

New Food Industry

食品加工および資材の新知識

<http://www.newfoodindustry.com>

2012 Vol.54 No.10

10

論 説

- 微生物を用いた二段階培養法による長鎖多価不飽和脂肪酸含有リン脂質の発酵生産
Fermentative production of long-chain polyunsaturated fatty acid-containing phospholipids by the two-step cultivation method using microorganisms
- 環境に優しい成分調製技術 -マイクロ波等を活用した乾燥と抽出技術-
- サルナシの抗発癌・抗炎症機能性
- 緑茶カテキンによるインスリン誘導性転写因子遺伝子 SHARP-1の発現調節機構の解析
- β -クリプトキサンチンは飲酒・喫煙による健康影響に対して有効か
-最近の栄養疫学研究から明らかになったこと-
- マンゴー生姜について
- 養魚用初期飼料原料としてのスサビノリスフェロプラス

総 論

- 塩麹 ~温故知新の調味料~

連 載

- “お好み焼”を全国に拡大中の驚くべきヒット食品
-『お好みソース』オタフクソース株式会社 -

New Food Industry

目 次

食品加工および資材の新知識

2012 Vol.54 No.8

論 説

- 酵素処理アスパラガス莖熱水抽出物の
熱ショックタンパク質発現増強効果
..... 伊藤 知洋, 下廣 慶宜, 小野 智子, 前田 哲宏 1

- キノコの抗IV型アレルギー作用
..... 芳野 恭士 10

- 官能評価とは何か, 何が分かるか
..... 相島 鐵郎 19

- 医薬品の範囲に関する基準の一部改正と生薬成分等
のリスク区分見直しの考え方と検討の結果について
..... 劉 勝彦 30

- 特許明細書から見た
チョコレートドリンク類の有益な技術情報
..... 宮部 正明 42

- 魚油の再評価 –Undenatured Tuna Oil の機能性
..... 伊東 芳則 51

Contents

2012年 8月号

連載

- 養魚用飼餌料への機能性物質の添加効果 酒本 秀一 58
- 野菜飲料市場を創造した驚くべきヒット食品
-『カゴメトマトジュース』カゴメ株式会社 - 田形 晴作 71
- 築地市場魚貝辞典（イサキ） 山田 和彦 82
- “薬膳”の知恵（68） 荒 勝俊 87

Report

- (株)クリマ 氷温熟成豚肉氷室熟成豚肉は新たな時代の幕開けか？ 山川 茂宏 92

~~~~~

**おいしさと健康に真剣です。**

酵素分解調味料なら  
大日本明治製糖へ

**コクベース**

酵母エキス系調味料

**エンザップ**

ゼラチン&小麦グルテン  
酵素分解調味料

**DM**

新発売！ 乳製品にベストマッチな調味料  
**コクベース**  
ラクトイックイーストエキス  
乳加工品・製パン・製菓・チーズ・パッタへの  
コクづけ・味や風味の底上げなど、ユニークな  
特長がある乳酵母エキスです。

**大日本明治製糖株式会社**  
食品事業部

〒103-0027 東京都中央区日本橋1-5-3 日本橋西川ビル7F TEL (03) 3271-0755

**D&M**  
ディアンドエム

# 微生物を用いた二段階培養法による 長鎖多価不飽和脂肪酸含有リン脂質の発酵生産

## Fermentative production of long-chain polyunsaturated fatty acid-containing phospholipids by the two-step cultivation method using microorganisms

Ahmad Iskandar Bin Haji Mohd Taha<sup>\*1</sup> 佐藤 真美子<sup>\*2</sup> 東條 元昭<sup>\*3</sup> 神田 啓史<sup>\*4</sup>  
木元 貴士<sup>\*5</sup> 金田 輝之<sup>\*5</sup> 奥山 英登志<sup>\*1, 6</sup>

<sup>\*1</sup> Ahmad Iskandar Bin Haji Mohd Taha (北海道大学大学院 環境科学院), <sup>\*2</sup> SATO Mamiko (日本女子大学 電子顕微鏡施設), <sup>\*3</sup> TOJO Motoaki (大阪府立大学大学院 生命環境科学研究所), <sup>\*4</sup> KANDA Hiroshi (国立極地研究所), <sup>\*5</sup> KIMOTO Takashi, KANADA Teruyuki (備前化成株式会社), <sup>\*6</sup> OKUYAMA Hidetoshi (北海道大学大学院 環境科学院, 大学院地球環境科学研究所)

Key Words : 長鎖多価不飽和脂肪酸 (LC-PUFA) · ドコサヘキサエン酸 (DHA) · アラキドン酸 (ARA) · リン脂質 · *Mortierella umbellata* · Thraustochytrid strain 12B · DHA 含有リン脂質 · ARA 含有リン脂質 · 二段階培養法

Key Words : long chain-polyunsaturated fatty acid (LC-PUFA) · docosahexaenoic acid · arachidonic acid · phospholipid · DHA-containing phospholipid · ARA-containing phospholipid · two-step cultivation method

### Summary

Long chain-polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA), such as arachidonic acid (ARA), eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid (DHA), have received a great deal of attention due to their health benefits. A brief introduction on biosynthesis, sources of bioproduction, advantages of phospholipids rich in LC-PUFA, the two-step cultivation and its principle is presented together with application to two microbial species, ARA-accumulating *Mortierella umbellata* strain NBRC 32836 and a DHA-accumulating thraustochytrid strain 12B. The widespread use of this cultivation process is expected in the future as preference and demand for LC-PUFA-containing phospholipid health supplements is also expected to increase.

### 要旨

アラキドン酸 (ARA), エイコサペンタエン酸, ドコサヘキサエン酸 (DHA) などの長鎖多価不飽和脂肪酸 (LC-PUFA) はその生理機能から有用脂肪酸と呼ばれている。現在, LC-PUFA が食品やサプリメントとして利用される際の分子形態はトリアルギリセロール (脂肪) である。LC-PUFA は、脂肪として細胞内に貯蔵される以外に、各種の生体膜を構成するリン脂質成分として特有の機能を発揮している。このことから LC-PUFA を摂取する場合の分子形態はリン脂質である方がより望ましいと考えられる。最近、微生物が LC-PUFA 源として広く用いられるようになってきているが、ARA, DHA 何れの場合も脂肪体が対象となっている。著者らが開発した二段階培養法により、脂肪として ARA を蓄積する *Mortierella umbellata* NBRC 32836 株と DHA を蓄積する thraustochytrid 12B 株を用いて ARA 含有リン脂質及び DHA 含有リン脂質の発酵生産が可能になった。

### はじめに

エイコサペンタエン酸 (EPA), ドコサヘキサエン酸 (DHA), アラキドン酸 (ARA) などの長鎖多価不飽和脂肪酸「Long chain-

polyunsaturated fatty acid (LC-PUFA)」は進化の過程で、動物、とりわけ人の神経系の発達において重要な役割をはたしてきたと考えられる<sup>1)</sup>。人の脳には非常に高レベルの LC-PUFA が存在

しており、脳下垂体には n-6 LC-PUFA が、前頭皮質には n-3 LC-PUFA が分布している<sup>2)</sup>。また、ニューロンの軸索には ARA 含有ホスファチジルコリン (ARA-PC) が存在している<sup>3)</sup>。人を含めて哺乳類は、LC-PUFA の前駆物質であるリノール酸や  $\alpha$ -リノレン酸（必須脂肪酸）を合成できないので、食物より摂取しなければならない。

必須脂肪酸は、一般的に植物などでは、脂肪酸合成酵素の産物である飽和脂肪酸の鎖長伸長と酸素依存性の脂肪酸不飽和化によって生成する。リノール酸からは ARA が、 $\alpha$ -リノレン酸からは EPA と DHA が合成される。また、ある種の細菌や微細藻類では、LC-PUFA はポリケチド合成酵素によって嫌気的にも合成される<sup>4)</sup>。DHA については、神経系<sup>5)</sup> や心臓血管系<sup>6)</sup> における機能、抗菌性<sup>7)</sup> など多くの報告がある。細菌では DHA と EPA の抗酸化機能が見出されている<sup>8)</sup>。興味深いことに ARA については DHA と比較した場合、炎症やメタボリックシンドロームなどに対する逆の生理作用が報告されている<sup>9, 10)</sup>。ARA はまた、エリシターとして利用することによって作物の耐病性を上昇させる<sup>11)</sup>。この事実は農業分野で LC-PUFA の新たな利用性を示唆している。

## 1. LC-PUFA の原材料と生物生産

LC-PUFA の素材として、それをもつ海産物に加えて、細菌、カビ、藻類などの微生物が考えられるが、特にラビリンチュラ類微生物は重要な DHA 源となりつつある。ラビリンチュラ類微生物とその DHA 収量については多数の報告がある<sup>12, 13)</sup>。ARA の原材料についても *Mortierella*<sup>11, 14)</sup> を含め、多数報告されている。本稿では ARA 合成糸状菌である *Mortierella umbellata* NBRC 32836 株<sup>15, 16)</sup> と

DHA 合成微生物として沖縄の汽水から単離された *thraustochytrid* 12B 株<sup>17, 18, 19, 20)</sup> を用いた LC-PUFA 含有リン脂質の生産<sup>15, 20, 21)</sup> に焦点を当てて概説する。

ラビリンチュラ類微生物はクロミスタ界、ヘテロコンタ門に属す真核微生物である<sup>13)</sup>。*Mortierella* は真核性の糸状菌であり、菌界、接合菌門に属している<sup>22, 23)</sup>。ラビリンチュラ類微生物のうち *thraustochytrid* は 61 種報告されており<sup>24)</sup>、*Mortierella* に関しては 70 種以上が同定されている<sup>22)</sup>。

## 2. LC-PUFA 含有リン脂質の有用性

今日商業レベルで利用されている LC-PUFA の分子形態は脂肪 (TG) である<sup>25)</sup>。しかし、一般的に TG は貯蔵物質として存在する。生理的に機能をもつ LC-PUFA はリン脂質体であり<sup>11)</sup>、リン脂質体の LC-PUFA こそ生体では利用性が高いと考えられる。TG を食品、サプリメントとして摂取した場合、胃や臍臍のリパーゼによって sn-1 位および sn-2 位の脂肪酸が遊離して sn-2 モノアシルグリセロール (MAG) が生じる。小腸細胞での吸収され易さは MAG > 遊離脂肪酸 > TG、ジアシルグリセロールの順だとされている<sup>26)</sup>。

LC-PUFA 含有リン脂質を含むリン脂質は、TG に比べてミセルを作りやすく、水に分散しやすいと考えられる。リン脂質はホスホリパーゼ A<sub>2</sub> で分解され、遊離脂肪酸とリゾ体リン脂質となる。そのほとんどは小腸で吸収されるが、およそ 20% は取込み系を経ずにさまざまな細胞に受動的に吸収されると考えられている<sup>27)</sup>。LC-PUFA 含有リン脂質を摂取することは、遊離脂肪酸や TG の摂取に比べて、炎症反応、癌、心血管疾患、神経疾患、肝疾患に対してより有用だとされている。他方、LC-PUFA 含有リン脂質の副作用は現時点では報告されていない。

DHA 含有性の TG とリン脂質を乳児に与えた場合、両者とも血漿の脂肪酸組成に影響を与えない報告されている<sup>28)</sup>。しかし、この場合、脳の脂肪酸組成に与える影響については不明であり、乳児に与えた DHA 量が、血漿中の恒常的な DHA 濃度（全血漿重量の 0.5% に相当）をもたらす 1 日当たり 100 mg を下回っていることも問題だと考えられる<sup>29)</sup>。

### 3. 微生物による LC-PUFA 含有リン脂質の発酵生産

著者らは、LC-PUFA 含有リン脂質の生産のために、微生物を使った二段階培養法を開発した<sup>8, 20, 21)</sup>。この方法は最初に（一段階目の培養で）LC-PUFA 含有脂肪を蓄積させるという点で、従来の LC-PUFA の発酵生産技術を発展させたものである。

二段階培養法においては、まず、微生物を窒素源に対して高い炭素源（ブドウ糖）濃度をもつ培地（F 培地）で培養する（第一段階）。第一段階では TG が蓄積された細胞が得られる。その細胞（培養液）を糖を含まない培地（Z 培地）に移し、培養する（第二段階）。この過程で、細胞内の TG は炭素源、エネルギー源として消費され、細胞は増殖する。

ARA を TG として蓄積する *Mortierella umbellata* NBRC 32836 株を F 培地、Z 培地を使い、ともに静置条件と振盪条件（150 rpm）で一段階でのみ培養をした時、培養液当たりの細胞乾燥重量は F 培地を用いた時の方が Z 培地を用いた時に比べて 2-5 倍高かった<sup>16)</sup>。また、細胞収量に与える振盪の影響は F 培地を用いた場合に、より顕著に表れた。用いた培地にかかわらず、振盪によって細胞はクランプ（塊）状になった。静置培養により、細胞は培養液と気相の界面にマットを形成し、その下にクランプも形成した。全脂質中に占める ARA の含量は

静地培養、振盪培養いずれの場合も F 培地にくらべ Z 培地を用いた方が高かった<sup>16)</sup>。

*M. umbellata* NBRC 32836 株の F 培地を用いた振盪培養は、より高い細胞収量をもたらすが、ARA の含量は低かった。他方、Z 培地で静置培養した細胞のリン脂質及び ARA 含量は F 培地を用いて振盪培養した細胞に比べて、より高かった<sup>16)</sup> ことから、ARA 含有リン脂質を得るために、F 培地を用いた振盪培養と Z 培地での静置培養からなる二段階培養を試みた。

*M. umbellata* を先ず F 培地で振盪培養し、得られた細胞を Z 培地に接種した。この時、培地と気相の界面面積を変えるために同体積（100 ml）の培地を異なる容積のフラスコに入れた。表 1 に示すように、回収された全細胞の乾燥重量当たりのリン脂質の含量はフラスコのサイズに依存して増加し、1000 ml フラスコで 215 mg となり、そのうち 149 mg（約 70%）がマット状細胞に由來した。この時、全細胞由來の全脂質当たりのリン脂質と全脂肪酸当たりの ARA の割合はそれぞれ 30% から 40%, 12% から 18% に増加した。また、乾燥細胞 1 g 当たりのリン脂質及び ARA の含量はそれぞれ 27 mg から 70 mg, 11 mg から 32 mg へ増加した。他方、TG 含量は減少することから、TG は、Z 培地中では炭素源として利用されるとともに、一部はリン脂質に変換されると考えられる。但し、F 培地から Z 培地に移した場合、TG の絶対量も増加しているので Z 培地においても *M. umbellata* の TG 蓄積性は維持されており、それはクランプ細胞の性質であり、TG からリン脂質への変換はマット細胞で起こっていると考えられる。

二段階培養法を DHA 産生ラビリンチュラ類微生物である *thraustochytrid* 12B 株（12B 株）にも用い、DHA 含有リン脂質の生成を試みた。表 2 に示すように、F 培地で培養した 12B 株細胞を Z 培地（Z1）培地に接種し、2 日間培養

表1 二段階培養による *M. umbellata* NBRC32836 株の増殖とその ARA および ARA 含有リン脂質の生産性に及ぼす影響

| 培養段階                  | 1st  | 2nd     | 2nd     | 2nd     | 2nd     |
|-----------------------|------|---------|---------|---------|---------|
|                       | F    | Z       | Z       | Z       | Z       |
| ブドウ糖濃度 (8%)           | 8    | 0       | 0       | 0       | 0       |
| ペプトン及び酵母エキス濃度 (%)     | 1    | 1       | 5       | 5       | 5       |
| 培養液体積 (ml)            | 100  | 100     | 100     | 100     | 100     |
| フラスコサイズ (ml)          | 300  | 300     | 300     | 500     | 1000    |
| 培養時間 (日)              | 5    | 2       | 2       | 2       | 2       |
| 振盪速度 (rpm)            | 150  | 静置      | 静置      | 静置      | 静置      |
| 細胞の状態                 | 塊状   | マット状と塊状 | マット状と塊状 | マット状と塊状 | マット状と塊状 |
|                       |      | 全細胞     | マット状細胞  | 全細胞     | マット状細胞  |
| 細胞収量 (mg)             | 2362 | 981     | 639     | 1483    | 857     |
| 細胞濃度 (mg/ml)          | 24   | 10      | 6       | 15      | 9       |
| 総脂質 (mg)              | 213  | 108     | 64      | 196     | 77      |
| 細胞当たりの脂質含量 (%)        | 9    | 11      | 10      | 13      | 9       |
| 全脂肪 (mg)              | 132  | 51      | 31      | 96      | 15      |
| 全脂質中の脂肪含量 (%)         | 62   | 47      | 48      | 49      | 20      |
| 全リン脂質 (mg)            | 64   | 38      | 24      | 64      | 52      |
| 細胞当たりのリン脂質含量 (mg/g)   | 27   | 39      | 38      | 43      | 61      |
| 全脂質中のリン脂質含量 (%)       | 30   | 35      | 38      | 33      | 68      |
| 全アラキドン酸 (mg)          | 26   | 22      | 15      | 39      | 18      |
| 細胞当たりのアラキドン酸含量 (mg/g) | 11   | 22      | 23      | 26      | 21      |
| 全脂質中のアラキドン酸含量 (%)     | 12   | 20      | 23      | 20      | 23      |
|                       |      |         |         |         |         |
|                       |      | マット     | 状細胞     | マット     | 状細胞     |
|                       |      | 全細胞     | マット     | 全細胞     | マット     |
|                       |      | 状細胞     | 全細胞     | 状細胞     | 全細胞     |

F 培地 (1% ペプトン, 1% 酵母エキス, 8% ブドウ糖)。Z 培地 (1% ペプトン, 1% 酵母エキス)。

することにより、全脂質中のリン脂質含量と全脂肪酸中の DHA 含量はそれぞれ 12.9% から 67.3%, 44.7% から 56.5% へ増加した。全培養液当たりのリン脂質含量は 5 mg (Z 培地中に接種したゼロタイム) から 14.8 mg へと増加した。Z 培地の酵母エキスとペプトンの濃度をともに 2% (Z2 培地), 4% (Z4 培地) にして二段階目の培養を実施すると、Z1 培地を用いた場合よりもより高い細胞収量 (Z2 培地で 243 mg, Z4 培地で 339 mg) が得られた。また、全脂質にしめるリン脂質の割合は Z1 培地で培養した場合で最も高く (67.3%), Z4 培地で全脂質中の TG 含量が最も高かった (34.8%)。この結果は 12B 株の場合もその TG 蓄積性はブドウ糖を含まない培地でも失われていないことを示している。

12 株のより高い細胞収量を得るため、ジャー

ファーメンター (JF) を用いて二段階培養法を実施したが、フラスコを用いた場合とほぼ同様の結果が得られた。JF を用いた場合は増殖速度が速いので DHA 含有リン脂質の生成速度も JF を用いた培養でより速かった。以上の結果は、DHA 含有リン脂質を得るための F 培地と Z 培地を用いた二段階培養法は培養のスケールを大きくしても、また培養手段によらず有効であることを示している。

#### 4. TG から LC-PUFA 含有リン脂質への変換

脂質 (脂肪) 蓄積性の微生物を用いて ARA や DHA を多く含むリン脂質の生産を、内在性の TG を炭素源として利用することによって行う二段階培養法はユニークな方法といってよいだろう。一般的に、脂質蓄積性のカビの場合、

表2 二段階培養によるラビンチュラ類微生物 12B 株の増殖とその DHA 及び DHA 含有リン脂質の生産性に及ぼす影響

| 培養段階                       | 培養条件 |      |      |      |
|----------------------------|------|------|------|------|
|                            | 1st  | 2nd  | 2nd  | 2nd  |
| 培地                         | F    | Z1   | Z2   | Z4   |
| ブドウ糖濃度 (8%)                | 8    | 0    | 0    | 0    |
| ペプトン及び酵母エキス濃度 (%)          | 1    | 1    | 2    | 4    |
| 培養液体積 (ml)                 | 10   | 29   | 29   | 29   |
| フラスコサイズ (ml)               | 50   | 300  | 300  | 300  |
| 培養時間 (日)                   | 3    | 2    | 2    | 2    |
| 振盪速度 (rpm)                 | 180  | 180  | 180  | 180  |
| 細胞収量 (mg)                  | 90.6 | 235  | 243  | 339  |
| 細胞濃度 (mg/ml)               | 22.7 | 8.1  | 8.4  | 11.7 |
| 総脂質 (mg)                   | 38.8 | 22   | 28.5 | 40   |
| 細胞当たりの脂質含量 (%)             | 42.8 | 9.4  | 11.7 | 11.8 |
| 全脂肪 (mg)                   | 25.9 | 1.2  | 6.2  | 13.9 |
| 全脂質中の脂肪含量 (%)              | 66.8 | 5.4  | 21.8 | 34.8 |
| 全リン脂質 (mg)                 | 5    | 14.8 | 14.9 | 20.8 |
| 細胞当たりのリン脂質含量 (mg/g) (mg/g) | 55   | 63   | 61   | 61   |
| 全脂質中のリン脂質含量 (%)            | 12.9 | 67.3 | 52.3 | 52   |
| 全脂肪酸中の DHA 含量 (%)          | 44.7 | 56.5 | 55.3 | 55.4 |

BY+寒天培地 (0.1% ペプトン, 0.1% 酵母エキス, 0.5% ブドウ糖, 50% 海水及び1% 寒天) で培養した 12 株細胞の 1 白金耳を 10 ml の F 培地 (1% ペプトン, 1% 酵母エキス, 8% ブドウ糖, 50% 海水) で 3 日間振盪培養し (第 1 段階培養), その 4 ml を 25 ml の Z 培地に接種して培養した (第 2 段階培養)。Z1 培地 (1% ペプトン, 1% 酵母エキス, 50% 海水), Z2 培地 (2% ペプトン, 2% 酵母エキス, 50% 海水), Z4 培地 (4% ペプトン, 4% 酵母エキス, 50% 海水)。脂質分析は Istokovics *et al.*<sup>30)</sup> によった。本表は文献<sup>8)</sup> から引用した。

脂質代謝はいくつかの過程を経て進行する。即ち, 活発な増殖期を経て栄養源が枯渇する定常期に至るが, 定常期のストレス条件下では TG の生産と蓄積が起こる<sup>14)</sup>。

脂質の転流, 代謝の過程で細胞の脂質総量は減少するが, 脂肪酸組成に大きな変動がない場合<sup>31)</sup> と脂質総量はほとんど変動せず, 脂肪酸組成に大きな変動がみられる場合<sup>11)</sup> がある。また, 静置培養をした場合は, 振盪培養をするなど増殖を活発化した場合に比べて脂質量, とりわけ TG 量の増加がみられる傾向にある<sup>14)</sup>。本稿で示した *M. umbellata* の場合, 振盪培養の後に静置することによって ARA 含有脂肪からリン脂質への転流が起こったと思われる (表 1)。

F 培地と Z 培地で培養した細胞にみられる顕著な違いは F 培地で培養した細胞にはオイル

ボディと思われる構造体が多数見出され, Z 培地で培養した細胞はミトコンドリアに著しく富んでいることである (図 1)。ミトコンドリアはリソソームとともに細胞内物質を取り込むオートファゴゾーム (autophagosomes) の形成に関与するといわれており<sup>32)</sup>, 細胞当たりのミトコンドリア数が多いことは, 糖が含まれない環境 (培地中) で内在性脂肪の利用に役立つて考えられる。また, Z 培地中で細胞が内膜系を発達させることができ琳脂質の含量の増加の要因になっていると考えられる。12B 株においてホスファチジルコリンが最も主要な琳脂質であり, DHA 含量も 50%-60% であったが, これらの事実は既報<sup>27, 33)</sup> とほぼ一致する。

## 5. 結論

LC-PUFA 含有リン脂質は従来の TG に代わる新しい、またより有効な LC-PUFA 源になると考えられる。事実、DHA 含有リン脂質については魚卵由来の DHA 含有濃度の高いリン脂質であるホスファチジルコリンが市場に出ている (<http://www.nof.co.jp/business/food/special/pc-dha/con04.html>)。今後は、海産物に替るものとして、より安全な微生物発酵によって製造した DHA 含有リン脂質の安定提供が可能になる。微生物を使った二段階培養法では、代謝調節によって DHA 含量の高い個別のリン脂質クラス

の生成も可能である<sup>34)</sup>。ARA 含有リン脂質の市場化は筆者らの知る限りないが、*Mortierella* 属糸状菌に由来する ARA 含有脂肪が健康食品として利用されている (<http://vitavita.digi2.jp/category1/entry1.html>) ことを考えれば、ARA 含有リン脂質の発酵生産は DHA 含有リン脂質に比べてより容易であると予想される。本稿で紹介した二段階培養法は ARA や DHA だけに限らず、EPA や他の有用脂肪酸を TG として蓄積する微生物に広く応用でき、そのリン脂質体の生産を可能にすると考えられる。

## [謝辞]

本論文のデータ多くは安藤ひとみさんと中野

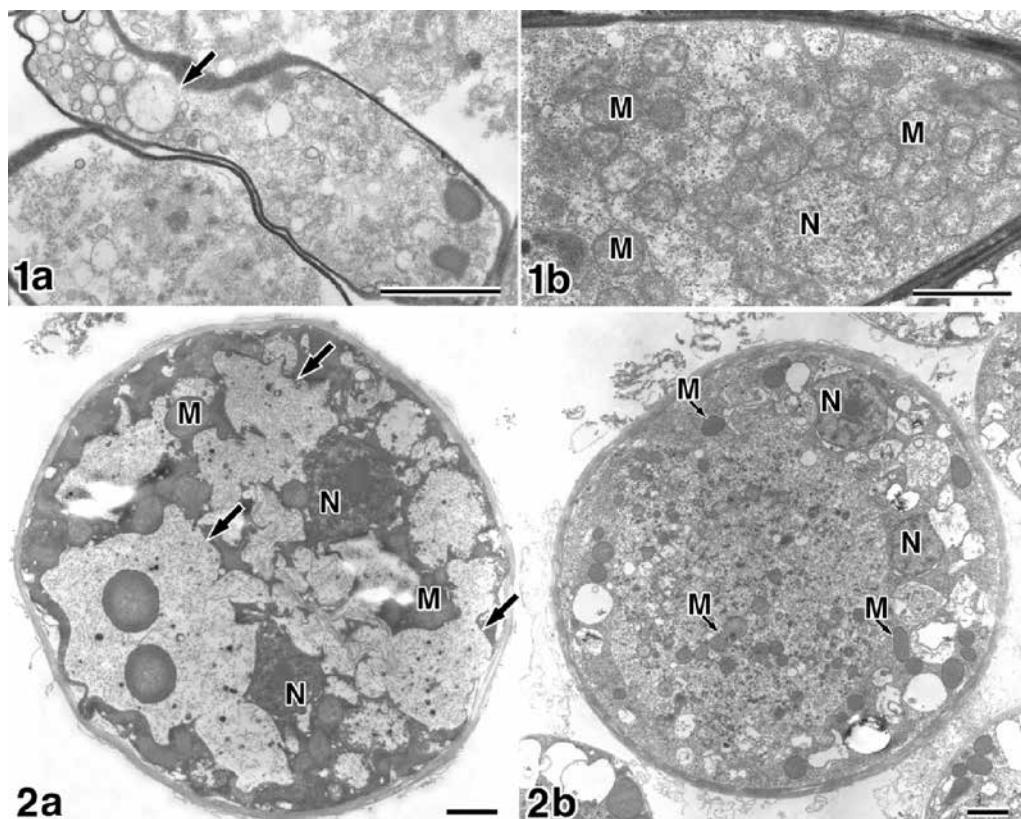


図 1 *M. umbellata* NBRC 32836 株 (1) と thraustochytrid 12B 株 (2) の電子顕微鏡写真。a, F 培地で培養したもの、b, Z 培地で培養したもの。1a, 2a, 2b は振盪培養 (150 rpm), 1b は静置培養した。矢印はオイルボディ、M はミトコンドリア、N は核を示す。*M. umbellata* NBRC 32836 株および thraustochytrid 12B 株に用いた培地はそれぞれ表 1 および表 2 の脚注に記載した。バーは 1 μm を示す。

渡瞳さん北海道大学大学院の修士論文から引用した。また、本研究の一部は国立極地研究所一般共同研究（no.19-22）および科学研究費（(C) no.22570130）の支援を得て行われた。

参考文献

- 1) Crawford MA, Broadhurst CL, Galli C, Ghebremeskel K, Holmsen H, Saugstad LF, Schmidt WF, Sinclair AJ, Cunnane SC: The role of docosahexaenoic and arachidonic acids as determinants of evolution and hominid brain development. *Fisheries for Global, 5th World Fisheries Congress*, 57-76, 2008.
- 2) Carrié I, Clément M, de Javel D, Francès H, Bourre JM: Specific phospholipid fatty acid composition of brain regions in mice: effects of n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency and phospholipid supplementation. *Journal of Lipid Research*, **41**: 465-472, 2000.
- 3) Yang HJ, Sagiura Y, Ikegami K, Konishi Y, Setou M: Axonal gradient of arachidonic acid-containing phosphatidylcholine and its dependence on actin dynamics. *The Journal of Biological Chemistry*, **28**: 6290-5300, 2012.
- 4) Metz JG, Roessler P, Facciotti D, Levering C, Dittrich F, Lassner M, Valentine R, Lardizabal K, Domergue F, Yamada A, Yazawa K, Knauf V, Browne J: Production of polyunsaturated fatty acids by polyketide synthases in both prokaryotes and eukaryotes. *Science*, **293**: 290-293, 2001.
- 5) Salem N, Litman B, Kim HY, Gawrisch K: Mechanisms of action of docosahexaenoic acid in the nervous system. *Lipids*, **36**: 2001.
- 6) Mozaffarian D, Wu JHY: (n-3) Fatty acids and cardiovascular health: are effects of EPA and DHA shared or complementary? *The Journal of Nutrition*, doi:10.3945/jn.111.149633, 614S-625S, 2012.
- 7) Shin SY, Bajpai VK, Kim HR, Kang SC: Antibacterial activity of bioconverted eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) against foodborne pathogenic bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, **13**: 233-236, 2007.
- 8) Okuyama H, Oriksa Y, Nishida T: Method for production of DHA-containing phospholipid through microbial fermentation. WO2008/149542, European Patent Office, 2008.
- 9) Bauguil SC, Fioroni A, Galinier A, Allenbach S, Pujol MC, Salvayre R, Cartier A, Lemieux I, Richard D, Biron S, Marceau P, Casteilla L, Pénicaud, Maurige: Pro-inflammatory phospholipid arachidonic acid/eicosapentaenoic acid ratio of dysmetabolic severely obese women. *Obesity Surgery*, **22**: 935-944, 2012.
- 10) Wen ZH, Su YC, Zhang Y, Zhao A, Yao GY, Jia CH, Lin J, Xu X, Wang L, Wang XK, Liu AL, Jiang Y, Dai YF, Bai XC: Critical role of arachidonic acid-activated mTOR signaling in breast carcinogenesis and angiogenesis. *Oncogene*, 1-11, 2012.
- 11) Dedyukhina EG, Chistyakova TI, Vainshtein MB: Biosynthesis of arachidonic acid by micromycetes (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, **47**: 109-117, 2011.
- 12) Lewis TE, Nichols PD, McMeekin TA: The biotechnological potential of thraustochytrids. *Marine Biotechnology*, **1**: 580-587, 1999.
- 13) Gupta A, Barrow CJ, Puri M: Omega-3 biotechnology: Thraustochytrids as a novel source of omega-3 oils. *Biotechnology Advances*, doi:10.1016/j.biotechadv.2012.02.014, 1-13, 2012.
- 14) Dyal SD, Narine SS: Implications for the use of Mortierella fungi in the industrial production of essential fatty acids. *Food Research International*, **38**: 445-467, 2005.
- 15) 奥山英登志, 中野渡瞳, 東條元昭: アラキドン酸リノ脂質含量の高い糸状菌の製造方法. 特願2009-269051, 2009.
- 16) 中野渡瞳: 微生物を用いた高度不飽和リノ脂質の発酵生産に関する研究. 北海道大学大学院環境科学院修士論文, 2010.
- 17) 安藤ひとみ: ドコサヘキサエン酸 (DHA) を蓄積する新規微生物の単離と同定およびDHAの生理機能に関する研究. 北海道大学大学院地球環境科学研究院修士論文, 2005.
- 18) Perveen Z, Ando H, Ueno A, Ito Y, Yamamoto Y, Yamada Y, Takagi T, Kaneko T, Kogame K, Okuyama H: Isolation and characterization of a novel thraustochytrid-like microorganism that efficiently produces docosahexaenoic acid. *Biotechnology Letters*, **28**: 197-202, 2006.
- 19) 奥山英登志, ザキアパルビーン, 安藤ひとみ他: ドコサヘキサエン酸 (DHA) の生産性の高い新規ラビリンチュラ類微生物およびその利用. 特許第4047354号, 2007.
- 20) 奥山英登志, 折笠善丈, 西田孝伸: 微生物発酵によるDHA含有リノ脂質の製造方法. 特願2007-148398 (PCT/JP2008/001394), 2007.
- 21) Okuyama H, Oriksa Y, and Nishida T: In vivo conversion of triacylglycerol to docosahexaenoic acid-containing phospholipids in a thraustochytrid-like microorganism, strain 12B. *Biotechnology Letters*, **29**: 1977-1981, 2007.

- 22) Benny GL: *Mortierella*, available at <http://zygomycetes.org/index.php?id=137>, 2009.
- 23) White MM, James TY, O' Donnell K, Cafaro MJ, Tanabe Y, Sugiyama J: Phylogeny of the Zygomycota based on nuclear ribosomal sequence data. *Mycologia*, **98**: 872-884, 2006.
- 24) Gbif: GBIF checklist bank, *Thraustochytrium*, available at <http://ecat-dev.gbif.org/usage/106293005>, 2010.
- 25) Mu H: Bioavailability of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids from foods. *Agro FOOD industry hi-tech*, **19**: 24-26, 2008.
- 26) McClamens DJ, Decker EA, Park Y: Controlling lipid bioavailability through physicochemical and structural approaches. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **49**: 48-67, 2009.
- 27) Küllenberg D, Taylor LA, Scheider M, Massing U: Health effects of dietary phospholipids. *Lipids in Health and Disease*, **11**: 1-16, 2012.
- 28) Sala-Vila A, Castellote AI, Campoy C, Rivero M, Rodriguez-Palmero M, López-Sabater MC: The source of long-chain PUFA in formula supplements does not affect the fatty acid composition of plasma lipids in full-term infants. *The Journal of Nutrition*, **134**: 868-873, 2004.
- 29) Cunnane SC, Chouinard-Watkins R, Castellano CA, Barberger-Gateau P: Docosahexaenoic acid homeostasis, brain aging and Alzheimer's disease: Can we reconcile the evidence? *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.plefa.2012.04.006>, 2012.
- 30) Istokovics A, Morita N, Izumi K, Hoshino T, Yumoto I, Sawada MT, Ishizaki K, Okuyama H: Neutral lipids, phospholipids and a betaine lipid of the snow mold fungus *Microdochium nivale*. *Canadian Journal of Microbiology*, **44**: 1051-1059, 1998.
- 31) Peberdy JF, Toomer DK: Effect of nutrient starvation on the utilization of storage lipids in *Mortierella ramanniana*. *Microbios*, **13**: 123-131, 1975.
- 32) Hailey DW, Rambold AS, Satpute-Krishnan P, Mitra K, Sougrat R, Kim PK, Lippincott-Schwartz J: Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell*, **141**: 656-667, 2010.
- 33) Lebiedzinska M, Szabadkai G, Jones AWE, Duszynski J, Wieckowski MR: Interactions between the endoplasmic reticulum, mitochondria, plasma membrane and outer subcellular organelles. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **41**: 1805-1816, 2009.
- 34) アマッド イスカンダール ビン ハジ モハマッド タハ, 佐藤真美子, 清水芳雄他:微生物発酵によるDHA含有ホスファチジルセリンの製造方法. 特願 2011-13708, 2011.

# 環境に優しい成分調製技術 —マイクロ波等を活用した乾燥と抽出技術—

大平 辰朗 \*

\* OHIRA Tatsuro (森林総合研究所 バイオマス化学研究領域 樹木抽出成分研究室)

Key Words : かおり成分・減圧式・マイクロ波・水蒸気蒸留・食品加工

## はじめに

化学技術は19世紀の医薬革命、20世紀の農薬や肥料革命を生みだし、今日では衣食住や輸送・通信など分野での飛躍的な進歩を成し遂げ、生活の質の向上に貢献してきた。しかしながら、それらの発達により、人間の健康や住環境を損なうことが問題になってきている。そのため、物質の製造・使用だけでなく、それらの廃棄にいたるまでを規制する動きが活発になっている。このような背景のもと、環境に優しい化学、即ち「グリーンケミストリー」という考え方方が注目され、様々な産業分野でその考え方についた対策がとられるようになった。本稿では、農・林産物の利用分野において、環境に優しく効率性も高いといった点で注目を集めているマイクロ波等を活用する乾燥や抽出技術について紹介する。

## 1. マイクロ波の特性と利用分野

マイクロ波は、太陽光線と同じく電磁波の一種である。電磁波の内、エネルギーの高いものからガンマ線、X線、紫外線、可視光、赤外線があり、これよりエネルギーが低い波長(1mm～1m程度)のものが一般的にマイ

クロ波と呼ばれている(図1)。マイクロ波は現代社会において、携帯電話をはじめとする通信技術や放送電波、レーダーなどの計測分野などの広範な分野において、欠かすことができないものである。これら以外にマイクロ波の利用分野は医療、工業、サイエンスといった広い分野において、加熱用のエネルギー源としても利用されている。マイクロ波加熱は他の加熱法とは異なり、物質の内部から加熱されるので、加熱効率が極めてよい。加熱のためのエネルギー源として身近なものとしては、電子レンジがある。マイクロ波とは、物質中の「電界」と「磁界」が非常に速く変化しながら伝播するエネルギーであり、発生源は高速で振動する電圧や電流である。電子レンジなどで食品加熱のためのエネルギー源として日常使われるマイクロ波の周波数は、通常2.45GHzである。これは1秒間に24億5000万回の電圧・電流が振動するこ

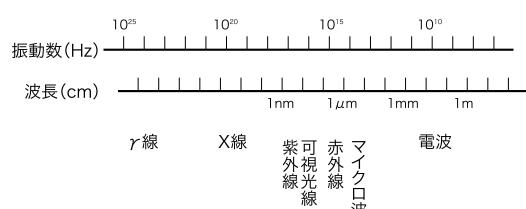


図1 電磁波とマイクロ波

とにより発生・伝播する電界と磁界と言い換えることができる。電子レンジのようにマイクロ波を利用することにより、短時間で加熱ができるが、これはマイクロ波により、水などのような双極子モーメントの大きい極性基を有する分子、即ち極性分子が配向分極などによる誘電損失が生じ、その結果発熱するためであり、1秒間に数十億回の振動といった高速のエネルギーがゆえに急速の加熱が可能となる。植物体や食品は主成分は一般的に水であり、60～80%存在している<sup>1)</sup>。

電子レンジで食品などが短時間で加熱できるのは極性分子である水を多く含んでいるためである。これを用いた技術は食品の乾燥などにも応用されている。その他、医療用としては血流の促進による炎症の治療や鎮痛、組織凝固による止血、加温による癌の治療、診断など多方面にわたっている。近年は特にグリーンケミストリーの一環として物質の抽出、合成などの化学工業の分野でも注目されている<sup>2)</sup>。またマイクロ波を利用した木材の酵素的変換（糖化）といった応用技術、も開発されている<sup>3, 4)</sup>。木材などの建築材料の乾燥<sup>5-7)</sup>、曲げ加工<sup>8, 9)</sup>、木材の有用物質への熱分解などの変換技術<sup>10, 11)</sup>としてもマイクロ波は利用できる。電子レンジで使われているマイクロ波は通常、無線通信などで使っているマイクロ波と物理的には同じものであるが、電力が桁違いに大きい。他方、非極性分子であるヘキサンなどの場合は、マイクロ波は吸収されず、素通りするためエネルギーが吸収されない。従って、温度の上昇は極めて小さい。このような特性を有機合成の分野で利用されている。非水溶性の溶媒中における極性化合物の合成反応において、マイクロ波を照射することによって、溶媒分子には影響を及ぼさず、溶質にのみマイクロ波のエネルギーを吸収させることができ、効率よく、溶媒との副反応を最小限に抑制して合成反応を行うことができる。

1995年までに我が国でマイクロ波が利用されている分野は食品工業用（42.5%）、電子・電気用（24.1%）、ゴム加硫用（5.2%）であり、食品工業用が最も多い。

マイクロ波加熱は、他の加熱方法にはない優れた特徴がある。これまでの化学工業などでは、外部から熱を加えるため、反応部の温度に比べ、外部の温度が高く、また内部温度が目標温度に達するための時間を要してしまい、かつ熱が外部に漏洩していた。このため熱損失を最小限に留める必要があった。これに対して、マイクロ波を利用する方法では内部のマイクロ波吸収性物質、例えば水のようなものが加熱され、急速に温度が上昇する。発生した熱は速やかに周囲の物質に伝達される。そのため局所的な急速加熱（スーパーヒーティング）が生じ、予想外の反応が起こる可能性がある。この特性を利用した化学反応の開発も期待されている。

## 2. 食品の乾燥とマイクロ波の利用

### 2-1. 食品保存に重要な乾燥技術

食品の乾燥技術は、食品から水分を除去することにより、保存性を高める技術の一つであるが、その歴史はたいへん古い。狩猟の時代から、捕獲した鳥獣・魚介類及び果実などを収穫期以外でも摂取可能とするために、保存性に影響する水分活性を低下させる技術、即ち乾燥技術が、長い歴史の中で経験と知識を重ねながら、確立されてきた。日本では縄文時代の後期または弥生時代の初期から、稲作のための乾燥した粉の保存技術が普及してきたとされている。古事記や日本書記などの文書には粉、干しアワビなどが、凍り豆腐、鰯節、くさやなどは江戸時代初期の記録に食物として扱われていたという。乾燥食品の工業的な生産の観点でみてみると、1800年代には大規模な野菜や果実の乾燥工程が欧米で盛んになり、冷凍乾燥食品は第二

次世界大戦で使用されている。1950年以降では、大量消費社会の出現や社会情勢の変化などにより、一般家庭の毎日の生活にも即席麺、インスタントコーヒーなどが取り入れられるようになった。このように食品の乾燥技術は今日では私たちの生活に欠かすことができないものとなっている。

食品の乾燥技術は、正確には水分の除去により、食品の水分活性を低下させる技術である。水分活性は水の活性を示す指標であり、微生物の生育、酵素による反応、酸化や褐変などの化学変化に必要な含水率の指標として有効とされている。別の見方として食品の有する相対湿度を考えることができ、食品の有する蒸気圧をその温度での純粋な水の蒸気圧で割った数値である。純粋な水の水分活性を1、水が完全になくなった状態を0とする。一般的な最近の生育に必要な最低水分活性は0.9以上であり、生鮮食品の水分活性は1に近いので、生鮮食品上では微生物はよく生育し、腐敗する要因となりうる。逆に乾燥食品の水分活性は0.1～0.3であるため、微生物は生育せず、腐敗もほとんどないわけである。しかしながら、水分活性が高いと酸素に対するバリア機能が向上するが、活性が低いと酸素等によるバリア機能が低下するため、乾燥した食品では酸化や褐変などの化学変化を受けやすくなるという側面もある。以上のように食品分野における乾燥技術は、品質保全などの点で極めて重要なものである。様々な乾燥技術、例えば遠心分離、濾過、吸水シートなどの脱水、水分吸収処理などがあるが、これらでは水分活性はほとんど変化しない。乾燥とは水分の除去により、水分活性を低下させる技術のことである。水分の除去には水分の蒸発が欠かせない。水分の蒸発には温度と圧力が影響する。温度は高温の方が蒸発しやすく、圧力は低いほど水分は蒸発しやすくなる。食品の中には高温で乾燥すると堅くなったり、縮んだりするため

に、そのままの状態では食べることができなくなるため、水で戻す処理が必要になる。高温での乾燥では油の酸化が速くなり、嗜好性や保存性が低下する。熱した風による乾燥においても、減圧下での乾燥においても蒸発に必要な熱は、食品の表面から食品の内部に伝わる。食品を内部から加熱することができれば、表面の固化や収縮が抑制され、食品の形態の変化が少ないものができる。このような内部からの加熱による乾燥技術として、最近注目されているのが、マイクロ波加熱を用いた乾燥技術である<sup>12)</sup>。

## 2-2. マイクロ波の食品加工への応用<sup>13)</sup>

マイクロ波はその特性から迅速な加熱、内部からの加熱、均一な加熱、容器等を透過した直接選択加熱などが可能になるため、様々な産業分野で利用が検討されている。中でも食品分野では素材の加熱において、清潔な面が注目され、最も早くから実用化が研究されている分野である。加工過程には、乾燥、加熱調理、解凍、滅菌・殺菌などがあるが、装置として導入されているものとして特に多いのが乾燥、加熱調理である。

### (1) 茶葉の乾燥・火入れ

緑茶の製造工程において、乾燥は風味や茶葉の色等に大きく影響を及ぼすと言われている。茶葉の乾燥工程にマイクロ波を利用すると、従来法であるガスエネルギーによる熱風乾燥で問題になる茶葉の含有成分の損失、クロロフィルの破損による色落ち、ビタミンCの成分量の低減などが解消できるとともに、作業性および作業環境の向上、改善に役立つと考えられる。茶葉の製造工程の中で、仕上げ再製工程というものがあるが、その工程では荒茶（香り、風味が未完成）をさらに乾燥、火入れ処理を行い、仕上げ乾燥の目的以外に、加熱による火入れ茶特有の香気を付与できる重要な工程となる。この工程にマイクロ波加熱を導入したところ、茶葉の成分の一種であるビタミンCの含量が従

来の方法に比べて約1.7倍上昇したという報告もある。

### (2) 野菜類の減圧乾燥

ほうれん草などの鮮度のよいものを乾燥するときに、水の蒸発温度まで加熱すると変質を招くため、減圧して沸点を下げた低温下での乾燥が重要である。マイクロ波を利用した事例では、減圧度6.65kPaの条件下ではおおよそ処理温度が38℃になり、この状態でマイクロ波加熱を数時間行うことにより、最終含水率30%まで乾燥が可能である。その他、濃縮オレンジジュースからオレンジ粉末を製造する技術や、生肉の塊、味付け油揚げの乾燥などが報告されている。

### (3) カップ麺の具の膨化乾燥加工

食品の含水率を9～48%の準結合水領域に調整後、マイクロ波加熱を行うと、瞬時に130℃前後に昇温し加熱変性・膨化・乾燥・殺菌の工程が同時に完了できる。カップ麺の具や膨化スナック、即席麺等の生産に威力を発揮できる。その他、あられなどの米菓の焼成工程の中で、膨化する場所にマイクロ波加熱を適用すると、食感のよい食品に加工ができる。

### (4) テンパーリング

食品を生鮮状態で安定供給するには、-20～-60℃に冷凍保存する。冷凍食品の解凍には低温空気解凍や水解凍が用いられる。しかしながら、空気解凍方式では解凍中に内部の水分とともに成分の一部が流出しドリップとなり、また変色や雑菌繁殖などの問題が生じる。水解凍方式では大量の水が必要であり、排水処理の問題が生じる。これらの問題を解消するために解凍直前の温度(0～5℃)で昇温を一端止める方式をテンパーリング(tempering)と呼んでおり、特にマイクロ波を利用したテンパーリングは効果的であると言われている。鶏肉用、牛肉用のテンパーリングなどが実用化されている。

以上のようにマイクロ波は、様々な物質中の水分を除く技術として優れた特性を有してお

り、実用化された例も多い。しかしながら、乾燥対象となる素材中には香り成分など有用な成分が含まれていることもあり、水分の除去の工程では同時に水蒸気とともに一部の香り成分も抽出されることもある。マイクロ波による乾燥技術は、見方を変えると成分の抽出技術と言い換えることができる。そこで、マイクロ波等を利用した成分の抽出技術に関する研究例について、以降紹介することにする。

## 3. 環境に優しい成分抽出技術

21世紀は人の時代・心の時代と言われている。物が豊かになった現代で求められているものは、精神的な安定や心の豊かさである。香り物質には、人の気分を快適にする働きや落ち着かせたり、逆に覚醒させる働きがあり、現代社会が求めている落ち着きや安心感といった心の豊かさに大きく影響する。香りを楽しむためには、直接自然とふれあうことがベストである。しかしながら、現代人は時間に束縛された生活パターンが多く、なかなか自然にふれあうための時間を生み出すことができない。そこで考えられたのが、香りをいつでもどこでも楽しむために、植物などから抽出することや化学合成することであった。市販されている香り成分の一部は合成品などが使用されているが、実際に植物体から抽出される香り成分も多くある。香り成分は大別すると天然性と単体に分類できる。単体は天然性の香り成分から分離したものと、これらを他の原料から合成したもの、その他天然に存在しない新しく合成されたものもある。この内、天然性の香り成分は1500種類ほどが知られているが、主に商業的に取引されているものは150種類ほどである。天然性の香り成分の内、原料が動物性のものもムスクなど一部が有名であるが、ほとんどは植物性である。製造コストを考慮すると、天然性は合成品よりもコ

スト高であるが、使用目的に応じては天然性の香り成分が選ばれることが多く、商業取引されているものでは、いかに低成本で抽出できるかが重要となっている。香りの抽出に関する歴史はとても古く、技術的に確立した方法も多くある。技術は日新月歩で進歩しており、抽出効率やエネルギー効率の向上はすさまじい。最近では環境への負荷を考慮した方法の開発が中心である。以下に、香り成分の最新の抽出法について紹介する。

### 3-1. 抽出法と環境問題

植物体等から香り成分（精油）を抽出するため実用化された方法には、抽出原理による分類で蒸留法、有機溶媒を用いた有機溶剤抽出法、物理的に原料を圧搾する方法に分類できる。国際標準化機構（ISO）やフランスの規格協会（AFNOR）では、精油の定義として生の植物材料から物理的な方法で得られるものとされており、この定義に従うとすれば、水蒸気蒸留法や圧搾法は最適な方法となろう。圧搾法は柑橘類の果皮から精油を採取する方法として用いられている。

しかしながら、全ての原料に適さず、また精油の収率が低くなることや酸化や酵素による分解の可能性などの問題点がある。水蒸気蒸留法は原理が簡単で、装置が安価であるなどの利点があるが、温度による熱変性や水によるエステル類の加水分解が生じたり、配糖体の加水分解によるアグリコンの生成、タンパク質の加水分解による変性などの問題がある。それぞれの問題点を解消するために、新しい抽出法の開発が盛んに行われている。このような抽出効率の改善といった技術開発も盛んであるが、昨今の社会情勢の変化の中では、環境への負荷を考慮する技術の開発も重要となっている。一般に環境問題には、化学物質に起因するものが多くある。例えば DDT、PCB のような意図的に合成され

た化学物質による環境汚染と被害の発生、ダイオキシンに代表される非意図的生成物の問題、化学工場の排水が引き金となった様々な病気、住宅に用いられている建材などから放散する物質に起因するシックハウス症候群、揮発性有機化合物が要因となる光化学オキシダントによるオゾン層破壊などがある。化学物質が引き起こすこのような状況の中で、有害な化学物質の使用制限の一方で、化学製品や製造プロセスそのものをいじって、健康や環境へのリスクを低減させる基本戦略であるグリーンケミストリーという考え方がある。グリーンケミストリー（Green Chemistry）とは Environmentally Benign Chemistry、Environmentally Friendly Chemistry あるいは Clean Chemistry とも呼ばれている。いわゆる「環境に優しい化学」を意味する。その定義はアメリカ環境保護局（EPA）の P.T.Anastas によれば、「人間の健康や環境に害のある原料、製品、副産物、溶媒・試薬などの使用や発生を低減あるいは停止するために、化学的技術で解決する手法」と定義されている。即ち、化学品の人間の健康と環境への害を防止あるいは削減するために、原料、反応試薬、反応、溶媒、製品をより安全で、かつ環境に影響を与えないものに転換することであり、変換効率、回収率、選択性の高い触媒やプロセスを開発し、廃棄物の少ないシステムを構築することである。従って、グリーンケミストリーは「環境に優しい」という単なるスローガンではなく、安全で環境への害がより少ない化学品や製造プロセスの開発を目指して、化学者が中心となって具体的な取り組みを行うことを意味する。グリーンケミストリーは消費者など社会一般の人々に、化学学者及び化学産業界が環境問題に対して、どのようにその専門性を発揮し、どのような技術と製品を提供するのかを、積極的にかつ具体的に提案する運動である。この概念を表現する名称としては、アメリカ、イギリス、イタリアなど

では「グリーンケミストリー」を使用しているが、ドイツ、OECDでは「サステイナブルケミストリー (Sustainable Chemistry)」を用いている。今日の日本ではより広義の意味を込めて「グリーン・サステイナブル・ケミストリー」を正式な名称としている。

### 3-2. グリーンケミストリーに適した抽出技術

P.T.Anastas と J.C.Warner はグリーンケミストリー 12箇条というものを提唱している（表1）<sup>14)</sup>。この中で抽出技術に関わりのあるものは、1の「廃棄物は“出してから処理”ではなく、出さない」5の「補助物質はなるべく減らし、使う場合無害なものを用いる」、6の「環境と経費への負荷を考え、省エネルギー化を心掛ける」、7の「原料は、枯渇性が危惧される資源ではなく再生可能な資源から得る」、12の「化学事故につながりにくい物質を用いる」などであろう。1については抽出残渣が該当するが、利用価値のない抽出残渣ならば、その処理が問題であるが、先に使用目的が明確になっていれば問題はないと考えられる。5で言われている補助物質とは有機溶媒類を指すが、抽出技術に置き換えてみると、抽出溶剤が該当する。植物体などから有用成分を抽出する時に用いられる塩化メチレンなどの有機溶媒であるが、健康や環境への負荷の点で問題になる。そこで注

目されているものは超臨界流体、特に超臨界二酸化炭素である。また水を溶媒とするプロセスの開発も最近では行われている。6については最も注目されている技術としてマイクロ波、超音波の利用がある。7については、あえて言うまでもないが、バイオマス資源のことである。地球上には様々なバイオマス資源があるが、蓄積量の多さからすると森林資源は有力な候補となる。12については環境汚染や健康影響が危惧されるものだけでなく、火災、爆発性などの心配のない超臨界二酸化炭素などが挙げられる。この概念に合致した抽出技術はいろいろあるが、ここでは超音波やマイクロ波を利用した抽出技術を紹介することにする。

#### 3-2-1. 環境配慮型の抽出技術

##### —超音波及びマイクロ波の利用—

環境配慮型の抽出技術として超音波やマイクロ波を利用したものがある。グリーンケミストリーの考え方の中に「環境と経費への負荷を考え、省エネルギー化を心掛ける。」というものがあったが（表1）、超音波やマイクロ波の利用はその代表的な技術と言われている。超音波は溶液中に超音波を照射すると数ミクロンの泡が発生し、圧壊など特異的な現象を生み、植物体のような固体内部に存在する目的物質の抽出を容易にしたり、発生する泡が特異的な化学反応を引き起こす<sup>15)</sup>。マイクロ波のエネルギー

は、化学反応を促進することや溶液中で行っていた反応を固体状態で進めたりすることに用いられる<sup>16, 17)</sup>。これは、マイクロ波をエネルギー源にすることによって、反応時間の短縮が可能となり、固体状態で反応を進めることができれば、溶液反応の時のような熱エネル

表1 グリーンケミストリーの12箇条<sup>14)</sup>

|                                    |
|------------------------------------|
| 1. 廃棄物は出してから処理ではなく、出さない。           |
| 2. 原料をなるべく無駄にしない形で合成する。            |
| 3. 人体と環境に害の少ない反応物・生成物にする。          |
| 4. 機能が同じなら、毒性のなるべく小さい物質をつくる。       |
| 5. 補助物質はなるべく減らし、使う場合無害なものを用いる。     |
| 6. 環境と経費への負荷を考え、省エネルギー化を心掛ける。      |
| 7. 原料は、枯渇性が危惧される資源ではなく再生可能な資源から得る。 |
| 8. 途中的修飾反応はさける。                    |
| 9. 可能なかぎり触媒反応を目指す。                 |
| 10. 使用後に環境で分解するような製品を目指す。          |
| 11. プロセス計測を導入する。                   |
| 12. 化学自己につながりにくい物質を用いる。            |

ギーや溶媒も不要となるからである。この技術は化学反応を利用した合成だけにとどまらず、有用成分の抽出にも適用されており、その抽出効率の高さが注目されている。ここでは、このような超音波やマイクロ波を利用した精油などの有用成分の抽出技術を紹介することにする。

### (1) 超音波抽出法

柑橘類の抽出において、超音波を利用した抽出法 (Ultrasound-assisted extraction, USE) が研究されている。超音波とは定常者が感じない音で周波数は 20kHz 以上である。超音波は空气中では秒速 344m、水中では秒速 1500m である。その特性を利用した身近なものとしては、魚群探知機、水深測定装置、エコー診断装置などがあり、これらは超音波が発信され、物体に当たって戻ってくるまでの時間を測定することにより、距離や物体の存在、形状などを測定する原理に基づいたものである。超音波はもう一つの特徴として、キャビテーションがある。液体中に存在する気体分子に超音波が当たると、交流による正・負の交互圧力がかかり、細かな気泡(キャビテーション気泡)の膨張と圧縮によって破裂が繰り返される。その結果、狭いすき間にある塵や付着物がきれいに取り除かれる。このような効果をキャビテーション効果という。一例としてメガネ洗浄機などがある<sup>18)</sup>。抽出との関係を見てみると発生する泡による抽出対象物への抽出溶媒の浸透性の向上、抽出対象物の表面にある抽出妨害物質の移動作用などが考えられ、従来の溶媒抽出法と比較して抽出時間の短縮、抽出温度を低減可能、溶媒消費量の軽減が達成できる。その結果、香り物質などのような熱に不安定な物質の抽出効率の向上や抽出に関わるエネルギーの低減が図れる<sup>15)</sup>。これまでに PAH など環境汚染物質<sup>19)</sup> や殺虫剤<sup>20)</sup> の抽出の他、生薬成分<sup>21)</sup>、色素成分<sup>22)</sup>、精油成分<sup>23)</sup> の抽出などが報告されている。公定法として半揮

発性有機化合物や非揮発性有機化合物の抽出法として EPA3550C に公定法として位置付けられてもいる。沢村らは超音波と減圧式水蒸気蒸留を組み合わせた「超音波印加型減圧水蒸気蒸留法」を開発している<sup>24)</sup>。本法を用いて未利用の柑橘類果皮から精油を抽出すると、従来法(水蒸気蒸留法)で得られる精油に比べて精油自体の収率が高く、<sup>14)</sup> また精油成分の中で収率の低かったリナロールなどのモノテルペンアルコールを多く含んだ精油が得られ、また不快臭の原因となるセスキテルペンアルコールをほとんど含まない、品質のよい精油が得られることが判明している。ここで「なぜテルペンアルコール類の収率が向上したのだろうか」という疑問が生じる。これについてはモノテルペンアルコールなどのテルペンアルコール類は、水や植物体の細胞のセルロースなどと水素結合を形成しており、単体で存在する時よりも揮発する温度が高くなる傾向にあることが知られており、そのような環境に超音波が照射されると、水溶液中でキャビテーションが起こり、その影響でセルロース等とテルペンアルコール類との間の水素結合が超音波印加工エネルギーにより切断され、結果的にテルペンアルコール類が揮発しやすくなつたためと考えられている<sup>25)</sup>。

### (2) マイクロ波を利用した抽出技術

マイクロ波を抽出技術に適用した最初の研究例は、K.Ganzler らの研究であり、土壤や植物種子、食物、飼料などから農薬、脂肪、有用成分などを抽出するためにマイクロ波を利用したものである<sup>26)</sup>。その抽出効率の高さはたいへん注目され、研究例は年を経るに従って増加している<sup>27)</sup>。これまでマイクロ波を利用した成分抽出法について、いろいろな原理の方法が公表されている。表 2 は、主なマイクロ波を利用した抽出法をまとめたものである。MAE<sup>28-31)</sup>、VMSD<sup>32-34)</sup>、MWS<sup>34, 35)</sup>、CAMD<sup>36)</sup>、SFME<sup>37, 38)</sup>など大気圧下での抽出を行うものや減圧下ある

表2 マイクロ波を利用した抽出法

| 略名 | MAE                           | VMSD                                | MWSD                         | CAMD                                  | SFME                              |
|----|-------------------------------|-------------------------------------|------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|
| 名称 | Microwave-assisted extraction | Vacuum microwave steam distillation | Microwave steam distillation | Compressed air microwave distillation | Solvent-free microwave extraction |
| 利点 | 速い、多段階抽出、低溶媒量                 | 速い                                  | 洗浄工程不要、揮発性物質の変化無し            | 速い                                    | 速い、経済的、洗浄工程不要                     |

いは加圧下で抽出を行うもの、植物体に含まれている水分を利用した水蒸気蒸留を行うものなどがあり、目的とする成分の特性により方法が異なっている<sup>39)</sup>。マイクロ波は前述のように加熱効率が高いため、短時間での抽出が可能であり、また一般的なマイクロ波の周波数は水をターゲットにしており、水と同じような物性を有する物質にはエネルギーが集中しやすく、従ってそれらの選択的な抽出が可能となる。このような特性を活かした方法も開発されている。海外では①半揮発性及び非揮発性有機物の抽出法として EPA3546 が、②石油関連の分析法として ASTM D-5765, ASTM D-6010, ③肉類など食品中の脂肪の抽出法として AOAC 991.36 などが公定法として位置付けられているものもある<sup>40)</sup>。また、殺虫剤、環境汚染物質などの効率的な抽出法としても威力を発揮している<sup>41)</sup>。

### (3) マイクロ波を利用した水蒸気蒸留技術

精油などの抽出においては、一般的に水蒸気蒸留法が用いられることが多い。花や葉などの柔らかい植物を、そのまま蒸留器に入れ、集中的に水蒸気を浴びせ、その熱で植物の芳香成分を揮発させる方法である。その芳香成分を含んだ水蒸気は、冷却され、凝縮され、液体になり、その液体は静置すると表面に浮いた上層と下層に分かれる。この上層が精油である。この方法は比較的装置が簡単で安価で済むこともあり、多くの精油がこの方法で抽出されている(図2)。しかし、長時間の水蒸気との接触により、精油に含まれる芳香成分が変質を受けやすいこ

と、精油採取後に廃液が大量に排出されることなどの問題点があり、環境配慮型の効率的な新規採取法の開発が求められていた<sup>38-40)</sup>。近年注目されている技術としてマイクロ波を利用した技術がある。マイクロ波は加熱効率が高く、家庭用の電子レンジなどにも用いられている技術であるが、化学合成や抽出などへの適用においても効率性や経済性の点で優れていると考えられている<sup>23)</sup>。マイクロ波を利用した抽出技術としてはオレンジピール<sup>42)</sup>、カルダモン種子<sup>43)</sup>、ラベンダーの花部<sup>44)</sup>、バジル、ガーデンミント、タイム葉<sup>45)</sup>などに含まれる精油成分の効率的な抽出について検討された例がある。マイクロ波による効率的な抽出処理により、精油採取時間が大幅に短縮でき、エネルギーコストの点でも改善効果が大きいとされている<sup>44)</sup>。図3はオレンジの皮に含まれている精油の抽出において、異なる手法による精油の収率の違いを記したものであるが、大気圧下でのマイクロ波水

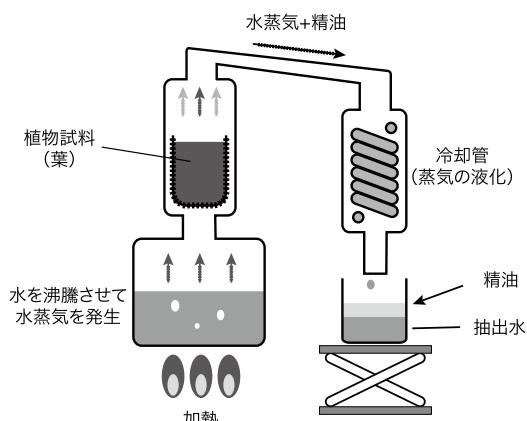


図2 水蒸気蒸留法

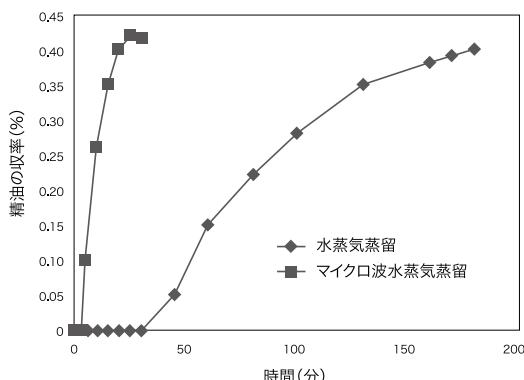


図3 オレンジピール(皮)から得られる精油の抽出速度<sup>42)</sup>

収率は試料の乾燥重量当たりの割合

蒸気蒸留では一般的な水蒸気蒸留法で得られる精油と同じ量を抽出するために要する時間が約1/6であり、抽出時間の短縮化が可能なことがわかる<sup>42)</sup>。また、表3は、オレンジの皮とタイム葉から精油を抽出するために必要な電力などを記したものであるが、マイクロ波水蒸気蒸留法は電力消費量が一般的な水蒸気蒸留法に比べて、約1/18程度であり、省エネルギー化が可能なことがわかる<sup>42,45)</sup>。

#### (4) 減圧調整式マイクロ波水蒸気蒸留

単なるマイクロ波を利用した精油抽出は、大気圧下での抽出であるため、含有精油成分の変質は避けられず、揮発性の高い物質の回収効率も低い。また大気圧下での抽出のため得られる精油の組成は一般的な水蒸気蒸留法と同じで画一的である。実用的には水蒸気蒸留法で得られた精油中には利用する上で問題になる物質や逆に有用性の高い物質が混在して含まれる場合がある。そのため精油をさらに蒸留して目的物質を再分画する操作が別途必要となることもあり、その場合、結果的にはコスト高や成分の変質を招く恐れがある。そこでこれらの問題点を解消するために、減圧条件下にて熱源にマイクロ波を利用した新規な水蒸気蒸留法の開発を試みた。その結果、一般的な水蒸気蒸留法に比べ

表3 各抽出法の電力消費量等の違いについて<sup>42,45)</sup>

#### オレンジピールの場合

|             | 水蒸気蒸留 | マイクロ波水蒸気蒸留 |
|-------------|-------|------------|
| 精油の収率 (%)   | 0.39  | 0.42       |
| 抽出時間 (分)    | 180   | 30         |
| 電力消費量 (kWh) | 4.33  | 0.25       |

#### タイム葉の場合

|             | 水蒸気蒸留 | マイクロ波水蒸気蒸留 |
|-------------|-------|------------|
| 精油の収率 (%)   | 0.16  | 0.16       |
| 抽出時間 (分)    | 270   | 30         |
| 電力消費量 (kWh) | 4.5   | 0.25       |

て精油採取効率が高いこと、精油含有成分を選択的に抽出することが可能であること、特に揮発性の高い物質を効率的に抽出することが可能であること、低含水率の採取残渣が得られることが判明しており、従来にないすばらしい特性が見いだされている。以下は、我々が最近開発した減圧式マイクロ波水蒸気蒸留法による樹木精油の抽出に関するものである<sup>46)</sup>。

減圧式マイクロ波水蒸気蒸留装置 (Vacuum Microwave Assisted Steam Distillation (VMSD), 以下 VMSD 法と呼ぶ) の概略を図4に示した。装置の主な構成は抽出槽、マイクロ波発振装置、減圧ポンプ、冷却装置である。マイクロ波周波数は 2.45GHz、最大供給出力は 1000W のものを 6 機用いた。抽出槽の容量は 1350L である。

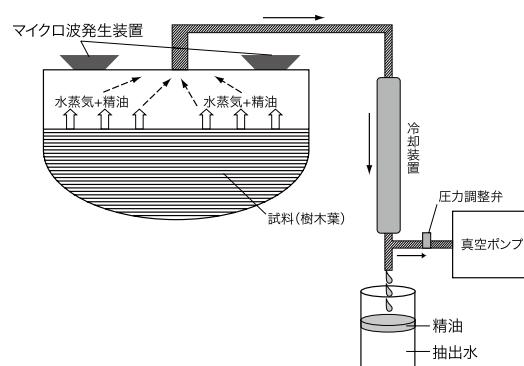


図4 減圧式マイクロ波水蒸気蒸留装置 (VMSD)

表4は、スギ、ヒノキ、トドマツの葉から抽出された精油及び抽出水の収率を試料の生重量あたりの割合で示している。本抽出条件で得られる精油量は3樹種ともにVMSD法の方が水蒸気蒸留法(Steam distillation, 以下SD法と呼ぶ)より低い結果となっている。精油の抽出時間はその抽出量に影響するため、精油の収率の差は抽出時間の相違が一因であると考えられる。しかしオレンジピールに対する大気圧下でのマイクロ波水蒸気蒸留法の抽出結果では、わずか30分で180分の水蒸気蒸留法と同等量の精油が抽出されたという研究例<sup>44)</sup>があり、マ

イクロ波水蒸気蒸留法の抽出速度の速さが窺えるが、このことは本実験結果と矛盾した結果となる。そこでVMSD法抽出残渣のSD法による精油の割合を検討したところ、VMSD抽出残渣中に未抽出の精油が残存していることがわかっている(表4)。これらの結果から水蒸気蒸留法で得られる精油成分の内、VMSD法により、ある種の成分のみが短い時間の間に効率的に抽出・分離されているのではないかと考えられた。

またVMSD法で得られる抽出水の量は22~28%(試料の生重量あたりの割合)であり、精油量ほど樹種間で大差はないことが判明している。マイクロ波の出力が同じである場合、蒸発する水分量は同程度になると考えられ、従って葉から得られる抽出水の抽出量も同程度になったのではないかと考えられた。

#### a. 精油の組成

スギ葉から得られた精油成分の分析結果を図5、6に示している。SD法による精油の組成は

表4 精油、抽出水の収率  
(%)

|      | VMSD |     | SD  |                |
|------|------|-----|-----|----------------|
|      | 精油   | 抽出水 | 精油  | VMSD残渣<br>中の精油 |
| スギ   | 0.4  | 22  | 0.8 | 0.4            |
| ヒノキ  | 0.7  | 26  | 1.6 | 0.8            |
| トドマツ | 1.7  | 28  | 2.3 | 0.5            |

\* 数値は試料の生重量あたりの割合を示す。

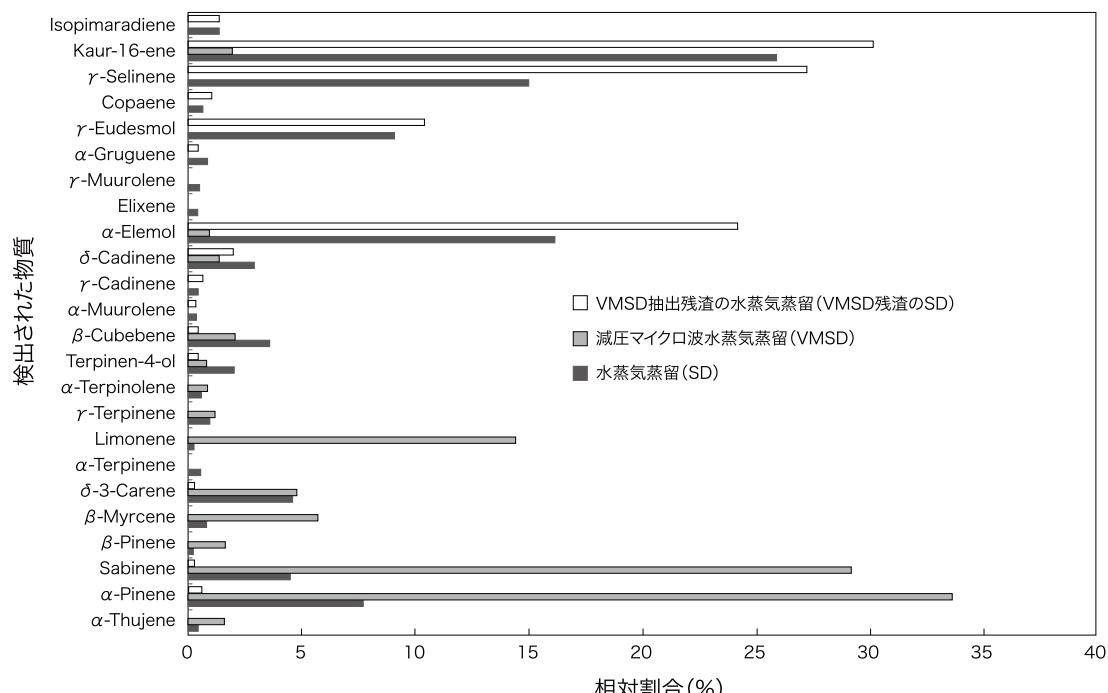


図5 スギ葉から得られる精油の組成

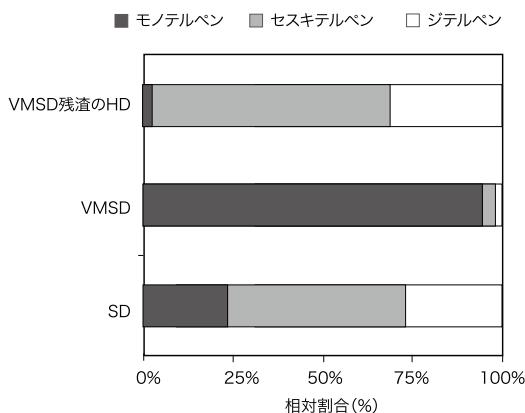


図6 スギ葉から得られるテルペン類の概要

モノテルペン類 23%, セスキテルペン類 50%, ジテルペン類 27% である。含有率の多い物質としては kaur-16-ene,  $\alpha$ -elemol,  $\alpha$ -pinene などであった。それに対して VMSD 法で得られた精油の組成は  $\alpha$ -pinene, sabinene, limonene などのモノテルペン類が多く、総計で 94% を占めていた。さらに VMSD 抽出残渣から SD 法

により得られた精油の組成は、モノテルペン類がほとんど検出されず、 $\alpha$ -elemol,  $\gamma$ -eudesmol,  $\gamma$ -selinene などのセスキテルペン類と kaur-16-ene などのジテルペン類が全体の 95% 以上を占めていた。このことは本実験条件における VMSD 法によりスギ葉精油中から揮発性の高いモノテルペン類が選択的に抽出されたことを意味しており、抽出工程において植物体から抽出と分画が同時に行われたと考えることができた。

ヒノキ葉から得られた精油成分の分析結果を図7, 8 に示した。SD 法による精油の組成はモノテルペン類 33%, セスキテルペン類 58%, ジテルペン類 9% であった。含有率の多い物質としては  $\alpha$ -eudesmol, elemol,  $\gamma$ -eudesmol などであった。これに対して VMSD 法で得られた精油の組成は sabinene, limonene,  $\alpha$ -terpinyl acetate などのモノテルペン類が多く、総計で 93% を占めていた。さらに VMSD 抽出残渣から SD 法により得られた精油の組成はモノテル

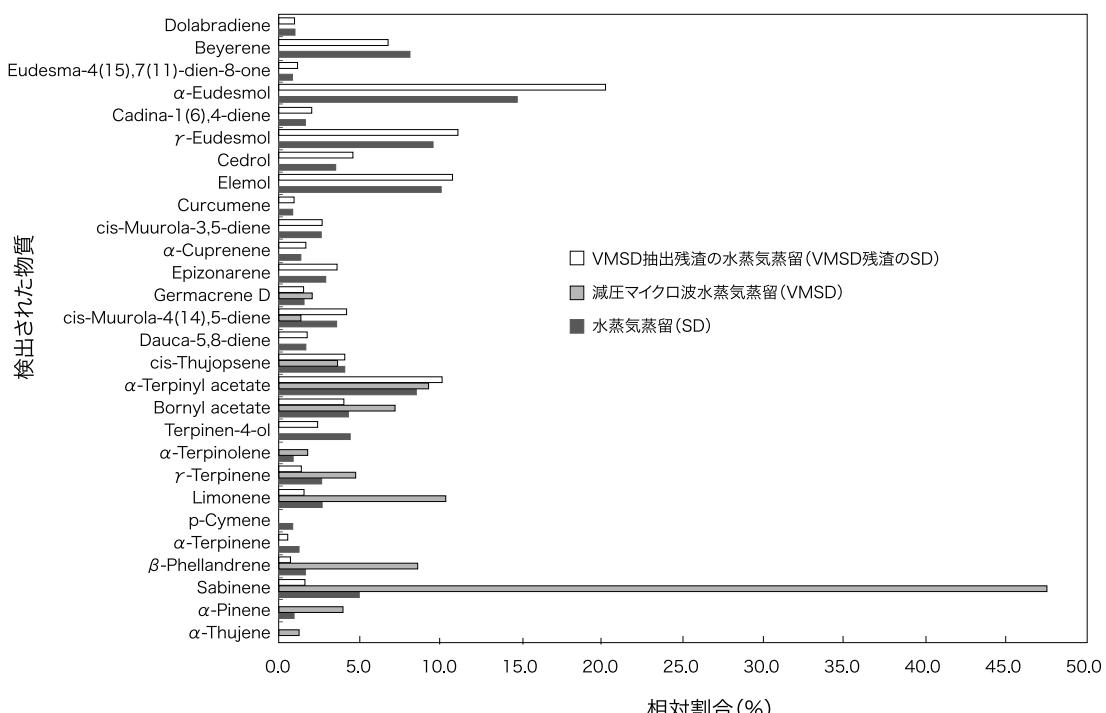


図7 ヒノキ葉から得られる精油の組成

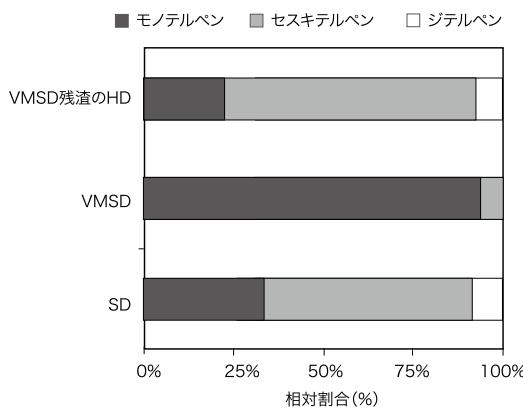


図8 ヒノキ葉から得られるテルペン類の概要

ペン類は少なく8%で、割合の最も高かったのは $\alpha$ -eudesmol,  $\gamma$ -eudesmol, elemolなどのセスキテルペン類と dolabradieneなどのジテルペン類であった。これらの傾向はスギと同様であった。

トドマツ葉から得られた精油成分の分析結果を図9, 10に示した。SD法による精油の組成はモノテルペン類98%, セスキテルペン類2%であった。含有率の多い物質としては bornyl acetate, camphene,  $\alpha$ -pineneなどであった。こ

れに対してVMSD法で得られた精油の組成は $\alpha$ -pinene, camphene,  $\beta$ -phellandreneなどのモノテルペン類が多かった。またVMSD抽出残渣からSD法により得られた精油の組成はモノテルペン類が87%が多いが、セスキテルペン類も13%含まれていた。

以上のようにトドマツではスギやヒノキとは異なりSD法により得られた精油において揮発性の高いモノテルペン類が多いが、VMSD法ではさらにその割合が増加しており、また含有成分において割合の多い物質は $\alpha$ -pineneなどの特に揮発性の高い物質であり、組成の特徴がSD法による精油とは異なっていた。

#### b. 抽出水の有機物組成

抽出水はいずれもさわやかな芳香を持ち、無色透明である。しかしながら、抽出水に含まれる有機物の割合はスギで0.24%, ヒノキで0.13%, トドマツで0.1%であり、極めて微量であった。スギ葉からVMSD法により得られた抽出水中の有機物の組成を表5に示した。含有割合の多い物質としては、terpinen-4-olが7割

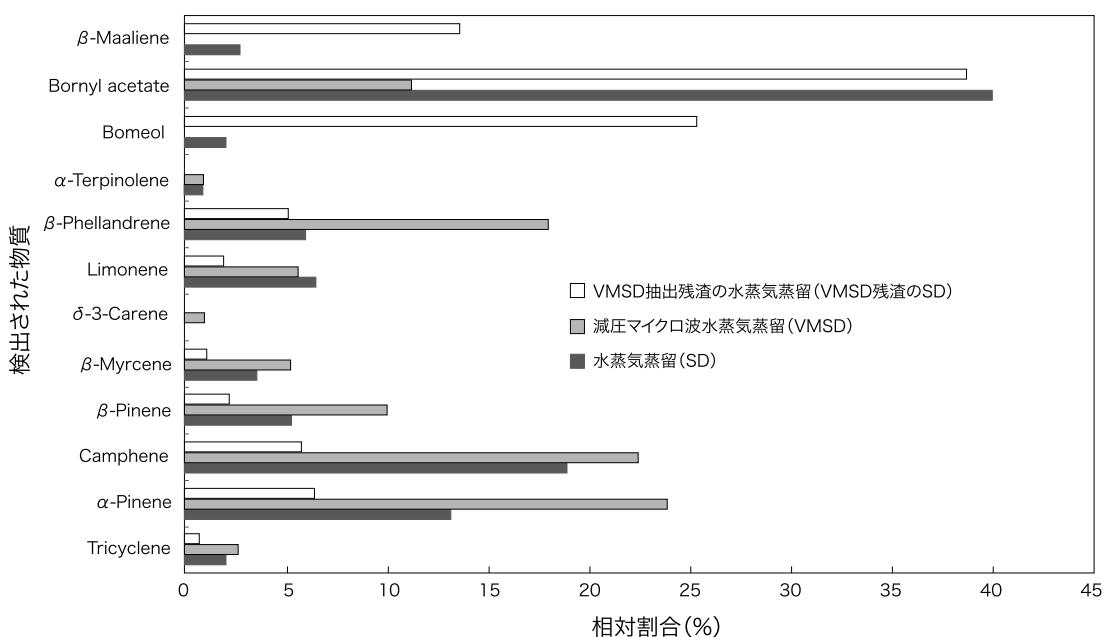


図9 トドマツ葉から得られる精油の組成

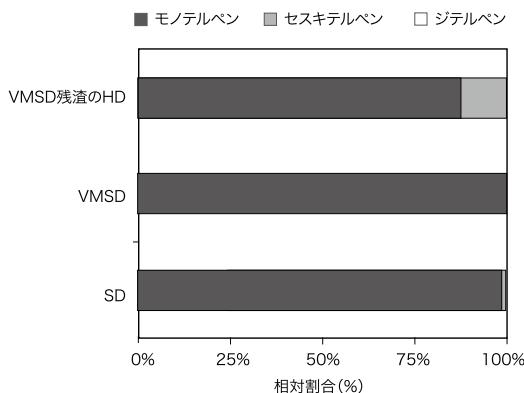


図 10 トドマツ葉から得られるテルペニ類の概要

程度を占めており、他に *cis*-3-hexen-1-ol などが検出された。抽出水から検出された物質の多くは精油中からも検出されているが、精油中からは検出されていない *cis*-3-hexen-1-ol なども存在していた。

ヒノキ葉から VMSD 法により得られた抽出水中の有機物の組成を表 6 に示した。含有割合の多い物質は、スギ同様に terpinen-4-ol などの水溶性の比較的高い物質であった。スギと同じように抽出水から検出された物質は精油中からも複数検出されている。

トドマツ葉から VMSD 法により得られた抽出水中の有機物の組成を表 7 に示した。含有割合の多い物質として *cis*-3-hexen-1-ol, borneol, maltol, 1-hexanol などが検出された。

*cis*-3-hexen-1-ol, borneol は他の 2 樹種の抽出水

表 5 VMSD 法により得られた抽出水の有機物組成 (スギ葉)

| 化合物                      | 相対割合 (%) |
|--------------------------|----------|
| <i>cis</i> -3-Hexen-1-ol | 4.2      |
| 1-Hexanol                | 1.4      |
| 1-Octen-3-ol             | 2.6      |
| $\beta$ -Linalool        | 2.0      |
| Terpinen-4-ol            | 73.8     |
| $\alpha$ -Terpineol      | 2.5      |
| $\alpha$ -Elemol         | 1.8      |
| $\gamma$ -Selinene       | 2.2      |
| $\gamma$ -Eudesmol       | 9.4      |

からも検出されているが、maltol, 1-hexanol はトドマツ葉において特異的であった。

*cis*-3-hexen-1-ol は青葉アルコールとも呼ばれる物質で、さわやかな青くさい香りと表現される物質である<sup>47)</sup>。本物質は水蒸気蒸留法で得られる樹木由来の精油成分としては検出された例はほとんどないが、VMSD 法により得られる抽出水中に多く含まれていたことは興味深

表 6 VMSD 法により得られた抽出水の有機物組成 (ヒノキ葉)

| 化合物                            | 相対割合 (%) |
|--------------------------------|----------|
| <i>cis</i> -3-Hexen-1-ol       | 3.8      |
| 1-Hexanol                      | 0.6      |
| 1-Octen-3-ol                   | 2.4      |
| <i>cis</i> -p-Menth-2-ene-1-ol | 2.0      |
| $\gamma$ -Terpinene            | 1.9      |
| Camphene hydrate               | 0.4      |
| Borneol                        | 1.3      |
| Terpinen-4-ol                  | 70.2     |
| $\alpha$ -Terpineol            | 3.7      |
| Bornyl acetate                 | 8.0      |
| Terpinolene                    | 5.1      |
| Thujopsene                     | 0.7      |

表 7 VMSD 法により得られた抽出水の有機物組成 (トドマツ葉)

| 化合物                                | 相対割合 (%) |
|------------------------------------|----------|
| n-Hexanol                          | 1.51     |
| 3z-Hexenol                         | 9.22     |
| Acetic acid                        | 0.57     |
| <i>cis</i> -Linalool oxide         | 0.55     |
| Camphor                            | 1.67     |
| Linalool                           | 0.76     |
| <i>cis</i> -para-Menth-2-en-1-ol   | 0.54     |
| Bornyl acetate                     | 5.90     |
| Fenohol                            | 0.49     |
| Camphene hydrate                   | 0.82     |
| Terpinen-4-ol                      | 1.46     |
| <i>trans</i> -para-Menth-2-en-1-ol | 0.64     |
| $\alpha$ -Terpineol                | 17.50    |
| Isobomeol                          | 0.39     |
| Borneol                            | 27.07    |
| Hexanoic acid                      | 0.46     |
| Cymen-9-ol                         | 0.57     |
| Hexenoic acid                      | 1.55     |
| Maltol                             | 27.16    |
| Gurjunene                          | 1.14     |

い。ハーブに対する水蒸気蒸留法により精油とともに得られる抽出水から検出された例<sup>48)</sup>もあることから、樹木葉部からも一般的な水蒸気蒸留法により抽出され、抽出水中に検出される可能性があると考えられる。

以上のように樹種間で検出される物質の種類は異なるが、共通していることとしては、抽出水中の有機物として検出された物質はアルコール系化合物（OH基を有する物質）の割合が多いこと（抽出水に含まれる有機物の中に占めるアルコール系化合物の割合：スギ（90.6%）、ヒノキ（80.2%）、トドマツ（94.8%））であった。水蒸気蒸留において精油とともに得られる抽出水にはアルコール系化合物（OH基を有する物質）の割合が多い傾向にあることが知られている<sup>48-51)</sup>。これは精油に豊富に存在するテルペン系炭化水素やエステル類は水に難溶性であり、一方、アルデヒド、アルコール、ケトン、フェノール系化合物は水に比較的易溶性であるためであると考えられている<sup>52, 53)</sup>。これらのことことが本実験において精油成分の組成と抽出水中の有機物の組成が異なっていた要因であると考えられる。

抽出水は精油に比べて多量に得られる（精油の約25倍量）。組成は殆どが水であるが、微香を有しており、また最近の研究で抗ウイルス作用、抗菌活性の強いものも見いだされており<sup>54)</sup>、消毒剤としても有望な素材である。

### c. VMSD法による抽出残渣

VMSD法による抽出残渣の含水率は抽出原料の重量と抽出時間に依存される。今回の実験条件においては単位抽出時間に対する抽出原料の重量は前述の通り1時間当たり30～35kgであり、大きな差はなかった。3樹種の抽出残渣の含水率は20%から30%の間であった。一般的なHD法の場合、抽出残渣の状態は水分を大量に含んだ状態であり、抽出後の処理において水分の除去などが必要であり課題が多かった。

一方VMSD法の場合、本実験の結果のように抽出残渣の含水率は低く、このままの状態でペレットなどの製造には適した状態にあると考えられる<sup>55)</sup>。参考までに発熱量を測定してみるとスギ葉抽出残渣4945kcal/kg、トドマツ葉抽出残渣で4800kcal/kgとなり、一般的な木質ペレットのそれ<sup>56)</sup>よりも高かった。このことから抽出残渣は燃料素材として有望であると考えられる。さらに、抽出残渣は悪臭成分の消臭活性が高いことが挙げられる。例えばトドマツ葉抽出残渣を用いた場合、アンモニアやトリメチルアミン等に対する消臭活性が極めて高い（図11）。数10ppmの試験ガスの存在下では実験開始後10分で約80%の除去率を示した。ただし、全ての消臭対象物質について活性が高いわけではない。メチルメルカプタンやキシレンなどに対する消臭活性はそれほど高くない（図12）。これらの悪臭成分に対する消臭活性を向上させるために、抽出残渣の炭化処理を行ったところ、未炭化の状態では消臭活性が低かったものが、高い消臭活性を示すようになった。消臭機構は現在研究中であるが、炭化処理による表面の化学構造の改変が要因の一つではないかと考えている<sup>57)</sup>。様々な悪臭物質が存在する実用的な場面を考慮すると、炭化物と未炭化物のブレンド化が重要となりそうだ。このように枝葉の抽

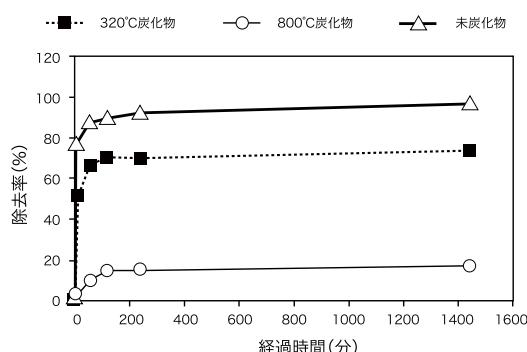


図11 抽出残渣によるアンモニアに対する消臭活性

\* 除去率(%) = [(試験ガスのプランク値 - 供試試料使用時の測定値) / 試験ガスのプランク値] × 100

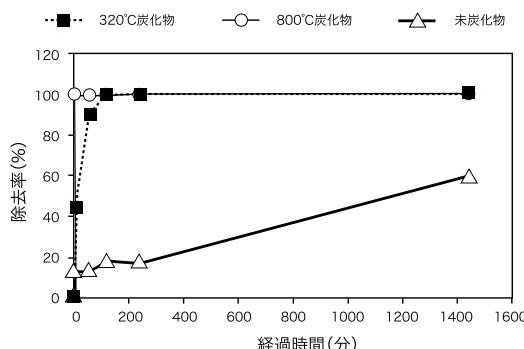


図 12 抽出残渣によるメチルメルカプタンの消臭活性

\* 除去率 (%) = [(試験ガスのブランク値—供試試料 使用時の測定値) / 試験ガスのブランク値] × 100

出残渣は簡単な炭化処理を経て有望な消臭剤素材として活用が期待できる。これは現在殆ど未利用である林地残材を原料として、まずは精油等の香り成分を抽出し、次いで抽出残渣を燃料や消臭素材として活用するもので、資源のカスケード利用にもつながる。

#### d. 実用的規模での VMSD 法による抽出

表 8 は減圧式マイクロ波水蒸気蒸留法と一般的な水蒸気蒸留法との比較をまとめたものである。本法は①廃液が少なく、残渣の直接利用が可能であるなど環境配慮型であること、②エネ

ルギーコストが低く、省エネルギー型であること、③減圧条件の調整が自由にできるので、目的とする成分を選択的に抽出と同時に分画でき効率的であるこの利点があるため、企業などにとってもたいへん魅力的な方法である。我々は現在、企業と共同で北海道にて実用的規模で精油の大量抽出を開始している(図 13, 14)。精油含量の多いトドマツ葉(約 500kg)から精油 4L、微香を有する抽出水 100L をわずか 100 分で採取することが可能となっている。精油採取に要する消費エネルギーを比較すると、一般的な水蒸気蒸留法の 1/4 程度であり、製造コストの低減化が大幅に達成できている。得られた精油の機能を活かした商品の開発も進みつつある。日本は国土の約 7 割が森林が占める世界有数の森林国であり<sup>58, 59)</sup>、昨今のバイオマスブームにおいて、森林資源が注目される。利用可能な森林資源の中では、利用率が最も少ないのは枝葉などの林地残材である(図 15)<sup>60)</sup>。従って、それらの利用法の開発は、重要な課題となっている。本法を用いれば、枝葉から付加価値の高い精油などを抽出し、抽出残渣は燃料や他の用途に使用するといった総合利用が可能になるため、有力な手段となるであろう。しかしながら、

表 8 水蒸気蒸留法と減圧式マイクロ波水蒸気蒸留法の比較

|        | 水蒸気蒸留法 (SD)                                   | 減圧マイクロ波水蒸気蒸留法 (VMSD)                                                                       |
|--------|-----------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| 抽出時間   | 長い<br>◎4 ~ 8 時間                               | 短い<br>◎0.4 ~ 2 時間 (省エネルギー型)                                                                |
| 抽出物の組成 | 抽出選択性無<br>◎大気圧、100°C 固定加熱による変質大<br>別途蒸留等の分画必要 | 抽出選択性有<br>◎圧力 (-0.8 ~ -0.2 気圧)、温度 (40-100°C) 可変<br>低温抽出可能 (変質小)<br>抽出と同時に分画可 (目的物質の選択的抽出可) |
| 抽出廃液   | 多い<br>◎植物体の水分 + 水蒸気<br>別途処理が必要                | 少ない<br>◎植物体中の水分のみ<br>(環境配慮型)<br>植物体の水分 (天然物 100%)                                          |
| 抽出残渣   | 高含水率 (70% 以上)<br>利用するには乾燥が必要                  | 低含水率 (30% 以下)<br>抽出工程 = 乾燥工程<br>直接利用可能                                                     |

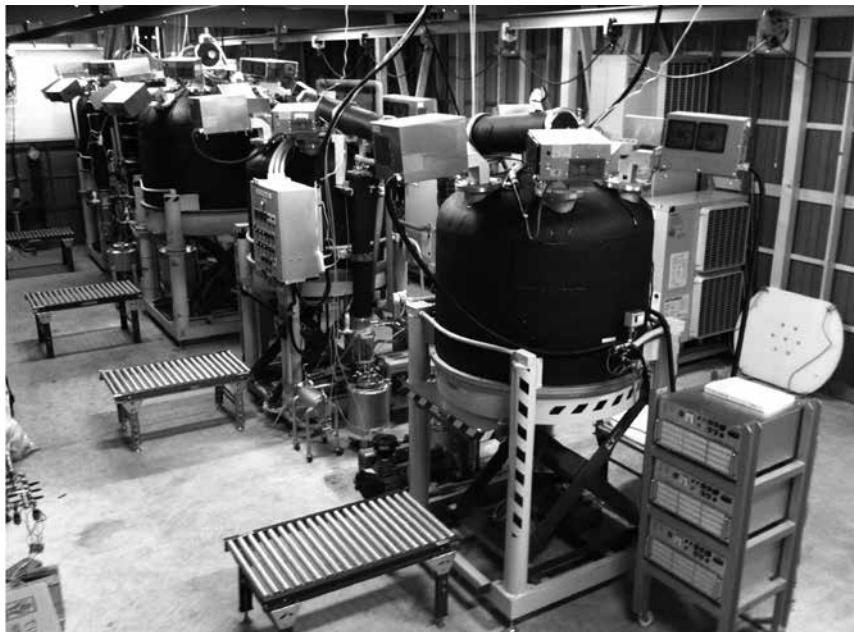


図 13 減圧式マイクロ波水蒸気蒸留法による精油の大量抽出



マイクロ波発生装置



大型チラー



油水分離装置

図 14 減圧式マイクロ波水蒸気蒸留法（装置の概観）

事業化にとって最も重要なことは原料となる植物体の収集・運搬システムの確立であろう。原料としては草本類から木本類まで多岐にわたるため、収集・運搬の方法もケースバイケースであろう。柑橘類の果皮であれば、食品加工工場にて大量収集が可能であるが、林地残材は伐採現場まで行かないと入手できない。これらの原料の収集・運搬システムの構築とともに精油の抽出、精油の実用化、抽出残渣の有効利用が事業として一体化できれば、新しい森林ビジネス

モデルとして面白いかもしれない（図16）。今後の進展が楽しみである。

### おわりに

よりよい成分を入手するためには、抽出技術だけがいくら進歩してもうまくいかない。新鮮な抽出原料、それも安定して大量に入手する必要がある。抽出原料について最近の傾向をみてみると、一部の高価な香料原料となる花などの素材を除き、食品や切削加工残渣などの未利用資源を活用する例が増えている。このような背景には、環境への負荷を考慮するといった意向があると思われる。また、昨今のバイオマスブームにより国内のバイオマス資源の見直しといった動きも少なからずあるだろう。表9は国内のバイオマス資源の利用状況を示したものであるが、7割以上利用されているものがほとんどであるが、枝葉などの林地残材や食品廃棄物の利用率は極めて低い<sup>61)</sup>。その要因としては、こ

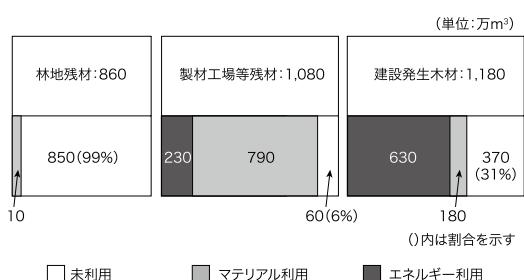


図15 発生場所別木質資源量と利用状況について

文献60)を参考にして作成

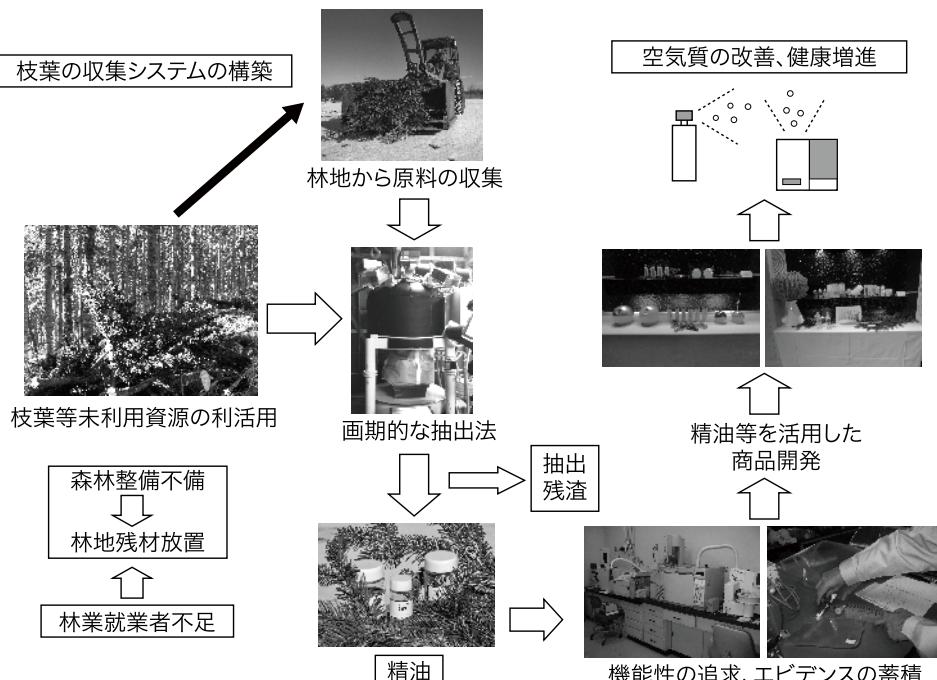


図16 森林ニュービジネスの創出へ

表9 国材のバイオマスの利用状況<sup>61)</sup>

| バイオマスの種類 | 発生量 * (万t/年) | 利用率 (%) |
|----------|--------------|---------|
| 家畜排せつ物   | 8800         | 90      |
| 下水汚泥     | 7800         | 77      |
| 黒液       | 1400         | 100     |
| 紙        | 2700         | 80      |
| 食品廃棄物    | 1900         | 27      |
| 製材工場等残材  | 340          | 95      |
| 建設発生材    | 410          | 90      |
| 農作物非食用部  | 1400         | 85      |
| 林地残材     | 800          | 殆ど未利用   |

\* 黒液、製材工場等残材、林地残材は乾燥重量、他は湿潤重量

のような未利用資源は燃料などとして活用するために必要な乾燥などの処理がコスト高であるためであろう。重要なことはお金をかけずに処理することである。前述のようにマイクロ波処理は素材の乾燥法である一方で成分抽出という働きも併せ持っている。香りなどの付加価値の高いものを生み出すことは、ゴミ同然の資源からお金を生むことになるわけで、新しいビジネスの芽となる。このような事業展開において重要なことは、原料をいかに効率的に収集するか、目的とする物質をいかに効率よく抽出するか、環境への負荷を考慮して、廃液、抽出残渣をい

かに少なくするかの3点であろう。この中で抽出技術は香り成分などの品質や組成などへの影響が大きく現れるので、最も重要である。できれば原料の収集—粉碎—抽出及び抽出残渣の処理までが一貫してできるシステム化され、さらには原料が栽培されている場所まで移動可能な移動式の装置の開発が理想である。今後ますます生活の豊かさが求められ、かつ環境に対する見方は厳しいものになると思われる。環境に優しくて効率的な乾燥法・成分抽出法として、マイクロ波等の技術はますます重要なものとなるだろう。

## 参考文献

- 1) 八杉龍一, 小関治男, 古谷雅樹, 日高敏隆:生物学辞典第四版, 岩波書店, 東京, p.1362, 2002.
- 2) 和田雄二, 竹内和彦監修:マイクロ波化学プロセス技術, シーエムシー出版(東京), 322p, 2006.
- 3) 越島哲夫, 真柄謙吾:マイクロ波を用いる木質系バイオマスの酵素的変換, 木材研究・資料, **24**: 1-12, 1988.
- 4) J.Azuma, F.Tanaka and T.Koshijima:Microwave irradiation of lignocellulosic materials.I., *Mokuzai Gakkaishi*, **30**: 501-509, 1984.
- 5) W.R.McAlister and H.Resh:Drying 1-inch ponderosa pine lumber with a combination of microwave power and hot air, *Forest Prod. J.*, **21**(3): 26-34, 1971.
- 6) 荒木邦夫, 三上正樹, 本田重司, 高野好平:木材ブロックのマイクロ波乾燥, 木材工業, **27**: 19-21, 1972.
- 7) A.L.Antti:Microwave drying of hardwood, *Forest Prod.J.*, **42**(6), 49-54, 1992.
- 8) M.Norimoto and J.Gril:Wood bending using microwave heating, *J.Microwave power and electromagnetic energy*, **24**(4): 203-212, 1989.
- 9) 須佐博典, 青柳敏郎, 林成実, 内山雅彦, 坂田昌裕:マイクロ波利用による家具用矯正装置の開発, 木材工業, **44**(4): 168-173, 1989.
- 10) M.Miura, H.Kaga, S.Tanaka, K.Takahashi, and K.Ando:Rapid microwave pyrolysis of wood, *J.Chem.Eng.Japan*, **33**(2): 299-302, 2000.

- 11) M.Miura, H.Kaga,T.Yoshida, and K.Ando:Microwave pyrolysis of cellulosic materials for the production of anhydrosugars, *J.Wood Sci.*, **47**: 502-506, 2001.
- 12) 独立行政法人工業所有権情報・研修館：特許流通支援チャート一般 15 食品乾燥加工技術, p.1-357, 2005.
- 13) マイクロ波応用技術研究会：初步から学ぶマイクロ波応用技術, 工業調査会, 東京, pp.192-211, 2004.
- 14) 渡辺正, 北島昌夫訳：グリーンケミストリー, 日本化学会, 化学技術戦略推進機構訳編, 丸善, 東京, 124pp, 1999.
- 15) S.de Konig, H.-G.Janssen and U.A.Th.Brinkman:Modern methods of sample preparation for GC analysis, *Chromatographia,Supplement*, **69**: S33-S75, 2009.
- 16) R.Gedye, F.Smith,K.Westaway,H.Ali,L.Boldisera,L.Laberge, and J.Rousell:The use of microwave ovens for rapid organic synthesis, *Tetrahedron Letters*, **27**(3): 279-282, 1986.
- 17) R.J.Giguere,T.L.Bray, and S.M.Duncan:Application of commercial microwave ovens to organic synthesis, *Tetrahedron Letters*, **27**(41): 4945-4948, 1986.
- 18) マグローヒル科学技術用語大辞典編集委員会：マグローヒル科学技術用語大辞典, 日刊工業新聞社, 東京 : 887-888, 1979.
- 19) DR.Banjoo and PK,Nelson:Improved ultrasonic extraction procedure for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments, *J.Chromatogr.A*, **1066**: 9-18, 2005.
- 20) C.Goncalves and MF Alpendurada:Assessment of pesticide contamination in soil samples from an intensive horticulture area, using ulyrasonic extraction and gas chromatography-mass spectrometry, *Talanta*, **65**: 1179-1189, 2005.
- 21) J.Wu, L.Lin and F-tim Chau:Ultrasaound-assisted extraction of ginseng saponins from ginseng roots and cultured ginseng cells, *Ultrason.Sonochem.*, **8**: 347-352, 2001.
- 22) SH.Rouhani,H.Valizadel, and SH.Salimi:Ultrasonic assisted extraction of natural pigments frion Rhizomes of Curcuma Longa L.,*Prog.Color Colorants Coat.*, **2**: 103-113, 2009.
- 23) E.Ali sandrakis,D.Daferera, P.A.Tarantilis,M.Poli siou, and P.C.Harizanis:Ultrasound-assisted extraction of volatile compounds from citrus flowers and citrus honey, *Food Chem.*, **82**(4): 575-582, 2003.
- 24) 沢村正義：精油抽出法, 特許第 3842794, 2005.
- 25) 沢村正義, 柏木丈拡, 田邊憲一：柑橘類搾汁後の残滓からのエココンシャスな精油抽出システムの開発 - 日本古来の柚子の有効利用について -, においてかおり環境学会誌, **43**(2): 102-111, 2012.
- 26) K.Ganzler, A.Salgo, and K.Valko:Microwave extraction A novel sample preparation method for chromatography, *J.Chromatogr.A*, **371**: 299-306, 1986.
- 27) L.Perreux and A.Loupy:A tentative rationalization of microwave effects in organic synthesis according to the reaction medium, and mechanistic considerations, *Tetrahedron*, **57**: 9199-9223, 2001.
- 28) J.R.J.Pare:Microwave assisted process for extraction and apparatus therefore, Canadian patent, CA2055390, 1992.
- 29) J.R.J.Pare, M.Sigouin, and J.Lapointe:Extraction de produits naturels assistee par micro-ondes, European patent, EP 398798, 1990.
- 30) J.R.J.Pare, M.Sigouin, and J.Lapointe:Microwave assisted natural product extraction, American patent, US5002784, 1991.
- 31) J.R.J.Pare:Microwave extractions of volatile oils, American patent, US5338557, 1994.
- 32) P.Mengal and B.Mompon:Procede et installation d'extraction sans solvant de produits par micro-ondes, International patent, WO 94/26853, 1994.
- 33) P.Mengal and B.Mompon:Procede et installation d'extraction sans solvant de produits naturels par micro-ondes, European patent, EP698076B1, 1996.
- 34) E.E.Stashenko, B.E.Jaramillo and J.R.Martinez:Analysis of volatile secondary metabolites from Colombian *Xylopia aromatic a* (Lamarck) by different extraction and headspace methods and gas chromatography, *J.Cromatogr.A*, **1025**(1): 105-113, 2004.
- 35) E.E.Stashenko, B.E.Jaramillo and J.R.Martinez:Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Columbia and evaluation of its *in vitro* antioxidant activity, *J.Cromatogr.A*, **1025**: 93-103, 2004.
- 36) A.A.Craveiro,F.J.A.Matos, J.W.Alencar, and M.M.Plumei:Microwave oven extraction of an essential oil, *Flavour. And Frag. J.*, **4**: 43-44, 1989.
- 37) F.Chemat, J.Snadia and M.E.Lucchesi:Extraction sans solvant assistee par micro-ondes de produits naturels,

- European patent, EP 1439218A1, 2004.
- 38) F.Chemat, M.E.Lucchesei and J.Swadja:Solvent-free microwave extraction of volatile natural substances. American patent, US2004/0187304A1, 2004.
- 39) F.Chemat and M.-E.Lucchesei:Microwave-assisted extraction of essential oils, in *Microwaves in organic synthesis*, Vol.2, A.Loupy Editor, WILEY-VCH, Weinheim, pp.959-985, 2006.
- 40) D.Kou and S.Mitra:Extraction of semivolatile organic compounds from solid matrices, in *Sample preparation techniques in analytical chemistry*, S.Mitra, Editor, WILEY-INTERSCIENCE, New Jersey, pp.139-182, 2003.
- 41) M.Letellier and H.Budzinski:Microwave assisted extraction of organic compounds, *Analisis*, **27**: 259-271, 1999.
- 42) M.A.Ferhat,B.Y.Meklati, J.Smadja, and F.Chemat:An improved microwave Clevenger apparatus for distillation of essential oils from orange peel, *J.Chromatogr. A.*, **1112**(1-2); 121-126, 2006.
- 43) M.E.Lucchesei,J.Smadja, S.Bradshaw, W.Louw, and F.Chemat:Solvent free microwave extraction of *Elletaria cardamomum L.*: A multivariate study of a new technique for the extraction of essential oil, *J.Food Eng.*, **79**(3): 1079-1086, 2007.
- 44) F.Chemat,M.E.Lucchesei, J.Smadja, L.Favretto, G.Colnaghi, and F.Visinoni:Microwave accelerated steam distillation of essential oil from lavender : A rapid, clean and environmentally friendly approach, *Anal. Chim. Acta*, **555**(1): 157-160, 2006.
- 45) M.E.Lucchesei,F.Chemat and J.Smadja:Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation, *J Chromatogr.A*, **1043**(2): 323-327, 2004.
- 46) 大平辰朗, 松井直之, 金子俊彦, 田中雄一:減圧式マイクロ波水蒸気蒸留法による樹木精油の効率的抽出, *AROMA RESEARCH*, **11**(2): 148-155, 2010.
- 47) 畑中顯和:みどりの香りの研究—その神秘性にせまる, においてかおり環境学会誌, **38**(6): 415-427, 2007.
- 48) A.Fleisher and Z.Fleisher:Water-Soluble Fractions of the Essential Oils, *Perfumer & Flavorist*, **16**: 37-41, 1991.
- 49) P.M.Bohra,A.V.Vaze and V.G.Pangarkar: Adsorptive Recovery of Water Soluble Essential Oil Components, *J.Chem.Tech.Biotechnol.*, **60**: 97-102, 1994.
- 50) K.W.Machale,K.Niranjan and V.G.Pangarkar: Recovery of dissolved essential oils from condensate waters of basil and *Mentha arvensis* distillation, *J.Chem.Tech.Biotechnol.*, **69**: 362-366, 1997.
- 51) B.R.R.Rao,P.N.Kaul, A.K.Bhattacharya, D.K.Rajput, K.V.Syamasundar, and S.Romesh:Comparative Chemical Composition of Steam-Distilled and Water-Soluble Essential Oils of South American Marigold (*Tagetes minuta* L.), *J.Essent.Oil*, **18**: 622-626, 2006.
- 52) J.D.Weidenhamer, F.A.Macias, N.H.Fischer, and G.B.Williamson:Just how insoluble are monoterpenes?, *J. Chem. Ecol.*, **19**(8): 1799-1807, 1993.
- 53) I.Fichan,C.Larroche and J.B.Gros:Water Solubility, Vapor Pressure, and Activity Coefficients of Terpenes and Terpenoids, *J.Chem.Eng.*, **44**(1): 56-62, 1999.
- 54) 大平辰朗, 松井直之, 金子俊彦, 田中雄一:減圧式マイクロ波水蒸気蒸留法により得られる樹木葉抽出水の機能性, 第 61 回日本木材学会大会研究発表要旨集, M19-P-AM31, 2011.
- 55) 斎藤尚子:岩手大学修士論文, p.22, 2005.
- 56) 日本住宅・木材技術センター:木質ペレットのすすめ, p.11, 2009.
- 57) 大平辰朗, 松井直之, 金子俊彦, 田中雄一:精油抽出残渣の有効利用 I—減圧式マイクロ波水蒸気蒸留法による葉部抽出残渣の消臭活性等—, 第 62 回日本木材学会大会研究発表要旨集, Q15-P-PM18, 2012.
- 58) 林野庁:平成 22 年度森林・林業白書, 東京 : pp.55-56, 2011.
- 59) FAO: State of world's Forests 2009, 2009 世界森林白書
- 60) 林野庁:木質バイオマスの新利用技術アドバイザリーグループ第 1 回会合「資料 2」
- 61) 農林水産省:バイオマス活用推進基本計画, 2010.

# サルナシの抗発癌・抗炎症機能性

有元 佐賀恵\* 沖増 侑磨\* 西村 麻里\*

\*ARIMOTO Sakae, OKIMASU Yuma, NISHIMURA Mari (岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 分子毒性薬科学)

Key Words: サルナシ・発癌物質・抗発癌・抗酸化・抗変異

## はじめに

サルナシ（猿梨, *Actinidia arguta*）はマタタビ科マタタビ属に属し、日本、朝鮮、中国などに分布する蔓性の落葉樹である。6月下旬頃に花をつけ、9月上旬から10月中旬には2～3cm程度の緑色無毛で特徴的な芳香を持つ果実をつけ、食べ頃を迎える（図1）。熟したサル



図1 栽培中のサルナシ果樹

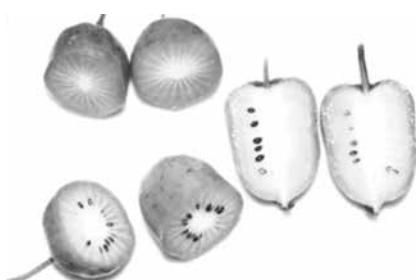


図2 サルナシ果実断面

ナシの実は生食に適するほか、ジュース・ジャムなどの加工品やアルコール発酵させたサルナシワイン等が開発されている。果実断面（図2）に見られるとおり、黒い種子を含むが、種ごと生食できる。

サルナシは山地に自生するが、一部は栽培もされており、「光香（みつこう）」「峰香（ほうこう）」などの栽培品種がある。近縁種にはキウイフルーツ（kiwifruit, 学名：*Actinidia deliciosa* あるいは *Actinidia chinensis*）がある。キウイフルーツは原種がマタタビ科マタタビ属のシナサルナシであるが、果実はサルナシの方が小ぶりで果実の周りに毛は生えていない点が異なる（図3）。

サルナシの果実や葉、茎抽出物はアジア諸国で伝承薬として使われ、たとえば韓国では果実



図3 (左) キウイフルーツ、(右) サルナシ

が利尿や熱、黄疸、消化不良に対して使用されてきた<sup>1,2)</sup>。しかしこれまで、サルナシによる、抗発癌に関する報告はなく、発癌物質によるイニシエーション活性やプロモーション活性などの多段階発癌に対する抑制または阻害作用を示す物質が果汁中に存在するか否かは知られていない。

本研究では、サルナシ果汁およびその成分による、発癌予防について検討を行った。

## 1. 癌と癌予防：イントロダクション

発癌の原因については疫学研究などにより、食生活や環境などの要因が大きいことが知られている。例えば1990年の調査<sup>3)</sup>では、日本人では胃がんの発生率が高いのに対して前立腺癌の発生率は低いが、ハワイやブラジルの白人では逆に胃癌はわずかで前立腺癌が多い。日系移民では同じ日本人の遺伝子を持つにもかかわらず、胃癌の発生率は低くなり、前立腺癌の発生率が上がり、むしろハワイやブラジルの白人のパターンになることが知られている。これは、発癌には遺伝因子の関与は低く、食生活などの生活環境因子の関与が大きいことを示しており、言い換えれば、食事などの食生活改善が発癌予防につながりうることを示している。

発癌的主要要因として、1996年の報告<sup>4)</sup>では、成年期の食事や肥満が30%、喫煙が30%、運動不足5%、感染5%、アルコール3%などとなっ

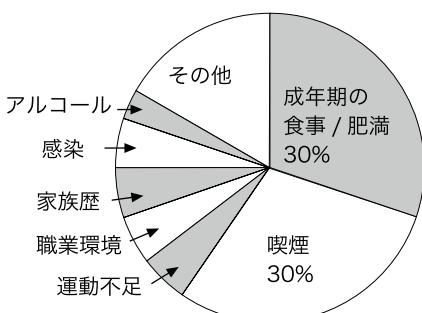


図4 ヒトの癌の原因

ている（図4）。その後の研究でピロリ菌の感染と胃癌との関わりが明らかとなつたため、感染の寄与はもっと高いと言われている。いずれにしても食事が主要要因であることに間違いがなく、食環境における発癌因子と癌予防因子の解明が重要である。

発癌とは、正常細胞が変異して癌細胞に変わることにより起きることが知られている。すなわち、正常細胞が潜在的腫瘍細胞に変化する不可逆的な段階である「イニシエーション」と、潜在的腫瘍細胞がクローナルに増殖し、最終的には悪性化する可逆的な段階である「プロモーション」などの複数の段階からなり、発癌イニシエーション、プロモーション作用を持つ化学物質を、それぞれ「発癌イニシエーター」、「発癌プロモーター」と呼ぶ。また、プロモーター作用とは複雑な細胞内シグナル伝達と遺伝子発現制御機構であることが明らかとなり、現在では、発がんには複数の遺伝子の順次変化が必要であるとする「多段階発癌説」が広く受け入れられている。従って、癌予防には発癌段階のどこかを標的として抑制・阻害し、正常細胞から癌細胞への進展を止めることが重要である（図5）。望ましくは、発癌物質による多段階発癌過程の2以上の過程における抑制活性、少なくともイニシエーション活性及びプロモーション活性を効果的に抑制する物質を開発できれば、癌予防に有用な食品や薬品開発につながると考えられる。

イニシエーション段階における発癌物質の作

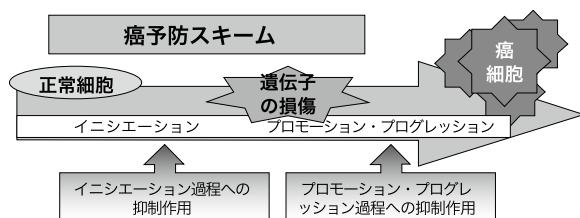


図5 多段階発癌と癌予防

用には、1) 発癌性物質による遺伝毒性、2) 発癌性物質によるDNAへの化学修飾、3) 酸化ストレス等があり、これらを抑制するかどうかが、癌予防効果に対する指標となりうる。加えて、発癌性物質は体内の酵素による代謝を受けた結果、活性化する場合もあり、発癌性物質を活性化する代謝酵素の阻害も癌予防のターゲットとなりうる。

また、プロモーション段階においては、1) 慢性炎症や、2) 酸化ストレス等の関与があり、これらの抑制効果物質に発癌プロモーション抑制を期待できる。

本稿では、サルナシ果汁による多段階発癌の抑制効果の研究成果を説明し、さらに、有効成分分析の途中経過ならびに、サルナシ成分による発癌予防効果について述べる。

## 2. 研究成果

### 2-1. 発癌のイニシエーションに対するサルナシ成分の抑制効果

#### 2-1-1. 試験官内 (*in vitro*) 研究：遺伝毒性に対する抑制

発癌物質の遺伝毒性試験として、細菌を用いる変異原性試験（エイムス試験）が広く行われている<sup>5)</sup>。そこで、いくつかの代表的な発癌物質としてジメチルベンツアントラセン（DMBA）、アフラトキシンB1、ベンツ(a)ピレン（B(a)P）、MeIQx、PhIP、Trp-P-2を選んで、その遺伝毒性をサルナシ成分が抑制するかどうかを研究した。DMBAは代表的な発癌実験である二段階発癌モデルにおいて、イニシエーションを起こさせる物質として使われている。アフラトキシンB1（aflatoxin B1）はカビ毒であり、最強の発癌物質として知られる。B(a)Pは煤煙に含まれる発

癌物質で、世界で初めて実験的に発癌を引き起こすことに成功したコールタールの有効成分としても知られる。また、MeIQx、PhIP、Trp-P-2は食品の焼けこげに含まれるヘテロサイクリックアミンと総称される発癌物質で、食生活における発癌要因として知られる<sup>6)</sup>。抗変異原性の検出方法の詳細は引用文献に譲る<sup>7)</sup>。

これらの遺伝毒性を100%として、そこにサルナシ果汁を共存させると、いずれの発癌物質の遺伝毒性も抑制され、10%以下になり、アフラトキシンB1とMeIQx、PhIP、Trp-P-2の遺伝毒性は0%つまり陰性対照値まで下がった（図6）。

以上から、サルナシ果汁は調べた発癌物質6種すべての遺伝毒性を抑制することが分かった。

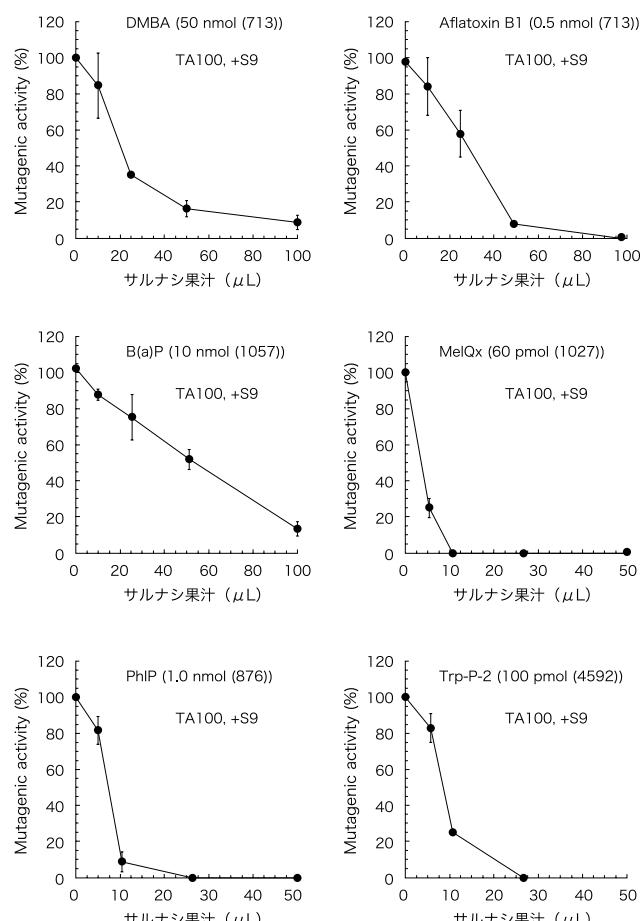


図6 サルナシ果汁による、発癌物質の遺伝毒性抑制

## 2-1-2. 試験官内 (*in vitro*) 研究：発癌物質の活性化に対する抑制

次いで、発癌性物質を活性化する代謝酵素に対する、サルナシ果汁の阻害効果を研究した。上記で調べた発癌物質はいずれもそのままの化学構造では毒性を発揮しないが、体内に入つて酵素系で代謝され化学変化を受けると発癌性を持つようになる。この代謝的活性化を行う酵素はチトクロム P450 と総称される酵素群が代表的であるが、それぞれに基質特異性があり、DMBA や B(a)P などは CYP1A1 酵素が働き、ヘテロサイクリックアミン類は CYP1A2 酵素が活性化する。そのため、CYP1A1 および CYP1A2 酵素は発癌物質の活性阻害のためのターゲットの一つと見なされている<sup>8)</sup>。CYP1A1 および CYP1A2 酵素の活性はそれぞれエトキシレゾルフィン脱エチル化 (EROD) 活性、メトキシレゾルフィン脱メチル化 (MROD) 活性を指標として評価される。そこで、サルナシ果汁が EROD および MROD 活性を抑制するかどうかを指標として、サルナシ果汁が発癌物質活性化能を抑制するかどうかを研究した。その結果、ラットより調製した CYP1A1 および CYP1A2 酵素を含む分画 (S9 分画) の EROD および MROD 活性をそれぞれ 1 として、反応にサルナシ果汁を共存させると、酵素活性はサルナシ果汁の用量依存的に減少し、0 まで減少した (図 7)。従って、サルナシ果汁は、発癌物質の代謝活性化を抑制して、発癌物質を活性化体へと変化させる反応を抑制することが分かった。

## 2-1-3. マウス (*in vivo*) 研究：サルナシ果汁経口投与による、発癌物質 MeIQx の肝臓 DNA 付加体形成の予防

発癌物質が体内に入って代謝的に活性化され、DNA と化学反応を起こして、遺伝子損傷や DNA 付加体を生じ、その遺伝子損傷から突然変異を誘発し、発癌のイニシエーションを起こす。その過程のどこをサルナシ果汁が抑制するのか明らかにするために、発癌物質が肝臓でおこす遺伝子損傷のひとつの DNA 付加体形成に対して、サルナシ果汁が抑制的に働くかどうかを研究した<sup>9)</sup>。

食事に焼いた肉を食べるというイメージを想定し、食品、特にタンパク質の焼けこげに含まれる発癌物質 MeIQx (図 8) を選んだ。陽性対照群には、MeIQx をマウスの餌に均一に混ぜた練り餌を作成し、3 日間餌代わりに食べさせた。一方、サルナシ群のマウスには、MeIQx を与える 2 日前から、計 5 日間、飲み水の代わりにサルナシ果汁を自由に飲ませた。サルナシ果汁は濃縮するため、いったん凍結乾燥した後、等量もしくは 3 分の一量の水に溶かし直して、等倍および 3 倍濃縮液を作成し、いずれかをマウスに飲ませた。加えて、3 日めより 3 日間、MeIQx を入れた練り餌を食べさせた (図 9)。

6 日めにマウスを安樂死させ、肝臓の DNA を分析し、MeIQx が化学結合した DNA 付加体の量を定量した。その結果、陽性対照のマウス肝臓の DNA で形成された遺伝子損傷、MeIQx-DNA 付加体

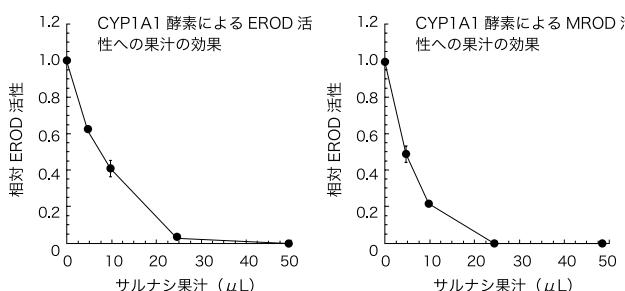


図 7 発癌物質代謝活性化に対するサルナシ果汁の阻害効果

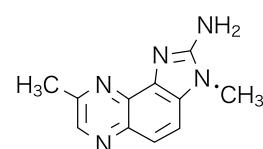


図 8 MeIQx

|               | 1日目         | 2日目 | 3日目 | 4日目 | 5日目 |
|---------------|-------------|-----|-----|-----|-----|
| 陽性対照群         | MeIQx入り餌    |     |     |     |     |
| サルナシ群<br>(等倍) | サルナシ果汁      |     |     |     |     |
| サルナシ群<br>(3倍) | サルナシ果汁 (x3) |     |     |     |     |

図9 発癌物質 MeIQx 入り餌とサルナシ入り飲み水の投与スケジュール

量に対して、等倍のサルナシ果汁をあらかじめ飲ませておいたマウスでは、同じ量の MeIQx が含まれた餌を与えたにもかかわらず、付加体量が 10.0% 減少した。また、3 倍濃縮サルナシ果汁をあらかじめ飲ませておいたマウスでは、付加体量が 23.5% 減少し、統計的にも有意差があった(図10)。

従って、マウスにサルナシ果汁を飲み物として経口摂取させると、発癌物質による遺伝子損傷を予防・防護でき、発癌のイニシエーションを抑制・阻止できることが明らかとなった。

## 2-2. 発癌のプロモーション過程に対するサルナシ成分の抑制効果

### 2-2-1. 酸化ストレス防護研究

生体の酸化ストレスは発癌のイニシエーションにもプロモーションにも関わる要因であるほか、炎症や老化など様々な方面に傷害を及ぼすことが知られている。実際、発癌物質によるイニシエーションにかかわる遺伝子損傷は、DNA 付加体形成だけでなく、発癌物質の生体内反応に伴う酸素ラジカルなどのラジカル発生による酸化的 DNA 損傷が知られている。また、プロモーション過程にも酸化的損傷が関わっていることが知られている。そこで、サルナシ果汁が酸化損傷に対する防護作用を持っているかどうかを研究した。酸化損傷に対する防御とし

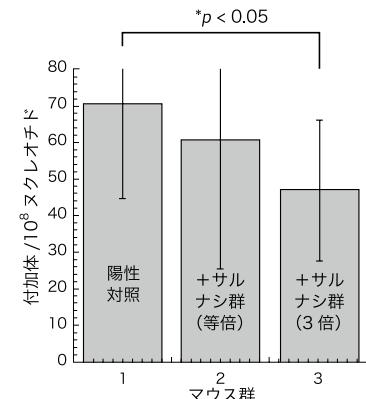


図10 サルナシ果汁経口投与による、発癌物質 MeIQx の肝臓 DNA 付加体形成の予防

て、発生するラジカルが DNA などに傷害を与える前に消去できるかどうかを調べる研究が広く行われている。そこで、ラジカルの例として 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカルを選び、サルナシ果汁が DPPH ラジカルを消去できるかどうかを調べた。研究の結果、サルナシは用量依存的に DPPH ラジカルを消去し、80% 以上のラジカルを消去し、抗酸化作用があることが分かった(図11)。

### 2-2-2. マウスの炎症性浮腫に対するサルナシの防護効果

発癌プロモーションは癌予防の良いターゲットであり、慢性炎症が発癌過程の進展に重要なことは良く知られている<sup>10)</sup>。代表的な発癌プロ

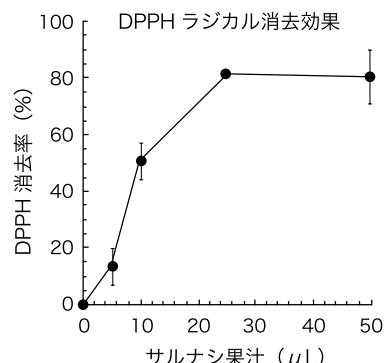


図11 サルナシによる DPPH ラジカル消去効果

口モーターであるホルボールエステル（12-O-テトラデカノイルホルボール 13-アセタート (TPA)）は強力な炎症性物質であるとともに、癌のプロモーター作用として、プロテインキナーゼ C の下流のシグナル伝達経路を活性化させることができて知られている。そこで、TPA により引き起こされる炎症をサルナシ果汁が予防・抑制するかどうかを調べた。

陽性対照として、マウスの耳に TPA を塗布すると炎症性の浮腫が起きて、耳が腫れ、耳重量が増加する。図 12 に示すように、陽性対照の耳重量は陰性対照と比べて 2.9 倍の重量になった。もし、サルナシ果汁をあらかじめ塗布したときに耳重量の増加が抑制されれば、TPA による炎症性の浮腫を予防したと考えられる。そこで、TPA を塗る 30 分前にサルナシ果汁をマウスの耳に塗っておいて、TPA を塗布した。その結果、TPA による耳重量の増加は、あらかじめサルナシ果汁を塗布しておくことで、用量依存的に抑制され、有意に浮腫が予防された。すなわち、サルナシ果汁が TPA に対し抗炎症性を示すことが分かった（図 12）。

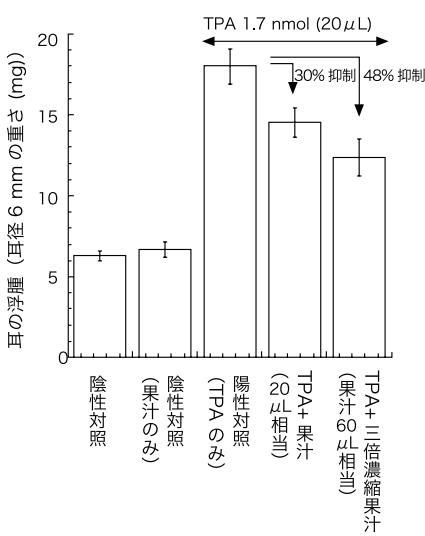


図 12 TPA による耳の浮腫に対するサルナシ塗布効果

### 2-3. サルナシの有効成分研究

サルナシに含まれる成分から、多段階発癌の抑制に関する有効成分を単離同定することを最終目標として、部分精製を行ったのが図 13 である。

その結果、「50% メタノール抽出分画」と「100% メタノール抽出分画」の 2 分画に遺伝毒性抑制効果と抗炎症効果が見られた。これは、サルナシ果汁には複数の遺伝毒性抑制物質と抗炎症効果物質が含まれていることを示唆している。

### 2-4. サルナシ部分精製分画による発癌抑制

そこで、サルナシ果汁の部分精製分画の、50% メタノール抽出分画が、マウスの皮膚がん発生を予防できるかどうかを試験した。

方法<sup>11)</sup>として、まず、マウスの背に、発癌イニシエーターであるジメチルベンツアントラゼン (DMBA) を塗布した。一週間後に、陽性対照群には発癌プロモーターのホルボールエステル (TPA) を同じところに塗った。DMBA 塗布は一回だけ、TPA 塗布は週 2 回、計 20 週行うと、塗った箇所に皮膚腫瘍が発生する。サルナシによる予防効果を見る群（サルナシ群）には、DMBA を塗った一週間後に、まずサル

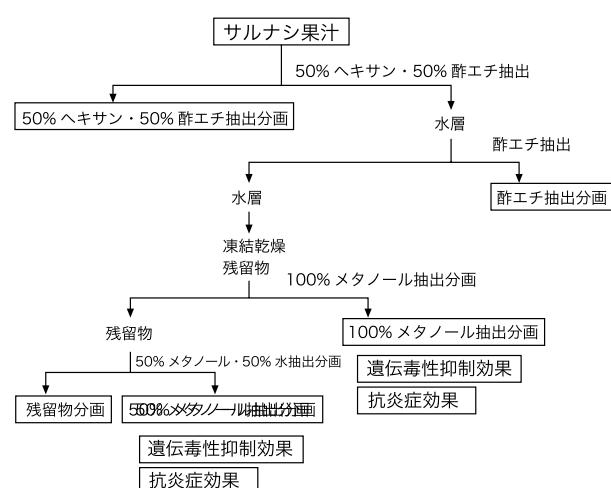


図 13 サルナシ有効成分の部分精製スキーム

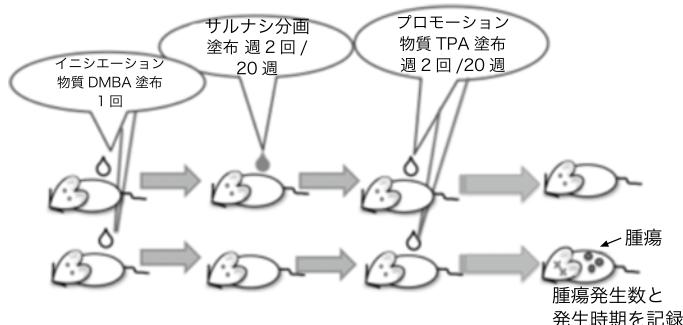
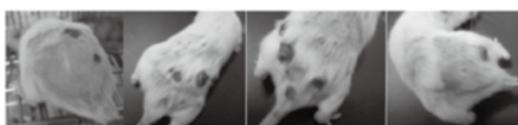


図 14 サルナシ塗布による、マウスの皮膚発癌抑制実験方法

陽性対照群マウスの例 発癌物質塗布のみ 全匹腫瘍発生



サルナシ塗布群マウスの例 発癌物質 + サルナシ分画塗布 半数のマウスに腫瘍発生なし

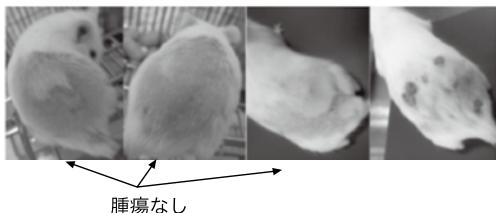


図 15 サルナシ部分精製分画による発癌予防効果

ナシの 50% メタノール抽出分画を塗布した。その 30 分後に TPA を陽性対照群と同量を塗布した。DMBA 塗布は 1 回のみだが、サルナシ塗布と TPA 塗布は週 2 回、計 20 週行った (図 14)。20 週まで、マウスの背の腫瘍発生時期とマウスごとの腫瘍数を記録した。

その結果、各群のマウスの代表的な例を写真で示すが、陽性対照群では 20 週を待たず、15 週までにすべてのマウスに腫瘍が発生した。一方、サルナシ塗布群では半数のマウスに 20 週に至るまで、腫瘍は発生せず、有意に予防効果が認められた (図 15)。

#### おわりに

本研究により、サルナシには多段階発癌におけるイニシエーション、プロモーション両段階をともに抑制する活性があることが分かった。メカニズムとして、遺伝子毒性物質の活性化を阻害し、突然変異阻害すること、ラジカル消去により酸化的損傷を防護すること、抗炎症作用によりプロモーション過程を阻害することが分かった。また、サルナシの有効成分は複数あることが示唆された。さらに、サルナシの部分精製分画により、マウスの皮膚腫瘍が予防されることが分かった。

従って、食生活環境改善による発癌要因の低減と癌予防に向けて、サルナシは有用な食品素材と考えられる。また、サルナシに含まれる有効成分を突き止めることは癌予防効果薬開発に向けて重要と考えられる。

なお、この論文の一部は第 71 回日本癌学会学術総会 (2012) にて発表する。

#### 参考文献

- 1) Choi J. J., Park B., Blockade of Atopic Dermatitis-Like Skin Lesions by DA-9102, a Natural Medicine Isolated from *Actinidia arguta*, in the Mg-Deficiency Induced Dermatitis Model of Hairless Rats. *Experimental Biological Medicine*, **233**: 1026-1034, 2008.
- 2) Lim H.-W., Kang S.-J., Anti-Oxidative and Nitric Oxide Production Inhibitory Activities of Phenolic Compounds from the Fruits of *Actinidia arguta*. *Natural Product Sciences*, **12**: 221-225, 2006.
- 3) Tsugane S., de Souza J. M. P., Costa Jr M. L. et al., Cancer incidence rates among Japanese immigrants in the city of Sao Paulo, Brazil, 1969 - 78. *Cancer Causes and Control*, **1**: 189 - 193, 1990.
- 4) Harvard report on cancer prevention. Volume 1, Causes of human cancer. *Cancer Causes and Control*, **7**, Suppl 1:

S3-59, 1996.

- 5) International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH), Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use. 2011.
- 6) Ohgaki H., Carcinogenicity in animals and specific organs. Rodents. In: Nagao, M., Sugimura, T. (eds.): *Food Born Carcinogens Heterocyclic Amines*, Wiley, Chichester, pp. 198-228, 2000.
- 7) Arimoto-Kobayashi S., Sugiyama C., Harada N. *et al.*, Inhibitory effects of beer and other alcoholic beverages on mutagenesis and DNA adduct formation induced by several carcinogens. *J. Agric. Food Chem.*, **47**: 21-230, 1999.
- 8) Brunoa R.D., Njar V.C.O., Targeting cytochrome P450 enzymes: A new approach in anti-cancer drug development, *Bioorg. Med. Chem.* **15**: 5047-5060, 2007.
- 9) Ochiai M., Nagaoka H., Wakabayashi K. *et al.*, Identification of N2-(deoxyguanosin-8-yl)-2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline-3',5'-diphosphate, a major DNA adduct, detected by nuclease P1 modification of the 32P-postlabeling method, in the liver of rats fed MelQx, *Carcinogenesis*, **14**: 2165-2170, 1993.
- 10) Marks F., Fürstenberger G., Müller-Decker K., Tumor promotion as a target of cancer prevention. *Recent Results Cancer Res.*, **174**: 37-47, 2007.
- 11) Tokuda H., Ohigashi H., Koshimizu K. *et al.*, Inhibitory effects of ursolic and oleanolic acid on skin tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Lett.*, **33**: 279-285, 1986.

# 緑茶カテキンによるインスリン誘導性転写因子遺伝子 *SHARP-1* の発現調節機構の解析

浅野 公介 <sup>\*1</sup> 高木 勝広 <sup>\*2</sup> 羽石 歩美 <sup>\*3</sup> 山田 一哉 <sup>\*4</sup>

<sup>\*1</sup> ASANO Kosuke, <sup>\*2</sup> TAKAGI Katsuhiro, <sup>\*3</sup> HANEISHI Ayumi (松本大学人間健康学部 健康栄養学科)

<sup>\*4</sup> YAMADA Kazuya (松本大学大学院 健康科学研究科)

Key Words : インスリン・エピガロカテキンガレート・シグナル伝達経路・遺伝子発現・転写

## 要旨

現在、我が国では、糖尿病患者およびその予備軍が、約 2,210 万人にも達している。我が国の糖尿病の 95 % 以上は 2 型糖尿病であり、その成因は、過食・高脂肪食・運動不足などの生活習慣の悪化による肥満から生じるインスリン抵抗性と考えられている。したがって、インスリン作用を引き起こす、すなわちインスリンシグナル伝達経路を刺激できる食品由来の低分子化合物の研究は、病態の予防や治療に有用であると考えられる。私どもは、肝において、インスリンによる血糖低下作用に関わる転写因子として、SHARP ファミリーを同定している。これまで、血糖低下作用を有することが知られている食品成分の中から、SHARP 遺伝子の発現誘導を指標にスクリーニングを行い、いくつかの候補成分を得ている。それらのうち、本稿では緑茶カテキンによる SHARP-1 遺伝子の発現誘導とそのメカニズムについて議論する。

## はじめに

生活習慣病の発症には遺伝的な素因と環境要因が関与している。環境要因には食生活や運動習慣等が含まれる。これらのうち食生活の面では、高エネルギー食の過剰摂取による肥満からインスリン抵抗性が引き起こされ、さらに糖尿病・動脈硬化症などの生活習慣病の発症が惹起されるといわれている。この肥満や糖尿病発症をコントロールする鍵となるホルモンがインスリンである。

食品成分には様々な生理活性をもつものが知られている。近年、話題になっているものにポリフェノール類がある。これらは、一般に抗酸化活性を示すが、それ以外にも、健康長寿に関わる様々な活性を示すことが知られている。特に、赤ブドウの種皮に含まれるレスベ

ラトロールは、フランス人が飽和脂肪酸を多量に摂取しているにも関わらず心血管疾患の発症率が低いという、いわゆるフレンチパラドックスを説明するものとして注目されている<sup>1)</sup>。レスベラトロールは他の多くの種においても寿命延長活性を示すことが報告されている<sup>2-4)</sup>。また、大豆イソフラボンや緑茶カテキンも様々な生理活性を有することが知られている<sup>5-9)</sup>。大豆イソフラボンにはゲニステインやダイゼインなどが含まれているが、これらの成分は遺伝性肥満症糖尿病マウスにおいて血糖低下やヘモグロビン A1C 値低下など病態を改善することが報告されている<sup>10)</sup>。一方、緑茶ポリフェノールであるカテキンには、(-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG), (-)-epicatechin-3-gallate, (-)-epigallocatechin, (-)-epicatechin の 4 種類が存

在する<sup>7,9)</sup>。これらのうちEGCGは最も生理活性が高く、*in vivo*や*in vitro*において、発ガンの抑制や、コラーゲン誘導関節炎、酸化ストレス誘導性神経変性病、肥満、および2型糖尿病といった病態を改善する活性を有することが知られている<sup>7,9)</sup>。実際、EGCGは、*in vivo*および*in vitro*において、糖新生系酵素遺伝子の発現を抑制することが報告されている<sup>9,11,12)</sup>。

ラットenhancer of split- and hairy-related protein (SHARP) ファミリーは、SHARP-1 (SHARP1/BHLHB3/ DEC2/ BHLHE 41)、およびSHARP-2 (SHARP2/ BHLHB2/ Eip1/ Stra13/ DEC1/ Clast5/ BHLHE 40)の2つのメンバーから構成されている<sup>13)</sup>。これらのタンパク質は、basic helix-loop-helix (bHLH)型転写因子に属している。SHARP ファミリータンパク質は、核内に局在し、互いにホモ2量体およびヘテロ2量体を形成してE box配列 (5'-CANNTG-3')に結合して転写抑制因子として機能する<sup>13)</sup>。SHARP-1およびSHARP-2遺伝子は普遍的に発現しているが、その発現は、様々な刺激により、細胞タイプ特異的に制御されている<sup>14-16)</sup>。私どもは、肝臓のSHARP-2 mRNA量が、正常ラットへの高炭水化物食の投与や糖尿病ラットへのインスリン投与により増加することを報告した<sup>17)</sup>。また、SHARP-2の過剰発現により糖新生系酵素phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) mRNA量が低下すること、およびSHARP-2発現ベクターのコトランスフェクションによりPEPCK遺伝子のプロモーター活性が特異的に抑制されることも明らかにした<sup>18)</sup>。したがって、SHARP-2がインスリンによる血糖低下に関与する転写因子の一つであると考えている。

私どもは、またSHARP-2遺伝子の発現が大豆イソフラボンのゲニステインやダイゼインの腸内細菌による代謝産物である(S)-Equolにより促進されること、EGCGがラット高分化型肝癌細胞株であるH4IIE細胞においてSHARP-2

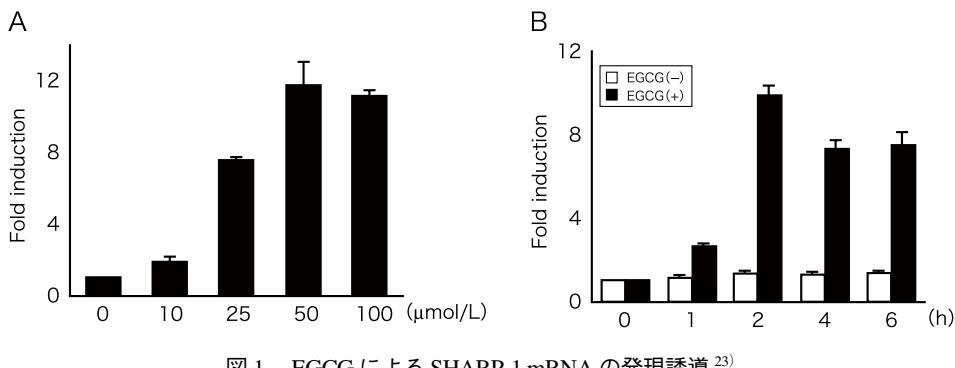
mRNA量を増加させると同時に、糖新生系酵素のPEPCK mRNA量を減少させることを報告した<sup>18-20)</sup>。したがって、インスリン以外の生理活性物質により、SHARP-2などのインスリン誘導性遺伝子の発現が誘導できれば、血糖調節が可能となり、インスリン抵抗性・糖尿病などの病態の予防や改善に至る可能性が考えられる。

一方、SHARP-2に比して、SHARP-1については、過剰発現による筋肉や脂肪細胞への分化抑制の報告があるものの、他の組織、特に肝臓での、SHARP-1遺伝子の発現調節メカニズムについてはほとんど明らかにされていなかった<sup>21,22)</sup>。私どもは最近、インスリンがH4IIE細胞でSHARP-2と同様に、SHARP-1 mRNAを誘導することを見いだした(投稿中)。この事実は、SHARP-1もまた、血糖値調節に関わる重要な転写因子の一つであることを示唆している。

そこで本稿では、インスリン誘導性転写因子SHARP-1遺伝子に焦点をあて、EGCGによる遺伝子発現の調節メカニズムについて論じたい。

## 1. EGCGによるSHARP-1遺伝子の発現誘導解析

まず初めに、SHARP-1 mRNAの発現がEGCGによって制御されているかどうかを検討した。H4IIE細胞を様々な濃度・時間下でEGCG処理したところ、SHARP-1 mRNA量がEGCG濃度依存的に増加することが明らかになった(図1A)<sup>23)</sup>。次に、25 μmol/L EGCGで、SHARP-1 mRNA量の経時的変化を検討したところ、SHARP-1 mRNA量は2時間で最大ピークに達し、それ以後は次第に減少した(図1B)<sup>23)</sup>。したがって、EGCGはインスリンと同様、SHARP-1 mRNA量を早期にかつ一過性に増加させることが示された。私どもは、以前にH4IIE細胞においてEGCGがSHARP-2遺

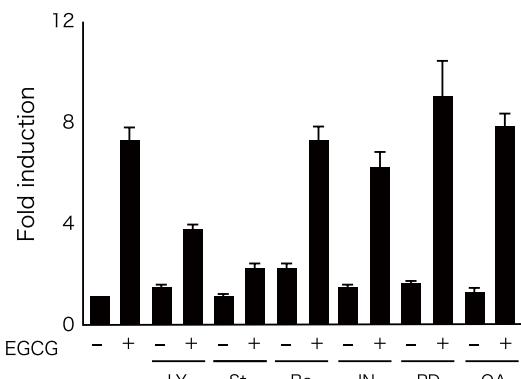
図1 EGCGによるSHARP-1 mRNAの発現誘導<sup>23)</sup>

- (A) 濃度依存的変化：下段に示した濃度の EGCG で H4IIE 細胞を 2 時間処理した。  
 (B) 経時的変化：H4IIE 細胞は、25 μmol/L EGCG の存在下 (EGCG (+))、または非存在下 (EGCG (-)) で下段に示した時間処理した。

伝子の発現を誘導することを報告している<sup>18)</sup>。したがって EGCG は *SHARP-1* および *SHARP-2* の両遺伝子の発現を誘導することが明らかになった。また、25 μmol/L EGCG において、両 mRNA の発現は 2 時間で最大レベルに達したが、そのレベルは *SHARP-1* では約 10 倍、*SHARP-2* では約 3 倍であったため、EGCG の作用は *SHARP-1* 遺伝子に対してより強いことも明らかになった (図 1B)<sup>18, 23)</sup>。

## 2. EGCGによる*SHARP-1*遺伝子の発現誘導にはphosphoinositide 3-kinase (PI 3-K)およびatypical PKC lambda (aPKC $\lambda$ )が関与する

次に、EGCGによる*SHARP-1*遺伝子の発現誘導にどのような細胞内シグナル伝達経路が関与するかを検討した。シグナル伝達酵素である各種のプロテインキナーゼやプロテインフォスファターゼに対する阻害剤で H4IIE 細胞に前処理を行った。その後、EGCG で 2 時間処理を行った。その結果、EGCG による SHARP-1 mRNA 量の増加は、PI 3-K を阻害する LY294002 により 36 % にまで、protein kinase C (PKC) を阻害する staurosporine により 18 % にまで抑制された (図 2)<sup>23)</sup>。しかし、p70S6 kinase を阻害す

図2 EGCGによるSHARP-1 mRNA誘導に関するシグナル伝達経路の同定 (1)<sup>23)</sup>

H4IIE 細胞を様々な阻害剤で 15 分間前処理した後、25 μmol/L EGCG 存在下 (+)、または非存在下 (-) で 2 時間培養した。下段に示したように、50 μmol/L LY294002 (LY), 0.1 μmol/L staurosporine (St), 0.1 μmol/L rapamycin (Ra), 10 μmol/L JNK inhibitor II (JN), 25 μmol/L PD98059 (PD), 10 nmol/L okadaic acid (OA) を阻害剤として用いた。

る rapamycin, Jun N-terminal kinase (JNK) を阻害する JNK inhibitor II, mitogen-activated protein kinase (MAPK) を阻害する PD98059, protein phosphatase を阻害する okadaic acid では、阻害効果は認められなかった (図 2)<sup>23)</sup>。これらの結果から、EGCG による SHARP-1 mRNA 量の増加は、PI 3-K や PKC シグナル伝達経路を介

することが示唆された。

PKC は, classical PKC (cPKC), novel PKC (nPKC), および atypical PKC (aPKC) の 3 種類に分類される。cPKC は  $\text{Ca}^{2+}$  とジアシルグリセロール (DG) により活性化されるが, nPKC は, DG によってのみ活性化され, aPKC はいずれによっても活性化されない<sup>24)</sup>。次に, PKC のどのアイソフォームが EGCG による SHARP-1 mRNA 量の増加に関与するのかについて検討

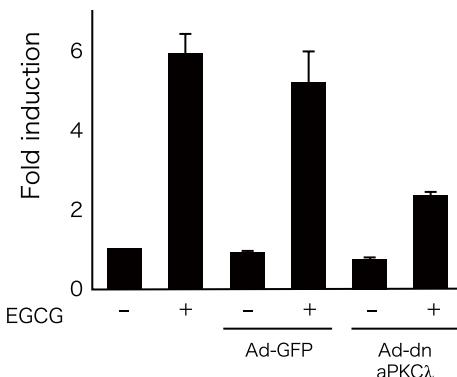


図3 EGCG による SHARP-1 mRNA の誘導は aPKCλ を介する<sup>23)</sup>

Ad-GFP および Ad-dn-aPKCλ は, それぞれ GFP, およびドミナントネガティブ変異型 aPKCλ を発現するアデノウイルスである。各アデノウイルスは m. o. i.=50 で, H4IIE 細胞に感染させ, その後 24 時間培養を行った。下段に示したように, それぞれの感染細胞を, さらに 25  $\mu\text{mol/L}$  EGCG 存在下 (+), または非存在下 (-) で 2 時間培養した。

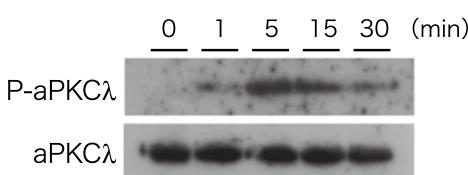


図4 EGCG による aPKCλ の活性化<sup>23)</sup>

上段に示した時間, 25  $\mu\text{mol/L}$  EGCG で処理した H4IIE 細胞から全細胞溶解液を調製した。全細胞溶解液 (200  $\mu\text{g}$  / レーン) を 10 % SDS-PAGE ゲルにて分離, PVDF 膜に転写し, ウエスタンプロット解析に用いた。(上図)抗リン酸化型 aPKCλ 抗体。(下図)抗 aPKCλ 抗体。

した。肝臓では PI 3-K の下流に aPKCλ が位置していることが報告されている<sup>25)</sup>。そこで, aPKCλ に注目して解析を行った。H4IIE 細胞に green fluorescence protein (GFP) を発現するアデノウイルス Ad-GFP を感染させたところ, SHARP-1 mRNA 量は全く変化しなかった(図3)<sup>23, 26)</sup>。これに対して, ドミナントネガティブ変異型 aPKCλ を発現するアデノウイルス Ad-dn-aPKCλ を感染させたところ, EGCG による SHARP-1 mRNA 量の増加が 33 % にまで抑制された(図3)<sup>23)</sup>。この抑制レベルは, LY294002 処理による抑制レベルと一致していた(図2 および3)<sup>23)</sup>。

aPKCλ は, スレオニン残基がリン酸化されることにより活性化される<sup>27)</sup>。次に, H4IIE 細胞内の aPKCλ が EGCG によって実際に活性化されるかどうかを検討した。EGCG で処理した全細胞溶解液を用いてウエスタンプロット解析を行ったところ, 活性型すなわちリン酸化型 aPKCλ 量は EGCG 処理 5 分後で増加し, 30 分までに速やかに減少することが明らかになった(図4)<sup>23)</sup>。一方, この間, 全 aPKCλ 量に変化は認められなかった(図4)<sup>23)</sup>。したがって, これらの結果から EGCG は PI 3-K/aPKCλ シグナル伝達経路を介して, SHARP-1 mRNA を誘導すると結論した。

### 3. EGCG による SHARP-1 遺伝子の発現誘導には AMP-activated protein kinase (AMPK) および nuclear factor-kappa B (NF-κB) も関与する

PI 3-K や PKC の阻害剤, およびアデノウイルスを介したドミナントネガティブ変異型 aPKCλ の感染実験では, SHARP-1 mRNA の誘導が完全に阻害されなかつたため, 他のシグナル伝達経路の存在が示唆された。そこで, 血糖低下やインスリン作用に関与することが知られているシグナル分子の AMPK や NF-κB に注目し

た。AMPK の阻害剤である compound-C および NF-κB の阻害剤である BAY11-7082 で H4IIE 細胞を処理したところ、EGCG による *SHARP-1* 遺伝子の発現上昇は部分的に抑制された（図 5）<sup>28)</sup>。しかも、compound-C および BAY11-7082 の両方で処理した場合、この抑制は相加的であることが明らかになった（図 5）<sup>28)</sup>。

次に、EGCG による SHARP-1 mRNA の誘導に AMPK が実際に関与しているのかを確認するため、AMPK の活性化剤 5-aminoimidazole-

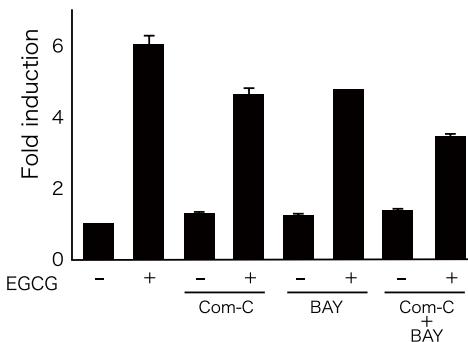


図 5 EGCG による SHARP-1 mRNA 誘導に関するシグナル伝達経路の同定（2）<sup>28)</sup>

H4IIE 細胞を阻害剤で 15 分間前処理した後、25 μmol/L EGCG 存在下（+）、または非存在下（-）で 2 時間培養した。下段に示したように 10 μmol/L compound-C (Com-C)、5 μmol/L BAY11-7082 (BAY)、および両者の組合せ (Com-C + BAY) を阻害剤として用いた。

4-carboxamide 1-β-D-ribofuranoside (AICAR) を用いて実験を行った。H4IIE 細胞を様々な濃度の AICAR で、2 時間処理したところ、SHARP-1 mRNA 量は濃度依存的に増加すること、ならびにその経時的变化は EGCG 処理時と同様であることが示された（図 1B および 6）<sup>23, 28)</sup>。これらの結果から、AMPK は EGCG による *SHARP-1* 遺伝子の発現誘導に関わるシグナル伝達物質であることが示された。AMPK は、代謝ストレスを検知するタンパク質キナーゼであり、代謝経路で律速酵素を直接リン酸化し、また遺伝子発現を調節することでエネルギー需給を制御している<sup>29)</sup>。一方、EGCG は AMPK の活性化を介して、肝臓の糖新生系酵素である *PEPCK* や *glucose-6-phosphatase* 遺伝子の発現を抑制することが報告されている<sup>12)</sup>。したがって AMPK の活性化による SHARP-1 mRNA 量の増加は、肝臓の糖新生系酵素の遺伝子発現抑制において重要な役割を果たしていると考えられる。

NF-κB は多面的な因子であり、発生過程、生体防御システム、および細胞生存率などを制御している<sup>30)</sup>。また、NF-κB は、PI 3-K/Akt シグナル伝達経路の下流標的因子としても知られている<sup>30, 31)</sup>。さらに、aPKCλ は、interleukin-1 で処理された細胞において、NF-κB の活性化

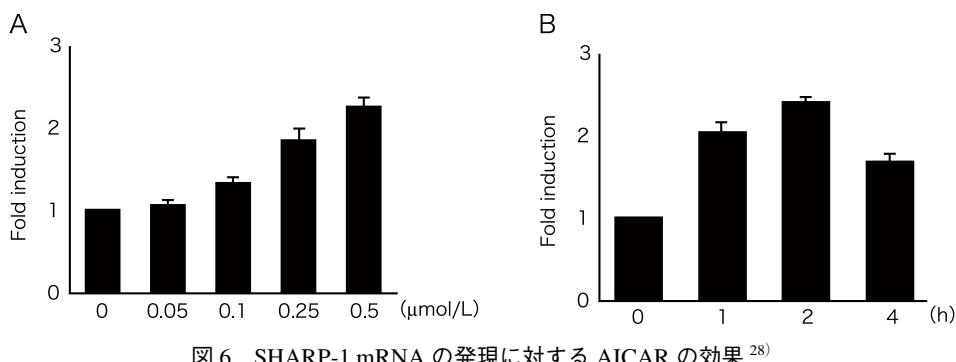


図 6 SHARP-1 mRNA の発現に対する AICAR の効果<sup>28)</sup>

- (A) 濃度依存的变化：H4IIE 細胞を下段に示した濃度の AICAR で 2 時間処理した。  
 (B) 経時的变化：H4IIE 細胞を、0.25 mmol/L AICAR 存在下または非存在下で、下段に示した時間培養した。

にも関わることが報告されている<sup>32)</sup>。したがって、PI 3-K か aPKC $\lambda$  の一方、もしくは両方が NF- $\kappa$ B の上流調節因子である可能性が考えられる。

最後に、LY294002, compound-C、および BAY11-7082 の 3 種の阻害剤で同時に処理した場合、EGCG による SHARP-1 mRNA の発現誘導は完全に阻害された<sup>28)</sup>。したがって、EGCG による SHARP-1 遺伝子の発現誘導には、PI 3-K/aPKC $\lambda$ 、AMPK、および NF- $\kappa$ B の 3 つのシグナル伝達経路で必要かつ十分であると結論した。

#### 4. EGCG による転写レベルでの SHARP-1 mRNA の誘導

次に、EGCG による SHARP-1 mRNA の誘導が SHARP-1 遺伝子の転写レベル、もしくは転写後レベルで調節されているかどうかを検討した。EGCG による SHARP-1 mRNA 量の増加は、RNA polymerase II の阻害剤である actinomycin D により部分的に抑制されたため、EGCG は転写および転写後レベルの両方でラット SHARP-1 遺伝子に作用すると考えられた（図 7）<sup>28)</sup>。

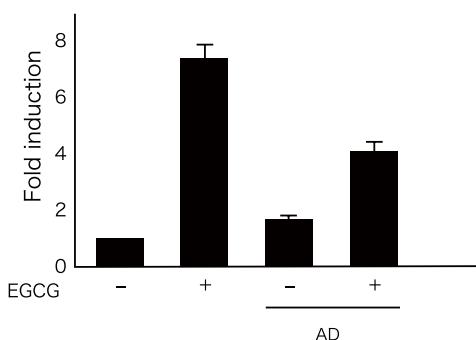


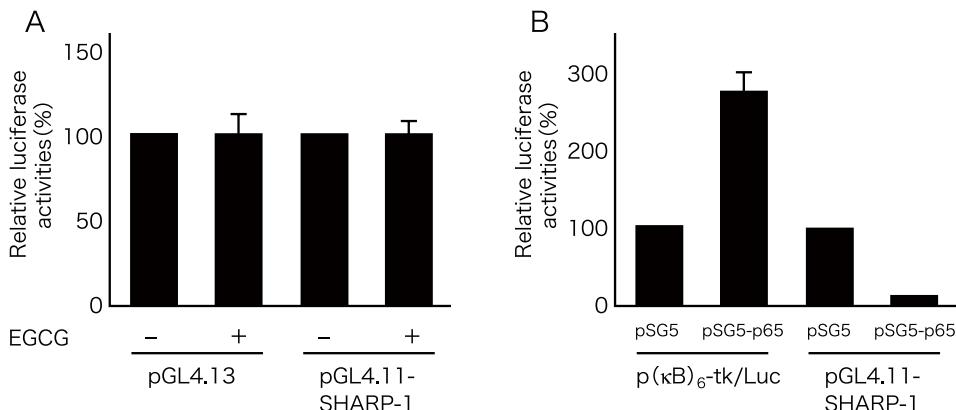
図 7 EGCG による SHARP-1 mRNA 誘導への actinomycin D の効果<sup>28)</sup>

H4IIE 細胞を 0.8  $\mu$ mol/L actinomycin D (AD) で 15 分間前処理した後、25  $\mu$ mol/L EGCG 存在下 (+)、または非存在下 (-) で 2 時間培養した。

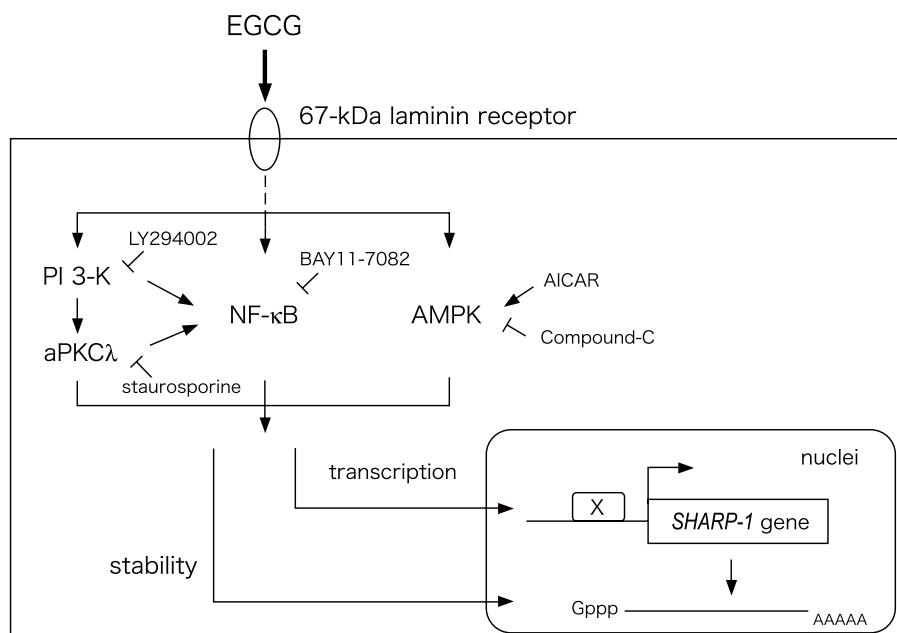
そこで、実際に EGCG が SHARP-1 遺伝子のプロモーター活性に影響を与えるかどうかを検討するために、ラット SHARP-1 遺伝子の基礎的発現や低酸素による発現調節に必須な転写調節領域を含む -1 から -1501 の領域を有するルシフェラーゼリポータープラスミド pGL4.11-SHARP-1 を作製した<sup>33)</sup>。このプラスミドまたは、SV40 ウィルスのエンハンサー/プロモーター領域を有するリポータープラスミド pGL4.13 を H4IIE 細胞にトランسفエクションし、EGCG 存在下、非存在下でのプロモーター活性を比較したが、いずれのリポーター活性も EGCG 処理による変化は認められなかった（図 8A）<sup>28)</sup>。

#### 5. NF- $\kappa$ B による転写レベルでの SHARP-1 mRNA の誘導

NF- $\kappa$ B は通常 3 量体として細胞質に局在している<sup>34)</sup>。細胞外刺激により I- $\kappa$ B がリン酸化されると 3 量体から解離し分解される。その後 p65/p50 へテロ 2 量体は核内へ移行して遺伝子発現を制御する<sup>34)</sup>。pGL4.11-SHARP-1 あるいはチミジンキナーゼ遺伝子プロモーターの上流に NF- $\kappa$ B の結合配列を 6 コピー有する p( $\kappa$ B)<sub>6</sub>-tk/Luc リポータープラスミドを活性型 NF- $\kappa$ B p65 を発現するプラスミド pSG5-p65 や親ベクター pSG5 とともに H4IIE 細胞にコトランسفエクションして、プロモーター活性に対する影響を検討した。しかし、ラット SHARP-1 遺伝子の -1 から -1501 の領域には、NF- $\kappa$ B で少なくとも正に応答する領域は存在しなかった（図 8B）<sup>28)</sup>。一方で、ヒト SHARP-1 遺伝子のプロモーター領域に NF- $\kappa$ B の結合領域が存在する可能性が報告されている<sup>35)</sup>。したがって、NF- $\kappa$ B 応答領域は、今回検討したラット SHARP-1 遺伝子の領域以外に存在すると考えられた。

図8 ラット *SHARP-1* 遺伝子のプロモーター活性に対する影響<sup>28)</sup>

- (A) ラット *SHARP-1* 遺伝子のプロモーター活性に対する EGCG の効果: SV40 ウィルスのエンハンサー／プロモーター領域を有するリポータープラスミド pGL4.13 もしくは *SHARP-1* 遺伝子の転写開始点上流 1.5 kb までを含むリポータープラスミド pGL4.11-SHARP-1, および phRL-CMV を, リン酸カルシウム法を用いて H4IE 細胞へ一過的にコトランスフェクションし, 16 時間培養した。さらに 25  $\mu$ mol/L EGCG 存在下 (+), または非存在下 (-) で 2 時間処理後, 細胞を回収してリポーター活性を測定した。EGCG 非存在下 (-) での各リポータープラスミドのプロモーター活性を 100 と設定した。
- (B) ラット *SHARP-1* 遺伝子のプロモーター活性に対する NF- $\kappa$ B p65 の影響: NF- $\kappa$ B の結合配列を含むリポータープラスミド p( $\kappa$ B)<sub>6</sub>-tk/Luc もしくは pGL4.11-SHARP-1 と, pSG5 もしくは NF- $\kappa$ B の p65 サブユニットを発現する pSG5-p65 プラスミド, および phRL-CMV を, リン酸カルシウム法を用いて H4IE 細胞へ一過的にコトランスフェクションした。16 時間後, 細胞を回収しリポーター活性を測定した。pSG5 をトランスフェクションしたときの各リポータープラスミドのプロモーター活性を 100 と設定した。

図9 EGCG によるラット *SHARP-1* 遺伝子の発現調節機構の模式図<sup>28)</sup>

## おわりに

緑茶カテキンである EGCG が、インスリンシグナル伝達経路を刺激できる低分子化合物であることを明らかにした。一方、EGCG は、いくつかのヒト腫瘍細胞において、増殖抑制およびアポトーシスを引き起こすことが報告されている<sup>7)</sup>。最近、Tachibana らは、EGCG の抗がん作用を仲介する細胞表面 EGCG 受容体として 67-kDa laminin receptor (67LR) を同定した<sup>36)</sup>。したがって、図 9 に示したように、EGCG は、67-kDa laminin receptor (67LR)

に結合した後、PI 3-K/ aPKCλ, AMPK、および NF-κB シグナル伝達経路を刺激し、ラット *SHARP-1* 遺伝子の発現を転写および転写後のレベルで誘導すると結論する。今後は、EGCG に応答するラット *SHARP-1* 遺伝子の転写調節領域の同定に取り組んでいきたいと考えている。

## [謝辞]

本研究は文部科学省の科学研究費（基礎研究 C 21500798）、松本大学学術研究助成金による援助を受けて行われた。ここに深謝する。

## 参考文献

- 1) Renaud, S., and de Lorgeril, M.: Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*, **339** (8808): 1523-1526, 1992.
- 2) Howitz, K. T., Bitterman, K. J., Cohen, H. Y., et al.: Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*, **425** (6954): 191-196, 2003.
- 3) Wood, J. G., Rogina, B., Lavu, S., et al.: Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature*, **430** (7000): 686-689, 2004.
- 4) Baur, J. A., Pearson, K. J., Price, N. L., et al.: Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*, **444** (7117): 337-342, 2006.
- 5) Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., et al.: Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J. Biol. Chem.*, **262** (12): 5592-5595, 1987.
- 6) Kuiper, G. G., Lemmen, J. G., Carlsson, B., et al.: Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology*, **139** (10): 4252-4263, 1998.
- 7) Shankar, S., Ganapathy, S., and Srivastava, R. K.: Green tea polyphenols: biology and therapeutic implications in cancer. *Front. Biosci.*, **12**: 4881-4899, 2007.
- 8) Moon, H. S., Lee, H. G., Choi, Y. J., et al.: Proposed mechanisms of (-)-epigallocatechin-3-gallate for anti-obesity. *Chem. Biol. Interact.*, **167** (2): 85-98, 2007.
- 9) Wolfram, S.: Effects of green tea and EGCG on cardiovascular and metabolic health. *J. Am. Coll. Nutr.*, **26** (4): 373S-388S, 2007.
- 10) Ae Park, S., Choi, M. S., Cho, S. Y., et al.: Genistein and daidzein modulate hepatic glucose and lipid regulating enzyme activities in C57BL/KsJ-db/db mice. *Life Sci.*, **79** (12): 1207-1213, 2006.
- 11) Waltner-Law, M. E., Wang, X. L., Law, B. K., et al.: Epigallocatechin gallate, a constituent of green tea, represses hepatic glucose production. *J. Biol. Chem.*, **277**: 34933-34940, 2002.
- 12) Collins, Q. F., Liu, H. Y., Pi, J., et al.: Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a green tea polyphenol, suppresses hepatic gluconeogenesis through 5'-AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.*, **282** (41): 30143-30149, 2007.
- 13) Yamada, K., and Miyamoto, K.: Basic helix-loop-helix transcription factors, BHLHB2 and BHLHB3; their gene expressions are regulated by multiple extracellular stimuli. *Front. Biosci.*, **10**: 3151-3171, 2005.
- 14) Shen, M., Kawamoto, T., Yan, W., et al.: Molecular characterization of the novel basic helix-loop-helix protein DEC1 expressed in differentiated human embryo chondrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **236**: 294-298, 1997.
- 15) Rossner, M. J., Dorr, J., Gass, P., et al.: SHARPs: mammalian enhancer-of-split- and hairy-related proteins coupled to neuronal stimulation. *Mol. Cell. Neurosci.*, **10**: 460-475, 1997.
- 16) Fujimoto, K., Shen, M., Noshiro, M., et al.: Molecular cloning and characterization of DEC2, a new member of

- basic helix-loop-helix proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **280**: 164-171, 2001.
- 17) Yamada, K., Kawata, H., Shou, Z., *et al.*: Insulin induces the expression of the *SHARP-2/Stra13/DEC1* gene via a phosphoinositide 3-kinase pathway. *J. Biol. Chem.*, **278**: 30719-30724, 2003.
- 18) Yamada, K., Ogata-Kawata, H., Matsuura, K., *et al.*: SHARP-2/ Stra13/ DEC1 as a potential repressor of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression. *FEBS Lett.*, **579**: 1509-1514, 2005.
- 19) Haneishi, A., Takagi, K., Asano, K., *et al.*: Genistein stimulates the insulin-dependent signaling pathway. *Front Biosci (Elite Ed)*, **3**: 1534-1540, 2011.
- 20) Haneishi, A., Takagi, K., Asano, K., *et al.*: Analysis of regulatory mechanisms of an insulin-inducible *SHARP-2* gene by (S)-Equol. *Arch. Biochem. Biophys.*, in press.
- 21) Azmi, S., Ozog, A., and Taneja, R.: Sharp-1/DEC2 inhibits skeletal muscle differentiation through repression of myogenic transcription factors. *J. Biol. Chem.*, **279**: 52643-52652, 2004.
- 22) Gulbagci, N. T., Li, L., Ling, B., *et al.*: SHARP1/DEC2 inhibits adipogenic differentiation by regulating the activity of C/EBP. *EMBO Rep.*, **10** (1): 79-86, 2009.
- 23) Asano, K., Takagi, K., Haneishi, A., *et al.*: (-)-Epigallocatechin-3-gallate enhances the expression of an insulin-inducible transcription factor gene via a phosphoinositide 3-kinase/atypical protein kinase C lambda pathway. *J. Agric. Food Chem.*, **59** (24): 13360-13364, 2011.
- 24) Jiang, G., and Zhang, B. B.: PI 3-kinase and its up- and down-stream modulators as potential targets for the treatment of type II diabetes. *Front. Biosci.*, **7**: 903-907, 2002.
- 25) Matsumoto, M., Ogawa, W., Akimoto, K., *et al.*: PKClambda in liver mediates insulin-induced SREBP-1c expression and determines both hepatic lipid content and overall insulin sensitivity. *J. Clin. Invest.*, **112** (6): 935-944, 2003.
- 26) Kotani, K., Ogawa, W., Matsumoto, M., *et al.*: Requirement of atypical protein kinase Clambda for insulin stimulation of glucose uptake but not for Akt activation in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Cell. Biol.*, **18** (12): 6971-6982, 1998.
- 27) Keranen, L. M., Dutil, E. M., and Newton, A. C.: Protein kinase C is regulated *in vivo* by three functionally distinct phosphorylations. *Curr. Biol.*, **5** (12): 1394-1403, 1995.
- 28) Asano, K., Takagi, K., Haneishi, A., *et al.*: (-)-Epigallocatechin-3-gallate stimulates both AMP-activated protein kinase and nuclear factor-kappa B signaling pathways. *Food Chem.*, **134** (2): 783-788, 2012.
- 29) Kemp, B. E., Stapleton, D., Campbell, D. J., *et al.*: AMP-activated protein kinase, super metabolic regulator. *Biochem. Soc. Trans.*, **31** (Pt 1): 162-168, 2003.
- 30) Salminen, A., and Kaarniranta, K.: Insulin/IGF-1 paradox of aging: regulation via AKT/IKK/NF-kappaB signaling. *Cell. Signal.*, **22** (4): 573-577, 2010.
- 31) Heck, S., Lezoualc'h, F., Engert, S., *et al.*: Insulin-like growth factor-1-mediated neuroprotection against oxidative stress is associated with activation of nuclear factor kappaB. *J. Biol. Chem.*, **274** (14): 9828-9835, 1999.
- 32) Sanz, L., Diaz-Meco, M. T., Nakano, H., *et al.*: The atypical PKC-interacting protein p62 channels NF-kappaB activation by the IL-1-TRAF6 pathway. *Embo J.*, **19** (7): 1576-1586, 2000.
- 33) Miyazaki, K., Kawamoto, T., Tanimoto, K., *et al.*: Identification of functional hypoxia response elements in the promoter region of the DEC1 and DEC2 genes. *J. Biol. Chem.*, **277**: 47014-47021, 2002.
- 34) Chen, L. F., and Greene, W. C.: Shaping the nuclear action of NF-kappaB. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **5** (5): 392-401, 2004.
- 35) Liu, Y., Sato, F., Kawamoto, T., *et al.*: Anti-apoptotic effect of the basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factor DEC2 in human breast cancer cells. *Genes Cells*, **15** (4): 315-325, 2010.
- 36) Tachibana, H., Koga, K., Fujimura, Y., *et al.*: A receptor for green tea polyphenol EGCG. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **11** (4): 380-381, 2004.

# β-クリプトキサンチンは 飲酒・喫煙による健康影響に対して有効か —最近の栄養疫学研究から明らかになったこと—

杉浦 実\*

\* SUGIURA Minoru (独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 果樹研究所カンキツ研究領域)

Key Words : β-クリプトキサンチン・抗腫瘍・飲酒・喫煙・臨床試験・疫学調査・三ヶ日町研究

## はじめに

果物・野菜はビタミンやミネラル、食物繊維など健康の維持増進に必要な栄養成分の重要な供給源であるが、これらの栄養素以外にも近年その生体調節機能が注目されているカロテノイド類が豊富に含まれている。これらカロテノイド類は何れも強力な抗酸化作用を有するものが多く、近年の疫学研究から、がんや循環器系疾患、糖尿病などの生活習慣病リスクとの関連が数多く報告されている。一方、喫煙者や飲酒者では生体内において酸化ストレスが亢進していること、またこれらの生活習慣が様々な病気の危険因子になることが解っているが、最近、喫煙や飲酒によって引き起こされる酸化ストレスに対してカロテノイドが有効なのではないかと考えられる疫学研究の結果が報告されるようになってきた。本稿では、喫煙・飲酒習慣とカロテノイドの血中濃度との関連について最近の研究を紹介する。

## 1. カロテノイドについて

果物・野菜に多く含まれている天然色素成分で、これまでにおよそ750種類が単離同定されている<sup>1)</sup>。カロテノイドは8個のイソプレン單

位が結合して構成された炭素数40の基本骨格を有する化合物群の総称であり、9個の共役二重結合からなる炭素数22のポリエン部とその両末端に水酸基やカルボニル基、カルボキシル基、エポキシ基が付いた構造を有している<sup>2)</sup>。人は普段の食生活において様々な食品からカロテノイドを摂取しているが、血中に存在する主要なカロテノイドには、リコ펜・α-カロテン・β-カロテン・ルテイン・ゼアキサンチン・β-クリプトキサンチンの6種がある(図1)<sup>3)</sup>。このうち体内でビタミンAに変換されるのはα-カロテン・β-カロテン・β-クリプトキサン

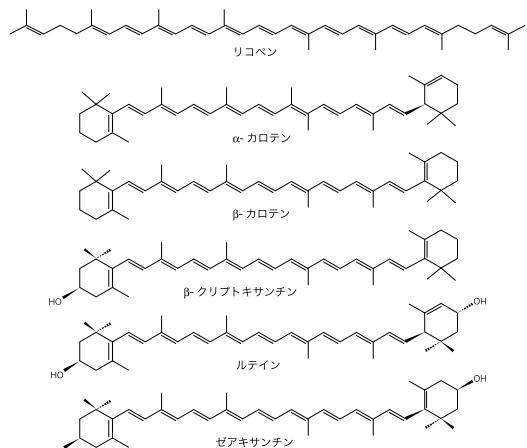


図1 ヒト血中に存在する主要なカロテノイド

チンの3つである。プロビタミンAとしての機能については多くの分子レベルでの研究が行われているが、近年、プロビタミンAとしての働き以外にも、がんや循環器系疾患、糖尿病などの生活習慣病に対する予防効果等、新たな生理機能が次々と明らかになってきた。現在、がんや心筋梗塞、糖尿病、肝臓疾患など様々な生活習慣病の発症に酸化ストレスが関与していることが多くの研究で明らかになっているが、カロテノイド類はその化学構造上に二重結合を多く含むために抗酸化作用が大きく、酸化ストレスから身を護ることで様々な病気の予防に役立つのではないかと考えられている<sup>4,6)</sup>。

## 2. 飲酒・喫煙と健康との関係

飲酒と喫煙はどちらも健康を害するものと一般には広く知られている。適量の飲酒は善玉コレステロールを増やす等の働きがあり、嗜む程度のお酒を毎日飲むことはむしろ健康に役立つことが多くの疫学調査から明らかになっている。この適量のアルコールというのは日本酒だとおよそ1合に相当し、純アルコール量とておよそ23gになる。アルコール度数5%のビールを大瓶で一本飲むと約25gのアルコール量になる。飲酒量とがん、心筋梗塞、総死亡リスクとの関係に関する疫学調査の結果は数多く報告されており、多くの研究から適量の飲酒は健康に役立つことが示されており、また飲み過ぎは様々な部位でのがんや総死亡リスクを上げる要因であることも明らかになっている。

一方、喫煙は肺がんをはじめとして喉頭がん、口腔・咽頭がん、食道がん、胃がん、膀胱がん、腎孟・尿管がん、肺がんなど多くのがんや、虚血性心疾患、脳血管疾患、慢性閉塞性肺疾患、歯周疾患など様々な疾患の危険因子であることはこれまでに明らかにされている。またこれまでに吸ったたばこの総量の指標である喫煙指數

(1日の喫煙本数÷20×喫煙年数)が高いほどがんや循環器系疾患による死亡リスクが高くなることが明らかになっており、煙草は吸えれば吸うほど害になることが解っている。

では過剰な飲酒や喫煙がどうして身体に悪いのか？まず喫煙であるが、煙草の煙にはニコチン以外の有害物質としてアンモニアやタール、アセトアルデヒド、窒素酸化物、また発ガン物質としてホルムアルデヒドやダイオキシン、アクロレイン、カドミウム化合物、シアノ化水素など非常に有害な物質がたくさん含まれている。人間の身体はこれらの有害物質を分解・排泄するために代謝反応が働くが、この過程で過剰な酸化ストレスが引き起こされる。過剰な酸化ストレスが発生すると、更にこれらのフリーラジカル種を消去するためにいろいろな機構が働くが、これにもやはり限度があり、限度を超えた酸化ストレスは細胞膜や遺伝子、脂質やたんぱく質などの生体成分を傷つけることになり、これらの酸化障害ががんなどの様々な病気を引き起こす大きな原因の一つと考えられている。一方、飲酒であるが、適量なら問題なく肝臓で代謝され、最終的には二酸化炭素と水に分解される。しかしながらもともと生体には存在しない毒であるため、飲み過ぎるとやはり酸化ストレスを増大させ、肝細胞に障害を与えてしまう。お酒を飲み過ぎると先ず脂肪肝になり、それでも止めない場合には、肝硬変まで移行して最終的には肝臓がんへと進行する。

このように喫煙と飲酒はそれぞれが大きな酸化ストレスの原因となるが、喫煙だけやる人、あるいは煙草は吸わないがお酒は結構飲むという人、どちらもやる人とではいったいどれくらい酸化ストレスに違いがあるのだろうか？明確な回答を示す詳しい実験データは多くないが、最近、喫煙と飲酒の両方をやると、どちらか一方だけの場合と比べて、酸化ストレスが著しく増大されるという実験データが報告されてい

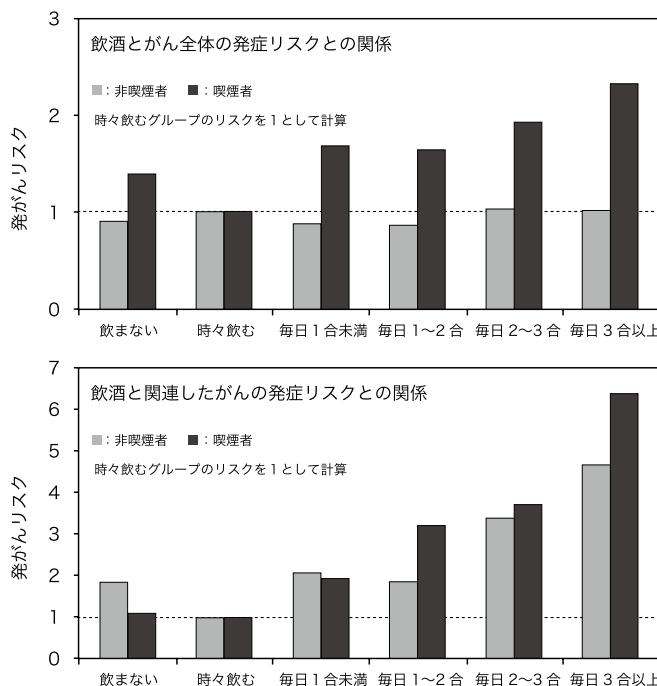


図2 飲酒と喫煙が重なると発がんリスクは増大する

引用文献 13) のデータから作図

る<sup>7-9)</sup>。愛煙家でなおかつ適量よりも多いお酒を毎日飲んでいる人では、酸化ストレスが著しく増大するようなのである。実際に疫学研究からもこのことを裏付ける調査結果が最近幾つか報告されている<sup>10-13)</sup>。飲酒と喫煙が重なることでがんの発生率が高くなるという結果である(図2)。

### 3. 栄養疫学調査：三ヶ日町研究について

我々はこれまでの研究から、主要なカロテノイド色素の一つであるβ-クリプトキサンチンが日本のウンシュウミカン(以下、ミカン)に特徴的に多く含まれていること<sup>14, 15)</sup>、またβ-クリプトキサンチンのヒト血中濃度からミカンの摂取量を推定できることから、栄養疫学研究を行う上での大変有益なバイオマーカーであることを見出している<sup>16-18)</sup>。そこで、国内主要果実であるミカンの健康機能性を栄養疫学的に明

らかにする事目的として、ミカン産地で全国的に有名な静岡県浜松市北区三ヶ日町の住民約千人を対象にした栄養疫学調査(三ヶ日町研究)を平成15年度から開始した。本調査研究では、β-クリプトキサンチン等のカロテノイドの血中濃度をHPLCにより測定し、様々な健康指標との関連を縦断的に検討することでこれらカロテノイドによる生活習慣病の予防効果について検討を行っている。これまでのベースラインデータを用いた横断的な解析から、β-クリプトキサンチンやβ-カロテンの血中濃度が高い人では、様々な生活習慣病のリスクが有意に低いことを明らかにしてきた<sup>19-26)</sup>。現在、これまでに見出されてきた血中カロテノイド値と生活習慣病リスクとの関連について、これらの因果関係を明らかにするための縦断的検討(追跡調査)に取り組んでいる。

このように三ヶ日町研究では、ミカン(β-クリプトキサンチン)が有する生活習慣病予防効果についてヒトレベルで検証することを主な研究目的としているが、ミカンの健康機能性を明らかにする研究目的以外にも公衆衛生学的に貢献できるような成果を上げることも目的の一つとして取り組んでいる。疫学調査では、調査を行うことで住民の健康作りに貢献できること、また得られた研究成果が日本人の健康維持増進に役立てられる情報となるかが重要になる。なかでも喫煙と飲酒が健康に及ぼす影響を調査することは大変重要な課題で、国内外の多くの疫学研究者が取り組んでいる。本稿では、三ヶ日町研究のベースラインデータを用いた横断解析の結果から明らかになった、喫煙・飲酒習慣と血中カロテノイド値との関連についての知見について紹介する。

#### 4. 飲酒・喫煙による健康影響と $\beta$ -クリプトキサンチンとの関係

これまでに国内外の栄養疫学研究から、飲酒・喫煙による健康影響とカロテノイドとの関連について幾つかの報告がある。これらの研究から、カロテノイドが飲酒や喫煙習慣が原因で発症するがんなどの生活習慣病に対して予防効果を有するのではないかと考えられている。

我々は三ヶ日町研究から、カロテノイドが飲酒に伴う肝機能障害に対して有効なのではないかとする知見を得た。基本健診などの血液検査では肝機能の指標値として、ALT (アラニンアミノ基転移酵素)・AST (アスパラギン酸アミノ基転移酵素)・ $\gamma$ -GTP (ガンマグルタミン酸アミノ基転移酵素)の3種類がよく測定される。何れもアミノ酸代謝に働く重要な酵素で、ALTは肝臓に最も多く、ASTは心筋・肝臓・骨格筋・腎臓等に多く存在する酵素で、これらの組織が障害を受けると酵素が逸脱し血中に漏出していくために検査値が高くなる。また $\gamma$ -GTPは肝臓・胆道系に分布し、アルコール摂取などで敏感に高くなることが多いため、アルコール性肝障害の指標として用いられている。そこでアルコール摂取による $\gamma$ -GTPの上昇と血中 $\beta$ -クリ

プトキサンチンレベルとの関連を調べた。その結果、血中 $\gamma$ -GTP値は一日当たりのエタノール摂取量が多いほどその数値は高くなるが、毎日25g以上のエタノール(瓶ビール大一本以上)を摂取していても、血中 $\beta$ -クリプトキサンチンレベルが高いグループでは $\gamma$ -GTP値がかなり低いことが解った<sup>19)</sup>(図3)。アルコールは肝臓で代謝されるが、その代謝過程において過剰なフリーラジカル(活性酸素種)が発生し、これが肝機能障害の原因の一つとも考えられている。 $\beta$ -クリプトキサンチンはアルコール性肝障害に対して防御的に働いているのではないかと考えられる。

一方、喫煙による肺がんの発症リスクが $\beta$ -クリプトキサンチンの摂取量が多いと顕著に低下するという興味深い知見が複数の研究から明らかになっている。カロテノイド類は活性酸素の害から体を守る働きがあり、がんに対して予防効果があるのではないかと以前から考えられていたが、 $\beta$ -カロテンのサプリメントを投与した大規模な臨床試験では逆に喫煙者の肺がんリスクを高めるという結果が相次ぎ、カロテノイドのがん予防についての研究は期待を裏切る結果となった<sup>27, 28)</sup>。しかしながら、最近の疫学研究では、 $\beta$ -クリプトキサンチンが肺がん

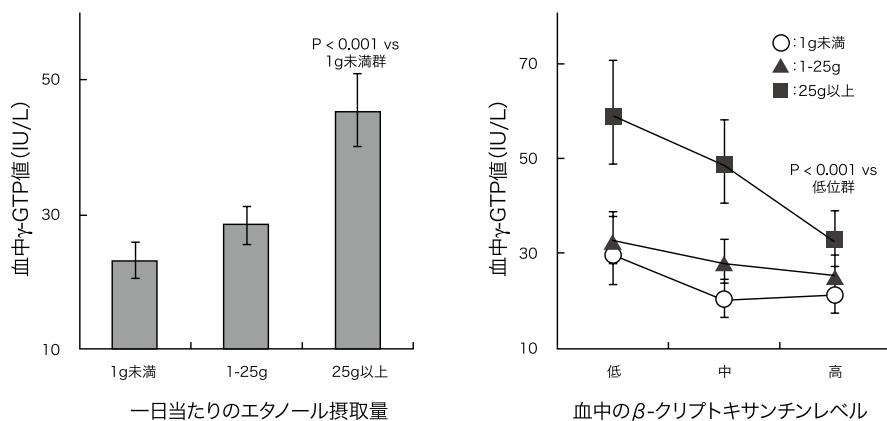


図3 一日あたりの飲酒量別にみた血中 $\gamma$ -GTP値と $\beta$ -クリプトキサンチンとの関係  
引用文献19)のデータから作図

に対して優れた予防効果があるのではないかとする研究結果が相次いで報告されるようになってきた。多のカロテノイドでは全く効果が無いのに  $\beta$ -クリプトキサンチンの摂取量が多い、あるいは血中の  $\beta$ -クリプトキサンチン濃度が高いグループで肺がんのリスクが低下したとする結果が相次いで報告されており<sup>29-31)</sup>、また海外の大規模な7つのコホート研究をまとめたメタアナリシスにおいても、有意なリスク低減効果が認められたのは  $\beta$ -クリプトキサンチンのみであったと報告されている<sup>32)</sup>。興味深いのは喫煙者でのリスクを低下させることである。またこのような喫煙者における肺がんリスクと  $\beta$ -クリプトキサンチンとの有意な負の関連性は日本国内での疫学調査においても認められている<sup>33)</sup>。喫煙者では非喫煙者に比べて特に酸化ストレスに曝されており、このような酸化ストレスが亢進した状態では特に  $\beta$ -クリプトキサンチン特有の効果があるのかもしれない。

また最近我々は、喫煙者ではメタボリックシンドロームのリスクが非喫煙者と比べて著しく高いこと、更に血中  $\beta$ -クリプトキサンチンレベルが高いほど喫煙者のメタボリックシンドロームリスクが有意に低いことを見出した<sup>25)</sup>。一方、このような関連は非喫煙者では認められなかった。

以上の研究結果から、様々な生活習慣病の予防に対してその有効性が期待されている  $\beta$ -クリプトキサンチンは、特に喫煙や飲酒によって発生する過剰な酸化ストレスに対して有効なのではないかと考えられる。

## 5. 抗酸化物質としてのカロテノイドは飲酒・喫煙によって消耗されるのか？

このように飲酒と喫煙によって引き起こされる酸化ストレスを無害化するために、人間の身体にはスーパーオキシドディスクレチターゼやカタ

ラーゼ、グルタチオンなどいろいろな抗酸化システム系が備わっている。また本来生体が有する抗酸化システム系以外にも、食品から摂取できる抗酸化物質がある。有名なのはビタミンCやビタミンEなどがあるが、これらのビタミン類は酸化ストレスから生体を護るために非常に重要な働きを担っている。またその他にも、カロテノイドやフラボノイド類といった天然由来の抗酸化物質も酸化ストレス防御という点において重要な物質として考えられており、これらの抗酸化物質の摂取量や血中濃度を測定し、がんや循環器系疾患リスクとの関連について多くの疫学研究が行われている。

老化や疾病に酸化ストレスが大きな原因の一つになっていることは多くの研究から示され、これらの酸化ストレスの害から身を守るためにビタミン類やカロテノイド類が抗酸化物質として働いていると考えられているが、ところがせっかく摂取したビタミン・カロテノイド類も、飲酒や喫煙をする人ではこれらの酸化ストレスの害から身を守るために毒消しとして無駄に消費されてしまうことが考えられる。喫煙すると体内のビタミンCが減るという話は有名であるが、ではカロテノイドではどうなのだろうか？またカロテノイドの種類によって何か違いはあるのだろうか？これまでに飲酒者や喫煙者では血中  $\beta$ -カロテン値が低下するという研究結果が幾つか報告されていたが、主要なカロテノイド6種全てについて、摂取量と血中濃度データから飲酒と喫煙の影響を同時に詳しく調べた研究データは無かった。喫煙と飲酒の両方をやるとどれくらいカロテノイドが減ってしまうのか？これらの疑問を明らかにすれば、喫煙・飲酒の両方をやる人にとって大変有益な情報となり、また先述したように公衆衛生学上、重要な知見となる。

## 6. 栄養調査からカロテノイドの摂取量を推定する

これまで三ヶ日町研究では主に6種類の血中カロテノイド濃度を測定し、様々な疾病との関連を解析してきたが、摂取量についても最近評価できるようになった。文部科学省科学技術・学術審議会・資源調査分科会が公表している五訂増補日本食品標準成分表には、各食品中のカロテノイドとして、 $\alpha$ -カロテン、 $\beta$ -カロテン及び $\beta$ -クリプトキサンチンの3種類の含有量についてそれぞれ記載されているが、その他の主要なカロテノイドである、リコ펜、ルテイン、ゼアキサンチンについてはまだデータが無い。そのため、日本人を対象にした国内の栄養疫学研究では $\alpha$ -カロテン、 $\beta$ -カロテン及び $\beta$ -クリプトキサンチンについてのみ解析が行われ、様々な生活習慣病リスクとの関連が報告されている。6種類全てのデータが揃えば、欧米並みにカロテノイドの疫学研究が更に進展することが期待される。

近年、果物・野菜中の非栄養素成分に関する研究が大きく進展し、これらの食品中における主要なカロテノイド6種についてその含有量に関するデータがようやく報告されるようになった<sup>14,15)</sup>。我々はこの果物・野菜中のカロテノイド含有量に関するデータを三ヶ日町研究で収集した各被験者の食事調査結果に組み込み、一日当たりのカロテノイド摂取量を推定できるようにプログラミングを行った。すでに米国などではこれらのデータベースは整備されていたが、日本国内では初めての取り組みである。これらのデータを用いて解析することで、血中濃度と

摂取量の両面からカロテノイドの健康機能性に関する更に詳しい研究が可能になった。

## 7. カロテノイドの摂取量と血中濃度との関係

野菜・果物中のカロテノイド含有量に関するデータを三ヶ日町研究のベースラインデータに組み込み、各被験者の一日当たりのカロテノイド摂取量を推定してみた。その結果、一番摂取量の多いカロテノイドはルテインであることがわかった<sup>26)</sup>。 $\beta$ -クリプトキサンチンのおよそ6倍で、一日当たり約1.92 mg（女性被験者の幾何平均値）摂取していた。二番目に多いのが $\beta$ -カロテンで（1.70 mg）、3番目にゼアキサンチン（0.70 mg）、 $\beta$ -クリプトキサンチンの摂取量は4番目で一日当たり約0.31 mgであった（図4上グラフ）。

さて、このように食事調査から推定したカロテノイド摂取量と血中濃度との関係はどうだったであろうか？結果は全てのカロテノイドはそ

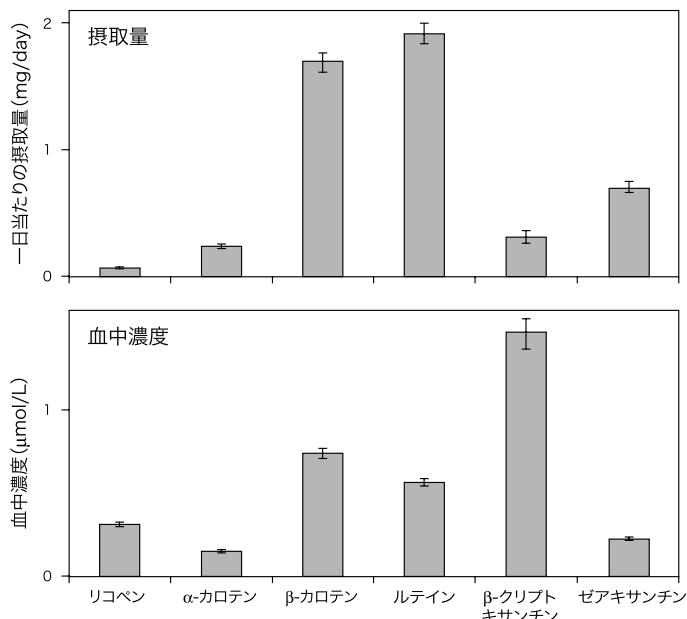


図4 各カロテノイドの一日当たりの摂取量と血中濃度  
(データは女性被験者の幾何平均値)

の摂取量と血中濃度とに有意な相関が確認できた。ちなみに摂取量は6種類中4番目という低さだった $\beta$ -クリプトキサンチンだが、血中濃度はルテインの約2.6倍も高く1.46 ( $\mu\text{mol/L}$ ) であった。このことから $\beta$ -クリプトキサンチンはカロテノイドの中でも特に吸収性が良く体内に溜まりやすいことが推察される(図4下グラフ)。また調査したのが4月であったために、 $\beta$ -クリプトキサンチンの摂取量が低い時期であったが、ミカンシーズンの冬であればおそらく摂取量は一番多いのではないかと予想される。

## 8. 血中カロテノイド濃度と喫煙・飲酒との関係

次に主要なカロテノイド6種の血中濃度に影響する要因を重回帰分析で調べた(表1)。我々はこれまでに血中 $\beta$ -クリプトキサンチン値には、年齢・性別・肥満度・喫煙・飲酒が有意に影響することを明らかにしてきたが<sup>17)</sup>、今回、更に血中総コレステロールも重回帰モデルに組み込んで解析してみた。その結果、年齢が血中濃度に影響するのは6種のうち、リコペン、 $\beta$ -カロテン、ルテイン、 $\beta$ -クリプトキサンチンであり、 $\beta$ -カロテン、ルテイン及び $\beta$ -クリプ

トキサンチンは高齢者ほど血中濃度が高く、逆にリコペンは低いことがわかった。また男女による違いがみられたのは $\beta$ -カロテンとゼアキサンチンであった。これらは食生活の違いが年齢や性別で異なることを示している。一方、肥満度は $\beta$ -クリプトキサンチン以外の全てのカロテノイドで負の関連が認められた。カロテノイドは脂肪組織に蓄えられ易いので、太った人ほど逆に血中濃度が低くなることが考えられる。また総コレステロールは全てのカロテノイドと正相関を示し、これはカロテノイドがリポタンパクに組み込まれて血液循環に乗るためと考えられる。さて、喫煙と飲酒習慣はどうだったであろうか？先ず喫煙であるが、ゼアキサンチン以外の全てのカロテノイドと有意な負の関連が認められた。一方、飲酒はルテインとゼアキサンチン以外のカロテノイドで有意な負の関連が認められた。この重回帰分析の結果からは、飲酒・喫煙習慣がこれらカロテノイドの血中レベルを低下させるのか、あるいはただ単にこれらの習慣を有する人ではカロテノイドの摂取量がもともと少ないというだけなのかもしれない。次に我々は喫煙習慣と飲酒量をもとに被験者を6つのグループに分けて、それぞれのカロテノイドの摂取量が各グループ間で同じとな

表1 各カロテノイドの血清濃度と関連要因との重回帰分析

| 独立変数                    | 従属変数    |         |                |         |               |         |         |         |                    |         |         |         |
|-------------------------|---------|---------|----------------|---------|---------------|---------|---------|---------|--------------------|---------|---------|---------|
|                         | リコペン    |         | $\alpha$ -カロテン |         | $\beta$ -カロテン |         | ルテイン    |         | $\beta$ -クリプトキサンチン |         | ゼアキサンチン |         |
|                         | $\beta$ | P value | $\beta$        | P value | $\beta$       | P value | $\beta$ | P value | $\beta$            | P value | $\beta$ | P value |
| 年齢                      | -0.329  | <0.001  | 0.013          | 0.641   | 0.134         | <0.001  | 0.128   | <0.001  | 0.142              | <0.001  | 0.015   | 0.619   |
| 性                       | 0.024   | 0.523   | 0.017          | 0.655   | 0.121         | <0.001  | -0.032  | 0.435   | -0.020             | 0.536   | -0.081  | 0.044   |
| 肥満度 (BMI)               | -0.098  | <0.001  | -0.126         | <0.001  | -0.165        | <0.001  | -0.133  | <0.001  | -0.031             | 0.179   | -0.093  | 0.001   |
| 喫煙習慣                    | -0.074  | 0.033   | -0.182         | <0.001  | -0.177        | <0.001  | -0.118  | 0.002   | -0.146             | <0.001  | -0.067  | 0.071   |
| アルコール摂取量                | -0.167  | <0.001  | -0.167         | <0.001  | -0.240        | <0.001  | 0.047   | 0.175   | -0.174             | <0.001  | 0.014   | 0.675   |
| 総コレステロール                | 0.262   | <0.001  | 0.205          | <0.001  | 0.212         | <0.001  | 0.277   | <0.001  | 0.146              | <0.001  | 0.315   | <0.001  |
| 総摂取カロリー<br>(アルコールを除く)   | -0.034  | 0.216   | -0.074         | 0.007   | -0.103        | <0.001  | -0.033  | 0.312   | -0.069             | 0.003   | -0.039  | 0.220   |
| 各カロテノイドの<br>摂取量         | 0.170   | <0.001  | 0.224          | <0.001  | 0.171         | <0.001  | 0.119   | <0.001  | 0.492              | <0.001  | 0.239   | <0.001  |
| R <sup>2</sup> adjusted | 0.249   |         | 0.264          |         | 0.409         |         | 0.140   |         | 0.455              |         | 0.145   |         |

るよう統計学的な補正を行った上で血中濃度を計算してみた。

9.

### 喫煙と飲酒は相乗的に血中カロテノイドを下げる？

被験者を先ず喫煙者と非喫煙者（煙草を止めた人を含む）で分け、その後、更にアルコール摂取量から①非飲酒群（一日当たり1g未満）、②軽度飲酒群（1g以上25g未満）、③アルコール常用群（毎日25g以上）の6群にグループ化した。先述したようにアルコール換算で25gまでが適量と考えられる量である。次に6グループにおけるそれぞれのカロテノイドの摂取量が同じになるように統計的に補正を行った上で各カロテノイドの血中濃度を解析した<sup>26)</sup>。その結果、非常に興味深い結果が得られた（図5）。

飲酒と喫煙のどちらの習慣も有さないグループと喫煙習慣を有するが非飲酒者であるグループの血中カロテノイド値を比較すると、何れのカロテノイドも有意な差は認められなかった。喫煙だけだと血中のカロテノイドにはどうも影響しないようである。ところが、非喫煙者でもアルコールの摂取量が25g以上になると、ルテインとゼアキサンチン以外のカロテノイドは全て有意に低いことがわかった（図5中の矢印b）。適量範囲である1-25gの飲酒量だと影響は無いようである（矢印a）。ところが適量の飲酒量でも、喫煙者についてみると $\alpha$ -カロテン、 $\beta$ -カロテン及び $\beta$ -クリプトキサンチンの血中濃度は有意に低くなり（矢印c）、喫煙と飲酒の両方をやることでどうやら相乗的に酸化ストレスが増大しているのではないかという結果が得られた。25g以上のアルコール常用者では喫煙

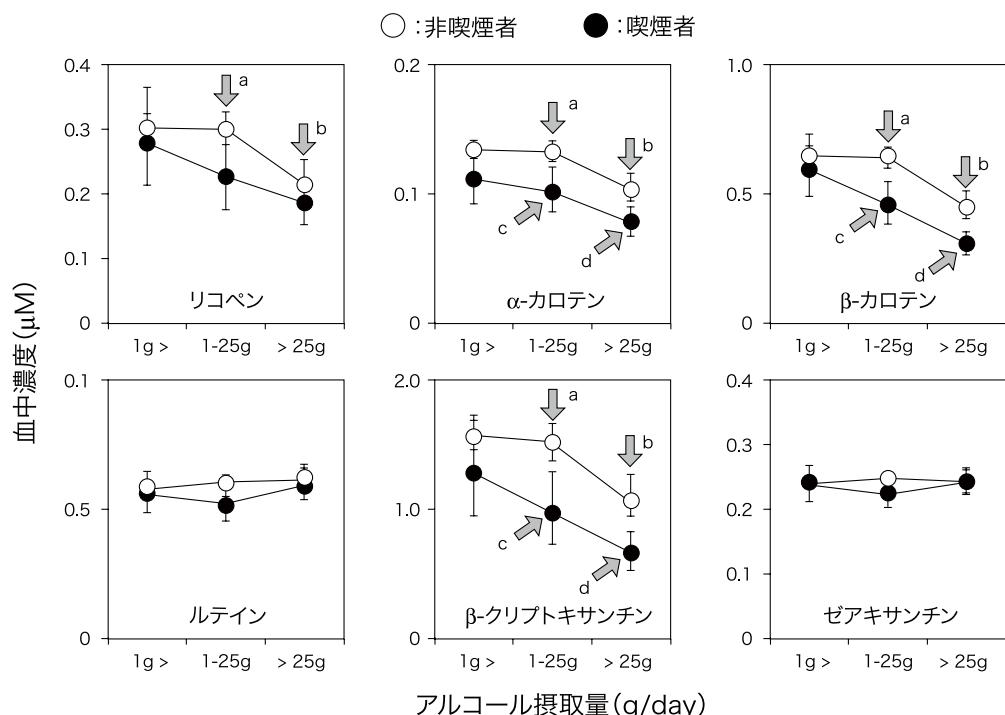


図5 喫煙・飲酒習慣別にみた血中カロテノイド値

6種それぞれのカロテノイド摂取量は各群で同じになるように統計学的な補正を行った上で血中濃度（幾何平均値）を算出した。引用文献26）のデータから作図

の影響が更に顕著に現れることも確認できた(矢印d)。興味深いのは、リコペンは飲酒による影響はあっても喫煙の影響は小さく、これに対し $\alpha$ -カロテン、 $\beta$ -カロテン及び $\beta$ -クリプトキサンチンの3つのカロテノイドは喫煙と飲酒の影響を相乗的に受けることがわかったことである。またルテインとゼアキサンチンは喫煙・飲酒の何れの影響も受けないようである。6つのグループにおけるそれぞれのカロテノイド摂取量が同じになるように統計学的な補正を行って血中カロテノイド値を多変量調整値として計算すると、お酒も煙草もやらない人達に比べて、煙草を吸って毎日25g以上のアルコールを摂取している人達では、仮に同じ量の $\beta$ -クリプトキサンチンを摂取したとしても、血中濃度は約53%も低いという結果になった。同様に $\beta$ -カロテンの場合は52%でほぼ同程度、 $\alpha$ -カロテンでは約43%、リコペンでは約37%低い計算結果になった。

#### 10. カロテノイドによって喫煙・飲酒の影響が違うのは何故?

近年の研究から、喫煙と飲酒が生体内の酸化ストレスを相乗的に増悪させることが幾つかの研究で報告されており、これらの研究から喫煙・飲酒は相乗的に生体内の抗酸化物質を消費してしまうことが十分に考えられる。実際に今回の研究結果においても、喫煙と飲酒が血中のカロテノイドレベルを相乗的に減少させるのではないかと考えられる結果が得られた。喫煙と飲酒の影響の受け易さがカロテノイドによって異なることを主要な6種のカロテノイドについて検討した報告は今回が初めてである。飲酒や喫煙により、生体内で過剰なフリーラジカルが產生することは広く知られており、これら両方の生活習慣を有する人では相乗的に増大したフリーラジカルを消去するためにカロテノイドが余計

に消費されているのではないかと考えられる。この点を考えると、 $\alpha$ -カロテン、 $\beta$ -カロテン、及び $\beta$ -クリプトキサンチンの3つのカロテノイドは酸化ストレスから身を護る上で非常に有益な抗酸化物質と云うことが考えられる。また喫煙者ではカロテノイドからレチナールへの変換が亢進していることが報告されており、また飲酒によっても血中レチナールが低下することも近年報告されている。 $\alpha$ -カロテン、 $\beta$ -カロテン、及び $\beta$ -クリプトキサンチンはビタミンA効力を有するカロテノイドであるが、そのために特にこれら3種のカロテノイドの血中濃度に違いが認められたではないかと考えられる。一方、ルテイン・ゼアキサンチンが喫煙・飲酒の影響を受けなかったのは、これらのカロテノイドがプロビタミンでは無いこと、また生体内の酸化ストレスに対して有効に機能しないカロテノイドであるということも推察される。その理由として、他のカロテノイドに比べてその化学構造上に水酸基を2つ有することで細胞膜での局在性が異なるために、細胞膜での酸化障害に対して有効に機能できないのではないかということも考えられる。いずれにせよ、今回の解析結果から、お酒と煙草の両方をやる人はどちらもやらない人よりもかなり多くの果物・野菜を摂らないといけないのではないかだろうか。

以上、紹介したように喫煙と飲酒は相乗的に生体内における酸化ストレスを増大させ、その結果、がんや心筋梗塞などの生活習慣病の発症リスクを著しく高めてしまうことが考えられる。このような酸化ストレスが増大した状況下で、 $\beta$ -クリプトキサンチンなどのカロテノイドが減少するのは、過剰に発生したフリーラジカル種を消去するために毒消し役としてせっせと働いているのではないだろうか。また飲酒だけ、あるいは喫煙だけに焦点を絞った疾患リスクとの関連を解析した結果はこれまで比較的多く報告されていたが、喫煙と飲酒の両方の習慣

を有する人における様々な疾病リスクとの関係を更に詳しく調べる必要もありそうだ。そうすればもっと公衆衛生学的にも重要な知見となるであろう。

### おわりに

$\beta$ -クリプトキサンチンや $\beta$ -カロテン等のカロテノイド類は喫煙・飲酒の毒消し役として優れた効果がありそうだが、だからといって、果

物や野菜類をたくさん食べていれば良いということではない。特に喫煙はがんなどいろいろな病気のリスクを著しく高めてしまう悪者でしかない。果物・野菜の健康効果よりも喫煙の害の方がはるかに大きいことは間違の無い事実である。なるべくなら禁煙して、そしてほどほどのお酒を嗜むことが肝要であろう。もちろんバランスの良い食事と毎日適度に運動することも重要である。

### 参考文献

- 1) Britton G, Synnove LJ & Pfander H: Carotenoids Handbook, Birkhauser Verlag, Base, 2004.
- 2) 宮下和夫監修: カロテノイドの科学と最新応用技術. シーエムシー出版, 2009.
- 3) Bieri JG, Brown ED, Smith JC. Determination of individual carotenoids in human plasma by high performance liquid chromatography. *J Liq Chromatogr*, 8, 473-484, 1985.
- 4) World Health Organization: Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases. Joint WHO/FAO Expert Consultation. *WHO Technical Report Series* no. 916, 2003.
- 5) 果樹試験研究推進協議会 Internet homepage: <http://www.cryptoanthin.jp/index02.html> (accessed 30 June 2012)
- 6) カロテノイド.info Internet homepage: <http://www.karotenoido.info/pdf/crt.pdf> (accessed 30 June 2012)
- 7) Sandhir R, Subramanian S, Koul A. Long-term smoking and ethanol exposure accentuates oxidative stress in hearts of mice. *Cardiovasc Toxicol*, 3(2):135-140, 2003.
- 8) Husain K, Scott BR, Reddy SK, Soman SM. Chronic ethanol and nicotine interaction on rat tissue antioxidant defense system. *Alcohol*, 25(2): 89-97, 2001.
- 9) Hartwig W, Werner J, Ryschich E, Mayer H, Schmidt J, Gebhard MM, Herfarth C, Klar E. Cigarette smoke enhances ethanol-induced pancreatic injury. *Pancreas*, 21(3): 272-278, 2000.
- 10) Sakata K, Hoshiyama Y, Morioka S, Hashimoto T, Takeshita T, Tamakoshi A; JACC Study Group. Smoking, alcohol drinking and esophageal cancer: findings from the JACC Study. *J Epidemiol*, 15 Suppl 2: S212-219, 2005.
- 11) Hara M, Sasaki S, Tsugane S; Japan Public Health Center Study Group. Effect of smoking on the association between alcohol consumption and cancer mortality among middle-aged Japanese men: JPHC Study Cohort I. *IARC Sci Publ.*, 156: 165-168, 2002.
- 12) Otani T, Iwasaki M, Yamamoto S, Sobue T, Hanaoka T, Inoue M, Tsugane S; Japan Public Health Center-based Prospective Study Group. Alcohol consumption, smoking, and subsequent risk of colorectal cancer in middle-aged and elderly Japanese men and women: Japan Public Health Center-based prospective study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 12(12): 1492-1500, 2003.
- 13) Inoue M, Tsugane S; JPHC Study Group. Impact of alcohol drinking on total cancer risk: data from a large-scale population-based cohort study in Japan. *Br J Cancer*, 92(1): 182-187, 2005.
- 14) Yano M, Kato M, Ikoma Y, Kawasaki A, Fukazawa Y, Sugiura M, Matsumoto H, Ohara Y, Nagao A. Quantitation of Carotenoids in Raw and Processed Fruits in Japan. *Food Sci Technol Res.*, 11(1): 13-18, 2005.
- 15) Aizawa K, Inakuma T. Quantitation of carotenoids in commonly consumed vegetables in Japan. *Food Sci Technol Res.*, 13(3): 247-252, 2007.
- 16) Sugiura M, Kato M, Matsumoto H, Nagao A, Yano M. Serum concentration of  $\beta$ -cryptoxanthin in Japan reflects the frequency of Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) consumption. *J Health Sci.*, 48(4): 350-353, 2002.
- 17) Sugiura M, Matsumoto H, Kato M, Ikoma Y, Yano M, Nagao A. Multiple linear regression analysis of seasonal changes in the serum concentration of  $\beta$ -cryptoxanthin. *J Nutr Sci Vitaminol*, 50(3): 196-202, 2004.

- 18) Sugiura M, Matsumoto H, Kato M, Ikoma Y, Yano M, Nagao A. Seasonal changes in the relationship of  $\beta$ -cryptoxanthin and serum lipid level. *J Nutr Sci Vitaminol*, **50**(6): 410-415, 2004.
- 19) Sugiura M, Nakamura M, Ikoma Y, Yano M, Ogawa K, Matsumoto H, Kato M, Ohshima M, Nagao A. High serum carotenoids are inversely associated with serum gamma-glutamyltransferase in alcohol drinkers within normal liver function. *J Epidemiol*, **15**(5): 180-186, 2005.
- 20) Sugiura M, Nakamura M, Ikoma Y, Yano M, Ogawa K, Matsumoto H, Kato M, Ohshima M, Nagao A. Serum carotenoid concentrations are inversely associated with serum aminotransferases in hyperglycemic subjects. *Diabetes Res Clin Pract*, **71**(1): 82-91, 2006.
- 21) Nakamura M, Sugiura M, and Aoki N. High  $\beta$ -carotene and  $\beta$ -cryptoxanthin are associated with low pulse wave velocity. *Atherosclerosis*, **184**(2): 363-369, 2006.
- 22) Sugiura M, Nakamura M, Ikoma Y, Yano M, Ogawa K, Matsumoto H, Kato M, Ohshima M, Nagao A. The homeostasis model assessment-insulin resistance index is inversely associated with serum carotenoids in non-diabetic subjects. *J Epidemiol*, **16**(2): 71-78, 2006.
- 23) Sugiura M, Nakamura M, Ogawa K, Ikoma Y, Ando F, Yano M. Bone mineral density in post-menopausal female subjects is associated with serum antioxidant carotenoids. *Osteoporosis Int*, **19**(2): 211-219, 2008.
- 24) Sugiura M, Nakamura M, Ogawa K, Ikoma Y, Ando F, Shimokata H and Yano M. Dietary patterns of antioxidant vitamin and carotenoid intake associated with bone mineral density: Findings from post-menopausal Japanese female subjects. *Osteoporosis Int*, **22**(1): 143-152, 2011.
- 25) Sugiura M, Nakamura M, Ogawa K, Ikoma Y, Matsumoto H, Ando F, Shimokata H and Yano M. Associations of serum carotenoid concentrations with metabolic syndrome: Interaction with smoking. *Br J Nutr*, **100**(6): 1297-1306, 2011.
- 26) Sugiura M, Nakamura M, Ogawa K, Ikoma Y, Matsumoto H, Ando F, Shimokata H and Yano M. Synergistic interaction of cigarette smoking and alcohol drinking with serum carotenoid concentrations: findings from the middle-Japanese population. *Br J Nutr*, **102**(8): 1211-1219, 2009.
- 27) The Alpha-Tocopherol, Beta Carotene Cancer Prevention Study Group. The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. *N Engl J Med*, **330**(15): 1029-1035, 2009.
- 28) Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD, Balmes J, Cullen MR, Glass A, Keogh JP, Meyskens FL, Valanis B, Williams JH, Barnhart S, Hammar S. Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N Engl J Med*, **334**(18): 1150-1155, 1996.
- 29) Yuan JM, Ross RK, Chu XD, Gao YT, Yu MC. Prediagnostic levels of serum beta-cryptoxanthin and retinol predict smoking-related lung cancer risk in Shanghai, China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **10**(7): 767-773, 2001.
- 30) Yuan JM, Stram DO, Arakawa K, Lee HP, Yu MC. Dietary cryptoxanthin and reduced risk of lung cancer: the Singapore Chinese Health Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **12**(9): 890-898, 2003.
- 31) Voorrips LE, Goldbohm RA, Brants HA, van Poppel GA, Sturmans F, Hermus RJ, van den Brandt PA. A prospective cohort study on antioxidant and folate intake and male lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **9**(4): 357-365, 2000.
- 32) Männistö S, Smith-Warner SA, Spiegelman D, Albanes D, Anderson K, van den Brandt PA, Cerhan JR, Colditz G, Feskanich D, Freudenheim JL, Giovannucci E, Goldbohm RA, Graham S, Miller AB, Rohan TE, Virtamo J, Willett WC, Hunter DJ. Dietary carotenoids and risk of lung cancer in a pooled analysis of seven cohort studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **13**(1): 40-48, 2000.
- 33) Ito Y, Wakai K, Suzuki K, Ozasa K, Watanabe Y, Seki N, Ando M, Nishino Y, Kondo T, Ohno Y, Tamakoshi A; JACC Study Group. Lung cancer mortality and serum levels of carotenoids, retinol, tocopherols, and folic acid in men and women: a case-control study nested in the JACC Study. *J Epidemiol*, **15** Suppl 2: S140-S149, 2005.

# マンゴー生姜について

堀田 幸子<sup>\*1</sup> 小谷 明司<sup>\*2</sup>

<sup>\*1</sup> HORITA Sachiko (備南ハイフーズ株式会社), <sup>\*2</sup> KOTANI Akeshi (技術士／水産部)

Key Words : ショウガ・ウコン・香辛料・抗酸化・血小板凝集阻害・抗炎症・アユールヴェーダ

## はじめに

生姜は香辛料、食材、あるいは漢方薬や民間薬の原料として世界的に利用されている。生姜の近縁植物にもマイナーではあるが同様に利用されているものが少なからずある。本稿ではマンゴー生姜の性質、利用法等について概要を紹介する。

## 1. マンゴー生姜とは

マンゴー生姜の学名は *Curcuma amada* Roxb. で、普通の生姜がショウガ属 [Zingibera] に分類されるのを考慮すれば植物分類学的にはやや類縁が薄い。生姜の類縁植物のうち約 80 類が利用されているが、これらの多くはアジア、アフリカ、オーストラリアの熱帯から亜熱帯に分

布する。マンゴー生姜の植物学的位置づけは単子葉植物綱、ショウガ目 [Zingiberales]、ショウガ科 [Zingiberaceae]、ウコン属 [Curcuma] である<sup>1,2)</sup> (図 1)。生姜類の原産地はインドからマレイにかけての地帯と推定され、インドの西ベンガルにマンゴー生姜の野生種の自生が確認されている。栽培はインド各地で行われている。

マンゴー生姜は根を利用するが、「マンゴー」の冠称があるように、根にはマンゴー様の芳香がある。筆者達はインド産のマンゴー生姜の根の乾燥品を入手したが、甘いハッカ様の香りを有していた (写真 1)。株分けした根を定植して栽培し 150 日程度で成長が極大に達し、180 日以後は老衰期に入る。根に含まれる生理活性

単子葉植物綱 (Monocotyledionae)  
ショウガ目 (Zingiberales)  
ショウガ科 (Zingiberaceae)  
ウコン属 (Curcuma)  
マンゴー生姜 (*Curcuma amada* Roxb.)  
ウコン (*Curcuma longa*)  
ショウガ属 (Zingiber)  
生姜 (*Zingiber officinale*)  
茗荷 (*Zingiber mioga*)

図 1 マンゴー生姜の植物分類



写真 1 インド産のマンゴー生姜の根のスライス乾燥製品

成分の含有量もほぼ同様の経過を辿るようである<sup>3)</sup>。

食材としては漬け物原料として利用される。古来より根には薬効が認められ、伝統医学や民間療法に利用されている。消化器系の異常、皮膚疾患や皮膚感覚異常、各種の炎症への効果が認められているようだ<sup>3)</sup>。

また、マンゴー生姜の根の抽出物の薬理作用や含有成分の特定と各成分の薬理作用も調べ始められている。これらについては後述したい。

## 2. 伝統医学でのマンゴー生姜の利用

### 1) アユール ヴェーダ

アユール ヴェーダはインドに承継されている医学大系で多分に哲学的要素を含む。5000年の歴史を有するとされ古代ギリシャ、ペルシャの医学にも影響を与えていたとされる。アユール ヴェーダでは人体に影響を与えていたとする三つの要素〔ヴァータ、ピッタ、カバ〕を仮定し、これらの調和を重視する。疾病や不健康状態は、これらのバランスの乱れに由来するとし、三者の調和の回復をめざして治療を行なう<sup>4)</sup>。アユール ヴェーダではマンゴー生姜は食欲増進剤、解熱剤、催淫剤、緩下剤等として処方するようだ<sup>3)</sup>。

### 2) ユナニー医学

ユナニー医学はイスラム圏に承継されている医学・薬学の大系である。古代ギリシャに源を持ちアラビアに伝わって発展した。中東、東南アジア、中央アジアに流布した後、現在ではパキスタンとインドに承継されている。ユナニー医学では人体の四つの液体〔血液、粘液、黄色の胆汁、黒色の胆汁〕の調和を重視する。治療はこれらの調和の回復をめざして行われる<sup>4)</sup>。

ユナニー医学ではマンゴー生姜は利尿剤、緩下剤、去痰剤、解熱剤、食欲増進剤、各種の炎症治療等に処方されるようだ<sup>3)</sup>。

## 3. マンゴー生姜の化学、生理活性

マンゴー生姜の薬理活性解明の目的で根の抽出物の活性が調べられ、さらに根の成分の分画、抽出物の活性の検定、さらには抽出物からの物質の精製・単離と化学構造の決定、同定された純物質の活性が調べられている。揮発性の精油を含みマンゴー様の芳香はカーニルエンとシス-オスマメンに由来するとされる<sup>2)</sup>(図2)。フェノール性成分を相当量含有し抗酸化活性、抗菌活性に寄与すると推定される<sup>2,5)</sup>。フェノール成分にはクルクミンとその類縁物質が含まれ、マンゴー生姜とウコン〔ターメリック〕との類縁を暗示している(図3)。さらにテルペノイド化合物を含み、これらのいくつかが純粋化合物として精製され化学的・生物的活性が確認されている。筆者達はマンゴー生姜の乾燥根のエタノール抽出液の薄層クロマトグラムを観察し、通常の生姜根に含まれる6-ジングオールは確認できず、ウコン(ターメリック)のエタノール抽出物に類似することを確認した(写真2)。一般食品成分として重要なデンプンを多量に根に蓄積し40%強になるという<sup>3)</sup>。

### 1) 根抽出物の化学、生理活性

マンゴー生姜の根の抽出物の活性については以下のようなものがある。

#### (1) 抗酸化活性

マンゴー生姜の根には相当量のフェノール

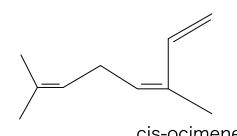
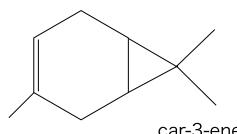


図2 マンゴー生姜のマンゴー様香気の成分

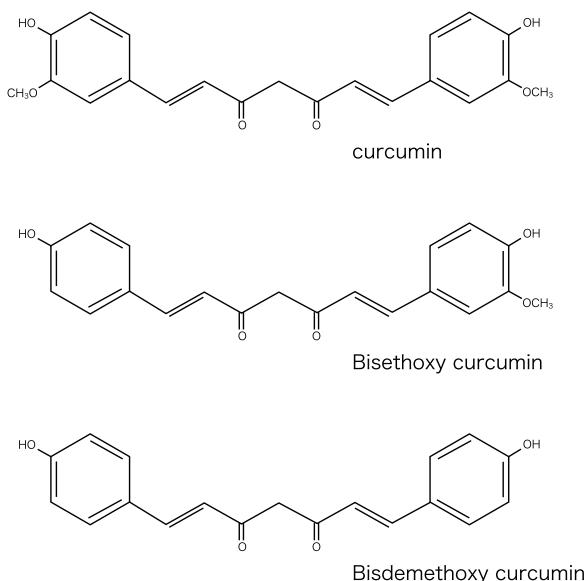


図3 マンゴー生姜のクルクミン関連物質

ル成分が含まれ、抗酸化活性が期待される。 Krishnaraj 等は乾燥根のメタノール抽出物のフェノール性物質含量は約 40 mg/g であったと報告しており、フェリシアン化カリを用いる還元力の測定、ニトロブルーテトラゾリウム [NBT] を用いるスーパーオキサイド消去活性、2,2'-アゾビス-(3-エチレンベンゾチアゾリン-6-スルfonyl 酸) ラジカル陽イオン [ABTS] を用いる遊離ラジカル消去活性を調べて、いずれの活性も確認している<sup>5)</sup>。

次に Policegourdra 等は根を抽出溶媒の極性の低いものから高いものへ段階的に選択して 6 段階で抽出し、各抽出物の活性を評価した。メタノール抽出物にフェノール性成分が最も多く含まれ、1,1-ジフェニル-2-ピクリル-1-ヒドラジルラジカルとスーパーオキサイドの消去活性、および総還元力は酢酸エチル抽出物が最も強いことを報告している。また彼らは各抽出物の脂肪の過酸化防止活性、金属イオンとのキレート生成活性についても報告している<sup>6)</sup>。

#### (2) 細胞毒性

Policegourdra 等は根を種々の溶媒で抽出し、



① 6-ジンゲオール

②生姜

③マンゴー生姜

④ターメリック

⑤ブラックジンジャー

写真2 マンゴー生姜とその類縁植物の乾燥根のエタノール抽出液の薄層クロマトグラム  
(オルシノール硫酸発色)

ベロ細胞（健常なアフリカミドリザルの腎細胞）、A-549 細胞（ヒト小胞肺癌細胞）を用いた細胞毒性試験で酢酸エチル抽出物が最も活性の強いことを報告している<sup>7)</sup>。

#### (3) 血小板凝集阻害作用

Policegourdra 等は根の酢酸エチル、アセトン、メタノール、水の抽出物に血小板凝集阻害作用のあることを報告している。酢酸エチル抽出物が最強の活性を示し  $IC_{50}$  は 50 ~ 60  $\mu\text{g}$  と報告している<sup>7)</sup>。

#### (4) 抗炎症作用

Mujumdar 等はアルビノラットにカラギナン皮下注射と錠粒挿入により腫瘍を発症させ、これらに対するマンゴー生姜の根のエタノール抽出物の抗炎症作用を観察した。カラギナン浮腫では対照薬インドメタシン 10 mg/Kg 投与には及ばないものの、エタノール抽出物 200 mg の

経口投与で抗炎症作用が観察された。綿粒により誘発された腫瘍は 20 mg, 40 mg の経口投与でインドメタシン 5 mg の投与よりやや弱い抗炎症作用を観察した<sup>8)</sup>。

## 2) 精製成分と活性

マンゴー生姜の根の活性成分の精製・分離は有機溶媒抽出、カラムクロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー等の方法を組み合わせて実施され数種の活性物質が確認されている。

### (1) アマダヌレン

アマダヌレンは炭素、水素、酸素からなるテルペノイド化合物である。一個の二重結合を共有して 10 個の炭素の環状炭化水素骨格と 5 個の炭化水素骨格が縮合した親骨格に 6 個の炭化水素骨格が結合したカルボン酸のエチルエステル構造を有する(図 4)。この化合物はマンゴー生姜の根から初めて検出された新規化合物である。DPPH ラジカル消去、スーパーオキサイド消去、脂肪過酸化防止、金属キレート形成等の酸化防止に関連する化学活性を有し、抗菌活性も確認された。シュードモナス、サルモネラ、クレブシラ、エンテロコッカス、イエルシア、ミクロコッカス、黄色ブドウ菌、エンテロバクター、バチルス、リステリア等の細菌に対して抗菌作用を示し、*Bacillus subtilis*, *Bacillus*

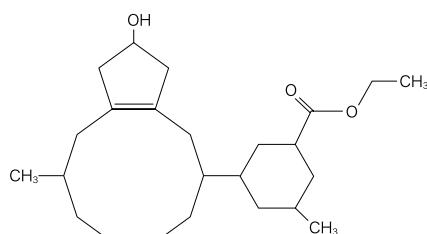


図 4 アマダヌレンの化学構造

*cereus* に対する殺菌作用も確認された。ただし作用発現濃度はかなり高かった<sup>9)</sup>。

### (2) ジフロクメノノール

ジフロクメノノールもマンゴー生姜より検出された新規なテルペノイド化合物であり窒素原子は含まれない。10 員環と 5 員環の縮合炭化水素を有する点でアマダヌレンと化学構造の類縁性が見られ 2 個のフラン環を有する(図 5)。

Policegoudra 等はこの化合物の抗菌活性を詳細に検討した。本化合物はシュードモナス、サルモネラ、クレブシラ、エンテロバクター、ミクロコッカス、黄色ブドウ菌、エンテロコッカス、バチルス、リステリア等の幅広い細菌に対して抗菌作用を示した。殺菌作用は観察されなかった<sup>2,3)</sup>。

### (3) アマドアルデヒド

アマドアルデヒドも窒素原子を含まない新規なテルペノイドである。本化合物は直鎖の炭化水素骨格を有し骨格中の共役位置に相隣接する二重結合と三重結合を有する。アルデヒド基は炭化水素骨格の末端に位置する(図 6)。

Policegoudra 等は本化合物の抗菌作用を調べ、

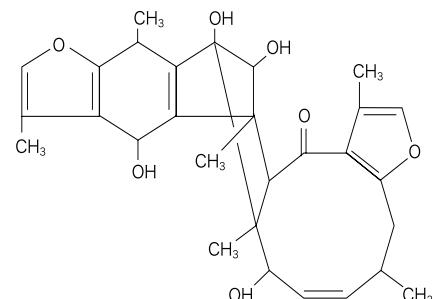


図 5 ジフロクメノノールの化学構造

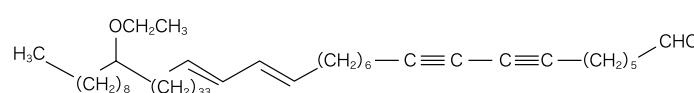


図 6 アマドアルデヒドの化学構造

グラム陽性菌、グラム陰性菌への抗菌作用を確認した。また、彼らはDPPHラジカル消去作用、スーパーオキサイド消去作用、脂肪過酸化抑制作用、金属キレート形成活性を確認し抗酸化活性のあることを確認した。さらに、血小板凝集抑制作用 [ $IC_{50}=113\text{ }\mu\text{g}$ ]、細胞毒性 [A-549細胞;  $IC_{50}=100\sim120\text{ }\mu\text{g}$ 、ベロ細胞  $IC_{50}=\text{約 }120\text{ }\mu\text{g}$ ] 等の生理活性を確認した<sup>10)</sup>。

### おわりに

日本の健康食品分野では生姜加工品の需要が活発化している。生姜の機能性成分であるショウガオール等の生体機能に着目した商品開発がヒットした。生姜乾燥品は漢方薬に配合する基本の生薬の一つであるが、アユール ヴェーダやユナニ医学等で賞用されてきたマンゴー生姜の成分の機能性が明らかにされつつあり、今後の健康食品開発の素材となる可能性を秘めている。

### 参考文献

- 1) 編集記事, *FFI Journal*, Vol.217(2): 205-210, 2012.
- 2) R. S. Policegourda *et al.*: *J. Biosci.*, Vol.36(4): 739-748, 2011.
- 3) R. S. Policegourda *et al.*: *J. Agric. Food Chem.*, Vol.55(20): 8105-8111, 2007.
- 4) ウィキペディア 2012年1月
- 5) M. Krishnaraj *et al.*: *International J. of Plant Production*, Vol.4(3): 169-173, 2010.
- 6) R. SA. Policegoudra *et al.*: *J. of Chromatography B*, Vol.852: 40-48, 2007.
- 7) R. S. Policegoudra *et al.*: *Food Technol. Biotechnol.*, Vol.49(2): 162-168, 2001.
- 8) A. M. Mujumdar *et al.*: *Indian J. of Pharmacology*, Vol.32: 375-377, 2000.
- 9) R. S. Policegourda *et al.*: *J. of Chromatography B*, Vol.852: 40-48, 2007.
- 10) R. S. Policegourda *et al.*: *J. Biosci.*, Vol.36(4): 231-240, 2010.

## 総 説

# 塩麹～温故知新の調味料～

山本 晋平<sup>\*1</sup> 松郷 誠一<sup>\*2</sup>

<sup>\*1</sup> YAMAMOTO Shinpei (株式会社ヤマト醤油味噌, 金沢大学大学院 自然科学研究科)

<sup>\*2</sup> MATSUGO Seiichi (金沢大学理工研究域自然システム学系)

Key Words : 塩麹・麹菌・米麹・発酵食品・醸造・調味料

### はじめに

米麹<sup>注)</sup>に食塩と水を混ぜて発酵させた調味料「塩麹」が近年とりわけ2011年の夏ごろから注目を集めている<sup>2)</sup>。日本の伝統的発酵食品である味噌、醤油、酒などの醸造には、必ず麹菌が用いられており<sup>3)</sup>、日本の人々のものの見方、考え方、そして、日本の社会に大きな影響を与えてきた微生物である<sup>4)</sup>として、2006年10月12日の日本醸造学会大会で麹菌が国菌に認定された。しかしながら、味噌<sup>5)</sup>、醤油<sup>6)</sup>、酒<sup>7)</sup>などの販売数量は減少傾向に歯止めがかかる状況で推移しており、国菌の将来に不安があった。国菌を使用した「塩麹」が単なる一過性のブームで終わらず、わが国の伝統的な食文化の根底を見直す一助となることを期待して、本総説にまとめてみる。

### 1. 歴 史

穀物のデンプンの糖化は、カビの力で行う場合と麦芽によって行われる場合がある。東洋で

はカビを、西洋では麦芽を用いる傾向があるが、この違いには気候や文化が関連しているのである。カビを用いる場合には、原料を蒸したりしたものにカビを植え付けて、「麹」という塊を作る。麦芽の場合には、大麦を適切な条件で発芽させたものを用いる<sup>8,9)</sup>。東洋でも、大陸で麹をつくるためのカビは主にクモノスカビであり、日本は古来よりコウジカビである。大陸の麹は原料を生のまま粉体としてから水で練りかためてカビを生やす「餅麹（もちこうじ）」タイプであるのに対し、日本の場合は蒸した米を粒のままでカビを生やす「散麹（ばらこうじ）」タイプであることから、米麹は、日本独自に発生したと考えられる<sup>9)</sup>。この米麹を用いた酒造りが書かれた最初の文献は、奈良時代初期（715年頃）の『播磨国風土記（はりまのくにふどき）』であるが、この文献だけでは、麹酒誕生の時期までは確定できない。しかし、醸造学的に見れば、麹の成立はもっと以前であってもおかしくないという。その根拠は、当時の飯の調理法にある。当時の人たちは、米は今のように水と一緒に

注)「こうじ」を表す漢字は2種類ある。こうじは米、麦、大豆などの穀類でつくるが、これらのこうじ全般を表す漢字として現在では主に「麹」という字が使われている。これは中国から伝わった漢字である。もうひとつの「糀」という字は、明治時代にできた国字（和製漢字）で米麹を表す。米麹を見てみるとふわふわした白い菌糸が蒸し米の表面を花のようにならべて覆っているのがわかる。この様子を表現したのが「糀」という象形文字である<sup>1)</sup>。「塩麹」は、「塩糀」、「塩こうじ」とも表記されているが本総説では「麹」の文字で統一する。

緒に炊くのではなく、甕（こしき）と呼ばれる蒸し器で蒸した強飯（こわめし）として食べていただいた。『播磨国風土記』に記された「御糧」も強飯のことである。そして、甕は縄文時代晩期後半あたりの遺跡からも出土しているし、水稻栽培が広く伝播した弥生時代前期には、すでに甕の使用は珍しくなくなっていた。米を甕で蒸した強飯の水分含有量と、麹カビの繁殖に最も適した水分領域（35～40%）とが一致するため強飯は、麹（酒）の誕生に重要な意味を持っている。炊いた（煮た）米では水分が多すぎ、焼いた米では少なすぎる。例えば、梅雨のようなカビの活動が活発になる時期、器に入れておいた強飯に麹カビが付着して麹ができるというような状況を想定すれば、弥生時代の比較的早い時期に、すでに麹（酒）が造られていたという可能性も否定できないという<sup>10)</sup>。

穀物を糖化する手段として米麹が使用されるようになったのは弥生時代であると考えられ、塩麹の誕生もこの頃と思われるが、正確なところは分かっていない。

柏木<sup>3)</sup>は麹菌はわが国の食事の根底を支えているとして図1を示した。米麹に食塩と水を混ぜて発酵させた調味料「塩麹」の観点から見ると、食塩を使用しないでアルコールで保存性を持たせた日本酒、焼酎、みりんを除き、味噌、醤油、漬物（麹漬け）、塩からは広義の塩麹であるとも言えよう。

食塩、米麹、米を3容、5容、8容の割合で使って甘酒様の床をつくり、これを野菜や水産物、畜肉の上にかけて塩味、甘味を付けた漬物を三五八漬（さごはちづけ）という。配合は種々あるうえに、現在は会津特産といわれているが山形、長野にも同様な漬物があり判然としない<sup>11、12)</sup>。三五八漬は塩麹（食塩と米麹と水をねかせたもの）のはじまりとされている<sup>11)</sup>。平安初期の朝廷運営マニュアルである『延喜式』（905～967）の中には醤漬（ひしおづけ）、未醤漬（みしょうづけ）、糟漬、酢漬、酢糟漬、甘漬、菹（にらぎ）、須須保利（すすほり）、荏裏（えづつみ）などの漬物が紹介されており、甘漬はたぶん米麹に漬けた今のべったら漬けのようなものか、または甘酒（米麹に湯を加え糖化した甘味な液）に漬けたものであるとされている<sup>13)</sup>。これが記録上の最古の塩麹の起源を示すものではないかと思われるが、1000年以上前のことである。

江戸時代になると、漬物のことが書かれた書物も多く、「本朝食鑑」（1695年）や「四季漬物塩嘉言（しおかげん）」（1836年）や、「漬物料理調法集」、「守貞慢稿」（1837年～）、「料理山海郷」（1750年）などに多種多様の漬物をみることができる。表面についた甘酒の麹がべとべとしていることからその名がついたべったら漬の始まりといわれる恵比寿神社の市のことが「増補江戸年中記」（1803年）や「江戸遊覧年

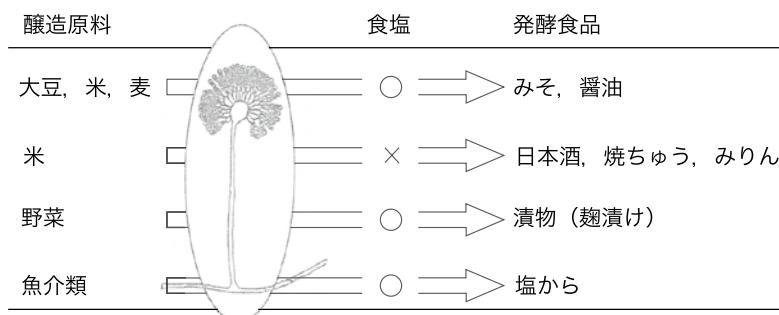


図1 麹菌（こうじきん）と日本の発酵食品  
文献3) の図に一部加筆

中行事」(1848年)などに書かれている<sup>14)</sup>。江戸時代に「香の物」は、主要な副食であり、重要な保存食として食生活の主役でもあった。

明治時代に入り、鎖国は解かれたが、依然として食生活は米食を中心とした生活で大きな変化はなかった。大正、昭和にかけて和食が主流で、漬物は依然として重要な副食の座を占めていた。

昭和20年を境に戦後の食糧難の時代に入り、米不足のために小麦の輸入が増加し、麺食、パン食が急増した。漬物も家庭漬けが少なくなり、小袋詰めが売られるようになった<sup>15)</sup>。

このような状況のもと、麹漬けは、地方の家庭漬けや地方の名産としてお土産となり残るにとどまったと思われる。米麹利用のものは一般に北日本に多い。米麹は昔は甘酒の材料で、寒い地方の甘味料でもあった。それで漬物に甘味をつけるために、べったら漬や三五八漬に使われていた。また、魚の入った漬物には麹が入ると生臭味がなくなるので、にしん漬やかぶらずし、はたはたずしなどに使われる、麹の酵素の働きによるものであろう<sup>14)</sup>。

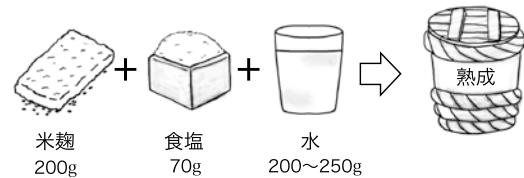
上述のように、塩麹は漬物の漬床としての長い歴史を持つものであるが、調味料としての塩麹に注目したのが浅利である。浅利は、その著書<sup>16)</sup>で「麹のことを学びたい欲求に駆られ、新旧の文献を読むうちに麹の奥深さに魅せられました。中でも、江戸時代に書かれた『本朝食鑑』は、日本食に関する知恵の宝庫でした。麹が生活にとけ込み食の豊かさを支えていたこと、「塩麹」が使われていたことも知りました。そして、麹屋である私たちがその素晴らしさを今に伝えていることに気がつき、家庭に麹の活躍の場を取り戻してもらおうと麹の料理講習会を始めました。料理に味噌や醤油、甘酒を使うと味にうま味や深みが出ることから発想を得て、塩麹を作り料理に使うと、食材の持つ色や香りも引き立ち、いつもの料理が予想以上に美味しいな

りました。まさに万能調味料。我が家では調味料の基本「さしそせそ」の「し」は塩麹に変わり、台所の必需品になりました。」と述べている。こうした活動により「2011年になって、塩麹の良さやおいしさが瞬く間に広がって行きました。その速さは想像を絶するスピードで、ただただ驚くばかりでした。」という塩麹ブームが起こり、今も続いている。

## 2. 製 法

塩麹のレシピ本は多数<sup>1, 16-18)</sup>出版されており、本により若干配合は異なる。前出の浅利の作り方<sup>11)</sup>を図2に示す。材料は、米麹と食塩と水だけである。図2の米麹は糀屋本店の生麹である。米麹は、麹屋、スーパー・マーケットの豆腐売り場、漬物売り場、インターネットショッピングなどでも市販されている<sup>17)</sup>。生麹、乾燥麹、塩切麹があるので、購入の際には注意が必要である。

海老根ら<sup>19)</sup>は、塩切麹、生麹をポリエチレン袋に密封し、25℃で貯蔵した場合、酵素類(α-アミラーゼ、β-アミラーゼ、および最適pHを



- ①米麹は、よくもにほぐしてばらばらにし、塩を合わせて入れてよくなじませる。
- ②握って塊ができるくらいになったら、水を入れ、さらに手のひらですり合わせる。
- ③容器に移して、1週刊~10日、常温に置き1日1回よくかき混ぜる。常に水がひたひたの状態になるように、水を足す。
- ④味見をしてまろやかな甘塩の味になっていたら出来上がり。その後は冷蔵庫で保存する。

図2 塩麹の製法  
文献11)の図に一部加筆

表 1 麴菌酵素とその作用<sup>22)</sup>

| 酵素名               | 作用                                         |
|-------------------|--------------------------------------------|
| プロテアーゼ            | 蛋白質の可溶性、ペプチドの生成<br>ペプチドから各種アミノ酸を遊離         |
| グルタミナーゼ           | グルタミンをグルタミン酸に変換                            |
| アミラーゼ             | 澱粉の液化、デキストリンの生成<br>デキストリン・澱粉（一部）からグルコースを遊離 |
| リパーゼ              | 脂肪をグリセロールと脂肪酸に分解                           |
| セルラーゼ             | 大豆など原料の植物組織を分解                             |
| ペクチナーゼ            | イソフラボン、サポニンなど配糖体から糖を分離                     |
| ヘミセルラーゼ           | 5' - リボヌクレオチド（リボ核酸）の分解（核酸系調味料の無味化）         |
| β-グルコシダーゼ         | 麹の褐変                                       |
| ホスファターゼ           | フィチン・フィチン酸からのイノシトール生成                      |
| チロシナーゼ（酸化酵素）      | レシチンからのコリン生成、イノシトール磷脂質からのイノシトール生成          |
| フィターゼ（ホスファターゼの一種） |                                            |
| ホスホリパーゼ（A～D）      | エステルをアルコールと酸に分解、およびその逆反応を行う酵素の総称           |
| エステラーゼ            |                                            |

異にする 3 種のプロテアーゼ）は、塩切麹でも無塩麹でも貯蔵の初期に激しい消長をみせ、以後は低いレベルで安定することを示している。このことから、生麹、塩切麹を使用する場合は品質の面から製造直後のものを使用するのが望ましいと考えられる。乾燥麹の場合、尾閥ら<sup>20)</sup>は、水分量 10% 以下に乾燥すれば、炭酸ガスなどガス置換の必要性もなく、15℃で 1 年程度、30℃で 6 カ月以内の貯蔵が可能であるとしている。

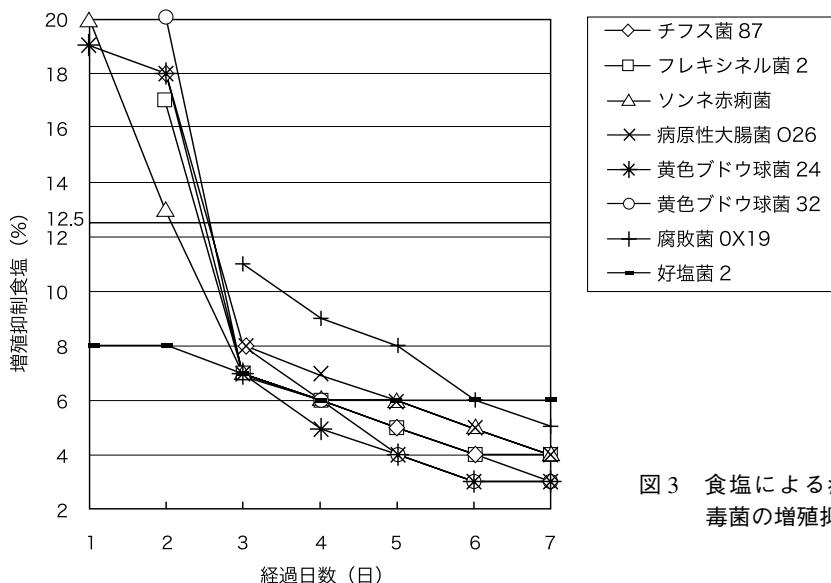
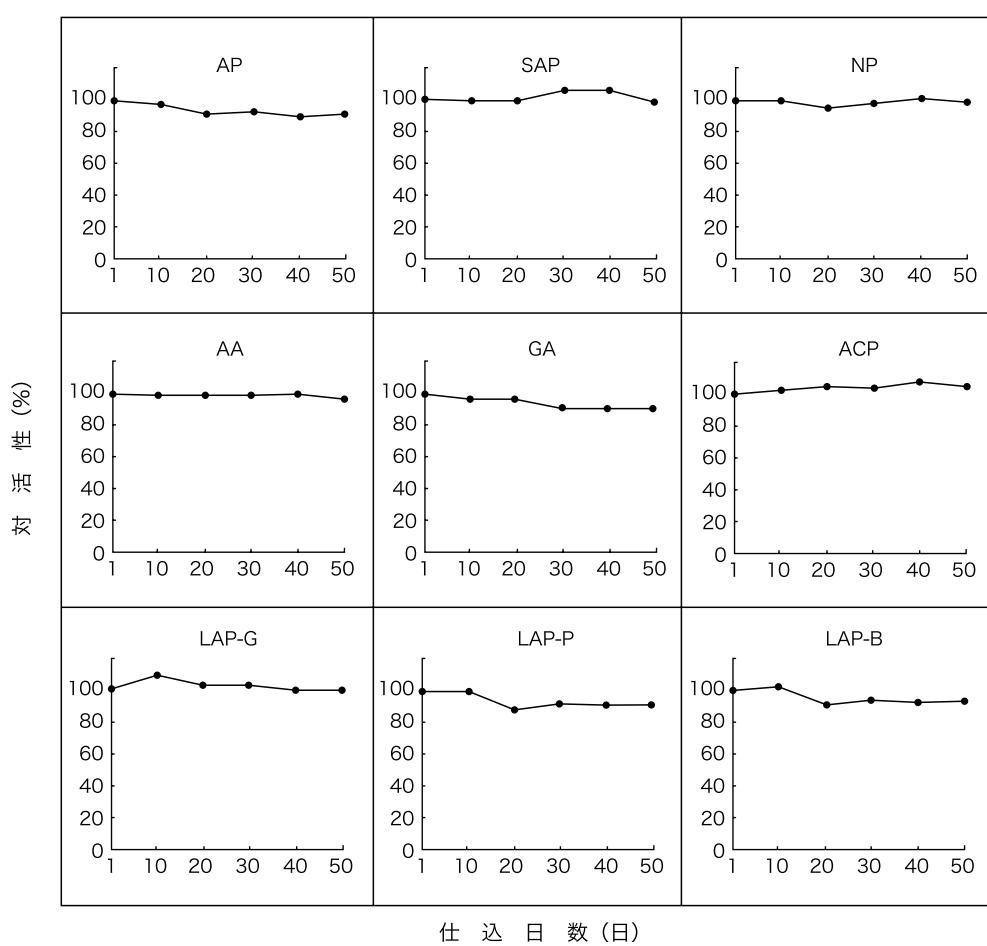
図 2 の製法に従えば、麹菌の作った酵素により、米の澱粉やたん白質などが分解され、とろみ、甘み、旨み成分ができる<sup>21)</sup>。麹菌は、塩と混ぜられた時点で死滅にむかう。ただ、麹菌の作った酵素は残っているので、物質の分解を進めていく。

塩麹に使われる麹菌は、詳しく分類すると黄麹菌で、*Aspergillus* 属のカビで、*Aspergillus oryzae* と言う分類種になる。そして、麹菌を米に繁殖させる目的は、プロテアーゼ、アミラーゼ

等原料高分子物質の加水分解に必要な酵素を生産させることである。

麹菌が生成する酵素とその働き<sup>22)</sup>を表 1 に示す。

以上のように、麹菌は様々な酵素を作る。しかし、この酵素もほとんどが 80℃ 以上になると、壊れてしまい本来の働きは出来なくなる。逆に言うと、高温にすることにより、永遠に続く酵素の活動を止めることが出来る。『図 2 の作り方の塩麹の塩分濃度は 12.5% ほどです。この、12.5% という数字は、保存に耐えうる「味噌」の塩分量とほぼ同じです。』と浅利は述べている<sup>16)</sup>。この塩分濃度により、塩麹は図 3 に示すように熟成期間中に病原菌と食中毒菌が生存できないようにしていると考えられる<sup>23, 24)</sup>。また、この塩分濃度と温度、期間では pH3.0, 6.0, 7.5 のプロテアーゼ（順に AP, SAP, NP）、α-アミラーゼ（AA）、グルコアミラーゼ（GA）、酸性カルボキシペプチダーゼ（ACP）及び 3 種のロイシンアミノペ

図3 食塩による病原・食中毒菌の増殖抑制作用<sup>23)</sup>図4 麹仕込試験における各種酵素活性の変化<sup>25)</sup>

仕込条件：水分含量 43%，食塩濃度 10%（対水食塩濃度 18%），熟成温度：30°C

表2 糖化液の成分<sup>26)</sup>

|                          | 白米   | 米麹    |
|--------------------------|------|-------|
| ボーメ                      | 12.6 | 11.5  |
| 全糖 (%)                   | 22.8 | 20.2  |
| グルコース (%)                | 17.7 | 17.7  |
| マルトース (mg/ml)            | 26.4 | 5.6   |
| イソマルトース (mg/ml)          | -    | 17.9  |
| 全窒素 (mg/l)               | 585  | 1,094 |
| アミノ態窒素 (mg/l)            | 139  | 581   |
| pH                       | 5.78 | 5.72  |
| 酸度                       | 0.30 | 0.55  |
| クエン酸 (ppm)               | 37   | 342   |
| リンゴ酸 (ppm)               | 87   | 130   |
| コハク酸 (ppm)               | -    | 23    |
| アミノ酸度                    | 0.65 | 3.05  |
| アミノ態窒素 (mg/l)<br>(加水分解後) | 569  | 845   |

プチダーゼ (Leu-Gly-GLy 基質:LAP-G, Leu-p-NA 基質:LAP-P,Leu-β-NA 基質:LAP-B) の 9 種類の酵素活性はほとんど変化しないことが和久のデータ<sup>25)</sup> から明らかであるといえる (図4)。図2の作り方は極めて理にかなった方法であるといえる。

図2③の熟成について考えてみる。配合直後は塩カドのあるキリッとした塩味であるが、まろやかな甘塩の味になっていたら出来上がりである。この甘味は米麹のでんぶんが麹菌が生成したアミラーゼ (AA,GA) により分解され糖を生成したことによるものであろう。

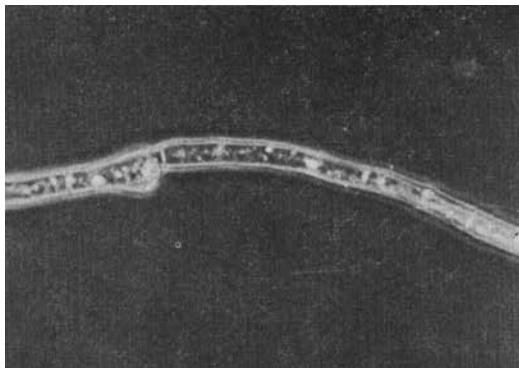
秋田ら<sup>26)</sup> は清酒醸造の研究で興味深い報告を行っている。無塩下ではあるが、白米と米麹にAA,GAを添加し、55℃で5時間糖化し比較した結果を表2に示す。麹糖化液では少糖類としてマルトース、イソマルトースが生成されるのに対して白米糖化液ではマルトースだけが生成された。酸度は、白米糖化液に比べ高くなり有機酸としてはクエン酸とリンゴ酸が主体であった。製麹中に麹菌がクエン酸、コハク酸、リンゴ酸およびフマル酸を生成することを林田ら<sup>27)</sup> が示している。また、窒素成分は麹糖化液で多くなり白米糖化液に比べ全

表3 糖化液のアミノ酸組成<sup>26)</sup>

|                   | 白米糖化液<br>(mM) | 米麹糖化液<br>(%) | 白米糖化液<br>(mM) | 米麹糖化液<br>(%) |
|-------------------|---------------|--------------|---------------|--------------|
| Asp               | 0.14          | 2.2          | 1.94          | 6.2          |
| Thr               | 0.40          | 6.2          | 1.96          | 6.3          |
| Ser               | 0.35          | 5.3          | 2.00          | 6.1          |
| Glu               | 0.27          | 4.2          | 1.89          | 6.2          |
| Gly               | 0.15          | 2.3          | 1.19          | 6.0          |
| Ala               | 0.32          | 4.9          | 2.67          | 8.6          |
| Cys               | 0.05          | 0.1          | 0.11          | 0.1          |
| Val               | 0.47          | 7.5          | 2.08          | 6.9          |
| Met               | 0.25          | 3.8          | 0.54          | 1.7          |
| Ile               | 0.32          | 4.7          | 1.28          | 4.0          |
| Leu               | 0.77          | 13.3         | 2.40          | 8.4          |
| Tyr               | 0.22          | 3.5          | 1.28          | 2.3          |
| Phe               | 0.35          | 5.7          | 1.04          | 3.4          |
| Orn               | 0.08          | 0.9          | 0.13          | 0.3          |
| Lys               | 0.38          | 7.0          | 1.26          | 4.7          |
| His               | 0.10          | 2.1          | 0.47          | 2.0          |
| Trp               | 0.01          | 0.3          | 0.24          | 0.9          |
| Arg               | 0.95          | 15.6         | 1.50          | 5.3          |
| Pro               | 0.07          | 0.6          | 1.40          | 4.2          |
| NH <sub>3</sub>   | 0.76          | 9.8          | 6.46          | 16.1         |
| TOTAL             | 6.41          |              | 32.56         |              |
| アミノ態窒素<br>(mg/ml) | 140           |              | 556           |              |

窒素で2倍弱、アミノ酸態窒素で4倍強の値となった。白米糖化液と米麹糖化液のアミノ酸組成を表3に示す。絶対量はどのアミノ酸も米麹糖化液で多くなっているが組成比では、Asp,Gly,Ala,Pro,NH<sub>3</sub>は米麹糖化液で白米糖化液に比べ高く、Leu,Phe,Lys,Argは低かった。また、Thr,Valには大きな違いは認められなかった。食塩含有食品を塩なれさせる(塩味を調和させる)方法としては、甘味、旨味、酸味など他の呈味成分と共に存させる方法が有効であることはよく知られている<sup>28)</sup>。塩麹の場合は、熟成中に生成するマルトース、イソマルトースの甘味、アミノ酸やペプチドの旨味、クエン酸やリンゴ酸の酸味によりまろやかな甘塩の味となるものと推察される。

白米と米麹の大きな差異は麹菌の生育、酵素タンパクの生産および自己消化によるものでは

写真 1 *Asp. oryzae* の新鮮菌体<sup>29)</sup>写真 2 自己消化した菌体<sup>29)</sup>  
蒸留水中, 30℃, 3日, 嫌気的

ないかと思われる。麹菌の自己消化については魚住らの総説<sup>29)</sup>がある。麹菌はアミラーゼ、プロテアーゼ、ヌクレアーゼその他各種の分解酵素を生産するが、これらの酵素は醸造原料を分解するだけでなく、菌体の構成成分をも分解する力を持っている。麹菌の生育が盛んな時期には、菌体成分がどんどん合成され、菌体が増加していく。しかし、菌体の生育が最高に達し生育が止まると、菌体成分が酵素によって分解され始め、可溶性の分解産物となって菌体外に出て行き、遂には菌体の中味が空になってしまふ。このような現象を麹菌の自己消化と呼んでいる。自己消化は麹菌ばかりでなく、酵母、細菌などでも一般に認められる現象である。

自己消化は一般に酸素の不足した条件下で起こりやすいので、酒および醤油のもろみや味噌の熟成の過程では自己消化が当然起っており、その結果として溶出してくる菌体成分の分解産物が醸造物の味に大きな役割をしていると考えられる。麹菌の菌体を構成する主成分は、菌体の乾物中、タンパク質が約 50%, 核酸が約 6% で、主として細胞の中味を構成し、糖分が 16%, アミノ酸が約 11% で細胞壁を構成し、その他に脂質が 8% 程存在している。麹菌が自己消化を起すと、核酸が最も分解されやすく、菌体内の全量の 90% 程度が分解溶出される。次に分解されやすいものがタンパク質であり、

これは約 75% が分解溶出されてくる。その結果、細胞の中味は大部分が溶解して空になり、少数の顆粒が残るのみとなる。写真 1 は液体培地で振盪培養して得られた新鮮な生菌体の写真であるが、細胞壁および隔壁は白く見え、また細胞内には中味が詰まっている様子が白く写っている。この菌体を蒸留水に懸濁し、三角フラスコに満たして密栓し、30℃で 3 日間放置して自己消化させると写真 2 のようになる。細胞壁はそのまま残っているが、細胞内に黒く写っているのは中味が溶解して消失した部分であり、白く見えるのは残った顆粒である<sup>29)</sup>。

麹菌体成分の分解産物は塩麹の味に大きな役割を果たしており、中味が空の菌体が塩麹中にかなりの量存在すると思われる。

一島<sup>30)</sup>は「日本の醸造はすべて、微生物の菌体、つまり微生物のからだを食べるという行為にいきつく。日本酒、焼酎、醤油、そして味噌、すべてそうである。醸造微生物の菌体成分の中には、長寿への道連れとなる各種の薬理効果を持つものが数多く見つかってきた。今日、世界的に注目してきたプロバイオテックスの考え方を古くから実施してきたのが日本人びとであったといえる。」と指摘している。小林ら<sup>31, 32)</sup>は「麹菌 *Aspergillus oryzae* は日本独特の菌種で世界に誇るにたるものである。わが国では古来、清酒、醤油、味噌などの主要食品を

はじめ味りん、焼ちう、甘酒、ジアスター製剤など応用範囲がすこぶる広く日本人の食生活にきわめて密接な関係を有し麹菌の菌体成分の一部はつねにわれわれの消化管内に導入され日本人の栄養に多少とも関与しているものと思われる。」と述べている。塩麹もこの範疇であり、麹菌の菌体を食べることになる。菌体量は麹原料白米の2~3%である<sup>33)</sup>。

### 3. 使い方

「塩麹」の使い方としては大きく2つの方法が考えられる。一つは酵素によって分解された米麹の持つ甘みや旨みを調味料として使う方法、もう一つは塩麹の酵素を使って素材を分解して、素材からの甘みや旨みを出していく方法である<sup>21)</sup>。

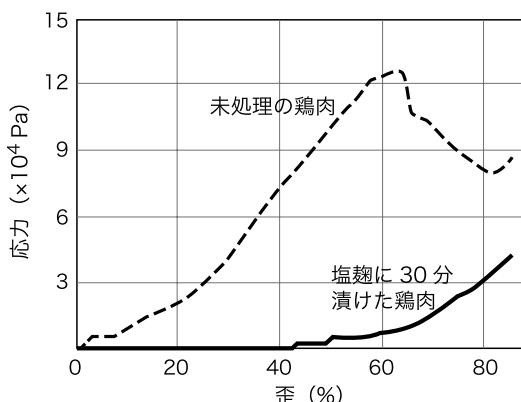
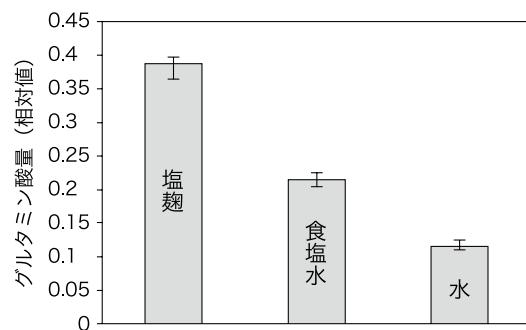
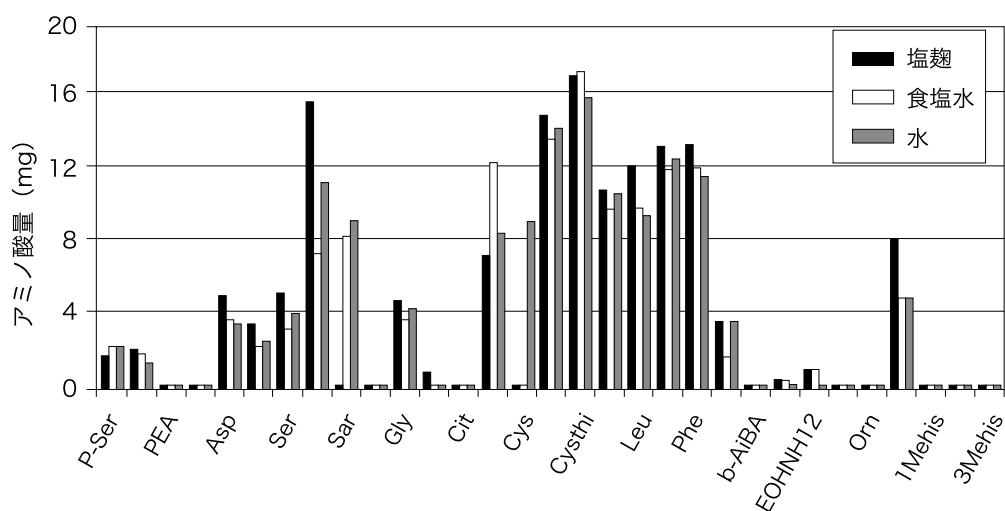
一番目の使い方は塩麹の風味を活かし、そのまま味付けに使うという調味料としての使い方

である。大西ら<sup>34)</sup>が指摘した味噌醸造における麹の働きと同様に、麹由来の香味成分や麹菌体成分が直接塩麹の風味を形成する。麹の香味は塩麹に不可欠のもので、香りのベースである。鈴木ら<sup>35)</sup>は麹の香気成分として53成分を定性し(表4)、麹の香気はこれら成分が混在しあって構成される複合香であると推察している。浅利<sup>16)</sup>は、塩小さじ1(6g)と塩麹小さじ2(約13.3g)が同じ味であるとしている。塩麹の塩分は約12.5%であるので、塩麹小さじ2の塩は約1.7gとなり、これだけで減塩となる。

二番目の使い方は、酵素の働きを素材に生かす方法なので、ある程度の時間は、塩麹に素材を漬けるなり、塗るなりしておく必要がある。その時間によって、塩麹の中の酵素が素材を分解し、素材を柔らかくしたり、甘みや旨みを引き出したりする。岡本ら<sup>36)</sup>は浅利の作った塩麹と鶏ささみ肉を使い、①30分漬けるだけで肉が柔らかくなる(図5)、②うまみ成分が増

表4 麹の香気成分<sup>35)</sup>

| アルコール        | エステル       | カルボニル化合物     | 有機酸    | アミン         |
|--------------|------------|--------------|--------|-------------|
| エタノール        | 酢酸エチル      | アセトアルデヒド     | 酢酸     | エタノールアミン    |
| n-プロパノール     | 酢酸プロピル     | プロピオンアルデヒド   | プロピオン酸 | イソブチルアミン    |
| イソブタノール      | プロピオン酸エチル  | アセトン         | 酪酸     | イソアミルアミン    |
| n-ブタノール      | 酢酸イソブチル    | イソブチルアルデヒド   | 吉草酸    | テトラメチレンジアミン |
| イソアミルアルコール   | 酢酸n-ブチル    | n-ブチルアルデヒド   | カプロン酸  | エチルアミン      |
| n-アミルアルコール   | 酢酸イソアミル    | ジアセチル        |        | ペンタメチレンジアミン |
| n-ヘキサノール     | カプロン酸エチル   | n-吉草酸アルデヒド   |        |             |
| n-オクタノール     | 酢酸n-ヘキシル   | n-カプロン酸アルデヒド |        |             |
| β-フェニチルアルコール | カプロン酸イソブチル | アセトイソ        |        |             |
|              | 乳酸エチル      |              |        |             |
|              | カプリル酸エチル   |              |        |             |
|              | カプロン酸イソアミル |              |        |             |
|              | カプリル酸イソブチル |              |        |             |
|              | マロン酸ジエチル   |              |        |             |
|              | カプリン酸エチル   |              |        |             |
|              | カプリル酸イソアミル |              |        |             |
|              | カプリン酸イソブチル |              |        |             |
|              | カプリン酸イソアミル |              |        |             |
|              | 安息香酸エチル    |              |        |             |
|              | コハク酸ジエチル   |              |        |             |
|              | スマル酸ジエチル   |              |        |             |
|              | 酢酸フェニチル    |              |        |             |
|              | ラウリン酸エチル   |              |        |             |

図5 鶏ささみ肉の応力一歪曲線<sup>36)</sup>図6 塩麹、食塩水、水に一晩漬けこんだ鶏肉の中からにじみ出るグルタミン酸の量<sup>36)</sup>図7 塩麹、食塩水、水に一晩漬けこんだ鶏肉の中からにじみ出るアミノ酸の量<sup>36)</sup>

える（図6）、③必須アミノ酸が増える（図7）ことのデータを示している。

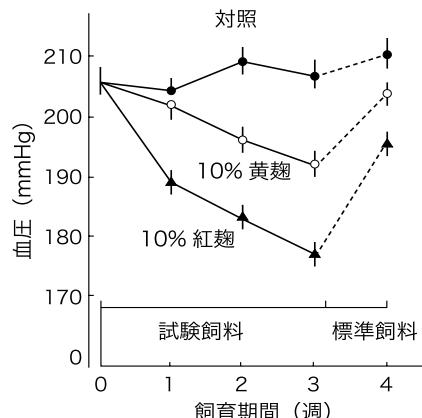
#### 4. 塩麹の機能性

食品の機能性は、栄養の問題に関する一次機能、感覚に関する二次機能、そして近年研究が進んでいる三次機能として、生体調節機能がある。日本の醸造食品である清酒<sup>37)</sup>、味噌<sup>38)</sup>、醤油<sup>39)</sup>、酢<sup>40)</sup>、甘酒<sup>41)</sup>などの機能性については詳しくまとめられているが、塩麹についての報告はほとんど無い。

白澤<sup>42)</sup>は発酵食の著書の中で、「塩麹には、

幅広い効能が秘められています。発酵の過程でビタミンB<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>6</sub>、ビオチン（ビタミンH）、ナイアシン、パテント酸、イノシトールといったビタミン類が生み出されるため、非常に高い疲労回復効果があります。また、アミノ酸の一種であるGABA（ギャバ）により、神経を鎮めてストレスを軽減する作用もあります。老化の原因である活性酸素を中和し、細胞のサビつきをコントロールしてくれるため、老化の予防にもつながります。」と述べている。

麹菌をはじめとした*Aspergillus*属はグルコースなどのエネルギー源があれば、生育に必要な有機物をすべて *de novo* 合成できる<sup>43)</sup>。麹菌

図8 高血圧自然発症ラットの血圧変化<sup>47)</sup>

は醸造産業をはじめ広範な産業でも有用であることから、産官学コンソーシアムにより *A. oryzae* RIB40 株の全ゲノム DNA 配列が解析され、2005 年 12 月の *Nature* 誌に掲載された<sup>44)</sup>。麹菌の設計図であるゲノム塩基配列が解析され、麹菌のもつ特性やポテンシャルが推定できるようになったことから、麹菌の安全性と相まって、さらに広範な産業への麹菌の利用と新産業創出を目指した研究が推進されていくと思われる<sup>45)</sup>が、現時点では麹の機能性についての報告は極めて少ない<sup>46)</sup>。塩麹は米麹に食塩と水だけを原料とするため、その機能性は麹の機能性であると考えられる。最近の麹の機能性に関する研究を以下にまとめた。

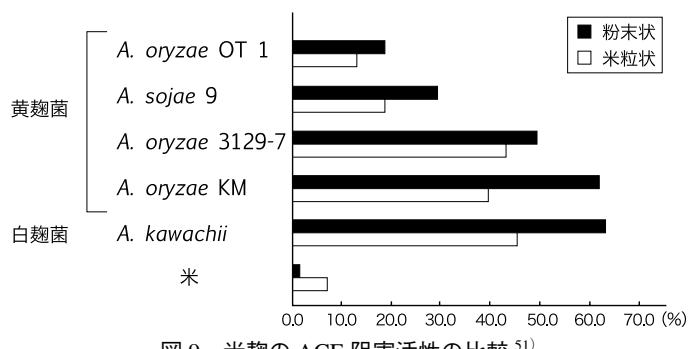
### ①血圧降下作用

辻ら<sup>47)</sup>は黄麹 (*Aspergillus oryzae*) および紅麹 (*Monascus pilosus*) の血圧降下作用について検討を行った。食塩を 1% 含む半合成飼料に黄麹または紅麹をそれぞれ 10% 添加し、高血圧自然発症ラットに 3 週間与え、血圧に及ぼす影響を検討した(図 8)。麹にはすぐれた血圧降下作用があり、その作用機序は、ミネラル代謝の変動によるものではないことを明らかにしている。

紅麹に含まれる降圧物質として  $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) とアセチルコリンが知られている<sup>48)</sup>。紅麹に含まれる GABA 量が約 300  $\mu\text{g/g}$ 、アセチルコリン量が塩化物として約 5  $\mu\text{g/g}$  とかなり少なく、アセチルコリンは極めて不安定な物質であり、しかも作用が一過性であることから重要な成分とは考えにくい。一方、GABA は人の血圧降下作用があることはよく知られており、その生理的な性質が本実験で得られたデータとよく一致する。GABA が有効成分の主たるものである可能性は強い。しかし、他にも有効成分が存在する可能性は強く、現時点ではペプチドであろうと予想される<sup>49)</sup>としている。

腎臓に働いて血管を広げると同時に、血圧を低下させる物質 (プラジキニン) が欠乏しないようにアンギオテンシン変換酵素 (ACE) を阻害するペプチドが数多くの食品から発見されている<sup>50)</sup>。要は、ACE が働かないようにすれば血圧が下がることになるが、鈴木ら<sup>51)</sup>は、米麹及び米麹水抽出物に ACE 阻害活性があることを見出した(図 9)。さらに、米麹中に含まれるタンパク質を人工胃腸消化したペプチドにも ACE 阻害活性があることを見出し、そのペプチドが Val-Ala-Asn-Asp であると同定した。

$\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) は非タンパク性アミノ酸で、グルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) の作用によりグルタミン酸が脱炭酸されて生成するが、GABA は血圧降下作用を有する。土谷ら<sup>52)</sup>

図9 米麹の ACE 阻害活性の比較<sup>51)</sup>

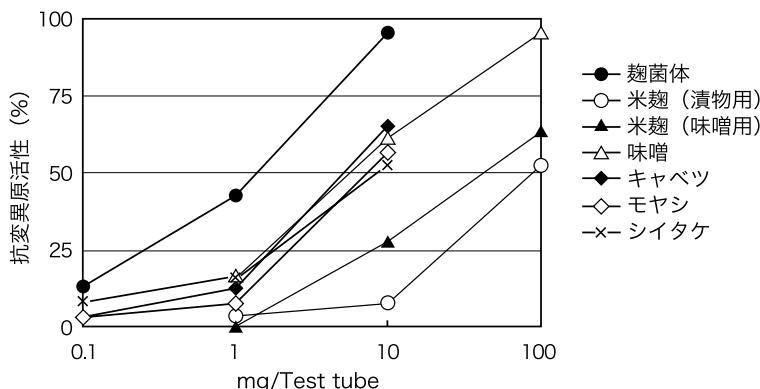


図 10 麹菌体、米麹、米味噌、野菜を凍結乾燥粉末とした場合の抗変異原活性<sup>53)</sup>  
変異原、Trp-P-2、使用菌株、TA-98、S9mix を用いるブレインキュベーション法により測定

は *Aspergillus oryzae* の有する GAD 活性が潜在的に高いことを明らかにした。これらのことより塩麹は GABA や ACE 阻害ペプチドを含有している可能性が高く、血压降下作用が期待できると考えられる。この分野の研究の進展が望まれるとともに、紅麹を用いた塩麹というものも面白いのではないかと考えられる。

## ②抗変異原性

変異原性物質と発癌性物質とは極めて密接な関係にある。食品中に含まれる変異原に対してその作用を抑制するような抗変異原性物質には発癌を抑制する可能性も期待できる。渡辺<sup>53)</sup>は凍結乾燥粉末とした米麹に変異原溶液 Trp-P-2 (3-Amino-1-methyl-5H-pyrido (4,3-b) indole acetate) を加え、一定時間インキュベートした後の抗変異原活性を測定した(図 10)。その結果、凍結乾燥粉末とした麹菌体に強い活性を認めた。米麹は乾燥重量での比較では同様の処理をした味噌、野菜類と比較して活性が低いものの明らかな抗変異原活性を示している。

## ③抗酸化作用

抗酸化性を持つ食品は、摂取されることで体内のフリーラジカルを消去し、毎日の食生活の中で日常起こりうる酸化的な傷害からわれわれの体を保護し、

酸化ストレスが原因であると考えられている疾病、例えば、がんをはじめ動脈硬化や糖尿病の合併症、虚血性心疾患やパーキンソン病やアルツハイマー症などを予防できるようになることが期待される<sup>54)</sup>。味噌<sup>38)</sup>、醤油<sup>39)</sup>、日本酒<sup>55)</sup>、みりん<sup>56)</sup>、甘酒<sup>57)</sup>などの麹を利用した醸造食品の抗酸化性については多くの検討がなされているが、同じく麹を利用した塩麹に関する報告はない。

北垣<sup>58)</sup>は清酒の製造工程における 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカル消去能の推移を調べた。製麹工程において、麹の DPPH 消去能は製麹開始 40 時間後に急増することを示した(図 11)。

同様に Saigusa ら<sup>59)</sup>は米麹を 2 倍量の水と

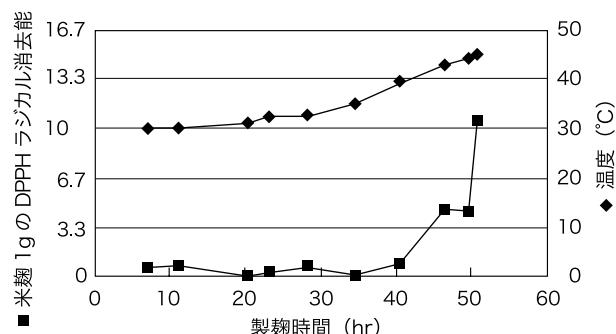


図 11 製麹工程における DPPH 消去能の推移<sup>58)</sup>  
米麹を製麹開始後一定時間ごとにサンプリングし、2 倍量の蒸留水に 24 時間浸漬して測定

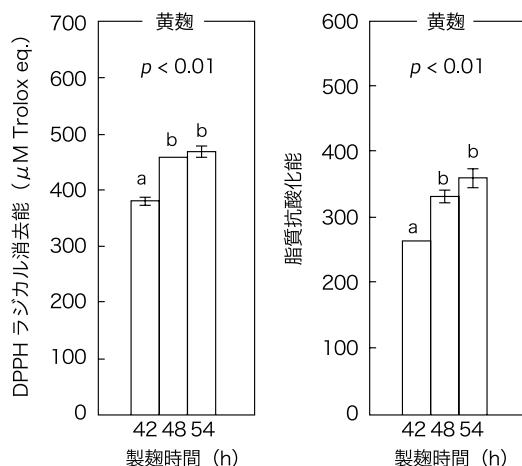


図 12 甘酒の抗酸化能に及ぼす米麹の製麹時間の影響<sup>59)</sup>

混合し, 55°Cで6時間糖化する甘酒の製造において製麹時間を42, 48, 54時間とした米麹を使用し, DPPH消去能と脂質抗酸化能を測定した(図12)。製麹時間が42時間と48時間の間で抗酸化能は有意に増加するが, さらに延長し54時間としても増加は認められない。

これら2つの報告はいずれも抗酸化能発現のメカニズムやそれに寄与する物質を明らかにしたものではないが, 米麹自体が抗酸化能を有することを明らかとしている。米麹と食塩と水だけからなる塩麹は抗酸化能を有すると考えられるが, 上記メカニズムや物質を明らかとするこ

表5 機能性食品・サプリメント素材として用いられる酵素の例<sup>61)</sup>

| 酵素             | 主な起源                                                                                                                                                                                                        |
|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| α-アミラーゼ        | <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Aspergillus niger</i> , 麦芽汁                                                                                   |
| グルコアミラーゼ       | <i>Aspergillus niger</i> , <i>Rhizopus oryzae</i>                                                                                                                                                           |
| β-アミラーゼ        | <i>Bacillus</i> spp., 麦芽汁                                                                                                                                                                                   |
| カタラーゼ          | <i>Aspergillus niger</i>                                                                                                                                                                                    |
| セルラーゼ          | <i>Aspergillus niger</i> , <i>Trichoderma longibrachiatum</i>                                                                                                                                               |
| α-D-ガラクトシダーゼ   | <i>Aspergillus niger</i>                                                                                                                                                                                    |
| グルコースオキシダーゼ    | <i>Aspergillus niger</i>                                                                                                                                                                                    |
| ヘミセルラーゼ        | <i>Aspergillus niger</i> , <i>Trichoderma longibrachiatum</i> , <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Bacillus subtilis</i>                                                                                        |
| インペルターゼ        | <i>Saccharomyces cerevisiae</i>                                                                                                                                                                             |
| ラクターゼ          | <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i>                                                                                                                                                     |
| デキストラナーゼ       | <i>Chaetomium erraticum</i>                                                                                                                                                                                 |
| リパーゼ           | <i>Aspergillus niger</i> , <i>Arthrobacter ureafaciens</i> , <i>Candida cylindracea</i> , <i>Rhizomucor miehei</i> , <i>Rhizopus oryzae</i> , <i>Rhizopus delemar</i><br>牛・豚臍臓                              |
| ホスホリパーゼ        | 豚臍臓                                                                                                                                                                                                         |
| リゾホスホリパーゼ      | <i>Aspergillus niger</i>                                                                                                                                                                                    |
| リゾチーム          | 卵白                                                                                                                                                                                                          |
| パンクレアチニン       | 豚臍臓                                                                                                                                                                                                         |
| ペクチナーゼ         | <i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus japonicus</i> , <i>Rhizopus oryzae</i>                                                                                                                            |
| 酸性ホスファターゼ      | <i>Aspergillus niger</i>                                                                                                                                                                                    |
| フィターゼ          | <i>Aspergillus niger</i>                                                                                                                                                                                    |
| プロテアーゼ (微生物由来) | <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus melleus</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus thermoproteolyticus</i> , <i>Rhizopus niveus</i> |
| プロテアーゼ (植物由来)  | パパイヤ (パパイン)                                                                                                                                                                                                 |
| プロテアーゼ (動物由来)  | パイナップル (プロメライン)                                                                                                                                                                                             |
| ラッカーゼ          | 牛、豚<br>(トリプシン, キモトリプシン, ベプシン, レンニン)                                                                                                                                                                         |
| スーパーオキシドジスムターゼ | <i>Trametes</i> sp., <i>Coriolus versicolor</i>                                                                                                                                                             |
|                | <i>Bacillus</i> spp.                                                                                                                                                                                        |

とは麹を利用した日本の伝統的醸造食品の根幹を明らかにすることになると思われる。さらなる研究の進展が望まれる。

#### ④栄養補給効果

上述したように麹菌のゲノムの全塩基配列解読が終了し、ポストゲノムの時代に入った。その結果、莫大な数の遺伝子およびその産物であるタンパク質の存在が推定されるに至っている。麹菌は真核生物の中で最もタンパク質分泌能力が高い生物であり、永年の食品製造に利用されてきた実績からその安全性が保証されており、有用タンパク質生産の宿主として世界的に注目され、様々なタンパク質生産に利用されている<sup>60)</sup>。一例として表5に現時点で、機能性食品・サプリメント素材として利用されている代表的な酵素をまとめた<sup>61)</sup>ものを示す。生産に用いられている微生物は古来発酵食品の生産に利用されている麹菌 (*Aspergillus oryzae*) などの醸造微生物であることがわかる。

酵素のタンパク質だけでは酵素作用は発現しない。酵素作用の発現には酵素のタンパク質部分に可逆的に結合する補酵素が必要で、両者が結合すると複合体を形成して酵素作用を示すようになる。補酵素は物質代謝に欠かせないが、ビタミン（特にB群）はこれら補酵素の主要部分を構成する<sup>62)</sup>。ビタミンB群とは、水溶性ビタミンのうち、ビタミンB<sub>1</sub>、ビタミンB<sub>2</sub>、ナイアシン、パントテン酸、ビタミンB<sub>6</sub>、ビタミンB<sub>12</sub>、葉酸、ビオチンの8種の総称であるが、麹菌はビタミンB<sub>12</sub>以外の総てを<sup>63)–67)</sup>つくり出す。

ビタミン自体の栄養機能を栄養機能食品の表示<sup>68)</sup>で認められている範囲で記すと、「ビタミンB<sub>1</sub>は、炭水化物からのエネルギー产生と皮膚や粘膜の健康維持を助ける栄養素です。」「ビタミンB<sub>2</sub>、ナイアシン、パントテン酸及びビオチンは、皮膚や粘膜の健康維持を助ける栄養素です。」「ビタミンB<sub>6</sub>はたんぱく質からのエ

ネルギー产生と皮膚や粘膜の健康維持を助ける栄養素です。」「葉酸は、赤血球の形成を助ける栄養素です。葉酸は、胎児の正常な発育に寄与する栄養素です。」ということである。

麹菌は多種類の酵素とともに補酵素も作り出すことは興味深い。

#### おわりに

富士経済によると、2011年見込みが1兆7744億円、2012年予測が1兆7797億円と、衰えを見せない健康美容食品市場。そんな健康美容食品市場内で「塩麹」がブームになっている。2011年後半からメディアでの露出が増え、徐々に認知度が高まってきた。

健康食品や医薬品などをインターネットで販売するケンコーモムが発表したところによると、運営サイトでの塩麹関連商品の発売開始は2011年9月であるものの、2012年2月の「塩麹」の注文数は2011年12月に比べて約24倍と爆発的に拡大した。また、2012年3月には、月間売れ筋ランキングで長期間にわたり総合第1位に君臨していたミネラルウォーターを抜き、塩麹が第1位になったという。これまでには中小規模のメーカーが限定的に発売していたが、2012年春には大手味噌メーカーが新商品を続々と投入。ハナマルキは2012年4月16日からの出荷で、売上げは初年度3億円、3年目にはシリーズ累計で年間10億円を見込む程、今後の伸長が期待される商品となっている<sup>69)、70)</sup>。

麹菌の代謝物や菌体は、清酒、醤油、味噌などの醸造食品を通して、長年日本人に食されてきた<sup>71)</sup>。しかし、塩麹は一部の漬物の漬床として細々と使われてきたに過ぎないが、浅利によって掘り出され、今脚光を浴びるに至った。塩麹は麹菌の产生する酵素作用で麹自体あるいは食材の消化性を向上し、麹特有の旨味や風味を形成する。同時に原料素材中には存在しない新たな生体調節機能も発現する可能性が高いこ

とを述べた。温故知新、塩麹はまさしく、「国  
菌酵素液」といえる。

塩麹の減塩効果による健康推進効果を含む生

体調節機能に関する研究が求められる。

尚、筆者らの力不足による誤り等があれば、  
ご指摘いただければと思う。

・・・・・ 文 献 ・・・・・

- 1) 浅利妙峰:『浅利妙峰が伝えるはじめての糀料理』, 西日本新聞社 (2012)
- 2) 株式会社 KSP-SP:『KSP-POS マーテットトレンドレポート vol.33』 (2012)
- 3) 柏木豊:「発酵食品と麹菌のゲノム解析」, 食品と技術, 6, p1-10 (2006)
- 4) 一島英治:「日本の国菌コウジキン」, 酿協, 99(2), p83(2004)
- 5) (社)中央味噌研究所:『みぞ知り博士のQ & A50』, みぞ健康づくり委員会, p22 (2011)
- 6) 中台忠信:「やさしい醤油の技術 醤油の機能性 (その1) 伸びる機能性のある食品」, 醤研, 35(1), p37-44 (2009)
- 7) 鈴木昭紀:「酒類の販売数量構成比の特徴と関係について」, 酿協, 106(3), p130-145 (2011)
- 8) 浜本哲郎, 浜本牧子:『Q&Aで学ぶやさしい微生物学』, (株)講談社, p127 (2007)
- 9) 小泉武夫:『発酵』, 中央公論新社, p71-73 (2004)
- 10) 小泉武夫:『日本酒百味百題』, (株)柴田書店, p10-11 (2006)
- 11) 小泉武夫:『発酵食品学』, (株)講談社, p287 (2012)
- 12) 奥村彪生:『聞き書 ふるさとの家庭料理⑧漬けもの』, (社)農山漁村文化協会, p30-62 (2008)
- 13) 小泉武夫:『漬け物大全』, 平凡社新書, p16 (2000)
- 14) 小川敏男:『光琳テクノブックス⑧漬物製造学』, (株)光琳, p1-22 (1989)
- 15) 小川敏夫:『漬物と日本人』, 日本放送出版協会, p107-131 (1996)
- 16) 浅利妙峰:『糀屋本店の塩麹レシピ』, (株)PHP研究所 (2011)
- 17) おのみさ:『からだに「いいこと」たくさん麹のレシピ』, (株)池田書店 (2011)
- 18) タカコ・ナカムラ:『塩麹と甘酒のおいしいレシピ 料理・スイーツ・保存食 麹のある暮らし』, (社)農山漁村文化協会 (2011)
- 19) 海老根英雄, 伊藤寛, 徐奇奉:「塩切麹の貯蔵中における酵素活性の消長」, 味噌科学, 11, p82-85 (1965)
- 20) 尾関健二, 本馬健光:「米麹の乾燥貯蔵について」, 酿協, 84(7), p447-452 (1989)
- 21) 日本味噌株式会社 :[http://www.nihonmiso.com/recipe/list\\_j/01.html](http://www.nihonmiso.com/recipe/list_j/01.html)
- 22) 全国味噌技術会:「新・みぞ技術ハンドブック付基準みぞ分析法」, 全国味噌技術会, p122 (2006)
- 23) 中台忠信:「やさしい醤油の技術 醤油の機能性 (その2) 病原菌・食中毒菌などの増殖抑制作用」, 醤研, 35(4), p294-309 (2009)
- 24) 清水利貞, 鈴木一良, 出川昭:「調味料中における数種病原および食中毒菌の生存期間について」, 日食工誌, 9(5), p10-12 (1962)
- 25) 和久豊:「味噌熟成中の酵素活性について」, 酿協, 88(6), p433-438 (1993)
- 26) 秋田修, 蓮尾徹夫, 大場俊輝:「糖化後発酵法における麹使用量の影響」, 酿協, 81(9), p626-632 (1986)
- 27) 林田正典, 北川栄三, 広田広良, 上田隆蔵, 寺本四郎:「清酒醸造における有機酸の研究 (第4報) 製麹中の有機酸の変化」, 酿工, 44(2), p93-96 (1966)
- 28) 菅野幸一, 木村圭, 松田正雄:「食品の塩なれ方法」, 特許第4478065号 (2010)
- 29) 魚住武司, 有馬啓:「麹菌の自己消化」, 酿協, 61(7), p563-567 (1966)
- 30) 一島英治:『ものと人間の文化史 138・麹 (こうじ)』, (財)法政大学出版局, p138 (2007)
- 31) 小林時夫, 深野美知子, 上原悌次郎:「麹菌々糸中の動物発育促進因子の検索 (I) 日本人の主要食糧資源にたいする麹菌の栄養学的補足効果」, ビタミン, 24, p266-269 (1961)
- 32) 小林時夫, 深野美知子, 上原悌次郎:「麹菌々糸中の動物発育促進因子の検索 (II) B群ビタミンの発育促進効果」, ビタミン, 24, p269-272 (1961)
- 33) 菅間誠之助, 岡崎直人:「麹菌の増殖特性とその製麹管理への応用」, 酒工, 60(3), p151-163 (1982)
- 34) 大西邦男, 戸井田仁一, 関口順一:「味噌醸造における麹の働きと遺伝子解析」, 農化, 71(10), p1032-1035 (1997)
- 35) 鈴木昌治, 小泉武夫:「麹の香気成分と清酒香気付与への麹の役割」, 酿協, 77(5), p272-277 (1982)

- 36) 岡本啓湖, 浅田憲彦, 林毅, 藤原秀彦:「別府大学 発酵食品学科 緊急発行 NEWS LETTER」, (2012)
- 37) 斎藤義幸:「清酒と副産物の新しい生理機能」, 酿協, **87**(10), p705-710 (1992)
- 38) 海老根英雄:「味噌の機能性」, 酿協, **85**(2), p70-75 (1990)
- 39) 木下克典:「醤油の機能性について」, 酿協, **85**(11), p762-770 (1990)
- 40) 柳田藤治:「酢の機能性について」, 酿協, **85**(3), p134-141 (1990)
- 41) 山本晋平, 松郷誠一:「甘酒の機能性~酒粕甘酒を中心として~」, *New Food Industry*, **50**(12), p43-54 (2008)
- 42) 白澤卓二:『100歳まで病気知らずでいたければ「発酵食」を食べなさい』, (株)河出書房新社, p56-57 (2012)
- 43) 岩下和裕:「麹菌ゲノムバイオロジーが開く醸造研究の新世界」, 科学と生物, **47**(5), p329-338 (2009)
- 44) Machida M., et al. "Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*", *Nature*, **438**, p1157-1161 (2006)
- 45) 秋田修:「麹菌ゲノム解析プロジェクトの概要とポストゲノム研究」, 酿協, **101**(8), p536-548 (2006)
- 46) 和久豊:「麹と麹菌ー最近の話題」, 酿協, **90**(2), p111-120 (1995)
- 47) 辻啓介, 市川富夫, 田辺伸和, 阿部士朗, 樽井庄一, 中川靖枝:「麹の高血圧自然発症ラットの血圧に及ぼす影響」, 農化, **66**(8), p1241-1246 (1992)
- 48) Kohama Y., Matumoto S., Mimura T. and Tanabe N. "Isolation and identification of hypotensive principles in red-mold rice", *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, p2484-2489 (1987)
- 49) 辻啓介:「紅麹の血圧調節作用」, 酿協, **89**(3), p207-211 (1994)
- 50) 丸山進:「食品タンパク質からの血圧降下ペプチドの生成」, バイオサイエンスとインダストリー, **47**(11), p1182-1186 (1989)
- 51) 鈴木佐知子, 石田博樹:「米麹を用いた降圧組成物」, 特開 2008-247888 (2008)
- 52) 土谷紀美, 西田賢了:「醸造用糸状菌のグルタミン酸 脱炭酸酵素活性とその特性」, 酿協, **97**(5), p382-386 (2002)
- 53) 渡辺隆幸:「味噌の抗変異原活性と麹菌」, 味噌の科学と技術, **54**(2), p26-34 (2006)
- 54) 日本栄養・食糧学会(監), 吉川敏一, 五十嵐修, 糸川嘉則(編), 『フリーラジカルと疾病予防』, (株)建帛社 (1997)
- 55) 大田剛雄, 高下秀春, 轟木康市, 岩野君夫, 大場俊輝:「清酒中に存在する抗酸化性物質」, 酿協, **87**(12), p922-926 (1992)
- 56) 岩崎俊行, 吉浜義雄, 平松順一, 高橋康次郎:「本味酔の抗酸化性について」, 酿協, **101**(11), p839-849 (2006)
- 57) Yamamoto S., Nakashima Y., Yoshikawa J., Wada N., Matugo S.: "Radical scavenging activity of the Japanese traditional food, Amazake" *Food Sci. Technol. Res.*, **17**(3), p209-218 (2011)
- 58) 北垣浩志:「清酒の製造工程におけるDPPH消去能の推移」, 酿協, **98**(8), p589-593 (2003)
- 59) Saigusa N. and Ohba R. "Effects of koji production and saccharification time on the antioxidant activity of amazake" *Food Sci. Technol. Res.*, **13**(2), p162-165 (2007)
- 60) 東京大学大学院農学生命科学研究科微生物学研究室, 研究内容 [http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/Lab\\_Microbiology/studiesfile/stuPfactoryfile/PFactory.html](http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/Lab_Microbiology/studiesfile/stuPfactoryfile/PFactory.html) (2012)
- 61) 小川順, 清水昌:「機能性食品・栄養補助食品としての酵素 利用と醸造微生物」, 酿協, **99**(12), p842-849 (2004)
- 62) 今堀和友, 山川民夫:『生化学辞典』, (株)東京科学同人, p1175 (1984)
- 63) (財)日本醸造協会:『醸造物の成分』, (財)日本醸造協会, p91-95 (1999)
- 64) 兵庫県立農林水産技術総合センター:「麹菌を利用した穀類麹の栄養・機能性の評価」ひょうごの農林水産技術一農業編一, 166, p8 (2009)
- 65) 福井三郎, 谷喜雄, 岸部忠信:「清酒醸造とビタミンB群の関係(第6報) 製麹中のパントテン酸, イノシトール, ビオチン及びビタミンB6の変化」, 酿工, **33**, p239-241 (1955)
- 66) 宮本悌次郎, 村田希久, 河村真木子:「醸酵大豆食品および野菜中の葉酸含有量」, ビタミン, **47**(5), p233-237 (1973)
- 67) 食品成分研究調査会:『五訂増補 日本食品成分表第2版』, 医歯薬出版(株), p22-26 (2006)
- 68) 厚生労働省:食安新発第0701002号 (2005)
- 69) サーチナニュース:<http://news.searchina.ne.jp> 2012.4.21 (2012)
- 70) 日本食糧新聞 10648号 2012.4.23 (2012)
- 71) 北本勝ひこ:『発酵・醸造食品の技術と機能性』, (株)シーエムシー出版, p155-165 (2010)

# 養魚用初期飼料原料としての スサビノリスフェロプラスチ

酒本 秀一<sup>\*1</sup> 荒木 利芳<sup>\*2</sup> 吉松 隆夫<sup>\*3</sup>

<sup>\*1</sup> SAKAMOTO Shuichi

<sup>\*2</sup> ARAKI Toshiyoshi, <sup>\*3</sup> YOSHIMATSU Takao (三重大学生物資源学研究科)

Key Words: スフェロプラスチ・スサビノリ・養魚用初期飼料・メダカ・トラフグ

現在の養魚用飼料には植物性原料として小麦粉、脱脂大豆粕、コーングルテンミールなどの陸上植物由来の物が用いられている。ところが海藻類は一部でアスコフィルムの粉末などが用いられている程度で、使用料はごく少ない。しかも海藻類の使用は、魚がある程度大きくなつてから与えられる育成用飼料向けが大部分で、仔稚魚に与えられる初期飼料には殆ど用いられない。その主たる理由は、海藻類の細胞壁が魚によって殆ど消化されない為に栄養成分が吸収出来ないことと、海藻の栄養成分には偏りが有って養魚飼料の原料として適切でない為とされている。

上記の理由によるのであれば、海藻の細胞壁を除去してプロトプラスチ（植物や微生物などの細胞壁を酵素処理によってほぼ完全に取り除くことによって得られる球状の細胞）あるいはスフェロプラスチ（細胞壁を酵素処理によって部分的に取り除くことによって得られる球状の原形質体で、細胞が一つ一つバラバラになっている物以外に、数個～数十個の細胞が凝集している物も混在している）の状態にすることによって魚の消化吸収を容易にし、更に不足している栄養成分を補足することによって養魚用初期飼料の原料として利用出来るのではないかと考えた。

## スフェロプラスチの調製

### 1. 原料海藻

飼料原料として利用するのであれば、一時に大量の入手が可能で、栄養成分が豊富な海藻であることが望ましい。

アマノリ属のスサビノリは日本における代表的な養殖海藻（所謂海苔である）で、年間40万トンほど生産されており、必要であれば一時に大量の入手も可能である。また栄養成分も表1に示すように、海藻類のなかではタンパク質、ビタミン類、ミネラル類の含量が多い。タンパク質には魚の必須アミノ酸である Ileu, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp, Val, His, Arg などの 10 種のアミノ酸が豊富に含まれている。更に、最近海産魚で重要な生理的役割を有していることが証明されているタウリン (Tau)<sup>1)</sup> も多く含まれている。ビタミン類では A, K, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, ナイアシン, 葉酸, B<sub>12</sub>, C などが含まれ、ミネラル類では K, Mg, P, Fe などが多く含まれている。脂質は少ないが、魚の必須脂肪酸の一つである EPA (エイコサペンタエン酸) の占める割合が高い。

この様な理由からスフェロプラスチ調製用の原料海藻としてアマノリ属のスサビノリを選択

表1 スサビノリの栄養成分組成

| 一般成分 (%)   | 必須アミノ酸 (%) | 脂肪酸組成 (%) | ビタミン (mg/100g)       | ミネラル (mg/100g) |
|------------|------------|-----------|----------------------|----------------|
| タンパク質 25.9 | Ileu 1.65  | 16:0 32.9 | β-カロチン 46.9          | Na 666         |
| 脂質 0.7     | Leu 2.97   | 16:1 3.9  | E 4.7                | K 3384         |
| 灰分 28.7    | Lys 2.09   | 18:0 1.0  | K 2.8                | Ca 152         |
| 炭水化物 44.7  | Met 0.92   | 18:1 6.0  | B <sub>1</sub> 1.3   | Mg 371         |
|            | Phe 1.54   | 18:2 4.2  | B <sub>2</sub> 2.9   | P 753          |
|            | Thr 1.98   | 20:1 4.9  | ナイアシン 12.9           | Fe 12          |
|            | Trp 0.53   | 20:2 1.3  | B <sub>6</sub> 0.7   | Zn 4           |
|            | Val 2.64   | 20:4 3.0  | 葉酸 1.3               | Mn 3           |
|            | His 0.59   | 20:5 30.0 | パントテン酸 1.0           | Cu 0.7         |
|            | Arg 2.31   |           | C 174.7              |                |
|            | Tau 0.84   |           | B <sub>12</sub> 0.04 |                |

した。

## 2. スフェロプラストの調製

スサビノリのプロトプラスト調製法は既に荒木<sup>2)</sup>によって報告されている。スサビノリの細胞壁はβ-1,4-マンナン、ポルフィラン、β-1,3-キシラナンという3種類のユニークな多糖で構成されている。よってスサビノリからプロトプラストを単離するには、これらの多糖の分解酵素(β-1,4-マンナナーゼ、アガラーゼ、β-1,3-キシラナーゼ)による処理が必要である。

養魚飼料用原料として利用するのであれば、ある程度の製品価格内に収めなければ実用化は

難しい。完全なプロトプラストを調製しようとすると時間も掛かるし必要な酵素の量も多くなり、経費が嵩む。よって、プロトプラストの調製法を簡略化したスフェロプラストの調製法(図1)を開発した。

約500gのスサビノリ藻体を細切する。細切したスサビノリを1000ユニットのβ-1,4-マンナナーゼ(新日本化学)、50ユニットのアガラーゼ(ヤクルト薬品)、50ユニットのβ-1,3-キシラナーゼ(ヤクルト薬品)を1Lの海水に溶解した酵素液に投入し、20℃で20時間確かに攪拌する。その後、2000×gで10分間遠心分離し、沈下物を回収して乾燥する。乾燥法には色々な方法が有るが、今回は試験なので、コストは高いが一番品質の劣化を伴わない真空凍結乾燥法で乾燥した。

この様にして得たスサビノリスフェロプラスト乾燥物をメダカとトラフグの飼育試験に用いた。

## メダカの飼育試験

大学の研究室では大量の水をかけ流しにして魚を飼育するのは無理なので、小型水槽で十分に飼育できるメダカを淡水魚の代表として選択した。

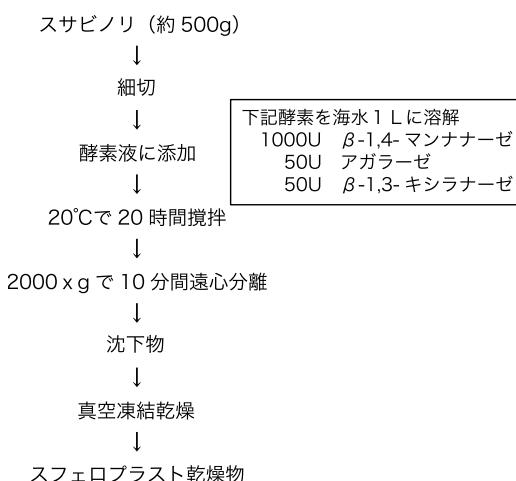


図1 スサビノリのスフェロプラスト調製法

表2 メダカ用試験飼料の分析値

|          | A 区  | B 区  |
|----------|------|------|
| 水分 (%)   | 6.3  | 8.0  |
| タンパク質    | 42.1 | 50.0 |
| 脂質       | 2.9  | 9.3  |
| 灰分       | 24.2 | 10.7 |
| 繊維       | 0.8  | 2.2  |
| 炭水化物     | 23.7 | 19.8 |
| Cal/100g | 242  | 323  |

(注) Cal はタンパク質 4、脂質 9、炭水化物 2Cal/g で計算。

### 1. 飼育条件

供試魚には熱帯魚店で市販されているメダカを購入して用いた。試験区は A, B の 2 区で、A 区にはスフェロプラスチックのみを与え、B 区には市販のメダカ用飼料 (Tetra Killi Min, Tetra Inc.) を与えた。両飼料の分析値は表 2 に示す通りで、スフェロプラスチックは市販飼料に比べてタンパク質と脂質が少なく、灰分が非常に多かった。また、タンパク質と脂質が少ないので当然のことながらカロリー量も低かった。

飼育試験には両区とも  $17 \times 17 \times 17\text{cm}$  のプラスチック水槽を 2 個ずつ用いた。各水槽には 10 尾ずつメダカを収容したので、供試尾数は 20 尾 / 区である。水槽毎の水温調節は行わず、 $20^\circ\text{C}$  の恒温室内で通気を行って飼育した。投餌量は両区とも 1 日に 100mg (午前中 50mg, 午後 50mg) とした。市販のメダカ用飼料はそのまま与え、スフェロプラスチックは塊を手で押し潰して与えた。両飼料ともメダカ用に飼料の粒径を調整していないので、メダカに食べられずに水中に散逸した物や、そのまま水槽底に沈下した物などもかなりの量あった。飼育期間は 55 日間である。

飼育試験終了後両区の 1 水槽分の魚を用いて全魚体の成分分析を行った。

また、両飼料区とも飼育 30 日目から 55 日目まで、1 水槽を用いて産卵数を調べ、雌 1 尾当たりの 1 日の産卵数を求めた。両飼料区と

も生まれた卵の 20 個をサンプリングして孵化試験を行った。孵化試験は  $20^\circ\text{C}$  の恒温室でシャーレを用いて行い、シャーレの水は毎日交換した。

更にスフェロプラスチック区の 1 水槽は飼育試験終了後も同じ飼料で 150 日目まで飼育を継続した。

### 2. 結果

飼育結果を表 3 に示す。55 日間の飼育期間中に両区とも 1 尾ずつ死亡したが、残りの 19 尾はいずれも何ら問題なく飼育出来た。また、スフェロプラスチック区の 1 水槽は、その後も同じ飼料で飼育を続けたが、150 日間の長期にわたって何ら異常なく飼育が継続できた。この結果から、メダカはスサビノリのスフェロプラスチックのみでも十分に飼育出来ることが証明出来た。

成長や飼料効率 (増重量  $\times 100$  / 給餌量)、タンパク質効率 (増重量  $\times 100$  / 給与タンパク質量) は市販飼料区に比べてスフェロプラスチック区は劣ったが、この原因として飼料の栄養成分や形状が考えられる。魚の成長、飼料効率、タンパク質効率は飼料のタンパク質量、脂質量、エネルギー量などによって規定される部分が大きいことは良く知られている。スフェロプラスチック

表3 メダカの飼育結果

|             | A 区  | B 区  |
|-------------|------|------|
| 生残率 (%)     | 95   | 95   |
| 総体重 (g)     |      |      |
| 開始時         | 2.22 | 1.75 |
| 終了時         | 3.04 | 3.21 |
| 平均体重 (mg)   |      |      |
| 開始時         | 222  | 175  |
| 終了時         | 320  | 338  |
| 増重量 (g)     | 0.82 | 1.46 |
| 投餌量 (g)     | 5.5  | 5.5  |
| 飼料効率 (%)    | 14.9 | 26.5 |
| タンパク質効率 (%) | 35.4 | 53.0 |

(注) 数字は 2 水槽の平均値

表4 飼育試験終了時のメダカの体成分

|         | A 区         | B 区         |
|---------|-------------|-------------|
| 水分 (%)  | 68.3        | 67.1        |
| タンパク質   | 14.6 (46.1) | 15.9 (48.3) |
| 脂質      | 1.83 (5.77) | 4.88 (14.8) |
| 灰分      | 14.6 (46.1) | 11.0 (33.4) |
| (乾物換算値) |             |             |

のタンパク質や脂質含量が市販飼料に比べて少なかったことが飼育成績を悪くした原因と考えられる。また、スフェロプラスチックは凍結乾燥品をただ単に手で押し潰しただけで、メダカの口に合った大きさに筛选していない為、食べられずに無駄になった部分が市販飼料より多かったものと考えられる。

飼育試験終了時全魚体の分析結果を表4に示す。スフェロプラスチック区は市販飼料区に比べて水分がやや多く、タンパク質がやや少ないと考えられる。灰分含量はスフェロプラスチック区が市販飼料区より高い値を示したが、これはスフェロプラスチックが市販飼料より灰分を多く含んでいたことと、魚体の脂質含量が少なかったことが関係しているのではないかと思われる。

雌1尾当たりの産卵数は表5に示すように、市販飼料区の方がスフェロプラスチック区より多かった。卵が卵巣内で発達するにつれて魚体のタンパク質と脂質が移行し、一定の成分量になると産卵される。供給されるタンパク質と脂質の量が少ないと、産卵数を減らしたり、卵の大きさを小さくすることによって対応することが知られている。よって、スフェロプラスチック区の

産卵数が少ないのは、スフェロプラスチックの方が市販飼料よりタンパク質と脂質含量が少ないことが関係していると思われる。

卵と孵化仔魚の色は市販飼料区で白っぽかったが、スフェロプラスチック区は黄色がかっていた。これはスサビノリに豊富に含まれているカロチノイド色素が卵に移行した為であろう。カロチノイド色素は卵の質を良くすることがマダイ他多くの魚種で明らかにされており<sup>3)</sup>、スサビノリのスフェロプラスチックは優れたカロチノイドの供給源であると考えられる。

卵の孵化試験ではいずれの区の卵も正常に胚を形成し、約2週間でスフェロプラスチック区が20個中18個、市販飼料区が20個中17個孵化した。孵化仔魚の飼育を試みたが、飼育容器がシャーレだったので十分量の投餌も出来ず、水の汚れも酷かったので、孵化仔魚は両区とも約1週間で死滅した。

海藻による魚の長期飼育は難しく、海藻単独投与による飼育例は見当たらない。

本試験でスサビノリのスフェロプラスチック単独投与でメダカの飼育が可能であったのは、酵素処理によってスサビノリの細胞壁を除去することによって、メダカがスサビノリの栄養成分を吸収出来るようになったことと、スサビノリの栄養成分組成が優れていることによると思われる。

以上の結果から、スサビノリのスフェロプラスチックは不足している栄養成分、具体的にはタンパク質や脂質などを補足してやることによって淡水魚用初期飼料の原料として十分に利用出来ると判断した。

表5 雌1尾当たりの産卵数

|             | A 区 | B 区 |
|-------------|-----|-----|
| 総産卵数 (個)    | 66  | 214 |
| 雌数          | 3   | 6   |
| 産卵数 / 雌     | 22  | 36  |
| 産卵数 / 雌 / 日 | 1.1 | 1.8 |

### トラフグの飼育試験

メダカの飼育試験から、スサビノリスフェロプラスチックのみでは養魚用初期飼料としてタンパク質と脂質が不足していることが分かった。海

産魚であるトラフグは飼料中にある程度のタンパク質量とn3系高度不飽和脂肪酸(DHAやEPAなど)、レシチン(フォスファチジールコリン)などを要求する。よってこれらの栄養素をスフェロプラスに補足する必要がある。また、飼料の粒径も魚の口の大きさに合った大きさにしなければならない。

### 1. 飼育条件

試験には4種類の飼料を用い、それぞれの給与区をA～D区とした。表6に飼料の組成と一般成分、表7に脂肪酸組成を示す。A区はスフェロプラスト単独区、B区は飼料の脂質含量を高めてカロリー量を高くすると共に、DHAなどのn3系高度不飽和脂肪酸を増やすために粉末の魚油、更にビタミンとミネラルを添加した区、C区はタンパク質源としてイカミール、油脂源としてイカ油とレシチン、更にビタミンとミネラルを添加した区、D区は市販のトラフグ用初期飼料である。

D区以外の試験飼料の製造法は以下の通りである。イカ油以外の原料を混合した後微粉碎し、小型の流動層造粒機で造粒・乾燥した。乾燥物を100μm以下、100～150μm、150～470μmの3つの粒径に分析篩を用いて篩別した。その後C区飼料のみイカ油をスプレーコーティングした。

飼育試験は九州大学農学部付属水産実験所で行った。供試魚には富山産天然親魚より種苗生産した日齢24日の稚魚を用いた。1区1水槽とし、100L容角型水槽に1000尾を収容して飼育した。飼育水は水温無調整の砂濾過海水で、かけ流し方式である。

試験飼料は毎日7時から18時の間、1.5～2.0時間毎に手撒きで飽食量を与え、飼料サイ

ズは魚の成長に応じて順次大型の物を用いた。水槽底の掃除は毎日午後にサイフォンを用いて行った。

飼育期間は6月9日から6月21日の約2週間。飼育試験終了時に各区20尾の魚をタモ網を用いて15秒間空中露出して再び水に戻し、2.5時間後までの生残率を求め、魚の活力を示す指標とした。この活力試験は魚の健康状態を示す指標として優れていることが経験的に証明されている。

表6 トラフグ用試験飼料の配合と分析値

|         | A区   | B区   | C区   | D区   |
|---------|------|------|------|------|
| 配合      |      |      |      |      |
| スフェロプラス | 100  | 87   | 54   | 市販飼料 |
| イカミール   |      |      | 30   |      |
| 魚油粉末油脂  |      | 3    |      |      |
| イカ油     |      |      | 5    |      |
| ビタミン混合  |      | 5    | 5    |      |
| ミネラル混合  |      | 5    | 5    |      |
| 大豆レシチン  |      |      | 1    |      |
| 分析値     |      |      |      |      |
| 水分(%)   | 7.7  | 13.2 | 9.5  | 8.3  |
| タンパク質   | 36.8 | 30.6 | 45.9 | 51.7 |
| 脂質      | 2.7  | 8.3  | 10.3 | 13.8 |
| 灰分      | 26.9 | 25.7 | 20.5 | 13.7 |
| 炭水化物    | 11.9 | 11.7 | 9.4  | 7.8  |

表7 試験飼料の脂肪酸組成

|         | A区   | B区   | C区   | D区   |
|---------|------|------|------|------|
| 14:0(%) |      | 3.0  | 3.9  | 4.6  |
| 16:0    | 32.9 | 24.1 | 22.7 | 21.0 |
| 16:1    | 3.9  | 4.4  | 2.1  |      |
| 18:0    | 1.0  | 2.3  | 4.8  | 5.5  |
| 18:1    | 6.0  | 9.7  | 13.3 | 16.5 |
| 18:2    | 4.2  | 2.7  | 9.9  | 10.3 |
| 18:3    |      |      | 1.0  | 1.2  |
| 18:4    |      | 1.0  | 1.3  | 1.5  |
| 20:1    | 4.9  | 5.9  | 2.0  | 1.8  |
| 20:2    | 1.3  |      |      |      |
| 20:3    | 2.3  | 1.0  |      |      |
| 20:4    | 3.0  | 2.0  | 1.7  | 1.7  |
| 20:5    | 30.0 | 19.3 | 12.1 | 9.9  |
| 22:1    |      | 2.8  |      |      |
| 22:6    |      | 8.6  | 9.1  | 10.9 |

## 2. 結果

飼育結果を表8に示す。飼育期間中常に活発な摂餌が見られたが、飼育開始10日目頃から斃死魚の出現が目立つようになり、特にスフェロプラスチック単用のA区でその傾向が顕著であった。また、飼育期間を通じて大型魚が小型魚を攻撃する噛み合いが頻繁に認められ、それに起因する斃死も見られた。生残率はA区で特に低く、終了時にはわずか7.5%の魚が生き残っていたにすぎなかった。飼育終了の数日前から斃死個体の出現が顕著に増加し、その時の魚のピンヘッド状の体型（痩せて頭部が異常に大きく見える状態）や活力のないフラフラした遊泳状態などから、この斃死の主たる原因は栄養不良であると考えられた。

イカミール、イカ油、ビタミン、ミネラル、レシチンなどをスフェロプラスチックに添加したC区並びに市販飼料のD区も実際のトラフグ種苗生産場の生産事例に比べて生残率が低いが、魚の活力は高かった。両区の斃死の可也の部分は狭い水槽に多数の魚を収容して飼育したことによる共食いによるものと思われる。

飼育開始時には平均体長7.3mmであったが、約2週間の飼育で8.5～10.5mmに成長した。しかしながらスフェロプラスチック単独使用のA区、スフェロプラスチックを87%使用したB区は、スフェロプラスチックを54%まで減らしてイカミール、イカ油、大豆レシチンなどを添加したC区と市販飼料区（D区）に比べて有意に劣る結果であった。これは活力試験の結果にも顕著に表れており、スフェロプラスチック単用のA区が最も活力が劣り、C区とD区が高い活力を示し、B区は中間値を示した。

飼料の分析値、生残率、成長、体型および活力などから、A区とB区は飼料のタンパク質、脂質、カロリー並びにn3系高度不飽和脂肪酸（特にDHA）などが不足していたものと考えられる。

表8 トラフグの飼育結果

|          | A区   | B区   | C区   | D区   |
|----------|------|------|------|------|
| 生残率（%）   | 7.5  | 17.8 | 18.1 | 18.3 |
| 平均体長（mm） |      |      |      |      |
| 開始時      | 7.3  | 7.3  | 7.3  | 7.3  |
| 終了時      | 8.8  | 8.5  | 9.9  | 10.5 |
| 活力試験     |      |      |      |      |
| 生残率（%）   | 16.7 | 41.7 | 71.0 | 75.0 |

この様にスフェロプラスチック単独ではトラフグ用初期飼料として適切ではないが、不足する成分を補足してやることによって市販のトラフグ用初期飼料とほぼ同じ飼育結果を示すようになることから、スサビノリのスフェロプラスチックはトラフグ用初期飼料の原料として十分に利用出来る物であると判断した。

## 考 察

スサビノリのスフェロプラスチックのみでメダカを飼育したところ、市販飼料より成長は劣るものとの長期間の飼育が可能で、しかも得られた卵から孵化まで何ら異常無く行うことが出来た。ところがトラフグの場合は約2週間の短期飼育でも市販飼料より著しく劣る結果を示した。これは魚種による食性の違いと、淡水魚・海水魚の栄養要求の違いに起因するものと考えられる。メダカのように淡水産で植物食性が強い魚種は比較的タンパク質と脂質が少ない餌でも十分に生きていけるであろうし、トラフグのように海水産で肉食性が強い魚は高タンパク質、高脂質の餌を要求するであろう。更に海水魚はn3系高度不飽和脂肪酸やレシチンの要求量が淡水魚より多いことが知られている。

本試験の結果から、スサビノリのスフェロプラスチック単独ではトラフグのような肉食性の強い海産魚の初期飼料として適切でないことが分かったが、不足している栄養成分、具体的にはタンパク質、脂質、カロリー、n3系高度不飽和脂肪酸（特にDHA）、レシチンなどを補うこ

とによって海産魚用初期飼料の原料として十分利用出来ることが証明出来た。

今後はより安価なスフェロプラスチの調製法の開発が求められるであろう。具体的には、原料海藻がスサビノリでなければならぬのかと云う問題が有る。スサビノリは本来人間の食用のために養殖されている海藻なので、それなりの価格がする。人間の食用にされていない海藻で、大量入手が可能と思われるアオサ、ホンダワラ、アスコフィルムなども利用出来るのであれば面白い。次にスフェロプラスチの調製に必要な酵素の種類と量の問題である。使用する酵

素の種類と量を減らすこと、粗酵素の利用、一度使用した酵素の再利用などを検討すべきである。また、酵素の代わりに酵素を分泌する微生物を利用する方法も有るのではないか。更にスフェロプラスチの乾燥法の問題が有る。真空凍結乾燥法やスプレードライ乾燥法はコストが高く、飼料原料向きでない。多少の熱変性は伴うものの、熱風乾燥法やドラムドライ法などを検討すべきである。

これらの問題点をある程度解決出来れば、海藻類のスフェロプラスチは初期飼料も含めた養魚用飼料に十分に利用出来るであろう。

#### ・・・・・文 献 ・・・・・

- 1) 竹内俊郎: 海産魚介類種苗の健全性向上に関する栄養学的研究. 日本水産学会誌, 75 (4), 623-635 (2009)
- 2) 荒木利芳: プロトプラスチ単離技術. 有用海藻のバイオテクノロジー (水産学シリーズ 113 能登谷正浩編), 恒星社厚生閣, 東京, 62-72 (1997)
- 3) 渡辺武: 親魚用飼料. 養魚飼料 - 基礎と応用 (水産学シリーズ 54 米康夫編), 恒星社厚生閣, 東京, 135-145 (1985)

# “お好み焼”を全国に拡大中の驚くべきヒット食品 —『お好みソース』オタフクソース株式会社—

田形 晓作\*

\*TAGATA Yoshinari (TAGATA食品企画・開発)

Key Words: お好みソース・ロングヒット食品・商品開発・ブランド化・マーケティング戦略

## はじめに

オタフクソース株式会社は1922年（大正11年），創業者・佐々木清一が広島市横川町で，酒・醤油類の卸小売業「佐々木商店」を創業したことが始まりである。その後，1938年（昭和13年）醸造酢の製造を開始。ブランド名を「お多福酢」とした。

「お多福酢」と名付けた気持ちは”精魂込めてつくった酢を食してもらうことによって，一人でも多くの人たちに幸福を広めたい”という考え方からである。創業者には，「人々に喜びと幸せを広めることを自らの喜びとする」という思いがあった。これは今でも社員に理念として受け継がれている。

現在の経営基本理念に使命観として「『健康と豊かさと和』をもたらすことにより，社会に貢献します」。また，行動の誓いとして，

1. 一滴一滴に真心を込めて，美味しさと安全・安心を笑顔でお届けします。
2. お天道様に恥じない企業として，法令と企業倫理を遵守します。
3. 郷土の誇る企業として，「食を通じて団らんの楽しさ」を発信します。
4. 自然の恵みに感謝し，天然の味覚をつくります。

5. 無限の変化にスピードある行動で挑み，喜びと幸せに奉仕します。
6. 自ら高い目標を掲げ，気迫，執念，勇気，責任感をもって行動します。

これらを掲げている。使命感，行動の誓いとともに，全社員が共有している。本稿を記述するにあたり，オタフクソース株式会社 佐々木茂喜社長に取材をした。

## 1. オタフクソースの歩み

1922年（大正11年）佐々木清一が広島市横川町で，酒・醤油類の卸小売業（佐々木商店）を創業。

1938年（昭和13年）醸造酢の製造を開始，ブランド名を「お多福酢」とする。

1945年（昭和20年）原爆投下により全焼。

1946年（昭和21年）広島市祇園町長束の酒造蔵を借り受け，醸造酢の製造を再開。

1950年（昭和25年）ソースの製造・販売を開始。

1952年（昭和27年）お多福造酢株式会社を設立。広島市大芝町へ工場移転。※佐々木清一が初代社長に就任。新製品『お多福ウスター

ソース お好み焼用』発売  
 1960年（昭和35年）新製品「焼そばソース」発売。  
 1964年（昭和39年）新製品「たこ焼ソース」発売。  
 1969年（昭和44年）※清一の三男、佐々木勉 二代目社長に就任。  
 1975年（昭和50年）デーツ使用開始。  
 オタフクソース株式会社に社名を変更。  
 1978年（昭和53年）広島市西区商工センターに本社工場移転。業界に先駆け紙容器にソースを詰め発売。  
 1979年（昭和54年）※清一の四男、佐々木繁明 三代目社長に就任。  
 1982年（昭和57年）業界に先駆け樹脂容器フクボトル（500g）を採用。  
 1987年（昭和62年）東京にお好み焼研修センター開設。  
 1989年（平成元年）学校給食の普及向上にて文部大臣表彰。  
 1994年（平成6年）※清一の五男、佐々木照雄 四代目社長に就任。消費者指向優良企業として通商産業大臣表彰。  
 1998年（平成10年）※清一の六男、佐々木尉文 五代目社長に就任。  
 お好みフーズより新製品「お好み焼こだわりセット」発売。  
 お好み焼課発足。名古屋、大阪、福岡にお好み焼研修センター開設。  
 2000年（平成12年）お好み焼キャラバンカー「団らん号」活動開始。岡山にお好み焼研修センター開設。  
 2005年（平成17年）※二代目社長 佐々木勉の次男、佐々木茂喜 六代目社長に就任。  
 ユニオンソース株式会社と業務・資本提携。  
 2006年（平成18年）高松にお好み焼研修センター開設。  
 2007年（平成19年）平成18年度ロングセラー

賞受賞。（日本食糧新聞社）子育てにやさしい企業認定。（広島県労働局）  
 2008年（平成20年）WoodEgg お好み焼館完成。  
 第41回食品産業功労賞受賞。（日本食糧新聞社）  
 第38回食品産業技術功労賞受賞。（食品産業新聞社）  
 2009年（平成21年）持株会社制へ移行。  
 仙台にお好み焼研修センター開設。  
 事業所内保育園「オタフクふっくる保育園」開園。  
 2010年（平成22年）オタフクキャベツ農場で新入社員キャベツ研修開始。

## 2. 広島県オンリーワン・ナンバーワン企業「オタフクソース株式会社」

広島県商工労働局商工労働総務課はオタフクソース株式会社をオンリーワン・ナンバーワン企業として位置付け、紹介している。また、内容に関してもポイントを簡単に纏めている（次ページ表）。

## 3. 戦前の広島のお好み焼状況

本稿では先ずは、「お好み焼」と「お好みソースの開発」について詳しく述べる。広島のお好み焼の原型は「一銭洋食」だといわれている。一銭洋食は昭和初期から戦前にかけて、屋台や駄菓子屋で売られる子供向けの食べ物であった。一銭洋食の時代にはそばやうどんはもちろん、肉や卵をいれることはなく、野菜にキャベツが使われることもなかった。メリケン粉（小麦粉）の生地の上に、魚粉やとろろ昆布、刻みねぎなどの具材をわずかに乗せる程度の、ごく素朴な軽食であった。

屋台や駄菓子屋の片隅に置かれた火鉢の鉄

| オンリーワン・ナンバーワン   |                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                        |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 製品・技術の特長        | <p>お好みソース（生産量国内ナンバーワン）</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・主な原材料はトマトやリンゴなどの野菜や果物である。</li> <li>・独特の甘みのある「デーツ」（ナツメヤシの実）を使用。</li> <li>・自然の恵みで天然の味覚を作るという理念で合成着色料、保存料を一切使用していない。</li> <li>・2003年（平成15年）10月 ISO9001認証取得</li> </ul> | <p>お好みソース</p>  <p>500g<br/>(家庭用)</p> |
| 開発のきっかけ         | <p>酒・醤油類の卸小売業だったが、1938年（昭和13年）に醸造酢の製造を開始し、1945年（昭和20年）の原爆投下により全焼。その後の食文化の洋風化が進む戦後まもない1950年（昭和25年）頃に手探りでソースづくりに取り組み始めた。その後、販売のため訪問したお好み焼店の意見・要望を取りいれ試行錯誤し、1952年（昭和27年）に最初のお好み焼専用ソースを完成させた。</p>                                         |  <p>2.1kg<br/>(業務用)</p>              |
| 開発・製品化における苦労と努力 | <p>防腐剤などは使用せず、また、ウスターソースよりも塩分と酸味を抑えているため、防腐効果が得られにくかった。そのため酵母が働いて炭酸ガスが出る現象が起り、発酵したソースによって瓶の栓が飛ぶことなどもあった。しかし、素早いクレーム対応により、注文が途切れることはなかった。今では技術も向上し、この問題も改善した。合成着色料・保存料などを使用していない商品を現在も提供している。</p>                                      |                                                                                                                        |
| 製品・技術の主な取引先     | 問屋、量販店、お好み焼店を含む飲食店など                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                        |
| 特記事項            | ソースの原料などにも使用する酢の醸造は、きれいな空気・温暖な気候・おいしい水という自然環境に恵まれた三原市大和町の工場ですべておこなわれている。                                                                                                                                                              |                                                                                                                        |

板の上で、焼きあがったら真ん中から半月型に折り、ウスターソースか醤油、あるいは両方を半々に混ぜたものを塗って完成。これを新聞紙にくるんでもらい、熱いうちにハフハフと食べた。小麦粉と有り合わせの材料に、鉄板さえあれば簡単にできるので、昭和の初めには家庭で日常的に作っていたという。広島と関西および東京では、生地に乗せる具材や作り方に若干の違いがあるものの、いずれにしても戦前の一錢洋食（どんどん焼き）は子供たちが大好きなおやつであった。お好み焼のルーツは定かではないと言われているが、このあたりにあるようである。

#### 4. ソースの開発開始

戦後、国内では既に英國中部のウスター市で誕生したウスターソースが伝わり、販売されていた。1949年（昭和24年）秋、佐々木商店では醸造酢の製造を再開していたが、佐々木商店に出入りしていた知人が重要な提案をしたことがソース開発のきっかけとなった。「酢は安い。家族みんなで酢だけつくりようたんじや、儲からんよ。なんじやいうても、これからは洋食の時代じゃ。日本の食生活は、まだまだ洋風化が進むじゃろうけえ、ソースを作ってみんさいや」。その知人は、学生時代にソースの醸造

方法を学んでいた。

一方、大手ソースメーカーの代理店も兼ねる卸問屋に勤めていた別の知人から、やめたほうが良いと反対された。その理由は、ソース市場は明治あるいは大正時代からの老舗数社が、全国ブランドのソースを製造・販売している。県内だけでも既存のメーカーがいくつもあり、後発の佐々木商店ではどう考えても不利である。あわせて、戦後、ソース（ウスター・ソース）は調味料不足とインフレの影響で飛ぶように売れた時期もあったが、この頃はフルーツソース（果実を主原料としたソースで、のちに「とんかつソース」や「濃厚ソース」と呼ばれるようになる）の登場で、ソース業界は熾烈な販売競争の時代に入っているということであった。さらに、販路の問題もあった。卸問屋の世界では、メーカーの特約店として契約するのが常識となっている。すでに広島の問屋は既存メーカーと特約契約を結んでおり、佐々木商店が新しいソースを作っても、どこの問屋にも扱ってもらえないのが現状。「ソースをつくるのはええが、どうやって売るんじゃ」ということであった。業界の流通状況が厳しいことは分かったが、あきらめたくはなかった。

アドバイスをくれた知人もウスター・ソースを作ったことはなかったが、ノートには使用する材料をはじめ作り方が書いてあった。先ずは使用する香辛料や野菜などの買いつけからはじめた。初めてであったが試行錯誤を繰り返しながら、1年がかりで遂に、佐々木商店のウスター・ソースが完成し発売を開始した。その年、広島市内の中心にあたる八丁堀から南の平和大通りまでの、中央通りの拡張工事が完了。これを機に、数件のお好み焼の屋台が登場したのである。かつての一錢洋食が進化した食べ物は、このころから『お好み焼』とよばれるようになっていた。主に使われる野菜もネギからキャベツへかわり、戦前と違ってボリュームたっぷりの重ね

焼きになっていた。ただ、当時はまだ豚肉や卵は高価なぜいたく品だったため、よほどのことがないとお好み焼に入れることはなく、現代の広島お好み焼の定番といわれる「肉玉そば」や「肉玉うどん」が広く食べられるようになるのは、もっと後年になってからである。やがて、中央通りだけでなく、隣接する新天地広場などの繁華街に、お好み焼の店や屋台が続々と増えていった。

## 5. 『お好みソース』の誕生

夢に至る過程には、障害や困難は付物である。しかし、それを乗り越えようとする性根がなければ、夢という名の産物を醸造することは、永遠にできない。1950年（昭和25年）の秋、満を持して世に問うた佐々木商店の「お多福ウスター・ソース」は、発売当初はまったくといってよいほど売れなかった。酢の方で取引がある八百屋や酒屋が気持ち程度に置いてくれるだけであった。そういういた好意的な店でも、既存メーカーの商品が陳列棚の大半を占領していた。

後発の、それも新参メーカーが不利なことは承知していたが、現実はやはり厳しかった。しかし、自分たちの製造方法は間違っていないという自負があった。知人の製造ノートを基本に、合わせて酢の醸造で培った知識と技術を結集してつくり出したソースは、他社のメーカーとは異なる大きな特徴があった。それは野菜と果物の果肉・果汁、香辛料、さらに味を調える食酢など原材料のすべてを元から仕込む、文字どおりの「元仕込み」と呼ばれる作り方である。「元仕込み」は酒造りの製法で、当時のソース業界では常識外で、通常の製造工程にはない方法であった。

当初から使っていた一斗炊きの羽釜を、より深さのある風呂釜にかえて、1日に3～4回仕込みを続けた。そんなに沢山作っても、注文が

あるわけではない。材料の無駄を省くために仕込み量を減らせばよいようなものだが、少なすぎるとソースの旨みやコクが出てこない。やはり、一定量の仕込みはやむを得ないのであった。そのうち、市内の大衆食堂やお好み焼店にも販売を始めた。当時の好み焼には、通常ウスターソースを使っていた。さらさらしたウスターソースは香ばしい、いい匂いはするが、すぐに鉄板の上で蒸発してしまう。好み焼店によつては、独自にソースを工夫している店もあった。ウスターソースにトマトケチャップを混ぜたり、一味唐辛子や七味唐辛子を入れたりしていた。なかには、リンゴやタマネギを煮込んで、裏ごししたものをウスターソースに混ぜる本格的な店もあった。そこでは普通の釜で野菜や果物を煮炊きすると、火力と酸で半年すると釜が使い物にならなくなってしまうという話を聞いた。

好み焼店をこまめに回るうちに、それぞれの店のソースにからむ実状や問題点が見えてきた。結果的に、このことが佐々木商店にとって大きな力となっていく。問屋に相手にされないので仕方なく始めた飲食店への営業であったが、店主や好み焼を食べる人々の生の声を直接聞きながら、その問題点を解決する商品をつくることが使命なのだと感じるようになつていた。これが、まだ見ぬ『好みソース』を開発していく始まりであった。

好み焼にピッタリの味となるよう、試作を繰り返したソースを、午前中に納品した。夕方にはもう一度店に寄つて、事細かく味の加減を聞いた。そして、ソースの味を分析し、改良した。徹夜になることもあった。翌朝、作り直したソースを持ってまた好み焼店を訪ねた。その繰り返しであった。基本的には「お多福ウスターソース」の原材料の配合を変えたりして味を調べていったが、それでも、なかなか好み焼に合うソースは完成しなかった。

たっぷりの野菜と果物、香辛料、そして調味のための醤油や味噌、醸造酢などでつくったソースは、1日もすると製造した釜や瓶の底に沈殿物ができた。これを捨てるにはもったいないと感じ、何とか利用できないかと頭をひねっていた。底に沈殿したオリは、言わばソースそのものの濃縮エキスである。一番コクがあって、栄養もあって、おいしいはずなのだ。でも、どのように使えばいいのか、わからなかつた。ある時、料理に使うため、オリに調味料を加えて煮炊きした。そしてそれが、夕食の食卓にあんかけとしてでてきた。それには、「とろみ、粘り」があった。これを見て、すぐに醸造蔵で試作を行つた。

広島の好み焼は野菜などを生地の上に重ねて焼くので、高さがある。サラサラしたウスターソースではすぐに流れ落ちてしまうのが欠点であった。粘りのあるソースなら落ちにくい上に、好み焼全体を包み込み、しかも具材とソースが絡みやすい。とろみのあるソースの試作を繰り返し、好み焼店へと持つて行った。最初は「こんなどろどろしたソースは気持ち悪い」とか「ほんまにおいしいのか?」と疑問視されたが、そのとろみが好み焼に合うことや、ウスターソースにはないまろやかな味が、次第に認められるようになった。

このあんかけのようなとろみのある『お多福ウスターソース　好み焼用』を完成したのが1952年(昭和27年)。イメージどおりのソースをつくり、これはいけるという自信を一層強めた。好み焼店への訪問も積極的に続け、1日に数十軒は回り、とりあえずソースを置かせてもらった。『お多福ウスターソース　好み焼用』の名称も略して「お多福ソース」と呼んでいた。分類上はあくまでウスターソースであった。当然ながらまだ『好みソース』という概念が存在しなかつた。従来のウスターソースの一升瓶やかめの、肩ラベルと銅ラベルの間

に「お好み焼用」という小さなシールを貼っただけであった。お好み焼店から「甘すぎる」「酸味が強い」などの注文が出れば、すぐに改良してもらっていた。このように、改良に改良を重ねて、一層お客様に満足していただける「お好み焼用」ソースに仕上がっていった。

## 6. オタフクお好みソース史

1950年（昭和25年）佐々木商店がソースの製造販売開始。

1952年（昭和27年）お多福造酢株式会社を設立。『お多福ウスター・ソース お好み焼用』が誕生。

1957年（昭和32年）一般消費者からの要望を受け、業務用のみだった「お好み焼用」ソースの家庭用二合瓶を発売。商品名を『オタフクお好みソース』に変更。

1969年（昭和44年）チクロ問題が勃発し、総力をあげて製品を回収。いち早く、全糖ソースに取り替える。取引先の多くは好意的に受け止め、結果、売上は増加していく。

1975年（昭和50年）高騰する砂糖の代替品として、栄養価が高く、独特の甘みのあるデー

ツの使用を開始。ソースの売上が酢を上回り、オタフクソース株式会社に社名を変更。

1978年（昭和53年）業界に先駆け、紙容器にソースを詰め製造。

1982年（昭和57年）業界に先駆け樹脂容器フクボトル（500g）を採用。

## 7. 社名一新、デーツとの出会い

1975年（昭和50年）、大旋風を巻き起こした「赤ヘル軍団」広島カープが悲願の初優勝を遂げた。10月20日、広島市の平和大通りで優勝パレードが行われ、市民や県民など30万人のファンが沿道に詰めかけた。「広島」の名前が全国に知れ渡り注目されるようになった。お多福造酢には、この年、社名の変更とデーツの使用という2つの転機があった。社名の変更は、酢とソースの売り上げが逆転してからすでに数年が経過し、ソースの方が有名になってきた。また、個人商店から企業へと脱却すべき段階にも差しかかっていた。1975年（昭和50年）10月（第24期のスタート）に初めて経営方針発表会を行った。これからは総合調味料メーカーとして進んでいく決意を宣言した。会社名もブ

|        | 糖質 (g) | 食物繊維 (g) | カルシウム (g) | 鉄 (mg) | カリウム (mg) |
|--------|--------|----------|-----------|--------|-----------|
| デーツ    | 75.8   | 7.4      | 110       | 2.1    | 647       |
| 【参考比較】 |        |          |           |        |           |
| はちみつ   | 79.7   | -        | 2         | 0.8    | 13        |
| バナナ    | 21.4   | 0.5      | 5         | 0.4    | 390       |
| リンゴ    | 10.4   | 0.6      | 3         | 0.2    | 110       |

（株）日本デーツエンタープライズ調べ

※デーツの栄養価は高い



砂漠を移動するキャラバンでは、何日もデーツとラクダの乳で飢えをしのぎ、旅を続けていました。

イランでは、妊娠中の女性が毎日2~3個のデーツを食べると、生まれてくる子が丈夫に育つと言われています。

ラマダン（断食月）明けには栄養補給としてジュースにして飲まれます。

ランド名と直結していた方が良いという判断で「オタフクソース株式会社」に改めた。また、「ソース」には、液体調味料 (SAUCE) のほかに、綴り違いで源や源泉 (SOURCE) という意味もある。他の一つは、業界をあげて高騰する砂糖の代替品としてデーツに着目し、日本ソース工業会が一括輸入することになり、いっせいに各社で使い始めた。オタフクソースは現在もデーツを使用している。

#### 《デーツについて》

デーツは砂漠の過酷な条件で育成し、その生命力の強さから「生命の木」と呼ばれる。鉄分、カルシウム、カリウムなどのミネラルや食物繊維が豊富に含まれ、その含有量は果実の中でもトップクラスで栄養価の高い果物である。

### 8. 全国展開の胎動

昭和 50 年台初頭のソース業界は、減産に悩んでいた。オイルショック以降、ソースの出荷量は大きく後退し、生産量も十数年前の水準へと退潮していた。業界シェアの 70% 以上を上位 5 社が占めるという寡占状態であった。オタフクソースなどの中小メーカーは、小回りのきく機動力を生かして直販ルートを開拓し、取引拡大を図るほかなかった。また、一方で、1975 年（昭和 50 年）7 月には、前年に制定されたウスターソース類の日本農林規格 (JAS) に沿って、JAS マーク製品が市場にお目見えした。しかし、オタフクソースの主力商品は JAS 製品に認定されなかった。『お好みソース』『焼そばソース』『たこ焼ソース』ともに、広島という 1 地方の需要があるだけの特殊なソースという見解が理由であった。国から「規格外」との烙印をおされたわけで、通常であれば残念がるところだが、社内の見解は逆であった。その理由は「JAS 規格の範囲内の塩分と酸度で『お好みソース』をつくったら、おいしくなくなる。健

康とおいしさを追求した結果、低塩・低酸になつただけのこと。」という考えであった。

社名変更をした際、新生オタフクソースは企業としてのビジョンを策定した。昭和 30 年代半ばまでは広島市内だけに販売先を特定していた。30 年代後半から 40 年代にかけては、広島県内の開拓が目標であった。50 年代からは中国・四国地方の瀬戸内経済圏を経て、やがては西日本一帯へと販売エリアを拡げていくことを、将来構想および目標とした。

その構想のベースには本社工場の移転計画があった。1978 年（昭和 53 年）春。のちの「商工センター」の西部に念願の新工場を着工した。これを機に新生産システムに切り替えた。斬新さでいえば、ソース容器の紙パック使用も業界に先駆けたものであった。牛乳の紙パックをヒントに、容器の内側に薄いアルミ箔を貼って缶詰め状態にしたものを開発した。商工センターに移転してすぐに実用化し、『お好みソース』『焼そばソース』『たこ焼ソース』の業務用をこれに変えて発売したところ、大きな話題と反響を呼んだ。

1980 年（昭和 55 年）。後年の『お好みソース』量産のきっかけとなるアイデアがでてきた。斬新だった紙パックに続いて、容器に変革をもたらしたスクイズボトルの開発である。当時、『お好みソース』の家庭用は瓶の容器で販売していたが、粘度があるため出にくいという指摘が多くあった。一方で、『お好みソース』は低塩・低酸で、あわせて保存料などを使っていないので、瓶のように気密性が高くないと品質が保てなかつた。その頃から、マヨネーズやケチャップに使われる樹脂容器はあったが、肝心の気密性が足りず、ソースには不向きであった。『お好みソース』を出しやすくて、品質も保てる最良の容器を探していたら、ガスバリア性の高い樹脂「エバール」があることを知った。さっそく、容器メーカーに提案し、共同開発をスタートし

た。なかなか、狙いどおりの物ができず、完成までに2年間かかった。

1982年（昭和57年），ようやく完成したスクイズボトルを「フクボトル」と名付け，『お好みソース』を詰めて販売を開始した。ところが，売れ行きはさっぱりだった。その理由はデザインを現代風に変更していたからである。お好み焼以外にも多様に使ってもらおうと，料理写真なども載せたカラフルなデザインであった。瓶は昔から使っている“オレンジ色をベースにした山形の素朴なデザイン”であった。どうやら，昔ながらのデザインが『オタフクお好みソース』のイメージとして浸透し，思いもよらぬほど定着しているようなのだ。従って，フクボトルのデザインを瓶と同じに戻したとたん，急速に売れ始めた。フクボトル入りの『お好みソース』の発売は，広島の小さなソースメーカーが，お好み焼という限定された料理を対象に，その専用ソースの存在を全国の家庭に向けて発信する第一歩であった。

## 9. 全国発売開始

そのテレビコマーシャルは，昭和50年代に放送された。広島県竹原市出身の落語家，桂文平（現・柳亭左楽）が両手にいっぱいの土産物を提げて，広島駅の新幹線のホームへとエスカレーターで昇ってくる。出張中のサラリーマンという設定で，映像に本人のセリフが重なる。「東京でも大阪でも売ってないんですよ」……「忘れられない広島の味。『オタフクお好みソース』」オタフクソースが初めてタレントを起用して制作した，15秒のテレビコマーシャルであった。広島県内を中心に放送された。

1975年（昭和50年）に山陽新幹線の岡山－博多間が開業し，広島は東京と直通となった。それ以後，広島駅のキヨスクにも置かせてもらっていたが，広島を訪れる出張会社員や観光

客，あるいは帰省した県内出身者らの手によって『オタフクお好みソース』は，関東や関西へも輪を広げていった。

さらに，口コミによって，独特の味わいのソースという評判は広がり，東京や大阪をはじめ各地から，取引についての問い合わせが来るようになっていった。しかし，品質の一定化やクレーム対応体制が十分できていない状況であることから，お客様に迷惑がかかる可能性があるので，丁寧にひとつひとつお断りしていった。そして，1982年（昭和57年），画期的なフクボトルができた。

お多福造酢からオタフクソースに社名を変更して以降，各地に営業所，駐在所をおいた。1977年（昭和52年）松山に，1980年（昭和55年）山口に，1982年（昭和57年）岡山に営業所を，1981年（昭和56年）高松に，1982年（昭和57年）福岡に駐在所を開所した。さらに，1983年（昭和58年）に東京に駐在所をおき，『お好みソース』をはじめとする商品を関東でも売り出した。

## 10.『お好みソース』の商品情報

### お好みソースの商品特長

たっぷりの野菜・果実に約20種類の香辛料をブレンドした，こだわり原料「デーツ」のコクのある甘さが特徴のまろやかなソース。





| 商品名          | 内容量<br>(g) | 税込価格<br>(円) |
|--------------|------------|-------------|
| お好みソース       | 500        | 346         |
| お好みソース       | 300        | 231         |
| お好みソース       | 150        | 168         |
| お好みソース       | 1150       | 567         |
| お好みソース (ビン)  | 1050       | 509         |
| お好みソース (ビン)  | 350        | 231         |
| お弁当ミニ お好みソース | 8g × 10    | 115         |

※希望小壺価格

## 原材料の表示

野菜・果実（トマト、デーツ、たまねぎ、りんご、その他）、糖類（ぶどう糖果糖液糖、砂糖）、醸造酢、アミノ酸液、食塩、酒精、醤油、香辛料、オイスターエキス、肉エキス、酵母エキス、昆布、蛋白加水分解物、しいたけ、増粘剤（加工でんぶん、増粘多糖類）、調味料（アミノ酸等）、カラメル色素、（原材料の一部として小麦、大豆、鶏肉、豚肉、もも、りんごを含む）

本商品は全て家庭用商品です。(家庭用の他に、業務用も様々な容量の商品があります。)

### 栄養成分 (100g 中)

| エネルギー (kcal) | たんぱく質 (g) | 脂質 (g) | 炭水化物 (g) | ナトリウム (mg) / 食塩相当量 (g) |
|--------------|-----------|--------|----------|------------------------|
| 132          | 1.8       | 0.0    | 31.1     | 2000 / 5.1             |

財団法人広島県環境保健協会調べ

## 11. お多福グループの組織

2009年（平成21年）10月より、グループ各社の力を結集した持株会社制となった。

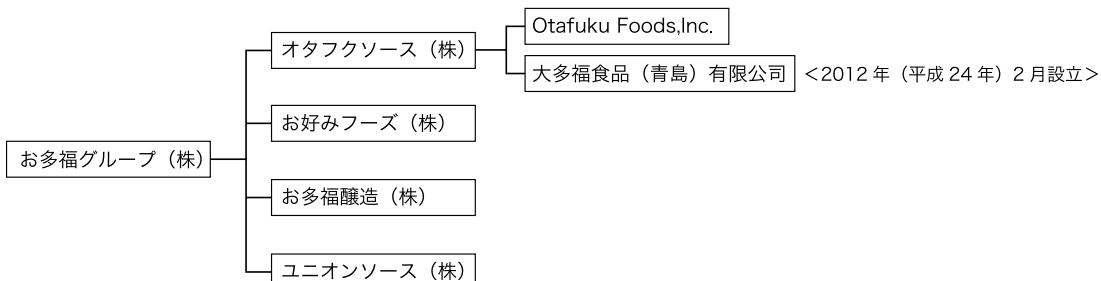
## 12. お多福グループの売上と利益

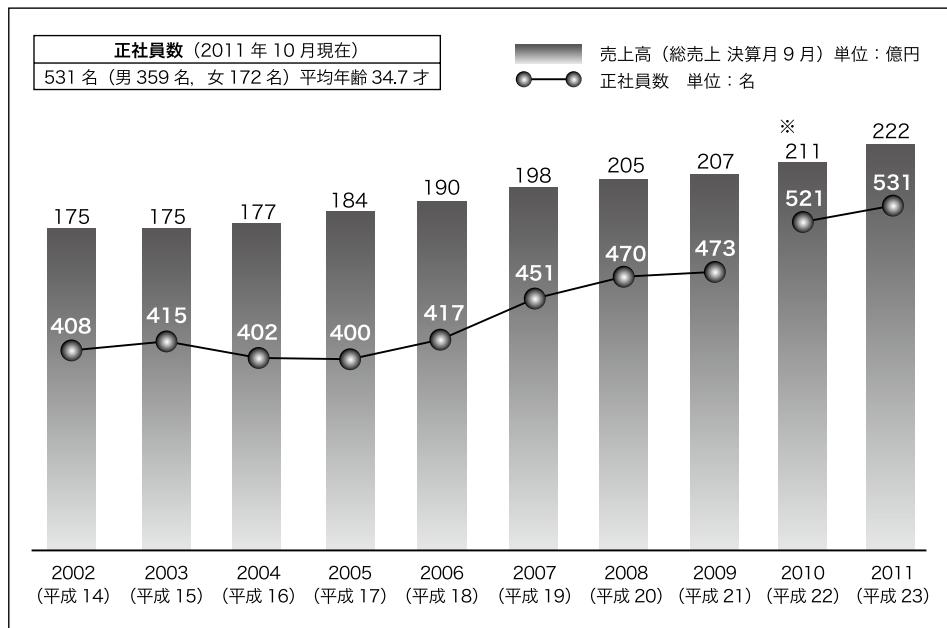
お多福グループの売上は2011年(平成23年)度で222億である。1922年(大正11年)創業

以来今年は90年目になるが、業績は順調に伸びている。

### 13. お好み焼の普及活動

オタフクソースの中核商品は『お好みソース』である。オタフクソースは『お好みソース』の販売に注力するだけではなく、お好み焼の普及活動に注力している。すなわち、広島風、関西風のお好み焼を食べる頻度が増えれば、それに





お多福グループ 年度別売上高・正社員数推移

※ H21 以前はオタフクソース単体の数値、H22 以降はお多福グループ連結の数値

伴い、『お好みソース』の使用頻度が増えるわけである。では、家庭内においてお好み焼を食べる意義は何であるか。野菜嫌いの家族でも、野菜をたくさん食べられるということはあるが、重要な役割を「家族の団らん」においていた。現在では、家族と一緒に食事をする機会は少なくなっている。この機会をお好み焼を通じて増やし、家族の団らんの場を作っていたいこうという考え方である。また、組織として、1998年（平成10年）に「お好み焼課」を新設した。「お好み焼課」は、お好み焼店のフォローや、開業志望者に店舗経営のノウハウを伝授するお好み研修センターの運営、各種イベントへの参加など、さらにお好み焼を広めていくための活動を担う専門の部署である。

2000年（平成12年）には、お好み焼を作るのに必要な機材を搭載したキャラバンカー「お好み焼団らん号」の活動を開始した。トラックを改装して、プロパンガス使用の鉄板に冷蔵庫、調理備品を載せた特注車で、福祉

施設や幼稚園などを巡回して、あつあつのお好み焼を食べてもらうのである。『お好みソース』の原点である広島お好み焼の、一層の普及を図るための導入であったが、そこで得られる人々とのふれあいは、かけがえのないものとなった。また、2008年（平成20年）にはWoodEggお好み焼館を開館した。お好み焼の歴史や文化を見学で学んでいただいたら、自分でお好み焼を焼いて、食べていただき、お好み焼に親しんでいただくといった活動をしている。社員のお好み焼に対する一層の理解を深めるために、お好み焼士マイスター制度も社員向けに開始した。

オタフクの社員たるもの、お好み焼に関する基礎的な知識を有し、社内外に養成指導



[WoodEgg お好み焼館]

ができるレベルを目指して研鑽しようという考えで始めた社内資格である。2011年(平成23年)10月現在、391人が資格を取得している。今後も、一層、社員ひとりひとりが、普及活動に邁進していく。

#### 14. 『お好みソース』をターゲット、TPO と 5P にのっとり説明

新商品を開発し、その商品がお客様の手元に届くために、筆者は新商品開発5Pをチェック用に使用している。(図1参照)

先ず第一に「Product」ありきである。「Product」には商品コンセプト、商品仕様、ネーミングなどを決定しなければならない。

第二は「Package」である。包装仕様、デザインなどを決定しなければならない。

第三は「Price」である。「Price」は販売、事業化に最も重要と考えている。

第四は「Place」である。『Target』の属性を定め、お客様に届けるにはどのチャネルが良いのか。量販店なのか、CVSなのか、専門店なのか、ドラッグストアなのかそれとも通販なのか。色々なチャネルがあるので選択と集中が必要になる。

技術先行型の新商品は兎角『Target』を忘れて技術開発に自己満足する傾向がある。顧客あっての新商品であることは最重要である。

この考えに基づき、『お好みソース』の開発から今までを整理してみる。『お好みソース』は1952年(昭和27年)、国内で初めて発売された。発売当初の商品名は『お多福ウスターソース お好み焼用』であった。取引先ではいつの間にか「お多福ソース」と呼んでいた。あくまで分類的にはウスターソースであり、『お好みソース』という概念はなかった。容器は一升瓶などであった。

現在の、『Packege』は『お好みソース』は粘

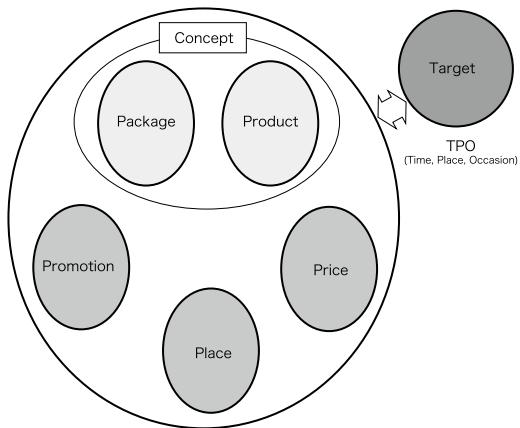


図1 商品開発5P；開発品はユーザーの手元に届く仕組みになっているか

度があるので出しやすい容器にしなければならないという考えで、容器の開発に着手した。当時は『お好みソース』の品質を保持できる樹脂容器がなかったため、ガスバリア性の高い樹脂(エバール)を使用したスクイズボトル(フクボトル)を開発した。2年間を要し完成したのが1982年(昭和57年)であり、これが契機となり全国発売に繋がっていった。

『Product』は1952年(昭和27年)の発売に至るまでに、お好み焼店で味をみていただきながら改良をくり返してきた。お好み焼の上に塗ってもウスターソースのようにたれ落ちない粘度を持たせた画期的なものであった。また1975年(昭和50年)以来、" デーツ(ナツメヤシ)" をこだわりの原料として使用している。

『Promotion』は、昭和50年代に15秒のテレビコマーシャルを広島県内を中心とする地域のみで放送した。内容は『お好みソース』を土産物として紹介するものだった。本格的な『Promotion』は「お好み焼の普及活動」である。実際に食べてもらい、お好み焼に親しんでいただけるような教室やキャラバン活動、また、お好み焼店開業を支援することなどにより、オタフクの『お好みソース』を使用したお好み

み焼店も広がり、さらに、一般の消費者の方にお好み焼を食べていただく機会が増え、広がっていった。

### おわりに

筆者は 1947 年（昭和 22 年）広島県に生まれ、広島のお好み焼を食べながら成長した。従って、お好み焼には愛着がある。広島風お好み焼という”のぼり”がたっていると、ついつい入ってしまう。今回は、筆者が佐々木茂喜社長に頼んで取材をお願いした。その目的は、広島で育った広島風お好み焼をどのようにしてオタフクソースが全国に広めていったかである。本誌だけでは十分理解いただけないと思うので、参考

資料を掲載したので是非参考にしていただきたい。お好み焼は野菜をおいしくたくさん食べられる料理である。葉物野菜の中でもキャベツは白菜やレタスなどに比べると食物繊維がたっぷり含まれており健康的なメニューである。食物繊維は一人・一日 5g 不足していると厚生労働省が発表している。食物繊維は食事の中の糖分、脂肪分を吸着して体外に排出してくれる。また、腸内環境を整えてくれる、言い換えれば、腸内を掃除してくれる。お好み焼は、”おいしく、野菜をたっぷり食べられるメニュー”である。まずは、国内の多くの人々にお好み焼を知っていただき、食べて戴くことである。国内にお好み焼が広がることを希望する。

### [参考文献]

- 1) ふくがたり；2011 年（平成 23 年）10 月 7 日初版発行、発行 オタフクソース株式会社
- 2) OCOLOGY（オコロジー）；1988 年（昭和 63 年）4 月 25 日初版発行、発行 オタフクソース株式会社
- 3) お多福グループ社会活動報告書 2011

月刊 ニューフードインダストリー

# NEW FOOD INDUSTRY

定期購読の  
ご案内

月刊「ニューフードインダストリー」は創刊54年の食品業界誌です。

多くの食品メーカー、技術開発部門、研究機関、全国の大学・大学院などの教育機関、図書館などでの愛読いただいております。

食の安全・健康・美に関する情報発信、新しい食品のご案内など広く情報を発信しております。

1年間の定期購読は、一括前払いでの定価の10%割引でご提供させていただいております。

年間購読料：23,760円（送料・税込）

お申し込み・お問い合わせは下記FAXかお電話で

電話：03-3254-9191 担当：村松

FAX：03-3256-9559

## ニューフードインダストリ一年間購読申込用紙

住所 〒

氏名

会社名・所属

電話

FAX

E-mail

<http://www.newfoodindustry.com/>

## ニューフードインダストリー 第54巻 第10号

印刷 平成24年 9月25日

発行 平成24年 10月1日

発行人 宇田 守孝

編集人 村松 右一

発行所 株式会社食品資料研究会

〒101-0038 東京都千代田区神田美倉町10(共同ビル新神田)

TEL:03-3254-9191(代表)

FAX:03-3256-9559

振込先:三菱東京UFJ銀行 京橋支店(普通)0070318

三井住友銀行 日本橋支店(当座)6551432

郵便振替口座 00110-6-62663

印刷所 株式会社アイエムアート

定価 2,100円(本体2,000円+税)(送料100円)

email:info@newfoodindustry.com