

2022 年度受託研究報告書

「鶏肉イミダゾールジペプチドに関する解析」

2023 年 1 月 27 日

九州大学大学院農学研究院

片倉 喜範

序

カルノシン (β -アラニル-L-ヒスチジン) およびアンセリン (β -アラニル-3-メチル-L-ヒスチジン) は、pH 緩衝作用、金属イオンキレート作用、抗酸化作用など、ヒトにおいて様々な生理作用を示すイミダゾールジペプチド (IDP) である(1)。近年の研究では、糖尿病やそれに伴う合併症である眼疾患、老化、神経疾患など多くの疾患において IDP サプリメントの治療効果が検証され、IDP サプリメントの摂取により、ヒトの疲労軽減や認知機能低下の抑制が確認されている(2,3)。

肉類は他の食品と比較して特に IDP の含有量が多いことが知られている。肉類の中でも、鶏胸肉は最も IDP 含量が高い。したがって、肉類、特に鶏胸肉を適量摂取すれば、疲労を緩和し、認知機能の低下を抑制するために十分なレベルの IDP を供給することができるものと考えられる。十分な IDP 摂取に必要な肉の量を決定するためには、肉中の IDP を正確かつ再現性よく定量する方法を開発する必要があり、我々はこれまでに、肉中の IDP 含量を定量する新しい方法を確立し、様々な肉試料中の IDP を定量化してきた(4)。図 1 からわかるように、豚肉および牛肉におけるカルノシンの相対的な含有量は、鶏肉におけるそれよりも多かった。アンセリンは鶏肉に存在する優勢な IDP であるのに対し、カルノシンは豚肉と牛肉の肉に存在する優勢な IDP であることが明らかとなっている。また、試験したサンプルの中で、鶏ムネ肉サンプルが最も高い IDP 含有量であることもあきらかになっている。さらに、ボイルすること

で、すべての食肉サンプルの IDP 含有量が有意に減少したことから、この調理方法が筋繊維からの IDP の放出につながったことが考えられた。個別分析の報告もあるが図 1 は、IDP 含量の調理依存性だけでなく、種および肉部位特異的な変化を明瞭に示している。

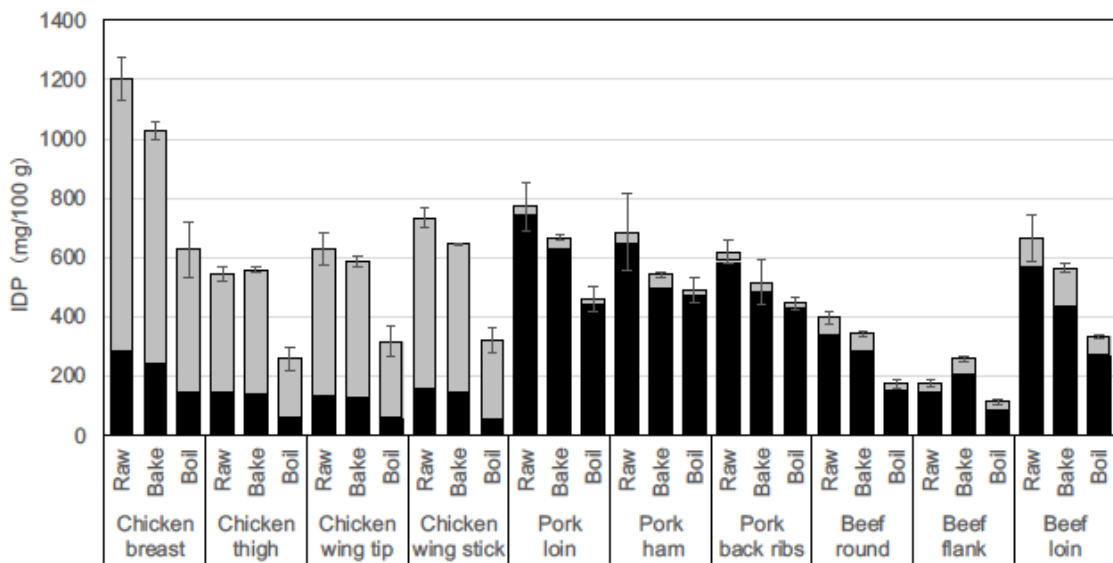


図1 鶏・豚・牛肉中の IDP 含量

(灰色：アンセリン、黒色：カルノシン)

方法 1

測定サンプル

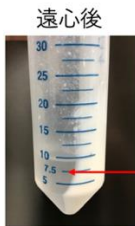
下記の鶏肉部位について、それぞれ調理方法を生・焼き・揚げに分けたもの 3 種
ずつ計 21 サンプルで行った。

1. もも肉
2. ムネ肉
3. ささみ
4. 手羽先
5. 手羽元
6. 手羽小間（肩小肉）
7. レバー

前処理

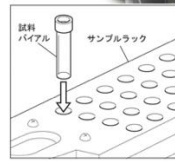
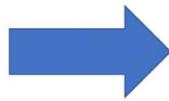
ポリトロンホモジナイザーで肉を粉碎

1. もも肉
2. ムネ肉
3. ささみ
4. 手羽先
5. 手羽元
6. 手羽小間 (肩小肉)
7. レバー

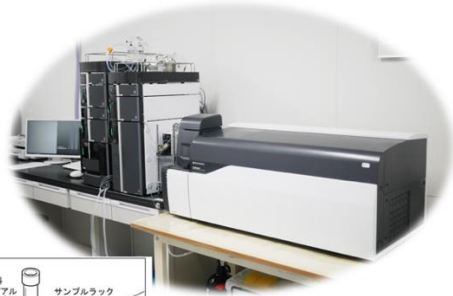


遠心後

上清のみ採取
フィルター濾過



LC/MS



カルノシン・アンセリン測定

測定サンプルの調製

肉サンプル 21 種類をそれぞれ 1 g ずつ計りとり 50 mL tube に入れた。ここに滅菌水 9 mL を添加し total 10 mL にした。ポリトロンでホモジナイズし、完全に均一にした。ポリトロン先端に残った肉を洗い流すため、滅菌水 5 mL を先端に当てながら加え、total 15 mL とした。ここから 5 mL をとり、3%スルホサリチル酸 5 mL と混合しタンパク質の除去を行った。その後この溶液を 3500 rpm, 4°C, 30 min の条件で遠心し、上清のみ 0.45 μ m フィルター濾過した。続いて、この溶液を 0.22 μ m フィルター濾過した。滅菌水で 10 倍希釈したのち、質量分析の測定まで -80°C で保存した。

アミノ酸濃度の測定

処理後の試料のアミノ酸濃度は、全自動アミノ酸分析装置 (JVC-500/V2 ; 日本電子株式会社、東京) または液体クロマトグラフィー質量分析装置 (LC-MS) を用いて測定した。LC-MS 分析では、LC-MS グレードの溶媒を和光純薬工業株式会社 (大阪市) から購入した。クロマトグラフィーは、Intrada Amino Acid カラム (50 \times 3 mm; Imtakt, Kyoto, Japan) を装着した LCMS-8050 (Shimadzu, Kyoto, Japan) を用いて行った。グラジエント溶出バッファは、バッファ A (0.1%ギ酸/アセトニトリル) およびバッファ B (100 mM ギ酸アンモニウム) で、流速は 0.6 mL/min であった。溶出勾配 (バッファ A : バッファ B、v/v)

は、初期条件、バッファ A：バッファ B=86：14 で 3 分間、100 %バッファ B への線形勾配で 7 分間、100 %バッファ B で 5 分間とした。サンプルは、ESI ポジティブイオンモードのタンデム質量分析計で分析した。操作条件は、ネブライザーガス流量 3.0 L/min、乾燥ガス流量 10 L/min、加熱ガス流量 10 L/min、インターフェース電圧 (+) 4.0 kV、DL 温度 250 °C、ブロック温度 400 °C、インターフェース温度 300 °Cであった。カルノシンは、質量分析を用いて、多重反応の mg/mL とし、回収したカルノシンの濃度をモニタリングモードで検出した。プリカーサーイオン (m/z 227.1) に由来するプロダクトイオン (m/z 110.1) のクロマトグラムを用いて、食肉中のカルノシン濃度を測定した。クロマトグラムのピーク面積を、外部の安定同位体標識内部標準アミノ酸に由来するピーク面積と比較して定量値を求めた (Hata et al.2019)。安定同位体標識カルノシン [β -Ala-His (13C6, 15N3)] は Sigma-Aldrich (米国セントルイス) から購入した。安定同位体標識アンセリン (アンセリン-d4) は、既報の方法を用いて合成した(5)。

分析条件

HPLC (Nexera XR, 島津製作所)

カラム Discovery HS F5-3 (2.1 x 150 mm, 3 μ m, SPELCO)
カラム温度 40 °C
移動相 A: 0.1% ギ酸水溶液
B: 0.1% ギ酸アセトニトリル溶液
グラジエント B 0% (0-2 min.), 0-25% (2-5 min.), 25-35% (5-11 min.), 35-95% (11-15 min.), 95% (15-20 min.)
流速 0.25 mL/min.
分析時間 25 min.
導入量 3 μ L

MS (LCMS-8050, 島津製作所)

イオン化法 ESI (+)
インターフェイス電圧 4.0 kV
ネブライザーガス流量 3.0 L/min.
乾燥ガス流量 10 L/min.
ヒーティングガス流量 10 L/min.
インターフェイス温度 300°C
脱溶媒管温度 250°C
ブロックヒーター温度 400°C
MRM

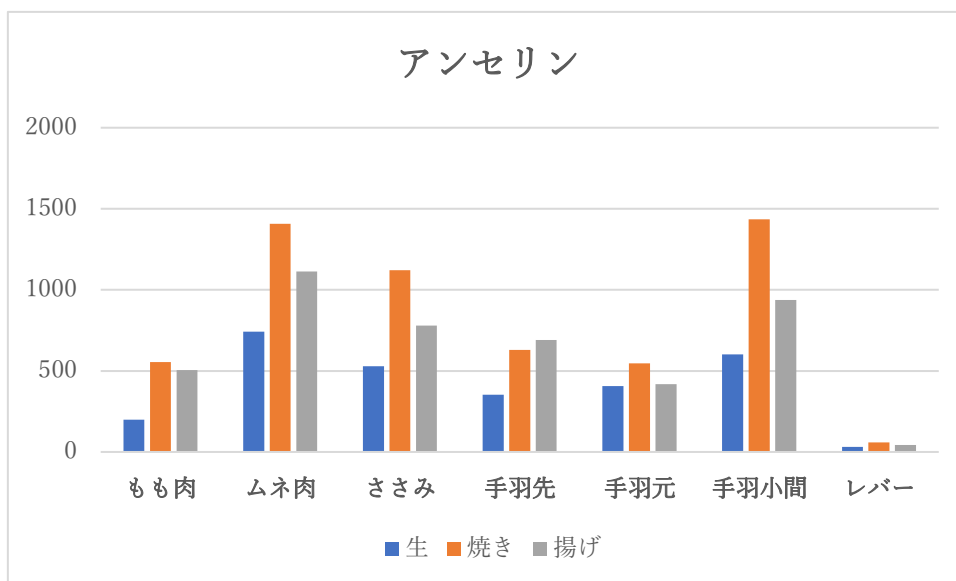
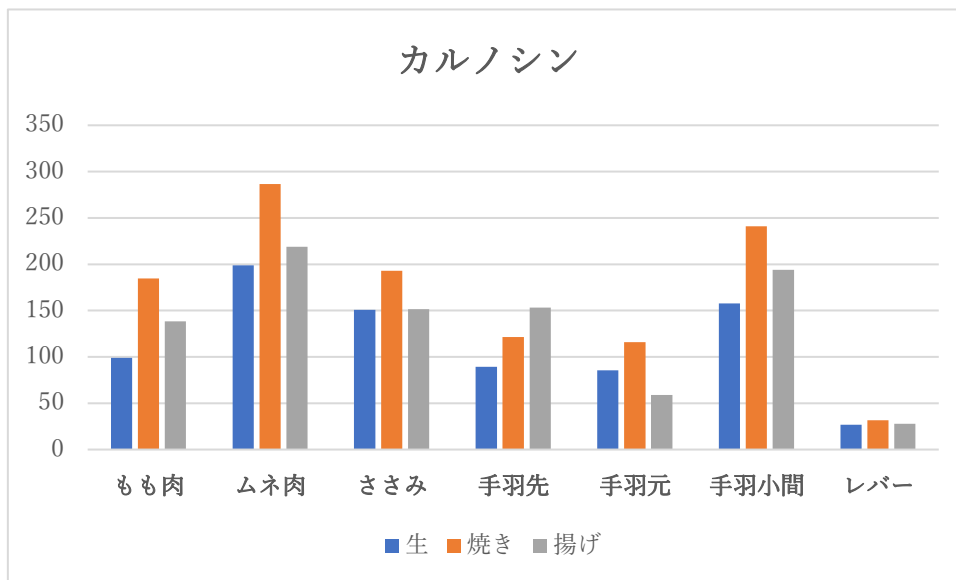
Carnosine: m/z 227.10 > 110.05, CE -
Anserine: m/z 241.10 > 109.10, CE -17.0 V

結果 1

実験 1. 食肉中に含まれる IDP の測定

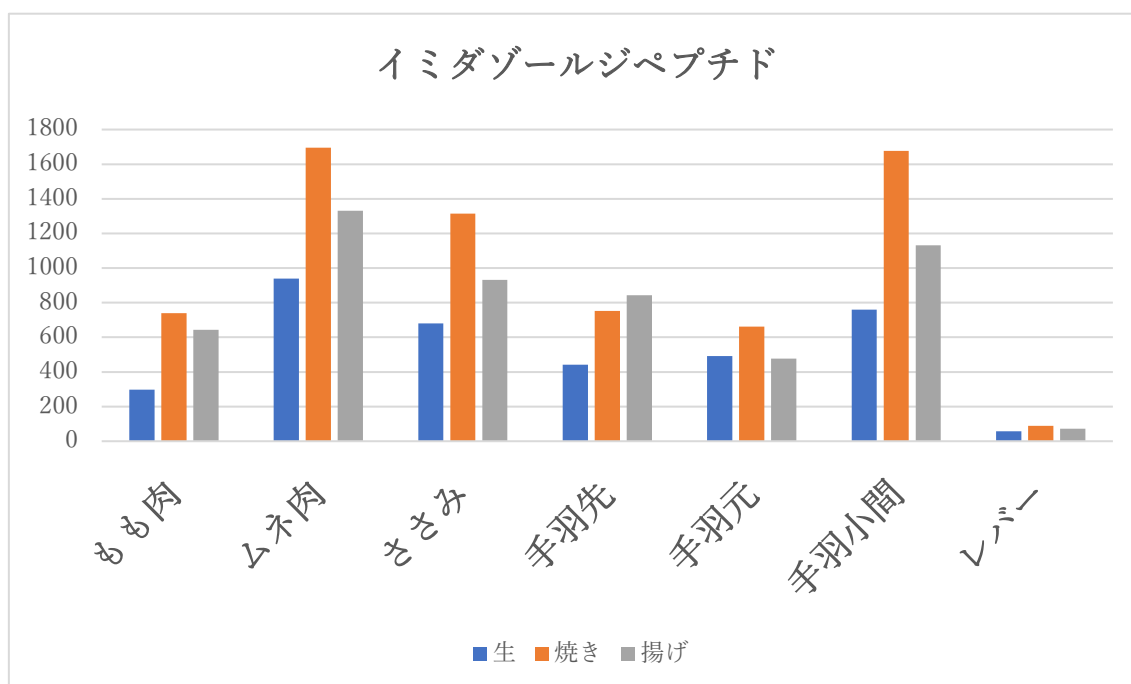
それぞれのサンプル 100 g 中に存在するアンセリン・カルノシン量を定量した結果を下記に示す。またそれとともに、調理に伴うアンセリン・カルノシン量も示している（青：生、オレンジ：焼き、灰：揚げ）。

100 g あたり



下記には、各サンプル 100 g 中のアンセリンおよびカルノシンの合計量（イミダゾールジペプチド含量）を示している。またそれとともに、調理に伴うイミダゾールジペプチド含量も示している（青：生、オレンジ：焼き、灰：揚げ）。

100 g あたり



上記方法に則って、それぞれの肉 100 g 中に含まれるカルノシンおよびアンセリン含量の測定を行った。その結果、生、焼き、揚げのいずれのサンプルにおいても、ムネ肉サンプルにおいて、高濃度のイミダゾールジペプチドが観察された。また既報の通り、モモ肉サンプルにおいては、ムネ肉に比べて半分以下のイミダゾールジペプチド含量であった。また、今回新たに測定を行った、ささみ、手羽小間において、予想を超える量のイミダゾールジペプチドが観察さ

れた。このデータをもとにして、ささみや手羽小間においても、イミダゾールジペプチド含量に基づく、機能性表示が可能であると考えられた。また手羽小間に比べて、手羽先や手羽元でのイミダゾールジペプチド含量は少量であった。この点は、組織的な違いなのか、筋肉成分の組成の違いであるのか、今後明らかにする必要があるものと考えられる。

方法 2

鉄・レチノール含有量の測定

鶏肉、牛肉、豚肉、ウナギをそれぞれ 100 g ずつ計りとり、測定まで-20°Cで保存した。測定は、一般財団法人日本食品分析センター (<https://www.jfri.or.jp>) に依頼した。

結果 2

下記には、鶏レバー中の鉄分量及びビタミン A（レチノール活性当量）量を示している。

検 体 名 鶏レバー



2022年11月30日 当センターに提出された上記検体について分析試験した結果は次のとおりです。

分析試験結果

分 析 試 験 項 目		結 果	定 量 下 限	注	方 法
鉄	*1	13.7 mg/100g		ICP発光分析法
ビタミンA(レチノール活性当量)	*1	21500 µg/100g
レチノール	*1	21500 µg/100g		高速液体クロマトグラフィー

*1 ドリップを除いて試験した。

以 上

下記には、牛肉もも肉中の鉄分量及びビタミンA（レチノール活性当量）量を示している。

検体名 牛肉もも肉

一般財団法人

日本食品分析センター

東京都渋谷区元代々木1-52番1号



2022年11月30日 当センターに提出された上記検体について分析試験した結果は次のとおりです。

分析試験結果

分析試験項目		結果	定量下限	注	方法
鉄	*1	1.68 mg/100g		ICP発光分析法
ビタミンA(レチノール活性当量)	*1	-	1
レチノール	*1	検出せず	3 µg/100g		高速液体クロマトグラフィー

*1 ドリップを除いて試験した。

注1. -: 定量下限未満のため換算せず。

以 上

下記には、豚肉もも肉中の鉄分量及びビタミンA（レチノール活性当量）量を示している。

検体名 豚肉もも肉

一般財団法人

日本食品分析センター

東京都渋谷区元代々木4-52番1号



2022年11月30日 当センターに提出された上記検体について分析試験した結果は次のとおりです。

分析試験結果

分析試験項目	結果	定量下限	注	方法
鉄	*1 0.45 mg/100g		ICP発光分析法
ビタミンA(レチノール活性当量)	*1 5 µg/100g
レチノール	*1 5 µg/100g		高速液体クロマトグラフィー

*1 ドリップを除いて試験した。

以上

下記には、ウナギ中の鉄分量及びビタミンA（レチノール活性当量）量を示している。

検体名 ウナギ



2022年11月30日 当センターに提出された上記検体について分析試験した結果は次のとおりです。

分析試験結果

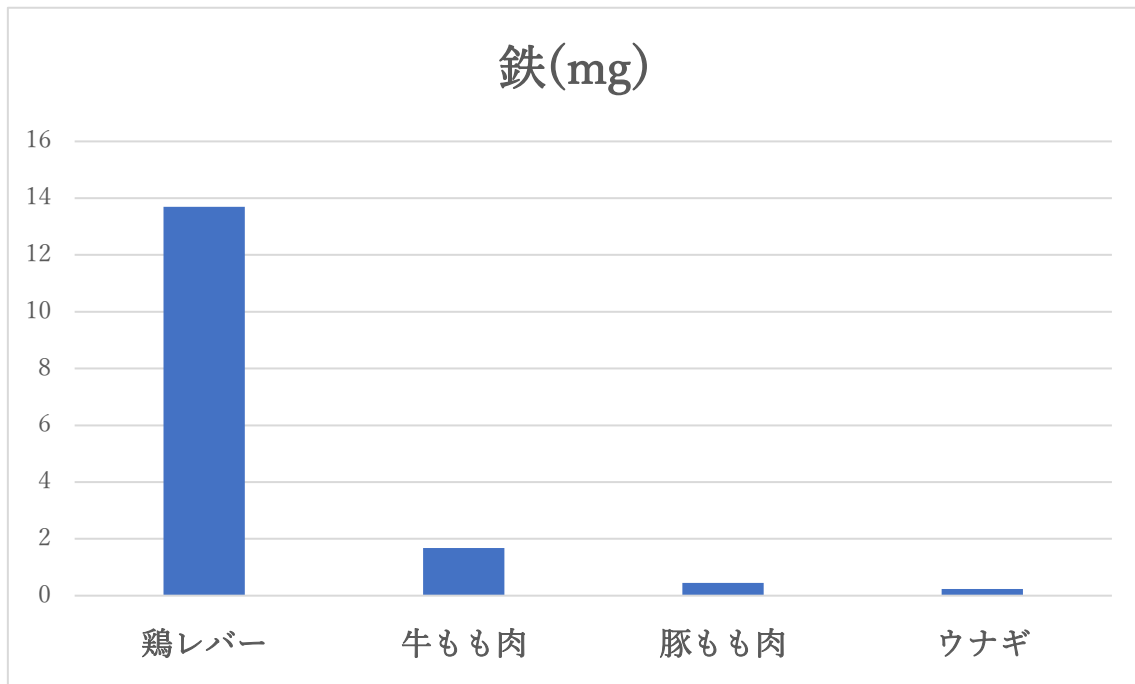
分析試験項目	結果	定量下限	注	方法
鉄	*1 0.24 mg/100g		ICP発光分析法
ビタミンA(レチノール活性当量)	*1 2050 µg/100g
レチノール	*1 2050 µg/100g		高速液体クロマトグラフィー

*1 ドリップを除いて試験した。

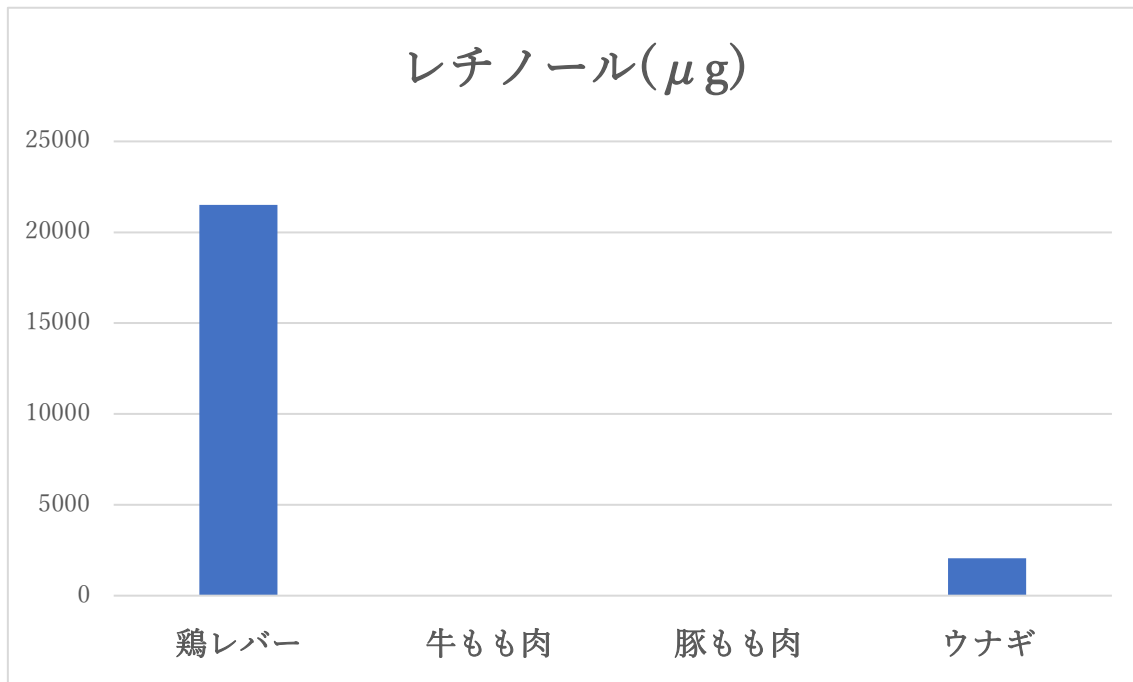
1

以上

100 g あたり



100 g あたり



以上の結果から、鉄分及びレチノールは、ともに鶏レバーにおいて高濃度に含まれていることが明らかとなった。特に、鉄分に関しては、牛もも肉の8倍以上、レチノールに関しては、ウナギの10倍以上含まれていることが今回明らかとなった。今後は、この点にフォーカスした商品開発および機能性表示の可能性を検討する必要があるものと考えられた。特にレチノールは、牛もも肉や豚もも肉には全く含まれておらず、鶏レバーの特徴を示すものと考えられた。またウナギに関しては、鉄分やレチノールの含有が認められたが、鶏レバーと比べるとかなり少量であることが明らかとなった。この点を考えても、巷で人気のある高栄養価食材と比べても鶏レバーの富栄養性が証明されたものと考えられる。

参考文献

1. Boldyrev AA, Aldini G, Derave W. Physiology and pathophysiology of carnosine. *Physiological Reviews*. 2013 Oct;93(4):1803–45.
2. Begum G, Cunliffe A, Leveritt M. Physiological role of carnosine in contracting muscle. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*. 2005 Oct;15(5):493–514.
3. Hisatsune T, Kaneko J, Kurashige H, Cao Y, Satsu H, Totsuka M, et al. Effect of Anserine/Carnosine Supplementation on Verbal Episodic Memory in Elderly People. Asada T, editor. *J Alzheimers Dis*. IOS Press; 2015;50(1):149–59.
4. Abe K, Yamashita S, Kitazaki K, Katakura Y. Homogenization in water improves the recovery rate of imidazole dipeptides in meat. *Food Science and Technology Research*. Japanese Society for Food Science and Technology; 2021;27(2):335–9.
5. Gopinathan MB, Jin C, Rehder KS. Synthesis of Carnosine-d7 and Anserine-d4 for Use as Internal Standards in Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. *Synthetic Communications®*. Taylor & Francis Group; 2009 Oct 16;39(22):3973–81.