

New Food Industry

食品加工および資材の新知識

New food indust. 59 (12): 2017.

12

論文

- インスリン誘導性時計遺伝子 SHARP ファミリーの発現調節機構
- 澱粉の消化性を抑制する多糖類の作用
- ビタミン B₆ の関わる代謝異常: ビタミン B₆ 欠乏時のホモシステイン蓄積と肝臓脂質蓄積およびその改善
- 地域の食資源から抗酸化作用と生理機能の探索
6. カワラケツメイの肝機能と脂質に対する生理作用

解説

- 過去 20 年間の食中毒事例から見た原因食品と病原微生物の関連性
- グルテン不耐性, セリアック病, および小麦アレルギー

食品害虫の防除

- 食品害虫の DNA による同定手法
- 低エネルギー電子線を利用した貯穀害虫の殺虫技術

連載

- 野山の花 – 身近な山野草の食効・薬効 –
サフラン *Crocus sativus* L. (アヤメ科 Iridaceae)
- デンマーク通信 デンマークの米

解説

- ポビドンヨード液を基準にした OTC の口臭・口腔内細菌・口腔細胞に与える影響の検討
- 機能性物質の養魚用飼料への添加効果 – 1. プロメライン, グルタチオン



論文

- インスリン誘導性時計遺伝子 SHARP ファミリーの発現調節機構
..... 塚田 晃子, 高木 勝広, 浅野 公介, 山田 一哉 1
- 澱粉の消化性を抑制する多糖類の作用
..... 佐々木 朋子 11
- ビタミン B₆ の関わる代謝異常:
 ビタミン B₆ 欠乏時のホモシステイン蓄積と肝臓脂質蓄積およびその改善
 Vitamin B₆-related metabolic disorder :
 Mechanism of accumulation of homocystein and lipids in liver under vitamin B₆-deficiency,
 and their amelioration
..... 早川 享志 19
- 地域の食資源から抗酸化作用と生理機能の探索
 6. カワラケツメイの肝機能と脂質に対する生理作用
..... 岩井 邦久 29

解説

- 過去 20 年間の食中毒事例から見た原因食品と病原微生物の関連性
..... 高橋 正弘 36
- グルテン不耐性, セリアック病, および小麦アレルギー
..... 瀬口 正晴, 木村 万里子 44

食品害虫の防除

- 食品害虫の DNA による同定手法
..... 古井 聡 53
- 低エネルギー電子線を利用した貯穀害虫の殺虫技術
..... 今村 太郎 59

Contents

2017 年 12 月号

連 載

□ 野山の花 — 身近な山野草の食効・薬効 —

サフラン *Crocus sativus* L. (アヤメ科 Iridaceae)

..... 白瀧 義明 64

□ デンマーク通信 デンマークの米

..... Naoko Ryde Nishioka 68

解 説

□ ポビドンヨード液を基準にした OTC の

口臭・口腔内細菌・口腔細胞に与える影響の検討

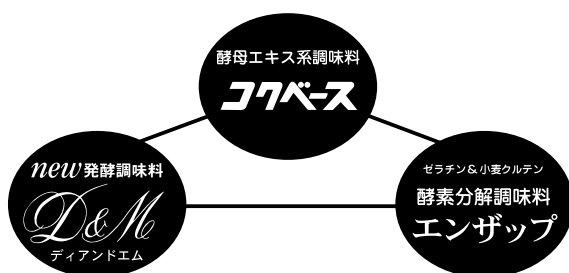
..... 小島 百代, 坂上 宏 71

□ 機能性物質の養魚用飼料への添加効果-1. ブロメライン, グルタチオン

..... 酒本 秀一 77

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
特長がある乳糖酵母エキスです。



大日本明治製糖株式会社

食品事業部

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

インスリン誘導性時計遺伝子 *SHARP* ファミリーの発現調節機構

塚田 晃子 (TSUKADA Akiko)¹ 高木 勝広 (TAKAGI Katsuhiro)^{1, 2}
浅野 公介 (ASANO Kosuke)¹ 山田 一哉 (YAMADA Kazuya)^{1, 2}

¹ 松本大学 人間健康学部 健康栄養学科, ² 松本大学大学院 健康科学研究科

Key Words: インスリン 肝臓 シグナル伝達 転写因子 時計遺伝子

要旨

わが国の糖尿病患者およびその予備軍は約 2,000 万人にも達し、糖尿病は今や国民病とも言われている。糖尿病のうち 95% 以上は 2 型糖尿病である。その原因は、遺伝的素因に加えて生活習慣の悪化に伴う肥満から生じるインスリン抵抗性であり、この状態が長期にわたることで糖尿病が発症する。私どもは、肝臓において、高炭水化物摂食後にインスリンによって誘導される転写因子 *SHARP* ファミリー (*SHARP*-1 および *SHARP*-2) を同定し、これらが血糖低下に関与する重要な転写因子であることを明らかにしている。また、*SHARP* ファミリーは、時計遺伝子の一つであることが報告されている。したがって、2 型糖尿病の発症には、概日リズムを刻む体内の生物時計の機能障害が密に関連している可能性が考えられる。概日リズムを有する時計遺伝子の発現調節メカニズム、および時計遺伝子が糖代謝調節に関与するメカニズムを明らかにできれば、2 型糖尿病の発症およびその予防に大きく貢献できると思われる。

本稿では、*SHARP* ファミリー遺伝子の詳細な発現調節メカニズムについて論述する。

はじめに

平成 28 年度国民健康・栄養調査によると、現在、わが国の糖尿病およびその予備軍は 2,000 万人と推計され、実に国民の約 6 人に 1 人の割合となっている。

糖尿病は、インスリンの作用不足により慢性の高血糖状態を示す代謝疾患であり、大きく 1 型糖尿病と 2 型糖尿病の 2 つに分類される。1 型糖尿病は「自己免疫機序による膵β細胞の破壊」を病因とし、2 型糖尿病は「インスリン抵抗性と膵島機能不全によるインスリン作用不足」を病因とする。すなわち、1 型はインスリン欠乏状態、2 型はインスリンが存在するにも関わらず作用しにくい状態やその後のインスリン分泌不全状態のことをいう。わが国におけ

る糖尿病の 95% 以上は 2 型糖尿病である。日本人は、もともとインスリン分泌量が低いという遺伝的素因に、過食や運動不足、夜型生活等による生活習慣の乱れが加わることで肥満となり、これがインスリン抵抗性へと導き、ついには糖尿病発症へと至る。

1. 血糖調節機構

1-1. インスリンによる血糖値の低下

インスリンは、生体において血糖値を低下させる唯一のホルモンであり、細胞内へのグルコース取り込み促進・グリコゲン合成促進・脂肪酸合成促進・糖新生抑制・細胞増殖促進など、様々な生物学的機能に重要な役割を担っている。

生体において、インスリン分泌の最も強力な刺激はグルコースである。インスリンは、食後の血糖値の上昇が刺激となり、膵臓のランゲルハンス島 β 細胞から分泌される。インスリンは、標的器官の細胞膜上に存在するチロシンキナーゼ型インスリン受容体に結合し、下流の様々なシグナル伝達経路を活性化して生理作用を発揮する。例えば、肝臓では、インスリンは解糖系酵素である *glucokinase* の発現を誘導し、解糖系・グリコーゲン合成・脂肪酸合成・トリグリセリド合成を促進するとともに、糖新生系酵素である *phosphoenolpyruvate carboxykinase* (*PEPCK*) の発現を低下させ、糖新生を抑制する。一方、筋肉・脂肪組織では、グルコース輸送担体 (*Glucose transporter type 4* ; *GLUT4*) による血中グルコースの細胞内への取り込みを促進する。*GLUT4* は、通常、細胞質に存在しているが、インスリンが分泌されたときのみ細胞膜にトランスロケーションして、グルコースを細胞内に取り込み、血糖値を低下させる。インスリン刺激が減少すると、*GLUT4* は細胞膜から細胞内に戻り、グルコースの取り込みを中止する。細胞内に取り込まれたグルコースは、筋肉ではグリコーゲンとして、脂肪組織ではトリグリセリドとして貯蔵される。

1-2. ホルモンによる糖新生の調節

血糖値の過度の低下は脳のはたらきに重篤な影響を及ぼす。食物から十分な糖質の供給を得られない状況 (絶食・飢餓) においては、血糖値を維持するために、膵 α 細胞から分泌されたグルカゴンの作用により、肝臓では、糖質以外の物質からグルコースを合成する糖新生を行ったり、肝グリコーゲンを分解してグルコースを血中に放出することで血糖値を維持している。しかし、肝臓のグリコーゲン貯蔵量は 100g 程度しかないため、短時間で消費されてしまう。肝グリコーゲンが減少すると、骨格筋においてタンパク質分解により生じたアミノ酸、および運動中の筋肉や赤血球で解糖系により生じた乳酸を糖新生の材料として利用する。

このように、長期の絶食時ではグルカゴンの刺激により主に糖新生が活性化し、体内の貯蔵エネルギーを利用することで血糖値を一定に保っているのである。糖新生は生命を維持するために不可欠であるが、その亢進は 2 型糖尿病患者における空腹時高血糖の主要因ともなる。

糖新生の律速酵素である *PEPCK* の mRNA は半減期が極端に短いため、その mRNA 量は *PEPCK* 遺伝子の転写量を反映したものとなっている。*PEPCK* 遺伝子の転写は、グルカゴン以外にも副腎皮質ホルモン (グルココルチコイド)・甲状腺ホルモンにより促進され、インスリンにより抑制される¹⁾。抗糖尿病薬であるメトホルミンは、*PEPCK* を含む糖新生系酵素遺伝子の発現を低下させることにより、血糖値を低下させている。

ホルモンによる糖新生系酵素遺伝子の転写調節は、転写因子 *cAMP response element-binding protein* (*CREB*) や *forkhead box containing protein O-1* (*FoxO1*) が担っている。例えば、空腹時に分泌されるグルカゴンの刺激により、セカンドメッセンジャーの *cAMP* を介して *protein kinase A* が活性化されて *CREB* がリン酸化される。リン酸化された *CREB* は *PEPCK* 遺伝子の転写制御領域に存在する *cAMP response element* に結合して転写を促進する。これによって糖新生が促進され、肝臓からのグルコースの産生・放出が高まり、血糖値が上昇する。一方、インスリンは *FoxO1* をリン酸化し、核外へ移行させるとともに、後述する *SHARP* ファミリー遺伝子の発現を誘導して *PEPCK* 遺伝子の転写を低下させる。

糖新生系酵素遺伝子の発現は、これら以外にも *HNF4 α* ・*KLF15* といった転写因子に加えて、*CBP*・*CRCT2*・*PGC1- α* ・*TORC2* などの転写共役因子の作用によって調節されている²⁻⁶⁾。

2. 生体リズムと時計遺伝子

2-1. 概日リズムと疾患

生物は、体内で 1 日 24 時間の生活リズムを刻みながら活動をしている。このリズムのこと

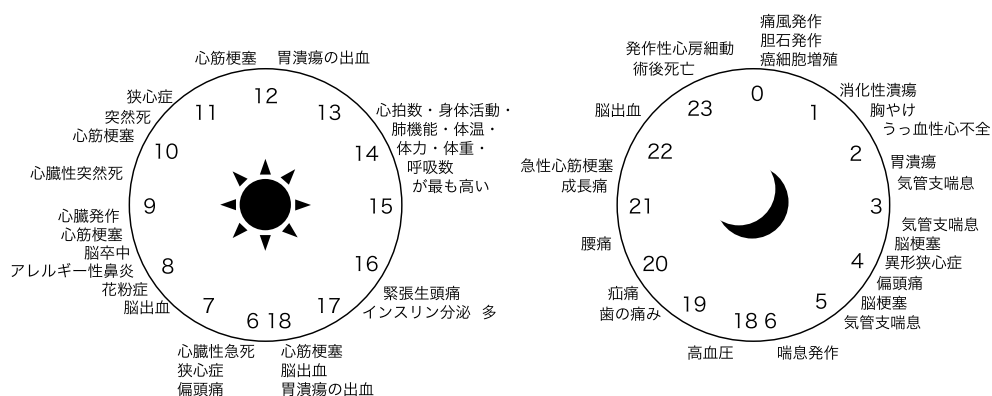


図1 病気が発症しやすい時間帯

を「サーカディアンリズム (概日リズム)」といい、生体に備わっている時計のことを生物時計という。

私たちヒトは、夜に睡眠、昼間に活動し、だいたい決まった時間に空腹を感じて食事を摂るように、日常的生活リズムをもっている。また、24時間の中で病気が起こりやすい時間帯が明らかにされている (図1)。例えば、心筋梗塞の発症は朝方に多くみられ、午前8時から10時の間に発作の最大ピークを示すことが報告されている。喘息は深夜から明け方に多く、癌細胞は夜中に増殖し、癌の進行を促進させることが知られている。

2型糖尿病人口の増加は、主に生活習慣の乱れによって引き起こされている。食の欧米化が進み、高脂肪・高エネルギー食をいつでも手軽に口にすることができる飽食の時代となったことも大きな要因である。また、24時間営業の飲食店やサービス業の増加に伴って夜間労働者が増え、昼夜逆転の生活をしている人も少なくない。時代とともに変化した人間の生活形態は、私たちの身体に何かしらの悪影響を与えていると思われる。

2-2. 時計遺伝子

概日リズムは、脳下垂体の視交叉上核 (suprachiasmatic nucleus ; SCN) に存在する中枢時計によって支配されている。中枢時計は光刺激によりリセットされる。概日リズムを調節す

る遺伝子のことを「時計遺伝子」といい、主に *Clock*・*Bmal1*・*Period* (*Per*)・*Cryptochrome* (*Cry*) が知られている。これらのうち、*Per* 遺伝子が光刺激に反応する。また、その他の時計関連遺伝子として20種類以上が報告されている。SCNにおいて、概日リズムはこれら時計遺伝子の転写・翻訳を介したネガティブフィードバックによる調節を受けている⁷⁾。転写因子である *Clock* と *Bmal1* がヘテロ2量体 (*CLOCK* / *BMAL1*) を形成し、*Per* および *Cry* 遺伝子のプロモーター領域にある E box 配列に結合し、時計遺伝子の転写を促進する。合成された *PER* および *CRY* タンパク質は互いに結合して *PER* / *CRY* 複合体を形成する。核内の *PER* / *CRY* 複合体が過剰になると、*PER* / *CRY* 複合体は *CLOCK* / *BMAL1* による転写を阻害し、*Per* および *Cry* 遺伝子の発現量が減少する。その結果、*PER* / *CRY* 複合体が減少し、*CLOCK* / *BMAL1* 複合体が再活性化されて *Per* および *Cry* 遺伝子の転写が再開される。転写活性化因子の *CLOCK*・*BMAL1* と転写抑制因子の *PER*・*CRY* が交互に作用するため、振動が起こり、この一連の周期が約24時間のリズムを刻んでいるのである⁷⁾。

2-3. インスリン誘導性時計遺伝子 SHARP ファミリー

ラット enhancer of split- and hairy-related protein (SHARP) ファミリーは、SHARP-1 (SHARP1 / BHLHB3 / DEC2 / BHLHE 41 という) およ

び *SHARP-2* (*SHARP2* / *BHLHB2* / *Epi1* / *Stra13* / *DEC1* / *Clast5* / *BHLHE 40* ともいう) の 2 種類から構成されており, basic helix-loop-helix (bHLH) 型転写因子に属している⁸⁾。*SHARP-1* および *SHARP-2* ともに, N 末端側に bHLH モチーフを, 中央にオレンジドメインを有している。*SHARP-1* では C 末端側にアラニンやグリシンに富む領域を有し, *SHARP-2* ではプロリンに富む領域を有している。*SHARP* ファミリータンパク質は, 核に局在し, 互いにホモおよびヘテロ 2 量体を形成して, E box 配列 (5'-CANNTG-3') に結合することにより標的遺伝子の転写を抑制する⁹⁾。また, 他の転写因子などとタンパク質間相互作用も行っている。

SHARP-1 および *SHARP-2* 遺伝子は普遍的に発現しているが, その発現は, 様々な細胞外刺激により細胞タイプ特異的に制御されている。さらに, SCN での *SHARP* ファミリー遺伝子の発現は, 主観的昼に発現が上昇する概日リズムを示すことが明らかにされている⁸⁾。活動開始の時間帯 (朝) に光を浴びることで概日リズムがリセットされ, 活動とともに *SHARP* ファミリー遺伝子の発現が上昇するのである。ラットを暗所で飼育してもこのパターンは変動しないため, これらの遺伝子に内因性のリズムが存在すると思われる。したがって, *SHARP* ファミリー遺伝子は時計遺伝子としての機能を有し, 概日リズムを調節する遺伝子の一つであると考えられる。

また, ラット肝では, *SHARP-1* および *SHARP-2* は, 高炭水化物摂食後に膵 β 細胞から分泌されたインスリンにより発現が誘導されることも明らかにされている¹⁰⁻¹²⁾。

3. インスリンによる *SHARP* ファミリー遺伝子の発現調節

ラット肝および初代培養肝細胞またはラット高分化型肝癌細胞株 H4IIE 細胞にインスリン投与・処理を行ったところ, *SHARP-1* mRNA 量は 1 時間で, *SHARP-2* mRNA 量は 2 時間で増加した¹¹⁻¹³⁾。一方で, *PEPCK* mRNA

の発現量はインスリンにより減少した。したがって, *SHARP* ファミリーの発現は, インスリンによって特異的かつ非常に早期に誘導されると言える。

次に, インスリンによる *SHARP* ファミリー mRNA の発現誘導にどのような細胞内シグナル伝達経路が関与しているのかを検討した。H4IIE 細胞を用いて, 各種のインスリンシグナル伝達分子の阻害剤で処理を行った。*SHARP-1* mRNA の発現誘導は, phosphoinositide 3-kinase (PI 3-K) 経路の阻害剤である LY294002 と wortmannin, protein kinase C (PKC) の阻害剤である staurosporine で完全に阻害された¹²⁾。また, Rac1 阻害剤や Jun N-terminal kinase の阻害剤である JNKII でも, 部分的に阻害された¹²⁾。一方, *SHARP-2* mRNA の発現誘導は LY294002, wortmannin, staurosporine および mammalian target of rapamycin (mTOR) の阻害剤である rapamycin により完全に阻害された¹³⁾。

PKC は, 10 種類以上のアイソザイムから構成されるタンパク質ファミリーである¹⁴⁾。活性化された PKC は細胞分化・細胞増殖など, 多種多様な生理機能を制御している。PKC は, 構造により classical PKC (cPKC), novel PKC (nPKC), atypical PKC (aPKC) に分類される。cPKC と nPKC の活性化には, ジアシルグリセロール (diacylglycerol; DAG) を必要とするが, aPKC は DAG を必要としない¹⁵⁾。肝臓では, PI 3-K 経路の下流に aPKC λ が存在することが知られている¹⁶⁾。そこで, aPKC λ に焦点を当てインスリンによる *SHARP* ファミリー mRNA の発現誘導に aPKC λ が関与しているかどうかを検討した。H4IIE 細胞に, ドミナントネガティブ変異型 aPKC λ を発現するアデノウイルスを感染させたところ, インスリンによる *SHARP* ファミリー mRNA 量の増加を抑制した¹²⁻¹³⁾。

また, Rac1 および JNK 阻害剤がインスリンによる *SHARP-1* mRNA の発現誘導を阻害したことをふまえ, 同様に, ドミナントネガティブ変異型 Rac1 を発現するアデノウイルスを H4IIE 細胞に感染させた。その結果, *SHARP-1*

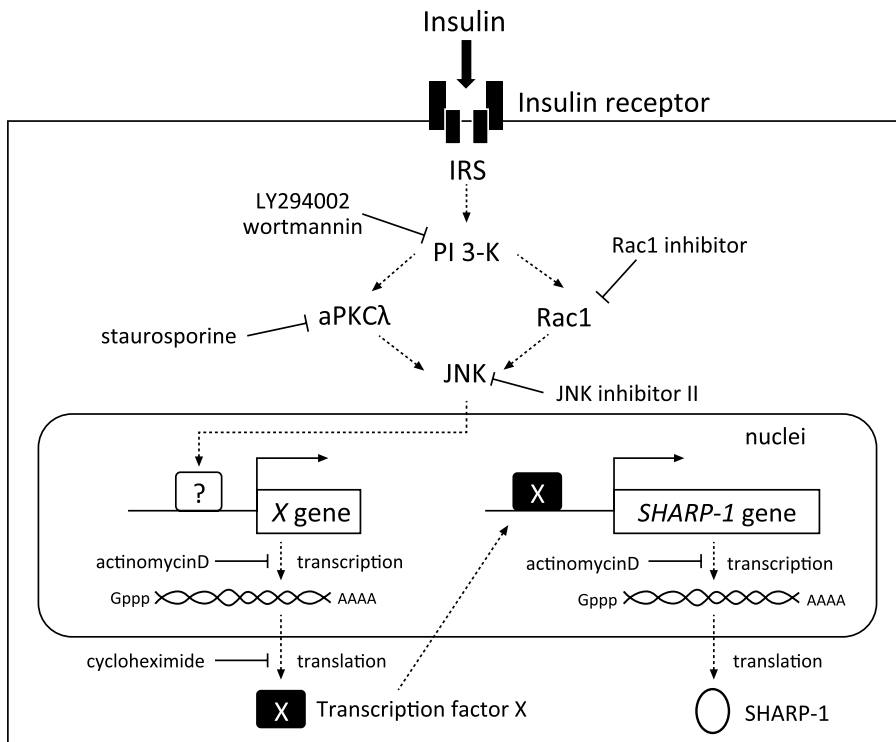


図2 インスリンによる *SHARP-1* 遺伝子の発現調節機構¹²⁾

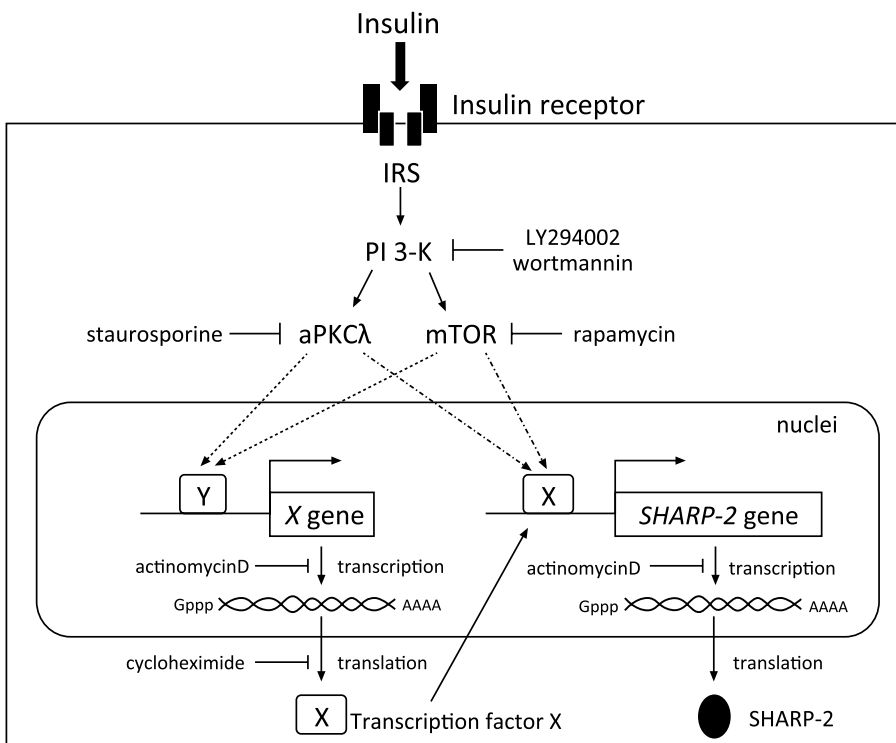


図3 インスリンによる *SHARP-2* 遺伝子の発現調節機構¹³⁾

mRNA の発現誘導が抑制された¹²⁾。

肝臓では、PI 3-K 経路の下流に aPKC λ のほかに、mTOR も独立して存在している¹⁶⁻¹⁸⁾。SHARP-2 mRNA の発現誘導に mTOR 経路の関与が示唆されたため、H4IIE 細胞へのインスリン処理により mTOR が活性化されているかどうかを検討した。その結果、活性化（リン酸化）型の mTOR 量はインスリン処理後、早期に増加した¹³⁾。

これらの結果より、インスリンによる SHARP-1 mRNA の発現誘導は、PI 3-K / aPKC λ / JNK 経路および PI 3-K / Rac1 / JNK 経路を介することが明らかになった（図 2）¹²⁾。また、SHARP-2 mRNA の発現誘導は、PI 3-K / aPKC λ 経路および PI 3-K / mTOR シグナル経路を介していることが示された（図 3）¹³⁾。興味深いことに、構造が類似している SHARP-1 と SHARP-2 のインスリンによる発現誘導は、PI 3-K 経路下流で全く異なるシグナル分子を介していることが明らかになった。

次に、SHARP ファミリー mRNA の発現誘導が、転写レベル、もしくは転写後レベルで調節されているかどうかを検討した。H4IIE 細胞を用いて、RNA polymerase II の阻害剤である actinomycin D、タンパク質合成の阻害剤である cycloheximide で処理を行ったところ、インスリンによる SHARP ファミリー mRNA の発現誘導は、両阻害剤によって完全に阻害された。これらの結果から、インスリンによる SHARP ファミリー mRNA の発現誘導は転写レベルで調節され、その誘導には新規タンパク質の合成が必要であることが示唆された（表 1）¹²⁻¹³⁾。

そこで、インスリンの *SHARP* ファミリー遺伝子プロモーターに対する効果について検討した。*SHARP-1* 遺伝子の転写開始点上流 1.5

kb までと *SHARP-2* 遺伝子の -3,700 から +265 の塩基配列をレポータープラスミドに挿入し、H4IIE 細胞にトランスフェクション後、インスリン処理を行った。しかし、*SHARP-1* および *SHARP-2* 遺伝子のプロモーター活性にインスリンによる有意な変化は認められなかったため、これらの領域にはインスリンに応答する領域は存在しないことが明らかとなった¹²⁻¹³⁾。この領域以外にインスリン応答性エレメントが存在する可能性があると思われるが、その同定は今後の課題である。

次に、SHARP ファミリーの標的遺伝子の解析を行った。SHARP ファミリーがインスリンによって発現が誘導される転写抑制因子であることから、インスリンによって転写が抑制される *PEPCK* 遺伝子との関連性を検討した。ラット *PEPCK* 遺伝子の -467 から +69 までの塩基配列は、肝臓での発現やホルモン調節に必要な全配列が含まれている。この領域を含むレポータープラスミドを H4IIE 細胞にトランスフェクションし、インスリン処理を行ったところ、*PEPCK* 遺伝子のプロモーター活性が抑制された。次に、SHARP-1 および SHARP-2 発現ベクターをコトランスフェクションしたところ、*PEPCK* 遺伝子のプロモーター活性を有意にかつ特異的に低下させた^{11-12, 19)}。

したがって、SHARP ファミリーはインスリンによる血糖低下に関与する重要な転写因子の一つであると結論づけた。

4. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofranoside (AICAR) による *SHARP-2* 遺伝子の発現誘導解析

筋肉、脂肪組織および肝臓における糖質・脂質代謝は、個体全体のエネルギー代謝調節の中

表 1 インスリンによる *SHARP* ファミリー遺伝子の発現調節メカニズム

遺伝子名	mRNA 量	転写	タンパク質合成	シグナル経路
<i>SHARP-1</i>	↑	↑	必要	PI 3-K / aPKC λ / JNK PI 3-K / Rac1 / JNK
<i>SHARP-2</i>	↑	↑	必要	PI 3-K / aPKC λ / JNK PI 3-K / mTOR

心的な役割を担っている。この調節は、ホルモンからのシグナル、栄養素シグナル、ならびに神経を介した機序が相互に関連している。栄養素シグナルは、細胞内のエネルギー状態を感知して活性化される機序であり、5' -AMP 活性化タンパク質キナーゼ (AMPK) が中心的な役割を担っている。AMPK は、 $\alpha \cdot \beta \cdot \gamma$ の3つのサブユニットから構成されるヘテロ三量体で、細胞内のエネルギーセンサーとして機能するセリン/スレオニンキナーゼである²⁰⁻²¹⁾。AMPK は細胞内エネルギー量が十分な場合は不活性化型であるが、細胞内エネルギー量が低下すると活性化型となる。すなわち、飢餓時や運動時のエネルギー消費が亢進している場合には ATP が分解され ADP になるが、細胞内では *adenylate kinase* により、 $2 \text{ ADP} \rightarrow \text{ATP} + \text{AMP}$ の反応が生じる。これらの条件下では、AMP / ATP 比が増大して AMPK の活性化を引き起こす。

AICAR は、アデノシン輸送担体によって細胞内に取り込まれ、*adenosine kinase* によりリン酸化されて AICAR ribotide (ZMP) に変換される。AMP と構造が類似する ZMP は、AMP と同様の機序で AMPK を活性化することから、AICAR は AMPK の活性化剤として広く用いられている²²⁾。肥満糖尿病モデルの *ob / ob* マウスに AICAR を連日皮下投与すると非肥満マウスのレベルまで血糖値が是正されること、およびこの耐糖能改善が骨格筋と肝臓に対する作用であることが報告されている²²⁾。また、H4IIE 細胞を AICAR で処理すると、糖新生系酵素遺伝子の発現を低下させることが報告されている²³⁻²⁴⁾。

AICAR によって活性化された AMPK は、*acetyl-CoA carboxylase* (ACC) の Ser79 をリン酸化する²²⁾。H4IIE 細胞において、AICAR 処理により実際に AMPK が活性化されているかどうかを検討した。AICAR で処理した H4IIE 細胞から全細胞溶解液を調製し、リン酸化 ACC および ACC 抗体を用いてウエスタンブロット解析を行ったところ、AICAR 処理後 15 分でリン酸化 ACC が検出された。したがって、

H4IIE 細胞において AICAR は AMPK を活性化することが示された²⁶⁾。

次に、AICAR により SHARP ファミリー mRNA の発現が誘導されるかどうかを検討した。H4IIE 細胞に様々な濃度や時間 AICAR で処理を行ったところ、SHARP ファミリー mRNA は、AICAR 処理により 2 時間という比較的早期に、かつ一過性に誘導された。そこで、これらのうち、AICAR による SHARP-2 mRNA の発現誘導が、実際に AMPK の活性化と関連しているかどうかを検討した。H4IIE 細胞を、AMPK の阻害剤である *compound-C* および LY294002, *staurosporine* で処理したところ、AICAR による SHARP-2 mRNA の発現は意外にも *compound-C* では阻害されなかったが、LY294002 および *staurosporine* で完全に阻害された。したがって、AICAR による SHARP-2 mRNA の発現誘導が、AMPK 依存的経路によるものではなく、PI 3-K 経路や PKC 経路によるものであることが示唆された²⁶⁾。さらに、AMPK の活性化が LY294002 によって影響を受けるかどうかを検討した。LY294002 で処理を行った H4IIE 細胞の細胞溶解液を用いて、ウエスタンブロット解析を行ったところ、AICAR の存在下／非存在下に関わらず、15 分でリン酸化 ACC が検出された。したがって、AICAR による SHARP-2 mRNA の発現誘導は、AMPK の活性化とは独立して PI 3-K および PKC 経路の両方により媒介されることが明らかになった²⁶⁾。

肝臓の主要な PKC アイソフォームは cPKC α である。また、前述のように、肝臓では PI 3-K 経路の下流に aPKC λ が存在している。そこで、cPKC α および aPKC λ に着目し、AICAR による SHARP-2 mRNA の発現誘導に関与しているかどうかを検討した。AICAR 処理を行った H4IIE 細胞の全細胞溶解液を経時的に調製し、cPKC α と aPKC λ のリン酸化および非リン酸化抗体を用いてウエスタンブロット解析を行ったところ、AICAR による cPKC α のリン酸化 (活性化) の亢進は見られなかったが、aPKC λ は AICAR 処理後 5 分でリン酸化 (活性化) 型

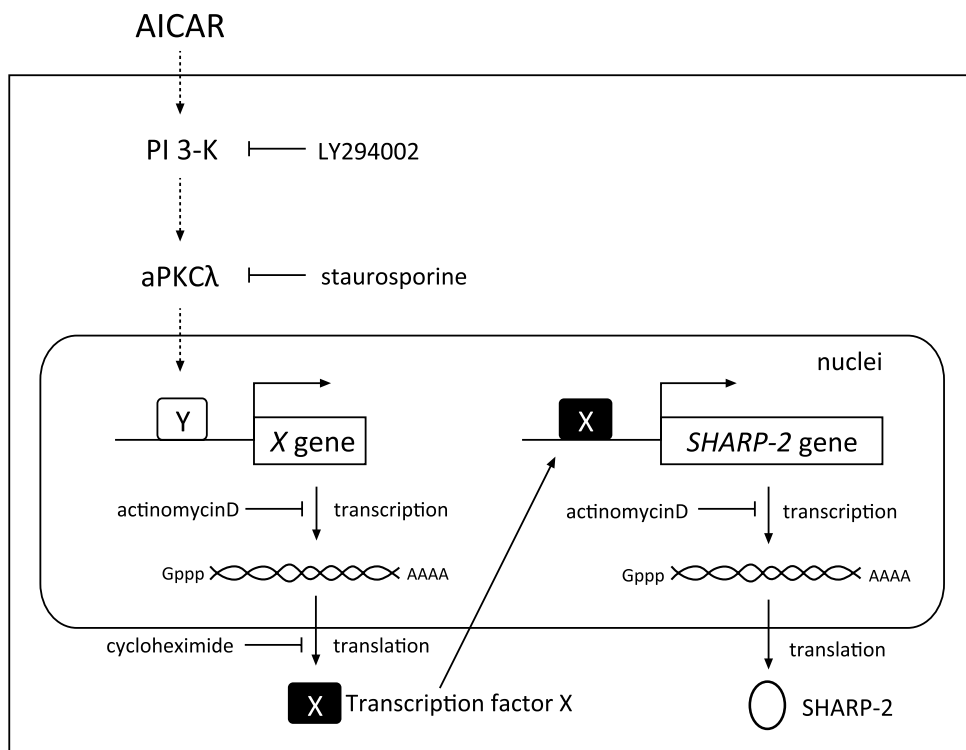


図4 AICARによる *SHARP-2* 遺伝子の発現調節機構²⁶⁾

aPKCλが検出され、15分まで維持された²⁶⁾。

次に、H4IIE細胞にドミナントネガティブ変異型aPKCλを発現するアデノウイルスを感染させ、AICAR処理を行ったところ、SHARP-2 mRNAの発現は完全に抑制されることが示された²⁶⁾。

さらに、cPKCαの活性化にはCa²⁺を必要とするが、aPKCλの活性化にはCa²⁺を必要としないため、Ca²⁺のキレート剤であるEGTAを用いて検討を行った。H4IIE細胞にEGTAで処理を行った後、AICAR処理を行ったところ、SHARP-2 mRNAの発現誘導は阻害されなかった。したがって、AICARによるSHARP-2 mRNAの発現誘導は、cPKCαではなく、インスリンと同様にPI 3-K / aPKCλ経路を介していることが示された(図4)²⁶⁾。

AICARによるSHARP-2 mRNAの発現誘導が、SHARP-2遺伝子の転写レベルで生じているのか、あるいはこの誘導に新規タンパク質合成を必要とするのかどうかについて検討した。

H4IIE細胞を、actinomycin Dとcycloheximideで処理を行ったところ、actinomycin DではAICARによるSHARP-2 mRNAの発現誘導を部分的に抑制したが、cycloheximideでは完全に阻害された²⁶⁾。したがって、AICARによるSHARP-2 mRNAの発現誘導は、少なくとも部分的には転写レベルで制御されていること、および、その誘導には新規タンパク質の合成を必要とすることが示唆された。

おわりに

SHARPファミリーは、インスリンによる血糖低下作用に関与する重要な転写因子である。また、新たにAICARがAMPKではなく、インスリンと同様にPI 3-K / aPKCλ経路を介してSHARP-2遺伝子の発現を誘導することが明らかになった。すなわち、SHARPファミリー遺伝子発現の分子調節メカニズムを明らかにすることは、糖尿病における高血糖状態の要因でもある糖新生の抑制(特にPEPCK遺伝子の転写

抑制)に貢献でき、糖尿病の治療や発症の予防に寄与できると思われる。私どもは、インスリン以外に *SHARP* ファミリーの発現を刺激できるような食品成分の検索にも取り組んでおり、血糖低下作用をもたらす化合物が明らかにされつつある²⁷⁻³³⁾。現在までに、H4IIE細胞やラット肝におけるインスリンおよびAICARによる *SHARP* ファミリーの発現調節メカニズムについて解析を進めてきた。今後は、肝臓以外の組織における *SHARP* ファミリーの発現調節や標的遺伝子についても検討する必要がある。

また、*SHARP* ファミリーは概日リズムを調

節する遺伝子のひとつでもあるため、日常の生活リズムの乱れ、すなわち体内の生物時計の狂いから引き起こされる生活習慣病の予防には、*SHARP* ファミリー遺伝子を正しく機能させることが重要であると考えられる。すなわち、*SHARP-2* 遺伝子はSCNでは光により、末梢(肝臓)では食事により発現が誘導されるため、活動を開始する朝に太陽光を浴びて、朝食をしっかりと摂ることにより生物時計をリセットし、概日リズムを正確に調整することで、生活習慣病が防げる可能性が考えられる。

参考文献

1. Granner DK, Wang J-C and Yamamoto KR.: Regulatory actions of glucocorticoid hormones : From organisms to mechanisms. *Ad. Exp. Med. Biol.* 872: 3-31, 2015.
2. Yoon, J.C., Puigserver, P., Chen, G., *et al.*: Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature*. **413**: 131-138, 2001.
3. Zhou, X.Y., Shibusawa, N., Naik, K., *et al.*: Insulin regulation of hepatic gluconeogenesis through phosphorylation of CREB-binding protein. *Nat Med*. **10**: 633-637, 2004.
4. Koo, S.H., Flechner, L., Qi, L., *et al.*: The CREB coactivator TORC2 is a key regulator of fasting glucose metabolism. *Nature*. **437**: 1109-1111, 2005.
5. Choi, J.H., Park, M.J., Kim, K.W., *et al.*: Molecular mechanism of hypoxia-mediated hepatic gluconeogenesis by transcriptional regulation. *FEBS Lett.* **579**: 2795-2801, 2005.
6. He, L., Sabet, A., Djedjos, S., *et al.*: Metformin and insulin suppress hepatic gluconeogenesis through phosphorylation of CREB binding protein. *Cell*. **137**: 635-646, 2009.
7. Dunlap, J.C., Molecular bases for circadian clocks. *Cell*. **96**: 271-290, 1999.
8. Rossner, M.J., Dorr, J., Gass, P., *et al.*: SHARPs: mammalian enhancer-of-split- and hairy-related proteins coupled to neuronal stimulation. *Mol. Cell. Neurosci.* **10**: 460-475, 1997.
9. Yamada, K. and Miyamoto, K.: Basic helix-loop-helix transcription factors, BHLHB2 and BHLHB3; their gene expressions are regulated by multiple extracellular stimuli. *Front. Biosci.* **10**: 3151-3171, 2005.
10. Hirano S, Yamada K, Kawata H., *et al.*: The rat enhancer of split- and hairy- related protein -2 gene : hepatic expression, genomic structure, and analysis. *Arch. Biochem. Biophys.* **422**: 81-90, 2004.
11. Yamada, K., Kawata, H., Shou, Z., *et al.*: Insulin induces the expression of the *SHARP-2/Stra13/DEC1* gene via a phosphoinositide 3-kinase pathway. *J. Biol. Chem.* **278**: 30719-30724, 2003.
12. Takagi, K., Asano, K., Haneishi, A., *et al.*: Insulin stimulates the expression of the *SHARP-1* gene via multiple signaling pathways. *Horm Metab Res.* **46**: 397-403, 2014.
13. Kanai, Y., Asano, K., Komatsu, Y., *et al.*: Induction of the *SHARP-2* mRNA level by insulin is mediated by multiple signaling pathways. *Biosci. Biotech. Biochem.* **81**: 256-261, 2017.
14. S. F. Steinberg., Structural Basis of Protein Kinase C Isoform Function. *Physiol Rev.* **88**: 1341-1378, 2008.
15. Jiang, G., and Zhang, B. B.: PI 3-kinase and its up- and down-stream modulators as potential targets for the treatment of type II diabetes. *Front. Biosci.* **7**: 903-907, 2002.
16. Matsumoto, M., Ogawa, W., Akimoto, K., *et al.*: PKC λ in liver mediates insulin-induced SREBP-1c expression and determines both hepatic lipid content and overall insulin sensitivity. *J. Clin. Invest.* **112**:

935-944, 2003.

17. Oshiro N, Takahashi R, Yoshino K, *et al.*: The proline-rich Akt substrate of 40 kDa (PRAS40) is a physiological substrate of mammalian target of rapamycin complex 1. *J Biol Chem.* **282**: 20329-20339, 2007.
18. Sato T, Nakashima A, Guo L, *et al.*: Specific activation of mTORC1 by Rheb G-protein in vitro involves enhanced recruitment of its substrate protein. *J Biol Chem.* **284**: 12783-12791, 2009.
19. Yamada, K., Ogata-Kawata, H., Matsuura, K., *et al.*: SHARP-2/ Stra13/ DEC1 as a potential repressor of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression. *FEBS Lett.* **579**: 1509-1514, 2005.
20. Hardie, D. G., Carling, D., and Gamblin, S. J.: AMP-activated protein kinase: also regulated by ADP? *Trends Biochem. Sci.* **36**: 470-477, 2011.
21. Hardie, D. G., Ross, F. A., and Hawley, S. A.: AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **13**: 251-262, 2012.
22. Corton, J. M., Gillespie, J. G., Hawley, S. A., *et al.*: 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? *Eur. J. Biochem.* **229**: 558-565, 1995.
23. Song, X. M., Fiedler, M., Galuska, D., *et al.*: 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside treatment improves glucose homeostasis in insulin-resistant diabetic (ob/ob) mice. *Diabetologia.* **45**: 56-65, 2002.
24. Lochhead, P. A., Salt, I. P., Walker, K. S., *et al.*: 5-Aminoimidazole-4-carboxamide riboside mimics the effects of insulin on the expression of the 2 key gluconeogenic genes PEPCK and glucose-6-phosphatase. *Diabetes.* **49**: 896-903, 2000.
25. Yamauchi, T., Kamon, J., Minokoshi, Y., *et al.*: Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat. Med.* **8**: 1288-1295, 2002.
26. Komatsu, Y., Yanagisawa, Y., Moriizumi, M., *et al.*: 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside stimulates the rat *enhancer of split- and hairy-related protein-2* gene via atypical protein kinase C lambda. *J. Biochem.* **159**: 429-436, 2016.
27. 羽石歩美, 高木勝広, 浅野公介ら: ゲニステインによるインスリン誘導性転写因子 SHARP-2 の発現調節機構の解析. *New Food Industry.* **53**: 1-8, 2011.
28. 浅野公介, 高木勝広, 羽石歩美ら: 緑茶カテキンによるインスリン誘導性転写遺伝子の発現制御. *New Food Industry.* **54**: 37-45, 2012.
29. 羽石歩美, 高木勝広, 浅野公介ら: 腸内細菌代謝産物によるインスリン誘導性遺伝子の発現制御. *New Food Industry.* **56**: 57-65, 2014.
30. 高木勝広, 浅野公介, 羽石歩美ら: ホルモンと食品成分による時計遺伝子 *SHARPs* の発現調節機構. *New Food Industry.* **57**: 7-18, 2015.
31. Asano, K., Takagi, K., Haneishi, A., *et al.*: (-)-Epigallocatechin-3-gallate enhances the expression of an insulin-inducible transcription factor gene via a phosphoinositide 3-kinase/atypical protein kinase C lambda pathway. *J Agric Food Chem.* **59**: 13360-13364, 2011.
32. Haneishi, A., Takagi, K., Asano, K., *et al.*: Analysis of induction mechanisms of an insulin-inducible transcription factor *SHARP-2* gene by (-)-epigallocatechin-3-gallate. *J Agric Food Chem.* **60**: 9850-9855, 2012.
33. Haneishi, A., Takagi, K., Asano, K., *et al.*: Analysis of regulatory mechanisms of an insulin-inducible *SHARP-2* gene by (S)-Equis. *Arch Biochem Biophys.* **525**: 32-39, 2012.

澱粉の消化性を抑制する多糖類の作用

佐々木 朋子 (SASAKI Tomoko)*

* 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品研究部門・食品加工流通研究領域

Key Words：澱粉消化性 キサンタンガム グアガム ペクチン コンニャクグルコマンナン 寒天 血糖値上昇抑制作用

はじめに

澱粉は我々の主食となる食品であるご飯、パン、麺類の主要な成分であり、重要なエネルギー源として食事には欠かせない成分である。しかし最近では、糖尿病の患者数が増え続けているため、澱粉は食後の血糖値上昇に影響を及ぼす成分として関心が高まっている。イギリスの研究者 Englyst らは、1990 年代に人工消化液による澱粉の消化性を酵素分解の反応時間によって、

- ① RDS (Rapidly Digestible Starch：易消化性澱粉)
- ② SDS (Slowly Digestible Starch：遅消化性澱粉)
- ③ RS (Resistant Starch：難消化性澱粉)

に分類し、総澱粉中においてゆっくり消化される澱粉 (SDS) が占める割合が食後血糖値の上昇度と負の相関性にあることを明らかにしている^{1,2)}。その後も澱粉中の SDS 含量と食後血糖値の関連性については関心が高く、食後血糖値の上昇抑制を期待して緩やかに消化される澱粉素材や澱粉系食品の開発がもとめられている³⁾。食品に含まれている澱粉の消化速度には澱粉の化学構造および物理化学的特性の他にも、食品の物理特性や食品中に存在する共存成分が影響を及ぼすことが知られている。内的な要因である澱粉自体の特性と消化性の関連性については

研究例も多く、澱粉粒の大きさ、澱粉の結晶構造、澱粉中のアミロース含量やアミロペクチンの化学構造等が澱粉消化性に影響を及ぼすことが報告されている^{4,5)}。一般的にはアミロース含量が高く、アミロペクチンの側鎖に長鎖画分が多い澱粉ほど消化が遅くなると考えられている。しかし外的な要因、つまり食品の物理特性、食品中に存在する共存成分、またはマトリクス構造等による影響についてはまだ報告例も少なく、今後の研究が期待されている⁶⁾。これらの外的要因は食品の加工技術によってある程度の制御が可能であることから、澱粉の消化性を抑制する要因を明らかにすることができれば、血糖値の上昇抑制効果をもつ食品の加工技術への応用が期待できる。

そこで筆者らは、澱粉系加工食品の高機能化をめざし、パンや麺などの加工食品に増粘剤 (増粘多糖類)、ゲル化剤、安定剤として使用されている非澱粉性多糖類に着目して、澱粉に対して消化遅延作用を示す多糖類の探索を行った。さらに、消化遅延作用を示した多糖類についてはその制御要因を解析したので、その結果をご紹介します。

1. 生澱粉懸濁液の澱粉酵素分解性に及ぼす多糖類の影響

増粘安定剤とは、水に溶解または分散して粘稠性を示す高分子のことで、その中でも少量で高い粘性を示すものを増粘剤、ゲル化を目的として使用するものをゲル化剤と区別する。一般的には、食品の粘度が上昇すると消化酵素と基質の移動速度が遅くなることによって酵素反応が抑制され、さらには胃からの排出速度や小腸での吸収速度も遅くなり、食後血糖値が抑制されると考えられているが、粘度上昇効果が高いすべての多糖類が血糖値上昇抑制作用を示すわけではなく、粘度と血糖値上昇抑制効果の関連性については未解明な部分が多い⁷⁻⁸⁾。そこで生澱粉と多糖類のシンプルな混合系を用いて、多糖類の消化酵素による澱粉分解性に及ぼす影響と粘度上昇効果の関連性を解析した。図1に消化抵抗性の高いハイアミロースコーンスターチの懸濁液に、様々な加工食品に使用されている4種類の水溶性多糖類(キサンタンガム、グアガム、ペクチン、コンニャクグルコマンナン)を同じ濃度で混合した試料について、澱粉分解率の経時変化を比較した結果を示す。

添加した4種類の多糖類はすべて、澱粉の酵

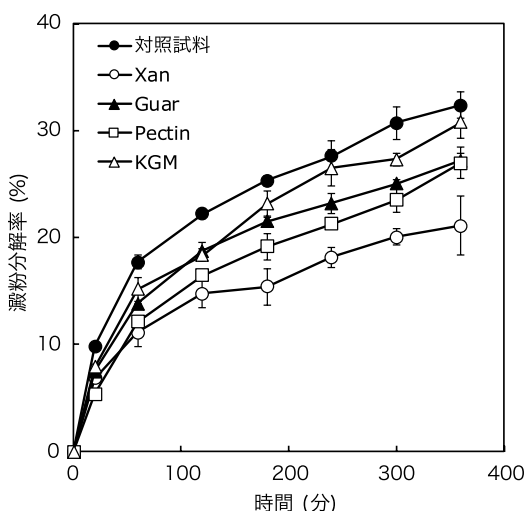


図1 多糖類を添加した澱粉懸濁液の澱粉分解率 (Xan: キサンタンガム, Guar: グアガム, Pectin: ペクチン, KGM: コンニャクグルコマンナン)

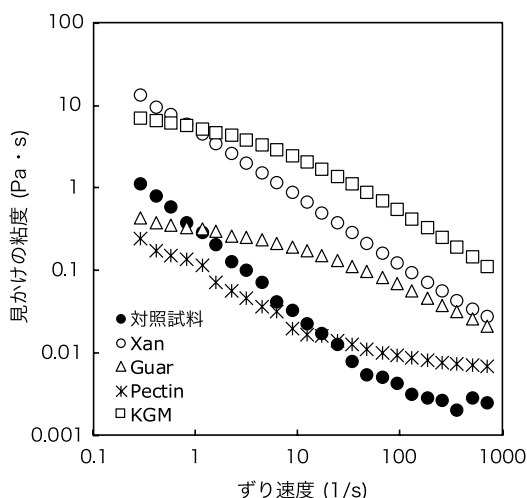


図2 多糖類を添加した澱粉懸濁液の見かけの粘度とずり速度の関係

(Xan: キサンタンガム, Guar: グアガム, Pectin: ペクチン, KGM: コンニャクグルコマンナン)

素分解性を抑制し、その抑制効果には添加した多糖類の濃度依存性が認められたが、多糖類の種類によって抑制効果の程度は異なり、ほとんどの添加濃度でキサンタンガムが最も高い抑制効果を示した。澱粉消化性の評価には、Englystらが提案した *in vitro* 評価法¹⁻²⁾を改良して使用したが、この評価法の中ではヒトの消化過程を模擬し、胃内消化の環境を反映して塩酸+ペプシン処理をした後に、pHを調整して澱粉分解酵素(パンクレアチン、アミログルコシダーゼ)を作用させる。試料の粘度と澱粉分解酵素の作用性の関連性を明らかにするために、澱粉分解酵素を添加する直前の状態である、塩酸+ペプシン処理をした試料の粘度をコンプレート型粘度計で測定した。澱粉懸濁液は糊化していない澱粉粒が分散しており、非ニュートン流動、およびずり速度の増加に伴い粘度が減少するずり流動化の特徴を示す(図2)。

添加した4種類の多糖類によって、澱粉懸濁液の粘度曲線のパターンは異なっており、添加した多糖類の中ではキサンタンガムとコンニャクグルコマンナンの粘度上昇効果が高かった。粘度の試料間差はずり速度で傾向が異なってい

たので、各ずり速度での見かけの粘度と澱粉の酵素分解率の関連性を解析した。Englyst らが提案した *in vitro* 評価法¹⁻²⁾に従い、50mL 試験管内で酵素反応を行った際の澱粉分解率とは有意な相関性が見られなかったが、透析膜内で多糖類共存下での澱粉の酵素分解を行った後、透析外液中のグルコース量を測定した値との関連性を解析した結果、ずり速度の値が 1.15 s^{-1} より小さい範囲での見かけの粘度との間に有意な相関性が認められた。

以上の結果から、低ずり速度領域における粘度の差が、各種多糖類が共存している状態でのグルコースの拡散速度の違いに反映されている可能性が示唆された⁹⁾。しかし、見かけの粘度と消化酵素による澱粉分解率の試料間差を比較すると、各種多糖類の澱粉消化に対する遅延効果の程度の違いは粘度の差だけでは説明することはできないため、多糖類と澱粉の分子間相互作用等の他の要因の関与が考えられる。

2. 馬鈴薯糊化澱粉の酵素分解性および食後血糖値に及ぼす各種多糖類の作用

澱粉は水とともに加熱すると糊化する。ごはん、パン、麺などの食品に代表されるように、我々は多くの場合、糊化した状態で澱粉を摂取する。そこで、上述の生澱粉と多糖類の単純な混合系と併せて、急速に消化される馬鈴薯糊化澱粉についても多糖類の澱粉酵素分解性に対する抑制作用と粘度上昇作用を解析した。糊化した馬鈴薯澱粉は極めて消化速度が速く、酵素反応時間 20 分以内で 80% 以上の澱粉が分解された。生澱粉の酵素分解性に対して抑制作用を示した 4 種類の多糖類（キサンタンガム、グアガム、ペクチン、コンニャクグルコマンナン）を馬鈴薯糊化澱粉に添加し、澱粉の酵素分解性を測定した結果、急速に消化される馬鈴薯糊化澱粉においても酵素分解性に対して抑制作用を示した（図 3）。生澱粉の時と同様に、同じ添加濃度では 4 種類の多糖類の中でキサンタンガムの抑制効果が最も高かった。糊化澱粉の粘度は

温度によって変動する上に、粘度が高くなった糊化澱粉に多糖類を均一に混合することが困難なため、馬鈴薯澱粉と各種多糖類の混合懸濁液の加熱および冷却時の粘度特性の変化を、一定の速度で攪拌しながら測定を行うラビッドビスコアライザー（RVA）を用いて測定した。ここでも澱粉の酵素分解性の *in vitro* 評価法の測定条件を反映して、塩酸とペプシンを添加した試料の粘度特性を解析した。その結果、RVA 測定で得られた最高粘度と澱粉分解率との間に有意な負の相関性が認められた。澱粉の酵素分解性に対して最も高い抑制効果を示したキサンタンガムは、糊化粘度の上昇効果も他の多糖類と比べて高かったため、粘度上昇効果が澱粉の酵素分解性の主な制御要因になっていることが推察された。

さらに、水晶振動子マイクロバランス（QCM）を用いて、澱粉と各種多糖類の相互作用を解析した。QCM は、センサー上で起こる物質の吸着および解離をリアルタイムに質量変化として検出できる装置である。馬鈴薯糊化澱粉を直接

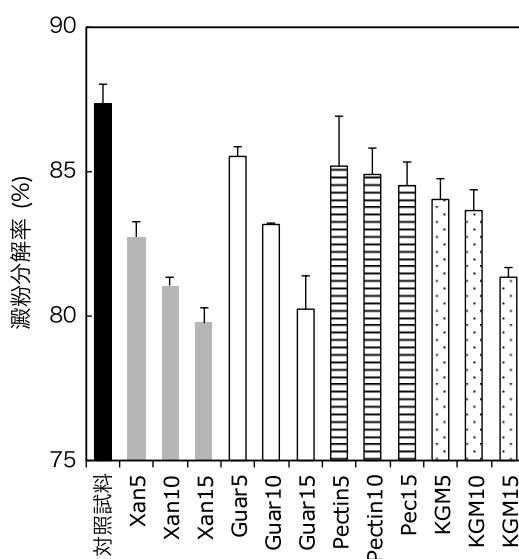


図 3 多糖類を添加した馬鈴薯糊化澱粉の澱粉分解率

(Xan: キサンタンガム, Guar: グアガム, Pectin: ペクチン, KGM: コンニャクグルコマンナン, 澱粉重量に対して 5, 10, 15% 添加)

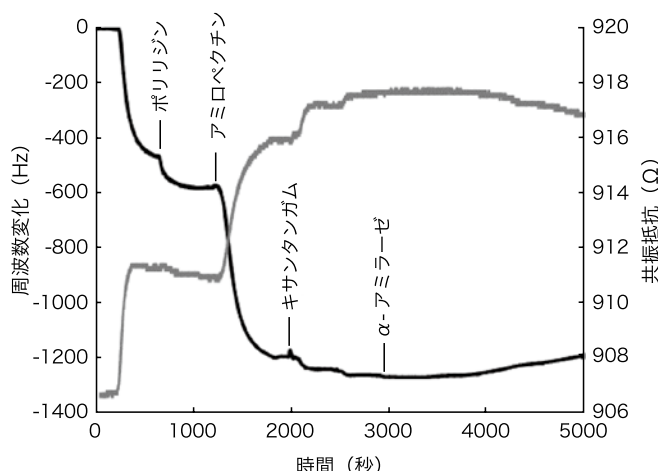


図4 水晶振動子マイクロバランスで解析した馬鈴薯由来のアミロペクチンとキサンタンガムの相互作用

QCMのセンサー上に固定化することができなかったため、異なる電荷の静電力を利用して、澱粉試料をセンサー上に固定化した¹⁰⁾。QCMのセンサー上にプラス電荷をもつポリリジンを吸着させた後に、リン酸基を多く含むためにマイナス荷電の馬鈴薯アミロペクチンの糊化液を添加したところ、アミロペクチンの吸着を示す周波数の減少が見られたため、馬鈴薯アミロペクチンの固定化が確認できた。固定化された馬鈴薯アミロペクチンに各種多糖類（キサンタンガム、グアガム、ペクチン、コンニャクグルコマンナン）を添加した結果、キサンタンガムのみがセンサー上に固定化された馬鈴薯アミロペクチン層に吸着したことを示す周波数の減少と共振抵抗の増加が見られた（図4）。さらに、アミロペクチン層にキサンタンガムが吸着された状態で澱粉分解酵素を添加した結果、アミロペクチンの分解を示す周波数の増加の速度が極めて遅かったため、アミロペクチンに吸着したキサンタンガムが消化酵素によるアミロペクチンの分解に対して高い抑制作用をもつことが示された。

一方でグアガム、ペクチンおよびコンニャクグルコマンナンについては、アミロペクチンに吸着することを示す周波数の減少が見られなかった上に、各種多糖類を添加した後に澱粉分

解酵素を加えると、アミロペクチンの急速な分解を示す周波数の急激な上昇が見られたため、アミロペクチンの分解に対する抑制作用は確認できなかった。以上の結果から、キサンタンガムが示した澱粉の酵素分解性に対する高い抑制作用には、粘度上昇効果に加えて澱粉粒にキサンタンガムが吸着する相互作用も関与していることが考えられる。

4種類の多糖類を添加した馬鈴薯糊化澱粉については、*in vitro* 評価法による澱粉の酵素分解性の測定に加え、同じ試料を用いてラットを用いた澱粉負荷試験を実施した。動物実験は受託機関である株式会社ケー・エー・シーに委託して行い、委託したすべての実験は当該会社の動物実験委員会および食品総合研究所（現食品研究部門）動物実験委員会の承認を得て、農研機構動物実験実施規定および食品総合研究所（現食品研究部門）実施要領に従い実施した。その結果、多糖類を添加していない対照群と比較してキサンタンガム添加群では摂取後30分の血糖値、グアガムおよびペクチン添加群では60分後の血糖値が有意に低い値を示した（図5）。澱粉酵素分解性に対して高い抑制効果を示したキサンタンガムは、食後血糖値上昇抑制効果については澱粉摂取直後の血糖値上昇のみに効果があり、摂取後60

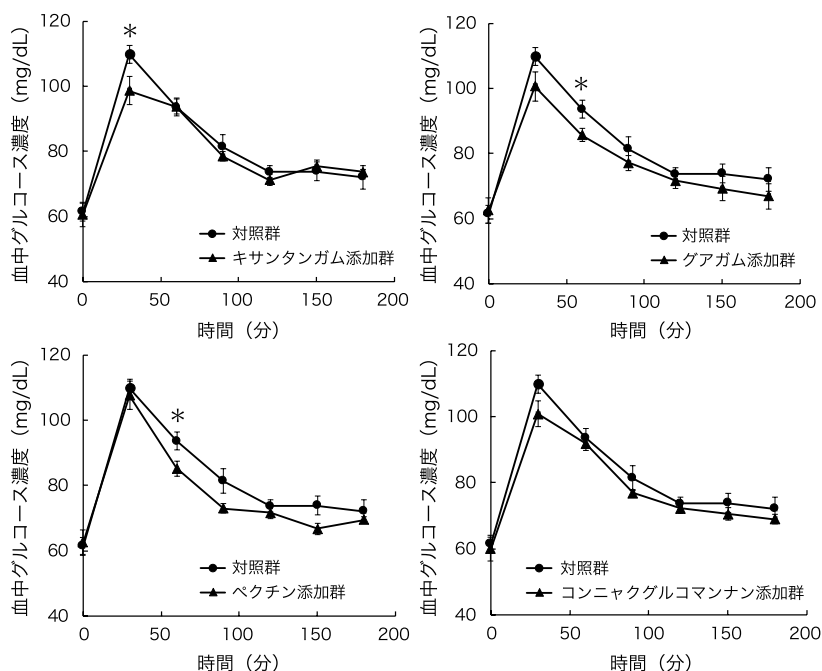


図5 馬鈴薯糊化澱粉と多糖類（5% 添加）の混合試料摂取後の血糖値の推移

分以降の血糖値は対照群との間に有意差は見られなかった。血糖値と *in vitro* 評価法を用いて測定した消化酵素による澱粉分解率との関連性を解析した結果、グアガム添加群のみが他の多糖類と異なる挙動を示し、グアガム添加群を除いた試料では酵素反応時間 20 分以内に分解される澱粉（RDS）の量と投与 30 分後の血糖値との間に高い正の相関性が認められた。グアガムは他の多糖類と比較して、澱粉の酵素分解性に対する抑制効果よりも血糖値上昇抑制効果が顕著であり、澱粉の酵素分解性を抑制する効果だけではなく、グルコース吸収抑制等の他の作用が血糖値上昇により大きな影響を及ぼしていることが推察される¹¹⁾。

3. 多糖類を添加した澱粉ゲルの物理特性と澱粉の酵素分解性の関連性

固形食品のモデル系として、澱粉と 3 種類の多糖類（コンニャクグルコマンナン：0.1%, 0.2%, キサンタンガム：0.1%, 0.2%, 0.5%, 寒天：0.1%, 0.2%, 0.5%, 1.0%, 1.5%）の混合ゲル

を調製して、生澱粉懸濁液および馬鈴薯糊化澱粉と同様に、添加された多糖類がゲルに含まれる澱粉の酵素分解性に及ぼす影響を解析した。澱粉ゲルの調製には高アミロース米から精製した澱粉を使用した。澱粉濃度 30% のゲルを調製した後、5℃の冷蔵庫で 1 日保存した試料を測定に用いた。各種多糖類の添加濃度は、ゲルを調製する際に澱粉と多糖類が均一に混合できる濃度を設定した。同じゲルの試料を用いて澱粉の酵素分解性とゲルの物性を測定し、各種パラメータの関連性を解析した。図 6 に 3 種類の多糖類を米澱粉に混合して調製したゲルの消化酵素による澱粉分解率の経時変化を示す。各種多糖類を添加したゲルは、多糖類を添加していない対照試料と比較して、澱粉分解率は低い値を示し、多糖類の澱粉酵素分解性を抑制する効果が見られた。また、その抑制効果には多糖類の濃度依存性が認められた。同じ添加濃度で 3 種の多糖類間の抑制効果を比較すると、0.1% 添加ではキサンタンガム、0.2% ではコンニャクグルコマンナンが最も高い効果を示した。

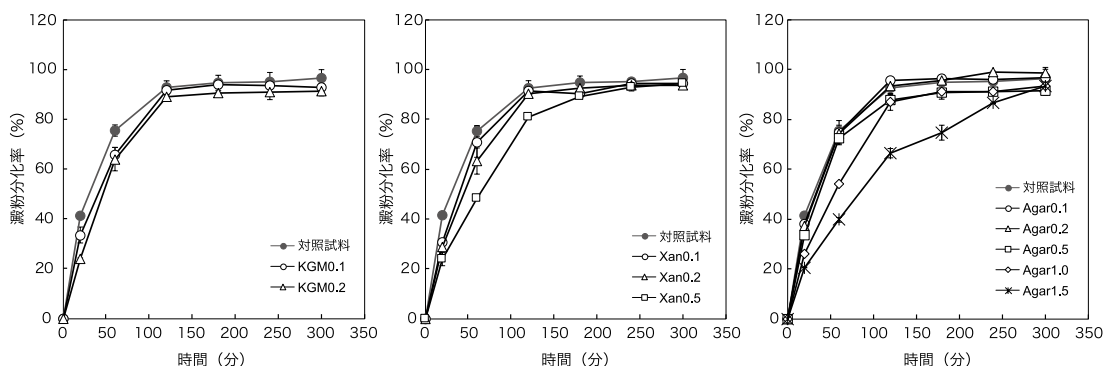


図6 多糖類を混合した米澱粉ゲルの澱粉分解率の経時変化
(KGM: コンニャクグルコマンナン, Xan: キサンタンガム, Agar: 寒天)

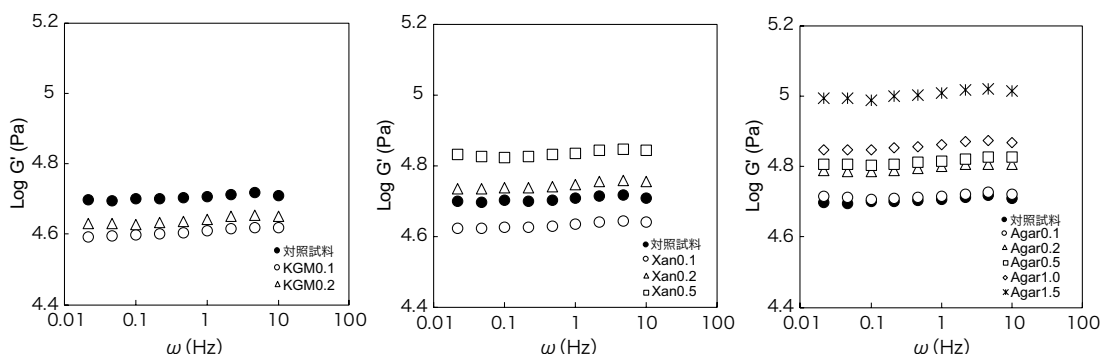


図7 多糖類を混合した米澱粉ゲルの貯蔵弾性率の周波数依存性
(KGM: コンニャクグルコマンナン, Xan: キサンタンガム, Agar: 寒天)

さらに、各種ゲルについて微小変形下での動的粘弾性の測定と大変形下での破断試験を行った。コンニャクグルコマンナンの添加は米澱粉ゲルの貯蔵弾性率を下げたが、寒天は逆に上昇させる効果を示した（図7）。一方、キサンタンガムは添加濃度によって貯蔵弾性率に及ぼす影響が異なり、0.1%添加では対象試料より低い値を示したが、0.2%以上の添加では高くなり、わずかな添加濃度の差がゲルの物性に顕著な影響を及ぼしていた。破断試験によって測定した破断荷重値および破断変形率は各種多糖類を添加することによって減少し、多糖類の添加によって柔らかく脆いゲルになる傾向が見られた。ゲルのレオロジー測定（動的粘弾性、破断特性）によって得られた各種パラメータと澱粉分解率の関連性を解析したが、いずれのパラ

メータにおいても澱粉分解率との間に有意な相関性は認められなかった。澱粉ゲルの酵素感受性はゲルのネットワーク構造への消化酵素の拡散と澱粉粒の中への浸透の速度に影響を受けるため、ゲル構造の強度がゲル中の澱粉の酵素分解性に影響を及ぼしていると考えられる。しかし、今回用いた3種類の多糖類の添加によって物性が異なるゲルについては、ゲルの強度と澱粉の酵素分解性との間に有意な関連性は認められなかった。コンニャクグルコマンナンを添加した澱粉ゲルの場合を見ると、澱粉のみの対照ゲルと比べて、貯蔵弾性率、破断荷重値および破断変形率のいずれも低い値を示したことから、コンニャクグルコマンナンの添加によりゲル構造が変化して脆弱化したと考えられるが、ゲル中の澱粉の酵素分解性はコンニャクグルコ

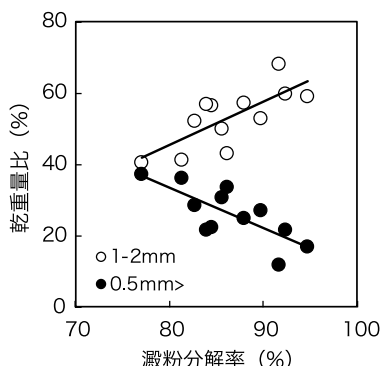


図8 ゲルの破砕度と破砕後の澱粉分解率の関係

マンナンの添加によって抑制されたため、ゲル強度の関与は考えられない。

澱粉の酵素分解性を測定する際には、酵素液を添加後、恒温振盪水槽の中で酵素反応を行うため、ゲルは振盪による物理的な衝撃で反応中に破砕される。そこでゲルを同じ条件で破砕した後の粒度分布を比較した結果、多糖類を添加したゲルは対照のゲルよりも、破砕後小さいサイズの断片 (<0.5mm) の比率が高い値を示し、より細かい断片に破砕されていることが明らかになった。破砕後の断片のサイズが小さいほど、消化酵素が作用できる表面積は増加し、澱粉分解性は上昇すると考えられるが、今回の測定結果では小さいサイズの画分比率と澱粉分解率との間に負の相関性が認められた (図8)。これらの結果から、多糖類を添加した澱粉ゲルは細

かく破砕されるほど、多糖類がゲルのマトリクス構造から溶出し、酵素溶液の粘度を上昇させることによって酵素分解性が抑えられたことが推察される。さらに、共存する多糖類は保水力が高いために、ゲルを調製する際に澱粉の糊化が抑えられ、消化酵素による分解率が低下した可能性も考えられる。ゲルの物理特性と澱粉の酵素分解性に直接的な関係性は認められなかったが、ゲルの破砕度、破砕後の粘度の上昇、および多糖類の保水力等が澱粉の酵素分解性の制御機構に関与していることが考えられる¹²⁾。

おわりに

本稿では、澱粉系加工食品に増粘剤、ゲル化剤、安定剤として使用されている非澱粉性多糖類の澱粉消化性に対する抑制作用と、その制御機構解明に関する研究例を紹介した。食品に含まれている澱粉の消化性の制御要因については、様々な要因が複合的に関与しているため、直接的な要因を解明することは難しい。今回の研究例の中で、澱粉と多糖類のシンプルな混合系で澱粉の酵素分解性に対して抑制効果が認められた多糖類についても、今後は食品の形態での作用を検証する必要がある。さらには、食品の加工技術によるマトリクス構造や物理特性の改変による澱粉消化性の制御技術の検討が今後必要であると思われる。

参考文献

1. Englyst H. N., Kingman S. M., Cummings J. H.: Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. *Eur. J. Clin. Nutr.* **46**: S33-S50, 1992.
2. Englyst K. N., Englyst H. N., Hudson G. J., *et al.*: Rapidly available glucose in foods; An in vitro measurement that reflects the glycemic response. *Am. J. Clin. Nutr.* **69**: 448-454, 1999.
3. Wongsagonsup R., Varavinit S., BeMiller J. N.: Increasing slowly digestible starch content of normal and waxy maize starches and properties of starch products. *Cereal Chem.* **85**: 738-745, 2008.
4. Benmoussa M., Moldenhauer K. A. K., Hamaker B. R.: Rice amylopectin fine structure variability affects starch digestion properties. *J. Agric. Food Chem.* **55**: 1475-1479, 2007.
5. Williamson G. W., Belshaw N. J., Self D. J., *et al.*: Hydrolysis of A- and B-type crystalline polymorphs of starch by α -amylase, β -amylase and glucoamylase 1. *Carbohydr. Polym.* **18**: 179-187, 1992.
6. Singh J., Dartois A., Kaur L.: Starch digestibility in food matrix: a review. *Trends Food Sci. Tech.* **21**: 168-180, 2010.
7. Hallfrisch J., Behall K. M.: Mechanism of the effects of grains on insulin and glucose responses. *J. Am. Coll. Nutr.* **19**: 320S-325S, 2000.
8. Wood P. J., Beer M. U., Butler G.: Evaluation of role of concentration and molecular weight of oat β -glucan in determining effect of viscosity on plasma glucose and insulin following an oral glucose load. *Brit. J. Nutr.* **84**: 19-23, 2000.
9. Sasaki T., Kohyama K.: Influence of non-starch polysaccharides on the in vitro digestibility and viscosity of starch suspensions. *Food Chem.* **133**: 1420-1426, 2012.
10. Sasaki T., Noel T. R., Ring S. G.: Study on α -amylase hydrolysis of potato amylopectin by a quartz crystal microbalance. *J. Agric. Food Chem.* **56**: 1091-1096, 2008.
11. Sasaki T., Sotome I., Okadome H.: In vitro starch digestibility and in vivo glucose response of gelatinized potato starch in the presence of non-starch polysaccharides. *Starch* **67**: 415-423, 2015.
12. Sasaki T., Kohyama K.: Effect of non-starch polysaccharides on the in vitro digestibility and rheological properties of rice starch gel. *Food Chem.* **127**: 541-546, 2011.

ビタミン B₆ の関わる代謝異常：ビタミン B₆ 欠乏時のホモシステイン蓄積と肝臓脂質蓄積およびその改善

Vitamin B₆-related metabolic disorder : Mechanism of accumulation of homocysteine and lipids in liver under vitamin B₆-deficiency, and their amelioration

早川 享志 (HAYAKAWA Takashi)*

* 岐阜大学応用生物科学部 応用生命科学課程

Department of Applied Biological Science, Faculty of Applied Lifesciences, Gifu University

Key Words：ビタミン B₆ メチオニン代謝 ホモシステイン 肝臓脂質蓄積 超低密度リポタンパク質
vitamin B₆, methionine metabolism, homocysteine, lipids deposition in liver, very-low density lipoprotein (VLDL)

Abstract.

Vitamin B₆ (B₆) is one of the water soluble vitamins and involves in methionine metabolism. When rats were made B₆-deficient, methionine metabolism was disturbed and homocysteine was accumulated in liver and plasma. We observed lipid deposition in liver and decreased lipids in plasma of these rats especially with B₆-deficient diet supplemented with 0.9 % of methionine (D diet). Pteroylmonoglutamate (folate) fortification in diet ameliorated increase in plasma homocysteine and liver S-adenosylhomocysteine (SAH), and accompanied by reduction of liver lipids deposition and recovery of plasma lipids profile. Folate fortification recovered 5-methyltetrahydrofolate in liver which was reduced by D diet. Phosphatidylcholine (PC) supplementation to the D diet was effective in ameliorate liver lipid deposition by B₆-deficiency. Increased lipids in liver accompanied by reduced (LDL + VLDL) cholesterol and triacylglycerol and phospholipids in plasma, and these were ameliorated by PC supplementation to the D diet. It was speculated that PC supplementation recovered PC synthesis in liver and normalized VLDL secretion into blood.

要旨

ビタミン B₆ (B₆) は、水溶性ビタミンの1つであり、メチオニン代謝に関わっている。ラットが B₆ 欠乏になると、メチオニン代謝が乱れ、肝臓や血漿にホモシステインが蓄積する。B₆ 欠乏で 0.9%のメチオニンを添加した飼料 (D 食) では特に、こうしたラットの肝臓脂質蓄積と血漿脂質の低下が観察された。飼料中プテロイルモノグルタミン酸 (葉酸) の強化は血漿ホモシステインと S-アデノシルホモシステイン (SAH) の増加を緩和し、それに伴い肝臓脂質の低減と血漿脂質プロファイルの回復が認められた。葉酸の強化は D 食で低下した肝臓の 5-メチルテトラヒドロ葉酸レベルを回復させた。D 飼料へのホスファチジルコリン (PC) 添加は、B₆ 欠乏による肝臓脂質蓄積の緩和に有効であった。肝臓脂質増加は、血漿中 (LDL + VLDL) コレステロール、トリグリセリド、リン脂質の低下を伴っており、これらは D 飼料への PC 添加により緩和された。PC 添加は、肝臓での PC 合成を回復し、血中への VLDL 分泌を正常化したと推定した。

はじめに

ヒトは、タンパク質、脂質、炭水化物といった三大栄養素以外にミネラルが必要であることが1800年代に示され、その後、多種類のミネラルの必要性が明らかになった。しかし、これらのみではラットの成長には不十分であり、乳汁の添加により改善することが示された。この中には、脂溶性のA因子と、水溶性のB因子の二つの因子が含まれ、ビタミンA、B群ビタミンの発見につながった。今では、4種類の脂溶性ビタミンと、9種類の水溶性ビタミンが明らかにされており¹⁾、どのビタミンが欠乏しても特徴的な欠乏症となることから、各ビタミンのおかれている状況を考慮して食事摂取基準が算定されている²⁾。

ビタミンB₆はB群ビタミンの一つであり、1934年に抗皮膚炎因子として見出された。ピリドキシン(PN)、ピリドキサル(PL)およびピリドキサミン(PM)の3つの遊離型と、それらがリン酸化されたピリドキシン5'-リン酸(PNP)、ピリドキサル5'-リン酸(PLP)およびピリドキサミン5'-リン酸(PMP)の3つのリン酸化型の6種がビタミンB₆の活性型である(図1)。植物性食品には、PNの配糖体であるピリドキシン-5'-β-グルコシド(PN-5'-βG)が含まれており、日本人のビタミンB₆供給源として植物性食品も重要である³⁾。PN-5'-βGは、加水分解されてPNとなり初めてビ

タミンB₆として有効になるが、この加水分解反応で全てが遊離型のPNに変換されるわけではない。遊離型からリン酸化型への変換はPLキナーゼ[EC 2.7.1.35]により、PNPとPMPのPLPへの変換はPNP / PMP酸化酵素[EC 1.4.3.5]により触媒される。後者の酵素は、ビタミンB₂の補酵素型の1つであるフラビンモノヌクレオチド(FMN)を補酵素としており、ビタミンの活性型への変換に別のビタミンが関わっている希な例である。従って、摂取したビタミンB₆の有効性を発揮するには、ビタミンB₂栄養状態にも気を配る必要がある。

ビタミンB₆は約120種の酵素反応の補酵素として働いているが、良く知られているのは、アミノ酸代謝に関わるアミノ基転移反応である。アミノ酸の炭素骨格代謝に導く初段反応を触媒する一方で、この逆反応は非必須アミノ酸の生合成反応とも関係するので、ビタミンB₆はアミノ酸の代謝と生合成に寄与している。一方、アミノ酸の脱炭酸酵素にも関わっており、ヒスチジンからのヒスタミンの合成、グルタミン酸からのγ-アミノ酪酸(GABA)の合成、トリプトファンからのセロトニンの合成、チロシンからのドーパミン、エピネフリンやノルエピネフリンの合成など、神経伝達物質をはじめとする生理活性アミン類の生合成に関わっている。このようにビタミンB₆は、タンパク質・アミノ酸代謝への関わりが強く、食事摂取基準

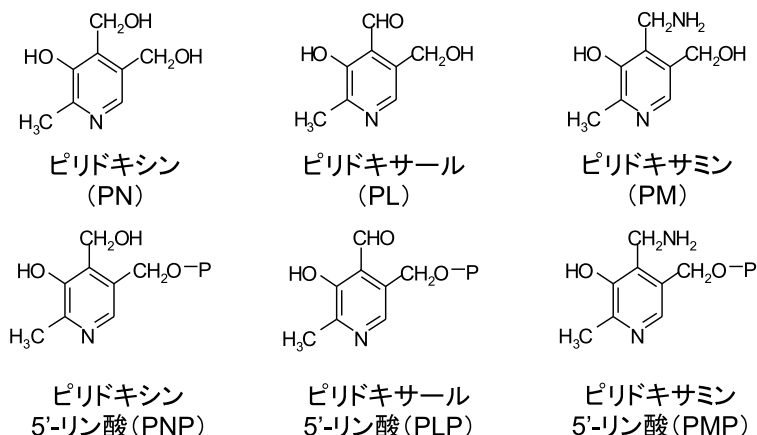


図1 生理活性を持つビタミンB₆化合物

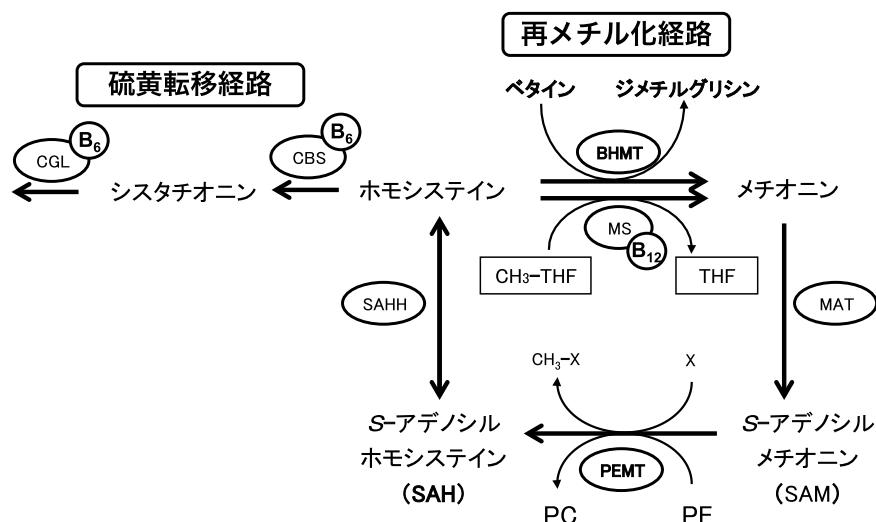


図2 メチオニン代謝系

B₂: ビタミン B₂, B₆: ビタミン B₆, B₁₂: ビタミン B₁₂, BHMT: ベタイン - ホモシステインメチル転移酵素, CBS: シスタチオニン β- シンターゼ, CGL: シスタチオニン γ- リアーゼ, CH₃-THF: 5- メチルトetraヒドロ葉酸, MAT: , メチオニンアデノシルトランスフェラーゼ, MS: メチオニン合成酵素, PEMT: ホスファチジルエタノールアミンメチルトランスフェラーゼ, SAHH: S- アデノシルホモシステインハイドロラーゼ, THF: テトラヒドロ葉酸

は、摂取タンパク質量当たりの摂取量を元に策定されている。ビタミン B₆ 栄養状態の判定には、トリプトファン負荷後の尿中キサンツレン酸の排泄量を調べる方法が広く使われてきた。トリプトファン代謝において、ビタミン B₆ は 3- ヒドロキシキヌレニン代謝に関わるキヌレニンアミノトランスフェラーゼ [EC 2.6.1.7] とキヌレニナーゼ [EC 3.7.1.3] の 2 酵素の補酵素となっている。ビタミン B₆ 欠乏時は、細胞質のキヌレニナーゼ活性が早く影響を受けて代謝活性が低下することから、3- ヒドロキシキヌレニンの代謝は、ミトコンドリア外膜に存在するキヌレニンアミノトランスフェラーゼによるキサンツレン酸への代謝が優位となる。その結果、キサンツレン酸の産生に代謝が傾き、尿中にキサンツレン酸が増える。これがビタミン B₆ 欠乏の指標となっている⁴⁾。

1. メチオニン代謝におけるホモシステインの位置づけ

トリプトファン代謝に加えて、ビタミン B₆ はメチオニン代謝でも重要な役割を演じてい

る⁵⁾。メチオニンはタンパク質の構成アミノ酸として利用される以外に、生体内でのメチル化反応のメチル基供与体としての働きがある。メチオニンはメチオニンアデノシルトランスフェラーゼ (MAT: EC 2.5.1.6) により S- アデノシルメチオニン (SAM) となり、メチル基受容体 (X とする) にメチル基を渡して CH₃-X とする一方で、自身は S- アデノシルホモシステイン (SAH) となる。SAH は加水分解を受け、アデノシンを遊離してメチオニンより 1 つ炭素数の少ないホモシステインとなる (図 2)。SAH とホモシステインの平衡は SAH 生成に向かっており⁶⁾、ホモシステインの蓄積は SAH の蓄積を伴う。ホモシステインの代謝には、大きく分けて二つの経路がある。一つは、メチオニンの再メチル化経路である。この経路では 5- メチルトetraヒドロ葉酸 (CH₃-THF) をメチル基供与体とするビタミン B₁₂ 酵素であるメチオニン合成酵素 [MS: EC 2.1.1.13] が働いている。ベタインが利用可能な場合にはベタイン-ホモシステイン S- メチル転移酵素 (BHMT: EC 2.1.1.5) による再メチル化も進む。もう一つは硫黄転移

経路である。この経路では、ホモシステインはシスタチオニン β- 合成酵素（CBS：EC 2.4.1.22）によりシスタチオニンに、さらにシスタチオニン γ- リアーゼ（CGL：EC 4.4.1.1）によりシステインへと代謝される。これら二つの酵素は PLP を補酵素としており、ビタミン B₆ 欠乏が進行するとこれらの実質的活性は低下する⁷⁾。このように、ホモシステイン代謝には、ビタミン B₁₂、葉酸、ビタミン B₆ の3つのビタミンが関わっており、ホモシステイン代謝に関わる活性のバランスがホモシステインの動態と密接に関連している。

2. ホモシステインの蓄積には複数の要因が関わっている

ホモシステインについては、動脈硬化との関連が注目され、研究が進められてきたが、現在では、認知症との関連に関心が集まっている。もともとホモシステインは年齢に伴って濃度が上昇方向であるが、ホモシステインの蓄積には種々の要因が関わっている。栄養学的には、上記で述べたように複数のビタミンが関係している。ビタミン B₁₂、葉酸およびビタミン B₆ がホモシステイン代謝とどのように関係するのか、また、葉酸のメチル基供与に依存しないもう一つの経路として、ベタインがどのようにホモシステイン代謝に関わるのかについて説明する。

2-1. ビタミン B₁₂、葉酸の欠乏

ホモシステインの再メチル化経路において、ビタミン B₁₂（メチル B₁₂）はメチオニン合成酵素の補酵素となっている。このメチル化反応において、CH₃-THF はメチル基供与基質であるので、ビタミン B₁₂ 欠乏単独でも、葉酸欠乏単独でもホモシステインの代謝が停滞し、ホモシステインの蓄積の要因となる。なお、植物においては、葉酸のメチル基が直接ホモシステインのメチル化に用いられるので、植物はビタミン B₁₂ を必要とせず、植物はビタミン B₁₂ を合成しないので、植物からこのビタミンを摂ることはできない。

2-2. ビタミン B₆ の欠乏

硫黄転移経路において、PLP はシスタチオニン β- 合成酵素とそれに続くシスタチオニン γ- リアーゼの補酵素となっている。通常、ホモシステインはこれら酵素により L- システインへと代謝されるが、ビタミン B₆ 欠乏では、これら酵素活性が低下し⁷⁾、ホモシステイン代謝が滞る結果としてホモシステインの蓄積が起こる。

2-3. ベタインによるホモシステインの再メチル化反応

通常の再メチル化反応とは別に肝臓にはベタインのメチル基をホモシステインに転移することによりメチオニンを再合成する再メチル化反応がある。この反応は、メチオニン合成酵素とは別に、ベタインーホモシステイン S- メチル転移酵素により触媒される。ベタインは、ビートや穀類に含まれるメチル基供与物質である。高ホモシステイン血症の治療方法の一つとしてベタイン投与が行われるのは、この理由による。この反応自体にはビタミンの関与がないので、ビタミン不足に起因する高ホモシステイン血症対策としてベタイン投与は有効なホモシステイン代謝促進法である。

3. ビタミン B₆ 欠乏による肝臓ホモシステインの蓄積は葉酸強化により低減化する

ビタミン B₆ 欠乏を引き起こす飼料として以前は高タンパク質飼料（70% カゼイン）を用いていた⁶⁻⁸⁾。しかし、条件が特殊であるという指摘を受けることが多かった。かといって、通常の 20% カゼイン飼料では安定して高ホモシステイン血症を惹起することは難しい。そこで、飼料へのメチオニン負荷と高ホモシステイン血症との関連を調べた。その結果、20% カゼイン含有ビタミン B₆ 欠乏飼料中へのメチオニン添加量を通常の AIN-76 精製飼料の 0.3% から 0.6% に上げると血漿ホモシステイン濃度は上昇し始め、0.9% の添加で安定した高ホモシステイン血症を惹起することを明らかにし

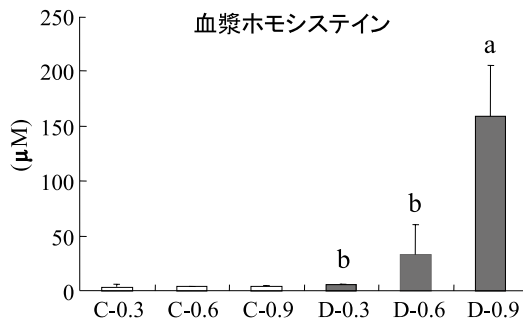


図3 飼料中メチオニン添加レベルが血漿ホモシステインに及ぼす影響

C: Control 飼料, D: ビタミン B₆ 欠乏飼料
飼料中メチオニン添加レベル: 0.3, 0.6 および 0.9 %
同じアルファベット記号を持たない群間に有意差がある ($p < 0.05$)

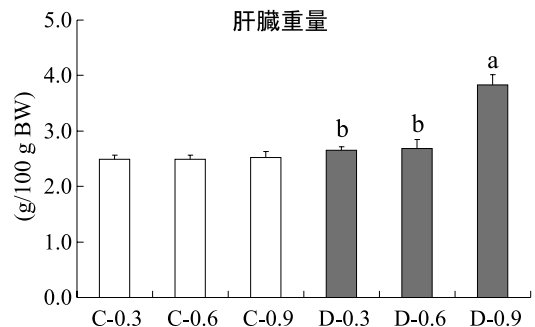


図4 飼料中メチオニン添加レベルが肝臓重量に及ぼす影響

C: Control 飼料, D: ビタミン B₆ 欠乏飼料
飼料中メチオニン添加レベル: 0.3, 0.6 および 0.9 %
同じアルファベット記号を持たない群間に有意差がある ($p < 0.05$)

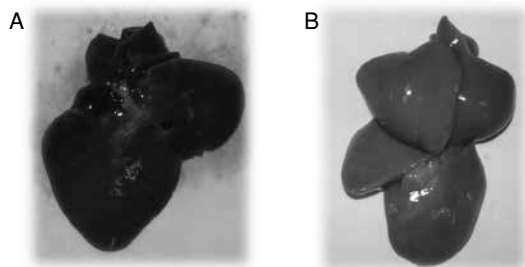


図5 コントロール飼料ラット肝臓 (A) およびメチオニン負荷ビタミン B₆ 欠乏ラット肝臓 (B) の外見

た (図3) 9)。また、この時メチオニン 0.9% 添加のビタミン B₆ 欠乏群では、肝臓重量が増加し (図4)、ビタミン B₆ 欠乏ラットの肝臓は白っぽく変化しており、脂肪肝の様相を呈していた (図5)。

メチオニン合成酵素によるホモシステインの代謝には、メチル基供与基質として CH₃-THF が必要である。CH₃-THF は 5, 10- メチレンテトラヒドロ葉酸 (MTHF) にメチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素 (MTHFR: EC1.5.1.20) が作用して生成する。MTHF は、テトラヒドロ葉酸 (THF) に PLP 酵素であるセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ (SHMT: EC2.1.2.1) が作用して生成する。メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素はフラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) を補酵素として要求し、この酵素

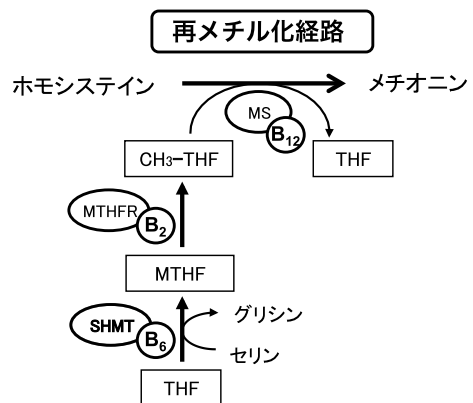


図6 ホモシステインの再メチル化に関わる関連代謝

B₂, ビタミン B₂, B₆: ビタミン B₆, B₁₂: ビタミン B₁₂, CH₃-THF: 5- メチレンテトラヒドロ葉酸, MS: メチオニン合成酵素, MTHF: 5,10- メチレンテトラヒドロ葉酸, MTHFR: メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素, SHMT: セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ, THF: テトラヒドロ葉酸

の遺伝子多型は、FAD への親和性を低下させ MTHF 活性に影響することによりホモシステイン再メチル化を低下させ、ホモシステイン蓄積に関わる (図6)。このように再メチル化経路は、葉酸供給も律速となっている。即ち、ビタミン B₆ 欠乏下においては、硫黄転移経路での代謝が低下する一方で、葉酸の変換に影響することにより再メチル化反応も低下する可能性が予測された。そこで、ビタミン B₆ 欠乏下にお

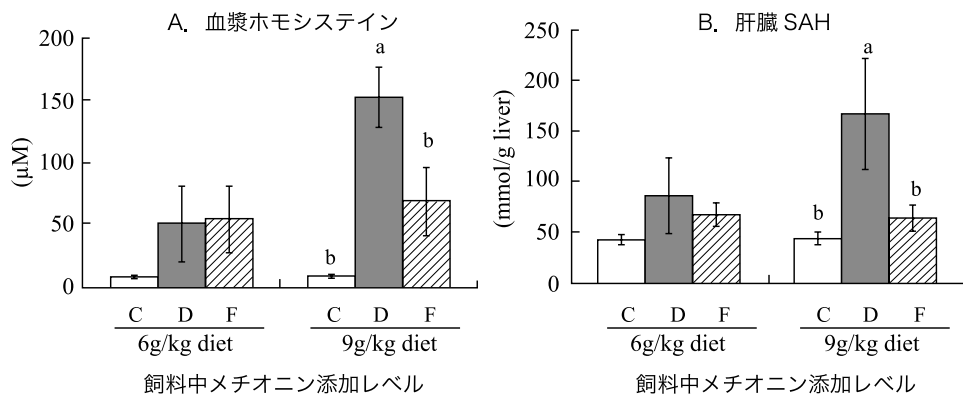


図7 飼料中葉酸強化が血漿ホモシステイン (A) および肝臓 SAH (B) に及ぼす影響
C: Control 飼料, D: ビタミン B₆ 欠乏飼料, F: D に葉酸 5 倍強化した飼料
飼料中メチオニン添加レベル: 0.6 および 0.9 %
同じアルファベット記号を持たない群間に有意差がある ($p<0.05$)

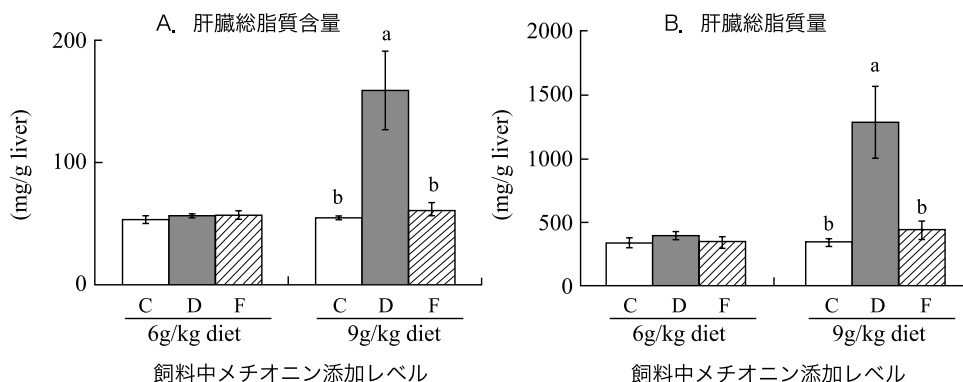


図8 飼料中葉酸強化が肝臓総脂質含量に及ぼす影響
C: Control 飼料, D: ビタミン B₆ 欠乏飼料, F: D に葉酸 5 倍強化した飼料
飼料中メチオニン添加レベル: 0.6 および 0.9 %
同じアルファベット記号を持たない群間に有意差がある ($p<0.05$)

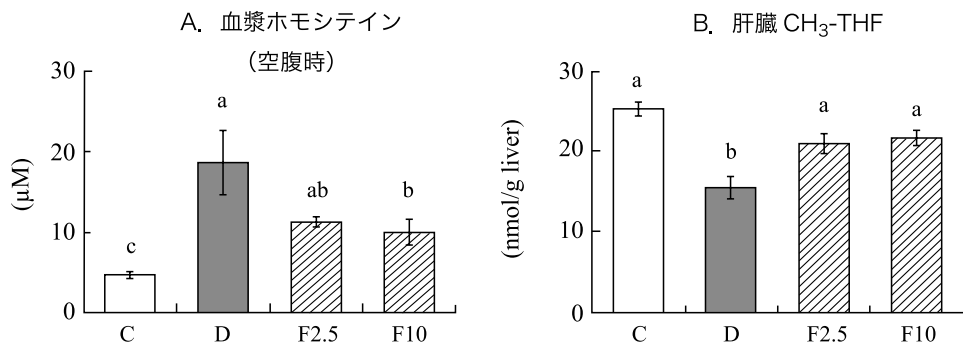


図9 飼料中葉酸強化が血漿ホモシステイン (A) および肝臓 5-メチルテトラヒドロ葉酸 (B) に及ぼす影響
C: Control 飼料, D: ビタミン B₆ 欠乏飼料, F2.5: D に葉酸 2.5 倍強化した飼料, F10: D に葉酸 10 倍強化した飼料
同じアルファベット記号を持たない群間に有意差がある ($p<0.05$)

いて葉酸を5倍強化したところ、血漿ホモシステインおよび肝臓 SAH の蓄積が葉酸の強化により改善（低下）した（図7）⁹⁾。同様に、肝臓脂質蓄積も葉酸の強化によって有意に低下した（図8）。葉酸の強化による改善の理由として、図6において示したように再メチル化反応におけるメチル基供与体としての MTHF の利用性の問題があり、それが葉酸強化により改善したことが考えられる。そこで、メチオニン負荷後の CH₃-THF の変動について調べた。ビタミン B₆ 欠乏下、空腹時において血漿ホモシステインは有意な増加を示し、葉酸強化群においては低下が認められた（図9-A）。肝臓中の CH₃-THF は、ビタミン B₆ 欠乏飼料では、有意な低下が見られ、葉酸の強化飼料により CH₃-THF レベルは有意に増加した（図9-B）¹⁰⁾。これまでのビタミン B₆ 欠乏実験において葉酸は飼料中に通常量（十分量）入っていたが、ビタミン B₆ 欠乏下においては、葉酸の代謝が低下し、再メチル化反応に十分な CH₃-THF を供給できないため、ホモシステインの蓄積が顕著となったこと、また、葉酸の強化により MTHF の供給が改善し、CH₃-THF の供給が回復したために再メチル化反応が回復した結果として、ホモシステイン代謝が改善（促進）され濃度の正常化（低下）が起こったことが推察された。通常、

あるビタミン欠乏による影響が他のビタミンにより影響を受けることはまずないが、ホモシステイン代謝のように複数のビタミンが関与している場合には、レアケースとしてこのようなことが起こり得ることが示された。

4. 肝臓ホモシステイン蓄積時の肝臓脂質蓄積とその改善について

肝臓は、摂取した脂質代謝の中心臓器である。消化・吸収した脂質はカイロミクロンとしてリンパを經由して静脈に入り、一部末梢組織で利用された後、肝臓に取込まれる。次いで、肝臓脂質は超低密度リポタンパク質（VLDL）に組み込まれて肝臓から分泌され、全身に脂質を供給する。VLDL はアポタンパク質、リン脂質、コレステロールエステル、トリグリセリドから成るリポタンパク質の1種であるが、肝臓からの分泌には、新たに合成されたホスファチジルコリン（PC）が必要である¹¹⁾。ところがビタミン B₆ 欠乏では、ホスファチジルエタノールアミン（PE）が蓄積し、PCが低下する⁷⁾。PEのPCへのメチル化は、SAMのメチル基をPEに転移させることにより行われるが、この反応を触媒する酵素ホスファチジルエタノールアミンメチル基転移酵素（PEMT：EC 2.1.1.17）は、SAHにより強力に阻害される¹²⁾。従って、ビ

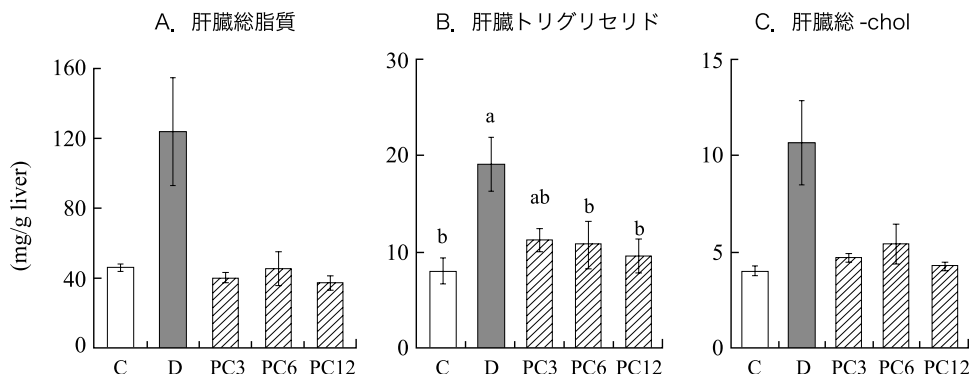


図10 飼料中ホスファチジルコリン（PC）添加がビタミン B₆ 欠乏時の肝臓総脂質（A）、肝臓トリグリセリド（B）および肝臓総コレステロール（C）に及ぼす影響

C: Control 飼料, D: ビタミン B₆ 欠乏飼料, PC3, PC6, PC12: D に PC をそれぞれ飼料中 3, 6 および 12 g/kg 添加した飼料

同じアルファベット記号を持たない群間に有意差がある（ $p < 0.05$ ）

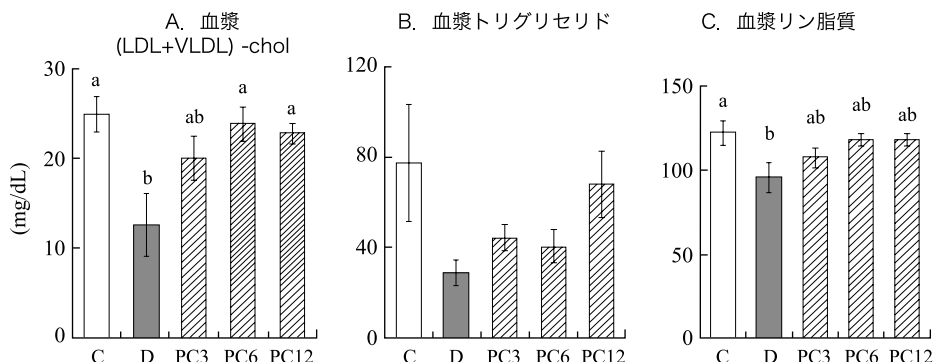


図 11 飼料中ホスファチジルコリン (PC) 添加がビタミン B₆ 欠乏時の血漿 (LDL+VLDL) -chol (A), 血漿トリグリセリド (B) および血漿リン脂質 (C) に及ぼす影響

C: Control 飼料, D: ビタミン B₆ 欠乏飼料, PC3, PC6, PC12: D に PC をそれぞれ飼料中 3, 6 および 12 g /kg 添加した飼料

同じアルファベット記号を持たない群間に有意差がある ($p<0.05$)

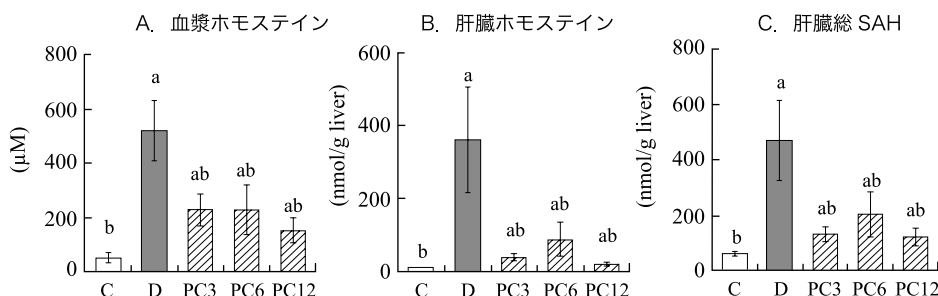


図 12 飼料中ホスファチジルコリン (PC) 添加がビタミン B₆ 欠乏時の血漿ホモシステイン (A), 肝臓ホモシステイン (B) および肝臓 SAH (C) に及ぼす影響

C: Control 飼料, D: ビタミン B₆ 欠乏飼料, PC3, PC6, PC12: D に PC をそれぞれ飼料中 3, 6 および 12 g /kg 添加した飼料

同じアルファベット記号を持たない群間に有意差がある ($p<0.05$)

タミン B₆ 欠乏時には、ミクロソームでの PC 合成が阻害される。その結果として、脂質成分が VLDL として肝臓から移送される機構が障害を受け、肝臓に脂質が溜まると推察した。そこで、ビタミン B₆ 欠乏飼料に PC を添加した場合の効果について検討した。その結果、ビタミン B₆ 欠乏時の肝臓脂質の蓄積は、飼料へのリン脂質添加により有意に改善した¹³⁾。この場合の肝臓脂質と血漿脂質の動態を調べたところ、肝臓脂質が蓄積した場合には、血漿脂質が低下していた。そして、肝臓脂質の蓄積が改善(低下)すると、血漿脂質も正常レベルまで回復(上昇)した(図 10 および図 11)。つまり、肝臓脂質は、肝臓から血中への脂質の搬出が低

下すると蓄積し、血中への搬出が正常化すると蓄積が解除され、肝臓蓄積が解消することを明らかにした。従って、ビタミン B₆ 欠乏により惹起される肝臓脂質の蓄積は、メチオニン代謝異常により肝臓と血漿のホモシステインが蓄積し(図 12-A および図 12-B)、それに伴って生じた SAH 蓄積が(図 12-C)、PE からの PC 合成を低下させ、VLDL として肝臓から血中への脂質移送を滞らせることにより、肝臓脂質の蓄積が生じることを明らかにした¹³⁾。飼料への PC の添加は、ビタミン B₆ 欠乏時の肝臓脂質蓄積を改善する一つの策である。

5. 今後の展望

脂肪肝モデル作成飼料としてコリン・メチオニン欠乏飼料（MCD 飼料）が良く用いられている。コリンはリン脂質生合成の前駆体であり、メチオニンは、PE からの PC 合成に必須のメチル基供与体である SAM の供給源である。従って、この飼料では PC 合成不全となり、脂肪肝の発症は、肝臓からの脂質移送に関わる VLDL 分泌障害が生じることによって考えられている。本実験では、ビタミン B₆ 欠乏飼料条件であるが、コリンやメチオニンは飼料中に含まれており、これらの不足によるものではない。しかし、脂質の蓄積要因が、VLDL 分泌障害であることは MCD 飼料の場合と類似している。肝臓脂質蓄積においては、VLDL の機能が重要と思われる。アメリカにおいては、コリンの食事摂取基準が策定されているが、日本ではまだ策定されていない。本実験からは、コリンの必要量は、ビタミン B₆ 欠乏により増加するのではないかと考えられる。

一般に、高脂質血漿で増加した血漿脂質を低下させる薬剤として、ミクロソームトリグリセリド輸送タンパク質（MTP）阻害剤がある。この薬剤は、肝臓での VLDL アッセムブリを阻害することにより、肝臓から血中への脂質の搬出を阻害することにより血漿脂質を低下させる。ビタミン B₆ 欠乏時の肝臓脂肪蓄積の PC 添加による改善は、MTP 阻害剤により消失した（未発表）。従って、MTP 阻害剤により PC 添加による VLDL アッセムブリの改善が阻害

され、VLDL として肝臓脂質の血中移送が阻害された結果、PC による肝臓脂質蓄積の改善が消失したと考えられた。MTP 阻害剤については、血中脂質蓄積の改善という対処療法的な効果であり、私共の実験と逆に肝臓脂質蓄積を助長する要因になる。MTP 自体が、ビタミン B₆ 欠乏により影響を受けるのか？、PC 添加によりビタミン B₆ 欠乏の影響が軽減される可能性は？、など、作用機構についてはまだ検討の余地がある。

ビタミン B₆ 欠乏は通常の食事では起きることはまずないので、ビタミン B₆ 欠乏時の肝臓脂質蓄積は、通常では起こらない現象かもしれない。しかし、ビタミン B₆ 欠乏時の肝臓脂質蓄積は、脂肪肝の一つのモデルとして脂肪肝の研究に有効ではないかと考えられる。特に、ホモシステイン代謝には、複数のビタミンと複数の関連物質の関与があるので、多様な可能性を残している。PC が有効である理由については、PC 自体の供給が効くのか、PC として取り込まれ、それがコリンに変換されて効くのか、コリンがさらにベタインに変換されて効くのかなど、ビタミン B₆ 欠乏時の肝臓脂質蓄積の解除機構についてはまだ完全に解明されたわけではない。しかし、コリンやベタインを飼料に添加しておくと、ビタミン B₆ 欠乏時の肝臓脂質蓄積が改善することは既に明らかにした¹⁴⁾。引き続き、更なる検討により、ビタミン B₆ 欠乏時の肝臓脂質蓄積の改善機構についてより詳細に検討を進めたいと考えている。

本稿は SUNATEC e - Magazine vol.127 に掲載された原稿に加筆・修正をしたものです。

参考文献

1. 早川享志: 1 ビタミン発見の歴史, ビタミンの科学と最新応用技術, 糸川嘉則監修, 東京, シーエムシー出版, 1-10. 2011.
2. 日本人の食事摂取基準 (2015 年版) http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryou/kenkou/eiyou/syokuji_kijyun.html
3. 早川享志: 日本人におけるビタミン摂取の現状と課題, *Hormone Frontier in Gynecology* **19**: 207-211. 2012.
4. 早川享志, 柘植治人: 3.5 栄養 (摂取基準と栄養評価, 欠乏症・過剰症), ビタミン総合事典, 日本ビタミン学会編集, 東京, 朝倉書店, 229-231. 2015.
5. 早川享志: ビタミンの栄養雑学とビタミン B₆ の関わる代謝研究 *New Diet Therapy*, **30**: 71-76. 2015.
6. Yasuka I, Mishima T, Tsuge H, *et al.*: Increase in S-adenosylhomocysteine content and its effect on the S-adenosylhomocysteine hydrolase activity under transient high plasma homocysteine levels in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **52**: 479-482. 2006.
7. She Q, Hayakawa T, Tsuge H: Alteration in the phosphatidylcholine biosynthesis of rat liver microsomes caused by vitamin B₆ deficiency. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **59**: 163-167. 1995.
8. She Q, Hayakawa T, Tsuge H: A simple HPLC method for the determination of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine in rat tissues: the effect of vitamin B₆ deficiency on these concentrations in rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **205**: 1748-1754. 1994.
9. Yamamoto K, Isa Y, Nakagawa T, *et al.*: Folic acid fortification ameliorates hyperhomocysteinemia caused by a vitamin B₆-deficient diet supplemented with L-methionine. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **76**: 1861-1865. 2012.
10. Yamamoto K, Isa Y, Nakagawa T, *et al.*: Involvement of 5-methyltetrahydrofolate in the amelioration of hyperhomocysteinemia caused by a vitamin B₆-deficiency and L-methionine supplementation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **77**: 378-380. 2013.
11. Noga AA, Zhao Y, Vance DE: An unexpected requirement for phosphatidylethanolamine N-methyltransferase in the secretion of very low density lipoproteins. *J. Biol. Chem.*, **277**: 42358-42365. 2002.
12. Hoffman DR, Haming JA, Cornatzer WE: Microsomal phosphatidylethanolamine methyltransferase: inhibition by S-adenosylhomocysteine. *Lipids*, **16**: 561-567. 1981.
13. Kitagawa E, Yamamoto T, Yamamoto K, *et al.*: Accumulation of lipid in rat liver was induced by vitamin B₆ deficiency and was ameliorated by supplemental phosphatidylcholine in the diet. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **79**: 1320-1326. 2015.
14. Kitagawa E, Yamamoto T, Fujishita M, *et al.*: Choline and betaine ameliorate liver lipid accumulation induced by vitamin B₆ deficiency in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **81**: 316-322. 2017.

* Correspondence to: Takashi Hayakawa

Department of Applied Biological Science, Faculty of Applied Lifescience, Gifu University
1-1 Yanagi-do, Gifu, 501-1193, Japan

TEL: +81-58-293-2929 FAX: +81-58-293-2840 E-mail: hayakawa@gifu-u.ac.jp

連絡先: 〒 501-1193 岐阜県岐阜市柳戸 1-1

岐阜大学応用生物科学部 応用生命科学課程 食品栄養学研究室

TEL: 058-293-2929 FAX: 058-293-2840 E-mail: hayakawa@gifu-u.ac.jp

地域の食資源から抗酸化作用と生理機能の探索

6. カワラケツメイの肝機能と脂質に対する生理作用

岩井 邦久 (Iwai Kunihisa)*

* 弘前大学・農学生命科学部・食料資源学科

Key Words：カワラケツメイ 肝機能 アルコール 脂質 リパーゼ ポリフェノール

はじめに

カワラケツメイ (*Cassia mimosoides*, 図1) はマメ科カワラケツメイ属の1年草で、日本では本州から九州に、国外では朝鮮半島や中国東北部に分布しており、主に河川周辺域に群生する。全長40～50 cm程度でシダ様の葉をつけ、夏に黄色い花が咲き、秋に鞘状の果実ができる。秋に刈り取られたカワラケツメイは陰干しされ、軽く煎じて煮出しお茶のように飲用される。青森県野辺地町では、カワラケツメイが肝臓や胃腸に効くと言われ、茶粥にして食されてきた。また、民間伝承的にも利尿、強壮、緩化作用があるといわれている¹⁾。

多くの生活習慣病には肥満の関与が指摘されており、脂質の吸収抑制や、体脂肪の減少に

役立つ食品成分が注目されている。食品に含まれる脂質の多くはトリアシルグリセロール (TG) であり、これはリパーゼによって消化管内で脂肪酸とグリセロールに分解されてから吸収され、その後に小腸細胞内でTGに再合成されて生体内に移行する。したがって、リパーゼの阻害はTGの分解を抑制することで脂質の吸収を減少させ、体内の脂肪蓄積抑制につながる事が期待できる。カワラケツメイにはリパーゼ阻害活性が見出されており²⁾、その豆果に含まれる有効成分が肥満患者の体重や血清TGを低下したことが報告されている³⁾。また、カワラケツメイの愛用者からは飲酒後の摂取で体調が良いという体験談もある。ここでは、機能性が期待されるカワラケツメイの生理作用と



図1 カワラケツメイの畑(左)、生草本(中)および乾燥物(右)

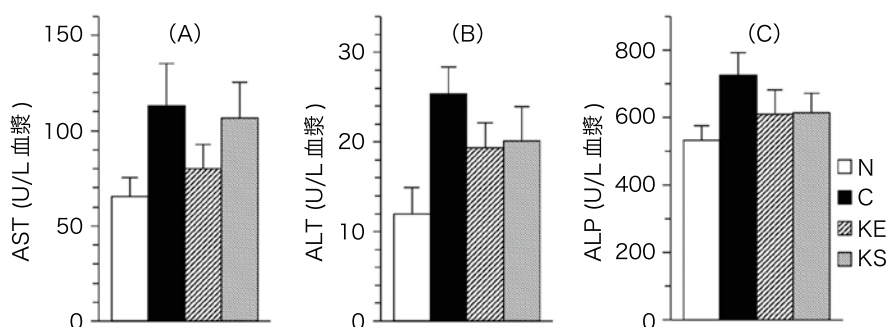


図2 流動食でEtOHとカワラケツメイを6週間摂取したラットの肝機能(AST (A)、ALT (B) およびALP (C) の各活性)

N: 正常群 (無 EtOH), C: EtOH 対照群, KE: EtOH+ カワラケツメイ抽出物群, KS: EtOH+ カワラケツメイ種子群. 採血は絶食下で行った. データは各群6匹の平均値±標準偏差を示した.

それに関わる部位を紹介する。

1. アルコール性肝障害に対する作用

アルコールは適量の摂取であれば精神的なリラックスをもたらす、健康にも良い効果があるとされている。男性の飲酒率は57.4%、女性は28.2%で、アルコールは日常生活に密着した嗜好食品となっているが、その過剰摂取は中毒や各種疾患の引き金となる。現在、生活習慣病のリスクを増加させるような飲酒習慣のある者は男性で14.7%、女性で8.9%存在すると見られている⁴⁾。1日に60g以上のエタノール(EtOH)摂取に相当する飲酒を5年以上継続したことが原因と考えられる病態がアルコール性疾患で、アルコール中毒者の死亡率を増加させるのがアルコール性肝障害である。アルコール性肝障害はアルコール性脂肪肝、アルコール性線維症、アルコール性肝炎、アルコール性肝硬変、アルコール性肝臓に分類され、アルコール性肝臓の重症化にはC型肝炎ウイルスの感染が関わっており、飲酒はC型肝炎悪化の因子の一つであると考えられている^{5,6)}。

そこで、流動食⁷⁾を用いることでラットにEtOHを摂取させ、アルコール性肝障害を惹起し、カワラケツメイの作用を検討した。アルコール摂取により肝臓重量は増加するといわれており、この実験ではEtOHを含まない正常食(N)、EtOH食(C)、EtOH+カワラケツメイ抽出物

食(KE)およびEtOH+カワラケツメイ種子食(KS)を与え、摂取カロリーを同等に調節したため体重に大きな差は見られなかったが、6週間のEtOH摂取による肝肥大の傾向と、カワラケツメイがそれを抑制する傾向が現れた。

また、肝機能の指標であるアスパラギン酸トランスアミナーゼ(AST)、アラニントランスアミナーゼ(ALT)、アルカリホスファターゼ(ALP)の血漿中の各活性は、EtOHの摂取(対照群)によって試験期間とともに上昇する推移を示した。カワラケツメイ摂取ではそれより低い活性で推移したが、種子の摂取は対照群と同レベルでの推移であった。6週間のEtOH摂取後では、AST、ALTおよびALP活性が上昇し肝機能の悪化が示されたが、カワラケツメイはその上昇を抑え、EtOH摂取による肝機能悪化を防ぐことが示された(図2)。しかし、種子ではその効果が弱いことから、カワラケツメイの作用には部位による差があることが推察された。

2. 脂質濃度に対する作用

アルコールは肝臓で代謝され、アルコール脱水素酵素(ADH)とアルデヒド脱水素酵素(ALDH)が作用してEtOHがアセチルCoAに変換される。通常、アセチルCoAはTCA回路に移行しニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NADH)を生成することでエネルギー産生に供されるが、ADHやALDHの作用によ

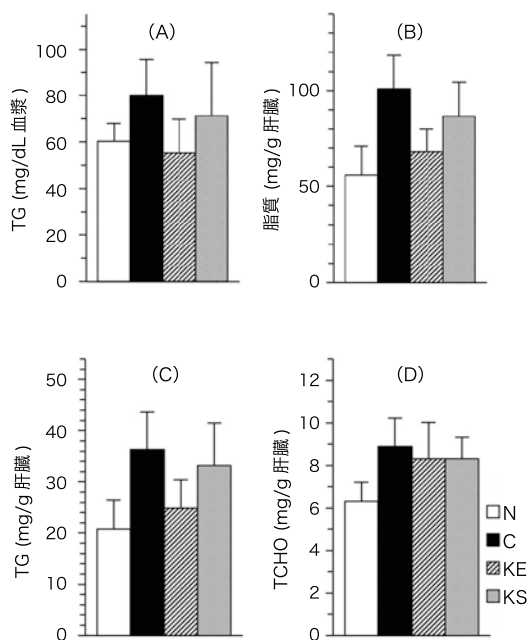


図3 流動食でEtOHとカワラケツメイを6週間摂取したラットの血漿中TG (A)、肝臓中総脂質 (B)、肝臓中TG (C) および肝臓中TCHO (D) の各濃度

N: 正常群 (無 EtOH), C: EtOH 対照群, KE: EtOH+ カワラケツメイ抽出物群, KS: EtOH+ カワラケツメイ種子群。採血, 肝臓採取は絶食下で行った。データは各群6匹の平均値±標準偏差を示した。

り NADH が大量に生成すると肝ミトコンドリアの TCA 回路の活性が低下し, アセチル CoA は脂肪酸の合成に使われる。また, NADH の増加は脂肪酸から TG の生成を促進する。したがって, アルコールの長期摂取は TG を肝臓に蓄積させてアルコール性脂肪肝を引き起こし, 血漿中 TG 濃度も増大する^{8,9)}。血漿中総コレステロール (TCHO) も TG と同様に過剰なアルコール摂取により濃度の増加が見られ, 肝臓でのコレステロール合成状態や脂質代謝異常の指標となる。

そこで, EtOH を摂取させたラットの血漿中脂質濃度に及ぼすカワラケツメイの影響を検討した。EtOH を摂取した対照群の血漿中 TG 濃度は EtOH 摂取期間とともに次第に増加したが, カワラケツメイを共に摂取するとあまり増

加せず, EtOH を摂取しない正常ラットと同レベルで推移した。一方, 種子の摂取では対照群よりは低めだが次第に血漿中 TG 濃度は増加した。6 週間 EtOH を摂取した後の絶食下でも同様に, 血漿中 TG 濃度の増加をカワラケツメイは抑制した。しかし, 種子にはその作用が見られないことから, この作用は種子以外の部位にあることが明らかになった (図 3-A)。

アルコール性肝障害では肝臓中の TG や TCHO 濃度も増加することから, これらラットの肝臓中脂質濃度を測定した。対照群は正常ラットよりも肝臓中脂質, TG および TCHO 濃度が増大し, EtOH の摂取により肝臓に脂質が蓄積したことが確認された。それに対し, カワラケツメイの摂取では肝臓中脂質および TG 濃度が対照群より低下する一方, TCHO 濃度は低下しなかった。また, 種子の摂取はいずれも対照群に近い濃度を示した (図 3-B ~ D)。この結果から, EtOH 摂取に起因する肝臓の脂質増加に対して, カワラケツメイは TG の蓄積を抑制することが示唆された。カワラケツメイにはリパーゼ阻害活性が見出されており²⁾, 食餌由来の脂質の加水分解を抑制することで脂肪酸の吸収を減らし, それによって体内の脂肪や TG の増加・蓄積を軽減することが期待できる。しかし, EtOH 摂取で生じる TG の増加・蓄積は EtOH の代謝に起因するものであるため, カワラケツメイによる抑制はリパーゼ阻害とは別の生理活性によるものと推察される。

3. 作用に関わるカワラケツメイの部位

カワラケツメイは, 慢性的な EtOH 摂取に起因する肝機能の悪化や TG 増大を抑制し得ることが明らかになった。しかし, その効果は種子では顕著に見られなかったことから, 部位による作用の違いが推測される。そこで, カワラケツメイを葉, 茎, 鞘および種子に分別し *in vitro* で活性を検討した (図 4)。

これらの抽出物の総ポリフェノール濃度は, 高い順に鞘 > 葉 > 茎 > 種子となり, 鞘は葉の 2 倍, 種子より 10 倍多くポリフェノールを含ん



図4 分別したカワラケツメイの各部位
(A) 全体; (B) 葉; (C) 茎; (D) 鞘; (E) 種子. いずれも乾燥物.

でいる。DPPH ラジカル消去活性も総ポリフェノール濃度と同様に鞘>葉>茎>種子の順になり、鞘は葉の3倍以上、種子の17倍以上の活性を示した。溶媒を変えて抽出したところ、鞘の活性は70% EtOH 抽出物>酢酸エチル抽出物>水抽出物となったことから、ラジカル消去活性にはフラボノイド系のポリフェノールが関与していることが推察された。抗酸化作用は多くのポリフェノールに認められるが、カワラケツメイもポリフェノールの多い部位が抗酸化作用も強いことが示された。また、鞘は乾燥重量で34%を占めることから(葉21.0%, 茎38.5%, 鞘33.9%, 種子6.6%), 鞘がカワラケツメイの抗酸化作用に最も寄与していることが明らかとなった。

カワラケツメイのポリフェノールに関しては、タンニンが多い画分にリパーゼ阻害活性が見出されており¹⁰⁾、果実からはフラバンとカテキンの重合体が同定されている¹¹⁾。また、カワラケツメイ全粉末から縮合型タンニンの二量体と三量体がリパーゼ阻害成分として同定されているほか¹²⁾、これらタンニン類以外にもリパーゼ阻害作用が認められているフラボノイ

ド類がある¹³⁾。リパーゼは血漿や肝臓のTG濃度に影響することから、カワラケツメイ各部位のリパーゼ阻害活性を測定したところ、ラジカル消去活性と同様に鞘が最も強く、次いで葉、茎、種子の順となった(表1)。すなわち、種子はリパーゼ阻害活性がなくポリフェノールも少ないことから、EtOH 摂取に起因する肝機能悪化やTG増加に対する作用が見られなかったと考えられ、カワラケツメイ果実から同定されたりパーゼ阻害成分¹¹⁾は、種子ではなく鞘に存在すると思われる。また、リパーゼ阻害活性は水抽出物より70% EtOH 抽出物が強いことから、阻害に関与するのはポリフェノール類である可能性が高く、それらは鞘や葉に存在することが明らかになった。

そこで、鞘から複数のリパーゼ阻害成分を分離し、全ての同定には至っていないが、その中にルテオリンとその配糖体を見出した。ルテオリンはケンフェロールに次ぐ強いリパーゼ阻害活性を有するフラボノイドであることから¹³⁾、カワラケツメイ鞘の活性成分の一つはルテオリンであることが示唆された。ルテオリンを多く含む野菜はセロリ0.02～0.2 mg/g、ブロッコ

表1 カワラケツメイ部位のリパーゼ阻害活性

	リパーゼ阻害活性 IC ₅₀ (μg/mL)			
	葉	茎	鞘	種子
水抽出物	951.3	6.0 × 10 ³	926.5	9.6 × 10 ¹⁰
70% EtOH 抽出物	81.4	356.5	63.5	1.6 × 10 ³

リー 0.001 ~ 0.075 mg/g, パセリ 0.001 ~ 0.01 mg/g であるが, 乾燥鞘のルテオリンの含量は 2.73 mg/g, 生のカワラケツメイ全体では 0.32 mg/g であることから, カワラケツメイはルテオリンが多い食品である。また, ルテオリンは腸上皮細胞のコレステロール吸収トランスポーターを阻害することでコレステロール吸収を抑制し, 血中コレステロール濃度を低下することが報告されている¹⁴⁾。このことから, カワラケツメイにはコレステロール低下作用の可能性も考えられる。

4. 鞘の脂質抑制作用

カワラケツメイ鞘にリパーゼ阻害活性が示されたので, その作用を *in vivo* で検討した。鞘および鞘から分画したリパーゼ阻害画分 S60 (鞘抽出物を Sep-Pak C₁₈ から 60% メタノールで溶出) をラットに EtOH 流動食で 4 週間摂取させた。EtOH 摂取による肝臓の肥大傾向 (体重に対する重量比) は, 鞘の摂取では見られなかった。また, カワラケツメイ鞘および S60 画分の摂取により腎周囲および副睪丸周囲脂肪の体重に対する重量比が低値傾向を示したことから, カワラケツメイ鞘が EtOH 摂取による脂肪蓄積を抑制し得ることが推察された。

肝機能の指標である AST, ALT および ALP 活性は, 対照群が EtOH 摂取期間とともに次第に増加する傾向を示したが, 鞘および S60 の摂取では AST は増加しなかった。4 週間後も同様に, EtOH 摂取で AST, ALT および ALP 活性は高まり, 鞘および S60 の摂取では AST 活性が増大せず, ALT 活性は増加したものの対照群より低値を示した (図 5)。したがって, EtOH 摂取による肝機能の悪化をカワラケツメイの鞘および S60 画分は抑制し得ることが示された。

この時, EtOH 摂取により血漿中 TG 濃度は増加する推移を示したのに対し, 鞘摂取群の血漿中 TG 濃度は正常群よりも高値になったが対照群より低濃度で推移した。この傾向は 4 週間後の絶食下でも見られ, EtOH 摂取による血漿中 TG 濃度の増大を鞘および S60 は抑制した

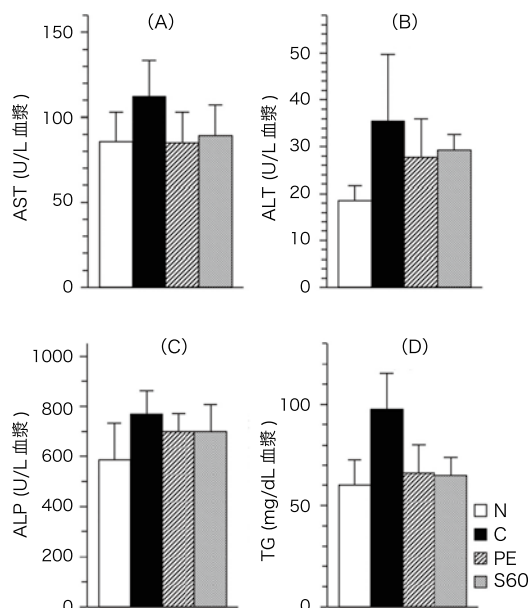


図 5 流動食で EtOH とカワラケツメイを 4 週間摂取したラットの AST (A), ALT (B), ALP (C) の各活性および血漿中 TG 濃度 (D)

N: 正常群 (無 EtOH), C: EtOH 対照群, PE: EtOH+ 鞘抽出物群, S60: EtOH+ S60 画分群。採血は絶食下で行った。データは 6 匹の平均値±標準偏差を示す。

(図 5-D)。鞘の摂取量はカワラケツメイ中含量と同等に設定しているため, この結果は, カワラケツメイのアルコール性肝機能障害および脂質蓄積の抑制作用が鞘によってもたらされていることを示している。

さらに, カワラケツメイ鞘および S60 画分を肥満型の糖尿病モデルである KK-A^y マウスに固形食で 4 週間与え, これらが食餌由来の脂質の吸収と蓄積に影響するか否かを検討した。摂取カロリーを同等に調節したため体重に差は認められなかったが, 体重あたりの脂肪組織重量比は鞘および S60 摂取で低値傾向を示した。

対照群の血漿中 TG 濃度は次第に増加し, 2 週間後から高濃度で推移したのに対し, 鞘および S60 画分の摂取で血漿中 TG 濃度は増加したが, 対照群より低い濃度で推移した。4 週間摂取後の絶食下でも, 鞘と S60 画分の摂取は低めの血漿中 TG 濃度を示し, 肝臓中脂質濃度も

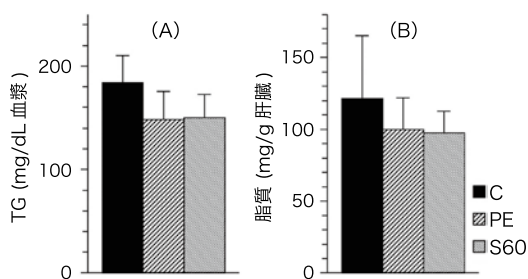


図6 カワラケツメイを固形食で4週間摂取したKK-A^yマウスの血漿中TG濃度(A)および肝臓中脂質濃度(B)

C: 対照群, PE: 鞘抽出物群, S60: S60画分群. 餌は固形食. 採血と肝臓採取は絶食下で行った. データは6匹の平均値±標準偏差を示す.

同様に低値傾向を示した(図6)。食餌中の脂質は、腸リパーゼによって消化管内で加水分解され、生成した脂肪酸とモノアシルグリセロールが小腸上皮細胞から吸収された後、小腸細胞内でTGに再合成され、血液に移行する。したがって、カワラケツメイ鞘に含まれるリパーゼ阻害成分が食餌由来脂質の分解吸収を抑えたことで、血漿中TGおよび肝臓中脂質濃度が低下したと推察される。

5. カワラケツメイの焙煎処理

カワラケツメイは乾燥焙煎して茶のように利用することが多い。そこで、焙煎による活性の変化を検討した(図7)。どの部位でも総ポリフェノール濃度に焙煎時間による変化は見られなかった。全体と葉のDPPHラジカル消去活性は焙煎で少し強まり、鞘は焙煎時間とともに活性が強まった。鞘のリパーゼ阻害活性は焙煎時間とともに強まり、全体と葉では時間依存性は明確ではないが阻害活性は強まった。焙煎によるポリフェノール濃度はほとんど変わらないことから、活性成分が熱に強いことや加熱による非活性成分の減少または抽出低下が推察される。

この結果から、カワラケツメイを焙煎して使用することはリパーゼ阻害作用等の観点から理にかなっているといえる。その一方で、「お茶の代替」あるいは「煮出したもの」が使用され

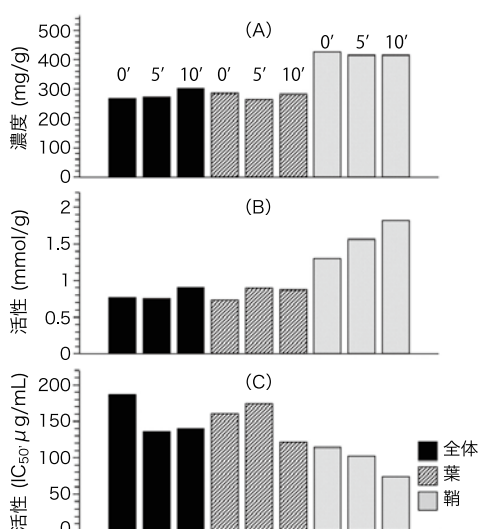


図7 焙煎時間によるカワラケツメイ全体、葉および鞘抽出物の総ポリフェノール濃度(A)、DPPHラジカル消去活性(B)およびリパーゼ阻害活性(C)

0'~10'は焙煎時間(分)を示す。データは3回測定の実験値を示す。

ているが、水抽出物よりも70% EtOH抽出物がポリフェノールは多く活性も強い。したがって、アルコール抽出物の利用が活性の点では優れているといえる。

おわりに

慢性的なアルコール摂取は肝臓にTGを蓄積させアルコール性脂肪肝の原因となるが、カワラケツメイは長期EtOH摂取による肝機能悪化と脂質の蓄積を抑制し得ること、これらの作用には主にカワラケツメイの鞘が寄与していることが明らかになった。肝機能に関与する成分は明らかにできておらず今後の課題となっているなど、全てが解明されたわけではないが、カワラケツメイの有益な生理作用と活性成分の一端を明らかにし、生活習慣病の遠因となる脂質代謝の改善に役立つ可能性を秘めていることを示すことができた。また、焙煎により活性が強まることから、茶粥などの加工食品や薬膳的な利用など、より効果的なカワラケツメイの利用が期待できる。

参考文献

1. 鈴木洋:山扁豆. 漢方のくすりの事典 第2版 一生ぐすり・ハーブ・民間薬-. 東京, 医歯薬出版, p.186, 2011.
2. Shimura S, Tsuzuki W, Kobayashi S, *et al.*: Screening of lipase inhibitors from natural materials. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **40** (3): 214-217, 1993.
3. 住野清一, 村上透, 山本学, 他: 高脂血症を伴う肥満患者に対する Lipase inhibitor (CT-II) の投与効果. 肥満研究, **4**, 217-222, 1998.
4. 厚生労働省:平成28年 国民生活基礎調査, p.23-24, 2017.
5. 日本アルコール医学生物学研究会 (JASBRA): アルコール性肝障害診断基準 2011年版. 国立国際医療研究センター肝炎情報センター URL: <http://www.kanen.ncgm.go.jp/cont/010/sankou.html>.
6. 肝疾患と免疫. 各務伸一編. 大阪, 医薬ジャーナル社, 2005.
7. Lieber CS, DeCarli LM: Quantitative relationship between amount of dietary fat and severity of alcoholic fatty liver. *Am. J. Clin. Nutr.*, **23** (4), 474-478, 1970.
8. Purohit V, Brenner DA: Mechanisms of alcohol-induced hepatic fibrosis: A summary of the Ron Thurman Symposium. *Hepatology*, **43** (4): 827-878, 2006.
9. Purohit V, Gao B, Song BJ: Molecular mechanisms of alcoholic fatty liver. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, **33** (2): 191-205, 2009.
10. 志村進, 都築和香子, 伊東禧男, 他: カワラケツメイのタンニン含有画分のリパーゼ阻害効果. 日本食品工業学会誌, **41** (8), 561-564, 1994.
11. Hatano T, Yamashita A, Hashimoto T, *et al.*: Flavan dimers with lipase inhibitory activity from *Cassia nomame*. *Phytochemistry*, **46** (5), 893-900, 1997.
12. 小島芳弘, 村中隆: カワラケツメイに含まれる新規タンニンおよびそのリパーゼ阻害活性. 日本食品科学工学会誌, **59** (6): 279-283, 2012.
13. Shimura S, Itoh Y, Yamashita A, *et al.*: Inhibitory effects of flavonoids on lipase. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **41** (11): 847-850, 1994.
14. Nekohashi M, Ogawa M, Ogihara T, *et al.*: Luteolin and quercetin affect the cholesterol absorption mediated by epithelial cholesterol transporter niemann-pick c1-like 1 in caco-2 cells and rats. *PLoS One*, **9** (5): e97901, 2014.

過去 20 年間の食中毒事例から見た 原因食品と病原微生物の関連性

高橋 正弘 (TAKAHASHI Masahiro)*

* 公益財団法人日本食品油脂検査協会

Key Words：食中毒 コレスポンデンス分析 原因食品 病原微生物 発生件数 HACCP

はじめに

2017 年 2 月 24 日、東京都保健福祉局は立川市内の複数の小学校で児童や教職員 1,098 人がおう吐、下痢、発熱等の症状を呈した食中毒が発生した旨の報道発表を行った。同月 28 日、給食に使用した刻みのりからノロウイルスを検出し、病因物質と原因食品が特定できた旨の発表を行った。

刻みのりは加熱・乾燥して袋詰めした焼きのりを加工したもので、病原微生物の汚染リスクが少ない食品と考えられていた。当時、刻みのりがノロウイルス食中毒の原因食品と誰が予想したであろうか。

事件の原因は、加工時に従事者の手指からノロウイルスが刻みのりを汚染したことであった。小規模の委託加工業の衛生管理や増殖適性のないと思われる食品に対する汚染防止の重要性が示唆された。

さて、一次汚染を受けた食材は、調理加工過程や加熱殺菌過程を経て食品 (food) や食べ物 (diet) (これらを以下「食品」という) となる。この間、食品は一次汚染の残存菌が増殖したり二次汚染を受ける。病原微生物の中には、特定の食品だけに優位に増殖する、すなわち、増殖適性をもつものもある。

いずれにしても、一次・二次汚染、調理加工

後の長期の保存などで食品中の病原体 (病原微生物) が発症するのに必要な病原体数を超え、食中毒が発生するものと考えられる。しかし、刻みのりの事例のように発症するのに必要な病原体数が比較的少ない場合には、食品に存在 (付着) しただけでも食中毒が発生する可能性もある。現状では、このような事例は顕在化し対応が重要視されている¹⁾。

食品を媒介とする健康被害は厚生労働省が食中毒統計や食中毒原因食品別発生状況²⁾として公表している。

食中毒原因食品 (以下「原因食品」という) の種別は、「肉類およびその加工品」など食材とその加工品が同一のカテゴリーになっている²⁾。これらの種別では食材の生の状態と調理加工した状態での衛生上の差異を評価することはできない。

食品は微生物汚染度合によって①生菌数が多いもの、②病原微生物が存在しないもの、③無菌に近いものに分けられ、いずれの食品もどれかに分別できると述べている³⁾。また、原因食品は数量化理論第Ⅲ類による解析結果から、非加熱食品と加熱済み食品に弁別できると述べている⁴⁾。

これらのことから、食中毒の原因食品は微生物汚染度合や微生物制御方法の違いなどによってカテゴリー化し、その妥当性などが検証され

ている⁵⁾。

食中毒統計は 1948 年から旧厚生省、現厚生労働省が公表している。そこで指定した病因物質（病原体）は、当初、ウイルス、寄生虫および消化器系（経口）感染症起因菌は除外されていた。その後、厚生労働省はウイルスを 1997 年、寄生虫および経口感染症起因菌（赤痢菌・コレラ・パラチフス A 菌など）を 1999 年に食中毒の病原体として指定し、現在に至っている。なお、1982 年カンピロバクター・ジェジュニ/コリ（以下「カンピロバクター」という）を食中毒の病原体として指定したが、本菌やノロウイルスによる食中毒は近年増加傾向を示している^{2, 6, 7)}。

過去の食中毒事例、すなわち、これらの疫学的データから原因食品と病原微生物の関連性を検証することは、今後の食中毒予防対策ならびに HACCP における危害分析への対応の一助となることが期待できる。そこで、わが国の食中毒事例から原因食品と病原体（病原微生物）の組み合わせ別の発生件数を求め、解析し、原因食品と病原微生物の関連性が明らかになったので報告する。

方法

1. 資料

食中毒の原因食品、病因物質（病原微生物）および食中毒発生件数（1 年当たりの）（以下「発生件数」という）は、著者が「全国食中毒事件録」第三篇をもとにアプリケーションソフト FileMaker Pro で作成したデータベースに収録した事例を抽出して用いた。

原因食品は著者らが提唱した食材ごとに生食品、調理加工食品および加熱殺菌食品に分けた

種別⁵⁾によった。

病原微生物は厚生労働省が定めた食中毒事件票（12）病因物質の種別によった。

対象期間は、1988 年～2007 年の 20 年間としたが、腸管出血性大腸菌 1997 年、ノロウイルス・その他のウイルス 1998 年、赤痢菌・コレラ菌・パラチフス A 菌 1999 年から 2007 年までとした。

供試データは、1 事件当たりの食中毒患者数が 3,000 人以上を異常値とみなしてこれらを除いた食中毒事例とした。

2. 解析

コレスポンデンス分析は、原因食品と病原微生物の組み合わせ別に集計したクロス集計表（度数）から行った。因子を抽出し、原因食品・病原微生物の要素（項目）のスコアを求め、第 1 軸と第 2 軸のスコアをもとに種別した原因食品および病原微生物を二次元平面上に布置し、これらの関連性を図示した。

計算および作図は、エクセル統計 2010 for Windows の分析ツールを使用した。

表 1 原因食品の種別

魚類（生食品）
貝類（生食品）
魚卵類（生食品）
魚貝類盛合せ（生食品）
カキ（生食品）
カキ（調理加工品）
魚類（調理加工品）
貝類（調理加工品）
魚介練り製品（加熱殺菌食品）
食肉類（生食品）
食肉類（調理加工品）
食肉製品（加熱殺菌食品）
鶏肉（生食品）
鶏肉（調理加工品）
卵（生食品）
卵（調理加工品）
野菜・芋類（生食品）
野菜・芋類（調理加工品）
豆類
めん・米飯・穀物類
乳・乳加工品（加熱殺菌食品）
洋菓子
和菓子
使用水
複合調理食品
和え物・サラダ
おにぎり
すし類
弁当
その他の食品

表 2 病原微生物（原因物質）の種別

腸炎ビブリオ
ナグ・ビブリオ
ぶどう球菌
セレウス菌
ウェルシュ菌
サルモネラ属菌
腸管出血大腸菌
その他の病原大腸菌
カンピロバクター
エルシニア・エンテロコリチカ
ボツリヌス菌
ノロウイルス
その他のウイルス
赤痢菌
コレラ
その他の細菌

結果・考察

1. 原因食品と病原微生物の組み合わせ

前ページ表 1 は原因食品の項目で 30 種類に種別した。表 2 は病原微生物の項目で食中毒事例のあった 16 種類に種別した。表 3 のクロス集計表は、これら原因食品と病原微生物の組み合わせ別に発生件数の平均値（度数）を集計した。

2. 原因食品と病原微生物の関連性

クロス集計表（度数）からコレスポンデンス分析を行い、原因食品と病原微生物の関連性を検討した。

表 4 は固有値表で寄与率は第 1 軸が 27.0%、第 2 軸が 19.0% であった。また、第 5 軸までの累積寄与率は 81.9% であった。累積寄与率から第 5 軸まで求めることが妥当と考えられる。表 5 は行間差・列間差の有意性の検定結果で、第 1 軸から第 5 軸まですべて有意であった。表 6 は行・列（原因食品・病原微生物）の要素（項

表 3 原因食品と病原微生物のク

	腸炎 ビブリオ	ナグ・ ビブリオ	ぶどう 球菌	セレウス菌	ウェルシュ菌	サルモネラ 属菌
魚類（生食品）	19.10	0.10	0.30	0.00	0.05	0.55
貝類（生食品）	6.60	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
魚卵類（生食品）	2.70	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00
魚貝類盛合せ（生食品）	6.25	0.00	0.05	0.00	0.00	0.25
カキ（生食品）	2.30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
カキ（調理加工品）	0.10	0.00	0.00	0.00	0.10	0.05
魚類（調理加工品）	11.75	0.00	2.95	0.00	0.55	2.40
貝類（調理加工品）	4.40	0.00	0.10	0.00	0.20	0.15
魚介練り製品（加熱殺菌食品）	0.10	0.00	0.15	0.00	0.30	0.35
食肉類（生食品）	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.70
食肉類（調理加工品）	0.00	0.00	0.55	0.00	0.75	2.80
食肉製品（加熱殺菌食品）	0.00	0.00	0.20	0.00	0.05	0.10
鶏肉（生食品）	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	1.20
鶏肉（調理加工品）	0.05	0.00	0.70	0.05	1.05	1.70
卵（生食品）	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	10.55
卵（調理加工品）	0.60	0.00	1.10	0.00	0.10	9.10
野菜・芋類（生食品）	1.25	0.00	0.00	0.05	0.05	0.40
野菜・芋類（調理加工品）	0.55	0.00	0.10	0.15	0.60	0.60
豆類	0.05	0.00	0.30	0.05	0.15	0.30
めん・米飯・穀物類	0.65	0.00	4.20	6.40	2.55	8.80
乳・乳加工品（加熱殺菌食品）	0.00	0.00	0.25	0.10	0.00	0.65
洋菓子	0.00	0.00	1.05	0.05	0.05	6.30
和菓子	0.00	0.00	2.80	0.15	0.05	0.55
使用水	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.15
複合調理食品	1.80	0.00	2.25	0.40	4.55	4.65
和え物・サラダ	1.00	0.00	0.50	0.20	0.20	2.45
おにぎり	0.20	0.00	16.25	0.50	0.00	0.45
すし類	19.35	0.05	3.35	0.15	0.05	4.50
弁当	20.95	0.10	14.65	1.15	3.65	16.60
その他の食品	0.15	0.00	0.10	0.00	0.05	0.70
全体	99.90	0.25	52.00	9.40	15.10	79.00

目)の第1軸から第5軸までのスコアを示した。図1は、表6に示した要素(項目)の第1軸と第2軸のスコアをもとに原因食品と病原微生物を二次元平面上に布置した散布図である。

各項目は原因食品を×印で、病原微生物を◆印で示した。原因食品と病原微生物の項目は、近くにあるものは関連性が高く、遠くにあるものは関連性が低い。また、対立する項目は離れて布置する。

第I象限右側では鶏肉(生食品)、カンピロバクター、食肉類(生食品)、腸管出血性大腸菌、

鶏肉(調理加工食品)、食肉類(調理加工食品)が近くに布置し、食肉類系グループを形成した。食肉類・鶏肉(調理加工食品)や食肉類・鶏肉(生食品)は、腸管出血性大腸菌やカンピロバクターによる発現頻度が高かったので同一グループになったものと考えられる。また、生食品と調理加工食品が同一グループだったのは、調理加工食品の食中毒の発生要因が加熱不足によるものが多く、生食品と同じように一次汚染の影響を強く受けているためと考えられる。鶏肉とカンピロバクター、食肉類と腸管出血性大腸菌との

ロス集計表(発生件数の平均値)

腸管出血 大腸菌	その他の 病原大腸菌	カンピロ バクター	エルシニア ・エンテロ コリチカ	ボツリ ヌス菌	ノロ ウイルス	その他の ウイルス	赤痢菌	コレラ	その他の 細菌	全体
0.00	0.25	0.00	0.00	0.00	1.20	0.10	0.00	0.00	0.25	21.90
0.00	0.05	0.00	0.00	0.00	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	6.75
0.18	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.93
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.20	0.00	0.00	0.00	0.00	6.75
0.00	0.40	0.00	0.00	0.00	39.60	0.00	0.22	0.00	0.00	42.52
0.00	0.05	0.00	0.00	0.00	4.80	0.00	0.00	0.00	0.00	5.10
0.09	0.15	0.00	0.00	0.05	0.50	0.00	0.00	0.00	0.00	18.44
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.60	0.00	0.00	0.00	0.00	7.45
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.20	0.00	0.00	0.00	0.00	1.10
2.73	0.05	2.75	0.00	0.00	0.00	0.10	0.00	0.00	0.00	8.33
3.27	0.05	3.70	0.00	0.00	0.70	0.10	0.00	0.00	0.10	12.02
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.35
0.09	0.00	12.50	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00	0.25	14.14
0.00	0.10	3.85	0.00	0.00	0.30	0.00	0.00	0.00	0.00	7.80
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	10.55
0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	11.05
0.18	0.10	0.00	0.00	0.00	0.20	0.00	0.00	0.00	0.00	2.23
0.00	0.20	0.05	0.00	0.10	0.40	0.00	0.00	0.00	0.00	2.75
0.00	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.90
0.09	0.10	0.30	0.00	0.00	1.60	0.00	0.00	0.00	0.05	24.74
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.10	0.00	0.00	0.00	0.00	8.55
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.40	0.10	0.00	0.00	0.00	4.05
0.18	1.60	0.80	0.05	0.05	0.60	0.10	0.00	0.00	0.10	3.63
0.27	0.30	0.25	0.00	0.05	0.70	0.00	0.00	0.00	0.00	15.22
0.18	0.45	0.20	0.05	1.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	6.28
0.00	0.10	0.00	0.00	0.00	0.30	0.00	0.00	0.00	0.00	17.80
0.09	0.25	0.05	0.00	0.50	7.60	0.20	0.22	0.00	0.10	36.46
0.27	3.95	0.60	0.10	0.05	23.50	0.00	0.00	0.11	0.25	85.93
0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	0.20	0.00	0.00	0.00	0.00	1.25
7.64	8.20	25.15	0.20	1.85	86.95	0.70	0.44	0.11	1.10	387.99

表 4 固有値表

軸	特異値	固有値	寄与率	累積寄与率
第 1 軸	0.8178	0.6687	0.2703	0.2703
第 2 軸	0.6859	0.4705	0.1902	0.4605
第 3 軸	0.6418	0.4119	0.1665	0.6271
第 4 軸	0.5389	0.2904	0.1174	0.7445
第 5 軸	0.4301	0.1850	0.0748	0.8193
第 6 軸	0.3851	0.1483	0.0600	0.8792
第 7 軸	0.3540	0.1253	0.0507	0.9299
第 8 軸	0.2931	0.0859	0.0347	0.9646
第 9 軸	0.2742	0.0752	0.0304	0.9950
第 10 軸	0.0812	0.0066	0.0027	0.9977
第 11 軸	0.0548	0.0030	0.0012	0.9989
第 12 軸	0.0398	0.0016	0.0006	0.9995
第 13 軸	0.0277	0.0008	0.0003	0.9998
第 14 軸	0.0162	0.0003	0.0001	1.0000
第 15 軸	0.0110	0.0001	0.0000	1.0000

表 5 行間差・列間差の有意性の検定

軸	カイニ乗値	自由度	P 値
第 1 軸	402.7159	43	0.0000
第 2 軸	231.7378	41	0.0000
第 3 軸	193.4878	39	0.0000
第 4 軸	125.0645	37	0.0000
第 5 軸	74.5595	35	0.0001
第 6 軸	58.5234	33	0.0040
第 7 軸	48.7981	31	0.0220
第 8 軸	32.7466	29	0.2881
第 9 軸	28.4959	27	0.3858
第 10 軸	2.4129	25	1.0000
第 11 軸	1.0956	23	1.0000
第 12 軸	0.5774	21	1.0000
第 13 軸	0.2806	19	1.0000
第 14 軸	0.0959	17	1.0000
第 15 軸	0.0439	15	1.0000

関連性が視覚的に明らかになった。

第Ⅱ象限左側と第Ⅲ象限上方ではカキ（生食品）、カキ（調理加工食品）、赤痢菌、ノロウイルス、貝類（生食品）、貝類（調理加工食品）、魚類（生食品）、魚貝類盛合せ（生食品）、魚卵類（生食品）、ナグビブリオ、腸炎ビブリオ、すし類、弁当、コレラ、魚類（調理加工食品）、野菜・芋類（生食品）が近くに布置し、魚貝類系グループを形成した。

野菜・芋類（生食品）、弁当および魚類（調理加工食品）がこのグループになったのは、腸炎ビブリオの発現頻度の高さが影響したものと考えられる。

カキや貝類とノロウイルスや赤痢菌の関連性、また、魚類、魚貝類盛合せおよび魚卵類と腸炎ビブリオ・ナグビブリオ・コレラなどの関連性が視覚的に明らかになった。

食肉類系と魚貝類系の 2 つのグループは、離れて布置しているので、第 1 軸上の対立する概念グループと言えた。

第Ⅲ・第Ⅳ象限下側からセレウス菌、おにぎり、乳・乳加工品（加熱殺菌食品）、食肉製品（加熱殺菌食品）、めん・米飯・穀物類、卵（生食品）、卵（調理加工食品）、豆類、ぶどう球菌、和菓子、洋菓子、サルモネラ属菌、複合調理食

品、ウエルシュ菌、和え物・サラダ、魚肉練り製品、ボツリヌス菌、その他の食品、野菜・芋類（調理加工食品）が近くに布置し、調理加工・加熱殺菌食品系グループを形成した。

サルモネラ属菌は食肉類を中心としたグループに本来布置すると考えられるが、卵など調理加工・加熱殺菌食品系のグループに布置した。これは、1980 年後半から急増した卵の *S. Enteritidis* による事例が影響したものと考えられる。

洋菓子、卵、複合調理食品、魚肉練り製品、和え物・サラダとウエルシュ菌、サルモネラ属菌の関連性、また、和菓子、おにぎり、めん・米飯・穀物類とぶどう球菌、セレウス菌の関連性が視覚的に明らかになった。調理加工・加熱殺菌食品系グループと食肉類系や魚貝類系のグループは離れて布置しているので、第 2 軸上の対立する概念グループと言えた。

原点周辺の第Ⅰ象限と第Ⅱ象限にはその他の病原大腸菌、エルシニア・エンテロコリチカ、その他のウイルス、その他の細菌、使用水が近くに布置し、使用水系グループを形成した。使用水とその他の細菌やその他の病原大腸菌などの関連性が視覚的に明らかになった。

以上のとおり、原因食品と病原微生物は視覚

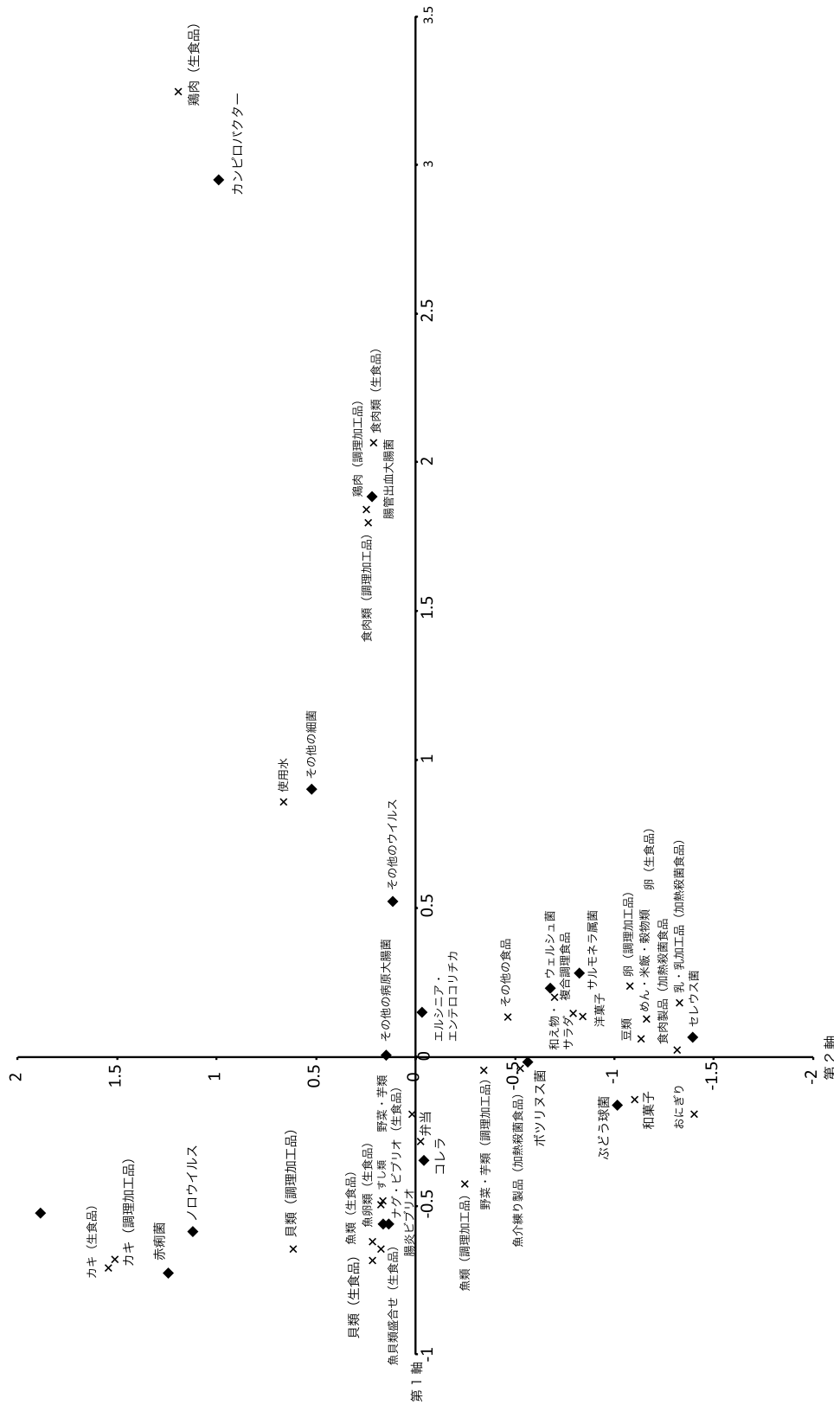


図1 原因食品と病原微生物の散布図

表 6 原因食品と病原微生物（行・列）の要素（項目）のスコア

行・列の要素	第 1 軸	第 2 軸	第 3 軸	第 4 軸	第 5 軸
魚類（生食品）	-0.621	0.220	1.609	-0.019	0.096
貝類（生食品）	-0.684	0.216	1.865	-0.019	0.120
魚卵類（生食品）	-0.495	0.174	1.783	-0.069	-0.485
魚貝類盛合せ（生食品）	-0.648	0.175	1.723	-0.065	0.121
カキ（生食品）	-0.709	1.543	-1.145	-0.038	-0.017
カキ（調理加工品）	-0.679	1.512	-1.237	-0.066	0.001
魚類（調理加工品）	-0.426	-0.247	1.009	0.167	-0.024
貝類（調理加工品）	-0.645	0.615	0.640	-0.039	0.090
魚介練り製品（加熱殺菌食品）	-0.035	-0.525	-0.462	-0.356	0.273
食肉類（生食品）	2.065	0.210	0.130	-0.724	-2.510
食肉類（調理加工品）	1.798	0.237	0.014	-0.404	-1.997
食肉製品（加熱殺菌食品）	0.024	-1.316	-0.593	0.989	-0.202
鶏肉（生食品）	3.248	1.195	0.491	0.866	1.472
鶏肉（調理加工品）	1.843	0.249	0.000	0.342	0.979
卵（生食品）	0.344	-1.156	-0.509	-1.804	0.281
卵（調理加工品）	0.238	-1.076	-0.393	-1.211	0.180
野菜・芋類（生食品）	-0.192	0.016	0.842	-0.483	-0.588
野菜・芋類（調理加工品）	-0.044	-0.344	-0.114	-0.474	0.422
豆類	0.061	-1.133	-0.454	0.217	0.153
めん・米飯・穀物類	0.128	-1.160	-0.728	-0.293	0.797
乳・乳加工品（加熱殺菌食品）	0.182	-1.325	-0.631	-0.507	0.278
洋菓子	0.139	-0.841	-0.638	-0.999	0.135
和菓子	-0.140	-1.101	-0.690	1.658	-0.465
使用水	0.859	0.665	-0.119	0.109	-0.392
複合調理食品	0.146	-0.792	-0.265	-0.333	0.217
和え物・サラダ	0.201	-0.700	0.105	-0.799	-0.106
おにぎり	-0.191	-1.404	-0.648	2.477	-0.599
すし類	-0.479	0.163	0.630	-0.010	-0.006
弁当	-0.284	-0.028	-0.143	0.087	-0.004
その他の食品	0.135	-0.463	-0.317	-0.774	0.218
腸炎ビブリオ	-0.564	0.133	1.238	-0.010	0.054
ナグ・ビブリオ	-0.560	0.160	1.110	0.047	0.082
ぶどう球菌	-0.163	-1.013	-0.418	1.494	-0.322
セレウス菌	0.066	-1.400	-0.885	-0.148	1.216
ウェルシュ菌	0.226	-0.679	-0.337	-0.299	0.439
サルモネラ属菌	0.281	-0.793	-0.327	-0.972	0.121
腸管出血大腸菌	1.885	0.219	0.182	-0.856	-4.082
その他の病原大腸菌	0.007	0.148	-0.113	0.028	-0.194
カンピロバクター	2.949	0.991	0.377	0.615	0.727
エルシニア・エンテロコリチカ	0.151	-0.033	-0.117	-0.239	-0.295
ボツリヌス菌	-0.012	-0.558	0.369	-0.892	-0.104
ノロウイルス	-0.586	1.120	-0.857	-0.021	-0.009
その他のウイルス	0.525	0.116	0.491	0.159	-1.754
赤痢菌	-0.727	1.244	-0.401	-0.045	-0.027
コレラ	-0.347	-0.040	-0.223	0.162	-0.010
その他の細菌	0.900	0.524	0.716	0.318	0.404

的に大きく 4 つに、すなわち、魚貝類系、食肉類系、調理加工・加熱殺菌食品系および使用水系のグループに類別できたと言える。

また、第 1 軸は食肉類と魚貝類など食品を弁別する軸と解釈した。第 2 軸は主に生食品と調理加工・加熱殺菌食品を弁別する軸と解釈した。このように原因食品と病原微生物の関連性は散布図によって、視覚的に解釈することができた。

食中毒予防対策は、4 つのグループごとに対応する対策を講ずることが示唆された。

供試したデータは HACC の危害分析を実施する際の疫学的データの 1 つとして位置づけられる。これらを用いたコレスポンデンス分析によって食品衛生上の危害の原因となる食品と病原微生物の関連性が明らかになったと言える。

今後の課題としては、過去の食中毒事例から原因食品と病原微生物の姿が明らかになったので、現在あるいは将来の食中毒事例による解析を行い、両者の結果を比較検討することが考えられる。

結論

わが国の食中毒の原因食品と病原微生物は、コレスポンデンス分析によって得られた第 1 軸と第 2 軸のスコアによる散布図から、次の 4 つ

に類別した。

- ①食肉類系（鶏肉（生食品・調理加工食品）、食肉類（生食品・調理加工食品）、カンピロバクター、腸管出血性大腸菌）
- ②魚貝類系（カキ（生食品・調理加工食品）、赤痢菌、ノロウイルス、貝類（生食品・調理加工食品）、魚類（生食品・調理加工食品）、魚貝類盛合せ（生食品）、魚卵類（生食品）、ナグビブリオ、腸炎ビブリオ、すし類、弁当、コレラ、野菜・芋類（生食品）
- ③調理加工・加熱殺菌食品系（セレウス菌、おにぎり、乳・乳加工品（加熱殺菌食品）、食肉製品（加熱殺菌食品）、めん・米飯・穀物類、卵（生食品・調理加工食品）、豆類、ぶどう球菌、和菓子、洋菓子、サルモネラ属菌、複合調理食品、ウエルシュ菌、和え物・サラダ、魚肉練り製品、ボツリヌス菌、その他の食品、野菜・芋類（調理加工食品）
- ④使用水系（その他の病原大腸菌、エルシニア・エンテロコリチカ、その他のウイルス、その他の細菌、使用水）。

第 1 軸は食肉類と魚貝類などの食品を弁別する軸と解釈した。

第 2 軸は主に生食品と調理加工・加熱殺菌食品を弁別する軸と解釈した。

参考・引用文献

1. 玉木武：食中毒予防必携第 2 版。東京、社団法人日本食品衛生協会、4-8, 2007.
2. 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課編：平成 27 年食中毒発生状況。東京、食品衛生研究、66(9): 統計資料、2016.
3. 獣医公衆衛生学教育研修協議会編：獣医公衆衛生学。東京、株式会社文永堂、278-279, 1977.
4. 高橋正弘ほか：細菌性食中毒の発生要因の相互関連。防菌防黴誌、24(9): 581-586, 1996.
5. 高橋正弘ほか：食品カテゴリーのリスクランキング設定への疫学的アプローチ。神奈川県立保健福祉大学誌、7(1): 37-47, 2010.
6. 野田衛ほか：ノロウイルス食中毒の発生動向および調査・検査体制の取組み。食品衛生研究、62(1): 9-19, 2012.
7. 高橋正弘ほか：食中毒の病原微生物別のリスクランキング設定に関する研究、厚生労働科学研究費補助金「食品衛生監視員による食品衛生監視手法の高度化に関する研究」（主任研究者：豊福肇）平成 22 年総括・分担研究報告書、367-391, 2011.

グルテン不耐性, セリアック病, および小麦アレルギー

瀬口 正晴 (SEGUCHI Masaharu)^{1,2} 木村 万里子 (KIMURA Mariko)¹

¹ 神戸女子大学, ² 日本穀物科学研究会会長

Key Words : グルテンフリー ベーカリー 小麦 セリアック病

要約

本論文「グルテン不耐性, セリアック病, および小麦アレルギー」は, 米国の穀物科学者, Jeff Casper と Bill Atwell によって書かれた本 (“Gluten-Free Baked Products” 2014 by AACC International, Inc. 3340 Pilot Knob Road St. Paul, Minnesota 55121, U.S.A.) の一部 (“The Gluten-Free Ingredients”) を翻訳し紹介するものである。

小麦粉を信用し, あるいは理解して, その害を受けることなくふつうに食べている人にとって, セリアック病, グルテン不耐性, あるいは小麦アレルギーをもっているヒトの生活を理解することは難しい。食品店に行ってちょっとでもその棚を覗いてみると, 何と多くの小麦, その他大麦, ライ麦といった穀類と我々の生活が大きく関わっているのかとよくわかる。小麦と人の歴史は実に不可分であるが, 小麦, ライ麦, 大麦, とこれら一般的穀類成分を含む食品を食べられない人にとっては愛想のない食品の供給体制ということになるであろう。しかしながら, 第1のマーケットは, グルテンを食べられるけれども他の理由でグルテンフリーの食品を求める人の急増のためだが, セリアック病患者あるいはグルテン不耐性の人にとって最近のグルテンフリー食品への関心は, グルテンフリー食品の選択肢と品種増加してきたことである。

セリアック病患者に対するマーケット上の食品の要求性と, グルテン不耐性患者のマーケット上の食品要求性には特別のちがいはない。だけれども, 食品加工業者はセリアック病, グル

テン不耐性, 及び小麦アレルギーの違いをよく理解しておくことが重要である。その理由は各最終利用者の要求性にそれぞれ内容上の違いがあるからである。グルテンフリー食品の利用者は, 多分セリアック病患者の基準にあった食品を購入するであろう。というのは食品加工業者は一般には基準のあいまいなグルテンフリー加工食品などはつukらないからである。この章では各病気の全体像を示す。さらにこれらの病気の理解のために, とくに重要なことは, “グルテン” という言葉の意味で, それが医学的には一般にどのように理解されているか, 同時に食品分野ではどのように理解されているか, とその違いは何かという点も理解しておく必要がある。

グルテン

一般の小麦粉には, 14% 水分含量ベースで約7-15% のタンパク質が含まれている¹⁾。小麦中の殆どのタンパク質は“貯蔵タンパク質”で, 発芽と種子の生長に用いられる。“グルテン”と考えられるタンパク質は小麦種子の全組織タ

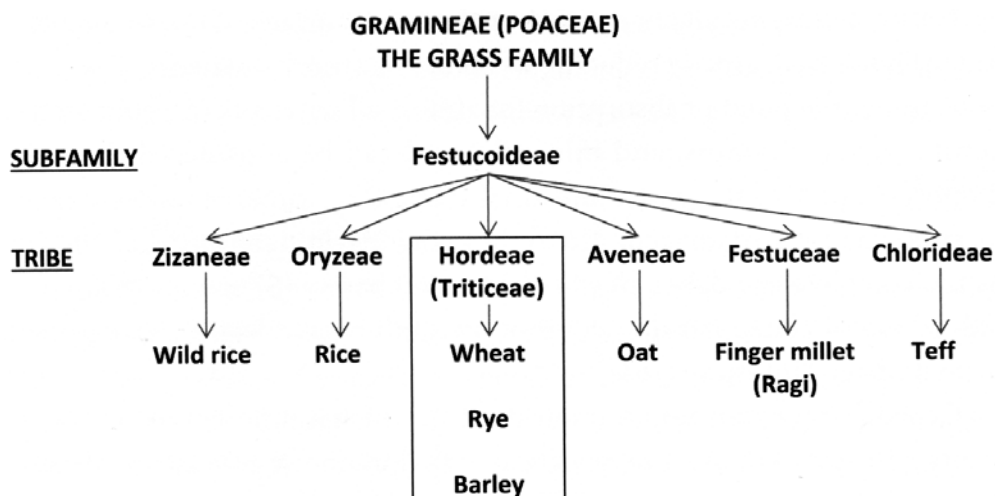


図 1.1 グルテンを含む穀粒，含まない穀粒の間の遺伝的関係

ンパク質の約 80% である。グルテンは多くの異なったタイプのタンパク質に分画されるものからなっているが、それは一般に Osborne 分画法²⁾で分画される。このシステムは、タンパク質の溶解性の異なる性質で分離、分画されるものである。小麦中の一般的タンパク質区分は、水溶性タンパク質 (albumins)、塩可溶タンパク質 (globulins)、70% アルコール可溶タンパク質 (prolamins)、希酸、希アルカリ可溶タンパク質 (glutelins) である。このタンパク質のクラス分けで、prolamins と glutelins は小麦タンパク質の中で大きな成分で、小麦粉中の全タンパク質中の各 33 と 16% である。これら 2 つのタンパク質区分が混合されたとき、これらのタンパク質を食品加工技術の分野では“グルテン”と知られている。

食品技術者にとって“グルテン”とは、グルテニン (glutelin) とグリアジン (prolamin) の 2 つの組み合わせである。グルテンの特性とは、この 2 つのタイプのタンパク質の機能の組み合わせによるものである。グルテニンは小麦粉ドウに弾力性と力強さを与え、引っ張ったときにそれに抵抗し元の形に戻す力がある。一方、グリアジンは抵抗なく簡単にのびる性質である。これらの 2 つのタンパク質がむすびついてドウに粘弾性 (viscoelasticity) の特徴を与え、それ

がガスをトラップし、ガスが逃げることを押さえるのである。ドウ中のアワは拡大し、ドウに十分な多孔性を与え、焼いたとき望ましいテクスチュアの軽い食品を作る。

対照的に医学的観点からは、グルテンを小麦、ライ麦、大麦のプロラミン、あるいはグリアジンとしている。プロラミンはアミノ酸組成の点でユニークで、そこにはこれらの類の大部分のタンパク質のうちで最もプロリン、グルタミン含量が高い。これらの穀物中貯蔵タンパク質は全てプロラミンであり、それら穀物は全て同一の植物の科 (family) であり、同一の進化の過程を踏んで来た。図 1.1 は穀物間の関係を示した。普通パン小麦は *Triticum aestivum* として植物の分類学者に知られている。Spelt 小麦 (*T. aestivum* var. *spelta*) は遺伝学的には modern 小麦に近く、セリアック患者への反応性があり、あるいは毒性がある。科の系統を見ると、我々はより modern 小麦と関係あるものとして durum (*T. turgidum*) を見出す。もっと古代の emmer 小麦 (一般に 4 倍体の小麦)、及び einkorn (一粒形小麦) (*T. monococcum*) ですら、ずっと小麦から距離があるが、しかしセリアック反応を起こす。大麦 (*Hordeum vulgare*) とライ麦 (*Secale cereale*) は小麦とはずっと離れた関係だが、未だにセリアック反応があり、

それはそのプロラミン中の特異的なペプチドの配列の存在のためである。プロラミンはその源の故、それぞれの名前がついている（大麦では hordeins, ライ麦では secalins, オートムギでは avenins）。

“グルテン”の言葉の意味するところは、両科学者にとってちがう：食品化学の場合、2つのタンパク質のくみあわせ、即ちグルテニンとグリアジン、医学の場合、グリアジンだけである。

セリアック病

セリアック病は、全米人口の0.7%に強い影響を与えていると言われており、ヨーロッパで見られるものとはほぼ同じパーセントである³⁾。非ヒスパニック系白人人口のセリアック病の発生は全人口(%)よりも高い(1%)。これらのセリアック病をもつ人の大部分は、未だ診察未確認である。

簡単に言うと、セリアック病は小麦、ライ麦、あるいは大麦の貯蔵タンパク質の消費により引き起こされる永遠の病気である。Mayo Clinic(世界最大の医療センター)⁴⁾ではセリアック病を以下のように述べている。

タンパク質グルテンの摂取が引き金になる消化系病気 --- [結果として] 免疫

反応——小腸の内面に損傷を引き起こし -----

セリアック病は小腸の内表面への損傷を引き起こし(図1.2)、栄養素の吸収能を大きく低下

させる。小腸は殆ど全ての栄養素(炭水化物、アミノ酸、ビタミン、ミネラル)の吸収する点であり、胃腸消化管の最も重要な部分であると考えられている。時間とともに、損傷が起こると栄養不良がおこる。

セリアック病の知られている唯一の治療法は、小麦、ライ麦、大麦の完全摂取拒否である⁵⁾。1日グルテンを20-50mgとただけで、障害を受けた小腸を持つセリアック患者の完全回復はとまる⁶⁾。

セリアック病は自己免疫疾患であり、これまでのアレルギー病とはちがう。自己免疫疾患は異物から体を守る以上に、体の免疫システムで自身の組織を攻撃する。セリアック病の発生は小麦、ライ麦、大麦のタンパク質に基づくもののみならず、以下3つのファクター(遺伝的体質、反応性エピトープス(抗原決定基)、腸管透過性)のコンビネーションの結果で引き起こされるものである。

ファクター1；

遺伝的体質 (Genetic Predisposition)

セリアック病にかかっている人の免疫システムは一般に過剰反応しやすい⁷⁾。この遺伝的体質では、組織適合性HLAs(ヒト白血球抗原)として知られているタンパク質の生産が行なわれる。HLADQ2とHLADQ8は95%のセリアック病患者によって生産される。西側社会の35-40%の人はこの組織タイプを持っていると計算されている。最近の研究から約2%のヒトが実際にはセリアック病にかかっているという⁶⁾。

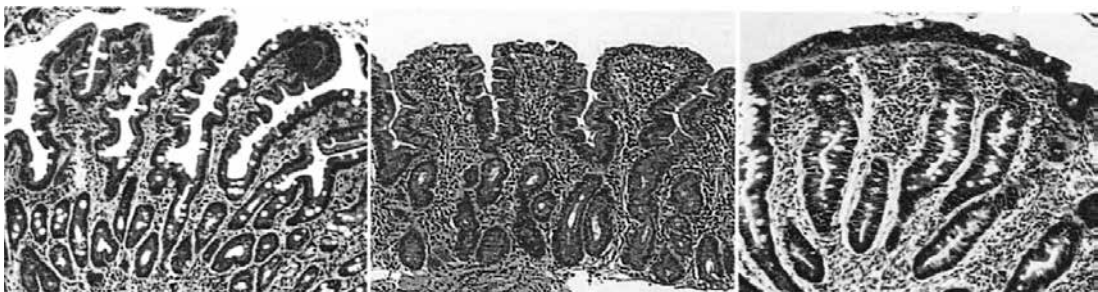


図1.2 小腸絨毛。左から右へ：正常、一部損傷あるいは萎縮、セリアック患者の完全に萎縮した絨毛。

HLADQ2 あるいは HLADQ8 の遺伝子を持つてなくては、セリアック病にかかることはほぼ無理であるが、組織タイプは一般的で、環境要因がまた必要である。さらにセリアック病は強い女性体質嗜好がある。セリアック病の子供では 5-10% が病気にかかる。セリアック病の双子の兄弟は 80% が病気にかかるが、一方双子でない兄弟はかかるのが 10% である⁶⁾。

ファクター 2；

反応性抗原決定基 (Reactive Epitopes)

セリアック自己免疫疾患反応は。タンパク質自体が引き金になるのではなく、ペプチドと呼ばれるタンパク質の小さなかけらで構成されて特別なアミノ酸配列が必要で、それによって引き起こされる。この反応性ペプチドはエピトープと呼ばれる。100 以上の異なったグルテンタンパク質中に 50 種以上のエピトープがこれまで同定されている⁸⁾。それは人間の全ての胃、脾臓、小腸の酵素による分解に対して高度の抵抗性があり、体中の内蔵を通じて小さくなったものは消化管を通じて体内に入ってゆき、そこで順次複雑な流れの反応が起こる⁹⁾。ヒト酵素による破壊に対する抵抗性は、小麦タンパク質自体の機能に結びついている。

ある種のペプチドは、体の酵素反応で変化し、その結果より強い免疫反応をおこす。組織トランスグルタミナーゼは、全ての細胞中に見られる酵素だが、タンパク質を他のものへ結合させるのに関係のあるもので、組織の成長と修正に非常に大切なことをやっている。トランスグルタミナーゼはグリアジンペプチドをもっと反応性のあるエピトープにかえ、セリアック病に感受性あるものにとって、潜在的に悪影響を及ぼす可能性がある。

セリアック病とは

- ・自己免疫疾患である。
- ・栄養素の吸収性の低下を起こす。
- ・小麦、ライ麦、大麦の摂取によって起こる。
- ・数百万の人々に影響する。
- ・部分的には遺伝的である。
- ・小麦アレルギーやグルテン不耐性とは違う。

ファクター 3；腸管透過性

セリアック病の第 3 のファクターは高度の腸管透過性である。セリアック病、1 型糖尿病、多発性硬化症 (MS)、炎症性腸疾患 (IBD)⁷⁾ は全て腸管透過性が高まることによる特徴と信じられている。ペプチドの腸管透過性が高まることで、より簡単にセリアック病の患者の免疫システムが過剰反応するようになる。

セリアック病の症状

セリアック病には特徴的なサインあるいは症状は全くない。殆どのこの病気のヒトは、一般的症状、例えば腹痛、膨満、たえまない下痢、異常な悪臭臭気の大便、油性粘性の大便という特徴がある。セリアック病は又、それ自体はつきりしない症状も出てくるが、その中には怒りっぽくなるとか、神経衰弱、貧血、胃不調、関節病、筋肉痙攣、皮膚発疹、口の痛み、歯、骨異常 (例えば骨粗鬆症) 等がある。セリアック病の症状にはまた、他の病気の偽物の様な症状もあるが、例えば過敏性腸症候群、胃潰瘍、クローン病、寄生虫にかかる、及び貧血症とかである。これらの病気の多くは栄養素の吸収障害に似た徴候である。興味深いのは、時にセリアック病の人々は全く胃腸障害の症状を示さないことだ。

セリアック病の診断

セリアック病の発症はどんな年齢でも起こる。その診断は、しばしば病気の影響を受けた生命の最後にみられる；しかしながら症状の現れない人々は、親類がその病気で診断を受けたかどうかを探してみるべきである。健康と食事の状態をよく見た後で、ふつう診断の第 1 段階は、血清抗体試験¹⁰⁾を行なう。このテストでは、彼、彼女の食事に各人がまだグルテンが摂取されているかどうかが必要である。このためセリアック病と疑われる人は、グルテンを摂取している間に、医学的検査をせねばならない。いろいろな抗体試験が使われる。もっとも一般的な試験は抗—組織グルタミナーゼに対するも

ので、さらにイミューグロブリン A と G への抗体に対するものである。もしプラスの血清試験あればセリアック病であれば、生検試験も多く行なわれるだろう。生検試験（BIOPSY）は小腸の損傷の程度を確認できる。生検試験の方法で、上部消化管内視鏡と呼ばれるものだが、内視鏡を用いて小腸の内層から小さな組織を集めるのに使う。その方法は苦痛はなく、僅か 30 分程度で終了する。遺伝的な血清学的試験とのコンビネーションは、生検をする必要を無くす；しかしながら生検は標準試験¹¹⁾と考えられている。もし診断が疑問ならば、HLADQ タイプは、遺伝的体質があるかどうかを決めるのに用いられるであろう。

今日までは、この種の試験は普通の保険によってカバーされない。

セリアック病による栄養素欠乏の問題と関連の病気

セリアック病の人は、栄養面で 2 つの重要なことと関係している：それは、腸の損傷による栄養素吸収阻害と、グルテンを含む穀物でつくる食品と類似のグルテンフリー食品を比べた時、グルテンフリー食品の方の栄養分不足のことである。小腸の損傷は、厳正なグルテンフリー食品をとることで解決されるが、グルテンフリー食品の利用にはしばしば栄養素を欠くことがある。この食品の栄養面のプロフィールは、グルテンフリー食品生産者が考えられねばならない。栄養素補充の理解は、グルテンフリー食品の重要な一面である。マーケット上の多くのグルテンフリー食品は、病気からくる栄養欠乏の軽減化には残念ながらなっていない。その殆どはデンプンベースのものであり、セリアック病患者にとって必要な全粒からくる微量栄養素濃度や繊維を含むものではない。十分な栄養素を含むグルテンフリー食品はわずかしかなない。

十分な栄養分を含むグルテンフリー食品は極めて少ない。

繊維

繊維は、セリアック病を持つ人にとって特に関心のあるものである。多くのグルテンフリー食品の粒やその全粒を粉にしたものは、繊維を強化した小麦粉よりもその量は多いが、殆どのは全粒小麦粉の繊維含量に比べレベルが低い¹²⁾。胃腸の健康にとって繊維は重要な役割をしているが、多くのグルテンフリー食品は繊維欠乏である。平均的なグルテンフリー食品から、一日当たり繊維 6g の供給があると報告された¹³⁾。これは推薦される量、女性 1 日 25g、男性 1 日 38g に比べて低い。より繊維を加えたグルテンフリー食品がマーケットに出始めているが、セリアック病患者の食事にはなお不足である。マーケットにあるグルテンフリー食品の多くは、肥満を起こす。それは油脂からの過剰カロリー¹⁴⁾によるものである。多くのグルテンフリーパンは、同じ小麦パンよりもより高カロリーである¹⁵⁾。幾つかの報告から、大人と子供両方のグルテンフリー食品の摂取者から、高い BMI（body mass index= 肥満を示す）の結果が出ている。

B. Vitamins

葉酸塩欠乏は、診断未確定セリアック病患者にとって問題である。葉酸塩、また葉酸はビタミンの一種で、小麦粉から供給されている。豊富な小麦粉は、北アメリカ人の食事中、最も重要な葉酸塩源の一つであるが、セリアック病患者にとって利用できない源である。重要なのは、セリアック病患者で出産適齢期の女性は、胎児の成長に必要な十分な葉酸塩の取り込みを確保することである。葉酸欠乏は、神経管欠を引き起こし、妊娠中の他の合併症をも引き起こす原因である。

Iron-Deficiency Anemias（鉄欠乏貧血）

鉄欠乏はセリアック病患者によるもっとも一般的な症状の一つだ。Mayo Clinic¹⁶⁾ は鉄欠乏貧血を次の様に定義している。

--- 貧血の一般的タイプ --- 血液の健康な赤血球を欠く病気。赤血球は体組織に酸素を運びます。名前が意味するように、鉄欠乏貧血は不十分な鉄のせいです。十分に鉄がないとみなさんの体は十分なヘモグロビンを作れません。それは酸素を運ぶことのできる赤血球細胞中のものだからです。その結果、鉄欠乏貧血で疲れやすく、すぐに息を切らせます。

鉄の吸収不十分は、厳格なグルテンフリー食品に変えた後、続いて生じる。小腸の絨毛の形態に完全な回復が必要で、鉄欠乏のサインのである前に体中の鉄の補充が必要である。鉄リッチのグルテンフリー全粒（キノア、ソバ、テフ、アマランスのような）の組み込みが大きな助けになる。

乳糖不耐症

乳糖不耐症のヒトはラクターゼを作ることができない。その酵素はラクトースを分解する。ラクトースはミルク中にある糖の二糖類で、グルコースとガラクトースからなり、小腸を覆う細胞内皮で生産される。セリアック病はしばしばラクターゼの生産を低下させる。小腸のラクトース分解不能は、糖の発酵を胃腸のより低い部位でおこし、その結果、ガス発生、苦痛、膨満をひきおこす。厳格なグルテンフリー食品の摂取をすれば、絨毛の形態、機能の回復につれて、この重要な点を軽減させ、セリアック病患者がいつも乳糖不耐症者とは限らないということになる。

セリアック病の栄養欠損には十分な繊維不足、
B Vitamin s 不足、
鉄不足、
カルシウム不足、
Vitamin D 不足、
マグネシウム不足、
ラクターゼ欠乏がある。

骨粗鬆症 (Osteoporosis) と骨質減少 (Osteopenia)

カルシウムに対する吸収不十分さは普通にセ

リアック病患者でみられ、それがしばしば正常者より低い骨質減少 (osteopenia) あるいは骨粗鬆症を引き起こす¹⁷⁾。グルテンフリー食品に変えた後ですら、これらの病気は小腸のダメージとは裏腹に経時的に続く。ビタミン D、マグネシウムもカルシウム吸収に重要な役割を演じ、これらの微量栄養素の欠損が骨量減少、骨粗鬆症をセリアック病患者におこす。テフ、キノアは、全粒小麦よりカルシウム含量が高く、これらはいずれもグルテンフリー穀物である。キノア、ソバ、トウモロコシ、テフ、アマランスは、全てグルテンフリー全粒穀物で、マグネシウムも小麦粉に比べ高い。

セリアック病と他の病気との関連

他の自己免疫疾患

これまでの研究から、セリアック病が1型糖尿病、自己免疫性甲状腺炎のような他の自己免疫疾患病と関連のあることがわかってきた。タイプ1型糖尿病患者のセリアック病への広がりには、正常のヒトの10-30倍であり、事実グルテンフリー食品がタイプ1型糖尿病のヒトの病気改善に効果のあることを示した。MS（多発性硬化症）はセリアック病にリンクしている¹⁸⁾。ある研究者¹⁹⁾はテストしたMS患者の11.1%がセリアック病気であることを見出し、セリアック病の患者は全て女性²⁰⁾であった。さらに研究は、第1度近親者に高度にセリアック病患者のいる（32%）ことを示した。自己免疫性甲状腺炎のヒトのセリアック病頻度は、コントロールの非自己免疫人口の0.4%に比べて4.3%であった²⁰⁾。

自閉症 (Austin)

自閉症と診断された子供の両親は、子供を助けるため、次第に食事をグルテンフリー食品にかえ、決定的な病気の症状をゆるめようとした。今日まで、グルテンと自閉症との間の関係に、食事による治療が決定的によかったという証明はない^{19, 21)}。しかしながら神経的病気、その進み方の遅延は、栄養的欠乏と関係があろう。そ

して医学のコミュニティのあるものは次のように進めている。即ち、栄養的欠陥や吸収不十分さは、神経発生阻害の問題とも関連のある要因と考えている。

ヘルペス状皮膚炎（Dermatitis Herpetiformis）

ヘルペス状皮膚炎は、かゆく、水ぶくれする皮膚病であるが、これもまたセリアック病の系統のものである。ほぼ 10% のセリアック病患者はこの病気を持っている。発疹は普通、胴、頭の皮、尻におこる。ヘルペス状皮膚炎は、セリアック病と同じように小腸の内皮に変化を起こす可能性がある。しかしながらそれは顕著な消化器症状ではない。この病気は医学的に疱疹を処置することに加えて、グルテンフリー食事で処置される。

小麦アレルギー

Mayo Clinic²²⁾ は、小麦アレルギーを以下のように定義している。

--- 小麦を含む食品に対するアレルギー反応 ---
小麦アレルギーは、時にセリアック病と混乱されるが、この病気とはちがうものです。小麦アレルギーは、小麦粉中のタンパク質に対するアレルギー原因の抗体を生じるもので

す。しかし、セリアック病では、小麦中のある特異的タンパク質—グルテンが、セリアック病をもつヒトの小腸中で異常な免疫系反応を引き起こします。セリアック病は、時に誤って小麦グルテンに対するアレルギーとよばれるが、この 2 つにははっきりした違いがあります。

小麦アレルギーは、セリアック病患者自身の体組織を攻撃する自己免疫反応よりはむしろ、その原因の特異性が低く、アレルギー反応の結果、異物タンパク質を攻撃する抗体の生産が行なわれる。食品不耐性と比べると、アレルギー反応は多くの組織に影響できるが、食品不耐性は殆ど消化系部位に限定されている。

他の食物アレルギーとして、アナフィラキシーのような非常にひどい、反応の素早いものがあり、アレルゲンの少量のものの取り込みから始まる。アナフィラキシーは、呼吸困難、血圧低下を引き起こす。軽い徴候としては、腫れ、かゆみ、口元、舌、唇、のどのかゆみがある。アレルギー反応は又、吐く、腹部の痙攣、下痢を示す。

グルテン不耐性

グルテン不耐性はセリアック病よりもっと一

表 1.1 グルテンフリー食品の利用に結びつく病気^a

	セリアック病	小麦 あるいは グルテンアレルギー	非セリアック グルテン不耐症
記述	薬理的（自己免疫的）	Immunoglobulin E 対応	非アレルギー的障害 非自己免疫反応
反応速度とタイプ	和らぐまで（週～年）； 腸障害	早い（分～時間）； アナフィラキシーは 潜在的に致命的	ゆっくり（時間～日） 腸障害または死を 引き起こさない。
米国人口への影響	300 万以上	数百万	1800-2100 万
消化器 (GI) 症状	びらん性胆汁症候群の症状、下痢、腹痛、腹部の痛み、鼻の嘔吐、嘔吐、敗血症、代謝、酸分泌、体重増加または喪失、刺激性ガス		
非—GI 症状	貧血、認知症、過敏症、うつ病、頭痛、めまい、衰弱、疲労、皮膚刺激うっ血、関節および筋肉痛、視覚障害、脱毛症および糖尿病（セリアック病患者）		

^a さらに多くの数値は不明の人々がグルテンフリー食品を摂取しているが、グルテンフリー食品が彼らの人生の質を変えるという個人的信念に基づくためのものである。

般的な病気である。ある研究では、グルテン感受性、または不耐性はセリアック病より6倍多いという²³⁾。グルテン不耐性はひどい病気で、グルテンは健康にマイナスの働きをする。それは、アレルギー反応または絨毛の萎縮またはアレルギー反応をもたらす自己免疫応答をもたらさない胃腸の苦痛として定義される。それは多くの健康上の問題を引き起こし、多くの問題に対し、食品アレルギーあるいはセリアック病に似たものと受け止められている。グリアジン抗体はセリアック病でなくグルテン不耐性の証明に使われるだろう。しかしながら今までグルテン不耐性用の試験方法はなかった。そこで、そ

の診断には基準のない方法で行なわれていたに違いない。グルテン不耐性の病気は、それ自身一般にいろいろな程度で現われ、一般にはグルテンフリー食事で治療されている。

グルテン不耐性の原因には次のことが含まれる。

- ・グルテンの完全な消化に必要な酵素類（プロテアーゼ，あるいはエンドペプチダーゼ）のないこと，
- ・過敏性腸症候群
- ・再発ストレスまたは心理的要因。

表1.1にいろいろな病気を示したが、これは人々をグルテンフリー加工食品の利用に導く。

文 献

1. Atwell, W. A.: Composition of commercial flour. Wheat Flour. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN. 27-28, 2001.
2. Osborne, T. B.: The Vegetable Proteins. 2nd ed. Longmans Green & Co., London. 1924.
3. Rubio-Tapia, A., Ludvigsson, J. F., Branger, T. L., Murray, J. A., and Everhart, J. E.: The prevalence of celiac disease in the United States. *Am. J. Gastroenterol.* **107**:1538-1544. 2012.
4. Anonymous. Celiac disease: Definition. Mayo Foundation for Medical Education and Research. Rochester, MN. 2013. <http://www.mayoclinic.com/health/ceeliac-disease/DS00319>.(Accessed 2013)
5. Fasano, A., and Catassi, C.: Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: An evolving spectrum. *Gastroenterology* **120**:636-651.2001.
6. Mckeown, N. M., Jacques, P. S., Seal, C. J., de Vries, J., Jonnalagadda, S. S., *et al.*: Whole grains and health: From theory to practice - Highlights of the Grains for Health Foundation's Whole Grains Summit. *J. Nutr.* **143**:744S-758S. 2013.
7. Fasano, A.: Surprises from celiac disease. *Sci. Am.* **301**:54-61. 2009.
8. Vader, W., Kooy, Y., Van Veelen, P., De Ru, A., Harris, D., Benckhuijsen, W., Pena, S., Mearin, L., Drijfhout, J. W., and Konig, F.: The gluten response in children with celiac disease is directed toward multiple gliadin and glutenin peptides. *Gastroenterology* **122**:1729-1737. 2002.
9. Shan, L., Molberg, O., Parrot, I., Hausch, F., Filiz, F., Gray, G. M., Sollid, L. M., and Khosla, C.: Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science* **27**:2275-2279. 2002.
10. Mayo Clinic: Mayo Laboratories celiac disease comprehensive cascade form. http://www.mayomedicallaboratories.com/it-mmfiles/Celiac_CompCascade_Final.pdf
11. Jackson, J., Eaton, W., Cascella, N., Fasano, A., and Kelly, D.: Neurologic and psychiatric manifestations of celiac disease and gluten sensitivity. *Psychiatr. Q.* **83**:91-102. 2012.
12. Hager, A., Wolter, A., Jacob, F., Zannini, E., and Arendt, E. K.: Nutritional properties and ultrastructure of commercial gluten free flours from different botanical sources compared with wheat flours. *J. Cereal Sci.* **56**:239-247. 2012.
13. Jones, J. M.: *Wheat Belly* - An analysis of selected statements and basic theses from the book. *Cereal Foods World* **57**:177-189. 2012.
14. Mariani, P., Viti, M. G., Montuori, M., La Vecchia, A., Cipolletta, E., Calvani, L., and Bonamico, M.: The gluten-free diet: A nutritional risk factor for adolescents with celiac disease? *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **27**:519-523. 1998.

15. Hager, A.-S., Axel, C., and Arendt, E. K.: Status of carbohydrates and dietary fiber in gluten-free diets. *Cereal Foods World* **56**:109-114. 2011.
16. Anonymous.: Iron deficiency anemia: Definition. Mayo Foundation for Medical Education and Research. Rochester, MN. 2011. <http://www.mayoclinic.com/health/iron-deficiency-anemia/DS00323>. (Accessed 2013)
17. Kupper, C.: Dietary guidelines and implementation for celiac disease. *Gastroenterology* **128**:S121-127. 2005.
18. Kumar, V., Rajadhaksha, M., and Wortsman, J.: Celiac disease - Associated autoimmune endocrinopathies. *Clin. Vaccine Immunol.* **8**:678-685. 2001.
19. Batista, I. C., Gandolfi, L., Medeiros Nobrega, Y. K., Almeida, R. C., Almeida, L. M., Campos, D., and Pratesi, R.: Autism spectrum disorder and celiac disease: No evidence for a link. *Arq. Neuropsiquiatr.* **70**:28-33. 2012.
20. Rodrigo, L., Hernández-Lahoz, C., Fuentes, D., Alvarez, N., López-Vázquez, A., and González, S.: Prevalence of celiac disease in multiple sclerosis. *BMC Neurol.* **11**: 31. 2011.
21. Pavonea, L., Fiumaraa, A., Bottaro, G., Mazzonea, D., and Coleman, M.: Autism and celiac disease: Failure to validate the hypothesis that a link might exist. *Biol. Psychiatr.* **42**:72-75. 1997.
22. Anonymous.: Wheat allergy; Definition. Mayo Foundation for Medical Education and Research. Rochester, MN. 2011. <http://www.mayoclinic.com/health/wheatallergy/DS01002>. (Accessed 2013)
23. Jackson, J. R., Eaton, W.W., Cascella, N. G., Fasano, A., and Kelly, D. L.: Neurologic and psychiatric manifestations of celiac disease and gluten sensitivity. *Psychiatr. Q.* **83**:91-102. 2012.

白石カルシウムの炭酸カルシウム

炭酸
カルシウム
とは?

古くから食品に使用されている
安全性・吸収性に優れたカルシ
ウム源です。
用途も栄養強化はもちろんのこと、
練製品の弾力増強などの品質改
良、粉体の流動性向上・固
結防止といった加工助剤などそ
の目的は多彩です。

分散性・混合性に優れたものや、飲料用として
沈殿を抑制したタイプ等、品揃えております。

一般の栄養強化には「ホワイトン」

機能を求めるならば「コロカルソ」

飲料用には、スラリー状の「カルエッセン」

詳細につきましては弊社営業担当に
お気軽にお尋ねください。

 **白石カルシウム株式会社**

食品部：東京都千代田区岩本町1-1-8 TEL03-3863-8913
本社：大阪府北区中之島2-2-7 TEL06-6231-8265

食品害虫の DNA による同定手法

古井 聡 (FURUI Satoshi)¹

¹ 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品研究部門 食品安全研究領域 食品害虫ユニット

Key Words：食品害虫 同定 DNA バーコーディング PCR

はじめに

著者が所属する農研機構 食品研究部門 食品害虫ユニットでは、食品へ混入する異物としての害虫防除を研究テーマとしている¹⁾。主な研究対象としては、当部門の前身である農林省米穀利用研究所の流れを汲んで、貯穀害虫を長年に渡って取り扱っている。貯穀を食害する害虫は、田畑に代表されるフィールドに植えられている段階で侵入する（プレハーベスト害虫）例はあまり見られず、主に収穫後や加工・運送・貯蔵中に侵入する（ポストハーベスト害虫）ことが知られている。ポストハーベスト害虫の研究は、フィールドで植物体への直接的な病害や食害・品質低下を防ぐことを目的とした防除とは対象昆虫種のみならず手法や成果へのアプローチ法等が大きく異なる。当研究室は、高圧二酸化炭素を用いたクリシギゾウムシ（*Curculio sikkimensis* (Heller)）防除の例²⁾を除き、ポストハーベスト害虫の防除を専門に研究している。

消費者の「食の安心・安全」に対する関心は、人間の生存本能に直結する事項である。農産物を含む「食品」に混入した虫、毛、金属片、小石などは、食品衛生法上においては異物として分類されるが、食品への異物混入事例の中で消費者からのクレームが最も多いのは害虫である³⁾。このような事例が発生すると、消費者は食品が不衛生な環境で扱われていたと疑い、安全性に疑念を

持つ。食品への疑念は、食品関連事業者（生産者、流通・加工業者、生産国）にとって商品そのものの価値やイメージが損なわれるだけでなく、消費者への謝罪・説明責任が生じると共に、商品の回収・賠償等による金銭的負担が生じる場合もある。このため、ひとたび食品への異物の混入事例が発生すると、食品関連事業者は消費者への安心を確保するためにまず異物の同定を行う。同定された異物が昆虫であれば、その生態に関する知見を基に、現場の状況等から総合的に考察して混入原因や経路を究明し、再発防止に努めることが求められる。

この一連の過程のうち、昆虫の同定は、虫の特徴的な形態を含む部分を熟練した専門家が目視で鑑定しているのが現状であるが、食品関連事業者は消費者の安心や再発防止策を確保するため、適用性が広く、迅速性や精確性の高い同定結果を常に求めている。

この一連の過程のうち、昆虫の同定は、虫の特徴的な形態を含む部分を熟練した専門家が目視で鑑定しているのが現状であるが、供給者は消費者の安心や再発防止策を確保するため、適用性が広く、迅速性や精確性の高い同定結果を常に求めている。

DNA を用いた分析は、操作に慣れればルーチン作業で実施が可能であるため、目視鑑定のように高度な専門知識や経験は不要である。ま

た、DNA を含む昆虫の一部が残存していれば検査可能であり、一般に形態的な特徴が少なく同定が難しいとされる幼虫においても精確に同定できる利点がある。本稿では、DNA 分析を行う際の留意点を記すと共に、DNA 分析による昆虫の同定法を 2 例紹介する。

DNA による食品害虫の同定法

1. 同定用 DNA の調製

DNA の調製は、分析対象の性状に適した手法を使うことが必要になる。昆虫単体からの DNA 抽出法としては、通常、市販のキットである DNeasy Blood & Tissue Kit (キアゲン社)あるいは ISOSPIN Blood & Plasma DNA (ニッポンジーン社)等(図 1)を用いることができる。しかし、一例として、甲虫の体表にはメラニン系色素が含まれており、抽出した DNA に共存すると検出する際に妨げとなりうる ことが知られている⁴⁾。このような物質が DNA に混在する、あるいは検査対象が加工食品で昆虫 DNA が変質している等の事情によって検出に適した DNA の調製が困難な場合には、抽出キットのプロトコル改変や他のキットを試す等の工夫が必要となる。品質の評価基準については、抽出 DNA の紫外線の吸光度を測定後、OD260 値から DNA 量を求め、O.D.260 nm/ O.D.280 nm

が 1.7 ~ 2.0 程度であれば良好と判断するケースが一般的である⁵⁾。

2. DNA バーコーディングによる同定法

生物は遺伝的な背景に沿って固有の DNA 変異が発生している。DNA バーコーディングは、2003 年に Hebert ら⁶⁾ によって提唱された、短い DNA 領域の塩基配列の違いを利用して生物を同定する手法であり、DNA を構成する 4 塩基をそれぞれ幅の異なるバーコードになぞらえてその並び方の違いを利用することから名付けられた。現在、この手法は Consortium for the Barcode of Life (CBOL) が中心となって設立された International Barcode of Life project (iBOL) によって国際的な協力の下に情報の蓄積と実用化が進められている。わが国では、日本バーコードオブライフ・イニシアティブ (Japanese Barcode of Life Initiative:JBOLI)⁷⁾ が DNA バーコーディングの普及や関連プロジェクトの支援を目的として設立されている。この国際的な取り組みの中で、ほとんど全ての動物群に対する同定には、標準的なバーコードとしてミトコンドリア DNA 上にコードされているシトクロム c オキシダーゼ I 遺伝子 (*cytochrome c oxidase I:COI*) の約 650 塩基対の DNA 領域が指定されており、昆虫の同定もこれを用いている。他方、植物については、葉緑体の 2 つの遺伝子領域、



図 1 食品害虫からの DNA 抽出キットの例

左図は DNeasy Blood & Tissue Kit(キアゲン社)、右図は ISOSPIN Blood & Plasma DNA(ニッポンジーン社)。

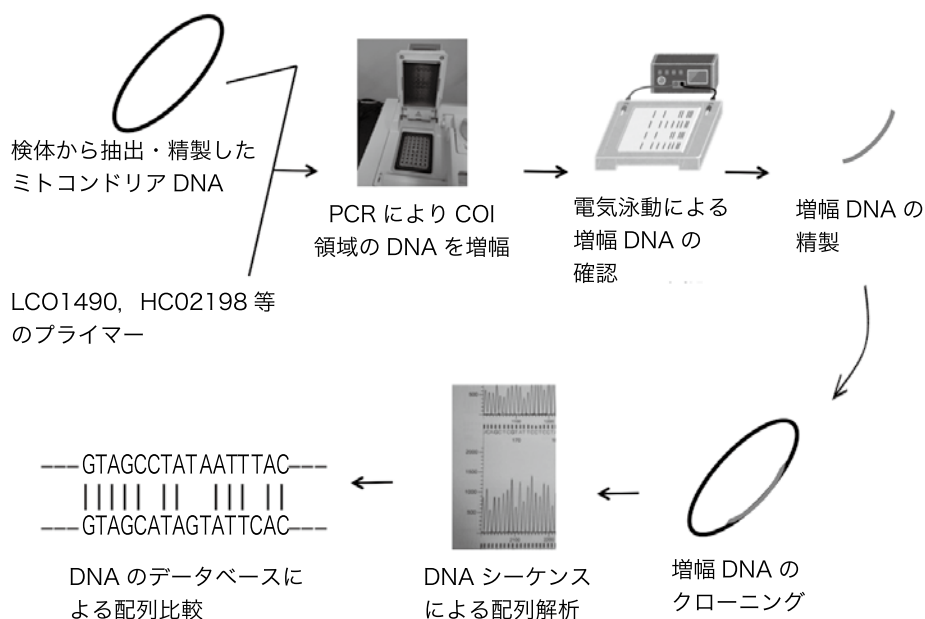


図2 DNA バーコーディングによる同定手順

chloroplast maturase K 遺伝子 (*matK*) および Rubisco L subunit 遺伝子 (*rbcL*) がバーコード領域として承認されている⁸⁾。本法は、検査対象の生物から Polymerase Chain Reaction (PCR) 等の手法により調製したバーコード領域を解读できれば、データベースに照合し配列情報を比較・同定することができる。DNA バーコーディングは煩雑かつ大量の同定に向かない側面はあるが、DNA の他に情報が全くない検体についても、COI の配列さえ判明すれば同定が可能である等の大きな利点がある。

DNA 抽出操作後からの具体的な作業工程は、PCR、アガロースゲル電気泳動によるチェック、クローニング、シーケンス、配列の比較という流れが一般的である (図2)。PCR は iBOL で用いられている共通配列である LCO1490: 5'-ggtaacaatacataaagattgg-3' および HC02198: 5'-taaacttcagggtgaccaaataca-3' を用いるとされている⁹⁾ が、生物種によっては増幅できない例が認められるので、その際には検体の近縁種等のデータベース情報等を参考に、特異性を確保しつつプライマー配列を変更する等の工夫が必要となる。首尾良く DNA が増幅された場合

についても、きちんと目的の COI 領域が得られているか、得られていたとしても副次的に増幅された DNA が混在していないか調べるために、一部 PCR 液の電気泳動を行い、増幅 DNA が 1 本のみ増幅され、鎖長が約 650 塩基対であることを確認すべきである。増幅 DNA 状態が良ければ、その後、精製した増幅産物を前述の LCO1490 または HC02198 プライマーによりそれぞれ直接シーケンスして塩基配列を解析することもできるが、一般には、増幅した COI 領域をプラスミド等にクローニングしてシーケンス用のユニバーサル配列等も活用しつつ塩基配列を解析するとより確実性が向上する。このようにして解读した検体に由来する COI 領域塩基配列は、生命科学の研究活動をサポートするために、国際塩基配列データベースを協同運営する INSDC (International Nucleotide Sequence Database Collaboration) の参画機関である、DNA Data Bank of Japan (DDBJ) や National Center for Biotechnology Information (NCBI) 等のサイトで BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) による検索を行い、一致の程度から生物の候補を調べることができる。食品害虫に対する適用例と

しては、Zhang ら¹⁰⁾ によるカシミールコクス
ストモドキの論文がある。

3. リアルタイム PCR による同定法

PCR 法を用いた分析は、犯罪捜査や親子鑑定にも活用されているように、生物に固有の DNA 情報を利用するため精度や信頼性が高く、目視鑑定のように高度な専門知識や経験が不要である。PCR 法⁵⁾ には、プライマーを 1 対のみ用いるシングルプレックス PCR のほか、互いに干渉しない複数対のプライマーを用いて複数のターゲットを同時に検出するマルチプレックス等様々な手法がある。これらの手法は、いずれも電気泳動等による増幅確認が必要であるので、手間と時間を要する。以下に説明する Taq-man プローブを用いたリアルタイム PCR は、一対のプライマー間に両端を蛍光色素で標識したプローブを結合させ、PCR のサイクル毎に遊離する特定波長の蛍光量を検出する手法である（図 3）。本法は、リアルタイムでの蛍光量のモニタリングが可能な PCR 装置や蛍光標識したプローブを必要とするため、前述したシングルプレックス PCR やマルチプレックス PCR よりも分析が高価となる側面はあるが、検出に電気泳動が必要なく迅速であり、PCR 時にプライマーだけでなくプローブの特異性も求められるため、特異性の向上が期待できる点が優れている。

また、本法は前述した DNA バーコーディン

グとは異なり、分析を行う DNA 試料の中にこれらの DNA が含まれているか、いないかを調べる手法である。検知対象の生物の DNA から検査用のプライマー・プローブを設計するため、検査は予め検査対象の生物種が推定できる検体が分析の対象であり、生物種に関する情報が乏しい検体については同定できない。しかし、検査は抽出した DNA をリアルタイム PCR に供するだけで検知対象の生物の DNA の有無が判定可能であり、大量・高速に判定できるという特長がある。例えば、著者らは以前にフェロモントラップにおける調査¹¹⁾ を行っているが、このような際に、捕らえられた複数の昆虫が同定対象であるか、否かを迅速・大量に確認できる。また、外見が非常によく似た生物の判別について、検査対象であるか否かの判定にも活用できる。

リアルタイム PCR におけるプライマー長は 17 ～ 25 塩基程度、グアニンおよびシトシンの構成比率（GC 含量）は 40 ～ 60% 程度、Tm 値は 60 ～ 65℃であることが望ましいとされている。また、プローブについては、Tm 値は 68 ～ 70℃が好適とされており、プライマー・プローブにおいて干渉が少ないことが必要である。これらが保たれない場合には、PCR の標的配列による制限、検査の目的や反応条件によっては十分に満たせない場合があるが、一般に検査対象に対する特異性は低くなる。また、PCR の標的鎖長は長いほど反応時間も要

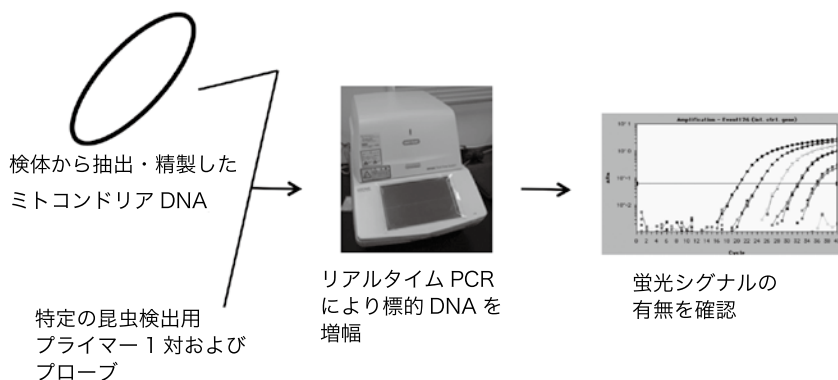


図 3 リアルタイム PCR による同定手順

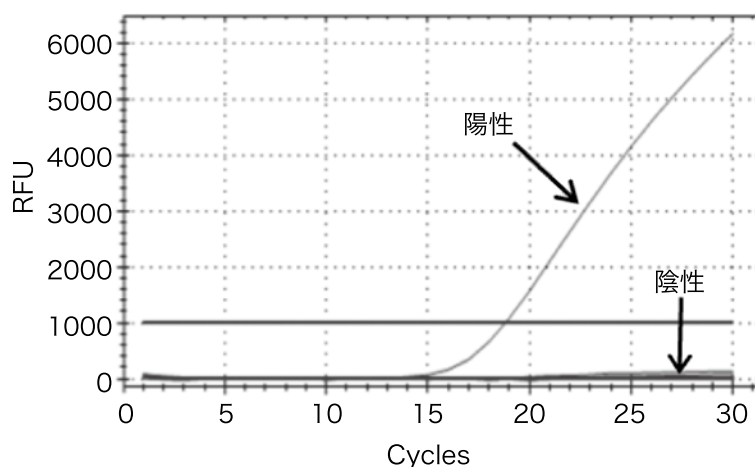


図4 リアルタイム PCR 法による同定結果の例
ヒメアカカツオブシムシの検出例。

し、検体由来の DNA が何らかの理由で分解されていると検出が困難な分析法になるのでプライマー・プローブの設定には注意が必要である。

抽出した DNA からの具体的な同定結果を図4に示す。食品害虫であるヒメアカカツオブシムシ (*Trogoderma granarium* Everts) の DNA が含まれる陽性検体は、標的 DNA が増幅すると共に遊離した Taqman プローブ由来の蛍光物質が約15サイクル付近から検出されているが、陰性検体は PCR により標的 DNA は増幅されず、プローブも分解されないため、30サイクルでも蛍光はほとんど認められないことがわかる。

おわりに

DNA 実験全般に言えることであるが、特に PCR は鋳型となる DNA を増幅する技術である。このため、実験上最も注意すべきことは PCR

によって増幅した DNA 液による汚染防止である。汚染防止には DNA 抽出、PCR、電気泳動等を行う作業エリアを区分けし、相互の汚染を防ぐことが望ましい。また、昆虫の DNA 検査を実施する際には、昆虫の捕食物に由来する DNA が検査結果に与える影響も考えておく必要がある。

DNA による昆虫の同定法を紹介したが、平成20年度に環境省で纏められた環境循環型社会白書¹²⁾の中で、全世界の既知の総生物種数は約175万種で、このうち、哺乳類は約6,000種、鳥類は約9,000種、昆虫は約95万種、維管束植物は約27万種との記載がある。これによると、生物の約55%は昆虫であり、極めて多様な昆虫を DNA で分類・同定することは理に叶っているといえる。これらの研究成果が蓄積されれば、今後、学術研究だけでなく産業においても大いに活用されると思われる。

参考文献

1. 農研機構 食品研究部門 食品害虫ユニット HP, <http://www.naro.affrc.go.jp/nfri-neo/introduction/chart/0403/index.html>
2. 宮ノ下明大, 今村太郎: 高压二酸化炭素を用いた貯蔵食品害虫の殺虫技術, 食糧, **44**:59-72, 2006. (http://www.naro.affrc.go.jp/org/nfri/publications/pdf/sousetsu/kanko_sou44/p059.pdf)
3. 全国における食品への異物混入被害実態の把握 (食品媒介感染症被害実態の推定), 平成 28 年度厚生労働科学研究費補助金 (食品の安全確保推進研究事業) 分担研究報告書, 105-162.
4. Opel K. L., Chung D., McCord B. R.: A study of PCR inhibition mechanisms using real time PCR. *J Forensic Sci.* **55**:25-33, 2010
5. Sambrook J., Russell D.W.: Molecular Cloning (Third Edition), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
6. Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S. L., *et al.*: Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B.* **270**:313-321, 2003
7. 日本バーコードオプライフ・イニシアティブ HP, <http://www.jboli.org/>
8. 陣保宇嗣: DNA バーコーディングの概要と同定支援システム, 昆虫と自然, **44** (3): 4-8, 2009.
9. 岸本圭子, 伊藤元己: DNA バーコーディングを活用した昆虫の種間相互作用網の解明, 日本生態学会誌, **65**:255-266, 2015.
10. Zang T., Wang Y., *et al.*: DNA barcoding, species-specific PCR and real-time PCR techniques for the identification of six *Tribolium* pests of stored products. *Scientific Reports*, **6**:1-11, 2016.
11. 古井聡, 宮ノ下明大ら: 茨城県つくば市の屋外でトラップに捕獲された貯穀害虫の記録 (2015 年 11 月 ~ 2016 年 10 月), 農研機構研究報告 食品研究部門, **1**:65-71, 2017.
12. 平成 20 年度版 環境循環型社会白書, 環境省編 <https://www.env.go.jp/policy/hakusyo/h20/index.html#index>

低エネルギー電子線を利用した 貯穀害虫の殺虫技術

今村 太郎 (IMAMURA Taro)¹

¹ 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品研究部門 食品安全研究領域 食品害虫ユニット

Key Words：貯穀害虫 低エネルギー電子線 放射線 殺虫 くん蒸

はじめに

貯蔵害虫は貯蔵期間の長い穀物、穀物加工品などを加害する害虫群である¹⁾。それらは主に小型のコウチュウ類やガ類であり²⁾、貯蔵穀物の害虫コクゾウムシ、小麦粉製品の害虫で精米所でもよく見られるコクヌストモドキ、貯蔵アズキの害虫アズキゾウムシ、玄米や乾燥食品の害虫であるノシメマダラメイガなどがよく知られている（図1）。

貯蔵害虫の防除は安価で安定した効果が得られる化学農薬、特に臭化メチルによるくん蒸に大部分を依存してきた。しかしながら大部分の

化学農薬は毒性の問題で使用できなくなり、また臭化メチルにはオゾン層を破壊する恐れのあることが指摘され、国際連合環境計画（UNEP）モントリオール議定書により、先進国では2005年までに、開発途上国では2015年までに検疫用途、緊急用途、不可欠用途を除き原則的に禁止された³⁾。さらに植物防疫法のポジティブリスト化により、検疫の際に生きた害虫が発見されても、それが非検疫対象害虫であれば臭化メチルによるくん蒸の必要がなくなった。そのため、非検疫対象害虫に汚染された輸入品は、輸入業者が臭化メチルクん蒸以外の方法で自主的に殺虫処理を行う必要が生じた。このような状況から、臭化メチルに代わる殺虫技術の開発が早急に必要とされている。

放射線の利用は有力な代替手段である。貯蔵害虫の防除にはコバルト60およびセシウム137のガンマ線（実際にはコバルト60の方を用いる）、加速電圧が1,000万ボルト以下の電子線、加速電圧が500万ボルト以下のエックス線が利用可能である。これらのうち、電子線、とくに低エネルギーの電子線を利用した殺虫技術について紹介する。

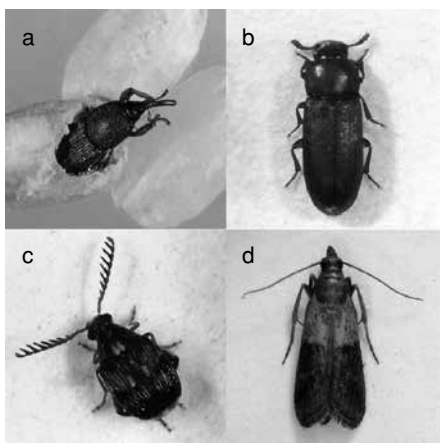


図1 a: コクゾウムシ成虫, b: コクヌストモドキ成虫, c: アズキゾウムシ成虫, d: ノシメマダラメイガ成虫

1. 殺虫に利用できる放射線について

ガンマ線とエックス線は、電磁波放射線であり、透過力が大きい。そのため、食品にほぼ

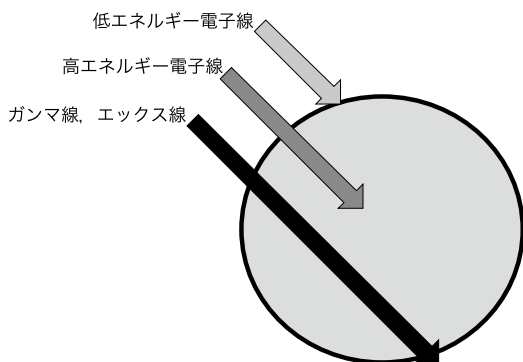


図2 ガンマ線、エックス線、電子線の透過イメージ

均一に処理できるという利点があるが(図2)、その反面、施設や装置に分厚い遮蔽が必要である。ガンマ線は食品に対する照射で現在もっとも多く用いられている方法であるが⁴⁾、ガンマ線処理施設は線源となるコバルト 60 を必要とし、その減衰もあるため施設の維持が困難である。また、食品に対する照射を考えた場合、処理施設は空港など交通の便のよいところに建設される可能性があり、これは事故などを想定すればあまり好ましくはない。それに対してエックス線、電子線は線源に放射性物質を必要とせず加速器によって機械的に発生させるため、放射性物質による周辺への汚染の心配がなく、注目されるようになってきている。ただし、エックス線は電子線からの変換時に発熱量が大きく、転換効率が低いという問題がある。

電子線は電子加速装置により発生させられた高速の電子であり、粒子線である。そのため透過力は小さく、その透過力はエネルギーに依存する(図2)。透過力が小さいことは、メリットとしては大きな遮蔽を必要としないという点だけでなく、エネルギーの小さい電子線を穀物粒に照射した場合、穀物粒の内部まで透過せず(図2)、内部の性質を変えないという利点がある⁵⁾。加速電圧 300 kV 以下の低エネルギーの電子線をソフトエレクトロンと定義し、これは穀物の表面殺菌を目的に研究が進められてきた⁵⁻⁹⁾。

2. ソフトエレクトロン照射による貯穀害虫の殺虫効果¹⁰⁾

図3で模式的に示した装置を用いて、ソフトエレクトロンが貯穀害虫に対して殺虫効果を持つことを確かめた。透過力の小さい電子線を穀物などの粒状の食品に照射する場合、その表面を均等に処理する必要があるため、ソフトエレクトロン照射窓の下で穀物粒を回転させるようになっている。コクヌストモドキ、ノシメマダラメイガ、アズキゾウムシに加速電圧 170 kV、電流 4 μ A の電子線を照射した。この条件下で 15 cm はなれた穀物表面におけるエネルギーは 60 keV であり、線量率は RCF 線量計による測定で 0.48 Gy/min であった。

表1は結果である。コクヌストモドキ、ノシメマダラメイガは穀物を外部から加害するタイプの害虫であり、すべての発育ステージで直接的に電子線を照射することができる。このタイプの害虫はすべての発育ステージにおいて短時間で殺虫ができることが分かった。しかしながら、アズキゾウムシの場合、成虫がアズキ粒表面に産卵し、幼虫はアズキ粒内に食入し、内部で発育する生活史を持つ。そのため、卵、成虫には直接的に電子線を当てることができるが、アズキ粒の奥深くに幼虫がいた場合、電子線が到達しないことがあると思われる。その結

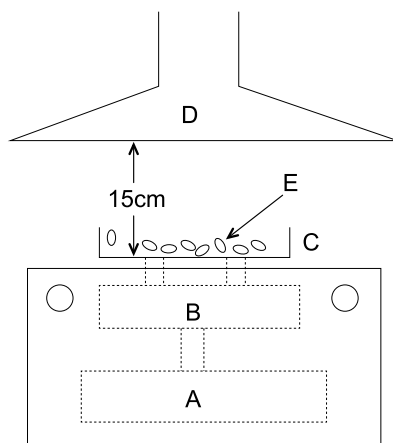


図3 ソフトエレクトロン照射装置。A: しんとう機、B: 振動機、C: プラスチックトレイ、D: 加速器のスキニングホーン、E: 試料(種子)

表1 貯穀害虫にソフトエレクトロンを照射した場合の生存数

種名	発育段階	供試個体数	生存個体数 a						
			照射時間 (min)						
			0	1	2	5	10	15	
コクヌストモドキ	卵	20	15 ^b	-	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	
	幼虫	20	19 ^c	0 ^c	0 ^c	0 ^c	0 ^c	0 ^c	
	蛹	15	13 ^c	0 ^c	0 ^c	0 ^c	0 ^c	0 ^c	
	成虫	20	19 ^d	19 ^d	19 ^d	16 ^d	0 ^d	0 ^d	
ノシメダラメイガ	卵	20	16 ^b	-	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	
	幼虫	20	5 ^c	-	0 ^c	0 ^c	0 ^c	0 ^c	
	蛹	10	9 ^c	-	0 ^c	0 ^c	0 ^c	0 ^c	
	成虫	10	9 ^d	9 ^d	7 ^d	3 ^d	3 ^d	0 ^d	
アズキゾウムシ	卵	15	12 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	
	幼虫	20	19 ^c	3 ^c	4 ^c	3 ^c	3 ^c	3 ^c	
	成虫	10	10 ^c	9 ^c	7 ^c	0 ^c	0 ^c	0 ^c	

^a 3 反復の平均, ^b 孵化幼虫数, ^c 出現成虫数, ^d 生存個体数, ^e 歩行能力のある個体数

果, 卵, 成虫に関しては効果的に殺虫できたが, 幼虫は照射時間に関わらず, 一定の割合が生存することが分かった。

ソフトエレクトロンは透過力が低く, 表面のみの処理であるために, 食品を外側から加害するタイプの害虫に対しては非常に効果的であるが, 粒状の食品の内部で発育するタイプの害虫は一部生存することが明らかになった。

3. ソフトエレクトロンに対する耐性ステージについて^{11, 12)}

アズキゾウムシの幼虫のように, 直接的に電子線を当てることのできないステージでは, ソフトエレクトロン処理で生き残るものがある可能性がある。そこで, アズキゾウムシとコクゾ

ウムシの異なる飼育期間の卵, 幼虫, 蛹にソフトエレクトロンを照射し, 産卵開始からの日齢と殺虫率の関係を調べた。

図4は産卵開始からの飼育期間が異なるアズキゾウムシ (アズキを餌として30℃で飼育) とコクゾウムシ (玄米を餌として25℃で飼育) にソフトエレクトロンを照射した場合の殺虫率である。アズキゾウムシの場合, 1～3日齢は卵の期間であり, アズキの表面にあるために完全に殺虫ができた。齢が大きくなるに従い, 殺虫率は低くなる傾向にあり, これは幼虫が豆に食入するにつれて電子線が到達しにくくなるためであると考えられる。19日齢は極端に出現率が高くなるが, この齢のものが既に蛹から成虫へと羽化しているものの豆の中でとどまっ

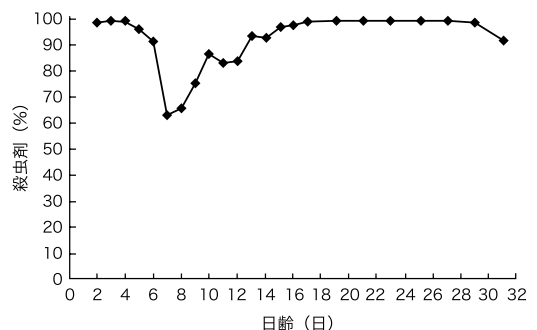
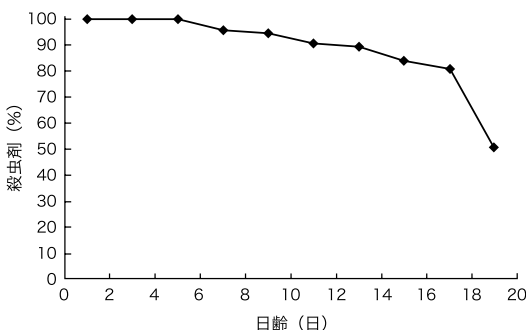


図4 アズキゾウムシ (a) とコクゾウムシ (b) の日齢とソフトエレクトロンによる殺虫率の関係

表2 ソフトエレクトロン処理とホスフィンくん蒸およびその組み合わせによるコクゾウムシの殺虫効果

発育段階	対照区	ソフト エレクトロン処理	ホスフィンくん蒸		ソフトエレクトロンと ホスフィンくん蒸の併用	
			0.5mg/L ^a	1.0mg/L	0.5mg/L	1.0mg/L
卵	87.7	3.7 (96) ^b	0.0 (100)	0.0 (100)	0.0 (100)	0.0 (100)
幼虫	318.3	100.7 (68)	0.0 (100)	0.0 (100)	0.0 (100)	0.0 (100)
蛹	119.7	4.7 (96)	82.0 (31)	50.3 (58)	1.3 (99)	0.7 (99)

^a ホスフィンの濃度, ^b 対照区と比べた減少率

ている状態であり、電子線によって即死しないために豆から脱出してくることによって考えられる。一方、コクゾウムシでは、4日齢までは卵の期間であり完全に殺虫ができたが、5～16日齢では殺虫率が低くなった。この期間のものは孵化直後の初齢幼虫から3齢幼虫であり、玄米粒の奥深くに食入していることがあるために電子線が到達しないことがあることによると考えられる。17～27日齢のものは完全に殺虫できたが、これは玄米粒の大きさに対して内部で発育するコクゾウムシが十分に大きくなるため、電子線が到達しやすくなるためであると考えられる。29, 31日齢では少し生存したが、これらの齢では既に羽化しているものの玄米粒の中でとどまっている状態のものを含み、電子線によって即死せずに玄米から脱出してくるものがあるためであると考えられる。

4. ソフトエレクトロンを利用した効果的な殺虫法の開発¹²⁾

ソフトエレクトロン処理は穀物を外側から食べるタイプの貯穀害虫に対しては非常に効果的であるが、内部を食べるタイプの貯穀害虫は一部生存することが明らかになった。その解決策として、ひとつには加速電圧を上げることが考えられ、これによってアズキゾウムシをアズキの発芽力を損なうことなく防除できることが明らかになっている¹¹⁾。ところで、穀物表面における電圧 60 keV のソフトエレクトロンで処理した玄米を精米度 90% で精米すると、脂質の酸化、炊飯の物理特性が無処理のものと差がないものの、穀物表面における電圧 75 keV 以上では無処理のものと比べて有意に脂質の酸化

が起こり、穀物表面における電圧 90 keV 以上では炊飯の物理特性にも影響が現れることが明らかになっている⁷⁾。したがって、玄米の場合、精米の品質の観点では照射するソフトエレクトロンの加速電圧は低いことが望ましい。よって、別の解決策として、玄米を加害するコクゾウムシに対してソフトエレクトロン照射とホスフィン（リン化水素）くん蒸と組み合わせることにより、殺虫効果の向上を目指した。

表2に対照区、ソフトエレクトロン処理、ホスフィンくん蒸および両方の処理を行った玄米から出現したコクゾウムシ成虫の数を示す。卵と蛹の大部分はソフトエレクトロン処理で殺虫できたが、幼虫はソフトエレクトロン処理では32%が生存した。これは第3章第2節で明らかになったように、コクゾウムシの幼虫は玄米の中心付近にいる場合があり、ソフトエレクトロンがこれらの幼虫まで到達しないことによる。一方、ホスフィンくん蒸では卵と幼虫を完全に殺虫できたが、蛹は50%以上が生存した。同属のココクゾウムシ、グラナリアコクゾウムシも含め、コクゾウムシ類の蛹は貯穀害虫の中でヒメアカカツオブシムシの休眠幼虫とともに特にホスフィンくん蒸に対する感受性が低いと報告されている^{13, 14)}。両方の処理を組み合わせると、卵と幼虫は完全に殺虫でき、蛹はごく少数が生存した。

おわりに

食品への放射線照射は、日本では馬鈴薯の芽止め目的のガンマ線照射のみが認められている。しかし、許可には至らなかったものの2000年に全日本スパイス協会がスパイス類に

対する殺菌目的での放射線照射の利用許可を厚生省に要請し、2006年には原子力委員会の専門部会がその利用を認めるべきだとする報告書をまとめた。今後、放射線の利用が拡大する可能性がある。また、電子線は加速電圧が1 MV以上のものが規制の対象であるため、加速電圧が300 kV以下であるソフトエレクトロンは法律によって規制されない。また、表面のみの処理であり中心の可食部には電子線が到達しないという利点があるので、種子、穀物の殺菌、殺虫目的での普及をはかるべきであろう。

ソフトエレクトロン処理は穀物を外部から食べる害虫に対しては非常に効果の高いことが明らかになった。また、内部で発育する害虫に関しては、発育ステージによってはソフトエレクトロン処理を行っても生き残ってしまうことが明らかになったが、加速電圧を上げたり、ホス

フィンくん蒸と組み合わせたりすることによって、殺虫率を改善できることが明らかになった。ソフトエレクトロンの利用によりくん蒸剤への依存を軽減できる可能性がある。ソフトエレクトロンによる殺虫を普及させるための課題としては、より効果的で穀物に対する負の影響のない加速電圧、線量や、他の手段との組み合わせの研究が必要であるとともに、実用型ソフトエレクトロン処理装置の処理量の改善が必要になると思われる。また、通常のくん蒸は極めて安価であり、装置導入の初期費用や装置のランニング、メンテナンスの費用が必要なソフトエレクトロン処理が価格の面でこれに対抗することは困難であると思われることから、処理装置の価格の改善とともにソフトエレクトロン処理の適用範囲の拡大などを考える必要があると思われる。

参考文献

1. 三井英三：食品害虫の食性。食糧，**11**: 85-110, 1968.
2. 吉田敏治，渡辺直，尊田望之：図説 貯蔵食品の害虫 ―実用的識別法から防除まで―。全国農林教育協会，東京。628 pp., 1989.
3. Anonymous: The Montreal Protocol on substrates that deplete the ozone layer (with amendments). United Nations Environment Programme, Nairobi, Kenya., 2000.
4. Anonymous: Database on approvals for irradiated foods. *Food Environ. Prot. Newslett.*, **9**: 27-59, 2006.
5. Hayashi, T.: Decontamination of dry food ingredients and seeds with soft-electrons (low energy electrons). *Food Sci. Technol. Int. Tokyo*, **4**: 114-120, 1998.
6. Hayashi, T., Takahashi, Y., Todoriki, S.: Low-energy electron effects on the sterility and viscosity of grains. *J. Food Sci.*, **62**: 858-860, 1997.
7. Hayashi, T., Okadome, H., Toyoshima, H. *et al.*: Rheological properties and lipid oxidation of rice decontaminated with low energy electrons. *J. Food Prot.*, **61**: 73-77, 1998.
8. Hayashi, T., Takahashi, Y., Todoriki, S.: Sterilization of foods with low-energy electrons “soft-electrons”. *Radiat. Phys. Chem.*, **52**: 73-76, 1998.
9. Todoriki, S., Hayashi, T.: Disinfection of seeds and sprout inhibition of potatoes with low energy electrons. *Radiat. Phys. Chem.*, **57**: 253-255, 2000.
10. Imamura, T., Todoriki, S., Sota, N. *et al.*: Effect of “soft-electron” (low energy electron) treatment on three stored product insect pests. *J. Stored Prod. Res.*, **40**: 169-177, 2004.
11. Reddy, P.V.R., Todoriki, S., Miyanoshta, *et al.*: Effect of soft electron treatment on adzuki bean weevil, *Callosobruchus chinensis* (L.) (Col., Bruchidae). *J. Appl. Entomol.*, **130**: 393-399, 2006.
12. Imamura, T., Todoriki, S., Miyanoshta, *et al.*: Efficacy of soft-electron (low-energy electron) treatment for disinfestation of brown rice containing different ages of the maize weevil, *Sitophilus zeamais* Motschulsky. *Radiat. Phys. Chem.*, **78**: 627-630, 2009.
13. Hole, B.D., Bell, C.H., Mills, K.A. *et al.*: The toxicity of phosphine to all developmental stages of thirteen species of stored product beetles. *J. Stored Prod. Res.*, **12**: 235-244, 1976.
14. 相馬幸博：「第2章 植物防疫法に基づく害虫侵入防止の実態 第3節 害虫の種類と消毒法」。輸入農産物の防虫・くん蒸ハンドブック，サイエンスフォーラム。東京。pp. 111-127, 1995.

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)

サフラン *Crocus sativus* L. (アヤメ科 Iridaceae)

北から冬の便りが届き、木枯らしが吹き始める頃、山里を歩いていると、民家の畑で淡い紫色をした可憐な花を見かけます。これがサフランです。サフランはヨーロッパ南部、小アジア原産の多年生草本で、ヨーロッパでは 3000 年以上も前から栽培されていたそうです。おそらく原種の *Crocus cartwrightianus* から選別が行われ、*C. sativus* へ品種改良されたものと考えられます。雌しべは紀元前から世界各地で香辛料・染料・香料・薬用として利用され、古代ギリシアではサフランの黄色を珍重し、王族だけが使うことを許されるロイヤルカラーとされた時代もあり、日本へは江戸時代に伝えられました。その後、明治 19 年に本格的に球根が輸入され、神奈川県で栽培が始め

られた後、大分県竹田市へ伝わり、現在、日本国内の約 8～9 割が竹田市で生産されています。球根は直径約 3cm、平行した繊維からなる被膜が冠状に付き、下部にひげ根があります。葉は多数^{そうせい}叢生し、狭線形、灰緑色、主脈は白色で、花後、長く伸び長さ 30～45cm にもなります。花は 11 月、短い新葉の間に 1～3 個生じ、薄紫色で甘い香りを放ちます。花冠は筒状で 6 深裂、雄しべは黄色で 3 本、雌しべの花柱は濃紅色、上部で 3 本に分かれ、垂下し、先端（柱頭部）はややラッパ状に広がり乳頭状突起があります。柱頭を摘み



写真1 サフラン（花）



写真2 クロッカス（花）



写真3 イヌサフラン（花）



写真4 サフラン（球根）



写真5 サフラン（生薬、雌しべ）

集め、陰干しするか、低温で火力乾燥したものをサフラン（^{ばんこうか}番紅花, Crocus）といい、鎮静、鎮痛、通経作用があるとして婦人病や不定愁訴、食品の着色料などに使われます。食品としてはパエリアやブイヤベースなどと用途が広く、レシピの数は1000を超えともいわれ、世界一高価な香辛料としても知られています。サフランティーといって、サフランの雌しべ一つまみを熱湯に注ぎ5分ほど置いてから飲むと気分が和らぎ、香辛料としても使えます。ただし、妊婦の方は使用しない方がよいとのこと。成分としては、カロテノイド（黄色色素）の crocin (crocetin digentiobiose

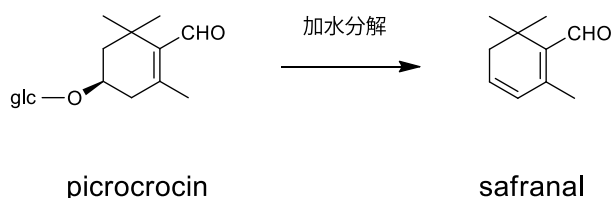
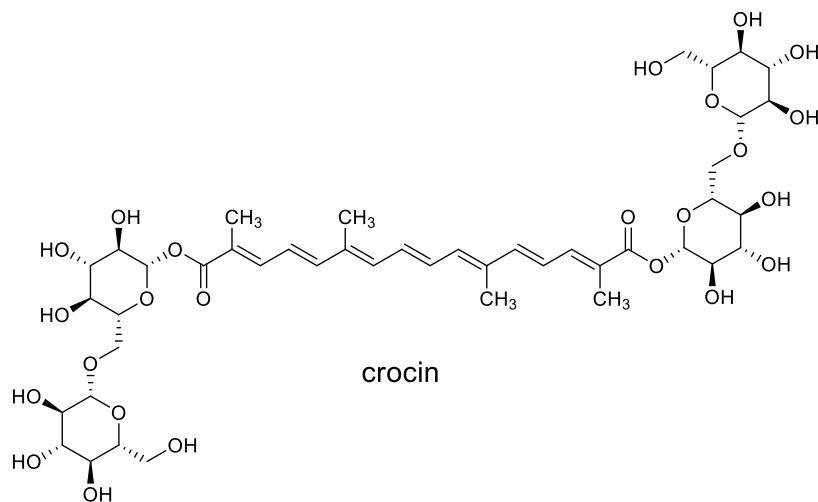


図1 成分の構造式

ester) やモノテルペン配糖体（苦味成分）の picrocrocin, 精油の safranal などが報告されています。日本市場の大部分はスペインからの輸入品で年間、約 2 トンが輸入され、国内では熊本、鳥取、大分の各県で生産され、近年、埼玉県鶴ヶ島市でも生産されています。

サフランの栽培については 12 月から 4 月の間は畑で球根を育てますが、その他の期間は室内に保管し、11 月、暗室で開花させます。11 月上旬、開花は一斉に始まります。花が咲くと、まず花を摘み、その後、赤く垂れ下がる雌しべの摘み取りを行います。この作業がサフランの収穫では最も重要です。摘んだ雌しべは直ちに乾燥させます。開花後の球根は 11 月下旬～12 月上旬、畑に植え付けます。国内主産地の大分県竹田市では、稲刈りの終わった水田に球根を植えるそうです。翌年、5 月、新緑を迎え、葉が枯れ始める頃、日本では梅雨のため、植えたままにしていると病気で球根が腐ってしまいますので球根を地中から掘り上げ、秋になるまで保管し 9 月中旬に再び暗い室内（開花室）に入れ、11 月の開花を待ちます。

園芸屋さんでは、特に春、花の咲くのを“クロッカス”，秋、咲くのを“サフラン”と呼び、区別していますが、植物種としてはどちらも同じ *C. sativus* です。しかし、花の造りはやや異なり、クロッカスの雌しべはサフランのように長く、赤くありません。また、名前も見た目も良く似ているイヌサフラン *Colchicum autumnale* は、ユリ科に属し球茎などにアルカロイドの colchicine を含み、colchicine は抗痛風薬としては有用ですが、本植物は有毒なので要注意です。

骨代謝研究の第一人者の渾身の一冊

好評発売中



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

■A5 版

■定価：(本体 3,000 円 + 税)

■発行：食品資材研究会

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

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

■著者／山口 正義（やまぐち まさよし）

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

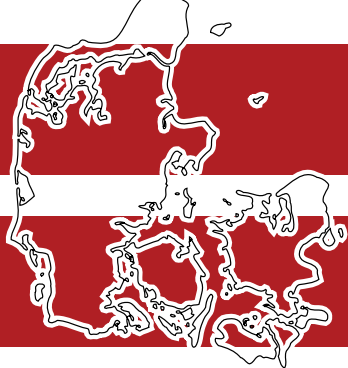
お申し込み・お問い合わせは、
FAX・お電話・WEBにて

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

株式会社 食品資材研究会
〒101-0038
東京都千代田区神田美倉町10（喜助新神田ビル3F）

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



デンマークの米

今回はデンマークのお米にまつわる話を紹介したいと思います。

デンマークの主食といえば、まずは、じゃがいもです。デンマークの伝統的な食卓には、豚肉などの肉料理に、ジャガイモが主食として並ぶ、というのが一般的です。ジャガイモと言っても、小さなじゃがいもを煮たものや、マッシュポテトにしたもの、オーブンで大きなじゃがいもをまるごと料理したバークトポテトなど、さまざまです。しかしデンマークでも食卓の多文化化はすすんでおり、米も多くのデンマーク人の食卓で使われる食材となっています。もちろん、じゃがいもや、パン、パスタなどに比べると、まだまだその普及率は低いですが、珍しい食材ではないことは確かです。

どのような場面でお米が登場するかというと、デンマークで流行っている寿司がデンマーク人に親しまれていることはもちろんですが、タイ料理やインド料理などもデンマーク人に人気があり、タイカレーを自宅で作る家庭も珍しくなく、そういったアジア料理にお米は登場します。一方で、デンマーク料理にもお米を主食として使うことがあり、たとえば Boller i Karrysovs は、カレーソースのミートボール、という意味のデンマーク料理ですが、ミートボールがカレー味のソースに入っている料理で（日本のカレーとはかなりちがう味で、タマネギとリンゴ、カレーパウダーで煮たトロツとしたソース）、この料理は必ずといっていいほど、お米をあわせて食べます。また、grødris（プティングライス）というお粥のようなものにするための米を使った料理、Risengrød（ライスプティング）もデンマークでは、特にクリスマス時期には必ず見かける料理です。この料理は、プティングライスを牛乳で煮たもので、バターやシナモンなどをかけて食べます。牛乳で煮てあるので、甘



プティングライスはおかゆ状にして食べたり、クリスマスイブのデザートにしたりする。



クリスマスイブのデザートにかかせない、risalamande。アーモンドがまるまるあったらプレゼントをもらえる。



スーパーの米売り場。小さなパッケージの商品が主流。



ブラックライスやブラウンライス。サラダにつかうこともできるさらさらした食感。

いお粥といった感じの料理です。特にクリスマスには、この料理を、サンタクロースの使いの者達が食べるために、屋根裏部屋に置いておく、という習慣があります。また、クリスマス料理を締めくくるデザート定番、risalamande にもこのプティングライスが使われています。クリスマスイブの夜には必ず食べる料理で、牛乳で煮たお米とホイップクリーム、アーモンドを混ぜ、さくらんぼソースで食べます。アーモンドは、みじん切りにしたもの混ぜるのですが、一つだけ丸いままのアーモンドを混ぜ入れます。それをみんなで小分けにして食べるのですが、丸いままのアーモンドが入っていた人が、プレゼントをもらえる、というちょっとしたゲームがクリスマスイブに行われるため、子供達が大好きなデザートでもあります。

では次に、どのような米が流通しているかについてですが、スーパーにいった、お米を買おうとすると、パッケージされているお米の量がとても少ないことに気がきます。5 キロや 10 キロになっている米は通常のスーパーではまず見かけません。500 グラムくらい、またはそれよりもさらに小さな単位でパックされているお米が多く、お米は家に常備してある主食ではなく、必要な時に買う食材であるようです。また、流通しているお米は、ジャスミンライスやバスマティライスなど、タ

イ米のような長細いものが主です。その中には、玄米のジャスミンライスがあったり、ワイルドライスと言われる、雑穀米になっているものなど、選択肢がいくつかあります。これらの米はカレーやソース料理に合う米で、ぱさぱさした食感の米なので、おにぎりや巻き寿司には使えません。そのため、日本米のようなもっちりしたお米を買いたい時には、SUSHI ライスと言われるお米を買うことになります。これは SUSHI を作る時に買う米として流通している商品で、とても小さいパックになって売られています。その他には、先ほど紹介したプティングライスや、リゾット用の米が通常のスーパーの棚に陳列されています。

さて、お米を買って、家で炊く場合ですが、デンマークのキッチンで炊飯器を見かけることはあまりありません。炊飯器は売ってはいますが、日本のようにいろいろな機能のついた美味しく炊ける炊飯器は流通しておらず、お米は、必要なときに買って、お鍋に水を入れて炊くのが普通です。

近年、日本では、日本米の海外輸出を増やそうという動きがありますが、それが近い将来、デンマークの米市場に少しいろどりを加えることになる？かもしれません。



500g 入りの寿司ライス（日本米のようにもっちりとしているのでおにぎりや巻き寿司に使える）

ポビドンヨード液を基準にした OTC の口臭・口腔内細菌・口腔細胞に与える影響の検討

Investigation of the effect of OTC on the halitosis, oral bacterial and oral cells, based on Povidone Iodine Solution used as reference drug

小島 百代 (KOJIMA Momoyo)¹ 坂上 宏 (SAKAGAMI Hiroshi)²

¹ 明海大学歯学部, ² 明海大学歯科医学総合研究所 (M-RIO)

Key Words : ポビドンヨード液 OTC 口臭 口腔内細菌 口腔細胞

Abstract

In order to evaluate the ability of "over-the-counter" (OTC) drugs (that are sold at the drug store) to improve the oral function, it is necessary to include an appropriate reference drug, and then measure the relative potency of OTC to it. However, most of previous studies have not considered this point.

Povidone Iodine Solution (abbreviated as PI) (Third-class OTC drugs) having potent antibacterial and antiviral activity, are popular and therefore is a potential candidate of such reference drug. We propose that if anti-halitosis, anti-bacterial and cytotoxic activity of PI is quantifiable, efficacy of other OTC drugs can also be evaluated. Halitosis, bacterial number and viable cell number were measured by volatile sulfur compound (VSC) concentration, bacterial counter and MTT method, respectively.

PI showed potent cytotoxicity against various normal oral cells. Since the cytotoxicity of PI declined with increasing concentrations of fetal bovine serum, non-specific binding of PI to serum proteins was suggested. Gargling with PI reduced the bacterial number more markedly in the buccal mucosa, as compared with tongue. PI alone did not produce VSC, but gargling with PI produced extremely higher level of VSC. PI may have caused some biological reaction, by yet unexplained mechanism.

Therapeutic index (=safety margin), defined as the ratio of CC_{50} (a concentration that reduces the viability of oral keratinocyte by 50%) to IC_{50} (a concentration that reduces the bacterial number in the buccal mucosal membrane by 50%), may be useful to quantitatively evaluate the ability of OTC drug to improve the oral function.

要 旨

薬局で販売されている OTC (over-the-counter) 医薬品の口腔機能改善効果を判断するためには、適切な基準薬を選択し、基準薬との相対的な強さを測定することが必要であるが、これまでの研究ではこの点の配慮がなされていなかった。

第 3 類薬品に属するポビドンヨード液 (以下 PI と略) は、高い抗菌性と抗ウイルス性を有するため、多くの人が使用しており、基準薬として妥当である。PI の口臭予防効果、抗菌効果および細胞傷害性を定量化できれば OTC の効果を客観的に測定できるという仮説を立てた。口臭、口腔内細菌数、細胞傷害性は、それぞれ、揮発性イオウ化合物 (VSC) の濃度、細菌測定機、MTT 法により測定した。

PI は強力な細胞傷害活性を示した。PI の傷害性は血清の存在で弱くなることから、非特異的にタンパク質に結合することが示唆された。PI の含漱により、頬粘膜における細菌数は、舌表面の細菌数と比較して、より顕著に減少した。PI 単体では VSC 値を高めることはないが、PI で含漱すると、瞬間的に高い VSC 値を示した。PI が何らかの生体反応を引き起こす可能性が考えられた。

ヒト口腔粘膜ケラチノサイトに対する CC_{50} と、頬粘膜の細菌数を 50% 減少させる濃度 (IC_{50}) との比から計算される化学療法係数は、OTC 薬の口腔機能改善効果への定量に有用であると思われる。

はじめに

OTC 医薬品（一般医薬品）とは、薬局・薬店・ドラッグストアなどで販売されている医薬品である。OTC の口腔機能改善効果を判断するためには、適切な基準薬を選択し、その基準薬と比較検討することにより、効果を定量的に評価することが必要である。しかしながらこれまでの研究ではこの点の配慮がなされていなかった。

ポビドンヨード液（以下 PI と略）は OTC の第 3 類医薬品に属するうがい薬であり、高い抗菌性¹⁻³⁾と抗ウイルス性^{4,6)}を有することが報告されている。また、多くの人が使用していることから、基準薬として妥当である。PI の口臭予防効果、抗菌効果、および細胞傷害性を定量化できれば薬局で販売されている OTC の効果を客観的に測定できるのではないかと考えて、学内倫理委員会のガイドラインに従い、本研究を始めることになった。本研究内容は、筆頭著者の小島が平成 29 年度スチューデント・クリニシャン・リサーチ・プログラム (SCRП) 日本代表選抜大会（於：歯科医師会館、開催日：8 月 18 日（金））にて発表した内容を加筆・訂正したものである。

1. 舌表面・頬粘膜の細菌数に及ぼす PI の効果

まず、口腔内で細菌が最も多く存在するとされる舌表面の菌数の日内変動を調べた。途中、細菌数の減少を引き起こす間食を摂らず、飲水により喉の渇きを防止した。朝食をとり、歯磨きをした後、朝 9:00 より夕方 16:30 まで 90 分毎に、舌表面を綿棒で擦り取り、溶液の入ったカップの中に入れ、細菌数測定機にかけた。その結果、間食を摂らない場合は、細菌数は、

少なくとも 7 時間、直線的に増加することが確認できた（図 1）。

毎日の学生生活の支障をきたさないように、朝の 8:30 に水あるいは PI による含漱、4 時間後（12:30、昼食前）に舌表面および頬粘膜の細菌数の測定といった短縮したタイムスケジュールで実験を行った。PI で含漱することにより被験者 1（65 歳男性）、被験者 2（21 歳女性）いずれも、舌表面の細菌数が若干減少した（図 2A）。頬粘膜の菌数は、舌表面の 1/2 ～

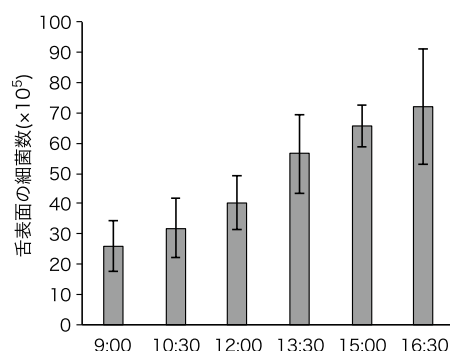


図 1 被験者 2 における舌表面の細菌数の経時変化、各点は、平均値 ± S.D. (n=3) を示す。

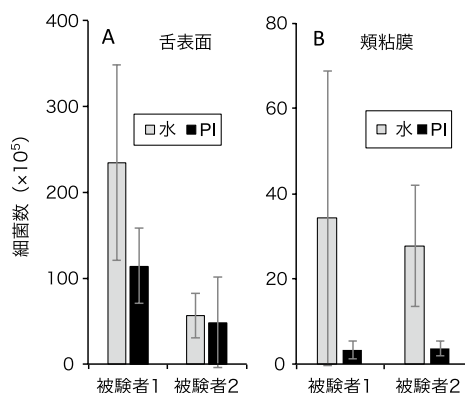


図 2 PI の舌表面 (A) および頬粘膜 (B) の菌数に及ぼす効果。各値は、平均値 ± S.D. (n=5)。

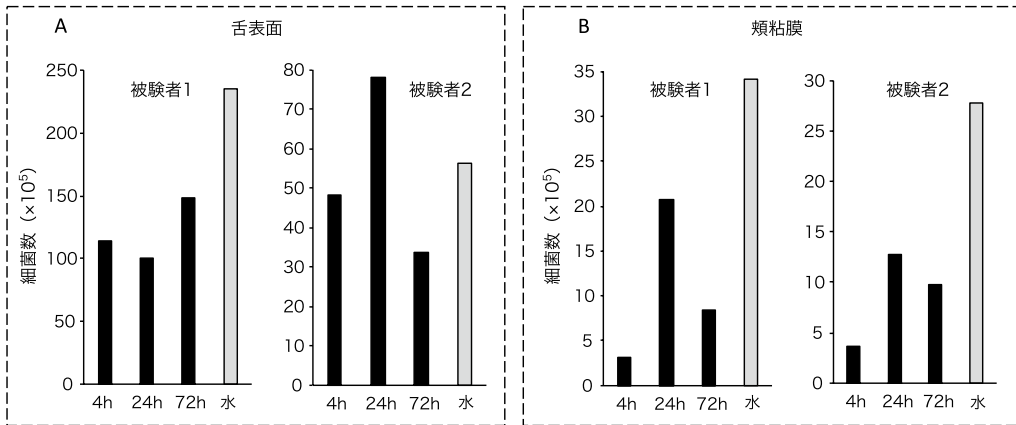


図3 PIによる含嗽を中止後の舌表面菌数の経時変化。

1/7 程度であった。PI の含嗽により、舌表面の細菌数は、約半分まで減少した。これに対して、頬粘膜の細菌数は、10% まで低下することが明らかになった (図 2B)。

次に、PI の細菌減少効果がどの位持続できるかを検討した。PI の含嗽を中止すると、4, 24, 72 h と時間が経過するにつれて、舌表面の細菌数は、初期値に戻っていった。この結果は、PI の抗菌作用は可逆的であることを示す (図 3)。PI による含嗽は続けることが必要である。

2. 口腔細胞に対する PI の傷害性と結合

ヒト歯肉線維芽細胞 (HGF) とヒト歯根膜線維芽細胞 (HPLF) は 10% 牛胎児血清 (FBS) を含む DMEM 培地、ヒト歯肉上皮前駆細胞 (HGEP) とヒト口腔粘膜ケラチノサイト (HOK)

は、増殖因子を含む特殊培地で培養した。細胞を 96 穴プレートにまき、2 日後に 0, 1, 5 あるいは 25% の FBS を含むリン酸緩衝液 (PBS) 中に置換し、様々な濃度の PI を加え、0.5 ~ 5 分間インキュベートし、新鮮培地に置換し、48 時間インキュベート後生細胞数を MTT 法により測定した。すなわち、培養液を除去し、0.2% の MTT を含む培養液と 2 時間インキュベートし、DMSO に溶かし、560 nm の吸光度をプレートリーダーで測定した。

PI の傷害性の発現は分単位で見られた。PI と僅か 1 分接触するだけで、PI のヒト歯肉線維芽細胞 (HGF) (A)、ヒト歯肉上皮前駆細胞 (HGEP) (B) に対する強い細胞傷害活性が発現した。接触時間を 5 分間にまで延ばしても傷害性の程度は殆ど変わらなかった (図 4)。

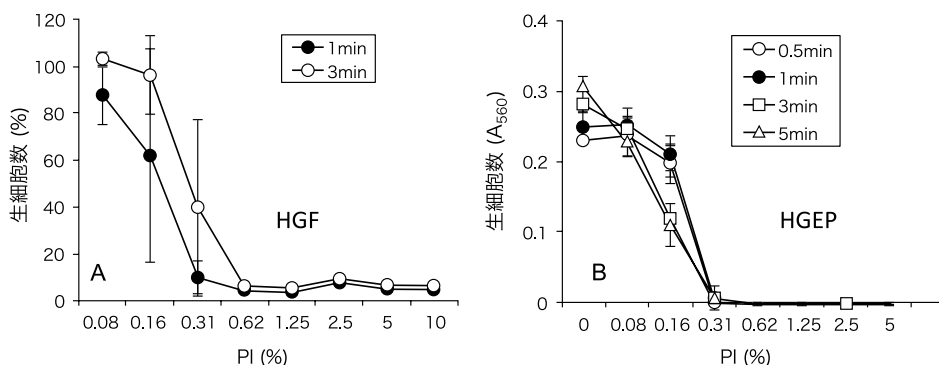


図4 血清無添加の PBS (—) 中では、1 分間の PI との接触により細胞死が誘導される。各点は、平均値 $\pm$ S.D. (n=3) を示す。A₅₆₀, 560nm における吸光度

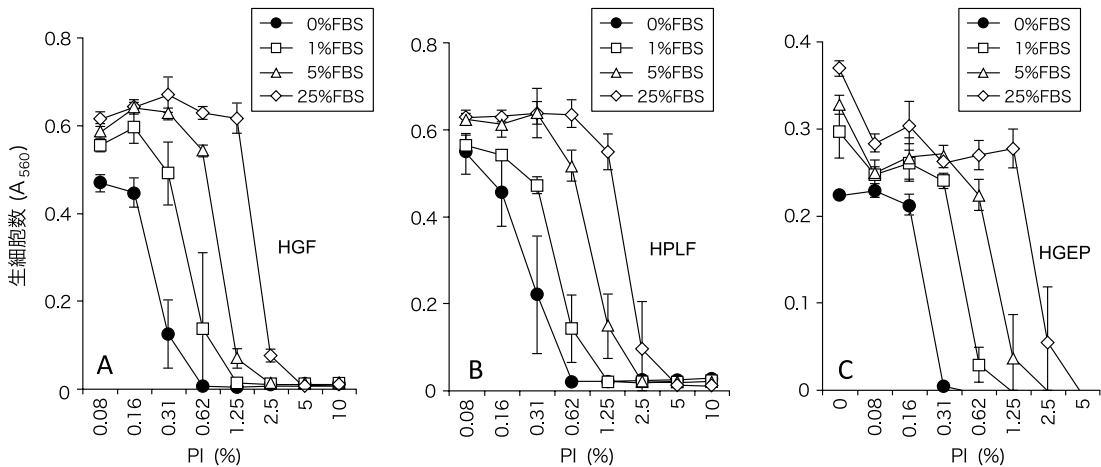


図 5 PI のヒト歯肉線維芽細胞 (HGF)(A)、歯根膜線維芽細胞 (HPLF)(B)、歯肉上皮前駆細胞 (HGEF)(C) に対する細胞傷害活性は血清により阻害される。各点は、平均値±S.D. (n=3) を示す。

表 1 PI の口腔粘膜細胞および口腔組織への結合量 各値は、4 点の平均値を示す

実験 1 (培養細胞)			実験 2 (臨床試験)					
HOK 細胞			被験者 1			被験者 2		
添加した PI	結合した PI	結合率	添加した PI	結合した PI	結合率	添加した PI	結合した PI	結合率
(mg)	(mg)	(%)	(mg)	(mg)	(%)	(mg)	(mg)	(%)
0.46	0.35	76	14	11.3	81	14	9.3	66
0.92	0.39	42	42	17.1	41	42	21.2	50
1.37	0.35	26	140	12.9	9	140	18.2	13
1.82	0.45	25						

培養細胞の増殖を維持するためには、DMEM 培地に、栄養因子を多量含む胎児牛血清 (FBS) を 10% 程添加する必要がある。血清が存在すると、PI の細胞傷害活性が濃度依存的に抑制された (図 5)。

被験者 1 および被験者 2 の唾液中には、それぞれ、2.2 mg/mL (FBS の 1.7%)、6.5 mg/mL (FBS の 4.9%) のタンパク質が含まれているので、多少、PI の作用が減弱されると思われる。また、これらの結果は、PI は口腔粘膜細胞に瞬間的に結合する可能性を示唆する。

そこで、添加した PI の何 % 位が口腔組織に結合するかを、405 nm の吸光度を指標として検討した。15 × 10⁴ 個のヒト口腔粘膜上皮細胞 (HOK) に、0.46 mg の PI を添加すると、1 分後には、0.35 mg、すなわち、76% が結合した。添加する量を 1.82mg まで増やしても、結合す

る量は殆ど増加しなかった (実験 1, 表 1)。また、14 mg の PI を 1 分含嗽すると、9.3 ~ 11.3 mg、すなわち、66 ~ 88% 結合した。その量を、通常使用する 140 mg まで増やしても、極めて僅かしか増加しなかった (実験 2, 表 1)。この結果は、PI での含嗽は 1 分で十分であり、また、含嗽に使用する量を、推奨する量の 1/3 に減らせることを示している。

3. OTC 薬の安全域による評価

薬物の効果は、薬効と毒性の比率により求められる。今回の場合は、頬粘膜の細菌数を 50% 低下させる濃度 (IC₅₀) ができるだけ小さく、口腔正常細胞の生存率を 50% 低下させる濃度 (CC₅₀) ができるだけ大きいほど、安全であることになる。すなわち、選択係数 (SI) (=CC₅₀/IC₅₀) が大きいほど安全であることになる。今

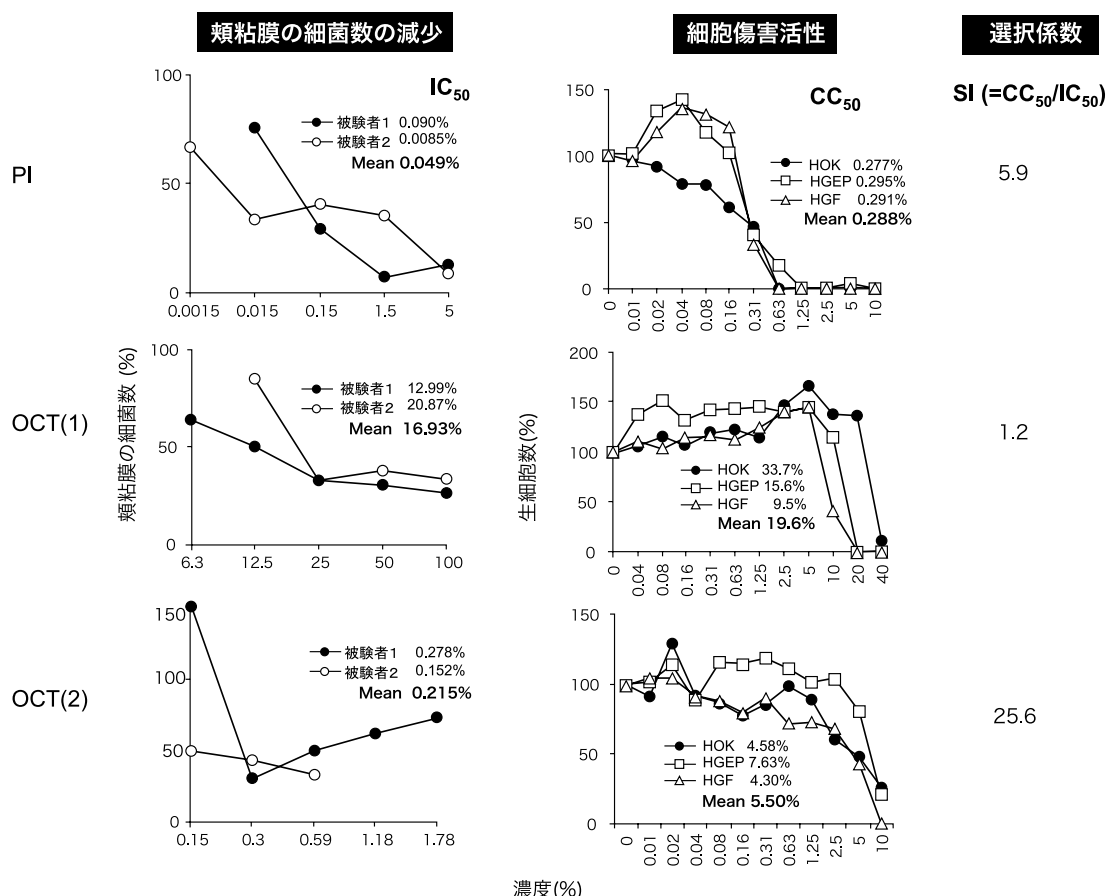


図6 各種 OTC の安全域の測定. 頬粘膜の細菌数は細菌カウンターで, ヒト口腔粘膜ケラチノサイト (HOK), ヒト歯肉上皮前駆細胞 (HGEP), 歯肉線維芽細胞 (HGF) の生存率は, MTT 法で求めた。

回の3種のヒト口腔正常細胞, すなわち, ヒト口腔粘膜ケラチノサイト (HOK), ヒト歯肉上皮前駆細胞 (HGEP), 歯肉線維芽細胞 (HGF) を用いた予試験では, PI は SI 値=5.9 を与えた。これに対して, 植物抽出液である OTC (1) と洗口液の OTC (2) は, それぞれ, 1.2, 25.6 を与えた (図6)。

4. PI の口臭に及ぼす影響

口臭の原因物質は, 硫化水素や, 歯周病菌が産生するメチルメルカプタン, ジメチルスルフィドなどの揮発性硫黄化合物 (Volatile sulfur compounds, VSC) である。その 60% が「舌苔 (ぜったい)」より生産されていると言われてい。そこで, 通常通り, 8:30 に PI (20 倍希

釈) で1分間含嗽, 4時間後 (12:30) に, VSC の濃度を測定したところ, PI による含嗽は, VSC を下げず, むしろ増加させることが判明した (図7)。この以外な実験事実は, 再現性

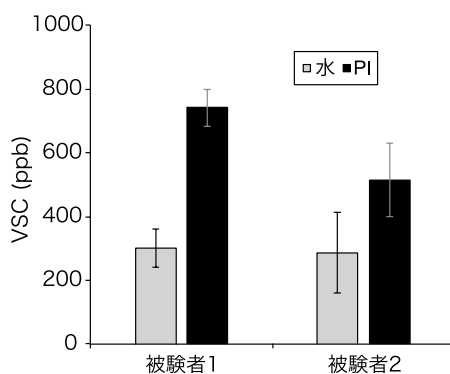


図7 PI による含嗽は, VSC 値を上昇させた。

良く確認された。すなわち、PI の顕著な口腔内細菌数減少効果とは、対照的に、PI は VSC 値を増加させることが発見された。

まとめ

PI は、予想通り、頬粘膜の細菌数を著しく減少させたが、VSC 値を上げたことは思わぬ発見であった。何故、PI による含嗽は、VSC を上昇させるのだろうか？ PI から遊離されるヨードによるものだろうか？ しかし、PI 単体の VSC 値は 168 ppb と低いのでこの可能性は低い。次に、PI を含嗽した直後では 2895 ppb と高い VSC 値を与えたので、生体を介する反応の結果であると思われる。PI 含嗽により舌

の深部に潜んでいた細菌が露出したためか、PI から遊離したヨウ素によるミエロペルオキシダーゼ陽性細胞の活性化によるものか、あるいは、それ以外のメカニズムによるものか不明である、この現象の解明は、PI の利用法の改善にもつながると思われる。

PI は強力な細胞傷害活性を示した。PI の傷害性は血清の存在で弱くなることから、PI はタンパク質と非特異的に結合することが示唆された。ヒト口腔粘膜ケラチノサイトに対する CC_{50} と、頬粘膜の細菌数を 50% 減少させる濃度 (IC_{50}) との比から計算される化学療法係数は、OTC 薬の口腔機能改善効果への定量に有用であると思われる。

参考文献

1. 国定孝夫ら：基礎と臨床 **28**(9): 2797, 1994.
2. 常葉信雄ら：歯界展望 **22**(3): 382, 1963.
3. Yoneyama A *et al.*: *Dermatology* **212** (Suppl.1): 103, 2006.
4. 川名林治ら：臨床とウイルス **26**(5): 371, 1998.
5. 伊藤啓史ら：日本化学療法学会雑誌 **57**(6): 508, 2009.
6. Matsuhira T, *et al.*: *Exp. Anim* **61**(1): 35, 2012.

連絡先

坂上宏：明海大学歯科医学総合研究所 (M-RIO)

e-mail:sakagami@dent.meikai.ac.jp

<http://www.meikai.ac.jp/dent/m-rio.html>

〒350-0283 埼玉県坂戸市けやき台 1-1

機能性物質の養魚用飼料への添加効果ー 1. ブロメライン，グルタチオン

酒本 秀一 (SAKAMOTO Shuichi)

Key Words : 養魚用飼料 機能性物質 ブロメライン 水溶性窒素量 グルタチオン 飼育成績
魚体蓄積脂質量 肝臓機能

最近では機能性物質という言葉をよく見聞きするが、機能性物質とはどのような物質であろうか。ヒトの食品では保健機能食品制度が制定されて以来可也整理されて来ており、特定保健用食品や栄養機能食品がその代表的な物である。食品には第一次機能（栄養素としての働き）、第二次機能（人間の五感に訴える働き）、第三次機能（人間の健康，身体能力，心理状態などに好ましい影響を与える働き）が有るが、主に第三次機能を発現出来る食品を一般に機能性食品と呼んでいる。従って、機能性物質とは必須栄養素には含まれないが、その生体調節機能によって健康維持や病気予防等にプラスの効果を有する物といえるであろう。

魚の食べ物である養魚用飼料ではこのような整理は全くなされていない。よって本報告では、機能性物質とはタンパク質，脂質，炭水化物，無機質，ビタミンの五大必須栄養素には含まれず、必ずしも必要な物ではないが、摂取することによって何らかのプラス効果を発揮する物質で、薬剤以外の物と規定する。魚にとってのプラス効果は当然であるが、養殖は事業であるので、事業者にとってのプラス効果も含むことにする。また、魚は水中に生息するので、何らかの物質を飼育水に溶解することによって魚に取り込ませることも有り得るのであるが、経口摂取する物に限ることにする。

第一報ではブロメラインとグルタチオンについて説明する。

ブロメライン

ブロメラインとはパイナップルに含まれるタンパク質分解酵素で、システインプロテアーゼに分類される酵素である。最近では、タンパク質の分解能や炎症抑制効果を利用して消化吸収促進剤や抗炎症剤としてサプリメントに利用されている様である。

1. 材料と方法

1-1. 供試酵素剤

日本シイベルヘグナー社より入手したブロメラインで、説明書によるとタンパク質分解酵素としての至適温度は 50 ～ 60℃（40 ～ 65℃で有効），至適 pH は 4.5 ～ 5.0（4.0 ～ 5.2 で有効），成分含量は水分 10 ～ 12%，タンパク質 4 ～ 6%，脂質 1 ～ 2%，灰分 3 ～ 5%，炭水化物 70 ～ 75%，繊維 10 ～ 12% とのことである。

1-2. 試験飼料

A-E の 5 試験区を設定した。それぞれの飼料の組成と分析値を表 1 に示す。各飼料の基本配合は魚粉 50%，小麦粉 25%，魚油 20%，ビタミン・ミネラル混合 5% より成っている。ブロメラインの添加量は外割で 0, 0.05, 0.1, 0.25

表 1 試験飼料の組成と分析値

試験区	A	B	C	D	E
基本配合 *	100	100	100	100	100
プロメライン	0	0.05	0.1	0.25	0.5
水分 (%)	22.2	21.1	22.4	21.7	22.3
タンパク質	30.7	31.6	30.6	31.0	29.5
脂質	19.9	22.2	19.9	20.3	19.9
灰分	8.63	8.71	8.53	8.61	8.46
炭水化物	22.1	20.0	18.7	20.7	17.7
水溶性 N (%)	0.31	0.43	0.45	0.59	0.62
水溶性 N/ 全 N (%)	6.32	8.50	9.19	11.9	13.1
Cal/100g	346	366	339	349	332
C/P 比	11.3	11.6	11.1	11.2	11.3

* 魚粉 50, 小麦粉 25, 魚油 20, ビタミン・ミネラル混合 5%。

および 0.5% の 5 段階とした。

酵素が作用するには水の存在が必須なので、飼料はシングルモイストペレット（粉末飼料に油と水を添加して混練し、成型した飼料。以下 MP と略記する。）とした。製造法は以下の通りである。油以外の原料を混合して粉碎する。これに油と水を加えて混練する。この時に小型のミートチョッパーで成型するのに適切な物性になるように水の添加量を調整する。プロメラインの添加量が 0.5% 以下であれば水の添加量を調整する必要は無かったので、各飼料共水の添加量は同じであった。ミートチョッパーの内刃を取り除いて皿を選択し、直径が約 2mm のヌードル状に押し出し成型する。魚が食べられる程度の長さに切り、試験用 MP 飼料とする。製造後直ちに -20℃ の冷凍庫に移し、給餌するまで凍結保存した。給餌前日の夕方に一日の必要量を冷蔵庫に移して解凍し、魚に与えた。

ミートチョッパーでの成型時に摩擦によって多少温度が上昇したが、ミートチョッパーの外側を手で触ると多少暖かくなっているのが分かる程度であった。

それぞれの飼料の分析値では、水分、タンパク質、脂質、炭水化物、灰分、カロリー、カロリー/タンパク質比（C/P 比）に B 区以外殆ど違いは無かった。B 区は原因は不明であるが、他区より脂質が多かったので、カロリー含量と C/P 比が高い値を示した。なお、カロリーはタ

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

水溶性窒素量と全窒素中に占める水溶性窒素の割合はプロメラインの添加量が多い区ほど高い値を示した。

1-3. 飼育試験

供試魚には受精卵からタマミジンコを用いて種苗生産した後市販の配合飼料を与えて飼育したマゴイを用いた。60L 容角型透明プラスチック水槽に平均体重 18.8g の魚を各区 35 尾ずつ収容し、4 月 4 日から 5 月 2 日まで約 1 ヶ月間飼育した。水温は 20℃ で、給餌は日に数回各区同じ量をゆっくりと与え、残餌が出ないように注意した。

1-4. 測定項目

飼育試験開始時と終了時に各区の尾数と総体重を測定し、生残率と増重量を求めた。給餌量と増重量から飼料効率（増重量×100/給餌量）、飼料の水分含量の影響を除くために乾物飼料効率（増重量×100/乾物給餌量）およびタンパク質効率（増重量×100/給与タンパク質量）を求めた。また、水溶性窒素とカロリーの給与量を計算し、乾物飼料効率およびタンパク質効率との関係を調べた。

本試験では人手の問題も有って飼育試験開始時と終了時の魚体測定や解剖検査、魚体や血液成分の分析は行わなかった。

2. 結果

2-1. プロメラインの飼料タンパク質分解作用

プロメラインの添加量と MP の水溶性窒素量の関係を図 1 に、全窒素中に占める水溶性窒素の割合を図 2 に示す。

プロメラインの添加量が増えるに従って水溶性窒素の量も増えている。プロメラインのタンパク質含量が 6% で全てが水溶性であると仮定すると、プロメラインの飼料への添加量が 0.5% であれば水溶性窒素量は計算上 $0.5 \times 0.06/6.25=0.0048\%$ 増えることになるが、問題

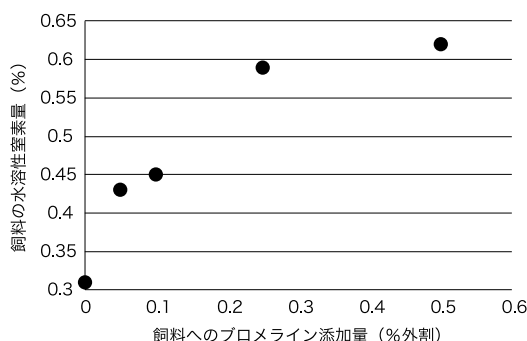


図1 飼料へのプロメライン添加量と飼料の水溶性窒素量

になる数値ではない。プロメラインの添加量が多くなるに従って水溶性窒素の量が増えていること、プロメライン自体に含まれる水溶性窒素量より遥かに多く水溶性窒素が増えていること等からプロメラインの添加によって飼料原料のタンパク質が分解されて分子量が小さくなり、水溶性になったことが分かる。また、全窒素中の水溶性窒素の比率から、タンパク質の約7%程度 ($13.1-6.31=6.78$) がプロメラインによって分解され、水溶性になったものと思われる。

以上の結果から、プロメラインのタンパク質分解作用はMP製造時にも発揮されることが明らかである。

図1の飼料へのプロメラインの添加量と飼料の水溶性窒素量との関係から、プロメラインの添加量は本試験の条件下では0.25%で十分と思われる。それ以上の量添加しても水溶性窒素の量は殆ど増えていないので、無駄である。但し、MP製造時の温度条件や加熱時間が異なればプロメラインの至適添加量は変化するのではないかとと思われるので、それぞれの製造条件下での至適添加量を明らかにしておく必要が有る。

ミートチョッパーによるMP成型時の摩擦熱によって短時間多少温度が上昇していた(40℃には達していなかったと思われる)が、この工程以外で温度が高くなることは無い。このような条件下でもプロメラインの添加によってタンパク質の分解は起こっていたので、作用の強弱

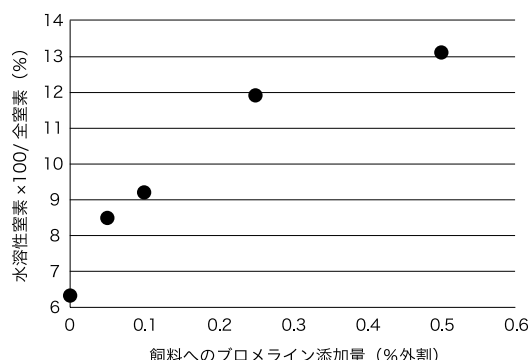


図2 飼料へのプロメライン添加量と全窒素中水溶性窒素の割合

は有るにしても、40℃以下の温度でもプロメラインは作用していたものと思われる。

2-2. 飼育成績

飼育試験の結果を表2に示す。飼育期間中各区の魚の行動や外観に異常は認められなかった。また、生残率は各区共100%で区間差は無かった。プロメラインの添加量と飼料効率、乾物飼料効率の間には明確な相関は無かったが、図3に示す様にプロメラインの添加量とタンパク質効率の間には相関が認められた。プロメラインの添加量が多くなるに従ってタンパク質効率は高くなり、0.25%の添加量で略一定値に

表2 飼育試験の結果

試験区	A	B	C	D	E
生残率 (%)	100	100	100	100	100
増重量 (g)	327.5	361.1	349.4	375.1	359.3
乾物給餌量 (g)	355.2	360.9	354.8	358.4	354.8
乾物飼料効率 (%)	92.2	100.0	98.5	104.7	101.3
タンパク質効率 (%)	234.3	249.9	250.1	264.3	266.4

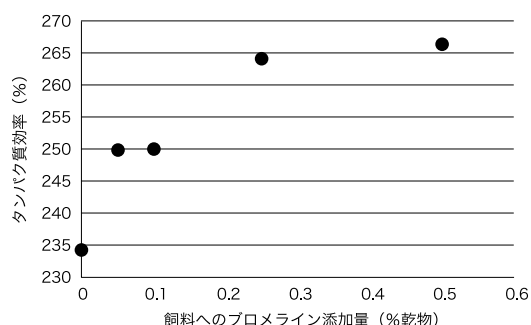


図3 飼料へのプロメライン添加量とタンパク質効率

表3 各区に給与された水溶性N，タンパク質，カロリー量

試験区	A	B	C	D	E
湿物給餌量 (g)	456.3	457.3	457.0	457.8	456.9
水溶性N 給与量 (g)	1.41	1.97	2.06	2.70	2.83
タンパク質給与量 (g)	139.9	144.6	139.8	141.9	135.0
カロリー給与量 (Cal)	1579	1673	1550	1595	1519

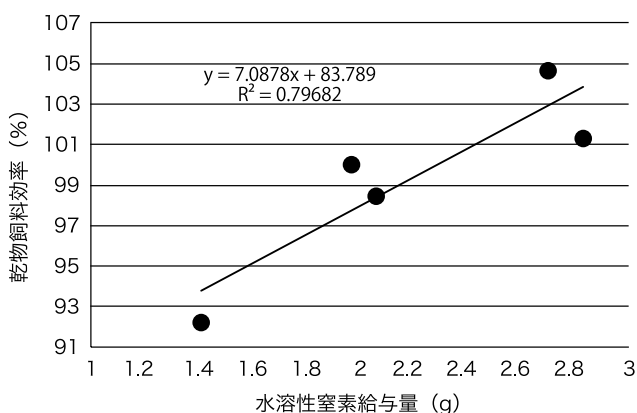


図4 水溶性窒素給与量と乾物飼料効率

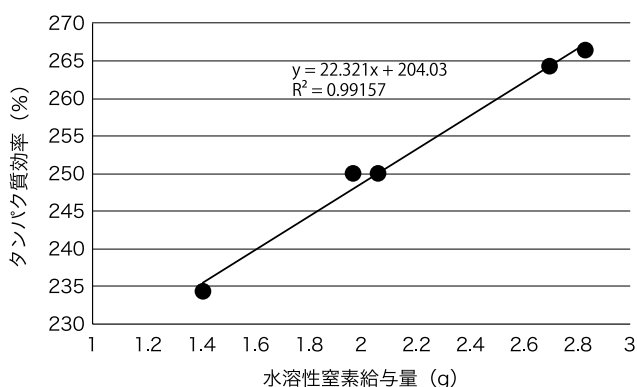


図5 水溶性窒素給与量とタンパク質効率

達した。プロメラインの添加量が多くなれば水溶性窒素の量も多くなるので、水溶性窒素の給与量と乾物飼料効率，タンパク質効率との関係を調べた。さらに，タンパク質の給与量，カロリー給与量と乾物飼料効率，タンパク質効率との関係も調べた。

表3に各区の水溶性窒素，タンパク質，カロリー等の給与量を示す。各区間でタンパク質とカロリーの給与量に大きな違いは無かったが，水溶性窒素の給与量には明らかに違いがあった。

水溶性窒素の給与量と乾物飼料効率の関係を図4に示す。プロメライン無添加区以外ハッキリした違いが有るとはいいい難い程度の違いであるが，水溶性窒素の給与量が増えるに従って乾物飼料効率は

高くなっており，両者の間には正の相関が認められた。

水溶性窒素の給与量とタンパク質効率との関係を図5に示す。水溶性窒素の給与量が多くなるに従ってタンパク質効率は直線的に高くなり，両者の間には強い正の相関が認められた。

各飼料のタンパク質含量，カロリー含量，C/P比に大きな違いが無かったためか，タンパク質給与量，カロリー給与量，C/P比と乾物飼料効率，タンパク質効率との間には明確な相関は認められなかった。

以上の結果から，マゴイではタンパク質給与量，カロリー給与量，飼料のC/P比が略等しい場合には水溶性窒素の給与量が飼育成績を左右し，水溶性窒素の給与量が多い程成長，飼料効率，タンパク質効率等が高くなることが分かった。特に水溶性窒素の給与量とタンパク質効率の間には強い正の相関が認められた。プロメラインの添加はMPの水溶性窒素量を増やすので，魚の飼育成績の改善には有効であると考ええる。

3. 要約と考察

プロメラインの添加量に従ってMP中の水溶性窒素量が増えたので，MP製造中にプロメラインが飼料原料中のタンパク質を分解して分子量を小さくし，水溶性にしたものと思われる。MPの製造工程では温度はそれ程高くないので，作用の強弱は有るにしてもプロメラインは40℃以下の低い温度でも効果を発揮するものとする。

プロメラインの添加によって増えたMP中

の水溶性窒素がマゴイの飼育成績に大きな影響を与え、水溶性窒素の給与量と魚の成長、飼料効率、タンパク質効率の間には正の相関が認められた。特に水溶性窒素給与量とタンパク質効率の間には $R^2=0.99157$ の強い正の相関が認められた。

飼料へのプロメライン添加量と飼料の水溶性窒素量（図1）、飼料へのプロメライン添加量とタンパク質効率（図3）、水溶性窒素給与量と乾物飼料効率（図4）、水溶性窒素給与量とタンパク質効率（図5）から、本試験条件下で飼料へのプロメラインの添加量は0.25%で十分であると考え。それ以上の量添加しても水溶性窒素の量は殆ど増えず、期待するほどの効果は得られない。但し、MP製造時の温度条件や加熱時間が異なればプロメラインの適切な添加量は変化する可能性があるので、それぞれのMP製造条件下で至適添加量を明らかにしておく必要が有る。

以上の結果から、プロメラインのMPへの添加はMPの水溶性窒素量を増やし、魚の飼育成績を著しく改善するので、有効であると判断する。酵素を十分に作用させるためには加水と適切な温度やpHが必須である。養魚飼料の製造工程を工夫することによってプロメラインを有効に利用出来る可能性が有る。ハードペレットでもエクストルーダーペレットでも成型前の工程を多少変更すればこれは可能であろう。

魚において飼餌料の水溶性窒素量がより重要なのは、胃腺の発達が不十分で消化能が劣る仔稚魚期である^{1,2)}。初期飼料の製造時にプロメラインを利用すれば、より優れた初期飼料が開発出来るのではないかとと思われる。

なお、プロメライン以外のタンパク質分解酵素も幾つか試してみたが、物によっては殆ど効果が認められなかったので、使用に当たっては注意が必要であることを付記しておく。

グルタチオン

グルタチオンはグルタミン酸、システイン、

グリシンより成るトリペプチドで、抗酸化作用や解毒作用を有していることが知られている。魚ではブリ類で酸化脂質による肝機能障害の予防と肉質改善作用、観賞魚で環境変化によるストレスに対する耐性向上作用、トラフグで貧血防止と表皮剥離防止作用、サケ・マス類でリゾチーム活性向上による抗病性向上作用等が有るとされている。

1. 材料と方法

1-1. 供試グルタチオン剤

水産用のグルタチオン散剤は数社から市販されている様であるが、本試験には水産用アトモレート散（協和発酵工業。以下アトモレートと略記。）を用いた。

1-2. 試験飼料

A-Eの5試験区を設定した。それぞれの飼料の組成と分析値を表4に示す。アトモレートの添加量は0, 2.5, 5, 7.5 および10%とし、 α -セルロース量で調整した。試験飼料の調製法は前項のプロメライン試験と同じであったが、ミートチョッパーによる成型に適切な物性にするのに必要な水の量はアトモレートの添加量が多くなるに従って少なくなった。アトモレートの添加量が多くなるに従って水の添加量が少なくなったので、MPの成分は水分が減少

表4 試験飼料の組成と分析値

試験区	A	B	C	D	E
魚粉 (%)	31	31	31	31	31
小麦粉	31	31	31	31	31
ミネラル混合	4	4	4	4	4
ビタミン混合	4	4	4	4	4
α -セルロース	10	7.5	5	2.5	0
アトモレート	0	2.5	5	7.5	10
魚油	20	20	20	20	20
水分 (%)	29.0	26.1	24.1	23.4	17.6
タンパク質	21.6	22.1	22.0	22.3	24.0
脂質	16.5	17.9	19.0	18.7	19.9
灰分	6.6	6.7	6.8	6.7	7.6
炭水化物	17.6	20.2	22.7	25.4	29.2
Cal/100g	270.1	289.9	304.4	308.3	333.5
C/P 比	12.5	13.1	13.8	13.8	13.9

表 5 飼料成分の乾物換算値

試験区	A	B	C	D	E
タンパク質 (% 乾物)	30.4	29.9	29.0	29.1	29.1
脂質	23.2	24.2	25.0	24.4	24.2
灰分	9.30	9.07	8.96	8.75	9.22
炭水化物	24.8	27.3	29.9	33.2	35.4

し、タンパク質、脂質、灰分、炭水化物、カロリー含量は増加した。水分の影響を除くため、乾物換算値で飼料成分を示したのが表 5 である。アトモレートの添加量が増えるに従って僅かにタンパク質と灰分が減少して脂質が増加する傾向が認められたが、最も変化が大きかったのは炭水化物であった。アトモレートの添加量が増えるに従って炭水化物量も増え、しかもアトモレートの添加量と略同じ量の炭水化物が増えていた。このことからアトモレートはグルタチオンを炭水化物原料で希釈した物であろうと推測出来る。α-セルロースとアトモレートに使用されている炭水化物源の性状の違い、例えば吸水性や水溶性の違いなどによって、MP 製造時に必要な加水量に違いが生じたのであろう。

1-3. 飼育試験

受精卵を入手し、シオミズツボワムシとタマミジンコを用いて種苗生産した後市販飼料で飼育した和金を供試魚とした。60L 容角型透明プラスチック水槽に平均体重 28.1g の魚を各区 14 尾ずつ収容し、水温 20℃で 11 月 17 日から 12 月 28 日まで 40 日間飼育した。給餌法と注意点はプロメライン試験と同じであった。

1-4. 測定項目

飼育試験開始時と終了時に尾数と総体重を測定し、各区の生残率と増重量を求めた。飼育試験終了時に各区から 5 尾をサンプリングし、以下の処理を行った。FA100 で麻酔し、異常の有無を確認した後ペーパータオルで体表の水を拭き取る。体重を測定し、ヘパリン処理した 1mL プラスチック注射筒を用いて心臓から各尾等量ずつ採血する。残りの魚体は解剖して各臓器の状態を観察すると共に重量を測定して体重比を求めた。背肉は鱗、血合肉、皮下脂肪が混入しないように注意

して各尾から等量ずつ採取し、グループ毎に纏めて一般成分の分析試料とした。肝臓も同様に処理した。血液は区毎にプールし、3000rpm で 15 分間遠心分離して血漿を単離した。血漿はグルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ (GOT。近年、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ:AST という名称に変更されつつある。), グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ (GPT。同様にアラニンアミノトランスフェラーゼ:ALT という名称に変更されつつある。), アルカリ性フォスファターゼ (ALT) の活性と、グルコース (Glu), 総タンパク質 (T-Pro), トリグリセライド (TG), 総コレステロール (T-Cho) 含量の測定に供した。

なお、採血可能量と分析に必要な試料量の関係から、供試魚は各区共大きい方から 5 尾サンプリングしたので、厳密に言えば各グループを代表する魚ではない。

2. 結果

2-1. 飼育成績

飼育試験の結果を表 6 に示す。各区共飼育期間中に死魚は無く、生残率は 100% で区間差は無かった。MP の給与量は各区共 386g であったが、それぞれの飼料で水分含量が著しく違うので、乾物換算した給餌量がこの表の数値である。

アトモレート添加量と増重量の関係を図 6 に示す。アトモレート添加量が 7.5% までは添加量に従って魚の成長が良くなり、増重量が増える傾向にあるが、10% になると反って減少し、2.5% 添加区より低い値を示した。アトモレート添加量が多い区ほど飼料の水分含量が少ないので、乾物給餌量と増重量の関係を調べたのが

表 6 飼育試験の結果

試験区	A	B	C	D	E
生残率 (%)	100	100	100	100	100
増重量 (g)	128.3	161.4	159.1	187.3	148.4
乾物給餌量 (g)	274.1	285.3	293.0	295.7	318.1
乾物飼料効率 (%)	46.8	56.6	54.3	63.3	46.7
タンパク質効率 (%)	154.1	189.4	187.0	217.7	160.5

図7である。アトモレート添加量が7.5%までの区では乾物給餌量と増重量の間に正の相関が有った。つまり餌を食べた量が多い区ほど魚の成長が良く、増重量も多いということで、必ずしもアトモレートの添加効果で増重量が大きくなったとは言えない。アトモレートの添加効果を知るにはアトモレート添加量と乾物飼料単位

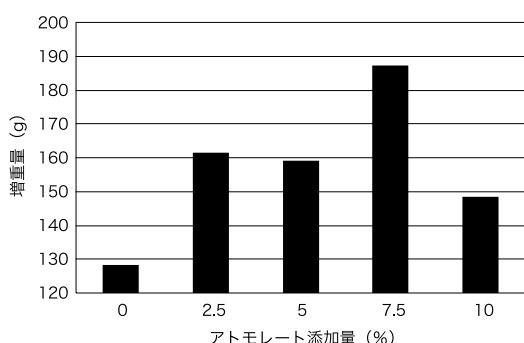


図6 アトモレート添加量と増重量

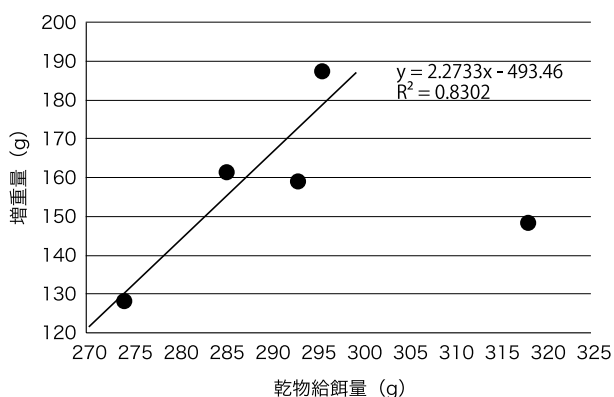


図7 乾物給餌量と増重量

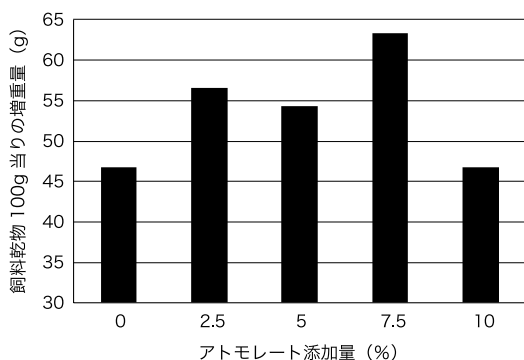


図8 アトモレート添加量と飼料乾物 100g 当りの増重量

給与量当たりの増重量との関係性を調べる必要が有る。アトモレート添加量と乾物飼料 100g 当りの増重量との関係を図8に示す。アトモレート添加量が7.5%まで増重量は略直線的に増加し、10%になると反って減少して無添加区と等しい値を示した。

以上の結果から、アトモレートの7.5%添加までは魚の成長を促進し、増重量を大きくする効果が有ることと、それ以上の量になると成長を阻害する可能性が有ることが分かった。

飼料成分の何が魚の成長、飼料効率、タンパク質効率に最も強い影響を及ぼしているかを調べたところ、タンパク質であることが分かった。給与タンパク質量と乾物飼料効率との関係を図9に、タンパク質効率との関係を図10に示す。何れもアトモレートの添加量が7.5%までは給与タンパク質量との間に強い正の相関が認められたが、10%になると反って減少し、無添加区と略等しい値を示した。

アトモレートの添加が飼料タンパク質の魚体蓄積率を上げて成長を促進し、増重量を大きくしている事を確認するには、アトモレート添加量と給与タンパク質当たりの増重量との関係を知る必要が有る。両者の関係を示したのが図11である。アトモレートの添加量が7.5%までは添加量が増えるに従って給与タンパク質量当たりの増重量も直線的に増え、両者の間に正の相関が認められたが、10%になると

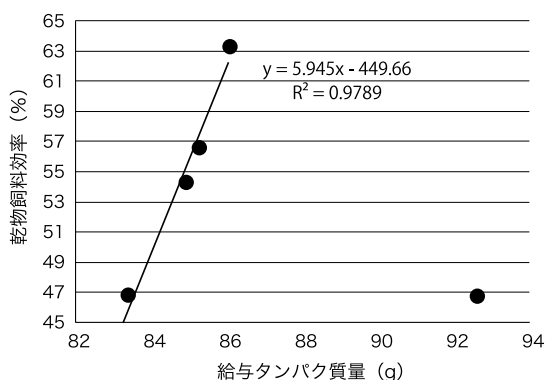


図9 給与タンパク質量と乾物飼料効率

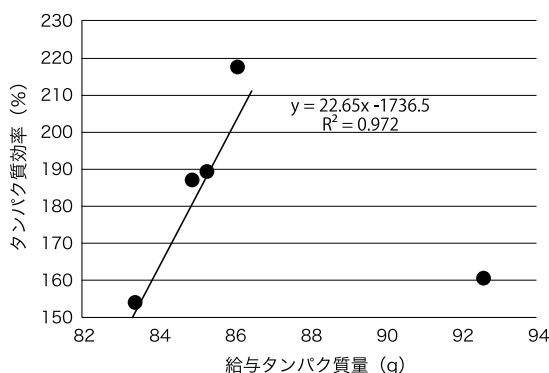


図 10 給与タンパク質量とタンパク質効率

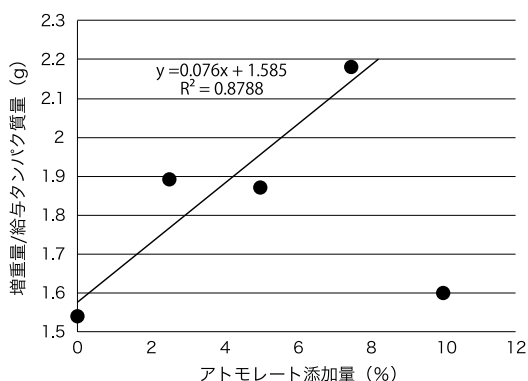


図 11 アトモレート添加量と単位タンパク質給与量当りの増重量

表 7 臓器体重比

試験区	A	B	C	D	E
体重 (g)	46.1	50.1	44.4	51.1	46.8
内臓体重比 (%)	18.0	17.2	18.2	19.2	19.0
DL 体重比	6.3	4.8	5.4	5.7	5.3
肝臓体重比	5.0	4.2	5.0	4.5	4.9
生殖腺体重比	2.7	2.4	2.9	1.4	2.6
消化管体重比 *	4.0	5.8	4.9	7.6	6.2

* (内臓 - DL - 肝臓 - 生殖腺) 体重比

減少し、無添加区に近い値を示した。

この様に飼育成績に最も強い影響を及ぼすタンパク質の給与量を指標にしてもアトモレートの 7.5% までの添加は魚の成長促進に効果が有ることが分かった。

2-2. 臓器体重比

各区共魚の外観や臓器に異常は認められなかった。各臓器の体重比を表 7 に示す。アトモレート添加区は図 12 に示す様に DL (腹腔内脂肪蓄積組織) 体重比が無添加区より小さい。魚体内の蓄積脂質の量を増やす要因は飼料から摂取された脂質と炭水化物の量である。A-E 区の脂質摂取量はそれぞれ 63.6, 69.0, 73.3, 72.2, 77.0g, 炭水化物の摂取量は 68.0, 77.9, 87.6, 98.2, 112.6g とアトモレート添加区の方が多いの、腹腔内蓄積脂質の量は減少している。これはアトモレートの添加によって脂質と炭水化物がエネルギー源として利用される割合が増え、魚体に蓄積される脂質の量が減少したことを示すものと思われる。脂質と炭水化

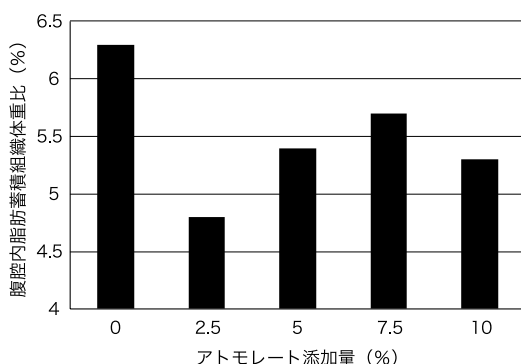


図 12 アトモレート添加量と DL 体重比

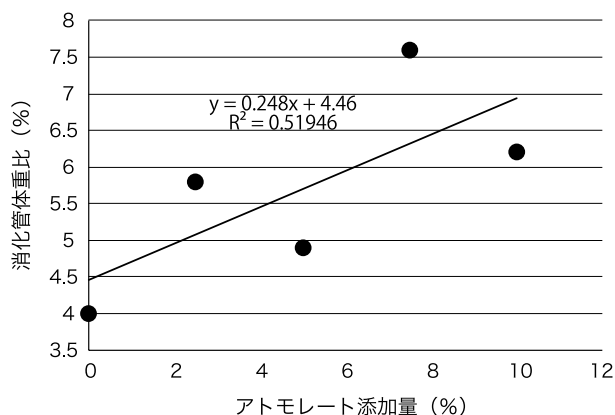


図 13 アトモレート添加量と消化管体重比

物がエネルギー源として有効に利用されるので、タンパク質がエネルギー源として利用される割合が減少し、魚体に蓄積される量が増える。これが魚の成長を促進し、飼料効率とタンパク質効率を向上させているのであろう。

図 13 に示す様に内臓体重比から DL, 肝臓, 生殖腺体重比を除いた消化管体重比はバラツキが大きいものの, アトモレート添加量が多い区ほど大きい傾向が認められた。アトモレート添

加量が多い程 α -セルロースが少なく, 繊維量が少ないはずであるのに消化管体重比は大きくなっていた。アトモレートの添加によって消化管が厚く丈夫になるのであろうか?

2-3. 背肉と肝臓の成分

背肉と肝臓の分析結果を表 8 に示す。背肉ではアトモレート添加区の方が無添加区より水分 (図 14) とタンパク質 (図 15) が多く, 脂質 (図 16) が少なかった。また, 乾物換算してもアトモレート添加区の方がタンパク質が多く, 脂質が少ないのは変わらなかった。

アトモレート添加区の背肉の水分含量に区間差が殆ど無いので水分と脂質の相関は不明確であるが, 水分と脂質の間には強い負の相関が有ることは多くの魚種で確認されている。脂質とタンパク質, 脂質と灰分の間には図 17 と図 18 に示す様に負の相関が認められる。よって, 背肉成分の変動の主体

は脂質で, 脂質の増減によって水分, タンパク質, 灰分が連動して動くことが分かる。アトモレートの添加によって脂質が減少するため, 水分とタンパク質が増加したのであろう。

アトモレートの添加によって腹腔内蓄積脂質の量のみでなく肉部の脂質含量も減少したので, アトモレートは全魚体への脂質の蓄積を抑制しているのであろう。

肝臓では水分, タンパク質, 脂質, 灰分含量と

表 8 背肉と肝臓の分析値

試験区	A	B	C	D	E
背肉					
水分 (%)	74.7	76.7	76.2	76.7	76.1
タンパク質	18.2	19.6	19.3	18.7	19.4
脂質	4.6	2.4	2.8	3.1	2.8
灰分	1.2	1.2	1.2	1.1	1.2
タンパク質 (% 乾物)	71.9	84.1	79.8	80.3	81.2
脂質	18.2	10.3	11.8	13.3	11.7
灰分	4.74	5.15	5.04	4.72	5.02
肝臓					
水分 (%)	67.8	66.5	66.6	67.8	67.6
タンパク質	9.0	9.2	8.3	9.0	8.3
脂質	4.9	5.2	4.5	5.5	4.4
灰分	0.9	0.9	0.9	0.8	0.8
タンパク質 (% 乾物)	28.0	27.5	24.9	28.0	25.6
脂質	15.2	15.5	13.5	16.8	13.6
灰分	2.80	2.69	2.69	2.48	2.47

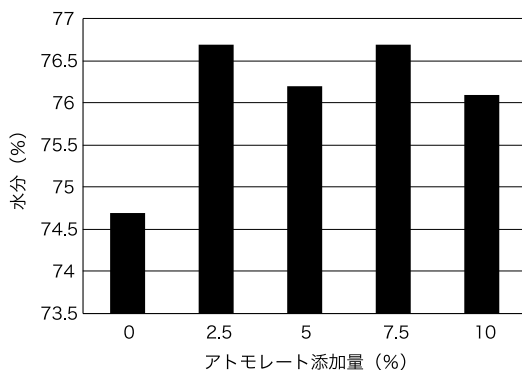


図 14 アトモレート添加量と背肉の水分含量

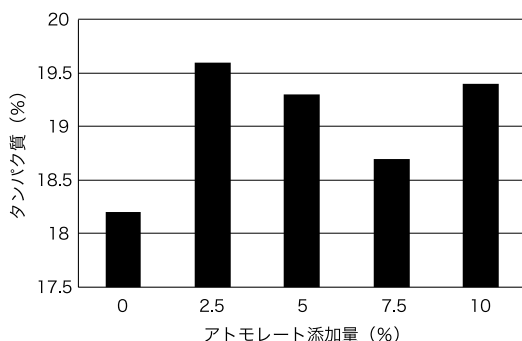


図 15 アトモレート添加量と背肉のタンパク質含量

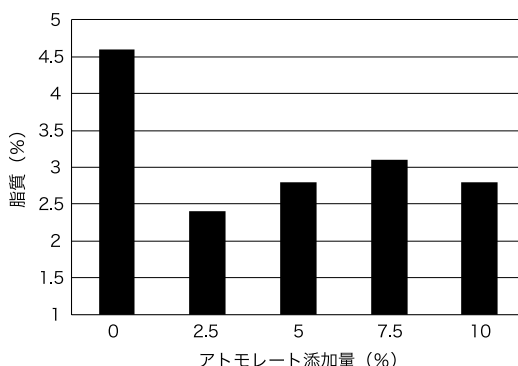


図 16 アトモレート添加量と背肉の脂質含量

アトモレート添加量との間に明確な相関は認められなかった。グリコーゲン量を測定していないので断言は出来ないが、各区間で乾物換算したタンパク質、脂質、灰分含量に大きな違いが無いことから、グリコーゲン含量も各区間で大きな違いは無いものと思われる。炭水化物の給与量はアトモレート添加量が多い区ほど多いので、グリコーゲンが増えていないということは、消化吸收された炭水化物がエネルギー源として有効に利用されたことを示すのかも知れない。

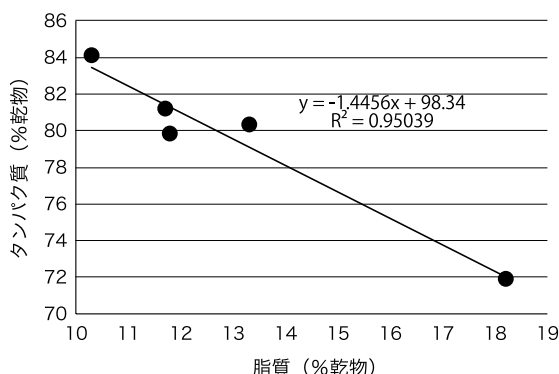


図 17 背肉の脂質含量とタンパク質含量の相関

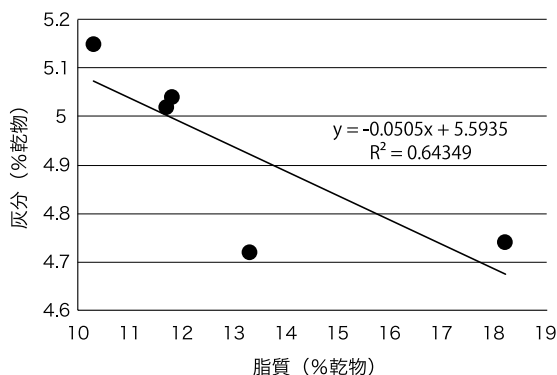


図 18 背肉の脂質含量と灰分含量の相関

表 9 血漿成分の分析値

試験区	A	B	C	D	E
GOT (K.U)	716	223	396	254	337
GPT (K.U)	22	8	15	13	13
Glu (mg/dL)	43	36	49	46	50
T-Pro (g/dL)	4.26	3.78	4.48	4.25	4.32
TG (mg/dL)	291	270	431	542	431
T-Cho (mg/dL)	537	447	610	441	496
ALP (K-A.U)	5.0	5.6	6.2	5.1	5.2

2-4. 血漿成分

血漿成分の分析結果を表 9 に示す。アトモレート添加区は無添加区より GOT (図 19) と GPT (図 20) が著しく低い値を示しており、肝臓の状態が良いことが分かる。図には示さないが、Glu と TG は給与炭水化物量と脂質量が多い区の方が高い傾向を示した。T-Pro と T-Cho 含量、ALP 活性とアトモレート添加量の間に相関は認められなかった。アトモレート添加区間では、血漿の TG 含量と DL 体重比、背肉の脂質量との間に正の相関が認められた。

アトモレート無添加区では血漿の TG 含量は比較的少ないのに魚体の蓄積脂質量が多い。一方、アトモレート添加区は血漿の TG 含量は多いのに魚体の蓄積脂質量が少ない。給与脂質量と血漿の TG 含量、給与炭水化物量と血漿の Glu 含量に正の相関が認められたので、アトモレートの添加によって飼料脂質と炭水化物の消化吸收率が低下している訳ではない。

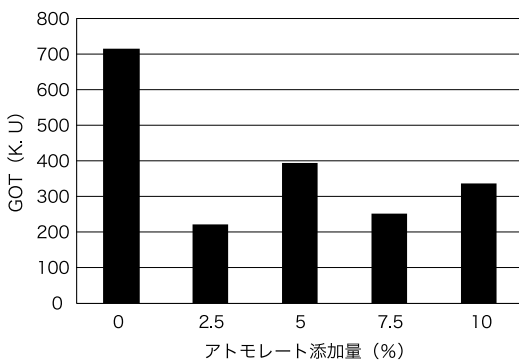


図 19 アトモレート添加量と血漿 GOT 活性

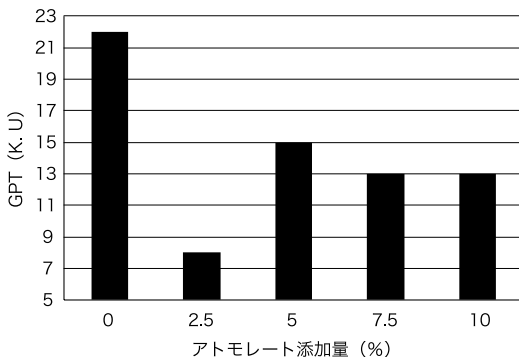


図 20 アトモレート添加量と血漿 GPT 活性

以上の結果から、飼料から消化吸収された脂質と炭水化物がアトモレートの添加によってエネルギー源として有効に利用されるようになったものと考えられる。

3. 要約と考察

グルタチオンの作用と今回の試験結果並びにこれまでに魚で報告されている効果との関連性について考えてみる。

アトモレートの飼料添加量が7.5%以下であれば魚の成長を促進し、飼料効率とタンパク質効率を改善する。アトモレート添加区は無添加区に比べて腹腔内蓄積脂質と肉部の脂質が少なく、魚体に蓄積している脂質の量が少ない。脂質と炭水化物の摂取量はアトモレート添加区の方が多いのに関し、魚体に蓄積された脂質の量は少ない。血漿中のGluとTG含量は摂取した炭水化物と脂質の量を反映しているため、アトモレートの添加によって炭水化物と脂質の消化吸収が抑制されてはいない。

以上の結果から考えられるのは、アトモレートの添加によって消化吸収された炭水化物と脂質のエネルギー源としての利用率が高くなったため、魚体に蓄積される脂質の量が減少したこと、このためにエネルギー源として利用されるタンパク質の割合が減少し、魚体に蓄積されるタンパク質の量が多くなったこと、これが魚の成長を促進し、飼料効率とタンパク質効率の改善へと繋がっていること等であろう。

養殖魚は魚体に過剰量の脂質が蓄積していることが多いので、グルタチオン添加による脂質の蓄積抑制効果が肉質改善作用として表れていると考えられる。

グルタチオンはシステイン残基やチオール基に様々な有毒物質を結合して抱合体を形成する。抱合体は細胞外に排出され、胆汁や尿を通して排泄される。この抱合体を形成する主臓器は肝臓である。GOTとGPTは肝細胞に多く含まれているため、肝細胞の障害が進むと血液中のGOT、GPTの値が上昇する。アトモレート添加区の血漿中のGOTとGPT活性が無添加区より著しく低いということは、肝細胞が障害を受けていないことを表し、グルタチオンに肝機能障害の予防効果が有ることを示す。

グルタチオンは自らのチオール基を用いて過酸化物質や活性酸素種を還元して消去する抗酸化作用を有する。同様の抗酸化作用を有するブドウポリフェノールの飼料添加によってマダイの空中露出耐性や水温の急変に対する耐性が著しく高くなることが知られている³⁾ので、グルタチオンでも環境条件の変化に対する耐性が向上するのであろう。

普通は紫外線の影響を受けない水深に棲息しているトラフグを養殖場では海面生簀で飼育する。よって、トラフグの表皮剥離は、寄生虫や細菌感染を別にすれば、紫外線によって細胞内に生じた活性酸素種による炎症が原因ではないかと推測出来る。これがグルタチオンの様な抗酸化作用を有する物質の添加によって軽減されることは十分有り得ることと思われる。

この様にグルタチオンは炭水化物や脂質の利用効率向上作用や抗酸化作用、解毒作用を通じて魚にとってプラスになる点を多く有しており、養魚飼料にも上手に利用すべき物であると考えられる。

参考文献

1. 酒本秀一：仔稚魚用人工配合飼料の現状と問題点．昭和63年度栽培漁業技術研修事業基礎理論コース 餌料生物シリーズ No.10, 1-25, 1988.
2. 山本章造, 酒本秀一, 竹内昌昭：アユ仔魚の飼育成績に及ぼす飼料タンパク質源と水溶性窒素の効果．日本水産学会誌, **68** (3): 327-333, 2002.
3. 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.

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、学術業界誌としてふさわしい論文・解説記事の掲載、編集課題等の意見を得ることを目的としております。また、査読者のご紹介や論文投稿者のご紹介、編集へのご指導・ご助言をいただき、編集委員会として貢献していただいているものです。

■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	（明海大学歯科医学総合研究所 (M-RIO) 所長）
早田 邦康 氏	自治医科大学附属さいたま医療センター 自治医科大学大学院 基礎系総合医学 教授 循環器病臨床医学研究所 所長
宮尾 茂雄 氏	（東京家政大学教授）
山口 正義 氏	（University of California, Los Angeles (UCLA) 医学部） （University of Hawaii Cancer Center Adjunct Professor 兼務）

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

ニューフードインダストリー 第59巻 第12号

印 刷 平成 29 年 11 月 25 日
発 行 平成 29 年 12 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(喜助新神田ビル3F)
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 株式会社メイク
定 価 本体2,000円 + 税 (送料100円)

e-mail: newfood@newfoodindustry.com