

反芻家畜由来食品の共役リノール酸に関与する
要因の解明に関する研究

Studies on the elucidation of some factors responsible for
the conjugated linoleic acid in foods of ruminant origin

竹之山 慎一

2001

①

反芻家畜由来食品の共役リノール酸に關与する
要因の解明に關する研究

**Studies on the elucidation of some factors responsible for
the conjugated linoleic acid in foods of ruminant origin**

1. 序論 1.1. CLAの定義法とその同定法 13
1.2. 本研究の目的 16

2. 材料と方法 2.1. 試料の9c,11c CLA定量法の検討 20
2.2. 試料の抽出 21

2.3. 各成分の分析 2.3.1. 脂肪酸の分析 21
2.3.2. 脂肪酸の抽出 21

2.3.3. 脂肪酸の分析 2.3.3.1. 脂肪酸の分析 21
2.3.3.2. 脂肪酸の抽出 21

2.3.4. 脂肪酸の分析 2.3.4.1. 脂肪酸の分析 21
2.3.4.2. 脂肪酸の抽出 21

2.3.5. 脂肪酸の分析 2.3.5.1. 脂肪酸の分析 21
2.3.5.2. 脂肪酸の抽出 21

竹 之 山 慎 一

2001

1. 序論 1.1. CLAの定義法とその同定法 13

目 次

第1章 緒論	1
1. はじめに	1
2. 共役リノール酸 (Conjugated linoleic acid: CLA) の構造	6
3. CLA (<i>9c,11t</i> CLA) の起源とその生成機構	9
4. CLA (または <i>9c,11t</i> CLA) の生理作用	11
5. 食品の <i>9c,11t</i> CLAの定量法とその問題点	13
6. 本研究の目的	16
第2章 食肉の <i>9c,11t</i> CLA定量法の検討	20
緒言	20
実験材料と方法	21
1. 供試肉	21
2. 脂質の抽出	21
3. 各種脂肪酸メチルエステル調製法	23
4. 脂肪酸メチルエステルの分離、同定および定量	31
結果と考察	33
要約	45
第3章 反芻家畜の食肉 <i>9c,11t</i> CLA含量に及ぼす給餌	

飼料の影響並びに各種組織および脂質画分の 9 <i>c</i> ,11 <i>t</i> CLA分布の相違	46
緒言	46
実験材料と方法	47
1. 供試材料	47
2. 脂質の抽出	48
3. 脂質の分画	48
4. 9 <i>c</i> ,11 <i>t</i> CLAの定量	51
結果と考察	51
要約	59

第4章 食肉の9 <i>c</i> ,11 <i>t</i> CLA含量に及ぼす冷蔵および脂 質過酸化の影響	61
緒言	61
実験材料と方法	63
1. 供試肉	63
2. 各種未加熱肉および加熱肉の調製と冷蔵	63
3. 脂質の抽出	64
4. 9 <i>c</i> ,11 <i>t</i> CLAおよびリノール酸の定量	64
5. 2-チオバルピツール酸反応物質 (TBARS) 値の 測定	65
結果と考察	66

要約	75
第5章 肉製品および乳製品の <i>9c, 11t</i> CLA含量について	
緒言	78
実験材料と方法	79
1. 供試肉製品および乳製品	79
2. 脂質の抽出	80
3. <i>9c, 11t</i> CLAおよび脂肪酸の定量	80
4. 統計分析処理	80
結果と考察	81
1. 肉製品の <i>9c, 11t</i> CLA含量	81
2. 乳製品（チーズ）の <i>9c, 11t</i> CLA含量	88
要約	98
第6章 <i>9c, 11t</i> CLAの生成に関与する2, 3の要因と 生成機構の解明	100
緒言	100
実験材料と方法	102
1. 実験材料	102
2. ルーメン液培養	107
3. 脂質の抽出	107
4. <i>9c, 11t</i> CLAおよび脂肪酸の定量	109

5. ガスクロマトグラフィー/質量 (GC/MS) 分析による脂肪酸ピロリジン誘導体の分析	109
結果と考察	112
1. ルーメン液培養における基質飼料並びに基質脂質の相違が <i>9c, 11t</i> CLA生成に及ぼす影響	112
2. ルーメン液培養におけるpH値の相違が <i>9c, 11t</i> CLA前駆脂肪酸の代謝に及ぼす影響	126
3. α -リノレン酸の不明代謝脂肪酸の同定	131
要約	139
第7章 総括	142
SUMMARY	149
謝辞	156
参考文献	157

第1章 緒 論

1. はじめに

脂質とは、生体成分のなかで脂肪酸とその誘導体、ステロイド、テルペン、カロテノイドおよび胆汁酸を含む多種多様の天然物で、水に不溶でジエチルエーテル、ヘキサン、ベンゼン、クロロホルムあるいはメタノールなどの有機溶媒に可溶なものの総称であり、生体内で重要な栄養生理学的役割を担っている。その一つはエネルギー源としての脂質であり、脂質1g当り約9kcalのエネルギーとなり、糖質やタンパク質（約4kcal/g）に比較して大きな熱量源となっている。また、リン脂質や糖脂質などは生体膜の構成とその構造機能維持に大きく関与している。ステロイドホルモンおよび脂溶性ビタミン、さらにはジホモ- γ -リノレン酸、アラキドン酸およびエイコサペンタエン酸から生合成されるホルモン様作用をもつイコサノイド（プロスタグランジンPG、ロイコトリエンLTなど）などは、生体の生理機能に深く関わっている。また、食餌性脂肪の量やそれを構成する脂肪酸の種類がガン、心筋梗塞、脳卒中および肥満などのいわゆる生活習慣病に大きな影響を及ぼすことが知られてい

る^{8,47,48,68,79,83})。脂質は生体にとって必要不可欠なものであり、それらの栄養的価値をはじめ、最近、特に生体内での代謝ならびに生理機能に関する研究が盛んに行われている。

動物性食品中の脂質は、植物性油脂に多く含まれるリノール酸 (C18:2 n-6) や α -リノレン酸 (C18:3 n-3) などの必須脂肪酸をはじめ、魚油に多く含まれるエイコサペンタエン酸 (EPA、C20:5 n-3) やドコサヘキサエン酸 (DHA、C22:6 n-3) の含有量が低く、逆にコレステロールや飽和脂肪酸が多く含まれることから生活習慣病の様々な疾病との関連性が示唆され、人の健康にマイナス要因として作用するとの考えから、動物性脂質の摂取が控えられる傾向にある^{47,48,68,83})。

他方、リノール酸などのn-6系列の高度不飽和脂肪酸 (Polyunsaturated fatty acid:PUFA) のとりすぎは、発ガンやガン転移の促進、さらにはアレルギー反応性の亢進などに関与することが示唆され³⁵)、またリノール酸のとりすぎによる各種慢性疾患の増加が明らかにされつつある⁸⁶)。最近の研究は、脂質栄養生化学的観点から、食餌脂肪酸としてリノール酸やアラキドン酸などのn-6系PUFAと α -リノレン酸、エイコサペンタエン酸およびドコサヘキサエン酸などのn-3系PUFAと

の間のバランスの重要性を指摘している。それによれば、血清コレステロール濃度の上昇の抑制や血栓症の予防の観点から、n-6系PUFA/n-3系PUFAの比は3~5が一応の目安と考えられている⁷⁹⁾。なお、この場合にも、リノール酸、 α -リノレン酸の代謝能を考慮して、構成PUFAの種類に充分注意を払う必要があるとしている。また、食餌脂肪酸のPUFA(P)（主としてリノール酸）と飽和脂肪酸(S)の比は、一般に1~1.5が推奨されているが、脂肪組織のリノール酸含量が低いと冠動脈性心疾患の発症率が高いことからP/S比1.5以上が長期的予防の面から望ましいと示唆されている⁷⁹⁾。PUFA、特に不飽和度の高いPUFAの摂取に際しては、トコフェロール量に留意し、脂質過酸化の防止に最大の注意を払わなければならない。脂質過酸化の生体に及ぼす悪影響は極めて重大である⁵⁰⁾。

また、脂肪酸のトランス異性体の栄養価については種々の意見がある^{41,48)}。それによれば、トランス酸はその性質が飽和脂肪酸に類似するため、血清コレステロール濃度や虚血性心疾患への影響が懸念されている。また、トランス型リノール酸は血清コレステロール値を増加し、発ガンと関係することなどが示唆されている。他方、トランス酸は血清コレステロール値の増加にほとんど影響

せず、またトランス酸の代謝は β -酸化であるために生化学的には飽和脂肪酸とシス型モノエン酸の中間的性質を示すことからリノール酸が充分存在すれば負の影響はないとされている。

ところで、家畜・家禽の中でブタやニワトリの各種組織の脂質性状は飼料性脂質の影響を受け易いのに対して、ウシ、ヒツジおよびヤギなどの反芻家畜の各種組織の脂質性状はその影響を受け難いことがよく知られている⁶⁶⁾。その原因は、反芻家畜においては第一胃（ルーメン）内の微生物による飼料性脂質の不飽和脂肪酸の水素添加反応が起こることによるものと考えられる。このルーメン内での水素添加反応と併行して不飽和脂肪酸の異性化が進行する結果、反芻家畜由来食品（肉製品および乳製品）の脂質の構成脂肪酸には飽和脂肪酸、モノ不飽和脂肪酸（飽和脂肪酸の形になったものが、組織に吸収される過程で不飽和化されてモノ不飽和脂肪酸となる。）およびトランス脂肪酸が豊富に含有されること、またウシおよびヒツジの枝肉の脂肪組織には約5～11%のトランス脂肪酸が含有されていることが報告されている⁶⁶⁾。この反芻家畜由来食肉の脂質特性に対しては、上述したように、これまで脂質栄養生化学的にヒトの健康に対する影響が懸念されて来た事実が存在している。Scottら⁷⁰⁾

は反芻家畜由来食肉の脂質性状を脂質栄養生化学的視点から改質する方策として、ルーメン内微生物による不飽和脂肪酸の水素添加反応を阻害し、食肉脂質中にリノール酸などのPUFA含有量を増大させる画期的方法を考案した。彼らは、ホルムアルデヒド処理カゼイン皮膜でコーティングを施したリノール酸や α -リノレン酸が豊富な植物油がルーメン内微生物による作用を受けずに第四胃に到達し、第四胃においてはじめてカゼイン皮膜が分解されてリノール酸などの不飽和脂肪酸が他の脂肪酸と同様に体内に吸収せれることを明らかにした。しかし、この方策は実験的には成功したが、飼料コストの問題などから実用段階には至っていない。

最近、食品由来の生理活性脂肪酸の一つとして共役リノール酸 (Conjugated linoleic acid: CLA) の生理活性が注目されている。このCLAは植物性油脂や魚油に比較して畜産食品、特に反芻家畜由来の食品に多く含有されていることが明らかにされている。このCLAは、Parizaら⁶⁴⁾によってフライパンで調理したハンバーガー (fried hamburger)、またその後未加熱のハンバーガーから発ガン抑制作用を持つ物質として見出され、Haら²⁴⁾によってその物質が9cis,11trans CLAであると同定された。その後、Parizaらの共同研究者

によって、CLAの機能として抗ガン活性、抗変異原活性、抗動脈硬化作用、増体促進作用、体脂肪低減作用および筋肉増強作用、その他の多岐に及ぶ生理作用が報告されている。

食品中の *9cis,11trans* CLAの生成機構には大別して反芻家畜のルーメン内微生物によって生成される生物的要因と脂質過酸化の過程で生成される化学的要因の二つが考えられているが、それらの生成に関与する要因の詳細は明らかではない。また食品中の *9cis,11trans* CLAの定量法については *9cis,11trans* CLAの異性化と分解などの幾つかの問題点があり、一般に汎用されている分析法を用いて *9cis,11trans* CLAを正確に定量することが困難である。

2. 共役リノール酸 (Conjugated linoleic acid: CLA) の構造

天然の脂肪酸は通常偶数個の炭素分子が直鎖状に結合し、末端にメチル基 ($-\text{CH}_3$) とカルボキシル基 ($-\text{COOH}$) を有している。脂肪酸は二重結合を含まない飽和脂肪酸と、二重結合を1個以上含む不飽和脂肪酸に大別される。二重結合を1個含む不飽和脂肪酸はモノ

エン酸、また二重結合を2個以上含む不飽和脂肪酸は高度不飽和脂肪酸と呼称される。また、天然の不飽和脂肪酸の二重結合はシス (*cis*) 型の立体構造をとり、さらに二重結合が2個以上の不飽和脂肪酸の場合は二重結合と二重結合の間にメチレン基 ($-\text{CH}_2-$) を含む。リノール酸 ($\text{C}_{18}:2 \text{ n-6}$) は、カルボキシル基側から9位と12位にシス型の二重結合を有する *9cis,12cis* オクタデカジエン酸 (*9cis,12cis* Octadecadienoic acid) であるが、CLAは9位と11位あるいは10位と12位の炭素のそれぞれの二重結合が共役ジエン結合を形成し、またそれぞれの二重結合がシス型またはトランス型の配置をとるリノール酸の位置・幾何異性体の総称である。そのため、理論的には *9cis,11trans*、*10trans,12cis*、*9trans,11cis*、*10cis,12trans*、*9cis,11cis*、*10cis,12cis*、*9trans,11trans* および *10trans,12trans* の8つの異性体が存在すると考えられる。その異性体の中で、*9cis,11trans* CLA (*9c,11t* CLA、Fig. 1) および *10trans,12cis* CLAが発現する生理活性作用が期待されている。特に *9c,11t* CLAは、反芻家畜由来食品の総CLA中の約80~90%を占めることが分っている¹⁰⁾。

Linoleic acid

9*c*,11*t* CLA

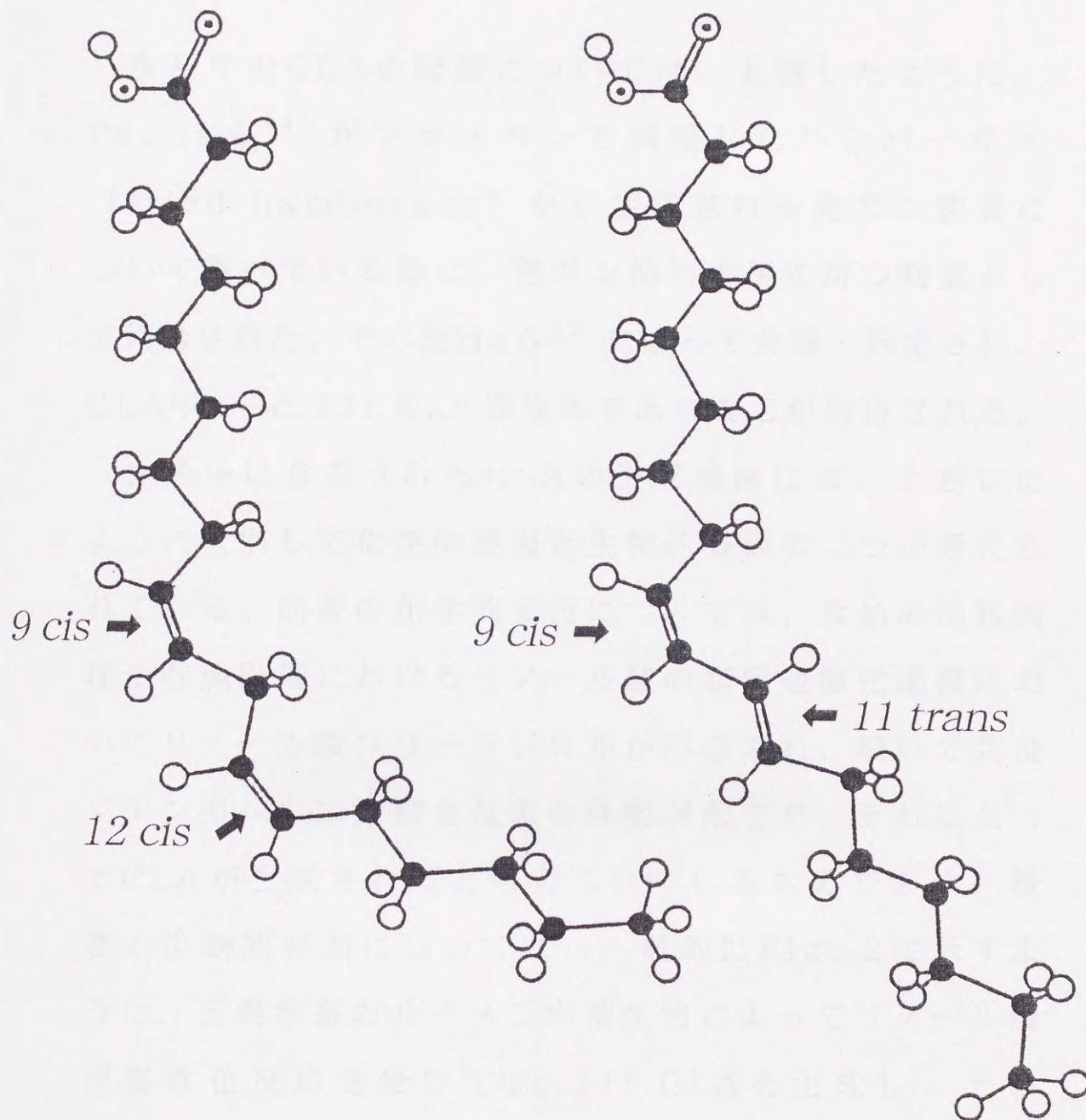


Fig. 1. Structures of linoleic acid and 9*cis*,11*trans* conjugated linoleic acid (9*c*,11*t* CLA).

3. CLA (9*c*, 11*t* CLA) の起源とその生成機構

食品中のCLAの起源については、上述したように、Parizaら⁶⁴⁾がフライパンで調理したハンバーガー (fried hamburger) から生成される発ガン物質について調べている際に、発ガン抑制作用を持つ物質として見出された。その後Haら²⁴⁾によって分離・同定され、CLA中の9*c*, 11*t* CLA異性体であることが報告された。

食品中に含有されるCLAの生成機構には、上述したように大別して化学的要因と生物的要因の二つが考えられている。前者の化学的要因については、食品の加熱調理や貯蔵段階におけるリノール酸の脂質過酸化過程においてリノール酸フリーラジカルが形成され、続いて共役ジエン型への二重結合位置の移動が起こり、それによってCLAが生成されると考えられているものである。後者の生物的要因については、一般的にFig. 2に示すように、反芻家畜のルーメン内微生物によってリノール酸が異性化反応を受けて9*c*, 11*t* CLAを生成し、その9*c*, 11*t* CLAが動物体内へ吸収・蓄積されると考えられているものである。当初、9*c*, 11*t* CLAの生成は、上述のHaらの報告²⁴⁾のように、加熱調理等による脂質過酸化により生成するという化学的要因によりよるものと推

測されていたが、最近では後者の生物的要因がその主体であると考えられている。しかし、CLAの前駆脂肪酸やその生成条件などの詳細については、未だ不明な点が残されている。

4. CLA (または9*c*,11*t* CLA) の生理作用

CLAの生理作用については、抗ガン活性、抗変異原活性、抗動脈硬化作用、増体促進作用、体脂肪低減作用および筋肉増強作用、その他多岐に亘る生理活性作用が報告されている。Haら²⁴⁾は、合成発ガン物質であるDMBA (7,12-dimethyl benz (a) anthracene) によって化学的に誘起されるマウスでの皮膚腫瘍について、CLAを経口投与することにより量依存的に腫瘍形成を抑制することを報告した。また同様に、彼らはBenzo (a) pyreneによって引き起こされる前胃新生物形成について、CLAの経口投与が他の油脂に比較して新生物形成の抑制に効果のあることも明らかにした²⁶⁾。Ipらの報告³⁶⁾によると、食餌に0.5、1あるいは1.5%のCLAを与えることにより、DMBA投与による乳ガン形成を抑制するという結果を示した。CLAの抗酸化作用が抗ガン活性の一因と考えられていた³⁶⁾が、Banni

らの結果⁵⁾はCLAの抗酸化作用が抗ガン作用に大きく影響するとは考えられないと推測している。また、van den Bergら⁸⁴⁾もCLAの抗酸化作用は確認できなかった。ウサギやハムスターを用いたCLAの抗動脈硬化作用についてもいくつかの報告があり、Leeら⁵¹⁾は0.1%コレステロール食餌を与えたウサギにCLAを1日0.5g投与することによってその影響を調べた。その結果、低密度リポタンパク質(LDL)コレステロール濃度と血清トリグリセリド濃度の減少並びに動脈硬化症の抑制が認められた。またNicolosiら⁶²⁾らも、高コレステロール食餌ハムスターにおいて同様の抗動脈硬化作用を認めた。ラットを用いたChinら¹²⁾の報告によると、0.25%~0.5%のCLA含有飼料を給餌することにより飼料効率と増体の向上が認められている。またDuganら¹⁷⁾の研究では、ブタに2.0%CLA含有飼料を給餌した結果、増体と飼料効率の向上が認められた。さらに彼らの結果は、CLAを給餌したブタの体脂肪が27%減少し、他方赤肉量が5%増加したことを示した。その後、Parkら⁶⁵⁾は、同様にCLAを給餌したマウスにおいて、オスで57%、メスで60%の体脂肪の減少、同時にオスで5%、メスで15%の筋肉の増加を認めたが、体重の若干の減少を認めた。同時に、彼らは体脂肪の低減機構を

検討し、CLAが β -酸化の律速酵素であるカルニチン・パルミトイルトランスフェラーゼ (CPT) の活性や脂肪細胞の脂質を加水分解するホルモン感受性リパーゼの活性を高めること、また脂肪細胞への脂肪酸の取り込みに関与するリポプロテインリパーゼ (LPL) の活性を減少させることなどを明らかにした。これらの脂質代謝酵素活性がCLAによって影響を受けたことは、体脂肪の低減にCLAが関与していることを裏付けた。その他のCLAの生理作用としては骨形成への影響⁵³⁾、耐糖能への影響³¹⁾、免疫機能への影響²⁹⁾ および抗アレルギー作用⁸⁰⁾ など多岐に及んでいる。

5. 食品の *9c, 11t* CLAの定量法とその問題点

CLA中の *9c, 11t* CLA異性体の生体における生理作用が注目されていることから、食品に微量に存在する *9c, 11t* CLA定量法を確立することが重要な課題である。

Haら²⁵⁾ は食品の *9c, 11t* CLA定量法として、HPLC分析とキャピラリーカラムGC分析とを組み合わせた方法を考案した。彼らが採用した定量法は、まずHPLC分析で総CLA量を測定し、その後キャピラリーカラムGC分析により総CLA中の *9c, 11t* CLAの割合を求め、

9*c*, 11*t* CLA含量を算出する方法であった。彼らの方法では9*c*, 11*t* CLAを直接定量することが不可能であり、二段階の分析法を踏むため煩雑さが残る。Chinら¹⁰⁾はキャピラリーカラムGC分析の際の前処理段階の脂肪酸メチルエステル調製法として、14%三フッ化ホウ素/メタノール(14% BF₃/MetOH)法⁴⁾、4%硫酸/メタノール(4% H₂SO₄/MetOH)法^{5,6)}および4%塩酸/メタノール(4% HCl/MetOH)法^{5,6)}の各種方法を比較検討した。彼らは、14% BF₃/MetOH法および4% H₂SO₄/MetOH法において、9*c*, 11*t* CLA異性体が他のCLA異性体(9*t*, 11*t* CLAおよび10*t*, 12*t* CLA異性体)に変換され、かつ、酸化分解された割合がそれぞれ57%および28%であったことを明らかにした。他方、4% HCl/MetOH法では、9*c*, 11*t* CLAの分解割合が約5%であったことを報告している。

Shanthaら⁷³⁾は、ナトリウムメトキシド/メタノール(NaOMe/MetOH)法¹³⁾、AOCS法⁴⁾、テトラメチルグアニジン/メタノール(TMG/MetOH)法⁷⁶⁾およびベンゼン/アセチルクロライドによる直接メチルエステル化(DAC)法⁵²⁾を用いて脂肪酸メチルエステルを調製し、9*c*, 11*t* CLAの定量法を検討した。その結果によれば、AOCS法とDAC法においては9*c*, 11*t*

CLAと10*t*,12*c* CLAの顕著な減少に伴い9*t*,11*t* CLAと10*t*,12*t* CLAが顕著に増加したことが認められた。他方、NaOMe/MeOH法およびTMG/MeOH法では9*c*,11*t* CLA異性体の他異性体への変換や酸化分解の割合を減少させることが可能であったが、総脂肪酸メチルエステルの収量が低いことが示唆された。

これまでHaら²⁵⁾、Chinら¹⁰⁾ およびShanthaら⁷³⁾をはじめ多くの研究者が、食品の9*c*,11*t* CLAを定量するための脂肪酸メチルエステル調製法を検討してきた。しかし、脂肪酸メチルエステル調製において使用するメチルエステル化剤をはじめその反応条件によって、9*c*,11*t* CLAの他の異性体への変換や分解、さらには脂肪酸メチルエステル収量の点などで、それぞれの方法に一長一短があった。

そこで、特に、食肉脂質中では9*c*,11*t* CLAが脂質エステル状態で存在することが推測されることから、まず脂質をケン化して脂肪酸の形にした後に9*c*,11*t* CLAメチルエステルを調製することが適していると考えられる。また、一般に、脂肪酸メチルエステル調製法に使用する試薬は、危険で取り扱いが難しい場合があるので、比較的取り扱いやすい試薬を用いた簡便な方法を検討する必要がある。

6. 本研究の目的

本研究では、上記3および4で記述した反芻家畜由来食品に高濃度含まれるCLA、特に*9c,11t* CLAについて、その示唆されている多岐に及ぶ生理作用（抗ガン作用、抗変異原作用、抗動脈硬化作用、増体促進作用、体脂肪低減作用、筋肉増強作用およびその他多岐に及ぶ生理作用）を踏まえ、これまでその脂質栄養生化学的性状からヒトの健康にマイナス要因として懸念されていた反芻家畜由来食肉の脂質に*9c,11t* CLAを通して高付加価値を付与する目的で、まず食肉の*9c,11t* CLA定量法を確立し、*9c,11t* CLA含量に及ぼす諸要因と*9c,11t* CLAの生成機構を検討した。

まず、第2章においては、食肉中に微量に含有される*9c,11t* CLAを正確に定量するために、脂質の脂肪酸メチルエステル調製法に広く使用されている種々の方法を用いて、脂肪酸メチルエステルの調製法を比較し、キャピラリーカラムガスクロマトグラフィー（GC）分析によって*9c,11t* CLAを直接定量する方法を検討した。また、検討して確立した方法を用いて、家畜・家禽肉の*9c,11t* CLA含量を測定し、若干の考察をした。

第3章においては、第2章において確立した定量法を

採用し、給餌飼料（粗飼料多給あるいは濃厚飼料多給）が明らかに相違する反芻家畜の枝肉の *9c, 11t* CLA 含量を測定し、それらの含量の相違について考察した。また、ヤギから採取した各種組織部位の *9c, 11t* CLA 含量の相違を検討した。さらに、食肉 *9c, 11t* CLA の脂質画分分布の基礎的知見を得る目的で、特にヤギから採取した筋肉および肝臓の脂質を中性脂質（主としてトリグリセリド）、極性脂質（主としてリン脂質）および糖脂質に分画し、各脂質画分中の *9c, 11t* CLA を定量すると同時に、筋肉と肝臓ではそれらの *9c, 11t* CLA の脂質画分中の分布割合が相違することを考察した。

第 4 章では、*9c, 11t* CLA の化学的生成機構としてリノール酸の脂質過酸化の過程での生成が推測されていることを踏まえて、牛肉、羊肉、山羊肉およびリノール酸含有量が比較的高い豚肉のそれぞれの挽き肉を用いて、加熱や脂質過酸化促進物質によってそれぞれの冷蔵中の 2-チオバルビツール酸反応物質値（2-Thiobarbituric acid reactive substances value: TBARS 値）で測定される脂質過酸化を促進し、TBARS 値の増加に伴った *9c, 11t* CLA の生成の可能性の有無を検討すると同時に、*9c, 11t* CLA の生成機構を考察した。

第 5 章では、第 2 章で考案した脂肪酸メチルエステル

調製法を用いたキャピラリーカラムGC分析による *9c,11t* CLA定量法によって、市販肉製品および乳製品（チーズ製品）の *9c,11t* CLA含量を調査し、その *9c,11t* CLA含量は国内産と国外産の間並びに反芻家畜由来製品と非反芻家畜製品の間でそれぞれ比較検討した。その結果から、*9c,11t* CLA含量に及ぼす諸要因を考察すると同時に、*9c,11t* CLAと他脂肪酸（*9c,11t* CLAの前駆脂肪酸あるいは中間代謝脂肪酸）との間の相関関係を介して*9c,11t* CLAの生物的生成機構について考察した。

第6章では、第2章の反芻家畜由来食肉の高*9c,11t* CLA含量、第3章の粗飼料多給反芻家畜由来食肉の高*9c,11t* CLA含量および第5章の肉製品・乳製品の結果を踏まえて、ルーメン内微生物による*9c,11t* CLAの生物的生成機構を明らかにする目的で、ヤギから採取したルーメン内容物から調製したルーメン液を用いた培養液に、高 α -リノレン酸含有イタリアンライグラス乾草と高リノール酸含有圧ペントウモロコシを培養すると同時に、また多種形態（エステル型、遊離型、ナトリウム塩型）のリノール酸および α -リノレン酸を培養した。そして、ルーメン液培養したイタリアンライグラス乾草および圧ペントウモロコシ並びにリノール酸および α -リ

ノレン酸の形態の相違が9*c*,11*t* CLAの生成に及ぼす影響を検討すると同時に、 α -リノレン酸からの中間代謝脂肪酸を同定した。また、pH値が異なるルーメン培養液にナトリウム塩型のリノール酸および α -リノレン酸を培養し、その得られた結果から9*c*,11*t* CLAの生成機構を考察した。

第2章 食肉の9*c*,11*t* CLA定量法の検討

緒言

第1章の1ではCLAの9*c*,11*t* CLA異性体が反芻家畜由来食品に多く含有されること、また第1章の4においてはCLAの中でも9*c*,11*t* CLA異性体の生理作用が特に注目されていることを述べた。さらに第1章の5において、これまでの9*c*,11*t* CLA定量法には特に脂肪酸メチルエステル調製段階における9*c*,11*t* CLAの他の異性体への変換や分解、さらには脂肪酸メチルエステルの収量の点に一長一短が存在し、9*c*,11*t* CLAを正確に定量することが難しいことを説明した。

そこで本研究の第2章では、食品、特に食肉の9*c*,11*t* CLA含量に関与する要因を明らかにする手段として、9*c*,11*t* CLA定量法を確立する目的で種々検討を行った。本研究では、まず食品脂質の脂肪酸メチルエステル調製法として汎用されている5種類の方法を用いて、総脂肪酸メチルエステルの収量並びに9*c*,11*t* CLAの他異性体への変換と分解の観点から、食肉の9*c*,11*t* CLAをキャピラリーカラムガスクロマトグラフィー分析によって定量する最適の脂肪酸メチルエステル調製法を比較検

討して、簡便で再現性のある高精度の *9c,11t* CLA 定量法を考案することができた。またこの考案した方法を用いて、各種食肉の *9c,11t* CLA 含量を測定し、*9c,11t* CLA 含量の食肉による相違について若干の考察をした。

実験材料と方法

1. 供試肉：供試肉としては市販の牛肉（モモ）、豚肉（モモ）、鶏肉（モモ）、羊肉（モモ）および山羊肉（モモ）を用い、付着する脂肪および結合組織を除去後、刀で十分に細切して分析に供した。

2. 脂質の抽出

1) 試薬

i) クロロホルム：クロロホルム（和光純薬工業株式会社製 一級）を蒸留し、窒素ガスを通気して冷蔵保存後、2週間以内に使用した。

ii) メチルアルコール：メチルアルコール（和光純薬工業株式会社製、一級）を蒸留したものを用いた（以下蒸留メタノールと記す。）。

iii) 蒸留水：一度蒸留水製造機で製造した蒸留水を用いて、蒸留装置（日本ミリポア・リミテッド製

MILLI-Q II) で再蒸留した蒸留水を使用した。

iv) クロロホルム・メタノール溶液：上記 i) と ii) で調製したクロロホルムと蒸留メタノールを体積比 2 : 1 で混合し、窒素ガスを通気して使用した（以下 C・M 溶液と記す。）。

v) 0.9% 塩化ナトリウム水溶液：塩化ナトリウム（和光純薬工業株式会社製 特級）を上記 iii) で調製した蒸留水に溶解した。

vi) メタノール水溶液：上記 ii) と iii) で調製した蒸留メタノールと蒸留水を体積比 1 : 1 で混合した（以下 M・W 溶液と記す。）。

vii) 無水硫酸ナトリウム：無水硫酸ナトリウム無水物（和光純薬工業株式会社製 特級）を用いた。

2) 脂質の抽出法

脂質の抽出は、主として Folch らの方法¹⁹⁾ に準じて行った。上記 1 の細切した供試肉約 10g をそれぞれ 300 ml 容コニカルビーカーに秤取し、それぞれに 100 ml の C・M 溶液を加え、氷冷しながら 2 分間ホモジナイズした。そしてホモジネートは吸引濾過（桐山ロート 直径 40 mm、濾紙 No.5A) した後、その残渣を再度コニカルビーカーに戻し、50 ml の C・M 溶液を加え、1 分間ホモジナイズし、吸引濾過した。口液は 50 ml の C・M

溶液でよく洗浄しながら300 ml容分液ロートに定量的に移し、これに0.2倍容の0.9%塩化ナトリウム水溶液を加え、2~3分間激しく振盪した後、低温室に一昼夜静置した。静置後、二層に分離した下層のクロロホルム層を別の300 ml容分液ロートに移し、0.2倍容のM・W溶液を加え、2~3分間激しく振盪した後、低温室に一昼夜静置した。静置後、二層に分離した下層のクロロホルム層を500 ml容褐色試薬ビンに移し、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水した後、500 ml容ナス型フラスコに濾過（東洋濾紙 No.5A）しながら定量的に移し、これをロータリーエバポレーターで濃縮後、クロロホルムで一定容量にし、脂質抽出液とした。

3) 総脂質含量の定量

総脂質含量は、あらかじめ恒量を求めておいた50 ml容ナス型フラスコに脂質抽出液をそれぞれ一定量採り、ロータリーエバポレーターで濃縮乾固させた後、恒温器（105℃）で1時間乾燥し、デシケーター内で40分間放冷した後、秤量し、恒量を求めた。

3. 各種脂肪酸メチルエステル調製法

1) 試薬

i) クロロホルム：上記2の1)のi)と同様に調製し

て使用した。

ii) n-Octadecane : n-Octadecane (ガスクロ工業株式会社製) を上記 1) の i) のクロロホルムに溶解させ、内部標準物質として使用した。

iii) Heneicosanoic acid : Heneicosanoic acid (SIGMA社製 $C_{21:0}$) を上記 1) の i) のクロロホルムに溶解させ、内部標準物質として使用した。

iv) Tricosanoic acid : Tricosanoic acid (SIGMA社製 $C_{23:0}$) を上記 1) の i) のクロロホルムに溶解させ、内部標準物質として使用した。

v) メチルアルコール : メチルアルコール (和光純薬工業製 HPLC級) を用いた (以下HPLCメタノールと記す。) 。

vi) 0.5 M水酸化カリウム / メタノール溶液 : 水酸化カリウム (和光純薬工業製 特級) を上記 v) のHPLCメタノールを用いて調製した (以下 0.5 M KOH / MetOH溶液と記す。) 。

vii) 14%三フッ化ホウ素 / メタノール溶液 : 14%三フッ化ホウ素 / メタノール溶液 (和光純薬工業製 ガスクロマトグラフィー用) を用いた (以下14% BF_3 / MetOH溶液と記す。) 。

viii) ベンゼン : ベンゼン (和光純薬工業製 HPLC級)

を用いた。

ix) 8%三フッ化ホウ素/メタノール溶液：上記v)と
vii)の試薬を用いて調製した(以下8%BF₃/MetOH
溶液と記す。)

x) 4%塩酸/メタノール溶液：塩酸/メタノール溶液
(東京化成工業株式会社製 ガスクロマトグラフィー用)
を上記v)のHPLCメタノールを用いて調製した(以下
4% HCl/MetOH溶液と記す。)

xi) テトラメチルグアニジン/メタノール溶液：
1,1,3,3-テトラメチルグアニジン(和光純薬工業製
精密分析用)を上記v)のHPLCメタノールを用いて体
積比1:4に混合した(以下TMG/MetOH溶液と記す。)

xii) 塩酸/メタノール溶液：濃塩酸(和光純薬工業製
精密分析用)を上記v)を用いて体積比4:1から4:
4の割合で混合した(以下aq.HCl/MetOH溶液と記す。)

xiii) n-ヘキサン：n-ヘキサン和光純薬工業製 HPLC
級)を用いた。

xiv) 石油エーテル：石油エーテル300(和光純薬工業製
残留農薬試験用)を用いた。

xv) 飽和食塩水：塩化ナトリウム(和光純薬工業製 特
級)を沸騰蒸留水に溶解させた後冷却し、その上澄液を
飽和食塩水として使用した。

xvi) 無水硫酸ナトリウム：硫酸ナトリウム無水物（和光純薬工業製 特級）を用いた。

xvii) 蒸留水：上記2の1)のiii)と同様に調製して使用した。

2) 脂肪酸メチルエステル調製法

i) 0.5 M KOH/MetOH/14% BF₃/MetOH法⁴⁾

上記2で調製した脂質抽出液から約100 mgの脂質を含む量を50 ml容共栓付試験管に採取し、脂質量の約1/10の内部標準物質を添加した後、ロータリーエバポレーターで濃縮乾固した。そして、直ちに0.5 M KOH/MetOH溶液5 mlを加えて5分間および続いて14% BF₃/MetOH溶液5 mlを加えて5分間、それぞれ沸騰水中で加熱還流し、ケン化およびメチルエステル化を行った。その後、流水中で冷却後、n-ヘキサン約10 mlを加え、よく振盪した後上層のn-ヘキサン層を別の50 ml容共栓付試験管に移した。この抽出操作を2回繰り返して、脂肪酸メチルエステルを抽出した。得られた脂肪酸メチルエステルのn-ヘキサン抽出液は飽和食塩水約20 mlを加えてよく振盪し、上層のn-ヘキサン層を別の25 ml容共栓付試験管に移し、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水乾燥した。n-ヘキサン層は褐色ナス型

フラスコに移し、ロータリーエバポレーターで濃縮し、*n*-ヘキサンで一定量にしてキャピラリーカラムガスクロマトグラフィー分析用の試料とした。以後、本法は第I法と略記する。

ii) 8% BF_3/MetOH 法⁶⁰⁾

本脂肪酸メチルエステル調製法は、主としてMorrisonらの方法⁶⁰⁾に準じて行った。上記2で調製した脂質抽出液から約50 mgの脂質を含む量を10 ml容スクリーキャップ付試験管に採取し、脂質量の約1/10の内部標準物質を添加した後、ヒートブロック内で40℃に加温しながら窒素ガスを通気し濃縮乾固し、ベンゼン1.0 mlを加え溶解させた。そして、直ちに8% BF_3/MetOH 溶液1.5 mlを加え、100℃のヒートブロック内で直接メチルエステル化を行った。メチルエステル化は10分、15分、20分、25分、30分あるいは60分を行い、反応時間の影響を検討した。メチルエステル化反応後、流水中で冷却後、蒸留水2 mlを加えて攪拌した。これに*n*-ヘキサン1.0 mlを加えよく攪拌した後に、上層の*n*-ヘキサン層を別の10 ml容褐色遠沈管に移した。この抽出操作を3回繰り返し、脂肪酸メチルエステルを抽出した。得られた脂肪酸メチルエステルの*n*-ヘキサン抽出液は蒸留水2 mlを加えよく振盪し、上層の*n*-ヘ

キサン層を10 ml容褐色遠沈管に移し、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水乾燥した。n-ヘキサン層は10 ml容褐色遠沈管に移し、ヒートブロック内で40℃に加温しながら窒素ガスを通気し濃縮乾固し、n-ヘキサンで一定容量にしてキャピラリーカラムガスクロマトグラフィー分析用の試料とした。以後、本法は第Ⅱ法と略記する。

iii) 4% HCl/MetOH法¹⁰⁾

本脂肪酸メチルエステル調製法は、主としてChinらの方法¹⁰⁾に準じて行った。上記2で調製した脂質抽出液から約50 mgの脂質を含む量を15 ml容スクリーキャップ付試験管に採取し、脂質量の約1/10の内部標準物質を添加した後、ヒートブロック内で40℃に加温しながら窒素ガスを通気し濃縮乾固した。そして、直ちに4% HCl/MetOH溶液6 mlを加え、100℃のヒートブロック内で直接メチルエステル化を行った。メチルエステル化は10分、15分、20分、25分、30分あるいは60分行い、反応時間の影響を検討した。メチルエステル化反応後、流水中で冷却後、蒸留水2 mlを加えて攪拌した。これにn-ヘキサン5 mlを加えよく振盪した後、上層のn-ヘキサン層を別の10 ml容褐色遠沈管に移し、脂肪酸メチルエステルを抽出した。得られた脂肪酸メチルエステルのn-ヘキサン抽出液は蒸留水2 ml

を加えてよく振盪し、上層のn-ヘキサン層を10 ml容褐色遠沈管に移し、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水乾燥した。n-ヘキサン層は別の10 ml容褐色遠沈管に移し、ヒートブロック内で40℃に加温しながら窒素ガスを通気し濃縮乾固し、n-ヘキサンで一定容量にしてキャピラリーカラムガスクロマトグラフィー分析用の試料とした。以後、本法は第Ⅲ法と略記する。

iv) TMG/MetOH法⁷⁶⁾

本脂肪酸メチルエステル調製法は、主としてShuchardtらの方法⁷⁶⁾に準じて行った。上記2で調製した脂質抽出液から約50 mgの脂質を含む量を50ml容共栓付試験管に採取し、脂質量の約1/10の内部標準物質を添加した後、ロータリーエバポレーターで濃縮乾固した。そして、直ちにTMG/MetOH溶液2 mlを加え、10分間沸騰水中で加熱還流し、直接メチルエステル化を行った。その後、流水中で冷却後、20 mlの飽和食塩水を加えてよく振盪し、続いて石油エーテル8 mlを加えてよく攪拌した後に上層の石油エーテル層を別の10 ml容褐色遠沈管に移し、脂肪酸メチルエステルを抽出した。得られた脂肪酸メチルエステルの石油エーテル抽出液は、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水乾燥した。石油エーテル層は10 ml容褐色遠沈管に移し、ヒートブ

ロック内で40℃に加温しながら窒素ガスを通気し濃縮乾固し、n-ヘキサンで一定容量にしてキャピラリーカラムガスクロマトグラフィー分析用の試料とした。以後、本法は第IV法と略記する。

v) 0.5 M KOH/MetOH/aq.HCl/MetOH法³⁸⁾

本脂肪酸メチルエステル調製法は、主としてJhamらの方法³⁸⁾に準じて行った。上記2で調製した脂質抽出液から約30 mgの脂質を含む量を10 ml容スクリーキャップ付試験管に採取し、脂質量の約1/10の内部標準物質を添加した後、ヒートブロック内で40℃に加温しながら窒素ガスを通気し濃縮乾固した。そして、直ちに0.5 M KOH/MetOH溶液1.0 mlを加えて5分間および続いてaq.HCl/MetOH溶液0.4 mlを加えて5分間、それぞれ100℃のヒートブロック内でケン化およびメチルエステル化を行った。その後、流水中で冷却後、蒸留水2 mlを加えて攪拌し、n-ヘキサン3 mlを加えてよく振盪した後上層のn-ヘキサン層を別の10 ml容褐色遠沈管に移した。この抽出操作を2回繰り返し、脂肪酸メチルエステルを抽出した。得られた脂肪酸メチルエステルのn-ヘキサン抽出液は、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水乾燥した。n-ヘキサン層は10 ml容褐色遠沈管に移し、ヒートブロック内で40℃に加温しながら

ら窒素ガスを通気し濃縮乾固し、n-ヘキサンで一定容量にしてキャピラリーカラムガスクロマトグラフィー分析用の試料とした。なお、あらかじめ0.5 M KOH/MetOH溶液によるケン化時間を5分と10分で検討した結果、両反応時間でケン化反応が終了することを確認できたので、この後の実験では5分間の反応時間を採用した。また、aq.HCl/MetOH溶液によるメチルエステル化の反応時間をそれぞれ5分、10分、15分、20分、25分あるいは30分に設定し、反応時間の影響を検討した。さらに、aq.HCl/MetOH溶液の塩酸濃度をHPLCメタノールで希釈 (aq.HCl : MetOH = 4 : 1、4 : 2、4 : 3、4 : 4 ; v/v) し、9c, 11t CLA量に及ぼす影響を検討した。以後、本法は第V法と略記する。

4. 脂肪酸メチルエステルの分離、同定および定量

1) ガスクロマトグラフ装置の運転条件

脂肪酸メチルエステルを分離するためのガスクロマトグラフ装置には、GC17A (島津製作所製) を用いた。ガスクロマトグラフィー分析用カラムには、キャピラリーカラム (SUPELCO社 SUPELCOWAX^{TM10} Fused silica capillary column 60 m, 0.32 mm I. D., 0.25 μ m film thickness) を使用した。カラム温度

は初期保持温度195℃で8分間保持し、その後220℃まで毎分2℃で昇温させ、最終温度220℃で40分間保持した。また、注入部及び検出部の温度はそれぞれ240℃、250℃に設定した。キャリアーガスにはヘリウムガスを用い、流速は毎分2 ml、スプリット分析を採用し、スプリット比1:100とした。また、検出器には水素炎イオン化検出器 (FID) を使用し、水素ガス圧60 kpa、圧縮空気圧50 kpaとした。

2) 脂肪酸メチルエステルの同定と定量

脂肪酸メチルエステルの同定には、脂肪酸メチルエステル標準混合物 (日本クロマト工業製 AI107Y、AI203Y、AI205Y、AI207Y、AI209Y) と魚油標準脂肪酸メチルエステル混合物およびCLAメチルエステル標準混合物との対比あるいは相対保持時間により同定し、ガスクロマトグラフィー分析データ処理装置クロマトパックCR4A (島津製作所製) を用いてクロマトグラムの各脂肪酸メチルエステルのピーク面積を測定した後、内部標準法で定量計算した。

結果と考察

Fig. 3は、第I法 (0.5 M KOH/MetOH / 14% BF₃/MetOH) で調製した牛肉脂質 (A)、CLAメチルエステル標品 (B) および (C) : (A) + (B) から得た典型的なクロマトグラムを示した。Fig. 3から明らかのように、今回検討した第I法のメチルエステル調製法において、牛肉脂質から *9c, 11t* CLAを分離、検出することができた。また第II法～第V法の4種類の脂肪酸メチルエステル調製法においても、牛肉脂質から *9c, 11t* CLAを分離、検出することができた。

しかし、第I法～第V法の5種の調製法を用いてそれぞれ牛肉脂質の脂肪酸メチルエステルを調製し、*9c, 11t* CLAの脂肪酸組成割合を調べた結果、第I法のそれは0.31%、その他の第II法から第V法の4種類の調製法では0.33～0.36%を与えた。このことより、第I法では *9c, 11t* CLAの酸化分解を促進する傾向があるというChinらの報告¹⁰⁾と同様の結果が得られ、*9c, 11t* CLAの定量法としては適していないと判断された。また、第IV法における脂肪酸メチルエステルの収量は、他の4種類の調製法に比較して顕著に低く、その収量は約1/10を与えた。さらに、第III法における脂肪

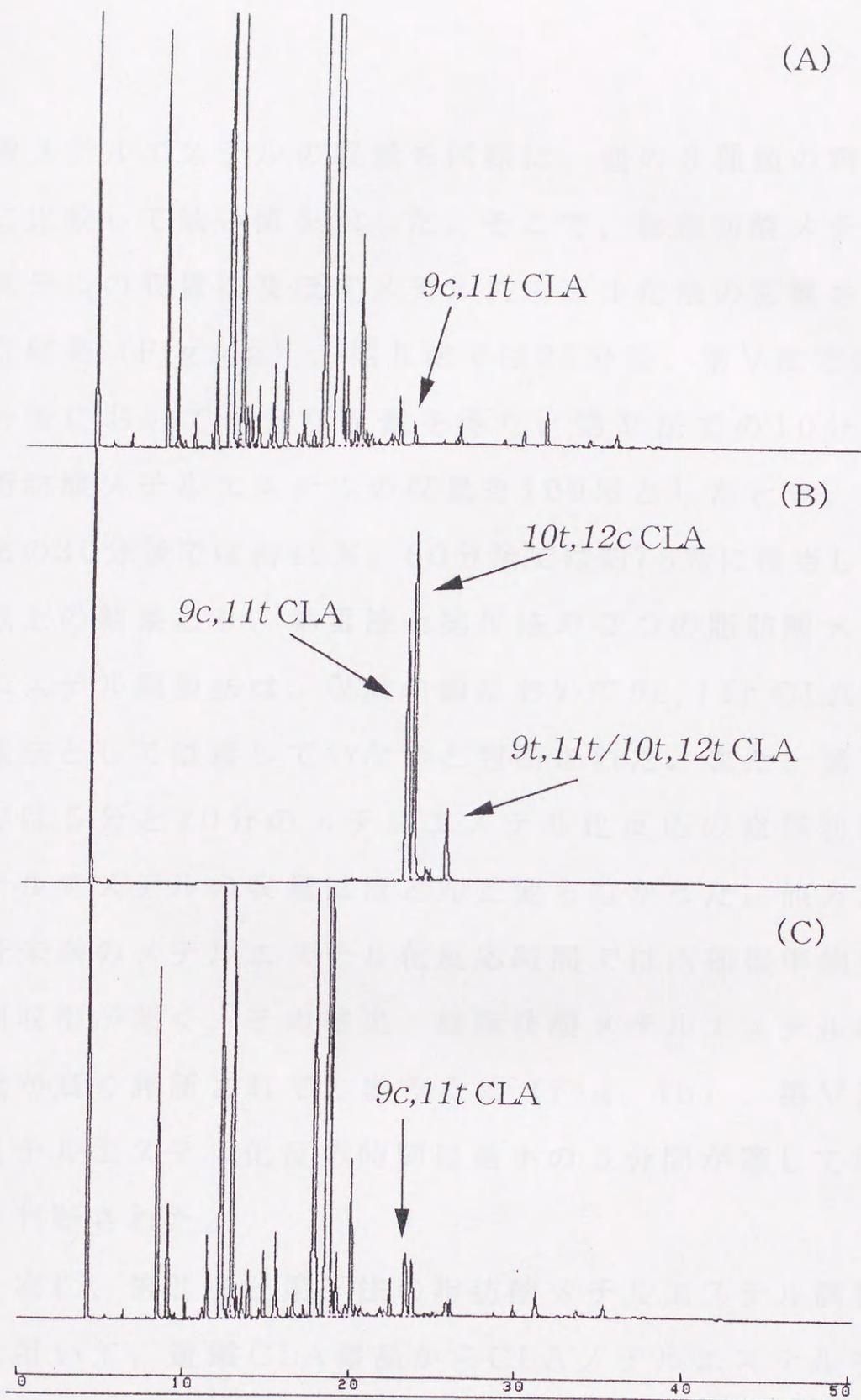


Fig. 3. Identification of CLA isomers in beef on capillary gas-liquid chromatography. Each panel showed (A): methyl esterified beef lipid with Method I, (B): CLA methyl ester standard, and (C): (A) + (B).

酸メチルエステルの収量も同様に、他の3種類の調製法に比較して低い値を示した。そこで、総脂肪酸メチルエステルの収量に及ぼすメチルエステル化法の影響を調べた結果 (Fig. 4a)、第Ⅱ法では25分後、第Ⅴ法では10分後において十分な収量を得た。第Ⅴ法での10分後の脂肪酸メチルエステルの収量を100%としたとき、第Ⅲ法の30分後では約40%、60分後では約75%に相当した。以上の結果より、第Ⅲ法と第Ⅳ法の2つの脂肪酸メチルエステル調製法は、収量の面において9*c*,11*t* CLAの定量法としては適していないと判断された。また、第Ⅴ法では5分と10分のメチルエステル化反応の総脂肪酸メチルエステルの収量はほとんど変らなかった。他方、5分未満のメチルエステル化反応時間では内部標準物質の回収率が悪く、その結果、総脂肪酸メチルエステルの収量が高く評価されてしまうため (Fig. 4b)、第Ⅴ法のメチルエステル化反応時間は最小の5分間が適していると判断された。

次に、第Ⅱ法と第Ⅴ法の脂肪酸メチルエステル調製法を用いて、遊離CLA標品からCLAメチルエステルを調製し、そのCLA異性体の組成割合に及ぼす影響を調べた。その結果、第Ⅱ法は第Ⅴ法に比較して9*c*,11*t* CLAと10*t*,12*c* CLA異性体の占める割合が低く、また第Ⅱ

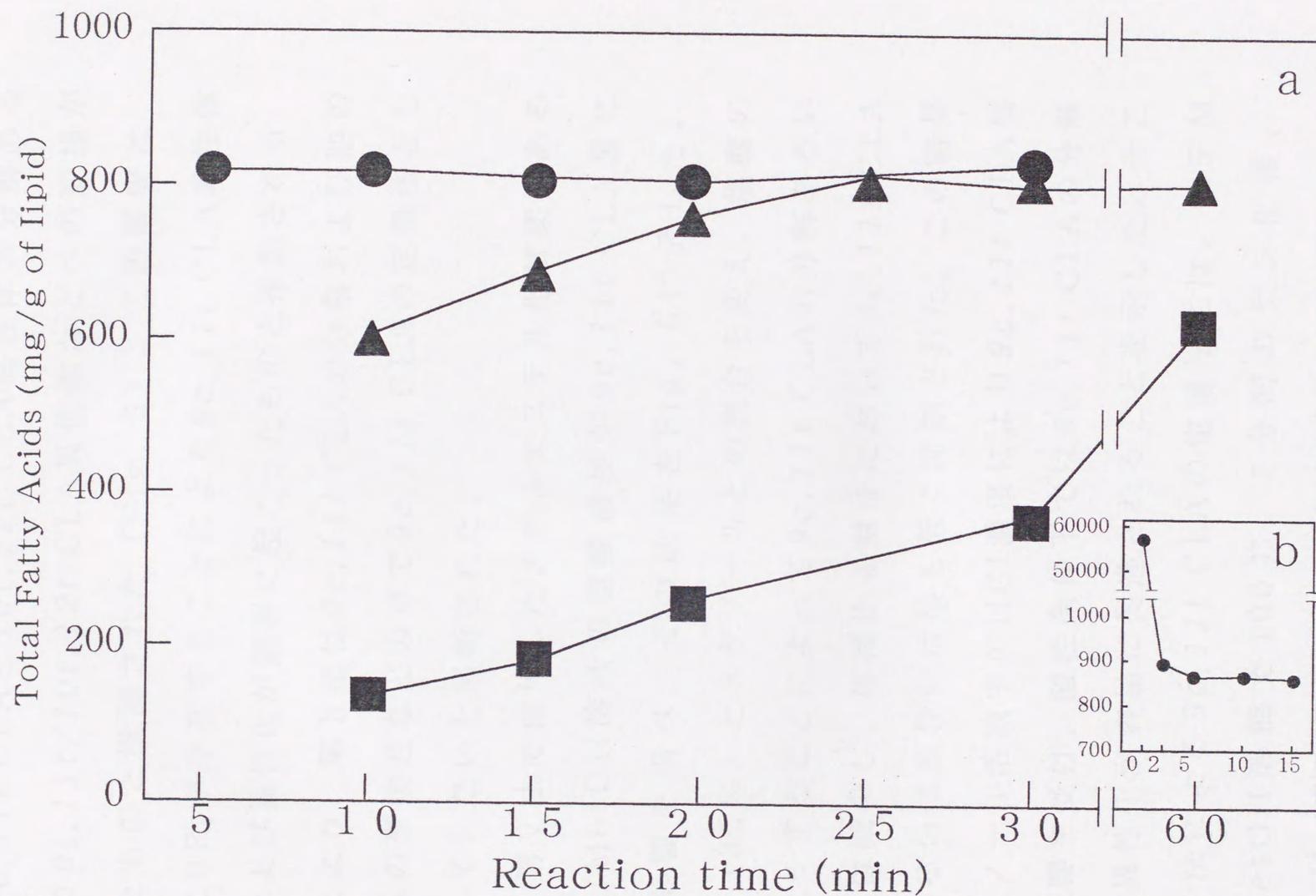


Fig. 4. Effect of esterifying time of various methods on the yield of total fatty acids from beef lipid. Each panel showed the yield of total fatty acids with a: Methods II, III and V and b: Method V. ▲ : Method II, ■ : Method III, ● : Method V

法では $9c, 11t$ CLA と $10t, 12c$ CLA 異性体の分解あるいは他の $9t, 11t/10t, 12t$ CLA 異性体などへの変換が起こったものと推測された (Fig. 5)。この事実は、反応系に BF_3 が存在することにより $9c, 11t$ CLA 異性体の分解および異性化が顕著に起こったものと推測される。このことより、第 II 法は $9c, 11t$ CLA の分解および他の異性体への変換性などの点で $9c, 11t$ CLA の定量法としては適していないと判断された。

次に、第 V 法で使用したメチルエステル化試薬である aq.HCl/MetOH 溶液の塩酸濃度が $9c, 11t$ CLA 量に及ぼす影響を調べ、その結果を Fig. 6 に示した。aq.HCl (35%) とメタノールとの割合を変え、塩酸の濃度を低くすることによって $9c, 11t$ CLA の分解あるいは異性化は減少し、体積比 4 対 4 において $9c, 11t$ CLA の分解あるいは異性化は最も低く抑制された。この結果は、メタノール溶液中の HCl 濃度により $9c, 11t$ CLA 異性体が影響を受け、酸性条件下では $9c, 11t$ CLA の分解あるいは異性化が容易に促進されることを示した。そこで、第 V 法による $9c, 11t$ CLA の定量法には、0.5 M KOH/MetOH 溶液で 100°C 、5 分間のケン化後、aq.HCl/MetOH (4 : 4、v/v) 溶液で 100°C 、5 分間のメチルエステル化を行う脂肪酸メチルエステル調製

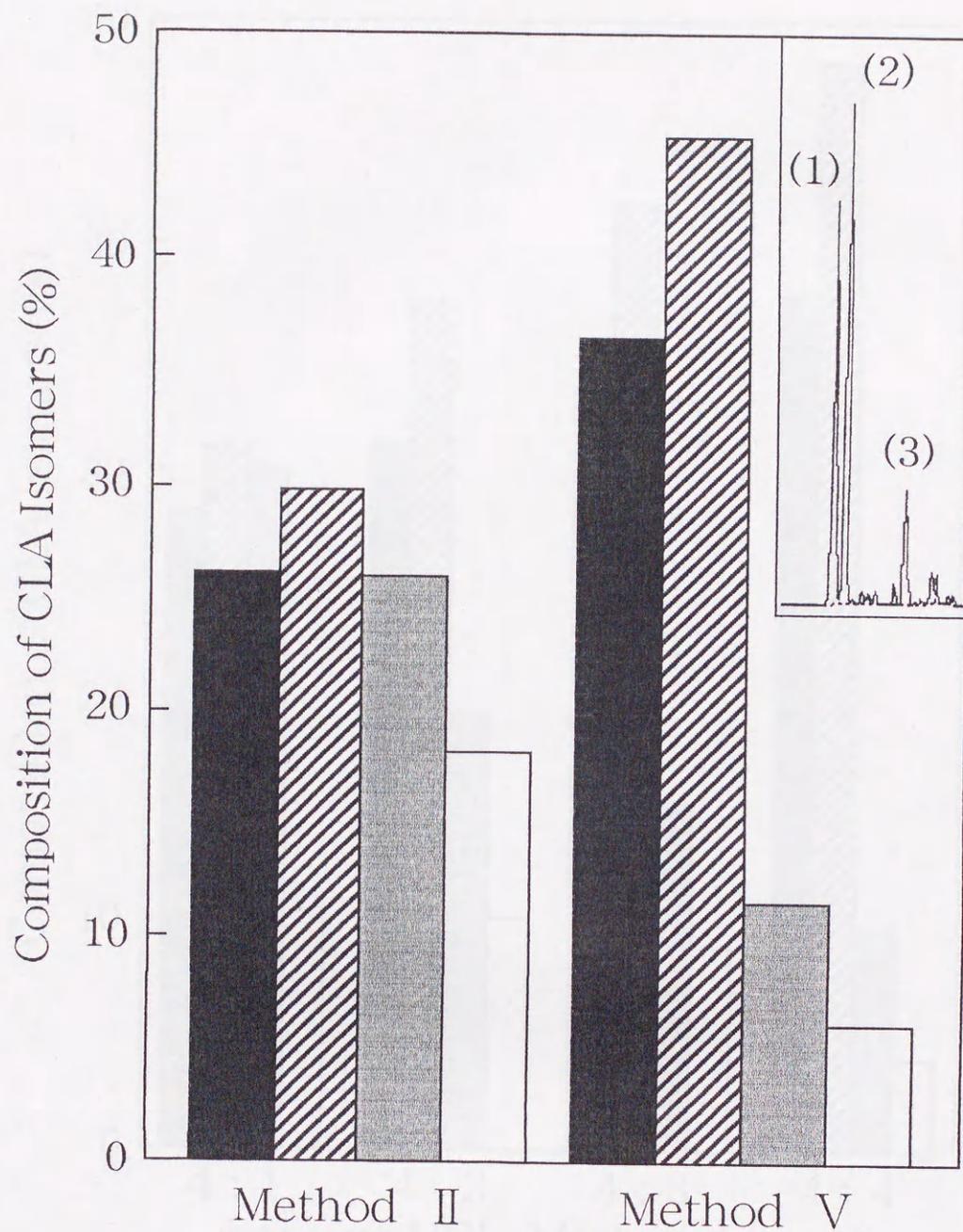


Fig. 5. Effect of esterifying procedures on the composition of CLA isomers. "others" represent total CLA peaks except *9c,11t*; *10t,12c*; *9t,11t* and *10t,12t* CLA isomers.

- : *9c,11t* CLA isomer (1)
- ▨ : *10t,12c* CLA isomer (2)
- ▩ : *9t,11t* and *10t,12t* CLA isomers (3)
- : others

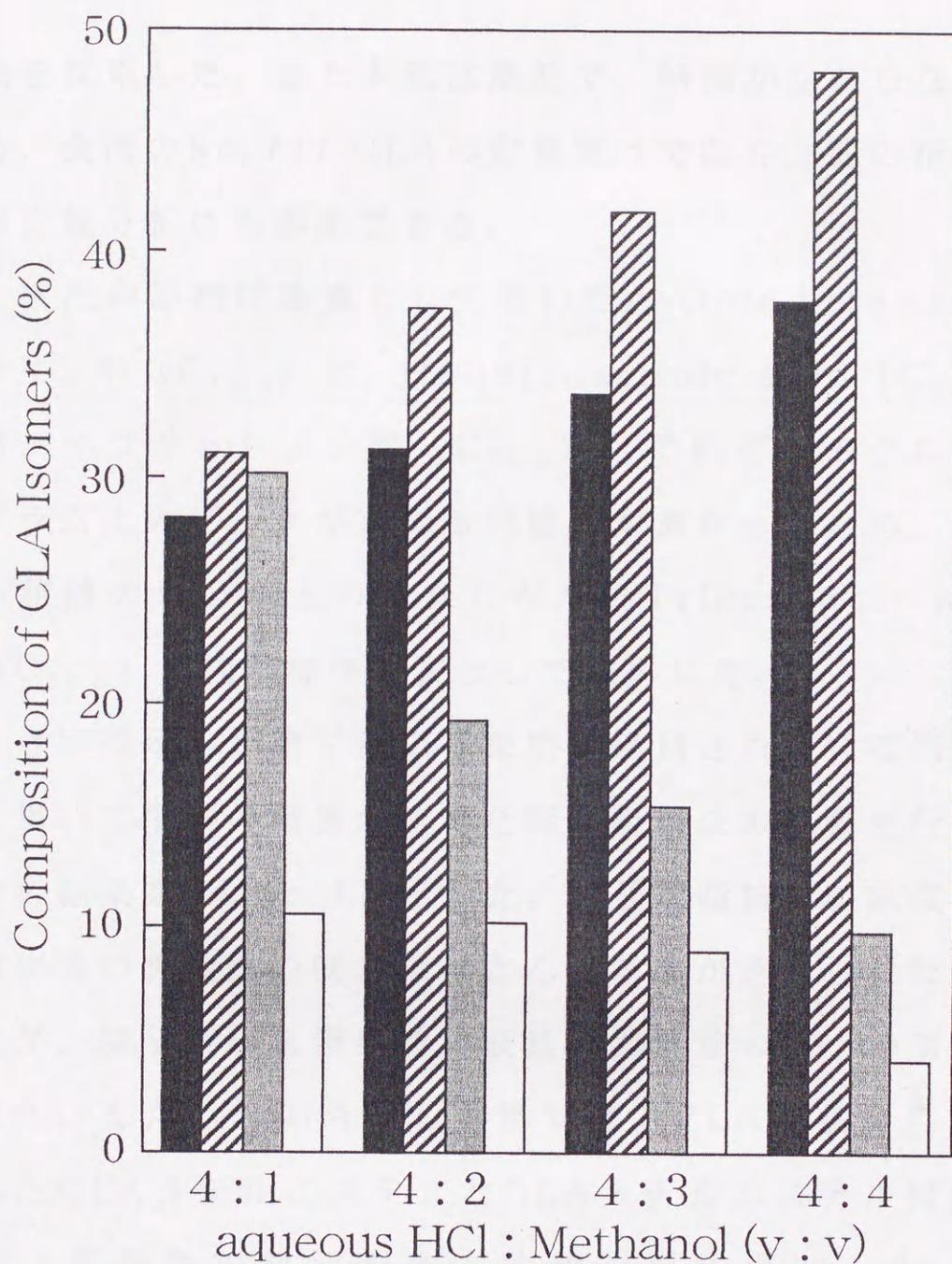


Fig. 6. Effect of HCl concentrations of aqueous HCl/methanol as esterifying reagent on the composition of CLA isomers.

- : *9c,11t* CLA isomer
- ▨ : *10t,12c* CLA isomer
- ▩ : *9t,11t* and *10t,12t* CLA isomers
- : others

法を採用した。また本法は簡便で、時間がかからないため、食肉の *9c, 11t* CLAの定量だけでなく、他の脂肪酸の定量分析にも応用できる。

また内部標準物質として用いた *n*-Octadecane はラウリン酸 ($C_{12:0}$) と、Heneicosanoic acid ($C_{21:0}$) はエイコサトリエン酸 ($C_{20:3}$) とそれぞれのクロマトグラム上のピークが重なる可能性が高かったため、他の脂肪酸のピークとの重なりがない Tricosanoic acid ($C_{23:0}$) を内部標準物質として採用した。

今回採用した第 V 法と従来広く使用されている第 II 法を用いて牛肉の脂質から得た脂肪酸組成の比較を行い、その結果を Table 1 に示した。主要な脂肪酸の組成割合は両者の調製法の間にはほとんど差異が認められなかったが、第 V 法の総脂肪酸の収量は第 II 法の 98.30% を与えた。また、今回考案した第 V 法で CLA 標品から調製した CLA メチルエステルと CLA メチルエステル標品の CLA 異性体の組成割合を比較した結果は、*9c, 11t* CLA が 5.19% の分解あるいは異性化を受けることを示した (Table 2)。

今回、種々の脂肪酸メチルエステル調製法を比較検討し、食肉の *9c, 11t* CLA 定量法を考案した。まず、Folch らの方法に準じて抽出した総脂質を第 V 法の

Table 1. Fatty acid content of beef lipid esterified with Methods II and V (mg/g of lipid)

Fatty Acids	Method	
	II	V
14:0	19.79 (2.46)	18.27 (2.31)
15:0	3.88 (0.48)	3.65 (0.46)
16:0	201.04 (24.94)	194.44 (24.54)
16:1	25.38 (3.15)	23.90 (3.02)
17:0	8.15 (1.01)	8.03 (1.01)
18:0	163.43 (20.28)	164.07 (20.71)
18:1(n-9)	328.41 (40.73)	324.18 (40.92)
18:1(n-7)	26.73 (3.32)	26.14 (3.30)
18:2(n-6)	13.93 (1.73)	14.14 (1.78)
18:3(n-3)	6.40 (0.79)	6.51 (0.82)
<i>9c,11t</i> CLA	2.44 (0.30)	2.87 (0.36)
20:1(n-9)	1.27 (0.16)	1.31 (0.17)
20:4(n-6)	1.78 (0.22)	1.59 (0.20)
20:5(n-3)	0.86 (0.11)	0.81 (0.10)
22:5(n-3)	2.54 (0.32)	2.39 (0.30)
Total	806.03 (100.00)	792.30 (100.00)

Each value in parentheses represents weight percentage of fatty acid composition.

Table 2. Comparison between the composition of CLA methyl esters standard and that prepared from free CLAs standard with Method V

CLA isomers	<i>9c,11t</i>	<i>10t,12c</i>	<i>9t,11t</i> and <i>10t,12t</i>	Others
A	39.06(0.26)	46.15(0.27)	9.50(0.05)	5.29(0.48)
B	36.80(0.47)	46.18(0.16)	10.83(2.00)	6.21(0.67)

A: CLA methyl esters standard.

B: CLA methyl esters derived from free CLAs standard with Method V.

Each value in parentheses represents standard deviation (n = 4).

0.5 M KOH/MetOHでケン化後、aq.HCl/MetOH (4 : 4、v/v) で脂肪酸メチルエステルを調製し、得られた脂肪酸メチルエステルは内部標準法によるキャピラリーカラムGCで分析した。食肉中の9*c*,11*t* CLA量は、キャピラリーカラムGC分析で得た9*c*,11*t* CLAの値を、9*c*,11*t* CLAの分解率と脂肪酸メチルエステル収量の両者から得た補正係数0.9261で除して算出した。

この考案した方法を用いて、各種食肉の9*c*,11*t* CLA含量を測定し、その結果はTable 3に示した。Chinら¹⁰⁾は彼らの9*c*,11*t* CLA定量法、すなわち、まずHPLC分析によって総CLA量を定量した後、キャピラリーカラムGC分析で9*c*,11*t* CLA異性体を分離し、総CLA中の9*c*,11*t* CLAの割合を算出する方法を用いて、各種食品中の9*c*,11*t* CLA含量を測定している。その結果によれば、反芻家畜由来の食肉の9*c*,11*t* CLA含量が非反芻家畜由来の食肉に比較して有意に高いことを明らかにしている。彼らの食肉の9*c*,11*t* CLA含量は、今回の食肉の値に近似するものであった。また、今回の山羊肉の9*c*,11*t* CLA含量は、豚肉および鶏肉の約10倍量であった。この反芻家畜由来の食肉の9*c*,11*t* CLA含量は、給餌する飼料の種類（粗飼料あるいは濃厚飼料）によって影響を受けることをShanthaら⁷⁵⁾ が報告している。

Table 3. *9c,11t* CLA content of various meats

Meat	<i>9c,11t</i> CLA (mg/g of lipid)
Beef	3.21
Mutton	2.28
Goat Meat	6.35
Pork	0.63
Chicken	0.56

要約

食肉の *9c, 11t* CLA 定量法を確立する目的で、一般に汎用されている 5 種類の脂肪酸メチルエステル調製法、0.5 M KOH/MetOH / 14% BF₃/MetOH 法、8% BF₃/MetOH 法、4% HCl/MetOH 法、テトラメチルグアニジン (TMG) /MetOH 法および 0.5 M KOH/MetOH / aq.HCl/MetOH 法を用いて、*9c, 11t* CLA の異性化や分解並びに脂肪酸メチルエステルの収量の観点から、各脂肪酸メチルエステル調製法の比較検討を行った。その結果、0.5 M KOH/MetOH / aq.HCl/MetOH 法の変法を用いた脂肪酸メチルエステル調製法と内部標準法によるキャピラリーカラム GC 分析を組み合わせた方法によって、食肉に微量含まれる *9c, 11t* CLA を簡便に直接定量できる再現性と精度が優れた方法を考案することができた。この考案した方法を用いて、各種食肉の *9c, 11t* CLA 含量を測定した。その結果、反芻家畜由来食肉が非反芻家畜由来食肉に比較して有意に高値を示した。特に、山羊肉の *9c, 11t* CLA 含量は豚肉および鶏肉の約 10 倍量であった。

第3章 反芻家畜の食肉9c,11t CLA含量に及ぼす給餌飼料の影響並びに各種組織および脂質画分の9c,11t CLA分布の相違

緒言

第2章において、9c,11t CLAは反芻家畜由来食肉が非反芻家畜由来食肉に比較して有意に高いことを示した。Chinらの報告¹⁰⁾においても、反芻家畜由来食品の9c,11t CLA含量が非反芻家畜由来食品や他食品に比較して有意に高いことが知られている。Shanthaら⁷⁵⁾は、牛肉の9c,11t CLA含量が給餌飼料によって影響を受けることを明らかにした。彼らの結果によれば、牧草を多給した牛から得た肉の9c,11t CLA含量は穀類を多給した牛から得た肉に比較して有意に高値を示した。また、Chinらのラットの結果¹¹⁾は、同一個体において、組織の相違が9c,11t CLA含量に影響することを示した。Kramerら⁴⁹⁾は、ベニバナ油から調製したCLA混合物を給餌したブタの各種臓器脂質の9c,11t CLAを調査し、肝臓ではリン脂質への9c,11t CLAの取り込みが大きいことを明らかにした。なお、Ipら³⁶⁾は、7,12-Dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) 投与に

よるラット乳腺腫瘍の誘発がCLA投与によって抑制される機構として、肝臓および乳腺腫瘍細胞リン脂質に *9c, 11t* CLAが存在することが重要であることを示唆している。

本章では、給餌飼料（粗飼料多給あるいは濃厚飼料多給）が明らかに相違するウシ、ヒツジおよびヤギから採取した筋肉組織および脂肪組織の *9c, 11t* CLA含量を調べると同時に、ヤギの各種組織の *9c, 11t* CLA含量の相違を検討した。併せて、*9c, 11t* CLAの脂質画分分布の組織依存性を検討した。

実験材料と方法

1. 供試材料

供試材料には、粗飼料多給（粗飼料約7割：濃厚飼料約3割）のウシ、ヒツジおよびヤギからそれぞれロース（胸最長筋）およびモモ（大腿二頭筋）、またウシからはバラ（Short plate）、さらにヒツジおよびヤギからはそれぞれ肝臓および腹腔内脂肪を採取した。併せて、濃厚飼料多給（粗飼料約3割：濃厚飼料約7割）のウシ、ヒツジおよびヤギからはそれぞれ同一部位の試料を採取した。また、ヤギからは筋肉（胸最長筋、大腿二頭筋）、

肝臓、腎臓、第一胃、第四胃、小腸、腎臓周囲脂肪、腹腔内脂肪および皮下脂肪の各組織を採取した。採取したすべての試料は、分析時まで -80°C で凍結保存した。分析に際しては、冷蔵庫(0°C)で一晩解凍した後、筋肉および臓器組織については付着する脂肪および結合組織を、また脂肪組織については結合組織を除去後、刀で十分に細切して分析に供した。

2. 脂質の抽出

脂質は、上記第2章の実験材料と方法の2に準じて抽出した。

3. 脂質の分画

脂質の分画は、Marinettiの方法⁵⁷⁾およびTerrellらの方法⁸¹⁾の両者を用いて、ヤギの筋肉(胸最長筋、大腿二頭筋)および肝臓の総脂質について行った。

1) 試薬

i) クロロホルム：クロロホルムは第2章の実験材料と方法の2の1)のi)と同様に調製して使用した。

ii) メチルアルコール：メチルアルコールは第2章の実験材料と方法の2の1)のii)と同様に調製して使用した。

iii) アセトン：アセトン（和光純薬工業製 特級）を蒸留して使用した。

iv) ケイ酸：ケイ酸（MALLINCKRODT CHEMICAL 100 mesh powder）を精製し、活性化した後使用した。

v) 無水硫酸ナトリウム：硫酸ナトリウム無水物（和光純薬工業株式会社製 特級）を用いた。

2) Marinettiの方法⁵⁷⁾による脂質の分画

i) ケイ酸カラムの調製

ケイ酸は蒸留水にけん濁し、よく混和して静置し、濁った上層を傾斜して除去した。同様の操作を上層が透明になるまで反復し、その後、ケイ酸は恒温乾燥器内（105℃）で水分を蒸発させた。次に、ケイ酸はクロロホルムにけん濁し、よく混和して静置し、濁った上層を傾斜して除去した。同様の操作を上層が透明になるまで反復し、その後得られたケイ酸はドラフト内で加温しながらクロロホルムを十分に蒸発させ、恒温乾燥器内（105℃）で十分に乾燥させた。精製したケイ酸は、カラム調製直前に乾燥器内（120℃）で6時間加熱し、活性化した後、デシケーター内で保存した。ガラスカラム（φ24 mm × 30 cm）にはガラスウールを詰め、45gの活性化ケ

イ酸をクロロホルム200 mlで気泡が入らないように洗い込みながら注入し、一晩静置した後30 cmのカラムを調製した。

ii) 脂質の分画

上記 i) で調製したケイ酸カラムに上記 2 で抽出した総脂質400 mg量に相当する抽出液をカラム内壁に伝わせながら静かに注入した。最初にクロロホルム525 mlで溶出したクロロホルム画分を分取した。次に、アセトン2100 mlで溶出したアセトン画分を分取した。最後に、メタノール525 mlでメタノール画分を溶出し、分取した。それぞれの脂質画分は無水硫酸ナトリウムで脱水後、濃縮し一定容量にした。なお、クロロホルム画分はトリグリセリド画分、アセトン画分は糖脂質画分、メタノール画分はリン脂質画分に該当した。

3) Terrellらの方法⁸¹⁾による脂質の分画

上記 2 で抽出した総脂質約100 mgに相当する抽出液を100 ml容褐色ナス型フラスコに採取し、ロータリーエバポレーターで濃縮乾固させた後、あらかじめ活性化(120℃、30分間)しておいたケイ酸5.5 gをクロロホルム50 mlで溶かし込み、15分間振盪し、ケイ酸に脂質を吸着させた。振盪後、ガラスフィルター(3G-3)

に定量的に移してケイ酸カラムを調製し、クロロホルム 150 ml をケイ酸カラムに注加してクロロホルム画分を溶出して 500 ml 容吸引ビンに分取した。次に、メタノール 120 ml をカラムに注加してメタノール画分を溶出して、500 ml 容吸引ビンに分取した。それぞれの脂質画分は濃縮した後一定容量にした。クロロホルム画分は中性脂質画分（主としてトリグリセリド）、またメタノール画分は極性脂質画分（主としてリン脂質）に該当した。

4. *9c,11t* CLA の定量

9c,11t CLA の定量は、上記第 2 章で検討し、採用した方法を用いて行った。

結果と考察

粗飼料多給並びに濃厚飼料多給のウシ、ヒツジおよびヤギから採取した筋肉および脂肪組織の *9c,11t* CLA 含量の結果は、Table 4 に示すとおりであった。

ウシではロース、モモおよびバラのいずれの部位の *9c,11t* CLA 含量も、粗飼料多給ウシ (Cattle 1) が濃厚飼料多給ウシ (Cattle 2) に比較して明らかに高値を示した。同様に、ヒツジおよびヤギのいずれの部位

Table 4. *9c,11t* CLA contents of meat and fat from different diets-fed ruminants¹⁾

Animal/Meat	Loin	Round	Short Plate	Depot Fat
Cattle 1	19.18(2.58)	31.62(3.21)	210.69(6.09)	
Cattle 2	12.18(1.26)	20.32(2.19)	59.01(2.46)	
Sheep 1		15.78(4.17)		460.25(5.20)
Sheep 2	8.20(2.17)	4.79(2.28)		166.32(1.80)
Goat 1	17.03(6.82)	11.79(6.35)		425.08(5.19)
Goat 2	10.65(4.53)	9.59(4.58)		461.09(5.08)
Goat 3	4.60(1.65)	2.69(1.45)		115.66(1.28)

1) Values represent mg/100g samples with mg/g lipid in parenthesis

も、粗飼料多給 (Sheep 1、Goat 1、2) が濃厚飼料多給 (Sheep 2、Goat 3) に比較して高 9c, 11t CLA 含量を与えた。また、粗飼料多給ヤギの Goat 1 と Goat 2 の場合、両者の間では摂食草種などが相違し、その結果が 9c, 11t CLA 含量の差に反映されたものと考えられる。

反芻家畜由来食品の 9c, 11t CLA 含量が他の食品に比較して高濃度含有されることは、すでに Chinらの報告¹⁰⁾ から明らかであった。また反芻家畜由来食肉が非反芻家畜由来食肉に比較して有意に高い 9c, 11t CLA 含量を示したことは、第2章の結果においても明らかである。反芻家畜由来食品の 9c, 11t CLA 含量が高い主要な原因の一つは、ルーメン内嫌気性細菌、*Butyrivibrio fibrisolvens* が飼料脂質構成脂肪酸のリノール酸の異性化反応を介して 9c, 11t CLA の生成に関与し、その 9c, 11t CLA が組織に蓄積されることに起因している⁴⁶⁾。しかし、今回の結果は、リノール酸を高濃度含有している濃厚飼料を多給した家畜からの筋肉および脂肪組織の 9c, 11t CLA 含量が、リノール酸濃度が低く、 α -リノレン酸濃度が比較的高い牧草などの粗飼料を多給した家畜に比較して、逆に低値を示した。この相反する結果の主原因が、給与飼料の相違によるルーメン内微生物叢の

変化によるものか、あるいは *9c,11t* CLA生成の前駆脂肪酸としてリノール酸以外に α -リノレン酸も関与しているのか、それともこれら両者が組み合わさった複合的原因なのかは、今回の実験結果のみから推測することは不可能であった。Shantha ら⁷⁵⁾ は、給餌飼料の異なる肉牛の筋肉中 *9c,11t* CLA含量を調査した。その結果によれば、牧草給餌区の肉牛から得た筋肉（半膜様筋）の *9c,11t* CLA含量が 7.4 mg/g 脂質に対して牧草+穀物給餌区の肉牛では 5.1 mg/g 脂質の値を示し、両者間に有意な差が認められた。反芻家畜におけるこの給餌飼料構造と組織中 *9c,11t* CLA含量との関係は、*9c,11t* CLAの前駆脂肪酸と飼料脂質構成脂肪酸の関連をとおして検討する必要がある。

CLAを実験動物に給餌すると生体内のCLA含量が増加することから、CLAが小腸などから吸収されることは間違いないようである。ラットに0.5%~2.0%CLA含有飼料を給餌した結果によれば、CLAが脂肪組織と乳腺脂肪に濃度依存的に蓄積され、それらの濃度は他組織より高値であった¹⁶⁾。また、Chinらのラットの各種組織の *9c,11t* CLA含量の結果では、腹腔内脂肪が他組織に比較して高濃度の *9c,11t* CLAを含有していたことが認められた¹¹⁾。今回調査したヤギから採取した各種

組織の *9c,11t* CLA の分布は、Chinら¹¹⁾ やDoyleら¹⁶⁾ がラットで得た結果に類似して、脂肪組織、特に皮下脂肪組織において高濃度の *9c,11t* CLA の分布を認めた (Table 5)。また、Table 5 の脂質グラム当りの *9c,11t* CLA 濃度の結果は、肝臓などの内臓器官に比較して筋肉や脂肪組織に *9c,11t* CLA 濃度が高いことを示した。他方、長渡ら⁶¹⁾ はラットに *9c,11t* CLA 含有ビーフパウダー (牛脂肪中の *9c,11t* CLA の脂肪酸組成割合 : 0.47%) を給餌し、各種組織の *9c,11t* CLA 含量を調査した。彼らの結果では、脂質グラム当りの *9c,11t* CLA の蓄積量は脂肪組織 (腎臓周囲脂肪) > 肝臓 > 脾臓 ≒ 腎臓 > 筋肉の順序で、脂肪組織 (腎臓周囲脂肪) に最も蓄積され易いことを認めた。また、彼らは、ラットの脳 (大脳) 組織において *9c,11t* CLA を検出できなかった。

次に、ヤギの筋肉と肝臓を用いて、それらの脂質画分の *9c,11t* CLA 分布を検討した。Table 6 には筋肉および肝臓のトリグリセリド、リン脂質および糖脂質について、また Table 7 には筋肉および肝臓の中性脂質 (主としてトリグリセリド) および極性脂質 (主としてリン脂質) について、それぞれの *9c,11t* CLA 濃度を示した。ヤギの筋肉脂質の各脂質画分における *9c,11t* CLA 濃度

Table 5. 9c,11t CLA contents of various tissues from the goat

Tissues	mg/100g samples	mg/g lipids
Muscle:		
<i>M. longissimus thoracis</i>	10.7	4.53
<i>M. biceps femoris</i>	9.6	4.58
Liver	11.7	2.88
Kidney	7.3	2.22
Rumen	2.3	2.03
Abomasum	15.6	4.43
Small intestine	3.2	1.32
Perirenal fat tissue	537	5.69
Abdominal fat tissue	461	5.08
Subcutaneous fat tissue	660	8.69

Table 6. *9c,11t* CLA contents in lipid fractions of the goat muscle and liver lipids

Tissues	Lipids (g/100g wet tissue)	<i>9c,11t</i> CLA	
		mg/100g samples	mg/g lipids
Muscle:			
<i>M. longissimus dorsi</i>			
	Total lipids	2.29	10.65
	Triglycerides	1.58	10.86
	Phospholipids	0.57	0.94
	Glycolipids	Trace	0.03
			4.65
			6.87
			1.64
			Trace
<i>M. biceps femoris</i>			
	Total lipids	2.11	9.58
	Triglycerides	1.11	8.14
	Phospholipids	0.74	1.38
	Glycolipids	Trace	0.08
			4.54
			7.35
			1.86
			Trace
Liver			
	Total lipids	4.02	11.72
	Triglycerides	0.81	3.02
	Phospholipids	2.47	9.31
	Glycolipids	Trace	0.22
			2.92
			3.74
			3.77
			Trace

Table 7. *9c,11t* CLA contents in lipid fractions of goat muscle and liver lipids

Tissues	Lipids (g/100g wet tissue)	<i>9c,11t</i> CLA	
		mg/100g samples	mg/g lipids
Muscle:			
<i>M. longissimus dorsi</i>			
	Total lipids	2.78	4.60
	Neutral lipids	2.13	4.91
	Polar lipids	0.54	0.42
<i>M. biceps femoris</i>			
	Total lipids	1.85	2.69
	Neutral lipids	1.15	2.51
	Polar lipids	0.61	0.37
Liver			
	Total lipids	3.86	6.67
	Neutral lipids	0.88	1.38
	Polar lipids	2.58	4.99

(mg/g 脂質) は、トリグリセリド画分がリン脂質画分の約4.0~4.2倍量 (Table 6)、中性脂質画分が極性脂質画分の約3.0~4.2倍量 (Table 7) 高い値を示した。この結果は、筋肉ではトリグリセリドなどの中性脂質画分に *9c, 11t* CLAが高濃度に取り込まれることを意味した。他方、肝臓の *9c, 11t* CLAの脂質局在性は筋肉の場合とは相違し、リン脂質などの極性脂質画分にはトリグリセリドなどの中性脂質画分より僅かに高濃度の *9c, 11t* CLAが取り込まれる傾向にあった (Table 6 および Table 7)。

要約

本章では、粗飼料多給あるいは濃厚飼料多給のウシ、ヒツジおよびヤギからそれぞれ採取した筋肉組織および脂肪組織並びにヤギから得た各種組織の *9c, 11t* CLA含量を調査すると同時に、筋肉と肝臓における *9c, 11t* CLAの脂質画分への局在性を検討した。

1. ウシ、ヒツジおよびヤギのいずれの場合も、粗飼料多給家畜から得た筋肉や脂肪組織の *9c, 11t* CLA含量は濃厚飼料多給家畜から得た各組織に比較して高値を与えた。この結果は、*9c, 11t* CLAの生成経路にリノール

酸以外の α -リノレン酸が $9c,11t$ CLA の前駆脂肪酸として関与する可能性を示唆した。

2. ヤギから採取した各種組織の $9c,11t$ CLA 含量 (mg/g lipid) は、脂肪組織 > 筋肉組織 \geq 臓器の順序で、脂肪組織、特に皮下脂肪組織が最も高い値を示した。

3. $9c,11t$ CLA の脂質画分への局在性は筋肉と肝臓では相違し、前者ではトリグリセリド画分に高濃度の $9c,11t$ CLA が含まれていたが、後者ではリン脂質画分の $9c,11t$ CLA 濃度がトリグリセリド画分に比較して僅かに高い傾向にあった。

第4章 食肉の9*c*,11*t* CLA含量に及ぼす冷蔵および脂質過酸化の影響

緒言

反芻家畜由来食品中の9*c*,11*t* CLAの起源は、前章で記述したように、反芻家畜のルーメン内嫌気性細菌が飼料性脂質のリノール酸を異性化して9*c*,11*t* CLAを生成する機構がその主要な生成経路であると考えられる。Haら²⁴⁾は加熱調理した牛挽き肉から発ガン抑制物質を分離し、その物質がCLA異性体中の9*c*,11*t* CLAであることを同定した。その後、彼ら²⁵⁾は、加熱調理により牛挽き肉の総CLA含量が脂質グラム当りで約4倍量、また9*c*,11*t* CLA含量が約1.6倍量増加したことをそれぞれ認め、その原因は脂質過酸化の進行に伴って9*c*,11*t* CLAが生成されたためであると推測した。他方、Shanthaら⁷⁴⁾は、種々の加熱処理方法を用いて、牛挽き肉を60℃あるいは80℃で加熱し、その9*c*,11*t* CLA含量を加熱肉100グラム当りの量および脂質グラム当りの量でそれぞれ比較検討した。その結果によれば、加熱処理によって牛挽き肉の2-チオバルビツール酸反応物質値(2-Thiobarbituric acid reactive substances

value : TBARS値)で測定した脂質過酸化が急速に進行したにもかかわらず、加熱牛挽き肉の総CLA含量および9*c*,11*t* CLA含量の増加は認められなかった。Haら²⁵⁾は、リノール酸が脂質過酸化の過程でリノール酸フリーラジカルを生成し、つぎに水素供与体によって9*c*,11*t* CLAに変換されると推測している。しかし、Shanthaら⁷⁴⁾の結果は、各種の加熱処理法によって顕著に促進された脂質過酸化の過程においても牛肉脂質構成脂肪酸のリノール酸からの9*c*,11*t* CLAの生成が認められないことを示すものであった。

食肉の脂質過酸化について、一般に、未加熱状態の食肉では冷蔵中の脂質過酸化はゆっくりと進行するが、70℃～80℃での加熱処理肉ではミオグロビンからの非ヘム鉄の遊離によって脂質過酸化が促進されることがよく知られている^{34,67)}。また、食肉への食塩とアスコルビン酸塩の添加は、脂質過酸化を顕著に促進することがよく知られている⁸⁹⁾。これらのことを踏まえて、第4章では食肉の脂質過酸化に伴う9*c*,11*t* CLAの生成の有無を検討する目的で、9*c*,11*t* CLAの前駆脂肪酸と考えられるリノール酸の含有量が比較的多い豚肉並びに反芻家畜由来食肉の未加熱肉、加熱肉、無機鉄添加肉、さらには食塩+アスコルビン酸塩添加肉を用いて、これら各

種処理肉の冷蔵中の脂質過酸化の程度と *9c, 11t* CLA 含量との関係を検討すると同時に、リノール酸量の変化を併せて調査した。

実験材料と方法

1. 供試肉：供試肉には山羊肉（胸最長筋および大腿二頭筋）、羊肉（胸最長筋）、牛肉（胸最長筋）および豚肉（胸最長筋）を用い、付着する脂肪および結合組織を除去後、刀で十分に細切して分析に供した。

2. 各種未加熱肉および加熱肉の調製と冷蔵

上記 1 で調製した各種供試肉は、それぞれ約 30 g ずつがあらかじめ綿栓を施して 170℃ で乾熱滅菌した 100 ml 容試験管に詰め込まれた。未加熱肉はそのまま 4℃ の冷蔵庫に貯蔵した。加熱肉は 75℃ の恒温水槽で 1 時間の加熱処理を施し、冷却後に未加熱肉と同様に冷蔵庫に貯蔵した。

また、食塩、アスコルビン酸ナトリウムを添加した肉試料の調製は、まず上記 1 で調製した羊肉および豚肉の供試肉に食塩およびアスコルビン酸ナトリウムをそれぞれ

れ2%および0.01%の水準で添加し、乳鉢中で十分に混和した後、上記の未加熱肉および加熱肉と同様に処理を施して冷蔵庫に貯蔵した。

さらに、電子レンジ加熱肉の調製は、上記1で調製した牛肉および豚肉に無機鉄（塩化鉄（Ⅱ）四水和物）、食塩およびアスコルビン酸ナトリウムをそれぞれ5 ppm（ Fe^{2+} として）、2.0%および0.01%の水準で添加した試料肉約50 gを厚さ約1 cm、直径約8 cmのパティ状にした後、電子レンジ（日立オープンレンジ、MRO-NF10型）を用いて、グリル設定（出力1300 W）で中心温度約75℃で30分間の加熱処理を施して行われた。未加熱パティおよび加熱パティはそれぞれアルミホイルで包装した後、冷蔵庫に貯蔵した。

なお、上記の冷蔵中の各種調製肉は、経日的に脂質分析に供した。

3. 脂質の抽出

脂質の抽出は、上記第2章の実験材料と方法の2に準じて行った。

4. *9c, 11t* CLAおよびリノール酸の定量

9c, 11t CLAおよびリノール酸の定量は、上記第2章

で検討し採用した方法を用いて行った。

5. 2-チオバルビツール酸反応物質 (TBARS) 値の測定

1) 試薬

i) BHT: Butylated Hydroxy Toluene (関東化学株式会社製 特級) を用いた。

ii) 消泡剤: Antifoam (Toray Silicone SH-5500 Toray Silicone Co., LTD) を用いた。

iii) 4 N HCl: 12 N 塩酸 (和光純薬工業社製 特級) を用いて調製した。

iv) TBA試薬: 2-チオバルビツール酸 (和光純薬工業社製 特級) を蒸留水に加温しながら溶解し、0.02 M TBA試薬を調製した。

2) TBARS値の測定法

TBARS値は、Yamauchiらの方法⁸⁷⁾ に準じて測定した。上記1で調製した各種試料肉10gを50ml容ビーカーに採取し、BHT 30 mgを添加してよく混和した後、40 mlの蒸留水で300 ml容ケルダール分解フラスコに定量的に移した。Antifoamを1~2滴加え、4 N HCl約2.5 mlを加え、直ちにケルダール蒸留装置で水蒸気蒸留を行い、200 mlの蒸留液を採取した。この蒸

留液を濾過（東洋濾紙 No.5A）し、濾液 5 ml を 20 ml 容スクリューキャップ付試験管に採り、TBA 試薬 5 ml を加えて 37℃ のインキュベーター内で 15 時間反応させた。TBARS 値は、波長 532nm における吸光度に 18.7 を乗じ、試料 1 kg 中のマロンジアルデヒド量 (mg) として表した。

結果と考察

本章では、まず山羊肉（ロース：胸最長筋；モモ：大腿二頭筋）の未加熱肉および加熱肉を用いて、それらの冷蔵中の脂質過酸化の程度（TBARS 値）を測定すると同時に、*9c,11t* CLA の含量を調べた（Table 8）。

ヤギの未加熱ロース肉の TBARS 値は 2 週間の冷蔵期間を通じてほとんど変化がなかったが、*9c,11t* CLA の含量 (mg/g 脂質) は貯蔵中減少傾向を示した。しかし、*9c,11t* CLA の脂肪酸組成割合の値 (0.57%~0.60%) から、貯蔵中ほとんど変化がなかったと判断された。加熱ロース肉の TBARS 値は貯蔵中顕著に増加したが、*9c,11t* CLA の含量 (mg/g 脂質) にはほとんど変化が認められなかった。また、モモ肉の場合、未加熱肉および加熱肉の両者共に貯蔵中の TBARS 値の増加が認め

Table 8. TBARS value and *9c,11t* CLA content of the ground goat meat during refrigerated storage at 4 °C

Treatments	Loin			Round		
	0 days	7 days	14 days	0 days	7 days	14 days
<u>Uncooked</u>						
TBARS value (mg MDA/kg)	0.22	0.27	0.26	0.94	2.23	2.52
<i>9c,11t</i> CLA (mg/g lipid)	4.82	4.69	4.34	4.03	4.25	3.88
<u>Cooked</u>						
TBARS value (mg MDA/kg)	0.95	4.89	6.92	1.33	7.00	6.99
<i>9c,11t</i> CLA (mg/g lipid)	4.68	4.66	4.69	4.27	3.97	3.92

られ、特に加熱肉が顕著であった。しかしながら、*9c,11t* CLAの含量 (mg/g 脂質) には、貯蔵中の変化が認められなかった。加熱モモ肉で貯蔵中に僅かに認められた*9c,11t* CLA含量 (mg/g 脂質) の相違は、貯蔵中その脂肪酸組成割合 (0.55 %) に変化がなかったことから、*9c,11t* CLAの含量 (mg/g 脂質) にも変化がなかったものと判断された。

ところで、*9c,11t* CLAの化学的生成機構の一つとしてリノール酸の脂質過酸化の過程が関係するのであれば、リノール酸含量が比較的高く、かつ脂質過酸化を受けやすい豚肉では、脂質過酸化に伴う*9c,11t* CLAの生成が期待される。また、豚肉の場合、上述したように、加塩処理 (2%食塩+0.01%アスコルビン酸塩) と加熱処理の併用によってその脂質過酸化が顕著に促進されることがよく知られている⁸⁹⁾。そこで、豚肉を供試肉として、その脂質過酸化に伴う*9c,11t* CLAの変化を検討すると同時に、羊肉についても併せて検討した。

Table 9に示すように、豚肉への加塩と加熱の併用は脂質過酸化を顕著に促進したが、他方、羊肉の場合はそのTBARS値の変化からはその脂質過酸化に及ぼす加塩と加熱の影響を認めることができなかった。*9c,11t* CLAの含量 (mg/g 脂質) については、加塩および加

Table 9. Effect of salting on TBARS values and *9c,11t* CLA contents of the ground pork and mutton during refrigerated storage at 4°C

Treatments	Ground Pork				Ground Mutton			
	Uncooked		Cooked		Uncooked		Cooked	
	0days	7days	0days	7days	0days	7days	0days	7days
<u>Unsalted</u>								
TBARS value (mg MDA/kg)	0.13	0.13	1.69	4.76	0.16	0.30	0.22	1.87
<i>9c,11t</i> CLA (mg/g lipid)	0.52	0.65	0.49	0.53	4.17	4.96	3.57	4.08
<u>Salted</u>								
TBARS value (mg MDA/kg)	0.18	3.54	1.91	7.93	0.17	0.85	0.21	1.83
<i>9c,11t</i> CLA (mg/g lipid)	0.51	0.56	0.56	0.59	4.12	4.20	3.53	4.51

Salted: 2 % NaCl + 0.01 % Sodium ascorbate

熱のいずれの処理にも関係なく、冷蔵中、豚肉および羊肉の両者において微増する傾向を示した。特に、未加塩で未加熱の冷蔵肉では9c, 11t CLA含量 (mg/g 脂質) の増加率が最も高く、豚肉では約25%、また羊肉では約19%を示した。また、未加塩および加塩羊肉の両者は、加熱処理によって9c, 11t CLAが減少した後、貯蔵7日目に増加(約15%~28%)する傾向を示した。豚肉の場合も、羊肉に類似して9c, 11t CLA含量 (mg/g 脂質) の僅かな増加傾向が認められた。豚肉および羊肉のTable 9の結果は、Table 8の山羊肉の結果と多少相違する傾向を示した。Table 9の豚肉および羊肉の結果は、TBARS値で測定される脂質過酸化の進行とは必ずしも関係なく、冷蔵中に微量ではあるが9c, 11t CLAの生成があったことを示唆した。

つぎに、食肉の脂質過酸化に伴う9c, 11t CLAの生成とリノール酸の挙動を明らかにするために、パティ状に成形した牛挽肉および豚挽肉の未加熱肉製品と電子レンジ加熱肉製品を調製した。なお、これら肉製品にはこれまでと同様に加塩を施して脂質過酸化を促進すると同時に、鉄イオンによる脂質過酸化の進行に伴う9c, 11t CLAの生成を検討した。食肉の脂質過酸化は鉄イオンによっても促進されることがよく知られているが、

Fe^{3+} に比較して Fe^{2+} による促進作用が顕著である⁸⁸⁾。そこで、本実験では、鉄イオンとして $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ を用いて5 ppmの Fe^{2+} を添加した。

Table 10は、冷蔵中の牛肉パティおよび豚肉パティのそれぞれのTBARS値と9*c*,11*t* CLA含量 (mg/g 脂質)を示した。5 ppm鉄イオン (Fe^{2+}) 添加牛肉および豚肉パティの0日目のTBARS値は、未処理パティおよび加塩パティに比較してそのグリル加熱処理の有無に関係なく高いTBARS値を与えたが、未加熱牛肉パティの場合を除いて、その後の冷蔵期間中は加塩に比較して低いTBARS値を示した。牛肉パティでは脂質過酸化に伴う9*c*,11*t* CLAの生成は明らかでなかったが、豚肉パティの加熱製品の場合、脂質過酸化の進行に伴った9*c*,11*t* CLA含量 (mg/g 脂質)の微増が観察された。特に、加熱処理を施した対照豚肉パティ (未添加) および加塩豚肉パティ (2%食塩 + 0.01%アスコルビン酸塩)の冷蔵10日目の9*c*,11*t* CLA含量 (mg/g 脂質)は、それぞれ約25%および約42%の増加を示した。Table 10に示したTBARS値と9*c*,11*t* CLA含量 (mg/g 脂質)を測定した供試牛肉パティと豚肉パティのリノール酸の冷蔵中の変化は、Table 11に示した。

Table 11に示すように、牛肉パティの冷蔵中のリノー

Table 10. Effects of added ferrous iron and salting on TBARS values and *9c,11t* CLA contents of the respective meat patties from ground beef and pork during refrigerated storage at 4 °C

Treatments	Beef Patty						Pork Patty					
	Ungrilled			Grilled			Ungrilled			Grilled		
	0days	5days	10days	0days	5days	10days	0days	5days	10days	0days	5days	10days
<u>Control</u>												
TBARS value (mg MDA/kg)	0.43	1.30	0.84	0.33	2.50	2.96	0.07	0.13	0.13	1.24	4.22	4.70
<i>9c,11t</i> CLA (mg/g lipid)	2.49	2.53	2.45	2.53	2.50	2.52	0.75	0.75	0.75	0.68	0.70	0.85
<u>Ferrous iron (5 ppm)¹⁾</u>												
TBARS value (mg MDA/kg)	1.24	2.58	2.72	1.54	5.05	5.69	0.65	2.21	1.61	2.22	5.09	5.41
<i>9c,11t</i> CLA (mg/g lipid)	2.46	2.36	2.36	2.52	2.42	2.38	0.73	0.73	0.72	0.68	0.72	0.75
<u>Salted²⁾</u>												
TBARS value (mg MDA/kg)	0.97	1.71	1.99	1.14	5.85	9.09	0.20	2.85	3.12	1.64	6.65	8.10
<i>9c,11t</i> CLA (mg/g lipid)	2.45	2.42	2.50	2.44	2.43	2.42	0.72	0.66	0.78	0.65	0.74	0.92

1) Ferrous iron was added as $\text{FeCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$.

2) Salted: 2 % NaCl + 0.01 % Sodium ascorbate

Table 11. Effects of added ferrous iron and salting on the linoleic acid contents of the respective meat patties from ground beef and ground pork during refrigerated storage at 4 °C¹⁾

Treatments	Beef Patty						Pork Patty					
	Ungrilled			Grilled			Ungrilled			Grilled		
	0days	5days	10days	0days	5days	10days	0days	5days	10days	0days	5days	10days
Control	32.1	32.2	31.6	34.3	33.2	32.3	59.3	62.7	58.2	62.3	57.8	53.0
Ferrous iron (5 ppm) ²⁾	31.3	31.0	31.9	33.0	32.1	31.3	59.9	58.3	56.9	61.2	56.9	52.1
Salted ³⁾	32.2	29.6	30.2	33.3	34.0	32.5	58.2	58.7	55.7	60.1	54.3	48.1

1) Each value represents mg per gram of lipid.

2) Ferrous iron was added as $\text{FeCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$.

3) Salted: 2 % NaCl + 0.01 % Sodium ascorbate

ル酸含量 (mg/g 脂質) の減少は、豚肉パティに比較して僅少であった。豚肉パティの場合、未加熱の鉄イオン添加試料や加塩試料並びに総ての加熱試料のリノール酸含量 (mg/g 脂質) は、冷蔵中に明らかに減少した。特に、豚肉パティの総ての加熱試料のリノール酸含量 (mg/g 脂質) の減少が顕著であった。この事実は、脂質過酸化に伴ってリノール酸が酸化分解されると同時に、減少したリノール酸の一部がTable 10に示したリノール酸からの *9c,11t* CLAの生成に関与している可能性を支持するものであった。また、今回の結果は、*9c,11t* CLAがリノール酸に比較して脂質過酸化や加熱に対して安定性が高いことを示唆した。

上述したように、Shanthaら⁷⁴⁾ は各種の加熱処理方法で加熱した牛挽き肉の脂質過酸化と*9c,11t* CLA生成との関連の可能性を検討した。しかし、彼らの結果は、牛肉脂質構成脂肪酸のリノール酸からの*9c,11t* CLAの生成が認められなかったことを示唆するものであった。他方、Haら²⁵⁾ は市販のグリルで焼いた牛挽き肉の*9c,11t* CLA含量を測定し、その含量がグリルで焼いていない対照の牛挽き肉に比較して約60%高かったことを認めた。彼らはその原因がリノール酸のフリーラジカル型の脂質過酸化の過程で生成されたものと推測した。

ところで、本章の実験に供試した山羊肉、羊肉および牛肉の反芻家畜由来食肉の中で、75℃で1時間の加熱処理を施し、かつ冷蔵7日目の羊肉において脂質過酸化の進行に伴った9*c*,11*t* CLA含量 (mg/g 脂質) の増加が示唆された。また、リノール酸含有量が比較的高い豚肉の結果は、特に電子レンジで焼いた豚肉パティにおいて冷蔵中に脂質過酸化の進行に伴った9*c*,11*t* CLA含量 (mg/g 脂質) の増加が認められた。そして、本章の実験で得た結果は、リノール酸含有量が比較的高かった豚肉の場合、そのリノール酸の脂質過酸化過程において生成された9*c*,11*t* CLAが量的に検出可能なレベルにあったことを示唆したものと推測される。また、9*c*,11*t* CLAは、リノール酸などの脂肪酸に比較して加熱や脂質過酸化に対して安定な脂肪酸であることを示した。

要約

本章では、9*c*,11*t* CLAの化学的生成機構としてリノール酸の脂質過酸化の過程での9*c*,11*t* CLAの生成が推測されていることを踏まえて、山羊肉、羊肉、牛肉および豚肉を用いて、それぞれの挽き肉の脂質過酸化に伴った9*c*,11*t* CLAの生成の有無を検討した。各種挽き肉の脂

質過酸化は、加熱および脂質過酸化促進物質の添加後の冷蔵によって促進した。

加熱を施した山羊挽き肉の脂質過酸化は冷蔵後促進されたが、*9c, 11t* CLA含量 (mg/g 脂質) の増加を認めることができなかった。未加熱羊挽き肉では、冷蔵中の脂質過酸化の進行の程度 (TBARS値) は低かったが *9c, 11t* CLA含量 (mg/g 脂質) の微増傾向が示された。また、加熱羊挽き肉では加塩の有無にかかわらず *9c, 11t* CLA含量 (mg/g 脂質) が微増した。牛挽き肉パティの場合、電子レンジ加熱、鉄イオンの添加および加塩 (2%食塩+0.01%アスコルビン酸塩) によって脂質過酸化が促進されたが、*9c, 11t* CLA含量 (mg/g 脂質) の増加は認められなかった。他方、豚挽き肉の場合、加熱および加塩 (2%食塩+0.01%アスコルビン酸塩) の有無にかかわらず、冷蔵中の脂質過酸化の進行に伴って *9c, 11t* CLA含量 (mg/g 脂質) の微増傾向が示された。また、豚挽き肉パティの場合、加塩の有無に関係なく電子レンジ加熱試料の *9c, 11t* CLA含量 (mg/g 脂質) が微増すると同時に、リノール酸含量の減少が認められた。

本章の結果は、リノール酸含有量が比較的高い豚肉では、脂質過酸化に伴った *9c, 11t* CLAの生成の可能性が

高いことを示した。また、冷蔵羊肉は脂質過酸化の進行の程度が低かったが、*9c,11t* CLAの生成の可能性が示唆された。さらに、食肉中の*9c,11t* CLAは、冷蔵、加熱および脂質過酸化に対して高い安定性を有することが示された。

第5章 肉製品および乳製品の9*c*,11*t* CLA含量について

緒言

第1章で述べたように、共役リノール酸 (CLA) はリノール酸の位置・幾何異性体の総称で、主として反芻家畜由来食品に存在する脂肪酸である¹⁰⁾。共役リノール酸の9種類の位置・幾何異性体が多くの種類の商品の微量成分として存在し、その中で9*c*,11*t* CLA、9*t*,11*t* CLA、10*t*,12*c* CLAおよび10*t*,12*t* CLAの4種類の異性体が総CLAの約89%を占めることが報告されている²⁵⁾。他方、Chinら¹⁰⁾は9*c*,11*t* CLA異性体が反芻家畜由来食品の最多の異性体で、総CLA含量中の約90%を占めることを明らかにした。O'Sheaら⁶³⁾も各種食品の総CLA含量が植物油の0.2 mg/gの低含量から牛脂の17 mg/gまたは乳脂肪の30 mg/gまでの変動値を示し、9*c*,11*t* CLA異性体含量は総CLA含量の90%に相当することを明らかにした。また、彼らは、食品の総CLA含量は顕著に相違し、このことが食餌性CLAの摂取量の大きな変動値につながることを示した。上述の第2章では牛肉、羊肉および山羊肉の9*c*,11*t* CLA含量が豚肉や鶏肉に比較して有意に高いこ

とを、また第3章では牛肉、羊肉および山羊肉の *9c, 11t* CLA含量が給餌飼料によって影響を受けることを明らかにした。しかしながら、国内産の肉製品および乳製品の *9c, 11t* CLA含量については、その有効な資料がほとんど見当たらない。

そこで本章では、まず国内産の畜産食品の *9c, 11t* CLA含量を調査し、つぎに国内産と国外産の畜産食品の *9c, 11t* CLA含量を比較し、さらに市販の国内産の畜産食品が国外産に比較して *9c, 11t* CLAの有益な供給源となり得るか否かを検討した。最後に、反芻家畜由来食品について、*9c, 11t* CLAとその前駆脂肪酸あるいは中間代謝脂肪酸との間の関連性を通して、*9c, 11t* CLAの生成機構について若干の考察をした。

実験材料と方法

1. 供試肉製品および乳製品

供試肉製品および乳製品には、宮崎市および福岡市の百貨店で無作為に購入した肉製品18種類、19品目、および乳製品（チーズ）28種類、35品目を用い、それら購入した製品は氷冷庫に入れて研究室に運び、直ちに脂質分析に供した。なお、供試した肉製品および乳製品は、

同一製造会社の製造年月日が相違する3試料について分析し、その平均値で表示した。

2. 脂質の抽出

脂質の抽出は、上記第2章の実験材料と方法の2に準じて行った。

3. 9c, 11t CLAおよび脂肪酸の定量

9c, 11t CLAおよび脂肪酸の定量は、上記第2章で検討し採用した方法を用いて行った。

4. 統計分析処理

肉製品については国内産または国外産並びに反芻家畜または非反芻家畜由来製品に分類し、また乳製品（チーズ）については国内産または国外産並びに細菌とカビによる熟成の有無によって分類し、その結果は平均値±標準誤差で表示した。データはまずF検定を行った後にTukeyとKramerの方法により平均値の有意差の検定を行った。回帰分析は、最小二乗法を用いて統計処理を行った。

結果と考察

1. 肉製品の9c,11t CLA含量

肉製品の総脂質含量、9c,11t CLA含量およびその他の主要な脂肪酸量は、Table 12とTable 13に示した。国内産肉製品の脂質含量は3.17%（スモークビーフ）から27.46%（ポークソーセージ）、また国外産肉製品のそれは5.18%（ビーフジャーキー）から38.37%（タンソーセージ）の範囲であった。それらの9c,11t CLA含量は0.68 mg（国内産ウインナーソーセージ）から5.59 mg/g 脂質（国外産コーンビーフ）の範囲であった。国外産肉製品の総脂質含量や脂肪酸量は国内産に比較して高い傾向にあった。しかしながら、国内産肉製品（ 2.13 ± 0.47 mg/g 脂質）と国外産（ 2.09 ± 0.38 mg/g 脂質）の9c,11t CLA含量の平均値の間には、有意な差は認められなかった（Table 12、Table 13、Fig. 7a）。他方、反芻家畜由来肉製品（ 3.32 ± 0.48 mg/g 脂質）は非反芻家畜由来肉製品（ 1.39 ± 0.14 mg/g 脂質）に比較して有意に高い値を示した（ $P < 0.01$ ）（Fig. 7b）。この結果は、反芻家畜由来肉製品が非反芻家畜由来肉製品の9c,11t CLA含量より有意に高いことを示したChinらの報告¹⁰⁾

Table 12. Total lipid, *9c,11t* CLA and some selected fatty acid contents in domestic meat products ^{a)}

Meat products	Total lipid	Fatty acids ^{b)}				
	(%)	<i>9c,11t</i> CLA	18:1(n-9)	18:1(n-7)	18:2(n-6)	18:3(n-3)
Vienna sausage ^{NRP}	24.70	0.68	346	28.9	120.6	7.61
Black pork sausage ^{NRP}	27.46	0.73	355	29.7	93.3	4.62
Black pork salami ^{NRP}	26.95	0.89	345	29.3	100.7	5.45
Smoked beef ^{RAP}	3.17	1.52	274	17.4	29.8	6.20
Pastrami beef ^{RAP}	9.63	3.59	414	20.2	20.9	2.01
Roast beef ^{RAP}	5.30	3.93	284	31.3	20.4	7.91
Beef jerky ^{RAP}	10.11	2.66	308	20.5	31.8	6.93
Corned beef ^{RAP}	9.69	3.00	313	26.1	25.9	5.85
mean ± S.E.	14.63 ± 3.55	2.13 ± 0.47	330 ± 16	25.4 ± 1.9	55.4 ± 14.8	5.82 ± 0.67

a) The values were expressed as means of three samples.

b) The contents of fatty acids were expressed as milligrams per gram of lipid.

RAP and NRP stand for ruminant animal and nonruminant animal products, respectively.

Table 13. Total lipid, *9c,11t* CLA and some selected fatty acid contents in imported meat products ^{a)}

Meat products	Total lipid	Fatty acids ^{b)}				
	(%)	<i>9c,11t</i> CLA	18:1(n-9)	18:1(n-7)	18:2(n-6)	18:3(n-3)
Vienna sausage ^{NRP}	23.77	1.84	365	27.8	133.1	6.53
Frankfurter sausage ^{NRP}	20.48	1.24	364	36.9	100.9	9.03
Hunting sausage ^{NRP}	35.45	1.79	368	32.7	113.1	12.45
Bologna sausage ^{NRP}	25.72	1.87	367	33.2	110.8	11.19
Gelder sausage ^{NRP}	32.73	2.04	374	33.1	107.7	10.80
Tongue sausage ^{NRP}	38.37	1.80	376	32.1	114.5	9.01
Rare salami 1 ^{NRP}	25.18	1.14	347	35.4	86.6	6.57
Rare salami 2 ^{NRP}	35.52	1.15	355	30.9	93.8	7.19
Meat loaf ^{NRP}	24.75	1.52	366	32.8	110.6	10.35
Beef jerky ^{RAP}	5.18	2.98	216	23.6	44.5	7.50
Corned beef ^{RAP}	15.02	5.59	335	35.4	16.9	4.04
mean ± S.E.	25.65 ± 2.97	2.09 ± 0.38	348 ± 14	32.2 ± 1.1	93.9 ± 10.2	8.61 ± 0.75

a) The values were expressed as means of three samples.

b) The contents of fatty acids were expressed as milligrams per gram of lipid.

RAP and NRP stand for ruminant animal and nonruminant animal products, respectively.

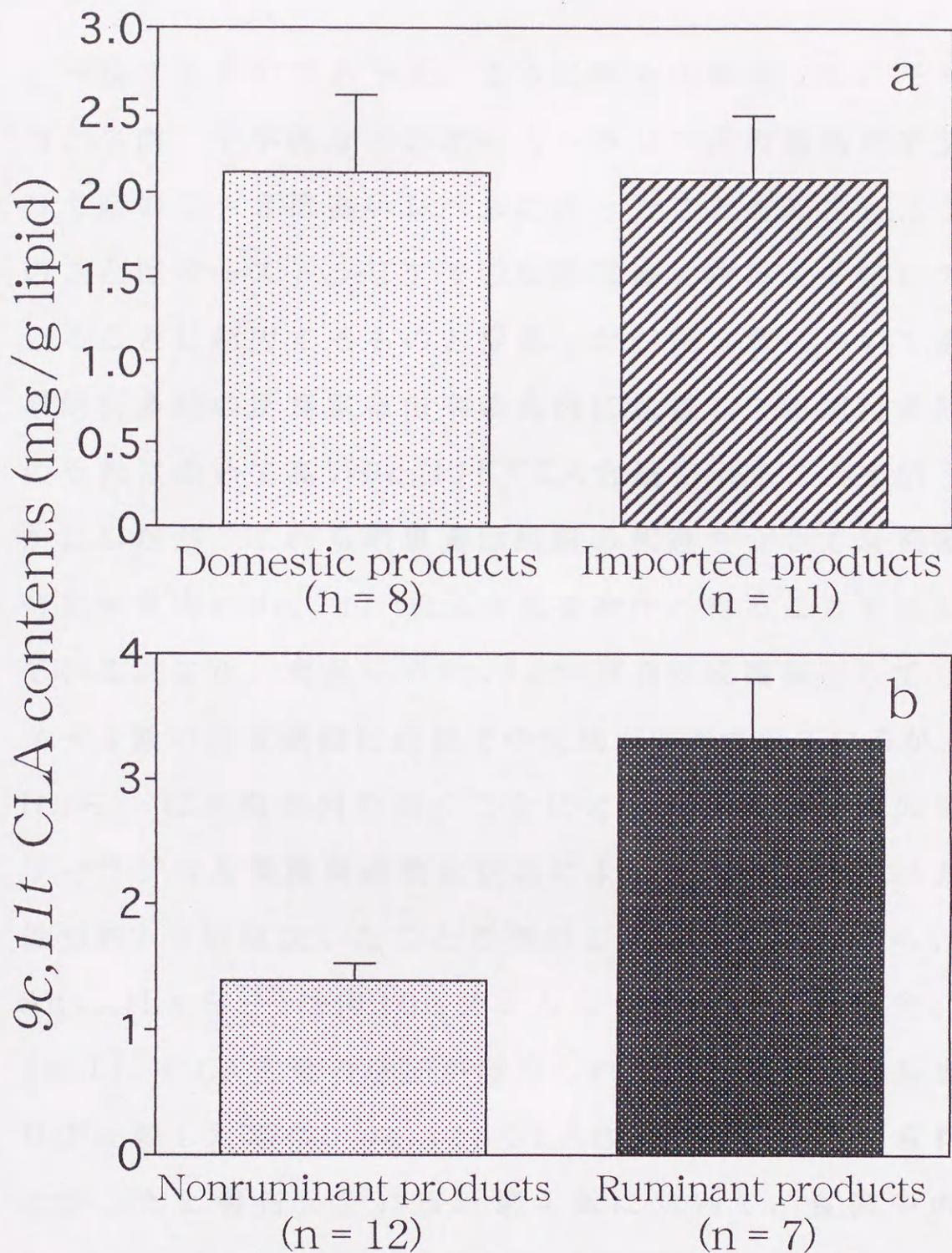


Fig. 7. Comparisons of the 9c,11t CLA contents of domestic and imported meat products, as well as those of nonruminant and ruminant meat products.

と一致するものであった。さらに彼らの報告では、子羊肉、牛肉、子牛肉などのオーストラリア産肉製品がアメリカ産の2～3倍高いレベルにあったことを報告し、このことはオーストラリアでは反芻家畜に牧草を多給していることに起因するものと推測した。第3章において濃厚飼料多給の反芻家畜由来の食肉に比較して粗飼料多給のそれにおいて高い9*c*,11*t* CLA含量を示すことを明らかにしたが、これらの事実は飼料の相違を介して反芻家畜由来食肉の9*c*,11*t* CLA含量を操作し得ることを示している。また、食品中の9*c*,11*t* CLA生成機構としてリノール酸の脂質過酸化過程での生成が推測されているが、Haら²⁵⁾は牛挽き肉を焼くことにより、リノール酸のフリーラジカル型脂質過酸化反応によって9*c*,11*t* CLA含量が約1.6倍増加したことを報告した。しかしながら、Shanthaら⁷⁴⁾は肉100グラム当りで比較した場合、9*c*,11*t* CLA含量の増加が認められたが、脂質グラム当りで比較した場合、9*c*,11*t* CLA含量の増加は認められなかったと報告している。第4章において、食肉中の9*c*,11*t* CLAは冷蔵、加熱および脂質過酸化に対して安定な脂肪酸であり、また脂質過酸化の過程で9*c*,11*t* CLAが生成されたとしてもその量は僅かであることが示された。

供試した肉製品の結果は、総脂質含量、*9c,11t* CLA 含量および脂肪酸量の相違の主な原因がその肉製品の原材料に依存することが明らかであり、また反芻家畜由来肉製品が *9c,11t* CLA の供給源となり得ることが明らかであった。

次に、牛肉を原料とする肉製品における *9c,11t* CLA とオレイン酸、バクセン酸、リノール酸あるいは α -リノレン酸などの脂肪酸との量的関係について調べた。その結果、オレイン酸と α -リノレン酸については、*9c,11t* CLA 含量との間に有意な相関関係を認めなかった (Fig. 8a,d) が、オレイン酸の異性体であるバクセン酸 (C18:1 n-7) との間には有意な正の相関関係 ($r=0.877$, $P<0.01$) が認められた (Fig. 8b)。他方、リノール酸との間には有意な負の相関関係 ($r=-0.707$, $P<0.05$) が認められた (Fig. 8c)。Shanthaら⁷⁵⁾ は、牧草のみを給餌したウシの筋肉の *9c,11t* CLA 含量 (7.4 mg/g 脂質) は、牧草と穀物を給餌したウシの筋肉 (5.1 mg/g 脂質) に比較して有意に高いことを報告した。彼らは、牧草のみを給餌したウシの筋肉のリノール酸含量が穀物と牧草を給餌した筋肉に比較して低い値を示し、かつ、*9c,11t* CLA とリノール酸の両者間に負の相関関係が認められたのは、リ

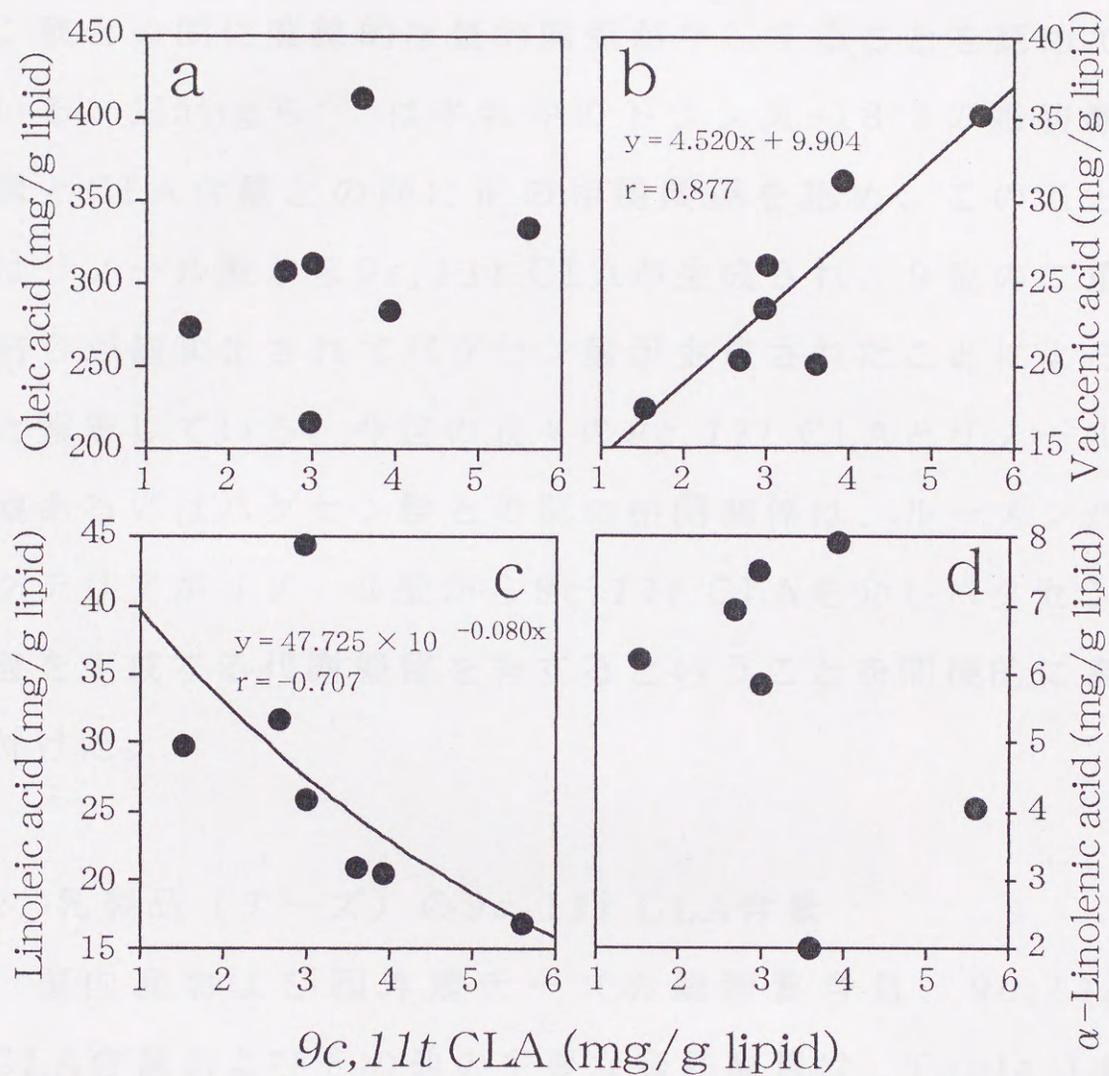


Fig. 8. Quantitative relationships between *9c,11t* CLA and some selected fatty acids in meat products originating from ruminant animals.

ノール酸から *9c,11t* CLA への変換が生じたためと示唆している。また Enser ら¹⁸⁾ は、*9c,11t* CLA とバクセン酸との間に直線的な量的関係が存在することを認めている。Jiang ら³⁹⁾ は牛乳中のトランス-18:1 の脂肪酸量と CLA 含量との間に正の相関関係を認め、このことはリノール酸から *9c,11t* CLA が生成され、9 位の二重結合が飽和化されてバクセン酸が生成されたことによると報告している。今回の我々の *9c,11t* CLA とリノール酸あるいはバクセン酸との間の相関関係は、ルーメンバクテリアがリノール酸から *9c,11t* CLA を介しバクセン酸を生成する代謝経路を有するという間接的に裏付けた。

2. 乳製品（チーズ）の *9c,11t* CLA 含量

国内産および国外産チーズの総脂質含量、*9c,11t* CLA 含量およびその他の主要な脂肪酸量は、Table 14 と Table 15 に示した。国内産チーズの脂質含量は 4.10 %（カッテージチーズ）から 31.21 %（クリームチーズ）、また国外産チーズのそれは 11.82 %（ヤギ乳チーズ 1）から 31.29 %（ブルーチーズ 1）の範囲を示した。それらの *9c,11t* CLA 含量は 2.64 mg/g 脂質（国外産エダムチーズ）から 14.65 mg/g 脂質（国外産ホワイト

Table 14. Total lipid, *9c,11t* CLA and some selected fatty acid contents in domestic cheeses ^{a)}

Cheeses	Total lipid		Fatty acids ^{b)}			
	(%)	<i>9c,11t</i> CLA	18:1(n-9)	18:1(n-7)	18:2(n-6)	18:3(n-3)
Mozzarella cheese	17.21	4.42	181	21.6	20.0	3.16
Cottage cheese	4.10	4.76	180	21.5	24.8	3.96
Cream cheese	31.21	7.50	166	26.0	14.4	4.41
Cheddar cheese ^{BRC}	25.66	4.80	180	20.5	22.9	5.00
Red cheddar cheese ^{BRC}	27.53	7.37	157	30.0	15.0	9.13
Gouda cheese ^{BRC}	28.08	3.17	164	18.5	17.8	4.42
Parmesan cheese ^{BRC}	27.47	8.98	149	34.3	14.1	8.28
Smoked cheese 1 ^{BRC}	23.11	4.44	183	20.8	22.5	3.92
Smoked cheese 2 ^{BRC}	24.42	7.40	174	32.2	18.0	6.59
Process regular cheese ^{BRC}	24.31	6.71	152	28.7	16.1	6.60
Camembert cheese 1 ^{MRC}	21.51	3.82	179	18.3	23.3	4.16
Camembert cheese 2 ^{MRC}	21.75	3.97	183	24.4	27.2	3.94
Camembert cheese 3 ^{MRC}	21.23	4.41	188	23.9	22.5	3.43
Process camembert cheese ^{MRC}	27.02	7.94	182	30.7	17.2	7.12
mean ± S.E.	23.19 ± 1.75	5.69 ± 0.5	173 ± 3	25.1 ± 1.4	19.7 ± 1.1	5.29 ± 0.51

a) The values were expressed as means of three samples.

b) The contents of fatty acids were expressed as milligrams per gram of lipid.

BRC and MRC stand for bacteria-ripened and mold-ripened cheeses, respectively.

Table 15. Total lipid, 9c,11t CLA and some selected fatty acid contents in imported cheeses ^{a)}

Cheeses	Total lipid	Fatty acids ^{b)}				
	(%)	9c,11t CLA	18:1(n-9)	18:1(n-7)	18:2(n-6)	18:3(n-3)
Mozzarella cheese 1	17.55	7.11	190	30.0	18.8	4.08
Mozzarella cheese 2	15.50	7.60	192	29.1	15.0	5.67
Cream cheese	31.14	9.77	168	33.3	17.1	7.73
Goat milk cheese 1	11.82	3.62	169	15.9	23.7	5.43
Goat milk cheese 2	13.90	5.75	170	17.5	21.9	4.59
White cheddar cheese ^{BRC}	24.42	14.65	163	52.6	15.5	7.28
Red cheddar cheese ^{BRC}	25.93	4.31	169	19.0	17.1	4.32
Gouda cheese ^{BRC}	25.07	7.06	176	28.2	16.3	5.00
Maribo cheese ^{BRC}	17.83	7.03	185	29.5	18.5	4.80
Samsøe cheese ^{BRC}	23.20	4.62	195	23.3	19.9	4.52
Emmental cheese ^{BRC}	28.76	6.87	161	25.0	14.9	8.66
Gruyere cheese ^{BRC}	21.80	5.44	175	22.1	16.7	8.27
Edam cheese ^{BRC}	16.70	2.64	144	14.6	14.9	4.03
Parmesan cheese ^{BRC}	19.74	5.20	185	23.6	24.9	3.68
Smoked cheese ^{BRC}	16.84	5.64	176	26.4	17.3	5.29
Supreme cheese ^{MRC}	31.06	7.29	188	27.6	19.0	5.80
Caprice des Dieux cheese ^{MRC}	28.02	10.74	189	36.3	16.7	7.03
Camembert cheese 1 ^{MRC}	18.22	9.31	181	33.0	16.2	6.99
Camembert cheese 2 ^{MRC}	28.39	12.56	168	40.5	16.9	8.79
Blue cheese 1 ^{MRC}	31.29	7.15	197	31.6	15.2	4.56
Blue cheese 2 ^{MRC}	26.13	6.86	183	25.9	17.8	6.90
mean ± S.E.	22.54 ± 1.33	7.20 ± 0.63	177 ± 3	27.9 ± 1.9	17.8 ± 0.6	5.88 ± 0.35

a) The values were expressed as means of three samples.

b) The contents of fatty acids were expressed as milligrams per gram of lipid.

BRC and MRC stand for bacteria-ripened and mold-ripened cheeses, respectively.

チェダーチーズ)の範囲であった。Chinらの報告¹⁰⁾ではチーズの総CLA含量は3~7 mg/g 脂質を示し、総CLA含量の約90%を9*c*,11*t* CLA異性体が占めていたことを計算すれば、9*c*,11*t* CLA含量は約2.7~6.3 mg/g 脂質に相当した。この値は、今回供試したチーズの総平均値(6.45 mg/g 脂質)に近似した。9*c*,11*t* CLA含量とその他の脂肪酸量は、国内産と国外産チーズとの間に有意な差は認められなかった(Table 14、Table 15)が、国外産チーズ(7.20 ± 0.63 mg/g 脂質)の9*c*,11*t* CLA含量は国内産(5.69 ± 0.50 mg/g 脂質)に比較して比較的高い値を示す傾向にあった(Fig. 9a)。

今回の実験において熟成の有無や細菌(6.26 ± 0.66 mg/g 脂質) / カビ(7.41 ± 0.92 mg/g 脂質)による熟成手段の相違(Fig. 9b)のようなチーズの品質やテクスチャーに關与する要因が、チーズの9*c*,11*t* CLA含量に有意な影響を与えているようには見受けられなかった。しかしながら、Shanthaらの報告⁷²⁾は、製造工程がチーズの9*c*,11*t* CLA含量に影響を与えることを示唆している。またLinら⁵⁴⁾も、チーズのCLA含量が3.59~7.96 mg/g 脂質の範囲にあったことを報告し、ブルーチーズ、ブリエチーズ、エダムチーズそしてスイスチー

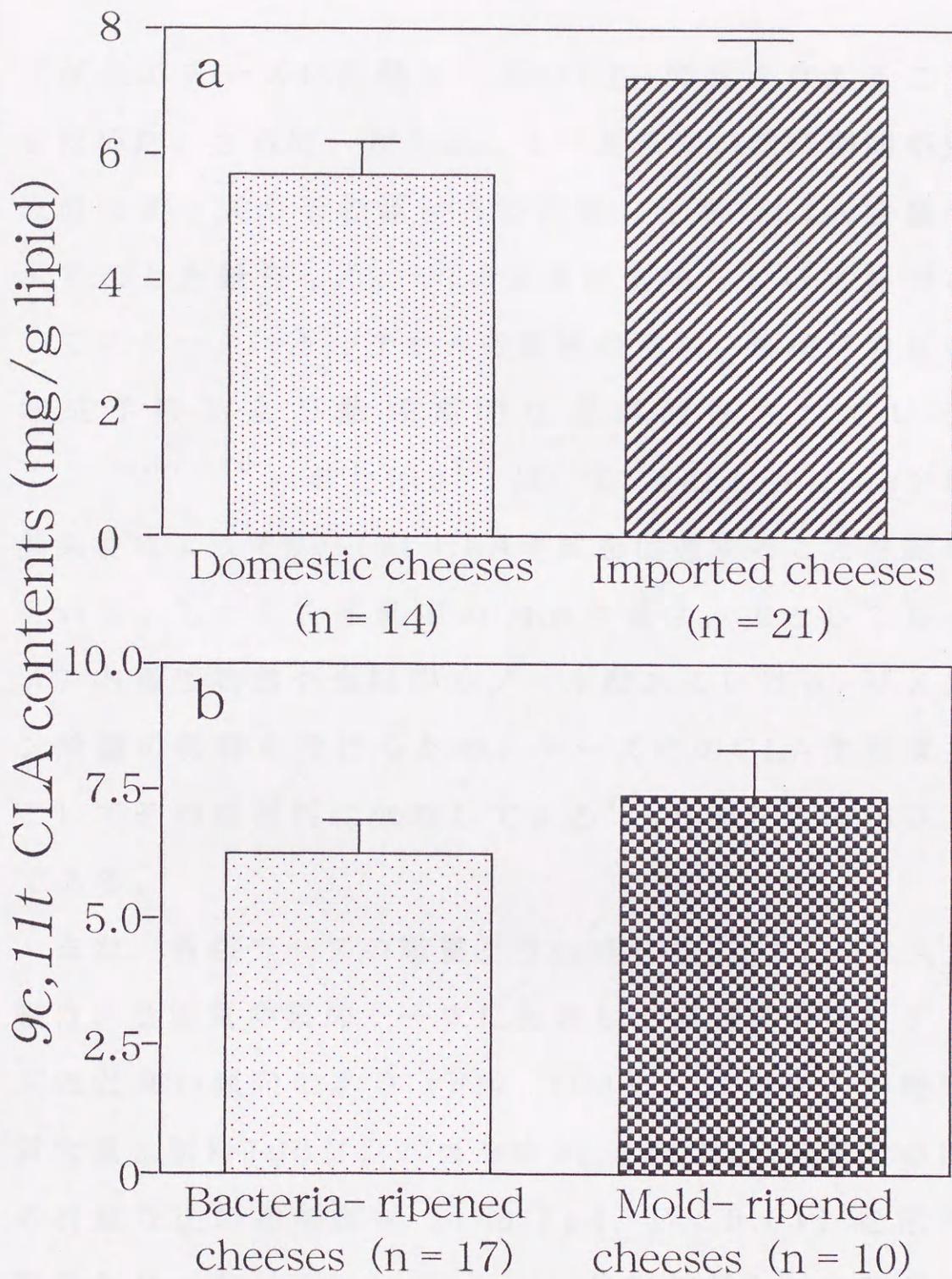


Fig. 9. Comparisons of the *9c,11t* CLA contents of domestic and imported cheeses, as well as those of bacteria- and mold- ripened cheeses.

ズが他のチーズに比較して高いCLA含量を与えることを認めた。さらに、彼らは、4～8週間の熟成期間が熟成前のチーズやその原料乳に比較して高いCLA含量を示すことも報告した。CLA含量に影響を及ぼす要因としてスターターカルチャーの菌株の種類、細菌/カビの熟成手段および熟成期間などが報告されている^{14, 23, 25, 40, 72)}。またLin⁵⁵⁾は、*L. acidophilus*が培養条件によって9c, 11t CLA生成を促進することを認めている。しかし、牛乳中のCLA含量は、主としてルーメン内微生物叢や食餌中リノール酸あるいは α -リノレン酸量の影響を受けるため、チーズ中のCLA含量は主としてその原材料に依存している⁸⁵⁾と考えるのが妥当である。

また、各種チーズの脂質グラム当りの9c, 11t CLA含量は、低脂質含量のチーズに比較して高脂質含量のチーズほど高い傾向にあり (Fig. 10a)、このことが総脂質含量と試料100グラム当りの9c, 11t CLA含量との間の有意な正の相関関係 ($r=0.714$, $P < 0.01$) を示す結果となった (Fig. 10b)。しかしながら、今回の高脂質含量のチーズの9c, 11t CLA含量 (mg/g 脂質) が高い傾向にあった理由は明らかではない。この事実を明らかにするためには、今後の研究を待たねばならない。

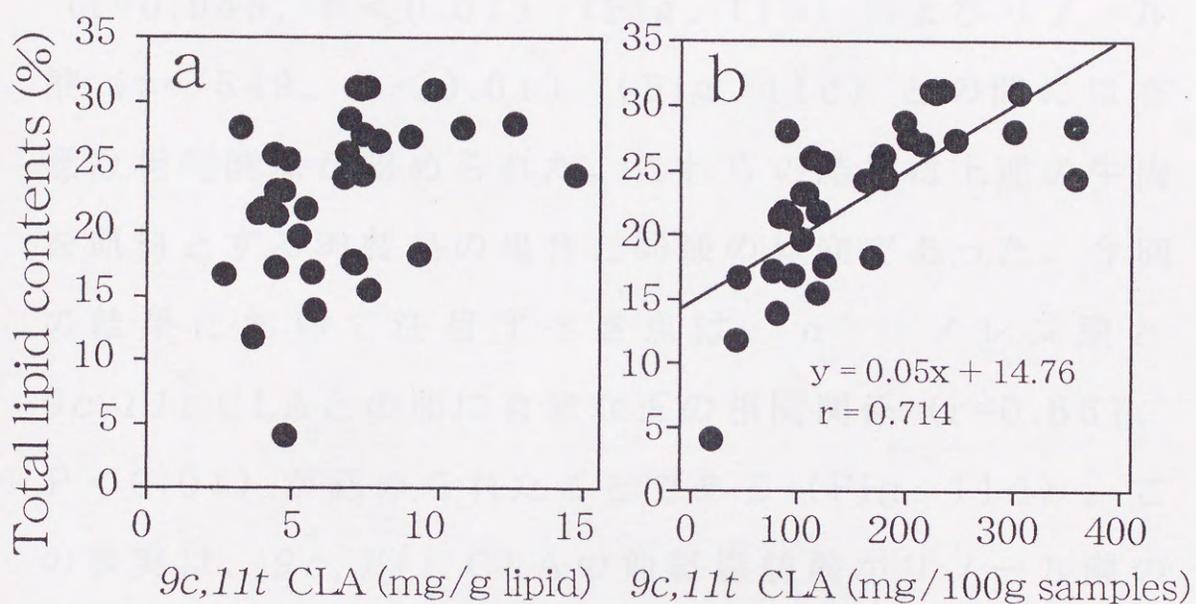


Fig. 10. Quantitative relationships between 9c,11t CLA and total lipid in cheeses.

次に、チーズの *9c,11t* CLA とオレイン酸、バクセン酸、リノール酸あるいは α -リノレン酸などの脂肪酸との間の量的関係について検討した。その結果、*9c,11t* CLA 含量とオレイン酸との間には有意な相関関係は認められなかった (Fig. 11a) が、バクセン酸 ($r=0.948$, $P<0.01$) (Fig. 11b) およびリノール酸 ($r=-0.549$, $P<0.01$) (Fig. 11c) との間には有意な相関関係が認められた。これらの結果は上述の牛肉を原料とする肉製品の場合と同様の傾向であった。今回の結果において注目すべき点は、 α -リノレン酸と *9c,11t* CLA との間に有意な正の相関関係 ($r=0.667$, $P<0.01$) が認められたことである (Fig. 11d)。この事実は、*9c,11t* CLA の前駆脂肪酸がリノール酸のみでなく、 α -リノレン酸が *9c,11t* CLA の前駆脂肪酸となり得る可能性を間接的に示唆していると推測される。第3章の結果も、高 α -リノレン酸含有粗飼料を多給した反芻家畜の *9c,11t* CLA 含量が増加した理由として、 α -リノレン酸が *9c,11t* CLA の前駆脂肪酸となる可能性を示唆した。

Lin ら⁵⁴⁾ は酪農製品の *9c,11t* CLA 含量を調べ、*9c,11t* CLA と他の脂肪酸との間の重回帰分析を行った。その結果、*9c,11t* CLA の前駆物質と考えられているリ

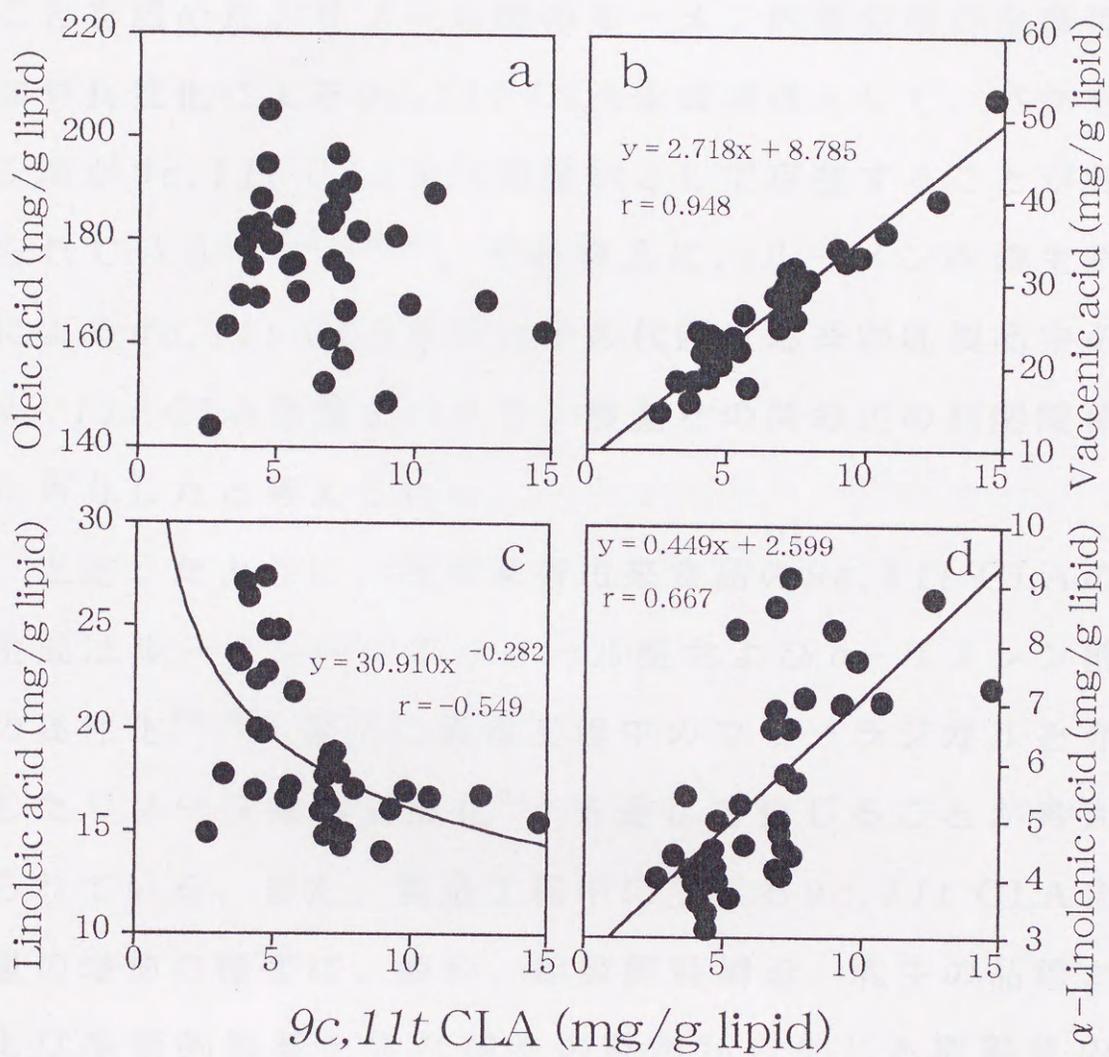


Fig. 11. Quantitative relationships between *9c,11t* CLA and some selected fatty acids in cheeses.

ノール酸との間に負の相関関係が、逆にオレイン酸の異性体であるバクセン酸との間に正の相関関係が存在することを認めた。リノール酸のルーメン内微生物の水素添加や異性化による *9c, 11t* CLA 生成機構として、バクセン酸が *9c, 11t* CLA の代謝産物として存在することが知られている^{1, 18, 33, 85)}。それゆえに、ルーメン内微生物による *9c, 11t* CLA 生成とその代謝反応系が乳製品中の *9c, 11t* CLA 含量とバクセン酸量との間の正の相関関係に寄与したと考えられる。

上述したように、反芻家畜由来食品の *9c, 11t* CLA の生成はルーメン内でのリノール酸および α -リノレン酸の異性化^{25, 85)} 並びに製造工程中のフリーラジカルを介したリノール酸の過酸化²⁵⁾ を通して生じることが考えられている。また、製造工程中に生じる *9c, 11t* CLA 含量の増加の程度は、餌料、給餌飼料構造、乳牛の品種および季節的影響を含む種々の要因から生じる原料乳の *9c, 11t* CLA 含量の大きな変動値に比較して小さいことが確認されている^{39, 43, 78)}。そして、特に反芻家畜の給餌飼料が、その畜産物の *9c, 11t* CLA 含量の主要な影響要因であることが示されている。

今回の供試肉製品および乳製品（チーズ）では、供試製品の詳細な履歴が不明であったので、それらの

9c,11t CLA含量と9c,11t CLA生成に影響する要因との関係を特定できなかった。また、今回のチーズ製品の結果は、製造工程（加熱処理および熟成など）以外の生物要因（餌料および給餌飼料構造など）が9c,11t CLA含量の大きな変動値の主要な要因となったと考えられる。このように、今回供試したチーズの9c,11t CLA含量は、専ら原料乳の9c,11t CLA含量に依存していると結論付けるのが妥当である。家畜の餌料が反芻家畜由来食品の9c,11t CLA含量の主要な影響要因となるという知見は、餌料を介在して牛乳や食肉の9c,11t CLA含量を操作することに道を拓くものである。そのような研究は、また、9c,11t CLAが豊富な新規反芻家畜由来食品の開発につながると考えられる。

要約

本章の研究は、肉製品および乳製品の9c,11t CLA含量の基礎資料を得る目的で、第2章で考案した脂肪酸メチルエステル調製法を用いたキャピラリーカラムGC分析による9c,11t CLA定量法によって、市販肉製品およびチーズ製品の9c,11t CLA含量を調査した。9c,11t CLA含量は、国内産と国外産並びに反芻家畜由来製品

と非反芻家畜製品の間でそれぞれ比較した。

その結果によれば、肉製品の場合、国内製品と国外製品との間の *9c, 11t* CLA 含量には有意差を認めなかった。また、反芻家畜由来肉製品の *9c, 11t* CLA 含量は、非反芻家畜肉製品に比較して有意な高値を示した。チーズ製品の場合、国内製品の *9c, 11t* CLA 含量は国外製品に比較して低値を示した。高脂質含有チーズの *9c, 11t* CLA 含量 (mg/g 脂質) は、低脂質含有チーズに比較して高い傾向を示した。肉製品およびチーズ製品の両者の *9c, 11t* CLA 含量 (mg/g 脂質) で認められた大きな変動値は、それらの原料の *9c, 11t* CLA 含量に専ら依存していると考察した。反芻家畜由来肉製品並びにチーズ製品について検討した *9c, 11t* CLA と他脂肪酸との間の量的相関関係では、*9c, 11t* CLA とリノール酸の間に有意な負の相関が、また *9c, 11t* CLA とバクセン酸の間に有意な正の相関が認められた。チーズ製品の場合、*9c, 11t* CLA と α -リノレン酸の間に有意な正の相関を認めた。これら得られた *9c, 11t* CLA と他脂肪酸との間の量的相関関係を踏まえて、反芻家畜のルーメン内での *9c, 11t* CLA の生成機構を間接的に考察した。

第6章 9c,11t CLAの生成に関与する2,3の要因と 生成機構の解明

緒言

反芻家畜由来の食品に存在するCLAの約90%が9c,11t CLA異性体であることは、Chinらの結果¹⁰⁾から明らかである。そして、9c,11t CLA異性体がりノール酸を前駆脂肪酸としてルーメン内嫌気性細菌、*Butyrivibrio fibrisolvens*の異性化反応を受けて生成されることが明らかにされている^{22,33,45,46)}。また、Vivianiの報告⁸⁵⁾をはじめ、Kempらの結果⁴³⁾は、*Butyrivibrio fibrisolvens*の他に*Eubacterium*、*Fusocillus*、*Micrococcus*、*Ruminococcus albus*、*Borrelia*、*Treponema*などの菌をはじめ、ルーメン内の多くのグラム陰性菌株がりノール酸を異性化して9c,11t CLAの生成に関与していることを示している。しかし、 α -リノレン酸から9c,11t CLAの生成に関与する微生物は確認されていない。ルーメン内で生成された9c,11t CLAが体内に吸収されて組織中に蓄積されることは、これまでの反芻家畜を用いた実験結果⁷⁵⁾から容易に推測される。

ところで、第3章における研究結果は、粗飼料多給の反芻家畜から採取した肉の $9c,11t$ CLA含量 (mg/g 脂質) が濃厚飼料多給の反芻家畜から採取した肉に比較して有意に高いことを示した。一般に、粗飼料脂質は α -リノレン酸が豊富であるのに対して、濃厚飼料はリノール酸を豊富に含有している。 $9c,11t$ CLA異性体がリノール酸のみを前駆脂肪酸としてルーメン内で生成されたことを仮定すれば、まず濃厚飼料を多給した反芻家畜の乳・肉の $9c,11t$ CLA含量 (mg/g 脂質) が粗飼料多給の反芻家畜に比較して有意に高くなることが期待されるが、その結果は上述したように逆であった。Shanthaらの結果⁷⁵⁾ も、 α -リノレン酸が豊富な牧草地で飼育した肉牛から採取した筋肉組織の $9c,11t$ CLA含量 (mg/g 脂質) がリノール酸が豊富な穀類と牧草を給餌した肉牛に比較して有意に高かった。また、牧草地で放牧した乳牛の場合、牛乳の $9c,11t$ CLA含量 (mg/g 脂質) を高めること^{16,63)} が知られている。これら α -リノレン酸が豊富な牧草などの粗飼料の多給が $9c,11t$ CLA含量 (mg/g 脂質) を高める理由の一つは、 α -リノレン酸が $9c,11t$ CLA異性体の前駆脂肪酸となる可能性を示唆しているものと考えられた。Viviani⁸⁵⁾ が提出した $9c,11t$ CLA生成機構図は、リノール酸と α -リノレン

酸の両脂肪酸からルーメン内微生物によって *9c,11t* CLA異性体が生成される可能性を示唆している。

そこで第6章では、ルーメン内微生物による *9c,11t* CLAの生成機構に関与する諸要因と *9c,11t* CLAの前駆脂肪酸を明らかにする目的で、ヤギのルーメン内容物から調製したルーメン液を用いて、ルーメン液培養の基質脂質として粗飼料と濃厚飼料、または遊離型、エステル型およびナトリウム塩型のリノール酸並びに α -リノレン酸を培養すると同時に、ルーメン液培養のpH値が *9c,11t* CLAの生成に及ぼす影響を検討した。併せて、ルーメン液培養に伴うリノール酸並びに α -リノレン酸の中間代謝脂肪酸についても検討を行った。同時に、 α -リノレン酸の不明代謝脂肪酸を、ガスクロマトグラフィー/質量分析によって同定した。

実験材料と方法

1. 実験材料

1) ルーメン液および緩衝液の調製

ルーメン液は、アルファルファハイキューブを給餌したフィステル装着ヤギ（ザーネン種去勢雄：約10才齢並びにアルパイン種雌：約2才齢）から採取したルーメ

ン内容物を用いて調製した。すなわち第一胃フィステルを通して採取したルーメン内容物を、直ちに二重のガーゼを用いて圧搾濾過し、その濾液をルーメン液として供試した。実験に用いるまで、ルーメン液は炭酸ガス (CO_2) 気流の嫌氣的条件下に $38^\circ\text{C} \sim 39^\circ\text{C}$ で保持された。

ルーメン液培養の緩衝液は、McDougall⁵⁸⁾ の人工唾液の組成に準じて調製した。蒸留水 1 l に NaHCO_3 9.8 g、 KCl 0.57 g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ 9.3 g および NaCl 0.47 g を溶解し、冷却しながら炭酸ガスを通気し飽和させた。次に $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0.12 g を添加して炭酸ガスを通気して完全に溶解させた後、さらに CaCl_2 0.04 g を添加して炭酸ガスを通気して完全に溶解してルーメン液培養用の緩衝液 (pH 6.8) を調製した。なお、pH 値が相違するルーメン液培養実験に使用した緩衝液の pH は、1 M 酢酸水溶液あるいは 1 M 炭酸ナトリウム水溶液を用いて、あらかじめ上記のルーメン液培養用の緩衝液 (pH 6.8) の pH を pH 5.8、pH 6.3、pH 7.3 および pH 7.8 に調整し、ルーメン液培養液の pH 値がそれぞれ最終的に pH 6.0、pH 6.5、pH 7.0、pH 7.5 および pH 8.0 になるように調製した。

なお、試薬は和光純薬工業 (株) 製の特級以上を使用した。

2) 基質飼料と基質脂質

基質飼料として、まずTable 16およびFig. 12に示した飼料性脂質の構成脂肪酸が明らかに異なる圧ペントウモロコシとイタリアンライグラス乾草を用いて、それらを十分に粉碎した後、それぞれの脂質の脂肪酸含量が5 mgに相当する量をルーメン液培養に供した。なお、構成脂肪酸から圧ペントウモロコシは高リノール酸の基質飼料として、またイタリアンライグラス乾草は高 α -リノレン酸の基質飼料として用いた。供試した圧ペントウモロコシおよびイタリアンライグラス乾草の総脂質含量はそれぞれ2.92%および1.42%を与え、またそれぞれの総脂肪酸含量は2442 mgおよび832 mg/100 g飼料であった (Table 16)。そこで、ルーメン液培養用の試料として、圧ペントウモロコシは0.2 g、またイタリアンライグラス乾草は0.6 gが供された。

引き続いての実験では、基質脂質として、リノール酸並びに α -リノレン酸の遊離型、ナトリウム塩型およびトリグリセリド型を供試し、脂肪酸の種類および脂肪酸の形態の相違による9*c*, 11*t* CLA生成の差異を検討した。あらかじめエチルアルコールに溶解した両脂肪酸のそれぞれ5 mgに相当する量を0.25 gの粉末濾紙に吸着させ

Table 16. Weight percentage of fatty acid composition of lipids in feeds used

Fatty acids	Crashed corn	Italian ryegrass hay
12 : 0	-	0.54
14 : 0	-	2.31
15 : 0	-	0.32
16 : 0	10.46	25.39
16 : 1 (n-7)	0.09	0.79
17 : 0	-	0.48
18 : 0	1.56	2.06
18 : 1 (n-9)	20.64	3.36
18 : 1 (n-7)	2.97	0.55
18 : 2 (n-6)	62.33	15.04
18 : 3 (n-3)	1.60	44.74
20 : 0	0.34	0.73
Others	-	3.70
Total fatty acids (mg/100g sample)	2441.98	831.83

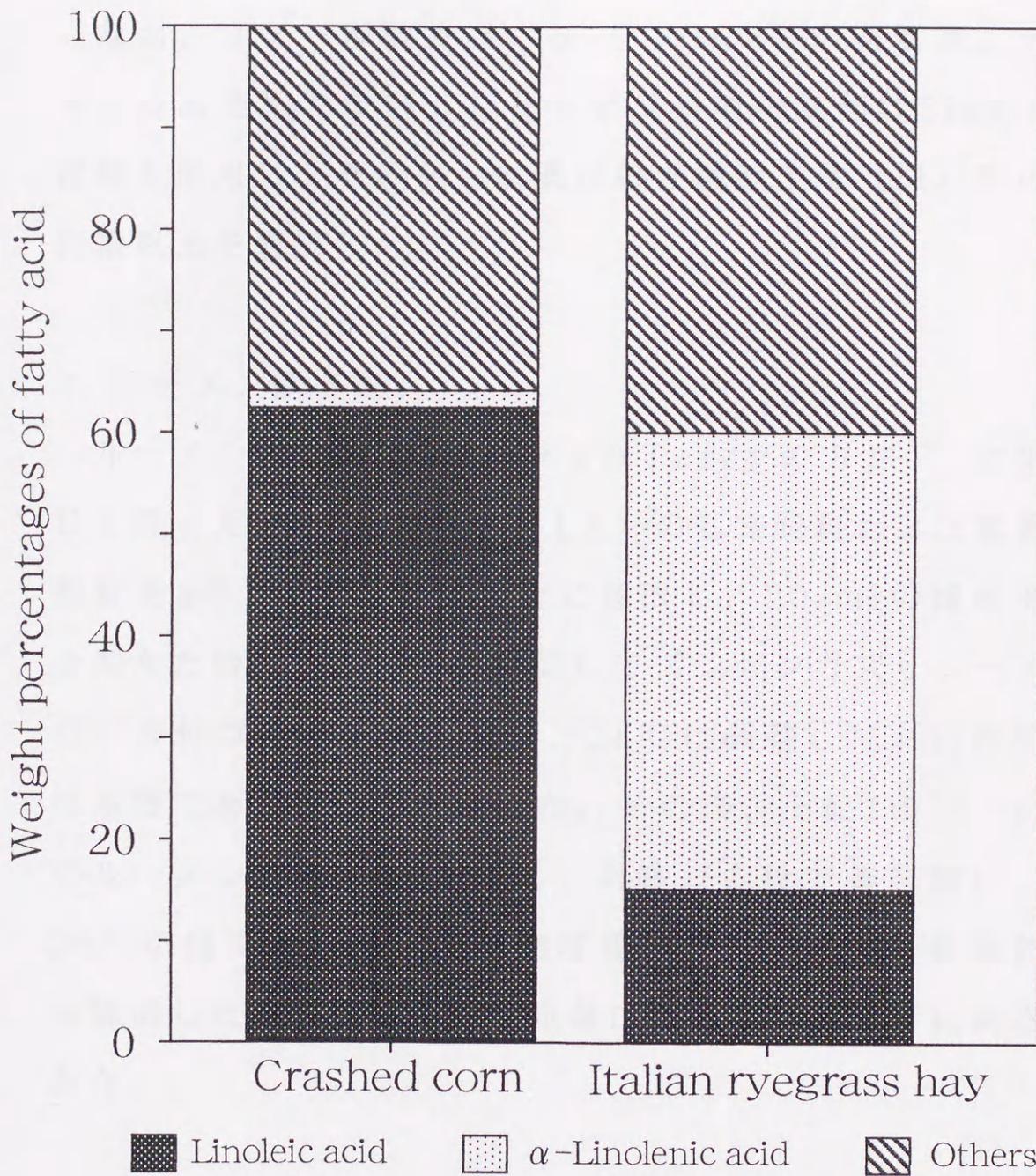


Fig. 12. Weight percentages of linoleic, α -linolenic and others fatty acids of lipids in feeds used.

た後、その粉末濾紙がルーメン液培養に供された。

なお、リノール酸並びに α -リノレン酸の遊離型、ナトリウム塩型およびトリグリセリド型の試薬はSigma社製を使用し、その他の試薬は和光純薬工業(株)製の特級以上を使用した。

2. ルーメン液培養

ルーメン液培養は、Tilley & Terryの方法⁸²⁾に準じて行った。まず上記1の(2)の基質飼料および基質脂質を50 ml容培養試験管に秤取し、20 mlの緩衝液を加えた後、炭酸ガスを通気してブンゼンガスリリースバブル付ゴム栓で蓋を施し、38℃に調整しておいた恒温水槽であらかじめ加温した。その後、上記1の(1)のルーメン液5 mlを注加し、再度ゴム栓で蓋を施し、38℃の恒温水槽で所定時間培養した。所定の培養時間が経過した後、培養反応液全量は直ちに脂質分析に供された。

3. 脂質の抽出

1) 試薬

i) クロロホルム：上記第2章の2の1)のi)と同様に調製した。

ii) メチルアルコール：上記第2章の2の1)のii)と同様に調製した。

iii) 蒸留水：上記第2章の2の1)のiii)と同様に調製した。

iv) クロロホルム・メタノール溶液：上記i)とii)で調製したクロロホルムと蒸留メタノールを体積比1：2で混合した後、窒素ガスを通気攪拌して使用した（以下C・M（1：2）溶液と記す。）。

v) 無水硫酸ナトリウム：上記第2章の2の1)のvii)と同一のものを使用した。

2) 脂質の抽出法

ルーメン液培養液からの総脂質の抽出は、主としてBlighとDyerの方法⁶⁾に準じてC・M（1：2）溶液を用いて行った。ルーメン液培養液の全量を200 ml容コニカルビーカーに移し、100 mlのC・M（1：2）溶液を加え、細かく刻んだ濾紙を加えた後に氷冷しながら2分間ホモジナイズした。そしてホモジネートは35 mlのC・M（1：2）溶液でよく洗浄しながら吸引濾過（桐山ロート 直径40 mm、濾紙No.5A）した後、濾液を300 ml容分液ロートへ定量的に移した。これにクロロホルム45 mlと蒸留水56 mlを加え激しく振盪した

後、低温室に一昼夜静置した。その後、二層に分離した下層のクロロホルム層を500 ml容褐色試薬ビンに移し、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水乾燥した後、500 ml容褐色ナス型フラスコに濾過（東洋濾紙 No.5A）しながら定量的に移した。これをロータリーエバポレーターで濃縮後、クロロホルムで一定容量としてルーメン液培養液の脂質抽出物とした。この脂質抽出物は、メチルエステル化用スクリューキャップ付試験管に定量的に移し、*9c, 11t* CLAおよび脂肪酸の分析に供した。

4. *9c, 11t* CLAおよび脂肪酸の定量

9c, 11t CLAおよび脂肪酸の定量は、上記第2章で検討し採用した方法を用いて行った。

5. ガスクロマトグラフィー/質量 (GC/MS) 分析による脂肪酸ピロリジン誘導体の分析

1) 試薬

i) ピロリジン: Pyrrolidine (Aldrich Chemical Company, Inc.社製) を用いた。

ii) 酢酸: 氷酢酸 (和光純薬工業社製 特級) を用いた。

iii) ジクロロメタン: ジクロロメタン (和光純薬工業社製 有機合成用) を用いた。

iv) 希塩酸：濃塩酸（和光純薬工業社製 精密分析用）を用いて 1 M 塩酸水溶液を調製して使用した。

v) 無水硫酸ナトリウム：硫酸ナトリウム無水物（和光純薬工業社製 精密分析用）を用いた。

2) ピロリジン誘導体の調製

脂肪酸メチルエステルのピロリジン誘導体の調製は、主として Andersson らの方法²⁾ に準じて行った。10 mg 量の脂肪酸メチルエステルをスクリーキャップ付試験管に取り、40℃のヒートブロック内で窒素ガスを通気しながら溶媒を除去した後、1.0 ml のピロリジンを加えて脂肪酸メチルエステルを溶解させ、0.1 ml の酢酸を加えた後、100℃のヒートブロック内で30分間反応させて脂肪酸ピロリジン誘導体を調製した。反応終了後、室温で放冷し、ジクロロメタン 3 ml を加え振盪した後、ジクロロメタン層を別のクリューキャップ付試験管に取り、この抽出操作を2回繰り返して、脂肪酸ピロリジン誘導体を抽出した。そのジクロロメタン層に希塩酸 3 ml を加えて振盪し、希塩酸層を除去した。この洗浄操作を2回繰り返した後、さらに蒸留水 3 ml を用いて洗浄操作を3回繰り返した。その後、無水硫酸ナトリウムを加え脱水乾燥し、濃縮後、ガスクロマトグラ

フイー/質量 (GC/MS) 分析用の試料とした。

3) ガスクロマトグラフィー/質量 (GC/MS) 分析

ルーメン液培養における α -リノレン酸の代謝脂肪酸として検出された不明代謝脂肪酸の同定は、次のようにガスクロマトグラフィー/質量 (GC/MS) 分析で行った。まず、ガスクロマトグラフ装置 GC17A (島津製作所製) を用い、第 2 章の 4 の 1) で使用した極性キャピラリーカラムを使用して、カラム初期保持温度 195°C で 8 分間保持し、その後 220°C まで毎分 2°C で昇温させ、一次保持温度 220°C で 25 分間保持した。その後、さらに 240°C まで毎分 20°C で昇温させ、最終温度 240°C で 90 分間保持することによる GC 分析を行い、脂肪酸ピロリジン誘導体の分離を行った。なお、他の分析条件については、第 2 章の 4 の 1) と同様に設定した。

続いて、ガスクロマトグラフ装置 GC17A (島津製作所製) を用い、非極性キャピラリーカラム (島津製作所 CBP1-M50-025 Fused silica capillary column 50 m, 0.22 mm I. D., 0.25 μ m film thickness) を使用して、カラム初期保持温度 50°C で 1 分間保持した後、100°C まで毎分 10°C で昇温させ、さらに 270°C まで毎分 5°C で昇温させた後、最終温度 270°C で 60 分間

保持した。注入部及び検出部の温度はそれぞれ250℃、270℃に設定し、それ以外の分析条件は上記極性キャピラリーカラムの使用時と同様に設定した。極性キャピラリーカラムで分離した不明代謝脂肪酸ピーク1、2および3のピロリジン誘導体のクロマトグラムの結果を基に、非極性キャピラリーカラムで分離した不明代謝脂肪酸ピーク1、2および3のピロリジン誘導体の保持時間を確認した後に質量分析に供した。

GC/MS分析は、ガスクロマトグラフ装置GC14A（島津製作所製）と質量分析装置QP-1000EX（島津製作所製）を用いた。ガスクロマトグラフィー分析では上記の非極性キャピラリーカラムを使用し、質量分析ではイオン化電圧を70eVに設定してGC/MS分析を行った。

結果と考察

1. ルーメン液培養における基質飼料並びに基質脂質の相違が9*c*, 11*t* CLA生成に及ぼす影響

ルーメン液培養に供試した圧ペントウモロコシおよびイタリアンライグラス乾草の培養中の主な脂肪酸含量の変化は、それぞれTable 17およびTable 18に示した。

Table 17. Changes in fatty acid contents of crashed corn lipids incubated with the rumen fluid culture¹⁾

Fatty acids	Incubation time (hr) at 38°C					
	0	0.25	0.5	1	2	3
18 : 0	1.32	1.37	1.36	1.47	1.75	1.85
18 : 1 (n-9)	1.78	1.77	1.77	1.71	1.69	1.64
18 : 1 (n-7)	0.27	0.32	0.33	0.39	0.49	0.60
<i>9c,11t</i> CLA	-	0.03	0.04	0.05	0.05	0.05
18 : 2 (n-6)	5.04	4.74	4.50	4.37	4.17	3.99
18 : 3 (n-3)	0.21	0.19	0.18	0.18	0.16	0.15
Total fatty acids	8.42	8.23	8.01	7.99	8.16	8.13

1) Fatty acid content was expressed as mg/10 mg of added total fatty acids.

Table 18. Changes in fatty acid contents of italian ryegrass hay lipids incubated with the rumen fluid culture¹⁾

Fatty acids	Incubation time (hr) at 38°C					
	0	0.25	0.5	1	2	3
18 : 0	1.49	1.47	1.49	1.52	1.58	1.91
18 : 1 (n-9)	0.41	0.39	0.39	0.39	0.42	0.48
18 : 1 (n-7)	0.19	0.22	0.30	0.47	0.89	1.16
<i>9c,11t</i> CLA	-	0.08	0.13	0.16	0.13	0.05
18 : 2 (n-6)	1.38	1.24	1.14	1.04	0.84	0.85
18 : 3 (n-3)	3.71	2.87	2.43	2.04	1.49	1.51
Total fatty acids	7.17	6.28	5.87	5.60	5.35	5.95

1) Fatty acid content was expressed as mg/10 mg of added total fatty acids.

圧ペントウモロコシ並びにイタリアンライグラス乾草の両者のリノール酸および α -リノレン酸の含量は培養時間の経過に伴って減少した (Fig. 13) が、特に培養1時間目におけるイタリアンライグラス乾草のリノール酸 (約25%) および α -リノレン酸 (約45%) の減少量は圧ペントウモロコシの両脂肪酸 (リノール酸: 約13%; α -リノレン酸: 約14%) に比較して顕著であった。他方、圧ペントウモロコシおよびイタリアンライグラス乾草の両者では、ルーメン液培養の結果、9c,11t CLAの生成が認められた。両飼料において、9c,11t CLA生成量は培養1時間目に最高値に達した。しかし、培養1時間目の9c,11t CLA生成量 (mg/10mg 総脂肪酸) には両者間に明白な相違が認められ、イタリアンライグラス乾草の9c,11t CLA生成量 (0.16 mg) は圧ペントウモロコシ (0.05 mg/10mg 総脂肪酸) の約3倍量に達した (Fig. 14)。またイタリアンライグラス乾草では9c,11t CLA量の培養2時間目以降の急激な減少に伴って、バクセン酸の急激な増加が認められた (Fig. 14)。さらに両飼料のステアリン酸含量は培養3時間目から6時間目にかけて増加した (Fig. 14) が、オレイン酸含量は培養6時間に亘ってその変化量が僅少であった (Table 17、Table 18)。今回の9c,11t

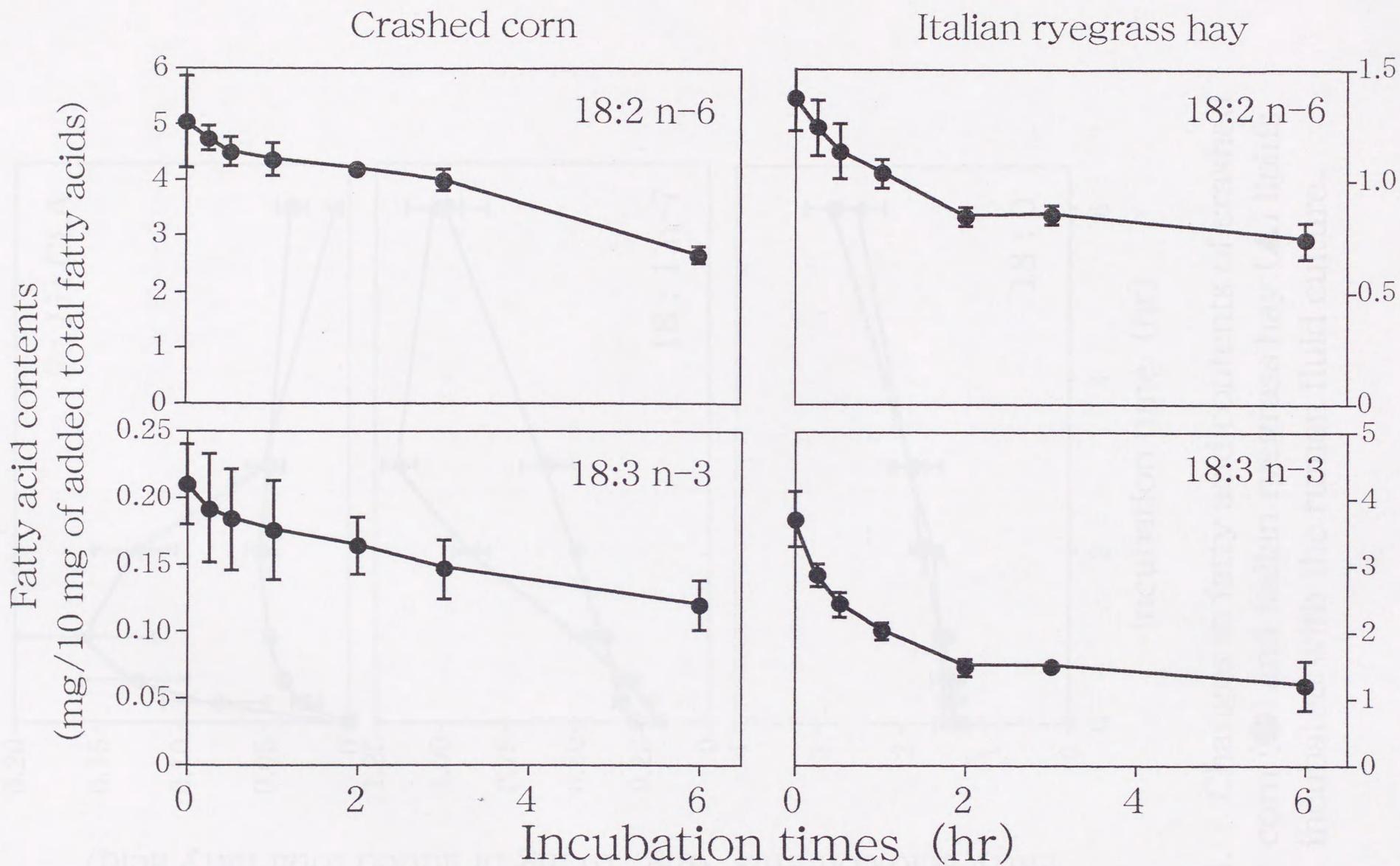


Fig.13. Changes in fatty acid contents of crashed corn and Italian ryegrass hay lipids incubated with the rumen fluid culture.

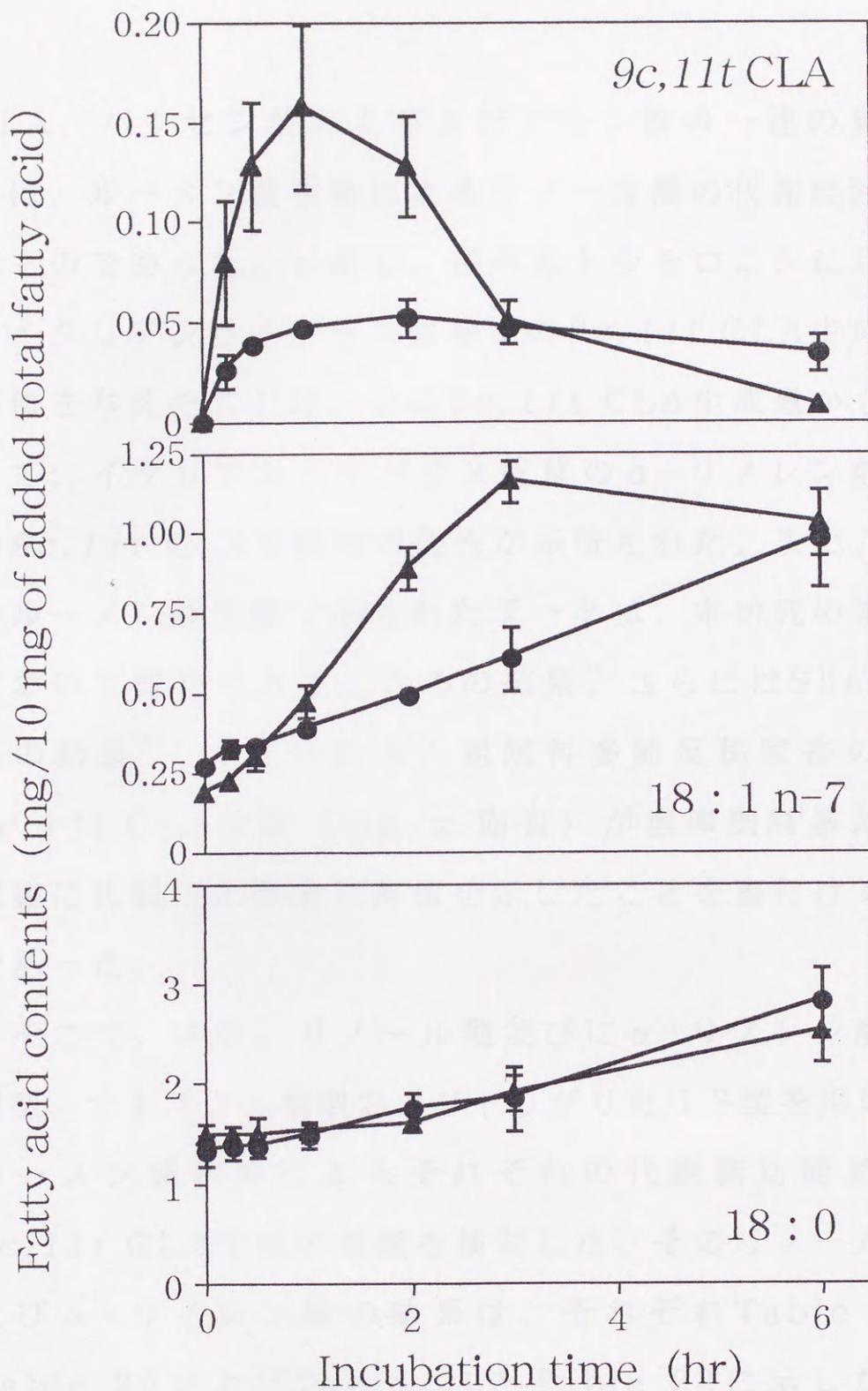


Fig.14. Changes in fatty acid contents of crashed corn (●) and italian ryegrass hay (▲) lipids incubated with the rumen fluid culture.

CLA、バクセン酸およびステアリン酸の一連の量的変化は、ルーメン微生物によるリノール酸の代謝経路を示すものであった。しかし、圧ペントウモロコシに比較してイタリアンライグラス乾草での9*c*,11*t* CLA生成量が高値を与えたことは、その9*c*,11*t* CLA生成量から推測して、イタリアンライグラス乾草の α -リノレン酸からの9*c*,11*t* CLA生成の可能性が示唆された。また、今回のルーメン液培養で得られたデータは、本研究の第3章において認められたところの結果、さらにはShanthaらの結果⁷⁵⁾、すなわち、粗飼料多給反芻家畜の肉の9*c*,11*t* CLA含量 (mg/g 脂質) が濃厚飼料多給反芻家畜に比較して有意に高値を示したことを裏付けるものであった。

そこで、次に、リノール酸並びに α -リノレン酸の遊離型、ナトリウム塩型およびトリグリセリド型を用いて、ルーメン液培養によるそれぞれの代謝脂肪酸並びに9*c*,11*t* CLA生成の有無を検討した。そのリノール酸および α -リノレン酸の結果は、それぞれTable 19とTable 20およびTable 21とTable 22に示した。なお、Table 19とTable 21はザーネン種去勢雄（約10才齢）のルーメン液を用いて得た結果を、またTable 20とTable 22はアルパイン種去勢雄（約2才齢）のルー

Table 19. Incubation of different types of linoleic acid with the rumen fluid culture¹⁾

Types of		Incubation time (hr)				
Linoleic acid	Fatty acid	0	0.5	1	2	3
Triglyceride	18 : 0	0.70	0.81	0.85	0.86	1.04
	18 : 1 (n-7)	0.07	0.10	0.11	0.15	0.21
	18 : 2 (n-6)	4.51	4.54	4.28	3.78	3.93
	<i>9c,11t</i> CLA	-	-	-	0.01	0.01
	<i>10t,12c</i> CLA	-	-	-	-	-
	<i>t-,t-</i> CLA ²⁾	-	0.01	0.02	0.02	0.02
Free acid	18 : 0	0.80	0.75	0.82	0.75	0.80
	18 : 1 (n-7)	0.08	0.13	0.24	0.33	0.50
	18 : 2 (n-6)	3.71	2.72	2.68	2.09	1.93
	<i>9c,11t</i> CLA	-	0.43	0.65	0.56	0.56
	<i>10t,12c</i> CLA	-	0.03	0.07	0.12	0.19
	<i>t-,t-</i> CLA	-	0.06	0.09	0.10	0.11
Sodium salt	18 : 0	0.63	0.76	0.78	0.79	0.75
	18 : 1 (n-7)	0.06	0.13	0.24	0.38	0.50
	18 : 2 (n-6)	3.30	2.30	1.85	1.19	0.74
	<i>9c,11t</i> CLA	-	0.64	1.09	1.41	1.40
	<i>10t,12c</i> CLA	-	0.11	0.20	0.28	0.30
	<i>t-,t-</i> CLA	-	0.07	0.17	0.19	0.21

1) Rumen fluid was obtained from goat (Saanen, castrated male, about 10 year - old).
Fatty acid contents were expressed as mg / tube.

2) *9t,11t* / *10t,12t* CLA

Table 20. Incubation of different types of linoleic acid with the rumen fluid culture¹⁾

Types of		Incubation time (hr)				
Linoleic acid	Fatty acid	0	0.5	1	2	3
Triglyceride	18 : 0	0.80	0.79	0.78	0.93	1.07
	18 : 1 (n-7)	0.06	0.06	0.08	0.10	0.11
	18 : 2 (n-6)	5.09	4.91	5.03	5.07	4.79
	<i>9c,11t</i> CLA	-	-	-	-	-
	<i>10t,12c</i> CLA	-	-	-	-	-
	<i>t-,t-</i> CLA ²⁾	-	0.08	0.08	0.08	0.08
Free acid	18 : 0	0.78	0.82	0.77	0.82	0.78
	18 : 1 (n-7)	0.06	0.09	0.10	0.14	0.17
	18 : 2 (n-6)	4.35	3.88	3.56	3.66	3.34
	<i>9c,11t</i> CLA	-	0.35	0.41	0.38	0.23
	<i>10t,12c</i> CLA	-	0.02	0.03	0.04	0.05
	<i>t-,t-</i> CLA	-	0.12	0.13	0.16	0.13
Sodium salt	18 : 0	0.80	0.77	0.77	0.81	0.79
	18 : 1 (n-7)	0.06	0.08	0.10	0.16	0.19
	18 : 2 (n-6)	4.44	3.82	3.65	3.66	3.27
	<i>9c,11t</i> CLA	-	0.09	0.09	0.13	0.10
	<i>10t,12c</i> CLA	-	0.03	0.04	0.08	0.08
	<i>t-,t-</i> CLA	-	0.09	0.10	0.12	0.11

1) Rumen fluid was obtained from goat (Alpine, castrated male, about 2 year - old).
Fatty acid contents were expressed as mg / tube.

2) *9t,11t* / *10t,12t* CLA

Table 21. Incubation of different types of α -linolenic acid with the rumen fluid culture¹⁾

Types of		Incubation time (hr)				
α -Linolenic acid	Fatty acid	0	0.5	1	2	3
Triglyceride	18 : 0	0.74	0.74	0.86	0.79	0.89
	18 : 1 (n-7)	0.08	0.08	0.10	0.10	0.14
	18 : 3 (n-3)	4.44	4.30	4.36	3.51	3.31
	Unknown 1	-	0.03	0.05	0.06	0.08
	Unknown 2	-	0.01	0.01	0.01	0.02
	Unknown 3	-	-	-	-	-
Free acid	18 : 0	0.62	0.69	0.84	0.84	0.83
	18 : 1 (n-7)	0.06	0.08	0.09	0.09	0.09
	18 : 3 (n-3)	2.84	1.52	1.31	1.13	0.92
	Unknown 1	-	0.09	0.15	0.25	0.38
	Unknown 2	-	1.08	1.54	1.49	1.40
	Unknown 3	-	0.04	0.06	0.08	0.10
Sodium salt	18 : 0	0.62	0.76	0.80	0.76	0.81
	18 : 1 (n-7)	0.06	0.08	0.08	0.08	0.09
	18 : 3 (n-3)	2.85	1.08	0.56	0.22	0.12
	Unknown 1	-	0.07	0.12	0.20	0.36
	Unknown 2	-	1.70	2.23	2.27	2.24
	Unknown 3	-	0.05	0.09	0.11	0.13

1) Rumen fluid was obtained from goat (Saanen, castrated male, about 10 year - old). Fatty acid contents were expressed as mg / tube.

Unknown 1, 2 and 3 stand for Unknown peaks 1, 2 and 3 respectively.

Table 22. Incubation of different types of α -linolenic acid with the rumen fluid culture¹⁾

Types of		Incubation time (hr)				
α -Linolenic acid	Fatty acid	0	0.5	1	2	3
Triglyceride	18 : 0	0.81	0.77	0.77	0.83	0.91
	18 : 1 (n-7)	0.06	0.06	0.06	0.07	0.07
	18 : 3 (n-3)	4.88	4.79	4.70	4.69	4.31
	Unknown 1	-	0.03	0.03	0.04	0.04
	Unknown 2	-	0.08	0.08	0.08	0.08
	Unknown 3	-	-	-	-	-
Free acid	18 : 0	0.80	0.76	0.75	0.79	0.78
	18 : 1 (n-7)	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06
	18 : 3 (n-3)	4.22	2.64	2.25	2.22	2.02
	Unknown 1	-	0.07	0.10	0.14	0.15
	Unknown 2	-	0.89	1.04	1.09	1.01
	Unknown 3	-	0.03	0.05	0.07	0.10
Sodium salt	18 : 0	0.80	0.77	0.77	0.78	0.84
	18 : 1 (n-7)	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06
	18 : 3 (n-3)	4.18	2.11	1.67	1.51	1.39
	Unknown 1	-	0.09	0.11	0.15	0.21
	Unknown 2	-	1.42	1.68	1.59	1.54
	Unknown 3	-	0.06	0.07	0.11	0.15

1) Rumen fluid was obtained from goat (Alpine, castrated male, about 2 year - old).

Fatty acid contents were expressed as mg / tube.

Unknown 1, 2 and 3 stand for Unknown peaks 1, 2 and 3 respectively.

メン液を用いて得た結果を示した。今回のルーメン液培養条件下において、トリグリセリド型のリノール酸からの *9c, 11t* CLA生成は培養2~3時間後に痕跡程度に確認できた (Table 19)。遊離型およびナトリウム塩型のリノール酸からは培養30分目で *9c, 11t* CLAの生成を認め、その後培養1~2時間目まで *9c, 11t* CLAの生成量は増加し、特にナトリウム塩型からの生成量が高値を示した (Table 19)。また、ヤギ個体系統および年齢の相違がルーメン内微生物によるリノール酸代謝能に大きく影響し、そのことが反芻家畜由来食品の *9c, 11t* CLA含量の大きな差として反映される可能性があることをTable 19とTable 20の結果は示した。Stantonら⁷⁸⁾は乳牛の泌乳期の相違が *9c, 11t* CLA含量に影響し、7泌乳期超の乳牛の牛乳中 *9c, 11t* CLA含量は若齢乳牛からの牛乳に比較して高値を与えることを、またMoralesら⁵⁹⁾は乳牛の品種・系統が乳牛中の *9c, 11t* CLA含量の相違に影響することを認めている。 α -リノレン酸では、いずれの形態の α -リノレン酸からも *9c, 11t* CLAの生成を認めることができなかった (Table 21, Table 22)。またリノール酸の場合と同様に、老齢ヤギ (Table 21) のルーメン液は若齢ヤギ (Table 22) に比較して α -リノレン酸代謝活性が

高かった。 α -リノレン酸のナトリウム塩型は遊離型に比較して速やかに代謝される傾向にあったが、実験した培養時間の範囲内でのトリグリセリド型の代謝は僅少であった (Table 21、Table 22)。種々の形態のリノール酸並びに α -リノレン酸のルーメン液培養の結果から、ルーメン内微生物が脂質構成脂肪酸を利用するためには、まずエステル型脂肪酸を遊離型脂肪酸に変換するためのリパーゼの働きが前提であることを明白に示している。

ところで、上述したようにリノール酸からは *9c,11t* CLAの生成などが確認された (Fig. 15a,b) が、 α -リノレン酸からはCLAとは異なる他の不明代謝脂肪酸ピーク (Unknown 1,2,3) が検出された (Table 21、Table 22、Fig. 15c,d)。これらのルーメン内微生物によって α -リノレン酸から代謝された不明代謝脂肪酸ピーク1、2および3は、後述するように、それぞれ *9t,15c* Octadecadienoic acid、*9c,11t,15c* Octadecatrienoic acid および *9t,11t,15c* Octadecatrenoic acid (?) であるとGC/MS分析の解析で推定した。

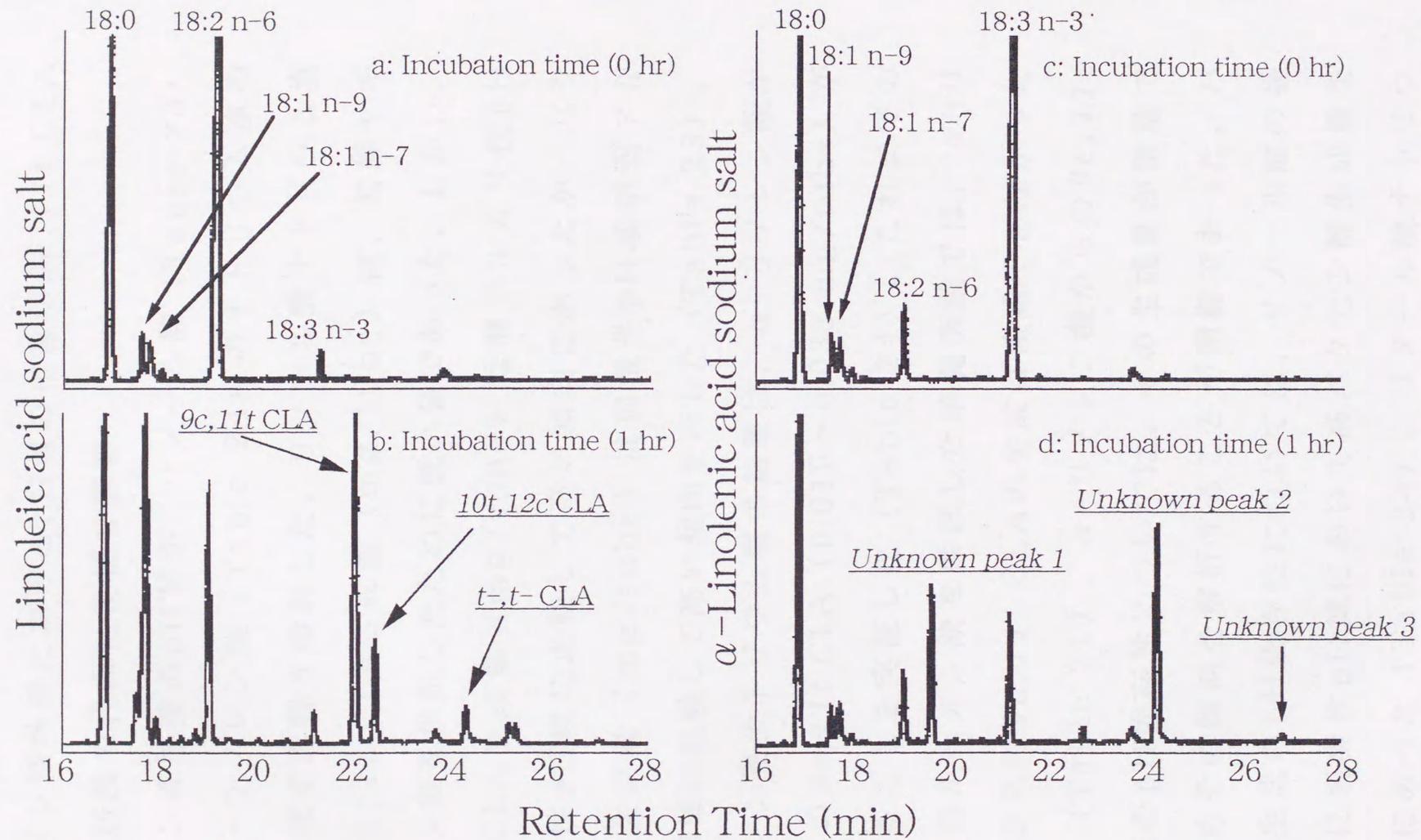


Fig. 15. Typical GC chromatograms of metabolized fatty acid methyl esters from sodium linoleate or α -linolenate incubated with the rumen fluid culture.

2. ルーメン液培養におけるpH値の相違が9*c*,11*t* CLA 前駆脂肪酸の代謝に及ぼす影響

ルーメン液培養のpH値が、リノール酸 (Table 23) および α -リノレン酸 (Table 24) のナトリウム塩の代謝に及ぼす影響を検討した。リノール酸ナトリウム塩からの9*c*,11*t* CLA生成量 (mg/tube) は、若齢ヤギのルーメン液を供試したために低い値であった。しかし、9*c*,11*t* CLA生成量 (mg/tube) は弱アルカリ性pH域が弱酸性pH域に比較して高い傾向にあったが、バクセン酸の生成量 (mg/tube) は弱酸性pH域が弱アルカリ性pH域に比較して高い傾向を示した (Table 23)。
 α -リノレン酸ナトリウム塩の結果は、 α -リノレン酸から極微量の9*c*,11*t* CLA (0.015~0.038 mg/tube) が生成されることを実証した (Table 24)。これまでの老齢ヤギのルーメン液を供試した培養実験では、 α -リノレン酸からの9*c*,11*t* CLAの生成は確認できなかったのである (Table 21)。 α -リノレン酸からの9*c*,11*t* CLA生成のpH依存性については、その生成量が微量であったためその傾向を解析することが困難であった。バクセン酸生成のpH依存性については、リノール酸の場合と同様に弱酸性pH域において高バクセン酸生成量を示す傾向にあった (Table 24)。リノール酸ナトリウ

Table 23. Effect of pH values of the rumen fluid culture on metabolism of sodium linoleate¹⁾

pH values	Fatty acids	Incubation time (hr)			
		0	1	2	3
6.0	18 : 0	1.01	1.09	1.03	1.03
	18 : 1 (n-7)	0.10	0.31	0.40	0.64
	18 : 2 (n-6)	3.68	3.16	2.80	2.13
	<i>9c,11t</i> CLA	-	0.03	0.03	0.02
	<i>10t,12c</i> CLA	-	0.25	0.40	0.54
	<i>t-,t-</i> CLA ²⁾	-	0.12	0.14	0.20
6.5	18 : 0	1.01	1.06	1.03	1.04
	18 : 1 (n-7)	0.10	0.25	0.41	0.55
	18 : 2 (n-6)	3.68	3.40	2.90	2.54
	<i>9c,11t</i> CLA	-	0.06	0.03	0.05
	<i>10t,12c</i> CLA	-	0.16	0.26	0.39
	<i>t-,t-</i> CLA	-	0.10	0.12	0.15
7.0	18 : 0	1.01	1.04	1.05	1.01
	18 : 1 (n-7)	0.10	0.28	0.38	0.47
	18 : 2 (n-6)	3.68	3.23	3.01	2.50
	<i>9c,11t</i> CLA	-	0.04	0.04	0.05
	<i>10t,12c</i> CLA	-	0.15	0.22	0.34
	<i>t-,t-</i> CLA	-	0.10	0.13	0.13
7.5	18 : 0	1.01	1.01	1.00	0.99
	18 : 1 (n-7)	0.10	0.16	0.22	0.31
	18 : 2 (n-6)	3.68	3.08	2.94	2.70
	<i>9c,11t</i> CLA	-	0.11	0.10	0.07
	<i>10t,12c</i> CLA	-	0.10	0.18	0.23
	<i>t-,t-</i> CLA	-	0.14	0.10	0.11
8.0	18 : 0	1.01	0.99	0.98	1.00
	18 : 1 (n-7)	0.10	0.11	0.14	0.18
	18 : 2 (n-6)	3.68	2.95	2.78	2.76
	<i>9c,11t</i> CLA	-	0.15	0.16	0.15
	<i>10t,12c</i> CLA	-	0.08	0.13	0.17
	<i>t-,t-</i> CLA	-	0.09	0.10	0.12

1) Fatty acid contents were expressed as mg/tube.

2) *9t,11t/10t,12t* CLA

Table 24. Effect of pH values of the rumen fluid culture on metabolism of sodium α -linolenate¹⁾

pH values	Fatty acids	Incubation time (hr)			
		0	1	2	3
6.0	18 : 0	1.01	1.07	0.86	1.05
	18 : 1 (n-7)	0.10	0.12	0.12	0.18
	18 : 3 (n-3)	3.94	0.85	1.59	0.96
	Unknown 1	-	0.36	0.54	0.92
	Unknown 2	-	2.43	1.45	1.35
	Unknown 3	-	0.06	0.06	0.10
	<i>9c,11t</i> CLA	-	0.023	0.022	0.025
6.5	18 : 0	1.01	1.05	1.06	1.03
	18 : 1 (n-7)	0.10	0.13	0.14	0.15
	18 : 3 (n-3)	3.94	0.86	0.27	0.23
	Unknown 1	-	0.47	0.55	0.62
	Unknown 2	-	2.07	2.42	2.18
	Unknown 3	-	0.05	0.10	0.11
	<i>9c,11t</i> CLA	-	0.024	0.038	0.037
7.0	18 : 0	1.01	1.01	1.04	1.03
	18 : 1 (n-7)	0.10	0.11	0.12	0.12
	18 : 3 (n-3)	3.94	0.66	0.20	0.18
	Unknown 1	-	0.31	0.38	0.45
	Unknown 2	-	2.28	2.51	2.40
	Unknown 3	-	0.05	0.09	0.10
	<i>9c,11t</i> CLA	-	0.019	0.035	0.024
7.5	18 : 0	1.01	1.03	0.95	0.98
	18 : 1 (n-7)	0.10	0.10	0.10	0.10
	18 : 3 (n-3)	3.94	0.25	0.22	0.28
	Unknown 1	-	0.17	0.28	0.33
	Unknown 2	-	2.96	2.54	2.35
	Unknown 3	-	0.06	0.08	0.10
	<i>9c,11t</i> CLA	-	0.024	0.030	0.020
8.0	18 : 0	1.01	1.00	0.99	0.99
	18 : 1 (n-7)	0.10	0.10	0.10	0.10
	18 : 3 (n-3)	3.94	0.19	0.28	0.46
	Unknown 1	-	0.10	0.21	0.16
	Unknown 2	-	2.99	2.30	2.57
	Unknown 3	-	0.05	0.07	0.12
	<i>9c,11t</i> CLA	-	0.027	0.027	0.015

1) Fatty acid contents were expressed as mg/tube.

Unknown 1, 2 and 3 stand for Unknown peaks 1, 2 and 3 respectively.

ム塩の結果は、弱アルカリ性pH域では異性化反応によってリノール酸から *9c, 11t* CLAの生成が進行するが、逆に、弱酸性pH域では飽和化反応によって生成された *9c, 11t* CLAからバクセン酸への反応が進行する可能性を示唆した。 α -リノレン酸ナトリウム塩においても、リノール酸ナトリウム塩と同様な傾向にあったと推測されるが、上述したように、 α -リノレン酸からの *9c, 11t* CLAの生成量が極微量であったためその傾向を解析することは困難であった。Viviani⁸⁵⁾ は、 α -リノレン酸のルーメン内微生物による代謝機構を提案した。それによれば、 α -リノレン酸からまず *cis* -, *trans* - conjugated, *cis*- nonconjugated Octadecatrienoic acidが生成され、この脂肪酸が飽和化されて *cis* -, *trans* - conjugated Octadecadienoic acidと *cis* -, *trans* - / *trans* -, *cis* - nonconjugated Octadecadienoic acidに変換される反応経路と、異性化されて *trans* -, *trans* - conjugated, *cis* - nonconjugated Octadecatrienoic acidに変換される反応経路が示唆された。他方、 α -リノレン酸はルーメン内微生物の異性化によって *9c, 11t, 15c* Octadecatrienoic acidとなり、水素添加反応による *11t, 15c* Octadecadienoic acidを経て *15t* /

15c Octadecenoic acid と 11t Octadecenoic acid に代謝され、11t Octadecenoic acid は水素添加反応によってステアリン酸となることが明らかにされている⁶⁹⁾。この報告では、ルーメン内微生物による α -リノレン酸からの9c,11t CLAの生成は否定的である。しかしながら、今回、 α -リノレン酸ナトリウム塩から9c,11t CLAの生成が確認されたことは、Viviani⁸⁵⁾が示唆した9c,11t CLAの生成機構を裏付け、またルーメン液中に α -リノレン酸から9c,11t CLAを生成する微生物が存在することを示唆した。また、この α -リノレン酸から9c,11t CLAが生成された事実は、牧草などの α -リノレン酸が豊富な粗飼料を多給した反芻家畜の枝肉の9c,11t CLA含量が高値を与えることを支持する結果でもある。今後、 α -リノレン酸からの9c,11t CLAの生成機構を確立するために、Viviani⁸⁵⁾が示唆した *cis* -, *trans* - conjugated, *cis* - nonconjugated Octadecatrienoic acid (Unknown 2: 9c,11t,15c Octadecatrienoic acid, Fig. 15d) から9c,11t CLAが生成される反応経路を検討することが肝要と考える。

3. α -リノレン酸の不明代謝脂肪酸の同定

Fig. 15において、 α -リノレン酸の不明代謝脂肪酸として検出されたピーク1、2および3のピロリジン誘導体についてそれぞれGC/MS分析を行った。その結果は、リノール酸ピロリジド (Fig. 16)、 α -リノレン酸ピロリジド (Fig. 17) および *9c, 11t* CLAピロリジド (Fig. 18) の結果を含めて Fig. 19~Fig. 21 に示した。

不明代謝脂肪酸ピーク1のピロリジン誘導体のMSスペクトラム (Fig. 19) は、 m/e 196, 210, 224, 236, 250, 264, 278, 290 (あるいは292), 304, 318並びに炭素数18個の二重結合2個の脂肪酸の特徴を示す333のフラグメントピークを示した。Anderssonの方法³⁾ に準じて解析した結果、不明代謝脂肪酸ピーク1は、 $\Delta 11, \Delta 15$ Octadecadienoic acidの脂肪酸であると推定された。

不明代謝脂肪酸ピーク2のピロリジン誘導体のMSスペクトラム (Fig. 20) は、 m/e 196, 206 (あるいは208), 220 (あるいは222), 234, 248, 262, 276, 288, 302, 316並びに炭素数18個の二重結合3個の脂肪酸の特徴を示す331のフラグメントピークを示した。そこで、Anderssonの方法³⁾ による解析では、

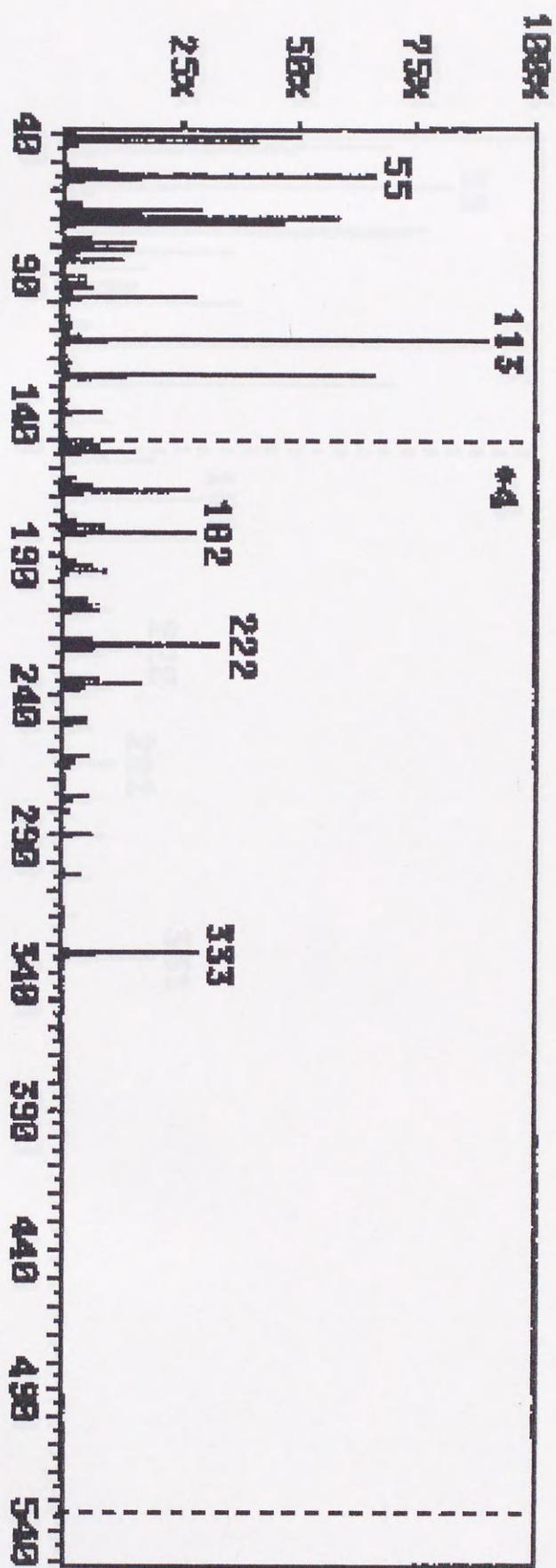


Fig. 16. Mass spectrum of the pyrrolidide derivative of linoleic acid.

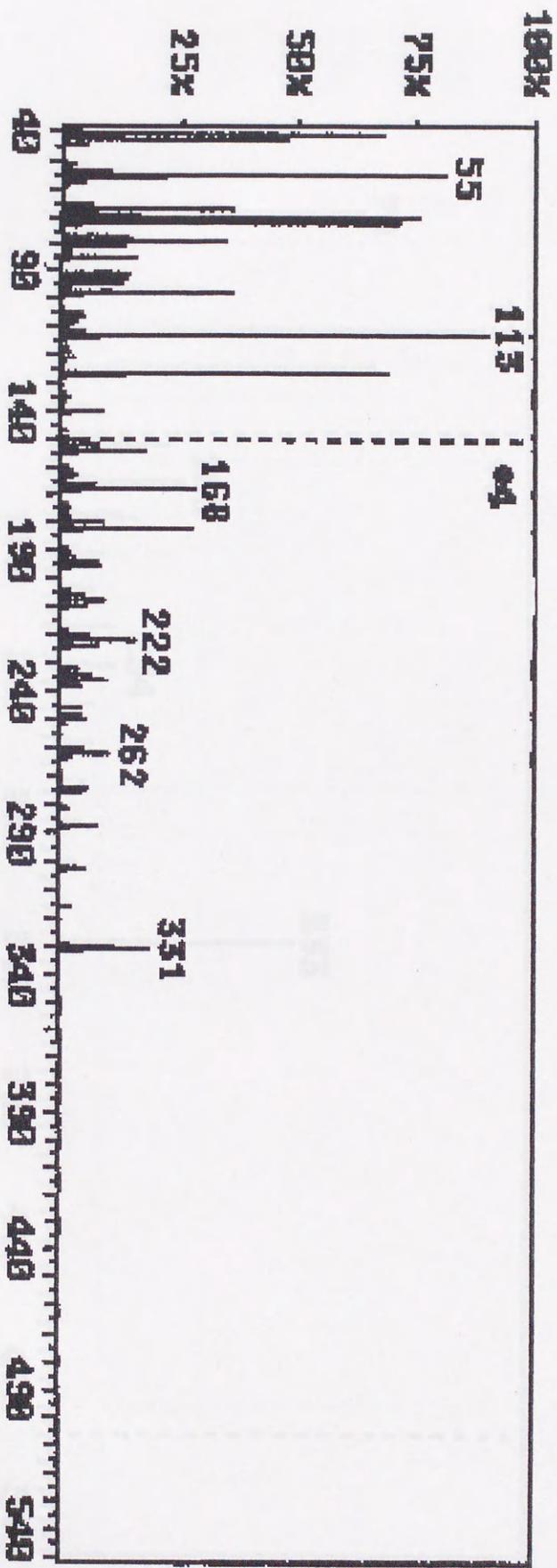


Fig. 17. Mass spectrum of the pyrrolidide derivative of α -linolenic acid.

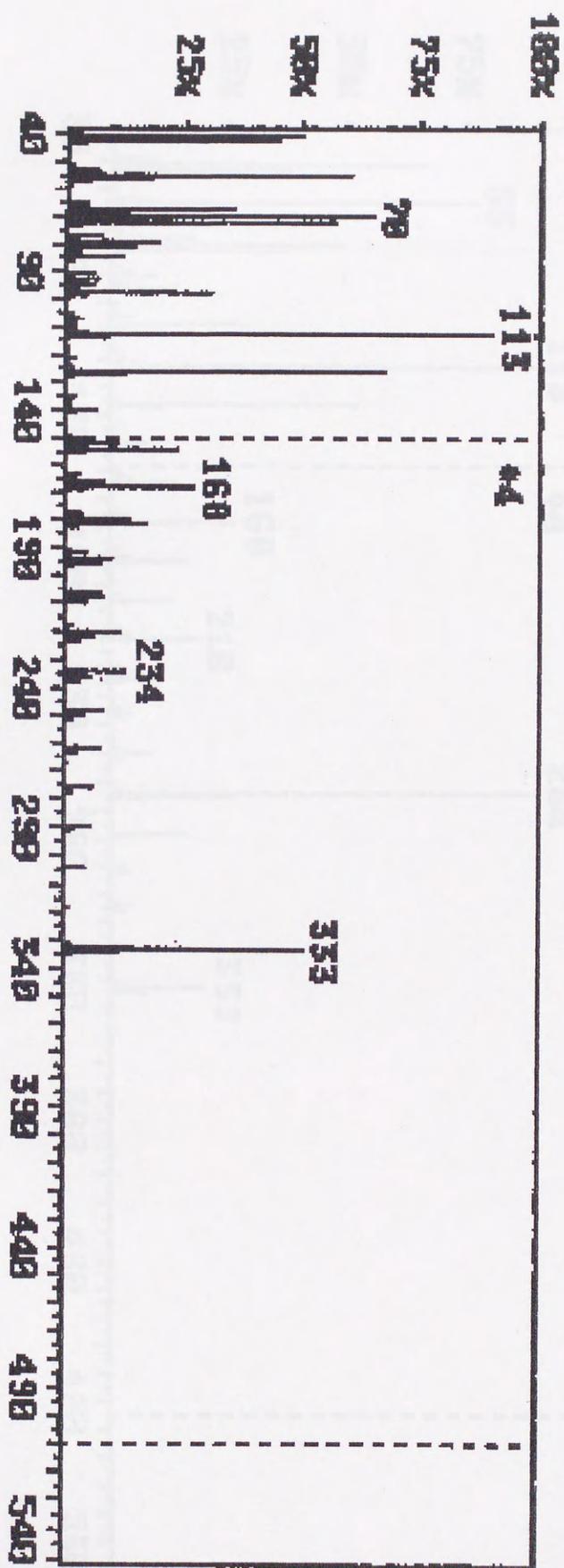


Fig. 18. Mass spectrum of the pyrrolidide derivative of 9c, 11t CIA.

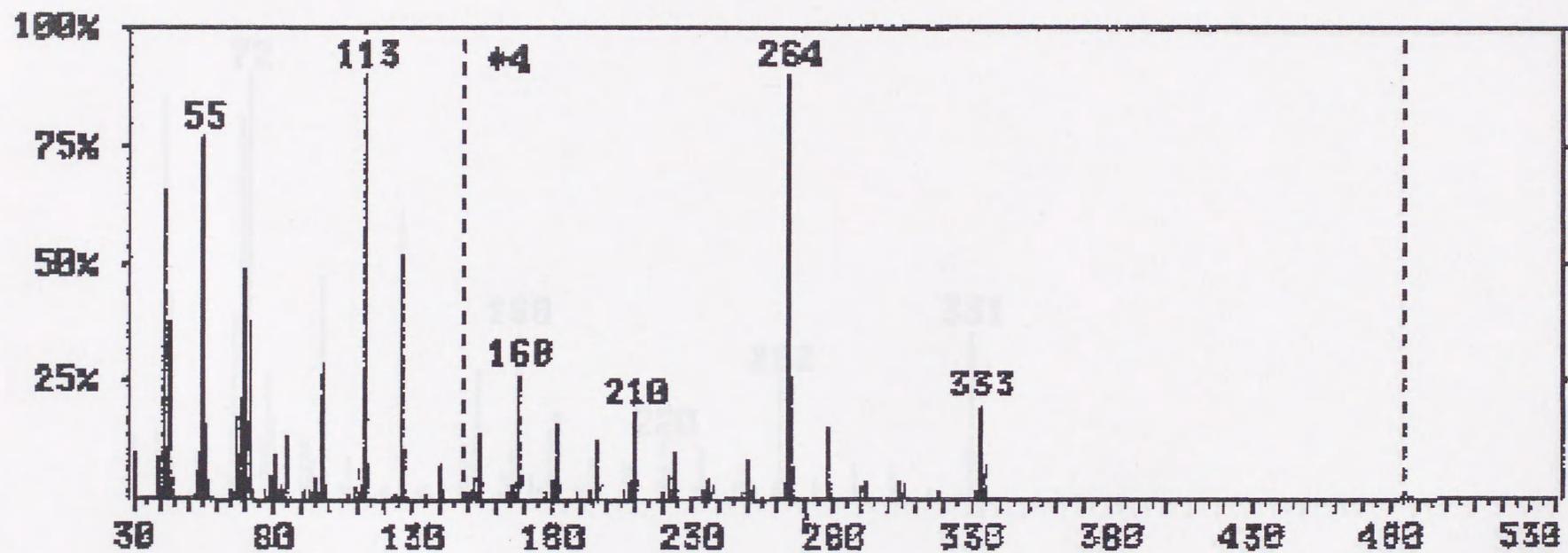


Fig. 19. Mass spectrum of the pyrrolidide derivative of unknown peak 1 produced by metabolism of sodium α -linolenate in the rumen fluid culture.

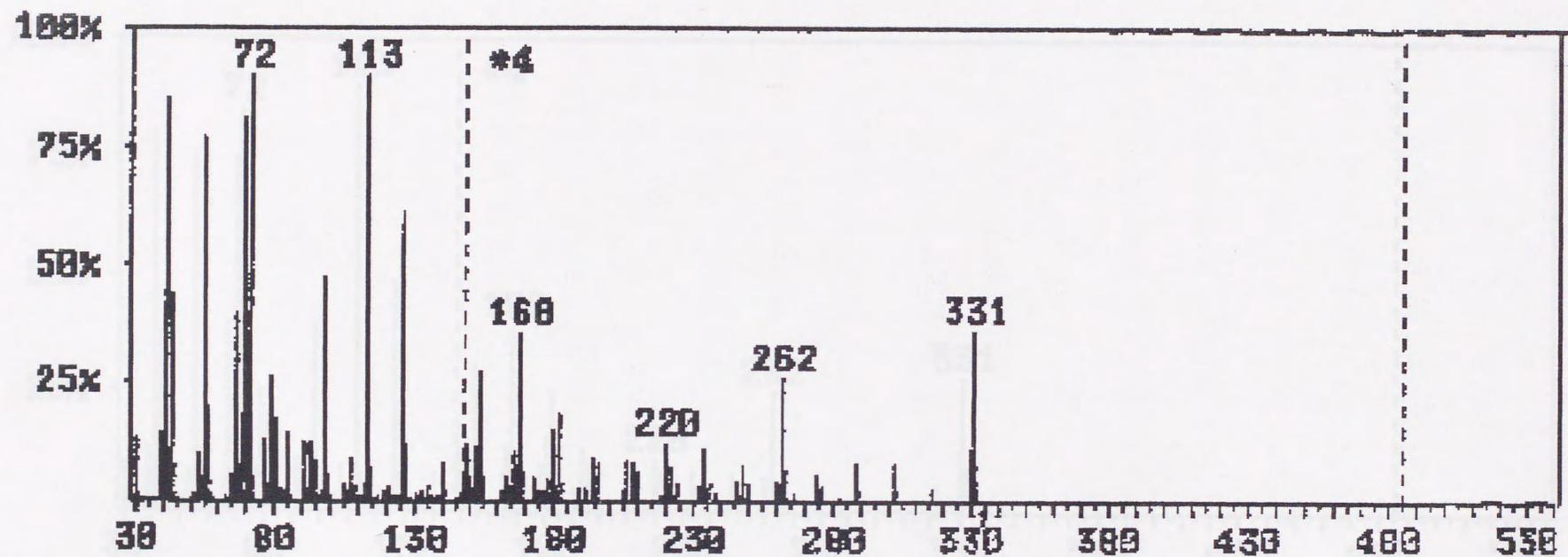


Fig. 20. Mass spectrum of the pyrrolidide derivative of unknown peak 2 produced by metabolism of sodium α -linolenate in the rumen fluid culture.

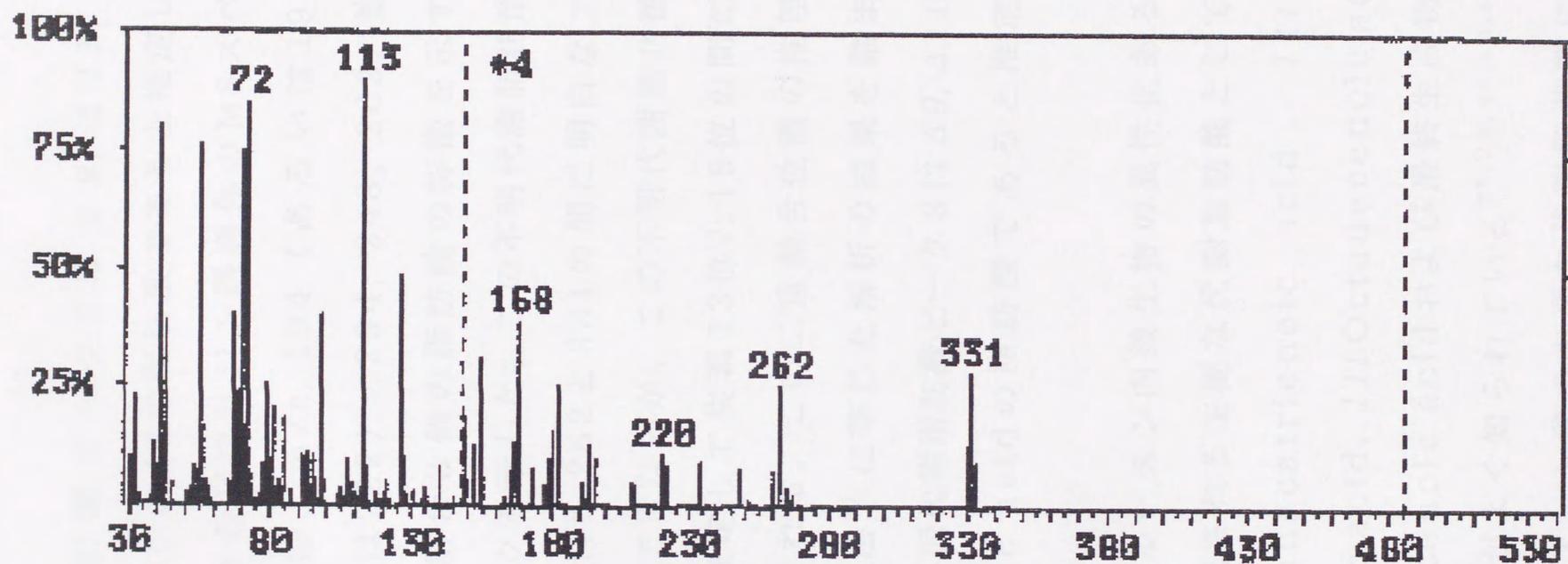


Fig. 21. Mass spectrum of the pyrrolidide derivative of unknown peak 3 produced by metabolism of sodium α -linolenate in the rumen fluid culture.

この不明代謝脂肪酸ピーク2は $\Delta 9, \Delta 11, \Delta 15$ Octadecatrienoic acidの脂肪酸であると推定した。次に、不明ピーク3のピロリジン誘導体のMSスペクトラム (Fig. 21) は、 m/e 194 (あるいは196), 209, 220 (あるいは222), 234, 248, 262, 並びに炭素数18個の二重結合3個の脂肪酸の特徴を示す331のフラグメントピークを示した。この不明代謝脂肪酸ピーク3については、 m/e 262と331の間に明白なフラグメントピークは確認できないが、この不明代謝脂肪酸ピーク3の分子量から推定して炭素13位と18位の間には二重結合の存在が推量される。この二重結合位置の推理結果をAnderssonの方法³⁾に準じた解析の結果を踏まえ解析した結果、この不明代謝脂肪酸ピーク3は $\Delta 9, \Delta 11, \Delta 15$ Octadecatrienoic acidの脂肪酸であると推定された。

α -リノレン酸がルーメン内微生物の異性化あるいは飽和化を受けて生成される主要な代謝脂肪酸としては、 $9c, 11t, 15c$ Octadecatrienoic acid、 $11t, 15c$ Octadecadienoic acid、 $11t$ Octadecenoic acid、 $15t/15c$ Octadecenoic acidおよび最終生成物としてのStearic acidがよく知られている^{27, 28, 44, 69, 85)}。これら文献の α -リノレン酸の主要な代謝脂肪酸に照ら

して、今回得られた不明代謝脂肪酸ピーク 1 および 2 はそれぞれの MS スペクトラムの解析結果から、*11t, 15c* Octadecadienoic acid および *9c, 11t, 15c* Octadecatrienoic acid であると推定された。なお、不明代謝脂肪酸ピーク 3 はその MS スペクトラムの解析結果から *9t, 11t, 15c* Octadecatrienoic acid (?) ではないかと推定されるが、これまでこの脂肪酸が α -リノレン酸の代謝脂肪酸として報告された文献は見当たらない。Kawaguchi ら⁴²⁾ は GC/MS 分析において高度不飽和脂肪酸の二重結合の位置を決定する方法として、二重結合部分に重水素を付加する方法を採用し、また Sehat ら⁷¹⁾ は共役リノール酸異性体の分離とその構造解析に銀イオン HPLC 分析法と GC/MS 分析法を併用している。今回、 α -リノレン酸がルーメン内微生物の異性化を受けて生成されたと推測される不明ピーク 3 の代謝脂肪酸の構造決定には、Kawaguchi ら⁴²⁾ および Sehat ら⁷¹⁾ の分析法を参考に、今後検討する必要がある。

要約

本章では、ルーメン内微生物による *9c, 11t* CLA の生

成機構とその要因を明らかにする目的で、ヤギのルーメン液を用いて、高リノール酸含有圧ペントウモロコシおよび高 α -リノレン酸含有イタリアンライグラス乾草並びに各種形態（遊離型、エステル型およびナトリウム塩型）のリノール酸および α -リノレン酸を培養し、*9c, 11t* CLAの生成の有無およびその生成に関与する2、3の要因並びに代謝脂肪酸について検討した。併せて、ルーメン液培養のpH値が*9c, 11t* CLAと代謝脂肪酸の生成に及ぼす影響を調べた。

1. 高 α -リノレン酸含有イタリアンライグラス乾草からの*9c, 11t* CLA生成量は高リノール酸含有圧ペントウモロコシに比較して高値を与え、 α -リノレン酸からの*9c, 11t* CLAの生成の可能性が示唆された。

2. *9c, 11t* CLAの生成はエステル型リノール酸を除く遊離型およびナトリウム塩型リノール酸で認められた。他方、 α -リノレン酸の場合、いずれの形態の α -リノレン酸からも*9c, 11t* CLAの生成は認められなかった。遊離型およびナトリウム型 α -リノレン酸からは3種類の不明代謝脂肪酸が検出され、GC/MS分析によってそれらが*9c, 11t, 15c* Octadecatrienoic acid、*11t, 15c* Octadecadienoic acid および *9t, 11t, 15c* Octadecatrienoic acid (?) であると推定された。

3. 若齢ヤギと老齢ヤギでは、それらから採取したルーメン液培養による *9c, 11t* CLA 生成量に大きな相違が認められ、反芻家畜の個体や年齢が *9c, 11t* CLA 生成量に有意に影響することを示唆した。

4. ルーメン液培養の pH 値は *9c, 11t* CLA およびバクセン酸などの代謝脂肪酸の生成に影響し、弱アルカリ pH 域では *9c, 11t* CLA の生成が、また弱酸性 pH 域ではバクセン酸の生成が高まる傾向にあった。

5. また、今回、若齢ヤギから採取したルーメン液に α -リノレン酸ナトリウム塩を培養して pH 値の影響を検討した結果は、 α -リノレン酸からの極微量の *9c, 11t* CLA の生成を初めて確認した。この事実は、高 α -リノレン酸含有牧草などの粗飼料を給餌した反芻家畜の組織中の *9c, 11t* CLA 含量を高める結果を裏付ける手掛かりを与えた。またこの結果は、 α -リノレン酸が *9c, 11t* CLA の前駆脂肪酸になることを初めて実証した。

第7章 総括

共役結合を有する不飽和脂肪酸が反芻家畜由来食品に存在していることは、よく知られていた。これら共役脂肪酸は、反芻家畜のルーメン内で起こる微生物の脂質代謝の生成物である。最近、共役リノール酸 (Conjugated linoleic acid : CLA)、特に *9cis,11trans* CLA (*9c,11t* CLA) によるラットなどの多くのモデル系での抗ガン活性が確認されて、CLAに対する関心が実質的に高まっている。その後、CLA (あるいは *9c,11t* CLA) は、また、動脈硬化症の抑制、免疫機能の強化、免疫刺激誘導性代謝作用の防御および体脂肪低減作用や筋肉増量作用を含む多くの生理作用を誘導することが報告されている。CLA異性体の中で、反芻家畜に主に含まれる *9c,11t* CLA異性体は反芻家畜由来製品の総CLAの90%を占めている。

上述したように、反芻家畜由来製品の脂質の *9c,11t* CLAの生理作用の多様性は、これまでその脂質性状に関連してヒトの健康に対してマイナス要因が指摘されていた反芻家畜の脂質性状に高付加価値を付与するのに役立つものである。

そこで本研究では、まず食肉の *9c,11t* CLAを直接定

量する方法を検討し、その確立した方法を用いて、反芻家畜の枝肉の *9c, 11t* CLA含量に及ぼす給餌飼料の影響、食肉の *9c, 11t* CLA含量に及ぼす冷蔵および脂質過酸化の影響、ルーメン液培養による飼料脂質、リノール酸および α -リノレン酸のルーメン微生物による代謝などについて種々検討を行った。

得られた結果の要点は、次のとおりである。

1. 食肉の *9c, 11t* CLA定量法の検討 (第2章)

食肉の *9c, 11t* CLA定量法を確立する目的で、一般に汎用されている5種類の脂肪酸メチルエステル調製法を用いて、*9c, 11t* CLAの異性化や分解並びに脂肪酸メチルエステルの収量の観点から、各脂肪酸メチルエステル調製法の比較検討を行った。

その結果、0.5 M KOH/MetOH / aqueous HCl/MetOH法の変法を用いた脂肪酸メチルエステル調製法と内部標準法によるキャピラリーカラムGC分析を組み合わせた方法によって、食肉に微量含有される *9c, 11t* CLAを簡便に直接定量できる再現性と精度が優れた方法を考案することができた。この考案した方法を用いて、各種食肉の *9c, 11t* CLA含量を測定し、反芻家畜由来食肉は非反芻家畜由来食肉に比較して有意に高く、

その含量は山羊肉 > 牛肉 \geq 羊肉 > 豚肉、鶏肉の順であった。特に山羊肉の *9c, 11t* CLA 含量は、豚肉および鶏肉の約 10 倍量であった。

2. 反芻家畜の食肉 *9c, 11t* CLA 含量に及ぼす給餌飼料の影響並びに各種組織および脂質画分の *9c, 11t* CLA 分布の相違 (第 3 章)

本章では、粗飼料多給あるいは濃厚飼料多給のウシ、ヒツジおよびヤギの筋肉と脂肪組織並びにヤギから採取した各種組織の *9c, 11t* CLA 含量を調査すると同時に、筋肉と肝臓の脂質画分における *9c, 11t* CLA 分布の局在性を検討した。

粗飼料多給家畜の筋肉および脂肪組織の *9c, 11t* CLA 含量は、濃厚飼料多給家畜に比較して高値を与えた。粗飼料多給家畜の結果は、*9c, 11t* CLA の前駆脂肪酸として α -リノレン酸が関与する可能性を示唆した。各種組織の *9c, 11t* CLA 含量 (mg/g lipid) は脂肪組織 > 筋肉 \geq 臓器の順序で、脂肪組織、特に皮下脂肪組織が最も高い含量を示した。*9c, 11t* CLA は筋肉組織ではトリグリセリド画分に高濃度局在したが、肝臓ではリン脂質画分に高濃度に局在する傾向にあった。

3. 食肉の *9c,11t* CLA 含量に及ぼす冷蔵および脂質過酸化の影響 (第4章)

本章では、*9c,11t* CLAの生成経路の一つとしてリノール酸の脂質過酸化の過程での*9c,11t* CLAの生成が推測されていることを踏まえて、食肉(牛肉、羊肉、山羊肉および豚肉)に脂質過酸化を促進する処理を施した後、冷蔵食肉のTBARS値(2-Thiobarbituric acid reactive substances value)で測定した脂質過酸化の進行に伴った*9c,11t* CLAの生成の可能性を検討した。

その結果、特に電子レンジでグリル加熱したりノール酸含有量が豊富な豚肉の場合、冷蔵中に脂質過酸化の進行(TBARS値の著増)とリノール酸含量の減少に伴って*9c,11t* CLAが僅かに増加した。また、冷蔵中の羊肉において、TBARS値の変化を伴わない*9c,11t* CLAの微増傾向が認められた。他方、冷蔵中の牛肉および山羊肉の両者のTBARS値は著増したが、*9c,11t* CLAの変化はなかった。しかしながら、今回の結果は、冷蔵あるいは脂質過酸化で生成される*9c,11t* CLAがごく微量であることを示した。本章の結果は、また、食肉中の*9c,11t* CLAが冷蔵、加熱および脂質過酸化に対して安定な脂肪酸であることを示した。

4. 肉製品および乳製品の *9c, 11t* CLA 含量について

(第5章)

本章では、肉製品および乳製品（チーズ製品）の *9c, 11t* CLA 含量を国内産と国外産並びに反芻家畜由来製品と非反芻家畜由来製品の間でそれぞれ比較検討すると同時に、*9c, 11t* CLA 含量とチーズの製造工程の相違との関連を調査し、さらに *9c, 11t* CLA と他脂肪酸との量的相関関係を通じて *9c, 11t* CLA の生成経路を推測した。

肉製品の *9c, 11t* CLA 含量は国内産と国外産との間に有意な差を認めなかったが、チーズ製品では国内産が国外産に比較して有意に低値を与えた。反芻家畜由来肉製品の *9c, 11t* CLA 含量は、非反芻家畜由来肉製品に比較して有意な高値を示した。なお、チーズの製造工程の相違と *9c, 11t* CLA 含量との間には有意な関係を認めなかった。また、反芻家畜由来製品では、*9c, 11t* CLA とリノール酸やバクセン酸との間に有意な量的相関関係を認めた。特にチーズ製品の場合、*9c, 11t* CLA と α -リノレン酸との間にも有意な相関関係を認め、このことは α -リノレン酸からの *9c, 11t* CLA の生成経路を示唆した。

5. *9c,11t* CLAの生成に関与する2,3の要因と生成機構の解明(第6章)

本章では、ルーメン内微生物による*9c,11t* CLAの生成に関与する要因と α -リノレン酸からの*9c,11t* CLAの生成機構を明らかにする目的で、ヤギのルーメン液を用いて、高リノール酸含有圧ペントウモロコシおよび高 α -リノレン酸含有イタリアンライグラス乾草並びに各種形態(遊離型、エステル型およびナトリウム塩型)のリノール酸および α -リノレン酸を培養した。また同時に、ルーメン液培養液のpH値がナトリウム塩型リノール酸および α -リノレン酸からの*9c,11t* CLA生成と代謝脂肪酸に及ぼす影響を検討した。

高 α -リノレン酸含有イタリアンライグラス乾草からの*9c,11t* CLA生成量は、高リノール酸含有圧ペントウモロコシに比較して高値を与えた。この結果は粗飼料多給の反芻家畜食肉における高*9c,11t* CLA含量を裏付けると同時に、 α -リノレン酸からの*9c,11t* CLA生成の可能性を示唆した。他方、遊離型およびナトリウム塩型のリノール酸からは*9c,11t* CLAが容易に生成されたが、 α -リノレン酸からの生成は認められなかった。 α -リノレン酸の中間代謝物として不明脂肪酸3成分を検出し、うち2成分はGC/MS分析で同定された。また、ルーメ

ン液培養液のpHはリノール酸代謝に影響し、弱アルカリpHでは9*c*, 11*t* CLAの生成が、また弱酸性pHではバクセン酸の生成が高まる傾向にあった。

さらに、ルーメン液培養液のpHが9*c*, 11*t* CLA生成に及ぼす影響を検討した実験において、若齢ヤギ（アルパイン種去勢雄：約2歳齢）から採取したルーメンではじめて9*c*, 11*t* CLAの生成が認められたが、老齢ヤギ（ザーネン種去勢雄：約10歳齢）のルーメン液では認められなかった。この事実は、ルーメンでの α -リノレン酸の微生物代謝を介した9*c*, 11*t* CLAの生成が、ルーメンの微生物叢の変化を通して、ルーメン液を採取したヤギの年齢、個体の相違によって影響されることを示唆した。さらに本章の結果は、ルーメンにおいて、リノール酸に加えて α -リノレン酸が9*c*, 11*t* CLAの潜在的な前駆脂肪酸として役立っていることをはじめて確認するものであった。

SUMMARY

It has been known for more than 50 years that fatty acids with conjugated double bonds are present at varying levels in dairy products and other foods derived from ruminant animals. These conjugated fatty acids are common, but usually minor products of microbial lipid metabolism, which occur in the rumen of cattle, sheep, goat and other ruminants. Interest in conjugated fatty acids has increased substantially in recent years, following the observation that conjugated linoleic acid (CLA), especially *9cis,11trans* CLA (*9c,11t* CLA), is anticarcinogenic in a number of rodent models. Since then, CLA / *9c,11t* CLA, has also been reported to induce a number of additional physiologic effects in a number of species, including the inhibition of atherosclerosis, enhancement of immunologic function, protection against the catabolic effects induced by immune stimulation, and nutrient repartitioning such that body fat is significantly reduced, whereas lean body mass is increased. Of the CLA isomers, *9c,11t* CLA isomer which is found primarily in ruminant animal amounts to as much as 90% of the total CLA contents of ruminant animal products.

As described just before, the diversity of the physiological effects of *9c,11t* CLA in the lipids from ruminant animal products may help to provide an added value on their lipid natures, since ruminant animal

products have so far suffered from a negative health image, related to the nature of their lipid fraction.

In the present work, a highly reliable method for determining *9c,11t* CLA in meat was developed first, and then applying this method, the effect of different feeds on the *9c,11t* CLA contents of meat and fat from ruminant animals, the effects of refrigerated storage and lipid peroxidation on the amounts of *9c,11t* CLA in meats, the metabolism of feed lipids, linoleic and α -linolenic acids in the rumen fluid culture and a potential precursor fatty acid of *9c,11t* CLA in the rumen and so forth were investigated.

The results obtained are summarized as follows:

1. The five most widely accepted procedures for preparing fatty acid methyl esters in food lipids were investigated for their suitability in capillary gas chromatographic analysis of a *9c,11t* CLA in meat. A modified procedure of fatty acid methyl esterification was developed and the method was applied to determine *9c,11t* CLA contents in some meats. This method involved hydrolysis of lipids with 0.5 M KOH in methanol at 100 °C for 5 min, followed by esterification with aqueous HCl (35%) / methanol (1:1, v/v) at 100 °C for 5 min. The resulting *9c,11t* CLA methyl ester was separated by gas-liquid chromatograph equipped with a capillary column and determined using tricosanoic acid ($C_{23:0}$) as an

internal standard. Meat from ruminant animals considerably contained more *9c,11t* CLA than those from nonruminant animals, with their contents being in the increasing order of goat meat > beef \cong mutton > pork, chicken. The amount in goat meat was 10 - fold greater than those in pork and chicken.

2. Effect of different feeds on the *9c,11t* CLA contents of meat and fat from ruminant animals, and the differences in the *9c,11t* CLA contents of various tissues and the distribution of *9c,11t* CLA in lipid fractions of muscle and liver lipids from goats were investigated. The *9c,11t* CLA contents of meat and fat from ruminant animals (cattle, sheep and goat) fed a relatively high roughage ration were significantly higher than those from ruminants fed a relatively high concentrate ration. In addition, the results suggested that α - linolenic acid in roughage lipids may be involved in the formation of *9c,11t* CLA. The *9c,11t* CLA contents of various tissues from goats were in the increasing order of depot fats > muscle \cong internal organs, with the contents being highest in the subcutaneous fat. The distributions of *9c,11t* CLA in lipid fractions of muscle and liver lipids were different from each other, with the *9c,11t* CLA in muscle lipids being concentrated in triglycerides fraction but that in liver lipids tended to be slightly higher in phospholipids fraction than triglycerides fraction.

3. Effects of refrigerated storage and lipid peroxidation on the amount of *9c,11t* CLA in meat were evaluated. Meats (beef, mutton, goat meat and pork) were treated without or with ferrous iron and/or salting (2 % NaCl + 0.01 % sodium ascorbate), unheated / heated or ungrilled / grilled, and then refrigerated. The degree of lipid peroxidation in meat samples was determined by 2-Thiobarbituric acid reactive substances value (TBARS value). For pork high rich in linoleic acid, especially for the grilled ground pork, the *9c,11t* CLA tended to increase slightly during refrigerated storage, accompanied by the remarkably increased TBARS value and the decreased linoleic acid. In the case of unheated ground mutton without salting, the amount of *9c,11t* CLA increased slightly during refrigerated storage, while it showed no change in the TBARS value. On the other hand, the respective TBARS values of beef and goat meat increased remarkably during refrigerated storage, but their *9c,11t* CLA contents remained unchanged. However, the results obtained in the present study showed that the *9c,11t* CLA formed during refrigerated storage and / or lipid peroxidation may be in fairly small amounts. In addition, the results demonstrate that the *9c,11t* CLA in meats and meat products may be highly stable against refrigerated storage, heat treatment and lipid peroxidation.

4. The *9c,11t* CLA contents of commercially available meat products and cheeses were determined using our developed method for measuring *9c,11t* CLA in order to obtain basic data about the *9c,11t* CLA contents of animal products. The *9c,11t* CLA contents of domestic and imported meat products and cheeses and of ruminant and nonruminant meat products were compared. The mean *9c,11t* CLA contents of the domestic meat products was not significantly different from that of the imported meat products. The *9c,11t* CLA contents of meat products in which meat from ruminant animals was formulated as raw material were clearly higher than those of meat products from nonruminant animals. The imported cheeses products had a higher *9c,11t* CLA contents than the domestic products. The *9c,11t* CLA concentrations (mg / g lipid) of cheeses high in lipid content appeared to be relatively higher compared to those low in lipid content. Quantitative relationship between *9c,11t* CLA and other fatty acids in animal products originating from ruminant animals showed a negative correlation between *9c,11t* CLA and linoleic acid and a positive correlation between *9c,11t* CLA and vaccenic acid. The results of this study are presumed that the large variations in *9c,11t* CLA contents of ruminant animal products may depend primarily on the materials from which they originate.

5. In order to elucidate some factors responsible for the production of

9c,11t CLA in the rumen and a potential precursor fatty acid of *9c,11t* CLA, crashed corn high in linoleic acid and Italian ryegrass hay high in α - linolenic acid as well as different types (free acid, sodium salt and triglyceride) of linoleic and α - linolenic acids were incubated with the rumen fluid culture from goats. The yield of *9c,11t* CLA from the Italian ryegrass hay was significantly higher than that from the crashed corn. On the other hand, linoleic acids (free acid and sodium salt) were easily metabolized in the rumen fluid culture to produce *9c,11t* CLA, but α - linolenic acid did not produce *9c,11t* CLA. Three unknown fatty acids were detected as intermediate metabolites of α - linolenic acids and two of them were identified by using GC / MS analysis. The pH value of the rumen fluid culture also influenced the metabolism of linoleic acid with the *9c,11t* CLA and vaccenic acid increasing at an alkaline pH and at an acidic pH, respectively. Additionally, in the experiment of evaluating the effect of the rumen fluid culture pH value on the *9c,11t* CLA production, the formation of *9c,11t* CLA from α - linolenic acid was first observed in the rumen fluid obtained from a young goat (Alpine, castrated male, about 2 year - old) but none was found in that from an old - aged goat (Saanen, castrated male, about 10 year - old). This finding suggests that the production of *9c,11t* CLA via the microbial metabolism of α - linolenic acid in the rumen may be affected by the differences in age and / or individual of goats, from which the rumen fluid originated,

accompanying the changes in the microflora of rumen. Additionally, the results obtained in the present study confirm for the first time that in addition to linoleic acid, α - linolenic acid may serve as a potential precursor of *9c,11t* CLA in the rumen.

謝 辞

本研究の遂行にあたり、終始懇切丁寧なる御指導・御鞭撻を賜り、さらにご高閲の労をお取りいただきました宮崎大学農学部食品機能化学講座の山内 清教授に対し、心より感謝の意を表します。

本研究を行う間、数々の御指導と御高閲の労をお取りいただきました宮崎大学農学部川村 修教授および福田 亘博教授、琉球大学農学部本郷富士彌教授並びに鹿児島大学農学部青木孝良教授に深く御礼申し上げます。

本研究の遂行および論文の作成にあたり、適切なお助言とご激励をいただきました宮崎大学農学部村田 寿教授、六車 三治男教授並びに河原 聡先生に心から感謝申し上げます。

GC/MS分析に際し、有益な御助言と分析に御協力いただきました琉球大学農学部屋 宏典先生に深く感謝申し上げます。

さらに、直接ご協力・ご支援いただいた宮崎大学農学部食品機能化学講座（畜産資源利用化学研究室）専攻学生の皆様に厚く御礼申し上げます。

最後に、私に対して研究の機会を与え、精神的・経済的支柱となって支援していただいた両親に感謝致します。

参 考 文 献

- 1) Ackman, R. G. Has evolution and long - term coexistence adapted us to cope with *trans* fatty acids ?. *J. Food Lipids*, 4: 295~318 (1997).
- 2) Andersson, B. A. and Holman, R. T. Pyrrolidides for mass spectrometric determination of the position of the double bond in monounsaturated fatty acids. *Lipids*, 9: 185~190 (1974).
- 3) Andersson, B. A. Mass spectrometry of fatty acid pyrrolidides. *Prog. Chem. Fats other Lipids*, 16: 279~308 (1978).
- 4) AOCS. Official Methods. AOCS Ce 2-66, American Oil Chemists' Society. Champaign, IL. 1973.
- 5) Banni, S., Angioni, E., Contini, M. S., Carta, G., Casu, V., Lengo, G. A., Melis, M. P., Deiana, G., Dessi, M. A. and Corongiu, F. P. Conjugated linoleic acid and oxidative stress. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 75: 261~267 (1998).
- 6) Bligh, E. G. and Dyer, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37: 911~917 (1959).
- 7) Britton, M., Fong, C., Wickens, D. and Yudkin, J. Diet as a source of phospholipid esterified 9,11-octadecadienoic acid in humans. *Clin. Sci.*, 83: 97~101 (1992).
- 8) Carroll, K. K. and Hopkins, G. J. Dietary polyunsaturated fat versus saturated fat in relation to mammary carcinogenesis. *Lipids*, 14:

155~158 (1979).

- 9) Cawood, P., Wickens, D. G., Iversen, S. A., Braganza, J. M. and Dormandy, T. L. The nature of diene conjugation in human serum, bile and duodenal juice. *FEBS Lett.*, 162: 239~243 (1983).
- 10) Chin, S. F., Liu, W., Storkson, J. M., Ha, Y. L. and Pariza, M. W. Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. *J. Food Comp. Anal.*, 5: 185~197 (1992).
- 11) Chin, S. F., Storkson, J. M., Liu, W., Albright, K. J. and Pariza, M. W. Conjugated linoleic acid (9, 11- and 10, 12- octadecadienoic acid) is produced in conventional but not germ-free rats fed linoleic acid. *J. Nutr.*, 124: 694~701 (1994).
- 12) Chin, S. F., Storkson, J. M., Albright, K. J., Cook, M. E. and Pariza, M. W. Conjugated linoleic acid is a growth factor for rats as shown by enhanced weight gain and improved feed efficiency. *J. Nutr.*, 124: 2344~2349 (1994).
- 13) Cristie, W. W. *Lipid Analysis (Second Edition)*. Pergamon Press, Oxford, England, 1982.
- 14) Dhiman, T. R., Helmink, E. D., McMahon, D. J., Fife, R. L. and Pariza, M. W. Conjugated linoleic acid content of milk and cheese from cows fed extruded oilseeds. *J. Dairy Sci.*, 82: 412~419 (1999).
- 15) Dormandy, T. L. and Wickens, D. G. The experimental and clinical

- pathology of diene conjugation. *Chem. Phys. Lipids*, 45: 353~364 (1987).
- 16) Doyle, E. Scientific forum explores CLA knowledge. *INFORM*, 9: 69~72 (1998).
- 17) Dugan, M. E. R., Alhus, J. L., Schaefer, A. L. and Kramer, J. K. G. The effect of conjugated linoleic acid on fat to lean repartitioning and feed conversion in pigs. *Can. J. Sci.*, 77: 723~725 (1997).
- 18) Enser, M., Scollan, N. D., Choi, N. J., Kurt, E., Hallett, K. and Wood, J. D. Conjugated linoleic acid in muscle from steers fed different lipids. *Proc. 45th Int. Congr. Meat Sci. Technol.* Vol. 2: 652~653 (1999).
- 19) Folch, J., Lees, M. and Sloane Stanley, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226: 497~509 (1957).
- 20) Forgerty, A. C., Ford, G. L. and Svoronos, D. Octadeca -9, 11-dienoic acid in food stuffs and in the lipids of human blood and breast milk. *Nutr. Rep. Int.*, 38: 937~944 (1988).
- 21) Fritsche, J. and Steinhart, H. Amount of conjugated linoleic acid (CLA) in german foods and evaluation of dairy intake. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 206: 77~82 (1998).
- 22) Fujimoto, K., Kimoto, H., Shishikura, M., Endo, Y. and Ogimoto, K. Biohydrogenation of linoleic acid by anaerobic bacteria isorated from

- rumen. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57: 1026~1027 (1993).
- 23) Garcia-Lopes, S., Echeverria, E., Tsui, I. and Balch, B. Changes in the content of conjugated linoleic acid (CLA) in processed cheese during processing. *Food Res. Int.*, 27: 61~64 (1994).
- 24) Ha, Y. L., Grimm, N. K. and Pariza, M. W. Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis*, 8: 1881~1887 (1987).
- 25) Ha, Y. L., Grimm, N. K. and Pariza, M. W. Newly recognized anti-carcinogenic fatty acids: identification and quantification in natural and processed cheeses. *J. Agric. Food Chem.*, 37: 75~81 (1989).
- 26) Ha, Y. L., Storkson, J. M. and Pariza, M. W. Inhibition of benzo (a) pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid. *Cancer Res.*, 50: 1097~1101 (1990).
- 27) Harfoot, C. G. Lipid metabolism in the rumen. In *Lipid Metabolism in Ruminant Animals*, Christie, W.W.(Ed.), pp.21~55, Pergamon Press, Oxford, England, 1981.
- 28) Harfoot, C. G. and Hazlewood, G. P. Lipid metabolism in the rumen. In *The Rumen Microbial Ecosystem*, Hobson, P.N. (Ed.), pp.285~322, Elsevier Applied Science, London, 1988.
- 29) Hayek, M. G., Han, S. N., Wu, D., Watkins, B. A., Meydani, M., Dorsey, J. L., Smith, D. E. and Meydani, S. N. Dietary conjugated

- linoleic acid influences the immune response of young and old C57BL/6NCr1BR mice. *J. Nutr.*, 129: 32~38 (1998).
- 30) Herbel, B. K., McGuire, M. K., McGuire, M. A. and Shultz, T. Z. Safflower oil consumption does not increase plasma conjugated linoleic acid concentrations in humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, 67: 332~337 (1998).
- 31) Houseknect, K. L., Vanden Heuvel, J. P., Moya-Camerena, S. Y., Portocarrero, C. P., Peck, L. W., Nickel, K. P. and Belury, M. A. Dietary conjugated linoleic acid normalizes impaired glucose tolerance in the Zucker diabetic fatty acid *fa/fa* rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 244: 678~682 (1998).
- 32) Huang, Y. C., Luedecke, L. O. and Shultz, T. D. Effect of cheddar cheese consumption on plasma conjugated linoleic acid concentrations in men. *Nutr. Res.*, 14: 373~386 (1994).
- 33) Hughes, P. E., Hunter, W. J. and Tove, S. B. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids: purification and properties of cis-9, trans-11-octadecadienoate reductase. *J. Biol. Chem.*, 257: 3643~3649 (1982).
- 34) Igene, J. O., Yamauchi, K., Pearson, A. M., Gray, J. I. and Aust, S. D. Mechanisms by which nitrite inhibits the development of warmed-over flavour (WOF) in cured meat. *Food Chem.*, 18: 1~18 (1985).
- 35) Ip, C., Carter, C. A. and Ip, M. M. Requirement of essential fatty acid for mammary tumorigenesis in the rat. *Cancer Res.*, 45:

1997~2001 (1985).

- 36) Ip, C., Chin, S. F., Scimeca, J. A. and Pariza, M. W. Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivative of linoleic acid. *Cancer Res.*, 51: 6118~6124 (1991).
- 37) Iversen, S. A., Cawood, P., Madigan, M. J., Lawson, A. M. and Dormandy, T. L. Identification of a diene conjugated component of human lipid as octadeca -9,11-dienoic acid. *FEBS Lett.*, 171: 320~324 (1984).
- 38) Jham, G. N., Teles, F. F. F. and Campos, L. G. Use of aqueous HCl / methanol as esterification reagent for analysis of fatty acids derived from soybean lipids. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 59: 132~133 (1982).
- 39) Jiang, J., Bjoerck, L., Fonden, R. and Emanuelson, M. Occurrence of *cis*9, *trans*11- octadecadienoic acid in bovine milk: effects of feed and dietary regimen. *J. Dairy Sci.*, 79: 438~445 (1996).
- 40) Jiang, J., Bjorck, L. and Fonden, R. Production of conjugated linoleic acid by dairy starter cultures. *J. Appl. Microbiol.*, 85: 95~102 (1998).
- 41) 梶本五郎. 食用油脂の栄養に関する最近の話題. *日本油化学会誌*, 8: 476~485 (1981).
- 42) Kawaguchi, A., Kobayashi, Y., Ogawa, Y. and Okuda, S. Determination of double bond positions in polyunsaturated fatty acids by mass spectrometry. *Chem. Pharm. Bull.*, 31: 3228~3232 (1983).
- 43) Kelly, M. L., Berry, J. R., Dwyer, D. A., Griinari, J. M.,

- Chouinard, P. Y., Amburgh, M. E. V. and Bauman, D. E. Dietary fatty acid sources affect conjugated linoleic acid concentrations in milk from lactating dairy cows. *J. Nutr.*, 128: 881~885 (1998).
- 44) Kemp, P., White, R. W. and Lander, D. J. The hydrogenation of unsaturated fatty acids by five bacterial isolates from sheep rumen, including a new species. *J. Gen. Microbiol.*, 90: 100~114 (1975).
- 45) Kepler, C. R., Hirons, K. P., McNeill, J. J. and Tove, S. B. Intermediates and products of the biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J. Biol. Chem.*, 241: 1350~1354 (1966).
- 46) Kepler, C. R. and Tove, S. B. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids III. purification and properties of a linoleate Δ^{12} -cis, Δ^{11} -trans-isomerase from *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J. Biol. Chem.*, 242: 5686~5692 (1967).
- 47) Kinsella, J. E. Food lipids and fatty acids : importance in food quality, nutrition and health. *Food Technol.*, 42: 124~145 (1988).
- 48) 近藤和男・岩本珠美. 脂質栄養学の最前線—脂質栄養と動脈硬化—. *日本油化学会誌*, 46: 1195~1203 (1997).
- 49) Kramer, J. K. G., Sehat, N., Dugan, M. E. R., Mossoba, M. M., Yurawecz, M. P., Roach, J. A. G., Eulitz, N., Aalhus, J., Shaefer, A. L. and Ku, Y. Distribution of conjugated linoleic acid (CLA) isomers in tissue lipid classes of pigs fed a commercial CLA mixture determined by gas chromatography. *Lipids*, 33: 549~558 (1998).

- 50) Kubow, S. Toxicity of dietary lipid peroxidation products. *Trends in Food Sci. Technol.*, 1: 67~71 (1990).
- 51) Lee, K. N., Kritchevsky, D. and Pariza, M. W. Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbit. *Atherosclerosis*, 108: 19~25 (1994).
- 52) Lepage, G. and Roy, C. C. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J. Lipid Res.*, 27: 114~120 (1986).
- 53) Li, Y. and Watkins, B. A. Conjugated linoleic acids alter bone fatty acid composition and reduce *ex vivo* prostaglandin E₂ biosynthesis in rats fed n-6 or n-3 fatty acids. *Lipids*, 33: 417~425 (1998).
- 54) Lin, H., Boyston, T. D., Chng, M. J., Luedecke, L. O. and Shultz, T. D. Survey of the conjugated linoleic acid contents of dairy products. *J. Dairy Sci.*, 78: 2358~2365 (1995).
- 55) Lin, T. Y. Conjugated linoleic acid concentration as affected by lactic culture and additives. *Food Chem.*, 69: 27~31 (2000).
- 56) Luddy, F. E., Barford, R. A. and Riemenchneider, R. W. Direct conversion of lipid components to their fatty acid methyl esters. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 37: 447~451 (1960).
- 57) Marinetti, G. V. *Lipid Chromatographic Analysis Volume 1*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1967.
- 58) McDougall, E. I. Studies on ruminant saliva I : the composition and output of sheep's saliva. *Biochem. J.*, 43: 99~109 (1948).

- 59) Morales, M. S., Palmquist, D. L. and Weiss, W. P. Effects of fat source and copper on unsaturation of blood and milk triacylglycerol fatty acids in Holstein and Jersey cows. *J. Dairy Sci.*, 83: 2105~2111 (2000).
- 60) Morrison, W. R. and Smith, L. M. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride methanol. *J. Lipid Res.*, 5: 600~608 (1964).
- 61) 長渡千鶴子・河原 聡・竹之山慎一・伊藤肇躬・山内 清.
食餌性脂質の相違による共役リノール酸を中心としたラット体脂肪組成の変動脂肪組成の変動. 第94回日本畜産学会大会講演要旨集, p 275 (1999).
- 62) Nicolosi, R. J., Rogers, E. J., Kritchevsky, D. and Pariza, M. W. Dietary conjugated linoleic acid reduces plasma lipoproteins and early aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic hamsters. *Artery*, 22: 266~277 (1997).
- 63) O'Shea, M., Lawless, F., Stanton, C. and Devery, R. Conjugated linoleic acid in bovine milk fat: a food-based approach to cancer chemoprevention. *Trends in Food Sci. Technol.*, 9: 192~196 (1998).
- 64) Pariza, M. W., Ashoor, S. H., Chu, F. S. and Lund, D. B. Effects of temperature and time on mutagen formation in panfried hamburger. *Cancer Lett.*, 5: 63~69 (1979).
- 65) Park, Y., Albright, K. J., Liu, W., Storkson, J. M., Cook, M. E. and

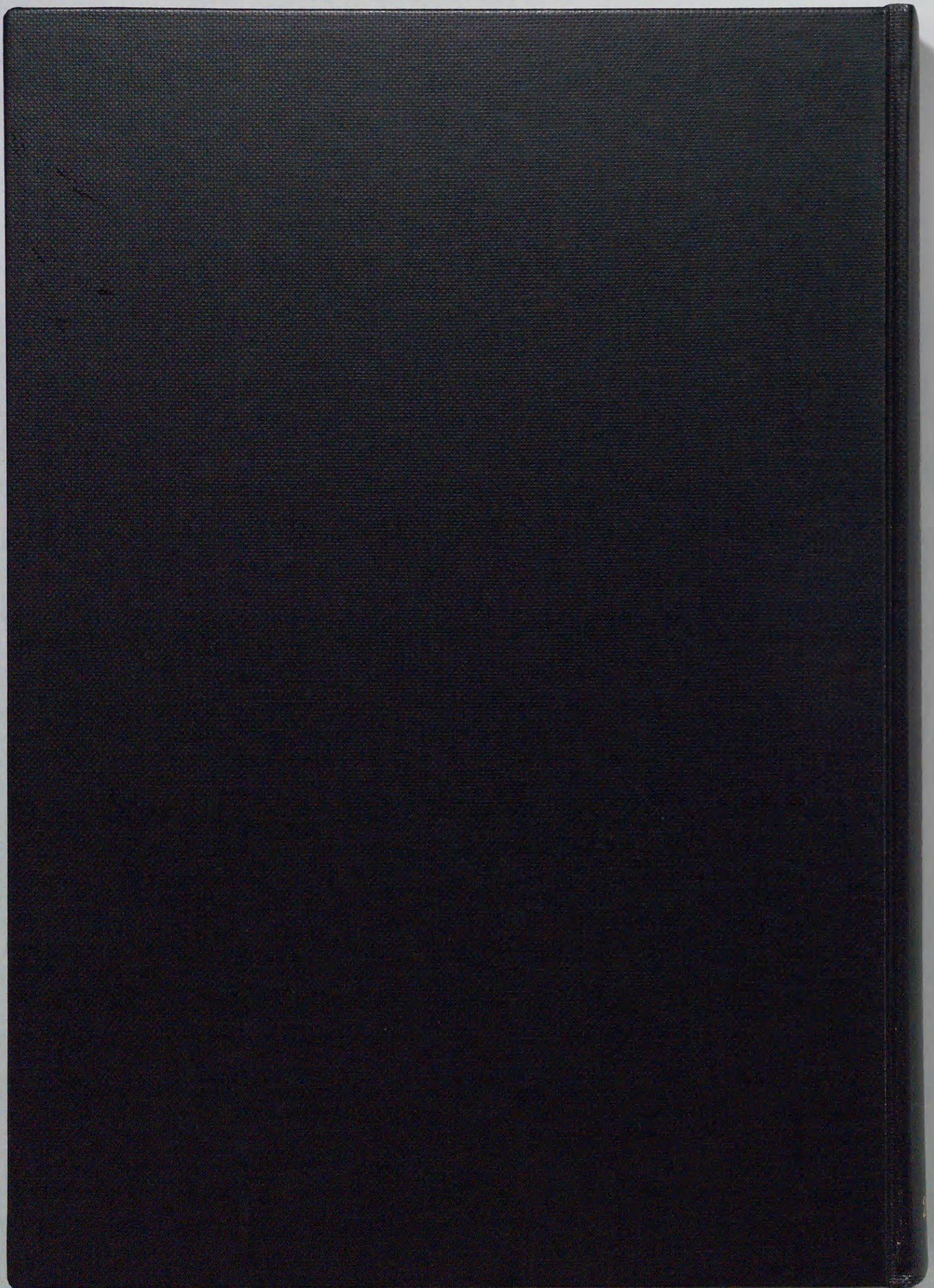
- Pariza, M. W. Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. *Lipids*, 32: 853~858 (1997).
- 66) Parodi, P. W. Conjugated linoleic acid of milk fat. *J. Dairy Sci.*, 60: 1550~1553 (1977).
- 67) Pearson, A. M., Love, J. D. and Shorland, F. B. "Warmed-Over" flavor in meat, poultry, and fish. *Adv. Food Res.*, 23: 1~74 (1977).
- 68) Pearson, A. M. Meat and Health. In *Developments in Meat Science-2*, Lawrie, R. (Ed.), pp.241~292, Applied Science Publishers, London and New Jersey, 1981.
- 69) Schaefer, D. M. Potential for altering quality of muscle and milk from ruminants. In *Antioxidants in Muscle Foods*, Decker, E.A., Faustman, C. and Lopez-Bote, C.J. (Eds.), pp.155~197, Wiley Interscience, New York, 2000.
- 70) Scott, T. W., Cook, L. J. and Mills, S. C. Protection of dietary polyunsaturated fattyacids against microbial hydrogenation in ruminants. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 48: 358~364 (1971).
- 71) Sehat, N., Yurawecz, M. P., Roach, J. A., Mossoba, M. M., Kramer, J. K. and Ku, Y. Silver-ion high-performance liquid chromatographic separation and identification of conjugated linoleic acid isomers. *Lipids*, 33: 217~221 (1998).
- 72) Shantha, N. C., Decker, E. A. and Ustunol, Z. Conjugated linoleic acid concentration in processed cheese. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 69:

- 425~428 (1992).
- 73) Shantha, N. C., Decker, E. A. and Hennig, B. Comparison of methylation methods for the quantitation of conjugated linoleic acid isomers. *J. AOAC. Int.*, 76: 644~649 (1993).
- 74) Shantha, N. C., Crum, A. D. and Decker, E. A. Evaluation of conjugated linoleic acid concentrations in cooked beef. *J. Agric. Food Chem.*, 42: 1757~1760 (1994).
- 75) Shantha, N. C., Moody, W. G. and Tabeidi, Z. Conjugated linoleic acid concentration in semimembranosus muscle of grass- and grain-fed and zeranol-implanted beef cattle. *J. Muscle Foods*, 8: 105~110 (1997).
- 76) Shuchardt, U. and Lopes, O. C. Tetramethylguanidine catalyzed transesterification of fats and oils: a new method for rapid determination of their composition. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 65: 1940~1941 (1988).
- 77) Smith, G. N., Tai, M. and Braganza, J. M. On the identification of a conjugated diene component of duodenal bile as 9Z, 11E-octadecadienoic acid. *Free Radical Biol. Med.*, 10: 13~21 (1991).
- 78) Stanton, C., Lawless, F., Kjellmer, G., Harrington, D., Devery, R., Connolly, J. F. and Murphy, J. Dietary influences on bovine milk cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid content. *J. Food Sci.*, 62: 1083~1086 (1997).

- 79) 菅野道廣・池田邦男. 必須脂肪酸. 日本油化学会誌, 40: 831~837 (1991).
- 80) Sugano, M., Tsujita, A., Yamasaki, M., Noguchi, K. and Yamada, K. Conjugated linoleic acid modulates tissue levels of chemical mediators and immunogloblins in rats. *Lipids*, 33: 521~527 (1998).
- 81) Terrell, N. R., Suess, G. G., Cassens, R. G. and Bray, R. W. Broiling, sex and interrelationships with carcass and growth characteristics and their effect on the neutral and phospholipid fatty acids of the bovine *longissimus dorsi*. *J. Food Sci.*, 33: 562~565 (1968).
- 82) Tilley, J. M. A. and Terry, R. A. A. Two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops, *J. Brit. Grassl. Soc.*, 18: 104~111 (1963).
- 83) 辻 悦子. 健康の維持と油脂の至適摂取量：脂肪酸の摂取バランスを中心に. 日本油化学会誌, 46: 1005~1015 (1999).
- 84) van den Berg, J. J., Cook, N. E. and Tribble, D. L. Reinvestigation of the antioxidant properties of conjugated linoleic acid. *Lipids*, 30: 599~605 (1995).
- 85) Viviani, R. Metabolism of long-chain fatty acids in the rumen. *Adv. Lipid Res.*, 8: 267~345 (1970).
- 86) Yamamoto, N., Saitoh, M., Moriuchi, A., Nomura, M. and Okuyama, H. Effect of dietary α - linolenate / linoleate balance on brain lipid compositons and learning ability of rats. *J. Lipid Res.*, 28:

144~151 (1987).

- 87) Yamauchi, K., Nagai, Y. and Ohashi, T. Quantitative relationship between alpha - tocopherol and polyunsaturated fatty acids and its connection to development of oxidative rancidity in porcine skeletal muscle. *Agric. Biol. Chem.*, 44: 1061~1067 (1980).
- 88) 山内 清. 肉・肉製品の脂質酸化とWarmed-Over Flavor. *肉の科学*, 28: 165~174 (1987).
- 89) 山内 清. 食肉・肉製品の脂質過酸化とその防止. *New Food Industry*, 38: 9~16 (1996).



Inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak

Blue	Cyan	Green	Yellow	Red	Magenta	White	3/Color	Black

Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19

