

# New Food Industry

食品加工および資材の新知識

<http://www.newfoodindustry.com>

2016 Vol.58 No.4

# 4

## 論 説

- 椎茸菌糸体培養培地抽出物 (LEM) の神経保護作用  
Neuroprotective effects of a water-soluble extract from  
the culture medium of *Lentinus edodes* mycelia (LEM)

- 食用色素アントシアニンのサイエンス –化学, 体内動態と機能, 将来展望–
- 品質危害への対応強化について
- 検査面からみたノロウイルス感染症の発生様式の特徴とノロウイルス検査法の現状
- 酵素耐熱化の実例 –ミルクオリゴ糖合成酵素の耐熱化–

## 連載コラム

- 野山の花 –身近な山野草の食効・薬効–  
アケビ *Akebia quinata* Decaisne (アケビ科 Lardizabalaceae)
- 健康食品のエビデンス 第 12 回 アスタキサンチン

## 連 載 これだけは知っておきたい 豆知識

- 金属の溶媒抽出法について ~鉛を例に~

## 特別寄稿 Review

- Liposome-Encapsulated Nisin as Preventive Strategy against Dental Caries

## ベジタリアン栄養学

- 歴史の潮流と科学的評価  
(第5節 ベジタリアン食の世界規模の問題と非栄養学的視点)

## Report

- ミラノ万国博覧会2015を訪れて (前編)

## 組織の活性化と人材の育成

- 企業組織における女性の雇用と活用  
Global organizations, especially regarding woman workers.

## News Release

- 松谷化学工業 「第 23 回芦原科学大賞」を受賞」



### 論説

- 椎茸菌糸体培養培地抽出物 (LEM) の神経保護作用  
Neuroprotective effects of a water-soluble extract  
from the culture medium of *Lentinus edodes* mycelia (LEM)  
……堀内 重紀, 岡崎 真理, 岩田 直洋, 神内 伸也, 浅野 哲, 飯塚 博, 日比野 康英 1
  
- 食用色素アントシアニンのサイエンス —化学, 体内動態と機能, 将来展望—  
……………津田 孝範 11
  
- 品質危害への対応強化について  
……………齋藤 希 21
  
- 検査面からみたノロウイルス感染症の  
発生様式の特徴とノロウイルス検査法の現状  
……………福田 伸治 25
  
- 酵素耐熱化の実例 —ミルクオリゴ糖合成酵素の耐熱化—  
……………北岡 本光 33

### 連載コラム

- 野山の花 —身近な山野草の食効・薬効—  
アケビ *Akebia quinata* Decaisne (アケビ科 Lardizabalaceae)  
……………白瀧 義明 38
  
- 健康食品のエビデンス 第12回 アスタキサンチン  
……………濱舘 直史 40

### 連載 これだけは知っておきたい 豆知識

- 金属の溶媒抽出法について ~鉛を例に~  
……………一般財団法人 食品分析開発センター SUNATEC 44

### 特別寄稿 Review

- Liposome-Encapsulated Nisin as Preventive Strategy against Dental Caries  
..... YOSHITAKA SHIMIZU, YASUHIRO KURODA, YASUHIKO MIBE,  
TOSHIMITSU KAJIWARA, YUTAKA SAKURAI and KAZUO YAMAKAMI 47

### ベジタリアン栄養学

- 歴史の潮流と科学的評価  
(第5節 ベジタリアン食の世界規模の問題と非栄養学的視点)  
17章 食肉生産の環境への影響とベジタリアン主義  
..... ジョアン・サバテ, 訳: 山路 明俊 57

### Report

- ミラノ万国博覧会 2015 を訪れて (前編)  
..... 尾作 浩司 71

### 組織の活性化と人材の育成～

- 企業組織における女性の雇用と活用  
Global organizations, especially regarding woman workers.  
..... 大石 隆介 79

### News Release

- 松谷化学工業「第23回芦原科学大賞」を受賞  
..... 86

**おいしさと健康に真剣です。** 酵素分解調味料なら  
大日本明治製糖へ

酵母エキス系調味料

**コクベス**

セラチン&小麦グルテン

酵素分解調味料

**エンザップ**

**new** 発酵調味料  
**D&M**  
ディアンドエム

**新発売!** 乳製品にベストマッチな調味料  
**コクベス**  
ラクティックイーストエキス  
乳加工品・製パン・製菓・チーズ・バターへの  
コクづけ、味や風味の底上げなど、ユニークな  
特長がある乳糖酵母エキスです。

**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

# 椎茸菌糸体培養培地抽出物 (LEM) の神経保護作用

## Neuroprotective effects of a water-soluble extract from the culture medium of *Lentinus edodes* mycelia (LEM)

堀内 重紀 (HORIUCHI Shigenori)<sup>1</sup> 岡崎 真理 (OKAZAKI Mari)<sup>1</sup> 岩田 直洋 (IWATA Naohiro)<sup>1</sup>  
神内 伸也 (KAMIUCHI Shinya)<sup>1</sup> 浅野 哲 (ASANO Satoshi)<sup>2</sup> 飯塚 博 (IIZUKA Hiroshi)<sup>3</sup>  
日比野 康英 (HIBINO Yasuhide)<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> 城西大学薬学部 医療栄養学科

<sup>2</sup> 国際医療福祉大学薬学部 薬学科

<sup>3</sup> 野田食菌工業株式会社

<sup>1</sup> Department of Clinical Dietetics and Human Nutrition, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University

<sup>2</sup> Department of Pharmaceutical Sciences, School of Pharmacy, International University of Health and Welfare

<sup>3</sup> Noda Shokukinkogyo Co., Ltd.

**Key Words :** 椎茸菌糸体培養培地抽出物 (LEM) 4血管閉塞 脳虚血 酸化ストレス アポトーシス  
Water-soluble extract from culture medium of *Lentinus edodes* mycelia (LEM), Four-vessel occlusion (4VO), Ischemia, Oxidative stress, Apoptosis

### Abstract.

Oxidative stress plays an essential role in the pathogenesis of transient cerebral ischemic injury. A water-soluble extract from the culture medium of *Lentinus edodes* mycelia (LEM), which is commercially available as a nutritional supplement, was prepared by hot-water treatment from a solid medium composed of bagasse and defatted-rice bran overgrown for about 4 months with its mycelia. LEM is a potent free radical scavenger and may decrease brain injury associated with reperfusion. This study examined the neuroprotective effects of oral administration of LEM on cerebral ischemic damage induced by 4-vessel occlusion (4VO) followed by reoxygenation in rats.

LEM inhibited apoptosis by oxidative stress of PC12 cells that were differentiated to nerve cells. Moreover, in using a 4VO as the brain ischemia model, hippocampus damage was observed by Nissl staining. The marked reduction of cell density in the CA1 region was observed in the 4VO group compared with the sham-operation group. This reduction was significantly inhibited by the oral administration of LEM. These results suggest that oral supplementation of LEM relieves the cerebral ischemic injury, which may be attributed to the anti-oxidant and anti-apoptosis effects of LEM.

**\*Correspondence to:** Yasuhide Hibino, Department of Clinical Dietetics and Human Nutrition,  
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University,  
1-1 Keyakidai Sakado, Saitama 350-0295, Japan  
TEL : +81-49-271-7285 FAX : +81-49-271-7284 E-mail : seitaib@josai.ac.jp

連絡先 : 〒 350-0295 埼玉県坂戸市けやき台 1-1  
城西大学薬学部 医療栄養学科生体防御学研究室  
Tel : 049-271-7285 Fax : 049-271-7284 E-mail : seitaib@josai.ac.jp

## はじめに

高齢化率の上昇に伴う認知症の増加は、医療費の増大と患者およびその家族のQOLを低下させるなど、高齢化が加速する日本のみならず世界的に大きな社会問題となっている。認知症には、主にアルツハイマー型認知症 (AD) と血管性認知症 (VaD) があるが、AD は大脳のびまん性萎縮であるのに対して、VaD は動脈硬化や血管壊死などの脳血管障害による脳実質の病変が誘因となる<sup>1)</sup>。そのため、VaD は脳血管障害の一種とされ、その危険因子には加齢の他に高血圧や糖尿病、高脂血症などがある<sup>2)</sup>。疫学調査から、欧米では VaD に比べて AD が多く、日本では逆に VaD が多いとされてきたが、最近では脳血管性疾患の減少から VaD は減少傾向を示している<sup>3)</sup>。しかし、近年の高齢化率や危険因子となる生活習慣病の増加、また若年性認知症の約4割が VaD によるものと考えれば、軽視できない疾患であることに疑う余地はない。

脳虚血のモデル動物は大きく二つに分類できる。一つは、一般に stroke と呼ばれ局所脳虚血の病態を解明するための局所脳虚血モデル (focal ischemia model)、もう一つは、手術中の心停止などの全脳虚血の病態を解明するための全脳虚血モデル (global ischemia model) である。4血管閉塞 (4VO) モデルは、後者の全脳虚血モデルに分類され、海馬や大脳皮質、線条体などへの選択的脆弱性を示すことから、スナネズミの両側総頸動脈閉塞モデルと並び遅発性神経細胞死 (delayed cell death) や虚血耐性現象のメカニズムなど神経細胞死の研究に欠かせない実験モデルとなっている<sup>4)</sup>。また、このモデルは、記憶に関わる海馬に選択的脆弱性を示し、虚血により記憶や学習能力に影響を及ぼすことがモーリス水迷路を用いた実験により示されたことから、VaD モデルとしても用いられている<sup>5)</sup>。

虚血による細胞死には、グルタミン酸・カルシウム説やアポトーシス説、カルパイン・カテプシン説があり、脳血管障害のストレス

が軽度で、かつ持続時間が短ければネクローシスではなくアポトーシスを生じる<sup>6)</sup>。Wistar ラットに4VOを5分間行い再灌流した例では、海馬 CA1 重領域において、2日目で神経細胞の変形、3日目で脱落が起こり始め、4日後には正常な神経細胞の大部分がアポトーシスにより消失する<sup>7)</sup>。

一過性脳虚血は、脳血流の極端な低下または途絶により代謝基質 (酸素、グルコースなど) の供給障害が生じ、過剰なグルタミン酸放出に伴い NMDA 受容体を介して細胞内カルシウム濃度が上昇する。このため、カルシウム依存性酵素群が活性化して細胞死が誘導され<sup>6,8)</sup>、さらに、虚血後の再灌流によって活性酸素種 (ROS) が生成する。ROS は、スーパーオキシドアニオン ( $O_2^-$ )、過酸化水素 ( $H_2O_2$ )、ヒドロキシラジカル ( $\cdot OH$ )、一重項酸素 ( $^1O_2$ ) など酸素分子より反応性の高い酸素種の総称であり、脳虚血再灌流時に発生する ROS は、主に  $O_2^-$ 、 $\cdot OH$ 、NO であると考えられている<sup>9)</sup>。生体内には、NAD (P) H オキシダーゼやキサンチンオキシダーゼ、シクロオキシゲナーゼなどの ROS の産生系が存在する一方で、グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) やカタラーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) など ROS 消去系としての抗酸化機構が存在する。過剰の ROS は、生体の構成成分であるタンパク質や核酸、脂質などの機能を障害して、細胞障害を誘発する。特に、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) などの神経変性疾患の発症には、ROS が関与していると考えられている<sup>10)</sup>。

ROS を消去するラジカルスカベンジャーは、酸化ストレスによる傷害に対して神経保護作用を示し、ヒト生体内には、生体内抗酸化成分としての非酵素タンパク質や種々の還元性物質が、また抗酸化ビタミンとしてビタミン C やビタミン E が抗酸化作用に寄与している。さらに、医薬品としてフリーラジカル消去能を有するエダラボンが、脳梗塞急性期に伴う神経症候や機能障害の改善に利用される<sup>11)</sup>。加えて、

抗酸化活性を有する食品・食品成分にも、酸化ストレスに対して神経保護作用を示す物質が数多く含まれていることが報告されている。

我々は、これまでに食品のスーパーオキシドアニオン消去能、フリーラジカル消去能、過酸化脂質生成抑制能を指標とした食品のスクリーニングを行ってきた。その中で、上記活性を示す椎茸菌糸体培養培地抽出物 (LEM) に注目した。LEM は、シイタケ菌糸体を固形培地に接種し、一定期間培養後、子実体発生直前に培地とともに熱水抽出・凍結乾燥させたものであり、40年以上にわたる食経験を有する滋養強壮を目的とした健康食品として利用されている<sup>12)</sup>。本研究では、LEM の一過性脳虚血障害に対する神経保護作用を明らかにするとともに、血管性認知症の予防あるいは治療効果に関する

知見を得ることを目的とした。

## 1. 実験材料および方法

### 1-1. 食品・食品成分

本研究で用いた LEM は、野田食菌工業 (株) において製造された「LEM」を使用した。LEM の製造工程を図 1 に示した。椎茸菌糸体ペレットをバガス (砂糖キビ搾汁残渣) と脱脂した米糠の混合固形培地に接種し、4 ヶ月間培養後、子実体発生直前に培地ごと破碎し、蒸留水で懸濁、熱水抽出した。抽出物を珪藻土上で濾過した後、メンブランフィルター (0.45 μm) にて濾過滅菌し、濾液の噴霧乾燥品を LEM とした。ビタミン C {L (+)-ascorbic acid, V. C} および Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl chroman-2-carboxylic acid) は、和光純薬工業から購入した。

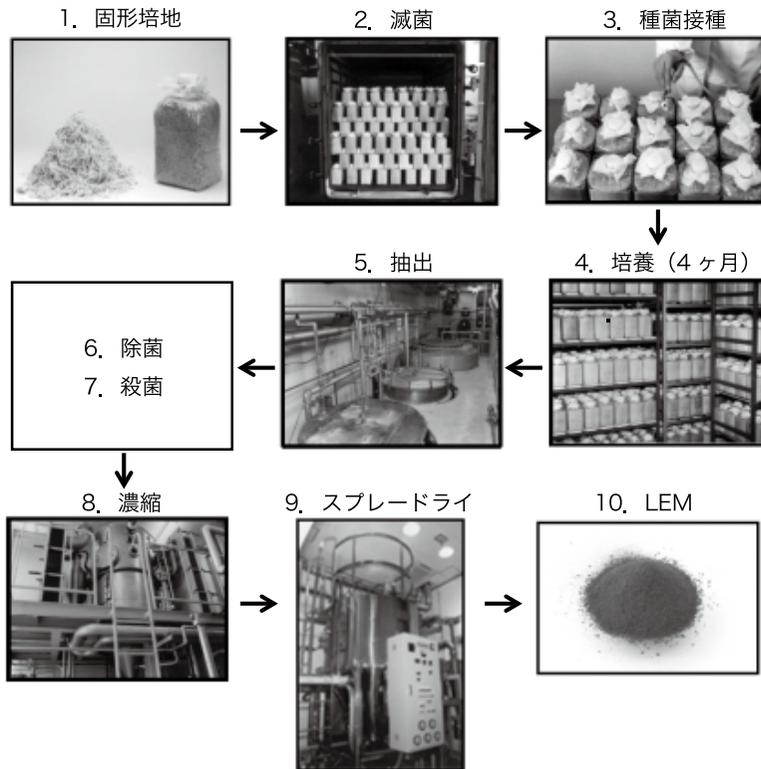


図 1 椎茸菌糸体培養培地抽出物 (LEM) の製造工程

LEM の製造工程を示した。椎茸菌糸体ペレットをバガス (砂糖キビ搾汁残渣) と脱脂した米糠の混合固形培地に滅菌後に接種し、4 ヶ月間培養後、子実体発生直前に培地ごと破碎し、蒸留水で懸濁、熱水抽出した。抽出物を珪藻土上で濾過した後、メンブランフィルター (0.45 μm) にて濾過滅菌し、濃縮後に濾液の噴霧乾燥品を LEM とした。

ビタミン E{(+)- $\alpha$ -tocopherol from vegetable oil, V. E} は、シグマアルドリッチジャパンから購入した。

### 1-2. 培養細胞と分化誘導

未分化のラット副腎髄質褐色細胞腫由来 PC12 細胞 { (財) ヒューマンサイエンス振興財団 } は、poly-D-lysine コートした 60 mm dish (Becton dickinson) に播種し、10% 非働化馬血清 (Tissue culture biologicals), 5% 非働化牛胎児血清 (Tissue culture biologicals), 24 mM NaHCO<sub>3</sub>, Antibiotic-antimycotic {100 unit/mL penicillin, 100  $\mu$ g/mL streptomycin, 0.25  $\mu$ g/mL amphotericin B (Gibco)} を添加した RPMI 1640 培地 (Gibco) で、37°C, 5% CO<sub>2</sub> 下で培養した。神経細胞への分化は、PC12 細胞をディッシュに接着させた後、神経成長因子 {NGF (2.5S), コスモ・バイオ} を無血清培地中に 50 ng/mL に調製して添加し、3 日間培養して誘導した<sup>13)</sup>。

### 1-3. 細胞生存率

細胞の生存率は、MTT assay により評価した。Poly-D-lysine コートした 24-well plate (Becton dickinson) に PC12 細胞を  $5 \times 10^4$  cells/well 播種し、2 日後に NGF を添加した。続いて、分化後の PC12 細胞に、無血清培地に溶解した抗酸化食品を 1 時間添加した。その後、100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (和光純薬工業) を抗酸化食品の存在下で 1 時間保温した。培地を取り除いた後、無血清培地で 0.25 mg/mL に調製した MTT { (3,4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (和光純薬工業) } を添加した。3 時間後に培地を取り除き、600  $\mu$ L/well のジメチルスルホキシド (DMSO, 和光純薬工業) を加え、10 分間反応後、吸光度 (570 nm および 630 nm) を Wallac 1420 ARVOsx を用いて測定した<sup>13,14)</sup>。

### 1-4. アポトーシス評価

細胞のアポトーシスは、TUNEL 染色により評価した。Poly-D-lysine コートした 6-well plate (Becton dickinson) に PC12 細胞を  $2.5 \times 10^5$  cells/well 播種して、24 時間後に NGF を添加した。分化後の PC12 細胞に抗酸化食品を添加

し、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理して培地を取り除いた後、無血清培地にて 24 時間培養した。培養後、Trypsin-EDTA (Gibco) で処理し、5,000 rpm, 5 分間遠心して上清を取り除き細胞を回収した。細胞を PBS (137 mM NaCl, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.68 mM KCl, 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 中に  $2 \times 10^6$  cells/mL となるように懸濁し、60  $\mu$ L を浮遊細胞収集バケツ (SC-2, トミー精工) と遠心機 (LC-100, トミー精工) を用いて 1,000 rpm, 3 分間遠心し、アミノシランコートスライドグラス (松浪硝子工業) に接着させた。接着させた細胞を 10 mM PBS (7.75 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.90 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O, 145 mM NaCl) で 4% に希釈したホルマリン (和光純薬工業) により 10 分間固定した後、浸透化溶液 (3.88 mM クエン酸三ナトリウム二水和物, 0.1% TritonX-100 (Sigma)) にて 2 分間反応させた。その後、Apoptosis in situ detection kit wako (和光純薬工業) を用いて細胞を染色し、さらにマイヤー・ヘマトキシリン (和光純薬工業) で対比染色を行った。

染色後、70%, 95%, 100% に調製したエタノール (和光純薬工業) で脱水し、キシレン (和光純薬工業) で透徹した。続いて、標本用封入剤 (MGK-S, 松浪硝子工業) で封入し、顕微鏡 (BX51W1, オリンパス) を用いて観察した。画像解析は、CCD カメラ (DP-50, オリンパス) および Lumina vision (三谷商事) を用いた。観察結果は、200  $\mu$ m<sup>2</sup> の全細胞数とアポトーシス陽性細胞数を計測し、Apoptosis index (%) = (アポトーシス陽性細胞数/全細胞数)  $\times$  100 として表した<sup>15)</sup>。

### 1-5. PC12 細胞のタンパク質抽出処理

Poly-D-lysine コートした 100 mm dish (Becton dickinson) に PC12 細胞を  $5 \times 10^6$  cells 播種し、24 時間後に NGF を添加した。分化させた PC12 細胞に抗酸化食品を添加後、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理して培地を取り除き、無血清培地で一定時間培養した。培養後、ディッシュに接着した PC12 細胞をスクレイパーを用いて回収した。回収後、5,000 rpm, 5 分間、4°C で遠心して上清を取り除き、沈殿に NET-N lysis buffer {50

mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.1% ノニデット P-40 (NP-40, ナカライテスク), 0.1% プロテアーゼ阻害剤ミックス (和光純薬工業) } を加えて懸濁し, 10 分間インキュベートした。その後, 17,000 g, 4°C, 10 分間遠心して得られた上清をタンパク質抽出画分とした。

#### 1-6. タンパク質定量

タンパク質定量は, 牛血清アルブミン (BSA, Sigma) を標準品として, Bio Rad Protein assay (Bio-Rad laboratories) を用いて行った。

#### 1-7. caspase-3 の活性化解析

caspase-3 の活性化は, western blot 法により評価した。SDS-PAGE 用サンプルは, タンパク質含量が 30  $\mu$ g となるように調製した。タンパク質縦型電気泳動システム (ミニプロテイン 3 セル, Bio-Rad laboratories) を用いて, 調製サンプルを 15% SDS- ポリアクリルアミドゲルで電気泳動 (200 V, running buffer : 0.3% Tris, 1.44% グリシン, 0.1% SDS) した。泳動後, タンパク質ブロッティング装置 (トランスブロット SD セル, Bio-Rad laboratories) を用いて, Hybond-ECL™ ニトロセルロースメンブラン (Amersham biosciences) に転写した。続いて, メンブランを 5% スキムミルク (和光純薬工業) で低温室にて一晩ブロッキング反応を行った。一次抗体は, 抗 caspase-3 抗体 (#9662, Cell signaling) を 1 : 500, 抗  $\beta$ -actin 抗体 (A2228-200UL, Sigma) を 1 : 10,000 で 1 時間反応させた。二次抗体は, それぞれ抗 rabbit IgG HRP 抗体 (NA934V, Amersham biosciences) を 1 : 2,000, 抗 mouse IgG HRP 抗体 (NA931V, Amersham biosciences) を 1 : 10,000 で 1 時間反応させた。発光反応は, Amersham ECL Plus Western blotting detection reagents (GE healthcare) を用いて 5 分間行い, X 線フィルム (Amersham Hyperfilm™ ECL, GE healthcare) に露光後, 現像した。バンドの強度は, image gauge (Fuji film) を使用して定量化した<sup>13, 16)</sup>。

#### 1-8. 使用動物等

8 週齢の SD 系雄性ラット (三協ラボサービ

ス) を, 温度 23  $\pm$  2°C, 湿度 55  $\pm$  10%, 12 時間明暗サイクル (明期 7:00 ~ 19:00) の環境下にて, 粉末飼料 (CE-2, 日本クレア) および水を自由摂取させ馴化した。1 週間の予備飼育を行った 9 週齢のラットに, それぞれ蒸留水, LEM (1 g/kg), V. E (100 mg/kg) を胃ゾンデを用いて 1 日 1 回 1 週間投与した 3 群を用いた。LEM は水に, V. E はサフラワー油 (和光純薬工業) に溶解した。なお, すべての動物実験は, 環境省の「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」および「城西大学動物実験規定」に従って行った。

#### 1-9. 4 血管閉塞 (4VO) 一過性脳虚血モデルの作製

ラットにペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg, 東京化成工業) を腹腔内投与し, 麻酔下で脳定位固定装置 (SN-2N, 成茂科学器械研究所) に固定し, 第 1 頸椎を露出させた。続いて, 実験動物用バイポーラ高周波電気メス (VETROSON V-10 Bi-Polar electrosurgical unit, Summit hill laboratories) を用いて, 第 1 頸椎の両側の椎骨動脈を電気焼灼して閉塞させた。23 時間後, サンプルとなる食品・食品成分を経口投与し, 1 時間後に 4% ハロタン (2-bromo-2-chloro-1,1,1-trifluoroethane : 武田薬品工業) で導入麻酔後, ラットを仰臥位に固定し, 頸部正中部分を切り開いて両側の総頸動脈を露出させた。続いて, 総頸動脈を縫合糸で 15 分間閉塞した。この間, デジタル温度計 (Microcomputer Thermometer 7001H, physitemp instruments) で直腸温を計測しながら, ヒートランプ (アズワン) およびヒートパッド (マルカン) でラットの体温を一定に保った。その後, 縫合糸をほどこいて血流を再開させ, 切開した部分を縫合糸で縫合した。なお, 擬似手術 (Sham-operation) 群には, 総頸動脈を閉塞しないこと以外は同様の処置を行った。再灌流から 5 日後に, ハロタン (武田製薬工業) 麻酔下で脳を摘出し, 4% パラホルムアルデヒド (和光純薬工業) で浸漬固定した。

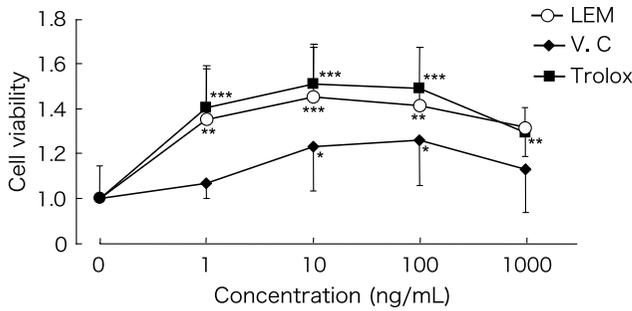


図2 LEMによる細胞生存率の濃度依存性

過酸化水素 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) に対する LEM の保護作用を, MTT assay により PC12 細胞の生存率から評価した。LEM, ビタミン C (V.C), Trolox (水溶性ビタミン E) それぞれ 1, 10, 100, 1000 ng/mL となるように添加後, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 μM) を曝露させた。結果は, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理のみの細胞生存率を 1 とし, 平均値 ± 標準偏差として表示した。統計的有意差は, 一元配置分散分析 (ANOVA) 後, Tukey の検定により解析した。\**p*<0.05, \*\**p*<0.01, \*\*\**p*<0.001 vs. 0 ng/mL (n=3-13)

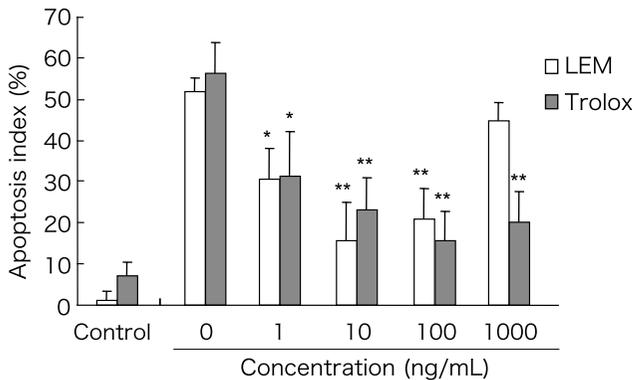


図3 LEMによるアポトーシ抑制作用の評価

LEMによるアポトーシ抑制作用を, TUNEL 染色により評価した。結果は, 200 μm<sup>2</sup> の範囲におけるアポトーシ陽性細胞数および全細胞数を計測し, Apoptosis index (%) = 陽性細胞数 / 全細胞数を平均値 ± 標準偏差として表示した。統計的有意差は, 一元配置分散分析 (ANOVA) 後, Tukey の検定により解析した。\**p*<0.01, \*\**p*<0.001 vs. each 0 ng/mL (n=3-4)

### 1-10. ニッスル染色による評価

海馬 CA1 垂領域における神経細胞を, ニッスル染色により評価した。固定した脳サンプルを用いて, 大型滑走式マイクローム・炭酸ガス凍結器 (ROM-380/CT-50, 大和光機工業) により, 30 μmm 厚の組織切片を作製した。切片を MAS コートスライドガラス (松浪硝子工業) に接着させた後, 60℃ に加温した 0.1% cresyl violet acetate (和光純薬工業) 中に 50 分間浸漬

した。続いて, 70%, 95%, 100% エタノールの順で脱水した後, キシレンにて透徹し<sup>7,17)</sup>, 顕微鏡 (BX51W1, オリンパス) を用いて観察した。

### 1-11. 統計処理

データは, 平均値 ± 標準偏差として表示し, 一元配置分散分析 (ANOVA) 後, Tukey's の検定により解析した。検定における有意水準は 5% とした。

## 2. 結果

### 2-1. 細胞生存率

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の PC12 細胞に対する作用を, MTT assay によって評価した。抗酸化食品を培地に添加することによって PC12 細胞の生存率が上昇したが, その効力は Trolox と LEM で最も強く, 続いて V.C であった。Trolox では, 1 ng/mL から細胞生存率の有意な上昇が認められたが, 1000 ng/mL では生存率は減少した。LEM についても, 1 ng/mL から細胞生存率の有意な上昇が認められ, 100-1000 ng/mL ではやや低下傾向ではあるものの有意な上昇を示した。一方, V.C については, 1 ng/mL では細胞生存率の上昇はほとんど認められず, 10-100 ng/mL で有意な上昇が認められたが, 1000 ng/mL では生存率は減少した (図 2)。

### 2-2. アポトーシ抑制作用の評価

細胞生存率の上昇がアポトーシ抑制作用によるものかを評価するために, TUNEL 染色を行った。未処理の Control では, 陽性細胞はほとんど認められず, 100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理によってアポトーシ陽性細胞が増加した。LEM 1 ng/mL の添加でアポトーシ陽性細胞は有意に減少し, 10-100 ng/mL でさらに顕著であった。しかし, 1000 ng/mL では逆に陽性細胞が増加した。Trolox は, 1 ng/mL からアポトーシ陽性細胞が有意に低下し, 10-1000 ng/mL でさらに減少した (図 3)。

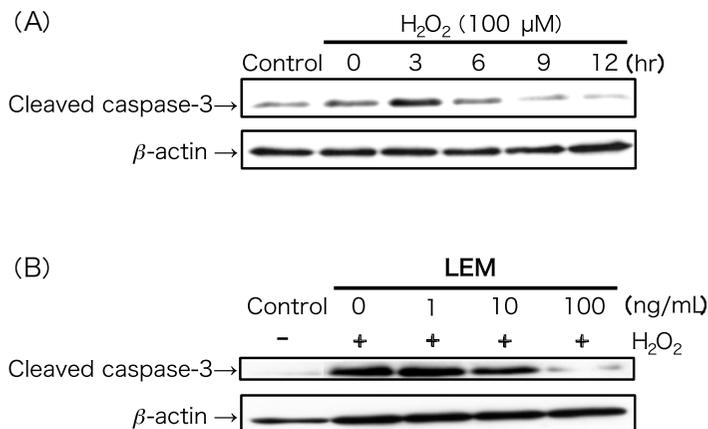


図4 LEMによるcaspase-3の活性化抑制

LEMによるcaspase-3の活性化抑制作用を、western blot法により解析した。PC12細胞にLEM(1, 10, 100 ng/mL)を添加後、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>処理した。細胞からタンパク質を抽出し電気泳動後、常法に従って抗caspase-3抗体を用いて解析した。(A) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>処理後のcaspase-3の経時変化 (B) LEMの濃度依存的caspase-3活性化抑制作用

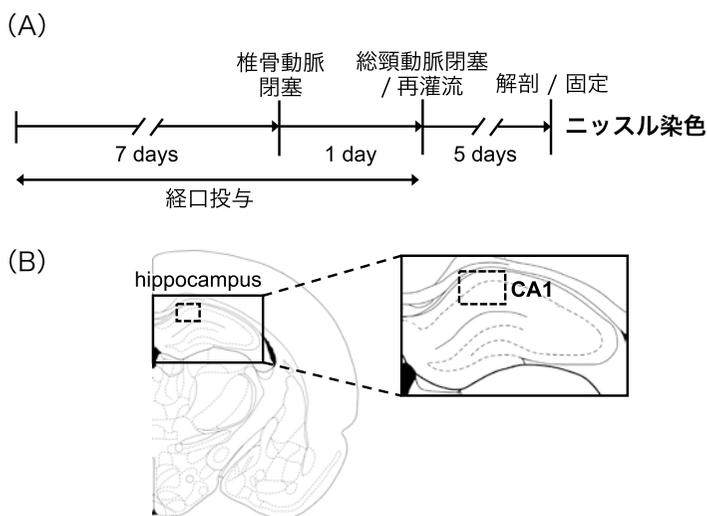


図5 動物実験概要

(A) ラットに蒸留水, LEM (1 g/kg), ビタミンE (V. E; 100 mg/kg) を1週間経口投与する3群を作製した。ラット脳の両側椎骨動脈を閉塞させて1日後、両側総頸動脈を15分間閉塞させた後、血流を再開させた。5日後に解剖し、摘出した脳をニッスル染色した。(B) Interaural 5.70 mm, Bregma -3.30 mmの脳断面図を示した(左図)。ラット海馬CA1亜領域(右図)における神経細胞の保護作用を評価した。

アポトーシスのシグナルカスケードの一つであるcaspase-3の活性化を、western blot法を用いて解析した。caspase-3は、不活性化状態では35 kDaで存在するが、活性化によって17 kDa

のフラグメントが形成される。本実験条件下では、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>処理後3時間で17 kDaのフラグメントが最も増加したことから、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>処理終了から3時間後にサンプルを採取した(図4A)。PC12細胞の培地にLEMを1-100 ng/mLの濃度で添加後、100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>処理し、caspase-3の活性化をwestern blot法により解析した。その結果、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>処理によって誘導された活性化caspase-3の産生が、10 ng/mL以上のLEMにより濃度依存的に抑制された(図4B)。

### 2-3. ニッスル染色による海馬CA1亜領域の評価

培養細胞で効果を示した抗酸化食品が、動物個体においても神経保護作用を示すかについて検討するために、4血管閉塞一過性脳虚血モデルラットを用いて検討した(図5)。擬似手術を行ったSham群では、海馬CA1亜領域における神経細胞の変性、脱落は認められなかった。一方、H<sub>2</sub>O経口投与群では4VO/Re処置により、海馬CA1亜領域の神経細胞が脱落し、周りに散乱した状態が観察できた。しかし、LEMまたはV. Eを経口投与した群においては、H<sub>2</sub>O経口投与群と比較して、海馬CA1亜領域の神経細胞の層の消失が減少し、脱落が抑制された(図6)。

### 3. 考察

本研究では、一過性脳虚血を特徴とする血管性認知症(VaD)モデルの4VO/Reモデルを用いて、LEMのVaDに対する効果を検討した。一過性脳虚血は、虚血後の再灌流によって

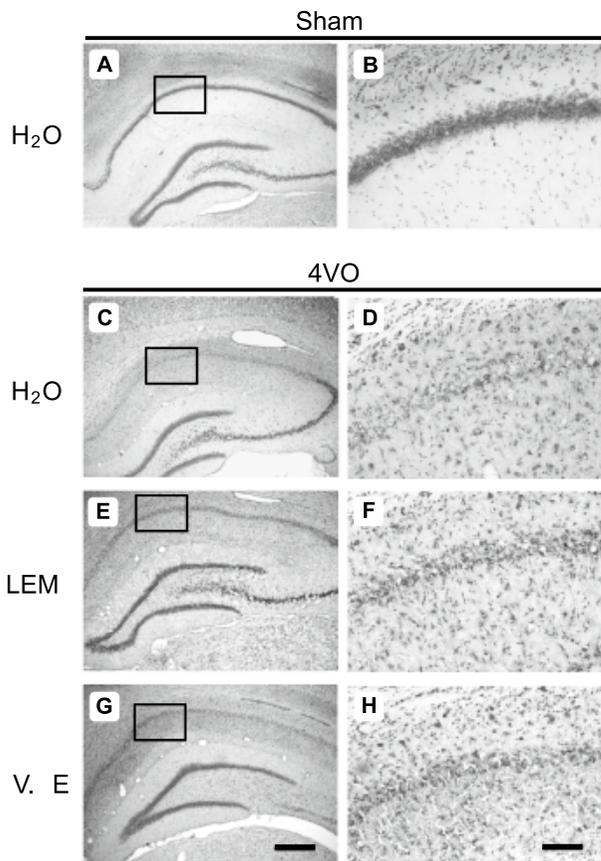


図6 4血管閉塞一過性脳虚血モデルラットによるLEMの神経細胞保護効果

海馬CA1領域のニッスル染色画像。(A, B):4VO擬似手術(Sham)群, (C, D):水投与4VO/Re処置群, (E, F):LEM(1g/kg)投与群, (G, H):V. E(100mg/kg)投与群。(A, C, E, G):scale=0.5mm, (B, D, F, H):scale=100μm

ROSが生成することから、初めにH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>処理したPC12細胞を用いて、LEMの神経細胞保護作用を評価した。MTT assayの結果から、LEMはTroloxと同様に強い神経細胞保護を示し、V. Cにも弱いながらその効果が認められた。TUNEL染色において、LEMとTroloxの両者はともに低濃度においてアポトーシス陽性細胞数を有意に減少させたが、LEMの高濃度下ではアポトーシス抑制作用が消失した。従って、LEMは酸化ストレス下の細胞生存率を高め、アポトーシスを抑制すると考えられる。しかし、LEMの高濃度条件下では細胞生存率が低下したことから、LEM中の抗酸化成分による細

胞保護作用とアポトーシス抑制作用は、LEM中の他の成分等の影響などによる有効域があることを示唆した。これまでに、PC12細胞をH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>処理すると、細胞内のROSとカルシウム濃度が上昇して過酸化脂質の産生が亢進し、mitochondrial membrane potential (MMP)の消失によってアポトーシスが誘導されるが、抗酸化物質がこれら現象を抑制することで神経保護作用を示すことが報告されている<sup>18)</sup>。また、種々の抗酸化物質がグルタチオン(GSH)量とカタラーゼ活性を上昇させ、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>処理による細胞のアポトーシスを抑制してその生存率を上昇させるとの報告もあり<sup>14)</sup>、LEMの神経細胞保護作用は、これらと類似した機構によるものと考えられる。

そこで、LEMのアポトーシス抑制作用機構を検討するために、アポトーシスのシグナルカスケードの一つであるcaspase-3の活性化能をwestern blot法を用いて解析した。その結果、細胞内のcaspase-3が活性化されるH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>処理3時間後において、LEMは濃度依存的にその活性を抑制した。このことから、LEMによる神経細胞保護作用は、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の酸化ストレス軽減によるアポトーシス抑制が寄与していると考えられる。

近年、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>処理に対して神経保護作用を示す物質の解析において、PC12細胞を用いたアポトーシスカスケードの抑制に関する解析が数多く行われている。本研究で用いたcaspase-3の活性化は、カスケード上流のMAPキナーゼやphosphoinositide-3-kinase(PI3K)/Akt経路によって制御されているものである。一方、アルツハイマー病発症に関与するglycogen synthase kinase-3やcaspase-3の活性に伴って断片化されるpoly(ADP-ribose)polymeraseなどについても詳細な解析がなされている。これまでに種々の物質がこれらシグナルカスケードに対して抑制作用を示すことが報告されて

おり<sup>13, 16, 21-24)</sup>, LEMの詳細な作用機序について明らかにしていくことが必要である。

続いて, ラット4VO/Reモデルを用いて一過性脳虚血におけるLEMの脳保護作用を検討した。その結果, Sham群においては神経細胞に変化は認められなかったのに対して, 4VO/Reモデルの水投与群では, 海馬CA1亜領域の神経細胞に脱落が認められた。しかし, LEMおよびV.E投与群では, 神経細胞の脱落が有意に抑制された。この結果は, LEMの1週間投与によって, V.Eと同様に一過性脳虚血による傷害に対して保護作用を示し, 神経細胞の変性, 脱落を抑制できることを示唆していた。

これまでに, 4VO/Re処置によって海馬CA1亜領域にアポトーシスが誘導されることが報告されており, その際nuclear factor- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)の活性化<sup>23)</sup>, シクロオキシゲナーゼ-2産生とそれに伴うプロスタグランジンE<sub>2</sub>が上昇することが報告されている<sup>17)</sup>。さらに, 大脳ではSODやGSH量の低下に伴って過酸化脂質が増大するが, L-carnitineやV.E投与によって過酸化脂質の増大が抑制される<sup>24)</sup>。また, スナネズミを用いた研究から, 海馬CA1亜領域においてSOD活性が低下する一方で, HMG-CoA還元酵素阻害薬のピタバスタチン投与によって神経細胞死が抑制されるが, これはピタバスタチンの抗酸化作用によるものであると考えられている<sup>25)</sup>。

LEMは, 担子菌である椎茸の菌糸体を固形培地に接種し, 子実体発生直前まで一定期間培養した後, 培地と共に熱水抽出・噴霧乾燥したもので, 人工的に管理された椎茸菌糸体のみの無菌的な培養により, 安定した品質と成分を維持することができる健康食品である。また, LEMには椎茸の菌糸体成分に加え, 菌糸体による固形培地の分解物や菌糸体の自己消化成分等も含まれ, その主なものに多糖類, 蛋白質, 核酸, 微量元素, リグニン, リグニンの分解産物であるポリフェノール化合物などがある。これまでに, LEMから抽出されたリグニン様物質が, 強いラジカル消去能およびマクロファー

ジ様細胞株のNO産生抑制作用を示すことが報告されている<sup>26)</sup>。また, Itoらは, リグニン等の分解物であるシリング酸およびバニリン酸が, ラジカル性肝障害モデルであるラット四塩化炭素肝障害に対して肝保護作用を示すことを報告している<sup>27)</sup>。従って, LEMの抗酸化作用の活性成分としては, 低分子のリグニン様物質やリグニン分解物, テルペノイド等のポリフェノールが考えられ, それらが虚血障害によって破綻した血液脳関門を通過し脳内で抗酸化作用に寄与している可能性や, 高分子のリグニンや多糖類が生体内抗酸化物質の消費を抑制していること等が考えられる。

一方, LEMの脳保護作用には, 酸化ストレスの軽減に加えて抗炎症作用等が関与している可能性もある。梗塞領域では炎症反応が亢進し, フリーラジカル産生を伴う炎症細胞の集積とともに炎症性サイトカインによる神経細胞損傷および血管内皮障害が梗塞周辺領域に誘導されることが報告されている<sup>28)</sup>。すでに, 椎茸子実体には抗炎症作用<sup>29)</sup>が確認されていることから, LEMの抗炎症作用による脳保護作用についても検討が必要である。

本研究より, PC12細胞を用いた検討において, LEMがH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>による酸化ストレスから細胞を保護し, アポトーシスを抑制した結果, 神経保護作用を示すことが明らかとなった。また, 4VO/Reモデルにおける検討では, LEMが一過性脳虚血による傷害に対して, 脳細胞保護作用を示すことが明らかとなった。すでに我々は, マウスの脳低酸素/虚血(H/I)処置によって増大するスーパーオキシド産生を持続的なLEM摂取が有意に抑制することを明らかにしている<sup>12)</sup>。しかし, その保護作用の詳細なメカニズムについては未だ明らかではないことから, 今後, LEMの脳細胞保護作用の詳細なメカニズムを解析するとともに, 4VOモデルを用いた記憶・学習の行動学的試験を行うことで血管性認知症の一次予防に対する有効性を明らかにしたいと考えている。

## 参考文献

1. 川上忠孝：アルツハイマー病と血管性認知症，*血圧*，**19**(8): 706-709, 2012.
2. 吉田光宏：血管性認知症，*医学のあゆみ*，**235**(6): 737-743, 2010.
3. 柄澤昭秀：痴呆の疫学，*治療*，**86**(5): 1635-1639, 2004.
4. 神谷達司，片山泰朗：4 血管閉塞モデル (Pulsinelli & Brierley のモデル)，*分子脳血管病*，**2**(3): 347-350, 2003.
5. Wang L., Tang C., Lai X.: Effects of electroacupuncture on learning, memory and formation system of free radicals in brain tissues of vascular dementia model rats. *J. Tradit. Chin. Med.* **24**(2): 140-143, 2004.
6. 岩田誠：ゲノム時代の脳神経医学，*Morecular Medicine*，**37** 臨時増刊号 中山書店 2000.
7. Yano T., Nakayama R., Imaizumi T., et al.: Dantrolene ameliorates delayed cell death and concomitant DNA fragmentation in the rat hippocampal CA1 neurons subjected to mild ischemia. *Resuscitation*. **50**(1): 117-125, 2001.
8. 上原孝，野村靖幸：脳虚血ストレスによるニューロン死惹起機構，*和光純薬時報*，**70**(2): 22-23, 2002.
9. 桂研一郎，片山泰朗：フリーラジカル，*Brain Medical*. **22**(1): 19-23, 2010.
10. 金藤秀明，片上直人：ROS reactive oxygen species. *Vascular Medicine*. **3**: 71-75, 2007.
11. 棚橋紀夫，山口武典：発症後 4.5 時間以内の脳梗塞急性期におけるエダラボン使用に関する前向き観察研究—方法と中間集計—，*脳卒中*，**35**(2): 108-113, 2013.
12. 玄美燕，岡崎真理，岩田直洋 他：マウス低酸素脳虚血障害に対する椎茸菌糸体培養培地抽出物の保護作用，*日本補完代替医療学会誌*，**8**(2): 99-107, 2011.
13. Koh SH., Kwon H., Park KH., et al.: Protective effect of diallyl disulfide on oxidative stress-injured neuronally differentiated PC12 cells. *Mol. Brain Res*, **133**(2): 176-186, 2005.
14. Guan S., Bao YM., Jiang B., et al.: Protective effect of protocatechuic acid from *Alpinia oxyphylla* on hydrogen peroxide-induced oxidative PC12 cell death. *Eur. J. Pharmacol.* **538**(1-3): 73-79, 2006.
15. Wu W., Shang Y., Sun S., et al.: Erythropoietin prevents PC12 cells from 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced apoptosis via the Akt/GSK-3beta/caspase-3 mediated signaling pathway. *Apoptosis*. **12**(8): 1365-1375, 2007.
16. Koh SH., Kim SH., Kwon H., et al.: Epigallocatechin gallate protects nerve growth factor differentiated PC12 cells from oxidative-radical-stress-induced apoptosis through its effect on phosphoinositide 3-kinase/Akt and glycogen synthase kinase-3. *Mol. Brain Res*. **118**(1-2): 72-81, 2003.
17. Suk K., Kim SY., Leem K., et al.: Neuroprotection by methanol extract of *Uncaria rhynchophylla* against global cerebral ischemia in rats. *Life Sci*. **70**(21): 2467-2480, 2002.
18. Hong H., Liu GQ.: Protection against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity in PC12 cells by scutellarin. *Life Sci*. **74**(24): 2959-2973, 2004.
19. Fujita Y., Izawa Y., Ali N., et al.: Pramipexole protects against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced PC12 cell death. *Naunyn-Schmiedeberg's arch. pharmacol.* **372**(4): 257-266, 2006.
20. Colognato R., Laurenza I., Fontana I., et al.: Modulation of hydrogen peroxide-induced DNA damage, MAPKs activation and cell death in PC12 by ergothioneine. *Clin. Nutr.* **25**(1): 135-145, 2006.
21. Bagetta G., Chiappetta O., Amantea D., et al.: Estradiol reduces cytochrome c translocation and minimizes hippocampal damage caused by transient global ischemia in rat. *Neurosci. Lett.* **368**(1): 87-91, 2004.
22. Wang Q., Zhang QG., Wu DN., et al.: Neuroprotection of selenite against ischemic brain injury through negatively regulating early activation of ASK1/JNK cascade via activation of PI3K/AKT pathway. *Acta pharmacol. Sin.* **28**(1): 19-27, 2007.
23. Clemens JA., Stephenson DT., Dixon EP., et al.: Global cerebral ischemia activates nuclear factor-kappa B prior to evidence of DNA fragmentation. *Mol. Brain Res*. **48**(2): 187-196, 1997.
24. Onem G., Aral E., Enli Y., et al.: Neuroprotective effects of L-carnitine and vitamin E alone or in combination against ischemia-reperfusion injury in rats. *J. Surg. Res.* **131**(1): 124-130, 2006.
25. 沖千絵，姫田敏樹，早川夏美 他：一過性脳虚血スナネズミの遅発性神経細胞死に対するピタバスタチン (HMG-CoA 還元酵素阻害薬) の抗酸化作用，*Therapeutic Research*. **26**(6): 1277-1286, 2005.
26. Kawano M., Thet MM., Makino T., et al.: DNA microarray analysis of signaling pathway in macrophages stimulated by lignin-carbohydrate complex from *Lentinus edodes* mycelia (LEM) extract. *Anticancer Res.* **30**(7): 2567-2576, 2010.
27. Itoh A., Isoda K., Kondoh M., et al.: Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on CCl<sub>4</sub>-induced liver injury. *Biol. Pharm. Bull.* **33**(6): 983-987, 2010.
28. 北川一夫：脳梗塞：炎症の制御を標的とした治療戦略の可能性，*日本薬理学雑誌*，**134**(4): 202-206, 2009.
29. Yu S., Weaver V., Martin K., et al.: The effects of whole mushroom during inflammation. *BMC Immunol.* **10**: 12, 2009.

# 食用色素アントシアニンのサイエンス —化学，体内動態と機能，将来展望—

津田 孝範 (TSUDA Takanori)

中部大学応用生物学部

Key Words：アントシアニン 肥満 糖尿病予防

## はじめに

「アントシアニン」はフラボノイド系の植物色素で、ブドウやリンゴ、イチゴ、ブルーベリー等の果実、ナス、シソ、マメ種子の美しい赤色や紫色の色素成分の多くはアントシアニンで構成されている。また花の色も、その多くはアントシアニンによる色である。これまでに食品化学分野では、果実類などの加工保存中における色調の変化と安定性や天然着色料としての応用についての研究が行われてきた。アントシアニンは食用色素としてもすでに多くの種類が開発され、実際に食品の着色に用いられている。園芸面からは、花の色の変換が実現している。特に遺伝子改変による青色のバラの作出は特筆すべき成果であり、これまでになかった色を持つ花を飾ることで、私たちの生活に潤いを与えてくれる。これはアントシアニンの生合成に関わる遺伝子とその発現機構が解明され、遺伝子工学的手法を用いた花の色の変換が可能になったからである。

アントシアニンに関する研究は、化学的な研究あるいは植物での生合成に関する研究が主体であったが、この20年ほどの間に、食品に含まれる生理機能成分として注目すべき研究対象となり、その生理機能研究に加えて、代謝やバイオアベイラビ

リティに関しても研究が進展している。

本稿では、アントシアニンとその含有食品の健康機能に関して、化学、給源と摂取量、代謝・吸収、健康機能として特に肥満・糖尿病の予防・抑制に関わる研究を紹介し、最後に今後の課題と展望を述べる。

## 1. 化学，給源と摂取量，代謝・吸収

### 1) 化学

アントシアニンは、一般には植物中では糖と結合した形（配糖体）として存在する。色素本体である糖以外の部分（アグリコン）は、アントシアニジンと呼ばれる。アントシアニンは、B環の置換基、結合糖の種類と数、アシル基の有無により多くの種類がある。主に存在するアントシアニジンは、ペラルゴニジン、シアニジン (Cy)、デルフィニジン (Del)、ペオニジン、ペチュニジン、マルビジンの6種である (図1)<sup>1)</sup>。

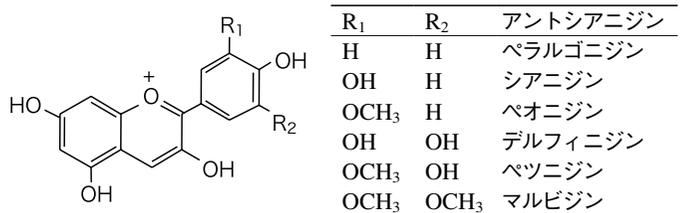


図1 アントシアニジンの化学構造<sup>1)</sup>

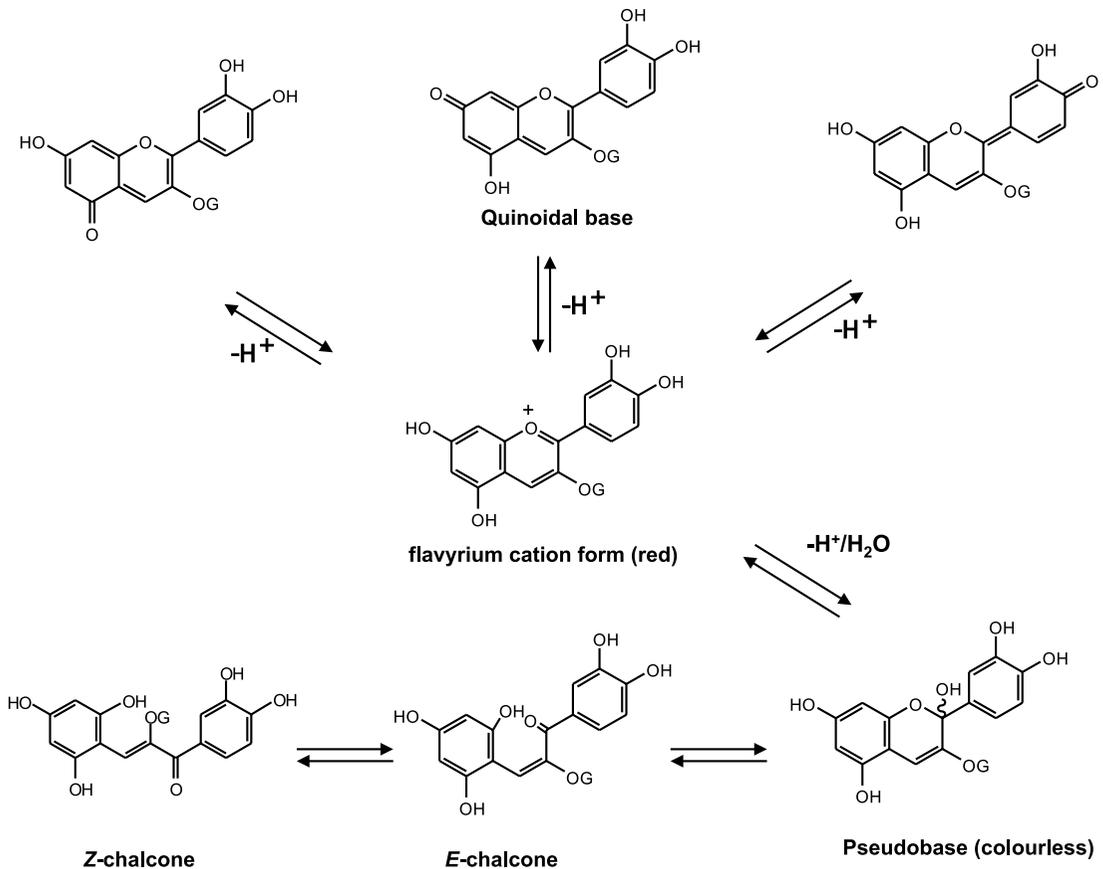


図2 アントシアニンの pH による構造変化<sup>1)</sup>

アントシアニンの色調は，B 環の置換基により異なり，水酸基の数が増加するに従い深色化し，メトキシル基の存在は浅色化をもたらす。図2に水溶液中でのアントシアニンの構造変化を示す<sup>1)</sup>。アントシアニンは，強酸性ではフラビリウム型といわれる構造をとり，赤色を呈し比較的安定であるが，弱酸性，中性領域では，水分子と反応して無色のプソイド塩基に変換し，不安定である<sup>2)</sup>。

## 2) 給源と摂取量

アントシアニンの含量は，植物や品種により大いに異なり，収穫時期によっても異なる。アントシアニンは，穀類，いも類，野菜類，豆類，果実類等，我々が常食している多くの植物に存在しているが，B 環に水酸基を2個持つシアニジン系の分布が最も広く，Del 系がこれについている。日本国内の食品中のアントシアニン量

に関するデータはないが，米国で流通している食品に含まれる平均的なアントシアニン量の比較を表1に示す<sup>3)</sup>。主にベリー類の果実に多く含まれ，米国人は一日に12.5mgを食事から摂取していると報告されている。1日あたりの総アントシアニン摂取量は，個人差が大きいと考えられるが，日本人はおそらく米国人より摂取量は少ないかもしれない。なお，主なベリー類に含まれるアントシアニンの組成と含有量についても報告されている(表2)<sup>1,4)</sup>。

数年前に European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition study としてヨーロッパ10カ国の36,037人(年齢35～74歳)のアントシアニン摂取量に関する詳細な研究成果が発表されている<sup>5)</sup>。この報告によると，アントシアニジンの平均摂取量は，男性の場合，19.8mg/日から64.9mg/日，女性の場合は18.7mg/日

表1 米国で流通している食品中のアントシアニン含量<sup>3)</sup>

Food	Total anthocyanins (mg/100 g of fresh weight or form consumed)	Total anthocyanins per serving (mg)
1. Apple		
(Fuji)	1.3	1.8
(Gala)	2.3	3.2
(Red Delicious)	12.3	17.0
2. Blackberry	245.0	353.0
3. Blueberry		
(cultivated)	386.6	529.0
(wild)	486.5	705.0
4. Cherry, sweet	122.0	177.0
5. Chokeberry	1,480.0	2,147.0
6. Cranberry	140.0	133.0
7. Currant		
(black currant)	476.0	533.0
(red currant)	12.8	14.3
8. Elderberry	1,375.0	1,993.0
9. Grape		
(red grape)	26.7	42.7
(Concord)	120.1	192.0
10. Nectarine	6.8	9.2
11. Peach	4.8	4.7
12. Plum	19.0	12.5
13. Strawberry	21.2	35.0
14. Black bean	44.5	23.1
15. Eggplant	85.7	35.1
16. Red cabbage	322.0	113.0
17. Red onion	48.5	38.8

から 44.1mg/日であった。その摂取量には明確な傾向があり、ヨーロッパ北部から南部に向うに従い、その平均摂取量が高くなった。アントシアニン摂取量は、非肥満の高齢女性、非喫煙者で高く、その摂取量は教育レベルと身体活動とともに増加した。主要な給源は、果物、ワイン、ノンアルコール飲料や野菜だった。日本人にとっては、アントシアニンの給源を考えた場合、ベリー類などの果実はアントシアニンを多く含むが、毎日毎食の摂取を実現しようとする場合、野菜からの摂取の方が容易かもしれない。野菜類のアントシアニン含量は比較的低い

表2 ベリー類のアントシアニン組成と含有量<sup>4)</sup>

Berries	Anthocyanins	mg/g extracta
Bilberry	cyanidin 3-galactoside	3.70
	cyanidin 3-glucoside	4.05
	cyanidin 3-arabinoside	2.54
	delphinidin 3-galactoside	4.58
	delphinidin 3-glucoside	4.73
	delphinidin 3-arabinoside	3.53
	peonidin 3-galactoside	0.46
	petunidin 3-halactoside	1.52
	petunidin 3-glucoside	2.94
	petunidin 3-arabinoside	0.84
	malvidin 3-arabinoside	0.81
	peonidin 3-glucoside /malvidin 3-galactoside	3.48
	peonidin 3-arabinoside /malvidin 3-glucoside	3.62
Blackberry	cyanidin 3-glucoside	7.17
	cyanidin 3-rutinoside	0.06
	cyanidin 3-arabinoside	0.05
	cyanidin 3-xyloside	0.47
	cyanidin 3-(6-malonoyl) glucoside	0.3
cyanidin 3-dioxaloylglucoside	2.05	
Blackcurrant	cyanidin 3-glucoside	1.1
	cyanidin 3-rutinoside	7.08
	delphinidin 3-glucoside	2.94
	delphinidin 3-rutinoside	9.79
	peonidin 3-rutinoside	0.11
petunidin 3-rutinoside	0.18	
Blueberry	cyanidin 3-galactoside	0.28
	cyanidin 3-glucoside	0.04
	cyanidin 3-arabinoside	0.12
	delphinidin 3-galactoside	1.37
	delphinidin 3-glucoside	0.13
	delphinidin 3-arabinoside	0.74
	peonidin 3-galactoside	0.15
	petunidin 3-galactoside	1.07
	petunidin 3-glucoside	0.11
	petunidin 3-arabinoside	0.46
marlidin 3-arabinoside	1.75	
peonidin 3-glucoside /malvidin 3-galactoside	3.65	
peonidin 3-arabinoside /malvidin 3-glucoside	0.43	
Strawberry	cyanidin 3-glucoside	0.09
	pelargonidin 3-glucoside	5.07

ため，アントシアニンを豊富に含む野菜の作出が安定的なアントシアニンの摂取に貢献するかもしれない。さらに農産物についても機能性表示が可能になったことから，アントシアニンの高含有野菜あるいは果実は重要な研究開発の対象となるであろう。さらにこれらの素材を用いたアントシアニンを豊富に含む飲料も同様にアントシアニンの摂取に貢献する可能性がある。

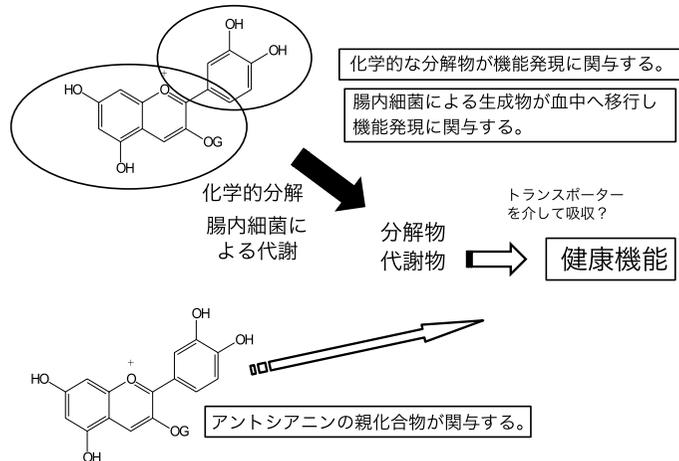


図3 アントシアニンの代謝と機能性発現

### 3) 代謝・吸収と機能発現

アントシアニンの代謝・吸収については，著者らの報告をはじめ，その多くは配糖体のままで直接生体内へ吸収されると報告されている<sup>6)</sup>。著者らはアントシアニンの代謝物として，シアニジン 3- グルコシド (C3G) の B- 環に由来する protocatechuic acid が検出されることを報告していた<sup>6)</sup>。最近では，アントシアニンの腸内細菌による分解と生成されたフェノール酸の関与が重要視されている。アントシアニンの代謝物として，その化学構造に由来する protocatechuic acid, syringic acid, vanillic acid, phloroglucinol aldehyde, phloroglucinol acid, gallic acid などのフェノール酸が検出されるとする報告が相次いでいる<sup>7-14)</sup>。アントシアニンが腸内細菌による代謝を受けること，あるいは化学変化によりこれらのフェノール酸が生成すると考えられ，ヒトにおいてもその存在が認められている<sup>15)</sup>。アントシアニンの健康機能への関与として，これらの代謝物の作用を考慮する必要がある (図3)。

これまでアントシアニンのバイオアベイラビリティはかなり低い (0.1 % 程度) と考えられてきたが，Kay らの研究グループは，<sup>13</sup>C でラベルした C3G を用いたヒトでの代謝・吸収に関する研究成果を発表している<sup>16)</sup>。この研究では 8 名の成人男性ボランティアに 500 mg の <sup>13</sup>C ラベル化 C3G を摂取してもらい，48 時間にわたり血液，尿，糞，呼吸への排出を調べた。こ

れによると，<sup>13</sup>C は 24-48 時間後でも排泄され，検出された抱合体や代謝物は多様であり，バイオアベイラビリティは 12.38 ± 1.38 % 以上と算出された。さらにこの研究グループは C3G に由来する分解物，代謝物についても検討しており，C3G やそのアグリコン (シアニジン) の抱合体以外に，分解物として protocatechuic acid とそのグルクロン酸抱合体や硫酸抱合体，vanillic acid とその関連化合物とその抱合体，phenylacetic acids (3,4-dihydroxyphenyl acetic acid, 4-hydroxyphenylacetic acid)，phenylpropenoic acids (caffeic acid, ferulic acid)，hippuric acid が検出された。C3G は化学的な分解，さらに腸内細菌等 でかなり複雑な代謝を受け，これらが再吸収されていると考えられる。他の研究グループもブルーベリードリンクを摂取すると，血漿に多様なフェノール酸が認められることを報告している<sup>17)</sup>。

これらの化合物は，摂取後すでに 1 時間で血中に検出され，最大ピークを示す化合物と，数時間後になって検出される化合物があり，アントシアニン等の分解物あるいは代謝物と考えられる。Kalt らの研究グループは，ヒトにおいて 250mL のブルーベリージュースの摂取後のアントシアニンの代謝物を調べた。その結果，アントシアニンを含まない食事を摂取していても 5 日間にわたり尿中にその代謝物が排泄される

ことを報告している<sup>18)</sup>。この現象はアントシアニンの代謝物が腸肝循環し、長く留まっていることを示唆する。これらの報告からフェノール酸関連化合物等の代謝物や分解物のみでアントシアニンの健康機能が説明できるかについては、まだエビデンスが不足しているものの、健康機能との関連付けは興味あるところである。なお最近 Kay らの研究グループは、C3G の多様な代謝物を調製し、この代謝物が生理的な濃度でもヒト血管内皮細胞での炎症を抑制することを報告しており<sup>19,20)</sup>、今後の研究の進展が期待されている。

### 3. アントシアニンの肥満・糖尿病予防・抑制作用

アントシアニンの健康機能に関わる研究は、抗酸化作用から始まっているが、これまでに種々の健康機能が報告されている。特にこの10年ほどの間でアントシアニンの健康機能とその分子レベルでの作用メカニズムの解明に関わる研究は大きく進展している。この項では、アントシアニンの肥満・糖尿病に対する予防・抑制作用に関する最近の研究を示す。

#### 1) 肥満

アントシアニンの体脂肪蓄積抑制に関する最初の報告は2003年に著者らにより報告された<sup>21)</sup>。C3G (2g/kg) を含む食餌 (C3G 食) の摂取は、C57BL/6J マウスにおいて、高脂肪食 (エネルギー源の60%が脂肪由来) により誘導される体脂肪蓄積を有意に抑制した。このメカニズムについては、肝臓、白色脂肪組織の脂肪合成の低下によるものであると報告している<sup>21,22)</sup>。なお、この実験において、高脂肪食により誘導される血清グルコース濃度の上昇も C3G 食の摂取により有意に低下した。Prior らの研究グループは、ブルーベリーから抽出したアントシアニンを高脂肪食 (エネルギー源の45%が脂肪由来) へ添加した食餌を C57BL/6 マウスへ摂取させたとき、このアントシアニン抽出物の摂取は、体重増加と体脂肪蓄積を抑制

するが、ブルーベリー果実の凍結乾燥により得たブルーベリーパウダー (WBP) の摂取はむしろ脂肪蓄積を促すと報告している<sup>23)</sup>。

同グループは別の研究において、高脂肪食 (エネルギー源の45%が脂肪由来) を摂取させたマウスのブルーベリージュース摂取は体重と白色脂肪組織 (精巢上体脂肪、後腹膜脂肪) 重量の有意な低下をもたらさなかったと報告している<sup>24)</sup>。同様に DeFuria らは、C57BL/6 マウスにおいて、WBP の摂取は高脂肪食 (エネルギー源の60%が脂肪由来) による体重増加を有意に抑制しないことを報告している<sup>25)</sup>。ところが、大変興味深いことに、最近 Seymour らは、2%の WBP を添加した高脂肪食 (エネルギー源の45%が脂肪由来) が Zucker Fatty rats において腹腔内脂肪重量の低下をもたらし、脂肪組織と骨格筋の peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) 活性を上昇させることを報告している<sup>26)</sup>。しかし同研究グループは、Zucker Lean rats における WBP 摂取は、むしろ体重増加を誘導することも報告している<sup>26)</sup>。

一方、ブルーベリー以外のベリー類の例として、アントシアニンを含むブラックラズベリーの摂取 (ブラックラズベリージュースあるいは粉末) は、高脂肪食 (エネルギー源の60%が脂肪由来) によるマウスの体脂肪蓄積、体重増加を有意に抑制しなかった<sup>27-29)</sup>。しかし高濃度のアントシアニンを含むマルベリーの水抽出物の摂取は体重増加を抑制した<sup>31)</sup>。タルトチェリーパウダーの摂取は Zucker fatty rat において、体重増加、後腹膜脂肪量を低下させた<sup>31)</sup>。チョークベリーもまたアントシアニンを豊富に含むが、この抽出物の摂取は、高フルクトース食摂取ラットにおいて精巢上体脂肪重量や血中グルコース濃度の上昇を抑制した<sup>32)</sup>。

アントシアニンは脂肪細胞に作用してアディポサイトカインの発現変化等を引き起こす。著者らは、C3G もしくはそのアグリコンである Cy が単離されたラット白色脂肪細胞、ヒト白色脂肪細胞において、インスリンの感受性を高める adiponectin の発現上昇を引き起こすこと

を報告している<sup>33,34)</sup>。しかしこの作用は *in vivo* においては観察されていない。前述の DeFuria らの研究において、WBP の摂取は肥満による白色脂肪組織の炎症を抑制した<sup>25)</sup>。すなわち、高脂肪食群において観察される白色脂肪組織の tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) の mRNA レベルの上昇を WBP 群で有意に低下した。この時、glutathione peroxidase3 は高脂肪食群で有意に低下するが、ブルーベリーの摂取はこの低下を抑制した。タルトチェリーパウダーの摂取は、Zucker fatty rat において、肥満に伴う炎症性サイトカイン (IL-6, TNF- $\alpha$ ) の上昇抑制, PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$  の mRNA レベルを上昇させ<sup>31)</sup>、チョコレート摂取においては、血漿アディポネクチン濃度の上昇, 血漿 TNF- $\alpha$  と IL-6 濃度が低下したと報告されている<sup>32)</sup>。

## 2) 糖尿病

アントシアニンの摂取は 2 型糖尿病モデルにおいて血糖値の上昇抑制, インスリン感受性の改善をもたらす。これまでに著者らにより高純度のアントシアニン (C3G) の摂取<sup>22,35)</sup>、多様な種類のアントシアニンを含むビルベリーアントシアニン (BBE) の摂取<sup>36)</sup>、黒大豆成分 (C3G, プロシアニジン) の作用が報告されている<sup>37)</sup>。著者らは、単離 C3G の摂取は 2 型糖尿病モデルマウス (KK-A<sup>y</sup>) において血糖値の上昇を抑制し、インスリン感受性を改善するが、この作用メカニズムとしてレチノール結合タンパク質 4 (RBP4) の発現低下が関係していることを明らかにしている<sup>35)</sup>。Yang, Graham らはレチノール結合タンパク質 4 (RBP4) が新たなアディポサイトカインとして 2 型糖尿病の発症にリンクしており、インスリン抵抗性の原因分子であると報告した<sup>38)</sup>。

ヒトにおける生理的意義については、完全に結論が出ていないが、マウスモデルでの C3G の糖尿病抑制効果は、この理論によりメカニズムを説明することが可能である。すなわち、C3G の摂取は Glucose transporter 4 (Glut4) の発

現上昇をもたらし、このことが RBP4 の発現を低下させることにより末梢組織でのインスリン感受性を改善し、糖新生の亢進によるグルコースの流出を抑制すると考えられる<sup>35)</sup>。なお、最近の報告では、マウス 3T3-L1 脂肪細胞、ヒト脂肪細胞において C3G とその代謝物である protocatechuic acid は PPAR $\gamma$  の活性化をもたらすと同時に Glut4 とアディポネクチンの発現上昇を誘導することが報告されている<sup>39)</sup>。しかし著者らの研究では、C3G は PPAR $\gamma$  のリガンドとして作用せず、*in vivo* でのアディポネクチン発現上昇をもたらさない<sup>33,35)</sup>。従って C3G の糖尿病抑制効果は、PPAR $\gamma$  リガンド作用やアディポネクチンの発現上昇によるものと結論できない。

BBE の糖尿病抑制効果は、C3G の含有量が少ないために RBP4 の発現低下からは説明することは困難である。BBE の摂取は、骨格筋や白色脂肪組織、肝臓において AMP-activated protein kinase (AMPK) を活性化する。BBE の摂取による AMPK の活性化は、骨格筋や白色脂肪組織において Glut4 の発現上昇をもたらす。肝臓においては糖新生を抑制する。一方脂質代謝においても脂肪の利用を促進するために結果として血糖値上昇の抑制とインスリン感受性の増加をもたらす。以上のことから BBE の糖尿病予防・抑制作用メカニズムの概略を図 4 に示す<sup>36)</sup>。BBE のように多種類のアントシアニン分子を含むことが AMPK の活性化作用を介した糖尿病抑制作用に重要かもしれない。この解明は重要な課題の一つである。

アントシアニンの糖尿病予防・抑制作用については、最近著者らのグループがインクレチンの一つである glucagon-like peptide-1 (GLP-1) の分泌促進作用を見出している。インクレチンとは、食事摂取に伴い消化管から分泌され、膵  $\beta$  細胞に作用して血中グルコース濃度に依存してインスリン分泌を促進するペプチドホルモンの総称である。インクレチンには GLP-1 を含めた 2 種類が知られており、GLP-1 作用を高めることは 2 型糖尿病の予防・治療に有効なため、

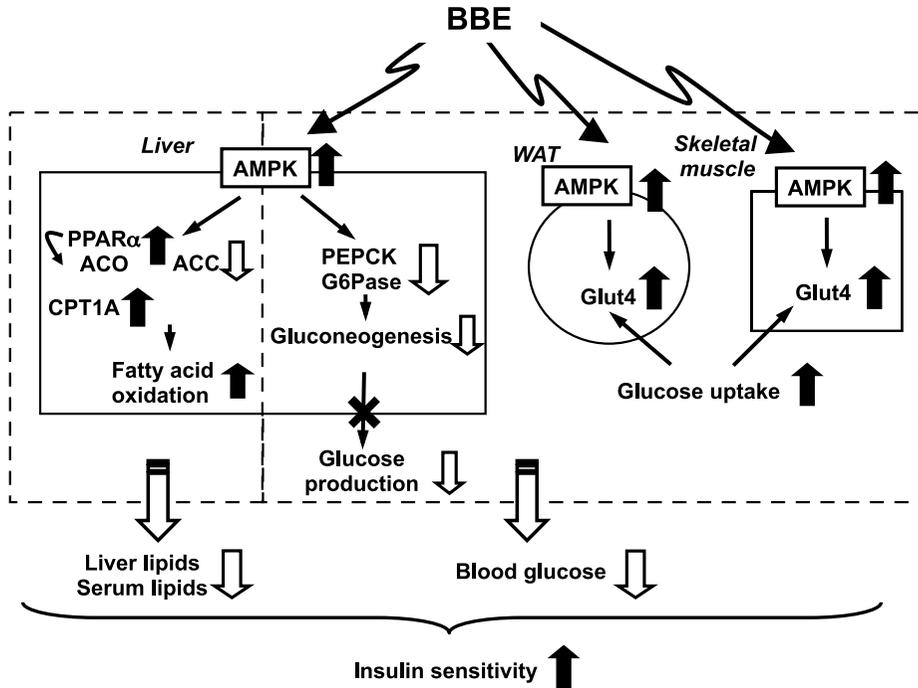


図4 BBE 摂取による糖尿病予防・抑制メカニズムの概要<sup>36)</sup>

GLP-1 の分解阻害薬や分解抵抗性の GLP-1 受容体作動薬が治療に用いられている。食品機能学，栄養学的な視点からは，血中 GLP-1 濃度を増やすために，食品由来因子により内因性の GLP-1 の分泌を促進させることが最も良い戦略と考えられる。

一方，アントシアニンの糖尿病予防・抑制作用については，アントシアニン分子自体が不安定で吸収性が低いため，その作用機序には未だ疑問も多い。前述のように腸内細菌で代謝されたアントシアニンの代謝物や化学的な分解物の生理機能発現への関与は，この疑問に答えることができる可能性がある。アントシアニンには種々の分子種があり，それぞ

れの分子種毎の作用は不明であり，アントシアニンの糖尿病予防・抑制作用には GLP-1 が関与する可能性が考えられる。この観点から各種アントシアニンの分子種毎の GLP-1 分泌促進作用を検討し，delphinidin 3-rutinoside (D3R) を見出した<sup>40)</sup> (図5)。さらに著者らは，この分泌促進作用機序についても明らかにしている。これらの知見は，アントシアニンが腸管内で直接作用して機能発現に関与することを示すものであり，現在さらに詳細な検討を進めている。

### 3) ヒト介入試験

アントシアニンのメタボリックシンドローム関連のヒト介入試験についても最近多くの報告がある。そのいくつかをアントシアニンを豊富に含むベリー類を中心とした事例で紹介する。

ブルーベリー，ビルベリーでは，イタリアの研究グループにより 48 名の肥満の男女（平均 BMI は 37.8）に 742 mg のアントシアニンを含む凍結乾燥ブルーベリーを 8 週間摂取する無作

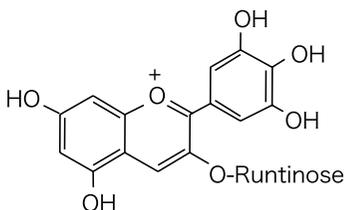


図5 Delphinidin 3-rutinoside (D3R) の化学構造

為試験が実施された。その結果，アントシアニン群では血圧が有意に改善され，酸化LDLレベルが低下したが，血中グルコース濃度や体重，ウエスト周囲径は改善しなかった<sup>41)</sup>。一方，米国の研究グループは，インスリン抵抗性の32名の男女による二重盲検無作為化比較試験において，ブルーベリーパウダーを6週間摂取することにより（アントシアニンとして668 mg/日），インスリン感受性が改善されることを報告している<sup>42)</sup>。最近英国のグループもアントシアニンの摂取と血中インスリン濃度や炎症マーカーの低下との相関を報告している<sup>43)</sup>。さらにコホート研究，無作為試験の解析からアントシアニンは心血管疾患に対して有効であるとの報告があるが，一方で52名の閉経後の女性を対象としたエルダーベリーの摂取（500 mg/日，12週間）は，心血管疾患のマーカーの改善に至らなかったと報告している<sup>44)</sup>。また16名の肥満の男性（平均BMIは32.8）による二重盲検無作為化比較試験において，紫ニンジン（アントシアニン；118.5 mg/日，フェノール酸；259.2 mg/日）を4週間摂取した時の体重，LDL-コレステロール，血圧等には差がなく，HDL-コレステロール値は，むしろ有意に低下したという結果もある<sup>45)</sup>。このようにヒト介入試験は，相反する結果もあるため，さらに検証する必要がある。

#### 4. 課題と今後の展望

アントシアニンの健康機能について，代謝・吸収に加えて肥満・糖尿病予防・抑制作用に関する研究動向を概説した。最後にまとめとしてアントシアニンの健康機能研究に関する課題を提示する。

アントシアニンの体脂肪蓄積抑制作用，糖尿病抑制作用の研究をはじめとする多くの研究においては，一部の研究を除くが，アントシアニン分子の中でどのような化学構造を持つことが

種々の健康機能の発現に必要なのか不明確である。一方，興味深いことに，多様な種類のアントシアニンを摂取する方が高い効果を示す可能性もある。従って個々の健康機能に対して，どのアントシアニンの分子種や組成が最も効果的なのかを明らかにする必要があるだろう。この点については，アントシアニンに由来する代謝物，分解物の生成とこの機能との関係から考える必要がある。

これまでの研究において，アントシアニンの単離精製品での健康機能に関する報告はあるが，アントシアニンを豊富に含む粗抽出物として検討されている例が多い。食品としてアントシアニンの摂取を考えた場合，確かにアントシアニンは，アントシアニン以外のポリフェノールなどの多様な食品成分と同時に摂取されるだろう。しかし実験的には，アントシアニン単独で健康機能を発現するのか，あるいはアントシアニンとそれ以外の成分が同時に共存することが効果の発現に重要なのかを知る必要がある。さらにアントシアニンのヒトにおける健康機能の効果の検証は近年相次いでいるが，まだ十分とはいえず，今後さらに検証する必要があるだろう。

数十年前までは，アントシアニンは分解されやすく，化学構造の解明と食品成分としてその利用や貯蔵中の変化，アントシアニンの色の安定化などの研究が主流であった。現在では，アントシアニンは健康機能に関与する成分の一つとして認識され，その研究は以前に比べると分子レベルで大きく発展している。今後もアントシアニンの研究は花色の改変も含めて魅力的なものであり続けるであろう。種々の課題はあるが，アントシアニンの健康機能研究は，機能的表示食品の開発の点からもさらに研究が進むと予想される。

## 参考文献

1. Tsuda T. Dietary anthocyanin-rich plants: biochemical basis and recent progress in health benefits studies *Mol. Nutr. Food Res.* **56**, 159-170 (2012).
2. Brouillard, R. Flavonoids and flower color. In: Harborne, J.B., (Ed.), *The flavonoids*. London: Chapman and Hall; 525-538 (1988).
3. Wu, X., Beecher, G.R., Holden, J.M. *et al.* Concentration of Anthocyanins in Common Food in the United States and Estimation of Normal Consumption. *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 4069-4075 (2006).
4. Ogawa, K., Sakakibara, H., Iwata, R. *et al.* Anthocyanin composition and antioxidant activity of the Crowberry (*Empetrum nigrum*) and other berries. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 4457-4462 (2008).
5. Zamora-Ros, R., Knaze, V., Luján-Barroso, L. *et al.* Estimation of the intake of anthocyanidins and their food sources in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Br. J. Nutr.* **106**, 1090-1099 (2011).
6. Tsuda, T., Horio, F., Osawa, T. Absorption and metabolism of cyanidin 3-*O*- $\beta$ -D-glucoside in rats. *FEBS Lett.* **449**, 179-182 (1999).
7. Keppler, K., Humpf, H.-U. Metabolism of anthocyanins and their phenolic degradation products by the intestinal microflora. *Bioorg. Med. Chem.* **13**, 5195-5205 (2005).
8. Aura, A. M., Martin-Lopez, P., O' Leary, K.-A. *et al.* *In vitro* metabolism of anthocyanins by human gut microflora. *Eur. J. Nutr.* **44**, 133-142 (2005).
9. He, J., Magnuson, B.A., Giusti, M.M. Analysis of anthocyanins in rat intestinal contents – impact of anthocyanin chemical structure on fecal excretion. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 2859-2866 (2005).
10. Forester, S. C., Waterhouse, A.L. Identification of Cabernet Sauvignon anthocyanin gut microflora metabolites. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 9299-9304 (2008).
11. Forester, S.C., Waterhouse, A.L. Gut metabolites of anthocyanins, gallic acid, 3-*O*-methylgallic acid, and 2,4,6-trihydroxybenzaldehyde, inhibit cell proliferation of Caco-2 cells. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 5320-5327 (2010).
12. Avila, M., Hidalgo, M., Sanchez-Moreno, C. *et al.* Bioconversion of anthocyanin glycosides by *Bifidobacteria* and *Lactobacillus*. *Food Res. Int.* **42**, 1453-1461 (2009).
13. Gonthier, M.P., Cheynier, V., Donovan, J.L. *et al.* Microbial aromatic acid metabolites formed in the gut account for a major fraction of the polyphenols excreted in urine of rats fed red wine polyphenols. *J. Nutr.* **133**, 461-467 (2003).
14. Borges, G., Roowi, S., Rouanet, J.M. *et al.* The bioavailability of raspberry anthocyanins and ellagitannins in rats. *Mol. Nutr. Food Res.* **51**, 714-725 (2007).
15. Vitaglione, P., Donnarumma, G., Napolitano, A. *et al.* Protocatechuic acid is the major human metabolite of cyanidin-glucosides. *J. Nutr.* **137**, 2043-2048 (2007).
16. Czank, C., Cassidy, A., Zhang, Q. *et al.* Human metabolism and elimination of the anthocyanin, cyanidin-3-glucoside: a <sup>13</sup>C-tracer study. *Am. J. Clin. Nutr.* **97**, 995-1003 (2013).
17. Rodriguez-Mateos, A. Rendeiro, C., Bergillos-MecaIntake, T. *et al.* Intake and time dependence of blueberry flavonoid-induced improvements in vascular function: a randomized, controlled, double-blind, crossover intervention study with mechanistic insights into biological activity. *Am. J. Clin. Nutr.* **98**, 1179-1191 (2013).
18. Kalt, W., Liu, Y., McDonald, J.E. *et al.* Anthocyanin metabolites are abundant and persistent in human urine. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 2489-2496 (2014).
19. Amin, H.P., Czank, C., Raheem S. *et al.* Anthocyanins and their physiologically relevant metabolites alter the expression of IL-6 and VCAM-1 in CD40L and oxidized LDL challenged vascular endothelial cells. *Mol. Nutr. Food Res.* **59**, 1095-1106 (2015).
20. Edwards, M., Czank, C., Woodward, G.M. *et al.* Phenolic metabolites of anthocyanins modulate mechanisms of endothelial function. *J. Agric. Food Chem.*, **63**, 2423-2431 (2015).
21. Tsuda, T., Horio, F., Uchida, K. *et al.* Dietary cyanidin 3-*O*- $\beta$ -D-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice. *J. Nutr.* **133**, 2125-2130 (2003).
22. Tsuda, T. Regulation of adipocyte function by anthocyanins; possibility of preventing the metabolic syndrome. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 642-646 (2008).
23. Prior, R.L., Wu, X., Gu, L. *et al.* Whole berries versus berry anthocyanins: interactions with dietary fat levels in the C57BL/6J mouse model of obesity. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 647-653 (2008).
24. Prior, R.L., Wilkes, S.E., Rogers T.R. *et al.* Purified blueberry anthocyanins and blueberry juice alter development of obesity in mice fed an obesogenic high-fat diet. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 3970-3976 (2010).

25. DeFuria, J., Bennett, G., Strissel, K.J. *et al.* Dietary blueberry attenuates whole-body insulin resistance in high fat-fed mice by reducing adipocyte death and its inflammatory sequelae. *J. Nutr.* **139**, 1510-1516 (2009).
26. Seymour, E.M., Tanone, I.I., Urcuyo-Llanes, D.E. *et al.* Blueberry intake alters skeletal muscle and adipose tissue peroxisome proliferator-activated receptor activity and reduces insulin resistance in obese rats. *J. Med. Food.* **14**, 1511-1518 (2011).
27. Prior, R.L., Wu, X., Gu, L. *et al.* Purified berry anthocyanins but not whole berries normalize lipid parameters in mice fed an obesogenic high fat diet. *Mol. Nutr. Food Res.* **53**, 1406-1418 (2009).
28. Prior, R.L., Wilkes, S., Rogers, T. *et al.* Dietary black raspberry anthocyanins do not alter development of obesity in mice fed an obesogenic high-fat diet. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 3977-3983 (2010).
29. Kaume, L., Howard, L.R., Devarreddy, L. The Blackberry Fruit: A Review on Its Composition and Chemistry, Metabolism and Bioavailability, and Health Benefits. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 5716-5727 (2012).
30. Peng, C.H., Liu, L.K., Chuang, C.M. *et al.* Mulberry water extracts possess an anti-obesity effect and ability to inhibit hepatic lipogenesis and promote lipolysis. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 2663-2671 (2011).
31. Seymour, E.M., Lewis, S.K., Urcuyo-Llanes, D.E. *et al.* (2009) Regular tart cherry intake alters abdominal adiposity, adipose gene transcription, and inflammation in obesity-prone rats fed a high fat diet. *J. Med. Food.* **12**, 935-942.
32. Qin, B., Anderson, R.A. An extract of chokeberry attenuates weight gain and modulates insulin, adipogenic and inflammatory signalling pathways in epididymal adipose tissue of rats fed a fructose-rich diet. *Br. J. Nutr.* **108**, 581-587 (2011).
33. Tsuda, T., Ueno, Y., Aoki, H. *et al.* Anthocyanin enhances adipocytokine secretion and adipocyte-specific gene expression in isolated rat adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **316**, 149-157 (2004).
34. Tsuda, T., Ueno, Y., Yoshikawa, T. *et al.* Microarray profiling of gene expression in human adipocytes in response to anthocyanins. *Biochem. Pharmacol.* **71**, 1184-1197 (2006).
35. Sasaki, R., Nishimura, N., Hoshino, H. *et al.* Cyanidin 3-glucoside ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity due to downregulation of retinol binding protein 4 expression in diabetic mice. *Biochem. Pharmacol.* **74**, 1619-1627 (2007).
36. Takikawa, M., Inoue, S., Horio, F. *et al.* Dietary anthocyanin-rich bilberry extract ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity via activation of AMP-activated protein kinase in diabetic mice. *J. Nutr.* **140**, 527-533 (2010).
37. Kurimoto, Y., Shibayama, S., Inoue, S. *et al.* Black soybean seed coat extract ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity via the activation of AMP-activated protein kinase in diabetic mice. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 5558-5564 (2013).
38. Yang, Q., Graham, T.E., Mody, N. *et al.* Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* **436**, 356-362 (2005).
39. Scazzocchio, B., Vari, R., Filesì, C. *et al.* Cyanidin-3-O- $\beta$ -glucoside and protocatechuic acid exert insulin-like effects by upregulating PPAR $\gamma$  activity in human omental adipocytes. *Diabetes.* **60**, 2234-2244 (2011).
40. Kato, M., Tani, T., Terahara, N. *et al.* The anthocyanin delphinidin 3-rutinoside stimulates glucagon-like peptide-1 secretion in murine GLUTag cell line via the Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II pathway. *PLoS ONE* **10**, e0126157 (2015).
41. Basu, A., Du, M., Leyva, M. J. *et al.* Blueberries decrease cardiovascular risk factors in obese men and women with metabolic syndrome. *J. Nutr.* **140**, 1582-1587 (2010).
42. Stull, A. J., Cash, K. C., Johnson, W. D. *et al.* Bioactives in blueberries improve insulin sensitivity in obese, insulin-resistant men and women. *J. Nutr.* **140**, 1764-1768 (2010).
43. Jennings, A., Welch, A. A., Spector, T. *et al.* Intakes of anthocyanins and flavones are associated with biomarkers of insulin resistance and inflammation in women. *J. Nutr.* **144**, 202-208 (2014).
44. Curtis, P. J., Kroon, P. A., Hollands, W. J. *et al.* Cardiovascular disease risk biomarkers and liver and kidney function are not altered in postmenopausal women after ingesting an elderberry extract rich in anthocyanins for 12 weeks. *J. Nutr.* **139**, 2266-2271 (2009).
45. Wright, O. R., Netzel, G. A., Sakzewski, A. R. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of the effect of dried purple carrot on body mass, lipids, blood pressure, body composition, and inflammatory markers in overweight and obese adults : the QUENCH trial. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **91**, 480-488 (2013).

# 品質危害への対応強化について

齋藤 希 (SAITO Nozomu)

一般財団法人 食品分析開発センター SUNATEC コンサルティング室

Key Words : 品質異常 健康危害 HACCP 流出防止

## はじめに

現在食品業界は、近年のさまざまな問題の発生や取り巻く環境の劇的な変化への対応を求められている。変化のひとつとして、消費者が購入した製品の品質異常を発見した際の情報発信形態の変化が挙げられる。以前であれば、消費者が品質異常の発見に対する改善等を求める場合、販売店や製造者あるいは保健所へ連絡する対応であったが、これに加えて SNS などの新たな情報システムの発展によって、自らが情報の発信源となり、品質異常品の発見を不特定多数に発信することが可能となった。実際、そのような事例は既に多く発生している。

このようなことから、一つの品質異常の発生であっても、場合によっては組織の経営に大きな影響を及ぼす事態を招く危険もあり、組織は今まで以上に品質異常に対する取り組み強化が必要となっている。

## 1. 品質異常とは

食品における品質異常としては、広義には健康危害に繋がる異常と健康危害には繋がらないが自組織あるいは顧客が求める品質に満たない異常が挙げられる。

健康危害に繋がる異常は、発生した場合に

非常に大きな事態に発展する事が考えられるため、これまでも食品事業者はそれらへの取組みを進めてきた。2014年に「食品等事業者が実施すべき管理運用基準に関する指針（ガイドライン）」が改定され、HACCPを用いた衛生管理の基準の追加や、苦情発生について保健所等への速やかな報告の規定などが追加されたことなどからも、その取組みは促進されている。

しかし、一方の健康危害に繋がらない異常についても、発生した場合には顧客への配慮等によって製品の回収などが行われる事も多い。

一般財団法人食品産業センターがインターネットで公表している「食品事故情報告知ネット (<http://www.shokusan-kokuchi.jp/KokuchiInfo/index>)」の中には、健康危害に繋がらないと考えられる事例もみられる。また、実際のところ、健康危害に繋がるものと繋がらないと考えられるものの線引きは曖昧なものであると言わざるを得ない点もある。

これらのことから、健康危害に繋がる異常品の流出防止は最低限実施すべきこととして、事業者はクレーム低減のためには健康危害に繋がらない異常品の流出についても防止する体制を強化していくことが必要と考えられる。

本稿では、これらの品質問題への対応強化について述べることにする。

なお、本稿では、以後、健康危害に繋がる異常を健康危害と略し、健康危害に繋がらない異常を品質危害と称することとする。

## 2. 発生要因の抽出

健康危害および品質危害の発生を防止するためには、まずはそれらがなぜ発生するかといった発生要因を適切に把握することから始まる。仮に同じような製品を製造している事業者であっても、その原材料 (Material)、製造方法 (Method)、製造に関わる人員 (Man)、製造に使用する機器 (Machine)、製造環境 (Environment) によって危害の発生要因は異なるため、様々な情報を参考にしたとしても、最終的には自組織の発生危害は自ら抽出していくことが必要となる。

食品製造における危害要因の抽出作業としては、HACCP あるいは ISO22000 における危害分析が代表的なものとして挙げられるが、一般的には健康危害の発生要因を中心にまとめることが多い。最低限かつ必須事項として、健康危害の管理は必要となるため、取組み当初においては健康危害中心の方が分かりやすいと考えられる。しかし、それらの取組みを継続する中で、上述の点からこれに加えて出来る限り品質危害の発生要因についてもさらに細かく抽出していくことが望まれる。

ただし、このような品質危害の発生要因は非常に多岐に渡り、全てを網羅することは難しく、また、抽出の方法も実施者の経験によって危害要因を挙げる内容も異なる。残念なことに、全ての製品に対して画一的に危害要因の抽出を行うことが出来るシステムは無いのが現状である。このことから、危害要因の抽出については、それぞれの事業者が模索しながら取組むことが必要と考えられる。取組み方法例を参考に述べる。

## 3. 詳細な危害要因の抽出取り組み例

1. 自組織でこれまで発生した問題（組織外からの指摘，組織内発見含む）の水平展開
2. 既に挙げている危害の深堀
3. 組織外で発生した問題の自組織の製品への置き換え
4. ISO/TS 22002-1 を参考にした自組織の工程の確認

### 3-1. 自組織でこれまで発生した問題（組織外からの指摘，組織内発見含む）の水平展開

これまで自組織にて発生した問題については多くの事業者は再発防止のため、原因調査を実施の上、原因となった事象を取り除く改善措置を実施されているであろう。しかし、その対策は例えば問題が発生した当該ラインや当該部署のみの対応となっていることも多いのではないだろうか。

確認された問題を別ラインや別部署の危害分析に反映させ、それらにおいても同様のリスクがあるかについて検討を進めることによって同様の問題が今後自組織内で再発することが無いように全組織的に取り組むことが出来る。

このことから、これまでに組織内外で発生した問題の一覧をまずは作成し、自組織内で取組みを進めるメンバー（食品安全チーム：例えば生産部門の各担当者と品質保証部担当者、さらに必要に応じて工務担当者や購買担当者、開発担当者など）が中心となって、重要な問題から優先的に取り組むを進めることが推奨される。

### 3-2. 既に挙げている危害の深堀

次に、現状の危害分析にて既に挙げられている項目についてテーマを決め、食品安全チームにて協議し、深堀していく取組みについて、異物についての例を以下に述べる。

### 〈異物発生要因の検討例〉

#### (1) 『各工程において原料、中間製品、製品への影響が高い直接食品に触れる機器、器具の材質、構造の再確認』

直接食品に接する箇所においては、通常、ガラスのような破損しやすい材質の使用は少ないと考えられるが、金属片の発生源については多く存在する。例えば、加工のためのスライサー、粉碎機などは刃の欠損が起りやすい。移送のためのポンプも、ポンプの羽根の設置不備などが生じた際にケーシングと接触し、羽根の破損や削れが発生する。異物除去としても使われる篩やストレーナーなどでも、それらが破損したことで、異物混入事故となった事例などもある。もちろん、ネジやボルト、ワッシャー、スプリング、ベアリングなどの部品の欠落なども異物対象となる。

このように、製造に必要な機器においても、異物発生源となり得ると認識し、自組織で使用する機器がどのような場合に、どのような状態の異物が発生するか、事前に検討することが必要となる。このためには当該機器を使用する生産担当者と工務担当者との協議、さらには機器メーカーの協力にて検討を進めることが重要である。また、器具としては、バットなどのプラスチックの欠け、攪拌のためのカイなどの器具の破損も硬質異物の混入に繋がる。このような危害要因の抽出を行う。

次に、軟質異物（ビニール片、糸片、ペンキ片、毛髪、虫など）の発生源についても、製造ライン中心に検討を行う。例えば、多数の異物発生が懸念されるものとして、食品に接触する部分に存在するビニール（原料や中間製品を包んだビニールなど）を誤って食品ごと粉碎機に投入してしまうケースや、製造ラインの付近に塗装が剥がれ易い状態になっている箇所があるケースなどが挙げられる。

#### (2) 『原料、中間製品、製品に直接は触れないが、それらの近くに存在する設備・器具、人員が保有する用具の確認』

食品の近くに存在する設備としては、例えば、

機器の水圧計などのカバーや、労働安全のために設置されているカバーなどが挙げられる。また、食材の上部に位置する蛍光灯なども該当する。食材が開放状態にある箇所については、特に注意が必要となる。

器具では、ライン横に置かれている計量カップや温度計、Brix計などの計測具、開封用のハサミ、カッター（一枚刃）などが該当する。人員が保有する用具では、自組織の工場内で携帯が許されている用具（たとえば、筆記用具、計測具、携帯電話など）や、労働安全のためのゴーグルなどが挙げられる。これらの器具はどのように管理されているか、例えば、使用時にライン付近への落下が懸念される場所に仮置きされるようなことはないか、使用後は定位置に員数管理がされているかなどの確認が必要となる。

#### (3) 『製造ラインを有する施設、製造ラインから離れているが施設内に保有する設備の確認』

施設・設備における異物発生源としては、例えば、ラインから離れた場所にある蛍光灯、窓、ドア、姿見などが挙げられる。また、フォークリフトのランプ、時計のカバーなど、それぞれの工場で多くの発生源が存在する。また、上部からのペンキ片の混入、そ族昆虫などをそれぞれ検討する。

同様に、微生物的要因においては、食中毒菌の付着・増殖・殺菌不良による残存だけでなく、腐敗、変敗菌の付着・増殖・殺菌不良による残存についての検討が推奨される。また、微生物的要因 (B)、化学的要因 (C)、物理的要因 (P) だけでは抽出出来ない危害の検討、例えば、配合ミスや表示工程におけるミスなどについても拡げて検討を進めることが推奨される。

### 3-3. 組織外で発生した問題の自組織の製品への置き換え

次に、組織外での問題が報道された場合、自組織でも同様の事象が発生することがないか食品安全チームが検討し、必要であれば、上述の

3-1, 3-2 同様に自組織の製造に当てはめて深掘することが推奨される。このためには、組織外での問題事例の情報や、業界内あるいは行政の情報など必要な情報の入手を担当する部署を決め、定期的な品質会議あるいは食品安全会議などにて上述の食品安全チームが協議する体制の構築が推奨される。

#### **3-4. ISO/TS 22002-1 を参考にした自組織 工程の確認**

最後に、自組織で進めている管理策に対して、ISO/TS 22002-1 にて挙げられている項目に対して漏れがないことおよび放置されてい

る危害要因がないことの確認を進めることが推奨される。

#### **おわりに**

現在、消費者は食品に関する様々な疑問と不安を持っており、それ故に安全、安心な食品を求める意識も高い。その一方で食品を製造することは、異物混入をはじめ様々な品質危害が発生する危険と隣り合わせである。事業者はその危険に向き合い、自組織にてその対策を進めていくことが重要である。そのことにより、少しずつでも危害要因の管理を進めることで、消費者の信頼に繋がると考えられる。

# 検査面からみたノロウイルス感染症の発生様式の特徴とノロウイルス検査法の現状

福田 伸治 (FUKUDA Shinji)

中国学園大学 現代生活学部 人間栄養学科

Key Words : ノロウイルス 発生様式 感染ルート 検査法 検査キット

## はじめに

今やノロウイルスは、わが国の食中毒および冬季の乳幼児感染性胃腸炎の上位を占め、その対策が必要な病原微生物であるが、減少傾向はみられていない。この原因としては、①新たな遺伝子型亜型の出現（特にノロウイルス感染症の主体を占める遺伝子型 GII.4 が年々遺伝子変化を繰り返す）<sup>1,2)</sup>、新型の出現<sup>3)</sup>などの流行遺伝子型の変化やキメラウイルスの出現<sup>4,5)</sup>により、ヒトの免疫から逃れていること、②糞便のみならず嘔吐物（嘔吐初期の固形物主体の嘔吐物よりも後期の胆汁が混入した苦い液体様の嘔吐物にウイルス量が多い）中に大量のウイルスが排泄されること（図1）<sup>6)</sup>、③症状消失後長期間にわたり糞便中にウイルスが排泄されること<sup>7)</sup>、④感染しても症状を呈さない調理従事者が存在すること<sup>8,9)</sup>、⑤発症ウイルス量が非常に少なく感染率が高いこと<sup>10)</sup>、⑥乳幼児から成人まで幅広く感染発症すること、⑦容易に生活環境を汚染しやすく、冬季などの低温環境化では長期間ウイルスが生存すること<sup>11)</sup>、⑧潜伏時間が24-48時間（平均的には30時間前後の場合が

多い）と長いこと、⑨二枚貝を生食すること（環境中のウイルスを餌であるプランクトンとともに摂取し、中腸腺にウイルスが蓄積）などが関係していると推察される。

ノロウイルスの効果的な感染予防のためには、感染ルートを明らかにし、その原因を断つことが肝要である。ノロウイルスの感染ルートには、いくつかのものが知られているが、検査結果の面からノロウイルス感染症をみると、発

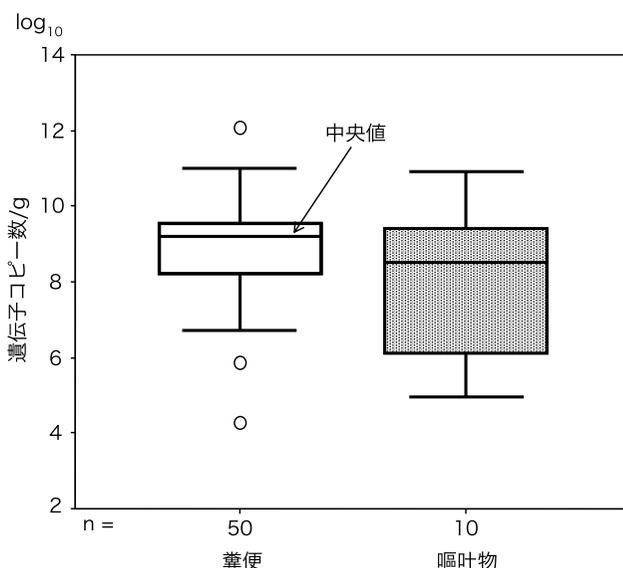


図1 嘔吐物中に排泄されるノロウイルス量（箱ひげ図）

生様式にいくつかの特徴がみられる。ここでは、この特徴について紹介するとともに、感染ルート等疫学調査に必要な検査法の現状について紹介する。

## 1. 検査面からみたノロウイルス感染症の発生様式の特徴

ノロウイルスの感染ルートは、経口感染であるが、一般的には、①汚染された食品（水）の摂食による食品（水）媒介感染（いわゆる食中毒）、②感染者の排泄物に触れた場合あるいはドアノブなど感染者が汚染した環境を介した接触感染、③感染者の排泄物の飛沫あるいはそれが乾燥した塵埃による飛沫感染・塵埃感染に大別されている（ノロウイルス感染の症状と感染経路、<http://www.nihs.go.jp/fhm/fhm4/fhm4-nov012.html>）。

①は、調理従事者が保有するウイルスが食品を介して摂食者に感染する場合あるいは二枚貝に蓄積されたウイルスの摂食により感染する場合である（巻貝は食性が二枚貝と異なるので、ノロウイルスを保有することはない）。この感染ルートの疫学的特徴は、当然のことながら飲食店関係施設での発生の報告が多く、患者発生状況は1峰性（単峰性）である。二枚貝を原因とする事例では、原因となった二枚貝からノロウイルスを検出した事例は少なくないが、二枚貝に起因しない食中毒事例においては、原因食品からのノロウイルスの検出などの感染ルートを明確に解明した得た事例は少ない。ノロウイルスは、細菌のように食品中では増殖せず、人工培養もできないため、遺伝子検査により食品中のノロウイルス検査が行われるが、現状の検査法では、食品からノロウイルスを検出することは容易ではない状況にある。二枚貝以外の食品からも確実にノロウイルスを検出できる技術開発が望まれているところであるが、調理従事者を原因とする食中毒において、明確に感染ルートが解明された事例が報告されているので、これを紹介する<sup>12)</sup>。

平成12年12月、仕出し弁当屋が調理した昼

食弁当を広島県内の某中学校において給食として提供していた事例である。遺伝子学的検査の結果、患者便はもとより、調理従事者便、同一の調理従事者手指ふき取り、食品（調理済みのアジフライおよびシューマイ）から同じ遺伝子型のノロウイルスが検出され、調理従事者便→手指→調理済み食品→摂食者へと伝播したことが強く示唆されている。調理済みのアジフライおよびシューマイからはノロウイルスが検出されているが、加熱調理前のアジフライおよびシューマイからは検出されず、調理後に汚染したことが明らかである。このような感染ルートが明確な事例は珍しいと言っても過言ではない。

②は、いわゆるヒト→ヒト感染であり、この事例が最も多い。老人関係施設、幼稚園などの集団生活施設での発生が多く、数日間にわたりダラダラと患者発生が続く多峰性を示す傾向がある。

また、③の間接的なヒト→ヒト感染である飛沫感染・塵埃感染は近年注目されている感染ルートであり、その感染源として嘔吐物が重要である。平成18年12月に、東京都豊島区のMホテルで436人が発症した事例<sup>13)</sup>では、利用者1名が3階と25階で嘔吐し、これらの階の利用者に患者が集中した。嘔吐物の処理が適切に行われず、ノロウイルスの付着した塵埃が感染源であった可能性が示唆された事例である。同様に、長野県で平成20年4月に発生した結婚式披露宴において、出席者と当該会場スタッフが患者となった事例<sup>14)</sup>では、何らかの原因で会場の床がノロウイルスで汚染し、披露宴の間に塵埃とともにノロウイルスを摂取したことが原因と推察された。この事例では、専用掃除機のダストからノロウイルスが検出されている。

一方で、上記の感染ルートを検査面からみると、表1に示したように、発生様式にいくつかの特徴が観察される<sup>15,16)</sup>。

1) 二枚貝の生食あるいは加熱不足に起因する事例では、患者便から遺伝子グループIおよ

表1 検査面からみたノロウイルス感染症の発生様式の特徴

感染	特徴
食品を介しての感染（食中毒）	①同一の遺伝子型のノロウイルスに起因する。 ②患者便のほか、調理従事者便、食品、ふき取り材料などからノロウイルスが検出される。 ③複数の調理従事者便からノロウイルスが検出される場合が多い。 (④患者発生は単峰性である。)
ウイルス汚染二枚貝の生食、加熱不足による感染	①患者便から遺伝子グループⅠあるいはⅡに属する数種類の遺伝子型のノロウイルスが検出される。 ②調理従事者便からノロウイルスが検出されない。 (③患者発生は単峰性である。) (④1月および2月の発生が多い。)
ヒト-ヒト感染	①同一の遺伝子型のノロウイルスに起因する。 ②調理従事者からノロウイルスが検出されることはほとんどない。 ③提供された食品からノロウイルスが検出されない。 (④患者発生は多峰性である。) (⑤嘔吐物による飛沫・塵埃感染がある。)

( ) 内は、疫学調査から得られる情報

びⅡに属する複数の遺伝子型のノロウイルスが同時に検出される。これは、二枚貝の生育環境に流入した数種の遺伝子型のノロウイルスを餌であるプランクトンとともに取り込むためである。下水中には多くの遺伝子型のノロウイルスが検出されること<sup>17,18)</sup>からも明らかである。二枚貝を原因とする食中毒の場合は、通常、調理従事者からノロウイルスが検出されることはないが、患者に提供したものと同一二枚貝を摂食していた場合には、ノロウイルスが検出されることもある。

2) 調理従事者を原因とする食中毒事例では、限定された1種類の遺伝子型に起因して発生する。これは、ノロウイルスを保有する調理従事者から食品などを介して感染が拡大するためである。

3) また、調理従事者を原因とする食中毒事例では、複数の調理従事者から同じ遺伝子型のノロウイルスが検出される場合が多い<sup>15,19)</sup>。一度、トイレなどの共用施設を介して<sup>20)</sup>、調理従事者間で感染が拡大した後、ウイルス保有者が調理中に食品を汚染し、それを摂食した摂食者に伝播していることが推察される。しかしながら、このような事例では、調理従事者が明

らかな症状を呈しない場合が多く、感染していることに気付いていないことがほとんどのようである。

4) ヒト-ヒト感染事例では、調理従事者を原因とする食中毒事例と同様に、1種類の遺伝子型のノロウイルスに起因して発生する。同じ生活空間でトイレドアノブなどのだれもが触れる個所を介して、あるいは介護者などの手指を介してノロウイルスが伝播・拡散するため、提供された食品および調理従事者便からノロウイルスが検出されることはない。

ノロウイルス感染症の原因究明は、検査結果のみならず疫学情報などの種々の情報を総合して行われるが、上記のように検査面からも感染ルートを推定することが可能である。例えば、①患者排泄物から複数の遺伝子型のノロウイルスが検出されるか否か、②調理従事者便からノロウイルスが検出されるか否か、③複数の調理従事者から患者と同じ遺伝子型のノロウイルスが検出されるか否か、に注目すれば二枚貝に関連する事例であるか、あるいはそれ以外の食品が原因である事例か、またはヒト-ヒト感染によるものかの判別の参考となる。



での迅速診断の補助には有効である。イムノクロマトグラフィー法によるベットサイドでの検査を目的としたいくつかのキットが市販されている。機器を必要としないため、病院などにお

ける急性期患者のノロウイルス感染症の診断の補助に広く利用されているが、遺伝子型によっては検出感度が低い場合がある。そこで、最近、ルシフェリン・ルシフェラーゼによる生物

表2 主な市販ノロウイルス検出キット

キット	方法	メーカー	体外診断用医薬品	検出対象物	所要時間	キット以外に必要な主な機器・試薬	特徴
TaKaRa qPCR Norovirus (GI/GII) Typing Kit	リアルタイム RT-PCR	タカラバイオ		遺伝子	1-2 時間	・リアルタイム PCR 装置 ・RNA 抽出試薬	・厚生労働省通知法（最終改正 平成 25 年 10 月 22 日食安監発 1022 第 1 号）に記載されたプライマー、プローブ配列
TaKaRa ノロウイルス GI/GII 検出キット	リアルタイム RT-PCR	タカラバイオ		遺伝子	2 時間 (含前処理)	・リアルタイム PCR 装置	・厚生労働省通知法に記載されたプライマー、プローブ配列 ・RNA 精製不要
1 step RT-PCR ノロウイルス G1, G2, G1&G2 検出試薬キット	Ampdirect RT-PCR	島津製作所		遺伝子	3 時間 (含前処理)	・PCR 装置 ・リアルタイム PCR 装置	・厚生労働省通知法に記載されたプライマー配列 ・RNA 精製不要
ノロウイルス検出キット G1, G2, G1/G2 一融解曲線解析ー G1/G2 ープローブ検出ー	リアルタイム RT-PCR	東洋紡		遺伝子	2.5 時間 (含前処理)	・リアルタイム PCR 装置	・厚生労働省通知法に記載されたプローブ配列（プローブ検出） ・RNA 精製不要
Loopamp ノロウイルス G I, G II 検出キット	RT-LAMP	栄研化学		遺伝子	1 時間	・リアルタイム濁度測定装置または恒温装置 ・RNA 抽出試薬	・一定温度で遺伝子増幅 ・ピロリン酸マグネシウムの白濁による目視検出が可能
TRCRtest NV-W/NV-WL	TRC	東ソー		遺伝子	0.5 時間	・TRCR リアルタイムモニター ・RNA 抽出試薬	・一定温度で遺伝子増幅
スイフトジーン® ノロウイルス G I/GII 「カイノス」	NASBA 核酸クロマトグラフィー	カイノス		遺伝子	2 時間	・恒温装置 ・RNA 抽出試薬	・一定温度で遺伝子増幅
NV-AD (III) 「生研」	酵素免疫測定法	デンカ生研	○	抗原	2 時間	・プレートリーダー	・操作が簡単で、多検体処理が可能
クイックナビ™ ーノロ2	イムノクロマトグラフィー	デンカ生研	○	抗原	15 分		・操作が簡単で、臨床現場で有用
イムノキャッチ® ーノロ	イムノクロマトグラフィー	栄研化学	○	抗原	15 分		・操作が簡単で、臨床現場で有用
GE テスト イムノクロマト ーノロ 「ニッスイ」	イムノクロマトグラフィー	日水製薬	○	抗原	15 分		・操作が簡単で、臨床現場で有用
ラビッドエスピー® ー《ノロ》	イムノクロマトグラフィー	DS ファーマ バイオ メディカル	○	抗原	15 分		・操作が簡単で、臨床現場で有用
クイックチェイサー® ー Noro	イムノクロマトグラフィー	ミズホメディー	○	抗原	10 分		・操作が簡単で、臨床現場で有用
BL-NV ‘栄研’	生物発光免疫測定法	栄研化学		抗原	120 テスト / 時間	・全自動生物化学発光免疫測定装置 (BLEIA®-1200)	・抗原検出法の中では高感度で、多検体処理が可能 ・BL 採便容器を用いることで、全自動測定

発光法を原理とするより高感度の検査キット (BLEIA 法) も販売された。この方法は、全自動生物化学発光免疫測定装置が必要であるが、120 検体 / 時間の処理が可能で、検査センターなどでの多検体処理に有効な方法であると考えられる。また、この方法は、ふき取り検査においても、リアルタイム PCR 法と同等もしくはそれ以上の検出感度が得られたことが報告されている<sup>28)</sup>。

表 2 には、主な市販ノロウイルス検査キットの一覧を記載した。また、「微生物の簡易迅速検査法」<sup>29)</sup> にも簡易あるいは迅速検査法が紹介されている。イムノクロマトグラフィー法を原理とする簡易検出キットは、その簡便性から広く利用されているが、2014 年後半から新しい遺伝子型 GII.P17-GII.17 のノロウイルスが多く検出されるようになり<sup>3)</sup>、イムノクロマトグラフィー法による市販簡易検査キットでは、十分な遺伝子量があるにもかかわらず、この遺伝子型のノロウイルスが検出されない場合があることが報告された<sup>30,31)</sup>。この新しい遺伝子型については、各社で情報提供などの迅速な対応がなされたが、イムノクロマトグラフィー法などの抗原抗体反応を利用した検査法は、新しい遺伝子型あるいは新しい遺伝子型型の出現時には使用に当たって注意が必要である。また、それぞれの検査キットには、遺伝子グループ別ができるものなどのそれぞれの特徴があるので、それぞれの長所および短所を考慮して使用することが望ましい。さらに、検査キットの検出原理の違いから検出感度が異なるので<sup>32,33)</sup>、このことにも十分注意する必要がある。

なお、対外診断薬として認可され、保険収載されているものがいくつかあるが、① 3 歳未満の患者、② 65 歳以上の患者、③ 悪性腫瘍の診

断が確定している患者、④ 臓器移植後の患者および⑤ 抗悪性腫瘍剤、免疫抑制剤、又は免疫抑制効果のある薬剤を投与中の患者、のハイリスクグループに限られている。

## まとめ

検査面からみた発生様式にも感染ルートを推定できるいくつかの特徴があり、ノロウイルス対策の参考にさせていただきたいが、感染ルート (原因食品など) を明確に特定できるだけの高感度検査法が存在しない現状にある。ノロウイルス検査は、厚生労働省より通知された方法 (平成 19 年 5 月 14 日付け食安監発第 0514004 号最終改正「ノロウイルスの検出法について」) に準拠して行われてきたが、特に、食品の検査に関しては、検出が困難な状況にあり、二枚貝の検査においても検査機関間の精度格差が大きとも言われている<sup>22)</sup>。下痢を主徴とする集団感染性腸炎、感染症発生時の原因の特定のみならず食品のリスク評価などの食品の安全性確保のため、汎用性の高い標準化されたノロウイルス検査法の確立が望まれているところである。平成 22 年 6 月には、食品のウイルス標準化試験法検討委員会 (<http://www.nihs.go.jp/fhm/csvdf/index.htm>) が設立され、平成 25 年 1 月には、「一般的な食品検体からのウイルスの回収・濃縮法」の標準試験法案が示された。この方法は、 $\alpha$ -アミラーゼ処理とパンソルビン・トラップ法によるノロウイルス回収・濃縮であり、平成 25 年 10 月 22 日付け食安監発 1022 第 1 号 (「ノロウイルスの検出法について」の一部改正について) で、厚生労働省医薬品食品局食品安全部監視安全課長から地方自治体衛生主管部 (局) 長宛に通知されたところであるが、さらなる研究の進展、標準化に期待するところが大きい。

## 参考文献

1. Motomura K, Yokoyama M, Ode H *et al.*: Divergent evolution norovirus GII/4 by genome recombination from May 2006 to February 2009 in Japan. *J. Virol.*, **84**(16) : 8085-8097, 2010.
2. 福田伸治, 重本直樹, 谷澤由枝: 広島県におけるノロウイルス遺伝子型 GII.4 の変異. 広島県立総合技術研究所保健環境センター研究報告, **18** : 15-19, 2010.
3. Matsushima Y, Ishikawa M, Shimizu T *et al.*: Genetic analyses of GII.17 norovirus strains in diarrheal disease outbreaks from December 2014 to March 2015 in Japan reveal a novel polymerase sequence and amino acid substitutions in the capsid region. *Euro Surveill.*, **20**(26) : 1-6, 2015.
4. Phan T G, Kaneshi K, Ueda Y *et al.*: Genetic heterogeneity, evolution, and recombination in noroviruses. *J. Med. Virol.*, **79**(9) : 1388-400, 2007.
5. Fukuda S, Sasaki Y, Takao S *et al.*: Recombinant norovirus implicated in gastroenteritis outbreaks in Hiroshima Prefecture, Japan. *J. Med. Virol.*, **80**(5) : 921-928, 2008.
6. 福田伸治, 重本直樹, 谷澤由枝 他: 患者糞便中に排泄されるノロウイルス遺伝子量の遺伝子型による差異と吐物中に排泄される遺伝子量. 広島県立総合技術研究所保健環境センター研究報告, **17** : 11-14, 2009.
7. 三好龍也, 内野清子, 吉田永祥 他: ノロウイルス感染におけるウイルス排泄期間と排出量. 食品衛生研究, **56**(11) : 9-15, 2006.
8. 柿島安博, 杉枝 正明, 中島 節子: 学校給食施設調理従事者便からの SRSV 遺伝子の検出. 日食微誌, **16**(3) : 193-196, 1999.
9. Jeong AY, Jeong HS, Lee JS *et al.*: Occurrence of norovirus infections in asymptomatic food handlers in South Korea. *J. Clin. Microbiol.*, **51**(2) : 598-600, 2013.
10. Green KY : The role of human caliciviruses in epidemic gastroenteritis. *Arch. Virol. Suppl.*, **13** : 153-165, 1997.
11. Doultree JC, Druce JD, Birch CJ *et al.*: Inactivation of feline calicivirus, a Norwalk virus surrogate. *J. Hosp. Infect.*, **41**(1) : 51-57, 1999.
12. 福田伸治, 高尾信一, 河崎智彦 他: 感染経路が解明された *Norwalk virus* 食中毒事例. 広島県保健環境センター研究報告, **10** : 15-18, 2002.
13. 木村博子, 上野曜子, 清水みつこ 他: M ホテルにおけるノロウイルスによる集団胃腸炎の発生について. 病原微生物検出情報, **28**(3) : 84, 2007.
14. 吉田徹也, 中沢春幸: 塵埃感染の疑われたノロウイルスによる集団感染性胃腸炎事例. 感染症誌, **84**(6) : 702-707, 2010.
15. 福田伸治, 高尾信一, 桑山勝 他: ウイルス性食中毒の発生の特徴. 日食微誌, **20**(4) : 203-209, 2003.
16. 福田伸治, 高尾信一, 桑山勝 他: ノロウイルス集団感染事例の分子疫学的解析. 広島県獣医学会雑誌, **21** : 64-68, 2006.
17. Iwai M, Hasegawa S, Obara M *et al.*: Continuous presence of noroviruses and sapoviruses in raw sewage reflects infections among inhabitants of Toyama, Japan (2006 to 2008). *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**(5) : 1264-1270, 2009.
18. Kitajima M, Haramoto E, Phanuwat C *et al.*: Molecular detection and genotyping of human noroviruses in influent and effluent water at a wastewater treatment plant in Japan. *J. Appl. Microbiol.*, **112**(3) : 605-613, 2012.
19. 吉澄 志磨, 三好 正浩, 後藤 明子 他: ノロウイルスによる胃腸炎集団発生について—北海道, 2009/10 シーズン—. 道衛研所報, **60** : 61-65, 2010.
20. 高野穂高, 和田由美, 安田正美 他: トイレを起点とするノロウイルス汚染拡大の検証. 食品衛生研究, **62**(9) : 33-35, 2012.
21. 有田知子, 木村博一, 野田衛 他: パンに含まれるノロウイルスの回収法の検討. 感染症誌, **82**(5) : 473-475, 2008.
22. 野田衛: 食品のウイルス検査の現状と課題. 日食微誌, **29**(1) : 25-31, 2012.
23. 秋場哲哉: 細菌による前処理を用いた食品からのノロウイルス検出法. 日食微誌, **29**(1) : 38-41, 2012.
24. 福田伸治, 重本直樹, 谷澤由枝 他: 還元剤処理と等温遺伝子増幅法を併用した二枚貝からのノロウイルス遺伝子の迅速検出. 広島県立総合技術研究所保健環境センター研究報告, **17** : 1-6, 2009.

25. 斎藤博之：食品のノロウイルス検査の汎用化を目指したパンソルピン・トラップ法の開発. 日食微誌, **29**(1) : 32-37, 2012.
26. 篠原美代子, 富岡恭子, 峯岸俊貴 他：非昌性リン酸カルシウム微粒子を用いた食品からのウイルス検出法. 病原微生物検出情報, **32**(12) : 357-358, 2011.
27. 溝口嘉範, 木田浩司, 葛谷光隆 他：ふきとり検体のノロウイルス検査法の改良. 病原微生物検出情報, **32**(12) : 358-359, 2011.
28. 下村力斗, 清水大輔, 中川弘：環境中のノロウイルスの拭き取り検査における生物発光酵素免疫測定法 (BLEIA 法) の検討. 日食微誌, **34**(4) : 219-223, 2015.
29. 野田衛, 福田伸治：ウイルスの簡易迅速検査法. 微生物の簡易迅速検査法, 五十君静信, 江崎孝行, 高鳥浩介 他 監修, p.539-548, テクノシステム, 東京, 2013.
30. 楠原一, 赤池重宏, 小林隆司 他：ノロウイルス GII.17 型の流行とその特徴について－三重県. 病原微生物検出情報, **36**(5) : 91-92, 2015.
31. Khamrin P, Thongprachum A, Takahashi S *et al.*: Evaluation of immunochromatography tests for detection of novel GII.17 noroviruses in stool samples. *Euro Surveill.*, **20**(28) : 7-8, 2015.
32. 西尾治：ノロウイルス感染症. 公衆衛生, **71**(12) : 972-976, 2007.
33. 前田秀雄:エビデンスに基づいたノロウイルス感染拡大防止策の検討－東京都健康安全研究センター「ノロウイルス対策緊急タスクホース」の試み－. 感染対策 ICT ジャーナル, **5**(4) : 434-439, 2010.

# 酵素耐熱化の実例

## — ミルクオリゴ糖合成酵素の耐熱化 —

北岡 本光 (KITAOKA Motomitsu)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所

Key Words：酵素 耐熱化 ランダム変異 選抜 LNB

### はじめに

酵素は触媒作用を持つタンパク質と定義される。酵素を触媒とした反応は例えば澱粉糖化など食品原料の製造を目的として工業的に多数利用されている。酵素は一般の化学触媒と比較して常温常圧などの温和な反応条件で行うことが利点と理解されている。しかしながら酵素反応の産業利用を行う上では 50 ~ 60℃ 程度以上のある程度高温で反応することが望ましい場合が多い。例えば澱粉糖化においてはある程度高温で反応が進行しなければ澱粉の老化による反応性低下が問題になるし、常温付近の反応であれば種々の微生物等が増殖してしまう危険性が高まる。特に糖のような微生物に資化されやすい化合物を反応で取り扱う場合にはある程度高温で反応を行うことが望ましい。

耐熱性の高い酵素を見つけるためには、一般的に耐熱性の高い微生物から酵素を取得する方法が行われる。近年のゲノム解析の進歩により多数の好熱性微生物の遺伝子情報が得られる。これらの中から耐熱性酵素の候補を見いだすことは日常的に行われている。しかしながら、酵素によっては類似遺伝子が耐熱性微生物に知られていないものも存在する。耐熱性微生物からの酵素の取得が困難である場合は、酵素のアミノ酸配列を変化させることにより酵素そのものを耐熱化する方法が試みられることが多い。ア

ミノ酸配列に変異を導入した酵素は、その設計図である酵素遺伝子に変異を導入し宿主に発現させることにより得られる。遺伝子にランダムな変異を導入する技術は多数報告されている。

耐熱性を向上させる変異はある程度予測できる場合もあるが、多くの場合はランダム変異導入-選抜の試行錯誤により見つけられる。このような選抜を行うためには多数の変異酵素の耐熱性を一括して評価する方法の開発が必要である。酵素の活性測定法は目的酵素により異なるため、目的とする酵素の活性を如何に効率的に測定できるかが鍵を握ることになる。以下我々が行った、ヒトミルクオリゴ糖合成酵素の耐熱化について紹介する。

### 1. ヒトミルクオリゴ糖関連二糖 LNB の製造法および問題点

我々は、母乳栄養乳児の腸管にビフィズス菌が優先増殖するメカニズムを探っていたところ、母乳に含まれるヒトミルクオリゴ糖末端に多く存在する二糖単位であるラクト-N-ビオース I (LNB) が、ある種のビフィズス菌により利用されるものの、他の微生物に利用されにくいことを見いだした。そのため、この二糖が母乳中に含まれるビフィズス菌増殖因子の本質であると考え LNB の酵素合成法を考案した。LNB はガラクトースと N-アセチルグルコサミ

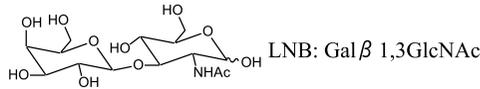


図1 スクロースを原料としたLNB製造法の原理

四酵素反応を同時に行うと両辺に現れる化合物はリサイクルされるため触媒量あれば十分であり式から消すことができる。その結果スクロースから一段階でLNBを生成する反応が実現する。両辺に現れる化合物をそれぞれ異なる下線で示している。

ンがβ1,3-結合した単純な構造の二糖であるが天然の入手源がほとんど知られていない。そこで我々はまず、ピフィズス菌由来の酵素4種類を用いるLNBの製造法を開発した(図1)。この方法を用いると実験室スケールで10L規模の反応を行うことにより一度に1.4kg以上のLNBを調製することが可能である。これらの酵素のみをピフィズス菌から経済的に調製することが困難であるので、現時点では遺伝子組換え酵素を用いて反応を行っている。

遺伝子組換え酵素による反応において、ピフィズス菌由来スクロースホスホリラーゼはもともと耐熱性が高く60℃程度までは十分使用可能である。GalTとGalEはピフィズス菌由来酵素自体の耐熱性は高くないものの、これらの酵素は一般的なガラクトース代謝に関わる酵素であるため好熱性菌から耐熱性酵素を取得することが容易と考えられる。しかしながら、GNB/LNBホスホリラーゼを持つ微生物は極めて限られており、好熱性菌からは見つからない。ピフィズス菌由来酵素の耐熱性は45℃程度であるが、それ以上の耐熱性を示す酵素の報告例はない。将来の産業化を目指す上で、四酵素による反応を高温で行うためにはすべての酵素について耐熱性のものを用意する必要がある。そこで一番問題になるであろうGNB/LNBホスホリラーゼの耐熱化に取り組んだ。

## 2. ランダム変異 - 選抜に対する考え方

ランダム変異 - 選抜の方法は大多数の砂利の中から宝石を見つけ出すことに例えることができる。大部分が砂利(ハズレ)の集団から宝石(アタリ)を見つけ出すためには、できるだけ少ない手間で多数のサンプルを評価することが鍵となる。そのため、評価のスループットを上げることが重要である。

ランダム変異により得られる酵素の特性が宿主の生存に影響を与える場合は、有用な変異が導入された酵素を発現している宿主を選択的に増殖させることが可能である。そのため培養法により大きなランダム変異プールから比較的簡便に変異酵素を取得することができる。抗生物質耐性に関わる酵素の改変では、宿主の生存により容易に変異酵素を識別することができるため、このような手法が使われることが多い。

酵素の耐熱化では、形質の違いが宿主の生存に影響を与えることは通常考えにくい。そこで、ランダム変異導入後に個別に耐熱性を評価して選抜する手法を採用する必要があり、多数のサンプルの測定を行うことになる。一般的に、スループットを上げようとすると測定精度が低下する。そのため、精度が低下しても目的の変異体(宝石)をきちんと見つけられる条件設定が重要になる。

### 3. 酵素の熱処理条件の考え方

変異 - 選抜を始める前に、熱処理条件を決定しておくことも重要である。酵素の熱失活における基本的な式を以下に示す。

$$A = A_0 e^{-kt}$$

(A, 酵素の残存活性 :A<sub>0</sub>, 酵素の初期活性 :k, 失活速度定数)

酵素の熱失活仮定は一次反応と見なすことができるため、ある温度での失活速度定数を k とすると残存活性は以下の式で表される。この温度での酵素の半減期は  $\ln 2/k (= 0.693/k)$  と計算される。

ここで、失活速度定数が 1/2 倍 (半減期が 2 倍) になった酵素を仮定する。酵素の熱処理時間を親酵素の半減期の 2 倍に設定すると、親酵素の残存活性は 25%、変異酵素の残存活性は 50% となりその比は 2 である。熱処理時間を半減期の 6 倍にすると、残存活性はそれぞれ 1.6%、12.5% となり、活性比は 8 にまで上昇する。この条件においては、失活速度が親酵素の 80% の場合で活性比が 2.3、90% の場合で 1.5 と計算されるため、わずかな耐熱性増加も鋭敏に検出できることが期待される。このように、熱処理条件において、親酵素の残存活性比率を低く設定するほど耐熱化された酵素との熱処理後の活性比が大きくなる。そのため熱処理条件としては十分に残存活性を低くすることが重要である。実際問題として熱処理後の活性が正確に測定できることは必要であるので、残存活性を 1% 程度に設定すると良い。それ以上に失活させても活性測定が可能であるならばそのような条件設定も可能である。

### 4. ランダム変異 - 選抜による候補変異株取得後の進め方

ランダム変異 - 選抜で候補となる変異酵素を取得したら、遺伝子配列を解析し変異点を見つける。一般に一つの変異体に入る変異の数は 1 つとは限らないため複数の変異点を持つ変異酵素が見つかることが多い。また、多数の候補の遺伝子を解析すると同じアミノ酸に変異の入っ

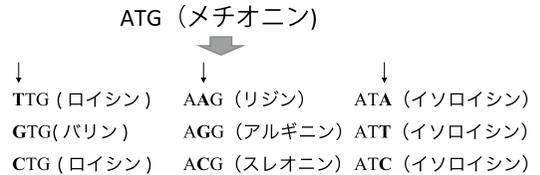


図2 一塩基変異によるアミノ酸置換のパターン  
例えばメチオニンからは6種のアミノ酸以外に変異できない (13種は原理的に得ることができない)

た複数の変異酵素が得られることも多い。このようにして、耐熱性を向上させるための変異点の候補を見つける。

次に、変異箇所の候補に対して飽和変異 (19 種のアミノ酸への置換の効果をすべて確認する方法) を行い、どのアミノ酸に置換した場合に最も効果が高いか調べる。DNA へのランダム変異導入法では、原理的に連続した 2 塩基に変異が入ることはない。例えば、DNA 塩基に 1/1000 の確立で変異の入る条件だとすると、変異が 2 塩基並ぶ確立は 1/1,000,000 となり事実上 0 と見なすことができる。DNA は 3 塩基でアミノ酸 1 残基をコードしており、1 塩基だけの変異においては、変異可能なアミノ酸の数は限られている。例えば、図 2 に示すようにメチオニンからのアミノ酸変異は 7 種類のみ可能であり他のアミノ酸に置換されることは原理的にない。そのため、飽和変異による有効なアミノ酸変異の確認は重要である。最終的に、各変異点を最適化することにより、耐熱性を向上させた変異酵素を得る。

### 5. GNB/LNB ホスホリラーゼ耐熱化の実際

酵素の耐熱性を調べるためには、熱処理を施した酵素の活性を個別に測る必要がある。多数の酵素活性を同時に測定するにはマイクロプレートを利用すると効率的である。96 穴のマイクロプレートが一般的に市販されており、マイクロプレート間のサンプル移動は 8 連ピペット等を用いることができる。さらにスループットを上げる必要があれば自動化された液体ハン

ドリングシステムも入手可能である。酵素活性測定法として比色法を使うことができればマイクロプレートリーダーによりプレート1枚(96サンプル)の活性測定を数秒で行うことが可能である。また、滅菌済みのマイクロプレートも市販されており、大腸菌の培養もマイクロプレート上で行うことが可能である。

個々の大腸菌を多数同時に培養するためにはマイクロプレートを利用するとその後のアッセイまで好都合である。96穴マイクロプレート中200 $\mu$ Lの培地により大腸菌の培養を行った。スループットを上げる上で、なるべく酵素生産性のばらつかない培養条件を見出すことが重要である。今回最適化した実験条件では、各大腸菌の酵素タンパク生産性の標準偏差は35%であった。

通常のエラープローンPCR法によりランダム変異が導入された酵素遺伝子ライブラリーを導入したベクターにより大腸菌を形質転換し、コロニー分離することによりランダム変異が導入された酵素遺伝子を発現するクローン群を得た。大腸菌は、寒天プレートから直接マイクロプレート中の培地に食菌した。今回はこの操作を手動で行っているが、必要であればコロニー

ピッカーを用いて自動化することも可能である。培養終了後に、96ピンレプリケーターを用いて、各ウエルの大腸菌を別の寒天培地に移しておく。目的のクローンがあればこの寒天培地から取得することができる。

大腸菌からの酵素抽出のスループットを上げるためには、超音波破碎のような物理処理よりも、液体試薬による溶菌処理の法が望ましい。マイクロプレートで培養した大腸菌をプレートのまま遠心分離を行い、各ウエルの上清を除去する。残った菌体に溶菌試薬(Merck社製 Bug Buster)を添加することにより酵素の抽出を行った。酵素の熱処理を行う前に、適当な緩衝液で希釈を行う。溶菌液には界面活性剤など酵素を不安定化する因子が含まれるため、熱処理前の希釈は必須である。この希釈は次の加熱仮定のために、96連のPCRプレート上で行った。事前に親酵素の残存活性が1%前後になるような温度及び時間条件を設定した(この場合は55 $^{\circ}$ C 30分)。

熱処理後の酵素活性をマイクロプレート上での比色定量法により測定した。失活率を厳密に測定するためには本来熱処理前後の活性を測定して比較することが望ましい。しかしながら、

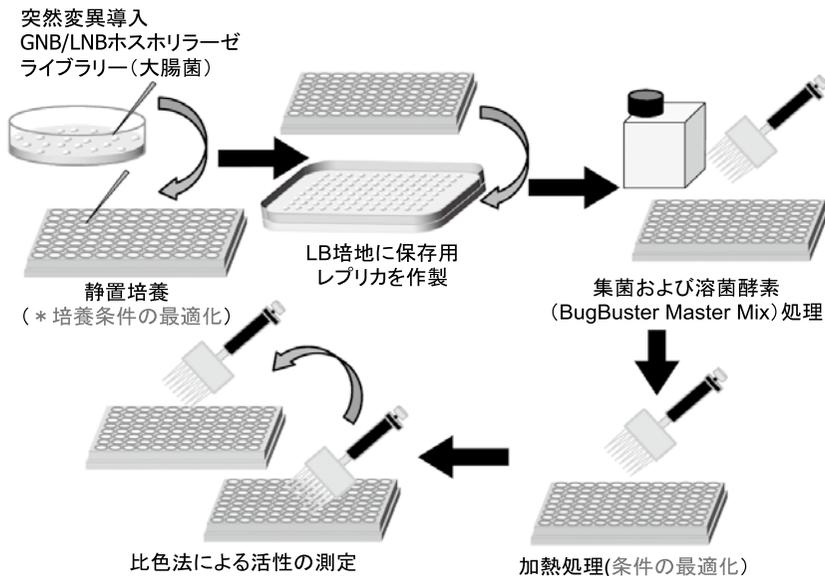


図3 ランダム変異—選抜法によるGNB/LNBホスホリラーゼの耐熱化の戦略

前後の活性を測定しようとするすると測定数が二倍になってしまいスループットを下げることになる。今回は熱処理後の活性のみを測定して効率を高めた。事前にタンパクの生産性のばらつきの少ない培養法を検討しているため、精度をある程度犠牲にすることにはなるが、一度の測定での耐熱性評価が可能になった。なお、加熱後の活性でのみ評価を行う場合は、比活性が大きく低下するものの安定性が向上するタイプの変異酵素は見落とすことには注意を要する。今回は実用的な耐熱酵素の取得を目指していたため、比活性の低下する酵素は選抜の対象外とした。

方法の概略を図3に示した。この方法では1人の労力で無理なく8プレート(=768サンプル)/週のペース程度のペースで評価を行うことが可能であり、約3ヶ月のスクリーニング期間で約5000クローンの熱安定性評価を行った。その結果、172個の熱安定性の向上した変異酵素候補を取得した。得られた変異酵素の変異点を解析したところ、同じ変異箇所を含むものも見いだされた。

得られた変異パターンを元に、熱安定性を向上させるアミノ酸変異点5点を選抜した。そのうち236番目のシステイン(以下C236)および576番目のアスパラギン酸(以下D576)が効果の高い変異点であった。次に、C236およ

びD576を他のアミノ酸に変異させたときの熱安定性について調べた。C236では、チロシンへの置換(C236Y)のみ大きな耐熱性の向上が見られた。D576はバリン(D576V)イソロイシン(D576I)、ロイシン(D576L)、メチオニン(D576M)で同程度の安定性上昇が見られた。D576の熱安定性を向上させる置換アミノ酸はすべて中程度の大きさの疎水性アミノ酸という共通点があった。

親酵素、C236Y、D576Vの熱安定性はそれぞれ45℃、60℃、55℃までであった。二重変異酵素C236Y/D576Vでは熱安定性が65℃まで向上しており、この2点の変異点はそれぞれ独立に熱安定性に寄与していることがわかった。以上のように、効率的な選抜を行うことにより耐熱性の20℃向上した酵素の取得に成功した。

## おわりに

本稿で紹介した酵素の耐熱化は他の酵素に対しても一般的に使うことの可能な方法である。また、耐熱化以外のスクリーニングでも同様の手法が適用可能なことも多いと考えられる。今後種々の酵素の改良に役立てていきたい。

本稿は参考文献1の結果を解説したものである。また、本項に記載した内容の一部は参考文献2に発表したものである。

## 参考文献

1. Y. Koyama *et al.*; Directed evolution to enhance thermostability of galacto-N-biose/lacto-N-biose I phosphorylase. *Protein Eng. Des. Select.*, **26** (11), 755-761 (2013).
2. 西本完, 北岡本光, 林清: 糖質関連酵素の革新的利用技術・改変技術の開発. *化学と生物*, **52** (8), 505-511 (2014)

城西大学薬学部 白瀧 義明 (SHIRATAKI Yoshiaki)

## アケビ *Akebia quinata* Decaisne (アケビ科 Lardizabalaceae)

4月になると、人里近い山裾の茂みに紫色の花を付けたつる性の木本を見かけます。下に垂れさがる総状花序に雌花と雄花をつけ、大きい雌花が花序の基部に、小さいいくつかの雄花が先端につきますが、花卉のように見えるのはがく片で、雌花、雄花ともに花卉はありません。小葉は普通5枚、長楕円形、長さ3~5cm、鋸歯はなく、先が少しへこんでいます。秋になると、大きな楕円体の果実ができ、果皮はやがて1ヶ所で縦に割れ、中から白くて柔らかい果肉が顔を出します。アケビの名は大きく口を開けた独特の実の形「開け実」が変化して生まれたとする説が有力です。

アケビのつるは上から見て左巻きに伸び、人家の生け垣でも良く見かけます。同属植物のミツバアケビ *A. trifoliata* Koidz. も、よく見かけますが、両方とも果肉を食べるだけでなく、若芽も果皮も山菜として、その独特のほろ苦い味が好まれ、山菜料理等によく使われます。ミツバアケビのつるは東北地方や信州では、かごや玩具などの民芸品の素材としても重用されています。アケビは北海道以外の日本各地に分布しますが、ミツバアケビは、北海道西南部まで分布し、小葉が3枚、数個の鈍鋸歯があるのが特徴です。花は暗赤紫色、雄花、雌花ともにアケビより小さくて花の色は濃いのですが、一方、果実は大きく、長さ10cmを超え、熟すと濃紅紫色を帯びます。我が国に分布するアケビ属植物にはほかに小葉が3~5枚あるゴヨウアケビ *A. lobata* Decne. var. *pentaphylla* Makino がありますが、アケビとミツバアケビの自然交配による雑種と考えられています。アケビ、ミツバ



写真1 アケビ(花)



写真2 ミツバアケビ(花)



写真3 ミツバアケビ (果実)



写真4 ムベ (花)

アケビとも、落葉する11月頃、直径2 cm 位の木質化したつるを採集し、厚さ2~3 cm に輪切りにして日干しにしたものを「木通 (もくつう)」といい、漢方では、利尿、通経、消炎を目標として消風散 (しょうふうさん)、竜胆瀉肝湯 (りゅうたんしゃかんとう) などに処方されます。成分はサポニンのアケボシド akeboside Ste やカリウム塩を含んでいます。

同じアケビ科の植物に、ムベ *Stauntonia hexaphylla* (Thunb.) Decne. があります。ムベは、常緑のつる性木本でトキワアケビともよばれ、

関東地方以西の本州に分布します。葉はアケビ同様、掌状複葉で、成熟したつるでは、楕円形で長さ6~10 cm の小葉が5~7枚つきますが若いつるでは3枚しかつきません。そこで七五三にちなんで、おめでたい木とされてきました。花は4~5月頃、総状花序の先に、雄花と雌花がつきますが、黄白色の広披針形の花弁のように見える部分は外がく片です。秋には楕円体の硬い液果ができ、アケビのように裂開はしないものの食べられます。

アケビ科植物は世界に8属約30種が知られ、東アジアに6属、遠く離れた南アメリカに2属が分布しています。このように、地球の遠く離れた場所に分布するアケビ科植物の隔離分布は古くから植物地理学上の謎の一つとなっています。



写真5 ムベ (果実)

# 健康食品の エビデンス

## 第12回

濱舘 直史 / 濱舘学術事務所

## アスタキサンチン

「サケは白身魚なんです!」と教えを受けたときに、とても衝撃を受けたことを覚えています<sup>1,2)</sup>。とはいえ、サケは白身魚か赤身魚かということ考えたこともなく、ピンク色をしているという認識しかありませんでしたが、サケは、ヘマトコッカス藻などが生産するアスタキサンチンという赤色素を筋肉中に蓄積することでその色を呈しています。この赤色は、その卵であるイクラにも蓄積されています。サケの他にも、エビ、カニ、タイ、コイ、金魚などもアスタキサンチンを体表に蓄えることで赤色を呈します。当然のことですが、食物からアスタキサンチンを除くことで、サケやエビの赤色は除かれます。アスタキサンチンは、ホウレンソウやマリーゴールドに含まれるルテインと同じ、カロテノイドのキサントフィルに属します。カロテノイドなどの研究功績でノーベル化学賞を受賞したリヒャルト・クーンによって、1938年に発見され、ロプスターの学名(アスタカスガニマルス)とキサントフィルであることから命名されました。13個もの長い共役二重結合である疎水部分と両脇にそれぞれ親水部分である水酸基を持つ特徴的な分子構造を持ちます。また、サプリメントの多くは、ヘマトコッカス藻の色素を原料としています。

アスタキサンチンは、強力な抗酸化作用を持つことが良く知られています。特に、一重項酸素を消去する能力は、抗酸化物質として良く知られているビタミンE、β-カロテン、お茶のカテキンなどよりも著しく強いという報告もあります<sup>3)</sup>。また、一重項酸素の消去反応は、抗酸化物質が酸化分解を受ける化学的消去反応と、一度吸収しても分解されずに熱エネルギーに変換して放出する物理的消去反応の2つが知られていますが、アスタキサンチンは抗酸化物質として優れた物理的消去反応の度合いが高い物質であ

ることが報告されています<sup>4)</sup>。活性酸素は老化や生活習慣病などに関連するため、この優れた抗酸化作用を基軸に様々な研究が進められています。シワやメラニンの生成を抑制する美容効果、LDLの酸化抑制や抗炎症作用などによる抗動脈硬化作用、エネルギー代謝調節による運動パフォーマンスの向上効果、眼精疲労軽減や眼底血流速度の増加など眼疾患に対する有効性があることがわかってきています。アスタキサンチンの美容効果については、アスタキサンチン配合の化粧品のテレビCMをご覧になった方も多いのではないのでしょうか。

アスタキサンチンのヒトに対する研究も多数報告されています。美容効果については、アスタキサンチンとトコトリエノールを含むソフトカプセル摂取による影響を二重盲検法で健康人女性16名を対象に評価した報告があります<sup>5)</sup>。この報告では、4週間後に目尻の肌水分量、シミ、にきび、はりつやなどにおいて有意な改善が認められています。さらに、アスタキサンチン含有カプセルおよび美容液の使用によって、シワ、弾力、キメなどが改善した単盲検試験結果も報告されています<sup>6)</sup>。動脈硬化については、LDL被酸化能の指標であるlag timeが延長されることが報告されています<sup>7)</sup>。また、アスタキサンチン摂取によって血清中性脂肪濃度が低下し、HDLおよびアディポネクチン濃度が上昇したことが報告されています<sup>8)</sup>。スポーツ医学の分野では、長距離走競技者を対象にアスタキサンチンを摂取することによって、筋肉崩壊の指標である運動による血中クレアチンホスホキナーゼの上昇が軽減することを示しています<sup>9)</sup>。また、アスタキサンチン摂取によって自転車競技者の競技成績が改善したことも報告されています<sup>10)</sup>。眼科領域においては、アスタキサンチン摂取による眼精疲労

埼玉県出身。北海道大学大学院医学研究科博士課程修了。専門分野は天然物化学、循環器薬理学、神経薬理学。健康食品会社にて研究開発部門の創設に携わり、健康食品の安全性・有効性の評価を担当。現在は濱館学術事務所を設立し、健康食品関連企業向けの学術・研究開発をサポートするコンサルタント業務を行っている。



を自覚する健常者の準他覚的調節力および客観的眼精疲労度評価の改善が二重盲検試験によって認められています<sup>11)</sup>。また、加齢黄斑変性やぶどう膜炎に関連する眼底血流がアスタキサンチン摂取によって有意に増加することが示されています<sup>12)</sup>。

アスタキサンチンの有効性は、前述した強力な抗酸化作用を機序とするところが大きいと考えられますが、さらにアスタキサンチンはその分子構造によってユニークな特性を持っていることが知られています<sup>13)</sup>。抗酸化物質でもビタミンCのような親水性成分は水と良く混ざりますが、脂質二重膜でできている細胞膜は通過できません。逆にビタミンEのような疎水性成分は油と良く混ざり、脂質でできている細胞膜中に留まることができます。アスタキサンチンは、脂質二重膜の厚みとちょうど同じ長さの炭素長鎖を持ち、両サイドのケト基がアンカーのようにリン脂質の極性部位と結合して、細胞膜を貫通する形で留まることができます。これによって、受容体やトランスポーター、イオンチャンネルを多く持つ生命活動に重要な細胞膜に対して、膜中およびその内外で特異的に働くことができると考えられています。加えてアスタキサンチンは、NO、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ を制御することによって、NF- $\kappa$ Bを介する炎症機序を軽減することが報告されています<sup>14)、15)</sup>。アスタキサンチンは、これらの作用機序によって多種多様な有効性を発揮

すると考えられています。

血中動態について、アスタキサンチン9mgを含んだソフトカプセルを摂取すると、 $C_{max}=77.15 \pm 66.26$  ng/mL、 $t_{max}=10 \pm 2$ h、 $t_{1/2}=26.0 \pm 4.8$ h、 $AUC_{0-72}=1.683 \pm 1394$ ng·h/mLであったことが報告されています<sup>16)</sup>。また、8mgのアスタキサンチンを毎日摂取したところ、血中濃度が4週後に78ng/mL、8週間後に65ng/mLであったことから、摂取4週間以前に定常状態に達すると考えられています<sup>17)</sup>。

(独) 国立健康・栄養研究所の「健康食品」の安全性有効性情報では、アスタキサンチンについて「食品に含まれる量を経口摂取する場合、おそらく安全である。」「サプリメントとしての経口摂取や外用の場合の安全性については信頼できるデータが十分にないので、妊娠中・授乳中は使用を避けた方がよい。」と記載があります。また、有効量とされる6mgの5倍量である1日30mgをサプリメント形状で4週間摂取した安全性臨床試験においても有害事象はみられなかったことが報告されています<sup>18)</sup>。以上に加えて、これまでの食経験や多くの臨床試験結果から、妊娠中・授乳中は使用を避けた方がよいが、アスタキサンチンは通常のサプリメント使用量において安全性は高いと考えられます。

## 参考文献

- 1) 矢澤一良, 特集 食品と疾病 アスタキサンチン 3. アスタキサンチンとメタボリックシンドローム, *Functional Food*, **5**(4): 285-290. 2012.
- 2) 矢澤一良, マリンビタミン健康法—海が育てた13種の超健康物質が創る驚異の健康効果—, 現代書林, 1999年10月17日発行; 146-155.
- 3) Nishida Y *et al.*, Quenching Activities of Common Hydrophilic and Lipophilic Antioxidants against Singlet Oxygen Using Chemiluminescence Detection System, *Carotenoid Science*, **11**: 16-20. 2007.
- 4) Nielsen BR *et al.*, Triplet-triplet extinction coefficients, rate constants of triplet decay and rate constants of anthracene triplet sensitization by laser flash photolysis of astaxanthin, beta-carotene, canthaxanthin and zeaxanthin in deaerated toluene at 298 K, *J Photochem Photobio A: Chemistry*, **112**(2-3): 127-133. 1998.
- 5) 山下栄次, 研究情報 アスタキサンチン & トコトリエノール配合健康補助食品の美肌効果, *Food style* 21, 6(6): 112-117. 2002.
- 6) 山下栄次, アスタキサンチン含有健康補助食品の美容効果, *FOOD Style* 21, 9(9): 72-75. 2005.
- 7) Iwamoto T *et al.*, Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by astaxanthin, *J Atheroscler Thromb*, **7**(4): 216-222. 2000.
- 8) Yoshida H *et al.*, Administration of natural astaxanthin increases serum HDL-cholesterol and adiponectin in subjects with mild hyperlipidemia, *Atherosclerosis*, **209**(2): 520-523. 2010.
- 9) Sawaki K *et al.*, Sports performance benefits from taking natural astaxanthin characterized by visual activity and muscle fatigue improvements in humans, *J Clin Ther Med*, **18**(9): 73-88. 2002.
- 10) Earnest CP *et al.*, Effect of astaxanthin on cycling time trial performance, *Int J Sports Med*, **32**(11): 882-888. 2011.
- 11) 白取謙治ら, アスタキサンチンの調節機能および疲れ眼に及ぼす影響 - 健常成人を対象とした効果確認試験 -, *臨床医薬*, **21**(6): 637-650. 2005.
- 12) Saito M *et al.*, Astaxanthin increases choroidal blood flow velocity, *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, **250**(2): 239-245. 2012.
- 13) Goto S *et al.*, Efficient radical trapping at the surface and inside the phospholipid membrane is responsible for highly potent antiperoxidative activity of the carotenoid astaxanthin, *Biochim Biophys Acta*, **1512**(2): 251-158. 2001.
- 14) Lee SJ *et al.*, Astaxanthin inhibits nitric oxide production and inflammatory gene expression by suppressing I(kappa)B kinase-dependent NF-kappaB activation, *Mol Cells*, **16**(1): 97-105. 2003.
- 15) Izumi-Nagai K *et al.*, Inhibition of choroidal neovascularization with an anti-inflammatory carotenoid astaxanthin, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **49**(4): 1679-1685. 2008.
- 16) 大井友梨ら, アスタキサンチン含有食品 (ソフトカプセル) 摂取における血中動態についての検討, *臨床医薬*, **27**(4): 297-303(45-51). 2011.
- 17) Park JS *et al.*, Astaxanthin decreased oxidative stress and inflammation and enhanced immune response in humans, *Nutr Metab (Lond)*, **7**: 18. 2010.
- 18) 大神一浩ら, アスタキサンチンの過剰摂取における安全性の検討, *臨床医薬*, **21**: 651-659. 2005.

480 ページ超の大迫力！  
業界第一人者が集結！  
チーズ研究の必携書

チーズ研究の頭脳集結！  
熟成した研究成果を、  
じっくり書き上げた  
問い合わせ殺到の  
究極のチーズ技術書！

- B5 版 / 496 ページ
- 定価：(本体 7,500 円 + 税)
- 発行：食品資材研究会



# 現代チーズ学

## 現代チーズ学 目次

1. チーズの歴史、食文化、分類および生産	
1.1 チーズの起源と歴史	大谷 元
1.2 チーズの食文化	村山 重信
1.3 チーズの分類と名称	村山 重信
1.4 世界のチーズの生産・輸出入と消費	伊藤 晋治
2. チーズの基礎科学	
2.1 乳の成分科学	石田 光晴
2.2 チーズ製造の基本フロー	齋藤 忠夫
2.3 乳酸菌スターターの科学	宮本 拓
2.4 キモシンによる凝乳機構	阿久澤良造
2.5 チーズの熟成機構	井越 敬司
3. チーズの製造技術と衛生管理	
3.1 クリームチーズ	岩附 慧二
3.2 モッツアレラチーズ	橋本 英夫
3.3 カッテージチーズ	久米 仁司
3.4 熟成型チーズ	田中 穂積
3.5 キモシン酵素利用の現状	高見 修平
3.6 プロセスチーズ	川崎 功博
3.7 チーズの包装技術	佐々木敬卓
3.8 チーズ製造の衛生管理	柳平 修一 鈴木 明 花形 吾朗

4. チーズの機能性	
4.1 チーズの微細構造	木村 利昭
4.2 一次機能	根岸 晴夫
4.3 二次機能	井筒 雅
4.4 三次機能	堂迫 俊一
4.5 チーズとホエイに含まれるタンパク質の免疫科学	大谷 元
5. ホエイ成分の高度利用	
5.1 チーズホエイとその成分別調製技術	元島 英雅 野島 一晃
5.2 機能性オリゴ糖	浦島 匡
5.3 機能性ホエイ味噌	六車三治男
6. チーズの諸制度と知的財産権	
6.1 チーズの規格基準と表示規制	石田 洋一
6.2 チーズの知的財産権	工藤 力
7. 近未来のチーズ学	
7.1 チーズ製造技術の変遷と進歩	相澤 茂
7.2 近未来のチーズ製造技術	市橋 信夫
7.3 新しいタイプの機能性チーズの開発	松尾 光郎
7.4 スターター乳酸菌における遺伝子組替え技術の応用	佐藤 英一

編集

齋藤 忠夫 東北大学大学院農学研究科  
堂迫 俊一 雪印乳業株式会社 技術研究所  
井越 敬司 東海大学農学部

お申し込み・お問い合わせは、  
FAX・お電話・WEBにて

電話：03-3254-9191 FAX：03-3256-9559  
<http://www.newfoodindustry.com/cheese.html>

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)

これだけは知っておきたい

<http://www.mac.or.jp/>

# 豆知識

一般財団法人 食品分析開発センター SUNATEC

## 金属の溶媒抽出法について ～鉛を例に～

### 1. はじめに

2014年9月の豆知識では、重金属試験法について紹介した (<http://www.mac.or.jp/mail/140901/03.shtml>)。この方法は、重金属類が総量としてどれぐらいの濃度域で試料中に含まれているかを知る手段としては、高額な分析機器を必要としない有効な方法である。しかし、平成26年3月26日に行われた薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会添加物部会の資料として公開されている第9版食品添加物公定書作成検討会報告書を見ると、重金属規格が主に鉛規格へと改正される予定であることから、今後、食品等の規制には、重金属類としてではなく、各個別の金属元素として規格が設定されていくと思われる。(第9版食品添加物公定書案は、平成27年12月25日に行われた同部会の資料として公開されている。) 個別元素は、通例、試料を灰化したのち、その酸溶解液を原子吸光度計や誘導結合プラズマ (ICP) 発光分析装置などで測定するが、金属元素の種類、試料によっては、感度不足や干渉等の影響で測定できない場合がある。そのような時に採用する前処理法の1つとして溶媒抽出法がある。方法の概要は、まず、目的金属を含む水溶液に親水性が小さいキレート剤などの抽出試薬を加えて目的金属を錯化または抽出試薬とのイオン対とする。そこに有機溶媒を加えて、抽出試薬との相互作用で水和水を失い、疎水性を増した目的金属を有機溶媒中に転溶する方法である。転溶の際に、水溶液量よりも少ない量の有機溶媒に転溶することで濃縮できる点や不要な成分が溶媒中に抽出されないことで測定時の妨害を抑制できる点など、溶媒抽出法を用いることの利点は大きい。本稿では、清涼飲料水の成分規格にある鉛の試験法に溶媒抽出法が用いられているので、これを例として紹介する。

### 2. 清涼飲料水の成分規格における鉛の試験法

試験操作の概要を図1に示す。試料の湿式灰化または乾式灰化ののち得られた試験溶液に対し溶媒抽出を行う (灰化手順については省略する)。まず、試験溶液にクエン酸アンモニウム溶液を加え、指示薬にプロモチモールブルー溶液を用いてアンモニア水で中和する。この液に硫酸アンモニウム溶液を加えたのち、ジエチルジ

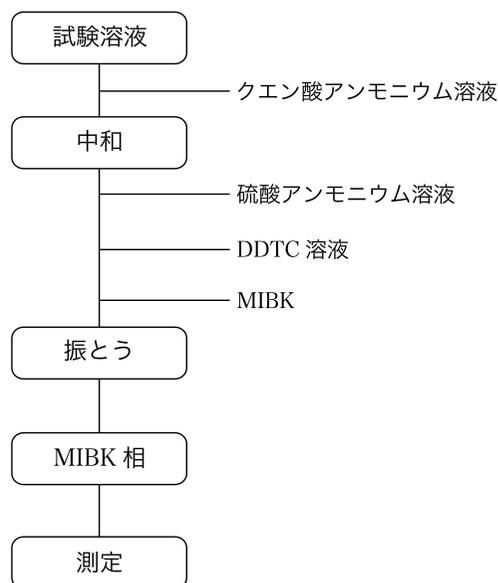


図1 鉛の試験法 (清涼飲料水の成分規格)

チオカルバミン酸ナトリウム (DDTC) 溶液を加えて鉛を錯化し、メチルイソブチルケトン (MIBK) を加えて激しく振とうする。静置後、分離した上層 (MIBK 相) について原子吸光光度計で測定を行う。

本法は、DDTC-MIBK 抽出法とも呼ばれる方法である。キレート剤として DDTC を用い、DDTC が金属を抽出できる pH が中性付近であるため中和操作を実施しており、この際に水酸化カルシウムなどの沈殿が析出し、鉛が共沈してしまうのを防ぐためクエン酸アンモニウムを添加している。また硫酸アンモニウム溶液の添加により、水相の塩濃度が高まり、塩析効果により DDTC と錯体を形成した鉛が MIBK 相に移行しやすくなることに加えて、MIBK の水相への溶解を抑制する効果もある。転溶後、相分離が不十分な場合には、遠心分離を行うことにより明瞭に分離することができる。さらに、抽出された鉛を MIBK の溶液として原子吸光光度計に導入することで、ネブライザにおける霧化効率が水溶液の場合よりも高くなり、測光部への導入量が増加して測定感度を高めることができる。

### 3. 溶媒抽出法の応用

清涼飲料水の成分規格における鉛の試験法を紹介したがその他の試験法では、DDTC 以外のキレート剤としてピロリジンジチオカルバミン酸アンモニウム (APDC) やジチゾンを用いる方法がある。また、キレート剤ではないがヨウ化カリウムを加えてヨウ化物として抽出する方法もある。また転溶する有機溶媒例として MIBK 以外に、ジイソブチルケトン (DIBK)、クロロホルム、酢酸ブチル、ベンゼンなどもある。キレート剤と抽出する金属の組み合わせごとに最適な pH があるので、抽出する際の pH には注意が必要である。キレート剤や溶媒の種類により抽出効率が 100% ではない場合があるため、標準液も同様に抽出する、もしくは抽出操作を複数回行い目的金属を完全に抽出する必要がある。より正確な測定を目指すのであれば標準添加法を行うことが望ましい。

溶媒抽出法を用いても起こりうる妨害の例として、試料中に目的金属とともに抽出されてしまう他の金属が過多に含まれる事例がある。あまりに過剰に含まれていると測定の際に妨害することもあるが、それ以前にキレート剤がこの金属に消費されてしまうため、目的金属が錯体を形成できず、抽出されなくなる。対処法としては、キレート剤等の組合せを変更することで選択的に抽出できる場合がある。これは、キレート剤の種類により錯体を形成できる金属の種類が異なり、抽出時の最適な pH も異なるため、これらの条件次第で抽出する金属の選択性を高めることが可能である。また、妨害金属によっては、シアン化カリウムや EDTA などのマスク剤を加えて有機溶媒相に抽出されるのを防ぐ方法や溶媒抽出後に酸溶液へと逆抽出することで妨害金属を有機溶媒相に留めておく方法などが適用できる。鉄が妨害する場合は、目的金属の抽出に先立って塩酸性下での塩化物錯体として抽出除去しておく方法などもある。

### 4. 鉛以外での溶媒抽出法の例

鉛以外の金属でも溶媒抽出法が用いられている試験法があるので簡単にその例を紹介する。清涼飲料水の成分規格におけるスズの試験法では、キレート剤にサリチリデンアミノ-2'-チオフェノール (SATP)、抽出溶媒にキシレンを用いる。第 2 版食品中の食品添加物分析法のミョウバン類の試験法では、アルミニウムの測定に際し、キレート剤にアセチルアセトン、抽出溶媒に酢酸ブチルを用いており、ポリソルベートの試験法では、ポリソルベートとコバルトチオシアン酸錯体からなる錯体をジクロロメタン中に抽出している。第十六改正日本薬局方一般試験法の鉄試験法 B 法では、鉄 (II) を 2,2'-ビピリジルと 2,4,6-トリニトロフェノールからなる三元錯体として 1,2-ジクロロエタンに転溶させて検液としている。

## おわりに

ICP 質量分析装置などの高感度で選択性の高い測定機器を用いることができるようになり、特別に精製・抽出操作などをしなくても金属元素は測定できるようになってきた。また、溶媒抽出法ではなく、カートリッジカラムやディスクなどを用いた固相抽出法も用いられるようになってきており、振とうなどの手作業が不要で、検液を負荷し、リンスののち、溶出させるだけのより簡便な操作での抽出も可能となってきた。しかし、より高性能な機器はより高価であり、固相抽出のアクセサリはその性能にロット間差やメーカー間差があるため、比較的簡便に安価で実施できる溶媒抽出法は今後も主要な試験法としてあり続けると考えられる。

### [参考文献]

1. 日本薬学会編：“衛生試験法・注解 2015” 金原出版，2015.
2. “第 8 版食品添加物公定書解説書” 廣川書店，2007.
3. “第十六改正日本薬局方解説書” 廣川書店，2011.
4. 平成 26 年 3 月 26 日薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会添加物部会  
<http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/0000040629.html>
5. 平成 27 年 12 月 25 日薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会添加物部会  
<http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi2/0000107623.html>
6. 日本食品衛生協会編：“第 2 版食品中の食品添加物分析法 2000”，2000.
7. 独立行政法人農林水産消費安全技術センター (FAMIC)：“肥料分析法 (農林水産省農業環境技術研究所法) - 1992 年版 -”  
[https://www.famic.go.jp/ffis/fert/sub6\\_data/sub6\\_analyze.html](https://www.famic.go.jp/ffis/fert/sub6_data/sub6_analyze.html)
8. 厚生労働省 監修：“食品衛生検査指針理化学編” 日本食品衛生協会，2015.
9. 厚生労働省：“食品に残留する農薬，飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法 第 3 章 - 個別試験法 - (通知試験法) 鉛試験法 (農産物)”  
<http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/zanryu3/2-102.html>
10. 厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課長通知「食品中の食品添加物分析法」の改正について平成 20 年 4 月 30 日食安基発第 0430001 号，2008.

---

## Review

# Liposome-Encapsulated Nisin as Preventive Strategy against Dental Caries

YOSHITAKA SHIMIZU <sup>1</sup>, YASUHIRO KURODA <sup>1</sup>, YASUHIKO MIBE <sup>2</sup>,  
TOSHIMITSU KAJIWARA <sup>3</sup>, YUTAKA SAKURAI <sup>4</sup> and KAZUO YAMAKAMI <sup>4</sup>

---

<sup>1</sup> Department of Applied Biochemistry, Tokai University, Hiratsuka, Japan

<sup>2</sup> Research and Development Division, BioMedCore, Inc., Yokohama, Japan

<sup>3</sup> Department of 1st Pathology, Sapporo Medical University School of Medicine, Sapporo, Japan

<sup>4</sup> Department of Preventive Medicine and Public Health, National Defense Medical College, Tokorozawa, Japan

**Key Words:** dental caries, liposome, nisin, oral health, prophylaxis, *Streptococcus mutans*

## Abstract

Dental caries is a prevalent chronic infectious disease, which continues to inflict a large burden on the people of several age groups worldwide. Its prevention requires the control of *Streptococcus mutans*, a causative pathogen that colonises the dental plaque. Interactions between *S. mutans* and dietary carbohydrates in the oral cavity trigger the onset of dental caries. As an attractive prophylaxis agent for dental caries, nisin, an antimicrobial peptide, has been proposed for preventing the disease. Nisin is a proteinaceous bacteriocin produced by *Lactococcus lactis*. It has an inhibitory action against a wide range of gram-positive bacteria. Preventive benefits of antibacterial compounds can be improved if they are retained as liposomes for an extended period of time, thus increasing the efficiency of encapsulated compounds in the oral cavity. Liposome technologies that effectively maintain the activities of encapsulated molecules have the potential to improve their therapeutic and preventive effects in humans. Therefore, the application of liposomes for encapsulation of antimicrobial peptides, such as nisin, has spurred research into their use for prophylaxis. Considerable studies have shown that liposomal formulations of nisin can improve its stability and bactericidal activity against *S. mutans*. The present review discusses the strategy for application of liposome-encapsulated nisin as a preventive tool against cariogenic streptococci for oral health.

---

**Correspondence to:** Yoshitaka Shimizu,

Department of Applied Biochemistry, Tokai University, Hiratsuka 259-1292 Japan

Tel: +81 463 58 1211 (ext: 4173), Fax: +81 463 50 2506,

E-mail: shimizuy@tsc.u-tokai.ac.jp

**Running title:** Liposomal nisin for oral health

## Introduction

Oral health problems caused by cariogenic microorganisms, such as dental caries, affect majority of the world's populations.<sup>1</sup> Dental caries reduces the quality of daily life of an individual, and the disease continues throughout an individual's life. Therefore, oral health should be achieved by implementing primary dental care strategies designed to prevent dental caries. The disease results from interactions of the pathogenic microorganism *Streptococcus mutans* with dietary carbohydrates in the oral cavity. The streptococcal glucan-synthesising enzyme is a key contributor to the formation of cariogenic glucan biofilms on the tooth surface.<sup>2</sup> For prevention of dental caries, a unique technology should be introduced, inhibiting the virulence factors of this chronic infectious disease. Nisin is a bactericidal peptide effective against gram-positive bacteria and is produced by certain strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.<sup>3,4</sup> Nisin formulations have been used with food materials for food preservation.<sup>4</sup> Importantly, nisin exhibits bactericidal activity against *S. mutans*, a typical cariogenic streptococcus,<sup>5</sup> and it may be useful to formulate liposomes as a carrier for nisin.<sup>6</sup>

Liposomes are spherical vesicles that are prepared from phospholipids, and their capabilities as carriers of bioactive molecules have been evaluated for the purpose of targeting organs and specific cells.<sup>7,8</sup> In liposome formulations, certain factors, such as the lipid composition, charge on the lipid bilayer and size of the vesicles, affect liposome capabilities to be used for a particular purpose.<sup>7</sup> Studies on liposomes have led to their application on many bioactive compounds, and encapsulated molecules have been shown to be pharmacodynamically and pharmacokinetically much more efficient than the naked molecules.<sup>9</sup> Encapsulation of substances in liposomes has been accepted in many cases, such as to maintain bioactivities and to control the release of compounds, and liposomes have been administered to deliver pharmaceuticals.<sup>10,11,12</sup> Encapsulation of nisin into liposomes should be

able to provide effective inhibition of the target pathogens, cariogenic streptococci. The available information indicates successful use of liposome-encapsulated nisin for oral administration and safe prevention of dental caries. Oral delivery of liposome-encapsulated bacteriocins could be useful as a prophylaxis agent against chronic oral infectious diseases, especially dental caries.<sup>6</sup>

Thus, liposome technologies, which enable shielding of bioactive substances from enzymatic inactivation and allow a slow, steady release of an encapsulated compound, could be an advancement in the field of preventive medicine.<sup>13</sup> The present review article provides the background information on liposome-encapsulated nisin and explores its applications and solutions expected. The study also focuses on the factors affecting its effectiveness and the advantages it offers in maintaining oral health by preventing chronic oral infectious diseases, such as dental caries.

## Oral Microorganisms and Dental Caries

The oral cavity harbours many microorganisms, which together constitute a complex microecological environment.<sup>14</sup> Key for onset of dental caries is associated with various lifestyle-related factors. Dental caries is a chronic infectious disease caused by metabolic processes of dental plaque-colonising microorganisms. *S. mutans* in particular is recognised as a decisive factor for the disease.<sup>15</sup> Dental plaque is a diverse bacterial community on the tooth surface, attached as a biofilm consisting of insoluble glucans.<sup>16</sup> *S. mutans* synthesises insoluble glucans by streptococcal glucosyltransferases using dietary carbohydrates as the substrates, and these polysaccharides provide a matrix for dental plaque. The streptococcus has been shown to colonise the insoluble glucans.<sup>17</sup> The polysaccharides provide a binding site for oral bacterial colonisation and confer structural integrity on the extracellular matrix. Therefore, they are essential for the formation of dental plaque on the tooth surface.<sup>16</sup> Because *S. mutans* tenaciously adheres to the

polysaccharides and is highly acidogenic and acid-tolerant, these are critical virulence mechanisms in the pathogenesis of dental caries.<sup>18, 19</sup> Therefore, dental caries results from the interaction of *S. mutans* with dietary carbohydrates in the oral cavity, and the formation of glucan biofilms on the tooth surface is a key process for the onset of dental caries.

### **Nisin as an Antimicrobial Agent**

Nisin is approved for usage in foods and is used as a food preservative in many countries.<sup>20</sup> It has bactericidal activities against a broad range of gram-positive microorganisms, such as *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*, and also suppresses the outgrowth of many *Clostridium* and *Bacillus* spp.<sup>3, 10, 12</sup> However, its antibacterial activity is labile to proteolytic degradation and oxidation.

Nisin is a bactericidal peptide called type A lantibiotics and is a 3.5-kDa peptide composed of 34 amino acids.<sup>21</sup> Major variants of nisin (nisin A and nisin Z) have been well studied.<sup>4</sup> Nisin Z is widely distributed and contains asparagine instead of histidine at position 27 of the amino acid sequence of nisin A. These variants have nearly equal specificity for bactericidal activity, membrane insertion properties and pore-forming abilities. Nisin is sensitive to  $\alpha$ -chymotrypsin proteolysis but is resistant to trypsin hydrolysis. It is soluble and stable at acidic pH but loses solubility and biological activity in the alkaline pH range.<sup>22</sup> The amino acid sequence of nisin contains one lanthionine, four  $\beta$ -methyl-lanthionine, one dehydrobutyrine and two dehydroalanine residues. The lanthionine rings in the molecule act as the binding motifs for recognition of specific targets and create segments of defined spatial structures.<sup>23</sup> Antimicrobial activity of nisin against gram-positive microorganisms has been indicated to be a result of an electrostatic interaction of the positively charged carboxy-terminal end of the nisin molecule with negatively charged bacterial membrane lipids.<sup>24</sup>

Because nisin has dual activities against spore-forming bacteria, it inhibits the outgrowth of spores and kills cells in the vegetative state. The dihydro amino acid residues in nisin interact with membrane sulfhydryl groups of germinating spores.<sup>25</sup> The membrane disruption is a result of incorporation of nisin into the membrane and subsequent ion channel or pore formation.<sup>24</sup> The membrane potential is abolished in gram-positive cells as a result of the efflux of  $K^+$ , amino acids and adenosine triphosphate through membrane pores.<sup>24, 26</sup> Subsequently, the leakage of ions induces catastrophic changes in trans-membrane potential and internal pH. Nisin interacts with high-affinity pyrophosphate binding sites on the membrane-bound cell wall precursor lipid II, leading to the formation of pores and inhibition of biosynthesis of cell wall peptidoglycan.<sup>27</sup> These characteristics indicate that nisin should be an effective antibacterial agent.

Nisin could contribute to the prevention of gram-positive bacterial infections. Considerable studies have been carried out on the antimicrobial abilities of nisin in food materials, and a number of applications have been reported.<sup>4, 28</sup> Therefore, we expect nisin to be a safe and effective tool for the prevention of chronic infectious diseases.

### **Nisin against Cariogenic *Streptococci***

Oral health should be achieved by implementing primary dental care strategies designed for inhibition of causative pathogens. In this regard, chemical biocides are used for the prevention of dental caries. Typical antimicrobial agents, such as chlorhexidine, triclosan and cetylpyridinium chloride, have attracted interest as prophylaxis agents against dental caries for their ability to inhibit multiplication of the cariogenic microorganism *S. mutans* in the oral cavity.<sup>29</sup> However, these bactericidal peptides cause some side effects, such as discoloration of the teeth and tongue, may lead to the development of drug resistance and are characterised by low solubility.<sup>5</sup> Therefore, the

development of safe agents has been required. As an alternative to chemical tools, antibacterial peptides have been explored. Because nisin is a lantibiotic, it does not induce drug resistance or chiasmatic resistance.<sup>21</sup> Nisin has drawn considerable attention for its treatment potential as the antimicrobial agent against gram positive pathogens.<sup>25</sup> The bactericidal activity of nisin against the typical cariogenic microorganism *S. mutans* has been investigated for the purpose of prevention of dental caries.<sup>5</sup> The findings suggested that nisin could be used as the agent for prevention of dental caries. Furthermore, liposome-encapsulated nisin showed efficient bactericidal activity against *S. mutans*.<sup>6,9</sup> Moreover, nisin does not appear to be toxic to human gingival fibroblast and epithelial cells at concentrations that provide efficient antimicrobial activity.<sup>30</sup> Therefore, nisin should be applied to prevent dental caries and could be useful as a treatment to maintain oral health.

### **Liposomes for Medical Applications**

Liposomes are formulated from phospholipid bilayers and consist of colloidal dispersions of lipids in aqueous solutions.<sup>31</sup> Their formulations are based on the interactions between phospholipids and water molecules, and in their structure the polar head groups of phospholipids face the inner and outer aqueous phases while the hydrophobic lipid tails are forced to face each other in a bilayer.<sup>11,32</sup> Liposome vesicles can preserve bioactivities of formulated molecules by protecting those from enzymatic cleavages and chemical inactivation.<sup>33</sup> The aims of the medical application of liposomes are to improve the therapeutic index of encapsulated compounds and to reduce their unexpected side effects.

Liposomes encapsulate both hydrophobic and hydrophilic molecules, prevent the decomposition of encapsulated compounds and release the compounds at targeted sites and at a suitable time.<sup>34,35</sup> Liposomes can range in size from 40 nm to 2  $\mu$ m, depending on the phospholipid composition and intended application.<sup>36,37</sup> Many substances with different

lipophilicities can be encapsulated, for example, lipophilic compounds are encapsulated in the lipid bilayer and hydrophilic compounds are located in the aqueous components.<sup>38</sup> Encapsulation strategies have been developed in many fields because of the biocompatibility of liposomes, i.e. their ability to encapsulate unstable molecules, such as nucleotides and peptides, and deliver formulated molecules to preferred sites.<sup>39,40</sup> The encapsulation of bacteriocins, such as nisin, into liposomes represents an alternative to overcome problems related to the improvement of bactericidal activity.<sup>41</sup> Indeed, liposomes have been established as carriers for therapeutic molecules to improve the delivery of many anticancer and antibiotic compounds.<sup>42,43</sup>

The benefits of conservative therapeutics can be limited due to the inability to deliver compounds to designated sites.<sup>44</sup> The retention of encapsulated compounds is governed by interactions between the compounds and lipids. Passive encapsulation of hydrophilic compounds depends on the lipid composition, which determines the ability of liposomes to trap aqueous buffer containing dissolved compounds during vesicle formation.<sup>45</sup>

Advances in designing liposomes have led to their use for the delivery of novel therapeutic technology products, such as nucleotides and monoclonal antibodies, utilised in the area of cancer therapy and for the control of immune responses.<sup>46</sup> There are many results showing increased stability of conservative chemicals in liposomes, frequently resulting in an improved efficiency compared with that of the naked form of compounds.<sup>47</sup> Altered pharmacokinetics of liposome-encapsulated compounds leads to improved bioactivity at particular sites of interest. Thus, liposomes have achieved medical acceptance because of a slow, steady release of molecules and the delivery of compounds to required sites.<sup>48</sup> The liposome technology should prove to be successful in the fields of preventive and therapeutic medicine.

### Characteristics of Liposomes

The strategies for the development of liposomes are focused on the delivery and release of encapsulated compounds with minimum loss of activity.<sup>49</sup> The liposomal system expands the efficacy of the bioactivities of encapsulated molecules. The medical efficiency of encapsulated compounds in this regard depends on the lipid composition, surface charge and vesicular size of liposomes. Lipid bilayer fluidity and rigidity in liposomes affect the release of encapsulated materials.<sup>43</sup>

During formation of liposomes, lipid characteristics affect the stabilisation and encapsulation capacities of liposomes. The amount of encapsulated contents in vesicles is proportional to the acyl chain length of phosphatidylcholine. Dimyristoylphosphatidylcholine, dipalmitoylphosphatidylcholine and distearoylphosphatidylcholine have longer saturated acyl chains (14, 16 and 18 carbons, respectively), and their phase transition temperature increases according to the acyl chain length of the phospholipids.<sup>50</sup> The trend for the release of formulated compounds from vesicles follows the order of the saturated acyl chain lengths, which reflects the fluidity of vesicles composed of these phospholipids with an increasing phase transition temperature.<sup>43</sup> However, unsaturated phospholipid species result in more permeable and fluid bilayers.<sup>31, 32</sup> Addition of cholesterol to phosphatidylcholine-based liposomes reduces the permeability.<sup>44</sup> Cholesterol interacts with acyl chains in phospholipids via hydrogen bonding, increasing the cohesiveness and mechanical strength of the vesicular membrane.<sup>51, 52</sup> In addition, sphingomyelin also increases the rigidity of the lipid bilayer.<sup>7</sup> Thus, selection of lipid compositions enables the formulation of preferred types of liposomes for specific purposes.

The effect of charge on the liposome behaviour is governed by the surface charge density of the vesicles, characteristics of lipid head groups and the interactions between encapsulated contents and lipids.<sup>53</sup> Liposomes composed of charged polar

lipids with higher electrical charges are more stable than those composed of neutral polar lipids.<sup>54</sup> Surface charge on liposomes increases repulsive interactions and reduces the frequency of vesicle collisions.<sup>55</sup> The interaction with positively charged peptides decreases the electrostatic potential of zwitterionic and anionic liposomes.<sup>32</sup> With respect to the release of encapsulated substances from liposomes, the charge is found to be the factor for vesicle permeability.<sup>53</sup> Thus, the charge on the lipid bilayer influences the extent of efficiency of encapsulated compounds.

Regarding the potential use of liposomes as stabilising carriers for bioactive compounds, the phospholipid vesicles are capable of encapsulating unstable molecules, and their composing lipids are biodegradable and safe *in vivo*.<sup>55, 56</sup> Liposome-encapsulated chemicals have increased efficiency due to the improvement of their stability and permeability, as well as the acquisition of a targeting ability and an elongated period of release.<sup>57</sup> Unstable molecules formulated in liposomes are sufficiently protected from enzymatic inactivation and are escaped from immune recognition *in vivo*.<sup>58</sup> This is especially relevant to some bioactive molecules, such as insulin, calcitonin, parathyroid hormone and erythropoietin, which are susceptible to proteolytic inactivation and whose pharmacological effects have been improved by orally administered liposomal formulations.<sup>59</sup> Thus, oral delivery of liposome-encapsulated compounds is also useful for preventive and therapeutic treatments.

### Liposome-Encapsulated Nisin as a Tool for Preventive Medicine

Nisin is a cationic, amphiphilic antimicrobial peptide used as an inhibitor for gram-positive bacteria. Encapsulation of nisin into liposomes can lead to increased retention of its bactericidal activity.<sup>10, 60</sup> Studies have shown the efficiency of liposome-encapsulated nisin in food models.<sup>26</sup> Liposome formulations of nisin improve its bactericidal activity for preservation of food and

prevention of chronic oral infectious diseases.<sup>43</sup> In typical studies, encapsulated nisin in liposomes composed of phospholipids plus cholesterol showed efficient inhibition profiles against *L. monocytogenes*.<sup>52, 54</sup> Liposome-encapsulated nisin should be able to effectively provide long-term inhibition of the target microorganism *S. mutans* and thus is expected to be a tool for the prevention of dental caries.<sup>6</sup>

Regarding the formulation of liposome-encapsulated nisin, its highest efficiency is observed in vesicles composed of a combination of a low content of negatively charged phospholipids and a high content of zwitterionic phospholipids.<sup>61</sup> Encapsulation of nisin in anionic phospholipids results in an association due to attractive electrostatic interactions, and its encapsulation in neutral liposomes results in an association due to hydrophobic interactions.<sup>62</sup> The electrostatic interaction of nisin with negatively charged membrane phospholipids is more pronounced than the hydrophobic interaction of nisin with neutral phospholipids; therefore, nisin interacts more tightly with phosphatidylglycerol than with phosphatidylcholine.<sup>24, 54</sup> However, cationic lipids, such as stearylamine, show low encapsulation efficiency, which results from electrostatic repulsion between positively charged nisin and cationic vesicles.<sup>32</sup>

The functional abilities of liposome-encapsulated nisin depend on its interactions with the lipid membrane and bacterial cell membrane. Such electrostatic interactions have been proven to be an initial step for subsequent events leading to membrane pore formation on target microorganisms.<sup>63</sup> Nisin as a cationic peptide has been proven to have high penetration ability for anionic phospholipids and low penetration ability for neutral phospholipids.<sup>62</sup> Liposomes composed of phosphatidylcholine demonstrate a slow, steady release of encapsulated nisin, whereas liposomes composed of a combination of phosphatidylcholine and phosphatidylglycerol appear to have a higher rate of nisin release than

those composed of phosphatidylcholine alone.<sup>55</sup> The findings indicate that phosphatidylglycerol affects the release of nisin from the liposomes via pore formation. Because nisin is positively charged, the electrostatic interaction with negatively charged phosphatidylglycerol is attractive and leads to the formation of unstable pores due to binding to the charged phospholipid head groups of phosphatidylglycerol.<sup>24</sup> Bactericidal activity of nisin in liposomes is exhibited in two ways, i.e. as relatively short-term effects provided by the release of encapsulated nisin and long-term effects provided by the deposition of lipid membrane-immobilised nisin.<sup>26</sup> The combination of encapsulated nisin and membrane-immobilised nisin can provide a tool for inhibiting pathogenic microorganisms continuously. Thus, surface charge of the liposome influences the interaction between liposome-encapsulated nisin and microorganisms. With respect to the mechanism of bactericidal activity of liposomes, electrostatic repulsion occurs between liposomes composed of phosphatidylglycerol and the negatively charged bacterial cell surface, preventing direct contact of liposomes and microorganisms and the subsequent release of nisin.<sup>53</sup> This supports an assumption that the mechanism of interaction between liposomes and microorganisms may involve membrane fusion.<sup>64</sup> However, effects of charged phospholipids on liposome-encapsulated nisin should be confirmed in terms of the bactericidal activity against cariogenic streptococci.

### **Liposome-Encapsulated Nisin against Chronic Oral Infectious Diseases**

Colonisation of dental plaque by cariogenic streptococci is a key for the onset of dental caries. The approach to primary prevention of dental caries should be based on the elimination of the causative factor. Development of efficient antimicrobial compounds against cariogenic streptococci is expected for oral health. There is a limited number of data regarding the use of liposome-encapsulated nisin for the purpose of prevention

of chronic oral infectious diseases. We observed that liposome-encapsulated nisin inhibited the viability of *S. mutans* *in vitro* and also suppressed the formation of insoluble glucan by streptococcal glucosyltransferases.<sup>6, 65</sup> Furthermore, there is a report showing that nisin does not appear to be toxic for human gingival fibroblast and epithelial cells.<sup>30</sup> These findings support the idea that liposome-encapsulated nisin may be an effective prophylaxis agent for chronic oral infectious diseases, such as dental caries.

Combination of nisin and other antimicrobials enhances its efficacy by either synergistic or additive effects against both gram-positive and gram-negative microorganisms. Furthermore, an advantage of liposomes is that they can simultaneously incorporate and release multiple compounds with different efficiencies. Previous studies have reported synergistic antibacterial effects of a combination of nisin with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA).<sup>66</sup> In general, nisin is not effective against gram-negative bacteria.<sup>20</sup> The function of EDTA is to destabilise the outer membrane of gram-negative bacteria by sequestering ions, such as  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$ , and it has been shown to provide access for nisin to the cell membrane and thereby widen its inhibitory effects.<sup>66</sup> In this regard, a feasibility of formulating a combination of nisin and EDTA in vesicles for the inhibition of both gram-positive and gram-negative pathogens has been explored.<sup>38, 55</sup> Encapsulation of nisin plus EDTA in liposomes can expand their effective shelf life by a slow, steady release of the contents.<sup>11</sup> In addition, coencapsulation of nisin plus lysozyme has been shown to extend the efficacy of

antimicrobial activities.<sup>52</sup> Thus, coencapsulation of antimicrobials expands the inhibitory potential of liposomes against both gram-positive and gram-negative pathogens. These studies have indicated that liposome-encapsulated nisin plus EDTA can inhibit both *S. mutans* and *Porphyromonas gingivalis* for the prevention of dental caries and periodontitis. This technology also offers the opportunity to provide an additional barrier against oral pathogens.

### Aspects of Liposome-Encapsulated Nisin

The major concern in the oral health field is finding tools for the prevention of dental caries. Advances in the development of nisin conjugates that inhibit oral microorganisms are required to maintain oral health. Liposome carriers for nisin act as long-lasting inhibitors against the oral gram-positive pathogen *S. mutans*. A proper balance of lipid components of the vesicles leads to the construction of stable liposomes and to the improved efficiency of encapsulated nisin. Furthermore, the balance allows a slow, steady release of nisin and its extended bactericidal activity. These profiles should encourage efforts to study liposome-encapsulated nisin, aiming at the development of potential tools to be implemented in preventive medicine. Thus, better efficiency of liposome-encapsulated nisin can be advantageous for the prevention of chronic oral infectious diseases, such as dental caries. We focus on the application of the liposomal technology in order to assure the preventive potential for oral health of bacteriocins encapsulated with promising carriers.

## References

1. Marsh PD: Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology* **149**: 279-294, 2003.
2. Krzyściak W, Jurczak A, Kościelniak D, Bystrowska B Skalniak A: The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **33**: 499–515, 2014.
3. Field D, Connor PMO, Cotter PD, Hill C, Ross RP: The generation of nisin variants with enhanced activity against specific gram-positive pathogens. *Mol Microbiol* **69**: 218-230, 2008.
4. Suganthi V, Selvarajan E, Subathradevi C, Mohanasrinivasan V: Lantibiotic nisin: natural preservative from *Lactococcus lactis*. *Int Res J Pharm* **3**: 13-19, 2012.
5. Tong Z, Dong L, Zhou L, Ni L: Nisin inhibits dental caries-associated microorganism *in vitro*. *Peptides* **31**: 2003-2008, 2012.
6. Yamakami K, Tsumori H, Sakurai Y, Shimizu Y, Nagatoshi K, Sonomoto K: Sustainable inhibition efficacy of liposome-encapsulated nisin insoluble glucan-biofilm synthesis by *Streptococcus mutans*. *Pharm Biol* **51**: 267-270, 2013.
7. Katragadda A, Bridgman R, Betageri G: Effect of liposome composition and cholesterol on the cellular uptake of stavudine by human monocyte/macrophages. *Cell Mol Biol Lett* **5**: 483-493, 2000.
8. Shimizu Y, Takagi H, Nakayama T, Yamakami K, Tadakuma T, Yokoyama N, Kojima N: Intraperitoneal immunization with oligomannose-coated liposome-entrapped soluble leishmanial antigen induces antigen-specific T-helper type 1 immune response in BALB/c mice through uptake by peritoneal macrophages. *Parasite Immunol* **29**: 229-239, 2007.
9. Tsumori H, Shimizu Y, Nagatoshi K, Sakurai Y, Yamakami K: Prospects for liposome-encapsulated nisin in the prevention of dental caries. In *Interface Oral Health Science 2014*. Sasaki K, Suzuki O, Takahashi N. Ed. Springer, Heidelberg, Germany. pp 305-316, 2015.
10. Arthur TD, Cavera VL, Chikindas ML: On bacteriocin delivery systems and potential applications. *Future Microbiol* **9**: 235-248, 2014.
11. Brandelli A: Nanostructures of promising tools for delivery of antimicrobial peptides. *Medicine Chem* **12**: 731-741, 2012.
12. Malheiros PDS, Sant' Anna V, Barbosa MDS, Brandelli A, Franco BDGDM: Effect of liposome-encapsulated nisin and bacteriocin-like substance P34 on *Listeria monocytogenes* growth in Minas frescal cheese. *Int J food Microbiol* **156**: 272-277, 2012.
13. Tikshdeep C, Sonia A, Bharat P, Abhishek C: Liposome drug delivery: a review. *Int J Pharm Chem Sci* **1**: 754-764, 2012.
14. Kuramitsu HK, He X, Lux R, Anderson MH, Shi W: Interspecies interactions within oral microbial communities. *Microbiol Mol Biol Rev* **71**: 653-670, 2007.
15. Nishikawara F, Katsumura S, Ando A, Tamaki Y, Nakamura Y, Sato K, Nomura Y, Hanada N: Correlation of cariogenic bacteria and dental caries in adults. *J Oral Sci* **48**: 245-251, 2006.
16. Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB: Dental caries. *Lancet* **369**: 51-59, 2007.
17. Paes Leme AF, Koo H, Bellato CM, Bedi G, Cury JA: The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation—new insight. *J Dent Res* **85**: 878-887, 2006.
18. Quivey Jr RG, Kuhnert WL, Han K: Genetics of acid adaptation in oral streptococci. *Crit Rev Oral Biol Med* **12**: 301-314, 2001.
19. Kreth J, Zhu L, Merritt J, Shi W, Qi F: Role of sucrose in the fitness of *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol* **23**: 213-219, 2008.
20. de Arauz LJ, Jozala AF, Mazzola PG, Penna TCV: Nisin biotechnological production and application: a review. *Trends Food Sci Technol* **20**: 146-154, 2009.
21. Willey JM, van der Donk WA: Lanthibiotics: peptides of diverse structure and function. *Ann Rev Microbiol* **61**: 477-501, 2007.
22. Guerra NP, Pastrana L: Influence of pH drop on both nisin and pediocin production by *Lactococcus lactis* and *Pediococcus acidilactici*. *Lett Appl Microbiol* **37**: 51-55, 2003.
23. Hsu STD, Breukink E, Tischenko E, Lutters MAG, de Kruijff B, Kaptein R, Bonvin AMJJ, von Nuland NAJ: The nisin-lipid II complex reveals a pyrophosphate cage that provides a blueprint for novel antibiotics. *Nat Struct Mol Biol* **11**: 963-967, 2004.
24. Wiedemann I, Breukink E, van Kraaij C, Kuipers OP, Bierbaum G, de Kruijff B, Sahl HG: Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *J Boil Chem* **276**: 1772-1779, 2001.
25. Hancock REW, Sahl H-G: Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotech* **24**: 1551-1557, 2006.

26. Were LM, Bruce BD, Davidson M, Weiss J: Size, stability, and entrapment efficiency of phospholipids nanocapsules containing polypeptide antimicrobials. *J Agric Food Chem* **51**: 8073-8079, 2003.
27. Kuwano K, Tanaka N, Shimizu T, Nagatoshi K, Nou S, Sonomoto K: Dual antibacterial mechanisms of nisin Z against gram-positive and gram-negative bacteria. *Int J Antimicrobial Agents* **26**: 396-402, 2005.
28. Dosler S, Gereker AA: *In vitro* activities of antimicrobial cationic peptides; melittin and nisin, alone or in combination with antibiotics against gram-positive bacteria. *J Chemother* **24**: 137-143, 2012.
29. Pepperney A, Chikindas ML: Antibacterial peptides: opportunity for the prevention and treatment of dental caries. *Probiotics Antimicro Prot* **3**: 68-90, 2011.
30. Akerey B, Le-Lay C, Fliss I, Subirade M, Rouabhia M: *In vitro* efficacy of nisin Z against *Candida albicans* adhesion and transition following contact with normal human gingival cells. *J Appl Microbiol* **107**: 1298-1307, 2009.
31. Samad A, Sultana Y, Aqil M: Liposomal drug delivery systems: an update review. *Curr Drug Deliv* **4**: 297-305, 2007.
32. Maherani B, Arab-Tehrany E, Mozafari MR, Gaiani C, Linder M: Liposomes: a review of manufacturing techniques and targeting strategies. *Curr Nanosci* **7**: 436-452, 2011.
33. Khosravi-Darani K, Pardakhty A, Honarpisheh H, Rao VSNM, Mozafari MR: The role of high-resolution imaging in the evaluation of nanovesicles for bioactive encapsulation and targeted nanotherapy. *Micron* **38**: 804-818, 2007.
34. Shehata T, Ogawara K, Higaki K, Kimura T: Prolongation of residence time of liposome by surface-modification with mixture of hydrophilic polymers. *Int J Pharm* **359**: 272-279, 2008.
35. Yamauchi M, Tsutsumi K, Abe M, Uosaki Y, Nakamura M, Aoki N: Release of drugs from liposomes varies with particle size. *Biol Pharm Bull* **30**: 963-966, 2007.
36. Hemanthkumar M, Spandana V: Liposomal encapsulation technology: a novel drug delivery system designed for ayurvedic drug preparation. *Int Res J Pharm* **2**: 4-6, 2011.
37. Mozafari MR, Johnson C, Hatziantoniou S, Demetzos C: Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. *J Liposome Res* **18**: 309-327, 2008.
38. Taylor TM, Bruce BD, Weiss J, Davidson PM: *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 inhibition *in vitro* by liposome-encapsulated nisin and ethylenediaminetetraacetic acid. *J Food Safe* **28**: 183-197, 2008.
39. Johnston MJ, Semple SC, Klimuk SK, Ansell S, Maurer N, Cullis PR: Characterization of the drug retention and pharmacokinetic properties of liposomal nanoparticles containing dihydrosphingomyelin. *Biochim Biophys Acta* **1768**: 1121-1127, 2007.
40. Ikehara Y, Niwa T, Biao L, Ikehara SK, Ohashi N, Kobayashi T, Shimizu Y, Kojima N, Nakanishi H: A carbohydrate recognition-based drug delivery and controlled release system using interperitoneal macrophages as a cellular vehicle. *Cancer Res* **66**: 8740-8748, 2006.
41. Matsui M, Shimizu Y, Koderia Y, Kondo E, Ikehara Y, Nakanishi H: Targeted delivery of oligomannose-coated liposome to the omental micrometastasis by peritoneal macrophages from patients with gastric cancer. *Cancer Sci* **101**: 1670-1677, 2010.
42. Ikegami S, Yamakami K, Ono T, Sato M, Suzuki S, Yoshimura I, Asano T, Hayakawa M, Tadakuma T: Targeting gene therapy for prostate cancer cells by liposomes complexed with anti-prostate-specific membrane antigen monoclonal antibody. *Human Gene Thera* **17**: 997-1005, 2006.
43. Malheiros PDS, Micheletto YMS, Silveira NPD, Brandelli A: Development and characterization of phosphatidylcholine nanovesicles containing the antimicrobial peptide nisin. *Food Res Int* **43**: 1198-1203, 2010.
44. Daghestani KRP, Ferreira RB, Thedei GJ, Maggio B, Ciancaglini P: Lipid composition-dependent incorporation of multiple membrane proteins into liposomes. *Colloids Surf B* **36**: 127-137, 2004.
45. Allen TM, Cullis PR: Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science* **303**: 1818-1822, 2004.
46. Kozako T, Hirata S, Shimizu Y, Satoh Y, Yoshimitsu M, White Y, Lemonnier F, Shimeno H, Soeda S, Arima N: Oligomannose-coated liposomes efficiently induce human T-cell leukemia virus-1-specific cytotoxic T lymphocytes without adjuvant. *FEBS J* **278**: 1358-1366, 2011.
47. Garbuzenko OB, Saad M, Pozharov VP, Reuhi KR, Mainelis G, Minko T: Inhibition of lung tumor growth by complex pulmonary delivery of drugs with oligonucleotides as suppressors of cellular resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 10737-10742, 2010.
48. Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, Joo SW, Zarghami N, Hanifehpour Y, Samiei M, Kouhi M, Nejati-Koshki K: Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Lett* **8**: 102-110, 2013.
49. Allon N, Saxena A, Chambers C, Doctor BP: A new liposome-based gene delivery system targeting lung epithelial cells using endothelin antagonist. *J Control Release* **160**: 217-224, 2012.
50. Bhardwaj U, Burgess DJ: Physicochemical properties of extruded and non-extruded liposomes containing the hydrophobic drug dexamethasone. *Int J Pharm* **388**: 181-189, 2010.
51. Anderson M, Omri A: The effect of different lipid components on the *in vitro* stability and release kinetics of

- liposome formulations. *Drug Deliv* **11**: 33-39, 2004.
52. Were LM, Bruce B, Davidson PM, Weiss J: Encapsulation of nisin and lysozyme in liposomes enhances efficacy against *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot* **67**: 922-927, 2004.
  53. Malheiros PDS, Daroit DJ, Brandelli A: Food applications of liposome-encapsulated antimicrobial peptides. *Trend Food Sci Technol* **21**: 284-292, 2010.
  54. Lu T, Wang Z, Ma Y, Chen T: Influence of polymer size, liposomal composition, surface charge, and temperature on the permeability of pH-sensitive liposomes containing lipid-anchored poly (2-ethylacrylic acid). *Int J Nanomed* **7**: 4917-4926, 2012.
  55. Taylor TM, Gaysinsky S, Davidson PM, Bruce BD, Weiss, J: Characterization of antimicrobial-bearing liposomes by  $\zeta$ -potential, vesicle size, and encapsulation efficacy. *Food Biophys* **2**: 1-9, 2007.
  56. Takakura N, Wakabayashi H, Ishibashi H, Teraguchi S, Tamura Y, Yamaguchi H, Abe S: Oral lactoferrin treatment of experimental oral candidiasis in mice. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 2619-2623, 2003.
  57. Kisel MA, Kulik LN, Tsybovsky IS, Vlasov AP, Vorob'yov MS, Kholodova EA, Zabarovskaya ZV: Liposomes with phosphatidylethanol as a carrier for oral delivery of insulin: studies in the rat. *Int J Pharm* **216**: 105-114, 2001.
  58. Hayashida K, Kaneko T, Takeuchi T, Shimizu H, Ando K, Harada E: Oral administration of lactoferrin inhibits inflammation and nociception in rat adjuvant-induced arthritis. *J Vet Med Sci* **66**: 149-154, 2004.
  59. Ishikado A, Imanaka H, Takeuchi T, Harada E, Makino T: Liposomalization of lactoferrin enhanced its anti-inflammatory effects via oral administration. *Biol Pharm Bull* **28**: 1717-1721, 2005.
  60. Allen TM, Cullis PR: Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. *Adv Drug Deliv Rev* **65**: 36-48, 2013.
  61. Teixeira ML, dos Santos J, Silveria NP, Brandelli A: Phospholipid nanovesicles containing a bacteriocin-like substance for control of *Listeria monocytogenes*. *Innovativ Food Sci Emerg Technol* **9**: 49-53, 2008.
  62. Breukink E, Ganz P, de Kruijff B, Seelig J: Binding of nisin Z to bilayer vesicles as determined with isothermal titration calorimetry. *Biochemistry* **39**: 10247-10254, 2000.
  63. Deegan LH, Cotter PD, Hill C, Ross P: Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int Daily J* **16**: 1058-1071, 2006.
  64. Mugabe C, Halwani M, Azghani AO, Lafrenie PM, Omri A: Mechanism of enhanced activity of liposome-encapsulated aminoglycosides against resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **50**: 2016-2022, 2006.
  65. Yamakami K, Tsumori H, Shimizu Y, Sakurai Y, Nagatoshi K, Sonomoto K: Effects of acyl chain length of liposome-encapsulated nisin on bactericidal activity against cariogenic streptococci. *J Dent Health Oral Disord Ther* **1**: 17-20, 2014.
  66. Branen JK, Davidson PM: Environment of nisin, lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin. *Int J Food Microbiol* **90**: 63-74, 2004.

## 歴史の潮流と科学的評価

(第5節 ベジタリアン食の世界規模の問題と非栄養学的視点)

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：畜産，農業，天然資源，エネルギー，汚染，環境問題

### 17章 食肉生産の環境への影響とベジタリアン主義

#### 1. はじめに

食品は、一部は天然から、一部は、農業生産から得ています。先進国では、食品の殆どは、農業から得ています。しかし、まだ、かなりの量は天然資源から得ています。例えば、米国では、年間約4.3百万立方トンの野生の植物と動物が収穫、捕獲されています<sup>1)</sup>。このうち80%が魚で、残りは、哺乳類、鳥、ナッツとベリーです<sup>1)</sup>。ヨーロッパでは、魚、野生の果物ときのこが食事の材料となります。

実際、重量ベースで、先進国では、天然物からの食料の殆どは動物性食品に関心があります。魚の多くは現在でも、海、河と湖から獲れます。しかし、先進国では、哺乳類と鳥類からの食肉源は、圧倒的に畜産であり、自給の場合は狩猟が殆どです。天然の食品は、先進国以外では重要な意味を持っています。例えば、アフリカの740の部族では、食事の80%は野生の

動物と植物から得ています<sup>1)</sup>。

食料は、画一的には規定できない環境問題と関連しています。ここで言う「環境」という言葉は、3つの相互に関連する問題に関係しています：天然資源の利用、生活環境に関連することと公害です。食肉生産に関する活動の相対的な環境影響とベジタリアンの代替食料がこの章の議論の対象です。ヨーロッパ、北アメリカとオーストラリア等の先進地域での平均的生産活動を重視します。しかし、実際の活動は大きく変化し、また、平均よりかなり逸脱しているという事に注目する必要があります。さらに、穀物生産は、畜産に極めて大きな比重がかかっていることを認識すべきなのです。

#### 2. 天然資源

漁業と狩猟は天然資源を収奪します。天然資源のいくつかは、農業生産に利用されます。最も重大なものは、土地と水です。鉱物油、多くの金属鉱石、リン酸塩岩と天然ガス（肥料の生産に利用される）等のエネルギー資源は、また、重要です。議論すべきは、これらの資源が有効

に活用されるかどうかと、あると想定して、未来まで利用できる現在の効果的な活用とは何かです。

食料に包含される天然資源は、いつの時代でも、異なる原動力を持っています。鉱物油、天然ガス、リン酸塩岩と金属鉱石等のいくつかは、ゆっくりとした地質学的プロセスで生成されます。また、米国のOgallala Aquifer等の一部の「化石」地下水はこの範疇に入ります<sup>2)</sup>。ゆっくりとした生成ということは、このような天然資源が再生される量はほんのわずかずつであることを意味しています。これらの資源は、通常、実質上は、再生できないものと認識されます。

他の天然資源は、既存の資源に有効な積み上げとなる性格を有しています。これらの資源は、再生可能で、肥沃な土壌、魚、土地と地表水です<sup>2)</sup>。肥沃な土壌は、天候と泥炭生成から生まれます。水資源は、雨で補充されます。既存の資源に有効な積み上げになるかどうかは、時折、条件次第です。例えば、地下水面が十分に高く、他の多くの因子がその生成に有効に働く場合にのみ、泥炭の追加生成が起こります。これらの条件が満たされない場合は、資源の積み上げはなく、また、既存の泥炭の酸化による減少さえもあるかも知れません。また、条件次第ということは魚にも適用されます。魚資源の再生は、再生産に依存するので、十分な数の再生産できる魚が存在することが、再生の前提条件となります。

農業のための天然資源の活用は、将来の利用効率にとって重要な意味を持っています。利用が資源の生成を超える消失になるような場合は、未来の資源は減少して行くでしょう。そうして、例えば、天候による侵食が肥沃な土壌の生成を越えてしまう場合には、未来の土壌生成にはマイナスに働くこととなります。さらに、肥沃な土壌等の再生可能な資源は、他の質的な損失を受けるかも知れません。土壌の密集化、

塩水化と有毒化は実際に起こり、天然資源としての機能に悪影響を及ぼします。事実、過剰開発と公害の負の影響は、全ての再生可能な天然資源に影響する問題です。魚の乱獲は、近い将来魚資源の減少を招くでしょう。極端な魚の乱獲は、魚の種の絶滅を招き、その結果資源の消失に至ります。毒物の放出は、魚の健康に悪影響を及ぼします。

開発は、また、再生不可能な資源の将来の利用効率に影響します。未来の世代に対し、鉱物油と天然ガスの大規模な燃焼は、化石炭素化合物の利用効率に悪影響を及ぼします。著しい腐食がなく、また、効率良く再利用される銅鉱石の利用は、将来の利用効率に、大きな影響はありません。一方、豚の餌としての銅化合物の浪費は、未来の銅資源に悪影響を及ぼすでしょう。数多くの天然資源の減少という未来への実際的な影響が、異なる視点を持つ反対論者の間で白熱した議論の主題になっています。科学の進歩と潜在的な代替物があるので、問題はないとする一部の人があります。一方、資源の現在の消失速度を維持すると、遅かれ早かれ大きな問題を発生するという議論があります。後者の見方が正しい予測という視点で、実際の食料生産と関連する天然資源の消失が議論されるでしょう。天然から得られる食品は、過剰開発の可能性を受けやすく、将来の利用効率に悪影響を与えるかも知れません。狩猟は過去の世紀に於いて、数多くの動物にとって、絶滅のあるいは絶滅に近い主要な原因でした。犠牲となったのは、オーロックス (*Bos primigenius*)、ヨーロッパの家畜牛の祖先 (1627年絶滅)；ターパン (*Equus caballus ferus*)、ヨーロッパの野生の馬で、1851年絶滅；ドードー (*Raphus cucullatus*)、モーリシャス先住の大きな鳥で、白人住民の乱獲で20世紀初頭に絶滅<sup>1)</sup>。

先進国では、現在、狩猟は、哺乳動物と鳥の絶滅の脅威を殆ど回避してきていますが、ヨー

ロッパでは、移住してきた一部の鳥に対する狩猟による悪影響があることに注目が集まっています<sup>1)</sup>。先進国に於ける植物ときのこの収集は、また、生物多様性を制限する影響があります<sup>2)</sup>。

しかし、漁業についても、天然資源の過剰開発は主要な問題点です。世界の魚獲量の約70%は海域から得られます<sup>3)</sup>。残りは、養殖と淡水産です。海の魚資源は世界の一部の地域では強い監視下にあり、また、アジアでは、人口が密集した大陸近くの海域にあります。国連食糧農業機関 (FAO) によると、現在、15ヶ所の主要な漁獲海域の11ヶ所では乱獲とのことです。さらに、乱獲は多くの淡水漁業の問題でもあります<sup>3,4)</sup>。

農業はいくつかの天然資源を利用します。この章では、以下の天然資源に対する、農業と動物生産の影響に焦点を当てます：

- 土地 (肥沃な土壌)
- エネルギー資源 (化石炭素資源)
- 水
- リン酸塩

#### A. 土地

土地の利用を考える際、動物の飼料を生産する土壌は、人間の食料になる植物の生産に適しているかどうかという重要な問題が発生します。Buringhz<sup>5)</sup> は、地球の土地の約22%は、原則として、人が消費する穀物を育てるのに適していると推定しました。1984年、およそ土地の半分は、穀物のために使用されていて、残りは、牧草と森林に利用されていました。

実用的な観点から言えば、人類が食することができる穀物の生育には適していない広大な土地がありますが、牧畜の基本となる植物の生育には適しているのです。地表の約50%はこの範疇に入り<sup>6)</sup>、その半分が熱帯か亜熱帯にあり、残りの半分は温帯地域と寒冷地域にあります。この地域は、山の草地、大草原、ステップ、

サバンナと塩性植物の地域です<sup>6)</sup>。現在、牧草地と山脈地域は $3.1 \times 10^9$ ヘクタールを占めています<sup>8)</sup>。伝統から見ると、人類にとって食用となる食糧の多くは人間が消費しています。動物の飼料は主に、これらの食糧の食べ残しや加工から出る副産物です。これは実質的な面で変化をとげています。人間にとって食糧となる穀物に畜産が依存することが増えています。主要な食料は、穀類と大豆で、大豆は油糧種子の範疇に入ります<sup>7)</sup>。現在、世界の一人当たり穀物消費量/年は、およそ201kgで、同様に飼料消費量は144kgです<sup>8)</sup>。米国では、一人当たりの穀物消費量は約77kgで、同様に飼料消費量は663kgくらいです<sup>8)</sup>。

大豆の生産量は、1950年約17百万トンであったのが、1997年152百万トンと急激に増大した理由の多くは、動物の飼料としての大豆の重要性からです<sup>9)</sup>。大豆製品の多くが人間の直接の消費に向けられていた中国でさえ、1997年には、大豆たんぱく質の60%が動物の飼料に回されました<sup>9)</sup>。

飼料用穀物と大豆が家畜の為に生産されるので、人間の消費に必要なたんぱく質量とエネルギー (カロリー) を最終的には減少させます。というのは、穀物由来のたんぱく質とカロリーが家畜を養うのに必要なためです。変換効率、飼育動物のタイプによります<sup>6,10)</sup>。先進国では、総消費エネルギーを上回る可食エネルギー比は、豚群で約18%、乳類で13%、ブロイラーで10%、牛で15%です。米国では、牛乳のたんぱく質変換効率は約31%で、卵で27%、ブロイラー生産で18%、豚肉生産で約9%、牛肉生産で6%です<sup>10)</sup>。1980年の平均では、10kgの植物性たんぱく質は、1kgの動物性たんぱく質を生み出します<sup>11)</sup>。それ以来、変換効率に顕著な変化はありません。

さらに、養殖 (魚、軟体動物、えび) の増加に注目が集まっています。1996年、養殖は

23.1百万トンを生産したと見られ、1984年の6.9百万トンより大幅に増加しました<sup>9)</sup>。もう一度言いますが、穀物はしばしば飼料として利用されるのです。肉食動物の飼育に、魚がしばしば利用されます。草食性の魚をカロリー管理し、穀物で飼育することは、鶏を穀物で飼育する効率とほぼ同じと考えられます<sup>9)</sup>。さけやえび等の肉食種の場合は、同量得るためには、平均して、5 kgの魚を必要とします<sup>4)</sup>。

天然資源を考えた場合、世界的には、人間にとって食用となる植物を栽培するのに適している土地のおよそ50%以上の土地が実際は、一部は草、穀物と油糧種子を含む動物の飼料を生産しています。動物の飼料を人間の食用となる生産物に変換する効率には限りがあるので、食用となるエネルギーとたんぱく質の効率は低いものとなります。動物飼育に必要な穀物を栽培する土地は、ベジタリアン食の人々のおよそ5～10倍が必要となります。

### 1. 耕作地の荒廃

土地の利用についてのもう一つの重要な視点は、耕作と放牧が持続可能かどうかです。食糧生産に係る土壌は、農業が持続できなくなってしまふ程度までに至る侵食、塩害化、土壌緊密化を受け易くなります<sup>11)</sup>。

食糧生産にとって、侵食は主要な課題です。それは、食品生産と動物飼料生産の双方に影響します。保全耕うんの戦略が、食糧生産に於ける侵食を抑制するために発展してきました<sup>12)</sup>。米国では、栽培地域の37%が保全耕うんの下にあります<sup>12)</sup>。結局、それでもまだ、世界の主要な食品と飼料を栽培する地域では、肥沃な土壌の損失が確実に存在しています。前記で指摘したカロリーとたんぱく質を供給する相対的な効率という点で、肥沃な土壌の実質的な損失は、穀物と大豆等の食糧を基にしたとして、同じあるいは同様な食糧が人間の食糧として直接に利用される場合よりも、あらゆる確率で、動

物生産の為の方が大きいのです。

### 2. 家畜による土地の荒廃

家畜が土地の荒廃に影響するにはいくつかの形があります。最初の可能性は、飼育地の過剰な広さです。もう一つ、持続性のない放牧が泥炭質の土壌で見られます。ここでは、草はしばしば低位の地下水で育ち、牛と羊が放牧されます。このことは、急激に薄い泥炭層を生み出します<sup>2)</sup>。さらに、川岸の森が家畜の為に草地になるように伐採される時に、侵食の増加と栄養素の消失が起こります<sup>13)</sup>。

持続性があり、放牧の拡大に適した土地の多くは、事実、過剰な広さです。このことは、反面、土地の荒廃、特に風と水による飽和状態をまねきます。1993年、Oldeman<sup>14)</sup>は、1945年以来、20百万km<sup>2</sup>の土地が人間の活動によって荒廃してしまったと結論付けました。これは、地球上の植生地の約20%です。12.2百万km<sup>2</sup>が、緩慢あるいは強力に荒廃したと見られます。緩慢に荒廃した土地(9.1百万km<sup>2</sup>)は、生産性を大きく減少させ、強力な荒廃があった土地(3.1百万km<sup>2</sup>)は、農業が出来る能力を失いました。Oldeman<sup>14)</sup>が注目した荒廃の1/3は、過剰な放牧によるものです。北アメリカでは、土地荒廃に対する過剰放牧の影響度は30%で、ヨーロッパでは、23%です<sup>14-18)</sup>。Oldeman<sup>14)</sup>は、過剰放牧による土地荒廃の比較的高い影響度がオセアニア(80%)とアフリカ(49%)にあることを見出しました。1980年代の中頃、オーストラリアでは、乾燥した放牧地の55%、全体として4百万km<sup>2</sup>が過剰放牧による荒廃を蒙り、そして、復旧の手立てが必要とPerrensは推定しました<sup>18)</sup>。乾燥地に関する限り、このパーセントは比較的良好な数字です。アフリカ、北アメリカとラテンアメリカの相当する%は75%です<sup>11)</sup>。1990年代、放牧を実施したことに関係する最終的な荒廃は、全ての確率で、Oldemanが見積もった数字を越えて増加

していました<sup>14)</sup>。1990年の中頃で、土壤荒廃による年間の農業土壌の損失率は、まだ、5～6百万ヘクタールの大きさです<sup>15)</sup>。

### B. エネルギー資源

農業にとっての主要なエネルギー資源は、実質上再生不可の化石炭素化合物の貯蔵物から得られます<sup>2, 19)</sup>。最近、農業用への化石炭素化合物の利用は、経済で使用されるエネルギーよりも早い速度で大きくなる傾向にあります<sup>20)</sup>。今までは、先進国の食品用の化石炭素化合物の使用は一定でした。機械化、冷凍、そして飼料、肥料や農薬等に投入されたエネルギーは、確実に農業のエネルギー強度に影響しています。

農業の化石エネルギー強度は各国によってかなり異なります。例えば、耕作の草地での化石エネルギーの投入と補助は、オーストラリアとニュージーランドでは2～3 GJ/ヘクタール、イスラエルとオランダでは、70～80 GJ/ヘクタールで、米国ではその中間にあります<sup>20)</sup>。

先進国での農業のエネルギー強度の一般化は、化石燃料の貯蔵に対し主要な影響を持っています。例えば、もし、米国で現在食品の供給に使用されている化石燃料の一人当たりの使用が世界全体の全てを超えた場合、また、エネルギー需要が鉱物油で補われたとしたら、既知の油の保存量は10年の間に枯渇するでしょう<sup>21)</sup>。

それが示すように、先進国での動物生産のエネルギー強度は、穀物、じゃがいもと豆類等のベジタリアンの代替食品のエネルギー強度より

もはるかに大きいのです<sup>9, 10, 20, 21)</sup>。表17-1は米国の推定食料エネルギー消費/化石燃料供給エネルギー比を示しています。この表のデータは主に1980年代のもので、しかし、1985年より化石燃料は比較的低価格なので、比率が改善されることは期待できません。

EUのエネルギー効率に関するデータは、エネルギーの戻りが消失して行く傾向にある農業強度が他より高いので、米国よりも少し悪いかも知れません。また、魚、肉とえびという形態でたんぱく質を供給するエネルギー効率に関するデータがあります。これらは、表17-2に要約されています。この表には、データを比較する為に、牛肉、卵と乳のエネルギー投入量の概算値が加えられています。データは主に1980年代のもので、繰り返しになりますが、低価格のエネルギーという点では、エネルギー効率の改善はないように見えます。

現在の農業生産システムのエネルギー効率について、真剣な議論がなされてきて、今も続いています。この議論から、エネルギー効率についての主要な資源はまだ可能であることが明らかです<sup>19, 20, 22)</sup>。しかし、これらの資源は、肉とベジタリアンの代替物の相対的エネルギー強度には何ら影響は及ぼしません。

#### 1. 水

現在、多くの水資源は、重圧にさらされています。地球上の水は潤沢ですが、利用可能な水

表17-1 推定食品エネルギー消費/化石エネルギー供給比 (米国)<sup>9, 10, 20, 21)</sup>

生産品	食品エネルギー消費/ 化石エネルギー供給
とうもろこし	2.7
じゃがいも	2.2
小麦	2
牛肉	0.02～0.04
豚肉	0.033

表17-2 様々な動物製品に対するエネルギー投入量 kJ/たんぱく質 g

たんぱく質源	エネルギー投入量 kJ/ たんぱく質 g
海由来の魚 (ヨーロッパ)	500
海由来の魚(米国ネブラスカ)	75
生えび (米国)	1800
鯉による収奪 (東アジア)	150～200
さけの単作 (ヨーロッパ)	2000
牛肉 (米国)	>600
卵 (米国)	350
乳 (米国)	200

の1%以下が農業を含めた、人間の利用に適した生水です。また、良質の利用可能な生水は、産業全体に平等に配分はされません。良質の生水の供給が地域の問題となることが増えています。この不足が政治的な緊張を起こすケースが見られ、その例として、中東と中央アジアがあります。また、水に関連する政治的問題が米国のコロラド川沿岸の南西地区で起こりつつあるようです。それゆえ、食品生産の水効率を、考慮すべき問題かも知れません<sup>16)</sup>。

動物製品の水への影響度は、穀物生産のそれよりかなり大きなものです。例えば、大豆は、乾燥重量当り約0.75リットルの水を必要とします<sup>6)</sup>。灌水のないとうもろこしは、0.6リットルを必要とし、灌水があるとうもろこしは1.4リットル、灌水のある米は、4.7リットルを必要とします<sup>8)</sup>。乾燥重量1gの牛生産物には、平均して、約20リットルの水が必要です<sup>6, 23)</sup>。大豆を参考例として見てみると、牛飼育よりも大豆の生産の方がおよそ26倍も水効率が良いことをデータは示唆しています。また、水資源の質はとうもろこし栽培よりも動物生産からの方が悪影響があります。IV. Bでさらにこの問題を取り上げます。

農業では、水効率を改善する為の確実な技術的な展望があります。しかし、前述のおよそ26という水効率が、これらの改善を実行することで劇的に変化するという事は期待できません。

## 2. リン酸塩

現在、リン酸塩鉱石から得られるリン酸肥料は、農業耕地と牧草地で頻繁に使用されています。リン酸塩鉱石は、緩慢な地質学的プロセスで形成され、事実上再生不可能と考えられています。このことは、通常のビジネスでは、この資源の消失を招くことを意味します<sup>2)</sup>。オランダ等の西欧の先進国では、肉生産に投入されるリン酸塩は、大豆たんぱく質の生産への投入

よりも少なくとも6倍になることが見積もられています<sup>20)</sup>。

精密農法は、とうもろこし生産に使用されるリン酸塩鉱石から得られる肥料の投入を減少させるかも知れません。精密農法では、肥料の適用システムは慣行農法よりも作物の需要により正確に対応しています。動物肥料に含まれるリン酸塩は、精密農法にはあまり適していないでしょう。このことは、精密農法の導入の際には、効果的な作物生産のために、リン酸塩効率を考え、変更が必要かも知れません。

## 3. 生きている自然との関係

生きている自然は、有用なものから活気があるものと数多くの恩恵を人類に提供してくれます。食糧はこれらの一つにすぎません。その他に、光合成、受粉、再生、物質循環、病原菌の抑制、遺伝資源、鉱物の生成と公害の抑制があります。自然が生み出す恩恵の総合的価値を決めるのは大変に困難です。しかし、世界総生産と同じ尺度で推定はできます<sup>15)</sup>。それゆえに、自然に対する負の影響は、軽く取り扱ってはなりません。

食料として野生の動物を捕獲することは、自然の生活にかなりの影響を与えるかも知れません。野生動物の捕獲は、種の一部を消失することに繋がることを2項ですでに指摘しています。現在、多くの種の減少が進行中です。例えば、大規模な商業的漁業に伴う乱獲と非意図的な捕獲により、過去25年間で、102種の淡水種の数は45%減少し、一方、海洋生物種は35%減少しました<sup>4)</sup>。魚種への負の影響が、魚を食料とする鳥や哺乳動物等の他の種に順番に起きるかも知れません。

また、生きている自然に対する負の影響は農業と関係しています。農業の拡大は、自然の「後退」があります<sup>25-28)</sup>。もし、自然を、人類によっ

て影響の受けない地域と定義したら、自然はなくなるという議論になるかも知れません。今までは、おそらく、人類の活動に全く影響を受けないまま残っているという、生きている自然の地域はないかも知れません。しかし、自然を人間の直接の指揮下にはない地域と定義するならば、地球上の生きている自然は、まだ、光合成の50%以上がそれと言えます。(一次生産)<sup>25)</sup> 自然の後退は生物多様性の確実な消失を伴ってきました。現在の消失率は、過去全体の消失率と同じか、それ以上となっています。例えば、ヨーロッパでは、11,000の伝統種が失われ、米国の相当する数字は20,000のオーダーと見積もられています<sup>1)</sup>。

かなりの程度で、自然の縮小が置換によって起きています。野生の地域が、作物の育つ牧草地や耕地に転換する時には、自然は、大幅に耕作に取って代わられます。後退の少しの部分は、農業の間接的な影響によります。例えば、ブラジルでは、新しい大豆を栽培する地域を開発する為に河川が荷物の運搬の為に利用され、その代わりに、河川のエコシステムに影響が出るでしょう<sup>29)</sup>。また、農業での農薬の使用は、標的としない生物に重大な影響を与える傾向があります<sup>1)</sup>。もう一つの例は、集約的動物飼育から発生し、近隣の野生の区域に強い影響を及ぼすと考えられる窒素の流出に関することです。土壌は酸性化するか富栄養化します。(多肥) 富栄養化は、種の多様性の損失を招くようです<sup>30)</sup>。ヨーロッパの温かな気候の地域では、野ばら、いらくさと草の増殖は大量の窒素とリン酸塩の流出をしばしば伴うことが見られます。窒素化合物を大量に投入すると、カルーナ(ヒース等の低木)のある荒地を *Deschampsia Molina* 等の草で侵食されてしまうこととなります<sup>30)</sup>。土壌の酸性化は、樹木の活性損失に繋がるかも知れません<sup>9)</sup>。森林では、窒素化合物の負荷は、病原性の菌類の発生増加、*Mycorrhizae* (共生

の菌類)の生育減少、藪の多様性の減少と多くの実生の減少を誘起させます<sup>31)</sup>。また、土壌中の虫群は、窒素負荷に向かって変化するかも知れません。さらに、農業による自然の置換は、表層水と流出を変化させるかも知れません。引き続き、このような変化は近隣地域の生物多様性の主要な変化を誘導することになります。畜産が自然の生活に及ぼす影響の程度は、その方式の正確さに強く依存しています。

#### A. 未耕作地での畜産

影響の範囲がもっとも少ない所では、未耕作地での畜産が非常に低い密度ということかも知れません。それゆえに、生物多様性の利点を論じることができます。例えば、放牧は、新しい無生物の変化を起こすような、新しい環境に適した場所を作りだします。それは、放牧者がいなかった時には、存在しなかった種の出現を可能にします。未耕作地で放牧者と動物の密度が増加した場合には、この生物多様性にとっての良い影響は消失します。生物多様性に対し負の影響を与える過密は、明らかに低密度の放牧者で起こります。これは、一般的に、生態系中の低密度の脊椎動物と調和がとれていて、平均的には、植物性バイオマスの0.03%を超えてはいません<sup>18,20)</sup>。

過密でしかも未耕作地に於いては、生物多様性は減少します。動物と豚を放牧することに伴う過密による、このような現象についての証拠は有り余る程十分にあります。過密が極限に達すると、生物多様性が著しく減少した砂漠が出現します。事実、ヨーロッパの一部では、このような砂漠が有史以前にすでに誕生していました<sup>32)</sup>。

現在、食品生産を目的にした極めて低い密度の放牧は、まれになりつつあり、一方、過密は共通したものとなっています。これは、過去50年間の乾燥地域の砂漠化で証明されます。(1. A項参照)

## B. 農業生産を基にした畜産

耕作地から得られる飼料で多くの動物を増やすために、損傷のない自然が耕作地に定期的に置換されることとなります。世界規模で、一次生産（光合成）の自然が普遍的な変化を遂げています。自然な一次生産が減少しています。前述のように、地球上の光合成の占有率は恐らくまだ、50%以上<sup>21)</sup>でしょう。しかし、特に農業の拡大により、これは長くは続かないかも知れません。たんぱく質とカロリー生産に於ける相対的非効率性が原因で、畜産は、特別な量の食品エネルギーあるいはたんぱく質の為に、作物生産よりもより多くの土地を要求します。実際の量は、畜産の正確な性質によりますが、1.A項で論じたように、概略で言うと、肉たんぱく質の固定量は作物のたんぱく質の5～10倍を必要とします。このように、他の条件が同じとして、耕作に適した土地での畜産の拡大は、人類に直接供給する作物生産の5～10倍の自然を置換することになります。

現在の食事がベジタリアン風の国へ、米国の食習慣を外挿することは、先進国での現在の行動の影響を例証することになるかも知れません。もし、インドネシア人あるいはコスタ・リカ人が平均的米国人と同じ食事をした場合、また、もし、動物生産を自給したとすると、インドネシアとコスタ・リカの雨林は2.3年で消失してしまうでしょう<sup>33)</sup>。耕作地への自然の置換は、自然種の消滅の増加速度に大きく影響します<sup>26-28)</sup>。このことは、続いて、生物多様性が急速に減少させます。

また、もう一つの影響が考えられ、生きている自然が地球上から失われるかも知れません。大気の組成を決定する際に、自然は決定的な役割を果たし、人類に対しこの組成を有益な状態に保持する道具となることを、Huxley<sup>34)</sup>と Lovelock<sup>35)</sup>は論じました。この仮説が正しいとするならば、自然を消失するという事は、遅

かれ早かれ、この機能を失うことに繋がるという結果になるかも知れません。事実、Lovelockは、これに関して、火傷に喩えました。火傷が危機レベルの80%を超えた場合、生体内部のホメオスタシスが失われ、重要な臓器がだめになるので死は避けられません。Lovelockの仮説と推論が正しいかどうかは、現在明らかではありません。しかし、それらが正しいとすれば、野生地域の損失拡大は、容易に起こり得ます。

## 4. 汚染

汚染とは、本質的に、不適切な場所あるいは、不適切な量の化学的、物理的、生物的な実体を言います。その重要性は、用量依存を示し、しばしば影響を示さないレベルでの負の影響と相関していることにあります。対象となる負の影響は直接、人の健康に影響を及ぼすかも知れません。また、汚染は農業等の人間の活動、ヒトが作り出したしくみや自然に負の影響を与えるかも知れません。

実際、広い範囲での汚染問題があり、いくつかの微小ガス濃度が空気中で増加することで引き起こされる、地球規模での変化に対する過剰な騒音に関連する問題や、伝染性疾患の酸性雨を引き起こす微生物の放出があります。汚染は地理的展開を変化させる様々なタイプがあります。それは、局地的（例：銅を多く含んだ肥料に起因する土壌中の銅の増加）なものから、地球規模的（例：農業によるメタンと2窒素酸化物の放出に起因する気候変動の増加）なものに及びます。その中間には、窒素とリン化合物による河川流域と海に近い地域の富栄養化と、空気中への窒素化合物の放出に相関する土壌酸性化で示される、地球に深刻に影響する汚染があります。

表 17-3 は、オランダの肉生産によって発生する汚染の原因となる化合物と、大豆を同量生

表 17-3 オランダでの肉生産の相対的排出量  
(vs 大豆製品との比較)<sup>24, 32)</sup>

排出の化合物	大豆製品の 排出量	肉製品の 相対的排出量
二酸化炭素	1	7
銅	1	>100
農薬	1	6
酸性物質	1	>7

産する場合と比較した相対的農業放出を示しています。肉を生産する動物が食べる植物の栽培と関連した汚染は、肉生産が原因の放出に含まれます。

表 17-3 中の化合物は、様々な環境問題の一因となります。二酸化炭素は「温室ガス」で、可視光に対しては半透明ですが、地球からの赤外放射を吸収します。現在、空気中での増加が、大気のもっと低い層である成層圏の温暖化の原因の一部と考えられています。(地球規模の大気汚染を参照)

土壌中の含量が大きく増加した場合は、特に銅は問題となります。それは必須元素ですが、生物は自分の利益のために大量に取り込みます。大量かどうかは生物によります。羊と一部ののみず等の種は、土壌中の銅濃度がかなり緩慢にしか増加しないことに対し、比較的被害を受け易いのです。(IV. D 参照)

農薬は様々な病原菌を抑制するために使用される化合物です。不幸にも、それらは、標的としない生物に対し負の影響を与える傾向があります。しばしば、これらの負の影響は、排出に近いものとされています。しかし、有機塩素系農薬等の分解しにくく、比較的移動性のある農薬は、温帯と(亜)熱帯地域で使用された後、極地まで拡散するという影響があります。

最後の「酸性雨」として知られる酸性物質は、酸性雨の中に含まれています。酸性雨は、多くの物質と生物多様性に負の影響を与え、臨界負荷を超えた場合、特に影響があります。これらの臨界負荷は、緩衝能力の低い湖と土壌で

は、比較的低値です。実際、臨界負荷の過剰が北アメリカ、ヨーロッパとアジアの一部で発生していて、生物多様性の低下と変化を起こしています。

表 17-3 は、農業に関係した全ての重要な公害物質は網羅していません。(しかし、農業によって発生する他の重要な汚染物質は次の項で検討されます) さらに、これらの汚染物質に対し、オランダの肉生産に関係する相対的排出は大豆生産のそれよりも大きいという表 17-3 で示唆される傾向に偏りはありません<sup>24, 36)</sup>。

次の項では、動物生産の直接的な汚染影響がさらに詳しく論じられます。

#### A. 局所的影響

畜産から排出される一部の化合物は、全く移動しないかあるいは移動性は低いのです。例えば、肥大を促進するために豚の飼料に添加される銅化合物は、大部分は堆肥と一緒に排泄されます。豚飼料中の銅濃度は、175 mg/kg 程度です<sup>32)</sup>。豚の飼育から出る堆肥が土壌に施された場合には、殆どの銅は表層部に結合しています。豚の肥料が徹底された場合は、表層での銅濃度は急速に増加します。オランダでは、豚の飼育が集約的で、銅含量は 133 mg/kg に達していることが見出されています<sup>33)</sup>。これらの大きな増加は、土壌を保持してくれる多くのみみずに負の影響を与えるかも知れません。銅濃度が 60 mg/kg を超えると、ミミズ *Lumbricus rubellus* の集団に負の影響が出るかも知れません<sup>37, 38)</sup>。表層中の銅量の増加は、また、豚の堆肥を施された土壌で栽培された植物中の銅含量を増加させるでしょう。その結果、このことは、これらの植物の摂取に関連した問題を発生させるかも知れません。羊は飼料中の銅濃度の増加に対し、比較的影響を受けません。羊にとって、0.8 mg/kg 体重/日の摂取は毒となり、溶血によって死に至ります<sup>36)</sup>。土壌中の銅濃度

が 30 mg/kg を超え、有機物が 5% 以下になると、脆弱な性質の羊は負の影響を受けます<sup>36)</sup>。

比較的低移動性のもう一つの化合物は、リン酸です。堆肥と共に排泄されたリン酸は通常土壌と結合します。しかし、塩基性土壌のように、堆肥が集約的で、リン酸結合能力が制限される場合は、土壌はリン酸で急速に飽和状態となります。この場合、かなりの量の「漏れた」リン酸が地表と表層水に表れます<sup>39)</sup>。

畜産で排出される他の化合物は、銅やリン酸と比べかなり低い土壌結合力です。特別な例は窒素とカリウム化合物で、急激に地表と表層水に漏れ出します。また、リンデーン等の洗羊液として使用される殺虫剤と、容易には分解しない家畜用医薬品が地表と表層水に現れるかも知れません。

地下水中に溶解している化合物の移動性には限界があります。通常、ミリメートル/日の領域を越えることはありません。このことはまず、最初は近い所が影響を受けることを示しています。この点に関し、特に重要なことは、人間と動物に飲み水を供給する井戸への地下水汚染の影響です。集約的な下肥えになり易い堆肥堆積場や畑に近接する井戸では、硝酸塩（ホットスポット）の大きな増加が見られます。米国では、硝酸塩のホットスポットが中西部の一部とネブラスカの砂丘の地域で見られます<sup>18)</sup>。ヨーロッパのフランス（ブリタニ）、ポルトガルの西部地区、イタリアのポ地区と土地の低い国等の密度の高い集約的な畜産の地域では、地下水中の硝酸塩濃度がかなり増加しています。この量は、富栄養化をもたらす（Ⅲ項参照）、人の健康に有害となるかも知れません。高硝酸塩濃度のリスクは、亜硝酸塩への変化と強い相関があります。亜硝酸塩は、ヘモグロビンと反応し、消化管で発がん性のニトロソアミンを合成するかも知れません<sup>31, 39)</sup>。世界保健機関（WHO）は亜硝酸塩の 1 日許容摂取量（ADI）は、0.134 mg/

kg 体重と設定しました。生体中で 5% の転化があると、硝酸塩の ADI は 3.3 mg/kg 体重となります。他は、さらに低い ADIs を提案していません<sup>39)</sup>。小児は硝酸塩濃度の増加に対しては特に被害を受け易いのです。高濃度（44.3 ~ 88.6 mg 硝酸塩/リットル）に晒されると、小児は、「ブルーベビー症」かあるいはチアノーゼを患うことが見られました<sup>39)</sup>。また、胃と腎臓のいくつかの疾患は、虚弱性が増すことを誘起するかも知れません<sup>39)</sup>。このような影響の観点から、ヨーロッパ連合（EU）は、飲料水では最大値を 50 mg 硝酸塩/リットルとし、目標値は 25 mg/リットルと設定しました。堆肥蓄積場と堆肥の厚い砂地付近の地下水では、これらの濃度をしばしば超えています<sup>34, 36)</sup>。

もう一つの局所的汚染は、畜産での抗生物質、特に微生物感染を防いだり抑制したりするための飼料添加物としての抗生物質の使用から起こることです。飼料添加物の定期的使用は、抗生物質耐性の微生物を出現させることを助けることとなります。例えば、鶏の飼料添加物として抗生物質を使用した鶏舎付近では、バンコマイシン耐性が強力に増加したことが見られています<sup>39)</sup>。このことは、バンコマイシン耐性が局所に止まらず、現在バンコマイシンが唯一の効果的な抗生物質である、メチシリン耐性の *Staphylococcus aureus* を出現させてしまうということが、特に問題となります。もっと一般的なことでいえば、家畜治療と人の薬に重要な感染性微生物に、抗生物質耐性が出現することが問題であるかも知れません。

## B. 表層水の汚染

長い時間をかけて、地下水に溶解した汚染物は長距離を移動します。このように、多くの表層水の一部は地下水が流れ込むので、地下水汚染は表層水汚染にかなり影響を及ぼします。また、農場からの流出と灌漑用水は、表層水汚染

に影響を及ぼすかも知れません。

表層水の汚染物は地下水よりも速く移動します。10 km/日という川の速度は、特別なものでなく、地下水よりも、10,000,000倍という単位です。このスピードの観点から地質学的に言うと、川の汚染は、広い影響を及ぼします。汚染物が表層水中で容易に分解されない場合は、このことは特に顕著になります。これらの流域汚染は、川下と湖や川が注いでいる海に影響を及ぼすかも知れません。

特に集約的な畜産の重大な影響は、多量の窒素、カリウムとリン化合物が表層水に表れるということです。天然水中の窒素とリン化合物は、一次生産（藻類の成長等）に対してしばしば制限因子となるので、畜産からの排出は富栄養化を招くかも知れません。例えば、貧栄養の水が富栄養になった場合、水の生物多様性は減少する傾向があります。また、富栄養の水は、藻類と渦鞭毛虫類の繁茂を持続します。このことは、内陸部の水と富栄養川近辺の海の一部でも見られます。後者は、北アメリカの以下の地域に該当します：チェサピーク湾、ロングアイランドサウンドとメキシコ湾です。ヨーロッパでは、バルト海、北海とアドリア海の一部が影響を受けています<sup>16)</sup>。これらの繁茂は、毒素を排出する藍藻と渦鞭毛虫類が対象となり、その結果、これらの水中で生活している動物に負の影響を与えることとなります。水泳する人も藻類と渦鞭毛虫類に負の影響を受けるかも知れません。

その例として、*Pfiesteria piscicide* というノースカロライナ海岸で多くの魚キラーの一つとして知られる渦鞭毛虫類です<sup>40)</sup>。*Pfiesteria* はまた、人に対しても害となる毒素を生産します。*Pfiesteria* の毒性変異体の成長は、豚が放出する尿尿で刺激を受けます<sup>40)</sup>。

富栄養で増殖する藍藻には *Micocystis* がいます。*Micocystis* はシアン毒素を排出し、水泳する人の胃腸傷害と皮膚障害を誘因するリポ多糖

類化合物を含んでいます<sup>41)</sup>。極端な場合、藻類の繁茂が拡大すると酸素枯渇を誘起するかも知れません。このことは、魚などの酸素に頼る生物の死を招くこととなります。その例はメキシコ湾の「死の地帯」と称される所で、ミシシッピ川によって富栄養化となり、何千 km<sup>2</sup> にわたり生物が存在しない地域です。

畜産よりもたらされ、水汚染に対するもう一つの影響は *Cryptosporidium* と *Giardia* 種等の腸管病原体に関することです。感染は一部動物から人へ、糞便と口を通して起こり、特に表層水中での入浴により起こります<sup>42)</sup>。

### C. 局所的汚染

畜産に関連した局所的大気汚染は、酸素の低下を伴った堆肥中の化合物の排出から、殆ど発生します。特に、アンモニアの排出と還元硫黄化合物が重要とされています。還元硫黄化合物は臭気を発しますが、アンモニア化合物は、大気から堆積する富栄養化に影響します<sup>31)</sup>。また、堆積後、アンモニアは土壤微生物によって、一部硝酸と亜酸化窒素（2 窒素酸化物）に転化します。このことは、順番に、地下水の硝酸濃度の上昇（IV. A 項参照）、土壤酸性化と亜酸化窒素の大気中への排出（IV. D 項参照）を生じさせます<sup>39, 43, 44)</sup>。

畜産からはまた、他に重大な排出があります。集約的な畜産が高密度で行われている地域で、喘息等の呼吸器系の疾患が比較的高頻度で見られるということです。

### D. 地球規模の大気汚染

畜産は地球規模の大気汚染に影響し、特に、温室効果をもたらす大気中の微量ガスの増加です。二酸化炭素とメタン等の温室効果ガスの大気中の増加量/年は、現在、それぞれ0.5%と約0.4%です<sup>45, 46)</sup>。二酸化窒素の増加は0.25%/年です<sup>45, 46)</sup>。前述のように、この増加は、地

球の表層付近の温度に対し上昇圧力を生じさせ、その後、気候変化を誘起させるかも知れません。畜産はまた、動物食品の料理と冷凍に使用される冷却剤のクロロフルオロカーボンの消失と関係しているオゾン層の崩壊に少し、間接的に影響を及ぼしています。

温室効果ガス濃度の増加に対する畜産の影響は主に、二酸化炭素、メタンと2窒素酸化物の排出にあります。二酸化炭素の排出は、動物生産にエネルギーを供給する為に必要な炭素燃料の燃焼と大きく関係しています。表 17-3 で示されているように、オランダの肉生産に関係した二酸化炭素の排出は、大豆たんぱく質を同量生産するのに必要な二酸化炭素排出の7倍です。メタン排出は一部、飼育動物の腸に由来し、一部は堆肥の嫌気的変換によります。家畜からのメタン排出は、約 80 メガトン/年で、65 ~ 100 メガトンの幅があると推定されています<sup>45)</sup>。牛とバッファローがこの排出の約 80% を占めます<sup>45)</sup>。堆肥と反芻動物からの世界規模のメタン排出は、85 ~ 130 メガトン炭素/年と見積もられています<sup>46)</sup>。総合的に人間が関与するメタン排出は、300 ~ 450 メガトン炭素/年です<sup>45, 46)</sup>。

亜酸化窒素は、畜産で発生する窒素化合物を微生物によって変換されることで生成します。1990 年の堆肥からの世界の亜酸化窒素排出は、1.0 ~ 1.1 テラ gN と推定され、全体では、2.6 ~ 4.4 テラ g でした<sup>44)</sup>。間接的に、畜産は動物飼料用の栽培に関係した二窒素酸化物を発生させます。これらの排出は合成肥料の使用と大豆による窒素固定に関連しています。この畜産に伴う間接的な排出は、0.5 ~ 0.7 テラ gN と推定されるかも知れません。

## 5. まとめ

肉生産と同量の肉を生産するための穀物の環境影響が、北アメリカ、ヨーロッパとオーストラリア等の先進国を中心にその実態について論じられました。

結局、天然資源の利用、野生地域への影響と汚染に関する現在のデータから導き出される結論は、あらゆる角度から見た環境問題に対し、畜産による肉生産の負の環境影響は、対照の穀物（大豆）生産よりも、平均して、かなり大きい傾向があるということです。しかし、実際の穀物生産は、畜産から生成される堆肥にある程度依存していることを記憶に留めて置く必要があります。その上、有機農場での依存は、かなりの量になります。

さらに、II. A 項で指摘したように、多くの農業用地は穀物栽培には適さず、酪農の持続に適しているのです。また、動物肉に対する環境側面が全く明快でない特別な場合があるかも知れません。例えば、殆ど手つかずの未耕作地で育てた動物の肉と、温室から得られる野菜の栄養的な価値を比較した場合の例です。

漁業の環境影響を穀物生産と比較した場合はさらに困難となります。これは、それぞれの影響の性質が異なる為に起こります。多かれ少なかれ、影響が同様な程度の場合は、平均して、漁業の方が大きい負の影響があるようです。しかし、穀物生産には、漁業にはない多くの負の環境影響があります。これは、付随する環境影響に起因する、相対重量に依存した穀物生産と漁業を比較した結果に委ねられます。これらは議論の余地があるので、ここでは、穀物栽培と漁業の相対的環境影響については判断を下すことはできません。

## 参考文献

1. De Groot, R. *Functions of Nature*. Wolters-Noordhoff, Gronigen, 1992.
2. Reijnders, L. *Environmentally Improved Products and Production Processes*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1996.
3. FAO. *Yearbook of Fishery Statistics: Catches and Landings*. Rome, 1996, 1998.
4. WWF. *The Living Planet Report*, Geneva, 1999.
5. Buringh, H. Availability of Agricultural Land for Crop and Livestock Production. *Food and Natural Resources*. Pimentel, D. and Hall, C. W., Eds., Academic Press, San Diego, 1988.
6. Tivy, J. *Agricultural Ecology*. Longman Scientific, Harlow, 1990.
7. Pimentel, D., Oltenacu, P. A., Nesheim, M., Kummel, J., Allen, M., and Chick, S. Grass-fed livestock potential: energy and land constrains. *Science* **207**:843-848, 1980.
8. Kendall, H. W., and Pimentel, D. Constrains on the expansion of the global food supply. *Ambio*, **23**:198-205, 1994.
9. Brown, L. R., Renner, M., Flavin, C. Vital Signs 1998. W. W. Norton and Company, New York, 1998.
10. Pimentel, D. Pimentel, M. Food, Energy and Society. Edward Arnold, London, 1982.
11. Tolba, M. K., and El-Holy, O. A. *The World Environment 1977-1992*. Chapman & Hall, 1992.
12. Uri, N. D. Energy and the use of conservation tillage in U.S. agriculture. *J. Energy Pol.*, **27**:299-306, 1999.
13. Rippl, W., Pokorny, J., Eiseltova, M., Ridgill, S. *A Holistic Approach to the Structure and Function of Wetlands and their Degradation*. IRWB Publications. **32**:16-35, 1984.
14. Oldeman, L. R. Global extent of soil degradation. *Soil Resilience and Global Land Use*, C. A. B., Wallingford (UK): 99-118, 1993.
15. United Nations Environmental Program. *Global Environmental Outlook*. Oxford University Press, New York, 1997.
16. World Resources Institute. *World Resources 1992*. Oxford University Press, New York, 1992.
17. Perrens, S. J. *Conversion of Forest Land to Annual Crops: Australian Experience*. RAPA Report 186, FAO Regional Office, Bangkok, 1986.
18. Schnoor, J., and Thomas, N. Soil as a Vulnerable Environmental System, In: *Industrial Ecology and Global Change*, Socolow, R., Ed., Cambridge University Press, Cambridge, 1994.
19. Reijnders, L. The Factor X debate: Setting targets for eco-efficiency. *J. Ind. Ecol.* **2**:13-22, 1998.
20. Smil, V. *General Energetics*. John Willey & Sons, New York, 1991.
21. Pierce, J. T. *The Food Resource*. Longman Scientific & Technical, Harlow UK, 1990.
22. Wilting, H. *An energy perspective on economic activities*. Ph.D. thesis, State University of Groningen 1996.
23. Pagot, J. *Animal Production in the Tropic and Subtropics*. MacMillan, London, 1992.
24. DTO, *Spectrum van een duurzame voedselvoorziening*, Hagen en Stam, Den Haag, 1997.
25. Vitousek, P. M., Ehrlich, P. R., Ehrlich, A. M., and Matson, O. A. Primary production on land. *Bioscience*, **36**:368-383, 1986.
26. Kaufman, L., and Malory, K. *The Last Extinction*. MIT Press, Cambridge (Mass), 1986.
27. Raup, D. M. Biological extinction in earth's history. *Science*, **231**:1528-1533, 1986.
28. Wilson, E. O. The biological diversity crisis: a challenge to science. *Issues in Science and Technology* (fall): 20-29, 1985.
29. Burprawen, S. and Surupredo, A. Letter to H. H. *Apotheker*, Brasilla, 1999.
30. Schlesinger, W. Vulnerability of Biotic Diversity. In: *Industrial Ecology and Global Change*, Socolow, R., Ed., Cambridge University Press, Cambridge, 1994.
31. Van Duijvenbooden, W. and Matthijsen, A. J. C. M. *Integrated Criteria Document Nitrate*, RIVM, Bilthoven, 1989.
32. P. Onting, C. *A Green History of the World*. Penguin Books, Harmondsworth, London, 1991.
33. Reijnders, L. Vegetarianism and the Environment, *Proc. World Veg. Congr.*, The Hague, 1994.
34. Huxley, A. *Physiography*, MacMillan, London, 1877.
35. Lovelock, J. E. *The Ages of Gaia*, Oxford University Press, Oxford, 1989.
36. Slooff, R. F. M. J., Gleven, J. A., Janus, J. A. and Ros, J. P. M. *Integrated Criteria Document Copper*, RIVM, Bilthoven, 1987.
37. Ma, W. Toxicity of copper to lumbricid earthworms in sandy agricultural soils amended with copper-enriched organic waste materials. *Eco. Bull.*, **39**:53-56, 1988.
38. Klok, C., de Roos, A. M., Marinissen, J. C. Y., Baveco, J. M., Ma, W. Assessing the impact of abiotic environmental stress on population growth in *Lumbricus rubellus*. *Soil Biol. And Biochem.*, **29**:287-283, 1997.

39. Copius Peereboom, J.W., and Reijnders, L. *Hoe gevaarlijk zijn milieugevaarlijke stoffen 1&2*, Boom, Meppel, 1991.
40. Springer, J. *NSCU Aquatic Botany Laboratoria Pfiesteria piscicide page*, www.pfiesteria.org/pfiest.html, 1998.
41. World Health Organization. *Toxic Cyanobacteria in Water; a Guide to Public Health, Significance Monitoring and Management*. Geneva, 1999.
42. Medema, G.J. and Ketelaars, H.A.M. Betekenis van Cryptosporidium and Giardia voor de drinkwatervoorziening. *H2O*, **23**:699-704, 1995.
43. Bouwman, A.F., Fung, I., Matthews, E., and Hohn, H. Global analysis of the potential for dinitrogenoxide production in natural soils. *Global Biochem.Cycles*, **7**:557-597, 1993.
44. Kroeze, C., and Bouwman, A.F. Emissions of nitrous oxide. In: *Non-carbondioxide Greenhouse Gases*, van Ham, J., Ed. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1994.
45. IPC, Climate Change 1995. *Impacts, Adaptations and Mitigation of Climate Change: Scientific-Technical Analyses*. Cambridge University Press, Cambridge, 1996.
46. Zwerver, S. and Klok, M.T.J. *Klimaatonderzoek*, RIVM, Bilthoven, 199.

<b>白石カルシウムの炭酸カルシウム</b>	
 <p style="font-size: 1.2em; font-weight: bold;">炭酸 カルシウム とは？</p>	<p>古くから食品に使用されている安全性・吸収性に優れたカルシウム源です。用途も栄養強化はもちろんのこと、練製品の弾力増強などの品質改良、粉体の流動性向上・固結防止といった加工助剤などその目的は多彩です。</p> <div style="border: 1px solid black; border-radius: 15px; padding: 10px; margin-top: 10px;"> <p>分散性・混合性に優れたものや、飲料用として沈澱を抑制したタイプ等、品揃えております。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px; margin-bottom: 5px; text-align: center;">一般の栄養強化には、「ホワイトン」</li> <li style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px; margin-bottom: 5px; text-align: center;">機能を求めるならば、「コロカルソ」</li> <li style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px; margin-bottom: 5px; text-align: center;">飲料用には、スラー状の「カルエッセン」</li> </ul> <p style="text-align: center; font-size: 0.8em;">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。</p> </div>
<div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p style="font-size: 1.2em; font-weight: bold;">白石カルシウム株式会社</p> </div> <div style="font-size: 0.8em;"> <p>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</p> </div> </div>	

## ミラノ万国博覧会 2015 を訪れて（前編）

尾作 浩司 (OZAKU Koji)

一般財団法人 日本食品分析センター



欧州とミラノの位置 ((C)2015 google)

### はじめに

2015年、ミラノ万国博覧会が万国博覧会史上初めて「食」を主題として開催されたのは記憶に新しいと思います。昨夏、私はその万国博覧会に食品業界関係者ではありませんが、食に興味のある一人の日本人として訪れました。万博を含めた旅を通じて食に関して学び感じたものをここに旅の記録として記します。

### ■ミラノ万博とこれまでの万博

2015年5月1日～10月31日までの184日間に渡ってイタリア・ミラノにおいて国際博覧会（通称：万国博覧会。以下、「万博」）が開催されました。

メインテーマは「Feeding the Planet, Energy for Life（地球に食料を、生命にエネルギーを）」。

5年に1度の開催周期の万博。思い起こせばモリゾーとキッコロのメインキャラクターであった愛知県で開催された愛・地球博は、前々回の10年前の2005年。時が経つのも早いと感じます。

その愛・地球博のメインテーマは「自然の叡智 (Nature's Wisdom)」で、今回の万博との継続性がとても強く感じました。改めてこれまでの万博のテーマを含めてイメージや名称などを考えてみると、産業革命や高度経済成長など工業化や宇宙開発などを含めた科学技術の発展を前面に出したものだのように思えます。子供の頃に万博と聞けば興味津々で胸躍らさずにはいられないものでした。しかし、今回は地球上に住む者として本質を見直す。現地でそんな様子を目の当たりにしました。まさに素晴らしい食文化を持つ先進国である主催国・イタリアだからこそ食をメインテーマとした万博を開催できたのだと感じました。そんな21世紀の人類としての本質に迫る万博は、とても画期的で新たな方向性を見出したと感じ、これまでの万博とは違った意味で胸躍る思いをしました。

### ■イタリアについて

さて、イタリア…、伊太利亜…、Italy…と言えば、映画「ローマの休日」、サッカープロリーグのセリエA、F1サンマリノグランプリ…。ここは食を中心に考えてみました。最も身近な洋食と言えばパスタやピッツァといったイタリア料理を思い浮かべる人も少なくないと思いますし、少なからず私もその一人に数えられます。個人的には、家庭料理の一つに挙げられるトリッパも大好きです。先日も自ら精肉店で新鮮な牛のハチノスを入手して作りました。そんなイタリアには、非常

に身近なヨーロッパの国というイメージをもっています。

その国土は長靴みたいな形だと例えられ、南北に約 1000km で日本の約半分。北は稚内市と南は福島市と同じ程度の北緯です。また国土はイタリアが約 30 万 km<sup>2</sup>、日本が約 38 万 km<sup>2</sup> で広さも近いこともあり、かつ東西南の方角を海で囲まれるなど地図上でも共通点があります。もし、異なる点があるとしたら東西南側に面しているのが地中海ということもあり、特にその地域の気候は非常に温暖とされています。以前、4月のギリシャを訪れた際に地中海(エーゲ海)で海水浴ができるほど暖かったです。そのため、地中海にあるイタリア南部のシチリア島と北部のミラノでは、作物も異なれば食文化も異なっているとされています。

## ■食文化の歴史と食文化

また、とても興味深いことがあります。それはイタリアには日本と同じように四季があること。イタリアに駐在経験のある妻とも話したのですが、私はこれが当たり前のことではないことをすっかり忘れていました。インドネシアなどの赤道直下の国々は雨期や乾期、またイギリスなどは主に春と秋の二つの季節と言われます。もちろん北極や南極は常に冬。つまり、日本のように四季の景色や食材を楽しむこともまた限られる。さらに四季と料理について、真っ先に浮かんだのが宮廷料理として発展した背景のある世界三大料理(フランス、トルコ、中国)。もちろんその三国にも四季があります。食文化の発展には、やはり四季折々の景色によって人の感性が磨かれ、四季折々の食材に囲まれることも大事なのかも知れません。

世界の食事という意味では、また違ったエピソードがあります。ちょうど一年前の2015年4月。ギリシャを訪れたときに、あるレストランでとても美味しかったので、店主に「ギリシャ料理は、どうしてこんなに美味しいのですか。」と質問したところ、店主は「トルコ料理の影響を色濃く受けているからです。」という答えが返ってきました。ギリシャがオスマン帝国の支配下になったことが大きいのでしょう。

パスタが中国からトルコを経てイタリアに渡ったり、フォークがイタリアからフランスに渡ったりと食文化を理解するためには、その国の歴史を多少なりとも理解することの大切さを再認識したのでした。

そんなギリシャ料理とイタリア料理、そして私がミラノ万博の後に訪れた国の料理・スペイン料理、そしてモロッコ料理を含めた地中海料理として、2013年に和食も登録されたユネスコの無形文化遺産に2010年に登録されているそうです。

## ■過去も現在も世界の芸術をリードする街・ミラノ

今回の万博の開催都市であったミラノは、ローマに次ぐ第二の都市。そのミラノは北イタリアでは最も大きな商業都市であり、フランスはパリのパリコレクションと共にミラノコレクションなど服飾の業界では世界的に最新情報の発信地として有名であるだけでなく、レオナルド・ダ・ビンチの代表作「最後の晚餐」の壁画、世界の代表的なゴシック建築のドォーモ、代表的なショッピングモールのガッレリアなどの歴史



写真1 「最後の晚餐」  
(レオナルド・ダ・ビンチ国立科学博物館にあるレプリカ。最後の晚餐のあるサンタ・マリア・デルレ・グラッツェ教会の食堂での撮影は禁止のため。)

的芸術品が有名な街でもあります。この旅で、私も「最後の晚餐」を鑑賞に行きました。日本で予約してから訪れるのが一般的ですが、実のところ、希望日のチケットを確保できずに日本を出発する日を迎えました。しかし、私はどうしても一度はこの目でその壁画を観たかったので、突き返されるのを覚悟の上で鑑賞当日の朝にチケット売場を直接訪れたところ、当日券を見事に購入することができました。何とも記憶に残る旅の一頁となりました。



写真2 ミラノ大聖堂広場  
(左：ガッレリア、右：ドゥオーモ(大聖堂))

### ■なぜ食の万博を訪れたのか

そんな「食」をテーマとしたミラノ万博に興味を抱き行動に移すには、生い立ちに触れる必要がありそうです。

私は東京都八王子市で生まれ育ちました。幼少の頃から兄や妹と野山を駆け回り、畑では泥遊びをし、祖父や父から川釣りを教わり、自宅の祖父の畑で自らも手伝いながら野菜の収穫などをして過ごしました。そして家族みんなが揃う食卓で祖父母、両親から沢山のことを学びました。いま思えば、東京に居ながら、できる限りの本物を伝えてくれていたのだと思います。また、学生時代にはスポーツに明け暮れたことから、その基本となる体は口にしたものからでしかないという事実が付き、「食」について関心を持つようになりました。

その学生時代に今でも忘れられないのが平成5年(1993年)の出来事です。当時、私は高校2年生。記録的な冷夏で古米も国内在庫が尽き、大量の輸入米が国内流通する中、決して裕福ではない我が家でしたが、希少で高価な国内のお米を必死にかき集め、成長期で体育会系運動部に所属する私を含めた三兄妹に日本米のみを口にさせて乗り切ってくれた両親の背中には、「食」を通じて両親からの愛情に気付かせてくれました。

その後、大学・大学院へと進み、社会人となって食品・医薬品・環境分析の仕事に従事して15年目になります。その間、日本国内外問わず様々な分野で活躍する友人達と交流し、様々な国を旅してきました。そのような経験から自国のみならず他国の食文化に対しても深い興味を抱くようになった私にとって、今回の万博はとても興味深いものでした。そして、私が30代のうちに開催される最後の万博。人生の節目となる40歳を前に夏休みを利用して行く価値があると判断し、一路、イタリアへ向かったのです。

### ■今回の目的について

今回の私は大きな目的を2つ掲げました。

1. 主催国であり日本にも似た南北に長く独自の食文化を発達させた先進国・イタリアは、何を大切に、どのようなことを後世に伝えようとしているのかを学び知ること。
2. 我が国・日本が、世界中から注目されている日本の食文化をどうアウトプットしているか、外から見る日本を学び知ること。



写真3 入場ゲートの様子



写真4 メインモニュメント

### ■空港～万博会場

私がイタリアに到着したのはミラノ万博の会期も後半であり、世界中が注目するミラノコレクション週間 (Milan fashion week) の初日の 2015 年 9 月 23 日水曜日早朝、小雨のミラノ・マルペンサ国際空港でした。北欧やフランスなどには幾度が訪れましたが、イタリアは初めての入国でした。空港から万博会場へは、電車と地下鉄を乗り継ぐ方法もありましたが、よりシンプルな移動手段でもあり、かつ空港内にあった案内所の勤めもあり、私は直行バスを利用しました。今でこそ、すんなりと欧州で公共交通機関を利用できますが、数年前に初めて欧州を訪れたときのパリで私は切符の買い方すらわからずに空港から地下鉄に乗ることすらままならなかったものでした。自分自身が随分と進歩したと、車窓から風情ある雨のイタリアの景色を眺めながら思っていました。

約 1 時間後、会場のバス停で降車しました。会場が視界に入りながら歩いている際、否が応でも期待が高まってもおかしくないところではありましたが、当日は昼前から天候が荒れ、入場ゲートに到着するまでの長いコンコースのごみ箱には、台風一過の日本と同じように骨の折れた傘がごみ箱を埋めており、世界中、何処でも同じなのだなと冷静に思うのでした。

歩くこと 10 分、入場ゲートに到着後、アメリカの空港のような厳重な保安検査を受け、事前に購入していた e-ticket のチェックと国外からの入場者である私はパスポートのチェックを受けて、会場内へ向かいました。テロ対策も含めこの辺りは、日本は飛行機の国内線の搭乗の際や大きなイベントなど、セキュリティチェックが進歩しているためかとても簡素化されています。しかし、欧米諸国のように基本に立ち返り見習うべきところの一つであるとも感じましたし、世界的なイベントですので、私が利用した入場ゲートだけでもゲート数が 50 はあったでしょうか。その数の多さに圧倒されました。



写真5 イタリア館への長蛇の列

### ■イタリア館

世界中が注目する万博であり、かつ世界屈指の観光客の多いことでも知られるイタリアだけに入場ゲートから一歩会場内に踏み入ると人、人、人。各パビリオンのみならず食事一つ取っても、悪天候にも関わらず、いずれも長蛇の列。晴天の休日が大混雑であったというのも、想像することも容易かったです。そんな中、まずイタリア館を訪れることにしました。今回の主催



写真6 美味しかったカットされたラザーニャ

写真7 イタリアの美を表現した部屋  
壁は一面モニタになっていて、国内の様々なデザインが映し出されていました。天井はガラス張り

国であり、最も大きなパピリオンの広さを有していました。羽馬のエンブレムでお馴染みのフェラーリのF1カーの展示やメインモニュメントを横目に3時間待ち。周りの人に聞くと、今日は空いている方だと情報をくれました。ただ、機内食を口にした後、何も食べてなかった私は、あまりの長蛇の列を目の当たりにして、イタリア館に併設されていたイタリア料理のブースからチーズの香りに誘われるように店内へ。そして、とてもボリュームのあるラザーニャを購入し、一口頬張ったのでした。「美味いッ!!!」イベントでの食事のブースではありませんが侮るなかれ、非常に美味しかったです。エスプレッソを飲むことで気合を入れ、いざイタリア館の長蛇の列へ。そのころには、冬を思わせるような気温となり、約一週間の旅の初日で風邪を引くわけにいかないので数少ない手持ちの上着を全て重ね着しました。ミラノは内陸部でかつ札幌よりも北に位置するため、気温が下がるときは、ほんとに寒い。数年前の9月の同じころに訪れたモスクワを思い起こすほどでした。

### ■食と美と持続可能なエネルギー

凍えるほどの寒さの中で3時間に及ぶ行列の末、ようやくイタリア館の中へ。最初は国内各州の伝説的な人物の説明から始まり、イタリアの美について、自生するルッコラなどのイタリア料理のサラダによく用いられる食用植物やバジルなどの香草についてなどの紹介がありました。そんなイタリア館の中で、とても印象に残ったことを2つ挙げます。一つ目として、食と美と持続可能なエネルギーとはとても密接な関係について。特に美についてフォーカスしていたところです。自然の景観のみならず歴史的建造物やデザインは人の活力の源であるという内容でした。正直、このような表現には驚かされました。人の活力は、自分や人のためと思う心が多いのではないかと考えていたのですが、ここでは様々な美が人の活力の源となり得るストーリーでした。さすがは古くから芸術を大切にする国だと感じるほど深いものがありました。

「モナ・リザ」「最後の晩餐」を描いたレオナルド・ダ・ヴィンチを始め、「ベルヴェデーレの聖母」を描き、建築家でもあったラファエロ・サンティ、「ダビデ像」を造ったミケランジェロなどの数多くの芸術家の存在は、いくら私が芸術に疎くても知っているのですから、そんな方々を輩出したイタリアならではの言語化であったと思います。世界の共通語は英語とされますが、英語やイタリア語はわからなくても、そこに映し出される美しい世界観は、誰もが共感できます。美しさは富や力の象徴というだけでなく心も豊かにし、よりよい生き方をするために歴史的にも大切に守ってきた文化であるのだと感じました。私が写真を趣味としているのも、美しいものから自らが力を得る



写真8 スイス・ツェルマットの街と名峰マッターホルン

が原風景を保護することにも繋がります。観光業（三次産業）が一次産業の下支えをする仕組みは素晴らしい。そう考えたとき、真っ先に思い浮かぶのがスイス。私がスイスを訪れたときもそうでしたが、マッターホルンを間近で眺めたくて、登山列車に乗っていると背景に放牧された牛や山羊を目にした「これぞスイス!」といった景色に感動しました。しかし最近、その内情を知った訳ですが、酪農家にスイス国家が補助金を出し、観光客にスイスらしい景色を堪能してもらう働きかけをしているそうです。

よく考えてみると日本も形は違えども同様なことを仕掛けていることに気が付きました。日本人にとって、わかりやすいのが京都の街。その古くからの景観を保つために、古くからの文化財のみならず様々な取り組みをしています。色使いの制限を設けた看板や店舗の装飾、高さ制限のある建築物などに始まり、電柱や電線を地下に潜らせるなど。また、お茶屋さんの制度や芸子さんや舞妓さんの存在など、他の地域では成立が困難になりつつあるものごとをしっかりと保護しています。海外から来る友達も、最近は直接関西に入り、京都、大阪、神戸を廻って帰る人が増えています。そのように、街や景色を愛し、誇りを持てるというのは非常にいいものだと思います。作られた景色を態とらしいと捉えるか、それとも伝統的な物事を国や地域をあげて保護しているか。海外の取り組みや表現を目にすることで、捉え次第で、如何様にもなるのだなとも考えが広がりました。そして、それは海外の良いところを取り入れる柔軟性を持ち、科学技術が進歩し、地震大国でも理由もあるが故に近代化が進む日本に、良き伝統・文化をいままで以上に見直しましょうと訴えているかのようにも感じました。

## ■次世代を担う子供達にこの場で伝えること

二つ目として、多くの子供たちの姿があったことについて。従来型の科学技術の進歩発展に重きを置いた万博ではなく、どんな時代も変わらない食というキーワードを通じて、一心に自国の誇るべき歴史を学び、現状を知り、今後の食糧・環境・エネルギー問題について学ぶ。それらを題材にして子供たちが意見を交わす姿。正直、これは衝撃でした。

少し話は逸れますが日本と欧州との違いにつ

こと。そして偉大な芸術家とは比較にもならないですが、感性を表現し、私が感じた美しいと思った物事を生きた証を残したいと思うことからだと再認識しました。

その力によって、一次産業は従事者自らの土地を愛し、緑や景観を大切に、昔ながらの農作物を加工して、大きな利益を得る生ハムやワインなどの二次産業を生み、三次産業でそれらを国内外でビジネスとして成立させて、一次・二次産業に還元する。また、観光業などの三次産業の立場からも、一次産業の保護・繁栄こそ



写真9 イタリアのない世界を表した大きな立体模型の前に沢山の子供たちがいる様子。

いて一つ例をあげます。私がかつて訪れたオスロのムンク美術館やバルセロナのピカソ美術館でもそうですが、会場内はとても賑やかでした。一方で、香川県・直島の地中美術館や東京の国立博物館をはじめ外国人にも人気の日本国内の美術館・博物館はとても凜とした空気に包まれていました。そのような文化の違いを経験し理解した上で、今回のように題材とするものを目の前にして、意見を交換する様子はとても素晴らしいと思いました。余談ですが、パリのルーブル美術館やオランジェリー美術館などは写真撮影も可能でした。それだけ芸術などの文化が身近な存在だという解釈もできます。(ただし、ストロボや三脚の使用は禁止)

日本人の文化は、侘び寂びと表現されたり、弟子は師匠から技を盗み学ぶといった文化があります。一方で、昨今の日本でも意見し合うことが大事になってきました。小学校の授業では、みんな率先してわかったら手を挙げていたのに対し、中学校や高校になるとわかってても手を挙げる傾向にあります。私の児童や生徒の時代もそうでした。また、「伝えなければ伝わらない。」そう友人から言われたことがありました。背中を見て学ぶ、相手の考えを目で見ることで感じ取ることから、意見し合う環境がより身近になったのだと思います。

## ■イタリアワインと日本のお酒

主催国イタリアは、メインのパビリオン以外にも幾つかのパビリオンがありました。イタリア航空のパビリオンでは、機体の機長室に入る体験ができると聞いていました。とても興味深い。しかし、次に向かったのは「イタリアワイン館」。オーストラリアやチリなどの“ニューワールド”の成長著しいワイン業界にあって、イタリアはフランスと毎年ワインの生産量の1位を争うほどのワイン大国。いわゆる“オールドワールド”の代表格。フランスのブルゴーニュワインの繊細な世界観によってワインの世界に誘われ、いつしか様々なものを口にするようになった私にとって、地中海の温暖な気候が育てた果実味溢れるイタリアワインを伝えるイタリアワイン館は無視することのできない存在でした。



写真10 イタリアワイン館の外観



写真11 陳列されたワインとソムリエがいる様子



写真12 日本館の前の47都道府県名の酒樽

ここでは各州(各地方)のワインやスパークリングワインを陳列。年代も様々。特に南北に国内にまんべんなく生産地があり、改めてワインの歴史もある国なのだなどと学び知ることがで

きました。冒頭で書きましたが、イタリアの北緯は日本の稚内から福島程度。日本でワインの生産が盛んなのは山形県もありますが、山梨県や長野県などが有名。つまり日本のワインの生産地はイタリアのワインのそれよりも南に位置している。ここからもイタリアという国が温暖であることが想像できます。付け加えておきますが、このパピリオンでは、有料でワインを飲むこと（10€で3種類）もできました。使用したワイングラスはお土産としてもらうことができました。欧州滞在全8日間の旅の初日に割れ物のお土産を手にし、無事に自宅まで持って帰ることができたことはいい思い出です。

## ■日本のお酒の今とこれから

さて、後編で日本館を取り上げるため、話が前後しますが、実際、日本館の前には各都道府県の名称を記した酒樽が明治神宮敷地内にあるように飾られていました。（日本酒を体験できるブースはありませんでした。有料で日本の食事をとることのできるお店がいくつかありました。）

イタリアワインをしっかりと管理し、その土地のワインを紹介するために、イタリアワイン館でソムリエも各コーナーに配備していました。日本にも数多くの酒蔵があります。

先日の東京の六本木で開催された日本酒イベントは、大勢の外国人の方が参加しており大盛況でした。もし日本で同じような万博を開催したとしたら、日本米・日本酒館が登場することでしょう。そんな日を想像するだけで、食品業界関係者としても楽しみでなりません。ぜひとも、お猪口をお土産に持って帰ってもらいたいですね。

さて、日本食が海外で注目されていることはとても有名ですが、日本のお酒も同様に注目されていることは、ご存知でしょうか。ワイングラスで日本酒を飲むイベントが世界の主要都市で行なわれているという情報は日本でも報道されています。近年、フランス・パリには日本酒をメインとしたレストランが出店しました。また、私は今回の旅でイタリアの後に訪れたスペイン・バルセロナ近郊のミシュランガイドで星を獲得しているレストランのバーカウンターにも日本のウイスキーが陳列されていました。そのお店のウエイトレス曰く、欧州のウイスキーはとても美味しいがピートがかなり利いているためか癖が強いのに対し、高度に米を磨き上げられた日本酒のように日本のウイスキーはとても繊細で透明感がありどんな料理にも合わせ易いということで、そのお店では採用しているそうです。

また、日本酒はとても香りもよく、お魚でもお肉でも合わせられる万能選手として世界中で注目されているそうです。イタリアはフランスと並び評されるほどのワインの消費国。つまり彼らにとってはワインなどの酒類も食文化の大切な一部なのです。洞爺湖サミットで各国の首相たちに気に入られたこともある日本のお酒。そして、今度は伊勢志摩サミットですね。世界中で日本の食文化がさらにいい形で評価されることを願います。

さて、日本の食に軽く触れたところで続きは次号の後編で。

---

### ～ プロフィール紹介 ～

尾作浩司（おざくこうじ） 1976年生まれ。2000年東京薬科大学生命科学部環境生命科学科卒。2002年東京薬科大学大学院生命科学研究科修了、生命科学修士。同年（一財）日本食品分析センター入所。臭素系ダイオキシン類調査事業（環境省・平成14-17年度）、放射線照射食品の検知事業（厚生労働省・平成18年度）など官公庁事業に従事。その後、ポリフェノールなどを含む機能性食品の分析、アフラトキシンなどのカビ毒分析、異物検査、NMRによる医薬品等の確認、純度および定量、輸入食品および容器等検査に従事。現在に至る。

# 組織の活性化と人材の育成～

Improving the working environment and nurturing human resources :

## 企業組織における女性の雇用と活用

Global organizations, especially regarding woman workers.

大石 隆介 (OISHI Ryusuke)

明海大学 経済学部

Key Words : グローバル化・ダイバーシティ・ワークライフバランス・グローバル社会

### Abstract

Being born as a human in this world is precious; hence we should endeavour to live meaningful lives. To contribute in society, we need to use our abilities to the fullest to vitalize the organizations to which we belong. This is one of the most important issues in life as a member of society, and this is possible in an environment where human resources can exert their ability. With a theme of 'development of human resources to activate the organizations', we analyze human resource management in global organizations, especially regarding woman workers.

### はじめに

「この世に生を受けたことは大変尊い。我々は人生に真剣に取り組まなければならない。どのようにしたら、自己の能力を最大限に伸ばし、社会に貢献でき、そして、満足の行く人生を送ることができるだろうか?」<sup>1)</sup>。これは人として社会を生きていく上で最も重要な課題の一つであり、これを可能にするのは人材が力を発揮するための環境である。今回は「組織の活性化と人材の育成」をテーマに、グローバルな企業組織が目指すべき多様な人材の活用、その中でも特に女性の雇用と活用について考察したい。

### 1. テーマの選定

組織とは目的を共有する人材の集まりであり、組織が成功するためには優れた人材の獲得と育成、さらに彼らが存分に力を発揮するための環境整備が必要不可欠となる<sup>2)</sup>。筆者は以前、本ジャーナルにおいて、グローバル社会における日本の企業組織の在り方、およびグローバル人材に必要とされる能力について考察した。ここにおけるグローバルとは「地球」単位で世界全体を見る発想を意味し、従ってグローバルな企業組織は世界全体の情勢に気を配る必要がある<sup>3)</sup>。故に、グローバルな企業組織は世界のあらゆる状況に直面する可能性があり、それに対応するためにはあらゆる多様性を受け入れなければならない。本稿ではグローバルな企業組織が目指すべきダイバーシティ・マネジメント(多様な人材の活用)を取り上げ、その中でも女性の雇用と活用に注目して考察してみたい(図1)。

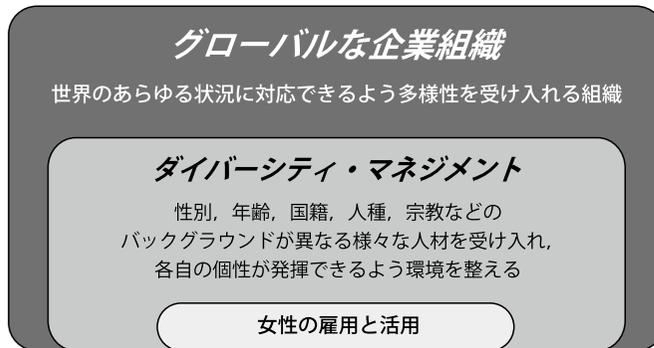


図1 グローバルな企業組織におけるダイバーシティ・マネジメント  
(引用文献<sup>4)</sup>を基に筆者作成)

## 2. ダイバーシティ・マネジメント

ダイバーシティとは多様性を意味する。ダイバーシティ・マネジメントは、性別だけでなく、年齢、国籍、人種、宗教などのバックグラウンドが異なる様々な人材を受け入れ、各自が個性を発揮できるようにするという概念<sup>4)</sup>に基づいた人的資源管理である。今後、グローバル化がますます進む世界において、ダイバーシティ・マネジメントは日本の企業組織の重要な課題となってくる。これまで日本の企業組織における人的資源管理では、同質の集団をマネジメントすることで経営の効率性を上げることができると考えられてきた<sup>5)</sup>。しかし社会構造の変化により市場は多様化し、画一的な体質の企業組織では多様な市場のニーズに対応することはできなくなっている<sup>5)</sup>。

今後グローバル化が進行すれば市場の多様性はさらに複雑さを増す。このような状況で画一的なマネジメントを続けることは、むしろ企業組織の弱点となる。企業組織はこのような多様な市場のニーズに応えるべく、マネジメントの中に多様性を受け入れる努力が必要となってきた。

## 3. 女性の雇用と活用について

本章では、ダイバーシティ・マネジメントの中でも、女性の雇用や活用について考察してみたい。女性が働きやすい社会を創り出すためにはどうすれば良いのか、という課題に世界中の国が共通して取り組んでおり、日本でも近年話題になることが多い。日本政府もアベノミクス三本の矢の一つである成長戦略において、女性が持つ力を最大限発揮できる環境作りに取り組んでいる<sup>6)</sup>。

これまで日本の企業組織では女性よりも男性が多く雇用され、また能力に関わらず男性が女性よりも高い役職に就くことが一般的であった。このような不平等が生み出された大きな理由は、女性の出産であろう。女性は出産、育児のために仕事を長期的に休まなくてはならず、また結婚を機に退職することも多かった。そのため企業組織は女性職員に男性職員ほど大きな期待を抱かず、結婚して自分たちのものを去ってしまう女性職員よりも、長い間自分たちに尽くしてくれる男性職員を大切

にしたいという気持ちが生まれてきたのだろう。このような考えが多くの企業組織の固定観念となり、女性職員が離職した際の費用を軽減するために男女の待遇にあらかじめ差を設けるようになった<sup>7)</sup>。すべての女性職員が離職するわけではないため、前述の固定観念は実際の状況を正確に反映したものではないが、企業組織にとっては合理的な行動選択であるとされ、労働経済学における‘統計的差別’によって説明されてきた<sup>7)</sup>。<sup>脚注1</sup>

このような企業の行動は社会的に好ましくない結果をもたらす原因にもなる。例えば、前述の固定観念により企業組織は女性職員にやりがいのある仕事を与えず、これが女性職員の離職を促進してしまう<sup>7)</sup>。

さらに、前述の統計的差別は、女性の雇用において男性の場合よりも深刻な逆選択という問題を引き起こす<sup>7)</sup>。<sup>脚注2</sup> 企業組織は個々の女性職員についての正確な情報を持ち合わせていないため、女性職員全体の離職率の平均を各女性職員の離職率の目安として扱い、それを基に賃金水準を低く設定する<sup>7)</sup>。すると能力の高い女性職員はこれを不服として離職し、能力の低い女性職員だけが条件を受け入れるため、企業組織では平均よりも低い能力を持った女性職員しか雇用することができない状況が生じる<sup>7)</sup>。

しかし、このような不平等は時代の変化とともに見直されつつある。日本では、男性は一度就職した企業組織に定年まで勤め続けることが多かった。しかし現在は派遣や契約といった雇用体系が増え、さらに正規雇用された社員もより良い条件の職場へ転職する等、人材の流動性が増している。それに加え、女性の労働に対する意識も変化し、現在は結婚や出産後も継続して働きたいと考える女性が増え始めている。女性は結婚を機に退職し、男性は定年まで企業組織のために尽くすという以前の常識は、今ではなくなりつつあるのだ。このような状況において男女の雇用に格差を設けることに、もはや妥当性はない。

日本でも男女雇用機会均等法により男女の雇用における差別の禁止が明文化され、原則として企業組織は男女の雇用に格差を設けることはできなくなった<sup>10)</sup>。しかし真に男女の不平等をなくすには、まだ課題も多い。例えば2013年度の日本の企業組織の係長以上の役職に女性が占める比率は、欧米やアジアの主要国のものと比べると、著しく低い水準にある<sup>11)</sup>。女性の雇用の格差はなくなったにも関わらず、なぜ管理職に占める女性の割合は増えないのか。その原因は、日本の社会や企業組織が抱える構造的な問題、そしてその慣行にあると考えられる。

最近では母親が子供を保育園に預けて、働きに行く姿をよく見かけるが、保育施設の数が足りず待機児童となる子供たちも多いようだ。さらに母親が定時に退社する

<sup>脚注1</sup> 統計的差別とは統計情報を利用し、企業組織の合理的な判断に基づいて行われる差別のことをいう<sup>8)</sup>

<sup>脚注2</sup> 逆選択とは、複数の観察できない属性の混合状態が、情報を保有していない集団の観点から望ましくないものになる傾向のことをいう<sup>9)</sup>

ことが難しい日もあり、子供の送り迎えに不都合が生じる場合もある。このような状況では育児のためにやむなく就労をあきらめざるを得ない女性も出てくるのではないか。また、多くの日本の企業組織では全員が共に費やした時間の長さでやる気を測るため、女性職員が育児などのために就労時間を減らすと、評価を下げられかねないのだ<sup>12)</sup>。

ここまでで理解できるように、日本の社会や企業組織では真に男女の不平等がなくなつたとは言えない。これを改善させるには、男女ともに現在の働き方を見直し、出産や育児を含む生活と就労の両立について深く考える必要がある。

#### 4. ワークライフバランス

生活と就労の両立のために有効と考えられるのは、企業組織のワークライフバランスへの取り組みだろう。<sup>脚注3</sup>しかしこの考え方に対して懐疑的な見方も少なくない。多くの人は、業績を向上させるためには長時間働く必要があり、そのためには生活を犠牲にしなければならず、逆に生活を充実させようと思えばその分業務の量を減らす必要がある、と考え、就労と生活それぞれを経済学における機会費用のようなものと捉えている。<sup>脚注4</sup>しかしこの考え方は必ずしも正しいものではない。就労と生活はそれぞれ機会費用的にどちらかを放棄しなければ、もう一つの充実が不可能となるものではないからだ。例えば、企業組織内における長時間労働(残業等)は定時内に処理しきれなかった業務を定時外に行うことであり、業務の効率性を上げ、定時内にすべての業務が片付けば、必要がなくなる。

また、ワークライフバランスの充実が女性就労者のためだけのものと捉えられがちだが、これも正しい見解ではない。ワークライフバランスの充実が効果を発揮するのは就労と育児の両立だけでなく、就労と高齢者の介護にも同様だからである。日本の人口における高齢者の割合は2050年には40%近くになると予想されている<sup>13)</sup>。高齢者の介護は女性就労者だけでなく、男性就労者も向き合わねばならない課題であり、ワークライフバランスの充実が男性就労者にとっても有意義なものとなる。

そしてワークライフバランスを充実させることによって、個人、企業組織、そして国家は次のような便益を得る(図2)<sup>13)</sup>。まず、個人はワークライフバランスの充実により、育児や介護などの生活面に何らかの事情を抱えていても、継続して働き続けることが可能となる<sup>13)</sup>。企業組織はワークライフバランスを充実させることで、職員が生活面に何らかの事情を抱えていても働きやすい環境を作ることができ、優秀な人材の獲得や職員の離職防止につなげることができる<sup>13)</sup>。そして就労

<sup>脚注3</sup> ワークライフバランスとは「就労と生活との調和を図り、相互により影響を与え合うようにする」ことを指す<sup>4)</sup>

<sup>脚注4</sup> 機会費用とは、あるものを手に入れるために諦めなければならないものを意味し、経済学において使われる概念である<sup>9)</sup>

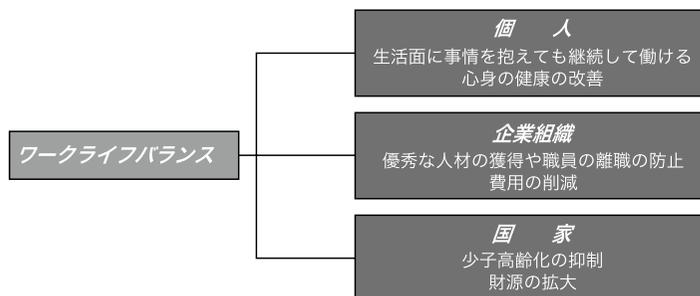


図2 ワークライフバランスから得られる個人・企業組織・国家の便益。  
引用文献<sup>13)</sup>を基に筆者作成。

と育児が両立できる環境が整えば子供を産み、育てたいと考える女性が増え、少子高齢化の抑制につながるにより、国家は恩恵を受ける<sup>13)</sup>。

## 5. おわりに

今回は‘組織の活性化と人材の育成’をテーマに、ダイバーシティ・マネジメントを取り上げ、特に女性の雇用と活用に着目して考察した。女性が働きやすい環境を作り出すことは世界共通の課題の一つであり、日本の企業組織も真剣に取り組むべきである。日本においても男女間の雇用の格差はなくなりつつあるが、いまだ女性が働きやすい環境は十分に整備されていない。その大きな原因と考えられるのは就労と生活の両立の困難性であり、これには日本の社会や企業組織の構造的な問題や慣行が関係している。この状況を改善するために有効と考えられるのは、企業組織のワークライフバランスへの取り組みである。就労と生活の両立は不可能なことではなく、これを達成できれば個人だけでなく企業組織や日本国全体も便益を得ることが期待できる。

筆者が以前、本ジャーナルに、グローバル社会における日本の企業組織の在り方、およびグローバル人材に必要とされる能力について寄稿して以来、日本の企業組織がグローバルにモデルチェンジすることを意識し、そのために取り組むべき課題を考察し続けている。

今回もその一環として、女性の雇用と活用について原稿を執筆させて頂いた。短い原稿ではあるが、これが読者の皆さんにとって有意義なものになればと願っている。

## 引用文献

- 1) 坂上宏：組織の活性化と人材の育成～新たなスタートを迎えるにあたって. *New Food Industry* 57(4)：83-88, 2014.
- 2) 大石隆介：組織の活性化と人材の育成～グローバル化が進む世界での組織と人材. *New Food Industry* 57(8)：82-88, 2015.
- 3) 渥美育子：グローバル企業で30年間伝え続けてきた「世界で戦える人材」の条件. 東京, PHP 研究所, 2013.
- 4) 小室淑恵：改訂版 ワークライフバランス 考え方と導入法. 東京, 日本能率協会

- マネジメントセンター，2010.
- 5) 武石恵美子：雇用システムと女性のキャリア．東京，勁草書房，2006.
  - 6) 内閣官房：改訂！やわらか成長戦略。～アベノミクスをもっと身近に～．2015.
  - 7) 大沢真知子：女性はなぜ活躍できないのか．東京，東洋経済新報社，2015.
  - 8) 川口章：ジェンダー経済格差 なぜ格差が生まれるのか，克服の手がかりはどこにあるのか．東京，勁草書房，2008.
  - 9) N・グレゴリー・マンキュー：マンキュー経済学I ミクロ編（第3版）．足立英之，石川城太，小川英治，他訳．東京，東洋経済新報社，2014.
  - 10) 厚生労働省 都道府県労働局雇用均等室：男女雇用均等法のあらまし．2014.
  - 11) 八代尚宏：日本的雇用慣行を打ち破れ 働き方改革の進め方．東京，日本経済新聞出版社，2015.
  - 12) 株式会社リクルートHCソリューショングループ：実践ダイバーシティマネジメント 何をめざし，何をすべきか．東京，英治出版，2008.
  - 13) 小室淑恵：実践 ワークライフバランス プロジェクトの進め方と定着の仕組みづくり．東京，日本能率協会マネジメントセンター，2012.

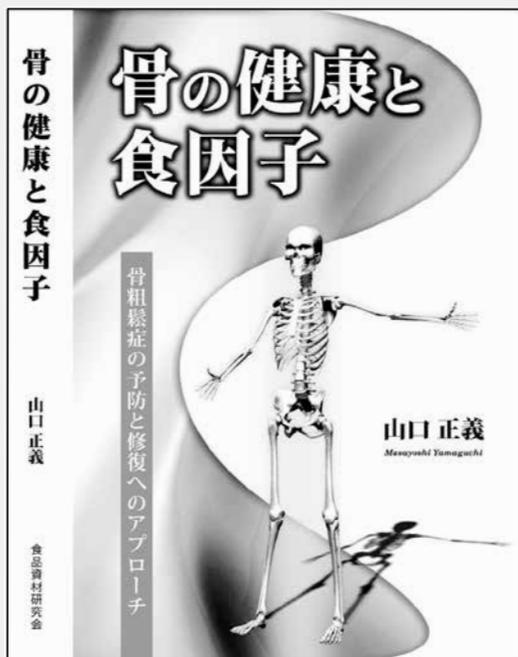
---

連絡先：大石 隆介  
明海大学 経済学部  
〒279-8550  
千葉県浦安市明海1  
E-mail: r-o@meikai.ac.jp

---

骨代謝研究の第一人者の渾身の一冊

好評発売中



国内はもちろん海外からも高い評価を受け、数多く賞を受け、国際人名録に登録されてきた著者が、長年研究を続けてきた骨粗鬆症の予防と修復における食因子の役割についてまとめあげた、食品研究における貴重な一冊

骨粗鬆症の予防と修復へのアプローチ

骨の健康と食因子

■A5版 / 000ページ ■定価：(本体 3,000円 + 税)  
■発行：食品資材研究会

- 生体機能はホルモン（内分泌因子）によってダイナミックに調節されている
- カルシウム代謝および骨代謝のホルモン調節のしくみ
- 骨代謝調節機能を発揮して、骨粗鬆症の予防と修復に役立つ食因子の知見とその周辺

亜鉛、大豆成分イソフラボンのゲニステイン、納豆に高濃度に存在しているビタミン K2（メナキノール-7）、温州ミカンに高濃度に含有されているβ-クリプトキサンチン、植物成分の各種フラボノイドおよびカロテンの中で p-ヒドロキシケイ皮酸、アカモクの成分、ワサビの葉柄成分、ミツバチ花粉など。

- 著者 / 山口 正義（やまぐち まさよし）
- ◆薬学博士。米国エモリー大学医学部内分泌代謝学部門客員教授（任用）。静岡県立静岡薬科大学助手、講師、静岡県立大学薬学部講師を経て、1991年より静岡県立大学大学院生活健康科学研究科助教授、1993年から同教授。この間に、米国ペンシルベニア大学、テキサス大学およびテキサス大学の各医学部で在外研究に従事。2007年から現職。
- 現在、New York Academy of Sciences, American Society for Bone and Mineral Research, American Society of Biochemistry and Molecular Biology の会員、日本生化学会評議員、International Journal of Molecular Medicine, Journal of Osteoporosis など国際誌 10 誌の編集委員。

お申し込み・お問い合わせは、  
FAX・お電話・WEBにて

電話：03-3254-9191 FAX：03-3256-9559  
<http://www.newfoodindustry.com/cheese.html>

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）

# 松谷化学工業「第 23 回芦原科学大賞」を受賞」 テーマは「新規化学法による希少糖含有異性化糖の生産技術の開発」

## 希少糖生産技術研究所，香川大学，松谷化学工業が共同で受賞

でん粉加工と機能性食品素材の総合メーカー松谷化学工業株式会社（本社：兵庫県伊丹市代表取締役社長：松谷 晴世以下，松谷）は，このたび，当社社員の高峰 啓が，公益財団法人かがわ産業支援財団が主催する「第 23 回芦原科学大賞」を受賞しました。2 月 29 日には高松国際ホテル（香川県）において同賞の贈呈式が行われました。

なお，「第 23 回芦原科学大賞」の受賞は，株式会社希少糖生産技術研究所 何森 健代表取締役，香川大学希少糖研究センター徳田 雅明 センター長との共同での受賞となります。



「芦原科学賞」は，香川県出身の故芦原 義重氏（関西電力株式会社 名誉会長）からの寄附金を基金として，「県内の中小企業者等の育成を支援するとともに，県内産業技術高度化および産業の振興に寄与する」ことを目的して，表彰するもので平成 5 年度に創設されたものです。

「第 23 回芦原科学大賞」受賞者と研究内容等について：  
（以下，かがわ産業支援財団の発表資料 [bit.ly/2152kCt](http://bit.ly/2152kCt) からの抜粋です）

テーマ：新規化学法による希少糖含有異性化糖の生産技術の開発

### 概要：

ぶどう糖果糖液糖からアルカリ異性化法により希少糖含有機能性異性化糖の生産技術を開発するとともに，開発商品の有効性の検証と安全性の確認をした。

### 受賞者：

◆（株）希少糖生産技術研究所 代表取締役 何森 健（いずもり けん）氏

- ◆香川大学希少糖研究センター長 徳田 雅明（とくだ まさあき）氏
- ◆松谷化学工業（株）番の州工場同社社員 高峰 啓（たかみねさとし）氏

**推薦者：**（一社）希少糖普及協会代表理事 会長 近藤 浩二（こんどうこうじ）氏

## 研究内容と成果：

### 〔研究の背景〕

香川大学農学部では、全単糖類の生産設計図である「イズモリング」を完成させ、全ての単糖類の製造が可能になり、機能性を持った希少糖の早期の商品化が待たれていた。

### 〔研究開発した技術概要と成果〕

ぶどう糖果糖液糖を、強塩基性イオン交換樹脂を使用することによって、より多くの希少糖を含有するシロップの製造技術を開発した。また、同シロップが抗肥満効果や糖尿病予防効果などの機能性を有することを確認した。安価なぶどう糖果糖液糖を原料にして、アルカリ異性化法により、ぶどう糖、果糖を15%希少糖に変えることによって、甘味料として用いながら生活習慣病の予防に役立つ機能性を持たせた希少糖含有シロップ「レアシュガースウィート」の商品開発に成功した。

### 〔産業の振興〕

- 希少糖含有シロップ「レアシュガースウィート」は、平成23年度に発売開始以来、順調に販売を伸ばし、平成27年8月には累計100万本を超えた。
- 現在、レアシュガースウィートは全国で298企業、689商品(1,457品目)に利用されている。

希少糖含有シロップ「レアシュガースウィート」の販売実績：

- 香川大学ベンチャー企業として希少糖生産技術研究所やレアスウィートが設立され、県内に希少糖産業が形成された。
  - 松谷化学工業（株）番の州工場新設により14名（県内11名）、レアスウィートにおいても5名の雇用が創出された。
  - 今後、新たな希少糖の製品開発を含め、香川県から世界へ展開する計画であり、将来性が大いに期待できる。
- ・国際特許出願1件、各国移行出願（日本・米国・韓国・中国）

本ニュースリリースに関するお問い合わせは：  
松谷化学工業株式会社／株式会社レアスウィート 広報東京事務局  
東京都中央区日本橋本町4丁目4-2  
TEL：03-6804-1012 E-mail：pr@raresweet.co.jp

## New Food Industry のアドバイザーボード設置について

月刊 New Food Industry は、2016 年 4 月号より「アドバイザーボード」を設置いたしました。本「アドバイザーボード」は、今後の弊誌編集上の課題、学術業界誌としてふさわしい論文・解説記事の掲載等、社外の有識者の意見を得ることを目的として設置するものです。弊誌の経営状況や編集課題を踏まえた、有意義な指導・助言をいただき、今後の編集業務に役立てていきます。

■ ボードメンバー（敬称略 / 五十音順）	
氏 名	所 属
大石 隆介氏	（明海大学 経済学部経済学科）
大谷 元氏	（信州大学名誉教授）
坂上 宏氏	（明海大学大学院）
宮尾 茂雄氏	（東京家政大学）
山口 正義氏	（エモリー大学 医学部）

（アドバイザーは今後も増員予定となっています。）

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

### ニューフードインダストリー 第58巻 第4号

印刷 平成 28 年 3 月 25 日  
発行 平成 28 年 4 月 1 日  
発行人 平井 朋美  
編集人 今西 和政  
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)

e-mail:newfood@newfoodindustry.com