粒子を微粒子化し、牛乳であれば最大50MPaでホモジナイズすることで乳中の脂肪球が1 $\mu$ m程度に微粒化され、乳脂肪の分離を防ぐことができる。

その後、1985年にアメリカで開発されたマイクロフルイダイザー(Microfluidics International Corporation, USA, Massachusetts)は100~270MPaの超高圧領域においてホモジナイズできる高圧ホモジナイザーである(Fig.2 (A))<sup>1</sup>。液体物を間隙に通す基本原理はホモジナイザーと同様だが、ホモジナイザーは間隙を調節できる「可変バルブ式」を採用しており、マイクロフルイダイザーは流路を分岐させた後に間隙を通過させる「流路固定式」を採用している。その後、マイクロフルイダイザーは日本でも販売されたが、当時は消耗品であるシール部分の耐圧性が低く、交換用の消耗品が即時入手できないために日本独自で開発したものがナノマイザー(ナノマイザー株式会社)である(Fig.2 (B))<sup>2,3</sup>。ナノマイザーはマイクロフルイダイザーの影響から「流路固定式」が採用され、2つの穴が開いたディスクを組み合わせて使用する。穴と穴の間には液体が通過する溝があり、液体が1枚目のディスクから2枚目のディスクに移動する際に動水圧が生じる。しかし、「流路固定式」は試料による閉塞が起こった場合に、加圧部分から原因物を除去する必要があり、スラリー物質への対応が課題点となっている。本研究で使用した高圧ホモジナイ

ザー(超高压処理微粒化装置, MTJ-GA18-300-EH-S, (株)MTJ)は「可変バルブ式」で、加圧部位での閉塞が起こらないことから、ある程度の粘性物を通すことができ、圧力上限は 300MPa となっている (Fig.3)。

高压ホモジナイザーを使用して、超高压領域でホモジナイズすることで液体は、数百 m/sec の流速で吐出され、強力な動水圧、特にせん断が作用し、ナノレベルの超微粒化を起こす<sup>4-6</sup>。このことから、高压ホモジナイザーはナノテクノロジー分野において、物質をナノ化する手法の一つとされている。物質をナノ粒子化や微細化することで、皮膚への浸透性向上やドラッグキャリアとしての効果が認められており、すでに医薬・化粧品分野で利用されている<sup>7-10</sup>。一方、分子量に関しては、低分子化する報告<sup>11-13</sup>と、低分子化の過程で凝集する報告<sup>14,15</sup>がある。しかし、試料のタンパク質の構造や濃度、圧力をかけた回数が論文によって異なるため、動水圧が分子量に与える影響の程度は一定ではない。いずれの研究においてもタンパク質は強力なせん断力によって切断され、高次構造は崩壊し、二次構造におよぶ変化をもたらしていることが明らかとなっている<sup>16-19</sup>。したがって、動水圧によって、タンパク質の高次構造が変性もしくは低分子化することで、吸収性の向上を起こすことが期待されている。

## 第2節 動水圧技術の食品への応用

近年、ナノテクノロジーを食品へ応用するフードナノテクノロジー (Food nanotechnology : FNS) についての開発・研究が始まった。無機物である金属などとは異なり、有機物である食品のナノ化は制御が難しいため、FNS における「ナノ化」のサイズは、数十  $\mu\text{m}$  ~ 10nm とされている。国内では農林水産省より食品ナノテクノロジープロジェクトとして、加工技術、評価技術や物理特性などの研究が 2007 ~ 2012 年に渡り行われた<sup>20-22</sup>。

現在はドラッグキャリアとしてのサプリメント、食品を長期保管できる方法や包材、環境評価などに利用されており、食品そのものとし

て利用された例は希少である。食品へ応用するメリットは、①テクスチャー改善：高圧ホモジナイザーによる乳化・分散により、滑らかなテクスチャーが得られる、②機能性の付与：低粒子・低分子化による吸収性の向上や抗原性の減弱化などが得られる、③資源の有効利用：食品を懸濁することで動水圧処理が可能であるため、食品の残渣を出さない、もしくは残渣の二次利用が可能、などが挙げられる。

機能性に関しては乳から精製した B-ラクトグロブリンに 120MPa の動水圧処理を行うことで、抗原性が低下した報告<sup>16</sup> やゼラチンの加水分解物とコエンザイム Q10 を 60MPa でエマルジョン化することでバリオアクセスが増加した報告<sup>10</sup> がある。しかし、吸収性向上が期待されているにも関わらず、動水圧処理を行った食品を摂取した際の体内動態は確認されていないのが現状である。

### 第3節 研究目的

本研究は、高圧ホモジナイザーによる動水圧処理を食品へ行い、*in vivo* における生体調節機能を評価することを目的とした。動水圧処理がタンパク質の変性を起こすことから、対象食品は動物性タンパク質食品と植物性タンパク質食品とした。動物性タンパク質食品については、鶏ささみ肉を動水圧処理し、窒素出納試験による吸収性を評価した。さらに当該試料をサルコペニアモデルマウスに給餌し、骨格筋合成への影響を評価した。植物性タンパク質食品については、大豆全粒粉末を動水圧処理し、生活習慣病モデルラットの代謝改善機能について評価した。

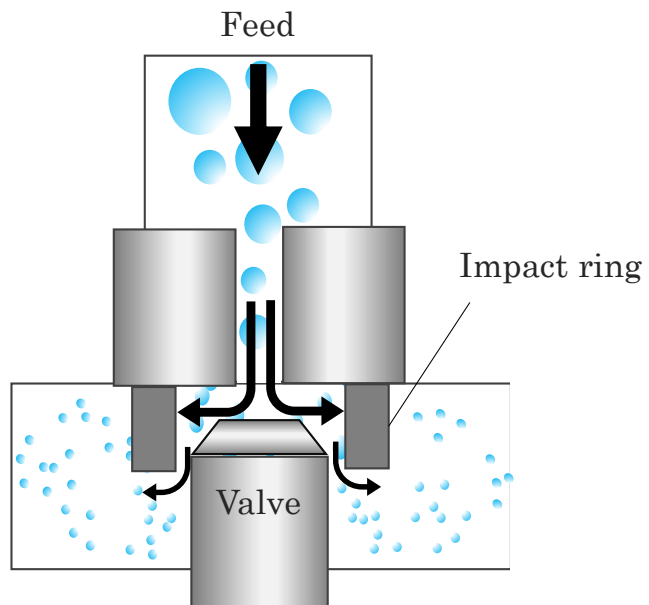
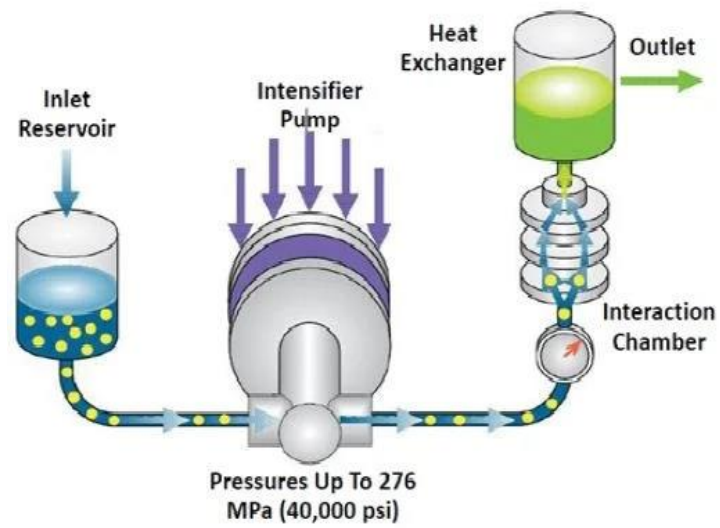


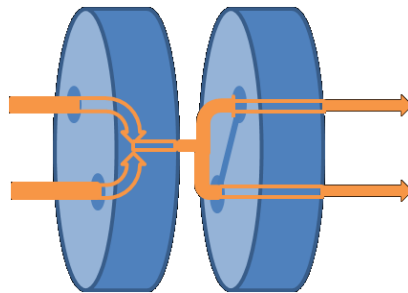
Fig.1 Principle of the Gaulin homogenizer

(A) Microfluidizer®



Source : Microfluidics International Corporation

(B) Nanomizer



Source : NANOMIZER Inc.

Fig.2 Principle of the high-pressure homogenizer



(A) Whole of the device



(B) Pressure part



Fig.3 High pressure treatment atomization equipment

## 第2章 動水圧処理による動物性タンパク質の改質

### 第1節 サルコペニアにおけるタンパク質摂取の必要性

2020年の世界総人口は77億9,480万人であり、そのうち先進地域における65歳以上の人口比率は28.2%となっている。WHOと国連は、7%以上で「高齢化社会」、14%以上で「高齢社会」、21%以上で「超高齢社会」と定義している。高齢化率が7%から14%になるまで要した時間を高齢化の速度として比較すると、フランスは115年(1864～1979)、アメリカは72年(1942～2014)、ドイツは40年(1932～1972)であり、欧州とアメリカでは、少なくとも40年以上かけて高齢化が進行してきた。一方、アジア諸国では日本は24年(1970～1994)、中国は20年(2001～2021)、韓国は18年(2000～2018)であり、短期間に急速な高齢化が起こっている。そして、国連経済社会局人口部は、「世界人口推計2019年版」において、この先40年で高齢化率が減少する地域はないと推測している<sup>23</sup>。そのような中で、高齢化社会の問題点の一つとしてサルコペニアが挙げられる。サルコペニアは加齢や疾患によって骨格筋量と骨格筋力の低下が生じた状態と定義されている<sup>24</sup>。サルコペニアによって総死亡リスクが約2.2倍、要介護発生リスクが約1.7倍高まることが報告されている<sup>25</sup>。予防には適切な栄養素、特に良質なタンパク質の摂取と運動が推奨されている<sup>26</sup>。Denison et al.は、メタ解析によって高齢者への栄養と運動の介入は、筋力増加へ繋がり、サルコペニア予防に効果的であると報告している<sup>27</sup>。骨格筋を維持するためには、良質なタンパク質を1食当たり25～30g摂取することが望ましいとされる<sup>28</sup>。日本では、2020年に改訂された食事摂取基準において、タンパク質の摂取目標量の下限が、13%エネルギー比から15%エネルギー比に変更された<sup>29</sup>。世界的にもタンパク質摂取が着目されているが、加齢により咀嚼嚥下機能の衰えや活動量の低下が起こるため、食事量を維持することは容易ではない。タンパク質摂取量を手軽に充足することを目的として、タンパク質補助食品が販売されているが、現在の主流は乳あるいは大豆由来のプロテイン飲料やサプリメントであり、タンパク質に機能性を付

与し、食事として食べる方法はあまり検討されていない。咀嚼して食物を食べることは脳や消化器官を刺激し、生活の質を向上させることが知られている<sup>30)</sup>。したがって、食事としてタンパク質補助ができるような製品の選択肢を増やすことが重要である。著者は、吸収性と体内利用の向上に着目したタンパク質の改質を目的として、食品に対して動水圧処理を試みた。本研究では、タンパク質食品として食肉を選択し、高圧ホモジナイザーを使用して動水圧を加え、食肉タンパク質を微粒子化および低分子化させ、実験動物を用いて窒素出納試験を行うことで、体内での吸収性を評価した。さらに、老化促進モデル動物を用いて骨格筋への影響を見ることで、体内での利用性を評価した。タンパク質が微粒化および低分子され吸収性が高まることで、高齢者に向けた高タンパク質補助食品の素材として、幅広く活用されることが期待できる。

## 第2節 動水圧処理が鶏ささみ肉の低分子化に与える影響

### 第1項 試料調製および実験方法

試料は市販の若鶏ささみ肉(岩手県産)を40kg購入し、ミートチョッパー(MS-12B, Nantsune)で挽肉にし、1kgずつに包装したものを-20℃で保管した。試料は用事解凍し、以下の方法で4種類の試験試料を調製した(Fig.4)。

#### 1. 試料調製方法

##### (1) Control (CTL)

鶏ささみ挽肉 500g に対して 1.5 倍量の純水を加え、ブレンダーミル(HGB-SS, 株式会社 FMI)で 40 秒間攪拌・磨砕した後、筋膜を除くために 40 メッシュの篩に通したものを対照試料(CTL)とした。

##### (2) Dynamic high-pressure treatment (DHP)

CTLに高圧ホモジナイザー処理(MTJ-GA18-300-EH-S, 株式会社 MTJ)を行った。圧力条件は、食品に対して動水圧を利用している先行研究<sup>6,31</sup>および著者らの予備試験から 150MPa とした。試料液を 8L (I.D.Φ16cm × 40cm)のタンクよりエアコンプレッサーによって装置へ送液し、0.31L/min の通液量で 15 回の動水圧処理を行い、動水圧処理試料(DHP)とした。なお、圧力処理中は摩擦熱による温度上昇を防ぐために吐出後の流路をチラー水で冷却し、試料温度を 20℃以下に抑制した。

##### (3) Enzyme treatment (Ezm)

CTLに 40℃で 10 分間の予備加熱を行い、鶏ささみ肉重量の 0.06% (w/w)の食品添加物用プロテアーゼ(プロテアーゼ P「アマノ」3SD、天野エンザイム)を加え、40℃で 30 分間攪拌しながら酵素処理をしたものを酵素処理試料(Ezm)とした。プロテアーゼ P「アマノ」3SD は、*Aspergillus melleus* 由来であり、至適 pH7.0~8.0、至適温度 40℃、また、50℃の加熱に対して残存活性率は 90%低下する。

#### (4) Combination treatment (Ezm+DHP)

酵素と動水圧の併用処理条件として、(3)の Ezm 後に(2)の条件で DHP 処理を行ったものを酵素処理+動水圧処理試料(Ezm+DHP)とした。

#### (5) 凍結乾燥器による乾燥と粉末化

CTL、DHP、Ezm、Ezm+DHP 処理した各試料液は真空凍結乾燥器(DC280 型, TAITEC 社)にて凍結乾燥後、粉碎機(ニューパワーミル, 大阪ケミカル株式会社)で粉末化し、各実験に使用した。約 1kg(湿重量)の鶏ささみ肉から CTL、Ezm は約 220g、DHP、Ezm+DHP は約 200g の試料乾燥粉末が得られた。

### 2. タンパク質全体に関する実験

#### (1) SDS-PAGE による分子量測定

試料粉末 0.1g に 20mL の 1M Tris-HCl(pH8.0)、1%SDS を加え、37℃で 1 時間振盪して可溶化した。BCA protein assay kit (TaKaRa)にてタンパク質濃度を測定後、低分子用の 16.5%ポリアクリルアミドゲル(p-PAGE1, ATTO)でポリアクリルアミド電気泳動(SDS Polyacrylamide gel electrophoresis : SDS-PAGE)を行った。SDS-PAGE はサンプルバッファー(200mM Tris-HCl(pH6.8), 40% glycerol, 2% SDS, 0.04% Coomassie Blue G-250, 2% 2-mercaptoethanol)、マーカー(Precision Plus Protein All Blue Standards)ならびに低分子量用マーカー(Polypeptide SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Bio Rad)、泳動バッファー(100mM Tris, 100mMTricine, 0.1% SDS(pH8.3))、により 30mA、130 分間泳動した。1 ウェル当たりのタンパク質量は 115ng とし、泳動後のゲルは銀染色 (AE-1360 EzStain Silver, ATTO)を行った。分子量の測定は、マーカーの移動距離から検量線を作成し、試料中のバンドの分子量を算出した。

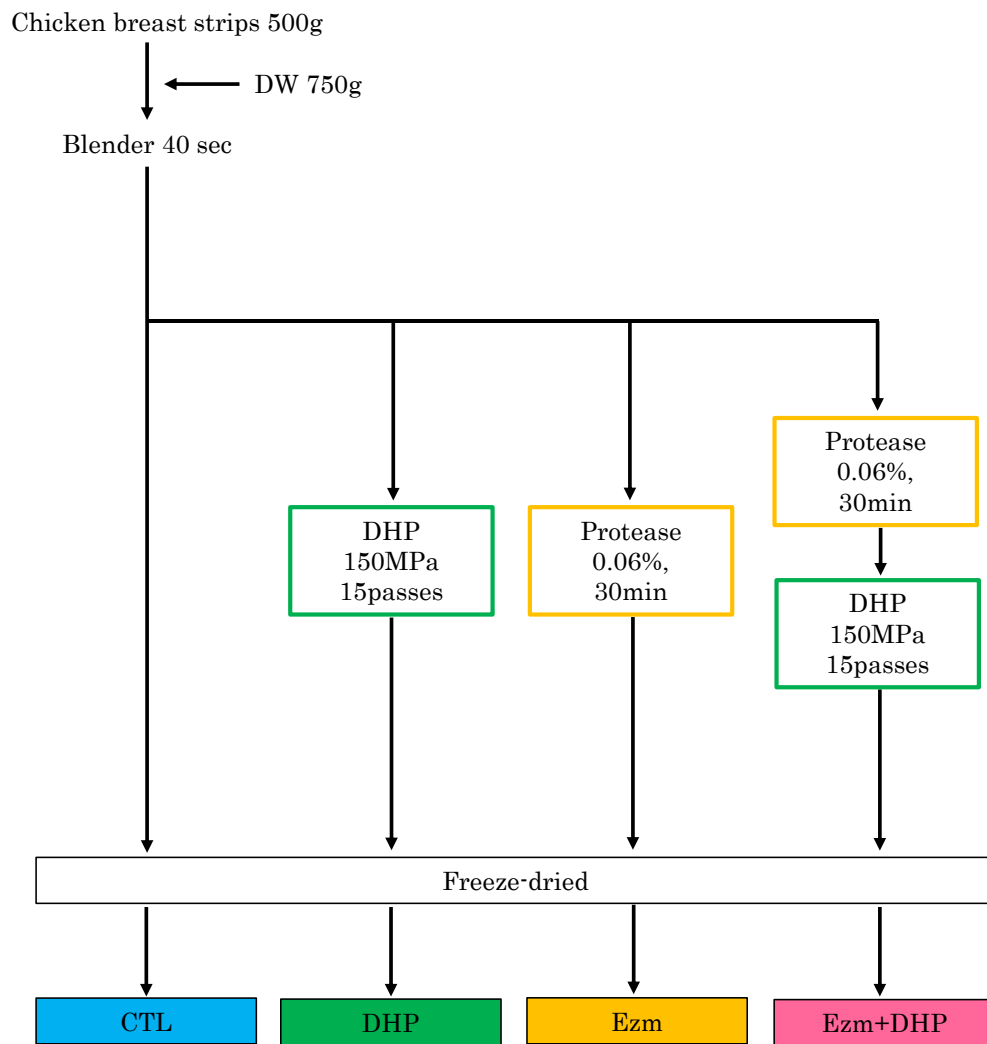


Fig.4 Protocol of sample preparation

## (2) タンパク質溶解性試験

タンパク質の高次構造を成すそれぞれの結合を可溶化させる目的で4種類の試薬を使用し、タンパク質溶解性試験を行った<sup>32</sup>。S1 試薬(0.6M NaCl)はイオン結合、S2 試薬(S1+1.5M 尿素)は水素結合、S3 試薬(S2+8.0M 尿素)は疎水性相互作用、S4 試薬(S3+2% 2-mercaptoethanol)はジスルフィド結合をターゲットとした試薬である。

### ①S1 測定溶液

試料粉末 0.5g を 50mL 容ビーカーに計り、S1 試薬を 10mL 加え、室温で1時間攪拌(KF-50M, YAZAWA)した。0.1M NaOH で pH7.0 に調整し、遠心分離(10,000rpm、15 分間)後の上清を S1 測定溶液とした。

### ②S2～S4 試薬

試料粉末 25mg を 1.5mL 容マイクロチューブに計り、S2 試薬を 1mL 加え、室温で1時間振盪した。遠心分離(10,000rpm、15 分間)後の上清を S2 測定溶液とした。S3、S4 試薬も同様に抽出し、測定溶液とした。

### ③Lowry 法による定量

S1～S4 の測定溶液中のタンパク質量は、Lowry 法によって波長 750nm(V-630iRM, 日本分光)での吸光度を測定した。検量線にはウシ血清アルブミン(BSA, バイオメディカルサイエンス)を希釈したもの(30～500 $\mu$ g/mL)を用い、また、サンプルブランクとして S1～S4 試薬の吸光度を測定し、各測定溶液の吸光度より差し引いた。S4 測定溶液の定量値を全タンパク質量とし、S4-S3 の値をジスルフィド結合量、S3-S2 の値を疎水性相互作用量、S2-S1 の値を水素結合量として算出した。

### 3. 低分子画分に関する実験

#### (1) OPA 蛍光誘導体化法によるアミノ基の定量化

o-フタルアデヒド(o-Phthalaldehyde : OPA)は第1アミノ基のラベル化試薬として使用されており、アミノ酸やペプチドのアミノ基と反応させ蛍光強度を測定することで高感度分析ができる。そこで、動水圧処理によりタンパク質が分解され、低分子しているかを OPA 蛍光誘導体化法によりアミノ基を定量することで確認した。

##### ① 限外ろ過フィルターによる分画(尿素抽出)

試料粉末 0.3g に還元剤・変性剤として 2% 2-mercaptoethanol 含有 8M 尿素を 15mL 加え、1 晩振盪したものを限外ろ過フィルター (Centrifugal Devices Microsep Advance with 1K, Pall)を用いて 8,000rpm、4℃、60 分間で限外ろ過した。

##### ② OPA 試薬による定量

限外ろ過によって得られた分子量 1,000 以下の画分を OPA Protein Quantitation Kit (AS-71015, ANA SPEC)で蛍光誘導体化し、励起波長 338nm、蛍光波長 455nm で蛍光強度を検出器 (GloMax DISCOVER, Promega)を使用して測定した。得られた測定値について BSA で作成した検量線より定量計算した。

#### (2) HPLC を使用した遊離アミノ酸の定量

##### ① 試料調製方法

本節 1 で調製した試料に加え、加熱処理を行った試料の 2 パターンを分析した。加熱は、凍結乾燥前の液体を攪拌しながら 65℃で 10 分間行い、真空凍結乾燥(DC-280, タイテック)後に粉末化した。

##### ② 限外ろ過フィルターによる分画(HCl 抽出)

試料粉末 0.3g に 0.01M HCl を 15mL 加え、1 時間振盪したものを限外ろ過フィルター(Centrifugal Devices Microsep Advance with 1K, Pall)を用いて 8,000rpm、4℃、60 分間で限外ろ過した。

##### ③ OPA プレカラム誘導体化法によるアミノ酸の定量

誘導体化試薬として OPA を使い、オートサンプラの前処理機能によ



ってプレカラム処理(誘導体化)した。OPA 溶液は、OPA 5mg をメタノール(MeOH)0.5mL で溶解した後、0.4M ホウ酸緩衝液(pH9.0) 1mL と 2-mercaptoethanol 10 $\mu$ l を加え、混合した。HPLC の分析は、カラム：CrestPak C18S(4.6mm I.D. $\times$ 150mm, JASCO)、プレカラム：CrestPak C18T-5P(4.6mm I.D. $\times$ 35mm, JASCO)、試料注入量：10 $\mu$ l (前処理機能によって試料 80 $\mu$ l と OPA 溶液 20 $\mu$ l を混合した後に採取)、カラム温度：20 $^{\circ}$ C、流速：1.0mL/min、移動相 A：50mM 酢酸ナトリウム(pH6.0)/MeOH/THF(89:10:1)、移動相 B：MeOH/THF(90:10)、蛍光検出：Ex. 345nm、Em. 455nm (FP2025 Plus, JASCO)を使用した。標準品はアミノ酸混合標準液(富士フイルム和光純薬株式会社)を 0.01M HCl で希釈し(1.25~8.3nmol/mL)、使用した。測定対象は、15 種のアミノ酸(アスパラギン酸：Asp、グルタミン酸：Glu、セリン：Ser、ヒスチジン：His、グリシン：Gly、スレオニン：Thr、アルギニン：Arg、アラニン：Ala、チロシン：Tyr、メチオニン：Met、バリン：Val、フェニルアラニン：Phe、イソロイシン：Ile、ロイシン：Leu、リジン：Lys)とした。

### (3) C<sub>4</sub>-300 カラムによるペプチドの定性

カラムはタンパク質やペプチドを測定するのに適した C<sub>4</sub>-300 カラムを使用した。試料は遊離アミノ酸の定量と同一のものを使用し、OPA 試薬で誘導体化したものを測定した。HPLC の分析は、カラム：TSKgel® Protein C<sub>4</sub>-300 (4.6mm I.D. $\times$ 15mm, TOSHO)、試料注入量：10 $\mu$ l (前処理機能によって試料 80 $\mu$ l と OPA 溶液 20 $\mu$ l を混合した後に採取)、カラム温度：40 $^{\circ}$ C、流速：1.0mL/min、移動相 A：H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/TFA (90:10:0.05)、移動相 B：CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O/TFA (80:20:0.05)、蛍光検出：Ex. 345nm、Em. 455nm (FP2025 Plus, JASCO)ならびに紫外可視吸光度検出：210nm (UV-970M, JASCO)を使用した。送液条件は B 液を 0 分：10%、45 分：100%とした。解析は、①蛍光検出器とペプチド結合の

吸収波長である 210nm の両方でピークが検出されたもの、②標準品であるアミノ酸の波形とは異なる保持時間(tR)であること、の 2 つを条件にピーク面積を比較した。

#### 4. 統計処理

実験結果は平均値±標準誤差(SE)で表示した。統計処理は解析ソフトの Statcel4 (OMS 出版)を使用した。グループ間の比較は Tukey-Kramer 多重比較検定を用いて解析し、有意水準は  $p < 0.05$  または  $p < 0.01$  とした。

### 第2項 結果および考察

本研究では、CTL に対して動水圧、酵素、酵素と動水圧の併用処理を比較した。動水圧における低分子化はいくつかの論文で報告され<sup>11-13</sup>、酵素処理は低分子化を目的とした実験において主に利用される方法である。この 2 つの処理を併用することによる相乗的な低分子化の促進について、SDS-PAGE と OPA 蛍光誘導体化法を用いて検討した。

#### 1. タンパク質に関する実験

##### (1) SDS-PAGE による分子量の推定

SDS-PAGE の結果を Fig.5 に示した。16.5%低分子用ゲルにおいて鶏ささみ肉の主要タンパク質であるミオシン重鎖(a : 220kDa)、アクチン(b : 42kDa)、ミオシン軽鎖 3 本(c : 25kDa, d : 17kDa, e : 15kDa)が検出された<sup>33</sup>。CTL と比較すると DHP はバンド面積の変化が少なかった。一方、Ezm および Ezm+DHP では、アクチンやミオシンのバンドが減少したのに対して、14.4kDa 以下のバンドの増加が見られた。また、Ezm と Ezm+DHP は 48.2kDa (F)、13.7kDa (G)、12.6kDa (H) に酵素由来のバンドが出現した。Ezm と比較して Ezm+DHP では、Ezm よりこれらのバンド面積が減少しており、Ezm+DHP の方が低分子領域のバンドが濃かった。このことから、鶏ささみ肉の低分子化は CTL < DHP < Ezm < Ezm+DHP 処理の順に促進されたことが示唆された。

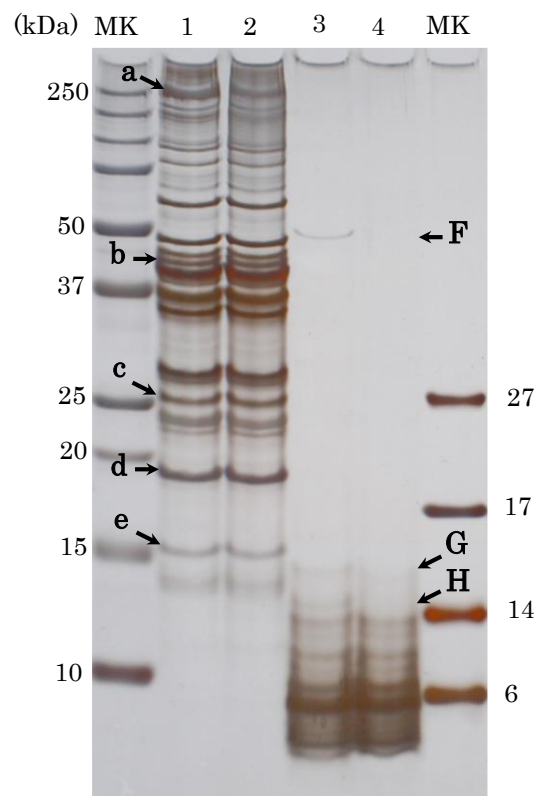


Fig.5 Representative SDS-PAGE pattern  
 Lane1 CTL, lane2 DHP, lane3 Ezm, lane4 Ezm+DHP, MK: marker

## (2) タンパク質溶解性試験

動水圧や酵素処理によるタンパク質の変性を調べる目的でタンパク質溶解性試験を行った(Fig.6)。

イオン結合は CTL :  $15.6 \pm 0.8$  mg/mL、Ezm :  $17.8 \pm 0.6$  mg/mL、Ezm + DHP :  $16.1 \pm 0.4$  mg/mL に対して DHP :  $8.8 \pm 0.4$  mg/mL と有意に低値となった。高圧ホモジナイザーは、強いせん断力が働くため、疎水性相互作用やタンパク質間のイオン結合を弱めることが報告されている<sup>34</sup>。DHP は、高圧ホモジナイザーのみの処理であったことが原因でイオン結合が減少し、Ezm + DHP は酵素反応との併用処理であったため、イオン結合に直接的な影響がなかったものと推察される。もしくは、イオン結合は陽イオンと陰イオンが強く引き合っている場合には比較的、強固な結合だが、外部から力が加わるとイオン同士の配置がずれ、同符号のイオン同士が近づくことで、反発し合う。DHP は動水圧処理の物理力のみが作用したため、この現象が起こり、イオン結合量が少なくなったことが考えられた。

水素結合は CTL :  $4.0 \pm 1.0$  mg/mL、Ezm :  $4.6 \pm 0.2$  mg/mL に対して DHP :  $1.0 \pm 0.5$  mg/mL、Ezm + DHP :  $1.0 \pm 0.5$  mg/mL と有意に低値となった。

疎水性相互作用は CTL :  $1.1 \pm 0.4$  mg/mL、Ezm :  $1.0 \pm 0.6$  mg/mL に対して Ezm + DHP :  $4.8 \pm 1.0$  mg/mL、DHP :  $8.8 \pm 0.7$  mg/mL と有意に高値となった。

S-S 結合は CTL :  $0.2 \pm 0.8$  mg/mL、DHP :  $2.0 \pm 1.0$  mg/mL、Ezm :  $1.8 \pm 0.6$  mg/mL に対して Ezm + DHP :  $3.4 \pm 0.4$  mg/mL と有意に高値となった。

水素結合と疎水性相互作用において、CTL・Ezm と DHP・Ezm + DHP は対照的に増減した。動水圧のせん断力によって水素結合が切断され、分子は疎水性相互作用によって安定化を図ったために水素結合の減少と共に疎水性相互作用が増加したことが推察される。先行研究において高圧ホモジナイザー処理は、タンパク質の水素結合や疎水性相互作用に影響を与えることが報告されている<sup>33,35-37</sup>。Zhang らは、

タイガーナッツから抽出したタンパク質に対して高圧ホモジナイザー処理を行ったところ、100MPa 以上の圧力条件においてタンパク質は変性し、疎水性コアが露出し、その後、相互作用で再凝集したと考察している<sup>38</sup>。

S-S 結合は強固な結合であるが、本実験において CTL に対して Ezm + DHP は有意に増加し、DHP と Ezm はその中間だった。動水圧処理によるタンパク質の変性において、S-S 結合は切断されることで SH 基に還元され、変性が進むにつれて遊離 SH 基が多量となり、S-S 結合が再形成されることが推察される。Wang らは高圧ホモジナイザー処理において 100MPa 以下で S-S 結合が減少し、SH 基が増加するが、100MPa 以上で S-S 結合の増加と SH 基の減少が起こったと報告している<sup>39</sup>。他の研究においても 100MPa 以上の高圧ホモジナイザー処理は、SH 基を減少させ、S-S 結合の増加を起こすことが報告されている<sup>19,37</sup>。Ezm + DHP は、タンパク質の高次構造の崩壊・断片化が最も進んでいる状態であることが示唆された。また、S-S 結合の形成もゾル化や物性の変化に繋がるため、疎水性相互作用と同様に凝集体を成す要因となることも推察された。

SDS-PAGE とタンパク質溶解性試験の結果より、DHP と Ezm + DHP はタンパク質の四次、三次、二次構造の変性が示唆されたが、DHP では一次構造の分解は起こらず、Ezm + DHP において一次構造が分解され、低分子化したことが推察された。

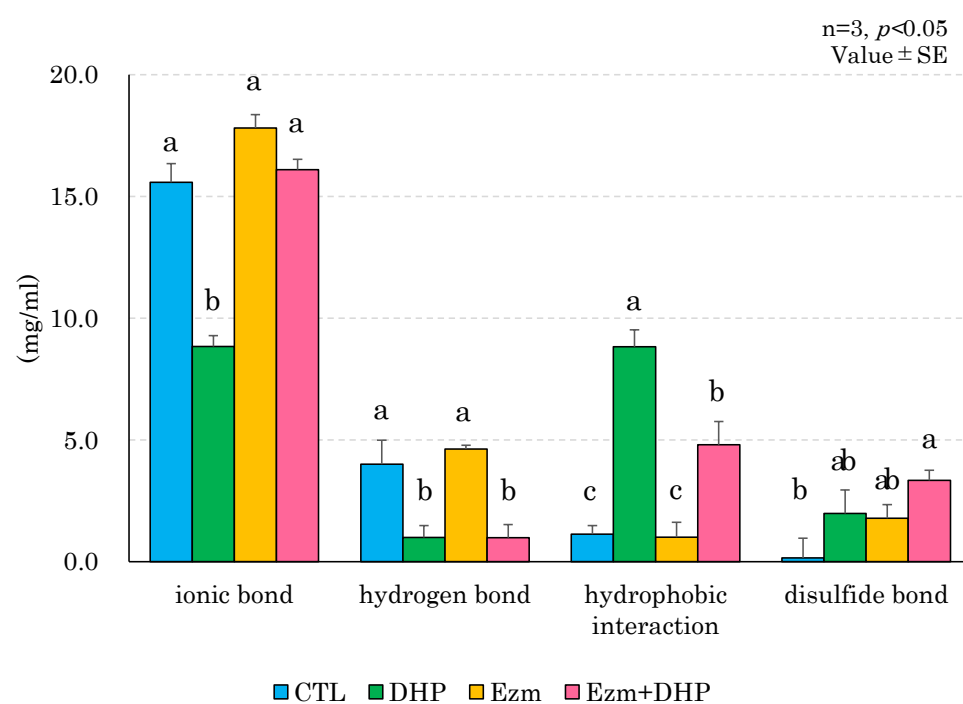


Fig.6 Protein solubility test

## 2. OPA 蛍光誘導体化法を使用した低分子画分に関する実験

Ezm+DHP 処理によって発生した低分子物の量を比較するため、分子量 1,000 以下の低分子画分について OPA 蛍光誘導体化法を用いた定量と定性を行った。

### (1) OPA 試薬によるアミノ基増加の推定

OPA Protein Quantitation Kit による測定値は BSA を使用した検量線によってタンパク質濃度に変換し、CTL の濃度を 1 とした際の相対値で比較した (Fig.7)。CTL に対して、DHP :  $1.3 \pm 0.1$ 、Ezm :  $2.0 \pm 0.1$ 、Ezm + DHP :  $2.7 \pm 0.2$  となり、CTL に対して DHP で 1.3 倍、Ezm で 2.0 倍、Ezm + DHP では 2.7 倍の濃度を示し、Ezm + DHP が有意に高値となった。分子量 1,000 以下の低分子画分において、Ezm + DHP はアミノ酸もしくはペプチド断片が多いことが示唆された。

### (2) OPA 法によるアミノ酸定量

HPLC によるアミノ酸の定量結果は、試料粉末 1g 中(おおよそ生肉 5g 分)の濃度として Fig.8(A)に示した。また、動物実験においては、殺菌のために加熱(65℃、10 分間)した試料を飼料として使用するため、加熱した試料についても同様に分析し、結果を Fig.8(B)に示した。

試料中の遊離アミノ酸量は、アスパラギン、グルタミン、セリン以外は CTL、DHP に対して Ezm、Ezm + DHP の順に有意に高値となった。アスパラギン、グルタミン、セリンは、Ezm と Ezm + DHP 間での有意差が見られなかった。CTL のアミノ酸量と比較して、DHP は 1.4 倍、Ezm は 5.0 倍、Ezm + DHP は 7.4 倍となった。

加熱した試料についても同様に、スレオニン以外は CTL、DHP に対して Ezm、Ezm + DHP の順に有意に高値となった。スレオニンのみ、DHP と Ezm 間での有意差が見られなかった。CTL のアミノ酸量と比較して、DHP は 1.2 倍、Ezm は 3.3 倍、Ezm + DHP は 5.6 倍のアミノ酸量の増加となった。

非加熱試料と加熱試料のアミノ酸量を比較すると CTL は加熱試料に

においてアミノ酸が増加していた。鶏肉はグルコース含量が低く、アミノカルボニル反応による香気成分の発生が牛肉や豚肉ほど多くない。そのため、加熱によって牛肉や豚肉のアミノ酸は減少し、鶏肉のアミノ酸は増加することが報告されている<sup>40</sup>。一方で Ezm や Ezm + DHP では加熱試料においてアミノ酸が減少しており、65℃で 10 分間の加熱処理を行う際に酵素の至適温度帯を通過したことで、加水分解が進んだことが推察された。しかし、熱耐性の低い酵素であったため、加熱による定量値の変化は微増にとどまり、非加熱と加熱の試料はほぼ同じ定量値を示した。

### (3) ペプチドカラムによるペプチドの定性

アミノ酸の定量と同様に OPA で誘導体化した試料について、蛍光ならびに UV 検出器でペプチドの定性を試みた。蛍光検出された試料のピークは 15 本、加熱した試料で 14 本あり、それに対して標準品であるアミノ酸のピークは 13 本検出された。アミノ酸以外のピークかつ、UV210nm においてピークが確認できたものは 5 本、加熱した試料で 4 本あった。そのうちの tR が同一である 3 本のピークの平均面積を Fig.9 に示した。試料のピーク面積(Fig.9 (A))において、13.9 分、17.6 分に 4 群間での有意差は見られなかった。19.7 分において CTL :  $1.2 \times 10^6$ 、DHP :  $1.2 \times 10^6$  に対して Ezm :  $2.1 \times 10^6$ 、Ezm+DHP :  $2.9 \times 10^6$  と、有意に高値となった。加熱した試料のピーク面積(Fig.9 (B))において、14.1 分、17.5 分に 4 群間での有意差は見られなかった。(A)と同様に 19.9 分において CTL :  $0.4 \times 10^6$ 、DHP :  $0.8 \times 10^6$ 、Ezm :  $1.8 \times 10^6$ 、Ezm+DHP :  $2.8 \times 10^6$  となり、CTL に対して Ezm、Ezm+DHP は有意に高値となった。

C<sub>4</sub>-300 カラムはタンパク質やペプチドの分析に適したカラムであり、疎水性が高いペプチドほど保持時間が長い性質をもつ。15 分までのピーク面積は、CTL から Ezm + DHP にかけて同程度もしくは減少し、一方で 17 分以降のピーク面積は、CTL から Ezm + DHP にかけて増加する傾向が見られた。保持時間が長いものほど、Ezm + DHP のピ



一ク面積が増加するということは、疎水性ペプチドの含有量の増加を意味していると考えられた。高圧ホモジナイザー処理による物理力は、タンパク質溶解性試験で述べた通り、高次構造の変性を起こす。疎水性コアが露出したことで、タンパク質構造は一時的に不安定となり、相互作用を働かせ、再凝集することで安定化を図る。これは **Fig.6** で示した **Ezm + DHP** の水素結合の減少と疎水性相互作用の増加を裏付ける結果となった。

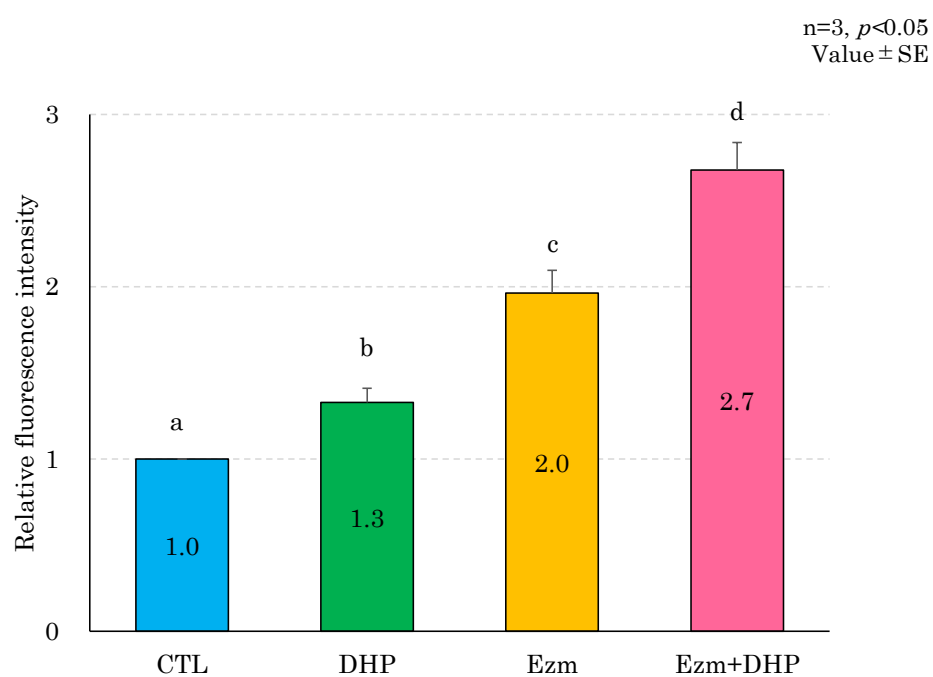


Fig.7 The fluorescence intensities measured using the o-Phthaldialdehyde (OPA) protein assay

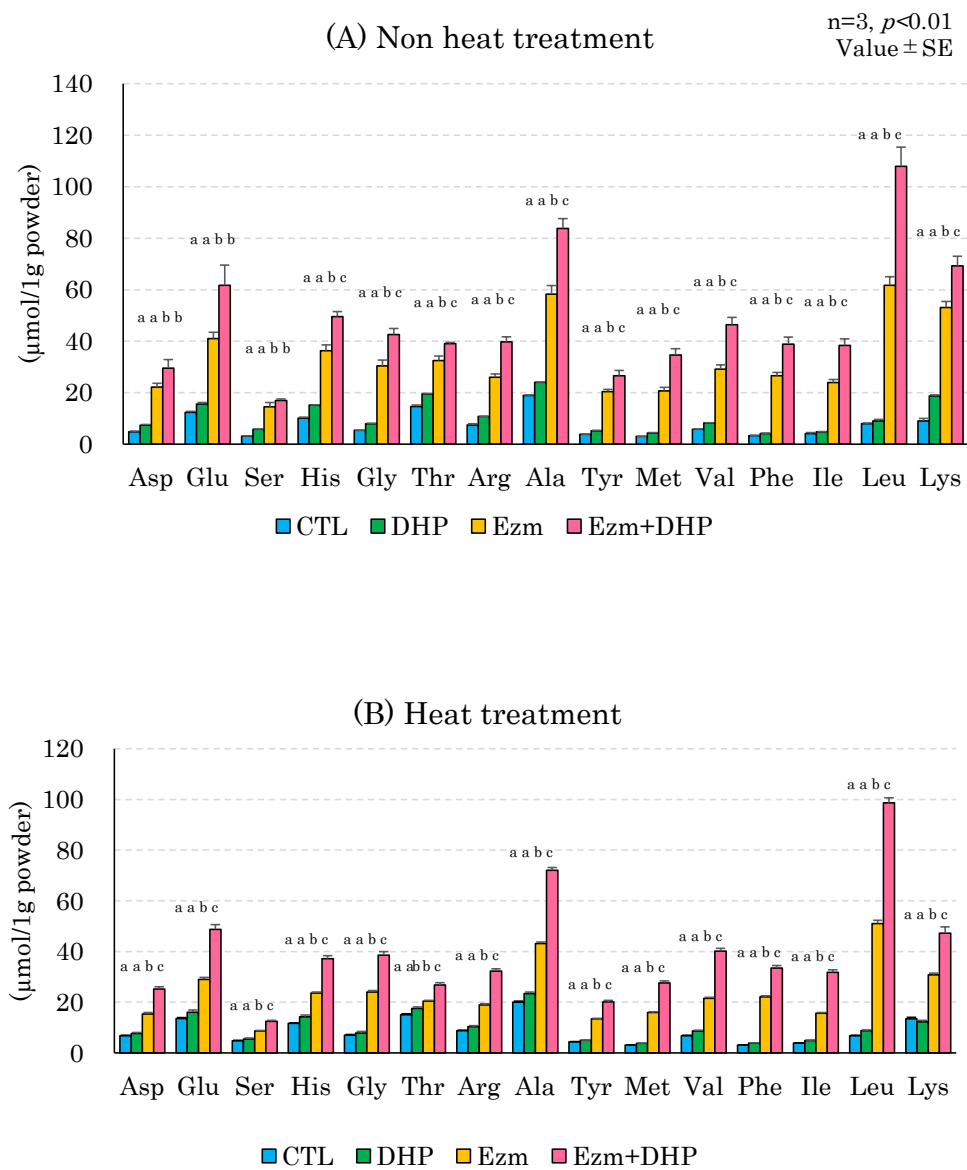


Fig.8 Quantification of free amino acids by HPLC  
(A) is non heat treatment of chicken and (B) is heat treatment of chicken at 65 °C for 10 minutes.

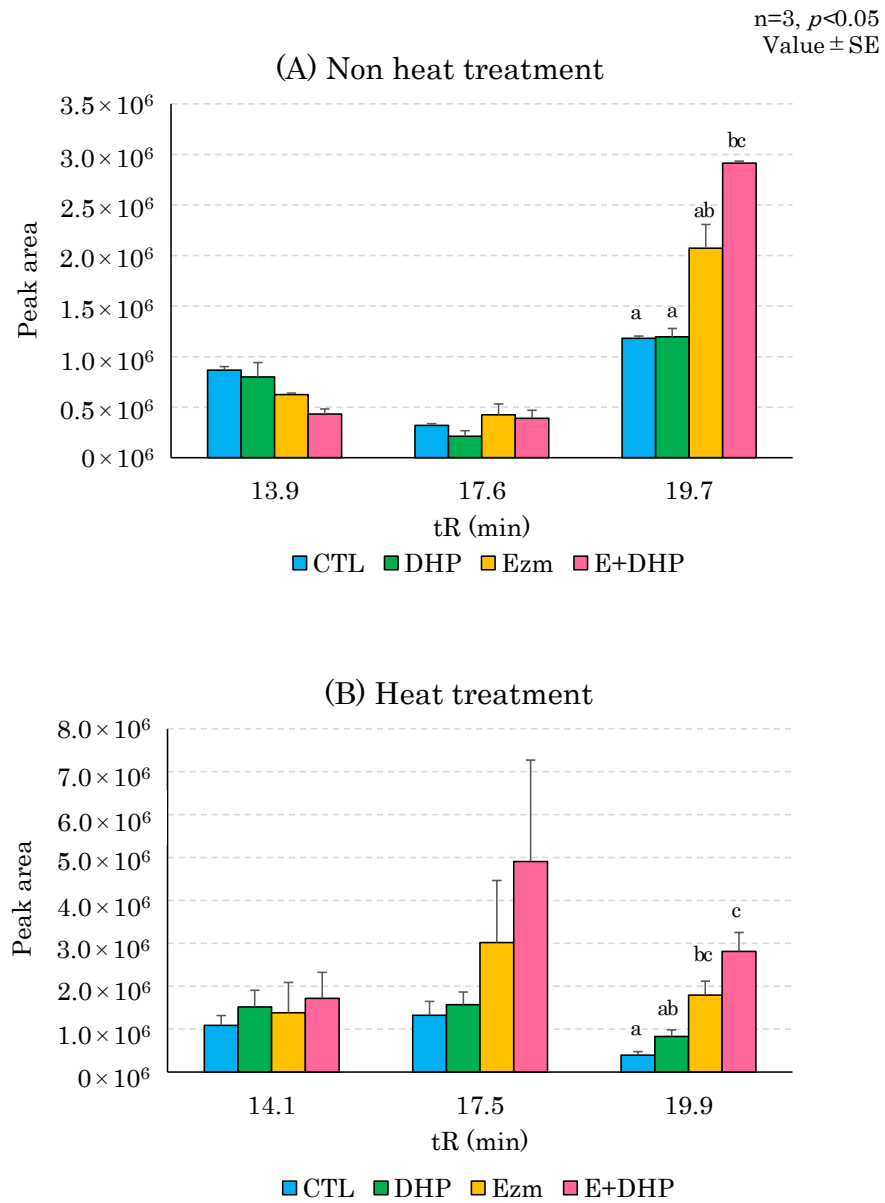


Fig.9 Qualitative of peptides by HPLC  
 (A) is non heat treatment of chicken and (B) is heat treatment of chicken at 65 °C for 10 minutes.

### 第3項 小括

動水圧処理が鶏ささみ肉の低分子化へ与える影響を調べる目的で実験を行った。SDS-PAGE では CTL に対して DHP では、ほとんど変わらず、Ezm や Ezm + DHP において分子量 1,000 以下のバンド面積の増加が見られた。このことから、限外ろ過によって分子量 1,000 以下の低分子画分を分画し、OPA 試薬を利用した実験を行った。OPA タンパク質定量において、CTL < DHP < Ezm < Ezm + DHP の順に有意に高値となり、HPLC によるアミノ酸定量においても、同様の結果となった。また、タンパク質溶解性試験の結果で、Ezm + DHP は、水素結合の減少と疎水性相互作用の増加が見られ、C<sub>4</sub>-300 カラムを使用したペプチド定性においても、疎水性と思われるピークが検出された。これらの結果は、Ezm + DHP 処理によってタンパク質が改質され、低分子化したことを強く示唆するものである。

DHP はタンパク質溶解性試験で Ezm + DHP と同様に水素結合の減少と疎水相互作用の増加を示したが、SDS-PAGE や OPA を使用した実験の結果、低分子化を起こしていなかった。Saricaoglu et al.らは、鶏肉タンパク質への高圧ホモジナイザー処理はポリペプチドの内部に埋没していた  $\alpha$ -ヘリックスや  $\beta$  シートを露出させ、タンパク質の高次構造に変化を与えることを明らかにしている<sup>35</sup>。このように、動水圧は鶏肉タンパク質の二次構造に影響を与えるが、複数回の動水圧処理を行ったことで、二次構造は変化したものの、断片化する前に衝撃力が加わり続け、分子間の密度が上昇し、それによって外部からの物理力がアクセスしにくくなったことが、DHP が低分子化しなかった原因なのかもしれない。

以上より、動水圧のみの条件では低分子化せず、酵素処理後に動水圧処理を行った併用条件において顕著な低分子化が認められた。Ezm + DHP 処理による鶏肉タンパク質の低分子化は、エンド型の酵素が広範囲を加水分解し、ある程度、タンパク質の粗分解が進んだ状態から動水圧が加わった。そのことで、タンパク質の構造内部に動水圧が加わりやすくなり、高次構造の崩壊が促進されたことが考えられた。

### 第3節 動水圧処理した鶏ささみ肉が吸収性向上に与える影響

#### 第1項 生体内におけるタンパク質利用の評価方法

タンパク質はギリシャ語で「最も重要なもの」の語源をもち、糖質や脂質が不足した際のエネルギー源になるだけでなく、骨格筋などの身体構成成分であり、酵素やホルモンなどの生理活性物質でもある。タンパク質は胃でペプシン、小腸でトリプシンやキモトリプシンによって分解され、アミノ酸や2～4個のペプチドになることで吸収される。

生体内におけるタンパク質の利用の研究において、ペプチドとアミノ酸を比較した研究は1968年に最初の報告がされ、現在では吸収速度はペプチド>アミノ酸>タンパク質の順に速いことが知られるようになった<sup>41-43</sup>。アミノ酸のトランスポーターは中性アミノ酸、塩基性アミノ酸、酸性アミノ酸など基質選択性が異なり、複数のトランスポーターが関与する。一方でペプチドはジペプチドやトリペプチドを基質として認識するプロトン共役型オリゴペプチド輸送体(**proton-dependent oligopeptide transporter : POT**)によって吸収されるが、基質多選択性のトランスポーターであることから、アミノ酸よりも早く吸収される。テトラペプチド以上の大きさのペプチドは、**POT**が認識しないが、血中移行が認められていることから、細胞間隙を通る経路もしくはトランスサイトosisで輸送されることが仮説となっている<sup>44,45</sup>。

*in vivo*での食事性タンパク質の栄養価測定法には、摂取タンパク質に対して体重を評価する方法と、窒素量で評価する方法に大別される。本実験では、日本人の食事摂取基準で利用されている測定方法である窒素出納試験を行った。窒素出納とは、食事として摂取した窒素量から尿、糞便として排泄された窒素量を差し引いた値をいい、窒素バランスを見ることで体内でのタンパク質代謝の動的状態を把握できる。摂取窒素量を100とした場合、糞便と尿からの排泄量がおおむね100となることを利用している。窒素バランスを測定することで、真の吸収率 (**True digestibility : TD**)、生物価 (**Biological value : BV**)、TDにBVを乗じた正味タンパク利用率 (**Net protein**

utilization : NPU)が算出できる。NPU は摂取タンパク質が体内に保持される割合を示し、体構成タンパク質の維持や増加のために食事がどの程度寄与したのかを示している。一方で、食べこぼしや器へ付着した残渣量や毛髪、皮膚、爪などからの損失量の測定が困難であることから、窒素出納は誤って正に算出され、タンパク質必要量が低く見積もられる可能性がある。そのため、近年では指標アミノ酸化法によって正確な測定を行う研究が進められている。現時点では、研究の数と質が十分でないことから、日本人の食事摂取基準では窒素出納試験が運用されている<sup>46</sup>。

## 第2項 飼料組成を決定するための一般成分分析

### 1. 試料調製および実験方法

#### (1) 試料調製方法

試料は第2節と同様に調製し、凍結乾燥前の液体を攪拌しながら、65℃で10分間の加熱殺菌を行い、真空凍結乾燥(DC-280, タイテック)後に粉末化した。

#### (2) 一般成分分析

一般成分分析は五訂日本食品標準成分表<sup>47</sup>に準拠して実施した。

##### ① 水分含量(常圧加熱乾燥法)

アルミ秤量缶を洗浄後、105℃の電気定温乾燥器で1時間乾燥させ、デシケーター内で30分間放冷し、恒量となるまで繰り返した。アルミ秤量缶に試料3gを精秤し、同条件で乾燥・放冷し、恒量となるまで繰り返した。水分含量は下記の式により算出した。

$$\text{水分含量 (g/100g)} = (W_1 - W_2) / (W_1 - W_0) \times 100$$

$W_0$  : アルミ秤量缶の恒量

$W_1$  : アルミ秤量缶＋試料の質量

$W_2$  :  $W_1$ を乾燥し恒量とした際の質量

##### ② タンパク質含量(マクロ改良ケルダール法)

###### ・ 試料の分解

分解フラスコに試料0.5g、分解促進剤5g、沸騰石2~3粒、濃硫酸20mLを入れ、ケルダール分解装置(KB8S, ゲルハルトジャパン)を使用して250℃で1時間、430℃で2時間加熱した。分解フラスコ内の試料が青緑色に変色した時点から、さらに30分加熱し、分解を終了した。室温まで放冷した後、発熱しないように分解フラスコを氷冷水しながら分解液に純水を加え、100mL容メスフラスコで定容した。

###### ・ 蒸留

パルナスワーグナー型蒸留装置を用いて行った。定容した分解試料



液をホールピペットで 5mL または 10mL 採取し、30% (w/w) NaOH 10mL と共に蒸留管に注入した。三角フラスコに 4% (w/v) ホウ酸 10mL と混合指示薬(0.07% メチルレッド, 0.03% メチルブルー, 99.9% エタノール)を 2~3 滴を入れ、蒸留されたアンモニア態窒素を捕集した。

### ③ 中和滴定

0.01M HCl を使用し、灰青色を終点として中和滴定を行った。窒素量は下記の式により算出した。また、得られた窒素量に鶏肉の窒素・タンパク質換算係数である 6.25 を乗じることでタンパク質含量 (g/100g) とした。

窒素量 (g/100g)

$$= 0.00014 \times (V_0 - V_1) \times F \times 100\text{mL}/10\text{mL} \times 100/S$$

$V_0$  : 空試験における 0.01M HCl 溶液の滴定値 (mL)

$V_1$  : 試料における 0.01M HCl 溶液の滴定値 (mL)

$F$  : 0.01M HCl 溶液のファクター

$S$  : 試料採取重量 (g)

### ③ 脂質含量(ソックスレー抽出法)

ナシ型フラスコを 105℃ の電気定温乾燥器で 1 時間乾燥させ、デシケーター内で 30 分間放冷し、恒量となるまで繰り返した。円筒ろ紙に試料 3g を精秤し、試料の上に脱脂綿を詰め、ソックスレー抽出器に入れた。ナシ型フラスコにジエチルエーテルを 100mL 入れ、ソックスレー抽出器ならびに冷却管と連結させ、電気恒温槽で 60℃、15 時間の抽出を行った。その後、ナシ型フラスコ内のジエチルエーテルをロータリーエバポレーターで留去し、105℃ の電気定温乾燥機で 1 時間乾燥させ、デシケーター内で 30 分間放冷し精秤した。脂質含量は下記の式により算出した。

$$\text{脂質含量 (g / 100g)} = (W_1 - W_0) / W \times 100$$

$W_0$  : 恒量としたナス型フラスコ質量(g)

$W_1$  : 脂質を抽出した乾燥後のナス型フラスコ質量(g)

$W$  : 試料採取量(g)

#### ④ 全糖量(アンスロン硫酸法)

##### ・測定用試料溶液の調整

試料 5g を 50mL 容コニカルチューブに精秤し、10% (w/v) トリクロロ酢酸溶液を試料の 2 倍量加え、ホモジナイズ (10,000rpm、3 分間) し、遠沈管へ移した。コニカルチューブおよびホモジナイザーの刃を 5% (w/v) トリクロロ酢酸溶液 20mL で洗い込みし、遠沈管へ移した。2,000rpm で 5 分間遠心分離し、上清を 200mL 容フラスコに移した。沈殿物は、5% (w/v) トリクロロ酢酸を試料の 4 倍量の加え、洗い込みを 2 回繰り返し、すべての上清を合一して定容した。ろ紙 (No.5A, 125mm, ADVANTEC) を使用して、ろ過した液を測定用試料溶液とした。

##### ・アンスロン溶液による測定

0.2% (w/v) アンスロン溶液 10mL を共栓試験管に入れ、氷水で十分に冷却した。氷水中で試料溶液 1mL をアンスロン溶液の上に層になるよう静かに注ぎ込み、栓をしてボルテックスミキサーで激しく振り混ぜた。沸騰水浴中で 10 分間加熱後、冷水で冷却し、波長 620 nm で吸光度を測定した (V-630iRM, 日本分光)。同様にブドウ糖 (0.020 ~ 0.080 mg/mL) を標準品として検量線を作成した。全糖量はブドウ糖 (g/100g) として下記の式により算出した。

$$\text{全糖量 (g / 100g)} = (A \times V_1 \times V_3) / (1(\text{mL}) V_2 \times W \times 1000) \times 100$$

$A$  : 検量線より求めた試料溶液中のブドウ糖濃度 (mg/mL)

$V_1$  : 試験溶液の定容量 (mL)

$V_2$  : 試験溶液の採取量 (mL)

$V_3$  : ブドウ糖試験溶液の定容量 (mL)

W：試料採取量(g)

1/1000：mg から g への変換

#### ⑤ 灰分（直接灰化法）

るつぼを洗浄・乾燥し、550℃のマッフル炉で 2 時間焼いた。デシケーター内で 1 時間放冷し、恒量を測定した。るつぼに試料 1g を精秤し、250℃のマッフル炉で 2 時間予備灰化した後、550℃で試料が灰白色になるまで加熱した。デシケーター内で 1 時間放冷し、恒量となるまで繰り返した。灰分は下記の式により算出した。

$$\text{灰分 (g / 100 g)} = (W_2 - W_0) / (W_1 - W_0) \times 100$$

W<sub>0</sub>：るつぼの恒量(g)

W<sub>1</sub>：W<sub>0</sub> + 試料採取量(g)

W<sub>2</sub>：W<sub>1</sub>の灰化後の質量(g)

## 2. 結果および飼料組成の決定

Table 1(A)に一般成分分析の結果を示す。市販の若鶏・ささみ・生<sup>48</sup>と比較するために(B)無水物換算値も示した。無水物換算において試料粉末はおおよそ若鶏と同等の数値となった。DHP や Ezm + DHP では水分含量が多かったため、タンパク質が計算上 100g を超える結果となった。凍結乾燥後の仕上がりによって水分含量に差が出たことが原因と考えられた。一方で、日本食品標準成分表では誤差範囲を成分値の±20%としており、本結果は許容範囲であったと言える。飼料組成は AIN76 に基づき、タンパク質源をカゼインと同等量の試料粉末で置換し、脂質は大豆油、灰分はミネラル混合から調整を行った。試料粉末を配合した動物の飼料組成は Table 2 に示す。飼料 100g 中の平均窒素含有量は  $2.8 \pm 0.01\text{g}$ 、平均タンパク質含有量は  $17.2 \pm 0.01\text{g}$  となった。

Table1

## (A) Composition of sample powder (g/100g)

	Water	Protein	Fat	Carbohydrate*	Ash
CTL	7.4	86.6	2.2	0.1	2.8
DHP	11.4	92.8	0.2	0.1	3.9
Ezm	7.5	87.1	2.9	0.2	3.4
Ezm+DHP	9.3	91.6	0.2	0.2	4.2

## (B) Anhydride equivalent (g/100g)

	Protein	Fat	Carbohydrate*	Ash
CTL	93.5	2.4	0.1	3.0
DHP	104.8	0.2	0.2	4.4
Ezm	94.2	3.1	0.3	3.7
Ezm+DHP	100.9	0.3	0.3	4.6
若鶏・ささみ・生	95.6	3.2	0.4	4.8

\*Carbohydrates were determined as total sugar content.

Table2 Composition of diets

	AIN76	CTL	DHP	Ezm	Ezm+ DHP
Sucrose	1000	1000	1000	1000	1000
Casein	400	0	0	0	0
Meat powder	0	397	371	395	376
Soybean oil (containing 10 ml of vitamin ADE mixture)	100	90	100	88	100
Corn starch	300	300	300	300	300
Cellulose	100	100	100	100	100
DL-Methionine	6	6	6	6	6
Choline Chloride	4	4	4	4	4
AIN76 vitamin mix	20	20	20	20	20
AIN76 mineral mix	70	59	56	57	54
Toral(g)	2000	1976	1957	1970	1960

### 第3項 人工消化試験による消化性の評価

#### 1. 実験方法

稲川ら<sup>49</sup>の方法に基づいて人工消化試験を行った。

##### (1) ペプシンによる試料溶液の分解

試料粉末 100mg を試験管に入れ、0.1M KCl-HCl (pH1.9) 12mL と純水 7.1mL を加え、37℃の恒温槽で30分間予備加温を行った後、ペプシン(ブタ粘膜由来, SIGMA) 1mg を0.8mL の0.1M HCl に溶かしたものを加え、60分間反応させた。20% (w/v) トリクロロ酢酸を20mL 加え、酵素反応を停止させた。1時間の静置後、20,000×g で5分間遠心分離した上清を測定溶液とした。

##### (2) トリプシンによる試料溶液の分解

試料粉末 1g を100mL 容ビーカーに計り、1M NaOH を20mL 加え、マグネチックスターラーで30分間攪拌した。試料粉末の可溶化後、0.1M HCl を加え、pH7.5 に調整し、50mL 容メスフラスコで定容し、試料溶液とした。試料溶液 2mL を試験管に入れ、0.2M Tris-HCl (pH7.5) 4mL と純水 3.6mL を加え、ボルテックスミキサーで混合した。37℃の恒温槽で30分間予備加温を行った後、トリプシン(ブタ膵臓由来, 富士フイルム和光純薬株式会社)を0.4mL 加え、60分間反応させた。20% (w/v) トリクロロ酢酸を10mL 加え、酵素反応を停止させた。1時間の静置後、20,000×g で5分間遠心分離した上清を測定溶液とした。

##### (3) 2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸(TNBS)法による遊離アミノ酸量の測定

測定溶液 0.2mL を試験管に入れ、0.2M ホウ酸-NaOH (pH9.4) を2mL と4mM TNBS を1mL 加え、ボルテックスミキサーで混合した。室温で30分間静置し、18mM 炭酸ナトリウムを含む2M リン酸二水素ナトリウムを1mL 加え、波長 420 nm での吸光度を測定した(V-630iRM, 日本分光)。検量線にはグリシンを希釈したもの(5～

0.625  $\mu\text{mol/mL}$ )を用い、試料の遊離アミノ酸量を測定した。

#### (4) 統計処理

実験結果は平均値 $\pm$ 標準誤差(SE)で表示した。統計処理は解析ソフトの Statcel4 (OMS 出版)を使用した。グループ間の比較は Tukey-Kramer 多重比較検定を用いて解析し、有意水準は  $p < 0.01$  とした。

## 2. 結果および考察

動水圧処理によって消化性が向上するのかを調べるためにトリプシンとペプシンを使用し、人工消化試験を行った(Fig.10)。ペプシン分解による遊離アミノ酸量は CTL :  $1.5 \pm 0.1 \mu\text{mol/mL}$ 、DHP :  $1.5 \pm 0.1 \mu\text{mol/mL}$ 、Ezm :  $3.1 \pm 0.1 \mu\text{mol/mL}$ 、Ezm + DHP :  $4.0 \pm 0.1 \mu\text{mol/mL}$  となった。トリプシン分解では、CTL :  $1.4 \pm 0.1 \mu\text{mol/mL}$ 、DHP :  $1.4 \pm 0.1 \mu\text{mol/mL}$ 、Ezm :  $2.2 \pm 0.1 \mu\text{mol/mL}$ 、Ezm + DHP :  $3.3 \pm 0.1 \mu\text{mol/mL}$  となった。ペプシンとトリプシンの両方で、CTL と DHP に対して Ezm は有意に高値で、Ezm に対して Ezm + DHP は有意に高値であった。このことから、動水圧の単独処理では *in vitro* における消化性の向上は見られず、酵素との併用処理において易消化性を示すことが明らかとなった。

ペプシンは酸性環境でタンパク質を粗分解する。基質特異性は厳密でないものの、主にチロシンやフェニルアラニンなどの芳香族アミノ酸のペプチド結合を切断する。また、トリプシンは基質特異性が高く、塩基性アミノ酸のアルギニンまたはリジンのカルボキシル基側のペプチド結合を加水分解する。第2節で Ezm + DHP は、遊離アミノ酸やペプチドの含有量が多く、低分子化していることが示された。元々の遊離アミノ酸の多さに加え、ペプチドが消化酵素の加水分解を受け、遊離アミノ酸となったことで、人工消化試験において高値を示したと、推察された。DHP において CTL との差がみられなかった理由としては、酵素による前処理がなかったため、複数回の動水圧処理によってタンパク質構造の密度が上昇し、内部の空間が少なくなったことで加

水分解を受けにくい構造になった可能性が考えられた。DHP は低分子化しなかったために人工消化試験においても遊離アミノ酸が増加しなかったと推察された。



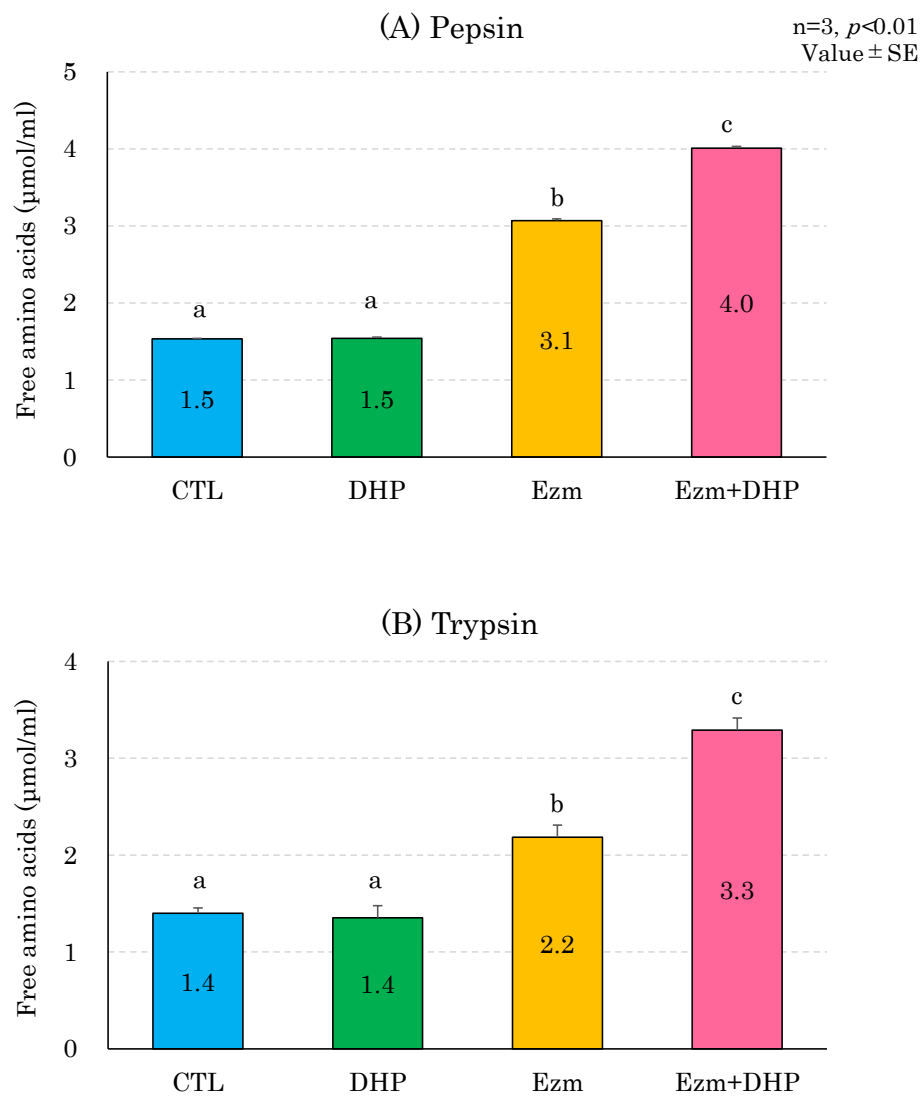


Fig.10 Artificial digestion test

#### 第4項 窒素出納試験によるタンパク質利用率の評価

##### 1. 実験方法

##### (1) 被験動物および飼育方法

被験動物は雄性 10 週齢の SD 系ラットを 30 匹(日本 SLC)を用い、市販固形飼料(MF, オリエンタル酵母工業)で 2 週間の馴化飼育を行った。その後、平均体重が均一になるように 6 匹ずつ CTL 群、DHP 群、Ezm 群、Ezm+DHP 群、無タンパク質 (Protein-free : Pf) 群の 5 群に分け、Table2 に示した組成の飼料を 7 日間 pair-feeding で給餌した。代謝性窒素を測定する目的で Pf 群を設け、AIN76 組成のカゼインをコーンスターチに置換した無タンパク質食を与えた。また、飼料は食べこぼしがないように、ぬるま湯を加え、練り餌とした。8 日目より代謝ゲージに移し、3 日分の糞尿を分別採取した。給餌は 11:00~12:00 の間に行い、水は自由摂取とし、8:00~ 20:00 の 12 時間照明下、室温 24℃、湿度 55%のクリーンに準じる環境下の飼育室で飼育した。試験飼育終了後、イソフルラン麻酔下で心臓より全血採取し、肝臓、脂肪 2 点(腎周囲脂肪、精巣上体周囲脂肪)、骨格筋である後肢のヒラメ筋(Soleus muscle : SOL)、長趾伸筋(Extensor digitorum longus muscle : EDL)を摘出して筋湿重量を計測した。

##### (2) 代謝ゲージを用いた窒素量の測定

代謝ゲージを使用して採尿する際は、50mL 容コニカルチューブに 2N HCl を 2mL 入れ、尿受け器の先とチューブを密着させて設置することで揮発性窒素化合物の散逸を防いだ。糞は代謝ゲージの下にアルミホイルで作成した受け皿を設置し回収した。糞尿の採取は 12:00~13:00 の間に行い、重量を測定した後に-30℃で保管した。

糞尿中の窒素量はマクロ改良ケルダール法によって測定した。尿は全量を混合して純水で 90mL に定容後に 2mL 採取し、糞は凍結乾燥(DC-280, タイテック)後に全量をコーヒーマイルで粉碎したものを 0.5g 精秤し、一般成分分析と同様に測定した。真の吸収率 (True digestibility : TD)、生物価 (Biological value : BV)、正味タン

パク利用率 (Net protein utilization : NPU) は下記の式により算出した。

$$TD = \frac{I - (F - F_0)}{I} \times 100$$

$$BV = \frac{I - (F - F_0) - (U - U_0)}{I - (F - F_0)} \times 100$$

$$NPU = TD \times BV \times 1/100$$

I : 摂取窒素量

F : 糞窒素量

F<sub>0</sub> : 代謝性糞窒素量

U : 尿窒素量

U<sub>0</sub> : 内因性尿窒素量

なお、動物実験は東京農業大学動物実験委員会における倫理的承認を得て、総理府の「実験動物の飼育および保管等に関する基準」および東京農業大学「動物実験に関するガイドライン」に従い行った。

### (3) RT-Quantitative PCR(RT-qPCR)による骨格筋の解析

RNA の抽出は、筋肉組織を液体窒素中で粉末化し、ISOGEN (NIPPON GENE)を用いて行った。200ng のトータル RNA から cDNA を ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (TOYOBO)を使用して合成した。以下の特定のプライマーセットを用いたリアルタイム(RT)-PCR によって p70S6K および 18S ribosomal RNA の mRNA 発現レベルを測定した。使用したプライマーは

70S6K 5'-GGTGGAGTCTGGGAGCATTA-3' (forward) and  
5'-GCTTGGACTTCTCCAGCATC-3' (reverse);

18S ribosomal RNA 5'-GCCATGCATGTCTAAGTACGC-3'

(forward) and 5'-CCGTCGGCATGTATTAGCTC-3' (reverse) である。PCR 産物の増幅と定量は、TUNDEBIRD Next SYBR qPCR Mix(TOYOBO)と CFX Connect Real-Time System(Bio-Rad)を用いて行った。相対的な mRNA 発現量の算出には、相対標準曲線法を用いて標準物質を投与した。RNA 量は、18SrRNA レベルに対して正規化した。

#### (4) 統計処理

実験結果は平均値±標準誤差(SE)で表示した。統計処理は解析ソフトの Statcel4 (OMS 出版)を使用した。グループ間の比較は Tukey-Kramer 多重比較検定を用いて解析し、有意水準は  $p < 0.05$  または  $p < 0.01$  とした。外れ値はグラブススミルノフ棄却検定によって除外した。

## 2. 結果および考察

### (1) 動水圧処理した食肉摂取が体重増加、臓器・脂肪組織重量、骨格筋重量に及ぼす影響

体重および摂餌量を Table3 に示した。初期体重、最終体重、体重増加量、摂餌量および飼料 1g が増やす体重を示す飼料効率は 4 群での有意差はなかった。しかし、Ezm+DHP 群では最終体重、体重増加量、飼料効率が微増する傾向が見られた。次に Table4 に肝臓重量、脂肪重量、筋湿重量を示した。肝臓重量、脂肪重量は 4 群間での有意差は見られなかった。体重 100g 当たりの骨格筋重量は、SOL では CTL 群 :  $72.1 \pm 3.2 \text{ mg}$ 、DHP 群 :  $84.6 \pm 3.6 \text{ mg}$ 、Ezm 群 :  $71.2 \pm 3.6 \text{ mg}$ 、Ezm+DHP 群 :  $83.8 \pm 1.6 \text{ mg}$  となり、4 群間での有意差はないものの、動水圧処理した試料は微増した。EDL では 4 群間での有意差は見られなかった。

Table3 Body weight and amount of food intake

		CTL	DHP	Ezm	Ezm+DHP
Initial B.W.	(g)	$372.0 \pm 10.2$	$374.7 \pm 6.4$	$373.1 \pm 6.0$	$374.6 \pm 5.6$
Final B.W.	(g)	$399.9 \pm 9.4$	$399.3 \pm 5.3$	$391.9 \pm 4.8$	$403.2 \pm 5.6$
B.W. gain	(g)	$27.9 \pm 3.5$	$24.6 \pm 3.3$	$18.8 \pm 2.4$	$28.6 \pm 3.9$
Food intake	(g)	$173.2 \pm 0.3$	$173.5 \pm 0.1$	$172.3 \pm 1.0$	$172.3 \pm 1.2$
Food efficiency ratio		$0.16 \pm 0.02$	$0.14 \pm 0.02$	$0.11 \pm 0.01$	$0.17 \pm 0.02$

n=6, Value  $\pm$  SE  
 B.W. : Body weight

Table4 Weight of liver, fat, and muscle

		CTL	DHP	Ezm	Ezm+DHP
Liver	(g)	$19.2 \pm 0.5$	$17.8 \pm 0.8$	$19.7 \pm 0.4$	$19.5 \pm 0.4$
Perirenal fat	(g)	$8.9 \pm 0.8$	$8.0 \pm 0.5$	$8.3 \pm 1.0$	$9.8 \pm 0.7$
Epididymal fat	(g)	$7.9 \pm 0.7$	$7.0 \pm 0.3$	$7.6 \pm 0.7$	$8.8 \pm 0.5$
SOL	(mg/100g B.W.)	$72.1 \pm 3.2$	$84.6 \pm 3.6$	$71.2 \pm 3.6$	$83.8 \pm 1.6$
EDL	(mg/100g B.W.)	$85.9 \pm 3.5$	$84.8 \pm 6.5$	$96.7 \pm 3.4$	$95.6 \pm 3.3$

n=6, Value  $\pm$  SE  
 SOL : Soleus muscle  
 EDL : Extensor digitorum longus muscle

### (2) 動水圧処理した食肉摂取が窒素出納に及ぼす影響

窒素出納試験の結果を Fig.11 に示す。摂取窒素量(Fig.11 (A))と糞中の排泄窒素量(Fig.11 (B))は 4 群間での差は見られなかった。尿中の排泄窒素量は、Ezm 群： $413.8 \pm 16.1 \text{ mg/day}$ 、CTL 群： $397.6 \pm 17.2 \text{ mg/day}$ 、DHP 群： $390.4 \pm 8.4 \text{ mg/day}$  に対して Ezm + DHP 群は  $316.7 \pm 17.5 \text{ mg/day}$  と有意に低値を示した。TD(Fig.11 (C))は 4 群間での有意差は見られず、消化率はいずれも約 96%であった。BV(Fig.11 (D))は吸収後の窒素の利用率を示しており、CTL 群： $38.9 \pm 2.6\%$ 、Ezm 群： $35.9 \pm 2.9\%$  に対して Ezm + DHP 群： $50.6 \pm 2.4\%$  は有意に増加し、DHP 群： $41.4 \pm 1.2\%$  はその間であった。NPU(Fig.11 (E))は窒素が体タンパク質として保持される割合を示し、TD と BV を乗じて算出される。結果は、BV と同様に CTL 群： $37.2 \pm 2.6\%$ 、Ezm 群： $34.9 \pm 3.2\%$  に対して Ezm + DHP 群： $48.4 \pm 1.6\%$  は有意に増加し、DHP 群： $40.4 \pm 1.1\%$  はその間であった。以上より、体内での窒素保持率が最も高く、体タンパク質合成に寄与している処理条件は Ezm + DHP であることが示された。

### (3) 動水圧処理した食肉摂取が骨格筋中の体タンパク質合成因子に及ぼす影響

RT-qPCR の結果を Fig.12 に示した。CTL 群に対して、SOL も EDL もほぼ同じ相対値を示した。SOL の筋湿重量において、DHP 群や Ezm + DHP 群はやや増加傾向を示したものの、RT-qPCR において、体タンパク質合成時に増加する p70S6K の遺伝子発現量に変化は見られなかった。運動負荷を加えていないため、骨格筋の分解と合成が活発に行われなかったことが原因と推察された。

CTL と Ezm に対して、Ezm + DHP は低分子化していたことによって、体内での窒素保持率と NPU が向上したことが推察された。NPU はタンパク質よりもペプチドにおいて向上することが報告されており<sup>50-52</sup>、本結果でもタンパク質である CTL 群に対し、ペプチドを

含む **Ezm+DHP** 群での **NPU** は増加した。ペプチドでは、低分子化の過程で高分子が少なくなり、消化酵素の抵抗性が下がるために窒素保持率が高くなる。また、**Poullain** らの研究ではホエイ、ホエイペプチド、同じ組成のアミノ酸の 3 つの試料を使用して窒素出納試験を行ったところ、ホエイペプチドは窒素保持率が有意に高い結果となった<sup>53</sup>。**Ezm+DHP** は、遊離アミノ酸量とペプチドが増加したことが第 2 節において示されたが、ペプチドが優位に存在することで **NPU** が向上したことが推察された。また、ナノ粒子を扱うドラッグデリバリーシステムにおいて、粒子径が 1,000nm 以下の場合はパイエル板を介して肝臓へ移行し、300nm 以下の場合は肝臓を介して血中まで速やかに移行することから、粒子の大きさも吸収に影響を及ぼす<sup>54,55</sup>。このことから、**Ezm+DHP** 群において **NPU** が向上した要因は、低分子化だけでなく、動水圧処理による微粒化の影響も含まれることが推察された。

ただし、本実験においては運動負荷を加えていないこと、短期間であることが原因で筋湿重量と **RT-qPCR** における遺伝子発現量に変化がなかったと推察される。**Ezm+DHP** の摂取が骨格筋合成を促進させるのかについては、給餌と共に運動負荷を加えた実験を行う必要があると考えられた。

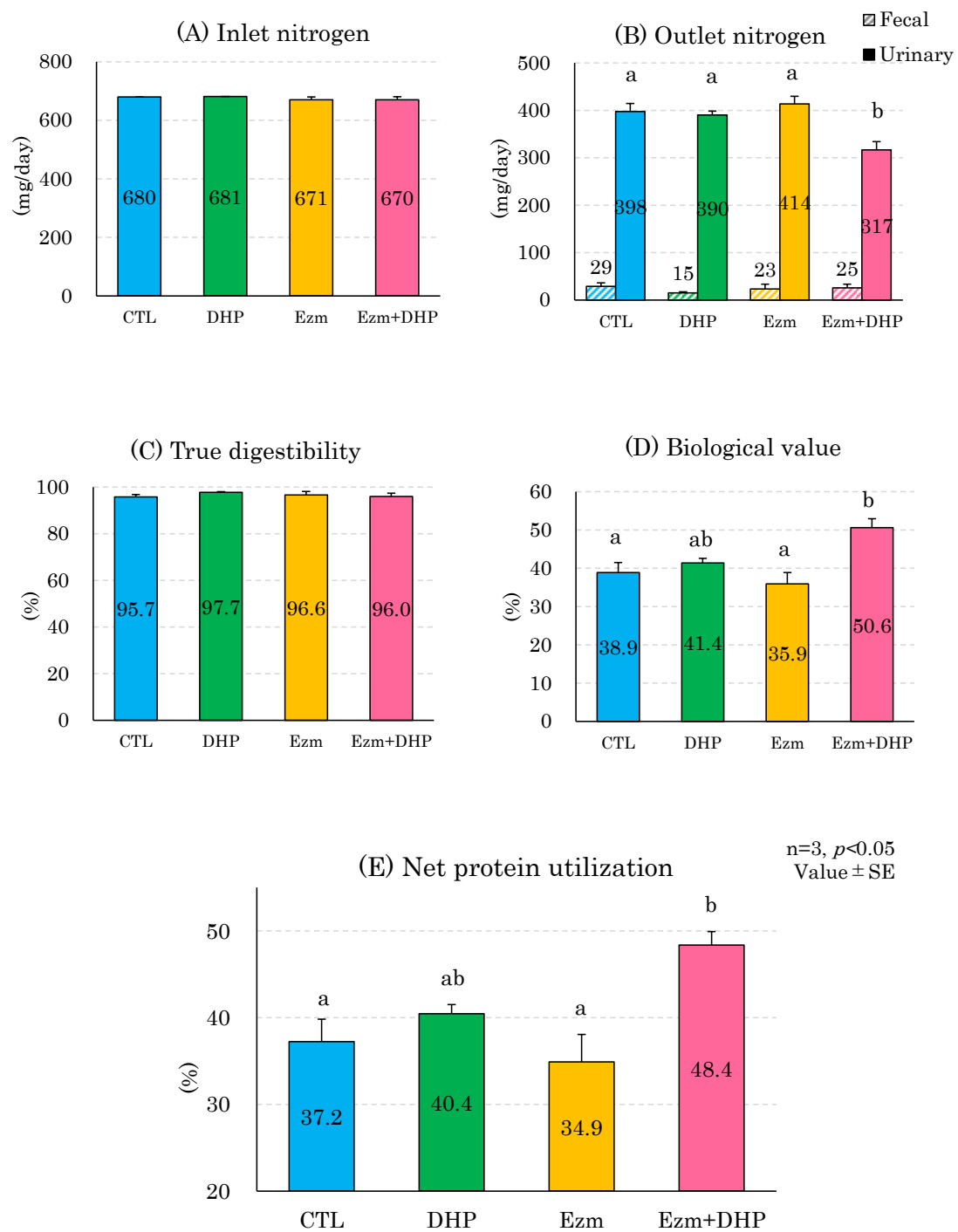


Fig.11 Nitrogen balance test



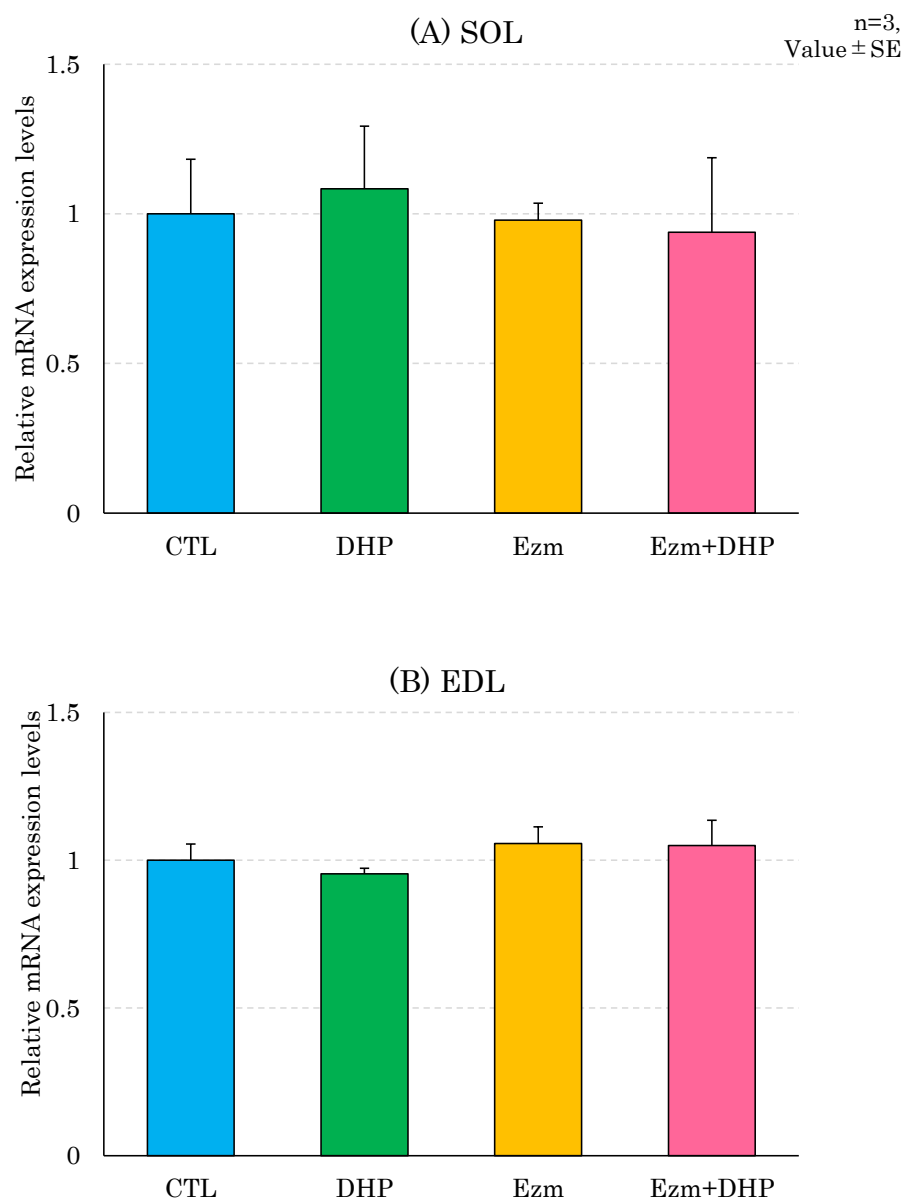


Fig.12 mRNA expression levels of p70S6K by RT-qPCR

## 第5項 小括

超高圧領域における動水圧処理は、強い物理力によって粒子径だけでなく分子量に影響を与える。第2節において低分子化は、酵素と高圧ホモジナイザーの併用処理である **Ezm+DHP** で最も促進され、次いで **Ezm** となり、**DHP** はほとんど変化がなかった。*in vitro* の人工消化試験で、**Ezm+DHP** は最も高値を示し、次いで **Ezm**、**DHP**、**CTL** となったことから、低分子化しているほど消化酵素の作用を受けやすいことが示唆された。

*in vivo* の窒素出納試験では、**Ezm+DHP** 群は最も **NPU** が高く、次いで **DHP** 群、**CTL** 群、**Ezm** 群となった。生体内での吸収速度はペプチド、アミノ酸、タンパク質の順に速く、同様に **NPU** はペプチド、アミノ酸、タンパク質の順に高値を示すことから、**Ezm+DHP** 群において、ペプチドの存在がアミノ酸よりも優位に作用したために **NPU** が高値となったことが推察された。しかし、2番目に低分子化が進んでいた **Ezm** 群は最も低い **NPU** となった。このことから、**NPU** の向上は微粒化と低分子化の両方が成因であることが示唆された。**DHP** は微粒化しているが、低分子化しておらず、**Ezm** は微粒化しておらず、低分子化していたことで、**NPU** が向上せず、**CTL** との有意差がなかったものと推察された。

本実験の窒素出納試験では、鶏ささみ肉が微粒化・低分子化していた **Ezm+DHP** において、体内でのタンパク質保持率が増加し、超高圧領域における動水圧処理で期待されていた吸収性向上が示された。

#### 第4節 酵素・動水圧処理したささみ肉が骨格筋に与える影響

##### 第1項 サルコペニアと骨格筋

骨格筋は体重の約 40%を占める運動器官である。骨格筋では日常的に体タンパク質の分解と合成が繰り返され、常に新しいタンパク質に置き換わっている<sup>56</sup>。骨格筋タンパク質は、合成が優位であれば筋肥大、分解が優位であれば筋委縮を起こす。サルコペニアでは加齢や疾患によって分解が優位になり、骨格筋量と骨格筋力の低下を生じる。特に瞬発力に関係する速筋繊維の量的減少と質的低下を起こすことが特徴で、速筋の減少は高齢者が転倒し、寝たきりとなる原因の一つである。筋肉量の低下を予防するには、筋肉に一定以上の運動刺激を加えることが推奨されている<sup>57</sup>。タンパク質の合成と分解の経路の一部を Fig.13 に示したが、運動刺激は IGF-1 を、ペプチドやアミノ酸は mTOR を介して体タンパク質合成へと至ることが知られている<sup>58,59</sup>。

サルコペニア研究におけるモデル動物は、高齢の F344 系、Wister 系、SD 系のラットの利用や、尾部懸垂、ギプス固定による筋委縮の誘導、病態モデルの応用などが行われてきた。しかし、動物が高齢化するまでの時間を要することや、サルコペニア病態を示さないことから、現在でもサルコペニアモデル動物の確立が模索されている。近年では、老化促進モデルマウス (Senescence- Accelerated Mouse : SAM) がサルコペニアモデルとして応用されるようになった。特に Prone 8 (SAMP8) は短命であると共に学習記憶障害を起こすため、認知症研究において多用されてきたが、サルコペニアモデルとしても有用であることが報告されている<sup>60,61</sup>。本実験では SAMP8 に対し、第 2 節において最も NPU が向上した Ezm+DHP をタンパク質源として与え、持久トレーニングを同時に行うことで、サルコペニアモデル動物の骨格筋への影響を評価した。

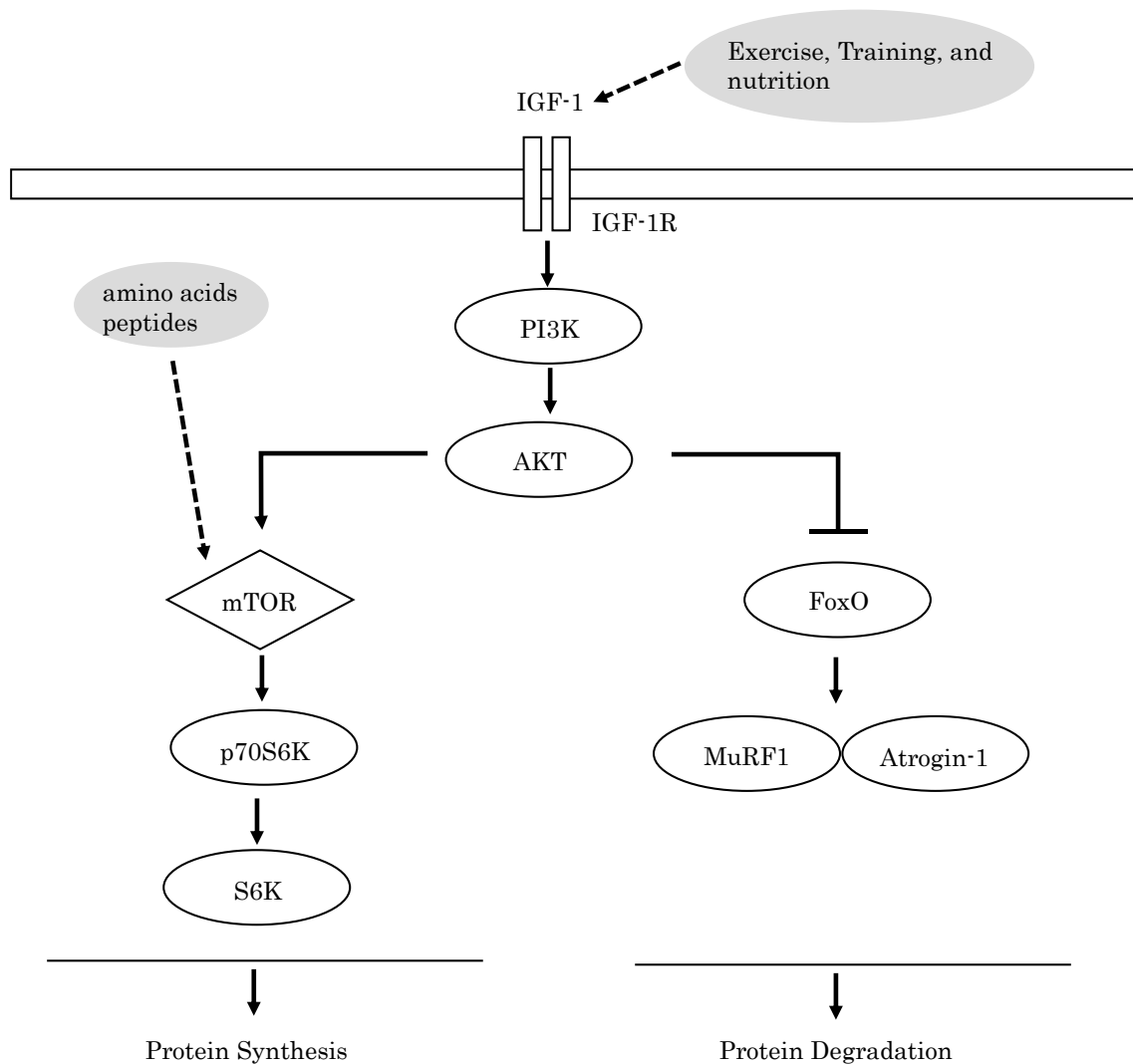


Fig.13 Pathways of protein synthesis and degradation.  
 Quoted from Cabello-Verrugio et al, Angiotensin II: Role in Skeletal Muscle Atrophy, Curr. Protein Pept. Sci., 13, 560-569 (2012) and modified in part.

## 第2項 実験方法

### 1. 被験動物および飼育方法

被験動物として老化促進・学習障害・サルコペニアを示す Senescence-Accelerated Mouse Prone 8 (SAMP8)を選択した。マウスは日本 SLC より雄性 10 週齢を 20 匹購入した。

SAMP8 は闘争心が強く、一空間で共生できないためアルミ製の仕切り板をつけた 10 連のステンレスゲージにて個別に飼育した。2 か月間の馴化飼育後、19 週齢にて体重が均一になるよう CTL 食群(n=10)と Ezm+DHP 食群(n=10)の 2 群に分けた。飼料は、タンパク質源に CTL と Ezm + DHP を配合した第 3 節(Table2)と同一の組成とした。なお、CTL と Ezm + DHP は生食を避け、熱変性を最小限に抑えるために凍結乾燥の前に 65℃ 10 分間の加熱処理を行った。給餌方法は pair-feeding で行い、水は自由摂取とした。8:00~20:00 の 12 時間照明下、室温 24℃、湿度 55%のクリーンに準じる環境下の飼育室で飼育した。

### 2. 持久トレーニング

試験飼料給餌開始後からトレッドミル(MK-680C, 室町機械)により持久トレーニングを週 2 回、5 か月間行った。トレーニングは給餌前の午前中に行い、8m/min で開始し、1 分毎に 1m/min ずつ速度を上げ、10m/min で 13 分間維持し、合計 15 分間の運動を負荷した。

### 3. 骨格筋の摘出

マウスは 39 週齢目にイソフルランによる吸入麻酔下で心臓採血により屠殺し、速やかに両脚からヒラメ筋(SOL)、長趾伸筋(EDL)の摘出を行った。摘出した骨格筋は湿重量を測定した後、液体窒素で凍結し、分析まで-80℃で保管した。次に腸間膜脂肪、腎周囲脂肪、精巣上体脂肪をそれぞれ摘出した。

なお、動物実験は東京農業大学動物実験委員会における倫理的承認(承認番号 2020003)を得て、総理府の「実験動物の飼育および保管等

に関する基準」および東京農業大学「動物実験に関するガイドライン」に従って行った。

#### 4. 骨格筋の解析方法

##### (1) RT-Quantitative PCR(RT-qPCR)

第3節第4項と同様の手法で RT-qPCR を行い、体タンパク質の合成系因子として IGF-1(Insulin growth factor-1)、mTOR(mammalian target of rapamycin)、p70S6K(P70 S6 Kinase)、分解系因子として MuRF1(Muscle RING-finger protein1)、Atrogin-1 および内部標準の 18S ribosomal RNA の mRNA 発現レベルを測定した。使用したプライマーは Table5 に示した。相対的な mRNA 発現量の算出には、相対標準曲線法を用いて標準物質を投与した。RNA 量は、18SrRNA レベルに対して正規化した。

##### (2) Western blot による p70S6K のリン酸化率の解析

マウス骨格筋は RIPA Lysis バッファー(Santa Cruz)を用いて溶解液を調製した。タンパク質濃度は BCA protein assay kit (TaKaRa)を用いて測定した。等量のタンパク質を含むサンプルを SDS 化し、12.5%ポリアクリルアミドゲルに 30 $\mu$ g/well でアプライし、SDS-PAGE にて分離を行った。PVDF 膜に転写し、PBS-Tween に溶解した 5%スキムミルクでブロッキングした後、一次抗体として 1000 倍に希釈した p-p70S6K (Thr389, Cell Signaling)、p70S6K (Cell Signaling)、GAPDH (FL-335, Santa Cruz Biotechnology)を添加して 4℃で一晩反応させた。次に二次抗体として 10,000 倍希釈した抗ウサギ IgG HRP 結合抗体を添加して 27℃で 1 時間反応させた後、PVDF 膜を ECL ウェスタンブロット検出試薬(GE Healthcare Life Sciences)で化学発光させ、ChemiDoc イメージングシステム(Bio-Rad)を用いて画像化した。定量化は Image J(NIH)を用いて行った。

Table5 Primer set

Primer name	Forward sequence 5'-3'	Reverse sequence 5'-3'
IGF-1	GACATCCGCAACGACTATCAG	GTAGTTATTGGACACCGCATC
mTOR	GTGCCAGGAACATACGACCC	CCTCTGCTTGGATGTGATGACTT
p70S6K	CACTTCCAATCCGACAACCC	GGCCGTTTGGAGATCATAGG
Atrogin-1	GGCGGACGGCTGGAA	CAGATTCTCCTTACTGTATACCTCCTTGT
MURF1	ACGAGAAGAAAGAGCGAGCTG	CTTGGCACTTGAGAGGAAGG
18S rRNA	CTCAACACGGGAAACCTCAC	CGCTCCACCAACTAAGAACG

## 5. 統計処理

実験結果は平均値±標準誤差(SE)で表示した。統計処理は解析ソフトの Statcel4 (OMS 出版)を使用した。複数グループ間の比較は、Tukey-Kramer 多重比較検定、2 群間の比較は、スチューデントの  $t$  検定を用いて解析した。いずれも有意水準は  $p < 0.05$  または  $p < 0.01$  とした。

### 第3項 結果および考察

#### 1. 動水圧処理した食肉摂取が体重増加と脂肪組織および骨格筋重量に及ぼす影響

体重と摂食量合計、脂肪重量の結果を Table6 に示した。初期体重は CTL 群 : 35.0g、Ezm+DHP 群 : 33.9g、終体重は CTL 群 : 38.5g、Ezm+DHP 群 39.3g であった。CTL 群の体重は 36 週齢をピークに減少し、体重増加量は 3.5g で初期体重と終体重間で有意差はなかった。一方、Ezm+DHP 群では体重増加量が 5.4g で有意に ( $p<0.01$ ) 増加し、体重は 38 週齢まで維持された。CTL 群と Ezm+DHP 群間においては、初期体重、終体重ともに有意差は見られなかった。体重 1g 当たりの腸間膜脂肪、腎周囲脂肪、精巢上体脂肪の合計重量は、CTL 群 :  $57.7 \pm 5.7$ mg、Ezm+DHP 群 :  $69.6 \pm 6.0$ mg となり、有意差は見られなかった。

体重 1g に占める SOL の重量は、CTL 群 :  $0.96 \pm 0.06$ mg、Ezm+DHP 群 :  $1.12 \pm 0.07$ mg となり、有意差ないものの、Ezm+DHP において増加傾向を示した。EDL の重量は、CTL 群 :  $0.48 \pm 0.02$ mg、Ezm+DHP 群 :  $0.62 \pm 0.05$ mg となり、筋湿重量が有意に ( $p<0.05$ ) 増加した。



Table6 Body weight, total food intake, fat weight and muscle weight of SAMP8 fed CTL and Ezm+DHP diets.

		CTL	Ezm+DHP
Initial B.W.	(g)	35.0 $\pm$ 1.4	33.9 $\pm$ 1.3
Final B.W.	(g)	38.5 $\pm$ 1.6	39.3 $\pm$ 1.7 <sup>††</sup>
Total feed intake	(g)	532.9 $\pm$ 10.7	525.4 $\pm$ 5.4
Mesenteric fat	(g)	0.43 $\pm$ 0.06	0.54 $\pm$ 0.08
Perirenal fat	(g)	0.69 $\pm$ 0.10	0.88 $\pm$ 0.13
Epididymal fat	(g)	1.20 $\pm$ 0.16	1.40 $\pm$ 0.15
Total fat mass	(mg/1g BW)	57.7 $\pm$ 5.7	69.6 $\pm$ 6.0
SOL muscle	(mg)	36.1 $\pm$ 3.2	43.9 $\pm$ 2.4
	(mg/1g BW)	0.96 $\pm$ 0.06	1.12 $\pm$ 0.07
EDL muscle	(mg)	18.7 $\pm$ 0.2	23.8 $\pm$ 1.2**
	(mg/1g BW)	0.48 $\pm$ 0.02	0.62 $\pm$ 0.05*

†† Significant difference was compared between initial weight and final weight for each group ( $p < 0.01$ ).

The total food intake was the sum of the total food intake during the rearing period from 19 to 39 weeks of age.

Fat mass was the weight of epididymal fat, perirenal fat, and mesenteric fat, and the total weight of all three per gram of body weight.

Values are mean  $\pm$  SE.\* and \*\* denote  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  vs CTL (n = 8).

BW: Body weight

## 2. 動水圧処理した食肉摂取が骨格筋タンパク質合成遺伝子発現量に及ぼす影響

Ezm + DHP 群における筋湿重量の増加が筋合成系の亢進によるものなのかを明らかにするため、骨格筋タンパク質合成系因子 IGF-1、mTOR、p70S6K について RT-qPCR で発現量を検討した(Fig.14)。SOL と EDL のどちらも IGF-1 では CTL 群と Ezm + DHP 群に差が見られなかった。mTOR と p70S6K は、SOL において CTL 群と Ezm + DHP 群での差はないものの増加傾向を示し、EDL において CTL 群に対して Ezm + DHP 群で有意に増加した。

さらに遺伝子発現量に有意差があった EDL についてウエスタンブロッティングによる p70S6K のリン酸化率を測定した(Fig.15)。リン酸化率を CTL 群の相対値として示すと、Ezm + DHP 群は  $1.30 \pm 0.01$  となり、有意に( $p < 0.05$ )増加した。このことから Ezm + DHP 群では、筋合成系の亢進によって筋湿重量が増加したことが推察された。

一方で骨格筋は、分解系抑制によっても筋湿重量の増加が生じることが報告されている<sup>62</sup>。Ezm + DHP 群において、骨格筋の分解系抑制が起こっているのかを検討するため、タンパク質分解因子である MuRF1、Atrogin-1 の遺伝子発現量を RT-qPCR にて検出した(Fig.16)。その結果、CTL 群と Ezm + DHP 群に差が見られなかった。以上のことから、Ezm + DHP 群における筋湿重量の増加は、ユビキチンプロテアソーム系の分解抑制ではなく、筋合成系の亢進によるものであることが明らかになった。

Ezm + DHP の摂取が骨格筋を増加させた要因には、鶏ささみ肉が低分子化したことによる①ペプチド・アミノ酸の影響、②消化・吸収の効率向上による影響が考えられた。

食品由来のペプチドが筋肉増強へ関与する事例は、大豆や乳、卵白を中心に多く報告されている。乳ホエイペプチドは高齢者の筋肉において mTOR シグナルを改善し、タンパク質合成を促進することが報告されており<sup>63</sup>、ジペプチドのカルノシン・アンセリンやコラーゲンペプチドによる疲労軽減効果に伴う持久力向上や骨格筋の増量も報告さ

れている<sup>64-66</sup>。また、アミノ酸としては、鶏ささみ肉に含まれる分岐鎖アミノ酸が影響したことも考えられた。特にロイシンは **mTOR** を活性化させることで骨格筋タンパク質合成を促進するとともに、オートファジーの制御をすることで骨格筋タンパク質の分解を抑制している<sup>56,67</sup>。しかし、本研究ではオートファジーに関する実験を行っていないため、**Ezm + DHP** の摂取による **EDL** の肥大は、ペプチドとアミノ酸のどちらが優位に影響したのかは不明である。

体内への吸収速度は、タンパク質やアミノ酸よりもペプチドが優れていることは知られている<sup>68</sup>。通常、タンパク質は消化管内で3~4時間かけてアミノ酸やペプチドの状態に消化されて吸収に至る。特に乳由来のカゼインは、胃酸によって凝集するために胃での滞留時間が長く、緩やかに吸収される。このため、運動直後に速やかに筋肉への栄養補給を行うためには、アミノ酸やペプチドの方が適していると言える。さらに、ペプチドは吸収速度が速いだけでなく、体内での保持率が高く、体タンパク質合成に利用されやすいことも報告されている。高齢者の経管栄養補給においても、タンパク質を消化・吸収しやすいペプチドやアミノ酸に低分子化した消化態栄養剤や成分栄養剤が利用されている。窒素源がペプチドの消化態栄養剤は、窒素源がアミノ酸の成分栄養剤よりも体内での窒素保持率が高く、高齢者を含む被験者の術後栄養管理において体タンパク質であるアルブミンが有意に増加したと報告されている<sup>69</sup>。第3節の窒素出納において、**CTL** 群に対して **NPU** が最も高値だったのは **Ezm + DHP** 群であった。微粒化・低分子化された **Ezm + DHP** は体内への吸収速度が速いだけでなく、体タンパク質への利用効率が高いことが示されており、本節において筋湿重量が増加した要因の一つとして、低分子化したタンパク質摂取による吸収速度や体内保持率が関与している可能性が十分に考えられた。

以上のことから、鶏ささみ肉を酵素と動水圧で併用処理して低分子化したものをタンパク質源として摂取し、持久トレーニングをすると **mTOR** を介して骨格筋の肥大を惹起することが示された。

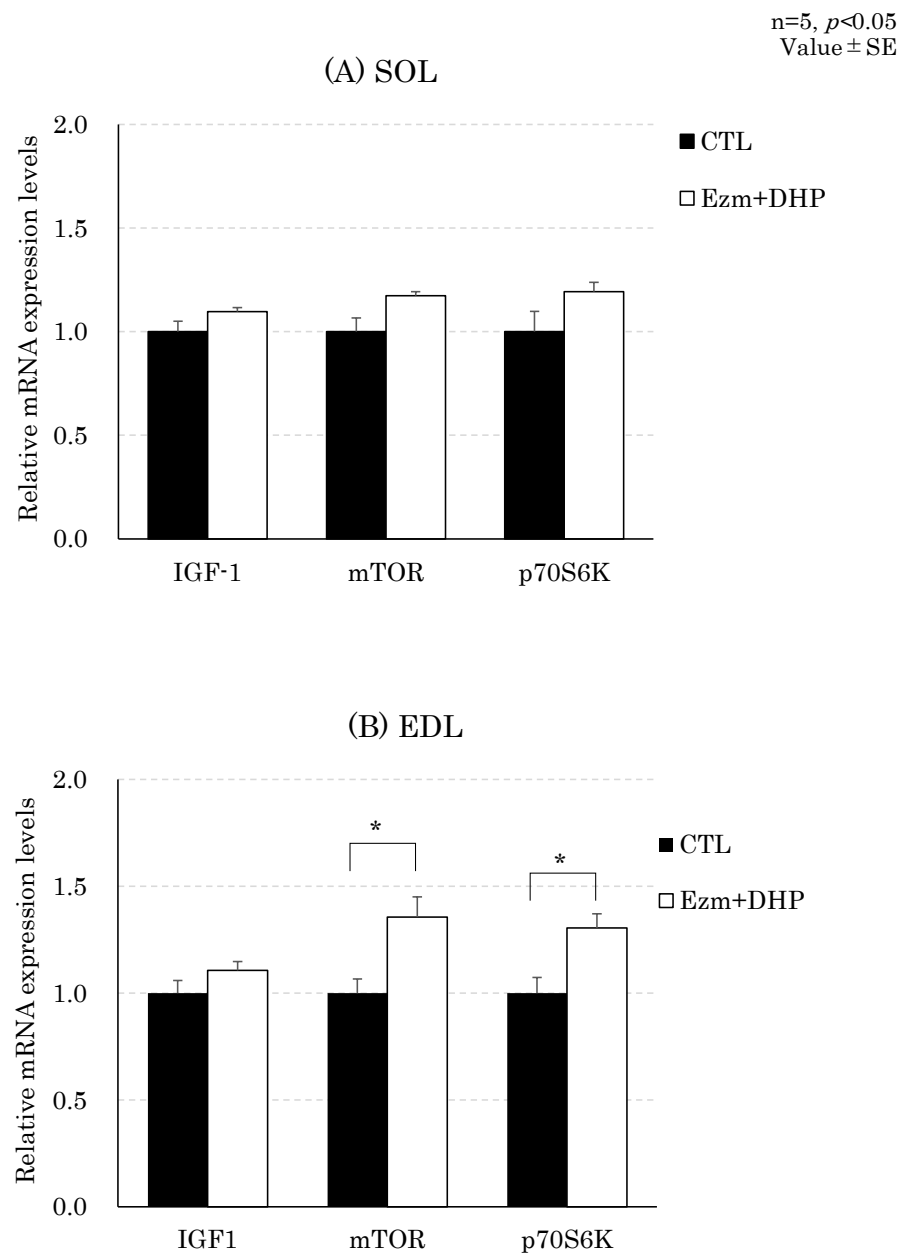


Fig.14 mRNA expression levels related to protein synthesis pathways

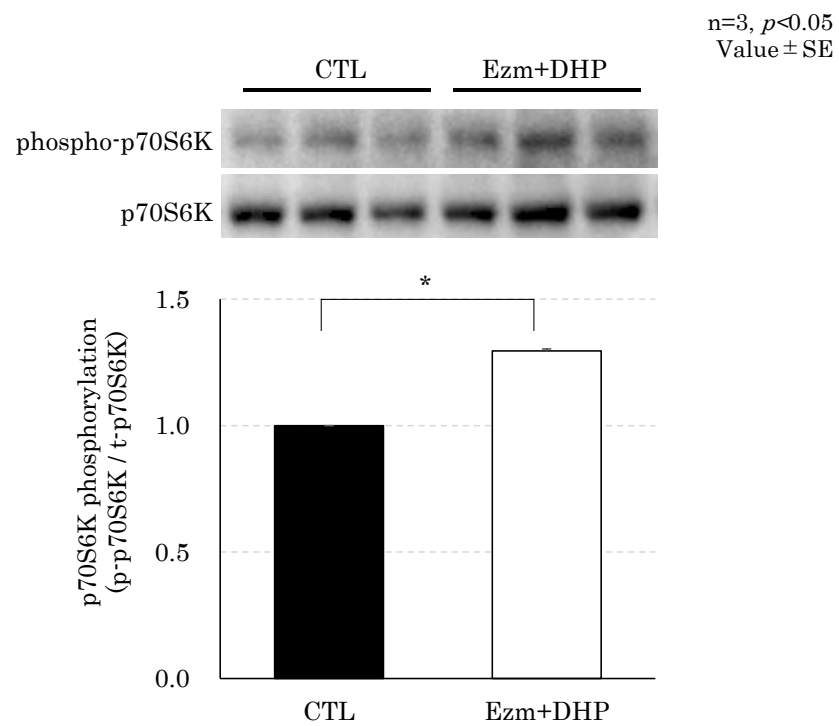


Fig.15 Phosphorylation rates were divided p-p70S6K by total p70S6K levels by western blotting

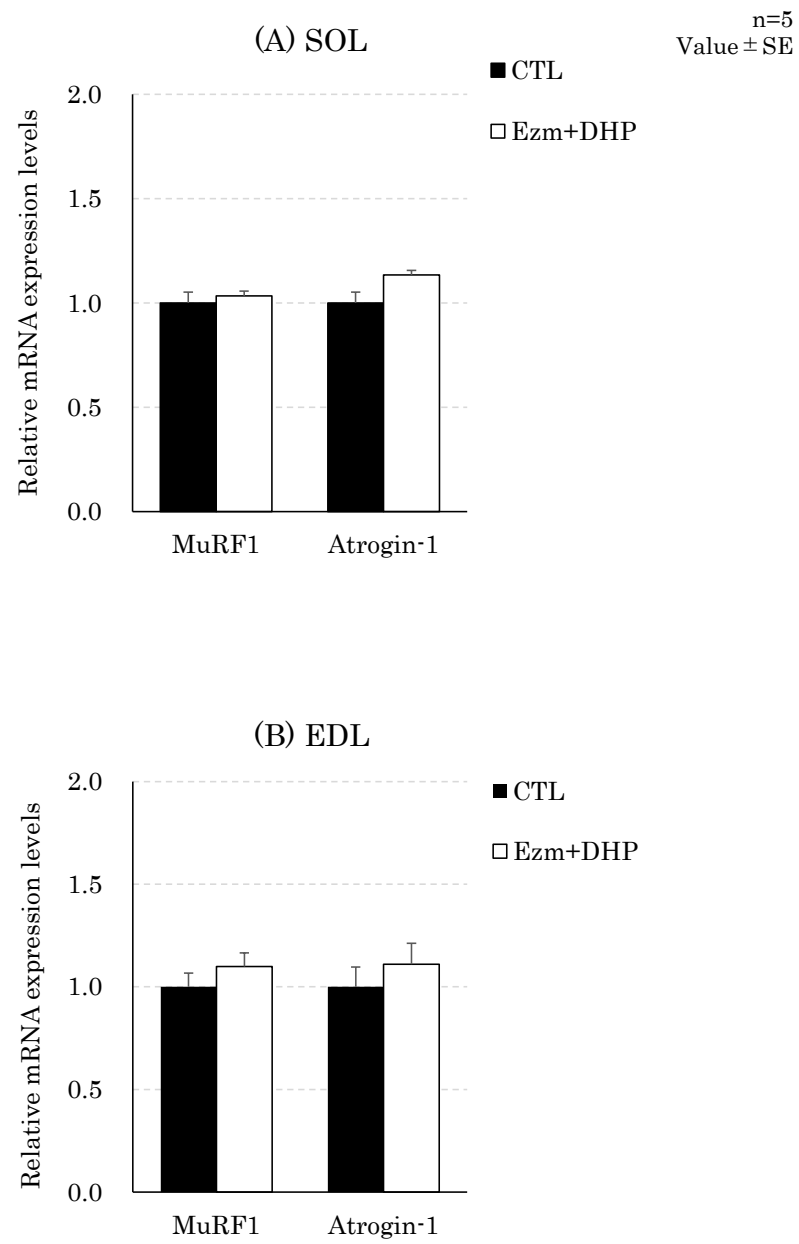


Fig.16 mRNA expression levels related to protein degradation pathways

#### 第4項 小括

鶏ささみ肉に酵素・動水圧処理した Ezm + DHP をサルコペニアモデルマウス (SAMP8) に給餌すると共に持久トレーニングを 5 か月間行った。SAMP8 は 35 週齢頃からサルコペニアを呈するが、39 週齢にて解剖し、遅筋であるヒラメ筋と、速筋である長趾伸筋を採取した。筋湿重量はヒラメ筋で増加傾向、長趾伸筋 (EDL) で有意に増加を示した。筋湿重量で有意差が見られた EDL に対して、RT-qPCR による遺伝子発現量の解析を行ったところ、タンパク質分解に関与するユビキチンプロテアソームの発現量には差が無く、タンパク質合成に関与する mTOR、p70S6K の発現量は Ezm + DHP において有意に増加した。また、ウエスタンブロッティングによる p70S6K のリン酸化率を評価したところ、Ezm + DHP において有意にリン酸化率が増加した。したがって、筋湿重量の増加は、骨格筋におけるタンパク質合成経路が活発になったために起きたことが明らかとなった。骨格筋合成の促進は、第 2 節、第 3 節において示された Ezm + DHP の低分子化による吸収性と体内保持率の向上が要因となったことが推察された。

## 第5節 第2章の研究成果

本章では、タンパク質の改質として吸収性および体内利用率の向上に着目し、鶏ささみ肉に対して動水圧処理を試みた。

第2節ではタンパク質の低分子化に関して実験を行った。タンパク質溶解性の結果、CTL と Ezm に対して DHP と Ezm + DHP は水素結合の減少と疎水性相互作用の増加が見られた。動水圧処理ではせん断力が強く働くため、水素結合は切断され、内部の疎水性部位が露出し、分子は安定化を図るために相互作用を働かせる。これら先行例と同様の結果が得られ、動水圧がタンパク質の高次構造を変性させたことが示された。次に SDS-PAGE や OPA タンパク質定量、HPLC によって低分子物の測定を行った。いずれの結果からも、DHP は CTL との差がなく、低分子化は起こっていなかった。DHP はタンパク質溶解性試験において動水圧の影響が確認されたものの、一次構造は変化しなかったことが示された。Ezm は CTL や DHP と比較して、低分子化が進んでいた。酵素による分解は、アミノ酸同士のペプチド結合を切断するため、水素結合や疎水性相互作用などは変化せず、低分子化が起こったものと推察された。Ezm + DHP は最も低分子化が進んでいた。酵素によってペプチド結合の切断が行われるだけでなく、動水圧が加わることで、水素結合や疎水性相互作用、S-S 結合が変化し、低分子化が促進されたものと推察された。このように、動水圧と酵素は作用部位が異なり、単独処理よりも併用処理において、低分子化を促進することが明らかとなった。

第3節では吸収性への評価を行った。*in vitro* の人工消化試験では消化酵素の加水分解を受けやすい試料は、Ezm と Ezm + DHP であることが示され、低分子化しているほど、分解されやすいことが示唆された。*in vivo* の窒素出納試験では Ezm + DHP 群の NPU が最も高値を示し、Ezm 群は低分子化しているものの、NPU は向上しなかった。このことから、NPU を向上させるには、低分子化だけでなく、微粒化していることも要因となることが推察された。

ここまでの結果で、Ezm + DHP 処理がもっとも吸収性高く、体内



保持されやすい条件であることが明らかとなった。

さらに第 4 節では **Ezm+DHP** が老化促進モデルの骨格筋へ与える影響を評価した。**CTL** 群に対して **Ezm+DHP** 群では骨格筋の増加が見られ、**mTOR** を介してタンパク質が合成されていることが示された。

このことから、体内保持された窒素は、運動刺激によって骨格筋合成に利用されることが示された。**mTOR** はアミノ酸とペプチドの双方に反応するため、どちらが優位に作用したかは判断できない。しかし、ペプチドは **NPU** がアミノ酸やタンパク質よりも高いことから、保持されたものが骨格筋へ利用された可能性が推察される。また、微粒化によって機能性成分のデリバリーが行われたことも可能性として挙げられるが、生体内で微粒化と低分子化のどちらが優位に働くのかは、評価が困難だと考えられた。動水圧技術を酵素と併用して食品へ応用することで、タンパク質は改質され、吸収性と体内利用率が向上することが、本章によって明らかとなった。

### 第3章 酵素・動水圧処理した鶏ささみ肉の調理性

#### 第1節 タンパク質補助食品の現状

第2章第4節の冒頭でふれたように、高齢になるほどタンパク質を積極的に摂取することが推奨されている。タンパク質補助機能を謳う食品・加工品は、これまで「筋肉・ボディーメイク」が目的であったが、「シニア」や「大人」といった言葉を使用した「骨格筋維持」を目的とする商品へと広がりを見せている。しかし、現在販売されている食品は、粉末を料理に添加する以外には、スープやゼリーとして摂取するものが多い。また、タンパク質源として乳や大豆が利用されており、畜肉を原材料とするものは皆無である。乳カゼインやホエイは高栄養価だが、加齢によって消化液の分泌量が減少し、乳製品の消化吸収能力が衰える。このことから、原材料であるタンパク質源を多様化し、補助食品の選択肢を増やす必要がある。

第2章において DHP、Ezm、Ezm + DHP のタンパク質は変性し、Ezm + DHP においては顕著な低分子化が示された。また、窒素出納による吸収性の評価やサルコペニアモデルマウスの実験結果より、高齢者の骨格筋維持に対する Ezm + DHP 摂取の有効性が示唆された。本章では Ezm + DHP を加工して食することを想定し、加水・加塩・焼成を行った際の試料表面組織の変化を電子顕微鏡レベルで観察すると共に、テクスチャー解析を行い、食べやすさを評価した。

## 第2節 酵素・動水圧処理した鶏ささみ肉の焼成による変化

### 第1項 実験方法

#### 1. 試料調製および焼成による水分損失率

試料は第2章第2節と同様の粉末化したものを使用した。試料粉末15gを100mL容ビーカーに計り、純水30mLを加え、ガラス棒で70回練り合わせた。重量の1%の塩化ナトリウムを添加し、再びガラス棒で70回練り合わせた。出来上がった練り肉を内寸 W10×D15×H1.5cmの枠に空気を抜きながら充填し、ヘラで W2.5×D3.0×H1.5cmに切断した。小さく切ったアルミホイル上に1個ずつ載せ、180℃で15分間予熱したトースター(BO-R65JB, MITSUBISHI)で15分間焼成した。なお、焼成時の肉の中心温度は93.9±3.7℃であり、75℃で1分間以上の加熱が行われていることを確認した。焼成前後の重量差を求めることで、焼成により損失した水分を下記の式から算出した。また、焼成による肉汁は見られなかった。

$$\text{水分損失率 (\%)} = \frac{(W_1 - W_2)}{(W_1 - W_0)} \times 100$$

W<sub>0</sub> : アルミホイルの重量

W<sub>1</sub> : アルミホイル+試料の重量

W<sub>2</sub> : W<sub>1</sub>を焼成した際の重量

#### 2. テンシプレッサーによるテクスチャー解析

食品の物性における圧縮応力とは、プランジャーで試料を圧縮した際に生じる抵抗力を指す。テクスチャー解析(Texture Profile Analysis : TPA)は複数回、プランジャーで試料を圧縮することで口腔内での咀嚼を模擬的に数値化する方法である。

焼成した試料の切断面に対し、食感物性測定器 TENSIPRESSER™ (テンシプレッサー MyBoy II SYSTEM, タケトモ電機)を使用して TPA の測定を行った。測定項目は硬さ、付着性、凝集性とし、測定条件はクリアランス 1mm、圧縮率 50%、圧縮速度

2.0mm/sec の設定で、2mm 円柱プランジャーを使用した。焼成した 9 点の試料を 2 つに切断し、1 つの試料断面に対し 3 点で測定した。測定時の表面温度は  $23.4 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$  であった。

### 3. 走査型電子顕微鏡による表面組織の観察

走査型電子顕微鏡(Scanning Electron Microscope : SEM)は電子線を用いて試料表面を観察する装置である。電子線を絞って電子ビームとして試料に照射し、試料から放出される二次電子などを検出することで数十倍～数万倍以上の高い倍率で表面組織の観察が可能である。本節では試料粉末と焼成後の試料について、走査型電子顕微鏡(SU1570, 日立)を用いて観察を行った。

#### (1) 試料粉末の観察

観察用の試料台に試料粉末を両面テープで固定し、イオンスパッタ(MC1000, 日立)を用いて、試料を白金パラジウムコーティングした。その後、SEM による観察を行った。

#### (2) 焼成試料の観察

焼成した試料を樹脂切断法により固定・脱水した。試料をカッターで  $W2 \times D2 \times H5\text{mm}$  の大きさに細片した。試料をキャップ付きバイアルに移し、スポイトで 2% グルタルアルデヒドを加えて 24 時間浸漬した(前固定)。除液後、スポイトで 0.2M リン酸バッファー(pH7.0)を加え、1 時間浸漬した(洗浄)。洗浄を 2 回繰り返し、3 回目にリン酸バッファーを入れ、24 時間浸漬した。除液後、スポイトで 2% 四酸化オスミウムを加え、気化防止のためにパラフィルムを巻き、ドラフト内で 24 時間浸漬した(後固定)。除液後、50% エタノールを加えて 15 分間浸漬した。エタノールの濃度を 70、80、90、95、100% と順次変え、それぞれ 15 分間浸漬した(脱水)。なお、本実験では 70% エタノールを加えた時点で 24 時間浸漬した。除液後、スポイトでプロピレンオキシドを加えて 15 分浸漬した。除液後、Epon812 と

プロピレンオキシドの混合液(Epon812 : プロピレンオキシド = 1 : 1)を加えて 24 時間浸漬した。除液後、Epon812 を加えて更に 24 時間浸漬した(樹脂への置換)。氷冷したシャーレに液体窒素を注ぎ、試料を 1 つずつ爪楊枝で入れ、カッターで試料を割断した。プロピレンオキシドを入れ、あらかじめ冷却した新しいバイアルに、割断した試料を入れ 15 分間浸漬した。その後、プロピレンオキシドを交換しながら 15 分間×3 回浸漬した。最後に 1 時間浸漬し、除液後、t-ブチルアルコールを加え、30℃の恒温器中で 20 時間浸漬した。なお、t-ブチルアルコールは 25℃以下で固化するため、事前に 37℃のウォーターバスで溶解させた。t-ブチルアルコールから試料を取り出し、試料同士が重ならないように凍結乾燥用の試料台に乗せた。試料台を t-ブチルアルコールで満たし、冷凍庫に 15 分間入れ、固化させた。その後、試料台を凍結真空乾燥装置(ES-2030, 日立)の試料室内に装着し、4 時間凍結乾燥を行った。乾燥後の試料は、ピンセットで取り出し、観察用の試料台にマニキュアを用いて乗せ、イオンスパッタで白金パラジウムコーティングし、SEM による観察を行った。

#### 4. 統計処理

実験結果は平均値±標準誤差(SE)で表示した。統計処理は解析ソフトの Statcel4 (OMS 出版)を使用した。有意水準は  $p < 0.01$  とした。

## 第2項 結果および考察

### 1. 焼成による水分損失率

動水圧や酵素処理によるタンパク質の変性が、焼成時の水分蒸発に及ぼす影響を確認するために水分損失率を測定した。加水量を決定する際、CTL や Ezm は試料粉末重量の 2.5 倍が挽肉に近い触感だと感じたが、DHP や Ezm + DHP は、加水後の加塩時に緩くなる現象が見られ、加水量 2.5 倍では成形できなかった。そのため、本実験での試料粉末への加水量は 2 倍とした。水分損失率の結果は、CTL :  $11.2 \pm 0.9\%$ 、DHP :  $12.2 \pm 0.4\%$ 、Ezm :  $13.2 \pm 0.5\%$ 、Ezm + DHP :  $15.0 \pm 0.6\%$  となり、CTL と DHP に対して Ezm + DHP は有意に高く、Ezm はその中間であった (Fig.17)。日本食品標準成分表において、鶏肉の水分は焼成により、挽肉は 18.7%、ささみ肉は 11.5% 減少することが示されている。本実験結果では、いずれの試料も成分表と近似値を示した。一方で水分損失率は  $CTL < DHP < Ezm < Ezm + DHP$  と増加しており、酵素や動水圧処理による鶏肉中のタンパク質の変性が大きいほど、水分損失率が高くなることが推察された。

### 2. テクスチャー解析

鶏ささみ肉への動水圧処理が加工時の物性に及ぼす影響を明らかにするためにテクスチャー解析 (TPA) を行った。結果は Fig.18 に (A) 硬さ、(B) 付着性、(C) 凝集性をそれぞれ示した。硬さでは、CTL :  $504.3 \pm 10.7 \text{ gw/cm}^2$ 、DHP :  $278.7 \pm 5.4 \text{ gw/cm}^2$ 、Ezm :  $132.3 \pm 6.7 \text{ gw/cm}^2$ 、Ezm + DHP :  $74.4 \pm 3.4 \text{ gw/cm}^2$  となり、CTL から Ezm + DHP までの順にグループ間で有意に低値を示した。凝集性では、CTL :  $0.6 \pm 0.01$ 、DHP :  $0.6 \pm 0.01$ 、Ezm :  $0.5 \pm 0.01$ 、Ezm + DHP :  $0.4 \pm 0.01$  となり、CTL と DHP に対して Ezm、Ezm + DHP は有意に低値を示した。付着性では、CTL :  $26.3 \pm 1.2 \text{ J/m}^3$ 、DHP :  $23.5 \pm 1.0 \text{ J/m}^3$ 、Ezm :  $9.6 \pm 0.8 \text{ J/m}^3$ 、Ezm + DHP :  $4.6 \pm 0.4 \text{ J/m}^3$  となり、CTL と DHP に対して Ezm、Ezm + DHP は有意に低値を示した。

付着性は、複数回噛んだ際の歯への付着や口腔内でのベタつきを、凝集性は、口腔内での食塊の作りやすさを表す。**Ezm+DHP** はどちらも低値を示しており、付着性の低さは、凝集性の脆さを表していることが推察された。これらは水分損失率の結果を裏付けており、水分が少ない試料ほど脆く、つまりパサついていることを示している。以上のことから、CTL に対して **Ezm+DHP** は柔らかい一方で食塊を作りにくくパサついていることが示された。

タンパク質の変性は、加熱、攪拌、凍結・融解、高圧、超音波などの物理的要因と、酵素、pH、尿素、グアニジン塩酸、有機溶媒、界面活性剤などの化学的要因に大別される。これらの要因によってタンパク質の水素結合や疎水性相互作用、ペプチド結合が解離されることで、タンパク質の高次構造が崩壊して変性状態となる<sup>70,71</sup>。**Ezm** はペプチド結合の切断が起こり、**Ezm+DHP** は水素結合の減少と、疎水性相互作用・S-S 結合の増加が起こり、共にタンパク質の変性が認められた(第2章第2節)。このことは、これらの処理を施すことで食肉の保水性が低下することを示唆している。通常、挽肉に食塩を添加して練り合わせると塩可溶性タンパク質であるアクチンとミオシンが可溶化され、アクトミオシンがネットワーク構造を形成することで粘弾性が増加し、保水力も高くなることが知られている。しかし、今回の結果からは、酵素処理や動水圧処理を加えることで保水力の低下が起きているため、これらの処理により筋原線維タンパク質であるアクチンやミオシンも低分子化が生じたことによりネットワーク構造が脆弱になったことが原因と考えられた。

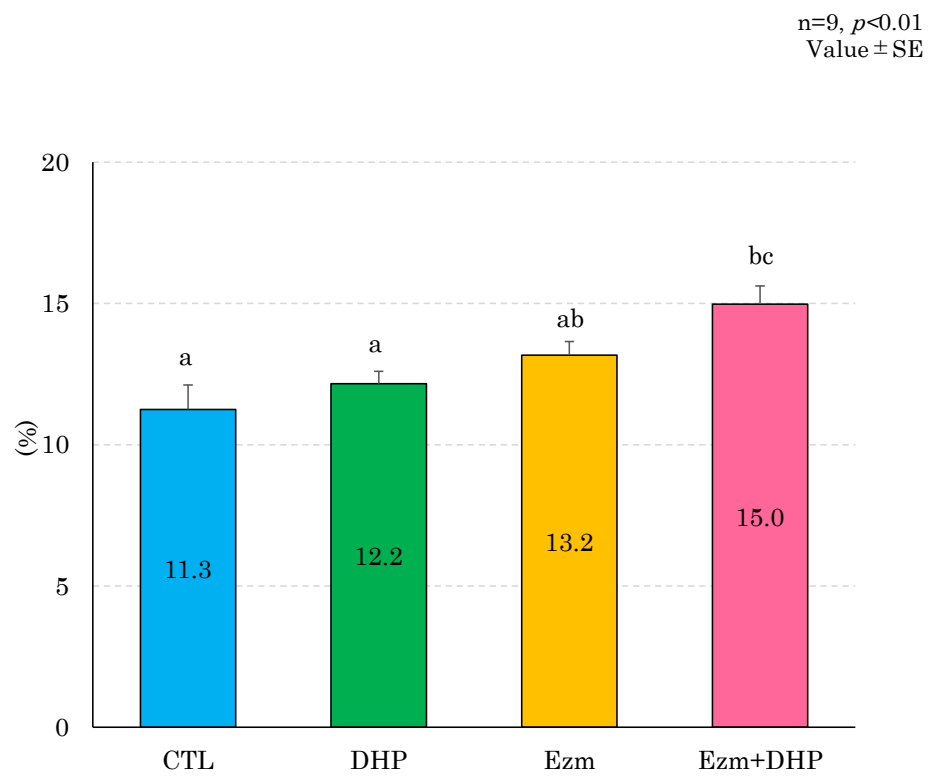


Fig.17 Moisture loss rate when meat was baked



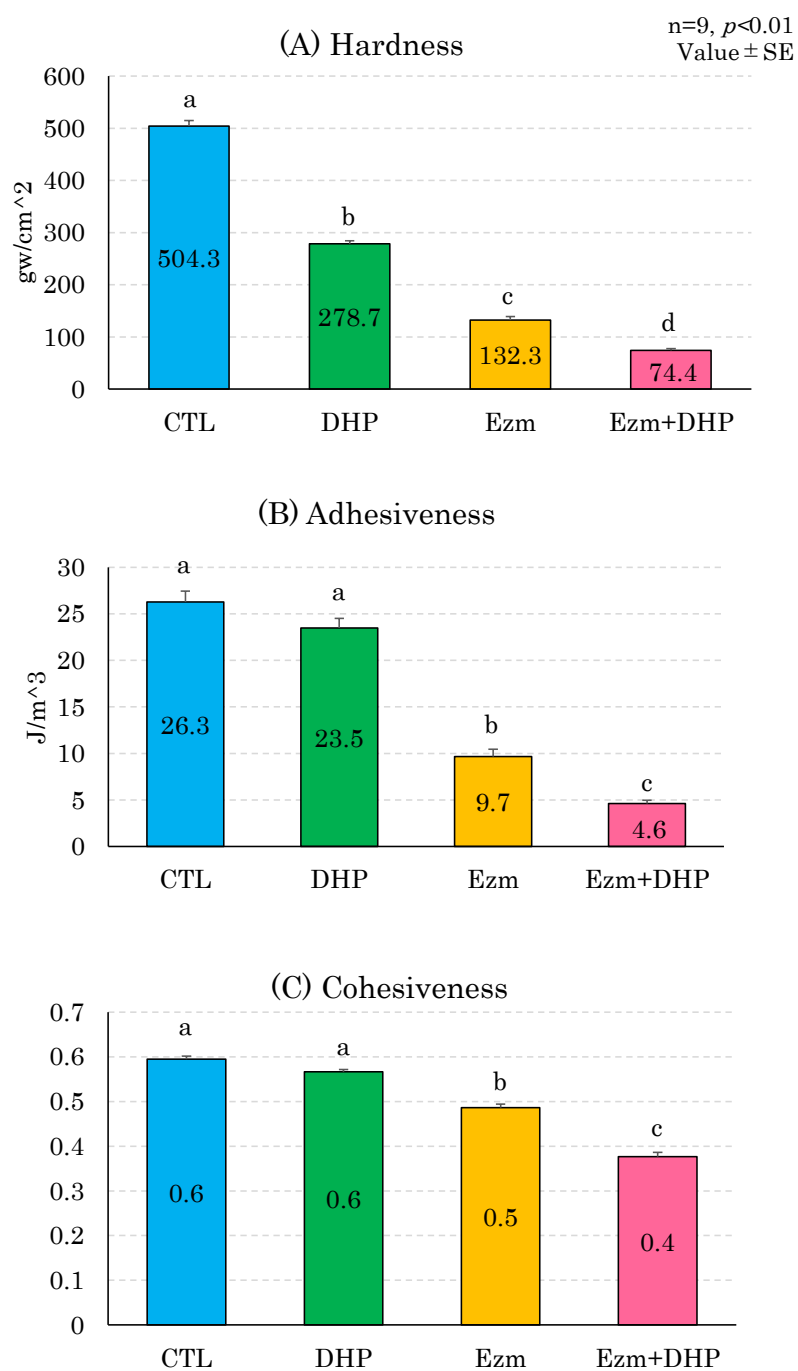


Fig.18 Texture Profile Analysis of bakes meat

### 3. 走査型電子顕微鏡による試料表面の観察

粉末および焼成後の試料に対して、走査型電子顕微鏡(SEM)を用いて、動水圧処理が試料表面に与えた影響を観察した。試料粉末の結果を Fig.19 (15 万倍率)に、焼成した試料の結果を Fig.20 (20 万倍率)に示した。試料粉末では、CTL、Ezm は表面が滑らかであるのに対し、DHP は約  $5\mu\text{m}$  のクラム状の凝集体が連なっており、Ezm+DHP は表面に小さな凹凸が均一に並んでいた。焼成試料では、CTL は間隙に細い架橋が見られ、アクトミオシンのネットワーク形成が認められた。Ezm は表面が微細化しているものの、均質化はされていなかった。DHP や Ezm+DHP では全体的に粒子が丸く、微細化していたが CTL の様なネットワーク形成は見られなかった。また、粒子の大きさは約  $0.5\sim 1\mu\text{m}$  でナノスケールになっていることも確認できた。間隙の深さは Ezm+DHP が最も深いことが観察された。Ezm+DHP は前処理として酵素を使用しているため、酵素の影響が大きいと予想していたが、表面組織を観察する限り、DHP と非常によく似ており、動水圧の影響も強く受けていることが示された。また、Ezm+DHP の間隙の深さは、水分損失量が高かったことや TPA における柔らかさ、凝集性の低さを裏付けた。

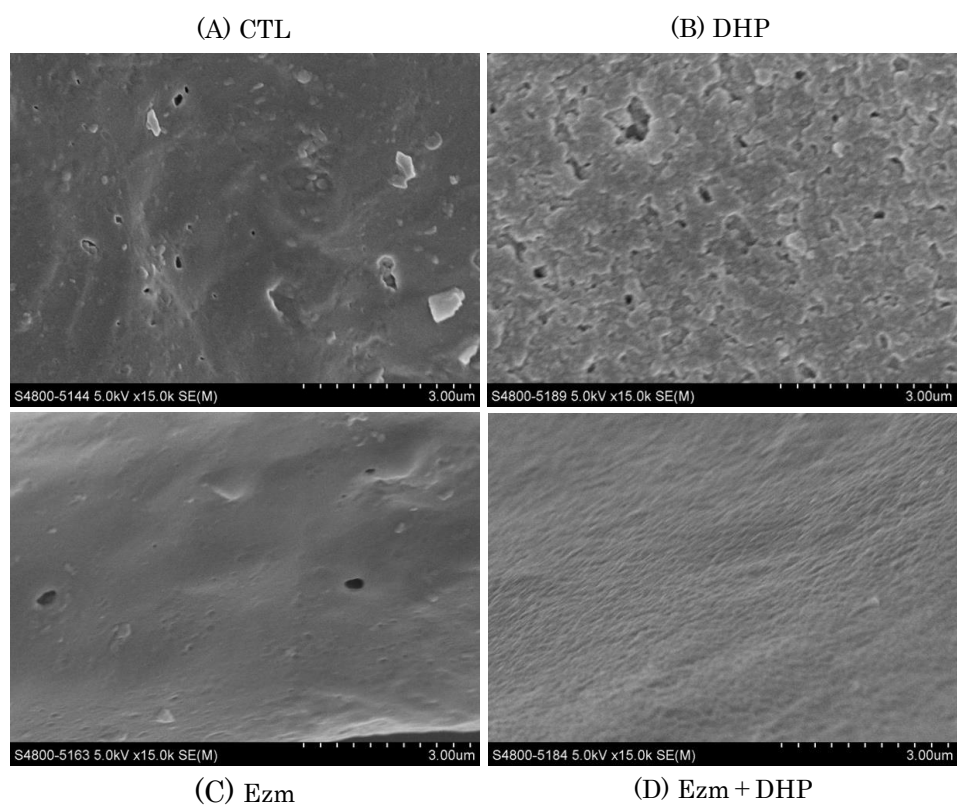


Fig.19 Observation of the surface of the sample powder using Scanning Electron Microscope

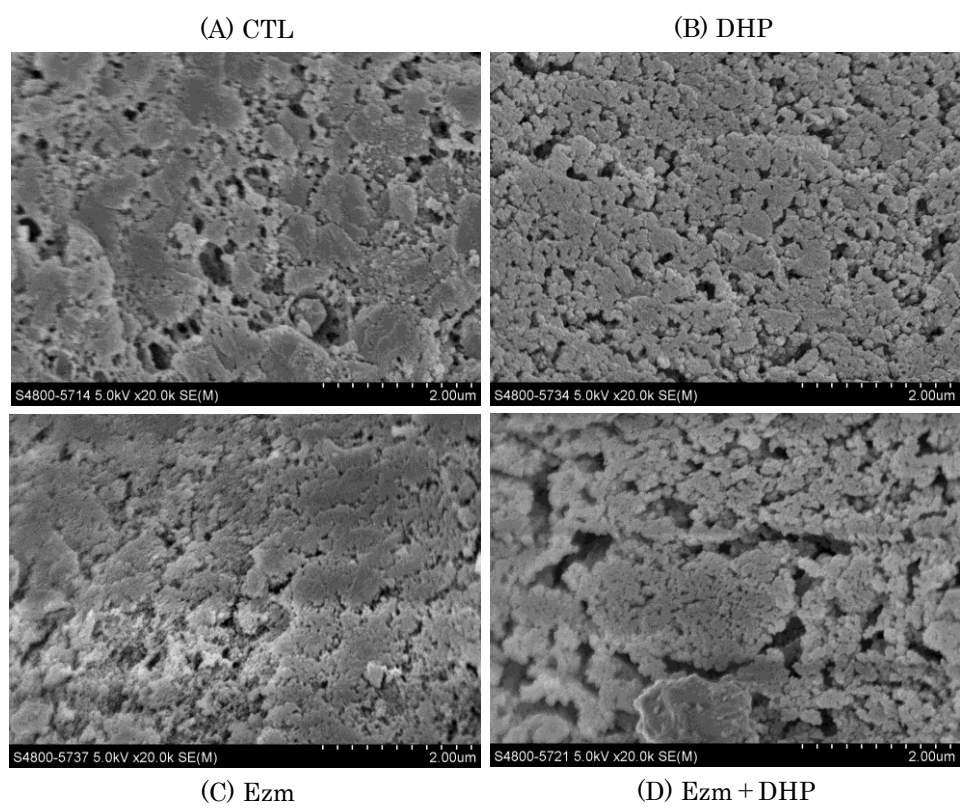


Fig.20 Observation of the surface of the baked sample using Scanning Electron Microscope

### 第3項 小括

本節では実際に食することを想定し、試料の持つ加工特性を評価した。試料粉末に対する加水量は 2 倍とし、加塩・焼成を行ったところ、 $Ezm + DHP > Ezm > DHP > CTL$  の順に水分損失率が高かった。TPA において、 $Ezm + DHP$  は柔らかいが付着性・凝集性の低さが示され、水分が損失したためにパサついた状態となったことが推察された。さらに SEM における焼成試料の表面組織観察では、 $Ezm + DHP$  や DHP は表面が微細化していた。 $Ezm + DHP$  は間隙が最も深く、表面積が大きくなることで、水分損失率が高く、TPA の付着性・凝集性が低くなったことが推察された。 $Ezm + DHP$  は高次構造が破壊され、低分子化したことでアクトミオシンのネットワーク形成が阻害されたことが推察された。DHP は水分損失率や付着性、凝集性は CTL と同等だが、 $Ezm + DHP$  と同様に試料表面が均質化し、間隙も見られた。したがって、DHP 処理による微粒化はタンパク質の一次構造へ影響を与えなかったことが示された。

また、本実験では比較のため、加水量を同一としたが、DHP や  $Ezm + DHP$  は加塩後に流動性が増した。第 2 節の SDS-PAGE の結果でもあったように、主要タンパク質であるアクチン、ミオシンが変性、または断片化しており、塩の  $Na^+$  や  $Cl^-$  が浸透した際に架橋ができず、流動性が増したものと考えられた。したがって、加塩を行う場合、加水量は 1.8 倍程度にとどめる方が良いことが考えられた。また、個人的な試食の範疇ではあるが、 $Ezm + DHP$  は最も塩味を強く感じた。HPLC によるアミノ酸定量においても旨味のアミノ酸であるアスパラギン酸やグルタミン酸は他の試料に比較して有意に高値となっていた。減塩食を作る際には、濃いだしの利用などが行われるが、本試料に関しても同様の使途が可能となることが示唆された。

以上より、 $Ezm + DHP$  を加工する際は、結着剤を利用しパサつきや脆さをカバーする必要があり、また、減塩利用の可能性も示された。

### 第3節 第3章の研究成果

本章では  $Ezm + DHP$  を加工して食することを想定し、練り合わせて焼成し、テンシプレッサーによるテクスチャーの測定(TPA)と電子顕微鏡(SEM)による表面組織の観察を行った。 $Ezm + DHP$  は、焼成による水分損失率が最も高く、TPA の結果、柔らかい一方で、脆く、まとまりのない状態であることが示された。また、表面組織は、CTL や  $Ezm$  は組織同士の結着が見られたが、DHP は間隙が多く、 $Ezm + DHP$  はさらに間隙が多く、深いことが観察された。粒子サイズが  $0.5 \sim 1 \mu m$  となっていたことから、DHP、 $Ezm + DHP$  は微粒化していることが示された。 $Ezm + DHP$  は微粒化だけでなく、低分子化しており(第2章第2節)、タンパク質の四次構造から一次構造までが酵素・動水圧処理の影響を受けたことが示された。肉の主要タンパク質であるアクチンやミオシンが変性したことで、アクトミオシンの形成が阻害され、保水性が低下したことが推察された。このことから、加工の際は結着剤を使用することで、テクスチャーを改善できると考えられた。

これまで、タンパク質補助食品は錠剤や液体のサプリメントが主形態であったが、本研究によって食品として成形された食肉加工品を喫食する道筋が示された。同時に第2章で示したようにサルコペニアの発症予防および進行遅延させることで、高齢者の生活の質向上に貢献することが期待できる。

## 第4章 動水圧処理による植物性タンパク質の改質

### 第1節 背景および目的

我が国では、食習慣に起因すると考えられる高血圧症、糖尿病、脂質異常症ならびにこれらが複合するメタボリックシンドロームの患者数が増加の一途を辿っている。そのことから、食品タンパク質由来ペプチドなどを用いた生活習慣病予防・改善に有効な食品への期待は大きく、乳、食肉、大豆タンパク質由来のペプチドに関する研究は多い。

日本人にとって大豆発酵食品である味噌や醤油は食経験が長く、それ以外の大豆利用食品も多いことから大豆タンパク質は広く研究対象とされてきた。その結果、大豆ペプチドからは抗肥満、脂質代謝改善、糖質代謝改善など幅広い効果が発見されている<sup>72</sup>。2016年の日本の大豆の消費量は、輸入が76%、国産が24%となっている。輸入大豆は主に油脂原料として使用され、搾り粕である大豆ミールは有価物として家畜飼料などに利用されている。国産大豆は味が良いことから主に食用として利用されるが、豆腐や豆乳へ加工する際に排出される「おから」は栄養価が高いにも関わらず日持ちしないことから、多くが廃棄されている<sup>73</sup>。日本豆腐協会によると豆腐由来の「おから」だけでも年間3~6万トンが二次利用されずに廃棄され<sup>74</sup>、また、処理費用は1kg当たり8~15円という報告もある<sup>75</sup>。「おから」にはタンパク質を始め、多くの栄養素が残存している一方で、日持ちせず、重量があることから、腐敗を遅延させる乳酸菌の添加や加熱乾燥による一次加工が必要となってくる。そこで、「おから」を排出しない運用が検討されている。2002年に発売された「スゴイダイズ(大塚製薬)」は、こうした運用を実現させた代表例である。通常、豆乳の製法は、大豆を水に浸漬後、粉碎して呉汁を作り、おからを除去している。一方で、スゴイダイズでは浸漬する前、大豆を微粉末化し、加水後に均質化しているため、おからが出ない上に高栄養価である<sup>76</sup>。その後、2006年に「まるごと大豆(カゴメ)」、2017年に「のむ大豆(スジャータ)」など、相次いで同様の製造方法で作られた大豆飲料が発売されている。さらに、大豆を微粒化することで、おからの出ない豆腐の製造も行われ(ミ

ナミ産業株式会社)、この取り組みは 2018 年に「食品産業もったいない大賞」にて農林水産省食料産業局長賞を受賞している<sup>77</sup>。2016 年からスタートした持続可能な開発目標(SDGs)も追い風となり、残渣を出さない運用は徐々に広がっている。

そこで、本章では大豆全粒粉末を試料とし、微粒化を得意とする動水圧処理による残渣の出ない運用を試みると共に、微粒化と低分子化された大豆が生活習慣病へどのような機能性を発現するのかを明らかにすることを目的とした。



## 第2節 動水圧処理が大豆の低分子化に与える影響

### 第1項 試料調製および実験方法

#### 1. 試料調製方法

飼料は国産黄大豆を外皮ごと粒度 20~40 $\mu$ m に粉末化したものを購入し(マエダ・スーパーテクノ)、以下の方法で第 2 章と同様に 4 種類の試験飼料を調製した(Fig.21)。

##### (1) Control (CTL)

大豆粉末 250g に対して純水を加え、ポリトロンホモジナイザー(PT10-35, セントラル貿易科学)で 1 分間分散させ、5L に定容したものを対照試料(CTL)とした。

##### (2) Dynamic high-pressure treatment (DHP)

CTL に高圧ホモジナイザー処理(MTJ-GA18-300-EH-S, 株式会社 MTJ)を行った。圧力条件は、第 2 章と同様の 150MPa、15 回の通液回数とした。なお、圧力処理中は摩擦熱による温度上昇を防ぐために吐出後の流路をチラー水で冷却し、試料温度を 20℃以下に抑制した。

##### (3) Enzyme treatment (Ezm)

超高压処理の前処理として細胞壁とタンパク質の高次構造の部分的な分解を目的として酵素添加量は微量で短時間の温和な処理とした。CTL に 40℃で 10 分間の予備加熱を行い、大豆粉末重量の 0.02%(w/w)セルラーゼ(Celluclast 1.5L, ノボザイムス ジャパン)および 0.01%(w/w)プロテアーゼ(Alcalase 2.4L FG, ノボザイムス ジャパン)の 2 種類の食品添加物用酵素を添加し、40℃で 30 分間攪拌しながら酵素処理をしたものを酵素処理試料(Ezm)とした。使用したセルラーゼは、*Trichoderma reesei* 由来であり、至適 pH4.0~6.0、至適温度 65℃、熱安定性は 85℃で失活する。プロテアーゼは、*Bacillus licheniformis* 由来のエンドプロテアーゼであり、至適 pH8.0~9.0、至適温度 70℃、熱安定性は 85℃で失活する。

#### (4) Combination treatment (Ezm + DHP)

酵素と動水圧の併用処理条件として、(3)の Ezm 後に(2)の条件で DHP 処理を行ったものを酵素処理 + 動水圧処理試料(Ezm + DHP)とした。

#### (5) トリプシンインヒビターの失活と粉末化

CTL、DHP、Ezm、Ezm+DHP 処理した各試料液は直ちに 120℃で 20 分間オートクレーブ処理をし、トリプシンインヒビターを失活させた<sup>78</sup>。冷却した後、真空凍結乾燥器(DC280 型, TAITEC 社)にて凍結乾燥した後、粉碎機(ニューパワーミル, 大阪ケミカル株式会社)で粉末化したものを各実験に使用した。

### 2. SDS-PAGE による分子量測定

CTL、Ezm + DHP の粉末 0.25g に 35mL の 0.1M NaOH を加え、室温で 1 時間振盪して可溶化後、1M HCl で pH7.0 に中和した。ガラスフィルターでろ過後、50mL 容メスフラスコで定容した。Bradford 法にてタンパク質濃度を測定し、15%SDS-ポリアクリルアミドゲル(マルチゲルII ミニ 15, コスモ・バイオ)で SDS-PAGE を行った。SDS-PAGE はサンプルバッファー(65.8mM Tris-HCl (pH6.8), 26.3%(w/v)glycerol、2.1%SDS, 0.01% BPB, 2.5% 2-mercaptoethanol)、マーカー(Precision Plus Protein TM All Blue Standard, Bio Rad)、泳動バッファー(25mM Tris-192mM glycine, 0.1% SDS (pH8.4))により 200V、30mA で 60 分間泳動した。泳動後のゲルは銀染色(Silver Stain PlusTM, Bio Rad)を行い、画像解析ソフト Image J(NIH)にてバンド面積を数値化した。

### 3. OPA 蛍光誘導体化法によるアミノ基の定量化

#### ① 限外ろ過フィルターによる分画(尿素抽出)

試料粉末 0.3g に還元剤・変性剤として 2% 2-mercaptoethanol

含有 8M 尿素を 15mL 加え、1 晩振盪したものを限外ろ過フィルター  
の 1k(Centrifugal Devices Microsep Advance with 1K, Pall)  
および 30k(Amicon<sup>®</sup> Ultra-15, Millipore)の 2 種類を用いて  
8,000rpm、4℃、60 分間で限外ろ過した。

#### ② OPA 試薬によるアミノ基の定量

限外ろ過によって得られた分子量 1,000 以下および 30,000 以下の  
画分を、第 2 章と同様に OPA Protein Quantitation Kit (AS-  
71015, ANA SPEC)で蛍光誘導体化し、励起波長 338nm、蛍光波長  
455nm で蛍光強度を検出器(GloMax DISCOVER, Promega)を使  
用して測定した。得られた測定値について BSA で作成した検量線より、  
定量計算した。

#### 4. 統計処理

実験結果は平均値±標準誤差 (SE) で表示した。統計処理は解析ソ  
フトの Statcel4 (OMS 出版)を使用した。グループ間の比較は  
Tukey-Kramer 多重比較検定を用いて解析し、有意水準は  $p < 0.01$   
とした。

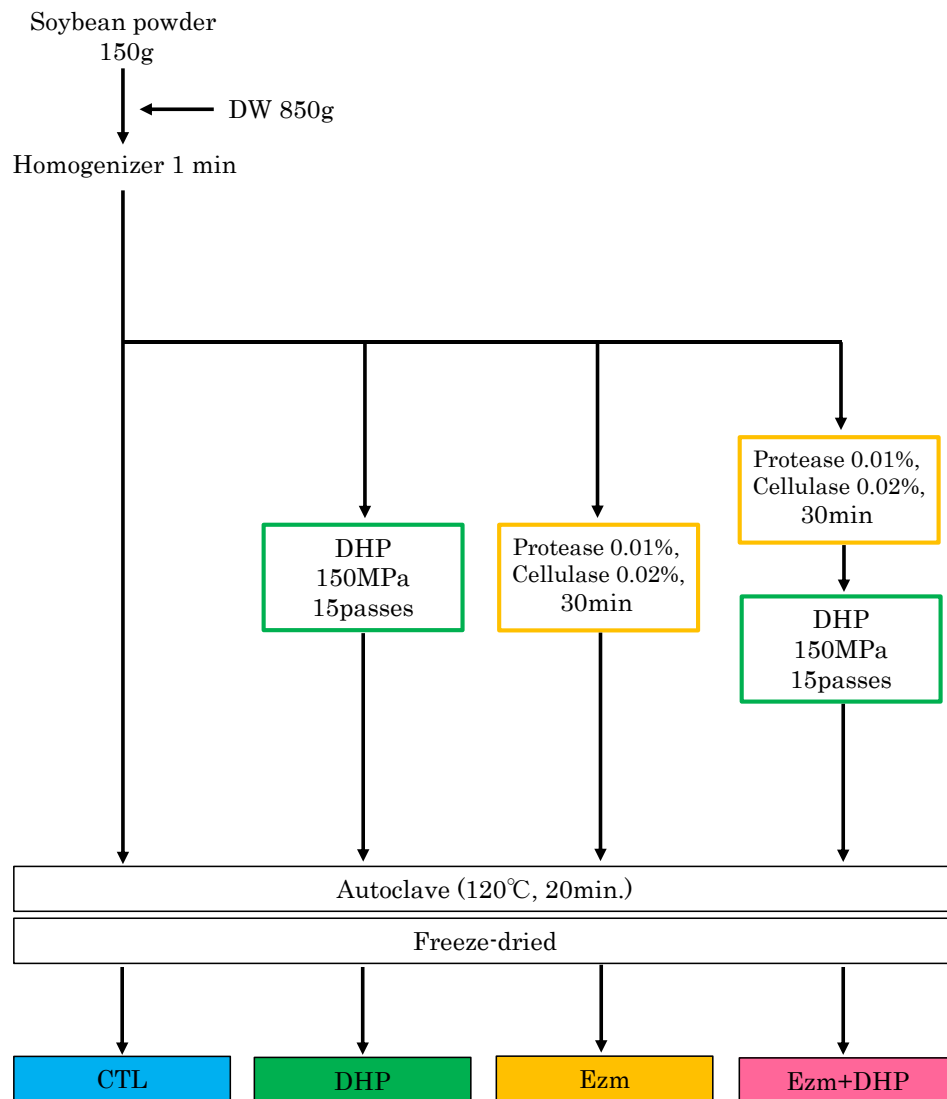


Fig.21 Protocol of sample preparation

## 第2項 結果および考察

### 1. SDS-PAGE による分子量の測定

SDS-PAGE の結果を Fig.22(A)に、バンド面積を数値化したものを Fig.22(B)に示した。分子量 72kDa、68kDa、50kDa のバンドは大豆の主要タンパク質である  $\beta$ -コングリシニンのサブユニット、30kDa、16kDa のバンドはグリシニンのサブユニット、20kDa のバンドはグリシニンまたはトリプシンインヒビターと推察された<sup>79</sup>。CTL と比較して Ezm+DHP のバンド面積は、72kDa は 50.9 %、50kDa 付近のバンドは 62.6%となり、40~50%の減少が見られた。また、20kDa は 13.5%、16kDa は 14.8%となり、著しくバンド面積が減少した。一方で、68kDa は 147.1%、30kDa は 111.1%となり、バンド面積が増加した。

Ezm+DHP は、72kDa 以上の領域においてバンド面積の増加が見られなかったことから、72kDa の分子の一部が分解された結果、68kDa のバンド面積が増加したことが推察された。同様に 72kDa と 68kDa および 50kDa のタンパク質が分解されたことによって、本来はグリシニンのサブユニットである 30kDa に  $\beta$ -コングリシニン由来の分解物のバンドが重なり、面積が増加したように見えたことが考えられた。また、16kDa 以下の領域において Ezm+DHP のバンド面積の顕著な増加が見られないことから、20kDa や 16kDa は凝集し、30kDa あるいは 68kDa の分子量となった可能性も考えられた。

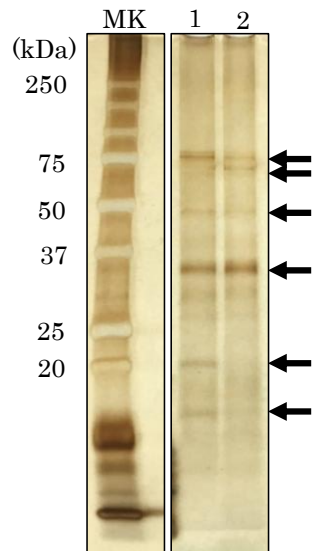
### 2. OPA 試薬によるアミノ基の定量

OPA Protein Quantitation Kit による測定は、第2章第2節と同様に BSA を使用した検量線によってタンパク質濃度に変換した。SDS-PAGE の結果より、1kDa 未満のタンパク質濃度が増加しない可能性を考慮し、1kDa だけでなく 30kDa の限外ろ過フィルターも使用した。結果は、CTL の 30kDa の濃度を 1 とした際の相対値で比較した(Fig.23)。30kDa 画分は CTL に対して、DHP :  $0.6 \pm 0.02$ 、Ezm :  $0.7 \pm 0.01$ 、Ezm+DHP :  $0.9 \pm 0.03$  となり、CTL、Ezm+

DHP に対して DHP、Ezm は有意に低値を示した。1kDa 画分は CTL :  $0.8 \pm 0.04$ 、DHP :  $0.4 \pm 0.04$ 、Ezm :  $0.5 \pm 0.05$ 、Ezm + DHP :  $0.4 \pm 0.02$  となり、CTL に対して DHP、Ezm、Ezm + DHP は有意に低値を示した。

1kDa 画分において、DHP と Ezm + DHP は CTL の半分程度まで減少しており、凝集したことで分子量が大きくなり、1kDa のフィルターを通過できなかったことが推察された。大豆のタンパク質や加水分解物は、高圧ホモジナイザーのせん断力によって水素結合や疎水性相互作用が変化し、凝集を起こすことが報告されている<sup>14,34</sup>。一方で Ezm + DHP の 30kDa 画分は CTL と同程度まで増加していたことから、凝集体は 1kDa 以上~30kDa 未満の間で増加した可能性が考えられた。DHP は酵素によるタンパク質の高次構造の粗分解が行われなかったために、凝集体はさらに高分子であることも推察された。また、Ezm は 30kDa 画分も 1kDa 画分も増加しなかった。大豆は酵素処理や加熱によっても凝集するため<sup>80</sup>、Ezm 処理においても凝集し、DHP と同様に凝集物の分子量は 30kDa 以上であったことが考えられた。

(A) Representative SDS-PAGE pattern



(B) Comparison of band area

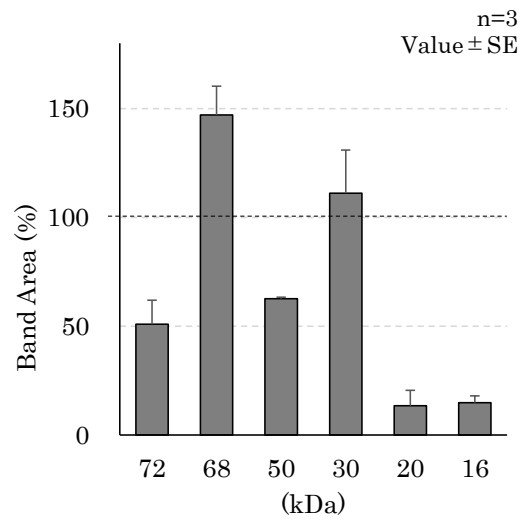


Fig.22 Representative SDS-PAGE pattern  
Lane1 CTL, lane2 Ezm+DHP, MK: marker

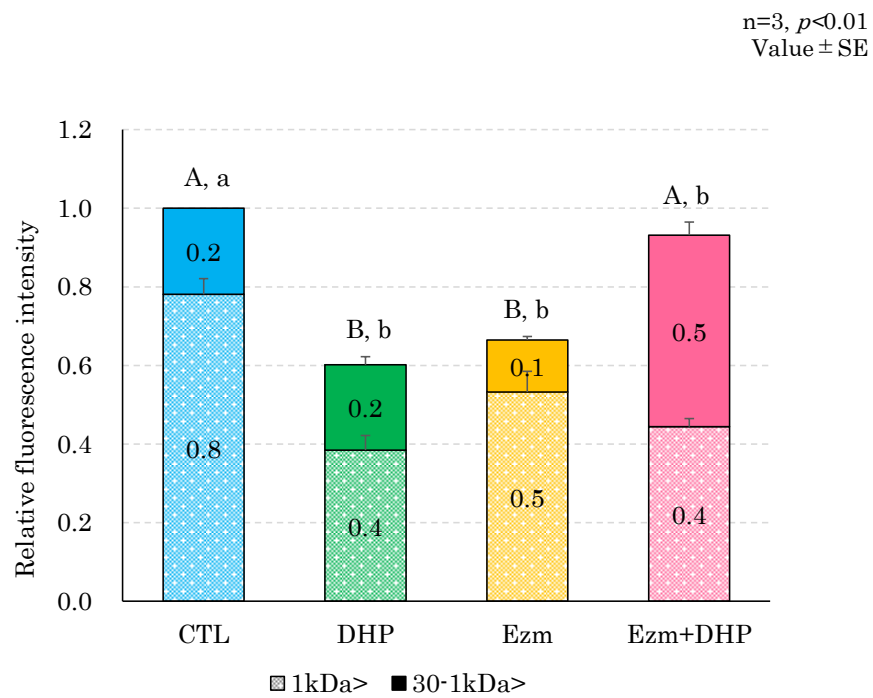


Fig.23 Ratio of 1kDa fraction to 30kDa fraction using by the o-Phthaldialdehyde (OPA) protein assay



### 第3項 小括

SDS-PAGE において Ez m + DHP は、バンド面積が減少する分子量と増加する分子量があった。動水圧のせん断力によって分子量が減少したことで、別のバンドに重なり、バンド面積が増加して見えたことが推察された。また、20kDa や 16kDa のバンド面積は減少したものの、16kDa 以下の領域でのバンド面積の増加がなかったことから、これらは凝集し、分子量が増加した可能性が考えられた。OPA 試薬による定量においても、1kDa 画分では DHP も Ez m + DHP も増加せず、むしろ CTL の半分の定量値となり、凝集を示唆した結果となった。30kDa 画分の定量値では、DHP は増加せず、動水圧処理のみであったため、30kDa 以上の分子量をもつ凝集体ができたことが考えられた。衝撃力などで分子間の密度が上昇し、物理力が加わりにくい構造になったことが原因であることも考えられた。一方、Ez m + DHP では 30kDa 画分の定量値が増加しており、1kD 以上 a ~ 30kDa 未満の画分においてオリゴペプチドが存在することが示唆された。

### 第3節 酵素・動水圧処理した大豆が脂質代謝改善に与える影響

#### 第1項 実験方法

##### 1. 被験動物および飼育方法

###### (1) 飼料組成

飼料組成は購入元の大豆粉末の規格成分値(Table7)を基に、AIN76 標準飼料組成に準じて調製を行った(Table8)。タンパク質源を全て CTL と Ezm + DHP に置換すると脂質が過剰になってしまうため、脂質の上限まで CTL、Ezm + DHP を加え、不足分のタンパク質はカゼインで補い、AIN76 と PFC 比が同等になるように配合した。

###### (2) 実験動物および飼育条件

被験動物は雄性 7 週齢の肥満・高血圧自然発症ラット (SHR/NDmcr-cp) を 15 匹(日本 SLC)用い、AIN76 で 1 週間の馴化飼育を行った。その後、平均体重が均一になるように 5 匹ずつ AIN76 を給餌する Cas 群、CTL 群、Ezm + DHP 群の 3 群に分け、16 週間飼育した。飼料は 11:00~12:00 の間に pair-feeding で与え、水は自由摂取とし、8:00~20:00 の 12 時間照明下、室温 24℃、湿度 55% のクリーンに準じる環境下の飼育室で飼育した。23 週齢に 6 時間の絶食後、三種混合麻酔下で心臓採血を行い、肝臓、脂肪 3 点(腸間膜脂肪、腎周囲脂肪、精巣上体周囲脂肪)を摘出して重量を計測した。採取した血液は血清分離管 (セパラピッドチューブ, 三商) で 2,500rpm、15 分間遠心分離後、上清を血清とした。また、糞を採取し、重量を測定した。

なお、動物実験は東京農業大学動物実験委員会における倫理的承認を得て(承認番号 300060)、総理府の「実験動物の飼育および保管等に関する基準」および東京農業大学「動物実験に関するガイドライン」に従い行った。

Table7

Composition of soybean powder (g/100g)

Water	Protein	Fat	Carbohydrate	Insoluble fiber	Ash
5.6	32.3	20.1	29.8	2.2	5.0

Table8 Composition of diets

(%)	Casein (AIN76)	CTL	Ezm+DHP
Casein	20.0	10.7	10.7
Soy powder	0	25.0	0
Soy powder (Ezm+DHP)	0	0	25.0
DL-Methionine	0.3	0.3	0.3
Corn starch	15.0	7.6	7.6
Sucrose	50.0	50.0	50.0
Cellulose	5.0	4.4	4.4
Soybean oil	5.0	0	0
AIN76 vitamin mix	1.0	1.0	1.0
AIN76 mineral mix	3.5	2.2	2.2
Choline Chloride	0.2	0.2	0.2

## 2. 血圧測定

8 週齢から 22 週齢までの隔週で、給餌前に収縮期および拡張期血圧を無加温型非観血式血圧計 (MK - 2000, 室町機械) で測定した。

## 3. 肝臓の解析

### (1) Folch 法による脂質重量の測定

肝臓中の脂質は Folch 法により抽出し、総脂質量を重量法で測定した後、2-プロパノールに溶解して中性脂肪(トリグリセライド E-テストワコー)と、総コレステロール(コレステロール E-テストワコー)にて測定した。

### (2) 組織切片の観察

解剖時に摘出した肝臓は一部を切除し、マイルドホルム®10N(富士フィルム和光純薬)に浸漬した。固定後の組織は、定法<sup>81</sup>に従って HE 染色、Oil Red O 染色による標本を作成し(バイオ病理研究所)、光学顕微鏡(×200)にて組織観察を行った。

## 4. 血清中脂質の解析

解剖時に採取した血清は、中性脂肪(トリグリセライド E-テストワコー)、遊離脂肪酸(NEFA C-テストワコー)、総コレステロール(コレステロール E-テストワコー)、遊離コレステロール(遊離コレステロール E-テストワコー)、HDL-コレステロール(HDL-コレステロール E-テストワコー)のキットを用いて測定した。

## 5. 糞中の胆汁酸量測定

岩見ら<sup>82</sup>の方法に基づいて糞中の総胆汁酸量を測定した。解剖時に回収した糞は、凍結乾燥 (DC-280, タイテック)後に全量をコーヒーミルで粉碎し、1.5mL 容マイクロチューブに 10mg 精秤した。0.2mL の 90%エタノールを加え、65℃で 1 時間インキュベートし、遠心分離(10,000rpm、5 分間)後、上清を新しいチューブに分取した。

沈殿に再度 0.2 mL の 90%エタノールを加え、ボルテックスミキサーで懸濁し、遠心分離を行う操作を 2 回繰り返して洗い込んだ上清を合一した。得られた上清は 95℃で 30 分間の加熱して蒸発乾固させた。残渣に 0.5 mL の 90%エタノールを加えたものを測定用サンプルとし、総胆汁酸量(総胆汁酸 テストワコー)を測定した。測定結果は 1 日の糞量中の胆汁酸量として示した。

## 6. ACE 阻害活性の測定

第 2 節の SDS-PAGE と同じ定容物について、ACE Kit (同人化学研究所)を用いて、ルミノメーター(Glo Max, Promega)で波長 450 nm の吸光度を測定し、ACE 阻害活性を求めた。阻害率は下記の式により算出し、阻害活性が 50%を示す際の反応液中の試料粉末重量を IC<sub>50</sub> とした。

$$\text{ACE 阻害活性値(阻害率\%)} = \frac{(\text{A blank1} - \text{A sample})}{(\text{A blank1} - \text{A blank2})} \times 100$$

blank1 : 試料の代わりに純水を加えたもの

blank2 : 試薬ブランク

## 7. 統計処理

実験結果は平均値±標準誤差(SE)で表示した。統計処理は解析ソフトの Statcel4 (OMS 出版)を使用した。グループ間の比較は Tukey-Kramer 多重比較検定を用いて解析し、有意水準は  $p < 0.05$  または  $p < 0.01$  とした。外れ値はグラブススミルノフ棄却検定によって除外した。

## 第2項 結果および考察

### 1. 体重ならびに脂肪重量の比較

体重推移を Fig.24 に示した。群分け時の初体重は、Cas 群 :  $232.2 \pm 3.6$  g、CTL 群 :  $234.8 \pm 2.8$  g、Ezm+DHP 群 :  $234.7 \pm 3.4$  g であり、終体重は、Cas 群 :  $557.5 \pm 3.2$  g、CTL 群 :  $566.9 \pm 4.2$  g、Ezm+DHP 群 :  $563.5 \pm 3.9$  g であった。初体重に対して終体重では有意に体重が増加したが、終体重において 3 群間での有意差は見られなかった。腸間膜脂肪、腎周囲脂肪および精巣上体脂肪の体重 100g 当たりの重量を Fig.25 に示した。腸間膜脂肪は Cas 群 :  $1.4 \pm 0.1$  g、CTL 群 :  $1.4 \pm 0.1$  g、Ezm+DHP 群 :  $1.5 \pm 0.1$  g で 3 群間での有意差は認められなかった。腎周囲脂肪は、Cas 群 :  $5.9 \pm 0.2$  g、CTL 群 :  $5.0 \pm 0.3$  g、Ezm+DHP 群 :  $4.9 \pm 0.1$  g で、Cas 群に対して CTL 群、Ezm+DHP 群は有意に ( $p < 0.05$ ) に低値を示した。しかし、精巣上体脂肪は Cas 群 :  $1.3 \pm 0.1$  g、CTL 群 :  $1.4 \pm 0.1$  g、Ezm+DHP 群 :  $1.5 \pm 0.1$  g で Cas 群に対して Ezm+DHP 群が有意に増加し、CTL 群はその中間だった。これら脂肪 3 点の合計においては、Cas 群に対して CTL 群、Ezm+DHP 群は脂肪重量が減少する傾向が見られ、何らかの脂質代謝改善が行われたものと推察された。

### 2. 肝臓の脂質に関する解析

体重 100g 当たりの肝臓重量は Cas 群 :  $4.4 \pm 0.1$  g、CTL 群 :  $3.2 \pm 0.2$  g、Ezm+DHP 群 :  $3.4 \pm 0.2$  g となり、Cas 群に対して CTL 群、Ezm+DHP 群が有意 ( $p < 0.01$ ) に低値を示した (Fig.26(A))。肝臓 1g 当たりの脂質重量は Cas 群 :  $143.8 \pm 9.9$  mg、CTL 群 :  $123.1 \pm 3.8$  mg、Ezm+DHP 群 :  $79.9 \pm 7.7$  mg となり、Cas 群と CTL 群に対して Ezm+DHP 群が有意 ( $p < 0.01$ ) に低値を示した (Fig.26(B))。

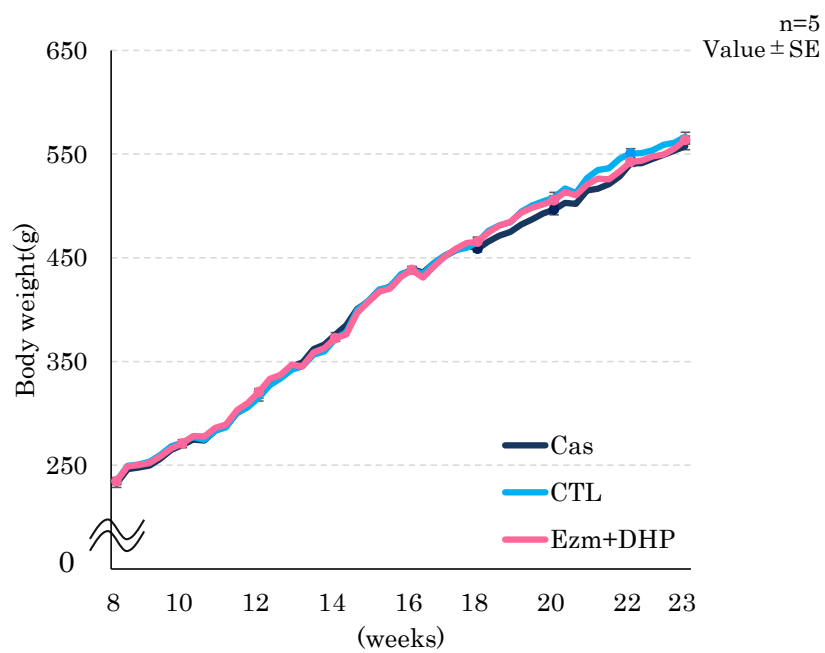


Fig.24 Changes in bodyweight

n=5,  $p<0.05$   
Value  $\pm$  SE

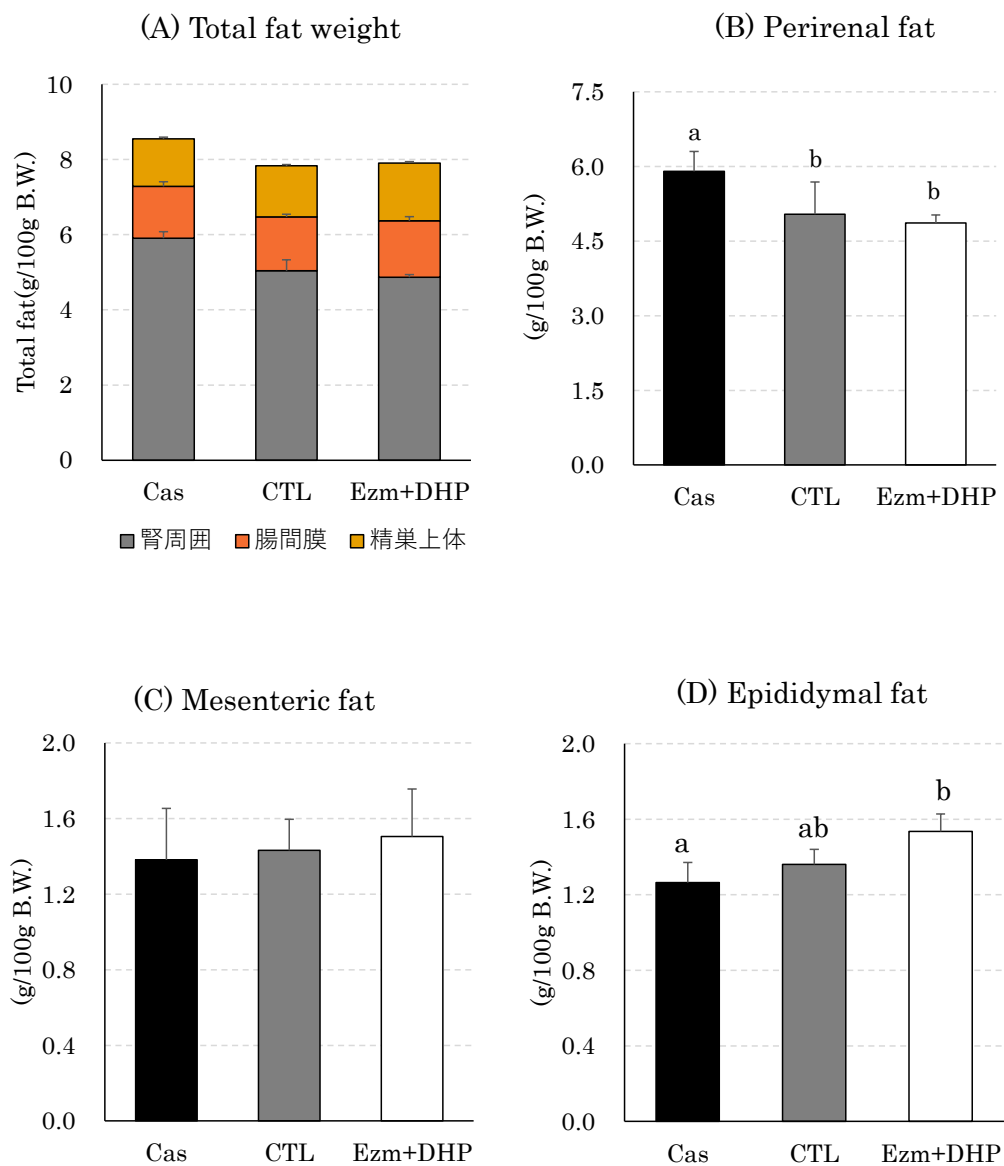


Fig.25 Fat weight of Perirenal fat, Mesenteric fat, and Epididymal fat



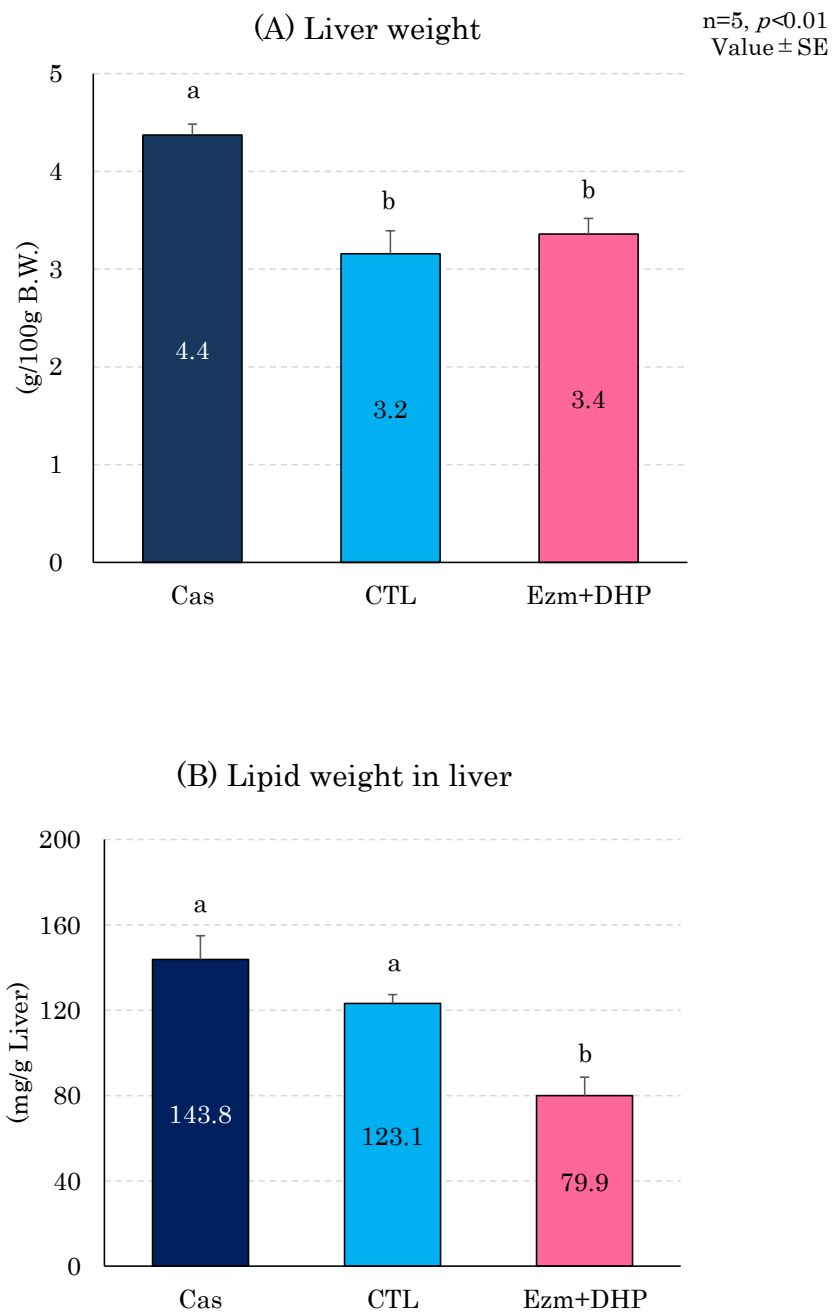


Fig.26 Liver weight and lipid weight in liver

肝臓の解剖時所見では、Cas 群の肝臓は褪色し、かつ肥大化しており、脂肪化の進行が見られた。これに対して Ezm+DHP 群の肝臓は正常色であり、CTL 群は Cas 群と Ezm+DHP 群の間であった (Fig.27(A))。

肝臓の組織切片の観察では、HE 染色 (Fig.27(B)) ならびに Oil Red O 染色 (Fig.27(C)) したものを顕微鏡観察した。HE 染色の観察では、Cas 群に細胞の肥大化と脂肪滴の沈着、CTL 群に血管を中心とした細胞の肥大化が見られた一方で、Ezm+DHP 群に異常は見られなかった。Oil Red O 染色の観察では、Cas 群は脂肪の顕著な染色、CTL 群はやや染色が見られたのに対して、Ezm+DHP 群ではわずかに染色されたものの Cas および CTL 群に比べて脂肪化の抑制が観察された。

肝臓中の総コレステロールと中性脂肪量を Fig.28 に示した。肝臓 1g に占める総コレステロールは Cas 群： $14.3 \pm 1.1 \text{ mg}$ 、CTL 群： $12.2 \pm 1.1 \text{ mg}$ 、Ezm+DHP 群： $8.6 \pm 1.2 \text{ mg}$  となり、Cas 群に対して Ezm+DHP 群は有意に低値を示し、CTL 群はその間であった。肝臓 1g に占める中性脂肪は Cas 群： $50.4 \pm 8.7 \text{ mg}$ 、CTL 群： $19.0 \pm 2.2 \text{ mg}$ 、Ezm+DHP 群： $9.5 \pm 3.2 \text{ mg}$  となり、Cas 群に対して CTL 群、Ezm+DHP は有意に低値を示した。総コレステロールも中性脂肪も CTL 群と Ezm+DHP 群の間に有意差はなかったものの、Ezm+DHP 群が減少傾向を示した。

以上より、Cas 群は脂肪蓄積の亢進、CTL 群はやや脂肪蓄積の抑制が見られた一方で、Ezm+DHP 群は CTL 群よりも強く肝臓の脂肪蓄積が抑制された。本病態モデルにおいて、無処理大豆である CTL の摂取は肝臓における脂肪蓄積を抑制しきれず、動水圧処理大豆である Ezm+DHP は顕著に脂肪蓄積の抑制をした。第 2 章において Ezm+DHP 処理は微粒化と低分子化を促進し、吸収性向上をもたらすことが示された。大豆においてもタンパク質の高次構造が変性し、低分子化していることが示唆された。本動物実験の結果の要因として、低分子化による吸収性向上が肝臓での脂質代謝を亢進させたことが考えられ

た。Tamaru らは、大豆タンパク質の低分子画分は肝臓での脂質代謝を調節することを報告している<sup>83</sup>。また、大豆ペプチドにはコレステロール合成の律速酵素である HMG-CoA 還元酵素を阻害するとの報告もあり<sup>84</sup>、いずれも本実験における肝臓の脂肪化抑制と総コレステロール低下の結果を支持するものと考えられた。他の要因としては、肝臓での脂肪酸の酸化促進ならびに合成抑制が行われたことや、動水圧による微粒化によって大豆タンパク質の機能性成分がナノエマルションとなり、デリバリーされた可能性が考えられた。

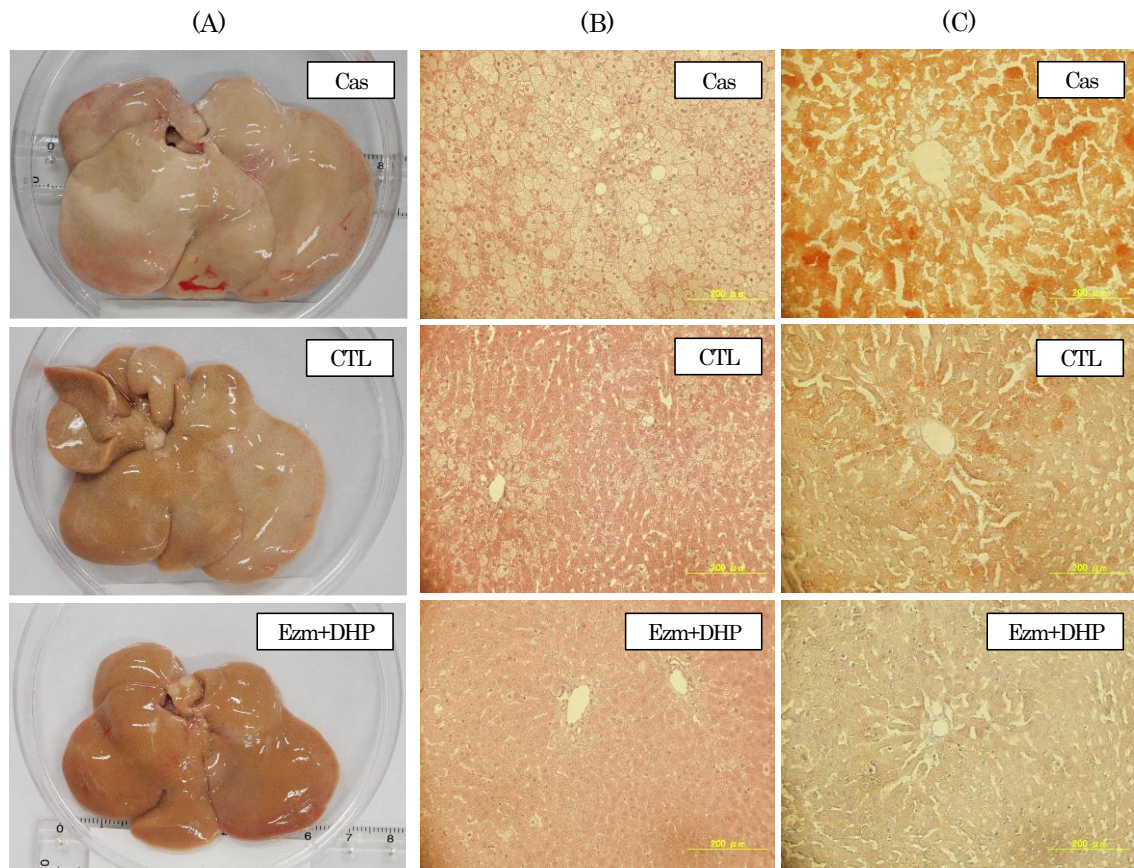


Fig.27 Tissue hypertrophy and fat accumulation due to liver fattening  
 (A) Photographs of livers in each of the CTL, SBP, and DHP-SBP groups.  
 (B) Microscopic images of the liver tissue sections of the CTL, SBP, and DHP-SBP groups stained with hematoxylin and eosin (H&E). (C) Microscopic images of liver tissue sections of the CTL, SBP, and DHP-SBP groups stained with Oil Red O.

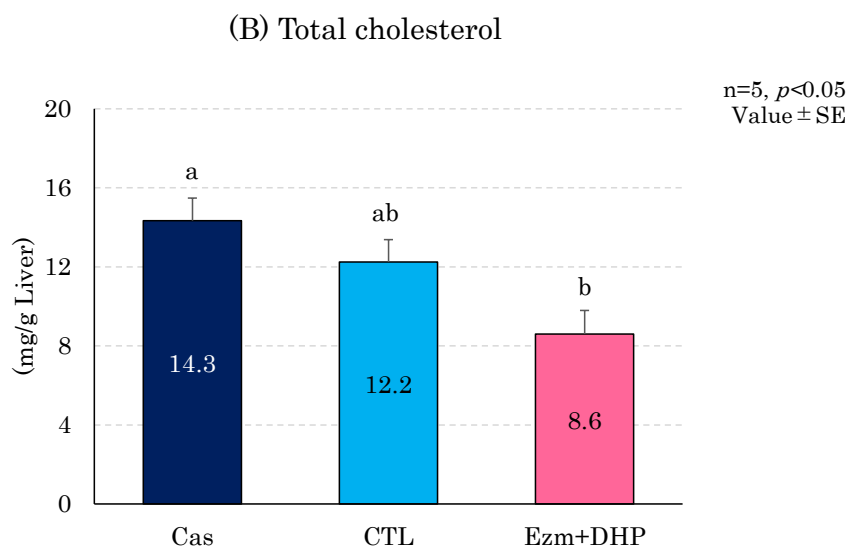
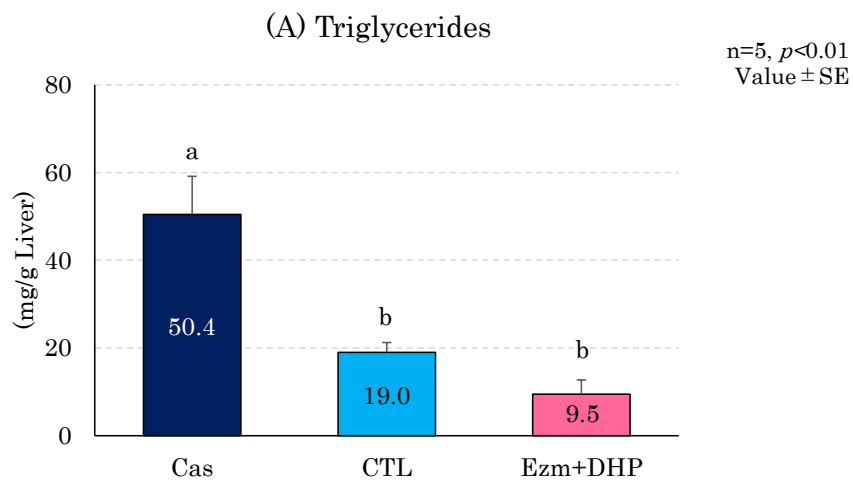


Fig.28 Triglycerides and total cholesterol levels in the liver

### 3. 血清の脂質に関する解析

血清中の脂質に関する結果を Fig.29、Fig.30 に示した。多くのメトリックスにおいて Cas 群は高値を示しており、脂質異常症の病態を示していた。血清中の中性脂肪は Cas 群： $582.0 \pm 85.8 \text{ mg/dL}$ 、CTL 群： $713.6 \pm 83.8 \text{ mg/dL}$ 、Ezm+DHP 群： $588.5 \pm 84.8 \text{ mg/dL}$  となり、群間での有意差はなかった。遊離脂肪酸は Cas 群： $2.6 \pm 0.2 \text{ mEq/L}$ 、CTL 群： $2.9 \pm 0.2 \text{ mEq/L}$ 、Ezm+DHP 群： $2.1 \pm 0.2 \text{ mEq/L}$  となり、群間での有意差はなかった。しかし、中性脂肪と遊離脂肪酸は、Cas 群に対して CTL 群では増加傾向を、Ezm+DHP は抑制傾向を示した。総コレステロールは Cas 群： $336.3 \pm 30.4 \text{ mg/dL}$ 、CTL 群： $183.0 \pm 20.3 \text{ mg/dL}$ 、Ezm+DHP 群： $191.8 \pm 13.5 \text{ mg/dL}$  となり、CTL 群、Ezm+DHP 群の両群で有意に低値を示した。HDL-コレステロールは Cas 群： $229.0 \pm 15.1 \text{ mg/dL}$ 、CTL 群： $125.1 \pm 9.1 \text{ mg/dL}$ 、Ezm+DHP 群： $114.4 \pm 8.7 \text{ mg/dL}$  となった。Cas 群の総コレステロールが高値であったため、Cas 群に対して CTL 群と Ezm+DHP 群が有意に低値を示し、総コレステロールに占める HDL-コレステロールの割合では差は見られなかった。遊離コレステロールは Cas 群： $88.6 \pm 9.2 \text{ mg/dL}$ 、CTL 群： $84.1 \pm 8.2 \text{ mg/dL}$ 、Ezm+DHP 群： $76.2 \pm 8.1 \text{ mg/dL}$  となり、群間での有意差はなかったものの Cas 群に対して Ezm+DHP は低値傾向を示した。

Cas 群に対して総コレステロールは、CTL 群と Ezm+DHP 群で有意に低値を示した。大豆にはイソフラボンを始め、含有成分であるタンパク質や脂質、食物繊維による機能性が広く知られている。特に大豆タンパク質は中性脂肪やコレステロールの蓄積抑制などの脂質代謝改善効果が多数報告されている<sup>85-87</sup>。このことから、総コレステロールにおいては、大豆が本来もっている機能性が発揮されたものと推察された。しかし、CTL 群と Ezm+DHP 群の間で差は認められなかったことから、Ezm+DHP の摂取による脂質代謝の改善は肝臓を中心に起こっているものと推察された。また、大豆ペプチドには、胆汁酸

の排泄促進によって血中のコレステロールを低下させる作用があることから、糞中の胆汁酸量を測定した(Fig.31)。1 日の糞中の胆汁酸量は Cas 群 :  $15.8 \pm 0.7 \mu\text{mol}$ 、CTL 群 :  $8.3 \pm 1.0 \mu\text{mol}$ 、Ezm + DHP :  $13.0 \pm 1.3 \mu\text{mol}$  となり、Cas 群、Ezm+DHP 群に対して CTL 群は有意に低値を示した。排泄される胆汁酸量が多いほど、コレステロールが減少することが考えられたが、最も胆汁酸量が多かったのは Cas 群であり、血中のコレステロールは減少していなかった。被験動物はレプチン受容体遺伝子変異による過食を示すため、食事由来の外因性コレステロールが多量に存在していたことが原因であると推察された。したがって、Ezm+DHP 群に胆汁酸吸着能があるかは判断できなかった。

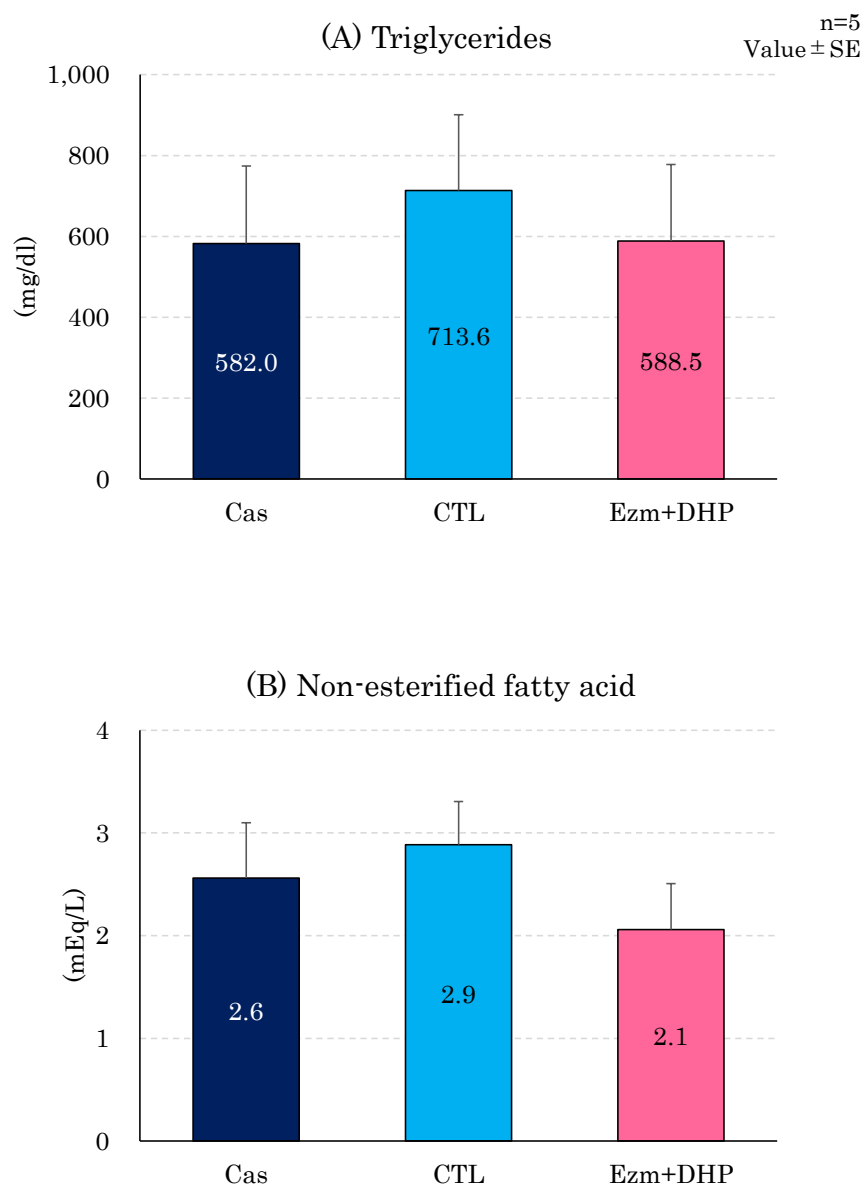


Fig.29 Triglycerides and free fatty acids levels in serum



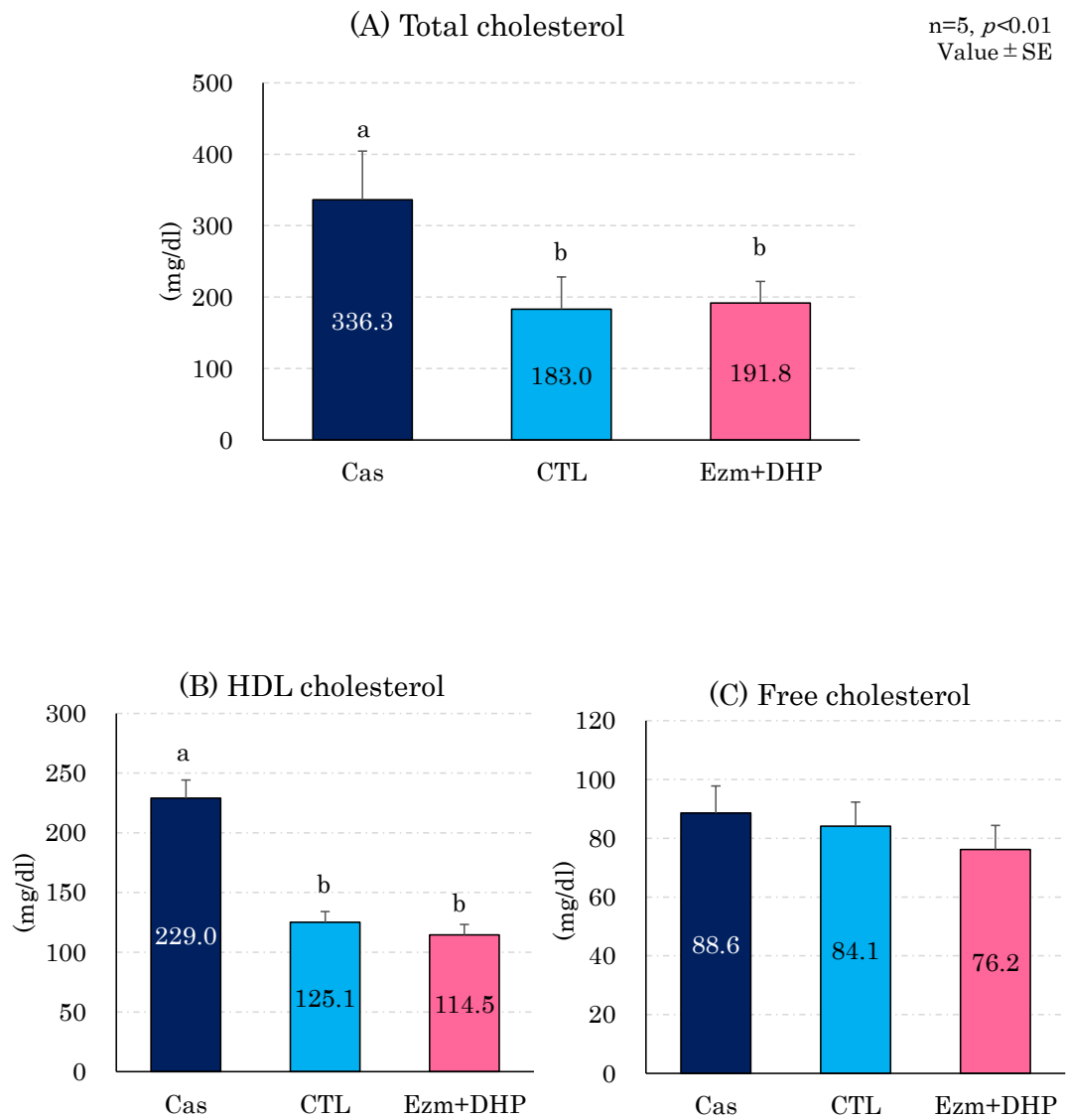


Fig.30 Cholesterol levels in serum

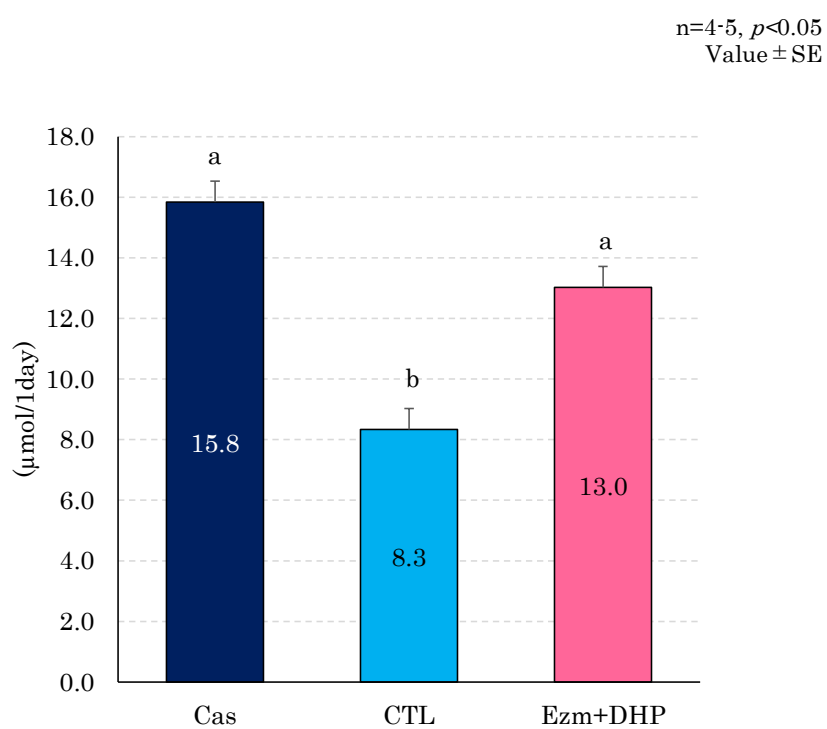


Fig.31 Bile acid contents in feces

#### 4. 血圧の推移

血圧の推移を Fig.32 に示した。本モデルは 16 週から 21 週齢にかけて顕著な血圧上昇や血清脂質の増加を示す特徴がある<sup>88</sup>。各群の 8 週齢の収縮期血圧は Cas 群 :  $94.6 \pm 6.2 \text{ mmHg}$ 、CTL 群 :  $96.2 \pm 5.1 \text{ mmHg}$ 、Ezm+DHP 群 :  $91.9 \pm 7.6 \text{ mmHg}$  であり、いずれも  $120 \text{ mmHg}$  以下の正常領域内で有意差はないことから、群分けによる影響はなかったと考えられた。初期の収縮期血圧と比較して Cas 群は 14 週齢、CTL 群と Ezm+DHP 群は 12 週齢に有意に上昇を示した。Ezm+DHP 群は 16 週齢より血圧上昇が緩慢になり、最終血圧は Cas 群 :  $152.2 \pm 1.5 \text{ mmHg}$ 、CTL 群 :  $146.9 \pm 3.0 \text{ mmHg}$  であったのに対して Ezm+DHP 群 :  $133.1 \pm 1.4 \text{ mmHg}$  と有意に血圧上昇が抑制された。各群の 8 週齢の拡張期血圧は Cas 群 :  $48.6 \pm 2.2 \text{ mmHg}$ 、CTL 群 :  $55.0 \pm 2.6 \text{ mmHg}$ 、Ezm+DHP 群 :  $53.7 \pm 1.9 \text{ mmHg}$  であり、初期の拡張期血圧と比較して Cas 群は 18 週齢、CTL 群は 22 週齢で有意に上昇を示し、Ezm+DHP 群は有意差が見られなかった。

収縮期血圧において Cas 群、CTL 群に対して Ezm+DHP 群は有意に血圧上昇が抑制されていたことから、動水圧処理して改質された大豆タンパク質には、血圧上昇抑制作用を持つペプチドが含まれていることが考えられた。大豆ペプチドには ACE 阻害による血圧上昇抑制効果が報告されている<sup>72,89</sup>。ACE 阻害活性の測定結果は、CTL :  $0.097 \mu\text{g/mL}$ 、Ezm+DHP :  $0.376 \mu\text{g/mL}$  となり、試料間に有意差は見られなかった。その他の血圧上昇を抑制する要因は、抗酸化作用や Na 排泄促進、レニン合成抑制など<sup>90</sup> あるが、本実験における Ezm+DHP の血圧上昇抑制効果は、肝臓重量や血清脂質のメトリックスから、おそらく肝臓での脂質蓄積の抑制によって引き起こされたものと考えられた。

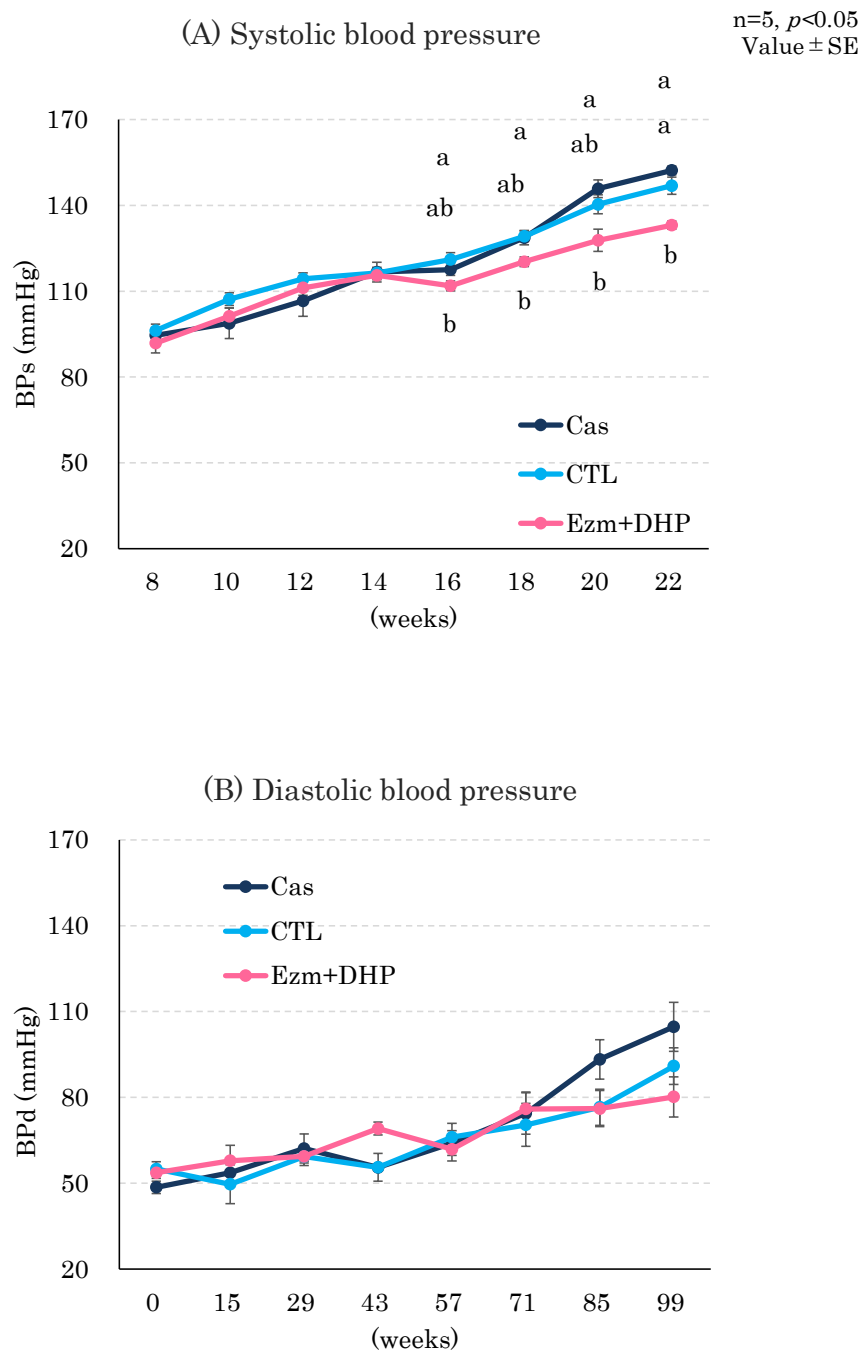


Fig.32 Changes in blood pressure

### 第3項 小括

**Ezm+DHP** を摂取したラットは、肝臓中の脂質蓄積が顕著に抑制され、血圧上昇も有意に抑制された。肝臓中の脂質重量は **Cas** 群に対して **CTL** 群は 14.4%の減少に留まり、有意差は見られなかった。一方で **Ezm+DHP** 群は脂質重量が 44.4%減少し、**Cas** 群と **CTL** 群に対して有意に低値を示した。肝臓中の総コレステロールや中性脂肪も **Cas** 群に対して有意に低値、**CTL** 群に対して減少傾向を示した。

本研究で使用した **SHR/NDmc<sup>r</sup>-cp** ラットは、レプチン受容体遺伝子変異による過食と **SHR** の持つ遺伝的高血圧により、肥満、高血圧、高血糖、脂質異常症、高インスリン血症、インスリン抵抗性などを合併症とするいわゆるメタボリックシンドロームを自然発症する病態モデルである。18週齢で血清中中性脂肪は 500mg/dL、総コレステロールは 200mg/dL を超えるとされていることから、**Ezm+DHP** 摂取により肝臓中の脂質の蓄積は抑制されたが血中脂質の改善までは至らなかったものと推察される。通常、肝臓で合成された中性脂肪やコレステロールは肝臓外へ放出され、肝臓の脂質量は動的平衡が維持されている。しかし、本モデルラットでは常に過剰な糖質・脂質が肝臓へ流入し続けたため、放出先の血中において、3群間に有意差が見られなかったことが考えられた。

**Ezm+DHP** の肝臓を中心とした脂質代謝改善や血圧上昇抑制作用の要因は、胆汁酸吸着能や **ACE** 阻害活性が認められなかったことから、微粒化・低分子化による体内への吸収性が向上し、取り込み量が上がったことが成因であると考えた。第2章で述べたように粒子の大きさと体内への取り込みは相関しており、特に 1 $\mu$ m 以下の粒子は門脈を経由して肝臓へ取り込まれる。**Ezm+DHP** 処理した大豆は、微粒化した影響で大豆本来の機能性成分または大豆ペプチドが効率的に肝臓へ取り込まれたことで、肝臓を中心とした脂質代謝改善が現れた可能性が推察された。また、肥満に伴う肝臓の **PPAR $\gamma$**  のアップレギュレーションは血圧上昇に関与している<sup>91</sup> ことから、大豆ペプチドが **PPAR $\gamma$**  を介して肥満関連の代謝と血圧上昇を改善<sup>92</sup> した可能性や、大豆ペプ

チドが体熱産生を上昇させることからエネルギー代謝が活発になった<sup>93</sup> 可能性が考えられた。

#### 第4項 第4章の研究成果

本章では大豆を試料とし、微粒化を得意とする動水圧処理による残渣の出ない運用を試みると共に、メタボリックシンドロームに対する脂質代謝の改善作用を評価した。

OPA 試薬を用いた定量では、動水圧や酵素の単独処理を行った DHP、Ezm は CTL に対して 1kDa 画分や 30kDa 画分で減少した。大豆タンパク質は、動水圧や酵素によって凝集を起こすため、30kDa 以上の高分子になっていることが推察され、改質によってどの程度の分子量になっているかは判断できなかった。Ezm+DHP は CTL に対して 1kDa 画分で DHP と同様に減少しており、凝集の影響が推察された。一方で 30kDa 画分では減少しなかったことから、凝集物は 1kDa 以上～30kDa 未満の画分にオリゴペプチドとして存在していることが推察された。

肥満・高血圧自然発症モデルラットへ CTL と Ezm+DHP を給餌したところ、標準食である Cas 群に対して CTL 群では血中の総コレステロールや肝臓中の中性脂肪は有意に低値を示し、大豆本来の効果が発揮された。しかし、肝臓の解剖所見や組織染色で脂肪化の進行が見られたことから、本病態モデルにおいて未処理大豆の摂取は、血中脂質の改善は起こしても、肝臓中の脂質への改善効果は低いものと推察された。Ezm+DHP 群は、CTL 群に対して血中の中性脂肪や遊離脂肪酸は、有意差が見られないものの、減少傾向を示した。肝臓中の脂質では、Cas 群と CTL 群に対して Ezm+DHP は脂質重量、中性脂肪、総コレステロールが減少しており、肝臓を中心とした強い脂肪蓄積の抑制が見られた。さらに Ezm+DHP 群では Cas 群と CTL 群に対して有意な血圧上昇の抑制も見られた。脂質代謝が改善し、脂肪蓄積が抑制されたことで血圧にも影響が及んだものと推察された。

脂質代謝の改善が起こった原因としては、微粒化・低分子化によっ

て吸収性が向上し、体内への取り込み量が上がったことで、大豆本来の効果もしくは大豆ペプチドの効果が発揮された可能性が考えられた。

また、本章では加工による残渣を出さないことを目標に試みたが、すべての処理過程において大豆残渣は出現せず、外皮丸ごとを加工することができた。本試験では、あらかじめ微粉末化した大豆を使用した。呉汁の状態からの処理も可能である。微粉末化する一次加工を省くことで、より運用しやすくなることが考えられた。本技術を応用することで、ゼロエミッションでの食品加工が可能となることが期待できる。

## 第5章 総括

高圧ホモジナイザーは 100MPa 以上の超高压領域で乳化・分散を行う装置である。内部で動水圧が作用することで、試料の粒子が減径し、タンパク質の二次構造が変化することが報告されている。このことから、食品への動水圧処理は、機能性成分の微粒化や低分子化によって吸収性が向上することが期待されている。これまでの食品タンパク質由来のペプチドを得る手法は高濃度・長時間の酵素処理が主流であったが、本研究では動水圧による改質を試みた。動水圧(150MPa・15 passes)と酵素(プロテアーゼ、0.01%~0.06%、30 分間)の単独処理に加え、酵素処理後に動水圧処理を行った併用処理を比較した。また、試料は動物性タンパク質として鶏ささみ肉、植物性タンパク質として大豆全粒粉末を利用した。

### 1. 酵素・動水圧処理による低分子化のメカニズム

第 2 章よりタンパク質の構造を維持する水素結合、疎水性相互作用、S-S 結合に影響があった試料は DHP と Ezm+DHP であった。一方で、低分子化しているのは Ezm と Ezm+DHP であることが示された。酵素と動水圧は、タンパク質の高次構造に対する作用部位が異なるためにこうした現象が起こったと考えられた。酵素と動水圧を併用したことによる低分子化の概念図を Fig.33 に示した。酵素はアミノ酸同士をつなぐペプチド結合を加水分解する。本研究で使用したエンド型プロテアーゼは食品添加物用の粗酵素であり、切断のターゲットとしているアミノ酸もしくはアミノ酸配列は不明であるが、多くのプロテアーゼは基質特異性によって特定の部位のペプチド結合を切断する。したがって、必ずしもサブユニット間の切断が優位に起こるわけではなく、構造の広範囲のペプチド結合が切断される。酵素のみの単独処理で水素結合や疎水性相互作用に変化がなかったのは、このためである。酵素で粗分解した後に動水圧処理を行うことで、圧力・物理力を受ける構造の表面積が大きくなり、併用条件下で低分子化が促進されたものと推察される。タンパク質へ動水圧処理を行った先行研究は、



二次構造の変化を報告したものが多く、一次構造については、変化がなかった、もしくは論じないものが多い。確かに本研究でも DHP 処理のみでは水素結合など二次構造に関する結合量は変化しても、一次構造に変化がなく低分子化しなかった。しかし、動水圧処理は酵素と併用することで一次構造に大きな変化をもたらし、鶏ささみ肉のアミノ酸とペプチドを増加させた。

また、大豆で見られた凝集は、疎水部位が露出したペプチドが増加したことで、互いに安定化を図るために疎水部位同士を内側にして再形成されたことや S-S 結合は切断によって遊離 SH 基に還元されるが、SH 基が増加したことで、近接した SH 基同士で S-S 結合が再形成されたことが要因と考えられた。

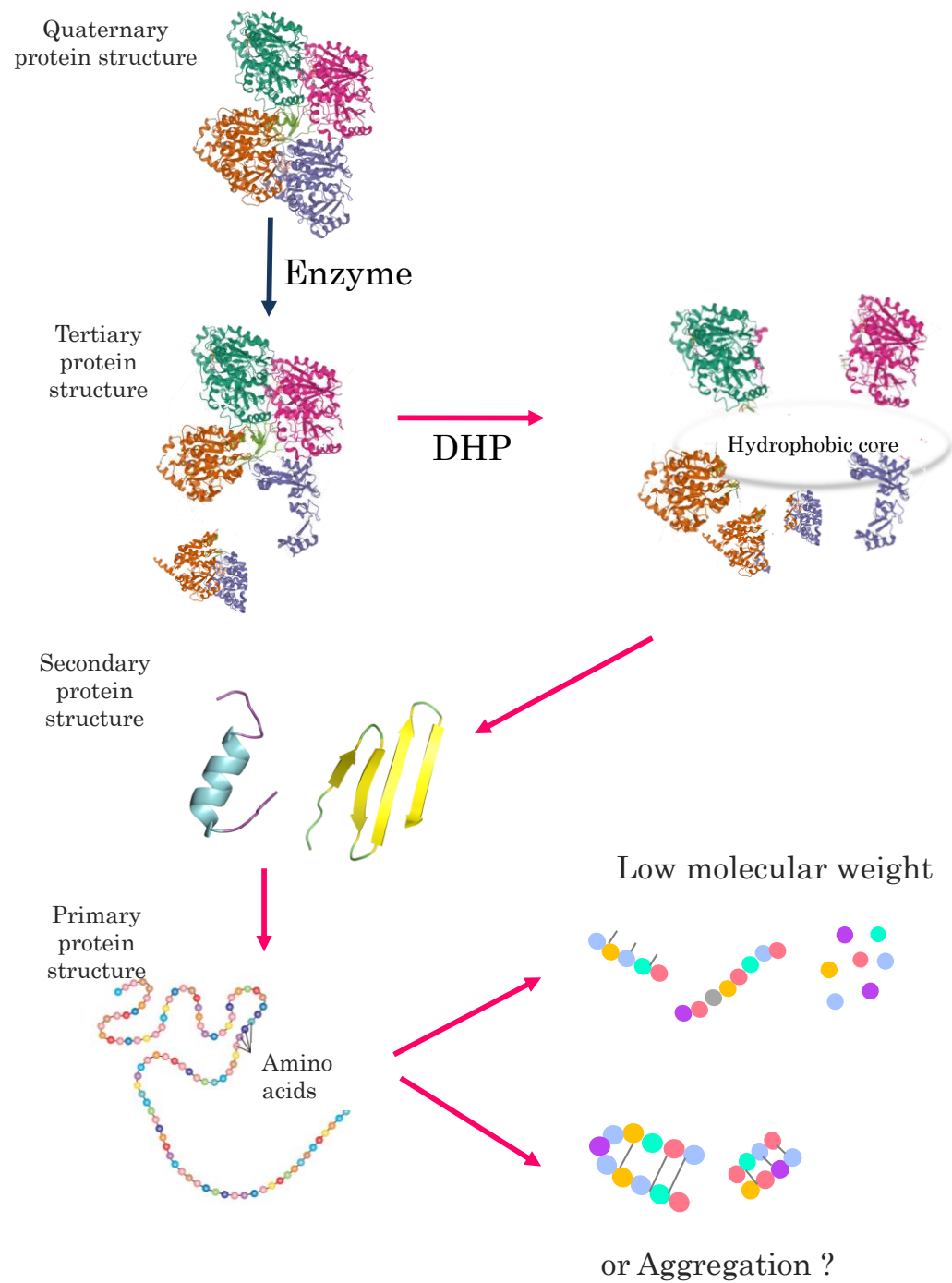


Fig.33 Mechanism of low molecular weight by Ezm+DHP

## 2. 吸収性の向上

第2章第2節において、低分子化しているのは **Ezm** と **Ezm+DHP** であった。しかし、第3節の吸収性の評価において、**NPU** は **Ezm+DHP** が最も高く、次いで **DHP**、**CTL**、**Ezm** となり、後者3群間には差がなかった。このことから、低分子化だけでなく微粒化も **NPU** を向上させる要因であることが推察された。ナノ粒子を扱うドラッグデリバリーシステムにおいて、 $1\mu\text{m}$  以下の粒子径はパイエル板を介して肝臓へ移行することから、粒子の大きさも体内への取り込みやすさに影響を与える。したがって、**NPU** の向上は粒子の減径と質量の減少が要因となったことが推察された。

## 3. 鶏ささみ肉における骨格筋の増量

**NPU** の向上が見られた **Ezm+DHP** について、保持された窒素が骨格筋合成に使用されるのかを確認するため、サルコペニアモデル動物へ給餌し、同時に持久トレーニングを行った。採取したヒラメ筋の筋湿重量は、**CTL** 群に対して有意差はないものの **Ezm+DHP** 群で増加傾向を示し、長趾伸筋(**EDL**)は有意に増加した。**EDL** の骨格筋解析では **Ezm+DHP** 群の **mTOR**、**p70S6K** の遺伝子発現量が有意に増加した。さらに **p70S6K** のリン酸化率を測定したところ、こちらも **Ezm+DHP** 群で有意な増加が見られた。このことから、**Ezm+DHP** に含まれるペプチドやアミノ酸は **mTOR** を介して骨格筋合成を促進させたことが明らかとなった。アミノ酸もしくはペプチドのどちらが優位に作用したかは判断できないが、吸収が向上したことで、体内で効率良く体タンパク質合成に利用されたことが推察された。

## 4. 大豆における脂質代謝改善作用

大豆全粒粉末に対して、**DHP**、**Ezm**、**Ezm+DHP** の処理を行い、**OPA** タンパク質定量を行ったところ、 $1\text{kDa}$  の低分子画分では **DHP**、**Ezm**、**Ezm+DHP** は減少し、 $30\text{kDa}$  の画分では **DHP**、**Ezm** は減少、**Ezm+DHP** は増加した。大豆に対する動水圧処理は大豆タンパク質の

凝集を惹起することから、DHP は低分子画分が凝集し、30kDa 以上となっていることや、Ezm + DHP は 30kDa 画分で増加したことから、1kDa 以上～30kDa 未満でのオリゴペプチドの増加が推察された。メタボリックシンドロームモデル動物へ給餌したところ、通常食を与えた Cas 群に対して CTL 群と Ezm + DHP 群は有意に肝臓中の中性脂肪や血清中の総コレステロールなどが減少し、大豆そのものの機能性が発現した。しかし、肝臓中の脂質重量、総コレステロール量、組織切片の観察から CTL 群に対して Ezm + DHP 群では有意な脂肪蓄積の抑制がみられた。収縮期血圧においても Cas 群、CTL 群に対して Ezm + DHP 群は有意に血圧上昇を抑制した。CTL と Ezm + DHP の ACE 阻害活性に差がなかったことから、脂質代謝改善に付随して血圧上昇が抑制されたとも推察された。しかし、ACE 阻害活性については、ペプチド画分として精製していないものを使用しているため、今後の検討課題である。

以上のことから、Ezm + DHP は肝臓を中心とした脂質代謝改善を行うことが示された。また、大豆の全粒を使用することで、残渣を出さない運用が可能であることが示唆された。

## 5. 展望

現在、食品由来の機能性ペプチドを得る方法として化学的手法の酵素処理が主流となっている。酵素は汎用性が高いものの、高濃度・長時間の処理が必要であり、苦味ペプチドが出やすいことがデメリットとして挙げられる。動水圧処理の場合、汎用性は低く、エネルギー効率が悪いものの、短時間で簡易的な処理が可能であり、嗜好を損ねる苦味ペプチドやえぐみなどは乳化によってマスキングされる。本研究において、酵素と動水圧を併用処理することで、微粒化と低分子化が起こり、生体内への吸収性と利用率が向上した。動水圧研究では、食品成分のナノ粒子化における安全性の評価が中心となっており、食品としての摂取を検討した例はほとんどない。さらに機能性ペプチドやタンパク質補助食品のほとんどは、食事の形態をとらず粉末やサブリ

メント形状である。必要な栄養素を瞬時に摂取できる利便性がある一方で、咀嚼を必要としないことから、脳への刺激や消化液の分泌などが低下し、腸を使わないために免疫力も低下する。食事は、咀嚼による刺激を身体へ加え、健康を維持・増進するだけでなく、心の豊かさや人間関係を形成し、生活の質や社会性を高める役割をもつ。そのため、効率的な栄養摂取を目的とした食品には、食事としての選択肢が必要であると考ええる。例えば、第 2 章、第 3 章の鶏ささみ肉は凍結乾燥前の液体に結着剤を加えて、容器に充填し、成形肉とすることや、第 4 章の大豆は味噌や胡麻豆腐、アイスクリーム、プリンへの活用が考えられる。酵素・動水圧処理食品は高齢者だけでなく、アスリートの身体づくりや傷病者の早期回復、果ては宇宙食にも応用が可能であると考えている。

動水圧研究で未開拓であった「食品全体を対象に処理」し、「*in vivo*」において、吸収性や生体調節機能を評価した」点が本研究の大きな成果である。酵素・動水圧処理食品を食事として複合物の状態で食することは、体内で生体調節機能を発現することが明らかとなった。技術面や安全面などの課題は多いが、本技術の運用においてヒトと環境が得る恩恵は非常に大きく、この素晴らしい技術の研究開発が進むことを願っている。

## Summary

### Effects of dynamic high-pressure treated foods on biological regulatory functions

The water pressure in running water is called dynamic high-pressure (DHP), and it is characterized by the physical forces of shear, impact, and cavitation that act with the pressure. DHP treatment atomizes the sample and improves its permeability in the body and skin. Furthermore, the protein structure is denatured, and the primary structure is often changed, so low molecular weight is expected.

In this study, we applied DHP treatment to the samples using a high-pressure homogenizer to try to reduce the molecular weight of the proteins and to examine whether the absorption of the proteins would be improved. In addition, we evaluated the biological regulatory function of DHP treatment by testing its effects on skeletal muscle gain and improvement of lipid metabolism in vivo.

In Chapter 2, experiments were conducted on chicken breast strips. Chicken breast strips were subjected to dynamic high-pressure (DHP), enzymatic (Ezm), and combined conditions (Ezm+DHP), and powdered after freeze-drying treatment. First, in the first half of Chapter 2, low molecular weight and absorbability were evaluated. Extraction of proteins from sample powders, SDS-PAGE and OPA protein showed that Ezm+DHP had the lowest molecular weight, followed by Ezm. In the nitrogen

balance test, the NPU of Ezm+DHP was increased and the NPU of Ezm was similar to that of CTL. It was inferred that not only low molecular weight but also atomizes was important for improved absorption.

Next, in the latter half of Chapter 2, we examined the effects of Ezm+DHP with increased NPU on skeletal muscle. SAMP8, which develops sarcopenia due to accelerated aging, was given CTL and Ezm + DHP, and treadmill training was performed for 5 months. The results showed that the soleus muscle of Ezm+DHP tended to increase and the extensor digitorum longus muscle (EDL) increased significantly. The analysis of EDL revealed that the phosphorylation rate of p70S6K was increased via mTOR. These results indicate that absorption increased in Ezm+DHP due to both low molecular weight and particulate matter, and that the nitrogen retained in the body was used for skeletal muscle synthesis through endurance exercise.

In Chapter 3, experiments were conducted on whole soybeans in order to attempt residue-free operation as well as functionality. After DHP, Ezm, and Ezm+DHP treatments similar to chicken breast strips were performed on soybeans, the trypsin-inhibitor was inactivated by autoclaving and after then powdered. The results of OPA protein quantification showed that none of the samples were low molecular weight in the fractions below 1 kDa, and DHP and Ezm + DHP were lower than CTL and Ezm. Since previous studies have shown that DHP treatment agglutinates soybean proteins, it is possible

that this experiment was similarly agglutinated. The protein concentration of DHP decreased in fractions below 30 kDa, while that of Ezm+DHP increased, inferring that the molecular weight of DHP aggregates was above 30 kDa and that of Ezm+DHP was above 1 kDa to below 30 kDa. This suggested that the Ezm+DHP contained oligopeptides. Next, SHR/NDmcr-cp, which develop obesity and hypertension, were fed a standard diet (Cas) with casein as the protein source, CTL, and Ezm+DHP. As a result, Cas caused significant fat accumulation in the liver, exacerbated lipid-related parameters in the liver and blood, and showed an increase in blood pressure. In CTL, fat accumulation in the liver was slightly suppressed and blood lipids also improved, but blood pressure increased to the same extent as in Cas. In Ezm+DHP, fat accumulation in the liver was hardly observed, blood lipids showed a tendency to improve more than in CTL, and the increase in blood pressure was significantly suppressed versus Cas and CTL. Triglycerides in the liver and total cholesterol in the blood were also improved in CTL, suggested that the lipid metabolism-improving effects of soybeans are inherent. Ezm+DHP lowered the lipid weight, total cholesterol, and triglycerides in the liver more than CTL, indicating a strong improvement in lipid metabolism mainly in the liver. Ezm+DHP was lowered in molecular weight and atomizes, which improved its absorption into the body, suggested that the functional components of soybeans were efficiently taken up by the liver.



The present study revealed that DHP treatment of animal and plant proteins, in combination with enzymes, promoted low molecular weight and improved absorption in the body. In addition, the combination treatment of enzymes and DHP expressed biomodulatory functions such as promotion of skeletal muscle synthesis and improvement of lipid metabolism mainly in the liver. This indicates that Ezm+DHP treatment can be one of the most useful food processing technologies for both humans and the environment.

## 参考文献

1. Microfluidics International Corporation : Microfluidizer® Processors, <https://www.microfluidicsmpt.com/> (2021.3.1 閲覧)
2. 株式会社美粒：高圧乳化分散装置の系図, <http://www.berryu.net/> (2021.3.1 閲覧)
3. ナノマイザー株式会社：微粒化の原理, [http://www.nanomizer.co.jp/Japanese/nanomizer\\_tec/mechanism.html](http://www.nanomizer.co.jp/Japanese/nanomizer_tec/mechanism.html) (2021.3.1 閲覧)
4. Fukutomi, J., Sumitomo, T., Yoshimura, Y., Shigemitsu, T. & Ichimiya, M. Study of emulsification mechanism in a pressure type homogenizer. Nihon Kikai Gakkai Ronbunshu, B Hen/Transactions of the Japan Society of Mechanical Engineers, Part B 79, 2030–2040 (2013).
5. 森田正道・片田順規：高圧ホモジナイザーによる O/W エマルションの調製, 日油化学会誌, 40, 58–63 (1991).
6. Ciron, C. I. E., Gee, V. L., Kelly, A. L. & Auty, M. A. E. Comparison of the effects of high-pressure microfluidization and conventional homogenization of milk on particle size, water retention and texture of non-fat and low-fat yoghurts. Int. Dairy J. 20, 314–320 (2010).
7. 石井文由：リピッドマイクロスフェア, 日油化学会誌, 49, 1141–1148 (2000).
8. 石井文由：リン脂質を利用した製剤, オレオサイエンス, 2, 197–203 (2002).
9. 作山 秀・福田泰博・酒井裕二・中前勝彦：高圧乳化機の高相エマルションに及ぼす影響, 色材協会誌, 74, 279–284 (2001).
10. Cao, W., Shi, L., Hao, G., Chen, J. & Weng,

- W. Effect of molecular weight on the emulsion properties of microfluidized gelatin hydrolysates. *Food Hydrocoll.* 111, 106267 (2021).
11. Xie, F. et al. Effects of high hydrostatic pressure and high pressure homogenization processing on characteristics of potato peel waste pectin. *Carbohydr. Polym.* 196, 474–482 (2018).
  12. Chen, J. et al. Degradation of high-methoxyl pectin by dynamic high pressure microfluidization and its mechanism. *Food Hydrocoll.* 28, 121–129 (2012).
  13. Dissanayake, M. & Vasiljevic, T. Functional properties of whey proteins affected by heat treatment and hydrodynamic high-pressure shearing. *J. Dairy Sci.* 92, 1387–1397 (2009).
  14. Keerati-U-Rai, M. & Corredig, M. Effect of dynamic high pressure homogenization on the aggregation state of soy protein. *J. Agric. Food Chem.* 57, 3556–3562 (2009).
  15. Carullo, D., Donsì, F. & Ferrari, G. Influence of high-pressure homogenization on structural properties and enzymatic hydrolysis of milk proteins. *LWT* 130, 109657 (2020).
  16. Zhong, J. et al. Antigenicity and conformational changes of  $\beta$ -lactoglobulin by dynamic high pressure microfluidization combining with glycation treatment. *J. Dairy Sci.* 97, 4695–4702 (2014).
  17. Liu, W. et al. The effect of dynamic high-pressure microfluidization on the activity, stability and conformation of trypsin. *Food*

- Chem. 123, 616–621 (2010).
18. Zong-Cai Tu, Hui Wang, Guang-Xian Liu, Guang Chen, Yu-Xin Dou, Xue-Chun Zhang. Effect of Dynamic High Pressure Microfluidization Treatment on the Microstructure of Ovalbumin .pdf. Spectroscopy and Spectral Analysis 30, 495–498 (2010).
19. Maresca, P. et al. Effect of dynamic high pressure on functional and structural properties of bovine serum albumin. Food Res. Int. 99, 748–754 (2017).
20. 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構：食品ナノテクノロジープロジェクト，  
[http://www.naro.affrc.go.jp/org/nfri/yakudachi/foodnanotech/kenkyu\\_00.html](http://www.naro.affrc.go.jp/org/nfri/yakudachi/foodnanotech/kenkyu_00.html) (2021.3.1 閲覧)
21. 中嶋光敏・杉山 滋：フードナノテクノロジー，CMC 出版，1–20 (2009).
22. 杉山 滋：食品におけるナノテクノロジーの展開，食品と容器，53, 640–646 (2012).
23. United Nations: The 2019 Revision of World Population Prospects,  
<https://population.un.org/wpp/> (2021.10.27 閲覧)
24. Morley, J. E., Baumgartner, R. N., Roubenoff, R., Mayer, J. & Nair, K. S. Sarcopenia. J. Lab. Clin. Med. 137, 231–243 (2001).
25. Kitamura, A. et al. Sarcopenia: prevalence, associated factors, and the risk of mortality and disability in Japanese older adults. J. Cachexia Sarcopenia Muscle 12, 30–38 (2021).
26. Arai, H. Latest findings of world sarcopenia research. J. Integr. Study Diet. Habits 29, 81–84 (2018).

27. Denison, H. J., Cooper, C., Sayer, A. A. & Robinson, S. M. Prevention and optimal management of sarcopenia: a review of combined exercise and nutrition interventions to improve muscle outcomes in older people. *Clin. Interv. Aging* 10, 859–869 (2015).
28. Paddon-Jones, D. & Rasmussen, B. B. Dietary protein recommendations and the prevention of sarcopenia. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 12, 86–90 (2009).
29. 厚生労働省：日本人の食事摂取基準（2020年版），  
[https://www.mhlw.go.jp/stf/newpage\\_08517.html](https://www.mhlw.go.jp/stf/newpage_08517.html)  
（2021.10.27 閲覧）
30. Kobayashi, Y. A long life built by mastication and occlusion. *Ann. Jpn. Prosthodont. Soc.* 3, 189–219 (2011).
31. Arredondo-Ochoa, T. et al. Physicochemical and antimicrobial characterization of beeswax-starch food-grade nanoemulsions incorporating natural antimicrobials. *Int. J. Mol. Sci.* 18, (2017).
32. 小泉亮輔・入澤友啓・多田耕太郎・鈴木敏郎：アクトミオシンのゲル形成機構と微細構造に及ぼす塩濃度ならびに圧力強度の影響，東京農大農学集報，60，212–218（2016）。
33. Chen, X., Zhou, R., Xu, X., Zhou, G. & Liu, D. Structural modification by high-pressure homogenization for improved functional properties of freeze-dried myofibrillar proteins powder. *Food Res. Int.* 100, 193–200 (2017).
34. Li, C., Dou, Z., Ma, P., Wang, C. & Jiang, L. Effect of Homogenization at a Lower Pressure on Structural and Functional Properties of Soy

- Protein Isolate. *J. Oleo Sci.* 69, 1417–1426 (2020).
35. Saricaoglu, F. T., Tural, S., Gul, O. & Turhan, S. High pressure homogenization of mechanically deboned chicken meat protein suspensions to improve mechanical and barrier properties of edible films. *Food Hydrocoll.* 84, 135–145 (2018).
  36. Yang, J., Liu, G., Zeng, H. & Chen, L. Effects of high pressure homogenization on faba bean protein aggregation in relation to solubility and interfacial properties. *Food Hydrocoll.* 83, 275–286 (2018).
  37. Zamora, A., Trujillo, A. J., Armaforte, E., Waldron, D. S. & Kelly, A. L. Effect of fat content and homogenization under conventional or ultra-high-pressure conditions on interactions between proteins in rennet curds. *J. Dairy Sci.* 95, 4796–4803 (2012).
  38. Zhang, A. et al. Effects of high pressure homogenization on the structural and emulsifying properties of a vegetable protein: *Cyperus esculentus* L. *LWT* 153, 112542 (2022).
  39. Wang, C. et al. Effect of dynamic ultra-high pressure homogenization on the structure and functional properties of whey protein. *J. Food Sci. Technol.* 57, 1301–1309 (2020).
  40. 本郷富士弥・加香芳孝：遊離糖および遊離アミノ酸の加熱前後における存在量の消長と揮発性カルボニル化合物合成に対する関係，琉球大学農学部学術報告，20，245–261 (1973).
  41. Matthews, D. M. Intestinal absorption of peptides. *Physiol. Rev.* 55, 537–608 (1975).

42. 山本茂：タンパク質、ペプチドおよびアミノ酸の体内利用に関する研究，日本栄養・食糧学会誌，39，81-88（1986）.
43. 青山敏明・福井健介・山本孝史：ラットに強制投与された窒素源の違いが胃内通過時間に及ぼす影響，日本栄養・食糧学会誌，49，46-51（1996）.
44. Shimizu, M. Food-derived peptides and intestinal functions. Biofactors 21, 43-47（2004）.
45. Shimizu, M. Studies on milk proteins and peptides -From biochemical characterization to the gut physiology-. Milk Science, 57, 35-44（2008）.
46. 細谷憲政・印南 敏・五島孜郎編集：小動物を用いる栄養実験，第一出版，127-152（1980）.
47. 財団法人日本食品分析センター編集：分析実務者が書いた五訂日本食品標準成分表分析マニュアルの解説，中央法規出版，10-86（2004）.
48. 文部科学省：食品成分データベース「肉類//＜鳥肉類 にわとり [若どり・副品目] ささみ 生」，[https://www.mext.go.jp/a\\_menu/syokuhinseibun/mext\\_01110.html](https://www.mext.go.jp/a_menu/syokuhinseibun/mext_01110.html)（2021.3.1 閲覧）
49. 稲川淳一・清澤 功・長澤太郎：トリプシン、パンクレアチンおよびペプシンによるカゼインおよび大豆タンパク質の消化性に及ぼすフィチン酸の影響，日本栄養・食糧学会誌，40，367-373（1987）.
50. 中埜 拓・島谷雅治・村上雄二・佐藤則文・井戸田 正：乳清タンパク質酵素分解物の窒素利用効率，日本栄養・食糧学会誌，47，203-208（1994）.
51. 中村 強・栗林 稔・吉原大二・竹下保義：乳タンパク質および乳タンパク質加水分解物の消化吸収障害ラットにおける栄養学的影響，日本栄養・食糧学会誌，50，355-361（1997）.

52. 赤染陽子・越智 浩・田村吉隆：牛乳タンパク質加水分解物の特性と利用，*Japanese Journal of Dairy and Food Science*, 44, A129-A138 (1995).
53. Poullain, M. G., Cezard, J. P., Roger, L. & Mendy, F. Effect of whey proteins, their oligopeptide hydrolysates and free amino acid mixtures on growth and nitrogen retention in fed and starved rats. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* vol. 13 382-386 (1989).
54. 山本浩充・竹内洋文・川島嘉明：粒子物性制御による微粒子ドラッグデリバリーシステムの機能設計，*Drug Delivery system*, 17-4, 321-329 (2002).
55. Ichikawa, H. Development of Nanoparticulate Systems for Biomedical Use. *Plan. Perspect.* 543, 550 (2010).
56. 長澤孝志：アミノ酸による骨格筋タンパク質分解調節機構に関する研究，*日本栄養・食糧学会誌*, 71, 3-10 (2018).
57. 石井直方：サルコペニアのメカニズムとその予防・改善のためのトレーニング，*Functional Food Research*, 14, 88-98 (2018).
58. Cui, D. et al. A novel voluntary weightlifting model in mice promotes muscle adaptation and insulin sensitivity with simultaneous enhancement of autophagy and mTOR pathway. *FASEB J.* 34, 7330-7344 (2020).
59. Ken, N. Physical therapy. *Feldsher. Akush.* 9, 18-21 (1954).
60. 森 政之・樋口京一：老化研究のためのモデルマウスー老化促進モデルマウスを軸にしてー，*日本薬理学会誌*, 153, 179-185 (2019).
61. Guo, A. Y. et al. Muscle mass, structural and functional investigations of senescence-accelerated mouse P8 (SAMP8). *Exp. Anim.* 64,



- 425-433 (2015).
62. 平坂勝也・前田 翼・春名真里江・安倍知紀・越智あり  
さ・真板綾子・近藤茂忠・谷山茂人・橘 勝康・二川 健,  
サルコペニアに対する大豆由来イソフラボンの予防効果, 大  
豆たん白質研究, 17, 150-155 (2014).
63. Gilmartin, S., O'Brien, N. & Giblin, L. Whey  
for Sarcopenia; Can Whey Peptides,  
Hydrolysates or Proteins Play a Beneficial  
Role? Foods 9, (2020).
64. 西谷真人・宗清芳美・杉野友啓・梶本修身: 新規抗疲労成  
分イミダゾールジペプチド, 日本補完代替医療学会誌, 6,  
123-129 (2009).
65. 原田理恵・田口靖希・浦島浩司・佐藤三佳子・大森 丘・  
森松文毅: トリ胸肉抽出物のマウス遊泳持久力に対する効果  
日本栄養・食糧学会誌, 55, 73-78 (2002).
66. Kimira, Y. & Mano, H. Food function of  
collagen peptide. J. Integr. Study Diet. Habits  
25, 005-008 (2014).
67. Sato, T., Ito, Y. & Nagasawa, T. L-Lysine  
suppresses myofibrillar protein degradation  
and autophagy in skeletal muscles of  
senescence-accelerated mouse prone 8.  
Biogerontology 18, 85-95 (2017).
68. 三上俊夫・伊藤 朗・吉野芳夫: ペプチド食摂取が激運動  
後の骨格筋および肝臓でのタンパク質代謝に及ぼす影響, デ  
サントスポーツ科学, 19, 183-190 (1998).
69. 小林展章・谷村 弘・稲本 俊・佐藤友信・日笠頼則・瀬  
戸山元一・向原純雄・三根康毅: 低分子ペプチド経腸栄養剤  
の栄養評価に関する基礎的・臨床的研究(II) T-330 の臨床  
応用とエレンタール®との比較, 日本外科宝函, 53, 133-  
144 (1984).
70. 新井健一: 水産動物筋肉タンパク質の変性と制御,  
Nippon Suisan Gakkaishi, 68, 137-143 (2002).

71. 平野 篤・白木賢太郎：姿をかえるタンパク質，生物工学，89，404-407（2011）.
72. 長岡 利：食品タンパク質由来ペプチドの生活習慣病 予防改善作用に関する研究の新展開，化学と生物，54，804-811（2016）.
73. 農林水産省：第 67 回企画部会 米・麦・大豆をめぐる状況について（平成 31 年 3 月 18 日），  
<https://www.maff.go.jp/j/council/seisaku/kikaku/bukai/index.html>（2021.3.1 閲覧）
74. 農林水産省：第 4 回 食品廃棄物等の発生抑制の目標値検討ワーキンググループ（平成 23 年 12 月 2 日） 日本豆腐協会 食品リサイクル法に関わる発生抑制，  
<https://www.maff.go.jp/j/council/seisaku/syokusan/>（2021.3.1 閲覧）
75. 胡 柏：食品加工残さの燃料ペレット事業化の経済条件に関する一考察，農林業問題研究，170，61-66（2008）.
76. 大塚製薬スゴイダイズ公式サイト：スゴイダイズと SDGs，  
<https://sugoidaizu.jp/sdgs/>（2021.3.1 閲覧）
77. 農林水産省：第 5 回「食品産業もったいない大賞」受賞者 ミナミ産業株式会社，  
<https://www.maff.go.jp/j/shokusan/recycle/ondanka/mottai/mottai.html>（2021.3.1 閲覧）
78. Morinaga K. Effect of a small quantity of moisture on inactivation of trypsin-inhibitor in soybeans by parching. Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi 49, 182-187（2002）.
79. Moriyama, T. et al. Effect of gamma irradiation on soybean allergen levels. Biosci. Biotechnol. Biochem. 77, 2371-2377（2013）.
80. 松岡博厚・関口正勝：ブロメライン処理大豆蛋白質の加熱凝固，Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 39, 316-321（1992）.
81. 水口國雄：最新染色法のすべて，医歯薬出版，7-45

- (2011).
82. 岩見公和・藤井尚人・鈴鹿智彦・金本龍平：糞中ステロイド排泄増加における大豆レジスタントプロテインの中心的役割と補足胆汁酸の構造特異性，大豆たん白研究，5，58-62 (2002).
83. Tamaru, S. et al. Effects of dietary soybean peptides on hepatic production of ketone bodies and secretion of triglyceride by perfused rat liver. Biosci. Biotechnol. Biochem. 71, 2451-2457 (2007).
84. Pak, Valeriy V. ,Koo, Min-Seon ,Lee, Na-Ri ,Oh, Su-Kyung,Kim, Myung-Sunny ,Lee, Jong-Soo ,Kwon, Dae-Young. Hypocholesterolemic soybean peptide (IAVP) inhibits HMG-CoA reductase in a competitive manner.pdf. Food Science and Biotechnology 14, 727-731 (2005).
85. Iritani, N., Hosomi, H., Fukuda, H., Tada, K. & Ikeda, H. Soybean Protein Suppresses Hepatic Lipogenic Enzyme Gene Expression in Wistar Fatty Rats. J. Nutr. 126, 380-388 (1996).
86. 高橋陽子：凍り豆腐がラット肝臓でのコレステロール代謝に及ぼす影響，食総研報，75，33-38 (2011).
87. 高橋陽子：食糧－その科学と技術－ 大豆とその調理加工が脂質代謝改善作用に及ぼす影響，食品総合研究所，54，35-48 (2016).
88. 山本潤子・池田克巳・奈良安雄・家森幸男：肥満・高血圧自然発症ラット SHR-NDmcr-cp，肥満研究，10，329-330 (2004).
89. 仲原文晴・内田理一郎：醸造技術の革新による血圧降下ペプチド高含有醤油の開発，化学と生物，56，445-449 (2018).
90. 稗田蛍火舞・砂川陽一・刀坂泰史・長谷川浩二・森本達

也：降圧効果を持つ機能性食品の薬理作用，日薬理誌，146，33-39（2015）．

91. Uno, K. et al. Hepatic peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ -fat-specific protein 27 pathway contributes to obesity-related hypertension via afferent vagal signals. Eur. Heart J. 33, 1279-1289 (2012).
92. Goto, T., Mori, A. & Nagaoka, S. Soluble soy protein peptic hydrolysate stimulates adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. Mol. Nutr. Food Res. 57, 1435-1445 (2013).
93. 齋藤昌之：大豆たん白質ペプチドの経管栄養への応用－熱産生に及ぼす影響－，大豆たん白質栄養研究会会誌，10，81-83（1989）．

## 謝 辞

本研究を進めるにあたり、多くの方々にご指導ご鞭撻を賜りました。

本研究の遂行ならびに論文作成にあたり、多大なご指導を賜りました東京農業大学大学院農学研究科環境共生学専攻 食環境科学研究室の古庄 律教授に心より御礼申し上げます。

本研究の遂行ならびに論文作成にあたり、御校閲と御助言を賜りました同研究室の山内 淳教授、谷岡由梨准教授、大阪府立大学総合リハビリテーション学研究科の永野ひかる博士に深く感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、御助言を賜りました本学大学院農学研究科 環境共生学専攻の亀山慶晃教授をはじめ環境共生学専攻の先生方に御礼申し上げます。

微粒化装置の使用に際し、度重なるメンテナンスや多くの御助言を賜った長谷川一利氏に感謝申し上げます。

微粒化装置の運用面におけるサポートならびに研究を見守って頂きました中嶋康雄氏、内藤久富氏に感謝申し上げます。

微粒化装置のトラブル対応や第3章で使用した成形用金枠の製造をご指導下さいました本学地域環境科学部 生産環境工学科 バイオロボティクス研究室の田島 淳教授に感謝申し上げます。

電子顕微鏡の利用にあたり、ご指導と御助言を賜りました本学農生命科学研究所 超微細形態解析室の矢口行雄名誉教授に深く感謝申し上げます。

微粒化装置の学内設置にあたり、ご協力いただいた本学食品加工技術センターの野口智弘教授に感謝申し上げます。

実験の遂行にあたり、多大な御協力を頂いた本学国際食料情報学部国際食農科学科 食環境科学研究室の博士前期課程および学部生の皆様に深く感謝致します。

本研究の一部は本学 農生命科学研究所 令和 3 年度博士後期課程研究支援制度により遂行することができました。御支援賜りました研究所の皆様に御礼申し上げます。

最後に、本研究ならびに学業全般にわたって経済的・心身的に支援して下さいました家族に深く感謝し、心より厚く御礼を申し上げます。