

New Food Industry

食品加工および資材の新知識

<http://www.newfoodindustry.com>

2016 Vol.58 No.8

8

論 説

- 海藻アカモク因子の多機能性とその健康増進における役割
Role of marine algae *Sargassum horneri* bioactive factor in health care
- コメタンパク質由来抗菌ペプチドは抗炎症作用を発揮する
- 発酵食品由来抗がん・抗ウイルスおよび抗菌剤
Fermented food-derived anti-cancer, anti-viral and anti-microbial agents.
- 環境有害因子に対する吸引型プロポリスおよびヒノキオイルによる健康維持効果に関する研究
- 生鮮食品の機能性表示対応のシステム作り ー温州みかん・β-クリプトキサンチンを例としてー

連載 野山の花 ー身近な山野草の食効・薬効ー

- クズ *Pueraria lobata* Ohwi (マメ科 Leguminosae)

連載 デンマーク通信

- デンマークのパン

連載 ILSコラム

- L-カルニチンの老齡ラットによる脳機能改善効果に関する研究

解 説

- 地球温暖化防止法, 食料増産法
Methods to protect global warming, Food production increase way
- ワムシへの免疫賦活剤と抗酸化剤の強化で
ヒラメ種苗の生残率, 変態速度, 体型異常を改善出来る

驚くべきヒット商品

- 本格的なプロの味を追求した驚くべきヒット食品 ー「本格炒め炒飯」株式会社ニチレイフーズー

国際的コミュニケーション能力の重要性 (2)

- ー外向き志向への切り替えー

News Release

- ◆ 水溶性食物繊維「インマルトデキストリン」のGRAS認証を米国食品医薬品局 (FDA) から取得 株式会社 林原



論 説

- 海藻アカモク因子の多機能性とその健康増進における役割
Role of marine algae *Sargassum horneri* bioactive factor in health care
..... 山口 正義 1

- コメタンパク質由来抗菌ペプチドは抗炎症作用を発揮する
..... 谷口 正之, 落合 秋人 9

- 発酵食品由来抗がん・抗ウイルスおよび抗菌剤
Fermented food-derived anti-cancer, anti-viral and anti-microbial agents.
..... 伊藤 英晃 17

- 環境有害因子に対する吸引型プロポリスおよび
ヒノキオイルによる健康維持効果に関する研究
..... 具 然和 26

- 生鮮食品の機能性表示対応のシステム作り
-温州みかん・β-クリプトキサンチンを例として-
..... 矢野 昌充 33

連 載

- 野山の花 — 身近な山野草の食効・薬効 —
クズ *Pueraria lobata* Ohwi (マメ科 Leguminosae)
..... 白瀧 義明 40

- デンマーク通信 デンマークのホットドッグ
..... Naoko Ryde Nishioka 42

- ILS コラム L-カルニチンの老齢ラットによる脳機能改善効果に関する研究
..... I L S 株式会社 44

解説

- 地球温暖化防止法，食料増産法

Methods to protect global warming, Food production increase way

..... 尾崎 庄一郎 47

- ワムシへの免疫賦活剤と抗酸化剤の強化で

ヒラメ種苗の生残率，変態速度，体型異常を改善出来る

..... 酒本 秀一，澤山 英太郎 53

驚くべきヒット商品

- 本格的なプロの味を探求した驚くべきヒット食品

- 『本格炒め炒飯』株式会社ニチレイフーズ-

..... 田形 暁作 68

国際的コミュニケーション能力の重要性 (2)

- 一外向き志向への切り替えー

..... 大石 隆介，坂上 宏 72

News Release

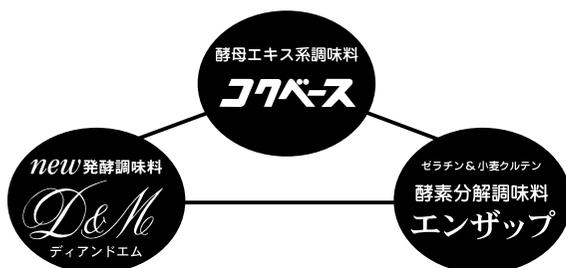
- 水溶性食物繊維「イソマルトデキストリン」の GRAS 認証を

米国食品医薬品局 (FDA) から取得 株式会社 林 原

..... 前付 6

おいしさと健康に真剣です。

酵素分解調味料なら
大日本明治製糖へ



新発売! 乳製品にベストマッチな調味料

コクベース
ラクティックイーストエキス
乳加工品・製パン・製菓・チーズ・バターへの
コクづけ、味や風味の底上げなど、ユニークな
特長がある乳酵母エキスです。



大日本明治製糖株式会社

食品事業部

海藻アカモク因子の多機能性と その健康増進における役割

Role of marine algae *Sargassum horneri* bioactive factor in health care

山口 正義 (YAMAGUCHI Masayoshi)

エモリー大学医学部

Department of Hematology and Medical Oncology, Emory University School of Medicine

Key Words : *Sargassum horneri*, osteoporosis, diabetes, obesity, cancer

アカモク 骨粗鬆症 糖尿病 肥満 がん

Abstract

Food and botanical factors may play a preventive role in human health care. Marine algae *Sargassum horneri* (*S. horneri*) has been demonstrated to have multifunctional role in the regulation of cellular and body functions. Osteoporosis is resulted from decrease in bone mass associated with aging, and it is widely recognized as a major public health problem. Osteoporosis was demonstrated to be prevented by the intake of bioactive factor obtained from *S. horneri* extract. This effect was not found in *Undaria pinnatifida*, *Eisenia bicyclis*, *Cryptonemia scmitziana*, *Gelidium amansii*, and *Ulva pertusa* Kjellman. In various marine algae, *S. horneri* active factor revealed a unique anabolic effect on bone. *S. horneri* bioactive factor possessed a stimulatory effect on osteoblastic bone formation and an inhibitory effect on osteoclastic bone resorption *in vitro*, thereby increasing bone mass. Moreover, the intake of *S. horneri* extract exhibited preventive and restorative effects on bone loss in animal models for osteoporosis and in healthy human. *S. horneri* extract may be usefulness as an osteogenic factor in prevention of osteoporosis. Interestingly, *S. horneri* bioactive factor was found to have preventive effects on diabetes, adipogenesis, and breast cancer, which are related to inflammation conditions. Importantly, *S. horneri* bioactive component was demonstrated to suppress the activation of NF- κ B induced by tumor necrosis factor- α , a cytokine related to inflammation. Thus, *S. horneri* bioactive factor has been demonstrated to play a multifunctional role in the prevention and treatment of metabolic disorder.

はじめに

海藻アカモク (*Sargassum horneri*; *S. horneri*) は、日本および中国の沿岸に棲息し、比較的波の穏やかな海底の岩場に、冬から春にかけて成育する。繁殖が著しく、船舶のスクリューに絡み、ほとんど活用されていなかった。一部の地域においては食用に利用されていたが、多くは

環境に廃棄されていた。一方、この海藻は、コンブ、モズクやワカメの属する褐藻で、程よいヌメリと独自の歯ごたえのある食感で、古くからおいしくて健康によい海藻として、秋田、岩手、富山、能登半島などで佃煮や生食として食用されてきた (図 1)。アカモクには、他の海藻と比較して、含有量が著しく多い栄養成分

Correspondence to: Masayoshi Yamaguchi, Department of Hematology and Medical Oncology, Emory University School of Medicine, Atlanta, GA, USA
E-mail: yamamasa1155@yahoo.co.jp



図1 海藻アカモク (*Sargassum horneri*; ホンダワラ属)。静岡県下田市沿岸から採取

として、カロテノイド、ビタミンC、ビタミンB₂、食物繊維、ミネラルや微量元素などが知られている。

筆者は、食品因子の骨代謝調節機能の解明と骨粗鬆症の予防と修復における役割について、強い関心を持ち、国内外に先駆けて研究を遂行していた¹⁻⁴⁾。その過程で、日本人が食用している海藻の骨代謝調節機能について調べた。筆者が在籍していた大学の関係で、静岡県近海(下田)で採取した海藻ワカメ (*Undaria pinnatifida*; ワカメ属)、アカモク (*Sargassum horneri*; ホンダワラ属)、アラメ (*Eisenia bicyclis*; アラメ属)、オオバキントキ (*Cryptonemia scmitziana*; カクレイト属)、マクサ (*Gelidium amansii*; テングサ属) および静岡県浜名湖に生息するアオサを採取して、その抽出成分の骨カルシウム量に及ぼす効果について調べた⁵⁾。その結果、食用海藻の中で、アカモクの抽出成分は強い骨形成増進効果が発揮され、新規機能性が見出された(特許第3749978号)。この生理活性は、アカモクに特異なものとして注目された。その後、筆者らはアカモクの抽出成分には多くの生理活性が発揮されることを見出し、その疾病の予防と修復への応用が期待された。

本稿においては、筆者らがこれまでに解明した海藻アカモク成分の生理活性機能の知見を紹介し、その健康増進を目標にした新規サプリメントの開発について、考察する。

1. アカモクの骨量増進効果と骨粗鬆症の予防

骨量は加齢に伴って減少し、骨粗鬆症を引き起こす。この骨の病気は、易骨折性を示し、骨折による寝たきりの原因となる。本症は、近年の高齢化人口の増大に伴って年々増加しており、医療費の高騰をもたらしている。そのために、その予防はきわめて重要である。骨組織は、骨塩溶解をもたらす破骨細胞 (osteoclast) の機能により古い骨を破壊(骨吸収)し、そこに骨芽細胞 (osteoblast) が出現して、その働きによって新しい骨を形成(骨形成)し、たえず柔軟な弾力性のある骨を保持する仕組みを有している。これは骨の再構築 (bone remodeling) とよばれている。このバランスが、生理的老化によるホルモン分泌、糖尿病や肥満などの代謝性病態により崩れると、骨量が減少し、いわゆる骨粗鬆症をもたらす。それに伴って骨折がもたらされると寝たきりの状態へと導き、介護を必要とした大きな医療および社会問題を引き起こしている。

前述したように、筆者らは、食用海藻のワカメ、天草、アカモク、ヒジキおよびアオサの中で、アカモク抽出物中に特異的に骨成分増加効果を発揮する因子が存在することを見出すことに成功した⁵⁾。このような効果は他の海藻成分にはみられず、この知見は注目に値した。ここでは、海藻アカモク成分の骨代謝調節機能についての知見を概説し、その骨粗鬆症の予防と修復を目標にした新規食品機能性素材の開発へと発展したことについて紹介する。

1-1. アカモク成分の骨形成促進作用

アカモクなどの海藻を3%塩化ナトリウム溶液にて洗浄し、精製蒸留水にて洗浄後、3倍量の20%エタノールを加え、粉碎した。それを6000回転/分で遠心分離後に、その上清を回収し、凍結乾燥し、その試料を冷凍保存した。実験には、凍結乾燥した試料を精製蒸留水に溶解したものを用いた。ワカメ、アカモク、アラメ、オオバキントキ、マクサおよびアオサの水

抽出成分の5%水溶解液10mlをラット体重kg当たり7日間連続経口投与したところ、アカモク成分においては、大腿骨骨幹端部（海綿骨）組織のカルシウム量とその石灰化促進酵素アルカリ性ホスファターゼ活性の両方を有意に増加することが見出された^{5,6)}。

さらに、ラット大腿骨から無菌的に得た骨幹部（皮質骨）と骨幹端部（海綿骨）組織を、上記のアカモク抽出成分（25ならびに50 µg/ml）含有培養液中で24–72時間培養すると、それら骨組織中のカルシウム量、石灰化促進酵素のアルカリ性ホスファターゼ活性およびDNA量（骨組織中の細胞数の指標として評価している）の有意な増加がみられた^{5,6)}。これらの増加は、タンパク質合成阻害剤の存在下で培養するとほぼ完全に抑制され、アカモク抽出成分の作用発現は骨タンパク質合成の増進にもとづくことが示唆された。このようにアカモク抽出成分には骨形成増進作用を発揮する因子の存在が判明した^{5,6)}。また、このような効果は、他の海藻水抽出成分には見出されず、アカモクに特徴的であ

った。

1-2. アカモク成分の骨吸収抑制作用の発現

骨組織を溶解する破骨細胞は、骨吸収促進因子である副甲状腺ホルモン（parathyroid hormone; PTH）やプロスタグランジンE₂（prostaglandin E₂; PGE₂）の作用により、骨髄細胞から分化、形成される。そこで、ラットの大腿骨の骨幹部組織および骨幹端部組織をPTH、PGE₂存在下で培養すると、骨カルシウム量は減少した。これらの作用はアカモク抽出成分が存在すると、ほぼ完全に抑制された⁷⁾。また、PTHおよびPGE₂は、骨組織による培養液中のグルコース消費の増大に伴って、乳酸産生の増加を引き起こしたが、これらの増加もアカモク抽出成分の存在下ではほぼ完全に抑制された。これらの知見から、アカモク抽出成分には骨吸収抑制作用を発揮する因子の存在が示された。

アカモク抽出成分を膜分画法により、まず分子量50000以上とそれ以下に分画した。骨組織培養系において骨吸収抑制作用を調べると、そ

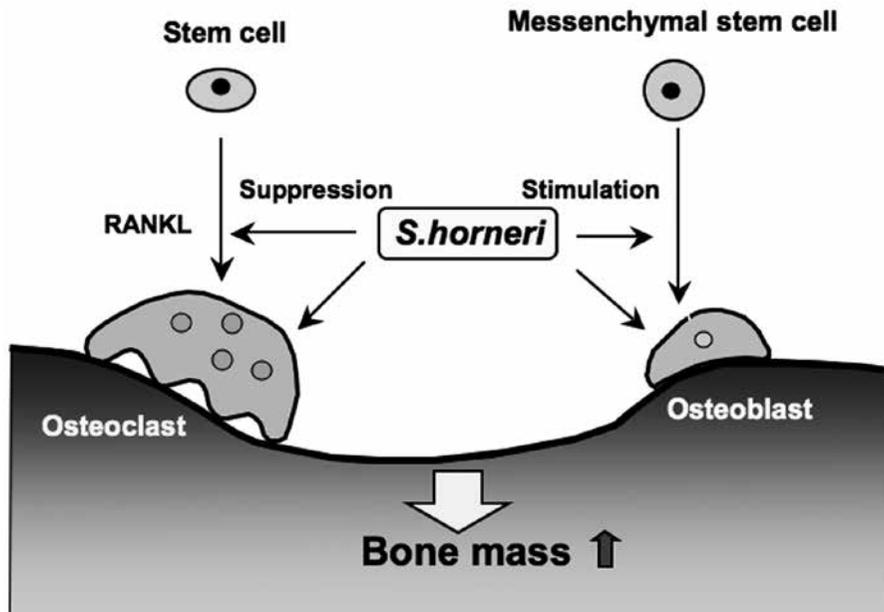


図2 海藻アカモク因子は骨量増進効果を発現し、骨粗鬆症の予防と修復に役割を果たしている。本因子は、骨髄 stem cell から分化する破骨細胞の形成とこの細胞による骨吸収（骨破壊）を抑制し、また、骨芽細胞への分化を促進することにより、骨形成の増進をもたらす。その結果、骨量は増加される。

の強い抑制活性が分子量 50000 以上の分画に見出された⁸⁾。さらに、アカモク水抽出成分を膜分画法で分子量 3000 以下に分画し、前駆破骨細胞と骨芽細胞の培養系において、その活性を調べた。その結果、この分画には、破骨細胞形成を抑制する作用と骨芽細胞による石灰化を増進する作用因子が存在することを見出した⁹⁾。そこで、分子量 3000 以下の分画を用いて、骨髓細胞からの骨芽細胞および破骨細胞への分化形成を調べた。この成分には、骨髓細胞からの骨芽細胞への分化を促進し、破骨細胞への分化を抑制する因子が存在することが見出された⁹⁾。さらに、この成分は、骨芽細胞による石灰化を増進する効果も確認された¹⁰⁾。

図2に要約したように、アカモク成分因子は、破骨細胞による骨吸収を抑制し、さらには骨芽細胞による骨形成を増進することにより、骨量増進効果を発揮することが明らかにされた。

1-3. アカモク成分の成長期および加齢ラットへの投与による骨量増進

成長期（4週齢雄性）および加齢（50週齢雌性）ラットを用いて、アカモク水抽出成分（凍結乾燥物）をラット体重 kg 当たり 25, 50 および 100 mg の水溶液を 1 日 1 回 7 および 14 日間連続経口投与し、大腿骨の骨幹部並びに骨幹部組織の骨成分（カルシウム、アルカリ性ホスファターゼ活性および DNA 量）の変動を調べた¹¹⁾。その結果、成長期と加齢期ラットの骨幹部並びに骨幹部組織の骨成分の前述の全て骨成分において有意な増加が見出された¹¹⁾。このように、アカモク成分の摂取は成長期ならびに加齢期の骨量を増進することが、生体レベルにおいても実証された。

1-4. アカモク成分の糖尿病性骨減少の抑制効果

糖尿病の合併症として骨粗鬆症（骨減少）がもたらされることは難治性疾患として臨床医学的に注目されている。ストレプトゾトシン（streptozotocin; STZ）を投与すると膵臓が破壊されてインスリン分泌障害を引き起こし、1型

の糖尿病を誘発する。これは糖尿病のモデル動物として実験に使用されている。STZ 投与ラットにおいては、体重増加抑制、血清グルコースとトリグリセライド濃度の上昇、血清カルシウム濃度上昇と無機リン濃度低下をもたらした¹²⁾。このような糖尿病状態の指標は、アカモク水抽出成分（凍結乾燥重量として 100 mg/kg 体重）を 14 および 21 日間連続経口投与すると、有意に改善することが見出された¹²⁾。アカモク成分中には抗糖尿病作用を発揮する因子が存在することが明らかとなった。

さらに、STZ 投与ラットにおいては、大腿骨の骨幹部ならびに骨幹部組織の骨成分（カルシウム、アルカリ性ホスファターゼ活性および DNA 量）が有意に減少した。これらの減少は、アカモク水抽出成分（凍結乾燥重量として 100 mg/kg 体重）を 14 および 21 日間連続経口投与すると有意に抑制されることが見出され、糖尿病性骨粗鬆症の改善効果を発揮した¹²⁾。このように、アカモク成分の摂取は、抗糖尿病効果を発揮するとともに糖尿病性骨粗鬆症の予防と修復に有用であることが判明した。

1-5. 骨粗鬆症の予防に有用なアカモクサプリメントの開発

多くの海藻類の中で、アカモクは、骨代謝調節機能を発揮する成分を有するものとして、最初の発見であった。前述の知見を基礎にして、骨粗鬆症を予防・修復するアカモク水抽出物を有効成分とする新規機能性食品素材（ホルマックス OT[®]）の開発がなされた（株式会社マルハチ村松）。原料のアカモク水抽出成分に認められる骨組織カルシウム増量効果は、製造工程の精製段階、濃縮後、殺菌後の抽出液、最終製品の粉末において、ほぼ同等にみられることをラット大腿骨骨組織培養系における *in vitro* 実験で確認した¹³⁾。さらに、原料のアカモク水抽出成分にみられる骨吸収抑制（マウス骨髓細胞培養系における骨髓細胞からの破骨細胞形成の抑制）効果も最終製品粉末においてほぼ同等に発揮されることを認めた¹³⁾。最終製品の素

材をアカモク (*Sargassum horneri*) の名前にちなんで「ホルマックス OT」と命名された。なお、OT は、osteone (骨を意味する) の略語である。

そこで、一般健常人ボランティア (男女 36 名、各群 11-13 名) において、1 日 1 錠 (ホルマックス OT 300 mg 含有) あるいは 3 錠 (ホルマックス OT 900 mg 含有) を 4 あるいは 8 週間服用したときの、骨代謝に及ぼす効果について調べた¹⁴⁾。これは骨粗鬆症の臨床評価のために開発されている骨代謝マーカーの血清中濃度を測定することにより解析した。なお、プラセボーには澱粉を錠剤にしたものを摂取した。骨代謝マーカーには、骨形成のマーカーとなる骨型アルカリ性ホスファターゼとオステオカルシン (これらは骨芽細胞が特異的に産生するタンパク質) と骨吸収マーカーの酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (破骨細胞が産生するタンパク質) と I 型コラーゲンの分解物 *N*-テロペプチド (骨吸収のときに骨組織に存在する I 型コラーゲンタンパク質が分解したときの特異分解物) が用いられている。

ホルマックスを摂取すると、特に、血清骨吸収マーカーの酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼは有意に低下することが見出され、骨吸収 (骨塩溶解) が抑制されているものと推察された¹⁴⁾。これらの知見から、アカモク抽出成分の摂取は、まず骨吸収抑制効果が摂取早期に発揮され、その後に骨形成が増進され、骨量保持に役立つものと推察された。なお、一般血液生化学的検査並びに血球数は、ホルマックスを 1 日 1 および 3 錠の 8 週間摂取により有意に変動せず、毒性が認められなかった。

このように、アカモク水抽出成分を粉末化した骨粗鬆症予防用サプリメント素材として、わが国において最初に開発された機能性食品素材「ホルマックス OT」は、その効用がヒトにおいても実証された。この海藻アカモクは、わが国において僅かに食用されているものの一つであり、骨粗鬆症を予防する機能性食品としても注目される。

2. アカモク成分の脂肪細胞形成の抑制効果

先述したように、アカモク成分因子は、糖尿病態で発現する血清中のグルコースとトリグリセライド濃度の上昇を顕著に抑制し、抗糖尿病効果を発現することが見出された¹²⁾。さらに、アカモク成分因子が骨髄細胞からの脂肪細胞形成を抑制することが明らかにされ⁹⁾、肥満抑制との関連が示唆された。

骨髄の mesenchymal stem cell は、多能性の stromal cell であり、骨芽細胞、軟骨細胞、心筋細胞、脂肪細胞などに分化される¹⁵⁻¹⁸⁾。この分化の過程は複雑なシグナルシステムによって調節されている。例えば、骨形態タンパク (bone morphogenic proteins), winglestype MMTV integration site タンパク, hedgehogs, delta/jagged タンパク, 繊維芽細胞成長因子 (fibroblastic growth factors), インスリン (insulin), インスリン様成長因子 (insulin-like growth factors), さらには、脂肪細胞と骨芽細胞分化を調節する転写因子 (peroxisome proliferators-activated receptor γ および runt-related transcription factor 2) などのタンパク分子が関与している。mesenchymal stem cell からの脂肪細胞 (adipocyte) あるいは骨芽細胞のいずれの細胞に分化するのかが、骨粗鬆症の進展との関係で、近年、多くの関心を集めている。

筆者らは、アカモク水抽出成分を膜分画法で分子量 3000 以下のものに分画 (アカモク成分 3000 画分) し、マウス骨髄細胞の培養系において、脂肪細胞形成について調べた。このアカモク成分 3,000 画分因子は、インスリンにより刺激される骨髄の mesenchymal stem cell からの骨芽細胞への分化を増進し、脂肪細胞の形成への分化を抑制することが明らかにされた⁹⁾。このように、アカモク成分 3000 画分因子は骨髄細胞から脂肪細胞への分化抑制作用を発現することから、インスリン作用に関連してもたらされる摂食後の肥満を制御する効果を発揮するものと推察され、興味もたれた。

なお、肥満による骨粗鬆症の発症には成熟脂

肪細胞から分泌する tumor necrosis factor (TNF) α が関係することが示されている。アカモク成分 3000 画分因子は、TNF- α により刺激された細胞内 NF- κ B シグナリングの活性化による骨芽細胞の機能阻害と破骨細胞形成亢進を抑制した¹⁰⁾。TNF- α は、骨髄の脂肪細胞ならびに成熟脂肪細胞において産生増大され、炎症およびインスリン抵抗性をもたらす重要な因子であることが知られている。アカモク成分因子は、肥満に関連したインスリン抵抗性を示す 2 型糖尿病の予防に役立つ可能性が示唆され、今後の展開が期待される。

3. アカモク成分の乳がん細胞増殖の抑制効果

乳がんや前立腺がんの細胞は、その 80% に骨転移が引き起こされる。それに伴った骨破壊による高カルシウム血症は、患者の予後を悪化させることから、臨床医学的に古くから注目されていた。その治療には、骨吸収をもたらす破骨細胞の機能を活性化させるサイトカインの RANKL [Receptor activator of the nuclear factor kappa B (NF- κ B) (RANK) ligand] の作用を抑制する薬剤やその抗体が活用されている^{19, 20)}。さらに、その予防と修復に役立つ食因子はほとんど明らかにされていなかった。そこで、筆者は、アカモク成分因子が、米国において強い関心をもたれている乳がんの制御に役立つかを調べた。

ヒト乳がん細胞 (MDA-MB-231 cell) は、Triple-negative (エストロゲン受容体 α 、プロゲステロンおよび上皮成長因子受容 α -2 の発現を欠如している) を示すことから、その薬物治療が困難であるとされている。この細胞培養系において、アカモク成分 3000 画分因子は、ヒト乳がん細胞の増殖を抑制することが見出された²¹⁾。また、本因子は、核 DNA 分解に関与する caspase-3 の活性を亢進して、細胞死 (apoptotic cell death) をも引き起こし、乳がん細胞の増殖を強く制御することが明らかにされた²¹⁾。

アカモク成分因子は、他の多くのがん細胞の

制御にも関与していることが推察され、がんの予防と修復に役立つことを示唆する知見が見出されたことから、今後の発展が期待される。

5. アカモク成分の転写因子 NF- κ B 阻害作用と病態制御における意義

先述したように、アカモク水抽出成分の分子量 3000 画分の因子を用いて、その生理活性を骨髄細胞、骨芽細胞、破骨細胞、脂肪細胞、乳がん細胞の培養系において調べた。これらの細胞は、骨粗鬆症、肥満、糖尿病、がんとの関連があり、アカモク成分因子はそれらの疾患の予防や修復に役割を果たすものと推察される^{22, 23)}。特に、筆者は、アカモク水抽出成分の分子量 3000 画分の因子が、骨粗鬆症との関連で、サイトカイン TNF- α による骨芽細胞機能の抑制および RANKL による破骨細胞の活性化の制御に共通の分子メカニズムを担っている転写因子 NF- κ B の活性化を抑制することを解明した。肥満細胞が産生する TNF- α は、インスリンの抵抗性をもたらす、2 型糖尿病の発症に重要な病態生理的因子である。さらに、この因子は炎症性疾患およびがんの発症に重要であり、多様な疾病の要因になっている。アカモク水抽出成分の分子量 3000 画分の因子が転写因子 NF- κ B の活性化を阻害する機能は、NF- κ B の活性化が関与する多くの疾患の予防と修復に役立つ薬剤的役割を果たすことができると推察される (特許第 5950656 号)。

アカモク水抽出成分の分子量 3000 画分には、分子量が 200-400 の新規および既知の化学物質が数種類存在することを同定している²²⁾。これらの単独あるいは複合的な作用をもって、NF- κ B 活性化を制御しているのかは不明であるが、筆者は、強い複合的効果の現れが、アカモクが有する多機能性の発現において、重要であると考察している。

おわりに

人口の高齢化に伴って多発する易骨折性を示す骨粗鬆症は寝たきりの要因になり医療面から

みても社会的に重要な疾患として位置づけられている。その予防は重要であり、そのための食生活習慣は大切となる。骨粗鬆症を予防、修復する食品成分については十分に解明されていないが、筆者はその面における研究を国内外に先駆けて遂行してきた。その過程で、食用されている多くの海藻の中で、アカモクに骨粗鬆症の予防と修復に役立つ活性因子が存在することを見出したことは、食生活と健康の面からもきわめて意義あることであった。

本稿で紹介したように、海藻アカモク抽出成分を粉末化した骨粗鬆症予防に役立つサプリメント素材は、その効果がヒトにおいても実証さ

れ、骨粗鬆症の予防と修復に役立つものとして、その有用性が示されている。さらに、アカモク成分は、多機能性を有し、炎症性疾患、肥満、糖尿病、がんなどの病態制御にかかわることが見出された。今後、機能性素材としての海藻アカモク成分は、漢方薬的サプリメントとして、その効用が期待される。

謝辞

アカモク成分をご恵与賜りました株式会社マルハチ村松・開発研究部の共同研究者の松本透ならびに橋詰昌幸両氏に深謝申し上げます。

参考文献

1. 山口正義：骨粗鬆症の予防と栄養，黒船出版，静岡，2000.
2. 山口正義：「骨の健康と食因子—骨粗鬆症の予防と修復へのアプローチ」，食品資材研究会，東京，2010.
3. Yamaguchi M: Nutritional Factors and Osteoporosis Prevention. Nova Science Publishers, Inc., New York, USA, 2010.
4. Yamaguchi M: Biomedical Osteoporosis Treatment. Nova Science Publishers, Inc., New York, USA, 2013.
5. Yamaguchi M, Hachiya S, Hiratsuka S, Suzuki T: Effect of marine algae extract on bone calcification in the femoral-metaphyseal tissues of rats: Anabolic effect of *Sargassum horneri*. *J. Health Sci.*, **47**, 533-538. 2001.
6. Uchiyama S, Yamaguchi M: Stimulatory effect of *Sargassum horneri* extract on bone formation in rat femoral-diaphyseal and -metaphyseal tissues *in vitro*. *J. Health Sci.*, **48**, 148-153. 2002.
7. Uchiyama S, Yamaguchi M: Inhibitory effect of marine alga *Sargassum horneri* extract on bone resorption in tissue culture *in vitro*. *J. Health Sci.*, **48**:154-160. 2002.
8. Uchiyama S, Hashizume M, Hokari Y, Nakagawa T, Igarashi A, Yamaguchi M: Characterization of active component in marine alga *Sargassum horneri* extract in stimulating bone calcification *in vitro*. *J. Health Sci.*, **50**:634-639. 2004.
9. Yamaguchi M, Matsumoto T: Marine algae *Sargassum horneri* bioactive factor suppresses adipogenesis in mouse bone marrow culture *in vitro*. *OA Biotechnology*, **3**:7. 2014.
10. Yamaguchi M, Matsumoto T: Marine algae *Sargassum horneri* bioactive factor stimulates osteoblastogenesis and suppresses osteoclastogenesis *in vitro*. *OA Biotechnology*, **1**, 3. 2012.
11. Uchiyama S, Yamaguchi M: Anabolic effect of marine alga *Sargassum horneri* extract on bone components in the femoral-diaphyseal and -metaphyseal tissues of young and aged rats *in vivo*. *J. Health Sci.*, **48**:325-330. 2002.
12. Uchiyama S, Yamaguchi M: Preventive effect of marine alga *Sargassum horneri* extract on bone loss in streptozotocin-diabetic rats *in vivo*. *J. Health Sci.*, **49**, 149-155. 2003.
13. 山口 正義, 松本 透, 保莉 義則, 橋詰 昌幸: 海藻アカモク成分の骨代謝調節機能: 骨粗鬆症を予防する新規機能性素材ホルマックス®の開発. *New Food Industry*, **50**, 1-6. 2008.
14. Matsumoto T, Hokari Y, Hashizume M, Yamaguchi M: Effect of *Sargassum horneri* extract on circulating bone metabolic markers: Supplemental intake has an effect in health humans. *J. Health Sci.*, **54**:50-55. 2008.
15. Minguel JJ, Erices A, Conget P: Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med* **226**:507-520. 2001.
16. Muruganandan S, Roman AA, Sinal CJ: Adipocyte differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells: cross talk with the osteoblastogenesis program. *Cell Mol Life Sci*, **66**:236-253. 2009.
17. Laudes M: Role of WNT signaling in the determination of human mesenchymal stem cells into preadipocytes. *J Mol Endocrinol*, **46**:R65-72. 2011.
18. Gharibi B, Abraham AA, Ham J, Evans BA: Adenosine receptor subtype expression and activation influence the

- differentiation of mesenchymal stem cells to osteoblasts and adipocytes. *J Bone Miner Res.*, **26**:2112-2124. 2011.
19. Weilbaecher KN, Guise TA, McCauley LK: Cancer to bone: a fatal attraction. *Nature Review Cancer*, **11**:411-425. 2011.
 20. Yamaguchi M, Murata T, Shoji M, Weitzmann MN: The flavonoid p-hydroxycinnamic acid mediates anticancer effects on MDA-MB-231 human breast cancer cells *in vitro*: Implication with suppression of bone metastatic effects. *Int J Oncol.*, **47**,1563-1571. 2015.
 21. Yamaguchi M, Matsumoto T: Marine algae *Sargassum horneri* bioactive factor suppresses proliferation and stimulates apoptotic cell death in human breast cancer MDA-MB-231 cells *in vitro*. *Integr Mol Med.*, **2**,135-138. 2015. Doi:10.15761/IMM.1000127.
 22. Yamaguchi M: Marine alga *Sargassum horneri* component and bone homeostasis: Role in osteoporosis prevention. *Int J Food Sci Nutr Diet.*, **2**,9-14. 2013. Doi:http://dx.doi.org/10.19070/2326-3350-130003.
 23. Yamaguchi M: Marine algae *Sargassum horneri* active component: Prevention of Obese diabetic bone loss. *Integr Food Nutr Metab.*, **1**, 1-6. 2014. Doi: 10.15761/IFNM.1000101.

コメタンパク質由来抗菌ペプチドは 抗炎症作用を発揮する

谷口 正之 (TANIGUCHI Masayuki)^{1,2} 落合 秋人 (OCHIAI Akihito)^{1,2}

¹新潟大学自然科学系付置フードサイエンスセンター ²新潟大学自然科学系 (工学部)

Key Words : ペプチド 抗炎症活性 エンドトキシン リポ多糖 リピド A

はじめに

近年、従来の抗生物質に対して耐性を示す病原微生物の増加に伴って、新しい治療薬として天然物由来の抗菌ペプチドが関心を集めている。また、殺傷されたグラム陰性菌の外膜に由来するリポ多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) は、重篤な炎症を引き起こすエンドトキシンであり、その不活性化が大きな課題になっている^{1,3)}。代表的な抗菌ペプチドは、12~50程度のアミノ酸により構成され、両親媒性であり、正味の正電荷を有し、 α -ヘリックスなどの二次構造を有していることが報告されている^{4,5)}。一方、抗菌ペプチドは、抗菌作用ばかりでなく、LPS に対する中和・解毒、炎症性サイトカインの産生抑制、血管新生促進、細胞増殖・細胞遊走促進などの多くの生体防御機能を有することが報告されている^{6,7)}。

筆者らは、コメの酵素 cyanate lyase の部分配列である抗菌ペプチド CL-12⁸⁾ およびコメの heat shock protein 70 の部分配列である抗菌ペプチド Hsp70-18⁹⁾ を見出し、既に報告している。また、最近、X 線構造解析によって立体構造を明らかにしたコメの α -amylase (AmyI-1) から新規抗菌ペプチドとして 18 残基のアミノ酸からなる AmyI-1-18 を見出し、歯周病菌、ニキビ

菌、う蝕菌、日和見感染真菌 (カンジダ菌) などのヒト病原微生物に対して抗菌活性を示すことを報告している¹⁰⁾。さらに、AmyI-1-18 のアミノ酸を置換することによって、それらの抗菌活性が増大することも見出している¹¹⁾。

LPS はグラム陰性菌の外膜の構成成分であり、発熱作用や細胞傷害作用などの種々の生理活性を有しており、主に O 抗原、コア多糖、および lipid A から構成されている。この LPS がマクロファージなどの細胞表面に存在する Toll-like receptor 4 (TLR4) に結合すると、シグナル伝達経路が活性化され、一酸化窒素 (nitric oxide, NO) 合成酵素が誘導されて細胞傷害性のある NO が過剰に産生される¹²⁻¹⁴⁾。そこで、TLR4 と LPS の結合から始まるシグナル伝達経路を AmyI-1-18 によって阻害することができれば、LPS 刺激によって誘導される NO 産生を抑制できると考えられる。そこで本稿では、炎症シグナルである NO の産生に対する AmyI-1-18 の抑制効果を測定することによって、AmyI-1-18 の抗炎症作用を評価した結果¹⁵⁾ を解説する。また、AmyI-1-18 のエンドトキシン中和活性、AmyI-1-18 とエンドトキシンの結合活性などを定量的に解析し、AmyI-1-18 の抗炎症の作用メカニズムを解析した結果¹⁵⁾ も解説する。

1. 実験材料と実験方法

1-1. ペプチド¹⁵⁾

本研究では、コメの α -amylase (AmyI-1) の部分配列である 18 残基のアミノ酸からなる抗菌ペプチド (AmyI-1-18, HLNKRQRELIGWLDWLK) を使用した。AmyI-1-18 は、分子量が 2304.723 Da, 正味の電荷が +2, および等電点が 9.99 である。また、表面プラズモン共鳴装置を用いて AmyI-1-18 とエンドトキシンの親和性を解析するために、AmyI-1-18 の N 末端にシステインを付加したペプチド (Cys-AmyI-1-18) を使用した。AmyI-1-18 と Cys-AmyI-1-18 は、医学生物学研究所 (株) に委託して化学合成した。

1-2. エンドトキシン¹⁵⁾

本研究では、エンドトキシンとして *Escherichia coli* O55:B5 由来の O 抗原を含む smooth 型 LPS, *E. coli* J5 由来の O 抗原を含まない Rc 型 LPS, および *E. coli* R515 由来の lipid A を使用した。

1-3. LPS 刺激したマクロファージによる一酸化窒素産生の抑制¹⁵⁾

エンドトキシンを用いて刺激したマウスマクロファージ RAW264 細胞の NO 産生量は、著しく増加した。一方、エンドトキシンと同時に AmyI-1-18 を添加することによって、NO の産生量は抑制された。そこで、AmyI-1-18 の添加によって低下する NO 産生量を測定し、その NO 産生量によって AmyI-1-18 の抗炎症活性を評価した。すなわち、96 ウェルプレートに RAW264 細胞を播種し、一定時間培養後に smooth 型 LPS, Rc 型 LPS, または lipid A を添加した。また、この時に AmyI-1-18 を同時に添加して、その NO 産生抑制効果を検討した。培地中に産生された NO は、培養 24 時間後に Griess 試薬 ((株) 同仁化学研究所) を用いて、NO₂ として定量した。

さらに、NO 産生抑制効果に及ぼす smooth 型 LPS または lipid A と AmyI-1-18 の添加方法の影響についても検討した。すなわち、smooth 型 LPS または Lipid A だけを添加する方法 (I), smooth 型 LPS または Lipid A と AmyI-1-18 を

同時添加する方法 (II), smooth 型 LPS または lipid A と AmyI-1-18 を予め混合し、1 時間インキュベート後に添加する方法 (III), および smooth 型 LPS または lipid A を添加する 1 時間前に AmyI-1-18 を添加する方法 (IV) について、それぞれ検討した。

1-4. リムルステストを用いたペプチドのエンドトキシン中和活性の解析¹⁵⁾

リムルステスト (Endospecy ES-50, 生化学工業 (株)) では、エンドトキシンを特異的に検出するカプトガニの血球抽出物から調製した *Limulus* amoebocyte lysate (LAL) 試薬を用いて、エンドトキシンを定量することができる。リムルステストにおいては、LAL 試薬に含まれる Factor C (セリンプロテアーゼ前駆体) とエンドトキシンの反応を起点としたカスケード反応により、最終的にエンドトキシンの濃度に応じて遊離した *p*-nitroaniline の 405nm における吸光度を測定した。本研究では、予め AmyI-1-18 と smooth 型 LPS または lipid A をインキュベートした後に反応系に添加し、この時の吸光度の減少からリムルステストの反応を阻害する程度を、エンドトキシン中和活性として評価した。エンドトキシンに強く結合することが知られている抗生物質である polymyxin B を、コントロールとして用いた。中和活性の強さは、リムルステストの反応を 50% 阻害する濃度、すなわち 50% 有効濃度 (EC₅₀) として表した。

1-5. Biacore を用いたペプチドとエンドトキシンの結合活性の解析¹⁵⁾

表面プラズモン共鳴 (surface plasmon resonance, SPR) 法では、2 分子間の結合と解離の挙動をリアルタイムで測定することができる。測定する 2 分子のうち、センサーチップに固定化する分子をリガンドと、それと相互作用する分子をアナライトと、それぞれ呼ぶ。本研究では、解析装置として Biacore X (GE Healthcare Bioscience Corp.) を用いて、カルボキシメチルデキストランがコーティングされたセンサーチップ (CM5, GE Healthcare Bioscience Corp.) 上にリガンドとして AmyI-1-18 を、次に述べる

ようにして固定化した。すなわち、アンカーとしてペプチドのN末端にシステインを付加した Cys-AmyI-1-18 をリガンドとして用いた。最初に NHS/EDC 混合試薬と PDEA 試薬を添加し、デキストランを活性化させた。その後、Cys-AmyI-1-18 を添加し、センサーチップ上のスルフィド基とシステインのスルフィド基によりジスルフィド結合を形成させ、固定化した。固定化操作の最後に、非特異的吸着を防ぐために Cys-AmyI-1-18 が結合していない部分を L-システインでブロッキングした。最終的な結合量はおよそ 2,000 resonance units (RUs), すなわち固定化量は約 2 ng/mm² 程度となった。

結合解析は、センサーチップ上にアナライトとして smooth 型 LPS または lipid A を添加して行った。結合が起こった場合には、センサーチップ表面の微量な質量変化、すなわちリガンドに結合したアナライトの質量に比例して、センサーチップ表面の溶媒の屈折率が変化する。この屈折率の変化を経時的にモニタリングすることによって、2 分子間の結合速度と結合量を高感度に測定した。

1-6. ELISA を用いたペプチドの LPS-LBP 結合阻害活性の解析¹⁵⁾

LPS binding protein (LBP, R&D Systems Inc.), LPS 抗体 (Anti-LPS IgG, Glycobiotech GmbH), LBP 抗体 (Anti-LBP IgG, R&D Systems Inc.), 西洋わさびペルオキシダーゼ標識二次抗体 (Anti-goat IgG conjugated HRP, R&D Systems Inc.) などを用いた ELISA 法によって、AmyI-1-18 の LPS-LBP 結合阻害活性を測定した。発色には、3,3',5,5'-tetramethylbenzidine substrate solution (Sigma-Aldrich Co.) を用いた。30 分間反応後、650 nm における吸光度を測定することによって、LPS に結合した LBP 量を算出した。本研究では、LPS-LBP 結合を阻害することが報告されている polymyxin B を、コントロールとして用いた。

2. 実験結果

2-1. LPS 刺激したマクロファージによる一酸化窒素産生に対するペプチドの抑制効果¹⁵⁾

Smooth 型 LPS, Rc 型 LPS, または lipid A を用いて刺激した RAW264 細胞に対して、AmyI-1-18 を同時添加した時の NO 産生抑制作用を図 1 に示す。縦軸は smooth 型 LPS, Rc 型 LPS, または lipid A だけを添加した時の NO 産生量を 100% とした相対値を、横軸は smooth 型 LPS, Rc 型 LPS, または lipid A の添加の有無および AmyI-1-18 の添加濃度を、それぞれ示す。2 種類の LPS または lipid A を用いて刺激することによって、コントロールと比較して、それぞれ NO 産生量が大幅に増加した。そこに AmyI-1-18 を同時添加することによって、NO 産生量は添加した AmyI-1-18 の濃度に依存してそれぞれ減少した。また、lipid A を用いて刺激

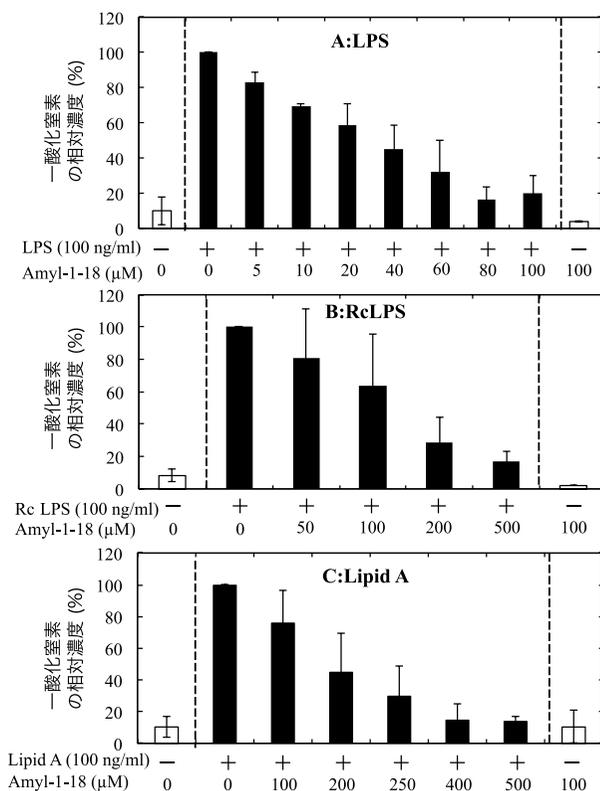


図 1 エンドトキシン中和に対するペプチド濃度の影響 (文献 15 より改変)

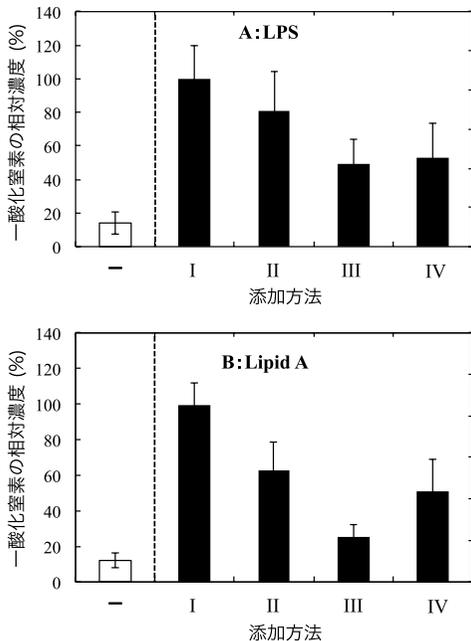


図2 一酸化窒素産生に及ぼすペプチドとLPSまたはLipid Aの添加方法の影響 (文献15より改変)

した場合のNO産生量を減少させるには、smooth型LPSを用いて刺激した場合に比べて、より高濃度のAmyI-1-18を添加する必要がある。これは、smooth型LPSとlipid Aの添加濃度を100 ng/mlと同一にしたために、分子量が小さいlipid Aのモル濃度が約11倍高くなったためであると考えられる。さらに、AmyI-1-18だけの添加は、NO産生に影響を及ぼさなかった。

次に、smooth型LPSまたはlipid AとAmyI-1-18の添加方法の影響に関する結果を図2に示す。Smooth型LPSまたはlipid Aを用いてそれぞれ刺激することによって、コントロールと比較して、方法(I)の結果の通り、NO産生量が大幅に増加した。さらに、方法を変えてAmyI-1-18を添加した結果、方法(III)、方法(IV)、方法(II)の順に抑制効果が観察された。特に、予め混合した方法(III)の場合に、最もNO産生量が低下した。

2-2. リムルテストを用いたペプチドのエンドトキシン中和活性の評価¹⁵⁾

polymyxin Bはエンドトキシンに強く結合することが知られている抗生物質であり、治療薬として市販されている。リムルテストを用いて、polymyxin Bのエンドトキシン中和活性を測定した結果を図3に示す。polymyxin Bは、smooth型LPSによって引き起こされるリムルテストの反応を濃度依存的に阻害した。一方、AmyI-1-18も、図4に示すように、polymyxin

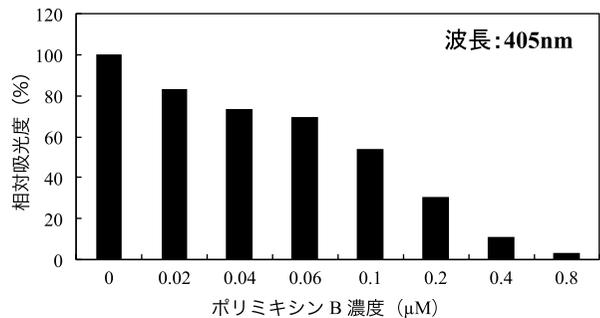


図3 リムルテストを用いたポリミキシン B の LPS 中和活性の評価 (文献15より改変)

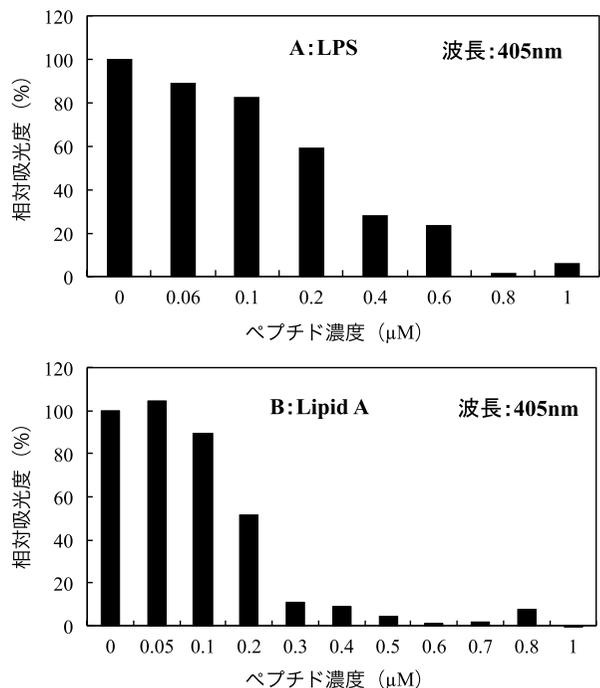


図4 リムルテストを用いたペプチドのLPSまたはLipid Aの中和活性の評価 (文献15より改変)

Bと同じように、smooth型LPSとlipid Aによって引き起こされるリムルステストの反応を濃度依存的に阻害した。したがって、これらのリムルステストの結果から、AmyI-1-18はsmooth型LPSおよびLipid Aに強く結合し、中和活性を発揮することがわかった。

これまでの結果から、AmyI-1-18とpolymyxin BのEC₅₀を算出した。その結果、AmyI-1-18のEC₅₀は、それぞれsmooth型LPSに対して0.26 μM、Lipid Aに対して0.17 μMとなった。このAmyI-1-18のsmooth型LPSに対するEC₅₀は、polymyxin Bの値(0.11 μM)と比較して、2倍程度であることから、AmyI-1-18は非常に強くLPSに結合することがわかった。

2-3. Biacoreを用いたペプチドのエンドトキシン結合活性の評価¹⁵⁾

AmyI-1-18を固定化したセンサーチップに、10, 30, および50 ng/mlのsmooth型LPSまたはlipid Aを添加した時の結果を図5に示す。0-240秒の領域がアナライト溶液を添加している時の結合に関するレスポンスの変化を示す。240秒にアナライト溶液を、アナライトを含まない緩衝液に切り換えた。240秒以降の領域がセンサーチップに結合したアナライトが解離している時のレスポンスの変化を示す。

AmyI-1-18は非常に低い濃度でも、smooth型LPSおよびlipid Aに対して、濃度に依存して結合のレスポンスを示した。これらの結果に基づいて解析ソフトにより解離定数(K_D)を算出した結果、AmyI-1-18のsmooth型LPSに対するK_Dは4.3 × 10⁻¹⁰ M、lipid Aに対するK_Dは5.6 × 10⁻¹⁰ Mとなった。したがって、AmyI-1-18は、smooth型LPSとlipid Aに対して、抗原-抗体結合と同じ程度の強い親和性を示すことがわかった。

2-4. ELISAを用いたペプチドによるLPS-LBP結合阻害活性の評価¹⁵⁾

LPSはLBPにより補足された後に、細胞膜上のCD14を介してTLR4-MD2複合体に受け渡される。LPSを受け取ったTLR4は2量体となり、細胞内シグナル

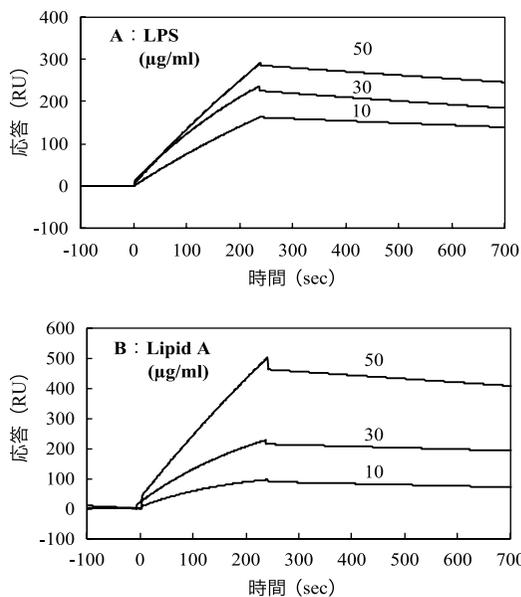


図5 Biacoreを用いたペプチドとLPSまたはLipid Aとの親和性の解析(文献15より改変)

伝達が開始される。したがって、LPS-LBP結合を阻害することができれば、TLR4を介したシグナル伝達を抑制することができ、炎症を抑えることができると考えられる。AmyI-1-18とpolymyxin BのLPS-LBP結合阻害活性を図6に示す。AmyI-1-18とpolymyxin Bは、濃度依存的にLPS-LBP結合を阻害した。しかし、結合を50%阻害する濃度は、polymyxin Bの場合には約0.05 μg/wellであり、一方、AmyI-1-18の場合には約5 μg/wellであった。したがって、AmyI-1-18のLPS-LBP結合阻害活性は、

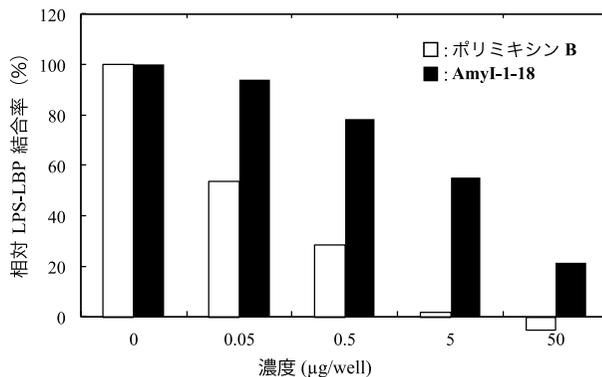


図6 ペプチドとポリミキシンBによるLPS-LBP結合の阻害(文献15より改変)

polymyxin B に比べて、約 100 倍低いことがわかった。

3. 考察

3-1. 抗炎症作用を有する抗菌ペプチド

これまでに LL-37 (ヒト), β -defensin (ヒト), CAP-18 (ウサギ), PR-39 (ブタ), BMAP-28 (ウシ), indolicidine (ウシ) などの動物由来ペプチドは、病原微生物に対して抗菌活性を発揮するばかりでなく、LPS 誘発型の TLR 4 を介したシグナル伝達を阻害する抗炎症活性を兼ね備えていることが報告されている。これらの 2 つの機能を備えていることは、従来の抗生物質や単独の作用しか有しないペプチドに比べて、感染症の治療において有利である。既往の研究において、AmyI-1-18 は、歯周病菌、ニキビ菌、う蝕菌、日和見感染真菌 (カンジダ菌) などのヒト病原微生物に対して抗菌活性を示すことを報告している¹⁰⁾。さらに、AmyI-1-18 のアミノ酸をカチオン性のアルギニンや疎水性のロイシンに置換することによって、それらの抗菌活性が増大することも見出している¹¹⁾。

3-2. コメタンパク質由来抗菌ペプチドの抗炎症作用¹⁵⁾

本研究では、エンドトキシンを用いて刺激したマウスマクロファージ RAW264 細胞による NO 産生に対する AmyI-1-18 の抑制作用を解析した。Smooth 型 LPS, Rc 型 LPS, または lipid A を用いて刺激した RAW264 細胞による NO 産生量は、AmyI-1-18 を同時添加することによって、AmyI-1-18 の濃度に依存して、それぞれ減少した。エンドトキシンが NO 産生を引き起こすメカニズムの概略は、次の通りである。遊離したエンドトキシンは最初に LBP により補足された後、LPS は細胞膜上の CD14 を介して TLR4-MD2 複合体に受け渡される。LPS を受け取った TLR4 は 2 量体となり、細胞内シグナル伝達が開始される。最終的に NF- κ B や IRF-3 などの転写因子を発現させ、細胞傷害性の NO の産生を誘導する¹²⁻¹⁴⁾。これまでに報告されている抗菌ペプチドについては、LPS また

は LPS-LBP 複合体に結合して中和 (不活性化) する作用、MyD88 経路のシグナル伝達を阻害する作用、転写因子である NF- κ B のはたらきを抑制する作用などによって、NO の産生を抑制することが報告されている^{3, 14, 16, 17)}。そこで、smooth 型 LPS または lipid A と AmyI-1-18 の添加方法の影響について検討した。その結果、特に、予め smooth 型 LPS または lipid A と AmyI-1-18 を混合した方法 (Ⅲ) の場合に、最も NO 産生量が低下した。したがって、AmyI-1-18 は、smooth 型 LPS または lipid A に直接結合することによって、エンドトキシンの作用を抑制したと考えられる。

3-3. コメタンパク質由来抗菌ペプチドの抗炎症作用メカニズム¹⁵⁾

NO 産生抑制のメカニズムを解明するために、リムルステストを用いたエンドトキシン中和活性の解析と SPR を用いたエンドトキシン結合活性の解析を行った。リムルステストにおいて、AmyI-1-18 の EC₅₀ は、それぞれ smooth 型 LPS に対して 0.26 μ M, lipid A に対して 0.17 μ M であった。一方、polymyxin B の smooth 型 LPS に対する EC₅₀ は、0.11 μ M であった。このように AmyI-1-18 の EC₅₀ は、polymyxin B と比較して、2 倍程度であることから、AmyI-1-18 は非常に強く LPS に結合することがわかった。また、AmyI-1-18 の smooth 型 LPS に対する EC₅₀ と lipid A に対する EC₅₀ が非常に近い値であることから、AmyI-1-18 は smooth 型 LPS の lipid A 部分に結合することが示唆された。SPR 解析において、AmyI-1-18 の smooth 型 LPS に対する K_D は 4.3×10^{-10} M, Lipid A に対する K_D は 5.6×10^{-10} M とそれぞれ算出され、両者はともに AmyI-1-18 に対して強い親和性を示した。また、AmyI-1-18 の smooth 型 LPS に対する K_D と lipid A に対する K_D の値が非常に近く、統計的有意差が認められなかったことから、AmyI-1-18 は LPS の lipid A 部分に結合することが示唆された。以上のリムルステストと SPR 解析の結果は、AmyI-1-18 が smooth 型 LPS の lipid A 部分に結合して、TLR4 との結合を阻害

し、結果としてNO産生を抑制するメカニズムを強く支持している。上述したように、LPSはLBPにより補足された後、LPSは細胞膜上のCD14を介してTLR4-MD2複合体に受け渡される。そこで、本研究では、AmyI-1-18によるLPS-LBP結合の阻害について検討した。その結果、AmyI-1-18は、polymyxin Bと同じように、濃度依存的にLPS-LBP結合を阻害した。しかし、AmyI-1-18のLPS-LBP結合阻害活性は、polymyxin Bに比べて、約100倍低いことがわかった。したがって、AmyI-1-18は、LPS-LBP結合を阻害する作用メカニズムではなく、LPSのlipid A部分に直接結合するメカニズムによってNO産生を抑制したと考えられる。

おわりに

既往の研究において、コメ α -アミラーゼ由来のペプチドであるAmyI-1-18は、う蝕菌とアクネ菌に対する細胞膜損傷作用は強かったが、一方、歯周病菌と日和見感染真菌に対する細胞膜損傷作用は弱かったことから、細胞内分子を標的とした抗菌作用メカニズムも有する可能性が高いと推定した。これまでに抗菌ペプチドのタンパク質合成阻害作用を定量的に測定できる*E. coli*の無細胞系を用いたアッセイ法および分子シャペロンを用いた酵素 luciferase のリフォールディングを評価するアッセイ法を利用して、AmyI-1-18のタンパク質合成の各ステップ（転写、翻訳、フォールディング）に対する作用を、他の抗菌ペプチドの作用と比較しながら、検討した^{18, 19)}。その結果、AmyI-1-18は翻訳とフォールディングステップを阻害してタン

パク質合成を阻害することがわかった¹⁹⁾。本研究においては、AmyI-1-18はLPSのlipid A部分に結合して、LPSのTLR4への結合を阻害し、結果としてNO産生を抑制するメカニズムを有していると考えられる。しかし、AmyI-1-18が、LBPを介したLPSのCD14分子への移行の阻害、細胞内シグナル伝達経路におけるリン酸化ステップの阻害などの他の作用メカニズムを有しているとも考えられる。これらの点に関して、今後、さらに検討する必要がある。また、現在、単一ペプチドの複数の生体防御機能を明らかにする一環として、AmyI-1-18の創傷治癒作用を解析しており、これまでに血管内皮細胞の管腔形成促進作用や細胞遊走促進作用を見出しており²⁰⁾、今後、創傷治癒作用のメカニズムを、1) apoptosisに関与するcaspase-3活性の抑制作用、2) 増殖促進因子レセプター(VEGFR-2)の活性化作用、および3) レセプター活性化に関与するリン酸化酵素(MAPK/ERK1/2, P13K/Aktなど)の発現調節作用を、アミノ酸配列と活性の関係を考慮しながら、今後それぞれ検討する予定である。なお、AmyI-1-18について、マクロファージに対する細胞毒性とヒツジ赤血球に対する溶血活性を検討した結果、抗菌活性や抗炎症活性を発揮する500 μ M以下の濃度範囲では、細胞毒性をまったく示さず、溶血活性も検出できなかった。したがって、AmyI-1-18は、安全な多機能性生体防御ペプチドとして特定保健用食品、医薬品、ヘルスケア製品などの素材として利用されることが期待される。

参考文献

1. A. Nilsson, C. Fant, M. Nydén, *et al.*, Lipopolysaccharide removal by a peptide functionalized surface. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, **40**: 99-106, 2005.
2. T. Into, K. Shibata, Y. Murakami, Effect of the antimicrobial peptide LL-37 on Toll-like receptors 2-, 3-, and 4-triggered expression of IL-6, IL-8, and CXCL10 in human gingival fibroblasts. *Cell Immunol.*, **264**: 104-109, 2010.
3. M. M. Iskandar, N. Dauletbaev, S. Kubow, *et al.*, Whey protein hydrolysates decrease IL-8 secretion in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated respiratory epithelial cells by affecting LPS binding to Toll-like receptor 4. *Br. J. Nutr.*, **110**: 58-68, 2013.
4. L. T. Nguyen, E. F. Haney, H. J. Vogel, The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends Biotechnol.*, **29**: 464-472, 2011.
5. P. Nicolas, Multifunctional host defense peptides: intracellular-targeting antimicrobial peptides. *FEBS J.*, **276**: 6483-6496, 2009.
6. K. L. Brown, R. E. W. Hancock, Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Curr. Opin. Immunol.*, **18**: 24-30, 2006.
7. S. C. Mansour, O. M. Pena, R. E. W. Hancock, Host defense peptides: front-line immunomodulators. *Trends Immunol.*, **35**: 443-450, 2014.
8. N. Takei, N. Takahashi, T. Takayanagi, *et al.*, Antimicrobial activity and mechanism of action of a novel cationic α -helical dodecapeptide, a partial sequence of cyanate lyase from rice. *Peptides*, **42**: 55-62, 2013.
9. M. Taniguchi, A. Ikeda, S. Nakamichi, *et al.*, Antimicrobial activity and mechanism of action of a novel cationic α -helical octadecapeptide derived from heat shock protein 70 of rice. *Peptides*, **48**: 147-155, 2013.
10. M. Taniguchi, A. Ochiai, K. Takahashi, *et al.*, Antimicrobial activity and mechanism of action of a novel cationic α -helical octadecapeptide derived from α -amylase of rice. *Peptide Sci.*, **104**: 73- 83, 2015.
11. M. Taniguchi, A. Ochiai, K. Takahashi, *et al.*, Effect of alanine, leucine, and arginine substitution on antimicrobial activity against *Candida albicans* and action mechanism of a cationic octadecapeptide derived from α -amylase of rice. *Peptide Sci.*, **104**: 219-229, 2016.
12. S. Bhattacharjya, *De novo* designed lipopolysaccharide binding peptides: structure based development of antiendotoxic and antimicrobial drugs. *Curr. Med. Chem.*, **17**: 3080-3093, 2010.
13. L. Wei, J. Yang, X. He, *et al.*, Structure and function of a potent lipopolysaccharide-binding antimicrobial and anti-inflammatory peptide. *J. Med. Chem.*, **56**: 33546-33556, 2013.
14. X. Yang, H. Jin, K. Liu, *et al.*, A novel peptide derived from human pancreatitis-associated protein inhibits inflammation *in vitro* and *in vivo* and blocks NF-kappa B signaling pathway. *Plos One*, **6**: e29155, 2011.
15. M. Taniguchi, A. Ochiai, K. Matsushima, *et al.*, Endotoxin-neutralizing activity and mechanism of action of a cationic α -helical antimicrobial octadecapeptide derived from α -amylase of rice. *Peptides*, **75**: 101-108, 2016.
16. Y. Liu, N. Ni, J.-D. Ren, *et al.*, Cyclic Limulus anti-lipopolysacchride (LPS) factor-derived peptide CLP-19 antagonizes LPS function by blocking binding to LPS binding protein. *Biol. Pharm. Bull.*, **34**: 1678-1683, 2011.
17. R. E. W. Hancock, A. Nijnik, D. Philpott, Modulating immunity as a therapy for bacterial infection. *Nat. Rev. Microbiol.*, **10**: 243-254, 2012.
18. M. Taniguchi, A. Ochiai, H. Kondo, *et al.*, Pyrrhocoricin, a proline-rich antimicrobial peptide derived from insect, inhibits the translation process in the cell-free *Escherichia coli* protein synthesis system. *J. Biosci. Bioeng.*, **121**: 591-598, 2016.
19. M. Taniguchi, A. Ochiai, S. Fukuda, *et al.*, AmyI-1-18, a cationic α -helical antimicrobial peptide derived from α -amylase of rice, inhibits the translation and folding processes in a protein synthesis system. *J. Biosci. Bioeng.*, **122**: in press, 2016. DOI:10.1016/j.jbiosc.2016.03.004
20. 谷口 正之, 金子 陽徳, 田嶋 幸司, 落合 秋人, 田中 孝明, 米由来抗菌ペプチドとそのアミノ酸置換体の抗炎症作用と創傷治癒作用の解明. 2015年度日本生物工学会大会 (鹿児島), 講演要旨集, P-272, 2015.

発酵食品由来抗がん・抗ウイルスおよび抗菌剤

Fermented food-derived anti-cancer, anti-viral and anti-microbial agents.

伊藤 英晃 (ITO HIDEAKI)^{1, 2}

¹ 秋田大学大学院理工学研究科生命科学専攻 ² 秋田大学発酵食品開発研究所

Key Words : 発酵食品 抗がん剤 抗ウイルス剤 抗菌剤 抗菌ペプチド

Abstract

Hideaki Itoh.^{1,2)}

¹⁾ Department of Life Science, Graduate School and Faculty of Engineering Science, Akita University,

²⁾ Institute of Fermented Food, Akita University

Fermented food-derived anti-cancer, anti-viral and anti-microbial agents

[Key words: Fermented foods, Anticancer drug, Antiviral drug, Antibacterial drug, Antimicrobial peptide]

We have investigated anti-cancer, anti-virus, and anti-microbial properties of Natto, a traditional Japanese food made from soybeans fermented with *Bacillus subtilis*. The protein related ingredient was partially purified from Natto using an ammonium sulphate fractionation and added to HeLa cells. As a result, all cancer cells perished the next day. On the other hand, if only a protein related extract from boiled beans and fermented soybean bacterium was added, there were no changes in cell growth. We purified and investigated amino acid sequence of anti-cancer peptide from Natto using Butyl Sepharose column chromatography of 5-kDa peptide. The peptide appeared to be a new antibacterial peptide. The peptide was effective in herpes virus 1 (HSV1) and *Streptococcus pneumoniae*.

はじめに

微生物によって食物などが分解されることを、発酵するまたは、腐るといふ。食物等を常温で放置するとやがて腐敗する。一方、人間の有用になるように微生物をコントロールして食物等を分解させることを「発酵」と呼ぶ。ヨーグルトなどの発酵食品は、洋の東西を問わず、古来より健康食品として広く知られている。

発酵食品は身体の免疫力を高めると言われており、我々の健康維持のためには欠かせないものとなっている^{1, 2)}。発酵食品の一般的な健康効果は、腸内環境を整えることにより、栄養価の消化吸収がよくなり、便秘予防、血中コレステロール値の低下、免疫力が高まるなどの効果がある。秋田県には、日本酒、納豆、味噌・醤油等の発酵食品関連産業が多い。健康食品の生体にとって有用な未知なる分子を、科学的に

解析することとした。我々は、発酵食品の中でも食卓になじみの深い食品の一つである納豆に着目した。

納豆は、古来より日本の発酵食品の代表格である。納豆には人体に不可欠な必須アミノ酸群をバランスよく含んでおり、ビタミン B₂・E・K 等のビタミン群、カリウム・亜鉛・カルシウム・鉄などのミネラル成分、食物繊維などの栄養素も豊富である。納豆の効用は、栄養的な面だけでなく納豆菌自体の優れた作用に負うところが大きい。すなわち、納豆菌は胃酸にも耐えて腸にたどりつき、ビフィズス菌や乳酸菌の増殖を促進して整腸作用を発揮し、便秘を改善する。また、ウェルシュ菌や大腸菌等がつくる腐敗産物の生成を減少させ、有害物質を吸着して排泄を促すことから肝臓の負担を軽くし、肌や各組織にも良い影響を与えるものと考えられている。

納豆の健康効果を挙げると、疲労回復、整腸作用、便秘促進、滋養強壮、コレステロールの代謝を促す、免疫力アップ効果、活性酸素の働きを抑え体の老化やがんを防ぐ、肌や皮膚を若々しく保つ、などがマスコミや一般書籍等で多数紹介されているが、納豆の如何なる成分が効果を発揮するのか等の科学的分析報告はあまりなく、ナットウキナーゼ以外には科学的解析は殆どされていない³⁾。我々は、納豆抽出成分を生化学的に分離し、培養がん細胞、単純ヘルペス I 型ウイルス、および肺炎双球菌に対する影響を解析した。

1. 材料および方法

1-1. 材料

本研究で使用した納豆、納豆菌添加直前の煮豆、および納豆菌は、株式会社ヤマダフーズ（秋田県仙北郡美郷町）より入手した。テンペ菌、麹菌は、株式会社秋田今野商店（秋田県大仙市刈和野）より入手した。

1-2. 納豆抽出成分

納豆、または煮豆（100g）に 300 ml の 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) を加え、ポリトロンで全体

が均一に滑らかになるまでホモジナイズし、15,000 rpm, 15 min, 4℃で遠心分離した。上清を回収し、飽和硫酸アンモニウム濃度が 0-30% (分画 A), 30%-50% (分画 B), 50-75% (分画 C), および 75-95% (分画 D) で硫酸アンモニウム分画（硫酸分画）した。遠心分離後の沈殿部分を 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) で溶解し、同バッファーに一晩透析して、透析後に凍結乾燥を行い、サンプルとして回収した。

1-3. 培養がん細胞

細胞は、理化学研究所 バイオリソースセンター 細胞材料開発室より入手した。本研究では 60 mm dish を用い、がん細胞由来のヒト子宮頸部がん細胞 (HeLa 細胞)、マウス神経芽細胞 (Neuro 2A 細胞)、ラット副腎褐色細胞腫細胞 (PC12 細胞)、ヒトバーキットリンパ腫・B リンパ球様細胞 (Raji 細胞)、およびヒト胎児腎臓細胞 (HEK293 細胞) の培養に、Dulbecco's Modified Eagle's Medium (SIGMA 社) にウシ胎児血清 (MBL 社) 10 (v/v) % と 0.2 (v/v) % ペニシリンストレプトマイシン添加培地を使用し、37℃, 5% CO₂ インキュベーターにて培養した。

納豆抽出物凍結乾燥品を、1 × PBS (Phosphate Buffered Saline) で 100 mg/ml の濃度で溶解し、0.2 μm の滅菌フィルター (Millipore 社) 濾過後、培地中に最終濃度が 1 mg/ml となるよう添加し、37℃で 24、または 48 時間培養した。

1-4. タンパク質量および培養細胞生存率

タンパク質の濃度測定は、BCA Protein Assay Kit (Thermo SCIENTIFIC 社) を用いて BCA 法により測定した。細胞生存率は、MTT 細胞増殖アッセイキット (コスモバイオ社) により測定した。

1-5. イムノブロット

HeLa 細胞に納豆抽出物添加し、24 および 48 時間後に HSP90、およびそのクライアントプロテインの Akt-1 および Raf-1 の発現挙動を確認するため、イムノブロット法を用いて定量した。抗 HSP90 抗体はウサギに免疫した血清を用いた。また、Akt-1 抗体: Akt-1 (B-1) Mouse monoclonal IgG (Santa Cruz 社), Raf-1 抗体:

Raf-1 (E-10) Mouse monoclonal IgG (Santa Cruz 社), および β -actin: Mouse Monoclonal (SIGMA 社) を使用し, Image J ソフトウェアにより, 定量した。

1-6. Butyl column chromatography

納豆抽出物分画 B を 10 mM Tris-HCl pH7.4 で溶解後, Butyl Sepharose High Performance (GE ヘルスケアサイエンス) に添加後, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4 バッファー中の硫安濃度 25 ~ 0% にて溶出後, 10 mM Tris-HCl pH 7.4 で透析し, 凍結乾燥した。凍結乾燥品は PBS 煮て溶解後, Raji 細胞に 1 mg/ml の濃度で添加し, 24 時間後に細胞生存率を確認した。また, Tris-Tricine SDS- ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い, ペプチドを解析した。

1-7. HPLC, アミノ酸配列

納豆抽出物抗がん作用ペプチドの HPLC による精製, およびアミノ酸配列の同定は, 既報に従った⁴⁻⁶⁾。

1-8. 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定試験

納豆抽出物分画 B の濃度が 2 倍希釈系列になるように作製した培地に, 肺炎早急貴菌を接種し, 接種後培養し, 菌が生えなかった一番低い濃度を MIC として判定した。

1-9. 抗ウイルス効果

納豆抽出物分画 B を, 濃度を変化させて活性を確認した。サンプル毎に単純ヘルペスウイルス I 型ウイルスに対する抗ウイルス活性のポテンシャルを測定・比較した。

2. 結果

2-1. 納豆抽出成分の HeLa 細胞に及ぼす影響

納豆抽出成分の各硫安分画を HeLa 細胞に投与し, 24 時間後の細胞生存率を測定した (Fig. 1A)。コントロールに比較し, 納豆抽出成分非分画, 分画 A, および分画 D 投与群では約 80% の細胞が生存した。分画 C 投与群では約 62% 生存率であり, 非分画, 分画 A, C, D では僅かな抗がん作用を呈した。一方, 分画 B 投与群での細胞生存率は約 18% 生存率と, がん細胞はほぼ死滅した。顕微鏡画像解析の結果,

納豆抽出成分投与前, 非分画での HeLa 細胞に顕著な変化は観察できなかった (Fig. 1B)。一方, 硫安分画 B 投与群では, 接着細胞である HeLa 細胞が死滅し, 球状に浮遊していた。納豆抽出成分硫安分画 B には, 強力な抗がん作用のあることが判明した。

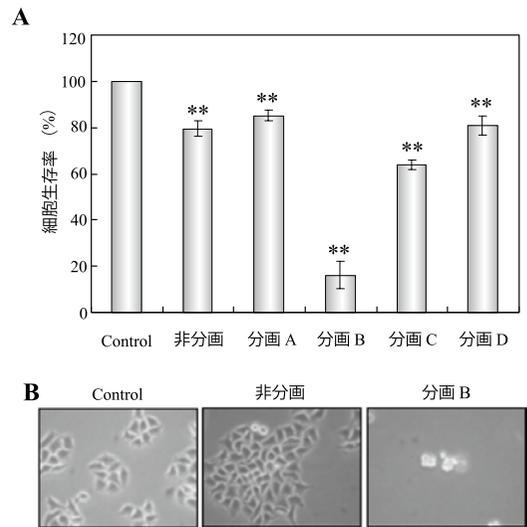


Fig. 1 納豆抽出液の HeLa 細胞生存率に及ぼす影響
A. 納豆抽出液, 納豆抽出液の硫安分画 A, B, C, および D を HeLa 細胞に添加し, 24 時間後の生存率。B, A の顕微鏡画像。

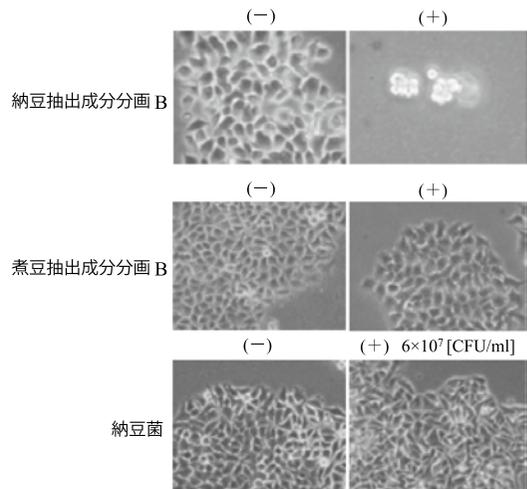


Fig. 2 納豆と煮豆抽出液硫安分画 B, および納豆菌の HeLa 細胞に及ぼす影響
HeLa 細胞に納豆と煮豆抽出液硫安分画 B, および納豆菌投与後, 24 時間後の顕微鏡画像。

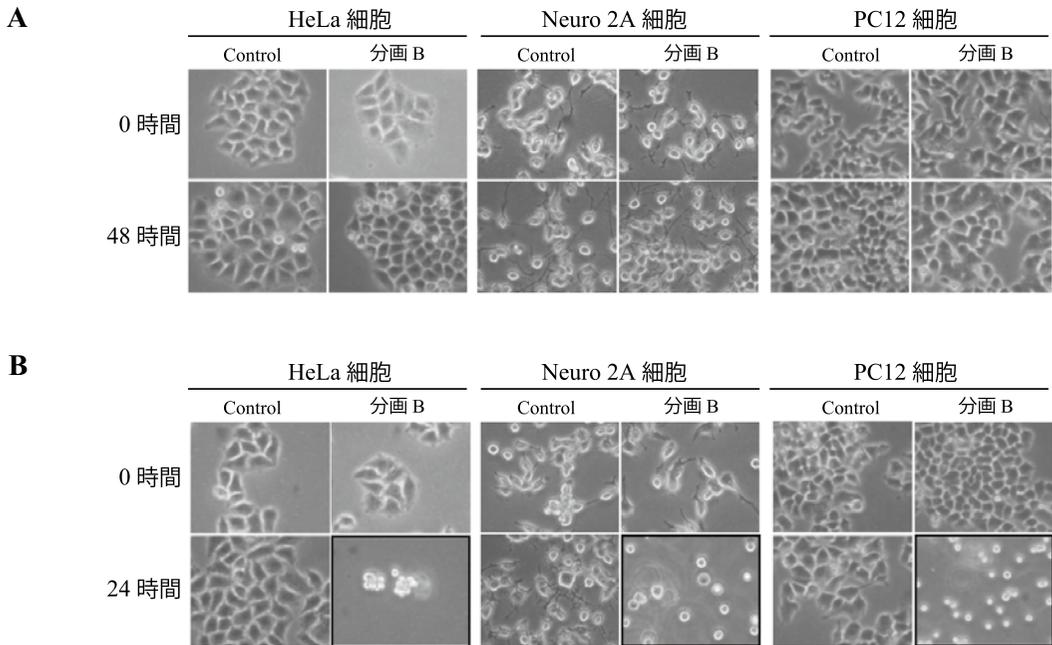


Fig. 3 納豆と煮豆抽出液硫安分画 B の各種培養がん細胞に及ぼす影響

細胞に納豆と煮豆抽出液硫安分画 B を、HeLa 細胞、Neuro 2A 細胞、および PC12 細胞に投与後、0, 1, 及び 2 日後の顕微鏡画像。A: 煮豆抽出成分添加, B: 納豆抽出成分添加。

2-2. 煮豆抽出成分、および納豆菌の HeLa 細胞に及ぼす影響

我々は納豆抽出成分分画 B に含まれる抗がん成分がイソフラボンならば、納豆以外の煮豆抽出成分や納豆菌でも抗がん作用が確認できるものと考え、納豆菌添加直前の煮豆抽出成分分画 B、および納豆菌を HeLa 細胞に投与し、24 時間後の顕微鏡画像を解析した (Fig. 2)。納豆抽出成分分画 B の結果と異なり、細胞増殖には全く変化が生じなかった。

2-3. 納豆硫安分画 B の他のがん細胞に及ぼす影響

我々は、HeLa 細胞以外の他の培養がん細胞を用いて納豆抽出成分分画 B の抗がん作用を解析した (Fig. 3)。マウス神経芽細胞腫細胞 (Neuro 2A 細胞)、ラット副腎褐色細胞腫細胞 (PC12 細胞) に煮豆抽出成分分画 B を投与した結果、投与後 48 時間の HeLa 細胞、Neuro 2A 細胞、および PC12 細胞では全く変化が確認できなかった (Fig. 3A)。一方、納豆抽出成分分画 B 投与後 24 時間の HeLa 細胞、Neuro

2A 細胞、および PC12 細胞では、枠で囲ったように、がん細胞の種類には無関係に全て細胞は死滅した (Fig. 3B)。この様に、納豆抽出成分分画 B は、HeLa 細胞以外の接着型培養がん細胞を死滅させることが確認できた。一方、

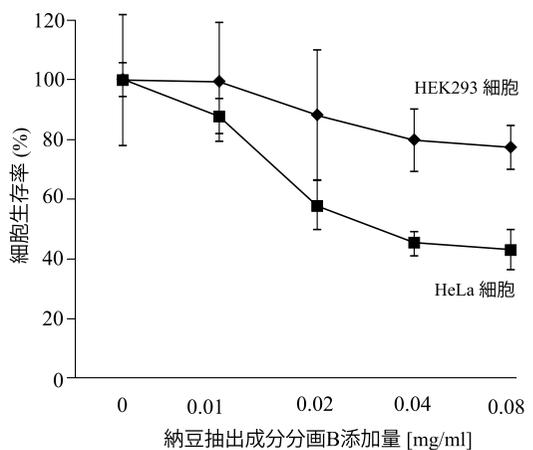


Fig. 4 納豆抽出液硫安分画 B の HEK293、および HeLa 細胞に及ぼす影響

納豆抽出液硫安分画 B を HEK293、および HeLa 細胞物添加後 24 時間後の生存率。

がん細胞とは由来が異なるヒト胎児腎臓細胞株 HEK293 細胞では、納豆抽出成分分画 B 投与 0.08 mg/ml 濃度において、HeLa 細胞の細胞生存率約 40% と比較し、約 80% であり、細胞生存率に優れた差を認めた (Fig. 4)。

2-4. 納豆硫安分画 B の細胞増殖シグナル経路と細胞生存シグナル経路に及ぼす影響

がん細胞では、Ras, MAPK の細胞増殖シグナル経路と、PI3K, AKT の細胞生存シグナ

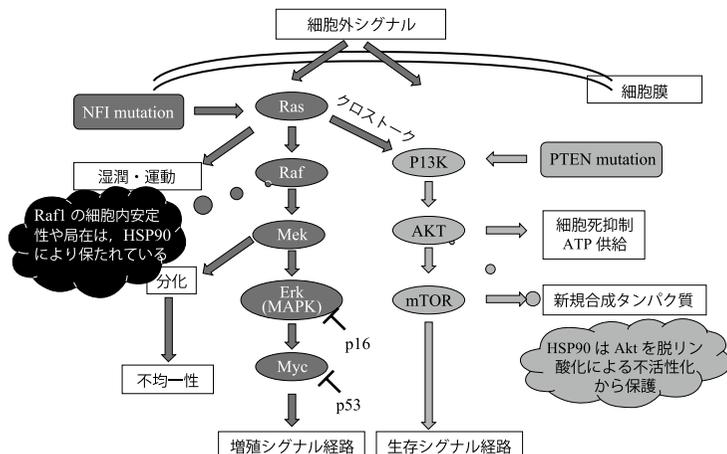


Fig. 5 がん細胞で活性化されている 2 つの経路

増殖シグナル経路と生存シグナル経路。分子シャペロン HSP90 は両経路において、重要な役割を果たす。

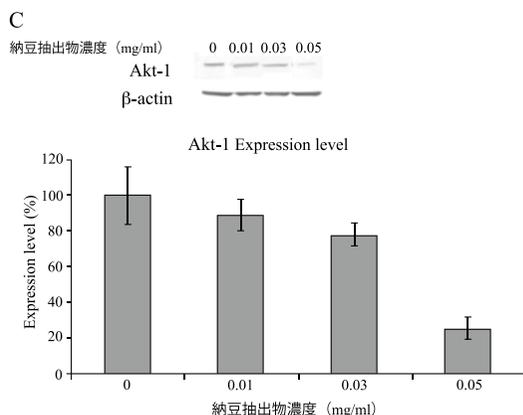
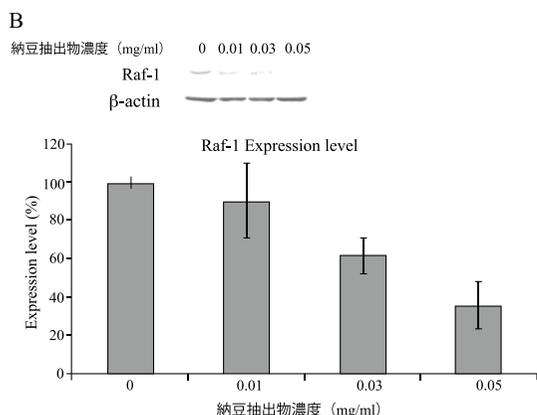
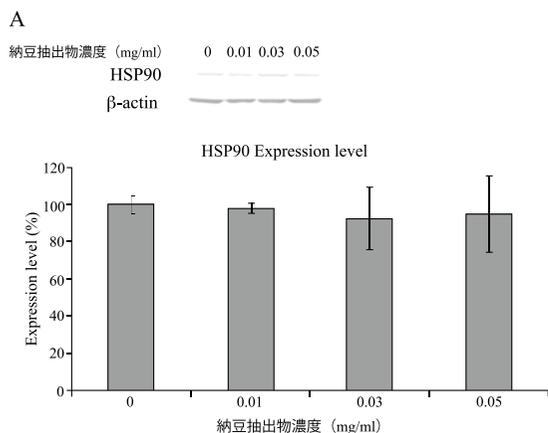


Fig. 6 納豆抽出液硫安分画 B 投与後 24 時間における HeLa 細胞の HSP90, Raf-1, 及び Akt-1 発現量の変動 HSP90 量 (A), Raf-1 (B), 及び Akt-1 発現量 (C). A-C の上段はイムノブロットにおける解析, 及び下段はイムノブロットを基にイメージ J にて定量した結果。

ル経路の、2 つの経路が活性化されている (Fig. 5)。どちらの経路においても、分子シャペロン HSP90 が生理機能発現を制御している。

納豆抽出成分を HeLa 細胞に添加し、24、または 48 時間後の HSP90, Raf-1, および Akt-1 の発現量をイムノブロット法にて解析し、定量した (Fig. 6)。HSP90 の発現量にはほとんど差が無く (Fig. 6A), HSP90 のクライアントタンパク質である Raf-1 (Fig. 6B) および Akt-1 (Fig. 6C) の発現量が減少する傾向を示した。この結果より、納豆硫安分画 B 成分は、分子

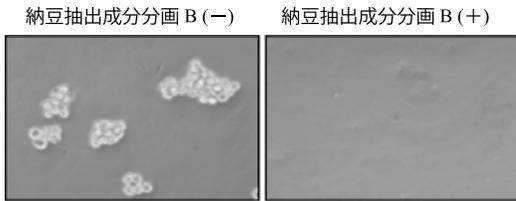


Fig. 7 納豆抽出液硫安分画 B の Raji 細胞に及ぼす影響

納豆抽出液硫安分画 B 投与後、24 時間の Raji 細胞の顕微鏡画像。

シャペロン HSP90 の N-ドメインの ATP 結合領域に選択的に結合するため、シャペロン活性が抑制され、結果としてクライアントタンパク質が不安定化し、がん細胞が死滅するものと予想した。

2-5. 納豆硫安分画 B の浮遊がん細胞に対する影響

これまで、HeLa 細胞等、接着型のがん細胞に対する納豆抽出成分分画 B の影響を解析したが、血液系のがんに対する影響も解析した。ヒトバーキットリンパ腫・B リンパ球様細胞 (Raji 細胞) は浮遊細胞であるが、納豆抽出成分分画 B 投与後 24 時間後には、全ての Raji 細胞が消滅した (Fig. 7)。納豆抽出成分分画 B 投与により、Raji 細胞の膜破壊により消滅したことが示唆された。以上の結果より、納豆抽出成分分画 B は、接着型、および浮遊型いずれのがんの種類とは無関係に強力な抗がん作用を示すことが確認できた。しかしこの結果は、我々が当初予想したがん細胞における細胞増殖シグナル経路と細胞生存シグナル経路のシグナルトランスダクション阻害では説明が出来ないことが判明した。

2-6. がん細胞増殖阻止因子の同定

納豆硫安分画 B を Butyl Sepharose カラムクロマトグラフィーを行い、分子量約 5,000 のペプチドを精製し、HeLa 細胞に投与した結果、がん細胞の死滅が確認され、分子量約 5,000 のペプチドががん細胞増殖阻止因子であることが示唆された (Fig. 8)。さらに詳細な解析を行うために、このペプチドを電気泳動のゲルから切

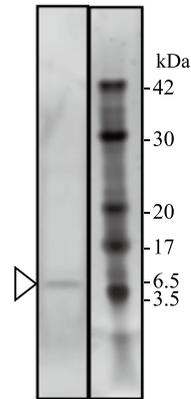


Fig. 8 納豆抽出液硫安分画 B がん細胞殺傷成分 納豆抽出液硫安分画 B の Butyl Sepharose column chromatography 分離のがん

り出して精製し、リシルエンドペプチダーゼ処理による酵素消化処理後、C18 逆相カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーでペプチドを分離精製し、ペプチドシーケンサーにてアミノ酸配列を同定した。その結果、AVKVLDTSGSQY のアミノ酸配列結果であった。データベース、および二次構造予測の結果、納豆抽出成分中の強力な抗がん作用を示す成分は、分子量約 5,000 の新規抗菌ペプチドであった^{6,7)}。

2-7. 納豆硫安分画 B のヘルペス I 型ウイルス、および肺炎双球菌に対する影響

これまで、納豆抽出成分のがん細胞に対する効果を中心に解析してきたが、ウイルスと細菌に対する影響を解析した。特許申請中のため、詳細は省くが、納豆硫安分画 B は、単純ヘルペス I 型ウイルスを死滅させた。同様に、納豆硫安分画 B を添加した肺炎双球菌は、全て死滅した。緑膿菌に対しても同一効果が確認できた。納豆抗菌ペプチドは、がん細胞、単純ヘルペス I 型ウイルス、および肺炎双球菌を死滅させる機能を有することが判明した。

3. 考察

アジア圏では豆腐や納豆などの大豆中心の食生活であるため、乳がんと前立腺がんの発症が少ないことが報告されている⁸⁾。中でもイソフラボンは、大豆や漢方薬に使われる葛根などの

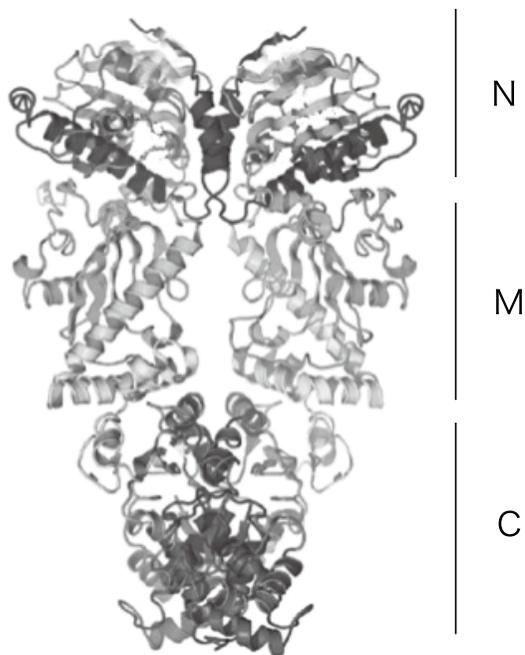


Fig. 9 ヒト HSP90 のドメイン構造

N, M および C ドメインからなり、分子量：約180kDa (2量体：90 kDa × 2)。細胞生育に必須とされるタンパク質の1つ。

N ドメインは ATP 結合ドメイン。C ドメインは、2量体形成化ドメイン。

マメ科の植物に多く含まれており、イソフラボンは、体内でつくられるエストロゲンと構造や働きが似ているためフィト・エストロゲン（植物エストロゲン）とも呼ばれている。

納豆抽出成分から、強力な抗がん作用を示す抗菌ペプチドを同定した。納豆以外に、納豆菌添加前の煮豆、インドネシアの納豆と呼ばれるテンペ、米麴、および納豆菌では、がん細胞の細胞増殖に影響を与えなかった。一方、がん細胞由来ではないヒト胎児腎臓 HEK293 細胞では、ヒト子宮頸部がん細胞 HeLa 細胞と比較し、優位に生存率が維持された。がん細胞で活性化されている2つの経路として、Raf-1 を介した細胞増殖シグナル経路と、Akt-1 を介した細胞生存シグナル経路がある^{9,10)}。

Raf-1 の細胞内安定性や局在は、分子シャペロン HSP90 により保たれており、HSP90 は Akt-1 を脱リン酸化による不活性化から保護

する¹¹⁾。分子シャペロン HSP90 は、N 末端の ATPase ドメイン、M ドメイン、二量体化形成の C ドメインから成り、新規合成タンパク質のフォールディング介助や、ステロイドホルモン受容体、変異体 p53 (mutant p53) タンパク質、乳がんに関係する HER2 タンパク質など数百種類以上の転写因子やリン酸化酵素(キナーゼ)の生理機能制御等、細胞にとって必須のタンパク質の一つである¹²⁻¹⁵⁾ (Fig. 9)。

当初、我々は納豆抽出成分分画 B による抗がん作用は、HSP90 N ドメインの ATP 結合サイトに納豆抽出成分分画 B が優先的に結合するために、ATP が結合できなくなると推定した。HSP90 のシャペロン活性が抑制されるため、Raf-1 を介した細胞増殖シグナル経路と、Akt-1 を介した生存シグナル細胞経路が阻害され、結果としてがん細胞を死滅させるものと予想した。そのため、細胞に濃度依存的に納豆抽出成分分画 B を添加して HSP90 の ATPase 活性を測定したところ、納豆抽出物分画 B は濃度依存的に HSP90 の ATPase 活性を抑制する傾向が見られた。さらに、HSP90 のクライアントタンパク質である Raf-1 および Akt-1 の発現量が減少する傾向を示した (Fig. 6)。

一方、HSP90 の発現量に大きな変化は認められなかった。以上の結果より、納豆抽出物分画 B は HSP90 の発現量に直接影響はせず、HSP90 の ATPase 活性に影響を及ぼし、HSP90 の ATPase 活性を抑制することにより、通常は HSP90 と相互作用しているクライアントタンパク質を不安定化するために抗がん作用を発揮することが示唆された。この様に、納豆抽出成分分画 B は、HSP90 のクライアントタンパク質である Raf-1 および Akt-1 を不安定化し、間接的に細胞の生存、増殖シグナル経路を阻害することにより細胞毒性を示したものと考えた。ところが、浮遊細胞のヒトバーキットリンパ腫・B リンパ球様細胞 Raji 細胞は、納豆抽出物分画 B を投与した翌日には、膜破壊により細胞が消失した。そのため、上述した細胞増殖シグナル経路と細胞生存シグナル経路阻害説では説

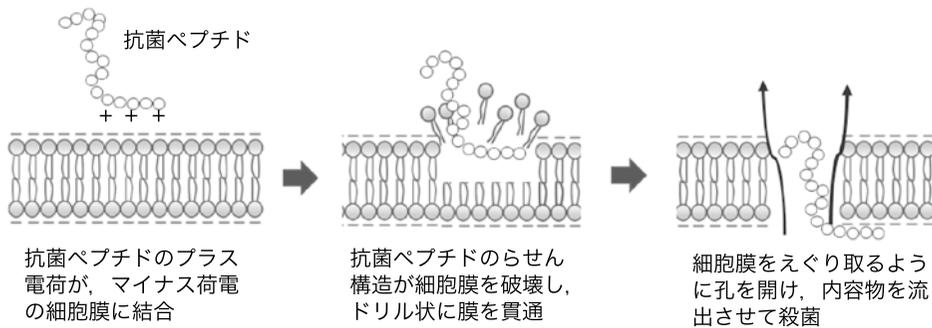


Fig. 10 抗菌ペプチドの作用機序

細菌の細胞膜はフォスファチジルグリセロールとカルジオリピンの様な、酸性リン脂質に富む。これらのリン脂質の頭部は非常に強く負に荷電している。

明が付かなくなった。

納豆抽出物分画 B をさらに分離し、抗がん作用を示す 5kDa ペプチドのペプチドシーケンスの結果、新規抗菌ペプチドであった。ペプチドの二次構造予測の解析の結果、 α -ヘリックスに富む両親媒性で、かつ数残基ごとに塩基性アミノ酸を含む構造であった。これは、 α -ヘリックスのある面に沿って親水性の残基が並び、反対側には疎水性の残基が並ぶという抗菌ペプチドと一致した。

生物が生来もっている生体防御機構として、植物、昆虫、哺乳類などに抗菌ペプチドが存在していることが知られている¹⁶⁾。これらは自然免疫に属し、感染初期に侵入する病原体を最初に認識してその排除を行い、獲得免疫系を活性化するものである。このうちヒトにおける抗菌ペプチドはディフェンシンと総称されている。他の抗菌ペプチドと同様にその抗菌活性は広範囲であり、また細菌以外に真菌やウイルスにも抗菌活性を持っている¹⁶⁾。ヒトは、好中球が主として産生する α -ディフェンシン(HNP)と上皮系の細胞が産生する β -ディフェンシン(HBD)という抗菌ペプチドを産生している¹⁷⁾。

細菌の細胞膜は、フォスファチジルグリセロールとカルジオリピンのような酸性リン脂質に富む (Fig. 10)。これらのリン脂質の頭部は非常に強く負に荷電している。抗菌ペプチドの

作用機序として、① 抗菌ペプチドのプラス電荷が、マイナス荷電の細胞膜に結合、② α -ヘリックス構造が膜を貫通、③ 細菌の細胞膜をえぐり取るように孔を開け、内容物の流出により殺菌するものと考えられている^{18, 19)}。

それでは納豆抽出物分画 B 5kDa ペプチドは、なぜがん細胞を殺傷したのかに関しては、多くのがん細胞表面は正常細胞と比較し、フォスファチジルセリンやムチンなどの陰性荷電分子が高発現するため、正常細胞の膜と比較して、強く負に荷電している。抗菌ペプチドによってがん細胞膜破壊が誘導され、Raji 細胞が消滅したのはこのためと考えられる。一方、同一濃度の納豆抽出物分画 B 5kDa ペプチド投与細胞において、HeLa 細胞と比較し、HEK293 細胞での高生存率が維持されたのは、細胞膜表面荷電の相違が考えられる。

納豆には、強力な抗がん作用を呈する新規抗菌ペプチドが含まれている。さらにこの抗菌ペプチドは、一部のウイルス、一部の細菌も死滅させる機能を有する。

謝辞

本研究は、札幌医科大学医学部微生物学講座の横田伸一教授との共同研究の結果であり、ここに深謝致します。

また、本研究内容は、2014年10月に韓国全州市の Chonbuk National University で

開催された2014 International Conference on Fermentation において、招待講演として発表を行った。Chonbuk National University の Professor Yong-Seob Jeong, Professor Yong-

Suk Kim, 及び Professor Soon Il Kim はじめ、Conference 組織委員会の各位には大変お世話になり、ここに深謝致します。

参考文献

1. 辻啓介：紅麴の血圧調節作。日本醸造協会誌，**89**, 207-211, 1994.
2. 遠藤 明仁, Dicks Leon M.T.: Lactobacillus 属乳酸菌の分類と非典型的な特徴。日本乳酸菌学会誌，**19**, 152-159 (2008)
3. 須見 洋行：納豆の歴史と機能成分。日本味と匂学会誌，**14**, 129-136, 2007.
4. Itoh H, Komatsuda A, Wakui H, Miura AB, Tashima Y.: Mammalian 60-kDa stress protein (chaperonin homolog). Identification, biochemical properties, and localization. *J Biol Chem.* **270**, 13429-35, 1995.
5. Miyazaki T, Sagawa R, Honma T, Noguchi S, Harada T, Komatsuda A, Ohtani H, Wakui H, Sawada K, Otaka M, Watanabe S, Jikei M, Ogawa N, Hamada F, Itoh H.: 73-kDa molecular chaperone HSP73 is a direct target of antibiotic gentamicin. *J Biol Chem.* **279**, 17295-300, 2004.
6. 伊藤英晃, 宮崎敏夫：特許第 5572856 号。
7. 伊藤英晃, 涌井秀樹, 宮崎敏夫：特開 2012-41316, 2012.
8. Messina M, Nagata C, Wu AH.: Estimated Asian adult soy protein and isoflavone intakes. *Nutr Cancer.* **55**, 1-12, 2006.
9. Roberts, P. J. Der, C. J.: Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene*, **26**, 3291-310, 2007.
10. Vivanco, I. Sawyers, C. L.: The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nature Rev. Cancer.* **2**, 489-501, 2002.
11. Vali S, Pallavi R, Kapoor S, Tatu U.: Virtual prototyping study shows increased ATPase activity of Hsp90 to be the key determinant of cancer phenotype. *Syst Synth Biol.* **4**, 25-33, 2010.
12. Itoh H, Tashima Y.: The stress (heat shock) proteins. *Int J Biochem.* **23**, 1185-91, 1991.
13. 伊藤英晃：哺乳類分子シャペロンの作用機構。生化学，**77**, 1137-1151, 2005.
14. Tsuji N, Fukuda K, Nagata Y, Okada H, Haga, Hatakeyama S, Yoshida S, Okamoto T, Hosaka M, Sekine K, Ohtaka Kei, Yamamoto S, Otaka M, Grave E, Itoh H.: AhR activation mechanisms by molecular chaperone HSP90. *FEBS Open Bio* **4**, 796-803, 2014.
15. Alvira S, Cuéllar J, Röhl A, Yamamoto S, Itoh H, Alfonso CB, Rivas G, Buchner J, Valpuesta JM.: Structural characterization of the substrate transfer mechanism in Hsp70/Hsp90 folding machinery mediated by Hop. *Nature Commun.* **5**:5484. doi: 10.1038/ncomms6484. 2014.
16. Ganz T, Selsted ME, Lehrer RI: Defensins. *Eur J Haematol.* **44**: 1-8, 1990.
17. Lehrer RI, Lichtenstein AK, Ganz T: Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annu Rev Immunol* **11**: 105-128, 1993.
18. 松崎勝巳：抗菌性ペプチドによる先天性免疫機構。蛋白質核酸酵素，**46**, 2060-2065, 2001.
19. Zhang LJ, Guerrero-Juarez CF, Hata T1, Bapat SP, Ramos R, Plikus MV, Gallo RL.: Innate immunity. Dermal adipocytes protect against invasive Staphylococcus aureus skin infection. *Science* **347**: 67-71, 2015.

環境有害因子に対する吸引型プロポリスおよびヒノキオイルによる健康維持効果に関する研究

具 然和*

* 純真学園大学 放射線技術科学科

Key Words : TNF- α · リンパ球 · 免疫作用 · IFN- γ · 併用効果

要 旨

現在国民の寿命が伸び、産業の発展に伴い便利さが追求されている。しかし、その反面公害が発生し、病気の種類も増加しているため人体に及ぼす影響は無視できず、自然と調和のとれた住宅環境を設定できるかどうか重要である。そこで、免疫効果に関係する血球細胞に着目することで、天然素材（プロポリスおよびヒノキオイル）の人体に対する影響について検討を行った。

本研究では雄のICRマウスを用いて、コントロール群、水吸引群（以下 sham control 群）、プロポリス吸引群、ヒノキオイル吸引群、プロポリス＋ヒノキオイル併用吸引群に分け、血球細胞（白血球、赤血球、血小板、リンパ球、単球、顆粒球）に対する天然素材（プロポリスおよびヒノキオイル）の健康維持効果（免疫効果）について検討した。全体的な白血球数については、sham control 群とプロポリス＋ヒノキオイル併用吸引群を比較すると、吸引7日後において白血球数の増加が見られた。また、単独吸引においても白血球数の増加が見られた。リンパ球数については、sham control 群とプロポリス＋ヒノキオイル併用吸引群を比較すると、吸引7日後から吸引15日後において血球数の変化が見られた。単球数については、sham control 群とプロポリス＋ヒノキオイル併用吸引群を比較すると、吸引7日後において単球数の増加が見られた。顆粒球数については、sham control 群とプロポリス＋ヒノキオイル併用吸引群を比較すると、吸引3日後において顆粒球数の増加が見られた。赤血球数においては、各群とも顕著な変化は見られなかった。血小板数においては、各群とも顕著な変化は見られなかった。活性酸素については、sham control 群とプロポリス＋ヒノキオイル吸引群を比較すると、プロポリス＋ヒノキオイル併用吸引群において活性酸素の割合の減少が見られた。従って、本研究では、sham control 群とプロポリス＋ヒノキオイル併用吸引群を併用吸引させることにより、血球細胞に対する免疫効果が見られた。また、sham control 群とプロポリス＋ヒノキオイル併用吸引群を併用吸引させることにより、好酸化作用があることが見られた。しかし、単独吸引では、免疫効果、抗酸化作用は見られなかった。

1. 序論

プロポリスとは、ギリシャ語で「巣を防衛する」という意味であり、ユーカリなどの樹木の皮や木の芽などからとれる樹脂（ヤニ）とミツバチ自身から出る蜂ロウや唾液などの分泌物を混ぜ合わせて作られた物質である¹⁾。プロポリスの成分としては、アルコール類、有機酸類、アルデヒド類、フラボン類、フラバノン類、ス

チルベン類、ヒェノール類、ミネラル類、ビタミン類などがある。中でもフラボン、フラバノンなどのフラバノイド類が注目されており、病気への抵抗力、つまり免疫作用を高め、体を丈夫にする働きがあるとされている。このプロポリスの人体に及ぼす健康効果には、免疫作用、抗酸化作用（酸化防止作用）、抗菌作用、鎮痛・麻酔作用があると考えられている²⁻⁴⁾。ま

た、ヒノキやユーカリなどの菩提樹はアロマセラピーに用いられているが、樹脂から作られるプロポリスはアロマセラピーと同様な作用があるのではないかと考えられている。一方、土壌に対する適応力と乾燥地でも耐える力が強い檜は、福島県以南から屋久島まで分布しており、常緑高木で樹高は30メートル～40メートルに達する。檜も杉と同様に拡大造林され、造林産地としては、尾鷲、天竜川、吉野、東濃などが有名である。

木肌は、美しく緻密で、独特の香気を放ちます。檜の放つ芳香は、ヤニ分に含まれるテルペンによるもので、ツェドロール、フソイドツェドール、セスキテルペン、フィトンチッド、ヒノキチオールなどの成分で構成されている。中でもヒノキ科の木材に含まれているヒノキチオールは、抗菌・防虫・防カビなどの優れた働きが知られている成分で、同じヒノキ科の、青森ヒバには、特に多く含まれている³⁾。

また、森の中に入ると気持ちよくなり、さわやか感を味わう事ができるのは、フィトンチッドの影響が考えられている。多くの樹木には、このフィトンチッドが多く含まれているが、特に檜には多く含まれ、他の成分の α ピネン、ボルネオール、ヒノキチオールとあいまって、自律神経の安定や、血圧を安定させたり、ストレスを緩和させたりする⁵⁾。その他の効果として、防臭効果、病原菌や細菌を寄せ付けない殺菌効果、カビや雑菌の繁殖を防ぐ防腐効果、芳香性の物質として精神安定、アロマセラピーに使用され、その効果が注目されている。本研究では、これらのプロポリスおよびヒノキオイルの免疫作用を利用して、環境因子に対する健康維持効果の研究を行った。

2. 研究目的

現在、国民の平均寿命は75才を超えており、江戸時代の平均寿命40才と比較してみると国

民の平均寿命が著しく伸びていることが分かる。従って、長寿に伴い自然的に家で過ごす時間が長くなるだろう。また、産業の発展に付随して便利さが追求された結果、数えきれない公害が発生し、病気の種類は飛躍的に増加してきている。住環境も変化し、子供達も屋外で遊ぶことも少なく、例えば冷暖房設備の充実により、密閉された環境でテレビゲームやパソコンなどで遊ぶ生活様式に変化している。

この生活様式と患者さんとの直接的な関係は明らかではないが、数十年前より遥かに原因不明な免疫機能失調によるアレルギー性炎症疾患が増加していることは明らかである。これらの疾患の予防・軽減するかは重要な課題であり、いかに快適な住環境でこれらの問題を和らげ、自然と調和のとれた住環境を設定ができるかが重要な課題となる。そこで今回我々は、免疫活性化作用、抗酸化作用、抗炎症作用、抗菌作用といった生理作用があることが知られているプロポリスと、この頃注目されているアロマセラピーについて、免疫に関係する血球に着目して検討した。

本研究では、ICRマウスを用いてControl群、水吸引群（以下Sham control群）、プロポリス吸引群、ヒノキオイル吸引群、プロポリスおよびヒノキオイル併用吸引群における血液細胞を、吸引開始1日後、吸引3日後、吸引7日後、吸引15日後、吸引30日後に採血・測定し血球数（白血球数、リンパ球数、顆粒球数、赤血球数、血小板数、単球数）の経時的な変化について検討した。

3. 研究方法

実験動物

本研究で用いた実験動物は、ICRマウスである。5週齢の雄マウスを購入し、本研究の飼育条件に慣らすために1週間の予備飼育を行った。本研究で用いたマウスの数は、コントロール群雄10匹、水吸引群雄10匹、プロポリス吸引群雄10匹、ヒノキオイル吸引群雄10匹、プロポリスおよびヒノキオイル吸引群雄10匹を使用した。

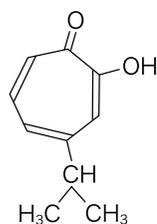


図1 ヒノキチオールの構造

飼育条件

水吸引群，プロポリス吸引群，ヒノキオイル吸引群雄，プロポリスおよびヒノキオイル吸引群の各群をケージの中で飼育を行った。餌，水の規制は行わず，自主的に摂取させた。

使用装置

自動血球測定器は，日本光電工業株式会社の型名 MEK-5216，電源入力 900VA を用いた。ケミルミネセンスリーダーは，Aloka 社 (MODEL TDC-772) を使用した。

プロポリスの抽出方法

源塊のプロポリス 200 g と蒸留水 2000 ml をフラスコの中に入れ，50℃で2時間攪拌した。攪拌後，10分間 3000 ppm で遠心分離にかけ，上澄み液を濾過し，プロポリスの溶液を得た⁶⁾。

採血方法

尾静脈採血を行うために，固定したマウスの尾静脈カスピツメスを用い，10 μl のマイク

ロピレットで採血を行い，自動血球測定器を用い白血球数，赤血球数，リンパ球数，血小板数，顆粒球数，単球数の測定を行った。また，経時の変化を観察するために，吸引開始1日後，3日後，7日後，15日後，30日後の採血を行い，同様の測定を行った。

心臓採血

麻酔下マウスの腹部を切開し，心臓より注射器を持ち採血を行った。得られた血液を10分，3000 ppm で遠心分離を行い血清と上澄みに分け，ケミルミネセンスリーダーを用い活性酸素の割合を測定した。なお，各グループにおいても同様の測定を行った。

活性酸素の測定方法

500倍希釈した血清に AAPH 試薬 200 μl を加え，37℃，2分間加温処理を行った。2分間経過後ルミノール試薬 200μl を添加し，化学発光パターンをケミルミネセンスリーダーにより測定した。

4. 研究結果

白血球数の測定

吸引開始1日後，3日後，7日後，15日後，30日後の白血球数を測定した結果の平均値および標準偏差を表1に示す。Sham control 群とプロポリス+ヒノキオイル吸引群を比較すると，吸引7日後において白血球数の増加が見られた。

リンパ球数の測定

吸引開始1日後，3日後，7日後，15日後，30日後のリンパ球数を測定した結果の平均値および標準偏差を表2に示す。Sham control 群とプロポリス+ヒノキオイル吸引群を比較すると，吸引7日後から吸引15日後において血球数の増加が見られた。

単球数の測定

吸引開始1日後，3日後，7日後，15日後，30日後の単球数を測定した結果の平均値および標準偏差を表3

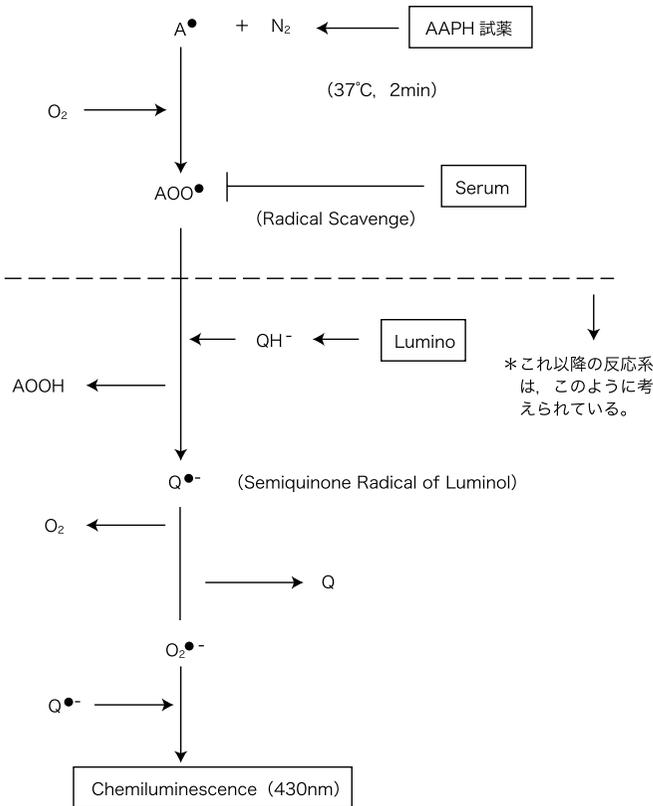


図2 血清によるケミルミネセンス抑制制御機構

表 1 The number of leukocytes treatment with each groups in mice. Show are the mean ($\times 10^2/\mu\text{l}$) and standard deviation (SD) .

Group	Time	1dp	3dp	7dp	15dp	30dp
Control	Average	159.5	159.9	150.3	149.4	205
	SD	49.93	40.06	45.31	47.41	54.30
Sham control	Average	115.1	111.8	80.44	100.8	160.4
	SD	51.97	46.50	32.16	31.49	32.89
Japanses rcypress oil	Average	117.5	168.2	163.7	167.8	182.5
	SD	36.25	60.82	38.80	31.66	36.72
Propolis	Average	120.6	138.2	147.1	118.6	197.5
	SD	24.69	36.23	52.39	27.92	55.47
Japanses rcypress oil +Propolis	Average	197.9	187.6	207.8	157.5	203.3
	SD	99.06	68.63	71.65	68.87	64.78

Significant difference ($p<0.05$) between control group and each sample group by *t*-test. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ (n=10), dp : days post

表 2 The number of lymphocytes treatment with each groups in mice. Show are the mean ($\times 10^2/\mu\text{l}$) and standard deviation (SD) .

Group	Time	1dp	3dp	7dp	15dp	30dp
Control	Average	88.7	90.7	84	88	144.9
	SD	27.77	30.98	30.06	23.51	33.51
Sham control	Average	67.7	66.5	68.1	69.8	114.6
	SD	31.34	19.60	43.72	29.15	28.47
Japanses rcypress oil	Average	82.52	89.5	106.1*	114.9*	117*
	SD	21.67	21.75	37.60	26.95	27.66
Propolis	Average	85.4	84.2	105.3*	80.6	134.6*
	SD	23.91	25.59	41.48	22.65	36.88
Japanses rcypress oil +Propolis	Average	130.8*	110.6*	139.1*	109*	130.6*
	SD	52.67	29.39	49.09	48.87	61.43

Significant difference ($p<0.05$) between control group and each sample group by *t*-test. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ (n=10), dp : days post

表 3 The number of monocytes treatment with each groups in mice. Show are the mean ($\times 10^2/\mu\text{l}$) and standard deviation (SD) .

Group	Time	1dp	3dp	7dp	15dp	30dp
Control	Average	37.6	34.1	33.2	34.8	37.2
	SD	18.73	9.56	11.23	15.93	9.00
Sham control	Average	31.6	28.4	16.6	22.3	26.9
	SD	23.97	13.75	4.77	7.85	5.11
Japanses rcypress oil	Average	26.23	35.3*	33.3*	31.8*	33.6*
	SD	11.87	12.92	7.86	8.66	7.82
Propolis	Average	26.5	34.1*	29.1*	25.6	36.2*
	SD	9.74	10.03	9.95	8.81	10.95
Japanses rcypress oil +Propolis	Average	37.6	39	42.2*	44.2*	45.4*
	SD	23.07	10.46	17.96	18.53	6.90

Significant difference ($p<0.05$) between control group and each sample group by *t*-test. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ (n=10), dp : days post

表 4 The number of granulocytes treatment with each groups in mice. Show are the mean ($\times 10^2/\mu\text{l}$) and standard deviation (SD) .

Group	Time	1dp	3dp	7dp	15dp	30dp
Control	Average	33.2	35.1	33.1	26.6	35
	SD	25.49	26.19	28.51	17.71	26.28
Sham control	Average	15.8	16.9	11.3	8.7	18.9
	SD	7.38	20.05	4.35	7.30	7.22
Japanses rcypress oil	Average	9.25	43.4	24.3	21.1	31.9
	SD	6.62	48.53	15.19	10.09	18.89
Propolis	Average	8.7	19.9	12.7	12.4	26.7
	SD	7.10	15.88	6.93	9.89	20.38
Japanses rcypress oil +Propolis	Average	29.5	38	26.5	14.3	37.3
	SD	28.29	56.93	13.29	11.72	20.73

Significant difference ($p<0.05$) between control group and each sample group by *t*-test. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ (n=10), dp : days post

表 5 The number of erythrocytes treatment with each groups in mice. Show are the mean ($\times 10^4/\mu\text{l}$) and standard deviation (SD) .

Group	Time	1dp	3dp	7dp	15dp	30dp
Control	Average	960.7	1019.2	1010	982.4	912.6
	SD	116.03	123.43	121.08	61.71	62.40
Sham control	Average	1178.1	1053.9	989	962.2	989.7
	SD	131.17	89.98	111.76	202.71	90.98
Japanses rcypress oil	Average	896.6	869.1	1007.2	1002.3	967.8
	SD	103.29	157.91	131.53	88.01	77.51
Propolis	Average	1036.2	955.9	961.5	948.1	1011.6
	SD	126.65	69.80	132.80	76.97	56.40
Japanses rcypress oil +Propolis	Average	967.6	930	1010.7	927.9	926.2
	SD	116.20	101.83	69.24	73.01	69.23

Significant difference ($p<0.05$) between control group and each sample group by *t*-test. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ (n=10), dp : days post

表 6 The number of granulocytes treatment with each groups in mice. Show are the mean ($\times 10^4/\mu\text{l}$) and standard deviation (SD) .

Group	Time	1dp	3dp	7dp	15dp	30dp
Control	Average	60.56	71.21	58.56	59.2	57.74
	SD	21.08	26.88	14.62	10.69	9.27
Sham control	Average	59.26	66.5	52.73	30.03	49.1
	SD	9.73	8.54	10.32	6.77	7.50
Japanses rcypress oil	Average	49.44	60.03	56.39	46.64	45.46
	SD	7.48	17.31	12.87	10.77	11.37
Propolis	Average	57	69.54	54.87	43.66	44.13
	SD	7.44	5.14	10.72	6.41	4.79
Japanses rcypress oil +Propolis	Average	51.38	70.1	58.31	45.37	49.03
	SD	8.18	12.94	9.19	7.86	13.82

Significant difference ($p<0.05$) between control group and each sample group by *t*-test. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ (n=10), dp : days post

表7 The value of oxidant ratio.

Groups	K count		Average	SD	Ratio
Control	0.091	0.075	0.0830	0.0080	1.00
Sham control	0.048	0.033	0.0405	0.0075	0.49
Japanese rcypress oil	0.046	0.045	0.0455	0.0005	0.55
Propolis	0.053	0.049	0.0510	0.0020	0.61
Combination	0.016	0.018	0.0170**	0.0010	0.20

Significant difference ($p < 0.05$) between control group and each sample group by *t*-test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ ($n = 10$), dp : days post

に示す。Sham control 群とプロポリス + ヒノキオイル吸引群を比較すると、吸引7日後において単球数の増加が見られた。

顆粒球数の測定

吸引開始1日後, 3日後, 7日後, 15日後, 30日後の顆粒球数を測定した結果の平均値および標準偏差を表4に示す。各群とも顕著な変化は見られなかった。

赤血球数の測定

吸引開始1日後, 3日後, 7日後, 15日後, 30日後の赤血球数を測定した結果の平均値および標準偏差を表5に示す。各群とも顕著な変化は見られなかった。

血小板数の測定

吸引開始1日後, 3日後, 7日後, 15日後, 30日後の血小板数を測定した結果の平均値および標準偏差を表6に示す。各群とも顕著な変化は見られなかった。

活性酸素の測定

各グループの活性酸素を測定した結果の測定値, 平均値, 標準偏差およびcontrol群の活性酸素の値を1とした時の値を表7に示す。Sham control群とプロポリス + ヒノキオイル吸引群を比較すると, 活性酸素の割合の減少が見られた。

5. 考察

白血球数の経時的変化において, sham control群とプロポリス + ヒノキオイル吸引群を比較すると, 吸引7日後において白血球数の増加が見られた。プロポリスには免疫作用の増強効果があり, 体内に侵入した細菌やウイルスを排除しようとする働きをもっている。こ

の免疫作用を担っている, マクロファージ (大食細胞), T細胞やB細胞の働きを補助したり, 抗体生産を補助したりするなどして結果免疫機能を強化したと考えられる⁷⁻⁸⁾。そして, プロポリスは独特な芳香を持っており, 約30種類ほどの成分があることが知られている。その中でも,

酢酸リナリル・安息香酸メチル・アセトフェノンなどは中枢神経に働いて精神のバランスを保つと考えられている⁵⁾。また, ヒノキオイルには独特な香りが含まれており, この芳香はツェドロール, フソイドツェドール, セスキテルペン, フィトンチッド, ヒノキチオールなどの成分で構成されている。特に, フィトンチッド, ヒノキチオールなどがあまって, ストレスの緩和, 自律神経の安定などの効果があるとされている。これらは, アロマセラピーとして知られている。白血球の中にはストレスにより活性の低下を受けるリンパ球が含まれており, アロマセラピー効果によりストレスの緩和により活性の低下を防ぐことができ, 血球数の増加が見られたのではないかと考えられる。従って, プロポリスおよびヒノキオイルには, 免疫増強作用があると考えられる。

リンパ球, 単球, 顆粒球数の経時的変化において, sham control群とプロポリス + ヒノキオイル併用吸引群を比較すると, 吸引7日後において単球数の増加が見られた。プロポリスには免疫作用の増強効果があり, 体内に侵入した細菌やウイルスを排除しようとする働きをもっている。この免疫作用を担っている, マクロファージ (大食細胞), T細胞やB細胞の働きを補助したり, 抗体生産を補助したりするなどして結果免疫機能を強化したと考えられる^{9, 10)}。マクロファージの活性により, 血球数が増加したと考えられる。従って, プロポリスには, 免疫増強作用があると考えられる。また, ヒノキオイルには抗菌作用があることが知られており, この作用によって生体を蝕む病原体に対する免疫が亢進した

ため血球数が増加したとも考えられる。

sham control 群とプロポリス+ヒノキオイル併用吸引群を比較すると、活性酸素の割合の減少が見られた。Yong Kun Park らは、水抽出プロポリスにはクレスチンなどのフラボノイド系物質を含有しておりラジカルスカベンジャー効果があると報告した¹¹⁾。従って、プロポリスには抗酸化作用（酸化防止作用）があり、プロポリスの中に含まれているフラボノイドによって活性酸素を消去したと考えられる²⁾。そして、プロポリスは独特な芳香を持っており、約30種類ほどの成分があることが知られている。その中でも、酢酸リナリル・安息香酸メチル・アセトフェノンなどは中枢神経に働いて精神のバランスを保つと考えられている¹⁾。また、ヒノキオイルには独特な香りが含まれており、この芳香はツェドロール、フソイドツェドール、セスキテルペン、フィトンチッド、ヒノキチオールなどの成分で構成されている。特に、フィトンチッド、ヒノキチオールなどがあいまって、ストレスの緩和、自律神経の安定などの効果が

あるとされている。これらは、アロマセラピーとして知られている。その他にも、アレルギーの原因ともなるダニなどの殺菌作用や防虫作用があることが知られている。これらヒノキオイルの独特な芳香により、ストレスの緩和を図り、ストレスによっても生じる活性酸素を抑制したと考えられる。従って、プロポリスおよびヒノキオイルには、抗酸化作用（酸化防止作用）があると考えられる⁵⁾。

今回の研究により、プロポリスおよびヒノキオイルの併用吸引により血球数の増加がみられ、少なからず免疫効果があることが明らかになった。これは少なからず、プロポリスとヒノキオイルの相乗効果によって免疫活性が促されたと考えられる。プロポリスおよびヒノキオイルは即効性のもではなく、ある程度の期間吸引することにより効果が現れる¹⁾。また、今回はヒノキオイルを用いて吸引を行ったが、ヒノキには檜の他にスギ、松などもあり、これらヒノキ以外の木材の香りを吸引させることにより血球の変化がどのように異なるかを検討して必要性があると考えられる。

参考文献

1. Un-Ho Jin, Tae-Wook Chung, Sung-Koo Kang, Seok-Jong Suh, June-Ki Kim, Kang-Hyun Chung, Yeun-Hwa Gu, Ikukatsu Suzuki, Cheorl-Ho Kima: Caffeic acid phenyl ester in propolis is a strong inhibitor of matrix metalloproteinase-9 and invasion inhibitor: Isolation and identification. *Clinica Chimica Acta*. **362**, 57-64, 2005.
2. Yasuyuki Takagi, In-Sook Choi, Takenori Yamashita, Takashi Nakamura, Ikukatsu Suzuki, Takeo Hasegawa, Masami Oshima and Yeun-Hwa Gu. Immune Activation and Radioprotection by Propolis. *Am. J. Chi. Med.*, **33**(2), 231-240, 2005.
3. BS Kang, YG Park, JY Cho, JK Kim, TH Lee, DW Kim, YH Gu, I Suzuki, YC Chang, CH Kim. Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor- Induce Collagenolysis and Bone Resorption by Regulation of Matrix Metalloproteinase-2 in Mouse Calvarial Bone Cells. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, **25**(3), 347-364, 2003.
4. Mishima S, Saito K, Maruyama H, Inoue M, Yamashita T, Ishida T, Gu Y. Antioxidant and immuno-enhancing effects of Echinacea purpurea. *Biol. Pharm. Bull.* **27**(7): 1004-1009, 2004.
5. B.P. トーキソ, 神山恵三: 植物の不思議な力; フィトンチッド, 講談社, 23-42, 1980.
6. Suzuki I, Hayashi I, Takaki T, Groveman DS, Fujimiya Y. Antitumor and anticytopenic effects of aqueous extracts of propolis in combination with chemotherapeutic agents. *Cancer Biother. Radiopharm.* **17**: 553-562, 2002.
7. Abbas, A.K., K.M. Murphy, A. Sher. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*. **383**: 787-793, 1996.
8. Mosmann, T.R., S. Sad. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol. Today*. **17**: 138-146, 1996.
9. Beuscher, N., C. Bodinet, D. Neumann-Haefelin, A. Marston, K. Hostettmann. Antiviral activity of African medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* **42**: 101-109, 1994.
10. Andreassen, C.N., C. Grau, J.C. Lindegaard. Chemical radioprotection: a critical review of amifostine as a cytoprotector in radiotherapy. *Semin. Radiat. Oncol.* **13**: 62-72, 2003.
11. Yang, K., E. Azoulay, L. Attalah, J.R. Zahar, A. Van De Louw, C. Cerf, C.J. Soussy, P. Duvaldestin, L. Brochard, C. Brun-Buisson, A. Harf, C. Delclaux. Bactericidal activity response of blood neutrophils from critically ill patients to *in vitro* granulocyte colony-stimulating factor stimulation. *Intensive. Care. Med.* **29**: 396-402, 2003.

生鮮食品の機能性表示対応のシステム作り —温州みかん・β-クリプトキサンチンを例として—

矢野 昌充 (YANO Masamichi) ¹

¹ 果樹試験研究推進協議会 *

Key Words : 温州みかん β-クリプトキサンチン 三ヶ日町 機能性表示食品

1. 機能性成分研究を農水産物の消費 拡大に役立てるために

過去 20 ~ 30 年に及ぶ機能性成分研究の高まりにより、我が国の農水産物に豊かな健康増進機能があることが明らかになった。DHA や EPA の青魚、カテキンの茶、リコペンのトマト、β-クリプトキサンチンの温州みかん、プロシアニジンのリンゴ、イソフラボンの大豆製品など枚挙にいとまがない。これらの健康増進機能を国民が熟知することにより、消費が大幅に増えれば、国民の健康増進の観点から喜ばしいが、健康増進機能が明らかになったおかげでその農水産物消費が飛躍的に伸びたとの話は聞かれない。農水産物の販売現場で、機能性表示が行われないためかもしれない。

ここに来て、状況が変わった。安倍内閣の規制改革推進会議が新たな機能性表示食品制度を提言し、2015 年 4 月に実現したからである。提言では、健康を維持して長生きしたいという国民のニーズに応え、併せて世界に先駆け「健康長寿社会」を実現するため機能性表示を現状の特定保健用食品・栄養機能食品から農水産物を含む一般食品にまで拡大するとしている。機能性表示食品として消費者庁に届出し、受理・登録されれば農水産物であっても販売現場での

機能性表示が可能になった。とは言っても、農水産物が対象となる「生鮮食品」タイプの機能性表示食品では、他のタイプ「サプリメント」や「加工食品」とは異なり、事業者は機能性表示に取り組んだ経験は乏しく関心もそれほど高くはないので消費者庁への届出のハードルは高そうである（実際、2015 年度末までに消費者庁に受理された 300 余りの商品の中に「生鮮食品」はわずか 2 商品しかない）。農水産物の機能性表示商品を一朝一夕に増やすのは難しそうである。

温州みかんでは温州みかんの代表的カロテノイドである β-クリプトキサンチンの機能性研究が盛んに行われてきた。そして健康増進効果の十分なエビデンスが蓄積した時期が機能性表示食品制度の新設・施行の時期とぴたりと重なった。そこで、生産者団体・行政・研究機関の関係者が協力しあい、温州みかん・β-クリプトキサンチンで機能性表示食品を創成する試みが行われ、「生鮮食品」タイプの機能性表示食品としての第 1 号を誕生させた。本項では、その間の経緯を紹介し、他の農水産物での取り組みの参考に供したい。

2. みかん産地での疫学研究（「三ヶ日町研究」）

機能性表示食品を創成するための最重要ポイントである「機能性の根拠」がどのように構築されたかを紹介する。

2-1. 研究開始の背景

四半世紀前、農林水産省果樹試験場興津支場（現在は国立研究開発法人農研機構果樹茶業研究部門カンキツ研究領域）でカンキツの健康増進機能の研究が始まった。カンキツは健康に良さそうなイメージはあるものの、具体的なエビデンスを欠いていたが、この研究でがん予防、生活習慣病予防などの成果が得られるにつれて、特に温州みかんとβ-クリプトキサンチンについて国民の健康への貢献に期待を抱かせることになった。

2003年農研機構果樹研究所（以下果樹研究所と表記）は、「温州みかんと健康」に関する研究をもう一步進め、みかん産地で栄養疫学調査（「三ヶ日町研究」）を浜松医科大学、静岡県

三ヶ日町（現在は浜松市北区）の協力によりスタートさせた。この研究では、みかん産地を調査地点とすることにより、温州みかンをほとんど食べない人から日に4個以上食べる人まで幅広い摂取量の被験者を容易にリクルートできた。また被験者の温州みかん摂取量を、聞き取りによる主観的方法によらず、β-クリプトキサンチン血中濃度をバイオマーカーとして使用して客観的評価を行うことで疫学研究としての精度を高めることに成功している。

2-2. 研究の主な成果

「三ヶ日町研究」の実施概要を図1に示し、主要な成果¹⁾を以下にまとめた。研究成果は2003年のベースライン時の調査結果による横断研究と2003年から2013年までの変化を観察した縦断研究に大別される。

【横断研究】血中β-クリプトキサンチン濃度（温州みかん摂取量）と各種疾病罹患率の関係

β-クリプトキサンチンの血中高濃度の被験者群は、低濃度群に比較し、骨粗しょう症、動

「三ヶ日町研究」

- 目的:国内有数のみかん産地住民を対象とした栄養疫学調査(三ヶ日町研究)を実施し、みかん摂取が糖尿病・肝疾患・動脈硬化・骨粗鬆症等の生活習慣病に及ぼす影響をみかん摂取のバイオマーカーを用いて縦断的に検討し、みかんの有用性をヒトレベルで明らかにする。

- **対象集団**

静岡県浜松市三ヶ日町の住民健診受診者で同意の得られた1073名(30～70才)

- **三ヶ日町研究の全体計画**

- 2003 ベースライン調査(コホート1) 886人
- 2004 フォローアップ調査
- 2005 ベースライン調査(コホート2) 701人
- 2006 コホート1 拡大追跡調査
- 2007 フォローアップ調査
- 2008 フォローアップ調査
- 2009 コホート1,2 拡大追跡調査
- 2010 縦断解析開始
- 2013 10年後追跡調査



- コホート1
糖尿病, 動脈硬化, 肝疾患調査
- コホート2
骨密度調査
- コホート1, 2
メタボリックシンドローム調査

図1 「三ヶ日町研究」の実施要領
(本研究の中心になって担当した果樹研究所杉浦実上席研究員作成資料)

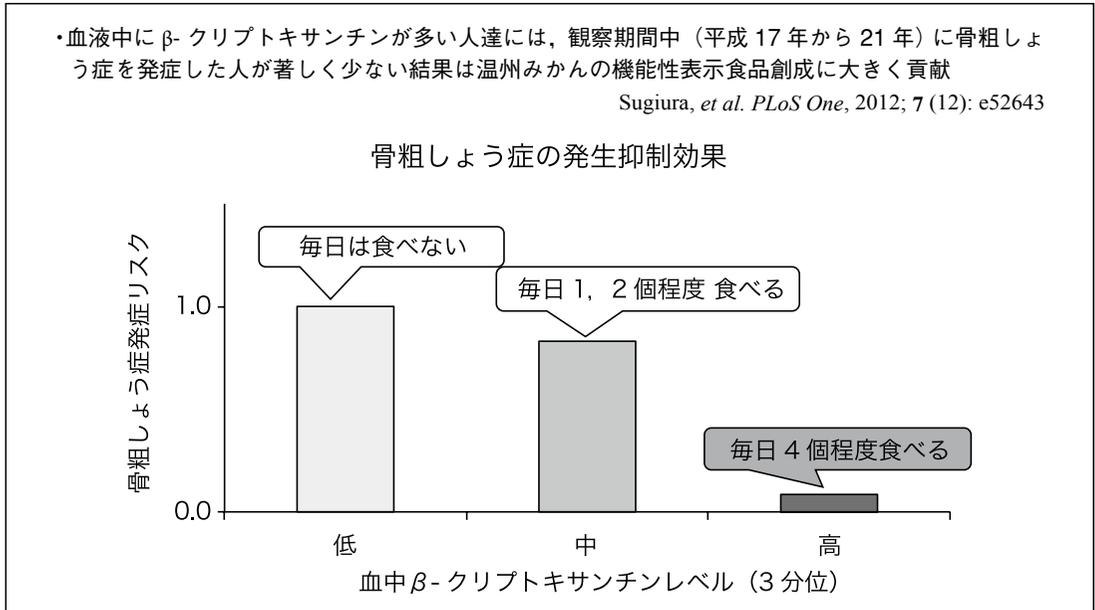


図2 栄養疫学研究「三ヶ日町研究」に見るβ-クリプトキサンチン（温州みかん摂取）の健康増進機能の一例（骨粗しょう症発症リスクの軽減）

脈硬化、メタボリックシンドローム、インスリン抵抗性である被験者が少なく、高血糖あるいは飲酒量の多い被験者でも肝臓機能障害の程度が比較的軽い傾向にあった。

【縦断研究】血中β-クリプトキサンチン濃度（温州みかん摂取量）と10年間（骨粗しょう症は4年）の観察から明らかになった各種疾病発症リスクとの関係

血中β-クリプトキサンチン高濃度者は観察期間中の骨粗しょう症（92%）（図2）、脂質代謝異常（33%）、肝機能異常（高血中ALT）（44%）、2型糖尿病（57%）、動脈硬化（45%）の発症リスクが低いことを認めた（括弧内の数値は、血中β-クリプトキサンチン値で被験者を3段階に群分けし、最高位群の最低位群に対する発症リスク低下を%で表示したもの）。

2-3. 評価

1) 西欧を中心に論文発表を進め、他の論文に引用される例も増加

「三ヶ日町研究」の成果発表は直近の発表²⁾で14報に達したほか、本研究に触発されて行われた研究³⁻⁵⁾も多く、β-クリプトキサンチ

ンの作用機序の解明に役立っている。学術分野でのβ-クリプトキサンチンの効能への理解は確実に進んでいる。

2) 日本人対象の研究であること

機能性表示食品で使用する機能性の根拠は日本人対象に認められたものでなければならないが、「三ヶ日町研究」は当然のことながら日本人対象の研究であるという意義を持つ。

3) 国民の一部にある誤った果物観を正すことができる

我が国には「果物は糖分が多く、糖尿病など病気の原因になっているのではないか」という懸念を持つ人が多いという我が国特有な果物観⁶⁾がある。温州みかんが機能性表示食品として普及した暁には、この果物観の誤りを是正するのに役立つ。

3. 農水産物商品を機能性表示食品として届け出るための要件

消費者庁が指示する機能性表示食品届出のガイドラインから、農水産物（生鮮食品）に重要と思われる項目を抽出し、温州みかん・β-ク

リプトキサンチンに関連した情報を紹介する。

- ①機能性関与成分が明らかで定量できること
(標準化された分析法)
関与成分であるβ-クリプトキサンチンの分析には液体クロマト法が普及しており、食品・血液試料の依頼分析を引き受ける分析機関も存在する。
- ②作用機序が*in vitro* 試験及び*in vivo* 試験、または臨床試験により考察されていること
カロテノイドとしての特性である抗酸化能のほか、炎症・免疫応答遺伝子群の発現抑制の面からも研究が進んでいる。
- ③最終製品を用いた臨床試験か、最終製品か機能性関与成分に関する研究レビュー(臨床試験 or 観察研究)で機能性の根拠が説明できること
「骨の健康」に関する研究レビュー結果が公開されている(4.⑥参照)。
- ④機能性は、健康の維持・増進に資するものであること
関与成分は骨粗しょう症、脂質代謝異常、肝機能異常、2型糖尿病、動脈硬化などを発症しにくくするデータが得られている(上述)。
- ⑤十分な食経験があるか安全性試験が実施されており安全性が担保されていること
温州みかんは明治時代には既に国民的果物になっており、100年以上の食経験があるが問題は発生していない。食べ過ぎで皮膚が黄色く見える(柑皮症)ことがあるが、他の疾患は伴わないことが明らかになっている。
- ⑥発売日の60日前までに消費者庁に届け出て容器包装に表示できるもの
段ボールで出荷され、販売箇所まで再包装される際に使用するリパック袋に必要事項を印刷し、販売事業者配布することを、事業者は消費者庁へ届出している。
- ⑦1日摂取目安量が通常食べられる分量であること(塩分、糖分、飽和脂肪酸、コレステロールを過剰摂取させる食品は不可)
1日300gの温州みかんでβ-クリプトキサン

チンの摂取目安量3mg/日を保証でき、一方で塩分、糖分、飽和脂肪酸、コレステロールを過剰摂取することにはならない。

- ⑧関与成分の含有量を担保できること
(4.の⑤で紹介)

4. 生鮮食品を対象とする機能性表示食品事業への協力支援体制作り

生鮮食品タイプの機能性表示食品を目指す事業者の場合、本務は機能性表示商品の開発とはかなり距離があり、独自に機能性表示食品を目指そうとすると困難を極める。幸いなことに温州みかんの場合、事業者は機能性表示食品に関わる有益な情報、届出ノウハウを持つ研究機関、生産者団体、国県レベルの行政部局など果物関係者と日常的に連携協力関係を持っており、その活用が機能性表示食品の届出に結び付いた。ここでは連携協力関係の具体的内容を時系列的に紹介する。

- ①果樹研究所を中心に「みかんと健康」について研究が行われ、温州みかんの健康維持増進機能が解明され、内外の学術誌に公表されている(上述)ほか、果物関係者にも積極的に情報提供されている。
- ②機能性表示食品制度新設に関する詳細情報が行政部局から果物関係者にもたらされた。
- ③果樹試験研究推進協議会により生産者団体向けに「温州みかんを機能性表示食品にする」意義について、啓発活動(執筆や講演会活動)が行われた。
- ④果樹試験研究推進協議会は生産者団体・果樹研究所等と協力し、広範囲から果物関係者を集めてシンポジウムを開催し、果物で機能性表示食品を創成することで意思統一を図った(図3、図4)。
- ⑤現在、農林水産省農林水産技術会議事務局により、農水産物対象に機能性表示食品の構築に役立つための技術情報収集プロジェクトが企画推進されている。その成果の中で「生鮮食品」タイプの機能性表示食品を創る際の最大の難関である関与成分含有量

主催：果樹試験研究推進協議会・柑橘消費拡大協議会・果樹研究所

後援：農林水産省・日本果汁協会・日本果樹種苗協会

開催日：大阪会場（2014年10月23日）、東京会場（同10月30日）

＝ 参加者概要：所属からの推定 ＝

- ・生産関係：97名
- ・研究・行政：65名
- ・果物流通・販売：90
- ・食品・報道・学生その他：180名
- ・2会場合計：432名



東京会場風景

図3 温州みかんの「機能性表示食品」化に向けて果物関係者の意思統一

温州みかんの「機能性表示食品」 報道機関・消費者団体・学識経験者へアピール

主催：果樹試験研究推進協議会

開催場所・日時：東京 ホテルゆうぼうと（2015年6月5日）

シンポジウム—果物で機能性表示食品をどのように創り、育てる？

- 講演3課題：研究分野・報道機関・果樹試験研究推進協議会事務局
- パネルディスカッション：果物関係者の要望・課題・提案、オブザーバーからのアドバイス
 - ・栄養と食事分野：中村丁次（日本栄養士会 前会長）
 - ・機能性食素材分野：横田光正（医食農連携プラットフォーム副会長）
 - ・消費者団体から：森田満樹（一般社団法人「Food Communication Compass」消費生活コンサルタント）
 - ・食品流通業から：市原卓弥（株式会社シジシージャパン 生鮮事業部 主事）

図4 温州みかんの「機能性表示食品」化に向けて各界からの情報入手と決意表明

を担保する幾つかの工夫が明らかにされた（温州みかん関連の事例：非破壊選果機による全果調査で糖度10度以上と判定された温州みかんはβ-クリプトキサンチン1mg/100g以上を保証できるとしている）。

- ⑥農林水産省農林水産技術会議事務局が機能性表示食品の届出に使用できる研究レビューを民間機関に委託し、結果が公表された。その中に温州みかんの「骨の健康維持増進」

があり、温州みかんの機能性表示の届け出にヘルスクレームとして活用できることになった⁷⁾。

- ⑦静岡県内温州みかん関連のJA関係者・静岡県の関連部局は、果樹研究所や農林水産省から情報収集しつつ、機能性表示食品の届出準備を開始した。
- ⑧JAみっかびが先頭を切って消費者庁に届出、更にその届出情報を基に県内の他JAも届出

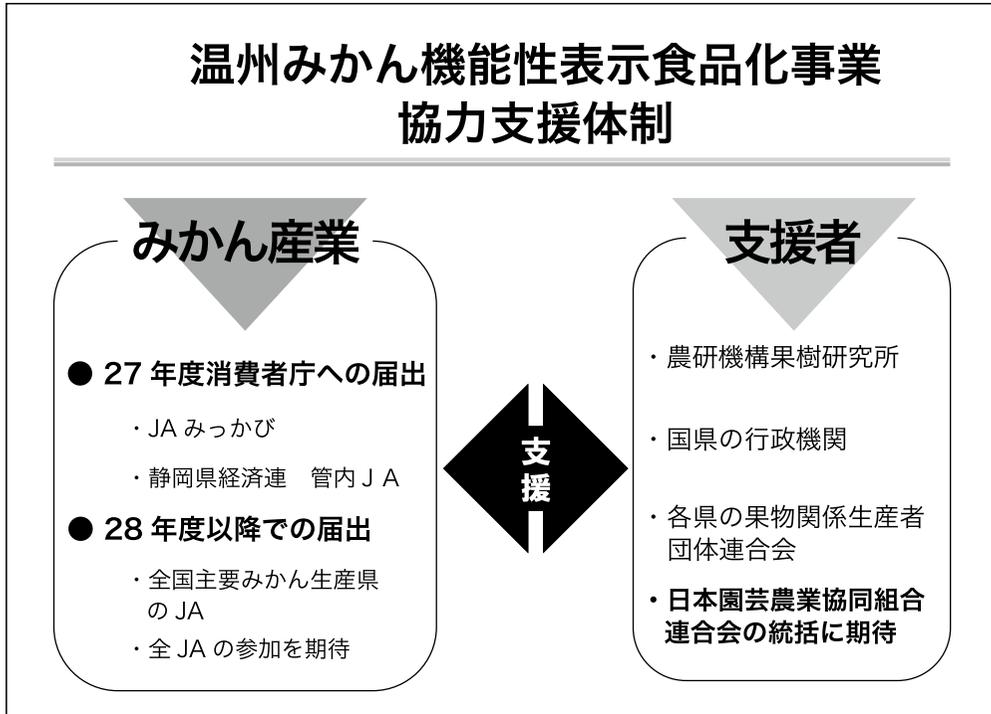


図5 温州みかんでの機能性表示食品事業での協力・支援関係

準備を開始した。

- ⑨全国柑橘消費拡大協議会は各県生産者団体・JAの機能性表示届出希望者を招集し情報提供のための打ち合わせ会を開催した。
- ⑩JAみっかびの届出が受理・登録された（受理番号：A79）。続いて静岡県内のJA5団体が届出を行った。
- ⑪静岡県経済農業協同組合連合会は果物流通業界関係者を集め、「機能性表示温州みかん」の販売に協力要請を行った。
- ⑫機能性表示温州みかんの届出、販売体制について、全国柑橘消費拡大協議会や果樹研究所関係者の努力下、先発の静岡県内関係事業者から後発の各県の生産者団体へ技術移転するシステムが出来上がりつつある。
- ⑬全国柑橘消費拡大協議会は「三ヶ日町研究」などの成果を基に「肝臓の健康」について

研究レビューを発注し、「骨の健康」に続くヘルスクレームの準備を進めている。

おわりに

以上の取り組みにより、温州みかんの機能性表示食品としての販売が可能になった。消費者庁へ届出をした事業者はみかん産地のJAであるが、関連組織・機関が一体となった取り組み（図5）があったからこそ、届出・登録が可能になったことに注目願いたい。

他の農水産物に温州みかんで成功したのと同様なシステムが簡単に作れるかは分からないが、温州みかんの事例を十分検討いただき、「生鮮食品」タイプの機能性表示食品をより多く創り出すことで、機能性に富む様々な農水産物の消費拡大と国民の健康増進に結び付けたいものである。

参考文献

1. Sugiura M, β-Cryptoxanthin and the risk for lifestyle-related disease: findings from recent nutritional epidemiologic studies. *Yakugaku Zasshi*. 2015; **135** (1), 67-76.
2. Nakamura M, Sugiura M, Ogawa K, *et al*, Serum β-cryptoxanthin and β-carotene derived from Satsuma mandarin and brachial-ankle pulse wave velocity: The Mikkabi cohort study. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 2016 Apr 20.S0939-4753 (16), 30021-7.
3. Ni Y, Nagashimada M, Zhan L, *et al*, Prevention and reversal of lipotoxicity-induced hepatic insulin resistance and steatohepatitis in mice by an antioxidant carotenoid, β-cryptoxanthin. *Endocrinology*. 2015 Mar;**156** (3), 987-99.
4. Kobori M, Ni Y, Takahashi Y *et al*, β-Cryptoxanthin alleviates diet-induced nonalcoholic steatohepatitis by suppressing inflammatory gene expression in mice. *PLoS One*. 2014 May 23; **9** (5), e98294.
5. Yamaguchi M, Role of carotenoid β-cryptoxanthin in bone homeostasis. *J Biomed Sci.* 2012 Apr 2;19:36.
6. 鈴木暁子, 朝日新聞 GLOBE 「フルーツのひみつ」特集に取り組んで: 2014.2.2 発行 G-5, 果樹試験研究推進協議会会報 2014, **33**:26-28.
7. http://www.naro.affrc.go.jp/project/f_foodpro/files/nfri_01_review2_1.pdf

*「果物と健康」に関する試験研究の支援と研究成果の啓発活動を 10 年にわたり行ってきたが、役割を終え、2016 年 4 月 30 日をもって活動の幕を下ろした。

白石カルシウムの炭酸カルシウム	
	<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>
	<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、品揃えしております。</p> <ul style="list-style-type: none">一般の栄養強化には、「ホワイトン」機能を求めるならば、「コロカルソ」飲料用には、スラリー状の「カルエッセン」 <p>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>
	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

野山の花

— 身近な山野草の食効・薬効 —

城西大学薬学部 白瀧 義明 (SHIRATAKI Yoshiaki)

クズ *Pueraria lobata* Ohwi (マメ科 Leguminosae)

夏から秋にかけて野山を歩いていると、紫～紫紅色の蝶形花をつけた大型のつる性草本を見かけます。全株に粗毛があり、茎は長くのびて他物にまきつき10m以上にもなります。本植物が漢方薬「葛根湯」の構成生薬である「葛根」の基原植物となるクズです。

クズは日本各地、朝鮮半島、中国の山野に普通に見られるつる性の多年生草本で北米にも帰化しています。葉は互生し長柄があり、3出複葉で小葉は長さ10～17cmのひし形ないしだ円形で、時に浅く3裂しています。夏の暑い日中、良く、葉が反り返っていますが、「クズの裏見返し」といわれ、強烈な太陽の光を避けているようです。下面はやや白く白色の毛が密生し、夏～初秋のころ葉腋から15～18cmになる総状花序を出し、紫～紫紅色の蝶形花を多数つけ、秋の七草の一つとしてもよく知られています。クズの名は大和の国(現、奈良県)国栖くずに由来し、この地方の人々が根から得られるデンプンを京都に売りに来たことによるそうです。又、クズは他にも有用で、茎から得た繊維は織布に用いられ、葛布と称して現在も製造され、花を乾燥したものは葛花と云い、二日酔いの妙薬として中国、台湾で使用され、我国では健康食品として販売されています。根は長大でデンプンが多く、皮をはぎ、適当に切って乾燥したものをカッコン(葛根, *Puerariae Radix*)とよび、漢方の要薬の一つで、熱を冷まし首の後ろや背中がこわばるのを治す働きがあるとされ、葛根湯(構成生薬: 葛根、麻黄、桂皮、芍薬、甘草、生姜、大棗)などに配合されます。葛根湯は漢方で発汗、解熱、緩和薬として用いられ、ふだん健康な人の頭痛や肩こりをともなう



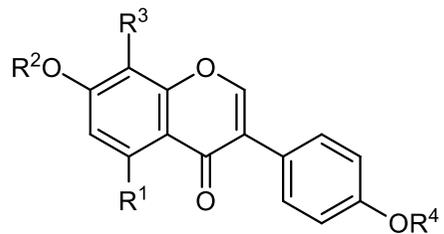
写真1 クズ (花)



写真2 クズの裏見返し



写真3 生薬：葛根

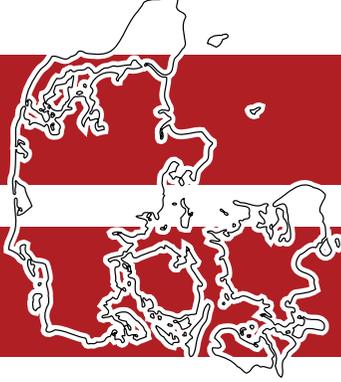


	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
daidzein	H	H	H	H
daidzin	H	glc	H	H
puerarin	H	H	glc	H
genistein	OH	H	H	H
formononetin	H	H	H	CH ₃

図1 成分の構造式

感冒の初期によく効きます。体表が実して汗ばむことがなく悪寒，発熱，頭痛がして首筋や背中のこわばるものに用いられ，感冒のほか乾性の皮膚病，小児はしか，神経痛，結膜炎，大腸カタル，

じん麻疹等きわめて応用範囲が広いものです。また，根から得たデンプンをクズデンプン *Amylum Puerariae* とよび，滋養剤や錠剤賦形薬とされます。我が国の生薬の生産量は少なく，韓国からの輸入が主ですが，最近是中国からの輸入が増えています。クズの成分は10～14%のデンプンのほかイソフラボノイドの daidzein, daizin, puerarin, genistein, formononetin 等が知られています。これらのイソフラボノイドには，女性ホルモン用作用が認められていますが，内分泌攪乱化学物質としても知られています。



デンマークのホットドッグ

デンマークのファーストフード、といえば、マクドナルドのハンバーガーや、ピザのお持ち帰りなども人気のカテゴリーですが、まず欠かせないのが、ホットドッグではないでしょうか。観光でにぎわう繁華街や、空港、ガソリンスタンド併設のコンビニなど、いたるところでホットドッグを見かけます。サッカーの試合や、イベント時の屋台にもホットドッグはよく登場する食べ物で、多くのデンマーク人に親しみのある軽食といえるでしょう。街中には、ホットドッグワゴン、と呼ばれる、いわばホットドッグの屋台をよく見かけます。屋台なので、営業終了時には、店がしまわれ、ワゴンごとその場からいなくなってしまう。コペンハーゲンの繁華街に行くと、週末には夜中まで営業しているホットドッグワゴンもあり、夕飯後や飲み会の後、ちょっと小腹が空いたな、と思う人たちで賑わっています。日本で飲み会の後にラーメンを一杯という感じで、ちょっとしょっぱいものが欲しくなったら、ホットドッグを食べると感じるのかもかもしれません。



さて、このホットドッグですが、その味や種類には、実はいろいろなバリエーションがあります。ソーセージを挟むパンには、日本でいうホットドッグと同じような、柔らかいパンに切り目を入れ、そこにソーセージを入れるタイプや、フランスパン風にパンの外側がややカリカリとしたパンに穴が空いていて、そこにソーセージをはめるタイプなどがあるほか、ソーセージにも、チェダーチーズ味の物や、辛いスパイスのきいたもの、またはベーコンが巻いてあるものなどなど、いろいろな種類があります。もちろんパンなしで、ソーセージだけをケチャップやマスタードで食べる場合もあります。デンマークに観光で来た外国人がはじめてホットドッグを注文するときには、いろいろな種類があるの





で迷ってしまいます。そして軽食であるホットドッグですが、さすが物価の高いデンマークだけあり、値段は 25 クローネ (500 円くらい) はします。コンビニでサンドイッチを買っても同じくらいはするので、ファーストフードの低価格ゾーンがこれくらい、ということなのでしょう。

また、ホットドッグは、ファーストフードで親しまれるほかに、家でもバーベキューでソーセージをグリルし、夕飯に食べることがよくあります。特

に子供達はホットドッグが大好き (?) なので、週末や、天気のいい日には、近所の家の庭から、グリルの香ばしい匂いがする、というのも、デンマークの夏にはよくある光景です。特にデンマークの夏は日が長く、夜 10 時くらいまで明るいので、夜ご飯も天気がいいと、外でグリルを楽しみ、暗くて寒い冬とは対照的に、明るく暖かい夏を目一杯楽しむ、という習慣が根付いているのでしょう。

デンマーク人に最も親しみのあるファーストフードであるホットドッグですが、実は近年、ホットドッグ危機、というには大げさですが、大きな転換期を迎えているという説があるのです。数年前の調査で、ファーストフード (お持ち帰りフード) 消費者調査で、なんと、寿司がホットドッグを抜いた、という調査結果が発表されたのです。健康志向のトレンドとともに、寿司は健康にいい食品としての認知が広がる一方で、ホットドッグの人気度が下がっているというのが現実で、特にその傾向は、コペンハーゲンなどの都市部ではさらに顕著だということです。確かに、トレンドに敏感なニューヨーカーから世界の寿司ブームは始まったという説もあるくらいですから、健康食品としての寿司が、デンマークの首都コペンハーゲンで、ホットドッグ需要を抜くことは不思議なことではないのかもしれませんが。

デンマークでの寿司の認知度は確かに高く、寿司は、レストランで食べるだけでなく、お持ち帰りもあれば、スーパーの惣菜売り場にお弁当サイズで売っていたり、様々な形態で入手可能です。飲み会の後に食べるホットドッグが寿司に置き換わることはないにしても、昼間の軽食としてのホットドッグが、都市部では寿司に置き換わりつつあるのかもしれませんが。

そんなホットドッグですが、まだまだデンマークで最も身近なファーストフードですので、デンマークに訪れることがあったら、ホットドッグスタンドで注文して食べてみると、デンマーク人の食文化を垣間見ることができるかもしれません。

L-カルニチンの老齢ラットによる脳機能改善効果に関する研究

ILS株式会社

2008年度研究（東京都老人総合研究所・老化ゲノム研究チームとの共同研究）

【目的】

L-カルニチン誘導体であるアセチルL-カルニチンは脳内に移行してアセチルコリンの産生を促し、老化による認知力や記憶力低下および精神的・肉体的疲労などの高齢者の脳機能改善効果を有する事が明らかになっており、欧米では「ブレインフード」としてサプリメント等に使用されています。しかし、日本においては認可されていないため、使用不可能です。そこで、前駆体である「L-カルニチン」の摂取で同効果をえられるかを確認するため、神経科学的実験で検証しました。

【試験内容】

1. ラット

老齢ラット F344 雄 27 ヶ月齢 18 匹 3 群

2. 投与量

コントロール群 (Control) 酸性水 (細菌感染予防のため)

アセチルL-カルニチン投与群 (ALCAR) 100mg/kg/day 飲料水

L-カルニチン投与群 (LCAR) アセチルL-カルニチンと同モル濃度飲料水 (試験中の水の摂取量に差異なし)

3. 試験項目

2 ヶ月間投与後、以下の測定を行ないました。

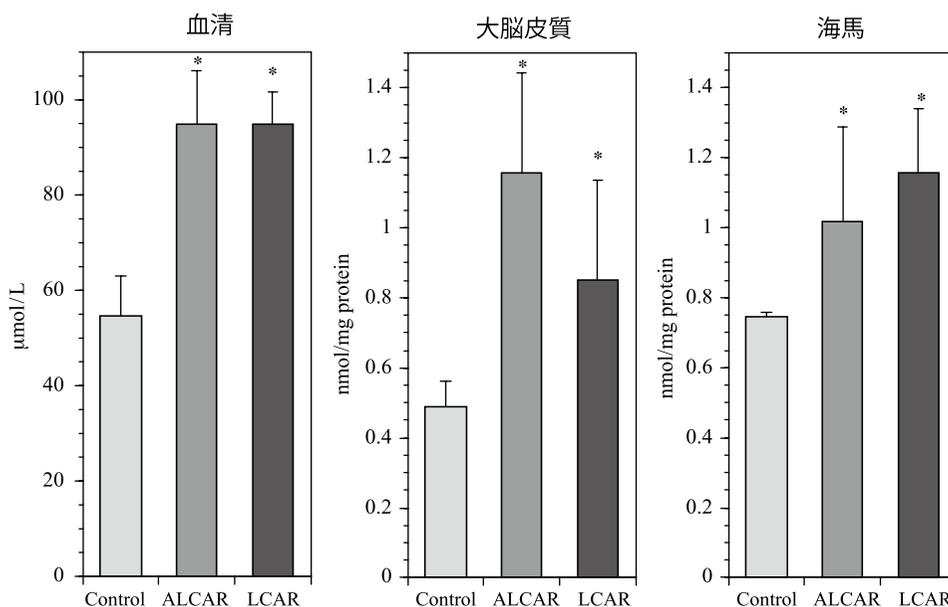


図1 血清、大脳皮質、海馬の総カルニチンレベルへのカルニチン投与効果 *、 $P < 0.05$ vs Control

①血清および脳内のカルニチン濃度

血清および脳内（大脳皮質、海馬）の総カルニチン量の定量

②大脳皮質シナプス活性への効果

アセチルコリン合成と放出量の測定

シナプトソーム内カルシウムイオン濃度の測定

【結果】

①血清および脳内カルニチン濃度の結果

図 1 に示すように L- カルニチン投与群とアセチル L- カルニチン投与群において、血清および大脳皮質と海馬のカルニチン量が対照群と比べて有意に増加しました。これらの総カルニチンレベルに有意差を認めなかったことから、体内の取り込み効率が同等であることが分かりました。

②大脳皮質シナプス活性への効果

●アセチルコリン合成

シナプスにおけるアセチルコリンはコリンとアセチル-CoA を基質としてアセチルコリン合成酵素で合成されます。図 2-(A) はアセチルコリン合成量を示しており、両カルニチン投与ラットともコントロール群と比較して有意にアセチルコリン合成量が増加しました。また、両カルニチン投与群での有意差を認めなかったことから、アセチルコリン合成は同等であることが示唆されました。

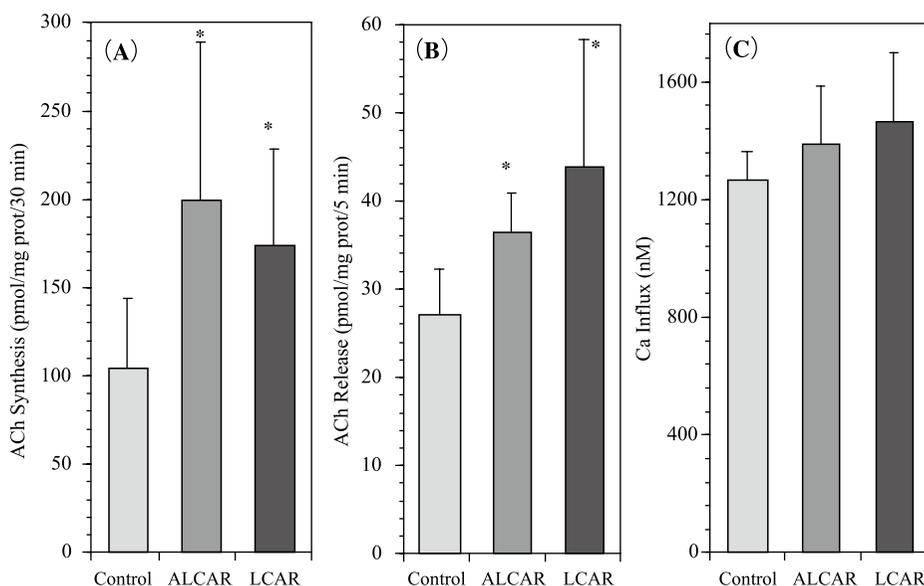


図 2 カルニチン投与による大脳シナプスにおけるアセチルコリン合成 (A), アセチルコリン放出 (B), カルシウムイオン流入 (C) への効果 *、 $P < 0.05$ vs Control

●アセチルコリン放出

シナプス膜の脱分極刺激によってシナプス小胞内に蓄えられているアセチルコリンが放出されます。

図2-(B)は高濃度カリウムによる脱分極刺激によるアセチルコリン放出量を示しており、両カルニチン投与ラット共にコントロール群と比較して有意にアセチルコリン放出量が増加しておりました。カルニチン投与群およびアセチルL-カルニチン投与群での合成量は同等～ややカルニチン投与群の方が高い結果となりました。両カルニチン投与群での有意差を認めなかったことから、アセチルコリン放出は同等であることが示唆されました。

●カルシウムイオン流入活性

高濃度カリウム脱分極刺激を与えた後、1秒間にシナプスに流入したカリウムイオン流入量を測定しました。図2-(C)はコントロール群と比較してカルニチン投与群は増加する傾向を示しましたが、統計的には有意とは言えず、影響を与えなかったことが示唆されました。このことからアセチルコリン放出量の増加はアセチルコリン合成量の増加によるものと考えられました。

【結論】

- ・「L-カルニチン」の経口摂取による小腸での吸収効率および血流からの組織への移行効率が、アセチルL-カルニチンとほぼ同じであることが示唆されました。
- ・「L-カルニチン」は、アセチルL-カルニチン同様にアセチルコリン合成ならびにアセチルコリン放出を促進することが確認できました。
- ・これらのカルニチンのシナプス機能促進作用において、「L-カルニチン」とアセチルL-カルニチンの差異はなく両化合物とも同様の脳のコリン作動性活性化効果を有することが明らかになりました。

「L-カルニチン」は、認可されていないアセチルL-カルニチンに代わる高齢者の脳機能改善（認知力・記憶力、精神的・肉体的疲労の改善）に対するアンチエイジングサプリメントへの活用が期待できます。

ILS商品 ラインナップ

L-カルニチンAシリーズ	L-カルニチンSシリーズ	L-カルニチンAシリーズ：国産品（国内工場で製造された安全で高品質な製品）
L-カルニチンA	L-カルニチンS	
L-カルニチンフマル酸塩A	L-カルニチンフマル酸塩S	L-カルニチンSシリーズ：中国産（品質にこだわり、国内工場にて篩・小分けを実施）
L-カルニチンL-酒石酸塩A	L-カルニチンL-酒石酸塩S	

本コラムに関するお問い合わせは：大塚化学グループ ILS株式会社
〒302-0104 茨城県守谷市久保ヶ丘1-2-1 TEL:0297-45-6342

地球温暖化防止法, 食料増産法

Methods to protect global warming, Food production increase way

尾崎 庄一郎 (OZAKI Shoichiro)

愛媛大学名誉教授

KeyWords : 窒素酸化物 リン 排水処理 二酸化炭素 同化反応 地球温暖化

Abstract

Shoichiro Ozaki.

Professor emeritus, Ehime University,

Methods to protect global warming, Food production increase way

KeyWords : NOx, phosphorus, effluent treatment, carbon dioxide, assimilation, global warming

Plants contain N and P. Supply of N and P as absorbable form is essential. Elimination process of nitrogen oxide in power station flue gas should be stopped. Elimination of phosphoric acid and urea, and ammonium salt in drainage should be stopped. By the supply of sufficient N and P, enough growth of plant and enough carbon dioxide assimilation is performed. Then increased production of food and elimination of carbon dioxide and cooldown of earth will be expected.

要旨

植物は窒素 N, リン P を含む化合物を含むので, 植物の成長には N と P が必須である。物質が燃焼すると窒素酸化物 NOx が生成するが, NOx は公害ガスとして嫌悪され除去の処置がとられている。しかし生物の成長に必要な肥料, 食料として大歓迎して食物の生産に役だてるべきである。リンを含む食物を食べた動物はリン酸を排出する。リン酸を除去する排水処理がされているが, リン酸は生物の成長に必要な肥料, 食料として大歓迎して生物の生産に役だてるべきである。排ガスの脱硝処理, 排水の処理を廃止し, 植物に十分な窒素, リンを供給して植物の生長と同化作用を盛んにして二酸化炭素と熱の吸収を盛んにして, 地球の温暖化防止と食料の増産をはかりたい。

1. 序文

筆者は愛媛大学資源化学科に在籍中, 窒素, リンの肥料成分の排出が厳しく規制され, 漁業の衰退して行く姿を見て, 嘆いて“食品増産のため窒素, リンのリサイクルを”の解説を本誌に投稿した¹⁾。また“水清ければ魚住まず”との四季録を愛媛新聞に書いた。

最近は不老長寿の食品の研究をしている²⁻⁴⁾。不老長寿の為には子魚を丸ごとたべるとよいこ

とがわかった。子供のときから小魚で育ってきたが, いま小魚が買いにくく肉より高価になっていることに気がついた。みんなの長寿のために小魚の増産, 地球温暖化防止に役立ちたい。

私は 1930 年岡山県倉敷市児島田の口に生まれた。海に面していたので食べる蛋白質はすべて魚で, 牛, 鳥の肉は高価でほとんど食べなかった。夕方には, いかなご, いかなごと叫びながら自転車で売り歩く声があった。今瀬戸大橋のか

かっている下津井は漁港として栄え干しダコがいっぱい、付近の瀬戸内海は漁船であふれていた。ところが最近丸亀と児島を結ぶ瀬戸大橋を走るマリンライナーから見下ろす瀬戸内海には漁船は1隻も見当たらない。瀬戸内海の魚業は壊滅的打撃をうけている。その原因は植物の栄養塩類である窒素，リンを排除する条令が出て下水処理により，ゴミの焼却，工場，発電所，自動車の排ガス規制，たき火の禁止によってプランクトン，それを食べる魚，海藻が生育出来ない様になったからである。窒素酸化物 NO_x の重要性，リン (P) の重要性，二酸化炭素 (CO₂) 同化反応の重要性を説明したい。

2. 窒素酸化物 NO_x の重要性

海苔は蛋白質を 30% 含んでいる。蛋白質はアミノ酸のポリマーであり約 15% の窒素を含んでいる。アミノ酸には 1 つの窒素原子，同化作用に必要なクロロフィルは窒素原子 1 つを含むピロール環が 4 つ環状に結合した化合物である。細胞増殖に必要な核酸のプリン塩基には窒素が 4 ~ 5 個，ピリミジン塩基には窒素原子が 2 ~ 3 個含まれている。これら化合物が作られる為には相当する窒素が必要である。海苔の生育には多量の窒素を必要とする。筆者の元勤務先愛媛大学の地元愛媛新聞に海苔養殖：水質浄化が生育を拒むとの記事がでた。西条地区は江戸時代からの海苔の養殖地，初セリに出た海苔は段ボールのように赤茶色だった。海苔の質は黒さで決まる。黒い色はクロロフィルの色である。松山の北 10km の北条市では，1978 年に 80 ~ 90 人の海苔養殖業者がいて販売額が 1 億 5 千万円あったが，1993 年ゼロになった。窒素を必要とするのはすべての植物，海藻，プランクトンである。

松山の西海岸では 40 年前までは西風が吹くと大量の海藻が打ち上げられ，たくさんのナマコがその中であつたときく。松山市の西の海岸に浄水センターがある。そこではアンモニア体，硝酸体，尿素の窒素は，いずれも窒素ガスになるまで処理されて水道水のようにきれいにし

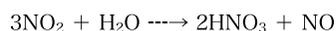
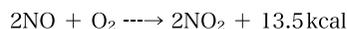
て 9000 トンを毎日放出される。この付近では海藻が少なく魚も釣れないという。瀬戸内海では，海藻を食べて成長するアワビ，ウニ，ナマコ，オコゼ，カワハギも減っている。プランクトンを食べて生活するイカナゴ，イワシ，これらを食べる太刀魚，鯛，チヌ，タコも激減している。岩場で海水が引いてあらわに出ている岩に付着している牡蠣がなくなった。瀬戸内海の内海は海草のほとんどない海砂漠化している。

トイレ等の排水は直接浄化センターに集められる場合と家庭にある浄化槽に集めて処理される場合がある。浄化センターでは活性汚泥法を用いて強く攪拌して空気を吹き込み有機物をなくしている。硝酸イオンはアンモニア体窒素と混合されて窒素ガスにしている。



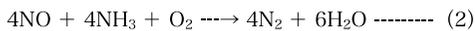
昔 (年代不明) 雨水 1L 中に 0.8mg のアンモニウムイオン体窒素と 0.44mg の硝酸体窒素が含まれていた。合計すると 1.2mg の窒素がふくまれていた。年間雨量 1200mm とすれば 1m² に 120L の雨が降ったことになる。1 ヘクタールに 15kg の窒素，言い換えると 15% の窒素を含有する 100kg の化成肥料を全国」の山野に満遍なく与えてくれていたことになる。雨で作物が生きかえたように元気になるのは水分だけではない。窒素肥料をあたえてくれているからである。

このような植物の栄養分となる窒素はどのようにして空中で生成するのであろうか。空気の 80% は窒素 N₂ ガスである。植物，プランクトンが吸収できない窒素 N₂ ガスを吸収出来る栄養塩類 NO₃⁻ NH₄⁺ に変える必要がある。これを自然は太古からおこなう仕組みができています。雷と燃焼によって窒素 N₂ を窒素酸化物 NO_x に変える次のような反応がおこる。

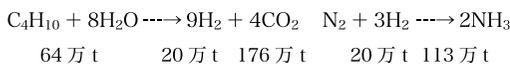


これらの反応は，工場の助けを借りなくても雷の作用で大量に起こる。また薪で御飯を炊

き風呂をわかす火の高温のため NOx が生成する。動植物に含まれている窒素も燃やすと NOx が生成する。雨水に溶けて栄養塩類である硝酸イオン NO₃⁻ ができる。太古より窒素の循環はこのようにうまくおこなわれてきた。文明開化にともなって、人類が化石資源である石油、天然ガス、石炭を大量に燃焼するようになった。大量の NOx が排出されることになる。火力発電所等の大形設備には必ず脱硝装置がついており、300 ~ 400℃ ガスにアンモニアを加えて触媒層を通して NO を N₂ ガスに変えている。



この反応を見ると NO と等モルのアンモニアを必要とする。水の処理 (1) 式、大気処理 (2) 式共に共通して、1つの肥料成分をもう1つの肥料成分を加えて相殺していることがわかる。我が国の NOx の人為的発生量は 200 万トンといわれる。これを全部アンモニアで処理すると 113 万トンのアンモニアが必要である。これは我が国で使用されている窒素肥料の 2 倍に近い。これだけのアンモニア (113 万トン) を作るには水素ガス 20 万トンが必要である。20 万トンの水素ガスを作るには 64 万トンのブタンが必要である。そして 176 万トンの二酸化炭素 (地球温暖化原因) が発生する。



木や草またはこれらが化石となった石炭、水中のプランクトン等が化石になった石油が燃焼する時必ず高温のため N₂ が O₂ と反応して NOx がでる。これは植物、化石燃料を燃やしたらまた植物が育つ様にと植物が吸収出来る様に窒素ガス N₂ を NOx に変えるという天然のリサイクルの仕組みになっていると考えられる。

現在の排ガス処理は、植物に必須の NOx を役にたたない、植物が吸収できない窒素ガスに変える、しかも大切な化石燃料を使って得た等モルの肥料成分アンモニアを用いている。しかも地球温暖化原因の二酸化炭素を大量に発生さ

せている。天の配に反する不経済的 NOx 削減政策は至急やめるべきである。

3. リン (P) 化合物の重要性

リンは植物、動物を構成する必須の原子である。細胞の核を構成する核酸は核酸塩基と糖がリン酸を介して結合した化合物である。脂肪の 1/10 はリン脂質である。脂肪酸の代わりにリン酸がついていてその 1 部はイノシトール三リン酸 (IP₃) という細胞内の情報伝達に参与している重要な物質である。この IP₃ の研究は私のライフワークである⁵⁾。

植物の種である米、麦、大豆、と一もろこし、の表皮にはフィチン酸というイノシトールにリン酸が 6 つついた化合物のカルシウム塩が 30% 含まれている。これは種がもしリンの不足する土地で発芽した時、核酸を作るリン酸が不足しない様に、細胞増殖ができる様にとリン酸の貯蔵庫を造っている種の自衛本能である。このフィチン酸を作る為に収穫期にはこれを作るに相当するリンを植物は吸収する。リンが不足すると穀物の収穫は激減する。植物性プランクトンのような小さい植物、海苔、海草、野菜、樹木などいずれの植物も細胞ができるには核酸が作られ、核酸の指令で蛋白質がつくられる。リンは植物にとって食物のように体の 1 部を構成するための必需品である。

リンの供給はどのようになっているのであろうか。現在リンは公害源として敵視されているので、リサイクルされていない。リンの供給が不足し、リン酸肥料を施肥する農耕地以外では農水産物の生産が落ち込んでいる。世界的にリンの資源としてはリン鉱石が用いられ、その主成分はフッ素化アパタイト Ca₂(PO₄)₃F である。これは海中の動物の遺骸が分解し不溶性の部分が堆積したものとリンを含む魚を食べた海鳥のフンが化石化したものと言われている。水中の生物はリンを水中から摂取する。水中のリンは岩石土壌中のリンが溶け出したものである。リンは、地殻中に金属塩の形で平均 0.1% 存在するが溶解度はすくない。リンを植物に吸

収可能な形にするには、リン鉱石を硫酸、硝酸等で分解する方法が主にとられている。

可溶化されたリン酸が植物に供給されるには4つのルートがある。(1) 洗剤 (2) し尿、生活排水 (3) 天然のリン酸イオン (4) 肥料である。

(1) 洗剤：洗剤を溶けやすくするトリポリリン酸ソーダ6万tが昭和54年に使用され、愛媛県など瀬戸内海の家産額は全国の80%を占め、瀬戸内海は海草が茂り、ナマコ、かわはぎなどたくさんとれ、瀬戸内海の海面漁業の生産は49万tに達した。ところが、香川県の魚養殖場付近で赤潮プランクトンの発生、琵琶湖に水草茂り過ぎの記事にあわててトリポリリン酸ソーダの禁止、排水浄化規制の法律”ができた。

(2) し尿、生活排水：リンの供給源はし尿、生活排水である。我々人間、牛、馬、鳥等の動物は、リンの入った食物をとる。そしてリンをし尿として排出している。し尿と家庭の浄化槽から汲み取ったものをあわせて浄化センターで処理される。水中のリンはアルミニウム、鉄イオンで凝縮沈殿され、遠心脱水焼却され、セメントと混ぜ合わせてコンクリート詰めされて埋め立てられる。リンは植物に再利用されなくされている。

トリポリリン酸ソーダの禁止、排水浄化規制の法律ができたことにより。瀬戸内海は一変した。海草が生えなくなり、植物性プランクトンの生育がとまった。愛媛県岡山県の家産が全滅、プランクトンをたべるイワシ、イカナゴ、海草をたべるメバル、オコゼ、カワハギ、が、またイカナゴを食べる鯛が激減した。

(3) の供給源は天然の海水、川中のリンである。海水11中にリンは平均88μgふくまれている。植物プランクトンはこの微量のリンを取って栄養分としている。しかしたえず不足気味である。

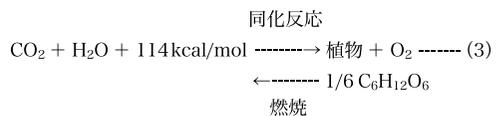
非常にきれいで栄養塩類（リン酸塩、硝酸塩）の少ないいわゆる貧栄養水である黒潮には、プランクトンが少なく魚が少ない。栄養塩類の多

い親潮にはプランクトンが多くて魚が多い。アメリカ西海岸を南下する寒流には栄養塩類が多くてジャイアントケルプが生い茂りプランクトンが多くて魚が1杯である。おなじ海であってなぜこのような差がでるのであろうか。室戸沖100kmの海水表面の窒素、リンの濃度は各々1μg/L、0.3μg/Lと低く、細胞培養に使う理想濃度の2万分の1、200万分の1と低い。室戸沖同地点の水深1000mでは、窒素33μg/Lと表面の30倍、リンは2.9μg/Lと10倍栄養分が多い。黒潮は深くて表面が温かく（26℃）底が冷たい（3.9℃）ので対流が起りにくい。親潮の流れる北の海は表面が冷やされ底が温かいので対流が起りかつ風波が強いのので深い海に蓄積されている窒素、リン等の栄養塩類が上層に巻き上げられるからではないかと思われる。高知大学では深層の水を汲みあげてプランクトンの生育が良いとの結果をだしている。

黒潮の流れ込む、雷が3年に1度と稀な瀬戸内海でし尿、生活排水中の窒素、リンを完全排除されれば瀬戸内海では植物は生活できない。

4. 二酸化炭素同化反応の重要性

二酸化炭素が地球の温暖化を進めその排出、除去が大問題になっている。二酸化炭素と水にクロロフィルの存在下に日光をあてると植物と酸素ができる。逆に植物ないしその化石である石油、石炭を酸素と反応（燃焼）させてエネルギーを得て人類は文明生活」を送らせてもらっている。



- | | | | | | | |
|-----|-------|-----|------------|-------|-----|-------|
| (A) | 44g | 18g | 114kcal | 30g | 32g | 22.4L |
| (B) | 1.47t | | 380万 kcal | 1t | | |
| (C) | 1t | | 259万 kcal | 0.68t | | |
| (D) | 69万 t | | 1800億 kcal | 47万 t | | |

(A) 実験室にて：1モルの二酸化炭素44gと1モルの水18gが114kcalの熱を吸収して1/6モルのグルコース30gと1モルの酸素32g、22.4lができる反応は、同化反応と

いわれて地球上の全生物が何億年もこの反応のお陰で生きている極めて重要な反応である。地球上の同化反応は80%海洋で行われているといわれている。海洋では海藻、プランクトンにより同化反応が行われるが、海洋の水深を考えると海藻の生育は限られプランクトンによる同化反応が全同化反応の60%と推定される。石油はプランクトンの化石、石炭は樹木の化石であるという説から考えてみても、プランクトンの同化作用のすごさ、大きさ、偉大さ、貢献度に驚く。

- (B) 水田にて。その1植物は二酸化炭素を食べて生きている。どのくらいの量の二酸化炭素が0.1ヘクタール(1000m², 300坪)で食べられているのであろうか。0.1ヘクタールの水田でコメが500kg生産される。わらを加えると1t(1000kg)の植物ができる。1tの植物ができるとき $1 \times 44/30 = 1.47t$ の二酸化炭素が食べられる。この時380万kcalの熱が奪われる。
- (C) 水田にて。その21トンの二酸化炭素消費される時 $114 \times 1000000/44 = 259$ 万kcalの熱が奪われる。それだけ地球は冷却され、温暖化が防げる事になる。木陰で涼しく感じるのはこの吸熱反応のためである。
- (D) 瀬戸内海にて：瀬戸内海の面積は4万7千km²。1ヘクタールの470万倍ある。もし瀬戸内海で水田と同じような同化効率で二酸化炭素を利用できれば $1.47t \times 4700000 = 690$ 万トンの二酸化炭素を消費することができる。同化効率が水田の1/10としても、69万トンの二酸化炭素を削減でき1800億kcalの熱を吸集して地球を冷却できることになる。47万tの農水産物が期待できる。

東京農工大松永教授は藻類の光合成による二酸化炭素固定の研究を行っている。(化学と工業46巻763(1993))。海洋における藻の生育

は窒素、リンを十分に与えると、4320g/m²/dayになるという。地球温暖化の原因は化石燃料を燃やした時発生する熱のためである。逆反応である同化反応は吸熱反応である。同化反応により地球を冷却できる。

化石燃料の可採埋蔵量は石油が100年、天然ガスが200年、石炭が200年といわれている。100年後車、航空機は使えるであろうか?電気はどのようにして発電するであろうか?化石燃料は限られた大切な宝物である。NO_xの削減に化石燃料を使う事をやめて肥料としての効果を生かして二酸化炭素同化作用を盛んにして食料の増産をしたいものである。

5. 結語

窒素酸化物NO_xが健康に悪い影響があるとの理由で絶えず患者扱いにされ排斥されている。しかしどのように、どれほど健康に悪い影響があるかわかっていない。植物は窒素酸化物NO_x、リン酸塩を食料として成長している。動物は植物ないし植物を食べて成長した動物を食べて生きて成長し健康を維持している。窒素酸化物NO_xを排斥してはならない。焚き火、暖炉、灯油、石炭、石油、天然ガスによる暖房、発電、ガソリン重油による車、船、航空機の運行などでNO_xが生成する。排水中には植物の食料であるリン酸塩、尿素も多い。これらをそのまま肥料として利用すればよい。これらを利用して植物をできるだけ多く育てて同化作用をできるだけ多く行い二酸化炭素と熱をできるだけ多く吸収してもらい地球の温暖化防止と食料の増産をしたい。

6. 提言

1. 排水処理の中止下水中の有機物、窒素、リンを除去するために大量の電気を使用している。「我が家の水道料/月2000円、下水道料2000円である」。「下水道料が電気料6000円の1/3の2000円」と高いのは活性汚泥の攪拌に大量の電気を使うためという。下水処理によってプランクトン、海藻

の食料が奪われている。瀬戸内海の場合「海苔，魚類，貝類，漁業者」が激減している。排水処理は食料生産のさまたげ，電気消費など経済的損失が大きい。同化作用が抑えられる排水処理は中止すべきである。

2. し尿の田畑への投与，森林への投与を勧めたい。また，し尿は以前のような洋上投与を推奨したい。海洋の栄養塩類である窒素化合物， NO_3^- ， NH_4^+ ，尿素，リン化合物のリン酸が増え，プランクトンが増え，同化反応が増え，イワシ，秋刀魚，鰹，マグロ等の魚類が増えることが期待できる。
3. 発電，製鉄にともなう排ガス処理のうち脱硝処理は中止すべきである。自動車の排ガス中の NO_3^- 規制はなくすべきである。

4. 高温ゴミ燃焼の中止。ごみの焼却に関して2002年焼却の規制法で燃焼室で発生するガスの温度が 800°C 以上の状態で燃焼できるもの，助燃装置が設けられているもの以外での焼却は禁止と定められた。 800°C 以下では NO_x の分解が不十分，ダイオキシンの発生が多すぎるとのことらしい。しかしこの法律は問題である。 800°C に温度を上げる為余分の化石燃料を加えて余分の二酸化炭素を発生させている。東北大震災のときはがれきの現地焼却ができなため，どれほどの費用，時間，資源がかかったか，復興の障害になったか計りしれない。熊本地震災害の現在，ゴミの燃焼は現地焼却を許可し，焚き火禁止を解除すべきである。

参考文献

1. 尾崎庄一郎：食品増産のため窒素，リンのリサイクルを *NewFoodIndustry* 35, 1033-39, 1993.
2. Ozaki Shoichiro: Glucosamine Derivatives. Sulfodisaccharides-co-working with Klotho. *J Nutr Food Sci*, 5, 416, 2015. <http://dx.doi.org/10.4172/2155-9600.1000416>
3. Ozaki Shoichiro: Sulfodisaccharides co-working with Klotho. Studies on structure, structure activity relation and function *World. J Pharm Pharm Sci* 4 (8), 152-175, 2015.
4. Ozaki Shoichiro: Secret of anti-aging : Anti-aging food containing glucosamine, hyaluronic acid and chondroitin. *Jacobs Journal of Physiology* 2 (1), 13-17, 2016.s
5. Ozaki Shoichiro: Chemical approach to signal transduction by inositoltrisphosphate. *J Bioengineer & Biomedical Sci* 4:133. 2014. <http://dx.doi.org/10.4172/2155-9538.1000133>
6. Ozaki Shoichiro: Methods to protect global warming. *Adv Tech Biol Med* 4, 181, 2016. doi: 10.4172/2379-1764.1000181

ワムシへの免疫賦活剤と抗酸化剤の強化でヒラメ 種苗の生残率，変態速度，体型異常を改善出来る

酒本 秀一 (SAKAMOTO Shuichi) 澤山 英太郎 (SAWAYAMA Eitaro) *

* (有) まる阿水産

Key Words : ヒラメ 種苗生産 ワムシ 免疫賦活剤 抗酸化剤 脂質 HUFA DHA TBA 値 SO 消去活性 抗病的
変態速度 体型異常

前回試験の要約

市販のクロレラで一次培養したシオミズツボワムシ (以下ワムシと略記) に海産魚の必須脂肪酸であるエイコサペンタエン酸 (EPA) とドコサヘキサエン酸 (DHA) を強化し、ヒラメの種苗生産を行った結果を前報^{1,2)}で説明した。詳細は前報を参照して欲しいが、要点のみを記しておく。

EPA の強化には3種類のナンノクロロプシス (ナンノ) を用いた。一つはまる阿水産の露天池で培養したナンノ (露天ナンノ) をそのまま用い、他の二つは他所の露天池で培養したナンノを回収、濃縮して使用時まで4℃で冷蔵保存した物 (冷蔵ナンノ) と-20℃で冷凍保存した物 (冷凍ナンノ) であった。冷蔵ナンノと冷凍ナンノは同一メーカーの市販品である。DHA の強化にはシズキトリウム主体の市販強化剤を用いた。

ヒラメ種苗生産時の餌料体系はワムシ→アルテミア孵化幼生→配合飼料の極一般的な体系で、3試験区の違いはワムシのEPA強化に用いたナンノが違うだけであった。

孵化後7, 10, 14, 20, 23, 33および50日目に魚の成長、変態ステージの組成比および体型を調査し、以下の結果を得た。

成長は3区間で有意差 (危険率5%) は認められなかったものの、冷凍ナンノ区がやや遅れ

ていた。生残率は冷凍ナンノ区が著しく低かった。冷凍ナンノ区で生残率が低かった原因は、冷凍時にナンノが粘液状物質を放出してフロックを形成し、ヒラメ飼育水槽の排水ネットに詰まって飼育水がオーバーフローした為に仔魚が可也の数流出したことで、フロック形成でワムシが摂餌出来ないナンノが増え、摂餌量不足によるワムシの質の低下、それに起因するヒラメの栄養状態悪化等ではないかと推測した。

ワムシの脂質、高度不飽和脂肪酸 (HUFA)、DHA量は露天ナンノ>冷蔵ナンノ>冷凍ナンノの順に多く、この順にヒラメの変態も早く進んだ。特に冷凍ナンノ区の変態の遅れは顕著であった。アルテミア孵化幼生を与え始めると変態の遅れは急速に改善され、わずか3日間の投与で各区間の違いは小さくなっていた。この結果から、ワムシの脂質量や脂肪酸組成とヒラメの変態には何らかの関係が有るのではないかと推測した。

孵化後50日目のヒラメの体型を肉眼で観察したところ、冷蔵ナンノ区と冷凍ナンノ区で体型異常魚の出現率が高く、異常の主体は下顎の伸長であった。次いで鰓蓋欠損や顎の振れが多く、頭部に異常が集中していた。軟X線写真でヒラメの骨格を調べたところ、下顎が長く見えるのは下顎の骨が著しく伸びている為で、上顎の骨は正常であった。

ワムシの成分と体型異常の関係を調べると、

ワムシの脂質含量と体型異常魚率との間には負の相関が認められ、特に顎の捩れとの間の相関が強かった。また、ワムシの HUFA, DHA 量と鰓蓋欠損との間にも負の相関が認められたが、体弯曲との間は逆に正の相関であった。

ワムシのチオバルビツール酸価 (TBA 値) と鰓蓋欠損との間には負の、体弯曲との間には正の相関が認められた。また、ワムシの TBA 値をナンノの死細胞率で除した値、言い換えるとナンノ死細胞の TBA 値が高い (ナンノ死細胞中の脂質の過酸化が進んでいる) 程下顎伸長魚の出現率が大きく、両者の間には強い正の相関が存在した。

以上の結果から、ヒラメの種苗生産時に生じる体型異常は最初に与える生物餌料であるワムシの質によって大きな影響を受けていると推測した。ワムシの質は餌として与える植物プランクトンの質を反映する事が知られている。よって、ヒラメの種苗生産時に生じる体型異常はワムシに与える植物プランクトンの質による部分が大きいと判断出来る。

ワムシの脂質, HUFA, DHA 量はヒラメの変態速度に大きな影響を及ぼしており、変態が遅かった冷蔵ナンノ区と冷凍ナンノ区で体型異常魚の出現率が高かった。この結果から、変態と体型異常に何らかの関係が有るのではないかと推測し、甲状腺ホルモンとの関係を文献によって調べた。また、ナンノ死細胞中の脂質の酸化が進んでいるほど下顎伸長魚の出現率が高かった事から、脂質の酸化生成物あるいは酸化時に生成される何らかの物質がワムシに移行し、ヒラメに体型異常、特に下顎の伸長を引き起こしているのではないかと推測した。

ワムシの成分と各体型異常の相関から、下顎伸長とその他の異常では生じる機構が異なる事が考えられ、異常のタイプ別に原因を解明する必要が有るのではないかと考えた。

親魚の遺伝的要因と体型異常との関係を調べたところ、受精卵の採取に用いた親魚に雌雄共ワムシに含まれる何らかの物質に感受性の高い魚が存在し、この様な親魚由来の仔稚魚に高率

で異常が出現していた¹⁾。

ヒラメの種苗生産時に生じる体型異常の出現率を低くする為には、ワムシに含まれる (ナンノに含まれる) 原因物質を特定することが肝腎であるが、未だそれが分かっていない現状では、感受性の高い親魚を除去し、ワムシに与えるナンノの質を十分に検討する必要があると結論した。

今回試験

前回試験の結果から、ワムシに与えるナンノの脂質量や脂肪酸組成、酸化生成物等がヒラメの種苗生産において体型異常の発生に大きな影響を及ぼしていると判断した。よって、本試験ではワムシに強い抗酸化力を持つ物質を強化することによる効果を中心に調べることにした。また、前回試験では何れの試験区にも腹部膨満症によると思われる斃死が生じたので、本試験では魚に免疫賦活効果が認められている物質も併用することにした。試験の詳細を以下に説明する。

1. 方法

1-1. ワムシ用強化剤

表 1 に本試験で用いたワムシ用強化剤の組成を示す。免疫賦活剤として β -1,3/1,6-グルカン (グルカン) が細胞の最外層に露出している特殊なパン酵母を用いた。グルカンが抗病性に及ぼす効果については多くの報告や成書が有るが、著者らも魚を中心に報告³⁻¹⁵⁾している。ブドウ種子抽出物 (GSE), ビタミン E, アスタキサンチンは抗酸化剤として使用したが、これらの物質にも魚の抗病性を向上させる効果が有ることを確認している^{7-9, 13-15)}。GSE は BRENN-O-KEM 社の Grape Seed Extract, ビタ

表 1 ワムシ用強化剤の組成

	A	B	C
パン酵母 (g)	90	85	80
ブドウ種子抽出物	0	5	10
ビタミン E (50%)	10	10	10
アスタキサンチン (8%)	10	10	10

ミン E はエーザイ (株) の E 含量 50% の製品、アスタキサンチンはロッシュ社のカロフィルペンク (アスタキサンチン含量 8%) を用いた。

各原料を電動コーヒーミルで微粉碎し、必要量を十分に混合する。混合物は酸素不透過性のアルミ袋に脱酸素剤と共に封入してヒートシールし、使用時まで -20°C で冷凍保存した。

本試験では最も抗酸化力が強い GSE の効果を調べる為、混合物中の GSE の添加量を 3 段階に設定した。GSE の添加量はパン酵母で調製した。ビタミン E とアスタキサンチンの添加量は 3 区共同じにした。

1-2. ワムシの培養法

市販の濃縮クロレラ V₁₂ (ワムシの増殖に必須であるビタミン B₁₂ を強化したクロレラで、海産魚の必須脂肪酸である EPA や DHA は殆ど含まない。) を餌とし、まる阿水産の 40KL 水槽で 3 日間培養した S 型ワムシを朝 10 時に回収し、EPA を強化する為にナンノで二次培養した。その後 DHA 強化の為にシズキトリウム (特異的に DHA を高濃度に含む植物プランクトン) 主体の市販 DHA 強化剤 (バイオクロミス) を与えた。

二次培養以降の手順は以下の通りであった。100L 容 FRP 水槽にワムシを 5×10^8 個体収容し、水温 25°C でナンノを餌にして二次培養した。表 1 のワムシ用強化剤がヒラメ仔稚魚の生残率や体型異常の発生に与える影響を明らかにする為、使用するナンノは前回試験で生残率が低く、体型異常の発生率が高かった冷凍ナンノとした。ナンノは 1×10^6 個 / ワムシ 1 個体になる量を添加した。二次培養開始当日の 17 時に DHA 強化剤を 50mL 添加した。バイオクロミスと同時にワムシ用強化剤を 3g/kg ワムシ湿重量になる様に添加した。添加すべき強化剤の量はマダイやゼブラフィッシュの試験結果を参考にして決めた。添加に必要な混合物の量が非常に少なかったため、現場での作業の簡便性と精度を確保する為、

必要な強化剤の 10 倍量を海水で 10 倍量に稀釈、懸濁し、その 1/10 量をワムシに与える事にした。残りの稀釈物は使用せずに処分し、毎回新たに調整した物のみを与えた。翌朝 7 時にワムシの半量を回収し、清浄海水で十分に洗浄し、ナンノ、バイオクロミス、強化剤、汚れ等を取り除いてからヒラメに与えた。残りのワムシにはバイオクロミスと強化剤を前述の半量ずつ追加投与し、同日の 13 時に残りのワムシを全量回収して与えた。

1-3. ヒラメの飼育法

4 才のヒラメを複数尾収容した親魚水槽から得られた受精卵を 500L 容 FRP 水槽に 9000 粒ずつ収容した。水槽は 1 試験区に 2 個ずつ用いた。何れの水槽でも 7500 ~ 8000 尾が孵化し、受精卵の質に問題はなかった。親魚は前報¹⁾で説明した冷蔵や冷凍ナンノに対する感受性が高い個体を取り除いていなかったため、本試験に用いた受精卵が前報と同じ親魚由来であるか否かは不明である。用水は砂濾過した海水を更にプランクトンネットで濾過し、紫外線殺菌を施して用いた。光周期は水槽上に設置した蛍光灯によって調整し、12 時間明 : 12 時間暗とした。飼育水温の調整は行わなかったため、試験開始時から終了時にかけて約 18°C から 22.5°C まで多少変動しながら上昇した (図 1)。前回試験^{1,2)}は秋に行ったので、飼育日数が長くなるに従っ

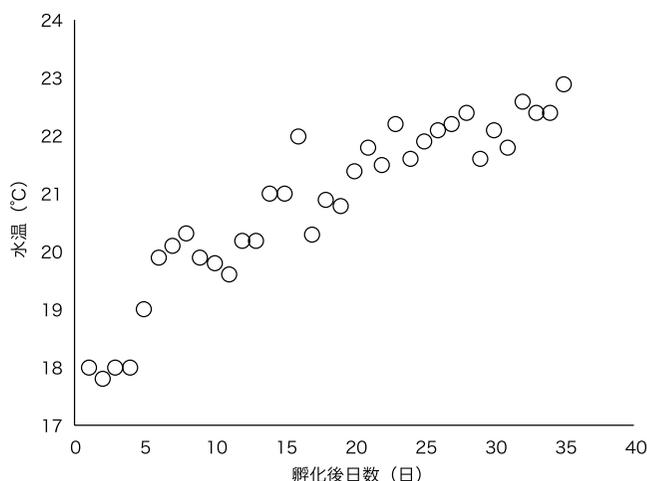


図 1 飼育水温の変化

て水温は次第に低下したが、本試験は翌年の初夏に行ったので、水温は次第に上昇していた。

餌料体系はワムシ→アルテミア孵化幼生→配合飼料の順で、極一般的な体系であった。孵化後4日目からワムシの投与を開始し、26日目まで継続した。投与量は魚の成長に従って増やし、5～10個体/mL飼育水になる様に日に1～2回与えた。ワムシの投与期間中はヒラメ飼育水槽の水質安定とワムシが飢餓状態にならない様にする為、冷凍ナンノを朝7時に5×10⁵個/mL飼育水の濃度で添加した。アルテミアはヒラメの孵化後20日目から与え始めた。アルテミア1000万個体に対してバイオクロミスを100mL添加してDHAを強化した後、日に1～2回与えた。孵化後30日目からは市販の配合飼料も与えた。ワムシとアルテミアは一週間、アルテミアと配合飼料は試験終了の孵化後36日目まで併用した。

1-4. ワムシの分析

強化剤を添加した3種類のワムシと無添加のワムシ(対照)を分析に供した。なお、無添加ワムシは使用可能な水槽の数の問題で飼育試験に供することが出来なかったが、強化剤添加前の成分を知る為に分析した。

測定項目は水分と脂質含量、脂肪酸組成、TBA値およびスーパーオキシド消去活性(SO消去活性)であった。前報^{1,2)}の結果から、ワムシの脂質、HUFA、DHA量等がヒラメの体型異常の発生に影響している可能性が高いので脂質含量と脂肪酸組成を分析した。TBA値はワムシの脂質の酸化度、言い換えるとワムシの餌として与えるナンノの脂質の酸化度も体型異常に関与している可能性があると判断し、測定した。水分はこれらの結果を乾物換算する為である。SO消去活性はワムシが強化剤を摂取している事を確認する指標としてと、ヒラメの体内で脂質の酸化時に生成される物質、特に活性酸素やフリーラジカルの毒性を軽減している可能性を調べる為に測定した。

バイオクロミスと強化剤を与えた後のワムシを目開き40μmのプランクトンネットで回収

し、清浄海水で十分に洗浄、濾過して不要物を除去し、分析時まで-80℃で凍結保存した。なお、対照のワムシは強化剤を与えていないだけで、その他の処理法は全て同じであった。

水分は常圧加熱乾燥法、脂質はジエチルエーテル抽出法、脂肪酸組成は脂質をクロロホルム:メタノール混液で抽出した後にメチルエステル化し、ガスクロマトグラフによって分析した。TBA値は水蒸気蒸留法¹⁶⁾、SO消去活性は電子スピン共鳴(ESR)法で測定し、活性はJ. M. McCord and I. Fridovichが定義した単位¹⁷⁾に相当する消去能として表記した。

1-5. ヒラメの成長と変態ステージの調査

孵化後6, 12, 18, 24および36日目に各水槽から30尾ずつサンプリングし、全長を測定して成長状態を調べた。ヒラメは成長に伴って著しく体型が変化する、所謂変態を行う魚として知られている。よって、全長測定に用いた魚で南の報告¹⁸⁾に基づいて外観から各変態ステージの分布割合を調べた。ステージはAからIまで認められたが、記号が進むに従って変態のステージも進んでいる事を示す。

1-6. 生残率と体型異常魚の調査

孵化後36日目の試験終了時に各水槽で生き残っている魚を全て取上げて計数した。この数字と経時的に全長測定のために取上げた魚数から生残率を求めた。

孵化後36日目の魚を各水槽から30尾ずつ採取して体重と全長を測定し、肥満度(体重×1000/全長³⁾)を求めた。肥満度は脊椎骨の異常を知る為のひとつの指標として測定した。更に、各水槽から100尾ずつサンプリングし、肉眼で白化個体と体型異常魚の出現率を調べ、体型異常の類別を行った。白化魚とは成長に伴って体表に表れるヒラメ特有の色が認められず、白いままである個体を云う。全体が白いままである完全白化から一部分が白いままである部分白化まで色々な段階があるが、ここでは全ての段階を含む数字である。白化も異常の一種であるが、体型の異常ではないので、体型異常魚には加えなかった。

2. 結果

2-1. ワムシの分析値

ワムシの分析値を表2に示す。強化剤添加の有無、強化剤中のGSE量等によってワムシの脂質含量は殆ど影響されておらず、何れの区も略同じ値を示した。TBA値は強化剤無添加の対照ワムシに比べ、添加区A, B, Cの値は何れも低く、強化剤添加ワムシの脂質の過酸化程度が低かったことが分かる。但し、GSE添加量とTBA値の間に正の相関は認められなかった。

前回試験で二次培養に冷凍ナンノを用いた区のワムシのTBA値89nmol/g乾物と比較すると、対照ワムシのTBA値は著しく高く、試験区ワムシの値も高かった。対照ワムシの培養法は前回試験の冷凍ナンノ区と同じであったので、この違いは本試験でワムシに与えた餌、即ちクロレラV₁₂、シゾキトリウム(バイオクロミス)、冷凍ナンノの何れかのTBA値が高かったものと考えられる。クロレラV₁₂とバイオクロミスは前回試験以降に新たに購入した製品を用いたが、冷凍ナンノは前回試験に使用した物を本試験まで-20℃で冷凍保存して使用した。よって、原因として可能性が高いのは冷凍ナンノであろう。前回試験に用いた冷凍ナンノより半年間-20℃での保存期間が長かったので、ナンノの死細胞率と死細胞中の脂質の酸化が進んでいたのではないかと推測する。仮に本試験で用いた冷凍ナンノの死細胞率を前回試験と同じ39.7%であったとすると、本試験に用いた冷凍ナンノ死細胞の酸化の指標となるワムシのTBA値/ナンノの死細胞率は1673nmol/g、100%死細胞であったとすると664nmol/gとなり、何れの値も前回試験の204nmol/g乾物より著しく高かった。本試験に用いた冷凍ナンノの死細胞率やTBA値を測定していないので断言は出来ないが、本試験で使用した冷凍ナンノの死細胞率が前回試験の物より高かっただけでなく、ナンノ死細胞中

表2 ワムシの分析値

	A	B	C	対照
水分 (%)	88.1	88.2	88.5	88.1
脂質	1.4	1.4	1.3	1.3
TBA値 (nmol/g)	43	27	39	79
SO消去活性 (単位/g)	240	250	270	240
脂質 (% 乾物)	11.8	11.9	11.3	10.9
TBA値 (nmol/g 乾物)	361	229	339	664
SO消去活性 (単位/g 乾物)	2017	2119	2348	2017

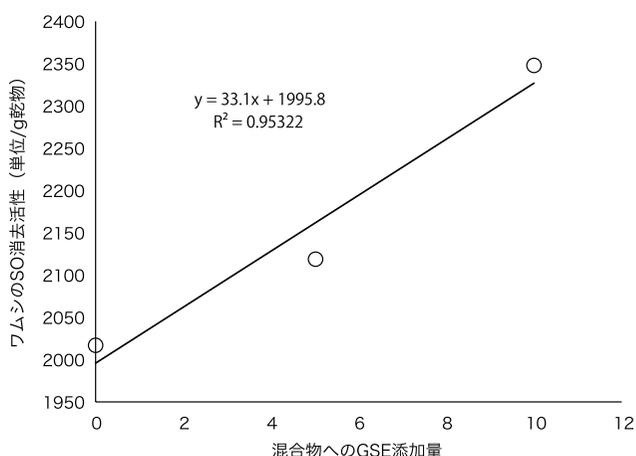


図2 GSE添加量とワムシのSO消去活性

の脂質の酸化が進んでいたのではないかと推測出来る。

図2に示す様にSO消去活性はGSEの添加量に比例して高くなっていったが、強化剤中にGSEを含まないA区ワムシの値は対照ワムシと同じであった。この結果から、ワムシは強化剤を投与量に比例して摂取していたことと、ワムシのSO消去活性にビタミンEとアスタキサンチンは殆ど関与していなかったことが分かる。強化剤添加区のワムシは何れも対照ワムシよりTBA値が低かったので、GSEを含まない強化剤もワムシ中で脂質の酸化を抑制していたと判断出来る。生体中での脂質の酸化行程には多くの段階が有り、ビタミンEやアスタキサンチンが作用する部分はGSEと異なっている事によるのであろう。

対照ワムシの脂質含量は前回試験の冷凍ナンノ区ワムシと同じであり、A~C区の強化剤添加ワムシの脂質含量も対照区と略同じであっ

表3 ワムシの脂肪酸組成

	A	B	C	対照
8:0 (%)			0.2	0.1
10:0	0.1		0.2	0.1
12:0	0.1	0.1	0.1	0.1
14:0	3.4	3.5	3.1	3.3
15:0	0.5	0.5	0.5	0.4
16:0	17.7	17.5	16.6	17.2
16:1	3.2	3.4	3.6	3.4
16:2	0.6	0.5	0.7	0.6
17:0	0.6	0.5	0.7	0.4
17:1	0.2	0.2	0.2	0.2
18:0	3.3	3.4	3.7	3.6
18:1	6.8	6.9	7.1	7.0
18:2n6	8.7	8.2	9.4	9.1
18:3n6	0.3	0.3	0.4	0.3
18:3n3	2.0	1.8	1.0	2.0
18:4n3	0.2	0.2	0.2	0.2
20:0	0.1			
20:1	1.8	1.7	1.8	1.9
20:2n6	0.7	0.7	0.8	0.7
20:3n6	1.4	1.3	1.6	1.5
20:3n3	0.2			0.1
20:4n6	2.6	2.5	2.7	2.6
20:4n3	1.6	1.5	1.3	1.6
20:5n3	4.9	4.9	5.1	4.7
21:5n3	0.2	0.2		
22:0	0.1	0.1	0.1	
22:1	0.6	0.5	0.6	0.6
22:4n6	0.4	0.4	0.4	0.4
22:5n6	8.7	9.4	8.7	8.6
22:5n3	1.3	1.4	1.5	1.4
22:6n3	22.0	23.5	22.5	22.6
24:0	0.2	0.2	0.2	0.2
24:1	0.5	0.5	0.5	0.6
未同定	5.0	4.2	4.5	4.5
Σ飽和酸 (%)	26.1	25.8	25.4	25.4
Σモノエン酸	13.1	13.2	13.8	13.7
Σn6	22.8	22.8	24.0	23.2
Σn3	32.4	33.5	31.6	32.6
Σn3/Σn6	1.42	1.47	1.32	1.41
EPA	4.9	4.9	5.1	4.7
DHA	22.0	23.5	22.5	22.6

た。これは本試験で用いたクロレラ V₁₂ とバイオクロミスの脂質含量が前回試験に用いた物と略同じであった事と、強化剤の脂質含量も少なかった事を表す結果である。

ワムシの脂肪酸組成を表3に示す。3試験区のワムシの脂肪酸組成に多少の違いは認められたが、その差は小さく、ヒラメの飼育成績に大

表4 ワムシの脂肪酸量

	A	B	C	対照
Σ飽和酸	36.5	36.1	33.0	33.0
Σモノエン酸	18.3	18.5	17.9	17.8
Σn6	31.9	31.9	31.2	30.2
Σn3	45.4	46.9	41.1	42.4
Σn3/Σn6	1.42	1.47	1.32	1.41
EPA	6.86	6.86	6.63	6.11
DHA	30.8	32.9	29.3	29.4

脂肪酸量 = 脂肪酸組成 (%) × 脂質量 (%)

きな影響を及ぼす程の違いではなかった。対照ワムシの脂肪酸組成は 14:0, 18:3n3, 20:4n3 および 22:5n6 等の値から GSE 無添加区 (A 区) ワムシに近かったのではないかとと思われるが、幾つかの脂肪酸で違いが認められた。但し、その差は小さく、強化剤の添加によってワムシの脂肪酸組成は殆ど影響を受けていなかったと考えられる。

前回試験の冷凍ナンノ区ワムシ²⁾ と本試験対照ワムシの脂肪酸組成を比較すると、本試験のワムシは 18:2n6, 18:3n3 および Σn6 (n6 系脂肪酸の合計値) が低く、22:5n6, DHA および Σn3, Σn3/Σn6 比が高かった。特に DHA と Σn3/Σn6 比が高かった事から、本試験ワムシは前回試験ワムシよりバイオクロミスの摂取比が高かったのではないかと推測出来る。

表3の値は脂肪酸の組成比であり、夫々のワムシの脂質含量は考慮されていない。ワムシの有する各脂肪酸量を求めるには定量分析を行わなければならないが、簡便法として表3の値に夫々のワムシの脂質含量を乗じて求めたのが表4の値である。本試験対照ワムシの値と前回試験冷凍ナンノ区ワムシの値を比較すると、本試験ワムシの方が Σn3, Σn3/Σn6 比, DHA が著しく高く、逆に Σn6 は低かった。Σ飽和酸, Σモノエン酸, EPA に大きな違いは認められなかった。この結果からも本試験ワムシは前回試験ワムシよりバイオクロミスの摂取量比が大きく、冷凍ナンノの比が少なかったのが分かる。この原因として本試験に用いた冷凍ナンノが前回試験よりワムシに摂取され難い形状になっていたのではないかと推測出来る。

2-2. ヒラメの飼育成績

各区の飼育結果を2水槽の平均値で表5に示す。3区共に生残率は前回試験より著しく高かった。この原因として、本試験でも腹部膨満症は認められたものの、強化剤中の免疫賦活剤の為か症状が軽微であったこと、飼育水温が前回より高かったため飼育期間が2週間短かったこと、ワムシの脂肪酸組成でヒラメの必須脂肪酸であるn3HUFA、特にDHAが多かったこと等が考えられる。使用出来る水槽数の問題で、本試験では強化剤無添加の試験区を設定出来なかったため、前回試験と本試験の生残率を直接比較することは出来ないが、ワムシへのグルカンやGSEの強化によって仔稚魚の生残率が高くなったのはマダイやゼブラフィッシュの結果⁸⁾と一致していた。

B区が生残率がA区、C区より低かったが、これは1水槽の生残率が20.2%と他水槽より著しく低かった事によって。もう一方の水槽は29.4%で、他水槽と大きな違いは無かった。6水槽のうち1水槽のみで生残率が低かった原因は不明であるが、GSEの添加量を増やしても本試験の範囲内であればヒラメの生残率に悪影響を与えることは無いと云える。

孵化後36日目の全長と体重は危険率5%で各区間に有意差は認められなかったものの、GSEの添加量が多くなるに従って大きくなっており、ワムシへのGSEの強化によってヒラメの成長が促進される可能性が有ることを示唆している。図3にワムシのSO消去活性と体重の関係を示す。両者の間には強い正の相関が認められた。ワムシがGSEを取り込んだ量が多い区ほど魚の成長が良かったことが分かる。

肥満度は前回試験の冷凍ナンノ区では約11であったが、本試験では8~9で、何れの区も可也低かった。ヒラメの肥満度は成長に伴って

表5 飼育成績

	A	B	C
生残率 (%)	34.3	24.8	30.3
全長 (cm)	1.874	1.987	2.008
体重 (g)	0.056	0.062	0.071
肥満度	8.509	7.903	8.770

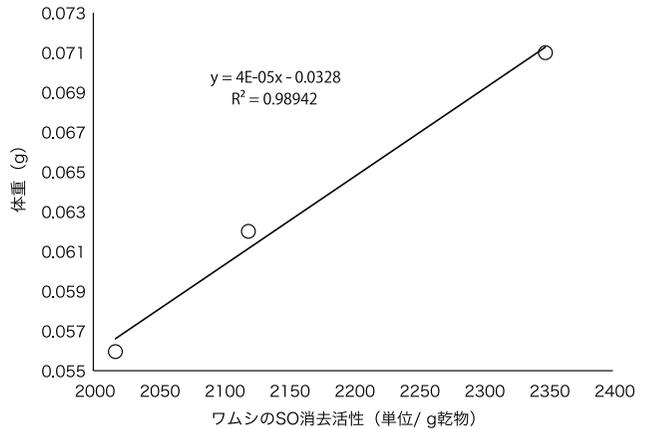


図3 ワムシのSO消去活性とヒラメの体重

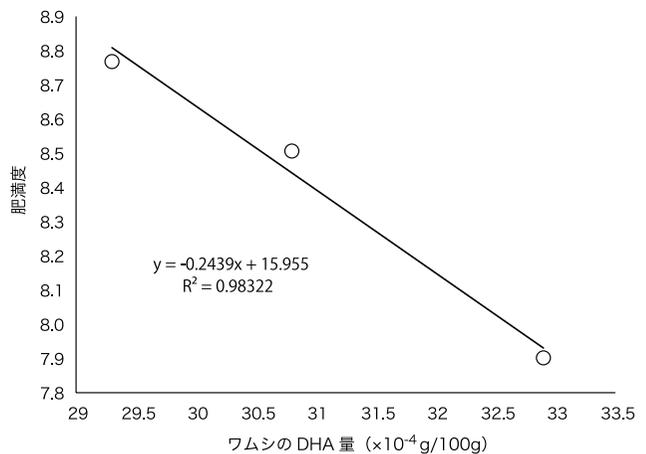


図4 ワムシのDHA量とヒラメの肥満度

大きくなる傾向が有る様なので、本試験の魚の肥満度が小さかったのは測定時の魚が前回試験よりやや小さかった事も関係しているのであろうが、本試験の魚は体重に対する全長が長く、脊椎骨の異状が少なかった事を示唆するものと推測する。

ワムシの成分と肥満度の関係では、ワムシのn3HUFA、特にDHA量と肥満度の間に強い負の相関が認められた(図4)。つまり、ワムシ

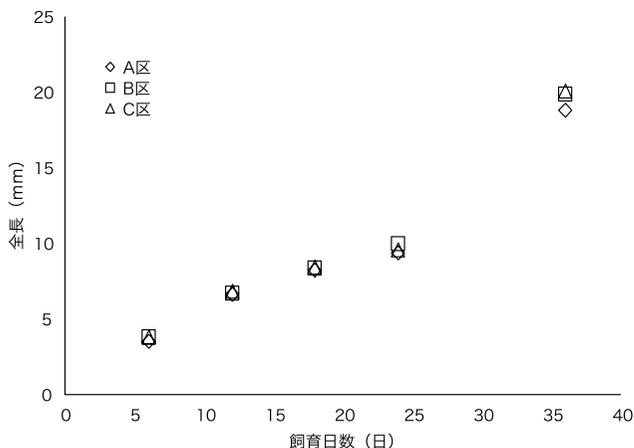


図5 成長曲線

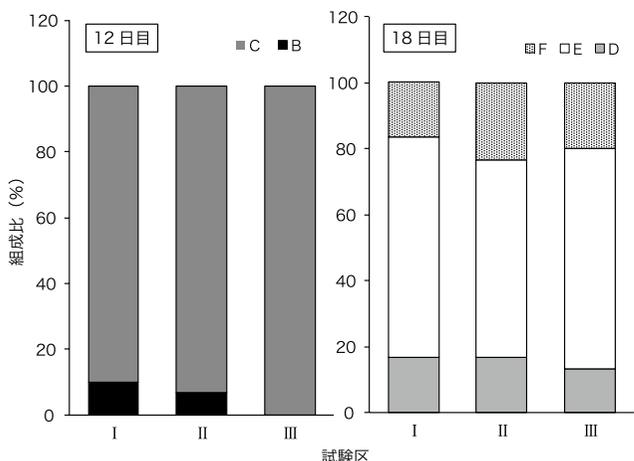


図6 孵化後12日目と18日目の変態ステージ

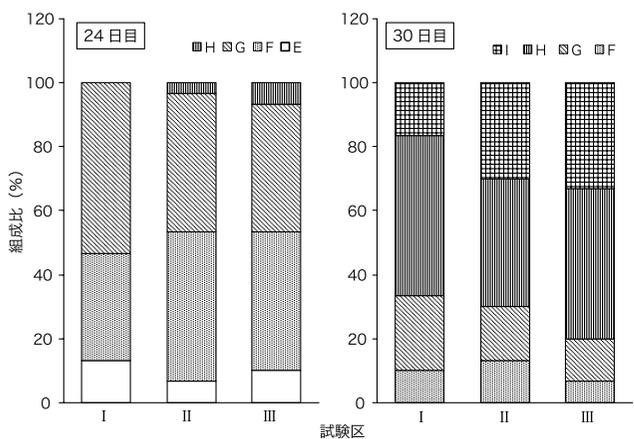


図7 孵化後24日目と30日目の変態ステージ

中にn3HUFA, 特にDHA量が多い程脊椎骨の異常を呈する魚の率が低いことを表している。この結果は, ワムシ中のn3HUFA, 特にDHA量の不足が脊椎骨の異常を起こす原因の一つになっている可能性を示す。

前回試験の飼育期間は孵化後50日であったが, 本試験は36日と2週間短かったにも拘らずヒラメは略同じ大きさにまで成長していた。これは本試験の水温が高かったので摂餌量も多く, 早く成長したものと思われる。

経時的な全長測定によって求めた成長曲線を図5に示す。ワムシの単独投与期間中は各区間の成長差は不明確であったが, アルテミアの孵化幼生を与え始めると次第に各区間で成長差が認められるようになり, 配合飼料を与え始めると更にその差が大きくなった。ワムシへのGSE投与量が多い区ほど成長が速かった。アルテミアの孵化幼生と配合飼料は各区共同じ物と同じ量与えたので, 与えたワムシの質の違いがその後のヒラメの成長にも影響を与えていたと判断出来る。

2-3. 変態ステージ

南の報告¹⁸⁾ではヒラメの変態ステージをA~Iの9段階に分けてある。本試験の試験区もA~Cとしたので紛らわしい。よって, この変態ステージの項でのみ本試験のA区をI, B区をII, C区をIIIと表記した。

孵化後6日目にはいずれの区も全てAの変態ステージであったが, 12日目には区間差が認められるようになり, GSE添加量が多い区ほど変態の進み方が早かった(図6)。18日も同様であった。ワムシとアルテミア孵化幼生を4日間併用した孵化後24日目, アルテミア孵化幼生の単独投与最後の日である孵化後30日目でも同様にGSEの添加

量が多い区ほど変態は早く進んでいた (図7)。配合飼料を与え始めると何れの区も変態は急速に進み、孵化後36日目には全区全ての魚がIステージに達していた。

以上の結果から、ワムシにGSEを強化するとGSEの量に比例してヒラメの変態が早く進むことが分かったが、GSEの何がヒラメの変態を促進しているのかは不明であり、今後解明する必要がある。前項で説明した様にGSEの強化によって成長も促進されるので、成長と変態スピードが関係していたのかも知れない。

2-4. 白化魚と体型異常魚

試験終了時に調べた白化魚と体型異常魚の出現率を表6に示す。

白化魚の出現率は3区共1%以下と少なく、問題になる程の出現率ではなかったが、ワムシのTBA値と白化魚出現率の関係を調べると両者の間には負の相関が認められた (図8)。これまでの試験で飼餌料の脂質やHUFA量が多い程背面白化魚の出現率が低く、逆に腹面黒化魚の出現率が高くなり、両者の間には負の相関が有ることが分かっている。また、背面白化や腹面黒化は配合飼料の単独投与時期になっても影響を受けるが、ワムシ投与期の影響が長期間続くことや、ワムシへのGSEの投与によって腹面黒化魚の出現率は減少するが、それに従って背面白化魚の出現率が増加することが分かっている^{19,20)}。HUFAは体内で酸化され、TBA値が高くなり易い。本試験の結果は飼餌料中の脂質含量が高く、脂質の酸化が進んでいる程背面白化魚の出現率が低く、逆に腹面黒化魚の出現率が高くなり易い事を示すものと思われる。メラニン合成量との関係が有るのであろう。前回試験においても冷凍ナンノ区の白化魚率は1.0%と低かったものの、本試験では3区共0.3~0.6%と更に低くなっており、ワムシへの強化剤の添加効果が有ったのかも知れない。

本試験の体型異常魚の出現率は7.0~8.5%で、前回試験冷凍ナンノ区の38.5%より著し

表6 白化魚率と体型異常魚率

	A	B	C
白化魚率 (%)	0.33	0.56	0.39
体型異常魚率	8.5	8.5	7.0
異常の種類			
下顎伸長 (%)	6.0	3.5	2.5
上顎短縮	1.5	3.0	1.0
体弯曲	1.0	2.0	2.5

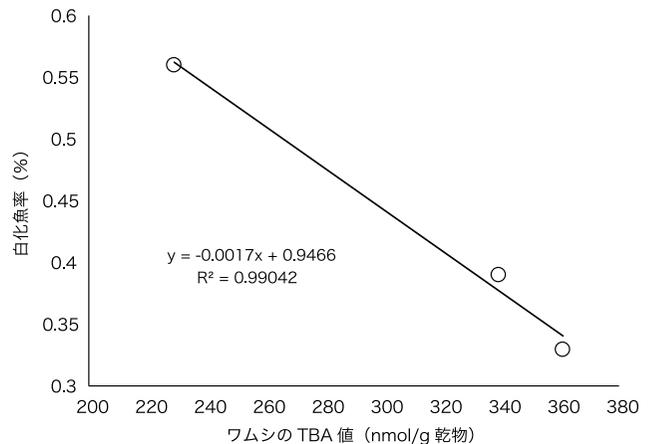


図8 ワムシのTBA値とヒラメの白化魚率

く少なくなっていた。また、異常の種類も前回試験では下顎伸長をはじめとし、顎の捩れ、体弯曲、鰓蓋欠損、短軀、頭部逆位等多数の種類が認められたが、本試験では下顎伸長、上顎短縮、体弯曲のみで異常の種類も少なかった。ワムシへの強化剤添加がヒラメ仔稚魚の体型異常を予防する効果が有ったと云える。

ヒラメの飼育成績の項で説明した通り、ワムシのDHA量と肥満度の間に負の相関が認められた。肥満度は体重と全長の関係を表す指標であり、肥満度が小さいのは体重に対する全長が長い事を表している。DHA量と肥満度の間には負の相関が存在するので、DHA量が多い程体重に対する全長が長い、言い替えると脊椎骨が正常に発達している事を示している。本試験では脊椎骨の形状を精査していないので断言は出来ないが、ワムシのDHA量がヒラメの脊椎骨異常に関与している可能性が有る。

本試験では前回試験で認められなかった上顎の短縮症状を呈する異常が認められた。受精卵を得た親魚個体と仔稚魚の上顎短縮との関係

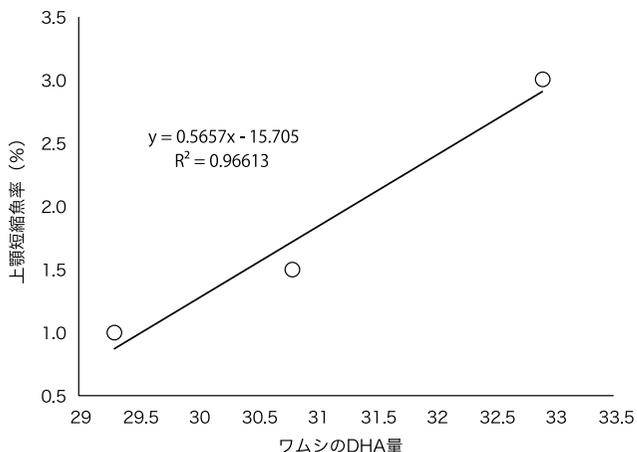


図9 ワムシのDHA量とヒラメの上顎短縮魚率

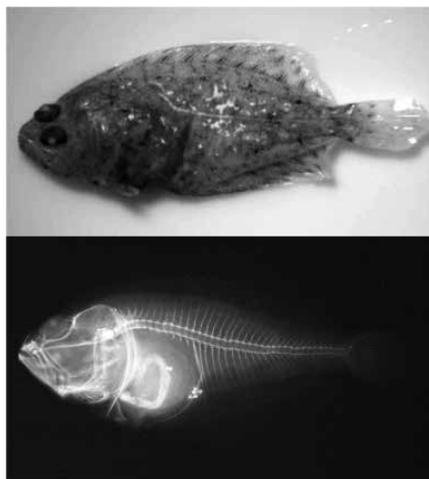


写真1 正常魚

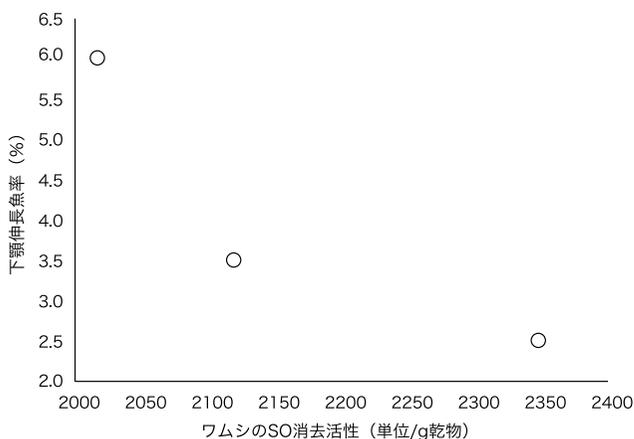


図10 ワムシのSO消去活性とヒラメの下顎伸長魚率

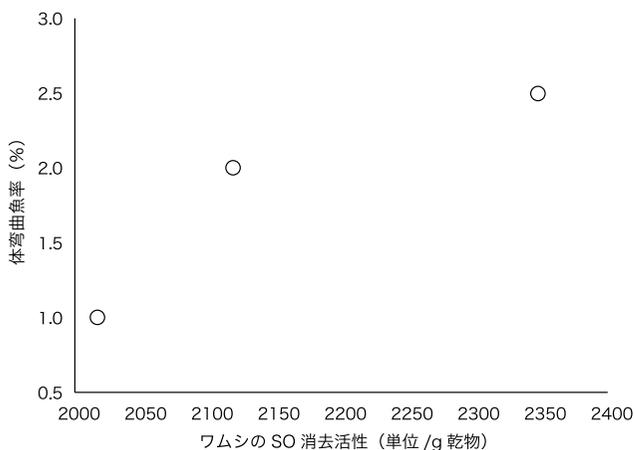


図11 ワムシのSO消去活性とヒラメの体彎曲魚率

については既に Sawayama ら²¹⁾ が報告しているのので、ここではワムシの成分と上顎短縮個体出現率の関係について述べる。ワムシのDHA量が多い程上顎短縮魚の出現率が高く、両者の間には正の相関が認められ(図9)、前回試験の体彎曲魚の出現率と同じ傾向であった。DHA そのものが骨の異状を引き起こすとは考え難いので、DHA量の増加に伴って変化する何らかの物質が上顎骨の発育異常を生じる原因になっている事が考えられる。

正常魚(写真1)に比べて下顎が異常に長く見える下顎骨伸長魚の出現率は強化物中のGSE添加量が多くなってワムシのSO消去活性が高くなるに従って低くなっていた(図10)が、体彎曲魚率は逆に高くなっていた(図11)。下顎伸長魚率と体彎曲魚率の間には非常に強い負の相関が認められた(図12)ので、夫々の体型異常を引き起こす機構が異なっているのではないかと推測する。下顎伸長魚(写真2)は下顎の骨が長くなっており、体彎曲魚(写真3)は脊椎骨の変形が原因となっていることが軟X線写真より分かる。頭部の骨あるいは脊椎骨が変形する原因が異なっ

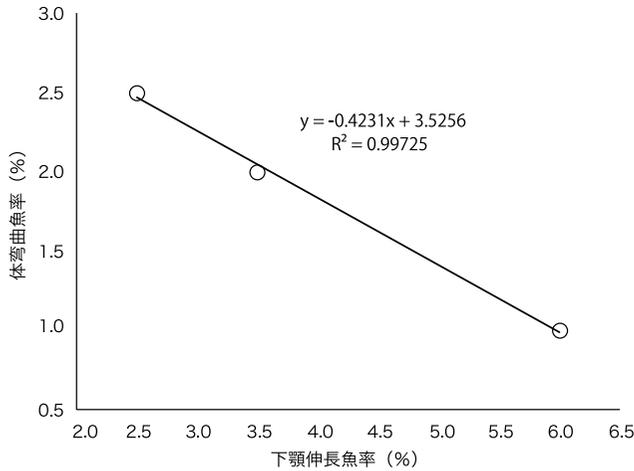


図 12 ヒラメの下顎伸長と体弯曲の関係

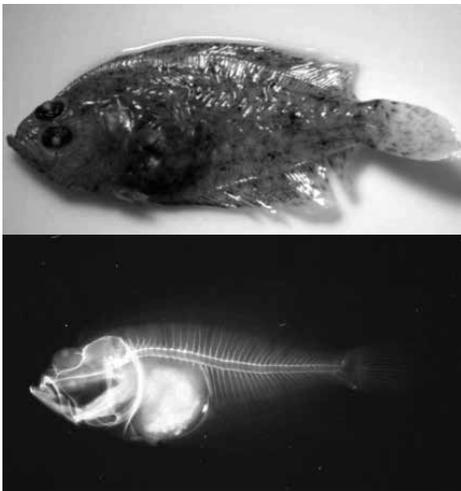


写真 2 下顎伸長魚



写真 3 体弯曲魚

ているのであろう。

前回試験で冷凍ナンノ投与区ワムシの SO 消去活性は 2033 単位 /g 乾物で、本試験の GSE 無添加の A 区と略同じであった。ところが前回試験で同区の下顎伸長魚率は 25.0% で、本試験 A 区の 6.0% より著しく高かった。この結果は強化剤への GSE 添加による SO 消去活性の増加が下顎伸長魚の発生を抑制しているのは確かであるが、それ以外の強化剤成分であるグルカン、ビタミン E、アスタキサンチン等も下顎伸長の発生を抑制している可能性を示唆している。本試験に用いたパン酵母（グルカン源）

が有する抗酸化力は調べていないが、ビタミン E とアスタキサンチンは強い抗酸化力を有する事が知られている。強化物中のビタミン E とアスタキサンチンもワムシに取り込まれたであろうから、恐らくワムシの有する抗酸化力とヒラメ仔稚魚の体型異常、特に下顎伸長の出現との間に何らかの関係が有るのではないかと推測する。

前回試験で体弯曲魚の出現率とワムシの脂質量、DHA 量および TBA 値との間に正の相関が認められた。これはワムシ中の脂質、特に HUFA の酸化が体弯曲魚の出現を促進している可能性を示唆している。ところが本試験では体弯曲魚の出現率とワムシの SO 消去活性との間に正の相関が認められ、脂質の酸化を抑制する力が強いワムシを与えた区ほど体弯曲魚の出現率が高かった。何故この様に一見矛盾する結果になったのか現在のところ不明であるが、何らかの理由が有るのであろう。

3. 考察

前回試験の結果と本試験の結果を併せ考えると、ワムシへの免疫賦活剤や抗酸化剤の強化がヒラメ仔稚魚の生残率を高め、変態スピードを速くし、体型異常魚の発生を抑制したと判断出来る。

ワムシやアルテミアへのパン酵母由来

β -1,3/1,6-グルカン、GSE、ビタミンC、ビタミンE、アスタキサンチン等の強化が魚の抗病性を強くすることはニジマス^{13,14)}、マダイ⁹⁾、ゼブラフィッシュ⁹⁾、アユ⁸⁾等で既に報告した。

グルカンやGSEの強化によって補体C3群の遺伝子発現が上昇し、これにビタミンCやEを併用するとC4群の遺伝子の発現も促進される。その結果マクロファージを中心とする貪食細胞の貪食能が強くなる。また、アスタキサンチンによって白血球中の活性酸素産生能や血漿中のリゾチーム活性も上昇する。これによって貪食細胞中に取り込まれた病原菌の殺菌力や、魚体内に侵入した病原菌に対する殺菌力も強くなる。更にGSE、ビタミンE、アスタキサンチン等の生体内で強い抗酸化作用を有する物質によって、生体内の酸化ストレスによって出来る活性酸素やフリーラジカルを減少させる。生体内のタンパク質、脂質、核酸等の物質と非常に強い反応性を持つ活性酸素やフリーラジカルが減少することによって免疫系の障害が軽減され、抗病性が上昇する。この様にグルカン、GSE、ビタミンE、アスタキサンチン等による抗病性の上昇は、主として非特異的免疫系の強化によるものと思われる。

上記の他にマダイではワムシへのグルカンとGSEの強化によって仔稚魚の空中露出耐性(=酸素欠乏耐性)や低水温耐性、水温の急変に対する耐性等が著しく強くなっていた。強化区の魚ではATPの合成に関する酵素や補酵素の遺伝子発現が上昇し、赤血球の造血や上皮細胞の活性化に関する遺伝子の発現も上昇していた。また、ヒートショックタンパク質他のストレス耐性に関する遺伝子の発現も変化していた。

魚を空中露出して酸素欠乏状態にした後水中に戻した時のエネルギー源はATPである事が証明されている。赤血球の造血能が強くなる事によって酸素欠乏に対する耐性が強くなり、上皮細胞が活性化することによって空中露出時の体表の乾燥に対する耐性が高くなっていたものと考えられる。強化されたワムシを食べた魚はこれらの反応によって空中露出耐性が高くなっ

たものと推測する。更にヒートショックタンパク質をはじめとするストレス耐性遺伝子の発現が変化する事によって、低水温や水温の急変に対する耐性が高くなっていたのであろう。

これらの働きが複合して作用した結果、本試験でグルカン、GSE、ビタミンE、アスタキサンチン等を強化したワムシを与えたヒラメ仔稚魚の生残率が著しく高くなったものと推測する。

その他の遺伝子では強化ワムシを食べた魚のタンパク質合成やヌクレオチド合成に関する遺伝子の発現が上昇し、タンパク質分解に関する遺伝子の発現は抑制されていた。体タンパク質ひいては体細胞や体組織の形成が促進され、成長や代謝に必要なエネルギーの供給量が多くなる状態に変化していたのではないかと思われる。これが何れの魚種においても強化剤無添加のワムシを食べた区の魚と成長に有意差は認められないものの、強化ワムシ区の方がやや成長が良い理由ではないかと推測する。

変態ステージの進行は前回試験より早い傾向が認められたが、これは飼育水温の違いによるのであろう。また、前回試験で露天ナンノ、冷蔵ナンノあるいは冷凍ナンノでワムシを二次培養した区間の違いより本試験のA～C区間の違いは小さかった。これは本試験では何れの区も冷凍ナンノでワムシの二次培養を行った為であろう。変態の遅れはアルテミアの孵化幼生や配合飼料を与え始めると回復したのは前回試験の結果と一致しており、本試験でもA～C区間の変態速度の違いは与えたワムシの質の違いによっていたと云える。

本試験でワムシ強化剤中のGSEが多い区ほど早く変態が進んだのは、生体内での脂質の酸化と変態に何らかの関係が有ることを示唆している。ヒラメの変態は甲状腺ホルモンの作用と密接に関係している事を乾^{22,23)}が報告している。ワムシ中に含まれるGSEをヒラメが摂取することによって、魚体内での脂質の酸化が抑制され、酸化過程で形成される反応性が強い物質の悪影響が軽減され、脳下垂体からの甲状腺

表7 ワムシの成分と体型異常との関係

相関	正	負
前回試験	脂質含量 対 体弯曲 DHA 含量 対 体弯曲 TBA 値 対 体弯曲	脂質含量 対 体型異常 脂質含量 対 顎振れ HUFA 量 対 鰓蓋欠損 DHA 量 対 鰓蓋欠損 TBA 値 対 鰓蓋欠損
今回試験	DHA 量 対 上顎短縮 SO 消去活性 対 体弯曲	DHA 量 対 脊椎骨異状 SO 消去活性 対 下顎伸長

ホルモンの分泌や甲状腺ホルモンの作用が正常な状態に保たれていたのではないだろう。

脂質、特に HUFA が多い飼餌料を与えたヒラメで腹面黒化が多く、逆に背面白化が少ない事は既に報告した^{19,20)}。これらの体色異常が変態異常の一症状であるとすると、変態速度と飼餌料の脂質、特に HUFA 含量との間にも関係が有るのではないかと考えられる。HUFA は体内で酸化され易いこと、抗酸化剤は酸化を抑制すること、ワムシへの GSE の強化によって体色異常魚の出現率が減少すること等から、ヒラメの体色異常は変態異常のひとつの症状ではないかと推測出来る。

表7に前回試験と本試験でワムシ成分との間に強い相関が認められた体型異常を纏めてある。この他にナンノ死細胞の TBA 値と下顎伸長の間には正の、下顎伸長と体弯曲の間には負の相関が存在していた。

ワムシの脂質、特に HUFA や DHA 量、脂質の酸化程度、SO 消去活性等が体型異常と強い関係が有ること、異常の種類によって発症機構が異なる可能性が高い事等が分かる。

S.P.Lall ら²⁴⁾ は魚類において飼餌料中の栄養成分と骨の代謝、病態がどの様にしているかを要約し、その中で脂質および脂質の酸化が骨に及ぼす影響を説明している。

脂質については次のように述べている。

「必須脂肪酸由来の炭素数 20 の HUFA はエイコサノイド、プロスタグランジン (PG)、ロイコトリエン等のプレカーサーであり、これらの物質は骨細胞の代謝に影響を及ぼす。

PG は骨細胞機能の主要なメデイエーターであり、アラキドン酸 (20:4n6) から合成される PGE2 は骨の再吸収を促進する。一方、PGS はインスリン様成長因子 (Insulin-like growth factors:IGFS) の産生と合成に影響を及ぼす。この IGFS は新しい骨の形成や骨基質の生産を活発化させる主要

な骨由来の成長因子である。誕生、成長、老化に伴う骨容量の維持は PGS と IGFS の複合作用によっている。よって、飼餌料の脂質含量、特に HUFA 含量が骨の形成、維持に大きな役割を担っている可能性が高い。

最近ヨーロッパスズキの稚魚で餌の HUFA、特に EPA と DHA 濃度と脊椎骨の変形の関係が調べられ、魚の成長や生残率とは逆に EPA や DHA が一定量以上であると頭部や脊椎骨の変形を引き起こすことが明らかにされた。HUFA の過剰は骨芽細胞の分化を促進し、骨数の増加を生じ、変形に繋がっている。また、ヨーロッパスズキでは孵化後の日数によって脂質やビタミン A の影響が変化し、孵化後 13 日前後が境の様なので、孵化後日数によって原因の区別を行わなければならない。」

脂質の酸化と骨格異常の項では以下の記述が認められる。

「抗酸化物質が不足した組織では HUFA が酸化され、それが筋肉ジストロフィーを含む病変を引き起こす。アルデヒド、エポキシサイト、ケトン等の酸化成分はビタミン、タンパク質、脂質等と反応し、更に組織のダメージを大きくし、病態を酷くする。脂質の酸化過程で産生される活性酸素やフリーラジカルのダメージから骨芽細胞を守るには餌中の抗酸化物質が重要な役割を果たす。脂質、特に HUFA が多い餌には抗酸化物質の添加が必要である。」

更に考察の項では、「魚の組織には脂質と微量栄養素が多量に含まれており、これらの物質はコラーゲンを含む骨細胞の脂質過酸化に感受

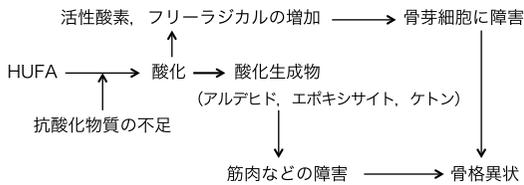


図 13 脂質の酸化が骨格異常を生ずる機構 (推測)

性が高い。骨の代謝や病気に対して抗酸化的な栄養素、脂質の質、HUFA等の要因に焦点を当てた更なる研究が必要である。この点から餌由来のEPAとDHA濃度がヨーロッパスズキにおいて脊椎骨や頭部の変形に影響を及ぼすとの研究は興味深い。HUFAがエイコサノイドの生合成に及ぼす役割、特に骨の形成や骨細胞の分化に対する役割に関する研究が、魚の骨の健康に対して重要な手がかりを与えるであろう。」と述べている。

上記を要約したのが図13である。本試験ではヒラメの体型異常を予防する目的でGSE、ビタミンE、アスタキサンチンをワムシに強化したが、これらの物質は代表的な抗酸化剤として知られている。

S.P.Lallらの報告と著者らの前回試験と本試験の結果で体型異常に関する部分を比較すると、以下の点で良く一致している。

- ・体型異常は種苗生産初期のワムシ摂取時期の影響が大きい。
- ・ワムシの脂質、特にHUFAやDHA量が多い程成長が良い傾向が認められるが、特定の骨格異常が多かったり少なかったりする。
- ・ワムシの脂質、言い替えるとワムシに与え

たワムシの脂質の酸化が進んでいるほど特定の骨格異常が高率で生じる。

- ・魚の孵化後日数の関係か、異常の種類によって発生機構が違うのではないかと考えられる。
- ・ワムシにGSE、ビタミンE、アスタキサンチン等の抗酸化物質を強化することによって骨格異常魚の出現率を減らせる。

著者らの試験結果と文献より結論として以下の事が云える。

- ・ヒラメ種苗生産時の生残率を高くするには、ワムシへの免疫賦活剤強化も効果が有る。
- ・ワムシの脂質、特にHUFA量は魚の成長や活力に大きな影響を及ぼすので、これらの栄養成分を必要以上に減らすべきではない。
- ・一方、ワムシの脂質、特にHUFA量が多い程腹面黒化や特定の骨格異常魚の出現率が高くなるので、これを防がなくてはならない。
- ・ワムシの一時培養、二次培養および強化用餌料の脂質の酸化が進んでいるほど変態の進行が遅れたり、特定の骨格異常の出現率が高くなったりするので、ワムシに与える餌料は新鮮な物を使用すべきである。
- ・魚体の脂質の酸化を抑制し、酸化生成物や活性酸素、フリーラジカルの害を防ぐ為には抗酸化物質をワムシに強化してやれば良い。
- ・ワムシへグルカン等の免疫賦活剤やGSE、ビタミンE、アスタキサンチン等の抗酸化物質を強化することによって生残率を向上させ、変態スピードを速くし、腹面黒化魚や体型異常魚の出現率を低減出来る。

参考文献

1. E.Sawayama, S.Sakamoto and M.Takagi:Abnormal elongation of the lower jaw in juvenile Japanese flounder;combined effects of rotifer diet enriched with Nannochloropsis preserved by various methods and parentage. *Fisheries Science*, **78** (3), 631-640, 2012.
2. 酒本秀一, 澤山英太郎: ワムシ培養餌料がヒラメ仔稚魚の変態と体型に及ぼす影響. *New Food Industry*, **58** (7), 17-31, 2016.
3. 酒本秀一, 糟谷健二, 伊藤千夏, 神崎 健: パン酵母由来 β -1,3/1,6- グルカンの持つ機能性. *New Food Industry*, **52** (4), 21-31, 2010.
4. 酒本秀一, 伊藤千夏, 糟谷健二, 神崎 健: パン酵母由来 β -1,3/1,6- グルカンのヒトでの機能性評価. β グルカンの基礎と応用 (大野尚仁 監修), シーエムシー出版, 東京, 145-151, 2010.
5. 酒本秀一, 糟谷健二, 伊藤千夏, 神崎 健: パン酵母 β -1,3/1,6- グルカンの特性と用途. *ジャパンフードサイエンス*, **50** (1), 21-25, 2011.
6. 酒本秀一, 糟谷健二: パン酵母 β -1,3/1,6- グルカンの機能. *Food Style 21*, **15** (6), 38-39, 2011.
7. 酒本秀一, 糟谷健二: 魚類の細菌感染症に対するブドウ種子抽出物と β -1,3/1,6- グルカンの予防効果. *New Food Industry*, **53** (7), 27-40, 2011.
8. 酒本秀一, 糟谷健二, 海野徹也, 古澤修一: パン酵母 β - グルカン, ブドウ皮粉砕物, ビタミン C およびビタミン E の投与で魚の抗病性が向上する理由. *New Food Industry*, **53** (8), 1-11, 2011.
9. 酒本秀一, 糟谷健二, 山本真司, 村田 修, 海野徹也: パン酵母 β - グルカンとブドウ種子抽出物を生物餌料経由でマダイおよびゼブラフィッシュ仔魚に与えた効果. *New Food Industry*, **53** (9), 15-26, 2011.
10. 酒本秀一, 糟谷健二: β グルカンの機能 -1. *New Food Industry*, **53** (11), 27-36, 2011.
11. 酒本秀一, 糟谷健二: β グルカンの機能 -2. *New Food Industry*, **53** (12), 1-11, 2011.
12. 酒本秀一, 糟谷健二: β グルカンの機能 -3. *New Food Industry*, **54** (1), 31-42, 2012.
13. 酒本秀一: ニジマスで *Flavobacterium* 属細菌の被害を軽減する方法 -1. *New Food Industry*, **54** (6), 51-62, 2012.
14. 酒本秀一: ニジマスで *Flavobacterium* 属細菌の被害を軽減する方法 -2. *New Food Industry*, **54** (7), 49-58, 2012.
15. 酒本秀一: 養魚用飼料への機能性物質の添加効果. *New Food Industry*, **54** (8), 58-70, 2012.
16. 柴田宣和, 衣巻豊輔: 水産食品油脂の TBA 測定法の検討 - I, 水蒸気蒸留法. *日本水産学会誌*, **45** (4), 499-503, 1979.
17. J.M. McCord and I.Fridovich:Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte protein (hemocuprein).*J. Biol. Chem.*, **244** (22), 6049-6055, 1969.
18. 南卓志: ヒラメの初期生活史. *日本水産学会誌*, **48** (11), 1581-1588, 1982.
19. 酒本秀一, 山本真司, 糟谷健二, 村田 修: パン酵母 β - グルカンとブドウ種子抽出物のヒラメ腹面黒化症抑制効果. *New Food Industry*, **53** (10), 15-26, 2011.
20. 村田 修, 山本真司, 酒本秀一: ヒラメ飼育用配合飼料及びヒラメ飼育方法. 特願 2010-5745, 2010.
21. E.Sawayama and M.Takagi:Morphology and parentage association of shortened upper jaw deformity in hatchery-produced Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck & Schlegel, 1846). *J. Appl. Ichthyol.*, in press.
22. 乾靖夫: ヒラメの眼が移動する訳. 魚の変態の謎を解く (バルソープックス 025, (社)日本水産学会監修), 成山堂書店, 東京, 25-92, 2006.
23. 乾靖夫: なぜ変態するか. 魚の変態の謎を解く (バルソープックス 025, (社)日本水産学会監修), 成山堂書店, 東京, 119-133, 2006.
24. S.P.Lall and L.M. Lewis-McCrea:Role of nutrients in skeletal metabolism and pathology in fish-An overview. *Aquaculture*, **267**(1-4), 3-19, 2007.

本格的なプロの味を探求した驚くべきヒット食品

— 『本格炒め炒飯』 株式会社ニチレイフーズ —

田形 暁作 (TAGATA Yoshinari)

TAGATA 食品企画・開発代表

Key Words: 商品開発 プロの味 技術開発 開発品 5P 売上 No.1

はじめに

ニチレイグループは創業60周年の2005年(平成17年)度より、持ち株会社と5つの基幹事業会社(現在は4つ)からなる持ち株会社に移行した。株式会社ニチレイフーズは其中で加工食品事業を担当する。

ニチレイグループは2015年、創立70周年を迎えた。その間、冷凍食品のバイオニアとして数多くの商品を開発・発売してきた。商品開発の基本理念は生活者に喜んでいただける商品づくり、サービスの提供に努めることであり、ものづくりへの想いは強い企業である。

今回の『本格炒め炒飯』はまさしく、従来の炒飯とは異なり本当に喜んでいただける炒飯とは何かを追求し完成させた商品である。発売は2001年3月であり、15年になる。売上は14年連続No1である。このたび、広報グループの責任者に取材をお願いした。

1. 会社概要

日本で初めて冷凍食品をつくった企業として、研究開発・調達・生産・販売・物流の能力をフルに活用し、生活者に役立つ価値ある商品とサービスを提供し続ける。

社名	株式会社ニチレイフーズ
代表取締役社長	池田 泰弘
本社所在地	〒104-8402 東京都中央区築地6丁目19番20号ニチレイ東銀座ビル
設立	2005年1月5日株式会社ニチレイの持株会社体制への移行に伴い設立
資本金	150億円
売上高	1992億円(2016年3月期ニチレイフーズグループ連結)
従業員数	11,015名(2016年3月期ニチレイフーズグループ連結)
事業内容	冷凍食品・レトルト食品・缶詰・包装氷等の製造・加工並びにこれらの製品の販売

2. 企業情報

- 企業コンセプト; ぐらしに笑顔を
- ミッション(存在意義); ニチレイフーズは人々のぐらしを見つめ、食を通じて、健康で豊かな社会の実現に貢献する。
- ビジョン(目指す姿); 常に独自能力を磨き、卓越した価値を創造することで、世界でも信頼される食品企業を目指す。

3. 『本格炒め炒飯』の開発の背景と商品開発について

2001年3月に発売したが、当時の冷凍炒飯の作り方はごはん調味料や具材を混ぜた「ま



初代『本格炒め炒飯』の商品写真

「ぜごはん」というのが実態であった。炒めることは業界では不可能と考えられていた。家庭での炒飯のメニュー出現頻度は高かったが、満足度は低かった。そこで、おいしいといわれている中華料理店の炒飯を食べ歩き、それを持ち帰り、油がごはん粒全体にコーティングされていることをマイクロスコープで観察し、目標とする炒飯の作り方を検討していった。再現できるように製造設備の開発研究をした。完成するまでに3年を要した。『本格炒め炒飯』を完成するに当たり、多くの技術ノウハウと特許取得がある。

4.『本格炒め炒飯』を開発品 5P にのっとり紹介

筆者は新商品を開発し、その商品がお客様の手に届くために、新商品開発 5P を開発段階の確認のためのチェック用に使用している (図 1)。

5P は先ず第一に『Product』ありきである。『Product』には商品コンセプト、商品形状、ネーミングなどがある。第二は『Package』である。包装仕様、デザインなどがある。第三は『Price』であり、商品を発売するとき非常に重要である。第四は『Place』である。スーパーで販売するのか、コンビニエンスストアなのか、デパートなのか、専門店なのか、ドラッグストアなのか、それとも通販なのか。色々なチャネルがあるので、選択と集中が必要になる。第五は『Promotion』である。店頭プロモーション、媒

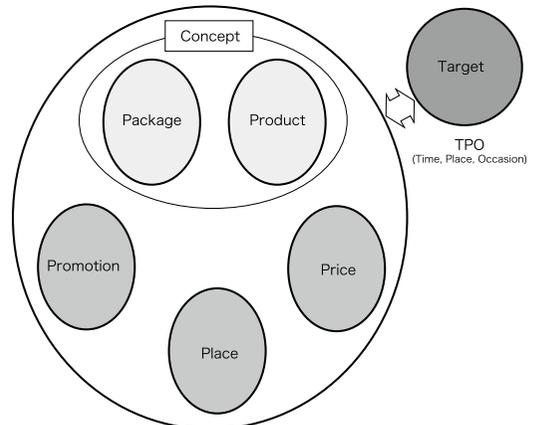


図 1 商品開発 5P

開発品はユーザーの手に届く仕組みになっているか

体プロモーションなど効果的に使うことが重要である。最後に 5P ではないが、『Target』がある。全ての 5P は『Target』を明確にした後のことである。『Product』は『Target』が明確にならないと決まらないはずである。さらに、包装仕様を決定するうえで重要なのが T (Time), P (Place), O (Occasion) である。この考えに基づき、『本格炒め炒飯』を整理してみる。

『Product』には商品コンセプトとネーミングなどがある。商品コンセプトはプロが中華料理店でつくる味を家庭でレンジで簡単に料理し、中華料理店のおいしさを楽しめる事である。その技術開発はプロが中華鍋で高温で炒め、ごはん粒一粒ずつを油でコーティングする設備を開発したことである。

ネーミングは炒めることが重要なので“炒める”と“炒飯”に「炒」という文字を 2 回使用した。その結果、『本格炒め炒飯』とした。

『Package』はデザインを工夫した。一般的には皿に炒飯を乗せているのが多いが、『本格炒め炒飯』は中華なべで炒めている画像をパッケージに入れた。このことは冷凍食品としては画期的なことである。

『Price』は参考小売価格として一袋 450g 入りを 460 円とした。

『Place』はスーパー中心で販売した。

『Promotion』はCF投入は費用がかかるため、テレビの情報番組などでパブリシティを勝ち取る戦略を取った。レンジで加熱すると加熱時から香ばしい香りが立ち、さらに、出来上がりを見るとぱらっとしており、食べるとおいしく、すぐに商品の良さを実感していただけるので効果的であった。商品力があるということがこんなにメディアにも反響があるということであらためて実感した。

5Pではないが、『Target』は冷食を購入する主婦である。ただし、食べるのは男性が多い。また、『T・P・O=食シーン』は主婦の昼食、一人暮らしの夕食・夜食、子供の塾前の軽食などである。

5. 『新・本格炒め炒飯』の大改良

『本格炒め炒飯』を2001年に発売後15年になる。ここまで、連続14年売上No1を達成してきた。今後とも売上No1を継続するにはナンバーワンのプライドにかけ、革新的なおいしさを実現すべく生産ラインの抜本的な改良をする必要がある。その理由は、追いつけてくるライバル商品を引き離し、ナンバーワンであり続けるためである。長年親しまれた味を変えることはリスクを伴う。リニューアルするからにはファンの消費者を感動させるおいしさを実現しなければならない。そこで今回のリニューアルでは「中華シェフの技と味の再現」という現行品の商品コンセプトをさらに突き詰めて、素材を見直し、製法も一新した。商品を一から作りあげた。

5-1. 改良商品『新・本格炒め炒飯』

『新・本格炒め炒飯』にはニチレイフーズのこだわりをぎっしり詰め込んだ。その一つが「炒め」だ。おいしい炒飯づくりのポイントは、ごはんをぱらぱらに炒めること。しかし、プロの料理人でもごはんの量が多いとうまく炒められ

ないように、工場での大量生産となれば難易度はさらにあがる。今回のリニューアルでは、その炒め技術をさらに高めている。プロが中華なべをあおって炒める際に中華鍋の上で生じる高温の熱を、工場のラインで初めて再現した。この改良には約30億円の設備投資をし、これまで一段階だった炒め工程を、「高温熱風」を取り入れた3段階の独自製法に更新した。

「新・本格炒め製法~三段階炒め」とは
3つの炒め工程で、中華シェフの技と味を今まで以上に忠実に再現

●コーティング炒め

筒型の鍋を回転させながら、油と卵、ごはんを炒める。卵でごはんをコーティングするように攪拌し、米粒への油の染み込みをガード。こうすることで油っぽくならずぱらぱらに。

●「高温熱風」による炒め

ごはん一粒一粒に、250℃以上の「高温熱風」をまとわせることで、余分な水分をとばして、もっとパラパラに。味付けに加えた焼豚の煮汁の水分も一瞬で飛ばし、中華シェフが調味料を鍋肌からまわし入れたときのような香ばしさを出す。

●仕上げ炒め

工場内でつくった焼豚を入れ、攪拌しながら強火で炒める。仕上げに、焦がしたネギ油の風味をプラス。

5-2. もう一つの大きなこだわり

炒飯の味を左右する「米」である。米の品質を重視する従来からの姿勢を、今回のリニューアルでさらに強化し、良質の粒のそろった北海道産の一等米を使用。この背景には、ニチレイフーズの米飯にかける強い思いがある。高齢化が進み、共働き世帯が増加する今、調理負担が少なく、品質・保存性に優れた冷凍食品が担う役割は大きくなっている。そんな中、日本人の日常の食を支えるために重視しているのが米である。日本人が愛着を持つ米食を家庭で手軽に楽しんでもらおうと力を入れている。その代表が『本格炒め炒飯』である。この商品はニチレイフーズの成長戦略の柱である。

6.『新・本格炒め炒飯』の紹介

新・本格炒め製法（三段階炒め）でさらにおいしく！ 焼豚 20% 増量！



- 卵をご飯の一粒一粒に絡め、電子レンジ調理でパラッと香ばしい本格的な炒飯。
- 一次炒めでごはんに卵をコーティングし、250℃以上の高温熱風をまとうせ、さらに、強く混ぜ合わせながら仕上げの炒めを行う三段階炒めで、さらにより香ばしくパラパラになる。
- 自社工場内で丁寧に仕込んだ焼豚、ネギ油を使い、コク深い炒飯に仕上げた。

おわりに

図2に示したように、食生活の変化と共に日本人の米の家庭内消費量は減少している。一人あたりの米消費量（年間）は2000年では64.6Kgであったが、2013年には56.9Kgと減少した。一方、加工米飯生産量は2000年が244.2千トンであったが、2013年には324.2千トンと増えた。その比率は133%の増加である。加工米飯生産量が多くなった要因の一つに冷凍米飯類、すなわち炒飯、焼きおにぎりなどの味をおいしくするメーカーの技術開発が寄与している。今回の『本格炒め炒飯』の貢献は大きい。ニチレイフーズの商品としては他に『本格焼おにぎり』などがある。加工米飯の消費量は今後、高齢化世帯、共稼ぎ世帯、単身世帯が増えてくるとさらに増えてくることは予想される。それだけに、今回の『本格炒め炒飯』のような生活者に喜んでいただけるような本格的な商品を開発していただきたい。

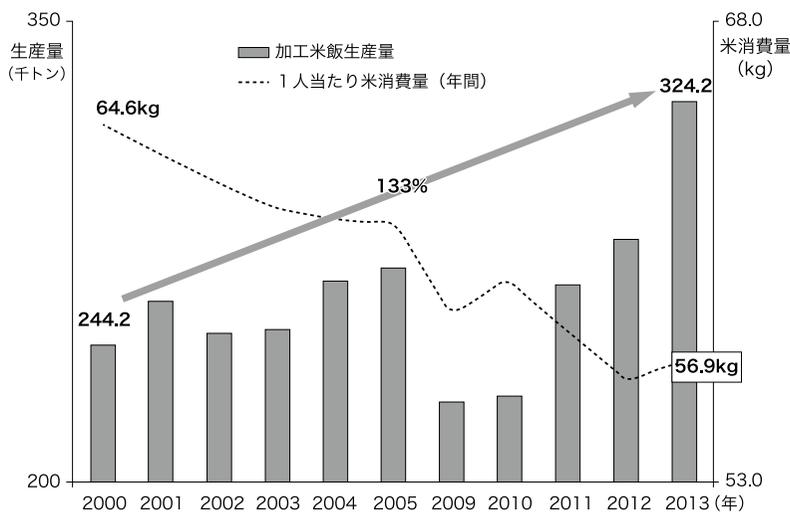


図2 米の家庭内消費量と加工米飯生産量の推移

※「加工米飯」は、①レトルト、②無菌包装、③冷凍、④チルドの合計

資料：公益社団法人 米穀安定供給確保支援機構『加工米飯の動向』より当社作成

参考資料

- 1) 田形院作；特許取得8件・冷食をレンジで揚げたて驚くべきヒット食品『パリパリの春巻』株式会社ニチレイフーズ、*NewFoodIndustry*, 54(6), 63-68, 2012.

国際的コミュニケーション能力の重要性 (2)

—外向き志向への切り替え—

Importance of international communication capability —How to acquire the outward-oriented attitude—

大石 隆介 (OISHI Ryusuke)¹ 坂上 宏 (SAKAGAMI Hiroshi)²

¹ 明海大学経済学部, ² 明海大学歯学部,

Key Words : 国際的コミュニケーション能力 外向き指向

Abstract

Japan is confronting with economic deflation and inward-oriented attitude of its citizen. In order to keep leadership in the Asian world, our nation has to provide new strategy by which turns our attitude to be outward-oriented.

1. 日本のおかれている現状 (坂上)

中国は着々と包囲網を巡らせている。

日本はいまデフレで経済成長が止まっているのに対して、中国のGDP成長率は依然として増加しております。日本が技術移転した新幹線網整備は、中国国内の移動を活発化し、生産性を向上させ、GDPそして軍事費を増加させました。日本はアメリカとの協力関係を継続する必要があり、日本独自で軍事力を高めることは難しいでしょう。中国の防衛予算（すでに10兆円超）は、日本の防衛予算（5兆円程度）の倍の規模であり、5年後には、日本の5～10倍になろうとしております¹⁾。

中国政府は、96の国や地域に、多数の孔子学院、孔子教室を設立し、「中国語を世界語」というスローガンのもと、積極的な海外展開を図っております。2007年以来、「国家建設高水準大学公派留学生項目」を掲げ、毎年5000人規模の大学院生を「一流の学生を一流の大学の一流の教授の下に」派遣してきました。2020年までに50万人の留学生を受け入れ、アジア最大の留学生受け入れ国とする計画を立てております²⁾。中国の海外留学者帰国者数は、2013年8月の段階で、69万人であり³⁾、現在100万人を越すものと推定されます。これらのエリートは既に要職についており、多額の国家予算をもらい中国経済・文化・産業の推進力になっております。さらに、中国はパンダを外国との友好のシンボルとして、多くの国に寄贈しています。このパンダ外交は、多くの国から歓迎されており、南シナ海の領域主張やサイバー攻撃による緊張をいくらか和らげているようです⁴⁾。

中国は、「一帯一路」構想を掲げ包囲網を作成しつつあります。しかし、課題も多いようです。例えば、大きな資金が回収できる需要が出てくるのか、テロの危険性にどのように対処するのか？年間 1000 万人前後も新規に増える労働者に職を与えるには、7% 以上の経済成長が必要であります。職を与えられなければ、失業率がアップし、暴動が増加するでしょう⁵⁾。

中国の急速な台頭に伴い、日本には益々強いリーダーシップが求められています⁶⁾。日本は、対外発信を強化するために、国際情報検討委員会を発足させましたが（2014 年 3 月）、日本の政策と立場を英語で論理的に説明できるスピーカーの育成を急がねばなりません⁷⁾。国際的コミュニケーション能力を高めるためには、語学力は強力な武器になりますが⁸⁾、それだけでは不十分です。日本の内向き志向をどのようにしたら、外向き志向に転換できるのかを、真剣に考える時がきたようです。

若者たちの「内向き志向」

日本人の海外留学人数は、2004～2010 年の 6 年間で 30.0% 減少しましたが、逆に、中国、台湾、韓国などのアジア圏やカナダなどへの留学生は、最近増え始めております（文部科学省調査）。日本人大学生は、「英語力、家庭の経済状況、帰国後の就職不安」を理由として、米国の大学院への留学をあきらめる場合が多いようです（フルブライト・ジャパン）。海外赴任を希望しない若者が直近で 58.3% と、6 年間で 22.1 ポイントも増えています（産業能率大学の新入社員調査）。「夫は外で働き妻は家を守るべきだ」という意見に賛成する 20 代女性が大幅に増えており、職場においても「男性の方が優遇されている」と多くの女性が答えております（内閣府の調査）。以上のアンケート結果は、英語教育の充実、経済支援、就職活動、海外体験の評価、女性が働きやすい社会を作ることの重要性を示しております⁹⁾。

日本人の性格と中国人の性格は異なる

まず、日本人の性格を考えてみよう。日本人の教育水準は高く、均質であり、日本語でのコミュニケーションが取れない人はまずいません。日本人は共通の言葉話し、同質性が強いので生産性を高めやすい反面¹⁾、礼儀正しいが、外見を気にする人が多いようです。日本人は過剰に気を遣い合うため、気を遣われる方の立場が上と考えている中国人にとり、日本は居心地が良いように見えます¹⁰⁾。

次に、中国人の性格を考えてみましょう。中国人の独特な性格の形成には、その国土環境が影響していると思われます。中国には黄河と揚子江という 2 大川があります。北側に位置する「母なる黄河」が歴史に登場してくる数々の独裁者を生みだし、自己中心的な性格を形成しました¹¹⁾。孫文は、中国を「バラバラな砂」と表現したそうです。

中国人は、騎馬民族。大陸民族であり、流浪の民であります。生き延びるためには二つの顔を持っています。世話をしてもらった時の感謝の顔と、職場を平気で変わる恩知らずな顔。自分の面子は死んでも守る顔と、契約はいっこうに守らない顔。中国人にとり、金銭は第一であり、金儲は善であると考えているそうです¹²⁾。確

かに、資金がないと仕事はできません。特別な才能を持って生まれた人だけが選抜され、それ以外の一般人はひたすら勉強で勝ち残っていくしかありません。成績第一でそれ以外には人を評価しない。ただひたすら「勝ち組」になるための詰め込み教育が行われています¹²⁾。中国人は、一人ひとりの個性が非常に強く、まとまりがないのです¹⁰⁾。

2. 日本人と中国人が仲良くなるためには (大石)

①相手のことを理解し、一人よがりにならない。

自分たちにとって当たり前のことであっても国や育った環境が違えばそれが当たり前ではなくなる場合があります⁷⁾。自分にとって非常識と思われる行動を相手をとったとしても、それは必ずしも悪気があることではないということを、しっかり理解しておく必要があります⁷⁾。これは中国人に限らず、世界中どこの国の人と会った場合でも重要なことです。

ここで言う理解とは言葉についてだけでなく、政治、社会、文化、相手の心理など様々な分野に至るまで理解することを意味しています。しかし、多くの日本人の中国に対する理解は、実際のところさほど深いものとは言えません。今でこそ中国は世界から注目される大国に成長し、日本でも話題に上ることが多くなりましたが、少し前までは一般的な日本人の中国に対する理解といえば、学校の教科書の一部に載っている程度のものでしかなかったのではないのでしょうか。日本人が中国人の行動をなかなか理解できない一因は、そのための材料や情報が十分ではなかった経緯も関係していると考えられます¹³⁾。日本は明治維新から戦後に至るまで、積極的に欧米の学問・主義・思想を取り入れ、自分たちが欧米人からどのように映っているのかについて注意を払い、そのことが結果的に「日本人らしさとは何か」という意識につながったのだと思います。それに対し、中国では社会主義思想が欧米の資本主義を受け入れず、結果的に日本ほどの自国人論は展開されなかったのです¹³⁾。つまり、「中国人らしさとは何か」について中国人たちによる客観的な分析がまだ十分でないため、日本人もそれを参考にできないのです¹³⁾。グローバル化が進む世界では日本と中国の相互依存の必要性も増していきます。我々はまだ中国について知らないことが多く、そのことを認識し、中国を多面的に受け入れる努力が大切ではないかと思います。

②メディアの報道規制、国家の意見や統制により、本音を伝えにくいことを理解する。

中国における社会（報道など）の現状は日本のそれとは少し様子が違います。私の個人的な意見ではありますが、社会主義国家の中央集権的な政治においては、規制やその他の圧力により、政府にとって好ましくない報道などは排除されがちで、国民が得ることのできる情報は内容が偏っている感があります。

③領土問題や歴史認識の問題については必要がない限り触れるべきではない。

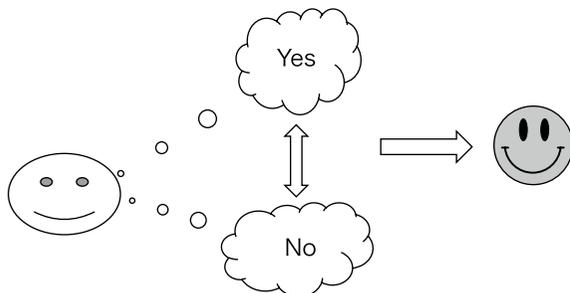
私が海外に留学していた際、中国から留学してきた友人が多くいましたが、彼らは友好的で互いに良き友人として留学時代をともに過ごしました。彼らは日本に強

い興味を持ち、好感を抱いていました。私に気を使っていたところがあったかもしれませんが、彼らと話す際には領土問題や歴史認識が話題に上ることはありませんでした。これは私の勝手な憶測ではありますが、個人レベルで見れば反日的な感情を抱いている中国人は意外と少ないのかもしれませんが。しかし、政治レベルになると、こういった問題は放置できなくなります。日本と中国の国交正常化後から半世紀近くが経とうとしていますが、この2国間に根強く残るのが歴史認識の問題です。この問題が両者の間でなかなか合意に至らない理由は、やはり加害者・被害者という立場の違いから、お互いの言い分を聞き入れられないためでしょう。

④ イエス・ノーの意思表示ははっきりとして、自分の意思を相手に明確に伝える。

人とコミュニケーションをとる際、自分の意思を相手に明確に伝える事が何より重要であり、そのためにはイエス、ノーの意思表示をはっきりと行う必要があります。日本人は相手に多分に気を使い、はっきりした意思表示をしない人が多いのに対し（図1-B）、中国人は自己主張が強くその点をはっきりしていると感じます（図1-A）。はっきりと意思表示をするという点では日本人は中国人を見習うべきかもしれません⁷⁾。

A. 中国人はイエスとノーがはっきりしているので、相手に意志が正確に伝わる。



B. 日本人はイエスとノーが不明瞭であるので、相手をイライラさせてしまう。

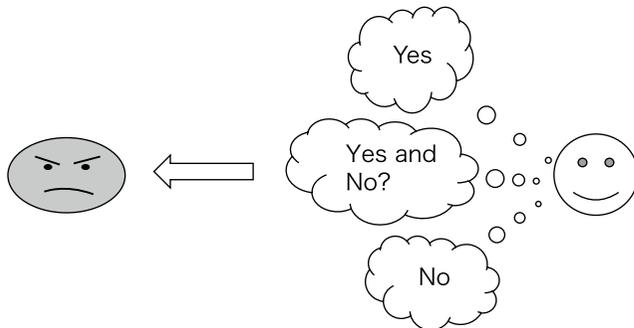


図1 日本人と中国人の比較

⑤ 人前で間違いの指摘や忠告をしない。

国民性やその気質についていえば、多くの中国人は日本人と違い、自尊心が強くメンツを重んじる傾向があります。私の個人的な見解ですが、中国人は日本人に比べ自己主張が強く、自分の非を認めたりしません。我々日本人は「すみません」、「申

し訳ありません」というセリフを言うのがたいへん得意で、時には何もしていなくても、こういった言葉を口にする場合がありますが、私が見てきた中国人は確かにそのようなフレーズを使うことはほとんどなかったように思います。また、日本には「叱咤激励」という言葉があるように、誰かを叱責するのはその人への期待の表れと捉えられますが、中国人は人前で誰かに叱責されれば、自分のメンツを潰されたと感じるようです¹⁴⁾。断るときにも相手のメンツをつぶさないように心がけることが肝心です。

⑥自分から挨拶や声をかける。

常に周りの人間がアプローチしてくれるわけではありませんから自分からアプローチしていかなければ、さまざまなチャンスをみすみす無駄にすることになりかねません。私が見てきた中国人たちは、同じアジア人でありながらこの点においては日本人よりも積極性があったように思います。もともと違う文化の中で育ったため、さまざまな面で違いが出るのは当然のことですが、日本人が中国人から見習うべきところも多いと思います。

⑦具体的に丁寧に一からかみ砕いて、漏らさず最後まで説明する。

前述の‘やや相手側の立場にたって話す’にも通じる内容ですが、相手にわかりやすい説明をすることが、コミュニケーションをとる際には重要です。相手に何かを伝える際、人は一人よがりになりがちで、自分が言いたいことを一通り話せば、それで相手は理解すると考えてしまいます。説明する方はすでに必要な情報が頭に入っていますが、必要な情報が頭に入っていない聞き手は、話し手よりもはるかに詳細な説明を必要とします。聞き手の気持ちを考えず、自分がわかる説明は相手もわかるだろうという考えを持っていては、相手との十分な意思疎通はできません。

⑧相手との共通利益を探す。

日本企業の中国への進出は以前から活発に行われていますが、これは日本企業だけでなく中国にとっても利益を生み出しているようです。同じ先進国からの進出であっても、米国や韓国などの企業は高い利益が出ない場所からは早々に撤退してしまう傾向が強いようですが、日本の企業は利益の出ない時期を経験しても、どうすればその状況を打開できるかを検討し、長くその場にとどまる企業が多いようです¹⁵⁾。これは中国政府にとっては税金に加え、長期的に安定した現地での雇用と経済効果を生み出すこととなります¹⁵⁾。自身の利益のための行動が、結果として相手に恩恵を与えるという関係が実現されているようです。

⑨先手必勝を心がける。

多くの事柄において先手を取ったものが主導権を握ります。将棋の世界では、先手の勝率(52～53%)が後手よりも高い(プロ棋士対局データ)とされています。ボクシングやK-1においても、先に主導権を取った方が、自分のペースで試合でき、有利な試合展開ができます。ビジネスの場で、互いを認め合い、win-winの関係を構築する際にも、どちらかが他方をリードする必要があります。その場合、自身の考えやアプローチを積極的に用いる努力が、主導権をとることにつながります。

⑩相手国を知らずして批判しない。

日本へ渡航経験のある中国人（2.7%）は、日本人（14.7%）と比較し圧倒的に低く、また、日本人と多少話ができる人や日本人に親しい友人がいる人（1.3%）も、日本人（20.3%）のそれと比較して低いようです（言論NPOの調査）。日本に来たことがないのに、日本の批判をする習慣があります。

このように自身の経験に基づいた根拠がないまま、相手の国について批判論を展開するのは、褒められた行動ではなく慎むべきだと思います。日本を批判する中国の人々も実際に日本人と付き合いを持ってみればその心境に変化が生じるかもしれません。

3. 「内向き志向」から「外向き志向」への切り替え

自然科学の分野では（坂上）

競争社会において、どのようにしたら勝ち組になれるのでしょうか。そのために、どのような取り組みをされているのでしょうか？これまでの日本の大学の研究室のほとんどは、研究室単位で研究を行ってきました。しかしながら、大学間の研究資金の獲得における競争の激化に伴い、研究室単独では、研究遂行に必要な資金を得ることは難しくなりました。大学間での共同研究を行い、不足分を補うことが必要となります（図2）。

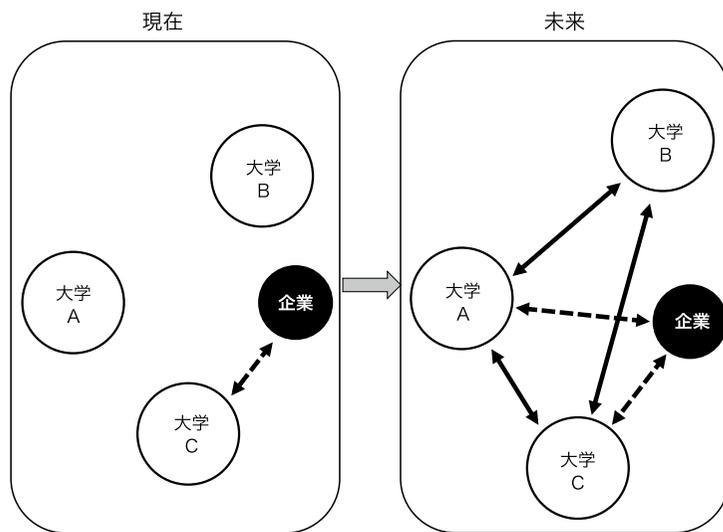


図2 日本の今後期待される研究体制

私も、現在、城西大学薬学部・理学部、昭和大学医学部、聖マリアンナ医科大学、岡山大学薬学部、東京薬科大学、慶応大学先端研究所、カナダのサスカチュワン大学、トルコのアタトゥルク大学と共同研究を行っております。高いキットを買うことができないため、他の大学に測定を依頼したり、他大学との共同研究により経費の節約をしながら文部科学省の科学研究費の申請を行っております。学術振興会では、2国間の共同研究資金の応募を行っておりますので、次回挑戦したいと考えてお

ります。

中国では、最先端の研究を行っている大学は、もう一歩進んでいるそうです。ここでは、大学間の共同研究以外にも、サンプルの定量や生物活性の測定を会社に委託し、限られた時間で最大の成果を上げております。そのため、研究の精度と生産量は、加速度的に増加し、よりインパクトファクターの高い雑誌に投稿できるようになります (図3)。これは、「work smart, 週末は relax」の実践であります⁸⁾。日本も遅れをとらないように、中国的なやり方を取り入れるべきでしょう。

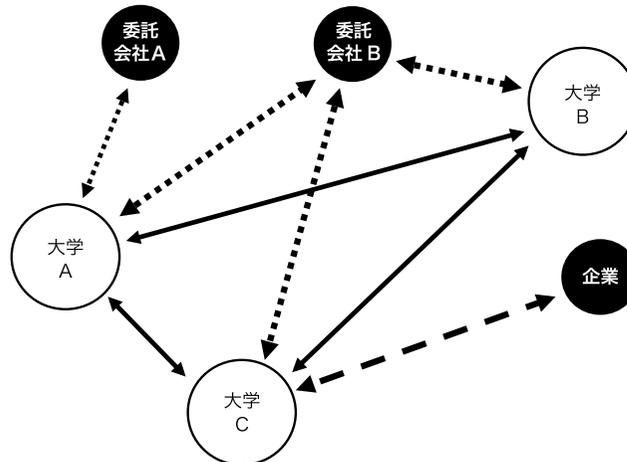


図3 中国における研究体制。日本よりもより積極的に企業を利用している。

経済学の分野では (大石)

経済学の分野でも大学間の垣根を超えた共同研究は多く行われています。経済学が扱うテーマは、そのほとんどが我々の過ごしているこの実社会で起こる現象ですので、先生方の分野とは違い、実験による分析は行うことができませんが、私が行っている研究のように、多くの企業データを用いた分析を行っています。これらのデータは企業から直接手に入れることも可能ですが、ほとんどの場合はデータベースに蓄積されたものを使用します。これらの作業では膨大な量のデータと向き合うため、一人で行うには負担が大きく、また、ミスにつながる可能性も出てきます。そのため、多くの経済学者たちは、共著で論文を書く際には、理論の構築、データ処理、実証等と役割を分担した上で、一つの論文を仕上げるようにしています。

日本と中国の間で win-win の関係を築くには (大石)

日本人と中国人が、この問題を真剣に考え、その道筋を考えることは、国際的にも有意義なことであると思います。政治レベルにおいて日本と中国が真の友好国となるためには、まだまだ課題が山積しているように感じます。しかし、前述したように、個人レベルで見れば互いの国に興味や好感を持ち、協力しあいたい、関係を強めたいと考えている人たちが多いのではないのでしょうか。道のりは長いですが、国民一人ひとりが友好を深め、それが蓄積されることで日中関係は改善されていく、そして win-win の関係が出来上がるのではないかと思います。我々が共に行ってい

るこの執筆もその一環と言えると思います。

国際的理解に向けて（坂上）

中国は、映画界においては、アメリカとの共同制作の契約を交わし¹⁶⁾、日本においては、民泊やホテル業界にどんどん進出してきております¹⁷⁾。このような異なる人種が組織を構築する場合、相手の考え方や文化背景をよく理解することがなにより大切です。そうすると、世界の現象やできごとが、より深く理解できるようになります。地球上で起こっている様々なことに自分達が関わっているという自覚を持ちさえすれば、きっと思いやりや労わりの気持ちも芽生えてくるでしょう¹⁸⁾。

現在の情報化時代を迎えて、インターネットを介して瞬時に世界の情勢を知り、異なる社会や文化と接し、広い視野と多様な価値観を受け入れることが可能になりました。次世代を生き抜く若い人たちには、柔軟な思考を育み、社会に貢献してもらいたいと思います。

引用文献

1. 三橋貴明, 中国との貿易をやめても、まったく日本は困らない! ワック文庫, 2015年2月23日
2. 黒田千晴, 中国の留学生政策—人材資源強国を目指して— ウェブマガジン「国際理交流」2011年4月.
3. 趙菁, 中国の留学ブーム, アジアンサイト, 大和総研ビジネス・イノベーション, 2013年8月8日, http://www.dir.co.jp/consulting/asian_insight/20130808_007526.html
4. Hannah Beech : The panda doctrine. Pp 40-45, *Time* January 10, 2016.
5. 長谷川慶太郎, ロシア転覆, 中国破綻, 隆盛日本, 実業之日本社, 2015年7月
6. 中島俊宏, 大庭三枝, 小谷哲男: 特別座談, 戦後70年日・米・アジアの視点で戦争と平和を考える。 *Wedge* 27 (9), 8-14, 2015.
7. Wedge 編集部: 今年是对外発信の転換点, 進むべきはプロパガンダか, *Wedge* 27 (6), 14-15, 2015.
8. 坂上宏, 生宏, 大石隆介: 国際的コミュニケーション能力の重要性 (1) —語学力は強力な武器になる—, *New Food Industry* 58 (7), 81-94, 2016.
9. 若者たちの「外向き志向」を生かそう。日本経済新聞 2014/1/13
10. 中島恵: 中国人の誤解, 日本人の誤解, 日経プレミアシリーズ, 2013年10月
11. 邱 海涛: 悠久の大地と歴史がダメにした, とても不幸な中国人, 宝島社, 2016年1月
12. 孔 健: 中国人を理解しないで生きていけない日本人—激変した「チャイナ・ニーズ」をつかむ方法, ベストセラーズ, 2010年8月
13. 園田茂人, 中国人の心理と行動, 日本放送出版協会, 2001年2月
14. 吉村章, 知っておくと必ずビジネスに役に立つ中国人の面子, オス号法令出版, 2016年2月
15. 小川英治, 中国資本市場の現状と課題, 財経詳報社, 2013年12月
16. マット・プレスバーク, 中国がハリウッドの熱烈ラブコール, *Newsweek* (日本版) 67, 66-67, 2016 May.
17. 富坂聡, 日本で Airbnb を猛追する中国民泊, *Wedge* 15-19, 2016 April.
18. 酒井正人, 日本・中国縁結び—地球市民としての国際交流, 文芸社, 2015年12月15日

連絡先:

大石 隆介 (おおいし りゅうすけ)

明海大学経済学部専任講師

Tel : 047-355-5120, e-mail : r-o@meikai.ac.jp

坂上 宏 (さかがみ ひろし)

明海大学歯学部病態診断治療学講座 薬理学分野教授

Tel : 049-279-2758, e-mail : sakagami@dent.meikai.ac.jp

New Food Industry のアドバイザーボード

月刊 New Food Industry は、「アドバイザーボード」を設置しております。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を得ることを目的として設置しているものです。弊誌の経営状況や編集課題を踏まえた、有意義なご指導・ご助言をいただき、今後の編集業務に役立てております。

■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)
岡 希太郎氏	(東京薬科大学名誉教授)
坂上 宏氏	(明海大学大学院教授)
宮尾 茂雄氏	(東京家政大学教授)
山口 正義氏	(エモリー大学 医学部)

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

ニューフードインダストリー 第58巻 第8号

印刷 平成 28 年 7 月 25 日

発行 平成 28 年 8 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)

T E L : 03-3254-9191 (代表)

F A X : 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

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