

琉球大学学術リポジトリ

高脂肪高コレステロール負荷ラットの血清および肝臓中脂質に及ぼすウコン入発酵飲料投与の影響

メタデータ	言語: 出版者: 琉球大学農学部 公開日: 2008-02-14 キーワード (Ja): ウコン, ミルクホエー, ラット, 脂質代謝 キーワード (En): Turmeric, milk-whey, rat, lipid metabolism 作成者: 上地, 俊徳, 福重, 耕一郎, 小倉, 剛, 川島, 由次, 砂川, 勝徳, 田幸, 正邦, 本郷, 富士弥 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/3610

高脂肪高コレステロール負荷ラットの血清および肝臓中脂質に 及ぼすウコン入発酵飲料投与の影響

上地俊徳・福重耕一郎・小倉 剛*・川島由次*・砂川勝徳*・田幸正邦・本郷富士弥**

Shuntoku UECHEI, Koichiro FUKUSHIGE, Go OGURA*, Yoshitsugu KAWASHIMA*,
Katsunori SUNAGAWA*, Masakuni TAKO and Fujiya HONGO**

Effect of oral administration of new fermented preparations containing turmeric on serum and liver lipid concentrations in rats feeding high fat and high cholesterol

キーワード：ウコン，ミルクホエー，ラット，脂質代謝

Key words : Turmeric, milk-whey, rat, lipid metabolism

Summary

The effect of new fermented preparations with turmeric on serum and liver lipid concentrations in rats feeding high fat/cholesterol was investigated.

We made three kinds of fermented preparations: Preparation 1 contained both milk-whey and turmeric, Preparation 2 contained milk-whey only, Preparation 3 contained turmeric only. In animal experiment I, both the liver total lipid and TG levels for the group drinking fermented preparation 1 was lower than the levels of the positive control group in rats. Similar phenomenon were recognized in rats drinking preparation 2 and 3. In animal experiment II, the serum TG level for the group drinking fermented preparation 1 was significantly lower than that of the positive control group in rats. From the animal experiment I and II, Preparation 1, 2 and 3 that we made may improve the lipid metabolism of the rats feeding the high fat high cholesterol food. These results suggest the potential to develop a new fermented preparation with multiple therapeutic effects.

緒言

本邦や欧米諸国を中心として，生活習慣病の代表格である高脂血症患者の増加が危惧されているが，高脂肪・高カロリー食の過剰摂取がこれの誘導要因の一つといわれている。すなわち日常の食生活において，われわれは知らず知

らずのうちに生活習慣病への階段を登っているというのがどうやら実情のようである。こうした現況改善の一策として昨今，抗高脂血症作用を有する天然物由来の食品因子の探究あるいは商品開発の研究が盛んに行なわれている。

今回著者らは，肝機能改善作用を始めとして多様な薬理作用を有することが報告され¹⁾，最近生産量の増加に伴い沖縄県産の主力商品にまで急成長したウコンと，牛乳から乳製品を製造する過程で副産物的に生じ，その高度利用が模索されているホエーとを組み合わせた発酵食品を開発することを企図した。手始めとしてホエーをベースとした数種類の発酵飲料を自家調整した。これの食品機能性を検索する試験の一環として，高脂肪高コレステロール食負荷ラットに発酵飲料を経口投与し，血清および肝臓中脂質濃度に及ぼす影響を調べ，若干の知見を得たのでその成績を報告する。

材料および方法

1. 発酵飲料調製用材料

表1に発酵飲料調製用材料を示した。ホエーパウダー，脱脂乳，安定剤，ビートオリゴはいずれも市販製品を用いた。発酵ウコン粉末は(株)琉球バイオリソース開発の提供品を用いた。乳酸菌は *Lactobacillus acidophilus* L-54, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B-5b, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* 510, *Streptococcus lactis* subsp. *lactis* 527 を日本乳業技術協会より購入した。

表1 発酵飲料調製用原材料

ホエーパウダー (WP)	: よつ葉乳業 (株)
発酵ウコン粉末	: (株) 琉球バイオリソース開発
脱脂乳	: 森永乳業 (株)
安定剤「ネオソフト」	: 太陽化学 (株)
ビートオリゴ	: 日本甜菜製糖 (株)
乳酸菌	: (財) 日本乳業技術協会
① <i>Lactobacillus acidophilus</i> L-54	
② <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i> B-5b	
③ <i>Streptococcus salivarius subsp. thermophilus</i> 510	
④ <i>Streptococcus lactis subsp. lactis</i> 527	

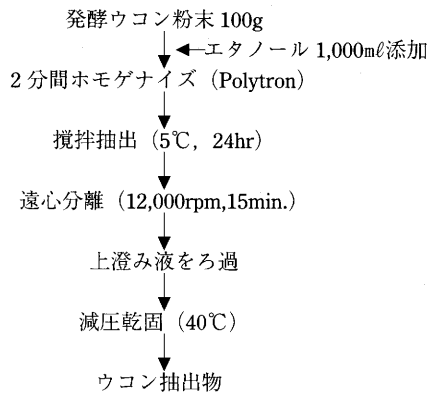


図1 ウコン抽出物の調製法

表2 ラット投与用発酵飲料の原料配合割合(100ml中)

原料名	原料配合割合		
	①WP 発酵乳	②ウコン入 発酵乳	③ウコン入 WP 発酵乳
ホエーパウダー	8.0 g	—	8.0 g
ウコン抽出物*	—	1.0 ml	1.0ml
オリゴ糖	5.0 g	5.0 g	5.0 g
安定剤	0.2ml	0.2ml	0.2ml
乳酸菌スターター	2.0ml	2.0ml	2.0ml
香料	0.1ml	0.1ml	0.1ml
蒸留水	84.7ml	91.7ml	83.7ml

WP: Whey Powder *10% (v/v) 水溶液

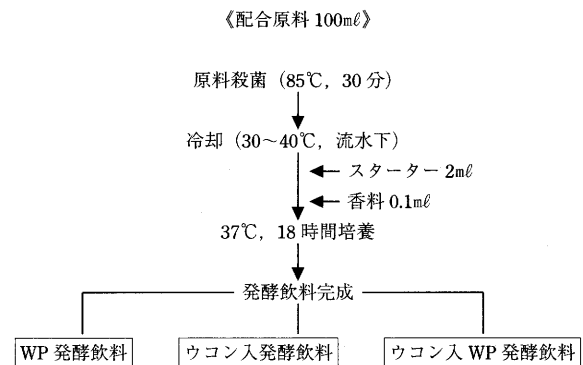


図2 発酵飲料の調製法

2. ウコン抽出物と発酵飲料の調製法

図1にウコン抽出物の調製法を示した。発酵ウコン粉末100gにエタノール1リットルを加え、2分間のホモゲナイズ後、24時間攪拌抽出(5°C)した。12,000rpm, 15分間遠心し、上澄み液をろ過した。ろ液を減圧乾固してウコン抽出物とした。

表2に発酵飲料調製時の原料の配合割合を示した。オリゴ糖、安定剤、スターターおよび香料の配合割合は一定とし、ホエーパウダーあるいはウコン抽出物の添加の有無によって3種類の発酵飲料を調製した。この時、乳酸菌は予め個別に10%脱脂粉乳培地で2~3回継代培養して活性の高いマザースターターを調製しておき、発酵飲料調製前日に4菌種のマザースターターを等容量ずつ混合後、37°C, 18時間培養したものをスターターとして用いた。

図2に発酵飲料製造法を示した。表2で配合した原料を85°C, 30分間殺菌し、流水下で液温を40°C以下まで冷却した。次に、4菌種混合のスターター2mlと香料を添加し、37°C, 18時間培養により3種類の自家調製発酵飲料を得た。

3. 動物実験および分析方法

1) 供試動物および飼育環境 動物はWistar系の雄性ラット(日本エスエルシー, 株; 6週齢)を用いた。飼育室の温度は23°C, 湿度は60%に設定, 照明は12時間毎の明暗(8:00~20:00明)とした。動物実験は給与飼料の種

類や給与方法および発酵飲料の投与期間あるいは投与時期などを定めることにより動物実験Iと動物実験IIを行った。

2) 動物実験I 図3には高脂肪高コレステロール食と発酵飲料を同時期に投与する動物実験Iの概要を示した。試験群として1群6匹の5群を設定した。第1群には基本食(一般飼育用MF粉末飼料;オリエンタル酵母工業)を与えた。第2群から第5群には高脂肪高コレステロール食[基本食にコレステロール1%, コール酸ナトリウム0.25%およびブレード10%(いずれも重量比)を添加したもの]を与えた。飲料として、第1群(正常対照)と第2群[高脂血症陽性対照]には水を与えた。第3群にはWP発酵飲料, 第4群にはウコン入WP発酵飲料, 第5群にはウコン入発酵飲料をそれぞれ投与した。なお, これらの発酵飲料は投与に際して水で5倍希釈後, 給水瓶に入れて自由摂取とし, 投与期間は4週間とした。

3) 動物実験II 図4には高脂肪高コレステロール食を給与した後に発酵飲料を投与する動物実験IIの概要を示した。試験群として, 1群6匹の4群を設定した。前半の4週間は4群とも高脂肪高コレステロール食と水を給与して, 高脂血症ラットの誘導期間とした。後半の4週間は4群とも餌を基本食に切り替えると同時に, 第1群には水(対照), 第2群にはWP発酵飲料, 第3群にはウコン入WP発酵飲料, 第4群にはウコン入発酵飲料をそれぞれ投与した。なお, これらの発酵飲料は実験Iと同様に水で5倍希釈後, 給水瓶に入れて自由摂取とした。発酵飲料投与期間は実験

[実験Ⅰ] 試験期間：4週間

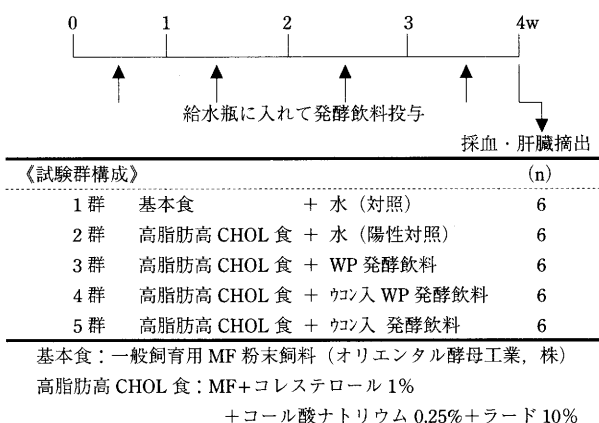


図3 動物実験Ⅰの概要

Iの場合と同じ4週間とした。

4) 測定および分析 実験Ⅰ・Ⅱとも投与期間中は体重、摂餌量および飲水量(発酵飲料摂取量)を毎日測定した。投与期間終了後、ネブタール麻酔下で腹腔内後大静脈より採血した。採血に際しラットは18-20時間絶食させた。遠心分離(3000rpm, 15分)により血清を得た。また肝臓を摘出し、重量を測定した。血清については総コレステロール(T-cho), HDL-コレステロール(HDL-cho), トリグリセライド(TG), リン脂質(PL), 遊離脂肪酸(FFA), GOTおよびGPTを測定した。肝臓についてはFolch法²⁾で脂質を抽出して総脂質(TL)は重量法, 総コレステロール(T-cho)はSperry and Webb法³⁾, トリグリセライド(TG)はアセチルアセトン法⁴⁾により測定した。測定には和光純薬工業(株)のキットを用いた。また、肝臓組織切片のHE染色を行い、組織学的検査を行なった。統計学的有意差の解析はt検定により行った。

結果および考察

【動物実験Ⅰ】

I-1. ラットの発育への影響

成績は示さなかったが、発酵飲料を投与した3試験群間

[実験Ⅱ] 試験期間：8週間

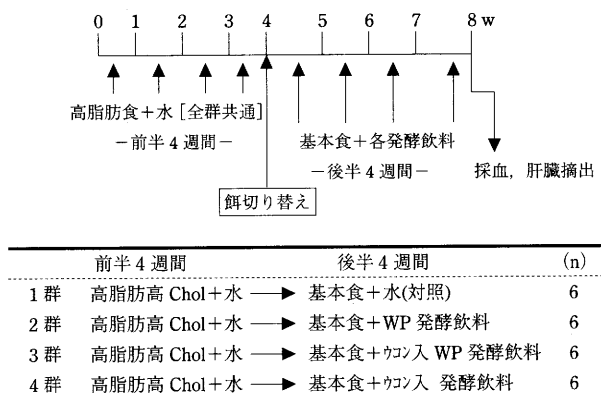


図4 動物実験Ⅱの概要

の飲水量は同等であったので、今回調製した発酵飲料間に嗜好性の違いはほとんどないものと考えられた。また各群の平均体重曲線は飼育期間中順調な伸びを示し、試験期間終了時の増体重には試験群間で差は認められなかった。

I-2. 血清および肝臓中の脂質濃度、酵素活性への影響

表3に血清中の脂質および酵素濃度を示した。基本食+水を投与した対照群(1群)に比べて、高脂肪高コレステロール食+水を投与した陽性対照群(2群)では総コレステロールとGPTとが有意に高くなり、HDL-cho, TG, PLおよびFFAは逆に低くなった。陽性対照群と発酵飲料を投与した第3, 第4および5群との間にこれらの値に有意な変動は認められなかった。GOTには変化は認められず、全試験群が正常範囲であった。

表4に肝臓重量を示した。肝臓重量は対照群の6.9gに対し、陽性対照群では11.8gに増大した。ウコン入WP発酵飲料投与群では陽性対照群と同等の12.3gを示し、重量の軽減は認められなかった。他の発酵飲料投与群でも肝臓重量に大きな変化は認められなかった。ヒトでは肝細胞内に脂質が肝臓重量の5%以上蓄積した状態、あるいは光学顕微鏡で脂肪滴を含む肝細胞が5%以上で観察される場合を脂肪肝と定義している。第2群から第5群の肝臓は脂肪蓄積を示唆する灰白色化が認められ、高脂肪高コレステロール食摂

表3 発酵飲料給与ラットの血清脂質および酵素濃度(動物実験Ⅰ)

試験群	T-cho (mg/dℓ)	HDL-cho (mg/dℓ)	TG (mg/dℓ)	PL (mg/dℓ)	FFA (mEq/l)	GOT (Karmen)	GPT (Karmen)
1群	38.4±4.2	26.0±1.9	36.6±14.0	93.0±4.0	0.51±0.2	73±9.7	34±5.6
2群	61.9±8.1*	15.2±2.0*	17.2±7.0*	77.0±7.0*	0.26±1.0*	88±7.6	40±7.0*
3群	66.7±14.4	16.9±1.1	15.9±4.2	81.9±8.8	0.31±0.9	83±8.5	34±3.2
4群	62.4±12.2	15.5±0.8	17.6±2.6	79.3±8.6	0.29±0.5	88±13	35±6.2
5群	64.7±10.4	17.5±1.2	18.6±7.2	78.6±9.5	0.36±0.1	80±8.0	40±2.8

Mean±S.D. *p<0.05 vs 1群(対照)

1群：基本食+水(対照), 2群：高脂肪高 CHOL 食+水(陽性対照), 3群：高脂肪高 CHOL 食+WP 発酵飲料, 4群高脂肪高 CHOL 食+ウコン入 WP 発酵飲料, 5群：高脂肪高 CHOL 食+ウコン入 発酵飲料

表4 発酵飲料給与ラットの肝臓重量 (動物実験 I)

試験群	湿重量 (g)	相対重量 (g/100g B.W.)
1群 基本食 +水 (対照)	6.9±0.7 (1.0)	5.0±0.1
2群 高脂肪高 CHOL 食+水 (陽性対照)	11.8±0.9 (1.7) ¹	7.9±0.2
3群 高脂肪高 CHOL 食+WP 発酵乳	12.3±0.6 (1.8)	8.1±0.5
4群 高脂肪高 CHOL 食+ウコン入 WP 発酵乳	12.3±0.7 (1.8)	8.0±0.2
5群 高脂肪高 CHOL 食+ウコン入発酵乳	11.6±1.2 (1.7)	7.4±0.3*

(¹)は対照に対する重量比 Mean±S.D. *p<0.05 vs 陽性対照

取の影響であると考えられた。

表5にラット肝臓中の脂質含量を示した。基本食+水投与の対照群に比べて、高脂肪高コレステロール食+水投与の陽性対照群では総脂質量が56.0mgから376mgへと約7倍に、総コレステロールが27.1mgから599.4mgへと約22倍に、トリグリセライドが41.9mgから106mgへと約2.5倍にそれぞれ上昇していた。ヒトでは血中の総コレステロールとトリグリセライドのいずれか一方または両者が増加した状態を高脂血症と呼んでいるが、これを今回のラットに当てはめると、陽性対照群において高脂血症が誘導されていることが示された。この陽性対照群と第3、第4および第5群を比較すると、第4群のウコン入WP発酵飲料投与群で総脂質量およびトリグリセライド濃度が有意に低下しており、またT-choも有意ではないが、低値傾向にあった。同様の傾向は、第3群のWP発酵飲料投与群と第5群のウコン入発酵飲料投与群でも認められた。すなわち、発酵飲料を投与した3群すべてにおいて総脂質およびトリグリセライドの上昇抑制傾向が認められた。なお、肝臓の肉眼的所見および組織学的検査において3種類の発酵飲料投与群間に違いはほとんど見られなかった。

【動物実験 II】

II-1. ラットの発育への影響

成績は示さなかったが、ウコン入WP発酵飲料投与群において、平均飲水量および平均摂餌量に低値傾向が見られたが、体重増加にはその影響は見られなかった。すなわち、動物実験Iの場合と同じく、発酵飲料を投与した3群間でラットの発育に差は認められなかった。

II-2. 血清および肝臓中の脂質濃度、酵素活性への影響

表6に血清中の脂質および酵素活性の測定結果を示した。T-choは1群の対照群を含めて4群すべてが40mg台を示し、試験群間で違いは見られなかった。抗動脈硬化作用を有し、善玉コレステロールの呼称を有するHDL-choは第2群のWP発酵飲料投与群と第4群のウコン入発酵飲料投与群で有意な高値を示した。TGは第3群のウコン入WP発酵飲料投与群で有意な低値であった。すなわち、第2、第3および第4群でHDL-choの上昇傾向と中性脂肪の低下傾向が見られた。

肝臓の肉眼観察では、色調は対照群のラットを含めてすべての試験群において実験Iと同じような灰白色から赤褐色への変化が認められ、いわゆる正常色に近い色調まで戻っ

表5 発酵飲料給与ラットの肝臓中脂質濃度 (動物実験 I)

試験群	TL (mg/g)	T-cho (mg/g)	TG (mg/g)
1群 基本食 +水 (対照)	56.0±11.3	27.1±0.7	41.9±1.8
2群 高脂肪高 CHO+水 (陽性対照)	376.0±40.5	599.4±321.0	106.0±18.8
3群 高脂肪高 CHO+WP 発酵飲料	328.3±44.9*	533.4±73.6	79.4±8.7*
4群 高脂肪高 CHO+ウコン入 WP 発酵飲料	307.3±30.6*	490.0±219.4	84.3±18.3*
5群 高脂肪高 CHO+ウコン入発酵飲料	317.1±29.3*	594.9±206.1	69.9±14.9*

Mean±S.D. *p<0.05 vs 2群

表6 発酵飲料給与ラットの血清脂質および酵素濃度 (動物実験 II)

試験群	T-cho (mg/dl)	HDL-cho (mg/dl)	TG (mg/dl)	PL (mg/dl)	FFA (mEq/l)	GOT (Karmen)	GPT (Karmen)
1群	44.3±8.8	23.0±3.1	56.0±12.0	66.3±4.0	0.51±0.0	73.3±9.7	34.0±5.7
2群	44.8±2.3	27.3±1.4*	49.6±9.0	65.7±3.1	0.47±0.1	76.5±8.7	31.3±5.1
3群	42.7±7.7	25.1±2.1	43.6±9.0*	62.4±9.2	0.46±0.1	77.7±8.4	34.0±5.7
4群	42.7±5.1	27.9±2.6*	51.2±13.9	66.3±6.0	0.47±0.1	72.0±10.5	29.8±4.1

1群：水(対照)，2群：WP発酵飲料，3群：ウコン入WP発酵飲料，4群：ウコン入発酵飲料
Mean±S.D. *p<0.05 vs 1群(対照)

表7 発酵飲料給与ラットの肝臓重量 (動物実験Ⅱ)

試験群	後半	実重量(g)	相対重量(g/100g, B.W.)
1群	基本食+水(対照)	9.2±1.1 (1.00)	3.0±0.2
2群	基本食+WP発酵乳	9.4±0.9 (1.02) ¹	3.2±0.2
3群	基本食+ウコン入WP発酵乳	10.1±1.2 (1.09)	3.1±0.2
4群	基本食+ウコン入発酵乳	9.5±0.4 (1.03)	3.0±0.1

(¹)は対照に対する重量比 Mean±S.D.

表8 発酵飲料給与ラットの肝臓中脂質濃度 (動物実験Ⅱ)

試験群	後半	TL (mg/g)	T-cho (mg/g)	TG (mg/g)
1群	基本食+水(対照)	149.1±24.5	130.1±39.9	41.2±39.9
2群	基本食+WP発酵飲料	126.9±23.7	115.0±16.5	41.4±2.2
3群	基本食+ウコン入WP発酵飲料	117.4±26.7	138.6±46.5	47.2±2.2
4群	基本食+ウコン入発酵飲料	138.5±21.5	114.7±18.2	46.5±4.9

Mean±S.D.

ていた。肝臓の組織学的検査においても、すべての群で脂肪滴の数の減少とそのサイズの縮小化が認められた。表7に示したように、肝臓重量においても対照群と発酵飲料投与の3試験群間で差は見られなくなっていた。

表8に肝臓中脂質を示した。総脂質は対照群では149.1mgであった。これに対して第2群のWP発酵飲料、第3群のウコン入WP発酵飲料、第4群のウコン入発酵飲料投与の総脂質は各々126.9、117.4および138.5mgを示し、有意差は認められなかったが低値傾向にあった。T-cho.およびTGにも対照群と発酵飲料投与群間で有意差は認められなかった。すなわち、実験Ⅱでは、第一段階で高脂肪高コレステロール食を給与して高脂血症ラットを作成し、第二段階で餌をこれ含有しない普通食に切り替えた上で発酵飲料を投与した場合に、高脂血症からの回復度合に試験群間で違いが生じるかどうかを検討したが、結果として総脂質、T-cho.およびTGのいずれの測定項目にも対照群と3種類の発酵飲料投与群間の比較において有意な変動は認められなかった。

牛乳を乳酸発酵させて造る発酵乳の血清コレステロール低下作用の有無については効果あり^{5,6)}、効果なし^{7,8)}の相反する報告があり、見解が別れている。効果ありとするコレステロール低下作用機序については幾つかの説がある。橋本ら⁹⁾は発酵乳による血清コレステロール上昇抑制作用は発酵成分や乳成分のみにその作用があるのではなく、乳酸菌自体にも同様の作用が存在すると報告している。すなわち橋本ら⁹⁾は乳酸菌体自身にコレステロール上昇抑制作用を認め、その機序として乳酸菌体が胆汁酸を吸着し、菌体と一緒に体外に排泄する現象、すなわち腸管循環阻止に由来すると推測している。凍結乾燥菌体を高コレステロール食と一緒にラットに投与した橋本ら⁹⁾の成績によると、有意な血清コレステロール上昇抑制には5%の菌体添加が必要であったという。今回、著者らは実験Ⅰ、Ⅱとも発酵飲料を水で5

倍に希釈して投与したが、この操作はコレステロールの上昇抑制活性を有する菌体量や発酵成分を希釈していたことを意味する。半固形状の発酵飲料を投与するためにはそうせざるを得なかったが、仕方ない操作であったとは言え、このことにより発酵乳の本来の生理活性が減弱された可能性は否定できず、今後の課題の1つである。

一方で著者らは別の実験において、主要薬効成分クルクミンを含有するウコンやキョウオウだけでなく、これを含有しないガジュツを摂取した高脂肪高コレステロール負荷ラットにおいても血清や肝臓中の脂質濃度の低下を観察している(投稿中)。すなわちクルクミン以外にも脂質代謝改善効果を有する成分の存在が示唆されるものの今の所詳細は明らかでない。今回のウコン入発酵飲料の脂質代謝への影響については、ウコンを含まない他の発酵飲料との比較においてその効果にほとんど違いはみられなかった。これにはウコン摂取量や最少有効量も関与しており、これらの点を踏まえた上で、改善すべき点は改善し、その上でホエーをベースとしたウコン入新規発酵飲料の研究開発に今後とも取り組んでいきたい。

要約

高脂肪高コレステロール食を負荷したラットに自家調製した3種類の新規発酵飲料を経口投与し、血清および肝臓中の脂質濃度に及ぼす影響を検討した。実験Ⅰにおいて、水を投与した陽性対照群に比べてウコン入WP発酵飲料を投与した群で肝臓中の総脂質量およびトリグリセライド濃度が有意に低下した。これと同様のことがWP発酵飲料投与群とウコン入発酵飲料投与群でも見られた。次に、前半4週間は高脂肪高コレステロール食と水を投与し、後半4週間は餌を基本食に切り替えた上で飲料水を各発酵飲料に切り替えた実験Ⅱにおいて、ウコン入WP発酵飲料投与群で

血清中のトリグリセライド濃度の有意な低下が観察された。同様の傾向は WP 発酵飲料投与群とウコン入発酵飲料投与群でも見られた。すなわち、実験 I と II においてウコン入 WP 発酵飲料、WP 発酵飲料およびウコン入発酵飲料のいずれにも高脂肪高コレステロール食を負荷したラットの脂質代謝改善を示唆する成績が得られたが、効果の点でこれらの飲料間に特に違いは認められなかった。

参考文献

1. Sugaya, A: II.7 Micropropagation of turmeric (*Curcuma domestica* Valet) and other Curcuma species. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* **19**, 277-294. 1992
2. Folch, J., et al. : A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**, 497-509. 1957
3. Sperry WM, Webb MA : Revision of the schoenheimer-sperry method for cholesterol determination. *J Biol Chem* **187**: 97-106. 1950
4. Fletcher MJ : A colorimetric method for estimating serum triglycerids. *Clin Che Acta* **22** : 393-397. 1968
5. Grunewald, K. K. : Serum cholesterol levels in rate fed skim milk fermented by *Lactobacillus acidophilus*. *J Food Sci* **47**:2078-2079. 1982
6. Hopner, G., Friend, R., Jeor, S. S. Fusetti, L., Morin, R.: Hypocholesterolemic effect of yoghurt and milk. *Am J Clin Nutri* **32**: 19-24. 1979
7. Massey L. K. : Effect of changing milk and yoghurt consumption on human nutrient intake and serum lipoproteins. *J Dairy Sci* **67**: 255-262. 1984
8. Thompson L. U., Jenkins, D. J. A., Amr, M. A. V., Reichert, R., Jenkins, A., Kamulsky, J. The effect of fermented and unfermented milk on serum cholesterol. *AM J Clin Nutr* **36**: 1106-1111. 1982
9. 橋本英夫, 山崎和幸, 荒井靖子, 川瀬 学, 何方, 細田正孝, 細野明義: 乳酸菌のラット血清コレステロール上昇抑制作用に関する検討, 日本畜産学会報, **67** (7) : 702-707. 1998