

# BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

平成22年9月15日(隔月1回15日発行)  
ISSN 1345-5958

TECHNO NEWS

**No.141**

15 SEPTEMBER, 2010

ブレインテクノニュース



鶏由来低分子コラーゲンペプチド C-COP

## 血管保護作用を有する鶏由来低分子 コラーゲンペプチドの開発研究 ～コラーゲンペプチドの新規作用を探る～

日本ハム株式会社 中央研究所  
河口 友美・高畑 能久・森松 文毅

## 目 次

## 総 説

- 牛乳および食肉の機能性食品への展開 ..... 1  
有原 圭三 (北里大学獣医学部)

## 総説関連

- 血管保護作用を有する鶏由来低分子コラーゲンペプチドの開発研究  
-コラーゲンペプチドの新規作用を探る- ..... 8  
河口友美・高畑能久・森松文毅 (日本ハム株式会社 中央研究所)
- 親鶏由来の機能性リン脂質：スフィンゴミエリンの抗高脂血症及び抗高血糖効果 ..... 13  
府中英孝<sup>1</sup>・柚木恵太<sup>2</sup>・松山弘幸<sup>3</sup>・藤野武彦<sup>2</sup>・大西正男<sup>4</sup>・小玉芳郎<sup>5</sup>・杉山雅昭<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>九大食品株式会社 中央研究所, <sup>2</sup>株式会社レオロジー機能食品研究所,  
<sup>3</sup>農事組合法人エヌチキン, <sup>4</sup>国立大学法人帯広畜産大学 食品科学研究部門,  
<sup>5</sup>株式会社パイオニアフーズ)
- 乳脂肪球膜の摂取による肌質改善効果 ..... 20  
後藤英嗣・辻 敏宏・明石啓子・元島英雅 (よつ葉乳業株式会社 中央研究所)
- 1073R-1乳酸菌に免疫機能を活性化させる効果があることを発見 ..... 25  
池上秀二・牧野聖也・伊藤裕之 (明治乳業株式会社 研究本部 食機能科学研究所)
- GABA 高含有チーズを安定生産する手法を開発～GABA 生成力が強い乳酸菌を含むチーズ  
発酵種菌～ ..... 30  
野村 将 ((独)農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究所)

## 国内情報

- バイオディーゼル燃料のトラクタへの利用 ..... 34  
清水一史・千葉大基\*・杉浦泰郎・高橋弘行・積 栄・手島司・原野道生 ((独)農業・  
食品産業技術総合研究機構 生物系特定産業技術研究支援センター \*現農林水産省)

## 文献情報

- 部分的不妊化処理ニワトリ胚への始原生殖細胞の移植による生殖細胞の置換 ..... 38  
Y. Nakamura et al. (*BIOLOGY OF REPRODUCTION*, 83, 130-137, 2010) 抄訳：下司雅也
- アブラナ自家不和合性ではトランスに作用する低分子RNAが優劣性を決定する ..... 39  
Y. Tarutani et al. (*Nature*, 466, 983-986, 2010) 抄訳：高田美信
- Lactococcus lactis* 生細胞中のペプチドグリカンのナノスケール構造の可視化 ..... 40  
Guillaume Andre et al. (*Nature communications*, 1:27 doi: 10.1038/ncomms 1027,2010)  
抄訳：柳原沙恵

## 生研センターからのご案内

- アグリビジネス創出フェア開催のお知らせ ..... 41  
地域版アグリビジネス創出フェア開催案内 ..... 42

## 表紙の説明

機能性食品としてコラーゲンペプチドの利用が年々増加している。しかし、消費者の体感性が高い一方で、その作用機序は十分には解明されていない。そこで筆者らは、これまでの知見を元に鶏由来のコラーゲンペプチド(表紙写真)を開発し、新規の作用とその機序について検討することとした。その結果、コラーゲンペプチドによる血管保護作用という新しい知見と、確かな作用機序が明らかになってきた。

詳細については8頁をご覧ください。

## ◀ 総 説 ▶

## 牛乳および食肉の機能性食品への展開

北里大学 獣医学部

有原 圭三

牛乳および食肉の機能性成分に注目し、新たな機能性食品の開発をも視野に入れ、最近の状況を中心に解説した。とくに、ラクトフェリンや乳塩基性タンパク質などの牛乳タンパク質、牛乳・食肉タンパク質由来の生理活性ペプチド、プロバイオティクスの新しい利用法について、重点的に取り上げた。また、食肉の機能性成分として関心の高い共役リノール酸、カルノシン、L-カルニチン、クレアチンについても、研究状況を紹介した。

## 1. はじめに

牛乳と食肉に代表される畜産物は、良質なタンパク質を豊富に含んだ栄養学的に優れた食品である。また、畜産物は多くのビタミンやミネラルの供給源としても重要である。牛乳はカルシウムが多く含まれていることが大きな特徴にもなっているが、その吸収効率も優れている。一方、食肉は、鉄、ビタミン B12、葉酸の供給源としても好適な食品である。

近年、食品のもつ3次機能（生体調節機能）が注目されるようになり、機能性食品に対する関心が高まっているが、乳・肉といった畜産物を対象とした機能性研究も大きな発展を遂げている。本稿では、牛乳と食肉を主たる対象とし、注目されている保健的機能性成分を解説するとともに、そのような成分を積極的に生かした機能性食品への展開についても論じる。

## 2. 牛乳タンパク質の保健的機能

牛乳中に3%程度含まれるタンパク質は、含量では糖質や脂質より少ないが、機能としては牛乳成分の主役と言ってよいだろう。牛乳タンパク質は、食品素材として利用しやすいことも

ARIHARA Keizo

〒034-8628 青森県十和田市東二十三番町 35-1

あり、多くの研究が行われてきた。牛乳タンパク質は、大きくカゼインとホエータンパク質に分けられる。これらのタンパク質は8種類の必須アミノ酸をバランスよく含んでおり、栄養学的に優れたものである。ここでは、牛乳タンパク質の保健的機能（生体調節機能）<sup>1)</sup>の主要なものを解説する。

## (1) カゼインの機能

牛乳に酸を加え、pHが4.6になったときに沈殿するタンパク質がカゼインである。カゼインは、牛乳タンパク質の約80%を占める。カゼインの保健的機能として、カルシウムの吸収促進作用が示されている。これはカゼインそのものの作用ではなく、消化過程において生成する分解物であるカゼインホスホペプチド(CPP)によるものである。カゼインの分解により様々な生理活性ペプチドが生成するが、これについては後述する。

## (2) ホエータンパク質の機能

カゼイン以外の大部分の牛乳タンパク質がホエータンパク質である。含量はカゼインに及ばないものの、その機能は多様である。主なホエータンパク質として、 $\alpha$ -ラクトアルブミン、 $\beta$ -ラクトグロブリン、免疫グロブリン、ラクトフェリンがある。これらのタンパク質につい

では、様々な保健的機能が報告されており、たとえば、抗胃潰瘍作用（ $\alpha$ -ラクトアルブミン）やウイルス性下痢症軽減（ $\alpha$ -ラクトアルブミン、 $\beta$ -ラクトグロブリン）がある。

保健的機能が詳しく検討されているホエータンパク

質としてラクトフェリンがあり、食品素材としても広く利用されている。ラクトフェリンの機能は広範で、抗菌、鉄吸収調節、細胞増殖促進、抗酸化といった作用を示す。未分解のラクトフェリンも抗菌作用を有するが、酵素分解により生成するペプチド（ラクトフェリシン）は、作用が増強されている。ラクトフェリシンは、抗菌スペクトルが広く、リステリアやバチルスなどのグラム陽性菌に加えてサルモネラなどのグラム陰性菌にも効果を示す。胃潰瘍の原因菌として注目されているピロリ菌（*Helicobacter pylori*）に対しても抗菌作用を示すことが報告されている。

ホエー中の骨形成因子として、乳塩基性タンパク質（Milk Basic Protein, MBP）が存在することが、骨芽細胞を用いた実験で明らかにされた。MBPの効果は、ヒト介入試験によっても示されており、1日あたり40mgのMBPを6ヶ月間摂取した場合に、骨密度の上昇などが認められている。すでにMBPは、数種の機能性食品に利用されている。

### 3. 牛乳・食肉タンパク質から生成するペプチド

食品タンパク質が酵素分解されることにより生成するペプチドには、様々な生理活性があることが知られている<sup>3, 5, 8, 9)</sup>。特に牛乳タンパ

表1 牛乳タンパク質由来の生理活性ペプチドの例

生理活性	名称	アミノ酸配列
血圧降下	ラクトリペプチド カゾキニン	IPP, VPP FF, FFVAP
オピオイド	ラクトロフィン	YGLF, YLLF
免疫調節	イムノペプチド	PGPIP, GLY
抗菌	イスラシディン	$\alpha$ s1-casein f(1-23)
プレバイオティック	PRELP-I	CAVGGCIAL
ミネラル吸収	カゼインホスホペプチド	$\alpha$ s1-casein f(1-23)
抗血栓	カゾプラテリン	MAIPPKNQDK
コレステロール低下	LTHペプチド	IIAEK
抗酸化	(名称なし)	YFYPEL

ク質分解物からは、多くの生理活性ペプチドが発見されてきた。牛乳タンパク質由来の代表的な生理活性ペプチドを表1にまとめた。今日までに約900の特定保健用食品が表示許可を得ているが、そのうちでペプチドあるいはタンパク質分解物が「関与する成分」となっているものは150ほどあり、ペプチドは注目度の高い機能性食品素材と言えよう。ペプチドを利用した特定保健用食品を機能別に見ると、血圧調節がもっとも多く、虫歯予防、中性脂肪調節、コレステロール調節、カルシウム吸収補助と続いている。

#### (1) 食品タンパク質からのペプチド生成

食品タンパク質が分解されて生成するペプチドの構造は、分解前のタンパク質中にも存在する。しかし、未分解のタンパク質中にある配列の状態では、生理活性を発現することはできない。食品タンパク質からのペプチドの生成経路として、主に4つのものが考えられる(図1)。

食品として摂取したタンパク質は、消化管内で消化酵素の作用を受け、ペプチドやアミノ酸となる。食品タンパク質をin vitroで消化酵素により分解すると、血圧降下ペプチドや抗酸化ペプチドが生成することから、消化管内においてもこの種のペプチドが生成していると考えられる。また、熟成を伴う食品では、原料や微生物由来のプロテアーゼがタンパク質を分解する。



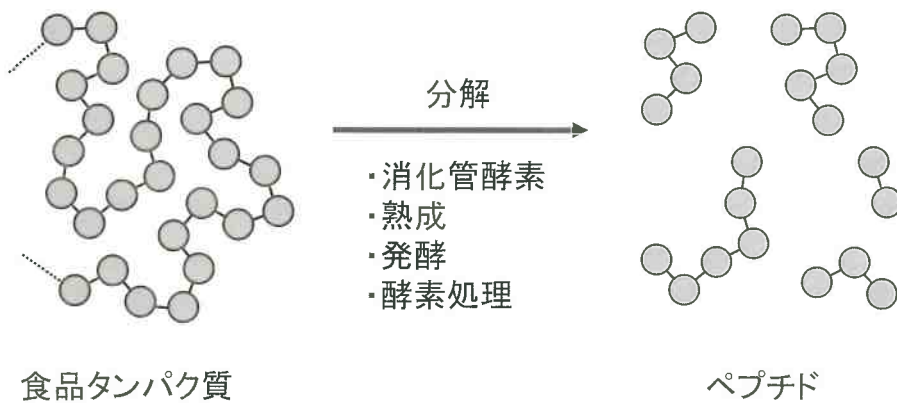


図1 食品タンパク質からのペプチド生成

1950年に発見された牛乳由来のカゼインホスホペプチド(CPP)は、食品タンパク質から生成する生理活性ペプチドに関する初期の大きな研究成果である。CPPはカルシウムを溶けやすい状態に保持

食肉の場合、牛肉、豚肉、鶏肉のいずれも熟成や貯蔵中にペプチド含量が増加する。牛肉のように熟成期間の長い食肉では、タンパク質の分解がかなり進行するので、生理活性ペプチドの生成も期待できる。発酵食品では、発酵・熟成中に微生物によるタンパク質分解はかなり進み、チーズやヨーグルトからは血圧降下ペプチドや抗酸化ペプチドが見出されている。発酵ソーセージや生ハムといった発酵食肉製品では、微生物プロテアーゼとともに筋肉由来のプロテアーゼも働くため、タンパク質の分解は顕著である。これまで、発酵食品中に生成する生理活性ペプチドは、乳製品を中心に検討されてきたが、機能性食肉製品の開発につなげることも可能だろう。

一方、食品や食品タンパク質の溶液に市販のプロテアーゼを添加し、タンパク質の分解を行えば、効率よくペプチドの生成が行える。動物、植物、微生物由来の各種プロテアーゼを利用し、多くの食品タンパク質由来の生理活性ペプチドが同定されている。特定保健用食品などいわゆる機能性食品の素材として利用されているペプチドの多くは、プロテアーゼを用いて調製された食品タンパク質分解物である。目的とする生理活性ペプチドの純度は低いものの、低コストで素材調製ができるのは大きなメリットである。

## (2) 牛乳タンパク質由来のペプチド

するため、カルシウムの吸収効率が向上する。CPPを利用した食品は非常に多く、特定保健用食品にも利用されている。また、カゼインホスホペプチド-非結晶リン酸カルシウム複合体(CPP-ACP)は、初期う蝕(脱灰)の抑制、再石灰化増強、耐酸性増強といった機能を有し、「歯を丈夫で健康にする食品」に利用されている。牛乳やチーズといった乳製品がう蝕予防作用を示すことが知られていたが、この現象の解明により、食品レベルで生かすことに成功している。

食品タンパク質由来の生理活性ペプチドで、今日最もよく研究されているのは、血圧降下ペプチドであろう。多くの血圧降下ペプチドは、アンジオテンシンI変換酵素(ACE)阻害作用を有する。牛乳タンパク質由来の血圧降下ペプチドであるラクトリペプチドの作用を利用した酸乳(カルピスマミールS)は、代表的な特定保健用食品にもなっている。カゼインドデカペプチドも特定保健用食品に利用されている牛乳タンパク質由来のペプチドである。その他、牛乳タンパク質由来の生理活性ペプチドとして、神経調節、免疫調節、抗酸化など多くのものが報告されている。これらのペプチドの機能性食品等への利用が期待される。

## (3) 食肉タンパク質由来のペプチド

牛乳タンパク質に比べると、食肉タンパク質の分解により生成する生理活性ペプチドに関する

る研究はかなり少なかった。しかし、ここ数年の間に、血圧降下 (ACE 阻害)、抗酸化、ビフィズス菌増殖といったペプチドに関する研究が急速に進んでいる<sup>3, 9)</sup>。上述したように、食肉では熟成といった過程が重要であることや、日本でも発酵食肉製品への関心が高まっていることから、熟成や発酵を上手に生かした機能性食肉製品の誕生が期待されている。とくに食肉や食肉製品の場合、美味しさが重要であるため、「美味しくて体に良い」食品であることを考える必要がある。

#### 4. プロバイオティクスの利用

プロバイオティクス (probiotics) は、「摂取により、宿主に有益な作用をもたらす生きた微生物」である<sup>11, 12)</sup>。プロバイオティクスという言葉は製品のネーミングや広告に使用している例も多く、すでに多くの消費者に認知されている。プロバイオティクスとして用いられている代表的な細菌として、消化管由来の *Lactobacillus* (乳酸桿菌) と *Bifidobacterium* (ビフィズス菌) がある。プロバイオティクスの主な保健的機能として、消化管微生物叢調節、下痢改善、便秘改善、便中酵素活性低下、血清コレステロール低下、免疫機能調節、アレルギー症状緩和、がん予防、ピロリ菌除去などがあげられる。ここでは、プロバイオティクスの免疫調節機能とプロバイオティクスを利用した食肉製品を中心に解説する。

##### (1) プロバイオティクスの免疫調節機能

プロバイオティクスの機能として、近年盛んに研究されているものに、免疫調節機能がある<sup>14)</sup>。花粉症などのアレルギー疾患や炎症性腸疾患、あるいは細菌やウイルスによる感染症といった様々な疾患の予防や症状軽減につながることで、この分野の研究が盛んになった大きな理由である。

プロバイオティクスの免疫調節作用として、T細胞調節効果、炎症性・抗炎症性サイトカイ

ン調節、抗体産生への効果、NK細胞への効果などが知られている。とくに、近年増加が著しい花粉症や食物アレルギーといったアレルギー性疾患の予防という観点からの研究が多く行われている。乳酸菌やビフィズス菌を経口投与することにより、アレルギー症状 (アトピー性皮膚炎・鼻炎、花粉症) が抑制されることが報告されている。これは乳酸菌のT細胞応答に対する調節効果であるという説が有力である。乳酸菌がマクロファージ等を介して、Th1細胞の分化やアポトーシスを誘導することにより、T細胞応答を調節できることが示されている。また、乳酸菌やビフィズス菌を経口摂取した場合、腸管免疫系の果たす役割も重要と考えられている。実際に、ビフィズス菌の経口投与により、IgA抗体応答が増強されることが報告されている。

乳酸菌やビフィズス菌による花粉症の予防あるいは症状軽減は、すでにヒトにおけるデータも蓄積している。菌種や菌株レベルの選択が重要であり、ヨーグルトや乳酸菌飲料なら何でもよいというわけではない。現在、効果が確認されている菌株を利用した製品が製造・販売されているが、薬事法による制限があるため、「花粉症予防」等の表示をすることができず、消費者が適切に製品を選択するのは困難である。特定保健用食品においても、「アレルギー」や「花粉症」といった文言の使用は許されておらず、行政の対応も望まれる。

##### (2) プロバイオティクス食肉製品

食肉製品における乳酸菌の利用は、発酵ソーセージ (発酵サラミなど) を中心に欧米では盛んに行われており、乳酸菌スターターも多くのものが製品化されている。しかし、乳酸菌をプロバイオティクスとしてとらえ、食肉製品に利用するという方向での研究は少なかった。実際の製品としても、3種の消化管由来の乳酸菌とビフィズス菌を利用したドイツの発酵サラミや、日本で開発されたヒト腸管由来の *Lactobacillus rhamnosus* を利用した発酵ミートスプレッド程度しか見当たらない。

しかし、最近 10 年間ほどの研究で、食肉製品においてもプロバイオティクスが効果的に使用できることが判明した<sup>6, 11, 12)</sup>。嗜好性や安全性などの面でも十分に市場価値のあるものが試作されるようになってきている。ただ、プロバイオティクスを利用した食肉製品というコンセプトが消費者に浸透しにくい状況もある。多くの消費者は食肉製品に美味しさを求めている。プロバイオティクスを利用した「美味しくて体によい」食肉製品の意義を上手に消費者に伝える必要がある。

### (3) プレバイオティクス・シンバイオティクス・バイオジェニクス

プロバイオティクスによく似た用語に、プレバイオティクス (prebiotics) がある。このプレバイオティクスは、「腸内有用微生物の増殖を特異的に促進して活性を高めることにより、宿主の健康に有益に作用する難消化性食品成分」である。代表的なプレバイオティクスとしてオリゴ糖や食物繊維がある。オリゴ糖や食物繊維を利用した乳製品は多く、食肉製品にも見られる。また、プロバイオティクスとプレバイオティクスの混合物をシンバイオティクス (synbiotics) と呼ぶようになってきている。さらに新しい概念として、バイオジェニクス (biogenics) も提唱されている (図 2)。バイ

オジェニクスは、「直接あるいは腸内菌叢を介して、生体調節、生体防御および疾病予防に働く食品成分」である<sup>15)</sup>。このような概念の導入は、発酵乳などの乳製品を中心に議論が進められており、新たな機能性食品の誕生につながることであろう。

## 5. 注目される食肉の機能性成分

牛乳・乳製品に比べると、食肉・食肉製品の分野は、保健的機能性の解明や機能性食品の開発という観点からの研究が少なかった。しかし、近年、食肉由来の生理活性物質についても知見が蓄積しつつある<sup>2, 4, 10, 12)</sup>。共役リノール酸、カルノシン、アンセリン、L-カルニチン、グルタチオン、タウリン、クレアチンといった物質は、食肉や食肉製品の保健的機能をアピールすると共に、機能性食品素材としての発展にも期待が持てる。

### (1) 共役リノール酸

共役リノール酸 (CLA) は、1979 年にフライドハンバーガー中に見出された抗変異原物質で、リノール酸の位置幾何異性体である。反芻動物では、ルーメン細菌がリノール酸を CLA に変換するため、反芻動物由来の畜産物 (牛肉や牛乳など) に CLA は多く含まれている。牛肉中の含量は、品種、年齢、飼料組成などの影響を受ける。CLA の生理機能については多くの研究が行われ、抗がん、体脂肪減少、動脈硬化予防、血清コレステロール低下、抗酸化、免疫調節などが報告されている。また、牛乳中において、ある種の乳酸菌が CLA を生成することが見出されている。このような乳酸菌を乳製品や食肉製品に用いることによって、CLA 含量を増加させた畜産食品の開発も考えられよう。

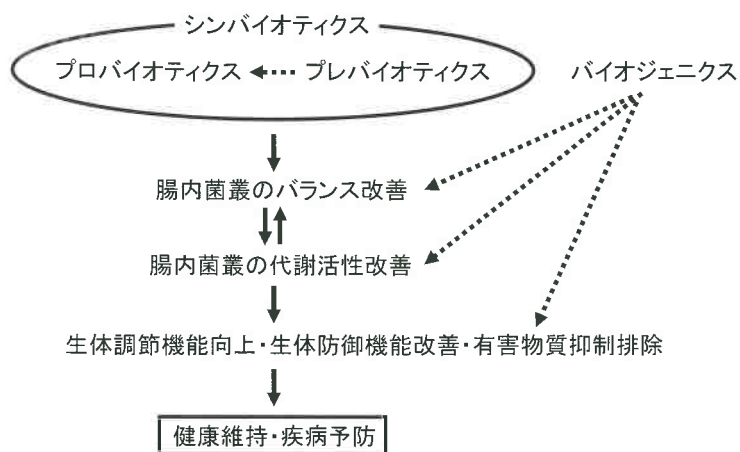


図 2 プロバイオティクス・プレバイオティクス・シンバイオティクス・バイオジェニクス

## (2) カルノシンとアンセリン

活性酸素による生体の傷害を軽減するためには、抗酸化物質の摂取が有効である。アスコルビン酸やポリフェノール類が代表的な抗酸化物質としてよく知られている。食肉中にも抗酸化物質は存在し、トコフェロール類、ユビキノン、カルテノイド類、グルタチオンなどがあるが、量的に最も重要な抗酸化物質はカルノシンやアンセリンといったヒスチジルジペプチドと言っただろう。カルノシンは豚肉などに比較的多く含まれ（豚肩肉 1kg あたり 2,700mg）、アンセリンは鶏肉における含量が多い。カルノシンやアンセリンの摂取は、酸化ストレスに起因する各種疾病の予防に寄与することが示唆されている。また、最近では、抗疲労作用を有する食品素材としても注目されている。

## (3) L-カルニチン

L-カルニチンは肝臓や腎臓で生合成される物質で、脂肪代謝に必須な働きをしている。食品では、食肉（骨格筋）に多く含まれ、とくに牛肉に多い（牛もも肉 1kg あたり 1,300mg）。生体内ではエネルギー産生やコレステロール低下に寄与するが、脂肪酸分解を促進することにより中性脂肪の蓄積を抑制することも知られている。また、アポトーシス抑制により心疾患予防作用を有することなども報告されている。L-カルニチンの摂取は、運動時のスタミナ維持や疲労回復にも効果があることから、スポーツ飲料にも用いられている。その他、ダイエット用サプリメントなど、すでに食品への利用はかなり行われている。

## (4) クレアチン

クレアチンは、生体内では主に骨格筋に存在するため、食品では食肉に多く含まれる物質である。筋収縮のエネルギーである ATP の利用維持に寄与している。摂取により、筋タンパク質合成が促されるため、筋萎縮が進行する

高齢者にとっては有効な食品成分と考えられている。

## 6. おわりに

牛乳を主原料とする機能性食品（機能性乳製品）は、すでに非常に多くのものが市場化されている。また、牛乳由来の機能性成分も、食品素材として広く産業的に利用されている。しかし、同じ畜産食品である食肉製品では、まだ機能性食品という概念の浸透が十分ではなく、特定保健用食品等の開発も限定的である<sup>2, 4)</sup>。美味しさを最大の特徴とする食肉製品の場合は、乳製品とは異なるアプローチも求められるような気がしている。保健的な付加価値の高い食肉や食肉製品を開発するための手法は様々なものが考えられる。家畜に与える飼料など飼育条件を改善する家畜生産の段階から、食肉処理、さらには保健的な機能性を有する素材を添加するなど食肉製品の製造段階にいたるまで工夫範囲は大きいとも言えよう（表 2）。機能性食品には大きな期待が寄せられているが、その一方で食品としての厳しい限界も存在する。その辺の状況については、別稿<sup>7)</sup>にて詳細に論じているので、そちらもご参照願いたい。

表 2 保健的付加価値の高い食肉・食肉製品の開発

1. と体組成の改善（家畜飼育条件改良など）
2. 生肉への操作（食肉処理方法改良など）
3. 製品製造時の工夫
  - ・ 脂肪含量低減
  - ・ 脂肪酸組成修正
  - ・ コレステロール含量低減
  - ・ カロリー低減
  - ・ 食塩添加量低減
  - ・ 発色剤添加量低減
  - ・ 機能性成分添加



## 文 献

- 1) 青木孝良 (2009), 牛乳タンパク質の機能性. 乳業技術, 59, 15-28.
- 2) 有原圭三 (2005), 食肉の保健的機能性と機能性食肉製品の開発. 畜産コンサルタント, 41, 18-22.
- 3) Arihara, K. (2006), Functional properties of bioactive peptides derived from meat proteins. in *Advanced Technologies for Meat Processing*, 245-274, CRC Press, Boca Raton.
- 4) Arihara, K. (2006), Strategies for designing novel functional meat products (review). *Meat science*, 74, 219-229.
- 5) 有原圭三 (2006), 健康維持や疾病予防に役立つペプチド化畜産食品の可能性. 畜産の情報, 203, 35-40.
- 6) 有原圭三 (2007), 食肉の保健的機能と機能性食肉製品の開発. 食肉の科学, 48, 4-19.
- 7) 有原圭三 (2009), 機能性食品の可能性と限界. 食の安全と予防医学, 215-234, 養賢堂, 東京.
- 8) 有原圭三(監修) (2009), 機能性ペプチドの最新応用技術 -食品・化粧品・ペットフードへの展開-. シーエムシー出版, 東京.
- 9) 有原圭三, 大畑素子 (2009), 食肉・食肉製品の機能性研究 -とくに食肉タンパク質由来のペプチドについて-. 食肉の科学, 50, 202-211.
- 10) Arihara, K. & Ohata, M. (2010), Functional meat products. in *Handbook of Meat Processing*, 423-439. Wiley-Blackwell, Ames.
- 11) Arihara, K. & Ohata, M. (2010), Probiotics and prebiotics in meat products. in *Processed Meats*. Woodhead Publishing, Cambridge (in press).
- 12) Arihara, K. & Ohata, M. (2010), Probiotic and prebiotic meat products. in *Probiotic and Prebiotic Foods*. Nova Publishers, New York (in press).
- 13) Arihara, K. & Ohata, M. (2010), Functional meat products. in *Functional Foods (2nd Edition)*. Woodhead Publishing, Cambridge (in press).
- 14) 八村敏志 (2007), 乳酸菌の免疫調節機能. 日本乳酸菌学会誌, 18, 54-57.
- 15) 向井孝夫 (2009), 農医連携の架け橋としてのプロバイオティクスの可能性を探る. 食の安全と予防医学, 185-214, 養賢堂, 東京.

## ◀ 総説関連 ▶

# 血管保護作用を有する鶏由来低分子 コラーゲンペプチドの開発研究 -コラーゲンペプチドの新規作用を探る-

日本ハム株式会社 中央研究所

河口 友美・高畑 能久・森松 文毅

機能性食品としてコラーゲンペプチドの利用が年々増加している。しかし、消費者の体感性が高い一方で、その作用機序は十分には解明されていない。そこで我々は、これまでの知見を元に鶏由来のコラーゲンペプチドを開発し、新規の作用とその機序について検討することとした。その結果、コラーゲンペプチドによる血管保護作用という新しい知見と、確かな作用機序が明らかになってきた。

## 1. はじめに

機能性食品、食品の三次機能といった言葉が声高に叫ばれるようになって久しい。生命を営むために必要な栄養としての一次機能、嗜好性を意味する二次機能に加え、摂取により生体が発現する生体防御、恒常性維持、疾病の予防といった生体調節作用として利用されるのが三次機能である。特に、三次機能を示す食品成分の純度を高めたものが、機能性素材としてサプリメントメーカー各社に使用されている。中でも、サプリメントのみならず、一般食品へと多様な広がりを見せているのがコラーゲンである。

コラーゲンは生体における主要なタンパク質であり、哺乳類、特にヒトでは生体を構成するタンパク質のうち、約1/3を占める。体内では細胞外マトリックスとして結合組織の形成や細胞の足場としての役割を担っており、加齢に伴い蓄積量は減少する。そのため、主にこれを補うことを目的としたコラーゲンペプチドの食品応用が行われており、利用量は年々増加し、現在では年間5000トンに及ぶ勢いと言われる。

KOUGUCHI Tomomi, TAKAHATA Yoshihisa,  
MORIMATSU Fumiki

〒300-2646 茨城県つくば市緑ヶ原 3-3

生体内におけるコラーゲンの大部分は3重らせん構造を有しているが、食品加工工程における加熱によりらせん構造は失われ、ゼラチンとなる。更に、ゼラチンを酵素分解し、ゲル化能を消失させることで溶解性を増したものがコラーゲンペプチドと呼ばれ、機能性食品素材として利用されている。

## 2. コラーゲンペプチドが有する三次機能

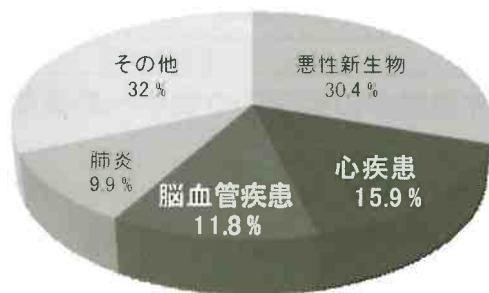
近年、消費者の体感性を裏付けるように、経口摂取されたコラーゲンペプチドによる生理機能が急速に明らかにされつつある。経口摂取されたコラーゲンペプチドは、アミノ酸にまで完全に分解されず、ジペプチドやトリペプチドとして血中に移行すること<sup>1)</sup>、更に、移行したコラーゲン由来ペプチドは、線維芽細胞の遊走を促進させることも明らかとなっている<sup>2)</sup>。また、プラセボを設定した二重盲検試験において、コラーゲンペプチド摂取により肌の水分量が増加することも確認されており、プラセボ効果では説明できない作用が見出されている<sup>3)</sup>。コラーゲンの一次構造は-Gly-X-Y-という特殊な繰返し配列であり、翻訳後修飾により産生される

Hyp (ハイドロキシプロリン) を持つのが特徴である。肌や骨のみならず血管などコラーゲンが多く含まれる器官において、これらの特殊な配列が種々の生理活性に寄与しているのではないかと示唆も多い。このことから、コラーゲンペプチドの更なる三次機能が期待された。

### 3. 血管をターゲットに

血管は、体内における最大の臓器とも呼ばれ、血管内腔を裏打ちする血管内皮細胞は面積にしてテニスコート 6 面分、重量にして 1.5kg もあり、肝臓と同等である。古典的には、血液を循環させるパイプと考えられてきたが、近年の研究から、血管内皮細胞が各種臓器からのシグナルを感知し、需要に応じた血液供給や各種サイトカインの分泌を亢進していることが明らかになってきた。

血管に起因する疾病は実に多い。厚生労働省が発表した平成 18 年の主な死因別死亡数の割合においては、第一位の悪性新生物（全死亡者における割合 30.4%）に次いで、心疾患（15.9%）、脳血管疾患（11.8%）と、循環器系に関わる死因が極めて多い（図 1）。血管を保護することが出来れば、広く国民の QOL の向上が望めるはずである。そこで我々は、血中へ吸収されるコラーゲンペプチドの特性に着目し、血管をターゲットとしたコラーゲンペプチドの開発に着手した。



厚生労働省 平成 18 年度 人口動態統計

図 1 主な死因別死亡数の割合

### 4. 鶏由来低分子コラーゲンペプチドの開発

一般に、コラーゲンペプチドの原料には豚皮や魚の鱗が用いられているが、今回の新規コラーゲンペプチドの原料には、鶏足を使用した。ゼラチンにはアレルギー性があることが知られているが、我々の研究から、鶏由来のゼラチンが最もアレルギー性が低いことが明らかとなっているためである<sup>4)</sup>。

鶏足を酸処理により可溶化させ、抽出されたコラーゲンをプロテアーゼ処理し、低分子化したものを乾燥・粉末化させ、鶏由来低分子コラーゲンペプチドとした。このコラーゲンペプチドには、強い ACE 阻害活性を有する 8 残基のコラーゲン特異的配列が含まれていたことから、鶏・コラーゲン・オクタ・ペプチド (Chicken Collagen Octa Peptides) の頭文字をとり、以下「C-COP」と称する<sup>5)</sup> (図 2)。

### 5. ヒト血管への影響

C-COP が人の血管に及ぼす影響について、baPWV を用いて検討した。baPWV とは、brachial ankle Pulse Wave Velocity (上腕足首脈波伝播速度) の略称名であり、心臓から押し出された血液による拍動 (脈波) を利用し、血管の硬さを測定する機器である。カフを巻いた後 3 分で測定可能という簡便さから、広く医療機関に普及し、現在では動脈硬化度の検査指標の一つとなっている<sup>6)</sup>。

被験者は、動脈硬化度がやや高く、投薬を受けていない 58 名とした。性別、年齢、身長、体重、血圧が均等になるよう 2 群に振分け、試験食群には 2.9g の C-COP 配合飲料、プラセボ群には擬似飲料を 1 日 1 本、12 週間継続摂取させた。4 週間に 1 度、baPWV にて動脈硬化度を測定し、さらに試験開始前後 (試験開始日及び試験開始 12 週間後) の血中窒素酸化物 (以下、NOx) を測定した。NOx 量は、血管弛緩作用を呈する一酸化窒素 NO の産生量と関連すること

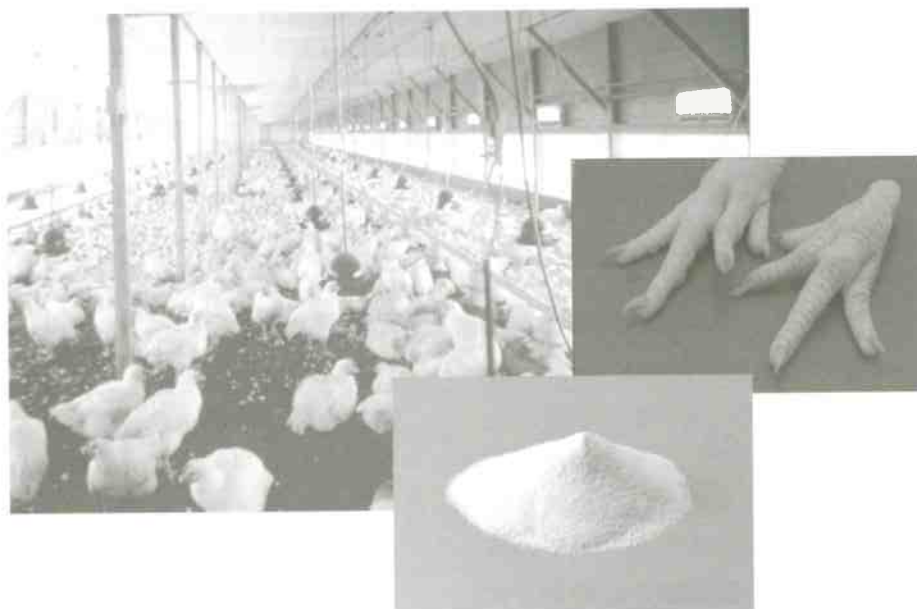
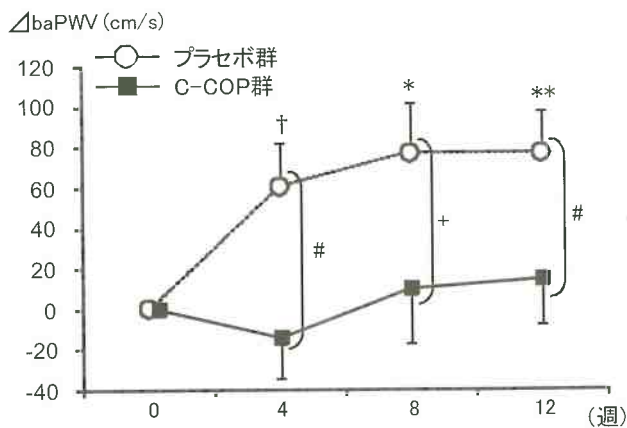


図2 鶏由来低分子コラーゲンペプチド C-COP

が示唆されている。

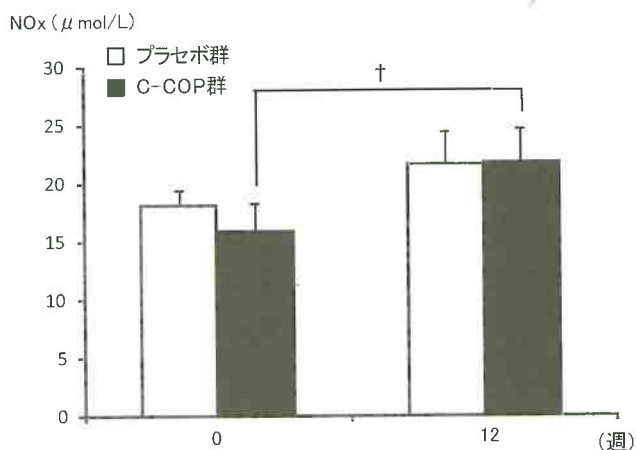
試験食摂取開始前の baPWV に対する変化値を計測したところ、摂取4週目、摂取8週目及び摂取12週目に、プラセボ群に比して C-COP 群にて有意な baPWV の低下または低下傾向が認められた(図3)。また、試験食摂取前後の血液中の NOx 量を比較したところ、C-COP 群において摂取12週間後に、NOx 量が高値を示す傾向にあることが明らかとなった(図4)。



試験食群間の比較 : +p<0.1, #p<0.05

試験開始日との比較 : †p<0.1, \*p<0.05, \*\*p<0.01

図3 C-COP 摂取によるヒト baPWV の変化



試験開始日との比較 : †p<0.1

図4 C-COP 摂取によるヒト血中 NOx 量の変化

## 6. 作用機序の解明① 血中への吸収

C-COP の摂取により血管の柔軟性が改善されているというのは、どのような機序に起因するのであろうか。そこで我々は、まずは C-COP の血中への吸収を検討することとした。

健康な男性5名を被験者とし、体重60kgあたり25gの C-COP を摂取させ、摂取前及び摂取



0.5, 1, 2, 4, 6 時間後に採血を実施した。コラーゲン特異的なアミノ酸である Hyp をマーカーに分析を行った結果、ヒト血中からは遊離型 Hyp だけではなく、ペプチド型の Hyp も検出された (図 5)。これは、C-COP は完全には分解されず、ペプチド態のまま体内に吸収されていることを意味する。そこで、最大吸収を示していた摂取 2 時間後の血液について、ゲルろ過 HPLC 及びプロテインシーケンサーに供したところ、9 種類のペプチドが検出された (表 1)<sup>1)</sup>。我々はこれらのペプチドについて、血中より検出されたことから「血中ペプチド」と称している。

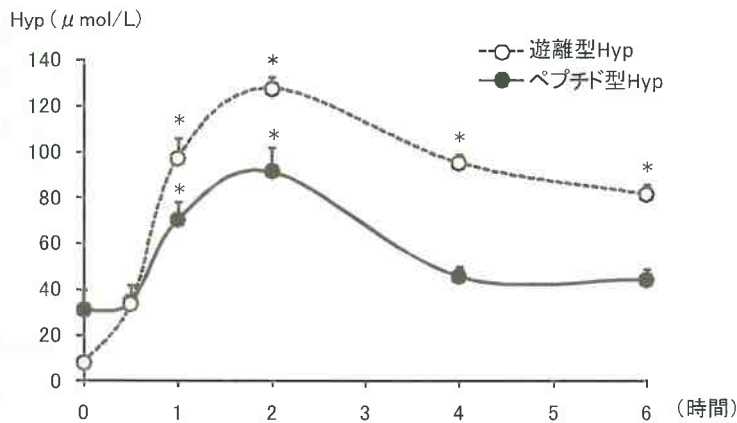
## 7. 作用機序の解明② 体内における血中ペプチドの働き

では、体内から発見された 9 種類の血中ペプチドが何らかの生理活性を発揮し、ヒトの血管保護に寄与しているのだろうか。我々は、合成した血中ペプチドを用いて、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cells: HUVEC) の eNOS (endothelial Nitric Oxide Synthase) に対する影響を検討することとした。

eNOS とは、血管内皮細胞に発現している膜タンパクで、リン酸化を経て、血管弛緩物質である NO の産生を促す。血管内皮細胞は、血流

(ずり応力)、酸素分圧、受容体刺激に応答して血管作動性物質を分泌し、血管の収縮・弛緩の恒常性を維持しているが、中でも eNOS による NO 産生は血管保護に大きく寄与する。糖尿病患者のような血管に炎症をもつヒトにおいては、eNOS の活性化に伴う NO 産生量が低下していることが知られる。

血中ペプチドをそれぞれ血中検出濃度の 10 倍量培地に添加し、この培地で HUVEC を 24 時間培養した。回収した細胞について、eNOS mRNA の発現量を検討したところ、血中ペプチドの作用により、発現が約 5 倍に促進されていることが明らかとなった。また、同様の培地にて HUVEC を 3 時間培養し、eNOS 抗体及び eNOS リン酸化抗体を用いて eNOS のリン酸化率について解析したところ、血中ペプチドの添加によりリン酸化も約 2 倍に促進されていた。さらに、eNOS リン酸化の下流産生物である NO についても、48 時間後の培養上清中で増加



摂取 0 時間との比較: \*p<0.05

図 5 C-COP 摂取によるヒト血中 Hyp 量の変化

表 1 C-COP 摂取により発現するヒト血中ペプチド及び血中濃度

アミノ酸配列	血中濃度(μmol/L)
Pro-Hyp	47.79
Leu-Hyp	28.22
Pro-Hyp-Gly	5.58
Phe-Hyp	3.79
Ala-Hyp	2.27
Hyp-Gly	1.68
Glu-Hyp-Gly	1.02
Ala-Hyp-Gly	0.50
Ser-Hyp-Gly	0.26

が確認され、加えて、24 時間後にはブラジキニンのレセプターである BK2 の mRNA 発現も亢進されていた。ブラジキニンとは、eNOS のリン酸化を促進する 9 残基の内在性ペプチドである。つまり、血中ペプチドは、ブラジキニンのレセプターを利用して内皮細胞へシグナルを伝達し、eNOS mRNA の発現・リン酸化の促進を経て、血管弛緩物質 NO の産生を増強させている可能性が示唆された。ヒト baPWV 値の改善という血管保護効果は、このような一連の作用機序に則っていたものと考えられた。

## 8. おわりに

コラーゲンペプチドは高い保水性を有するため、外用塗布した際には外部刺激の緩和や水分保持に寄与することはこれまでにも多く報告されている。その一方で、コラーゲンを内用（摂取）した際における機能性については、解明されていない点が多かったのは前述の通りである。しかし、今回本研究によって示されたエビデンスも含め、吸収されたコラーゲンが特異的な生理活性を有していることが、近年の数々の報告から示唆されている。

食品による機能性が、医薬品に取って代わることはない。しかし、ヒトが生きていく上で、欠かさず続けるのが食事である。バランスの良い食事が健康な生活を支えるのは自明の理であるが、食品成分が明確な機序を辿りながら三次機能を示すことを解明するのは、食に関わる研究者たちの長期の使命であろう。このたび、未だブラックボックスイメージの強いコラーゲンについて、我々は新規の鶏由来コラーゲンペプチドの開発から研究まで一貫して取り組んできた。その結果、血管保護作用という新たな三次機能について、作用機序を含めて示すことが出

来たと考えている。もちろん、更なる新規機能の存在も否定できない。本素材の摂取により国民の QOL が向上することを願いながら、今後もコラーゲンの可能性を示して行きたいと考える。

## 9. 謝 辞

本研究は、民間実用化研究促進事業 平成 18 年度採択課題「生活習慣病を予防する高付加価値畜産食品及び素材の開発研究」の一環として実施致しました。農研機構 生研センター並びに試験にご参加いただいた被験者の皆様に深く感謝致します。

また、研究にあたりご指導を賜りました大阪市立大学 梶本佳孝教授、京都府立大学 佐藤健司教授、広島大学 田辺誠一准教授をはじめ多くの方にご協力をいただきました。ここに謹んで感謝申し上げます。

## 10. 引用文献

- 1) Iwai, K. et al. (2009), *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 56(6), 326-330
- 2) Shigemura, Y. et al. (2009), *J. Agric. Food Chem.* 57(2), 444-449
- 3) Ohara, H. et al. (2009), *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 56, 137-145
- 4) Taguchi, Y. et al. (2004), *食品の包装*, 33(2), 35-40
- 5) Saiga, A. et al. (2008), *J. Agric. Food Chem.* 56, 9586-9591
- 6) 日本高血圧学会高血圧治療ガイドライン作成委員会 (2009), *高血圧治療ガイドライン 2009*, 第 1 版, 22-23, 日本高血圧学会, 東京

◀ 総説関連 ▶

## 親鶏由来の機能性リン脂質： スフィンゴミエリンの抗高脂血症及び抗高血糖効果

<sup>1</sup>丸大食品株式会社 中央研究所, <sup>2</sup>株式会社レオロジー機能食品研究所,  
<sup>3</sup>農事組合法人エヌチキン, <sup>4</sup>国立大学法人帯広畜産大学 食品科学研究部門,  
<sup>5</sup>株式会社パイオニアフーズ

府中英孝<sup>1</sup>・柚木恵太<sup>2</sup>・松山弘幸<sup>3</sup>・藤野武彦<sup>2</sup>・  
大西正男<sup>4</sup>・小玉芳郎<sup>5</sup>・杉山雅昭<sup>1</sup>

低利用の畜産資源である親鶏皮部は、SMの供給源として有望である。SMの機能として、脂肪肝の改善、高コレステロール血症の改善、高血糖症状の改善が期待でき、SMを1食当たり10mg含む試験食品は、軽度～中等度の高脂血症或いは高血糖の方の食事改善に有効な食品であることが示唆された。

### 1. はじめに

スフィンゴミエリン (SM) はスフィンゴ脂質の一種であり、スフィンゴシン、脂肪酸、リン酸、コリンから成り (図1)、高等動物の細胞膜や神経組織に広く分布している。スフィンゴ脂質は大腸がん発症予防効果、皮膚のバリア機能や保湿性の維持、コレステロール吸収阻害効果など様々な生理機能が報告されている。

Yunokiらは、小規模スケールの試験において親鶏皮部はSMやプラズマローゲンといった機能性複合脂質の供給源として有用であることを示した<sup>1)</sup>。そこで、我々は安定的に供給可能な国産の畜産資源である親鶏に着目して、その高度利用の検討を行ってきた。産卵養鶏場では年間約1億3千万羽の鶏が飼育されており、産卵

FUCHU Hidetaka<sup>1</sup>, YUNOKI Keita<sup>2</sup>, MATSUYAMA Hiroyuki<sup>3</sup>, FUJINO Takehiko<sup>2</sup>, OHNISHI Masao<sup>4</sup>, KODAMA Yoshirou<sup>5</sup>, SUGIYAMA Masaaki<sup>1</sup>

<sup>1</sup>〒569-8577 大阪府高槻市緑町21-3

<sup>2</sup>〒811-2501 福岡県糟屋郡久山町久原2241-1

<sup>3</sup>〒897-0302 鹿児島県南九州市知覧町郡3669

<sup>4</sup>〒080-8555 北海道帯広市稲田町西二線

<sup>5</sup>〒040-1010 北海道虻田郡京極町字京極138-1

後の鶏として年間約9千万羽の親鶏が発生する。親鶏の品種としては茶系統のボリスブラウン、白系統のジュリア、ピンク系統のマリアなどがある。主要鶏種であるジュリア及びボリスブラウンの2鶏種について夏期及び冬期の親鶏皮部を採取して含量測定を行った結果、SM含有率に大きな変動はなかった (表1)。

### 2. スフィンゴミエリン素材の開発

鶏皮の中性脂肪除去並びに機能性リン脂質の濃縮を行うため、「気・液混合高温媒体 (アクアガス)」加熱装置「アクアクッカー」を用いて加熱処理を行った後、圧搾機を用いて脱油鶏皮を調製した。さらに機能性リン脂質の濃縮を行うために凍結乾燥、粉碎工程を経て、脱油鶏皮乾燥粉末を得た。SM含有量は脱油鶏皮で鶏皮の約2.5倍、脱油鶏皮乾燥粉末で鶏皮の約4.7倍に増加した (表2)。また、脱油鶏皮乾燥粉末の成分分析値を表3に示す。脱油鶏皮乾燥粉末は、タンパク質含有量が高く、特に機能性食素材として認知度の高いコラーゲンを豊富に含む食素材である。

高純度SMの調製方法を図2に示す。脱油鶏

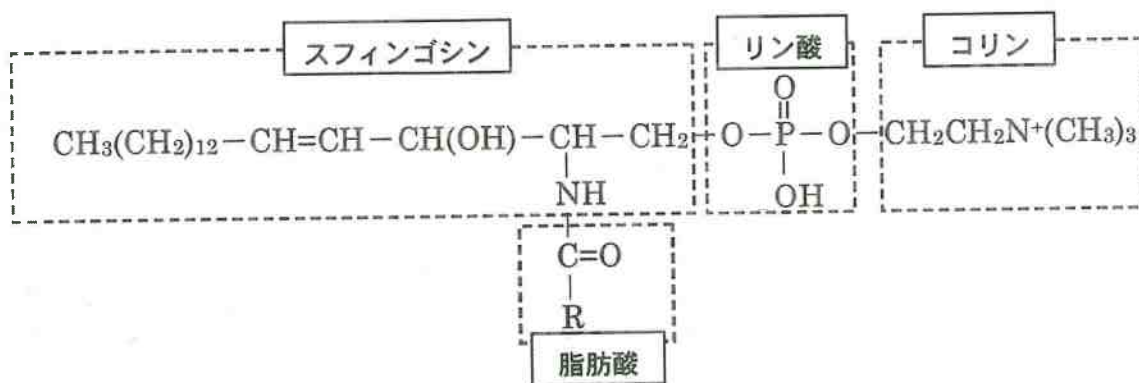


図1 スフィンゴミエリンの構造式

表1 親鶏皮部のリン脂質含有量（季節変動）

	夏期		冬期	
	ジュリア	ボリスブラウン	ジュリア	ボリスブラウン
TL (g/100g)	14.6±3.1	21.1±0.3	26.0±2.5	22.1±2.5
PL (g/100g)	0.42±0.05	0.58±0.10	0.42±0.02	0.43±0.04
SM (mg/100g)	63±3	78±8	57±7	79±18

TL：総脂質、PL：リン脂質、SM：スフィンゴミエリン

測定方法：TL及びPLはYunokiらの方法<sup>1)</sup>、SMはMawatariらの方法<sup>2)</sup>

表2 鶏皮各種試料のスフィンゴミエリン含有率

調製品	脱油工程		TL (g/100g)	PL (g/100g)	SM (mg/100g)
	乾燥工程	歩留 (%)			
生鶏皮	—	—	31.1	0.3	43.6
脱油鶏皮	35.1	—	13.5	0.7	112.7
脱油鶏皮乾燥粉末	—	43.3	31.3	1.4	207.0

表3 脱油鶏皮乾燥粉末の成分分析値

水分	タンパク質	脂質	灰分	ナトリウム	コラーゲン*
(g/100g)			(mg/100g)		
2.7	65.6	34.7	0.9	66.0	39.7

\*コラーゲンはヒドロキシプロリン (5.37g/100g) に係数 7.4 を乗じて算出した。

皮乾燥粉末のエタノール抽出物を得た後、少量の水を加えて攪拌して沈澱物を回収した。沈澱物をアセトン及びヘキサン/アセトンで分画して粗 SM 画分を調製した。次に、粗 SM 画分を

弱アルカリ分解処理した後、アセトン及び含水エタノールで洗浄して純度 90%以上の高純度 SM 画分 (図3) を調製した。高純度 SM の脂肪酸組成及びスフィンゴ塩基組成を表4に示す。



脱油鶏皮乾燥粉末

↓エタノール

ろ液

↓濃縮乾固

エタノール抽出物

↓水

沈澱

↓アセトン

沈澱

↓ヘキサン/アセトン (7 : 3)

沈澱 (粗 SM 画分)

↓0.2M 水酸化ナトリウム

↓アセトン

沈澱

↓エタノール

沈澱

↓70%エタノール

沈澱

↓アセトン

沈澱

↓乾固

高純度 SM

表4 SMの脂肪酸組成及びスフィンゴイド塩基組成

Acyl group	Mol%
C16:0	44.1
C18:0	20.1
C18:1	3.8
C20:0	4.1
C22:0	6.3
C22:1	0.2
C23:0	1.8
C24:0	6.0
C24:1	8.3
C24:2	1.8
Others <sup>※</sup>	3.0
Sphingoid base	
d18:0	1.7
d18:1 <sup>4t</sup>	98.3

※others : 14:0, 17:0, 19:0, 21:0, 25:0

図2 高純度 SM の調製方法

尚、測定方法は Yunoki らの方法<sup>3)</sup>に従って行った。鶏皮由来スフィンゴ脂質は C14:0 から C25:1 までの 16 種類の脂肪酸から成り、主要な脂肪酸は C16:0 及び C18:0 であった。主要なスフィンゴイド塩基は哺乳動物で一般的にみられる 4-*trans*-sphinganine (d18:1<sup>4t</sup>) であった。

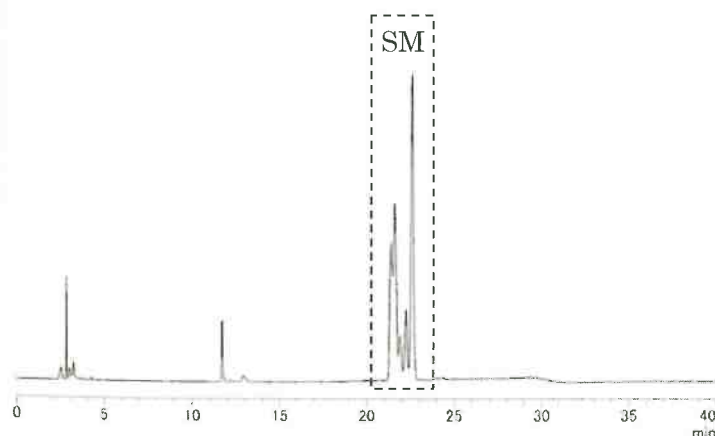


図3 高純度 SM の HPLC パターン

### 3. 動物試験による抗高脂血症、抗高血糖効果の確認

肥満モデルラット (Zucker ラット) にコントロール食 (AIN-76) 又は試験食 (AIN-76 に高純度 SM を 0.5% 加えた飼料) を 45 日間与えた後、体重、内臓脂肪重量、肝臓の脂質分析、血漿脂質、血漿ホルモン、血漿糖関連成分並びに肝臓の遺伝子発現解析を行った<sup>4)</sup>。コントロール食摂取群と試験食摂

取群間で体重増加の差はなかった。試験終了時の腸間膜脂肪重量は試験食摂取群で減少した（試験終了時のコントロール食摂取群：8.84±0.54g，試験食摂取群：7.82±0.86g， $p<0.01$ ，平均値±SD）。肝臓の脂肪酸組成を表5に示す。総脂肪量は試験食摂取群で24.3%減少した（ $p<0.01$ ）。リン脂質由来のリン濃度は増加した（ $p<0.001$ ）。肝臓のコレステロール濃度は有意な変化はなかった（データ非掲載）。試験食摂取によってリノール酸（ $p<0.05$ ），アラキドン酸

（ $p<0.01$ ）及びドコサヘキサエン酸（ $p<0.01$ ）が増加し，n-3/n-6比が有意に増加した（ $p<0.01$ ）。

血漿中の脂質関連成分並びにホルモンの分析結果を表6に示す。試験食摂取によって血漿中の総コレステロールの減少（ $p<0.01$ ），リン脂質の減少（ $p<0.05$ ）が観察された。血漿中の遊離脂肪酸量，トリグリセリド値に変化はなかった。インスリン濃度は21%減少したが（ $p<0.05$ ），アディポネクチン濃度は変化なかった。

試験食摂取によって誘導される脂質代謝関連

表5 肝臓の脂肪酸組成

	コントロール食 (AIN-76)	試験食 (AIN-76+0.5%SM)
総脂質 (g/100g 肝臓)	26.3±1.2	19.9±1.4**
リン (mg/g 総脂質)	3.4±0.3	4.8±0.2***
14:0	1.6±0.2	1.7±0.1
16:0	42.9±0.4	41.4±1.0*
16:1 (n-7)	9.8±0.3	9.9±0.2
18:0	4.5±0.3	5.2±0.2*
18:1 (n-9)	31.2±1.3	28.9±1.2
18:1 (n-7)	2.5±0.2	2.5±0.0
18:2 (n-6)	4.3±0.6	5.4±0.4*
20:4 (n-6)	2.1±0.3	3.2±0.3**
22:6 (n-3)	0.4±0.1	0.8±0.1**
others	0.8±0.1	1.0±0.1
n-6	6.6±0.8	9.0±0.7*
n-3/n-6	0.07±0.01	0.09±0.01**

値は平均値±SD，コントロール食摂取に比べて\*， $p<0.05$ ；\*\*， $p<0.01$ ；\*\*\*， $p<0.001$

表6 血漿中の脂質，グルコース，インスリン及びアディポネクチン濃度

	コントロール食	試験食
total cholesterol (mg/dL)	181.5±11.2	139.5±9.4**
non-HDL-cholesterol (mg/dL)	97.5±12.4	66.0±9.4**
TG (mg/dL)	171.4±80.8	164.0±38.9
PL (mg/dL)	287.8±24.7	243.8±14.7*
FFA (mequiv/dL)	2.3±1.5	1.6±0.3
glucose (mg/dL)	160.2±14.3	169.8±24.2
insulin (ng/dL)	14.6±1.9	11.5±0.9*
adiponectin (μg/dL)	27.5±1.6	27.2±4.9

値は平均値±SD，コントロール食摂取に比べて\*， $p<0.05$ ；\*\*， $p<0.01$ ；\*\*\*， $p<0.001$

遺伝子の発現の変化を解析するために肝臓の総 RNA を用いて DNA マイクロアレイ解析を行った (表 7)。コレステロール合成系遺伝子では、Hmgcs1 の発現量は減少していたが ( $p<0.01$ ), Hmgcr の発現量は変化がなかった。また、ピルビン酸からアセチル CoA を合成するピルビン酸デヒドロゲナーゼをリン酸化して阻害する Pdk4 の発現量が増加した ( $p<0.01$ )。コレステロール輸送系遺伝子では、Lrp4 発現量が増加傾向を示した ( $p<0.1$ )。また、コレステロール排出系遺伝子では、Abcg5 の発現が増加した

( $p<0.05$ )。アディポネクチンシグナリング関連遺伝子では、主に肝臓に発現している Adipor2 ( $p<0.01$ ) 及びその下流に位置する Ppara ( $p<0.05$ ) の発現上昇が見られた。

SM 摂取によって、Pdk4 発現上昇によるアセチル CoA 合成の抑制、Hmgcs1 発現低下によるアセトアセチル CoA から HMG-CoA の産生抑制といったコレステロール合成の低下、Lrp4 発現上昇によるコレステロール輸送系の亢進、Abcg5 発現上昇によるコレステロール排出系の亢進によって血漿コレステロール値の低下が引

表 7 肝臓における脂質代謝関連及び糖代謝関連遺伝子の発現変化

Gene name	description	試験食/コントロール食
Hmgcr	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase	1.1
Hmgcs1	hydroxymethylglutaryl-CoA synthase	0.5
Pdk4	pyruvate dehydrogenase kinase isozyme 4	4.3
Cyp7a1	Cytochrome P450 7A1	0.3
Lrp4	LDL receptor-related protein 4	2.2
Abcg1	ATP-binding cassette subfamily G, member 1	1.5
Abcg5	ATP-binding cassette subfamily G, member 5	2.8
Abcg8	ATP-binding cassette subfamily G, member 8	1.2
Lip1	lysosomal acid lipase	1.9
Acacb	acetyl-coenzyme A carboxylase $\beta$	0.6
Scd1	stearoyl-CoA desaturase 1	0.1
Nr1h3	liver X receptor $\alpha$	0.5
Apoa5	apolipoprotein A5	1.5
Apob	apolipoprotein B	0.4
Adipor1	adiponectin receptor 1	1.3
Adipor2	adiponectin receptor 2	1.8
Ppara	peroxisome proliferator-activated receptor $\alpha$	2.1
Cpt1a	carnitine O-palmitoyltransferase 1	1.4
Cpt2	carnitine O-palmitoyltransferase 2	2.1
Acox3	acyl-coenzyme A oxidase 3	1.7
Mlycd	malonyl-CoA decarboxylase	1.6
Fbp2	fructose-1, 6-bisphosphatase isozyme 2	0.6
Pck1	phosphoenolpyruvate carboxykinase	1.1
G6pc3	glucose-6-phosphatase, catalytic, 3	0.8
Hk3	hexokinase-3	2.0
Gck	glucokinase	1.5

き起こされたと考えられる。また、Cpt1a や Cpt2 発現上昇によって PPAR $\alpha$  が活性化され、肝臓の脂肪分解を促進し、脂肪肝の防止に繋がる可能性が示唆された。Scd1 発現の低下はインスリン感受性を亢進し、肥満防止に効果があると考えられる。

以上より、SM 摂取によって脂肪肝の改善、高コレステロール血症の改善、アディポネクチンシグナルの正常化によるインスリン抵抗性の改善が期待できる。

#### 4. 治験による抗高脂血症，抗高血糖効果の確認

##### (1) 抗高脂血症治験

LDL-コレステロール値が 120mg/dL 以上の被験者に、1 食当たり SM を 10mg 含むミートボールを 4 週間摂取して抗高脂血症効果を確認した。治験の実施概要を表 8 に示す。

LDL-コレステロールにおいて、中性脂肪 150mg/dL 以上の被験者では、被験食品群の変化量は、対照食品群に比較して LDL-コレステロール値が有意に低かった（被験食品群： $-10.0 \pm 15.2$  対照食品群： $20.3 \pm 20.9$ ,  $p < 0.05$ ）。また、中性脂肪 150mg/dL 未満の被験者においても、被験食品群の変化量は、対照食品群に比較して有意な差が認められた（被験食品群： $4.0 \pm 15.0$  対照食品群： $-7.9 \pm 15.4$ ,  $p < 0.05$ ）。

総コレステロールにおいて、被験食品群の変化量は、対照食品群に比較し、総コレステロール値が有意に低かった（被験食品群： $-15.8 \pm 16.6$  対照食品群： $14.9 \pm 22.3$ ,  $p < 0.05$ ）。

また、医師の診察や臨床検査等で臨症上問題となる所見は見られなかった。

##### (2) 抗高血糖治験

ヘモグロビン A<sub>1c</sub> (HbA<sub>1c</sub>) 値が 5.8~8.0% の被験者に、1 食当たり SM を 10mg 含むミートボ

表 8 抗高脂血症並びに抗高血糖治験の実施概要

	抗高脂血症治験	抗高血糖治験
試験デザイン	二重盲検並行群間比較 前観察期間 4 週間を経て、被験食品或いは対照食品を 4 週間継続摂取	
対照	LDL-コレステロール値 120mg/dL 以上の成人（性別不問） 被験食品摂取：24 名 対照食品摂取：24 名	HbA <sub>1c</sub> 値が 5.8~8.0 の成人（性別不問） 被験食品摂取：16 名 対照食品摂取：15 名
主要評価項目	LDL-コレステロール 総コレステロール，HDL-コレステロール，中性脂肪，遊離脂肪酸，空腹時血糖，HbA <sub>1c</sub> ，体重，BMI，体脂肪率，腹囲	空腹時血糖，HbA <sub>1c</sub> 糖化アルブミン，インスリン，HOMA-R，総コレステロール，HDL-コレステロール，LDL-コレステロール，中性脂肪，体重，BMI，体脂肪率，腹囲
被験食品	SM 含有量：10.08mg/食（脱油鶏皮使用のチキンミートボール） 被験食品 1 食当たり 熱量：50kcal，タンパク質：4.7g，脂質：2.8g，炭水化物 1.4g	
対照食品	SM 含有量：0.76mg/食 対照食品 1 食当たり 熱量：46kcal，タンパク質：3.4g，脂質：1.1g，炭水化物 5.7g	



ールを4週間摂取して抗高血糖効果を確認した。治験の実施概要を表8に示す。

HbA<sub>1c</sub>において、全例解析では対照食品群と比較して、被験食品群の変化量に有意な変動は認められなかった。今回の治験では摂取期間が4週間と短かったため、1~3ヶ月前の血糖値と相関するHbA<sub>1c</sub>に有意な変化が現れなかったと考えられる。

過去1~2週間の血糖値と相関する糖化アルブミンにおいて、被験食品群の変化量（前観察期間終了後-摂取4週間後）は、対照食品群と比較して糖化アルブミン値が有意に低かった（被験食品群： $-0.56 \pm 1.27$  対照食品群： $0.28 \pm 0.88$ ,  $p < 0.05$ ）。

また、医師の診察や臨床検査等で臨症上問題となる所見は見られなかった。

## 5. おわりに

低利用の畜産資源である親鶏皮部は、SMの供給源として有望であることが確認できた。SMの機能として、脂肪肝の改善、高コレステロール血症の改善、高血糖症状の改善が期待でき、SMを1食当たり10mg含む試験食品は、軽度~中等度の高脂血症或いは高血糖の方の食事改善に有効な食品であることが示唆された。

## 参考文献

- 1) Yunoki, K. et al. (2008), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 85, 427-433
- 2) Mawatari, S. et al. (2009), *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73, 2621-2625
- 3) Yunoki, K. et al. (2008), *Lipids*, 43, 151-159
- 4) Yunoki, K. et al. (2010), *J. Agric. Food Chem.*, 58, 7030-7035

## ◀ 総説関連 ▶

## 乳脂肪球膜の摂取による肌質改善効果

よつ葉乳業株式会社 中央研究所

後藤 英嗣・辻 敏宏・明石 啓子・元島 英雅

乳脂肪球膜 (Milk Fat Globule Membrane, MFGM) は乳脂肪を被膜して乳化に寄与している膜物質であり、特徴的な構成成分を有している。一般的な乳成分とは大きく異なるため、我々は、他の乳成分にはない新たな機能が隠れているのではと考えて種々の試験を行った。アトピー様症状発症モデルマウスに MFGM を投与させたところ、外観から顕著な肌質改善効果が確認された。また、肌荒れやかゆみの自覚症状を有する男女を対象に MFGM を摂取させたヒト試験では、顔の肌の乾燥や荒れなどへの改善効果が体感された。一連の結果より、MFGM には肌質を整える機能を有することが確認された。

## 1. はじめに

乳を合成する乳腺細胞から乳脂肪が分泌される際、乳腺細胞の小胞体と形質膜による被膜を受けて水系で安定なエマルションを構成する。MFGM とは乳腺細胞由来の小胞体と形質膜からなる膜物質である<sup>1)2)</sup>。MFGM 構成タンパク質は、小胞体や乳腺細胞由来の両親媒性タンパク質から構成されており、他の画分には認められないユニークな組成を有している。ムチン 1 (MUC1)<sup>3)</sup>、キサンチンデヒドロゲナーゼ/オキシダーゼ (XDH/XO)<sup>4)</sup>、分化抗原群 (CD36)<sup>5)</sup>、ラクトアドヘリン (PAS6/7)<sup>6)</sup>、アディポフィリン (ADPH) およびブチロフィリン (BTN)<sup>7)</sup>などのほかに、200 種類以上のタンパク質の存在が知られている。MFGM の健康機能性について、近年、欧米での研究が盛んになっており、例えば、抗腫瘍、抗ステロール、ピロリ菌感染防御効果などが認められている<sup>8)-10)</sup>。

我々は、バター製造時に発生する水相画分であるバターミルクを原料にした工業的な MFGM の製造方法を既に開発している (特許 3488327)。本方法で製造した MFGM の新たな健康機能性を明

GOTO Hidetsugu, TSUJI Toshihiro, AKASHI Keiko, MOTOSHIMA Hidemasa

〒061-1264 北海道北広島市輪厚 465-1

らかにするため、アトピー様症状モデルマウスに経口投与させ、MFGM が肌質改善効果を有していることを見出した。本稿では、モデルマウスの試験結果の一部と肌荒れを自覚する健常成人を対象に実施した MFGM による肌質改善効果について報告する。

## 2. バターミルクからの MFGM 調製

MFGM 精製物は、クリームおよびチーズホエイなどの乳由来原料を使用し、膜分離工程による様々な条件の組み合わせ (例えば、膜の孔径、処理温度など) から作製できるが、用いる分離、精製方法によって組成が異なることが知られている<sup>11)-14)</sup>。現在入手できる MFGM 精製物は、脂質含有量、特に極性脂質中のリン脂質の多いことが特徴であるが、我々が既に特許化した製法では、バター製造時に発生する水相画分のバターミルクを原料とすることで、脂質含有量が比較的少なくなり、タンパク質含有量が増加した MFGM 精製物を作製することができる。

本製法では、乳の主要構成タンパク質であるカゼインミセルと MFGM の大きさの差を利用し、バターミルクを精密濾過処理することによってカゼイン

および乳糖を透過させ、濃縮し、乾燥工程により粉末化を行う。この製法により調製した MFGM 粉末の組成は、全固形分あたりタンパク質が約 86%、脂質が約 7%、糖質が約 1%、灰分が約 7%である。さらに、MFGM は難溶性のタンパク質複合体であり、夾雑物は可溶性のカゼインが主体であることから、MFGM 粉末中の可溶性および不溶性タンパク質量を測定したところ、粉末中に含まれる MFGM は 50% (重量%) と見積もられた。

### 3. MFGM の動物試験における肌質改善効果

アトピー様症状モデルマウスである Hos:HR-1 (HR-1) は、特殊飼料を摂取させると皮膚水分量の低下および皮膚の肥厚など、肌質が悪化することが知られている。特殊飼料に MFGM を 1.5%、0.0125% (いずれも重量%) になるように加えた飼料を自由摂取させ、肌質の変化を観察した。

図 1 では、試験期間中の背部皮膚外観の代表例を示した。通常飼料を与えたアトピー様症状非発症群では、試験期間中滑らかな肌質を維持しており、顕著なしわの形成も観察されなかった。一方で特殊飼料を給餌させた発症群では、顕著なしわの形成が観察され、一部には掻痒による出血も認められた。このアトピー様症状発症 HR-1 マウスに MFGM 量を調整して投与した各群では、濃度依存的にしわの形成などが抑えられており、非発症群に類似した形態を保持したことが観察された。

図 2 では背部皮膚の厚さを示したが、非発症群では、 $0.30 \pm 0.02$  mm であった。発症群では、 $0.44 \pm 0.02$  mm であり、非発症群と比較して有意に高い値を示した。一方、1.5% MFGM 投与群では  $0.32 \pm 0.01$  mm、0.0125% MFGM 投与群では  $0.36 \pm 0.01$  mm であり、各 MFGM 投与群は発症群と比較して有意に低い値を示した。また、結果は示していないが、遺伝子発現解析の結果からは、MFGM は皮膚の角質層の構成成分である各種遺

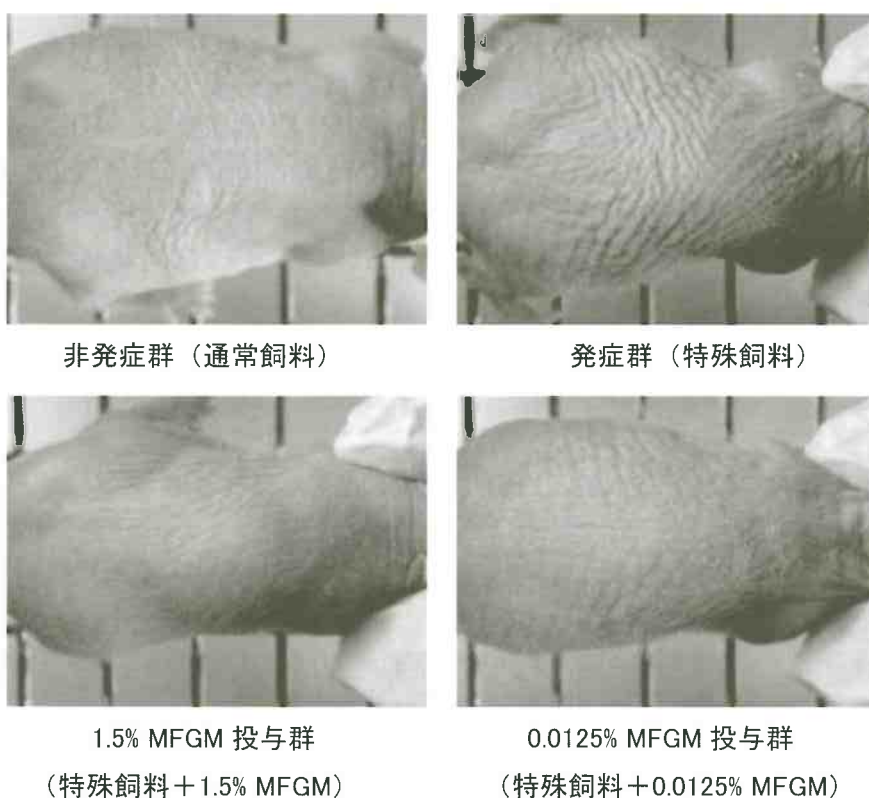


図 1 アトピー様症状発症 HR-1 マウスでの MFGM による肌質改善効果

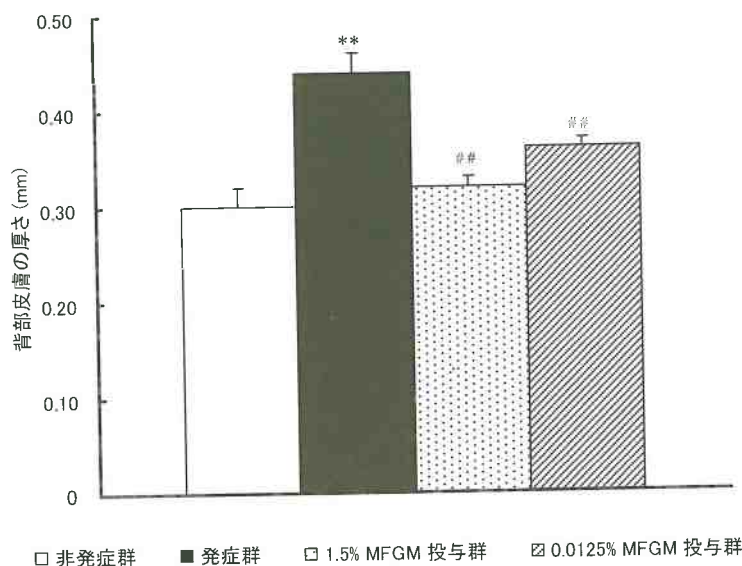


図2 アトピー様症状発症 HR-1 マウスの背部皮膚の肥厚に対する MFGM の抑制効果

背部皮膚の厚さを平均値±標準誤差で示す (n=12)。

\*\*、非発症群との t 検定で有意差あり (P < 0.01) ; ##, 発症群との Dunnett の多重比較検定で有意差あり (P < 0.01)。

伝子群の発現量を調節し、通常状態へ回復させる動きを示した。つまり、MFGM は表皮の形成や角化を正常に保つことによって荒れ肌を改善し、皮膚機能改善組成物としての機能性を有することが分かった。

#### 4. ヒトの肌質に対する MFGM の改善効果

皮膚の最外層は表皮と呼ばれ、表皮は内側から基底層、有棘層、顆粒層および角質層から構成されている。角質層は外界との接点に位置する組織であり、皮膚がバリア機能を発揮するためには、これらの構成組織が正常に形成される必要がある。アトピー様症

状発症による皮膚からの水分蒸散量の増加の一因として、皮膚の肥厚化が知られている。肥厚化は各組織の構成物質のバランスが乱れることに起因しており、乾燥肌や荒れ肌にも影響を及ぼす。したがって、MFGM がアトピー様症状発症 HR-1 マウスに対して皮膚厚や表皮の構成成分の発現量を正常に保つ結果を示したことは、ヒトに対する皮膚バリア機能改善作用の効果も期待できる。そこで、肌荒れを自覚する健康成人を対象に、MFGM の経口投与による肌質改善効果の検証を行った。

試験は、2009年2月の冬季における北海道で、脱脂粉乳を摂取させた対照食品群とMFGMを摂取させた被験食品群による二重盲験並行群間試験とした。摂取食品は、両群とも同一配合の錠剤として3食後に約1gずつとした。つまり、1日あたり約3g (MFGMは、純品換算で約1.5g)による、実施期間4週間での連続摂取とした。被験者は、北海道札幌市近郊から募集を行い、経皮水分蒸散量が低値であり、表1の除外基準を満たす男女40名を対象とした。試験は両群20名で開始したが、対照食品群の男女各1名、被験食品群の女性1名が禁忌医薬品を摂取したことが判明したため、対照

表1 ヒト試験での被験者除外基準

1. 薬物および乳由来食品アレルギーがある者
2. アトピー性皮膚炎の症状を有する者
3. 肌に影響を及ぼす可能性がある薬やサプリメントを常用している者
4. 過度のタバコ、アルコール常用者並びに食生活が極度に不規則な者
5. 肝機能又は腎機能に著しい障害がある者
6. 胃切除、胃腸縫合術、腸管切除などの胃腸管部位に大きな手術歴のある者
7. 摂取開始前12週間以内に400mL献血か、4週間以内に200mL献血または2週間以内に成分献血(血漿成分献血および血小板成分献血)を行った者
8. 深夜および不規則シフト勤務者
9. その他、試験責任医師が不適格であると判断した者
10. 皮膚水分値が平均値よりも高い者



食品群 18 名 (うち女性 13 名), 被験食品群 19 名 (うち女性 12 名) として解析を行った。

顔の肌の経皮水分蒸散量測定では (データ非掲載), 摂取 2 週間では両群共に有意に上昇しており, 対照食品群では摂取 4 週後でさらに上昇した。一方で, 被験食品群では摂取 4 週目で減少して摂取前と同程度の値を示し, MFGM により顔の肌での経皮水分蒸散量が減少することが判明した。また体感効果を検証すべく, 摂取期間中にアンケート調査も実施し, その結果を表 2 で示した。両群とも, 全項目において, 摂取 2 週目までは高スコアが示されたものの群間に大差は認められなかった。しかし摂取 3 週目以降は, 対照食品群では顕著な高スコア化は示されなかったのに対し, 被験食品群ではより顕著な高スコア化が示され, 摂取 4 週目には全項目において対照食品群と比べて有意な高値が認められた。特に女性では「化粧のり」の改善が顕著であった。以上の結果から, 肌質改善効果が体感できることも判明した。摂取 2 週目では体感に差がなく, 4 週目で有意差が認め

られたことは, 皮膚のターンオーバーの周期と一致しており, バリア機能に必要な皮膚組織が正常に形成されたためであると思われる。なお, 医師による問診, 聴打診, 理学的検査, 血液学的検査, 血液生化学的検査および尿検査も併せて実施したが, 被験物質による有害事象に相当するものは認められなかった。

今回調製した MFGM には主成分として約 86% のタンパク質と約 7% の脂質が含まれており, タンパク質画分には, BTN や XDH/XO といった MFGM に特徴的なタンパク質が存在している。脂質画分には, 乳脂肪であるトリアシルグリセロールの他に, グリセロリン脂質やスフィンゴ脂質が含まれる。近年, スフィンゴ脂質の経皮水分蒸散量抑制効果や水分量増加効果が報告されており, HR-1 マウスを用いた試験で, 乳由来スフィンゴミエリン高含有物でも角質水分量や角質セラミド量の増加が報告されている<sup>15)</sup>。本試験で使用した被験食品中には約 21 mg/日の濃度でスフィンゴミエリンが存在しているため, スフィンゴミエリンによる経皮水分蒸散量抑

表 2 顔の肌に対する MFGM の体感効果

項目	群	経過週数			
		1	2	3	4
顔の乾燥	対照食品	0.4±0.6 **	0.7±0.8 **	0.4±0.9 *	0.5±0.9 *
	被験食品	0.6±0.7 **	0.8±0.5 **	0.8±0.5 **	<b>0.8±0.8 ** #</b>
顔の荒れ	対照食品	0.1±0.5	0.4±0.6 **	0.2±0.8	0.1±0.8
	被験食品	0.4±0.6 **	0.4±0.6 *	<b>0.7±0.7 ** #</b>	<b>0.5±0.9 ** #</b>
顔の色つや	対照食品	0.2±0.4	0.2±0.5	0.1±0.4	0.1±0.5
	被験食品	0.3±0.6 *	0.3±0.6	<b>0.5±0.6 ** #</b>	<b>0.4±0.7 ** ##</b>
顔の透明感	対照食品	0.0±0.0	0.1±0.3	0.1±0.4	0.2±0.5
	被験食品	0.2±0.5	0.2±0.5	0.3±0.7	<b>0.4±0.7 ** #</b>
化粧のり (女性のみ)	対照食品	0.3±0.6	0.3±0.8	0.0±0.8	0.3±0.9
	被験食品	0.6±0.5 **	0.5±0.5 **	<b>0.6±0.5 ** #</b>	<b>1.0±0.7 ** #</b>

平均値±標準偏差で示した。摂取前を「0」とし, 「良くなった: 2」, 「やや良くなった: 1」, 「変化なし: 0」, 「やや悪くなった: -1」, 「悪くなった: -2」とスコア化して解析した。\*, \*\*, それぞれの群で, 摂取前「0」と比較して有意差あり (\* P < 0.05, \*\* P < 0.01, Paired-t)。#, ##, vs 対照食品群 (# P < 0.05, ## P < 0.01)。

制効果が発揮された可能性が考えられる。しかし、HR-1 マウスを用いた試験において皮膚の脂質分析ならびに遺伝子発現解析結果からは、スフィンゴ脂質を投与した試験結果<sup>15)</sup>とは異なり、皮膚におけるセラミド量は MFGM によって増加せず、遺伝子発現解析の結果からはスフィンゴ脂質代謝系の遺伝子群に有意な増減は認められなかった。一方、MFGM 投与群では角質層の形成に必要な遺伝子群に対して影響を及ぼすという新規な作用機序を認めており、我々は新たな機能物質としてタンパク質の関与を考えている。

## 5. おわりに

乳由来の物質について新たな健康機能性の探索を試みた本研究から、バターミルクに比較的豊富に含まれる MFGM 構成タンパク質に肌質改善効果を有していることが示唆された。今後は、本機能が活用されるような、例えば乳飲料のような商品化を検討し、市場への普及を進めていきたい。

## 謝 辞

本研究は独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構が実施する「民間実用化研究促進事業」の研究課題の一部として行った。本研究を支援して頂いた関係者に、この場を借りて感謝申し上げます。

## 参考文献

- 1) Evers, J. M. (2004), *Int. Dairy. Sci.*, 14, 661-674
- 2) 後藤英嗣 (2009), ミルクの事典 (上野川修一ら編集), 第1版, 451, 朝倉書店
- 3) Pallesen, L. T. et. al. (2001), *J. Dairy. Sci.*, 84, 2591-2598
- 4) Berglund, L. et. al. (1996), *J. Dairy. Sci.*, 79, 198-204
- 5) Berglund, L. et. al. (1996), *Biochim. Biophys. Acta.*, 1309, 63-68
- 6) Hvarregaard, J. et. al. (1996), *Eur. J. Biochem.*, 240, 628-636
- 7) Nielsen, R. L. et. al. (1999), *J. Dairy. Sci.*, 82, 2543-2549
- 8) Harrison, R. et. al. (2006), *Int. Dairy. J.*, 16, 546-554
- 9) Mañá, P. et. al. (2004), *Int. Immunol.*, 16, 489-499
- 10) Peterson, J. A. et. al. (1998), *Pediatr. Res.*, 44, 499-506
- 11) Morin, P. et. al. (2004), *J. Dairy. Sci.*, 87, 267-273
- 12) Sodini, I. et. al. (2006), *J. Dairy. Sci.*, 89, 525-536
- 13) Morin, P. et. al. (2007), *J. Dairy. Sci.*, 90, 2132-2140
- 14) Rombaut, R. et. al. (2007), *J. Dairy. Sci.*, 90, 1662-1673
- 15) Haruta, Y. et. al. (2008), *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72, 2151-2157

## ◀ 総説関連 ▶

1073R-1 乳酸菌に免疫機能を  
活性化させる効果があることを発見

明治乳業株式会社 研究本部 食機能科学研究所

池上秀二・牧野聖也・伊藤裕之

古くからヨーグルトは、整腸作用をはじめとした様々な生理作用を示すことが知られており、保健効果の高い食品として認知されてきた。こうした中、ヨーグルトの製造に用いるブルガリア菌の一つに免疫機能を活性化させる作用があることを見出した。この 1073R-1 乳酸菌が産生する多糖体に IFN- $\gamma$  誘導作用、NK 活性上昇作用、この乳酸菌で発酵したヨーグルトにヒト試験において、NK 活性の改善効果、風邪罹患リスクの低減効果を見出した。

## 1. はじめに

ロシアの生物学者でノーベル賞受賞者でもあるメチニコフ (1845-1916) が、20 世紀初頭、老化に関する論文の中で、ブルガリアのヨーグルトを「不老長寿の妙薬」として紹介したことに始まり、ヨーグルトは古くから保健効果の高い食品として認知されてきた。ヨーグルトは、栄養学的に優れた食品であることに加え、整腸作用をはじめとした様々な生理作用を示すことが報告されている。ヨーグルトは、*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (*L. bulgaricus*) と *Streptococcus thermophilus* (*S. thermophilus*) の共生作用を利用して乳を発酵することで製造される。乳酸菌は乳酸をはじめとした多くの代謝産物をヨーグルト中に産生するが、その中の一つとして多糖体が挙げられる。乳酸菌が産生する多糖体についてはヨーグルトに及ぼす物性面だけではなく、生理機能についても研究が行われている。代表的な多糖体は北欧の粘性発酵乳 Viili に含まれるリン酸化多糖体である。さらに、当社が保有するヨーグルトスターター乳酸菌である *L. bulgaricus* OLL1073R-1 (以下、1073R-1 乳酸菌) についてもリン酸化多糖体を産生し、  
IKEGAMI Shuji, MAKINO Seiya, ITOH Hiroyuki  
〒250-0862 神奈川県小田原市成田 540

Viili の多糖体と同様に *in vitro* での B 細胞マイトジェン活性、マクロファージ活性化といった免疫賦活作用が報告されている<sup>1),2)</sup>。こうした乳酸菌が菌体外に産生する多糖体は *exopolysaccharides* あるいは、*extracellular polysaccharides*、略して、EPS と呼ばれている。そこで、我々は 1073R-1 乳酸菌が産生する EPS (多糖体) を活用した免疫賦活ヨーグルトの研究開発を開始した。本稿では 1073R-1 乳酸菌が産生する EPS あるいはこの乳酸菌を使用して発酵したヨーグルトの免疫賦活効果について、マウスへの経口投与による NK (ナチュラル・キラー) 活性増強効果、健常高齢者における風邪症候群への罹患リスク低減効果等について紹介する。

2. *In vitro* における EPS の IFN- $\gamma$   
産生誘導活性

1073R-1 乳酸菌が産生する EPS を分離・精製し、*in vitro* における IFN- $\gamma$  産生誘導活性について評価を行った。IFN- $\gamma$  は活性化した NK 細胞や T 細胞から産生されるサイトカインであり、種々の免疫細胞の活性化作用や、抗ウイルス作用などが知られている。まず、1073R-1 乳酸菌の培養物から遠心分離により菌体等を除去し、エタノール沈澱により EPS 粗精製物を得た。そ

の後、陰イオン交換樹脂 DEAE-Sepharose を用いてリン酸基を持つ酸性 EPS と持たない中性 EPS を分離した。得られた酸性 EPS, 中性 EPS はそれぞれ C3H/HeJ マウスの脾臓細胞に *in vitro* で 72 時間作用させ、培養上清中の IFN- $\gamma$  濃度を ELISA 法を用いて測定した。その結果、酸性 EPS にのみ IFN- $\gamma$  濃度の有意な上昇がみられた<sup>3)</sup> (図 1)。

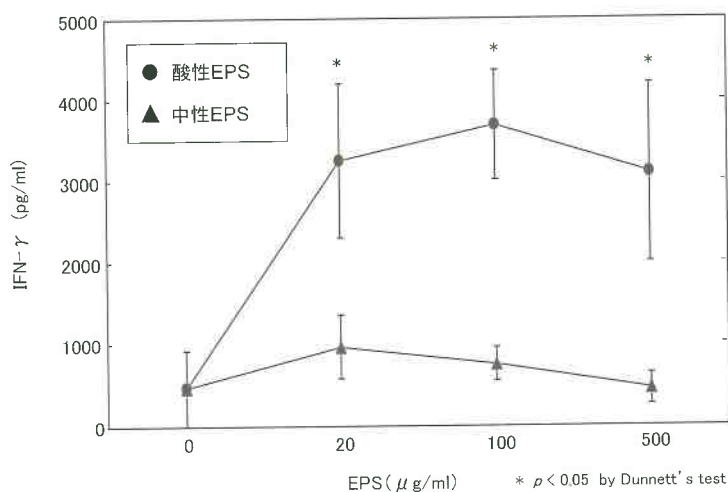


図 1 1073R-1EPS の IFN- $\gamma$  産生誘導活性

### 3. マウスへの経口投与による NK 活性増強効果

*In vitro* においてマウス脾臓細胞に対する IFN- $\gamma$  産生誘導活性が確認された酸性 EPS を BALB/c マウスに 3 週間経口投与し、脾臓細胞の NK 活性についてフローサイトメーターを用いて評価を行った。その結果、30mg/kg の投与量において有意な NK 活性の上昇が認められた (図 2)。次に、1073R-1 乳酸菌を使用したヨーグルトについても BALB/c マウスに 4 週間経口投与することで脾臓細胞の NK 活性について評価を行った。1073R-1 乳酸菌を使用したヨーグルトは 1073R-1 乳酸菌と *S. thermophilus* OLS3059 を用いて発酵を行い、その凍結乾燥物を 200 mg/body の投与量で経口投与を行った。その結果、1073R-1 乳酸菌を使用したヨーグルトを投与した群では蒸留水投与群に比べて NK 活性の有意な上昇が認められた (図 2)。一方、未発酵乳投与群と対照ヨーグルト投与群では NK 活性の有意な上昇は認められなかった<sup>3)</sup>。なお、対照ヨーグルトの発酵には 1073R-1 EPS を産生しないブルガリア菌とサーモフィラス菌を用いた。

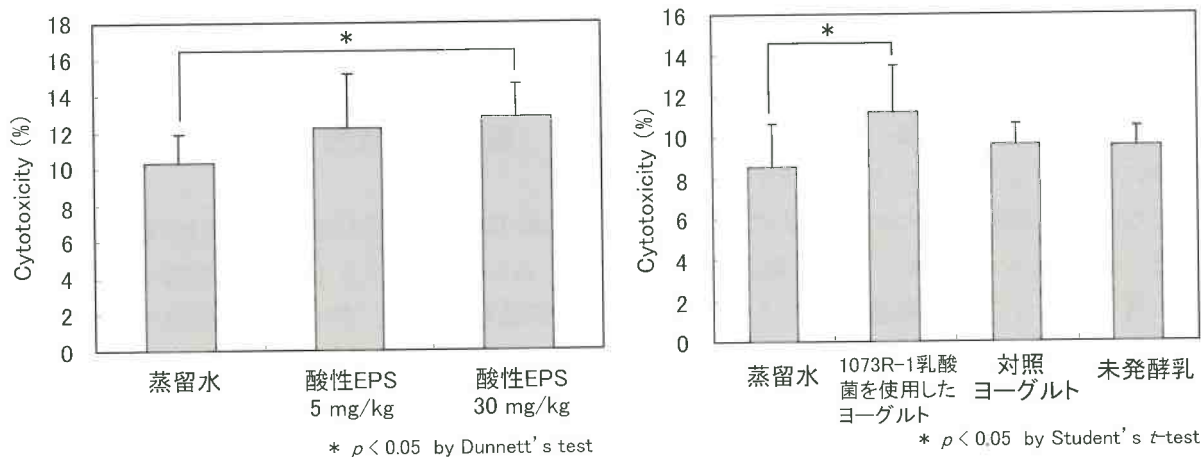


図 2 1073R-1EPS および 1073R-1 乳酸菌を使用したヨーグルトの NK 活性増強効果



#### 4. 1073R-1 乳酸菌を使用したヨーグルトの健常高齢者における免疫賦活効果

1073R-1 乳酸菌を使用したヨーグルトの摂取がヒトの免疫機能に与える影響を評価するために、健常高齢者を対象とした 1073R-1 乳酸菌を使用したヨーグルトの長期摂取試験を山形県舟形町（2005 年 3 月～5 月）、佐賀県有田町（2006 年 11 月～2007 年 2 月）で実施した。

##### 4-1. 山形県舟形町での臨床試験

山形県舟形町に在住する 70～80 歳の健常高齢者を対象に試験を実施した。被験者 57 名を年齢、性別に偏りがないう、無作為に 1073R-1 乳酸菌を使用したヨーグルト摂取群 29 名と牛乳摂取群 28 名の 2 群に分けた。各群ともに摂取期間は 8 週間とし、ヨーグルトは 90 g を、牛乳は 100 ml を 1 日 1 回任意の時間に摂取した。そ

の間、摂取前、摂取 8 週間後の 2 回、問診、アンケート調査、採血を行い、各指標を測定した。その結果、1073R-1 乳酸菌を使用したヨーグルトを摂取した群、牛乳摂取群ともに T 細胞増殖能（ConA 刺激リンパ球幼若化反応）は、摂取前後で有意に上昇した。また、その上昇の程度は、ヨーグルト摂取群が牛乳摂取群と比べて有意に高かった。NK 活性については両群共に是正効果が見られた。すなわち、被験者を摂取前の NK 活性で低値群、正常値群、高値群に層別化した場合、低値群では正常値へと上昇し、高値群は正常値へと変化した（図 3）。特にヨーグルト摂取群では低値群で正常値へと有意に上昇し、全体としての是正効果についても牛乳摂取群に比べて強かった。アンケート調査による風邪・インフルエンザ罹患状況は、ヨーグルト摂取群が 29 人中 3 人であったのに対し、牛乳摂取群は 28 人中 8 人であった。しかし、罹患リスクについては、両群に有意な差は認められなかつ

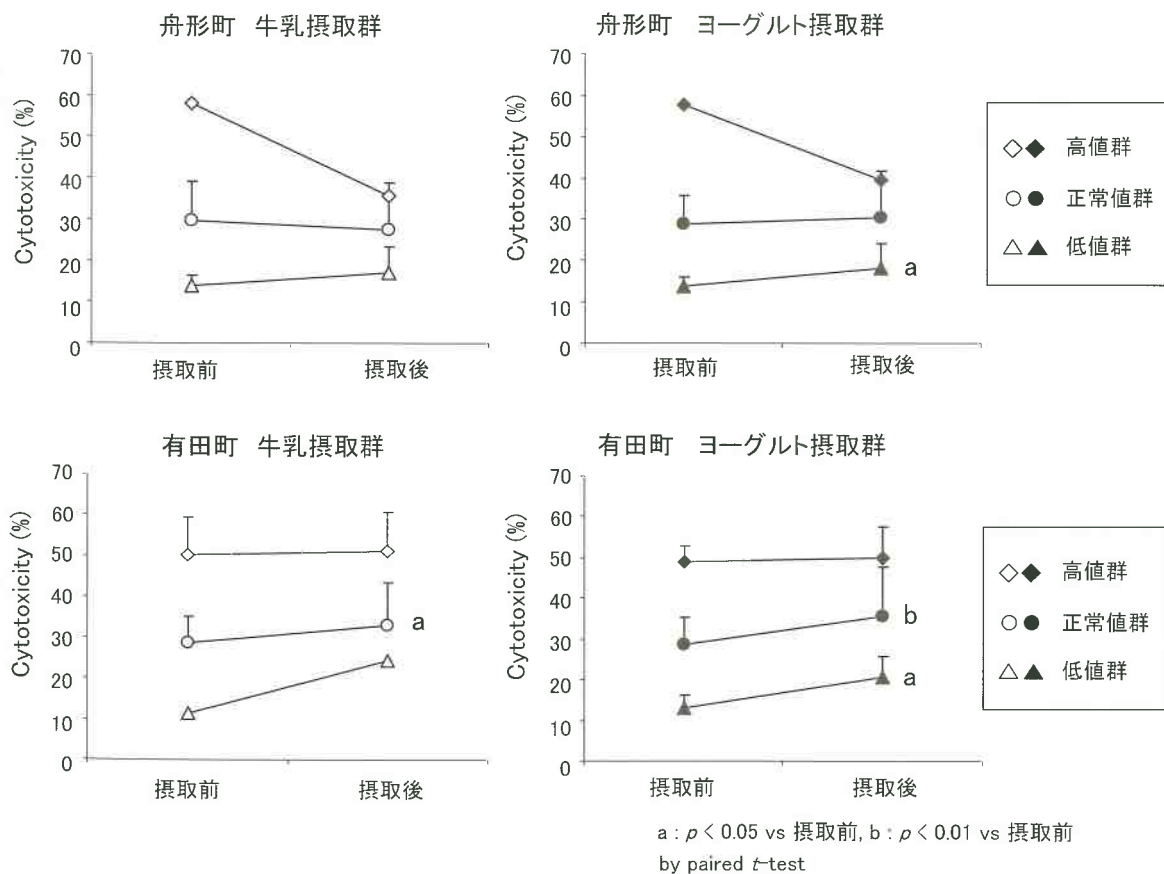


図 3 牛乳、1073R-1 乳酸菌を使用したヨーグルトの摂取前後での NK 活性の是正効果

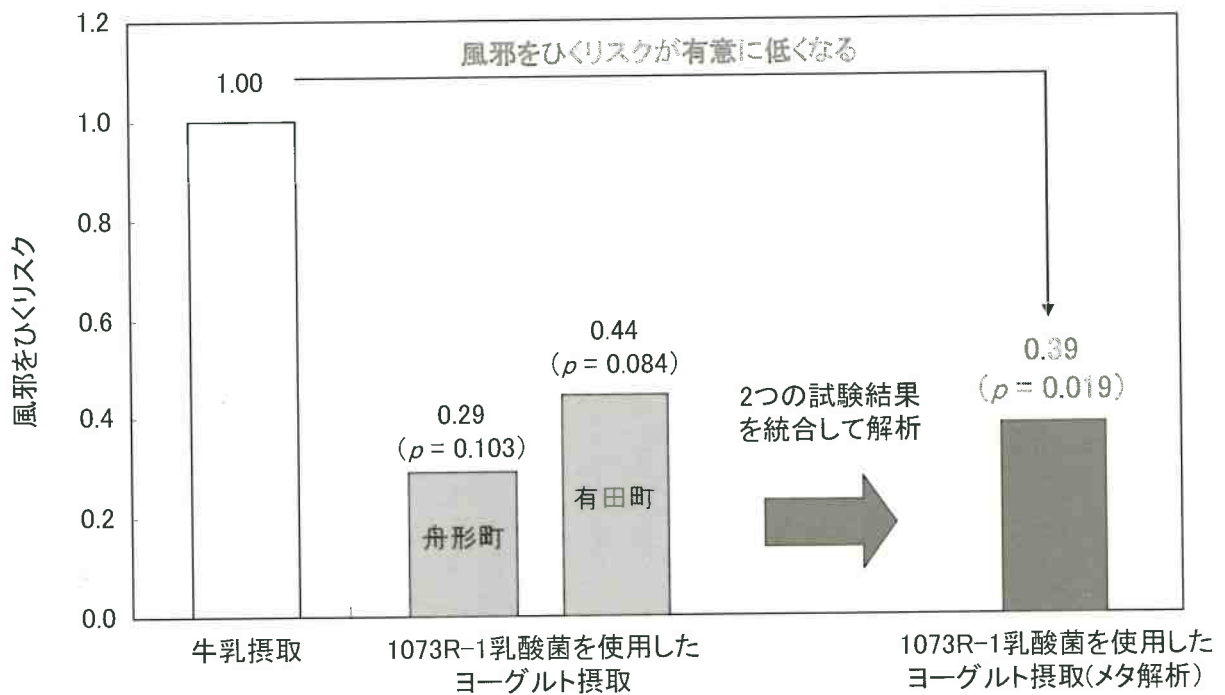
た ( $p = 0.103$ ) (図4)<sup>4)</sup>。

#### 4-2. 佐賀県有田町での臨床試験

佐賀県有田町在住の60歳以上の健常高齢者85名を対象に山形県舟形町での試験と同様の摂取試験を実施し、各種免疫マーカーの動き、風邪症候群の罹患状況、QOL (Quality of Life) の改善効果について評価を行った。1073R-1乳酸菌を使用したヨーグルト摂取群43名、牛乳摂取群42名に分け、摂取期間は12週間とした。その結果、両群共にNK活性、T細胞増殖能は摂取前後で有意に上昇した。NK活性についてはヨーグルト摂取群、牛乳摂取群ともに正常値群において有意な上昇が見られた(図3)。また、ヨーグルト摂取群では低値群についても有意な上昇が認められた。しかし、牛乳摂取群の低値群は2名であり統計学的解析は不可能であった。風邪症候群の罹患リスクについては牛乳摂取群と比べて、1073R-1乳酸菌を使用したヨーグルトを摂取した群では約半分に低下した(OR 0.44,  $p = 0.084$ , Fisher's Exact 検定) (図4)。

#### 4-3. 2つの臨床試験結果のメタ解析

有田町での試験では、1073R-1乳酸菌を使用したヨーグルトの摂取により風邪症候群への罹患リスクが牛乳摂取に比べて低下する傾向がみられた ( $p = 0.084$ )。一方、舟形町での試験では有意な差は認められなかった ( $p = 0.103$ )。そこで、これら2回の試験結果を統合して解析(メタ解析)を行った。その結果、1073R-1乳酸菌を使用したヨーグルトを摂取した群では牛乳摂取群に比べて風邪・インフルエンザ等の風邪症候群への罹患リスクが有意に低下することが明らかとなった (OR 0.39,  $p = 0.019$ , 図4)<sup>4)</sup>。また、1073R-1乳酸菌を使用したヨーグルトを摂取した群では摂取前後におけるNK活性の上昇の程度が牛乳摂取群に比べて有意に高かった ( $p = 0.028$ )。



検定方法: Fisher's exact test, メタ解析: Mantel-Haenszel method.

図4 1073R-1乳酸菌を使用したヨーグルトの風邪症候群への罹患リスク低減効果

## 5. おわりに

EPSを産生する1073R-1乳酸菌を活用したヨーグルトは、健常高齢者における風邪症候群への罹患リスクの低減効果を発揮することが明らかとなった。また、NK活性の摂取前後での比較では、摂取前にNK活性が低値であった集団において1073R-1乳酸菌を使用したヨーグルトを摂取した群での上昇が顕著であった。NK活性は自然免疫において中心的な役割を担っており、ウイルス感染防御、がん細胞の増殖抑制に関与している。したがって、風邪症候群への罹患リスクの低減についてもNK活性が関わっている可能性が示唆される。さらに、マウスを用いた実験結果から1073R-1乳酸菌を使用したヨーグルトの免疫賦活効果には1073R-1乳酸菌が産生するEPSの関与が示唆された。

今後、我が国では、急速に進行する高齢化に対応するため、ますます高齢者の健康維持増進を図る必要がある。また、新型インフルエンザウイルスの流行が現実のものとなった今、国民の免疫力の向上も重要な課題である。これまで、ヨーグルトの主な効用は整腸作用とされてきた

が、免疫機能に与える影響についても解明されつつある。もちろん腸内細菌叢の正常化、腸内腐敗産物の低減による腸内環境の改善が免疫機能に良い影響を与えることは想像に難くない。しかし、今回紹介した1073R-1乳酸菌を使用したヨーグルトには、EPSという直接的に免疫機能を高める成分が含まれており、加齢による免疫機能の低下を緩和する可能性が秘められている。食を楽しむことは高齢者にとっても大きな喜びであり、手軽に毎日摂取できる食品により、免疫力の向上を図り、風邪やインフルエンザなどへの罹患リスクを低減できれば、人々の健康長寿に少なからず寄与できるものと考えられる。

## 参考文献

- 1) Kitazawa, H. et al. (1998), *Int. J. Food Microbiol.*, 40, 169-175
- 2) Nishimura-Uemura, J. et al. (2003), *Food Microbiol.*, 20, 267-273
- 3) Makino, S. et al. (2006), *J. Dairy Sci.*, 89, 2873-2881
- 4) Makino, S. et al. (2010), *Br. J. Nutr.*, in press

## ◀ 総説関連 ▶

GABA 高含有チーズを安定生産する手法を開発  
～GABA 生成力が強い乳酸菌を含むチーズ発酵種菌～

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究所

野村 将

$\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) は、血圧降下作用などの機能性が注目されている食品成分である。GABA を高含有するチーズを製造するため、チーズ製造に利用される乳酸菌から GABA 高生産株を探索し、チーズ熟成中の GABA 生成条件を明らかにした。分離株を利用して GABA 生成能を発揮する乳酸発酵スターターを開発し、GABA を多く含むチーズを安定して製造することを可能にした。

## 1. はじめに

$\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) は、グルタミン酸の  $\alpha$  位のカルボキシル基が酵素反応により脱炭酸されて生成するアミノ酸の一種である。動物、植物、微生物に広く存在し、動物においては、中枢神経系の抑制性神経伝達物質として機能している。

ヨーグルトや漬け物などの発酵食品には乳酸菌が関与しているものが多いが、乳酸菌は生育に伴って乳酸を生成して周辺の pH を低下させ、自ら作り出した酸性環境の中で活性を失い死滅してしまう。そのため、酸性環境に対応し生残性を改善するための低 pH 耐性機構を備えており、その一つが GABA 生成反応である。細菌が低 pH 環境に曝され、菌体内 pH が低下すると、細胞内でグルタミン酸脱炭酸酵素の発現が誘導され、GABA 生成活性が高まる。GABA 生成反応は水素イオンを消費して炭酸を生成するので、反応が進むことによって菌体内の pH 低下が抑制され、菌の生残性が改善される。なお、細菌のグルタミン酸脱炭酸酵素は、pH4.5-5.0 の間でよく作用する。

近年、GABA を含む食品を摂取することによって血圧降下作用を期待できることが分かって

NOMURA Masaru

〒305-0901 茨城県つくば市池の台 2

きた。ほかにも、抗ストレス作用、鎮静作用などについて研究が行われており、機能性が期待される食品成分の一つとして注目を集めている。

## 2. GABA を含む食品

お茶、発芽玄米、チョコレート、発酵乳など GABA 含有を謳う食品が増えてきている。農産物はもともと GABA を含んでいるものも多いが、GABA 含有量が高い品種を探索したり、加工処理によりさらに GABA 含量を高めたりする工夫がなされている。例えば、植物の種子が発芽する際に GABA 生成力が高まる現象を利用して発芽玄米の GABA 含量を高めているし、あるいは、嫌気発酵により GABA 含量を高めた茶葉が開発されている。乳酸菌が関わる食品の場合、GABA 生成力が強い乳酸菌株の探索と利用が行われている。

## 3. GABA 生成菌の分離と性質

チーズやヨーグルトなどの発酵乳製品は、乳に乳酸菌が増殖して乳酸発酵する現象を利用して製造される。ほとんどの場合、発酵をコントロールして製品の品質を安定させるため、乳酸菌の種菌を原料乳に接種しているが、乳酸発酵をスタートさせるこの種菌をスターターという。



チーズ製造のスターターはチーズスターターと呼ばれ、いくつかの菌株が混在するミックススターターを用いることが多い。

市販されているチーズのアミノ酸含量を測ると、GABA はほとんど含まれていない。しかし、一般によく使用されているチーズスターター数種類を脱脂乳培地に接種し、数日培養した後に培地中のアミノ酸を調べたところ、スターターによっては GABA を生成していた。そこで、GABA 生成を示すスターターを寒天平板培地上で培養し、生育したコロニーそれぞれについて GABA 生成試験を行ったところ、分離株の約半数は GABA を生成した。最も強い GABA 生成能力を示した株は、チーズや発酵バターに乳製品らしい風味を与える *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* と同定され、01-7 株と命名された。

チーズスターターは GABA 生成能を示すのに、チーズには GABA が含まれていないのはなぜだろうか。この疑問を解決するために *L. lactis* の GABA 生成活性（グルタミン酸脱炭酸酵素活性）に及ぼす pH の影響を調べた。この酵素の作用最適 pH は 4.7 を示し、pH5.0 ではよく作用するが、pH5.5 ではほとんど作用しなかった。市販チーズの多くは pH5.3-5.5 程度であり、スターターの GABA 生成酵素が効率よく作用できない条件であるため、GABA が生成しないのだろう。

#### 4. GABA 含有チーズの製造

GABA 生成力の強い 01-7 株をチーズスターターに用い、チーズの pH が GABA 生成に適した pH5.2 以下になるよう製造条件を調整することで、100g 当たり 100-200mg の GABA を含むチーズを製造することができた。また、01-7 株をスターターではなく、GABA 生成のための酵素剤として利用するために、グルタミン酸脱炭酸酵素活性を保持した殺菌菌体を調製する処理条件を調べた。その結果、pH6.0 のリン酸緩衝液に懸濁した培養菌体を、37, 45, 55, 63°C に段

階的に温度を上昇させながら各 30 分加温したときに、GABA 生成活性が高い殺菌菌体が得られた（表 1）。この菌体を製造時に原料乳に添加すると、チーズ熟成中に GABA を生成させることができた。

表 1 各種処理した 01-7 菌体のグルタミン酸脱炭酸酵素活性

菌体処理	相対活性* (%)
凍結乾燥	100
63°C, 30 分加温**	42
37, 45, 55, 63°C, 各 30 分加温**	199

\* 凍結乾燥菌体で得られた数値を 100 とした

\*\* pH6.0

細菌の作用で食品の GABA 含量を高めるには、次の 3 つの条件が必要である。①利用する細菌の安全性が確認されている、②基質となるグルタミン酸が供給される、③pH が 4.5-5.0 程度である。上述の 01-7 株は、チーズスターターから分離した株なので、ヒトによる食経験が豊富にあり、安全性は高いと考えられる。また、グルタミン酸はチーズの主要なタンパク質であるカゼインに多く含まれているアミノ酸であり、熟成の進行とともに遊離して供給される。ところが、一般的なチーズの pH は GABA 生成に不適な pH5.3-5.5 である。そのため、GABA 含量を高めるためには、通常よりも pH が低くなるように製造する必要がある。しかし、あまり低い pH では、チーズの食感が硬くボロボロになり、食味が損なわれてしまうので注意が必要である。

#### 5. GABA を安定生成する乳酸菌混合 チーズスターター

乳製品に特徴を付けるには、その特徴を付与する乳酸菌をスターターとして原料乳に接種する。しかし、スターターを何種類も接種する方法は、製造ロットによって品質のばらつきが出やすく、また種菌の維持管理する労力も大きくなる。そこで、必要な性質を持つ菌株を混合し、

1 種類のミックススターターとして維持できれば、常に一定の性質を発揮することが期待できる。ところが、ミックススターターは継代培養を繰り返すと、次第に構成菌株の比率が変化し、期待している能力を充分発揮できなくなってしまう場合がある。菌株間の相互作用は未だ不明な点が多く、菌叢を人為的に制御することは困難であり、菌株の相性が良ければ安定した菌叢が得られ、良くなければ菌叢は崩れ、最終

的に一菌種のみになってしまうこともたびたびある。

チーズスターター菌から分離した GABA 生成力が強い *L. lactis* 01-7 株は、牛乳を発酵する力が弱いという弱点があり、チーズスターターとして牛乳に接種する際には、乳酸生成力が強いスターターと混合接種する必要がある。そこで、私たちは GABA 生成力が強い株および乳酸生成力が強い株 2 株の計 3 株を混合し、週 1 回の

継代培養を繰り返して菌叢の変化を追跡した。すると、この混合培養物は 2 回継代以降に 3 株の存在比率が安定した (図 1)。安定存在比率に達した本乳酸発酵スターターを用いてチーズを作ると、GABA 含量が高く風味が良いチーズを安定して製造できた (表 2, 図 2)。チーズに GABA 生成の基質としてグルタミン酸ナトリウムを添加すると、さらに GABA 含量を高めることができる。

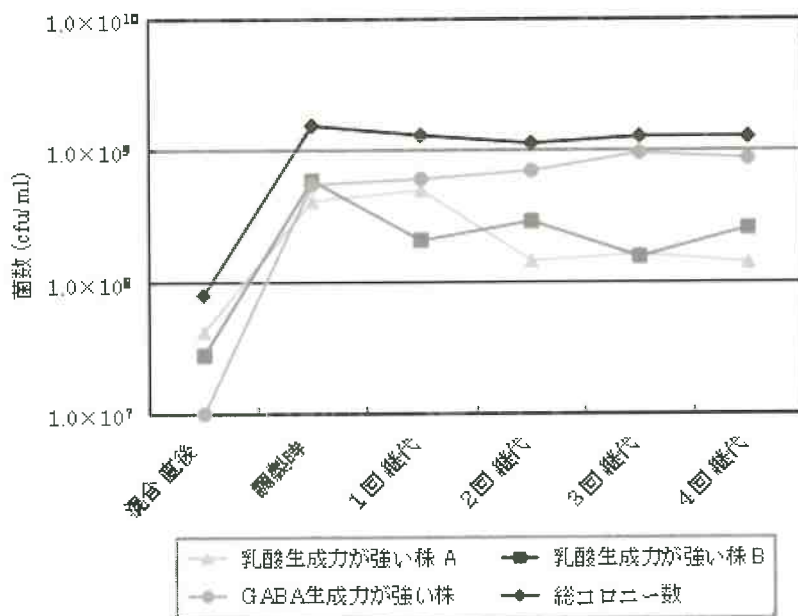


図 1 混合スターター中の 3 菌株の生菌数

表 2 本チーズスターターを用いたチーズの GABA 含量

	GABA (mg/100g)
本チーズスターター	
Glu 1.0%添加*	113
Glu 無添加	26
市販チーズ	
ゴーダ	18
チェダー	5
エダム	0
エメンタール	0
カマンベール	0

\* グルタミン酸ナトリウム (Glu) を GABA 生成の基質として加塩時にチーズに添加



図2 3株混合スターターを用いたチーズ

## 6. おわりに

本チーズスターターは、各チーズ製造場で前培養して菌の活性を高めて原料乳に接種するという伝統的製法で用いる必要がある。伝統的製法は、滅菌器や無菌室等の細菌培養設備と作業者の細菌取扱いの技能を必要とする。現在のチーズ製造は、凍結乾燥した粉末状のチーズスターターを原料乳に直接接種する方法が主流なので、本チーズスターターも取扱いの簡単な凍結乾燥粉末が提供できるよう、さらに研究開発を進めたい。なお、チーズスターターの GABA 生成能は熟成型チーズを製造した場合のみ発揮され、非熟成型のフレッシュチーズでは GABA は生成しない。

## ◀ 国内情報 ▶

## バイオディーゼル燃料のトラクタへの利用

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構  
生物系特定産業技術研究支援センター \*現農林水産省

清水一史・千葉大基\*・杉浦泰郎・高橋弘行・積栄・手島司・原野道生

生研センターにおいて、FAME をトラクタに供試した場合の出力、燃費、排出ガスなどを調査した結果、FAME は、軽油と比べて、単位質量あたりのエネルギー量が少ないため、一定の仕事をするために必要な燃料の質量は多くなる。また、残留メタノールが多いと、メタノールの気化により出力低下が起こり、ロータリ耕うんなど高負荷作業では、通常の作業を行えない可能性があることなどが明らかとなった。

## 1. はじめに

再生可能エネルギーであるバイオマス燃料は、大気汚染防止や廃棄物削減、石油燃料の消費削減の観点から注目されている。その中で、バイオディーゼル燃料は、トラクタなどディーゼルエンジンを搭載する多くの農業機械への利活用が期待される。

日本国内では、主に家庭や食品加工業者等から排出される廃食油などの油脂（トリグリセリド）を原料に、KOH や NaOH などアルカリ触媒を利用するアルカリ触媒法により得られる脂肪酸メチルエステル（Fatty Acid Methyl Ester：以下、FAME）がバイオディーゼル燃料として製造されている。

平成 21 年 2 月 25 日には、安全、安心なバイオ混合燃料の確保、普及を目的に改正された「揮発油等の品質の確保等に関する法律」が施行され、品質規格に適合した FAME 5 質量%混合までの軽油（以下、品確法軽油）を、公道走行する自動車用の燃料として販売又は自ら消費できるとしている。

国内農業機械メーカー等においても、品確法  
SHIMIZU Kazufumi, CHIBA Masamoto, SUGIURA  
Yasuro, TAKAHASHI Hiroyuki, SEKI Ei, TESHIMA  
Tsukasa, HARANO Michio  
〒331-8537 さいたま市北区日進町 1 丁目 40-2

軽油の使用を保証しているが、自己責任での使用となるバイオディーゼル燃料 100%では、出力や燃費、排出ガス等の性能を公表しておらず、点検・整備方法等も確立されていない。

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構生物系特定産業技術研究支援センターでは、トラクタ等ディーゼルエンジン搭載の農業機械へ FAME を使用した場合の指針を示すため、FAME 使用時の出力、燃費、排出ガス等の調査を行ってきたので、その結果概要について報告する。

## 2. FAME の燃料性状

FAME 6 種類の燃料性状を調べたところ、JIS 2 号軽油（以下「軽油」）と比べて、低位発熱量（単位質量あたりのエネルギー量）が少ない、密度や流動点が高い、酸素分を含むなどの特徴があり、水分、メタノール分、トリグリセリド等のグリセリド類が残留するなど、性状は様々であった（表 1）。また、FAME 製造の際、メタノールが使用されるが、残留メタノール分が多い FAME ほど引火点が下がり、燃料を取扱う上で危険性が増す。更に品確法軽油に対し、質量分率で 5%を超えない範囲で混合して用いる FAME の要求品質を規定するために作成された日本工業規格 JIS K2390「自動車燃料—混合用脂肪酸メチルエステル（FAME）」の品質基準値と比



表1 軽油及びFAMEの主な性状

項目	単位	軽油	製造所A	製造所B	製造所C	製造所D	製造所E	製造所F
密度(15°C)	g/cm <sup>3</sup>	0.8271	0.8880	0.8864	0.8868	0.8834	0.8861	0.8910
引火点	°C	72	168	67	163	41	27	173
動粘度(40°C)	mm <sup>2</sup> /s	3.304	5.123	4.601	4.449	4.314	4.660	6.008
流動点	°C	-15.0	-7.5	-2.5	-5.0	-7.5	-2.5	-2.5
水分	ppm	28	907	283	613	561	348	1200
灰分	質量%	0.01 未満	0.01 未満	0.01 未満	0.01 未満	0.01	0.01	0.01
硫黄分	ppm	5	6	8	4	3	2	2
セタン指数		64.9	54.8	55.3	55.0	56.4	55.5	53.7
10%残留炭素分	質量%	0.01	0.61	0.80	0.72	0.48	1.15	3.27
酸価		-	0.30	0.71	0.80	0.13	0.12	0.28
低位発熱量	kJ/kg	43030	38010	37970	38550	38800	38300	38180
メタノール分	質量%	-	0.04	0.79	0.16	1.30	1.59	0.01 未満
目詰まり点	°C	-13	-8	-4	-6	-7	-5	-6
ヨウ素価		-	117	121	127	116	119	115
酸化安定度	h	-	1.4	0.5	3.9	2.0	5.2	0.0
汚染度	mg/kg	4.9	5.4	17.9	2.7	45.6	71.7	41.0
酸素分	質量%	0.5 未満	10.4	9.8	10.5	11.0	11.2	10.8
炭素分	質量%	86.1	77.1	77.0	77.1	76.8	76.5	77.1
遊離グリセリン	質量%	-	0.00	0.03	0.01	0.02	0.00	0.00
モノグリセリド	質量%	-	0.95	1.04	1.58	0.43	0.75	0.76
ジグリセリド	質量%	-	0.88	0.45	0.46	0.16	0.96	1.43
トリグリセリド	質量%	-	5.52	1.90	0.70	0.75	2.42	16.73
総グリセリン	質量%	-	0.94	0.55	0.55	0.23	0.58	2.12
蟻酸	mg/L	-	9	3	2	3	5	3
酢酸	mg/L	-	4	2	2	1	4	3
プロピオン酸	mg/L	-	2	1	2	1 未満	1	4
総FAME	質量%	-	89.50	92.17	95.04	97.00	92.28	80.97
リノレン酸ME	質量%	-	6.41	6.33	8.10	7.18	6.05	5.12

較すると、基準に適合しない項目が多く、特に10%残油の残留炭素分、トリグリセリドでは、全ての燃料が基準値を大幅に超え、調査したFAMEは、軽油規格に適合しないことが明らかとなった。

### 3. FAME 使用時のトラクタ性能

表1のFAME3種類(製造所A、製造所B、製造所C)をそのまま、あるいは軽油と混合して、3気筒副室式エンジン(22.1kW/2500rpm, 1.498L)に供試し、新型自動車試験方法に記載されるTRIAS24-8-2003「ディーゼル特殊自動車8モード排出ガス試験方法」(以下、D8法)により試験を行った。測定項目は、エンジン軸トルク、エンジン回転速度、燃料消費量、各部温

度、一酸化炭素 (CO), 炭化水素 (HC), 窒素酸化物 (NO<sub>x</sub>), 粒子状物質 (PM), 黒煙濃度等とした。なお, FAME と軽油との容積混合割合を① FAME100%, ② FAME50%+軽油 50%, ③ FAME25%+軽油 75%, ④軽油 100%とした。

その結果, 燃料の種類や混合割合に係わらずエンジン出力については軽油と同程度であった。また, 一定の仕事をするために必要な燃料の質量いわゆる燃料消費率については, 軽油と比べて低位発熱量が少ないバイオディーゼル燃料の混合割合が高いほど上昇した。

ディーゼルエンジンの排出ガスで特に問題となる NO<sub>x</sub> と PM の平均排出率を見ると, NO<sub>x</sub> につ

いては燃料の種類や混合割合の条件に関わらず軽油と同程度であり, PM については, バイオディーゼル燃料の混合割合が高いほど, すず成分の生成が抑制されることにより, 平均排出率が減少した (図1)。

#### 4. 残留メタノールの多い FAME でのトラクタ性能

残留メタノール分の異なる表1の FAME 2種類 (製造所A, 製造所D) と軽油をそのまま3気筒副室式エンジン (22.1kW/2500rpm, 1.498L)

に供試し, 新型自動車試験方法に記載される TRIAS3-5-2003「原動機車載出力試験方法」により, エンジン軸トルク, エンジン回転速度, 燃料消費量等を測定した。

その結果, 残留メタノールの少ない FAME (メタノール分 0.04 質量%) に比べ, 残留メタノールの多い FAME (メタノール分 1.30 質量%) では, 特に定格回

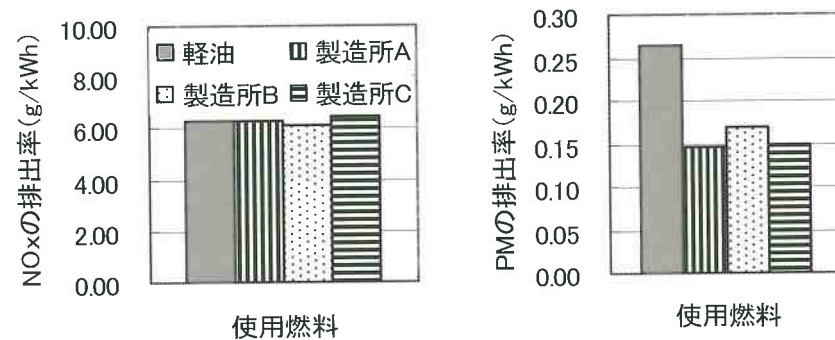


図1 NO<sub>x</sub>とPMの平均排出率 (FAME100%時)

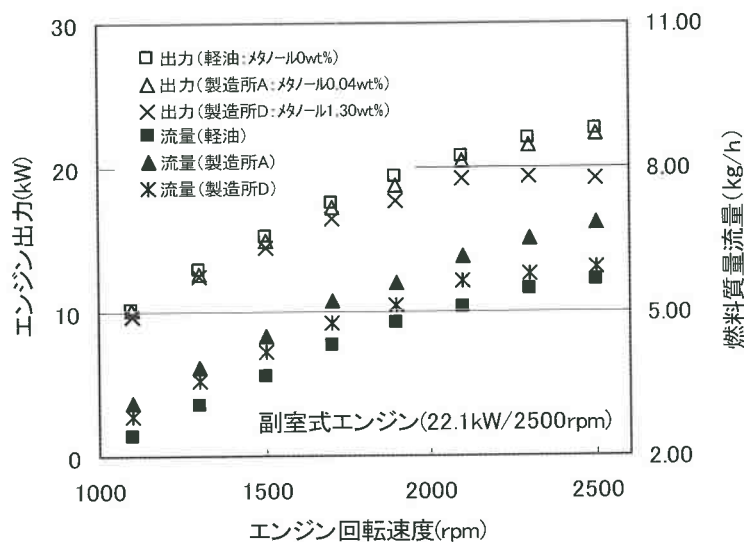


図2 残留メタノール分の異なる FAME によるエンジン出力と燃料質量流量

転速度付近で燃料質量流量が 13.2%低下し, エンジン出力が 14.3%低下した (図2)。これは, 噴射される燃料中に酸化したメタノール (沸点:64.7℃) が混入し, 本来の燃料噴射量が確保できなくなったためと考えられた。

このため, ロータリ耕うんなど高負荷作業では, 速度が低下, 変動し, 通常の作業が行えない可能性があることが考えられる。これらを改善するためには, FAME 製造工程の中で, 残留メタノールを徹底的に除去することが必要となる。

## 5. 未反応トリグリセリドの多いFAMEによる長時間運転時のトラクタ性能と部品への影響

同一製造所の未反応トリグリセリドの多いFAME(トリグリセリド分1.18~8.56質量%)をそのまま3気筒副室式エンジン(22.1kW/2800rpm, 1.498L:平成15年排出ガス規制適合)搭載新車トラクタに供試し、D8法のエンジン回転速度及び負荷率をもとに作成した運転パターン(1サイクル1時間)により700時間運転を行った。また、運転の開始前及び運転50時間毎に、PTO出力、燃料消費量、CO、黒煙濃度等を測定した。また、200時間毎にエンジンオイル劣化の調査を行った。なお、運転にあたっては、トラクタメーカーの取扱説明書に従って点検・整備を実施した。

その結果、400時間経過時点まで性能変化は見られなかったものの、400時間以降、黒煙濃度、CO濃度が大幅に増加、また、徐々に出力の低下、燃料消費率の上昇も見られるようになり、運転開始前と比べて、700時間時点のPTO出力は、0.4~1.2kW低下し、燃料消費率は、7~23g/kWh上昇した。これは、通常の軽油を長時間使用することでも起こり得るバルブシートの摩耗に伴う排気弁クリアランスの減少によるものと考えられた。

各部品への影響については、機能的に問題ないもののインジェクションポンプのプランジャーにFAMEが原因と見られる渋り(固着)が確認された。更に、噴射ノズルのデリバリスプリング等に錆、ピストンの燃焼室やシリンダヘッドに軽油での燃焼では見られない酸化鉄の付着が見られたが、FAMEとの因果関係は不明であった。

## 6. おわりに

表1に示すとおり、FAMEの燃料性状は、様々である。その原因として、①地域の家庭や飲食店その他様々なところから原料油脂の調達をしなければならぬため、原料油脂の種類(把握)が困難なこと。②FAME変換にあたって、前処理工程やグリセリンの除去、変換工程の管理など、製造団体によってバラツキがあること。などが考えられる。

トラクタ等へのFAME使用にあたっては、その燃料性状により、性能、部品等への影響が異なることが考えられ、留意が必要である。

## 参考文献

- 1) 生研センター(2007.3),平成18年度事業報告,154~155
- 2) 生研センター(2008.3),平成19年度事業報告,154~155
- 3) 生研センター(2009.3),平成20年度事業報告,142~143
- 4) 生研センター(2010.3),平成21年度事業報告,164~167
- 5) 社団法人日本農業機械工業会(2008.3),農業機械におけるバイオ燃料の利用促進に向けた取組手法の調査・分析に関する調査報告書

## ◀ 文献情報 ▶

## 部分的な不妊化处理ニワトリ胚への始原生殖細胞の移植による生殖細胞の置換

Germline Replacement by Transfer of Primordial Germ Cells into Partially Sterilized Embryos in the Chicken.

Y. Nakamura<sup>1,2)</sup>, F. Usui<sup>1)</sup>, T. Ono<sup>1)</sup>, K. Takeda<sup>2)</sup>, K. Nirasawa<sup>2)</sup>, H. Kagami<sup>1)</sup> and T. Tagami<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Faculty of Agriculture, Shinshu University, Nagano, Japan. <sup>2)</sup>National Institute of Livestock and Grassland Science, Tsukuba, Japan.

*BIOLOGY OF REPRODUCTION*, 83, 130–137 (2010)

始原生殖細胞のレシピエント胚への移植により、これまでに生殖系列キメラの鳥類が作出されてきている。この方法は、遺伝子組換え鳥の作出や、卵子の長期保存が困難な希少な鳥類の保存のためにも、重要な手法である。しかしながら、生殖系列キメラによる遺伝子組換え鳥や希少な種類の鳥の作出効率はこれまで非常に低く、生殖系列キメラにおけるドナー始原生殖細胞由来産子の作出効率の向上が求められている。ドナー由来産子の比率は、レシピエント胚におけるドナーとレシピエント由来始原生殖細胞の比率により決定されている可能性があることから、レシピエント胚の内在性始原生殖細胞の除去がキメラ生殖巣のドナー由来始原生殖細胞の比率を高めるための重要な方法の一つであると考えられる。著者らは、これまでに busulfan の徐放性エマルジョンを用いて内在性始原生殖細胞を除去した生殖巣に、移植したドナー始原生殖細胞が定着可能であることを報告している (Reproduction, Fertility and Development, 20, 900–907, 2008)。本論文においては、研究をさらに進展させ、busulfan 処理により内在性始原生殖細胞を除去した胚へのドナー始原生殖細胞の移植により、ほぼ完全に生殖細胞を置換する方法について報告している。まず、培養前受

精卵の卵黄内への busulfan 徐放性エマルジョン注入試験により、6日間培養後のステージ 29 における生殖巣内の内在性生殖細胞の数をもっとも減少 (対照区の 0.6%) させるとともに、高い孵化率 (36.4%) が得られる busulfan 徐放性エマルジョンの最適量は 100  $\mu$ g であることを明らかにした。この条件で作出した部分的な不妊化胚への外来性始原生殖細胞の移植試験が行われ、6日齢胚生殖巣の組織免疫学的解析において、busulfan 処理胚におけるドナー始原生殖細胞の割合 (98.6%) は、対照区 (6.4%) に比べ有意に高くなることを明らかにした。また、交配試験の結果から、busulfan 処理ニワトリにおけるドナー始原生殖細胞由来後代作出率 (生殖系列細胞置換率: 99.5%) は対照区 (6.0%) に比べ有意に高くなることを明らかにした。さらに、キメラニワトリ 11羽中7羽においてはドナー細胞由来の後代のみが得られたことから、これら7羽の生殖巣からはドナー始原生殖細胞のみに由来する生殖細胞が生産されていたと考えられた。

鳥類においては受精卵・胚の凍結による長期保存は困難であり、遺伝資源保存のためにも始原生殖細胞の凍結保存が有望視されているが、保存した始原生殖細胞の有効活用のためには、始原生殖細胞を用いた効率的な生殖系列キメラ個体作出技術の開発が求められている。今回報告の技術は、ニワトリにおいてほぼ完全に生殖巣の生殖細胞をドナー始原生殖細胞由来生殖細胞に置換する技術であり、今後、ニワトリにおける生殖細胞の分化に関する研究、遺伝子改変個体の作出、遺伝資源の保存・再生のための強力なツールとして使用されるであろう。

(抄訳: 下司雅也, GESHI Masaya, 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究所)



## ◀ 文献情報 ▶

## アブラナ自家不和合性ではトランスに作用する低分子RNAが優劣性を決定する

*Trans-acting small RNA determines dominance relationships in Brassica self-incompatibility.*

Y. Tarutani<sup>1</sup>, H. shiba<sup>1</sup>, M Iwano<sup>1</sup>, T Kakizaki<sup>2</sup>, G. Suzuki<sup>3</sup>, M. Watanabe<sup>4</sup>, A. Isogai<sup>1</sup> and S. Takayama<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Graduate school of biological sciences, NAIST, Japan, <sup>2</sup>Faculty of Agriculture, Iwate Univ., Japan, <sup>3</sup>Division of natural science, Osaka kyoiku Univ., Japan, <sup>4</sup>Graduate school of life sciences, Tohoku Univ., Japan.

*Nature*, 2010, 466, 983-986

2倍体の生物において、2つの対立遺伝子(アレル)間の相互作用により優劣性が生じ、遺伝子発現を制御することによって最終的に片親由来の表現型のみが生じる場合がある。著者らは、アブラナ科植物の自家不和合性において見られる花粉側認識因子の優劣性に着目し、この優劣性機構がトランスに作用する低分子干渉RNA (siRNA) により制御されている事を明らかにした。

アブラナ科植物の自家不和合性は、多様に富んだ複対立遺伝子系を持つS遺伝子座に座乗する柱頭側因子SRK(S-locus receptor kinase)と花粉側因子SP11(S-locus protein 11)によって制御される事が知られている。著者らは以前の報告で、花粉側に見られる優劣性関係は、S遺伝子型ヘテロ接合体において優性のSP11のみが葯タペート細胞で発現することによって引き起こされる事を明らかにしていた。この単一アレル型のSP11発現は、劣性アレル側のSP11プロモーター領域がアレル特異的にメチル化されることによるものであった。これまで、DNAのメチル化による遺伝子発現抑制機構においては、メチル化領域と相同な配列を持つsiRNAが、重要な役割を持つことがあるという報告が成されている。

本論文ではSP11を含むゲノム領域の解析か

ら、優性SP11遺伝子座近傍ゲノム領域に劣性SP11プロモーター領域と相同性を持つ領域が存在することを明らかにした。この領域は不完全ではあるもののステム-ループ構造をとり、siRNAが作り出されることが予測されたことから、SP11-methylation-inducing region (SMI)と名付けられた。次に、花粉側優性植物体のsmall RNA libraryを劣性SP11アレルのメチル化領域をプローブとしてスクリーニングする事により、確かにこのSMIが存在する事を明らかにした。また、発現解析を行ったところ、SMI由来のtrans-acting small RNAが葯の発達中に特異的に発現していた。これらの結果から著者らは、優性SP11アレル近傍から発現するSMIが劣性SP11アレルのプロモーター領域のメチル化を誘導することで劣性SP11アレルの発現を抑制すると考え、この領域の形質転換実験を行った。花粉側優性を示すS<sub>9</sub>アレルのSMIを含むゲノム領域を劣性のS<sub>60</sub>ホモ個体に導入したところ、S<sub>9</sub>アレル由来SMIがS<sub>60</sub>-SP11のプロモーター領域のメチル化が増加し、S<sub>60</sub>-SP11発現が抑制され、そして形質転換体は自家不和合性となった。さらに、S<sub>60</sub>以外のS<sub>44</sub>, S<sub>40</sub>, S<sub>29</sub>ハプロタイプにおいても、同様な結果が得られたことから、SMIが自家不和合性の花粉側優劣性を制御することを明らかにした。

メンデル遺伝の優劣性関係において、これまでの報告のほぼすべては対立遺伝子間において、優性側；機能型、劣性側；機能喪失型となることによるものであった。しかし、今回の報告により優性側アレルの近傍に存在するsRNAがトランスに作用することにより、メンデル遺伝の優劣性関係を引き起こされるという新たな知見が得られた。

アブラナ科植物自家不和合性の優劣性関係において、今回の結果で説明できるのは、限られた組み合わせのヘテロ接合体の場合のみである。今後、複雑なS遺伝子座の優劣性関係についてさらなる研究が進められるものと考えられる。(抄訳：高田美信, TAKADA Yoshinobu, 東北大学大学院 生命科学研究科)



## ◀ 文献情報 ▶

***Lactococcus lactis* 生細胞中のペプチドグリカンのナノスケール構造の可視化**Imaging the nanoscale organization of peptidoglycan in living *Lactococcus lactis* cells

Guillaume Andre, Saulis Kulakauskas, Marie-Pierre Chapot-Chartier, Benjamine Navet, Marie Deghorain, Evis Bernard, Pascal Hols &amp; Yves F. Dufrene

*Nature communications*, 1:27 doi: 10.1038/ncomms 1027 (2010)

本論文では、原子間力顕微鏡を用いて生きた *Lactococcus lactis* のペプチドグリカンのナノスケール構造の可視化に成功した。

グラム陽性細菌では、厚いペプチドグリカン構造が細胞壁の主要な構成成分であり、細胞壁の外側に多糖構造を有することもある。細胞壁はβラクタム系やグリコペプチド系など様々な抗生物質の標的因子でもある。このように、細菌細胞壁の主な構成成分であるペプチドグリカンの空間的な構造は、微生物学において細菌の生理的現象を理解する上でとても重要な問題だが、これまで完全には解明されていなかった。これまで、グラム陰性細菌である *Escherichia coli* や *Caulobacter crescentus*、グラム陽性細菌の中でも桿菌である *Bacillus subtilis* の外側構造を分離する方法でペプチドグリカン構造が推定されてきたが、議論が尽きることはなかった。

近年、原子間力顕微鏡によるイメージング手法が確立され、微生物学において強力なツールとなっている。原子間力顕微鏡は、あらゆる物質の間に働く原子間力を利用するため容易に試料が観察できる装置で、現在では原子レベルの分解能が実現されている。

まず、原子間力顕微鏡を用いて *L. lactis* 野生株を観察した結果、表面構造はとて滑らかで特徴のないものであった。分裂中の細胞を観察

した結果、隔壁および隔壁からやや離れた位置に環状構造が見られた。この環状構造は *streptococci* でいわゆる”赤道環帯”と呼ばれているもので、細胞伸長の際に新しく合成されたペプチドグリカン領域の縁であると考えられた。

次に、細胞外多糖欠損株と同様に観察した結果、むき出しになったペプチドグリカンが全長約  $1\mu\text{m}$  の細胞の短軸方向に幅 25 nm の帯状に並行して走っていた。野生株と細胞外多糖欠損株を比較して観察することにより、ペプチドグリカン構造の解明に成功した。

さらに、細胞外多糖欠損株をフレンチプレスで破碎した小胞状のものを原子間力顕微鏡観察した結果、生細胞と同様なペプチドグリカン構造は見られなかった。これは、細胞の処理によってペプチドグリカン構造が壊れてしまったことが原因と考えられ、化学的・酵素的処理、固定化や標識をすることなく、生きたままの状態の細胞を直接観察することの重要性が強調された。

今後の展望としては、細胞外多糖合成酵素と協調的に働くタンパク質の欠損株や、細胞壁の合成を阻害するβラクタム系抗生物質を処理した菌体を用いて、同様に原子間力顕微鏡でペプチドグリカン構造を観察することなどが期待される。

本論文では、生きた *L. lactis* のペプチドグリカン構造を「見る」ことにより、ペプチドグリカンの構造におけるこれまでの論争に一つの結論をもたらした。「百聞は一見に如かず」というように、これは実際「見る」ことによって初めてわかることや深く納得できることがたくさんあるという事実を、我々に改めて教えてくれる論文である。

(抄訳: 柳原沙恵, YANAGIHARA Sae, カルピス株式会社 発酵応用研究所)

## 生研センターからのご案内

## アグリビジネス創出フェア開催のお知らせ

アグリビジネス創出フェアは、農林水産省主催による技術交流展示会です。

平成22年度においては、11月24日（水）から26日（金）までの3日間、幕張メッセにおいて、盛大に開催されることとなっており、生産者、産業界、研究者、行政部局等の関係者が一堂に会する機会は、技術シーズとニーズに関わる幅広い人・情報の交流を通じて、食と農林水産の未来を拓く新たな連携の芽が育つこととなるでしょう。

- 会 期 2010年11月24日（水）～26日（金）  
9：30～16：30
- 会 場 幕張メッセ6ホール
- 主 催 農林水産省
- 展示予定規模 200団体
- 予定来場者数 約40,000人

詳細につきましては、下記のホームページをご覧ください。

<http://agribiz-fair.jp/>

<お問い合わせ先>

アグリビジネス創出フェア2010事務局（株式会社フジヤ）

電話：03（5560）7731 FAX：03（5548）2838

E-mail：agribiz-ex@fujiya-net.co.jp

## 生研センターからのご案内

## 地域版アグリビジネス創出フェア等のお知らせ

平成22年10月から平成23年3月の期間に、下記の地域において地域版アグリビジネス創出フェア等の技術交流フェアが開催されます。

詳細については、ホームページ等で御案内させていただきます。

## 【北海道地域】

- 2010 アグリビジネス創出フェア in Hokkaido  
日時：平成22年12月3日(金)～4日(土)  
場所：サッポロファクトリー

## 【東北地域】

- 東北地域アグリビジネス創出フェア  
日時：平成23年3月2日(水)  
場所：仙台市情報・産業プラザ

## 【東海地域】

- アグリビジネスフェア 2010 in 東海  
日時：平成22年12月21日(火)～22日(水)  
場所：名古屋大学 野依記念学術交流館(1F・2F)

## 【近畿地域】

- 知財ビジネスマッチングフェア 2010  
日時：平成22年12月7日(火)  
場所：マイドームおおさか(3階)

## 【中国四国地域】

- 中国四国地域アグリビジネス創出フェア 2010  
日時：平成22年12月8日(水)  
場所：岡山コンベンションセンター

## 【九州地域】

- 食と農の技術交流会 in 九州 2010  
日時：平成22年10月28日(木)  
場所：福岡ファッションビル(8階)

## &lt;お問い合わせ先&gt;

生研センター 企画部 企画第1課

電話:03(3459)6565 FAX:03(3459)6566

E-mail:braink1@ml.affrc.go.jp

## 編集後記

141号をお届けします。本号では特集として「畜産生産物の機能と高品質化」を取り上げました。総説で有原圭三氏(北里大学)に牛乳および食肉の機能性食品への展開について、総説関連で河口友美氏(日本ハム(株))らに血管保護作用を有する鶏由来低分子コラーゲンペプチドの開発、府中英孝氏(丸大食品(株))らに親鶏由来の機能性リン脂質：スフィンゴミエリンの抗高脂血症及び抗高血糖効果、後藤英嗣氏(よつ葉乳業(株))らに乳脂肪球膜の摂取による肌質改善効果、池上秀二氏(明治乳業(株))らに1073R-1乳酸菌に免疫機能を活性化させる効果、野村将氏(畜産草地研究所)にGABA高含有チーズを安定生産する手法の開発について、それぞれご執筆戴きました。

その他の研究情報としては、清水一史氏(生研センター)らにバイオディーゼル燃料のトラクタへの利用についてご執筆戴きました。

また、本号の文献情報は、下司雅也氏(畜産草地研究所)、高田美信氏(東北大学)、柳原沙恵氏(カルピス(株))にご執筆戴きました。

ご多忙な中玉稿をお寄せ戴きました執筆者各位に深甚の謝意を申し上げます。(佐々木記)

## 本誌著作物の複写利用等について

本誌掲載の論文・記事の複写・転載等を希望される方は、執筆者ならびに生物系特定産業技術研究支援センター(生研センター)の許諾を得て行って下さい。

## 生研センター 業務のご案内

～研究開発を強力に支援いたします～

### 提案公募型の委託研究制度

- 民間企業の実用化段階の研究支援なら 民間実用化研究促進事業
- 技術シーズ開発のための基礎研究や  
応用・発展研究及びベンチャー創業を目指すなら イノベーション創出基礎的研究推進事業

### その他の支援制度

- 「共同研究先のあっせん」、「遺伝資源配布先のあっせん」などもお気軽にご相談下さい。

詳細は、生研センター企画部企画第1課までお問い合わせください。

## ブレインテクノニュース 第141号

平成22年9月15日発行

発行人 前川 泰一郎

編集人 浅野 将人

発行所 独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構

◎生物系特定産業技術研究支援センター(生研センター)

〒105-0001 東京都港区虎ノ門3丁目18番19号 虎ノ門マリビル10階

TEL 03-3459-6565 FAX 03-3459-6566

e-mail brainki1@ml.affrc.go.jp

URL <http://brain.naro.affrc.go.jp/tokyo/>