

メイラード反応生成香気である DMHF の生理作用
および食肉における DMHF の生成要因

北里大学大学院 獣医学系研究科
動物資源科学専攻 食品科学 博士後期課程

横山 尨成

**The physiological activities of DMHF generated
by the Maillard reaction and factors affecting
DMHF generation in meats**

Kitasato University, School of Veterinary Medicine
Animal Science and Resources, Food Science,
Doctoral course

Issei Yokoyama

目次

第1章	緒論	1
第1節	食品のメイラード反応と香り	1
第2節	香気成分により誘導される生理作用	3
第3節	メイラード反応により生成する香気成分 DMHF	6
第4節	本研究の目的・意義	8
第2章	DMHFの吸入が生体パラメーターに及ぼす影響	10
第1節	アミノ酸-還元糖のメイラード反応によって生成する 香気が生体パラメーターに及ぼす影響	10
2.1.1.	実験方法	11
2.1.1.1.	メイラード反応試料の調製	11
2.1.1.2.	供試動物	11
2.1.1.3.	ラットへの香気曝露方法	12
2.1.1.4.	ラットの血圧および心拍の測定	12
2.1.1.5.	統計処理	13
2.1.2.	結果および考察	13
第2節	ラットの血圧および心拍の低下に 関与するメイラード反応生成香気成分の 検索	15
2.2.1.	実験方法	16
2.2.1.1.	香気成分の検出に用いた試料	16
2.2.1.2.	試料中の香気寄与成分の検出	16
(1)	試料からの香気成分抽出	16

(2) AEDA 法による試料中香気寄与成分の同定	17
2.2.1.3. 検量線の作成および香気寄与成分の定量	18
2.2.1.4. Odor active value (OAV)値の算出	19
2.2.2. 結果および考察	19
第3節 DMHF の吸入が血圧および心拍に及ぼす影響	21
2.3.1. 実験方法	21
2.3.1.1. 試料の調製および準備	21
2.3.1.2. DMHF がラットの血圧および心拍に及ぼす影響	22
(1) 供試動物	22
(2) ラットへの香気曝露方法	22
(3) ラットの血圧および心拍の測定	22
2.3.1.3. 統計処理	22
2.3.2. DMHF を除く香気寄与成分が血圧および心拍に及ぼす影響	22
2.3.2.1. 実験方法	23
(1) 試料の調製	23
(2) 供試動物	23
(3) 香気曝露方法	23
(4) 血圧および心拍の測定	24
2.3.2.2. 統計処理	24
2.3.3. 結果および考察	24
2.3.3.1. DMHF 吸入による血圧および心拍の低下	24

2.3.3.2.	DMHF を除く主要成分の吸入による血圧および心拍 への影響	26
第4節	DMHF の吸入が酸化ストレスに及ぼす影響	27
2.4.1.	実験方法	27
2.4.1.1.	試料の調製	28
2.4.1.2.	DMHF 吸入による血漿酸化ストレスへの影響	28
(1)	供試動物	28
(2)	香気曝露方法	28
(3)	血漿サンプルの採取	28
(4)	血漿ヒドロペルオキシド濃度の測定	29
2.4.1.3	統計処理	29
2.4.2.	結果および考察	29
第3章	DMHF の吸入が食欲および遺伝子発現に及ぼす影響	32
第1節	DMHF の吸入が食欲に及ぼす影響	33
3.1.1.	実験方法	33
3.1.1.1.	DMHF の吸入がラットの採食量および体重に及ぼす 影響	33
(1)	供試動物	33
(2)	香気曝露方法、採食量および体重の測定	33
(3)	統計処理	34
3.1.2.	結果および考察	34

第2節	DMHF 吸入後のラット脳内遺伝子発現の解析	37
3.2.1.	実験方法	37
3.2.1.1.	ラットへの DMHF 曝露	37
(1)	供試動物	37
(2)	香気の曝露方法	37
(3)	試料の採取	37
3.2.1.2.	DNA マイクロアレイ解析	38
(1)	RNA 抽出および RNA 標識	38
(2)	DNA マイクロアレイデータの正規化および主成分分析	38
(3)	Gene Ontology 解析	38
3.2.2.	結果および考察	39
第3節	遺伝子発現の定量的解析	42
3.3.1.	実験方法	41
3.3.1.1.	供試動物	42
3.3.1.2.	香気の曝露方法	43
3.3.1.3.	試料の採取	43
3.3.1.4.	RNA 抽出および逆転写反応	43
3.3.1.5.	リアルタイム PCR 法による遺伝子発現解析	44
3.3.1.6.	統計処理	44
3.2.2.	結果および考察	45
第4章	食肉の加熱により生成する DMHF の検出	49
第1節	食肉加熱香気中の DMHF 検出および寄与	49

4.1.1.	実験方法	50
4.1.1.1.	HS-SPME法による食肉加熱香気	50
(1)	食肉および加熱条件	50
(2)	香気成分の回収方法	51
(3)	GC/MS分析による香気成分の同定	51
4.1.1.2.	HS-SPME/GC-O法による食肉加熱香気中における DMHFの寄与	51
(1)	加熱条件	51
(2)	香気成分の回収方法	51
(3)	HS-SPME/GC-O法による香気寄与成分の検索	51
4.1.2.	結果および考察	52
第2節	加熱された食肉におけるDMHF生成量の比較	54
4.2.1.	実験方法	55
4.2.1.1.	加熱された食肉中におけるDMHFの定量	55
(1)	使用した食肉	55
(2)	加熱条件	55
(3)	香気成分の抽出	56
(4)	GC/MS分析	57
(5)	統計処理	57
4.2.1.2.	加熱温度および調理方法によるDMHF生成の変化	57
(1)	使用した食肉	57
(2)	加熱方法	57
(3)	香気成分抽出およびGC/MS分析	58

4.2.1.3.	メイラード反応基質の測定	58
(1)	使用した食肉	58
(2)	遊離アミノ酸含量の測定	58
(3)	グルコース含量の測定	59
(4)	統計処理	59
4.2.1.4.	メイラード反応基質の添加が加熱時の DMHF 生成に及ぼす影響	60
(1)	試料肉	60
(2)	加熱条件および抽出方法	60
(3)	統計処理	60
4.2.2.	結果および考察	60
4.2.2.1.	各種食肉中における DMHF 生成量の比較	61
4.2.2.2.	肉中メイラード反応基質と DMHF 生成	63
第3節	熟成および飼養条件が加熱時の DMHF 生成に及ぼす影響	65
4.3.1.	実験方法	67
4.3.1.1.	牛肉の熟成による DMHF 生成量の変化	67
(1)	牛肉の熟成方法	67
(2)	加熱方法および DMHF 定量	67
(3)	メイラード反応基質の測定	68
4.3.1.2.	飼養条件による DMHF 生成量の違い	68
(1)	牛の飼養条件	68
(2)	加熱方法および HS-SPME 法による香気成分分析	69

(3) DMHF の定量分析	69
(4) メイラード反応基質の測定	69
(5) 統計処理	69
4.3.2. 結果および考察	69
4.3.2.1. 熟成による DMHF 生成量の変化	69
4.3.2.2. 飼養条件による DMHF 生成量の違い	71
第5章 総括	75
謝辞	80
引用文献	82
図および表	97

第1章 緒論

第1節 食品のメイラード反応と香り

食品の加熱調理・加工時には、色調が変化する褐変反応がみられる。この褐変反応は、酵素的褐変反応と非酵素的褐変反応の2つに大別される。非酵素的褐変反応の主要なものにメイラード反応があり、1912年にフランスの Maillard¹⁾によって報告された。この反応は、食品の加熱調理・加工時にアミノ酸などのアミノ化合物と還元糖などのカルボニル化合物を基質として起こる化学反応である。メイラード反応ではメラノイジンのような褐色物質や多種多様な香気成分が生成され、これらは食品の品質や嗜好性に大きく影響する^{2,3)}。メイラード反応は高温加熱条件下において容易に起こるが、低温条件下であっても長期間の保存や熟成によって穏やかに反応が進行する。しかし、いずれの場合でも生成した香気成分はその食品の嗜好性に深く寄与する。メイラード反応による香気成分の生成は、普段の加熱調理時や食品の加熱加工時において必ず起こっていることが考えられ、食品の嗜好性向上のために必須な工程であるといえる。

メイラード反応による香気成分の生成機構は、Jousseら⁴⁾により大きく初期、中期、終期段階に分けられることが提唱されている。初期段階においては、アミノ酸などのアミノ基とカルボニル基との縮合反応が起こり、アマドリ化合物が形成される。このアマドリ化合物は反応の中期段階において、脱水、加水分解、逆アルドール反応などを経て、カルボニル化合物や香気成分であるフ

ラン類が生じる。また、同時にアミノ酸の分解生成物であるアンモニアや硫化水素の存在下で、ピロール類やピリジン類を形成する。また、高い pH 下の場合、アマドリ化合物からレダクトン類を経由して、ピラノン類やフラノン類が生成される。さらに、終期段階においては、カルボニル化合物がさまざまな反応を経て、褐色物質やその他の香気成分が生成されるとともに、ストレッカー分解反応も起こる。ストレッカー分解反応とは、 α -ジカルボニル化合物とアミノ化合物が反応し、アルデヒド類やピラジン類を生成する反応である。これらの反応を経て形成された香気成分は、アーモンドやナッツ様の香り、焦げたような香り、ポップコーン様の香り、甘い香りなどの特徴を有している^{3,5)}。そのため、メイラード反応を起こした食品の全体的な香気特徴として、甘く香ばしいという点が挙げられる。メイラード反応によって生成する香気成分は、用いるアミノ化合物や還元糖の種類^{6,7)}、反応時間⁸⁾や反応温度⁹⁾など様々な条件によって左右される。特に、アミノ酸の種類が異なると、生成される香気成分の種類やその生成量も異なるとされている。例えば、ロイシンやバリンといった分岐鎖アミノ酸を用いたメイラード反応で生成する香りは、チョコレート様やフルーツ様の香りを呈する^{10,11)}が、含硫アミノ酸であるシステインやメチオニンでは焼き過ぎたポテトの香りや肉様の香りを呈するとされている^{10,12)}。実際の食品では、基質であるアミノ化合物はペプチドやアミノ酸が混在している。そのため、どのアミノ酸が優先的に反応で利用されるかについては不明である。しかし通常、アミノ基はペプチド結合を形成している状態(タンパク質、ペプチド)で食品中に存在する。そのため、側鎖に別

のアミノ基を有するアルギニン、リジンまたは構造が最も単純なグリシンが、食品中のメイラード反応に大きく関与することが示唆されている¹³⁾。

加熱時のメイラード反応の影響を受ける食品のひとつに食肉がある。食肉の糖質含量は少ないが、アミノ化合物であるアミノ酸やペプチドは豊富に含まれる。そのため、加熱時のメイラード反応を介して、様々な香気成分が生成される^{5,14)}。実際に、加熱前の食肉では僅かな酸臭や血液臭があるものの、特徴的な香りは感じられない。しかし、加熱調理後には食欲をそそる香ばしい香気成分が生成され、嗜好性が大きく向上することが知られている。また、焼く、煮る、揚げるなどの調理方法や温度、時間などの諸条件により、生成する香気成分の組成が異なることも報告されている¹⁵⁻¹⁶⁾。例えば、焼いた牛肉の加熱香気では、肉様、ロースト様、脂様、アーモンド様の香りが感じられるが、煮たものでは全体的に香りの生成量が減少し、肉様や青草のような香りが強く感じられるようになる¹⁷⁾。つまり、加熱条件などによって生成される香気成分の種類や生成量も異なることが考えられる。

第2節 香気成分により誘導される生理作用

食品を始めとして、香りは我々の生活に密接に関係している。このような香りの利用方法として、ある不快臭を他の香気成分と混在させることによって、不快臭を認知できないようにするマスキング効果を利用した不快臭の改善や心身の治療に用いるアロマセラピーにも利用されている。これは、吸入された香気成分が

生理作用を誘導することを利用したものである。1928年にフランスの Gattefossé¹⁸⁾がアロマセラピーの研究に着手し、香りは処方薬として病気の予防や治療に広く活用されるようになったとされている。さらに、香気成分の吸入による心理的あるいは生理的な作用が科学的に検証され、1982年頃より香気成分によるストレス軽減、睡眠改善、作業率向上などの様々な効果が報告されるようになった¹⁹⁻²¹⁾。

香気成分が生理作用を及ぼす経路には、主に心理的効果と薬理的効果の2つが存在すると考えられている²²⁾。心理的効果とは、その香気成分が嗅覚器を介して脳を刺激することで生じる一連の心理・生理反応である。この効果は、香りの認知で重要となる大脳辺縁系と密接に連携していることが明らかになっている。大脳辺縁系には、記憶を司る海馬や快・不快を決める扁桃体が存在し、心理的効果に大きく影響する。さらには、大脳辺縁系からの指令は視床下部に伝えられ、自律神経系、内分泌系および免疫系などの活動に変化をもたらす。これにより、精神状態の鎮静や興奮といった生理作用が誘発される。一方、薬理的効果は、香気成分が肺や皮膚から吸収され、血液に吸収されたのちに生理作用を示す経路である。香気成分の多くは脂溶性のため、血中に吸収された香気成分は血液脳関門を容易に通過し、その効果を示すとされている²³⁾。この2つの経路では、効果が現れるまでの時間が異なることが大きな違いとして挙げられる。心理的効果では、香気成分の情報が瞬時に大脳辺縁系などに伝達されるため、非常に短時間で生理作用が誘発される。例として、ラベンダーやレモンの精油を吸引マスクによって、ヒトに吸引させたところ、吸引後3

分ほどで自律神経活動が変化することが確認されている²⁰⁾。一方の薬理的効果では、香気成分が血中から脳に取り込まれて生理作用を示すまで、最低でも20分程度要すると考えられている^{21,24)}。このように、香気成分は嗅覚器を介して脳や神経系に影響すること、また体内に取り込まれることで生体に様々な生理作用をもたらす。

香気成分が生理作用を示す際、重要となる機構のひとつに自律神経系がある。自律神経系には交感神経と副交感神経が存在し、呼吸、消化、代謝、体温など生命維持に関わる重要な機能を調節している²⁵⁾。血圧や心拍などを始めとした生体パラメーターは、自律神経系の支配を受けながら、その恒常性を維持している。交感神経系は「fight or flight」の神経が集合しており、動物が闘うかあるいは逃げるために効果器を反応させるような神経系である²⁵⁾。この神経系は、血圧や心拍が増加することで必要な血液を臓器に送るとともに、アドレナリンなどの興奮系神経伝達物質の放出を促す。一方で、副交感神経系は安静の神経系であり、その活性化により血圧や心拍は低下し、生体を沈静状態へと誘導する。さらに、抑制系の神経伝達物質であるアセチルコリンなどを介して、消化管の蠕動運動や栄養素の吸収を亢進する。このように自律神経系は、生理機能の維持に大きく関連していることから、本来正常に保たれている自律神経系の活動が長期にわたって乱れることにより、多くの疾患とも関連がある活性酸素の増加を通じて心身の不調に繋がるという報告もある²⁶⁻²⁸⁾。

香気成分の吸引による自律神経系の変化やそれに伴う生理機能の変化に関する研究は多く報告されている。例えば、グレープ

フルーツ精油の香気は、ラットの交感神経系を活性化させ、脂肪分解の亢進とともに、食欲が低下することが報告されている²⁹⁾。また、小長井ら³⁰⁾は、未加熱および加熱大豆の香りが自律神経系を介して脳機能に作用し、生体の沈静化の指標である α 波を上昇させることを報告している。このような研究からも、香気成分による生理作用には自律神経系が大きく関わっている。さらに、香気成分は遺伝子発現にも影響を及ぼすことも報告されている。例えば、ラベンダー香気の主成分であるリナロールを、拘束ストレスを与えたラットに曝露した際に、ストレスによって変化する遺伝子の発現が抑制されている³¹⁾。また、Seoら³²⁾は、コーヒー豆の香りをラットに曝露した際、ラットの脳内で抗酸化やストレスの緩和に関わるタンパク質発現が増加することを報告している。

このような香気成分が誘導する生理作用に関する研究は、香草や果実に由来したものが多く、食品に由来した香気成分に着目した研究は乏しい。食肉などの加熱工程を伴う食品の香りに大きく影響するメイラード反応においても、非常に多くの香気成分が生成されるが、そのような香気の吸入による生理的な作用は、最近までまったく未解明であった。

第3節 メイラード反応により生成する香気成分 DMHF

当研究室では、メイラード反応生成香気の吸入により発現する生理的な作用について検討を行い、新たな知見を見出した³³⁻³⁵⁾。食肉タンパク質分解物とキシロースのメイラード反応の香気をWistar系ラットに曝露したところ、血圧降下を誘導することが判

明した³⁴⁾。さらに、この血圧降下がメイラード反応生成香気中の2,5-ジメチル-4-ヒドロキシ-3(2*H*)-フラノン (DMHF) による自律神経系の変化を介して誘導されるというメカニズムの解明に成功した³⁴⁾。この作用は、嗅覚麻痺ラットを用いた検討では、血圧降下は見られないことからラットの嗅覚器を介して誘導される効果であるといえる。さらに最近、グリシンとグルコースのメイラード反応で生成する DMHF の吸入がヒトの自律神経系および中枢神経系に作用し、脳波の変化や瞳孔縮瞳率の上昇を誘導することも明らかにした³⁵⁾。これら一連の作用は、DMHF を吸入することにより、副交感神経系が優位になることに起因し、様々な生理作用が誘導される。

吸入により生理作用を発現する DMHF は、1960 年に初めて Hodge ら³⁶⁾により、メイラード反応生成物中に検出された。以降、メイラード反応を利用した様々な食品（醤油、味噌、食肉、ビールなど）で DMHF は検出されている³⁷⁾。また、加熱の工程が無いイチゴやパイナップルなどの果物においても検出されており³⁸⁾、これら果物での DMHF 生成は酵素反応によって行われることが報告されている³⁹⁾。DMHF は甘くカラメル様の香りを呈し、その食品全体の香りに寄与するだけでなく、食品の甘味を増強させることが報告されている⁴⁰⁾。水溶液中の閾値が 60 $\mu\text{l/L}$ と低く、無有害作用量 (NOAEL) は一日に 200 mg/kg であり、発がん性⁴¹⁾もないため食品香料および香粧品香料として多くの国で認可・利用されている³⁸⁾。また、DMHF の経口的摂取による生理的な作用として、抗酸化活性⁴²⁾や抗菌作用⁴³⁾が報告されているが、その香気の吸入による保健的な作用はこれまで報告され

ていなかった。

当研究室での先行研究より、DMHFが自律神経系を介して生理作用を誘導することが判明した。先述の通り、自律神経系は血圧を始めとした生体パラメーターや食欲なども制御することから、DMHF吸入によるさらなる生理作用の発現に繋がることが予想された。さらに、香気成分の吸入により変化する遺伝子についてもDMHFによる影響が予想されるが、これまでそのような報告はない。自律神経系を介した生理作用に加えて、遺伝子発現との関連を明らかにすることは、DMHFが生体に及ぼす影響の学術的な知見の集積になるだけでなく、食品などへの積極的な応用が期待される。また、本研究では加熱時のメイラード反応が重要となる食品のひとつである、食肉の加熱によるDMHF生成に注目した。

これまで食肉では、牛肉の加熱香気中にものみDMHFが検出されていた⁴⁴⁾ものの、詳細な検討例はなく、その生成に影響する要因については不明であった。食肉におけるDMHF生成要因の解明は、食肉の嗜好性向上だけでなく、吸入により発現する生理作用を介した保健的機能性の付与も期待される。

第4節 本研究の目的・意義

以上を研究背景として、本研究ではメイラード反応により生成する香気成分DMHFの吸入による生理作用を検討するとともに、食肉における生成量の比較や生成要因を解明することを目的とした。

本論文は、5章で構成されている。第1章緒論に続き、第2章

では、アミノ酸と還元糖のモデルメイラード反応により生成した香気をラットに曝露し、自律神経系の支配を受ける血圧および心拍に対する影響を検討した。また、Aroma extract dilution analysis法を用いた Gas chromatography-olfactometry 分析によって試料中の香気寄与成分を検索した。さらに、自律神経系の影響を受け、様々な疾病の原因となる活性酸素への DMHF 吸入による影響を明らかにした。

第 3 章では、自律神経系の影響を受ける食欲に注目し、ラットに対して DMHF を定期的に吸入させ、採食量に及ぼす影響を明らかにした。さらに、香気成分の情報伝達が脳内で行われることから、脳における遺伝子発現の変化を検討した。DMHF 吸入後のラットの脳を DNA マイクロアレイ法または定量的 PCR 法により解析を行い、DMHF 吸入により発現する生理作用と遺伝子発現との関連を明らかにした。

第 4 章では、これまで詳細な検討例がみられない食肉加熱香気中における DMHF の検出を試み、加熱された食肉中の DMHF 生成量を定量した。畜種や部位が異なる食肉を実験に使用し、DMHF 生成量の比較を行った。また、熟成や飼養条件が DMHF 生成に及ぼす影響に明らかにするとともに、食肉中のメイラード反応基質との関連を解明した。

最後に第 5 章では、メイラード反応により生成する香気成分 DMHF について、本研究で得られた知見を総括し、さらに今後の展望についてまとめた。

第2章 DMHFの吸入が生体パラメーターに及ぼす影響

第1節 アミノ酸・還元糖のメイラード反応によって生成する香気が血圧および心拍に及ぼす影響

メイラード反応は、タンパク質中のペプチドやアミノ酸と還元糖を基質として反応する。そのため、これら基質が豊富な食品では加熱時のメイラード反応が容易に起こることが予想される。当研究室における先行研究として、食肉タンパク質分解物とキシロースで生じるメイラード反応香気が、ラットの自律神経系を介して血圧降下を誘導することを見出した³⁴⁾。この先行研究では、アミノ酸やペプチドを基質とした複雑モデル系において検討を行った。第1章で述べたように、実際の食品でのメイラード反応では、反応性の高いアミノ酸とカルボニル化合物との間で反応が進行することが考えられる。また、アミノ酸と還元糖を用いた単純モデル系において生成する褐色物質は、抗酸化作用⁴⁵⁾や抗炎症作用⁴⁶⁾などの保健的機能を有していることが報告されている。しかし、単純モデルから生成するメイラード反応香気の吸入による生理的な作用は不明である。単純モデルから生成する香気の生理作用を複雑モデル同様に解明できれば、香りの面から、さらなる機能性の付与が期待される。そこで本章では、アミノ酸と還元糖のモデルメイラード反応を作製し、その香気成分の吸入による生理的な作用を検討した。実験で使用したアミノ酸は、食品中で容易に反応すると考えられているグリシン、アルギニンまたはリジンをそれぞれグルコースと共に加熱した試料を用いた。なお、本実

験では生理的な作用を検討するため、ラット生体パラメーターの変化を測定した。本章では、自律神経系の影響を受ける血圧および心拍、そして酸化ストレスに対するメイラード反応生成香気の吸入による影響を検討した。

2.1.1. 実験方法

2.1.1.1. メイラード反応試料の調製

メイラード反応に用いるアミノ酸としてグリシン、アルギニン、リジン（関東化学，東京）を各 1 mol/L、還元糖であるグルコース（関東化学，東京）1 mol/Lとなるように 0.25%炭酸ナトリウム水溶液で溶解した。溶解した後に 6N 塩酸あるいは 10N 水酸化ナトリウム水溶液を用いて溶液を pH9 に調整した。90℃で 30 分間加熱してメイラード反応させ、反応終了後、氷で冷却し反応を停止させた。なお、各アミノ酸から調製したメイラード反応試料をそれぞれ、「グリシン反応物」、「アルギニン反応物」、「リジン反応物」とした。

2.1.1.2. 供試動物

4 週齢の Wistar 系雄性ラット（日本クレア，東京）15 匹を購入し、実験には、8 週齢時のラットを使用した。飼育の明暗条件は午前 7 時から 12 時間、午後 7 時から 12 時間とし、4 週間の予備飼育を行った。飼育は市販の固形飼料（CE-2，日本クレア，東京）と水道水を自由摂取させた。なお、すべての動物実験は、北

里大学獣医学部動物実験倫理委員会の承認のもと行った。(承認番号：16-169)

2.1.1.3. ラットへの香気曝露方法

2.1.1.1 において調製した各試料を 50 ml 容量の二口フラスコに 5 ml 入れ、30 分間平衡させ、二口フラスコ内のヘッドスペースに香気を充満するようにした。また、コントロールとして蒸留水を曝露する群を設定した。

香気の曝露方法を Fig. 1 に示した。フラスコの片方の口にエアポンプ、もう片方の口に香気を曝露するためのチューブを取り付け、先端に漏斗を取り付けた。ポンプから空気が送り出されていることを確認し、一定の流量で二口フラスコ内の空気をラットの鼻先に曝露できるようにした。このような曝露方法で、蒸留水をラットに曝露させる群をコントロール群とし、3 種のアミノ酸から調製したメイラード反応香気を曝露した計 4 群で実験を行った。

なお、曝露は香気に対するラットの順応をできるだけ避ける目的から、週に 1 度とした。

2.1.1.4. ラットの血圧および心拍の測定

ラットポケットに保定させたラットが落ち着くまで静置させた。その後、非観血式血圧自動測定装置 (BP-98A, ソフトロン, 東京) を用いて、ラットの尾静脈の収縮期血圧および心拍を測定した。血圧および心拍をあらかじめ測定し、値が安定したことを確認してから香気の曝露を行った。このときの香気曝露は 5 分間行い、曝露終了後の変化を測定するため、さらに 10 分間測定を行

った。なお、測定は暗期直前の夕方 16 時頃から開始した。また、これらの測定はラット 1 匹につき最低 3 回行った。

2.1.1.5. 統計処理

すべてのデータは平均値±標準誤差で表し、二元配置分散分析 (Two-way ANOVA) を行い、試料と経過時間に交互作用が認められた場合に、Dunnett's test による各時点でのコントロール群との多重比較検定を行った。

2.1.2. 結果および考察

グリシン、アルギニン、リジンを用いて調製したメイラード反応試料をラットに曝露し、香気曝露開始前の値を基準とした、継続的な変化を Fig. 2-A に示した。グリシン反応香気では香気の曝露中に、素早く血圧の降下が起こり、5 分後においてコントロール群と比較して有意な ($p<0.05$) 血圧降下が認められた。その後も血圧は降下を続け、曝露開始から 10 分および 15 分後においても有意な ($p<0.01$) 血圧降下が認められた。アルギニン反応香気の曝露においては、香気曝露 5 分後でコントロールよりも血圧が降下し、曝露 10 分後において有意な ($p<0.05$) 血圧降下が認められた。グリシンおよびアルギニン反応香気の曝露による血圧降下が認められた一方で、リジン反応香気を曝露した際には血圧への影響は認められなかった。心拍に関しても、グリシン反応香気は曝露中から変化がみられ、曝露から 10 および 15 分後において有意に ($p<0.05$) 低下することが明らかになった (Fig. 2-B)。ア

ルギニン反応香気では有意な差は認められなかったが、コントロールよりも低値を示していた。

グリシンおよびアルギニン反応香気をラットに曝露した際に血圧および心拍の低下が認められた。これらの変化は、香気の曝露 5 分後という非常に早い段階でみられた。第 1 章で述べたように、香気成分が生理作用を誘導する経路には、心理的効果と薬理的効果が存在する。本実験では、メイラード反応香気に対する素早い生体の変化が確認されたことから、即座に自律神経系に作用する心理的効果を介することで、血圧および心拍の変化が誘導されたことが考えられる。香気成分が自律神経系に働きかけるためには、嗅覚器からその成分を吸入し、受容体に結合する必要がある。Shen ら²⁹⁾は、血中グリセロール濃度を上昇させるグレープフルーツの香気的作用が、鼻粘膜硫酸亜鉛溶液処理により、消失することを報告している。嗅覚器を介して自律神経系に働きかける経路では、嗅神経から大脳辺縁系への投射が瞬時的であるため気分、生理、行動への影響は迅速に現れる。そのため、グリシンおよびアルギニン反応香気の吸入による血圧および心拍の変化は嗅覚器を介して、自律神経活動の変化によって誘導されたことが考えられた。自律神経活動の変化は、様々な生体反応の変化を誘導するが、副交感神経系が優位になると血圧や心拍は低下する²⁵⁾。そのため、グリシンおよびアルギニン反応香気は吸入により、交感神経系の活動が抑制され、副交感神経系が優位となったことが考えられる。さらに、5 分という短い曝露時間による生体への影響を検討したが、その影響は曝露 15 分後においても継続していた。香気成分の曝露による交感神経活動および副交感神経活動

の変化は、比較的長く継続することが報告されている^{29,47)}。これらの結果より、グリシンおよびアルギニン反応香気の吸入は、嗅覚器で受容され、副交感神経系を介して、血圧および心拍の低下を誘導することが示唆された。一方、リジン反応香気では血圧への影響は認められなかった。前述のとおり、メイラード反応では用いるアミノ酸種によって生成する香気成分が異なることが報告されている^{6,7,10-12)}。そのため、リジン反応香気には血圧および心拍に影響を及ぼす成分が含まれていなかったことが考えられた。そこで次に、各モデル反応香気中の香気成分組成を明らかにするとともに、生体パラメーターに影響した成分を検索した。

第2節 ラットの血圧および心拍の低下に關与するメイラード反応生成香気成分の検索

第1節の結果から、グリシンおよびアルギニンを用いたメイラード反応香気の曝露によって、比較的短時間で血圧および心拍の低下が確認された。このことから、メイラード反応生成香気中に含まれる血圧降下を誘発する香気成分が、自律神経系に作用することが示唆された。そこで、本節では血圧降下に關与する香気成分を検索するために、香気抽出物希釈分析(Aroma extract dilution analysis: AEDA)法⁴⁸⁾を用いたガスクロマトグラフィ-匂い嗅ぎ(Gas chromatography-olfactometry: GC-O)分析を行った。

2.2.1. 実験方法

2.2.1.1. 香気成分の検出に用いた試料

2.1.1.1.で調製したアルギニンまたはリジンメイラード反応試料を用いた。なお、グリシン反応試料については既報⁴⁹⁾の値を結果において引用した。

2.2.1.2. 試料中の香気寄与成分の検出

(1) 試料からの香気成分抽出

メイラード反応試料に含まれる香気成分を抽出するため、ポラスポリマー樹脂 Tenax-TA (mesh 60/80、ジーエルサイエンス、東京) を、ソックスレー抽出装置を用いて、ジエチルエーテルで10時間精製した。精製した5gのTenax-TAを50 mLのメタノールで膨潤させ、ガラスカラム管に充填した。充填したTenax-TAに、蒸留水(50 mL)、ジエチルエーテル(50 mL)、蒸留水(50 mL)、メタノール(50 mL)、蒸留水(100 mL)を順に流し、Tenax-TAカラムを作製した。

アルギニンおよびリジンをそれぞれグルコースと加熱して調製したメイラード反応試料25 mLに蒸留水25 mLを加えた。これらを作製したTenax-TAカラムに流し、香気成分を樹脂に吸着させた。吸着した香気成分は、ペンタンおよびジエチルエーテルを1:1の割合で混合した混合溶媒(ペンタン・エーテル)を用いて吸着させた香気成分を溶出させた。その後、無水硫酸ナトリウムで一晩脱水した。脱水後、高真空香気蒸留(Solvent assisted

flavor evaporation: SAFE) によって不揮発性成分を除去し、常圧蒸留および窒素ガスによって溶媒を留去し、香気濃縮物を得た。同様の操作を 5 回繰り返して、香気濃縮物を得た。香気濃縮物は、分析まで -80°C で密閉保存した。

(2) AEDA 法による試料中香気寄与成分の同定

(1) で調製した香気濃縮物を原液として、GC-O 分析を行った。原液で香りを感じることのできたピークについて、原液 $10\ \mu\text{L}$ とペンタン・エーテル $30\ \mu\text{L}$ を加え、4 倍希釈溶液として GC-O 分析を行った。以下、すべてのピークで香りを感じできなくなるまで、同様の手順で、4ⁿ 倍に希釈し、順次 GC-O 分析を行った。最後に香りを感じることのできた希釈倍率を、その香気成分の Flavor dilution (FD 値) として試料香気への寄与度を評価した。なお、GC-O 分析は最低 3 人のパネリストに行ってもらい、FD 値はその平均値を算出した。

GC-O 分析は、GC-2010 Plus (島津製作所) および Sniffer 9000 System (Brechtbühler) を用いて行った。キャピラリーカラムには DB-WAX ($60\ \text{m} \times 0.25\ \text{mm} \times 0.25\ \mu\text{m}$, Agilent Technologies) を用い、キャリアガスとしてヘリウムを使用した。注入口温度は 210°C 、検出器温度は 210°C 、オープン温度は 40°C 、Sniffer カラム温度は 200°C に設定した。スプリットレスモードで $1\ \mu\text{L}$ の試料を注入した。昇温条件は、 40°C で 10 分間保持した後、 $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で昇温し、 210°C で 30 分間保持するように設定した。香気成分の同定は、GC/MS-QP2010 (島津製作所, 京都) を用いて行った。キャピラリーカラム、注入口温度、検出器温度およびオープン温

度の昇温温度は GC-O 分析と同様である。フラグメントイオンは EI (Electron Ionization) により 70 eV で発生させた。インターフェース温度は 210℃、イオン源温度は 200℃とした。各香気成分の同定は、標準化合物の保持時間およびマススペクトルとの一致により行った。

2.2.1.3. 検量線の作成および香気寄与成分の定量

2 種のアミノ酸を用いて調製した各メイラード反応試料から、香気濃縮物を調製した。内部標準物質 (Internal Standard: IS) として、0.5 ppm の methyl decanoate (東京化成工業, 東京 >98%) を 5 μ L 加え、GC および GC/MS 分析に供した。GC 分析の条件は、2.2.1.2. (2) での条件と同様に行った。

5, 50, 500 ppm の 2,5-ジメチル-4-ヒドロキシ-3(2*H*)-フランオン (DMHF, 東京化成工業, 東京 >98%)、10, 50, 100, 500 ppm のメチルピラジン (東京化成工業, 東京 >98%)、1, 10, 100, 200 ppm の 2,3-ジメチルピラジン (東京化成工業, 東京 >99%)、1, 10, 100, 500 ppm の 2,3,5-トリメチルピラジン (東京化成工業, 東京 >95%)、5, 10, 20 ppm の酢酸 (関東科学, 東京 >99.5%) および IS を 100 mL となるように蒸留水を添加し、それぞれの香気濃縮物を調製後、GC 分析に供した。各香気成分のピーク面積を、IS のピーク面積で除した値、すなわち IS 比を算出した。各香気成分の添加濃度と各 IS 比から検量線を作成した。作成した検量線を用いて各メイラード反応試料中に含まれる香気寄与成分の濃度 (ppm) を算出した。なお、各モデル香気で共通していた香気成分の定量に用いた回帰式を Table 1 に示した。試料中の香気成

分の定量は、最低 2 回行いその平均値を算出した。

2.2.1.4. Odor Active Value (OAV)値の算出

OAV 値は、試料中での濃度がその香気成分の閾値以上である香気成分を検出する手法であり、この値が 1 以上を示す香気成分は、その試料の香気に大きく寄与している⁴¹⁾。2.2.1.3.において、定量値を各成分の閾値で除した値を求めた。なお、正確な閾値が不明であったものについては OAV 値を算出していない。

2.2.2. 結果および考察

アルギニンおよびリジン反応香気 of 香気濃縮物を GC-O 分析に供し、AEDA 法を用いて香気寄与成分を検索した結果を Table. 2 に示した。なお、グリシンから調製した試料に関しては既報⁴⁹⁾の値を引用した。アルギニン反応香気において、高い香気寄与度を示した香気成分として、ローストナッツ様香気を呈するメチルピラジン (FD 値=0, OAV 値=615)、アーモンド様香気を呈する 2,3-ジメチルピラジン (FD 値=3, OAV 値=41.5)、酸っぱい香気を呈する酢酸 (FD 値=0, OAV 値=49)、カラメル様香気を呈する DMHF (FD 値=6, OAV 値=2250) を同定した。また、リジン反応香気においてはアルギニン反応香気よりも多種類の香気成分が同定された。リジン反応香気において、高い香気寄与度を示した化合物として、ローストナッツ様香気を呈する 2,3-ジメチルピラジン (FD 値=3, OAV 値=74)、2,3,5-トリメチルピラジン (FD 値=2, OAV 値=1250)、カラメル様香気を呈する 2-ヒドロキシ-3-メ

チル-2-シクロペンテン-1-オン (FD 値=1, 閾値不確定のため OAV 値なし)、DMHF (FD 値=8, OAV 値=7613)、2,5-ジヒドロキシ-6-メチル-4H-ピラノン-4-オン (FD 値=4, 閾値不明確のため OAV 値なし) が同定された。

香気成分分析の結果、アルギニンおよびリジン反応香気の両試料で高い FD 値を示した香気成分は 2,3-ジメチルピラジンおよび DMHF であった。Zhou ら⁴⁹⁾は、グリシン/グルコースメイラード反応香気の香気成分分析を行い、同様に 2,3-ジメチルピラジンと DMHF を主要成分として同定している。一方、リジン反応香気においてはこれらに加えて、より多く、香りを感じることのできたピークが存在した。しかし本節では、試料中に含有される量が極めて少ないことから、それらの成分を同定するに至らなかった。

2,3-ジメチルピラジンのようなピラジン類は、メイラード反応の終期段階で同時に起こるストレッカー分解反応によって生成される。これらの香気成分は、総じて香ばしい香りを呈することが特徴的である。ピラジン類は経口的に摂取した際、血管内皮細胞に作用し、血管弛緩誘導物質 (プロスタサイクリン) の産生を亢進することが知られている⁵⁰⁾。また、吸入による効果として 2,3-ジメチルピラジンを吸入した際に、ヒトの前頭前野前額中央部において酸素化ヘモグロビン濃度が減少することも報告されている⁵¹⁾。また、全ての試料で DMHF が最も高い FD 値および OAV 値を示した。先行研究における複雑系においても、DMHF は主要成分として検出されており³⁴⁾、吸入による生理作用に寄与する成分のひとつである。そのため、単純モデルであるグリシンおよびアルギニン反応香気の吸入による血圧および心拍の低下に

は、DMHFが大きく寄与していることが考えられた。それぞれの試料中に含まれるDMHFの濃度は57.7、67.5 ppmであった。リジン反応香気においてもDMHFは検出されたが、228.4 ppmと非常に高い濃度で存在した。各モデル反応香気中のDMHF濃度の違いによって、生体に及ぼす影響が異なることが考えられたため、次に各モデル反応香気に含まれるDMHF濃度でラットに曝露し、血圧および心拍に及ぼす影響を検討した。

第3節 DMHFの吸入が血圧および心拍に及ぼす影響

第2節より、各アミノ酸に由来するメイラード反応香気の主要香気成分としてDMHFが同定された。このDMHFがラットの血圧降下に関与したことが示唆された。さらに、すべてのメイラード反応香気においてDMHFは検出されていたが、その濃度が異なることが明らかとなった。そこで、DMHFの濃度が血圧および心拍の低下に寄与したのではないかと考え、DMHFを各モデルメイラード反応香気に含まれる濃度に調製したものをラットに曝露し、血圧および心拍への影響を検討した。

2.3.1. 実験方法

2.3.1.1. 試料の調製および準備

DMHFをそれぞれ57.7、67.5、228.4 ppmとなるように蒸留水で希釈し、50 mL容量の二口フラスコに5 mL入れ、香気を充満さ

せた。

2.3.1.2. DMHF がラットの血圧および心拍に及ぼす影響

(1) 供試動物

5 週齢の Wistar 系雄性ラット（日本クレア，東京）24 匹を購入し、実験は、ラットが 9 週齢の時に行った。飼育の明暗条件は午前 7 時から 12 時間、午後 7 時から 12 時間とし、4 週間の予備飼育を行った。飼育は市販の固形飼料（CE-2，日本クレア，東京）と水道水を自由摂取させた。

(2) ラットへの香気曝露方法

2.1.1.4.での方法と同様に行った。

(3) ラットの血圧および心拍の測定

2.1.1.5.での方法と同様に行った。

2.3.1.3. 統計処理

2.1.1.6.での方法と同様に行った。

2.3.2. DMHF を除く香気寄与成分が血圧および心拍に及ぼす影響

本章第 2 節の結果より、メイラード反応試料中の主要成分である DMHF が、ラットの血圧および心拍の低下に寄与することが推測された。そこで、血圧および心拍への影響が最も顕著であった

グリシン-グルコースメイラード反応試料中の DMHF 以外の主要成分をラットに曝露した。これは DMHF を除く主要成分の構築液の吸入が、生体へ影響するかどうかを検討することで DMHF 吸入による効果がより明確なるためである。

2.3.2.1. 実験方法

(1) 試料の調製

グリシンとグルコースから調製したメイラード反応試料中の主要成分である 2,3-ジメチルピラジン (0.92 ppm), 2,3,5-トリメチルピラジン (8.00 ppm), 酢酸 (7.42 ppm)となるように混合し、香気構築液を作製した。これらの濃度は Zhou らの報告⁴⁹⁾にある数値を用いた。

(2) 供試動物

4 週齢の Wistar 系雄性ラット (日本クレア, 東京) 15 匹を購入し、実験には、8 週齢時のラットを使用した。飼育の明暗条件は午前 7 時から 12 時間、午後 7 時から 12 時間とし、4 週間の予備飼育を行った。飼育では、市販の固形飼料 (CE-2, 日本クレア, 東京) と水道水を自由摂取させた。

(3) 香気曝露方法

2.1.1.4.での方法と同様に行った。

(4) 血圧および心拍の測定

2.1.1.5.での方法と同様に行った。

2.3.2.2. 統計処理

2.1.1.6.での方法と同様に行った。

2.3.3. 結果および考察

2.3.3.1. DMHF 吸入による血圧および心拍の低下

グリシン、アルギニン、リジンを用いて調製したメイラード反応試料に含まれる DMHF 濃度に調整した各溶液をラットに曝露し、血圧および心拍に及ぼす影響を検討した。その結果を Fig. 3-A に示した。結果は香気曝露開始前の血圧および心拍の値を基準とした、経時的な変化を 5 分おきに示している。グリシンおよびアルギニン反応香気の濃度である 57.7 ppm、67.5 ppm では香気の曝露中に、素早く血圧降下が起こり、5 分後においてコントロール群およびリジン反応香気に含まれる 228.4 ppm と比較して有意な ($p < 0.01$) 血圧の降下が認められた。その後も血圧は降下を続け、曝露開始から 10~15 分後においても同様にコントロール群と比較して有意な ($p < 0.01$) な変化が継続した。一方、モデル香気の結果同様に、228.4 ppm の DMHF を曝露したラットでは血圧への影響は認められなかった。心拍に関しては、57.7 および 67.5 ppm の DMHF の曝露により、5 分後から有意な差が継続し、15 分後においてもその変化は継続した (Fig. 3-B)。しかし、228.4 ppm の DMHF ではコントロール群との間に差は認められなかつ

た。これらの結果より、メイラード反応試料中に含まれる DMHF が血圧および心拍を低下させる香気成分であることが明らかになった。また、DMHF 吸入による生体への影響は濃度によって異なり、高濃度では生理作用を誘導しないことも判明した。

香気成分の中には、その吸入により様々な生理的な作用を誘導するものが存在する。しかし、その構造や濃度によって異なった生理作用を示すことも報告されている。例えば、柑橘系の果物で広く検出されるリモネンには R 体と S 体が存在し、吸入による生理的な作用も異なる。ヒトにおいて、(S)-リモネンの吸入は気分に影響はしないが、(R)-リモネンは覚醒作用を示す⁵²⁾。また、香気成分の濃度も生理作用に大きく影響する。ジャスミン茶の香気は低濃度において副交感神経活動を亢進するが、高濃度においては交感神経活動を亢進することが報告されている⁵³⁾。これらの報告にもあるように、吸入により生理作用を誘導する香気成分であっても、その構造や濃度が生理作用の発現に大きく影響する場合がある。これに加えて、ラットの嗅覚受容体が脱感作を引き起こしたことも、原因のひとつとして考えられる。嗅覚における脱感作は、香りを感じることができなくなることを指す⁵⁴⁾。そのため、高濃度での DMHF 香気の曝露によって、脱感作が誘発され、香りを感じることができなくなったことが考えられる。特に香気成分の吸入による心理的効果を期待する場合は、香りの認知が非常に重要になる。そのため、DMHF が高濃度になった際の生理作用への影響は、より詳しく検討する必要がある。

今回の検討では、3つのメイラード反応試料に含まれる DMHF の濃度に調整したものをラットへ曝露したため、DMHF が生理作

用をもたらす適切な濃度の範囲は不明である。しかし、すでに生理作用を示すことが報告されている濃度^{34,49)}と兼ね合わせると、5.7～67.5 ppm の間で生理作用を誘発することが示唆される。また、ヒトにおいても、DMHF の濃度を分けてその香気を吸引させた際に、2.5～100 ppm の範囲で脳波に異なる影響を及ぼすことが明らかにされており、低濃度でより生体を沈静状態に誘導する^{34,51)}。実際の食品における例を挙げると、メイラード反応を利用した食品において、約 10 ppm^{49,55,56)}という比較的低い濃度で存在することが報告されている。つまり、普段食品に存在するような濃度の DMHF の吸入でも生理作用は発現することが十分に考えられる。

2.3.3.2. DMHF を除く主要成分の吸入による血圧および心拍への影響

DMHF を除く、グリシン反応香気中に含まれる主要香気成分で構築された溶液をラットに曝露した。しかし、ラットの血圧および心拍に大きな変動は認められなかった (Fig. 4-A および B)。この結果より、メイラード反応生成香気の吸入により誘導される変化は、DMHF が大きく寄与していることが明らかになった。

構築液の調製に用いた香気成分は 2,3-ジメチルピラジン、2,3,5-トリメチルピラジン、酢酸である。3 種類のうち、2 つはピラジン類でありラットにおいて、いくつかのピラジン類はラットの忌避行動を誘発することが報告されている⁵⁷⁾。これは、オオカミなどのラットの天敵に値する動物の尿中にピラジン類が含まれることに起因するとされている。よって、ラットではこれら

の香気成分が逆にストレスとなり、交感神経系の興奮に繋がることが考えられる。しかし、本実験ではこれらピラジン類の吸入による血圧および心拍の増加は認められなかった。しかし、ヒトにおいて Ohata ら³⁴⁾は DMHF あるいは 2,3-ジメチルピラジンの吸入が副交感神経系を優位にし、指先皮膚温の上昇や瞳孔縮瞳率の低下が誘導されることを報告している。つまり、メイラード反応で生成する香気成分の中でも、DMHF のようにラットやヒトに対する共通した生理作用を誘導するものがある一方で、そうでないものも存在することが示唆された。DMHF を除く香気成分の吸入で血圧および心拍に影響がみられなかったことより、メイラード反応試料中では、DMHF が生理作用を誘導する香気成分であることを裏付ける結果となった。

第4節 DMHF の吸入が酸化ストレスに及ぼす影響

アミノ酸・還元糖メイラード反応香気中の DMHF は、吸入により血圧および心拍の低下を誘導することが判明した。これは自律神経系を介して引き起こされる作用であるが、自律神経系の変化は活性酸素にも影響することが報告されている²⁶⁻²⁸⁾。特にヒトにおける活性酸素の増加は様々な疾病のリスクを高めることから、日常的な抗酸化物質の摂取が推奨されている。DMHF は自律神経系に作用することから、吸入により酸化ストレスに関しても影響することが予想された。DMHF 吸入による酸化ストレスへの影響が明らかになれば、これまで経口的な抗酸化物質の摂取であったものが、より簡便なものになることが期待できる。そこで、ラッ

トに DMHF を曝露し、血漿における酸化ストレスを測定した。

2.4.1. 実験方法

2.4.1.1. DMHF 試料の調製

2.3.1.1.での調製方法と同様に行った。

2.4.1.2. DMHF 吸入による血漿酸化ストレスへの影響

(1) 供試動物

5 週齢の Wistar 系雄性ラット（日本クレア）24 匹を購入し、血漿の採取は 12 週齢時に行った。飼育の明暗条件は午前 7 時から 12 時間、午後 7 時から 12 時間とし、4 週間の予備飼育を行った。飼育は市販の固形飼料（CE-2, 日本クレア）と水道水を自由摂取させた。

(2) 香気曝露方法

2.1.1.4.での方法と同様に行った。曝露の回数は、週に 1 度香気曝露を行い、それを 3 回繰り返した。

(3) 血漿サンプルの採取

3 回の香気曝露が終了した群から、12 時間の絶食期間を設け、ラットを解剖した。血液は腹部大動脈から採取し、ヘパリンコーティング済みのマイクロチューブ（Microvette CB300, Sarstedt, 東京）に入れ、 $1,200 \text{ g} \cdot 4^{\circ}\text{C}$ で 10 分間遠心分離を行った。得られた血漿は、別のマイクロチューブに分注し、使用時まで -80°C

で保存した。

(4) 血漿ヒドロペルオキシド濃度の測定

血漿ヒドロペルオキシド濃度の測定は、d-ROMs test kit (ウイスマー, 東京) を用いて行った。酸性緩衝液 (pH4.8) の入ったキュベットを事前に 37°C で 10 分間保温し、これに血漿サンプルを 20 μ L 加え、混合した。次に呈色クロモゲン 20 μ L を混合し、直ちに光度計に入れ、発光強度の測定を行った。d-ROMs test の測定結果は、U.CARR で表記し、1 U.CARR は 0.08 mg/dL の過酸化水素に相当する。

2.4.1.3 統計処理

データは平均値 \pm 標準誤差で示した。得られたデータは、Dunnett's test による対照群との多重比較検定を行った。

2.4.2. 結果および考察

DMHF の吸入後、ラット血漿を採取し、d-ROMs 試験を用いてヒドロペルオキシド濃度を評価した。DMHF (57.7 および 67.5 ppm) の吸入は、ラット血漿中のヒドロペルオキシド濃度を低下させることが判明した (Fig. 5)。一方で、血圧や心拍同様に 228.4 ppm の吸入では有意な低下は認められなかった。

香りは自律神経系に作用することから、生体が受ける酸化ストレスへの影響が推察される。Vassalle ら⁵⁸⁾は、交感神経系の長期的な活性化によって引き起こされる心血管疾患の指標にヒドロ

ペルオキシド濃度が有用であることを報告している。また前述のとおり、交感神経系の活性化は、生体の酸化ストレスを上昇させることが明らかにされている^{26,28)}。さらに、ラットでは猫の臭腺から採取した香気成分の曝露により、脳内における酸化ストレスレベルが増加することが報告されている⁵⁹⁾。これは、忌避するような香りがストレスとなっている例である。したがって、香気成分の吸入においても酸化ストレスは変動し、その変動に自律神経系を介していることがいえる。これらのことより、交感神経系の活動を抑制する DMHF の吸入により、血漿における酸化ストレスレベルが低下したことが考えられる。一方、DMHF はマウスにおいて、経口的な摂取により抗酸化作用を示すことも報告されている⁴³⁾。本実験では嗅覚器を介して吸収された DMHF が、どの程度血中へと移行しているかについては検討を行っていない。通常、機能性成分の効果は濃度に応じて増加するが、228.4 ppm の DMHF を吸入した場合、ヒドロペルオキシド濃度の変化は認められなかった。つまり、DMHF による酸化ストレスの低下には薬理的な作用よりも、自律神経活動の変化を介した心理的な作用による部分が大きいことが推察される。以上より、DMHF の吸入は、自律神経系の変化を介して酸化ストレスを低下させることが示唆された。

本章で得られた結果より、メイラード反応試料中の DMHF の吸入が、血圧などを始めとしたラットの生体パラメーターを変化させることが明らかになった^{60,61)}。この中でも香気成分の吸入が酸化ストレスに影響するという結果から、日常的な香気の入る行うことで様々な疾病の予防に繋がることを期待される。

第3章 DMHFの吸入が食欲および遺伝子発現に及ぼす影響

第1節 DMHFの吸入が食欲に及ぼす影響

食品から生じる香りは食欲に大きく影響し、嗜好性に深く関与する。また、食欲は自律神経系の変化と連動するとともに、香氣成分の吸入による変化も報告されている^{29,47)}。第2章において、モデルメイラード反応香氣の主要香氣成分であるDMHFの吸入により、生体パラメーターが変化することが明らかになった。これは、DMHF吸入によって交感神経活動が抑制され、副交感神経活動が亢進されたことに起因する。副交感神経系の活発化に伴って、食欲の亢進が同時に誘導されることが知られているため、DMHF吸入によっても同様の変化が起こることが予想された。また、メイラード反応で生成する香氣は、食欲をそそる甘く香ばしい香りを持ち、食品の嗜好性を向上させる。この香氣の主要成分であるDMHFは、全体の香氣に大きく寄与していることから、嗜好性向上の一端に貢献していることが考えられる。しかし、DMHFの香氣が食欲に及ぼす影響について、検討を行った例はこれまでに存在しない。

一方、食欲の調節には脳の視床下部において発現する遺伝子も大きな役割を果たす。摂食調節ペプチドとして知られるニューロペプチドY(NPY)やオレキシンは食欲を亢進させるが、コカインアンフェタミン転写調節産物(CART)やプロオピオメラノコルチン(POMC)などは食欲を抑制する⁶²⁾。これらは自律神経系に働きかけることから、遺伝子発現と自律神経系との関連性が予想される。しかし、DMHF吸入によるこの種の報告はされてい

い。香気成分の吸入時には、視床下部などの脳の様々な部分が活性化する⁶³⁾ため、食欲調節に関連する遺伝子だけでなく、その他多くの遺伝子の発現が広範囲で変化することが考えられる。第2章において示された生理作用に関しても、遺伝子発現との関連も考えられる。

そこで本章では、DMHFをラットへ継続的に吸入させた際の食欲に及ぼす影響について検討を行った。また、DMHFの吸入による一連の生理的な作用と遺伝子との関連についてDNAマイクロアレイ法および定量的PCR法により解明することを目的とした。

3.1.1. 実験方法

3.1.1.1. DMHFの吸入がラットの採食量および体重に及ぼす影響

(1) 供試動物

4週齢のWistar系雄性ラット（日本クレア，東京）12匹を購入し、実験には6週齢時のラットを用いた。飼育の明暗条件は午前7時から12時間、午後7時から12時間とし、1週間の予備飼育を行った。飼育は市販の固形飼料（CE-2，日本クレア，東京）と水道水を自由摂取させた。

(2) 香気曝露の方法および採食量および体重の測定

香気の曝露方法はShenら^{29,64)}の方法に従って行った。コントロールとして蒸留水または5.7 ppmに調整したDMHFをラット

に吸入させる香気として用意した。本実験での DMHF 濃度は先行研究より、吸入によって自律神経系に作用することで血圧降下を誘導する濃度である³⁴⁾。調整した溶液を脱脂綿 (5 cm × 5 cm × 1.5 cm) に浸した。浸した脱脂綿をラットのケージ上 1 cm の場所に置き、15 分間の香気の曝露を行った。香気成分の飛散を防ぐため、ケージをビニール製の袋で覆い、香気曝露中においてもラットが採食および飲水ができるようにした。香気の曝露は 1 週間のうち、月曜日・水曜日・金曜日に行い、計 6 週間行った。その期間中の採食量および体重を毎日、同じ時間帯に記録した。なお、採食量は 24 時間にラットが食べた餌の量を差し引きで算出した。6 週間の飼育期間後、ラットを安楽死させた。その後、ラットを解剖し、白色脂肪 (腎周囲脂肪、腸間膜脂肪、精巣周囲脂肪) の重量を測定した。

(3) 統計処理

採食量および体重のデータは各週の平均値 ± 標準誤差で示し、組織重量は各群の平均値 ± 標準誤差で示した。コントロール群と DMHF 群の検定は、採食量および体重は二元配置分散分析 (Two-way ANOVA) を行い、Tukey-Kramer 法による多重比較検定を行った。また、脂肪組織重量に関しては、Student's *t*-test によって 2 群間に統計的な差があるかを検討した。

3.1.2. 結果および考察

ラットに 6 週間 DMHF を曝露した際の採食量の変化 (各群の 1

週間ごとの採食量)を Fig. 6-A に示した。DMHF の曝露開始から 1 週間後において、コントロール群よりも DMHF 群で採食量が増加し、曝露 2~3 週間目で有意な ($p<0.05$) 増加が認められた。さらに曝露 4~6 週間目においても有意な ($p<0.01$) 採食量の増加は継続していた。また、曝露期間中の体重推移を Fig. 6-B に示した。曝露開始から 3 週間は、コントロール群および DMHF 群で同様な体重推移を示したが、それ以降は DMHF 群でわずかに体重増加が抑制される傾向にあったが有意な差は認められなかった。ラットを解剖した際の白色脂肪重量の結果を Fig. 7 に示した。DMHF の吸入により若干の体重増加の抑制がみられたが、白色脂肪のいずれの部位においても、2 群間に有意な差は認められなかった。

香気成分は自律神経系と連動して、食欲の変化を誘導する。精油として広く用いられるラベンダーの香りを、今回と同様の方法でラットに曝露した際には、採食量の増加とともに体重の増加が認められている⁶⁴⁾。一方で、グレープフルーツの香りをラットに曝露した際には、採食量の低下とともに体重が低下することが報告されている²⁹⁾。これらの現象は、香気成分の吸入により、副交感神経あるいは交感神経活動が活発化することに起因している。加えて、食欲に影響を及ぼす消化管活動や消化液の分泌は、副交感神経活動によって亢進される。自律神経系の調節を担っているのは、主に脳の視床下部である。視床下部に存在する食欲中枢には摂食中枢と満腹中枢が存在し、食行動を制御している⁶⁴⁾。空腹時においては、摂食中枢が刺激されるが、食べ物を食べると満腹中枢が刺激され、食行動が抑制される。視床下部は内部の恒常性

の維持に重要な役割を果たす統合中枢であり、自律神経系の働きを調節している。本実験系では、DMHF吸入が摂食中枢を活発化し、それに伴う副交感神経系の亢進が、結果的にラットの食欲亢進を誘導したことが推測される。前述のとおり、DMHFは食品の嗜好性向上に寄与していることが考えられていたが、実際に吸入することより、食欲が亢進するという報告は今回が初めてである。この結果より、食品のメイラード反応の嗜好性向上の一端に香気成分であるDMHFが寄与していることも示唆された。

採食量が増加した一方、体重増加はコントロールと有意な差は認められなかった。また、試験後のラットを解剖した結果においても、白色脂肪の重量に差は認められなかった。多くの報告では、採食量に伴った体重の変化がみられている。組織重量に目立った変化が認められなかったことから、ラット体内での代謝または消化・吸収活動が変化していることが考えられる。副交感神経活動の亢進は消化管活動の活発化にも関係するため⁶⁶⁾、香気曝露によって消化活動の変化も引き起こされたことが考えられる。また、香気成分の吸入は行動量やエネルギー代謝にも影響することから、DMHF吸入後のこれらの変化を測定し、体重増加の抑制メカニズムの解明を行う必要がある。これまで、香気成分の吸入によるこのような変化に関する報告例はなく、メカニズムを解明することができれば、DMHFに特有の生理的な作用の発見に繋がることが期待される。

本節の実験結果より、DMHF吸入は食欲の亢進に働くことが明らかになった。前章との結果に加え、新たな生理的な作用を発現することが判明したが、これらの作用と遺伝子発現との関連は明

らかでない。そこで、DMHF吸入後の脳における遺伝子発現の変化を解析するために、DNAマイクロアレイ法による網羅的解析を行った。

第2節 DMHF吸入後のラット脳内遺伝子発現の解析

3.2.1. 実験方法

3.2.1.1. ラットへのDMHF曝露

(1) 供試動物

5週齢のWistar系雄性ラット（日本クレア，東京）11匹を購入し、実験には11週齢時のラットを用いた。飼育の明暗条件は午前7時から12時間、午後7時から12時間とした。飼育は市販の固形飼料（CE-2，日本クレア，東京）と水道水を自由摂取させた。

(2) 香気の曝露方法

2.1.1.4.と同様に行った。

(3) 試料の採取

5分間の香気曝露スケジュールの後、即座にラットを断頭によって安楽死させ、脳を摘出した。摘出した脳は左脳と右脳に分け、液体窒素によって凍結した。凍結した脳は使用するまで-80℃で保存した。なお、DNAマイクロアレイ解析には右脳を用いた。

3.2.1.2. DNA マイクロアレイ解析

(1) RNA 抽出および RNA 標識

採材したラットの右脳から TRizol reagent(Invitrogen, USA) によって total RNA を抽出し、RNeasy mini Kit (Qiagen, NLD) を用いて精製した。精製した total RNA は GeneChip 3'IVT PLUS Reagent Kit (Affimetrix, USA) を用いて、ビオチンによって標識化されたポリ RNA を得た。得られたポリ RNA は、Rat Genome 230 2.0 Array (Affimetrix, USA) とハイブリダイズさせた。反応は 45°C で 16 時間行われ、反応後は洗浄、フィコエリスリンによる染色を行った。蛍光強度は、Affimetrix GeneChip System を用いて読み取られ、各スポットにおける蛍光強度のデータを得た。

(2) DNA マイクロアレイデータの正規化および主成分分析

得られたデータは統計解析ソフト R および Bioconductor を用いて、DFW 法によって正規化され、各遺伝子における蛍光発現強度を算出した。算出されたデータに基づいて主成分分析を行った。

(3) Gene Ontology 解析

正規化されたデータに基づいて、2 群間比較を行い、発現が変動していた遺伝子を抽出した。発現変動遺伝子の抽出の際には、Rank products 法によって選抜を行った。なお、このときの偽陽性率（発現変動遺伝子として選抜した遺伝子群の中に含まれる、本当は発現変動遺伝子ではない遺伝子の割合）を 5% とし、

Benjamini-Hochberg 法によって多重比較検定を行った。統計処理の結果をもとに、有意に変化した発現変動遺伝子のリストを製作した。次に、これら遺伝子群において、どのような機能を有した遺伝子が濃縮されているのかを解析した。各遺伝子の機能をデータベースである Gene Ontology (GO) に準拠した。この情報に基づき、The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID; <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) および Quick GO (<http://www.ebi.ac.uk/QuickGO/>) を用いて GO 解析を行った。

3.2.2. 結果および考察

DNA マイクロアレイデータに基づく主成分分析を Fig. 8 に示した。その結果、DMHF を吸入したラットは、第二主成分方向にコントロール群とは異なるグループを形成していることが明らかとなった。この結果より、DMHF 香気を曝露したラットの脳では、コントロールのものとは異なる遺伝子発現のパターンを示すことが判明した。次に、発現が変動した遺伝子群を抽出した結果、DMHF 群において発現が増加していた遺伝子は 180 個、発現が低下していた遺伝子は 413 個存在していた。これら遺伝子群において GO 解析を行ったところ、発現が増加した遺伝子群において、「neurological system process」、「feeding behavior」、「amine transport」の 3 つの機能が有意に変化していた。実際に Quick GO にて得られたアノテーションツリーおよびその詳細を Fig. 9 に示した。また、これら機能の変化に関連した遺伝子の一覧を Table 3

に示した。なお、発現が低下していた遺伝子群における、機能の変化は認められなかった。

香気成分をラットに曝露した際、香りの情報は脳辺縁系へと伝達される。脳辺縁系には扁桃核、海馬および自律神経系、内分泌系、免疫機能系などを調節する視床下部が存在する^{67,68)}。香気成分による嗅覚刺激が視床下部に伝達されたとき、自律神経系あるいは内分泌系を介して血圧、心拍、ホルモン分泌などに影響が及ぼされる。香気成分による生体への影響は、脳での変化が起点となり、遺伝子発現に関しても脳での変化が最も素早く引き起こされることが考えられる。本節では、DMHF 香気の曝露時間を生体パラメーターの変化が認められた 5 分間という非常に短い時間に設定した。しかし、短時間にもかかわらず DMHF を曝露したラットの脳内では、多くの遺伝子の発現が変化した。このことから、DMHF の吸入によって自律神経系と同様に、遺伝子発現への影響が認められたことになる。通常、DNA マイクロアレイは機能性成分を含んだ食餌を与えて、数週間飼育した動物の組織を採取し、解析を行う研究が多い⁶⁹⁾。また、香気成分が遺伝子に及ぼす影響を DNA マイクロアレイで解析している研究では、香気成分の曝露時間を 2 時間に設定している⁵³⁾。そのため、5 分という短い香気曝露によって、脳内の遺伝子発現が異なったことは興味深い結果であり、DMHF 香気の曝露による影響が即座にもたらされていることが明らかとなった。

GO 解析を行った結果、発現が増加していた遺伝子群において、「neurological system process」「feeding behavior」「amine transport」の 3 つの機能が、DMHF 香気を曝露したラットの脳

において変化していることが明らかとなった。1 番目の「neurological system process」は主に神経経路の活性化に応じて遺伝子の発現が変化したと考えられる。この機能に関連する遺伝子には、神経伝達を調節する遺伝子や細胞間のシグナル伝達に関わる遺伝子が多く含まれていた。これは、DMHF 香気の刺激に反応して生体内の神経活動が活発となったことに由来するものと考えられる。今回の検討において、ラットへの DMHF 香気の曝露は 1 回だけであった。蒸留水を曝露されたラットに比べて、DMHF 香気を曝露されたラットは初めて体験する香りを曝露されることになる。そのため、香気曝露が行われた際には、香りが刺激となって神経伝達などが大きく変化したことが考えられる。また、神経伝達は自律神経系や記憶にも影響がもたらされる。GTP シクロヒドロラーゼ I (*Gch1*) は、記憶との関連が報告されているドーパミンの生合成に重要な酵素であることが報告されている⁷⁰⁾。このように DMHF 香気が刺激となり、多くの遺伝子の発現が変化したのではないかと考えられる。

2 番目の「feeding behavior」に関しては、摂食調節ペプチドの発現が主に変化していた。上位に位置する *Cartpt* は代表的な摂食抑制ペプチドである^{61,71)}。また、*prepro-orexin* は、摂食を亢進させるペプチドとして知られている。このように、DNA マイクロアレイにおける遺伝子の発現に関しては、生体のある現象を亢進させるような遺伝子と抑制する遺伝子の変化が混合した結果となる。そのため、本結果では摂食の亢進に働く遺伝子と、摂食を抑制させる遺伝子が混合するという結果が得られたものと考えられる。「feeding behavior」で発現が増加していた遺伝子で

は、*Cartpt* が最も上位に位置していた。

3 番目の「**amine transport**」では、ドーパミンを構成する遺伝子であるドーパデカルボキシラーゼ (*Ddc*) の発現が増加していた。また、ヒトやラットの妊娠時に分泌されるオキシトシン (*Oxt*)⁷²⁾ も発現が増加していたことが明らかになった。カテコールアミンの仲間であるドーパミンは、快感や情動行動に大きく影響することが知られており、セロトニンやノルアドレナリンとともに神経伝達物質として働く。また、お茶に含まれるテアニンを摂取した際に、ドーパミンの放出増加と共に血圧降下が確認されている⁷³⁾。オキシトシンに関しても幸福感が得られたときにその分泌が増加し、末梢での血圧降下を誘発することが報告されている⁷⁴⁾。つまり、DMHF 香気の曝露によって、副交感神経活動を亢進する神経伝達物質が変化したことが考えられる。

DNA マイクロアレイを用いた網羅的解析によって、DMHF 香気の曝露が神経伝達や採食行動に mRNA 発現レベルで影響をもたらすことが明らかとなった。これらの結果は、これまでに得られている DMHF 香気による、血圧降下および食欲亢進の結果を裏付けることとなった。

第 3 節 遺伝子発現の定量的解析

3.3.1. 実験方法

3.1.1.1. 供試動物

5 週齢の Wistar 系雄性ラット（日本クレア，東京）11 匹を購入し、実験には 11 週齢時のラットを用いた。飼育の明暗条件は午前 7 時から 12 時間、午後 7 時から 12 時間とした。飼育は市販の固形飼料（CE-2，日本クレア，東京）と水道水を自由摂取させた。

3.1.1.2. 香気の曝露方法

2.1.1.4.と同様に行った。

3.1.1.3. 試料の採取

3.2.1.1.での手順と同様に行い、採材した組織は即座に液体窒素によって凍結させた。組織は使用時まで -80°C で保存した。また、3.2.1.1.の解剖時に採材した視床下部も実験に用いた。

3.1.1.4. RNA 抽出および逆転写反応

組織からの total RNA 抽出のため、乳棒と乳鉢またはクライオプレス（マイクロテックニチオン，千葉）によって液体窒素で冷やしながら組織を粉砕した。粉砕した組織は、2 mL チューブに入れ、Trizol Reagent（Invitrogen, USA）を 1 mL 加え、よく混合させた。次に、冷クロロホルム（ナカライテスク，京都）を 0.2 mL 加え、約 30 秒間ボルテックスによって混合させた。混合後、遠心分離（ 4°C 、12,000 g、30 分間）を行い、上清（約 500 μL ）のみ新たな 2 mL チューブに移し、等量のイソプロパノール（ナカライテスク，京都）を加えた。十分に混合した後、室温下で 10 分間静置した。再び遠心分離（ 4°C 、12,000 g、30 分間）を行い、

上澄みを捨て、75%冷エタノール（ナカライテスク，京都）を 800 μL 加え、軽く混合した。遠心分離（4 $^{\circ}\text{C}$ 、12,000 g、5 分間）を行い、上清を捨て、10 分間室温で放置しエタノールを蒸発除去した。20 μL の Milli-Q 水を加え、沈殿物を溶かした。Nano Drop（Nano Drop Technologies, USA）を用いて total RNA 濃度を測定した。

次に、抽出した total RNA をもとに、逆転写反応によって cDNA を作製した。Nano Drop で測定した total RNA 濃度が 2 $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$ になるように Milli-Q 水で希釈した。Oligo dT（0.5 μL : Invitrogen, USA）、dNTP（2 μL : Invitrogen, USA）、DTT（0.5 μL : Invitrogen, USA）を混合させた試薬（A）をサンプル分用意した。0.2 μL チューブに（A）を 3 μL 加え、2 $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$ に調製した total RNA 6 μL を混合し、サーマルサイクラー（アステック，福岡）で 65 $^{\circ}\text{C}$ 、15 分間反応させた。反応後は 3 分間氷上で放置した。5 \times sample buffer（2.5 μL : Invitrogen, USA）、RNase inhibitor（0.5 μL : Invitrogen, USA）、Super script III（0.5 μL : Invitrogen, USA）を混合させた試薬（B）をサンプル分用意した。（B）をサーマルサイクラーで反応させた反応液に 3.5 μL ずつ混合させ、サーマルサイクラーで逆転写反応（42 $^{\circ}\text{C}$ 、1 時間）を行い、その後失活反応（70 $^{\circ}\text{C}$ 、15 分間）を行って cDNA を作製した。cDNA は使用するまで -20 $^{\circ}\text{C}$ 下で保存した。

3.1.1.5. リアルタイム PCR 法による遺伝子発現解析

作製した cDNA を用いてリアルタイム RT-qPCR を行った。cDNA サンプルをそれぞれ Milli-Q 水で 5 倍希釈した。次にプラ

イマー-left (0.5 μ L : Applied Biosystems, USA)、プライマー-right (0.5 μ L : Applied Biosystems, USA)、Power Up SYBR Green Master Mix (5 μ L : Invitrogen, USA) をサンプル分混合させた PCR 溶液を作製し、PCR プレートに 6 μ L ずつ加えた。cDNA サンプルを 4 μ L ずつ加え、Applied Biosystems Step One PlusTM Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA) によって、サイクル数 40 で、リアルタイム RT-qPCR に供した。リアルタイム RT-qPCR は Applied Biosystems のワークフローに則って行った。対象とした遺伝子は、DNA マイクロアレイで発現が上昇した遺伝子に関して行い有意な変化がみられた、コカインアンフェタミン転写調節産物 (*Cartpt*)、アンジオテンシノーゲン (*Agt*)、ヘモグロビン A1 (*Hba1*) の発現量を内部標準遺伝子ラクテートデヒドロゲナーゼ (*Ldha*) の発現量で補正した。使用したプライマーは Table 4 に示した。

(6) 統計処理

結果は各遺伝子の発現量を、コントロール群を 1 とした相対発現量で示した (平均値 \pm 標準誤差)。コントロール群と DMHF 群との検定は Student's *t*-test によって 2 群間に統計的な差があるかを検討した。

3.2.2. 結果および考察

DMHF 吸入後のラット脳内における遺伝子発現の定量的な解析の結果を Fig. 10 に示した。この結果は、DNA マイクロアレイ

解析において変動した遺伝子群の定量的な解析により得たものである。*Cartpt*はコントロールと比較して有意に ($p<0.01$) 増加し、*Agt*も有意に ($p<0.05$) 増加していることが明らかになった。また、*Hba1*はコントロール群と比較して増加する傾向 ($p<0.1$) にあった。

DMHF吸入による *Cartpt*と *Agt*の有意な上昇を定量的 PCR で検証した。これらの遺伝子は、DNA マイクロアレイの結果から「feeding behavior」と「amine transport」の両方の機能に大きく関連することが判明した。*Cartpt*はラットの脳、心臓、腎臓で発現している代表的な食欲抑制ペプチドである。Yamamotoら⁷⁵⁾は金木犀の香りラットに吸入させ、採食量を低下させるとともに、視床下部における *Cartpt*の mRNA 発現が 1.3 倍上昇されたことを報告している。しかし一方で、傍室核における *Cartpt*の過剰発現は採食量を増加させることも報告されている⁷⁶⁾。本実験の結果では、*Cartpt*の mRNA 発現は DMHF 吸入により、約 12 倍に上昇していることが判明した。しかし、これは脳全体を対象として mRNA 発現を検証しているため、各部位ごとでの発現については不明である。したがって、DMHF 吸入後の *Cartpt*の局在を明らかにする必要がある。また、*Cartpt*は神経伝達物質としても機能し、ドーパミン神経細胞の損失を改善する⁷⁷⁾。また、自律神経系の活動を調節する重要な神経伝達物質であるドーパミンとセロトニンは、*Cartpt*によって側坐核における産生が増加する⁷⁸⁾。このように、DMHFの吸入により発現が変化する *Cartpt*は、自律神経系を介して食欲や神経伝達に影響を及ぼすことが示唆された。

レニン-アンジオテンシン系の重要な構成要素である *Agt* の遺伝子産物は、レニンによってアンジオテンシン I に変換される。また、アンジオテンシン I は血管の内皮細胞に存在するアンジオテンシン変換酵素によってアンジオテンシン II に変換される。アンジオテンシン II は血液量を増加させ、最終的には血圧を上昇させる⁷⁹⁾。腎臓交感神経は血圧調節と深く関わっており、腎臓交感神経が興奮すると、腎臓の傍糸球体装置からレニンが血中に放出され、*Agt* がアンジオテンシン I に変換される量が増加する。このことから *Agt* の発現と交感神経系との関連性が示唆される。DMHF 吸入は腎臓交感神経活動を抑制することで素早い血圧および心拍の低下を誘導する。したがって、末梢での生理機能の変化を受けたフィードバック調節が起こり、脳における *Agt* の mRNA 発現の上昇が引き起こされた可能性がある。

さらに、*Hba1* は糖化されたヘモグロビンであり、血中に存在することで全身の血糖値の調節に関わっている。血糖は自律神経系による調節も受け⁸⁰⁾、交感神経系により上昇する。*Hba1* の mRNA 発現の変化は、先の *Agt* と同様に、香気吸入による急な生体の変化に適応するための反応であることが考えられる。定量的 PCR の結果は、これまでに得られている生理作用と大きな機能としては一致していることが判明したが、逆の作用をもたらす遺伝子の発現が上昇するという興味深い結果となった。これまでのところ、自律神経活動と遺伝子発現のこのような関係については報告されていない。よって、この不一致を調べるためには、香気吸入による血中成分の変化や継続的な曝露でこれら遺伝子がどのように変化するかを検討する必要がある。しかし、これらの結果

は、鼻腔からの DMHF の吸入が、自律神経系を介して即座に、血圧や食欲に影響を及ぼしていることを裏付けるものである。

以上より、DMHF の吸入はラットの食欲を亢進させることが判明し、生体パラメーターの変化と同じく、自律神経系の影響を受けていることが示唆された^{81,61)}。また、これらの生理作用と遺伝子の発現との間には、一定の関連性が認められることも判明した。今後、体重への影響および部位ごとの遺伝子発現などを解明する必要があるが、自律神経系および遺伝子発現の両者を介して生理的な機能性を発現させることが示唆された。

第 4 章 食肉の加熱により生成する DMHF の検出

第 1 節 食肉加熱香気中の DMHF 検出および寄与

加熱過程を伴う食品では、メイラード反応を介して多くの香気成分が生成される。加熱時のメイラード反応が重要視される食品のひとつである食肉では、加熱前に特徴的な香りを感じることはないが、加熱を伴う調理や加工により食欲をそそる香りが生成する。多くの場合我々はこの過程を経て、嗜好性が大きく向上した食肉を食している。食肉の加熱時に生成する香気成分には DMHF も含まれ、牛肉の加熱香気中においてもいくつか検出例がある^{82,83)}。しかし、食肉における DMHF 生成に関する詳細な検討例はなく、その生成要因についても不明であった。第 1 章で述べたように、DMHF は食品の嗜好性を向上させることから、加熱された食肉の嗜好性にも影響することが考えられる。また、第 2 および 3 章より、DMHF の吸入は生理作用を発現することが明らかになっている。これらのことより、食肉加熱時の DMHF 生成は、嗜好性の向上や機能性の付与に貢献することが期待される。しかし、加熱食肉における基礎的な知見や生成要因が明らかでないことから、実際の加熱調理・加工時での応用は困難である。そこで、本実験では加熱された食肉香気中における DMHF 検出および様々な条件の食肉を用いて DMHF 生成に影響する要因の解明を行った。

食品の香気成分分析において、対象とされるものは空気中に揮発するものと、食品中に含有されるものの 2 種類に大別される^{84,85)}。本実験において、前者は Head Space-Solid Phase Micro

Extraction (HS-SPME)法⁸⁶⁾により香気成分を回収し、後者は溶媒抽出法を用いて DMHF 検出を試みた。加熱食肉の DMHF の検討を行うにあたり、初めに加熱香気中に生成される香気成分の検出を試みた。その後、加熱食肉中に含まれる DMHF の分析を行った。また、食肉の生産時に重要となる熟成処理や飼養条件に応じて加熱時の DMHF 生成がどのように変化するののかについて検討した。

4.1.1. 実験方法

4.1.1.1. HS-SPME 法による食肉加熱香気の実験方法

(1) 食肉および加熱条件

青森県十和田市内の大型小売店で購入した黒毛和牛、豪州産牛（アバディーン・アンガス種）、豚、鶏のモモ肉を用いた。豚および鶏肉は国産のものを使用した。個体情報の追跡が可能であった黒毛和牛肉（個体識別番号：1502177665）は、と畜から約 1 ヶ月後に加工処理されていた。これらの試料肉は小分けにし、実験時まで -30°C で保存した。また、冷凍した食肉は事前に 4°C で 24 時間自然解凍させて、実験に用いた。

自然解凍した食肉 5 g をホットプレート上にて 230°C で 1 分間加熱した。このとき、生成した香気成分が大気中に飛散しないようにスチール製の筒を被せて密閉状態にした。さらに 4 分間の余熱下で食肉を加熱し、計 5 分間のうちに生成する香気成分を分析対象とした。

(2) 香気成分の回収方法

上記(1)で生成された香気成分は HS-SPME 法⁸⁶⁾にて回収した。SPME で用いるファイバーのうち、本実験では 50/30 μm Divinlylbenzene/Carboxen/Polydimethylsiloxane を採用した。これは予備実験において、他のファイバーよりも多くの成分を捕集することが可能であったためである。

(3) GC/MS 分析による香気成分の同定

2.2.1.2. (2)での GC/MS 分析条件および同定方法と同様に行った。

4.1.1.2. HS-SPME/GC-O 法による食肉加熱香気中における DMHF の寄与

(1) 加熱条件

4.1.1.1. (1)と同様である。

(2) 香気成分の回収方法

4.1.1.1. (2)と同様である。

(3) HS-SPME/GC-O 法による香気寄与成分の検出

ヘッドスペース中の主要成分を検出する際に用いられる簡便な方法のひとつに、分析試料の重量または濃度を段階的に変化させる方法がある⁸⁷⁾。これは、少ない重量や低い濃度においても、その香りを強く感じるかどうかで全体の香気へ

の寄与を明らかにする手法である。本実験では、食肉を 5g から 0.31g まで段階的に変化させ、少ない重量でも DMHF の香りを感じることができるかを検討した。

加熱により生成した香気成分を HS-SPME 法により回収し、GC のインジェクションポートに注入した。HS-SPME 法にて回収された香気成分は常温において揮発することはないが、温度が上昇すると再び揮発する。この原理を利用することで、カラム内に成分を注入することができる。本実験では、吸着した成分を揮発させるための時間を 5 分間に設定した。分析の設定などに関しては 2.2.1.2. (2) の GC-O 分析と同様である。なお、使用したファイバーは空焼き処理を行い、香気成分のキャリーオーバーがないことを確認して再度実験に用いた。なお、GC-O 分析は 2 名のパネリストで各試料最低 2 回ずつ行った。

4.1.2. 結果および考察

各種食肉の加熱香気中に検出された香気成分を Table 5 に示した。メイラード反応で生成するピラジン類を始め、アルデヒド類など様々な種類の香気成分が検出された。また、DMHF は全ての食肉の加熱香気中で生成されていることが判明した。これまで牛肉での報告例はいくつかあったが、食肉のみの加熱で豚や鶏肉での検出例は初めてである。また、GC-O 分析により、DMHF の加熱香気中での寄与を検討した結果を Table 6 に示した。黒毛和牛肉における DMHF の香りは 0.31g でも感知することができた。また、豪州産牛肉および豚肉は、2.5g まで DMHF の香りを感知

することができたが、機器分析では検出された鶏肉における DMHF の香りは、実際にはほとんど感じられないということが判明した。このことから、畜種に応じて加熱時の DMHF 生成量が異なっていることが考えられた。以上より、食肉の加熱時には畜種に関わらず DMHF が生成されるが、その生成量が異なることが示唆された。

食肉は通常、加熱調理して食されるが、その他の食品同様に「おいしさ」に及ぼす香りの影響が大きいとされている。Matsuishi ら⁸⁸⁾はノーズクリップ法を用いて、食肉の官能評価を行ったところ、畜種の判別が難しくなることを報告している。このことから、普段我々が食肉の特徴を認識する際には、香りによる影響が大きいことが考えられる。事実、食肉の畜種が異なっても、それらの味はほとんど同じであり、味だけでその違いを認識することは困難とされている。このような食肉の香りに関与する化学反応には、脂質酸化反応やメイラード反応がある。脂質の酸化反応は常温下においても進行し、低級アルコールやラクトン類の生成に寄与している¹⁴⁾。不飽和脂肪酸の加熱酸化から生成される香気成分は、畜種ごとの特徴的な香りに大きく寄与していることが報告されている⁸⁸⁾。一方、メイラード反応は主に加熱調理・加工時に大きく進行し、ピラジン類やチオール類などといった非常に多種多様な香気成分の生成に貢献している。食肉のメイラード反応で生成する香気成分は、脂質の酸化反応で生じる成分よりも、多様かつ閾値が低いものが多く存在する。したがって、加熱された食肉の香気成分生成には、メイラード反応の貢献度が高いことが考えられる。メイラード反応で生成される DMHF に関しても、牛肉

の加熱香気中⁸¹⁻⁸³⁾や加熱抽出エキス⁸⁹⁾において検出されているが、詳細な検討例はこれまで行われていなかった。食肉にはメイラード反応の基質となるアミノ酸やペプチドなどのアミノ化合物が豊富に存在し、微量ではあるが還元糖などのカルボニル化合物も含有することから、DMHFが生成することは容易に推定できる。しかし、実際に食肉からDMHFを検出した例は少ない。この理由として、先述のように食肉では還元糖の含量が少なく、比較的メイラード反応が進行しにくいことが挙げられる。DMHFが検出される食品の中でも、食肉における糖質の含量は著しく低いことから、アミノ化合物と反応する基質（カルボニル化合物）が不足していることが考えられる。したがって、メイラード反応の進行に伴うDMHFの生成は食肉において限られていることになる。

本研究で、DMHFが検出された食肉の中でも、特に黒毛和牛肉はその他の食肉よりもDMHFの寄与が大きいことが示唆された。Inagakiら⁸³⁾は、80℃のウォーターバス内で加熱した黒毛和牛肉または豪州産牛肉からDMHFを検出しており、豪州産牛肉よりも黒毛和牛肉の方がDMHFの香りを強く感じることを報告している。本実験においても同様の結果が得られており、これは加熱によるDMHFの生成量が異なることを示唆している。そこで、加熱された食肉中に含有されるDMHFを定量し、食肉によってDMHF生成量の違いを検討した。

第2節 加熱された食肉におけるDMHF生成量の比較

本章第1節の検討から、加熱時のDMHFは畜種に関わらずに生

成されることが判明し、全体の香気への寄与も高いことも明らかになった。これらのことから、加熱時の DMHF の生成量が異なることが示唆された。そこで、加熱食肉中に含まれる DMHF 生成量を定量的に分析し、畜種ごとに生成量の比較を行った。また、加熱温度や加熱方法が DMHF 生成量に及ぼす影響を検討するとともに、肉中のメイラード反応基質の測定を行った。

4.2.1. 実験方法

4.2.1.1. 加熱された食肉中における DMHF の定量

(1) 使用した食肉

4.1.1.1. (1)で用いたモモ肉に加え、同一畜種の別部位の食肉を実験に用いた。黒毛和牛肉はサーロイン、豪州産牛肉および豚肉はロース、鶏肉はムネを用いた。これらの試料肉は小分けにし、実験時まで -30°C で保存した。また、冷凍した食肉は事前に 4°C で24時間自然解凍させて、実験に使用した。

(2) 加熱条件

本実験では、加熱後の食肉中に含まれる DMHF を分析対象としているため、密閉状態にせず、開放状態で加熱処理を行った。各食肉 60 g をフードプロセッサーで挽肉状にし、直径 12 cm、厚さ 5 mm に成型した。これを 230°C のホットプレート上で両面 100 秒ずつ加熱した。加熱後直ちにアルミホイルで包み、氷上で約 10 分間冷却した。

(3) 香気成分の抽出

加熱された食肉に含まれる香気成分の回収は、小林らの方法⁹⁰⁾を参考に行った。(2)の冷却後、加熱肉を細分化し、メタノール 60 mL を加えてハンドミキサーでホモジナイズした。これを遠心分離用の容器に移し、標準物質 (IS) として *o*-methylbenzyl alcohol (10 ppm, 富士フィルム和光純薬, 大阪) を 3 mL 加えて、4°C で 3,000 rpm・20 分間の遠心分離を行った。遠心分離後、脂肪を固化させる目的で 30 分間氷冷し、再度、遠心分離を行った。この段階では、食肉に含まれる乳酸や低級脂肪酸の影響により、DMHF を含んだ上清は弱酸性を示す。上清をろ過して得られたろ液を 15 mL ずつ 2 つの分液ロートにとり、蒸留水を 60 mL ずつ加えて混和した。それぞれを約 10 mL のヘキサンで混和した後、ペンタン・ジエチルエーテルの混合溶液 (1:4, v/v) 150 mL で 10 分間振盪抽出し、溶媒層を採取した。水層を再度ペンタン・ジエチルエーテル混合溶液 (1:4, v/v) 150 mL で再度 10 分間振盪抽出した。2 回の抽出で得られた溶媒層は無水硫酸ナトリウムで一晩脱水した。脱水後、ヘキサンを 2 mL 添加し、37°C の恒温槽で 2 mL 以下になるまで常圧蒸留を行い、粗香気濃縮物を得た。蒸留後、香気成分を吸着・分離する固相抽出用カートリッジとして NH₂ カートリッジ (InertSep™, ジーエルサイエンス, 東京) を用いて抽出した。なお、カートリッジは事前にメタノール 1.5 mL を 2 回、ヘキサン 1.5 mL を 3 回通液させ、コンディショニングを行った。カートリッジに吸着した香気成分画分をジエチルエーテル・メタノール (7:3, v/v) 混合溶液 1 mL で溶出させた。

溶出液は窒素ガスにて 0.1 mL まで濃縮した。

(4) GC/MS 分析

GC/MS の分析条件および成分の同定方法は 2.2.1.2. (2)と同様に行った。

(5) 統計処理

データは平均値±標準誤差で示した。畜種間における比較は、Tukey-Kramer 法による多重比較検定を行い、部位間における統計処理は Student's *t*-test を用いて、平均値に統計的な差があるかを検討した。

4.2.1.2. 加熱温度および調理方法による DMHF 生成の変化

(1) 使用した食肉

市販の豪州産牛モモ肉を用いた。

(2) 加熱方法

加熱温度による DMHF 生成量の変化では、ホットプレートの温度を 80、130、180、230℃に設定し、両面 1 分ずつ加熱した。その後、加熱された食肉中に含まれる香気成分画分を回収した。また、調理方法による DMHF への影響は、ホットプレート上で焼く方法とウォーターバス内で煮る 2 種類の方法を比較検討した。焼く条件は 230℃のホットプレート上で両面 1 分ずつ加熱し、香気成分画分を回収した。また、牛肉を煮る際には、真空パックに入

れ、75℃の熱水の中で30分間加熱した後に香気成分画分の回収を行った。

(3) 香気成分抽出およびGC/MS分析

4.2.1.1. (3)における香気成分の抽出方法と同様に行い、各項目で最低2回ずつ行った。

4.2.1.3. メイラード反応基質の測定

(1) 使用した食肉

4.1.2.1. (1)で使用した食肉と同様である。

(2) 遊離アミノ酸含量の測定

本実験では、芳香族アミノ酸であるチロシンを指標として、肉中の遊離アミノ酸含量を算出するHullの方法⁹⁾に従って行った。

分析用試料の調製では、試料肉30gに対し2倍量の蒸留水60mLを加えて、ホモジナイズした。これをろ過して得られたろ液を4℃で10,000rpm・10分間遠心分離し、上清を分析試料として用いた。

遠沈管に試料（コントロール：蒸留水）または標準曲線用のチロシン溶液（200μg/mL）0.5mLを加え、蒸留水0.5mLおよび0.72Mトリクロロ酢酸溶液2mL加えて攪拌し、室温で10分間静置した。標準曲線用のチロシン溶液は原液のものを2, 4, 8, 16, 32倍となるように希釈して用いた。その後、4℃で3,000rpm・10分間遠心分離し、中間層0.5mLを別の遠沈管に分注した。次いで、2倍希釈したフェノール試薬（関東科学，東京）0.3mL、

炭酸ソーダ溶液 1 mL を加えて、5 分間反応させた後、マイクロプレートリーダーを用いて 650 nm における反応液の吸光度を測定した。標準チロシン溶液から作成された標準曲線を用い、試料中の遊離アミノ酸含量をチロシン等量として算出した。

(3) グルコース含量の測定

グルコース含量の測定には Glycogen Assay Kit (Cell Biolabs, USA) を使用した。分析用試料の調製では、試料肉 2 g に対し 48 倍量の PBS 98 mL を加えて、ホモジナイズした。これをろ過して得られたろ液を 4°C で 10,000 rpm・10 分間遠心分離し、上清を分析試料として用いた。

マイクロプレートにグリコーゲン標準液 (50, 100, 200, 400, 800, 1,600 倍希釈) および分析用試料を 50 μ L ずつ分注した。そこにグリコーゲンを分解する酵素であるアミログルコシダーゼを 10 μ L 添加した。その後、プレートを軽く振盪して混合し、37°C で 30 分間インキュベートした。発色プローブ、ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼおよびグルコースオキシダーゼが含まれる反応試薬溶液を 50 μ L ずつ添加し、遮光状態で 37°C・45 分間インキュベートした。その後、マイクロプレートリーダーにて 570 nm における吸光度を測定し、グリコーゲン標準曲線から試料中のグルコース含量を算出した。

(4) 統計処理

データは平均値±標準誤差で示した。畜種間における比較は、Tukey-Kramer 法による多重比較検定を行い、部位間における統

計処理は Student's *t*-test を用いて、平均値に統計的な差があるかを検討した。

4.2.1.4. メイラード反応基質の添加が加熱時の DMHF 生成量に及ぼす影響

(1) 試料肉

市販の豪州産牛モモ肉を用いた。

(2) 加熱および抽出方法

牛肉 60 g をフードプロセッサーで細かくする前にグルコース、キシロース、グリシン、アルギニン、リジン溶液(いずれも 100 μ M) を 1 mL 添加した。コントロールとして、蒸留水を添加した。それぞれの溶液を添加した後、4.2.1.1.(2)の加熱条件および(3)の抽出方法を用いて、DMHF 生成量の比較を行った。

(3) 統計処理

データは平均値±標準誤差で示した。蒸留水を添加して加熱した食肉中の DMHF 生成量と還元糖またはアミノ酸溶液を添加した際の DMHF 生成量を比較した。統計処理は Dunnet's test によりコントロール群との多重比較検定を行った。

4.2.2. 結果および考察

4.2.2.1. 各種食肉中における DMHF 生成量

各種食肉中の DMHF 生成量の定量結果を Fig. 11 に示した。モモでは、黒毛和牛肉が最も DMHF 生成量が多く、次いで豪州産牛肉、豚肉、鶏肉と続いた。一方、部位間での比較を行うと、黒毛和牛肉において有意な差は認められなかったが、モモよりもサーロインの方で DMHF 生成量が多かった。豪州産牛肉では、モモよりもロースにおける DMHF 生成量が有意に ($p<0.05$) 低いことが判明した。また、豚肉に関してはロースにおける DMHF 生成量がモモにおける生成量よりも多く、有意な ($p<0.05$) 差が認められた。鶏肉ではモモよりもムネの加熱で生じる DMHF の方が多い傾向 ($p<0.1$) にあった。本実験で用いた全ての食肉において DMHF が検出され、その生成量の比較を行うことができた。次に、加熱温度や調理方法による DMHF 生成の変化を検討した。まず、加熱温度の変化により DMHF の生成は大きく異なることが判明し、80℃から 130℃までは DMHF がほとんど生成されないということが明らかになった (Fig. 12)。180℃から生成され始めたが、230℃で DMHF 生成量が大きく増加した。また、茹でた牛肉における DMHF 生成を検討したところ、今回の実験条件 (75℃・20分間) では、焼きと比較して DMHF がほとんど生成されないことも明らかになった (Fig. 13)。これらの結果より、DMHF は高い加熱温度で焼くことにより、効率よく生成されることが示唆された。

食肉に含まれる栄養成分は部位によって異なることが報告されている。例えば牛肉においては、脂身が比較的少ないモモやヒレではタンパク質の割合が高くなるが、バラやロースでは脂質の

割合が高くなることが知られている。これらの違いは、加熱時の香気成分の形成にも大きく影響する。脂身が多い部位では、甘くココナッツのような香りを呈するラクトン類やアセトインなどのケトン類、アルコール類が多く生成される^{83,92)}。一方、脂身の少ない部位では、メチオニンやシステインからのメイラード反応で生成される含硫化合物や香ばしいピラジン類の香りによって特徴付けられる^{14,83)}。このように部位による栄養成分の違いが加熱時の香気成分形成を決定する。DMHFに関しても肉中の栄養成分による影響を受け、部位ごとの生成量が異なっていたことが考えられる。

牛肉間で結果を比較すると、黒毛和牛肉ではサーロインにおけるDMHF生成量がモモよりも多かったが、豪州産牛肉では逆の結果となった。黒毛牛肉のサーロインは、モモよりも脂肪交雑が多く入り込んでいることから、脂肪組織の加熱によってDMHFが生成された可能性が考えられる。Vastaら⁹³⁾は、放牧された子羊の脂肪組織を90℃の温水中で20分間加熱した際の揮発成分中にDMHFを検出している。つまり、脂肪組織の加熱によって生成するDMHF量に関しても測定する必要がある。

食肉加熱時の調理方法や温度は、メイラード反応などに大きく影響することが報告されている。Kayleyら¹⁵⁾は、熟成したリブローズ、サーロインにおいて加熱時間に伴う香気成分の動態を分析したところ、メイラード反応で生成するピラジン類が加熱温度とともに、増加することを報告している。高い温度でのメイラード反応は進行が速い^{9,14,16)}ことから、加熱温度の上昇に伴ってDMHFが増加したことが考えられる。また、田口ら¹⁷⁾は黒毛和

牛肉を焼くあるいは煮た際に生成される香気成分について分析し、焼いた牛肉ではバター様の香りが強く感じられるが、煮たものでは青草のような香りが強く感じられることを報告している。また、煮た牛肉ではピラジン類が検出されなかったことから、メイラード反応が十分に進行していないことが予想される。本実験の結果からも、DMHFは、高い温度で焼くことにより多く生成することが判明し、メイラード反応による影響が大きいことが考えられる。

4.2.2.2. 肉中メイラード反応基質と DMHF 生成

各種食肉中に含まれるメイラード反応基質の測定結果を Fig. 14 に示した。遊離アミノ酸はモモでは畜種間に差は見られなかったが、黒毛和牛肉においては、モモよりもサーロインで有意に ($p<0.05$) 高く、鶏肉においてもムネで有意に ($p<0.05$) 高い値を示した。豪州産牛肉および豚肉では、部位間に差は見られなかった。次に肉中のグルコース含量は、モモで黒毛和牛肉が最も高く、次いで豪州産牛肉、豚肉、鶏肉と推移した。つまり、モモにおけるグルコース含量の差異が、DMHF 生成量と類似していることが判明した。部位間を比較すると、ほとんどの畜種で有意な差が認められた。また、食肉に還元糖またはアミノ酸を添加した後に加熱したところ、グルコースの添加により有意な ($p<0.05$) DMHF 生成量の増加が認められた (Fig. 15)。また、リジンの添加によっても DMHF 生成量が増加する傾向 ($p<0.1$) にあった。つまり、加熱時の DMHF 生成にはグルコースが大きく影響することが示唆された。

食肉中に含まれるメイラード反応の基質には、アミノ酸やペプチドといったアミノ化合物やグルコースなどの還元糖がある。食肉中にはアミノ化合物は豊富に含まれているため、もともと含有量が低い還元糖が食肉のメイラード反応において重要であることが予想される。チロシン等量で算出した肉中の遊離アミノ酸含量の結果では、黒毛和牛肉においてサーロインの方が高い値を示した。一般的に、モモに含まれるアミノ酸含量はサーロインよりも高いとされているが、脂肪交雑などにより変動する。そのため、実験で用いた食肉に関しても脂肪交雑の影響を大きく受けたことが考えられる。また、鶏でもムネの方がモモよりも高い値であったが、これは一般的な食品成分分析の結果⁹⁴⁾と一致している(芳香族アミノ酸含量, モモ: 1,600 mg/100 g, ムネ: 1,700 mg/100 g)。

一方で、肉中グルコース含量は、モモの結果が DMHF 生成量と類似していた。この結果より、モモにおける DMHF 生成量は主にグルコース含量が影響することが示唆された。実際に牛モモ肉にグルコースを添加して加熱すると、DMHF 生成量が大きく増加した。一方で、部位間での比較において、DMHF 生成量との関連はみられなかった。黒毛和牛肉では、サーロインの DMHF 生成量が多かったことから、リジンのようなメイラード反応を起こしやすいアミノ酸が影響したことも考えられる。また、第 2 章で行った実験ではリジンを用いたモデル溶液において、最も DMHF の濃度が高いことが明らかになっている。このことから、アミノ酸の中でもリジンがメイラード反応を介して、DMHF 生成に影響することが考えられた。しかし、本実験では食肉中の各アミノ酸の含量

は測定を行っていないため、より詳細に検討を進めることが必要である。

本節の結果より、脂肪の影響をあまり受けないモモのような部位では、肉中のグルコース含量が加熱時の DMHF 生成量に影響することが判明した。本節ではすでに市販されている状態の食肉を用いて、DMHF 生成量の検討を行った。次に、熟成期間や飼養条件による DMHF 生成の変化を検討した。

第 3 節 熟成および飼養条件が加熱時の DMHF 生成に及ぼす影響

第 2 節より、食肉の加熱時に生成する香気成分 DMHF が畜種や部位により異なることが判明した。また、これらの違いはメイラード反応基質であるグルコース含量に影響を受けることが示唆された。これまで実験に使用した食肉は、消費者の手に渡った段階のものであったが、さらに前の段階である食肉の熟成や牛の飼養段階による DMHF 生成の変化に注目した。

と畜されて死後硬直した牛肉は、10~14 日間程度の熟成を経ることによって食肉へと変化する⁹⁵⁾。この熟成工程により、保水性の増加⁹⁶⁾や加熱時の香りの向上^{5,96,97)}などの効果が現れ、食肉としてふさわしいものに変化していく。これらの効果は熟成期間が長期化されることでさらに高まることも判明している⁹⁵⁾。熟成中には、筋肉内在性のプロテアーゼであるカテプシンやカルパインなどの酵素によるタンパク質分解が起こり、熟成期間に比例してペプチドやアミノ酸が増加する⁹⁸⁾。一方、還元糖も熟成により増

加するという報告もある⁹⁹⁾。牛肉における還元糖はグルコースの占める割合が圧倒的であり、その他のマンノースやフルクトースなどと比較すると8倍ほど高い。さらに、熟成に伴う変化においては、と畜後の牛肉を21日間熟成することにより、グルコース、フルクトース、マンノースといった還元糖の含量が増加することが報告されている⁹⁹⁾。

牛の飼養条件も生産される肉の呈味や香りに大きく影響することが報告されている。例えば、温暖な環境で肥育された牛は、寒冷地の牛よりも肉に入る脂肪交雑が多くなるという報告がある¹⁰⁰⁾。本研究で注目している香気成分に関しても、輸入された穀物飼料を利用した霜降り牛肉では、香ばしいだけでなく、脂っぽく甘い香りが強いことが知られている^{14,17,83)}。一方、粗飼料を与えて肥育された牛肉では、肉様の香りが強くなることが報告されている¹⁰¹⁾。このように飼養条件によって変化する香気成分には、DMHFも含まれていることが予想されるが、これまでにこの種の検討は行われていない。本研究では飼養条件のひとつである放牧に注目した。放牧は牛本来の生活を反映しており、筋線維横断面積の肥大化による枝肉歩留まりの向上¹⁰²⁾、ストレス耐性の向上¹⁰³⁾といった報告がされているだけでなく、動物福祉の観点からも注目を集めている。

北里大学獣医学部附属フィールドサイエンスセンター八雲牧場では、日本短角種を主要品種として、「夏山冬里」方式の飼養管理を行っており、春から秋にかけて放牧を、冬は牧場内で生産されたロールラップおよびグラスサイレージ（自給粗飼料）のみで舎飼飼養し、牧場で排出された堆肥は全て牧場内の草地に還元

する資源循環型畜産を実践している¹⁰⁴⁾。八雲牧場で飼育される日本短角種は、出荷月齢が約30カ月で生体重は約660kgに達し、得られる牛肉の肉質は脂肪交雑の少ない赤身肉という特徴を有する¹⁰⁵⁾。さらに、この牛肉中には保健的機能性を有する共役リノール酸含量が高いことも明らかになっており¹⁰⁴⁾、これまでの生産形態および牛肉よりも優位な点が多いことがうかがえる。

以上より、熟成や飼養条件は牛肉の加熱香気に影響するため、DMHFに関しても何らかの影響を受けることが推測される。本実験では、熟成や飼養条件がDMHF生成に及ぼす影響について検討するとともに、肉中メイラード反応基質との関連を解明を試みた。

4.3.1. 実験方法

4.3.1.1. 牛肉の熟成によるDMHF生成量の変化

(1) 牛肉の熟成方法

市販される豪州産牛モモ肉を一辺約8cmの塊肉として切り分けた。表面に70%エタノールを噴霧し、ポリ塩化ビニリデンフィルムで包んでチャック付きポリ袋で密封した。4℃で0, 1, 3, 5, 7, 9週間熟成し、順次-30℃で冷凍保存した。

(2) 加熱方法およびDMHF定量

4.2.1.1. (3)における香气成分の抽出方法と同様に行った。

(3) メイラード反応基質の測定

4.2.1.3. (2)~(3)と同様に測定を行った。

(4) データの処理

データは各熟成段階における平均値を継時的に示した。なお、本実験で行った分析項目は試料の関係上、2回の平均値を算出しているため統計的な処理を行っていない。

4.3.1.2. 飼養条件による DMHF 生成量の違い

(1) 牛の飼養条件

供試牛は北里大学附属八雲牧場にて飼養される日本短角種去勢雄とし、冬季舎飼時に出荷した群（舎飼区）または夏期放牧終了時の11月に出荷した群（放牧区）それぞれ3頭ずつとした。供試牛は出生後、6ヵ月間の自然哺乳を経て、離乳後、夏期は放牧、冬期は舎飼いでロールラップまたはグラスサイレージを飽食給与した。供試牛の出荷月齢は舎飼区および放牧区でそれぞれ、 28 ± 1 および 28 ± 2 ヲ月齢、出荷時体重は舎飼区および放牧区でそれぞれ、 687 ± 16 および 653 ± 33 kgであった。各区における出荷前の飼料は、舎飼区がグラスサイレージ、放牧区は放牧草をそれぞれ自由採食させた。これらの牛から得られたウチモモまたはリブローズを 0°C でウエットエイジング処理を15日間行ったものを実験に用いた。なお、実験に用いる牛肉サンプルは細分化し、可能な限り脂肪組織を取り除き、使用時まで -30°C で保存した。本

実験で用いた牛の詳細については Table 7 に示した。

(2) 加熱方法および HS-SPME 法による香気成分分析

4.1.1.1. (2)~(3)での方法と同様に行った。

(3) DMHF の定量分析

4.2.1.1. (3)での方法と同様に行った。

(4) メイラード反応基質の測定

4.2.1.3. (2)~(3)と同様に測定を行った。

(5) 統計処理

データはすべて平均値±標準誤差で示した。HS-SPME 法による香気成分の比較には Student's *t*-test により舎飼と放牧の牛肉で差があるかを判定した。また、牛肉中のメイラード反応基質の測定に関しては、飼養条件および部位を要因とした分散分析を行い、Tukey-Kramer 法により有意差判定を行った。

4.3.2. 結果および考察

4.3.2.1. 熟成による DMHF 生成量の変化

加熱された熟成肉における DMHF 生成量の変化を Fig. 16-A に示した。熟成 1~3 週間にかけて DMHF 生成量は増加したが、5 週間目から減少し、それ以降は一定の低い値で推移した。また、

肉中の遊離アミノ酸含量は、熟成期間に応じて増加し続けていたのに対し、グルコース含量は DMHF 生成量と同様に推移した (Fig. 16-B)。これらの結果より、熟成された牛肉において、加熱時の DMHF 生成量は熟成期間に依存して大きく変化し、その変化に肉中のグルコース含量が影響していることが示唆された。

食肉における熟成は、味や香りなど嗜好性に関与する重要な工程である。Watanabe ら⁸²⁾は、と畜から 2 日後の日本短角種の大腿二頭筋 (ソトモモ) を 30 日まで熟成し、180℃ で加熱した際に生成する香気成分の分析を HS-SPME 法にて行っている。この研究では、DMHF を含むメイラード反応で生成される香気成分が多く検出されている。また、フランおよびフラノン類の生成量が、熟成期間に応じて増加することを明らかにしている。フラノン類である DMHF については、熟成に応じた変化は検討されていないが、今回得られた実験結果のように、生成量が増加していることが推測される。また、Koutsidis ら⁹⁹⁾は、と畜後から 3 週間の熟成期間に伴うグルコース含量は増加を示し続けており、本実験のように顕著な減少はみられていない。本実験において、熟成 3 週間目を境にグルコース含量が減少した理由として、牛肉の輸送期間を考慮していないことが挙げられる。今回実験に使用した牛肉は市販される豪州産牛であったが、一般的に豪州から輸入される牛肉は、輸送期間中に解硬を伴った熟成が行われる。そのため、消費者が購入する時点では 2 週間程度の熟成が進行していることが考えられる。実験に用いた牛肉がと畜から何日目のものであるかを正確に把握することは難しい。したがって、今回調製した牛肉は、2 週間程度の熟成後、さらに追加で熟成処理を行っている

ことになる。牛肉中の糖質の含量は、約 0.3%と極めて低いことから、その分解速度も速いことが推測されるため、と畜直後の牛肉を用いて、より詳細な検討を行うことが望ましい。実際の家庭での加熱調理時には、小売店で牛肉を購入してから、さらなる熟成期間を設けることで、DMHF生成量を増加させることが可能であることが考えられる。

4.3.2.2. 飼養条件による DMHF 生成の違い

SPME 法による加熱香気成分分析の結果、およそ 200 種類ほどのピークが確認された。このうち、加熱時のメイラード反応により生成する香気成分に着目すると、リブローズでは飼養条件の違いによる大きな違いは認められなかったが、ウチモモでは違いがみられた。放牧されたウチモモにおいて違いが見られた香気成分の平均面積比を Fig. 17 に示した。ピラジン類（2,3-ジメチルピラジン、2,5-ジメチルピラジン、2,6-ジメチルピラジン）は、いずれも舎飼のものより有意に ($p<0.05$) 多く、3-メチルチオプロパナールおよび DMHF は、多い傾向 ($p<0.1$) にあった。また、アセトアルデヒドおよび 2,3-ジヒドロ-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-ピラン-4-オン (DDMP) は放牧でわずかに多かった。一方、アセトインとジアセチルは放牧で少なく、アセトインでは有意な ($p<0.05$) 差が認められた。DMHF 生成量の差を溶媒抽出法により測定した結果を Fig. 18 に示した。SPME 法の結果同様、放牧されたウチモモにおいて DMHF 含量が有意に ($p<0.05$) 高いことが明らかとなった。

牛肉中の遊離アミノ酸およびグルコース含量を Fig. 19 に示し

た。遊離アミノ酸含量は放牧のウチモモにおいて舎飼より高い値であった (Fig. 19-A)。一方でグルコース含量においても、放牧されたウチモモで舎飼よりも有意に ($p<0.05$)高いことが認められた (Fig. 19-B)。

放牧された牛肉の加熱香気中に多く検出されたピラジン類はメイラード反応中に起こるストレッカー分解により生成される。これは加熱中に α -ジカルボニル化合物と遊離アミノ酸が反応し、ピラジン類およびアルデヒド類を生成する反応である。ピラジン類は加熱された食品の香ばしさに大きく寄与し、メイラード反応により生成する香気成分の代表例である。また、放牧で多い傾向にあった、肉様の香りを呈するメチオナールはメチオニンのストレッカー分解で生じ、加熱された食肉の香りの主要成分である。一方で、カラメル様の香りを呈する DMHF、甘いバター様の香りの DDMP は糖類に由来して生成することが考えられている。これらの香気成分の変化から、放牧された牛肉 (ウチモモ) では舎飼よりも甘く香ばしい香りが強く感じられることが示唆された。一方、放牧されたウチモモではアセトインおよびジアセチルに関しても違いがみられ、アセトインでは統計的な差が認められた。これらの成分は霜降り和牛肉の加熱香気中に多く存在し、いわゆる“和牛香”に寄与することが報告されている^{83,92)}。放牧された牛肉は一般的に赤身肉の割合が多く、脂肪交雑も少ないことが特徴である。しかし、今回用いた牛肉に関しては、飼養条件問わず脂肪交雑の度合い (B.M.S.) は 2 前後で大きな違いはみられなかった。したがって、牛肉中の脂肪酸組成などの脂肪の質が影響していることが推察される。

今回用いた牛肉は、熟成期間や熟成方法に違いはみられないため、この差は飼養条件もしくは飼料が影響したことが考えられた。これまで放牧飼養により牛肉中の総遊離アミノ酸が増加するという報告はいくつかあるが、そのメカニズムを詳細に考察したものはない。放牧飼養により遊離アミノ酸が増加すると仮定すると、生前あるいはと畜後で増加することが考えられる。生前の場合、放牧期の運動による影響が考えられる。Mashimaら¹⁰⁶⁾は、黒毛和種において遅筋型筋線維の割合が高くなると総遊離アミノ酸含量も高くなることを報告している。つまり、放牧期の運動による筋線維の変化がアミノ酸含量に影響したことが推察される。一方、死後の場合、筋肉中の酵素が影響することが考えられる。しかし、放牧飼養された牛肉において内在性プロテアーゼの活性が異なるといった報告はされておらず、実際に測定を行って比較する必要がある。

放牧で高い値を示した理由として、舎飼ではグラスサイレージを与え、放牧区は放牧草を採食していた。グラスサイレージに比べ、放牧草の方で非繊維炭水化物が豊富であるため、これが肉中のグルコース含量に影響することが考えられるが現段階で詳細は不明である。また、運動によるグルコース輸送体(*Glut4*)の変化も考えられる。*Glut4*は細胞質へのグルコースの取り込みを行っており、黒毛和種では放牧によりそのmRNA発現が上昇することが報告されている¹⁰⁷⁾。

以上の結果より、放牧飼養された牛肉では加熱時のDMHFが舎飼のものより、多く生成されることが判明した^{14,108)}。また、この変化は牛肉中のグルコース含量が大きく影響されることが示

唆された。

本章で得られた結果より、食肉の加熱時に生成する DMHF は畜種や部位などでその生成量が異なり、肉中のグルコース含量が DMHF 生成に大きく寄与することが明らかになった。これらの結果は、加熱された食肉において、DMHF 制御による嗜好性向上および機能性付与に貢献することが期待される。

第 5 章 総括

食品の加熱調理・加工における重要な化学反応にメイラード反応がある。この反応は、食品中に存在するアミノ酸などのアミノ化合物とグルコースなどのカルボニル化合物が加熱されることにより容易に起こる。また、メイラード反応により様々な香気成分が生成され、これらは食品の嗜好性に影響する。例えば食肉では、加熱前にはほとんど香りを感じることはないが、加熱調理により食欲をそそる香りが生成され、嗜好性が著しく向上する。香りは我々の生活に密接に関係し、その利用法のひとつとして生理作用の発現を目的としたアロマセラピーが行われてきた。これは香気成分が自律神経系あるいは遺伝子発現に影響を及ぼすことで生理作用を誘導することを利用したものである。香気成分の生理作用に関する研究は、香草や果実に由来したものが多く、食品由来の香気成分に着目した研究は少ない。メイラード反応によっても様々な香気成分が生成するが、そのような香気の吸入による生理的な作用は、最近までまったく未解明であった。

当研究室における先行研究では、食肉タンパク質分解物と還元糖の加熱により生じるメイラード反応香気中の主要成分である 2,5-ジメチル-4-ヒドロキシ-3(2*H*)-フラノン (DMHF) が、自律神経系を介して血圧降下を誘導した。DMHF は甘くカラメル様の香りを呈し、メイラード反応で生成される代表的な香気成分のひとつである。また、DMHF は食品の嗜好性を向上させることから、食品香料としても広く利用されている。自律神経系は、血圧を始めとする生体パラメーターや食欲なども制御することから、

DMHF のさらなる生理作用の発現に繋がると予想した。また、食品の中でも加熱時のメイラード反応が重要となる食肉では、これまで加熱された牛肉の香気中に DMHF が検出されていたものの、詳細な検討例はなく、その生成に影響する要因についても不明であった。食肉における DMHF 生成要因の解明は、食肉の嗜好性および機能性への向上に寄与することが期待される。本研究では、メイラード反応により生成する香気成分 DMHF の吸入による生理作用を検討するとともに、食肉における生成量や生成要因を明らかにすることを目的とし、以下の知見を得た。

1. DMHF の吸入が生体パラメーターに及ぼす影響

当研究室の先行研究では、アミノ化合物としてアミノ酸とペプチドが存在する複雑系モデルで生理作用の検討が行われたため、本研究ではアミノ酸と還元糖から調製した単純系モデルを採用した。まず、メイラード反応生成香気吸入が生体パラメーター（血圧、心拍、酸化ストレス）に及ぼす影響を検討した。アミノ酸（グリシン、アルギニン、リジン）と還元糖（グルコース）を 90℃ で 30 分間加熱し、得られたメイラード反応生成香気を Wistar 系ラットに曝露した。その結果、グリシンとアルギニンから生成されたメイラード反応香気は、香気曝露直後から血圧への影響がみられ、曝露終了後も継続して有意な血圧の低下が認められた。また、心拍はグリシン反応香気で有意な低下が認められた。

これらの香気吸入による生体の変化に関与する香気成分を明らかにするため、ガスクロマトグラフィー/質量分析により、試料

中の主要な香気成分の同定を試みた。その結果、主要成分として DMHF が同定された。DMHF は単一成分のみの曝露でも有意な血圧および心拍の低下を誘導した。さらに、多くの疾病とも関連する酸化ストレスの測定を行ったところ、DMHF 吸入により、血漿における酸化ストレスレベルが有意に低下することが明らかとなった。以上の結果より、メイラード反応生成香気中の DMHF の吸入は、自律神経系に作用し、血圧を始めとした生体パラメータを変化させることが明らかとなった。

2. DMHF の吸入が食欲および脳内遺伝子発現に及ぼす影響

食品の香りは食欲に大きく影響し、嗜好性にも直接的に関与する。また、食欲は自律神経系の変化と連動することから、DMHF の吸入が食欲に対しても影響することが考えられた。そこで、Wistar 系ラットに DMHF を定期的(15 分間・3 日/週)に曝露し、6 週間の採食量および体重の変化を測定した。その結果、DMHF の吸入はラットの採食量を増加させることが明らかとなった。これは、DMHF 吸入により副交感神経活動が亢進されることに起因したものであると考えられる。この結果より、メイラード反応生成香気は嗜好性に大きく影響し、その一端に DMHF が関与していることが示唆された。また、興味深いことに採食量の増加に伴った体重の増加は認められなかった。この体重増加の抑制メカニズムに関しては、香気吸入による生体の変化をより詳細に検討する必要があると考えられる。続いて、これまでに得られた DMHF 吸入による生理作用と遺伝子発現の関連を解明するため、DNA マイクロアレイ法による脳内遺伝子発現の網羅的解析を行った。その

結果、DMHF 吸入により発現が上昇した 180 遺伝子には、神経伝達物質や食欲の調節を行う遺伝子が存在することが判明した。以上の結果より、DMHF の吸入は、食欲を亢進させ、生理作用の発現に遺伝子発現の変化も大きく関連することが明らかになった。

3. 食肉の加熱により生成する DMHF の検出

食肉加熱時のメイラード反応生成香気中における DMHF の研究に着手するにあたり、まず、食肉の種類に関わらず DMHF が検出されるかを検討した。市販の黒毛和牛、豪州産牛、豚、鶏のモモ肉を 230℃で 1 分間加熱し、生成する香気成分を SPME 法により回収し、ガスクロマトグラフィー/質量分析装置で分析した。その結果、すべての食肉加熱香気中に DMHF が検出された。さらに、DMHF は加熱香気全体へ高く寄与する成分であることも判明した。また、加熱された食肉中に含有される DMHF を定量したところ、畜種や部位によりその生成量が異なることが判明した。さらに、DMHF 生成は熟成期間に伴って変化すること、飼養条件が異なる牛肉においても違いがみられた。食肉の加熱時に生成する DMHF 量に影響する要因を明らかにするため、食肉中におけるメイラード反応基質（遊離アミノ酸およびグルコース含量）を測定した。その結果、モモのような部位では肉中グルコース含量が加熱時の DMHF 生成に大きく影響することが示唆された。第 2、3 章で示したように DMHF は吸入により様々な生理作用を発現することから、食肉の加熱時における DMHF 制御は嗜好性向上および機能性付与に繋がることが期待される。

3. まとめと展望

メイラード反応により生成する香気成分である DMHF は、加熱を伴う加工や調理を経た食品の加熱香気中に存在する。本研究では、自律神経系に作用する DMHF の吸入により、血圧などの生体パラメーターが変化することや食欲が亢進することを明らかにした。また、特定の機能を有する遺伝子の発現の変化も生理作用に影響することが示唆された。さらに、これまで報告例に乏しかった食肉の加熱香気における DMHF 生成量が、肉中に含まれるグルコース含量の影響を受け、諸条件により異なるという知見を得た。

加熱過程を経る食品において、メイラード反応は容易に起こり香りや色調の変化を通して、嗜好性が大きく向上する。メイラード反応生成香気である DMHF は、食品の嗜好性に影響するだけでなく、食欲にも影響し、さらには吸入によって生理作用が誘導される。DMHF は食品に由来した成分であるとともに、生体への有害性などの懸念も少ない。本研究で得られた DMHF に関する知見を活かし、嗜好性と機能性の両者に優れた食品が誕生することが期待される。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始丁寧なご指導、ご鞭撻を賜り、暖かく見守っていただきました北里大学食品機能安全学研究室教授 有原圭三先生に深く感謝を申し上げます。また、香気成分に関する実験だけでなく、論文作成においても細部にわたってご助言を賜りました日本大学生物資源科学部講師 大畑素子先生に深く感謝申し上げます。また、丁寧なご指導やご助言を賜った同研究室講師 長竿淳先生、講師 小宮佑介先生に深く感謝申し上げます。

本研究をまとめるにあたり、多大なるご助言を賜りました北里大学獣医学部教授 黒瀬陽平先生、向井孝夫先生、山脇英之先生、ならびに日本食肉研究会会長 坂田亮一先生に心より感謝申し上げます。

DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現の解析に関して、多大なるご指導や有益なご助言を賜りました弘前大学食糧科学研究所所長 中井雄治先生、北里大学獣医学部助教 鈴木喜博先生に深く感謝申し上げます。

加熱食肉の DMHF 分析に関して丁寧なご指導を賜りました(一社)家畜改良事業団家畜改良技術研究所上席専門役 小林正人先生に深く感謝申し上げます。

飼養条件による香気成分に関して、試料肉の準備から有益なご助言を賜った北里大学獣医学部フィールドサイエンスセンター講師 小笠原英毅先生に深く感謝申し上げます。

日々の研究活動をともに行っていただきました食品機能安全学研究室の皆様へ感謝申し上げます。

最後に、ここに至るまでの学生生活に関して様々な面からサポートし、支えていただきました家族に心より感謝いたします。ありがとうございます。

引用文献

- 1) Maillard, L. C. 1912. Action of amino acids on sugars. Formation of melanoidins in a methological way. *Comptes Rendus* **152**:66–68.
- 2) Losso, J. N. 2016. *The Maillard reaction reconsidered: cooking and eating for health*. 1st ed. Boca Raton: CRC Press.
- 3) Ohata, M., Yokoyama, I., Arihara, K. 2018. Functionality and capability of odorants generated by the Maillard reaction in foods. *IMARS Highlights*. **13**: 9-16.
- 4) Jousse, F., Jongen, T., Agterof, W., Russell, S., Braat, P. 2002. Simplified kinetic scheme of flavor formation by the Maillard reaction. *J. Food Sci.* **67**: 2534–2542.
- 5) Shahidi, F., Samaranyaka A. G. P., Pegg, R. B. 2014. Flavor development. In M. Dikeman & C.Devine (Eds.), *Encyclopedia of meat sciences, 2nd edition, volume 1* (pp. 391-403). London, UK: Academic Press/Elsevier.
- 6) Chen, X. M., Liang, N., Kitts, D. D. 2015. Chemical properties and reactive oxygen and nitrogen species quenching activities of dry sugar-amino acid maillard reaction mixtures exposed to baking temperatures. *Food Res. Int.* **76**: 618–625.
- 7) Yoo, S. S., Ho, C.-T. 1997. Pyrazine generation from the Maillard reaction of mixed amino acids. *Perfum Flavorist* **48**: 3985–3989.
- 8) Antony, S. M., Han, I. Y., Rieck, J. R., Dawson, P. L. 2000. Antioxidative effect of Maillard reaction products formed from

- honey at different reaction times. *J. Agric. Food Chem.* **48**: 3985-3989.
- 9) Cuzzoni, M. T., Stoppini, G. Gazzani, G. 1988. Influence of water activity and reaction temperature of ribose-lysine and glucose-lysine Maillard systems on mutagenicity, absorbance and content of furfurals. *Food Chem.Toxicol.* **26**: 815-822.
- 10) 奥村 丞司. 1991. メイラード反応によるフレーバーの生成. *澱粉科学* **38**: 81-92.
- 11) Oberparleiter, S., Ziegleder, G. 1997. Amadori-Verbindungen als Aromavorstufen in Cacao. *Nahrung.* **41**: 142-145.
- 12) Zheng, Y., Jianchun, X., Ling, Z., Rongqiang, D., Changchun, C., Meng, W., Baoguo, S., Terry, A. 2015. Aromatic effect of fat and oxidized fat on a meat-like model reaction system of cysteine and glucose. *Flavour Fragr. J.* **30**: 320-329.
- 13) Van Boekel, M. A. 2006. Formation of flavour compounds in the Maillard reaction. *Biotechnol. Adv.* **24**: 230-233.
- 14) 大畑素子, 横山 壱成. 2020. 第25章 メイラード反応により生成される香り. pp. 262-272. *グリケーションの制御とメイラード反応の利用 (有原圭三監修)*.シーエムシー出版, 東京.
- 15) 松石昌典. 2016. 第21章 食肉とメイラード反応. pp. 183-188. *メイラード反応の機構・制御・利用 (宮澤陽夫監修)*. シーエムシー出版, 東京.
- 16) Kayley, R. W., Chris, R. K., Rhonda, K. M., Christine, A. 2019. Grilling temperature effects on tenderness, juiciness, flavor and volatile aroma compounds of aged ribeye, strip loin, and sirloin

- steaks. *Meat Sci.* **150**: 141-148.
- 17) 田口聡子, 高橋理沙, 安原久美子, 浅野雅子, 飯田文子. 2013. 調理法の異なる黒毛和種去勢牛の香気成分について. *日本女大紀*. **60**: 23-27.
 - 18) Gattefossé, R. M. 1937., 前田久仁子訳, 2006. 第5章アロマテラピー. pp. 71-72. ガットフォセのアロマテラピー (ロバート・ティスランド編集). フレグランスジャーナル社, 東京.
 - 19) 好田裕史. 2006. ビール香気成分のストレス緩和作用. *日醸誌*. **101**: 927-934.
 - 20) 山上 彩, 井村紘子, 渋谷耕司, 村川論士, 河野益範, 杉本久美子. 2012. 唾液分泌、自律神経活動および脳活動からみた香り刺激の効果 —クロモジ精油とベルガモット精油について—. *味と匂誌*. **19**: 453-456.
 - 21) 福本修一, 寺島健彦, 中山勉, 横越英彦. 2005. 抗ストレス剤. 特許241051, 日本国特許庁.
 - 22) Herz, R. S. 2009. Aromatherapy facts and fictions: a scientific analysis of olfactory effects on mood, physiology and behavior. *Int. J. Neurosci.* **119**: 263-290.
 - 23) 青島 均. 2007. 第7章 香りと神経伝達物質受容体. pp. 80-81. 香りの科学はどこまで解明されたか. フレグランスジャーナル社. 東京.
 - 24) E. ジョイ. ボウルズ. 2014. 第5章 身体機能とエッセンシャルオイル. pp. 91-93. アロマテラピーを学ぶためのやさしい精油科学. フレグランスジャーナル.
 - 25) 岩瀬 敏. 2006. 第II章構造と機能と薬理. pp. 30-31. 自律神

経の基礎と臨床改訂3版（後藤由夫，本郷道夫編集）．医薬ジャーナル．大阪．

- 26) Hirooka, Y., Sagara, Y., Kishi, T., Sunagawa, K. 2010. Oxidative stress and central cardiovascular regulation - Pathogenesis of hypertension and therapeutic aspects. *Circ. J.* **74**, 827-835.
- 27) Hakucho, A., Liu, J., Liu, X., Fujimiya, T. 2014. Carvedilol improves ethanol-induced liver injury via modifying the interaction between oxidative stress and sympathetic hyperactivity in rats. *Hepatol. Res.* **44**, 560-570.
- 28) Hirooka, Y. 2011. Oxidative stress in the cardiovascular center has a pivotal role in the sympathetic activation in hypertension. *Hypertens. Res.* **34**, 407-412.
- 29) Shen, J., Niijima, A., Tanida, M., Horii, Y., Maeda, K., Nagai, K. 2005. Olfactory stimulation with scent of grapefruit oil affects autonomic nerves, lipolysis and appetite in rats. *Neurosci. Lett.* **380**: 289-294.
- 30) Konagai, C. 2006. Physiological evaluation of the effects of food aroma on brain function. *J. Int. Soc. Life Info. Sci.* **24**: 76-78.
- 31) Yoshida, K., Yamamoto, N., Fujiwara, S., Kamei, A., Abe, K., Nakamura, A. 2017. Inhalation of a racemic mixture (*R,S*)-linalool by rats experiencing restraint stress alters neuropeptide and MHC class I gene expression in the hypothalamus. *Neurosci. Lett.* **653**:314-319.

- 32) Seo, H. S., Hirano, M., Shibato, J., Rakwal, R., Hwang, I. K., Masuo, Y. 2008. Effects of coffee bean aroma on the rat brain stressed by sleep deprivation: a selected transcript- and 2D gel-based proteome analysis. *J. Agric. Food Chem.* **56**: 4665-4673.
- 33) 大畑素子, 横山壱成, 有原圭三. 2019. メイラード反応生成香気成分の有する新たな可能性への挑戦 食品メイラード反応の最新の香り研究. *化学と生物*. **57**: 722-729.
- 34) Zhou, L., Ohata, M., Owashi, C., Nagai, K., Yokoyama, I., Arihara, K. 2017. Odors generated from the Maillard reaction affect autonomic nervous activity and decrease blood pressure through the olfactory system. *J. Sci. Food Agric.* **97**:27-31.
- 35) Ohata, M., Zhou, L., Yada, Y., Yokoyama, I., Arihara, K. 2020. 2,3-Dimethylpyrazine (3DP) and 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone (DMHF) generated by the Maillard reaction in foods affect autonomic nervous activity and central nervous activity in human. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **84**: 1894-1902.
- 36) Hodge, J. E. 1960. Novel reductones and methods of making them. 2,936,308. U.S. Patent. 1960 May 10.
- 37) Arihara, K., Yokoyama, I., Ohata, M. 2019. DMHF (2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone), a volatile food component with attractive sensory properties, brings physiological functions through inhalation. *Adv. Food Nutr. Res.* **89**: 239-258.
- 38) Schwab, W. 2013. Natural 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-

- furanone (Furaneol). *Molecules*, **18**: 6936-6951.
- 39) 時友祐紀子. 2017. 果実の香気分析 GCにおいかぎ分析と官能評価. *化学と生物*. 55: 743-749.
- 40) Barba, C., Beno, N., Guichard, E., Thomas-Danguin, T. 2018. Selecting odorant compounds to enhance sweet flavor perception by gas chromatography/olfactometry-associated taste (GC/O-AT). *Food Chem.* **257**: 172-181.
- 41) 国立医薬品食品衛生研究所. 2011. 食品安全情報(化学物質) <<http://www.nihs.go.jp/hse/food-info/foodinfonews/index.html>> 2011. 10. 05. p. 6 国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部.
- 42) Sasaki, T., Yamakoshi, J., Saito, M., Kasai, K., Matsudo, T., Koga, T., Mori, K. 1998. Antioxidative activities of 4-hydroxy-3(2H)-furanones and their anti-cataract effect on spontaneous cataract rat (ICR/f). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**: 1865-1869.
- 43) Sung, W. S., Jung, H. J., Park, K., Kim, H. S., Lee, I., Lee, D. G. 2007. 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone (DMHF); anti-microbial compound with cell cycle arrest in nosocomial pathogens. *Life Sci.* **80**: 586-591.
- 44) Elmore, J. S., Papantoniou, E. Mottram, D. S. 2001. A comparison of headspace entrainment on Tenax with solid phase microextraction for the analysis of the aroma volatiles of cooked beef. *Adv. Exp. Med. Biol.* **488**:125-132.
- 45) 黒井瑞穂. 2013. アミノ酸由来メイラード反応生成物の抗酸

化活性と味覚特性．北里大学大学院獣医学系研究科動物資源科学専攻修士論文．

- 46) Hong, C. O., Rhee, C. H., Pyo, M. C., Lee, K. W. 2017. Anti-inflammatory effect of glucose-lysine Maillard reaction products on intestinal inflammation model in vivo. *Int. Immunopharmacol.* **52**: 324-332.
- 47) Nagai, K., Niijima, A., Horii, Y., Shen, J., Tanida, M. 2014. Olfactory stimulatory with grapefruit and lavender oils change autonomic nerve activity and physiological function. *Auton. Neurosci.* **185**: 29-35.
- 48) Grosch, W. 1994. Determination of potent odourants in foods by aroma extract dilution analysis. *Trends Food Sci. Technol.* **4**: 68-73.
- 49) Zhou, L., Ohata, M., Arihara, K. 2016. Effects of odor generated from the glycine/glucose Maillard reaction on human mood and brainwaves. *Food Funct.* **7**: 2574-2581.
- 50) 菅沼大行, 稲熊隆博. 2002. 麦茶のフレーバー成分であるピラジン類の血液流動性向上作用. アロマリサーチ. **10**: 138-141.
- 51) 周 蘭西. 2016. メイラード反応によってアミノ酸やペプチドから生成する香気成分の生理作用. 北里大学大学院獣医学系研究科動物資源科学専攻博士論文.
- 52) Heuberger, E., Hongratanaworakit, T., Bohm, C., Weber, R., Buchbauer, G. 2001. Effects of chiral fragrances on human autonomic nervous system parameters and self-evaluation. *Chem.*

- Senses* **26**:281-292.
- 53) Inoue, N., Kuroda, K., Sugimoto, A., Kakuda, T., Fushiki, T. 2003. Autonomic nervous responses according to preference for the odor of jasmine tea. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**: 1206-1214.
- 54) 加藤 綾. 2005. 嗅覚受容体の脱感作とにおいへの順応. におい・かおり環境会誌. **36**: 132-134.
- 55) Zheng, L. Y., Sun, G. M., Liu, Y. G., Lv, L. L., Yang, W. X., Zhao, W. F., Wei, C. B. 2012. Aroma volatile compounds from two fresh pineapple varieties in China. *Int. J. Mol. Sci.* **13**: 7383-92.
- 56) Takakura, Y., Sakamoto, T., Hirai, S., Masuzawa, T., Wakabayashi, H., Nishimura, T. 2014. Characterization of the key aroma compounds in beef extract using aroma extract dilution analysis. *Meat Sci.* **97**: 27-31.
- 57) 長田和実, 宮園貞治, 柏柳 誠. 2016. ピラジン化合物のマウスに対する警戒行動誘起作用について. 日生理誌. **78**: 62.
- 58) Vassalle, C., Boni, C., Cecco, P. D., Landi, P. 2006. Elevated hydroperoxide levels as a prognostic predictor of mortality in a cohort of patients with cardiovascular disease. *Int. J. Cardiol.* **110**, 415-416.
- 59) Mejia-Carmona, G. E., Gosselink, K. L., Pérez-Ishiwara, G. Martínez-Martínez, A. 2015. Oxidant/antioxidant effects of chronic exposure to predator odor in prefrontal cortex, amygdala, and hypothalamus. *Mol. Cell. Biochem.* **406**, 121-129.

- 60) Yokoyama, I., Ohata, M., Komiya, Y, Jun, N., Arihara, K. 2020. Inhalation of odors containing DMHF generated by the Maillard reaction affects physiological parameters in rats. *Sci. Rep.* **10**: 13931-13940.
- 61) 横山 壱成 . 大畑 素子 . 2020. 第26章 メイラード反応生成香気の保健的機能性 . pp. 273-284. グリケーションの制御とメイラード反応の利用 (有原圭三監修).シーエムシー出版, 東京.
- 62) Shen, J., Nijjima, A., Tanida, M., Horii, Y., Maeda, K., Nagai, K. 2005. Olfactory stimulation with scent of lavender oil affects autonomic nerves, lipolysis and appetite in rats. *Neurosci. Lett.* **383**: 188-193.
- 63) 小木曾和磨, 浅川明弘, 乾 明夫 . 2010. NPY受容体 - 摂食調節ペプチドと摂食障害 . 医のあゆみ . **233**: 730-735.
- 64) 古賀義彦 . 2003. 第5章 香りが脳機能に与える効果の脳波解析による測定 . pp. 27-31. アロマサイエンスシリーズ21 [7] 香りの機能性と効用 (アロマサイエンスシリーズ21編集委員会編) . フレグランスジャーナル社, 東京.
- 65) 香川靖雄 . 2008. 第1章脳機能と栄養 : 食べ物からのアプローチ . pp. 13-16. 脳と栄養ハンドブック (古賀良彦, 高田明和編) . サイエンスフォーラム, 千葉.
- 66) 松尾 裕 . 1961. 消化管の自律神経支配 . 日消化管会誌 . **5**: 1173-1182.
- 67) 渡辺雅彦 . 2010. 第6章脳の構造と機能 : 全体的な神経機能調節 . pp. 346-347. みる見るわかる脳・神経科学入門講座改訂版後編 初めて学ぶ, 情報伝達の制御と脳の機能システム . 羊

土社，東京．

- 68) 西条寿夫，堀悦郎，小野武年．2005．ストレス反応の身体表出における大脳辺縁系－視床下部の役割．日薬理誌．**126**: 184-188.
- 69) Chun, S., Bamba, T., Suyama, T., Ishijima, T., Fukusaki, E., Abe, K., Nakai, Y. 2016. A high phosphorus diet affects lipid metabolism in rat liver: A DNA microarray analysis. *PLoS One*. **17**: 11-16.
- 70) Bowling, K. M., Huang, Z. Xu., D., Ferdousy, F., Funderburk, C. D., Karnik, N., Neckameyer, W., O'Donnell, J. M. 2008. Direct binding of GTP cyclohydrolase and tyrosine hydroxylase: regulatory interactions between key enzymes in dopamine biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **283**: 31449-31459.
- 71) 中田正範，矢田俊彦．2014．摂食調節機構と神経ペプチド．医のあゆみ．**250**: 785-789.
- 72) 根来英雄．1993．授乳時のオキシトシン分泌調整．日内分泌誌．**69**:520-529.
- 73) Chu, D. C., 大久保勉，上田智子，Juneja, L. R. 2000．茶成分の機能と応用 緑茶に含まれるユニークなアミノ酸,L-テアニンとそのリラックス効果．*Fragrance. J.* **28**:74-80.
- 74) Petty, M. A. 1987. The cardiovascular effects of the neurohypophysial hormone oxytocin. *J. Auton. Pharmacol.* **7**:97-104.
- 75) Yamamoto, T., Inui, T., Tsuji, T. 2013. The odor of *Osmanthus fragrans* attenuates food intake. *Sci. Rep.* **3**: 1518-1526.

- 76) Smith, K. L., Gardiner, J. V., Ward, H. L., Kong, W. M., Murphy, K. G., Martin, N. M., Ghatel, M. A., Bloom, S. R. 2008. Overexpression of CART in the PVN increases food intake and weight gain in rats. *Obesity*. **16**: 2239-2244.
- 77) Mao, P. 2011. Potential antidepressant role of neurotransmitter CART: Implications for mental disorders. *Depress. Res. Treat.* **2011**: 1-11.
- 78) Mao, P., Meshul, C. K., Thuillier, P., Reddy, P. H. 2013. Neurotransmitter CART as a new therapeutic candidate for Parkinson's disease. *Pharmaceuticals*. **6**, 108-123.
- 79) 尾前照雄. 1998. 1 血圧とは何か. pp. 12-16. 血圧の話. 岩波書店, 東京.
- 80) Sheykhzade, M., Dalsgaard, G. T., Johansen, T., Berg-Nyborg, N. C. 2000. The effect of long-term streptozotocin-induced diabetes on contractile and relaxation responses of coronary arteries: selective attenuation of CGRP-induced relaxations. *Br. J. Pharmacol.* **129**, 1212-1218.
- 81) Yokoyama, I., Nakai, Y., Suzuki, Y., Ohata, M., Komiyama, Y., Nagasao, J., Arihara, K. 2020. DMHF (2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone), a volatile food component generated by the Maillard reaction, promotes appetite and changes gene expression in the rat brain through inhalation. *J. Food Sci.* **85**: 1338-1343.
- 82) Watanabe, A., Kamada, G., Imanari, M., Shiba, N., Yonai, M., Muramoto, T. 2015. Effect of aging on volatile compounds in

cooked beef. *Meat Sci.* **107**: 12-19.

- 83) Inagaki, S., Amano, Y., Kumazawa, K. 2017. Identification and characterization of volatile compounds causing the characteristic flavor of Wagyu beef (Japanese black cattle). *J. Agric. Food. Chem.* **65**: 8691-8695.
- 84) 下田満哉. 2005. 食品の香りはおいしさを決定する. pp. 198-201. アロマサイエンスシリーズ21 [9] (渋谷達明編). フレグランスジャーナル社, 東京.
- 85) 佐々木啓介. 2019. 食肉の「おいしさ」について 少数成分で食肉の「おいしさ」を説明できるか. *化学と生物.* **57**: 456-458.
- 86) Arthur, C. L, Pawliszyn, J. 1990. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Anal. Chem.* **62**: 2145-2148.
- 87) Feng, Y., Cai, Y., Sun-Waterhouse, D., Cui, C., Su, G., Lin, L., Zhao, M. 2015. Approaches of aroma extraction dilution analysis (AEDA) for headspace solid phase microextraction and gas chromatography-olfactometry (HS-SPME-GC-O): Altering sample amount, diluting the sample or adjusting split ratio? *Food Chem.* **187**:44-52.
- 88) Matsuishi, M., Igeta, M., Takeda, S., Okitani, A. 2004. Sensory factors contributing to the identification of the animal species of meat. *J. Food Sci.* **69**: 218-220.
- 89) Takakura, Y., Sakamoto, T., Hirai, S., Masuzawa, T., Wakabayashi, H., Nishimura, T. 2014. Characterization of the

- key aroma compounds in beef extract using aroma extract dilution analysis. *Meat Sci.* **97**: 27-31.
- 90) 小林正人, 佐々木整輝, 内山京子. 2018. 牛肉の焙焼に伴う香気成分の動態. *食肉の科学*. **59**: 111-112.
- 91) Hull, M. E. 1947. Studies on milk proteins. II. Colorimetric determination of the partial hydrolysis of the proteins in milk. *J. Dairy Sci.* **30**: 881-884.
- 92) Matsuishi, M., Fujimori, M., Okitani, A. 2001. Wagyu beef aroma in Wagyu (Japanese black cattle) beef preferred by the Japanese over imported beef. *Anim. Sci. J.* **72**: 498-504.
- 93) Vasta, V., Ventura, V., Luciano, G., Andronico, V., Pagano, R. I., Scerra, M., Biondi, L., Avondo, M., Priolo, A. 2012. The volatile compounds in lamb fat are affected by the time of grazing. *Meat Sci.* **90**: 451-456.
- 94) 文部科学省 . 食品成分データベース . <https://fooddb.mext.go.jp/> (参照 2020-12-11).
- 95) 樋口幹人. 2011. (2) 筋肉の軟化と熟成. pp. 134-135. 畜産物利用学 (齋藤忠夫編). 文英堂出版, 東京.
- 96) Campo, M. M. 1999. Breed type and ageing time effects on sensory characteristic of beef strip loin steaks. *Meat Sci.* **51**: 383-390.
- 97) 岡山高秀. 1999. 牛肉の熟成中に生じるペプチド成分の挙動解析. *食肉に関する助成研究調査結果報告書*. **17**: 837-839.
- 98) 有原圭三. 2009. 機能性ペプチドの最新応用技術-食品・化粧品・ペットフードへの展開. pp. 21-23, 57-65. シーエムシー

出版，東京．

- 99) Koutsidis, G., Elmore, J. S., Oruna-Concha, M. J., Campo, M. M., Wood, J. D., Mottram, D. S. 2008. Water-soluble precursors of beef flavour: I. Effect of diet and breed. *Meat Sci.* **79**: 124-130.
- 100) 加藤康彦，沢崎 徹，沢崎 坦，広瀬 昶．1978. 脂質代謝から見た山岳育成牛の肥育効率．日畜会報．**49**: 148-154.
- 101) Yang, A., Brewster, M. J., Beilken, S. L., Lanari, M. C., Taylor, D. G., Tume, R. K. 2006. Warmed-over flavor and lipid stability of beef: effects of prior nutrition. *J. Food Sci.* **67**: 3309-3313.
- 102) 仮屋喜弘．2004. 放牧による牛の健康増進効果．畜会経営報．**173** : 1-7.
- 103) 谷本保幸，千田雅之，大島一修，小山信明．2003. 中国中山間地域における遊休農林地の放牧利用が肉用繁殖牛の栄養生理に及ぼす影響．日草誌．**49** : 465-470.
- 104) 萬田富治．2004. 自然・食・人の健康を保全する地域資源循環型畜産の構築－北里大学八雲牧場における理論と実践．日草誌．**50** : 453-460.
- 105) 小笠原英毅，畔柳 正，寶示戸雅之．2014. 北里大学における自給飼料100%による牛肉生産と加工・販売の取り組み ～北里大学発・北里八雲牛ここにあり!!～．日畜会報，**85** : 390-393.
- 106) Mashima, D., Oka, Y., Gotoh, T., Tomonaga, S., Sawano, S., Nakamura, M., Tatsumi, R., Mizunoya, W. 2019. Correlation

between skeletal muscle fiber type and free amino acid levels in Japanese Black steers. *Anim. Sci. J.* **90** : 604-609.

- 107) 木戸恭子. 2010. 黒毛和種牛の骨格筋線維動態に及ぼす放牧の影響. 栄養生理会報. **54** : 39-59.
- 108) 横山壱成, 小笠原英毅, 岩城祐奈, 小宮佑介, 長竿 淳, 有原圭三. 2020. 日本短角種牛肉における香気および呈味に及ぼす放牧飼養の影響. 東畜会報. **70**: 19-27.

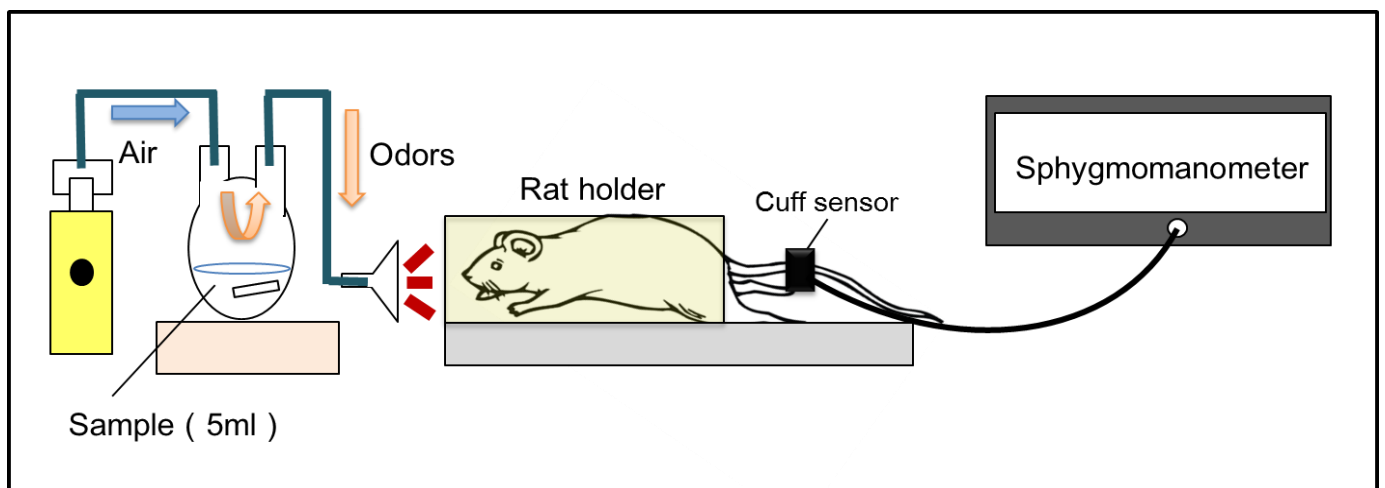


Fig. 1. Inhalation of odor samples to rats and physiological parameters measurement.

Systolic blood pressure and heart rate were measured by tail cuff method with a programmed electro-sphygmomanometer (BP-98; Softron Co., Tokyo, Japan). Five milliliters of each odor samples or control (distilled water) was deposited into a two-neck flask; air was pumped into one neck and the vapor phase from the flask was ejected from the other.

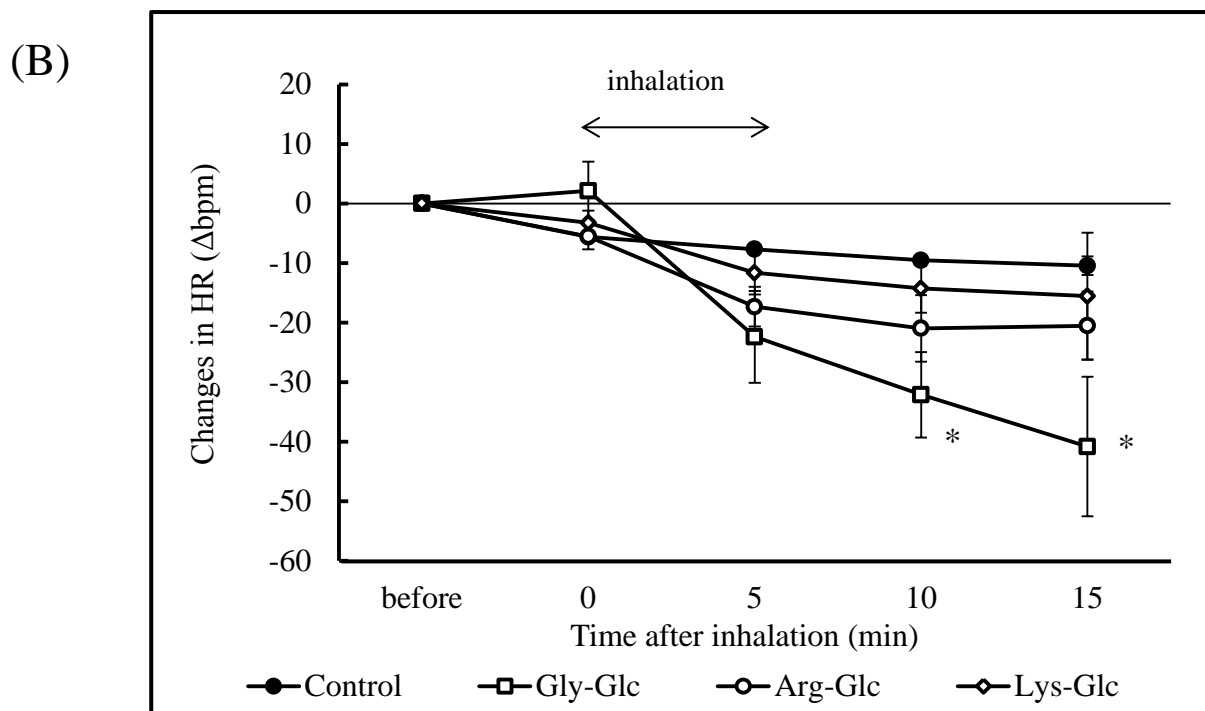
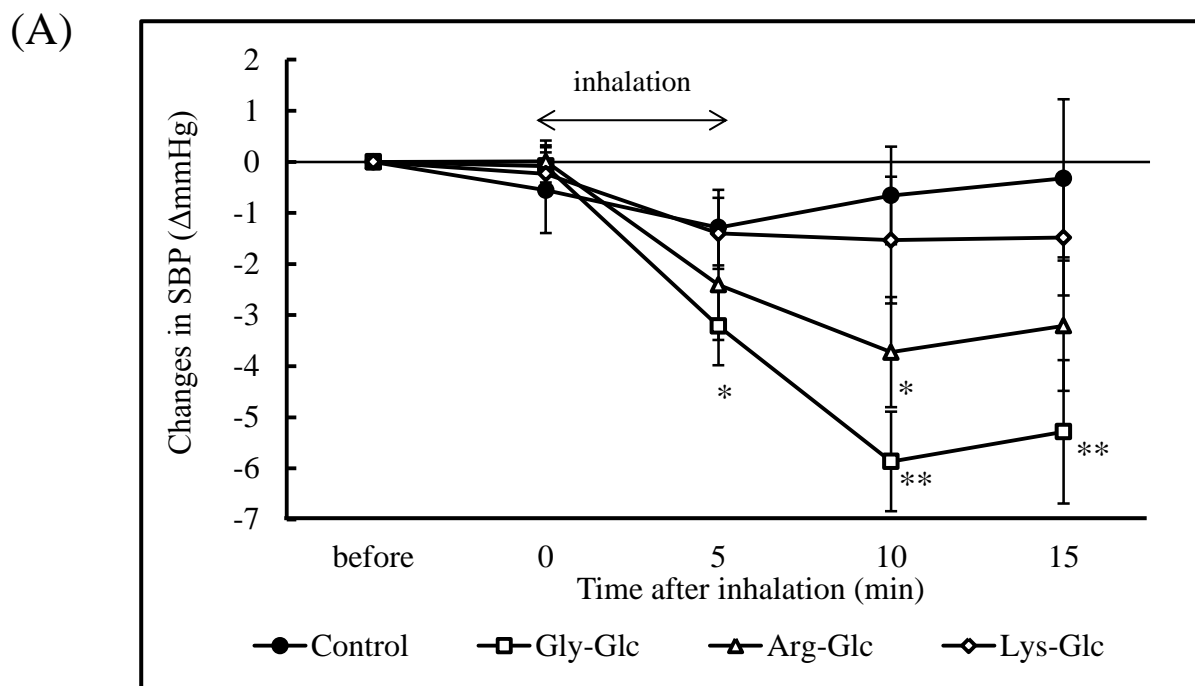
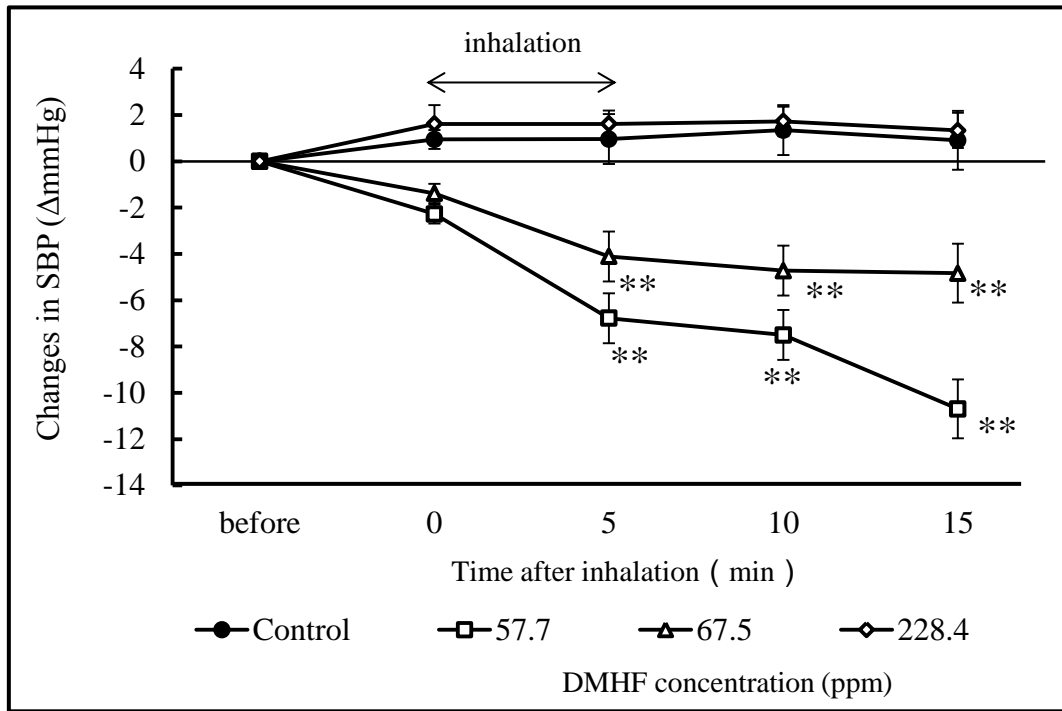


Fig. 2. Effects of odors from each model Maillard reaction sample on SBP and HR. (a) Changes in SBP. (b) Changes in HR.

Data are expressed (mean \pm S.E.M.). SBP and HR in rats were measured during the 15-min trial. Differences in SBP and heart rate were statistically analyzed by a two-way ANOVA with Dunnett's test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (vs. Control).

SBP: systolic blood pressure, HR: heart rate, Arg: arginine, Lys: lysine, Gly: Glycine, Glc: glucose.

(A)



(B)

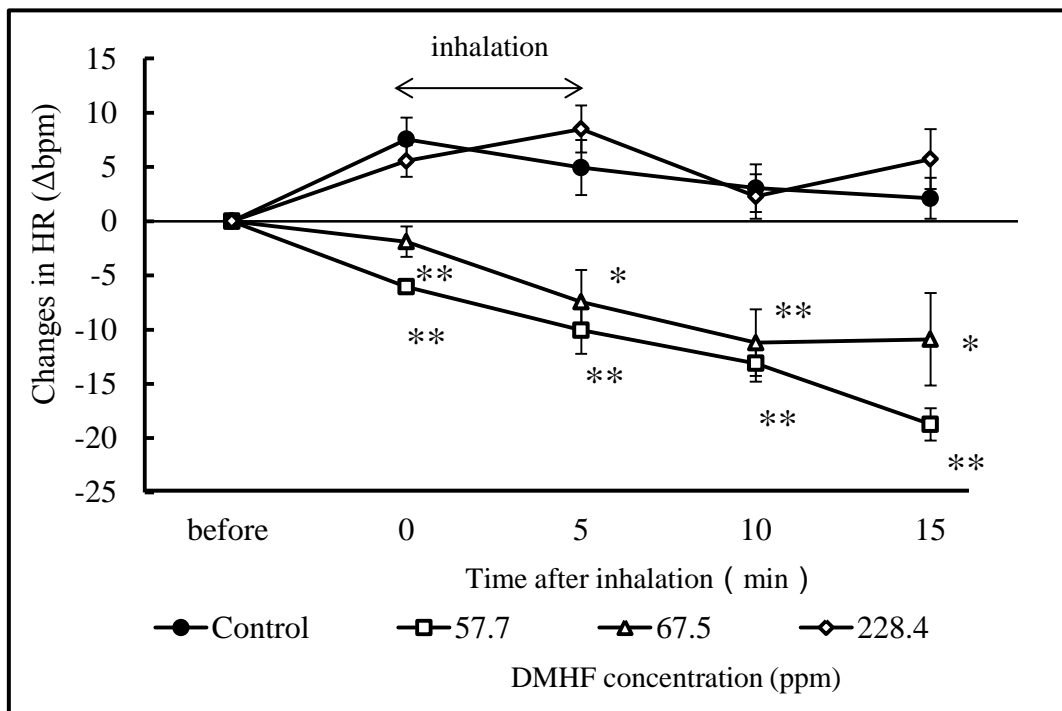


Fig. 3. Effects of DMHF inhalation on SBP and HR. (a) Changes in SBP. (b) Changes in HR.

Data are expressed (mean \pm S.E.M.). SBP and HR in rats were measured during the 15-min trial. Differences in SBP and heart rate were statistically analyzed by a two-way ANOVA with Dunnett's test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (vs. Control). SBP: systolic blood pressure, HR: heart rate, DMHF: 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone.

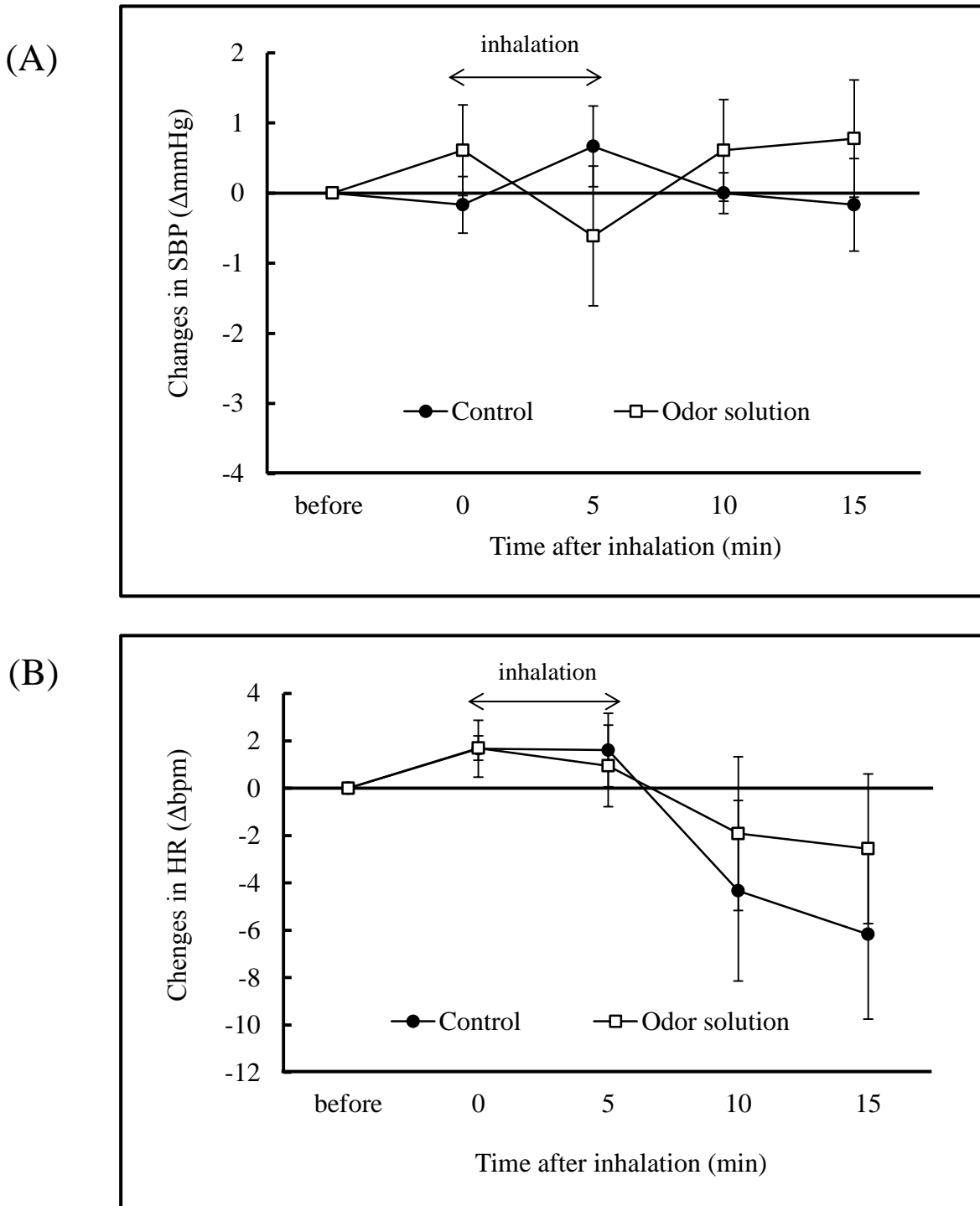


Fig. 4. Changes in SBP and HR after the inhalation of distilled water as the control or constructed odor solution without DMHF.

Odor solution was constructed with acetic acid (7.42 ppm), 2,3-dimethylpyrazine (0.92 ppm) and 2,3,5-trimethylpyrazine (8.00 ppm). These odor compounds concentration were referred from Zhou et al. (2016) and dissolved in distilled water. Data are expressed (mean \pm S.E.M.). Differences in SBP and heart rate were statistically analyzed by a two-way ANOVA with Dunnett's test. SBP: systolic blood pressure, HR: heart rate, DMHF: 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2*H*)-furanone.

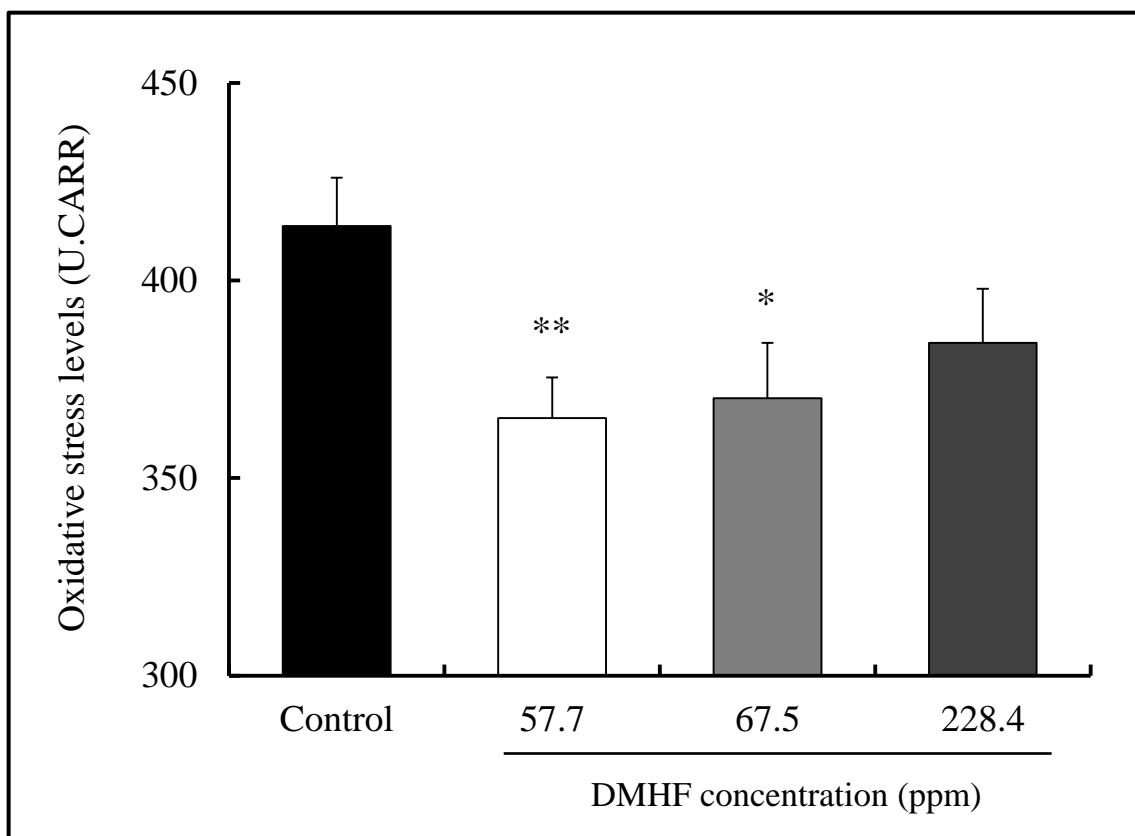


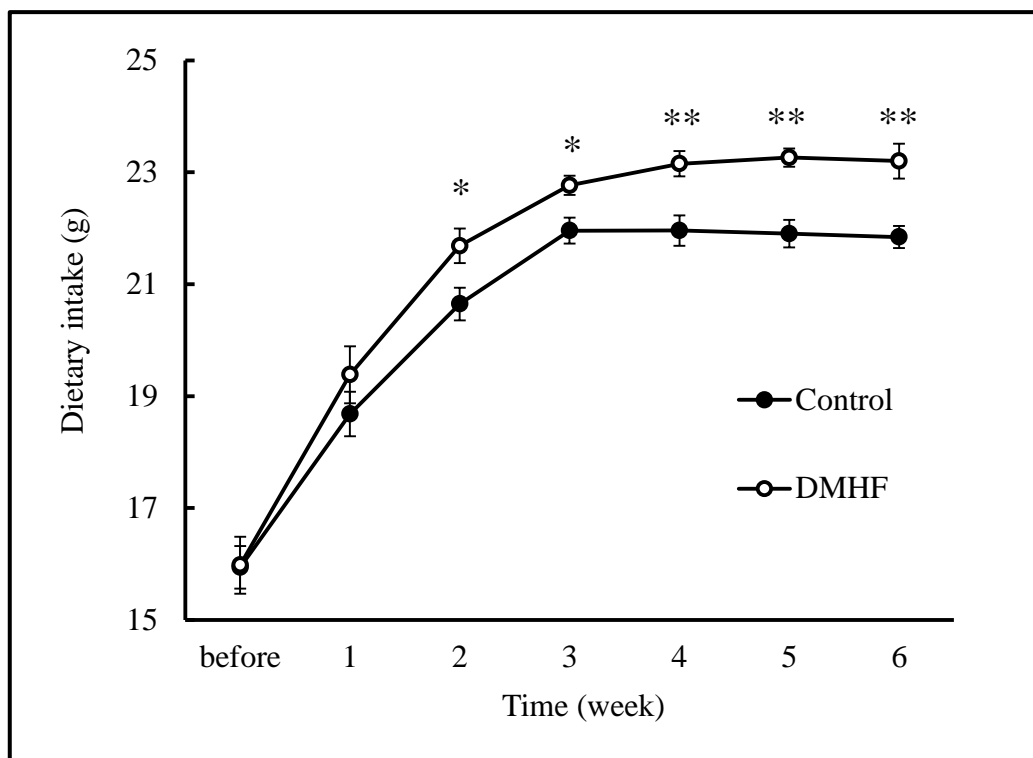
Fig. 5. Effects of DMHF inhalation on oxidative stress levels in rat plasma.

The results of the d-ROMs test are expressed as Carratelli Units (CARR U), where 1 U CARR corresponds to 0.08 mg/100 ml H₂O₂. Data are expressed (mean ± S.E.M.). Differences in hydroperoxide levels between the control and DMHF solution were statistically analyzed by Dunnett's test.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (vs. Control).

DMHF: 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2*H*)-furanone.

(A)



(B)

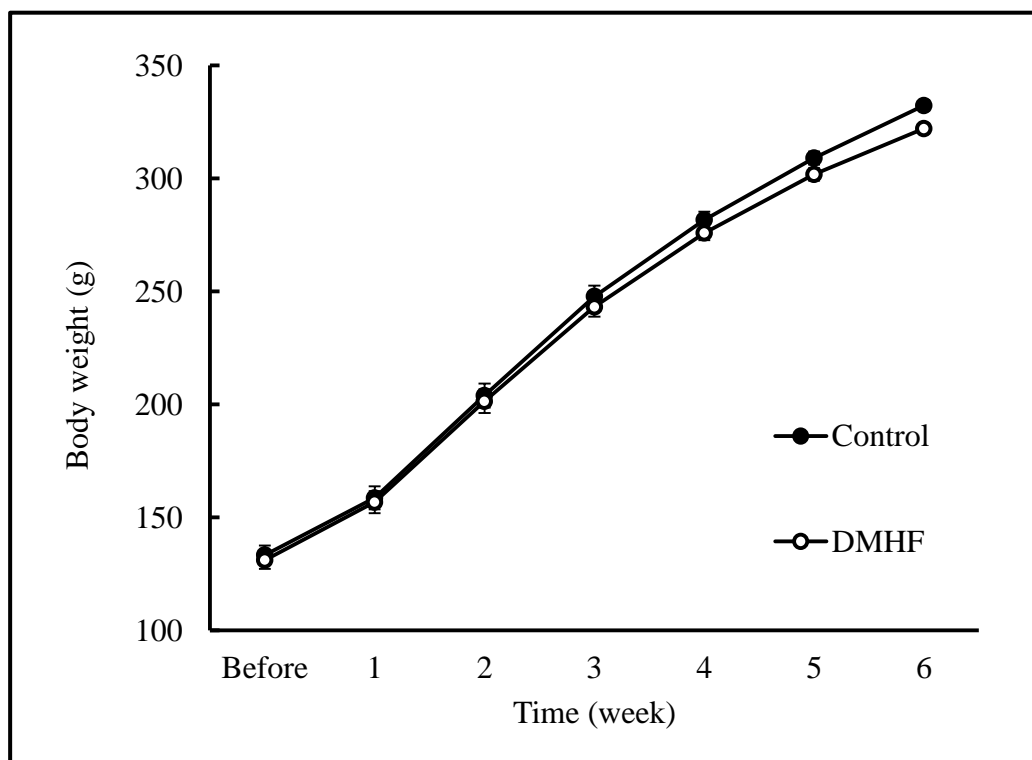


Fig. 6. Effects of DMHF inhalation on dietary intake and body weight gain in Wistar rats: (A) changes in dietary intake; (B) changes in body weight gain.

Data are expressed as means \pm S.E.M. Statistical analyses of differences between the control groups were performed with a two-way ANOVA and the Tukey-Kramer multiple-comparison test.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

DMHF: 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone.

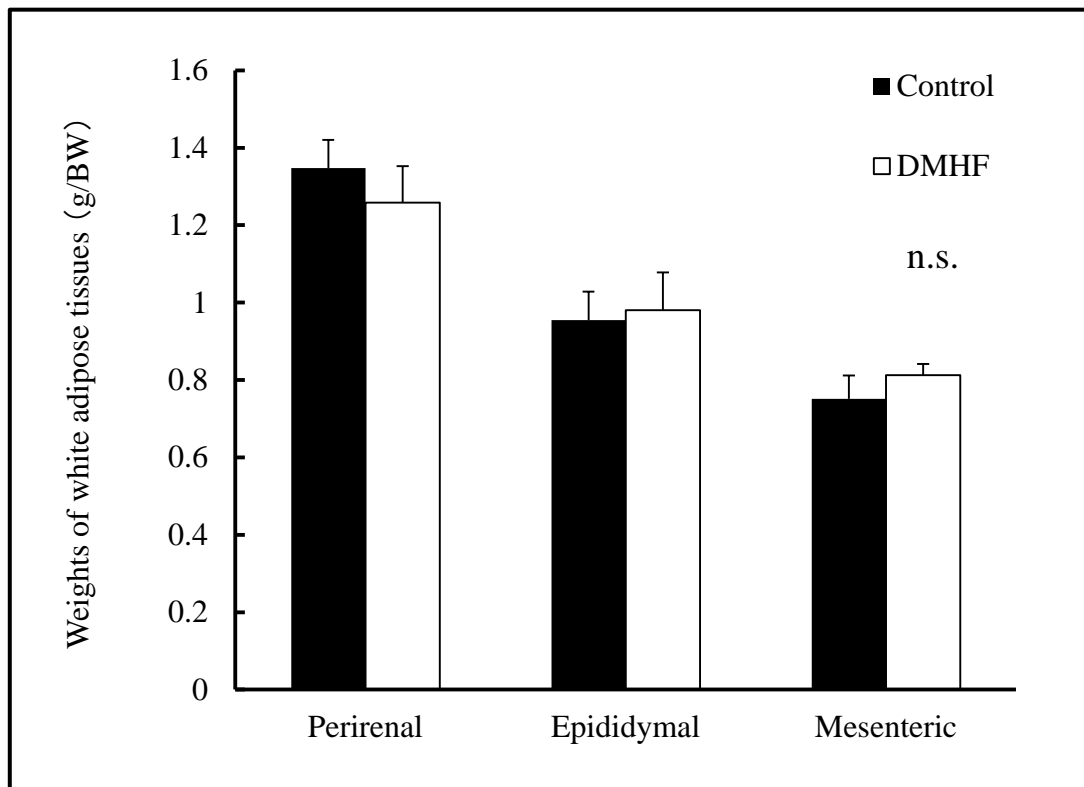


Fig. 7. Weights of white adipose tissues after 6 weeks DMHF inhalation.

Data are expressed as means \pm S.E.M. Statistical analyses of differences between the control group and DMHF group were performed with the Student's *t*-test.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

DMHF: 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2*H*)-furanone.

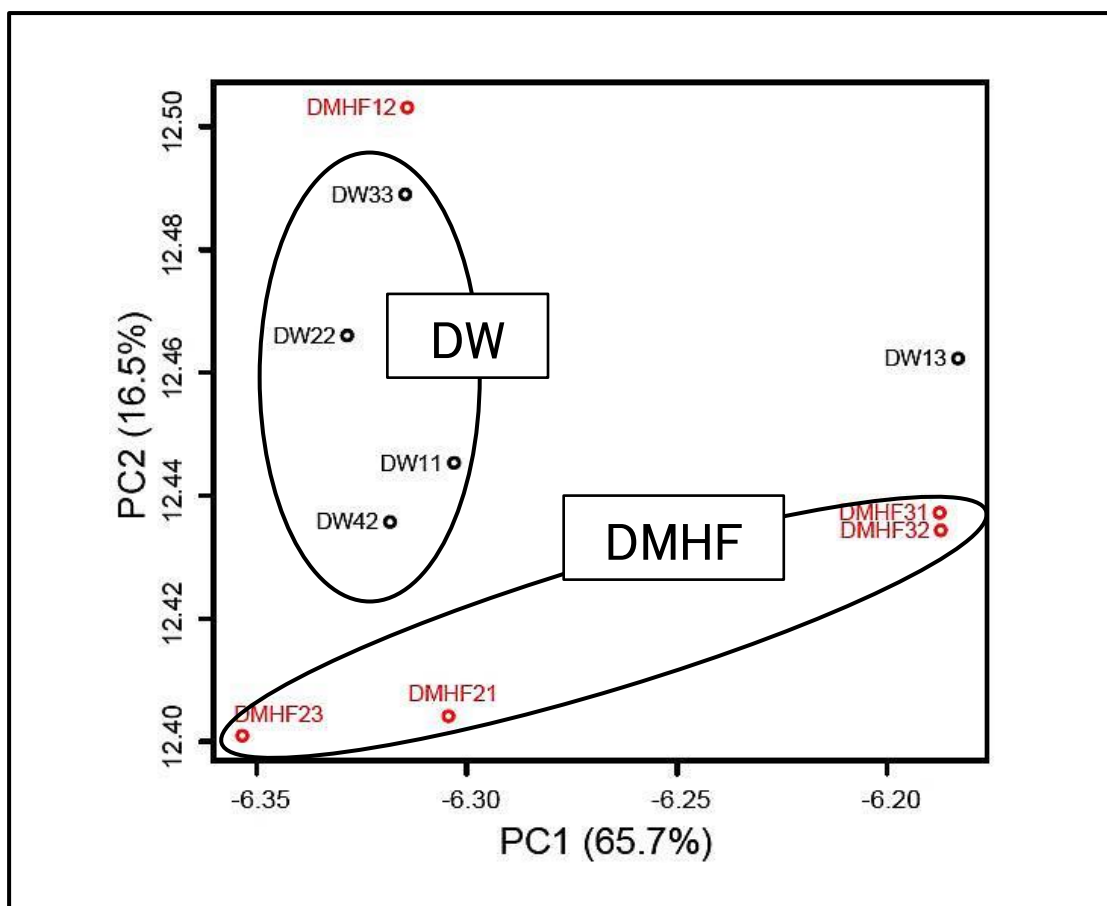
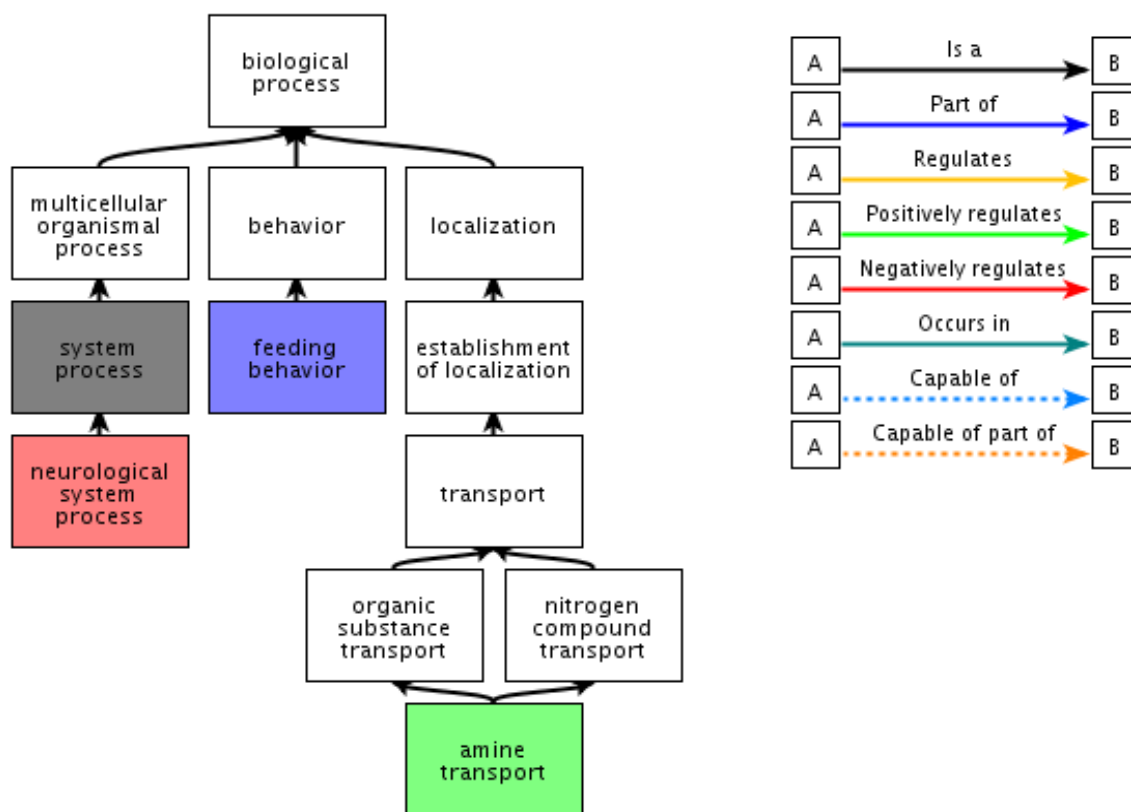


Fig. 8. Principle component analysis (PCA) of DNA microarray data in the rat brain from the control group and DMHF group.

The labels on the x- and y-axes represent PC1 and PC2, respectively, with the proportion of variance being shown in parentheses.

DW, control group (distilled water); DMHF, 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2*H*)-furanone. Each dot was represented as treatment+sample#.



QuickGO - <http://www.ebi.ac.uk/QuickGO>

GO-ID	GO term	FDR-corrected <i>p</i> -value
0007631	Feeding behavior	5.5E-7
0003008	System process	3.3E-6
0015837	Amine transport	1.0E-5
0050877	Neurological system process	2.4E-5

Fig. 9. The annotation tree and GO terms of 180 genes up-regulated by DMHF inhalation.

DMHF: 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2*H*)-furanone.

Annotation tree was obtained from Quick GO (<https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/>).

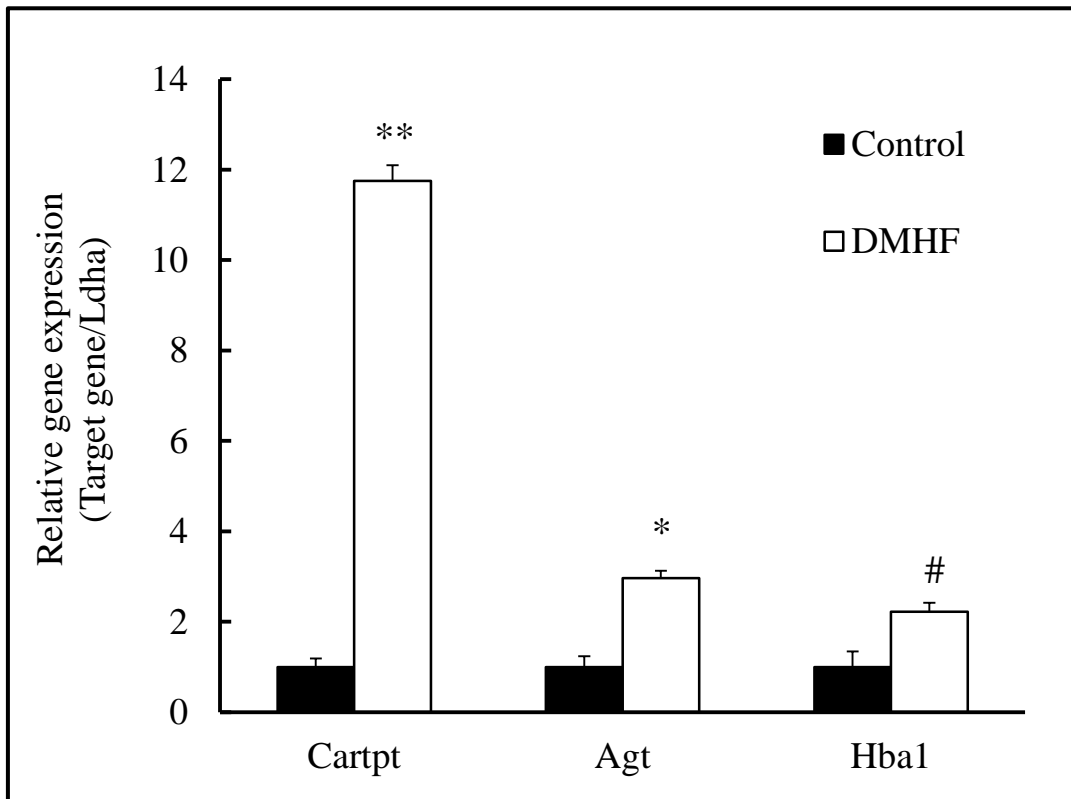


Fig. 10. Validation of mRNA expression in the rat brain after DMHF inhalation by RT-PCR.

Data are expressed as means \pm S.E.M. Statistical analyses of differences between the control group and DMHF group were performed using the Student's t-test.

$p < 0.1$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Ldha, lactate dehydrogenase A; Cartpt, cocaine- and amphetamine-regulated transcript prepropeptide; Agt, angiotensinogen; Hba1, hemoglobin alpha 1; DMHF, 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone.

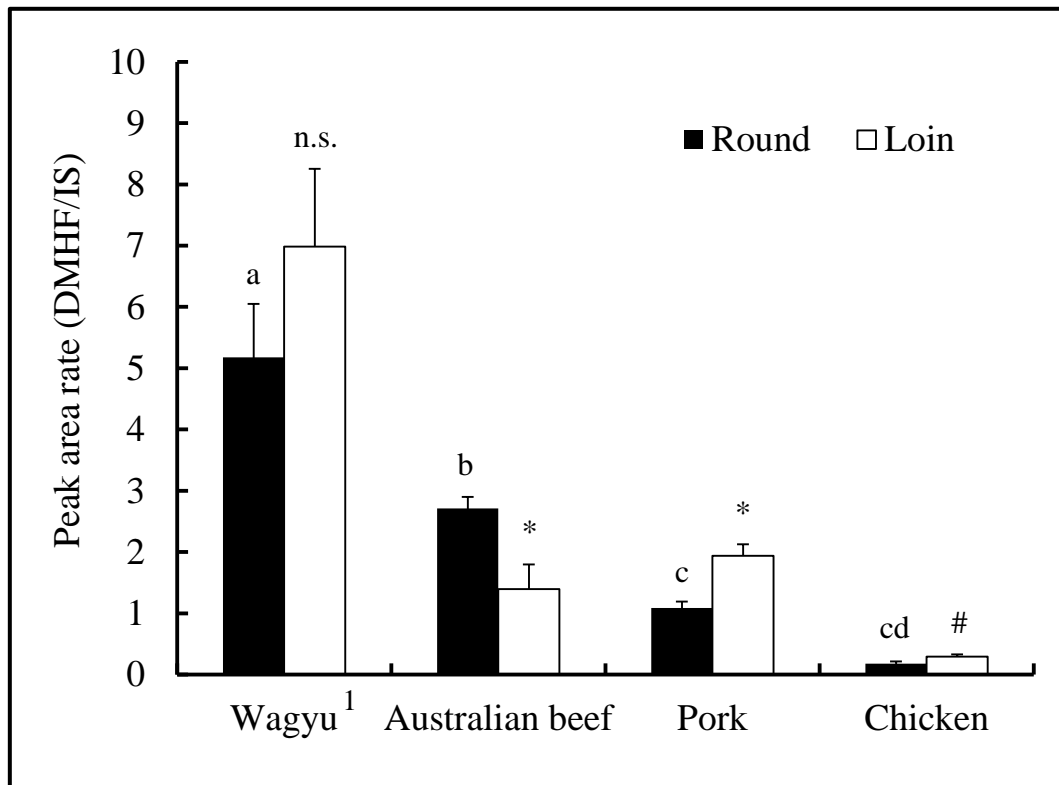


Fig. 11. Quantification of DMHF in cooked meats by the GC/MS.

Data are expressed as means \pm S.E.M. Statistical analyses of differences between the animals in the same parts were performed using the Tukey-Kramer multiple-comparison test.

a, b, c, d The different letters mean significant difference in the round.

$p < 0.1$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Means significant difference in the same animal.

1, Japanese black cattle beef.

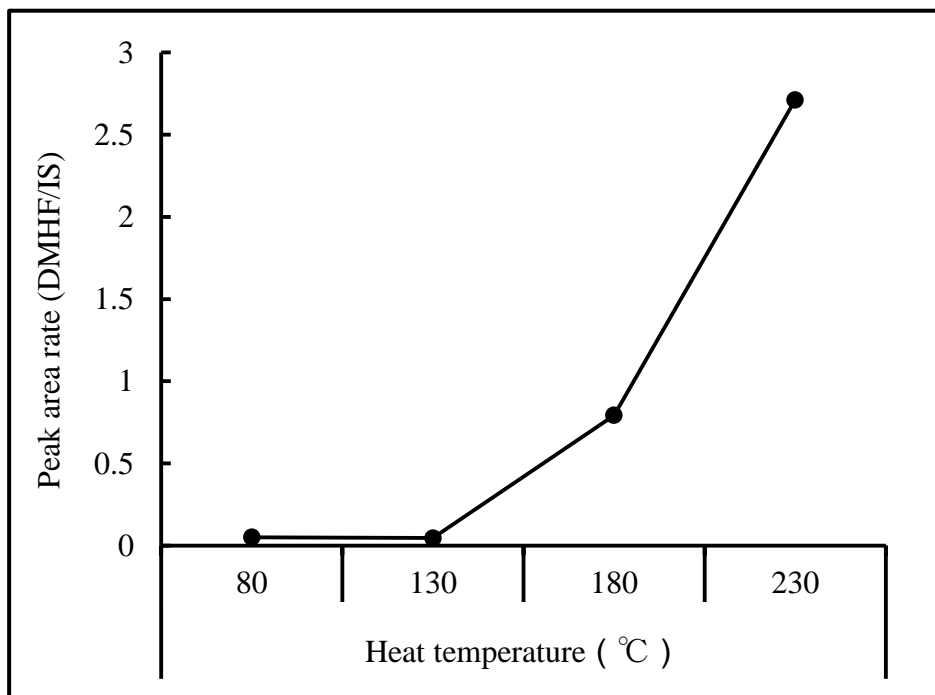


Fig. 12. Changes in DMHF generation by heat temperature.

Data are expressed as means twice.

DMHF: 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2*H*)-furanone.

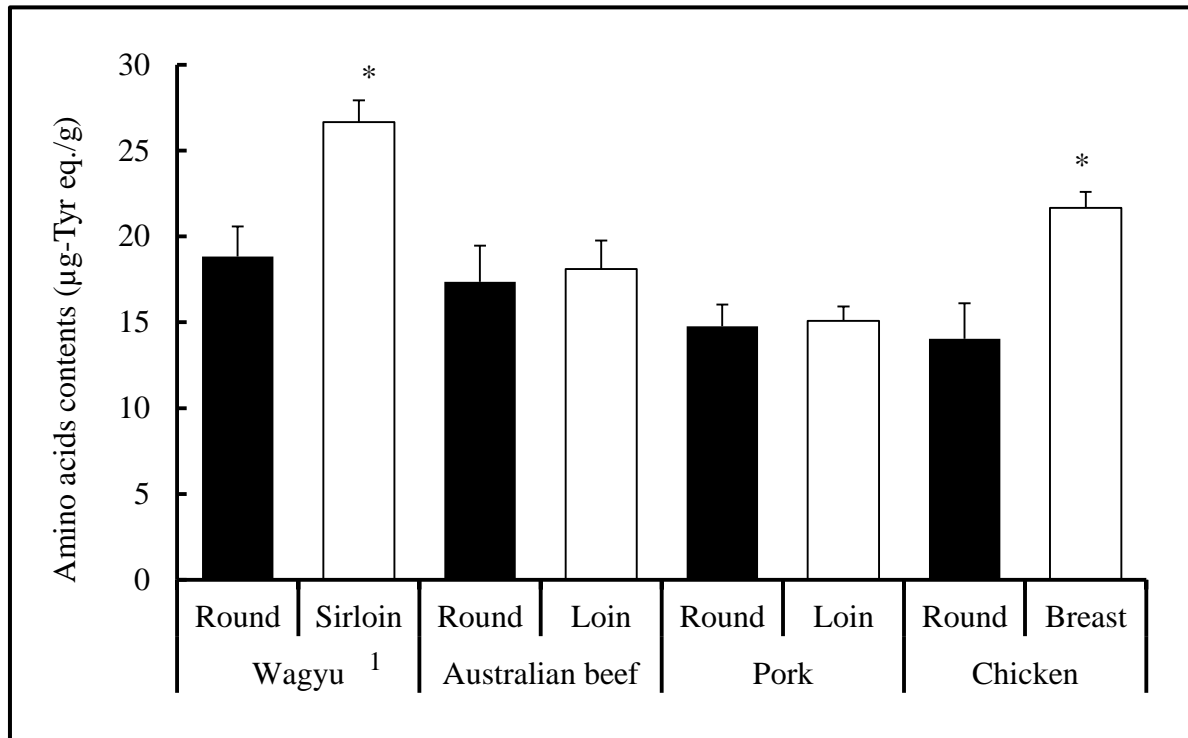


Fig. 13. Changes in DMHF generation by cooking method.

Data are expressed as means \pm S.E.M.

DMHF: 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2*H*)-furanone.

(A)



(B)

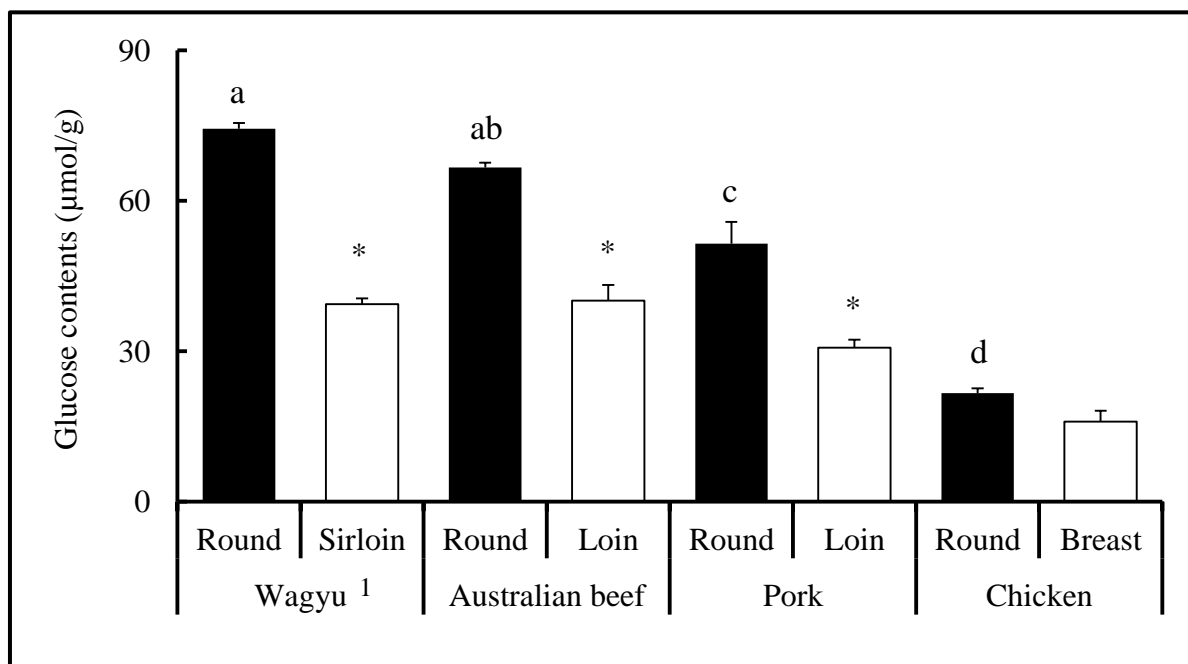


Fig. 14. Measurement of the Maillard reaction substrates in meats.

Data are expressed as means \pm S.E.M. Statistical analyses of differences between animals were performed using the Tukey-Kramer multiple-comparison test.

a, b, c, d The different letters mean significant difference in the round.

$p < 0.05$ Means significant difference in the same animal.

1, Japanese black cattle beef.

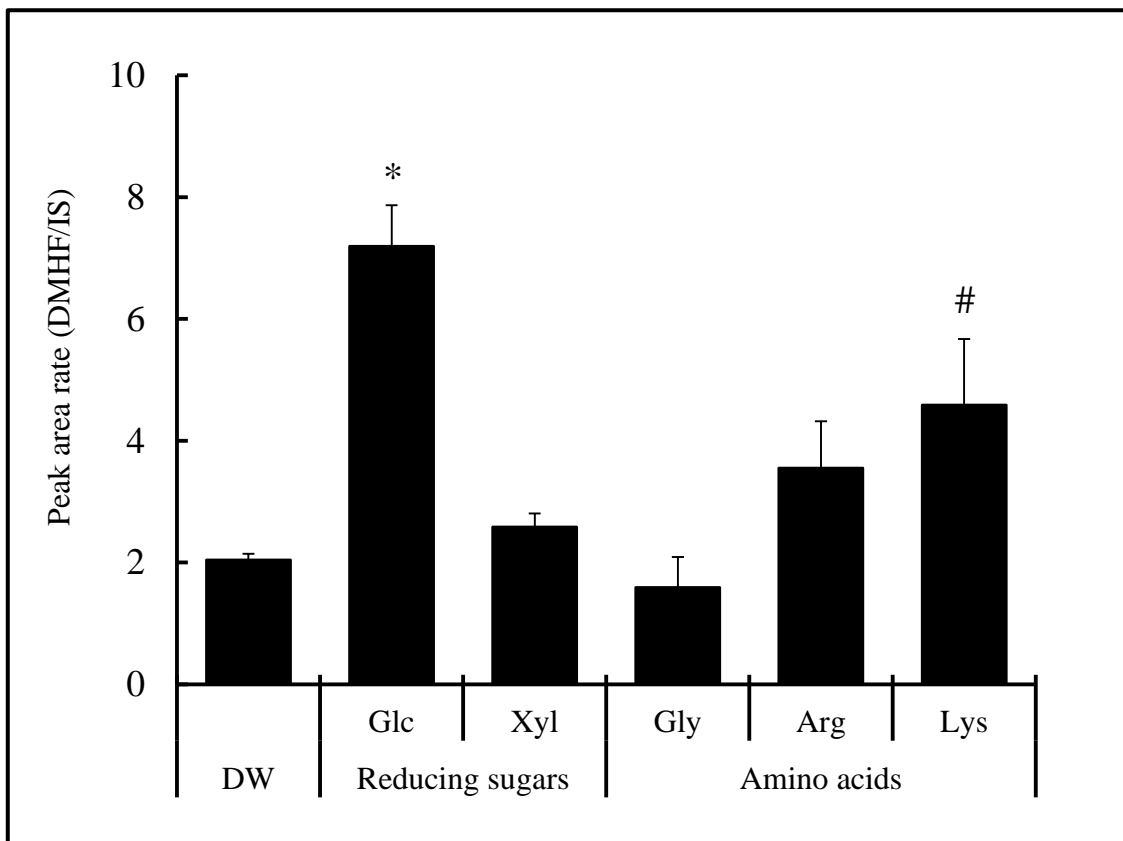


Fig. 15. Effects of the addition of Maillard reaction substrates on DMHF generation in meats.

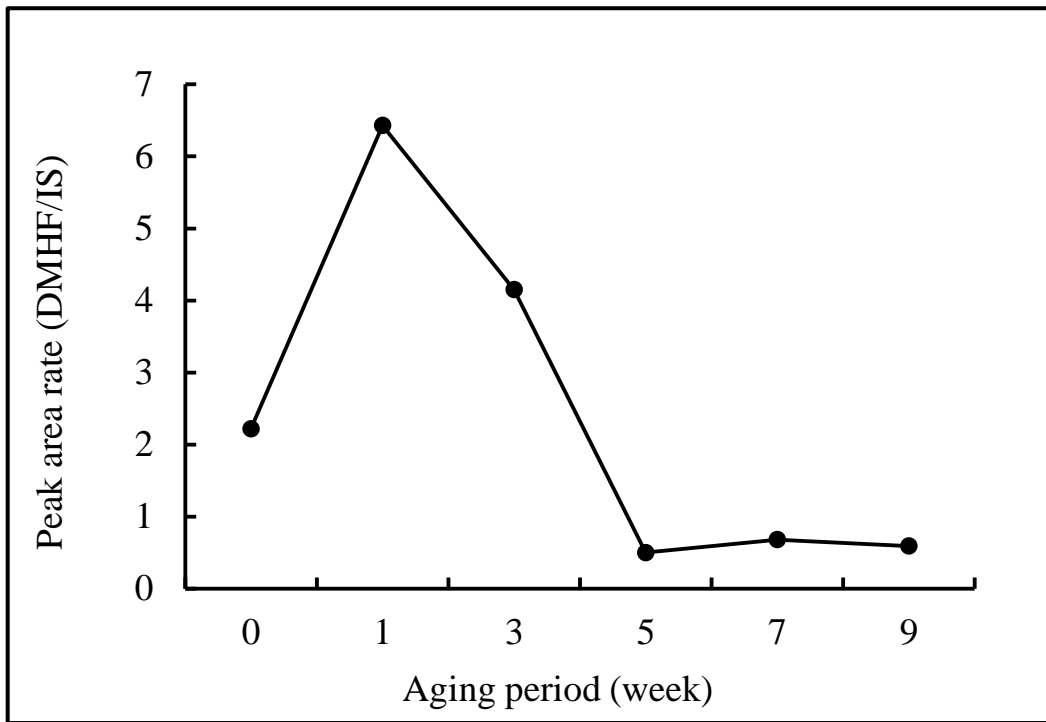
Data are expressed as means \pm S.E.M. Statistical analyses of differences were performed using the Dunnett's test.

* $p < 0.05$, # $p < 0.1$. (vs. DW)

DMHF: 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2*H*)-furanone.

Glc: glucose, Xyl: xylose, Gly: glycine, Arg: arginine, Lys: lysine.

(A)



(B)

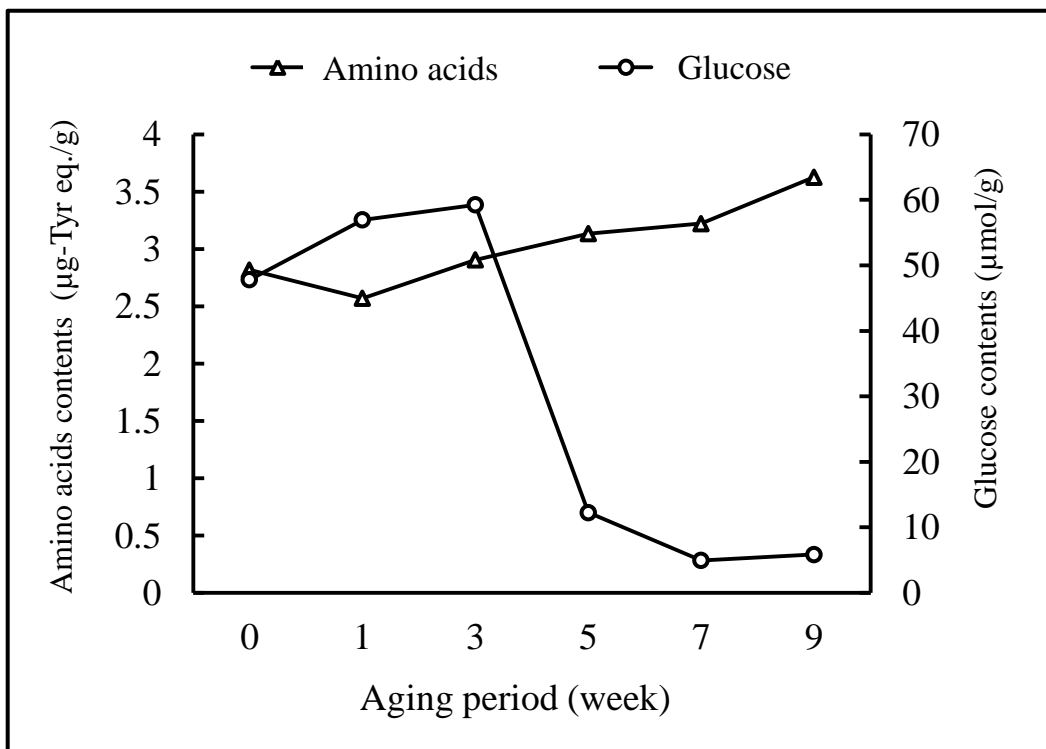


Fig. 16. Changes in DMHF generation and Maillard reaction substrates in meats by aging.

DMHF: 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2*H*)-furanone.

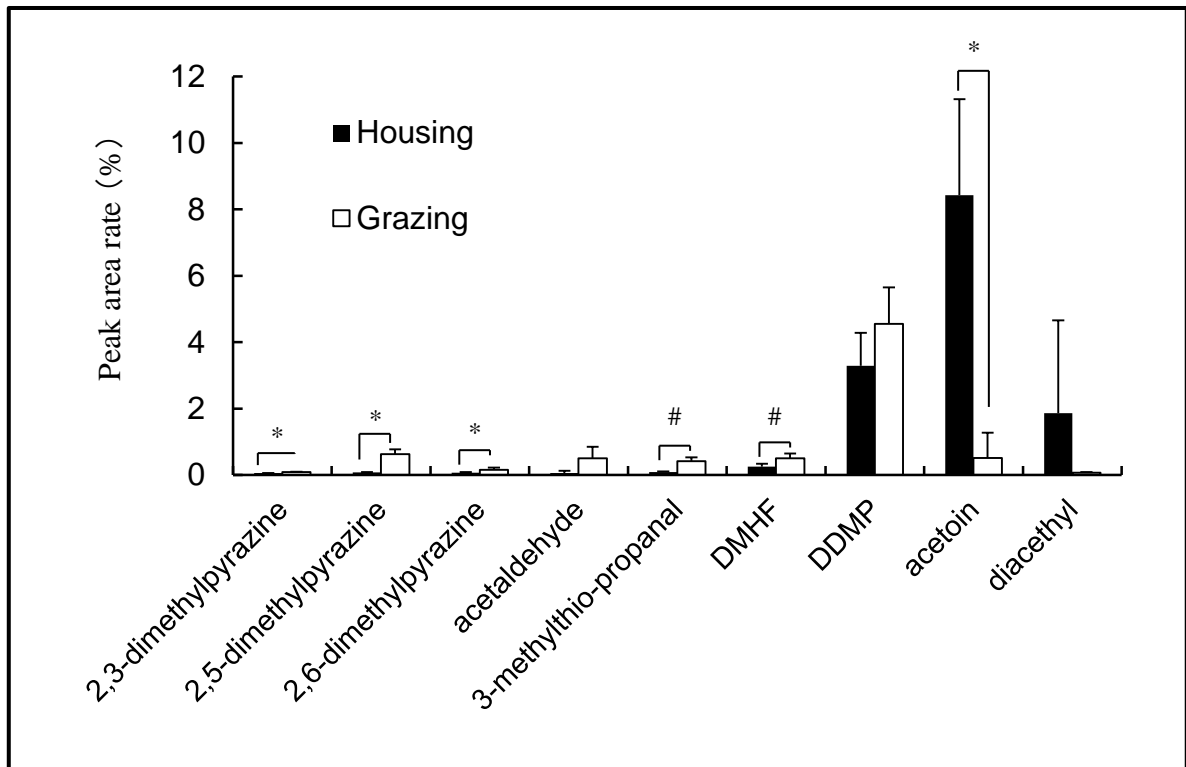


Fig. 17. Changes in odor compounds of cooked beef by different feeding conditions.

Data are expressed as means \pm S.E.M. Statistical analyses of differences between the control groups were performed using the Student's t-test.

* $p < 0.05$, # $p < 0.1$.

DMHF: 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2*H*)-furanone.

DDMP: 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4*H*-pyran-4-one.

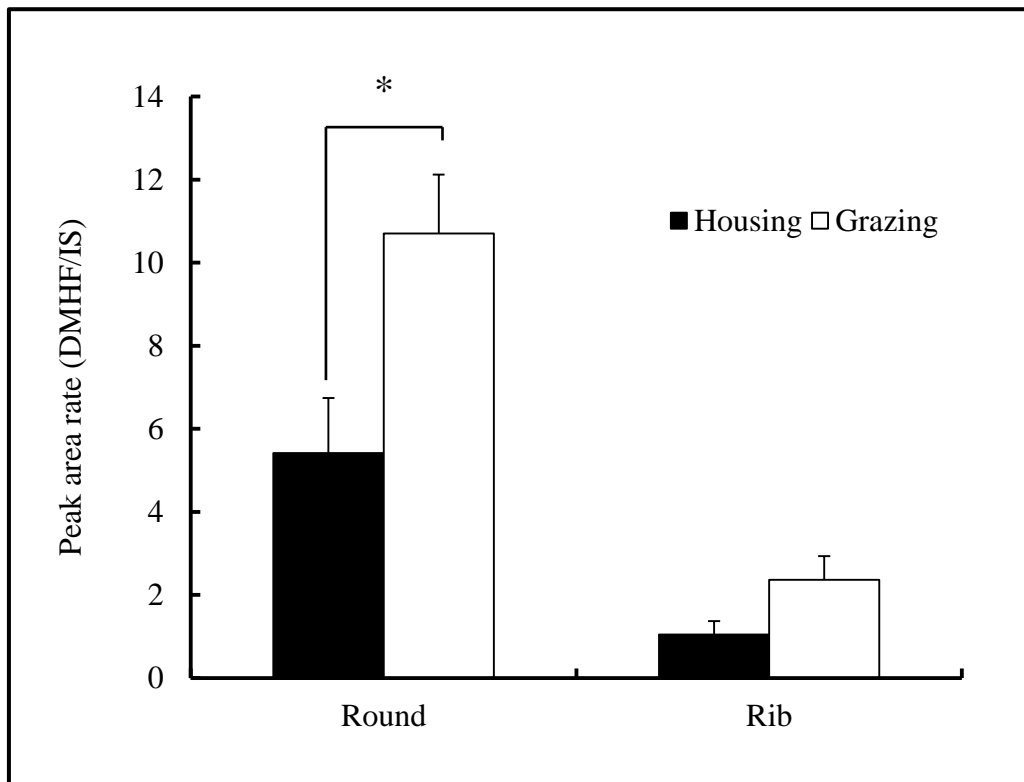
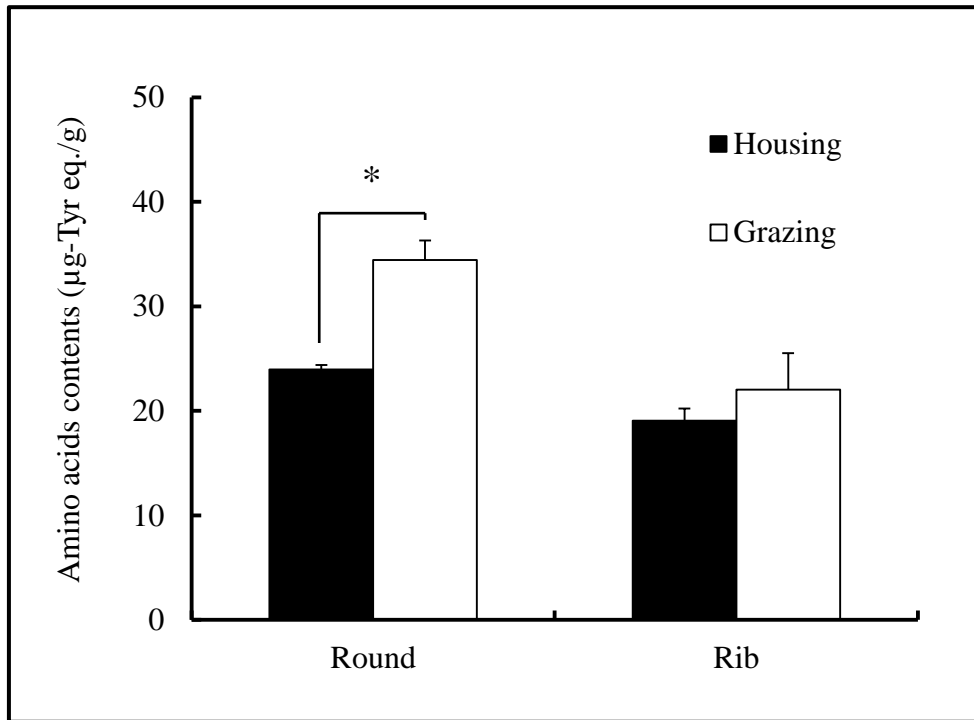


Fig. 18. Changes in DMHF generation in cooked beef by different feeding conditions.

Data are expressed as means \pm S.E.M. Statistical analyses of differences between the control groups were performed with a two-way ANOVA and the Tukey-Kramer multiple-comparison test. * $p < 0.05$.

DMHF: 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2*H*)-furanone.

(A)



(B)

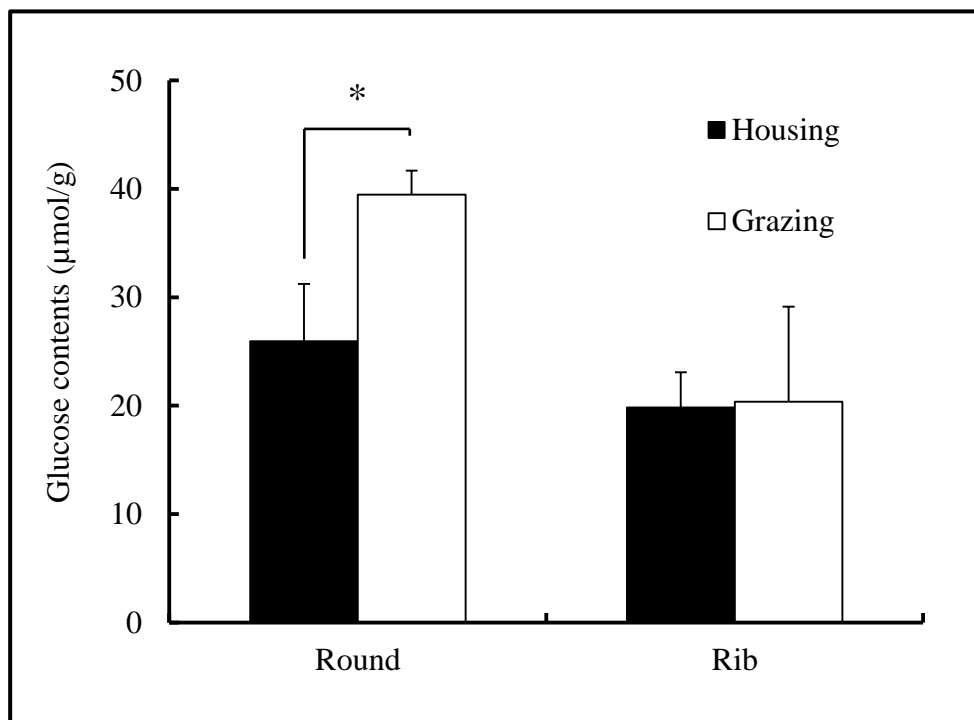


Fig. 19. Changes in Maillard reaction substrates in beef by different feeding conditions.

Data are expressed as means \pm S.E.M. Statistical analyses of differences between the control groups were performed with a two-way ANOVA and the Tukey-Kramer multiple-comparison test. * $p < 0.05$.

Table 1. Standard curve for quantification of odor compounds in the Maillard reaction samples

Odor compound	Standard curve	r^2
Methylpyrazine	$y=0.4698x$	0.99
2,3-Dimethylpyrazine	$y=0.4071x$	0.99
2,3,5-Trimethylpyrazine	$y=0.888x$	1.00
Acetic acid	$y=0.1227x-0.0643$	0.99
DMHF	$y=23.497x-0.0558$	1.00

DMHF: 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2*H*)-furanone.

Table 2. Odor contributions and concentrations of odor compounds in the Maillard reaction samples

KI ^a	RT ^b	Odor compound	Odor quality ^c	Odor threshold ^d (ppm)	FD factor (log ₄)			Concentration ^e (ppm)			Odor activity value (OAV) ^f		
					Gly ¹	Arg	Lys	Gly ¹	Arg	Lys	Gly	Arg	Lys
1269	22.3	Methylpyrazine	Nutty, roasted	0.06	0	0	0	36.9	0	0	615	0	0
1347	27	2,3-Dimethylpyrazine	Nutty, savory	0.02	6	3	3	0.83	0.92	1.48	46	41.5	74
1406	30.2	2,3,5-Trimethylpyrazine	Peanut, green	0.001	4	2	2	8	8	1.25	8000	8	1250
1454	31.9	Acetic acid	Sour	1	1	1	1	7.42	7.42	44	7.42	49	44
1597	36.4	Unknown ^h	Popcorn	1	1	1	1	Trace	Trace	Trace	1	1	1
1888	47.3	2-Hydroxy-3-methyl-2-cyclopenten-1-one	Sweet, burnt	1	1	1	1	1.09	1.09	1.09	1	1	1
2039	54.5	2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3-(2H)-furanone	Caramel, sweet	0.03	6	6	8	57.7	67.5	228.4	1923	2250	7613
2258	60.4	2,3-Dihydro-5-hydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one	Sweet	1	4	4	4	1	1	1	1	1	1

^a Kovats' index on the DB-Wax capillary. ^b Retention time. ^c Odor quality assigned during AEDA. ^d Odor threshold in water. Information from the National Institute of Health Science (Japan).

^e Concentration of the odor compound in the Maillard reaction sample. ^f The ratio between the concentration of individual odor compounds in the sample and the threshold. ^g The odor compound was too weak to be detected by GC-O.

^h The compound was not purchased or quantified. ⁱ Data not available. ^j The OAV was not determined. ¹ The reference data were adapted from Zhou et al. (2016). Gly: glycine, Arg: arginine, Lys: lysine

Table 3. List of genes that were up-regulated by DMHF inhalation

Probe ID	Gene Symbol	Gene Title
<i>Feeding Behavior</i>		
1368585_at	<i>Cartpt</i>	Cart prepropeptide
1387811_at	<i>Agt</i>	Angiotensinogen
1394008_x_at	<i>Cntfr</i>	Ciliary neurotrophic factor receptor
1387088_at	<i>Gal</i>	Galanin and GMAP prepropeptide
1387163_at	<i>Hcrt</i>	Hypocretin neuropeptide precursor
1390159_at	<i>Npw</i>	Neuropeptide W
1369067_at	<i>Nr4a3</i>	Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3
1368312_at	<i>Oxt</i>	Oxytocin/neurophysin 1 prepropeptide
1368802_at	<i>Pmch</i>	Pro-melanin-concentrating hormone
1390525_a_at	<i>Stra6</i>	Stimulated by retinoic acid 6
<i>Amine Transport</i>		
	<i>Cartpt, Agt, Oxt</i>	
1369001_at	<i>Chrna3</i>	Cholinergic receptor, nicotinic, alpha 3
1368064_a_at	<i>Ddc</i>	Dopa decarboxylase
1380303_at	<i>Per2</i>	Period circadian clock 2
1387822_at	<i>P2ry12</i>	Purinergic receptor P2Y12
1387013_at	<i>Tmem27</i>	Transmembrane protein 27
<i>System Process and Neurological System Process</i>		
	<i>Cartpt, Agt, Oxt, Hcrt, Stra6</i>	
1387221_at	<i>Gch1</i>	GTP cyclohydrolase 1
1387166_at	<i>Aipl1</i>	Arly hydrocarbon receptor-interacting protein-like 1
1368321_at	<i>Egr1</i>	Early growth response 1
1369829_at	<i>Gjb4</i>	Gap junction protein, beta 4
1370239_at	<i>Hba1</i>	Hemoglobin, alpha 1
1377434_at	<i>Mfrp</i>	Membrane frizzled-related protein
1369067_at	<i>Nr4a3</i>	Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3
1369080_at	<i>Prph2</i>	Peripherin 2
1369139_at	<i>Pdc</i>	Phosducin
1389501_at	<i>Pde6g</i>	Phosphodiesterase 6G
1368802_at	<i>Pmch</i>	Pro-melanin-concentrating hormone
1368348_at	<i>Slc6a4</i>	Solute carrier family 6 member 4
1387564_at	<i>Slc8a2</i>	Solute carrier family 8 member 2
1388478_at	<i>Tb11x</i>	Transducing (beta)-like 1 X-linked
1391323_at	<i>Tf</i>	Transferrin
1393071_at	<i>Tulp1</i>	Tubby-like protein 1

Table 4. Primer sets used for real-time quantitative RT-PCR

mRNA		Sequence (5'-3')	Amplicon (nt)	Access no.
<i>Cartpt</i>	Forward	AGAAGAAGTACGGCCAAGTCC	84	NM_017110.1
	Reverse	CACACAGCTTCCCGATCC		
<i>Agt</i>	Forward	CACCTACGTTCACTTCCAAGG	65	NM_134432.2
	Reverse	AGAACTCATGGAGCCCAGTC		
<i>Hba1</i>	Forward	CAAGAACTGCTGGGGGAAG	105	NM_013096.1
	Reverse	GAAGGCAGCGAACATCCTC		
<i>Ldha</i>	Forward	GATCTCGCGCACGCTACT	111	NM_017025.1
	Reverse	CACAATCAGCTGGTCCTTGAG		

Cartpt, cocaine and amphetamine-regulated transcript prepropeptide; *Agt*, angiotensinogen; *Hba1*, Hemoglobin, alpha 1; *Ldha*, lactate dehydrogenase A

Table 5-1. Odor compounds were detected in cooked meats by HS-SPME/GC-MS

Identified odor compounds by MS-spectrum	Odor descriptions	Detected meat sample
<i>Pyrazines</i>		
2,3,5-trimethylpyrazine	Nutty, roasted	AB, C
2,3-Dimethylpyrazine	Nutty, roasted	W, AB
2,5-Dimethylpyrazine	Nutty, roasted	W, AB, P, C
2,6-Dimethylpyrazine	Nutty, roasted	W, AB, P, C
3-Ethyl-2,5-dimethylpyrazine	Nutty, cocoa-like	W, AB, P, C
Methylpyrazine	Nutty	W, AB, P, C
<i>Aldehydes</i>		
(E)-2-decenal	Fatty, green	C
(E)-2-hexenal	Green	W
(E,E)-2,4-decadienal	Fatty, fresh	W, C
1-octen-3-one	Mushroom-like	W
2-Furancarboxaldehyde	Caramel-like	W, AB, C
2-Methylbutanal	Nutty, malty	W, AB, P, C
2-methyl-propanal	Fresh	P, C
2-Nonenal	Fatty, green	W, AB, P, C
2-Undecenal	Fresh, fruity	AB
3-Methylbutanal	Nutty, malty	W, AB, P, C
4-Tetradecanol	Fruity, coconuts-like	AB
Acetaldehyde	Fruity	W, AB, P, C
Benzaldehyde	Almond-like, fruity	W, AB, P, C
Butanal	Green	C
Decanal	Floral, sweet	W, AB, C
Heptanal	Fatty, green	W, P, C
Hexanal	Green	AB, P, C
Nonanal	Green, fatty	W, AB, P, C
Octanal	Green, fatty	C
Pentanal	Fermented, fruity	W, P, C
Tetradecanal	Fatty	AB, P
Undecanal	Floral, fatty	W, AB
(Z)-2-Heptanal	Green, fatty	P
<i>Alcohols</i>		
(E)-2-Octen-1-ol	Green, fatty	C
1-Butanol	Fatty	W, AB, P, C
1-Decanol	Fatty, green	AB
1-Dodecanol	Fatty, fresh	W, AB, C
1-Heptanol	Green	C
1-Hexanol	Green, fatty	W, AB
1-Hydroxy-2-propanone	Sweet, green	W, C
1-Nonanol	Fresh, floral	C
1-Octanol	Green, fatty	W, AB, P, C
1-Octen-3-ol	Mushroom-like	W, AB, C
2,3-butandiol	Buttery, creamy	W, AB
2-Ethyl-1-hexanol	Citrus, floral	C
3-Octanol	Woody	C
3-penten-2-ol	Green	W
Benzenemethanol	Sweet, floral	AB, C

Continue...

Table 5-2. Odor compounds were detected in cooked meats by HS-SPME/GC-MS

<i>Ketones</i>		
2,3-butandione	Creamy, fatty	AB
2,3-Pentanedione	Creamy, fatty	W, AB, P
2-Butanone	Fruity	AB
2-Propanone	Sweet, green	AB, P
3,5-octadien-2-one	Fruity	C
Pentadecan-2-one	Fresh, floral	W, AB, P, C
<i>Furan, furanones</i>		
2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone	Sweet, caramel-like	W, AB, P, C
2-Acetylfuran	Sweet, almond-like	W, AB
2-Pentylfuran	Fruity, green	W, AB, P, C
<i>Acids</i>		
2-methylpropanoic acid	Sour, buttery	W
Acetic acid	Sour	W, AB, P, C
Dimethylpropanedioic acid	Sour	AB
Heptanoic acid	Cheese-like, fruity	P, C
Nonanoic acid	Cheese-like, rancid	W, P, C
Octanoic acid	Fatty, rancid	C
<i>Pyran, pyrrole</i>		
2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one	Sweet	W, AB, P, C
2-Acetylpyrrole	Nutty, roasty	W
<i>Sulfur compounds</i>		
3-(Methylthio)-propanal	Meaty, onion-like	W, AB, P, C
Carbon disulfide	Ether, radish-like	W, P, C
Dimethyldisulfide		W, AB, P
<i>lactones</i>		
Gamma-butanolactone	Peach-like, fruity	W
Butyrolactone	Creamy, fatty	W

W: Japanese black cattle (Wagyu), AB: Australian beef, P: Pork, C: Chicken

Table 6. Perception of DMHF in cooked meats according to weights by HS-SPME/GC-O

Meat sample	Meat weights (g)				
	5	2.5	1.25	0.62	0.31
Japanese black cattle beef	+	+	+	+	+
Australian beef	+	+	-	-	-
Pork	+	+	-	-	-
Chicken	-	-	-	-	-

+: feel DMHF odor, -:not feel DMHF odor

DMHF: 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2*H*)-furanone.

Table 7. Information on beef samples from different breeding management

Individual identification number	1424813481	1424813443	1424813467	1510213867	1514714056	1514714162
Birth date	2015/6/4	2015/5/3	2015/6/14	2016/4/25	2016/8/1	2016/9/19
Variety	Japanese shorthorn					
Sex	Castrated male					
Breeding management before shipment	Housing			Grazing		
Slaughter date	2018/1/30			2018/11/6		
Processing date to partial meat	2018/2/5			2018/11/12		
Aging method	Wet aging					
Aging peiod	2/5-2/20			11/12-11/26		
Part of meat	Top round or rib eye roll					

*All beef samples were provided from Field Science Center in Kitasato University.