

New Food Industry

2020
12

New food indust. 62 (12): 2020.

総説

- ◆ ゲノム編集法を活用したトマトの成熟制御遺伝子の様々な変異
～*RIPENING INHIBITOR (RIN)*遺伝子の機能の新解釈
- ◆ アスペルギルス属かび毒産生菌の多様性の検出
～DV-AM法と画像解析・AM法とのコンビネーション～

解説

- ◆ エタノールと水をめぐる話：エタノール溶液の殺菌力

研究解説

- ◆ 腫瘍選択性が高く、副作用が低い新規クロモン誘導体の開発
- ◆ セリサイト(Tellus Gizer)における免疫作用,
抗糖尿病とダイエット効果に関する臨床研究

コーヒー博士のワールドニュース

- ◆ 循環ACE2高値は心臓病の新バイオマーカー

New Food Industry Editorial Board

■ボードメンバー敬称略(五十音順)

大石	隆介	Ryusuke Oishi	明海大学 経済学部経済学科
岡	希太郎	Kitaro Oka	東京薬科大学
具	然和	Yeunhwa Gu	純真学園大学 放射線技術科学科
古賀	邦正	Kunimasa Koga	(一財)自然環境研究センター
齋藤	忠夫	Tadao Saito	東北大学
坂上	宏	Hiroshi Sakagami	明海大学歯科医学総合研究所(M-RIO)
史	海霞	Haixia Shi	上海交通大学医学院第九人民医院
白瀧	義明	Yoshiaki Shirataki	城西大学薬学部生薬学講座
須見	洋行	Hiroyuki Sumi	倉敷芸術科学大学
瀬口	正晴	Masaharu Seguchi	神戸女子大学, 日本穀物科学研究会会長
早田	邦康	Kuniyasu Soda	自治医科大学附属さいたま医療センター
津田	孝範	Takanori Tsuda	中部大学応用生物学部食品栄養科学科
友村	美根子	Mineko Tomomura	明海大学 総合教育センター
日比野	康英	Yauhide Hibino	城西大学大学院 薬学研究科
豊崎	俊幸	Toyosaki Toshiyuki	香蘭女子短期大学 食物栄養学科
牧	純	Jun Maki	松山大学薬学部 医療薬学科
増田	宜子	Yoshiko Masuda	松本歯科大学 歯科保存学講座
松郷	誠一	Seiichi Matsugo	金沢大学
宮尾	茂雄	Shigeo Miyao	東京家政大学教授
山口	正義	Masayoshi Yamaguchi	University of Hawaii Cancer Center
山田	正子	Masako Yamada	東京家政学院大学 現代生活学部 食物学科
肖	黎	Li Xiao	日本歯科大学 生命歯学部薬理学講座
渡部	保夫	Yasuo Watanabe	愛媛大学大学院農学研究会

酸化防止剤

B B H A
サステン乳液A
サステン乳液T

Sustane



日揮ユニバーサル株式会社

化成品部／東京都品川区大崎 1-6-3 日精ビル
電話(03)5436-8470 FAX(03)3493-9125

セサミンを規格

香り芳醇

リグナンリッチ黒胡麻 マイクロパウダー

金胡麻マイクロパウダー

60 メッシュ 90% パス、胡麻粉末飲料、ふりかけ、生菓子、製菓へ
「通常のすりごまより香りが広がる」セサミンリッチな黒胡麻です。

～プロテイン飲料、菓子、スープ、トッピング等へ～

～リグナンリッチ黒ごままで栽培された～

胡麻若葉末

有機認定（島根産）

九州産（鹿児島）

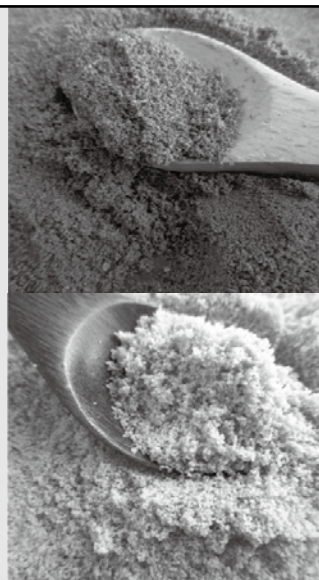
※特許査定を受けました
※急性毒性、変異原性試験、ORAC 値測定
※黒酢との比較で ACE 活性阻害作用を確認

リグナンリッチ黒胡麻ペースト
(セサミン規格値 0.8%)

リグナンリッチ黒胡麻油
(セサミン規格値 1.2%)

発酵胡麻ほか

胡麻クランチの OEM



胡麻を通じて健康を科学する。
～香と機能、個性ある胡麻をお届けします～

株式会社

わだまんサイエンス

本社 〒604-0845 京都市中京区烏丸御池上る二条殿町546
TEL 075-222-7318 / FAX 075-222-0318
<http://www.wadaman-s.com>

総説

- ゲノム編集法を活用したトマトの成熟制御遺伝子の様々な変異
～ *RIPENING INHIBITOR (RIN)* 遺伝子の機能の新解釈

伊藤 康博 847

- アスペルギルス属かび毒産生菌の多様性の検出
～ DV-AM 法と画像解析・AM 法とのコンビネーション～

久城 真代, 矢部 希見子 857

解説

- エタノールと水をめぐる話：エタノール溶液の殺菌力

古賀 邦正 863

研究解説

- 腫瘍選択性が高く，副作用が低い新規クロモン誘導体の開発
Development of newly synthesized chromone derivatives with high tumor specificity, but low adverse effects

坂上 宏, 杉田 義昭, 高尾 浩一, 永井 純子, 植沢 芳広, 飯島 洋介, 佐野 元彦 871

- セリサイト (Tellus Gizer) における免疫作用,
抗糖尿病とダイエット効果に関する臨床研究
Clinical study on immune function, antidiabetic and diet effects in sericite (Tellus Gizer)

具 然和, 山下 剛範, 井上 登太 882

連載解説

- 新解説 グルテンフリー穀物製品のマーケットについて (1)

瀬口 正晴, 竹内 美貴, 中村 智英子 895

Contents

No. 12 Vol.62 2020

コーヒー博士のワールドニュース

■ 循環 ACE2 高値は心臓病の新バイオマーカー

岡 希太郎 903

連載 野山の花 — 身近な山野草の食効・薬効 —

■ ユズ *Citrus junos* (Makino) Siebold ex Tanaka (*Citrus junos* Sieb. ex Miq.) (ミカン科 Rutaceae)

白瀧 義明 906

連載 デンマーク通信

■ デンマークのラーメン

Naoko Ryde Nishioka 909

海外紀行文 2019 年夏のスコットランド紀行

■ ービフォーコロナー (2) ファイフ

林田 千代美 911

随想

■ *Lipomyces* 属酵母を新しく分離し分類する

兎束 保之 916

世界から、優れた「自然の恵み」を提供します

アンテスの母なる穀物 **キヌア**



南米アンテス原産のヒユ科アカザ亜科の雑穀です。インカ帝国の時代より食され、栄養価の高さから伝承的に「母なる穀物」として重用されてきました。食物繊維や鉄・マグネシウムなどのミネラル、すべての必須アミノ酸を含む、栄養バランスに優れたグルテンフリーの雑穀で、スーパーフードとして世界的にも注目されています。

「茹でる」「炊く」が1番ポピュラーな食べ方で、フクフクとした食感を楽しめます。スープ・雑炊・サラダ・雑穀米など様々な料理に使われています。

取扱製品

◆キヌア粒

◆有機キヌア粒



大日本明治製糖株式会社 食品営業部

〒100-0011 東京都千代田区内幸町二丁目1番1号 飯野ビルディング10階
電話 03-5510-1111

<http://www.dmsugar.co.jp>

現代チーズ学

編集

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

現代チーズ学

The Contemporary Cheese Science

現代チーズ学

監修 齋藤 忠夫
監訳 堂迫 俊一
監訳 井越 敬司



食品科学の発展

480 ページ超の大迫力！
業界第一人者が集結！
チーズ研究の必携書

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

PDF 版 いよいよ
発売!!お問合せは
エヌエフアイまで

■B5版／496ページ

■定価：(本体4,500円+税)

■発行：エヌエフアイ

現代チーズ学 目次

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

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

お申し込み・お問い合わせは、
FAX・お電話・WEB にて

電話：042-312-0836

FAX：042-312-0845

エヌエフアイ合同会社

The Contemporary Cheese Science

ゲノム編集法を活用した トマトの成熟制御遺伝子の様々な変異 ～ *RIPENING INHIBITOR (RIN)* 遺伝子の機能の新解釈

伊藤 康博 (ITO Yasuhiro)¹

Key Words: トマト, 成熟, 転写因子, 変異体, ゲノム編集

はじめに

ゲノム編集法は、農業分野でも作物の飛躍的な改良を可能とする技術として期待され、目覚ましくその技術開発と応用研究が進められている。同様に技術発展の著しいゲノム解析分野の研究から、膨大な遺伝子情報（ゲノム情報）が短期間で得られるようになり、それが体系化されて整備されてきている。この充実したゲノム情報を基盤として、個々の遺伝子をより深く理解し、高度に利用する技術として、ゲノム編集法は今後さらに発展すると思われる。本稿では、著者が長年研究を積み重ねてきたトマト果実の成熟を制御する仕組みについて、最近取り入れたゲノム編集法を活用した切り口により、これまでの研究手法では知ることのできなかった新たな知見を得るに至ったので、それを紹介したい。トマトの成熟をコントロールする遺伝子として知られている“*RIPENING INHIBITOR (RIN)*”という遺伝子をゲノム編集の標的として、二つの異なる改変を行った。その結果、一つの遺伝子に端を発する現象にも関わらず、異なる変異により、①異常に軟化が進行、逆に、②軟化を強く抑制、という全く逆の方向性の性質を示すトマトが得られた¹⁾。これらの変異トマトの詳細を述べ、その分子メカニズムの考察から *RIN* の機能を再考察するとともに、ゲノム編集法がこれまでの生物学の常識を変えていく可能性についても少し触れる。なお、ここで述べる研究は本誌 2018 年

9月号に掲載された拙著²⁾の延長線上にあり、可能であればそちらもご参照いただきたい。

1. 「*RIPENING INHIBITOR*（成熟“抑制”因子）遺伝子は、果実成熟を“促進”する機能を持つ」...?

最初に、この章のタイトルをよく読み返していただきたい。*RIPENING INHIBITOR*（略して *RIN*）遺伝子が本稿の主役となるのだが、遺伝子の名前とその機能が全く正反対なのではないか、と気付かれると思う。遺伝子の研究をしていると、こういうことはよくありその理由も分かっているのであまり違和感がないが、少し分野の違う研究をされている方にはとても引くかかることらしい。一般の方には当然、訳が分からないだろう。まず、*RIN* 遺伝子と果実成熟の関係について、これまでの知見をその遺伝子の存在の発見から現在に至る研究の歴史を振り返り、この機能と合致しない遺伝子名について説明したい。

トマトは果実の成熟研究の対象として古くから利用されているが、それはトマトの経済的な重要性や栽培の容易さ、成熟過程の明確さに加え、成熟に関する種々の変異体が見出されたことが研究対象として有利だったことも一因であろう。様々な変わった性質を示す変異体を正常なトマトと対比することにより、成熟のしくみを明らかにする研究が数多く行われてきている。中でも 1968 年に報告のあった成熟

* 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構（農研機構）
食品研究部門 食品生物機能開発 研究領域 分子生物機能ユニット
〒305-8642 茨城県つくば市観音台 2-1-12
e-mail: yasuito@affrc.go.jp

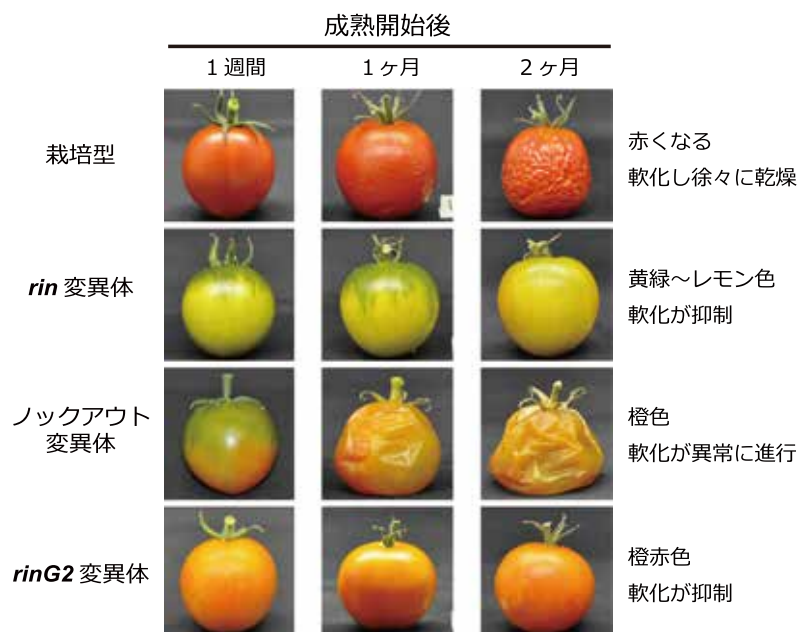


図1 RIN 遺伝子における三種類の変異による成熟進行の影響

RIN 遺伝子座に起きた、三種類の異なる変異が、果実の成熟後の生理的变化にそれぞれ異なる影響を与える。*rin* 変異は自然界で見つかった突然変異。ノックアウト変異および *rinG2* 変異は、ゲノム編集法で作出した変異体(図4参照)。

の全く進まない変異体³⁾は、その発見以来現在に至るまで、常に注目され成熟研究に広く利用されてきた。それが、*ripening inhibitor (rin)* 変異である。この変異をホモに持つ植物は、着果して果実が肥大していく過程までは正常だが、普通のトマトが赤くなる時期になっても一向に成熟が開始しない(図1)。何カ月経っても赤くならないし、果実は硬いまま、半年後でもその姿を保つ。まさに成熟を阻害する変異である。

ここで植物における遺伝子名の付け方を説明しておく。遺伝子の発見・同定は、まず遺伝子に変異が生じて形質が変化した変異体が見つかり、その変異が起こった遺伝子のDNA塩基配列を探し出す、というのがもっとも伝統的な流れである(近年はこれに当てはまらないことの方が多いが)。したがって遺伝子の決定は、まずは「変異ありき」である。ある日畑で見つけた、全く成熟が進まない果実を着ける変異(正確には変異型の対立遺伝子)は、その表現型通りに「*ripening inhibitor*」と命名された³⁾。ここでいくつか基本的なルールがある。優性(顕性)の対立遺伝子は大文字、劣性(潜性)の対立遺伝子は小文字で標記されることになっている。そして通常、一文字から三文字程度に略称される。また遺伝子名は斜体で、そのコードタンパク質は標準書体で示される。この成熟に関する変異はホモで持つ

時にだけ、果実の成熟が完全に抑えられる表現型を示すので、劣性対立遺伝子として、*rin* とされた。その後、2002年にこの遺伝子座の配列が決定され、野生型の対立遺伝子がMADSボックス転写因子をコードしていることが明らかになった⁴⁾。ここで、誤解が生じる遺伝子命名のルールが出てくる。先に述べたが、優性の対立遺伝子は、その遺伝子座に付けられた名前を大文字で記載するので、*rin* として命名された劣性対立遺伝子に対して、野生型対立遺伝子は、大文字の「*RIN*」と標記されるようになった(*MADS-RIN*と書いている論文も多い)。単に遺伝子の記号名と割り切って、何も考えずにこの三文字の略号を使っている分にはいいのだが、論文を書く際には、初出時に遺伝子名をスペルアウトすることが一般的なルールである。そのため、「*RIPENING INHIBITOR (RIN)* 遺伝子は、成熟を促進する機能を持つ」というような文章を書くことになる。少しややこしいが、ご理解いただけたであろうか? 遺伝子名を変更しても良さそうな事例であるが、既に世界中に浸透しきっているためにはやはり難しいと思われる。同様の例として、トマトの花のガクの大きさを制御する遺伝子「*MACRO CALYX*; (巨大ガク; *MC*)」について説明すると、やはり、野生型の *MC* 遺伝子は名前と違って巨大なガクを作る機能はなく、その表現型を示すのは *mc* 変異を有する対立遺

伝子をホモにもつ植物だけである。説明する方もややこしいので読者の方々も混乱されるかもしれないが、まずはここをご理解いただきたい。

2. *RIN* タンパク質の機能と *rin* 変異の再評価

若干文脈が前後することになるが、*RIN* タンパク質の機能と *rin* 変異の影響について、おさらいしておきたい。上述の通り *rin* 変異を持つ果実は、成熟の進行が全く進まない。赤くならず軟らかくならないし、何より成熟時におけるエチレンの生産量の増大が全く見られない。エチレンはよく知られているように、成熟全体の進行を促す植物ホルモンであり、その効果を阻害することで果実の成熟を抑えることができる。これらの現象から、発見当時から最近まで、野生型対立遺伝子 *RIN* の機能は、成熟を引き起こすエチレンの生産よりも早い段階で成熟の開始を制御している、そして *rin* 変異は野生型遺伝子の機能を失わせた (loss-of-function)、と考えられてきた。*rin* 変異体はその発見以来現在に至るまで、世界中の研究者や育種家に利用されてきており、*RIN* は成熟研究の世界では誰もが知っている「お馴染み」の遺伝子である。この遺伝子が成熟開始のスイッチであるという考えに疑問を持つ者はほとんどいなかったと思われる。

ところがこの遺伝子の機能が、実はそれまで考えられてきたものとは異なることが、最近筆者らの研究によって明らかになった。詳細は原著⁵⁾ およびその解説である拙著²⁾ をお読みいただくとよいのだが、ここではかいつまんで説明する。筆者らは、ゲノム編集法で *RIN* 遺伝子に対してノックアウト変異 (*RIN* タンパク質が全くできない変異) を創出したところ、そのトマトはほんのり赤くなり、*rin* 変異体とは全く違って明らかな成熟の開始が認められた (図 1)。つまり、① *RIN* がなくても成熟は開始する (完熟には必要)、② *rin* 変異は機能がなくなる変異 (loss-of-function) ではない、この二点に要約できる。種明かしをすると、*RIN* タンパク質は転写を活性化する機能を持っているが、*rin* 変異により、転写を「抑制する」機能に変換されていたのである (詳細は後述)。すなわち、*RIN* は成熟に関わる遺伝子の発現を活性化して成熟進行のアクセルを踏む機能を持ち、一方 *rin* 変異タンパク質は発現を積極的に抑制してしまう、いわばブレーキの機能

を持つ、と考えると分かりやすいかもしれない。そして、ノックアウト変異体で少し成熟が進むのは、アクセルもブレーキも効いていない状態、自動車で言うとオートマチック車のクリープ現象、という例えが近いかもしれない。筆者らの論文発表に少し遅れて同様の結果を示す論文も発表され⁶⁾、概ねこの新しい *RIN* の機能の解釈は正しいと受け止められていると思われる。*RIN* がノックアウトされても成熟開始するのは、*RIN* と共通の機能を一部持つような、似たよう遺伝子 (ホモログ) があるのではないかと、という議論もあり、まだ完全にこのノックアウト変異体の解釈が正しいとは言いきれていないが、少なくとも *RIN* がないと成熟しない、という長く信じられてきた常識が大きく覆された。

3. *RIN* ノックアウト変異体の異常な成熟パターンについて

このように *RIN* タンパク質の役割がこれまで常識的に信じられてきたものとは異なることが明らかとなったが、今回、さらに研究を進めることで、*RIN* の新たな側面が明らかになってきた¹⁾。簡単に言うと、*RIN* には成熟の進行を進める機能だけでなく、過剰な成熟を抑制する機能があるのではないかと、解釈できる結果が得られてきた。野生型の *RIN* が成熟抑制因子、つまり名前の通り “*RIPENING INHIBITOR*” の機能を、部分的にはあるが、持っていると言える。この新しい発見について概説する。

RIN のノックアウト変異は、*rin* 変異と異なり、成熟が開始すると前述した。しかし成熟期に特徴的な赤色への着色は不良で、この時期特有のエチレンの産生上昇も見られるがその上がり方は非常に小さく、成熟全体が不完全にしか進行しない、と当初は結論付けた。*RIN* は成熟開始に必須ではないが、しかし果実の完熟には必須で、専ら成熟の進行を促進する、と考えていた。この見解は、トマトが成熟開始から通常 7～10 日間で完熟に至る、その期間では問題ないように見えた。成熟の促進因子である *RIN* がなくなれば、成熟全体の進行がスローダウンするはず、そう考えるのが素直であろう。

しかし、である。この *RIN* ノックアウト変異体に思わぬ変化が見られた。このノックアウト果実は少し長く保存していると、果肉の軟化が栽培系統より進行するのである (図 1)。普通のトマトは、1 ケ

月以上放置していると、萎れていって表面がシワシワになり全体が縮むような変化をしていく。ドライトマトのように変化していくと考えてもらえばよいだろう。ところがノックアウト果実は2カ月もおいでと、さわるとブヨブヨで、中身が液状に近くなり重力に逆らえずグラッと下に溜まっている感じ、まるで水風船のよう、と書けばご理解いただけるだろうか。ブヨブヨになる前の段階で、顕微鏡写真を撮るために果肉切片の調製をしていると、ポロポロと細胞が離れてしまって、栽培系統のように細胞がギッシリ固まっているのとは異なる様子が観察される(図2b)。個々の細胞が割れてしまうことはないで、細胞間の接着が弱まっていると考えられる。さらに、Magnetic Resonance Imaging (MRI) 解

析してみると、成熟開始してから4週間後のRINノックアウトトマトは、果肉のプロトン密度が上昇し、ゼリー部と区別がつかなくなる(図2a)。果肉の組織中に流動性の高い水分子が多く含まれるようになったことを反映していると考えられ、実際に果実をスライスすると、トロトロになって液体に近くになっている様子が観察される。このようにノックアウト変異体でも明らかに軟化が進んでおり、しかもそれが栽培系統と変わらないどころかさらに過剰に進行しているようにみえる。果実の軟化に関わる細胞壁関連の酵素が数多く知られているが、トランスクリプトーム解析によりそれらの遺伝子の発現について検討している。その結果、例えばペクチンの分解酵素であるポリガラクトナーゼ(PG2a)や

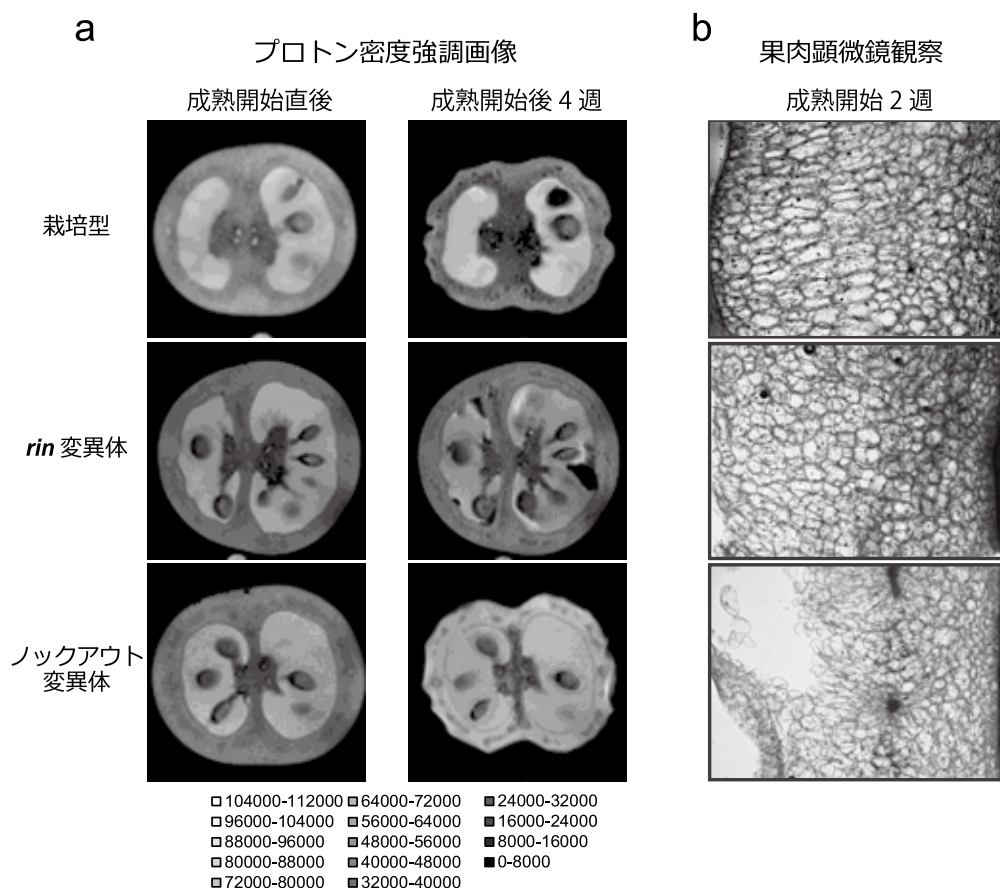


図2 ノックアウト変異体の果肉の特徴

- (a) Magnetic resonance imaging (MRI) によるノックアウト変異体果実の成熟に伴う果肉組織変化の観察。プロトン密度強調画像を示す。成熟開始直後にはゼリー部と果肉部で信号比が明確だが、成熟が進むと、ノックアウト果実では果肉部の信号が高くなってゼリー部と同程度のシグナルになる。プロトン(水素原子核)の信号は、生体では水または脂質の多い部分で高く検出されるが、果実の場合は主として水と考えてよいと思われる。果肉組織が流動性の高い水分子を多く含む組織に変化したと考えられる。
- (b) 成熟した果実の果肉組織の顕微鏡観察。栽培型は細長い細胞が多くみられるが、*rin* 変異体ではコンパクトな形の細胞が多い。細胞壁の分解進行の程度が細胞の膨圧に影響して形の違いに現れている可能性が考えられる。一方、ノックアウト変異体では、組織切片を作成していると、容易に組織が崩れて、細胞がバラバラになりやすい。細胞と細胞を接着している細胞壁成分の分解が過剰に進行していることが示唆される。

ペクチンリアーゼ (PL) の遺伝子は、栽培系統と比べても遜色ない発現がある。さらにマンナーゼ (MAN4) にいたっては、栽培系統よりも高い発現がみられる。一方でセルラーゼ遺伝子 (Cel2) の発現は強く抑制されている。したがってノックアウト変異体でも、一部の酵素遺伝子を除き、成熟中に細胞壁構造を変化させる種々の酵素の発現が認められることは、軟化が進行することと矛盾しないといえる。

ここまでの結果について、特に *rin* 変異については知識がある方にとっては、疑問を強く感じるのではないかと思う。前出の *PG2a* 等をはじめ、多くの細胞壁分解に関わる酵素遺伝子群は、栽培系統では成熟期になると一気に発現が上昇するのだが、成熟が進まない *rin* 変異体ではその発現上昇がみられないことがよく知られている。そのためこれらの遺伝子の成熟時における発現は、専ら RIN の転写活性化機能に依存している、というのが *rin* 変異体を扱ったことがある誰もが信じてきた成熟制御メカニズムだと思われる。しかしながら今回の研究で、RIN が全く存在しない状況下でこれらの遺伝子の発現が大きく誘導されることが明らかになった。つまり、これらの遺伝子は RIN がなくても発現誘導されるが、*rin* 変異タンパク質はこれらの発現の抑制因子 (リプレッサー) の役割を果たしている、と考えるのが妥当だろう。ノックアウト変異体で多くの成熟関連遺伝子の発現が上昇するのは、ノックアウト変異体でもわずかながらエチレンの生産上昇があり、このエチレンに誘導される、RIN とは別の種類の転写因子が成熟遺伝子の発現誘導を行っているのではないか、というのが一つの仮説である。

今のところ RIN ノックアウト変異体が過剰に軟化する現象を、分子レベルで説明するためのエビデンスは乏しい。成熟開始後、2 点のみの経時変化 (開始後 4 日及び 7 日) における遺伝子発現解析 (qRT-PCR) の結果だけ見ると、いくつかの細胞壁分解に関わる酵素遺伝子の発現は、栽培系統では 4 日後で高く 7 日後に減少しているが、ノックアウト変異体では 7 日後の方が高くなる傾向にある。もう少し、長い期間にわたって観察する必要はあるが、仮説として、ノックアウト変異体では、細胞壁分解に関わる酵素の発現は、長期間に亘って高いレベルの発現を維持し続けるのではないかと考えられる。確かに、

ノックアウト変異体の細胞壁抽出物を分析してみると、高分子化合物であるペクチンが単量体まで分解されてきたと思われるガラクトuron酸が、栽培種よりもずっと多く蓄積していたので、ノックアウト変異体では細胞壁分解酵素の発現が高いレベルで維持されているという仮説と矛盾しない。もしこの仮説が正しいならば、逆に栽培系統の果実では、成熟後期では RIN がある遺伝子群の発現をほどほどに「抑制」し、過剰な軟化 (成熟) を抑制している、と解釈することも可能ではないか? つまり、RIN が「ripening inhibitor」の役割を果たしている、ということになる。冒頭で、野生型の遺伝子の機能は変異で見られる形質の逆になるので、遺伝子名と機能が正反対になるという話をしたが、RIN の場合は、一部 (全部ではないが)、野生型の遺伝子名と機能が一致する、ということになる。裏の裏は表だった、といった感じで少しキツネにつままれたような気分もするが、今回、慎重にすすめた研究結果を並べてみると、この仮説も必ずしも間違いではないはずである。今後の詳細な検討が必要になろう。

4. RIN のゲノム編集による新たな変異の影響

上述の RIN のタンパク質ができない変異 (ノックアウト変異) 以外に、もう一種類、ゲノム編集で RIN 遺伝子上に変異を作出している^{1,7)}。遺伝子の後半部分を標的とし、変異導入により終止コドンが生じるようなフレームシフトにより、野生型より少し短いタンパク質ができる変異である (変異の詳細は後述)。*rinG2* 変異と命名したこの変異体の果実は、栽培品種とも *rin* 変異体とも異なり、オレンジ色の果皮色を示した (図 1)。リコペンの蓄積に関しては、*rin* 変異体では全く見られないのに対し、*rinG2* 変異果実では栽培品種よりずっと少ないがそれでも明確な蓄積がみられた。一方でトマトの主要なもう一つのカロテノイドである β -カロテンに関しては、栽培品種よりも多く蓄積しており、*rinG2* 変異果実がオレンジ色を呈する理由と考えられる。そして特徴的なのが、果実軟化の抑制がみられたことである。軟化のスピードが栽培品種に比べて明らかに遅く、*rin* 変異体ほどではないが、室温で 2 カ月以上は姿を維持できる。

これらの表現型の根拠を明確にするために、やはりトランスクリプトーム解析から関連する遺伝子の

発現を調査した。すると、成熟時に進むカロテノイド合成の律速酵素と言われるフィトエンシターゼ (PSY) の遺伝子発現が、*rinG2* 変異果実では栽培品種よりも若干低い程度で明確な発現がみられ、発現が強く抑制されている *rin* 変異体とは大きく異なる。栽培トマトは成熟期間中に赤色色素であるリコペンを大量に蓄積するが、これは前駆体からリコペンが合成されるまでの代謝経路に関わる多数の酵素（ここに PSY も含まれる）がこの期間に活性化すると同時に、リコペンを次の代謝物質へ変換する経路が抑制されるためである（図 3）。リコペンの次の代謝物の一つが β -カロテンであるが、栽培品種ではその代謝に関わる酵素リコペン β -シクラーゼ (*CrtL1*) 遺伝子の発現が成熟前の強い発現から成熟中に強く発現抑制されるのに対し、*rinG2* 変異果実では発現がそれほど下らない。つまりせっかく作ったリコペンを、せっせと代謝して β -カロテンにしており、そのためオレンジ色を呈しているわけである（図 3）。

軟化の抑制に関しても、種々の細胞壁関連酵素遺伝子の発現を検討した。*PG2a* や *Cel2*, *MAN4* について、栽培系統と比べ *rinG2* 変異トマトで顕著な発現低下がみられ、軟化への関与が予想される。しかしながら *PG2a* と *MAN4* に関しては、それぞれを組換え法により発現を抑制した報告があるが、軟化に顕著な影響はないとされている^{8,9)}。一方、最近 *PL* がトマトの軟化に強く影響すると報告されている¹⁰⁾ が、*rinG2* 変異では明確な発現低下がみられていない。果実軟化は複合的な要因で進むとされており、解析が困難な分野の一つである。これまで、軟化しない変異体として *rin* 変異を持つ果実が研究に用いられてきたが、関連しそうな酵素遺伝子が軒並み発現低下していて、狙いを絞りづらかった面がある。軟化の抑制程度は若干劣るが、*rinG2* 変異体のさらなる解析で、果実軟化に関わる酵素を絞り込めるのではないかと期待している。

日持ち性改善はトマトの重要な育種目標であり、*rinG2* 変異のもとらす果実の軟化抑制効果は育種素材として魅力的である。緑から淡黄色程度にしか変化しない *rin* 変異と異なり、成熟期間にカロテノイド生産が増加する *rinG2* 変異のユニークな特徴も期待を高めるものであるが、やはりトマトは鮮やかな赤になってこそ、食品としての価値が高いのでは

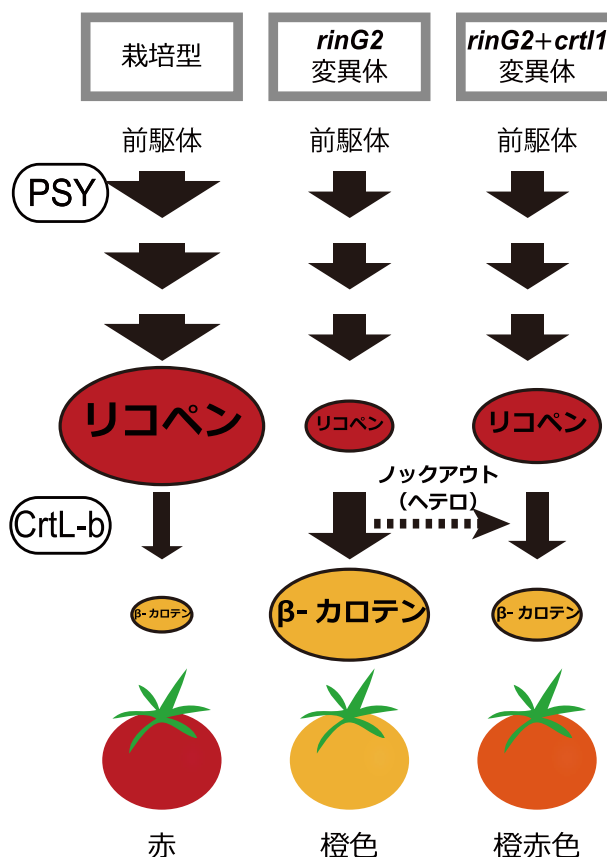


図 3 *rinG2* 変異体のカロテノイド合成経路とリコペン高蓄積の試み

成熟期の栽培トマトでは、フィトエンシターゼ (PSY) 等の酵素の発現が増大して赤色色素であるリコペンの合成を促進するとともに、リコペンの代謝を行うリコペン β -シクラーゼ (*CrtL-b*) の発現が低下することにより、リコペンが多く蓄積する。*rinG2* 変異体では *CrtL-b* の発現が低下しないので、リコペンが代謝されて蓄積量が減少する。*CrtL-b* 遺伝子のノックアウト変異をホモに持つと植物体は致死だが、ヘテロだと生育して、*rinG2* 変異体の低リコペン蓄積を一部回復させることができた。

ないだろうか。前述の通り、*rinG2* 変異果実はリコペンが代謝された β -カロテンが蓄積しているので、この代謝反応を触媒している酵素の遺伝子 *CrtL1* をノックアウトすることにより、リコペンの蓄積が改善するのではないか？この可能性を検証するために、*rinG2* 変異体にさらにゲノム編集法で *CrtL1* を標的とした二重変異体の作出を試みた。ところが、*CrtL1* 遺伝子のノックアウト変異をホモに持つとアルビノ植物になって生育できないことが判明した。このことから葉などでは光合成装置に結合するカロテノイドを合成するために *CrtL1* が必須であると思われる。しかし変異をヘテロに持つ植物は生育できることが分かったので、その果実を観察すると、確

かにリコペン蓄積が改善し、見た目にも明るい橙赤色の果実となった (図 3)。このことから、*rinG2* 変異果実でリコペンが減少するのは、リコペン β -シクラーゼの活性が維持されるためであることが裏付けられた。*CrtL1* 遺伝子のノックアウト変異のホモ植物体が維持できないため育種的な利用は困難であるが、可能性としては、*rinG2* 変異体にヘテロで *CrtL1* のノックアウト変異をヘテロに持つ植物を、クローン苗という形で増殖・栽培に用いる、という方法しかないだろう。トマトにはリコペン β -シクラーゼをコードする遺伝子が、実はもう一種あり、こちらは生育には必須でない。この遺伝子の変異 (*old gold*¹¹⁾) により果実のリコペン蓄積が改善して栽培トマトがより赤くなることが知られている。こちらの変異と *rinG2* 変異を組み合わせることで、赤くて日持ちのよい果実が育成できる可能性がある。

5. *RIN* の変異バリエーションと分子機能の変化

以上のように *RIN* 遺伝子に起こった様々な変異により、予想以上に多様な表現型を示すことが明らかとなったが、その違いが生じた要因について、現在の分析結果から分かっている部分について、遺伝

子と、そのコードタンパク質の点から整理しておきたい (図 4)。

まず野生型 *RIN* 遺伝子のコードタンパク質である MADS ボックス転写因子について説明をしておく。植物において MADS ボックス転写因子はその生活環境の中で様々な役割をしているものが知られているが、最も詳細に研究されているのが、花の器官分化の制御であろう。数種の MADS ボックス転写因子がさまざまな組み合わせで高次複合体を形成し、ガク、花弁、雄蕊、雌蕊のそれぞれが分化する制御の仕組みを「ABC モデル」として説明されている¹²⁾。シロイヌナズナの MADS ボックス転写因子のうち、*RIN* と最も相同性が高いのは、花器官分化に関わる MADS ボックス転写因子の一つ、*SEPALLATA (SEP)* である^{13,14)}。参考までに、シロイヌナズナの果実で *RIN* と同じような役割を果たす遺伝子は見当たらないことを付け加えておく。昔々に、シロイヌナズナとトマトの共通の先祖植物に果実の成熟制御に関わる *RIN* のプロトタイプ的な遺伝子があって、両種が分化した後にシロイヌナズナのグループでは *RIN* を失ったのか、あるいは両種がそれぞれ枝分かれして別の植物種となった後に、トマトのグループで

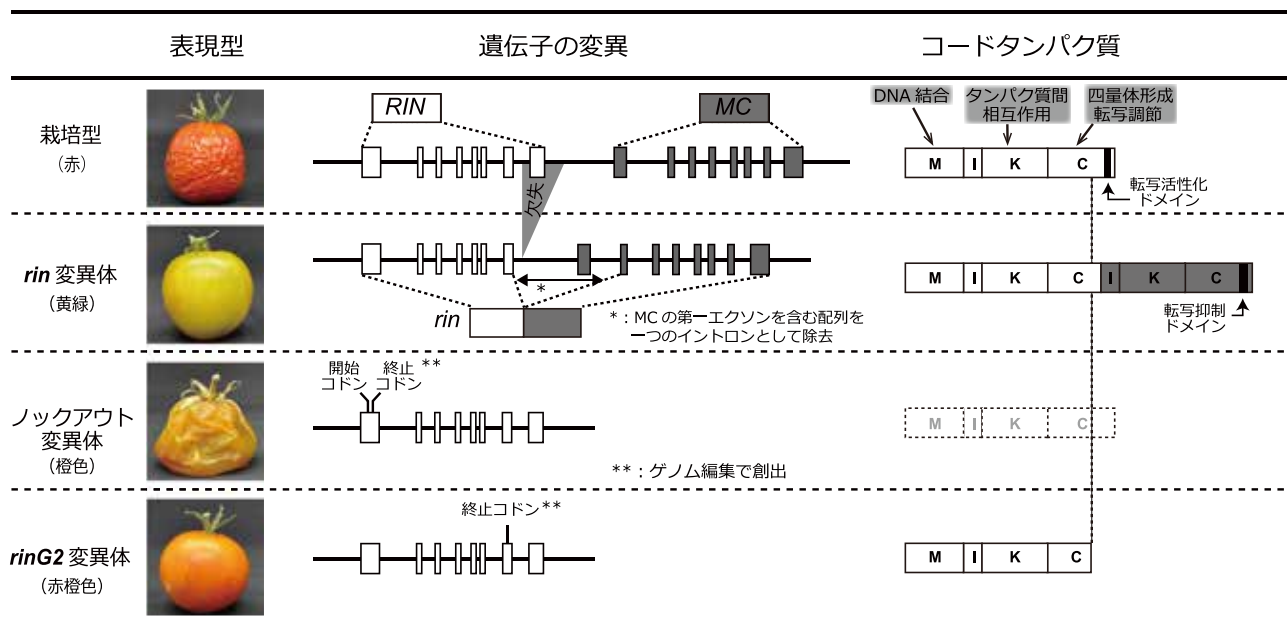


図 4 *RIN* 遺伝子の変異とタンパク質構造

RIN 遺伝子がコードする MADS ボックス転写因子は M, I, K, C の四つのドメインから構成されている。栽培型では、C ドメインに転写活性化ドメインが含まれる。*RIN* 遺伝子のすぐ隣に *MC* 遺伝子がある。*rin* 変異により欠失が起こった結果、*RIN* と *MC* の融合タンパク質が合成され、転写抑制機能が付加される (本文参照)。ゲノム編集を適用した結果、*RIN* の開始コドン直後に終止コドンができた場合は、タンパク質ができないノックアウト変異となり、遺伝子後半に終止コドンができた場合は、C ドメインの途中までのタンパク質ができる。この短くなったタンパク質は、転写活性化能を失っている。

SEP から派生した遺伝子が果実成熟に関わるようになったのか、その起源も果実の組織や成熟の進化を考える上で興味深い。

異なる *RIN* 遺伝子の変異がどのようにコードタンパク質の分子機能を変化させているのかを考えるために、先に MADS ボックス転写因子の分子構造を説明する。*RIN* が属する TypeII 型の MADS ボックス転写因子は、図 4 の通り四つのドメインから構成されており、一番最初の M ドメインに DNA 結合機能、その後の I, K ドメインはタンパク質間相互作用があるとされる¹⁵⁾。最後の C ドメインは MADS ボックス転写因子間でも配列・機能に多様性が高く、あるものは転写活性化機能があるとされており、また四量体形成に必要であるとも言われている。

野生型の *RIN* タンパク質は、典型的な MIKC ドメイン構造を持ち、*SEP* 型の分子機能の特徴を示す。M ドメインが結合する DNA 配列は *SEP* の結合配列と類似しており、また C 末端には転写活性化する機能がある¹⁶⁾。さらに成熟制御に関与する MADS ボックス転写因子、*TAGL1* や *FRUITFULL* ホモログ (*FUL1*, *FUL2*) と四量体を形成する¹⁷⁾。

次に一番複雑な、*rin* 変異型の対立遺伝子がコードするタンパク質について説明する。*rin* 変異によりコードタンパク質が、転写活性化因子から転写抑制因子に変換される、そのプロセスとなる。この変異の実態は、*RIN* 遺伝子の最終エクソンおよび遺伝子の転写が終わるターミネーター領域を含む 1.7kb の欠失である⁴⁾ (図 4)。この欠失により、この遺伝子座で転写が起こると、転写が止まるはずの *RIN* 遺伝子のターミネーター領域がないために、延々と隣の遺伝子、*MC* (*MACRO CALYX*) のターミネーター領域まで転写が続く。次にスプライシングが起こるが、*RIN* 遺伝子の最終エクソンの前にあるイントロンでは、終わりとなる配列も失っている。そのためこのイントロンは、となりの遺伝子の第一イントロンの終わりとなる配列までを一続きと認識され、長い配列がスプライシングで除去されることになる。結果として、*RIN* の最終エクソンと隣の遺伝子の第一エクソンを抜き出した、*RIN* と *MC* の融合した mRNA が出来上がる。ここで一つの注意点は、*RIN* の最終エクソンには転写活性化ドメインがコードされており、*RIN* の重要な機能が失われることで

ある。この融合した配列は、後半部分 (*MC* コード領域) もコドンの読み枠のずれが起こらないため、結果として、長い融合タンパク質ができる。気になるのは、後ろに繋がった *MC* の機能であろう。*MC* も実は MADS ボックス転写因子の一つであり、配列の類似性からシロイヌナズナの *APETALA 1* (*AP1*) のホモログとされる。しかし転写活性化機能を持つとされる *AP1* と異なり、*MC* は転写の抑制機能を持っており、それはタンパク質の C 末端側に存在する⁵⁾。つまり融合タンパク質は、元の *RIN* から転写活性化ドメインを除き、逆の活性である転写抑制機能が付与されたことになる。この融合タンパク質は、DNA に結合することができるが、野生型の *RIN* のパートナーと複合体を形成して結合するのではなく、自分自身とホモ二量体を形成して結合する活性が認められている⁵⁾。ゲノム編集技術が進んだ現在、*rin* 変異で生じた 1.7kb の欠失を人為的に起こすことは不可能ではないが、そもそもこの部分を削って転写活性化因子を抑制因子に変換する、そんな大胆で精密に計算されたかのような機能変換を起こすゲノム編集デザインを思いつけるような人間はいるだろうか？偶然の産物とは言え、人知を超える自然の力に驚嘆を覚える一つの例だと思っている。

ゲノム編集で創出した変異のうち、ノックアウト変異型の対立遺伝子からはタンパク質の蓄積が認められないので、特に機能的に言及する点はない。*rinG2* 変異は、遺伝子の後半部分を標的としたゲノム編集を行い、遺伝子の途中で終止コドンが生じている。その結果、野生型 *RIN* タンパク質が 242 アミノ酸から構成されているのに対し、C ドメインの中ほどから後ろの 43 アミノ酸が欠失した短いタンパク質が合成される (図 4)。この欠失により転写活性化能を失うが、*rin* 変異と異なって転写抑制能もなく、転写に与える影響としてはニュートラル、と言えるだろう。野生型と同じように、*TAGL1* や *FUL* と四量体を形成することができ、果実細胞内でも野生型の標的遺伝子のプロモーターに結合していることが確認されている。転写活性化あるいは抑制もしないこの複合体の結合が、転写にどのような影響を与えるのか、この部分はよく分かっていない。しかしながら、*RIN* 複合体が全くないノックアウト変異体と比較しても、同じような転写のパターンを示す標的遺伝子と、全く異なっている遺伝子があり、

rinG2 タイプの複合体にも何かしらの作用があると考えるのが妥当だろう。

おわりに

トマトの *RIN* 遺伝子上の様々な変異によって、これほどまでに多彩な表現型を示したことは実に予想外な結果である。ゲノム編集作物の国内での取り扱いについては、ゲノムの特定の位置を切断して、その後生体の修復メカニズムのエラーで生じた変異については、遺伝子組換え体としての規制の対象外とされた (<https://www.env.go.jp/press/106439.html>; なお、すべてのゲノム編集生物が対象外とされた訳ではないので注意が必要である)。今回育成されたノックアウト変異と *rinG2* 変異はこのカテゴリーに含まれ、今後その特徴を活かした実用育種につながることを期待したい。

本稿ではトマトの成熟制御因子 *RIN* について、これまで常識として考えられてきたその機能を大きく見直す必要があることを、筆者らの最近の知見を中心に述べた。この長年信じられてきた解釈の誤りはどこから生まれたかと言うと、*rin* という、極めて表現型がはっきりとした変異体が、この遺伝子座の最初の変異として見つかったためではないのか、と想像している。もし、この遺伝子座で最初に見つかった変異が *rin* ではなく、筆者らが作出したようなノックアウト変異であつたらどうだっただろう？ きっと、軟化が異常に進行してしまうことが一番に注目されて、変異名は *over softening* であるとか、あるいは *abnormal softening* のようになっていたかもしれない。そして、野生型の対立遺伝子（つまり *RIN*）が、最初から「軟化の抑制因子」と予測されたのではないだろうか？ だとしたら、これまで示されてきた成熟制御モデルは大きく書き換えられていたはずである。あるいは、最初に見つかった変異が *rinG2* 変異だつたらどうであろうか？ こちらは、オレンジ色の果実色が注目されて *orange ripening* のような名前だったかもしれない。いずれにしろ、*rin* 変異のような強烈なインパクトがある表現型で

はないので、研究対象としてはもっと地味な遺伝子になっていたかもしれない。

このような誤った解釈は、「突然変異＝遺伝子の機能がなくなる」、という思い込みからきたのではないだろうか？ 例えば赤い花色の植物が白い花を付けるようになった変異では、赤色素を合成する代謝経路の酵素遺伝子が機能を失った、という分かりやすい事例でいうとそれが正解かもしれない。しかし今回の *RIN* の事例は、変異体の表現型の変化は、必ずしもコードタンパク質の機能を失うことによるとは限らず、変異の種類によってはむしろ逆方向に表現型が向かうような、想定外のことが起きる可能性があることを示している。そもそも、多くの集団から変異体を選ぶときには、特別に派手な違いを示すものが好んで選抜されるのではないか？ しかしそれは、遺伝子が機能を失った変異であると第一に考えるのは危険で、むしろ、そんな派手な変異を起こすのは想像もつかない遺伝子の構造変化の賜物なのかもしれない。今回の *rin* 変異は典型的なその例で、隣の遺伝子と融合して機能をミックスしてしまうという、驚くような離れ業が現実起こっている。また、トマトでは *rin* と同じような成熟しない表現型を示す二つの変異、*non ripening (nor)* と *Colorless non-ripening (Cnr)* が知られているが、いずれも野生型遺伝子にゲノム編集でノックアウト変異を誘発しても、それぞれのオリジナルの変異体とは異なり、成熟が開始している^{18,19)}。こう考えると、従来の多くの変異体の研究において、見つかった遺伝子に対して RNAi 法やアンチセンス法で野生型遺伝子の発現を抑制した組換え体を作成し、その機能を確認する手法が取られてきたが、オリジナルの変異体と組換え体の表現型が異なるケースとなった場合、解釈が難しく、論文として報告されなかった例も数多くあるのではないか？ 本当は妥当な結果だったのかもしれないのに、である。こう考えると、ゲノム編集法の普及が、画期的な作物の育種に利用されるだけでなく、近年の生物学の常識を大きく書き換える可能性も大いにあろう。

参考文献

1. Ito, Y., Sekiyama, Y., Nakayama, H. *et al.*: Allelic mutations in the ripening -inhibitor locus generate extensive variation in tomato ripening. *Plant Physiol* **183**: 80-95, 2020.
2. 伊藤康博：高日持ちトマトの謎が明らかに一半世紀にわたる成熟制御因子の誤解を解く. *New Food Industry* **60**(9): 1-10, 2018.
3. Robinson, R., Tomes, M.: Ripening-inhibitor: a gene with multiple effects on ripening. *Rep Tomato Genet Coop* **18**: 36-37, 1968.
4. Vrebalov, J., Ruezinsky, D., Padmanabhan, V. *et al.*: A MADS-Box gene necessary for fruit ripening at the tomato ripening-inhibitor (rin) locus. *Science* **296**: 343-6, 2002.
5. Ito, Y., Nishizawa-Yokoi, A., Endo, M. *et al.*: Re-evaluation of the rin mutation and the role of RIN in the induction of tomato ripening. *Nat Plants* **3**: 866-874, 2017.
6. Li, S., Xu, H., Ju, Z. *et al.*: The RIN-MC fusion of MADS-Box transcription factors has transcriptional activity and modulates expression of many ripening genes. *Plant Physiol* **176**: 891-909, 2018.
7. Ito, Y., Nishizawa-Yokoi, A., Endo, M. *et al.*: CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the RIN locus that regulates tomato fruit ripening. *Biochem Biophys Res Commun* **467**: 76-82, 2015.
8. Wang, A., Li, J., Zhang, B. *et al.*: Expression and location of endo-beta-mannanase during the ripening of tomato fruit, and the relationship between its activity and softening. *J Plant Physiol* **166**: 1672-84, 2009.
9. Tucker, G., Yin, X., Zhang, A. *et al.*: Ethylene †and fruit softening. *Food Quality and Safety* **1**: 253-267, 2017.
10. Uluisik, S., Chapman, N.H., Smith, R. *et al.*: Genetic improvement of tomato by targeted control of fruit softening. *Nat Biotechnol* **34**: 950-2, 2016.
11. Ronen, G., Carmel-Goren, L., Zamir, D. *et al.*: An alternative pathway to beta -carotene formation in plant chromoplasts discovered by map-based cloning of beta and old-gold color mutations in tomato. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 11102-7, 2000.
12. Coen, E.S., Meyerowitz, E.M.: The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* **353**: 31-7, 1991.
13. Honma, T., Goto, K.: Complexes of MADS-Box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs. *Nature* **409**: 525-9, 2001.
14. Ditta, G., Pinyopich, A., Robles, P. *et al.*: The SEP4 gene of *Arabidopsis thaliana* functions in floral organ and meristem identity. *Curr Biol* **14**, 1935-40, 2004.
15. Shore, P., Sharrocks, A.D.: The MADS-box family of transcription factors. *Eur J Biochem* **229**: 1-13, 1995.
16. Ito, Y., Kitagawa, M., Ihashi, N. *et al.*: DNA-binding specificity, transcriptional activation potential, and the rin mutation effect for the tomato fruit-ripening regulator RIN. *Plant J* **55**: 212-23, 2008.
17. Fujisawa, M., Shima, Y., Nakagawa, H. *et al.*: Transcriptional regulation of fruit ripening by tomato FRUITFULL homologs and associated MADS Box proteins. *Plant Cell* **26**: 89-101, 2014.
18. Gao, Y., Wei, W., Fan, Z. *et al.*: Re-evaluation of the nor mutation and the role of the NAC-NOR transcription factor in tomato fruit ripening. *J Exp Bot* **71**: 3560-3574, 2020.
19. Wang, R., Tavano, E., Lammers, M. *et al.*: Re-evaluation of transcription factor function in tomato fruit development and ripening with CRISPR/Cas9-mutagenesis. *Sci Rep* **9**: 1696, 2019.

アスペルギルス属かび毒産生菌の多様性の検出 ～ DV-AM 法と画像解析・AM 法とのコンビネーション～

久城 真代 (KUSHIRO Masayo)¹ 矢部 希見子 (YABE Kimiko)²

Key Words: かび (糸状菌), アフラトキシン (AF), アンモニア (AM), ジクロロボス (DV), 土壌, 多様性

はじめに

かび (糸状菌) は, 人や動物と同様に従属栄養生物であり, 自然界に広く分布している。発酵食品や抗生物質を作るなど, 人々の生活を豊かにするかびが多数いるいっぽうで, 人畜に有害な毒素 (かび毒; マイコトキシン) を産生するかびも存在する。国際機関の以前の調査によると, 世界の重要穀類を含む農産物の 25% が, かび毒汚染により廃棄されている。かび毒として現在までに 300 種類以上の化合物が知られているが, 中でもアフラトキシン (AF) は, 強力な発がん性と急性毒性を有し, 諸外国で規制値が設定され, 管理対象となっ

ている (表 1)。AF 汚染は, 熱帯～亜熱帯圃場の土壌に生息する *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius* 等のアスペルギルス属菌の一部の菌が汚染源とされるが, 近年は, 地球規模の気候変動による AF 産生菌の北上が懸念されている。これまでに, 数多くの AF 産生菌検出法が開発されているが, 筆者らは, 日本で開発されたアンモニア (AM) 法¹⁾に, 長年の AF 生合成研究の成果を組み合わせ, 高度化した AF 産生菌の高感度検出法: ジクロロボス-アンモニア (DV-AM) 法²⁾を開発し, 以前 (2018 年) 本誌にて紹介した³⁾。さらに筆者らは, 土壌などの多様な微生物が共存するサンプルにも利用できる

表 1 各国のアフラトキシン規制

	規制値 (ppb = ng/g)	
	AFB ₁ 単独	Total AFs *
コーデックス基準		
加工原料用落花生, 加工原料用木の实*		15
直接消費用木の实*, 直接消費用乾燥いちじく		10
米国		20
欧州 (加工用)	5	10
欧州 (食用)	2	4
日本	10 (2011 まで)	10 (2011 以降)
豪州		15
カナダ		15
ブラジル		20

* Total AFs = AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ の和, 参考) FAO Food and Nutrition Paper #81, 2003

¹ 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 (農研機構)
食品研究部門 食品安全研究領域 食品化学ハザードユニット
〒305-8642 茨城県つくば市観音台 2-1-12
e-mail: kushirom@affrc.go.jp

² 福井工業大学 〒910-8505 福井県福井市学園 3-6-1

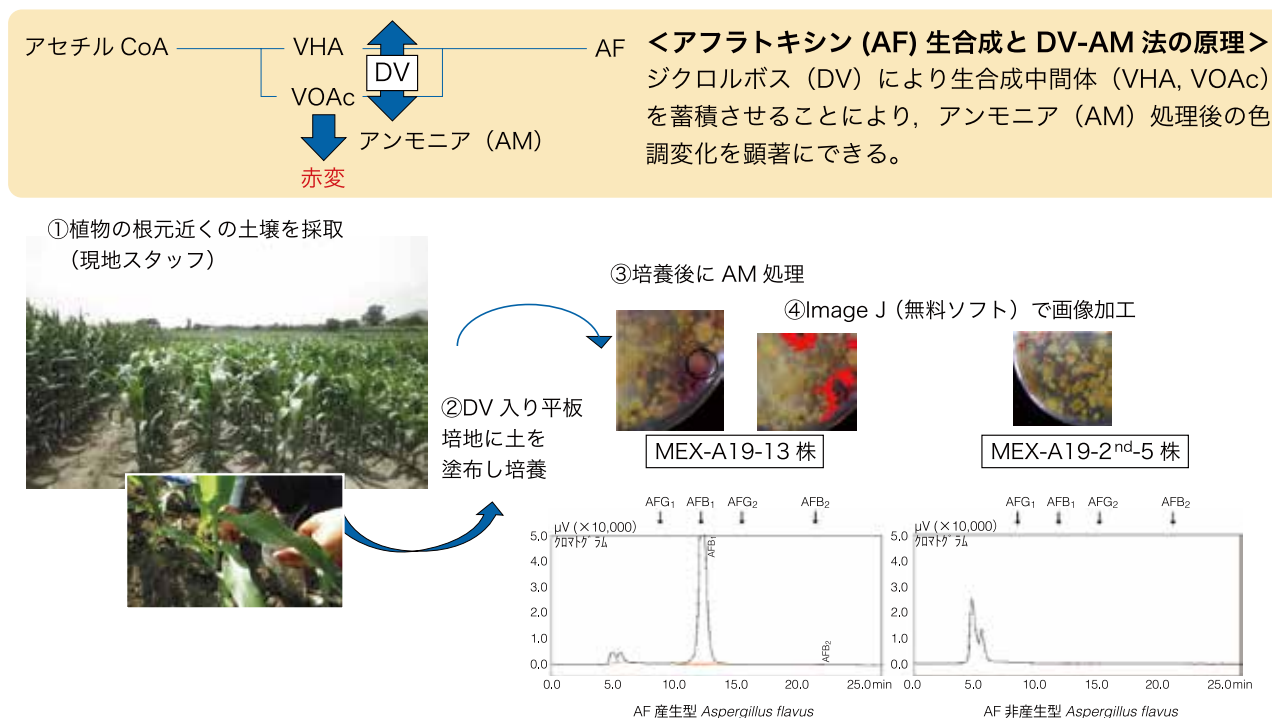


図1 メキシコでの土壌採取と DV-AM 法の実施

AF 生産菌の選択培地を開発し、この培地を DV-AM 法に利用することで様々なサンプルについて AF 生産菌を鋭敏に検出できることを明らかにした⁴⁾。この培地を用いた DV-AM 法は、菌を培養するだけの操作で、「毒素を作るか否か」を平板培地の色調変化観察により、目視で高感度な判別が可能である(図1上)⁵⁾。本方法は、高額な分析機器や遺伝子解析設備、高度な技術を必要としないため、フードチェーンの各工程に関与する事業者にとっても使用が容易かつ有益な技術であり、また食品中の AF 生産菌の検出にも有効である⁶⁾。本稿では、DV-AM 法のより広範な適用事例(画像解析ないし AM 法と組み合わせた土壌からの AF 産生菌の検出)として、最近の著者らの論文「メキシコのトウモロコシ圃場での調査」⁷⁾ならびに「沖縄のさとうきび圃場での調査」^{8, 9)}について解説する。

1. DV-AM 法と画像診断とのコンビネーション

土壌等の環境中に常在している AF 産生菌は、主に腐生菌として収穫後の農作物に付着し、温度や湿度などの条件が整うと繁殖して、保蔵中の農作物に AF を蓄積する。産生された AF は加熱調理等でも安定であり、除去や解毒が困難なため、各地の土壌における AF 産生菌の検知と初期防除が肝要である。

日本国内では AF の自然汚染事例(食品衛生法上、違反となるもの)として、2011 年に初めて1件(市場流通せず)が発生した。今後、温暖化の影響により、わが国でも AF 汚染事例が頻発する可能性がある。そこで、国内外の育種・栽培研究者の協力を得て、海外を含めたより広範な地域から、種々の作物の圃場土壌をサンプリングし、DV-AM 法による AF 産生菌の検出を試みることにした。

穀類の中では、トウモロコシの AF 汚染の報告が、ムギやコメに比べて圧倒的に多い。トウモロコシの原産地とされるメキシコ国内に、トウモロコシの品種改良を行う国際トウモロコシ・コムギ改良センター(CIMMYT)という国際農業研究協議グループ傘下の国際研究機関が設置されている。著者ら(久城、矢部)は縁あって、CIMMYT のトウモロコシ育種研究者であるロラツ博士(Dr. Aleksandre LOLADZE)の協力のもと、メキシコにて現地の技術スタッフに対して DV-AM 法のデモ実演を行うことができた。さらに、日本で開発された DV-AM 法の海外での適用可能性の検証を目的として、AF 汚染が問題となっている亜熱帯地域(メキシコ南東沿岸部 Agua Fria, 標高 80 m)のトウモロコシ試験圃場から土壌 20 点(A1 ~ A20)を採取して、現地スタッフとともに DV-AM 法による AF 産生菌の検出を試みた(図1①)。

採取した土壌を GYD-DV 平板培地（グルコースとイーストエキスを入れた寒天培地に、コロニーをコンパクトにするためデオキシコール酸を添加した培地⁴⁻⁶⁾に、DV を塗布）に撒き、25°C で培養後、アンモニア処理を行った（図 1 ②～③）。

その際、新たな手法としてフリーソフトウェアである Image J を用いて画像を加工することで、赤味が強調され、AF 産生菌をよりクリアーに識別できることが示された（図 1 MEX-A19-13 株）。一方、目視で微妙に赤変が観測された菌株では、Image J を用いた画像加工による赤味の強調は起こらなかった（図 1 MEX-A19-2nd-5 株）。これら菌株は、形態観察により、両株ともに *Aspergillus flavus* と考えられた。これら 2 株は、DV-AM 法の検出原理（図 1 上）より、AF 生合成中間体（VHA と VOAc）の蓄積量が異なる菌株と思われたが、最終産物である AF 産生にも差が見られ、前者は AF 産生（主要 AF のうち、B タイプの AFB₁ と AFB₂ を産生）、後者の AF 産生量は検出限界未満であった（図 1 ④）。

DV-AM 法の特色として、目視での赤変観察により AF 産生菌を分離できることが挙げられるが、画像解析を組み合わせ「赤味の強調が起こるか否か」を見ることで、AF 産生能の差異をより明確に識別できる可能性が示された。今回、同一の土壌（A19）から AF 産生能の異なる二系統の *A. flavus* が検出された⁷⁾。

以上より、日本で開発された DV-AM 法は、海外の圃場土壌でも適用可能であることが示された。1992 年にリオデジャネイロで調印された生物多様性条約、ならびに 2010 年の名古屋議定書の採択以降、締結国間では、生物資源の授受に MAT と PIC が必要となり、かび毒産生菌を含む糸状菌も例外で

はない。しかし、本共同実験を通じて、DV-AM 法を、実際に AF 汚染が問題となっているメキシコのトウモロコシ圃場に普及することが出来たと思われる。現在、ロラッズ博士のもとで、DV-AM 法を用いた AF 拮抗菌の効果（バイオコントロール剤として AF 非産生菌を利用したトウモロコシの AF 汚染低減）の検証が行われている（ロラッズ博士、私信）。

3. AM 法と組み合わせたスクリーニング

前述の通り、アスペルギルス属のかび毒産生菌のうち、AF 産生菌は、主に熱帯および亜熱帯地域に生息するとされている。日本国内の AF 産生菌の生息域については、1950 年代に真鍋らにより日本の広範な地域での調査が行われ、日本国内では、AF 産生菌は、主に真菌の繁殖や AF の生産に適した気候条件である沖縄本島のような年間平均気温が 18 度以上の地域で AF 産生菌が優占していることが明らかにされている¹⁰⁾。

沖縄ではサトウキビが広く栽培されており、サトウキビ畑からは、主要な AF 産生菌である *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* の分離報告が多い¹¹⁾。これら AF 産生菌のほとんどは、海外で開発された AFPA (*Aspergillus flavus/parasiticus* agar) 培地法¹²⁾を用いてスクリーニングされている。著者らは、DV-AM 法を沖縄のサトウキビ畑の土壌試料から AF 産生アスペルギルス属菌をスクリーニングするために適用してみた。

現地の方々の協力により土壌を採取し、1 回目のスクリーニングを行った結果、土壌サンプル 1 点（K22）より、多くの陽性（アンモニア処理により赤く色調変化）コロニーを見出した（図 2）。1 株（OKI-12）をピックアップし、形態観察ならびに分

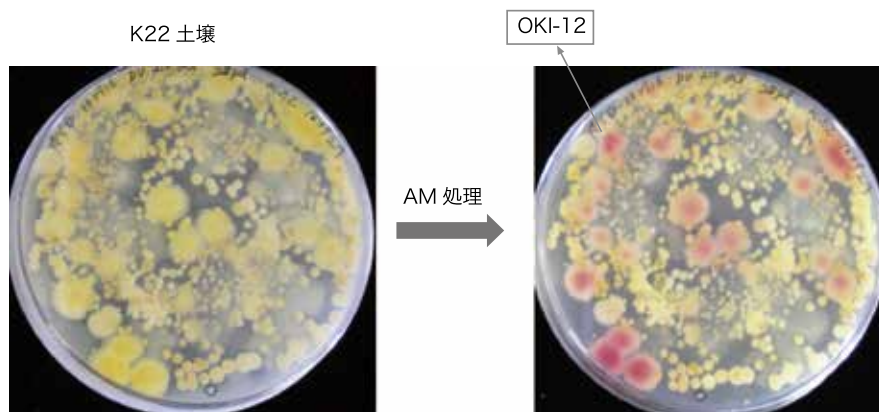


図 2 DV-AM 法でのコロニー識別

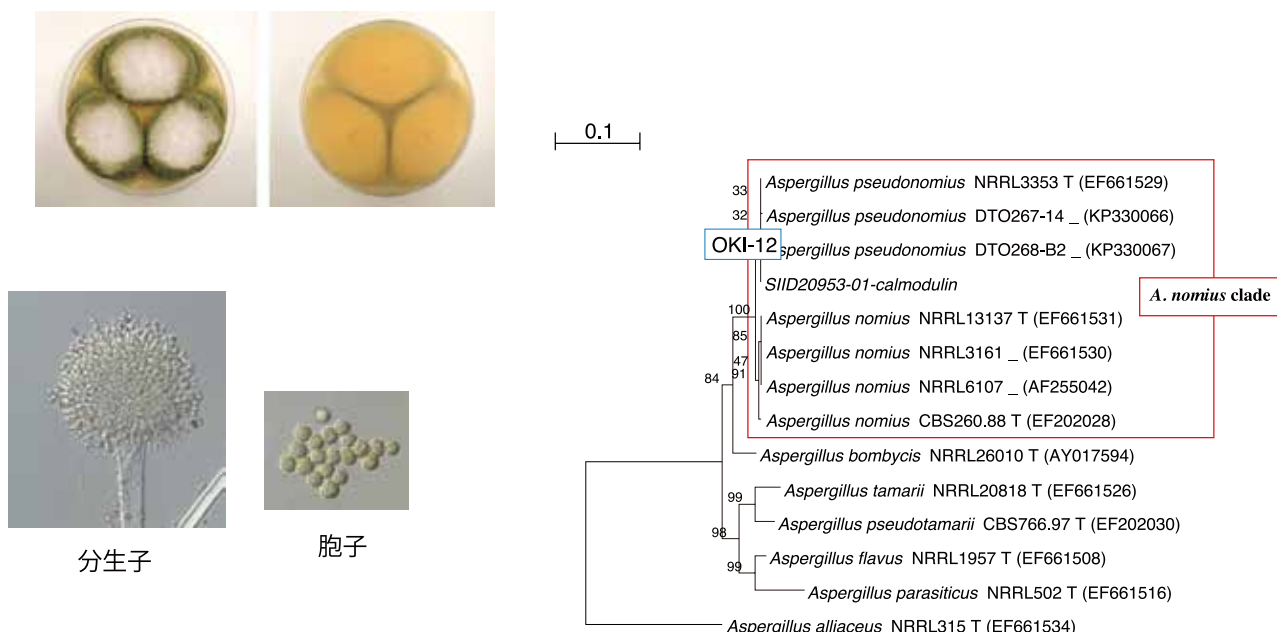


図3 OKI-12株の形態観察と分子系統解析

子系統解析を行った結果、*Aspergillus nomius* cladeに位置する *A. pseudonomius* というマイナーなAF産生菌の一種であることが判明した（図3）。よって、DV-AM法が、*A. flavus*, *A. parasiticus* 以外のマイナーなAF産生菌の分離にも適していることが示された⁸⁾。

さらに、OKI-12株が出現したのと同じ土壌サンプル（K22）を用いてより多種のAF産生菌の分離を試みた。この際、DV-AM法での色調変化の観察に引き続いて、従来のAM法を用いたシングルコロニーアッセイを行った。具体的には、DV-AM法での陽性コロニーを爪楊枝でピックアップして新しいGY培地（グルコースとイーストエキスのみの基本寒天培地）に移して再培養し、AM処理するとい

う、2ステップのスクリーニングを行った。

K22土壌を10枚のGYD-DV平板培地（#1～#10）で培養してDV-AM法を実施した結果、39個の赤色コロニーが見出された。その後、各コロニーをピックアップし、新しいGY培地に移してAM法でのシングルコロニーアッセイを行い、その形態観察を行った。生育した24コロニーのアスペルギルス属菌には、2グループが存在した。マイナーグループ（OKI-2nd-20と名付けられた1株）はAM蒸気で満たされると淡いピンク色を呈し、大多数のグループ（OKI-2nd-19, OKI-2nd-21を含む23株）は赤色を呈した（表2）（図4上）。

次いで、OKI-12とOKI-2nd-20の抽出物のAF産生性を比較した。OKI-2nd-20はOKI-12と同様に主要AFであるAFB₁, AFG₁, AFB₂, AFG₂を産生していたが、量的にOKI-12より低く、AFG₁産生がほとんどなかった（図4下）。このことから、OKI-2nd-20は他の主要な分離株とは別種の分離株の可能性があると考えられた。そこでさらに、微視的形態観察ならびにcmd遺伝子の部分塩基配列に基づいて分子系統解析を行った結果、本菌は*Aspergillus flavus* cladeに位置する*Aspergillus novoparasiticus*の近縁種であることが示された⁹⁾。

*A. novoparasiticus*はコロンビアやブラジルで環境もしくは臨床起源で報告されたばかりであり、本菌種の本邦での検出報告は初めてである¹³⁾。彼らの報告によると、AF産生菌の識別法として最も

表2 単離されたコロニー

培地 #	判定			
	成育せず	非アスペルギルス	薄桃色	赤色
#1	1			
#2		1		3
#3	1	1		3
#4	1	3		4
#5			1	1
#6				1
#7				1
#8	1	1		7
#9	2	2		3
#10		1		
計	6	9	1	23

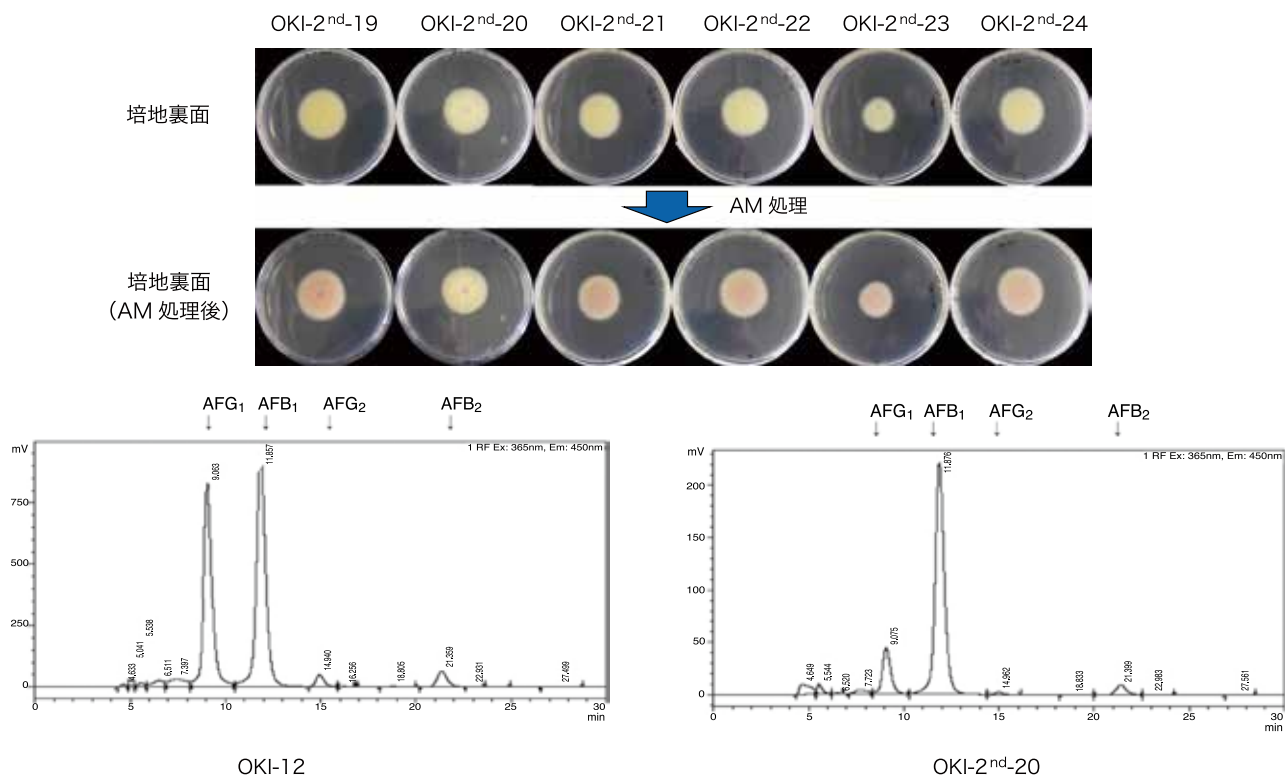


図4 AM法によるシングルコロニーアッセイとHPLCクロマトグラム比較

有名なAFPA培地法（前述）は、*A. novoparasiticus*の識別には適していない。今回、DV-AM法とシングルコロニーAM法の組み合わせにより、*A. novoparasiticus*をAF産生菌として識別することに成功した。シングルコロニーAM法は、もともとわが国でAF産生株の迅速なスクリーニングのために開発された簡便な識別法であり、本研究により、毒素産生量によるAF産生株の識別にも有用であることが判明した。以上から、DV-AM法とシングルコロニーAM法の組み合わせは、圃場土壌に生育するアフラトキシン産生菌の多様性の解明に適用できると考えられる。

おわりに

かび毒のなかでもAFは強い毒性を持ち、21世紀に入っても海外ではなお深刻な食中毒を引き起こしている。AFは安定な化合物であるため、無毒化よ

りもAFの生産段階での制御、すなわち産生菌の検出と防除がカギとなる。

今回著者らは、DV-AM法により、海外のトウモロコシ圃場からメジャーなAF産生菌である*A. flavus*でAF産生能が異なる菌を分離したほか、国内のサトウキビ畑で採取した土壌試料に*A. pseudonomius*と*A. novoparasiticus*という異なる種のAF産生菌が含まれていることを明らかにした。画像解析やAM法とのコンビネーションは、土壌に存在する様々なアスペルギルス属菌を解明するための強力な方法になりうる。

今回の結果は、異なる毒素産生能を持つ近縁のアスペルギルス属菌が同一環境下で共存しているという一般的な定説を裏付けるものである。天然物であるかび毒の農作物への汚染対策として、原因菌の動態解明のみならず、これらのアスペルギルス属菌間の関係についても今後研究が必要である。

参考文献

1. Saito M, Machida S.: A rapid identification method for aflatoxin producing strains of *A. flavus* and *A. parasiticus* by ammonia vapor. *Mycoscience* **40**: 205–221, 1999.
2. Yabe K, *et al.*: Development of the dichlorvos-ammonia (DV-AM) method for the visual detection of aflatoxigenic fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**: 10681–10694, 2015.
3. 久城真代, 矢部希見子: 培養による毒素産生型アスペルギルス属かびの検出法 - ジクロロボス - アンモニア蒸気法 (DV-AM法) *New Food Industry* **60**: 21–27, 2018.
4. Yabe K, *et al.*: Improvement of the culture medium for the dichlorvos-ammonia (DV-AM) method to selectively detect aflatoxigenic fungi in soil. *Toxins* **10**: 519, 2018.
5. Kushiro M, *et al.*: Application of newly-developed dichlorvos-ammonia (DV-AM) method to direct isolation of aflatoxigenic fungi from field soils. *Mycoscience* **58**: 85–91, 2017.
6. Yabe K, *et al.*: Detection of aflatoxigenic fungi in imported raw nuts using the dichlorvos-ammonia (DV-AM) method. *JSM Mycotoxins* **70**: 7–13, 2020.
7. Kushiro M, *et al.*: Detection of aflatoxigenic and atoxigenic Mexican *Aspergillus* strains by the dichlorvos-ammonia (DV-AM) method. *Toxins* **10**: 263, 2018.
8. Kushiro M, *et al.*: Isolation of minor aflatoxigenic fungi using dichlorvos-ammonia (DV-AM) method. *JSM Mycotoxins* **68**: 13–18, 2018.
9. Kushiro M, *et al.*: Detection of *Aspergillus novoparasiticus* from Japanese sugarcane field by the dichlorvos-ammonia (DV-AM) method with single colony AM assay. *JSM Mycotoxins* **70**: 51–56, 2020.
10. Manabe M and Tsuruta S: Geographical distribution of aflatoxin-producing fungi inhabiting in southeast Asia. *JARQ*. **12**: 224–227, 1978.
11. Takahashi H, Kamimura H, Ichinoe M: Distribution of aflatoxin-producing *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in sugarcane fields in the southernmost islands of Japan. *J. Food Prot.* **67**: 90–95, 2004.
12. Pitt JI, Hocking AD, Glenn DR: An improved medium for the detection of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *J. Appl. Bacteriol.* **54**: 109–114, 1983.
13. Gonçalves, S.S., Stchigel, A.M., Cano, J.F., Godoy-Martinez, P.C., Colombo, A.L., Guarro, J.: *Aspergillus novoparasiticus*: a new clinical species of the section Flavi. *Med. Mycol.* **50**: 152–160, 2012.

エタノールと水をめぐる話：エタノール溶液の殺菌力

古賀 邦正 (KOGA Kunimasa)*

Key Words: エタノール, 殺菌力, 抗ウイルス効果

新型コロナ (COVID-19) 騒ぎに明け暮れる毎日だが、年初には私たちの生活にこれほどの影響を及ぼすとは思ってもいなかった。あらためてパンデミックの恐ろしさを実感している。一日も早く落ち着いていた日々に戻ってほしいものだ。

この大騒ぎの中でマスクと消毒液としてのエタノールが注目を浴び、毎日の生活の中にすっかり定着してしまった。マスクはともかく、飲料としてのアルコールはすでにわが家の日々に定着して久しいが、消毒液としてのアルコールは確かに新型コロナ以来だ。スーパーや図書館など人の出入りが多い建物の入口には必ずエタノール入りスプレーが置いてあるし、わが家でも玄関・食卓・洗面所に鎮座して折々に私の保健生活の支えとなっている。

この消毒液としてのエタノールは 70% 近辺の濃度が最も殺菌力があるということをよく耳にする。実際、手元の市販のジェル入り消毒用アルコールスプレーにも「エタノール濃度 70%」と大きく書いてある。

その昔、私は企業の発酵関係の研究室に所属していたが、実験台には蒸留水の入った洗浄ボトルや「殺菌用アルコール溶液」と記した殺菌ボトルが置かれ、実験器具などの洗浄や殺菌に用いていた。この「殺菌用アルコール溶液」のエタノール濃度が 70% だった。もうはるか昔の話しかれど、このあたりの濃度が最も殺菌力があるという先輩の教えに従って新人の小生はなんの疑いもなく、アトロン缶入りの 96% 工業用エタノールに加水、約 70% に調製して

何十本とある「殺菌用アルコール溶液」と記したボトルに詰めて、各メンバーの実験台に置いてまわったことを懐かしく思い出す。

その後、ウイスキーの熟成研究に携わったが、ウイスキーの原酒を樽貯蔵する際のエタノール濃度が 60 ~ 70%。この濃度領域で最も樽材由来成分が抽出される。そういうこともあって、この 70% 近辺のエタノールの働きやその理由についてかねがね興味を覚えていた。そして、今回の新型コロナ騒ぎに出くわした。70% エタノール溶液が最も殺菌力があることを明らかにした人は誰だったのだろうか。新型コロナウイルスに対しても効果があるのだろうか。どのくらいの接触時間で効果を発揮するのだろうか。こういったことに関しての今までの世の中の研究結果について私自身の感想も加えながら紹介させていただこうと思う。

1. エタノール溶液の“殺菌力”の発見

微生物を最初に発見したのはアントニ・レーウェンフックで、17 世紀のことだ。彼は顕微鏡覗きを趣味とするオランダの貿易商だった。しかし、微生物が科学的な研究の対象になるには、19 世紀のルイ・パスツール (1822 ~ 1895) とロベルト・コッホ (1843 ~ 1910) の登場を待たねばならない。二人の素晴らしい業績の結果、微生物分野に多くの研究者が結集してさらに目覚ましい研究成果が成し遂げられた (図 1)。この時期 (1857 ~ 1910) は“微生物の黄金時代”と呼ばれている。

*一般財団法人 自然環境研究センター

1857	微生物による発酵・腐敗の発見（パスツール）
1861	自然発生説の否定（パスツール）
1864	パストウリゼーション（パスツール）
1867	外科治療（リスター）
1876	炭疽菌、コッホの三原則（コッホ）
1880	狂犬病ワクチン（パスツール）
1881	菌の純粋培養（コッホ）
1882	結核菌（コッホ）
1883	コレラ菌（コッホ）
1884	グラム染色法（グラム）
1898	赤痢菌（志賀 潔）
1910	梅毒治療薬サルバルサン（エーリッヒ、秦佐 八郎）

図1 微生物学の"黄金時代"

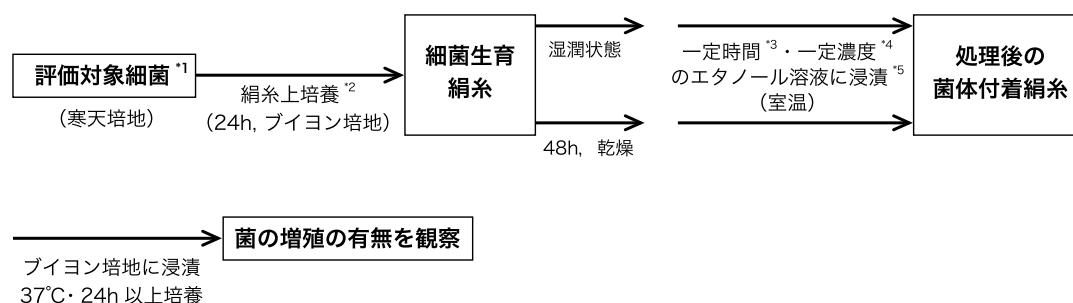
この時代、エタノールの殺菌効果に注目したのがコッホだった。“微生物学の祖”と言われるコッホの最初の仕事は炭疽菌（*Bacillus anthracis*）の純粋培養である。コッホは純粋培養に成功したことによって、炭疽菌が炭疽病の病原菌であることを突き止め、病原菌の証明指針としていわゆる“コッホの4原則”を提唱した。彼は*Bacillus anthracis* に対してのエタノールの効果を詳細に調べたが、残念ながら顕著な結果は得られなかったため、エタノールはコッホに“殺菌効果なし”の烙印を押されてしまった。エタノールは皮膚の脂質を取り去って、当時、殺菌剤として用いられていたフェノール溶液を皮膚深部に浸透させる補

助的な薬剤の役割に甘んじることとなった。いったん孢子形成するときわめて手ごわい*Bacillus anthracis* を評価対象としたためにこういう無残な結果になったのだろう。

その後、コッホやその弟子たちによって病原菌が次々と明らかにされて評価対象の菌種が増え、1894 年以降、エタノール溶液の殺菌剤としての働きが再度注目されるようになった。エタノール溶液は脂質を除去してより深部へ消毒薬を浸透させるばかりでなく、殺菌剤として皮膚の消毒が可能であるという報告がなされた。そして、乾燥状態の菌体と湿潤状態の菌体とではエタノール溶液の効き方が違うことが分かってきた。また、96% や 98% の高濃度エタノールには殺菌効果があまり認め

られないが、水を加えてエタノール水溶液にすると殺菌効果が向上することも分かってきた。この不思議な現象に興味をもたれて、多くの科学者がブドウ球菌、緑膿菌、枯草菌、炭疽菌、大腸菌などに対してエタノール濃度や処理時間を変えて実験を繰り返し、同様の結果を確認した。しかし、対象菌種や実験条件が異なるため“効き具合”が少しずつ異なっていた。

そこで、それまでの様々な報告・知見をもとに殺菌用エタノールについての詳細な検討が 1903 年にハーバード・メディカル・スクールのチャールズ・ハリントン（Charles Harrington; 当時、助教授）とハロルド・ウォーカー（Harold Walker; 当時、助手）



¹: 大腸菌群 (*Bacillus coli communis*), 緑膿菌 (*Bacillus pyocyaneus*), 黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus pyogenes aureus*), チフス菌 (*Bacillus typhosus*), ジフテリア菌 (*Bacillus diphtheriae*)

²: 植菌と同時に培地に絹糸を浸漬

³: 処理時間; 5m, 10m, 15m, 30m, 1h, 2h, 7h, 24h

5m で活性のあった場合, さらに 1m, 2m, 3m, 4m, 5m

⁴: エタノール濃度; 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 94, 99(V/V%)

⁵: 菌体が付着した絹糸をエタノール溶液に浸漬

図2 ハリントンらが行った実験

によってなされ、専門誌（Boston Med. Surg. ジャーナル）に報告された。

図2に彼らが行った実験の手順を示している。ブイヨン培地中の絹糸上で生育させた菌を絹糸ごと一定時間、一定濃度のエタノール溶液に浸漬した後、再度、ブイヨン培地に絹糸を戻して、絹糸上のエタノール処理菌がブイヨン培地中で増殖するかどうかを観察している。評価対象の菌としては、大腸菌群、緑膿菌、黄色ブドウ球菌、チフス菌、ジフテリア菌と幅広く行った。なお、ハリントンは学名で記しているが、微生物の分類体系が少しずつ見直されているため、学名が現在とは異なっているものもある。

どの菌の場合も乾燥状態の菌体は湿潤状態に比べてエタノール耐性が強いこととエタノール濃度が高いとエタノールの殺菌活性が弱まっていることが確認された。緑膿菌の結果を図3に示す。湿潤状態の菌体に対しては40%以上の濃度・5分のエタノール処理で殺菌できるけど、乾燥菌体を5分で殺菌しようとするれば40%～70%のエタノール濃度に限られてしまうことが分かる。評価した菌すべてに対してこれと類似した結果が得られた。

ハリントンらは一連の実験結果からエタノール溶液の殺菌作用について以下の7項目にまとめている。

① 99% エタノールは乾燥菌体に対して24時間接触

させても殺菌力を示さない。70%以上の濃度領域のエタノール溶液は殺菌力が弱く、この濃度領域では濃度が高いほど殺菌力は低下する。

② 孢子形成していない湿潤状態の菌体に対して40%以上の濃度のエタノール溶液は5分以内に殺菌効果を示す。また、1分以内に殺菌効果を示す濃度領域もある。

③ 40%以下の濃度のエタノール溶液は湿潤状態でも乾燥状態でも殺菌効果を示すのに時間がかかったり、結果が不確実だったりする。

④ エタノールに対して強い耐性を示す乾燥菌体に対して殺菌効果を示すエタノール濃度は60～70（v/v%）である。この濃度領域は湿潤状態の菌体にも最も効果的である（このことは処理時間を5分よりさらに短くすることによって明らかになった）。

⑤ 細菌の細胞壁は一定量の水を含まない時にはエタノールを通さない。しかし、30～60（v/v%）の水を含むエタノール水溶液と接した細菌は素早くそこから必要量の水を吸収し、その結果、エタノールは細胞壁を通過し、細胞質に達することができ、菌体を破壊するのだろう。

⑥ 70%以上の濃度のエタノール溶液は湿潤状態でも60～70%のエタノール溶液よりも殺菌効果が弱い。しかも、乾燥状態の菌体には殺菌効果がほとんどないのだから70%以上の濃度のエタノール

Alcohol		<i>Bacillus pyocyaneus</i> (Moist)									
		Time of Exposure									
%		5m.	10m.	15m.	30m.	45m.	1h.	2h.	7h.	24h.	
15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
20	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	
25	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	
30	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
40	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
50	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
60	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
70	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
75	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
80	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
85	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
90	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
94	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
99	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	

Alcohol		<i>Bacillus pyocyaneus</i> (Dried)									
		Time of Exposure									
%		5m.	10m.	15m.	30m.	45m.	1h.	2h.	7h.	24h.	
15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	
20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	
25	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	
30	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	
40	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
50	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
60	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
70	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
75	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
80	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
85	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	
90	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	
94	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
99	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

図3 緑膿菌に対するエタノール溶液の殺菌効果（ハリントンらの結果から）

＋：処理後の増殖あり，－：処理後の増殖なし

ル溶液は皮膚の消毒に用いるべきではない。

- ⑦通常、皮膚のさらに深部の菌を殺菌する場合にも 60～70% エタノール溶液が消毒薬として頼りになると考えられるが、必ずしも常に 5 分以内に菌体を破壊するとは言いきれない。

このように外科医らしい意見を加えてまとめている。また、ハリントンらは結果を示さず、エタノールは炭疽菌には効果がなかったことを付記している。そして、「この菌に対しては図にまとめる必要はない。コッホが繰り返し言っているようにエタノールはどんな濃度であっても効果がない。絶対濃度のエタノールで処理した場合、12 時間たつと菌は増殖を示した」と述べている。1903 年と言えば、コッホが 1900 年に最初のノーベル賞を受賞、微生物学者として多くの弟子を指導し、大活躍をしている時代であることから彼への敬意が感じられる。

なお、パスツール (1822～1895) はこの論文が発表される 8 年前に亡くなっている。パスツールはお酒の発酵も腐敗も微生物によることを明らかにした。また、微生物は神がつくったとする「自然発生説」を完全に否定した「白鳥の首フラスコ実験」なども行った。彼の業績が微生物学の夜明けを告げたとすると、コッホの業績は微生物学を確立したとすることができる。エタノール水溶液の殺菌作用・消毒作用が明らかにされたのもパスツールやコッホが登場した“微生物の黄金時代”の成果の一つなのだ。

2. エタノール溶液の“殺菌力”の概要

エタノールは昔から人類に馴染みのある素材でもあることから食品の保存料としての関心が高まった。実際に、醤油、味噌、ハンバーグ、麺類、水産練り製品、菓子などにエタノールを 1～3% 添加すると有害微生物の増殖を抑え、食品の保存期間を相当延長できることが明らかになった。“殺すか、殺さないか”も大事だが、微妙な作用を見つけ出してしまうくそれを利用することは科学の真髄とも言える。この分野での研究開発に長年携わってこられた山下勝氏はエタノールの微生物に対する作用を濃度別に以下のようにまとめている。

- ①低濃度 (1～8%) エタノールによる微生物増殖抑制作用：この濃度領域ではエタノールは微生物に対して殺菌作用を持たないが、微生物の増殖を

抑制することができる。そのメカニズムとしては、まず細胞膜の脂肪酸組成などが変化した結果、細胞膜の流動性や生理的性質が変化し、低分子物質が細胞内から細胞外へ漏出する。また、細胞膜のトランスポート系酵素が阻害されて細胞内への栄養素の取り込みが阻害される。細胞内酵素の働きも阻害されて ATP 合成や RNA 合成などが抑えられる。これら様々な働きが変調をきたした結果、微生物の増殖が抑制される。

- ②中低濃度 (8～20%) エタノールによる微生物の殺菌作用：この濃度領域では①で述べた現象がもっと明確になる。その結果、アミノ酸や RNA などの有機物や P, K などのミネラル成分の漏出が顕著となり、微生物は飢餓状態になって時間をかけてゆっくり死滅する。細胞からの成分漏出量と死滅との相関性の高いことが明らかにされている。なお、この領域で死滅した菌体の電顕写真では構造的に異常な点は見受けられない。

- ③中濃度 (20～40%) エタノールによる微生物の殺菌作用：20% 以上のエタノール濃度領域になると殺菌メカニズムが変わり、中低濃度領域では認められなかったカタラーゼの顕著な失活が観察される。他の補足実験でカタラーゼ活性と菌体のエタノール耐性とは密接に関係していることが明らかになった。また、カタラーゼ活性の低下とともに菌体内 H_2O_2 生成量が増すが、 H_2O_2 生成量と菌体死滅との相関性も高いことが知られた。なお、この領域では死滅菌体の細胞膜の一部損傷も観察された。従って、中濃度領域では中低濃度領域での死滅要因に加えて、カタラーゼの失活による菌体内 H_2O_2 生成量や菌体内酸化成分の増大、細胞膜の一部破損なども死滅の要因と考えられる。

- ④中高濃度 (40～80%) エタノールによる微生物の殺菌作用：従来から認められている短時間殺菌領域で、微生物の細胞膜が急速に破壊されたことによる死滅。電子顕微鏡でも細胞構造が破壊されていることが確認された。細胞からの顕著な漏出物の増大も観察されるが、これは死滅の原因ではなく、細胞膜が破壊された結果と考えられる。

- ⑤高濃度 (80% 以上) エタノールによる微生物の殺菌作用：常温で湿潤菌体に対しては 40～80% エタノール殺菌の場合と変わらず、微生物をほぼ完全に殺菌できる。しかし、0℃以下や乾燥菌体

に対しては殺菌力が低下する。80%の濃度を境にしてエタノールの溶液状態に違いがあると考えられる。

微生物に対してのエタノール溶液の殺菌作用を考えた場合、濃度領域によって変化するという山下氏の指摘は大変興味を持たれる。ウイスキー原酒はオーク樽で長期間貯蔵されるが、その原酒のエタノール濃度は通常、60～70%である。前述したようにこの濃度領域が最も樽材からの抽出成分が多く、原酒の熟成にとってきわめて大きな意味を持っている。また、加水（ブレンド）して40～43%に調製、暫く静置して後熟させた後に製品としている。熟成の妙を愉しむ場合は、そのままの濃度（ストレート）で味わったり、ほんの少し水を加えて香味の変化を感じとったりする。また、同量の水を加えて20%近辺の濃度で愉しむ場合も多くある（氷を加えてハーフロックという）。大抵の場合は、ハイボールや水割りにして10%以下で愉しむ。ウイスキーの場合には数えきれないほどの熟成成分が含まれていて、それらが大きな意味を持っている。また、微生物は単細胞生物であり、多細胞生物で皮膚・粘膜で外界と隔てられているヒトの官能とは大きな隔たりがあり、一概に消毒液としてのエタノール溶液とウイスキーとを比較することは軽率の誹りを受けるかも知れない。しかし、そうであったとしても、かねがね私は濃度の違いに伴うエタノール溶液の状態変化はウイスキーの香味に深く関わっているのではないかと考えている。従って、微生物に及ぼすエタノール濃度領域の違いに関して非常に興味を持たれるのだ。

3. 微生物やウイルスに対するエタノール溶液の“殺菌力”の定量的把握

消毒液としてのエタノール溶液は以下の通り規定されている。

日本薬局方（局方）	76.9～81.4（v/v）%
米国薬局方（USP-NF）	68.5～71.5（v/v）%
WHO ガイドライン	60～80（v/v）%

濃度範囲が少しずつ違っているが、これは2000年以前の実験データに基づいてそれぞれ決められたためということだ。殺菌力を評価する際の被験者の個体差、エタノール溶液と対象菌株種との混合比や

作用時間などの処理条件がそれぞれ少しずつ違っているのだろう。

ご承知の通り消毒用エタノールは採血する際や注射する際に、その部位の皮膚を消毒するのに用いられている。また、体温計、聴診器の消毒にも用いられている。“新型コロナ”登場以降は人の出入りの多い建物や施設に入る前にエタノール溶液を手にはスプレーしたり、食事前のテーブルやドアノブなどの頻繁接触部位を清拭するのも習慣になっている。このエタノール溶液による消毒作業によって実際にどの程度殺菌できているかを把握することはきわめて大事なことだ。

最近、神明朱美氏が種々の細菌・真菌・抗酸性細菌やウイルスに対してエタノール溶液が短時間でどの程度の殺菌効果や抗ウイルス効果を発揮するかを評価した結果を「殺菌・抗ウイルス効果に及ぼすエタノール濃度の影響」というタイトルの論文として報告している。大変興味深く読ませて戴いたのでその結果を引用させて戴くことにする。

評価に用いた菌を表1に示している。供試菌に対しての基本的な評価方法は共通だ。一般細菌の場合は供試菌体を培養後一定数に調製したものを供試菌液とする。供試菌液100μLをエタノール溶液900μLに添加して10秒間ボルテックスで攪拌した後、処理液を9倍量のリン酸バッファーに回収。10秒処理だからこの段階を手早くする必要がある。さらに10倍希釈系列を作製して生存菌数を測定する。得られた菌数は対数変換して「処理前の生菌数」から「処理後生菌数」を差し引いた指数減少値が5以上の場合を「殺菌効果あり」とした。すなわち、10秒間エタノール溶液に菌を懸濁させることによって菌数が10万分の1以下に減少した場合を「殺菌効果がある」と判断している。この方法だと乾燥状態の菌体の評価と90%以上のエタノール溶液の殺菌力の評価ができないが、通常のエタノール処理でどの程度の効果があるかということが明確になるし、最低どの濃度であれば「殺菌効果あり」と判断されるかの最小有効濃度が把握できる。手のひらにエタノール溶液をスプレーして10秒間手を擦り合わせたら菌数が劇的に減少する濃度領域が明らかになるわけで、きわめて有意義な知見が得られる。

一般細菌についてはグラム陰性菌；8種・10株、陽性菌；7種・9株について評価している。その結

表 1 供試微生物

I. グラム陰性菌			
1	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	JCM9659	
2	<i>Burkholderia cepacia</i>	NRBC15124	
3	<i>Escherichia coli</i>	ATCC10536	ATCC25922
4	<i>Klebsiella premoniae</i>	NBRC14940	
5	<i>Proteusu mirabilis</i>	NBRC105697	
6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC15442	ATCC27853
7	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>Enterica</i>	JCM1239	
8	<i>Serratia marcescens</i>	JCM1239	
II. グラム陽性菌			
1	<i>Enterococcus faecalis</i>	JCM5803	
2	<i>Enterococcus facium</i>	JCM5804	
3	<i>Micrococcus luteus</i>	NBRC3333	
4	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC6538	ATCC25923
5	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	臨床分離菌	
6	<i>Staphirococcus epidermidis</i>	JCM2414	
7	<i>Staphirococcus hemolyticus</i>	NBRC109768	
8	<i>Streptococcus pyogenes</i>	JCM5674	
III. 真菌			
1. 酵母糸状菌			
1	<i>Candida albicans</i>	NBRAC1393	NBRC1594
2	<i>Candida glabrata</i>	臨床分離菌	
3	<i>Candida orthopsilosis</i>	NBRC585	
2. 糸状菌			
1	<i>Aspergillus flavus</i>	NBRC5324	
2	<i>Aspergillus brasiliensis</i>		NBRC9455
3	<i>Aspergillus niger</i>	NBRC105649	
IV. 抗酸菌 1			
1	<i>Mycobacterium abscessus</i>	ATCC19977	
2	<i>Mycobacterium aurum</i>	ATCC23366	
3	<i>Mycobacterium avium</i>	ATCC19421	
4	<i>Mycobacterium chelonae</i>	ATCC19235	
5	<i>Mycobacterium intracelluiare</i>	臨床分離菌	
6	<i>Mycobacterium kansasii</i>	臨床分離菌	
7	<i>Mycobacterium terrae</i>	JCM12143	
V. ウイルスと感受性細胞			
1. ノンエンベロープウイルス			
1	<i>Adenovirus</i> (Ad) 2 型, 3 型, 5 型, 7 型, 8 型, 37 型 感受性細胞として A549 細胞 (ヒト肺がん由来)	JCRB0076	
2	<i>Coxsackievirus</i> A7 (CVA7), A16 (CVA1), B5 (CVB5) 感受性細胞として Vero 細胞 (アフリカミドリサル腎由来 DS ファーマ)		
3	<i>Felone calicivirus</i> F9 (FCV/F9) 感受性細胞として CRFK 細胞 (ネコ腎由来)	JCRB9035	
2. エンベロープウイルス			
1	<i>Influenzavirus</i> A A. Pdm. 2009 No48, A/FM/1/47, A/PR8, A/Tokyo/2/75, A/USSR/92/97 感受性細胞として MDCK 細胞 (イヌ腎由来)	JCRB9035	
2	Human herpesvirus 1 HF 株 (HSV-HF), Human herpesvirus 2 UW 株 (HSV-UW), 感受性細胞として Vero 細胞 (アフリカミドリサル腎由来 DS ファーマ)		

果、グラム陰性菌に対してはエタノール濃度 36% 以上で「殺菌効果あり」と評価されたのが 4 株、45% 以上で「あり」と認められたのが 5 株、54% 以上で認められたのが 1 株だった。一方、グラム陽性菌に対してはエタノール濃度 45% 以上の領域で「殺菌効果あり」と認められたのが 4 株、54% 以上で認められたのが 4 株、*S. epidermidis* が最もエタノール耐性

を持っており、63% 以上の濃度のエタノール溶液で処理した場合に「殺菌効果あり」という結果だった。従来からグラム陰性菌より陽性菌のほうがエタノール耐性のあることが知られていたがそれを裏付ける結果である。図 4 にグラム陽性菌と陰性菌の細胞表層構造の違いが示している。リン脂質二重層からなる細胞膜の外側をグラム陰性菌も陽性菌もペプチドグリカン層の細胞壁が取り囲んでいる。ペプチドグリカン層はアミノ糖のポリマーで構成され、ポリマー同士がペプチドで架橋された袋状構造を形成していて細胞に物理的強度を与えている。グラム陽性菌はペプチドグリカン層が発達しているけど、陰性菌のペプチドグリカン層は薄く、さらにその外側を外膜が覆っている。外膜は内側がリン脂質、外側がリポ多糖と呼ばれる糖脂質からなる二重層だ。脂質成分を多く含む外膜がエタノール溶液によって破壊されやすいことがグラム陰性菌と陽性菌のエタノール耐性の違いとなったと考えられる。いずれにしても一般細菌はエタノール消毒で充分殺菌されることが確認された。

抗酸菌として *Mycobacterium* 属の 7 種、7 株が評価された。抗酸菌もグラム陽性菌であるが、増殖が遅く、一般細菌と異なる性質を示す。このグループは独特の複合的細胞壁を持っていて、その主要な細胞壁多糖はアラビノースとガラクトースの共重合体（アラビノガラクトタン）で、この多糖に菌群特有の炭素数の大きな脂肪酸（ミコール酸）を始め多くの複合脂質が結合している。この複合脂質が多く存在すると細胞壁の透過性は確実に低下することが知られている。抗酸菌は増殖が遅いため 10 秒のエタノール処理で菌数が 1 万分の 1 以下にまで減少した場合を「殺菌効果あり」と判断している。その結果、7

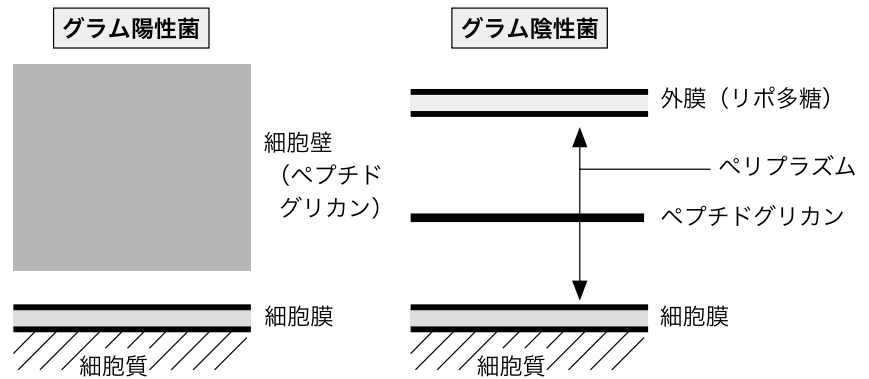


図 4 グラム陽性菌と陰性菌の細胞表層構造の違い

株のうち 2 株に対してエタノール濃度 45% 以上、3 株に対して 54% 以上、1 株に対して 63% 以上のエタノール溶液で「殺菌効果あり」だった。最もエタノール耐性は示したのは *M. intracellulare* で「殺菌効果あり」と判断するには 72% 以上の濃度のエタノール溶液が必要だった。抗酸菌は一般細菌よりエタノールの効きがよくないが、細胞壁の透過性の悪いことに起因していると思われる。なお、結核菌の *M. tuberculosis* もこのグループであり、脂質含量は菌体総重量の 25% 以上であることが知られている。エタノール溶液のターゲットの一つは脂質であると指摘されており、グラム陰性菌の外膜の場合にはその通りの結果だった。しかし、炭素数の多い複合脂質（ミコール酸は炭素数 60 個から 90 個）が結合している場合にはそうとは言えない結果となった。疎水性が強すぎるとエタノールの攻撃をはねつけてしまうのだろう。

真菌は酵母のような単細胞状真菌として *Candida* 属の 3 種・4 株、いわゆるカビのような糸状菌として *Aspergillus* 属の 3 種・3 株が評価されている。真菌は一般細菌ほど菌体密度が上がらないので、10 秒間のエタノール処理で 1 万分の 1 以下に菌数が減少した場合を「殺菌効果あり」としている。

単細胞状真菌に対してはエタノール濃度 45% 以上で 2 株、54% 以上で 2 株が「殺菌効果あり」を示し、糸状菌に対しても 54% 以上で 1 株、63% 以上で 2 株が「効果あり」を示した。一般細菌と同様、真菌に対してもエタノール消毒は効果的に働くことが確認された。

ウイルスにはノンエンベロープウイルスとエンベロープウイルスがあり、それぞれについて評価が行われた。両者の基本構造を図 5 に示した。ウイル

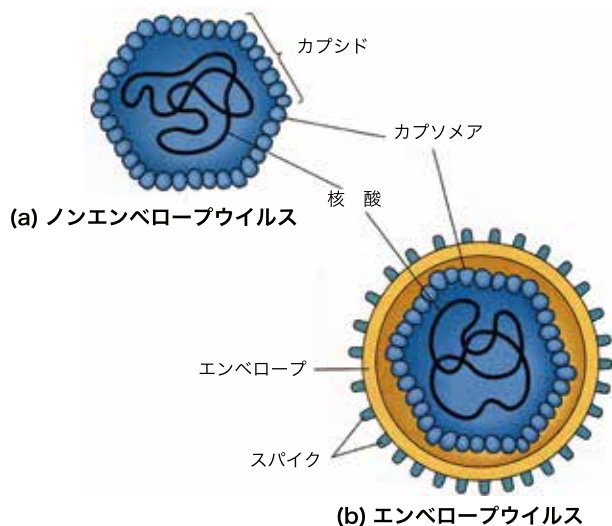


図5 ウイルスの一般的な構造
 (「Microbiology」より一部改変)

スの核酸はカプソメアというタンパクユニットからなるカプシドで守られている。カプシドをさらにエンベロープで覆っているのがエンベロープウイルス、そうでないのがノンエンベロープウイルス。エンベロープは脂肪、タンパク質、糖タンパク質で構成されている脂質膜だ。通常、エンベロープには感染する時に働くスパイクと呼ばれる突起がある。

評価されたウイルスはノンエンベロープウイルス；3種10株とエンベロープウイルス；2種7株。エタノールによる抗ウイルス効果については、保存ウイルス液（100 μ L）と種々の濃度のエタノール溶液（900 μ L）とを混合、一定時間（10秒）保持した後、直ちにウイルス感染価の測定を行った。ウイルス感染価の測定はエタノール処理液の10倍希釈系列を感染細胞の維持用培地で作成し、その10 μ Lを予め感受性細胞を培養した96well plateのwellに接種して、一定期間37 $^{\circ}$ Cで培養し、細胞変性効果を観察している。すなわち、ウイルス濃度が薄くなると感染力をなくすため、処理液をどこまで希釈すれば感染力を失くすかを把握してウイルス感染価

（TCID₅₀/10 μ L）を求めた。比較として、エタノールの代わりにリン酸バッファーを用い、感染価がエタノール溶液の10秒処理によって比較に比べて千分の一以下に低下した（LRが3以上）場合か検出限界以下を「ウイルス不活性化」としている。エンベロープウイルスに対しては、濃度36%以上のエタノール溶液で10秒処理すれば「不活性化効果あり」と評価されたのが1株、その他の6株も45%以上のエタノール溶液・10秒処理ですべて不活性化することが示された。ノンエンベロープウイルスに対してはエタノール濃度45%や54%で不活性化されるのもあったが、評価した条件で不活性化されないウイルスが多かった。しかし、エタノール処理を1分にすると濃度の違いはあるもののすべて不活性化される結果が得られた。エンベロープはエタノールの影響を受けやすい脂質膜から構成されているためこの様な結果となったのだろう。一方、カプシドはタンパク質で構成されていてエタノールの影響を受けにくいと考えられる。なお、動物性ウイルスは殆どエンベロープを有しており、新型コロナウイルスもエンベロープを有するRNAウイルスであることからエタノール溶液の不活性化力は比較的低濃度でも充分発揮されることが考えられる。因みにノロウイルスやロタウイルスはノンエンベロープウイルスでエタノール溶液は効きにくい、エタノール溶液にリン酸などを添加した「酸性エタノール溶液」を用いれば効果を発揮することが知られている。

また、エタノール溶液の効きにくいノンエンベロープウイルスも1分処理では不活性化されるが、この場合もエタノール濃度60%を中心に最も効果が顕れる現象が認められている。微生物に対してもウイルスに対しても効果的に働く60～80%の濃度領域のエタノール溶液はどのような状態にあるのだろうか。このことについて、また、機会を見つけてまとめてみたいと思っている。

参考文献

1. Charles Harrington and Harold Walker: The germicidal action of alcohol. *Boston Medical and Surgical Journal*, CXL VIII, 21: 548-552, 1903.
2. 山下 勝：アルコール類の微生物に対する作用、防菌防黴 24(3): 195-219, 1996.
3. 神明 朱美：殺菌・抗ウイルス効果に及ぼすエタノール濃度の影響、東京医療保健大学平成30年度博士学位論文
4. 百瀬 春生（編）：微生物工学（丸善株式会社）
5. G.J.Tortora, B.R.Funke, C.L.Case: Microbiology, The Benjamin/Cummings Publishing Company, INC.

腫瘍選択性が高く，副作用が低い 新規クロモン誘導体の開発

坂上 宏 (SAKAGAMI Hiroshi)¹, 杉田 義昭 (SUGITA Yoshiaki)², 高尾 浩一 (TAKAO Koichi)²,
永井 純子 (NAGAI Junko)³, 植沢 芳広 (UESAWA Yoshihiro)³,
飯島 洋介 (IIJIMA Yosuke)⁴, 佐野 元彦 (SANO Motohiko)⁵

¹ 明海大学歯科医学総合研究所 (M-RIO) sakagami@dent.meikai.ac.jp

² 城西大学薬学部生物有機化学 sugita@josai.ac.jp, ktakao@josai.ac.jp

³ 明治薬科大学医療分子解析学研究室 nagai-j@my-pharm.ac.jp, uesawa@my-pharm.ac.jp

⁴ 埼玉医科大学総合医療センター yoiijima@saitama-med.ac.jp

⁵ 星薬科大学実務教育研究部門 m-sano@hoshi.ac.jp

Key Words: クロモン誘導体, 腫瘍選択性, 有害事象, QSAR 解析, 作用メカニズム

Development of newly synthesized chromone derivatives with high tumor specificity, but low adverse effects

Abstract

Many of the anticancer drugs that have been developed so far cause side effects such as oral mucositis, neurotoxicity, and extravasation. In order to solve this problem, it is necessary to measure both tumor specificity and side effects at the same time using an *in vitro* experimental system of human cells. Recently, we have found that many of the natural organic compounds have low tumor specificity, but derivatives with substituents introduced into the chromone ring (contained in the flavonoid skeleton) show high tumor selectivity. We have succeeded in synthesizing several compounds keeping high tumor-specificity and low keratinocyte toxicity. Based on the review we recently published (Medicines (Basel). 2020 Aug 26;7(9):E50. Doi: 10.3390/medicines7090050), we describe the development of such new chromone derivatives and the future direction of our research.

要約

抗がん剤の多くは，口腔粘膜炎，神経毒性，血管外漏出による皮膚傷害などの有害事象を引き起こす。我々は，副作用の低い新規抗がん剤を探索するために，ヒト細胞を用いた *in vitro* 細胞傷害活性測定法を開発した。我々は，これまでに，天然有機化合物の多くは腫瘍特異性が低いこと，そして，クロモン環（フラボノイド骨格に含まれる）に置換基が導入された誘導体は高い腫瘍選択性を示すことを報告してきた。そして，高い腫瘍特異性と低いケラチノサイト毒性を維持するクロモン誘導体の合成に成功した。最近公開したレビュー (Medicines (Basel). 2020 Aug 26;7(9):E50. Doi: 10.3390/medicines7090050) に基づき，これまでの研究の進展の経緯と今後の方向性について解説する。

はじめに

これまで開発されてきた抗がん剤の多くは、口腔粘膜炎、神経毒性、血管外漏出による皮膚傷害などの有害事象を引き起こすことが明らかになってきた。この問題を解決するためには、ヒト細胞を用いた *in vitro* 実験系で、抗がん剤の腫瘍選択性と副作用の両方を同時に測定する必要がある。最近、我々は、天然有機化合物の多くは腫瘍選択性が低いが、フラボノイドの骨格に含まれるクロモン環に様々な置換基を導入した誘導体が高い腫瘍選択性を示すこと、また、その中で、ケラチノサイト毒性が低い化合物を合成することに成功した。我々の最近の総説¹⁾をもとに、これまでの研究を振り返り、今後の方向性について述べたい。

1. 抗がん剤の有害事象

1-1. 口腔粘膜炎

がん薬物療法や造血幹細胞移植において、口腔粘膜炎は発症頻度の高い有害事象の一つである。標準用量の化学療法を受ける患者の 5-50%、造血幹細胞移植などに関連する高用量化学療法では 68-98% の患者に口腔粘膜炎が発症すると報告されている。口腔粘膜炎は痛みにより患者 QOL を低下させるだけでなく経口摂取量を低下させ低栄養、脱水を招き全身状態を悪化させ、また細菌の侵入門戸となり全身感染症の契機になりえる。化学療法において投与量の減少、スケジュールの遅延はその有効性、生存率の低下につながるが現在、口腔粘膜炎に対する確立した予防法や治療法はなく、円滑ながん治療を妨げている。

1-2. 神経毒性

がん薬物療法は殺細胞性抗がん剤、分子標的治療薬の開発により生存率、QOL の向上に寄与してきた反面、がん薬物療法の副作用は QOL の低下を招き、薬物療法を中止せざるを得ない場面もある。代表的な副作用として骨髄抑制をはじめとする臓器障害、悪心、嘔吐のような身体障害、感覚異常に代表される神経障害があげられる。抗がん剤誘発性末梢神経障害 (chemotherapy-induced peripheral neuropathy; CIPN) は、骨髄抑制のように休薬により速やかに回復する場合は少なく生涯にわたって何らかの障害を残すことがある。また、CIPN は原因薬剤の中止

がその対処法の中心となっており化学療法継続の妨げとなる重大な有害事象である。CIPN の発生頻度は大腸がん、乳がん、婦人科がん、多発性骨髄腫の患者 4179 例の追跡調査で化学療法終了後 1 ヶ月以内に 68.1%、3 ヶ月後では 60.0%、6 ヶ月以降では 30.0% であったとの報告がある。しかしながら CIPN の予防薬、治療薬の報告は少ない。CIPN の原因薬剤として、白金製剤、タキサン系製剤、ビンカアルカロイド系製剤等が知られているが薬剤により末梢神経障害が起こるメカニズムが違うため症状に特徴があるものがある。

例えば、白金製剤のシスプラチンは、聴神経障害により高音域の感音性難聴が起こる。蓄積性があり、投与中止後も長期間に症状が継続することが多い。白金製剤のオキサリプラチンは、投与直後から起こる急性症状と慢性症状がある。急性症状では四肢末端や口唇周囲の知覚異常を特徴とし慢性期症状は数ヶ月から数年持続することもある。白金製剤であるカルボプラチンは、通常量の使用では神経症状の発現は比較的少なく、高用量でシスプラチンと同様の症状が出現することがある。タキサン系製剤であるパクリタキセルは、四肢の知覚異常を主体とし、一回投与量と総投与量に相関する。タキサン系製剤であるドセタキセルは、感覚障害、運動障害が出現するがパクリタキセルより頻度は少ないと報告されている。ビンカアルカロイド系製剤であるビンクリスチンは手指感覚異常、運動障害が治療開始から数週間以内に起こり、投与中止後も長期間持続することが多い。CIPN の病理学的所見としては軸索障害、神経細胞体障害、髄鞘障害に分類される。軸索障害は CIPN の中で最も多くみられる障害である。一般的に太く長い軸索から障害され神経細胞体は比較的保たれる。臨床的には四肢末端から始まる glove and stocking 型の感覚障害を呈することが多い。代表薬剤は微小管阻害剤であるビンカアルカロイド系、タキサン系製剤である。

神経細胞体障害は病変の主座が細胞体であり、主に脊髄後根神経節細胞の細胞死によって発生し、軸索や髄鞘も二次的に障害される。臨床的には軸索の短い神経細胞体も障害されるため、感覚障害は四肢末端とともに体幹や顔面にも発生する。代表薬剤は白金製剤であるオキサリプラチン、シスプラチンなどである。製薬会社のインタビューフォームより各

表1 抗がん剤による口腔粘膜炎および末梢神経障害の発生率¹⁾

分類	薬剤	報告されている発生率 (%)	
		口腔粘膜炎	末梢神経障害
ビンカアルカロイド	ビノレルビン	15.2	12.2
	ビンブラスチン	0.4	2.2
	ビンクリスチン	0.1	25.5
微小管阻害薬	エリブリン	39.5	24.7
白金製剤	シスプラチン	2.6	1.5
	オキサリプラチン	12.0	45.5
	カルボプラチン	N.D.	N.D.
タキサン系	ドセタキセル	未報告	未報告
	パクリタキセル	18.2	55
	Nab-パクリタキセル	2.8	39
代謝拮抗薬	5-FU	6.7	0.2
	ゲムシタビン	未報告	未報告
トポイソメラーゼ阻害薬	イリノテカン	未報告	未報告
	エトポシド	未報告	未報告
アントラサイクリン系	ドキシルビシン	51.7	27.6
分子標的阻害薬	ラムシルマブ	54.3	未報告
	セツキシマブ	>10.0	0.5~10.0
	ニボルマブ	1.0~5.0	3.1
プロテアソーム阻害薬	ボルテゾミブ	<5.0	28.3

種抗がん剤の粘膜炎、末梢神経障害の発生頻度をまとめた（表1）。最近、我々は、ボルテゾミブの神経毒性を *N*-acetyl-L-cysteine が強力に抑制することを明らかにした²⁾。メタボローム解析では、ボルテゾミブによる神経毒性発現に、酸化ストレスが関与していることが示唆された（論文投稿準備中）。

1-3. 血管外漏出

経静脈内投与によるがん薬物療法では、局所および全身に複数の有害事象を引き起こす可能性がある。特に薬物の血管外漏出は、化学療法で最も組織侵襲性の高い合併症の1つである。抗がん薬の血管外漏出の全体的な発生率は0.01～6.5%、中心静脈カテーテルを介した血管外漏出の発生率は0.3～10.3%の範囲である。化学療法による血管外漏出の正確な発生率は、突発性かつ希少性の高い事象であるため一般的に報告が少ない。化学療法による偶発的な血管外漏出は、重度の組織損傷、組織壊死、水疱形成、または注射部位の紅斑、腫脹、疼痛、熱感、びらんなどを引き起こす可能性がある。

抗がん薬は、組織傷害性の程度により、壊死起因性、炎症性、および非壊死性/非炎症性の3つのグループに分類される（表2）。壊死起因性抗がん薬は、

水疱の形成や組織壊死を誘発し、強い組織破壊を引き起こす可能性がある薬物である。これら薬物は、DNA結合化合物と非DNA結合化合物に細分類される。DNA結合化合物は、より深刻な組織損傷を引き起こす可能性があり、主にアントラサイクリン系薬物やアルキル化薬などが含まれる。非DNA結合化合物は、主にビンカアルカロイド系薬物とタキサン系薬物である。炎症性抗がん薬は、炎症反応の有無にかかわらず、注射部位または静脈に沿って疼痛を引き起こす可能性がある。いくつかの薬物では、濃縮された薬液が不注意に大量溢出された場合のみ、軟部組織の潰瘍を引き起こす可能性がある。非壊死性または非炎症性抗がん薬は、血管外漏出した場合、重篤な反応または組織壊死を引き起こすことは稀である。

ただし、血管外漏出を扱っている文献は、動物実験、症例報告、および小規模な人間の後ろ向き研究に限定されているため、その状況や症状に不明瞭なところが多い。さらに、ヒトを対象とした血管外漏出の前向き試験は、倫理的な理由や施設ごとの血管外漏出への対応差などが障壁となり困難を極める。結果、血管外漏出に対する予防、発見、対策などの指針は推奨グレードが低い状況にある。このような

表2 血管外漏出後の組織損傷による抗がん薬の分類¹⁾

組織傷害性	主なカテゴリー	薬物
壊死起因性	DNA に結合する化合物	
	アントラサイクリン	アムルビシン, ダウノルビシン, ドキソルビシン, エピルビシン, イダルビシン, ミトキサントロン, ピラルビシン
	アルキル化薬	ベンダムスチン, ブスルファン, カルムスチン, メルファラン, ニムスチン, ラニムスチン, ストレプトゾシン
	抗腫瘍性抗生物質	アクチノマイシン D
	その他	トラベクテジン
	DNA に結合しない化合物	
	タキサン	ドセタキセル, パクリタキセル, Nab- パクリタキセル
	ビンカルカロイド	ビンブラスチン, ビンクリスチン, ビンデシン, ビノレルビン
	その他	
	抗体薬物複合体	ゲムツズマブオゾガマイシン
炎症性	抗腫瘍性抗生物質	マイトマイシン C
	アントラサイクリン	アクリルビシン, ナノリポソームドキソルビシン
	アルキル化薬	ダカルバジン, シクロホスファミド, イホスファミド, テモゾロミド
	抗体薬物複合体	トラスツズマブエムタンシン
	代謝拮抗薬	アザシチジン, ゲムシタビン, フルオロウラシル, テガフル
	抗腫瘍性抗生物質	ブレオマイシン, ペプロマイシン
	白金製剤	カルボプラチン, シスプラチン, オキサリプラチン, ネダプラチン, ミリプラチン
	プロテアソーム阻害薬	ボルテゾミブ
	タキサン	カバジタキセル
	トポイソメラーゼⅠ阻害薬	イリノテカン, トポテカン, ナノリポソームイリノテカン
非壊死性 / 非炎症性	トポイソメラーゼⅡ阻害薬	エトポシド
	その他	三酸化ヒ素, ネララビン, ピシバニール, ボルフィマーナトリウム
	代謝拮抗薬	クラドリビン, クロファアラビン, シタラビン, エノシタビン, フルダラビン, メソトレキセート, ペメトレキセド
	抗体薬物複合体	ブレンツキシマブ ベドチン, イブリツモマブ チウキセタン
	抗腫瘍性ホルモン薬	デガレリックス, フルベストラン, ゴセレリン, リュープロレリン
	モノクローナル抗体	アレムツズマブ, ベバシズマブ, セツキシマブ, イピリムマブ, モガムリズマブ, オファツムマブ, パニツムマブ, ペルツズマブ, ラムシルマブ, リツキシマブ, トラスツズマブ
	免疫チェックポイント阻害薬	アテゾリズマブ, アベルマブ, デュルバルマブ, イピリムマブ, ニボルマブ, ペンブロリズマブ
	その他	BCG, ホリナートカルシウム, セルモロイキン, デクスラゾキシサン, エリブリン, インターフェロン, L- アスパラギナーゼ, レボホリナート, オクトレオチド, ペントスタチン, タラボルフィンナトリウム, テセロイキン

理由から化学療法の血管外漏出のメカニズムを解明するには、さらなる研究が必要である。

2. 腫瘍特異性は高く、ケラチノサイト毒性は低いクロモン誘導体の開発

2-1. 何故クロモンに注目したか？

4 種のヒト口腔扁平上皮癌細胞 (OSCC) (Ca9-22, HSC-2, HSC-3, HSC-4), 3 種のヒト間葉系口腔正

常細胞 (歯肉線維芽細胞 HGF, 歯根膜線維芽細胞 HPLF, 歯髓細胞 HPC) (明海大学歯学部で樹立) および 2 種のヒト上皮系正常口腔細胞 (ヒト口腔ケラチノサイト HOK および 初代ヒト歯肉上皮細胞 HGEp) を用いた *in vitro* 抗腫瘍活性の定量法を確立した^{1,2)}。腫瘍選択性 (TS) は、正常細胞に対する CC_{50} の平均と OSCC 細胞に対する CC_{50} の平均の比率として計算した。間葉系細胞 (M) または上皮細

表3 ポリフェノール類の腫瘍選択性²⁾

化合物	TSM 平均値 (範囲)
リグニン配糖体 (n=4)	2.7 (1.7~4.1) ¹⁾
フラボン, フラボノール, (n=36)	1.2 (0.3~3.2)
フラボノイド (n=31)	3.2 (0.8~31.7)
イソプレニルフラボノイド (n=22)	2.1 (1.6~3.0)
トリシン, モリン, ケルセチン, ケンフェロール (n=4)	1.5 (1~2.2)
イソリキリチゲニン, ダチセチン, ガランギン (n=3)	2.0 (1~4)
レスベラトロール, ダイゼイン, ゲニステイン (n=3)	2.1 (1.1~2.9)
没食子酸, カテチン, エピガロカテキンガレート (n=3)	2.1 (1.0~4.1)
プロシアニジン (n=6)	4.8 (1.0~7.4)
加水分解性タンニン (単量体) (n=7)	1.5 (1.0~2.5)
加水分解性タンニン (オリゴマー) (n=3)	1.4 (1.2~1.5)
大環状エラジタンニン (n=4)	4.4 (2.3~8.2)
2- スチリルクロモン (n=6)	7.3 (1.1~17.4)
3- スチリルクロモン (n=15)	14.9 (1.6~69.0)
アントラサイクリン系薬物 (n=4)	181 (47~259)

胞 (A) を使用した場合, それぞれ, TSM および TSE が得られる。ヒトの上皮系細胞を標的細胞として利用できれば最も理想的だが, ほとんどの抗がん剤は, 上皮細胞に対して強力な細胞毒性を示す。そこで, 最初の網羅的検索の段階では, TSE 値ではなく TSM 値を採用した。この方法を使用すると,

- (i) ほとんどの抗がん剤は, 高い TSM を示すこと,
- (ii) 3 大ポリフェノール, すなわちリグニン配糖体, タンニン, およびフラボノイドは, 抗がん剤と比較してはるかに低い TSM しか示さないこと,
- (iii) フラボノイド, フラボン, フラバノン, イソフラボンなどの骨格構造に含まれるクロモンの誘導体は, ポリフェノール類よりもはるかに高い TSM を示すことが明らかになった (表3)²⁾。

これらの発見により, 我々は, 腫瘍選択性が高く, ケラチノサイト毒性の低いクロモン誘導体を探索する計画を立てることになった。

2-2. 17 グループのクロモン誘導体, エステル類, アミド類の構造

●クロモン誘導体:

- (a) クロモン環を有する: 3- スチリルクロモン (A), 2- スチリルクロモン (B), 2- (N- 環状アミノ) クロモン (C), 3- (N- 環状アミノ) クロモン (D), 2- アゾリルクロモン (E), 3- ベンジリデンクロモン (F), ピラノ [4,3-b] クロモン (G), フロ [2,3-b] クロモン (H)。

- (b) クロメン環を有する: 3- スチリルクロメン (I), 3- フラベン (J)。

- (c) 開裂したクロモン環を有する: オーロン (K), カルコン (L)。

●エステル類:

桂皮酸フェネチルエステル (M), ピペリン酸エステル (N)。

●アミド類:

フェニルプロパノイドアミド (O), ピペリン酸アミド (P), オレオイルアミド (Q) (図1)。

2-3. 合成法 (図2)

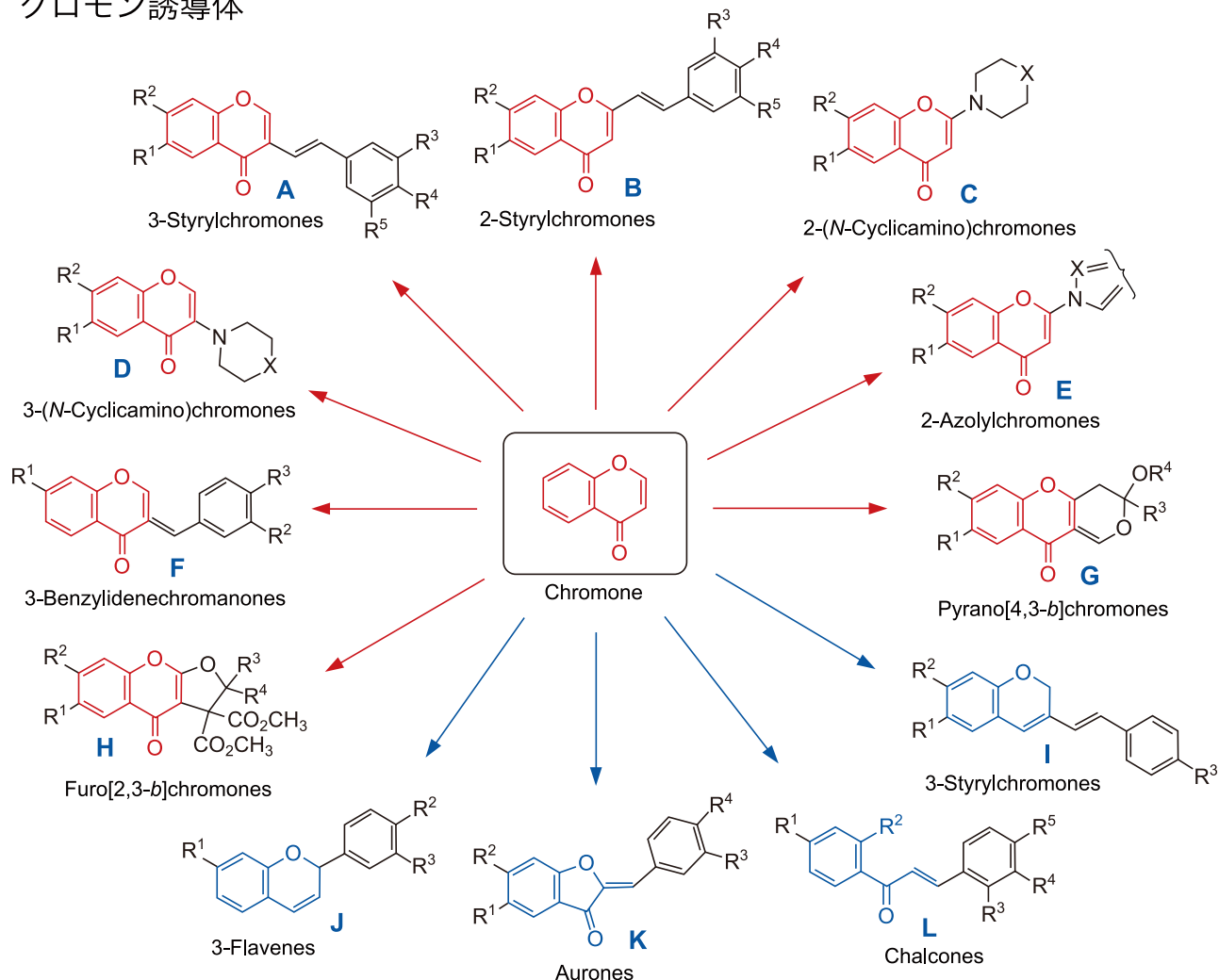
クロモン誘導体:

3- スチリルクロモン (A) は, 対応する 3- ホルミルクロモンとフェニル酢酸誘導体とのクネーフェナーゲル縮合により合成した。2- スチリルクロモン (B) は, 対応する 2- メチルクロモンとベンズアルデヒド誘導体との塩基触媒下での縮合により合成した。2- (N- 環状アミノ) クロモン (C) は, 3- ヨードクロモンとトリアゾールとの反応により合成された。2- トリアゾリルクロモン誘導体と, ピペリジンおよびピペラジン誘導体などの環状第二級アミンとの求核置換反応により合成した。3- (N- 環状アミノ) クロモン (D) は, 2,3- エポキシクロモン誘導体と環状第二級アミンとの縮合により合成した。2- アゾリルクロモン (E) は, 3- ヨードクロモン誘導体

とさまざまなアゾールとの共役付加反応により合成した。3-ベンジリデンクロモン (**F**) は、4-クロマノンと置換ベンズアルデヒド誘導体との塩基触媒下での縮合により合成した。ピラノ [4,3-*b*] クロモン (**G**)

は、3-ホルミルクロモンとエノールエーテルとの環化付加反応により合成した。フロ [2,3-*b*] クロモン (**H**) は、メタノクロマノンとアルデヒドまたはケトンとの環拡大を伴う環化付加反応により合成した。3-ス

クロモン誘導体



エステル類, アミド類

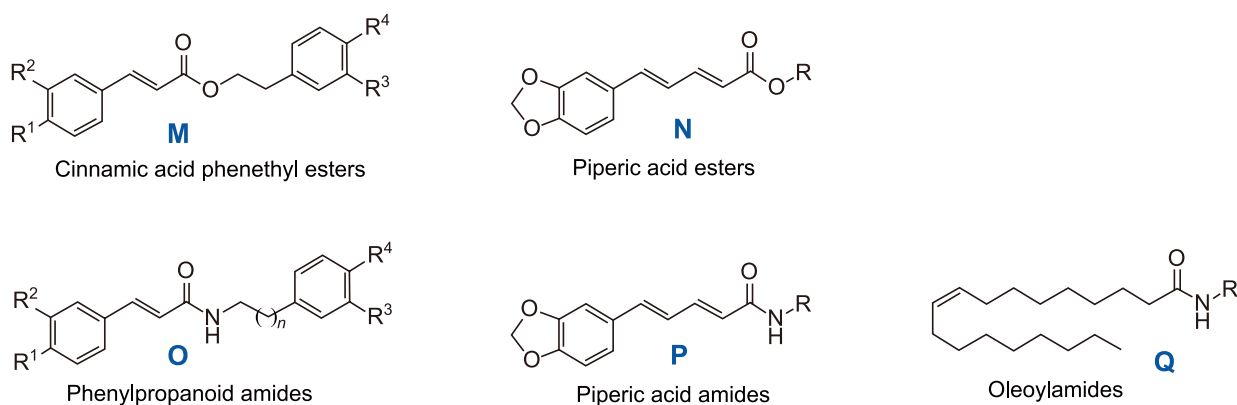


図1 クロモン誘導体 (**A~L**), エステル類 (**M, N**), アミド類 (**O~Q**) の構造

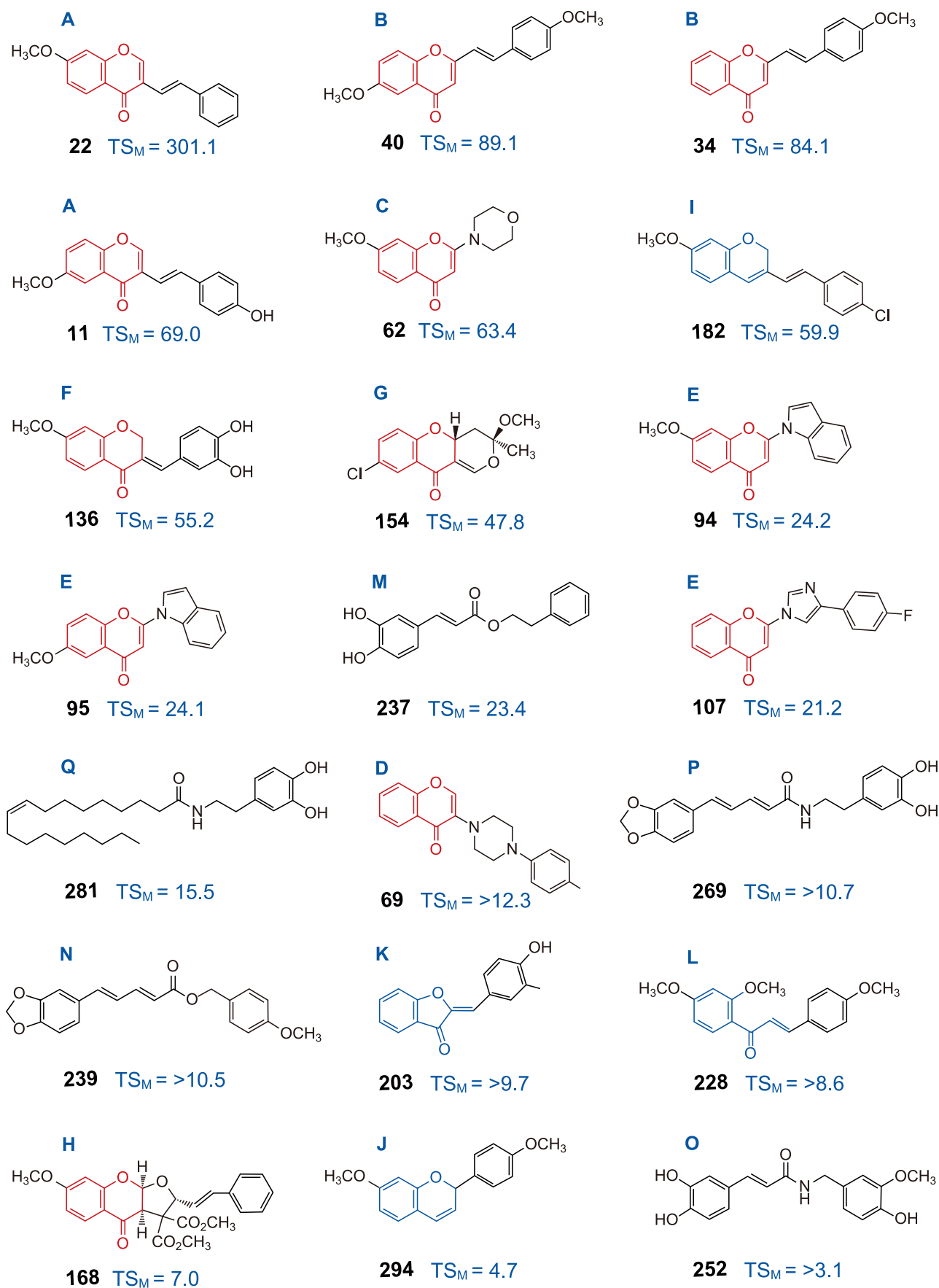


図2 各グループで最大の腫瘍選択性 (TS_M) を示す化合物を, 効力順に並べた

チリルクロメン (**I**) は、2*H*-クロメン-3-カルバルデヒドと市販のジエチルベンジルホスホネート誘導体とのホーナー・ワズワース・エモンズ反応により合成した。3-フラベン (**J**) は、2-ヒドロキシカルコン誘導体の還元的分子内環化付加反応により合成した。オーロン (**K**) は、3 (2*H*)-ベンゾフラノンとベンズアルデヒド誘導体との塩基触媒下での縮合により合成した。カルコン (**L**) は、アセトフェノンとベンズアルデヒド誘導体との塩基触媒下での縮合により合成した。

エステル類およびアミド類：

桂皮酸フェネチルエステル (**M**) は、桂皮酸およびその類似体 (カフェ酸、フェルラ酸、*p*-クマル酸など) とフェネチルアルコールとの縮合により合成した。ピペリン酸エステル (**N**) は、ピペリン酸とアルコールとの縮合により合成した。

フェニルプロパノイドアミド (**O**) は、対応する桂皮酸誘導体とさまざまな生体アミンとの縮合により合成した。ピペリン酸アミド (**P**) は、ピペリン酸の酸塩化物とさまざまなアミンと縮合させることにより合成した。原料となるピペリン酸は、ピペリンのアルカリ加水分解により調製した。オレオイルアミド (**Q**) は、オレイン酸と塩化オキサリルから合成された塩化オレオイルと、対応するさまざまな生体アミンとの縮合により合成した。

2-4. クロモン、エステル、およびアミドの腫瘍選択性

17 のグループ (**A** ~ **Q**) からの合計 291 の化合物の 4 種のヒト口腔扁平上皮がん細胞 (OSCC) (Ca9-22, HSC-2, HSC-3, HSC-4) および 3 種のヒト間葉系正常細胞 (HGF, HPLF および HPC) に対する細胞毒性 (CC_{50} で評価) を調べた。腫瘍選択性 (TS_M により評価) は前述のようにして計算した。腫瘍特異性と腫瘍細胞に対する細胞毒性の両方を反映する効力選択性発現 (PSE) は、 TS_M を腫瘍細胞の CC_{50} で割り、次に 100 を掛けることによって計算した。類似構造をもつ化合物の中で、限られた数の化合物のみがより高い腫瘍特異性を示すことが判明した。クロモン化合物の腫瘍特異性は、3D 構造を反映する化学記述子との密接な相関関係を示すため、このような腫瘍特異性の高い化合物が最適な 3D 構造を示す可能性がある (表 4)。

各グループで最も活性の高い化合物を図 2 に示す。腫瘍特異性 [TS_M (OSCC 対ヒト間葉系正常細胞), TS_E (OSCC 対ヒト上皮系正常細胞)] を表 5 に示す。

7-メトキシ-3-[(1*E*)-2-フェニルエテニル]-4*H*-1-ベンゾピラン-4-オン (化合物 **22**) が最も高い TS 値 ($TS_M = 301.1$) を示し、以下、2-[(1*E*)-2-(3,4-ジメトキシ)エテニル]-4*H*-1-ベンゾピラン-4-オン (化合物 **40**) ($TS_M = 89.1$) > 2-[(1*E*)-2-(4-メト

表 4 分子形状は腫瘍特異性の重要な決定要因である

	腫瘍選択性と相関する化学的記述子
3-スチリルクロモン (A)	分子形状, 静電相互作用, 電荷
2-スチリルクロモン (B)	分子の形状と平坦性
2-(<i>N</i> -環状アミノ)クロモン (C)	分子形状, 3D 構造
3-(<i>N</i> -環状アミノ)クロモン (D)	3D 構造, 親油性
2-アゾリルクロモン (E)	3D / トポロジー形状, サイズ, 分極率, 親油性
3-ベンジリデンクロモン (F)	分子の形状, サイズ, 分極
ピラノ [4,3- <i>b</i>]クロモン (G)	3D 構造, 極性, イオン電位, 電気状態
フロ [2,3- <i>b</i>]クロモン (H)	分子の柔軟性, 密度, サイズと形状, 親油性
3-スチリルクロメン (I)	分子の形状と平坦性
オーロン (K)	分子の形状, サイズ, 分極率
カルコン (L)	分子の形状と分極
桂皮酸フェネチルエステル (M)	形状, サイズ, イオン化ポテンシャル
ピペリン酸エステル (N)	分子の形状, サイズ, イオン化ポテンシャル, 電気陰性度
ピペリン酸アミド (O)	分子サイズ (表面積), 静電相互作用
ピペリン酸アミド (P)	分子形状, 静電相互作用
オレオイルアミド (Q)	分子分極と疎水性

表5 クロモンおよび抗がん剤の腫瘍特異性とケラチノサイト毒性の比較

グループ	化合物	腫瘍選択性		
		TSM		TSE
		OSCC/ HGF+HPLF +HPC	OSCC/ HOK	OSCC/ HGEP
3- スチリルクロモン (A)	11	69.0	9.5	400.0
	22	301.1		662.1
2- スチリルクロモン (B)	34	84.1		52.8
	40	89.1		
2- (N- 環状アミノ) クロモン (C)	62	63.4	65.2	
3- (N- 環状アミノ) クロモン (D)	69	>12.3	12.4	
	94	24.2		
2- アゾリルクロモン (E)	95	24.1		
	107	21.2		
3- ベンジリデンクロモン (F)	136	55.2	0.5	0.5
ピラノ [4,3- <i>b</i>] クロモン (G)	154	47.8	4.1	
フロ [2,3- <i>b</i>] クロモン (H)	168	7.0		
3- スチリルクロモン (I)	182	59.9		
3- フラベン (J)	194	4.7		
オーロン (K)	203	>9.7		
カルコン (L)	228	>8.6		
桂皮酸フェネチルエステル (M)	237	23.4		
ピペリン酸エステル (N)	239	>10.5		
ピペリン酸アミド (O)	252	>3.1		
ピペリン酸アミド (P)	269	>10.7		
オレオイルアミド (Q)	281	15.5	4.0	0.6
DXR		121.8	1.5	0.3
5-FU		16.2	0.4	0.3

キシフェニル) エテニル]-4*H*-1-ベンゾピラン-4-オン (化合物 **34**) ($T_{SM} = 84.1$) > (*E*)-3-(4-ヒドロキシスチリル)-6-メトキシ-4*H*-クロメン-4-オン (化合物 **11**) ($T_{SM} = 69.0$) > 7-メトキシ-2-(4-モルホリニル)-4*H*-1-ベンゾピラン-4-オン (化合物 **62**) ($T_{SM} = 63.4$) > (*E*)-3-(4-コロロスチリル)-7-メトキシ-2*H*-クロメン (化合物 **182**) ($T_{SM} = 59.9$) > (3*E*)-2,3-ジヒドロ-3-[(3,4-ジヒドロキシフェニル)メチレン]-7-メトキシ-4*H*-1-ベンゾピラン-4-オン ($T_{SM} = 52.2$) (化合物 **136**) の順であった。これらの化合物は、ドキソルビシン (DXR) とほぼ同等の T_{SM} 値を示し、5-FU よりもはるかに高い T_{SM} 値を示した。DXR および 5-FU は、ヒト口腔ケラチノサイト (HOK) およびヒト歯肉上皮細胞のヒト前駆細胞 (HGEP) などのヒト上皮系細胞に対して強力な毒性を示した (表5)。DXR が口腔ケラチノサイトにアポトーシス (細胞表面微絨毛の喪失, クロマチ

ンの凝縮, 核の断片化, およびカスパーゼ-3の活性化を特徴とする細胞死) を誘発することを以前に報告した³⁾。一方, 化合物 **11**, **22**, **34**, **62** および **69** のケラチノサイト毒性ははるかに低かった (表5)。

2-5. 作用点

3- スチリルクロモン (A) の化合物 **11** および **22**, 2- スチリルクロモン (B) の **34** および **40**, 2- アゾリルクロモン (E) の **95**, カルコン (L) の **228** および桂皮酸フェネチルエステル (M) の **237** はヒト OSCC 細胞株にアポトーシス [カスパーゼ-3の活性化 (ウエスタンブロット解析により評価) および subG1 細胞蓄積 (セルソーターにより評価)] を誘導した。一方, 2- (N- 環状アミノ) クロモン (C) の **62**, 3- (N- 環状アミノ) クロモン (D) の **69**, 2- アゾリルクロモン (E) の **107**, ピラノ [4,3-*b*] クロモン (G) の **154**, およびフロ [2,3-*b*] クロモン (H) の

表6 各グループで最も腫瘍選択性の高い化合物が、必ずしもヒト口腔扁平上皮癌 (OSCC) 細胞株にアポトーシスを誘導しない

グループ	化合物	作用メカニズム
3- スチリルクロモン (A)	11	ミトコンドリアの空胞化 カスパーゼ-3 の活性化
3- スチリルクロモン (A)	22	subG1 期の細胞, G2 + M 期の細胞の増加
2- スチリルクロモン (B)	34, 40	subG1 期の細胞, G2 + M 期の細胞の増加
2- (N- 環状アミノ) クロモン (C)	62	アポトーシスを誘導しない, cytotoxic
3- (N- 環状アミノ) クロモン (D)	69	アポトーシスを誘導しない, cytostatic
2- アゾリルクロモン (E)	95	カスパーゼ-3 の活性化
2- アゾリルクロモン (E)	107	G2 + M 期の細胞の増加, アポトーシスを誘導しない, cytostatic
ピラノ [4,3- <i>b</i>] クロモン (G)	154	アポトーシスを誘導しない, cytostatic
フロ [2,3- <i>b</i>] クロモン (H)	168	アポトーシスを誘導しない
カルコン (L)	228	カスパーゼ-3 の活性化
桂皮酸フェネチルエステル (M)	237	カスパーゼ-3 の活性化

168 は、アポトーシスを誘導しなかった (表 6)。化合物 22, 34, 40 および 107 も G2 + M 細胞の蓄積を誘導したが、化合物 22, 34, 40 のみがアポトーシスを誘導した。これは、G2 + M 蓄積の誘導がかならずしもアポトーシスを誘導しないことを示す。

2-6. G2 + M ブロッカーにおける神経毒性の 4 つの深刻な問題

腫瘍特異性の高い 3- スチリルクロモン誘導体 [7- メトキシ-3-[(1*E*)-2- フェニルエテニル]-4*H*-1- ベンゾピラン-4- オン (化合物 22) および 3-[(*E*)-2- (4- ヒドロキシフェニル) エテニル]-7- メトキシ-4*H*-1- ベンゾピラン-4- オン (化合物 29)] ($TS_M = 301$ および 182) は subG1 および G2 + M 期に細胞を集積させた。また、最近、タキサン系のパクリタキセル (タキソール®, 最初の微小管安定剤) やドセタキセルなどのいくつかの G2 / M ブロッカーが非常に高い TS_M 値 (それぞれ > 7,267 および > 86,122) を示すことが報告された³⁾。最近、4'- メトキシ-2- スチリルクロモンがパクリタキセルと同様にヒト乳癌 MCF-7 やヒト肺腺癌 NCI-H460 に有糸分裂停止を誘発することが報告された⁴⁾。天然に存在するフラボノールであるクドラフラボン C (Cud C) は、PI3K-AKT 経路を標的とすることにより、結腸直腸癌細胞 (CRC) にアポトーシス (カスパーゼの活性化) と腫瘍選択的細胞毒性を誘発した⁵⁾。しかし、我々を含む多くの報告は、微小管を標的とした薬剤が強力な神経毒性を示し、長期的に患者の生活の質に悪影響を与えることを示した^{6,9)}。飯島らは最近、カルボプラチンが非常に強い神経毒性を示すことを報

告した ($TS_N = 0.11$ (3.2 / 27.9)²⁾。クロモン誘導体、エステル類、およびアミド類の神経毒性の血管外漏出、および口内炎を調べるのが急務である。

3. 結論

我々は以下のことを明らかにした。

- クロモンは、3 大ポリフェノールよりもはるかに高い腫瘍特異性を示す。
- 17 のグループ (12 のクロモン、2 つのエステル、および 3 つのアミドからなる) 計 291 の新規合成化合物は、広範囲の腫瘍特異性の強度を与える。
- それらの腫瘍特異性は、3D 構造と電気的狀態を反映する化学的記述子と相関する。
- 3- スチリルクロモンに属する 7- メトキシ-3-[(1*E*)-2- フェニルエテニル]-4*H*-1- ベンゾピラン-4- オン (化合物 22) は、最も高い腫瘍選択性を示す。

化合物 22 は、ヒト OSCC 細胞株において subG1 および G2 + M 期の細胞の集積を誘導し、ドキソビシンおよび 5-FU よりもケラチノサイト毒性がはるかに少ない。この化合物は、抗腫瘍性の高い化合物を合成するためのリード化合物として期待できる。

4. 今後の研究の方向性

ターゲット分子を特定するために、¹³C 標識化合物を調製し、次に悪性細胞と非悪性細胞への取り込みを比較し、細胞小器官への分布を共焦点レーザー顕微鏡を使用して調べる。クロモンをビーズに結合させ、クロモン結合タンパク質の同定法を検討する

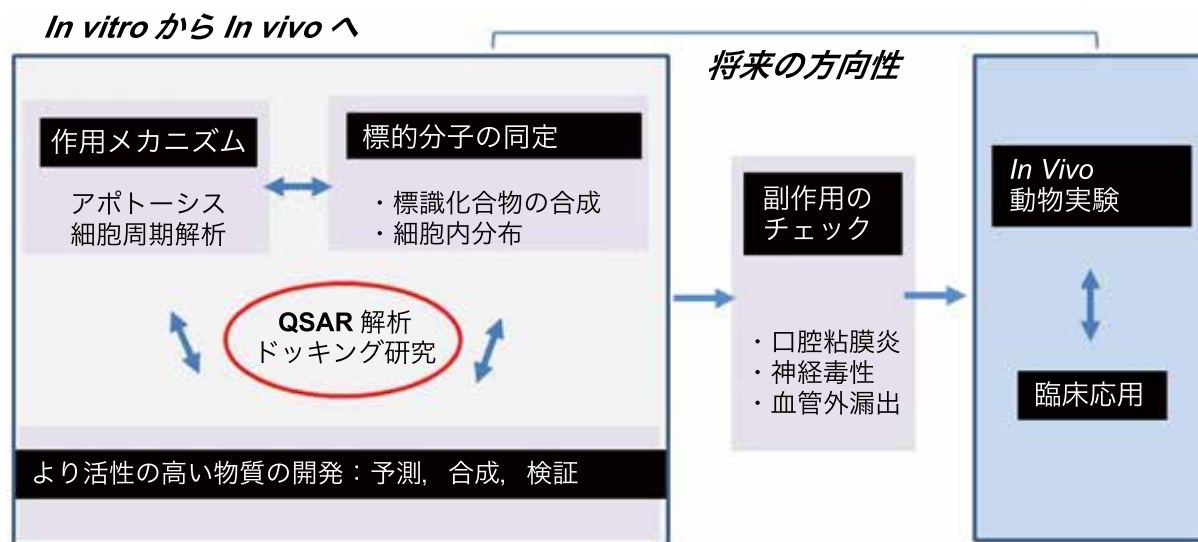


図3 新規クロモン誘導体の開発

(図3)。

より強力なクロモン誘導体を探索するために、最高の TS_M および TS_E を与える最適な置換基を QSAR を用いて予測する。予測した化合物を合成し、腫瘍選択性と副作用を検討する。動物実験および臨床応用の前に、ケラチノサイト毒性、神経毒性、および血管外漏出を誘発するか否かを検討することが

重要である。

本研究は、最適な 3D 構造を持つ選択された化合物のみが最高の腫瘍特異性を示すのに対し、同様の構造を持つ他のほとんどの類似体ははるかに低い腫瘍特異性を示すこと明らかにした。今後、クロモンの結合タンパク質または受容体の存在を明らかにしてゆきたい。

参考文献

1. Sugita Y, Takao K, Uesawa Y, Nagai J, Iijima Y, Sano M, Sakagami H: Development of newly synthesized chromone derivatives with high tumor specificity against human oral squamous cell carcinoma. *Review. Medicines (Basel)*. 2020 Aug 26; **7**(9): E50. doi: 10.3390/medicines7090050.
2. Iijima Y, Bandow K, Amano S, Sano M, Hino S, Kaneko T, Horie N, Sakagami H: Protection of bortezomib-induced neurotoxicity by antioxidants. *Anticancer Res* **40**(7): 3685-3696, 2020.
3. Iijima Y, Bandow K, Sano M, Hino S, Kaneko T, Horie N, Sakagami, H.: *In vitro* assessment of antitumor potential and combination ~ Effect of classical and molecular-targeted anticancer drugs. *Anticancer Res* **39**: 6673-6684, 2019.
4. Marinho J, Pedro M, Pinto DC, Silva AM, Cavaleiro JA, Sunkel CE, Nascimento MS.: 4'-Methoxy-2-styrylchromone a novel microtubule-stabilizing antimitotic agent. *Biochem. Pharmacol* **75**: 826-835, 2008.
5. Soo HC, Chung FF, Lim KH, Yap VA, Bradshaw TD, Hii LW, Tan SH, See SJ, Tan YF, Leong CO, Mai CW.: Cudraflavone C induces tumor-specific apoptosis in colorectal cancer cells through inhibition of the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-AKT Pathway. *PLoS ONE* 2017, **12**, e0170551, doi:10.1371/journal.pone.0170551.
6. Da Costa R, Passos GF, Quintão NLM, Fernandes ES, Maia JRLCB, Campos MM, Calixto JB.: Taxane-induced neurotoxicity: Pathophysiology and therapeutic perspectives. *Br J Pharmacol* **177**: 3127-3146, 2020.
7. Pittman SK, Gracias NG, Fehrenbacher JC.: Nerve growth factor alters microtubule targeting agent-induced neurotransmitter release but not MTA-induced neurite retraction in sensory neurons. *Exp Neurol* **279**: 104-115, 2016.
8. Rovini A, Savry A, Braguer D, Carré M.: Microtubule-targeted agents: When mitochondria become essential to chemotherapy. *Biochim Biophys Acta* **1807**: 679-688, 2011.

セリサイト (Tellus Gizer) における免疫作用, 抗糖尿病とダイエット効果に関する臨床研究

具 然和 (GU Yeunhwa)¹, 山下 剛範 (YAMASHITA Takenori)², 井上 登太 (INOUE Tota)³

Key Words: セリサイト, 抗糖尿病, メタボリックシンドローム, 温熱効果, 解毒作用

Clinical study on immune function, antidiabetic and diet effects in sericite (Tellus Gizer)

Author: Yeunhwa Gu¹, Takenori Yamashita² and Tota Inoue³

Corresponding author: Yeunhwa Gu¹, email: gu.y@junshin-u.ac.jp

¹ Chairperson International Affairs Department of Radiological Science,
Graduate School of Health Science, Faculty of Health Science Junshin Gakuen University
1-1-1 Chikushigaoka, Minami-ku, Fukuoka 815-8510 Japan.

² Suzuka University of Medical Science

³ Mie breathing swallowing rehabilitation clinic

Key Words: Sericite, Anti-diabetic effect, Thermal effect, Metabolic syndrome, Heat effect, Detoxification

Abstract

Recently, the number of obese people is increasing in Japan. Obesity may be high in subcutaneous fat or fat may be attached to internal organs, which is thought to lead to various diseases. The original purpose of a diet to eliminate obesity is not to lose weight, but to become healthier. In this study, we conducted clinical studies on immunopotential, antidiabetic, and diet effects in sericite (Tellus Gizer).

Sericite (Tellus Gizer) excretes waste products from deep inside the body, enhances natural healing power, and restores cell moisture. Sericite (Tellus Gizer) enhances the natural resilience of cells by incorporating the blessings of nature such as "ondol (Korean heating system) of far infrared rays" and "minus ion" into the body. Also, when the body cold sensitivity, it stores water and fat, so it warms the body from the core and burns fat to increase basal metabolism. In addition, sericite (Tellus Gizer) is said to promote metabolism, stabilize autonomic nerves, balance hormones and the body, and promote decomposition and excretion of waste products in the body. Therefore, in this study, we applied sericite (Tellus Gizer) to good sleep and examined the effects on diet effect, antioxidant effect, skin-beautifying effect, anti-diabetic effect and basal metabolism, and the following results were obtained. The thermal effect of sericite has a detoxifying effect because it may be a chelating agent that inactivates heavy metals that catalyze the oxidation reaction as an antioxidant due to the increase of SH groups in the body and the activity of SOD. Due to the increased blood flow and antioxidant effect, metabolism is expected due to the diet effect and thermal effect.

具 然和 (Yeunhwa Gu) (責任著者)¹

¹ 純真学園大学保健医療学部放射線技術科学科 〒815-8510 福岡県福岡市南区筑紫丘1丁目1-1
TEL: 092-554-1255 e-mail: gu.y@junshin-u.ac.jp

² 鈴鹿医療科学大学大学院保健衛生学研究科 〒510-0293 三重県鈴鹿市岸岡町1001番地1

³ みえ呼吸嚥下リハビリクリニック 〒519-0171 三重県亀山市アイリス町14-7

要旨

近年、日本において肥満者が増加している。肥満は皮下脂肪が多い場合と内臓の臓器に脂肪がついてしまっている場合があり、さまざまな病気につながると考えられている。この肥満を解消したダイエットとは体重を減らすことではなく、より健康になることが本来の目的である。本研究では、セリサイト (Tellus Gizer) における免疫増強、抗糖尿病、ダイエット効果に關した臨床研究を行った。

セリサイト (Tellus Gizer) は体の奥深くから老廃物を排出し、自然治癒力を高め、細胞の潤いを取り戻す。セリサイト (Tellus Gizer) は「オンドルの遠赤外線」「マイナスイオン」といった大自然の恵みを体内に取り入れることで、細胞本来の回復力を高める。また体は冷えると水分と脂肪をため込むため、体を芯から温め脂肪を燃焼させることで、基礎代謝を上げる。また、セリサイト (Tellus Gizer) は新陳代謝を促進し、自律神経の安定、ホルモンや身体のバランスを整え、体内の老廃物を分解・排出を促進したといわれる。そこで本試験においては、セリサイト (Tellus Gizer) を良い睡眠にあて、ダイエット効果、抗酸化効果、美肌効果、抗糖尿効果および基礎代謝への影響について検討し、以下の結果が得られた。セリサイトの温熱効果は、体内の SH 基の増加と SOD の活性により、酸化防止として酸化反応に触媒作用を呈する重金属を不活性化するキレート剤の可能性もあり、デトックス効果があった。血流上昇と抗酸化作用により、ダイエット効果及び温熱効果により新陳代謝が期待される。

はじめに

絹雲母石 (Sericite) は、約 1 億 5 千万年前、ジュラ紀のマグマによって床の温度が上昇し、熱によりその時代のマグマが固くなった鉱物である。絹雲母は SiO_2 , Al_2O_3 , K_2O , CaO , Fe_2O_3 , MgO , Na_2O などを主成分としており、毛穴の老廃物と余分な皮脂の除去、血行促進、塩分排出を促進し、血圧強化効果。解毒作用と精神安定効果、コラーゲン結合作用、老廃物排出促進などの効能を持っている。このような効能は古くから薬や化粧品の素材としても利用されてきた。また、Sericite が持っている 3 つの効能がマイナスイオン、ゲルマニウム、遠赤外線の効果は、他の鉱物より優れている。最近、先進国において生活習慣病が増加しているので、これらの生活用品の利用により、健康維持が必要である。従って、本研究では、セリサイト (Tellus Gizer) における免疫増強、抗糖尿病、ダイエット効果に關した臨床研究を行った。セリサイト (Tellus Gizer) における免疫増強、抗糖尿病、ダイエット効果に關した臨床研究を行った。

セリサイト (Tellus Gizer) は体の奥深くから老廃物を排出し、自然治癒力を高め、細胞の潤いを取り戻す。セリサイト (Tellus Gizer) は「オンドルの遠赤外線」「マイナスイオン」といった大自然の恵みを体内に取り入れることで、細胞本来の回復力を高める。また体は冷えると水分と脂肪をため込むため、体を芯から温め脂肪を燃焼させることで、基礎代謝を上げる。また、セリサイト (Tellus Gizer) は新陳代謝を促進し、自律神経の安定、ホルモンや身体のバランスを整え、体内の老廃物を分解・排出を促進したといわれる¹⁻²⁾。

セリサイト (Tellus Gizer) は、老廃物を排出し、

自然治癒力を高め、細胞の潤いを取り戻す。セリサイトの温熱効果は、体内の SH 基の増加と SOD の活性により、酸化防止として酸化反応に触媒作用を呈する重金属を不活性化するキレート剤の可能性もあり、デトックス効果もある。血流上昇と抗酸化作用により、ダイエット効果および温熱効果により新陳代謝が期待される³⁾。

1. 研究方法

1-1. 使用機器

セリサイトマット、肝機能 (AST, ALT) KIT, 脂質代謝 (総コレステロール, LDL- コレステロール, HDL- コレステロール, 中性脂肪) KIT, 糖代謝 (グルコース, HbA1c) KIT, Cell-Takα 測定機器: 血液学的検査 (白血球, 赤血球, ヘモグロビン, ヘマトクリット値, 血小板), MRI 検査装置, 超音波検査装置, 血流の検査装置, SOD 様活性の測定 KIT などを用いた。

1-2. 対象者

本試験の目的、試験方法、予想される結果などについて十分説明した後、同意が得て、書面において参加の意思が確認し、健常成人および糖尿病の患者女 15, 男 5 名を対象とした。なお、試験内容は大学内倫理委員会において承認と世界医師会総会 (World Medical Assembly) において承認されたヘルシンキ宣言 (2002 修正) の精神に則って実施した。

1-3. 試験方法

40-70 代女性と男性を対象に行った。試験は週 2 回とし、3 か月間(株)オーゾラのセリサイト (Tellus Gizer) を使用した。また、基礎代謝の指標として

体温測定を毎朝起床時に測定した。

セリサイト (Tellus Gizer) をセットしてヒーターの温度を設定した。一日 6-8 実感睡眠を取らせる。随時、水分を補給したことを基本とした。

試験開始 0, 4, 8 および 12 週後に観察を行った。観察日は純真学園大学に集合し、以下に示す項目の諸検査, 測定および調査を行った。

1-4. 生理学的検査

身長 (cm), 体重 (kg), 体脂肪 (%), ウエスト囲 (cm), ヒップ囲 (cm) の測定を行った。

1-5. 臨床検査

被験者から 10mL の血液を採取し、以下の項目に関して (株) ファルコバイオシステムの臨床検査部に委託し、標準的検査法により測定した。採血時間は検査日 10:00 を基本とした。

- 肝機能 (AST, ALT)
- 脂質代謝 (総コレステロール, LDL- コレステロール, HDL- コレステロール, 中性脂肪)
- 糖代謝 (グルコース, HbA1c)
- 血液学的検査 (白血球, 赤血球, ヘモグロビン, ヘマトクリット値, 血小板)
- MRI 検査
- 超音波検査
- 血流の検査などの測定を行った。

1-6. SOD 様活性の測定

被験者から 1 mL の血液を採取し、血液凝固防止のためにヘパリン処理 (100 単位 /mL) した後遠心分離し、得られた血清をサンプルとして用い、SOD (superoxide dismutase) 様活性度を求めた。

SOD 様活性の測定には、和光純薬工業株式会社製 SOD Activity Detection Kit を用いて、NBT 還元法による血清中の SOD 様活性度の測定を行った。NBT 還元法は、 O_2^- ラジカルの検出剤として、 NO_2^- -TB (ニトロブルーテトラゾリウム) を用い、 O_2^- ラジカルの生成反応 (キサンチンとキサンチンオキシダーゼ) と SOD による不均化反応とを共役させ、 O_2^- ラジカルによる還元呈色が低下した程度を阻害率として SOD 様活性度を求める方法であり、抗酸化活性を定量的に測定したことができる。Fig.1 に SOD 様活性測定原理のモデルを示す。

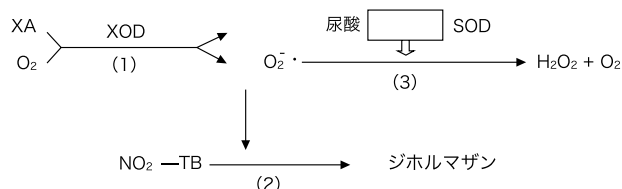


Fig.1 SOD 様活性測定原理のモデル

キサンチン (発色試液 (XA)) にキサンチンオキシダーゼ (酵素液 (XOD)) が作用したと O_2^- ・が生成した (1)。生成した O_2^- ・は共存した NO_2^- -TB (発色試液) を還元し、ジホルマゼンを生成した (2) が、反応液中にスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) が存在したと、 O_2^- ・の一部は H_2O_2 と O_2 に不均一化され (3)、ジホルマゼンの形成が減少する。

したがって、 O_2^- ・と NO_2^- -TB との反応に基づくジホルマゼン形成の減少の程度を、阻害率として求めることにより、試料中の SOD 活性値を求める。

測定法は、被験者の静脈採血により、テルモ社製シリンジ (針 :23G) を用いて、全血の採血を行い血液凝固防止のためにヘパリン処理 (5 単位 /mL) した後、遠心分離 (1000rpm, 10min (2 ~ 4°C)) にかけて得られた血清を用いる。この血清をサンプルとして、検体 (S), 盲検 (BI), 検体盲検 (S-BI), 試薬盲検 (BI-BI) をたて、96 穴マイクロプレートに各サンプルを 10μL/well ずつ分注を行った。その際の分注は、検体 (S) と検体盲検 (S-BI) には血清を、盲検 (BI) と試薬盲検 (BI-BI) には蒸留水とした。各サンプルの分注後、発色試薬を 100μL/well ずつ分注し、1 分間攪拌を行い、その後、検体 (S) と盲検 (BI) には酵素溶液、検体盲検 (S-BI) と試薬盲検 (BI-BI) に (株) オーゾラのセリサイト (Tellus Gizer) ランク液を 100μL/well ずつ分注し、再び 1 分間の攪拌後、37°C で 28 分間正確にインキュベートした。インキュベート後、各サンプルに反応停止液を 20μL/well ずつ分注し、5 分間の攪拌後、東洋曹達株式会社製マイクロプレートリーダー MPRA4 を用いて波長 560nm にて吸光度を測定した。測定より得られた吸光度から (1) 式により SOD 様活性度を求める。

$$\text{SOD 様活性度 (阻害率 \%)} = \frac{(E_{BI} - E_{BI-BI}) - (E_S - E_{S-BI})}{(E_{BI} - E_{BI-BI})} \times 100 \quad (1)$$

Es: 検体の吸光度 EBI: 盲検の吸光度 ES-BI: 検体盲検の吸光度 EBI-BI: 試薬盲検の吸光度

1-7. ケミルミネッセンス法による抗酸化測定 (AAPH 法)

2, 2- アゾビス (2- アミジノプロパン) 二塩酸塩 (AAPH) の加温発生ラジカルとアルカリ条件下のルミノール発光を組み合わせた系を用い測定した。Fig.2 に血清によるケミルミネッセンス抑制機構のモデルを示す。

AAPH 試薬は 37°C でペルオキシラジカル (AOO·) を発生した。ペルオキシラジカルとルミノール由来のセミキノンラジカルが反応したことにより化学発光したが、このときラジカルスカベンジ能力を有した血清が存在したと、セミキノンラジカルと反応したペルオキシラジカル量が減少したため化学発光が減少した。

実験試薬は以下のものを用いる。

	MW (分子量)
2,2-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)	271.19
Na ₂ HPO ₄	141.96
NaH ₂ PO ₄	119.98
Boric Acid (ホウ酸)	61.83
Luminol (ルミノール) 2 ~ 10°C で遮光保存	177.16

AAPH } 各 500mL
Luminol }

試薬の調製方法は以下の手順で行った。

1. 0.1M Na₂HPO₄ 溶液

Na₂HPO 47.098g を Distilled Water (蒸留水) に溶かし、500mL にメスアップした。

2. 0.1M NaH₂PO₄ 溶液

NaH₂PO 45.999g を D.W. に溶かし、500mL にメスアップした。

3. 0.1M リン酸緩衝液 (pH7.0)

0.1M Na₂HPO₄ 溶液

305mL + 0.1M NaH₂PO₄ 溶液 195mL とした。

4. AAPH 試薬

2,2-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) (和光純薬) 5.4238g を 0.1M リン酸緩衝液に溶解させ 500mL にメスアップした。

5. 0.05M ホウ酸緩衝液 (pH9.3)

ホウ酸 1.54575g を 400mL の D.W. に溶かし、1M NaOH で pH9.3 に合わせた後 500mL までメスアップした。

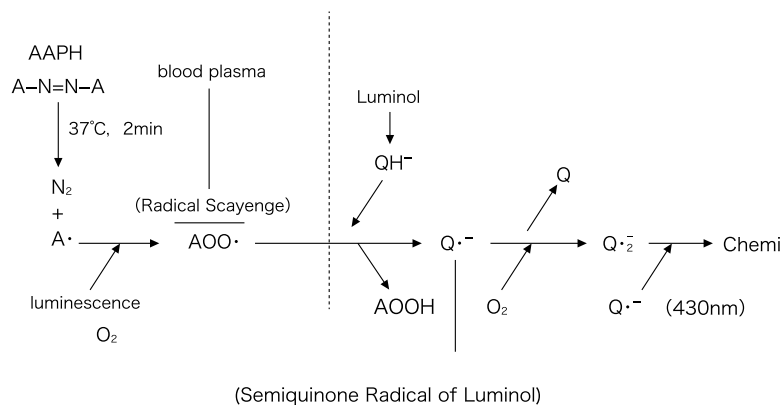


Fig.2 血清によるケミルミネッセンス抑制機構のモデル

6. 1M NaOH

20g の NaOH を D.W. に溶かし 500mL にメスアップした。

7. ルミノール試薬

50.438mg の Cytochrome C チトクローム C (和光純薬) と 9.744mg の Luminol ルミノール (和光純薬) を 0.05M ホウ酸緩衝液 (pH9.3) : メタノール = 1:3 の割合の溶液に溶かして 500mL にメスアップした。

測定試料は静脈採血に得られた血液を遠心分離 (1000rpm, 10min (2 ~ 4°C)) し上澄み (血清) を用いる。血清をラウンドチューブに 100μL 採り 900μL の 0.1M リン酸緩衝液を添加混合し、10 倍希釈した。この溶液をラウンドチューブに 100μL 採り 900μL の 0.1M リン酸緩衝液を添加混合しさらに 10 倍希釈し 100 倍希釈した。

100 倍希釈した血清をラウンドチューブに 200μL 採り同量の AAPH 試薬を添加混合した。測定試料は一匹につき 2 本作り、その平均を用いる。ブランク液は 0.1M リン酸緩衝液 200μL + AAPH 200μL とした。測定は測定試料をアロカ社製 BLR-201 ルミネッセンスリーダーに入れ 2 分間 37°C で加温し、ルミノール試液を入れ、20 秒反応させた後、発光量を測定し、blank (全発光量) よりそれぞれの試料の発行量を引く抗酸化活性度を求める。

1-8. 免疫実験の測定

採血を行ない、自動血球測定器を用い、白血球数、リンパ球数の測定を行った。

フローサイトメーターによる癌幹細胞比率の分析

回収した細胞を 2×10^5 ずつ分注し、抗 CD44 抗体 (PE 標識マウス抗ヒトイムノグロブリン抗体, Becton Dickinson) 20μL, 抗 CD24 抗体 (FITC

標識マウス抗ヒトイムノグロブリン抗体, Becton Dickinson) 20 μ L, 抗 EpCAM 抗体 (PerCP-Cy5.5 標識マウス抗ヒトイムノグロブリン抗体, Becton Dickinson) 4 μ L を順次反応させ, FACS Caliber を用いてフローサイトメトリーを施行した。その後, CellQuest Pro を用いて分析した。CD24-/low/CD44+/EpCAM+ を CSC と同定した。

1-9. その他

被験者の(株)オーゾラのセリサイト (Tellus Gizer) を使用した前と, 使用後 2 週間毎に尿も採取し, 3 か月まで行った。各グループのデータを比較検討し, 統計学的有意差を算出した。

1-10. アンケート調査

吹き出物等の肌に対する影響について, 被験者の主観的症状への影響を調査した。

1-11. 統計解析

結果はすべて平均値 $\pm$ 標準誤差で示す。有意差検定はクロスオーバーの単回実施試験では対応のある DUNETT 検定, 連続実施試験では対応のない DUNETT 検定にて行い, 両側検定で 5% 以下を有意水準とした。

2. 研究結果

2-1. 生理学的検査

2-1-1. 体重の変化

体重の測定結果を Fig. 3 に示す。セリサイトマット使用実施前 0 週目の平均体重と比較して, セリサイトマット使用実施後 4 週目, セリサイトマット使用実施後 8 週目, セリサイトマット使用実施後 12 週目の平均体重の減少が認められた ($p < 0.05$)。

2-1-2. 体脂肪率の変化

体脂肪率の測定結果を Fig. 4 に示す。セリサイトマット使用実施 0 週目の体脂肪率と比較して, セリサイトマット使用実施後 4 週目の体脂肪率, セリサイトマット使用実施後 8 週目の体脂肪率, セリサイトマット使用実施後 12 週目までの体脂肪率の減少が認められた ($p < 0.05$)。

2-1-3. BMI の測定結果

BMI の測定結果を Fig. 5 に示す。セリサイトマット使用実施 0 週目の BMI と比較して, 4 週目から,

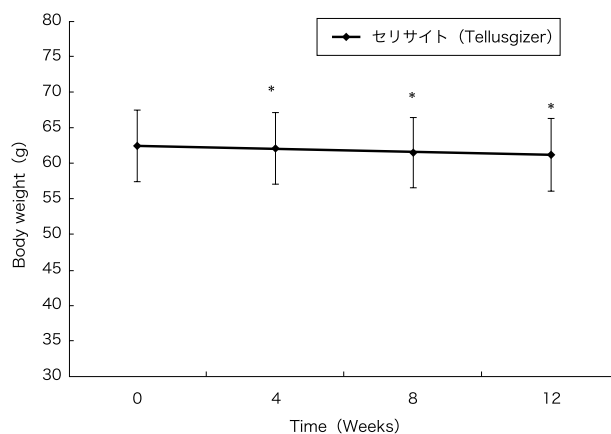


Fig.3 セリサイト (Tellus Gizer) 実施後の経時的な平均体重の変化 The result represents the mean value $\pm$ S.E. Asterisks indicate groups significantly different from control at $p < 0.05$ (*)

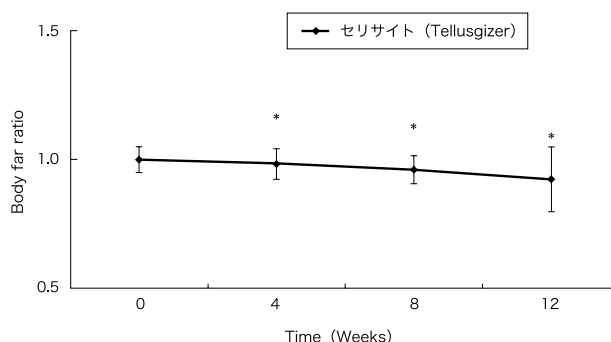


Fig. 4 セリサイト (Tellus Gizer) 実施後の経時的な体脂肪率の変化 The result represents the mean value $\pm$ S.E. Asterisks indicate groups significantly different from control at $p < 0.05$ (*)

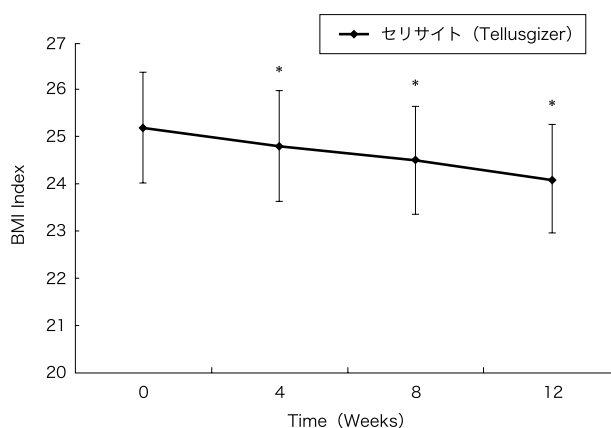


Fig.5 セリサイト (Tellus Gizer) 実施後の経時的な BMI の変化 The result represents the mean value $\pm$ S.E. Asterisks indicate groups significantly different from control at $p < 0.05$ (*)

8 週目, 12 週目の BMI の減少が認められた ($p < 0.05$)。

2-1-3. BMI の測定結果

BMI の測定結果を Fig. 6 に示す。セリサイトマット使用実施 0 週目の腹部 MRI (内臓脂肪の経時的変化) と比較して, 4 週目から, 8 週目, 12 週目の

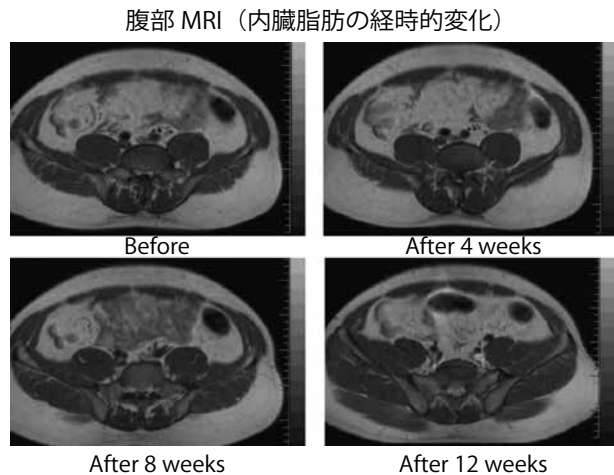


Fig.6 セリサイト (Tellus Gizer) 実施後の経時的な腹部 MRI (内臓脂肪の経時的変化) の変化

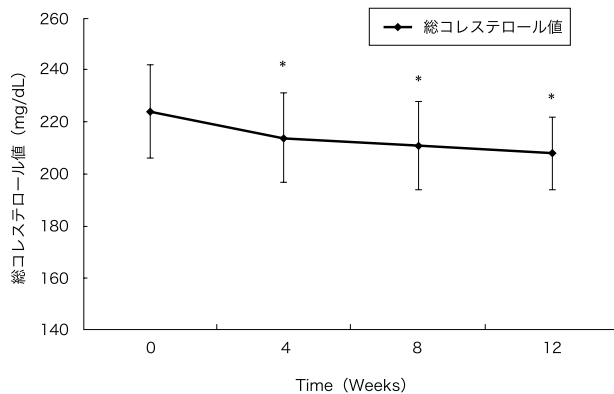


Fig.8 セリサイト (Tellus Gizer) 実施後の経時的な総コレステロールの測定値の変化 The result represents the mean value $\pm$ S.E. Asterisks indicate groups significantly different from control at $p < 0.05$ (*)

腹部 MRI (内臓脂肪の経時的変化) の減少が認められた。

2-1-3. BMI の測定結果

BMI の測定結果を Fig.7 に示す。セリサイトマット使用実施 0 週目の腹部超音波 (内臓脂肪の経時的変化) と比較して、4 週目から、8 週目、12 週目の腹部超音波 (内臓脂肪の経時的変化) の減少が認められた。

2-2. 臨床検査

2-2-1. 総コレステロールの測定値

総コレステロールの測定値を Fig. 8 に示す。総コレステロールは 0 週と比較すると 4 週、8 週、12 週までと経時的に減少が認められた ($p < 0.05$)。

2-2-2. HDL- コレステロールの測定値

HDL- コレステロールの測定値を Fig.9 に示す。

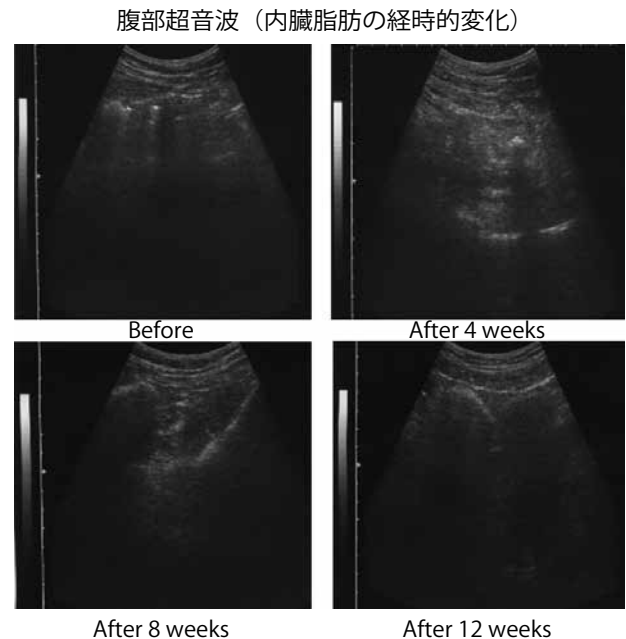


Fig.7 セリサイト (Tellus Gizer) 実施後の経時的な腹部超音波 (内臓脂肪の経時的変化) の変化

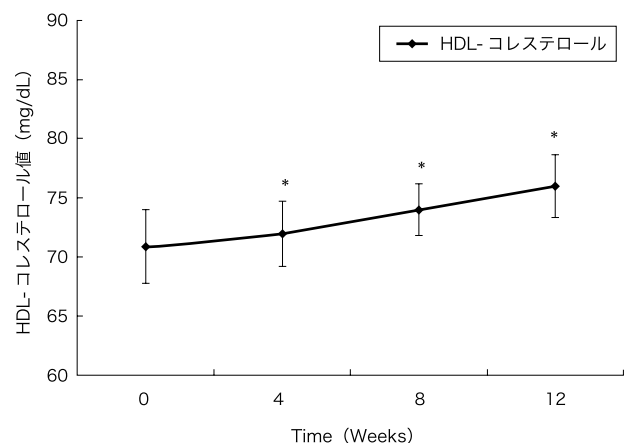


Fig.9 セリサイト (Tellus Gizer) 実施後の経時的な HDL- コレステロールの測定値の変化 The result represents the mean value $\pm$ S.E. Asterisks indicate groups significantly different from control at $p < 0.05$ (*)

HDL- コレステロールは 0 週と比較すると 4 週から 12 週まで増加が認められた ($p < 0.05$)。

2-2-3. LDL- コレステロールの測定値

LDL- コレステロールの測定値を Fig.10 に示す。LDL- コレステロールは 0 週と比較すると 4 週、8 週、特に 12 週に減少が認められた ($p < 0.05$)。

2-2-4. 中性脂肪の測定値

中性脂肪の測定値を Fig.11 に示す。中性脂肪は 0 週と比較すると 4 週、8 週、特に 12 週に減少が認められた ($p < 0.05$)。

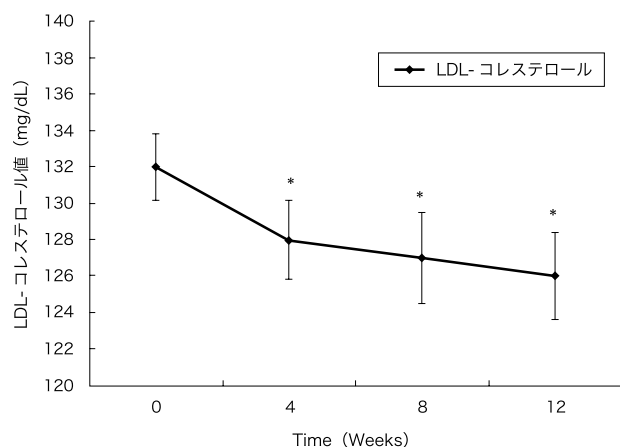


Fig.10 セリサイト (Tellus Gizer) 実施後の経時的な LDL- コレステロールの測定値の変化 The result represents the mean value $\pm$ S.E. Asterisks indicate groups significantly different from control at $p < 0.05$ (*)

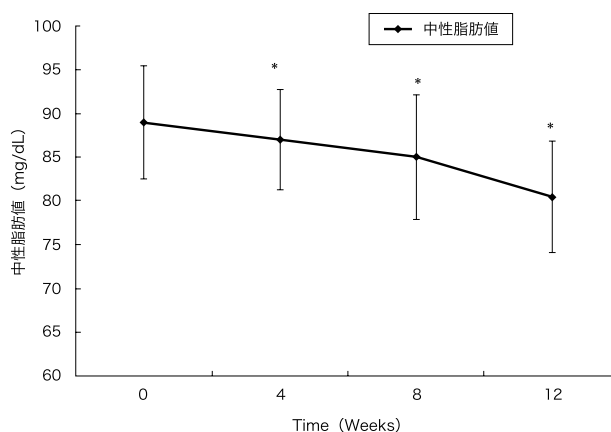


Fig.11 セリサイト (Tellus Gizer) 実施後の経時的な中性脂肪の測定値の変化 The result represents the mean value $\pm$ S.E. Asterisks indicate groups significantly different from control at $p < 0.05$ (*)

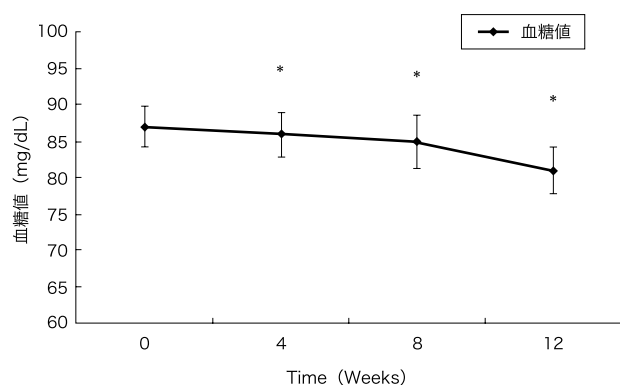


Fig.12 セリサイト (Tellus Gizer) 実施後の経時的な血糖値の測定値の変化 The result represents the mean value $\pm$ S.E. Asterisks indicate groups significantly different from control at $p < 0.05$ (*)

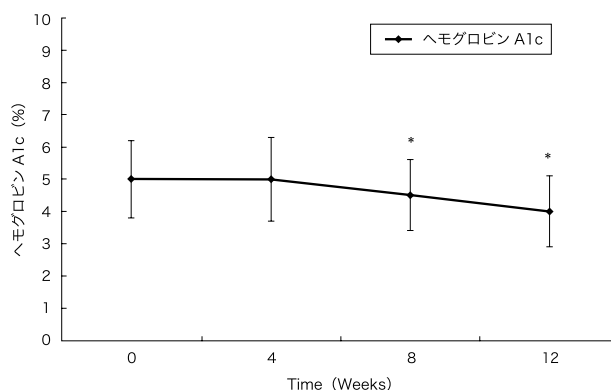


Fig.13 セリサイト (Tellus Gizer) 実施後の経時的な Hb-A1C の測定値の変化 The result represents the mean value $\pm$ S.E. Asterisks indicate groups significantly different from control at $p < 0.05$ (*)

2-2-5. 血糖値の測定値

血糖値の測定値を Fig.12 に示す。血糖値は 0 週と比較すると 4 週, 8 週, 12 週に減少が認められた ($p < 0.05$)。

2-2-6. Hb-A1C の測定値

Hb-A1C の測定値を Fig.13 に示す。Hb-A1C は 0 週と比較すると 8 週, 12 週に減少が認められた ($p < 0.05$)。

2-2-7. AST (GOT) の測定値

AST(GOT) の測定値を Fig.14 に示す。AST(GOT) は 0 週と比較すると 4 週, 8 週と 12 週 (22 ± 2 IU/L) に減少が認められた ($p < 0.05$)。

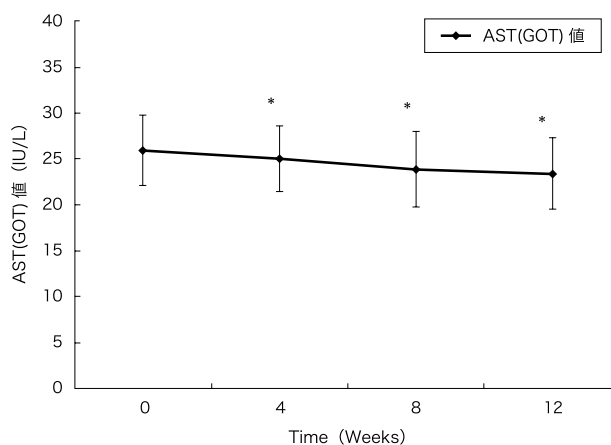


Fig.14 セリサイト (Tellus Gizer) 実施後の経時的な AST (GOT) の測定値の変化 The result represents the mean value $\pm$ S.E. Asterisks indicate groups significantly different from control at $p < 0.05$ (*)

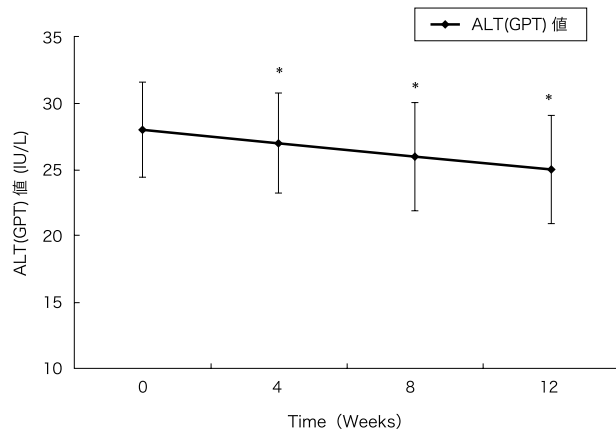


Fig.15 セリサイト (Tellus Gizer) 実施後の経時的な ALT (GPT) の測定値の変化 The result represents the mean value $\pm$ S.E. Asterisks indicate groups significantly different from control at $p < 0.05$ (*)

2-2-8. ALT (GPT) の測定値

ALT (GPT) の測定値を Fig.15 に示す。ALT (GPT) は 0 週と比較すると 4 週, 特に 8 週 (27 ± 2 IU/L) と 12 週 (25 ± 2 IU/L) に減少が認められた ($p < 0.05$)。

2-3. 脂肪抽出の結果

Table1 に, それぞれの部位における脂肪増減比の平均値を示す。皮下脂肪, 内臓脂肪, 脂肪全体において, 脂肪の減少傾向は見られなかった。しかし, 個人のデータをそれぞれ比較すると, 脂肪の減少と増加している数は半々なので個体差が大きいと考えられる

2-4. 抗酸化作用

2-4-1. SOD 様活性度

縦軸に測定した SOD 活性度 (%) をとり, セリサイト (Tellus Gizer) 使用後の 0 週目, 4 週目, 8 週目, 12 週目群の血清におけるラジカルに対する

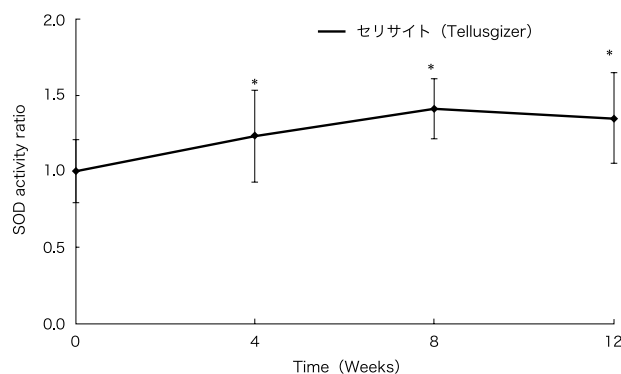


Fig.16 Effect of sericite on blood levels on SOD activity (inhibition rate, %) in human serum. DW, new sericite were treatment for 12weeks. The results represent the mean $\pm$ S.E. (n=10). Asterisks indicate groups significantly different from control at $p < 0.05$ (*) and control.

Table1. 0W-12W における皮下脂肪、内臓脂肪および全体脂肪の MRI 画像による脂肪抽出解析

計測部位		測定時期			
		0W	4W	8W	12W
皮下脂肪	Ave.	1	0.98	0.95	0.89
	S.E	0.05	0.07	0.05	0.08
内臓脂肪	Ave.	1	0.95	0.89	0.87
	S.E	0.06	0.07	0.05	0.05
脂肪全体	Ave.	1	0.93	0.84	0.76
	S.E	0.05	0.14	0.1	0.13

抗酸化作用の結果を Fig. 16 に示した。

0 週目の発光強度と比較して, 4 週目, 8 週目, 12 週目ともに SOD 活性度の増加が顕著 ($p < 0.01$) な増加であった。このことから, 4 週目, 8 週目, 12 週目に対する抗酸化作用認められ, 特に長期使用に対する抗酸化作用があることが示唆された。

2-4-2. ルミノール測定

縦軸に測定した発光強度をとり, セリサイト (Tellus Gizer) 使用後の 0 週目, 4 週目, 8 週目, 12 週目の血清におけるペルオキシラジカルに対するスカベンジング作用の結果を Fig.17 に示した。0 週目の発光強度 Kcounts と比較して, 4 週目, 8 週目, 12 週目ともに有意 ($p < 0.05$) な発光抑制が見られた。このことから, セリサイト (Tellus Gizer) 使用グループにペルオキシラジカルスカベンジング作用が期待でき, さらに, 相乗効果があることが示唆された。

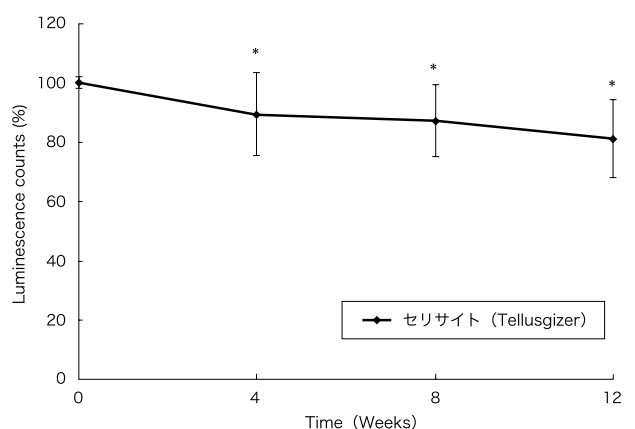


Fig.17 Effect of sericite on blood levels of anti-oxidation activity in human serum. DW, sericite were treatment for 12weeks. The results represent the mean $\pm$ S.E. (n=10). Asterisks indicate groups significantly different from control at $p < 0.05$ (*)

2-5. 体内デトックス効果 血中の尿素, 乳酸, アンモニア濃度の結果

2-5-1. 血中の尿素濃度

セリサイト (Tellus Gizer) 使用後の血中の尿素濃度は, 0 週目, 4 週目, 8 週目, 12 週目の血清における尿素濃度の結果を Fig. 18 に示した。

0 週目と比較して, 4 週目, 8 週目, 12 週目では, 有意な低下が認められた ($p < 0.05$)。

2-5-2. 血中の乳酸濃度

セリサイト (Tellus Gizer) 使用後の血中の乳酸濃度は, 0 週目, 4 週目, 8 週目, 12 週目の血清における乳酸濃度の結果を Fig.19 に示した。

0 週目と比較して, 4 週目, 8 週目, 12 週目と有意な低下が認められた ($p < 0.05$)。

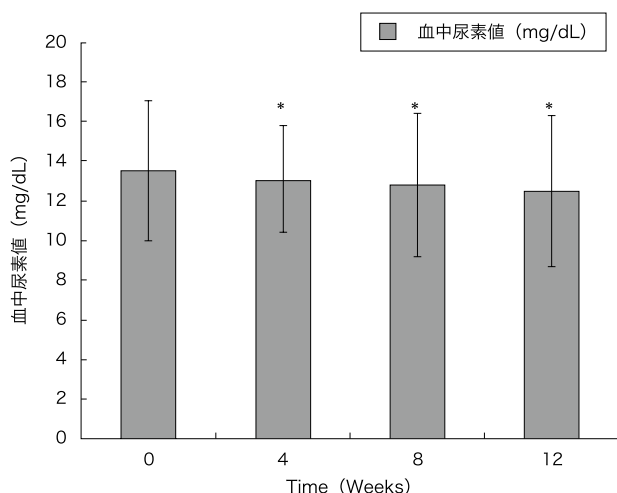


Fig.18 セリサイト (Tellus Gizer) 使用グループに対する血中尿素の量 (mg/dL) Asterisks indicate groups significantly different from control at $p < 0.05$ (*)

2-6. 尿による金属元素 (鉛, カドミウム) の検査の結果

2-6-1. 尿中鉛の濃度 (mEq/L)

セリサイト (Tellus Gizer) 使用後の尿中鉛の濃度は, 0 週目, 4 週目, 8 週目, 12 週目の尿中鉛の濃度の結果を Fig.20 に示した。

0 週目と比較して, 4 週目, 8 週目, 12 週目まで経過時間的に有意な増加が認められた ($p < 0.05$)。

2-6-2. 尿による Cd の濃度

セリサイト (Tellus Gizer) 使用後の尿中 Cd の濃度は, 0 週目, 4 週目, 8 週目, 12 週目の尿中 Cd の濃度の結果を Fig.21 に示した。

0 週目と比較して, 4 週目, 8 週目, 12 週目まで有意な増加が認められた ($p < 0.05$)。

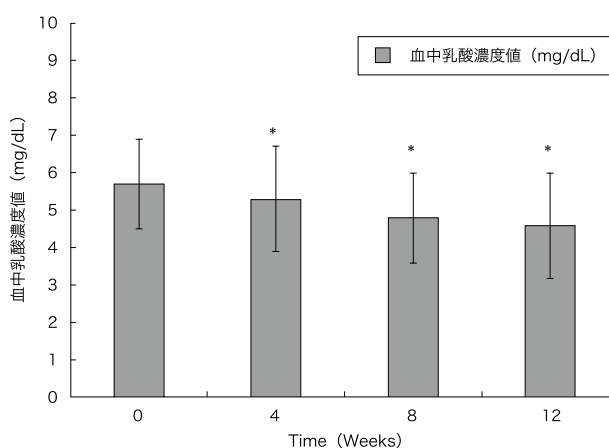


Fig.19 セリサイト (Tellus Gizer) 使用グループに対する血中乳酸の量 (mg/dL) Asterisks indicate groups significantly different from control at $p < 0.05$ (*)

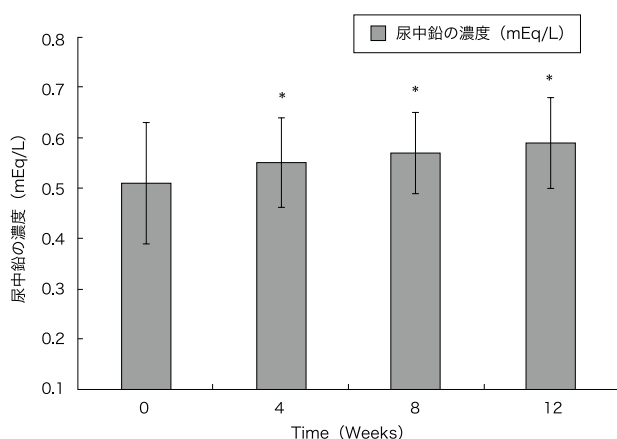


Fig.20 セリサイト (Tellus Gizer) 使用グループに対する尿中鉛の濃度 (mEq/L) Asterisks indicate groups significantly different from control at $p < 0.05$ (*)

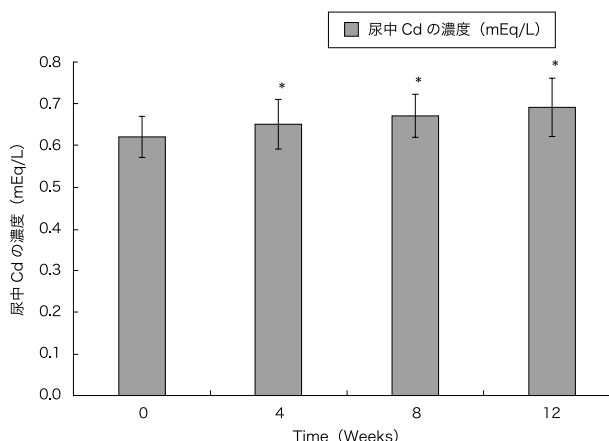


Fig.21 セリサイト (Tellus Gizer) 使用グループに対する尿中 Cd の濃度 (mEq/L) Asterisks indicate groups significantly different from control at $p < 0.05$ (*)

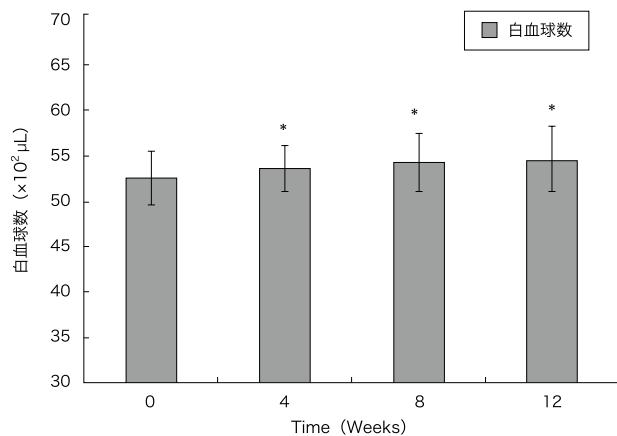


Fig.22 セリサイト (Tellus Gizer) 使用グループに対する白血球数の変化 Asterisks indicate groups significantly different from control at $p < 0.05$ (*)

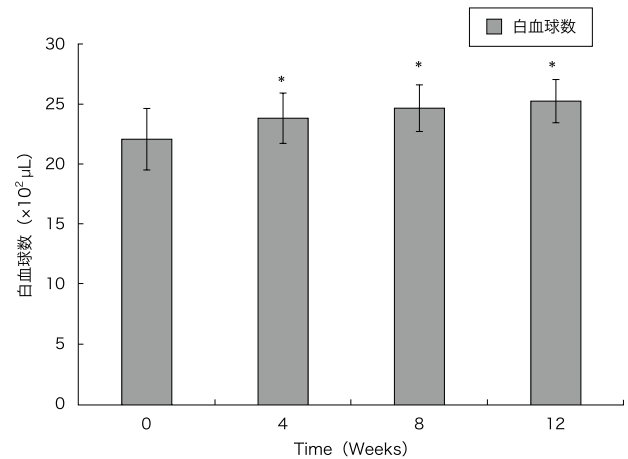


Fig.23 セリサイト (Tellus Gizer) 使用グループに対するリンパ球数の変化 Asterisks indicate groups significantly different from control at $p < 0.05$ (*)

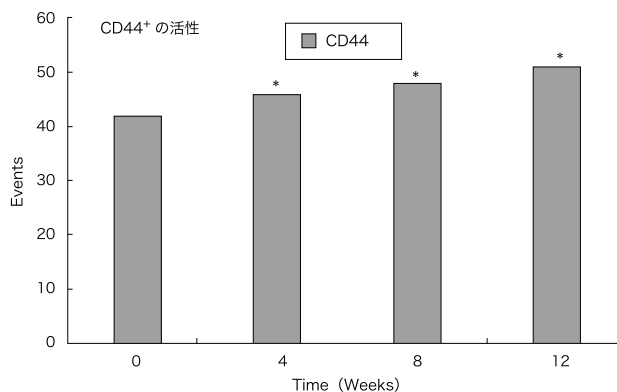


Fig.24 セリサイト (Tellus Gizer) 使用グループに対するリンパ球サブセットによる CD44+ の活性化 Asterisks indicate groups significantly different from control at $p < 0.05$ (*)

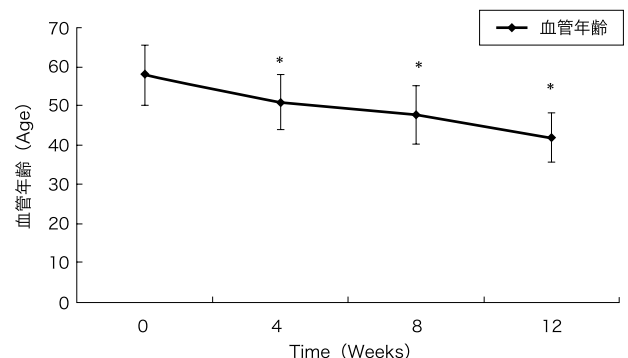


Fig.25. セリサイト (Tellus Gizer) 使用グループに対する経時的な血管年齢の変化 The result represents the mean value $\pm$ S.E. Asterisks indicate groups significantly different from control at $p < 0.05$ (*)

2-7. 免疫実験の結果

2-7-1. 白血球数

セリサイト (Tellus Gizer) 使用後の白血球数について、0 週目、4 週目、8 週目、12 週目の抹消血液中の白血球数の結果を Fig.22 に示した。

0 週目と比較して、4 週目、8 週目、12 週目まで経過時間的に有意な増加が認められた ($p < 0.05$)。

2-7-2. リンパ球数

セリサイト (Tellus Gizer) 使用後のリンパ球数について、0 週目、4 週目、8 週目、12 週目の抹消血液中のリンパ球数の結果を Fig.23 に示した。

0 週目と比較して、4 週目、8 週目、12 週目まで経過時間的に有意な増加が認められた ($p < 0.05$)。

2-7-3. リンパ球サブセットによる CD44+ の活性

セリサイト (Tellus Gizer) 使用後のリンパ球サブセットによる CD44+ の活性について、0 週目、4 週目、

8 週目、12 週目の抹消血液中のリンパ球サブセットによる CD44+ の活性の結果を Fig.24 に示した。0 週目と比較して、4 週目、8 週目、12 週目まで経過時間的に有意な増加が認められた ($p < 0.05$)。

2-8. 血管年齢の変化の結果

セリサイト (Tellus Gizer) 使用後の血管年齢の変化について、0 週目、4 週目、8 週目、12 週目の血管年齢の変化の結果を Fig.25 に示した。

0 週目と比較して、4 週目、8 週目、12 週目まで経過時間的に有意な低下が認められた ($p < 0.05$)。

3. 考察

3-1. 生理学的検査

体脂肪測定において、本試験ではインピーダンス法を使用した体脂肪体重計を用いた。インピーダンス

ス法とは体脂肪が水分を含まず電気を通しにくいという性質を利用し、感じない程度の微弱な電流を体に流すことで電気抵抗値を測って算定する方法であり、今回は電極を分離して足を広げることで測定姿勢が安定し、内股や膝が接触せず誤差が生じるのを防いだ。体脂肪の評価としては、男性は 10-20%、女性は 20-30% が標準値である。

測定結果より、0 週目に比べ、4 週目から 12 週目と標準値内での減少傾向が認められた。また、体重、BMI に経時的な減少傾向が認められたことから、内臓脂肪の燃焼により体脂肪率が減少したことが示唆された。体脂肪には重金属類（鉛、カドミウムなど）が沈着しやすく、単に汗をかくだけではその付着した重金属類も流れ出すことはなかなか難しく、脂肪そのものも減少しにくくなっている。よって、セリサイト (Tellus Gizer) により新陳代謝力が上昇し、恩熱効果による体内の老廃物を分解・排出を促進し解毒作用が働いたと考えられる。

3-2. 臨床検査

総コレステロールの基準値、LDL- コレステロール値は、0 週目に比べて 4 週目、8 週目、12 週目に有意な低下が認められた特に 12 週目において最も低下が認められ、効果が認められた。HDL- コレステロール値は、0 週目に比べて 8 週目と 12 週目に有意な増加が認められた。コレステロールは細胞膜あるいは細胞内の構造物の重要な構成因子のひとつであり、胆汁酸生成などに関する重要な生体内物質である⁸⁾。近年、血漿中のコレステロール濃度が上昇する高コレステロール血症が増加しており、動脈硬化、脳動脈硬化、心筋梗塞、脳血栓との関連で、特に強い関心が払われている。血液中のグルコースは肝細胞内で様々な過程を経てアセチル CoA を生成し、さらにアセチル CoA はオキザロ酢酸と縮合してクエン酸を生成し、クエン酸サイクルで分解される。このときクエン酸サイクルが機能しないと、蓄積したアセチル CoA はメバロン酸を経由してコレステロールを生合成する¹⁾。LDL (低比重リポたんぱく) は血液中に増加すると沈殿して動脈硬化を引き起こす原因となり、一方 HDL (低比重リポたんぱく) はそれを除去する抗動脈硬化作用がある。したがって HDL が低いと動脈硬化が進展しやすく、高いと起こりにくいとされている²⁾。そこで、セリ

サイト (Tellus Gizer) の各種コレステロール値への影響について検討した。測定結果より、0 週と比較して、4 週 -12 週までは LDL- コレステロールの減少が認められ、総コレステロール濃度の減少が示された。よって、セリサイト (Tellus Gizer) の熱刺激により血流が改善され、コレステロール値が減少したと考えられる。

中性脂肪の基準値は 35-149 mg/dL である (メディック (株) 検査基準値より)。中性脂肪はグルコースとともに、人体のエネルギー源として全身の脂肪組織に貯蓄されており、内臓脂肪型肥満や動脈硬化、脂肪肝等の原因にもなり得る³⁻⁸⁾。測定結果より、0 週と比較して 4 週 -12 週まで中性脂肪値が減少したことから、熱刺激による血流の改善により脂肪の分解能が上昇したと考えられる。

3-3. MRI&US の臨床検査

脂肪細胞には、白色脂肪細胞と褐色脂肪細胞があり、白色脂肪細胞は、脂肪を貯める。この白色脂肪細胞増やす遺伝子の一部が変異し、摂取したエネルギーの吸収 (蓄積) 効率を上げたり、消費するエネルギーを減らしたりするはたらきをもつようになったもののことである⁹⁻¹²⁾。いくつかの儉約遺伝子が知られているが、代表的なものに「 $\beta 3$ アドレナリン受容体遺伝子」というものがある¹³⁾。 $\beta 3$ アドレナリン受容体は、白色脂肪細胞と褐色脂肪細胞の両方にそなわっている。交感神経の末端から分泌される「ノルアドレナリン」というホルモンを受けとるための受容体である¹⁴⁾。 $\beta 3$ アドレナリン受容体にノルアドレナリンが結合すると、白色脂肪細胞では、中性脂肪が分解されて遊離脂肪酸となり、血管を通じて褐色脂肪細胞へと移動する。一方、褐色脂肪細胞では、遊離月旨肪酸を燃料として熱を発生し、体外へと放出する。従って、このようなセリサイト (Tellus Gizer) の温熱効果の効果により、新陳代謝のメカニズムにより、本研究の脂肪減少効果かが明らかにされたと考えられる¹⁵⁾。

3-4. 抗酸化作用

肥満特徴は、食事と運動不足に伴い有病率が増加することであり、新陳代謝が密接に関連することは広く知られている¹⁶⁾。酸素を利用しエネルギーを得る生体内では、常に活性酸素種 (reactive oxygen

species; ROS) が産生されている。ROS はその高い反応性からタンパク質、脂質、DNA などの機能分子を修飾することで、細胞機能の障害を引き起こす。細胞は ROS に対する防御機構を備えているが、細胞の内外で過剰に産生される ROS を十分に処理できないときに OS が生じる。AD を含めた神経変性疾患の発症に ROS の関与が指摘されている¹⁷⁾。また、生体の OS 防御に関わる物質は、SOD、グルタチオン・ペルオキシダーゼなどのフリーラジカル発生防止型抗酸化物質、ビタミン C、ビタミン E、フラボノイドなどのフリーラジカル補足型抗酸化物質、およびリパーゼ、プロテアーゼなどの酸化傷害修復酵素に分けられる¹⁸⁾。

セリサイト (Tellus Gizer) は、温熱効果の抗酸化物質により、ペルオキシラジカルを消去し、アゾ化合物による LDL の酸化を抑制し、これらの活性酸素種に対する消去作用の主な成分は SOD 活性であることが報告されている¹⁹⁾。

本研究では、 $O_2^{\cdot-}$ 分解酵素である SOD 様の活性度および AAPH 由来のペルオキシラジカルを消去する抗酸化作用の指標としセリサイト (Tellus Gizer) の温熱効果の抗酸化作用に対する影響を検討した。

セリサイト (Tellus Gizer) の温熱効果において SOD 様の活性は認められた。また、AAPH 由来のルミノール発光強度が顕著に抑制されたことから、セリサイト (Tellus Gizer) の温熱効果による血流上昇と新陳代謝による SH 基や SOD 様活性により、ペルオキシラジカルをスカベンジングし、生体内の OS を減弱させることが推察された。また、セリサイト (Tellus Gizer) の温熱効果におけるラジカルスカベンジング能が大きかったことから抗酸化作用が期待できる。従って、セリサイト (Tellus Gizer) は、抗酸化作用より、体内の汚れを除去すると考えられる。

3-5. セリサイト (Tellus Gizer) の温熱効果によるデトックス効果

本研究では、肥満社会に向かって、セリサイト (Tellus Gizer) の温熱効果のデトックス効果について検討を行った。本研究では、温熱による決了の増加によるデトックス効果が考えられる²⁰⁾。

血液より、尿素、乳酸などを液体クロマトグラフィ

で検査した結果と尿による金属元素の検査による鉛、カドミウム等を液体クロマトグラフィで検査したから、セリサイト (Tellus Gizer) 使用後の血中の尿素濃度は、0 週目に比べ、4 週目、8 週目、12 週目でも、有意なデトックス効果が認められた。その中でも特に 12 週目では、最も効果が著しく、効果が認められた。

尿によるセリサイト (Tellus Gizer) 使用後の尿中重金属の濃度は、0 週目に比べて 4 週目、8 週目、12 週目に有意な低下が認められた特に 12 週目において最も低下が認められ、効果が認められた。

セリサイト (Tellus Gizer) の温熱効果は、体内の SH 基の増加と SOD の活性により、酸化防止として酸化反応に触媒作用を呈する重金属を不活性化するキレート剤の可能性もあり、解毒としても期待される。解毒作用により体内の活性酸素を排出する働きを有することが明らかとなり、体内消臭効果も期待される (21-26)。本研究では、セリサイト (Tellus Gizer) の温熱効果の継続使用によって抗酸化作用や新陳代謝の旺盛により、体内老廃物 (尿素、乳酸など) 排泄によるデトックス効果が期待される。

血流量については、セリサイトマット使用実施前と比較して、実施後 4-12 週目の血流量の増加が認められた。セリサイト (Tellus Gizer) の温熱効果により、血流量の増加で新陳代謝の促進も期待できる。

4. 結論

本研究では、体重、BMI に経時的な減少傾向が認められたことから、内臓脂肪の燃焼により体脂肪率が減少したことが示唆された。体脂肪には重金属類 (鉛、カドミウムなど) が沈着しやすく、単に汗をかくだけではその付着した重金属類も流れ出すことはなかなか難しく、脂肪そのものも減少しにくくなっている。よって、セリサイト (Tellus Gizer) により新陳代謝力が上昇し、温熱効果による体内の老廃物を分解・排出を促進し解毒作用が働いたと考えられる。

セリサイトの温熱効果は、体内の SH 基の増加と SOD の活性により、酸化防止として酸化反応に触媒作用を呈する重金属を不活性化するキレート剤の可能性もあり、デトックス効果があった。血流上昇と抗酸化作用により、ダイエット効果および温熱効果により新陳代謝が期待される。

参考文献

1. Gu YH, Choi JS, Ann YH: Whitening mechanism by the extracts of *nardostachys chinensis* batal. *Int. J Beau Ind.* **3**(3): 131-135. 2008.
2. Gu YH, Nakamura T, Yamashita T, Takagi Y, Oshima M: Anti-glycosuric effect of *Gymnema sylvestre*. *Med Bio.* **148**(6): 38-42. 2004.
3. Yeunhwa Gu: Clinical test related to bloodstream, anti-oxidant, anti-metabolic syndrome in human by oriental medicine lust (YS). *New Food Industry.* **62**(7): 483-496, 2020.
4. Yamashita T, Kato T, Isogai T, Gu Y, Ma N: Protective effects of taurine on the radiation exposure induced cellular damages in the mouse intestine. *Adv Exp Med Biol.*, **1115**: 443-450, 2019.
5. Ma N, Kato T, Isogai T, Gu Y, Yamashita T: The potential effects of taurine in mitigation of radiation nephropathy. *Adv Exp Med Biol.*, **1115**: 497-505, 2019.
6. Gu YH, Yamasita T, Inoue T, Song JH and Kang KM: Cellular and molecular level mechanisms against electrochemical cancer therapy. *Journal of Pathogens*, Hindawi, Article ID 3431674, <https://doi.org/10.1155/2019/3431674>, 20192019,1-11.
7. Gu YH, Yamasita T, Choi DJ, Yamamoto H, Matsuo T, Washino N, Song JH and Kang KM: The anticancer effect of plant enzymes on mouse breast cancer model. *Adv Medi Plant Res.* **6**(4): 70-77. 2018.
8. Nakamura T, Itokawa Y, Tajima M, Ukawa Y, Cho KH, Choi JS, Ishida T, Gu YH: Radioprotective effect of lyophyllum decastes and the effect on immunological functions in irradiated mice. *J Tradi Chi Med.* **27**(1): 70-75. 2007.
9. Gu YH, Park SR, Hasegawa T, Koike M: Antihypertensive effect of lyophyllum decastes Sing in spontaneously hypertensive rats. *Int J Med Mus.* **3**(1): 103-110. 2001.
10. Gu YH, Hasegawa T, Suzuki I, Hayashi I, Ahn KS, Twaraya H: A study of the radioprotection effect of macro-glucan (β -1-3 glucan) on fetuses of ICR mice. *J Ori Med.* **5**(1): 63-70. 2000.
11. Gu YH, Yamasita T, Kang KM: Subchronic oral dose toxicity study of *Enterococcus faecalis* 2001(EF 2001) in mice. *Toxi Res.* **34**(1): 55-63. 2018.
12. Yamashita T, Kato T, Tunekawa M, Gu YH, Wang S, Ma N: Effect of radiation on the expression of taurine transporter in the intestine of mouse. *Adv Exp Med Biol.* **975**: 729-740. 2017.
13. Jin UH, Song KH, Motomura M, Gu YH, Kang YJ, Moon TC, Kim CH.: Caffeic acid phenethyl ester induces mitochondria-mediated apoptosis in human myeloid leukemia U937 cells. *Mol Cell Biochem.* **310**(1-2): 43-48. 2007.
14. Liu J, Edamatsu R, Hamada H, Mori A: Scavenging effect of guilingji on free radicals. *Neurosciences*, **16**: 623-630. 1990.
15. Kim JH, Park MY, Lee JY, Okuda H, Kim S, Hwang WI: Antioxidant and antitumor effects of manda. *Biochem Arch.* **14**: 211-219. 1998.
16. Gu YH, Yamashita T, Maenaka T, Itokawa Y, Nakamura T, Choi IS, Tano K, Ryu MS, Hasegawa T, Oshima M: Anti-tumor immunity and radioprotection effect of fuscoporia oblique.; *Med Bio.* **149**(9): 304-318. 2005.
17. Gu YH, Choi HJ, Yamashita T, Kang KM, Iwasa M, Lee MJ, Lee KH, Kim CH: Pharmaceutical production of anti-tumor and immune-potentiating *Enterococcus faecalis*-2001 β -glucans: enhanced activity of macrophage and lymphocytes in tumor-implanted mice. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, **18**(8): 653-661. 2017.
18. Gu YH, Takebe M: Immunological enhancement effect and radiation protection effect of Fuscoporia oblique. *Med Bio.* **153**: 165-175. 2009.
19. Gu YH, Iwasa M, Iwasa H, Kobayashi K, Itokawa Y, Ishida T: Radiation protection effect for EF 2001 (*Enterococcus faecalis* 2001). *Med Bio.* **151**: 289-295. 2007.
20. Jin UH, Song KH, Motomura M, Gu YH, Kang YJ, Moon TC, Kim CH: Caffeic acid phenethyl ester induces mitochondria-mediated apoptosis in human myeloid leukemia U937 cells. *Mol Cell Biochem.* **310**(1-2): 43-48. 2007.
21. Kang YN, Maenaka T, Itokawa Y, Yamashita T, Nakamura T, Oshima M, Hasegawa T, Suzuki I, Tano K, Ishida T, Gu YH: Embryonic Death Effects of Hyperthermia Induced by RF (Radiofrequency) Waves. *Med Bio.* **150**(3): 97-103. 2006.
22. Gu YH, Fujimiya Y, Itokwa Y, Oshima M, J Choi JS, Miura T, Ishida T: Tumorcidal effects of beta-glucans: mechanisms include both antioxidant activity plus enhanced systemic and topical immunity. *Nutr Cancer*, **60**(5): 685-691. 2008.
23. Gu YH, Takagi Y, Nakamura T, Hasegawa T, Suzuki I, Oshima M, Tawaraya H, Niwano Y: Enhancement of radioprotection and anti-tumor immunity by yeast-derived β -glucan in Mice. *J Med Food*, **8**(2): 154-158. 2005.
24. Gu YH, Yamashita T, Oshima M, Takagi Y: Immunological enhancement effect in PASSION FRUIT (MARACUJYA). *Med Bio.* **148**(1): 20-25. 2004.
25. Gu YH, Itokawa Y, Maenaka T, Yamashita T, Oshima M, Nakamura T, Young-nam Kang, Takeo Hasegawa, Ikukatsu Suzuki, Insuk Choi, Tano Kaori, Torao Ishida: The blood estradiol-17 β , testosterone and progesterone of male and female mice change by lepidium meyenii walp (MAX-180) and Muira Puama. *Med Bio.* **150**(4): 159-168. 2006.
26. Gu YH, Yamashita T, Oshima M, Takagi Y: The blood estradiol-17 β , Testosterone and progesterone of male and female mice change by *Lepidium meyenii* Walp(MAX-180). *Med Bio.* **148**(1): 14-73. 2004.

新解説

グルテンフリー穀物製品のマーケットについて (1)

瀬口 正晴 (SEGUCHI Masaharu)^{1, 2}

竹内 美貴 (TAKEUCHI Miki)³ 中村 智英子 (NAKAMURA Chieko)³

Key Words: グルテンフリー穀物製品, マーケット

本論文「新解説 グルテンフリー穀物製品のマーケットについて (1)」は“Gluten-Free Cereal Products and Beverages” (Edited by E. K. Arendt and F. D. Bello) 2008 by Academic Press (ELSEVIER) の第 17 章 The marketing of gluten-free cereal products by J.Bogue and D.Sorenson の一部を翻訳紹介するものである。

イントロダクション

新しい製品の開発とマーケット展開は、今日の激しい競争ビジネスの環境の中で不可欠、必須で、企業ビジネス戦略の一部であり、そして広くリスクを伴うロードとして認識されている。グルテンフリー穀物製品を必要とする消費者が、小麦、ライ麦、大麦をベースとする食品のグルテンからくるセリアック病および他アレルギー反応を示す人々の増加と共に次第に増えている。グルテンフリー穀物製品は、グローバルな健康と健全なマーケット内でマーケット成長のチャンスを示し、食品産業業者にとり消費者リードによる高級な価値感レベルの新製品を発展させ、最終的には消費者の受け入れられるものとなる。

この章では、グルテンフリー穀物製品のマーケットを調べ、この食品がうまく展開するマーケットに関し、戦略的重要点のいつかにハイライトをあてる。イントロダクションに続き、グルテンフリーマーケット全体像を眺め、その新たに現れた傾向について議論する。健康と健全マーケットに対する鍵となる戦略的重要点を概略し、グルテンフリー穀物製品に応用して、成長する製造業者とグルテンフリー穀物製品の消費者誘導マーケットの枠をガイドする。

グルテンフリーマーケットの全体像

グルテンフリー穀物製品のマーケットは、セリアック病の診察レベルの上昇に反応して消費者の要望の増加と、さらにまた特別の消費者が彼らの食事から意識的にグルテン除去という選択をするということから非常に大きく増えることが期待される。さらに診察レベルが上がるように準備され、米国では診察の最も遅れている病気と考えられている (Palmer, 2004)。グルテンフリー食品製品のマーケットは、セリアック病を持つ人々、彼らの食事からグルテンを除去したい人々のニーズを満足させるために成長していることと、さらに重要な事は、そこにとどまっているマーケットであることだ。

グルテンフリー穀物製品の米国におけるマーケットは 2006 年 700 million US ドルであり、年に 25% 成長し、2010 年までには 1.7 billion US ドルに達する (Gourmet Retailer, 2006)。2006 年 UK グルテンフリーマーケットは 225 million ユーロと計算された (Food Production Daily, 2006)。Gourmet Retailer (2006) によると、殆どのグルテンフリー穀物製品はこれまでの伝統的穀物ベース食品に変わり、そこには大麦食品、パスターや、例えば米やトウモロコシのような穀物、粉が入る。グルテンフリーマーケットの発展に結びつく困難な点は、その分野の厳

¹ 神戸女子大学, ² 日本穀物科学研究会前会長, ³ 神戸女子短期大学

しい加工上の要求によるもの、またその認められるマーケットのサイズの点である (Mark 2006)。しかしながら Food Production Daily (2006) によると、UK で 2000-2002 の間 37.1% グルテンフリー穀物製品の成長がマーケットにあった。ヨーロッパ、米国で 300 人中 1 人がグルテン不耐性であり、ドイツではもっと高く (200 人中 1 人)、UK では (100 人中 1 人) であると計算される (Food Navigator USA, 2006a)。マーケットが飽和している場合、食品不耐性区分をターゲットにする食品会社にとりマーケットチャンスが有り、ライバル会社との競走の利点を得るチャンスがある。

マーケットの要求とは何か? 消費者にとりグルテンフリー食事を消費することが必要な時、彼らは従来のものと同一の形、テクスチュアのグルテンフリー穀物製品を探す。しかしながらグルテンフリーベーカリー食品の殆どのマーケットにあるものは、非常に貧弱な品質で、特に小麦による相対する物に比べた場合はそうである (Arendt *et al.*, 2002)。

毎年治療を受けるセリアック病の人々の数は増加し、彼らの欲するベターな味、ベターなテクスチュアは、食品製造業者に対し食品マーケットの大きな機会を提供している (Shinsato, 2006)。Coeliac UK (2007) の記述する所によると、グルテンフリー穀物食品のマーケットはスケールも大きくなり、顕著に洗練されて来た。しかしながら Food Navigator USA (2006b) によると、或る大きな食品企業は未だマーケットに参入していないが、一定のグルテンフリー穀物食品のルールが収まるまで、彼らはリサーチと発展のための研究を不承不承しているという。Food and Drug Administration (FDA) は 2006 年に適当なルールの提案を要求し、最終的ルールが 2008 年に出され、食品ラベルに“グルテンフリー”という言葉が自発的に用いることを決めた。

グルテンフリーマーケットの傾向

グルテンフリー食物製品のマーケットは、これからの数年間極めて大きく成長する事が期待されており、これは会社によくの製品の成長、それは、味よく、てごろな新グルテンフリー穀物製品のマーケットの機会を供給するであろう (Reeves, 2006)。Milton (2003) によると、食品マーケットを通じ、これからの新しい食品の展開 (NPD= 新製品開発) で鍵と

なる食品領域に含まれるものは、インスタント食品、健康食品 (food with perceived health benefits)、低脂質のオーガニック食品、範囲の拡張、ブランドの拡張、商品の改良、新カテゴリー、高級品質食品がある。これらの領域は消費者が認めるグルテンフリー穀物商品開発のチャンスを製造業者に与えてくれる。さらにこのマーケットの機会、薬や手術でもないセリアック治療法であると示すことができ、すなわちグルテンフリー食品の消費による唯一の治療である (Reeves, 2006)。

グルテンフリー穀物食品の強い食品の傾向は 2006 年は明らかであり、それは多分 2010 年まで ω -3 油脂、特別のタンパク質、プロバイオテックス、プレバイオテックスをふくむ他成分・栄養物質が入り続く (Stagnito Communications 2006a)。これらの特別食品成分の演壇上牽引物質は、全ての食品、飲料、サプリメントマーケットのいたるところで NPD の活性を期待させる。予想されるのは、グルテンフリー食品、飲料のマーケットは 10 倍ほど 2010 年まで成長するが、それは新しいグルテンフリー食品と飲料のマーケットが成長する機会を与える (Food Navigator USA, 2006b)。例えば、飲料部門で Anheuser-Busch は、モロコシビールを Red bridge と呼び、小麦フリーあるいはグルテンフリー食品を求める消費者をターゲットに開発している (Nutra Ingredients USA, 2007)。

グルテンフリーマーケットは、セリアック病の 97% の人が未だ未診断で未治療であることにライトをあててその機会を見込むことができる (Gourmet etailer, 2006)。Reeves (2006) が述べているように、もっと調査の進んでいる国々では (例えばイタリア)、セリアック病の人々の数値は明らかにもっと高い。グルテンフリー食品の食品範囲は; ドレッシング、飲料、ピザ、冷凍アントレ (肉料理)、ベーキングミックスとフラワー、グルテンフリー甘いシロップ、ビール、菓子製品である。Palmer (2004) によると、消費者から要求される人気グルテンフリー穀物製品は; パン製品、ピザクラスト、パスタ、スナックフード、グルテンフリー粉、ベーキングミックス、ケーキ、クッキー、バーである。この製品範囲は多分、セリアック病を持つ多忙な人々が彼らのライフスタイルに合う食品製品を求めるほど広くなるだろう; そこには外食フード、ファストフー

ド、スナックフード、レディミール、機能性飲料を含む。これらのライフスタイルの傾向は、“これからの食品を考える人”に顕著な新しい食品、それは消費者ライフスタイルの変化にあった製品を作る機会を提供する(Reeves, 2006)。例えば Wennstrom and Mellentin (2003) が報告するのは、消費者は彼らの食事関連のことを中心に考えるよりも、できるだけ自分に適応した食事を次第に容認するようになる。これは多忙なライフスタイルの消費者にとり、一定の食事よりむしろフレキシブルな食事という結論である。さらに利便性の傾向は、消費者にとり作るのにシンプルで簡単な毎日の食事を求めていることを意味している。グルテンフリーマーケットで1つの大きな傾向で気になる点は、グルテンフリー製品展示マーケットから、特別主流グルテンフリー食品マーケットへ移り、毎年着実に成長していることだ(Nutra Ingredients USA, 2004; Food Production Daily, 2006)。さらにグルテンフリー穀物製品の生産は、クラフト産業に機会を与えるが、それは例えばベーカリー製品販売レベル増加のための付加価値として商品に包装紙を使うからである。このマーケットチャンスは、また、工業用ベーカリーからの量産品からの製品の差別化の手段を与える(Food Navigator USA, 2006a)。この製品の差別化は Anheuser-Busch のモロコシビール、Redbridge で小麦あるいは大麦を抜いた手作りビールの発明にみられた(Nutra Ingredients USA, 2007)。このような隙間のマーケット製品は食事からグルテンを抜きたい消費者を明らかにターゲットにしたものである。このような隙間のマーケットは特異的会社に魅力的なものであり、僅かな2-3の競争会社を引きつける(Kotler, 2000)。グルテンフリー穀物製品の新しい食品のアイデア源は、消費者、競争者、配送者チャンネル、従業員提案、マネージメントからである。

マーケットの重要点と新しい食品

Wennstrom and Mellentin (2003) は健康と健全マーケットに入る5つの戦略を確認した; 隠された栄養的利点の効力、新カテゴリーの生成、新セグメントの生成、カテゴリー代替え、および食品製造の改造である。これらのマーケットへの入口戦略は、企業目的として食品と飲料のカテゴリーにまたがってグ

ルテンフリーマーケットに参入する際、マーケットチャンスの開発目的のため企業に使われる。これはグルテンフリー穀物製品の進歩に革新的な成分が利用される場合に応用され、そこでは消費者はこれらの成分の長所に自信を持つ必要があり、使って安全であり、官能品質を改良し、シェルフライフを長くするものである。その文脈中、健康と健全マーケットにおいて新しい食品に対し多くの障害が消費者の納得にはあった。消費者は新しい成分に親しみが無いものであり、また、これらの成分の消費からのメリットに気がつかない。例えば、栄養的に強化された食品についてはこれらの食品を購入するためにある危険が伴う。1つのこの危険とは消費者が毎日の必要栄養量の過剰摂取をするということで、有毒化するかも知れない(Frewer *et al.*, 2005)。同様に、セリアック病の人々にとり、グルテンフリー穀物製品購入にリスクがあるため、Reeves (2006) が暗示するように、セリアック病の患者は“食品に用心深くなり、時間をかけて、ゆっくりとした食料品店での買い物のあいだ、ラベルを細心に読む”ようになる。殆どの消費者にとり、食品の安全性が優先され、消費者にとりその食品が安全で栄養的であることを期待させる(Frewer *et al.*, 2005)。しかし、セリアック病の人々にとり、食品と結びつく危険認識があり、彼らの健康に悪い影響を与えるグルテンが僅かにでも含んでいるかどうかである。

健康・健全のマーケットに非常に注目される失敗があった一方、戦略的マーケットの教訓がそのマーケットプレースでうまく進んだ製品から学ばれた。Wennstrom and Mellentin (2003) は特別な健康・健全食品の戦略的な成功を研究し、次のように結論した。このマーケット中で成功した製品のデザインとポジショニングは4つの鍵になる成功のファクターと関係した; その製品を必要とする消費者; その成分を受け入れる消費者; その成分の価値を理解する消費者; さらにそのブランドを信頼する消費者であると。グルテンフリー穀物製品と関連して、4つの成功のファクターは、グルテンフリー穀物製品のターゲットマーケットにも応用する事ができる。このターゲットマーケットには、セリアック病の患者とセリアック病ではないがグルテンフリー穀物製品をほしい人々の両方を含む。もし Wennstrom and Mellentin (2003) の4つの成功ファクターがグルテ

ンフリーマーケットに応用されるならば、消費者はまず十分に研究された食品あるいは飲料を望まねばならず、そしてそれが彼らのライフスタイルにびったり合致したものでなければならぬ。さらに、それらは受け入れられ、グルテンに変わる成分はセリアック病の人々にとり耐性であるか、あるいは耐える事はできないものかという観点で理解されねばならない。

最終的には、彼らはそのブランドを信用せねばならず、そのブランドは製品の品質と安全性の観点から配達される。Wennstrom and Mellentin (2003) の4つの成功ファクターは、グルテンフリー食品がうまく成長するためのマーケット戦略のガイドに重要な役割を演じることができる。

グルテンフリーターゲットのマーケット

Heasman and Mellentin (2001) は、新規の革新的な健康・健全製品をターゲットとする消費者グループの鑑別において、食品と飲料製造業者が遭遇する困難な場面を再考する。全体的には、健康・健全マーケットで新しい食品の成功の鍵になるファクターは、以下のように要約される；消費者受け入れ問題の克服；効能の証明；健康宣言する健康・健全製品プロモーションの立法上の問題；製品促進と消費者教育；それと重要な点は、鍵となるターゲットマーケットの同定と選択である (Hilliam and Young, 2000; Heasman and Mellentin, 2001; Bistrom and Nordstrom, 2002)。新しいマーケットに入る企業は、区切り、区切りのターゲット、さらにそのマーケット中の製品の位置について確認せねばならない。マーケット区分はマネージメントの道具であり、全マーケットを特別のマーケットプログラムによって決まる消費者グループに分ける (Hisrich and Peters, 1991)。これは会社が、特別だが類似の製品に関する要望、必要、性質で、消費者グループを分けることを指す (Meulenberg and Viaene, 2005)。あるマーケット区分とは、「ある与えられたマーケットミックスに面した時、期待した反応が類似する消費者グループ。ある区分は製品あるいは購入したサービスにユニークな一連の価値を求める」と定義する (Bradley, 1995)。そこで鍵となるグルテンフリー食品関与の戦略的決定は、まずマーケットプレースでターゲットになるこれらの製品のための適

当なマーケット区分の同定である。グルテンフリーマーケット中の適当な区分の同定は、消費者が製品に求め、あるいはそこから受けとる価値に基づき消費者をグループ化する行動的分節化プロセスを通じて前にすすめられる (Kotler, 2000)。グルテンフリーマーケットの場合、消費者は彼らが購入する製品から受け取る非常に特異的な価値を求め、例えばその製品とはグルテンフリーであり、購入者に品質と安全性を与える物である。

グルテンフリーマーケット区分を含む消費者のいろいろなグループがあり、例えばこれらの消費者は食品への不耐性の人々でありまた彼らの食事からグルテンを除去したいと思っている人々である。Food Navigator USA (2006b) によると、グルテンフリー食品は単にセリアック病の人々で消費されるだけではなく、その家族メンバーで同じ製品の異なったバージョンを買うのをいやだと思う人々も消費する。さらにセリアック病が遺伝すると知られているので、ファミリーのメンバーはグルテンフリー穀物製品を予防理由で消費するのであろうが、それはセリアック病がよく診断不足でしばしば患者にとり曖昧であるためである。さらに、Mark (2006) によるとグルテンフリー穀物製品は他の医学治療にも価値があり、例えば自閉症、注意血管障害 (ADD)、他の小麦、卵、大豆、ミルクアレルギーの消費者である。そこで、もしファミリーの他のメンバーがグルテンフリー穀物製品を消費するならば、食品製造業者は製品の本質的な面、味、テクスチュア、見てくれの面に関心を持たねばならない。

さらにもう一つははっきりしたターゲットマーケットは、食事からグルテンを除去したい消費者であろう。Gourmet Retailer (2006) によると、これらの消費者は有機、天然食品マーケットから移動してきた人々で、中間から上級消費者としてこれらをプロファイルする。彼らは、例えば偏頭痛、月経のような他の体調を悪化するかもしれないと感じるアレルギーをもつ食品の消費を避けようとする。さらに、セリアック病ではないが他の理由で小麦を避けたい消費者がいる。しかし、この態度の違うマーケット区分をターゲットにすることは、特にこのように食品が貧弱な消費者の受けとめに遭遇する場合、健康食品マーケットで追求する機会のチャレンジを伺っている企業に難題を提示する。(Verbeke 2004; Saher

et al., 2004)。これは消費者の受けとる問題点が、企業により無視、あるいは貧弱な理解程度の両方である事を示す。Wennstrom and Mellentin (2003) の議論に; “しばしば技術は製造者に対し制作価値の作成に用いられ、これは時に顧客の価値作成とは全く異なる” とある。そこで消費者基盤はグルテンフリー穀物製品が広がるにつれて、グルテンフリー穀物製品のテクスチャ、味プロフィールの改良に力点を強める (Food Production Daily, 2006)。

広がったマーケットベースは英国の Sunstart Bakery により示されたが、彼はグルテンフリークッキーを扱う雑貨店に多くのものを供給した。彼らのマーケットはセリアック病の患者用、少し小麦不耐性の人用、あるいは単に小麦を避ける消費者用に分けたと彼らは述べた (Food Production Daily, 2006)。今マーケットにあるものより新たに進歩した高品質のグルテンフリー穀物製品の開発、例えば栄養価を上げたパン、シェルフライフを長くしたパン、さらに普通のパンのテクスチャに似せたパンで、グルテンフリー穀物製品をより広げたマーケットに提供する (Medical New Today, 2006)。

グルテンフリーマーケットの商品の位置(positioning)

Hisrich and Peters (1991) によると、マーケットプレース (市場) でのブランドの位置の理解不足が、全紹介新製品のうち大部分、約 80% は失敗する原因である。Kotler (2000) はその位置のことを、“企業提案のデザインの行為とターゲットマーケットの精神の独特の場所占拠するためのイメージ” と定義した。マーケット戦略の全ての要因が、そのためマーケットプレースにおける製品の位置を決める助けとなり、企業はマーケットにおける製品のよい位置をきめる必要があり、つぎに消費者へのこの位置を売り込む。市場での明確な位置を持つことにより、ブランドは競争的長所の強い権限を展開することができる。製品の位置の点から、消費者はある環境下におかれ、そこで彼らは連続的なマーケットのメッセージの猛攻撃にあい、マーケットインフォメーションのオーバーロードに対して、防御し、消費者は叫び、彼らに提供されたマーケット情報の多くを拒絶する (Trout and Ries, 1995)。結果的に、食品会社はいかにしてそのメッセージが消費者により聞かれ、受けとめられたかを確かめことができるか? 会

社はマーケットリサーチをすすめて区分 option (選択) を決め、そしてどのように消費者がいろいろなマーケット戦略に反応するかを求める。最も大切な戦略的マーケット問題の 1 つは、ポジションの戦略はターゲットマーケットの心の中で競争品からその製品を差別することである。

企業マーケットにとりグルテンフリー穀物製品、特別のマーケットの疑問がそこで明らかになってくる; いかにこれらの製品が成功するマーケット戦略の不可欠なパートとして位置すべきであるか? マーケットポジショニングは始めにマーケットの区分に関係があり、そして次に製品と消費者グループのターゲットに関係する。ポジショニングプロセスの最後のステップは、競争他社の製品に関し、特定の製品を消費者の気持ちの中に位置付けることである。グルテンフリーマーケットでは、企業は彼らの商品の価値 (グルテンフリー)、あるいは彼らの製品の属性 (特別の官能品質)、あるいはその両方に基づいて位置戦略を展開する。例えば、Stagnitto communications (2006b) は、企業が狭いターゲットの健康アピールに置き換える時に、新しい健康ラベルの主張はできた商品の幾つかのブランドあるいはカテゴリをアピールするものであると報告している。

例えば Unilever は、ダイエット効果のあるシェーク (のみもの) やエネルギーバーの路線の Slim-Fast (早く痩せる) を通して、乳製品やグルテン由来成分を含まない消化しやすい製品を始めた。これらの製品はグルテンアレルギー、あるいは乳糖不耐性の消費者のために作られた。セリアック病の人々にとり、グルテンフリー製品に要求される大部分の 1 つは、如何なるグルテンの残渣も含まないことである。確かなグルテンフリー信頼性の面で、これらの製品の位置はセリアック病を持つ人々にとりマーケットが非常に意識的に純粋を求めるので重要である (Barr, 2004)。この事は生産者がグルテンフリー穀物製品を作るのに用いるレシピ、加工のためにターゲットのマーケットの必要性に合う食品を作らねばならぬことを示している。この点で強く信頼おけるブランドの発達、多分この消費者にとり非常にはっきりしていて、これらブランド面の品質と同じ意味で、購入決定時に巻き込まれるリスク面を減らすこともできる。セリアック病をもつ純粋でまじめな消費者に答えるために、ある企業はグルテンフ

リー穀物製品の製造のために食品施設を独占的に開いた。これはグルテンフリー穀物と普通の品種の物との間のクロスコンタミを防ぎ、新しいものを購入する時、安心を与え、その危険を減らす。さらに製品を美味しく、わくわくさせるようにすることが必要で、それはまさに置き換えたふつうの製品のようにである。食品を選択する面で、多くの影響が製品選択のため消費者にはあるが、製品の味、テクスチャ、見てくれの点は、グルテンフリーマーケット中、特にこのマーケットがより複雑化したとしても、製品受けとめ側のずっと奥にある。

マーケットミックスとグルテンフリー穀物製品

新製品の展開と上首尾のマーケット化が実現するためには、会社にとって2つの鍵となる重要な戦略的考えが有る。グルテンフリー穀物製品の成功するマーケット戦略の展開は、これらの製品を消費者全体に受け入れさせるためには不可欠であり、さらにセリアック病の人々に対してはこれらの製品を彼らの健康状態をコントロール下に置くというライフスタイルの戦略の一部に統合する。セリアック病を持つ患者はグルテンを避けて入れば正常な生活がおくれるが、そのためのブランド、ラベル、受け取る品質、パッケージ面の、これらの製品の表面的関与（マーケティング）があり、初めての消費者への購入とさらにその再購入に向けられる。企業の新規、あるいは修正を加えたグルテンフリー製品の成長にとって、1つの鍵となるものはマーケット戦略の案出であり、そこには製品の様相、ブランディング（銘柄）とパッケージ、値段、配送チャンネル、および特別な製品/マーケット状態のプロモーション等の正確なミックスを含む（Hisrich and Peters 1991）。これは明らかに新しいグルテンフリー食品や飲料の加工の進歩やマーケットに関する消費者情報の統一を必要とする。

製品とマーケット開発プロセスにおける殆どの活動は確率的設定で行われ、その不確実性は新しい製品の概念、属性、マーケット戦略の特定化する点で、このプロセスの初期の段階の特徴であり、殆ど有望視されているもので、最終的には消費者の受け入れをとる（Kim and Wilemon 2002）。Slater and Narver (1996) と Moorman (1995) が議論するのは、マーケット志向の文化、例えば組織文化や消費者志向である

会合活動が、新しい革命的製品の市場開発プロセスの中で生じる危険性の多くを低下させることができるということである。Calantone *et al.*, (1996) のノートによると、“消費者の購入意欲を理解するためにまた競争者の戦略について学ぶためには、消費者の製品に対するニーズ、要望、特徴づけの理解、そのためマーケットと競合的情報を集め、評価することが大切である。”そこで、マーケット志向型組織は、彼らのマーケットチャンスと競争者からの脅しの両方面の外的要因を連続的に調査する。消費者の必要性に注目して、マーケット組織会社は出現する必要性を十分にみとめ、消費者の新しい製品に対する反応を素早く調査するために準備する。事実、彼らのマーケット調査努力を通じて、マーケット組織会社は進みつつあるマーケットの適所、区域を探す事が可能であり、競争者の間違いによって生じる機会を見つける事ができる（Slater and Narver, 1996）。ある会社の情報発信システムとプロセスは、そこで製品の成果とマーケット発展プロセスにひどく影響を与える。

多くの会社は実現する事ができず、正式の情報発信プロセスをマネージできない、そして製品とマーケットの発展プロセスの危険的段階を無視する（Harmsen 1994, Bogue, 2001）。マーケット情報は製品とマーケット発展プロセスを通して生まれてくるが、Bogue (2001), Urban and Hauser (1993), Cooper (1988) のような研究者らは、特に初期段階のプロセスでの“消費者の声”情報のまとめには、消費者の満たされないニーズ、および欲しい物を知ることができることを主張する。製品のマーケット発展プロセスの初期段階は、まずチャンスが初めに考えられ、そしてさらに展開のため舞台の扉のプロセスを通り抜ける。事実 Cooper (1993) は、これらの初期ステージでの力の重要性を強調し、フロントエンド（一番最初）の活動を避けることを強調したが、それはフロントエンドの活動に関連した失敗は製品の失敗の危険性の増加に結びつくからだ。会社はそこで、新製品の発達とマーケット成功のために、“消費者の声”により大きな理解をする必要がある。

そこで如何にしてグルテンフリー穀物製品の発展とマーケットを望む会社のビジネス価値を生むためマーケット志向がビジネスに接近するか？素早い技術の変化、マーケットへの新規加入、消費者傾

向の変化、製品のライフサイクル短縮化と言った要因は、新しい製品の活動量と、またふくまれる固有のリスクとの両方を増加させるいくつかの起動力となるものである。このリスクの認識、適切な質問は次のようだ；マーケットを作るものは、グルテンフリーマーケットに新製品の成功のチャンスを得やすくする方法を知っているのか？どんな製品の発展とマーケット戦略がグルテンフリーマーケット中でおそらく成功を納められるのだろうか？増加する競争マーケットの中で、マーケットをつくるものは、単に製品の開発時間を減らすことのみでなく、消費者により受け入れられる製品の品質改良からも圧力をかける。これらの両方の要求を成就するのにある広く認められた手段で、製品のデザインの段階で消費者ニーズの理解によく関心を示し、さらにこれらのニーズを消費者が満足する製品に変えるのである。理論的には、消費者を初期の段階で新しい製品生産の進展プロセスに取り込むことは、消費者ニーズの理解、これらのニーズの満足性、さらに最終的に良い製品をつくることと効果的なマーケットプログラムのデザイン等の目的となる。例えば、多くの高技術産業、企業間のマーケットの中で、消費者はこの製品の開発プロセスの初期の段階で高レベルの成功を得るために利用される。しかしながら、より複雑なマーケットでは、例えば消費者製品マーケットの様などころでは、消費者を利用した製品開発はより難しくなり、そこでは食品の供給鎖にそって生産者と消費者の間に分離が広がる。

グルテンフリー食品と飲料の開発は、消費者の納得を得るが、それらはこれらの最適の食品のマーケット的（外的なこと）、技術/および官能的（内的なこと）関わりの点でNPD（new product development, 新製品開発）職員への多くの技術的なマーケット上の挑戦を構えさせる。これらの外的、内的関わりはこの食品の消費者の受けとめ方に強い影響を示す。マーケット組織NPDプロセスで、消費者は製品の共同デザイナーとして見られ

るが、それは彼らが効果的な貢献を新食品製品デザインにするためであり、さらにNPDプロセスと消費者の統一はコンセプト構想とコンセプトスクリーニングと最適化の発達前段階で成就されるのがベストである（Cooper, 1993; Bogue, 2001; Sorenson and Bogue 2005）。さらに消費者は会社による効果的なデザイン、効果的なマーケット戦略の役割を演じることができる。例えば、Anheuser-Buschは彼らのRedbridgeモロコシビールを開発した時、グルテンフリーあるいは小麦フリーライフスタイルをリードする消費者のニーズをよく理解してthe National Foundation for Celiac Awareness (NFCA)と密接に連絡して行った（Nutra Ingredients USA, 2007）。こうして、成功するマーケット戦略では、アイデアが消費者に接近し、ライフスタイルのファクターが含まれてゆく新グルテンフリー穀物製品の開発とマーケットが進む。これはイタリアからグルテンフリーマーケット会社Scharのマネージングのディレクターから指摘された点であるが、“我々が正しい方向にあると確信できるのは、消費者との接近が我々に残されている唯一の確実な方法だからである”（Schar, 2006）。Grunert(2005)は以下のように指摘している。我々は消費者に彼らがどんな新製品を欲しているかを聞くことはできないが、消費者の動き、購入動機を理解することは、新製品に対する失敗の程度を減らす助けになるであろう。

それではどのようにマーケット担当者、技術のR&D担当者はグルテンフリー穀物製品の最適なデザインをするのにNPDプロセスを持つ消費者をまとめてゆくのか？マーケット組織する消費者はその技術を研究するが、そこではNPDプロセスの初期の段階に焦点を絞り、よりシステムの、学際的に製品の進歩に近づくように導かれる。消費者研究技術の集団があり、それは技術的R&Dとマーケット情報の両方を利用している。これらのテクニックはマーケット機能とテクニカル機能の間をより近くに統合することを進める。

次号につづく

References

- Arendt, E., O'Brien, C., Schober, T., Gormley, T., and Gallagher, E.: (2002). *Farm and Food* **12**: 21-27.
- Barr, W.: (2004). *Rural Co-operative Magazine* July-August.
- Bistrom, M. and Nordstrom, K.: (2002). *Trends Food Sci. Technol.* **13**: 372-379.
- Bogue, J.: (2001). *Irish J. Manage. incorporating IBAR* **22**: 171-191.
- Bradley, F.: (1995). *Marketing Management*. Hertfordshire: Prentice Hall.
- Calantone, R., Schmidt, J., and Song, M.: (1996). *Marketing Sci.* **15**: 341-358.
- Coeliac UK (2007). www.gluten-free-onthego.com
- Cooper, R. G.: (1988). *Indust. Market. Manage.* **17**: 237-247.
- Cooper, R. G.: (1993). *Winning at New Products*, 2nd edn. Reading: Addison-Wesley.
- Food Navigator USA (2006a). www.foodnavigator-usa.com
- Food Navigator USA (2006b). www.foodnavigator-usa.com
- Food Production Daily (2006). www.foodproductiondaily.com
- Frewer, L., Fischer, A., Scholderer, J., and Verbeke, W.: (2005). *Innovation in Agri-food systems: Product Quality and Consumer Acceptance*. Wageningen, The Netherlands: Wageningen Academic Publishers.
- Gourmet Retailer: (2006). *Gourmet Retailer September 2006*, **27**: 13-3.
- Grunert, K.: (2005). *Innovation in Agri-food systems: Product Quality and Consumer Acceptance*. Wageningen, The Netherlands: Wageningen Academic Publishers.
- Harmsen, H.: (1994). *Managing the R&D Process*. University of Twente, School of Management Studies: Enschede; TQC, Twente Quality Centre; Milano: Politecnico di Milano Dipartimento di Economia e Produzione.
- Heasman, M. and Mellentin, J.: (2001). *The Functional Foods Revolution. Healthy People, Healthy Profits?* Surrey: Leatherhead International.
- Hilliam, M. A. and Young, J.: (2000). *Functional Food Markets, Innovation and Prospects: A Global Analysis*. Surrey: Leatherhead International.
- Hirsh, R. D. and Peters, M. P.: (1991). *Marketing Decisions for New and Mature Products*, 2nd edn. Columbus, Ohio: Merrill Publishing Company.
- Kim, J. and Wilemon, D.: (2002). *Eur. J. Innovation Manage.* **5**: 27-39.
- Kotler, P.: (2000). *Marketing Management*. Millenium Edition. Saddle River, NJ: Prentice Hall.
- Mark, K.: (2006). *Food in Canada*, June.
- Medical News Today (2006). New gluten-free bread developed by CeRPTA. www.medicalnewstoday.com
- Meulenberg, M. T. G. and Viaene, J.: (2005). *Innovation in Agri-food systems: Product Quality and Consumer Acceptance*. Wageningen, The Netherlands: Wageningen Academic Publishers
- Milton, J.: (2003). *New Product Development Strategies in Food to 2007*. London: Reuters Business Insight.
- Moorman, C.: (1995). *J. Market. Res.* **32**: 318-335.
- Nutra Ingredients USA (2004). www.nutraingredients-usa.com/news
- Nutra Ingredients USA (2007). www.nutraingredients-usa.com/news
- Palmer, S.: (2004). July, www.foodproductdesign.com
- Reeves, C.: (2006). *Food In Canada* October
- Saher, M., Arvola, A., Lindeman, M., and Lahteenmaki, L.: (2004). *Appetite* **42**: 79-89.
- Schär: (2006). www.schar.com
- Shinsato, E.: (2006). www.naturalproductsinsider.com
- Slater, S. F. and Narver, J. C.: (1996). *J. Market Focused Manage.* **1**: 159-174.
- Sorenson, D. and Bogue, J.: (2005). *J. Food Products Market.* **11**: 57-73.
- Stagnito Communications (2006a). www.stagnito.com
- Stagnito Communications (2006b). www.stagnito.com
- Trout, J. and Ries, A.: (1995). *The Future of Positioning*. Chicago: NTC Publishing Group, pp. 47-52.
- Urban, G. L. and Hauser, J. R.: (1993). *Design and Marketing of New Products*. Englewood Cliffs, New Jersey: Prentice Hall.
- Verbeke, W. (2004). *Food Quality and Preference*, **16**: 1:45-
- Wennström, P. and Mellentin, J.: (2003). *The Food and Health Marketing Handbook*. London: New Nutrition Business.



循環 ACE2 高値は心臓病の新バイオマーカー

東京薬科大学名誉教授 岡 希太郎

はじめに

新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) は、気管や血管の細胞表面にあるアンジオテンシン変換酵素 2 (ACE2) に結合して感染する。そのため ACE2 は「SARS-CoV-2 の受容体」とも呼ばれている。その ACE2 が細胞を離れると、血液に溶けて全身を循環しはじめる。可溶化、血漿、循環などの接頭語をつけて呼ばれているが、ここでは循環 ACE2 と呼ぶことにする。

SARS-CoV-2 に感染した COVID-19 患者に、感染から回復した元患者の血液を輸血する方法が注目されている。元患者の血液に含まれている抗 SARS-CoV-2 抗体を活用する治療法が効を奏するのである。その抗体の代替として、人工合成した循環 ACE2 にも一定の効果があると言われて試行されている (Muslim S, *et al.*: *SN Compl Clin Med*. 2020 Aug 22;1-6.)。

さて、去る 10 月 3 日のランセット誌に「循環 ACE2 の高値は心血管系疾患の重症化～死亡の兆候」とのコメント記事が掲載されました。従来のバイオマーカーより精度が高いとも強調されています。となりますと、COVID-19 で循環 ACE2 による治療が長引くと、副作用のリスクが気になります。また、疫学研究では「心臓病による死亡リスクはコーヒーで下がる」となっていますから、コーヒーと循環 ACE2 の関係も気になる所です。

以下は筆者によるランセット誌 (Vol.396 Oct 3,2020 pp937-9) の翻訳です。

循環 ACE2: 心血管病リスクの新たなバイオマーカー

Jay Ramchand* and Louise M Burrell** (訳: 岡 希太郎)

* 米国クリーブランド病院心血管研究所, ** オーストラリア・メルボルン大学医学部

レニン-アンジオテンシン系の調節不全は、ヒトの心血管疾患の進行に大きな役割を果たしています。レニン-アンジオテンシン系内の酵素反応はアンジオテンシン II を生成し、血管収縮と炎症など有害な心血管作用を促進します¹⁾。アンジオテンシン II を分解するアンジオテンシン変換酵素 2 (ACE2) は、この系の有害作用を打ち消すように作用します^{2,3)}。2005 年に、ACE2 は重症急性呼吸器症候群コロナウイルス (SARS-CoV) の受容体として同定されました⁴⁾。ACE2 は今回の SARS-CoV-2 のウイルス侵入にも関与し、感染患者 (COVID-19 患者) が広範な全身性疾患を引き起こす原因になっています⁵⁾。ACE2 は血管内皮細胞に存在していますが、注目すべきは、循環血中へのいわゆる脱落を起こすことです。心血管疾患の患者では、循環

ACE2 活性の増加により、心不全、冠状動脈狭窄、大動脈弁狭窄などの症状が有害転帰すると予測されます^{6,8)}。ただし、その他の患者や健常者においては、循環 ACE2 がリスクのバイオマーカーなのか否かは解っていません。

Sukrit Narula らは Lancet 誌で、一般集団における循環 ACE2 濃度に関する最大の疫学データセットを提示しています⁹⁾。彼らは、多国籍の前向き都市農村疫学研究からの 10,753 人の参加者を含むコホート研究を行いました。これにはサブコホートとして無作為に選んだ 5,084 人の患者と、心血管症状を示す 5,669 人が含まれています。サブコホートでは、2,935 人 (57.7%) が男性で、2,149 人 (42.3%) が女性でした。平均年齢は 50.79 歳 (SD 9.58) でした。解析結果として、従来の心血管リスクマーカー (喫煙、糖尿病、収縮期血圧、非 HDL コレステロール、および BMI) と比較して、死亡リスクと最も強く関連する独立予測因子は循環 ACE2 濃度であったと報告しています⁹⁾。循環 ACE2 濃度の上昇と従来のリスク因子上昇との関係は次の通りでした: 全死亡リスク (1SD 増加あたりのハザード比 [HR] 1.35 [95%CI 1.29–1.43])、心不全発作 (1SD 増加あたりの HR1.27 [1.10–1.46])、脳卒中 (1SD 増加あたりの HR1.21 [1.10–1.32])、心筋梗塞 (1SD 増加あたりの HR1.23 [1.13–1.33])、糖尿病発症 (1SD 増加あたりの HR1.44 [1.36–1.52])。

Narula らが解析したデータの膨大さは称賛に値します。彼らの研究の強みとして、サンプルサイズが大きいこと、表現型が良好な患者集団であること、および追跡期間が長いこと (中央値 9.42 年 [IQR 8.74–10.48]) を指摘できます。また、Narula らの研究の注目すべき特徴は、心血管疾患と薬物が循環 ACE2 レベルにどのように影響するかを知るために、メンデル・ランダム化解析を使ったことです。表現型データと組み合わせた解析によって、BMI 増加と循環 ACE2 の増加が糖尿病発症と関係する可能性を示唆しています。一方で研究の欠点としては、他に類型がないことであり、そのため最終的には、循環 ACE2 をリスク予測のバイオマーカーとして実用化する前に、独立したコホートでの Narula らの結論の検証が必要です。独立したコホートでの検証が不可欠となる理由は、バイオマーカーの実際の信頼度は最初の評価ほど良くはないからです¹⁰⁾。さらに、普通は各個人の ACE2 測定値は 1 回しか得られないため、疾患の進行に伴う変化や、治療による変動などは不明です。循環 ACE2 を臨床現場でのリスクマーカーとして使用するには、ACE2 レベルに対するさまざまな病状の影響を男女別に評価して基準を明確にする必要があります。

もう 1 つ次のような疑問があります。心臓血管医学における有害予後を予測する血液バイオマーカーの使用には長い歴史があります。これらのマーカーは個別化医療のなかで患者固有のリスクの予測に役立ってきました。それでも更に新たなバイオマーカーが必要でしょうか? 循環 ACE2 などのバイオマーカーのスクリーニングは、恐らく不十分な医療資源を競合し合って、結果として、心血管疾患の有害な後遺症を防ぐための治療的意味を持ち、かつ費用対効果の高いバイオマーカーだけが生き残るはずで、循環 ACE2 測定の費用対効果を標準的な現行法と比較するには、例えば質調整生存年 (QALY) 当たりの増分コストに基づいて判断することになります¹¹⁾。QALY に関するバイオマーカーの費用対効果は、直接介入する場合の費用対効果よりも小さい可能性が高いため、特に重要となるのです¹¹⁾。

恐らく、現在進行中の COVID-19 パンデミックの下で実施された Narula らの研究の最も重要な情報の 1 つは、循環 ACE2 レベルと治療薬である ACE 阻害薬、アンジオテンシン受容体遮断薬 (ARB)、β ブロッカー、カルシウムチャネルブロッカー、および利尿薬の使用量との間に関連性がないことです⁹⁾。これらの結果は、同時に実施されたメンデル・ランダム化研究によっても検証されたので、ACE2 値の改善だけを目的としてレニン - アンジオテンシン系阻害薬を差し控えるべきではないという証拠を裏付けています^{9,12)}。また、ACE 阻害薬も ARB も、心血管疾患患者の循環 ACE2 活性を変化させないという以前のデータとも矛盾しません^{8,13)}。観察されたデータは、ACE 阻害薬と ARB が COVID-19 患者に悪影響を及ぼさないことを示していますが、この分野で進行中の、レニン - アンジオテンシン系の治療薬を中断したり新たに開始することの無作為化対照臨床試験の結果を待たなければ確定はできません。COVID-19 呼吸器疾患の ARB 薬を評価する CLARITY 試験では、COVID-19 であってかつレニン - アンジオテンシン系阻害薬未投与患者を、インドとオーストラリアに拠点を置く試験 (NCT04394117) で、ARB またはプラセボにランダムに割り当てて実施

中です。

Narula らは、循環 ACE2 がレニン - アンジオテンシン系調節不全のマーカーである可能性を述べています⁹⁾。確かにこの特性は将来的に、循環 ACE2 レベルが上昇した個人を、より集中的な生活習慣の改善または薬理的な治療対象とすることで、予防的～治療的に対処する可能性を示しています。患者の予後を改善するための臨床試験が必要な仮説でもあるのです。

この論文には競合する利害関係が無いことを宣言します。

文 献

1. Burrell LM, Johnston CI, Tikellis C, *et al.*: ACE2, a new regulator of the renin-angiotensin system. *Trends Endocrinol Metab* **15**: 166-169. 2004.
2. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, *et al.*: A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res* **87**: E1-9. 2000.
3. Crackower MA, Sarao R, Oudit GY, *et al.*: Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature* **417**: 822-828. 2002.
4. Kuba K, Imai Y, Rao S, *et al.*: A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury. *Nat Med* **11**: 875-879. 2005.
5. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, *et al.*: SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell* **181**: 271-780.e8. 2020.
6. Epelman S, Tang WH, Chen SY, *et al.*: Detection of soluble angiotensin-converting enzyme 2 in heart failure: insights into the endogenous counter-regulatory pathway of the renin-angiotensinaldosterone system. *J Am Coll Cardiol* **52**: 750-754. 2008.
7. Ramchand J, Patel SK, Kearney LG, *et al.*: Plasma ACE2 activity predicts mortality in aortic stenosis and is associated with severe myocardial fibrosis. *JACC Cardiovasc Imaging* **13**: 655-664. 2020.
8. Ramchand J, Patel SK, Srivastava PM, *et al.*: Elevated plasma angiotensin converting enzyme 2 activity is an independent predictor of major adverse cardiac events in patients with obstructive coronary artery disease. *PLoS One* **13**: e0198144. 2018.
9. Narula S, Yusuf S, Chong M, *et al.*: Plasma ACE2 and risk of death or cardiometabolic diseases: a case-cohort analysis. *Lancet* **396**: 968-976. 2020.
10. Vasan RS. Biomarkers of cardiovascular disease: molecular basis and practical considerations. *Circulation* **113**: 2335-2362. 2006.
11. Henriksson M, Palmer S, Chen R, *et al.*: Assessing the cost effectiveness of using prognostic biomarkers with decision models: case study in prioritising patients waiting for coronary artery surgery. *BMJ* **340**: b5606. 2010.
12. Sparks MA, South A, Welling P, *et al.*: Sound science before quick judgement regarding RAS blockade in COVID-19. *Clin J Am Soc Nephrol* **15**: 714-716. 2020.
13. Walters TE, Kalman JM, Patel SK, *et al.*: Angiotensin converting enzyme 2 activity and human atrial fibrillation: increased plasma angiotensin converting enzyme 2 activity is associated with atrial fibrillation and more advanced left atrial structural remodelling. *Europace* **19**: 1280-1287. 2017.

城西大学薬学部 白瀧 義明 (SHIRATAKI Yoshiaki)

ユズ *Citrus junos* (Makino) Siebold ex Tanaka (*Citrus junos* Sieb. ex Miq.) (ミカン科 Rutaceae)

連絡先：城西大学薬学部
shiratak@josai.ac.jp

初冬を迎え、北から初雪の便りが届く頃、民家の軒先で鮮やかな黄色の果実を見かけます。ユズ（柚、柚子）は、別名をユノスといい、中国中央部～揚子江上流を原産とする常緑小高木で、5月頃、葉のわきに白い5弁の花を咲かせ、秋には表面がでこぼこした黄色い果実を結びます。果実は種子の多いものが多く、酸味が強く独特の芳香を放ち、ミカン属の中ではもっとも耐寒性が強く、年平均気温 12～15℃の涼しい気候を適地とします。古書に飛鳥時代・奈良時代には、すでに栽培されていたという記載があり、酸っぱいことから「柚酸（ユズ）」と書かれ、「柚ノ酸」の別名が生まれたとされています。種小名の *junos* は、四国・九州地方で使われた「ゆのす」に由来し、中国の植物名は香橙^{こうとう}といい「柚子」は中国の古い名で、今では「柚」や「柚子」はブンタンを指しています。ユズは成長が遅いことでも知られ「桃栗3年柿8年、ユズの大馬鹿18年」や「桃栗3年柿8年、ユズは9年の成り始め」などといわれます。このため、栽培に当たっては、種子から育てる実生栽培では、結実まで10年以上もかかってしまうため、カラタチ *C. trifoliata* への接ぎ木により数年で収穫可能にすることが多いようです。現在、日本で栽培されるユズは、本ユズとして「木頭系」、早期結実品種として「山根系」、無核（種無し）ユズとして「多田錦」があり、かつては埼玉県が主な産地でしたが、1970年以降、高知県、徳島県などが主要な産地となり、西日本の産地が大規模化する一方、東日本の産地は年々、縮小しています。

薬用には、風邪の初期、就寝前に生の果皮を削ったものを小さじ半分量か、果実1個分の果汁を搾り、砂糖か蜂蜜を適宜加えて熱湯を注いだ「ポン酢湯」を飲んですぐに就寝すると、口やのどの渇きが癒え、咳も和らぐそうです。その他、果汁には、顔や手足にすり込むと肌荒れやあかぎれ予防に役立つとされ、ユズの種子油には、メラニンの生成抑制やアレルギー性皮膚炎の症状緩和の効果があるとする研究報告もなされて



写真1 ユズ（花）



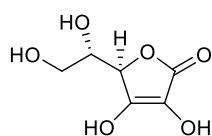
写真2 ユズ（果実）



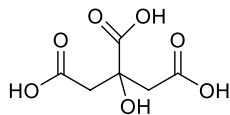
写真3 カラタチ (花)



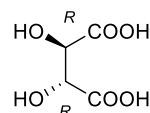
写真4 カラタチ (果実)



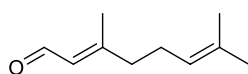
vitamin C
(L-ascorbic acid)



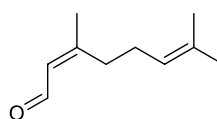
citric acid



(2*R*), 3*R*)-tartaric acid

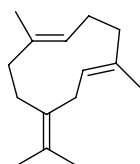


geranial (*E*) 体

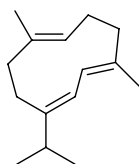


neral (*Z*) 体

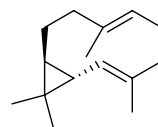
citral (一組の (*E*), (*Z*) 異性体を合わせて呼ぶ名称)



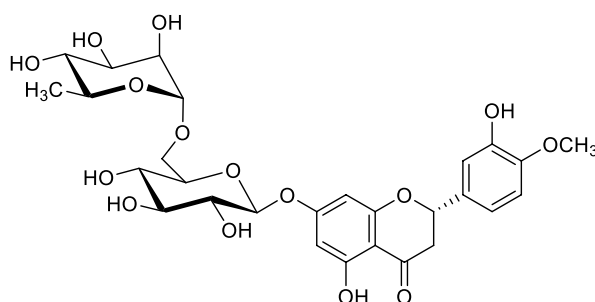
germacrene B



germacrene C



bicyclogermacrene



hesperidin

図1 成分の構造式



写真5 七味唐辛子（ゆず七味）

います。ユズの成分としては、vitamin C (L-ascorbic acid), citric acid (クエン酸), tataric acid (酒石酸), 精油の citral [geranial (*E* 体), neral (*Z* 体) の混合物], セスキテルペノイドの germacrene B, germacrene C, bicyclogermacrene, フラバノン配糖体の hesperidin 等が報告され、果皮に含まれる vitamin C はウンシュウミカンの約4倍（約150 mg）あるとされています。ユズの精油成分は、独特の爽やかな香りのため、様々な香水に使用されます。柚子料理のうち果肉の部分をくりぬいて器状にしたものは「柚子釜」とよばれ、料理の盛りつけなどに用いられます。ユズ自体を味わう調理例としては、保存食としての柚餅子^{ゆべし}の他、果汁を砂糖と無発泡水で割ったレモネードの

ような飲み物もありますが、ユズは熟したものでも酸味が非常に強いので、直接、食用とすることはありません。果汁は、調味料として香味・酸味を加えるために用いられ、ユズの皮は七味唐辛子に加えられるなど、香辛料・薬味として使用されています。冬至の風物詩である柚子湯は、収穫時期の冬場に、果実全体または果皮を布袋にいれて浴湯料として湯船に浮かべ入浴するものです。血行を促進させることにより体温を上昇させ、風邪を引きにくくする効果があるとして、肩こり、腰痛、神経痛、痛風、冷え症などに良いとされています。

デンマークのラーメン

デンマークは11月になると日照時間が短くなり、紅葉している木々の葉っぱも落ち、冬がどんどん深まっています。サマータイムからウィンタータイムへの切り替えも10月最終週の土曜日から日曜日の夜中に行われます。10月の末はハロウィーンですが、デンマークでもここ10年くらいの間にハロウィーンが大きなイベントになってきました。しかし今年はコロナウィルスの影響で、人の集まるイベントの制限や、ソーシャルディスタンスの推奨もあり、ハロウィーンの夜の通りも例年に比べると静かな夜でした。

寒くなってくると、暖かいものが食べたくなりますが、今回はデンマークのラーメン事情を紹介したいと思います。日本食は世界各国で高い評価を得ていますが、中でも寿司は日本の代表的な料理としてデンマークでも多くの人に受け入れられています。しかし近年、寿司の他にも、ラーメンが注目され始めています。

10年前には、デンマークにラーメン屋さんは存在しなかったと思われませんが、ここ5～6年の間に、コペンハーゲン市内にラーメン屋が数件進出し始めました。今では、若者や、新しもの好きの人にはラーメンは珍しいものではなくなっています。ラーメンをこちらのアルファベットで表現すると、Ramen となり、Rはデンマーク語の発音では、ガとラの混ざったような発音になるため、デンマーク人からラーメンについて聞かれると、なんのことが一瞬わからないこともあります。Ramenという言葉がデンマーク人との会話の中に出てきたら、それは紛れもなく日本のラーメンのことなのです。



コペンハーゲンにあるラーメン屋さんのお洒落な店内

では、ラーメンがなぜデンマーク人に受け入れられているのか？
 については、寿司が大人気であることのような明快な説明がありません。寿司はヘルシーでファンシー（おしゃれ）であることが大人気となった背景にあります。が、ラーメンは、ヘルシーとはいえません。おしゃれであるかといえば、寿司ほどのバリエーションや寿司ほどの高級感を出すことも難しいといえます。おそらく、ラーメンは単にその美味しさが受けているのではないかと思います。アジアのレストランはコペンハーゲンでは珍しくないですが、ラーメンは、中華料理の麺料理や、タイ料理の麺料理と比べると、スープのおいしさや、コシのある麺が際立つように感じます。そこに日本料理という、いいイメージも手伝って、新



人気のラーメン屋さんにはよく行列ができる



しもの好きのデンマーク人や、グルメなデンマーク人に受け入れられているのかもしれませんが。

さて、実際のラーメン屋にはどのようなものがあるかというと、まずラーメン屋の先駆け的存在の「ラーメンとビール」というお店があります。日本の渋谷にもある、MIKKELLER というマイクロブルワリーとのジョイントで開店したラーメン屋さんです。店内には、日本のラーメン屋さんにあるような自動発券機が置いてあったりと、日本のラーメン屋さんを、デンマーク流にちょっとおしゃれにしたような店内でラーメンを味わうことができます。日本のラーメン屋さんとの違いは、店内でビールを楽しんで長居しているお客さんがいることでしょう。

また、別のラーメン屋さんでコペンハーゲンで人気なのは、Ramen Slurp というお店があります。予約は取らないお店なので、その点では日本の街のラーメン屋さんを思わせますが、実際に行ってみると、おしゃれな店内で、一見するとラーメン屋というよりはおしゃれなカフェといった様相です。メニューは、ラーメン数品（醤油、塩、味噌、ベジタリアン）と、いくつかのつまみのみ（枝豆とキムチなど）です。このお店は行列がよくできるお店で、食事時にいくと、たいていはお店の外に数人の列ができています。気になる価格ですが、デンマークの外食は基本的に高くつくのですが、ラーメン屋も例外ではなく、Ramen Slurp のラーメンは一杯 140 クローネ（2000 円強）です。ラーメン一杯と飲み物を飲んだら、一人 3000 円となります。しかし、ラーメンの質はかなり高く、期待を裏切らない美味しさと言えます。お店によって日本の庶民的なラーメンを思わせるお店もあれば、日本のラーメンをちょっとおしゃれにローカライズしたようなラーメンもあります（醤油ラーメンに、マッシュルームペーストが入っていたり）が、美味しいことには変わりはありません。ということでラーメンはデンマーク人に受け入れられつつある食品となってきています。デンマークで、Ramen という文字を掲げた提灯や、のれんに遭遇する可能性は今後どんどん高くなっていくかもしれません。



日本のラーメン屋さんのようなカウンター席



ラーメンは一杯 2000 円強

最後に、デンマーク通信を約 4 年 4 ヶ月にわたり連載させていただいてきましたが、今回で終了となります。学術論文中で「デンマーク通信」が読者の一服の清涼剤になっていただけたなら幸いです。長きにわたって、お読みいただきありがとうございました。N. RN

2019 年夏のスコットランド紀行 ービフォーコローナー (2) ファイフ

林田 千代美 (HAYASHIDA Chiyomi)*

Key Words: スコットランド南東部, ファイフ, セントアンドリュース

はじめに

前回, スコットランドの首都エディンバラのエディンバラフェスティバルとカールトンヒルについて述べた。スコットランドには4泊5日の滞在だったが, 全日程, エディンバラを拠点に旅した。今回は, ファイフ地区への旅について述べたい。ファイフ地区を訪れた目的は, 世界最古のゴルフ場, セントアンドリュース・リンクス・オールドコースの芝を踏むことだった。

この日は車で移動した。旅のルートは, ①エディンバラ→②フォース湾の世界遺産フォース橋(エディンバラ地区とファイフ地区を結ぶ橋)→③鉄鋼王アンドリュー・カーネギーの出生地ダンファームリン→④港町アンストラザーで昼食→⑤セントアンドリュース。

1. エディンバラ旧市街→エディンバラの名門パブリックスクールのフェテスカレッジ

午前のはじめ, エディンバラ市街もまた少し散策したので, 紹介したい。作家のJ.K. ローリングが「ハリーポッター」第1作を執筆中に利用していたというカフェ「エレファントハウス」の前を通り, 旧市街のGoogle map上で見つけた「The Vennel Viewpoint Edinburgh Castle」という写真撮影のおすすめ地点からエディンバラ城を眺めた。エディンバラ出身の作家には, ウォルター・スコット(19世紀初頭に英国で初めて存命中に世界的ベストセラー作家となり, エディンバラ市街にスコットモニュメントがある), 「シャーロックホームズ」の著者コナン・ドイル, そして「ジキル博士とハイド氏」の著者ロバート・ルイス・ステイブンソン



写真 1-1 エレファントハウス

* 明海大学歯学部 形態機能成育学講座 口腔解剖学分野
〒350-0283 埼玉県坂戸市けやき台1-1
e-mail: hayashida@dent.meikai.ac.jp



写真 1-2 The Vennel Viewpoint Edinburgh Castle



写真 1-3 フェテスカレッジ

ンなどがある。エディンバラを歩いていると、ハリーポッターの魔法の世界や霊的なもう一つの世界が本当に今ここにありそうで、スコットランド人が英知をつくして生き延びてきた歴史と懐かしさを感じられ、こういう地で教育されると、自分にもできそうと信じられそうな、インスピレーションも湧きそうな、創作活動に適した街だと感じた。

その後、旧市街から車で10分ほど北上し、パブリックスクール「フェテスカレッジ」を見物。英国のパブリックスクールは、日本やアメリカで言う公立学校とは全く違う、英国社会オリジナルな名門私立進学校（多くが中高レベルで男子校）である。身分、境遇、出身地域の区別を排除して公開された学校という意味でパブリックだが、年間3万～5万ポンドの学費を支払える貴族階級や富裕層の子か、超優秀で奨学金の与えられた子といった選ばれた子供だけが入学できる学校である。英国のトップ大学群ラッセルグループ（ケンブリッジ大学、オックスフォード大学、エディンバラ大学など24校が属する）の大学への進学のための学力と、トップエリート社会で活躍するためのリーダーシップやコミュニケーション力、運動能力、体力やお作法を身に着けるために寮生活を基本とし、幅広く学ぶらしい。フェテスカレッジには附属小学校もあり、自宅通学も認められている。有名な卒業生はトニー・ブレア元首相、映画「007」の主人公ジェームズ・ボンド（架空の設定上）など。広々とした校庭にはラグビー場があった。私たちは外観だけ眺め、子孫がここに入学するにはどうすればいいのだろう何世代かかるのだろう…と憧れの世界に思いを馳せた（写真1）。

2. 世界遺産フォース橋

エディンバラ地区の西北端部のサウスクイーンズフェリーという地点から、フォース湾の対岸のファイフ地区のノースクイーンズフェリーという地点を結ぶ、1890年完成の全長2530mのフォース橋（フォース鉄道橋）を眺めることができる（写真2）。フォース橋はフォース湾に架かる赤色の橋で、カンチレバートラス構造の橋では世界一の長さを誇るらしい。ユネスコ世界遺産への登録基準の「人間の創造的才能を表す傑作である」という項目等に合致し、2015年に文化遺産に登録された。英国の世界遺産は現在31個登録されており、そのひとつ。フォース鉄道橋



写真 2 フォース橋

の隣には 1964 年開通のフォース道路橋があり、道路橋のまた隣に 2017 年開通のクイーンズフェリークロッシングという橋がある。巨大かつスマートな造りの 3 本の橋の眺めは、巨大建造物マニアにはたまらない絶景。私たちは車でクイーンズフェリークロッシングを渡って海を越え、ファイフ地区に入った。

3. フォース湾を渡ると、ファイフ王国

フォース湾を渡ると、ノースクイーンズフェリーからセントアンドリュースまでは、ファイフという行政区内に位置する。両地点間は、直線距離で約 40 マイル、車で直行すると 1 時間強で着くが、途中、寄り道をしながら向かった。ファイフ地区というのはかつて、スコットランド人（アイルランドから移住してきたスコット族）が住み着く前の古代に、先住民ピクト人の一部族が築いたファイフ王国があった貴重な歴史ある土地。まず、ノースクイーンズフェリーから約 3 マイルの距離にあるダンファームリンという街に寄り道した。

ダンファームリンでは鉄鋼王アンドリュー・カーネギーの生家博物館を訪れた。生家に隣接して生涯をたどる博物館、子供用の展示物、カーネギーの名言集や名言をデザインにとり入れたグッズの土産物店、カフェがある。カーネギーは、1835 年（英国産業革命の終わり頃）に手織り職人の長男として生まれた。産業革命による機械化のあおりを受け、貧困から逃れるため 1848 年に一家でアメリカに移住した。生家の建物は職人用の住み込み社宅のようなもので、屋根裏の 6 畳一間ほどの空間に一家 4 人で住み、寝るのも食べるのも何をするのもこの空間だけで、非常に貧しい生活だった様子。貧しすぎて他の大人の目にとまる機会がなく、前述のようなパブリックスクールに推薦される状況になかったのかもしれないと想像した。渡米後も学校には通えず、無料開放の本や通信・鉄道関連の実務を通して独学で知識を得、発想力もあり、周囲の信頼を得て事業を任され成功していったようだ。株や鉄道、鉄鋼業で財を成し、カーネギー財団を設立し莫大な資産をアメリカ・ニューヨークのカーネギーホール、その他各地の博物館、図書館、研究所、大学の建設などに費やした。成功についての名言が多数残されており、努力を惜しまず、好きなことを仕事にし、他者と協力して仕事をし、富は社会に還元することが大事とのこと（写真 3）。



写真 3-1 アンドリュー・カーネギー



写真 3-2 カーネギーの生家



写真 3-3 カーネギーの生家博物館

4. 港町アンストラザー

ダンファームリンから北東に 38 マイル、車で約 1 時間のところに、アンストラザーという港町がある。



写真 4-1 アンストラザーフィッシュバー



写真 4-2 看板キャラクターの漁師

Anstruther Fish Bar という、全英のフィッシュアンドチップスコンテストで優勝経験のある有名店があるので、昼食はここにしました。英国王室のウィリアム王子が学生時代に度々訪れていたお店。町に入ると、紙製のトレイをもった人々が、漁港の船着き場や堤防などあちこちに腰かけていた。皆、この店からテイクアウトして食べていた。

フィッシュアンドチップスは、今回の旅まで、大した料理ではないと思っていた。しかし、魚の産地、新鮮さ、衣の厚さやサクサク度、揚げる油の種類、チップスのポテトの形や油の種類も、すべてお店によるこだわりがあり全然違うのだとわかり、私は敬意を持った。19 世紀中ごろのイングランド北部発祥の英国の国民食のファーストフードであり、イギリスを代表する貴重な料理なのである。魚は主にタラ (haddock か cod) を使われることが多い。

Anstruther Fish Bar では、毎朝近くの漁港で仕入れた新鮮な魚やきちんと管理された魚を使っているらしい。衣が薄めのサクサクしたタイプ。テイクアウトして食べている人が多かったが、私たちは 20 分並び、店内で食べた。シンプルな塩味で本当に美味しく、何度もまた食べたい味だった。店の看板キャラクターは黄色のマリンウェアを着た漁師のひげおじさんだが、店の配膳スタッフは看護婦さんのような衛生面に配慮していますというような白い制服を着ていて、こだわり盛りだくさんな良いお店だった。塩味に飽きたら、レモン汁、酢、グレイビーソース (ウスターソースみたいなもの)、カレーソース、タルタルソース、ケチャップをつけて食べる。魚はタラの他に、サバ (mackerel), salmon, おひょう (巨大カレイ north sea halibut) があつ



写真 4-3 定番のタラのフライとチップス



写真 4-4 サバの素揚げとサラダ

た。フィッシュアンドチップスの付け合わせの定番は英国中どこでもグリーンピースのペースト，“マッシーピース”。マッシーピースはレストランでは別に注文しなくても同じ皿に乗ってくるが、テイクアウトできる形式の店だと、サイドオーダーとしてきちんと注文しないとマッシーピースは食べられない（写真4）。

5. ゴルフの聖地セントアンドリュースへ

アンストラザーからセントアンドリュースまでの距離は約10マイルで、車で20分弱である。あいにく雨が降り出したが、セントアンドリュース・リンクスのうちの最も由緒ある1552年に作られた世界最古のゴルフコース「オールドコース」の芝を踏み、1番と18番ホールに架かる「スウィルカン橋」と呼ばれる小さな橋の上で写真を撮影するという目的が達成できた。スウィルカン橋は有名ゴルファーも記念写真を撮る場所だ。ゴルフの権威であるR&Aゴルフクラブ（The Royal and Ancient Golf Club of St. Andrews）があり、隣接して英国ゴルフ博物館もある。ゴルフのオープン・トーナメントの四大メジャーで最古の歴史を誇る全英オープン（The Open，男子の大会）は、5年に1度はここで行うのが慣例。2020年の全英オープンはコロナ禍で1945年以来の中止だったが、2022年にはセントアンドリュースでの開催が内定している。

セントアンドリュースは、中世スコットランドの宗教の中心地として栄えた。セントアンドリュース大学は英国王室のウィリアム王子とキャサリン妃が卒業した大学である。1413年設立のスコットランド最初の大学であり、英国中ではオックスフォード大学（11世紀末設立）、ケンブリッジ大学に次いで三番目に古い大学だ。

スコットランドと言えば、スコッチウイスキー。せっかくなので、セントアンドリュース産のシングルモルト・スコッチウイスキーをお土産に買った（写真5）。



写真 5-1 オールドコースの標識



写真 5-2 スウィルカン橋



写真 5-3 スコッチウイスキー

Lipomyces 属酵母を新しく分離し分類する

兎束 保之 (*UDUKA Yasuyuki*) 山梨大学名誉教授

Key Words: 酵母, *L. starkeyi*, 酵母細胞, 菌體, 孢子

微生物の世界を少しでも知ると、わが手で新しい菌株を分離したくなる。蝶の収集に夢中になった人達が捕蝶網を持って、中南米にまで行きたくなる気持と同じである。

長い間、*L. starkeyi* を研究材料にして問いかけを続けてくると、微生物の保存・分譲機関から譲り受けた菌株ばかりではなく、自分の手で分離した新しい菌株がほしくなる。幸い、これまでに蓄積した知識と研究経験から、実現は難事業だとは思われなかった。唯ひとつの障壁は、分離できた菌株を分類する経験が欠落していたところである。

1. *Lipomyces* 属酵母は土から分離されていた

過去に出版されている学術論文から、*Lipomyces* 属酵母が分離できた生息場所を整理すると、僅かな例外を除いて、土すなわち土壌が圧倒的に多い。残念ながら、日本の土から分離したという日本人が書いた確かな学術文献には行き当たらなかった。極めて稀に眼にできた文献では、肝心な菌株の分離方法と分類学的なデータを見出せなかった。

特定の性質を持った微生物を探索しようという動機は、人間生活に役立つ利用方法を念頭に置くことが多い。目的を達成するのに役立つような微生物(病原菌も含む)が見つかり、その微生物を分類学的に位置付けし、学術論文に、あるいは特許にして観察記録を公表してゆくのが通例である。こうして発見された微生物が、日本ではJCM(独立行政法人理化学研究所)、NBRC(独立行政法人バイオテクノロジー本部)、あるいは特許庁などの公的な研究

機関に集積されてきた。

これまでの経験を生かし、日本の土壌から *Lipomyces* 属酵母を分離する確かな方法、分離した菌株を分類学的に位置付けする方法を、整理しようとした。

1-1. R. L. Starkey 博士の論文から学び、それを 超えよう

Lipomyces 属の酵母を最初に発見した R. L. Starkey 博士の論文には、土壌から窒素固定細菌を分離する意図で実験を開始した、と記述されている。その論文によれば、窒素源を添加しない培地（無窒素培地）の寒天平板上へ少量の土をまき、微生物コロニーの出現を待った。初めは窒素固定細菌のコロニーが現れたが、それから数日を経て酵母のコロニーが現れた、とある。日本の土を使って追試してみた。ところが、酵母らしいコロニーは出てくるが、周辺に細菌（バクテリア）のコロニーだけではなく、カビ（糸状菌）の菌糸が覆いかぶさるように現れるという。カビの菌糸を上手に避けて、酵母らしいコロニーから純粋に細胞を取り出すのは至難の技だろうと、報告してきた。

1-2. pH が低い寒天平板培地を使用して細菌の生育を抑制

そこから、過去の培養経験と知恵を生かすところである。*L. starkeyi* を Wickerham が提案した合成培地組成を基礎にしてつくったグルコース・無機塩類培地で培養すると、培地の pH は細胞増殖と共に下がり、最終的には 3.0 を下回った。*L. starkeyi* は通常の細菌が増殖できる pH より低い環境で増殖が

可能だから、この酵母を分離したい平板培地の pH を 3 以下にすれば、細菌のコロニーは形成されないだろう。

この着想を受けた安藤君が pH 3 の寒天培地を作ろうとしたところ、平板培地にならなかった。酸性度が強すぎて、培地の殺菌を目的にした 110℃-10 分のオートクレーブ処理の間に、固化剤の寒天が加水分解されてしまったのだ。培地に加える栄養源の組成を目的の 2 倍濃度の水溶液にして三角フラスコに入れてオートクレーブ殺菌し、寒天だけを濃度 2 倍にして別の三角フラスコ内で殺菌処理をしておく。やや冷え始めた頃に同量ずつ混合し、シャーレに入れて平板培地にすると、きれいに固まった。その平板培地を使うと細菌のコロニーは出なかった。しかし、まだカビの生育のほうに優勢なので、酵母らしいコロニーから細胞を取り出すのは困難だった。

1-3. 薬剤の使用でカビ菌糸の生長を抑える

現在では様々な抗生物質の作用機構が分かっており、それらを上手に使えば、目的とする微生物だけを選択的に分離できる。Wicherham の発案から出発した生理学的分類方法の一部にも薬剤耐性が採用されており、シクロヘキシミド (cycloheximide) の 0.1% 溶液に対する耐性を分類基準のひとつとしている（下掲の〔注〕を参照）。この濃度にする *Lipomyces* 属酵母は耐性を持ち、カビは原則としては耐性を持たない。この記述を応用することにした。

土壌の小粒を撒いた pH3 の無窒素寒天培地にシクロヘキシミドを加えると、完全とは言いがたいが、確かにカビの菌糸伸張は抑制された。*Lipomyces* 属酵母のコロニーは水分を含んで粘り気が強く、表面がキラキラ光っていた。この状態なら、コロニーから細胞を分離するのは容易であった（図 1）。

1-4. 土を水ガラス溶液に分散させメンブランフィルターで濾過する

日本で採取できる土には湿り気が多いので、平板培地上には撒きにくい。これを乾燥してしまえば、土の中で生息していた酵母を殺してしまう心配が

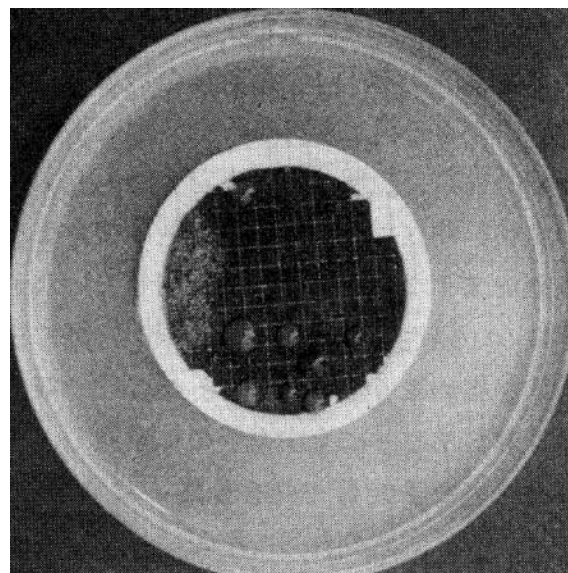


図 1 1,000 ppm シクロヘキシミド・無窒素・pH3 平板培地上に形成された *Lipomyces* 属酵母の粘性コロニー（左端部分にカビの菌糸が僅かに生えている）

ある。検出試料とした土の中で近接して *Lipomyces* 属酵母が存在すると、個々にコロニーへ発達する途中で互いに融合してしまうおそれもある。これらの障害を一挙に解決したのが、土壌試料を水ガラス溶液へ分散させた後に、メンブランフィルターを使った濾過であった。

微生物の一般的な性質として表層は電氣的にマイナスに帯電しており、プラスに荷電した物質の表面に付着しやすい。その現象を裏側から見れば、微生物の表面にはプラスの荷電を持った水溶性金属イオンが容易に吸着される。

土壌粒子を構成している鉱物の多くは、マイナスに帯電する珪酸イオンと、プラスに帯電したアルミニウム、カルシウム、マグネシウム等の金属イオンが複雑に混合されたまま固まった状態にある。したがって土壌微生物は、土壌粒子の金属イオン部分に付着していると考えられる。付着している酵母を土壌粒子から引き剥がすには、土壌粒子の中心をなす珪酸イオンを水溶液として多量に加え、土壌粒子を構成している金属イオンの表面を覆ってしまえば、そこへ吸着されていた微生物は遊離してくるだろうと、想像した。

水溶性の珪酸イオンを大量に加えるには水ガラ

〔注：シクロヘキシミドはカビを含む真核生物ではタンパク質合成の場であるリボソームの合成を阻害するが、原核生物のリボソームの合成は阻害しない抗生物質。〕

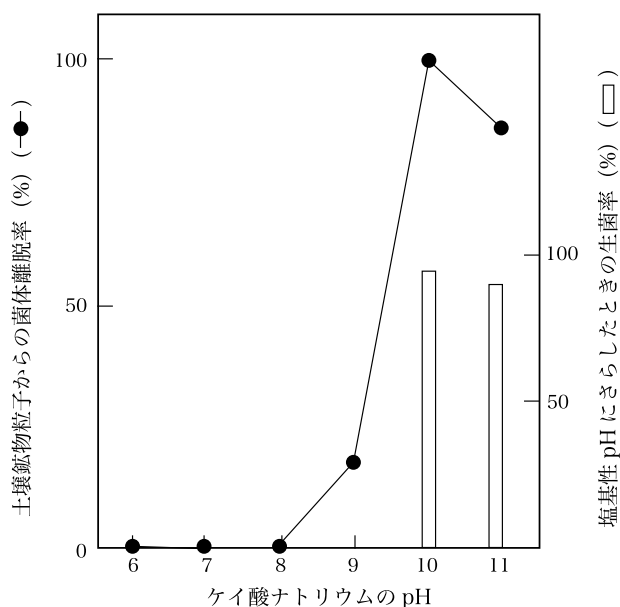


図2 赤玉土に吸着された *Lipomyces* 属酵母の水ガラス溶液による脱着

スを使えばよい。水ガラスとは珪酸ナトリウムであり、透明で粘度が極めて高く、水に溶かせば強いアルカリ性を示す。これを中和すれば白色の沈殿になってしまうので、注意深く塩酸を加えてゆき pH 10 にした。

この水溶液 5 mL と 0.2 g の土を試験管に加え、市販の試験管攪拌機ダイレクトミックスで十分に攪拌した。攪拌した懸濁液を直径 47 mm, 孔径 0.45 μm のメンブランフィルターで濾過すると、フィルター上面に分散された土壌粒子と微生物が残り、分散材とした水ガラス溶液は濾過面を通過する。

初めに行ったモデル実験では、土壌として粉碎した赤玉土を使い、その表面へ *L. starkeyi* を吸着させた後、pH 10 の水ガラス溶液で離脱させた。このモデル実験系では、メンブランフィルターの土粒子を捕捉した濾過面を上にして、上記の寒天培地上へ置くと、数日間の培養でほぼ定量的に *L. starkeyi* のコロニー数を検出できた (図2) (Naganuma ら *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**: 195 ~ 198 1999)。

1-5. 亜日本の土壌には *Lipomyces* 属酵母が生息しているか

森林から採取してきた土壌と、猪苗代湖畔から採取してきた土壌、各 0.2 g ずつを検出用の試料として使い、10 回繰り返すコロニー形成試験をした (表 1)。試料にした土壌が不均一であるから検出でき

表 1 異なる土壌から *Lipomyces* 酵母を 10 回ずつ検出試験した結果

実験回分	出現コロニー数	
	静岡県簗坂峠 雑木林土壌	福島県猪苗代湖 湖岸砂質土壌
1	95	3
2	84	0
3	88	3
4	70	1
5	102	0
6	102	0
7	101	1
8	86	1
9	54	1
10	80	1

たコロニー数にバラツキはあるが、少なくとも、性質が異なる日本の土壌から *Lipomyces* 属酵母が検出できた。

それからは研究室があった山梨県甲府市の市街部から南アルプス山塊の 3,000 m 級の山岳にいたる各地、学生の帰省先、学会や家族旅行に出かけた先で少量の土を採取して持ち帰り、検出対象にした。

「今日は土の採取に行ってきます」と、研究室を午前中に出かけた学生に採取先を聞くと、富士五湖方面や清里を初めとする観光地が多かった。その当時、神奈川県相模原市近郊の竹藪で 1 億円が入ったカバンが見つかった。早速そこへ遠征した学生がおり、“金”は見つけられなかったが、“菌”は検出できる土壌を採取してきた。

2. 視野を広げて生まれた「低栄養微生物としての酵母」の概念

L. starkeyi が pH 3 でシクロヘキシミドを添加した無窒素寒天培地上でコロニーを作る、という事実を前にし、小さな新聞コラムを思い出した。1980 年前後に、当時は富山大学の学長をしておられた柳田友道先生が、極端に栄養濃度が低い培地で増殖する微生物を意味する「低栄養微生物」の研究がまだ不足している、と述べておられた。

2-1. 低栄養培地で増殖する酵母を探索する

無窒素寒天培地上では眼で見えるほど大きなコロニーを作る酵母だから、窒素以外の栄養源を与えない培地でも、*L. starkeyi* は細胞増殖できるかもしれない、という思いに駆られた。直ちに試薬レベルの精製寒天と、北米産海草を精製して作ったアガロース

表 2 蒸留水から段階的に栄養源を加えた平板培地上における供試酵母の増殖

寒天培地						アガロース培地						菌 株	区 分
寒天のみ	+ Bio	+ V9	+ 無機塩類	+ 無機塩類 + V9	VM	アガロースのみ	+ Bio	+ V9	+ 無機塩類	+ 無機塩類 + V9	+ 無機塩類 + V9 + グルコース		
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Lipomyces starkeyi</i> IAM 4753, <i>L. konoenenkoae</i> IFO 10375, <i>L. tetrasporus</i> CBS 5910, <i>Hansenula saturans</i> R 263, <i>Candida boidinii</i> AJ 4779, IFO 10035, <i>C. hydrocarbofumaria</i> IFO 1973, <i>Cryptococcus humicolus</i> JCM 1457, <i>Cr. laurentii</i> IFO 12264, <i>Rhodotorula glutinis</i> JCM 5949, <i>Rh. rubra</i> IAM 12232, <i>Rhodospiridium diobovatum</i> IFO 1829, <i>Rhodosp. toruloides</i> IFO 0871, <i>Spotidiobolus pararoseus</i> JCM 5350, <i>Sporid. ruinenii</i> IFO 1689	A
+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	<i>L. japonicus</i> JCM 7254, <i>Torulaspora pretoriensis</i> JCM 3662	B
+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	<i>Myxozyma geophila</i> JCM 5220, <i>M. melibiosi</i> CBS 2102, <i>Debaryomyces hansenii</i> JCM 5205, <i>Deb. polymorphus</i> JCM 1628, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> IAM 4274, <i>T. delbrueckii</i> JCM 2204, <i>Filobasidium capsuligenum</i> IFO 1119	C
+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	<i>Sacch. cerevisiae</i> JCM 5917	D
+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	<i>Waltomyces lipofer</i> IFO 1288	E
-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	<i>C. versatilis</i> IFO 10038	F
-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	<i>Sacch. cerevisiae</i> IFO 0847	G
-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	<i>Zygosaccharomyces florentinus</i> IFO 1806	H
-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	<i>Zygosacch. fermentati</i> IFO 0851	I
-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	<i>L. anomalus</i> JCM 5988, <i>Sacch. servazzii</i> JCM 5179, JCM 5200, <i>Schizosaccharomyces pombe</i> 1011, IFO 342, <i>T. globosa</i> IFO 0073, <i>Zygosacch. rouxii</i> JCM 5924	J

+ Bio: ビオチン添加, + V9: 可溶性ビタミン 9 種添加

の 2 種類をゲル化材とし、そこへ栄養源を無添加からはじまり、添加する種類を逐次増加させた 6 段階の平板培地を作った。これら総計 12 種類の培地の上に 15 属 38 種の酵母菌株を植え付けて、コロニーの形成を待った。表 2 にその結果を示した（兎束保之化学と生物 30, 431-440, 1992）。

平板培地を作るのに使った水は、全てガラス製の装置で 3 回蒸留した再々蒸留水だけという平板培地で、コロニー形成を確認できたのは 16 種に及んだ。これらの種は、低栄養微生物と呼ぶに相応しい酵母ではないかと考えられた（図 3）。

日常生活で酵母といえば、アルコール飲料を作る、

パンやお菓子を作るという人間の食生活に直結する使われ方が多い。そこから、栄養源が豊富な場所に生息しているイメージがあっても不思議ではない。ところが実験をしてみると、栄養源を人為的には全く与えていない平板培地の上にコロニーを形成する種が、想像以上に多かったのである。酵母と呼ばれる一群の微生物の中には、低栄養微生物といえる種が、実際には多数含まれているのではないかと、という疑念と希望を抱くようになった。

2-2. *L. starkeyi* は極端な低栄養環境下でも増殖する

低栄養微生物としての酵母の存在を明確にする目的で、それらしい酵母の代表として、再び *L.*

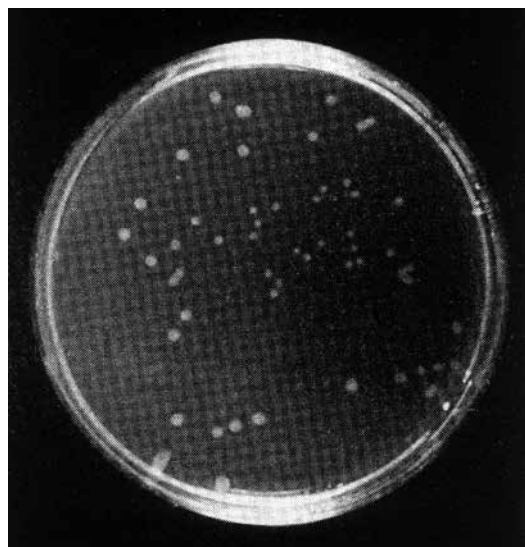


図3 寒天と蒸留水だけの培地上にコロニーを作った *L. starkeyi*

starkeyi を使い、徹底的な追い詰め作戦に入った。まず、精製寒天とアガロースという2種類のゲル化材に含まれている元素の分析をした。これらのゲル化材 10 g を再々蒸留水 80 mL に懸濁し、室温で 24 時間振盪したのち、可溶化してきた元素類、グルコース量等を測定した（表 3）。いずれも原料が海藻ということもあって、Na, Ca, K, Mg, P は 100 µg/

g を超えた。想像していた量以上の溶解量があったので、天然物を固化材にした平板培地は使わないことにした。

最高純度のポリビニールアルコールを企業から提供して頂き、そのゲルの上に、再々蒸留水で徹底的に洗浄してから再々蒸留水へ分散した *L. starkeyi* の細胞を植え付けた。それでもコロニーを形成した。形成したコロニーを再々蒸留水に懸濁し、希釈してから再びポリビニールアルコールゲルの表面へ植えた。まだ小さいながらもコロニーができた。もう一度、再々蒸留水への懸濁とゲルへの植え付けを繰り返したら、コロニーは出現しなくなった。

この結果を利用して、*L. starkeyi* がトリアジン系農薬を分解して窒素源にできることを証明する実験にまで発展した（Nishimura ら *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **58**: 848-852 2002）。

2-3. 低栄養酵母という概念は認知されるか

通常の細菌用平板培地に与える栄養物質濃度に比べて 100 分の 1 の低濃度にしか栄養源を与えていない培地上で増殖が確認できる細菌を、低（濃度）栄養（性）細菌（oligotrophic bacteria）と呼んでいる。

表 3 寒天およびアガロースから水に溶解する元素の分析結果

	全含有量 (µg/g)				可溶化量 ^{*1} (µg/g)			
	寒天		アガロース		寒天		アガロース	
	A	B	電気泳動用	等電点 電気泳動用	A	B	電気泳動用	等電点 電気泳動用
グルコース					18.4	10.4	2.4	20.4
NH ₃ -N					4.8	35.2	1.2	1.7
N	20.0	240.0	—	—				
P	145.6	55.0	1.2	8.8	114.2	85.7	—	—
K	64.7	119.1	—	53.1	46.8	85.7	—	54.0
Mg	537.9	122.2	1.1	13.2	354.0	54.2	0.1	7.9
Na	2850.8	3366.4	1368.9	599.1	2437.0	2191.4	461.3	497.6
Ca	342.6	283.9	227.6	197.8	379.6	233.8	1.0	79.6
Mn	15.6	1.7	—	0.3	5.7	0.6	—	0.2
Zn	0.3	0.7	0.2	2.4	0.6	1.1	—	—
Fe	77.5	16.2	4.5	17.4	7.4	5.1	0.5	4.0
Cu	0.6	—	—	0.4	—	—	—	—
Mo	—	—	—	—	—	—	—	—
B	75.5	14.2	30.5	9.7	42.8	14.9	39.4	9.4
I	—	—	—	—	—	—	—	—
(T) ^{*2}	(4131.1)	(4219.4)	(1634.0)	(902.2)	(3392.9)	(2707.8)	(503.5)	(654.4)

分析方法 N: セミミクロケルダール法 (BÜCHI 322 distillation unit-BÜCHI 342 control unit), グルコース: ムタロターゼ・GOD 法 (glucose C-test Wako), NH₃-N: インドフェノール法 (ammonia-test Wako), その他の元素: HNO₃-H₂SO₄-H₂O₂ 分解後, ICP 発光分光器 (SEIKO SPS 1200 VR plasma spectrometer) で測定

^{*1} 10g の試料を 3 回蒸留した水 80ml に懸濁後, 24 時間振盪 (100rpm, 室温)

^{*2} (T): 元素の総量, 可溶化量の場合にはグルコースを除く元素量

—: 検出限界以下



図4 土壤中に棲息している微生物密度（推定値）

ところが、酵母を低栄養微生物として取り扱った研究論文は、調査した限りでは見つからなかった。筆者達の研究室で収集した実験結果は、低栄養環境下で増殖できる酵母の存在を示している。許されるなら、低栄養性酵母（oligotrophic yeasts）と呼びたい。

一般的な畑では、ヘクタールあたり7トンの土壤生物が存在し、その20～25%が細菌、70～75%がカビと放線菌、残りがダニ、ミミズなどの土壤生物だという。酵母についての記載例を目にすることはなかった。これらの文献値と筆者達の経験に基づいて土壤微生物の生息数を中心にすれば、土壤1g当たりの生息密度は図4に纏めた程度と推測される。

土壤は研究室内で使用する培地に比較すれば栄養源濃度が低く、しかも生存競争する相手が多い。その土壤で生活する *Lipomyces* 属酵母が生き残る術として、他の微生物では利用できないほど低濃度の栄養源を細胞内に取り込み、その栄養源を徹底的に利用して増殖する能力を獲得したのではないだろうか。

3. 土壤から新しく分離した *Lipomyces* 属酵母を分類する

日本の土壤から *Lipomyces* 属酵母と考えられる酵母菌株を幾つも採取できたが、それらが間違いなくその属の酵母であるかを確認し、さらに種を決定するには伝統的な分類学的裏づけが必要になった。

残念ながら、筆者には酵母分類学を正面から学び、実験をした経験がなかった。微生物分類学を理解しようと書物を読み、その道の先輩から解説をしても

らう手探り状態で動き始めた。分類学を学ぼうとして大きな難関になったのは、特有な単語が次々と出てきて、それらを理解するのが困難なところであった。コト細かに歩んできた道を説明しようとすれば、際限のない単語の嵐に巻き込まれるので、必要最少限の知識で土壤から分離した酵母の分類経過を記述する。

3-1. 酵母とよばれる生物群を、ひとことでは定義できない

その道の先輩の話を聞くと、酵母という単語でくくられている生物群は、生物分類学の視点からは正式な名称ではなく、俗語だという。

これは驚きであり、肝をつぶす思いだった。微生物を論ずるときに、カビ、細菌と並んで酵母という単語が頻繁に現れてくるのに、“酵母とは”として、他の生物群とは明確に区別が出来ないのだという。

自然科学の世界では、全ての分野で言葉の定義から始まり、その定義された言葉を正確に使わなければ、第三者に納得してもらえ客観的な説明ができないのが通り相場である。それなのに酵母という言葉が俗語だというのだから厄介である

平易に表現すれば、酵母とはカビの仲間とキノコの仲間のうちで、単細胞で生活する期間が圧倒的に長いものを指している。カビは菌糸を長く伸ばすので、四季や場所を問わないで目に付き易い。キノコは、平素は菌糸の状態で生活しているが、気候の流れが適した時期になると、傘（カサ）の部分とそれを支える柄の部分大きく成長させるので、不思議な生きものとして人の興味をそそる。

酵母の分類学を扱った「The Yeasats, a taxonomic study」の第4版では、酵母の定義を二箇所に分けて記述している。はじめに、「酵母は栄養細胞が主として出芽あるいは分裂で増殖する菌類であり、生育は主として単細胞状態で行われる」と栄養増殖を中心にした概説を示している。そこから10行ほどの討論を経てから、「酵母は子囊菌系あるいは担子菌系を問わず、一般に出芽あるいは分裂で栄養増殖の特色があり、有性状態を持つてはいるが、それは子実体の中に隔離されているのではない」と性の区別を主題にしている。ここでいう子囊菌とはカビを指しており、担子菌とはキノコを指している。

Spencer らは「Yeasts in natural and artificial habitats」で、「一般的に酵母とは、栄養増殖の段階

では単細胞であって、出芽あるいは分裂で殖え、有性段階では孢子（分散して繁殖するための菌体単位）を作ったり作らなかったりし、それまでに他のタイプの菌類としての名称が与えられていない担子菌類、あるいは子囊菌類に属する菌類と定義するのが妥当であろう」としている。いずれをとっても、一度読んだだけで具体的なイメージが浮んでくるほどの明解さには欠けている。生物学的には広い範囲にまたがる雑多な微生物の集団が示す、共通の性質を集約しようとした苦心の作文である。

3-2. 酵母の分類学的な位置

地球上の生物全体は、分類学では5つの界（Kingdom）に分けられている。そのひとつが菌界（Fungi）であり、そこにカビ、キノコ、酵母が入っている。菌界をさらに分けた門（Division）の中に、Ascomycota（広くカビの仲間と考えてほしい）と Basidiomycota（広くキノコの仲間と考えてほしい）等がある。ここで出てきた門は幾つもの綱（Class）に分かれ、それらの中に分散して酵母という微生物が存在している。なお、分類学では綱を細分化して目（Order）、目を細分化して科（Family）、さらに連（族）（Tribe）、属（Genus）、種（Species）へと細分化して終わる。これは原則であり、綱以下では“次の”あるいは“次位”を意味する『亜』を付けた仕分け段階がよく見られる。

3-3. 子囊菌系酵母

Ascomycota 門のすぐ下に位置する Ascomycotina 亜門（子囊菌亜門）に属する菌類は、通常は Ascomycetes（子囊菌類）といわれ、ここでは属の

数だけでも 3,000 を越え、種の数はその 10 倍程度であるといわれている。子囊菌系（ascomycetous）とは Ascomycetes の形容詞である。子囊とは孢子（spore）を納めておく容器であるが、その形態や構造はさまざまで、それらが分類学の基準となっている。

一般論としての子囊菌類は、子囊（ascus, 複数形は asci, 英語の sac の意味）の中で遺伝子の数を半数にする減数分裂（reduction division）をしてから孢子を形成する。子囊を作るまでの細胞は、両親から受け継いだすべての遺伝子に対（つい）にして持っているから複相（二倍体：diploid）であるが、減数分裂を経た後は単相（一倍体：haploid）になる。これが配偶子（gamete）の遺伝子状態である。子囊の中では、標準的には 8 個の孢子が作られるが、その数は種によってバラツキがある。

単細胞でありながら子囊を形成するところが特徴である子囊菌系酵母では、カビの孢子形成とは様子が異なる。生活の本体である細胞がそのまま子囊になる場合（例えばアルコール飲料を発酵生産する *Saccharomyces* 属酵母）や、細胞の外側が大きくふくらんで子囊になる場合（例えば *Lipomyces* 属酵母など）がある。

3-4. 担子菌系酵母

Basidiomycota 門のすぐ下にくる Basidiomycotina 亜門（担子菌亜門）に属する菌は、一般に Basidiomycetes（担子菌類）とよばれている。そこには約 1,500 属、23,000 種のキノコの仲間が存在する。

キノコでは、性が異なる（身近な哺乳類の言葉で表現すれば精子と卵子に相当する）2 種類の交配型

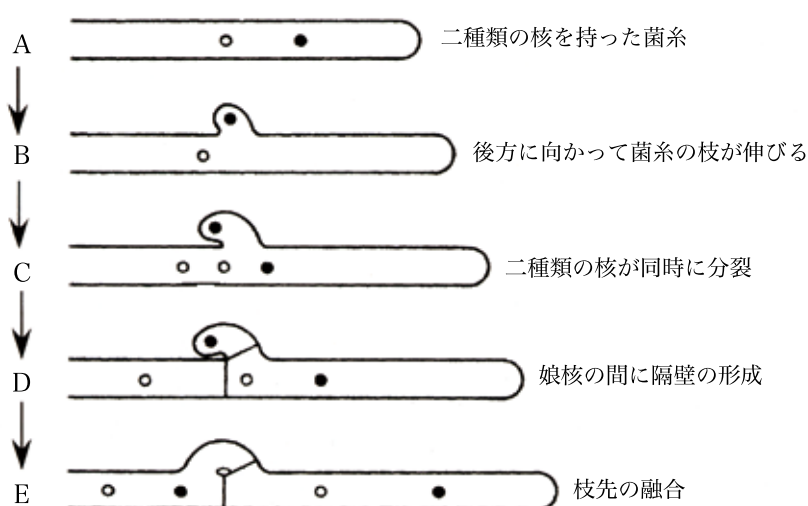


図5 担子菌類のかすがい連結

胞子 (basidiospore) から、それぞれ細胞が連なった一次菌糸が伸長する。それらが出会ったところで細胞同士は融合してひとつになるが、交配型が異なる2種類の核は融合しないで二次菌糸となる。2種類の核はそれぞれ独立して1個の細胞内に共存しながら二次菌糸は栄養増殖する。この状態を重相 (dikaryotic phase) と呼んでいる。

二次菌糸が伸長するようになったとき、しばしば、ひとつの細胞の末端の一部分を包むように、次の細胞から出ている突起構造が接着する。この特徴的な結合様式をかすがい (鋸: 両者の間をつなぎとめるもの) 連結 (clamp connection, クランプ結合) と呼んでいる (図5)。成熟して有性生殖をする時期になると、多数の二次菌糸が集合して子実体 (キノコ) をつくり、その一部の菌糸末端が棍棒形をした細胞、すなわち担子器 (basidium) となる。担子器で2種類の核の融合がおき、続いて減数分裂して4核になる。原則として、その4核が担子器の上へ移行して担子胞子となる。担子菌類に属する酵母 (担子菌系酵母) では、上記のような担子菌としての一連の経過を観察できる場合と、一部が省略されて観察できない場合がある。

3-5. アナモルフ (Anamorph) とテレオモルフ (Teleomorph)

酵母の分類学や有性世代と無性世代の関係を理解しようとして文献を調べていると、アナモルフとテレオモルフという単語に出会う。このふたつの訳語から記すと、アナモルフとは不完全な相 (Imperfect phase, 不完全時代), テレオモルフとは完全な相 (Perfect phase) である。何が不完全、あるいは完全なのかというと、観察している人間の知恵や技術の及ぶ範囲が関わっているから面倒である。

成熟した個体の中で性の異なる配偶子をつくり、ひとつの性と、それとは異なる性を持った配偶子が出会ったときを考える。出会いに続いて接合する過程をたどり、新しい個体をつくりだす経過が観察されていないか (不完全), あるいはすでに観察されているか (完全) を問題にしている。すなわち有性生殖が無い (まだ発見されていない) のか、有る (すでに発見されている) のか、を問題にしている。

菌類 (カビ, キノコ, 酵母) とは本質的には有性生殖をするものとし、その有性生殖がまだ人間によって発見されていないものをアナモルフ (無性世

代と訳すことがある), すでに有性世代が確認されているものをテレオモルフ (有性世代と訳すことがある) と呼んでいる。新しい発想に基づく実験方法の開発により、アナモルフがテレオモルフに修正された例がある。こうした場合には、アナモルフに付けられていた学名を廃し、テレオモルフの学名を優先して使用する。

3-6. 日本の土壌から新しく分離した酵母は *L. starkeyi* か

北海道から沖縄にいたる日本各地から採取した土壌試料約100点から、1-4にまとめた方法を使い、*Lipomyces* 属酵母と期待される酵母菌株を分離した。分離した菌株は、例外なくAF培地上で細胞から膨れ出た胞子嚢を作り、その中へ複数個の褐色の胞子を作った。ここまでの実験結果だけで、特徴的な胞子の作り方から、子嚢酵母で *Lipomyces* 属の酵母だと判断できた。そこから先は、属の中の種を特定しなければならない。幸いなことに、*Lipomyces* 属酵母の種数は限られており、現在では *L. japonicus*, *L. kononenkoeae*, *L. starkeyi*, *L. tetrasporus* の4種と考えてよい。歯切れが悪く「考えてよい」と表現したのは、公式に認定されている限りでは、という但し書きを必要とするからである。

幸い、*Lipomyces* 属酵母が形成する胞子の外形 (表面構造) は、種によって異なることが知られている。*L. japonicus* の胞子には表面にイガクリ状の突起があり、*L. kononenkoeae* の胞子表面は平滑、*L. starkeyi* の胞子表面には不規則な皺があり、*L. tetrasporus* の胞子表面は縦に走る明瞭な縞模様がある。これらの特徴を見分けるには、走査型電子顕微鏡で観察しなければならない。4種のtype strainに胞子を作らせ、それらの姿を図6に示した。

研究室で検出できた土壌酵母の結果を整理すると、日本の土壌から分離された全326菌株の *Lipomyces* 属酵母の91.4%が *L. starkeyi* であり、*L. japonicus* が4.9%, *L. tetrasporus* が2.8%, *L. kononenkoeae* が0.7%, 所属不明が1.8%であった。

L. starkeyi が圧倒的に多く、古くから存在が知られていた *L. kononenkoeae* と *L. tetrasporus* は意外に少なかった。学術的には最も新しく存在が知られるようになった *L. japonicus* は、見掛けの検出比率は4.9%であった。ところが、そこにはカラクリがある。走査型電子顕微鏡観察を始めた頃は全く検出されて

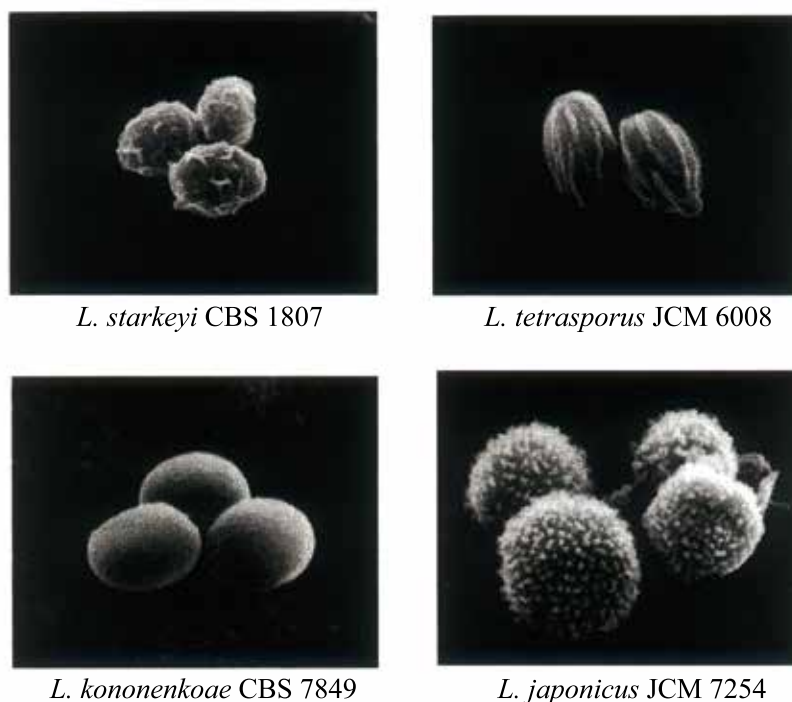


図 8-6 *Lipomyces* 属酵母の胞子の形態

いなかったが、研究生が山梨県内のある桃畑の土から最初の菌株分離に成功した。

万が一にも間違いがあつてはならないと、保管してあった同じ土壌試料から再度検出を試みたところ、再び *L. japonicus* が出てきた。その土壌試料を採取した畑へあらためて出向き、もう一度土壌試料を採取してきた。その新しい土壌試料からも、*L. japonicus* が出てきた。畑の所有者を尋ね当て、その方が所有する別の桃畑の土壌試料を採取したが、そこからも出てきた。そんな分離作業を繰り返しているうちに、*L. japonicus* の菌株が増えてしまったのである。

L. japonicus には、日本国名の Japan が織り込まれている。その名称が付けられた経緯を不確かながら説明しておきたい。日本で開かれた国際学会に出席した研究者の一人が、自国の酵母分類学者に依頼されて、どこかで土壌試料を採取して持ち帰ったらしい。その試料から検出された *Lipomyces* 属酵母の菌株のひとつが新種だったので、日本を記念して命名したようである。筆者達の経験では、極めて限定された土地の試料からしか *L. japonicus* を検出できなかった。偶然とはいいいながら、少数の土壌試料からこの種を発見できたとは、なんと運の強い研究者がいるものだろうかと感心した。

以上は研究の中の「良い所取り」で綴った粗筋で

ある。手っ取り早く結論に近づく内容を、古典的な手法で裏打ちをする作業があつてこそ、信頼される研究結果になる。形態観察、27 種類の炭素源の資化性試験、5 種類の窒素源の資化性試験、主要 CoQ の分子種試験、DNA を抽出して GC 含量の測定と相同性の判断、核内 DNA の本数と長さを測定する核型解析等が残されていた。

資化性試験では数多くの卒論生の手を借りてデータを揃えた。*Lipomyces* 属酵母は菌体の外に大量の酸性多糖を分泌する。その酸性多糖の性質が DNA の性質と共通するところがあったので、DNA を純粋な形で抽出できるようになるまでが大変な作業だった。その難事業に果敢に立ち向かい、冷静に観察を続けながら成し遂げた研究生の、昼夜を分かたぬ努力には頭が下がる思いが残る（Nishimura ら *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**: 1563-1566, 2002）。解析技術と結果の信頼性が統計学的に信頼できるようにする目的で、10 回も繰り返す実験によく耐えた。

研究生達の目立たない舞台裏の作業があつてこそ、信頼性がある分類学的データが揃えられた。これらの実験の積み重ねがあつてから、日本産の *L. starkeyi* と確信できた 10 菌株を、NBRC へ寄託するお誘いを受けた。同所で保存管理する菌株に登録する手続きを進めてもらい、カタログに記載されている。

ミルク

至高の食品がわかる

伊藤 敏敏 著

■A5 版／156 ページ

■定価：(1900 円 + 税)

■発行：エヌエフアイ



本書はミルクについて平易に解説された専門書です。著者が日本大学生物資源科学部において教鞭を執られていた際に執筆し、これまで教科書として発刊していましたが、本書が教科書だけでなく広く牛乳・乳製品工場の技術者にも役立つ参考書としてエヌエフアイより発刊いたしました。

まえがきより

世に出ている牛乳の科学や製造学の参考書の多くは、堅くて難しくてすぐに頭の痛くなるような専門書か、一般読者向けの啓蒙書でも、ことさら健康的価値や機能性などばかりを取り上げたものが多く、また一方では、牛乳は体に有害であるかのごとく書かれた本までが出回る有様で、ミルクの本当の姿をじっくりと知りたい者にとっての適書が見当たりません。本書はその要求を満たすものとして、一般読者にもよく解るように、また大学の教科書としても使えるように、さらには牛乳・乳製品工場で働く技術者の再勉強にも役立つようにと考えて書いたものです。この本を通してミルクに関する理解が少しでも増えて、食材としての価値がもっと見直されることを願うものです。

第1章 ミルクの科学的特性 一秘められた力

1. ミルクは食糧として作り出される唯一の天然物
2. 牛乳、母乳その他の動物の乳はどのように違うのだろう
3. 乳はなぜ白いのだろう
4. 乳の成分の特性とそのパワー
5. 牛乳の構成成分のまとめ
6. 牛乳のアレルギー性
7. 乳児用調製粉乳はどこまで母乳の代用になるか
8. 牛乳に人の免疫力を付けられるか
9. 特定保健用食品（機能性食品）は乳の研究から生まれた
10. 牛乳はどのようにして作られるか（餌が牛乳にかわるまで）
11. 牛乳成分の含量はいつも同じなのだろうか

第2章 乳製品の知識と製造の基本原則

1. 日本ではどの位の牛乳・乳製品が食べられているのだろう
2. 農家で搾った牛乳が工場に入るまで
3. 牛乳・乳製品の分類と規格
4. 牛乳の加熱殺菌について
5. 牛乳の均質化処理（ホモジナイズ処理）
6. 発酵乳と乳酸菌
7. チーズ
8. バター
9. アイスクリーム
10. 濃縮乳（練乳、コンデンスミルク、エバミルク）
11. 粉乳

■著者／伊藤 敏敏（いとう たかとし）

◆農学博士

1937 年愛媛県生まれ。東北大学大学院農学研究科修士課程修了後、1962 年株式会社ニチレイ入社。1963 年東北大学農学部助手。1976 年同大学助教授。1989 年同大学農学部教授を経て 2001 年日本大学生物資源科学部教授。東北大学名誉教授。

◆ご注文は FAX またはメールにて FAX:042-312-0845 info@nfi-llc.co.jp

好評発売中

- A5 版 / 248 ページ
- 定価：(本体 3,500円 + 税)
- 発行：食品資材研究会



■ 著者 / 山口 正義 (やまぐち まさよし)

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

- 第1章 ホルモンと生体機能調節
- 第2章 ホルモンの細胞内への情報伝達とそのしくみ
- 第3章 カルシウム代謝とそのホルモン調節
- 第4章 骨代謝とそのホルモン調節
- 第5章 老化と骨カルシウムホメオスタシス
- 第6章 栄養性ミネラルと骨粗鬆症の予防
- 第7章 生体微量元素と骨粗鬆症の予防
- 第8章 骨粗鬆症を予防する食品由来生理活性因子
- 第9章 骨粗鬆症を予防する食品素材
- 第10章 複合食因子の骨効果と新規サプリメントの開発

◆ご注文は FAX またはメールにて **FAX:042-312-0845** info@nfi-llc.co.jp

www.newfoodindustry.com

ニューフードインダストリー 第62巻 第12号

印刷 令和 2 年 11 月 20 日
発行 令和 2 年 12 月 1 日
発行人 渡邊 力
編集人 今西 和政
発行所 エヌエフアイ合同会社
〒185-0012 東京都国分寺市本町3-7-23-302
TEL: 042-312-0836 (代表)
FAX: 042-312-0845
振込先: 三井住友銀行 国分寺支店 普通2312814
多摩信用金庫 国分寺支店 普通3073817
ゆうちょ銀行 〇一九店 当座0324817

印刷所 株式会社メイク
定価 本体2,500円 + 税 (送料120円)

e-mail:newfood@newfoodindustry.com

New Food Industry 投稿規定

1. 本誌 New Food Industry は、食品に関する原著論文、総説、ノート、解説、特集原稿、国内新製品紹介、海外レポート、随想および各種研究会会告等を掲載します。
2. 投稿原稿は、日本語または英語を標準とし、欧語は使用しないでください。

和文原著論文、総説、ノート、解説には、和文タイトル、著者名および所属機関名（所在地）、次に英文タイトル、著者名、所属機関名（所在地）をつけ、本文の前に必ず7つ以内のキーワード（英語と日本語）を加える。原著論文、総説、ノートには、400単語程度の英文 Abstract をつけます。また、総説、解説等については出来れば Graphic abstract で本文の概要を説明してください。

英文原稿には、7つ以内の英語のキーワード、末尾に、和文タイトル、著者名および所属機関名（所在地）、7つ以内の和文キーワードおよび和文要約を書き入れてください。
3. 原著論文、ノート、総説については編集委員会にて査読者を選出し査読を行います（総説は査読希望があるものについて査読をします）。また、研究解説、特集等に関しては各著者の責任において投稿いただきます。

査読される原著論文は、未発表の新規知見を含み食品科学・食品の機能性等の発展に寄与するものとし、ノートは、食品業界の発展に寄与する短報とします。総説はすでに発表されたもので新たに加筆、修正をし、食品科学の知見に基づいた機能、官能評価、開発のための価値の高い研究論文などを対象とします。また、研究論文の著者が複数の場合、その責任者（研究室長・教授）等の責任において発表し、査読希望の場合に限り査読を行います。

原稿の取扱いは、編集委員会に一任され、査読を行う原稿は、編集委員会の判断で査読者を2人以上選出し掲載可の判断がされた後、編集作業にかかります。
4. 原稿はすべて A4 ワードドキュメントに、和文は横書きで 40 字×35 行、英文の場合は 72 字×35 行を標準とします。
5. 論文の長さは、本誌印刷時に原著論文では 8～12 頁（ワード頁で 10～20）以内、ノートでは 4 頁以内とします。
6. 和文原稿はひらがな、新仮名遣いとし、物質名や学術用語などに対して欧語を用いないこと。研究に用いた機器試薬名は一般名と商標登録名、メーカー名、所在地を記載します。
7. 本文および文献中の学名やジャーナル名はイタリック、ジャーナルの巻数はボールドとします。
8. 図・写真・表並びに説明文は、別稿で提出してください。
9. 図表の挿入希望位置は、原稿欄外に指示してください。
10. 数字はすべてアラビア数字を用い、数量の単位は SI 単位を基本とする。単位および述語の略字例は次の通り。
km, m, cm, mm, L, mL, m², kg, g, mg, mol, mmol, mM, μM, pH, b.p., f.p., MW, V, A, N, M, Rf 等
11. 引用文献は、本文中での引用順に片括弧付きの上付き番号を付して記載します。
12. 引用文献リストは、本文の後に番号順にまとめて記載します。
13. 原稿の校正は、初校・再校まで著者が行い、大幅な修正、加筆は不可。三校以降は希望があれば行います。
14. 掲載された論文は、論文公開検索システム等に採択されます。掲載論文の著作権は、エヌエフアイ合同会社に帰属します。
15. 掲載された論文は、出版元の許可を得れば頒布、複製、著者 HP での公開をしてもよい。



New Food Industry

エヌエフアイ合同会社

本社：〒185-0012 東京都国分寺市本町3-7-23-302
電話 042-312-0836 FAX 042-312-0845

