

# New Food Industry

食品加工および資材の新知识

<http://www.newfoodindustry.com>

2013 Vol.55 No.1

1

## 論 説

- 乳酸菌KT-11を利用したペット用アレルギー対策サプリメントの開発
- 純水と-20℃を用いたエノキタケ菌株の凍結保存の試み
- 食中毒細菌カンピロバクター属菌の簡便で迅速な高感度検出キットの開発
- ビタミンKオフ納豆風味大豆加工食品の開発
- ブラックジンジャーについて
- 東京都江戸川区産小松菜の色素成分の生理機能と硝酸塩の安全性の検討
- 小麦粉の一部に加工澱粉を添加した食パンの調理科学的特性
- レポーターアッセイを用いた美白評価

## 連 載

- シロザケ用飼料の油脂源
- “インスタントカレー市場”を創造した驚くべきヒット商品  
— 『バーモントカレー』ハウス食品株式会社 —
- 築地市場魚貝辞典 (シシャモ)
- “薬膳”の知恵 (73)



### 論 説

- 乳酸菌 KT-11 を利用した  
ペット用アレルギー対策サプリメントの開発  
..... 飛田 啓輔, 大谷 元 1
  
- 純水と -20°Cを用いたエノキタケ菌株の凍結保存の試み  
..... 富樫 巖, 幸田 有以 6
  
- 食中毒細菌カンピロバクター属菌の  
簡便で迅速な高感度検出キットの開発  
..... 山崎 伸二, 朝倉 昌博 17
  
- ビタミン K オフ納豆風味大豆加工食品の開発  
..... 北村 豊, 平松 祐司, 斉藤 有希 21
  
- ブラックジンジャーについて  
..... 堀田 幸子, 小谷 明司 29
  
- 東京都江戸川区産小松菜の色素成分の  
生理機能と硝酸塩の安全性の検討  
..... 前多 隼人, 阿部 美菜子, 伊藤 聖子, 片方 陽太郎, 加藤 陽治 33
  
- 小麦粉の一部に加工澱粉を添加した食パンの調理科学的特性  
..... 菊地 和美, 吉田 訓子, 高橋 セツ子, 知地 英征 41
  
- レポーターアッセイを用いた美白評価  
..... 白杉 一郎, 榊原 陽一, 松井 隆史, 水光 正仁 46

### 連載

□ シロザケ用飼料の油脂源

..... 大橋 勝彦, 酒本 秀一 53

□ “インスタントカレー市場”を創造した驚くべきヒット商品  
- 『バーモントカレー』ハウス食品株式会社 -

..... 田形 暁作 69

□ 築地市場魚貝辞典 (シシャモ)

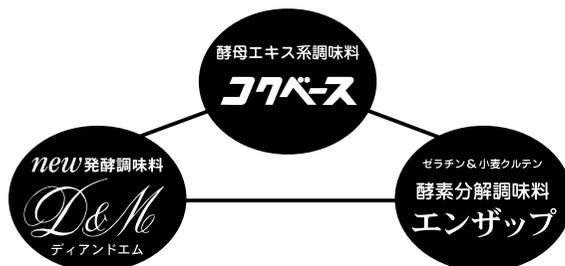
..... 山田 和彦 81

□ “薬膳”の知恵 (73)

..... 荒 勝俊 87

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



**新発売!** 乳製品にベストマッチな調味料

**コクベス**

ラクティックイーストエキス

乳加工品・製パン・製菓・チーズ・バターへの  
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

# 乳酸菌 KT-11 を利用した ペット用アレルギー対策サプリメントの開発

飛田 啓輔 (TOBITA Keisuke) \*1, \*2 大谷 元 (OTANI Hajime) \*1

\*1 信州大学大学院 総合工学系研究科, \*2 株式会社キティー バイオ事業部

Key Words : 乳酸菌・抗アレルギー・アレルギー性皮膚炎・ペット用サプリメント

## はじめに

わが国における 2011 年度のイヌおよびネコの累計飼育頭数は約 2,154 万頭であり、飼育世帯率はイヌで 17.7%、ネコで 10.3% に上る<sup>1)</sup>。このような、ペットの定着には少子高齢化や生活水準の向上を背景として、ヒトがペットに癒しや家族同様の関係を求めるようになったことが関係しているものと思われる。一方、最近のペットを取り巻く環境の変化から、アレルギー性疾患を抱えるペットが増えている。そこで、本稿では乳酸菌の抗アレルギー作用に着目したペット向けサプリメントの開発について紹介する。

## 1. ペットのアレルギー

ペットのアレルギー性疾患に関する報告は年々増加傾向にある。例えば、ペットとして飼育されているイヌのアレルギー罹患率は、イヌ全体の約 15% に上り、特にアレルギー性皮膚炎が小動物診療現場において多く観察されるようになってきている<sup>2)</sup>。

アレルギー性皮膚炎は、皮膚に強い痒みを伴うことが特徴であり、その原因物質によりノミ、ダニ、ハウスダストなどの小動物やその死骸に

対するアレルギー、食物アレルギー、接触性アレルギー、アトピー性皮膚炎などに分けられる。しかし、それらのアレルギー症状が慢性化すると、いずれの場合もマラセチア、膿皮症、脂漏性皮膚炎などの二次的な皮膚疾患を引き起こす。そのために、まずマラセチアや膿皮症などの合併した感染症を治療した後、副腎皮質ホルモン剤などの抗アレルギー剤で症状を制御し、アレルギーの原因となっているダニ、ノミ、ハウスダスト、食物などのアレルゲンを遠ざけることが一般的である<sup>3)</sup>。しかし、一度発症したアレルギーの完治は極めて困難であることや、一部の投薬は免疫力の低下を招き、感染症やその慢性化を誘発することが知られている。そのため、アレルギー症状の予防と改善という観点から、副作用の少ないペット用アレルギー対策サプリメントの開発が期待されている。

## 2. アレルギーの発症メカニズム

アレルギーは、その発症メカニズムの違いにより I 型～IV 型に大別される。それらの中でも、ヒトやペットにおいて高い頻度で観察されているアレルギー性皮膚炎の多くは、イムノグロブリン E (IgE) が発症に関与する I 型アレル

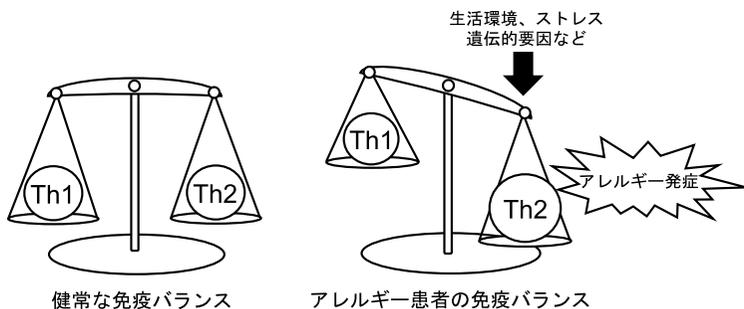


図1 Th1/Th2 バランスとアレルギー

ギーである。通常、免疫系は司令塔の役割を果たすI型ヘルパーT細胞(Th1)とII型ヘルパーT細胞(Th2)により巧みに調節されている。一般に、I型アレルギーでは、Th1とTh2のバランスがTh2優位となり、アレルギーの原因物質(アレルゲンと呼んでいる)に対する血液中のIgEレベルの顕著な上昇が観察される。そのために、I型アレルギーの発症にはTh1/Th2バランスの破綻が関わっていると考えられている(図1)。

一方、ペットにおけるTh1/Th2バランスの破綻の原因としては、嗜好性に優れた栄養価の高いペットフードの普及や室外から室内飼育への生活環境の変化などが招く肥満症、ストレス、運動不足などが挙げられる。また、犬種の違いによってアレルギー罹患率が異なることから<sup>2)</sup>、遺伝的因子の関与が示唆されている。

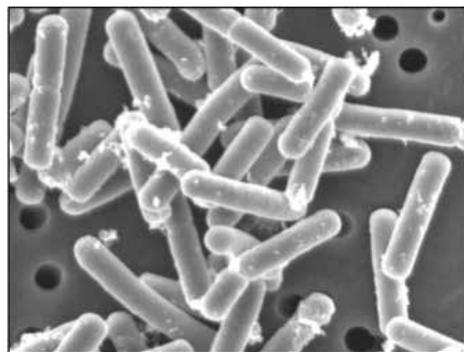


写真1 KT-11の電子顕微鏡写真

でありヒト消化管由来ラクトバチルス・アシドフィラスなどと比較して、極めて高いことを確認している。また、加熱処理を加えることでその作用が高まることも特徴の一つである<sup>4)</sup>。

### 3. 乳酸菌 KT-11

KT-11は、キティー社が保有する菌株の中から、Th1の誘導を介してTh1/Th2バランスの是正を促す菌株として選抜されたラクトバチルス・クリスパタスに属する乳酸菌株である(写真1)。KT-11のTh1誘導作用は、ラクトバチルス・クリスパタスの標準菌株、最近注目されている植物由来のラクトバチルス・プラントラム、ラクトバチルス・クリスパタスと類縁菌

### 4. アトピー性皮膚炎の改善効果

既に述べたように、ペットのアレルギー性疾患の中でも、イヌのアトピー性皮膚炎は高い頻度で観察されるとともに、罹患率は犬種間で異なる。また、原因物質としては、とりわけコナヒョウヒダニの場合が多いことが知られている<sup>5)</sup>。そこで、著者らは遺伝的にアトピー性皮膚炎の発症因子を有するマウス(I型アレルギー自然発症マウス、NC/Ngaマウス)への1日あたり1mgの加熱処理KT-11の15週間の経口投与が、コナヒョウヒダニで誘起したアトピー

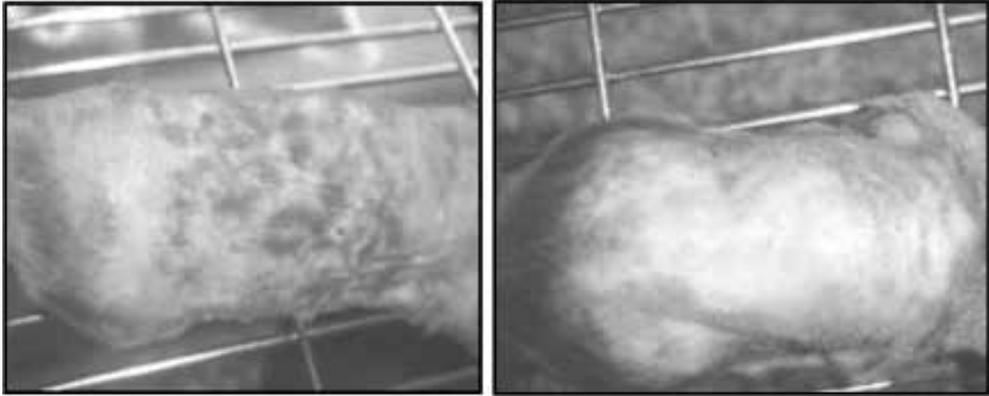


写真2 KT-11 非投与(左)および投与(右)マウスの背部のアトピー性皮膚炎症状

性皮膚炎に及ぼす影響を調べた<sup>4)</sup>。

その結果、KT-11 投与マウスのアトピー性皮膚炎は、非投与の場合と比べて明らかに弱いことが観察された(写真2)。また、KT-11 を投与したマウスの血液中のコナヒョウヒダニに対するIgE レベルは、非投与の場合と比べて有意に低く、Th1/Th2 バランスの是正が確認された(図2)。

すなわち、これらの結果から、KT-11 はTh1/Th2 バランスの是正を介してアトピー性皮膚炎を改善するものと考えられ、アトピー性皮膚炎改善のためのペット用経口投与剤の原料として用いることができることが示唆される。

## 5. 後天的アレルギーの改善効果

前項では、KT-11 の遺伝的アレルギーマウスのアレルギー症状改善効果について紹介した。しかし、既に述べたようにアレルギー性疾患の増加には、生活環境の変化が大きく関係していると考えられる。

そこで、著者らは食物アレルギーの一つである卵白アルブミン(OVA)の過免疫により健康マウスに後天的I型アレルギーを誘導し、その

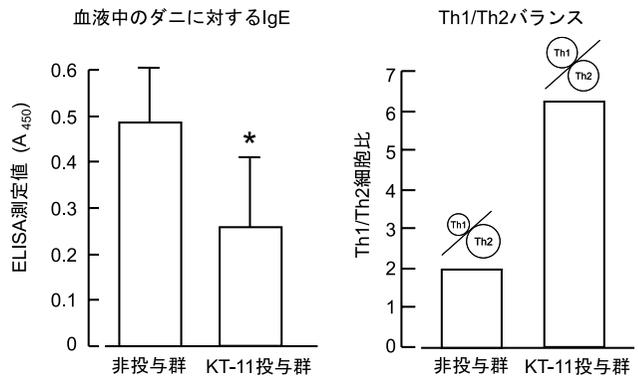


図2 KT-11 がアトピー性皮膚炎発症マウスの免疫系に及ぼす影響

各値は平均値または平均値と標準誤差で示している。\*:  $p < 0.05$

マウスのアレルギー症状と免疫パラメーターを加熱処理KT-11 添加飼料で飼育した場合と無添加飼料で飼育した場合と比較とした<sup>6)</sup>。

その結果、KT-11 添加飼料 ( $5.0 \times 10^7$  個/g) で7週間飼育したマウスは、無添加飼料で飼育した場合と比べて、アレルギーの指標となるくしゃみの回数が有意に減少した(図3)。また、KT-11 添加飼料で飼育したマウスでは、無添加飼料で飼育した場合よりも血液中のOVAに対するIgE レベルの有意な低下と、Th1/Th2 バランスの是正が観察された(図4)。さらに、図には示していないがKT-11 添加飼料で飼育したマウスは、アレルギーの発症に関与するマス

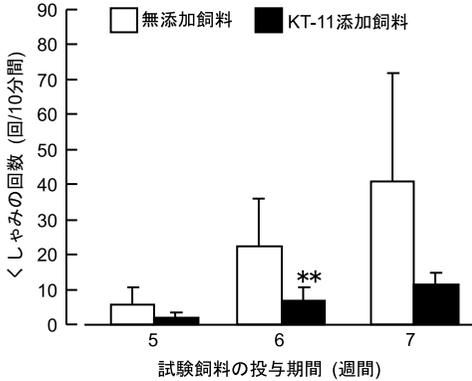


図3 KT-11 が後天的アレルギー発症マウスのアレルギーの指標であるくしゃみの回数に及ぼす影響

各値は平均値と標準誤差で示している。\*:  $p < 0.01$

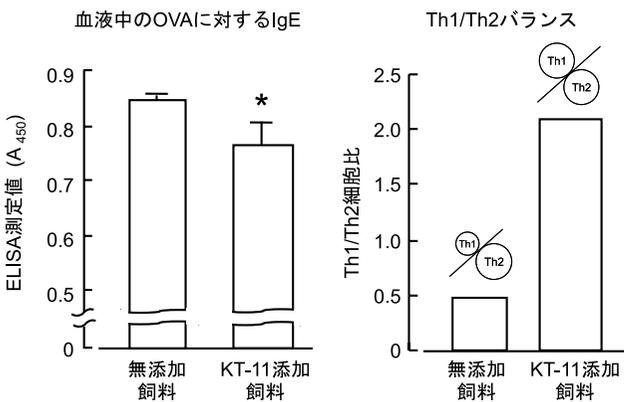


図4 KT-11 が後天的アレルギー発症マウスの免疫系に及ぼす影響

各値は平均値または平均値と標準誤差で示している。\*:  $p < 0.05$

ト細胞や抗原提示細胞数が顕著に減少した。

すなわち、KT-11 は Th1/Th2 バランスの是正だけでなく、アレルギーの発症に關与する免疫細胞の活性化の抑制を介して、後天的アレルギーマウスの症状を改善することが明らかになった。本結果も前項の結果と同様に、KT-11 を環境の変化により生じるアトピー性皮膚炎改善のためのペット用経口投与剤の原料として用いることができることを示唆している。

## 6. KT-11 の投与量とアレルギー改善効果

KT-11 の I 型アレルギー軽減のための最低投与量を知るために、後天的アレルギー発症マウスを加熱処理 KT-11 添加飼料（低濃度添加，中濃度添加，高濃度添加）および無添加飼料で 6 週間飼育し、アレルギー症状と免疫パラメーターを比較した。

その結果、いずれの濃度の KT-11 添加飼料で飼育した場合も無添加飼料で飼育した場合と比べて、I 型アレルギー症状の指標であるくしゃみの回数は有意に減少し、Th1/Th2 バランスの是正が観察された（図 5）。

本結果に基づき、マウス一匹、一日あたりの KT-11 の摂取量を給餌量から

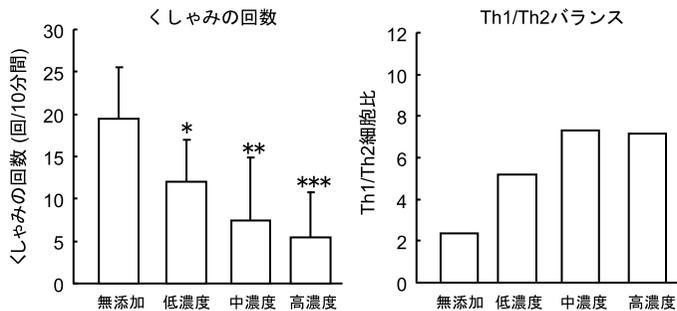


図5 KT-11 の摂取量の違いがアレルギー症状に及ぼす影響

低濃度：0.00283% KT-11 添加，中濃度：0.0085% KT-11 添加，高濃度：0.0283% KT-11 添加。各値は平均値または平均値と標準誤差で示している。\*:  $p < 0.05$ ，\*\*  $p < 0.01$ ，\*\*\*  $p < 0.001$



写真3 KT-11 含有サプリメント

算出すると、低濃度添加の場合は約 5 mg/kg、中濃度添加の場合は約 15 mg/kg、高濃度添加の場合は約 47 mg/kg である。このことから、KT-11 のアレルギー軽減効果はマウスでは少なくとも 5 mg/kg 以上の投与において生じるものと考えられる。現在、本結果に基づき、KT-11 を配合した錠剤や顆粒分包などの形態に仕立てたサプリメントを試作し(写真3)、ペット用アレルギー対策サプリメントの開発に向けて臨床試験を行っている。

## 7. KT-11 の安全性

一般に、乳酸菌は様々な生物の消化管内に常在し、宿主に有益な作用をもたらすことは周知のところである。KT-11 は乳児糞便から分離した乳酸菌であることから安全性は高いものと考えられるが、ペット用飼料素材として用いる計

表1 KT-11 の安全性試験項目

安全性試験	対象	投与量
単回投与試験	マウス <sup>7)</sup> ・ラット	2.0g/kg
反復投与試験 (3ヶ月間)	ビーグル犬	0.9g/kg
Ames 試験	細菌 5 種	—

画から KT-11 の安全性試験を行った。

その結果、表1に示したように、マウスおよびラットへの単回投与試験、並びに Ames 試験において KT-11 の毒性は認められなかった。また、ビーグル犬への反復投与試験においても一日あたり 900 mg/kg の投与では安全性に全く問題がないことが確認された。

すなわち、以上の結果は、前項で示したマウスにおける I 型アレルギー改善効果を示す KT-11 の投与量は、安全性において全く問題ないことを示唆している。

### おわりに

本稿では、著者らが乳児糞便から分離同定した乳酸菌(ラクトバチルス・クリスタス) KT-11 のアトピー性皮膚炎や後天的アレルギーの改善効果、並びにその安全性について紹介した。著者らは KT-11 をアレルギー症状の改善を目的とした安全性の高いペット向けサプリメントの素材として利用できるものと考え、現在、臨床試験を進めている。

### ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 参考文献 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・

- 1) ペットフード協会, 平成 23 年度全国犬猫飼育実態調査, <http://www.petfood.or.jp/data/index.html>.
- 2) 園田 開, 林屋 早苗, 林屋 牧男, 長谷川 篤彦, 獣医臨床皮膚科, **11**, 199-204, 2005.
- 3) Scott DW, Miller WH, Griffin C, in *Muller and Kirk's Small Animal Dermatology*. 6th ed., Saunders, Philadelphia, PA, 543-666, 2001.
- 4) Tobita K, Yanaka H, Otani H, *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 5586-5590, 2009.
- 5) 永田 雅彦, 日本獣医師会雑誌, **52**, 658-660, 1999.
- 6) Tobita K, Yanaka H, Otani H, *Anim. Sci. J.*, **81**, 699-705, 2010.
- 7) Tobita K, Yanaka H, Otani H, *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 6498-6502, 2010.

# 純水と $-20^{\circ}\text{C}$ を用いた エノキタケ菌株の凍結保存の試み

富樫 巖 (TOGASHI Iwao) \* 幸田 有以 (YUKITA Ai) \*

\* 旭川工業高等専門学校

Key Words：菌株保存・食用菌・栄養成長・生殖成長

## はじめに

北海道における食用キノコの人工栽培産業の生産額は、最新の統計によると2008年から100億円/年を超えるまでに達し、その生産量は生シタケ6,400 t/年、以下エノキタケ4,300 t/年、ブナシメジ3,300 t/年、マイタケ2,400 t/年、ナメコ1,300 t/年と続く<sup>1)</sup>。そして、この産業を支えてきた主要因としては、キノコ生産先進地域からの栽培技術（培地組成、温湿度管理など）の習得と独自改良、本州種菌メーカーや北海道立林産試験場が開発した優秀な栽培用キノコ菌株<sup>2,3)</sup>の利用を挙げることができる。

一方、食用キノコの菌株保存に注目すると設備的に恵まれている試験・研究施設等であれば $-80^{\circ}\text{C}$ 以下での凍結保存法が用いられるが<sup>4,5)</sup>、一般には $5^{\circ}\text{C}$ 前後の温度を用いる継代培養保存法が汎用されているものと考えられる。しかしながらエノキタケの菌株を継代培養保存すると、発芽温度と保存温度が重なっている<sup>6)</sup>ことで保存培地に子実体が発生してしまうことが少なくない（図1参照）。本研究では、この課題解決の一方策を狙い、リーズナブルな家庭用冷凍庫レベル（ $-20^{\circ}\text{C}$ 程度）の温度を利用したエノキタケ菌株の凍結保存の可能性、および同保存が菌株の子実体形成に及ぼす影響の把握を試

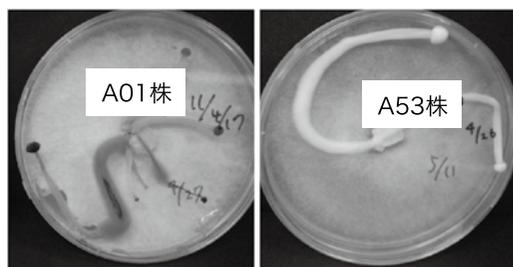


図1 エノキタケ菌株の継代培養で発生した子実体（ $7^{\circ}\text{C}$ 、左：野生系、右：白造り系）

みることにした。また、コスト削減や作業の簡略化を考慮し、凍結保護液の代わりに殺菌した純水の利用可能性についても併せて検討した。

## 1. 供試菌株と供試材料、および菌株の保存・解凍条件

供試菌のエノキタケ *Flammulina velutipes* (Curt.: Fr.) Sing には、野生系 (A01) と白造り系 (A53) の2菌株を用いた。いずれもポテトデキストロース寒天（日水製薬(株)製、以下PDA）平板培地を用いて温度 $7^{\circ}\text{C}$ で継代培養保存したものである。各試験に用いる場合には、直径9 cmのPDA平板培地に供試菌株を接種して $25^{\circ}\text{C}$ で7日間培養し、コルクボーラーで培

地ごと打ち抜いた直径 5 mm の菌体円盤を接種源とした。

凍結保護液には、高圧蒸気殺菌処理 (121℃・15 分) を施したグリセリン (和光純薬工業(株)製、特級) の 10% (w/v) 水溶液と純水を供試した。1.5 ml マイクロチューブに供試菌株の菌体円盤 5 枚を入れ、凍結保護液や純水を分注して同円盤全体を覆った。それらを、予冷することなく -80℃ (日本フリーザ(株)製小型超低温槽)、-20℃ (株トミー精工製アルミブロック超低温槽) と平均温度 -18.5℃ (株日立製作所製家庭用冷凍庫)、及びコントロールとして 7℃ (同家庭用冷蔵庫) の環境下へ最大 150 日間投入した。そして、一定期間経過毎にマイクロチューブを取り出し、コントロールを除いて 30℃ の湯浴中に 3 分間浸漬することで解凍した。

## 2. 保存後の菌株の生存状況

### 2-1. 生存率の測定方法

PDA 平板培地 1 枚にマイクロチューブから取り出した菌体円盤 5 枚を接種し、温度 25℃ のインキュベーター中で最大 10 日間培養することで供試菌株の菌糸再生状況を、目視および実体顕微鏡にて観察した。菌体円盤から菌糸再生が見られた時を『発菌』、再生菌糸が PDA 平板培地中に伸長した時を『活着』とした。活着したものは全て菌糸伸長に至ったことから、活

着に至ったものを生存数とすることで各生存率を求めた。

### 2-2. グリセリン水溶液または純水、および -20℃ を用いた凍結菌糸の再生状況

エノキタケ菌株については種々の凍結温度に耐性があることが報告されている<sup>7)</sup> こと、著者らの予備試験でも良好な生存状況が得られていることから、通常は利用されない純水と温度 -20℃ の組み合わせの利用可能性を検討することとした。対照となる凍結保護液には一般的な 10% (w/v) グリセリン水溶液を採用し、主には純水を用いて同温度で 3, 5, 10 日間凍結した供試菌株の菌糸の再生状況を観察した。

その結果を図 2 と同 3 に示した。凍結保護液の違い、菌株の違いにより生存率が 100% に達する培養日数に多少の差異があったが、遅くとも 5 日間で全ての菌体円盤が活着に至った。図 4 には生存率 100% に達するまでに要した日数をまとめたが、野生系 (A01) をグリセリン水溶液で 10 日間凍結保存した場合に 5 日間で活着したもの、多くが 2~3 日間となっており、凍結保護液と純水の差異は殆どみられなかった。以上の結果からエノキタケ菌株の凍結保存では純水と -20℃ の組み合わせの利用可能が認められる。そこで次に、純水と -80℃ の組み合わせの影響把握、さらには純水と -20℃ の組み合わせにおける中長期間の凍結保存の影響を把握することとした。

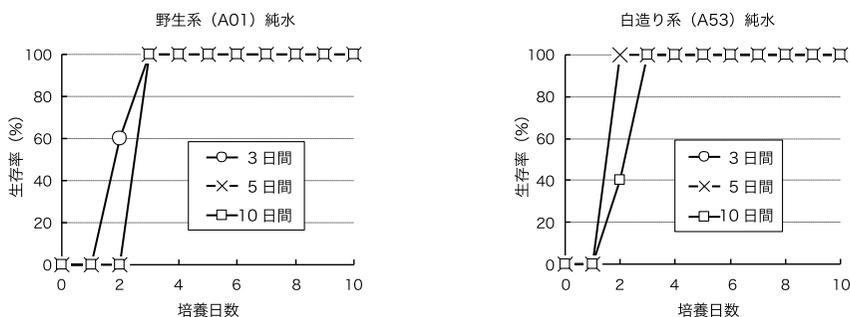


図 2 純水使用・-20℃凍結保存菌株の菌糸再生状況 (25℃培養)

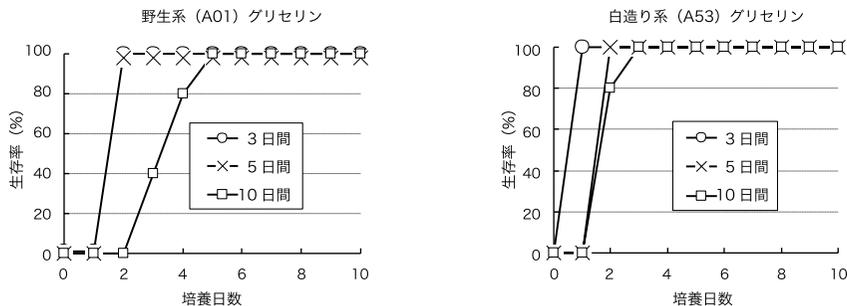


図3 グリセリン使用・-20℃凍結保存菌株の菌糸再生状況 (25℃培養)

### 2-3. 純水と-80℃を用いた凍結菌糸の再生状況

温度-80℃で3, 5, 10日間凍結した場合の2菌株の挙動を観察し, その菌糸再生状況を図5に示した。菌株により生存率が100%に達する培養日数に多少の差異はあるが, 2日間で全ての菌体円盤が活着に至ったことで, -20℃(図4参照)よりも-80℃が望ましいことが分かる。すなわち, -20℃凍結(一部, 解凍操作の影響)はエノキタケ菌糸体への何らかのストレスを与えており, その菌体円盤が活着に要した時間経過の長さはダメージの回復に費やされたものと推察される。

### 2-4. 純水と-80℃または-20℃を用いて中長期凍結した菌糸の再生状況

凍結保護液の代わりに純水, 凍結温度として-80℃と-20℃(上述の2種類の器材使用)を用い, 供試菌株に対する30~150日間凍結の影響を観察した。

その結果, 全ての試験区で生存率が100%となったが, そこに到達する培養日数に差異が観察された。図6には, 凍結温度と器材の違い別に, 生存率100%到達に要した日数をまとめた。-80℃ではいずれも2~3日間で活着が全て確認されたものの, -20℃では120日間以上の凍結で4~6日間を要した。これは, 2.3の場合と同じく, -20℃凍結保存時に生じるストレスの可能性が考えられる。今後, 実用化に向

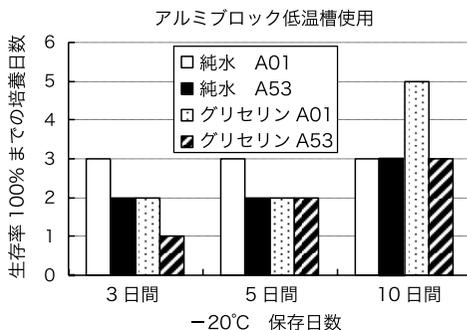


図4 -20℃凍結保存後の菌株が生存率100%に達するに要した日数 (25℃)

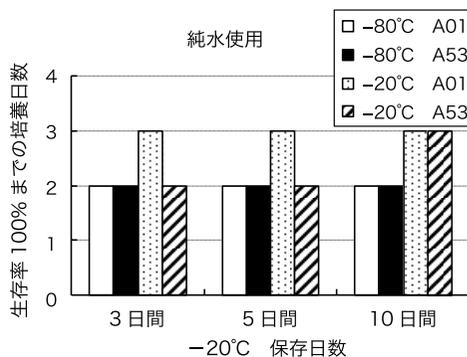


図5 純水使用・-80℃または-20℃凍結保存後の菌株が生存率100%に達するに要した日数 (25℃)

けて更なる長期間凍結の影響を把握する必要がある。

-20℃のアルミブロック超低温槽と家庭用冷凍庫の違いは, 前者の温度変動幅はほぼ0であるのに対し, 後者の庫内には10℃程度の温度

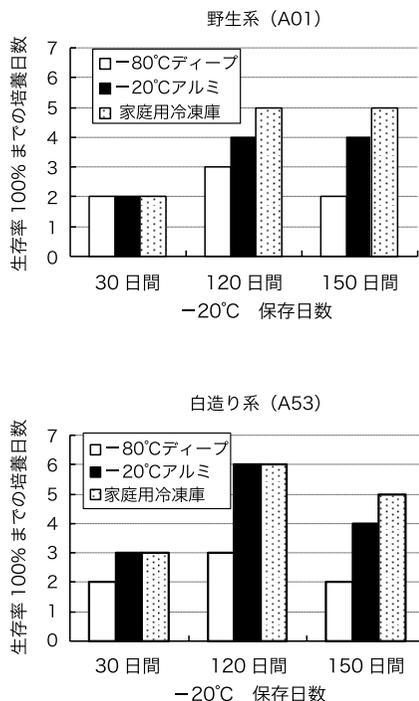


図6 純水使用・-80℃または-20℃凍結保存後の菌株が生存率100%に達するに要した日数(25℃)

注) ディープ：ディープフリーザー；アルミ：アルミブロック超低温槽

変動幅(-20～-12℃)が存在することである。図6から、両者の違いが凍結保存に及ぼす差異を判断することは難しいが、アルミブロック超低温槽が僅かに優れる傾向がみられる。

以上から、-80℃と比較して-20℃はエノキタケ菌株に何らかの凍結ストレスを与えるが、5カ月程度の保存期間では菌糸体の成長(栄養成長)において回復可能なダメージレベルと判断できる。続いて子実体形成(生殖成長)への影響評価を試みることにした。

### 3.

#### 純水中で凍結保存した菌株を用いた栽培試験

##### 3-1. エノキタケの栽培方法

栽培用種菌培地については、エゾマツ (*Picea*

*izeoensis* Carr.) のノコズ (水分：7.9%) と米ぬか (水分：7.5%) を体積比4：1で混合後に水道水を加えて攪拌し、強く握った時に指の間から僅かに水が染み出る程度の水分(60～63%)とした。それをスクリュューキャップ付の200 ml容ガラス培養ビンに約100g充填し、培地中央に直径9 mmの通気孔を1個あけて高压蒸気殺菌(温度121℃・20分)した。その後、上述のように活着・伸長したエノキタケのコロニーから得た菌体円盤を接種し、25℃で2週間培養して培地全体に菌糸を蔓延させたものを栽培用種菌として用いた。

栽培培地については、栽培用種菌培地と同様に調製・高压蒸気殺菌処理を行った。ただし培養ビン当たりの培地充てん量は60gとし、その培地組成は絶対乾燥質量換算でノコズ10g、米ぬか11g、水39g(水分：65%)とした。室温まで冷却した栽培培地の上面と通気孔へ1ビン当たり約5gの栽培用種菌を接種し、25℃で培養することで培地全体に菌糸を蔓延させた。培養期間については同一試験区の菌回りが全て終了するまでとし(菌回り日数として把握)、菌回り後に菌掻きと殺菌水の吸水処理を1時間行った。なお、試験区当たりの栽培培地の繰り返し数は6とした。

その後培養ビンに再度キャップをし、12℃に設定した蛍光灯の照明付きインキュベーター(照度約300 lux)で子実体の発芽と子実体の生育を促した。子実体の採取時期は菌傘が培養ビンのキャップに到達した時点とし、発芽までに要した日数と採取までに要したそれぞれの日数(発芽日数と採取日数、いずれも12℃に投入後の日数)、および子実体の収量と本数を測定するとともに目視による子実体の形態を観察した。

##### 3-2. エノキタケの栽培試験結果

栽培試験に供した2菌株の再生菌糸としては2.4で示したように、純水を用いて-80℃と

-20℃で30, 120, 150日間凍結保存処理を施したものの、およびコントロールは7℃で継代培養していたものを用いた。

栽培試験の結果、コントロールを含めた全試験区で子実体が得られ、子実体形成能が維持されていることが示された。菌回り日数に注目すると、いずれの試験区も12日間前後で差異はなかった。発茸日数と採取日数については、それぞれ野生系(A01)が12日間前後と24日前後、白造り系(A53)が18日間と33日前後であり、両菌株共に凍結保存条件の影響は確認されなかった。

両菌株の培養ビン当たりの子実体収量と子実体本数の結果を図7と同8に示した。野生系(A01)と白造り系(A53)を比較した場合の顕著な差異としては、後者のコントロールにおいて子実体収量が少ない試験区がみられたこと、前者の子実体本数が多いことである。この原因としては、本研究で用いた培養温度などの栽培環

境<sup>8)</sup>が白造り系(A53)に適していなかった可能性が考えられる。

子実体発生が安定していた野生系(A01)の結果を中心に考察すると、図9に示したようにコントロールと凍結保存処理区共に大きさの揃った正常な形態の子実体が発生し、子実体収量に関してコントロールとの間に有意な差が認められなかった。図7に示すように、全ての試験区で培養ビン当たりの子実体収量は21gを超え、培地質量の35%以上が利用されたことになる。なお、図8において凍結保存150日の試験区の栽培試験結果で、コントロールを含めて子実体本数が減少しているが、その原因は不明である。

以上から、エノキタケ菌株については、純水に投入した菌体円盤を家庭用冷凍庫レベルの温度で凍結保存しても、半年程度であれば生存の維持と正常な子実体形成能が維持されることが示された。

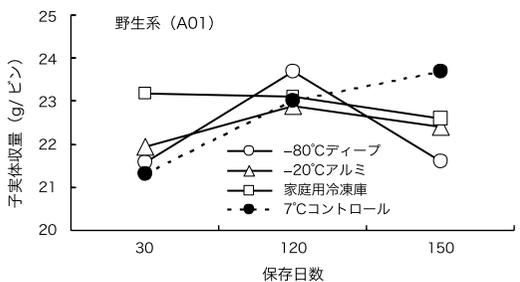


図7 純水使用・-80℃または-20℃凍結保存後の再生菌系を用いた栽培試験結果(子実体収量)

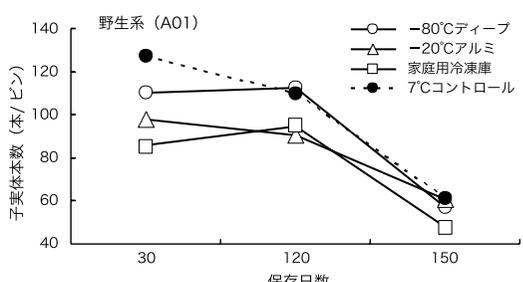
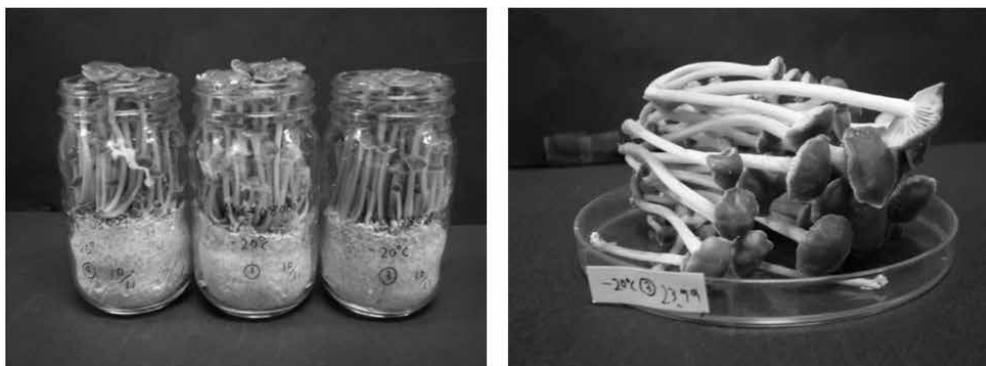


図8 純水使用・-80℃または-20℃凍結保存後の再生菌系を用いた栽培試験結果(子実体本数)

注) ディープ：小型超低温槽；アルミ：アルミブロック超低温槽。(図7, 8 共通)



ー20℃アルミブロック超低温槽を用いて120日間凍結保存した再生菌糸から発生した子実体



コントロール(7℃・継代培養保存)から発生した子実体

図9 栽培試験で発生した野生型エノキタケ(A01)の子実体  
注) エゾマツ・米ぬか培地使用(培養温度:25℃;発茸・生育温度:12℃)

#### まとめ

凍結保護液の代わりに純水を用い、かつ庭用冷凍庫レベルの温度(-20℃程度)を用いてエノキタケ2菌株の凍結保存試験(最大150日間)、および栽培試験を行った結果、全ての条件で菌糸が再生した。一方、-20℃凍結保存は-80℃の場合と比較して菌糸再生に多くの時間を要したことで、エノキタケ菌糸に何らかの凍結ダメージを与えたものの、栄養成長においては回復可能なレベルと思慮された。なお、同様の試験をシイタケ2菌株で行ったところ、-20℃凍結保存で3日間処理後において菌糸再生は生じ

なかった(富樫, 幸田:未発表データ)。純水と-20℃凍結保存の組み合わせは、一部の種類のキノコにのみ利用可能な条件と思慮される。

また、凍結処理後を施したエノキタケの再生菌糸を用いた栽培試験から、栽培に関わる種々の日数や子実体の収量・本数・形態を精査した結果、継代保存菌株のコントロールとほぼ同様の結果となった。したがって、本研究の凍結保存条件はエノキタケの子実体発生能(生殖成長)に顕著な影響を及ぼさなかった。今後においては、実用化に向けてより長期間の凍結保存の影響把握が必要である。

・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 参考文献 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・

- 1) 北海道水産林務部林務局林業木材課:資料編・特用林産物全般. 北海道特用林産統計(平成22年). 札幌, 5-8, 2012
- 2) 前川二郎:きのこの菌糸を凍らせて保存する. 菌草, **45**(5): 38-43, 1999
- 3) 原田 陽:道産きのこの品種開発と活用. 林産試だより 2012年7月号電子版 (<http://www.fpri.hro.or.jp/dayori/index.htm>): 8, 2012
- 4) 原田 陽:ブナシメジの品種開発とカラマツの活用. 林産試だより 2012年9月号電子版 (<http://www.fpri.hro.or.jp/dayori/index.htm>): 1-2, 2012
- 5) 岡田 元:糸状菌類の簡便で安全な凍結保存法. 日本微生物資源学会誌, **22**(2): 105-110, 2006
- 6) 寺下隆夫:2.3 茸菌の成長と環境. きのこの生化学と利用. 寺下隆夫編. 東京, 応用技術出版, 32-41, 1991
- 7) 大政正武:遺伝資源研究・最近の進歩(2) - 栽培きのこ菌株の超低温保存の検討 - . 農業技術, **48**(2): 74-77, 1993
- 8) 大森清寿, 小出博志:エノキタケ. キノコ栽培全科. 大森清寿・小出博志編. 東京, 農山漁村文化協会, 85-96, 2001

# 食中毒細菌カンピロバクター属菌の 簡便で迅速な高感度検出キットの開発

山崎 伸二 (YAMASAKI Shinji) \*1 朝倉 昌博 (ASAKURA Masahiro) \*1, \*2

\*1 大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科 獣医学専攻, \*2 扶桑薬品工業株式会社 研究開発センター

Key Words: カンピロバクター・食中毒細菌・マルチプレックス PCR・Real-time PCR

## はじめに

カンピロバクター属菌は、獣医学領域では100年以上も前から家畜の流産の原因菌として問題となっていた。1970年代に入り、カンピロバクター属菌が小児の下痢症の原因となることが明らかとされ、医学領域でも注目を集めるようになった<sup>1)</sup>。近年では、カンピロバクター属菌、特に *Campylobacter jejuni* と *C. coli* は、我が国や欧米において最も重要な食中毒細菌の1つとなっている。しかしながら、培養法に基づくカンピロバクターの検査法には様々な問題点がある。多くのカンピロバクター属菌は、微好気条件を好み、増殖が遅く、菌種同定まで約1週間を要する。生化学的性状が酷似しており、菌種同定が容易でない。16S rRNA 遺伝子の菌種間での相同性が高く、16S rRNA を基にした菌種の鑑別が困難である。

我々は、細胞膨化致死毒素 (*cdt*) 遺伝子がある種のカンピロバクター属菌に菌種特異的かつ普遍的に存在することを見だし、菌種同定の標的遺伝子となりうることを報告した<sup>2-5)</sup>。本稿では *cdt* 遺伝子を標的としたカンピロバクター属菌の簡便で迅速な高感度検出キットとその応用例について紹介する。

## 1. カンピロバクターとその感染症

カンピロバクター属菌は、グラム陰性のらせん状桿菌で、両端に鞭毛を有し、コルクスクリュー様の活発な運動をする。培養は微好気条件下 (5~10%の酸素) で行い、水素を要求する菌種もある。カンピロバクター属には、現在少なくとも18菌種報告されている (表1)<sup>6)</sup>。それらの多くは家禽類をはじめとする動物の腸管内、ヒトの腸管内や口腔内に生息している。多くのカンピロバクター属菌がヒトの胃腸炎の原因となるが、これら18菌種の中で食中毒細菌に指定されているのは *C. jejuni* と *C. coli* の2菌種である。一方、*C. fetus* は、食中毒細菌には指定されていないが、生レバーによる集団食中毒の原因菌として報告されている<sup>7)</sup>。

我が国における1年間のカンピロバクターによる食中毒は、発生件数で400件前後、患者数は約3,000名と近年常に上位を占めている。しかしながら、食品安全委員会の報告によるとカンピロバクターの感染者は年間述べ1億5千万人と推定されている。我が国の下痢症患者から分離されるカンピロバクター属菌の98%以上が *C. jejuni* と *C. coli* である<sup>9)</sup>。しかし、欧州で

表1 カンピロバクター属細菌 18 菌種の生息場所とヒトや動物に引き起こす病気の種類<sup>6)</sup>

菌種	環境中での生息場所		病気の種類	
	ヒト	動物	ヒト	動物
<i>C. jejuni</i>	ヒト, 家禽, ブタ, ウシ, ヒツジ, イヌ, ネコ, 水, トリ, ミンク,		胃腸炎, 敗血症, 髄膜炎, 流産, 直腸炎, ギランバレー症候群	下痢, 流産
<i>C. coli</i>	ウサギ, 昆虫 ブタ, 家禽, ウシ, ヒツジ, トリ		胃腸炎, 敗血症	胃腸炎
<i>C. fetus</i>	ウシ, ヒツジ		敗血症, 胃腸炎, 流産, 髄膜炎	ウシの自然流産, 感染性不妊症 不育症, ヒツジの自然流産
<i>C. lari</i>	トリ (家禽を含む), 水, イヌ, ネコ, サル, ウマ, アザラシ		胃腸炎, 敗血症	鳥類の胃腸炎
<i>C. upsaliensis</i>	イヌ, ネコ		胃腸炎, 敗血症, 膿瘍	犬, 猫の胃腸炎
<i>C. hyointestinalis</i>	ブタ, ウシ, ハムスター, シカ		胃腸炎	増殖性出血性腸炎
<i>C. concisus</i>	ヒト		歯周病, 胃腸炎	無し
<i>C. curvus</i>	ヒト		歯周病, 胃腸炎	無し
<i>C. spitorum</i>	ヒト, ウシ, ヒツジ, ブタ		膿瘍, 胃腸炎	無し
<i>C. hominis</i>	ヒト		易感染性宿主における胃腸炎	不明
<i>C. gracilis</i>	ヒト		歯周病, 著膿, 膿瘍	無し
<i>C. rectus</i>	ヒト		歯周病	無し
<i>C. showae</i>	ヒト		歯周病	無し
<i>C. helveticus</i>	ネコ, イヌ		無し (ヒトから分離報告あり)	猫, 犬の胃腸炎
<i>C. hyoilei</i>	ブタ		無し	ブタの増殖性出血性腸炎
<i>C. mucosalis</i>	ブタ		無し	ブタの壊死性腸炎・回腸炎
<i>C. insulaenigræ</i>	アザラシ, ネズミイルカ		無し	無し
<i>C. lariænae</i>	ウシ, ブタ, ヒト		無し	無し

は *C. jejuni* や *C. coli* 以外にも *C. upsaliensis*, *C. concisus* や *C. fetus* などが下痢症患者から分離されている<sup>10)</sup>。これらの違いは、培養法あるいは地理的要因が影響している可能性が考えられる。

一方, *C. jejuni* や *C. fetus* を始めカンピロバクター属菌の中には、胃腸炎以外に敗血症の原因になる菌種もある。特に *C. jejuni* による胃腸炎発症後、まれに末梢神経障害であるギランバレー症候群を併発することがある。さらに、カンピロバクター感染症の続発症として反応性関節炎、過敏性腸症候群や炎症性腸疾患がある<sup>11)</sup>。オランダの2004年の報告では、人口1,600万人あたりカンピロバクターによる胃腸炎患者は59,000人、そのうち入院患者は570人、死者は25人で、続発症としての反応性関節炎は1,000人、ギランバレー症候群は60人、炎症性腸疾患は22人と見積もられている<sup>11)</sup>。

## 2. カンピロバクターの検査法

カンピロバクターの培養による検査法は患者検体と食品検体とで若干異なる。患者検体の場合、通常、増菌培養を行わず抗菌薬を含んだ Skirrow 培地か mCCDA 培地上に直接便検体を塗布し、微好気条件下 42℃で 48 時間以上培養を行う。カンピロバクター様のコロニーが得られれば、さらに純培養を行い、生化学的性状試験にて菌

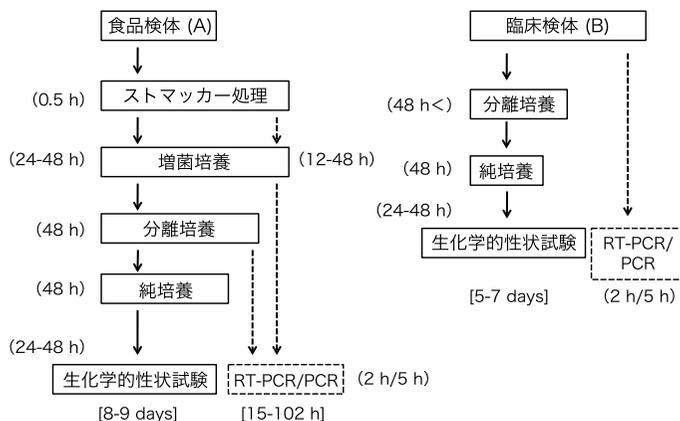


図1 食品検体 (A) および患者検体 (B) のカンピロバクターの検査手順

斜線左が、*C. jejuni* の数を右が *C. coli* の数を示す

種を同定する。最短でも6日程度要する(図1)。一方、食品検体の場合は、食品検体をストマッカーで処理し、同じく抗菌薬を含んだ Bolton 培地あるいは Preston 培地を用いて増菌培養を24~48時間行う。増菌培養液を mCCDA 培地に植菌し、微好気条件下で48時間培養する。その後、得られたコロニーを臨床検体と同様に純培養、生化学的性状試験を行いカンピロバクターの同定を行う。食品検体からカンピロバクターを培養法で調べる場合、最短でも8日を要する。しかも、*C. jejuni* と *C. coli* の鑑別は馬尿酸水解酵素活性の有無で判定するため偽陽性や偽陰性となる場合もあり、生化学的性状試験だけでは鑑別は困難である<sup>12)</sup>。それゆえ、食中毒細菌として報告する場合も *C. jejuni* と *C. coli* の鑑別は必須でなく *C. jejuni/coli* として報告してもよい。しかし、疫学的解析や続発するギランバレー症候群を予測する上においても鑑別する意義はある。

### 3. カンピロバクターの簡便・迅速高感度検出キットの開発

生化学的性状試験によるカンピロバクター属

菌の菌種同定が困難なことから、特異的な遺伝子を検出するカンピロバクターの菌種特異的検査法が多数開発されている。しかし、完璧な方法は確立されていない<sup>13-18)</sup>。我々は、カンピロバクター属菌、すなわち *C. jejuni*、*C. coli* 及び *C. fetus* が保有する細胞膨化致死毒素 (cytolethal distending toxin: *cdt*) 遺伝子がこれら3菌種に特異的かつ普遍的に存在することを見いだした<sup>2)</sup>。CDTは、A、B、C、3つのサブユニットからなるホロ毒素で細胞を膨化後、致死

させる。A、Cサブユニットが細胞表面のレセプターへの結合活性を、BサブユニットはDNase活性を有する毒素活性形態である<sup>19)</sup>。我々は、*cdtA*、*cdtB*、*cdtC* 遺伝子それぞれを標的としたマルチプレックスPCR法を開発し、一度のPCRで3菌種を特異的に検出できることを確認した<sup>4)</sup>。*cdtB* 遺伝子を標的としたマルチプレックスPCR法はPCRチューブあたり10 colony forming unit (cfu) の *C. jejuni*、*C. coli* および *C. fetus* を菌種特異的に検出できた。当初の解析では *cdtB* 遺伝子を標的としたものが特異性、感度とも最も優れていたが、その後 *cdt* 遺伝子の変異や部分欠損株が見つかり、最近の解析結果では *cdtC* 遺伝子の感度が最も優れていた<sup>5)</sup>。しかし、より信頼性の高い結果を得るためには、*cdtC* 遺伝子と *cdtB* あるいは *cdtA* 遺伝子を組み合わせることが重要である。分離菌の場合、本マルチプレックスPCR法と電気泳動とを組み合わせ約5時間で菌種の同定が可能である。

一方、電気泳動を行わず定量的に *C. jejuni* と *C. coli* を一度のPCRで検出できるデュプレックスリアルタイムPCR (RT-PCR) 法を開発した。この方法は *cdtC* 遺伝子を標的としPCR

チューブあたり 1 cfu の菌を菌種特異的に約 2 時間で検出・同定することができる。この RT-PCR 法は Cycleave PCR *Campylobacter (jejuni/coli)* Typing Kit として、また、*cdtB* 或は *cdtC* 遺伝子を標的とし 3 菌種を同時に検出できるマルチプレックス PCR 法も *Campylobacter (cdt gene)* PCR Detection and Typing Kit としてタカラバイオ社から販売されている。

#### 4. カンピロバクター検出キットの臨床検体への応用

下痢症患者便を用いたカンピロバクターの検査に、抗菌薬を含んだ Skirrow 培地と抗菌薬を含まず菌の運動性と大きさとで選択するフィルター法、すなわちフィルターを血液寒天培地の上に載せフィルターを通過できる大きさの菌のみを培養する方法と、*cdtB* 遺伝子を標的としたマルチプレックス PCR 法で患者便中のカンピロバクターを直接検出した結果を比較した<sup>20)</sup>。患者便 711 検体から、Skirrow 培地で *C. jejuni* を 41 検体、*C. coli* を 2 検体から分離した。フィルター法では *C. jejuni* は 36 検体からしか分離されなかったが、*C. coli* は 3 検体から分離され

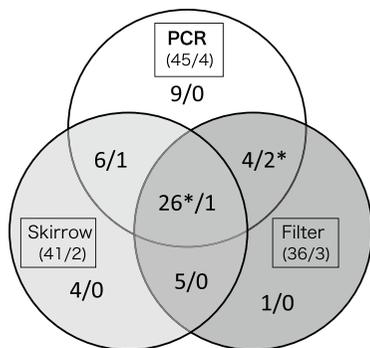


図 2 下痢症患者便から培養法と PCR 法によるカンピロバクターの検出<sup>20)</sup>

\* 同一検体から *C. jejuni* と *C. coli* が分離されたことを示す

た (図 2)。また、フィルター法でのみ *C. jejuni* が分離されたものが 5 検体、*C. coli* が 2 検体あった。一方、マルチプレックス PCR 法を用いると 45 検体から *C. jejuni* が検出され、4 検体で *C. coli* が検出された。すなわち、培養法でも完璧なものではなく、ある培地で分離された菌も別な培地では分離されないことがある。3つの方法を比較すると、*C. jejuni*、*C. coli* の検出において PCR 法が最も検出率が高く、臨床検体を用いた検査において簡便で迅速だけでなく、感度の面においても優れていた。

#### 5. カンピロバクター検出キットの食品検体への応用

鶏肉の *C. jejuni*、*C. coli* および *C. fetus* の汚染調査にそれぞれの PCR キットを用いて評価した<sup>21)</sup>。カンピロバクターで汚染されていないことを確認した市販鶏肉に *C. jejuni*、*C. coli* および *C. fetus* をそれぞれ表 2 に示した菌数スパイクし、Bolton 培地あるいは Preston 培地を用いて 12、16、24、48 時間増菌培養した。それぞれの菌液を mCCDA 培地に植菌し、カンピロバクター様のコロニーが得られるか調べた (表 2)。その結果、Bolton 培地を用いた場合、12 時間増菌で  $1.6 \times 10^5$  の *C. coli* をスパイクした鶏肉から菌が分離できたが、それ以外では全く分離できなかった。Bolton 培地は Preston 培地に比べ選択性が弱く、雑菌の方が早く増殖したためと考えられた。

Preston 培地を用いた場合、12 時間増菌では  $2.7 \times 10^4$  の *C. jejuni* あるいは  $1.6 \times 10^2$  以上の *C. coli* をスパイクした鶏肉全てから菌を分離できたが、*C. fetus* は全く分離できなかった。16 時間増菌では  $2.7 \times 10^2$  以上の *C. jejuni* をスパイクした鶏肉全てから菌を分離することができた。*C. fetus* は 16 時間増菌で、 $6.9 \times 10^4$  をスパイクした鶏肉からのみ菌を分離できた。24

表2 培養法と *Campylobacter* (*cdt* gene) PCR Detection and Typing Kit を用いたカンピロバクターの定量的検出結果の比較<sup>21)</sup>

菌種	鶏肉 10 g にスパイクした菌数 (cfu)	mCCDA 培地による分離			PCR Detection and Typing Kit		
		12 h	16 h	24 h	12 h	16 h	24 h
<i>C. jejuni</i>	$2.7 \times 10^2$	-/-	-/+	-/+	-/-	+/*	+/+
	$2.7 \times 10^3$	-/-	-/+	-/+	+/+	+/+	+/+
	$2.7 \times 10^4$	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	+/+
	$2.7 \times 10^5$	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	+/+
	$1.6 \times 10^2$	-/+	-/+	-/+	-/-	+*/-	+*/+
<i>C. coli</i>	$1.6 \times 10^3$	-/+	-/+	-/+	+/-	+/+*	+/+
	$1.6 \times 10^4$	-/+	-/+	-/+	+/-	+/+*	+/+
	$1.6 \times 10^5$	+/+	-/+	-/+	+/+	+/+	+/+
	$6.9 \times 10^1$	-/-	-/-	-/+	-/-	-/-	+*/+
	$6.9 \times 10^2$	-/-	-/-	-/+	-/-	+/-	+/+
<i>C. fetus</i>	$6.9 \times 10^3$	-/-	-/-	-/+	+/-	+/-	+/+
	$6.9 \times 10^4$	-/-	-/+	-/+	+/-	+/+	+/+

\*は精製 DNA を用いて PCR を行った結果を示す

時間増菌では *C. jejuni*, *C. coli*, *C. fetus* をスパイクした鶏肉全てから植菌数に関わらず菌を分離できた。

一方, *Campylobacter* (*cdt* gene) PCR Detection and Typing Kit を用いた場合, Bolton 培地では, 12 時間増菌で  $2.7 \times 10^3$  以上の *C. jejuni*,  $1.6 \times 10^3$  以上の *C. coli*, そして  $6.9 \times 10^3$  以上の *C. fetus* をスパイクした鶏肉全てからそれぞれの菌を検出できた (表 2)。16 時間増菌では  $2.7 \times 10^2$  以上の *C. jejuni*,  $1.6 \times 10^2$  以上の *C. coli*,  $6.9 \times 10^2$  以上の *C. fetus* をスパイクした鶏肉全てからそれぞれ菌を検出できた。24 時間増菌では, 3 菌種とも最も少ない菌数をスパイクした鶏肉からそれぞれの菌を検出できた。Preston 培地を用いた場合, 12 時間増菌では *C. jejuni* は  $2.7 \times 10^3$  以上をスパイクした鶏肉全てから菌を検出することができたが, *C. coli* は  $1.6 \times 10^3$  のみ, *C. fetus* ではどの群においても菌を検出することができなかった。16 時間増菌では, *C. fetus* は  $6.9 \times 10^4$  スパイクした検体でのみ菌を検出できたが, *C. jejuni* は  $2.7 \times 10^2$  以上を, *C. coli* は  $1.6 \times 10^3$  以上をスパイクした鶏肉全てから菌を検出できた。さらに 24 時間増菌す

ると, 精製 DNA を用いなくともそれぞれ最も少ない菌数で菌を検出することができた。

次に, 市販の鶏肉を Preston 培地あるいは Bolton 培地で 12, 16, 24 時間増菌培養を行い, mCCDA 培地を用いて菌を分離し, 同時にボイルテンプレートあるいは精製 DNA を鋳型として Cycleave PCR *Campylobacter* (*jejuni/coli*) Typing Kit で菌の検出・同定を行った (表 3)。その結果, Preston 又は Bolton 培地で 12 時間増菌培養後に mCCDA 培地で菌の分離を試みたところ Bolton 培地では菌を分離できなかったが, Preston 培地では 5 検体から *C. jejuni* を分離できた。16 時間増菌では, Bolton 培地では *C. jejuni* が 2 検体から, Preston では 7 検体から *C. jejuni*, 1 検体から *C. coli* を分離できた。24 時間増菌では Bolton 培地で先と同じ 2 検体から *C. jejuni* を分離し, Preston 培地では 8 検体から *C. jejuni* を分離できたが, 16 時間増菌で分離された *C. coli* は分離できなかった。

一方, Cycleave PCR *Campylobacter* (*jejuni/coli*) Typing Kit では 12 時間増菌培養した Bolton 培地, Preston 培地から調整したボイルテンプレートでは 3 検体で陽性となり, 精製 DNA を用いると

表3 市販鶏肉から Cycleave PCR *Campylobacter (jejuni/coli)* Typing Kit による検出と培養法による *C. jejuni* と *C. coli* の分離結果の比較

No	PCR	培養	12時間				16時間				24時間				
			Preston ボイル/精製DNA	Bolton RT-PCR ボイル/精製DNA	Preston 分離 mCCDA	Bolton 分離 mCCDA	Preston ボイル/精製DNA	Bolton RT-PCR ボイル/精製DNA	Preston 分離 mCCDA	Bolton 分離 mCCDA	Preston RT-PCR ボイル	Bolton	Preston 分離 mCCDA	Bolton	
1	Cj, Cc	-	Cj/-	-/Cj	-	-	Cj/Cc	-	-	Cj, Cc	-	-	-	Cc	-
2	-	-	-/-	-/-	-	-	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-/-	-/-	-	-	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	Gj	Gj	Gj/Cj	Gj/Cj	Gj	Gj	Gj/Cj	Gj	Gj	Gj	Gj	Gj	Gj	Gj	Gj
5	Gj	Gj	-/Cj	Gj/Cj	Gj	Gj	Gj/Cj	Gj	Gj	Gj	Gj	Gj	Gj	Gj	Gj
6	Gj	Gj	Gj/Cj	-/-	Gj	Gj	-/-	Gj	Gj	Gj	Gj	Gj	Gj	Gj	Gj
7	Gj	Gj	-/Cj	-/Cj	-	-	-/-	-	-	Gj	-	-	-	-	-
8	Gj	Gj	-/Cj	Gj/Cj	Gj	Gj	-/-	Gj	Gj	Gj	Gj	Gj	Gj	Gj	Gj
9	Gj	Gj	-/-	-/-	-	-	-/-	-	-	Gj	-	-	-	-	-
10	Cj, Cc	Gj	-/-	-/Cj	-	-	Cc/Cc	Cc/Cc	Cc/Cc	Cj, Cc	Cc	Cc	Cc	Cj	Cj
11	Gj	Cc	-/Cj	-/Cj	-	-	-/Cj	Cj, Cc/Cj, Cc	-/Cj	Gj	Gj	Gj	Gj	Gj	Gj
12	Gj	Gj	-/Cj	-/Cj	Gj	Gj	-/Cj	Gj	Gj	Gj	Gj	Gj	Gj	Gj, Cc	Gj
計	Cj(10), Cc(3)	Cj(8), Cc(1)	Cj(3)(7)	Cj(3)(8)	Cj(5)	-	Cj(8)(9)	Cj(3), Cc(2)(5), Cc(2)	Cj(2)	Cj(10), Cc(2)	Cj(7), Cc(1)	Cj(2)	Cj(6), Cc(2)	Cj(8)	Cj(2)

(四良丸他, 未発表データ)

Cj: *C. jejuni*, Cc: *C. coli*, 括弧内の数字は検出又は分離された菌株数

それぞれ8検体と7検体で *C. jejuni* が陽性となった(表3)。Preston 培地による16時間増菌から調整したボイルテンプレートを用いた場合8検体で、精製DNAでは9検体で *C. jejuni* が検出されたが、Bolton 培地から調整したボイルテンプレートでは3検体から *C. jejuni* が、2検体で *C. coli* が検出され、精製DNAを用いると5検体から *C. jejuni* が、2検体で *C. coli* が検出された。さらに24時間増菌から調整したボイルテンプレートを用いた場合でもPreston 培地で *C. jejuni* が10検体から *C. coli* が2検体から検出され、Bolton 培地の結果(6検体から *C. jejuni*, 2検体から *C. coli*)より良い結果が得られた。

以上の結果より、PCR法はカンピロバクターの検査時間を大幅に短縮できただけでなく、陽性率の向上にも貢献した。RT-PCR(Cycleave)法の結果をまとめると鶏肉12検体中10検体で *C. jejuni* が、3検体で *C. coli* が検出された(表3)。一方、培養法の結果をまとめると8検体から *C. jejuni* が、1検体から *C. coli* が分離された。RT-PCR法で死菌を検出していた可能性は否定できないが、例えば表3の7番の検体では、12時間培養では精製DNAを用いないと *C. jejuni* を検出することができなかったが、16時間、24時間増菌では、ボイルテンプレートでも *C. jejuni* を検出できた。このことは、生きた *C. jejuni* が存在し培地中で増殖したことを示している。同様のことが検体番号1や12の *C. coli* についても言える。一方、概してPreston 培地を増菌培養に用いた方がカンピロバクターの分離率、検出率は高かった

が、検体番号 10 や 12 の *C. coli* は Bolton 培地でしか検出、分離されていない。しかし、培養法による検査で Bolton 培地と Preston 培地の両方を用い、mCCDA 培地で分離することは手間とコストの面で困難である。Bolton 培地と Preston 培地を用いて増菌し、PCR 法で検出する方法は分離に要する手間を大幅に削減できるだけでなく、複数の増菌時間の検体も容易に調べることができる。例えば、検体番号 10 の *C. coli* の場合、Bolton 培地による 16 時間増菌では *C. coli* が検出されたが、24 時間増菌では検出されなくなった。おそらく、雑菌が増殖し、相対的に *C. coli* の比率が下がり *C. coli* が検出できなくなったものと考えられる。いずれにせよ、PCR 法をカンピロバクターの検査に適用することは時間の短縮、感度の向上等様々な利点がある。

おわりに

ヒトへの感染で最も問題となっている *C. jejuni*, *C. coli* および *C. fetus* の簡便で迅速な PCR 法を開発した。培養法によるカンピロバクターの検査では、時間がかかるだけでなく、用いる増菌培地の種類や分離培養に用いる培地の種類によっても分離、検出される菌種のみならず分離、検出率にも影響を及ぼした。PCR 法による検査は、これらの問題点を克服することを可能とした。しかし、RT-PCR 法は高価な機器を必要とすることから、イムノクロマト法のようなより簡便な検査キットの開発も求められている。また、増菌培養を行うこと無くカンピロバクターの検査を行うことができればより迅速な検査が可能となる。今後、検体中の菌を濃縮する方法を確立し RT-PCR と組み合わせ、より迅速に検査できる方法を開発して行くことが課題である。

・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 参考文献 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・

- 1) Skirrow MB, Butzler J-P: Foreword. p xvii-xxiii. In Nachamkin I, Blaser MJ (ed), *Campylobacter*, 2nd ed, ASM Press, Washington DC, 2000
- 2) Asakura M, Samosornsuk W, Taguchi M, Kobayashi K, Misawa N, Kusumoto M, Nishimura K, Matsuhisa A, Yamasaki S: Comparative analysis of cytolethal distending toxin (*cdt*) genes among *Campylobacter jejuni*, *C. coli* and *C. fetus* strains, *Microb Pathog*, **42**(5-6), 174-183, 2007.
- 3) Samosornsuk W, Asakura M, Yoshida E, Taguchi T, Nishimura K, Eampokalap B, Phongsisay V, Chaicumpa W, Yamasaki S: Evaluation of a cytolethal distending toxin (*cdt*) gene-based species-specific multiplex PCR assay for the identification of *Campylobacter* strains isolated from poultry in Thailand. *Microbiol Immunol*, **51**(9): 909-917, 2007.
- 4) Asakura M, Samosornsuk W, Hinenoya A, Misawa N, Nishimura K, Matsuhisa A, Yamasaki S. Development of a cytolethal distending toxin (*cdt*) gene-based species-specific multiplex PCR assay for the detection of *cdt* genes in *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter fetus*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **52**(2): 260-266, 2008.
- 5) Lutful Kabir SM, Kikuchi K, Asakura M, Shiramaru S, Tsuruoka N, Goto A, Hinenoya A, Yamasaki S: Evaluation of a cytolethal distending toxin (*cdt*) gene-based species-specific multiplex PCR assay for the identification of *Campylobacter* strains isolated from diarrheal patients in Japan. *Jpn J Infect Dis*, **64**(1): 19-26, 2011.
- 6) Humphrey T, O' Brien S, Madsen M: *Campylobacters* as zoonotic pathogens: a food production perspective. *Int J Food Microbiol*, **117**(3): 237-257, 2007
- 7) 赤木征宏, 水谷 哲, 木下承皓, 三澤尚明: *Campylobacter fetus* による集団食中毒の事例, 第 47 回日本感染症学会, 中日本地方総会抄録集, p.37, 2004.
- 8) 食品安全委員会 微生物・ウイルス専門調査会: 微生物・ウイルス評価書 鶏肉中のカンピロバクター・ジェジュニ/コリ 2009 年 6 月
- 9) 横山敬子: カンピロバクター食中毒の発生状況. 日本食品微生物学会雑誌, **23**(2), 109-113, 2006.

- 10) Vandenberg O, Dediste A, Houf K, Ibekwem S, Souayah H, Cadranel S, Douat N, Zissis G, Butzler JP, Vandamme P: *Arcobacter* species in humans. *Emerg Infect Dis*, **10**(10): 1863-1867, 2004.
- 11) Molbak K, Havelaar, A: p.151-162. In Nachamkin I, Szymanski CM, Blaser MJ (ed), *Campylobacter*, 3rd ed, ASM Press, Washington DC, 2008.
- 12) On SL: Identification methods for campylobacters, helicobacters, and related organisms. *Clin Microbiol Rev*, **9**(3), 405-422, 1996.
- 13) Linton D, Lawson AJ, Owen RJ, Stanley J: PCR detection, identification to species level, and finger-printing of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* direct from diarrheic samples. *J Clin Microbiol*, **35**(10), 2568-2572, 1997.
- 14) Fermer C, Engvall EO: Specific PCR identification and differentiation of the thermophilic campylobacters, *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari* and *C. upsaliensis*. *J Clin Microbiol*, **37**(10), 3370-3373, 1999.
- 15) Eyers M, Chapelle S, Van Camp G, Goossens H., De Wachter R.: Discrimination among thermophilic campylobacter species by polymerase chain reaction amplification of 23S rRNA gene fragments. *J Clin Microbiol*, **31**(12):3340-3343, 1993.
- 16) Gonzalez I, Grant KA, Richardson PT, Park SF, Collins MD: Specific identification of the enteropathogens *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by using a PCR test based on the *ceuE* gene encoding a putative virulence determinant. *J Clin Microbiol*, **35**(3):759-763, 1997.
- 17) Klena JD, Parker CT, Knibb K, Ibbitt JC, Devane PM, Horn ST, Miller W G, Konkel ME: Differentiation of *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari*, and *Campylobacter upsaliensis* by a multiplex PCR developed from the nucleotide sequence of the lipid A gene *lpxA*. *J Clin Microbiol*, **42**(12):5549-5557, 2004.
- 18) Eunju S, Lee Y: Comparison of three different methods for *Campylobacter* isolation from porcine intestines. *J Microbiol Biotechnol*, **19**(7): 647-650, 2009.
- 19) Yamasaki S, Asakura M, Tsukamoto T, Deb R, Faruque SM, Ramamurthy T: Cytolethal distending toxin (CDT): genetic diversity, structure and role in diarrheal disease. *Toxin Rev*, **25**(1): 61-88, 2006.
- 20) Shiramaru S, Asakura M, Inoue H, Nagita A, Matsuhisa A, Yamasaki S: A cytolethal distending toxin gene-based multiplex PCR assay for detection of *Campylobacter* spp. in stool specimens and comparison with culture method. *J Vet Med Sci*, **74**(7):857-862, 2012.
- 21) 四良丸 幸, 井上春奈, 西川明芳, 朝倉昌博, 松久明生, 山崎伸二: *Campylobacter* (*cdt* gene) PCR Detection and Typing Kit による市販鶏肉からのカンピロバクター属菌の検出, 日本食品微生物学会雑誌, 印刷中.

# ビタミン K オフ納豆風味大豆加工食品の開発

北村 豊 (KITAMURA Yutaka) \*1 平松 祐司 (HIRAMATSU Yuji) \*2 斉藤 有希 (SAITOH Yuki) \*3

\*1 筑波大学生命環境系, \*2 筑波大学医学医療系, \*3 フレグ食品工業株式会社

Key Words : 納豆・ワーファリン・納豆菌・ビタミン K・加熱殺菌・紫外線照射・糸引き・除去

## はじめに

糸引納豆は一般に蒸煮した丸大豆の表面に納豆菌を生育させ、独特の粘りと香りを醸成する日本独自の大豆発酵食品である<sup>1)</sup>。醤油、味噌の発酵には麹菌や乳酸菌類、酵母菌類など数々の微生物が関与しているが、納豆の発酵・熟成に直接関わる微生物は納豆菌のみである<sup>2)</sup>。納豆菌の代表的な発酵生産物に血栓溶解酵素であるナットウキナーゼがあり、これが含まれていることで納豆は血栓症の治療食としても期待されている<sup>1)</sup>。また納豆菌による大豆の発酵では、多量のビタミン K (主にビタミン K<sub>2</sub>: menaquinone-7; MK-7) が産出されることが知られている。発酵前的大豆 (国産の蒸煮品) 可食部 100g あたりビタミン K は 7 μg であるのに対して、発酵後の糸引納豆のビタミン K は 600 μg と大幅に増加する<sup>3)</sup>。ビタミン K は骨へのカルシウム沈着に効果があるとされる一方、血液凝固因子の生成にも関与しており、ビタミン K の投与が血液凝固抑制作用を急速に減弱することが動物実験および臨床実験で報告されている<sup>4)</sup>。したがって、心臓の人工弁置換術後などの患者が生涯の内服を求められるワーファリン (抗血液凝固剤) と拮抗して、ビタミン K 依存凝固因子の合成

を阻害する。そのためワーファリン内服患者はビタミン K 含有量の多い食品を避ける必要があり、ビタミン K を多量に含有する納豆の摂食は禁忌とされている<sup>5)</sup>。人工弁患者は全国に数十万人存在し、生活習慣病である冠動脈疾患は増加の一途にあることから、近い将来ワーファリン内服患者数は百万人規模に到達し得る。現在、医療現場には「ワーファリンには納豆禁食」という固定観念が定着しているが、ビタミン K を含有しない納豆を提供できれば、患者の食生活により高い自由度をもたらすことができ、院内食におけるメニュー設計の幅も広がるを考える。また、国産納豆の半分以上が本学の所在する茨城県で生産されていることも併せると、ビタミン K を含有しない納豆の開発は県内の産業振興に寄与する可能性がある。

そこで著者らは当初、「ビタミン K を含有しない納豆」の開発を構想した。ビタミン K を含有しない納豆を加工するには、発酵段階において納豆菌のビタミン K 産出を抑制する、あるいは納豆中に生成されたビタミン K を分解・除去する方法が考えられる。しかし、菌株を改良したビタミン K の生産方法<sup>6)</sup> やナットウキナーゼ及びビタミン K の製造<sup>7)</sup> に関す

る報告はみられたものの、ビタミンK産出を発酵温度や時間等の調整により制御させようとする知見、あるいは生成したビタミンKを分解・除去しようとする研究事例は見当たらなかった。さらに、納豆菌は腸管内においてもビタミンKを産出し続けるので、納豆中に生成されたビタミンKを分解・除去するだけでなく、納豆菌そのものも殺滅する必要がある。納豆を摂食する前に加熱殺菌を行う場合、芽胞を形成する納豆菌には120℃15分以上の加熱を要する<sup>8)</sup>とされている。しかし大豆に含まれるタンパク質は熱に対してかなり敏感であり、タンパク質の変性や不溶化現象による納豆食味の低下が懸念される。一方、ビタミンKは熱的には安定性が高いとされるが、紫外線照射により分解される<sup>9)</sup>ことが判明した。しかし紫外線は透過力が小さいため<sup>10)</sup>、固体食品である納豆への効用は期待できない。

以上のように一般的な納豆の製造において、その発酵段階でビタミンK不産出の制御を行うこと、あるいは製造後の納豆に加熱殺菌や紫外線照射を適用することは困難であると判断し、新たに「ビタミンKオフ納豆風味大豆食品」の加工を考案した。すなわち納豆自体の改質にこだわらず、納豆から納豆風味に富

む粘性物を抽出・液化することにより、殺菌のための加熱やビタミンK分解のための紫外線照射などの適用性を高めるとともに、それを粉末化して蒸煮大豆の調味料とするものである。具体的には図1に示すように、市販納豆の攪拌後に得られる曳糸性粘性物質を浄水に溶出し（以下、納豆粘性物水溶液）、大豆と分離する。これに熱処理・紫外線照射を行い、含有される納豆菌やビタミンKの殺滅・分解を行うとともに、その調味料としての利用性を向上させるため、乾燥・粉末化を行う。粉末化したものを別途蒸煮した非発酵の大豆に添付して得られたものを「ビタミンKオフ納豆風味大豆食品」とした。これによりビタミンKの含まれない納豆の風味を再現した加工食品が安心してワーファリン服用患者に提供できるようになる。

そこで本研究では、納豆粘性物水溶液中の納豆菌の加熱殺菌およびビタミンKの分解特性を解明するとともに、納豆粘性物水溶液の曳糸性および官能特性について実験的に明らかにして、ビタミンKオフ納豆風味大豆食品開発のための基礎資料を得ることを目的とした。

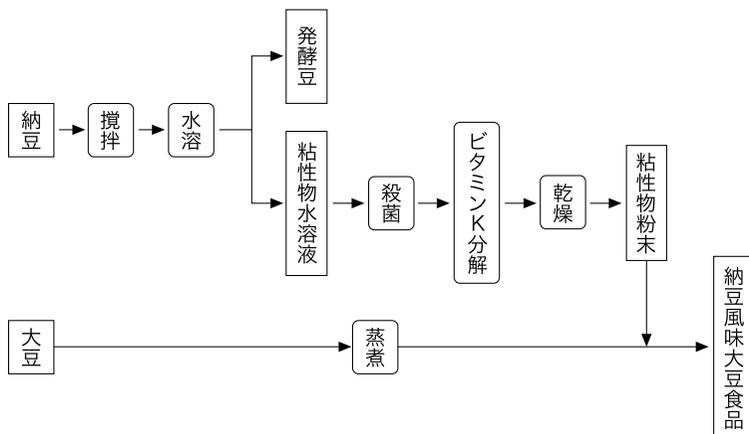


図1 納豆風味大豆加工食品の加工プロセス

## 1. 材料と方法

### 1-1. 材料

- 1) 納豆粘性物水溶液：市販の糸引納豆（タカノフーズ）をボウルに入れて箸で100回攪拌した。その後、納豆に蒸留水（使用する蒸留水の1/2量）を加えてゆるやかに室温で10分間攪拌し、ガーゼで豆と納豆粘性物水溶液とにこし分け、さらに豆だけを蒸留水（使用する蒸留水の1/4量）で洗って濾過する作業を二度繰り返し<sup>11)</sup>、納豆粘性物水溶液に加えた。また納豆と蒸留水の割合を変化させることにより、納豆粘性物水溶液の濃度を変化させた。
- 2) 納豆粘性物水溶液の乾燥粉末：納豆粘性物水溶液に賦形剤（デキストリン）を5%添加し、薄く角バットに拡げ（水深：2 ± 1 mm）、約60℃の乾燥機内で恒量になるまで（約20時間）乾燥させた。その後、乾燥残留物をすりこぎとすり鉢を用いて粉碎・粉末化した。
- 3) 蒸煮大豆：納豆用小粒大豆を大豆の約3倍量の水に室温23℃で20時間浸漬し、ザルに移して軽く水切りを行った。その後、親指と小指で軽くつまんでつぶれる位になるまで、オートクレーブにて約40分蒸煮した。

### 1-2. 加熱殺菌特性の測定

- 1) 加熱方法：作製した納豆粘性物水溶液100 mLを200 mL三角フラスコに入れ加熱殺菌した。100℃以上の高温殺菌にはオートクレーブを、100℃以下の低温殺菌には恒温水槽を用い、納豆粘性物水溶液の濃度（納豆/水（w/w））1/4および1/2について、65℃、85℃、105℃、121℃で加熱を行った。加熱中の菌数の経時変化を観察するとともに、熱殺菌効果をlog（生菌数/初発菌数）として明らかにした。

- 2) 菌数計測：標準培地で用いられる栄養成分や冷水可溶性ゲル化剤、およびコロニー数の計数を容易にする指示薬が含まれている生菌数測定用フィルム培地（3M）を使用した。各々の納豆粘性物水溶液の濃度（納豆の水希釈率）や加熱温度を変えて得られた納豆粘性物水溶液のサンプルについて10倍希釈法により数段階希釈したのち、その段階希釈した1 mLを培地（×3枚）に接種した。これらの操作は全てクリーンベンチ内で行った。その後、枯草菌の最適培養温度である37℃の恒温器中にて、栄養細胞だけで胞子形成がほとんど見られない18時間<sup>12)</sup>培養し、コロニー計数法により菌数測定を行った。

### 1-3. ビタミンK分解特性の測定

- 1) 紫外線照射：加熱殺菌を行った納豆粘性物水溶液10 mLを直径90 mmの滅菌シャーレ（φ90 mm）に液深2 mmとなるように入れ、紫外線照射を行った<sup>13)</sup>。紫外線照射にはクリーンベンチ内の殺菌線出力4.9 W、紫外線主波長253.7 nmの殺菌用紫外線ランプ（SANKYO DENKI, GL-15）を使用した。紫外線は透過力が小さいため、粘性物水溶液の入ったシャーレ（蓋なし）をスターラー上に置き、紫外線ランプの直下で攪拌しながら60 min照射した。紫外線ランプの照度をデジタルラジオメーター（SPECTROLINE, DRC-100X）を用いて測定したところ、シャーレ付近の平均紫外線照度は3.38 W/m<sup>2</sup>であった。
- 2) ビタミンK（メナキノン-7）の定量：納豆粘性物水溶液のビタミンK含有量は、（財）日本食品分析センターに測定を依頼した。ビタミンK含有量の分析は高速液体クロマトグラフ法により、メナキノン-4に対するピーク面積比を求め、メナキノン-7の分子量で補正が行われ、メナキノン-7量

とされた。

#### 1-4. 糸引特性の測定

粉末量を変えながら調製した納豆粘性物水溶液について、レオメーター (RHEOTECH, ADD-1002) を使用して引っ張り試験の要領でその糸引長を測定した。すなわち円柱状のプランジャーを水溶液の液面に触れさせた状態から上昇させ (実際は水溶液を載せたステージを降下)、プランジャーの先端と液面との間に展伸する粘性糸が切れた時点のプランジャーと液面の距離 (以後、糸引長) を測定した。なおステージ降下速度は 10, 60 cm/min とした。

#### 1-5. 官能特性の測定

蒸煮大豆 45 g に対し、市販糸引納豆に添付のタレ 1 袋 (7 g) および作製した粉末 14 g を添加し、粉末が完全に溶解するまでよく攪拌して得られたものをビタミン K オフ納豆風味大豆加工食品とした。官能評価は、外観、糸引き、香り (納豆らしさ)、風味 (全体)、豆の味、苦味、甘味、総合評価の 8 項目について、市販糸引納豆をコントロール (評価 4) として、7 段階評価 (1. 非常に悪い, 2. 悪い, 3. やや悪い,

4. 普通, 5. やや良い, 6. 良い, 7. 非常に良い) で行った<sup>14)</sup>。パネラーは当研究室の学生 17 名 (男: 8 名, 女: 9 名) に依頼した。

## 2. 結果と考察

### 2-1. 納豆菌の加熱殺菌特性

図 2 に加熱温度別に納豆菌数の経時変化を示した。加熱殺菌は他の条件が同じであれば温度の高い方が効果も大きくなるが、食品の成分を変質しかねない。よって加熱殺菌の温度が低い程、納豆の風味や曳糸性は保持されると予想される。実際に、牛乳の殺菌には病原性微生物を対象とし、63℃ 30 分などが用いられている<sup>15)</sup>。しかし、ここでは低温域 (65℃, 85℃) の加熱では納豆菌の減数を観察出来なかった。一方、高温域 (105℃, 120℃) の加熱では、105℃ 15 分以上もしくは 120℃ 1 分以上において  $\text{Log} = -7$  の納豆菌の殺菌が可能であった。なおオートクレーブは機械の設計上、加熱を開始すると一定温度 (95℃ 前後) に下がるまで蓋の開閉が行えないため、設定温度まで上昇した時点から加熱を開始する、

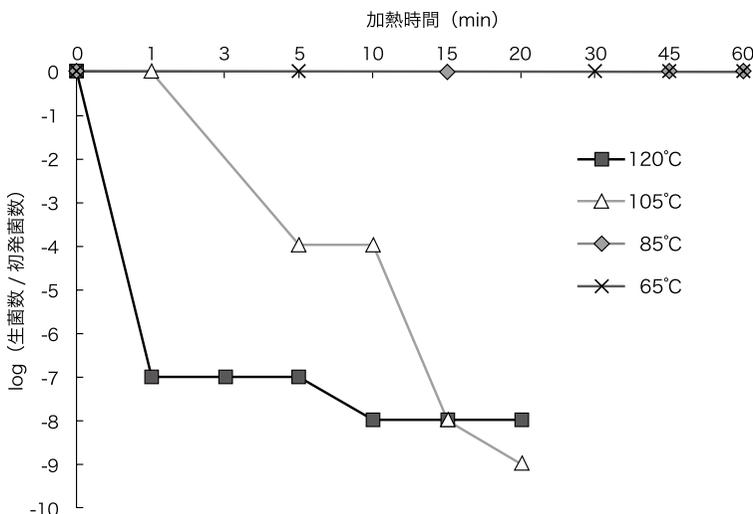


図 2 加熱処理における納豆菌数の経時変化

あるいは加熱時間が終了した時点で試料を取り出す、という操作は不可能である。従って、120℃ 1分加熱殺菌であっても、120℃まで上昇させる時間、また120℃から温度を下げる時間が含まれていないので、実際は105℃ 15分以上は加熱されていたことになる。よって納豆菌を殺菌するには、105℃ 15分以上の加熱が必要であることが分かった。

## 2-2. ビタミンKの分解特性

紫外線照射未処理の納豆粘性物水溶液のビタミンK含有量は224  $\mu\text{g}/100\text{g}$ であった。一方、紫外線照射（平均紫外照度3.38  $\text{W}/\text{cm}^2$ 、60分）を行った納豆粘性物水溶液からはビタミンKは検出されなかった。分析の定量下限は1  $\mu\text{g}/100\text{g}$ である。このことから、液深2mmの水溶液に対するビタミンKの分解は少なくとも3.38  $\text{W}/\text{m}^2$ 、60分の紫外線照射によって確実に達成されることが明らかとなった。これは納豆に含まれる粘性物を水溶液化することにより初めて可能になったと言える。また、紫外線照度がさほど強くはない紫外線ランプの使用によってビタミンK分解が達成されたことも、実用上重要と思われる。なお吉野ら

によれば、ここで使用したものより強い照度を有する紫外線ランプを使用すれば、納豆菌の殺菌も可能であるとされている<sup>13)</sup>。よって、納豆粘性物水溶液に対して紫外線照射処理のみを行うことによって納豆菌の殺菌とビタミンKの分解を同時に行える可能性がある。納豆粘性物水溶液に対する加熱殺菌を行わずに済めば、より納豆らしい風味や曳糸性を保持出来ると考えられる。

## 2-3. 納豆粘性物水溶液の糸引き特性

納豆のつくる粘質物はグルタミン酸のポリペプチドとフラクトースの重合体であり、粘質物の中の重量比は前者が90～81%である。糸を引く原因は、納豆菌が糸を引くプラスミドをもっているため、*Bacillus*属の枯草菌に、このプラスミドを組み込むと糸を引くようになり、プラスミドが欠落すると糸を引かなくなる。図3に105℃ 15分、120℃ 1分の2条件で殺菌を行った納豆粘性物水溶液粉末の還元水溶液濃度と糸引長の関係を示した。105℃ 15分加熱殺菌で得た粉末の方が、120℃ 1分加熱殺菌のものに比べ糸引長は大きく増加した。これは、より高温にて加熱した方が、納豆の

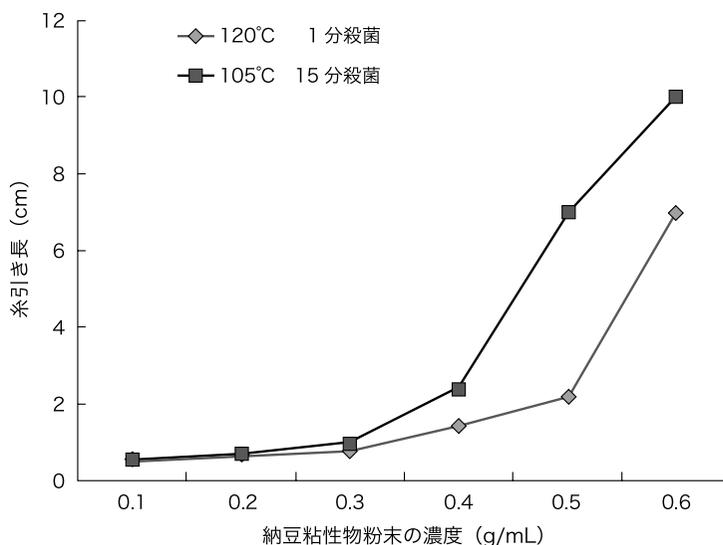


図3 加熱温度の異なる粘性液粉末の還元水溶液濃度と糸引長の関係

糸引の主成分であるグルタミン酸ポリペプチドが熱変性を生じたためと考えられる。よって、加熱殺菌はなるべく低温で行う方が、粘性物の曳糸性が保持されることが示唆された。

図4に、異なる水希釈率すなわち納豆/水(w/w)が1/2, 1/4, 1/8で得た納豆粘性物水溶液の粉末濃度と糸引長の関係を示した。同じ粉末濃度であっても、納豆の水希釈率が大きいもの程、曳糸性は弱かった。水希釈率を上げた方がより多くの糸引き成分を抽出できると考えたが、実際は抽出量が増加しなかったため、粉末中に占めるデキストリン(粘性水溶液の一律5wt%を添加)の見かけ濃度が高まり、糸引き長が短くなったと推察された。また糸引き長は乾燥前の水溶液よりも乾燥後の粉末還元水溶液の方が高くなる傾向にあった(データは示していない)。これは粉末化において添加したデキストリンによる粘性増加が影響していると考えられた。したがって、納豆から粘性物を水溶させるときは、粉末の特性にデキストリンが影響しないよう、できるだけ少量の水で行う必要があることが示された。あるいは納豆からの抽出法に代わる粘性物水溶液の生成法として、液体培地などを用いた納

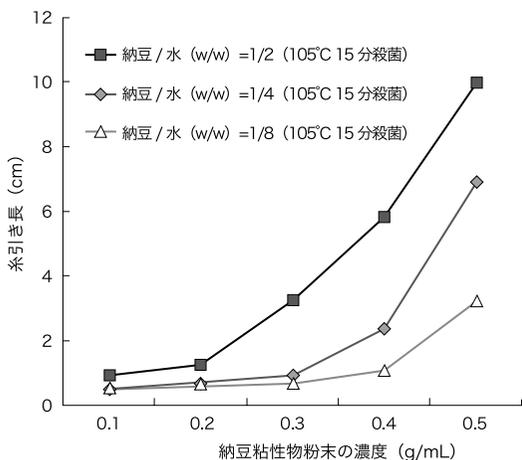


図4 希釈倍率の相違が還元水溶液中の粉末濃度と糸引長の関係に与える影響

豆菌の培養法の検討が求められる。

#### 2-4. 納豆風味大豆食品の官能特性

図5に作成した納豆風味大豆食品の官能評価の結果を示した。最も評価が低かった項目は糸引きであった。糸引長測定の結果では、粉末を水溶することによってある程度強い曳糸性が再現される結果が得られた。しかし実際に、蒸煮大豆に粉末を添加し作成した納豆風味大豆食品の曳糸性は、市販糸引納豆のものと比較すると非常に弱かった。すなわち市販糸引納豆は糸引きによって大豆の粒同士が絡み凝集し、より強固な糸引きを形成しているのに対し、納豆風味大豆食品ではそれらは認められなかった。レオメーターにて測定した糸引長測定の結果は、プランジャーと納豆粘性物水溶液との間に表面張力が生じ、曳糸性を強めた可能性があり、固体を含まない水溶液のみの曳糸性しか測定できていないので、その解析には測定法の見直しが必要である。次に評価の低かった項目は香り(納豆らしさ)であった。芽胞の殺菌を目的とした場合、過度の加熱により、香気成分の飛散・蒸発が起こり、また、成分同士の化学反応も進行するため、味や風味の低下が起こった<sup>16)</sup>と考えられる。香りや風味の低下を避けるためには、加熱に代わる殺菌法を適用することが有効と

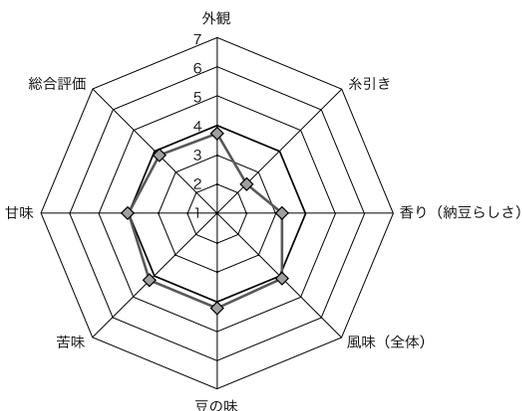


図5 納豆風味大豆食品の官能評価チャート

考えられる。

一方、パネラーのコメントとして、「市販糸引納豆より食べやすい」「豆の色が明るく、見た目が良い」など好評価も得られた。また、「豆の味が強い」とのコメントもあった。蒸煮大豆を発酵していないので、豆の味そのものが残り、市販糸引納豆より豆の味が強く感じられるためと思われた。以上を総合した納豆風味大豆食品の評価は3.75となった。官能評価結果には個人差があったが、平均値としては市販糸引納豆(段階4)より少々劣る結果となった。風味、香りの再現において課題が残るものの、納豆風味大豆食品開発の第一歩としては評価したい。

#### おわりに

全国に数十万人と言われるワーファリン内服患者を対象とする「ビタミンKを含有しない納豆」を加工するには、納豆菌のビタミンK産出を抑制する、もしくは腸内でもビタミンKを産出し続ける納豆菌を殺滅すると共に、生成されたビタミンKを分解・除去する必要がある。しかし、固体食品である納豆に対して、これらの操作は困難であることが予想された。そこで、改めて「ビタミンKを含まない、もしくは含有量の極めて低い納豆風味大豆食品」を加工することを本研究の目的とした。ここで提案する「ビタミンKオフ納豆風味大豆食品」の加工とは、納豆から納豆風味に富む粘性物を取り出し、液化することにより、殺菌のための加熱やビタミンK分解のための紫外

線照射などの適用性を高めると共に、それを粉末化し蒸煮大豆の調味料とするものである。具体的には、市販の納豆から得られる曳糸性粘性物質を浄水に溶出し、大豆と分離し、その水溶液に熱処理・紫外線照射を行い、含有される納豆菌やビタミンKの殺滅・分解を行った。その後、粘性物水溶液の加工性を向上させるため、その乾燥・粉末化を行った。実験の結果、粘性物水溶液中の納豆菌を殺菌するには、105℃以上の加熱が必要であることが分かった。また殺菌後の粘性物の乾燥粉末について、その水容量を増加させる程、糸引長は増加したが、105℃15分で得た粉末の方が、120℃1分のものとは比べ大きく増加した。また納豆の水希釈率が大きくなる程、曳糸性は弱くなった。納豆風味大豆食品の総合評価は3.75となった。官能評価結果には個人差があったが、平均値としては市販糸引納豆(段階4)より少々劣る結果となった。これは糸引きと香り(納豆らしさ)が弱かったことによる。今後は加熱によらない殺菌すなわち紫外線照射による納豆菌の殺菌とビタミンKの分解を同時に行い、納豆風味大豆加工食品の官能性を高めるとともに、納豆の豆部分を廃棄しないで済むよう、納豆粘性物の液体培養法を確立することなどが必要である。

[謝辞]

本研究の一部は、平成23-24年度科学研究費助成(挑戦的萌芽研究, 課題番号23650473)により行われたことを記して謝意を表す。

#### ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 参考文献 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・

- 1) 板倉辰六郎, 山田秀明, 別府輝彦, 左右田健次: 醗酵ハンドブック, (財)バイオインダストリー協会 醗酵と代謝研究会 編著, p.400, pp.609-610, 2001.
- 2) 山内文男, 大久保一良: 大豆の科学, 朝倉書店, pp.5-7, pp.117-121, 1992.
- 3) 文部科学省: 五訂増補日本食品標準成分表, 文部科学省 科学技術・学術審議会・資源調査分科会 報告書, 豆類, 2005.

- 4) 原久仁子, 秋山康博, 富宇賀孝, 小林正敏, 川島英敏: ラット血栓形成モデルでのワーファリンとビタミン K<sub>2</sub> の相互作用, 日薬理誌, **Vol.113**, 185-192, 1999.
- 5) エーザイ株式会社: ビタミン K 低生産性納豆菌, 特開 2006-67973, 2006.
- 6) 村澤久司, 荒木伸, 三井陳雄, 大谷豊, 佐藤俊郎: ビタミン K 高生産菌株及びそれを用いたビタミン K の生産方法, 特開 2000-83653, 2000.
- 7) 須見洋行: ナットウキナーゼ及びビタミン K<sub>2</sub> の製造方法, 特開 2008-72966, 2008.
- 8) 有藤和雄: 新 食品微生物学, 農業図書株式会社, pp.40-41, pp.50-55, 1980.
- 9) 五十嵐脩: ビタミンの生物学, 裳華房, p.43, 1998.
- 10) 伊藤均: 放射線殺菌, 新しい食品加工技術と装置, 産業調査会, p.139, 1993.
- 11) 池田ひろ: 納豆中の水可溶性ビタミン K<sub>2</sub> 複合体について, 日本家政学会誌, **Vol.43**, No.7, 643-648, 1992.
- 12) 藤井久雄: 納豆菌による粘質物の生成に関する研究(第6報) 粘性物生成の操作について(その1), 農化, **Vol.37**, No.10, pp.619-622, 1963.
- 13) 吉野潔, 坂井徳浩, 岩崎達行: 芽胞形成菌の紫外線感受性, IWASAKI 技報, No.22, 2010.
- 14) 高橋沙織, 勝股理恵, 吉澤久美, 八巻桃子, 大迫美由紀, 村上満利子, 毛利さやか, 佐藤みずき, 目黒寛子, 久保倉寛子, 広瀬佳苗, 田中直義, 渡辺杉夫, 木内幹: 豆豉から分離した *Bacillus subtilis* KFP 843 株をスターターとする軟らかい納豆, 日本食品科学工学会誌, **Vol.52**, No.10, 454-461, 2005.
- 15) 熊田薫: 食品衛生と微生物, 社団法人 日本惣菜協会, p47, 2008.
- 16) 宮本敬久: 食品における耐熱性芽胞形成菌の生育特性と制御, 日本食品微生物学会雑誌, **26**(2), 92-97, 2009.

# ブラックジンジャーについて

堀田 幸子 (HORITA Sachiko) \*1 小谷 明司 (KOTANI Akeshi) \*2

\*1 備南ハイフーズ株式会社, \*2 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

生姜は全世界的に香辛料あるいは薬草として賞用されているが、その類縁植物の約 80 種類も食材、香辛料、薬草としてインドと東南アジアで用いられている。ショウガ科の植物の原産地はインドからマレイにかけての熱帯地方と推定され、いくつかは栽培されている。

本稿では伝統的にタイで用いられているブラックジンジャーについての最近の知見を概観し、特にその機能性食品への応用可能性について考察したい。

クジンジャーの根のエタノール抽出液は体の痛み、消化器官の不調、痛風、膿瘍の治療等に用いられる<sup>1-3)</sup>。最近、ブラックジンジャーの機能性についてタイの研究者達が精力的に研究を



写真1 ブラックジンジャーのタイの農場での栽培風景

## 1. ブラックジンジャーとは

ブラックジンジャーはショウガ科に属し学名は *Kaempferia parviflora* Wall. Ex Baker (図1)で、タイでは栽培が行われクルチャイダムの名で知られている(写真1)。タイをはじめとする南アジアではその根を食材の他、民間薬として利用する。また、酒の原料としても用いられる。ブラッ

- 単子葉植物綱 (*Monocotyledonae*)
- ショウガ目 (*Zingiberales*)
- ショウガ科 (*Zingiberaceae*)
- カンファリア属 (*Kaempferia*)
- ブラックジンジャー (*Kaempferia parviflora* Wall. Ex Baker)
- ショウガ属 (*Zingiber*)
- 生姜 (*Zingiber officinale*)
- 茗荷 (*Zingiber mioga*)
- ウコン属 (*Curcuma*)
- ウコン (*Curcuma longa*)
- マンゴー生姜 (*Curcuma amada* Roxb.)

図1 ブラックジンジャーの植物分類学上の位置付け

進めている。

## 2. ブラックジンジャーの機能性

筆者達が検索した範囲ではブラックジンジャーについて抗菌活性、抗炎症活性、抗癌活性についての研究が実施されている。活性成分としてはフェノール化合物の配糖体とポリヒドロキシフラボン誘導体が注目されている<sup>1-4)</sup>。ブラックジンジャーの毒性についてはS. Chivapat 等によるラットを用いるエタノール抽出物の6ヶ月にわたる経口投与試験が行われ、健康被害につながる所見はなかったと報告している<sup>1)</sup>。

### 2-1. 抗菌活性

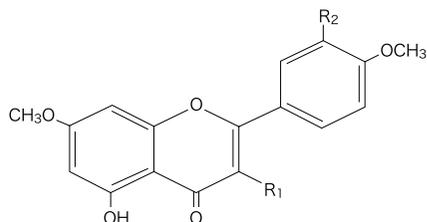
N. Chaichanawongsaroj 等はブラックジンジャーが胃潰瘍治療に用いられることに注目して、ブラックジンジャーの根をヘキサン、酢酸エチル、メタノールでそれぞれ抽出し、各抽出物のピロリ菌 [*Helicobacter pylori*] に対する抗菌活性を調べ、いずれの抽出物にも活性を認めたと、特に酢酸エチル抽出物にピロリ菌の HPe-2 細胞への侵入を防止する強い効果を認めた。酢酸エチル抽出物のピロリ菌の HPe-2 細胞への内部侵入阻止濃度は 32 µg/ml であった。この研究はヒトの胃潰瘍でピロリ菌が胃粘膜の上皮細胞内に侵入し、定着してヒトに有害な作用を発現するとの知見に基づいて行われたものである<sup>5)</sup>。胃潰瘍の発病の前提となるピロリ菌の胃粘膜への定住の阻止、あるいは胃潰瘍患者あるいはその予備軍の抗生物質による除菌処置後の再感染の予防を目的とする機能性食品への応用が期待される。

### 2-2. 抗炎症活性

S. Tewtrakul 等は、ブラックジンジャーの抽出物を分画し7個のメトキシフラボン化合物を単離した<sup>3)</sup>。これらの中で5-ヒドロキシ-3,7,3',4'-テトラメトキシフラボンに最も強いラットのマクロファージに対する一酸化窒素遊離抑制作用 [IC<sub>50</sub>=16.1 µg/ml] を認めた。次いで、5-ヒドロキシ-7,4'-ジメトキシフラボン [IC<sub>50</sub>=24.5 µg/ml]、5-ヒドロキシ-3,7,4'-トリメトキシフラボン [IC<sub>50</sub>=30.6 µg/ml] にも活性が認められた。5-ヒドロキシ-3,7,3',4'-テトラメトキシフラボンはさらにリポ多糖類により誘発されるプロスタグランジン E2 の遊離も抑制した [IC<sub>50</sub>=16.3 µg/ml] が、TNF-α の遊離は抑制しなかった (図2)。S. Tewtrakul 等はフラボン環のメトキシ残基と活性との関連も考察している。この研究は炎症反応のメディエーターとしての一酸化窒素、プロスタグランジン類や TNF-α の機能に注目し実施されたものである。

### 2-3. 抗癌活性

R. Banjerdpongchai 等はブラックジンジャーのエタノール抽出物のヒト白血病細胞 [HL-60] に対する作用を検討し、IC<sub>50</sub> は 24 時間で 25.5 mg/ml、48 時間で 18.5 mg/ml、72 時間で 14.5 mg/ml であることを観察した。活性発現にはアポトーシスが関与するとシキヤパーゼ3の活性化過程の関与を論じている<sup>4)</sup>。



	R1	R2
5-ヒドロキシ-3,7,3',4'-テトラメトキシフラボン	- OCH <sub>3</sub>	- OCH <sub>3</sub>
5-ヒドロキシ-7,4'-ジメトキシフラボン	- H	- H
5-ヒドロキシ-3,7,4'-トリメトキシフラボン	- OCH <sub>3</sub>	- H

図2 ラットのマクロファージからの一酸化窒素遊離抑制作用を示したメトキシフラボン誘導体の化学構造

これとは別に V. Leardkamolkarn 等はブラックジンジャーのエタノール抽出物と、それから単離した 5,7,4- トリメトキシフラボンのヒト胆管癌細胞 [HuCCA-1, RMCCA-1] に対する効果を検討した。エタノール抽出物は 48 時間処理で IC<sub>50</sub> はおよそ 50 ~ 60 μg/ml であった。5,7,4-トリメトキシフラボンは溶解性が極めて悪いために詳しい検定は行えなかったようだ。彼らもブラックジンジャーのエタノール抽出液の胆管癌細胞への抑制作用についてキャスパーゼ 3 の活性化によるアポトーシスの関与を論じている<sup>2)</sup>。

ヒトは発癌過程について種々の防御機能を本来有しており、癌化の前提となる遺伝子の異常発生に対してアポトーシス機序が自動的に発動され異常細胞が死滅するのもその一つに挙げられている。癌細胞ではアポトーシス発現機序が破壊もしくは凍結されており、癌細胞に対してアポトーシス機序発現の回復を促す物質は抗癌剤として機能するとの観点に基いて本研究は実施された。

#### おわりに

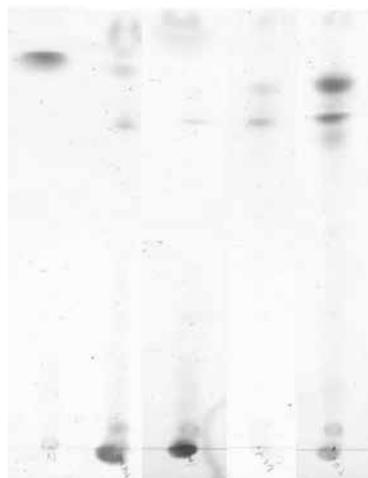
著者達はタイ産ブラックジンジャーの乾燥根を入手し商品化について検討したが (写真 2)、このものは極めて強い苦味を示し一般的な加工形態では味覚上の制約条件が厳しいと判断した。カプセル、錠剤等の剤形が好ましいように思われる。



写真 2 タイ産ブラックジンジャーの根のスライス乾燥品

ブラックジンジャーの根の抽出物と、それから単離された化合物の生物活性については研究が始まった段階であると見られる。筆者達はブラックジンジャー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たが、通常の生姜の生物活性成分とされる 6- ジンゲオールの含有は確認できなかった。また、同じくショウガ科に属するウコンとも異なるクロマトグラムを示した (写真 3)。

本稿で述べたように、ブラックジンジャーの抽出物あるいは含有成分には、抗ピロリ菌活性、抗炎症作用、癌細胞増殖阻害作用等の薬理作用が見いだされており、日本の高齢化社会の本格化を念頭に置いた機能性食品の開発への応用が期待できる可能性を秘めている。ブラックジン



① ② ③ ④ ⑤

- ① 6 - ジンゲオール
- ② 生姜
- ③ ブラックジンジャー
- ④ マンゴージンジャー
- ⑤ ターメリック

写真 3 ブラックジンジャーとショウガ科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 [シリカゲル / クロロホルム : メタノール : 酢酸 : 水 = 65 : 16 : 1 : 2])

ジャーは日本では薬物としての指定はなされて  
いない<sup>6)</sup>。

..... 参考文献 .....

- 1) S. Chivapat *et al.*: *Thai J. Vet. Med.* Vol.**40**(4): 377-383, 2010.
- 2) V. Leardkamolkarn *et al.*: *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, Vol.**10**: 695-698, 2009.
- 3) S. Tewtrakul *et al.*: *Journal of Ethnopharmacology* , Vol.**120**: 81-84, 2008.
- 4) R. Banjerdpongchai *et al.*: *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, Vol.**9**: 595-600, 2008.
- 5) N. Chaichanawongsaroj *et al.*: *African Journal of Biotechnology* Vol. **9**(30): 4796-4801, 2010.
- 6) (社) 日本健康食品サプリメントセンター所蔵の資料

<b>白石カルシウムの炭酸カルシウム</b>	
 <p>炭酸カルシウムとは？</p>	<p>古くから食品に使用されている安全性・吸収性に優れたカルシウム源です。 用途も栄養強化はもちろんのこと、練製品の弾力増強などの品質改良、粉体の流動性向上・固結防止といった加工助剤などその目的は多彩です。</p>
分散性・混合性に優れたものや、飲料用として沈澱を抑制したタイプ等、品揃えております。	
一般の栄養強化には、「ホワイトン」	
機能を求めるならば、「コロカルソ」	
飲料用には、スラリー状の「カルエッセン」	
詳細につきましては、弊社営業担当にお気軽にお尋ね下さい。	
 <b>白石カルシウム株式会社</b>	
食品部：東京都千代田区岩本町 1-1-8 TEL. 03-3863-8913 本 社：大 阪 市 北 区 同 心 2-10-5 TEL. 06-6358-1181	

# 東京都江戸川区産小松菜の色素成分の 生理機能と硝酸塩の安全性の検討

前多 隼人 (MAEDA Hayato) \*1    阿部 美菜子 (ABE Minako) \*1    伊藤 聖子 (ITO Seiko) \*2  
片方 陽太郎 (KATAGATA Yohtaro) \*1    加藤 陽治 (KATO Yoji) \*3

\*1 弘前大学農学生命科学部, \*2 静岡県立大学食品栄養科学部, \*3 弘前大学教育学部

Key Words : カロテノイド・メタボリックシンドローム・脂肪細胞・硝酸塩・小松菜

## はじめに

小松菜は東京都江戸川区が全国でもトップクラスを誇る野菜である。小松菜は江戸幕府将軍の徳川吉宗が「冬菜 (とうな)」と呼ばれている葉物を、江戸川区の小松川にちなみ命名したと伝えられている。東京都江戸川区では区内農家の団体である江戸川区農業経営者クラブと連携して、特産である小松菜のブランド化に向け、新しい品種の栽培や加工食品への応用を進めてきた。その取り組みの一つとして、小松菜に含まれる様々な成分の健康に対する機能を明らかにする共同研究を、平成 18 年度から弘前大学とおこなっている。これまでに、糖などの栄養成分や調理方法によるおいしさの評価、青森産のリングと小松菜を組み合わせた商品開発など様々な取り組みをおこなってきた。今回はこの取り組みの中で見いだされた、小松菜に含まれる色素成分であるカロテノイドによる、主に脂肪細胞をターゲットとした肥満による疾患の予防改善作用と、硝酸塩を含む生の野菜を摂取した際の安全性に関する検討について紹介する。

小松菜などの緑黄色野菜には様々な色素成分が含まれる。赤やオレンジ色の色素であるカロテノイドもその一つである。カロテノイドは $\beta$ -カロテンやルテイン、ピオラキサンチンな

どがある。カロテノイドの生理機能としては、抗酸化機能や抗がん作用が知られている<sup>1)</sup>。また、ある種のカロテノイドには肥満に関係する疾患の原因となる脂肪細胞に働きかけ、効果的に生活習慣病を予防、改善する機能があることが報告されている<sup>2)</sup>。小松菜にもさまざまなカロテノイドが含まれることから、このような作用を示す可能性が考えられた。そこで小松菜に含まれるカロテノイドの肥満に関与する疾患の予防、改善作用について、脂肪細胞を用いた評価をおこなった。

また、小松菜は通年で栽培されているが、茹でるなどの加熱調理をして食べることが多い野菜であり、調理の面倒さから夏場には需要が落ちてしまう。また、機能性成分であるカロテノイドは一般的に熱に弱いため、加熱調理で分解されやすい。このことから、カロテノイドを効率よく摂取するためにも生で摂取することは効果的であると考えられる。このような理由から、江戸川区では、生でも食べやすい品種の生産やサラダ、ジュースなどの調理方法の情報を提供している。特に区内農家が栽培している生食用小松菜の「サラダ小松菜」は甘味が高く、生食に適した商品である (図 1)。しかし、葉物野菜を食べる場合にしばしば、野菜に含まれる硝酸

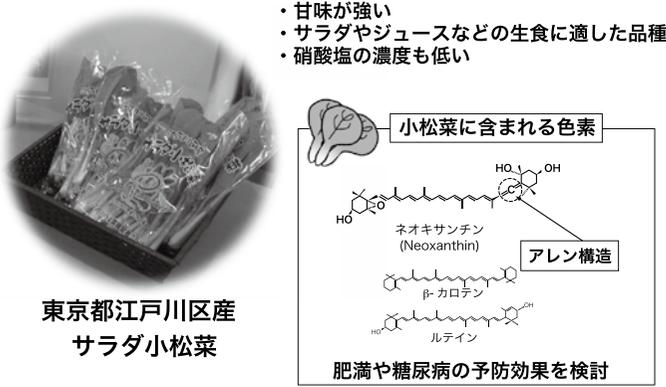


図1 東京都江戸川区産サラダ小松菜と小松菜に含まれるカロテノイド

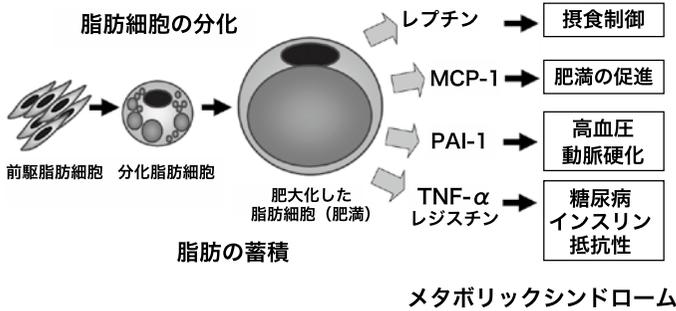


図2 脂肪細胞から分泌されるアディポサイトカインとメタボリックシンドローム

塩の身体への影響が指摘されることがある<sup>3,4)</sup>。野菜に含まれる硝酸塩は湯煎することで除くことができるため、小松菜は茹でて食べることが一般的に望ましいとされている。一方で野菜から摂取する場合の硝酸塩の健康に対する影響については議論が分かれている。厚生労働省 HP「野菜中の硝酸塩に関する情報」でも、むしろ野菜摂取による健康向上における利点について言及されている。そこで本研究では、硝酸塩を含む小松菜を投与した場合のマウスの成長に対する影響についても評価をおこなった。

### 1. 小松菜色素成分による脂肪細胞に対する機能

日本における肥満者の割合 (BMI ≥ 25) は、平成 20 年の厚生労働省の統計によると男性で

28.6%、女性で 20.6% とされている。肥満により引き起こされる疾患としては、近年増加の一途をたどる、糖尿病、高血圧、高脂血症などの生活習慣病が挙げられる。こうした疾患が合併した状態であるメタボリックシンドローム (内蔵型肥満症候群) は、心筋梗塞や脳梗塞のリスクが高まることが明らかとなっている。よってこれらの疾患を減少させる上で肥満を予防することは極めて重要な意味を持つ。肥満には生体内の脂肪細胞の肥大化や分化、増殖が密接に関わっている。間葉系幹細胞から発生した前駆脂肪細胞は、分化誘導処理により脂肪滴を蓄積し、分化脂肪細胞へと分化する (図 2)。分化した脂肪細胞に更に脂肪が蓄積するとアディポサイトカインと呼ばれる様々なホルモン様物質が脂肪細胞から分泌される<sup>5)</sup>。これらアディポサイトカインは糖尿病、高血圧、動脈硬化などの原因となることから、脂肪細胞への脂肪の過剰な蓄積を抑えることは重要である。

本研究ではマウス由来 3T3-L1 細胞に小松菜から抽出した色素成分を添加し、脂肪蓄積に与える効果について評価した。小松菜 (江戸川区産) を凍結乾燥し、アセトンによりカロテノイドを含む色素成分を抽出した後、ろ過処理し実験サンプルとして使用した。マウス由来前駆脂肪細胞 (3T3-L1 細胞) を脂肪細胞への分化誘導培地で 6 日間培養した。培養期間中に小松菜色素抽出物を 25, 50, 100 μg/mL 培地に添加し、無添加で培養したコントロールの細胞との脂質の蓄積度合の違いをオイルレッド O 法により比較した。その結果、小松菜色素抽出物を 25,

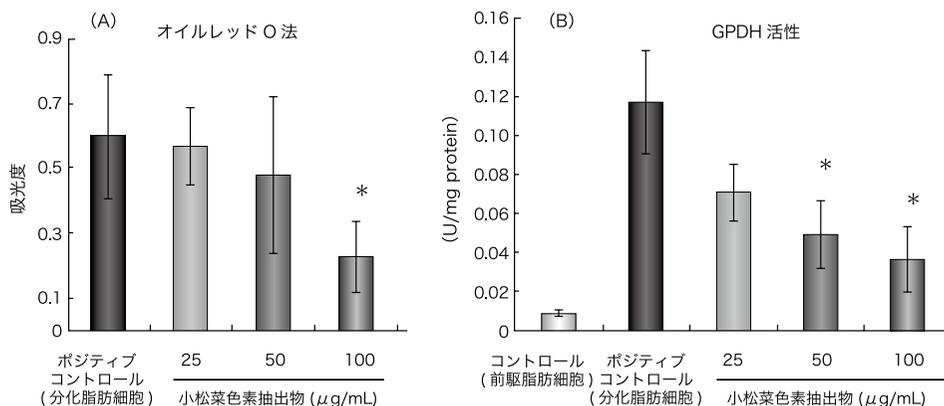
50, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  添加した細胞では、コントロールの細胞と比較し、細胞への脂質の蓄積が抑えられていることが明らかとなった (図3 (A))。また、別の脂肪細胞への分化の指標としてグリセロール-3-リン酸脱水素酵素 (GPDH) 活性の測定をおこなった (図3 (B))。GPDHは脂肪細胞内において脂質合成に関与する酵素であり、脂肪細胞の分化の過程において活性が高まる。前駆脂肪細胞と比較し、分化脂肪細胞 (ポジティブコントロール) では酵素活性が12倍まで上昇した。それに対して小松菜色素抽出物を添加した細胞ではGPDH活性の減少が認められ、脂肪細胞での脂質の合成能が低下していることが明らかとなった。これらのことから、小松菜色素成分には前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化を抑制する効果を示すことが示された。

次に小松菜色素成分が脂肪細胞への分化を抑制することから、その成分を同定するために、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより Fraction 1 ~ 5 に分画した。その後、それぞれの Fraction を 3T3-L1 前駆脂肪細胞へ 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度で添加し、脂肪細胞への分化誘導をおこない、分化の度合いをGPDH活性にて評価した。その結果、Fraction 5 に強い分化抑制効果の傾

向が示された。この Fraction 5 に含まれる色素について、更に詳細に検討した結果、ネオキサンチンが主に含まれることが明らかとなった (図1)。そこでこのネオキサンチンについての脂肪細胞に対する効果について検討した。

## 2. ネオキサンチンによる脂肪細胞への分化抑制効果とアディポサイトカインの調節作用

ネオキサンチンは $\beta$ -カロテン、ルテイン、ピオラキサンチンと共に高等植物の葉緑体中に含まれる主要なカロテノイドである。特徴として3つの炭素原子の間に2重結合が連続したアレン構造を含む (図1)。近年、このようなアレン構造を持つカロテノイドは他のカロテノイドには見られない、特徴的な機能を示すことが明らかになってきている。例えば、ワカメなどの海藻に含まれるフコキサンチンは肥満モデルマウスの体重と内臓脂肪の蓄積を抑制すること、更には脂肪組織でのアディポサイトカイン遺伝子の発現を調節しインスリン抵抗性を改善することで血糖値改善効果が期待できることが明らかとなっている<sup>6,7)</sup>。また、フコキサンチンは脂肪細胞での熱産生に関係する脱共役タンパク質 (UCP1) の発現を亢進し、エネルギー



\*:  $p < 0.05$  vs ポジティブコントロール

図3 小松菜色素抽出物による脂肪細胞の分化抑制効果

消費を亢進する。このような作用を示す食品成分は報告されておらず、極めて特徴的な作用である。小松菜に含まれるネオキサントンはフコキサントンと同様にアレン構造を有するカロテノイドである。アレン構造を有するカロテノイドは数少なく、ネオキサントンは最も豊富に野菜類から摂取できるアレンカロテノイドであると考えられる。このような特異な構造を有するネオキサントンはフコキサントンのように、他のカロテノイドには見られない効果的な機能を示す可能性が高い。そこで小松菜色素成分の中で特に脂肪細胞への分化抑制効果の強かった Fraction 5 からネオキサントンを精製し、脂肪細胞に対する機能について評価した。

小松菜色素成分と同様に、3T3-L1 前駆脂肪細胞に小松菜から抽出したネオキサントンを 1, 5, 10  $\mu\text{M}$  の濃度で添加し、分化誘導処理をおこなった。その後、脂肪細胞への分化の度合いを GPDH 活性により評価した。その結果ネオキサントンを添加した細胞で、脂肪細胞への分化が抑制する傾向を示した (図 4 (A))。このことから、小松菜に含まれるネオキサントンは脂肪細胞に働きかけ、肥満を予防、改善する作用を有することが示唆された。

次に、既に肥満になった状態の脂肪細胞に対しては効果を示すのかどうかについて明らかにするため以下の実験をおこなった。マウス由来 3T3-L1 前駆脂肪細胞を 8 日間、インスリンを含む分化誘導培地で培養し、充分脂質を蓄積し、肥大化した分化脂肪細胞に培養した。次にその分化脂肪細胞にネオキサントンを添加し、インスリン抵抗性の惹起に関するアディポサイトカインの発現量に与える効果について検討した。肥満状態の肥大化した脂肪細胞からは、レジスチンなどのインスリン抵抗性を高める物質が分泌される。また、脂肪細胞へ血液中のマクロファージの遊走を促す MCP-1 も分泌され、炎症状態を惹起する。このようなアディポサイトカイン

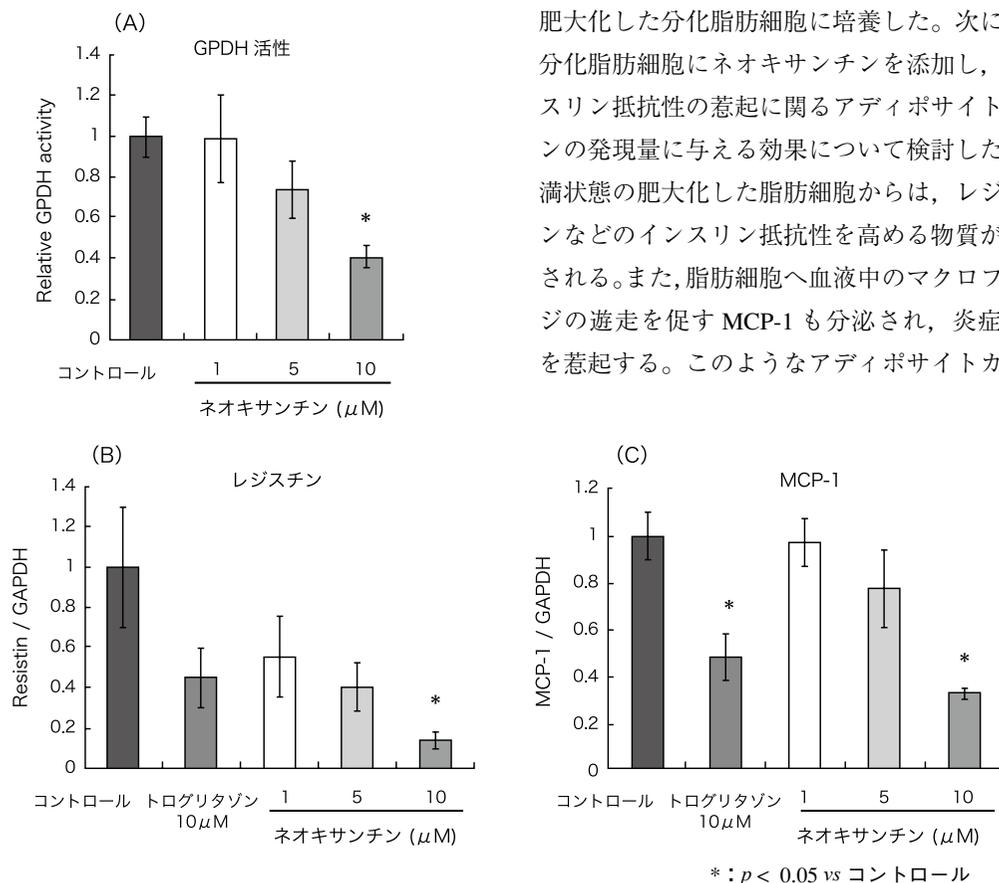


図 4 (A) ネオキサントンの脂肪細胞の分化抑制効果 (B) レジスチンの mRNA 発現量の変化 (C) MCP-1 の mRNA 発現量の変化

により、体内の筋肉や肝臓などの糖代謝に関わる組織のインスリン抵抗性が進むと、体内の糖代謝が滞り糖尿病となる（図2）。そのため、脂肪細胞へ働きかけこのようなインスリン抵抗性を高めるアディポサイトカインの分泌を制御することは糖尿病を予防する上で効果的な方法である。

### 3. 小松菜を大量に摂取した場合のマウスの成長に対する影響の検討

分化脂肪細胞にネオキサンチンを添加した場合、肝臓や筋肉組織でのインスリン抵抗性の惹起に関するレジスチンの mRNA 発現量が、添加濃度に依存して減少することが明らかとなった（図4（B））。また、脂肪細胞にマクロファージを誘引させ、脂肪細胞での炎症状態を引き起こす MCP-1 の mRNA 発現量も減少していた（図4（C））。これらは比較対照として用いた糖尿病の治療薬であるトログリタゾン 10  $\mu$ M 添加したものと比較し、強い傾向を示した。このことから、小松菜に含まれるネオキサンチンは肥満により既に肥大化した脂肪細胞にも働きかけ、インスリン抵抗性の惹起に関するアディポサイトカインの発現を抑制することが明らかとなった。

硝酸塩は土壌を含めた自然界に広く分布し、植物の成長には欠かせない重要な窒素源である。我々は生活の中で水や食品から日常的に摂取をしている。一方で大量に摂取した場合、硝

酸塩から生成するとされる亜硝酸塩による健康に与える影響が、一部で懸念されている<sup>3,4)</sup>。しかし、野菜に含まれる硝酸塩を摂取した場合の影響については報告例が少なく、不明な点も多い。そこで本実験ではマウスに対して小松菜を含む飼料を約 12 週間投与し、安全性評価試験を実施した。

小松菜粉末は生の小松菜（江戸川区産）を細かく切断し凍結乾燥機により水分を除去したものをミキサーにて粉末化したものを用いた。茹で小松菜粉末は約 90℃にて小松菜を湯煎した後、硬く絞り水分を除去したものを凍結乾燥し、粉末化したものを用いた。表 1, 2 に今回の実験で使用した粉末の一般組成及びコンパクトイオンメーター（HORIBA）にて測定した硝酸塩量を示した。茹でることにより硝酸塩が約 30% にまで有意に減少した。

次にこれらの小松菜の粉末を含む実験飼料を作成し、3 週齢のオスの正常マウス（BALB/c マウス）に対して 1 週間の予備飼育の後、12 週間の実験飼育をおこなった。実験飼料は AIN-93G の組成を参考に作製し、表 1 の一般成分分析結果に従い、タンパク質、脂質、炭水化物、食物繊維の成分組成を各群揃えた。実験群はコントロール群、飼料の 10%、15% を小松菜凍結乾燥粉末に置換した群（小松菜生 10% 群、小松菜生 15% 群）、及び飼料の 10% を茹でた小松菜凍結粉末にしたものに置換した群（小松菜茹で 10% 群）の計 4 群で、各群 6 匹で実施した。なお、小松菜茹で 10% 群は、硝酸塩を湯煎することで減少させた小松菜生 10% 群の対照群として設けた。図 5 には実験飼料中の硝酸塩含量を測定した結果を示した。小松菜生 10%、

表 1 小松菜粉末の一般成分 (%)

	小松菜生 乾燥粉末	小松菜茹で 乾燥粉末
水分	2.7	3.4
タンパク質	30.9	31.6
脂質	4.2	7.6
糖質	9	3.4
灰分	24.7	7.4
食物繊維	28.5	46.6

表 2 小松菜粉末 1g 中の硝酸塩 (mg)

	小松菜生乾燥粉末	小松菜茹で乾燥粉末
水分	103 $\pm$ 4.7	31 $\pm$ 5.8*

\* :  $p < 0.05$  vs. 小松菜生乾燥粉末

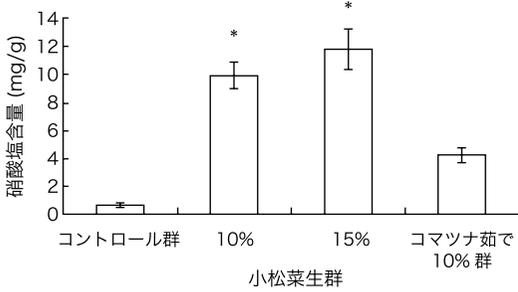


図5 飼料中の硝酸塩含量 (mg/g)

15% 群は硝酸塩含量が高く、コントロール群と比較し、10 倍以上高い値であった。

実験飼育中は体重、摂餌量、飲水量の測定、並びに外見や行動の異常についての観察をおこなった。12 週間飼育後に解剖をおこない、各種臓器や血漿成分への影響について調べ、小松菜の長期摂取による安全性について評価した。

マウス一匹あたり 1 日平均して約 3.6 g の摂餌量であったことから、マウス一匹あたり 1 日小松菜生 10% 群で約 36mg、小松菜生 15% 群で約 43 mg の硝酸塩を摂取した結果となった。

図 6 に実験飼育中の各群の体重変化を示した。コントロール群と比較し小松菜生 10% 群、小松菜生 15% 群いずれも体重に有意な差は認められなかった。このことから小松菜投与によりマウスの成長に悪影響を与えないことが明らかとなった。小松菜茹で 10% 群はコントロー

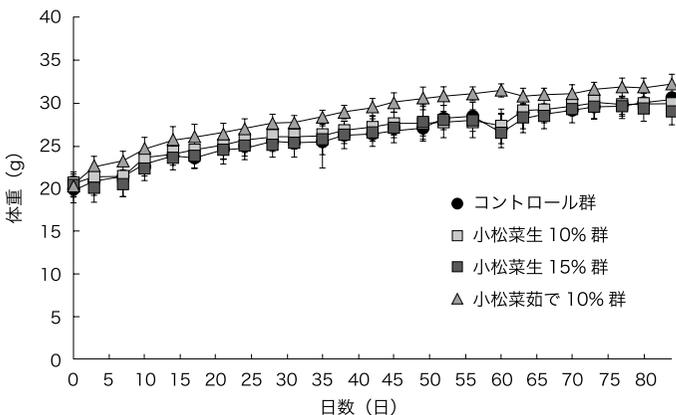


図 6 小松菜凍結乾燥粉末を含む飼料を投与したマウスの体重変化

ル群と比較し有意に体重が高かったが、これは実験飼育初期に小松菜茹で 10% 群の摂餌量が多かったことが原因として考えられる。実験飼育中の飲水量や、行動異常や痙攣、呼吸や姿勢、尿や排泄物の異常は各群に認められなかった。

表 3 に血漿成分結果について示した。肝臓や腎臓の異常時に変化を見せるアルブミン、GPT、ALP に各群有意な差は認められなかった。また血漿脂質成分 (中性脂肪、遊離脂肪酸、HDL コレステロール、LDL コレステロール)、及び血糖値に有意差は認められなかった。小松菜生 15% 群において総コレステロールの上昇が認められたが、これは HDL コレステロールの上昇に起因すると考えられる。HDL コレステロールは善玉コレステロールと呼ばれ、血液中の余分なコレステロールを排除し、血管性疾患を防ぐ働きのあるコレステロールである。以上のように血漿成分はコントロール群と比較して、試料投与群に変化は認められなかった。このことから硝酸塩を含む小松菜飼料が血液成分に悪影響を与えないことが示された。

体重 100 g あたりに換算した各臓器の重量について表 4 に示した。各臓器重量には有意な差が認められなかった。また、白色脂肪組織に小松菜由来する色素 (おそらくカロテノイドの代謝物) の蓄積が見られたが、その他の各臓器

に肥大化や出血などの肉眼的な異常は確認されなかった。また、組織学的には変化が起こっている可能性も考えられることから、薬物による異常が認められやすい肝臓の組織切片を作製し、観察をおこなったが、細胞の形態には大きな異常は確認されず、血漿成分や臓器重量の結果からも判断して肝臓への悪影響は生じていないと考えられた。

ヒトに対する硝酸塩の ADI (許

表3 小松菜摂取による血漿成分への影響

	コントロール群	小松菜生 10% 群	小松菜生 15% 群	小松菜茹で 10% 群
総タンパク質 (g/dL)	5.7 ± 0.3	5.7 ± 0.3	5.4 ± 0.2	5.5 ± 0.2
アルブミン (g/dL)	2.9 ± 0.2	3.0 ± 0.2	3.2 ± 0.1	2.8 ± 0.5
GOT (IU/L)	118 ± 28	126 ± 41	114 ± 27	103 ± 34
GPT (IU/L)	65 ± 34	44 ± 9	40 ± 11	63 ± 50
γ-GTP (IU/L)	3 ± 0.5	2 ± 0.4	2 ± 0.0	2 ± 0.5
ALP (IU/L)	266 ± 24	265 ± 16	357 ± 39	249 ± 23
直接ビリルビン (mg/dL)	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0
中性脂肪 (mg/dL)	54 ± 9	51 ± 8	68 ± 36	55 ± 10
遊離脂肪酸 (μ Eq/L)	2617 ± 415	2705 ± 421	2546 ± 479	2700 ± 343
総コレステロール (mg/dL)	127 ± 4	140 ± 6	157 ± 10*	115 ± 7
HDL コレステロール (mg/dL)	109 ± 5	117 ± 5	131 ± 7	91 ± 19
LDL コレステロール (mg/dL)	3 ± 1	3 ± 1	5 ± 1	3 ± 2
血糖値 (mg/dL)	102 ± 12	77 ± 29	84 ± 18	77 ± 30

\*:  $p < 0.05$  vs. コントロール群

表4 小松菜摂取による臓器重量への影響 (g/体重 100g あたり)

	コントロール群	コマツナ 10% 群	コマツナ 15% 群	コマツナ茹で 10% 群
白色脂肪組織 (精巣周囲)	1.15 ± 0.23	0.95 ± 0.16	1.27 ± 0.35	1.22 ± 0.14
白色脂肪組織 (腎周囲・後腹膜)	0.49 ± 0.15	0.40 ± 0.09	0.37 ± 0.08	0.37 ± 0.09
褐色脂肪組織	0.38 ± 0.07	0.34 ± 0.08	0.36 ± 0.10	0.34 ± 0.06
肝臓	4.45 ± 0.22	4.30 ± 0.14	4.37 ± 0.12	4.40 ± 0.27
脾臓	0.34 ± 0.08	0.39 ± 0.06	0.37 ± 0.03	0.33 ± 0.03
大腸	0.57 ± 0.08	0.61 ± 0.18	0.67 ± 0.25	0.60 ± 0.14
小腸	3.07 ± 0.20	3.44 ± 0.47	3.29 ± 0.53	3.04 ± 0.13
腎臓	1.53 ± 0.13	1.56 ± 0.12	1.42 ± 0.07	1.51 ± 0.08

容日摂食量)は、現在 JEFCA (FAO/WHO 合同食品添加物専門家委員会) 及び EU 食品科学委員会において、1日体重 1 kg 当たり 3.7 mg  $\text{NO}_3^-$  となっている。このデータはマウスに対して硝酸塩を 1% 以上含んだ飼料を与えた結果、いくぶん成長の低下が見られたという結果から導かれており、現在その妥当性についての疑問が言われている<sup>3)</sup>。また、硝酸塩から変化した亜硝酸による発がん性が危惧されているが、Maekawa らはマウスに対して硝酸ナトリウムを 2.5, 5% 添加した飼料を 2 年間与えた結果、発がん性に影響が認められなかったことを報告している<sup>8)</sup>。本実験では小松菜生 10% 群の飼料には約 1%, 小松菜生 15% 群には約 1.2% の硝酸塩が含まれていた。このことから考えても食品中の 10%, 15% という高い割合で小松菜を摂取

したとしても、硝酸塩による健康に与える影響は少ないと考えられた。また、近年は野菜に含まれる食物繊維やカロテノイドなどの健康の維持に役立つ効果が多く報告されている。これを受け JEFCA は 1995 年に「野菜からの硝酸塩の摂取量を ADI と比較することや、野菜から摂取する硝酸塩の上限を ADI から直接計算するのは不適切である」と報告している。本実験でマウスの一日当たりの摂餌量から、マウス体重 1 kg 当たりの硝酸塩の摂取量を計算すると、小松菜生 10% 群、小松菜生 15% 群でそれぞれ約 1200 mg, 1440 mg の硝酸塩を 1 日に摂取した結果となった。これは ADI と比較すると大量の摂取量であるが、マウスの成長や摂食量、行動、組織には異常は認められなかった。これらの結果から、野菜からの硝酸塩の大量摂取では、

危篤な中毒が生じる可能性は少ないことが示唆された。

#### おわりに

小松菜を生で食することで、小松菜に含まれるネオキサンチンを初めとした比較的熱に弱いカロテノイドも多く摂取することができる。近年、メタボリックシンドロームが問題とはなっているが、日本人は極度の肥満である割合が欧米人と比べて少ない。その一方で、日本人は他の人種よりも軽度の肥満でも体内のインスリン抵抗性を発症し、糖尿病になりやすいことが明らかとなっている。糖尿病の予防や治療には肥満による脂肪の増加を抑えるだけではなく、脂肪細胞の質的な改善が重要である。本研究により小松菜などに含まれるカロテノイドを摂取することで、脂肪細胞の質的な変化を与え、糖尿病の予防、改善に効果を示すことが強く示唆された。

食料自給率低下が危惧されている中、地域

で生産された旬の食材を地域で消費する地産地消の重要性が言われている。江戸川区と江戸川区農業経営者クラブ、弘前大学の小松菜を中心とした研究と消費の拡大を目指した取り組みは、農林水産省が取り組む「FOOD ACTION NIPPON」において、フード・アクション・ニッポンアワード2010入賞に選出された。野菜、果実類に含まれる、カロテノイド、ポリフェノールをはじめとした微量な成分による、がんや肥満、アレルギーの予防などの健康に対する機能が、次々と明らかになってきている。このような成分を上手に組み合わせ、薬とは違った意味で健康の向上に役立つ「食」を提供してゆくことが大事である。

#### [謝辞]

本研究は、江戸川区（東京都）、江戸川区農業経営者クラブ、江戸川花卉園芸組合、弘前大学との共同研究「えどがわ産農産物のブランド化に関する研究」で行われたものです。

#### ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 参考文献 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・

- 1) 宮下和夫：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.
- 2) Maeda H., Hosokawa M., Sashima T. *et al* : Fucoxanthin from edible seaweed, *Undaria pinnatifida*, shows antiobesity effect through UCP1 expression in white adipose tissues., *Biochem Biophys Res Commun.*, **332** : 392-397, 2005.
- 3) J. リロンデル, J-L. リロンデル：硝酸塩は本当に危険か，農文協，2006.
- 4) 田中章男：食品中の硝酸レベルと健康問題，公開シンポジウム 土と水と食品の中の硝酸 (NO<sub>3</sub>) をめぐる諸問題 講演資料，44-52, 1998.
- 5) 河田照雄，斉藤昌之，小川正：肥満と脂肪エネルギー代謝—メタボリックシンドロームへの戦略—，建帛社，2008.
- 6) 前多隼人，東小太郎：機能的食品素材としての雑海藻の高度利用，*New Food Industry*. **52**(4):33-40, 2010.
- 7) Hosokawa H., Miyashita T., Nishikawa S. *et al* : Fucoxanthin regulates adipocytokine mRNA expression in white adipose tissue of diabetic/obese KK-Ay mice., *Arch Biochem Biophys.*, **504**:1 17-25, 2010.
- 8) Maekawa A., Ogiu T., Onodera H. *et al* : Carcinogenicity studies of sodium nitrite and sodium nitrate in F-344 rats., *Food Chem Toxicol.*, **20**:1 25-33, 1982.

# 小麦粉の一部に加工澱粉を添加した 食パンの調理科学的特性

菊地 和美 (KIKUCHI Kazumi) \* 吉田 訓子 (YOSHIDA Kuniko) \* 高橋 セツ子 (TAKAHASHI Setsuko) \* 知地 英征 (CHIJI Hideyuki) \*

\* 藤女子大学人間生活学部 食物栄養学科

Key Words : 加工澱粉・馬鈴しょ澱粉・製パン・加工技術・冷凍・水分

## はじめに

北海道における馬鈴しょ澱粉の製造は安政年間(1850年代)に始まったともいわれ、販売用としては明治15年(1880年)渡島支庁八雲村において水車を動力として製造されてきた<sup>1)</sup>。北海道の馬鈴しょ生産量(2010年175万3,000t・全国の78.4%)のうち、約50%(2007年55.3%, 2008年54.2%, 2009年51.3%, 2010年49.1%)が澱粉の原料として用いられている<sup>2-4)</sup>。

澱粉に化学的・物理的处理を施した加工澱粉がさまざまな形で利用されるようになり、親水性の増加、糊化開始温度の低下<sup>1,5,6)</sup>や食粘度安定性および耐熱性の向上<sup>7)</sup>などの特徴が挙げられている。ベーカリー製品への加工澱粉の役割としては、テクスチャーの改良や機能性付与(保存性の向上, 電子レンジ耐性, 水分や糖度のコントロール)など<sup>8)</sup>が挙げられている。そこで、今回は加工澱粉添加パンの調理科学的特性と嗜好性について報告する。

## 1. 試料及び調製方法

### 1-1. 試料

実験に使用した加工澱粉は松谷化学工業(株)

製馬鈴しょ澱粉由来のリン酸架橋澱粉(ねりこみ No9), ヒドロキシプロピル化リン酸架橋澱粉(ファリネックス AG600)を用いた。パン試料は加工澱粉を添加した2種類(リン酸架橋澱粉とヒドロキシプロピル化リン酸架橋澱粉)と馬鈴しょ澱粉を添加した(コントロール)の3種類とした。

### 1-2. 配合割合

配合割合は、小麦粉70%, 澱粉30%(以上で100%)とし、牛乳15%, マーガリン7%, グラニュー糖5%, 塩2%, 生イースト2%, 水60%を加えた。

### 1-3. パンの調製

パンの調製は、シロクマ・北海食品(北海道札幌市)に依頼した。

## 2. 実験方法

### 2-1. パンの水分量

水分量は、焼成後、1時間室温(25℃)に放冷した試料のクラム(パン内部の白色部分)の中央部を厚さ1cmに切り、電子式水分計(島津製作所製, MOC-120H)を用いて、乾燥減量法(105℃)により測定した。

### 2-2. パンの体積および比容積

焼成後、1時間室温(25℃)に放冷した試料を用い、菜種置換法により体積を測定し、比容積は、 $\text{比容積} = \text{体積 (ml)} \div \text{重量 (g)}$ により算出した。

### 2-3. パンの色調と色差

クラム(内相)はパンを縦半分に切り、底部より5cm、左右側面から2cmの部分を除いて調整した。側面などのクラスト(外皮側面部)は3cm直方体に切断した試料を用いた。パンの色調と色差は分光色彩計(日本電色工業(株)製、SD-5000)により、CIE系に属するL\*値、a\*値、b\*値を測定し、これらの数値から彩度(C\*値)および色差を算出<sup>9)</sup>した。

### 2-4. パンの物性測定

焼成後、2時間室温(25℃)に放冷した一定体積パン(2cm直方体)のかたさ応力、凝集性、ガム性応力をクリープメーター(レオナーRE.3305山電(株))で測定した。

### 2-5. 官能検査

焼成後、1時間室温(25℃)に放冷した試料について、藤女子大学教職員(12名)をパネラーとし、3種類の食パンの官能検査を冷凍前と解凍後に実施した。官能検査は7項目(色相、きめの細かさ、香り、硬さ、もちもち感、しっとり感、味)について、その特性および総合評価

をそれぞれ5段階評点法で行った。

## 3. 結果および考察

### 3-1. パンの水分量

パンの解凍後の水分量は、ヒドロキシプロピル化リン酸架橋澱粉パン+4.4%、リン酸架橋澱粉パン+7.8%、未加工澱粉パン+16.8%であり、加工澱粉の変化率が少なかった。

### 3-2. パンの比容積

パンの比容積は、ヒドロキシプロピル化リン酸架橋澱粉パンが最も低くなった。パンの断面は(図3)、未加工澱粉パンとリン酸架橋澱粉パンが同様に山型となって観察されたが、ヒドロキシプロピル化リン酸架橋澱粉パンは、右側にくびれを生じていた。このくびれが生じたことにより、ヒドロキシプロピル化リン酸架橋澱粉

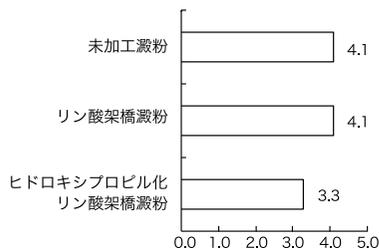


図2 パンの比容積

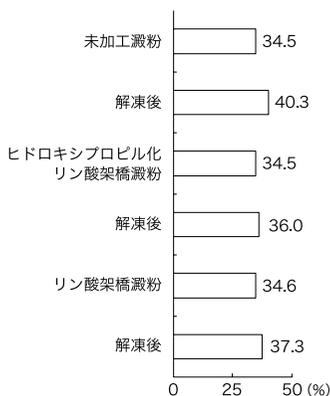


図1 パンの水分量



図3 パンの断面

右から、未加工澱粉、中央：リン酸架橋澱粉、左：ヒドロキシプロピル化リン酸架橋澱粉パン

表1 パン(クラム)の色調と色差

	L* 値	a* 値	b* 値	C* 値	ΔE	
未加工澱粉	58.0	-2.9	14.0	14.3	0.0	
ヒドロキシプロピル化リン酸架橋澱粉パン	60.9	-3.7	13.2	13.7	3.1	appreciable
リン酸架橋澱粉	65.6	-2.9	14.9	15.2	4.8	appreciable

ΔE 0-0.5 : trace, 0.5-1.5 : slight, 1.5-3.0 : noticeable, 3.6-6.0 : appreciable, 6.0-12.0 : much  
色調 (L\* 値 : 明度, C\* 値 : 彩度), 色差 (ΔE)

表2 パン(クラスト)の色調と色差

	L* 値	a* 値	b* 値	C* 値	ΔE	
未加工澱粉	53.2	12.0	36.5	38.4	0.0	
ヒドロキシプロピル化リン酸架橋澱粉パン	45.7	11.8	32.7	34.8	8.4	appreciable
リン酸架橋澱粉	50.1	12.0	45.1	46.7	9.6	appreciable

ΔE 0-0.5 : trace, 0.5-1.5 : slight, 1.5-3.0 : noticeable, 3.6-6.0 : appreciable, 6.0-12.0 : much  
色調 (L\* 値 : 明度, C\* 値 : 彩度), 色差 (ΔE)

粉パンの比容積が小さくなったと推察する。

### 3-3. パンの色調

パン(クラム:内相)の明度(L\*値:lightness)は,同じ条件で照明された白に見える面で標準化された明るさを示しているが,明度は,リン酸架橋澱粉パン,ヒドロキシプロピル化リン酸架橋澱粉パン,未加工澱粉パンの順に低くなった。パン(クラム)の色差(ΔE)は,未加工澱粉パンに比べて加工澱粉パンは「めだつほどに」(appreciable)色差があった。

パン(クラスト:外皮側面部)の明度は未加工澱粉パン,リン酸架橋澱粉パン,ヒドロキシプロピル化リン酸架橋澱粉パンの順に低くなった。鮮やかさを示す彩度(C\*値)はリン酸架橋澱粉パンが高く,未加工澱粉パン,ヒドロキシプロピル化リン酸架橋澱粉パンの順に低くなった。パンの色差(ΔE)は,加工澱粉パンは未加工澱粉パンに比べてそれぞれ「めだつほどに」(appreciable)という評価であった。

### 3-4. パンの物性測定

パンの物性は(図4),冷凍・解凍後パンのかたさ応力が未加工澱粉パン,ヒドロキシプロピル化リン酸架橋澱粉パン,リン酸架橋澱粉パンの順に低くなり,パン解凍後の変化は加工澱

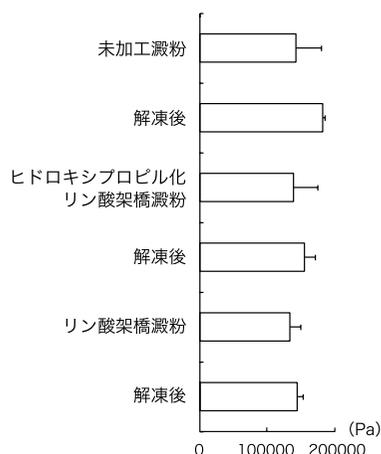


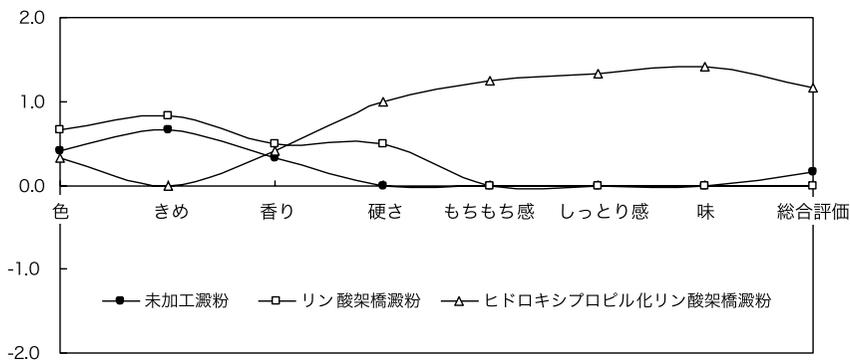
図4 パンのかたさ応力

粉添加パンが少ないことが観察された。

### 3-5. 官能検査

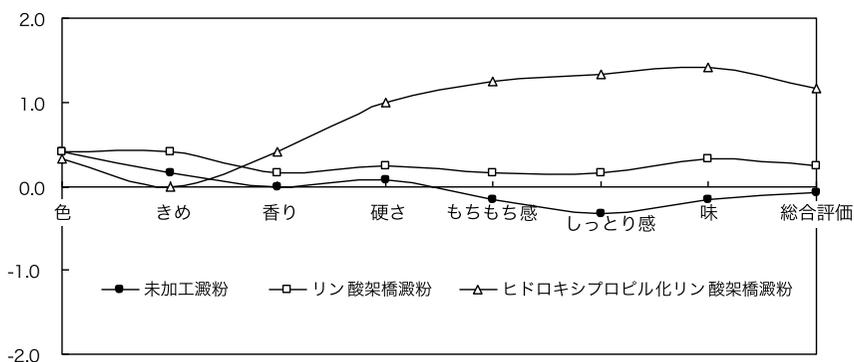
パンの好ましさの順位は冷凍前・解凍後ともにヒドロキシプロピル化リン酸架橋澱粉パン,リン酸架橋澱粉パン,未加工澱粉パンの順になり,二元配置分散分析の結果,澱粉の種類によって有意差がみられた(冷凍前パン  $p < 0.05$ , 解凍後パン  $p < 0.01$ )。

以上より,加工澱粉を小麦粉に添加して用いることにより,その特性を活かした冷凍パンなどへ利用の可能性が示唆される。



澱粉の種類 \*  $p < 0.05$

図5 冷凍前パンの官能検査



澱粉の種類 \*\*  $p < 0.01$

図6 冷凍・解凍後パンの官能検査

おわりに

馬鈴しょ澱粉に澱粉の有する機能を助長した加工澱粉を添加したパンの調理科学的特性と嗜好性について、次のような結果が得られた。

- ①加工澱粉パンの水分量は、冷凍・解凍後の変化が少なかった。
- ②パンの比容積は、ヒドロキシプロピル化リン酸架橋澱粉パンが低くなった。
- ③パン（クラム：内相）明度は冷凍・解凍後、リン酸架橋澱粉パン、ヒドロキシプロピル化リン酸架橋澱粉パン、未加工澱粉パンの順に低くなった。
- ④パンのかたさ応力は、加工澱粉パンが未加工澱粉パンに比べて冷凍・解凍後に低くなった。

- ⑤パンの官能検査における好ましさの順位では、ヒドロキシプロピル化リン酸架橋澱粉パン、リン酸架橋澱粉パン、未加工澱粉パンの順に好まれていた。

加工澱粉は小麦粉などに添加して用いることにより、その特性を活かして、冷凍・解凍後のパンなどへ利用可能性が示唆される。

[謝辞]

本研究は、平成22年度ノースティック財団「研究開発助成事業」の補助金を受けて行うことができました。研究をすすめるにあたりご協力いただいた関係各位に厚くお礼申し上げます。

・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 参考文献 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・

- 1) 高橋禮次：でん粉製品の知識，幸書房，p1-26，92-118, 2002.
- 2) 札幌商工会議所：北海道フードマイスター平成19年度版，札幌商工会議所，p49, 2007.
- 3) 北海道農業協同組合：北海道の農業2009，通信社，p6, 2009.
- 4) 農林水産省：「平成24年度いも・でん粉に関する資料」（平成24年7月版）
- 5) 島下昌夫：調理と化工澱粉，日本調理科学会誌，**25**，243-248, 1992.
- 6) 小倉徳生：その他の澱粉誘導体，澱粉科学ハンドブック，朝倉書店，東京，p92-518, 1977.
- 7) 高崎禎子，峯木真知子：馬鈴薯でん粉あるいは化工馬鈴薯でん粉添加が製パン製に及ぼす影響，日本調理科学会誌，**34(1)**，53-61, 2001.
- 8) 松谷化学工業（株）品質規格書および資料
- 9) 日本電色工業（株）資料
- 10) 不破英次，小巻利章，檜作進，貝沼圭二：澱粉科学の事典，朝倉書店，2003.

# レポーターアッセイを用いた美白評価

白杉 一郎\*<sup>1</sup> 榊原 陽一\*<sup>2</sup> 松井 隆史\*<sup>1</sup> 水光 正仁\*<sup>2</sup>

\*<sup>1</sup> SHIRASUGI Ichiro, MATSUI Takashi (株式会社くらこん 研究開発部)

\*<sup>2</sup> SAKAKIBARA Yoichi, SUIKO Masahito (宮崎大学農学部 応用生物科学科)

Key Words：ルシフェラーゼ・チロシナーゼ・メラニン・カルノソール・ロットレリン・美白

最近日本では肌の美白を望む女性が増えており、美白化粧品を含む化粧品の市場規模が年々大きくなっている。美白成分の探索にはマウス由来 B16 メラノーマ細胞を用いたメラニン産生試験とマッシュルーム由来チロシナーゼを用いたチロシナーゼの活性阻害試験が広く利用されている。しかし、メラニン産生試験は時間や培養スケール、さらには利便性などの様々な問題がある。また、チロシナーゼの活性阻害試験は簡便で迅速ではあるが、用いているのがマッシュルーム由来のチロシナーゼであり、結果がヒトに応用できるか不明であること、そしてチロシナーゼの発現量の減少を見出すことができないという問題点がある。したがって、これらの方法はスクリーニングには不向きである。そこで、私たちはメラニンの産生に最も重要な酵素であるチロシナーゼの転写調節領域に着目をし、マウスのチロシナーゼの転写活性を測定するハイスループットなレポーターアッセイ法を構築した。

この評価系を用いて、メラニンの産生を亢進させるテオフィリン、メラニンの産生を抑制するアルブチンを測定したところメラニン産生試験の結果と強い相関があった。また、以前私たちが美白作用を有する化合物として紹介したブ

ロッコリーのスプラウトに含まれるスルフォラファンもチロシナーゼのプロモーター活性を低下させた<sup>1,2)</sup>。これらの結果より、このレポーターアッセイ法は美白成分を探索する評価系として用いることが可能であることが示された。

50 種類以上の化合物を用いてスクリーニングを実施したところ、新規の美白剤の候補としてローズマリーに含まれるカルノソール、アカメガシワに含まれるロットレリンを見出すことが出来た。

本稿では、レポーターアッセイ法を用いた美白効果の評価システムの構築とその応用について紹介する<sup>3)</sup>。

## 1. メラニン合成経路とチロシナーゼ

メラニン色素の合成は、メラニン合成酵素であるチロシナーゼ、チロシナーゼ関連タンパク (TRP-1, TRP-2) により制御される。この中で最も重大な役割をもつのはメラニン合成における初期律速反応を触媒するチロシナーゼである。チロシナーゼの転写調節領域には M-box とよばれる 10 塩基からなる配列と E-box とよばれる 6 塩基からなる配列がある。M-box と E-box はともに CATGTG という配列が含まれ

```

-521 ATGCATTGAA  GCGATTCCAC  AAAATAACAA  AGTAACAAAG
-481 TAAGATATCT  TTGGAATAAT  CAATTCAGAG  TAATCAAGGA
-441 AAAATGAGAG  GCAACTATTT  TAGACTGATT  ACTTTTATAA
-401 AATAAATAAG  CTCAGATTAG  CCAGATATAA  GCAATATTCT
-361 GAGTTCAGAA  GAAAAATTTT  TGACAAAATG  AGTTCATATA
-321 ATGTTATTGT  CTACTTATGA  TCTCTAAATA  CAACAGGCTT
-281 GTATTCAGAA  TCTAGATGTT  TCATGACCTT  TATTATAAAG
-241 AGATGATGTA  TTCTTGATAC  TACTTCTCAT  TTGCAAATTC
-201 CAATTATTAT  TAATTTTATA  TCAATTAGAA  TAATATATCT
-161 TCCTTCAATT  TAGTTACCTC  ACTATGGGCT  ATGTACAAC
-121 TCCAAGAAAA  AGTTAGTCA  GTGCTTTGCA  GAAGATAAAA
-81  GCTTAGTGTA  AAACAGGCTG  AGAGTATTTG  ATGTAAGAAG
-41  GGGAGTGGTT  ATATAGTCT  TAGCCAAAAC  ATGTGATAGT
-1  CACTCCAGGG  GTTGCTGGAA  AAGAAGTCTG  TG
↑
Transcriptional start site

```

図1 マウスのチロシナーゼの転写調節領域

太文字の -106 から -97 までの 10 塩基対が M-box, -12 から -7 までの 6 塩基対が E-box を示す。

ており、これがコアプロモーター領域と言われている (図1)<sup>4,5)</sup>。

## 2. 実験方法

### 2-1. レポータープラスミドの作製

C57BL/6 マウスの腎臓から得た染色体 DNA を鋳型として Polymerase chain reaction (PCR) を行った。使用したプライマーはマウスのチロシナーゼの転写調節領域 (-521/+31) を含むように設計した。Sense primer (-521/-502) には Xho I サイト (CTCGAG) の 5'-末端に CCG, 3'-末端に G を加えたものを付加し, Antisense primer (+12/+31) には Bgl II サイト (GAAGATCTTC) を付加した。PCR の反応液は Reaction buffer, 染色体 DNA, 0.3 unit KOD-plus-, 1.5 mM MgSO<sub>4</sub>, 125 μM dNTPs, 10 pmol Sense primer, 10 pmol Antisense primer で全量が 20 μl となるように調製した。PCR は 95℃ で 3 分間変性させた後, 95℃ 30 秒, 55℃ 45 秒, 68℃ 2 分間の 3 ステップ反応を 30 サイクル行った。その後, 68℃ で 20 分間インキュベートした後, PCR 産物を 0.7% アガロースゲルで電気泳動により分離してサイズを確認した。アガロース電気泳動により分離した遺伝子断片をゲルから抽出し, 制限酵素 Xho I と

Bgl II で処理した。この遺伝子断片を Ligation-Convenience Kit を用いて pGL4 neo の Xho I と Bgl II サイトにサブクローニングし, *E. coli* XL1-Blue MRF' にトランスフェクトした。クローンのスクリーニングにはコロニー PCR を用いた。得られたクローンよりミニプレップ法を用いてプラスミドを精製した。これを鋳型にして, Big Dye Terminator v3.1 cycle Sequencing Kit を用いて ABI PISM 310 Genetic Analyzer によりシーケンス解析を行った。得られた塩基配列の解析には GENETYX-MAC Ver.11.2.5 を使用した。

### 2-2. 安定発現細胞株の樹立

100 mm ディッシュに B16 細胞を 500 cells 播種し, 播種してから 24 時間後に, ミディプレップ法を用いて作製したマウスのチロシナーゼの転写調節領域を含むレポータープラスミド 12 μg DNA 相当量と 24 μl の HilyMax reagents の混合液を添加した。4 時間後に 1,000 μg/ml G418 を含む DMEM に置き換え, 4 週間培養した。4 週間後, 大きくなったコロニーを 15 個単離し, それぞれのコロニーを 35 mm のディッシュで培養し, サブコンフルエントになった後にルシフェラーゼ活性を測定した。最も高い活性を示したものを以降の実験で用いた。

### 2-3. ルシフェラーゼ活性測定

レポータープラスミドを安定発現させた B16 細胞を 35 mm のディッシュに 3.0 × 10<sup>5</sup> cells 播種し, 24 時間後に化合物を 10 μM もしくは細胞毒性のない濃度で 24 時間処理した。テオフィリンとアルブチンは 10, 50, 100, 500, 1,000 μM の濃度で処理した。24 時間後, 培地を除き, PBS で洗浄した。可溶化液を加えて細胞を可溶化し, 遠心分離 (12,000 × g, 30 分, 4℃) 後, 上清を粗抽出液として用いた。なお, 粗抽出液のタンパク質濃度は Lowry 法を用いて測定した。粗抽出液 20 μl にルシフェラーゼアッセイキットの基質を 50 μl 加え, ボルテックスで混

合後にルミノセンサー-PSN(ATTO)でルシフェラーゼ活性を測定した。得られた値をタンパク質濃度で割り、コントロールの値を100%とすることで相対的な評価を行った。

#### 2-4.メラニン産生試験

B16細胞を35mmのディッシュに $3.0 \times 10^5$  cells 播種し、播種してから24時間後に化合物を処理した。なお、コントロールはDMEMに0.1%となるようにDMSOを添加したものを処理した。24時間後に培地を除き、PBSで洗浄した。トリプシンを加え、1分後にトリプシンインヒビター、PBSを加え細胞を剥がし回収した。回収した細胞を遠心分離(1,000 × g, 5分, 20℃)し、細胞の沈殿を得た。細胞の沈殿にPBSを1ml加えよく懸濁し、100 μlはトリパンブルーを用いた細胞毒性評価を行うために、残りは再度遠心分離(1,000 × g, 5分, 20℃)した。得られた沈殿に1M水酸化ナトリウムを加え可溶化し、405nmの吸光度からメラニン産生量を測定した。得られたメラニン産生量を生細胞数で割り、コントロールの値を100%とすることで相対的な評価を行った。

#### 2-5. 統計解析

結果は全て平均値±標準偏差で示した。統計解析にはDunnett's testを用いた。統計的な有意差は $p < 0.05$ に設定した。有意差は全てControlとの比較である。

処理したとき、ルシフェラーゼ活性は $105.4 \pm 7.1\%$ ,  $81.9 \pm 4.6\%$ ,  $77.8 \pm 2.2\%$ ,  $46.2 \pm 7.4\%$ ,  $38.5 \pm 10.0\%$ で、メラニン産生量は $92.9 \pm 5.9\%$ ,  $82.1 \pm 7.1\%$ ,  $76.2 \pm 0.9\%$ ,  $67.8 \pm 5.4\%$ ,  $67.4 \pm 11.3\%$ であった(図2)。

テオフィリンを10 μMから1,000 μMの濃度で処理したとき、ルシフェラーゼ活性は $114.0 \pm 25.0\%$ ,  $134.9 \pm 11.6\%$ ,  $151.4 \pm 10.9\%$ ,  $236.0 \pm 29.1\%$ ,  $296.8 \pm 58.9\%$ で、メラニン産生量は $113.0 \pm 10.4\%$ ,  $128.9 \pm 10.2\%$ ,  $146.6 \pm 6.4\%$ ,  $161.4 \pm 10.8\%$ ,  $188.0 \pm 25.9\%$ であった(図3)。アルブチン、テオフィリンともにルシフェラーゼ活性とメラニン産生量に相関があった。

また、私たちが美白作用を以前紹介したスルフォラファンも1, 5, 10 μMの濃度で処理し

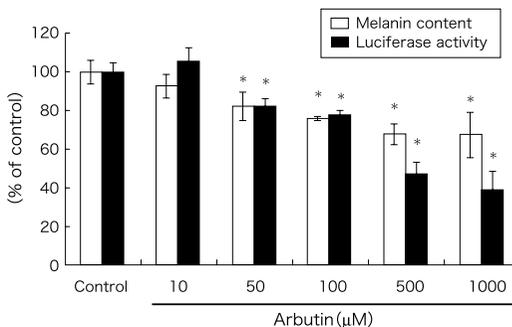


図2 アルブチンのメラニン産生とルシフェラーゼ活性の相関

### 3. 結果

#### 3-1. ルシフェラーゼ活性とメラニン産生量の相関

チロシナーゼの発現を抑制することによってメラニンの産生を阻害するアルブチンとテオフィリンを用いてルシフェラーゼ活性とメラニン産生量を測定した。それぞれの化合物を10 μMから1,000 μMの濃度で24時間処理した。

アルブチンを10 μMから1,000 μMの濃度で

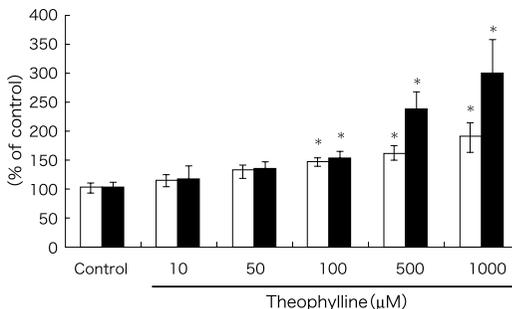


図3 テオフィリンのメラニン産生とルシフェラーゼ活性の相関

たときのルシフェラーゼ活性は  $89.4 \pm 10.1\%$ ,  $69.7 \pm 5.9\%$ ,  $66.4 \pm 3.9\%$  であり, 濃度依存的な活性の低下が見られた (データは未掲載)。

### 3-2. レポーターアッセイを用いた化合物のスクリーニング

50 種類以上の化合物を  $10 \mu\text{M}$  もしくは細胞毒性のない濃度で 24 時間処理した。2 倍以上のルシフェラーゼ活性を示した化合物はアピゲニン, クリシン, ルテオリン, ビオカニン A, ダイゼイン, ゲニステイン, ガランギン, レスバラトロール, ホモハリグトニン, ケンパウルノンの 10 種類であった (表 1, 表 2)。

一方, ルシフェラーゼ活性が 70% 以下を示した化合物はカルノソールと既に美白作用が報告されているカルノシン酸とスルフォラファンの 3 種類であった<sup>1,2,6)</sup>。細胞毒性が若干見られたものの, ルシフェラーゼ活性が  $1 \mu\text{M}$  で  $64.7 \pm 9.0\%$  を示したロットレリンにつ

いてもメラニン産生量を調べた。

### 3-3. カルノソールとロットレリンのルシフェラーゼ活性への影響

カルノソールを 1, 5,  $10 \mu\text{M}$  の濃度で処理したときのルシフェラーゼ活性は  $86.3 \pm 3.3\%$ ,  $58.3 \pm 18.2\%$ ,  $38.8 \pm 8.8\%$  であり, 濃度依存的にルシフェラーゼ活性は減少していた (図 4)。ロットレリンは細胞毒性の見られない  $0.05, 0.1, 0.5 \mu\text{M}$  の濃度で処理したときのルシフェラーゼ活性は  $93.9 \pm 6.7\%$ ,  $100.1 \pm 3.0\%$ ,  $87.6 \pm 4.9\%$  であった (図 5)。

### 3-4. カルノソールとロットレリンのメラニン産生抑制作用

カルノソールを 1, 5,  $10 \mu\text{M}$  の濃度で処理したときのメラニン産生量は  $85.7 \pm 4.4\%$ ,  $63.8 \pm 4.6\%$ ,  $52.3 \pm 3.9\%$  で濃度依存的に減少した (図 6)。ロットレリンは  $0.5 \mu\text{M}$  のとき, メラニン産生量が  $75.7 \pm 4.6\%$  で有意にメラニ

表 1 ポリフェノール類のルシフェラーゼ活性

Compound ( $10 \mu\text{M}$ )	Luciferase activity (% of control)	Compound ( $10 \mu\text{M}$ )	Luciferase activity (% of control)
<b>Flavonoids</b>		<i>Anthraquinones</i>	
<i>Flavones</i>		Alizarin	$132.6 \pm 4.6$
Apigenin	$276.0 \pm 53.5$	Danthron	$114.8 \pm 9.5$
Chrysin	$260.3 \pm 12.5$	Ofloxacin	$113.7 \pm 3.5$
Diosmin	$133.7 \pm 6.6$	<i>Others</i>	
Luteolin	$204.8 \pm 44.5$	Resveratrol	$291.7 \pm 54.2$
<i>Flavolignan</i>		Curcumin	$78.4 \pm 9.0$
Silymarin	$108.1 \pm 9.7$	Theaflavin 3,3-digallate	$73.5 \pm 10.3$
<i>Flavones</i>		Carnosic acid	$69.9 \pm 6.6$
Biochanin A	$207.7 \pm 53.5$	Carnosol	$37.1 \pm 6.6$
Daidzein	$260.3 \pm 12.5$		
Genistein	$292.5 \pm 60.1$		
Glycitein	$195.4 \pm 36.3$		
<i>Catechins</i>			
EGC	$91.5 \pm 7.4$		
EGCG	$125.7 \pm 19.9$		
<i>Anthocyanidins</i>			
Cyanidin chloride	$96.3 \pm 5.4$		
Pelargonidin chloride	$102.2 \pm 16.6$		
Delphinidin chloride	$98.5 \pm 15.6$		
<i>Flavonols</i>			
Kaempferol	$157.1 \pm 9.4$		
Quercetin dihydrate	$175.5 \pm 15.3$		
Galangin	$260.4 \pm 15.2$		

ン産生量が減少した (図 7)。

表 2 非ポリフェノール類のルシフェラーゼ活性

Compound (10 μM)	Luciferase activity (% of control)	Compound (10 μM)	Luciferase activity (% of control)
<i>Alkaloids</i>		<i>Others</i>	
Caffeine	116.3 ± 11.6	Lipoic acid	132.6 ± 4.6
Capsaicin	87.3 ± 7.6	GABA	118.5 ± 19.7
Chepharantine 1 μM	107.5 ± 6.2	Anisomycin 1 μM	91.6 ± 6.9
Homoharringtonin 10 nM	240.5 ± 37.4	Hexadecyl acetyl glycerol 1 μM	92.9 ± 11.0
Tropine	109.4 ± 7.4	Kenpaullnone	202.2 ± 23.1
<i>Isothiocyanates</i>		Rottlerin 0.5 μM	87.6 ± 4.9
BITC 5 μM	138.4 ± 20.8	Tryphostin	94.5 ± 8.0
3-Methoxyphenyl-ITC	107.5 ± 18.2	Tiglic acid	95.1 ± 12.3
Sulforaphane	66.4 ± 3.9	Benzylphosphonic acid	113.0 ± 12.3
<i>Steroids</i>		Cantharidin	172.1 ± 15.7
Testosterone	124.8 ± 19.8	Captopril	106.4 ± 10.3
17 β-estradiol	93.0 ± 2.2	Enalapril	105.8 ± 6.2
Cholesterol	105.6 ± 11.0	Ketoconazole	126.2 ± 0.1
Cholic acid	95.0 ± 9.4		
Deoxycholic acid	104.3 ± 11.6		
Keto-deoxycholic acid	91.8 ± 7.7		
<i>Terpenoids</i>			
Artemisin	95.7 ± 3.0		
Carveol	114.0 ± 14.7		
Ginkgolide A	105.3 ± 7.6		
Phytol	99.5 ± 3.5		
Thymol	105.4 ± 2.2		

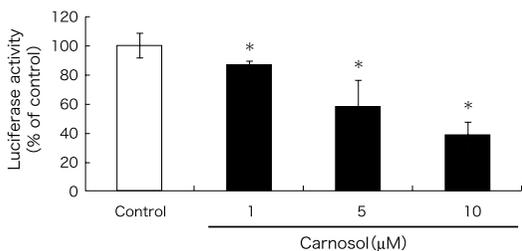


図 4 カルノソールのルシフェラーゼ活性への影響

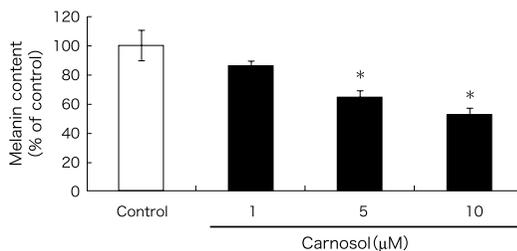


図 6 カルノソールのメラニン産生抑制作用

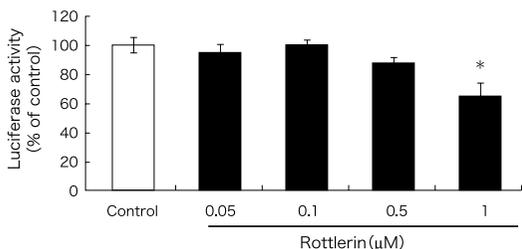


図 5 ロットレリンのルシフェラーゼ活性への影響

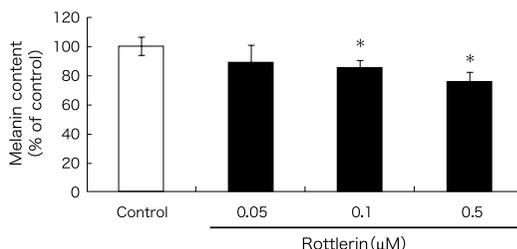


図 7 ロットレリンのメラニン産生抑制作用

#### 4. 考察

メラニンは紫外線や活性酸素から皮膚や髪を保護する重要な役割を有しているが、メラニンの過剰産生や蓄積が起こるとしみやそばかすなどの原因となる<sup>7,8)</sup>。近年、しみやそばかすに悩む女性は増えており、化粧品産業や医薬品産業において改善効果や予防効果をもった製品の開発が進められている。

これまでに美白作用、つまりメラニン産生抑制作用を有する化合物を探索するためにマウス由来 B16 メラノーマ細胞を用いたスクリーニング法が一般に用いられてきた。この方法のメリットは最終産物であるメラニンの産生量を簡便に測定できるところにある。また、B16 細胞はヒト由来メラノーマ細胞である G361 細胞よりチロシナーゼ活性が高いことからスクリーニングによく用いられる一つの要因となっている<sup>5)</sup>。しかし、このスクリーニング法のデメリットとして培養スケールが大きい、化合物の処理時間が 48 時間から 96 時間かかる<sup>9-11)</sup>、さらに細胞の回収からメラニンの産生量の測定までの作業の工程が煩雑であることが挙げられる。本研究では上記の問題点を改善した新たな評価系を開発し、新規の美白成分の探索法の開発を目指した。チロシナーゼはメラニンの合成において最も重要な酵素で、転写開始点から 106 塩基上流 (-106/-97)、そして 12 塩基上流 (-12/-7) に存在する CATGTG という配列がチロシナーゼの転写調節部位のコアプロモーター領域と言われている。転写開始点から 106 塩基上流に存在する配列は M-box、12 塩基上流に存在する配列が E-box とされている<sup>4,5)</sup>。本研究では M-box と E-box を含む 552 塩基対の配列をルシフェラーゼ遺伝子が組み込まれたベクターに挿入し、レポータープラスミドを作製した (図 1)。このプラスミドを B16 細胞に組み込み、安定

発現系細胞を構築し、実際にスクリーニング法として用いることが可能か、否かを検証した。チロシナーゼの活性化を誘導するテオフィリンやゲニステインではルシフェラーゼ活性が上昇し、チロシナーゼの発現を抑制するアルブチンやスルフォラファンではルシフェラーゼ活性の低下を確認することが出来た<sup>1,2,12-14)</sup>。また、このレポーターアッセイシステムは化合物の処理時間が 24 時間で済み、既存の方法よりも大幅に処理時間を削減することが出来た。さらに、既存の方法はメラニンの産生量を測定するため、培養スケールが 35 mm ディッシュ以上の容量が必要である。本研究のアッセイ系ではルシフェラーゼの感度が非常に高いため、実験自体は 35 mm ディッシュを用いて行ったが、その後の検証で培養スケールを 96 穴マルチプレートまでスケールダウンすることが可能であることを確認した。このアッセイ系を用いて 50 種類以上の化合物の評価を行ったところ、カルノソールとロットレリンが新規の美白剤となりうる化合物として見出すことが出来た。

カルノソールはローズマリーに含まれるフェノール性のジテルペン類に属する化合物で、これまでに抗酸化作用や抗炎症効果が報告されている<sup>15)</sup>。ロットレリンはアカメガシワといわれる植物に含まれる赤色の色素であり、プロテインキナーゼ C- $\delta$  (PKC- $\delta$ ) の阻害剤として用いられている<sup>16,17)</sup>。カルノソールとロットレリンのメラニン産生量も調べたところ、メラニン産生量の減少を確認することが出来た。したがって、このスクリーニングを用いることによって既存の方法より簡便かつ迅速に美白作用が期待される新規の化合物を見出すことが可能であることが示された。今後、この方法を一次スクリーニング法として用いて多くの美白作用を有する新規の化合物を見出し、作用メカニズムの解明に繋げたいと考えている。

..... 参考文献 .....

- 1) 白杉一郎, 榊原陽一, 水光正仁, *et al*, *New Food Industry*. **52**(7), 1-7, 2010.
- 2) Shirasugi I, Sakakibara Y, Suiko M, *et al*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 579-582, 2010.
- 3) Shirasugi I, Sakakibara Y, Suiko M, *et al*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 2253-2258, 2010.
- 4) Kluppel M, Beermann F, Ruppert S, *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **88**, 3777-3781, 1991.
- 5) Bertolotto C, Bille K, Ortonne JP, *et al*, *J. Cell Biol.*, **134**, 747-755, 1996.
- 6) 小坂邦男, 宮崎寿次, 小野誠, *FRAGRANCE JOURNAL*, **9**, 59-64, 2000
- 7) Hearing VJ, *J. Dermatol. Sci.*, **37**, 3-14, 2005.
- 8) Briganti S, Camera E and Picardo M, *Pigment Cell Res.*, **16**, 101-110, 2003.
- 9) Briganti S, Camera E and Picardo M, *Pigment Cell Res.*, **16**, 101-110, 2003.
- 10) Martinez-Esparza M, Jimenez-Cervantes C, Beermann F, *et al*, *J. Biol. Chem.*, **272**, 3967-3972, 1997.
- 11) Smalley K and Eisen T, *FEBS Lett.*, **476**, 198-202, 2000.
- 12) Valverde P, Benedito E, Solano F, *et al*, *Eur. J. Biochem*, **232**, 257-263, 1995.
- 13) Yan CH, Chen XG, Liu Y, *et al*, *J. Asian Nat. Prod. Res.*, **1**, 285-299, 1999.
- 14) Kai H, Baba M and Okuyama T, *Planta Med.*, **74**, 1785-1788, 2008.
- 15) Nakagawa K, Umeda T, Higuchi O, *et al*, *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 2479-2483, 2006.
- 16) Soltoff SP, *Trends. Pharmacol. Sci.*, **28**, 453-458, 2007.
- 17) Valacchi G, Pecorelli A, Mencarelli M, *et al*, *Exp. Dermatol.*, **18**, 516-521, 2009.

# シロザケ用飼料の油脂源

大橋 勝彦<sup>\*1</sup> 酒本 秀一<sup>\*2</sup>

<sup>\*1</sup>OHASHI Katsuhiko (日本ドナルドソントラウト研究所), <sup>\*2</sup>SAKAMOTO Shuichi

---

Key Words: シロザケ用飼料・油脂源・魚油・綿実油・肥満度・脂質含量・飼育成績・絶食耐性・回復能・海水馴致能

---

著者らは一連の報告<sup>1-4)</sup>で以下の点を明らかにした。

・シロザケ稚魚に与える飼料によって体型や成長に違いが生じるのみでなく、体成分組成、絶食耐性、絶食からの回復能力、海水への馴致能力等にも大きな違いが出る。

・餌付け用飼料に魚油を添加すると摂餌性が悪く、成長他に可也長期間悪い影響を及ぼす。餌付け時に魚油を添加すべきではなく、餌付け後4日程度で魚油添加飼料に切り替えれば良い。

・魚体の脂質含量と脂肪酸組成は飼料の脂質含量と脂肪酸組成を反映する。

・魚体の脂質含量が多い程絶食耐性が強く、絶食からの回復能力も高い。一方、魚体の脂質含量が少ない程絶食中の死魚数が多く、しかも肥満度が大きい魚も死ぬ傾向が有る。

・絶食耐性や絶食からの回復能力を規定しているのは魚体の脂質含量で、肥満度ではない。但し、脂質含量が多い魚は一般的に肥満度も高いので、現場で容易に測定出来る肥満度を指標にしても問題になることは無いと思われる。

・同一グループで餓死する魚が出るくらい衰弱すると給餌を再開しても容易に回復しない。給餌しても摂餌出来ない位に衰弱しているか、

消化管の消耗によって摂餌しても消化・吸収する能力が無くなっている可能性が有る。

・魚体の脂質含量が多い魚の方が海水への馴致能力が高い。

・絶食時には魚体の脂質が著しく減少する。脂質が絶食時の主たるエネルギー源になっているものと思われる。

・シロザケ用飼料に添加すべき油は、必須脂肪酸としての役割を有するn6系とn3系脂肪酸を必要量含み、更にパルミチン酸やオレイン酸等のエネルギー源として利用される脂肪酸をも豊富に含む油が良いと思われる。

・色々な指標から判断してシロザケ用飼料への魚油の至適添加量は外割で7% (飼料の脂質含量として約12%)程度である。

・絶食に起因する大量死が起こる時の体成分の目安は、脂質が約5%乾物、タンパク質が約90%乾物で、この時の水分含量は約85%である。但し、この値は絶食開始時の魚の大きさによって多少変化する可能性が有る。

・約1-2gまで孵化場で飼育されたシロザケ稚魚の大部分は河川に放流される。特に早期放流魚は可也長期間河川に滞留しており、河川に十分量の餌が存在しないこともあって降海時には痩せて飢餓状態にあると云われている。

・稚魚が海に下っても海水に馴染めずに死んでしまっただけでは放流の意味が無い。痩せて脂質含量が少ない魚は海水に適応する能力が低いこと、絶食後再給餌してある程度魚体の脂質含量を多くした魚は十分に海水に適応出来ること等から、シロザケ稚魚の放流時には魚体に脂質を十分量蓄積させておくことが重要である。

これらの条件を満たす為にはシロザケ用飼料にどのような油脂を添加すれば良いのであろうか。単品での添加であれば魚油が最も適しているであろう。

これまでに能勢ら<sup>5,6)</sup>は魚油と併用することによって牛脂も十分にシロザケ用飼料のエネルギー源として利用出来ることを報告している。また、酒本はニジマスにおいて魚油と大豆油の等量混合油<sup>7)</sup>あるいは魚油(マグロ油):植物油(亜麻仁油):獣脂(豚脂+牛脂)=65:28:7の混合油<sup>8)</sup>が魚油単独よりも優れた飼育成績を示すことを明らかにしている。

シロザケ用飼料でも魚油単独ではなく、獣脂や植物油を併用すれば更に良い結果が得られる可能性が有る。よってシロザケ用飼料への植物油の添加効果を調べることにし、本試験では綿実油を検討した。

図1に試験全体の流れを示す。試験飼料での飼育試験、絶食試験、同一飼料を用いての回復試験の順に行い、絶食試験と回復試験の終了時には海水馴致試験も行った。また、定期的に各

区から100尾ずつサンプリングして体重と尾叉長を測定した。更に各試験の開始時と終了時には全魚体の一般成分分析を行った。夫々の詳細は各試験の項で説明する。

## 飼育試験

### 1. 方法

#### 1-1. 試験区と試験飼料

A-Dの4試験区を設定した。A区は市販の油無添加シロザケ稚魚用飼料のみを与えた区。この飼料を基本飼料とした。B区は基本飼料に魚油[理研ビタミン(株)フィードオイルΩ]を外割で7%添加した飼料を与えた区。C区は魚油と綿実油(J-オイルミルズ)を夫々外割で3.5%ずつ添加した飼料を与えた区。D区は綿実油を外割で7%添加した飼料を与えた区である。

必要量の基本飼料をボールに計り入れ、精秤した油を添加して十分に混合し、油を均一に吸着させて各試験飼料を調製した。

表1に飼料の分析値と供試油の脂肪酸組成を示す。但し、油添加飼料の分析は行わなかったため、この値は油が外割で7%キチンと添加されていたと仮定して計算で求めた値である。これまでの試験でも同じ方法で調製した飼料の分析値と理論値の間に問題になるような違いは無かったので、多分本試験でも理論値と分析値の間に大きな違いは無いものと考えられる。なお、

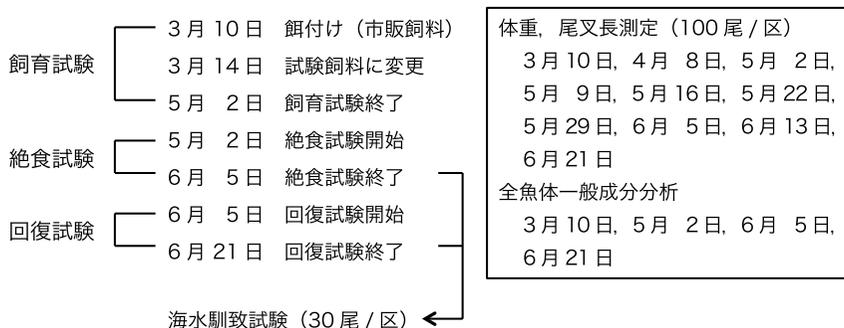


図1 サケ稚魚試験の流れ

表1 試験飼料と供試油の分析値

試験区	A	B, C, D	供試油	魚油	綿実油	大豆油
水分 (%)	8.28	7.74	14:0 (%)	6.1	5.9	
タンパク質	49.1	45.9	16:0	13.1	18.0	11.2
脂質	6.98	13.1	16:1n7	10.5	0.5	
灰分	11.9	11.1	18:0	2.6	2.2	4.1
炭水化物	23.8	22.2	18:1n9	20.1	17.0	22.5
Cal/100g	306.8	345.9	18:1n7	1.2		
C/P 比	6.25	7.54	18:2n6	0.3	54.0	54.2
A 区:市販飼料			18:3n3	0.5	0.3	8.0
B 区:市販飼料+魚油外割7%			20:1n9	17.1		
C 区:市販飼料+魚油外割3.5% +綿実油外割3.5%			20:4n6	0.4		
D 区:市販飼料+綿実油外割7%			20:5n3	8.3		
			22:1	12.3		
			22:5n3	0.8		
			22:6n3	4.0		
			Σn3	13.6	0.3	8.0
			Σn6	0.7	54.0	54.2
			Σn3/Σn6	19.4	0.006	0.15
			n3HUFA	13.1		

前述した様に餌付けから油添加飼料を与えると摂餌性に問題を生じる為、餌付けは油無添加の基本飼料で行い、4日間基本飼料を与えた後試験飼料に変更した。A区のみは基本飼料を継続した。最初の4日間の給餌量は少ないので、魚の増重量、飼料効率(増重量×100/給餌量)、タンパク質効率(増重量×100/給与タンパク質量)等の飼育成績に殆ど影響しない。

飼育期間中の死魚は尾数と体重を記録し、増重量の補正に用いた。

### 1-3. 魚体測定と成分分析

飼育試験開始時の3月10日に100尾、その後中間時の4月8日と終了時の5月2日に各区から100尾ずつサンプリングして魚体測定を行った。FA100で麻酔してペーパータオルで体表の水を拭き取り、ノギスと電子天秤で尾叉長と体重を測定した。それぞれの値から肥満度(体重×1000/尾叉長<sup>3</sup>)を求めた。3月10日と5月2日の魚はそのまま全魚体の一般成分の分析に供した。水分は常圧加熱乾燥法、タンパク質はケルダール法(N-タンパク質換算係数:6.25)、脂質はソックスレー法、灰分は直接灰化法で分析した。

4月8日の魚は体成分の分析を行わなかったが、この時の体成分を3月10日と5月2日の分析値の平均値と仮定し、各飼料の分析値と給餌量ならびに魚体成分の増加量から、推定値ではあるが飼料成分の魚体蓄積率を求めた。なお、各区共死魚数は少なかったため、死魚の補正は行わなかった。

カロリー数はタンパク質4、脂質9、炭水化物2Cal/gの数値を用いて計算で求め、C/P比はカロリー数をタンパク質含量で除して求めた。

魚油の脂肪酸組成は分析値であるが、綿実油の脂肪酸組成は日本食品標準成分表<sup>9)</sup>の値を引用した。大豆油はニジマス試験との比較の為に記した。魚油は炭素数20以上のn3系脂肪酸が多いこと、綿実油はリノール酸(18:2n6)の占める割合が著しく多く、n3系脂肪酸が殆ど含まれていないことに特徴が有る。綿実油と大豆油の違いは、綿実油にはリノレン酸(18:3n3)が0.3%と少ないのに、大豆油には8%含まれていることである。

### 1-2. 飼育条件

3月10日にアトキンス式孵化水槽(文献3, 29ページの写真参照)に各区1500尾ずつシロザケ稚魚を収容して飼育試験を開始した。水温は9℃、給餌率はライトリッツ給餌率、給餌回数は日に2回(午前中に2回投与)である。試験期間は3月10日から5月2日の約2カ月間であった。

表2 飼育試験の結果

試験区	A	B	C	D
生残率 (%)	99.4	99.6	99.3	99.6
増重量 (g)	1693	1754	1718	1679
給餌量 (g)	1508	1508	1508	1508
飼料効率 (%)	112.3	116.3	113.9	111.3
タンパク質効率 (%)	228.8	253.5	248.3	242.6

表3 体重, 尾叉長, 肥満度の変化

試験区	A	B	C	D
体重 (g)				
3月10日	0.35	0.35	0.35	0.35
4月8日	0.85	0.88	0.87	0.97
5月2日	1.53	1.57	1.62	1.51
尾叉長 (cm)				
3月10日	3.86	3.86	3.86	3.86
4月8日	4.79	4.78	4.77	4.92
5月2日	5.79	5.79	5.87	5.73
肥満度				
3月10日	5.95	5.95	5.95	5.95
4月8日	7.57	7.77	7.67	7.89
5月2日	7.76	7.93	7.80	7.80

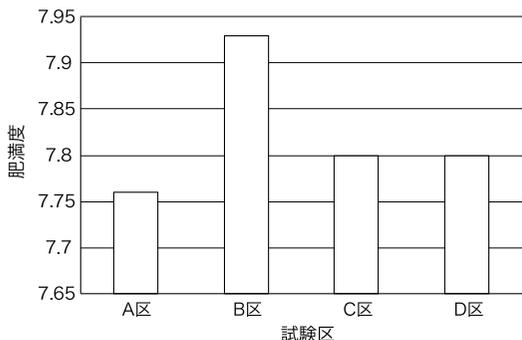


図2 飼育試験終了時の肥満度

2. 結果

2-1. 飼育成績

魚油添加飼料で餌付けを行った時の様な摂餌性の悪さは無く、基本飼料から油添加飼料への切り替えにも全く問題はなかった。

飼育試験の結果を表2に示す。生残率は何れの区も99%以上で高く、明確な区間差はなかった。増重量、飼料効率、タンパク質効率は魚油添加区(B, C)が油無添加区(A)より高く、特に魚油単独添加のB区が優れていた。綿実油単独添加のD区は油無添加区と同等か、やや劣る結果であった。魚油と綿実油の等量添加であるC区の増重量、飼料効率、タンパク質効率はB区とD区の平均値(増重量:1717g, 飼

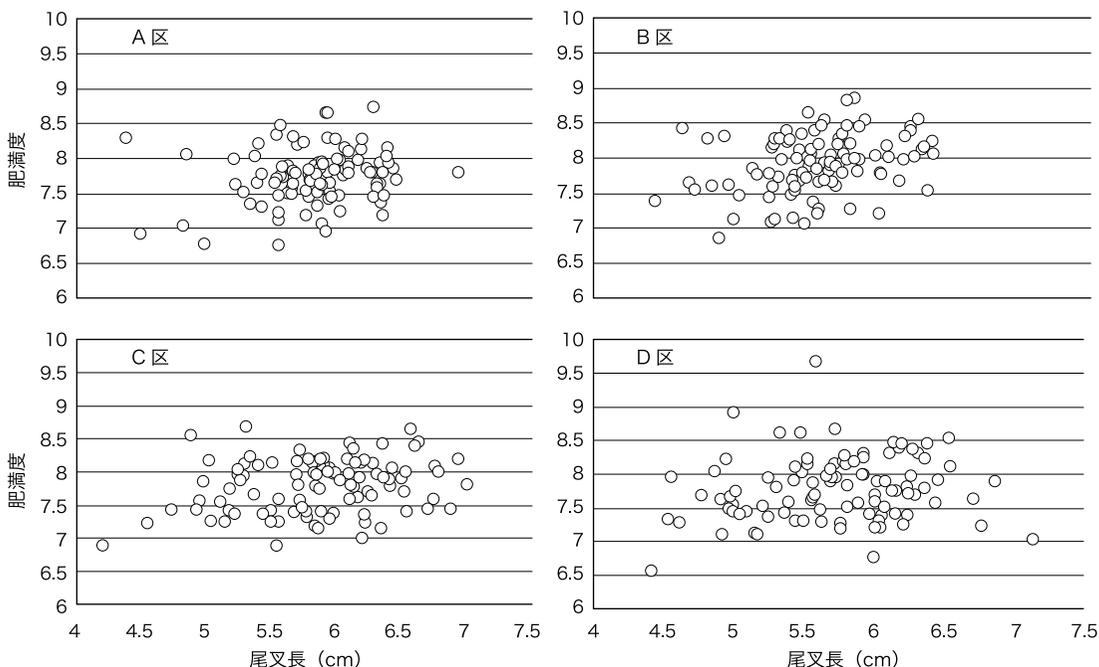


図3 飼育試験終了時の尾叉長と肥満度

料効率:113.8%, タンパク質効率:248.1%)と良く一致しており, 飼育成績は魚油の添加量によって略決められているように思える。

飼育成績から見る限り綿実油はシロザケ用飼料の油脂源として好ましくないようである。ニジマスでは大豆油は十分に利用出来たのに何故シロザケでは綿実油が利用出来ないのであろう。魚種の違いによる必須脂肪酸の要求量の違いによるのか, 大豆油と綿実油の脂肪酸組成の違いに原因が有るのか, 今後明らかにすべき問題である。

## 2-2. 魚体測定

体重, 尾叉長, 肥満度の変化を表3に示す。各区共3月10日から4月8日の飼育前半での肥満度の増加が大きく, それ以降の増加は小さかった。図2の様に飼育試験終了時の肥満度は $B>C=D \geq A$ 区の順に大きく, 魚油添加区の肥満度が大きいことが分かる。また, 綿実油添加区の肥満度も油無添加区よりやや大きい様である。

飼育試験終了時の尾叉長と肥満度の関係を図3に示す。油無添加のA区と魚油単独添加のB区は尾叉長, 肥満度とも略一定の範囲に収まっているのに, 綿実油を添加したC区とD区はバラツキが大きかった。魚油・綿実油等量添加のC区は尾叉長のバラツキが大きく, 綿実油単独添加のD区は尾叉長, 肥満度共にバラツキが大きかった。この結果から何が云えるであろう。一つは同じシロザケでも綿実油を利用出来る魚と利用出来ない魚が居る可能性である。また, 大小差は時間と共に大きくなるので, 同じ池内の魚に大小差が出ることは飼育管理上好ましくないと云うことである。

飼育成績同様, 魚体測定の結果からも綿実油

表4 飼育試験開始時と終了時の全魚体の分析値

時期 試験区	開始時	終了時			
		A	B	C	D
<b>湿物</b>					
水分 (%)	81.8	79.2	77.4	77.7	78.0
タンパク質	14.0	15.4	15.3	15.3	15.3
脂質	2.3	3.3	5.6	5.1	5.0
灰分	1.5	1.9	1.9	1.9	1.9
<b>乾物</b>					
タンパク質 (% 乾物)	76.9	74.0	67.7	68.6	69.5
脂質	12.6	15.9	24.8	22.9	22.7
灰分	8.24	9.13	8.41	8.52	8.64

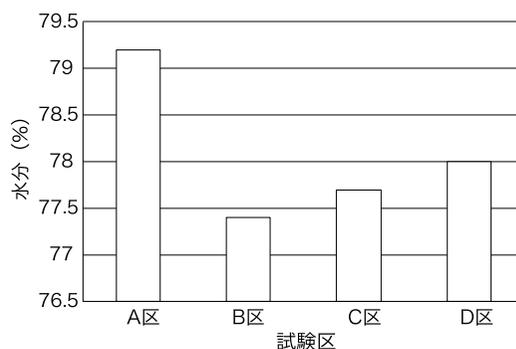


図4 飼育試験終了時の全魚体の水分含量

はシロザケ用飼料の油脂源として好ましくないと云わざるを得ない。

## 2-3. 魚体成分

飼育試験開始時と終了時の魚体成分を表4に示す。各区共魚の成長に伴って水分が減少し, タンパク質, 脂質, 灰分が増加していた。飼育試験終了時の各区の水分含量を図4に示す。油添加区は無添加区より水分が少なく, 添加区間では魚油単独添加区(B) < 魚油・綿実油等量添加区(C) < 綿実油単独添加区(D)の順に少なかった。魚油・綿実油等量添加区(C)の値は魚油単独添加区(B)と綿実油単独添加区の間値を示していた。

飼料への油, 特に魚油の添加は魚体の水分含量を少なくし, 脂質含量を多くすることが分かる。

水分と脂質の関係を図5に, 脂質とタンパク質の関係を図6に, 脂質と灰分の関係を図7

に示す。何れにも強い負の相関が認められる。これは魚体成分の変化の主因をなすのは脂質で、脂質の変動に伴って水分、タンパク質、灰分等が動いていることを示し、魚体の脂質含量

は飼料に添加される油の種類と量によって決められ、魚体では脂質の量が水分、タンパク質、灰分の量を決めていることになる。

魚体の脂質含量が絶食耐性、絶食からの回復

能、海水への馴致能等に大きな影響を及ぼすことがこれまでの試験で明らかになっている。飼育成績の面で綿実油はシロザケ用飼料の油脂源として好ましくないが、綿実油にも魚体の脂質含量を増やす効果は有るようである。綿実油も絶食耐性、絶食からの回復能、海水への馴致能をある程度高める効果を持つ可能性が有る。

#### 2-4. 飼料成分の魚体蓄積率

結果を表5と図8に示す。タンパク質と灰分の蓄積率は油添加区が無添加区より高く、添加区間では魚油添加区(B, C)の蓄積率が高かった。脂質の蓄積率は油無添加区 $\geq$ 魚油単独添加区 $>$ 魚油・綿実油等量添加区 $>$ 綿実油単独添加区の順に高く、意外なことに油無添加区が飼料脂質の魚体蓄積率が最も高かった。これは魚体の脂質含量は最も少ないもの、飼料の脂質含量も少ないことが関係している。また、油無添加区はタンパク質の蓄積率が少ないことから、タンパク質をエネルギー源として利用する割合を高くし、魚体にどうしても必要な脂質を蓄積する方向に代謝が進んでいるのであろう。油添加区では魚油の添加量が多い程脂質の蓄積率が高かった。魚油・綿実油等量添加のC区の値は魚油単独添加のB区と綿実油単独添加のD区の値の中間値に近く、魚油の添加量が脂質の蓄積率を左右しているものと

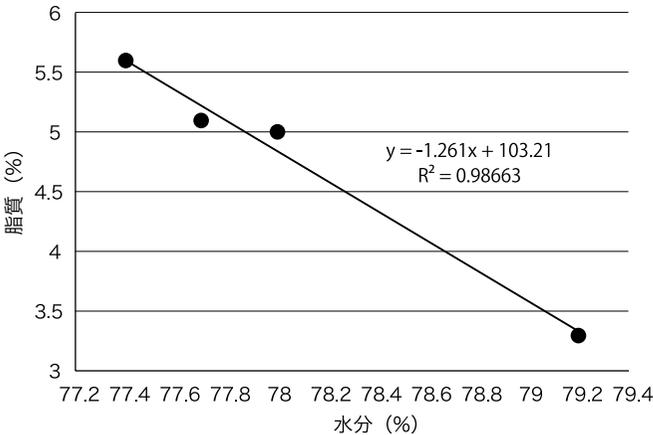


図5 水分と脂質の関係

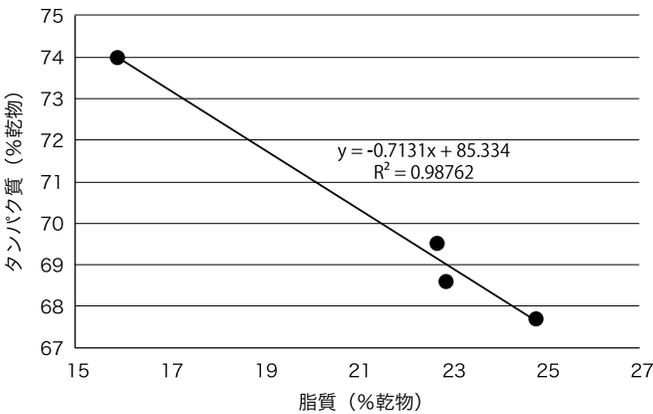


図6 脂質とタンパク質の関係

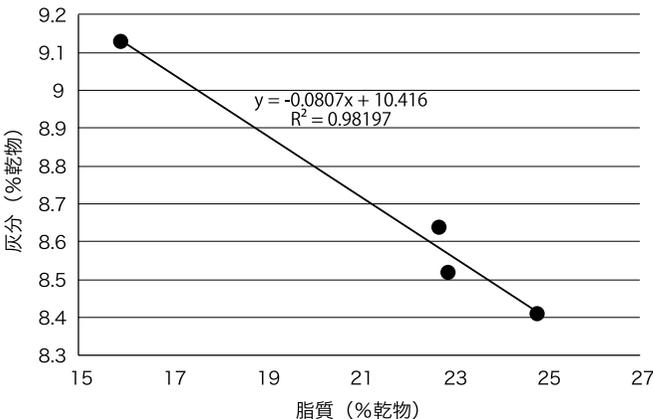


図7 脂質と灰分の関係

表5 飼料成分の魚体蓄積率

試験区	A	B	C	D
タンパク質 (%)	36.3	39.7	41.2	38.1
脂質	58.6	57.7	53.9	49.1
灰分	21.4	23.9	24.4	22.8

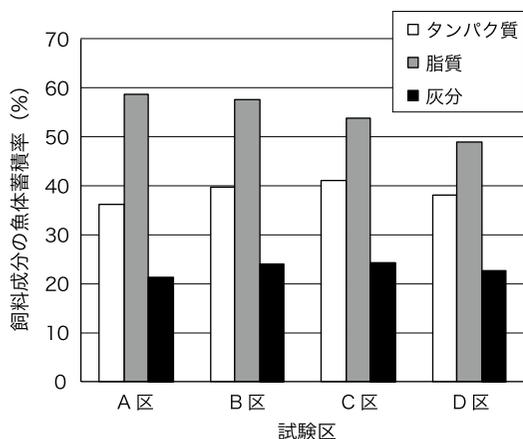


図8 飼料成分の魚体蓄積率

思われる。

綿実油単独添加区 (D) は油添加区の中ではタンパク質、脂質、灰分共に蓄積率が最も低く、シロザケ用飼料の油脂源として魚油より可也劣ることが分かる。この綿実油単独添加区の飼料成分の魚体蓄積率の低さが飼育成績に反映されているものと思われる。

脂質の蓄積率はタンパク質と灰分の蓄積率より著しく高いが、これは魚体内で炭水化物から脂質へ転換される部分も有ることによるのであろう。

### 3. 要約

・増重量、飼料効率、タンパク質効率等の飼育成績は魚油添加区が良く、特に魚油単独添加区が優れていた。綿実油単独添加区は油無添加区と略同等かやや劣る結果であった。

・魚油・綿実油等量添加区の飼育成績は魚油単独添加区と綿実油単独添加区の平均値と良く一致しており、飼育成績は魚油の添加量によって決められていた。

・綿実油単独添加区は魚油添加区より飼料のタンパク質、脂質、灰分共に魚体蓄積率が低く、これが飼育成績に反映されたものと思われる。シロザケ用飼料の油脂源として綿実油は魚油より劣ると判断した。

・魚体成分変化の主因をなすのは脂質で、脂質の変動に伴って水分、タンパク質、灰分が動いている。魚体の脂質量は飼料に添加される油の種類と量によって決められている。

・綿実油添加区の脂質含量は魚油添加区より少ないものの、油無添加区より可也多かった。飼育成績の面で綿実油はシロザケ用飼料の油脂源として好ましくないが、魚体の脂質含量を増やすにはある程度効果がある。綿実油の添加によっても絶食耐性、絶食からの回復能、海水馴致能を高く出来る可能性が有る。

・飼料脂質の魚体蓄積率が最も高かったのは油無添加区であった。これは魚体の脂質含量は最も少なかったものの、飼料の脂質含量も少ないことによる。また、同区のタンパク質の蓄積率が少ないことから、タンパク質をエネルギー源として利用する割合を多くし、魚体にどうしても必要な脂質を蓄積しているものと思われる。

・油添加区間では魚油の添加量が多い程飼料脂質の魚体蓄積率が高かった。魚油の添加量がある程度脂質の蓄積率を決めているのではないかとと思われる。

## 絶食試験

### 1. 方法

5月2日に飼育試験が終了したので、残りの魚をそのまま絶食試験に用いた。各区の開始時尾数は1290から1294尾で、略同じであった。飼育条件は無給餌である以外は飼育試験と同じである。試験期間は5月2日から6月5日の約1カ月で、絶食による大量死が発生する前に終了した。その間約1週間毎に各区から100尾ず

表6 絶食試験, 回復試験の生残率

試験区	A	B	C	D
<b>絶食試験</b>				
死魚(尾)	44	15	45	38
生残率(%)	95.4	98.4	95.3	96.1
<b>回復試験</b>				
死魚(尾)	22	8	10	12
生残率(%)	96.8	98.9	98.5	98.3
<b>通期</b>				
死魚(尾)	66	23	55	50
生残率(%)	92.3	97.3	93.9	94.5

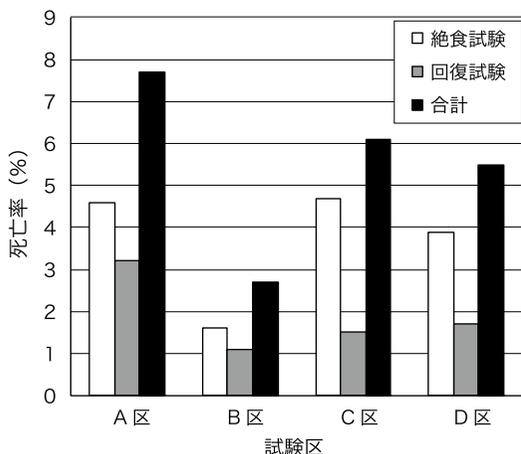


図9 絶食試験と回復試験の死亡率

つサンプリングし, 体重, 尾叉長, 肥満度の変化を調べた。また, 終了時には魚体成分の分析も行った。

## 2. 結果

### 2-1. 死魚数と生残率

絶食中の死魚数と生残率は表6に示す通りである。今回は絶食による大量死を起こす前に試験を終了したので生残率は各区共95%以上と高かったが, その中でも魚油単独添加区(B)が最も高かった。また, 終了時には油無添加区(A)はフラフラして元気の無い魚が多かったので, もう少し絶食期間を長くしていれば大量死を起こしたものと思われる。

これまでの試験で給餌を再開しても約10日程度絶食に起因する斃死が継続することが分

表7 絶食試験中の体重, 尾叉長, 肥満度の変化

試験区	A	B	C	D
<b>体重(g)</b>				
5月2日	1.53	1.57	1.62	1.51
5月9日	1.39	1.53	1.49	1.50
5月16日	1.34	1.45	1.43	1.50
5月22日	1.31	1.35	1.35	1.30
5月29日	1.11	1.37	1.22	1.38
6月5日	1.13	1.29	1.19	1.25
<b>尾叉長(cm)</b>				
5月2日	5.79	5.79	5.87	5.73
5月9日	5.74	5.86	5.82	5.84
5月16日	5.77	5.80	5.81	5.94
5月22日	5.80	5.76	5.78	5.74
5月29日	5.60	5.85	5.70	5.92
6月5日	5.72	5.82	5.73	5.83
<b>肥満度</b>				
5月2日	7.76	7.93	7.80	7.80
5月9日	7.20	7.46	7.28	7.27
5月16日	6.86	7.22	7.05	6.95
5月22日	6.58	6.78	6.76	6.64
5月29日	6.13	6.58	6.34	6.43
6月5日	5.92	6.38	6.18	6.15

かっている。絶食試験後の回復試験での死魚数と生残率も表6に併記した。予想通り回復試験中の死魚数は油無添加区が著しく多く, 油添加区は少なかった。油添加区間では魚油の添加量が多い程死魚数が少なかった。

絶食試験と回復試験を合わせた通期の死魚数と生残率を表6の最下段に, 絶食試験, 回復試験, 通期の死亡率を図9に示した。やはり魚油単独添加区の死魚数が少なく, 生残率が高かった。また, 綿実油添加区も油無添加区より死魚数が少なく, 生残率が高かった。飼育試験終了時の魚体成分から推測した通り, 魚油より劣るものの綿実油にも絶食耐性を高める効果があることがハッキリした。

### 2-2. 肥満度

絶食試験中の体重, 尾叉長, 肥満度の変化を表7に示す。各区共尾叉長に殆ど変化は無く, 絶食中魚は全く成長していない。終了時の肥満度は図10に示す様に魚油単独添加区(B) > 魚油・綿実油等量添加区(C) ≥ 綿実油単独添

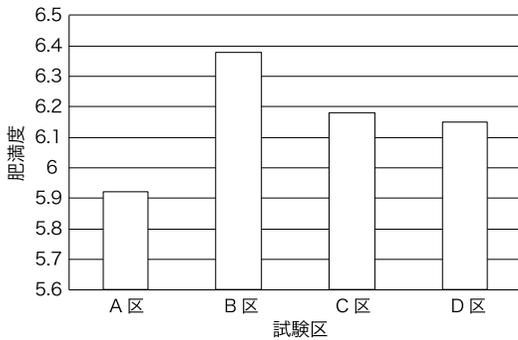


図10 絶食試験後の肥満度

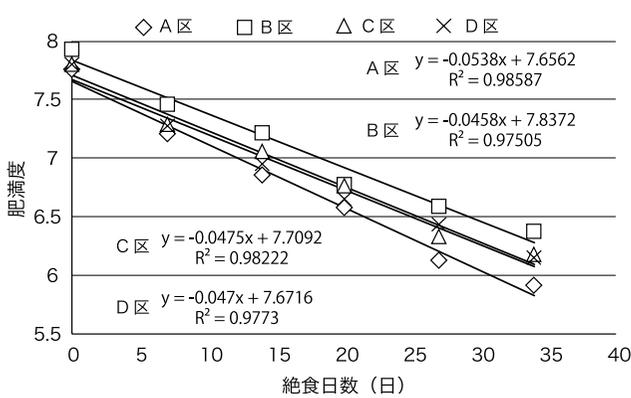


図11 絶食日数と肥満度の関係

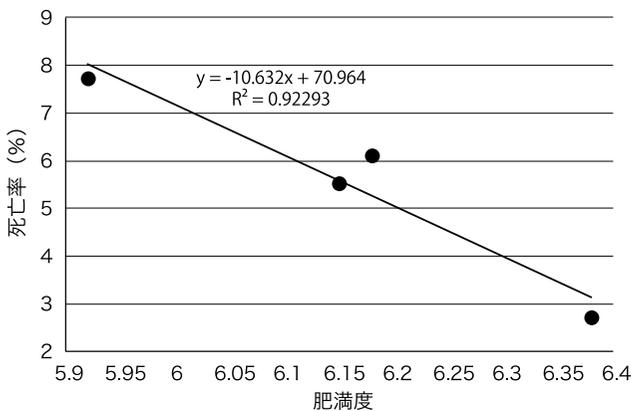


図12 絶食試験終了時肥満度と絶食試験と回復試験を合わせた死亡率

加区 (D) > 油無添加区 (A) の順に高かった。絶食期間中の各区の肥満度の変化を図 11 に示す。各区共肥満度は直線的に減少し、絶食日数と肥満度の間には強い負の相関が認められた。各区の回帰直線の傾きは A 区が  $-0.0538$ 、B 区が  $-0.0458$ 、C 区が  $-0.0475$ 、D 区が  $-0.047$  で、

絶食による肥満度の低下は油無添加区で最も大きく、魚油単独添加区が最も小さかった。この様に綿実油にも魚油より劣るものの肥満度の減少を小さくする効果が有ることが分かった。

絶食による肥満度減少の傾きが区によって違うので、絶食開始時の肥満度で比較するのは不適切と考え、終了時の肥満度と絶食試験と回復試験を合わせた魚の死亡率の関係を図 12 に示す。両者の間には強い負の相関が有り、絶食終

了時の肥満度が高い程死亡率が低いことが分かる。絶食開始時の肥満度が同じであったとしても絶食中の肥満度の減少が少ない魚油単独添加区の死亡率が低いことになる。

### 2-3. 魚体成分

絶食試験前後の魚体成分を表 8 と図 13 に示す。湿物の比較では水分と灰分が増え、タンパク質と脂質が減少していた。増加が大きかったのは水分で、減少が大きかったのは脂質であった。また、脂質の減少が大きい区ほどタンパク質の減少が少なかった。絶食中は脂質をエネルギー源として優先的に利用することによってタンパク質がエネルギー源として利用されるのを防ぎ、生体に大きなダメージを与えないようにしているものと思われる。タンパク質と脂質の単位重量当たりのカロリー量 (タンパク質 4Cal, 脂質 9Cal/g) からして、合理的な対応であると云える。

油添加区の方が絶食中に脂質の減少が大きく、油添加区では魚油添加区 (B, C) の減少が大きく、綿実油単独添加区 (D) の減少は少なかった。この順番は絶食開始時の魚体の脂質含量が多い順番と一致しており、魚体に脂質が多い魚ほど絶食時に脂質をエネルギー源として用いることを示している。

絶食中の魚 100 尾当たりの体成分の減少量と

表 8 絶食試験中の体成分変化

試験区	A			B		
	開始時	終了時	差	開始時	終了時	差
水分 (%)	79.2	83.5	+4.3	77.4	81.3	+3.9
タンパク質	15.4	13.9	-1.5	15.3	14.4	-0.9
脂質	3.3	1.1	-2.2	5.6	2.5	-3.1
灰分	1.9	2.4	+0.5	1.9	2.3	+0.4
タンパク質 (% 乾物)	74.0	84.2	+10.2	67.7	77.0	+9.3
脂質	15.9	6.67	-9.23	24.8	13.4	-11.4
灰分	9.13	14.5	+5.37	8.41	12.3	+3.89

試験区	C			D		
	開始時	終了時	差	開始時	終了時	差
水分 (%)	77.7	82.0	+4.3	78.0	82.3	+4.3
タンパク質	15.3	14.3	-1.0	15.3	14.3	-1.0
脂質	5.1	2.0	-3.1	5.0	2.2	-2.8
灰分	1.9	2.4	+0.5	1.9	2.3	+0.4
タンパク質 (% 乾物)	68.6	79.4	+10.8	69.5	80.8	+11.3
脂質	22.9	11.1	-11.8	22.7	12.4	-10.0
灰分	8.52	13.3	+4.78	8.64	13.0	+4.36

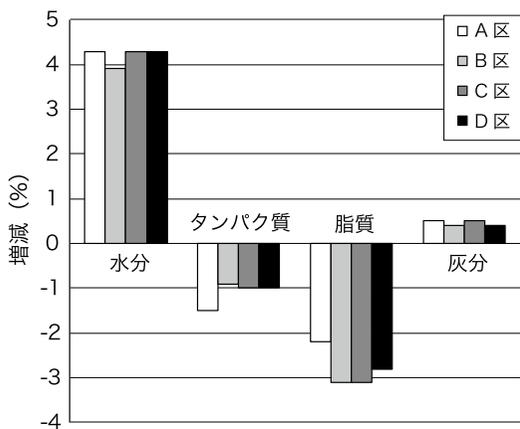


図 13 絶食試験前後の体成分含量の変化

減少率を表9に示す。この結果によって絶食中にどの成分の減少が最も大きいか分かる。各区共減少量が最も大きいのは水分で、次いでタンパク質、脂質の順で、灰分は殆ど減少していなかった。一方、減少率が最も大きいのは脂質で、次いでタンパク質、水分の順であった。

絶食開始時と終了時の総体重の減少量と体成分分析による各成分の減少量を合わせた値は略一致しているので、夫々の数値に問題は無いと考える。ところが絶食開始時と終了時の尾叉長差を見ると、A区-0.07cm、B区+0.03cm、C

表 9 絶食試験中の体成分の減少量と減少率

試験区	A	B	C	D
総重量 /100尾				
開始時	153.19	157.22	162.35	151.10
終了時	113.22	128.67	119.44	124.79
減少量 (g)	39.97	28.55	42.86	26.31
減少率 (%)	26.1	18.2	26.4	17.4
水分				
減少量 (g)	26.8	17.1	28.2	15.2
減少率 (%)	22.1	14.1	22.4	12.9
タンパク質				
減少量 (g)	7.9	5.6	7.7	5.3
減少率 (%)	33.5	23.2	31.0	22.9
脂質				
減少量 (g)	3.81	5.58	5.89	4.81
減少率 (%)	75.3	63.4	71.1	63.6
灰分				
減少量 (g)	0.19	0.03	0.21	0.00
減少率 (%)	6.53	1.00	6.82	0.00

区-0.14cm、D区+0.10cmと可也違いが大きかった。よって、C区は減少量、減少率共に大きく出、D区は小さく出ている可能性が高い。この点を補正して考えると、以下の事が云える。

絶食による総重量の減少は飼料への油添加によって少なく出来、特に魚油の添加による効果大きい。また、魚体に脂質が多い魚は絶食時にエネルギー源として脂質を消費する率が高

く、脂質が少ない魚はタンパク質を消費する率が高い。これが絶食耐性の強弱に反映されるので、魚油添加区の絶食耐性が高いのであろう。

### 3. 要約

・絶食に起因する大量死が起こる前に試験を終了したので生残率は各区共 95% 以上であったが、魚油単独添加区の死魚数が他区より著しく少なかった。

・絶食試験と回復試験を合わせた死魚数は魚油単独添加区が少なく、生残率が高かった。綿実油単独添加区も油無添加区より死魚数は少なく、綿実油にも絶食耐性を高める効果が認められた。

・絶食試験終了時の肥満度は魚油単独添加区 > 魚油・綿実油等量添加区  $\geq$  綿実油単独添加区 > 油無添加区の順に大きく、飼料への魚油の添加が絶食時の肥満度の減少を小さくしていた。また、魚油より劣るものの綿実油も肥満度の減少を小さくする効果を有していた。

・絶食によって肥満度は日数と共に直線的に減少し、直線の傾きは上記とは逆の順に大きかった。絶食開始時の魚の状態によって肥満度の減少率が異なることが分かった。

・絶食終了時の肥満度が大きい程絶食中の死魚数が少なかった。

・絶食によって体成分では水分と灰分の占める割合が増え、タンパク質と脂質の占める割合が減少した。

・絶食による魚 100 尾当たりの体成分の減少量と減少率を調べたところ、減少量が最も大きかったのは水分で、次いでタンパク質、脂質の順であった。灰分は殆ど減少していなかった。一方、減少率が最も大きかったのは脂質で、次いでタンパク質、水分の順であった。

・魚体に脂質が多い魚は絶食時にエネルギー源として脂質を消費する割合が高く、

脂質が少ない魚はタンパク質を消費する割合が高かった。

## 回復試験

### 1. 方法

絶食試験終了時に海水馴致試験用に各区から 30 尾ずつサンプリングし、残りの魚をそのまま回復試験に用いた。絶食からの回復能力を直接比較出来るように各区共同飼料を与えることにし、魚油単独添加飼料（飼育試験の B 区飼料）を用いた。消化管に急に大きな負担を与えないように回復試験開始後 3 日間は与える飼料の量を少なくしたが、4 日目からは普通の量を与えた。試験期間は 6 月 5 日から 6 月 21 日で、その間 6 月 13 日と 6 月 21 日に各区から 100 尾ずつサンプリングして体重と尾叉長を測定し、肥満度を求めた。6 月 21 日の魚はそのまま魚体成分の分析に供した。

### 2. 結果

#### 2-1. 回復状態

結果を表 10 に示す。各区共同飼料を与えたにも拘らず生残率は飼育試験で油添加飼料を与えた区の方が高かった。油添加区間では魚油単独添加区 (B) > 魚油・綿実油等量添加区 (C) > 綿実油単独添加区 (D) の順で、魚油の添加量が多い区ほど生残率が高かった。回復試験中の死魚数は絶食試験終了時の魚の衰弱状態をそのまま反映しているものと思われる。

増重量、飼料効率、タンパク質効率は魚油・

表 10 回復試験の結果

試験区	A	B	C	D
生残率 (%)	96.8	98.9	98.5	98.3
増重量 (g)	291.0	284.1	367.6	253.4
給餌量 (g)	285	285	285	285
飼料効率 (%)	102.1	99.7	129.0	88.9
タンパク質効率 (%)	207.9	217.2	281.0	193.7

表 11 回復試験中の体重, 尾叉長, 肥満度の変化

試験区	A	B	C	D
<b>体重 (g)</b>				
6月5日	1.13	1.29	1.19	1.25
6月13日	1.33	1.43	1.47	1.37
6月21日	1.58	1.71	1.75	1.64
増加	0.45	0.42	0.56	0.39
<b>尾叉長 (cm)</b>				
6月5日	5.72	5.82	5.73	5.83
6月13日	5.89	5.90	6.00	5.92
6月21日	6.08	6.11	6.20	6.12
増加	0.36	0.29	0.47	0.29
<b>肥満度</b>				
6月5日	5.92	6.38	6.18	6.15
6月13日	6.38	6.74	6.60	6.41
6月21日	6.82	7.20	7.08	6.94
増加	0.90	0.82	0.90	0.79

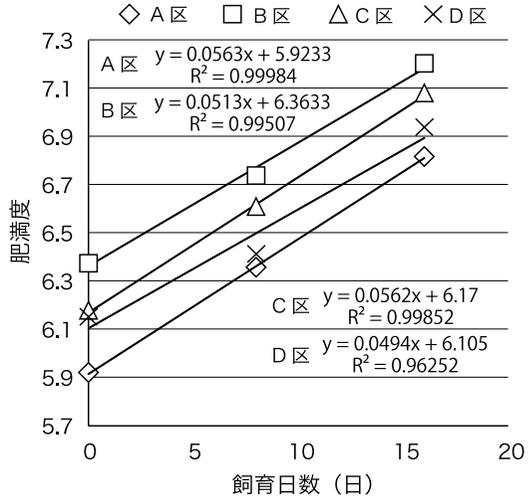


図 14 回復試験中の肥満度の変化

綿実油等量添加区 (C) が著しく高く、理屈に合わない結果を示した。この原因を調べたところ、6月5日のサンプリング魚がグループの平均値より小さかったのに、6月13日と6月21日のサンプリング魚が大きかった可能性が高いことが分かった。この為同区は増重量が著しく大きく出、その結果として飼料効率とタンパク質効率も高い値を示したものと推測出来る。C区の値を除いて考えると、絶食による衰弱が大きかった区ほど回復が急で、増重量、飼料効率、タンパク質効率が高くなるものと思われる。衰弱が大きいいほど急速に回復を図らなければならないことと、これまで不足していた栄養成分(脂質)を与えられるようになったことで著しく飼育成績が改善されたのであろう。

## 2-2. 魚体測定

回復試験中の体重, 尾叉長及び肥満度の変化を表 11 に示す。C区の魚の尾叉長を見ると前述した様に他区と比較して6月5日は小さく、6月13日と6月21日は大きいことが分かる。但し、肥満度は正常な値を示していた。

回復試験中の肥満度の変化を図 14 に示す。飼育日数と肥満度の間には強い正の相関が認め

られる。綿実油単独添加区 (D) は理由は不明であるが測定毎のバラツキが大きいので除いて考えると、油無添加区 (A) の直線の傾きは 0.0563、魚油単独添加区 (B) は 0.0513、魚油・綿実油等量添加区 (C) は 0.0562 と絶食期間中の衰弱が大きかった区ほど回復が急速である。

## 2-3. 魚体成分

回復試験開始時と終了時の魚体成分の変化を表 12 に示す。各区共タンパク質と脂質が増え、水分が減少している。灰分は殆ど変化していない。増減が最も大きいのは水分で、次いで脂質、タンパク質の順であった。絶食中魚の衰弱程度が大きかった区ほど再給餌による脂質の増加が大きい傾向が認められる。なお、C区の値は前述した理由によって脂質の増加が多く出過ぎている可能性が高い。

回復試験前後の体成分の変化率を図 15 に示す。各区共水分の減少と脂質の増加が最も大きかった。水分と脂質、脂質とタンパク質の間には負の相関が有るので脂質の増加が著しい区は水分の減少が大きく、タンパク質の増加が小さくなるはずである。多少のバラツキは有るものの、その通りの結果になっている。

絶食試験終了時に脂質が最も少なかった油無

表 12 回復試験中の体成分変化

試験区	A			B		
	開始時	終了時	差	開始時	終了時	差
水分 (%)	83.5	80.8	-2.7	81.3	79.9	-1.4
タンパク質	13.9	14.0	+0.1	14.4	14.6	+0.2
脂質	1.1	2.9	+1.8	2.5	3.3	+0.8
灰分	2.4	2.3	-0.1	2.3	2.3	0.0
タンパク質 (% 乾物)	84.2	72.9	-11.3	77.0	72.6	-4.4
脂質	6.67	15.1	+8.43	13.4	16.4	+3.0
灰分	14.5	12.0	-2.5	12.3	11.4	-0.9
試験区	C			D		
	開始時	終了時	差	開始時	終了時	差
水分 (%)	82.0	80.2	-1.8	82.3	80.5	-1.8
タンパク質	14.3	14.4	+0.1	14.3	14.4	+0.1
脂質	2.0	3.2	+1.2	2.2	2.9	+0.7
灰分	2.4	2.2	-0.2	2.3	2.3	0.0
タンパク質 (% 乾物)	79.4	72.7	-6.7	80.8	73.8	-7.0
脂質	11.1	16.2	+5.1	12.4	14.9	+2.5
灰分	13.3	11.1	-2.2	13.0	11.8	-1.2

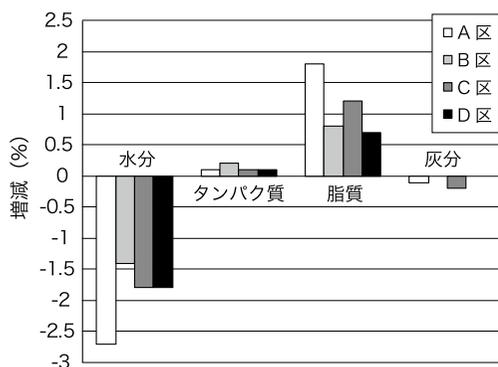


図 15 回復試験前後の体成分含量の変化

添加区 (A) の脂質の増加と水分の減少が最も大きく、タンパク質の増加は小さかった。絶食試験終了時に最も脂質が多かった魚油単独添加区 (B) は逆の傾向を示し、魚油・綿実油等量添加区 (C) と綿実油単独添加区 (D) はその中間の値を示した。

回復試験による各区の増重量と各成分の増加量、増加率を示したのが表 13 である。開始時と終了時のサンプル魚の尾又長差は A 区 0.36 cm, B 区 0.29cm, C 区 0.47cm, D 区 0.29cm なので、A 区と C 区、特に C 区は増加量と増加率が高く出ている可能性が高い。

表 13 回復試験中の体成分の増加量と増加率

試験区	A	B	C	D
総重量 (g/100 尾)				
開始時	113.22	128.67	119.44	124.79
終了時	157.91	170.53	175.12	163.63
増重量 (g)	44.69	41.86	55.68	38.84
増重量率 (%)	39.5	32.5	46.6	31.1
水分				
増加量 (g/100 尾)	33.1	31.7	42.5	29.0
増加率 (%)	35.0	30.3	43.4	28.2
タンパク質				
増加量 (g/100 尾)	6.4	6.4	8.1	5.8
増加率 (%)	40.8	34.6	47.4	32.6
脂質				
増加量 (g/100 尾)	3.33	2.40	3.21	2.00
増加率 (%)	266.4	74.5	134.3	72.7
灰分				
増加量 (g/100 尾)	1.58	1.02	0.98	0.89
増加率 (%)	58.1	34.5	34.1	31.0

バラツキが大きいので断言は出来ないが、油無添加区の水分、脂質、灰分の増加が油添加区より大きく、特に脂質の増加が大きい傾向が有るように思える。油無添加飼料で飼育された後絶食させられ、魚体に脂質が著しく不足している状態になっているところへ回復試験で魚油添加飼料を与えられたので、不足していた脂質を優先的に蓄積したのではないかと考えられる。灰分の増加は魚の成長に伴うものと思われる。

が、灰分の消化・吸収と蓄積に脂質が関与している可能性も考えられるので、今後検討しなければならない。

油添加区間の比較では、水分、タンパク質、脂質、灰分共に魚油単独添加区 (B) > 魚油・綿実油等量添加区 (C) > 綿実油単独添加区 (D) の順に増加が大きく、飼育試験で魚油の添加量が多かった区ほど絶食後の回復もスムーズであるように思える。

回復試験の結果からも綿実油はシロザケ用飼料の油脂源として魚油より劣ると判断出来る。

### 3. 要約

・各区同じ飼料を与えたにも拘らず、生残率は魚油単独添加区 > 魚油・綿実油等量添加区 > 綿実油単独添加区 > 油無添加区の順に高かった。この結果から、回復試験中の死魚数は絶食試験終了時の魚の衰弱状態を反映しているものと考えられる。

・飼育試験に魚油の添加量が多い区ほど生残率が高く、シロザケ用飼料の油脂源としては綿実油より魚油の方が適していると判断した。

・絶食による衰弱が大きかった区ほど再給餌による増重量、飼料効率、タンパク質効率の増加が急速である傾向が認められ、この結果は肥満度の変化にも反映されていた。また、再給餌による脂質の増加でも同じ傾向が認められた。

・絶食後の再給餌によって魚体のタンパク質と脂質が占める割合が増え、水分の占める割合が減少する。灰分は殆ど変化しなかった。増減が最も大きいのは水分で、次いで脂質、タンパク質の順であった。

・絶食後の再給餌によって油無添加区の水分、脂質、灰分の増加が油添加区より大きく、特に脂質の増加が大きかった。タンパク質に他区との違いは無かった。

・魚油の添加量が多い飼料で飼育した魚ほど絶食後の回復能が強いように思えた。

## 海水馴致試験

### 1. 方法

絶食試験終了時と回復試験終了時に各区から30尾ずつサンプリングし、海水馴致試験に供した。海水は天然海水を用い、各区10Lとした。供試魚は淡水から直接海水に移し、水温9℃、止水・通気状態で7日間飼育した。なお、海水は毎日半量ずつ交換した。試験中に死亡した魚の数と体重、尾叉長は記録した。馴致試験終了時まで生き残っていた魚は全て同じ方法で魚体測定を行った。

回復試験後の供試魚は3日間一尾も死亡せずに元気で、死にそうに思える魚は認められなかったため、3日で試験を中止した。生残魚の魚体測定は行わなかった。

### 2. 結果

絶食試験終了時の海水馴致試験の結果を表14に示す。死魚数は油無添加区が最も多く、他区より大きな魚(体重と尾叉長が大きい魚)も死んでいた。肥満度は他区より小さかった。

死魚、生残魚それぞれの尾叉長と肥満度の関係を図16に示す。各区共成長が遅く(尾叉長が小さい)、肥満度が小さい魚が死ぬ傾向が認められるが、特にグループ内の小さい魚が死亡

表14 海水馴致試験の生残魚と死亡魚(絶食試験後)

試験区	A	B	C	D
<b>生残魚</b>				
尾数	19	25	21	27
生残率 (%)	63.3	83.2	70.0	90.0
体重 (g)	1.24	1.26	1.46	1.31
尾叉長 (cm)	5.90	5.82	6.10	5.87
肥満度	5.97	6.24	6.36	6.23
<b>死魚</b>				
尾数	11	5	9	3
死亡率 (%)	36.7	16.7	30.0	10.0
体重 (g)	0.82	0.78	0.78	0.73
尾叉長 (cm)	5.31	5.01	5.13	4.97
肥満度	5.24	6.18	5.79	6.02

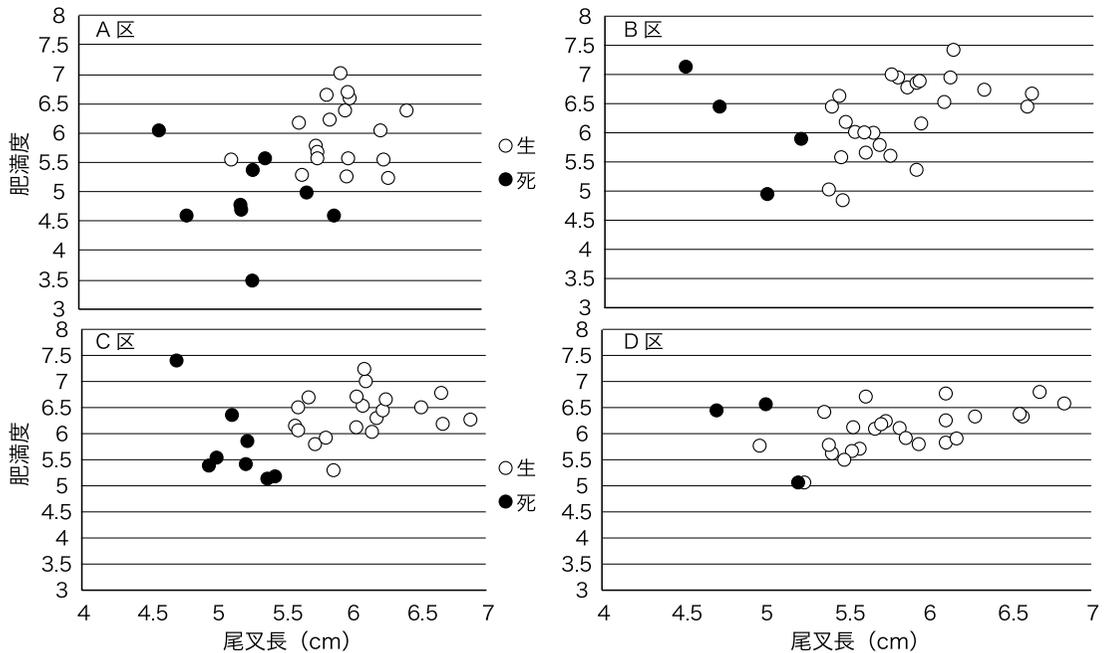


図 16 海水馴到試験での死魚と生残魚の違い

している点が共通していた。油無添加区と添加区では死亡する魚の大きさが違っていた。無添加区では尾叉長が6cm以下で肥満度が小さい魚、添加区では尾叉長が5.5cm以下の魚が肥満度に拘らず死亡する可能性が高い様である。

回復試験終了時の魚は海水馴致試験で一尾も死亡せず、全て海水に馴致した。回復試験終了時の魚体測定と魚体成分の分析結果から、平均尾叉長6.08cm、肥満度6.82、脂質含量2.9% (15.1% 乾物) 以上の魚であれば問題無く海水に移行出来るものと考ええる。

## 考 察

今回の試験結果では、綿実油に増重量、飼料効率、タンパク質効率等の飼育成績を改善する効果は無かった。ところが魚体の脂質含量を増やし、絶食耐性、絶食からの回復能、海水馴致能を高める作用は魚油より弱いものの認められた。この一見矛盾する結果をどう考えれば良い

のであろうか。

シロザケの必須脂肪酸については竹内ら<sup>10)</sup>が「シロザケ稚魚は必須脂肪酸欠乏に著しく敏感な魚で、必須脂肪酸としてリノール酸(18:2n6)、リノレン酸(18:3n3)、n3系高度不飽和脂肪酸(n3HUFA)の何れにも効果が有り、成長促進効果はn3HUFA>18:3n3>18:2n6である。また、最大成長に必要なそれぞれの要求量は18:2n6と18:3n3は約1%、n3HUFAであれば0.5-1.0%と推定される。」と報告している。

綿実油の18:2n6の組成比は54%である。綿実油単独添加区はこれを7%外割で添加したのであるから、3.8%程度の18:2n6を飼料に添加したことになる。更に、配合飼料には原料に由来する18:2n6も可也の量含まれている。一方、綿実油には18:3n3は0.3%しか含まれていないので、0.02%しか添加されておらず、原料由来の18:3n3も殆ど含まれていない。綿実油にはn3HUFAは全く含まれていないので、原料の魚粉に由来するn3HUFAが飼料に含まれている

だけである。

この様に綿実油添加区はn3系脂肪酸の不足ならびにn6系脂肪酸とn3系脂肪酸のバランスの不良によって飼育成績の改善が認められなかったのであろう。

綿実油も消化・吸収されて蓄積され、魚体の脂質含量を高くする。絶食耐性、絶食からの回復能、海水馴致能等は魚体の脂質含量が高い魚の方が強いことが分かっている。これが綿実油添加区で一見矛盾する結果が出る理由であろう。

シロザケ用飼料の油脂源として綿実油が魚油より劣るのは、シロザケは必須脂肪酸欠乏に著しく敏感であると言う魚種特異性と、魚油と綿実油の脂肪酸組成の違いによるところが大きい

のであろう。また、大豆油との違いもシロザケとニジマスと云う魚種の違いと18:3n3含量の違いによるのであろう。

魚油を中心に複数の油脂を混合するのは、魚油単独よりも飼育成績他が可也改善されることや、コストが大幅に安くなることを期待するものである。綿実油の場合にはこの二つとも期待出来ない。わざわざ魚油に綿実油を混合する必要は無いと考える。

#### 謝辞

本試験の結果を取り纏めるに当たり阿部信行氏に大変お世話になりました。記して感謝の意を表します。

#### ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 文 献 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・

- 1) 酒本秀一, 大橋勝彦: 飼料の違いがシロザケ稚魚に与える影響. *New Food Industry*. **54** (2), 41-48 (2012)
- 2) 酒本秀一, 大橋勝彦: シロザケ飼料の魚油添加効果 -1. *New Food Industry*. **54** (3), 49-58 (2012)
- 3) 酒本秀一, 大橋勝彦: シロザケ飼料の魚油添加効果 -2. *New Food Industry*. **54** (4), 28-38 (2012)
- 4) 酒本秀一, 大橋勝彦: シロザケ飼料の魚油添加効果 -3. *New Food Industry*. **54** (5), 41-49 (2012)
- 5) 秋山敏男, 八木沢功, 能勢健嗣: 放流用シロザケ稚魚飼料の改善に関する研究 - VI. 飼料中への牛脂の添加効果. さけ別枠 1979 河川型研究グループレポート, 133-140 (1980)
- 6) 能勢健嗣, 村井武四, 秋山敏男: シロザケ放流種苗の栄養特性 -5ヶ年の研究のとりまとめ -. さけ別枠 1981 河川型研究グループレポート, 189-204 (1982)
- 7) 酒本秀一: ニジマス用飼料の油脂源 -1. *New Food Industry*. 投稿中
- 8) 酒本秀一: ニジマス用飼料の油脂源 -2. *New Food Industry*. 投稿中
- 9) 五訂増補日本食品標準成分表 II. 脂肪酸成分表編 (安本教傳, 渡邊智子, 安井明美, 西牟田守, 竹内昌昭 編), 第一出版, 東京, 130 (2007)
- 10) 竹内俊郎, 渡邊武, 能勢健嗣: 淡水期間中におけるシロザケの必須脂肪酸. 日本水産学会誌, **45** (10), 127-131 (1979)

# “インスタントカレー市場”を創造した驚くべきヒット商品

## — 『バーモントカレー』ハウス食品株式会社 —

田形 暁作\*

\*TAGATA Yoshinari (TAGATA 食品企画・開発)

---

Key Words: インスタントカレー・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

ハウス食品株式会社は1913年（大正2年）に創業者浦上靖介が、大阪市松屋町筋に薬種化学原料店「浦上商店」を創業。当時の主な扱ひ品目は肉桂、大黃などの和漢薬品であった。その他、ソースの原料である唐辛子、山椒、クミン、セージなども扱っていた。会社が軌道に乗ってきた1921年（大正10年）に、得意先からカレー粉の販売を委託された。これが後のハウス食品とカレーとの出会いである。これを機にカレー粉の研究に没頭した。1926年（大正15年）には懇意にしていた会社の社長から自社の「ホームカレー粉」の製造・販売部門を買い取って欲しいという依頼があり、熟慮の末、多額の借金をして、営業権や工場などの譲受を決断した。早速、オリジナルの粉末即席カレーを研究開発し、販売を開始した。これが、ハウス食品のカレーの誕生である。

1928年（昭和3年）、それまで使用していた「ホームカレー」のブランドに商標権の問題が持ち上がった。この時、「ホーム」がだめなら「ハウス」にしようと考えた。「ハウス」のほうが歯切れがよく、明るい響きを持っていると判断した。「ハウス」の名前はこのようにして誕生した。ハウス食品は1963年（昭和38年）に”

リングとハチミツとろ〜りとけてる”でおなじみの『バーモントカレー』を発売し、大ヒットした。今年が発売して50年目にあたる。日本のインスタントカレー市場を創造し、牽引してきた。

### 1. ハウス食品の会社概況

2012年3月期の売上高は2,143億円、営業利益141億円であった。資本金は99億4800万円、従業員は4,450名である。また、連結子会社は19社あり、米国の他、アジア圏にも進出している。業務はカレーの他にスパイス、デザート、レトルト食品、シチューなどのコンビニエンス食品、ラーメン、スナック、ドリンクなど幅広い分野で商品を開発し参入している。

### 2. ハウス食品の企業理念とコーポレートメッセージ

企業理念は「食を通じて、家庭の幸せに役立つ」である。また、コーポレートメッセージは「おいしさとやすらぎを」である。おいしいものを食べると、何だかホッとあたたかい気持ちになる。食べることは、栄養をとるだけじゃない。ココロまで豊かになることだとハウスは思

う。だからこそハウス食品の製品は、いつもおいしくありたい。安心できるものでありたい。誰でも作れるものでありたい。そして新しい発

見に満ちていたい。これまでも、そしてこれからも。

### 3. ハウス食品の歩み

- 1913年（大正 2年） 創業者浦上靖介、弱冠 21歳で大阪市松屋町に薬種化学原料店「浦上商店」を創業。  
1921年（大正 10年） カレー粉の販売開始。  
1926年（大正 15年） 「ホームカレー」の稲田商店を吸収し、自社工場で即席カレー（ホームカレー）の製造を始める。  
1928年（昭和 3年） 「ホームカレー」を「ハウスカレー」にブランド名を改称。



- 1947年（昭和 22年） 株式会社組織に改め、社名を「株式会社浦上糧食工業所」とする。  
1949年（昭和 24年） 社名を「株式会社ハウスカレー浦上商店」と改める。  
1951年（昭和 26年） ラジオ CM を開始。  
1954年（昭和 29年） 東京に営業所を設置（現、東京支店）。  
1955年（昭和 30年） 名古屋に営業所を設置（現、名古屋支店）。  
1956年（昭和 31年） 福岡に営業所を設置（現、福岡支店）。  
1957年（昭和 32年） 札幌に営業所を設置（現、札幌支店）。  
1959年（昭和 34年） 広島に営業所を設置（現、中国支店）。大阪に即席カレールウの新工場竣工。  
1960年（昭和 35年） 社名を「ハウス食品工業株式会社」と改める。同社で初めての固型ルウタイプカレー「印度カレー」を発売。浦上靖介社長の次男郁夫入社。



- 1961年（昭和 36年） 研究室を新設。  
1962年（昭和 37年） 本社新社屋完成（現、東大阪市）  
1963年（昭和 38年） 『バーモントカレー』を発売。テレビ CM にも登場し、爆発的ヒット商品となる。



1964年(昭和39年)	仙台に営業所を設置(現、仙台支店)「プリンミクス」を発売。
1965年(昭和40年)	本社営業部を大阪営業部に改称(現、大阪支店)。
1966年(昭和41年)	浦上靖介社長逝去。会長に浦上靖代、社長に浦上郁夫就任。奈良工場竣工(奈良県大和郡山市)「シチューミクス」を発売。
1969年(昭和44年)	高松に営業所を設置(旧、高松支店。現、中国支店に統合)。
1970年(昭和45年)	テクノロジーセンター(現、ソマテックセンター)、イデアックセンター(研修所)完成。関東工場竣工(栃木県佐野市)。「ククレシチュー」を発売。
1971年(昭和46年)	東京・大阪両証券取引所市場第二部に株式上場。「ククレカレー」を発売。
1972年(昭和47年)	名古屋証券取引所市場第二部に株式上場。
1973年(昭和48年)	東京・大阪、名古屋証券取引所市場第1部に株式上場。「シャンメンしょうゆ味」を発売し、ラーメン業界に参入。
1974年(昭和49年)	東京本部を設置(現、東京支店)。「ねりわさび」を発売。
1976年(昭和51年)	福岡工場竣工(現、古賀市)「フルーチェ」を発売。
1977年(昭和52年)	米国ゼネラルミルズ社との技術提携により「ポテトチップス」を発売し、スナック食品分野に参入。
1978年(昭和53年)	「とんがりコーン」を発売。
1979年(昭和54年)	「うまかっちゃん」を発売。
1980年(昭和55年)	”楽しい家庭料理の世界をひろげるハウス食品”を新しいスローガンに、社のマーク及びロゴタイプを一新。売上高1,000億円突破。
1983年(昭和58年)	「六甲のおいしい水」発売。飲料業界に進出。東京ディズニーランドに企業参加。「カレーマルシェ」を発売。
1985年(昭和60年)	電子レンジ専用食品「レンジグルメ」を発売。
1990年(平成2年)	「オー・ザック」を発売。
1993年(平成5年)	社名を「ハウス食品株式会社」と改める。
1995年(平成7年)	「冷しゃぶドレッシング」を発売。
1996年(平成8年)	「こくまるカレー」「北海道シチュー」を発売。
2004年(平成16年)	「ウコンの力」発売。
2006年(平成18年)	通販部設立「活性ウコン」販売開始。「北海道ホワイトカレー」発売。
2008年(平成20年)	「カレー鍋つゆ」発売。
2009年(平成21年)	「めざめるカラダ朝カレー」発売。
2011年(平成23年)	「のっけてジュレ」「温めずにおいしいカレー」「唐辛子の力」発売。

#### 4. 創業～ハウスパーモントカレー誕生まで

##### 4-1. 1913年(大正2年)～1922年(大正11年)

##### ●創業者浦上靖介、21歳で独立・創業。

創業者の靖介は明治25年、徳島の士族の家に五人兄弟の末っ子として生まれた。明治35年、満10歳の時に、すでに大阪市東区で薬種原料店を営んでいた兄(当時22歳)を頼り、奉公に出ることを決意。翌年、船場の薬種問屋・河村伊之助商店に移り、10年間にわたる丁稚奉公で大阪商人としての心構えや商売の基礎を

みっちり仕込まれた。そして、大正2年、21歳の秋に独立を決め、薬種化学原料店「浦上商店」を松屋町筋に開業した。取扱品目は、肉桂、大黃、千振、白南天などの和漢薬品で、のちに、丁字、桂皮、唐辛子、セージといったソース原料や松脂粉末、アラビア糊、硫酸、炭酸などの工業薬品類も扱った。独立後は「商売は信用が第一。信用こそ資本であり、商人の命である」と堅く心に誓い、わき目も振らずに働いた。靖介を陰で支えたのが、大正3年に結婚した6つ年下の靖代夫人であった。靖介は商売のため各地を飛び回って留守がちで、特に販路拡大のた

めに台湾にまで出かけるようになって、月のうち10日くらいしか家にいなかった。

4-2. 1923年(大正12年)～1932年(昭和7年)

●「ハウスカレー」誕生。カレーの製造・販売が事業の中心に

「ホームカレー」の営業権譲り受け、カレーの本格的製造と販売に乗り出す。

大正10年頃、浦上商店はお得意先からビン詰の「カレー粉」の販売を委託された。これを機に、本格的にカレー粉の研究に没頭し始めた。河村商店に奉公していた頃から、鋭い臭覚の持ち主として主人も一目をおくほどで、漢方薬の配合には重宝がされていた。カレー粉の香に取りつかれ、原料の配合を変えてみたり、日本人の好みにあった香辛料を選んだり、試行錯誤を繰り返しながら研究を続けていた。

1926年(大正15年)のある日、稲田食品製造所の稲田社長が浦上商店を訪ねてきた。「ホームカレー」という会社を引き受けてくれないかという話であった。稲田社長は会社を譲りたいと思ったのである。靖介は非常に心を動かされた。カレーがすぐれた調味食品であり、応用範囲がひろいことを当時すでに見出していた。もっと改良すれば、日本中の家庭に普及するのではという思いがあった。その一方で、カレーを本格的に販売するには、市場も未成熟でリスクが大きすぎると感じていた。悩んだ靖介は靖代夫人に相談した。「やりなはれ、夫婦が力を合わせたら実らんわけはあらしまへん」そう言い切る夫人の言葉に後押しされ、「ホームカレー」の製造・販売に乗り出す決心をした。

営業権や小阪工場などの譲り受け金額は4,000円。手持ちの資金の2,400円を内金で支払い、残金はその後3年がかりで完済した。研究成果を活かしてオリジナルの粉末即席カレーが誕生したのは1926年(大正15年)の

秋であった。

歯切れの良い語調、明るい響き。商標を「ハウスカレー」に変更



即席カレーの売り込みに京阪神、中四国、九州を丹念に回った。しかし、売れ行きは芳しくなかった。何度も挫折しそうなになったが、辛抱強く配合や製法の改良をくり返した。努力が実って売り上げが伸び始めた矢先、使用していたブランド「ホームカレー」に商標権の問題が持ち上がった。争い事を好まないの、あっさりと商標権を譲り、新ブランドを作ることにした。夫人は「日本には”ホーム”の概念はあらしまへん。“ハウス”だす」と提言。歯切れの良い活気ある語調、明るい響きに「これこそ日本人にぴったりの商標である」と確信。こうして、1928年(昭和3年)新商標、家のマークの「ハウスカレー」が誕生したのである。

カレーを店頭で調理、試食販売する食品業界初の実演宣伝員を派遣

「カレーって何?食べられるの?」といった具合に、カレーを食べたことがない人が多かった。売り上げを伸ばす効果的な方法を考えて続いていた時、夫人が「調理法が簡単なことと、そのおいしさを実際に知ってもらうのが一番」と提案。食品業界初の試みである”店頭実演宣伝販売”1928年(昭和3年)に開始した。女性の実演宣伝員を小売店の店頭で派遣、お客様の目の前で調理し、試食してもらった。現代で言う”デモンストレーター”である。こうして、斬新な方法と地道な努力は、予想以上の話題を集めた。

「ハウスカレー」の名前を広めるべく、新聞広告などの宣伝を積極的に活用

1931年（昭和6年）、初めての新聞広告を朝日新聞に掲載、以後も継続して各新聞に広告を出した。また、当時まだ珍しかった宝塚歌劇団の観劇や自転車、集金袋、前掛けなどの景品付き特売も実施した。他にも、市電の車内広告など、あらゆる広告手段を積極的に利用。その結果、「ハウス」の名前はしだいに世の中に浸透していった。

#### 4-3. 1933年(昭和8年)～1942年(昭和17年)

●事業基盤の安定を機に会社組織に変更。従業員の福利厚生も充実

春と秋には慰安会。  
正月には全員で祝いの膳を囲む

社員の給料は月額3円(昭和3年当時)ほどで、そのうち半額を天引き貯金をして、食事は店で用意してくれたので生活には不自由しなかった。休日は月2回、第1・第3日曜日。この日は工場で働く者も松屋町筋の店に集まり、一緒に昼食をすませてから遊びに行くのが習わしであった。この昼食はあらかじめ夫人が一人一人の希望を聞いておき、肉・魚料理、シチューなど、それぞれの好みの食事を用意した。春と秋には「慰安会」（社員旅行）が行われた。

順調に成長していた浦上商店。  
やがて直面した戦争の影

「ハウスカレー」の生産が軌道に乗り始め、生産・販売体制が整ってお得意様も安定したことから1934年（昭和9年）5月、個人事業だった「浦上商店」を「合資会社浦上靖介商店」として会社組織に変更、浦上靖介は代表取締役社長に就任した。そして、帳簿を洋式帳に改めて経営を刷新、経験を積んだ外交、經理のベテランを入社させるなど販売面の強化を図った。

拡販活動の範囲は九州や四国、北海道などの

国内はもとより、中国、朝鮮、台湾などの周辺諸国にも及んだ。特に旧満州（中国東北部）は、当時の国策に従って大挙進出していた財閥や商社の需要が旺盛で、やがて最大のお得意先へと成長していった。製造品目も多岐にわたるようになった。純カレー、ハウスカレー、コシヨー、わさびのほか、ハヤシライスの素、ポッポ煮（大豆と海藻の佃煮）、コーヒーやココア、ふりかけなどを次々に発売し、売り上げを大きく伸ばした。そして、1935年（昭和10年）、西区の新社屋に移転した。しかし、戦争の影が近づくにつれ、1941年（昭和16年）に「ハウスカレー」の製造を中止せざるを得なくなった。その後、戦争がはげしくなるにつれて殆どの製品の生産が不可能になり、空襲により店も焼失した。

#### 4-4. 1943年(昭和18年)～1952年(昭和27年)

●即席ハウスカレーの製造を再開。CMや宣伝カーを使い知名度をアップ

空前のラジオブームが到来。  
CMソングを制作し消費者にアピール

第二次世界大戦後の混乱が一段落し、統制されていた食材や物資が出回り始めたことから、1949年（昭和24年）「即席ハウスカレー」の製造を再開した。食品業界はにわかに活気づいてきた。そして、1951年（昭和26年）9月、民間ラジオ局、中部日本放送や新日本放送（現、毎日放送）などが相次いで開局。各家電メーカーもラジオを発売したことから、ラジオは庶民の最大の娯楽として人気を集めた。民放の開局に伴って、ラジオCMが登場した。化粧品、医薬品、電気製品、食品などのメーカーは争ってCMをはじめ、それぞれに大きな効果をあげた。ハウス食品でもいち早くCMソングを制作、1951年（昭和26年）9月の開局と同時に「ハウスカレーの歌」が電波に乗ってお茶の間に流れた。歌は当時の子供達が口ずさむほど流行。「即席ハウスカレー」の売り上げは急速に伸び

始めた。

#### 4-5. 1953年(昭和28年)～1962年(昭和37年)

- 粉末カレーから固型カレーへ。組織も一新して近代経営に乗り出す

関東地区の売り上げ向上を目的に東京営業所を開設

主力製品「即席カレー」は全国で着実に伸びていた。関東地区だけは伸び悩んでいた。その理由は、戦前からのお得意先が戦争によって少なくなったことと、地元の純カレーが主流をしめ、「即席ハウスカレー」の食い込む余地がなかった。そこで1954年(昭和29年)、関東地区を中心に甲信越・東北までを幅広くカバーする拠点として、東京営業所を台東区入谷に開設した。当初の営業所員は所長を含む男性6人と現地採用の女性社員で問屋や小売店を休み返上でセールスに明け暮れた。ここでも、ラジオCMや宣伝カーの効果は大きかった。中でも、店頭での実演販売が評判となった。こういった努力が功を奏し「即席ハウスカレー」の売り上げは順調に向上していった。

初めての固形ルウカレー「印度カレー」の製造を開始

1955年(昭和30年)代に入ると、各家庭にインスタント食品が普及し始めた。「即席ハウスカレー」もこの一連のブームの中で順調に売り上げを伸ばしていった。その一方、東京では固形ルウのカレーが販売され始め、急速に人気が高まっていた。販売店からも固形ルウカレーの製造の要望が相次いだ。しかし、粉末のカレーが大きく伸びているこの時期に、あえてリスクを冒してまで固形カレーの製造に乗り出すことは適切なのか?社長は熟慮を重ねた。けれども、社内からも製造を推す声が強かったこともあり、ついに固形カレー分野への進出を決断した。

この決断を受けて、研究スタッフが早速開発に取り組んだ。これまで粉末カレーで培った技術と、ハウスカレーならではの豊かな風味を生かした固形ルウの開発に成功。東大阪工場内に新工場を建設して量産体制を整えた後、1960年(昭和35年)4月、固形タイプの新製品「印度カレー」を全国一斉に発売した。

その後、カレーメーカーとしての地位を不動のものにすることになる『バーモントカレー』の開発は、この固形ルウカレー「印度カレー」の技術があってこそ実現した。

#### 4-6. 1963年(昭和38年)～1972年(昭和47年)

- 創業精神を受け付きながら第2の創業期に向けて経営基盤を拡充

これまでのカレーの常識をくつがえす『バーモントカレー』の誕生



インスタントカレーの先駆者として、ハウス食品は急成長を続けていた。しかし、「即席ハウスカレー」の成長鈍化、「印度カレー」は主力商品の仲間入りを果たしたばかりで、シェア的には満足すべきものではなかった。その打開策として新しい戦略商品の研究開発が求められた。当時の家庭の食卓では「大人はカレーライス、子供はハヤシライス」と棲み分けができていた。郁夫副社長は「大人も子供も一緒に食べられるマイルドなカレーを」と考えていた。そこで注目したのが「リンゴとハチミツ」である。アメリカ東部にある長寿で有名なバーモント州に伝わる、リンゴ酢とハチミツを使った「バーモント健康法」にヒントを得たものである。マイルドな味がだせるだけでなく、美容と健康にも良いリンゴとハチミツを使い、試作品が次々

と作られていった。まさに、ハウス食品の社運をかけたと言っても過言ではない『バーモントカレー』は研究をスタートしてから1年6か月後の1963年(昭和38年)9月、ついに発売となった。「リンゴとハチミツ」、「美容と健康」をキャッチフレーズに、集中的にテレビCMを流すなど、大々的な宣伝活動を展開し、「ハウスバーモントカレーの歌」も大ヒットした。

創業者・浦上靖介逝去。  
 郁夫新社長に引き継がれる創業精神

1966年(昭和41年)2月15日、ハウス食品の創業者である浦上靖介が逝去した。新社長には副社長の浦上郁夫が選出され、浦上靖介が会長に就任した。弱冠28歳の郁夫新社長は、就任の挨拶で「お客様のことを考えられる社長になりたい」と述べ、同時に「社員とお得意先、そして株主を大切にしたい」と先代社長が掲げた創業精神をしっかりと受け継ぐことを表明した。

## 5. インスタントカレー市場を創造した『バーモントカレー』の商品情報

### ●「商品ラインアップ」

#### ・ハウスバーモントカレー〈甘口〉



容量	価格	賞味期限
119g	180円	製造後1年6か月(未開封)
238g	295円	製造後1年6か月(未開封)

#### 原材料名

食用油脂(牛脂豚脂混合油, バーム油), 小麦粉, 砂糖, 食塩, でんぷん, カレーパウダー, オニオンパウダー, トマトパウダー, チーズ加工品, はちみつ, ポークエキス, ごまペースト, チーズ, 粉乳小麦粉ルウ, 粉末ソース, トマトエキス, バナナペースト, ココア, バターミルクパウダー, リンゴペースト, ガーリックパウダー, 麦芽糖, しょうゆ加工品, ブドウ糖, 脱脂大豆, 酵母エキス, ローストオニオンパウダー, 玉ねぎエキス, 香辛料, 調味料(アミノ酸等), 着色料(カラメル, パブリカ色素), 乳化剤, 酸味料, 香料, 香辛料抽出物, (原材料の一部に鶏肉を含む)

#### 1皿分(製品19.8g)の栄養成分

熱量 105kcal, タンパク質 1.1g, 脂質 7.4g, 炭水化物 8.6g, ナトリウム 890mg (食塩相当量 2.3g)

#### アレルギー物質(食品衛生法による)

25品目のうち、乳成分、小麦、大豆、鶏肉、豚肉、りんご、バナナを含む原料を使用している。

#### ・ハウスバーモントカレー〈中辛〉



容量	価格	賞味期限
119g	180円	製造後1年6か月(未開封)
238g	295円	製造後1年6か月(未開封)

#### 原材料名

食用油脂(牛脂豚脂混合油, バーム油), 小麦粉, 砂糖, 食塩, でんぷん, カレーパウダー, 粉乳, 砂糖粉乳混合品, トマトパウダー, 脱脂大豆, はちみつ, チャツネ, 粉乳小麦粉ルウ, 玉ねぎエキス, ごまペースト, チーズ加工品, オニオンパウダー, ローストオニオンパウダー, ポークエキス, バナナペースト, ココア, リンゴペースト, 香辛料, しょうゆ加工品, ブドウ糖, ガーリックパウダー, ローストガーリックパウダー, チーズ, 着色料(カラメル, パブリカ色素), 調味料(アミノ酸等), 乳化剤, 香料, 酸味料, 香辛料抽出物, (原材料の一部に鶏肉を含む)

#### 1皿分(製品19.8g)の栄養成分

熱量 105kcal, タンパク質 1.2g, 脂質 7.4g, 炭水化物 8.4g, ナトリウム 870mg (食塩相当量 2.2g)

#### アレルギー物質(食品衛生法による)

25品目のうち、乳成分、小麦、大豆、鶏肉、豚肉、りんご、バナナを含む原料を使用している。

#### ・ハウスバーモントカレー〈辛口〉



容量	価格	賞味期限
119g	180円	製造後1年6か月(未開封)
238g	295円	製造後1年6か月(未開封)

#### 原材料名

食用油脂(牛脂豚脂混合油, バーム油), 小麦粉, 食塩, でんぷん, 砂糖, カレーパウダー, トマトパウダー, 香辛料, 脱脂大豆, ポークエキス, チーズ加工品, 粉末ソース, はちみつ, ごまペースト, バナナペースト, ガーリックパウダー, ローストオニオンパウダー, チャツネ, オニオンパウダー, 粉乳小麦粉ルウ, 玉ねぎエキス, 砂糖粉乳混合品, バターミルクパウダー, 全粉乳, リンゴペースト, しょうゆ加工品, チーズ, ブドウ糖, ココア, 酵母エキス, 調味料(アミノ酸等), 着色料(カラメル, パブリカ色素), 乳化剤, 酸味料, 香料, 香辛料抽出物(原材料の一部に鶏肉を含む)

1 皿分 (製品 19.8g) の栄養成分

熱量 106kcal, タンパク質 1.3g, 脂質 7.8g, 炭水化物 7.8g, ナトリウム 910mg (食塩相当量 2.3g)

アレルギー物質 (食品衛生法による)

25 品目のうち, 乳成分, 小麦, 大豆, 鶏肉, 豚肉, りんご, バナナを含む原料を使用している。

### ● 「商品特長」

- ・使用する油脂量を減らしながら, おいしさを凝縮し, じっくり加熱した, 濃縮加熱製法でさらにおいしく, ヘルシーになった。
- ・マイルドなスパイスと風味豊かな蜂蜜, 乳製品などを加えたまろやかでコクのあるカレーが味わえる。
- ・100% 国産のりんごペーストと風味豊かなハチミツ, 乳製品などを加えたまろやかでコクのあるカレーが味わえる。

## 6. インスタントカレーの市場状況

インスタントカレーの小売りベースでの市場規模は 2011 年度で 600 ~ 650 億円と推定されている。そのうち, バーモントカレーのシェアは約 30%, ハウス食品のその他のインスタントカレーのシェアが約 30% であり, 併せて, 約 60% である。昭和 50 年代ではバーモントカレーの金額シェアは約 40% 強であった。また, 昭和 60 年前後では 40% 台後半であり, この数字が過去最高のシェア % であった。

## 7. 日本食糧新聞社から「ロングセラー賞」を受賞

昭和 62 年 (1987 年) には日本食糧新聞社から「ロングセラー賞」を受賞している。授賞理由は「カレーの需要層を子供にまで広げたいと考え, 昭和 38 年 (1963 年) 当時, 米国北東部のバーモント地方の人々の長寿の秘訣であった「バーモント療法」にヒントを得て, この『バーモントカレー』を作ることを提案したことが,

開発の背景になっている。昭和 38 年 9 月に新発売後, 宣伝媒体にはテレビが有効に活用され, 「ハウスじゃなければ出来ないカレー」「若い子供の味がする」「りんごとハチミツ, ハウス・バーモントカレー」などの CM が全国に流れた。昭和 35 年 (1960 年) に発売した日本初のカレールー (インスタントカレー) 「印度カレー」は辛みの効いた大人の味に近く, 子供と一緒に食べられるカレーとして開発されたのが『バーモントカレー』である。

現在の即席カレールー (昭和 62 年当時) の配合スパイスは三十数種といわれるが, 毎年, 味覚テストを行い, いつも「今の味」を作り出し「味は大人, マイルドさは子供」が受けているのではないかとされている。

## 8. 『バーモントカレー』をターゲット, TPO と 5P にのっとり紹介

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。

まず第一に『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。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ンネルが良いのか。量販店なのか, CVS なのか, 専門店なのか, ドラッグなのか, それとも通販なのか。色々なチャンネルがあるので, 選択と集中が必要になる。第四は『Promotion』である。店頭プロモーション, 媒体プロモーションなど費用がかかるので効果的なメディアミックスが重要である。

最後に 5P ではないが, 『Target』がある。全ての 5P は『Target』を明確にした後のことで

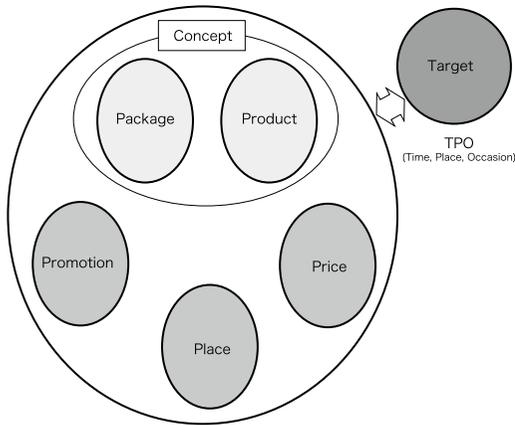


図1 商品開発 5P; 開発品はユーザーの手元に届く仕組みになっているか

ある。『Product』は『Target』が明確にならないと決まらないはずである。

さらに、包装仕様を決定するうえで重要なものがT (Time) ,P (Place) ,O (Occasion) である。この考えに基づき、『バーモントカレー』を整理してみる。『Product』である『バーモントカレー』の製造技術、設備は昭和35年(1960年)に発売した同社のカレールウ(インスタントカレー)「印度カレー」でできていた。

「印度カレー」は大人をターゲットにした辛口の商品であったため、シェア的には満足のいくものではなかった。当時の家庭の食卓では「大人はカレー、子供はハヤシライス」と棲み分けができていた。ところが、カレーは学校給食で人気があり、家でもカレーを食べたいという子供たちが増えてきた。ハウス食品が消費者調査をした結果、家庭では牛乳を入れたり、りんごをすりおろしたりして、カレーの辛さを和らげる工夫をしていることが分かった。

こうしたニーズを解決するために「大人も子供も一緒に食べられるマイルドなカレールウを開発しよう」と言う話がでてきた。これを解決するために注目したのが「リンゴとハチミツ」である。アメリカ東部にある長寿で有名なバーモント州に伝わる、リンゴ酢とハチミツを使っ

た「バーモント健康法」である。この健康法は当時、日本でもブームになっていた。美容と健康に良いリンゴとハチミツを食べる方法である。リンゴとハチミツを使うと味がマイルドになることを発見し、1年6か月をかけて、大人も子供も満足する味が完成した。

昭和38年(1963年)9月、ついに発売となった。「リンゴとハチミツ」、「美容と健康」をキャッチフレーズに、集中的にテレビCMを流すなど、大々的な宣伝活動を展開し、「ハウスバーモントカレーの歌」も大ヒットした。

発売当時の『バーモントカレー』は120gで60円であり、味も1種類のみであった。爆発的に売れたため昭和41年(1966年)大箱を発売した。240gで110円であった。味は同じく1種類のみであった。

昭和47年(1972年)に辛口を発売した。内容量はそれぞれ小箱120gと大箱240gの2種類をそろえた。昭和58年(1983年)には中辛を発売した。容器は小箱、大箱の2種類である。これで甘口、中辛、辛口の3種類が揃い、容器も小箱、大箱であり現在と同じ商品ラインが揃った。但し、当時の小箱の内容量は125gであり、大箱は250gであった。

平成22年(2010年)には使用する油脂量を控えながら、おいしさを凝縮し、じっくり加熱したヘルシーな「濃縮加熱製法」が完成した。この製法で甘口、中辛、辛口すべてを製造開始した。その結果、内容量が小箱で120gが119gに、大箱が240gが238gになった。大箱と小箱の売り上げ構成は大箱が80~90%である。

『Price』は、発売当時は60円/120g(6皿分)であった。発売当時(昭和38年1963年)の物価は食パン1斤;35円、コーヒ一杯;40円、ラーメン一杯;40円、コロッケ1個;10円、アジフライ1枚;10円、豚肉100g;55円、ジャガイモ1カゴ(やまもり);10円、電車賃(一区間)山手線;15円といった状況であった。バー

モントカレー 120g;60 円は妥当な価格と考えられる。現在では 119g が 180 円であり、50 年過ぎた現在において約 3 倍である。

『Package』は半分のルーを使用後コンパクトに保存できるように工夫してある。その情報を外箱に記載してある。その結果、商品情報、調理情報など、全ての情報を残すことができる。また、鍋ぶたをしてエコ料理!の情報も記載してある。書体は、読みやすさを重視し、はっきりと大きくした「ユニバーサルデザイン (UD) フォント」を商品パッケージに取り入れている。ハウス食品では 2010 年秋頃から取組、2011 年 6 月頃からは『バーモントカレー』(大箱)のパッケージに使っている。原材料の表記やカレーの作り方の表示がすっきりとし、視力が衰えたシニアでも読みやすくしてある。その他にも、多くの情報が記載してあり、『Package』をみれば、商品に関する情報はすべて入手できると言っても過言ではない。

『Promotion』は社運をかけ、集中的にテレビ CM を流すなど、大々的に宣伝活動を展開した。“リンゴとハチミツとろ〜りとけてる”でおなじみのテレビ CM で、西城秀樹をはじめ多くの芸能人が出演した。“リンゴとハチミツとろ〜りとけてる”のコピーは商品パッケージにも商品名の『バーモントカレー』の下に記されている。また、「ハウスバーモントカレーの歌」(作詞・山上路夫、作曲・いずみたく)も大ヒットした。

『バーモントカレー』を発売して 50 年になるが、1996 年から幼稚園児を対象に「はじめてクッキング」と銘打ったイベントを始めた。朝から野外で園児、保護者、先生たちがご飯を炊き、野菜を切ってカレーを作り、食べるイベントであり、子供たち、保護者の皆さんにここで作ったカレーのおいしさを知ってもらうのが目的である。おいしくできれば園児から「ママ、今日食べたカレーをおうちで作ってよ」となる。こ

の場合、使用したカレールウが『バーモントカレー』であることは話していない。帰りのお土産の中に『バーモントカレー』を入れておく。

この取り組みは 1996 年から始まり、2012 年までに、延べ参加した人数は約 500 万人である。現在では、1 年間に全国の園児の約 1 割、50 万人が参加するというイベントに育った。子供にも、母親にも『バーモントカレー』のおいしさを記憶していただき、カレーと言ったら『バーモントカレー』を連想してもらおうのが狙いである。多くの食品で割安なプライベートブランド (PB 商品) の商品数が増え、売り上げも増えている。カレールウ市場は嗜好性が強いのでおいしさを記憶して貰えれば、ブランドを指名買ってもらえるのではないかと考えている。こういった活動がカレールウ市場におけるハウス食品のシェアが約 60%、『バーモントカレー』のシェアが約 30% という結果になっている。

## 9. 消費者の購入状況

カレールウの 2 人以上世帯の 1 世帯当たり年間購入金額、購入数量、ユニット価格の推移を家計調査年報のデータをもとに図 2 にまとめた。カレールウの 1 世帯当たり年間購入金額は 1992 年をピークに徐々に減少しているが、2004 年からは余り変化はない。一方、購入数量は 1998 年から 2004 年までは多少の変化はあるが、ほぼ安定した購入数量である。2006 年以後は減少傾向にある。ユニット価格は 1990 年から 1994 年はグラム当たり 100 円強であるが、1996 年から 2006 年までは下がる傾向にあったが、2008 年以後は回復傾向にある。表 1 には 2 人以上世帯の年齢別購入金額とユニット価格を示した。購入金額は 40 歳から 49 歳が最も多く、次が 50 歳から 59 歳である。これはカレーを食べる家族人数が 40 歳から 69 歳が多いと推察される。ユニット価格は 50 ~ 69 歳は高い。

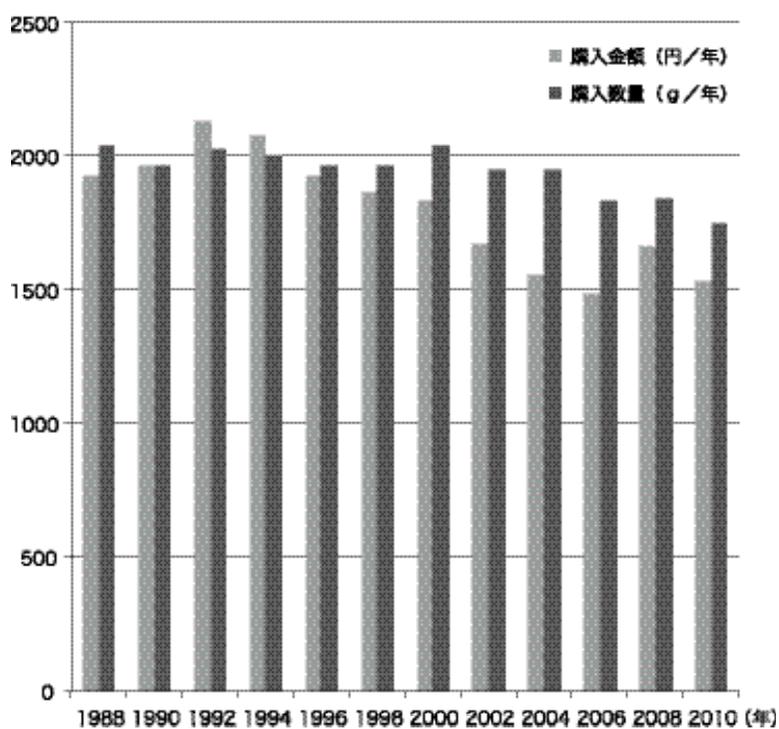
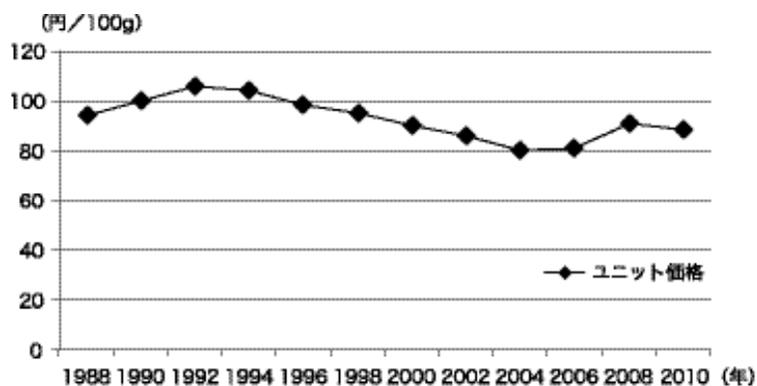


図2 カーレルウの購入金額、購入数量推移とユニット価格推移 (2人以上世帯)

表1 世帯主の年齢別購入金額とユニット価格

	年間購入金額 (円)	比率	ユニット価格 (円/g)
2人以上の世帯平均	1539	100	88
～29歳	1273	65	88
30～39歳	1523	99	83
40～49歳	1852	120	85
50～59歳	1758	114	92
60～69歳	1538	100	92
70歳～	1086	71	88

その他の年齢の方は比較的安価な商品を購入されている。特に、30～39歳の方は価格意識が高いことが伺われる。

#### おわりに

ハウス食品は1913年(大正2年)創業者浦上靖介が大阪に「浦上商店」を創業後、カレーに強い”おもい”を抱きながら会社を成長させてきた。戦中、戦後の物資がない時期を乗

り越え、1960年（昭和35年）に初めて固形カレールウ「印度カレー」を発売した。当時は大人は辛い“カレー”，子供は甘い“ハヤシライス”という食習慣が定着していた。『バーモントカレー』はこの常識を打ち破り「子供でも，大人でもおいしく食べられるカレールウ」をコンセプトにした全く新しいカレールウである。『バーモントカレー』のコンセプトを満足する技術は”リンゴとハチミツをはじめ，スパイス等の調合技術”にある。大人にも子供にもおいしく食べてもらえるカレールウの開発には

1年6か月の期間を必要とした。商品名は，先述の健康法にちなみ『バーモントカレー』とした。1963年（昭和38年）に発売した。郁夫副社長の社運をかけた大きな仕事であった。1966年創業者の突然の逝去で郁夫社長が誕生した以後，次々とヒット商品を発売し，現在では，2,143億円を売り上げる企業に成長した。ハウス食品には今後も世の中にない新しい商品を開発・上市し，日本の食品業界に刺激を与え，引っ張っていただくことを期待する。

[ 参考資料 ]

- 1) 90th Thanks&toTheFuture 2003年11月11日発行，発行者；ハウス食品株式会社広報室
- 2) カレーのひみつ 2005年10月31日初版発行，発行；株式会社学習研究社
- 3) カレーの経営学 2012年5月3日発行，著者；井上岳久 発行所；東洋経済新報社

## 築地市場魚貝辞典 (シシヤモ)

師走ともなると先生でなくても、なんとなく慌しい。普段からせわしなく人が動き回っている築地においてもそう感じるのは、体内の遺伝子に刻み込まれた体内時計が感じるからなのか、などと考えつつ、木枯らしの吹く晴海通りを築地市場へと向かう。場外市場は普段より買出しの人が増え、正月飾りを売る出店などもあって、年末の風景に彩を添えている。場内を見ても、北国の魚を中心にした冬の魚が増えて、冬を感じさせる。



師走の築地市場

今回は冬の貝、ホタテガイを紹介する。

### 一分類一

ホタテガイを分類学的に表すと二枚貝綱 - カキ目 - イタヤガイ科 - ホタテガイ属 - ホタテガイとなる。イタヤガイ科の貝は、殻は扇形で頂点側に耳状の張り出しがある。左右の殻で色が異なり、左側の殻の色が濃い。殻を開くバネに相当する弾帯は、殻の頂点（殻頂）の内側にある。殻を開閉する筋肉は1つなどの特徴を持っている。ホ



ホタテガイ

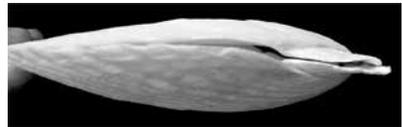
タテガイの含まれるイタヤガイ科に近いのは、マガキが含まれるカキ科と考えられている。ホタテガイとマガキでは殻の形がまるで違うように見えるが、殻を作る構造などが同じようになっている。イタヤガイ科には世界でおよそ400種、日本でも60種以上が含まれる大所帯で

ある。見た目はどれもホタテガイに似たようであるが、殻の色が変化に富んでいて、たとえば日本に分布し、築地市場にも入荷することのあるヒオウギは、同じ種類のうちでも殻の色が紫色、黄色、橙色など変異が多く、見た目にも美しい。ホタテガイのほかは一般には馴染みが少ないが、ヒオウギ、アズマニシキ（アカザラガイを含む）、イタヤガイは築地市場でも見かけることがある。ホタテガイ属はホタテガイのほかはアラスカに分布するホンホタテのみで、日本近海にはホタテガイ1種だけが分布する。

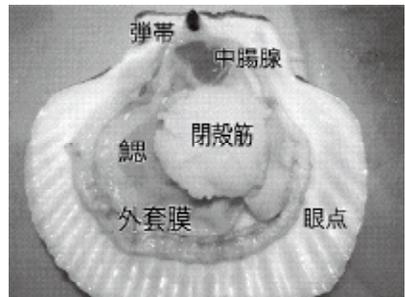
一形態一

ホタテガイは、スーパーなどの店先でも殻付きで売られているので、馴染みがあるのではないだろうか。居酒屋でもホタテガイは殻付きで焼かれて出てくることが多い。殻は丸い扇形で、表面には殻の頂点（殻頂；かくちょう）から放射状に20から26条の膨らみのあるスジ（肋；ろく）が伸びている。この肋を横断するように同心円状のスジがある。これは夏季の成長が滞ったときにできる成長線で、これを数えるとおよその年齢を知ることができる。殻頂の前後には殻の本体から張り出したような耳状部がある。二枚の殻を合わせたところを横から見ると、左の殻は膨らみがほとんどなく、右の殻は大きく膨らんでいる。左右の殻は閉じるとほぼかみ合っているが、殻頂の左右にはすき間ができています。

殻を開くとまず目に付くのが大きな貝柱（閉殻筋；へいかくきん）である。ハマグリやアカガイなど、ふつうの二枚貝は身を挟むように前後に1つ筒ずつあるが、ホタテガイは閉殻筋が主役のように中央にある。そのため、体の諸器官は閉殻筋を取り巻くようにある。殻の縁に沿ってあるフリル状のものは外套膜で、ここで殻を作っているほか、密に並んだヒゲ状の触覚や、小さく丸い眼（眼点；がんでん）が並んでいる。外套膜の後ろにはレースのような鰓（えら）があり呼吸をするほか、海水とともに取り込んだプランクトンを濾しとって食べる。取り込まれた餌は、殻頂に近い部分にある黒い塊状の中腸腺（ちゅうちょうせん）で消化



殻の膨らみとすき間



体のつくり

される。閉殻筋に寄り添うようにある鎌状のつるりとした部分は生殖腺でクリーム色は精巢，オレンジやピンク色は卵巣である。ここを見れば雌雄を知ることができる。

殻の色は，左側の殻は赤紫色，右側は白い。まれに左右ともに同色のものがある。殻長は20cmを超えるが，ふつう出回っているのは10cm ぐらいのものが多い。

#### —生態—

太平洋側では千葉県の銚子から，日本海側では富山湾から，北海道，サハリン，千島列島まで分布している。主に沿岸の水深70mまでの砂礫底にすむ。潜ってみると，海底の砂が“笑って”いる。何だろうと近寄ってみると，すっかり砂をかぶったホタテガイが殻を開いていて，その部分が笑顔の口のように見えていたわけである。このように海底の砂に浅く潜っていながら，海水を取り込んでプランクトンを食べている。このような砂底にはヒトデがいる。

ヒトデは二枚貝が大好物で，ホタテガイも狙われることになる。そこで役立つのが，形態の項で説明した殻と閉殻筋である。外敵のヒトデが近づくと，ホタテガイは自慢の閉殻筋を使って殻を開閉する。すると殻の中に取り込まれた海水は，殻頂の前後に開いた隙間から勢いよく噴射されることになる。ジェット推進である。これで，かなり離れたところまで逃げることができる。ただ，どの方向へどれだけ逃げるのかまでは考えていないようである。

産卵期は4月から6月で，いっせいに卵と精子を海中に放出し，受精させる。受精した卵は幼生となって海中を浮遊し，稚貝となる。殻ができてからもしばらく泳ぎ回っているが，やがて海底に下りて海藻や石に糸（足糸；そくし）を出してくっつくようになる。やがて足糸も切って，砂底で生活するようになる。1年で殻長2cm，2年で6cm，4年で12cmに成長する。寿命はおよそ10年。

#### —漁業—

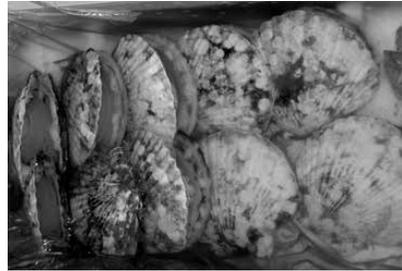
生態の項でふれたように，ホタテガイはやや浅い砂底にすんでいる。そのためホタテガイを漁獲するには網を海底に這わせて曳く桁網（けたあみ）が使われる。しかし，完全な天然ものは資源の変動が著しく，安定して漁獲できない問題があった。そこで養殖の方法がいくつか考案され，現在では生産量のほとんどが養殖となっている。ホタテガイの場合，養殖といっても自然の海の中で天然の餌であるプランクトンを食べて育つので，天然ものと味などの差はないもの魅力である。現在行われている主な養殖方法は，自然の海底を均し稚貝を撒き育った

ことに漁獲する「地撒き」、稚貝を籠に入れて海中に吊るしておく、または殻の耳の部分に穴を開け糸を通して吊るしておく海中垂下がある。

海外では朝鮮半島の北部にも分布し養殖も行われているので、冷凍品が輸入されているが、国内の養殖物の生産量が圧倒的に多い。ただホタテガイ以外のイタヤガイ類の貝もホタテガイと同じような閉殻筋を持つので、一時期“ホタテガイ”や“ベビーホタテ”などの名前で輸入、販売されていたこともある。

築地市場では、1年を通して見ることが出来る。海水に入れられて仲卸の店先に置かれた活のホタテガイが、そばを通る人に驚いて殻を閉じ海水を飛ばすのもよく見る光景である。活け物のほか、剥

いたり貝柱だけにした生鮮、冷凍や加工品が入荷する。主な産地はその生息地である北海道、青森県、岩手県、宮城県である。発泡スチロールの箱には新鮮などの字が躍り、産地の質の良さを競っている。



活け物



生鮮加工品



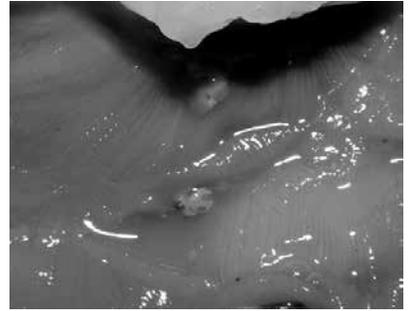
ボイル加工品

### —利用—

ホタテガイは身の全体を食べることができるが、やはり多く甘味の強い貝柱が進上であろう。生にしても加熱しても、和食、洋食を問わず、どんな料理にも向く重宝な食材である。しかも養殖されているため、安定供給されることも大きな要因であろう。刺身、寿司、殻焼き、バター焼き、中華風炒め物、煮付け、シュウマイ、フライ、テリーヌ、燻製。調理法に限りがない。東北地方の浜辺。取れたてのホタテガイを炭火の上の網において、殻が開くのを待つ。じゅうじゅう汁が沸き立ってくるとぱっと殻が開く。そこへさっと醤油をたらす。醤油のこげる香ばしい臭いが漂い、食欲をそそる。焼きすぎないうちに火から下ろし、熱々をほおばるときは至福のひとつでもある。

殻を開いたとき、レースのような鰓上に白っぽい1cm ぐらいの塊

がいくつか付いているのを見ることがある。これはホタテエラカザリという寄生虫絵ある。まるで豆腐の破片のような姿はとても動物とは思えないが、コペポーダというミジンコのような甲殻類の仲間、寄生生活に適応してこんな方になっている。食べても人体には影響はない。



ホタテエラカザリ

ふつう貝柱の色は白というかうっすらクリーム色がかっているが、時々オレンジ色がかっているものを見ることがある。これは疾患の一つで、しばらくすると衰弱して死んでしまうこともあるようである。ただし、これも人体には影響はない。



検査証

ホタテガイはプランクトンを餌としている。このため、時に有毒プランクトンを取り込んで貝自体が毒化することがある。いわゆる貝毒である。プランクトンの種類

によって毒の正常も異なり、以前は中毒事故も起きていた。現在では産地の水産試験場などでプランクトンの増減と貝の毒量を調べており、基準値を超えると出荷停止となる。そのため、市場に毒化したホタテガイが流通することはない。ホタテガイのパックに貼られた検査済みのマークが安心の証である。

ホタテガイの産卵期は初夏である。魚のように脂が乗るわけではないが、産卵を控え栄養を蓄えて肥えた冬が旬といえる。

## －エピソード－

今日では最も身近な食用貝の1つであるホタテガイも、以前は産地に行かないと食べられないローカルなものだったらしい。そのため、ホタテガイに似ているイタヤガイの仲間は、みなホタテガイと思われていたようである。移動することと殻の形から、その殻を船の帆のように風を立てて海を渡っていると考えられたのも無理からぬことで、そのネーミングは的を得たものだったのであろう。ホタテガイの分布

範囲を見ると、今でも人が多くすむ場所から離れている。そのため学術的に命名されたのは以外と遅く、幕末に日本へやってきたペリーが持ち帰った標本に基づいている（わずか150年前のこと）。学名には当時の北海道である蝦夷の名が用いられている。そのような事情から、ホタテガイと人とのかかわりは、東北地方や北海道などの産地を除くと、あまりない。これらの地方でも大きな殻を器に利用する程度であっただろうか。ヨーロッパでは貴族の紋章あるいは石油会社のトレードマーク、絵画の題材としてホタテガイが用いられている。しかし厳密にはこれらはホタテガイではなく、同じイタヤガイ科の別種である。極東の寒冷地にすむホタテガイをヨーロッパの人が目にするのは、もっと時代が下がってからである。

## 文 献

- 1) 奥谷喬司（編・著）：日本近海産貝類図鑑，東海大学出版会（2000）
- 2) 奥谷喬司：軟体動物二十面相，東海大学出版会（2003）
- 3) 水島敏博・鳥澤 雅（監）：新 北のさかなたち，北海道新聞社（2003）

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

### ニューフードインダストリー 第55巻 第1号

印刷 平成 24 年 12 月 25 日  
発行 平成 25 年 1 月 1 日  
発行人 宇田 守孝  
編集人 村松 右一  
発行所 株式会社食品資材研究会  
〒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