

冷蔵中における牛脊最長筋繊維のミオグロビン 分布ならびに筋繊維断面積の変化

小松 明德・乾 秀治・板原 和之

AKINORI KOMATSU, SHUJI INUI, KAZUYUKI ITAHARA

Change in cellular distribution of myoglobin and cross-sectional area of bovine *longissimus dorsi* muscle fibers during cold storage

要旨：屠殺直後の黒毛和種成雌2頭，ホルスタイン若雄1頭から得た脊最長筋（第5肋骨部）を材料とし，平均3°Cで12日間の冷蔵中における赤色筋繊維（Rmf）・白色筋繊維（Wmf）および中間色筋繊維（Imf）間のMb分布の状態，筋肉中総色素量および各色筋繊維断面積の変化を測定した。

屠殺後2～3時間の新鮮肉では各色筋繊維の区別が明確でWmfが約50%と最も多く，RmfおよびImfはそれぞれ25%前後であった。筋束内におけるRmfの分布に特定の型は見られなかった。しかし冷蔵が進むにしたがって各色筋繊維の分布割合が変化し，冷蔵10～13日目には約90%までがImfと見做されるようになり，RmfおよびWmfはそれぞれ約5%に減少した。一方各試料中の総色素量には冷蔵中殆んど変化が認められなかったため，おそらくは肉の熟成に伴ってMb濃度の高いRmfから濃度の低いWmfあるいはImfに色素が移行し，各色筋繊維間のMb濃度が平均化されるものと考えられる。

冷蔵各期の各色筋繊維断面積は冷蔵期間を通じてWmfが最大で，Rmfが最も小さく，Imfはその中間の太さであった。筋繊維断面積に対する冷蔵の影響については，4日目に黒毛和種では増大したがホルスタインでは減少した。しかし冷蔵7日目にいずれも新鮮時に近い値に復し，以後Wmf以外は徐々に細くなる傾向を示した。

I 緒 言

大部分の筋肉は，ミオグロビン（Mb）濃度の差異により赤色筋繊維（red muscle fiber=Rmf）と白色筋繊維（white muscle fiber=Wmf）および大体両者の中間の中間色筋繊維（intermediate muscle fiber=Imf）に外観上分類される3種類の筋繊維が混在して成り立つことが知られており¹⁾²⁾，これらの筋繊維の組成ならびに組織学的構造の違いに対する各種酵素反応の差異を応用した組織化学的研究がなされている³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾。しかしMbの筋繊維内分布そのものに関しては，Mbが水溶性であるためこれまで

組織化学的にこれを明確に観察することが難かしく，Moritaら（1969）¹³⁾によりglutaraldehydeを用いてMbを固定する組織化学的方法が考案されるまで筋繊維内Mb分布については正確に知られていなかった。

筆者らは本法にしたがって2～3の牛肉について予備的観察を行なったが，すでに店頭で販売されている熟成の進んだ牛肉ではMoritaらの方法によっても各色筋繊維の区別が不明瞭であるかまたはまったく識別し得ないことを観察した。この事実は肉の熟成中にMbの分布あるいは濃度に変化が起ったことを示すものと考えられたので，本実験においては屠殺直後の牛脊最長

京都府立大学農学部畜産学研究室

Laboratory of Animal Husbandry, Faculty of Agriculture, Kyoto Prefectural University, Kyoto, Japan.

本報告の概要は日本畜産学会関西支部大会（昭46，昭47，）で発表した。

昭和49年7月27日受理

筋を用い冷蔵中における筋繊維内 Mb 分布ならびに筋肉中総色素量の変化の状態を調べ、併せてその間における各色筋繊維断面面積の変化をも測定した。

II 実験材料および実験方法

1. 供試材料

供試牛肉は黒毛和種 2 頭、ホルスタイン 1 頭の計 3 頭から得たもので、材料採取牛の性・年齢および材料肉採取部位などは第 1 表のようである。いずれも特に依頼して、肉商が購入した屠殺 1~2 時間後の枝肉（温屠体）から第 5 肋骨のロース部を肋骨ごと切り取って貰い、直ちに実験室に持ち帰ってその中より実験試料の採取を行なった。

2. Mb 分布ならびに筋繊維断面面積の測定

冷蔵中の Mb 分布ならびに筋繊維断面面積の変化を測定する組織標本を作るため、材料肉より速かに骨を取り除きロース芯部を切り開いてその中央部より約 1cm 角の肉片を数個切り取り、これを屠殺当日の試料とした。試料採取後の材料肉は乾燥を防ぐため切り口を十分に合せた後ポリエチレン袋に入れて平均 3°C の冷蔵庫に貯蔵し、以後冷蔵中の変化を調べるため 3 日置きに材料 A については肉量の関係から 7 日目まで、材料 B および C についてはそれぞれ 13 日目まで同様な方法で試料の採取を行なった。

試料の固定ならびに切片に対する Mb 発色などの操作はすべて Morita ら (1969)¹³⁾ の方法にしたがい、採取試料を直ちに 2.5% glutaraldehyde 溶液 (pH 7.4) で固定し、蔗糖アラビヤゴム溶液中に浸漬した後 30 μ の氷結切片とし、H₂O₂ の存在下で benzidine を反応させて Mb の発色を行なった。発色を終えた切片は glycerol-jelly でマウントし、各試料のうち筋繊維走向に対して横断切片の標本から数視野ずつを選んでスライド用カラー・フィルムで顕微鏡写真を撮り以下の測定に供した。

Mb 分布については撮影したカラー・スライドを全紙大模造紙上に投影し、Rmf・Wmf および Imf の映像上に異なった色のマジック・インクで印をつけ、それぞれ各色筋繊維数を数えた。

各色筋繊維の断面面積については、上記カラー・スラ

イドを同一品質の印画紙（月光 V 2, 6 切）に同一倍率で引き伸ばし、原画スライドと照合しつつ各色筋繊維像に印をつけて繊維像を切り抜き、それぞれ秤量した値（単位 mg）をもって各筋繊維の断面積指数（以下単に面積または太さと記す）として比較に供した。当初葉面積測定器で切り抜き画像の面積を測る予定であったが誤差が大であったことと、使用した引伸印画紙の面積と重量が直線関係を示すことを確かめたので重量による指数を用いたものである。

3. 筋肉中総色素量の定量

組織用試料の採取時に各材料から別にそれぞれ約 25g の分析用試料を 2 個あて採取して -20°C の冷凍庫に保存し、後日一括して Mb の分析に供した。試料は各材料とも肉量の関係から冷蔵 7 日目までしか採取できなかった。総色素量は Drabkin の試薬に NaHCO₃ を加えた改良法で CN-Met 型として定量し¹⁴⁾¹⁵⁾、生肉 100g 中の g 数で表わした。

III 実験結果ならびに考察

1. 筋繊維内 Mb 分布と筋肉中総色素量

各材料の筋繊維内 Mb 分布状態はよく類似したものであったので、代表例とし屠殺当日から 3 日間置きに 13 日目まで試料を採取した材料 B の顕微鏡写真を示せば第 1 図のようである。

屠殺当日の試料（屠殺後 2~3 時間目にあたる）においては Rmf・Wmf および Imf が明らかに識別された（第 1 図の 1）。Moody and Cassens (1968)⁹⁾ は約 90kg 時の豚チェスターホワイト種の新鮮な脊最長筋において、普通 Rmf は塊をなして存在し Wmf がその周囲を取り巻き両者の間に Imf が見られることを観察している。Morita ら (1969)¹³⁾ も成豚の脊最長筋において同様な観察を行なうとともに、筋束の表層部には多数の Wmf が見られること、また筋繊維走向に沿った縦断切片において各筋繊維が均一な Mb 濃度であることを報告している。また Morita ら (1970)¹⁶⁾ は、Rmf が塊となって存在するのは豚の筋肉で必ず見られる型であると述べている。本実験の牛脊最長筋においても筋束表層部に多数の Wmf が見られ（第 1 図の 1）、また各色筋繊維はそれぞれの色素濃

Table 1. Description of experimental materials

Symbol	Breed	Sex	Age	Sample location
A	Japanese Black	Cow	8	} <i>Longissimus dorsi</i>
B	" "	"	5	
C	Holstein	Young bull	2	

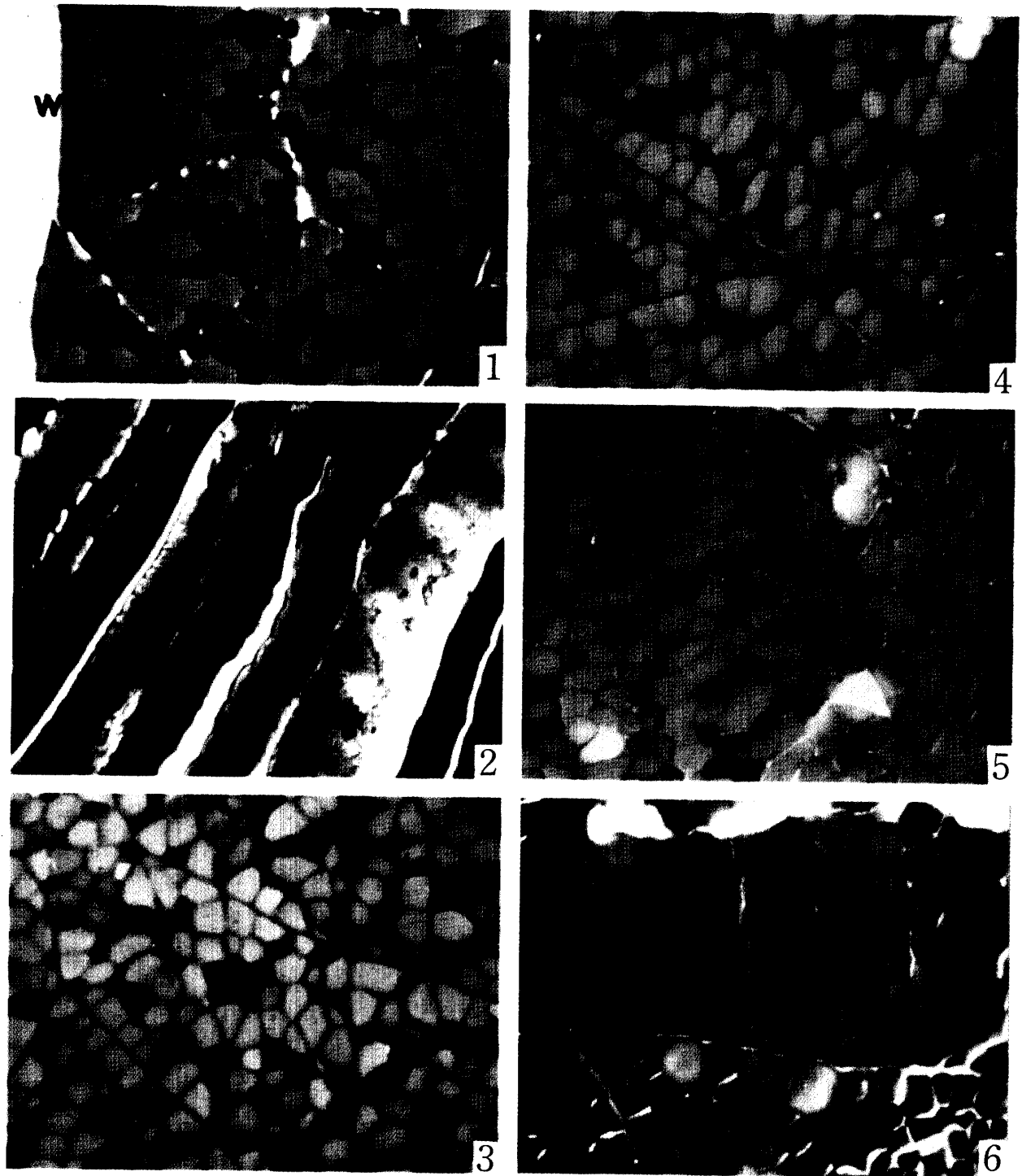


Fig. 1. *Longissimus* of bovine. Benzidine reaction for myoglobin, 30 μ thick frozen sections.

- (1) Cross-section of muscle from 2-3 hr after slaughter. Three types of muscle fibers are discriminated, R denotes red fiber, W denotes white fiber and I denotes intermediate fiber. A number of white fibers are seen in peripheral regions of bundles. Red fiber grouping pattern is not observed. x 40. (2) Longitudinal-section. Uniform distribution of myoglobin along each fiber is seen. x 100. (3) Cross-section. Fourth day of cold storage. x 40. (4) Seventh day of cold storage. x 40. (5) Tenth day of cold storage. x 40. (6) Thirteenth day of cold storage. x 40.

度に応じて筋繊維全長にわたってほぼ等濃度の Mb を含んでいる点も同様であったが (第1図の2), Rmf の分布は一定の型を示さず特に塊をなすとは認められなかった。しかし冷蔵が進むにしたがって各色筋繊維の分布の割合が変化し (第1図の3~6), 10~13日目には大部分が Imf と見做されるようになり, 明らかに Rmf および Wmf であると識別し得るものは極

く僅か観察されたにすぎない。

次に冷蔵各期における各色筋繊維数の測定結果ならびに各色筋繊維割合の変化傾向を示せば第2表ならびに第2図のようである。屠殺当日の新鮮時には Wmf が約50%と最も多く, Rmf および Imf はそれぞれ25%前後の割合で観察されたが, 冷蔵4日目には Wmf および Imf の割合がともに約40%となり, 冷蔵7日

Table 2. Change in distribution of three fiber types during cold storage

Materials	Storage period (days)	No. of muscle fibers measured			Total
		Red	Intermediate	White	
A	0	466	745	1,030	2,241
	3	85	330	306	721
	6	25	332	370	727
B	0	558	528	926	2,012
	3	473	1,052	819	2,344
	6	346	2,459	874	3,679
	9	72	625	146	843
	12	135	1,405	106	1,646
C	0	447	473	885	1,805
	3	553	1,769	1,953	4,275
	6	109	1,377	817	2,303
	9	404	8,061	388	8,853
	12	165	3,480	152	3,797

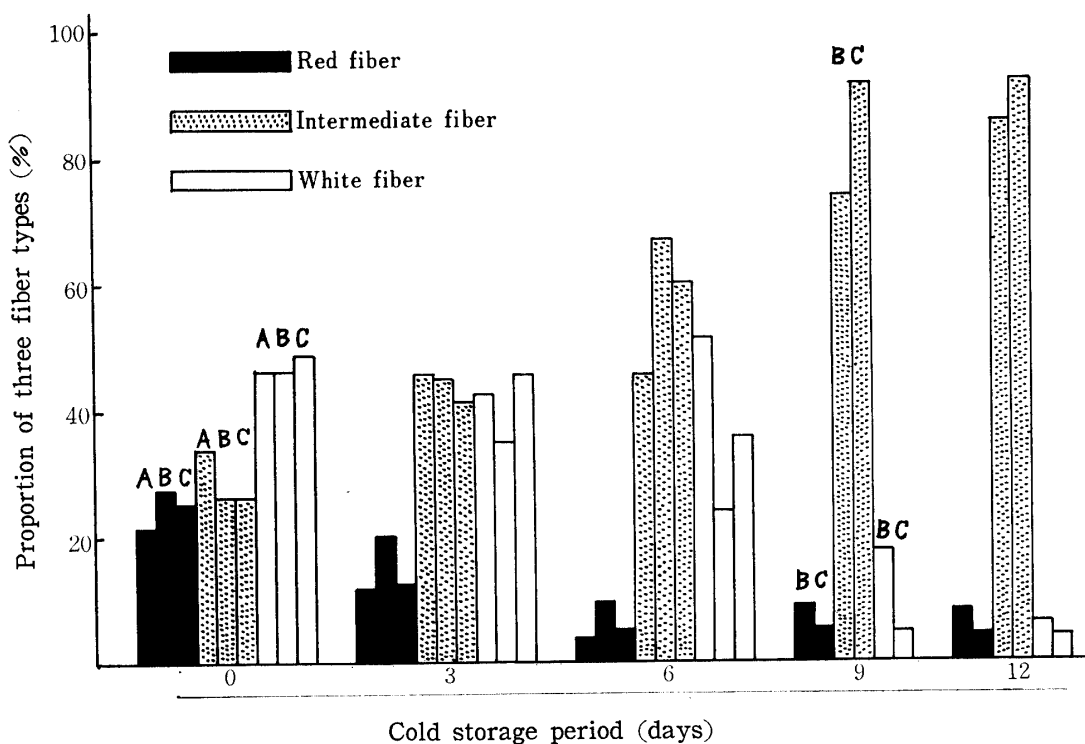


Fig. 2. Change in proportion of three fiber types during cold storage A, B and C are the symbols of experimental materials.

目には Imf と見做されるものが約 60% に増加したのに対して Rmf は新鮮時の 3 分の 1 に減少している。さらに冷蔵 10~13 日目には約 90% までが Imf と見做されるようになり、明らかに Rmf および Wmf と識別し得たものはそれぞれ約 5% であった。

一方主として Mb から成る試料中総色素量の測定結果は第 3 表のようである。前述のように材料肉量の関係から測定したのは冷蔵 7 日目までではあるが、その間における各材料の総色素含量には冷蔵による影響が殆んど認められなかったことから、冷蔵中には色素の

生産や消滅は起らなかったものと考えられる。したがって、枝肉で貯蔵した場合と小肉片で行なった実験結果とでは多少異なるであろうが、おそらくは肉の熟成に伴って Mb 濃度の高い Rmf から濃度の低い Wmf あるいは Imf に色素の移行が起り、徐々に各色筋繊維間の色素濃度が平均化されるのではないかと考えられる。

2. 筋繊維面積

筋繊維面積の測定は、冷蔵 13 日目まで試料を採取した材料 B および C について行なった。

まず材料 B において (第 3 図)、屠殺当日の各色筋繊維の太さを比較するとこれまでの報告⁵⁾¹⁷⁾ と一致して Wmf が最も太く、Rmf が最小であり、Imf は両者の中間の太さであった。この太さの順序 (Wmf > Imf > Rmf) は新鮮時から冷蔵 13 日目まで変わらず、冷蔵各期の各色筋繊維面積の間には冷蔵期間を通じてそれぞれ有意な差 ($P < .05 \sim P < .001$) が認められた。しかし各色筋繊維面積そのものは冷蔵によって変化し、冷蔵 4 日目には各筋繊維とも明らかに太さが増大

Table 3. Effect of cold storage on total pigment concentration of experimental muscles (g/100g)

Storage period(days)	Experimental materials		
	A	B	C
0	0.459	—	0.390
3	0.462	0.349	0.388
6	0.463	0.345	0.384

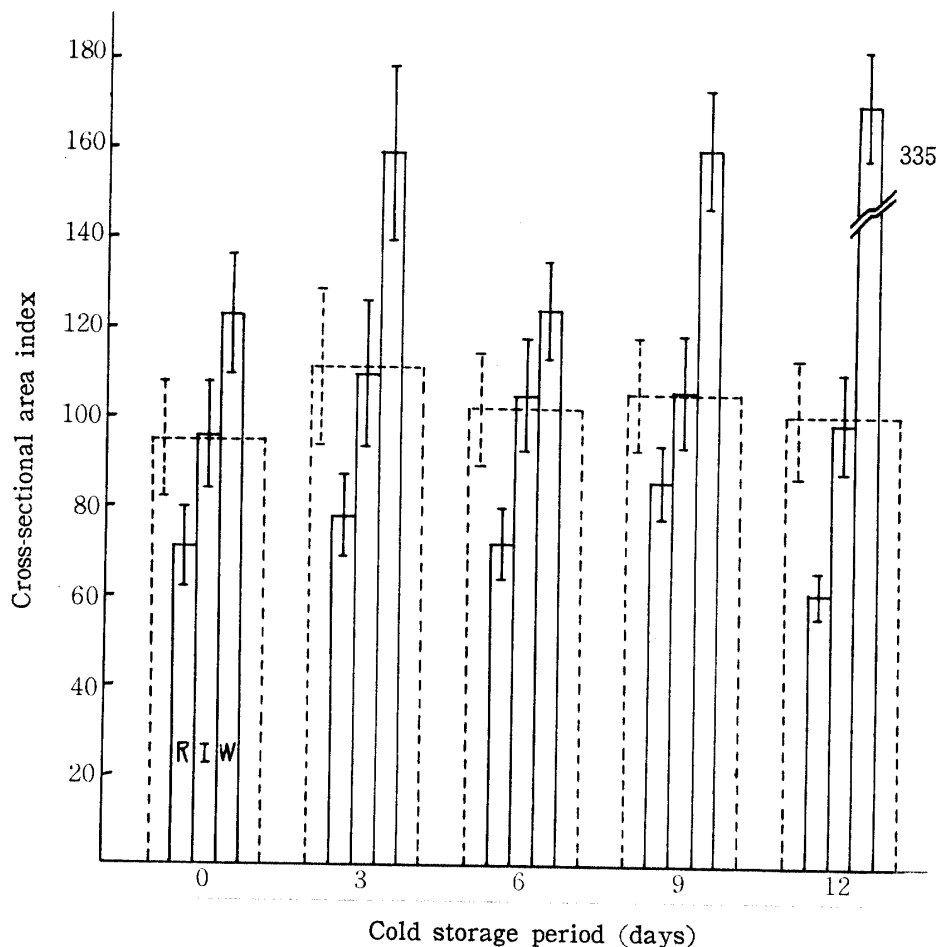


Fig. 3. Change in cross-sectional area of three fiber types during cold storage (Japanese Black). R, I and W indicate red, intermediate and white fibers. ——— average value in a sample. |——| standard deviation.

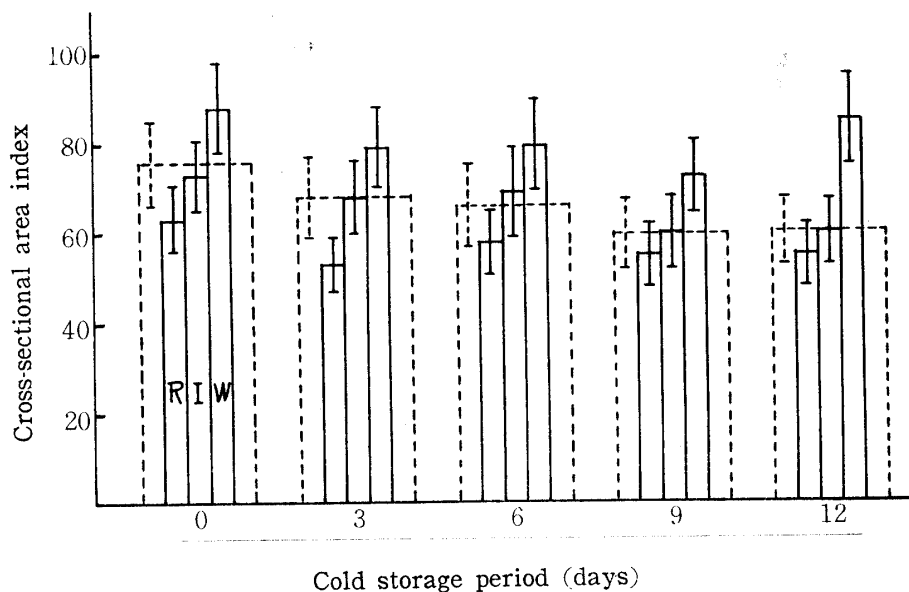


Fig. 4. Change in cross-sectional area of three fiber types during cold storage (Holstein). R, I and W indicate red, intermediate and White fibers. ————average value in a sample. |——|standard deviation.

しているが7日目には再び新鮮時の太さに近い値に減少した。そしてこの7日目以後、10日目に Rmf が太さを増しているが全体としては太さが減少して行く傾向が見られた。ただし Wmf は再び太さを増して行くことが認められた。

次に材料Cにおいては(第4図), 新鮮時から冷蔵13日目まで筋繊維面積の大きさが $Wmf > Imf > Rmf$ の順であったことは材料Bと同様で, 冷蔵各期の各色筋繊維面積の間には13日目の $Rmf : Imf$ 以外冷蔵期間を通じてそれぞれ有意な差 ($P < .05 \sim P < .001$) が認められた。また冷蔵により筋繊維面積に変化が起ることも同様であったが, 材料Bとは逆に冷蔵4日目には各筋繊維ともにその太さが減少し, 7日目に再び新鮮時に近い太さに復することが認められた。7日目以後は前者同様全体として筋繊維は細くなる傾向を示すが, Wmf は冷蔵13日目に再び太さを増した。

以上, 材料により冷蔵中の変化傾向は多少異なっているが, 冷蔵4日目頃に一時太さが大きく変化し7日目頃に再び殆んど原形に復することが認められた。両材料における冷蔵4日目の増減は, 硬直と解硬に直接関係を持つ変化と考えられるが本実験の範囲内ではこの点について明らかでない。そして冷蔵7日目以後は筋繊維全体としては細くなってゆく傾向を示すが, Wmf は再び太さを増すことを認めた。この現象は両材料においてともに認められたので, あるいは Wmf が持つ固有の性質によるためかとも考えられる。

IV 引 用 文 献

- 1) Lawrie, R. A., (1968) : Meat Science, p. 84, Pergamon Press.
- 2) Cassens, R. G., (1971) : Microscopic Structure of Animal Tissue, in J. F. Price and B. S. Schweigert (eds), The Science of Meat and Meat Products, 2nd ed., Freeman.
- 3) Ogata, T., (1960) : J. Biochem., **47** : 726-732.
- 4) Stein, J. M., and H. A. Padykula (1962) : Am. J. Anat., **110** : 103-123.
- 5) Ogata, T., and M. Mori (1964) : J. Histochem. Cytochem., **12** : 171-182.
- 6) Beecher, G. R., R. G. Cassens, W. G. Hoekstra and E. J. Briskey (1965) : J. Food Sci., **30** : 969-976.
- 7) Beatty, C. H., G. M. Basinger, C. C. Dully and R. M. Bocek (1966) : J. Histochem. Cytochem., **14** : 590-600.
- 8) Moody, W. G., and R. G. Cassens (1968) : J. Animal Sci., **27** : 961-968.
- 9) 中西武雄・星野忠彦・小堤恭平(1968) : 酪農科学の研究, **17** : A102-110.
- 10) ———— (1969) : 同上, **18** : A86-99.
- 11) ————・小堤恭平・星野忠彦 (1970) : 同上, **19** : A107-112, **19** : A137-144.

- 12) 鈴木 惇 (1971) : 日畜会報, **42** : 39-54, **42** : 463-473.
- 13) Morita, S., R. G. Cassens and E. J. Briskey (1969) : *Stain Tech.*, **44** : 283-286.
- 14) Fleming, H. P., T. N. Blumer and H. B. Craig (1960) : *J. Animal Sci.*, **19** : 1164-1171.
- 15) *Clinical Methods and Calibrations Manual*, Bauch & Lomb Co.
- 16) Morita, S., C. C. Cooper, R. G. Cassens, L. L. Kastenschmidt and E. J. Briskey (1970) : *J. Animal Sci.*, **31** : 664-670.
- 17) Swatland, H. J., and R.G. Cassens (1973) : *ibid.*, **37** : 885-891.

Summary

The *longissimus* muscle samples (5th rib) were taken as quickly as possible after slaughter from two Japanese Black cows and a Holstein young bull to determine the change in cellular distribution of myoglobin, myoglobin content and cross-sectional fiber area during cold storage of 3°C ave. for 13 days.

Fresh muscle fibers (2-3 hr after slaughter) were clearly discriminated into three types by benzidine reactions, i. e., the red, the white and the intermediate muscle fibers. The white fibers held a majority of about 50 percent, the red and the intermediate fibers were estimated about 25 percent, respectively. In the bovine *longissimus*, the red fiber grouping pattern which is well-known for swine muscles was not observed. The proportion of the three fiber types changed as the cold storage advanced, that is, in samples stored for 10 to 13 days the intermediate fibers increased to almost 90 percent, the red and the white fibers decreased

to about 5 percent, respectively. On the other hand, very little changes were observed in total pigment concentration of all samples studied during cold storage. This fact suggests that the pigment moves from the myoglobin-rich red fibers to the less concentrated white or intermediate fibers with aging of the muscles, so that the myoglobin concentrations among three fiber types become uniform.

Average cross-sectional areas of the three fiber types within a sample were in the order of the white, the intermediate and the red fibers during cold storage. As to the effect of cold storage on the area of the three fiber types, it increased in Japanese Black, whereas it decreased in Holstein after 3 days of storage. However, these areas almost returned to the initial value on the seventh day of cold storage, hereafter, the areas except of the white fibers showed a tendency to decrease gradually.