

4

物理的性質

4-1 保水性（加圧・遠心）・圧搾肉汁率

食肉の機器分析における物理的特性項目のうち、肉が水分を保持する性質を保水性、加圧したときの食肉に占める肉汁の割合を圧搾肉汁率という。保水性は、肉をろ紙で挟んで加圧した時に広がる肉汁面積と肉片面積から算出する加圧保水性と、肉を遠心分離した時に分離される肉片と肉汁の重量から算出する遠心保水性がある。これらの項目は、食肉中の脂肪含量や官能特性（ジューシーさ）等との関係が報告されており、食肉を評価する上で重要な項目である。

① 加圧保水性

(1) 【サンプル調製】 サンプルを $0.5\text{g} \pm 0.05\text{g}$ 程度の立方体にピンセット等を用いて切り出し、秤量する（サンプル重量をメモすること）。秤量したサンプルをろ紙の中央部に置く。1 サンプルにつき3 セット作成する。

※サンプル部位は、端の部分ではなく、その筋肉を代表する場所のものを用いること。



サンプルの切り出し



サンプルの秤量と設置

(2) 【加圧】 サンプルを置いたろ紙をアクリル板で挟み、加圧計で $35\text{kg}/\text{cm}^2$ で1 分間加圧する。加圧後、肉片の輪郭を鉛筆等でなぞり、ろ紙を破かないようにアクリル板からはがす。



加圧器



肉片の輪郭のトレース

(3) 【測定】 トレースした肉片面積と肉汁面積を画像解析装置等で計測し、得た数値を以下の式に代入し、保水性を算出する。数値が高い方が保水性の高い肉であることを意味する。脂肪含量が40%を超えるような肉の場合は、脂肪との広がり肉汁の広がりを部分的に超えることもあるが、赤色の肉汁面積をデータに用いることとする。

$$\text{加圧保水性} = \{1 - \{(\text{肉汁面積} - \text{肉片面積}) \times 9.47 / \text{肉の水分含量 (mg)}\}\} \times 100$$

※肉の水分含量は、(1)で秤量したサンプル重量に前出の水分分析で得た水分（％）を乗じて、単位をmgに換算したもの。

②遠心保水性

(1) 【分析準備】 冷却遠心器の電源を入れて、4℃に予冷しておく。遠沈管を分析サンプルあたり2本準備し、その中に6分目程度ガラスビーズを入れておく。

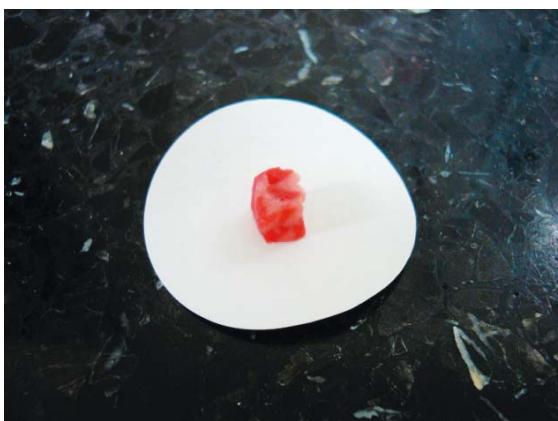


遠沈管



冷却遠心器

(2) 【サンプル調製】 サンプルを0.5g±0.05g程度の立方体にピンセット等を用いて切り出し、秤量する（サンプル重量をメモすること）。秤量したサンプルをメンブレンフィルター（ADVANTEC, 10μm 47mm）の中央部に置き、肉がはみ出ないように包んでホッチキスでとめる。1 サンプルにつき2 セット作成する。



サンプル



包まれたサンプル

(3) 【測定】 ホッチキスでとめたサンプルを予め準備した遠沈管に入れ、フタをし、4℃、2200×gで30min遠心分離を行った後、ホッチキスを外して取り出したサンプルを秤量する。以下の式に遠心分離の前後のサンプル重量を代入し、遠心保水性を算出する。

$$\text{遠心保水性 (\%)} = 100 \times (\text{遠心分離後のサンプル重量} / \text{遠心分離前のサンプル重量})$$

③ 圧搾肉汁率

(1) 【分析準備】 保水性分析に用いたろ紙、メンブレンフィルター、脱脂綿およびガーゼ (写真 7) の準備をする。(あらかじめ、脱脂綿をガーゼに挟んだセットを作成しておくとも便利)

(2) 【サンプル調製】 サンプルを保水性と同様に0.5g±0.05g程度の立方体にピンセット等を用いて切り出し、秤量する(サンプル重量をメモすること)。秤量したサンプルをメンブレンフィルターの中央部に置く。サンプルを中心にメンブレンフィルター、脱脂綿を挟んだガーゼ、ろ紙の順に挟んだサンプルセットを 1 サンプルにつき 2 セット作成する。



写真 7 分析準備

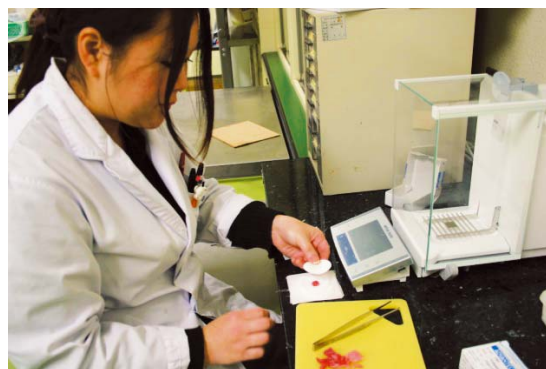


写真 8 サンプルセット作成

(3) 【加圧・測定】 サンプルセットを加圧保水性と同様にアクリル板で挟み、加圧計で35kg/cm²で1分間加圧する。加圧後、メンブレンフィルターに張り付いたサンプル肉をスパチュラ等ではがし、秤量する。秤量した重量を以下の式に代入し、圧搾肉汁率を算出する。



写真 9 加圧中のサンプル

$$\text{圧搾肉汁率 (\%)} = 100 \times (\text{加圧前のサンプル重量} - \text{加圧後のサンプル重量}) / \text{加圧前のサンプル重量}$$

4-2 加熱損失

肉は加熱すると肉汁が排出される。この理由の一つには肉中の水分子の動きが活発となり、蒸発や滲出を起こす。もう一つは加熱により筋線維や結合組織等の蛋白質が変性し、保水力を低下させる。肉は加熱により「縮み」といった三次元構造の変化やフィラメント等の微細構造の変性が起こり、筋線維間や結合組織間に保持されていた水が排出される。

食肉を熱水で抽出した溶液は、蛋白質、脂質、色素等の高分子化合物と非蛋白態窒素化合物、有機酸、ヌクレオチド、糖等の肉エキスから成っている¹⁾。

一般に、加熱損失と粗脂肪含量は負の関係にあり、粗脂肪含量が少ないと多汁性の評価も下がる傾向にある。

家畜改良センターで行っている分析方法について、以下に述べる。

①分析方法

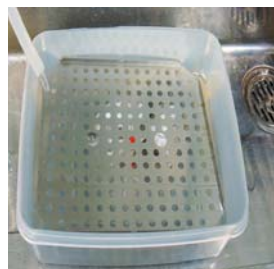
- (1) サンプル約50gを筋線維が明確になるように、立方体に切り出し、サンプルの重量（データⅠ）を量り、ビニール袋に形が崩れないように入れる。また、水が入らないように袋をしぼり、結び目の両脇を2カ所テープでとめる。
- (2) 70℃の温湯が入ったウォーターバスに入れ、1時間加温する。
- (3) 加温後、流水で30分間冷却する。
- (4) サンプルをビニール袋から出し、表面の肉汁の固まり等を流水で落とし、キムタオル等で表面の水分を軽く取り除く。
- (5) サンプルの重量を量る。（データⅡ）



加熱前のサンプル



ウォーターバス



流水による冷却



加熱後のサンプル

②加熱損失の算出

$$\text{加熱損失 (\%)} = \{(I - II) / I\} \times 100$$

引用文献

- 1) 細野明義、鈴木敦士、畜産加工、朝倉書店：38-69、1989

4-3 剪断力価

食肉のテクスチャーとしてやわらかさは重要とされており、機器によるテクスチャーの表現として最もよく用いられている方法が、Warner-Blatzler法である。この方法は、鋭利な刃物で切断するのではなく、肉片をちぎる（剪断する）というものであり、その値は剪断力価とよばれる。官能評価を併用した多くのテスト結果から、剪断力価はやわらかさと相関があることが認められ、食肉のやわらかさを示す指標として国際的に汎用されている。剪断力価測定において、調理やサンプリングのプロセスの違い、また機器によってもデータに違いがあることに留意しなければならない¹⁾。

剪断力価測定機器としては、従来型のWarner-Blatzler剪断力価計もあるが、ここではインストロン（Model5542）を用いた測定方法について、以下に述べる。

① サンプルの調製

- (1)加熱損失測定後のサンプルを用いる。
 - (2)筋線維に対して平行に1 cmの厚さにし、垂直断面が1 × 1 cmとなるように切り出す。
 - (3)6サンプル以上作製する。
- 注) 12回測定し、最小値と最大値を除いて平均値を算出し、剪断力価値としている。



写真1 サンプルの切り出し



写真2 サンプル

② インストロンの設定

- ・ Warner-Bratzler測定用アタッチメント（ブレード、ドリフトレー等）の取り付け
- ・ 剪断速度：200mm/min

③ 測定方法

- (1)電源を入れる。コントローラーの表示「2」となれば、正常に稼働する。
 - (2)「Bluehill2」を立ち上げる。
 - (3)本体のコントロールパネルのジョグ・アップ（ダウン）ボタンを操作し、アタッチメントをセットする。
- 注) ソフトを立ち上げないと本体は駆動しない。
- (4)クロスヘッド下の黒いバー（Limit switch actuator）を42cm（黄色の帯の下）にあわせ、サポートフレームに固定する。
 - (5)GLリセットを押す（「GL位置」に緑色ランプが点灯）。

注)「変位」を「0.000mm」に設定し、ジョグ・アップ（ダウン）しても、リターンを押せば元に戻るようにする。

(6)パソコン画面の逆さハットマーク（「ロードセル設定ダイアログを開く」）を押す。

(7)「トランスデューサの設定」をする。

はじめに、「荷重」を校正する（「荷重」→「校正する」→（ロードセルから荷重を除去します）→「OK」→完了）。次に、「リミット」を設定する（「最小リミット」→「値」:「kgf」を選択、「-40」を入力、「アクション」→「荷重除去」、「有効」をチェック→終了）。

(8)サンプルの測定を行う。

「試験」をクリック→「メソッド名」ダブルクリック→「新規サンプルを作成」画面→「サンプルファイル名」を入力→「次へ」→サンプルをセット→「次へ」→「開始」

(9)「次へ」→「開始」（またはEnter を2回押す）を全てのサンプルについて繰り返す。

注）測定後、クロスヘッドは設定位置（42cm）に戻る。

(10)平均値（最小値と最大値を除外）を算出する。

サンプルの測定終了→「結果」の最小値を右クリックで選択（セルは青色）→「試験片を除く」をクリック（最大値も同様に行う）

(11)結果を印刷する。

左側のグラフ上のタイトル名をダブルクリック→タイトルの入力（「サンプルファイル名」と同じ名前）→「印刷」を選択→「プリンターの設定」→OK→印刷プレビュー→「印刷」→「試験結果レポート」のプリントアウト

(12)「保存」→OK→「終了」、「サンプルの終了」→（同じ試験パラメーターを使って別の新規サンプルを開始しますか?）「はい」または「いいえ」（連続で分析する場合）→「新規サンプルを作成」画面→左上の「Bluehill」（「ホーム画面に戻る」）をクリック

(13)アタッチメントをはずし、電源を切る。

④結果

「試験結果レポート」に記載された「最大荷重」の平均値を剪断力価値とする。



写真 3 サンプルの測定

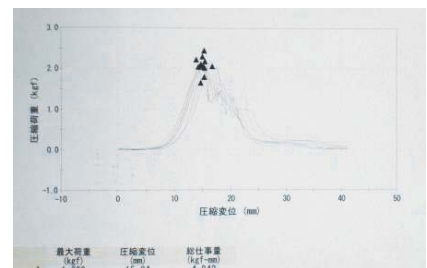


写真 4 試験結果レポート

引用文献

1) 家畜改良センター編、食肉の官能評価ガイドライン、日本食肉消費総合センター：142-145、2005

4-4 破断応力

前稿で紹介したWarner-Bratzler法による剪断力価測定は、一方向への1回加歪による破断測定（静的粘弾性測定）である。これは、人が前歯で噛み切る時の動きを模しており、噛み切った時の最大荷重を食肉の硬さとしている。一方、本稿で紹介するテンシプレッサー測定は、試料の粘弾性を考慮に入れて、交互に逆方向に、すなわち振動しながら力を加えていく破断測定（動的粘弾性測定）である。これは、人が奥歯で咀嚼する時の動きを模しており、少しずつ試料を変形させていき破断が起こった時の測定値から、食肉の柔らかさ、柔軟性、噛みごたえ、脆さ等を解析している。

テンシプレッサー分析後に得られる各測定項目について、Tendernessは、破断応力（やわらかさ）を表しており、値が大きいほど固い。Pliabilityは、柔軟性（しなやかさ）を表しており、値が大きいほど噛み切り難い。Toughnessは、総仕事量（噛みごたえ）を表しており、値が大きいほど噛みごたえがある。Brittlenessは、脆さを表しており、値が大きいほど脆い。これらの測定項目についての説明は、中井ら（中井ら，1994）が報告しているため参照されたい。

テンシプレッサーと官能検査との関係について、焼いた肉および煮た肉ともに官能検査のやわらかさと強い相関関係がある（中井ら，1994）ことと、焼いた肉と官能検査のやわらかさと相関（ $r=0.755$; $p<0.01$ ）がある（柳原ら，1995）ことが報告されている。

① 機器準備

- (1) プレッサー本体にプランジャーとテーブルをセットする。



<テンシプレッサー>

- (2) パソコン本体から電源を入れ、パソコンが立ち上がり次第、テンシプレッサー本体の電源を入れる。
- (3) 「多重積算バイト2」プログラムを起動。
- (4) start up画面の「ファイルを開く」から、使用するファイルを選択する。新しくファイルを作成する時は「新規作成」を選択する。
- (5) Main画面が開いたら「S.NAME」（F3）を押して、試料名・測定メモ・測定日付・試料番号を入力する。**入力終了後ESCキーを押す（重要）。**



<Main画面>

注）入力終了後にESCキーを押さないと、入力したものが認識されないので注意。

- (6)「COND.」(F4) を押して測定条件を確認する。すでに作成してあるファイルを使用する場合は、以前分析した測定条件に設定されているため特に変更する必要はない。(入力終了後ESCキー)

No	CONDITION	ITEM	DATA
1	ModeCheck		1
2	Selector		3
3	TimeSample	[sec]	0.000
4	Distance	[mm]	30.000
5	Clearance	[mm]	0.100
6	Thickness1	[mm]	15.000
7	Thickness2	[mm]	15.000
8	StaticTime	[sec]	0.0
9	BiteSpeed	[mm/sec]	2.00
10	SecondSpeed	[mm/sec]	2.00
11	Multiply		1
12	Magnificant		1
13	Baseline		1.0
14	Deformation	[%]	0.0
15	Deformation	[mm]	0.000
16	Deformation	[kg]	0.000
17	IntervalPoint	[%]	0.0
18	IntervalPoint	[mm]	0.000
19	NegaGain		1
20	LoadCell		10
21	Plansure Area	[cm ²]	0.041
22	CycleSec	[sec]	0.0

<条件設定 1>

No	CONDITION	ITEM	DATA
18	IntervalPoint	[mm]	0.000
19	NegaGain		1
20	LoadCell		10
21	Plansure Area	[cm ²]	0.041
22	CycleSec	[sec]	0.0
23	Amplitude	[mm]	0.000
24	MonitorSwich		ON
25	HighSence		OFF
26	RepeatTime		200
27	MultiRepeat		1
28	AddValue	[mm]	0.100
29	SecondStatic	[sec]	0.0
30	2ndDistance	[mm]	0.500
31	2ndClearance	[mm]	0.000
32	2ndDeformation	[%]	0.0
33	2ndDeformation	[mm]	0.0
34	2ndDeformation	[kg]	0.000
35	2ndMultiply		1
36	2ndMagnificant		1
37	2ndNegaGain		1
38	FirstStatic	[sec]	0.000

<条件設定 2>

- (7)試料名等の入力、測定条件の確認後、「MEASURE」(F2) を押してMeasure画面にする。
 (8)Measure画面が開いたら「BASE」(F3) を押して、黒い線がBaseLine設定値の目盛り付近に表示されていることを確認する。黒い線が表示されていない時は、パソコンとテンシブレッサ本体との接続に異常があるため再起動する。黒い線が表示されたら「ESC」(F4) を押す。



< BaseLine >

- (9)テーブルに何も載せていない状態で「DOWN」(F8) を押して、キャリブレーションを行う。
 (10)上記(8)(9)の行程は、「Main画面を閉じない」か「ほかのファイルを開かない」限り一度行うだけでよい。

②サンプル切り出し

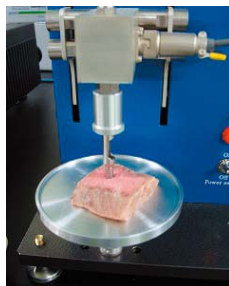
加熱損失分析後のサンプルから、筋線維に対して平行に 1cm 厚に切り出す。実際に分析する際には、筋線維に対して垂直方向からプランジャーが当たることになる。



<筋線維に対して平行に 1cm 厚で切り出す>

③測定

(1)サンプルをテーブルに載せて「MEASURE」(F2) を押して測定を開始する。



＜筋線維に対して垂直方向にプランジャーを当てる＞

(2)測定終了後、「SAVE」(F5) を押して測定データを保存する。

(3)上記(1)(2)の行程を 1 サンプルにつき 4 カ所、測定場所を変えて行う。

(4)次のサンプルに移る時は、「QUIT」(F12) を押してMeasure画面を閉じ、Main画面の「S.NAME」(F3) で試料名などを変更した後に、テーブルをアル綿で軽く拭きサンプルを載せる。

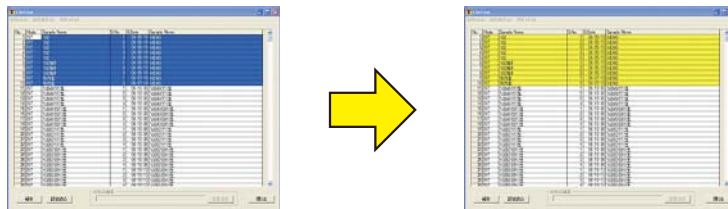
(5)上記(1)～(4)を全てのサンプルについて行う。

(6)全ての分析が終了したら、分析結果をエクセルファイルで保存する。

④エクセルファイル保存および終了

(1)Main画面の「FILE」(F5) を押し、FileDisp画面を開く。

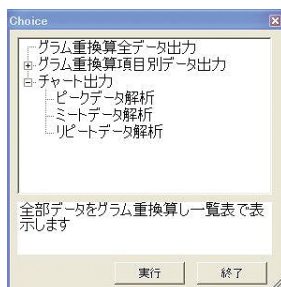
(2)保存したいファイルを選択しエンターキーを押して、バーを青色から黄色に変更する。一括してファイルを選択するには、ファイル全てをドラッグしてエンターキーを押す。



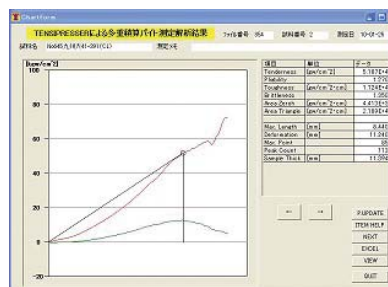
＜選択バーを青色から黄色へ＞

(3)保存したいファイルを黄色にしたら、「解析」を選択しChoice画面を表示する。

(4)Choice画面の「チャート出力」「ミートデータ解析」を選択し「実行」すると、解析結果画面が表示される。

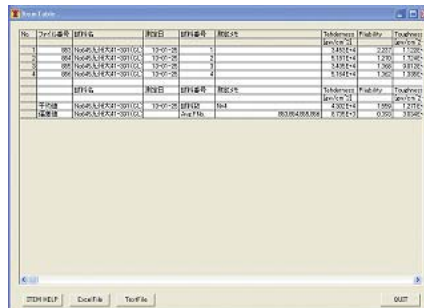


＜「チャート出力」、「ミート解析データ」を選択＞



＜解析結果＞

- (5) ミートデータ項目別出力画面の「ExcelFile」を選択して、ファイル名と保存場所を入力する。入力後、エクセルファイルが一瞬立ち上がりすぐ閉じる。これでエクセルファイルへの保存は終了となる。保存場所は、一時保管場所としてデスクトップに保存する。



No.	File Name	Date	File Number	File Size	Subdirectory	File Path
1	MeatDataExcelFile	11-01-28	1	1.000	1.000	1.000
2	MeatDataExcelFile	11-01-28	2	1.000	1.000	1.000
3	MeatDataExcelFile	11-01-28	3	1.000	1.000	1.000
4	MeatDataExcelFile	11-01-28	4	1.000	1.000	1.000

<この解析結果データをエクセルファイルで保存>

- (6) エクセルファイルの保存が終了したら、「QUIT」でプログラムを終了し、電源を落とす。
電源を落とす順番は、パソコン、テンシプレスー本体どちらからでも良い。
- (7) プランジャー及びテーブルは、洗剤をつけた柔らかいスポンジで洗った後、乾燥機へ入れて乾かす。

⑤解析

テンシプレスー測定値は、測定した4カ所の平均値を用いる。

【参考：使用機器】

テンシプレスー : TENSIPRESSER TTP-50BX II (タケトモ電機)
プランジャー : 外径5.5mm、内径5.0mm、面積0.041cm²の中空丸型

【参考文献】

- 1) 中井博康・柳原一美・田邊亮一・西澤光輝. 1994. テンシプレスーによる牛肉の物性測定 - 焼いた肉と煮た肉の比較 -. 食肉の科学, 35: 162-167.
- 2) 柳原一美・矢野幸夫・中村豊郎・中井博康・田邊亮一. 1995. 牛肉の長期熟成中における官能評価、物性および化学成分の変化. 日本畜産学会報, 66: 160-166.

4-5 筋線維の特徴

筋線維の特徴は肉質の物理的特性などを解明するため古くから研究されてきた。これまで品種の特徴、性差、飼養管理、成長等と筋線維との関係について研究され、それぞれの筋線維の特徴（筋線維型）が多数報告されてきた。筋線維型の分類手法としては、以前はsuccinate dehydrogenase（コハク酸脱水素酵素、以下SDHと表記）活性を利用する手法が用いられていた。しかし、この方法には、筋線維型の分類に重要なミオシンの違いがわからない、筋線維型の異なるものでも同程度のSDH活性を示すことがある、などの欠点があるため、現在は単独で用いられることは少ない。

ここでは、ミオシン重鎖抗体を用いた免疫組織化学的染色法とSDH活性を用いた染色法を組み合わせた筋線維型分類手法を紹介する。筋線維は、ミオシン重鎖抗体によって、ミオシン重鎖のタイプ別にⅠ型筋線維とⅡ型筋線維に分けることができる。Ⅰ型筋線維は収縮が遅く、疲れにくいといった特徴を持っている。Ⅱ型筋線維は、さらにSDH活性を調べることで、ⅡA型筋線維とⅡB型筋線維に分類できる。ⅡA型筋線維は収縮が速く、疲れにくいといった特徴を持っており、ⅡB型筋線維は収縮が速く、疲れやすいといった特徴を持っている。

なお、ミオシン重鎖抗体を用いた免疫組織化学的染色法は、東北大学大学院の山口高弘教授、渡邊康一助教よりご教授いただいた手法をもとにしている。

【作業上の注意点】

ここで紹介する手法において使用する薬品のうち、取り扱いに注意を要する薬品について示す。

①ホルマリン（37%ホルムアルデヒド）

劇物。特定化学物質の第2類に指定されており、作業にあたってはドラフトの使用が必要である。

②メタノール

劇物。危険物。有機溶剤。作業はドラフト内で行う。

③DABタブレット

発癌性が疑われている物質が含まれている。試薬に直接触れないように作業を行う。

④30%過酸化水素水

劇物。皮膚傷害性あり。

【サンプル採取及び保存】

サンプルは筋肉の一定の場所を決めて、1×1×2cm程度を切り出す。

このとき筋線維が垂直となるように切り出すと凍結切片の作製がしやすくなる。

これを液体窒素で十分に冷却したイソペンタンに浸し、30秒十分に攪拌する。

切片作製時まで－70度以下の冷凍庫で保管する。

【切片作成から一次抗体反応まで（1日目）】

分析準備

- ①分析するサンプルをクリオスタット内に30分程度置き、温度平衡させる。
- ②ウォーターバスに水を張り、38℃に設定する。
- ③基質反応液と10%ホルマリン液と封入剤を作成する。

(1)基質反応液の作成

ア. ニトロソブルーテトラゾリウム100mgを蒸留水25mlに溶解する。

イ. 以下のものを混合し基質反応液を作成する。

コハク酸（Ⅱ）ナトリウム	0.083 g
ニトロソブルーテトラゾリウム溶液	25ml
リン酸緩衝液（0.2M pH7.4）	17ml
蒸留水	42ml

(2)10%ホルマリン液の作成

以下のものを混合し 10%ホルマリン液を作成する。

ホルマリン（37%ホルムアルデヒド）	10ml
蒸留水	90ml

基質反応液と10%ホルマリン液は作成したら染色バットに移す。基質反応液は37～40℃のウォーターバスにつけておく。10%ホルマリン液はドラフト内に置く（室温）。

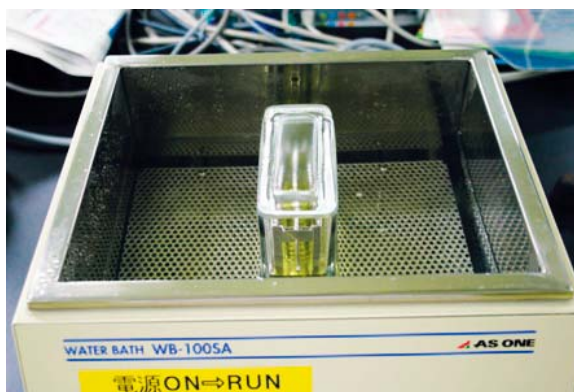


写真 1. 基質反応液



写真 2. 10%ホルマリン液

(3)封入剤の作成

以下のものを加温しながら混合する。

ゼラチン	7 g
蒸留水	42ml
グリセリン	50 g
結晶石炭酸（フェノール）	0.5 g

（作成した封入剤は4℃で保存が可能。40～50℃のウォーターバスで加温して使用する。）

分析手順

- ①-15℃のクリオスタット内で、MASコート付スライドガラス上に厚さ10 μ mの筋切片を作製する。筋切片を作製する時は、顕微鏡で筋線維がほぼ垂直に切れていることを確認する。



写真 3. 筋線維切片作成風景



写真 4. クリオスタット内部

1 サンプルにつき、以下の 4 枚を作成する。

1. SDH用
2. slow型ミオシン重鎖（以下slowと表記）用
3. fast型ミオシン重鎖（以下fastと表記）用
4. control用

SDH用→slow用→fast用→control用の順に作成する。

スライドガラスには区別できるように記号・印などを付けておく。

（例：slowならS、fastならF、controlならCなど）

- ② slow 用、fast 用、control 用の 3 枚については、スライドガラス上のサンプルの周囲をリキッドブロッカーで囲み、軽く風乾する。

風乾したら、ほこりが付かないように乾いた染色バットに入れておく。

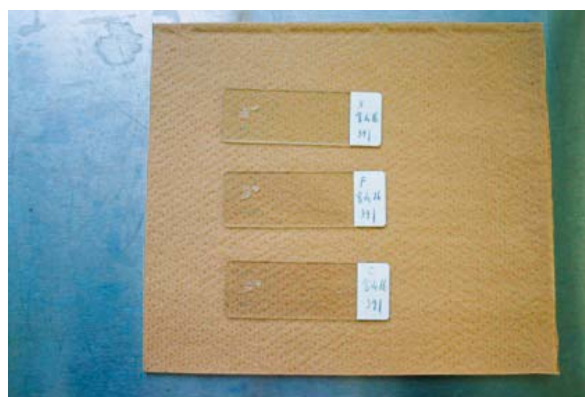


写真 5. 風乾中の筋線維切片

- ③SDH用のスライドガラスを37～40℃のウォーターバスにつけてある基質反応液に30～40分つける。
- ④SDH用のスライドガラスを取り出し、蒸留水の入った染色バットで反応液をすすぎ、軽くふきとってから10%ホルマリン液に5～10分つける。

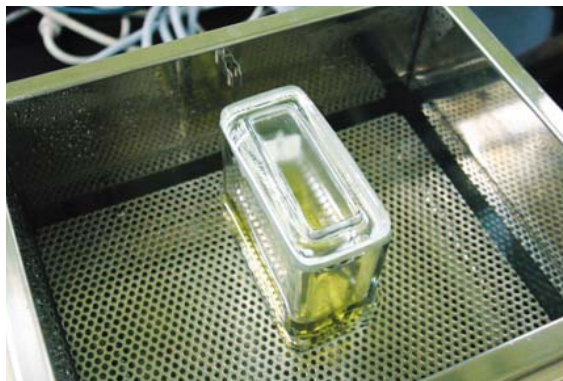


写真 6. 基質反応液による染色



写真 7. 10%ホルマリン液による固定

⑤SDH用のスライドグラスを取り出し、流水（水道水）で5分間洗浄しホルマリンを洗い落とす[または、染色バット内に水道水を入れ、スライドグラスをつけた後水道水を捨てる。これを5回繰り返す]。蒸留水ですすいだ後、ウォーターバスで加温しておいた封入剤をサンプル部分に一滴落とし、ホットプレート（40℃）上で加温しながらカバーガラスで封入する。



写真 8. 封入後の筋線維切片

⑥②のスライドグラスを0.01mol/l リン酸緩衝生理食塩溶液 pH7.2-7.4（以下PBSと表記）の入った染色バットにつける。

⑦30%過酸化水素水10mlに対しメタノール90mlを加え、新しい染色バットに入れる（ドラフト内で行う）。

⑧⑥のスライドグラスを⑦の染色バットに5分間つける（ドラフト内で行う）。

若干気泡が出るので振り落としてやる。



写真 9. 過酸化水素水・メタノール溶液中の筋線維切片

⑨別の染色バットにPBSを入れたのち⑧のスライドグラスを5分間つける。

⑩染色バット内のPBSを捨てて、新たにPBSを注いで5分間つける。

これを2回繰り返す。(計3回)

⑪サポニン100mgをPBS100mlに溶解させ、染色バットに入れる。

⑫⑩のスライドグラスを⑪の染色バットに20分間つける。

⑬⑨⑩と同様にしてPBSに5分間3回つける。

⑭Serum, Goat, Normal (正常ヤギ血清) 150 μ lを5mlのPBSで希釈する。

⑮ウェットボックスを以下の要領で準備する。

密閉できる容器に水道水で湿らせた布等を敷き、その上からスライドグラスが並べられるように金網等をのせる。

ウェットボックスが準備できたら⑬のスライドグラスを並べる。

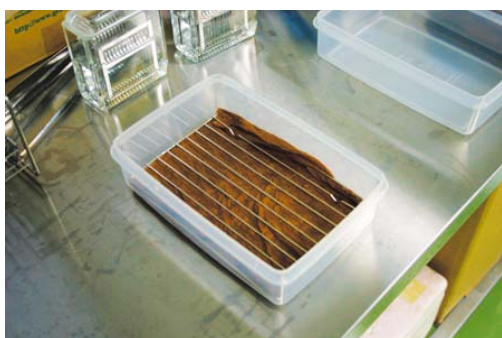


写真10. ウェットボックス



写真11. スライドグラスを並べた状態

⑯スライドグラス上のサンプル部分に⑭で希釈した正常ヤギ血清を300 μ l程度滴下し、ウェットボックスを密閉した後、室温で30分反応させる。

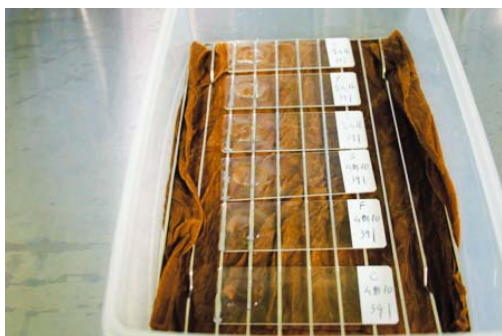


写真12. 正常ヤギ血清を滴下した状態



写真13. 反応風景

⑰(氷上で行う) マウス一次抗体をPBSで200倍に希釈する。

用いるマウス一次抗体は以下の通り。

slow用……………抗slow型ミオシン重鎖抗体

fast用……………抗fast型ミオシン重鎖抗体

(一次抗体は冷凍して保存するが、凍結融解を繰り返すと抗体が破壊されるので、事前に分注しておくなどして凍結融解の回数を最小限にした方がよい。)

⑱スライドグラス上の液をウェットボックス内に捨て、⑰で希釈した一次抗体を300 μ l程度それぞれのサンプルに滴下する。control用にはPBSを300 μ l程度滴下する。その後、ウェットボックスを密閉した後、4℃で一晩反応させる。



写真14. 一次抗体による反応

【一次抗体反応終了後から封入まで（2日目）】

- ①スライドグラス上の液をウェットボックス内に捨て、PBSの入った染色バットに5分間つける。
- ②染色バット内のPBSを捨てて、新たにPBSを注いで5分間つける。
これを2回繰り返す。（計3回）
- ③ウェットボックス内にスライドグラスを並べ、スライドグラス上のサンプル部分にマウス抗体用ヤギ二次抗体をサンプルが隠れる程度滴下し、ウェットボックスを密閉した後、室温で1時間反応させる。

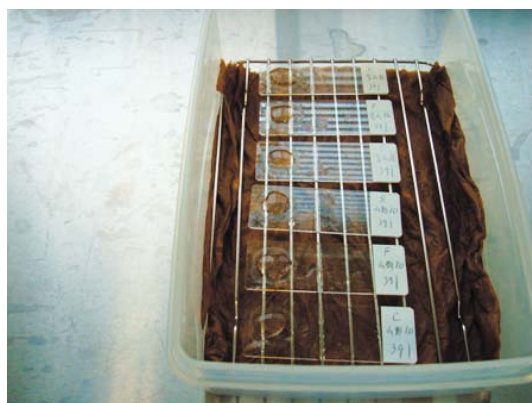


写真15. マウス抗体用ヤギ二次抗体による反応

- ④①②と同様の方法で、PBSで5分×3回洗浄する。
- ⑤50ml チューブにDABタブレットを1錠、直接手で触れないよう入れ、蒸留水9mlと0.1mol/l イミダゾール1mlを加え、ボルテックスミキサーで溶解させる。溶解したら、⑥の操作に移る直前に、5%過酸化水素水を30μl加える。
(0.1mol/l イミダゾール：イミダゾール0.034gを蒸留水5mlに溶解する。)
(5%過酸化水素水：30%過酸化水素水10μlを蒸留水50μlで希釈する。)



写真16. DABタブレット

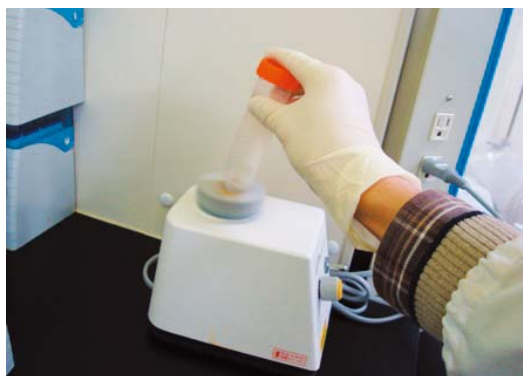


写真17. ボルテックスミキサーによる溶解

- ⑥スライドグラス上のサンプル部分に⑤で用意した液を300 μ l程度加え、4分程度反応させる。
時間をかけすぎないように注意する。



写真18. DAB溶液による反応

- ⑦染色バット内に水道水を入れ、スライドグラスをつけた後水道水を捨てる。これを5回繰り返す。



写真19. 水道水中の筋線維切片

- ⑧染色バットの水道水を捨て、蒸留水を入れる。
⑨ウォーターバスで加温しておいた封入剤をサンプル部分に加え、カバーガラスで封入する。
封入後は、大きめのろ紙等でスライドグラスをはさみ、カバーガラスの4辺を軽くなでて、余計な水や封入剤を吸い取る。



写真20. ろ紙による水、封入剤の除去



写真21. 封入後の筋線維切片

【筋組織画像の判定・計測】

- ①顕微鏡の倍率を10×10倍とし、顕微鏡CCDカメラおよびパソコンを接続させる。



写真22. 顕微鏡、CCDカメラ、パソコン

- ②顕微鏡を見ながらSDH切片の組織画像を画像データとして保存する。画像は何画面保存してもよいが、計測する筋線維の本数が合計200本以上になるようにする。



写真23. 画像保存風景（SDH切片）

- ③保存したSDH切片の画像を印刷する。
④SDH切片印刷画像を見ながら、slow切片、fast切片の画像を同様に保存する。
保存する時はSDH切片画像と同じ場所の画像を保存するようにする。

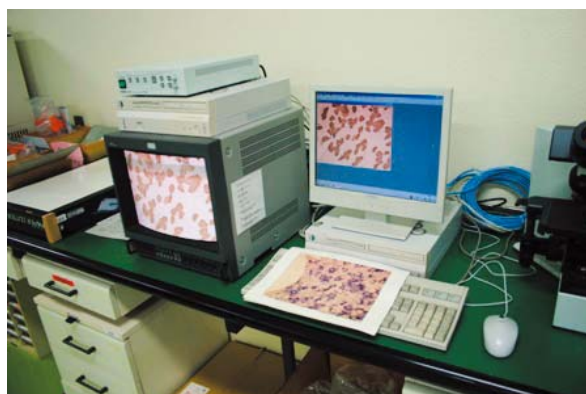


写真24. 画像保存風景 (slow切片、fast切片)

- ⑤slow切片とfast切片の画像を印刷し、両者を見比べ、中間型の筋線維（両方で染色されている）を調べ、SDH切片の印刷画像にペンなどでマークする。

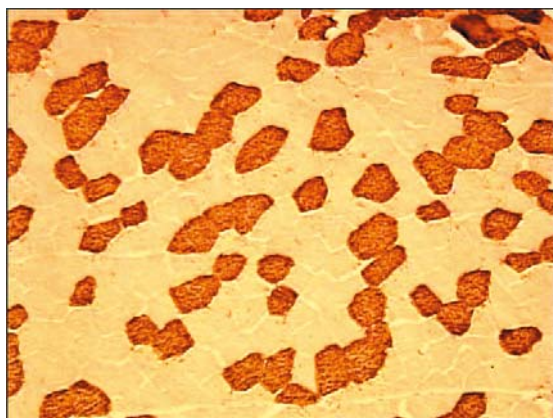


写真25. slow切片画像

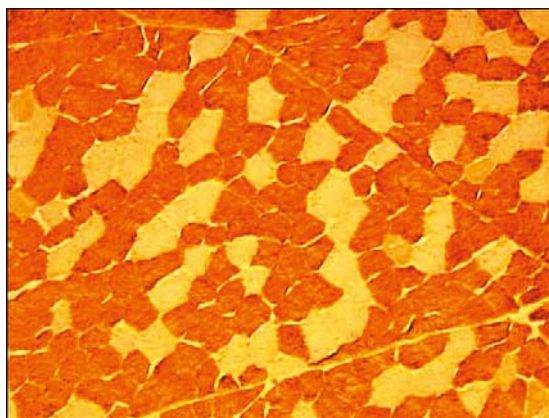


写真26. fast切片画像

- ⑥slow切片とSDH切片の印刷画像を比較して、I型の筋線維（slow切片で染色されている）を調べ、SDH切片の印刷画像にペンなどでマークする。

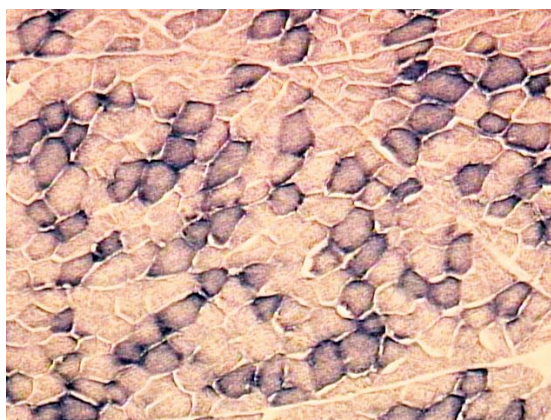


写真27. SDH切片画像

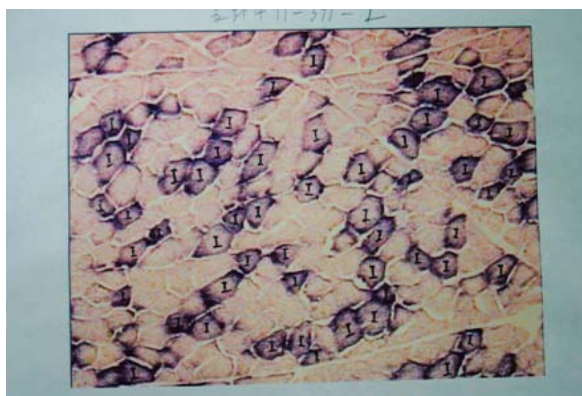


写真28. I型についてマークしたSDH切片印刷画像

- ⑦ I型および中間型の筋線維についてマークしたSDH切片の印刷画像を手元におき、パソコン上で保存していたSDH切片画像を開く。パソコン画面上で、I型、II A型（slow切片で染色されておらず、SDH切片で部分的に染色されている）、II B型（slow切片で染色されておらず、SDH切片でも染色されていない）、中間型筋線維についてマークする。マークしたらその画像を保存する。

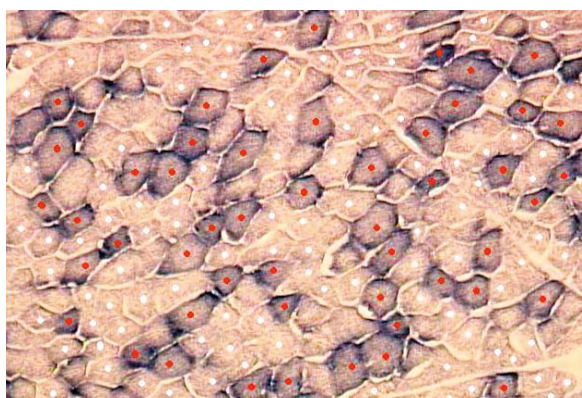


写真29. パソコン画面上でマークしたSDH切片画像

- ⑧保存した画像を画像解析ソフト（Winroof等）で解析する。解析にあたっては、筋線維型別に行う。また、それぞれの筋線維の短径値をその筋線維の太さとする。

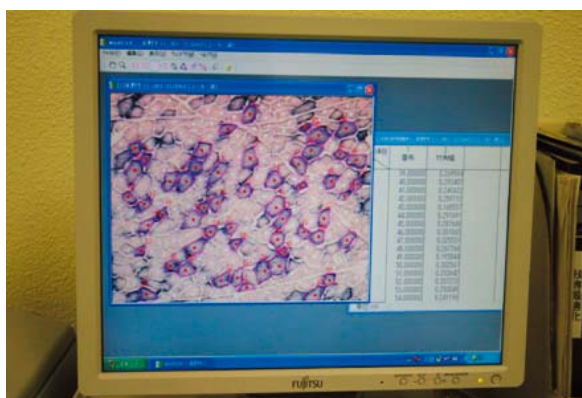


写真30. 画像解析ソフトによる解析風景

4-6 コラーゲン量（可溶性、不溶性）分析

食肉の硬さに関与している筋線維と結合組織のうち、筋肉組織を構成する結合組織には、膠原線維であるコラーゲンの他に、微量の弾性線維であるエラスチン等が存在している。その中でもコラーゲンは、腱や筋膜の主要成分であるだけでなく、筋線維同士の接着、あるいは線維状の構造を作り細胞を保持する役割も兼ねている。

コラーゲンが食肉の硬さに影響するのは、単純なコラーゲンの量ではなく、コラーゲンの質とその分布が影響しているとされ（鈴木，2000）、畜肉の加齢に伴い食肉が硬くなるのは、コラーゲン分子が分子内あるいは分子間に架橋を形成し、安定化、強固になるためと考えられている（鈴木ら，1998）。

コラーゲンの分析方法としては、組織化学的方法や生化学的方法があるが、肉質評価においては、生化学的方法を用いた、熱可溶性コラーゲンと不溶性コラーゲンに分離する方法が一般的である。本稿では、（独）東北農業研究センターの柴 伸弥氏が行っている方法を参考に家畜改良センターにて実施している、熱可溶性コラーゲン量と総コラーゲン量をそれぞれ分析し、それらの差から不溶性コラーゲン量を求める方法を紹介する。

なお、コラーゲンの定量には、コラーゲンには特異的にアミノ酸のヒドロキシプロリンが含まれていることから、このヒドロキシプロリンを呈色反応させた後、分光光度計を用いて測定することでそれぞれのコラーゲン量を算出している。

① サンプルの前処理

（サンプル調整・可溶性コラーゲン分離：Hill J.Food Sci.1966 Vol.31）

※以下、可溶性：可溶性コラーゲン、total：全コラーゲン（可溶性＋不溶性）と略す。

【試薬準備】

○ 1/4 の濃度のリンゲル液（3ヵ月間冷蔵保存可能）

NaCl 2.15g

KCl 0.075g

CaCl₂ 0.129g

上記試薬を 1 L メスフラスコに入れて、超純水でメスアップする。褐色ビンにて 3 ヶ月間冷蔵保存可能。

○ 濃塩酸（市販品の塩酸36%：試薬第一級）

○ 6N HCl

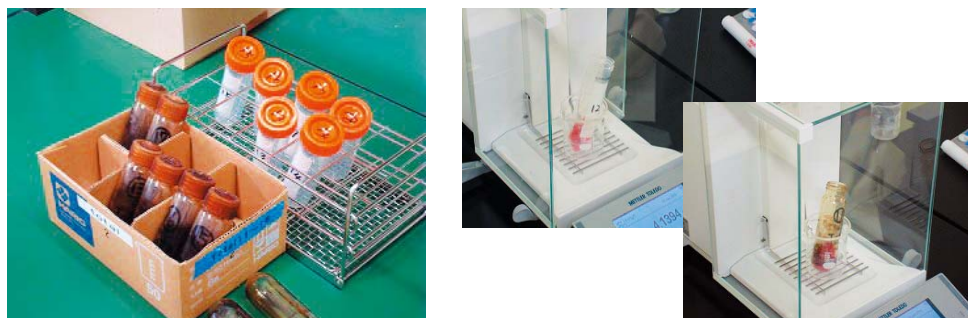
褐色ビンに超純水500mlと濃塩酸（約12N）500mlを入れてよく混和する。

注）濃塩酸に超純水を加えると発熱するため、超純水に濃塩酸を加えること。

【前処理手順】

<共通>

- (1)ウォーターバスを77℃にセットする。
- (2)冷凍サンプルを包丁でミンチする。
- (3)Totalとして、サンプル5 g±0.5gを50mlオートクレーブ用遠沈管に秤量する。…… (A)
- (4)可溶性として、サンプル4 g±0.5gを50mlプラスチック製遠沈管に秤量する。…… (B)



<可溶性、totalサンプルの準備>

<total>

- (1) (A) に6N HClを20ml加え、蓋をする。…… (C)



<totalに6NHClを20ml加える>

<可溶性>

- (1) (B) に1/4濃度リンゲル液を10ml加え、蓋をして77℃のウォーターバスで70分間加熱する。



<可溶性に1/4濃度リンゲル液を10ml加える>



<77℃で70分間加熱>

(2)加温後、流水で10分間冷却する。



<10分間冷却>

(3)25,000rpmで数秒間ホモジナイズし、10分間遠心分離（4℃×6,000g）を行う。



<25,000rpmで数秒間ホモジナイズ>

(4)上澄み液を50mlオートクレーブ用遠沈管に濾過し、この濾液に濃塩酸を10ml 加え、蓋をする。
…… (D1)



<上澄み液を濾過>



<濾液に濃塩酸を10ml加える>

(5)濾過して残った沈殿物に 1 / 4 濃度リンゲル液を10ml加えてよく攪拌し、再度10分間遠心分離（4℃×6,000g）を行う。

(6)上澄みを別の50mlオートクレーブ用遠沈管に濾過する。

(7)この上澄み液に濃塩酸を10ml加え、蓋をする。…… (D2)

<共通>

(1). (C) と (D1,2) を新聞紙で巻いた後、アルミバックに入れて密封し、オートクレーブ（121℃ × 1.2kg / cm²）にて11時間加熱処理する。



注) 遠沈管に新聞紙等を巻くことで、遠沈管同士の接着を防ぐことができ、かつ、万一塩酸が漏れた場合でも新聞紙等による吸収が可能である。

<新聞紙を巻いた遠沈管をアルミバックへ入れて密封し、11時間加熱処理する>

(2) サンプル名とサンプル量をコラーゲン計算原紙に記入する。

(3) オートクレーブ処理が終了し、オートクレーブが十分冷えたら、まず、total (C) を100mlメスフラスコに5Aの濾紙で濾過し、超純水10ml程度で遠沈管を共洗いする。



<100mlメスフラスコに濾過し、メスアップ>

(4) 共洗いを2～3回行った後、超純水で100mlにメスアップする。

(5) 可溶性の2本 (B1,2) を一つの100mlメスフラスコに5Aの濾紙で濾過し、totalと同じように共洗いした後、超純水で100mlにメスアップする。total、可溶性共にメスアップしたものは、1週間常温保存可能。



<可溶性の2本を一つのメスフラスコに濾過し、メスアップ>

(6) totalは0.5ml、可溶性は4mlをそれぞれ10ml試験管に取り、遠心エバポレーター (45℃ × 1000rpm) で7時間減圧乾固する。乾固が足りない場合は、さらに1～2時間減圧乾固する。



<total 0.5ml、可溶性4mlを採取>



<遠心エバポレーター式>

注) 乾固しきれず塩酸が残留していると、結果に悪影響を及ぼすため注意。

(7) 完全に乾固したものを前処理済サンプルとする。乾固したサンプルは、1晩放置可能。ただし、周りの物品を酸化させるのでドラフト内に置くこと。



<前処理済サンプル>

②前処理サンプルの定量

(Hydroxyprorin の定量 : Bergman and Loxley Anal.Chem.1963 Vol.35) (改)

【試薬準備】

※以下の試薬量は、1 回の分析を16サンプル (32本) + STD 5本とした時の量。

○Oxidant溶液

(a) 7%クロラミン T 溶液 (用事調製)

トルエンスルホンクロロアミドナトリウム	0.07g
(クロラミン T)	
超純水	1 ml

上記試薬を10ml蓋付試験管に加えてよく攪拌する。

(b) 酢酸・クエン酸緩衝液 (pH 6.0) (3 ヶ月間常温保存可能)

酢酸ナトリウム三水和物	11.4g
クエン酸三ナトリウム二水和物	7.5g
クエン酸一水和物	1.1g
イソプロパノール	77ml

上記試薬を200mlメスフラスコに加えた後、超純水でメスアップする。

使用直前に (a) : (b) = 1 : 4 の割合で10ml蓋付試験管に混和し、Oxidant溶液を作製する。

(a) 7%クロラミン T 溶液	1 ml
(b) 酢酸・クエン酸緩衝液	4 ml

○ Ehrlich' s 試験溶液

(c) ジメチルアミノベンズアルデヒド溶液 (用事調製)

ジメチルアミノベンズアルデヒド	14g
60%過塩素酸	21ml

上記試薬を100mlビーカーで混和する。

(d) イソプロパノール

使用直前に (c) : (d) = 3 : 13 の割合で100ml褐色三角ビンに混和し、Ehrlich' s 試験溶液を作製する。

(c) ジメチルアミノベンズアルデヒド溶液	12ml
(d) イソプロパノール	52ml

○ヒドロキシプロリン標準溶液

(e) 1000ppm ヒドロキシプロリン溶液 (3 ヶ月冷蔵保存可能) (褐色メスフラスコ使用)

ヒドロキシプロリン 0.1g

0.1N HCl 100ml

上記試薬を100ml褐色メスフラスコに加えてメスアップする。

(e) を以下のように調製してスタンダード (STD0 ~ STD4) を作製する。

		STD4	STD3	STD2	STD1	STD0 (ブランク)
ヒドロキシプロリン	1000ppm 1 ml	100ppm 4 ml	80ppm 3 ml	60ppm 2 ml	40ppm 1 ml	
超純水	9 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
合計	100ppm 10ml	80ppm 5 ml	60ppm 4 ml	40ppm 3 ml	20ppm 2 ml	0ppm 1 ml

【定量手順】

- (1)ウォーターバスを60℃にセットする。
- (2)Oxidant 溶液、Ehrrich's 試験溶液を作製。
- (3)前処理済サンプルに超純水を 1 ml加えよく攪拌する。



注) total:0.5ml、可溶性:
4 mlを減圧乾固して、1
mlの超純水で溶解してい
るため、total: 2倍希釈、
可溶性: 4倍濃縮となる。

<超純水を1ml入れ、よく攪拌する>

- (4)10ml蓋付き褐色試験管に各STD、サンプルを0.1mlずつ分注する。



<STD、サンプル共に0.1mlずつ分注>

- (5)すべての試験管にイソプロパノールを0.2ml加え、ボルテックスでよく攪拌する。

- (6) Oxidant 溶液を0.1ml加えてボルテックスで攪拌し、室温で4分間保持する。すべての試験管にOxidant溶液を入れたあと一斉に攪拌するのではなく、1本ずつ溶液を入れて攪拌するまでを通して行う。



<Oxidant溶液を0.1ml加え攪拌する>

- (7) Ehrich's 試験溶液を1.3ml加え、ボルテックスで攪拌する。この行程も(6)と同じく、1本ずつ溶液を入れて攪拌するまでを通して行う。



<Ehrich's試験溶液を1.3ml加え攪拌する>

- (8) すべての試験管に蓋をして、60℃のウォーターバスにて25分間加熱する。



<60℃で25分間加熱する>

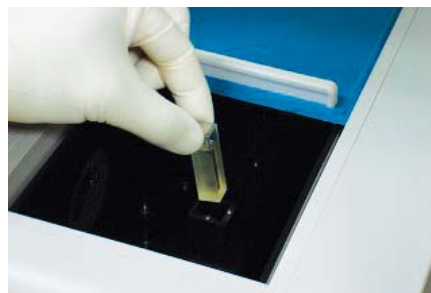
- (9) 加温後、3分間流水で冷却する。



<流水で3分間冷却する>

- (10) すべての試験管にイソプロパノールを3.3mlずつ加え、ボルテックスでよく攪拌する。

(1) 4 時間以内に分光光度計（吸光度560nm）で測定する。



<分光光度計による測定>



<参考：STDの比色>

【データ解析】

解析について、5つのSTD（STD0含む）の吸光度を用いて検量線を作成し、サンプルの吸光度からHydroxyproline濃度を求め、下記の計算式からそれぞれのコラーゲン量を算出する。

コラーゲン量計算式（Cross et al. J. Food Sci.1973 Vol.38）

$\text{soluble collagen} = \text{Hydroxyproline} \times 7.52$

$\text{total collagen} = \text{Hydroxyproline} \times 7.25$

【参考文献】

鈴木 惇 . 2000. 筋肉の構造と肉質との関連 . 東畜会報 , 49 : 1-8

鈴木敦士・渡辺終五・中川弘毅編 . 1998. 食品成分シリーズ - タンパク質の科学 . 朝倉書店 .

Hill, F. 1966. The Solubility of Intramuscular Collagen in Meat Animals of Various Ages. Journal of Food Science, 31: 161-166.

Bergman, I., and Loxley, R. 1963. Two Improved and Simplified Methods for the Spectrophotometric Determination of Hydroxyproline. Analytical Chemistry, 35 : 1961-1965.

Cross, H. R., Carpenter, Z. L., and Smith, G. C. 1973. Effects of intramuscular collagen and elastin on bovine muscle tenderness. Journal of Food Science, 38 : 998-1003.