

New Food Industry

食品加工および資材の新知識

<http://www.newfoodindustry.com>

2014 Vol.56 No.4

4

論 説

- 日本産カサガイ類のユニークな脂質成分
- 魚由来低分子コラーゲンの皮膚線維芽細胞コラーゲン産生に及ぼす影響
- 糖アルコール類の機能性と酵素法による新しい定量技術
Functions of sugar-alcohols and new determination of sugar-alcohols with the dehydrogenases
- 一滴の油のおいしさ
— 油脂の嗜好性への嗅覚の関与と料理への展開 —
- リポ酸のAktシグナル活性化による中枢神経保護作用機構

連 載

- ニジマスのグアニン量 —ヒメマスとの比較—
- ウイスキーは考えている
(3) 貯蔵工程と樽由来成分の変化
- “地域密着でキラリと光る企業”
海の恵みを探索・創造する『焼津水産化学工業株式会社』
- ベジタリアン栄養学
歴史の潮流と科学的評価 (第2節 ベジタリアン食と慢性疾患予防)



論 説

- ☐ 日本産カサガイ類のユニークな脂質成分
..... 川島 英城 1
- ☐ 魚由来低分子コラーゲンの皮膚線維芽細胞
コラーゲン産生に及ぼす影響
..... 下川 雅信, 佐藤 有里, 井上 正範, 齊藤 沙織, 井上 肇 9
- ☐ 糖アルコール類の機能性と酵素法による新しい定量技術
Functions of sugar-alcohols and new determination of sugar-
alcohols with the dehydrogenases
..... 渡部 保夫 15
- ☐ 一滴の油のおいしさ
一油脂の嗜好性への嗅覚の関与と料理への展開 —
..... 中野 久美子, 中村 元計, 久保 春香, 松村 成暢, 網塚 貴彦, 斉藤 司, 伏木 亨 30
- ☐ リポ酸の Akt シグナル活性化による中枢神経保護作用機構
..... 郡山 恵樹, 松郷 誠一 35
- 掲載論文の訂正とお詫び
..... 前付け 8

Contents

2014 年 4 月号

連 載

- ニジマスのグアニン量 ―ヒメマスとの比較―
..... 酒本 秀一, 佐藤 達朗 44
- ウィスキーは考えている
(3) 貯蔵工程と樽由来成分の変化
..... 古賀 邦正 57
- “地域密着でキラリと光る企業”
海の恵みを探索・創造する『焼津水産化学工業株式会社』
..... 田形 暁作 71
- ベジタリアン栄養学
歴史の潮流と科学的評価
(第2節 ベジタリアン食と慢性疾患予防)
..... ジョアン・サバテ, 訳: 山路 明俊 82

おいしさと健康に真剣です。

酵母エキス系調味料
コクベース

new発酵調味料
D&M
ディアンドエム

ゼラチン&小麦グルテン
酵素分解調味料
エンザップ

新発売! 乳製品にベストマッチな調味料
コクベース
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
特長がある乳糖酵母エキスです。

DM **大日本明治製糖株式会社**
食品事業部

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

日本産カサガイ類のユニークな脂質成分

川島 英城 (KAWASHIMA Hideki) *

* 岩手県立大学宮古短期大学部

Key Words：カサガイ類・非メチレン中断型脂肪酸・コレステロール前駆体

はじめに

海岸の岩場やテトラポットに付着している陣笠の形を被った貝であるカサガイ類を一度は見たことがあるかも知れない。(図1) 軟体動物の中で、カサガイ類は最も原始的な腹足類の単独グループに分類されている。これらは微細藻類を食餌とし、アワビに近縁であるが、殻長は種によって異なる。興味深いことに、鳥根県の出雲地方では、ベッコウカサガイ (*Cellana grata*) やヨメガカサガイ (*Cellana toreuma*) は優れた旨みとやわらかい肉質を持つため、炊き込みご飯や汁物の地域食材とし、古くから雑の節句に人々が使用してきた食文化の歴史がある¹⁾。現

在、国内の他の沿岸地域においても、カサガイ類はむしろ手軽な料理素材のひとつとして、日本人の伝統的食文化の一端を担ってきた²⁾。いわゆる、魚介類の現代版B級グルメに相当する地域の食文化とも言える。したがって、海外諸国においても、カサガイ類を消費する独自の食文化が、同様に存在する可能性がある。なお、カサガイ類は地産地消の傾向が強いので、その正確な消費量は把握できていない。

一方、これまでに、岩礁性潮間帯に生息するカサガイ類の研究はその生態や行動に関することが圧倒的に多く、生息環境などに関連する様々なパラメーターの解析が行われている^{3,4)}。その中で、明らかにされた唯一の機能性物質は、*Collisella limatula* に由来する生体防御物質のトリテルペン類である⁵⁾。この物質は、特に魚やカニなどの捕食者に対する強い摂食阻害活性を示した。

さて、本稿では、有用な生物資源として、これまでに殆ど注目されなかった日本産カサガイ類の生殖腺から見いだされた新規な非メチレン中断型脂肪酸および $\Delta 8$ 位に二重結合を有するコレステロール前駆体の多様な構造や分布特性、また、これらに関連する生理機能を概説する。

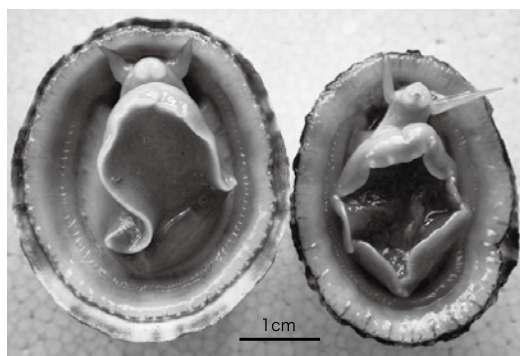


図1 岩手県大槌湾の岩礁性潮間帯から採取したベッコウカサガイ (*Cellana grata*)

1. 性差から見るカサガイ類の脂質成分

脂質化学の観点から、著者らは岩礁性潮間帯く分布するカサガイ類の性差を明らかにする目的で、岩手県大槌湾に生息する優占種であるベッコウカサガイとカモガイ (*Collisella dorsuosa*) の生殖腺における脂質クラスおよびこれら構成脂肪酸組成の分析を行った。図2の結果から、生殖腺における総脂質中の主要な構成脂肪酸には、明瞭な性差が認められた⁶⁾。

すなわち、両種において、精巣ではエイコサペンタン酸 (20:5n-3) の占める割合が最も高く、卵巣ではパルミチン酸 (16:0) と対照的な結果であった。また、多機能な生理活性を有することで知られるアラキドン酸 (20:4n-6) の割合は精巣よりも卵巣でより高い値を示した。しかし、海洋生物の代表的な多価不飽和脂肪酸のひとつであるドコサヘキサエン酸 (22:6n-3) は、

今回分析に使用した両種の卵巣および精巣からは検出されなかった⁶⁾。

両種の主要な脂質クラスとして、卵巣は主にトリアシルグリセロール (TAG)、一方精巣はホスファチジルコリン (PC) およびホスファチジルエタノールアミン (PE) から成っていた。さらに、主要なリン脂質クラスにおける構成脂肪酸組成の結果から、全脂質中の 20:5n-3 および 20:4n-6 の割合と比較した場合、20:5n-3 は精巣の PC および PE、20:4n-6 は卵巣の PC および PE に最も豊富な構成脂肪酸として存在していた⁶⁾。

次に、海洋に生息する軟体動物に特有な構成不飽和脂肪酸の存在を明らかにするため、硝酸銀クロマトグラフィー (Ag-TLC) および GC-MS 分析により、カサガイ類の生殖腺から検出されたジエン酸、トリエン酸、テトラエン酸およびペンタエン酸の構造について、詳細な解析を行った。その結果、検出された脂肪酸の多く

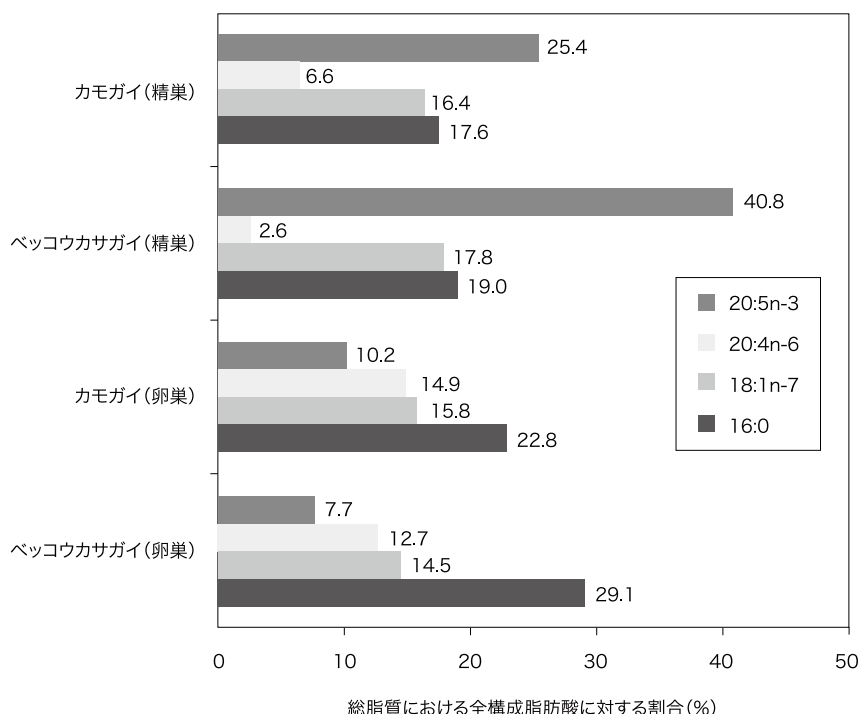


図2 日本産カサガイ類の生殖腺における主要な構成脂肪酸組成の比較

は希少な存在量であった。これらは、*cis* 型の二重結合から成り、メチレン基を2つ以上介して二重結合を有する非メチレン中断型脂肪酸 (non-methylene-interrupted fatty acid) と呼ばれているグループであった。なお、非メチレン中断型脂肪酸はポリメチレン中断型脂肪酸 (poly-methylene-interrupted fatty acid) あるいは非メチレン型 (系) 不飽和脂肪酸と別称されることがある。

2.

ベッコウカサガイの卵巣から見いだされたユニークな非メチレン中断型脂肪酸

本研究では、ベッコウカサガイの卵巣における TAG の構成脂肪酸として、これまでに良く知られている C22 のジェン酸 (22:2 Δ 7,13

および 22:2 Δ 7,15) に加え、偶数鎖・奇数鎖を有する非メチレン中断型脂肪酸を新たに 37 種類同定した⁷⁻¹⁰⁾。特に、ユニークな非メチレン中断型脂肪酸の構造式を図3 (C23を有する非メチレン中断型脂肪酸: 23:2 Δ 5,9, 23:2 Δ 8,14, 23:2 Δ 7,18, 23:2 Δ 9,15, 23:2 Δ 9,18 および 23:2 Δ 9,20) および図4 (C24を有する非メチレン中断型脂肪酸: 24:2 Δ 5,9, 24:2 Δ 9,15, 24:2 Δ 9,17, 24:3 Δ 5,9,15, 24:3 Δ 5,9,17, 24:4 Δ 5,9,15,18 および 24:5 Δ 5,9,15,18,21) に示した。この中で、 Δ 5,9 位に二重結合を有する長鎖のジェン酸⁷⁾は、海洋に広く生息するカイメン (海綿) からの主要な構成脂肪酸としてしばしば見いだされるが、これまでにこのジェン酸は腹足類からの報告はなかった。

さらに、これまでの知見に基づいて、今回

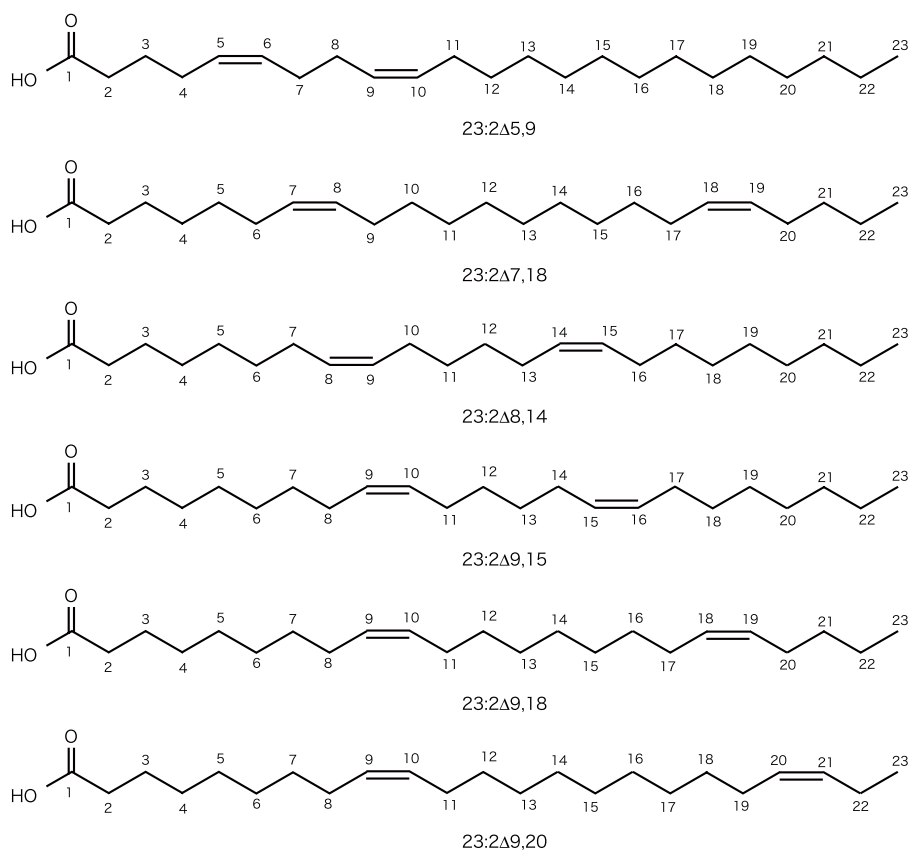


図3 ベッコウカサガイの卵巣から見いだされたユニークな C23 の非メチレン中断型脂肪酸

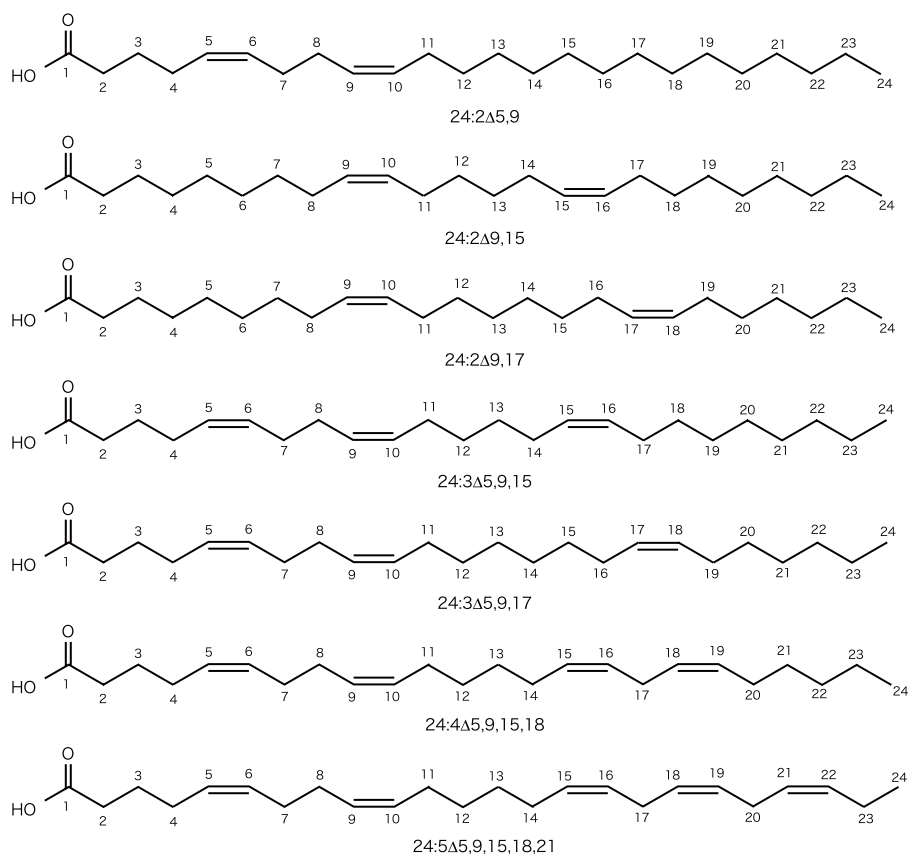


図4 ベッコウカサガイの卵巣から見いだされたユニークな C24 の非メチレン中断型脂肪酸

カサガイ類の生殖腺から見いだされた長鎖を有する非メチレン中断型脂肪酸の生合成経路を推定した(図5および図6)^{8, 10, 11)}。基本的には、脂肪酸の5位メチレン基の不飽和化酵素($\Delta 5$ desaturase)およびC2単位の伸長化酵素(elongase)の組み合わせにより、当該の長鎖を有する非メチレン中断型脂肪酸の生合成が完結すると考えられている。しかし、現在までに、2つの酵素系に関する詳細な検証はなされていない。なお、C23およびC24を有する非メチレン中断型脂肪酸の生合成経路は、全てカサガイ類自身によるものでなく、むしろ他の海洋性軟体動物や微生物を含めた共生生物などを想定した経路である。

一方、関連する非メチレン中断型脂肪酸の生理活性については、トルコ産カイメン(*Agelas*

oroides) に由来する 23:2Δ5,9 および 24:2Δ5,9 はマラリア原虫 ($IC_{50} = 0.35 \mu\text{g/ml}$), 結核菌 ($IC_{50} = 9.4 \mu\text{g/ml}$) および大腸菌 ($IC_{50} = 0.50 \mu\text{g/ml}$) のそれぞれの脂肪酸合成鍵酵素エノイルアシルキャリアープロテイン (ACP) レダクターゼに対する阻害活性を示すことが報告されている¹²⁾。さらに、ニュージーランドの先住民マオリ族が常食していたムール貝(*Perna canaliculus*) から見いだされた4種類の新規な非メチレン中断型脂肪酸である 18:4Δ5,9,12,15, 19:4Δ5,9,12,16, 20:4Δ7,11,14,17 および 21:5Δ5,9,12,15,18 を含むクロマト画分は抗炎症活性を示した¹³⁾。この画分の中で、20:4n-3 の構造異性体のひとつである 20:4Δ7,11,14,17 が最も豊富であった。同定された4種類は全て n-3 系多価不飽和脂肪酸に相当す

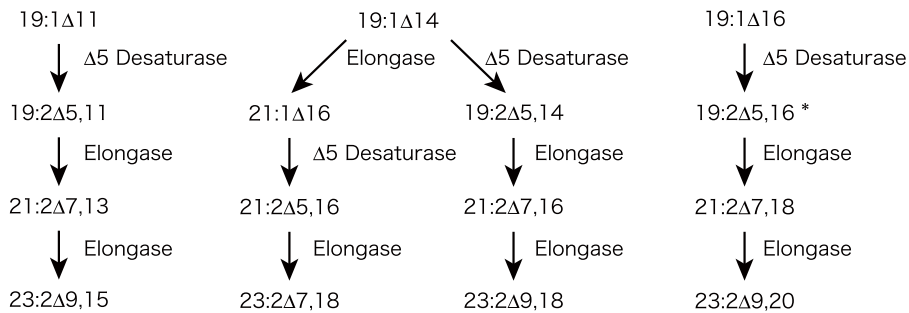


図5 C23を有する非メチレン中断型脂肪酸の推定生合成経路 (* 未同定)

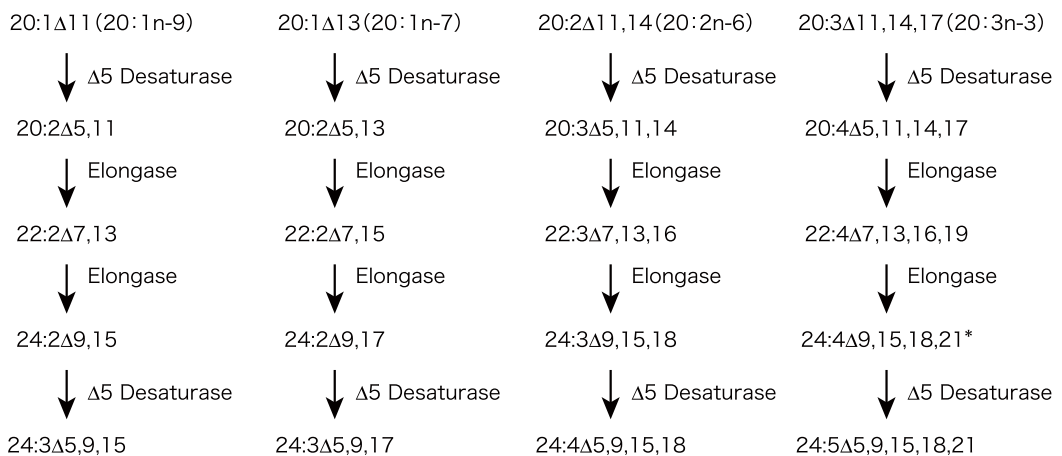


図6 C24を有する非メチレン中断型脂肪酸の推定生合成経路 (* 未同定)

ることも、生理機能を考える上で、大変興味深い結果である。また、このムール貝からは、さらに微量な2種類のフラン酸型脂肪酸が見いだされた。その生理機能として、前述で紹介した4種類の非メチレン中断型脂肪酸を含む画分と同様な抗炎症活性を示すことも明らかになった¹⁴⁾。

また、オリーブ油に共役リノール酸と五葉松 (*Pinus karaiensis*) の種子油に含まれている18:3Δ5,9,12 (pinolenic acid) を添加した食餌をマウスに与えると、オリーブ油に共役リノール酸を添加した場合と比較し、マウスの肝臓や血漿中における脂質レベル (TAG, リン脂質およびコレステロール) を低下させる効果が認められた¹⁵⁾。最近、特に注目されている多機

能な生理活性を持つ共役ジエン酸と他の非メチレン中断型脂肪酸を併用することにより、新たな栄養学的相乗効果も、今後期待できるかもしれない。

以上の知見から、その活性発現機構には依然不明な点もあるが、Δ5,9位に二重結合を有する非メチレン中断型脂肪酸の基本構造は、生理活性の発現に関与している可能性が考えられる^{16,17)}。今回、ベッコウカサガイから見いだされた多様な非メチレン中断型脂肪酸の中で、n-6系多価不飽和脂肪酸の24:4Δ5,9,15,18 および n-3系多価不飽和脂肪酸の24:5Δ5,9,15,18,21 は、何れもその生理活性は明らかされていない。

現在も、カサガイ類の生殖腺に由来する新規

な非メチレン中断型脂肪酸の構造解析を継続しながら、著者らはこれらの生理機能に関する共同研究を進めている。ここで紹介したベッコウカサガイの卵巣から見いだされたユニークな非メチレン中断型脂肪酸の一部は、ヨメガカサガイおよびカモガイの卵巣における TAG だけでなく、リン脂質の構成脂肪酸としても存在することを確認している。

なお、非メチレン中断型脂肪酸は、裸子植物の種子油の主要な構成脂肪酸としても知られているが¹⁸⁾、海洋性軟体動物では多様な位置異性体の存在が認められている¹⁶⁾。

3.

ベッコウカサガイの精巣から見いだされたユニークなコレステロール前駆体

前述した構成脂肪酸組成や脂質クラスの結果に加え、ステロール組成の差異からも、カサガイ類の性差について、検討した結果を紹介する。ここでは、岩手県の大槌湾や船越湾に生息する代表的な4種であるベッコウカサガイ、ヨメガカサガイ、コウダカアオガイ (*Nipponacmea concinna*) およびクサイロアオガ

イ (*Nipponacmea fuscoviridis*) の生殖腺を用いて、各々の卵巣と精巣におけるステロール組成を分析した。得られた結果から、全種において、主要なステロール成分であるコレステロールおよびデスモステロールの割合が卵巣に比べ精巣では有意に高いことが認められた^{19, 20)}。さらに、ベッコウカサガイおよびヨメガカサガイの精巣には、 $\Delta 8$ 位に二重結合を有するコレステロール前駆体であるザイモステノール (zymostenol) およびザイモステロール (zymosterol) を主要成分として含んでいたが、これらは、筋肉・内臓組織からは検出されなかった²⁰⁾。また、ベッコウカサガイおよびヨメガカサガイの精巣は、ザイモステノールおよびザイモステロールの有用な生物資源として、ひとつの可能性を示唆している。

さらに、ベッコウカサガイの生殖腺には、ザイモステノールおよびザイモステロールに加え、他にも $\Delta 8$ 位に二重結合を有するコレステロール前駆体の存在も認められた。

すなわち、4-メチルザイモステロール (4-methylzymosterol) , 4,4-ジメチルザイモステロール (4,4-dimethylzymosterol) , ラノステロー

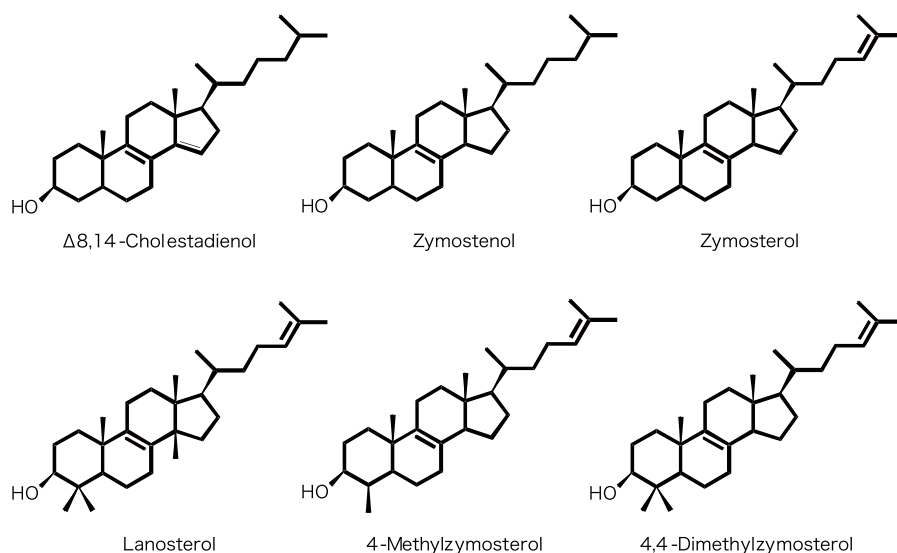


図7 ベッコウカサガイの精巣から見いだされたユニークなコレステロール前駆体

ル (lanosterol) および $\Delta 8,14$ - コレスタジエノール ($\Delta 8,14$ -cholestadienol) が、生殖腺に存在することを GC-MS を用いて明らかにした²¹⁾。しかし、これらの割合は、全ステロール組成の 0.2% 以下であった。検出されたステロール類の一部は、コウダカアオガイおよびクサイロアオガイの生殖腺からも認められた。なお、図 7 に紹介した $\Delta 8$ 位に二重結合を有するコレステロール前駆体の構造式を示した。

さて、生体組織から見いだされたコレステロール前駆体の中で、ザイモステロール、4-メチルザイモステロールおよび 4,4-ジメチルザイモステロールは、哺乳類の卵母細胞において、減数分裂の活性化に関与する機能（減数分裂促進による着床率の改善、いわゆる不妊治療の可能性）を示すことが報告されている²²⁻²⁵⁾。これら前駆体による減数分裂の活性化と投与量依存性の関係が明らかになり、関連する前駆体の誘導体も化学合成されたが、詳細な作用機構

については解決すべき課題が現在も残されている。

今後は、カサガイ類におけるステロールの合成経路およびコレステロール前駆体の生理機能について、詳細な解析が必要であると考えている。

おわりに

今回、ベッコウカサガイの生殖腺から見いだされたユニークな非メチレン中断型脂肪酸の構造やその多様性を紹介したが、カサガイ類自身から豊富な量を見いだすことは現在難しい。これらの生殖腺には構造的に多様な多価不飽和脂肪酸が存在することから、各々の生理活性を評価する場合、化学合成法による量的な供給が極めて重要になる。さらに、新規な非メチレン中断型脂肪酸の生理機能の解明には、鋭敏で特異的なバイオアッセイ系の確立も欠かせないと考えている。

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

- 1) 荒木 英之：松江食べ物語 . 出雲の食文化 春・夏 . 山陰中央新報社, 108-111, 1994.
- 2) 又野 康男：能登の貴重な食材 貝類 . News Letter of Noto Marine Center No. **28**: 4-5, 2008.
- 3) Wolcott, T. G.: Physiological ecology and intertidal zonation in limpets (Acmaea): A critical look at "limiting factors". *Biol. Bull.*, **145** (2): 389-422, 1973.
- 4) Connor, V. M., Quinn, J. F.: Stimulation of food species growth by limpet mucus. *Science* **225**: 843-844, 1984.
- 5) Albizzati, K. F., Pawlik, J. R., Faulkner, D. J.: Limatulone, a potent defensive metabolite of the intertidal limpet *Collisella limatula*. *J. Org. Chem.*, **50** (18): 3428-3430, 1985.
- 6) Kawashima, H., Ohnishi, M., Uchiyama, H.: Sexual differences in gonad fatty acid compositions in dominant limpets species from Sanriku coast in northern Japan. *J. Oleo Sci.*, **51** (7): 503-508, 2002.
- 7) Kawashima, H.: Unusual minor nonmethylene-interrupted di-, tri-, and tetraenoic fatty acids in limpet gonads. *Lipids* **40** (6): 627-630, 2005.
- 8) Kawashima, H., Ohnishi M.: Occurrence of novel nonmethylene-interrupted C24 polyenoic fatty acids in female gonad lipids of the limpet *Cellana grata*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70** (10): 2575-2578, 2006.
- 9) Kawashima, H., Ohnishi M., Ogawa, S. *et al.*: Unusual fatty acid isomers of triacylglycerols and polar lipids in female limpet gonads of *Cellana grata*. *Lipids* **43** (6): 559-567, 2008.
- 10) Kawashima, H. and Ohnishi M.: Novel heneicosadienoic and tricosadienoic acid isomers in ovaries of marine archaeogastropods. *Lipids* **47** (8): 827-833, 2012.
- 11) 川島 英城：海洋に生息する腹足類・二枚貝類から見いだされた新規な非メチレン中断型脂肪酸の構造と多様性. オレオサイエンス, **10** (7): 255-261, 2010.
- 12) Tasdemir, D., Topaloglu, B., Perozzo, R. *et al.*: Marine natural products from the Turkish sponge *Agelas oroides* that inhibit the enoyl reductases from *Plasmodium falciparum*, *Mycobacterium tuberculosis* and *Escherichia coli*.

Bioorg. Med. Chem., **15** (21): 6834-6845, 2007.

- 13) Treshow, A. P., Hodges, L. D., Wright, P. F. *et al.*: Novel anti-inflammatory ω -3 PUFAs from New Zealand green-lipped mussel, *Perna canaliculus*. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, **147** (4): 645-656, 2007.
- 14) Wakimoto, T., Kondo, H., Nii, H. *et al.*: Furan fatty acid as an anti-inflammatory component from the green-lipped mussel *Perna canaliculus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108** (42): 17533-17537, 2011.
- 15) Ferramosca, A., Savy, V., Conte, L. *et al.*: Dietary combination of conjugated linoleic acid (CLA) and pine nut oil prevents CLA-induced fatty liver in mice. *J. Agric. Food Chem.*, **56** (17): 8148-8158, 2008.
- 16) Barnathan, G.: Non-methylene-interrupted fatty acids from marine invertebrates: Occurrence, characterization and biological properties. *Biochimie* **91** (6): 671-678, 2009.
- 17) Carballeira, N. M.: New advances in fatty acids as antimycobacterial and antifungal agents. *Prog. Lipid Res.*, **47** (1): 50-61, 2008.
- 18) Destailats, F., Cruz-Hernandez, C., Giuffrida F. *et al.*: Identification of the botanical origin of pine nuts found in food products by gas-liquid chromatography analysis of fatty acid profile. *J. Agric. Food Chem.*, **58** (4): 2082-2087, 2010.
- 19) Kawashima, H., Ohnishi M., Ogawa, S.: Differences in sterol composition between male and female gonads of dominant limpet species. *Lipids* **44** (7): 665-669, 2009.
- 20) Kawashima, H., Ohnishi M., Ogawa, S.: Differences in sterol composition of gonads of the lottiid limpets *Nipponacmea concinna* and *Nipponacmea fuscoviridis* from northeastern Japan. *J. Oleo Sci.*, **60** (10): 501-504, 2011.
- 21) Kawashima, H., Ohnishi M., Ogawa, S.: Distribution of unusual cholesterol precursors, 4-methyl- and 4, 4-dimethylsterols with Δ 8 unsaturation, in gonads of marine archaeogastropods. *J. Oleo Sci.*, **62** (7): 465-470, 2013.
- 22) Byskov, A. G., Andersen, C. Y., Nordholm, L. *et al.*: Chemical structure of sterols that activate oocyte meiosis. *Nature* **374**: 559-562, 1995.
- 23) Byskov, A. G., Andersen, C. Y., Leonardsen, L. *et al.*: Meiosis activating sterols (MAS) and fertility in mammalian and man. *J. Exp. Zool., (Mol. Dev. Evol.)* **285** (3): 237-242, 1999.
- 24) Byskov, A. G., Andersen, C. Y., Nordholm, L. *et al.*: Regulation of meiosis using sterols, US Patent No 5,716,777, 1998.
- 25) Keber, R., Rozman, D., Horvat, S.: Sterols in spermatogenesis and sperm maturation. *J. Lipid Res.*, **54** (1), 20-33, 2013.

魚由来低分子コラーゲンの皮膚線維芽細胞 コラーゲン産生に及ぼす影響

下川 雅信 (SHIMOKAWA Masanobu) *¹ 佐藤 有里 (SATO Yuri) *^{2,3}
井上 正範 (INOUE Masanori) *³ 齊藤 沙織 (SAITO Saori) *¹ 井上 肇 (INOUE Hajime) *^{1,2,3}

*¹ 聖マリアンナ医科大学 形成外科学教室, *² 聖マリアンナ医科大学 幹細胞再生治療学 (ANGFA 寄附) 講座

*³ 株式会社細胞応用技術研究所

Key Words：魚鱗・コラーゲンペプチド・コラーゲン産生・線維芽細胞・ヒト・機能性食品・化粧品

要 旨

魚鱗を脱灰後に加熱変性させ、ゼラチンを回収後に酵素処理を行い得られた低分子ゼラチンはコラーゲンペプチドと呼ばれ、化粧品ならびに機能性食品として広く知られている。今回、このコラーゲンペプチドを含有した健康食品の皮膚由来線維芽細胞からのコラーゲン合成に及ぼす影響を検討した。

その結果健康ヒト培養線維芽細胞に 0.2 ~ 200 µg/mL のコラーゲンペプチドを添加する事で、線維芽細胞からのヒト由来Ⅰ型コラーゲン産生が用量依存的に促進された。特に 2.0 µg/mL 以上の添加で、統計学的時に有意な増加が認められた。このコラーゲン産生亢進作用は、24 ~ 72 時間まで持続し、細胞毒性を認めなかった。

以上の結果より、酵素処理によって低分子化された魚鱗由来コラーゲンペプチドは、皮膚由来培養線維芽細胞からの細胞外マトリクスの産生に影響する事が示唆された。

緒言

近年コラーゲンを始めとした機能性食品（健康食品）は、生体に何らかの有用性を示し健康促進に影響するとされる食品群として定義されている。しかしながら、これら食品群は、医薬品とは異なり疾病に対し明確な治療効果を持たないことから、客観的な判断基準に乏しく往々にして経験と主観に効果が左右される。また、食

品群である事、疾病を治療する目的には有効性の面から評価できないために、客観的な研究プロトコルを設定しにくい部分もある。従って、客観的結果に乏しい状況でありながら、効能効果の様な内容を謳うことで、信頼性を著しく低下させている食品も多い。

コラーゲン含有食品は数多く販売されている。とりわけ保湿・スキンケア・アンチエイジ

連絡先：聖マリアンナ医科大学 幹細胞再生治療学 (ANGFA 寄附) 講座

神奈川県川崎市宮前区菅生 2-16-1

TEL：044-977-8111

株式会社細胞応用技術研究所

神奈川県川崎市宮前区菅生 2-16-1

聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センター内

TEL：044-979-1622

ングを目的としたコラーゲン含有化粧品、コラーゲンの補充を目的とした飲料や食品などが知られるが、いずれも客観的根拠に乏しい。

そこで、今回分子量 3000 以下が全体の 70% を超えるとされる、低分子コラーゲンペプチドが、健常ヒト培養線維芽細胞からのコラーゲン産生に及ぼす影響等を糖検討した。

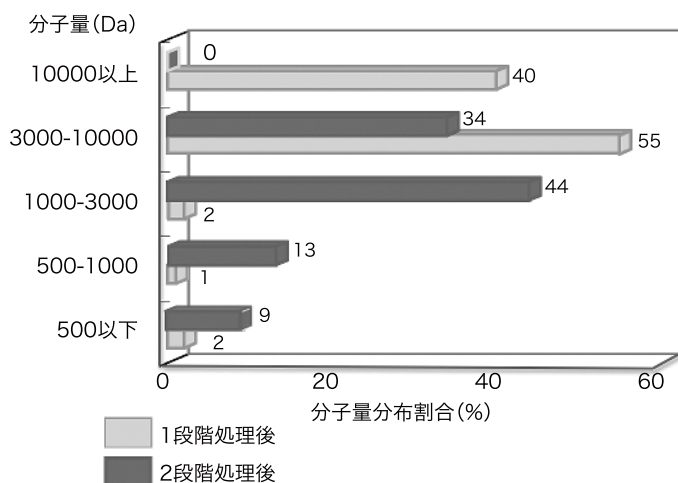


図1 コラーゲンペプチドの分子量分布

1. 材料および方法

1. ヒト健常線維芽細胞

ヒト皮膚由来線維芽細胞は、Fibropack (クラボウ株, 大阪) を用いた (図2)。10% ウシ胎児血清 (FBS) 含有ダルベッコ改変イーグル (DME) 培地を用いて定法に従って培養した。コンフルエントに到達後、0.05% トリプシン

、0.05% EDTA 含有 PBS で細胞を分散後、1200 回転、5 分間遠心分離した。得られた細胞沈渣に、10% FBS 含有 DME 培地を添加し、2500 cell/cm² の細胞密度に調整し、24 穴培養プレート (底面積 2 cm²) に播種した。2～3 日毎に培地を交換し、コンフルエントに到達後その後の実験に用いた。

2. コラーゲン誘導

コンフルエントに到達した培養線維芽細胞 1 群 3 穴に対して、無血清 DME 培地に被験試料 (魚鱗由来コラーゲンペプチド) を終濃

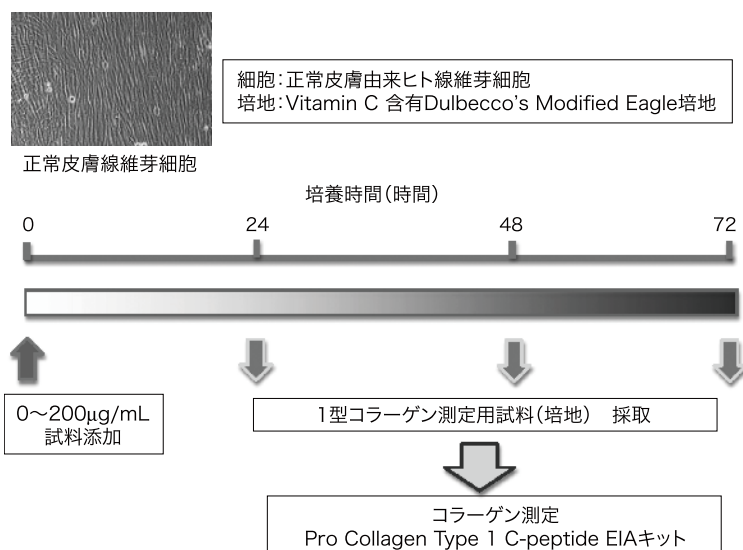


図2 実験スケジュール

度 0.2 ~ 200 $\mu\text{g/mL}$ となる様に添加し、直ちに 5% 炭酸ガス環境下 37℃ で、24 ~ 72 時間培養した。経時的に培地を一定量採取し、測定迄直ちに -80℃ の超低温冷凍庫に保管した。

3. コラーゲン測定

培地中に産生された I 型コラーゲンは、プロコラーゲン type I -C ペプチド EIA キット（タカラバイオ株）を用いて、測定された。

4. 統計処理

得られた結果は、ANOVA 検定後必要に応じて対応のある Dunnet's 多重比較検定を行い、 $p < 0.05$ をもって有意差とした。

2. 結果

ヒト培養線維芽細胞は、I 型コラーゲンを自然産生した（図 3 ~ 5）。このコラーゲン産生は、検討した 72 時間まで経時的に増加していた。一方、魚鱗由来コラーゲンペプチドを添加

した群においては、培養 24 時間以降、線維芽細胞から産生される I 型コラーゲンが、無添加に比べて用量依存的に増加した。この増加傾向は 48 時間以降においても同様の傾向が認められ、経時的にコラーゲン産生が増加すると共に、2 $\mu\text{g/mL}$ 以上の添加で対照群と比較し有意に増加していた。一方で、比較に用いた他社のコラーゲン溶液では、一部に於いて増加傾向を認めたが、魚鱗由来コラーゲンペプチドよりもその産生量は低下していた。

3. 考察

近年、生活習慣病などに対し医薬品とは異なるが類似の効果の認められるサプリメント、健康食品が市販されている。これらの多くは、特定保健用食品として認可されその基準として、有効成分と作用機序が明確であることが条件である。コラーゲンは、古くから美容に対する健

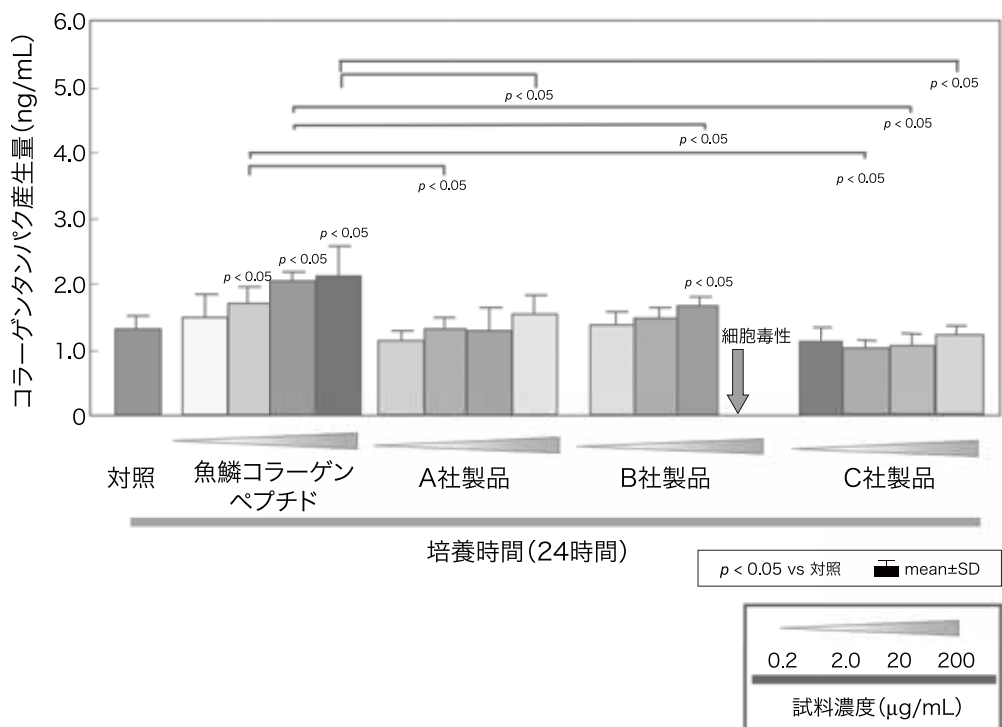


図 3 24 時間培養後のコラーゲン産生に及ぼす各種コラーゲン含有食品の影響

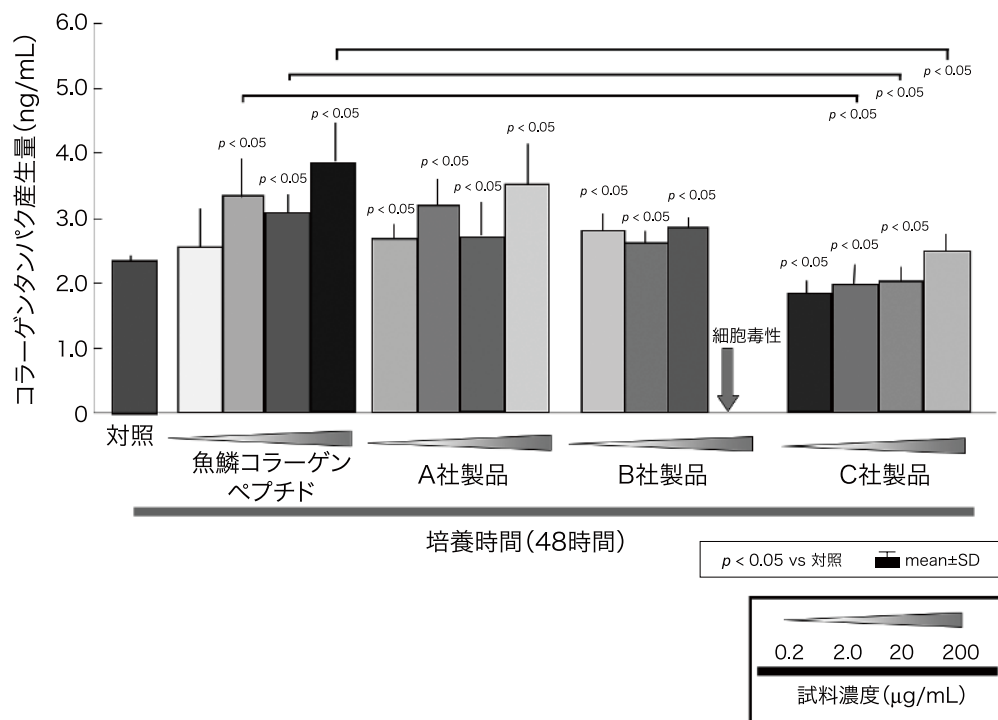


図4 48時間培養後のコラーゲン産生に及ぼす各種コラーゲン含有食品の影響

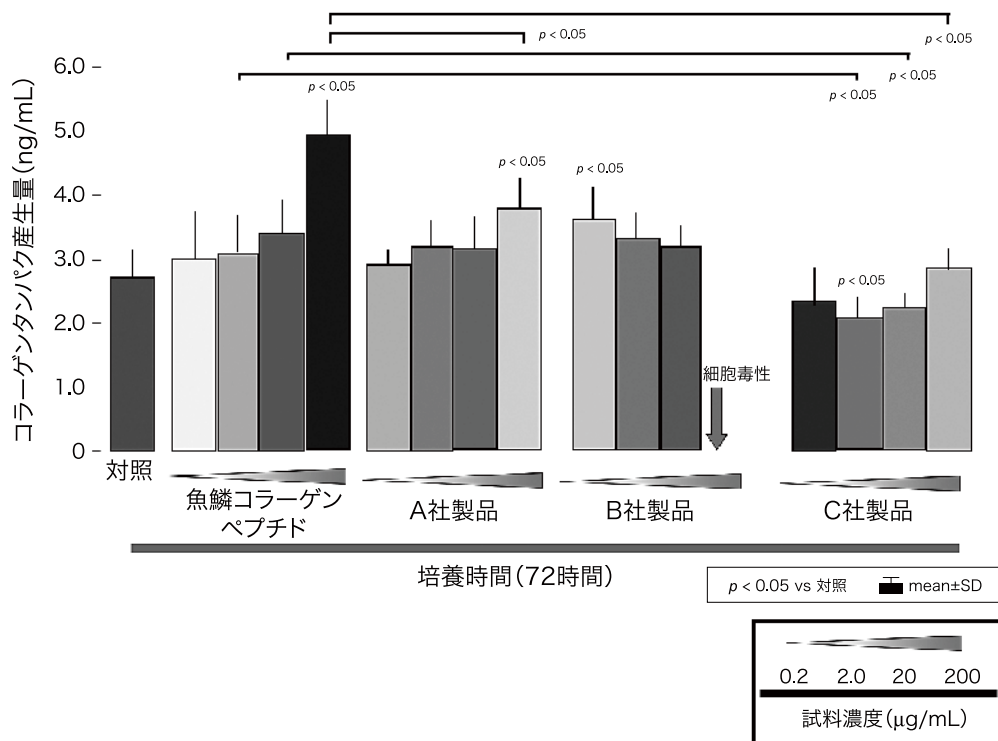


図5 72時間培養後のコラーゲン産生に及ぼす各種コラーゲン含有食品の影響

康食品として利用され、経験的にその有用性が報告されているが、主観的報告が多い。

一般的に、コラーゲン食品群の摂取は、エイジングによるコラーゲン減少を予防もしくは補充する目的で使われている事が多い。しかしながら、摂取されたコラーゲンは、高分子でありそのままでの体内吸収は理論的に不可能である。一方で、胃酸、膵臓から分泌される蛋白分解酵素で、コラーゲン蛋白は加水分解され、主な構成アミノ酸であるグリシン、プロリン、アラニンとして吸収されるために、不足した組織へ摂取したコラーゲンそのものが移行して補充されると言う根拠は乏しい。

Oesser ら¹⁾ は、放射能標識したコラーゲンペプチドを摂取させ、その体内動態を検討している。彼らは、分子量 15kD 以下のコラーゲンペプチドは小腸から吸収され、体内分布する事を報告し、特に軟骨においてはより低分子ペプチドが吸収後に保持される事、皮膚にも移行できる事を証明している。また Iwai ら²⁾ は、ヒト臨床研究でコラーゲンペプチドの血中動態を詳細に検討している。これらの事から、従来吸収されないと考えられてきた、コラーゲンもペプチドレベルであれば、アミノ酸までの分解に抵抗して、吸収される事が証明されたと思われる^{3,4)}。一方で機能性については、皮膚の紫外線障害に対する防護機能⁵⁾、皮膚への効果⁶⁾などが報告されている。

今回の検討において、用いたコラーゲンペプチドは図 1 に示したように分子量 3kD が全体の 70% を超える低分子化コラーゲンである。このペプチドコラーゲンを直接培養線維芽細胞に作用させる事で、線維芽細胞からのコラーゲ

ン産生が促進された。この事から、ペプチド化されたコラーゲンは、何らかの活性を有して線維芽細胞からのコラーゲン合成を促進したと考えられる。このとき短絡的には魚鱗由来コラーゲンペプチド自体が、線維芽細胞のコラーゲン合成原料として機能していると考えやすい。巷間の宣伝広告などもそのように誤解されやすい内容となっている。しかしもしもこれが事実であれば、ヒト線維芽細胞から産生されるコラーゲンのアミノ酸配列が、魚鱗由来のコラーゲンアミノ酸配列を一部共有して合成されていると考える必要がある。今回、コラーゲン検出に用いた EIA キットの抗体は、ヒト I 型コラーゲン特異性があり、魚類コラーゲンは認識しない。従って今回の結果から、摂取コラーゲンペプチドがそのまま再構築されてコラーゲンとして合成されていないと結論できる。

また、一般的に考えて一日 10 g 程度のコラーゲンペプチドの摂取が、体重 50 kg を超えるヒト成人に不足したコラーゲンを補充できるという考え方にも無理があろう。以上の事から、魚鱗コラーゲンペプチドによる線維芽細胞からのコラーゲン合成促進作用は、コラーゲンペプチドが何らかの機能性を有するシグナルペプチドとして細胞機能に影響し、コラーゲン合成を促進しているものと示唆された。

近年コラーゲン由来のジペプチドが血中に移行する事、マウス線維芽細胞の増殖を促進する事も報告されており^{7,8)}、今回効果がみられたコラーゲンペプチドのペプチド成分の構造を含めた同定と、生理活性について分子生物学的に検討する必要がある。

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

- 1) Oesser S, Adam M, Babel W, Seifert J, Oral Administration of ¹⁴C Labeled Gelatin Hydrolysate Leads to an Accumulation of Radioactivity in Cartilage of Mice (C57/BL). *J. Nutr.*, **129**: 1891–1895, 1999.
- 2) Iwai K, Hasegawa T, Taguchi Y, Morimatsu F, Sato K, Nakamura Y, Higashi A, Kido Y, Nakabo Y, Ohtsuki K,

Identification of Food-Derived Collagen Peptides in Human Blood after Oral Ingestion of Gelatin Hydrolysates. *J. Agric. Food Chem.*, **53**:6531-6536, 2005.

- 3) Shigemura Y, Akaba S, Kawashima E, Young Park E, Nakamura Y, Sato K Identification of a novel food-derived collagen peptide, hydroxyprolyl-glycine, in human peripheral blood by pre-column derivatisation with phenyl isothiocyanate. *Food Chemistry*, **129**:1019-1024, 2011.
- 4) Shimizu K, Sato M, Zhang Y, Koguchi T, Takahata Y, Morimatsu F, Shimizu M Molecular size collagen peptide reverses the permeability of Caco-2 cells. *Biosci Biotechnol Biochem*, **74**:1123-1125, 2010.
- 5) Tanaka M, Koyama Y, Nomura Y Effects of collagen peptide ingestion on UV-B-irradiated skin damage, *Biosci Biotechnol Biochem*, **73**:930-932, 2009.
- 6) Chai HJ Li JH, Huang HN, Li TL, Chan YL, Shiao CY, Wu CJ Effects of sizes and conformations of fish-scale collagen peptides on facial skin qualities and transdermal penetration efficiency. *J Biomed Biotechnol*, ID 757301 doi:10.1155/2010/757301, 2010.
- 7) Shigemura Y, Iwai K, Morimatsu F, Iwamoto T, Mori T, Oda C, Taira T, Young Park E, Nakamura Y, Sato K Effect of Prolyl- hydroxyproline (Pro-Hyp), a Food-Derived Collagen Peptide in Human Blood, on Growth of Fibroblasts from Mouse Skin. *J. Agric. Food Chem.*, **7**:444-449, 2009.

白石カルシウムの炭酸カルシウム

炭酸
カルシウム
とは？

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。

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、品揃えしております。

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。

 白石カルシウム株式会社

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

糖アルコール類の機能性と酵素法による新しい定量技術

Functions of sugar-alcohols and new determination of sugar-alcohols with the dehydrogenases

渡部 保夫 (WATANABE Yasuo) *

* 愛媛大学 農学部

Key Words : 糖アルコール・甘味料・デヒドロゲナーゼ・酵素定量法

Key Words : sugar-alcohols, sweetener, dehydrogenases, enzymatic determination

はじめに

糖アルコールとは、グルコース（ブドウ糖）やフルクトース（果糖）などの1位あるいは2位の炭素にあるアルデヒド基やケトン基に、水素が付加（還元）され、アルコールに変換された多価アルコールの総称である。糖の骨格が一つである単糖として、炭素数4個のエリスリトール（a）、炭素数5個のキシリトール（b）、アラビトール（アラビニトールともいう）（c）、炭素数6個のマンニトール（f）、ソルビトール（g）があり、糖骨格が2個の二糖類として、マルチトール（i）、ラクチトール（h）、還元パラチノースなどがある（図1）。図1には、これら以外にリビトール（アドニトールともいう）（d）やイノシトール（e）などの構造も示したが、ほとんど食品には含まれない。なお、いくつかの糖アルコールについては立体異性体があるが、アラビトールを除いてほぼD-型である。

それぞれの糖アルコールについては後述するが、糖に含まれる末端のアルデヒド基やケトン

基が還元されてOH基になった結果、糖-アミノ反応などが抑制されることが、食品加工においては重要な点である。

それぞれの糖アルコールがどのような食材に含まれているかは、生化学データブックによれば次の通りである。エリスリトールは海藻、地衣類、菌類、カビ類、牧草など、キシリトールはプラム、イチゴ、カリフラワーなど、マンニトールは海藻、菌類、茸類、トネリコマンナ、タマネギ、人參、干し柿など、ソルビトールはリンゴ、モモ、杏、ナナカマドなどの果実、海藻などである¹⁾。

糖質と言えば、甘味を呈することがよく知られている。舌の味蕾細胞（甘味細胞）における甘味を感知する機構も次第に明らかになってきているようで、甘味細胞のレセプタータンパク質も明らかにされている²⁾。甘味細胞は“舌”の先端に多く分布している。なお、苦味は舌の奥、酸味は舌側面奥、塩味は舌側面前がそれぞれの味覚に敏感な部分であると言われている。

Corresponding author : 渡部保夫 (Yasuo Watanabe)

連絡先 : 〒 790-8566 愛媛県松山市樽味3丁目5番7号

愛媛大学農学部生物資源学科応用生命化学専門教育コース

E-mail : watanabe@agr.ehime-u.ac.jp

Tel/Fax : 089-946-9849

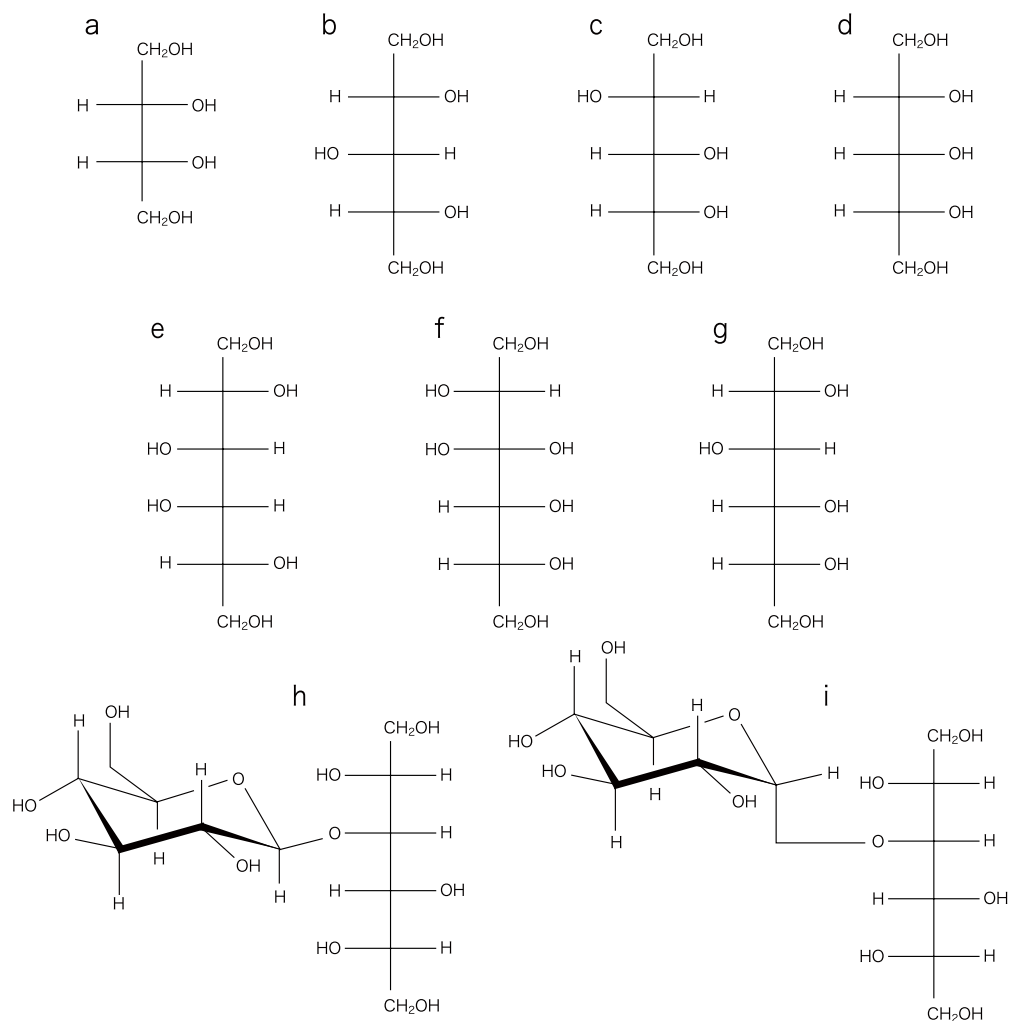


図1 糖アルコールの構造

a: エリスリトール, b: D- キシリトール, c: D- アラビトール, d: D- リビトール, e: ミオ - イノシトール, f: D- マンニトール, g: D- ソルビトール, h: ラクチトール, i: マルチトール.

ともあれ、糖類は基本味（甘味、苦味、酸味、塩味、旨味（あるいは辛味））のうち主に甘味に関係する。糖アルコールも甘味を示すが、砂糖とは幾分異なる種類の甘味である。表1にショ糖を基準とした場合の甘味度、カロリーと、糖アルコール独特な風味を記載した³⁻⁵⁾。

なお、糖アルコールに関して食品衛生法では、キシリトール、マンニトール、ソルビトールは食品添加物とされているが、エリスリトール、二糖類の糖アルコールなどは食品扱いとされて

いるようである⁵⁾。

糖アルコールは、低カロリーの甘味料として主に利用されているが、さらに後述の通り酸や熱に強い性質など食品加工において有効である。自然界では、これら多くの糖アルコールの存在量は少ないが、微生物による発酵製造技術も開発されており、安価な安全な製造品が提供され、今後とも利用が拡大すると推察される。

本稿では、まず糖アルコール類の現状をご紹介します、後半で、筆者らが検討してきた糖アルコー

ルの含量測定のための簡便な酵素法定量技術についてご報告する。

1. 糖アルコールの食経験

糖アルコールは、単糖類の代謝産物として広く見出される多価アルコールであり、単糖類の糖アルコールは天然に広く分布している。例えば、炭素数4のエリスリトールは、キノコ類や果実類のほか、ワインやチーズなどの発酵食品中に含まれている。炭素数5のD-キシリトールは、イチゴやプラムなどの果実類、カリフラワーやレタスなどの野菜類に、D-アラビトールは、稲麹は別として、マッシュルーム、地衣類、椎茸などに含まれている。炭素数6のD-マンニトールは、昆布やワカメなどの海藻類、キノコ類、干し柿などに含まれている。D-ソルビトールは、ナシ、リンゴ、プラムなどのバラ科植物の果実に多く含まれている。これら糖アルコール類は、従来から食経験があり、安全な物質であると言える。二糖類の糖アルコールとしては、マルチトール、ラクチトール、還元パラチノースも利用されている。天然に存在する炭素数3のD-グリセロールも発酵食品などに多

く含まれているが、これを除いて、上記の糖アルコールはいろいろな食品で甘味料として利用されはじめている。一般に多価アルコールは甘味を呈し、表1に示したような風味を示す^{3,4)}。

2. 糖アルコールの工業的製造

糖アルコールの工業的製造では、ラネーニッケルを触媒とする水素添加法により行われている。例えば、二糖類糖アルコールのマルチトールは、デンプンなどの加水分解によって生じたマルトースを高圧下で接触還元して製造する(マルチッドとも言う)。この糖アルコールは腸から吸収されにくく、原料のマルトースよりも低カロリーである⁶⁾。乳糖(ラクトース)を還元することでラクチトールが生成されるが、難消化性でまろやかな甘味を呈すると言われている。還元パラチノース(パラチニットとも言う)は、砂糖(α 1,2結合)をグルコーストランスフェラーゼで処理し⁷⁾、パラチノース(α 1,6結合)に変換した後、水素添加して製造する。パラチニットは原料である砂糖よりも甘味は半減するが、カロリーも半減し、まろやかですっきりした甘味を呈すると言われており、酸安定性、難

表1 各種糖アルコールおよびオリゴ糖の甘味度、カロリー、風味

		砂糖に対する甘味度 (%)	カロリー (kcal / g)	風味 (甘味)
ショ糖		100	4	-
糖 ア ル コ ー ル	エリスリトール	70 - 75	0 (0.0024)	冷涼感、あっさりした甘味
	アラビトール	-	2.4	-
	キシリトール	100	2.4	冷涼感、爽やかな甘味
	マンニトール	50 - 70	1.6	清涼感、爽やかな甘味
	ソルビトール	60 - 70	2.6	清涼な甘味
	マルチロール	70 - 80	2	まろやか、砂糖に似ている
	ラクチトール	30 - 40	2	まろやか
	還元パラチノース	45 - 60	2	さらっと、砂糖に似ている
オリ ゴ 糖	イソマルトオリゴ糖	40 - 50	4	まろやかで濃くがある
	フラクトオリゴ糖	25 - 35	1.6 - 2.2	砂糖に似ている
	ガラクトオリゴ糖	25 - 35	2.0 - 3.0	クセのない甘味
	キシロオリゴ糖	25 - 40	2	砂糖に似ている
	ラフィノース	20	2	砂糖に似ている
	トレハロース	45	4	温和な甘味

発酵性も示す。なお、ソルビトールはグルコースの還元により、マンニトールはマンノースの、キシリトールはキシラン（キシロース）を還元して製造できる。ここで記した糖アルコールは食品添加物あるいは食品としての使用が認められた、安全な化合物である。繰り返すが、ガムではキシリトールやマルチトール、還元パラチノースなど、キャンディではキシリトールやソルビトールなどの糖アルコールが、シュガーレス・低カロリー食材として利用されており、糖アルコールの食経験は豊富なのである。

3. オリゴ糖とは

オリゴ糖という糖類も最近注目されており、単糖類が3から20個程度つながったものである。表1に代表的なオリゴ糖の情報も記載した。オリゴ糖には低カロリーのモノもあるが、一般

に甘味度が低く、甘味料としての利用には不向きである。しかし、胃や小腸での消化率が低く、大腸ではビフィズス菌などの栄養源となりその増殖を促進し、腸内環境を改善する作用が注目されている。また、虫歯の原因になりにくいという特徴もある（表2）^{4,8)}。

4. 糖アルコールの一般毒性

エリスリトール、キシリトール、マンニトール、ソルビトール、マルチトール、ラクチトール、還元パラチノースの急性毒性は、ラット経口投与でLD50は、およそ10 g/kgから20 g/kg程度であり⁵⁾、慢性毒性やその他の試験でも安全性は確認されており、上述したように食経験も豊富であることから、安全性の高い食品添加物（食品）であると言える⁵⁾。

表2 各種糖アルコールおよびオリゴ糖の熱耐性、酸耐性、小腸吸収性、グリセミックインデックス（GI）値、ビフィズス菌に対する影響

		熱耐性	酸耐性	小腸吸収性	GI 値 (Glucose=100)	ビフィズス菌	その他
ショ糖		—	—	高い	65	なし	—
糖 ア ル コ ー ル	エリスリトール	強い	強い	高い	0	なし	吸湿性低い、 虫歯予防
	アラビトール	—	—	—	—	—	—
	キシリトール	強い	強い	高い	13	なし	虫歯予防、 保湿性
	マンニトール	強い	強い	高い	0	なし	吸湿性なし
	ソルビトール	強い	強い	高い	9	なし	虫歯予防、 保湿性
	マルチロール	強い	強い	低い	35	?	虫歯予防
	ラクチトール	強い	強い	低い	6	促進	吸湿性低い
	還元パラチノース	強い	強い	低い		?	吸湿性低い
オリ ゴ 糖	イソマルトオリゴ糖	強い	強い	ある程度	—	促進	吸湿性
	フラクトオリゴ糖	砂糖程度	弱い	低い	—	促進	吸湿性
	ガラクトオリゴ糖	強い	強い	低い	10	促進	吸湿性
	キシロオリゴ糖	強い	強い	低い	—	促進	吸湿性
	ラフィノース	砂糖程度	砂糖程度	低い	0	促進	吸湿性無し
	トレハロース	極めて強い	極めて強い	高い	—	なし	吸湿性無し

その他としてそれぞれの特性を示した。

5. 糖アルコールの安定性

糖アルコールは、酸やアルカリ、熱に対して高い安定性を有しており、食品加工工程でも品質変化（劣化）を起こし難いので、甘味料として加工食品に広く利用されている（表2）。一方、オリゴ糖は構成単糖の違いによって酸やアルカリ、熱に対する安定性が異なっているので注意が必要である（表2）⁴⁾。糖類とアミノ酸（タンパク質）が共存した状態で加熱すると、メイラード反応による褐変が生じることはよく知られている。アミノカルボニル反応という別名称が示すように、アミノ基（アミノ酸： ϵ -アミノ基（リジン残基）や α -アミノ基（アミノ末端））とカルボニル基（糖：アルドースやケトース）が反応して最終的にメラノイジンが生じ、褐色を示す。一般に、還元糖についてもこのメイラード反応における反応性の違いがあるようであるが、糖アルコールはカルボニル基を有しないため、褐変を起こしにくいことから、色調を変えたくない食品加工での利用に最適である⁹⁾。

6. 期待される機能性

6-1. タンパク質冷凍変性防止作用^{10,11)}

ソルビトールは、タンパク質の凍結変性防止を目的として、ショ糖などと一緒に魚のすり身などに添加されている。これらの効果はタンパク質の近くの水と結合し、凍結によるタンパク質水和水の攪乱を抑えることで、タンパク質の変性を防止する。水産物練り製品の長期間の冷凍保存とこれら食材の品質維持に貢献している。

6-2. 非う蝕性と難発酵性

糖アルコールは、一般に、腸内や口腔内の微生物による分解（資化）をほとんど受けないため、非う蝕性、難発酵性である（表2）⁴⁾。キシリトール、マルチトール、還元パラチノース、

エリスリトールは「歯を丈夫で健康にする」旨の表示を許可された特定保健用食品の成分として利用されている。また、「ルミナコイド」という栄養学の用語がある。「人の小腸内で消化・吸収され難く、消化管を介して健康の維持に役立つ生理作用を発現する食品成分」を表す総称であるが、上述したオリゴ糖や食物繊維に加えて、糖アルコールもそれに相当すると考えられている。詳細は詳しい書籍を参照いただきたい¹²⁾。

6-3. 低グリセミックインデックス（GI）値 食材と糖尿病

糖アルコールは低カロリーのものも多く、摂取後の血糖値やインスリン濃度がほとんど上昇しないという特徴がある。エリスリトールについては、エネルギー換算係数 0 kcal/g とされており、グリセミックインデックス（GI）値ゼロと計算されている（表2）^{4,8)}。なお、GI値は、Jenkins らが「いろいろな食品や食材の食後血糖値の変化を表す尺度」として提唱した概念であり¹³⁾、最近認知され始めている⁸⁾。実際には、炭水化物 50 g を摂取した後の血糖値の上昇度合いを表すためのもので、血糖値曲線から算出し一般にグルコースを 100 として表記する¹⁴⁾。つまり、GI 値が高い食品（食材）ほど食後の血糖値を上昇させやすいことを意味する。糖アルコールの中、マルチトールの GI 値は 35 と比較的高いが、それ以外の単糖および二糖類アルコールの GI 値はかなり低く、エリスリトールやマンニトールはゼロである。

食事を摂ると血糖値が上昇するが、健常者は、膵臓からインスリンが分泌されて組織や細胞に糖が吸収されて血糖値は次第に低下する。過食や早食いなどを繰り返すと、血糖値が急激に上昇し、インスリンも大量に分泌される。遺伝的に糖尿病になりやすい人や肥満の人は、インスリンの分泌能力が低下し、血糖の吸収が悪くなり、結果的に、慢性的に血糖値が高い状態「糖尿病」を発症すると言われている。「血糖値が

気になり始めた方」のための食品として、難消化性デキストリン（腸管での吸収阻害）、ギャバ茶ポリフェノールや小麦アルブミン（ α アミラーゼ阻害）、豆豉エキス（ α グルコシダーゼ阻害）、L- アラビノース（スクラーゼ阻害）についてその効能が特定保健用食品として認可され、「血糖値に対する効能」の表示が許されている。ここで述べた低 GI 値食品も、糖尿病を、あるいは血糖値の上昇を抑制する効果があることから、糖アルコールについても GI 値が低い特性を意識し、甘味料として摂取する流れを醸成する必要がある。

6-4. 血圧上昇抑制作用

色々なキノコから抽出された D- マンニトールや D- アラビトールは、血圧上昇因子であるレニン-アンジオテンシン系において重要な役割を果たす酵素であるアンジオテンシン変換酵素（ACE）の弱い阻害剤であることが知られている¹⁵⁻¹⁷⁾。

6-5. 抗酸化作用

D- マンニトール、D- ソルビトール、D- キシリトールには OH ラジカルを消去する抗酸化効果が古くから知られているが¹⁸⁾、それらの効果は弱いため、例えばエリスリトールを無水化して製造した無水糖アルコールが優れた抗酸化能を有するとの特許もある¹⁹⁾。

6-6. 薬理作用

D- アラビトールには新たな薬理的効能をもつことも示されている。例えば、D- アラビトールは、ニューロキニン 1（NK-1）受容体に拮抗的に作用することが示され、NK-1 介在性の疾患症状である、かゆみ、痛み、皮膚炎、咳、ぜんそく、悪心、嘔吐などの対策に使用できるようなのである²⁰⁾。日本薬局方には、ラクチトールが高アンモニア血症（肝硬変）・腸管機能改善剤、マンニトールが脳圧降下、浸透圧利尿剤として、キシリトール、ソルビトールなどは栄養補給のための液剤として利用されている。

6-7. 下痢と下剤

ソルビトールやキシリトールは甘味料として菓子やガムなどに添加されていることが多いが、そのガムを多量に噛んだときに下痢や腹痛を起こすことがあり、ソルビトールは下剤としての薬理効果もある。便媚薬としてマグネシウムを摂取すると血清マグネシウムが上がってしまうことが心配な場合、糖質下剤であるラクツロースやソルビトールは安心して摂取できることになる。日本薬局方によれば医薬品として、胃の X 線カメラ撮影後の便秘の防止のための医薬品として販売され、日本薬局方解説書では成人で 20 から 30 g で緩下作用を示すようである。

6-8. 化粧品（保湿効果）やキャンディ、ご飯の老化防止

本誌の対象、「食品」からは少し外れるが、ソルビトールやキシリトールは、保湿効果があることから、化粧品にもよく使われているようで、保湿剤や柔軟剤として配合されている。表 2 に糖アルコールやオリゴ糖の吸湿性についても記載した⁴⁾。逆に、吸湿性の低いマンニトールなどは、キャンディなどのコーティング剤としても使用されている。また、炊飯した米「ご飯」は低温で長時間放置しておくとも老化の現象を示す。デンプンの構造体から離水が起こり、構造がもろくなり、栄養価も低下する。糖アルコールやオリゴ糖は、その保水能のためにこの老化を防止する目的で添加されている。

7. 糖アルコールを簡単に計測する技術の開発のために

本稿で述べる「酵素を用いた糖アルコールの計測技術」に関連した筆者の研究の歴史をご紹介します。筆者らは、耐塩性（塩に強い性質）を解明し、その耐塩性を遺伝子組換え技術を用いて非耐塩性生物（酵母ならアルコール酵母、植物なら農耕食糧作物）に付与して耐塩性生物

を新規に作出したいと考え、まず、酵母を材料として研究を行ってきた。既に数年前に、筆者はこの分野の研究から手を引いてしまったが、耐塩性酵母(醤油や味噌に利用されている酵母, *Zygosaccharomyces rouxii*) から、細胞膜の塩(Na)輸送に関係する遺伝子や、浸透圧調節に関係する適合溶質(グリセロールやいろいろな糖アルコール)の合成に関係する遺伝子をクローニングし、単一あるいは複数の遺伝子を酵母に導入して耐塩性強化を検討した。酵母の食塩に対する耐性(耐塩性)を強化するためには、環境の高い塩分濃度によって生じる浸透圧の差を中和するために、適合溶質(細胞内に高濃度存在しても生理機能に悪影響を及ぼさない化合物)を蓄積する必要がある。耐塩性酵母ではグリセロールやアラビトールなどが蓄積されていることがよく知られている。残念ながら、耐塩性機構の複雑さのためか、世界を見渡してみても実用的な耐塩性植物の新規作出はできていない。

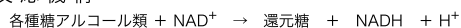
この研究の中で、糖アルコールの合成に関係するデヒドロゲナーゼ酵素に着目し、関係する遺伝子を高発現させることによって酵母細胞の耐塩性化を試み、一部強化を確認した²¹⁾。なお、別にマンニトールを強化して耐塩性を付与した植物も作出されている²²⁾。その研究の過程で、出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)の機能未知の遺伝子(ORF) *YEL070w* が D-マンニトールに高い特異性を持つ酵素をコードしていることを発見したことから、この酵素の食品分析への応用を志向した研究を開始した²³⁾。その後、日本科学技術振興機構(JST)の平成 21 年度シーズ発掘試験「天然甘味料糖アルコールの簡易含量測定技術の開発」と平成 22 年度 FS ステージ探索タイプ「天然甘味料糖アルコールの簡易測定キットの開発」と連続して採択され、研究費を支援いただいたことで、この研究は推進できた。

8. 糖アルコール計測の原理

本稿でご紹介する技術は、各種糖アルコールに高い特異性を有するデヒドロゲナーゼ(脱水素酵素)酵素を利用して、食品成分中に含まれる糖アルコール含量を簡便、安全、安価で計測できる酵素分析法である。この酸化還元酵素は反応のために補酵素(ニコチンアミドアデニンヌクレオチド, NAD^+)を必要とし、基質から H を 2 個受け取って、 NADH と H^+ を化学量論的に生成する。 NADH が 340 nm の紫外線の特異的に吸収するので(NAD^+ は同波長の紫外線を吸収しない)、糖アルコールデヒドロゲナーゼの反応をモニターすることは容易である。図 2 に、酵素反応機構と利用可能な補助反応を示した。

このキットでは対象とする化学物質(基質)に高い特異性をもつ酵素を用いて脱水素反応を行った後、生成物量(NADH 量として)を 340 nm の吸光度から測定するので、高価な計測機器や、危険な化学薬品を使用する必要がない。最近では $\text{NAD}^+ \rightarrow \text{NADH}$ の変化を計測する技術も進化しており、ジアフォラーゼという酵素と INT(インドニトロテトラゾリウム)や NTB(ニトロテトラゾイウムブルー)などのテトラゾリウム化合物を共存させることで、デヒドロゲナーゼ反応で生じた NADH 量に比例し

反応機構



補助反応

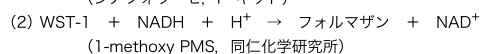
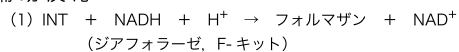


図 2 糖アルコールデヒドロゲナーゼの反応機構
いろいろな糖アルコールを定量するための補助反応として、(1) ジアフォラーゼを用いる方法と、(2) 電子キャリアーを用いる方法を示した。

て可視領域に吸収波長をもつフォルマザンが生成されるので、この化合物の生成量を可視光領域で計測できる²⁴⁾。デヒドロゲナーゼ反応とジオファラーゼ反応を共役させることで、より安価な分光光度計による計測(あるいは自動化)も可能になっている(図2(1))。

別に、同仁化学研究所のHPによると³⁰⁾、デヒドロゲナーゼによって生じたNADHは電子キャリアー(1-methoxy-PMS(1-Methyl-5-methyl-phenazium methylsulfate))の存在下でWST-1(2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium)という化学物質を還元し、水溶性フォルマザン(A438 nm)を生じる。本実験の対象酵素である各種糖アルコールのデヒドロゲナーゼ反応と同じ条件で発色反応は起こるので、NADH量を可視光領域で分光光度計を用いて計測できる(図2(2))。

糖アルコールの計測技術に話を戻すが、デヒドロゲナーゼを用いた酵素分析法は、特別新しいものでもなく、これまでに、F-キットとして市販されている食品分析法にも利用されている²⁵⁾。例えば、ソルビトール/キシリトールを計測できるとして、「F-キット D-ソルビトール/キシリトール」が販売されている。同キットに使用されている酵素(ソルビトールデヒドロゲナーゼ, SDH)は、筆者らの立場からすると特異性が低いと判断され、二つの糖アルコールの合計量としての計測しかできない。

そこで、このSDHよりも特異性の高いデヒドロゲナーゼ酵素を用いた定量キットは、限定した種類の糖アルコールだけを計測できるため有効であろうと考えられたので、上述したD-マンニトールデヒドロゲナーゼ(MDH)以外に、D-アラビトールデヒドロゲナーゼ(ADH)について検討した。筆者らが主要材料としている出芽酵母にはその存在が認められなかったので、ゲノムデータベースを検索したところ、乳糖資化酵母 *Kluyveromyces lactis* が候補遺伝子

(*ADHI*)を持つことを発見した²⁶⁾。D-グリセロールについては、出芽酵母のゲノム中に多数の候補遺伝子を確認した。

時代とともに、データベースに登録されている遺伝子数も飛躍的に多くなり、データベースの情報に従って目的の遺伝子のDNAを調製し、酵母や大腸菌細胞内で酵素タンパク質を大量に準備することも現在では容易である。また、出芽酵母の遺伝子(あるいはORF)は発現ベクターにクローニングされ、出芽酵母内で大量発現が可能になっている製品も販売されている。次に、それぞれの糖アルコールに特異的なデヒドロゲナーゼに関する研究をご紹介します。

9. 遺伝子組換え技術によるデヒドロゲナーゼ酵素タンパク質の調製

9-1. マンニトールデヒドロゲナーゼ(MDH)

遺伝子資源(データベース)を調査したところ、出芽酵母のゲノムデータベースから細菌のMDHに類似性を持つORF(*YEL070w*)の存在を見出したので、この遺伝子を出芽酵母で高発現させることとした。その時点で比較的入手しやすかった出芽酵母用発現ベクター(pESC-LEU, ストラタジーン社製)の*GALI10*プロモーターの下流にORF部分を連結し、出芽酵母を形質転換した。得られた組換え酵母細胞の破碎液を用いて、各種糖アルコールに対するデヒドロゲナーゼ活性(糖アルコールデヒドロゲナーゼ活性)を測定した(図3-A)。この酵素がD-マンニトールにだけ高い特異性を示すことが分かった²¹⁾。

9-2. アラビトールデヒドロゲナーゼ(ADH)

次に、D-アラビトールについて、ゲノムデータベースを調べたところ、乳糖資化酵母 *K. lactis* に候補遺伝子(*ADHI*)を確認したので、そのORFを出芽酵母用発現ベクター(pESC-LEU)に挿入して発現させた遺伝子組換え酵母

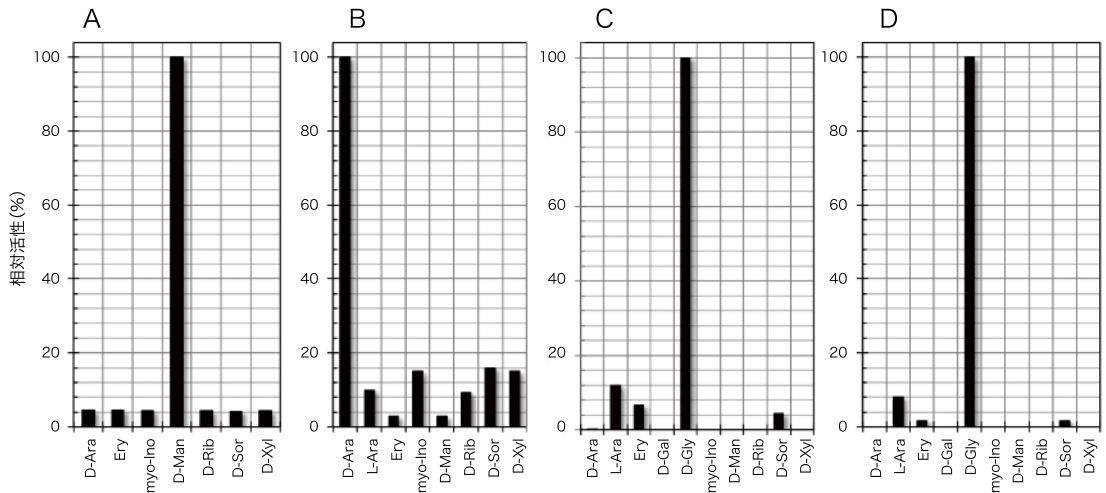


図3 マンニトールデヒドロゲナーゼ (MDH), アラビトールデヒドロゲナーゼ (ADH), グリセロールデヒドロゲナーゼ (GDH) の基質特異性

A: *Saccharomyces cerevisiae* 由来 MDH, B: *Kluyveromyces lactis* 由来 ADH, C: シグマ社製 GDH (G3512), D: シグマ社製 GDH (G4783)。参考文献に記載した図を改変した。Ara, アラビトール, Ery, エリスリトール, myo-Ino, ミオ - イノシトール, Man, マンニトール, Rib, リビトール, Sor, ソルビトール, Xyl, キシリトール, Gal, ガラクチトール, Gly, グリセロール。

細胞の破碎液の糖アルコールデヒドロゲナーゼ活性を測定した (図 3-B)。発現した酵素が D-アラビトールに高い特異性を持つことが分かった²⁶⁾。

9-3. その他のデヒドロゲナーゼ

ソルビトール, エリスリトール, キシリトールについてはこれまで筆者が調べた限り, 適当な遺伝子は見出せていない。グリセロールについては, 出芽酵母に候補遺伝子が多数存在していた。そこで, それらの遺伝子の ORF についても同様に発芽酵母で高発現することを計画したが, その時点で出芽酵母の多数の遺伝子が出芽酵母発現用ベクター (BG1805) にクローニングされ, 市販されていることが分かったので, グリセロールについてはその市販組換え酵母株を利用することにした。GCY1 と YPR1 遺伝子について, 組換え酵母株を入手し, 遺伝子を発現誘導した後, 酵母細胞破碎液の糖アルコールデヒドロゲナーゼ活性を測定した。期待に反して, これらの遺伝子がコードするデヒドロゲナーゼは, 試験した全ての糖アルコールを基質

として利用できる酵素で, いわゆるポリオールデヒドロゲナーゼであることが示唆された。ここで, これらの遺伝子の発現ベクターは, タンパク質の C 末端に His タグが付加されるように設計されていたこと, 出芽酵母には多種類のデヒドロゲナーゼが共存している可能性も考えられたので, これらの酵素を精製することにした。Ni を固定したカラムを用いた His タグタンパク質自動精製装置 (Bio-Rad 社製, Profinia) を用いて目的の酵素タンパク質を精製した。精製酵素の糖アルコールデヒドロゲナーゼ活性を測定したところ, やはりポリオールデヒドロゲナーゼの基質特異性を示し, 結局, この戦略ではグリセロールに特異的なデヒドロゲナーゼを得ることはできなかった³²⁾。

10. 糖アルコールの機器分析測定

糖アルコールの機器分析について, これまでガスクロマトグラフィー法 (GC) が基本であった。しかしながら, 糖あるいは糖アルコー

ルのGC分析のためには、これらの化合物をシリル化するなどの化学修飾が必要であった。筆者らも、同方法を用いてD-マンニトールの定量を行った²²⁾。この化学修飾などが定量性に影響を及ぼすため、最近では、この操作をスキップして材料中の糖や糖アルコールを直接分析する技術も開発されてきた。糖や糖アルコールは、検出に便利な紫外線(UV)を効率よく吸収しないので、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法で分離した後、物質を含む移動相(溶媒)と移動相自体との間の屈折率の違いによって溶解している物質の存在量を計測する示差屈折率(RI)法が用いられてきたが、感度はそれほど良いものではなく、さらに、HPLC法で糖や糖アルコール類を効率よく分離するために用いられる溶媒組成や濃度を変化させるグラジエント分離法には適さないと言われている。このような欠点を克服したHPLC用検出器として、蒸発光散乱検出器(ELSD)を装備したHPLC-ELSDが開発された。筆者の研究室では脂質分析でも利用しており、本誌にHPLC-ELSDを用いたリン脂質などの分析技法についてまとめているので参照願いたい²⁷⁾。

HPLC-ELSDでグルセロール、エリスリトール、キシリトール、アラビトール、ソルビトール、マンニトール、イノシトールなどの糖アル

コールを分析した結果を図4に示した。参考のために、島津社製のHPLC-ELSD装置の構成および図4の実験条件を記す。Prominenceシステムは、LC-29AD(2台)、SIL-20AC、CBM-20A、DGU-20As、CTO-20ACから構成され、検出器としてELSD-LTIIを装備している。使用カラムは、インタクト社製Unison UK-Amino(250×4.6 mm)を用いた。このカラムの固定相にはアミノプロピル基が付加されており、単糖、二糖、オリゴ糖、糖アルコールなどが分離できるとされている。カラムメーカーの推奨移動相は、A液:水、B液:アセトニトリルとし、次のような濃度グラジエントのプログラムで行った。すなわち、0分から6分:10%B液、6分から20分:10から25%B溶液グラジエント、20から25分:20%B液であり、流量:1.0 mL/分、カラム温度35℃で行った。なお、ELSDの検出条件は、フィルター:4 sec、検出温度:30℃(グリセロールを測定しない場合は40℃で行う)、N₂ガス圧:350 KPa、ゲイン:6であった。上記の糖アルコール類についてそれぞれ50～2500 µg/mL含む標準液を作製し、検量線を作製した(データ示さない)。検出器強度の面積値と糖アルコール含量値のそれぞれの対数値には直線関係が得られた。このHPLC-ELSDによる糖アルコールの分析値は、本稿の主題である糖アルコールの酵素

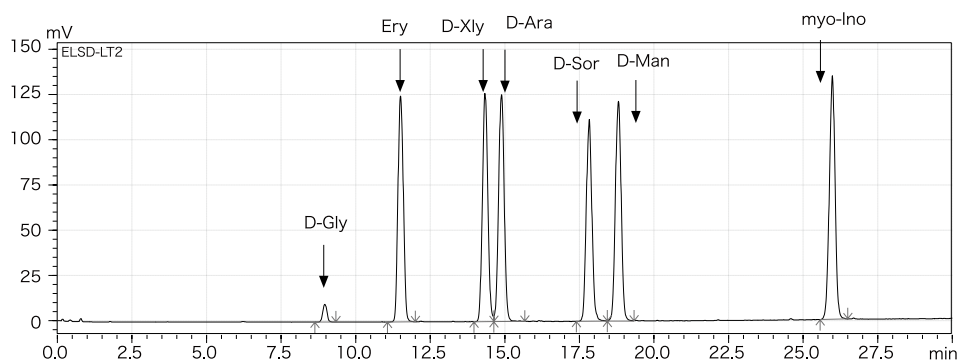


図4 蒸発光散乱検出器(ELSD)付き高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による各種糖アルコール類分析例
Gly, グリセロール, Ery, エリスリトール, Xyl, キシリトール, Ara, アラビトール, Sor, ソルビトール, Man, マンニトール, myo-Ino, ミオ-イノシトール。

法分析技術の精度を評価するために基準値として用いた。

11. 酵素法分析のためのサンプルの前処理

酵素分析法において、目的の化学物質（ここでは糖アルコール）の計測を妨害する夾雑物質が、食品や生体試料にはたくさん含まれているので、目的の物質を正確に計測するためには、その妨害物質を除去する必要がある。これまでいろいろな化学試薬や限外濾過フィルターを用いた除タンパクが行われてきた。また、可視光や紫外光での計測を妨害する色素化合物の除去も必要かもしれない。前述のF-キットでも、「Carrez 試薬を用いた塩析法、過塩素酸を用いた酸化還元法、トリクロロ酢酸を用いた強酸処理法、透過膜法、超遠心分離法、加熱処理法」などの除タンパクや色素の除去を必要に応じて行うことを推奨している²⁸⁾。

本誌でも、アミノ酸分析の前処理として、目的のアミノ酸を疎水性や荷電の有無などの特性に従って吸着回収する固相抽出法をご紹介した²⁹⁾。しかし、糖アルコールは親水性物質であり、水溶液中で電荷をもたないので、イオン交換樹脂には結合しない。正および負に電荷した官能基をもつ樹脂カラムにサンプルを通過させることにより、等電点以外ではどちらかの荷電をもつタンパク質や、荷電をもつ色素を吸着除去できることになる。筆者らが糖アルコールの酵素法分析において実際に用いた前処理法を2つご紹介する。

11-1. 除タンパク法

D-マンニトールの定量的ための前処理として、乾燥昆布からエタノール抽出したサンプルについて、過塩素酸を用いて除タンパクした例は、以下の通りである²²⁾。

乾燥昆布をハサミで細かく裁断後、ビーンミルミキサーを用いて粉碎した。昆布粉末 (5g) に 80% エタノール (30 ml) を加え、室温で 10

分間激しく振とうした。60℃で5分間加、5分間超音波処理後、1,000 × g、10分間遠心分離した。得られた上澄みを抽出液①とし、沈殿について上記と同様の操作を行い、上澄みを抽出液②とした。除タンパクするために、それぞれの抽出液 (3 mL) と 0.6 M 氷冷過塩素酸溶液 (3 mL) を混和、氷冷 10 分、10,000 × g、10 分間遠心分離し、上澄みを得た。上澄み (4 mL) にメチルオレンジ指示薬 (0.1 mL) を添加後、水酸化カリウム溶液を加え中和した。氷上で 15 分間放置した後、1,000 × g、10 分間遠心分離し、同時に過塩素酸カリウム沈殿として過剰の過塩素酸は除去した。得られた上澄みを酵素法定量の測定試料溶液とした。

11-2. ダブルイオン交換法

筆者の研究室ではアミノ酸の固相抽出法として、正あるいは負に荷電した官能基をもつイオン交換樹脂が充填されたカラムを使用している。糖アルコールは正にも負にも電荷をもたないので、酵素法における妨害物質であるタンパク質や色素など正あるいは負の荷電をもつ物質を、強カチオン交換樹脂（例えば、SCX）と強アニオン交換樹脂（例えば、SAX）の両方のカラムを順次通過吸着させることで試料液から除くことができると報告されていた³¹⁾。乾燥椎茸から水抽出したサンプルのD-アラビトール含量測定のため、2本のイオン交換樹脂を用いた前処理を以下の通りに行った²⁶⁾。

乾燥椎茸を細かく裁断後、ビーンミルミキサーを用いて粉碎した。椎茸粉末 (2 g) に水 (40 mL) を加え、攪拌後、冷蔵庫で一晩放置した。その後、遠心分離 (1,500 × g、10 分間) して上澄みを得た。溶液の一部を限外濾過フィルター (VIVASPIN500, 分子量 3000, GE Healthcare 社製) を用いて高分子タンパク質を除いた。得られた溶液 (1 mL) をコンディショニング済み SCX カラムに付加し、水 (2 mL) でカラムを洗浄した。次に溶出液をコンディ

ショニング済み SAX カラムに付加し、水（2 mL）でカラムを洗浄した。SAX カラム溶出液（約 5 mL）を凍結乾燥した後、水（1 mL）に再溶解し、酵素定量法の測定試料溶液とした。

12. 糖アルコール定量用試薬の構成

「簡便な糖アルコールの定量法」の基本コンセプトは、「一つの共通の反応溶液を用いるが、どの糖アルコールを定量するかによって酵素剤を使い分けるだけで、基本的な操作技術は共有できること」である。現在、筆者らが独自に調製した酵素剤は、ADH と MDH の 2 種であり、残念ながらその他の糖アルコールにはまだ対応できていない。D- ソルビトールについてはキッコーマン社のソルビトールデヒドロゲナーゼ（SDH）（なお、ガラクトクトールに対しても同程度に反応するが、この糖アルコールは食材には多く含まれない）、D- グリセロールについてはシグマ社製のグリセロールデヒドロゲナーゼ（GDH）が特異性も高いことからこの酵素が利用できる（図 3-C,D）。それでも、エリスリトールと D- キシリトールの特異的な酵素定量は残念ながら行えない。

以上、利用可能なデヒドロゲナーゼ酵素の最適 pH と補因子と基質特異性を表 3 に示した。これらの酵素剤を使用する限り、pH 9.5 から 10.0 の緩衝液を用いればよい。デヒドロゲナーゼ反応に必要な補因子も共に NAD^+ であるので、一つの共通の緩衝液を用いればよく、 NAD^+ を含めて凍結乾燥粉末として提供することになる。

遺伝子組換え酵母細胞から ADH と MDH 酵素を純粋に精製する方法は、現時点では確立できていないので、酵素サンプル毎に比活性が異なっているのだが、これら酵素をバイアルに入れ、凍結乾燥粉末としてキットに入れることになる。

別に、必要に応じて、標準糖アルコール類や、サンプル希釈用緩衝液（上記の NAD^+ を除いた反応液に相当）の凍結乾燥粉末を加えることになる（図 6 参照）。

13. 食品サンプルの糖アルコール分析例

13-1. D- マンニトール分析

昆布に含まれる D- マンニトールの含量を測定した例をご紹介します²²⁾。

MDH 酵素については、前述の通り出芽酵母の ORF *YEL070w* を酵母発現ベクターに組み込み、出芽酵母細胞で大量発現させた後、酵母細胞破碎液を MDH 酵素剤として用いた。酵素活性は十分に高かったので酵素の純化操作は行わず希釈して使用した。上述の通り、昆布から D- マンニトールを含むサンプルを水抽出、除タンパクなどの前処理を行ったものを測定用試料溶液とした。

反応液の組成は、検量線用マンニトール標準溶液あるいは希釈した測定試料溶液（67.5 μL ）、1mM WST-1（27 μL ）、50 μM 1-Methoxy PMS（27 μL ）、0.1M トリス塩酸緩衝液（pH 8.5, 67.5 μL ）、0.3 mM $\beta\text{-NAD}^+$ 溶液（67.5 μL ）、MDH 酵素希釈液（13.5 μL ）であった（全量 270 μL ）。MDH 酵素添加直後と 10 分、30 分後の吸光度（450 nm）をマイクロプレートリーダーで測定

表 3 4種の糖アルコールデヒドロゲナーゼの特徴

酵 素 名	最適 pH	補因子	基質特異性
D- アラビトールデヒドロゲナーゼ（ADH）	9.5 ～ 10.0	NAD^+	D- アラビトールだけ
D- マンニトールデヒドロゲナーゼ（MDH）	8.5 ～ 10.0	NAD^+	D- マンニトールだけ
D- ソルビトールデヒドロゲナーゼ（SDH）	9.0 ～ 10.0	NAD^+	D- ソルビトールと D- ガラクトクトール
D- グリセロールデヒドロゲナーゼ（GDH）	10.0	NAD^+	D- グリセロールだけ

表4 昆布から抽出したD-マンニトールサンプルの酵素法およびGC法による測定

昆布サンプル	D-マンニトール量 (mg / 5g)	
	GC 法	酵素法
A-1	88	72.9
A-2	48	45.8
B-1	146	131.9
B-2	114	111.3

した。反応液中に含まれる D-マンニトール量として 0.5 から 6 $\mu\text{mol/L}$ の間で検量線が作成できた (データ示さない)。また、測定用試料溶液を 20 倍, 100 倍, 1000 倍と希釈したとき、希釈率と測定値との間で良い相関性が見られた (データ示さない)。10 倍希釈ではその関係から外れ、低い測定値を示したことから、酵素測定に悪影響を及ぼす物質がなお共存していることが示唆された。本方法は、十分に感度が良いので、高倍率でサンプルを希釈することでその夾雑物の影響を軽減できるであろう。

昆布サンプル A と B の抽出液①と②について、本酵素法で測定した値と、GC 法³³⁾により測定した結果を表 4 に示した。酵素法の測定値の方が若干低かったが、両測定値の回帰分析の結果 (図 5) は良好な近似直線を描け、相関係数 (R) の 2 乗値は非常に高かった。

13-2. D-アラビトール分析例

次に、椎茸に含まれる D-アラビトールの含量を測定した例をご紹介します²⁶⁾。ADH 酵素剤としては *K. lactis* 由来の *ADHI* 遺伝子を出芽酵母で発現した出芽酵母細胞の破碎液を用いたが、上述したマンニトールの場合と同様に十分に高い ADH 酵素活性を示したので、純化等の処理は行わず、酵素液をなお希釈して使用した。

なお、D-マンニトールの場合は、マイクロプレートリーダーを使用したのが、D-アラビトール定量の実験では 4 mL 石英キューベットを使用して一般的な分光光度計を用いて行った。反応液の組成は、検量線用マンニトール標準溶液あるいは希釈した測定試料溶液 (1 mL)、10

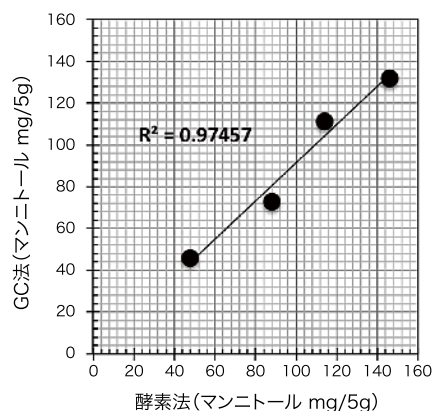


図5 D-マンニトールデヒドロゲナーゼ (MDH) を用いた酵素法の測定値とガスクロマトグラフィーを用いた測定値の回帰分析 R^2 , 相関係数の 2 乗値。

mM グリシン-NaOH 緩衝液 (pH 9.5, 0.8 mL), 0.3 mM $\beta\text{-NAD}^+$ (1 mL), ADH 酵素溶液 (0.1 mL) であった (全量 2.9 mL)。ADH 酵素を加えた後、25°C で 10 分間反応した。酵素添加直後と 10 分後の反応液の 340 nm の吸光度を測定した。標準マンニトール溶液を用いた検量線では、1 から 20 mmol/L の間で作成できた²⁶⁾。前述の D-マンニトール定量で述べたフォルマザン法 (可視光測定) と組み合わせた技術に比べて感度が低いことが分かった。D-マンニトールの定量においても A340 nm で計測した場合では 10 倍程度感度が低かった。ADH と MDH 酵素の触媒効率も違うことから、キットの完成時には測定感度を高値で揃えることも必要であろう。

除タンパクおよびカラム精製した D-アラビトール測定試料溶液について、3 倍, 5 倍, 10 倍, 50 倍, 100 倍に水希釈したサンプルについて、100 倍から 5 倍まで希釈率と測定値との間には良い相関性が認められたが、3 倍では測定値が低くなり、夾雑物質による酵素阻害がなお推察された (データ示さない)。しかし、マンニトール測定における過塩素酸による除タンパク前処理 (1) よりは限外濾過 + ダブルイオン交換法処理 (2) の方がより有効であることが示唆された。

図6 「糖アルコール四種の簡易定量キット」の内容物

内容物	マイクロプレートリーダー / WST-1/1-methoxy PMS	内容物	分光光度計（可視領域） / ジアフォラーゼ
A	サンプル希釈液：緩衝液（pH 8.5）	A	サンプル希釈液：緩衝液（pH 8.8）
B	β -NAD ⁺ in 緩衝液（pH 8.5）	B	β -NAD ⁺ in 緩衝液（pH 8.8）
C 1～4	糖アルコールデヒドロゲナーゼ（4種類）*	C 1～4	糖アルコールデヒドロゲナーゼ（4種類）*
D	WST-1（同仁化学研究所）	D	INT（Roche 社）
E	1-methoxy PMS（同仁化学研究所）	E	ジアフォラーゼ（Roche 社）
F 1～4	標準糖アルコール（4種類）	F 1～4	標準糖アルコール（4種類）

* ADH, MDH, SDH, GDH

表5 椎茸から抽出した D- アラビトールサンプルの酵素法および HPLC-ELSD 法による測定

サンプル	D- アラビトール量 (mg / 2g)	
	酵素法	HPLC-ELSD 法
A	58.7	46.8
B	58.4	47.2
C	41.2	33.9
平均値	52.8	42.6

 $t(4)=1.40, p=0.23$

椎茸サンプル ($n=3$) について、乾燥椎茸 2 g 当たりの D- アラビトール量を、酵素法と HPLC-ELSD 法で測定した結果を表5に示した。酵素法の平均値は 52.8 mg, HPLC-ELSD 法の平均値は 42.6 mg であり、 t 検定では両者に有意な差がなかった ($t(4)=1.40, p=0.23$)²⁶⁾。

結論として、昆布に含まれる D- マンニトールと、椎茸に含まれる D- アラビトールを本稿でご紹介した酵素法により定量した値は、機器分析の測定値と比較して統計的に有意な差はなく、本酵素定量法が技術的にも有効であることを例証できた。「糖アルコール四種の簡易定量キット」とでも名付けられるキットの内容物として、図6に示した構成を考えている。

おわりに

本稿でご紹介した糖アルコール簡易定量技術の開発を思い立ったきっかけは、D- マンニトールに特異性の高い酵素が取得できたことであっ

た。糖アルコールの重要性について承知していたわけではなく、逆にいろいろ調べてみると、糖アルコールが有用な機能を多数もっており、今後利用が拡大すると予想される食材であることを知った。キシリトールやエリスリトールなどの非う蝕性やノンカロリーな特性は既に広く利用されていることは周知の通りである。本稿でご紹介した糖アルコール類がもっているいろいろな機能を利用した食品（特定保健用食品）が新規に開発されることを期待しているところでもある。

このような流れにおいて、筆者らが開発しようとしている「糖アルコール類の簡易定量技術」は、食品産業界で少なからず貢献できると考えている。現在では紫外線波長（340 nm）での測定に一部は止まっているものもあるが、ジアフォラーゼ酵素や電子キャリアーを追加することにより可視領域波長（450 nm）での測定も可能であり、簡便性はさらに向上できる。

それでもなお、キシリトール、エリスリトールに特異的なデヒドロゲナーゼ酵素の情報を筆者らは持ち合わせていない。今後各種生物のゲノム情報が蓄積されれば、候補となる酵素も発見されるであろう。そうすれば、「自然界に比較的大量に存在する糖アルコール類すべての酵素法による定量技術」のためのツールは揃うことになる。今後に期待したい。

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

- 1) 山川 民夫ら編：生化学データブック I, 日本生化学会編, 東京化学同人, pp. 436-438 1979.
- 2) 松本 一朗, 應本 真：甘味, 旨味, 苦味細胞産生の必須因子 Skn-1a. 化学と生物, **50**(5), 312-314, 2012.
- 3) The calorie Control Council ホームページ：http://www.caloriecontrol.org/redcal.html
- 4) 脇谷 和彦, 菊池 美智子：砂糖類情報. 畜産産業振興機構ホームページ, 2007 年 7 月.
- 5) 津志田 藤二郎, 梅垣 敬三, 井上 浩一, 村上 明：機能性食品の安全性ガイドブック. pp. 46-50, SCIENCE FORUM, 2007.
- 6) 奥 恒行, 金 順姫, 細谷 憲政：マルチトールの分解におよぼすマルトースならびに食餌の影響. 栄養と食糧, **34**, 145-151, 1981.
- 7) 谷口 肇：世界に誇る日本の糖質関連酵素研究. 生物工学会誌, **91**(1), 14-17, 2013.
- 8) G. Livesey : Health potential of polyols as sugar replacers, with emphasis on low glycaemic properties. *Nutrition Res. Rev.*, **16**, 163-191, 2003.
- 9) 山田 耕路：食品成分の機能と化学, pp. 131-132, 株式会社アイピーシー, 2001.
- 10) 海老原 清, 関川 三男, 大槻 耕三：食品保蔵・加工学. p.85, 講談社菜園ティフック, 2008.
- 11) 西村 公雄, 内野 祥子, 佐藤 郁夫：冷凍変性防止剤, 耐冷凍変性すり身. 特開 2001-136901, 2001.
- 12) 海老原 清, 早川 享志, 奥 恒行：ルミナコイド研究のフロンティア. 建帛社, 2010.
- 13) G.N. Jenkins, R.H. Taylor, T.M. Wolever : The diabetic diet, dietary carbohydrate and differences in digestibility. *Diabetologia*, **23**, 477-484, 1982.
- 14) 奥村 仙示, 川上 由香, 佐久間 理英, 武田 英二：大麦を利用した食後高血糖抑制割合の検討と食品評価法. *New Food Industry*, **54**(4), 12-22, 2011.
- 15) S. Y. Hagiwara, M. Takahashi, Y. Shen, S. Kaihou, T. Tomiyama, M. Yazawa, Y. Tamai, Y. Sin, A. Kazusaka and M. Terazawa : A phytochemical in the edible Tamogi-take mushroom (*Pleurotus cornucopiae*), D-mannitol, inhibits ACE activity and lowers the blood pressure of spontaneously hypertensive rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**, 1603-1605, 2005.
- 16) M. Kiyoto, H. Suzuki, T. Hara, Y. Yagi, N. Cho, S. and M. Aoyama : Moderate angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitor from the fruit body of *Sarcodon aspratus*. *Mushroom Sci. Biotechnol.*, **13**, 189-194, 2005.
- 17) M. Aoyama, S. Saito, M. Kiyoto, I. Togashi, T. Hara, Y. Yagi, T. Kimura and S. Yoneyama : Antihypertensive components in the fruit body of *Ganoderma lucidum*. *Mushroom Sci. Biotechnol.*, **15**, 91-96, 2007.
- 18) 長野 哲雄, 増野 匡彦：ファルマシア, **27**(3), 231-233, 1991.
- 19) 佐藤 晃司：抗酸化剤, 特開 2012-136616, 2012.
- 20) 木村 光夫, 森下 聡, 田中 良昌, 尾林 裕子：NK1 受容体アンタゴニスト. 特開 2009-263270, 2009.
- 21) Y. Watanabe, Y. Takechi, K. Nagayama, Y. Tamai : Overexpression of *Saccharomyces cerevisiae* mannitol dehydrogenase gene (YEL070w) in glycerol synthesis-deficient *S. cerevisiae* mutant. *Enzyme Microb. Technol.*, **39**, 654-659, 2006.
- 22) M.C. Tarczynski, R.G. Jensen, H.J. Bohnert : Stress protection of transgenic tobacco by production of the osmolyte mannitol. *Science*, **259**, 508-510, 1993.
- 23) 渡部 保夫, 武智 由紀, 金澤 寛子, 森田 安佳里, 山田 寿, 玉井 洋一：酵母由来のマニトール脱水素酵素の特徴とマンニトールの酵素法分析への応用. *Food Function*, **4**(2), 74-79, 2008.
- 24) K.Takamizawa, S.Uchida, M.Hatsu, T.Suzuki, K.Kawai : Development of a xylitol biosensor composed of xylitol dehydrogenase and diaphorase. *Can. J. Microbiol.*, **46**(4), 350-357, 2000.
- 25) J.K. インターナショナル社ホームページ：http://www.food-analysis.jp/download/pdf/f_kit/catalogue/d_sorbitol_xylitol.pdf
- 26) Y. Watanabe, M. Ochi, Y. Shiraishi, S. Watanabe, Y. Tamai : Preparation of D-arabitol dehydrogenase from *Kluyveromyces lactis* and utilization for enzymatic quantitation of D-arabitol. *Food Function*, **12**, 13-19, 2013.
- 27) 渡部 保夫：脂質分析と食品加工 (その 1). *New Food Industry*, **54**(11), 47-55, 2012.
- 28) J.K. インターナショナル社ホームページ：http://www.food-analysis.jp/f_kit/faq/
- 29) 渡部 保夫, 石橋 智毅, 松井 都, 渡辺 誠也：アミノ酸分析のための固相抽出法. *New Food Industry*, **55**(3), 1-8, 2013.
- 30) 同仁化学研究所ホームページ：http://dominoweb.dojindo.co.jp/goodsr7.nsf/View_Display/W201?OpenDocument.
- 31) T. Niwa, K.Tohyama, Y.Kato : Analysis of polyols in uremic serum by liquid chromatography combined with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr.*, **613**, 9-14, 1993.
- 32) 趙 紅梅, 白石 雄大, 田中 宏樹, 渡部 保夫：Saccharomyces cerevisiae 由来グリセロール脱水素酵素の精製と細菌由来酵素の基質特異性. 愛媛大学農学部紀要, **56**, 33-39, 2011.
- 33) H. Yamada, M. Kamio, S. Amano: Varietal differences in susceptibility to early or high temperature-induced watercore in apples. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, **74**, 115-120, 2005.

一滴の油のおいしさ

— 油脂の嗜好性への嗅覚の関与と料理への展開 —

中野 久美子 (NAKANO Kumiko) *¹ 中村 元計 (NAKAMURA Motokazu) *¹ 久保 春香 (KUBO Haruka) *¹
松村 成暢 (MATSUMURA Shigenobu) *¹ 網塚 貴彦 (AMITSUKA Takahiko) *² 斉藤 司 (SAITO Tsukasa) *²
伏木 亨 (FUSHIKI Tohru) *¹

*¹ 京都大学大学院 農学研究科 食品生物科学専攻 栄養化学分野, *² 長谷川香料株式会社 総合研究所

Key Words：油脂・香り・風味・酸化・嗜好性・嗅覚・マウス・実験・官能評価

はじめに

油脂は狩猟、採取による食糧のほとんどすべてに含まれているため、意識するしなに関わらずヒトや動物は常に油脂を摂取してきた。食用油脂は、植物や動物から採油、製油され、液体または固体の油脂単独の状態に加工されたものである。油脂は抽出する原料や方法により風味や成分が異なり用途にあわせて使われている。これらの油脂を含む食品は一般的においしく感じられる。油脂は、それだけを口に入れてもヒトはおいしいと判断しないが、食品に加えられるとおいしさに寄与する。

調理の現場では、油脂は揚げ物やファーストフードのように大量に用いられる場合から、和食などで油脂がほとんど含まれない料理に油処理をした材料が加えられる、または一滴ほどの極少量の油が添加されることがある。油脂は少量でも食品に添加することでコクや満足感を増強させる効果があることが推察される。

これまでに、油脂の多様な要素がおいしさに影響することが報告されている¹⁻⁷⁾。油脂は、報酬効果をもたらす成分であることならびに口腔内での受容システム等が明らかにされ、食品の嗜好性に寄与する重要な成分である⁸⁾。さ

らに、油脂のおいしさの多様な要素の中で油脂の香りは重要な要素であることが報告されている⁹⁻¹²⁾。揚げ物や油を含む食品の魅力的に感じる共通の風味には、加熱等により油脂が酸化して生じる香気成分（アロマ）が含まれている。油脂の酸化によるアロマが油脂の風味に寄与し、油脂の嗜好性に影響を与えていることが推察される。

本研究では、少量の油脂や油脂の酸化による香気成分が食品の嗜好性に与える影響について、マウスによる行動学実験およびヒトによるおいしさの評価回帰モデル¹³⁾を用いて検討した。

1. 油脂の嗜好性とおいしさの評価方法

これまでの研究や文献により、嗜好性は好き嫌い、おいしさに影響を与えるもの、おいしさは食品を摂取した時の多様な要素を統合した判断、嗜好性の更新に寄与するものと定義した。おいしさ Palatability の重回帰分析による評価モデルは、構成要素として生理 Physiological、報酬効果 Rewarding、食文化（食経験）Cultural、情報 Informational を抽出・分類し、生理以外の3つの要素でおいしさを再構成するものであ

る。これまでに、油脂は報酬効果の要素に影響を与えることが示唆されている¹³⁾。ヒトによる油脂のおいしさの評価方法として、食べてすぐの脳の中で統合された判断を心理統計学的に測定することを試みた。マウスによる油脂の嗜好性評価方法として、行動学実験のリック数や摂取量の比較を行った。

2. 少量の油脂の嗜好性

8週齢のBALB/c雄性マウス($n=15$)を1週間予備飼育した後、100%コーンオイルと0.3%キサンタンガム溶液を識別できるようになるまで両液を用いたトレーニングを行った。すべての被験液は0.3%キサンタンガム溶液で懸濁した。10%スクロース溶液と100 mM MSG溶液に、各種油脂類を添加し、リック試験(1分間に試料をなめた回数)および二瓶選択試験(10分間の摂取量比較)を行った。各被験液の呈示する順番は各個体においてランダムに設定した。

リック試験および二瓶選択試験の結果、0.39%コーンオイル添加により、水、スクロース、MSGすべてのリック数と摂取量が増加した。0.01%コーンオイル、0.01%オレイン酸添加の場合は、水では識別できないが、スクロー

スでは有意に多く、MSGはオレイン酸で有意に多くコーンオイルで多い傾向があった。これらの結果から、低濃度の油脂類をスクロース溶液やMSG溶液に添加することで各味質の嗜好性を高めることが示唆された。

3. 調理油の嗜好性

低濃度の油脂の嗜好性には油脂の香りが寄与し、油脂の香りには油脂の酸化による香気成分が影響を与えることが考えられる。調理等で少し酸化させた油の嗜好性について、マウスを用いた10分間の二瓶選択試験により調査した。常温に3週間蓋をあけて放置した市販のオリーブオイルを、蓋を開けたてのオイルよりも有意に多く摂取した(図1)。その時の酸化オイルのテストペーパーによるPOV値は約25を示した。180℃7分間加熱した市販のオリーブオイルを、蓋を開けたてのオイルよりも有意に多く摂取した。その時の酸化オリーブオイルの濃度は1%では嗜好性を示さなく、0.1%で嗜好性を確認した(図2)。酸化オイルのテストペーパーによるPOV値は約50を示した。

酸化させたオリーブオイルの香気成分を集めたオリーブオイル酸化アロマを作成するための原料である酸化オイル¹⁴⁾は、酸化していない

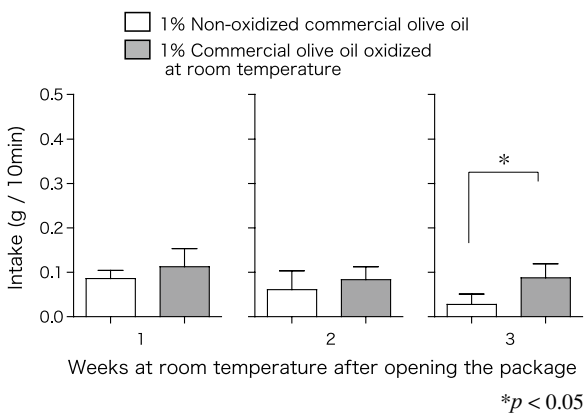


図1 二瓶選択試験¹⁵⁾(蓋を開けたてのオイル vs 室温放置したオイル)

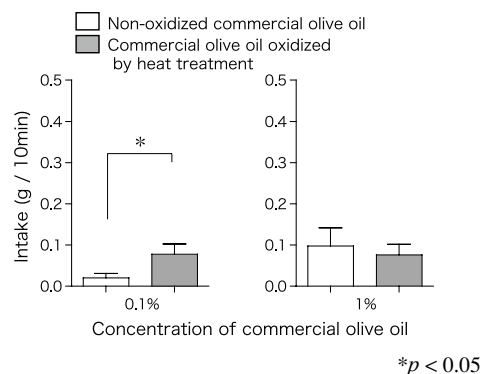


図2 二瓶選択試験¹⁵⁾(蓋を開けたてのオイル vs 加熱処理したオイル)

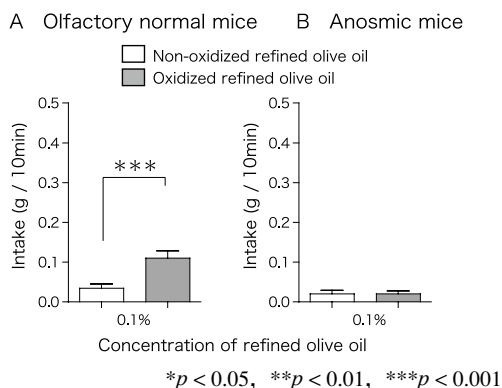


図3 二瓶選択試験¹⁵⁾ (A 嗅覚正常マウス B 嗅覚破壊マウス)

オリーブオイルよりも嗜好性が高いことが示唆された。硫酸亜鉛処理で嗅覚を破壊したマウスでは嗜好性を示さないことから、低濃度の酸化させたオリーブオイルの嗜好性には嗅覚が関与していることが示唆された(図3)。少量の調理油は油脂への嗜好性を高め、この嗜好性は主に嗅覚によるものであることを明らかにした。

4. 油の調理アロマの嗜好性

酸化させたオリーブオイルから生成される香気成分(調理アロマ)の嗜好性への添加効果を評価した。

0.0005%のオリーブオイル調理アロマを添加した1%のオリーブオイル溶液で有意に摂取量

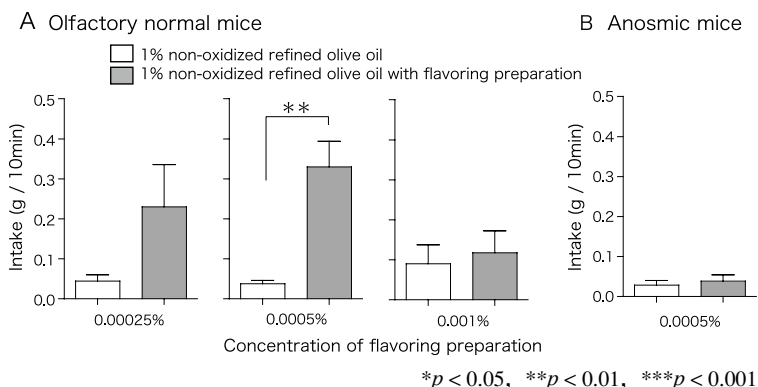


図4 二瓶選択試験¹⁵⁾ (油脂調理アロマの添加効果)

が多いことから、0.0005%濃度の調理アロマはマウスによるオリーブオイルの嗜好性に寄与することが示唆された(図4)。調理アロマの嗜好性には至適濃度があることが示された。嗅覚破壊マウスでは嗜好性を示さないことから、低濃度の油調理アロマの嗜好性への嗅覚の関与を確認した。マウスは油調理アロマを油脂の存在のシグナルとして認識していることが示唆された。

5. 和食のおいしさに寄与する油脂

近年、和食はノンオイルのヘルシーな料理ということで世界中の注目を浴びている。しかしながら、和食に油が全く使われていないわけではなく、天ぷら等は和食を代表する料理であり、和食にも様々な工程において油が使用されている。

和食においても油が料理のおいしさに影響を与えていることが考えられる。京都の料理の中には、揚げがたくさん使われている。揚げを使うことは、間接的に油が食材としての揚げに含まれた状態で他の食材やだしと一緒に料理されることであり、揚げに含まれる油がおいしさに寄与していることが推察される。

筍飯の原型では揚げは入れられていなかったが、一般的に炊き込みごはん等には揚げを入れる方がおいしいと考えられている。和食の食材としてよく使われる揚げに含まれる油がおいしさや嗜好性に与える影響について、筍ご飯を用いてヒトによる試食評価により検討した。

おいしさの総合評価では、揚げを入れる効果は有意差があるほど大きくないがおいしさが増強する傾向

表1 筍ご飯の官能評価

筍ご飯 n=19 (ブラインド, 順番ランダム)

質問項目	揚げなし	揚げあり	どちらでもない
華やかな風味がある	7	10	2
複雑な味がする	2	10	7
シンプルな味である	9	5	5
濃厚な感じがする	4	13	2
コクがある	4	14	1
ふくらみのある風味である	5	9	5
あっさりとしている	11	5	3
油っこい感じがする	2	9	8
もっと食べたいと思う	7	11	1
上品な味である	11	8	0
好みの風味である	8	11	0

が示された。さらに、揚げありの方はコクがある、濃厚な感じがするなどの項目において選択した被験者が多い傾向が示された(表1)。これは揚げが油で熱処理されていることから、加熱による油の酸化の影響もあり油調理アロマの関与も推察される。

実験サンプルには、米に対して揚げが約8%の割合で和食の料理人が作った筍ご飯を用いた。プロの料理人は、経験や勘により、料理や食材の様々な条件からおいしく作るための方法や量を瞬時に判断している。そのため揚げありなしに関わらずおいしさのレベルが高いご飯に仕上げられていた。また、被験者の期待感が大きいというような情報の要素の影響のため、おいしさの総合評価の基準が高く、揚げの添加効果の判断を難しくしていたことが考えられる。しかしながら、各種料理に揚げを入れると、揚げに含まれている油の風味等によりおいしさの評価が高くなる傾向が示唆された。

おわりに

一滴ほどの極少量の油脂類を低濃度の油脂や甘味溶液、うま味溶液に添加することで嗜好性を強化する、または次元の違うおいしさに発展することが示唆された。一滴の油の添加効果には、油の風味や油の調理アロマ等が大きく影響していることが明らかになった。油調理アロマは油脂の存在のシグナルとして働いていることが示唆された。

一滴の油のおいしさは、テクスチャーやカロリーの寄与はほとんどなく、油の風味が寄与することから、嗜好性香辛料の一種であり低カロリー高嗜好性食品の開発に有用である可能性が示された。

今後さらに、揚げに含まれる油の種類の違いによる影響や油の定量的分析を行うことで、和食において伝統的な手法や勘により用いられてきた油の効用を解明できる可能性が示された。

[謝辞]

本研究の一部は、農林水産・食品産業科学技術研究推進事業、およびJSPS 科研費基盤研究B(25292071)、若手研究A(24688014)の助成を受けたものである。

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

- 1) Ackroff K, Vigorito M and Sclafani A, Fat appetite in rats: the response of infant and adult rats to nutritive and non-nutritive oil emulsions. *Appetite*, **15**:171-188, 1990.
- 2) Elizalde G and Sclafani A, *Appetite*, **15**, 189-197, 1990.
- 3) Takeda M, Imaizumi M, and Fushiki T, *Life Sci.*, **67**, 197-204, 2000.
- 4) Fukuwatari T, Shibata K, Iguchi K, Saeki T, Iwata A, Tani K, Sugimoto E, and Fushiki T, *Physiol. Behav.*, **78**, 579-583, 2003.
- 5) Imaizumi M, Takeda M and Fushiki T, Effects of oil intake in the conditioned place preference test in mice. *Brain Res.*, **870**:150-156, 2000.
- 6) Suzuki A, Yamane T, Imaizumi M and Fushiki T, Integration of orosensory and postingestive stimuli for the control of excessive fat intake in mice. *Nutrition*, **19**:36-40, 2003.
- 7) Matsumura S, Eguchi A, Okafuji Y, Tatsu S, Mizushige T, Tsuzuki S, Inoue K and Fushiki T, Dietary fat ingestion activates beta-endorphin neurons in the hypothalamus. *FEBS Lett.*, **586**:1231-1235, 2012.
- 8) Matsumura S, Mizushige T, Yoneda T, Iwanaga T, Tsuzuki S, Inoue K and Fushiki T, GPR expression in the rat taste bud relating to fatty acid sensing. *Biomed Res*, **28**,:49-55, 2007.
- 9) Ramirez I, Role of Olfaction in Starch and Oil Preference. *American Journal of Physiology*, **265**:R1404-R1409, 1993.
- 10) Kinney NE and Antill RW, Role of olfaction in the formation of preference for high-fat foods in mice. *Physiology & Behavior*, **59**:475-478, 1996.
- 11) Drewnowski A, Why do we like fat? *Journal of the American Dietetic Association*, **97**:S58-S62, 1997.
- 12) Angerosa F, Influence of volatile compounds on virgin olive oil quality evaluated by analytical approaches and sensor panels. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **104**:639-660, 2002.
- 13) Nakano K, Kyutoku Y, Sawa M, Matsumura S, Dan I and Fushiki T, Analyzing comprehensive palatability of cheese products by multivariate regression to its subdomains. *Food Science & Nutrition*, **1**(5):369-376, 2013.
- 14) Okumura J and Yamamoto N, Japan Kokai Tokyo Koho, 3344522, Aug.30, 2002.
- 15) Nakano K , Kubo H, Matsumura S, Saito T, Fushiki T, Effects of aroma components from oxidized olive oil on preference. *Biosci, Biotechnol, Biochem.*, **77**(6):1166-1170, 2013.

リポ酸の Akt シグナル活性化による 中枢神経保護作用機構

郡山 恵樹 (KORIYAMA Yoshiki) *1 松郷 誠一 (MATSUGO Seichi) *2,3

*1 金沢大学大学院 医薬保健研究域医学系 脳情報分子学,

*2 金沢大学大学院 自然科学研究科, *3 金沢大学 理工研究域 自然システム学系

Key Words: リポ酸・抗酸化活性・抗炎症・シグナル伝達・中枢神経保護

1. リポ酸の歴史的背景

リポ酸の研究は肝臓および酵母エキス中に存在する微生物生育促進因子として 1930 年代に開始され、1950 年代には Reed らによって酸化型リポ酸の単離・同定が行われ、化学構造決定後に化学合成されるようになった¹⁾。彼らは約 10 トンの牛の肝臓から多岐にわたる抽出プロセスを経た後にわずか 100 mg のリポ酸を取り出し結晶化した。これらの事は当時リポ酸の抽出がどれだけ難しかったか容易に想像することができる²⁾。

リポ酸はジチオラン環を官能基として持つオクタン酸である。また、リポ酸は 6 位に不斉炭素を持つキラル分子であり、天然には R 体 (R-エナンチオマー, R(+)- α -リポ酸あるいは R-リポ酸) のみが存在する。リポ酸の化学的特性としては、分子量 206.33, 融点 47.5℃ の淡黄色小板結晶であり、光に対して不安定であることから低温、暗所保存すべき化合物であることが知られている³⁾。エタノール、メタノール、塩化メチレン、クロロフォルムなどの有機溶媒に比較的良好に溶けることが知られている^{4,5)}。また、炭素鎖 8 の脂肪酸であることより中性の水に対す

る溶解性は低いカルボン酸構造を有するため、緩衝液や弱アルカリ性になると水にも比較的容易に溶ける。その両親媒性により体内のほとんどすべての部位に存在すると考えられている。

また、リポ酸はチオクト酸という別名を持つ。この別名は R-リポ酸の基本骨格がオクタン酸であることに加え、分子内に 2 つの硫黄 (チオ) 原子が付加されているために付けられた。1952 年にアメリカ生物化学会が Lipoic acid という物質名を採用して以来、この「リポ酸」という名称が一般化され浸透されるようになった⁴⁾。リポ酸はこれまで多くの生理機能を有する化合物であることが分かっている。本論文ではリポ酸の基本的な生理機能に触れるとともに、特に中枢神経系の脱落および脳内炎症といった難治性中枢神経疾患を意識した病態モデルに対するリポ酸の作用メカニズムについて、近年の我々のデータを示したい。

2. リポ酸の生理学的作用

R(+)- α -リポ酸はエネルギー代謝に必要な物質として古くから研究されてきた。生体におけるエネルギー獲得は解糖とよばれる糖質の

分解を基本とする。糖質はアミラーゼなどに代表される各種酵素によって分解を受け、単糖であるグルコースに変換され、これが細胞中でリン酸化を受けた後、分解されてピルビン酸になる³⁾。次いで、ピルビン酸はアセチル CoA に変換されクエン酸回路 (TCA サイクル) に入る。その際、ピルビン酸からアセチル CoA へ変換する酵素はピルビン酸デヒドロゲナーゼである。この酵素複合体により触媒される反応に必要な補酵素は、TPP (チアミン, ビタミン B₁), FAD (リボフラビン, ビタミン B₂), NAD (ナイアシン, ニコチン酸), 補酵素 A (CoA, パントテン酸) の 4 種のビタミンとタンパク結合型リボ酸である。補酵素として機能するリボ酸はタンパク質の特定のリジン残基の ε- アミノ基とアミド結合する形で存在しているが、タンパク質結合 R(+)-α- リボ酸の欠如は糖代謝の進行を停止する。一方、クエン酸回路を回転させるためにはいくつもの酵素が必要とされ、その 1 つにケトグルタル酸デヒドロゲナーゼがある。この酵素反応においてもピルビン酸デヒドロゲナーゼ同様に上記の 5 種の補酵素が必要とされ、タンパク質結合型リボ酸がその 1 つとなっている。

食物から摂取された脂質は体内で分解を受け、脂肪酸に変換された後に種々の酸化的修飾を受けてエネルギー代謝システムに関与する。その際生成してくるアセチル CoA は糖の場合と同様にクエン酸回路に入るため、リボ酸は脂肪酸代謝にも一定の役割を担っている。3 大栄養素のもう一つである蛋白質はアミノ酸に分解された後に代謝系に入ることが知られている。アミノ酸の代謝経路は極めて複雑であるが、アラニンなどいくつかのアミノ酸は糖代謝経路を利用しピルビン酸を経由した代謝経路を通り電子伝達系へ進む。これらのことから、リボ酸は食物三大栄養素すべての代謝機構において重要な役割を担っているといっても過言ではない。

リボ酸の生合成経路に関して、多くの研究がなされてきたもののいまだに不明な点が多い。オクタン酸からリボ酸に変換するためにはオクタン酸の 6 位および 8 位の位置に SH 基が導入される必要がある。リボ酸の硫黄原子の由来はシステインのチオール基によると考えられてきた⁶⁾。リボイルシンターゼ (LipA) はリボ酸の合成に関わる酵素として大腸菌より単離されてきた⁷⁾。これはリボ酸の前駆体であるオクタン酸に 2 つの硫黄原子を立体特異的 (6 位および 8 位) に導入する酵素である。また、興味深いことにリボ酸の合成の際に挿入される硫黄原子は LipA の有する [Fe-S] から提供される。この過程において、S- アデノシル-L- メチオニンと Fe-S クラスターから生じるジオキシアデノシルラジカルが関与することが知られている^{8,9)}。また、リボ酸の生合成は主に大腸菌などの腸内細菌によって行われるが¹⁰⁾、腸内で産生されたリボ酸はグリシンやプロリン輸送系同様のシステムで血流に入り、細胞内に輸送されることが知られている¹¹⁾。この輸送システムは効率的に細胞内のリボ酸濃度を高めることができるが、オクタン酸により競合的な阻害を受けることも分かっている。一方、ミトコンドリアにおいてもリボ酸の生合成が行われている報告があるがその生成量を含め詳細は不明である^{12,13)}。しかしながら、内因性のリボ酸はごく少量しか存在せず、加齢とともにその量は徐々に低下する可能性が指摘されている¹⁴⁾。その代替発生源として、リボ酸は食物から摂取できることが知られている。リボ酸は食肉中に多く存在し、野菜源には少ないとされている。

3. リボ酸とジヒドロリボ酸の抗酸化活性

リボ酸は抗酸化活性を持つビタミンとの代替作用を持つことが知られている。1959 年、Rosenberg らは、ビタミン C 欠乏のモルモット

の壊血病の症状がリボ酸により改善したことやビタミンE欠乏食を与えたラットにリボ酸を与えることでその欠乏症が予防できることを報告している¹⁵⁾。また、糖尿病性神経症¹⁶⁾やいくつかの神経疾患改善にもリボ酸が効果を示すことが報告されている^{17,18)}。これらの疾患発症とフリーラジカルは関連が深いことから、リボ酸の抗酸化活性が注目されるようになった。リボ酸はその分配係数が約4(油/水)であり¹⁹⁾、油相と水相の両相において、一定以上の割合で分布することが可能である。また、リボ酸の還元体であるジヒドロリボ酸はジチオール構造を持ち、主に水相に分布される。つまり、リボ酸/ジヒドロリボ酸の組み合わせは両相にバランス良く分布されることになる。リボ酸とジヒドロリボ酸は生体内で共役することで抗酸化活性を発揮し、成体の恒常性を維持している。生体で最も重要な内因性抗酸化物質のひとつであるグルタチオンは酸化型、還元型の存在比が細胞生理に極めて重要な意味を持つことが知られている。リボ酸/ジヒドロリボ酸の酸化還元電位は-0.32Vであり²⁰⁾、グルタチオンの酸化還元電位より低く酸化型グルタチオン(GSSH)を還元型(GSH)に戻すことが可能である(GSSH/GSH, -0.24V)。換言すれば、リボ酸はグルタチオンの酸化型-還元型の量比を調整している可能性があり、こうした仕組みを通し生体の恒常性を維持している可能性も考えられる。また、ジヒドロリボ酸はその酸化-還元電位を考えれば、グルタチオン同様に酸化されたビタミンCおよびビタミンEを還元して再生することも可能であり、生体の抗酸化ネットワークにおいて常用な役割を担っていることになる。リボ酸はフリーラジカル捕捉型の抗酸化作用も有していると考えられる。生体にとって金属イオンは必要であるが、一方金属イオンの過剰は生体毒性にもつながるものであり、生体における金属イオンの制御は極めて重

要な問題である。リボ酸は官能基としてカルボン酸基と1,2ジチオラン環を持っているのに対し、ジヒドロリボ酸は分子内に官能基としてカルボン酸と2つのチオール基を有している。これらジチオール官能基は金属イオンと配位し安定化する能力(金属イオンの捕捉)を持つ。リボ酸は2価の鉄、3価の鉄と配位し、3価(酸化型)を2価(還元型)に戻す能力が知られている²¹⁾。また、ジヒドロリボ酸は鉄-フェリチン錯体から鉄を配位して取り除く作用を持つことが知られている^{22,23)}。また、銅イオンとリボ酸の相互作用についての報告もなされている²⁴⁾。一般的に内因性の還元型鉄イオンの上昇は過酸化水素などの過酸化物質と反応し、ヒドロキシラジカル等の活性酸素を増やす。つまり、ジヒドロキシリボ酸は抗酸化物質として働くよりも酸化剤として働く可能性も考えられる。ジヒドロリボ酸存在下ではラット肝ミクロソームの過酸化反応が促進したという報告はこの可能性を支持するものである²⁵⁾。また、2価鉄イオンにより脂質過酸化反応の系にジヒドロリボ酸を加えると過酸化反応が促進される一方、この系にビタミンCや酸化型グルタチオンを加えると過酸化反応が抑制される。この効果はジヒドロリボ酸の非存在下では認められない²⁵⁾。ジヒドロリボ酸は分子内にチオール基を2つ有している。このチオール基は還元力が強い反面、一旦SHの水素原子がラジカル的に引き抜かれると、チールラジカル(硫黄ラジカル)が生成し、これが酸化反応を促進する可能性がある。還元剤が他の物質を還元する過程で自身が酸化されることにより他の物質の還元を行うが、その過程で自らが酸化剤に変化する可能性はこれまでもいくつかの抗酸化物質の系において指摘されている論点である。抗酸化剤と呼ばれる化合物一般についてもこういった抗酸化物質の二面性を認識し、研究(開発)を進めていく必要があると思われる。

4. リポ酸による内因性抗酸化シグナル機構の活性化

脳や網膜組織は他の組織と比べて酸素消費量が多いため、活性酸素の産生が非常に高いことが知られている²⁶⁾。通常我々の体には酸化ストレスを感知してそれを無毒化の方向へシフトする仕組みが備わっており、酸化ストレスはラジカル捕捉型化合物や内因性抗酸化物によって処理することが可能である。しかし、一旦病態が進行する、あるいは強い酸化ストレスがかかると抗酸化機構が破綻し、酸化ストレス障害性の中枢神経疾患のトリガーになりうる。また、加齢などにより内因性の抗酸化物質およびその機構が減少すると疾病発症のリスクが高まる。特に眼は脳と比較して3～4倍の酸化ストレスがかかり、様々な活性酸素種に曝されることが知られている。網膜神経節細胞(RGCs)は視覚情報をまとめ、脳に送る重要な役割を担っているが活性酸素種に対して脆弱であり、その細胞死は緑内障などの眼疾患を引き起こす。緑内

障は眼圧上昇により視神経が圧迫されて、酸化ストレス依存的にRGCsの細胞死がもたらされる失明性の疾患である。緑内障は国内では40歳以上の20人に1人が罹患している。その有病率は加齢とともに増加するため、今後益々の高齢化社会につれ、患者数は400万人以上にのぼると言われている²⁷⁾。中枢神経系において、リポ酸は加齢ラットの異常な脂質過酸化を軽減することから、加齢とともに生体内含量が低下することが指摘されている²⁸⁾。また、虚血性の網膜障害に対してリポ酸が保護作用を示すことが分かっているが²⁹⁾。その詳細な作用メカニズムは分かっていない。そこで我々はリポ酸が内因性抗酸化システムを活性化する可能性に着目し、RGCsへの酸化ストレス障害に対する保護作用を精査した³⁰⁾。

酸化ストレスセンサーとして内因性抗酸化機構の中心的役割を担うタンパク質 Kelch-like ECH-associated protein-1 (Keap1) が知られている(図1)。非酸化ストレス下において Keap1 は転写因子である NF-E2-related factor 2 (Nrf2)

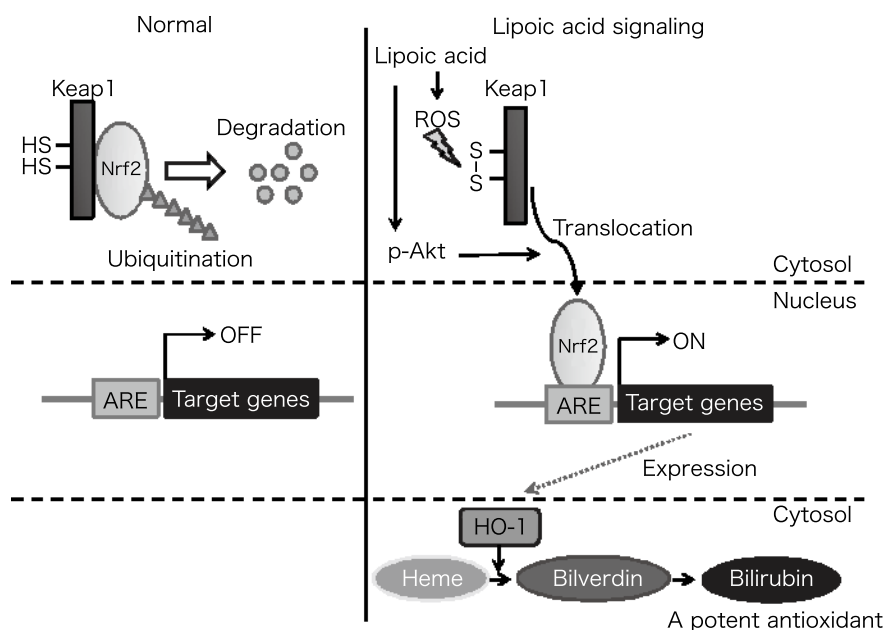


図1 リポ酸による内因性抗酸化機構

と結合し、Nrf2を細胞質に留めてその核内移行を抑えている。通常、酸化ストレスを消去する必要が無ければ、Keap1はユビキチンE3リガーゼのアダプターとして機能し、Nrf2をユビキチン化することで分解する。しかし、Keap1は酸化、S-ニトロシル化、アルキル化などの化学的修飾を受けると、Nrf2抑制機構が解除され、Keap1から解離して核内移行したNrf2が抗酸化応答エレメント(ARE)に結合する。これにより様々な抗酸化タンパク質の発現が促進され、細胞を酸化ストレスから守る。リポ酸とKeap1/Nrf2システムの活性化に関する報告は皆無であったため、我々はリポ酸のKeap1/Nrf2システム経由の抗酸化機構による神経保護作用について調べた。実験には網膜神経節細胞株であるRGC-5を用いた。血清除去モデルは内因性グルタチオンを枯渇させ酸化ストレス依存的な細胞死を誘発するモデルである^{31, 32)}。リポ酸は血清除去、過酸化水素、tBOOHによる障害に対して保護作用を示した。また、興味深いことに6時間の前処理は酸化ストレス刺激に対して保護作用を示したが、前処理時間がそれよりも短く(2時間未満)になると保護作用を示さなくなった。このことから、リポ酸の抗酸化的保護作用は直接的な活性酸素消去によるのではなく、何らかの抗酸化タンパク質発現作用を介していることが考えられた。抗酸化タンパク質群をスクリーニングした結果、リポ酸はヘムオキシゲナーゼ(HO-1)を顕著に発現増加させることが分かった。HO-1は細胞内ヘムを分解する際に遊離鉄と一酸化炭素とビリベルジンを生成する。ビリベルジンは素早くビリルビンに変換されて強力な活性酸素スカベンジャーとして作用し、過酸化脂質の最終産物の一つであり酸化ストレスマーカーとして知られている4-hydroxy-2-nonenal(4HNE)の産生を防ぐことが知られている。リポ酸は処理4-6時間で著しいHO-1の発現を誘導した。ま

た、血清除去(ストレス)モデルにおけるリポ酸の保護作用はHO-1特異的な阻害剤(SnMP)で見られなくなることから、HO-1の寄与が高いことが分かった。HO-1の発現機構を担うKeap1/Nrf2システムに着目し、リポ酸によるNrf2核内移行作用を観察した。その結果、リポ酸処理1時間でNrf2は対照群の1.5倍が核内移行することが分かった。また、その作用は生存シグナルAktのリン酸化依存的であることが分かった。一方、Nrf2が核内移行されるにはKeap1が酸化およびS-ニトロシル化される必要がある。一酸化窒素のマーカーである蛍光指示薬を用いた測定よりリポ酸は有意な一酸化窒素産生作用はない事が分かった。5-(6)-クロロメチル-2',7'-ジクロロジヒドロフルオレセインジアセテートおよび鉄イオン-キシレノールオレンジを用いて、それぞれ活性酸素および過酸化水素の生成を調べた結果、興味深いことに対照群の3-4倍の微弱ながら有意な活性酸素と過酸化水素の上昇が観察された。さらに、特異的蛍光プローブにより、リポ酸によって増加したのはスーパーオキシドであった(図2)。リポ酸の処理濃度はRGC-5の細胞毒性が認め

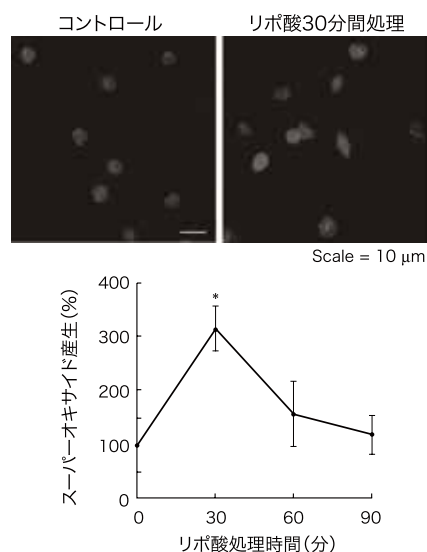


図2 リポ酸によるスーパーオキシド産生作用

られなかったことから、毒性が無い程度の活性酸素種が Keap1 を刺激（酸化）し、Nrf2 を核内移行させていることが考えられた。実際に活性酸素の消去剤や NADPH 酸化酵素の阻害剤はリポ酸による Nrf2 核内移行と HO-1 の発現を抑えた。これらのことからリポ酸の抗酸化システムのトリガーはリポ酸自身が産生する微弱な活性酸素種であり、Akt のリン酸化経路を介した HO-1 の発現が細胞保護メカニズムとして寄与していることが分かった。この保護作用は、細胞レベルだけでなく、マウス視神経損傷モデルにおける RGCs の細胞死に対しても見られた。さらに、視神経損傷後の 4HNE の蓄積と RGCs の細胞死は HO-1 依存的に抑えられることを証明した。

Yamada らは、神経芽細胞腫である SH-SY5Y 細胞を使い、BSO 刺激によるグルタチオン枯渇に対するリポ酸の効果を示している³³⁾。リポ酸の抗酸化作用について R 体と S 体を区別して調べた論文は皆無であるが、彼らは BSO 刺激のリポ酸の保護作用は R 体、S 体、ラセミ体に大差がない事を示した。また、HO-1 や他の抗酸化タンパク質（NQO1）がその抗酸化機構の本体であることをまとめている。また、いずれのタイプのリポ酸も Akt の活性化を介することも示している。近年、Akt の活性化をともなったりリポ酸の生理活性機構に関する報告が相次いでいる^{34,35)}。一方、リポ酸が ROS を産生する報告も少なからず報告され始めている^{36,37)}。直接的な抗酸化作用だけでなくリポ酸の細胞内シグナリングを介した生理機能について、今後も新たなメカニズムが発見されてリポ酸の知識が広がることを望んでいる。

5. リポ酸の脳内ミクログリアの活性化抑制機構

ミクログリアは脳内の自然免疫の代表的な担い手であり、傷害性にはたらく一方、保護的に

も作用することが知られている。ミクログリアは脳内に恒常的に存在し、非活性化の状態ではラミファイド型として待機しているが炎症性神経疾患、虚血性疾患およびアルツハイマー病やパーキンソン病などの変性疾患による外刺激に対してアメボイド型と呼ばれる性質・形態変化を示して損傷部に集積する^{38,39)}。活性化されたミクログリアは腫瘍壊死因子 α (TNF α)、インターロイキン 1β (IL- 1β)、インターフェロン γ (IFN γ) などの液性因子と一酸化窒素 (NO)、フリーラジカル、興奮性アミノ酸などを産生する。特に NO は多彩な生理機能を持ち、神経伝達物質として作用したり、血管トーンを調節して脳循環制御に関わっている。炎症時には誘導型の NO 合成酵素 (iNOS) が発現されることが知られている⁴⁰⁾。iNOS 由来の NO は虚血性脳障害⁴¹⁾、外傷性脳障害⁴²⁾ による神経細胞死をさらに促進させる。リポ酸による脳内炎症に対する抗炎症効果は古くから様々なモデルが知られている^{43,44)}。その多くはリポ酸が持つ抗酸化作用に起因するものである。我々はリポポリサッカライド (LPS) 刺激による脳内炎症惹起モデルとミクログリア細胞株 (BV2) を用いて、より積極的なリポ酸の新規抗炎症メカニズムを精査した。BV2 細胞に LPS を添加すると iNOS をはじめとする種々サイトカインの発現上昇が 4-8 時間後に見られる (図 3)。このサイトカイン産生経路には転写因子である核内因子 κ B (NF κ B) とその下流シグナルが中心的な役割を示す (図 4)。不活性な NF κ B は細胞質に存在し、アンキリンファミリーに属する分子である I κ B (Inhibitor κ B) と結合することによりその活性を抑制されている。しかし、LPS 刺激などにより I κ B のセリン残基をリン酸化する酵素複合体である I κ B キナーゼ (IKK) が活性化されると I κ B はタンパク質分解酵素複合体であるプロテアソームにより分解を受ける。次いで、I κ B によりマスクされていた NF- κ B の

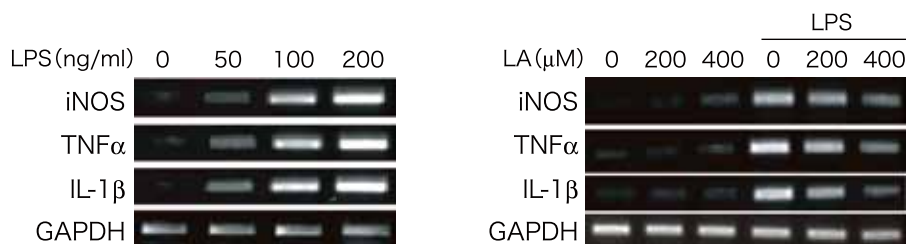


図3 リポ酸によるサイトカイン産生抑制作用

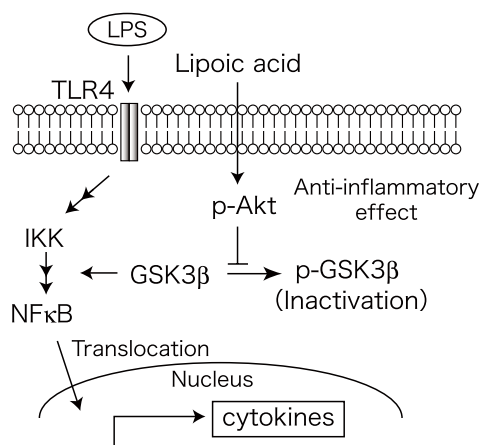


図4 リポ酸による抗炎症作用機構

核内移行シグナルが露出し、核移行し種々サイトカインを産生する。

リポ酸はその効果に対して抗炎症効果を示した。BV2細胞にLPS処理すると30～60分という早い時間でAktが活性化することとその標的であるグリコーゲン合成酵素キナーゼ3β (GSK3β) がリン酸化を受けて不活性化されることが分かった。興味深いことにGSK3βの欠損変異体ではIKKの活性化やIκBの分解が起らず抗炎症効果を示すことが知られている⁴⁵⁾。同様にGSK3βの阻害剤である塩化リチウムはNFκB経路を抑制することが知られている^{46, 47)}。これらの事からリポ酸によるGSK3βの不活性化作用は抗炎症効果に寄与するかもしれないと仮定した。実際にリポ酸はLPSによるNFκB (RelAサブユニット) の核内移

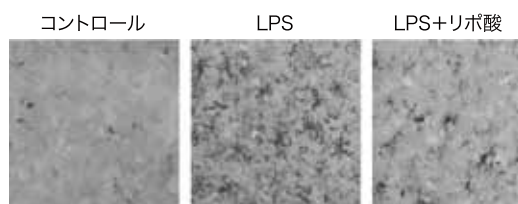


図5 リポ酸のLPSに対する抗炎症作用(大脳皮質)

行を有意に止めたが、Aktの阻害剤でGSK3βの不活性化を抑えれば抗炎症効果が認められなくなった。また、LPSによるNFκBの核内移行はGSK3β阻害剤で抑制された。また、リポ酸によってLPS誘導のiNOS産生作用が促進されるが、Aktの阻害剤でその産生作用が認められなくなった。さらに、マウスのLPS脳内炎症モデルにおいてもLPSの腹腔内投与でミクログリアの活性化とiNOSの産生を抑えることが確認できた(図5)。

このようにリポ酸のAktの活性化を介した細胞内シグナリングは難治性中枢神経疾患の進行を抑えるデータが出つつある。先に記載した通り、加齢とともに体内におけるリポ酸の生成量は減少している。また、脳内炎症や中枢神経障害の発症リスクと進行の程度は加齢とともに高まっていき、今後の益々の高齢化社会において患者数の増加することが知られている。リポ酸のシグナル経路活性化機構などの新たな側面を理解することは、リポ酸の未知なる効能・効果の発見や治療/予防への新たな応用の可能性が広がるものと信じている。

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

- 1) Reed L.J., DeBusk, B.G., Gunsalus, I.C., Hornberger, C.S.: Crystalline alpha-lipoic acid; a catalytic agent associated with pyruvate dehydrogenase. *Science.*, **114**, 93-94, 1951.
- 2) Reed, L.J.: The chemistry and function of lipoic acid. *Adv Enzymol Relat Subj Biochem.* **8**, 319-347, 1957.
- 3) 長倉 三郎, 井口 洋夫, 江沢 洋, 他: リポ酸. 岩波理化学辞典 (第5版). 久保亮五編集. 岩波書店, 1450, 1998.
- 4) リポ酸. ビタミン学Ⅱ水溶性ビタミン. 日本ビタミン学会編. 東京化学同人, 601-614, 1980.
- 5) リポ酸. 化学大辞典. 化学大辞典編集委員会編. 共立出版, 634, 1987.
- 6) Duprè, S., Spoto, G., Matarese, R.M., *et al.*: Biosynthesis of lipoic acid in the rat: incorporation of 35S- and 14C-labeled precursors. *Arch. Biochem. Biophys.*, **202**, 361-365, 1980.
- 7) Reed, K.E., Cronan, J.E. Jr. Lipoic acid metabolism in *Escherichia coli*: sequencing and functional characterization of the lipA and lipB genes. *J.Bacteriol.* **175**, 1325-1336, 1993.
- 8) Broderick, J.B., Henshaw, T.F., Cheek, J., *et al.*: Pyruvate formate-lyase-activating enzyme: strictly anaerobic isolation yields active enzyme containing a [3Fe-4S](+) cluster. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **69**, 451-456, 2000.
- 9) Cicchillo, R.M., Iwig, D.F., Jones, A.D. *et al.*: Lipoyl synthase requires two equivalents of S-adenosyl-L-methionine to synthesize one equivalent of lipoic acid. *Biochemistry.* **43**, 6378-6386, 2004.
- 10) Jordan, S.W., Cronan, J.E. Jr.: Biosynthesis of lipoic acid and posttranslational modification with lipoic acid in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* **279**, 176-183, 1997.
- 11) Leach, F.R., Winter, B.A., Wilson, D.D. *et al.*: Role of lipoic acid in pyruvate transport. *J. Bacteriol.* **87**, 1529-1530, 1964.
- 12) Wada, H., Shintani, D., Ohlrogge, J.: Why do mitochondria synthesize fatty acids? Evidence for involvement in lipoic acid production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 1591-1596, 1997.
- 13) Morikawa, T., Yasuno, R., Wada, H.: Do mammalian cells synthesize lipoic acid? Identification of a mouse cDNA encoding a lipoic acid synthase located in mitochondria. *FEBS Lett.* **498**, 16-21, 2001.
- 14) Heike, T.D.: α リポ酸 (チオクト酸) の特性と機能. *FOOD style 21.* **8**, 1-9, 2004.
- 15) Rosenberg, H.R., and R. Culik. Effect of α -lipoic acid on vitamin C and vitamin E deficiencies. *Arch. Biochem. Biophys.* **80**, 86-93, 1959.
- 16) Baydas, G., Donder, E., Kiliboz, M. *et al.*: Neuroprotection by alpha-lipoic acid in streptozotocin-induced diabetes. *Biochemistry.* **69**, 1001-1005, 2004.
- 17) Jalali-Nadoushan, M., Roghani, M.: Alpha-lipoic acid protects against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in a rat model of hemi-parkinsonism. *Brain Res.* **1505**, 68-74, 2013.
- 18) Lee, T.H., Park, J.H., Kim, J.D. *et al.*: Protective effects of a novel synthetic α -lipoic acid-decursinol hybrid compound in experimentally induced transient cerebral ischemia. *Cell Mol. Neurobiol.* **32**, 1209-1221, 2012.
- 19) Matsugo, S., Han, D., Tritschler, H.J., Packer, L.: Decomposition of alpha-lipoic acid derivatives by photoirradiation-formation of dihydrolipoic acid from alpha-lipoic acid. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **38**, 51-59, 1996.
- 20) Scott, E.M., Duncan, I.W., Ekstrand, V. *et al.*: Purification and properties of glutathione reductase of human erythrocyte. *J. Biol. Chem.* **238**, 3928-3933, 1963.
- 21) Bonomi, F., Werth, M.T., Kurtz, D.M. Jr.: Assembly of [FenSn (SR) 4]-2 ($n=2, 4$) in aqueous media from iron salts, thiols, and sulfur, sulfide or thiosulfate plus rhodanese. *Inorg. Chem.* **24**, 4431-4435, 1985.
- 22) F. Bonomi, S. Pagani, F. Cariati, A. Pozzi, G. Crisponi, F. Cristiani, A. Diaz, R. Zanoni.: Synthesis and characterization of metal derivatives of dihydrolipoic acid and dihydrolipoamide. *Inorg. Chem. Acta.*, **195**, 109-115, 1992.
- 23) Bonomi, F., Pagani, S.: Removal of ferritin-bound iron by DL-dihydrolipoate and DL-dihydrolipoamide. *Eur. J. Biochem.* **155** :295-300, 1986.
- 24) Bonomi, F., Cerioli, A., Pagani, S.: Molecular aspects of the removal of ferritin-bound iron by DL-dihydrolipoate. *Biochim. Biophys. Acta.* **994**, 180-186, 1989.
- 25) Bast, A., Haenen, G.R.: Interplay between lipoic acid and glutathione in the protection against microsomal lipid peroxidation. *Biochim. Biophys. Acta.* **963**, 558-561, 1988.
- 26) Koriyama, Y., Chiba, K., Yamazaki, M., Suzuki, H., Muramoto, K., Kato, S.: Long-acting genipin derivative protects retinal ganglion cells from oxidative stress models in vitro and in vivo through the Nrf2/antioxidant

- response element signaling pathway. *J. Neurochem.* **115**, 79-91, 2010.
- 27) Iwase, A., Suzuki, Y., Araie, M *et al.*: The prevalence of primary open-angle glaucoma in Japanese: the Tajimi Study. *Ophthalmology*, **111**, 1641-1648, 2004.
 - 28) Arivazhagan, P., Shila, S., Kumaran, S *et al.*: Effect of DL-alpha-lipoic acid on the status of lipid peroxidation and antioxidant enzymes in various brain regions of aged rats. *Exp Gerontol.* **37**:803-811, 2002.
 - 29) Chidlow, G., Schmidt, K.G., Wood, J.P., Melena, J., Osborne, N.N.: Alpha-lipoic acid protects the retina against ischemia-reperfusion. *Neuropharmacology* .**43**, 1015-1025, 2002.
 - 30) Koriyama, Y., Nakayama, Y., Matsugo, S., Kato, S.: Protective effect of lipoic acid against oxidative stress is mediated by Keap1/Nrf2-dependent heme oxygenase-1 induction in the RGC-5 cell line. *Brain Res.* **1499**, 145-157, 2013.
 - 31) Charles, I., Khalyfa, A., Kumar, D.M., Krishnamoorthy, R.R., Roque R.S, Cooper, N., Agarwal, N.: Serum deprivation induces apoptotic cell death of transformed rat retinal ganglion cells via mitochondrial signaling pathways. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **46**, 1330-1338, 2005.
 - 32) Tatsumi, Y., Kanamori, A., Nagai-Kusuhara, A., Nakanishi, Y., Agarwal, N., Negi, A., Nakamura, M.: Nipradilo l protects rat retinal ganglion cells from apoptosis induced by serum deprivation in vitro and by diabetes *in vivo*. *Curr. Eye Res.* **33**, 683-692, 2008.
 - 33) Yamada, T., Hashida, K., Takarada-Iemata, M., Matsugo, S., Hori, O.: α -Lipoic acid (LA) enantiomers protect SH-SY5Y cells against glutathione depletion. *Neurochem. Int.* **59**, 1003-1009, 2011.
 - 34) Jiang, S., Zhu, W., Li, C., Zhang, X., Lu, T., Ding, Z., Cao, K., Liu, L.: α -Lipoic acid attenuates LPS-induced cardiac dysfunction through a PI3K/Akt-dependent mechanism. *Int. Immunopharmacol.* **16**, 100-107, 2013.
 - 35) Xie, R., Li, X., Ling, Y., Shen, C., Wu, X., Xu, W., Gao, X. Alpha-lipoic acid pre- and post-treatments provide protection against *in vitro* ischemia-reperfusion injury in cerebral endothelial cells via Akt/mTOR signaling. *Brain Res.* **1482**, 81-90, 2012.
 - 36) Dieter, N., Madar, Z., Tirosch, O.:Alpha-lipoic acid inhibits glycogen synthesis in rat soleus muscle via its oxidative activity and the uncoupling of mitochondria. *J. Nutr.* **132**, 3001-3006, 2002.
 - 37) Wang, X., Wang, Z., Yao, Y., Li, J., Zhang, X., Li, C., Cheng, Y., Ding, G., Liu, L., Ding, Z.: Essential role of ERK activation in neurite outgrowth induced by α -lipoic acid. *Biochim. Biophys. Acta.* **1813**, 827-838, 2011.
 - 38) Gehrmann, J., Matsumoto, Y., Kreutzberg, G.W.: Microglia: intrinsic immune effector cell of the brain. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **20**, 269-287, 1995.
 - 39) Thomas, W.E.: Brain macrophages: evaluation of microglia and their functions. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **17**, 61-74, 1992.
 - 40) Xie, Q.W., Cho, H.J., Calaycay, J., Mumford, R.A., Swiderek, K.M., Lee, T.D., Ding, A., Troso, T., Nathan, C. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science.* **256**, 225-258, 1992.
 - 41) Zhao, X., Haensel, C., Araki, E., Ross, M.E., Iadecola, C. Gene-dosing effect and persistence of reduction in ischemic brain injury in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Brain Res.* **872**, 215-218, 2000.
 - 42) Stoffel, M., Rinecker, M., Plesnila, N., Eriskat, J., Baethmann, A.: Role of nitric oxide in the secondary expansion of a cortical brain lesion from cold injury. *J. Neurotrauma.* **18**, 425-434, 2001.
 - 43) Maczurek, A., Hager, K., Kenkies, M., Sharman, M., Martins, R., Engel, J., Carlson, D.A., Münch, G.: Lipoic acid as an anti-inflammatory and neuroprotective treatment for Alzheimer's disease. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 1463-1470, 2008.
 - 44) Miao, Y., Ren, J., Jiang, L., Liu, J., Jiang, B., Zhang, X.: α -Lipoic acid attenuates obesity-associated hippocampal neuroinflammation and increases the levels of brain-derived neurotrophic factor in ovariectomized rats fed a high-fat diet. *Int. J. Mol. Med.* **32**, 1179-1186, 2013.
 - 45) Takada, Y., Fang, X., Jamaluddin, M.S., Boyd, D.D., Aggarwal, B.B.: Genetic deletion of glycogen synthase kinase-3 β abrogates activation of IkappaB α kinase, JNK, Akt, and p44/p42 MAPK but potentiates apoptosis induced by tumor necrosis factor. *J. Biol. Chem.* **279**, 39541-39554, 2004.
 - 46) Grimes, C.A., Jope, R.S.: CREB DNA binding activity is inhibited by glycogen synthase kinase-3 β and facilitated by lithium. *J. Neurochem.* **78**, 1219-1232, 2001.
 - 47) Grimes, C.A., Jope, R.S.: The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3 β in cellular signaling. *Prog. Neurobiol.* **65**, 391-426, 2001.

ニジマスのグアニン量 ―ヒメマスとの比較―

酒本 秀一^{*1} 佐藤 達朗^{*2}

^{*1} SAKAMOTO Shuichi,

^{*2} SATO Tatsuro (中禅寺湖漁業協同組合)

Key Words: ニジマス・ヒメマス・グアニン・養殖魚・天然魚・性成熟・L値

湖沼に棲息している天然のヒメマスは体側から腹部にかけて光り輝くような銀白色をしているが、養殖魚はやや黒っぽいくすんだ色をしている。著者らはこの違いの原因を調べ、以下の点を明らかにした¹⁾。

- ・天然魚、養殖魚共に背部から体側部、腹部に向かうにつれて体表のグアニン量が多くなったが、その量は天然魚の方が著しく多かった。また、体表のグアニン量と肉眼による観察結果および色彩色差計による測色結果、特にL値の傾向とは良く一致していた。よって、天然魚と養殖魚の体表色の違いの一因は体表のグアニン量の違いにある。

- ・養殖の未成熟魚では体重が100g程度になるまで成長に伴って体表のグアニン量は直線的に増加し、それ以降略一定の値を示した。高い値を示すようになる時期はヒメマスが湖沼から海に下る行動を起こす時期に一致していた。

- ・雌雄共に性成熟の進行に伴ってグアニン量は一定の割合で減少したが、減少の割合は雄の方がやや大きかった。

以上の結果と文献²⁻⁶⁾から以下の推測を行った。

- ・ヒメマスが湖沼から降海行動を起こす時期に銀白色になる理由は、海水適応力の増加に必

要な成長ホルモンの産生量を増やす一過程としてグアニンやヒポキサンチンが沈着することによる。

- ・雄性ホルモン、雌性ホルモン共に銀毛化（グアニンの沈着を促進して体表を銀白色にする変化）を抑制し、抑制効果は雄性ホルモンの方が強いことが知られている。よって、ヒメマスの結果は、生殖腺が発達して性ホルモンの分泌が盛んになるに従ってグアニンの合成が阻害された結果なのかも知れない。但し、性成熟に伴うグアニン量の減少があまりに急激なので、グアニンの合成が阻害されると同時に分解も促進されている可能性があると推測した。

- ・天然魚と養殖魚で大きく違うのは食べている餌の種類と棲息環境である。天然魚は動物プランクトンや小魚等の生きた餌を食べているのに対し、養殖魚は魚粉、小麦粉、脱脂大豆粕等が主体の配合飼料を食べている。棲息環境では、天然魚は深い湖沼に棲息しており、棲息密度も低い。一方、養殖魚は浅い池で高密度で飼育されている。よって、体表のグアニン量に餌の種類や棲息環境が影響を及ぼしている可能性が有る。

これらの推測が妥当であれば、「①海に下る性質が無い魚は成長や季節の違いによって体表

のグアニン量に変化することは無く、性成熟の影響もヒメマスとは違った形で表れるのではないか。②海に下る性質が無い魚で天然魚と養殖魚のグアニン量を比較すると共に、棲息環境が異なる条件で飼育された養殖魚のグアニン量を比較することによって、何が天然魚と養殖魚のグアニン量の違いに大きな影響を及ぼしているかが推測出来るのではないか。」と考えた。

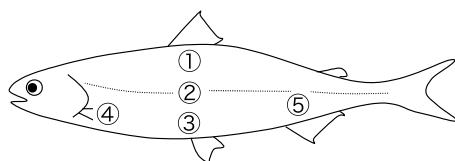
よって本試験では、海に下る性質が無いサケ・マス類であるニジマスを対象として2年間に亘って養殖魚の成長、季節および性成熟と体表グアニン量との関係、天然魚と養殖魚のグアニン量の比較、異なる環境条件で飼育された養殖魚のグアニン量の比較等を行った。

成長、季節および性成熟と体表グアニン量

1. 方法

1-1. 飼育試験

飼育試験は中禅寺湖漁業協同組合の養殖池において2年間継続して行った。初年度は1年魚（1⁺: 水産分野の慣習で孵化した年の魚を0⁺、次の年の魚を1⁺と呼び、1年魚であっても実際には丸1年経っていない魚も含まれる。）と2年魚（2⁺）を、次年度には3年魚（3⁺）を調べた。1年魚と2年魚は1年違いの別グループの魚であるが、3年魚は2年魚を継続飼育した魚なので、2年魚と同じグループである。夫々のグループから毎月5尾ずつサンプリングし、FA100 麻酔下で尾叉長と体重を測定して肥満度（ $\text{体重} \times 100 / \text{尾叉長}^3$ ）を求めた後色彩色差計（MINOLTA CR-100）で体表の明度（L 値）を調べた。更にグアニン量測定用の体表サンプルを採取した後解剖し、内臓（腎臓と心臓以外の全ての臓器を含む）、肝臓、腹腔内脂肪蓄積組織（DL）および生殖腺を分離して重量を測定した。なお、1年魚は5月に外池に移されるまで屋内の池で飼育されていたので、外池の2



①背鰭下背部、②背鰭下側部、③背鰭下腹部、④腹側前部、⑤腹側後部

図1 体表グアニン量の測定部位

年魚とは明らかに体表の色が違ったが、外池に移されてから比較的短期間で2年魚と同じような色になった。

1-2. 測色部位

前報¹⁾で説明したようにヒメマスで図1に示す5か所でL値とグアニン量の測定を行ったところ、③の部位でL値が高くグアニン量も多く、測定用サンプルの採取も容易であることが分かったので、ニジマスも③の部位で測定することにした。

1-3. グアニン量測定サンプルの採取法

魚は成長と共に体表が厚くなるので、大きな魚と小さな魚では単位面積当たりの重量が異なる。見た目の結果を反映させる為にはグアニン量を単位面積当たりで表示する必要がある。その為には一定面積の体表を単離する必要がある。よって、薄いプラスチック板に一定面積の窓を開けた物を作り、これを魚の体表に当てて鋭いメスの刃先で鱗を剥がさないように注意して体表を採取し、皮下に付着している脂肪組織や肉を出来る限り取り除いた。

1-4. グアニンの定量法

グアニンの定量は図2に示す Heing and Reckel⁷⁾ 法によった。上記の方法で準備した体表に1Mの過塩素酸を加えて繰り返しホモジナイズし、500×Gで3分間遠心分離後、上清を2Mの炭酸カルシウムでpH10.0に調整して試料溶液とした。試料溶液を250mUnitの aldehyde dehydrogenase を含む反応液（77mM diphosphate, 0.58mM nicotineamide adenine

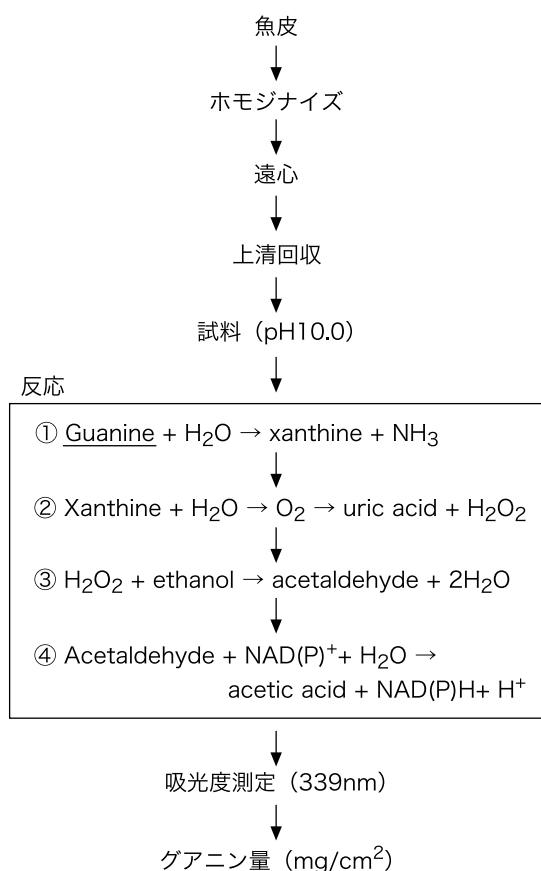


図2 グアニン量の測定法

dinucleotide, 1.3M ethanol, 2000kUnit/L catalase) 中で処理し (反応③, ④), 自記分光光度計 (HITACHI U-3210) にセットした。値が安定した後, 339nm における吸光度を測定した。続いて 30mUnit の xanthine oxidase を加え (反応②, ③, ④), 値が安定した後吸光度 (A1) を測定した。更に 2.4mUnit の guanase を加え (反応①, ②, ③, ④), 同様に吸光度 (A2) を測定し, 体表 1cm² 当たりのグアニン量を下記の式で求めた。

$$\text{グアニン量 (mg/L)} = (A2 - A1) \times 311.8$$

2. 結果

2-1. 成長と性成熟

魚体測定と解剖の結果を表 1-3 と図 3 に示す。1 年魚と 2 年魚, 3 年魚は採卵年度が違うグループである。1 年魚の 12 月と 2 年魚の 1 月の体重は可也違っていたが, その後は両グループ共略同じ傾きで成長していた。最初の 1 年間の飼育条件が 1 年魚と 2 年魚では違っていたのであろう。両グループとも同じ条件で飼育すれば同じ成長パターンを示すであろうことが分かる。2 年魚で一部の魚が性成熟したが, 大部分は 3 年魚での成熟で

表 1 ニジマス 1+ の魚体測定と解剖の結果

	尾叉長 (cm)	体重 (g)	肥満度	臓器体重比 (%)			
				内臓	肝臓	DL	生殖腺
1 月 30 日	18.6	78	1.21	11.21	1.43	0.88	0.05
2 月 27 日	18.7	70	1.07	9.21	1.14	0.50	0.04
3 月 26 日	21.2	106	1.11	9.44	1.08	0.91	0.08
4 月 30 日	22.0	119	1.12	10.32	1.10	0.47	0.10
5 月 29 日	21.3	116	1.20	13.80	1.54	1.15	0.07
6 月 24 日	20.9	110	1.20	8.50	1.10	0.81	0.12
7 月 29 日	23.2	141	1.13	10.11	1.20	1.09	0.08
8 月 28 日	22.4	122	1.09	8.26	0.94	0.07	0.09
9 月 20 日	24.7	183	1.21	10.19	0.98	0.19	1.79
10 月 30 日	25.4	186	1.14	8.99	1.13	0.34	0.11
11 月 20 日	24.2	156	1.10	9.00	1.02	0.36	0.12
12 月 18 日	24.8	170	1.11	8.80	1.11	0.22	0.10

(注) DL: 腹腔内脂肪蓄積組織

表2 ニジマス 2⁺ の魚体測定と解剖の結果

	尾叉長 (cm)	体重 (g)	肥満度	臓器体重比 (%)			
				内臓	肝臓	DL	生殖腺
1月30日	23.0	130	1.07	8.67	1.03	1.01	0.11
2月27日	23.6	143	1.09	10.06	1.22	0.49	0.12
3月26日	24.8	155	1.02	9.22	0.98	0.55	0.09
4月30日	26.6	209	1.11	9.45	1.23	1.27	0.09
5月29日	25.9	203	1.17	12.77	1.52	1.20	0.12
6月24日	25.8	206	1.20	12.78	1.15	2.20	0.43
7月29日	27.3	227	1.12	8.87	0.83	1.20	0.84
8月28日	28.4	251	1.10	8.75	0.84	0.99	0.85
9月20日	29.3	294	1.17	10.43	1.14	0.58	1.57
10月30日	29.6	290	1.12	9.12	1.32	0.58	1.92
11月20日	29.1	279	1.13	8.60	1.00	0.59	0.96
12月18日	29.8	300	1.13	6.84	1.00	0.28	0.35

表3 ニジマス 3⁺ の魚体測定と解剖の結果

	尾叉長 (cm)	体重 (g)	肥満度	臓器体重比 (%)				グアニン (mg/cm ²)
				内臓	肝臓	DL	生殖腺	
2月2日	30.2	309	1.12	9.92	1.19	0.31	0.48	0.31
2月26日	29.7	288	1.10	7.73	1.01	0.34	0.55	0.27
4月6日	32.9	403	1.13	9.70	1.11	0.73	0.15	0.34
4月27日	31.8	378	1.18	9.97	1.45	0.48	0.43	0.33
6月4日	32.9	400	1.12	10.23	1.21	0.87	0.40	0.32
6月29日	31.4	398	1.29	11.56	1.65	1.63	0.47	0.34
8月6日	29.1	315	1.28	11.47	1.49	0.93	0.77	0.27
9月3日	32.8	494	1.39	14.62	1.27	1.92	3.17	0.33
10月5日	35.4	573	1.29	12.79	1.49	0.71	4.28	0.36
10月29日	33.8	505	1.31	19.33	1.64	0.50	12.51	0.30
12月3日	35.7	531	1.17	12.95	1.36	0.19	6.00	0.31

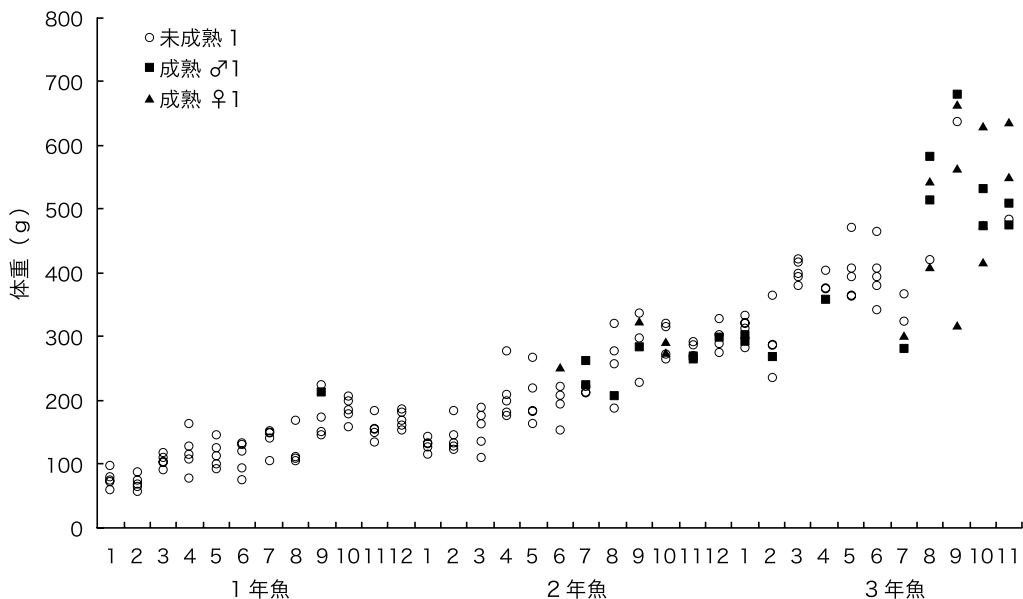


図3 ニジマスの年齢と体重

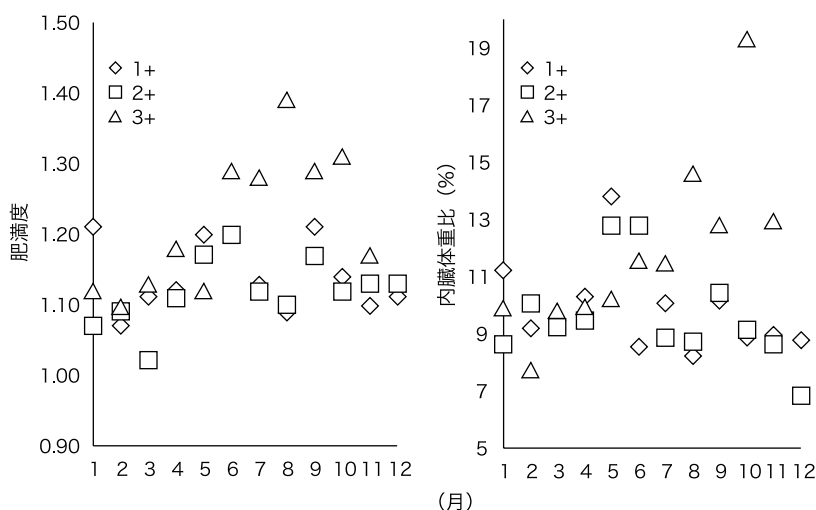


図4 年齢別、月別の肥満度と内臓体重比

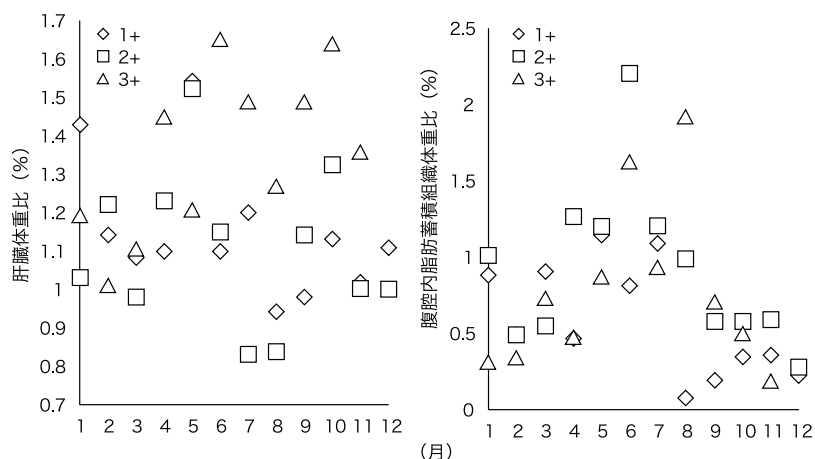


図5 年齢別、月別の肝臓体重比と腹腔内脂肪蓄積組織体重比

あった。性成熟すると雌雄共に体重のバラツキが大きくなり、従来の成長曲線から大きく外れる個体が多くなった。

2-2. 肥満度と臓器体重比

肥満度は1, 2年魚では春と秋にやや高くなり、夏と冬に低くなっていた。3年魚では初夏から高くなり、性成熟が進行している間は高い値を示し、排卵・放精後は低い値に戻った。1, 2年魚で夏に低い値を示すのは、高水温下で給餌量をやや減らすことと、エネルギー代謝が活発になる為であり、冬に低い値を示すのは摂餌

量が減る為である。3年魚で初夏から高い値を示すようになるのは、性成熟に伴って生殖腺や肝臓が次第に大きくなり、内臓全体の量が多くなる為である(図4, 5)。

肝臓体重比は肥満度や内臓体重比と同様の変化を示していた。3年魚で生殖腺が大きくなり始めてから完熟するまで高い値が続くのは、魚体成分を分解し、血液を介して生殖腺に栄養成分を送る為に肝臓が肥大することによる(図5)。

腹腔内脂肪蓄積組織体重比は1, 2年魚では初夏に高く、秋から冬にかけて低い値を示した。

表4 ニジマス 1⁺の体表L値とグアニン含量

	L 値	グアニン量 (mg/cm ²)
1月30日	67.9	0.31
2月27日	56.3	0.27
3月26日	72.5	0.36
4月30日	63.5	0.39
5月29日	43.9	0.30
6月24日	44.5	0.34
7月29日	42.5	0.36
8月28日	58.5	0.41
9月20日	53.4	0.29
10月30日	53.3	0.33
11月20日	61.4	0.33
12月18日	56.4	0.37

表5 ニジマス 2⁺の体表L値とグアニン含量

	L 値	グアニン量 (mg/cm ²)
1月30日	56.7	0.36
2月27日	54.6	0.33
3月26日	57.6	0.34
4月30日	56.9	0.35
5月29日	53.0	0.33
6月24日	51.9	0.39
7月29日	47.2	0.38
8月28日	52.5	0.41
9月20日	56.2	0.38
10月30日	53.9	0.27
11月20日	57.1	0.29
12月18日	53.4	0.31

これは春から水温の上昇に伴って急激に摂餌量が増え、秋から冬にかけて減る為であろう。3年魚では生殖腺の急激な発達に伴って、著しく減少した。これは蓄積脂質がエネルギー源として利用されると共に、生殖腺、特に卵の脂質成分として使われる為であろう（図5）。

2-3. 成長および季節とグアニン量

1年魚、2年魚、3年魚の月別の体表グアニン量を表4,5および3に示す。前報¹⁾で説明した様に未成熟のヒメマスは体重が100gになるくらいまで成長と共に体表のグアニン量が増え、それ以降略一定の量を維持していた（図6）。この100g程度になる時期がヒメマスの降海行動を起こす時期と略一致していた。これに対してニジマスでは図7の様に1年魚、2年魚共に成長とグ

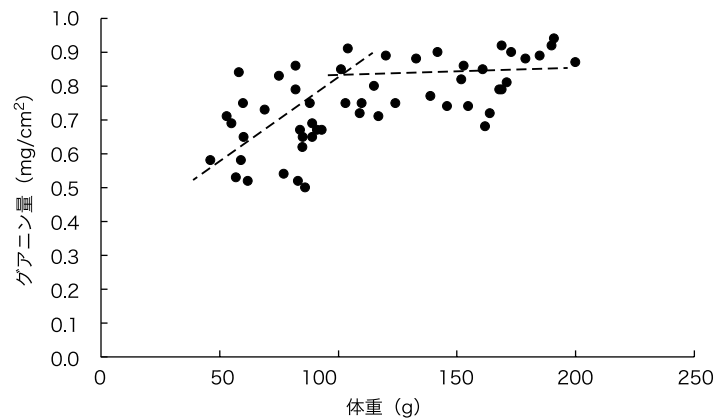


図6 養殖ヒメマスの体重と体表グアニン量

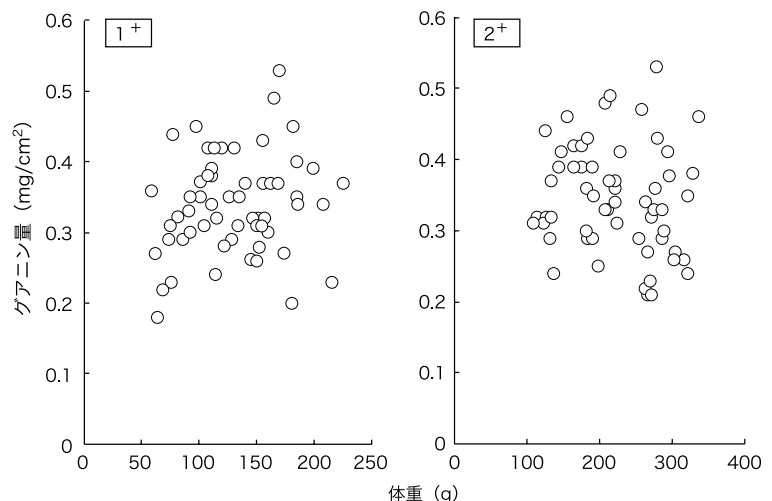


図7 ニジマスの年齢別体重とグアニン量

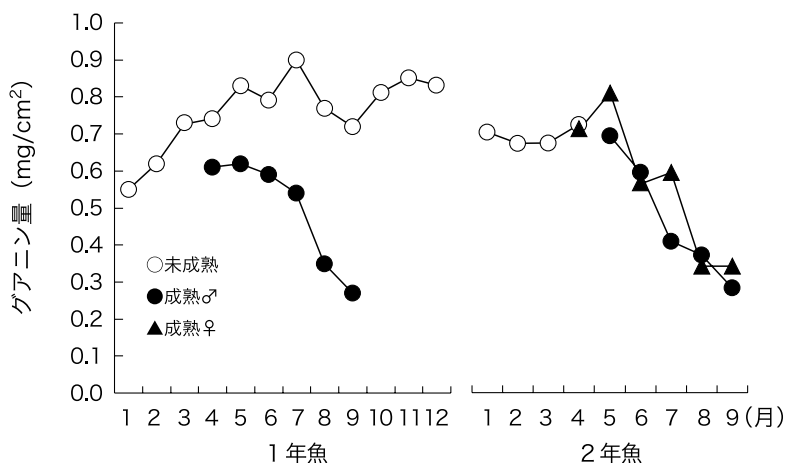


図8 養殖ヒメマスの性成熟に伴う体表グアニン量の変化

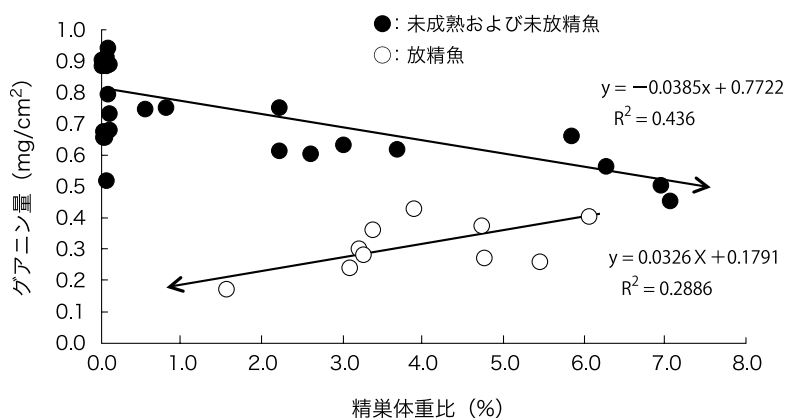


図9 ヒメマス1年魚雄の精巣体重比と体表グアニン量

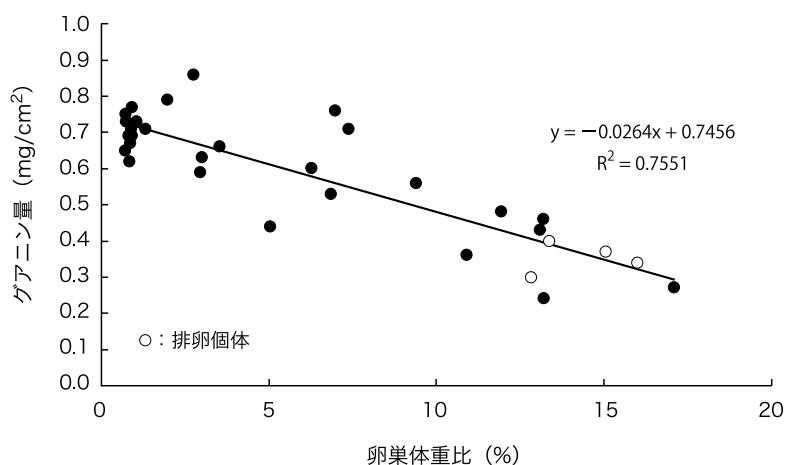


図10 ヒメマス2年魚雌の卵巣体重比と体表グアニン量

アニン量の間に相関は認められず、季節によるグアニン量の変化も起こっていなかった。ヒメマスとは違って海に下る性質を有しないニジマスでは成長や季節によってグアニン量の変化が起こらないものと判断出来る。

2-4. 性成熟とグアニン量

ヒメマスは雌雄共に性成熟に伴ってグアニン量が一定の割合で減少し(図8-10), 減少の割合は雄の方がやや大きかった。ところがニジマスでは雌雄共に性成熟によるグアニン量の明確な減少は認められず(図11), ヒメマスの結果とは異なっていた。但し, 1年魚から3年魚まで全ての魚を一つの図で表してみると, 放精あるいは排卵した魚, 特に雄は未成熟魚よりグアニン量が少ない傾向が認められた(図12)。ニジマスでも性成熟に伴って多少グアニン量の減少が起こっている可能性が有る。ヒメマスとニジマスのこの違いを如何考えれば良いのであろう。前述した様に雄性ホルモン, 雌性ホルモン共に銀毛化を抑制し, 抑制効果は雄性ホルモンの方が強いことが分かって

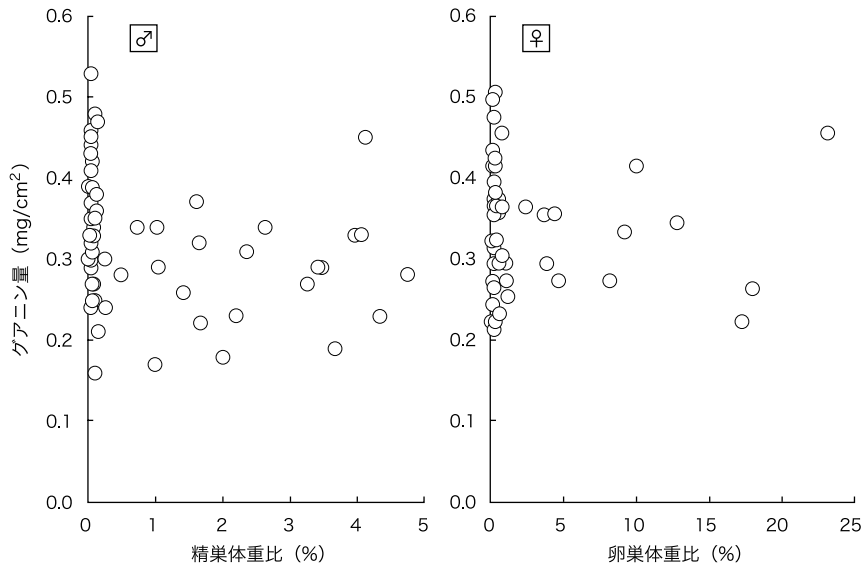


図 11 ニジマスの生殖腺体重比とグアニン量

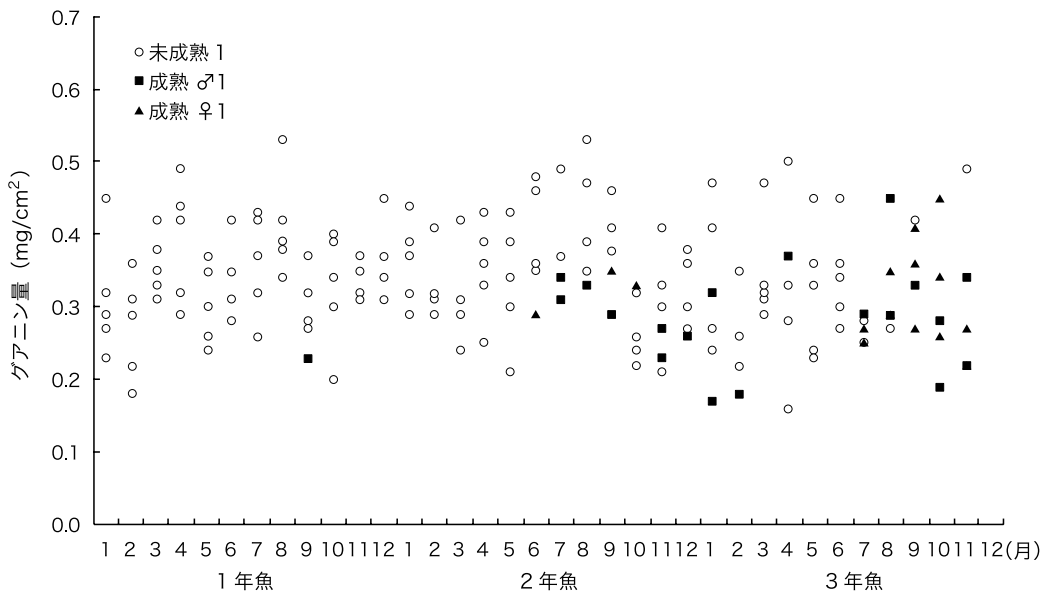


図 12 ニジマスの年齢とグアニン含量

いる。よって、ヒメマスでは「①生殖腺が発達して性ホルモンの分泌が盛んになるに従ってグアニンの合成が阻害されている。更に、②グアニンの分解も起こっている可能性が高い。」と推測した。

ヒメマスとニジマスの性成熟に関する最も大きな違いは、ヒメマスは単回成熟魚で、一度性成熟すると死んでしまうのに対し、ニジマスは

多回成熟魚で、一度性成熟してもその後回復し、数年間繰り返して成熟する点である。単回成熟魚であるヒメマスでは1回の成熟で全てを消耗しても構わないのでグアニンも分解され、多回成熟魚であるニジマスではそれ程の消耗を起こす訳にはいかないのか、グアニンの分解が生じていないか、あるいは分解率が小さいのではないかと推測する。

養殖魚と天然魚の違い

養殖魚と天然魚の違いを未成熟のヒメマスとニジマスで比較した結果が表6である。ヒメマス、ニジマス共に養殖魚は中禅寺湖漁業協同組合のコンクリート池で飼育されて

いた魚で、天然魚は中禅寺湖において釣りによって漁獲された魚である。ニジマス天然魚の詳細は表7に示してある。養殖魚はヒメマス、ニジマス共に1月、天然魚はヒメマスが3月、ニジマスが11月に調べた結果である。天然ヒメマスの体重の項が空欄なのは、入手した時既に食性調査の為に内臓が取り除かれていたことによる。

ヒメマスの養殖魚では成長に伴ってグアニン量が増え、2年魚では平均0.72mg/cm²であった。ところが天然魚では同じ2年魚であるのに0.89mg/cm²（この0.89mg/cm²は天然ヒメマスの例では最も低い値で、1mg/cm²程度のグアニン量を示すのが普通であることを付記しておく。）と高い値を示していた。この様にヒメマスでは同じ年齢でも天然魚の方が養殖魚より高いグアニン量を示していた（図13）。一方、ニジマスの養殖魚では1年魚、2年魚共にヒメマスより

表6 ヒメマスとニジマスのグアニン含量の違い

魚種 産 年齢	ヒメマス			ニジマス		
	養殖		天然	養殖		天然
	1+	2+		1+	2+	
採取月	1	1	3	1	1	11
尾数	5	5	10	5	5	7
尾叉長 (cm)	18.5	24.7	25.1	18.6	23.0	24.0
体重 (g)	73	155	-	78	130	168
グアニン (mg/cm ²)	0.55	0.72	0.89	0.31	0.36	0.75

表7 中禅寺湖天然ニジマスの魚体測定と解剖の結果

	尾叉長 (cm)	体重 (g)	肥満度	体重比 (%)	
				肝臓	DL
1	29.2	269	1.08	0.87	0.11
2	25.3	193	1.19	0.78	Tr
3	23.8	166	1.23	0.82	0.07
4	21.8	123	1.19	0.73	0.17
5	22.7	134	1.15	0.96	0.27
6	21.9	125	1.19	0.86	Tr
7	23.6	166	1.26	0.80	0.09
平均	24.0	168	1.18	0.83	0.10

グアニン量が少なく、更に1年魚と2年魚でグアニン量に殆ど違いが無く、ヒメマスとは明らかに異なっていた。また、天然魚のグアニン量は養殖魚の2倍高い値を示していた（図14）。

ヒメマス、ニジマスと魚種が違って天然魚の方が高いグアニン量を示す何らかの共通の要因が有るものと思われる。天然魚と養殖魚で大きく異なるのは食べている餌と棲息環境であ

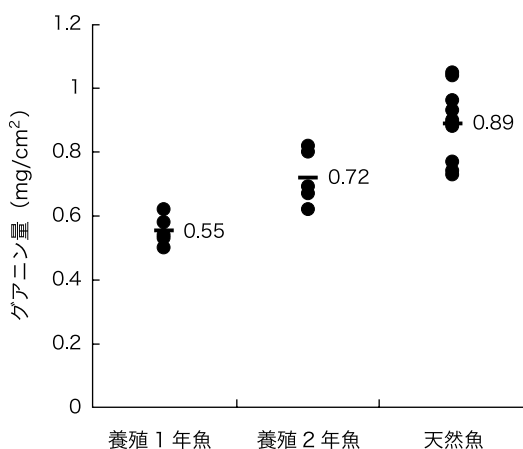


図13 ヒメマスのグアニン含量

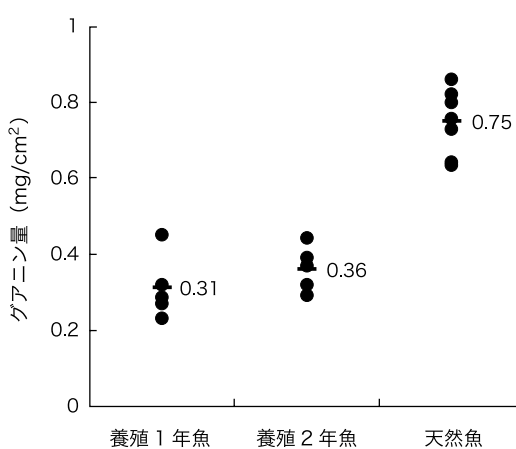


図14 ニジマスのグアニン含量

る。天然魚が食べている餌を詳細に調べ、その餌で養殖魚を飼育するのは容易ではない。よって、棲息環境が異なる条件下で同じ餌で飼育された養殖ニジマスのグアニン量を比較し、天然魚の方が高いグアニン量を示す原因を推定することにした。

富士宮の養殖場で中禅寺湖漁業協同組合と同じ餌で飼育されたニジマス2年魚5尾を用いてグアニン量を調べた。この魚は孵化してから一度も外の池に出されたことが無く、親魚候補として低密度飼育されていた魚である。平均尾叉長は23.6cmで、中禅寺湖漁業協同組合の魚の23.0cmと略同じ大きさであった。この5尾の魚の平均グアニン量は 0.36 mg/cm^2 で、中禅寺湖漁業協同組合の魚と全く同じ値であった。

この結果から、天然魚と養殖魚で体表グアニン量が異なるのは飼育密度や照度、紫外線量等によるのではなく、食べている餌の違いが主な原因ではないかと考えられる。また、天然魚、養殖魚共にヒメマスよりニジマスの方がグアニン量が少ないのは、降海性の有無によるのではないと思われる。

色彩色差計による測色結果

ニジマスの1年魚から3年魚まで年間を通じて色彩色差計で測色した明度(L値)の値を図15に示す。1年魚は5月に外池に出されるまで屋内で飼育されていたが、この時期のL値は外池に出されてからの値より高い値を示していた。外池に出される前のグアニン量が特に高い訳ではないので、体表のメラニンが少ないか、或いは黒色素顆粒が凝集していた為にL値が高い値を示したものと思われる。外池に移されると極短期間でL値は低くなっていた。また、L値は秋冬に高く、夏に低い傾向を示していた。これは太陽光による照度や紫外線の強さの違いによるものと考えられる。外池では屋内池より照度が高く、紫外線が強い為にメラニンが増えるか、或いは黒色素顆粒が色素胞内で拡散するのであろう。また、夏には照度が高くて紫外線も強く、冬には照度が低くて紫外線も弱いのでL値が変化するのであろう。その間グアニン量に大きな変化は認められなかった(図12)ので、見た目の体表の明るさ(=L値)はグアニン量

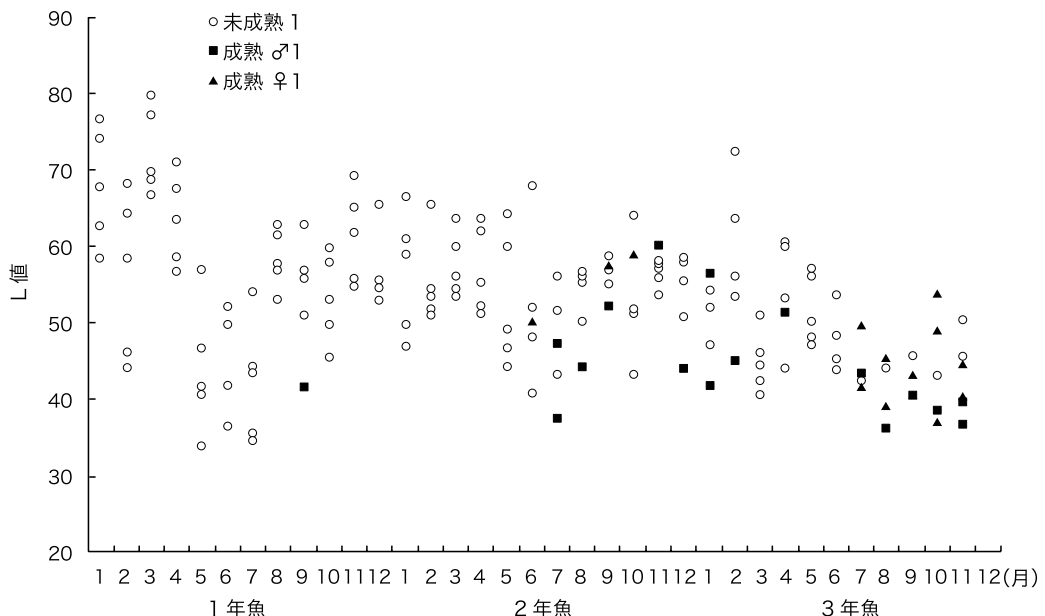


図15 ニジマスの年齢とL値

表 8 試験区の詳細

区	内容	水槽に対する処置
A	紫外線と可視光線を遮断	フィルム-1を貼ったアクリル板を被せる
B	対照区-1	目の粗い金属網を被せる
C	紫外線遮断	フィルム-2を貼ったアクリル板を被せる
D	対照区-2	アクリル板を被せる

フィルム-1: 紫外線遮断率 99%, 可視光線遮断率 95%

フィルム-2: 紫外線遮断率 95%, 可視光線遮断率 6%

アクリル板: 全ての光を透過

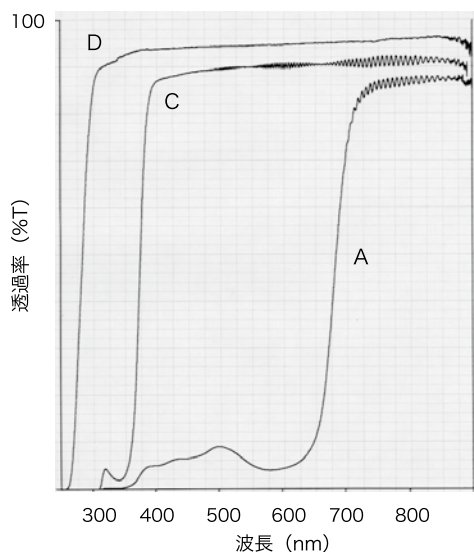


図 16 夫々のアクリル板の波長別透過率

ではなく、メラニン量或いはメラニン色素顆粒の分散程度に左右されていると考えることが出来る。

紫外線による体表色の変化

前項の色彩色差計による測色結果から、魚を屋内池から屋外池に移すと短期間で体色が黒っぽくなって明度（L 値）が低くなることと、外池の魚は太陽光が強い夏場に L 値が低くなる傾向が有ることが分かった。よって本項では、この原因が太陽光の紫外線によるのか否かを調べた。

1. 方法

屋外に設置した容量 400L の青色角型 FRP 水槽 4 面に孵化から試験開始時まで屋内水槽で飼育されていたニジマス（平均体重 111g）を夫々 4Kg ずつ収容した。

試験区として表 8 に示す 4

区を設定した。A 区は水槽上に紫外線遮断率 99%, 可視光線遮断率 95% のフィルム-1 を貼ったアクリル板（アクリル板は全ての光を透過）で覆った紫外線と可視光線をカットした区。B 区は水槽から魚の飛び出しを防ぐ為に目の粗い金属網で覆っただけで、遮光処理は行わなかった対照区-1。C 区は紫外線遮断率 95%, 可視光線遮断率 6% のフィルム-2 を貼ったアクリル板で覆った紫外線カット区。D 区はアクリル板のみを水槽に被せた対照区-2 である。A, C, D 区のアクリル板の光の波長別透過率を図 16 に示す。飼料は市販のニジマス育成用飼料を日に 2 回与えた。飼育試験開始時に 5 尾、1 ヶ月後に各区から 5 尾をサンプリングし、FA100 麻醉下で色彩色差計を用いて L 値を測定した。測色部位は背鰭下の背部、体側部、腹部で、それぞれ図 1 の①、②、③に相当する。

2. 結果

測定結果を表 9 に示す。A 区は背部の L 値は開始時と変わらないが、体側部と腹部はやや値が高くなっており、試験開始時より魚が白っぽくなっていた。B 区と D 区の魚は何れの部位も値が低くなっており、黒っぽくなっていた。

表 9 1 ヶ月間の L 値変化（5 尾平均）

時期	開始時	1 カ月後			
試験区		A	B	C	D
背側	36.7	36.1	27.9	31.5	33.5
体側	69.0	71.5	53.1	57.9	52.8
腹側	77.2	82.1	64.3	70.1	64.6

A 区

B 区

C 区

D 区

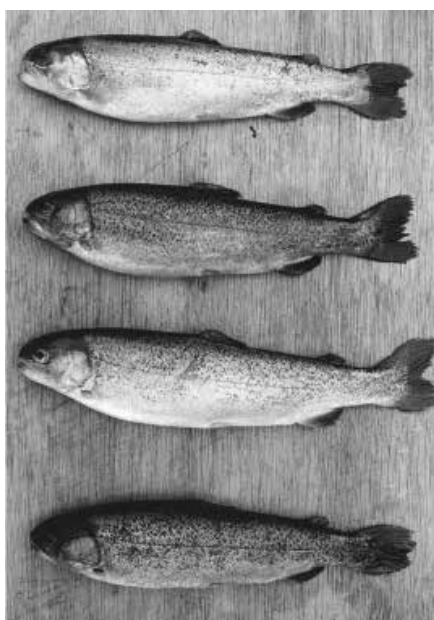


写真1 1カ月後の魚

C区はB、D区程ではないが、やはり値が低くなっており、何れの部位も黒味が増していた。1ヶ月後の魚の体色を写真1に示す。A区の魚は他区の魚より明らかに白っぽく、B、D区の魚が黒っぽいこと、C区の魚はその中間であることが分かる。

以上の結果から、紫外線と可視光線の殆どを遮断したA区の魚ではメラニンの過剰な生成・蓄積が抑制されていたか、或いは色素胞内で黒色素顆粒の拡散が抑えられていたものと思われる。また、紫外線の95%を遮断したC区でもある程度の黒化抑制効果が認められたものの、A区に比べると魚が黒っぽく、L値も低かった。体表の黒化には紫外線だけではなく、可視光線の影響も有るのではないかと考えられる。可視光線の影響の一つとして考えられるのが水槽内の色である。飼育1ヶ月後には何れの水槽内にもミズゴケ様の物が生じており、緑色～茶色になっていた。その程度は見た目ではA<C<B≒D区の順であった。魚が水槽内部の色に反応して体表の色を変えていた可能性も有る。

この試験ではメラニン量を測定していないので体色黒化の主要原因を特定することは出来ないが、何れが原因であるにせよ、屋内池から外池に魚を移すと短期間で体色の黒化が起こることと、太陽光が強い夏場により黒化が著しくなるであろうことが分かった。この結果は中禅寺湖漁業協同組合の池で調べた結果を良く再現していると言える。

要約と考察

本試験で得られた結果は以下の様に纏めることが出来る。

- ・ヒメマスと違ってニジマスでは成長や季節による体表グアニン量の変動は無かった。ヒメマスの銀色化は乾⁴⁾が述べている様に、銀色化に先立って甲状腺が活性化し、甲状腺ホルモンの産生量が増える。甲状腺ホルモンと成長ホルモンが協調してウロコや皮膚へのグアニンやヒポキサンチンの沈着を促進して銀色化を引き起こす。銀色化は脳下垂体の成長ホルモン生産細胞を活性化させ、成長ホルモンの産生量が増える。成長ホルモンは鰹のNa⁺, K⁺ - ATPアーゼの産生量と活性を上昇させ、海水適応能を強くする。つまり、降海性の魚にとって最も重要な海水に対する適応能の増加に必要な成長ホルモンの産生量を増やす為の一過程としてグアニンやヒポキサンチンの沈着が起こり、銀白色化が起きているのである。ところがニジマスは海に下る性質が無いので、特定の時期に海水適応能を高くする必要が無く、成長ホルモンの分泌量が略一定しているのではないかと考えられ、その結果としてグアニン量の変化が無いのではないかと考えられる。

- ・ヒメマスでは性成熟に伴う体表グアニン量の減少が顕著であったが、ニジマスでは不明確であった。但し、性成熟魚のグアニン量は未成熟魚より全体的にやや低い傾向は認められた。

この点に関しても乾^{4, 5)}が雄性ホルモン、雌性ホルモン共にグアニンやヒポキサンチンの蓄積を抑制し、抑制効果は雄性ホルモンの方が強いことと、性ステロイドホルモンが甲状腺ホルモンの作用を阻害し、特に雄性ホルモンの阻害作用が強いことを報告している。ヒメマスでは乾の報告通りの結果を示していたが、生殖腺の発達に伴うグアニン量の急激な減少から、単にグアニンの合成が阻害されているのみでなく、分解も促進されているのではないかと著者らは前報¹⁾で推測した。

本試験の結果、ニジマスでは性成熟によるグアニン量の減少は不明確で、起こっているにしても極小さなものであった。ヒメマスとニジマスの違いは単に性ホルモンによるグアニンの蓄積抑制作用のみでは説明できないように思える。ヒメマスとニジマスの大きな違いは、ヒメマスは単回成熟魚で、一回成熟すると死んでしまうのに対し、ニジマスは多回成熟魚で、一回成熟してもその後回復し、来シーズンには再び性成熟を繰り返すことである。この違いからヒメマスでは性ホルモンによるグアニンの蓄積抑

制作用のみでなく、グアニンも含めた体成分全体が大きく分解されているのではないかと推測した。一方、ニジマスでは性成熟後に回復しなければならないので、体成分の分解がヒメマスほど著しくなく、従って性ホルモンのグアニン蓄積抑制作用が主体になっている為にグアニンの減少が少ないのではないかと思える。この様にヒメマスとニジマスの性成熟に伴う体表グアニン量変化の違いは、両魚種の性成熟生態の違いによる部分が大きいのではないだろうか。

・ニジマスでもヒメマス同様養殖魚より天然魚の方が体表グアニン量が多かった。飼育密度、照度、紫外線等の条件が異なる環境下でニジマスを飼育すると体表の黒化（メラニンの量や黒色素顆粒の分散）に影響が表れるものの、グアニン量には殆ど変化が無かった。よって、天然魚と養殖魚のグアニン量の違いは食べている餌の違いが主原因ではないかと思われる。養殖魚は配合飼料、天然魚は動物プランクトンや小魚等の生きた餌を食べている。生きた餌を食べると何故グアニン量が増えるのか、今後解明すべき問題である。

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

- 1) 酒本秀一, 佐藤達朗: ヒメマスのグアニン量. *New Food Industry*, **54** (9), 48-58 (2012)
- 2) 伴真俊, 東照雄: 支笏湖と中禅寺湖に分布するヒメマスのスモルト化. さけ・ます資源管理センター技術情報, No. 170, 9-15 (2004)
- 3) 生田和正: 中禅寺湖のヒメマスは何故「華厳の滝」で投身自殺するのか??. 養殖研ニュース, **21**, 36-39 (1991)
- 4) 乾靖夫: 銀毛するサケー塩漬けにならない変化ー. 魚の変態の謎を解く (ベルソープックス 025), 成山堂書店, 東京, 101-113 (2006)
- 5) 乾靖夫: ヒラメの眼が移動する訳ー変態の司令塔を探るー. 魚の変態の謎を解く (ベルソープックス 025), 成山堂書店, 東京, 25-92 (2006)
- 6) 伴真俊, 伊藤二美男, 清水勝: ベニザケ0年魚秋スモルト放流の試み. さけ・ます資源管理センター技術情報, No. 168, 29-32 (2002)
- 7) F. Heing and S. Reckel: Guanine and adenine. In "Methods of enzymatic analysis" ed. by H. U. Bergmeyer, J. Bergmeyer and M. Grable., VCH, Weinheim, pp. 92-100 (1981)

(3) 貯蔵工程と樽由来成分の変化

古賀 邦正 (KOGA Kunimasa), 放送大学 京都学習センター 客員教授

Key Words: ウイスキー・製造工程・貯蔵・樽・熟成・香り成分

はじめに

今回は、ウイスキー樽および樽貯蔵中のウイスキーニューポット成分とその動きについて紹介した。今回は、樽由来成分とその貯蔵中の変化について紹介する。ウイスキーの樽は容器であると同時に反応器であることを前号で指摘したが、そのことが一層理解して頂けると思う。しかし、われわれは理解しやすくするために、まず分類して考える癖がついてしまっているが、自然の摂理はなかなか分類通りには進んでくれない。ウイスキーの熟成も、ニューポット成分と樽由来成分が分かれて進行しているわけではない。ウイスキー中のすべての成分が渾然一体となった中で、熟成した状態に移行するわけで、実際、どちらに分類してよいか分からないことも多々あるが、それこそが熟成の本質であることも勘案しながら、お読み戴ければと思う。

現するが、寝かされている間もウイスキーは結構忙しい。前回、紹介したように貯蔵中もニューポット中の成分は連鎖的に反応を繰り返し、さまざまな反応生成物をつくりだしている。しかも、原酒の「ゆりかご」である樽からも、驚くほど多量で、多様な成分が溶け出し、種々の反応に関与してウイスキー原酒の熟成に大きく貢献している。

12年から18年貯蔵したシングルモルトウイスキーでは、製品中の樽材に由来する不揮発成分の濃度は2500～3500 ppm ぐらいになる。たとえば、容量が約480リットルのパンチョンやシェリーウッドの樽に約400リットルのウイスキー原酒が入っていたとすると、アルコール濃度約60%の原酒は加水されて約43%の製品に仕上げられるのだから、約400リットルの原酒は約560リットルの製品に相当する。したがって、樽から原酒中に樽由来成分が1.4～2kg近くも溶け出していたことになる。これに加えて、樽からは香りの成分である多様な揮発成分も溶け出している。しかし、揮発成分は少量でも、充分、嗅覚を刺激するから、これは量的には少ないだろう。

貯蔵中に樽からさまざまな成分が溶け出していることは、「色」を見ることでもっとも端的

11 ウイスキー中の樽由来成分の概要

11-1. 樽由来成分含量と貯蔵中の色調変化

ウイスキー製造現場の人はニューポットを樽に入れて貯蔵することを「樽で寝かせる」と表

に理解できる。蒸留したてのニューポットは無色透明だが、それが最初の1～2年で急激に黄色く色づき、その後も徐々に色度を増していく。これは樽材由来成分が溶け込んでいるからにはほかならない。また、色調も時間の経過とともに淡黄色から黄褐色に、さらに明るく輝くような琥珀色になり、最後にはそれが赤みを帯びてくる。

着色物質としては、樽材から溶出したケルセチンやケンフェロールなどのフラボノール類が、淡黄色を与える。また、単に着色物質が溶出するだけでなく、様々な着色反応が進行している。すなわち、樽材成分であるフロログシノールとカルボニル化合物の反応、フラボノール類の酸化重合、バニリン類芳香族化合物の酸化・着色反応、リグニンの分解・着色化、樽材に含まれる糖類と含窒素化合物によるメラノイジン反応など様々な反応が進行しているのだ。着色物質のほとんどが $10^3 \sim 5 \times 10^4$ の分子量区分に集まっており、熟成とともにこの区分が増加することが知られている。

十分に熟成したウイスキーには「琥珀色」という言葉がよく似合うが、この色調になるには樽を通して入ってくる酸素の存在が不可欠

だ。貯蔵中に酸素の浸透が十分でないとウイスキーはドス黒くなってしまい、明るくて深い色調の「琥珀色」にはならない。呼吸によって樽に浸透する酸素が、エタノール成分などの酸化・熟成反応を促していることは述べたが、様々な着色反応がバランスよく進行してあの琥珀色へ変化する過程にも大きく寄与しているのだ。図11-1に色調関連物質と色調形成機作を示した。バニリン類芳香族化合物とリグニンの構造については後述する。

11-2. 香り成分の生成

熟成したウイスキーはまず、その琥珀色で飲む者の目を楽しませ、次に香りで心を満たしてくれる。エステルとアルデヒドは官能閾値が低く、ウイスキーの主要な香味成分の一つだが、それについては主要な反応も含めて前回のニューポット成分の章で述べた。とくに、アセトアルデヒド、アセタール、酢酸、酢酸エチルの貯蔵中における増加は著しいが、これには樽材が関与していることが明らかになっている。エステル成分のトータル量は貯蔵とともに増加してエステル化反応が進行するが、カプリン酸エチル、パルミチン酸エチル、リノール酸エチル

は減少し、それらの構成酸が増加していることからエステル分解反応も起きていると考えられる。また、エステル交換反応が起こっていることも示唆されている。一方、樽材成分のコハク酸などとエタノールの反応によってコハク酸エチルが生成する。このように個々のエス

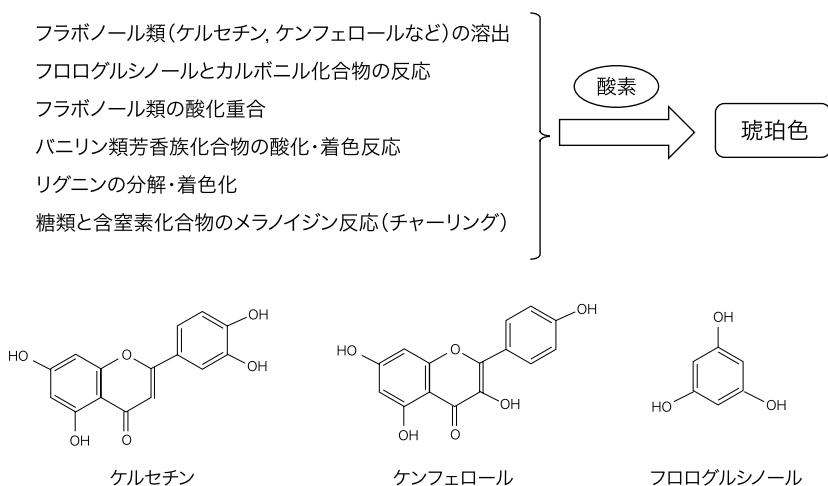


図 11-1 ウイスキーの色調関連物質と色調形成

テル成分によって増減は見られるが、総合的な結果としてこれらの変化がエステル成分の多様化とトータル量の増加をもたらし、ウイスキーの香味に厚みと華やかさを与えている。そして、これらの変化には樽材も大いに関与しているのだ。

ウイスキーの香りをつくるうえで、オーク材の香気成分は非常に大きな役割を果たしていると考えられるが、140種類以上の化合物が同定されている。これらの化合物のうち、ケルカスラクトン、オイゲノール、バニリン、ゲラニルアセトンなどは存在量も多く、それぞれ特有の強い香気を持つことから、オーク材の香気に最も寄与する成分と考えられる。

なかでも、ウイスキーに熟成香を与える成分としてとくに知られているのは、ココナッツ様の香りを持つ、ケルカスラクトンだ。ケルカスラクトンはオーク材特有のラクトン類であることから、オークラクトンとも呼ばれる。ケルカスとは、樽材となるコナラ類、つまりオーク材の学名だが、ケルカスラクトンはすべてのオーク材に含まれているわけではなく、ウイスキー樽に用いる落葉性のオークには含まれるが、常緑性のオークには含まれていない。樽

材の中ではタンニンに結合する形で存在していて、タンニンの分解とともにウイスキーへ溶出してくる。ケルカスラクトンには、a型とb型の光学異性体があり、b型のほうが閾値が低く、少量でも強い香りを発する。ウイスキーにはa型とb型の両方が含まれているが、a型のほうが量は多い(図11-2)。

11-3. 抽出成分と分解成分

樽由来成分が樽から溶け出し、ウイスキー原酒に溶け込むまでには2通りのパターンがある。一つは、樽のオーク材に含まれている成分が、ほぼそのままのかたちで溶出してきた、ウイスキー原酒に溶け込むパターンだ。この溶出パターンの成分は「抽出成分」と呼ばれている。前項の香りに関与する成分は主に抽出成分であるが、脂肪酸などはグリセロールにエステル結合した中性脂肪として材中で存在しており、それが加水分解されて溶出してくる。従って、グリセロールも溶出してくるが甘みを感じるほどの量ではない。また、コハク酸も抽出成分だ。コハク酸はカルボキシル基を2個持った不揮発成分だが、貯蔵中にアルコールと反応してエステル形成に寄与することは前述した。特徴的な

味を呈し、味噌、醤油、清酒などの調味料として用いられている。ウイスキー中にはコハク酸以外にも何種類かの不揮発性有機酸の存在が認められており、これらもエステル形成に向かう。酢酸もオーク材中では多糖類と結合して存在しており、ウイスキー原酒中に溶出してくる。酢酸は、貯蔵中のエステル成分生成のキー物質であることはすでに述べた。ウイスキー原酒中には、エタノールの酸化によって作られる酢酸とオーク材由来の酢酸があるが、量的に後者の

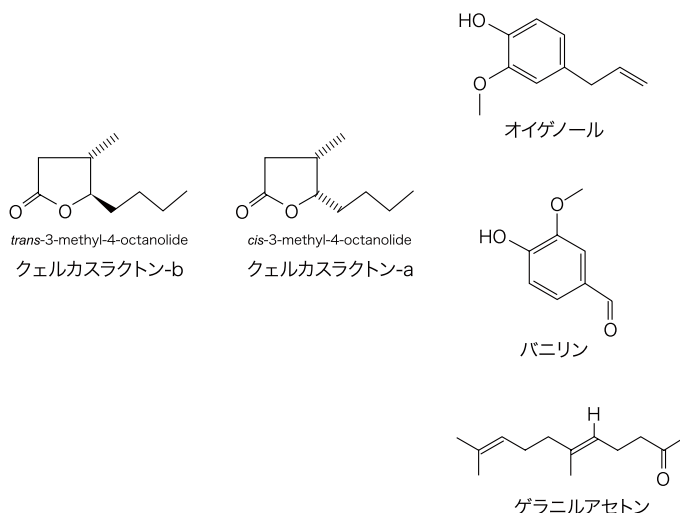


図 11-2 オーク材由来の主要香気成分

方が多いことが明らかにされている。

オーク材由来香気成分も抽出成分だが、なかでもオイゲノールは刺激があるが快い香りを持ち、香辛料のクローブにも含まれている成分だ。クローブは日本では「丁子」と呼ばれ、古くから愛用されている。さらに、酢酸やオーク材の香気成分に加え、リオニレシノールおよびスコボレチンも抽出成分として知られている。リオニレシノールは熟成ウイスキーの主要抗酸化成分の一つとして注目されているし、スコボレチンは微量でも比較的容易に測定でき、熟成とともに増加するため、熟成の指標物質とされる(図 11-3)。図から分かるように、酢酸、コハク酸以外の化合物はいずれもフェニル骨格を有している。後ほど述べるが樽材中の高分子化合物、リグニンの基本構造はフェニルプロパン骨格であり、リグニンとの関わりが興味のあるところだ。

植物の細胞膜を構成する成分である植物ステロールも、ウイスキー中に溶出してくる。熟成ウイスキーには、カンベステロール、スチグマステロール、 β -シトステロールとそのd-グルコシドが認められるが、量的にはほとんどが β -シトステロールだ(図 11-4)。香味はオイリーだが、構造がコレステロールに似ているため腸のコレステロール吸収を抑えることができ、最近、健康食品としても注目されている。

このように抽出成分として多様な成分が知られているが、ウイスキー中に含まれるこれらの成分は微量で、それぞれの個性が明確に出現するほどではない。

しかし、わずかでもこれらの成分が含まれているということが、ウイスキーの熟成香味の形成に何かしら寄与していると考えら

れる。

樽由来成分がウイスキーに溶け込むもう一つのパターンは、オーク材に含まれる高分子成分が、徐々に分解されてから溶け出してくるパターンである。樹木には心材部分と辺材部分とがあり、心材部分は死んだ組織、生きている細胞は辺材部分に存在する。ウイスキー樽はオーク材の心材部分から造られているが、死んでいるとはいえ心材部分には樹木を支えるという大切な役目がある。従って、樹木を支えるための非常にしっかりした高分子成分と組織を虫などの外敵から守るための成分であるタンニンが心材の主要成分だ。

心材を構成する、しっかりした高分子の成分はなかなか分解できない。それが長い貯蔵の間に、エタノールによって分解されて、溶け出してくるのだ。これをエタノリシスと言い、これ

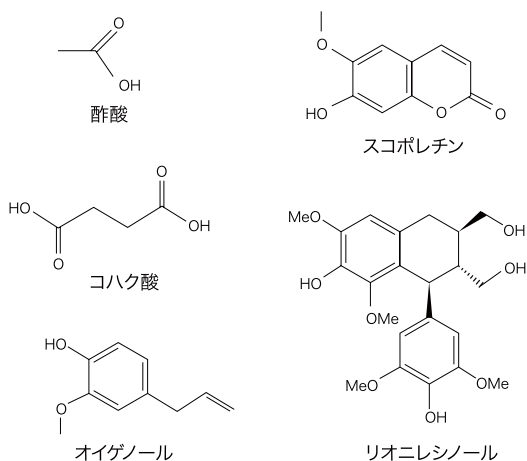


図 11-3 主な抽出成分:酢酸, コハク酸, オイゲノール, スコボレチン, リオニレシノール

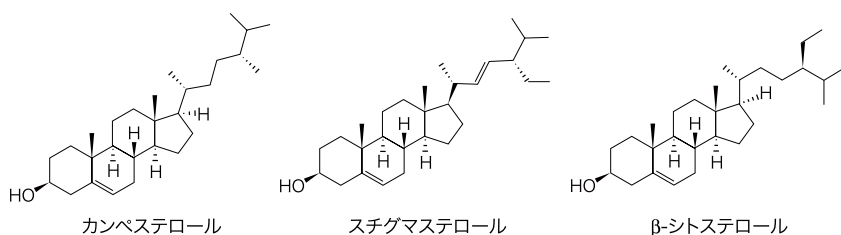


図 11-4 ウイスキー中の植物ステロール類

らの成分は分解成分と呼ばれる。難分解性高分子化合物からの分解成分のうち、その一部が、はじめから材中に存在する場合もある。また、樽表面をチャーした時に高分子化合物から生成する場合もある。これらがウイスキー原酒中に溶出してくる場合、厳密に言えば、これらの成分は抽出成分ということになる。ウイスキーへの溶出のパターンは二通りあるが、化合物が明確には二つに分かれているわけではない。抽出成分であれ、分解成分であれ、いずれにしても溶け出してきた成分は互いに反応しあい、さまざまに変化してウイスキーの香味を特徴づけている。

12 タンニンとその由来成分

樽材から溶け出す成分にはタンニンがある。タンニンはタンパク質や金属と激しく反応して結合する水溶性化合物の総称である。どの植物にも含まれており、多数のフェノール性ヒドロキシ基を持つ芳香族化合物（ポリフェノール）で、分子量 500 程度の低分子化合物からタンパク質や他の巨大分子と結合した高分子量のものまで様々なかたちで存在している。樹木に虫や微生物などの他者が侵入してきた場合、その侵入者のタンパク質に結合して動きを阻止する役割を担っている。タンニンは樹木を守る防御物質なのだ。

タンニンには加水分解型タンニンと縮合型タンニンがあり、両者は基本的に構造が異なる。加水分解型タンニンは加水分解されると、糖などのポリアルコールとポリフェノール酸をつくる。タンニン由来のポリフェノール酸はいずれも 1 分子

中にフェノール性水酸基（ヒドロキシ基）を複数持った有機酸で、ウイスキー中の主要なポリフェノール酸はガーリック酸（没食子酸）、タンニン酸、エラグ酸の 3 種類である。一方の縮合型タンニンは色調形成に關与するケルセチンやケンフェロールのように 2 つのベンゼン環を 3 個の炭素で結ぶ構造を持つ化合物で、フラボノールという。このフラボノールが重合したものが縮合型タンニンである。ウイスキー中のポリフェノール成分としては加水分解型タンニン由来の方が多く含まれており、これらは加水分解によって徐々にウイスキー中に溶け込んでくるものと考えられる。加水分解型タンニンも縮合型タンニンも渋味を呈することが知られている。ウイスキーポリフェノールは熟成にとっても重要な化合物群だ（図 12-1）。

また、ウイスキーの活性酸素消去活性（POD 活性および SOD 活性）はきわめて強く、熟成年数とともにこの活性が上昇することが知られている。この活性を担う主要物質はウイスキーポリフェノールであり、とくにガーリック酸、タンニン酸、エラグ酸と抽出成分のリオネレシノールの寄与が大きく、ポリフェノールは重合することによって活性酸素を消去する。タンニンがウイスキー貯蔵において抽出成分であるか、分解成分であるかの仕分けは難しいとこ

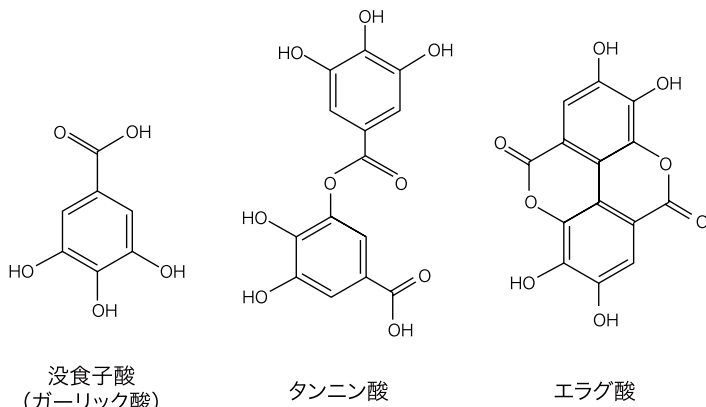


図 12-1 加水分解型タンニン由来の主要なウイスキーポリフェノール酸

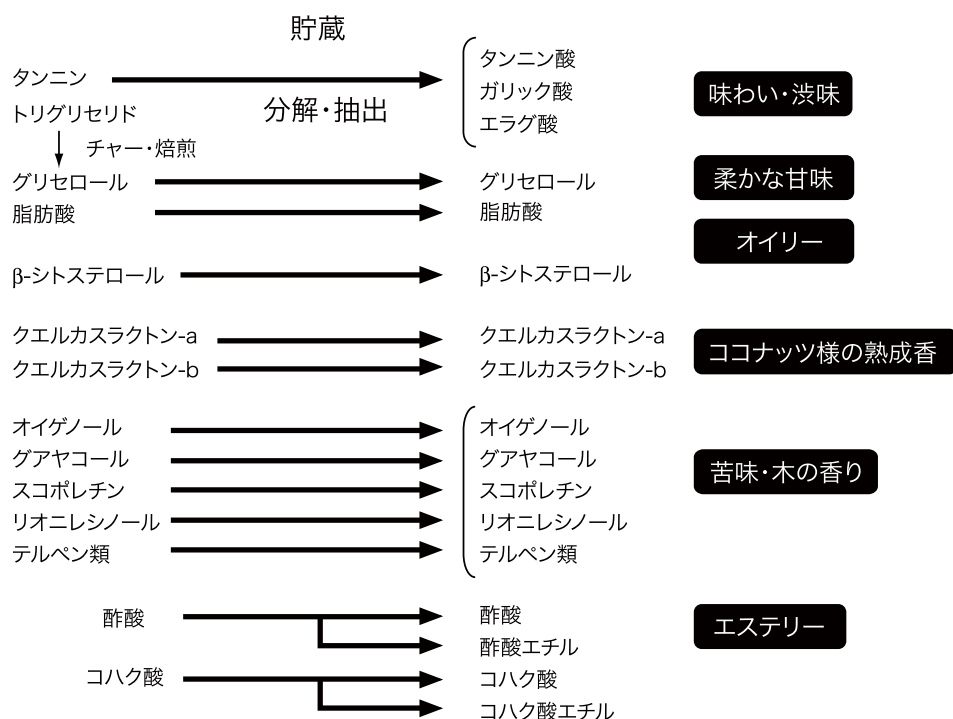


図 12-2 主な抽出成分と貯蔵中の変化

ろだが、後述する細胞壁の構成成分よりはるかに分解されやすいので抽出成分に入れて、主な抽出成分の貯蔵中の変化と香味への影響を図 12-2 にまとめて示す。

13

樽材中の高分子化合物：セルロース、ヘミセルロースとその由来成分

ウイスキー原酒中の樽由来成分を分子量別に見ると、分子量 3000 以下の低分子量成分から分子量 10 万以上の高分子量成分まで、じつに幅広く分かれる。かりに分子量 180 のグルコース（単糖類）だけで分子量 10 万の化合物が構成されているとすれば、約 6000 個のグルコースが重合していることになる。ウイスキー原酒にはこんなに大きな分子も溶け込んでいるのだ。

ウイスキー中の高分子量成分は、心材部分の細胞壁を構成している高分子成分（セルロース、

ヘミセルロース、リグニン）の分解成分と考えられる。これらの細胞壁を構成する高分子成分は、しっかりとした構造をつくりあげており、非常に分解されにくい。いずれも低分子量の物質が重合したもので、非常に強固に結合している。細胞壁が細胞の形と大きさを決め、細胞を守ることができるのは、これらの高分子成分のおかげである。細胞壁を鉄筋コンクリートにたとえるなら、リグニンが鉄骨、セルロースが鉄骨の周囲を埋めるコンクリート、ヘミセルロースが鉄骨とコンクリートをつなぐ針金に相当するといわれている（図 13-1）。

「コンクリート」にあたるセルロースは、単糖類のグルコースがつながった多糖類だ。植物体の 3 分の 1 を占めていて、地球上で最大のバイオマスといわれる。われわれのエネルギー源となるデンプンもグルコースがつながった多糖類だが、セルロースとデンプンではグルコースの結合様式が少し異なる。デンプンの場合、グ

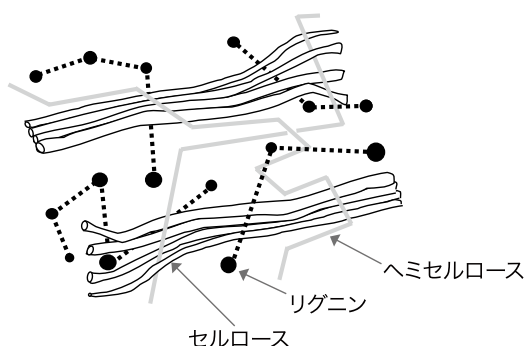


図 13-1 植物細胞壁を構成する主要 3 成分

ルコースの 1 番目の炭素と、別のグルコースの 4 番目の炭素が「 α 1-4 結合」と呼ばれる結合様式でつながっている。一方、セルロースの場合も結合する炭素は 1 番目と 4 番目でデンプンの場合と同じだが、結合様式は「 β 1-4 結合」と呼ばれる結合様式になっている。 α 結合は、グルコースの六員環の面に対して、少し角度を持ってもう一つのグルコースが結合している。従って、デンプンのようにグルコースが α 1-4 結合を繰り返し連結すると、グルコースの六員環の面が少しずつずれていくために、結果的にらせん状になる。一方の β 結合は、六員環の面と結合方向が同じ面になるように連結する。したがって、セルロースではグルコースがまっすぐつながった棒のようになる。細胞壁では、このような直鎖状のセルロースが 50 本ほど並んで互いに結合している。これは「構造多糖」と呼ばれる非常に強固な繊維構造で、隙間がないために分解されにくい。一方のデンプンは「貯蔵多糖」として、根や種子に蓄えられている。われわれがそれを頂戴してエネルギー源とすることができるのは、デンプンの結合がらせん状で空間に余裕があるため、消化酵素が作用して分解することができるからなのだ (図 13-2)。

「針金」に相当するヘミセルロースの場合は、おもに炭

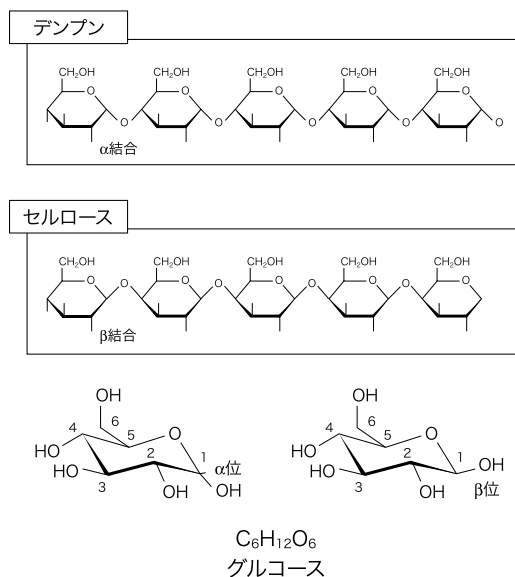


図 13-2 デンプンとセルロース；結合様式の違い

素 5 個（五炭糖）のキシロースやアラビノースを基本単位としていて、セルロースと同じように強固な β 1-4 結合でつながっている。ちなみに、キシロースは和名で「木糖」とも呼ばれている。

「鉄骨」にあたるリグニンは、分解され難さではセルロースやヘミセルロース以上で、フェニルプロパンと呼ばれる化合物を基本単位としている。フェニルプロパンは、いわゆるベンゼン環（芳香族環）に炭素数 3 個の炭化水素のプロパンが結合した化合物である (図 13-3)。これらがランダムに重合して高分子化したものがリグニンなのだが、どのようにリグニンがつくられるのかはまだあまりよくわかっていない。植物の細胞が成熟するとともに、リグニンは細

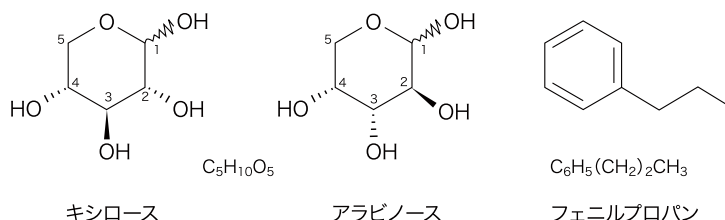


図 13-3 ヘミセルロースの構成糖とフェニルプロパン

胞壁に沈着してゆき、その結果、木部組織が強固になり、植物体を支えることができるようになる。このように樽材の細胞壁を構成する高分子化合物は、その組成はそれぞれ違うものの、いずれも強固で、なかなか分解できない難物である。しかし、いずれもウイスキーの香味をつくるうえでは欠かせない成分なのだ。この分解しにくい難物3兄弟(セルロース、ヘミセルロース、リグニン)の高分子化合物を、ウイスキーはどのように分解し、溶かし込んでゆくのだろうか。また、溶け込んだ成分はどのような働きをしているのであろうか。

「チャー」という操作は製樽の章で述べたとおり樽の側板を組み立てたあと、側板の内側を焼く作業だ。その目的は樽材の表面を焦がし、樽の木香が強く出すぎないようにすることだったが、このチャーが、難物の高分子成分を分解するために一役買っている。セルロースの場合は、構成糖であるグルコースがチャーによって熱せられると、加熱分解を起こす。その結果、

いろいろな成分に変化し、徐々にウイスキー中に溶け出してくる。チャーによって生成する成分はいずれも甘い香り成分で、カラメルや黒砂糖にも含まれるシクロテン、マルトール、アセチルフランなどの、炭素5～6個の環状の化合物である。ヘミセルロースの場合は、その構成糖であるアラビノースやキシロースが加熱によって分解し、アーモンド様の特徴がある香りを持つフルフラールを生成する。フルフラールは酸化されると、ピロ粘液酸やレブリン酸などに变化し、さらにこれらの酸のエチルエステル化が貯蔵中に進行する(図13-4)。このようにチャーという操作は、たんに木香臭を抑えるだけではなく、高分子成分を加熱分解するという非常に重要な役目を果たしているのだ。

チャーの影響を受けなかったセルロース、ヘミセルロースも加水分解され、それを構成するグルコース、アラビノース、キシロースなどの糖分が、貯蔵中に徐々に溶け出してくる。グルコースとアラビノースでウイスキー中の全糖量の3分2を占めるが、もともとウイスキーには甘みを感じさせるほど糖は多くなく、これらは味に丸みを与えるのに役立っていると考えられている。グルコースやアラビノースはさらに、貯蔵中にエタノールと脱水縮合して、新たな化合物に変化することも知られている。

また、オーク材中の酢酸はヘミセルロースと結合している場合が多く、加水分解によってこの結合が切れると、酢酸が徐々に溶け出してくる。酢酸はさらにエタノールやほかのさまざまなアルコールと脱水縮合して、酢酸エステル群を生成するキー物質として働くことはすでに述べたとおりだ。

主なセルロースとヘミセルロース由来成分の貯蔵中の変化と香味への影響をまとめて示す(図13-5)。

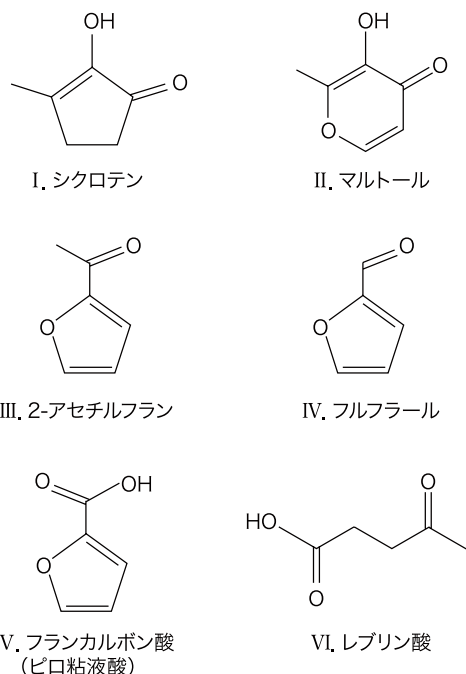


図13-4 セルロース、ヘミセルロース由来の成分

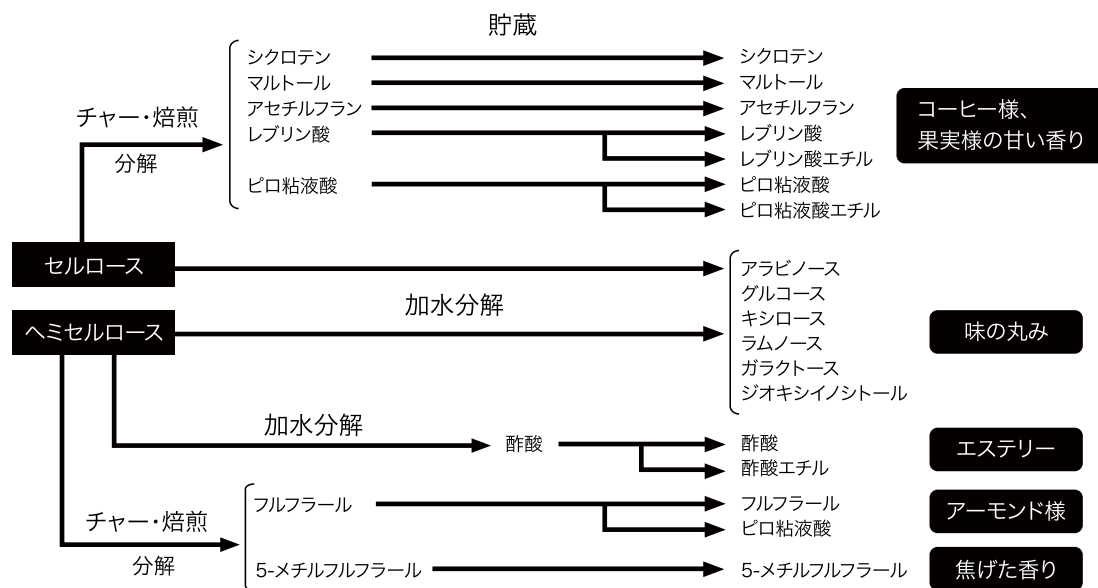


図 13-5 主なセルロース・ヘミセルロース由来成分と貯蔵中の変化

14 樽材中の高分子化合物：リグニンとその由来成分

鉄筋コンクリートにおける鉄骨役であるリグニンも、やはりチャーによって加熱分解する。その結果、基本単位であるフェニルプロパン構造を持つ化合物群が、特徴ある香味を持つ多くのフェノール化合物となって、ウイスキーに溶け出してくる。また、チャーの影響を受けなかったリグニンも貯蔵中、酸化とエタノリシスによって徐々に分解されて、ウイスキー中に溶け出してくる。エタノリシスはエタノールによる分解作用のことだが、とくに酸性下でその効果は大きい。ウイスキーには多くの有機酸も含まれており、ウイスキーの pH は 4～5 であることからエタノリシスには適している。糖類の結合やエステル結合の場合には脱水縮合で高分子化しているため、逆に分解のためには水を取り込んで加水分解ということになる。しかし、ランダムに重合してゆくリグニンの形成過程はよくわかっておらず、分解は必ずしも加水分解で

はない。エタノールがリグニンに対してどう働いてエタノリシスを進めているかは興味ぶかい謎の一つだ。

ウイスキー貯蔵中に多くのフェノール化合物が生じるが、中でもリグニン由来の芳香族アルデヒドは重要な香味成分であり、ウイスキー中にバニリン、シリングアルデヒド、コニフェリルアルデヒド、シナップアルデヒドなどが認められる。たとえば、代表的な芳香族アルデヒドであるバニリンはバニラ様芳香を持ち、匂い閾値も 0.1 ppm ときわめて低い。バニリンはオーク材の香り成分として材中に存在しているが、貯蔵中にも生成する。貯蔵中のこれら化合物の生成機作を図 14-1 に示した。樽材中のリグニンのエタノリシスにより生成したアルコール可溶のエタノールリグニンからコニフェリルアルコール、シナップアルコールが生じる。これらのアルコールの一部は直接リグニンからも生成すると考えられている。次いで、両アルコールの酸化により、それぞれコニフェリルアルデヒド、シナップアルデヒドが生じ、さらに酸化が

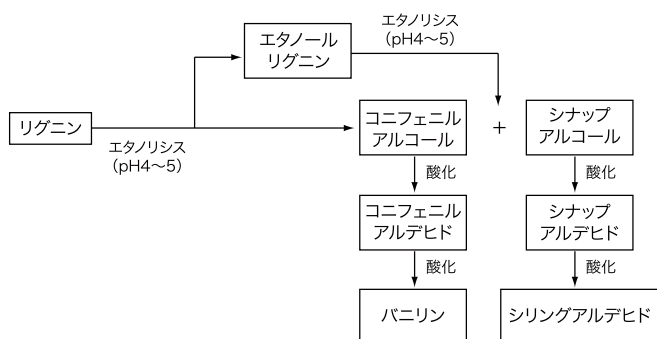


図 14-1 芳香族アルデヒドの生成機作

進み、前者からバニリン、後者からシリングアルデヒドが生じる。それぞれの芳香族化合物はさらに酸化され、多彩な芳香族化合物群を形成する。とくに、ウイスキー中に認められる類縁化合物群はコニフェリルグループ、シナップグループ、バニリングroup、シリンググループなどに分けることができる。リグニンは芳香族環（ベンゼン環）に炭素数3個のプロピル基が

結合したフェニルプロパンを基本構造としているため、いずれのグループもこの構造とよく似ている。しかし、ベンゼン環に結合しているメトキシ基（CH₃O-）の数やプロピル基部分の炭素数などがグループごとに少しずつ違っている（図 14-2）。その他のバニロン化合物のうちプロピオバニロンやアセトバニロンなどはバニリン生成にも関与している。また、

抽出成分として紹介したオイゲノールも構造的によく似ており、一部は貯蔵中にリグニンから生成する。

ウイスキー原酒中のアルコール型（-OH）のエタノールは酸化されて、アルデヒド型（-CHO）のアセトアルデヒド、カルボン酸型（-COOH）の酢酸と変化することを前に述べた。フェニルプロパン骨格由来の各グループにもそれぞれの

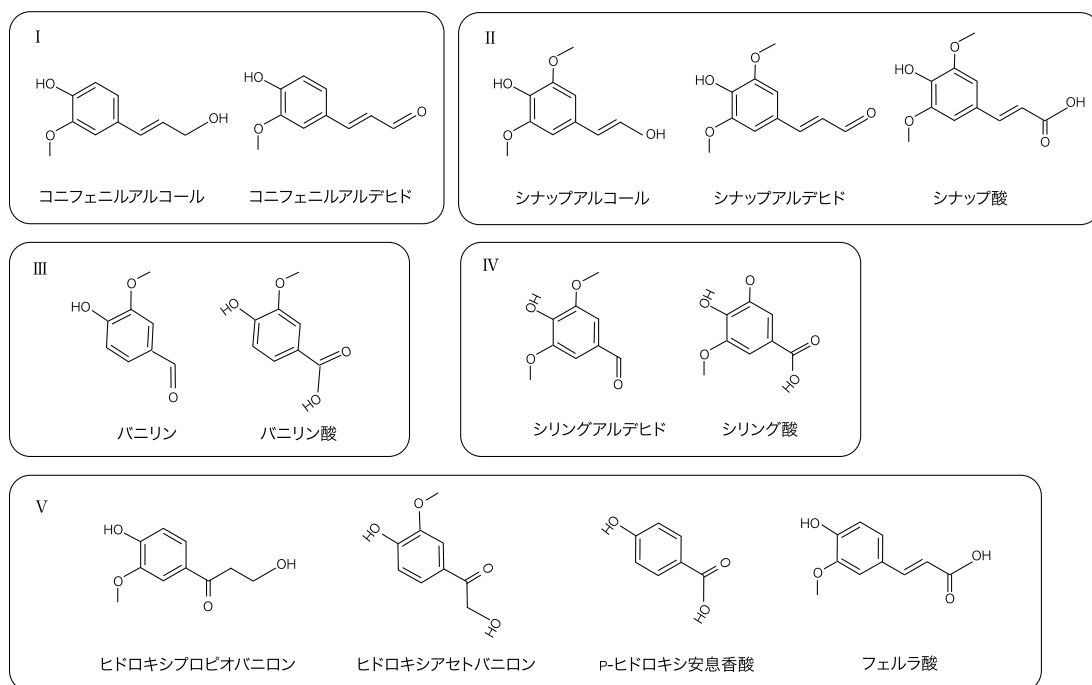


図 14-2 ウイスキー中の主なリグニン由来の芳香族化合物

I: コニフェリルグループ、II: シナップグループ、III: バニリングroup、IV: シリンググループ、V: その他のバニロン化合物

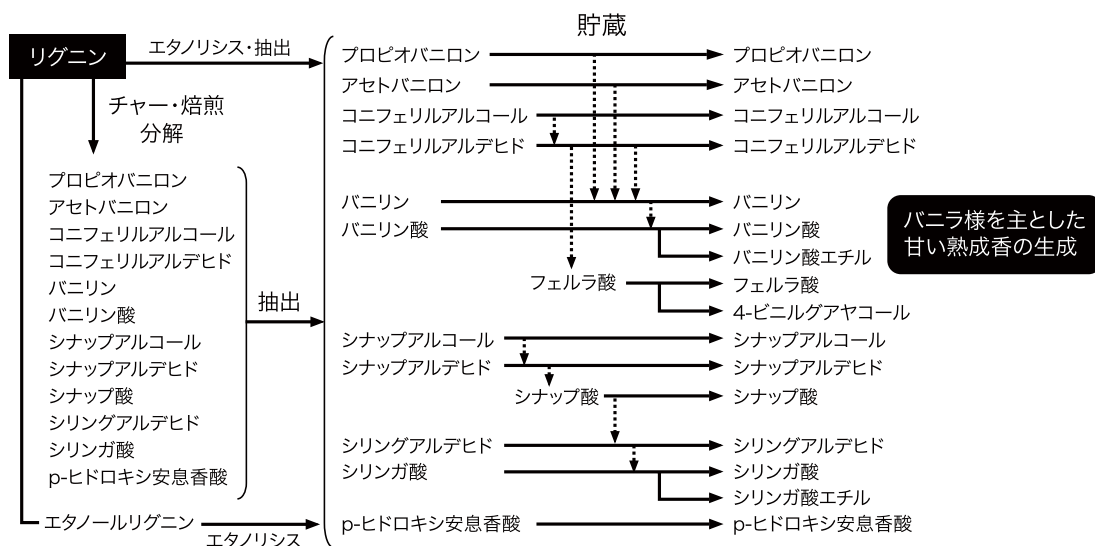


図 14-3 主なリグニン由来成分と熟成中の変化

構造を基本としたアルコール型、アルデヒド型、カルボン酸型の化合物がある。貯蔵中に、エタノールからアセトアルデヒド、酢酸と酸化が進行するのと同様に、これらの各グループの化合物は、貯蔵が進むにつれて、アルコール型からアルデヒド型そしてカルボン酸型へと酸化が進行する。さらに、エタノールの場合、エタノールと酢酸とが脱水縮合してエステル化反応、アセトアルデヒドとエタノールとのアセタール反応が進行することを述べたが、これと同様に、これらのアルコール型化合物、アルデヒド型化合物、カルボン酸型化合物の間でも同じようにエステル化反応やアセタール化反応が進行する可能性もある。さらに、主要成分であるエタノール、アセトアルデヒド、酢酸とこれらの成分が反応する可能性もある。

こうして見てくると、ウイスキーの熟成はたんなる樽材からの成分の分解・抽出ではなく、ウイスキーを反応の場として、それらの成分どうしがさらに反応しあって多様な香り成分や味成分を生成するところに大きな意味があることがわかる。気の遠くなるような話だが、主なりグニン由来成分の貯蔵中の変化と香味への影響

をまとめて図 14-3 に示した。

15 エタノール濃度「60%」の不思議

樽の内面を焦がすチャーという操作が、セルロース、ヘミセルロースやリグニンの加熱による分解産物を作り、それがウイスキーの熟成に大きな役割を果たしていた。しかし、何と言っても、熟成でより大きな意味を持つのは、貯蔵中のエタノールリシスによって徐々に行われるこれらの高分子成分の分解やウイスキー原酒中での加水分解による低分子化だ。エタノールリシスによってウイスキーに溶け出す分解産物の方が抽出成分よりも量的にもずっと多い。従って、最も効率よくエタノールリシスが進行するニューボットのエタノール濃度は？という疑問が当然わいてくるが、その解答は、まさに、ウイスキーの発酵モロミをポット・スチルで2度蒸留した時に得られるエタノール濃度、60%あたりなのだ。樽材となるオーク材を小片にして、さまざまなエタノール濃度の溶液に2年間浸漬したあと、その色素と樽材成分の溶出量を各濃度で比較

した結果、エタノール濃度が約 60% のときに、もっとも樽材からの着色成分や、そのほかの不揮発成分の溶出量が多かったという確認実験も行われている（図 15-1）。この理由については定かではないが、少なくとも溶液状態でオーク材の内部に沁み込んでゆかなければ、オーク材成分を分解し、溶け出させることはできない。エタノール濃度が高すぎると揮発しやすいし、低すぎると疎水性成分を含んでいるオーク材に浸透しにくい。その結果、溶液状態でオーク材内部に最も深く浸透できるエタノール濃度が約 60% だったということではないだろうか。

もう一つの理由は、60% エタノール溶液の親水性と疎水性のバランスがオーク材成分のウイスキー中への溶け込みに適した条件なのだろう。糖やミネラルなどの親水性物質は純水にはよく溶けるが、純粋のエタノールには溶けな

い。一方、脂質や脂溶性ビタミンなどの疎水性物質は純水には溶けないが、純粋のエタノールにはよく溶ける。そして 60% のエタノール溶液は、その中間の性質を示す。純水よりは疎水性の物質を溶かすことができるし、純粋のエタノールよりも親水性の物質を溶かすことができるのだ。水分子 3 個に対してエタノール分子が 1 個の割合で存在する 60% エタノール溶液は、それにふさわしい疎水性 / 親水性バランスにあり、そのバランスになじむ物質を優先的に溶かし込んでゆくに違いない。オーク材中の主成分であるリグニンやタンニン由来とする化合物は、親水性の官能基である水酸基、アルデヒド基、カルボキシル基と、疎水性の芳香族環とを合わせもっている。これらの化合物の疎水性 / 親水性バランスが、60% エタノール溶液のバランスと近いために、それらが優先的に溶出してきたのではないだろうか。

表 15-1 は、分子量の異なるそれぞれの画分の不揮発成分に含まれるポリフェノールと中性糖の量を示している。ポリフェノールはタンニンやリグニン由来、中性糖はセルロースとヘミセルロース由来の分解物と考えられる。分子量が 5000 以下の比較的小さい画分に比べ、分子量 5000 ~ 10000, 10000 ~ 100000, および 100000 以上の画分には、かなりの量のポリフェノールと中性糖が含まれている。これは、高分子の成分ほど疎水性 / 親水性バランスの特徴を発揮して、糖結合ポリフェノールがエタノール 60% 溶液に溶け込んでいることを示唆していると考えられる。

蒸留したばかりのニューポットが樽に入られて貯蔵が開始されるとき、そのエタノール

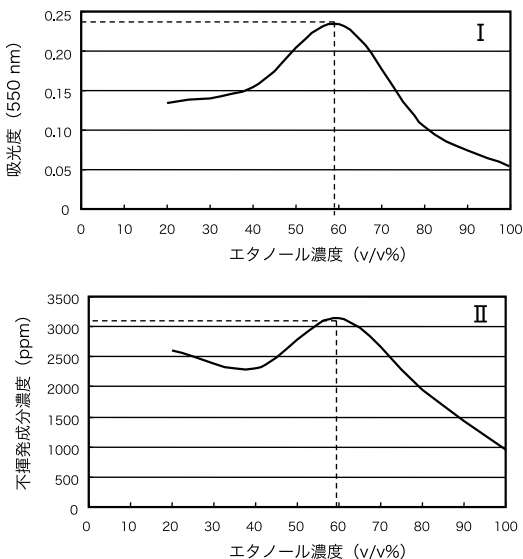


図 15-1 種々のエタノール濃度溶液でのオーク材から色素 (I) および不揮発成分 (II) 溶出

表 15-1 各分子量画分におけるポリフェノールと中性糖含量

分子量画分	3,000 以下	3,000 ~ 5,000	5,000 ~ 10,000	10,000 ~ 100,000	100,000 以上
ポリフェノール含量	3.6%	8.5%	20.6%	17.9%	14.1%
中性糖含量	6%	7%	13%	13%	12%

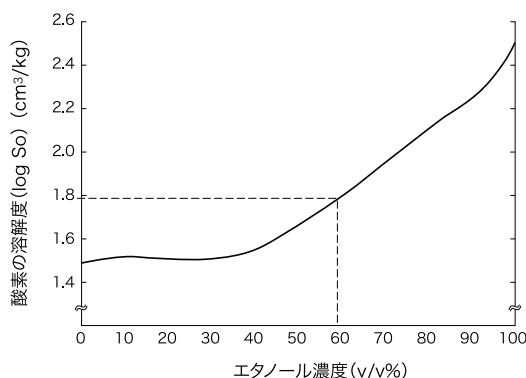


図 15-2 エタノール水溶液への酸素の等温溶解曲線
21℃, S_o は酸素の溶存体積

ル濃度は約 60% であることは蒸留の章で述べた。たまたまエタノール濃度 7% の発酵モロミをポット・スチルで 2 回蒸留することによって、約 60% のエタノール濃度になったのだ。しかし、この「たまたま」が樽材から成分を溶かしだし、ウイスキーにあの香味を与えるのに最適の条件となっていたのである。

熟成において酸化反応が重要なことは今まで述べてきたとおりだ。樽の呼吸によって浸透する酸素が、主成分であるエタノールをはじめ多くの成分を酸化し、その後のアセタール化反応やエステル化反応に参画するアルデヒドやカルボン酸を供給するのだ。また、リグニンのエタノリシスや多様な芳香族成分の生成にも酸素が大いに関与している。

これらの変化は、早く進みすぎではウイスキー原酒のバランスを崩してしまうので、ゆっくりと着実に進行させなくてはならない。そのためには、溶媒であるウイスキー原酒中に、ある程度、酸素が溶けている必要がある。エタノール濃度と酸素の溶解度の関係を調べてみると、純水（濃度 0%）から濃度 40% までは酸素の溶解度に大きな違いはないが、40% を超えると急激に酸素が溶けやすくなり、濃度 60% になると酸素の溶解度は 40% 溶液に比べて約 2 倍になる（図の縦軸は対数表示であることに注意）。

このことが、酸化反応の着実な進行に寄与しているに違いない（図 15-2）。

また、酸化反応に続くアセタール化反応、エステル化反応においても、「60%」の恩恵は見逃せない。これらの反応は脱水縮合の反応であり、水が引き抜かれて反応が進む。この逆反応が加水分解反応だ。エステル化反応は、エステル個々で見るとエステル生成に進むものも分解に進むものもあり、また、組み換えも起きているが、トータルでみればエステル成分が増加し、エステリーで華やかな香味に変化している。このエステル成分の反応に水の動き（水分活性）も関与しているに違いない。エタノール溶液の水分活性とエタノール濃度との関係については前回は述べている（図 8-3）が、60% エタノール溶液中の水の動きは、純水の動きに比べて約 30% 抑制されており、このことが適度に加水分解反応を抑え、脱水縮合反応のほうに向かわせ、香気成分であるアセタール成分やエステル成分の生成に寄与しているのだろう。

長い時間をかけて多様な成分がウイスキー原酒中に溶け込むことで、結果としてウイスキーは熟成状態に移行してゆく。そこには、一つの成分だけが主人公として存在するのではなく、多様な成分が折り合いをつけながら共存している。それらの多様な成分が共存している状態そのものが「熟成」だといえる。熟成は特定の成分の量として表現されるのではなく、多様な成分の共存のしかたとして表現されるべきものであろう。その共存の状態は、長い時間をかけて徐々に進行するオーク材からの成分の分解・溶出、成分どうしの反応によって達成される。そして、その状態にいたるには、エタノール濃度が 60% であることが非常に大きな意味を持っていると考えられる。

では、そもそもエタノールと水は、このエタノール濃度 60% という条件下ではどのような関係を保ちながら存在しているのだろうか。こ

れは非常に興味深い問題なのだが、残念ながら明確な答えは得られていない。しかし、次のような興味深い事実がある。

50 ml の純水と 50 ml の純粋エタノールを混ぜ合わせても、体積は 100 ml ではなく、97 ~ 98 ml にしかない。つまり、純水と純粋エタノールを混ぜ合わせると、混ぜ合わせる前より溶液の体積が縮んでしまうのだ。そこで、さまざまな比率で純水と純粋エタノールを混合し、体積の収縮率を縦軸に、混合後のエタノール濃度を横軸にとって両者の関係を求めてみたところ、混合後のエタノール濃度が 60% のとき、体積収縮率をもっとも大きかったのだ。水分子とエタノール分子の比でいうと 2.9 : 1 の濃度領域のところがこれにあたる (図 15-3)。もっとも体積が縮むということは、水分子とエタノール分子がもっともコンパクトに存在しているということに違いない。具体的にどのような状態になっているかは、わからない。だが、い

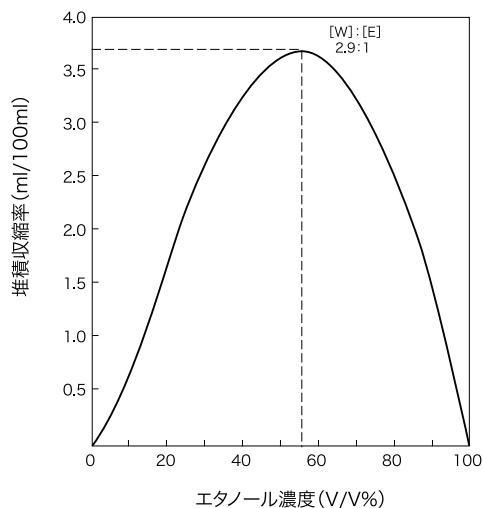


図 15-3 エタノールと水混合時の体積変化

ずれにしても濃度 60% のとき、エタノールと水は特殊な関係にあり、その関係がウイスキーの熟成に適しているということになる。「たまたま」の不思議さを感じずにいられないのは、私だけではあるまい。

< 参考書籍・文献 >

- ・佐治 敬三著, 洋酒天国, 文芸春秋 (1960)
- ・梅棹 忠夫, 開高 健監修, 「ウイスキー博物館」, 講談社 (1979)
- ・嶋谷 幸雄著, 「ウイスキーシンフォニー」, たる出版 (1998)
- ・加藤 定彦, 「樽とオークに魅せられて」, ティビーエス・ブリタニカ (2000)
- ・土屋 守著, 「シングルモルトを愉しむ」, 光文社新書 (2002)
- ・古賀 邦正著, 「ウイスキーの科学」, 講談社 (2009)
- ・興水 精一著, 「ウイスキーは日本の酒である」, 新潮社 (2011)
- ・S. Baldwin, et. al.: *J. Agr. Food Chem.*, **15**, 381, 1967.
- ・K. Nishimura, M. Masuda, Minor Constituents of Whisky Fusel Oils, *J. Food Science*, **36**, 819-822, 1971.
- ・R.A.Black, A.A.Anderson: *Journal of the A.O.A.C.*, **56**, 1357, 1973.
- ・R. W. Cargill, Solubility of Oxygen in some Water+Alcohol Systems, *J. Chem. Phys. Faraday I*, **72**, 2296-2300, 1976.
- ・大塚 謙一, 壺岐 勇: 醸工, **56**, 752, 1978.
- ・古賀 邦正, 酒精水溶液と酒類の物理化学的性質, 日本食品工業学会誌, **26**(7), 311-324, 1979.
- ・福井 靖彦: 醸協, **75**, 133, 1980.
- ・西村 驥一: 近代工, **1**, 5, 1981.
- ・増田 正裕: 酒類香気成分の研究 東北大学学位論文 (昭和 58 年)
- ・J R Piggott, R Sharp, R E B Duncan (Edit.), *The Science and Technology of Whiskies*, Longman Scientific & Technical, 1989.
- ・J. M. Conner, A. Pasterson, J. R. Piggott, Release of distillate flavor compounds in Scotch malt whisky, *J. Sci. Food Agric.* **79**, 1015-1020, 1999.
- ・K. Koga, et. al.: *J. Food Sci.*, **72**, 212, 2007.
- ・K. Koga, et. al.: *J. Biosci., Bioeng.*, **112**, 154, 2011.

“地域密着でキラリと光る企業”

海の恵みを探索・創造する 『焼津水産化学工業株式会社』

田形 暁作*

*TAGATA Yoshinari (TAGATA 食品企画・開発 代表)

Key Words : 魚介類・海藻・天然調味料・機能性食品・素材研究開発型

はじめに

焼津水産化学工業株式会社（Y S K）は1959年（昭和34年）3月飼料としてのフィッシュソリュブルおよび肝油の製造販売を目的に、静岡県焼津市に、資本金750万円で設立された。設立と同時に魚介調味料の基礎研究を始めた。5月には自己消化法によるフィッシュソリュブルの製造販売を開始した。翌35年、松本圭一郎氏（後の社長）を東北大学農学部水産利用学科・土屋研究室に派遣。魚の煮汁から調味料を作ることのみに絞って研究に集中した結果、最大の課題であった“臭みと苦みの除去”に成功した。この研究技術で特許を取得すると同時にテストプラントに取り組み工場を建設した。Y S Kはこの技術により高付加価値の天然調味料の製造販売を新たな事業として開始し現在のY S Kの基礎を確立した。

1. 焼津水産化学工業株式会社（Y S K）の概要

Y S Kの本社所在地は静岡県焼津市にあり、静岡本部は静岡県静岡市にある。設立は1959年3月18日、創業は1959年5月15日である。資本金は36億17百万円、従業員数は連結で365人、単体で251人である。売上高208億円、営業利益14億円（13億91万円）（平成25年度 連結）

である。事業所は静岡本部、焼津本社（研究所）、東京営業所、大阪営業所、名古屋営業所、九州営業所がある。また、工場は焼津・団地工場、榛原工場、大東工場、静岡工場、吉田工場があり、所在地はすべて静岡県内である。事業は、魚介類を中心とした天然素材を原料として天然調味料や機能性食品素材を製造販売している。

2. 企業理念

Y S Kグループは、企業の恒久的な存在意義として、また使命として、以下の企業理念を共有している。

焼津水産化学工業グループは、天然素材の持つ無限の可能性を追求し、“おいしさと健康”を通して豊かな生活に貢献します。

Y S Kは、日本の食文化の発展に歩調を合わせ、ほぼ半世紀にわたる成長を続けてきた。これは、同社事業が、人間生活になくてはならない“食”の世界に足場を置き、人々のニーズを的確にとらえてきたことの証であると確信している。Y S Kが開発・製造する調味料は、食品産業発展の一翼を担ってきたと自負している。また、天然素材から製造し販売する機能性素材は、人々の食を通じた“健康”の維持・向上に

貢献している。今後も“おいしさと健康”という人間の基本的な欲求に正面から向き合い、天然素材を原料に価値あるものづくりに挑戦していく。Y S Kグループに集う全員が、豊かな発想のもとに地球の恵みを生かし、人々の豊かな生活に貢献する。これこそが使命であり、人々の活力を支援するものであると信じている。

コーポレート・シンボル



Y S Kのイニシャルをデザインしたコーポレート・シンボルは、技術と開発力を基軸とし、積極果敢にチャレンジをする企業姿勢をイメージしている。また、コーポレート・カラーは、海・水を象徴し、清潔・知性・先進を表現するインディゴ・ブルー（藍色）を採用した。

3. 沿革

Y S Kは昭和34年（1959年）に会社が創設され今日に至っている。その概略的な沿革を示す。

昭和 34年（1959）	魚の煮汁から飼料、肥料の製造および肝油の製造を目的に会社創設
昭和 39年（1964）	粉末調味料の製造販売開始
昭和 54年（1979）	榛原町静谷（牧之原市）に榛原第1工場を建設、粉体製品および野菜顆粒の製造を開始
昭和 56年（1981）	東京連絡所開設
昭和 60年（1985）	大阪営業所開設、東京連絡所を営業所に昇格
昭和 63年（1988）	静岡県小笠郡大東町（現掛川市）に大東工場を新設し、国内初の連続式真空乾燥装置（CVD）を導入 日本証券業協会に株式を店頭登録
平成 元年（1989）	香辛料メーカー、オーケー食品（株）の全株式を取得

平成 2年（1990）	名古屋営業所開設
平成 4年（1992）	名古屋証券取引所市場第2部株式上場
平成 6年（1994）	焼津市に焼津・団地工場を新設（大型スプレードライヤー導入）
平成 12年（2000）	東京証券取引所市場第2部に株式上場 N-アセチルグルコサミンの工業生産開始 大東工場に医療栄養食の専用工場を増設 福岡営業所開設
平成 13年（2001）	東京証券取引所市場第1部、名古屋証券取引所市場第1部に昇格
平成 14年（2002）	ISO9001:2000年版全社で取得 大東工場にカラーゲン工場（大東第5工場）を増設
平成 16年（2004）	中国・大連に当社100%出資子会社 大連味思開生物技術有限公司（天然調味料及び機能食品の製造・販売）を設立 UMI ウェルネス株式会社を設立し、健康食品等の通信販売開始
平成 17年（2005）	静岡市のJR静岡駅南口に静岡本部を開設 榛原工場に品質保証センター棟を建設 株式会社マルミを買収し、マルミフーズ株式会社設立 低塩しょうゆ等販売の株式会社ソルケア設立 名古屋証券取引所市場第1部上場の廃止申請
平成 21年（2009）	50周年記念式典を開催
平成 22年（2010）	中国・上海市に大連 YSK の営業所を開設 大東工場にCVD（連続式減圧乾燥装置）2号機を導入
平成 24年（2012）	掛川市の高台に工場用地を取得し、新工場建設計画スタート

4. Y S K 50年史から基盤づくりポイント

1) 創業から天然調味料開発・販売まで

◆フィッシュソリブル製造で創業

静岡県焼津市は昔から「魚の町」で、昭和

30～40年代には、街はいつも生臭い悪臭で覆われていた。焼津港に水揚げされるカツオ、サバから鰹節、鯖節などをつくる中小零細企業が全市内に300社以上点在し、その加工工場の内臓などの残りかすの置き場から悪臭は広がった。これに加工残滓が小川に流れ込んでヘドロとなつての悪臭などが重なり合っていた。特に、魚介類の加工業者から出る魚の内臓、頭、骨などの残滓は毎日大変な量で、それは悪臭を発生させるだけではなく、水質汚濁などの公害源となっていた。市民から「この臭いはなんとかならないのか」という不満の声が年ごとに高まっていた。

焼津市は、これを解決するためにフィッシュソリブル製造法という新しい技術を導入。魚腸骨を集めて合理的に処理し、臭い町から脱却しようという動きを開始した。具体的な処置として、市内3か所にフィッシュソリブル^{*}を工業的に生産する事業会社を発足させることになった。2か所は協同組合、1か所は会社組織でスタートすることになり、YSKは、このような背景の中で、会社組織として発足した。昭和34年3月18日、フィッシュソリブル製造と魚肝油（ビタミン油）、魚油などの製造を目的に、資本金750万円で焼津市の約300坪の土地でスタートした。

◆バイオマス利用の原点からの出発

フィッシュソリブルの製造方法は塩辛などの製造方法と良く似たところがある。加工の初期工程が終わったところで、加熱して酵素の働きを止め、固形物と液体を分離する。液体の中から油脂分を取り除き、残りの水溶液がフィッシュソリブルの原液となる。これを濃縮したペースト状のものが、栄養満点の販売用のソリブル製品となった。用途はニフト

リの飼料添加物で、大量に出荷された。フィッシュソリブルの原料は、すべて水産加工品の副産物。従来は廃棄されていたもので、それを加工して活用した。この「天然資源を無駄なく生かして使う」という草創期の考え方は、会社発展のバックボーンとして定着していった。地球資源の有限化が叫ばれ、世界的にバイオマスの利用が進む中で、既に50年以上前に未利用資源の活用に着目して、ここを原点に独自の路線を歩んできた。

◆初代社長は藪崎淳太郎氏

初代社長には、焼津市議会議長であった藪崎淳太郎氏が就任した。社員はわずか6人という超零細企業でスタートすることになったが、社としては本格的な技術者がどうしても必要と考えた。そこで、水産加工技術が分かる若手技術者を探した。そこに大学卒で入社したのが、当社を大躍進させた松本圭一郎氏（後の社長）である。松本氏は、東北大学農学部水産利用学科をこの年に卒業したが、深刻な就職難で希望するところがない。そこへ出身地の静岡県内の有力者から、地元の水産会社に来てほしいという熱心な要請があり、これに応じて入社することになった。松本氏が焼津市を訪れてまず驚いたのは、YSKは書類上で誕生したばかりであった。松本氏は、埋め立て、基礎の杭打ち作業などの重労働に動員され、5月半ばの完成まで働いた。工場ができると、さっそくフィッシュソリブルの生産を開始した。松本氏は出来上がった自社製品に驚愕した。ソリブル製品はずっしり重いのに、とてつもなく安い。“臭い”“重い”“安い”の三重苦の現実を前に、途方に暮れた。

◆天然調味料への夢

会社唯一の技術者となった松本氏は、営業スタッフが出張したときに、市場の様子を見る目

※フィッシュソリブル（Fish soluble）

魚類の内臓など食用に利用しない素材を原料にして、原料自体が持つタンパク分解酵素により自己消化させ、これを精製・濃縮した液状のもの。

的で同行した。そこで、一つのインスピレーションを得ることになる。松本氏の目に飛び込んだのは、缶詰工場で捨てられている大量のアジの煮汁だった。新鮮で旨そうな匂いを漂わせ、味覚を誘った。当時はアミノ酸調味料が全盛であったが、天然のだし汁を使った調味料の市場もあるのではないかとひらめいた。これを推し進めれば、フィッシュソリブルと決別できるかもしれないと夢は広がった。

当時、欧米では世界ブランドのスープメーカーであるクノールやマギーといった会社の「スープの素」が市場を席巻していた。その原料は、鯨肉の煮汁を濃縮した鯨肉エキスが主体であった。しかし、この頃から、鯨の捕獲に関する国際世論が、「禁止」の方向に大きく傾き始めていた。そのような情勢から、将来は捕鯨が出来なくなり、魚の煮汁の出番がやってくることを予測した。会社に戻るとすぐに煮汁活用の研究を開始した。ところが実験設備は乏しく、とても高度な実験はできなかった。短い期間でもよいから、母校の東北大学に戻って実験に取り組んでみたいと、工場長に訴えた。工場長はすぐにこれを受け止め、社長あてに稟議書を書き上げ了承された。

◆松本技術員を東北大学へ派遣

東北大学での研究を、魚の煮汁から調味料を作ること一本に絞って、実験に集中した。土屋教授も2人研究助手を付けて、全面的に協力してくれた。魚の煮汁を調味料に変換させる最大の課題は、臭みと苦みをどう取り除くかという点であった。この2つを除去すれば、煮汁の中の旨みが生きてくる。魚臭はカーボンを使ったリ、アルコール法を試みるなどあらゆる手法を試みた。苦味はアミノ酸の鎖をどこで切るかだと方向を定めて、一つ一つ研究を進めていった。研究中に、国際的な社会経済に大きな変化があった。南氷洋捕鯨の漁獲量削減である。スープメーカーは鯨から魚介類を材料に煮汁を作る

検討を始めていた。国内の食品市場の動向も、インスタントラーメンが人気商品になりつつあって、ラーメンのスープに新しい調味料が求められていた。こういった動向は松本氏の研究を後押しした。研究の目指すものと時代の求めるものが一致することを確認した。昭和35年末、研究は成果を上げ、先の見通しが付いてきたため、ひとまず大学での研究に終止符打って焼津に戻るようになった。

◆エキス調味料製造で特許、工場新設

会社は研究室を設置し、大学での研究を完成させる環境を整えた。フィッシュソリブルを調味料に仕上げる課題の臭みと苦味の除去は、アルコール処理や加水分解、酵素分解などの手法を用いて解決した。これに力を得て、会社は製品試作のためのテストプラントを2,000万円かけて建設、新たな道を歩みだした。松本氏の研究成果は、昭和36年9月、「魚介エキスによる濃厚調味料製法」の特許取得として実った。

◆新調味料はできたが売れず

フィッシュソリブルから臭みと苦味をすっかり除去して、魚介類の旨みを引き出した新しい調味料がテストプラントから生まれた。ペースト状の調味料で、水に溶くだけで立派な調味料となった。これを目にした社員全員が、「これからは販路開拓だ」と意気込んだ。営業社員、研究員、役員も、県内はもちろん東京、大阪、名古屋へと向かい、この調味料を使ってくれそうな食品会社など、あらゆるところへ飛び込んで売り込みをはかった。だが、ほとんど実りはなかった。当時はグルタミン酸ナトリウムに代表される化学調味料全盛時代で、グルタミン酸を食べれば頭が良くなるなどという神話が流布している時代であった。味噌、醤油以外の天然調味料など、食品業界に入り込む余地は皆無であった。

◆インスタントラーメンが”天の助け”

天の助けになったのは、インスタントラーメ

ン（即席ラーメン）の流行で、これがエキス調味料の活路を開いてくれた。インスタントラーメンは昭和32年ごろに発売された。最初のころは、麺自体に味付けされていたが、間もなく、スープを別添するようになった。スープの素材は鯨だったが捕鯨が先細りとなってきたため、業界は鯨から魚介類に切り換え始めた。更に、スーパーマーケットの増加が追い風となった。

インスタントラーメンはスーパーマーケットの店頭で販売されるようになると、爆発的に売れ出した。これがY S Kのエキス調味料の大躍進を確かなものにした。エキス調味料は、カツオ煮汁などの魚を原料にした物だけでなく、エビやカニなどの水煮缶詰製造時の煮汁を利用した製品も作られた。カニエキスは「カニ風味かまぼこ」に使われ、急速に需要が高まった。

2) 業容拡大の発展期

◆松本社長が就任

創業から15年を経過して、調味料製造販売会社としての形が見え始めた昭和49年8月、松本圭一郎工場長が社長に就任した。前社長の急死に伴う突然の交代であった。社長となった松本氏は、まず団地工場を建設して幅広い生産体制の構築を進めた。東京、大阪に営業所を設けて国内の販売ネットワークを築いた。技術的には、オリゴ糖の製造をいち早く手掛け、機能性素材の将来を見据えた動きを開始した。研究開発、製造、営業などすべての部門に気を配り、改善し、改革し、成長路線を築いていった。27年間の社長時代を通じて、わずか6人から始まった零細企業を順調に育て上げ、東証1部上場の一流企業へと押し上げたのである。

◆フィッシュソリブルとの決別

松本氏は社長就任にあたって、2つの条件を提示した。1つは、創業以来の主力製品であるフィッシュソリブルを製造中止し、調味料製造販売への方向転換である。もう1つは、同族支配の会社体質の抜本的変革である。「マイ

カンパニーを廃して、アワーカンパニーにしたい」ということである。皆で企画し、皆で稼ぎ、社員が一丸となって進む会社を運営したい。社員の活力を引き出すのは、社員がやりがいのある会社であると思えるようにしなければならない。

◆キチン、キトサン WORLD の構築

カニエキスの製造が、昭和50年初頭から始まった。この結果、カニ殻が工場内に大量に残ってしまうので、研究陣はこれを有効利用できないか考えた。しばらくは土壌改良材などに役立てていたが、もっと付加価値の高い物に変えられないかをリサーチし始めた。カニ殻の構成成分であるキチンはセルロースによく似た多糖類で、構造の少し違うキトサンと合わせてキチン質と呼ばれていた。研究陣はまずキチン、キトサンづくりから始めた。

キチン、キトサンづくりの課題は生産したとしても後発であり、さらに利用範囲が限られ、利幅も狭いということであったが、その先にあるオリゴ糖づくりを進めてみようということになった。オリゴ糖の利用価値は明確になっていないので夢を求めた。2～3糖のオリゴ糖を作ることは難しいことではなかった。しかし、5～6糖のオリゴ糖は、簡単には作れなかった。問題を解決してくれたのは転移化酵素で、2～3糖のオリゴ糖を5～6糖に重合してくれた。オリゴ糖の新製品はオリゴ糖試薬、検査薬製造であり、この道が開けた。オリゴ糖の研究がさらに進むのは、Y S Kが中心になって昭和59年4月に設立した協業組合エヌエフアイの研究事業に取り上げられてからである。ここから、キチン、キトサンの世界が形を成していった。

◆協業組合エヌエフアイが発足

Y S Kを中心とした民間企業9社が手を組んで共同研究を行う協業組合が昭和59年3月に発足した。11月にY S K社内に研究所が建設され、多角的な研究を始めた。これは静岡県中

小企業団体中央会の異業種交流による活路開拓調査指導事業で、研究開発力をつけたい中小企業を協業組合にまとめ、互いの知恵を出し合っ
て大企業並みの開発力を身に付けようというプロジェクトであった。チームのメンバーはY S Kを中心に包装容器販売会社、削節製造会社、フードコンサルタント会社、水産練り製品会社、食品製造機械会社、研究機器販売会社、燃料器具販売会社、有機肥料販売会社の9社である。昭和60年度から本格的な研究事業に着手した。研究テーマは①水産加工副産物中の糖類の活用、②海藻類の糖質の活用、③水産加工副産物中の核酸関連物質の活用、④天然緑色色素の研究の4項目であった。

3) 上場実現までの大飛躍期

◆N-アセチルグルコサミン(NAG)製造を工業化

平成12年6月14日、Y S Kが製造特許を持つ、N-アセチルグルコサミンの工業生産を開始した。長年の研究成果である純白の結晶が、団地工場の製造機械からサラサラ流れ出ると、詰めかけた研究陣から歓声があがった。既に、ある程度の受注がまとまっていたため、営業スタッフも新製品の量産化を大歓迎した。NAGの開発から工業化までには、20年あまりの歳月を重ねている。最初はキチン、キトサンの開発、これに続いてキチンオリゴ糖の製造、そしてキチンオリゴ糖からNAGの精製に至るわけだが、その製造過程は複雑で、工業化までには多くの社員の力の結集があった。

この新素材NAGは協業組合エヌエフアイの研究項目に取り上げられてから本格的に歩み出した。この新素材は、大学等に試薬として提供し、キチンオリゴ糖などと同様に免疫増強効果が確認されていたが、グルコサミンの関節痛などへの効果が知られ始めると、にわかに研究熱が高まった。動物実験でNAGは摂取吸収されると皮膚や関節部分に集中的に集まることが分

かり、体内でヒアルロン酸を作り出すことを確かめた。この他に臨床試験でも有効性を確認しているため、多くの企業の健康食品に採用されている。

5. 研究開発

1) 機能性研究

Y S Kは、人々にとって有用な物質をいつも海に求めて来た。そして、海の天然素材の研究から多くの有用物質を探し出し、その答えを見いだしてきた。つまり、Y S Kの研究開発のキーワードは”答えはいつも海の中”なのである。海の恵みから得られた機能性素材を紹介する。

①N-アセチルグルコサミン(NAG)

NAGはヒアルロン酸などの構成成分である。

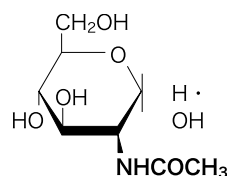
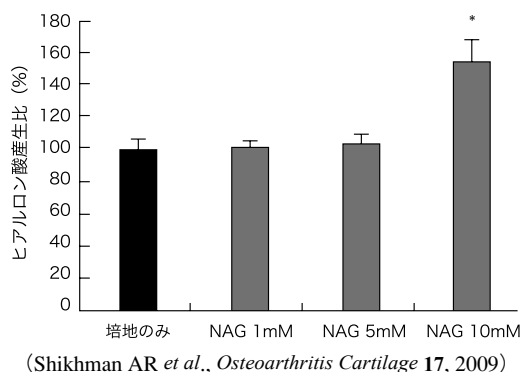
皮膚や関節液などに広く分布しており様々な役割を担っているが、加齢

とともに減少してしまうことが知られている。NAGは年を重ねる体に不可欠なアンチエイジング成分としても注目されている。

◆NAGは体内でヒアルロン酸の生成をサポートする

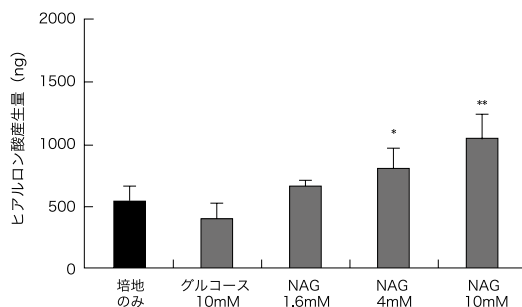
事例1: ヒトの軟骨細胞

ヒトの軟骨細胞にサンプルを加えて3日間培養後、上清に生成されたヒアルロン酸を結合タンパク質により測定した。



事例 2: ヒトの表皮細胞

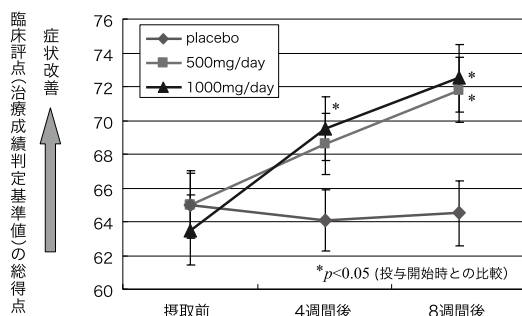
ヒトの表皮細胞にサンプルを加えて2日間培養後、上清に生成されたヒアルロン酸を結合タンパク質により測定した。結果は下図に示した。



(Kubomura D et al., *Fragrance J* 6, 2006)

事例 1, 事例 2 のいずれの細胞においても, NAG を加えるとヒアルロン酸が増加した。

◆NAG を日常的に摂取すると、関節炎の症状が緩和される軽度の変形性関節症患者に NAG 1000 mg, 500 mg を含む低脂肪乳、またはプラセボを 8 週間毎日摂取させ、4 週間ごとに測定を行った。その結果, NAG 摂取 4 週間後, 8 週間後において NAG 摂取群は摂取前に比べて優位に関節炎の症状が緩和された。



評価方法：日本整形外科学会制定の「変形性関節症疾患治療成績判定基準」に従って医師が評価。疼痛、歩行能、階段昇降能、屈折角度、腫脹、日常生活動作、夜間自発痛、圧痛に関して 4～5 段階評価し、スコア化。

結果：NAG 含有飲料の継続的摂取により、ひざ疾患治療成績が向上し、疼痛、階段昇降能、圧痛の症状が顕著に改善された。

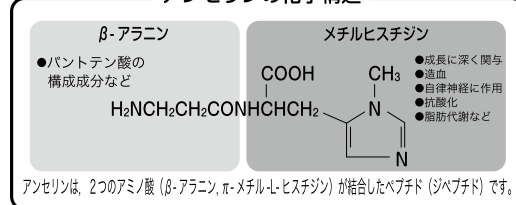
梶谷祐三, 梶本修身, 又平芳春, 新薬と臨床, Vol52, No.3 (2003)

NAG は関節のクッションであるプロテオグリカンを増やすとともに、免疫を調整し炎症を抑制する効果があると報告されている。

②アンセリン

アンセリンはマグロやカツオなどの大型の回遊魚の筋肉に含まれる成分であり、イミダゾールジペプチドに疲労軽減効果や尿酸値降下作用があることを科学的に実証した。

アンセリンの化学構造



③コラーゲン

体中の細胞同士をつなぎ支える役割をしているコラーゲンは、全タンパク質の 1/3 を占め、中でも肌では真皮の 7 割を構成する重要な物質である。消化・吸収性に優れた低分子の海洋性コラーゲンペプチドは、美容、骨強化、軟骨組織の修復に効果的であることが確認されている。

2) 調味料研究

Y S K は、“おいしさを届けるために” 食に関するさまざまな研究を行っている。いつもの食材や料理法にも、まだまだ知られていない秘密がたくさん隠れて“いる。このような“おいしさの理由”に関する研究について紹介する。

①鰹だし

鰹だしは、和食に欠かすことのできない味のベースである。多くの旨味成分を有し、特にイノシン酸が多い食材である。Y S K は、さまざまな用途に合わせて、鰹だしを利用した多くの調味料を提供している。

②低塩食品

基本 5 味の一つである塩味は、料理の中でも特に重要な味の要素である。食塩 (塩化ナトリウム) は健康に欠かすことのできない素材であ

るが、大量に摂取すると逆に健康を損なうため、適切な摂取が必要である。Y S Kは、さまざまな調味技術の研究の中から、おいしさや塩味を損なわないで食塩濃度を低減させた低塩タイプのしょうゆ加工品を開発した。

6. 製品紹介

1) バリエーションに富む商品群

食品メーカーをはじめ健康・医療・美容関連の企業が、当社の調味料や機能性素材を原材料にして、さまざまな商品を製造し、市場に送り出している。Y S Kの調味料や乾燥食品からは、実に幅広い商品が生まれている。それは、ダシの素、めん類のつゆ、即席めん、冷凍食品、カニ風味かまぼこ、スイーツ類、スナック食品、ふりかけ、お茶漬けなど多岐にわたる。機能性素材からは、各種サプリメントや機能性飲料、化粧品などがつくられている。また、病院などで必要な医療用食品の製造も手掛けている。

2) 広がるマーケットと当社製品

下記イラストは、Y S K製品が使用されている

マーケットのイメージ。

3) 調味料製品

調味料製品は製品カテゴリーと製品数が多いため、代表的な製品の紹介をする。

①液体調味料

液体調味料には・鰹節エキス、・鰹エキス、・煮干エキス、・ホタテエキス、・カニエキス、・昆布エキス、・アサリエキス、・エビエキス・畜肉エキス、・野菜エキスなどがある。用途により対応する商品があり製品数は非常に多い。

②粉末調味料

粉末調味料は液体調味料の粉末タイプである。具体的には・鰹節エキスパウダー、・鰹エキスパウダー、・昆布エキスパウダーなどであり製品は液体調味料同様に多い。

③香り三昧シリーズ

香り三昧シリーズには鰹 S, 鰹 D, いりこ N, 鯖節 G, 昆布 H があるが鰹 S について詳細説明をする。

◆香り三昧 鰹 S

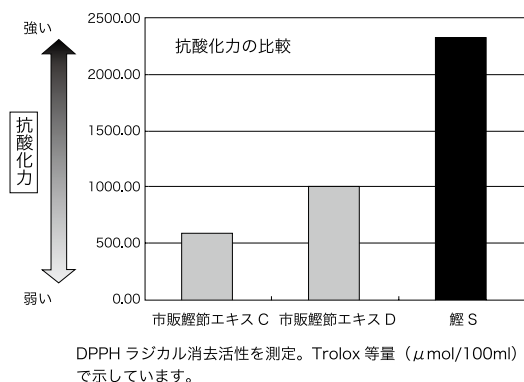
厳選した鰹節をふんだんに使用し、素材の旨味を凝縮した香り高い「だし」に仕立ててある。



抗酸化力にも優れているため、食品の酸化の進行を抑える。また、加熱による香りの劣化を抑える機能もある。

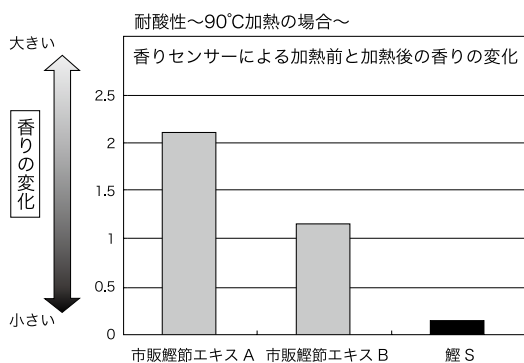
注目の「抗酸化力」

鰹だしの「鰹S」は、調理する食品に鰹節の持つ旨味や香りなどの風味を与える。効果はそれだけに留まらず、酸化を抑制することによって、食品の“おいしさ”をより引き立たせる。下の図は、抗酸化力を示したものである。「香り三味 鰹S」が強い抗酸化力を持つことが分かる。これを魚料理や肉料理に使うと、酸化臭の発生を抑え、料理の風味を長持ちさせる。



注目の「耐熱性」

一般的に「だし」の風味は、加熱により劣化する。下の図は、加熱による香りの変化を表している。「鰹S」は、熱による変化が少ないため加熱後も鰹だしの風味が加熱前と変わらず残っていることを示している。



調理効果

さまざまな食品に使用することで、すばらしい風味改善効果を期待できる。

ポイントは風味の維持、おいしさアップである。



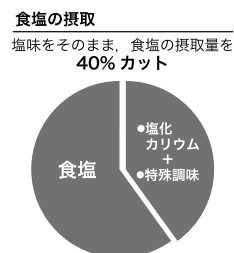
用途

用途は、和風、中華、洋風を問わない。幅広い食品に使用することで、鰹節の風味と旨味を加え、調理に冴えを与える。

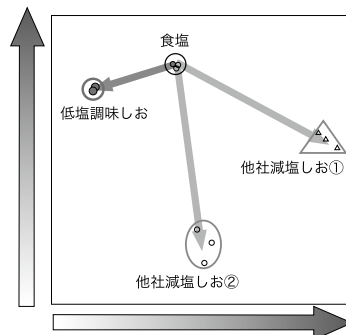
④低塩シリーズ

◆低塩調味塩

塩分(塩化ナトリウム)を40%カットし、塩化カリウムで塩味を補った、低塩なのにおいしい「しお」である。独自の調味技術で食塩と変わらない味を実現した。



味覚センサーの解析でも、「低塩調味しお」は一般の減塩しおと比べ、食塩に近い味という結果がでている。



※味覚センサー: いろいろな味をセンサーを通すことによって、人の味覚パターンを視覚的に再現することができる。位置関係に近いほど、近い味を示している。

4) 機能性素材

① マリンスウィート® (N- アセチルグルコサミン)

マリンスウィート®は、Y S Kが世界で初めて化学合成でない方法で量産化することに成功した天然型 N- アセチルグルコサミンで、食品への利用が可能である。砂糖の約半分の良質な甘味を持ち、水への溶解性と安定性が高いため、幅広い食品への配合が可能である。

◆食品素材としての用途

良質な甘味と水溶性・熱安定性を併せ持つため、ドリンク、錠剤、ソフトカプセル、ハードカプセルなど各種の加工が可能である。一般食品においても、飲料、スープ類、冷菓子、麺類など、あらゆる食品への使用が可能である。

② マリンアクティブ® (アンセリン)

鰹やマグロが一生休まずに泳ぎ続けるパワーの源を研究した結果生まれたのがマリンアクティブ®である。マリンアクティブ®は、天然のカツオ、マグロから独自の製法によりプリン体を約 99% カットして抽出されたペプチドで、ジペプチドであるアンセリンを多く含んでいる。疲れやすく、癒しを必要とする現代人に適した注目の素材である。

◆食品素材としての用途

マリンアクティブ®は水溶性で、ドリンクやサプリメントなどへの配合に適している。

③ マリンマトリックス® (コラーゲン)

その昔、生き物は海から陸へ移り住むとき、体に海を抱えて進化したと言われている。「マリンマトリックス®」は、その海から生まれたコラーゲンペプチドである。体内に約 60 兆個もある細胞、その細胞を支える柱のような役割を果たしているのがコラーゲンで、コラーゲンは、人体に存在するタンパク質の 3 分の 1 を占め、中でも肌の真皮の約 70% を構成する重要な物質である。Y S Kのマリンマトリックス®は魚皮由来のコラーゲンを低分子化したもの

で、消化性に優れた食品素材である。

◆食品素材としての用途

“マリンマトリックス®は中心分子量が約 3,000 と小さいため、水への溶解性に” 優れ、またその澄明性から特にドリンク用として適している。もちろん、錠剤、顆粒、カプセルなどへ加工し、サプリメントや一般食品として利用できる。

4) 焼成ボニカル (カルシウム)

飽食の時代と言われる現在、国民の栄養調査を行うと、不足しがちな栄養素の一つとしてカルシウムがあげられる。カルシウムの体内分布はその 99% が骨に存在している。Y S Kの焼成ボニカルは、魚の骨を焼成して製造した高純度のカルシウム粉末である。

◆食品素材としての用途

健康食品では、カルシウム強化を目的にビスケット類、ドリンク、打錠、顆粒などの形態に使用されている。また一般食品では、乳製品、麺類、冷菓子、スナック類、冷凍食品、キャンディー、練製品、パン、米飯、飲料など広い範囲の食品への添加が可能である。

7. グループ会社

1) マルミフーズ株式会社

遠洋カツオ漁船の廻船問屋業、冷凍のマグロ・カツオ刺身商材の加工・販売事業を行っている。焼津市に加工場・冷凍冷蔵庫を有し、安全・安心をモットーに良質なサカナを提供している。



2) 大連味思開生物技術有限公司(大連Y S K)
一大マーケットである中国市場を開拓すべく、2004年に設立されたY S Kのグループ子会社である。日本で培った技術を駆使し、中国マーケット向けに天然調味料や機能性食品素材の製造販売を行うとともに、日本のY S Kへ機能性素材中間体の製造供給を行っている。

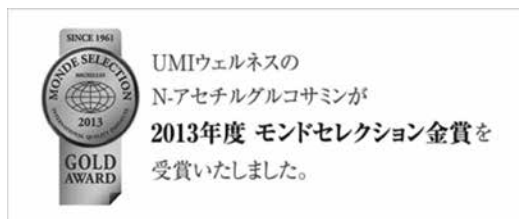
3) UMI ウェルネス株式会社

Y S Kが天然素材から研究開発し、製造するN-アセチルグルコサミン、コラーゲン、カルシウム、アンセリンなどの機能性素材を活用した独自商品の通信販売を行っている。健康食品の販売を通してグループの使命である「おいしさと健康」に貢献し、お客様に充実した人生を送っていただきたいと願っている。また、お客様の声を親会社に還元し、更なる製品の開発および改善に役立たせることも使命の一つである。

◆主力商品

① N-アセチルグルコサミン

N-アセチルグルコサミン (NAG)は、自然界のいろいろなところに分布しているが、人間の体の中にも存在する重要な糖質成分である。このNAGを配合することによって日本で初めての水無しで美味しく食べやすいタブレットが出来上がった。●特許を取得。



おわりに

焼津水産化学工業 (Y S K) は 1959 年 (昭和 34 年) 3 月に飼料用としてのフィッシュソリブルおよびの肝油の製造販売を目的に、静岡

県焼津市に資本金 750 万円で設立された。設立と同時に、大学卒の水産化学技術者を探していたところ、静岡県出身で東北大学農学部水産利用学科卒の松本圭一郎氏に巡り合い入社した。松本氏は主力であるフィッシュソリブルは重い割にはとてつもなく安いことに失望した。“臭い” “重い” “安い” の三重苦からの脱皮を考えた。翌、1960 年、松本氏は工場長に“魚の煮汁から液体の天然調味料の開発研究”を行うため、卒業した東北大学農学部土屋研究室への留学を申請した。この申請が許可され、天然調味料の技術開発に成功し、特許も取得した。

当時はアミノ酸の 1 種であるグルタミン酸ナトリウムの時代であったが、インスタントラーメンの別添のスープとして Y S K の天然調味料が採用され始めた。これを契機に Y S K の調味料製造会社としての形が見え始めた。1974 年 (昭和 49 年) 松本氏が社長に就任し、研究、製造、営業に指示し、社員一同業容拡大に走り出した。それから現在までは道のりは目標が明確になったため、課題を一つ一つクリアし発展してきた。Y S K には、市場のニーズを的確にとらえ、そのニーズを研究開発力で商品化し、全社一丸となって販売していくという DNA がある。

今後、一層この DNA に磨きをかけるために、改めて市場の変化から新たなニーズを嗅ぎ出し、商品コンセプトに仕上げ、研究開発力で商品化していただきたい。更には、新たな事業を創造していただきたい。Y S K の更なる発展を期待している。

[参考資料]

- 1) 焼津水産化学工業株式会社ホームページ
- 2) Y S K 物語 焼津水産化学工業 50 年史：発行者；焼津水産化学工業株式会社，2009 年 3 月 22 日，初版
- 3) Y S K 焼津水産化学工業 50 年史：発行者；焼津水産化学工業株式会社，2009 年 9 月 20 日

歴史の潮流と科学的評価

(第2節 ベジタリアン食と慢性疾患予防)

ジョアン・サバテ (Joan Sabate) *1 訳：山路 明俊 (Akitoshi Yamaji) *2

*1 ロマリンダ大学栄養学部, *2 食のフロンティア塾

Key Words：食習慣，肉類，長寿，コホート研究，死亡率

7章 肉を控えた食事は，長生きに貢献するだろうか？

3. 長寿に関係する，極めて少ない肉食の研究

前の項では，数多くの肉の主要な成分が，疾病の生化学的指標として高レベルで，また，特別な致死的な疾病に高リスクで関与していることを示すデータを提供してきました（表 7-1）。これらの推定される影響が，人の集団で，肉消費の総合的死亡率リスクの増加を生み出すかどうかの疑問は，まだ，残っています。現在，肉が長生きに影響を与えるかどうかを調査する最も実地的な方法の一つは，肉消費レベルが，死亡率の実質的なリスクに関与しているという前向きコホート研究を実施することです。死亡率に食事因子を関連付ける，殆どの前向き研究は，半定量的食物摂取頻度調査法を用いた大規模集団の日常の食事摂取を評価してきました。Willett⁸⁹⁾ は，最近，前向き研究中の食物摂取頻度調査法の妥当性を数多く研究し，頻度調査法に基づく食事測定は，食事の生化学的指標の良

好な推定手段であることを見出しました。

この項では，肉摂取が全ての死亡率に関与しているというコホート研究から最近，報告されたエビデンスをもとに，論評され，論説されます。また，肉の無い食事をしている多くの人のコホートと言える，カリフォルニア在住のセブンスデー・アドベンチストを対象にした，未発表のデータも含まれています。

A. 研究の選択

著者は，当時の死亡率調査に登録した集団の中で，研究開始時に食事摂取を測定した，前向きコホート研究を確認するために，MEDLINE (National Library of Medicine) のデータベースを調査しました。これらのデータを集めて報告した研究の中から，著者は，極低量の肉の摂取が，直接，全ての死亡原因に関与している分析を報告した，自らの研究を選び要約しました。この章の目的に対する「極低量の肉の摂取」というのは，肉を全く食べないか，著者の研究によって定義された，最も少ない肉の摂取に分類されます。また，私達は，当時，全ての死亡原因に繋がるリスクに関与していた食事パターン

表 7-3 成人 109,151 人を対象にした、全死亡原因に対して、極低量の肉摂取と低量の食パターンが関連する前向きコホート研究

出典文献	国	著者 (参考文献 NO)	数 (人)
オックスフォード・ベジタリアン研究	イギリス	Appleby ⁹⁰⁾	11,000
健康食品店来店者研究	イギリス	Key ⁹¹⁾	10,771
健康とライフスタイルの調査研究	イギリス	Whiclow ⁹²⁾	9,003
OXCHECK 研究	イギリス	Whiteman ⁹³⁾	11,090
ドイツベジタリアン	ドイツ	Claude-Chang ⁹⁴⁻⁹⁵⁾	1,904
アドベンチスト健康調査	米国	Fraser ⁹⁶⁾	34,198
アドベンチスト死亡研究	米国	Kahn ⁹⁷⁾	27,530
オランダ公務員	オランダ	Nube ⁹⁸⁾	2,820
地中海食実践集団	ギリシャ (地方)	Trichopolou ⁹⁹⁾	182
	移民ギリシャ人	Kouris-Blazos ¹⁰⁰⁾	330
	スペイン	Lasheras ¹⁰¹⁾	161
	イタリア人	Fortes ¹⁰²⁾	162

の変数を分析の手法で作りに出すために、肉と他の食品の摂取に関しては、研究開始時のデータ (例：食事数、クラスター分析、主成分分析) を用いた研究を選んで要約しました。

B. 研究の要約

前述の判断基準と文献の総説に基づき、極低量の肉の摂取と極低量肉摂取食事パターンと死亡率の全ての原因との関係を調べた、109,151 人の成人を対象にした、12 件の前向きコホート研究が確認されました。(表 7-3) これらの関係を調べた研究の全てが、肉の消費が一般の人の中で高率で行き渡っている富裕な国で実施されたことは、注目すべきです。それゆえに、これらの国で極低量の肉摂取が長生きに関与しているかどうかを調べる際、これらの集団では、極低量の肉摂取の普及が低いということが、統計的な力をかなり制限するという当面の問題があり、従って、極低量の肉摂取との関係を調べるには、大規模集団が必要となります。例えば、米国民の無作為の標本からのデータは、肉摂取ゼロ率は 6% を示しています¹⁰³⁾。この率に基づくと、肉摂取ゼロによる死亡率リスクが 20% 減少することを測定するための 80% の確率を持つためには、約 200,000 人の米国成人のコホートが必要とされます。

12 件の 10 件を考えると、肉無し食の低普及率の問題は、(1)「ベジタリアン」を過剰に選び出す (オックスフォード・ベジタリアン研究)⁹⁰⁾ (2)、肉少食者の高い普及率 (アドベンチストの研究^{96, 97)}、健康食品店来店客調査⁹¹⁾、地中海食を実践しているかなり大多数の人の研究⁹⁹⁻¹⁰²⁾ (3) ベジタリアンの研究と興味の表れとしての極低量肉摂取へのこだわりの期間に注目すること (ドイツのベジタリアン^{94, 95)}、アドベンチストの研究 (Adventist Studies) で提起されました。この項の残りは、表 7-3 に示されている、死亡率に対する極低量の肉摂取に関連する 12 件の研究計画、知見と制約について議論されます。

1. 研究計画

a. オックスフォード・ベジタリアン研究 (英国連邦)

オックスフォード・ベジタリアン研究⁹⁰⁾では、肉や魚を一切食べない人と定義された、6,000 人のベジタリアンが英国ベジタリアン協会とメディアの広報で応募しました。

研究者は、「同様な生活習慣か、肉を食べる社会的階層」の友達と親戚を確認する目的でベジタリアンに依頼するという方法を取り、5,000 人の非ベジタリアンが選ばれました。これらの 11,000 人の被験者は、肉摂取を含む項目がある、

研究開始時の食物摂取頻度調査を完全に実施し、その後、12年間の追跡調査の登録員となりました。研究開始後の2～4年で実施された、補足研究の検討において、肉を食べない人は、総コレステロールとLDLコレステロールを有意に低下することがわかりました。Thorogoodら⁹⁰⁾は、この研究集団における、超低量肉摂取と全死亡原因との相関を報告しました。

b. 健康食品店来店客調査 (英国連邦)

この研究の10,771人の成人のコホートは、健康食品店と診療所の顧客か、健康食品雑誌の購読者か、セブンスデー・アドベンチスト出版物の購読者か、あるいはベジタリアン協会の会員から構成されていました⁹¹⁾。全集団の内、4,627人(63%)が、ベジタリアンであることを示しました。(頻度調査では、それ以上は判定されませんでした)研究開始後の1.5～6年で実施された詳細な食事評価でもある、補足研究の検討で、研究開始時にベジタリアンと分類された人で、66%が1回/週間未満、肉と魚を摂取しているとわかりました。Key⁹¹⁾は、当研究集団における、研究開始時のベジタリアンの状態と、全死亡原因の17年間のリスクとの関係を調べました。

c. 健康と生活習慣実地調査・研究 (英国連邦)

1984～1985年の間、健康と生活習慣実地調査が、英国連邦(英国、スコットランド、ウェールズ)の代表的な地域の無作為に選ばれた成人を対象に実施されました。研究開始時に頻度調査に回答した9,003人(77.5%の回答率)は、枝肉(牛肉、羊肉、豚肉、ハム、ベーコン)、鶏肉、魚と他の35種の非肉食品を良く消費するというデータを提供しました。Whiclow⁹²⁾は、規定した、4つの主要な食事成分の主成分分析を実施しました。これらの一つは、負荷率に基づいた「低加工肉+低枝肉+果物と野菜が多い」組成のものとして明確に特徴付けされます。この組成のスコアは、全死亡原因に関連

がありました。

d. OXCHECK 研究 (英国連邦/UK)

OXCHECK 研究は、UK が研究開始時と9年間の継続調査を実施し、そのBedfordshireの5つの都市の11,090人の患者を対象にした、無作為割付研究です⁹³⁾。研究開始時の質問調査票は、赤身肉(牛、豚肉、羊)、鶏肉、魚、加工肉と6つの非肉食品についての簡単な食事頻度の項目を含んでいました。前向き研究で、Whiteman⁹³⁾は、この集団の、特殊な肉、加工肉と全死亡原因との関連を報告しました。

e. ドイツのベジタリアン

この研究で、研究者らは、ベジタリアン雑誌の読者層から、1,904人のドイツのベジタリアン(肉や魚を全く摂らないか、少し摂る)のコホートを実施しました^{94,95)}。この研究に用いられた研究開始時の頻度調査票は、被験者全てを「厳格なベジタリアン(肉と魚を全く食べない)」、「中程度のベジタリアン(肉と魚を少し食べる)」,さらに、肉摂取パターンに執着して持続したものに分類しました。Chang-Claudeら⁹⁴⁾は、これらのベジタリアンの中での、極低量の肉摂取の持続性と11年間の全死亡原因との関係を研究しました。Chang-Claudeらは、また、ドイツ人の死亡率に対するベジタリアンの死亡率を比較し、標準死亡率を算出しました⁹⁵⁾。

f. カリフォルニア・セブンスデー・アドベンチスト

セブンスデー・アドベンチスト教会は、米国で1850年代に設立されたクリスチャン宗派で、現在、世界中で1,000万を擁し、760,000人が北アメリカに住んでいます。1900年までに、多くの初期の教会戒律を、タバコ、アルコール摂取、豚肉消費について、正式な教会の禁止事項に発展させました。これらの指針に加え、教会の指導者達は、メンバーに対し、全ての肉の消費を停止する強力な勧告を含んだ食事指針の

セットを出版しました。過去 40 年の間に教会メンバー間で集まった食事データは、カリフォルニアのメンバーの 1/3 ~ 1/2 が、肉を消費しないことを示しました¹⁰⁴⁾。

2つの前向きコホート研究^{96, 97)}の目的のために、カリフォルニア・セブンスデー・アドベンチストの人口が、1958年と1974年に教会名簿に記載された国勢調査によって、確認されました。1958年の調査で確認された人口が、アドベンチストの死亡率研究を登録する為に利用され、その内、1960年に27,530人の非スペイン系の白人が、研究開始時の頻度調査(Hammond's American Cancer Questionnaire)を実施し、その後、前向きに26年間継続しました。1974年の調査で確認された人口が、アドベンチスト健康調査の登録のために利用され、その内の34,198人の非スペイン系の白人が、1976年に研究開始時の頻度調査(55項目の半定量的食物摂取頻度調査)を実施し、その後、12年間前向きに継続しました。アドベンチスト健康調査コホートの評価研究では、調査票で報告された肉摂取と24時間思い出し法との関係は0.83で、思い出し法で軽度の肉食家と分類された人の93%は、研究開始時の頻度調査票でも、また、軽度の肉食家と分類されることが示されました⁶⁰⁾。

両コホート研究のデータから、まだ、未報告の以下の分析が得られます。

1. アドベンチスト死亡率研究の成人の間には、26年間の全死亡率原因へのリスクと、極低量の肉全てには、相関があります。
2. アドベンチスト死亡率研究の成人の間には、12年間の全死亡率原因へのリスクと、極低量の肉全てと特殊な肉とには、相関があります。
3. アドベンチスト死亡率研究とアドベンチスト健康調査の、両者のコホートメンバーの成人間で、17年以上の間を置いて肉摂取

に代えた場合と、その後の17~29年間の全死亡率リスクとには、相関があります。

Fraser⁹⁶⁾は、最近、カリフォルニアのセブンスデー・アドベンチストのベジタリアンは、喫煙と飲酒を決してせず、慢性病が広がっていないことを報告しました。これらの潜在的な交絡因子の説明として、喫煙常習者、飲酒をする人、さらに冠動脈心疾患、心筋症とがんの既往歴の被験者が、この章で対象になっている、セブンスデー・アドベンチストの以前の未報告の分析から除外されていることがあります。

g. オランダの公務員

1953年、アムステルダム市の2,820人の公務員とその配偶者が、肉と魚の摂取の項目を含む、食物頻度調査を実施しました⁹⁸⁾。Nubeら⁹⁸⁾は、赤身肉と鶏肉の少食に1点を与え、さらに、次のもの(玄麦パン、低精白パン、調整度の低い牛乳、豊富なオートミールかゆ、中程度から豊富なじゃがいも、豊富な野菜、豊富な魚、中から少量の卵、豊富な果物)それぞれに点数を付加する10点食事スコアを算出する目的で、研究開始時の食事データを利用した研究を実施しました。肉消費と10点食事スコアの両者共、全死亡率の原因に相関していました。

h. 地中海食パターンを良く実施している集団

4件の小規模前向き研究が、地中海食パターンにこだわり、高い普及率を持つ、高齢の集団で実施されました(研究開始時に70歳か、それ以上)⁹⁹⁻¹⁰²⁾これらの研究集団は、以下の特徴です:地方のギリシャ人(n=182)、オーストラリアに移住したギリシャ人及び英国籍のオーストラリア人(n=330)、スペイン人(n=161)、イタリア人(n=162)。3件の研究で⁹⁹⁻¹⁰¹⁾、詳細な食事摂取頻度調査票の研究開始時のデータが、DavidsonとPassmer¹⁰⁴⁾から推奨された8点の「健康食」を算出するために使用されました。食事スコアは、肉の少食に1点と、高いモノ不飽和脂肪酸/飽和脂肪酸比、緩やかなアル

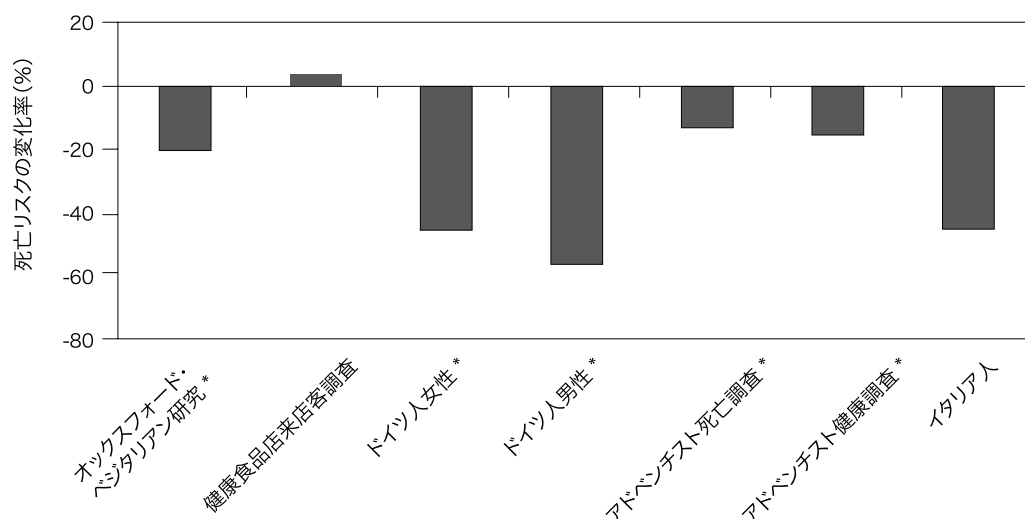


図 7-1 5 件の前向き研究における、肉の高量摂取に対する極低量摂取（ゼロか 1 回未満 / 週）の全ての死亡原因リスクの変化率 (%)

*死亡リスクの変化は $p < 0.05$

コール消費、高い豆類の消費、高い果物の消費、高い野菜消費、そして低い牛乳と乳製品消費に点数が付加されることで算出されました。このスコアの 1 単位の増加と全死亡率原因との関係が、これらの研究のそれぞれで検討されました。4 番目の研究で¹⁰²⁾、詳細な食事摂取頻度調査票のデータが、全ての肉と特殊な肉の品目を測定するために使用され、これらは全死亡率原因のリスクに関連していました。

2. 所見

表 7-4 と図 7-1 は、全ての肉の極少量摂取が、全死亡率原因に直接関与している 6 件の研究からの知見を要約したものです。これらの研究の 6 件のうち 5 件が、高い肉消費に対する極少量の肉摂取は、12 ~ 56% のリスク低下を示しています。残りの研究の、健康食品店来店客調査は、特に肉摂取を測定したものでない「ベジタリアン」ステータス変数に対し、強い相関はな

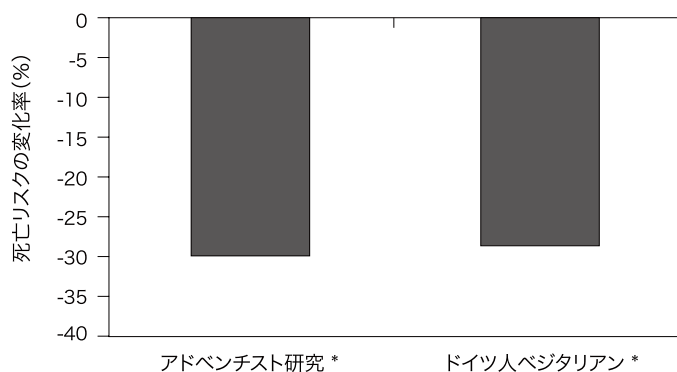


図 7-2 2 件の研究で見られる、極低量（ゼロか 1 回未満 / 週）の肉摂取の短期に対する長期の死亡リスクの変化率。ドイツ人の研究では、長期は 20 年以上、短期は 20 年未満。アドベンチスト研究では、17 年以上と 17 年未満。

(両者共、 $p < 0.05$)

いことを示しました。表 7-5 と図 7-2 は、極少量の肉摂取の継続と、全死亡原因とが相関する 2 件の研究のデータを示しています。両研究で、長期間（それぞれ >17 年と >20 年）極少量の肉摂取へのこだわりは、短期間（それぞれ、<17 年と <20 年）に比べ、30% と 29% のリスク低下を示しました。まとめてみると、これらのデータは、一般的に、肉消費の減少は長生きの利点

表 7-4 全死亡原因に対する極低量の肉摂取に関する研究

コホート	調査 期間	極低量肉摂取群の内訳	高肉摂取群の内訳	補正死亡比率 (極低量対高量摂取群)	交絡の調整法
1. オックスフォード・ベジタリアン研究 (英国連邦)	12 年	肉食ゼロ (n=6000)	肉食者 (N=5000)	0.80[0.65,0.99]	年齢、喫煙、BMI、階層
2. 健康食品店来店客調査 (英国連邦)	17 年	ベジタリアン (n=4627) *	非ベジタリアン (n=6144)	1.04[0.93,1.16]	年齢、性別、喫煙
3. ドイツ人	11 年	ベジタリアン (1904) **	一般人	男性 0.44[0.36,0.53], 女性 0.53[0.44,0.64]	年齢
4. アドベンチスト死亡研究 (米国)	26 年	肉食ゼロ (n=7918)	1 回以上 / 週の肉食 (n=6958)	0.88[0.82,0.93]	年齢、性別、学歴、BMI を多変量補正。喫煙歴の長い喫煙者、飲酒者、研究開始時に慢性疾患のある人は除外
5. アドベンチスト健康調査 (米国)	12 年	肉食ゼロ (n=7191)	1 回以上 / 週の肉食 (n=7463)	0.85[0.76,0.94]	年齢、性別、学歴、BMI、運動を多変量補正。喫煙歴の長い喫煙者、飲酒者、研究開始時に慢性疾患のある人は除外
6. イタリア人	5 年	1 回未満 / 週の肉食 (記載なし)	1 回以上 / 週の肉食 (記載なし)	0.55[0.28,1.10]	年齢、性別、学歴、BMI、喫煙、認知機能、慢性疾患

* 当調査の質問表には、「ベジタリアン」の定義はされていない。後で実施の妥当性のある研究では、これらのベジタリアンの 66% が肉や魚を食べないことを示していた。
 ** 「ベジタリアン」は、肉や魚を全く食べないか、時折食べると定義された。

表 7-5 極低量の肉摂取の継続と、その後の全死亡リスクとの関係を調査した研究

コホート	長期継続群	短期継続群	フォローアップ 期間	年齢補正の死亡率 (95%CI) (長期継続群対短期継続群)	多変量死亡率 (95%CI) (長期継続群対短期継続群)
極低量摂取のドイツ人	20 年以上極低量の 肉摂取 (n=1259)	20 年未満の極低量 の肉摂取 (n=645)	11 年	0.69[0.49,0.98]	0.71[0.49,1.02] *
肉摂取のないセブンスアドベンチスト **	17 年以上、肉摂取 なし (n=1906)	17 年未満、肉摂取 なし (n=265)	12 年	0.64[0.48,0.85]	0.70[0.51,0.96] ***

* 年齢、性別、運動、BMI、ベジタリアニズムへの順守を補正

*** 年齢、性別、運動、BMI を多変量補正。研究開始時に長期喫煙者、飲酒者、慢性疾患者は除外。

表 7-6 全死亡原因に対する種類の異なる肉の極低量摂取に関する研究

コホート	肉の種類	調査期間	極低量肉摂取群の内訳	高量肉摂取群の内訳	死亡率 (極低量摂取群対高量摂取群)	交絡因子
1. アドベンチスト健康調査 (米国)	赤肉	12 年	なし (n=8547)	1 回以上 / 週 (n=5721)	0.88[0.78,0.99]	年齢、性別、学歴、BMI を多変量補正。研究開始時に長期喫煙者、飲酒者、慢性疾患保有者は除外。
2. イタリア人	白肉	12 年	なし (n=8164)	1 回以上 / 週 (n=2646)	0.81[0.71,0.92]	年齢、性別、学歴、BMI を多変量補正。研究開始時に長期喫煙者、飲酒者、慢性疾患保有者は除外。
	赤肉 + 鳥肉	5 年	1 回未満 / 週 (n=90)	1 回以上 / 週 (n=39)	0.50[0.27,0.93]	なし
	魚	5 年	1 回未満 / 週 (n=31)	1 回以上 / 週 (n=128)	1.12[0.57,2.17]	なし
	内臓	5 年	1 回未満 / 週 (n=138)	1 回以上 / 週 (n=19)	0.85[0.38,1.89]	なし
	ソーセージ	5 年	1 回未満 / 週 (n=142)	1 回以上 / 週 (n=19)	1.15[0.49,2.70]	なし
3. オランダの公務員	赤肉 + 鳥肉	25 年	0 ~ 300g / 週 (女性 = 563, 男性 = 536)	600 ~ 800g / 週 (女性 = 406, 男性 = 563)	女性 1.28, 男性 1.05*	年齢
	加工肉	9 年	1 日未満 / 週 (n=6612)	4 ~ 7 日 / 週 (n=326)	0.95[0.57,1.61]	年齢、性別、喫煙
4. OXCHECK 研究 (英国連邦)	生又は冷凍赤肉	9 年	1 日未満 / 週 (n=2247)	4 ~ 7 日 / 週 (n=2506)	1.41[1.09,1.82]	年齢、性別、喫煙
	生又は冷凍鳥肉	9 年	1 日未満 / 週 (n=4191)	4 ~ 7 日 / 週 (n=588)	1.32[0.84,2.08]	年齢、性別、喫煙
	生又は冷凍魚	9 年	1 日未満 / 週 (n=4874)	4 ~ 7 日 / 週 (n=495)	0.94[0.63,1.41]	年齢、性別、喫煙

* 既報の累積生存推定値からの算出

があること、20 年以上の食事パターンの長期継続と、さらなるリスク低下の可能性をそれ以上に高めることを支持しています。

また、関連する研究のいくつかは、死亡と特殊な肉の摂取とに相関がある分析を提供しました。これらは、表 7-6 に示されています。この中で、アドベンチスト健康調査と老齢イタリア人の小規模研究¹⁰²⁾ は、赤身肉と白身肉が、死亡リスクを有意に低下することを示しました。アドベンチスト健康調査と老齢イタリア人研究が、ゼロか極少量の肉摂取である、最も低い肉摂取の分類を採用し、一方、特殊な肉の摂取が逆の相関を示さなかった研究のいくつかは、少量の肉を消費する人達を含んだ最も低い肉摂取分類を持っていたことは、注目に値することです。

表 7-7 は、極少量の肉摂取が全死亡原因に相関していた、5 件の研究からの知見を要約したものです。これらの研究は、少量の肉、豊富な植物性食品の食事パターンが、全死亡原因のリスクの有意な低下と相関を示しているという傾向を示していました。この傾向の例外は、あるサブグループ（オランダ女性と 80 歳以上のスペイン人）には、ないということでした。

3. 制約

a. 摂取パターンから見た、超低肉食に関する交絡因子

健康に寄与する特殊な食品（肉等）の摂取に関連する分析の主要な制約の一つに、代表的な人の食

事は、単一な食品から構成されていないことがあり、多種類の食品を含んだ特長のある食事パターンから成っているということがあります。それゆえに、単一な食品が健康に寄与しているという知見を判断する際、次のことに注目することは重要です。(1) 単一食品の消費増加と減少が、特別な食事パターンの指標であるかもしれないこと (2) 食事パターンが、単一食品よりも、真の原因因子であるかも知れないこと。

この章の表 7-4 ～ 7-6 にある、極少量の肉摂取の明白な予防的相関を判断する際、肉を置き換えられる「ベジタリアン」食パターン（例：豆類、大豆製品、ナッツ、野菜）の多くが、致死の疾病に対し、根源的な予防なのかも知れないことは注目に値します¹⁰⁷⁻¹⁰⁹⁾。たとえば、ベジタリアン・アドベンチストを対象にして、Kahn は、緑色サラダが、死亡率のリスクを低下させることを報告し⁹⁷⁾、Fraser は、ナッツの高い消費率は CHD 死亡率を低下させることを報告しました¹⁰⁹⁾。また、注目すべきことは、肉は繊維（表 7-2）とフィトケミカルがゼロに近いということです。この様に、食事の肉を置き換えられる植物性食品はいずれも、繊維とフィトケミカル（慢性疾患のリスクを幅広い範囲で低下させるとされてきた栄養学的因子）の総合的な摂取を増加させます。まとめると、極少量の肉摂取がリスクの低下を示しているこの章での知見は、考えられる肉の危害の低下よりも、少なくとも部分的ですが、人の食事の肉に置き換えられる代表的な食品が健康効果の増加に寄与する可能性を高めるということです。

健康に寄与する特殊な肉摂取に関連して、摂取パターンによる別の交絡因子が生じます。(表 7-6) 特に、特殊な肉の摂取減少との関係は、他の種類の肉の摂取増加を含む摂取パターンの原因に影響する潜在的な指標になり得ます。たとえば、Whiteman⁹³⁾ による、食事と死亡率との前向き研究では、生肉の少量摂取はリスクの

表 7-7 全死亡原因に対する極少量肉摂取パターンに関連する研究

コホート	規模	食事パターンの決定方法	食事内容	補正死亡比率	交絡因子
ギリシャ人 (>70 歳)	182 人	食事スコア *	肉少量、高 M/S 比 †、中程度の飲酒、豊富な豆類、穀類、果物、野菜の摂取	0.83[0.69,0.99]/1 単位のスコア増加	年齢、性別、喫煙
ギリシャ人 (移民、アングロ系オーストラリア人、>70 歳)	330 人	食事スコア *	上記と同じ	0.83[0.67,1.02]/1 単位のスコア増加	年齢、性別、喫煙、民族
スペイン、60 ～ 80 歳	74 人	食事スコア *	上記と同じ	0.69[0.43,0.93]/1 単位のスコア増加	年齢、性別、BMI、喫煙、アルブミン、運動
スペイン、80 ～ 95 歳	87 人	食事スコア *	上記と同じ	1.24[0.6,2.53]/1 単位のスコア増加	研究開始時の疾病、減量
英国連邦	9003 人	主成分 **	低量の加工肉・生肉、豊富な果物・野菜、低量の揚げもの	0.75[0.65,0.89]/1 単位のスコア増加	年齢、性別、喫煙、アルコール、職業、研究開始時の疾病、地域
オランダの公務員	2820 人	食事スコア	低量の赤肉・鳥肉、豊富な野菜、果物、未精製の穀類のパン、魚、ポリッジ	男 0.83、女 1.11/6 単位のスコア増加	年齢

* 食事内容で示された極少量の肉摂取の励行に対して加算する方法

** 食事内容に示された極少量の肉摂取の励行が大きい場合にスコアが増加する成分を抽出する主成分分析

† 1 価不飽和脂肪 / 飽和脂肪の比

p<0.01 (男性でのスコア変数のリニアトレンド) p=0.54 (女性でのスコア変数のリニアトレンド)

増加と相関がありました。(表 7-6) この知見に対する一つの説明としては、少量の生肉摂取は、ある種のがんの原因と考えられる因子であると多くの研究で示されてきた、もう一つの肉のタイプ、つまり、加工肉の過食の指標であるということです。

b. 非食品の交絡因子

極少量の肉摂取が良好な健康効果に相関しているという研究の共通の認識として、ベジタリアンは、他の多くの、ポジティブな前兆となる因子を有しているようだという事です。(96,106) 非ベジタリアンに比べ、ベジタリアンの間で普及しているように見えるいくつかの要因がありますが、喫煙、飲酒をしない、身体活動量が多い、社会経済的地位が高いや、健康に対する個人の高い意識には限定されません。このように、極少量の肉摂取に対する死亡率を報告する際には、これらの交絡因子の補正が必要です。この内容に関し、研究の殆どは、少し補正していますが、全ての重要な交絡因子を補正してはいないということを表 7-4 ~ 7-7 のデータは示しているということは注目すべきことです。たとえば、年齢のみの交絡因子を補正したドイツのベジタリアンの死亡率リスクの 47 ~ 56% の実質的な低下は、全ドイツ人と比べて、ドイツのベジタリアンには長寿に貢献する、明らかに他の多くの交絡因子があるので、注意深く判断されなくてはなりません。対照的に、ここで報告されたアドベンチストの研究は、肉そのものの影響を評価する特徴のある機会を提供します。それは、極少量の肉摂取の人も、肉の過食の人も、喫煙の経験はなく、飲酒もせず、また、研究開始時の主要な慢性疾患歴もないことです。さらに、アドベンチストの死亡率リスク(表 7-4 ~ 7-6) は、教育、体重及び身体活動が補正されていました。

c. 方法論的制約

この章の表 7-4 ~ 7-6 に要約されている研究

のひとつを除く全てが、全死亡率原因に対する食事摂取の単独の報告に関連しているということに注目することは重要です。この様に、これらの研究の知見を判断する際は、食事の変化によるバイアスの可能性が残るということです。特に注意すべきなのは、研究開始時の食事は、病気による食事パターンの変化に反映するということです。アドベンチストの研究で、著者は、全死亡原因の前後のリスクに対し、2 件の食事レポート(1960 年と 1976 年)を関連付ける機会を持ち、1960 年には毎週の肉摂取だったものから、1976 年には肉無しに変化した被験者が、17 年間毎週肉摂取を続けた人に比べ、有意ではありませんが、20% のリスクの上昇を経験したことを見出しました。この知見は、アドベンチストを対象にした、他の全ての知見に反するもので、極少量の肉摂取のリスクの減少を示しています。この予想に反する影響に対する考えられる説明の一つは、最終的に致死性になった病気が原因で肉の消費を中止した被験者だったのかも知れないということです。これは、病気が理由で喫煙を止めた人が、喫煙習慣を中止したこと予防的効果を、影響のない程度にバイアスしてしまう傾向にある、喫煙者間に見られる「病氣中止効果」に似ています¹¹¹⁾。

日常の肉摂取についての測定誤差は、ここで要約されている(表 7-3) 前向きコホート研究の知見を、ある程度、バイアスしてしまうようです。しかし、これらの前向き研究で使用された食事摂取頻度調査票について実施された評価研究は、24 時間思い出し法と生化学的指標によって測定されたものと同様に、これらの手段は肉摂取の良い評価系であることを示しました^{90, 92, 96, 99-102)}。その上、Willett⁸⁹⁾ は、食事評価における測定誤差が、影響のない程度に効果の推定をバイアスする傾向にあり、ここで報告された極少量の肉摂取の予防的な相関が、実際に強まることを報告しました。

複合的な研究の知見を要約したり判断したりする際に、数多くのバイアス源が発生します。ここで報告された極少量の肉摂取の死亡率は、特に、特殊な肉の場合変化します。(表7-6) この変数のうちのいくつかは、ある研究は肉摂取ゼロの分類を採用し、他は少量の肉摂取の分類を採用するという事実によるものです。極少量の肉摂取の予防的効果が、ゼロかほんのわずかな含んで初めて明らかになるというぎりぎりの影響を想定した場合、最低量の肉摂取分類を決めるための方法論における相違は、極少量の肉摂取の計算上の影響に含まれる重要な変数に影響を与えるかも知れません。さらに、医学研究に参加する傾向にある「健康な被験者」の間では、見た目が原因で、実質的に害になるような十分な高率の肉摂取はないようです。われわれのエビデンスの要約中にある他の避けられないバイアス源は出版バイアスです。つまり、ここで記載された研究は、前向き研究から得られたデータを部分的に集めて出版したことを示しているのです。

4. 要約及び結論

肉は、西欧食の中で、主要なたんぱく質源です¹¹²⁾。この様に、肉摂取が明らかに致死的な疾病の重荷になるかどうかを決めることは、重要な公衆衛生的及び臨床的意味合いを持っています。109,151人の成人を対象にした、既報の前向きコホートデータの要約は、以下の3つの主要な傾向を示しました。

1. 6件の研究のうち5件が、極少量の肉摂取の人は、高率の肉消費の人に比べ、死亡のリスクが12～56%減少したことを示しました。
2. 極少量の肉摂取が死亡率を有意に低下させた2件の研究は、極少量の肉摂取にこだわった人の間で、さらに長い期間（お

よそ20年間かそれ以上)持続した場合は、死亡率リスクが有意に30%の低下を示した、さらなる知見を提供しました。

3. 5件の研究のうち5件が、少量の肉と豊富な植物性食品食パターンを続けた成人は、異なる食事パターンの人に比べ、死亡率リスクは、有意にあるいはぎりぎりの17～30%の低下を示しましたが、別のグループでは相関は見られませんでした。

これらの傾向が、肉少食を原因とする予防効果を支持するかどうかを決定しようとする時、主要な2つの疑問を検討しなければなりません。最初は、ベジタリアン間の「健康的な行動」の高い普及率による交絡因子が、さらに大きな予防となって、少量の肉摂取にバイアスしないかどうか。2番目は、少量の肉摂取食の明らかな予防効果が、肉を置き換えられる植物性食品の利点に対し、少なくとも部分的に影響していないかどうか。注目する価値がある、この章の知見は、かなり健康意識の高い集団（例：アドベンチスト調査、オックスフォード・ベジタリアン社会調査）で、数多くの重要な長寿の予測因子（喫煙、飲酒、身体活動、教育、BMI）を調整した後でさえ、極少量の肉摂取に対する有意なリスク低下を示すという、最初の疑問を呈しています。しかし、最近のデータを利用して、2番目の疑問を呈することはできません。

このように、この章で示されているデータは、少量の肉食が長寿に寄与する可能性を高めますが、特に肉と植物性食品が有する役割を証明するために、栄養疫学の分野におけるさらなる研究が必要です。ここでの知見はまだ未解決ですが、低率の肉/豊富な野菜食は生存にとって有利であることを示し、疾病の予防のための最も賢明な食事パターンを選ぶ時の迅速な手段となります。特に肉に関連する危害の理解は、まもなく、肉の代謝物の影響、肉の代謝で作用す

る酵素やこれらの酵素の遺伝子の改変を調べる研究からもたらされるデータにより、高まるでしょう¹¹²⁾。また、実験食の特殊な生化学的反応を明らかにするための実践的食事レベ

ルでの更なる研究は、人の食事において、肉を置き換えられる植物性食品の病理学的影響から、肉の病理学的影響を説明する手助けを可能にします。

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

- 1) McCarrison,R. *Studies in Deficiency Diseases*. Henry Frowde and Hodder &Stoughton, London, 1921.
- 2) MaCarrison,R. The relationship of diet to physical efficiency of Indian races. pp 90-100. The Practitioner, London, Jan 1925.
- 3) Mazess,R,B. Health and longevity in Vilcabamba, Ecuador. *JAMA*, **240**:1781,1978.
- 4) Beller, S. and Palmore, E. Longevity in Turkey. *Gerontologist*, **14**(5 pt 1):373-6,Oct 1974.
- 5) Sachuk, N.N. A mass social-hygenic investigation of a very old population in various areas of the Soviet Union: program, procedure, results. *J.Gerontol.*,**25**(3):256-61, Jul 1970.
- 6) Chebotaryov, D,F. and Sachuk, NN. Sociomedical examination of longevous people in the USSR. *J.Gerontol.*, **19**:435-440,1964.
- 7) Georgakas,D. *The Methuselah Factors:The Secrets of the World's Longest-Lived People*. Simon & Schuster, New York,1980.
- 8) Strandler,M. and Strandler,N. Schocken Books, New York,New York,1981.
- 9) Young, T,E. *On Centenarians*. Charles and Edward Layton, London,1899.
- 10) Hindhede,M. The effect of food restriction during war on mortality in Copenhagen. *JAMA*,**76**:381-382,1920.
- 11) Friderica,L,S. Nutritional investigations in Denmark during the war, 1939-1945. *Proc. Nutr. Soc.*, **5**:255-259, 1947.
- 12) Tikka,J. Conditions and research into human nutrition in Finland during the war years. *Proc. Nur. Soc.*, **5**:260-263,1947.
- 13) Hnasen,O,G. Food Conditions in Norway during the war, 1939-1945. *Proc.Nutr. Soc.*, **5**:263-270,1947.
- 14) Bang,H,O. and Dyerberg,J. Personal reflections on the incidence of ischemic heart disease in Olso during the Second World War. *Acta.Med. Scand.*, **210**:245-248,1981.
- 15) Abramson,E. Nutrition and nutritional research in Sweden in the years of the war. 1939-1945. *Proc.Nutr. Soc.*, **5**:271,1947.
- 16) Stamler,J. Population studies. In: *Nutrition, Lipids and Coronary Heart Disease*. Levy,R,I., Rifkind,B,M., Dennis,B,H., Ernst,N. (Eds), Raven Press, New York, 1979.
- 17) Nestle,M. Animal v. plant foods in human diets and health: is the historical record unequivocal? *Proc. Nutr. Soc.*, **58**:211-218,1999.
- 18) Kushi, L,H., Lenart,F,B., and Willet,W,C. Health implications of Metitarranean diets in light of contemporary knowledge. 2. Meat, wine, fats, and oils. *Am. J. Clin. Nutr.*, **61**(6 Suppl):1416S-1427S, Jun 1995.
- 19) Hu,F,B., Stampfer,M,J., Manson,J,E., Ascherio,A., Colditz,G,A., Speizer,F,E.,Hennekens,C,H., and Willet,W,C. Dietary saturated fats and their food sources in relation to the risk of coronary heart disease in women. *Am. J. Clin. Nutr.*, **70**(6):1001-8,Dec 1999.
- 20) Fraser,G,E. Diet as primordial prevention in Seventh-Day Adventists. *Prev. Med.*, **29**(6 p 2):S18-23, Review, Dec 1999.
- 21) Menotti,A., Kromhout,D., Blackburn,H., Fidanza,F., Burina,R., and Nissinen,A. Food intake patterns and 25-year mortality from coronary heart disease: cross-cultural correlations in the Seventh Countries Study. The Seventh Countries Study Research Group. *Eur. J. Epidemiol.*, **15**(6):507-15, Jul 1999.
- 22) Campbell,T,C., Parpia,B., and Chen,J. Diet, life-style, and the etiology of coronary artery disease: the Cornell China study. *Am. J. Cardiol.*, **82**(10B):18T-21T, Nov 26,1998.
- 23) Field,C,J., Ryan,E,A., Thmson,A,B., and Clandinin,M,T. Diet fat composition alters membrane phospholipid composition, insulin biding, and glucose metabolism in adipocytes from control and diabetic animals. *J. Biol. Chem.*, **265**(19):11143-50, Jul 5,1990.
- 24) Storlien,L,H., Jenkins,A,B.,Chisholm,D,J.,Pascoe,W,S., Khouri,S., and Kraegen,E,W. Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rats. Relationship to muscle triglyceride and omega-3 fatty

- acids in muscle phospholipid. *Diabetes*, **40**(2):280-9, Feb 1991.
- 25) Joannic, J.L., Auboiron, S., Raison, J., Basdevant, A., Bornet, F., and Guy-Grand, B. How the degree of unsaturation of dietary fatty acids influences the glucose and insulin responses to different carbohydrates in mixed meals. *Am. J. Clin. Nutr.*, **65**(5):1427-33, May 1997.
 - 26) Snoedon, D.A., and Phillips, R.L. Does a vegetarian diet reduce the occurrence of diabetes? *Am. J. Public Health*, **75**(5):507-12, May 1985.
 - 27) Potter, J.D. Nutrition and colorectal cancer. *Cancer Causes Control*, **7**(1):127-46, Jan 1996.
 - 28) Giovannucci, E. Insulin-like growth factor-I and binding protein-3 and risk of cancer. *Horm Res.*, **51** Suppl 3:34-41, 1999.
 - 29) Bingham, S.A., Pignatelli, B., Pollock, J.R., Ellul, A., Malavelli, C., Gross, G., Runswick, S., Cummings, J.H., and O'Neill, I.K. Does increased endogenous formation of N-nitroso compounds in the human colon explain the association between red meat and colon cancer? *Carcinogenesis*, **17**(3):515-23, Mar 1996.
 - 30) Sugimura, T. Overview of carcinogenic heterocyclic amines. *Mutation Res.*, 211-219, 1997.
 - 31) Sugimura, T., and Wakabayashi, K. Mutagens and carcinogens in food. In: *Mutagens and Carcinogens in the Diet*. Priza, M.W., Aeshbacher, H.V., Felton, J.S., Sato, S. (Eds), Wiley-Liss Inc., New York, 1990.
 - 32) Toyota, M., Ushijima, T., Kakiuchi, H., Canzian, F., Watanabe, M., Imai, K., Sugimura, T., and Nagao, M. Genetic alteration in rat colon tumors induced by heterocyclic amines. *Cancer*. **77**(8 Suppl):1593-7, Apr 15, 1995.
 - 33) Kakiuchi, H., Watanabe, M., Ushijima, T., Toyota, M., Imai, K., Sugimura, T., and Nagao, M. Specific 5'-GGGA-3'-->5'-GGA-3' mutation of the Apc gene in rat colon tumors induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**(3):910-4, Jan 31, 1995.
 - 34) Adamson, R.H., and Thorgerisson, U.P. Carcinogens in Foods: Heterocyclic-Amines and Cancer and Heart Disease. In: *Nutrition and Biotechnology in Heart Disease and Cancer*. Longnecker, J.B., Kritchevsky, D., and Drezner, M.K. (Eds.), Plenum Press, New York, 1995.
 - 35) Adamson, R.H., and Thorgerisson, U.P. Carcinogens in foods: heterocyclic amines and cancer and heart disease. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **369**:211-20, 1995.
 - 36) Overvik, E., Ochiai, M., Hirose, M., Sugimura, T., and Nagao, M. The formation of heart DNA adducts in F344 rat following dietary administration of heterocyclic amines. *Mutat. Res.*, **256**(1):37-43, Jan 1991.
 - 37) Thorgerisson, U.P., Farb, A., Virmani, R., and Adamson, R.H. Cardiac damage induced by 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in nonhuman primates. *Environ. Hlth. Perspect.*, **102**(2):194-9, Feb 1994.
 - 38) Minchin, R.F., Kadlubar, F.F., and Ilett, K.F. Role of acetylation in colorectal cancer. *Mutat. Res.*, **290**(1):35-42, Nov 1993.
 - 39) Roberts-Thomson, I.C., Butler, W.J., and Ryan, P. Meat, Metabolic genotypes and risk for colorectal cancer. *Eur. J. Cancer Prev.*, **8**(3):207-11, Jul 1999.
 - 40) Kampman, E., Slattery, M.L., Bigler, J., Leppert, M., Samoit, W., Caan, B.J., and Potter, J.D. Meat consumption, genetic susceptibility, and colon cancer risk: a U.S. multicenter case-control study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **8**(1):15-24, Jan 1999.
 - 41) Appleby, P.N., Thorogood, M., Mann, J.I., and Key, T.J. Low body mass index in non-meat eaters: the possible roles of animal fat, dietary fibre and alcohol. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, **22**(5):454-60, May 1998.
 - 42) Weindruch, R., and Sohal, R.S. Senimars in medicine of the Beth Israel Deaconess Medical Center. Caloric intake and aging. *New. Engl. J. Med.*, **337**(14):986-94, Oct 2, 1997.
 - 43) Algeri, S., Biagini, L., Manfredi, A., and Pitsikas, N. Age-related ability of rats kept on a life-long hypocaloric diet in a spatial memory test. Longitudinal observations. *Neurobiol. Aging*, **12**(4):277-82, Jul-Aug 1997.
 - 44) Fraser, G.E., Singh, P.N., and Bennet, H. Variables associated with cognitive function in elderly California Seventh-Day Adventists. *Am. J. Epidemiol.*, **143**(12):1181-90, Jun 15, 1996.
 - 45) Cook, J.D. Adaptation in iron metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.*, **51**:301-308, 1990.
 - 46) Reif, D.W. Ferritin as a source of iron for oxidative damage. *Free Radic. Biol. Med.*, **12**(5):417-27, 1992.
 - 47) Zweir, J.L., and Jacobus, W.E. Substrate-induced alterations of high energy phosphate metabolism and contractile function in the perfused heart. *J. Biol. Chem.*, **262**(17):8015-21, Jun 15, 1987.
 - 48) Bolli, R., Patel, B.S., Jeroudi, M.O., Lai, E.K., and MacCay, P.B. Demonstration of free radical generation in "stunned" myocardium of intact dogs with the use of the spin trap alpha-phenyl N-tert-butyl nitron. *J. Clin. Invest.*, **82**(2):476-85, Aug 1998.
 - 49) Kiechl, S., Aichner, F., Gerstenbrand, F., Egger, G., Mair, A., Rungger, G., Spogler, F., Jarosch, E., Oberhollenzer, F., and Willet, J. Body iron stores and presence of carotid atherosclerosis. Results from the Bruneck Study. *Arterioscler.*

- Thromb.*, **14**(10):1625-30, Oct 1994.
- 50) Salonen, J.T., Nyyssonen, K., Korpela, H., Tuomilehto, J., Seppanen, R., and Salonen, R. High stored iron levels are associated with excess risk of myocardial infarction in eastern Finnish men. *Circulation*, **86**(3):803-11, Sep 1992.
 - 51) Tuomainen, T.P., Punnonen, K., Nyyssonen, K., and Salonen, J.T. Association between body iron stores and the risk of acute myocardial infarction in men. *Circulation*, **97**(15):146-6, Apr 21, 1998.
 - 52) Tzonou, A., Laggiou, P., Trichopoulou, A., Tsoutsos, V., and Trichopoulos, D. Dietary iron and coronary heart disease risk: a study from Greece. *Am. J. Epidemiol.*, **147**(2):161-6, Jan 15, 1998.
 - 53) Ascherio, A., Willet, W.C., Rimm, E.B., Giovannucci, E.L., and Stampfer, M.J. Dietary iron intake and risk of coronary disease among men. *Circulation*, **89**(3):969-74, Mar 1994.
 - 54) Corti, M.C., Gaziano, M., and Hennekens, C.H. Iron status and risk of cardiovascular disease. *Ann. Epidemiol.*, **7**(1):62-8, Jan 1997.
 - 55) Babbs, C.F. Free radicals and the etiology of colon cancer. *Free Radic. Biol. Med.*, **8**(2):191-200, 1990.
 - 56) Sesink, A.L., Termont, D.S., Kleibeuker, J.H., and Van der Meer, R. Red meat and colon cancer: the cytotoxic and hyperproliferative effects of dietary heme. *Cancer Res.*, **59**(22):5704-9, Nov 15, 1999.
 - 57) Willet, W.C., Stampfer, M.J., Colditz, G.A., Rosner, B.A., and Speizer, F.E. Relation of meat, fat, and fiber intake to the risk of colon cancer in a prospective study among women. *New Engl. J. Med.*, **323**(24):1664-72, Dec 13, 1990.
 - 58) Giovannucci, E., Rimm, E.B., Stampfer, M.J., Colditz, G.A., Ascherio, A., and Willet, W.C. Intake of fat, meat, and fiber in relation to risk of colon cancer in men. *Cancer Res.*, **54**(9):2390-7, May 1, 1994.
 - 59) Hsieh, A.W., McLaughlin, J.K., Chow, W.H., Schuman, L.M., Co Chien, H.T., Gridley, G., Bjelke, E., Wacholder, S., and Blot, W.J. Risk factors for colorectal cancer in a prospective study among U.S. white men. *Int. J. Cancer.*, **77**(4):549-53, Aug 12, 1998.
 - 60) Singh, P.N., and Fraser, G.E. Dietary risk factors for colon cancer in a low-risk population. *Am. J. Epidemiol.*, **148**(8):761-74, Oct 15, 1998.
 - 61) Giovannucci, E., Stampfer, M.J., Colditz, G., Rimm, E.B., and Willet, W.C. Relationship of diet to risk of colorectal adenoma in men. *J. Natl. Cancer Inst.*, **84**(2):91-8, Jan 15, 1992.
 - 62) Anderson, G.H., and Draper, H.H. Effect of dietary phosphorus on calcium metabolism in intact and parathyroidectomized adult rats. *J. Nutr.*, **102**(9):1123-32, Sep 1972.
 - 63) Krishnarao, G.V., and Draper, H.H. Influence of dietary phosphate on bone resorption in senescent mice. *J. Nutr.*, **102**(9):1143-5, Sep 1972.
 - 64) Calvo, M.S. The effects of high phosphorus intake on calcium homeostasis. *Adv. Nutr. Res.*, **9**:183-207, 1994.
 - 65) Calvo, M.S., Kumar, R., and Heath, H. 3d Elevated 823-9, Apr 1998. secretion and action of serum parathyroid hormone in young adults consuming high phosphorus, low calcium diets assembled from common foods. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **66**(4):
 - 66) Metz, J.A., Anderson, J.J., and Gallagher, P.N., Jr. Intake of calcium, phosphorus, and protein, and physical-activity level are related to radial bone mass in young adults women. *Am. J. Clin. Nutr.*, **58**(4):537-42, Oct 1993.
 - 67) Teegarden, D., Lyle, R.M., MacCabe, G.P., MacCabe, L.D., Proulx, W.R., Michon, K., Knight, A.P., Johnston, C.C., and Weaver, C.M. Dietary calcium, protein, and phosphorus are related to bone mineral density and content in young women. *Am. J. Clin. Nutr.*, **68**(3):749-54, Sep 1998.
 - 68) USDA, Meat Safety and Wholesomeness, Unit 2. In: *The Livestock Industry: Production of Lean, Wholesome Meat for the Consumer, Module 1 of The Consumer's Choice Meat Education Program*. Produced by the U.S. Department of Agriculture, Extension Service.
 - 69) Hanrahan, C. The EU's Ban on Hormone-Treated Meat. *Congressional Research Service Report RS20142*, Washington D. C., 1999.
 - 70) Liehr, J.G. Is estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen? *Endoc. Rev.*, **21**(1):40-54, Feb 2000.
 - 71) *Green Book - FDA Approved Animal Drug Products*, 1989-2000. Virginia Polytechnic Institute, Blacksburg, VA, 2000.
 - 72) Loizzo, A., Gatti, G.L., Macri, A., Moretti, G., Ortolani, E., and Palazzesi, S. Italian baby food containing diethylstilbestrol: 3 year later. *Lancet*, **1**(8384):1014-5, May 5, 1984.
 - 73) Loizzo, A., Gatti, G.L., Macri, A., Moretti, G., Ortolani, E., and Palazzesi, S. The case of diethylstilbestrol treated veal contained in homogenized baby foods in Italy. Methodological and toxicological aspects. *Ann. Ist. Super. Sanita.*, **20**(23):215-20, 1984.
 - 74) None of Us Should Eat Extra Estrogen. *Los Angeles Times*, March 24, 1997.
 - 75) Molbak, K., Baggesen, D.J., Aarestrup, F.M., Ebbesen, J.M., Engberg, J., Frydendahl, K., Gerner, S., and Smidt, P.,

- Petersen,A,M., and Wegener,H,C. An outbreak of multidrug-resistant, quinolone-resistant *Salmonella enterica* serotype typhimurium DT104. *New. Engl. J. Med.*, **341**(19):1429-5, Nov 4, 1999.
- 76) Smith,K,E., Besser,J,M., Hedberg,C,W., Leano,F,T., Bender,J,B., Wicklund,J,H., Johnson,B,P., Moore,K,A., and Osterholm,M,T. Quinolone-resistant *Campylobacter jejuni* infection in Minnesota, 1992 -1998. Investigation Team. *New. Engl. J. Med.*, **340**(20):1525-32, May 20, 1999.
 - 77) Collinge,J. Variant Creutzfeldt-jakob disease. *Lancet*, **354**(9175):317-23,Jul 24, 1999.
 - 78) Wilesmith,J,W., Ryan,J,B., and Atkinson,M,J. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin. *Vet. Rec.*, **128**(9):199-203, Mar 2, 1991.
 - 79) Wilesmith,J,W., Wells,G,A., Granwell,M,P., and Ryan,J,B. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies. *Vet. Res.*, **123**(25):638-44, Dec 17, 1988.
 - 80) Will,R,G., Ironside,J,W., Zeidler,M, Cousens,S,N., Estibeiro,K., Alperovitch,A., Poser,S., Pocchiari,M., Hofman,A., and Smith,P,G. A new variant of Creutzfeldt-jakob disease in the U.K. *Lancet*, **347**(9006):921-5, Apr 6, 1996.
 - 81) Tan,L., Williams,M,A., Khan,M,K.,Champion,H,C., and Nielsen,N,H. Risk of transmission of bovine spongiform encephalopathy to humans in the U.S. report of the Council on Scientific Affairs, American Medical Association. *JAMA*, **281**(24):2330-9, Jun 23-30, 1999.
 - 82) Ferguson, N,M., Ghani,A,C., Donnelly,C,A., Denny,G,O., and Anderson,R,M. BSE in NorthernIreland: epidemiological patterns past, present and future. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **265**(1396):545-54, Apr 7, 1998.
 - 83) Doll,R., and Peto,R. The causes of Cancer. *JNCI*, **66**:1191-1308, 1981.
 - 84) Joossens,J,V., and Geboers,J. Dietary salt and risks to health. *Am. J. Clin. Nutr.*, **45**(5 Suppl):1277-88, May 1987.
 - 85) Willett,W,C. Goals for Nutrition in 2000. *CA Cancer J. Clin.*, **49**:331-352, 1999.
 - 86) Park,S., Worobo,R,W., and Durst,R,A. *Escherichia Coli* O157:H7 as an emerging foodborne pathogen: a literature review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **39**(6):481-502, Nov 1999.
 - 87) *Dow Jones Commodity Service*, March 21, 2000.
 - 88) Lijinsky,W., and Shubik,P. Benzo[a]pyrene and other polynuclear hydrocarbons in charcoal-broiled meat. *Science*, **145**:53-55, 1964.
 - 89) Willett,W. Diet and Nutrition. In:*Cancer Epidemiology and Prevention Second Edition*. Schottenfield, D. and Fraumeni, J,F. (Eds.), Oxford University Press, 1986.
 - 90) Appleby,P,N., Thorogood,M., Mann,J,I., and Key,T,J. The Oxford Vegetarian Study: an overview. *Am. J. Clin. Nutr.*, **70**(3 Suppl):525S-531S, Sep 1999.
 - 91) Key,T,J., Thorogood,M., Appleby,P,N., and Burr,M,L. Dietary habits and mortality in 11,000 vegetarians and health conscious people: results of a 17-year follow up. *BMJ*. **313**(7060):775-9, Sep 28, 1996.
 - 92) Whichelow,M,J., and Prevost,A,T. Dietary patterns and their associations with demographic, lifestyle and health variables in a random sample of British adults. *Br. J. Nutr.*, **76**(1):17-30, Jul 1996.
 - 93) Whiteman,D., Muir,J., Jones,L., Murphy,M., and Key,T. Dietary questions as determinants of mortality: the OXCHECK experience. *Public Hlth. Nutr.*, **2**(4):477-87, Dec 1999.
 - 94) Chang-Claude,J., and Frentzel-Beyme,R. Dietary and lifestyle determinants of mortality among German vegetarians. *Int. J. Epidemiol.*, **22**(2):228-36, Apr 1993.
 - 95) Chang-Claude,J., Frentzel-Beume,R., and Eliber,U. Mortality pattern of German vegetarians after 11 years of follow-up. *Epidemiology*, **3**(5):395-401, Sep 1992.
 - 96) Fraser, G,E. Associations between diet and cancer, ischemic heart disease, and all-cause mortality in non-Hispanic white California Seventh-Day Adventists. *Am. J. Clin. Nutr.*, **70**(3 Suppl):532S0538S, Sep 1999.
 - 97) Kahn,H, A.,Phillips,R,L., Snowdon,D,A., and Choi,W. Association between reported diet and all-cause mortality. Twenty-one-year follow-up on 27,530 adult Seventh-Day Adventists. *Am. J. Epidemiol.*, **119**(5):775-87, May 1984.
 - 98) Nube,M., Kok,F,J., Vandenbroucke,J,P., van der Heide-Wessel,C., and van der Heide,R,M. Scoring of prudent dietary habits and its relation to 25-year survival. *J.Am. Diet. Assoc.*, **87**(2):171-5, Feb 1987.
 - 99) Trichopoulou,A., Kouris-Blazos,A., Wahlqvist,M,L.,Gnardellis,C., Lagiou,P., Polychopoulos,E., Vassilakou,T., Lipworth,L., and Trichopoulos,D. Diet and overall survival in elderly people. *BMJ*. **311**(7018):1457-60, Dec 2, 1995.
 - 100) Kouris-Blazos,A., Gnardellis,C., Wahlqvist,M,L., Trichopoulos,D., Lukito,W., and Trichopoulou,A. Are the advantages of the Mediterranean diet transferable to other populations? A cohort study in Melbourne, Australia.

- Br. J. Nutr.*, **82**(1):57-61, Jul 1999.
- 101) Lasheras,C., Forastiere,F., and Patterson,A,M. Mediterranean diet and age with respect to overall survival in institutionalized, nonsmoking elderly people. *Am. J. Clin. Nutr.*, **71**(4):987-92, Apr 2000.
- 102) Fortes,C., Forastiere,F., Farchi,S., Rapiti, E., Pastori,G., Peucci,C,A. Diet and overall survival in a cohort of very elderly people. *Epidemiology* **2000**;4:440-445.
- 103) Kant,A,K., Block,G., Schatzkin,A, Zeigler,R,G., and Nestle,M. Dietary diversity in the U.S. population, NHANES II , 1976-1980, *J. Am. Diet.Assoc.*, **91**(12):1526-31, Dec 1991.
- 104) Davidson,S,S., and Passmore,R. Human Nutrition and Dietetics. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1979.
- 105) Beeson,W,L., Mills,P,K., Phillips,R,L., Andress,M., and Fraser,G,E. Chronic disease among Seventh-Day Adventists, a low-risk group. Rationale, methodology, and description of the population. *Cancer*, **64**(3):570-81, Aug 1, 1989.
- 106) Willett,W,C. Convergence of philosophy and science: the third international congress on vegetarian nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.*, **70**(3 Suppl):434S-438S, Sep 1999.
- 107) Messina,M,J. Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. *Am. J. Clin. Nutr.*, **70**(3 Suppl):439S-450S., Sep 1999.
- 108) Otter,J,D., and Steibmetz,K. Vegetables, fruit and phytoestrogens as preventive agents. *IARC Sci. Publ.*, (**139**):61-90,1996.
- 109) Fraser,G,E., Sabate,J.,Beeson,W,L.,and Strahan,T,M. Possible protective effect of nut consumption on risk of coronary heart disease. The Adventist Health Study. *Arch. Intern.Med.*, **152**(7):1416-24, Jul 1992.
- 110) Singh,P,N., Tonstad,S., Abbey,D,E., and Fraser,G,E. Validity of selected physical activity questions in white Seventh-Day Adventists and non-Adventists. *Med. Sci.Sports. Exerc.*, (**8**)1026-37, Aug 28,1996.
- 111) Halpern. M,T., Gillespie,B,W., and Warner,K,E. Patterns of absolute risk of lung cancer mortality in former smokers. *J. Natl. Cancer Inst.*, **85**(6):457-64, Mar 17,1993.
- 112) *Designing Foods: Animal Product Options in the Marketplace*. Natinonal research Council, National Academy Press, Washington D.C.,1988.
- 113) Sram,R,J., and Binkova,B. Molecular epidemiology studies on occupational and environmental exposure to mutagens and carcinogens, 1997-1999. *Environ. Hlth. Perspect.*, **108** Suppl 1:57-70, Mar 2000.
-

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

ニューフードインダストリー 第56巻 第4号

印刷 平成 26 年 3 月 25 日

発行 平成 26 年 4 月 1 日

発行人 平井 朋美

編集人

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 モリモト印刷株式会社

定価 本体2,000円 + 税 (送料100円)

email:newfood@newfoodindustry.com