

まえがき

食のグローバル化の急速な進展，高齢化や食生活の乱れに伴う生活習慣病の増加，偽装表示に象徴される食品の安全性や信頼性の揺るぎ，低水準の食料自給率など，食に関わる問題が山積する状況下，食品研究の重要性が一層増加しています。

食品総合研究所は，昭和9年（1934年）に米穀局内の米穀利用研究所として設立されて以来，約70年間は農水省傘下の国立研究機関として，平成13年（2001年）には独立行政法人に移行し，平成18年（2006年）には農業・食品産業技術総合研究機構（農研機構）の1つの内部組織としての食品総合研究所として，食品研究の専門機関としての責務を果たしています。

食品総合研究所は研究を通して，国民に安全で豊かな食生活の提供，食に関わる適正な科学情報の提供，食に関わる行政施策への貢献，わが国の食品産業の健全な発展への貢献を使命とし，食品に関わる基礎から応用に至る幅広い研究を実施しています。

食品総合研究所が実施している研究のうち，関連深い研究トピックスをとりまとめ食糧として年に1回刊行しています。食糧の40号以降はホームページでも公開しています（<http://nfri.naro.affrc.go.jp/guidance/kankobutu/index.html>）。今回刊行する食糧49号は，「新規評価・測定技術の開発・利用による食品研究への挑戦」をテーマに関連深い研究トピックスを解説いたしました。

食品に係る研究者や技術者だけでなく，食に関心をお持ちの多くの方々にも広く活用して戴くとともに，現在の食総研の活動について少しでもご理解戴ければ幸いです。

平成23年2月

(独)農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所
所長 林 清

目 次

I	動物行動学に基づいた美味しさの評価およびリック計測器の開発 河合 崇行	1
II	採血を伴わないヒト血糖値の非侵襲測定と食品のグリセミック・イン デックス測定への応用 河野 澄夫	21
III	食品からの微弱発光を利用した品質評価技術 蘆原 昌司・鍋谷 浩志	31
IV	原子間力顕微鏡による食品の微細構造解析と相互作用評価 小堀 俊郎	45
V	核磁気共鳴（NMR）法を用いた立体構造解析及び分子間相互作用解 析による有用タンパク質の機能解明 逸見 光	67
VI	多点シートセンサシステムで解析した食品の咀嚼性と力学特性 神山 かおる	85

I 動物行動学に基づいた美味しさの評価および リック計測器の開発

1. はじめに

食べ物の好き嫌いは、本能的に決まる部分と情報に左右される部分から構成されている。ヒトでは高度な情報に因る部分が大きく、行列のできる店で食べた料理の味を実際以上に美味しいと評価してしまうこともよく見受けられる。しかし、本能的に美味しいと感じられる部分が足りなければ、ブームと共に客も去ってしまう。本報では、高度な情報に左右されないマウスを用いて、本能的に美味しいと感じられる部分を評価する方法の例を紹介する。また、マウスが溶液を舐める行動＝リックに着目して、美味しさを数値化する方法についても紹介する。

1-1. 美味しさとは

我々は食べたり飲んだりした際、口腔内に食品が含まれている間に、好ましい感覚を得られれば、それを“美味しい”と表現する。口にする前の良い香を嗅いだり食後に満足感や至福感を得たりしても“美味しい”とは感じられない。“美味しい”という感覚は、口・喉からの快情報を中心に、鼻や目、耳、脳からの情報を肉付けして得られる総合感覚である。そのため、鼻をつまんで味わうと、甘味、うま味、塩味、酸味、苦味などの基本味、温度、舌触りなどは判断できるものの、美味しさは大きく減少する。盛り付け、食事環境、心身の状態によっても美味しさは変動する。生理的に体や脳が欲する成分を含む食べ物を口にしたとき、美味しさが増すことはよく経験する現象である。喉が渴いているときは水を美味しく感じるし、汗をかいて体の塩分が流出しているときは塩味がするものを美味しく感じる。おなかが減っているときや脳で大量のエネルギーが消費されているときは、甘い食べ物をより美味しく感じる。味わう前に聞いていた情報やそれによる期待感によっても、美味しさは変動する。種々の影響を受けて美味しさの評価は変動するが、感覚の中心となる味が良くなければ美味しさは語れない。好ましくない匂いであっても食べて美味しいと感じる食品はたくさんあるが、口に入れて好ましくない味の食品はいい匂いがしても高級店で食べても美味しいとは感じられない。もちろん、味音痴の人は例外である。

美味しいと感じるとき、脳のいろいろな部分が活動する。味覚情報、嗅覚情報は、それぞれ味覚一次野、梨状皮質を介してこめかみの奥にある扁桃体に送られてくる。ものの好き嫌いを判断する部位である。苦い味や天敵の臭いなど生得的に忌避するものは、この部位で判断されると考えられている。扁桃体はすぐ隣あう位置に記憶を司る海馬と密に連絡し、過去の記憶と照合する（図1左）。食べ慣れた味は好ましく感じるのである。食経験、食文化の違いは“美味しさ”の個

人差を生む最大の原因である。食べ物を“美味しい”と感じたとき、もっと食べたいとなる場合もあれば、気持ちが高まる場合もあるし、心地よくて穏やかになる場合もある。扁桃体で“好き”と判断された情報は、すぐ近くにある腹側被蓋野を介して、前方にある側坐核に伝えられドーパミンを放出させる。この回路を報酬系と呼び、ここで“好感”から“快感”に情報変換される（図1右）。報酬系回路は期待感のみでも活性化するとされている。美味しいものを食べて直接的に快感を得ることや近い将来快感が得られるだろうと期待したりすることが、痛みや精神的ストレスを緩和させることは、多くの人が経験したことのある現象であろう。普通の人が通常の食事をする限りにおいては、適度な快感（=美味しさ）を感じるにとどまるが、まれにスナック菓子などが止められないなどの障害を持つ報酬系が敏感な人もいる。

客観的な美味しさを評価するには、可能な限り前述の要因を揃える努力が必要である。美味しさの構成要素を図解したものを図2に示す。

1-2. 味とは

我々は、食べものを口に入れて味を感じたとき、さまざまな言葉を使って表現しようとする。「牛肉の味がする」「ミルクの味がする」「ピーマンの味がする」「トマトの味がする」など具体的な食品の味を引き合いに出すことも多々あるが、これらは口腔内だけで感じ取れる感覚ではない。味嗅覚の研究分野では、これを“風味”と呼ぶ。舌や上あご、喉にある味覚センサー（=味蕾）から得られる情

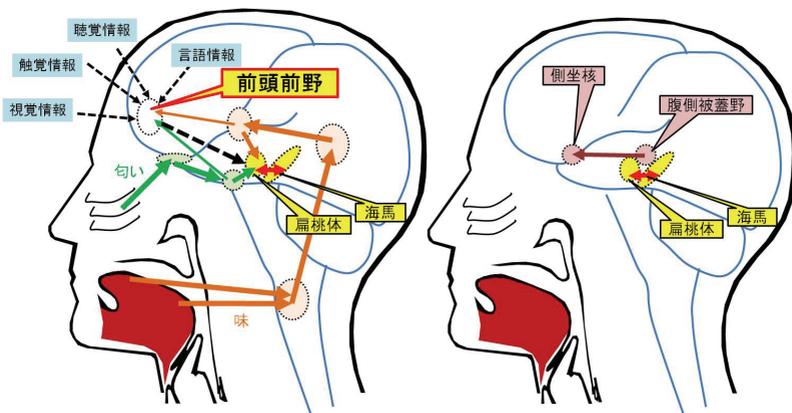


図1. 味を認知するときの脳内情報伝達

左図：味覚や嗅覚から得た情報が好き嫌い判断される経路。

右図：美味しいという快感が引き起こされる経路。

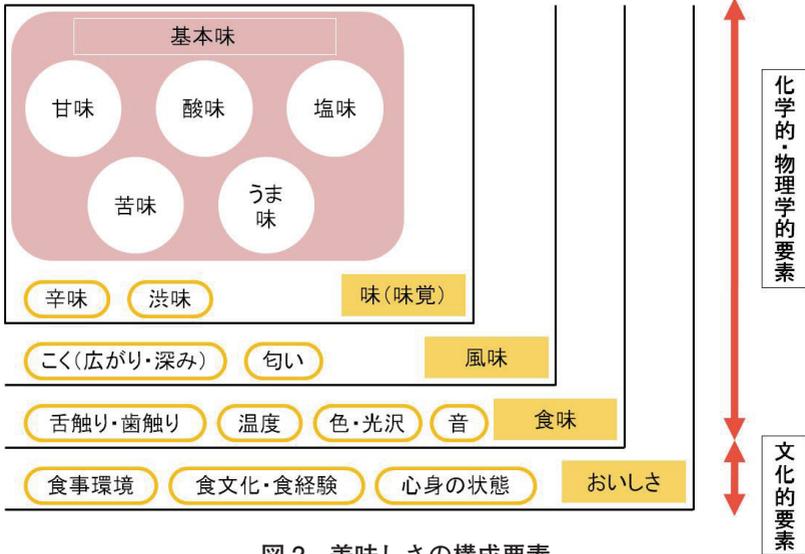


図 2. 美味しさの構成要素

化学的・物理学的要素と文化的要素に分けられる。

報は甘味，苦味，塩味など一般化された味覚情報のみである。具体的な食品の味の想起には匂いは必要不可欠である。実際，鼻をつまんで食べてみると，使える味表現が極端に減ってしまう。

味には，基本五味と呼ばれる甘味，苦味，うま味，塩味，酸味以外にも渋味，えぐ味，辛味，こくなどがあると考えられている。甘味を呈する物質の多くは糖やアミノ酸であり，消化吸收されてエネルギー（血糖）となるものが多い。ヒトや動物はエネルギーが得られることを期待して甘いものを食べる。苦味を呈する物質の多くは毒や薬効成分であり，ヒトや動物は生得的に苦いものを忌避する。うま味を呈する物質はグルタミン酸ナトリウムとそれを増強する核酸類であり，肉や魚などタンパク質の豊富な食品に多く含まれる。ヒトや動物はうま味のあるものを積極的に食べることで自然とタンパク質が吸収できるようになっている。塩味を呈する物質は食塩やカリウム塩であり，自然界では他のミネラルと共存する。ヒトや動物は生体浸透圧の維持のためのナトリウムやその他ミネラルが得られることを期待して塩味のするものを食べる。酸味を呈する物質は有機酸や無機酸であり，発酵や腐敗しているものに含まれていることが多い。ヒトや動物は生得的に酸っぱいものを忌避する。高等な動物ではクエン酸やリンゴ酸など体に有用な酸に対して忌避しないようになる。渋味やえぐ味を呈する物質はタンニンやホモゲンチジン酸であり，紅茶や赤ワイン，たけのこなどに含まれている。辛味

を呈する物質は、唐辛子のカプサイシン、生姜のショウガオール、黒胡椒のピペリンなど非常に多くの種類がある。これらの成分には強い刺激があり、単独で美味しいと感じられることはないが、食品の中の他の成分と共存することにより、一種のアクセントとして食品に美味しさを付加することができる。辛味は口の中への痛み刺激であり、食べ物が口腔内にある間は“辛い”と感じるが、口腔内からなくなれば“痛い”という感覚に変わる。こくを作り出す物質にはグルタチオン、メイラード化合物、脂肪、増粘物質など様々な説があるが、受容体も含めまだ解明されていない。人工脂質膜を利用した味覚センサーを開発している研究グループは、こくを持続するうま味刺激の一種として考えているようである。

2. ヒトの感じ方と動物の感じ方

実験動物あるいは動物由来の細胞を使って味の評価をするにあたって、ヒトと動物の味に対する感じ方の違いを整理しておく必要がある。舌の上や上あご、喉に味蕾が存在し、味蕾を形成する味細胞の先端に甘味・苦味・うま味・塩味・酸味を認識する膜タンパク質が局在することは、ヒトも実験動物（マウス・ラットなど）も同じである。味を伝える神経システムもほぼ同じであろうと考えられている。しかし、膜タンパク質のアミノ酸配列が種によって異なるため味物質に対する感度が変わってくる。ヒトは砂糖や糖アルコールの他にアスパルテムも甘く感じるができるが、マウス・ラットはアスパルテムを甘いと感することができない。ギムネマシルベスタという植物の葉に含まれるギムネマ酸はヒトや類人猿に対してのみ甘味阻害効果を示し、マウスやラットには全く示さない。同じ植物に含まれるグルマリンというペプチド成分は、マウスやラットに対して甘味阻害効果を示すが、ヒトには示さない。苦味受容体にはマウス・ラットもヒトも多種のサブタイプがある。自然界に存在する多種の毒性物質に適応するために獲得してきた多様性であるが、すべて動物種が同系のサブタイプを持っているわけではない。一種類の苦味物質が複数の受容体に結合する場合もあるため、実験動物を使ってヒトが感じる苦味の強度を推察することはできない。ヒトでは大人になって苦いものでも好きになるといった現象がよく見られるが、マウス・ラットで再現できた例はまだない。ビールやコーヒーやさんまのはらわたなどの苦味が美味しいと表現される場合もあるが、苦味そのものを好きになっているのではなく、苦味を一種のアクセントとして食品全体の味を楽しんでいるのだ。苦味成分を単離精製して味わっても心地良さは感じられない。うま味を評価することは非常に難しい。グルタミン酸受容体は人種を問わず全てのヒトが持っているものであるが、うま味認知や強度評定には慣れとトレーニングが必要である。文化的にうま味に慣れ、“うま味”という言葉を使い慣れている日本人であっても、明確な評価基準を持っていない。細胞科学的、神経科学的に認識していても、脳で認知できていないことが多い。マウス・ラットにおいても同様の現象が見られ

る。多くのマウスではうま味を甘味の一種として認知しており、多くのラットではうま味を塩味の一種として認知している可能性が高い。c57BL/6 や ICR という一部の系統のマウスではうま味を他の基本味と区別して認知できることが報告されているため、味覚実験ではこの2系統のマウスがよく利用される。代表的な塩味物質である塩化ナトリウムの受容に関しては、マウス・ラットもヒトもほぼ同じであると考えられている。等張濃度を境に、薄い塩味を好ましく感じ、濃い塩味を好まない特性も同じである。体の生理状態に左右されやすく、体内のミネラル分が不足気味のときは、少々濃い塩味であっても好ましく感じる。しかし、ナトリウム以外の塩味に関しては大きく異なる。ヒトの場合、塩化ナトリウムの味と塩化カリウムの味の違いを理解できるものの、いずれも塩味を呈する物質として考えるが、マウス・ラットでは同じ範疇には入らない。塩化ナトリウムの味と塩化カリウムの味の違いを異なったグループに属すると判断するのだ。そのため、塩化カリウムを用いて減塩させている製品の評価に、マウス・ラットは使えない。酸味の受容体は最近になって見つかった。酸味の正体は水素イオン濃度、つまり唾液と混ざりあったときの pH であることはわかっているが、酸味の好き嫌いに関する知見は非常にすくない。ヒトの場合、同じ pH であってもクエン酸の酸っぱさと酢酸の酸っぱさは異なる。酢酸の場合、揮発成分もありより酸っぱさを強めているのではないかと考えられる。運動後に酢酸よりもクエン酸の方を好ましく感じるメカニズムも不明である。マウス・ラットで似たような現象が起きるかどうか興味を持たれるところである。pH を数値化することは簡単であるが、酸っぱさやその好みを定量評価する技術はまだ確立されていない。近年、基本五味以外にも脂肪の呈する味についての研究が進められている。純粋な脂肪を口に入れたときに明確な味質を感じないため味の一種として認められるには至っていないが、舌の味細胞には脂肪酸受容体が多く存在すること、脂肪の存在が味覚神経を介して脳へ伝えられていることが分かってきている。食品中に含まれる脂肪はトリグリセライドの構造を取っているが、マウス・ラットでは舌の上で速やかに分解され、脂肪酸が生成することが分かっている¹⁾。マウスでは100%の油脂でも好んで摂ろうとするが、ラットでは25%を頂点として濃い脂肪に対する嗜好は下がってくる。ヒトの場合は100%の脂肪を好むヒトはほとんどいないが、マヨネーズで70%以上、最高ランクの和牛の霜降り肉で50%以上、大トロで40%以上である。ヒトの場合、舌の上でのトリグリセライドの分解はほとんど起こらない。

2-1. 動物実験のメリットデメリット

食品の味の評価や感受性は、個々の食経験や食文化、体調、遺伝的背景、季節に左右される。ヒトの官能試験では、化学分析よりも複雑で微妙な違いを認知し、表現することができるが、扁桃体での脳処理 (=好き嫌いの感情)を抑えて

食品の味を評価するには限界がある。試験当日の朝食べたもの、前日に食べたもの、子供の頃に慣れ親しんだ味、試験時の空腹状態、精神状態など、個人差が少なからず影響してしまう。上市するための最終製品候補の官能試験であればある程度の幅を持った実験参加者の意見が重要となってくるが、小さな差を見つけるための研究においては分析側の幅をできるだけ小さくする方が良い。実験動物を用いた場合、空調設備、餌・水の管理、試験時刻の調整によりばらつきの小さな集団を作ることができる。近交系の種を用いれば遺伝的背景によるばらつきも小さくすることができる。マウスでは c57BL/6 系、ICR 系、BALBc 系、ラットでは SD 系、Wistar 系などがよく利用される。ヒトでは比較的精神的ストレスのある実験、例えば同じ食事のみを何日も続けたり嗜好性の低い食事を食べさせたりすることも可能である。定量的な運動負荷や薬効成分の投与により生理状態・代謝状態を同程度に傾けた集団を作ることにも可能である。動物愛護・倫理の観点から、絶食期間や絶水期間を設ける実験の場合は頻繁に体重測定や通常行動を観察し過度のストレスがかかっていることを常に確認しておくことが重要である。

ヒトは食べたものの味を分解し言葉を使って、「甘味がこの程度で塩味がこの程度」といった多次元的な表現をすることができる。一方、動物は提示されたものを食べるか食べないか、多く食べるか少ししか食べないか、好きか嫌いかといった一次元でしか表現できない。複雑な味であっても総合的な評価結果しか返すことはできない。そのため動物実験においては、評価したい味質にのみ注力できるように、試料に細工をするかあるいは動物を学習させる必要がある。ヒトの場合はある程度まずい味の食品であってもその食品が有害でないことさえわかっているればしっかり味わって評価することができる。しかし、実験動物ではすぐに忌避してしまうため無理に食べさせることが難しい。スクロースを添加した試料を使って低血糖時に測定するなど、他の好ましい物質への欲求と拮抗させて評価することが多い。試料が溶液なら口腔内にまで伸びたカニューレを介して、強制投与できる。

2-2. 行動学実験いろいろ

実験動物を用いた実験では、複数の味成分の味質の類似性を調べたり、嗜好性を比較したり、味質の感覚強度を数値化したりすることができる。食品の持つ強化効果（自発摂取欲）についても数値化することができる。実験動物を用いた味成分の嗜好性評価方法には、提示した試料の消費量から求めるものと、動物の行動量・仕草を解析して求めるものがある。前者では一定時間に摂取した量を重量・容量やリック回数で計測し、比較解析する。後者では探索行動に費やした時間や回数を測定したり、一定時間に示す仕草をいくつかのパターンにカテゴリー分けして分析したりする。

2-2-1. 味覚嫌悪学習実験 (Conditioned Taste Aversion Tests)

ヒトや動物は、過去に食べて体調が悪くなった食品を避ける習性がある。自己防衛本能の一つである。動物の場合、般化範囲が広く、過去に食べたものに味や匂いが似ているだけで忌避するようになる。この習性を利用して味の類似性を調べるのが味覚嫌悪学習実験である。まず、味類似性を比較したい2試料を用意し、それぞれ別に提示して一定時間内における摂取量を測定する。一方の試料を提示し30分以内に0.15M塩化リチウム溶液を腹腔内投与する。塩化リチウム投与は時間差で消化管痛を引き起こすため、動物は摂取した試料による腹痛であると連合学習する。日を改めて味類似性を比較したい2試料の一定時間内における摂取量を測定する。味覚嫌悪学習が成立すれば、連合学習した試料の摂取量が投与前の摂取量と比べて激減するはずである。さらに、他方の試料の摂取量も減少する場合は、2溶液が類似した味質を含んでいることが示唆される。対照として塩化リチウム溶液の代わりに生理食塩水を腹腔内投与した群も作っておく。連合学習させる試料を入れ替えた群も作っておく。味覚嫌悪学習は定性的な実験であり、類似度を数値化することはできない。

醤油由来の塩味増強効果を持つグリシンエチルエステル (GOE)²⁾ と塩化ナトリウムを使った味覚嫌悪学習実験の例を図3に示す。塩化ナトリウム溶液に対して嫌悪学習したマウスはグリシンエチルエステル溶液に対しても嫌悪傾向が認められるが、グリシンエチルエステル溶液に対して嫌悪学習したマウスでは塩化ナ

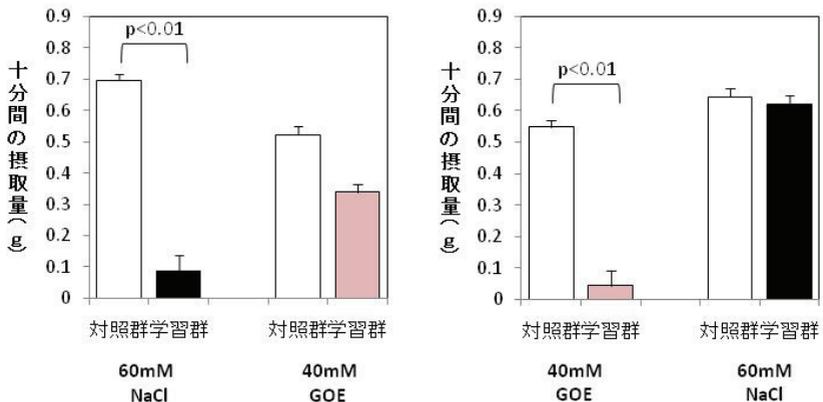


図3 グリシンエチルエステルと塩化ナトリウム (塩味) の味覚嫌悪学習実験

左図：塩化ナトリウムに対して嫌悪学習したマウスの摂取行動。

(値は平均+標準誤差, 対照群 n = 15, 学習群 n = 8)

右図：グリシンエチルエステルに対して嫌悪学習したマウスの摂取行動。

(値は平均+標準誤差, 対照群 n = 16, 学習群 n = 19)

トリウム溶液に対する嫌悪はまったく見られなかった。これは、グリシンエチルエステルに塩味成分が含まれている可能性があるが、それ以外の複雑な特徴(味)の影響が大きいことを示している。嫌悪学習実験の結果、グリシンエチルエステル単独では塩味代替物質として適用できないことを示している。

2-2-2. 二瓶選択嗜好実験 (Two-bottle Preference Tests)

同時に2試料を与えて一定時間にどちらの試料をより多く摂取するかを比較する方法である。これには、異なる2種類の試料が提示されていることを実験動物が知っていなければならない。本実験の1週間以上前から、2～5%砂糖水瓶と水瓶を数cmの間隔をおいて同時提示する。毎日瓶の位置を入れ替え、砂糖水瓶側から有意に摂取するようになるまで続ける。学習修了後、比較したい試料の組を5～30分あるいは48時間提示し、その間に摂取した量比をもって嗜好性の強さを評価する。学習修了した実験動物は、砂糖水に限らず種々の試料についても比較してより好ましい方の試料を摂取するようになる。同じ種類で濃度の異なる試料同士の比較も可能である。実験デザインがよければ、毎日違う試料の嗜好実験を同じ個体を用いて行うことができる。嗜好性のあまり高くない試料を用いて嗜好実験を行う場合は、実験前に適度な絶水あるいは絶食処理を施す必要がある。長時間提示する場合は、試料の味だけでなく試料が消化吸収されたあとの影響(血糖値が上がるなど)を加味する必要がある。水と同時に提示しときの試料摂取量の比率から快楽指数(Hedonic Index)を算出する研究も報告されている³⁾。食塩水と砂糖水を使った二瓶選択実験の様子を図4に示す。

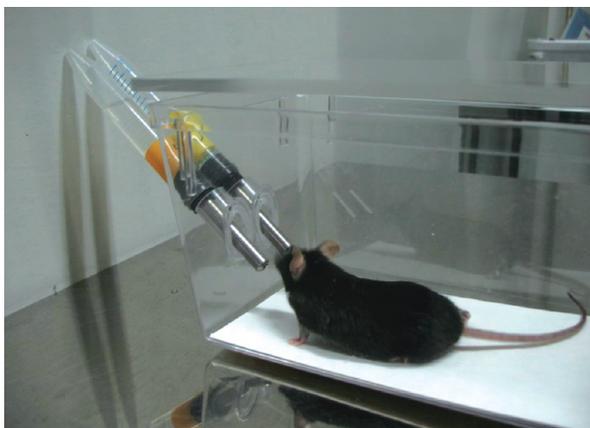


図4 二瓶選択実験の様子

マウスは二溶液を比較し、より好ましい味の方をより多く摂取する。

2-2-3. リック解析実験 (Brief Access Tests)

二瓶選択実験では1日に1対の試料の比較しかできない上、試料が消化吸収されたあとの影響(血糖値が上がるなど)が少なからずある。この問題点を克服するために、1試料あたり5～30秒だけの摂取量で嗜好性を評価できるようにしたものがリック解析実験である。摂取総量が微量なため舐めたりかじったりする回数を測定して摂取量と読み替える。好ましい味を呈する溶液を使った場合、その味の強さと一定時間内の舐める(リック)回数に相関が認められる。一回の実験で複数の試料を順次提示でき、それらの嗜好性を同一条件で比較することも可能である。測定時間が短時間であるため、実験動物の集中力を損なわないよう注意しなければならない。騒音や光などの外的環境変化を極力なくすことだけでなく、嗜好性のあまり高くない試料を評価する場合はときおり好ましい試料を提示するなど、次々と提示される試料に興味を持ち続けさせる工夫も必要である。リック解析実験の様子は後述の図6-1, 2, 3に示す。

2-2-4. オペラント試験 (Operant Task Tests)

食品成分には嗜好性を超え強化効果を示すものもある。自制が効かなくなり、それを食べるためならどうなっても良いという状態に陥る人もいる。食品成分が示す強化効果は薬物の強化効果に比べて非常に小さいものであるが、同じ装置で測定することができる。試料を微量ずつ排出できる機器の横にレバーを設置し、レバーを何度か押せば試料がもらえる装置である。試料が得られるまでのレバー押し回数を1回、2回、4回、8回と増やすように設定しておき、何回まで続けられるかを測定する。その限界値をブレイクポイントと呼ぶ。強化効果の強いものほど、たくさんの回数を押し続けてでも欲しいと思うようになる。食用油の大好きなマウスを使った実験では、100%コーン油でブレイクポイントが160回程度である⁴⁾。ちなみにコカインでは500～1000回程度である⁵⁾。機器内部の写真を図5に示す。

2-2-5. 条件付け場所嗜好試験 (Conditioned Place Preference Tests)

薬物探索行動を食品成分の強化効果測定に応用したものである。明暗2つの箱が繋がった装置を用意し、マウス・ラットに自由行動させ、それぞれの箱内の滞在時間を測定する。一方の箱内で試料を提示し、翌日他方で対照試料(水など)を提示する作業を何日か繰り返し、箱と試料の連合学習を成立させる。試験日はいずれの試料も提示せずに再び自由行動させ、それぞれの箱内の滞在時間を測定する。試料が強化効果を持っている場合は、試料を提示した側の箱内に滞在する時間が有意に増える。食用油や砂糖水、かつおダシ溶液などの弱い強化効果にも応用できる^{6,7)}。



図5 オペラント装置内部

左側にレバーがあり、決められた回数レバーを押すと右側の穴から試料が少量出てくる。レバーは非常に軽く、鼻先でも押し下げることができる。

2-2-6. 味覚反応試験 (Taste Reactivity Tests)

マウス・ラットは食べ物を味わっているとき、摂取性行動、中立性行動、嫌悪性行動のいずれかをとる。摂取性行動には「口をもぐもぐ動かす」「舌を前に突き出す」「舌を横に出す」、中立性行動には「手足を舐める」「顔をグルーミングする」「壁に触れずに立ち上がる」「歩き回る」、嫌悪性行動には「口を大きく開ける」「口の外へ唾液をたらす」「頭を振る」「前足を打ちつける」「手足を押しつける」「顎をこする」「涙や鼻汁を出したり糞尿を排泄したりする」「壁に触れて立ち上がる」が報告されている^{8,9,10}。好ましい味の試料であっても好ましくない味の試料であっても一定量食べさせるため、カニューレを使って口腔内に強制的に試料を注入する方法がよく採用されている。試料注入後の数分間の実験動物の行動・仕草をビデオカメラで撮影・録画し、摂取性行動・嫌悪性行動を何回行っているかを計測する。数枚の鏡を駆使して、実験動物がどちらの方を向いても顔の様子が観察できるように撮影する。手間がかかる割にはばらつきの大きいデータしか得られないので、小さな差異を見つける実験には向いていない。

いずれの実験も、通常飼育するケージから実験動物を取り出し、測定用のケージに移し替えて測定する。その際、なるだけストレスがかからないように移動させることがばらつきの小さな結果を取得するのに重要である。測定時刻に合わせて、飼育条件や測定条件を最適化することでより安定した結果を得ることができる。

3. リック解析と計測器の最適化

動物行動学では、好ましい試料を食べる際には舐めたり噛んだりする回数が多くなり、好ましくない試料を食べる際には少なくなることが知られている。マウス・ラットの場合、美味しい試料に対しては1秒間8回ペースのリックを10秒間以上続け、少し味の劣る試料に対してはリックと休憩を繰り返す。行動を観察すると、舐め始めの味感覚(=先味)とリック回数が相関するよう感じられる。短時間で試料の嗜好レベルを測定できること、一度に多数の試料を測定できること、少量の試料しか摂取しないので吸収後の影響を考慮する必要がないことから最近の味覚研究では良く使われる手法である。

3-1. 第一世代リック計測器

リック計測器は溶液の摂取量(消費量)をリックの回数に換算して求めることを前提としているので、1回のリックで得られる溶液量が同じであること、リックの読み落としがないよう計測することの2点が重要である。マウス・ラットのリック速度は最大で8~10 Hzである。第一世代では、15 mLサイズの遠心チューブの先に18Gの注射針を使って均一の穴をあけたものを準備した。ポリカーボネート製マウスケージの高さ35 mmのところを舌だけが出せる直径5 mmの小さな穴をあけ、外側に遠心チューブを刺せるアクリル台を取り付けた(図6-1)。キーエンス製の光センサーを用意し、センサーから延びる光ファイバーの先端を遠心チューブの先端と重なるように設置した。穴の内側に紙製のシャッターを取り付け、片手に持ったタイマーを見ながら開閉を行った。計測は

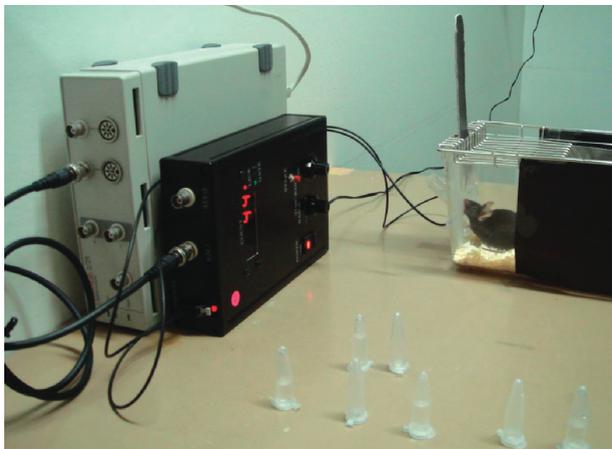


図6-1 第一世代リック計測器

マウスが最初にリックをしてから10秒間である。マウスはケージにいた小さな穴に興味を示し、鼻を近づけてスニフリングはするものの、舌を差し込もうとはしない。本実験の前に、嗜好性の高い砂糖水などを用いて、穴の先に美味しいかもしれない溶液があることを学習させる必要がある。

3-2. 第二世代リック計測器

第一世代リック計測器の問題点は、遠心チューブ先の小さな穴に唾液が着くと溶液の出方が変わってくることである。それに加え、マウスがリックを始める瞬間を見逃さないよう細心の注意を払うこと、ケージが透明であるため実験者の動きがマウスの集中力を散らす原因になることである。そこで、市販の金属製の玉付き吸口を利用できるよう加工し、かつリック回数の計測をシーケンシャルソフトで制御できるようにした(図6-2)。最初のリック時から自動で10秒間カウントできるようになった。リック開始を目視する必要がなくなり、ケージの周りを遮光することができ、マウスの集中力を維持することができるようになった。

3-3. 第三世代リック計測器

第二世代リック計測器までは、実験者が計測器の近くに待機して、シャッター



図6-2 第二世代リック計測器

左側にある器械が、プログラマブル計測器である。右側のマウスの吸口の先を通るレーザー光の遮断回数からマウスのリック回数を計測する。写真ではわかりやすいように透明ケージを使っているが、実際は遮光処理を施したケージを使う。

開閉と試料溶液交換を行っていた。試料溶液の交換が素早すぎるとマウスは新しい試料の味を十分吟味せずにリックし、遅すぎると待ちきれなくなったマウスはシャッターから離れてしまい、リック再開までに時間がかかる。これらの問題を解決するために、試料溶液を自動的に任意の順序で提示でき、提示時間を任意に設定でき、シャッターの開閉を自動化し、データを自動保存するプログラムを備えた装置を作成した（図6-3）。実験者の動きによるデータの不安定化を避けるためWEBカメラを取り付け、機器及びマウスを部屋の外から監視できるようにした。マウスは成長するに従って、口の周りの大きさや舌の長さが変わってくる。そのため、穴の大きさも数種類用意し、穴と吸口までの距離も微調整できるようにした。種々の条件検討の結果、試料溶液提示の間隔が15～30秒のときマウスのモチベーションが一番高いことが分かった。試料溶液は10サンプル以下がよく、試料溶液の提示の間に水を提示しておく方が良かった。さらに、同じマウスで3回以上続けてプログラムを実行すると、吸口についての微かな匂いを手掛かりに、嗜好性の高い溶液にはすぐにアクセスするが、嗜好性の低い溶液には匂いを嗅ぐだけで試し飲みをしないようになるマウスがいることが分かった。このような行動が見られた場合は、そのマウスの一連のデータを排除してから解析する。

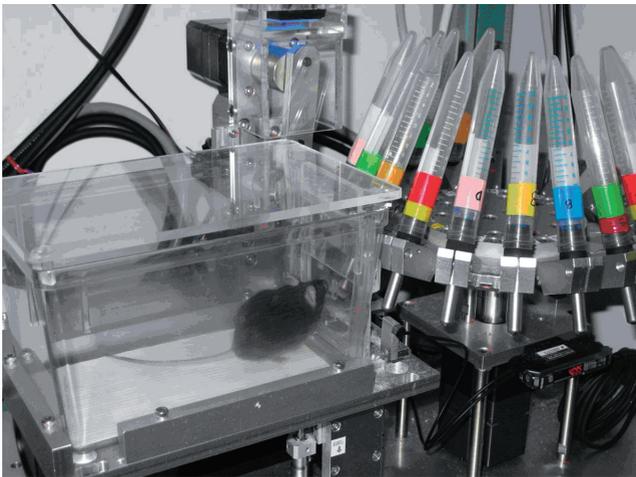


図6-3 第三世代リック計測器

左側がマウスケージでマウスの口先の位置に小さな穴とシャッターがある。写真ではわかりやすいように透明ケージを使っているが、実際は遮光処理を施したケージを使う。右側が試料自動供給装置。回転盤に試料を刺しておき、ステッピングモーターとプログラムで任意の順序で試料提示が可能となっている。

4. 減塩と塩味欲求性

塩分の過剰摂取は、いわゆる高血圧、動脈硬化、癌などの種々の疾病につながる危険要因と考えられているが、これらの疾病の治療・予防のために提供される食塩制限食や予防食は味全体が薄く、十分な支持を受けているとは考えにくい。当事者の食嗜好を犠牲にすることなく塩分の摂取抑制を促す有効な手段の一つは代替味物質や呈味増強物質を利用することであるが、現在のところ、独特のエグ味を有する塩化カリウムを代替塩として利用するしか方法がない。日本人全体の約2割（2500万人程度）、高血圧患者の約4割（1600万人程度）が食塩感受性の血圧上昇を引き起こすと言われており、エグ味を有しないおいしい塩味代替物質・増強物質を見つけること、しお味が増強されるメカニズムを解明することは、多くの食塩感受性の人の食事 QOL レベルを維持する上で重要な課題になってくるだろうと考えられる。

美味しい塩味を評価するには、塩味を好ましく感じる実験動物を作らなければならない。ヒトの場合、運動などで大量の発汗があったときやビールなど利尿作用のある飲料を飲んだときにしお味食品を美味しく感じることもある。全身を体毛で覆われている動物の場合、運動させても大量の発汗を期待することはできない。足の裏から水分とともに一部のミネラル成分が出て行くこともあるが、動物が手足を舐めることでミネラル分は再び回収される。一方、利尿作用により特定のイオンを強制的に排泄させ、体内イオンバランスを崩す状態は実験動物でも再現可能である。筆者は食塩を制限した餌を作成し、さらに利尿薬スピロノラクトン（カリウムイオン保持性利尿薬：腎臓の遠位尿細管におけるナトリウムイオン再吸収を阻害し、カリウムイオン尿中排泄を抑制する）を添加したもので3週間飼育することにより、低濃度の塩味の弁別能があがったマウスを作り出すことに成功した。利尿薬飼育マウスは砂糖水よりも食塩水の方を好む状態であった（図7-1）。15 mM と 30 mM 食塩水を同時提示したときは、30 mMの方を好んで多く摂取した（図7-2）。水と15 mM 食塩水を同時提示したときは、食塩水の方を有意に多く飲水するので、塩味認知閾値は15 mM以下である（図7-3）。グラフ中に示す対照群マウスとは利尿薬を与えていない通常飼育マウスのことである。

5. 塩味評価

利尿薬を与えて塩味に敏感になるように飼育したマウスを用いて、異なる濃度の食塩水に対する10秒間リック回数を計測した結果を図8-1に示す。濃度（＝塩味強度）に依存してリック回数が増えている。本実験の条件下では、60mM食塩水で10秒間舐め続けている状態になっており、それ以上の強度の塩味は測定できない。

元素周期表において、リチウムはナトリウムと同じある金属に属しナトリウムより小さいため、ナトリウムイオンチャネルを通過できる元素である。それゆ

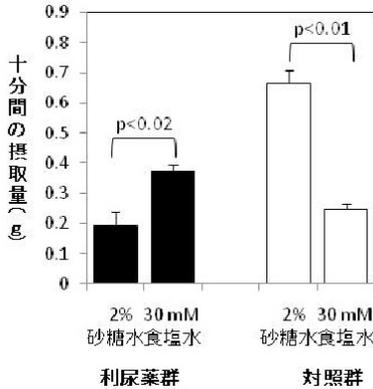


図7-1 2%砂糖水 vs. 30mM 食塩水の二瓶選択実験

(値は平均+標準誤差, n = 10)

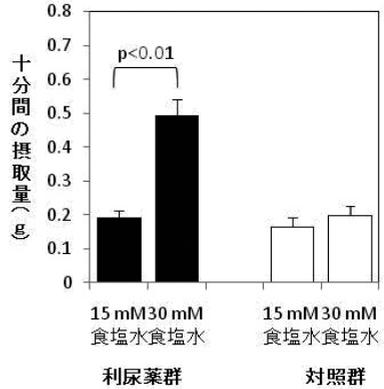


図7-2 15mM vs. 30mM 食塩水の二瓶選択実験

(値は平均+標準誤差, n = 10)

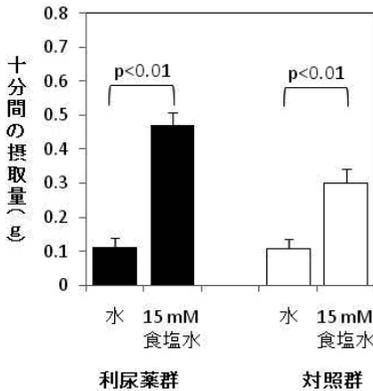


図7-3 水 vs.15mM 食塩水の二瓶選択実験

(値は平均+標準誤差, n = 10)

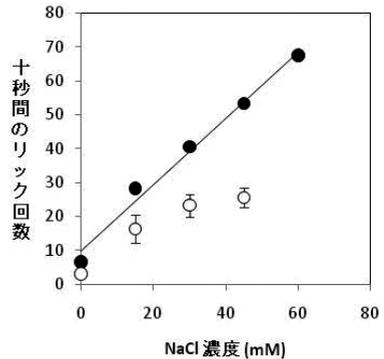


図8-1 利尿薬を与えたマウスの食塩水リック解析

●は利尿薬群 (n = 355-492), ○は対照群 (n = 15-45)。

(値は平均+標準誤差)

え、塩化リチウムは塩化ナトリウム様の塩味を示すことが知られている。塩化ナトリウム溶液とその溶液に塩化リチウムを添加した試料溶液に対してリック回数を測定した実験結果の一例を図8-2に示す。水, 15 mM, 30 mM, 45 mM 食塩水のリック回数を黒丸●で、それらに15mM塩化リチウムを加えた溶液のリック

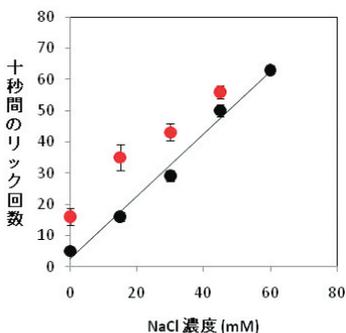


図8-2 塩化リチウムを添加した食塩水リック解析

●は塩化ナトリウムのみの試料, ●は15 mM 塩化リチウムを添加した試料。
(値は平均+標準誤差, n = 20-58)

ク数を赤丸●で示す。塩味強度の増加に応じてリック回数が増えている。この結果は、本実験系が60 mM以下の塩味の評価に適していることを示している。塩化リチウムには毒性が認められるため、1940年代以降は代替塩としての使用が中止されている。

塩化ナトリウム溶液とその溶液に重曹（炭酸水素ナトリウム）を添加した試料溶液に対してリック回数を測定した実験結果の一例を図8-3に示す。水、15 mM、30 mM、45 mM 食塩水のリック回数を黒丸●で、それらに5 mM重曹を加えた溶液のリック数を橙丸●で示す。ナトリウム含量は5 mMしか増えていないが、嗜好強度（本実験では塩味強度）は10～15 mM分増加していることが表から読み取れる。この結果は、重曹を使えば総ナトリウム量を少し減らしても塩味を維持できる可能性を示している。

醤油由来の塩味増強効果を持つグリシンエチルエステルについても同様の評価を行った。実験結果の一例を図8-4に示す。水、15 mM、30 mM、45 mM 食塩水のリック回数を黒丸●で、それらに30 mMグリシンエチルエステルを加えた溶液のリック数を薄い赤丸●で示す。ナトリウム含量は増えていないが、嗜好強度は10 mM分増加していることが表から読み取れる。嗜好強度は甘味を添加した場合も増加する。そこで、グリシンエチルエステルとグリシン（甘味）の味類似性を味覚嫌悪学習法で調べた（図9）。その結果、グリシンエチルエステルには甘味が無いことが示された。これらの結果は、グリシンエチルエステル添加による嗜好強度の増加は塩味の付加によるものであることを示唆している。リック解析で明らかな嗜好強度の増加が見られたということは、塩味の第一印象を強め

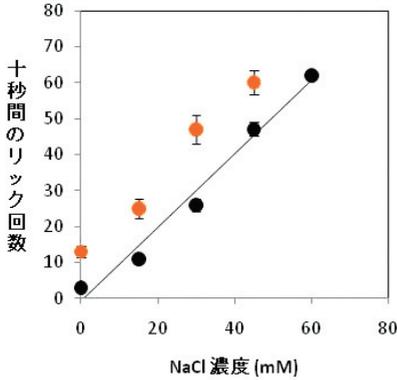


図8-3 重曹を添加した食塩水リック解析

●は塩化ナトリウムだけの試料, ●は5 mM 炭酸水素ナトリウムを添加した試料。
(値は平均+標準誤差, n = 27-47)

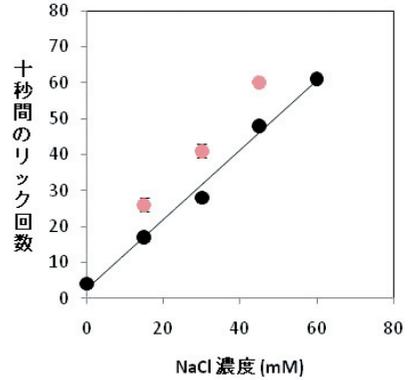


図8-4 グリシンエチルエステルを添加した食塩水リック解析

●は塩化ナトリウムだけの試料, ●は30 mM グリシンエチルエステルを添加した試料。
(値は平均+標準誤差, n = 89-132)

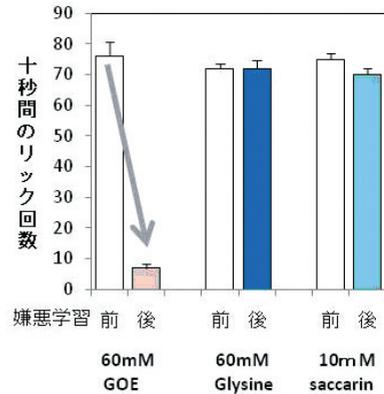
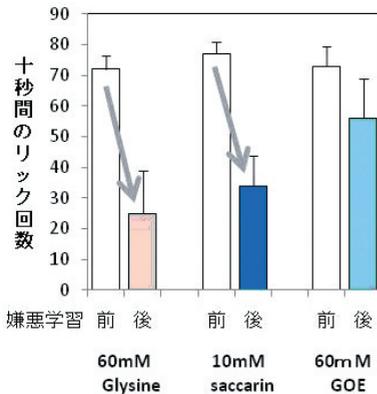


図 9 グリシンエチルエステルとグリシン (甘味) の味覚嫌悪学習実験

左図: グリシンに対して嫌悪学習したマウスの摂取行動。

(値は平均+標準誤差, n = 6)

右図: グリシンエチルエステルに対して嫌悪学習したマウスの摂取行動。

(値は平均+標準誤差, n = 10)

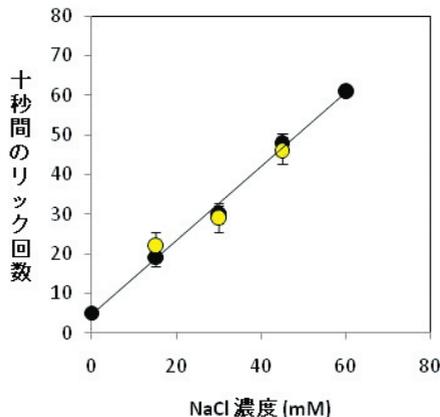


図8-5 塩化カリウムを添加した食塩水リック解析

●は塩化ナトリウムのみの試料, ●は30 mM 塩化カリウムを添加した試料。

(値は平均+標準誤差, n = 25-36)

ているのではないかと考えられる。

近年、“減塩しお”として販売されているものの多くは、塩化ナトリウムの半量を塩化カリウムに置き換えたものである。塩化カリウムについても同様の評価を行った。実験結果の一例を図8-5に示す。水、15 mM、30 mM、45 mM 食塩水のリック回数を黒丸●で、それらに30 mM 塩化カリウムを加えた溶液のリック数を黄丸●で示す。マウスの実験ではリック数の増加は全く認められなかった。マウス・ラットでは塩化ナトリウムの味と塩化カリウムの味を明らかに別味質として捉えていると言われているので、直接ヒトの実験結果に外挿することはできない。塩化ナトリウムの純粋な鋭い味こそが塩味であると考え、食品中の塩味に鋭い塩味を求めている人にとっては、塩化カリウムに置き換えた“減塩しお”では物足りないと感じるかもしれない。マウスを用いたリック塩味評価は鋭い塩味を好む人向けに特化した塩味増強物質の開発に役立つものと期待される。

6. 最後に

食塩は、体内の浸透圧調整のために必要なイオン源というだけでなく、食品保存力を強める、食材細胞内の水を減らして味を濃くする、うま味成分の味を強く感じさせる、甘味を強める、唾液を分泌させ味が口中に広がるのを助ける、などの他の成分との相互作用で美味しさに大きく影響する素材である。減塩を考える際、目的に合わせた、塩の代替物を上手に利用してQOL向上に努めて行かねば

ならない。

日本人は海に囲まれた国土で生活してきており、塩味の効いた食品と大量の水分、大量の米飯を摂る中で健康を維持してきた。古来よりミネラル、食物繊維が多く、脂肪の少ない食事を続けてきており、食事に順応するように水代謝も上がり、腸も長くなっている。日本人の尿の回数は西欧人と比べ格段に多い。食塩感受性の血圧上昇が起こらない日本人も8割程度いると推定されている。昨今、食糧自給率が40%前後であり、米離れも懸念されている。減塩の必要のない人にまで過激な減塩風潮を推し進めると、日本の食文化が壊れてしまい、順応してきた日本人の体に合わない新たな嗜好を求めた食に進んでしまう可能性がある。あるいは、思いもよらぬ、海外では見られない新規な生活習慣病に悩まされるようになるかもしれない。アルデヒド分解酵素活性の強弱(上戸か下戸か)、ラクトース分解酵素遺伝子発現の強弱(乳不耐症か)は、自覚できるものである。自分が食塩感受性遺伝子を持っているかどうかは、なかなか自覚できないものであるが、自分の血液型を知っているように一度調べて知っておくのも良いのではなからうか。うまく塩と付き合い、最期まで美味しい食事を食べて幸せでいたい。

(食品機能研究領域 食認知科学ユニット 河合 崇行)

参考文献

- 1) Kawai T., Fushiki T.: Importance of lipolysis in oral cavity for orosensory detection of fat. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **285**, R447-R454, (2003)
- 2) Kawasaki Y., Seki T., Tamura M., Kikuchi E., Tada M., Okai H.: Glycine methyl or ethyl ester hydrochloride as the simplest examples of salty peptides and their derivatives. *Agric. Biol. Chem.* **52**, 2679-2681, (1988)
- 3) Yamamoto T., Yuyama N., Kato T., Kawamura Y.J.: Gustatory responses of cortical neurons in rats. III. Neural and behavioral measures compared. *Neurophysiol.* **53**, 1370-86, (1985)
- 4) Yoneda T, Taka Y, Okamura M, Mizushige T, Matsumura S, Manabe Y, Tsuzuki S, Inoue K, Fushiki T.: Reinforcing effect for corn oil stimulus was concentration dependent in an operant task in mice. *Life Sci.* **81**, 1585-92, (2007)
- 5) W.C. Griffin, III, P.K. Randall, and L.D. Middaugh: Intravenous Cocaine Self-Administration: Individual Differences in Male and Female C57BL/6J Mice. *Pharmacol Biochem Behav.* **87**, 267-279, (2007)
- 6) Imaizumi, M., Takeda, M., Fushiki, T.: Effects of oil intake in the conditioned place preference test in mice. *Brain Research* **870**, 150-156, (2000)
- 7) Kawasaki H., Yamada A., Fuse R., Fushiki T.: Effect of bonito bouillon

flavored dextrin intake in the conditioned place preference test in mice. *Jpn. J. Taste Smell Res.* **9**, 325-328, (2002)

- 8) Grill H.J., Norgren R.: The taste reactivity test. I. Mimetic responses to gustatory stimuli in neurologically normal rats. *Brain Res.* **143**, 263-79, (1978)
- 9) Kiefer S.W., Bice P.J., Orr M.R., Dopp J.M.: Similarity of taste reactivity responses to alcohol and sucrose mixtures in rats. *Alcohol* **7**, 115-20, (1990)
- 10) Manabe Y., Toyoda T., Kuroda K., Imaizumi, M., Yamamoto T, Fushiki T.: Effect of diazepam binding inhibitor (DBI) on the fluid intake, preference and the taste reactivity in mice. *Behav. Brain Res.* **126**, 197-204, (2001)

Ⅱ 採血を伴わないヒト血糖値の非侵襲測定と食品のグリセミック・インデックス測定への応用

1. はじめに

生活習慣病予防・治療の観点から食生活の改善に関心が寄せられ、食後の血糖値の上昇性を示すグリセミック・インデックス (GI) が注目されている。GI はその値が高い食品ほど食後の血糖値を高く押し上げやすいことを意味する。糖尿病患者および糖尿病予備軍とよばれる人々にとって、食品の GI は良好な健康管理を行う上で重要な指標となる。食品の GI を測定するためには、指先から少量ではあるが数十回もの採血が必要で、被験者に大きな苦痛を与えることから、GI は未だ食品産業分野で広く採用されるまでには至っていない。

そこで、近赤外スペクトルの測定により、非侵襲で血糖値を測定する方法の開発を行うとともに、その方法の食品の GI 測定への応用を試みた。

2. 血糖値とは

血糖とは血液に含まれるブドウ糖 (グルコース) のことを意味し、その血液中の濃度を示した値が血糖値である。健常者の空腹時血糖値は、60～110 mg/dL である。食後、摂取した栄養素のうち糖質は消化酵素により分解されてグルコースになって小腸で吸収され、吸収されたグルコースは血液によって全身に運搬され、その血中グルコースはエネルギーとして消費される。エネルギーとしてすぐに消費されない余剰の血中グルコースは、肝臓や筋肉組織等でグリコーゲンとして、またさらには脂肪組織で中性脂肪として貯蔵される。エネルギー源として血糖が消費され血糖値が低下すると、蓄えられたグリコーゲンがグルコースに分解されて血液中に放出され、血糖値はほぼ一定に維持される。

この糖代謝のメカニズムをコントロールしているのがインスリンという酵素である。食後血糖値が上昇すると膵臓からのインスリンの分泌量が増加し、増加したインスリンの働きにより血中のグルコースが肝臓・筋肉組織・脂肪組織に取り込まれ、血糖値が低下する。血糖値が通常のレベルに達すると、インスリンの分泌量が低下する。このようなメカニズムにより血糖値はほぼ一定に維持される。空腹時血糖値が 126mg/dL 以上、かつ食後 2 時間時の血糖値が 200mg/dL 以上であり、別の日の検査でも同様の結果である場合、被験者は「糖尿病」と診断される。「平成 19 年国民健康・栄養調査」¹⁾によると、「糖尿病が強く疑われる人」は約 890 万人、「糖尿病の可能性を否定できない人」は約 1,320 万人であり、約 2,210 万人の者が糖尿病である可能性が高い。

糖尿病には「1 型糖尿病」と「2 型糖尿病」とがある。前者の「1 型糖尿病」は遺伝的な傷害により膵臓のインスリン分泌機能が極端に低下あるいは失われた

ことが原因で起こる糖尿病で、インスリン注射などの治療を必要とする。日本では糖尿病患者の約3～5%がこのタイプと言われている。後者の「2型糖尿病」は、インスリン分泌低下とインスリン感受性低下の二つを原因とする糖尿病で、糖尿病になりやすい生活習慣を行うことによって誘発される。日本の糖尿病患者の90%以上がこのタイプと言われている。糖尿病患者の大部分を占める「2型糖尿病」の場合、血糖値を低下させる能力が低下していることから、膵臓に負担を掛けないためには食後血糖値を高値に上昇させないことが食生活改善のポイントになる。

3. グリセミック・インデックス (GI) とは

グリセミック・インデックス (GI) は Jenkins ら²⁾ によって提唱された指標で、図1の様に、空腹の状態です糖質50グラム相当量の検査食を摂取した際の摂取後2時間までの血糖上昇曲線下面積を、基準食のそれに対する比率で表示した値で、次式で示される。

$$GI = \left\{ \frac{\text{検査食の血糖上昇曲線下面積}}{\text{基準食の血糖上昇曲線下面積}} \right\} \times 100$$

高GI食品摂取後の血糖値は急激に上昇して高値に達し血糖上昇曲線下面積が大きいのにに対し、低GI食品の血糖値は緩やかに上昇し、そのピーク値が低く血糖上昇曲線下面積が小さいことを意味する。従って、低GI食品はインスリン分泌低下とインスリン感受性低下を起こしている2型糖尿病患者にとって膵臓の負担を軽減する意味から適している。

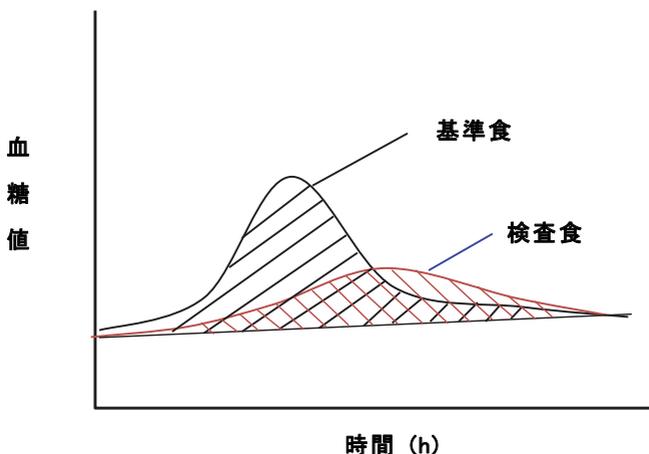


図1 基準食と検査食の血糖上昇曲線下面積

4. 非侵襲血糖値測定の精度に及ぼす要因の検討³⁾

4.1 スペクトル測定に適した部位

まず、ヒトの体のどこでスペクトルを測定すべきかを明らかにするためにスペクトル測定に適した部位について検討した。測定部位として腕、手首および手の平を選び、腕と手首の比較、手首と手の平の比較を行った。それぞれの比較試験で、グルコース負荷試験を実施し、比較する測定部位でスペクトルを測定、その後直ちに指先から採血、簡易型血糖値測定器（アークレイ社製、グルコカードダイアメーター）を用いて血糖値を測定した。測定したスペクトルデータと血糖値データを基に多変量解析の方法の一つである PLS（Partial Least Square）回帰を行い、測定精度を比較した結果、手の平の小指側（小指球）で最も良い結果が得られた。小指球で最もよい結果が得られた理由として、その領域には毛細血管が分布し生体組織が比較的均一であることが影響していると考えられた。大きな血管の近くでは測定プローブのセットの僅かなズレが測定するスペクトルに大きく影響する。

4.2 測定プローブのサイズの影響

今回のスペクトルの測定ではインタラクタンス法という方法を採用した。インタラクタンス方式の光ファイバプローブの構造を図2に示す。ドーナツ状の部分（照射部）から光が照射され、試料内部で拡散反射した光が中央部（検出部）で検出される。照射部と検出部の距離は測定する視野の広さおよび測定部分の深さに影響することから、測定プローブのサイズの影響についてグルコース負荷試

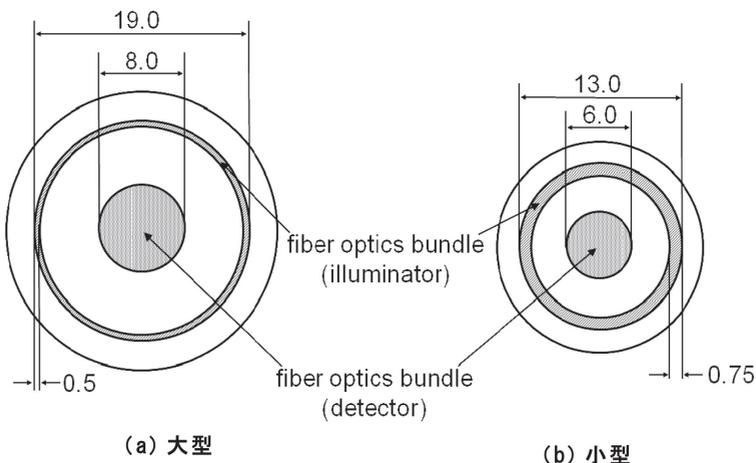


図2 インタラクタンス方式の光ファイバプローブ³⁾

験を行い測定精度を比較した。その結果、大きい光ファイバープローブでよい結果が得られた。大きければ大きいほどよいという訳ではないが、今回比較したプローブでは、大きい方がより広い範囲の平均スペクトルが測定できるためと考えられる。

4.3 測定プローブの保持方法の影響

スペクトル測定中のプローブの安定性は測定スペクトルに影響を及ぼす。そこで、「手で保持する方法」と「台に固定する方法」の測定精度に及ぼす影響について検討した。4.1の場合と同様にグルコース負荷試験を行い、測定精度の比較を行った結果、後者に於いて高い精度が得られた。その理由として、後者の方がプローブと手の平の接触圧力および手の平の温度がより安定しやすいことによると考えられる。

4.4 スペクトル測定と血糖値測定の時間的ズレの影響

グルコース負荷試験中は血糖値が急激に変化する。従って、スペクトル測定と従来法による血糖値の測定の僅かな時間のズレが測定誤差を大きくする危険性がある。そこで、スペクトル測定後に血糖値を測定する「順次測定」と両者の測定を同時に行う「同時測定」の測定精度に及ぼす影響について検討した。4.1の場合と同様にグルコース負荷試験を行った結果、後者に於いて二つの値によりよい一致が見られた。

4.5 総合評価

以上の結果を総合してすると、最良のスペクトル測定条件は次のようになった。



(a) 手で保持する方法



(b) 台に固定する方法

図3 測定プローブの保持方法³⁾

- (1) 測定部位は手の平の小指球とする。
- (2) プローブのサイズは図2の (a) 大型とする。
- (3) フローブの保持方法は図3の (b) 台に固定する方法とする。
- (4) スペクトル測定と血糖値測定は同時測定とする。

上記の条件でグルコース負荷試験を行った結果、決定係数 (R^2) 0.85、フルクロス・バリデーションによる測定誤差 (SECV) は 9.7 mg/dL という最良の結果が得られた。

5. 非侵襲測定装置による食品 GI の測定⁴⁾

5.1 非侵襲血糖値測定装置

上記の成果を踏まえ、食肉用のインタラクタンス方式の分光装置を改良することにより、手の平の近赤外スペクトルを非侵襲的に測定する血糖値測定用分光装置を開発した。その装置の構造を図4に示す。本装置は、光源、スペクトル測定

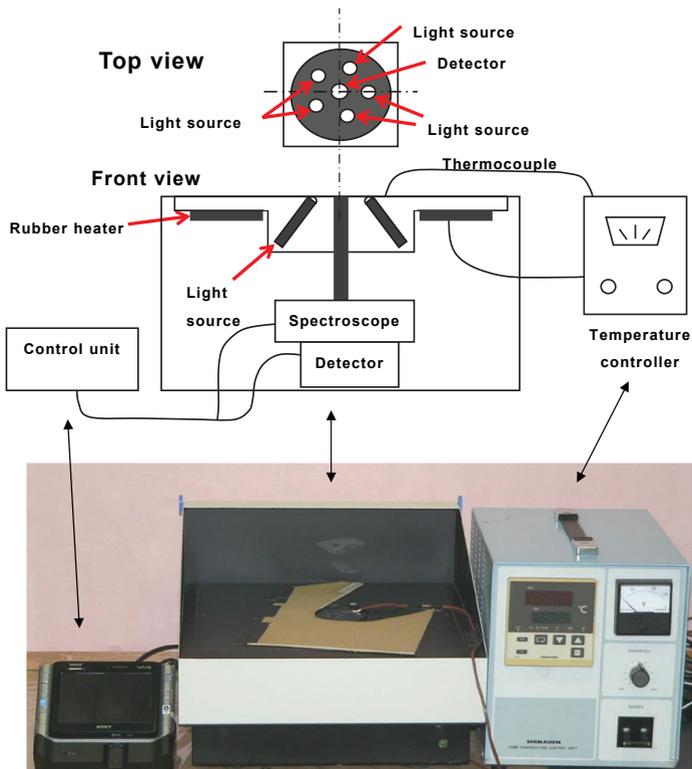


図4 非侵襲血糖値測定装置⁴⁾

部、分光器、検出器、制御装置および温度コントローラーから構成されている。スペクトル測定部には、小型タングステンハロゲンランプ5個が測光用パイプを中心にして半径8.5mmの円周上に配置されている。ランプから発した光は測定対象である手の平の内部で拡散反射され、その一部が測光用パイプを介して分光器に導かれ、アレイ型検出器によりスペクトルが測定される。スペクトル測定中の手の平の温度を一定に保持するため、手の平が接触するスペクトル測定部の内側にラバーヒーターが取り付けられている。ラバーヒーターの温度は銅-コンスタンタン熱電対からの温度シグナルによりヒーターへの供給電圧をコントロールする温度コントローラーにより調節される。血糖値測定装置の制御装置として小型コンピュータが設置されている。

5.2 基準食の負荷試験

基準食の負荷試験はFAO/WHOのプロトコル⁵⁾に準拠して行った。一晚絶食した健常者1名を対象に4.1の場合と同様にグルコース負荷試験を実施した。グルコース50gを溶かした水溶液150mLを摂取し、摂取前および摂取後15分、30分、45分、60分、75分、90分、105分、および120分時点のスペクトルおよび血糖値を同時測定した。血糖の測定は指先から採取した血液を用いて医療用血糖値測定装置(富士フィルムメディカル社製、ドライケムFDC300G)で行った。測定した手の平のスペクトルの2微分値データと血糖値データを基にPLS回帰を行った結果、図5に示すような良好なPLS検量モデルが得られた。血糖値の

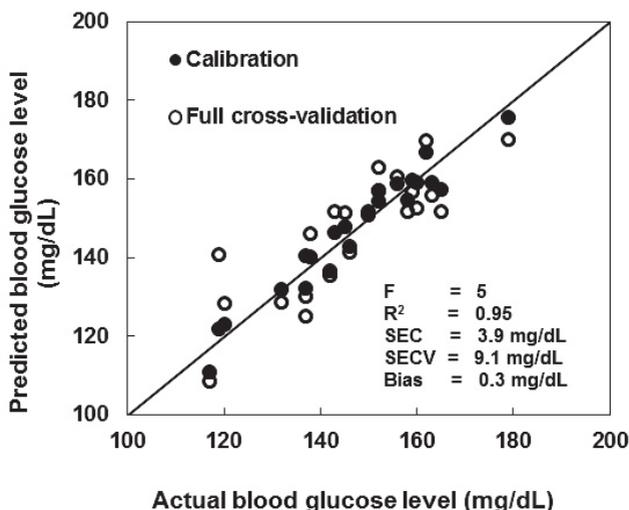


図5 非侵襲測定装置による血糖値の測定精度⁴⁾

測定誤差 (SECV) は 9.1 mg/dL であった。前に行ったインタラクタンス方式のスペクトル測定装置を用いた実験結果とほぼ同等の測定精度が得られた。

5.3 検査食の負荷試験

検査食の負荷試験も基準食と同様、FAO/WHO のプロトコルに準拠して実施した。検査食には、高 GI 食品として米飯、中 GI 食品としてかまぼこ、低 GI 食品としてヨーグルトを用い、糖質 50 g 相当量 (米飯 147g, かまぼこ 476g, ヨーグルト 424g) を水 150mL とともに摂取し、基準食と同様な手順によりスペクトルおよび血糖値の測定を同時に行った。

5.4 食品 GI の算出

開発した被験者専用の検量モデルを検査食摂取時に 5 分間隔で測定した手の平のスペクトルに適応し血糖値を算出した。GI 測定に必要な摂取後 15, 30, 45, 60, 90, 120 分時の血糖値は測定時の前後 5 分時の推定値の平均値を持ってその値とした。但し、5 分間隔の連続した推定値において直前の値との差が 30mg/dL 以上ある値は異常値と見なし計算から除外した。

基準食および各検査食の血糖上昇曲線を図 6 に示す。各検査食において、近赤外法による値と血糖の実測値の変動は類似した。現段階では、近赤外分光法による血糖値測定は安定性に欠けることから、基準食の血糖上昇曲線下面積は実測値から算出した。基準食および検査食の血糖上昇曲線下面積および GI を表 1 に示す。米飯、かまぼこ、ヨーグルトの GI は、近赤外値および実測値においてほぼ同じ値を示した。

6. まとめ

被験者に苦痛を与えない、食品のグリセミック・インデックス (GI) の測定法の確立を目的として、採血を伴わない非侵襲血糖値測定法の開発を行った。インタラクタンス法と言うスペクトル測定方法を用い、手の平の小指側 (小指球) の近赤外スペクトルを測定することにより、良好な血糖値用検量モデルを作成することに成功した。この実験結果を踏まえ、非侵襲血糖値測定装置を試作した。同装置を用い食品の GI 測定を試みたところ、近赤外法による推定値と実測値はほぼ同じ値となり、近赤外法により非侵襲的に食品の GI が測定可能であることが実証された。しかし、今回の実験では、被験者が一人で、血糖値測定用の検量モデルは被験者専用であり汎用性に欠け、また、非侵襲血糖値測定装置による血糖値推定値も必ずしも安定しておらず、今後更なる研究が必要である。

7. おわりに

この研究は農林水産省が実施する「食品・農産物の表示の信頼確保と機能性解

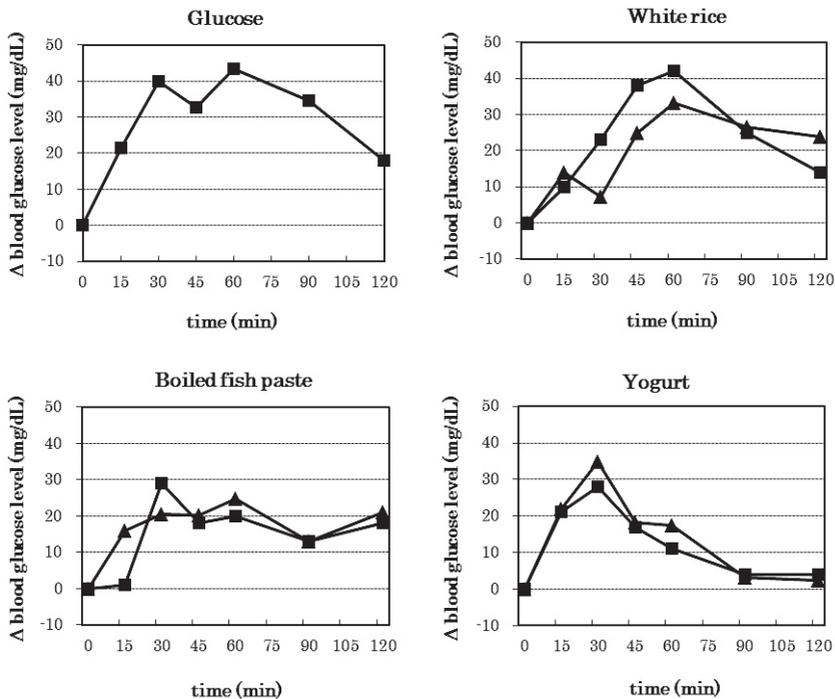


図6 基準食および各検査食の血糖値上昇曲線⁴⁾

■：実測値，▲：近赤外法による値

表1 食品のグリセミック・インデックス (GI) の測定例⁴⁾

食 品	面積		GI	
	実測値	近赤外値	実測値	近赤外値
グルコース	3698		100	-
米飯	2970	2590	80	70
かまぼこ	1830	2122	49	57
ヨーグルト	1418	1652	38	45

析のための基盤技術の開発(略称：信頼機能プロ)の研究の一環として実施した。また、この研究を実施するに当たり、筑波大学院生の上平安紘君を始め、多くの方々のご協力を頂いた。ここに厚くお礼申し上げます。

(食品分析研究領域 非破壊評価ユニット 河野 澄夫)

参考文献

- 1) 厚生労働省：平成 19 年度国民健康・栄養調査報告 (2010)
- 2) D.J.A. Jenkins, T.M.S. Wolever, R.H. Taylor, H. Barker, H. Fielden, J.M. Baldwin, A.C. Bowling, H.C. Newman, A.L. Jenkins and D.V. Goff, *Am. J. Clin. Nutr.*, **34**, 362 (1981) .
- 3) Y. Uwadaira, N. Adachi, A. Ikehata and S. Kawano, *J. Near Infrared Spectrosc.*, **18**, 291-300 (2010)
- 4) 上平安紘, 足立憲彦, 池羽田晶文, 河野澄夫, 日本食品科学工学誌, **58(3)** 印刷中 (2011)
- 5) FAO/WHO: FAO/WHO expert consultation carbohydrates in human nutrition, FAO, (1998)

Ⅲ 食品からの微弱発光を利用した品質評価技術

1. はじめに

近年、消費者の食品の安心や信頼に対する関心は高まっており、遺伝子組み換え食品（Genetically Modified Organism, GMO）の検出技術、DNA判別によるコメの偽品判別技術、残留農薬やポリ・アクリルアミドの分析などの高精度な分析技術が開発・利用されている。しかしながら、このような高度な分析方法は熟練した技術習得が不可欠であり、専用の実験施設や高額な分析機器も必要となることから、流通過程のすべてで分析することは難しい。危害要因や品質を高精度に分析する技術は重要であるが、「産地」から「消費者」までの品質管理を徹底するには迅速性のある簡易なスクリーニング技術も必要である。スクリーニング技術としては、測定者の熟練を必要としない機器分析法や簡単な分析キットなどが適している。

本研究では、食品から発生する「微弱な光」を利用した、新しい品質評価手法の開発を目的とする。食品から自発的に生じる極微弱発光現象は食品の品質変化と密接に関係しており、品質を発光量で推定できれば、分析者に熟練を要求しない非常に簡単な計測技術となる。また、光ルミネッセンス法は、自発極微弱発光計測装置に励起用光源とその制御機構を取り付けたものであり、計測中に作業者の操作を全く必要としない、非常に簡易な計測法である。

今回は、このような微弱発光を計測する装置の簡単な紹介と自発極微弱光、光（刺激）ルミネッセンス等の利用による品質評価技術の具体例を紹介する。

2. 食品からの自発極微弱発光現象による品質評価

食品や植物は非常に微弱な光「極微弱光」を自発的に発光しており、食品素材から生じる発光現象はその品質と関係があると言われている。食品や食品素材から自発的に発生する「極微弱発光現象」は、一般に化学発光（極微弱化学発光）の一つに分類され、脂質やタンパク質などの自動酸化や加熱酸化に伴う現象である¹⁾。この発光現象と品質の関係を詳細に検討した結果、発光量計測のみで食品の品質変化を簡便に推定できることが明らかになった。本項では、微弱な光を計測する計測装置および測定例を紹介する。

2.1 微弱発光計測装置

人間の眼は非常に高感度であり、肉眼の検出限界は 10^4 Lx（星明かりの夜空の明るさに相当）程度であるが、食品からの自発的に生じる極微弱発光は、 10^6 Lx以下の光であり肉眼で捉えることはできない。このような微弱な発光現象は、波動性を示す光（光波）ではなく、粒子性を示す光（光子あるいは光量

子)として発生するといわれている。これらの発光現象の計測には光電子増倍管 (Photomultiplier Tube, PMT) を用いたフォトンカウンティング計測や、超高感度カメラ等が用いられる。感度面では、PMT タイプの計数装置が優れている。PMT タイプでは、対象物からの発光部位に関する位置情報は得られないため、試料から均一に発光が生じる液体や粉体などの計測に適している。一方、高感度カメラでは、各種発光現象の位置情報が明らかになるため、発光メカニズム解明等に有効な計測装置である。それぞれ、長所と短所があるので、試料の種類や目的に合わせて計測装置を選定する必要がある。以下にそれぞれの装置の特徴をまとめた。

1) 光電子増倍管 (PMT) タイプ発光計数装置

PMT タイプ発光計数装置の概略を図1に示した。完全遮光された暗箱内に試料を入れPMTの光検出部(光電面)で発光計測される。一般に、検出感度と発光体までの距離は2乗に反比例する性質があるため、試料と検出器までの距離は短いほど高感度に計測できる。

PMTに入射した光子は、内部で電子(光電子)に変換され約 10^6 倍まで増幅され、微弱な電流として出力されている。フォトンカウンティングユニットでは、入力信号に一定のしきい値を設定し、発光の有無を断続的なパルス信号(TTL信号)として出力する。発光強度は、単位時間当たりの信号パルス量で表され、単位にはCPS(count/s)が使用されることが多い。この手法をフォトンカウンティング手法といい、極微弱光下の計測において検出限界(S/N比)が

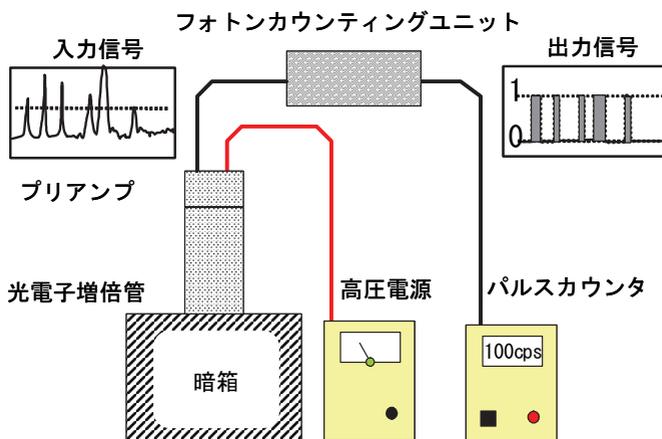


図1 極微弱発光計数装置の概略

格段に向上する。

極微弱発光現象は、計測前の光照射の影響を受けやすく遅延発光が生じるため、装置への試料セット後、発光測定まで一定時間の暗順化時間を要する。PMT タイプでの発光計測は高感度ではあるが、試料のどこから発光しているかまでは分からないため、均一に発光が生じる試料（液体、粉体など）の計測に適している。

2) 2次元画像計測装置

図2に極微弱発光画像計測装置の概略を示した。PTMタイプの計数装置と同

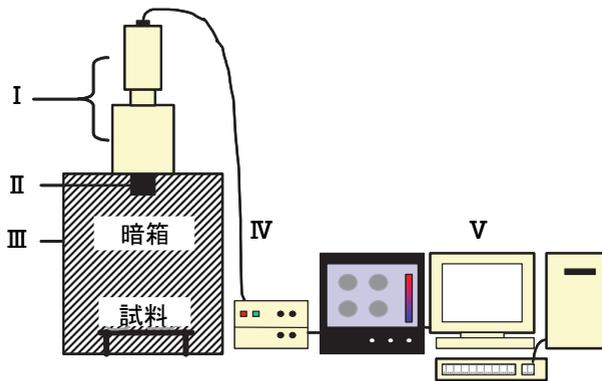


図2 極微弱発光画像計測装置（上図：概略，下図：システム一例）

I：カメラ（VIMカメラ，浜松ホトニクス）II：レンズ（ $F=25\text{mm}$ ， $f=0.95$ ），III：恒温チャンバ，IV：画像処理装置（ARGUS-20：浜松ホトニクス），V：コントローラ

様に、試料は測定暗箱内に並べられる。微弱光発光の計測は検出器に ICCD の一種であるイメージ・インテンシファイアー (I・I) 付きの高感度カメラ等が用いられる。高感度に計測するため、試料とカメラを近づける必要があるが、微弱光の画像計測においては焦点距離よりもレンズの f 値 (レンズの明るさ) の影響を大きく受けるため、f 値の小さい明るいレンズの利用が不可欠である (実験では $f=0.95$ Schneider 社製を利用している)。画像処理装置では、PMT のフォトンカウンティング計測と同様に、一画素毎の信号に対して一定強度のしきい値を設定し、ノイズを除去する。さらに、画像処理装置では、一定時間積算することで評価可能な画像が得られる。近年、光学機器の進歩により、I・I を使用しない冷却 CCD の感度も格段に良くなっており、食品素材からの発光現象の 2 次元画像計測が容易になっている。

3) 極微弱発光波長計測装置

微弱発光計数装置では光質 (波長) の違いは計測できない。発光波長解析からはその発光種や発光機構に関する特徴抽出や解明に極めて重要な情報が得られる。しかしながら、食品からの発光量は装置の検出限界に近く非常に微弱なため通常の分光装置では計測できない。このような極微弱発光を分光計測する装置として、①フィルター差分-PMT 方式、②回折格子-ICCD 方式 (多波長同時分光方式)、③サバール板偏光干渉-フーリエ変換方式が開発されている。

2.2 自発極微弱発光計測の食品品質評価への応用

食品分野では、PMT タイプの計数装置を利用した研究がなされ、食用油が劣化に伴い化学発光が増加すること²⁾、食肉や魚が劣化に伴い極微弱発光量が増加すること³⁾、150℃の高温で発光量を計測すると大豆油の劣化度を計測できること⁴⁾、リノール酸に抗酸化剤を添加し発光量の減衰で抗酸化性を評価できること⁵⁾、碎米からの微弱発光がチオバルビツール酸値 (TBA 値) と相関があること⁶⁾、等が明らかになり、ほとんどの極微弱発光現象は油脂の酸化によるものと考えられてきた。しかしながら、高感度カメラで 2 次元画像として発光現象を計測することで、食品素材からの発光現象は一様ではなく、油脂の酸化に伴う発光以外にも、抗酸化性成分も発光に関与することが明らかになった。ここでは、具体例として、精米、ポテトチップ、ゴマ油の自発発光現象を紹介する。

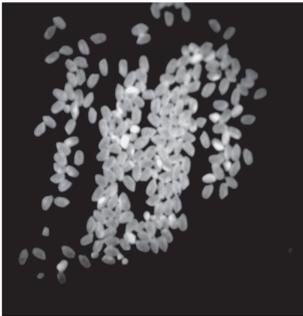
1) 精米の発光現象⁷⁾

赤外分光分析法を用いた食味計の開発により、良食味米のおいしさを食味値で表せるようになった。しかしながら、品質の指標となる脂肪酸度は、有機溶媒による抽出後、水酸化カリウム (KOH) 溶液の中和滴定で求められており、分析に約 3 時間を要している。精米の極微弱発光現象を高感度カメラにより画像で計

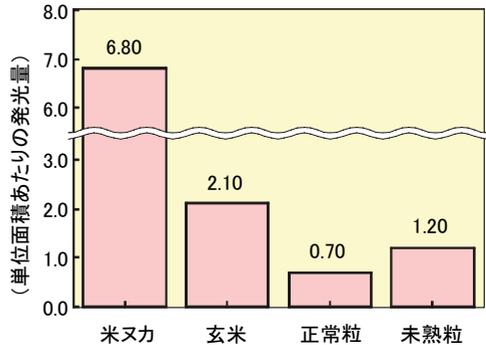
測したところ、米粒からの発光量は一粒ごとに異なっており、白濁した未熟粒からの発光量が多いことが明らかになった。正常粒と白濁した未熟粒を比較すると、未熟粒は精米に対して発光量は1.7倍多く、品質指標となる脂肪酸度も高いことが明らかになった（図3）。さらに、長期間貯蔵された精米でも、脂肪酸度が高いほど発光量は多くなった。また、スペクトル分析の結果から、米の極微弱発光は670～680 nm に特徴的な発光ピークがあることが確認された（図4）。

2) ポテトチップの発光現象⁹⁾

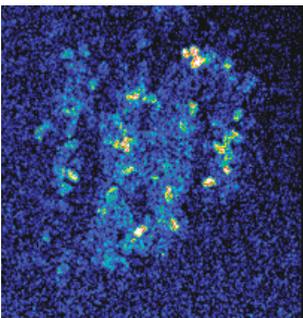
市販ポテトチップは、アルミニウム包材で窒素ガス充填包装されているため、貯蔵中の劣化が抑制されている。そのため、開封とともに酸素と接触することで、自発極微弱発光量が多くなった。また、一枚のポテトチップ中には外周よりはほんの少し内側の部分に黒く褐変している部分があり、極微弱発光もこの褐変し



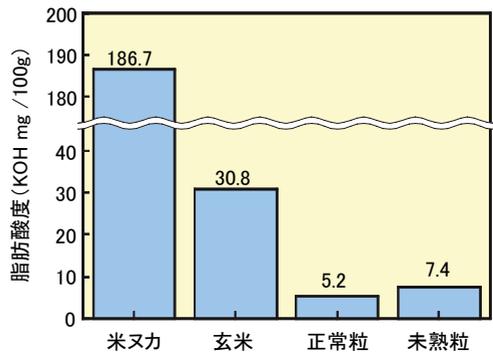
a) 通常画像



c) 供試試料の発光量
(積算時間10分、50℃)



d) 極微弱発光画像



d) 供試試料の脂肪酸度

図3 精米からの極微弱発光現象

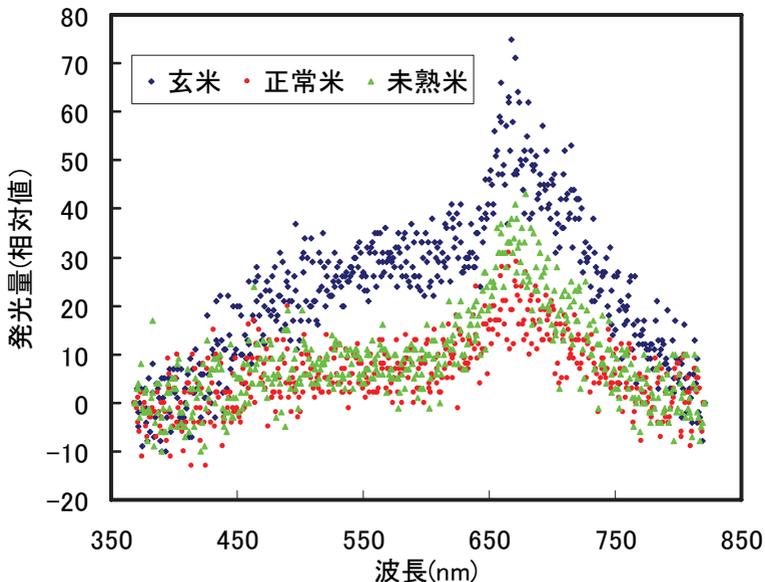


図4 コメの発光波長計測結果（コシヒカリ，計測温度 100℃）
回折格子－ICCD方式（東北電子産業 CLA-SP2）にて測定

た部分から多いことが明らかになった。このようにポテトチップからの極微弱発光現象は、これまで考えられていた油の酸化以外にも褐変反応物質が関係していることが極微弱発光の画像計測で明らかになった。さらに、極微弱発光計測による品質計測への応用可能性を検討するため、製造日の異なるポテトチップを計測したところ、遮光、窒素ガス充填された消費期限内のポテトチップであっても、貯蔵日数に伴い発光量の減少が生じ、特に、製造後1ヶ月以内に発光量が極端に少なくなることが明らかになった（図5）。ポテトチップの品質変化の指標となる過酸化価（POV）や酸価（AV）は、製造後1ヶ月程度では、ほとんど変化しないが、極微弱発光では明確な差異として検出でき、初期段階の品質変化を計測できる可能性が示されている。

3) 焙煎ゴマ油の極微弱発光⁹⁾

焙煎ゴマ油は他の食用油に比べ非常に高い抗酸化性（酸化安定性）を示す。また焙煎処理により油脂の持つ抗酸化性が高まることもよく知られている¹⁰⁻¹²⁾。搾油（圧搾）前のゴマ種子の微弱発光を計測したところ、焙煎温度が高くなるほど焙煎種子からの発光量は多くなった。すなわち、ゴマ種子焙煎時の高温加熱によ

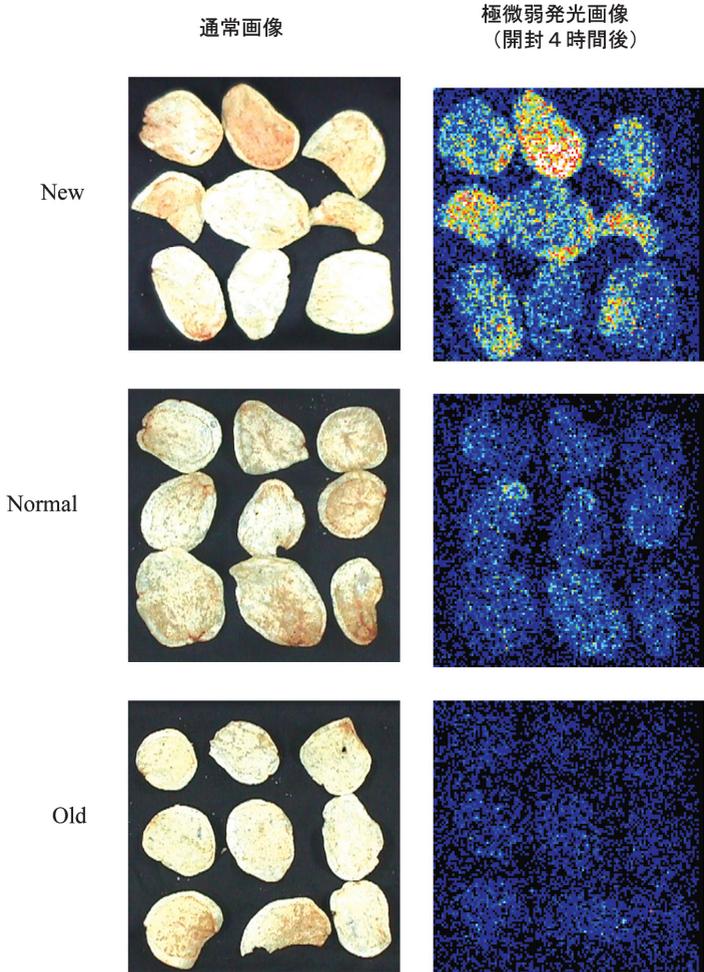


図5 貯蔵条件の違いがポテトチップの発光現象に及ぼす影響
(積算時間 30min, at 25°C)

New : 製造直後の製品, 通常包装 [アルミ包装, 窒素充填], 製造後 7 d,
Normal : 通常流通製品, 通常包装, 製造後 29 d, Old : 劣化加速試験品,
劣化促進包装 [透明フィルム包装, ガス置換なし] 製造後 26 d

り褐変物質 (アミノ・カルボニル反応物, セサモール等) が生成され, これらの抗酸化性物質が発光に関与したと考えられる。また, 加熱劣化時 (120°C) の焙煎ゴマ油は, 劣化の初期段階において品質劣化に伴い極微弱発光量が減少するこ

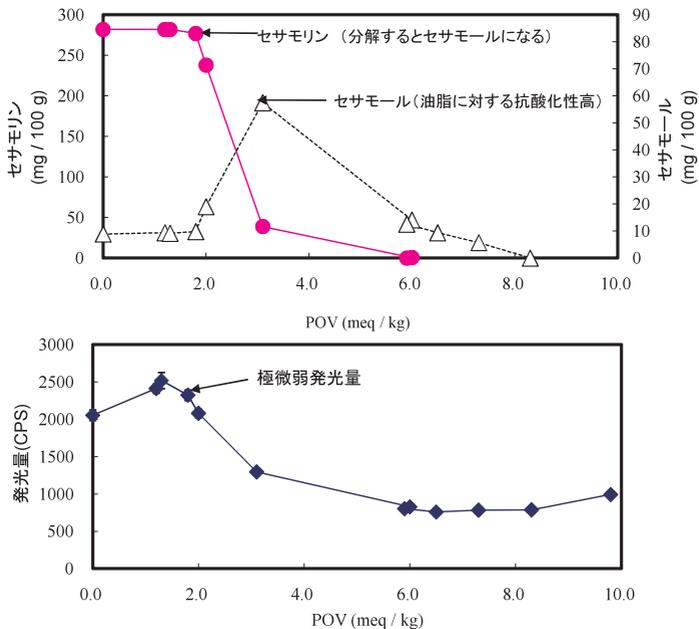


図6 焙煎ゴマ油の品質劣化（劣化加速試験）時の極微弱発光量と抗酸化性成分セサモリン、セサモールの変動

初期に抗酸化性分であるセサモールの減少に伴い発光量も減少する、劣化が進み抗酸化性成分がなくなると発光量が増加し始める

と、さらにこの発光量の減少は抗酸化性成分のセサモールならびにその前駆体であるセサモリン含量の変化に非常によく似ていることが確認された（図6）。通常、油脂類は酸化に伴い発光量が増加すると考えられているが、焙煎ゴマ油のように抗酸化性成分の影響（抗酸化性成分の酸化による発光）で生じることも確認された。

食品からの自発極微弱発光では、品質の良いものほど発光量が多くなるもの（ポテトチップ、焙煎ゴマ油の初期反応等）、逆に劣化に伴い発光量が増加するもの（精米、リノール酸等）がある。品質評価に使用するためには、食品毎に品質変化と発光現象の関係を事前に明らかにする必要がある。ただし、計測装置や操作は非常に簡単であることから、流通過程での品質管理用の簡易計測技術としては非常に有効な計測方法となることが期待される。

3. 光ルミネッセンスによる食品照射履歴の検知¹³⁾

食品や農産物に電子線やガンマ線などの放射線を照射することは「食品照

射」と呼ばれ、殺菌、殺虫、発芽抑制などに有効な技術の一つであり、海外では50ヶ国以上で食品照射が認可され、実用化が進められている。一方、日本では食品衛生法により馬鈴薯（ばれいしょ）の発芽抑制のため150 Gy以下のガンマ線照射が例外的に認められているが、殺菌や殺虫を目的とした食品への放射線照射は禁止されており、海外で照射処理された食品の輸入も一切認められていない。照射食品の適正な流通管理のため、欧州標準化委員会（CEN規格）には10種類の分析方法が採用されており、香辛料の放射線照射履歴の検知法には、熱ルミネッセンス（Thermoluminescence, TL）法や光ルミネッセンス（Photostimulated luminescence, PSL）法などの発光計測法がある¹⁴⁾。国内でも、TL法が照射食品検知の公定法（通知法）に採択されている¹⁵⁾。

TL法、PSL法とも食品自身ではなく微量に含まれる鉱物が発光する。放射線照射により、鉱物内の結晶構造内に準安定状態エネルギーが蓄えられる。そこに、熱あるいは光で刺激（励起）をすることで、トラップされている放射線由来のエネルギーは光として放出される。TL法では、約400℃まで加熱するため光計測に先駆けて食品素材から鉱物だけを分離する必要があるため、一連の分析には最低3日を要する。一方PSL法は、近赤外光の励起（刺激）で結晶構造内に蓄えられたエネルギーを可視光として放出させる方法であるため、事前の鉱物分離は不要であり、分析時間は1～2分と非常に短時間である。検知精度はTL法に比べると若干劣るものの、照射食品のスクリーニングには十分有効である。ただし、CEN法に採用されているPSL法（EN13751）では判別基準となる発光量を装置や食品毎に設定する必要があることから、より客観性の高い判別方法が必要とされていた。

そこで、自発微弱発光計測装置を改造によりPSL装置を試作し、客観性の高い食品照射履歴の判別方法を見いだした。また、開発したPSL装置および判別方法の感度を既存PSL装置の測定結果と比較し、実際の検査への利用の可能性も検討した。

3.1 PSL装置試作と新規PSL判別方法の開発

試作PSL計測装置は、自発極微弱発光計測装置の改良（励起光源、各種フィルター追加）により作製した（図7、8）。計測装置の励起光源には近赤外LED照明、励起光源の除去には赤外線カットフィルターを使用した。測定用の試料皿には、励起光の反射・吸収の少ないステンレスシャーレ（5 cmφ）を用いた。強いPSLシグナルを得るため、効率よく試料を照射できる光源や励起光除去フィルター等を検討し検出感度を向上させた。具体的なPSL計測手順は、①励起光を照射せずに10秒間測定し、試料からの自発発光量の変化により遅延発光がないことを確認する。②励起光を照射して100ミリ秒間隔で測定するものとした。

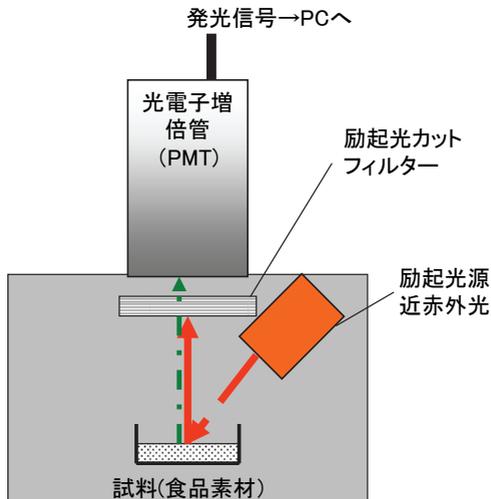


図7 PSL装置の概念図

PMTタイプの発光計装置に、励起光源、励起光カットフィルターを追加し作製



a) 開発PSL装置
(JREC製)



b) EN法推奨装置
(SURRC製)

図8 PSL計測装置

この試作 PSL 装置での照射パブリカの発光計測結果を図9に示した。計測開始から10秒までは、試料から生じる自発発光が計測される。10秒後から試料へ励起光(近赤外線)が照射され、照射食品からはPSLが生じ(発光量が増加し)、発光量は時間経過に伴い徐々に減衰する。一方、非照射試料では、放射線由来

のエネルギーが鉱物内にトラップされないため、PSL は生じることなく発光量に変化は生じない。EN 法では、PSL の積算発光量が、判別基準の発光量 (T_1 , T_2 ; $T_1 = 700$, $T_2 = 5000$ (一例)) に対して大きいか少ないかで判別しており、この基準発光量は食品ごとに異なっている。今回、PSL 装置を試作し、PSL シグナルの時間変化を計測できたことから、光励起 (刺激) 後に PSL シグナルの強度が変化することが明らかになり、この現象は他の食品でも同様に確認された。これらの検討により、照射試料は PSL 発光量が時間経過に伴い減衰し、非照射試料の発光は減衰しない (変化しない) という PSL シグナルの強度変化に基づく照射履歴判別方法が見いだされた (図 10)。

3.2 PSL による香辛料乾燥野菜の計測

食品照射履歴の検知精度を明らかにするため、表 1 に示す香辛料・乾燥野菜を食品総合研究所内コバルト 60 にて 1 kGy 照射し、1 週間暗所に保管した後、既存 PSL 装置 (SURRC 製) および開発 PSL 装置 (JREC 製) で分析した (図 8)。

PSL 測定は、試料 (香辛料、乾燥野菜) からの遅延発光の影響も考え、試料を装置にセットし 1 分間暗順化させた後、計測した。既存 PSL の分析結果は、基準積算発光量を元に自動的に、「Positive」, 「Intermediate」, 「Negative」と表される。開発 PSL 装置では、PSL シグナルの強度変化が明確だったものを「++」,

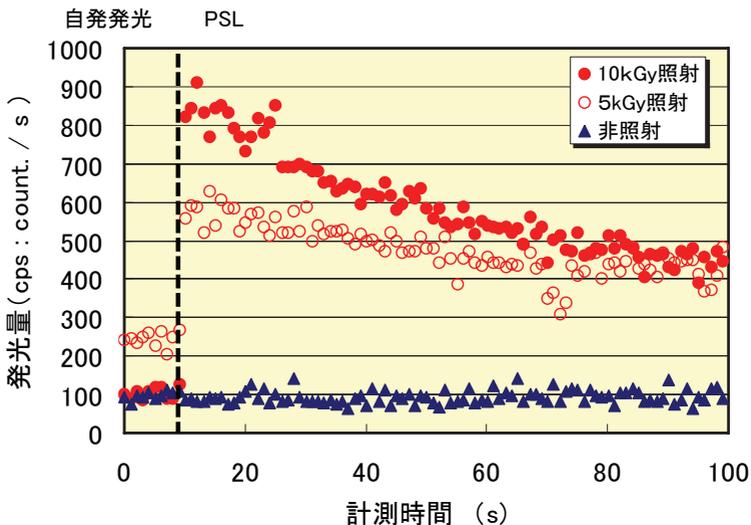


図 9 開発 PSL 装置によるパプリカの PSL 発光

(2004/08/22 照射処理, 2006/09/08 測定)

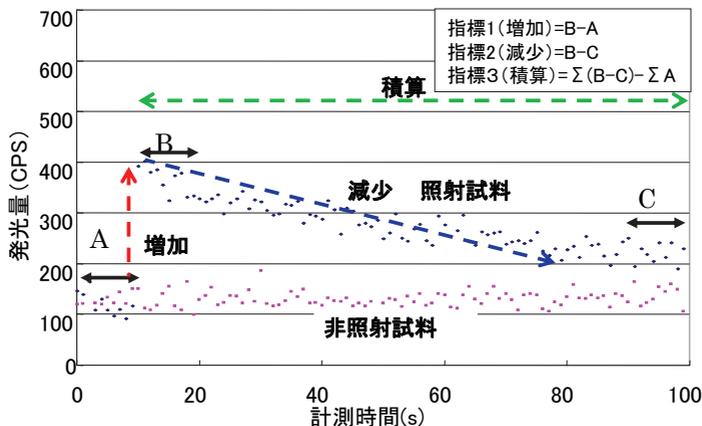


図 10 PSL 強度変化に基づく照射履歴判別方法 (新規 PSL 判別法)

照射試料は光励起後発光量が増加し徐々に減衰する

非照射試料は光励起後発光量は変化しない

強度変化が確認できたものを「+」、判定不可能であったものを「-」と表記した。PSL 計測の結果、新規 PSL 判定法でも、既存 PSL と同等の結果が得られた (表 1)。新規 PSL では判別基準となる発光量を設定する必要がないため、より客観的な判別方法と考えられる。

岩塩やナツメグなどの一部の試料の判定結果には、良好ではないものもあった。岩塩に関しては、自然放射線の影響で非照射であってもわずかに PSL が生じる。1 kGy 照射後の岩塩の発光量は、非照射に比べて数 10 倍以上多いことから、照射履歴の判別は可能である。このように一部の食品では、自然放射線でも PSL が生じるものもある。一方、ナツメグは照射試料で PSL 発光が生じないために PSL では分析できない試料である。これは、ナツメグの生産工程で発光の主要因である鉍物が混入することが少なく、試料中の鉍物量が少ないことが原因である。このように、PSL の応答は食品の種類や産地によって異なるが、一切前処理なく迅速に照射履歴を分析できる PSL 法は食品照射のスクリーニングには十分利用できる。さらに、食品関連企業等では、取り扱う原料 (食材) に対して放射線照射 (標準照射) 後の PSL の応答を事前に調べることで、照射の疑いのある食品の流通を防止するという目的は十分達成できる。

5. まとめ

食品からの自発極微弱発光は、品質の良いものほど発光量が多くなるもの (ポ

表1 1 kGy 照射された食品の PSL による検知の可能性 (ガンマ線照射 1 週間後)

品名	新規 PSL 判別法	既存 PSL 法 (EN 法*)	備考
オレガノ	++	Positive	
ガーリック (あらびき)	+	Intermediate	サンプリングにより感度不均一
岩塩	±	※ Positive	非照射試料も発光量が多い
クミンシード	++	Positive	
クミンパウダー	++	Positive	
粉わさび	++	Positive	遅延発光の影響大
コリアンダー	+	Intermediate	
シナモン	+	Intermediate	
スペアミント	++	Positive	
食塩	++	Positive	
セージ	++	Positive	
ターメリック	++	Intermediate	
ターメリックパウダー	++	Positive	
タイム	++	Positive	遅延発光の影響大
タラゴン	++	Positive	
チリーペッパー	++	Positive	
チリパウダー	++	Intermediate	
唐辛子	++	Intermediate	
ナツメグ	-	Negative	鉱物少ない
バジル	++	Positive	
パセリ	++	Positive	
パプリカ	++	Intermediate	
ブラックペッパー	+	Intermediate	
ペパーミント	++	Positive	
乾しいたけ	+	Positive	
ホワイトペッパー	+	Intermediate	
マスタード	+	Positive	遅延発光の影響大
緑茶	++	Positive	
ローズマリー	++	Positive	

* EN-13751 (2002) 推奨装置: SURRC 製 PPSL 基準発光量 $T_1=700$, $T_2=500$ Count. / 60 s
 Negative (非照射) < T_1 < Intermediate (疑有) < T_2 < Positive (照射)

テトチップ、焙煎ゴマ油の初期反応等)、逆に劣化に伴い発光量が増加するもの(精米、リノール酸等)があり、品質評価に使用するためには、食品毎に品質変化と発光現象の関係を事前に明らかにする必要がある。計測装置や操作は非常に簡単であることから、流通過程での品質管理用の簡易計測技術としては非常に有

効な計測方法となることが期待される。光ルミネッセンス（PSL）法は、1～2分と非常に短時間に、食品への放射線照射履歴を検出できる方法である。特に、海外から輸入される原料の照射履歴検査のスクリーニングには十分な能力を有していた。

このように、微弱発光計測を利用する迅速で簡易なスクリーニング技術を食品流通過程に提供できるよう、今後も引き続き研究に取り組みたい。

（食品工学研究領域 反応分離工学ユニット 蘗原 昌司, 鍋谷 浩志）

参考文献

- 1) 稲場文男, O Plus E, 82-89 (11), 1987.
- 2) 薄木理一郎, 鷹左右紀子, 金田尚志, 日食工誌, **27**, 332-336, 1980.
- 3) Miyazawa T., Kikuchi M., Fujimoto K., Endo Y., Cho S.-Y., Usuki R. and Kaneda T., JAOCS, **68**, 39-43, 1991.
- 4) Miyazawa T., Fujimoto K., Konoshita M. and Usuki R., JAOCS, **71**, 343-345, 1994.
- 5) 薄木理一郎, 遠藤泰志, 金田尚志, 日食工誌, **28**, 583-587, 1981.
- 6) 金田弘拳, 狩野幸信, 越野昌平, 醸協, **89**, 412-413, 1994.
- 7) 蘗原昌司, 齋藤高弘, 志賀 徹, 大谷敏郎, 食科工誌, **49**, 719-725, 2002.
- 8) 蘗原昌司, 大谷敏郎, 食科工誌, **47**, 588-595, 2000.
- 9) 蘗原昌司, 兀下伸二, 関 圭吾 齋藤高弘, 志賀 徹, 大谷敏郎, 食科工誌, **50**, 303-309, 2003.
- 10) Fukuda Y., Nagata M. and Namiki M., JAOCS, **63**, 1027-1031, 1986.
- 11) 小泉幸道, 福田靖子, 並木満夫, 食科工誌, **43**, 686-694, 1996.
- 12) Yoshida H. and Kajimoto G., J of Food. Sci., **59**, 613-616, 1994.
- 13) 萩原昌司, 鍋谷浩志, 等々力節子, 食品照射, **44**, 28-31, 2009.
- 14) 林 徹, **54(9)**, 食科工誌, 389-394, 2007.
- 15) 厚生労働 http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/gyousei/dl/100330_02.pdf (最終アクセス日 2010.11.1)

Ⅳ 原子間力顕微鏡による食品の微細構造解析と相互作用評価

1. はじめに

1.1 食品ナノテクノロジーと食品の微細構造解析／相互作用評価

近年ナノテクノロジーを食品関連分野に適用しようとする動きが世界各国で起きており、一般に「食品ナノテクノロジー」、あるいは「ナノテクノロジーの食品利用」などと呼ばれている。定義はこれまで明確ではなかったが、(1) 食品素材をナノ・マイクロスケールまでサイズダウンする、(2) 食品関連技術にナノテクノロジーを取り入れる、といった2つの方向性に集約されてきたようである^{1,2)}。

(1) に関しては、材料分野のナノテクノロジーに見られるように、食品素材のサイズダウンによって表面積／体積比が増大するため、これまで見られなかった新規機能を獲得できるのではないかと、との考えに基づいており、ここには近年進展が著しい栄養・機能性成分を内包させた微小液滴等も含まれている。また後者の(2)では、例えば、食品包装資材に金属ナノ粒子等を添加して高機能化を図る事例や、ナノテクノロジーを活用した食品品質評価技術を構築する事例についての報告がある。一方、我が国においては、農林水産省の委託プロジェクト研究を軸として、特に上記(1)について加工、製造、機能、あるいは構造の観点から研究開発が推進されているところである²⁾。ナノスケールまで微細化された食品素材は、単位体積当たりの表面積が大きくなるため、表面の微細構造が機能発現(例えば加工特性、味覚、消化吸収等)に大きく影響する可能性がある。そのため、食品素材の微細構造や微細なスケールでの食品(成分)間相互作用の評価は以前にも増して重要となってきた。

食品素材はDNA、タンパク質、糖質、脂質といった、様々な生体物質化合物の集合体で形成されているため、食感、食味、消化性、吸収性といった食品特有の機能は、単一の成分によって決定づけられることはほとんどなく、様々な分子から構成される集合体の微細構造と関係があると考えられている。従って、多成分間の相互作用によって形成される高次構造を解析することが重要となるが、食品の性質と微細構造との関係については未だ不明な点が多く、食品素材の構造機能相関の解明にむけて微細構造計測技術や成分間相互作用解析技術の進展が望まれている。

現在では、生体物質の微細構造を計測するために、その存在形態によって異なる実験手法が適用されている。タンパク質などの単一成分については、X線結晶構造解析やNMRといった手法が用いられる。これらはオングストロームレベルの分解能で精密な構造決定が可能であるが、食品素材等の高次複合体の構造解析には不適である。そのため、食品の微細構造解析には通常の光学顕微鏡や電子顕

微鏡が用いられることが多い。これらの分解能はX線解析等には及ばないが、高次複合体のまま解析できるという利点を持つ。しかし、電子顕微鏡では、重金属による試料の被覆と真空中観察が必要であり、食品本来の存在状態とは異なる環境下での観察にならざるを得ない。そこで我々は、走査型プローブ顕微鏡（Scanning Probe Microscopy; SPM）による高分解能構造計測技術に着目して研究を進めてきた。SPMとは各種プローブ顕微鏡の総称であり、生体試料の微細構造観察には主に原子間力顕微鏡（Atomic Force Microscopy; AFM）が用いられる。AFMは電子顕微鏡と同等の分解能で微細構造を計測できるだけでなく、測定対象に特別な表面修飾が不必要であるとともに、溶液環境下でも計測できる、といった大きな利点を持つ顕微鏡である（図1）。そのため、AFMは食品素材をはじめとした様々な生体試料の構造や相互作用の解析に適していると考えている。

1.2 食品関連分野で使われ始めた AFM

1986年にBinnigらによってAFMが発明されてから³⁾、AFMを用いた研究報告件数（原著論文のみを対象とし、プロシーディング等は含めていない）が毎年堅調な伸びを示している（図2A）。2009年末までに56,000件を超える原著論文が発表されており、2009年の原著論文数は年間5,000件を超えるまでになった。個々の学術雑誌がカバーする学術領域から評価した研究分野の内訳（図2A）を見ると、物理、化学、材料分野での報告が大半を占めており、これらの領域がAFMに密接に関連する学術領域であると言えよう。なお、通常1つの学術雑誌は複数の専門分野をカバーしているため、本調査では研究分野毎に論文件数の重複が含まれていることを予め了解されたい。

一方、AFMを食品関連研究に適用した、もしくは食品関連研究者がAFMを扱って研究論文を発表した事例を調査したところ、総原著論文数は400件を超えており、2007年以降急激に論文数が伸びていることがわかる（図2B）。これは、

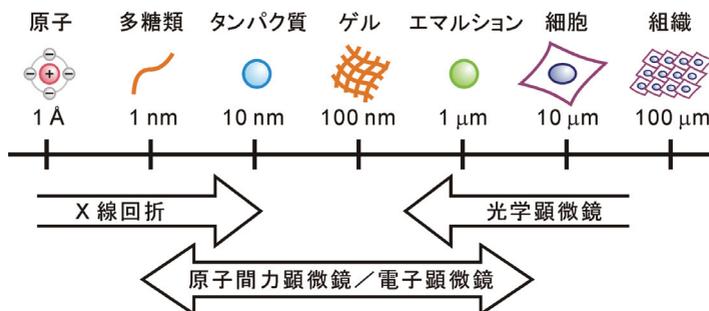


図1 代表的な顕微鏡とその分解能範囲

それまで続けられてきた装置改良等の研究開発が一段落し、装置関係の専門家以外でも利用しやすい環境が整ったことが一因と考えられる。また、AFM 関連の原著論文数全体 (図 2 A) に比べて、バイオや高分子関連における報告件数の割合が比較的高く、物理、化学、材料関連の研究領域が占める割合が相対的に低いことが特徴である (図 2 B)。これは、食品関連分野では生物由来の試料を観察対象とするケースが多いものの、ハード面での技術革新にはあまり関与していないためと推察できる。従来から AFM のセールスポイントは、「溶液中や大気中での高分解能画像取得」だったが、食品関連分野ではその利点をようやく実際に活かせる時代に入ったことを物語っているのだろう。

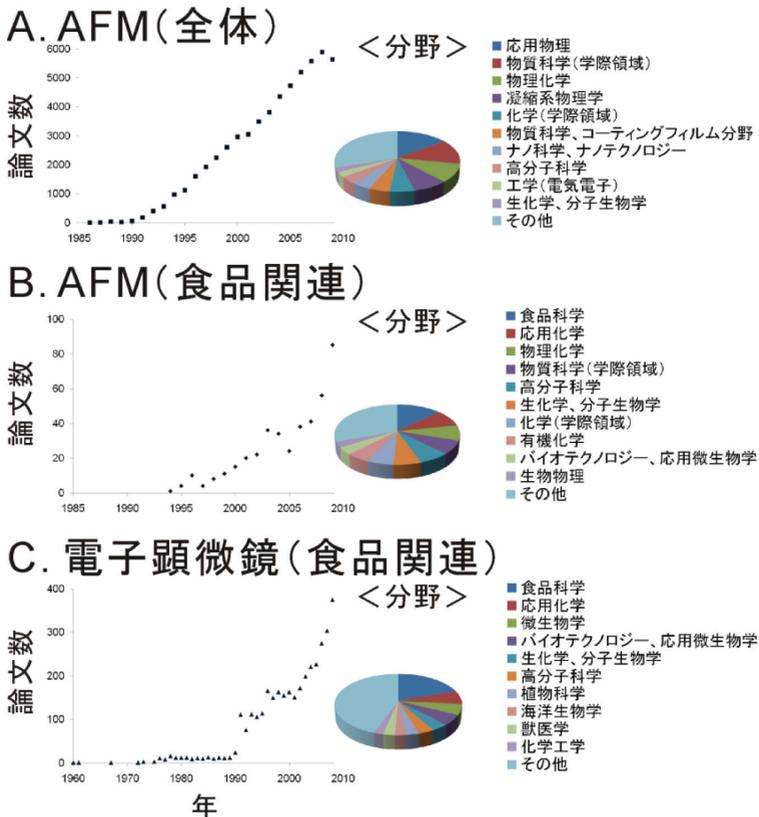


図 2 AFM あるいは電子顕微鏡を用いた研究の動向

- A. AFM を用いた研究論文数の推移と学術雑誌の対象分野
 B. 食品関連研究での AFM を用いた研究論文数の推移と学術雑誌の対象分野
 C. 食品関連研究での電子顕微鏡を用いた研究論文数の推移と学術雑誌の対象分野

さらに、キーワードを AFM から電子顕微鏡に換えて同様の検索をすることにより、食品関連分野における構造観察の推移を見たのが図 2 C である。2009 年の AFM の原著論文数は約 20 年前の電子顕微鏡の報告件数程度でしかないが、AFM と電子顕微鏡とについて共に研究報告数が伸び続けていることから、今後も食品関連研究での微細構造解析や相互作用解析に高い需要が見込まれると考えている。

AFM の基本性能は電子顕微鏡と同じくモノを観ることであるが、様々な研究領域で多様な使い方をされている装置であるため、アイデア次第で独自の解析手法を構築できる。つまり、研究ツールとして AFM を適用する際には、「いかにうまく AFM を活用するか」という視点がポイントとなる。そこで本稿では、AFM 技術の概略 (2 章, 3 章) とともに、食品科学や生化学に立脚して AFM の画像化を適用した研究事例 (4 章) と、画像化とは異なる「相互作用力測定モード」を活用した新規試験管内食品吸収評価技術の開発状況 (5 章) について紹介する。これらが、今後進展が予想される食品ナノテクノロジーに貢献するとともに、多くの方が食品の微細構造解析や相互作用評価における AFM の可能性を考える端緒となれば幸いである。

2. AFM の動作原理

AFM による画像化の難易度は、対象とする試料によるものの、技術の進展に伴って概して簡単になってきている。普段それほど AFM を使わない食品関連研究者にとっては喜ばしいことであるが、装置そのものがブラックボックスになってしまい、どのような原理で画像を取得しているのか見えにくくなってきていると思われる。そこで本章では、AFM の動作原理について簡単に説明したい。

AFM は、主に以下の 3 つの構成要素からなる。1. 探針を先端に持つカンチレバー、2. 3 次元的に試料ステージの位置を制御する駆動機構 (ピエゾ素子)、3. カンチレバーのたわみ・振動の検出機構 (図 3)。AFM 探針と試料との間にはレ

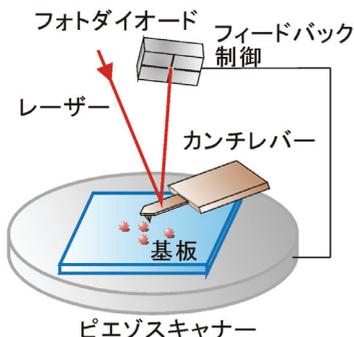


図 3 AFM の動作原理

AFM による試料観察では、カンチレバー先端についている探針によって基板を走査する。試料 (赤丸) が基板上に存在する状態で探針を走査させると、フォトディテクター上のレーザーの位置が変化するが、この変化をなくすようにピエゾスキャナの上下位置が補正される (フィードバック制御)。各 xy 座標でのピエゾスキャナの z 変位を試料の高さとすることにより、走査範囲全体の表面形状を画像化する。

ナード・ジョーンズ型のポテンシャルで近似される力学的相互作用が存在する。探針を試料遠方より近づけていった際、最初に van der Waals 引力が働き、さらに原子結合距離程度まで近接すると斥力が強く働く。この相互作用により、カンチレバーのたわみや振動状態に変化が生じる。この変化をカンチレバー背面に照射したレーザーの反射光を通して、位置センサであるフォトダイオードに当てて検出する。生体試料の画像化で多用されるタッピングモードでは、カンチレバーを共振周波数付近において振動させるが、その振幅は探針と試料の接触により減衰する。この振幅が一定となるようにステージの高さに対してフィードバックをかけながら試料表面を水平走査すれば、ステージの上下変位を各水平位置における高さとすることによって、走査範囲全体の表面形状が画像化される。

2.1 カンチレバー，探針

AFM の画像化には、タッピングモードとコンタクトモードに大別でき、柔らかい試料にはタッピングモードが適している。タッピングモードでは、高い共振周波数で大きなバネ定数を持つカンチレバーをその共振周波数付近で共振させた状態で試料表面を走査することにより画像化される。その際の信号雑音比 (S/N 比) は、カンチレバーのバネ定数、共振周波数、振動振幅、及び Q 値 (= [共振周波数] / [共振周波数でのピークの半値幅]) で規定されるため、共振周波数や Q 値の増加、またはバネ定数や振幅の減少により、AFM の画質を改善できる。Q 値を増加させるための技術としては、Active Q control と呼ばれる制御法が提案されている⁴⁾。この方法では、カンチレバーの振動信号の位相を変位相シフト回路により変化させたのち、可変ゲイン回路でカンチレバーの励振信号に変換させることで、Q 値を向上させることが可能である。タッピングモードによる大気中観察では、長さが 100 μm 程度、バネ定数が 0.01-100 N/m、共振周波数が 250-350kHz、Q 値が 10^3 - 10^5 程度のカンチレバーが用いられている。一方、溶液中での測定では、溶液の粘性抵抗のために共振周波数が著しく減少し、結果として得られる画像の質 (S/N 比) が低下する。一般に、溶液中観察で得られる画像は大気中観察で得られる画像よりも低画質である。

通常カンチレバーではシリコンの異方性エッチングにより作製された探針が先端に加工されている。AFM の表面観察における水平方向の分解能は、探針の先端径に大きく依存する。従って、その分解能の向上には、先端曲率半径や頂角のより小さな探針の利用が有効である。通常シリコン探針では先端曲率半径が約 10 nm であるが、水平分解能をあげるために先端曲率半径が約 2 nm で機械的強度にも優れるカーボンナノチューブを先端に付けた探針によって画像化する技術が確立されている⁵⁾。これにより、分子量が巨大で結晶化の困難なタンパク質複合体等の構造をナノレベルで観察することも可能になった。

2.2 ピエゾ素子

piezo素子は、印可電圧に応じて伸縮、変形するセラミックス製の素子であり、ピコメーターオーダーでの微動制御が可能であることから、カンチレバーやサンプルステージの3次元駆動制御、あるいはカンチレバーの加振用などに用いられる。一般的なAFMの駆動系では、積層型、あるいはチューブ型のpiezo素子が使われることが多い。一方でpiezo素子にはヒステリシスやクリーピング等の欠点もある。ヒステリシスは伸張時と縮小時でpiezoの変位が完全には一致しないことであり、一方、クリーピングとは印可電圧をセットした後もセラミックスの分極が続くために、ゆるやかな変位の伸びが観測される現象のことである。最近の市販装置では、入力信号（印可電圧）とそれに対する出力信号（piezoスキヤナの変位）を常に一致させようとする制御方式（クローズドループ）を採用しているため、以前より高精度での画像化が可能になっている。

2.3 フィードバック回路（制御系）

探針のz方向の位置は、フィードバック回路内の比例制御と積分制御との組合せによって、予め設定した目標値に向けて制御される。比例制御は、現在値と目標値との間に生じるエラー信号に比例した操作を施すことによって、目標値に近づけようとする制御方法である。しかし、比例制御のみでは現在値を目標値に完全に一致させることはできず、一定のオフセット値が生じてしまう。このオフセットは、一定時間の累積エラーに比例させた補正信号を追加する積分制御を同時に行うことにより取り除くことができる。このときの時間間隔が短すぎると、piezoスキヤナの反応に比べて制御信号の方が早いために機械的発振を引き起こし、表面構造をうまく追従できない。市販AFM装置での画像化では、比例制御及び積分制御のゲイン係数を各々設定することにより、比較的簡単に測定条件の最適化を行うことができる。

3. AFMの高度化

3.1 高速AFM

溶液環境中にある生体試料のAFM観察は、その試料の持つ本来の構造を可視化できる点で重要である。しかし、既存のAFMでは走査速度が遅く、画像化に数分から数十分の時間を要するため、生きた生体試料の静止画像を取得できても、ダイナミックな反応や構造変化を直接観察することはできなかった。AFMは走査型顕微鏡であるため、画像を取得するためには全てのピクセルにおいてピクセル毎の高さ情報を測定する必要がある。つまり、タッピングモードでのカンチレバーは、各ピクセルあたり少なくとも1回以上振動しなくてはならない。また、一般的に用いられている液中測定用カンチレバーの溶液中での共振周波数は

10 kHzである。こういったカンチレバーの持つ性質が AFM 測定の高速化に対する大きな制約の一つであった。この制約は、カンチレバーを通常より小さくする（長さ $9\mu\text{m}$ 、幅 $2\mu\text{m}$ 、厚さ 140nm ）ことで、板バネとしての柔らかさを損なうことなく、 600kHz （大気中では 1.5MHz ）という非常に高い共振周波数を獲得することに成功した⁶⁾。これによって溶液中においても、ノイズの少ない画像を非常に早い走査速度（画像 1 枚あたり 80msec ）で連続的に観察することが可能になった。

3.2 走査型近接場光学顕微鏡 (SNOM/AFM)

走査型近接場光学顕微鏡 (SNOM/AFM : Scanning near-field optical microscope/atomic force microscope) は、蛍光標識した試料の形状と蛍光シグナルを同時計測する走査型プローブ顕微鏡である。SNOM/AFM は光ファイバースキャンプローブ先端に生じさせた近接場光で試料を励起して蛍光像を取得する一方、AFM と同様に表面形状も取得できるプローブ顕微鏡である。この装置では、先鋭化した光ファイバースキャンプローブとして用いる。この光ファイバースキャンプローブは、側面からの光の漏れを防ぐために金属あるいは樹脂により表面修飾されているが、その先端部には光源波長よりも小さな開口（直径 $50\text{-}100\text{nm}$ ）が設けてあり、ここからファイバー内を導波してきた光が浸み出すことにより、局所的な近接場光を形成する。この近接場光が試料の局所領域のみを選択的に光励起する。SNOM/AFM の光学分解能はプローブ先端の開口径および試料のサイズにのみ依存するため、場合によっては通常の蛍光顕微鏡よりも高い分解能を発揮する。これにより、AFM による表面構造の画像化に加え、SNOM による高分解能での蛍光測定も可能である。バイオや食品分野での SNOM/AFM についての研究事例は別の総説を参照されたい⁷⁾。

4. 画像化モードでの研究事例

4.1 食物繊維とタンパク質の相互作用⁸⁾

食品素材は非常に多くの成分から構成されており、テクスチャーや安定性などの物理特性はタンパク質や食物繊維などのバイオポリマーによって作られるゲルや泡沫等によって主に制御されることが知られている。そのため、食物繊維-タンパク質間相互作用の制御機構を解明することは、食品の物理特性の向上に寄与すると考えられている^{9,10)}。

キサントンはグラム陰性細菌である *Xanthomonas campestris* が分泌する多糖類であり、アメリカ農務省研究所によって 1950 年代に発見された。*X. campestris* はアブラナ科植物に対する病原性を持ち、黒葉腐病を起こす。キサントンは植物の防御機構を抑えることによって病原性の発現に参与する。一方

で、こうした病原性とは別に独特なレオロジー特性を持った多糖類としても知られており、食品添加物としてサラダドレッシング、ソース、シロップ、アイスクリーム、ヨーグルト等、多彩な食品で使用されている。

キサントンの分子構造とコンフォメーションは旋光度測定、円偏光二色性解析、核磁気共鳴、粘弾性解析、熱測定などを用いて調べられている。しかし、こうした溶液解析では、各々の実験手法に適した濃度範囲においてのみ解析できるため、個々のキサントンの分子の特徴を解析しにくいとの指摘がある¹¹⁾。一方、AFMは個々の分子を可視化できるため、こうした従来の溶液解析に見られた問題を解決できる手法であると期待されてきた。実際、キサントンのAFM観察に関しては1990年代から研究報告があり、その画像は主に溶液中での観察であった¹²⁾。これは、大気中での観察では探針と試料間に働くキャピラリー相互作用によって画像化が阻まれてしまうことが一因である。しかし、AFMの動作制御技術が向上するにつれて大気中での観察も容易になり、キサントンのAFM観察に限って言えば、大気中測定から得られる情報は溶液条件下で得られるものと基本的には同じであることが示唆されている¹³⁾。

ここで、一分子レベルでの画像化が、キサントンのカゼインナトリウム塩との相互作用機構の解明に貢献した例を紹介する⁸⁾。カゼインナトリウム塩は、栄養性や機能的観点から幅広い食品に添加物として用いられている。その直径はおよそ10 nmであり、カゼインミセル（直径50-500 nm）よりも大幅に小さい。また、カゼインミセルで観察されるように、カゼインナトリウム塩も酸性ゲルを形成する。カゼインナトリウム塩の酸性化によるゲル形成はキサントン存在下でも起きるものの、中性条件下ではカゼインミセルを用いた場合とは異なり明確な相分離を示さない¹⁴⁾が、その原因は不明であった。

精製水に分散したカゼインナトリウム塩を酸滴定すると、カゼインの等電点付近を境に沈殿が生ずる（図4）。一方、キサントンをカゼインナトリウム塩に添加することによって、酸滴定による沈殿形成が遅延した。一方、中性領域においては、キサントンを添加したカゼインナトリウム塩の濁度がカゼインナトリウム塩単独での濁度より高かった。キサントンはpH変化に対して安定であるため、この中性での結果は、カゼインナトリウム塩とキサントンとが中性領域で相互作用した、もしくはカゼインナトリウム塩の溶解度が減少した可能性を示唆している。

レンネットはカゼインナトリウム塩の表面に存在する κ -カゼインのPhe105とMet106の間の共有結合を切断する。これにより負電荷を帯びたC末端が遊離し、カゼインナトリウム塩は全体として電荷を失い互いに凝集する。この反応をカゼインナトリウム塩とキサントンの相互作用解析に利用した。pH 2.7およびpH 4.2では、キサントンが存在しない場合では存在する場合より κ -カゼインはより短時間で分解された。一方、pH 6.6においては、キサントンの有無に関わらず、

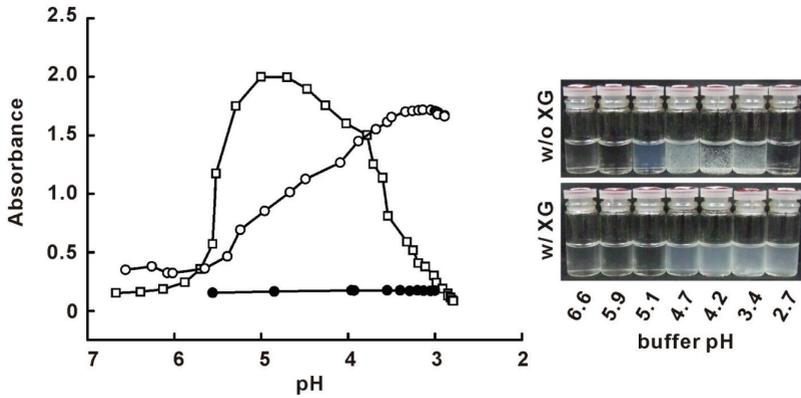


図4 カゼインナトリウム塩の酸性化に伴う 515 nm における吸光度変化

カゼインナトリウム塩 (□), カゼイン-キサンタン試料 (○), キサンタン (●)。右図は, キサンタン添加 (w/ XG), 及びキサンタン未添加 (w/o XG) のカゼイン溶液を塩酸によって酸滴定した際の変化を示す。

κ -カゼインは同様に短時間 (~5分) で分解された。キサンタン存在下では, pH 2.7 および pH 4.2 における κ -カゼインの分解が, pH 6.6 における分解よりも遅延した。これは, pH がカゼインの等電点よりも低い場合, キサンタンと κ -カゼインが相互作用している, もしくはレンネットの切断点である κ -カゼインの C 末端がキサンタンによって被覆され, 結果としてレンネットが作用しないことを示唆している。

濁度試験では, 中性-酸性に至る広い範囲においてキサンタンがカゼインナトリウム塩に何らかの影響を及ぼすという結果を得た。一方レンネットアッセイは, カゼインの等電点よりも酸性側で両者が相互作用していることを示唆する結果であった。そこで AFM によって微細構造を直接可視化することにより, 中性-酸性領域における相互作用機構の解明を試みた。

pH 6.6 ではカゼインナトリウム塩がキサンタンと結合することが判明した (図 5 A)。この pH では両者ともに全体として負電荷を帯びているため, 得られた複合体構造は負電荷による相互反発よりも両者間の疎水的相互作用が強いことを示唆していた。pH 6.6 でのレンネットアッセイにおいて, κ -カゼイン C 末端の切断にキサンタンが影響しないことも, 両者間の疎水領域同士の相互作用を示唆している。また, pH 4.2 では, カゼインナトリウム塩粒子がランダムに集まって凝集するのではなく, キサンタンのファイバーに沿って凝集しており (図 5 B), 3 次元的な高次構造を形成している可能性を示唆していた。一方 pH 2.7 では, キサンタンがネットワーク構造を呈していることが明らかとなった (図 5

C)。この pH では個々のカゼインタンパク質は完全に変性して正電荷を帯びるため、このネットワーク構造は変性カゼインとキサントランが静電的に相互作用した結果だと考えられる。

以上より、中性ではキサントランとカゼインナトリウム塩は疎水の相互作用を介して結合する。カゼインナトリウム塩とカゼインミセルの粒径の違いが、粒子表面の電荷密度の差として現れた結果、キサントランとの相互作用の違いとなった可能性がある。等電点付近ではカゼインナトリウム塩の表面電荷消失による凝集がキサントランのファイバーに沿って生じる。一方、酸性条件では、正電荷を持つ変性カゼインと負電荷のキサントランが静電的に相互作用してネットワーク構造を形成することが示唆された。こうした微視的環境での個々の相互作用の違いが、食品の巨視的な特性に少なからず影響を与えているのだらうと考えている。

4.2 微粉碎米粉の表面構造観察¹⁵⁾

次に比較的大きな食品素材の観察例を紹介する。近年の食品ナノテクノロジーの進展により、食品素材の粒径サイズの減少によって各種特性に影響を与えることができるかと期待されている。しかし、調理工程や摂食を経てもサイズ効果が維持されるかどうかは、素材毎に検討する必要がある。今回、堀金、岡留ら（農業・食品産業総合研究機構・食品総合研究所）によって、臼式製粉装置、ハンマーミル、ジェットミルを用いて調整された微粉碎米粉を用いて、そのサイズ効果を検討した。特に、粒径サイズの減少は比表面積の増大をもたらすため、消化酵素の反応性及び表面構造観察の観点から検証した。

用いた精米粉の粒径は各々約 $102.7\ \mu\text{m}$ 、 $43\ \mu\text{m}$ 、 $6.5\ \mu\text{m}$ で、玄米粉は各々約 $105.4\ \mu\text{m}$ 、 $41.7\ \mu\text{m}$ 、 $9.7\ \mu\text{m}$ であった。糊化前後にアミラーゼによるデンプン消化活性を測定したところ、加熱糊化した場合には粒径に関わらず高い消化性を示す一方、加熱糊化処理を施さない場合には、粒径の減少に伴いアミラーゼによる分

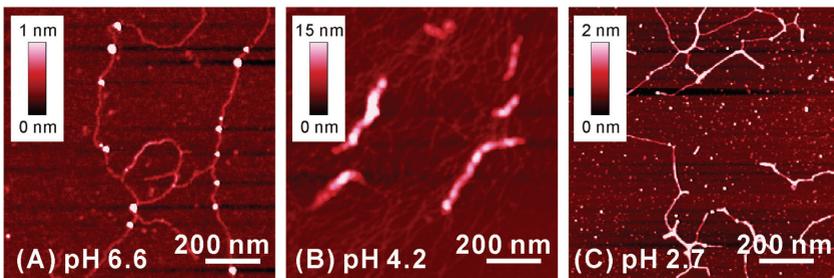


図5 カゼインナトリウム塩とキサントランの相互作用
pH 6.6 (A), pH 4.2 (B), pH 2.7 (C) における複合体構造を示す。

解が促進された。アミラーゼは生デンプンの結晶性の低い領域をより優先的に切断する。すなわち、微粉碎加工によって表面にデンプンの低結晶性領域が露出することによって、アミラーゼとの接触確率が増大し、酵素反応が加速したものと考えられた。

そこでこのアミラーゼ反応性の増大が、製造方法に由来する米粉表面の微細構造の違いによるものなのか、それとも単に粒径の減少によるものなのかを解析するために、AFMによって表面微細構造を可視化した(図6)。これらの微粉碎米粉は通常のAFMで測定するには大きく、いずれの場合も粒子全体に渡っての画像化は困難であった。しかし、粒子の一部領域に走査範囲を限定することにより、高分解能での画像化が可能であった。画像から算出した表面粗さは、粉碎手法に関わらず互いに類似した値(70~200 nm)を示した。また、微粉碎米粉の粒径がアミラーゼ活性に相関があったため、生の微粉碎米粉のアミラーゼに対する反応性の相違は、局所的な表面構造の違いではなく、粒子全体の大きさの違いが反映したものである。一方、製造工程でのデンプンの損傷もアミラーゼ反応性の向上に寄与することが知られているため、全体としては粒径の減少による

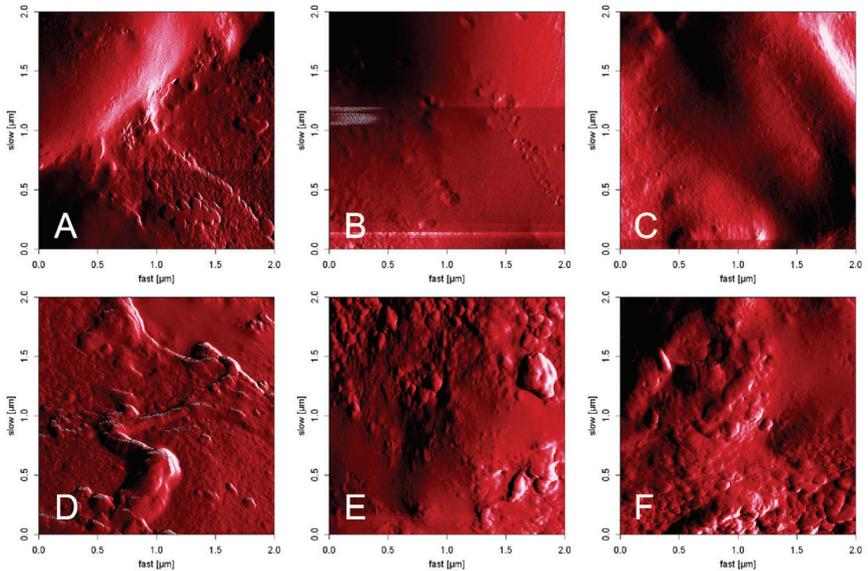


図6 微粉碎米粉の表面構造

精米粉 (A. 白式製粉装置, B. ハンマーミル, C. ハンマーミルとジェットミルの併用) と玄米粉 (D. 白式製粉装置, E. ハンマーミル, F. ハンマーミルとジェットミルの併用) の表面を画像化した。走査範囲は $2\mu\text{m} \times 2\mu\text{m}$ 。

表面積の増大と製造工程でのデンプン損傷の効果が複合的に反映しているものと考えられる。

4.3 膜タンパク質会合度の精密解析技術の開発¹⁶⁾

ここでは AFM が膜タンパク質の会合度解析に適用できることを紹介したい。TRP (Transient Receptor Potential) チャンネルファミリーに属する膜貫通型タンパク質は、熱、痛み、などの刺激を感知するカルシウムチャンネルやその類縁タンパク質から構成され、わさびや大根に含まれる辛み成分であるアリルイソチオシアナート、メントール、あるいは唐辛子のカプサイシンの受容体として機能するものも発見されている。このファミリーに属する TRPP2 タンパク質は、自身で会合体を形成してカルシウムチャンネルとしての機能を持つと共に、相同タンパク質である TRPC1 タンパク質や TRPV4 タンパク質とヘテロ会合体を形成して、ホモ会合体とは異なるチャンネル機能を発現することが知られている。しかし、化学量論的な解析は行われておらず、何分子の TRPP2 がホモ会合体を形成するのか、あるいは何分子の TRPC1 と会合して新規チャンネルを形成するのか、といった構造基盤に関する情報は不明であったため、AFM によってそれらの会合度及び分子配向を調べることにした。

解析対象とした TRPP2 と TRPC1 の C 末端を、各々異なるエピトープタグである Myc タグと V5 タグで標識するよう発現プラスミドを構築した。これらのプラスミドには共に His₆ ペプチドを融合させた。ヒト腎臓由来の培養細胞である tsA 201 細胞で一過的に発現させた TRPP2 や TRPC1 を各々ニッケルアガロースにより精製した。精製タンパク質を AFM によって直接観察することにより体積を測定した。一方、精製タンパク質を抗 Myc 抗体もしくは抗 V5 抗体で修飾した後に AFM 観察を行うことにより、精製タンパク質に結合した抗体間角度を解析した (図 7)。

AFM は 3 次元のデータが得られるため、観察したタンパク質の体積を見積もることができる。ちなみにタンパク質量と AFM で得られる体積には正の相関があるため、AFM のデータから体積が判明すればその分子量を算出することが可能である。本実験では、AFM 画像から計算された精製 TRPP2 の体積は $847 \pm 62 \text{ nm}^3$ であり、分子量から理論的に計算できる単量体当たりの体積 (209 nm^3) の約 4 倍であることが判明した。一方、TRPP2 は C 末端に Myc タグを持つため、精製 TRPP2 に抗 Myc 抗体で標識した後に AFM で観察したところ、抗体に対応する粒子が TRPP2 に結合した複合体構造が観察された (図 8 A)。抗体が 2 つ以上結合した複合体について、2 つの抗体と TRPP2 から形成される角度を測定したところ、 90° と 180° にピークを持つ頻度分布を得た (図 8 B)。この結果は、TRPP2 がホモ 4 量体であるという体積解析の結果を支持するものであった。一方、TRPC1 についても体積解析と抗 V5 抗体を用いた角度解析を行っ

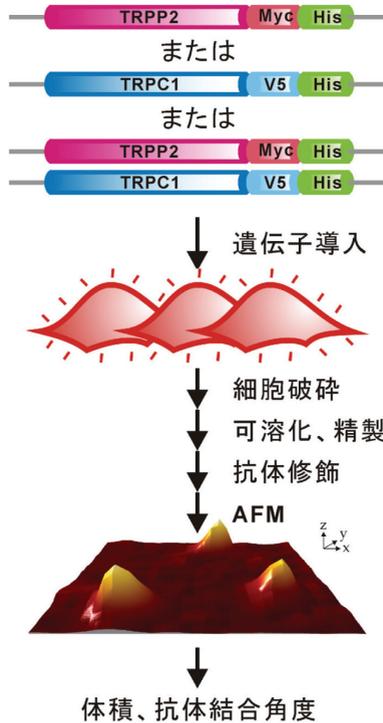


図7 膜タンパク質の会合度解析の概要

たところ、ホモ4量体を形成するという結果が得られた¹⁷⁾。

それでは TRPP2 と TRPC1 からなるヘテロ会合体では、各々の結合分子数あるいは会合体内での配向はどうなっているのだろうか？同量の TRPP2 と TRPC1 の発現プラスミドを混合し、培養細胞で発現させてヘテロ会合体を調整し解析に用いた。ヘテロ会合体の体積解析では、TRPP2 と TRPC1 のホモ会合体の体積の間にピークを持つ分布を示し、また角度解析では、抗 V5 抗体及び抗 Myc 抗体による結合角は 90° と 180° をピークとする分布であった (図 8 E) が、 180° の頻度が 90° の頻度よりも多く、TRPP2 と TRPC1 は 2 分子ずつが交互に配向してヘテロ複合体を形成すると考えられた (図 8 F)。しかしこの実験条件下では、ホモ会合体の形成を防ぐことができないため、TRPC1 の発現プラスミドから His₆ タグを削除した後、TRPP2 と TRPC1 の発現プラスミドを用いてヘテロ会合体を培養細胞で発現させることにより、精製標品からホモ会合体の混入を低減させた条件での解析を行った。精製したタンパク質を抗 V5 抗体によって修

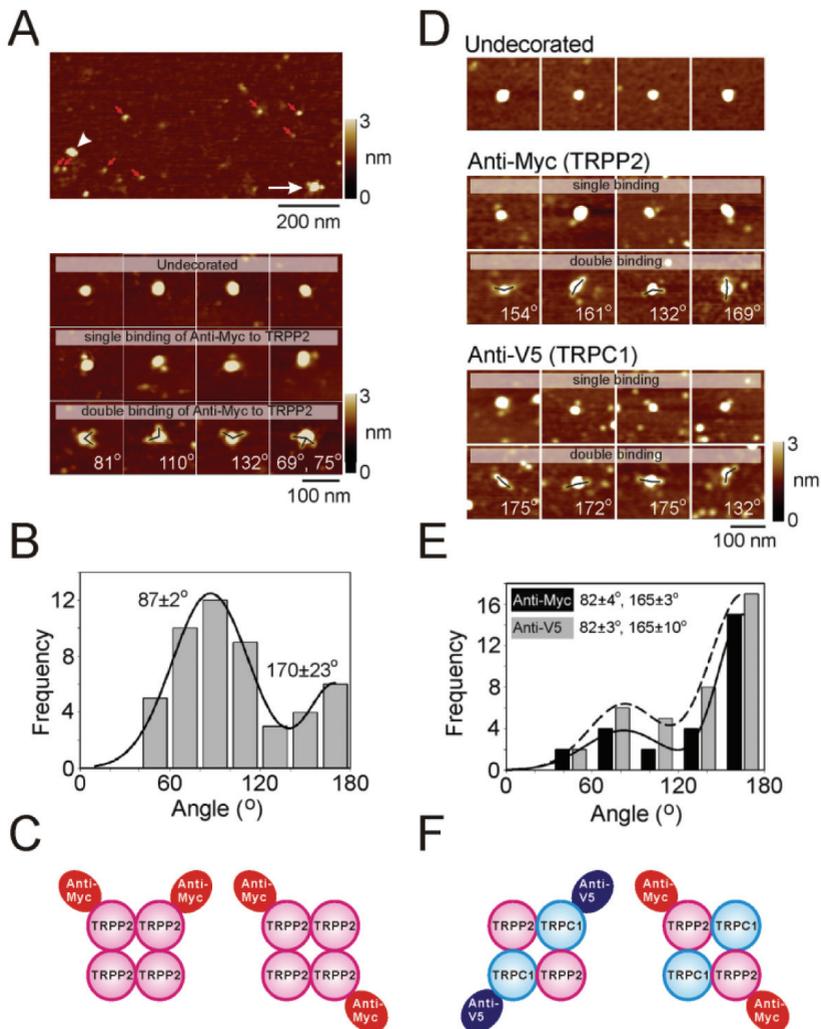


図8 TRPP2 もしくは TRPC1 に結合した抗体の角度解析

- A. TRPP2 ホモ会合体と抗 Myc 抗体の結合 (白矢印), TRPP2 ホモ会合体 (白矢頭), 抗 Myc 抗体 (赤矢印)。また TRPP2 ホモ会合体と抗 Myc 抗体との結合を拡大し (下図), 2つ以上の抗体が結合した TRPP2 には抗体結合角度を示した。
- B. 結合抗体の角度分布
- C. TRPP2 ホモ会合体モデル
- D. TRPP2/TRPC1 ヘテロ会合体と抗 Myc または抗 V5 抗体の結合
- E. 結合抗体の角度分布
- F. TRPP2/TRPC1 ヘテロ会合体モデル

飾し、その抗体結合角を計測したところ、抗 V5 抗体は約 180°の角度で会合体粒子に結合した。この結果は TRPP2 と TRPC1 のヘテロ会合体の 2 分子が交互に結合することでヘテロ 4 量体が形成されることを示唆していた。

通常タンパク質の会合度はゲル濾過クロマトグラフィー等の生化学的手法によって決定する。しかし、膜タンパク質の場合、可溶化に用いた界面活性剤の影響でゲル濾過クロマトグラフィーにおける溶出ピークがブロードになることが知られており、会合度解析を行うことは容易ではない。一方、AFM ではタンパク質を直接可視化するため、従来困難とされてきた膜タンパク質の会合度やその配向を詳細に解析することが可能となった。細胞膜に存在するイオンチャネルだけでなくトランスポーターも会合体や他のタンパク質との複合体として機能する例が知られており、今後、食品の成分吸収に関与するトランスポーターや受容体等の膜タンパク質の構造解析に貢献できるものと考えている。

5. 相互作用力測定モードを活用した食品吸収評価技術の開発

AFM は「探針と試料との間に作用する力を一定に保つことによって画像化する顕微鏡」であるため、AFM によって探針と試料の間に作用する相互作用力を測定できる。AFM による相互作用力の測定原理は以下の 2 つのステップからなる (図 9)。(1) 試料台を徐々にカンチレバーに近づけて探針に接触させた後、さらに試料台をカンチレバー方向に押し上げていく。(2) 次に試料台をカンチレバーから引き離す方向に移動させて、元の位置にまで戻していく。両者の間に相互作用がなければ、試料台を近づける時 (図 9 A : 赤線) と引き離す時 (図 9 A : 青線) のカンチレバーの変位量に違いは出ない。一方、両者間に相互作用がある場合には、試料台を引き離す時にカンチレバーが本来の位置よりも試料台側に引き込まれ (図 9 B : (5) の状態)、試料台がさらに離れるとカンチレバーが本来の位置まで一気に戻る (図 9 B : (6) の状態)。試料台がカンチレバーを引き込む変位量 (図 9 B : 青波線) とカンチレバーのバネ定数から、両者にかかる相互作用力を算出できる。

AFM の相互作用力測定モードは、例えば先に述べたキサントンの力学特性を測定する際にも用いられた。キサントンが層をなしている基板上にカンチレバーのチップを物理的に接触させて吸着させた後、カンチレバーを基板から引き上げることによってキサントンにかかる力を直接測定するというものである。通常のキサントンを用いた場合、400 pN (ピコニュートン) にプラトーをもつフォースカーブ曲線を示すが、変性したキサントンではプラトーを示さない¹⁸⁾。これは、未変性のキサントンは規則正しいヘリックス構造をとっているため、フォースカーブ曲線上のプラトーはヘリックスを形成する各分子を分離させる力に相当すると考えられている¹⁹⁾。

この相互作用力測定を生物学的な相互作用解析に用いる事例も報告されてきて

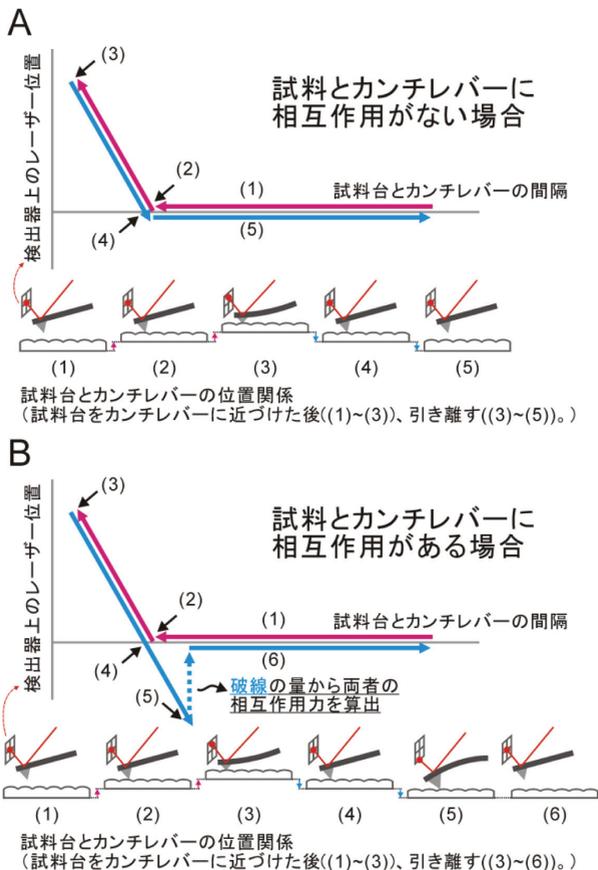


図9 原子間力顕微鏡による相互作用力の測定原理

相互作用力を測定する際には、最初カンチレバーから離れた試料台（状態(1)）を、徐々にカンチレバーに近づけて接触させる（状態(2)）。さらに押し込んだ後（状態(3)）、徐々に引き離していく（状態(4)、(5)）。この際、両者に相互作用がなければ、状態(4)と(5)の間でカンチレバーはたわまない（パネルA）が、両者に相互作用があれば状態(4)と(5)の間でカンチレバーがたわむ（パネルB）。なお相互作用力は、パネルB中の波線の量にカンチレバーのバネ定数を乗じることによって求める。

いる。ピオチン・アビジン間相互作用や抗原・抗体間相互作用といった、生体物質の中でも比較的強い相互作用を示す組合せがその代表的な事例であり、いずれもサブピコニュートンレベルの相互作用力を示す。最近では、これらよりも弱い相互作用を持つリガンド・受容体間の相互作用検出にも適用され始めている。現

在我々は、この相互作用力測定モードを適用して食品ペプチド吸収の試験管内評価技術を構築しているところであり（図10）、目的ペプチドが吸収される際に他の食事共存成分によってどのように影響をうけるのかを解析している。本項ではその一部を紹介したい。

タンパク質消化産物であるオリゴペプチドは、小腸上皮に存在する PepT1 を介して細胞内へ取り込まれる。PepT1 は細胞表面に存在して、細胞外で捕捉した基質をプロトン駆動力により細胞内に吸収する。また、PepT1 の発現は基質自身、あるいは共存するアミノ酸や薬剤等によって変動する²⁰⁾ ため、共存成分による吸収への影響は、(1) 転写、翻訳レベル、(2) PepT1 の基質認識レベル、の2通りで生じると考えられる。

共存成分によるオリゴペプチドの吸収への影響を、基質レベルでの調節機構という観点から解析するためには、精製 PepT1 と基質との結合、つまり膜透過の初発反応を解析することが有効である。PepT1 はアミノ酸が2～3個からなるオリゴペプチド全般の取り込みに関与し、理論的には8400通り（ $20^3 + 20^2$ 通り）の基質が可能のため、その基質特異性は非常に広い。従って、PepT1 を基板に固定し、基質を溶液中にフリーな状態で存在させた条件下で相互作用を測定する表面プラズモン共鳴では、測定溶液中に他の基質や阻害剤が混在している場合に

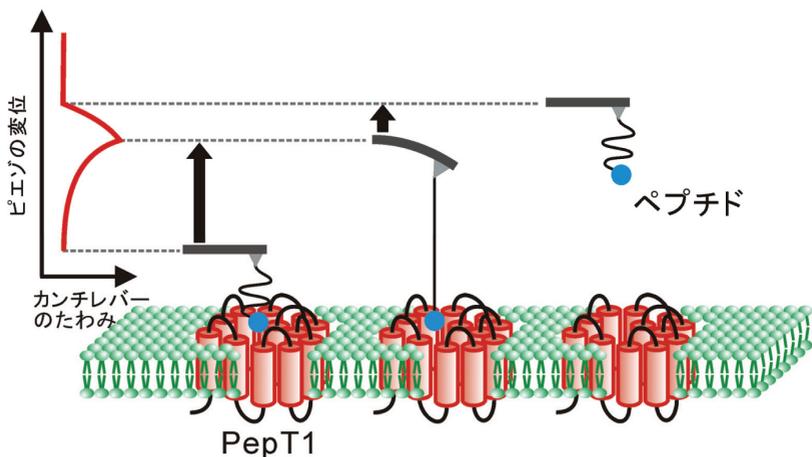


図10 相互作用力測定による食品吸収評価技術

カンチレバー先端の探針を基質であるペプチドで修飾し、再構成膜上の PepT1 との相互作用力を測定する。結合した状態から両者を離していくと、カンチレバーがたわんだ後結合が解消される。この時得られるカンチレバーのたわみ量から、両者にかかる相互作用力が解析できる。

擬陽性シグナルが発生すると予想される（図 11）。

そこで、オリゴペプチドと PepT1 とを共に固定した状態で、原子間力顕微鏡（AFM）を用いた 2 体間相互作用を直接観察する一分子解析系を構築し（図 10）、新たな試験管内評価技術を開発することを目的とした。そのために、PepT1 の精製、人工細胞膜への埋め込み、探針への基質の修飾を順次行い、AFM による相互作用力測定が可能かどうかを検証した。

PepT1 の C 末端に His₆ ペプチドが融合されるように発現ベクターを作製した。この発現ベクターをヒト培養細胞に遺伝子導入し、PepT1 を一過的に発現させた。発現した PepT1 を可溶化した後、ニッケルアガロースにより精製した。一方、細胞膜のモデルとしての人工脂質二重膜は、2 種類のリン脂質フォスファチジルコリンとフォスファチジルエタノールアミンを混合して作成した。リン脂質を溶解しているクロロホルムを、室温で窒素雰囲気下に静置することにより蒸発

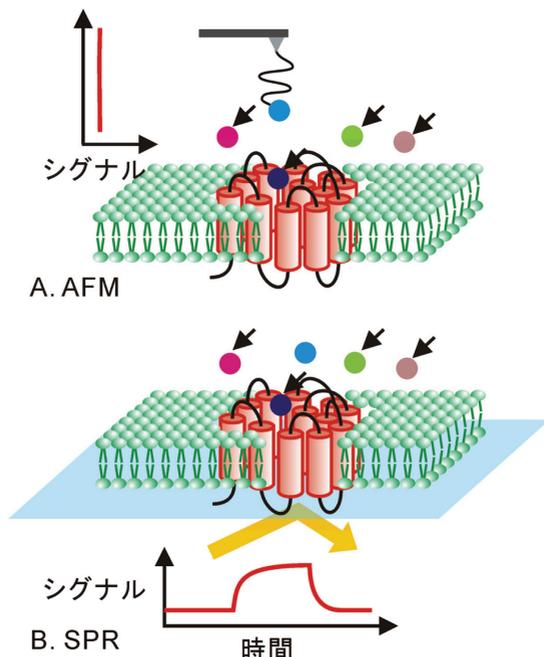


図 11 プラズモン共鳴法との比較

- AFM では競合物質（矢印）が存在しても、常に目的の基質に対する結合をモニターできる。
- 代表的な相互作用解析法であるプラズモン共鳴法（SPR）では、競合物質（矢印）により偽シグナルが検出される可能性がある。

させた後、超純水で再度懸濁した。引き続き 50 oC の恒温槽で超音波処理することにより、単層リポソームを調整した。

精製した PepT1 を人工脂質二重膜に再構成するには、界面活性剤を透析により除去しつつ単層リポソームで PepT1 を安定化させる必要があった。PepT1 とリン脂質の重量比を変えて再構成実験を行い、その後超遠心分離することにより再構成効率を測定した。抗 V5 抗体によるウェスタンブロッティングの結果、重量比にして PepT1 に対して脂質を 400 倍添加して透析した場合、ほぼ全ての PepT1 が単層リポソームに再構成されることが判明し、およそ脂質二重膜の面積 $1 \mu\text{m}^2$ あたり 20 分子の PepT1 が再構成されていた (図 12)。

AFM の相互作用力測定モードを用いて、基質と PepT1 の間の相互作用を測定するため、カンチレバーを基質の 1 つであるジペプチド Cys-Gly で修飾した。そのために、カンチレバーをアミノプロピルトリエトキシシランによって表面処理することにより、カンチレバー表面にアミノ基を付与した。このカンチレバーをマレイミド基と NHS-エステル基を両端に持つ架橋剤を含むクロロホルム溶液中で静置することにより、カンチレバー表面を架橋剤で被覆した。この際、アミ

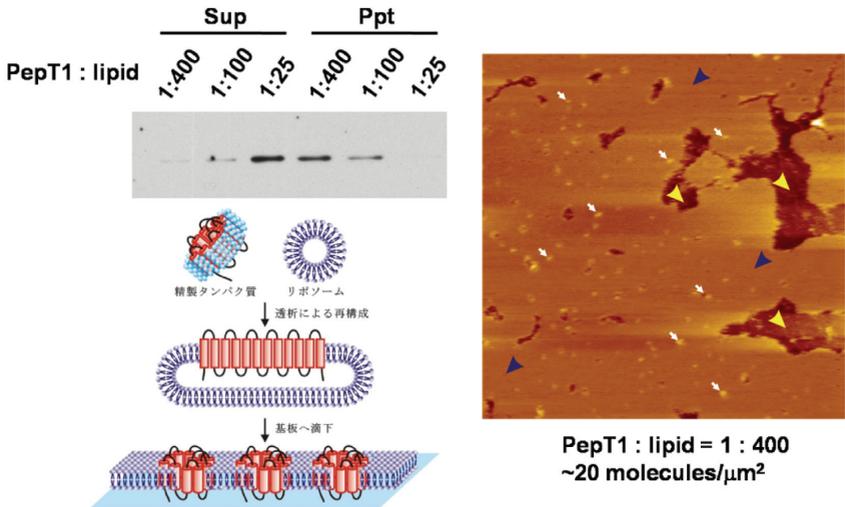


図 12 PepT1 の脂質二重膜への再構成

再構成スキームと条件の最適化 (左), 及び PepT1 を埋め込んだ再構成膜 (右) の AFM 観察画像を示す。再構成膜では z 方向の高さ (明るいほど高く, 暗いほど低い) に応じて, 基板 (黄矢頭) 上に膜領域 (青矢頭), 及びその膜中に PepT1 (白矢印) が形成されていることが判別できる。PepT1 と脂質の混合比を 1:400 にした場合, PepT1 は約 20 分子 / μm^2 の効率で埋め込まれていた。

ノ基と NHS- エステルの間で化学的に安定なアミド結合が形成される。一方、架橋剤の他端に存在するマレイミド基はチオール基と高い選択性を持って共有結合を生じることが知られている。そのため、マレイミド基で被覆された修飾探針を基質であるジペプチド溶液中で静置することにより、マレイミド基とシステイン残基中のチオール基間で結合し、最終的に基質ペプチドで修飾された探針を持つカンチレバーを得た。

PepT1 を再構成した脂質二重膜をマイカ基板の上に展開し、修飾カンチレバーを使って相互作用力測定を行った。上述の通り、サンプルステージがカンチレバーを引き込む変位量とカンチレバーのバネ定数から、両者にかかる相互作用力が算出できる。今回用いたカンチレバーのバネ定数は 0.02 N/m であり、測定で得られたフォースカーブから両者にかかる力を算出したところ、ペプチド修飾探針で再構成膜との相互作用を測定すると約 30 pN 程度であり、未修飾探針での相互作用力よりも大きい値を示した。予備的検討の域を超えていないが、この結果は探針を基質で修飾することによって PepT1 との相互作用力を検出できる可能性を示唆している。これまでに評価技術の核となる各要素技術の構築が確認できたものの、PepT1 の再構成効率の向上、探針修飾の安定化等、改良すべき点が残っている。今後、多様な溶液条件下で相互作用力を測定できるようこうした点を検討し、ペプチド吸収の試験管内評価技術として確立したいと考えている。

6. おわりに

本稿では、食品・バイオ領域における「微細構造／相互作用評価」をキーワードにした、AFM に関する研究を紹介した。このキーワードは、今回触れることができなかった多くの分野に当てはまるため、AFM による微細構造／相互作用評価は今後も進展していくものと考えている。実際、少しずつではあるが AFM の裾野が広がり始めたと感じている。この背景には、そもそも微細構造解析や相互作用評価のニーズがあったことに加え、AFM 技術の成熟化・高度化が大きく寄与していると考えている。しばしば AFM は電子顕微鏡と比較されるが、AFM には電子顕微鏡にはない利点（溶液中観察や相互作用力測定）があるので、高解像度観察はもちろんのこと、対象試料に応じた独創性の高い評価系を構築することが可能である。試験管内食品吸収評価技術はその一つであるが、他にも、高速 AFM を用いてセルラーゼによるセルロース分解過程を一分子レベルで追跡し、従来手法では知るよしもなかった酵素の性質の発見に繋がった研究事例も報告されている²¹⁾。AFM は従来技術と有機的に融合させることによって、これまでにない知見を導き出すツールになると期待している。

7. 謝辞

本稿で紹介した研究は、農林水産省委託プロジェクト研究「食品素材のナノス

ケール加工及び評価技術の開発」, 農業・食品産業技術総合研究機構長期在外研究員制度, 及び文部科学省科学研究費補助金の支援を受けて実施したものです。また, ケンブリッジ大学薬理学教室エドワードソン教授, 及びヘンダーソン教授には貴重な助言を頂きました。ここに記して感謝致します。

(食品工学研究領域 ナノバイオ工学ユニット 小堀 俊郎)

引用文献

1. Chaundhry Q, et al. "Nanotechnologies in Food", RSC Publishing, 2010.
2. 中島光敏, 杉山滋監修 「フードナノテクノロジー」, シーエムシー出版, 2009.
3. Binnig G and Quate CF. *Phys Rev Lett*, **56**, 930-933 (1986)
4. Humphris ADL et al. *Langmuir*, **16**, 7891-7894, 2000.
5. Wong SS et al. *Nature*, **394**, 52-55, 1998.
6. Ando T et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 12468-12472, 2001.
7. 大谷敏郎, 杉山滋 食糧, **43**, 17-32, 2005.
8. Kobori T et al. *Carbohydr Polym*, **75(4)**, 719-723, 2009
9. Dickinson E. (1995). Emulsion stabilization by polysaccharide and protein-polysaccharide complexes. In A. M. Stephen (Ed.), *Food Polysaccharides and Their Applications* (pp. 501-515). New York: Marcel Dekker.
10. Tolstoguzov VB. (1997). Protein-polysaccharide interactions. In S. Damodaran & A. Paraf (Eds.), *Food proteins and their applications* (pp. 171-198). New York: Marcel Dekker.
11. Camesano TA and Wilkinson KJ. *Biomacromolecules* 2001, **2**, 1184-1191.
12. Gunning AP et al. *Polym Bull*, 1995, **34**, 615-619.
13. Gunning AP et al. *Ultramicroscopy* 1996, **63**, 1-3.
14. Nashi W et al. *Int J Bio Macromol*, **30**, 269 (2002)
15. Kobori T et al. submitted.
16. Kobori T et al. *J Biol Chem*, **284 (51)**, 35507-35513, 2009
17. Barrera NP et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007 **358 (4)**: 1086-90.
18. Li H et al. *Adv Mater*, 1998, **10**, 316-319.
19. Holzwarth G and Prestridge EB. *Science*, 1977, **197**, 757-759.
20. Daniel H. *Ann Rev Physiol*, **66**, 361-384, 2004.
21. Igarashi K et al. *J Biol Chem*, **284(52)**, 36186-36190, 2009.

V 核磁気共鳴 (NMR) 法を用いた立体構造解析 及び分子間相互作用解析による 有用タンパク質の機能解明

1. はじめに

近年、分子生物学や細胞生物学の分野において、タンパク質や核酸を中心にした生体高分子の分子機能（働き）を、その分子の構造（かたち）から明らかにする構造生物学的手法が特に重要になっている。さらに、最近ではポストゲノム研究の一つとして構造生物学手法を用いてタンパク質の網羅的構造解析により生命現象を理解しようとする国家的プロジェクト「構造ゲノミクス（“タンパク質 3000 プロジェクト”として平成 14 年度から 5 年間）」がおこなわれたのは周知の通りである。現在、さらに、その後継プロジェクトとして、ターゲットタンパク質研究プログラム（平成 19 年度から 23 年度）がおこなわれている。これらの研究成果は、基本的な生命現象の解明という学術的な側面だけでなく、医学・薬学等への貢献や食品・環境等への産業応用も期待されている。食品関連タンパク質については、以前より糖質関連酵素等の X 線結晶構造解析が行われてきたが、ポストゲノムの現代において、既存酵素の機能解析から新規の酵素機能の創出へと時代が進む上で構造生物学手法は益々重要になると思われる。主な構造生物学的手法として X 線結晶構造解析や NMR (nuclear magnetic resonance, 核磁気共鳴) 法、さらには第三の立体構造解析法としては電子顕微鏡法があげられる。その中でも NMR は溶液状態での解析ができ、構造情報（かたち）だけでなく、低分子や高分子との相互作用情報や、緩和時間解析による動的な情報（うごき）も得ることができる。タンパク質の機能の発現において、“うごき”により、その“かたち”を変えること（構造変化）は良く知られている。当研究所は、800MHz 装置を始め数台の高磁場高分解能 NMR 装置を有しており、その NMR を用いた溶液中での立体構造解析及び分子間相互作用解析により有用タンパク質の機能解明をおこなっており、本稿ではそれらについて紹介する。まず、研究結果の紹介の前に、NMR 法について説明する。

2. NMR 法について

NMR 法とは、固体試料や溶液試料の NMR 現象を測定し、測定した試料中の化合物の化学構造や立体構造の解析や分子内の運動性等の解析を行う方法である。また、NMR 現象を利用した MRI (磁気共鳴イメージング) は、生体に含まれる水や脂肪の分布を断層画像または 3 次元画像として観測する方法で、一般に、臨床診断に利用されている。なお、当研究所においても、マイクロイメー

ジングとして、米や麺等の水分画像を観測し、米の吸水過程等を調べている。NMR法についてももう少し詳しく説明するために、NMR現象やそれを測定するNMR装置、さらに、NMR法を用いたタンパク質の溶液中での立体構造解析法や分子間相互作用解析法について以下に説明する。

2.1 NMR現象^{1,2)}

正電荷を持ち自転運動する原子核は磁気モーメントを持ち、一種の磁石として見なすことができ“核スピン”と呼ばれるが、これが静磁場中に置かれると、それまでそれぞれ勝手な方向に向いていた核スピンの、その静磁場と同じ向きか逆向きかのどちらかにそろろう。静磁場と同じ向きの方がエネルギー的にわずかであるが安定で、この向きになっている核スピンの数が少し多い。核スピンの静磁場と同じ方向と逆向きの間を行き来する時、そのエネルギー差（ゼーマンエネルギー）と等しいエネルギーを持つラジオ波（電磁波）を吸収・放出する（共鳴）現象がNMR現象である（図1では、スピン量子数が $1/2$ （ ^1H 核など）の場合で示してある）。NMR現象を引き起こすラジオ波の周波数は、その原子核の種類と核の存在する場所の磁場の強さによって決まるが、その磁場の強さは外部から与えられる静磁場のみでなく、それぞれの核のまわりの電子の作る磁場の影響を受ける。核のまわりの電子密度の違いによる共鳴周波数の差が化学シフトである。従って、化学シフトは、それぞれの原子核が置かれた化学的環境、例えば有機化合物ではその構造や官能基によってほぼ決まった値をとるため、構造決定にとって大変有用な情報になる。実際のNMRスペクトルでは、基準周波数と観測された共鳴周波数の差（Hz）を基準周波数（MHz）で割った値で表し、単位

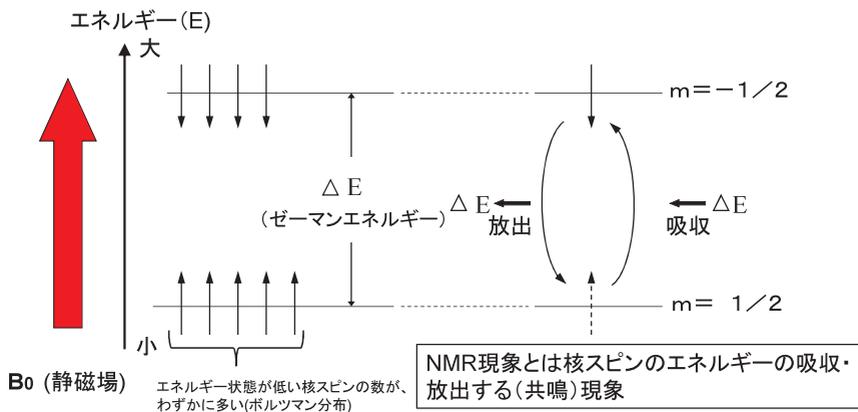


図1 NMR現象の原理

は ppm を用いる。ppm 単位で規格化した化学シフトは、測定した NMR 装置の磁場強度が異なっても同じ値を与える。なお、NMR から得られる情報には、主に、上記の化学シフトに加え、スピン結合及び緩和時間がある。スピン結合は化学結合を通して起こる核スピン間の相互作用で、緩和時間は吸収したエネルギーを放出し元のエネルギー状態に戻る過程（縦緩和）と、エネルギーが吸収されて秩序だった状態（コヒーレントな状態）が元の乱雑な状態（ランダムな状態）に戻っていく過程（横緩和）のそれぞれ 2 種類の緩和過程の時間のことである。なお、それらについての詳しい説明は、他の成書を参考にされたい。

2.2 NMR 装置について¹⁾

次に、その NMR 現象を測定する NMR 装置について簡単に説明する（図 2）。静磁場発生用には今日の NMR 装置ではほとんど超伝導磁石が用いられており、また分光計にはフーリエ変換（FT）- NMR 分光計が使用されている。溶液 NMR 測定の場合、溶媒に溶かした試料を NMR 用試料管に入れ、これを静磁場を発生させている超伝導磁石中のプローブに挿入する。このプローブとは、試料にラジオ波を照射したり、試料からのシグナルの検出をおこなう部分である。実際にラジオ波の発生やそのタイミングをコントロールしたり、プローブで検出したシグナルの増幅をおこなうのが分光計で、さらに分光計の A/D（アナログ-デジタル）変換器でデジタル化されたシグナルは、コンピューターに送られ FT などの処理され NMR スペクトルとして表示される。また、このコンピューターによりパルスプログラムなどの各種設定もおこなわれる。

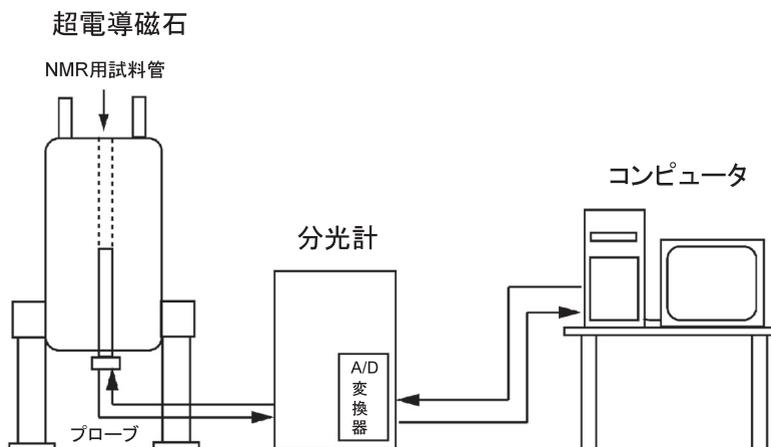


図 2 NMR 装置の構成

2.3 NMR によるタンパク質の立体構造解析法及び分子間相互作用解析法

溶液中のタンパク質の NMR 解析は、構造が未知の有機化合物の構造解析と異なり、その一次構造（アミノ酸配列）はすでにアミノ酸シーケンスや DNA 塩基配列解析等により決定されている。従って、タンパク質・ペプチドの NMR 解析の主な目的は、溶液中での立体構造解析やその動き（分子内運動性）、そして、リガント（例えば、酵素に対する基質や受容体に結合する化合物）等との相互作用解析になる。NMR による立体構造解析や分子間相互作用解析等で、まず、最初におこなうのが NMR シグナルの帰属である。NMR シグナルの帰属は、まずすでに他の手法で決定されたアミノ酸配列情報に基づき、2次元プロトン NMR スペクトルを用いて行われる。すなわち、直接スピン結合しているプロトン間を観測する COSY (COrelated SpectroscopY) スペクトル及び TOCSY (TOtal Correlated SpectroscopY) スペクトルからの各種アミノ酸の側鎖の違いを反映した特定のパターンによるアミノ酸の種類同定がおこなわれ、次いで空間的に近接しているプロトン間を観測する NOESY (Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY) スペクトルにおける隣接残基間 NOE の相関を利用してのアミノ酸の結合順序を含めた帰属がおこなわれる。このような配列情報に基づいたシグナル帰属は、配列特異的連鎖帰属法³⁾と呼ばれている（図3）。最近では、3次

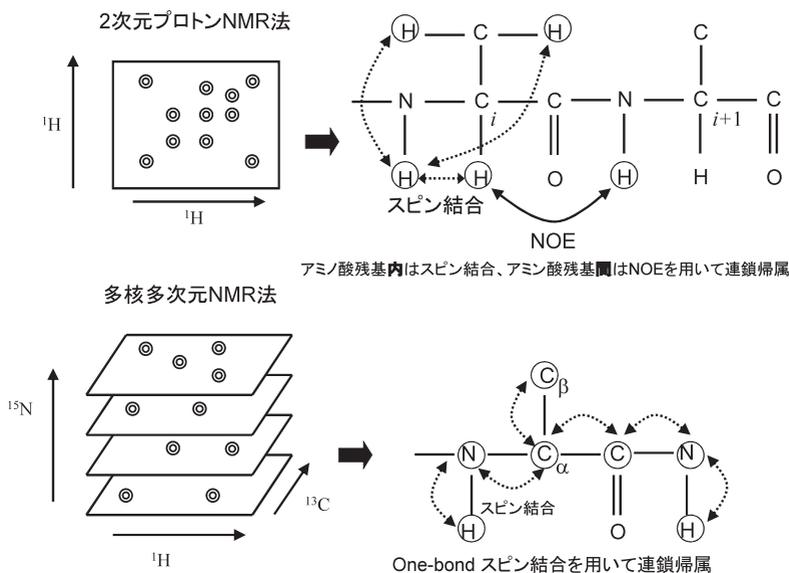


図3 2次元プロトン法および多核多次元 NMR 法による NMR シグナルの連鎖帰属法

元や4次元の多核多次元 NMR 法により、上記のプロトンだけでなく、 ^{13}C や ^{15}N の化学シフト及びスペクトルパターンにより NMR シグナルの帰属が行われている (図3)。多核多次元 NMR 法による NMR シグナルの解析は、直接結合する原子同士の one-bond スピン結合を用いた連鎖帰属法であるので、2次元プロトン NMR 法に比べ分解能と感度にすぐれており、より高分子量のタンパク質の解析が可能である。ただし、天然にわずかに存在する安定同位体である ^{13}C や ^{15}N を測定核として使用するため、タンパク質を ^{13}C や ^{15}N でラベルする必要がある。

NMR による溶液中での立体構造解析では、NMR シグナルの帰属に続いて、NOESY スペクトルを用いて、空間的に近接しているプロトン間の NOE シグナルを帰属する。NOE は基本的に距離の6乗に反比例するため、その帰属された NOE シグナルの強度より、空間的に距離の近いプロトン間同士の距離を算出し、それを構造計算プログラムで用いる原子間距離情報とする。この距離情報に加え、さらに、スピン結合定数による二面角情報とアミドプロトンの重水素交換法による水素結合情報を用いて、ディスタンス・ジオメトリー法やシミュレートッド・アニーリング法による構造計算プログラムによりタンパク質の立体構造が決定される (図4)⁴⁾。最近では、ラベルしたタンパク質を用いて分子内水素結合



図4 NMR によるタンパク質の構造解析の手順

を直接観測する NMR 測定法も開発されている⁵⁾。構造計算プログラムとしては、X-PLOR⁶⁾、CNS⁷⁾ 及び CYANA⁸⁾ が現在、主に用いられている。

また、上で述べたような溶液中での立体構造及びその分子内運動性の解析以外にも、NMR は、タンパク質の機能解明のためにリガンド等との分子間相互作用解析にも用いられている。いくつもある NMR による分子間相互作用解析法の中で、我々がこれまでに研究で用いたケミカルシフトマッピング法および NMR 滴定実験法 (図 5) と飽和移動差 (saturation transfer difference, STD) -NMR 法 (図 6) について、ここで簡単に説明する。ケミカルシフトマッピング法は、一般に、 ^{15}N でラベルしたタンパク質を用い、 ^1H - ^{15}N Heteronuclear Single-Quantum Correlated (HSQC) スペクトルにおける、主にタンパク質主鎖の ^{15}N と ^{15}N に結合した ^1H との NH の相関ピークを、リガンドを加える前と後で比較し、化学シフトが変化した NMR シグナルを同定することにより、リガンドとの相互作用部位を調べる方法である (図 5)。タンパク質のアミノ酸残基配列順 (一次構造) では遠く離れているが、立体構造をとることにより空間的に近接している幾つかのアミノ酸残基がリガンドと結合するため、すでにそのタンパク質の立体構造が分かっていると、より正確に相互作用部位の推定が可能である。なお、ケミカルシフトマッピング法による相互作用部位同定において、直接結合に関与する部位のみでなく構造変化に誘起された部位においても化学シフトが変化するため、直接結合に関与する部位のみを精度良く検出する方法として、嶋田らにより開発された NMR 転移交差緩和法⁹⁾ がある。

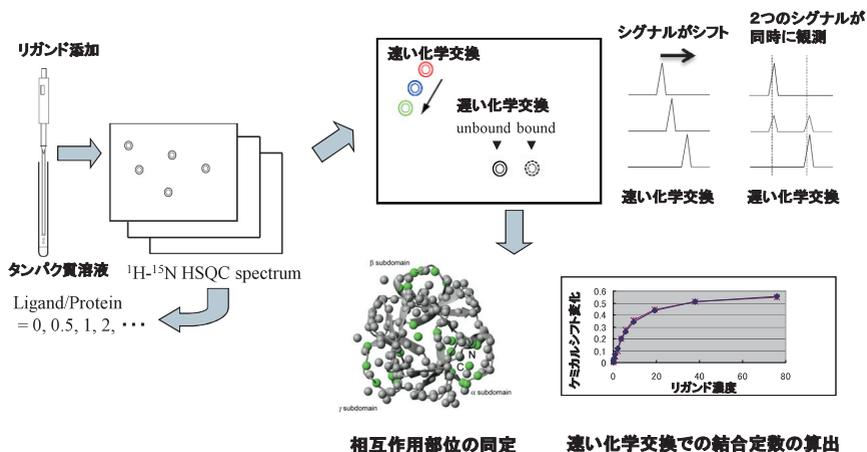


図 5 ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを用いたケミカルシフトマッピング法及び NMR 滴定実験法

さらに、NMR 滴定実験法では、タンパク質溶液にリガンドを一定量ずつ添加して、HSQC スペクトルを測定し、リガンド濃度変化に対するタンパク質の NMR シグナルの化学シフト変化を調べることで、リガンドに対するタンパク質のアミノ酸残基ごとの結合定数を求めることができる (図 5)。この方法では、リガンドとの結合において、1つの NMR シグナルのみ観測され、遊離状態から結合状態へその量比に従いシグナルがシフトする NMR の観測時間スケールより速い化学交換速度を持つ系についてのみ解析が可能である。しかし、著者らは、さらに、その方法を改良して、遊離状態の NMR シグナルと結合状態の NMR シグナルの 2つのシグナルが同時に観測される NMR の観測時間スケールより遅い化学交換速度を持つ系についても同時に結合定数を算出することを可能にした。それについては、後ほど詳しく述べる。

STD-NMR 法は、近年、Meyer らにより開発された方法¹⁰⁾で、タンパク質に選択的にラジオ波を照射して飽和させることにより、タンパク質に結合しているリガンドに飽和を伝播させ、飽和を伝播されたりガンドのスペクトルを測定し、その測定したスペクトルからタンパク質を飽和していないリガンドのスペクトルを差し引いて差スペクトルを得る (図 6)。この差スペクトルには、タンパク質に結合するリガンドのみシグナルが観測されるため、リガンドのスクリーニング

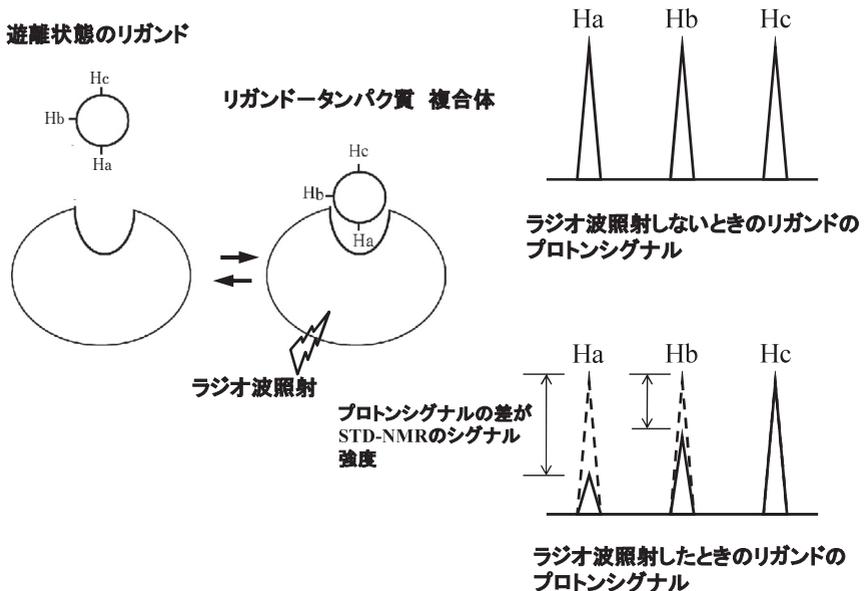


図 6 飽和移動差 (STD) -NMR 法の原理

に使用される。さらに、タンパク質との結合に関与するリガンドの部位ほど、タンパク質からの飽和が伝播しやすく、STD-NMR スペクトルにおけるシグナルの強度が強くなることから、リガンド中のタンパク質との相互作用部位（エピトープ）同定にも利用されている。

3. NMR法を用いた溶液中での立体構造解析及び分子間相互作用解析による機能解明について

我々がこれまでNMR法を用いて溶液中での立体構造解析及び分子間相互作用解析によりタンパク質・ペプチドの機能解明をおこなってきた研究結果について、ここで幾つか紹介する。

3.1 NMRによる抗菌ポリペプチドの構造解析と機能の解明¹¹⁾

カイコ体液由来の抗菌ポリペプチドであるモリシンは抗黄色ブドウ球菌活性を指標として分離された42アミノ酸残基からなる高塩基性のポリペプチドである。モリシンは、グラム陽性及び陰性細菌の両方に抗菌活性を示すが、特にグラム陽性菌に対する抗菌活性は他の抗菌性タンパク質と比較してかなり高い。このモリシンの特徴的な抗菌活性メカニズムを調べる一環として、2次元プロトンNMR法(DQF-COSY, TOCSY及びNOESYの各スペクトル)及び構造計算プログラムX-PLORにより、その溶液中での立体構造を決定した。その結果、モリシンは、連続した約8ターンからなる長い α ヘリックス構造を形成することが分かった(図7)。これまでに知られている α ヘリックス構造を持つ他の抗菌性ペプチドは、大体4~5ターンであることから、モリシンは非常にユニークな構造を持

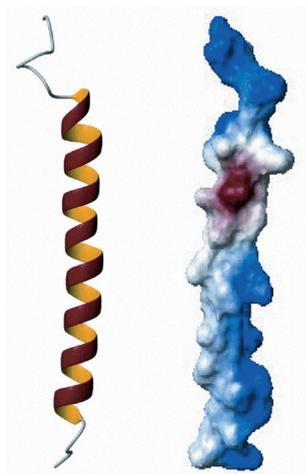


図7 抗菌ペプチド(モリシン)の主鎖の溶液中での立体構造とその表面電荷

表面電荷の図で、赤は負に荷電した領域で青が正に荷電した領域を示し、白の部分は疎水性領域を示す。

つ抗菌性ペプチドと言える。モリシンの α ヘリックス構造のうちN末端側の4～5ターンの部分の表面電荷については、典型的な両親媒性を示したことから、他の抗菌性ペプチドと同様、この構造が抗菌活性で中心的な役割を担うことが分かった。しかしながら、この部分構造のみでは十分な抗菌活性を示さないことが実験的に確かめられ、モリシンの有する強い抗菌活性には、このユニークな長い約8ターンの α ヘリックス構造全体が重要であることが推測された。現在、環境にやさしく安全性が高い天然抗菌剤に対する消費者の潜在的需要が大きいことや抗生物質耐性細菌に対する抗生物質に代わる新規の抗菌剤の開発等の面から、このような立体構造の研究は今後ますます重要になるとと思われる。

3.2 STD-NMR法によるジベレリンの認識部位（エピトープ）の解析¹²⁾

ジベレリン（GA）は、植物の伸長生長などに関与する植物ホルモンで、120種類を超える類縁化合物が存在する。しかしながら、そのうちの数種のみが活性型GAとして、GAレセプターに作用し、生理活性を発現すると考えられている。GAレセプターは、最近、松岡らの研究グループにより同定された¹³⁾。これとは別に、GAレセプターのように活性型GAを特異的に認識する抗GA抗体が得られており、これを用いた研究が行われてきた。その抗GA抗体に対する各種ジベレリンの結合活性及び抗体認識部位の研究は、これまで交差反応解析法により行われてきたが、その操作は煩雑でしかも時間がかかるため、より効率的な測定法が求められていた。最近、NMRを用いたリガントタンパク質間におけるリガント側の認識部位（エピトープ）解析法として、STD-NMR法が開発され、主に糖タンパク質間における糖側のエピトープ解析が行われてきた。そこで、このSTD-NMR法が、抗GA抗体に対するGAの結合活性及びエピトープ解析においても簡便かつ短時間で行うことが可能な方法かどうか検討を行った。最初に、活性型GAであるGA₃（図8A）と抗GA抗体との混合液（混合比＝100:1）について、リファレンスとして通常の1次元NMRスペクトル（図8B）と、STD-NMR法によるNMRスペクトル（STD-NMRスペクトル）を測定した（図8C）。STD-NMRスペクトルにおいては、GA₃由来のシグナル以外観測されなかったことから、抗体との結合活性を持つ活性型GAのスクリーニングに応用可能であると考えられた。次に、STD-NMR法では、タンパク質との距離が近いリガントの部位ほどタンパク質からの磁化移動率が大きいためシグナル強度が高まるという現象（図6）を利用して、GA₃の抗体に対するエピトープの解析を行った。そこで、STD-NMRスペクトル中のGA₃由来の各シグナルの面積積分値から抗体認識部位を推定した（図9）。図9に示すように、抗体はGA₃のA、B、Cの各リングを認識し、Dリングを認識していないこと、さらに、GA₃の β 表面側が抗体との結合に重要であることが分かった。この結果は、すでに結晶構造解析により報告されているGAの抗体認識部位¹⁴⁾と非常に良い一致を示し、STD-

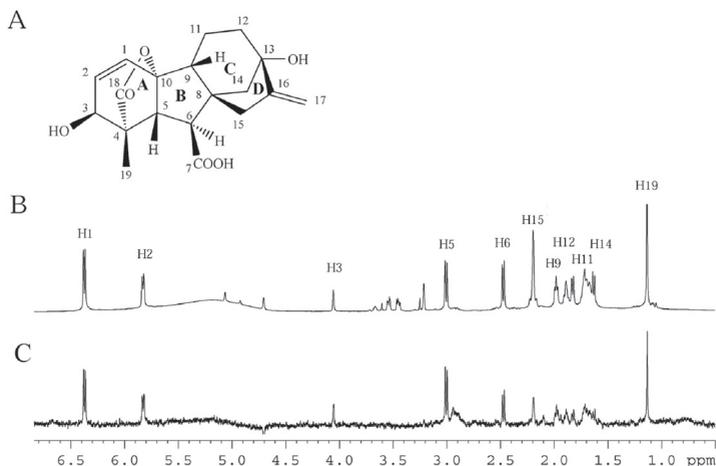


図8 GA₃の化学構造 (A) とGA₃と抗ジベレリン抗体との混合液 (100:1) のリファレンスNMRスペクトル (B) とSTD-NMRスペクトル (C)

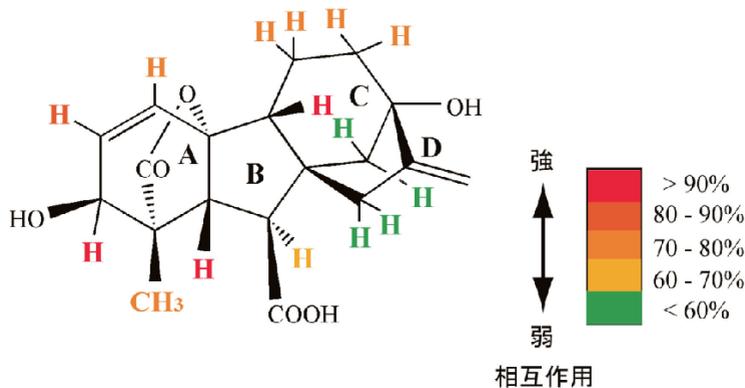


図9 GA₃のSTD-NMRスペクトルの各プロトンシグナルのシグナル強度

NMR法により容易にGAの抗GA抗体への認識部位の解析が可能であることが示された。STD-NMR法において、サンプル調製は基本的にGAと抗体を混合するだけであること、その測定は数十分で終了することから、簡便かつ短時間でエピトープ解析用のデータを取得できることが分かった。従って、この方法は、他の植物ホルモンとその抗体との相互作用解析にも応用できると考えられる。

3.3 NMR 及び分子モデリングによるジベレリン模倣ペプチド-抗体間相互作用の解析¹⁵⁾

これまで主にワクチンの開発のため、非ペプチド性リガンドとして糖質を認識する抗体に対する模倣ペプチドについての報告がなされている。また、それ以外にも、これまでDNA、ビオチンそしてカビ毒のデオキシニバレノールに対して、それを模倣するペプチドについても報告されている。しかしながら、疎水性化合物に対しては、その報告例はほとんどない。もし、疎水性リガンドに対する模倣ペプチドが容易に得られるのであれば、それらは植物ホルモン等の各種有機化合物に対して高い結合能を有する抗体を作製するための有効な抗原として利用出来る可能性がある。最近、共同研究者らにより疎水性化合物である植物ホルモンのジベレリンを認識する抗体に対して、ジベレリンのミミック（模倣体）として結合するペプチドの取得に成功した¹⁶⁾。しかしながら、オオムギ湖粉層プロトプラストを用いた α -アミラーゼ誘導などのアッセイ系においてジベレリンと類似の活性や抑制的効果は見られなかった。そこで、今回プロトン NMR 法によるジベレリン模倣ペプチドの溶液中での立体構造の解析を行うとともに、STD-NMR 法及び分子モデリング法により、ジベレリン模倣ペプチドと抗ジベレリン抗体との相互作用解析を行い、ジベレリン模倣ペプチドがジベレリンと同様に抗体と結合しているのかを検討した。最初に、2次元プロトン NMR 法により、溶液中でのジベレリン模倣ペプチドの立体構造を解析した。その結果、Leu3 - Ser6 (L3 - S6) の領域で β -ターン様構造をとることが分かった (図 10)。さらに、ジベレリン模倣ペプチドに抗ジベレリン抗体を加えたサンプルを用いて、

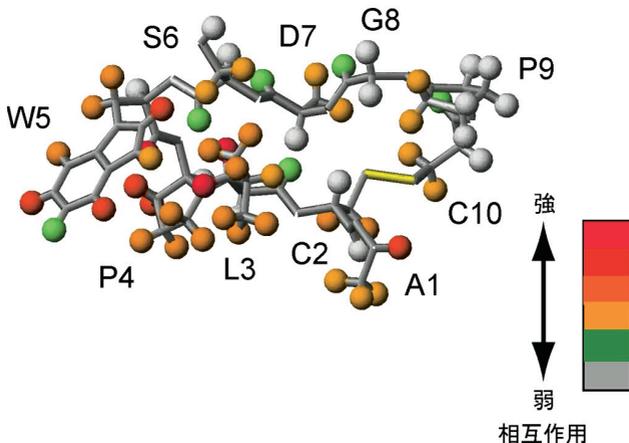


図 10 ジベレリン模倣ペプチドの溶液中での立体構造および STD-NMR 法による各プロトンシグナルのシグナル強度

STD-NMR法によりジベレリン模倣ペプチドの抗体との相互作用部位の検出を行った。その結果、 β -ターン様構造を形成する Leu3 - Trp5 (L3 - W5) の領域において強いシグナル強度を示し、Ser6 - Cys10 (S6 - C10) の領域においては弱いシグナル強度を示した (図 10)。このことから、ジベレリン模倣ペプチドは主に Leu3-Trp5 の領域で抗体と相互作用することが判明した。さらに、今回、2次元 NMR 法により決定したジベレリン模倣ペプチドの立体構造とすでに報告されている抗ジベレリン抗体の結晶構造を用いて、分子モデリング法によりジベレリン模倣ペプチド-抗ジベレリン抗体の複合体モデルを作製した。この複合体モデルにおけるジベレリン模倣ペプチドの抗体との相互作用部位は、STD-NMR 法により決定した相互作用部位と一致した。この結果から、ジベレリン模倣ペプチドは、抗体と主に疎水的な相互作用により結合し、2本の分子間水素結合を形成することが推測された (図 11 赤点線)。以上の結果より、ジベレリン模倣ペプチドと抗体との結合様式が、すでに結晶構造解析により報告されているジベレリンと抗体との結合様式と非常に類似していることを明らかにした。今回の結果より、他の植物ホルモン等の疎水性リガントに対して高い結合能を持つ抗体

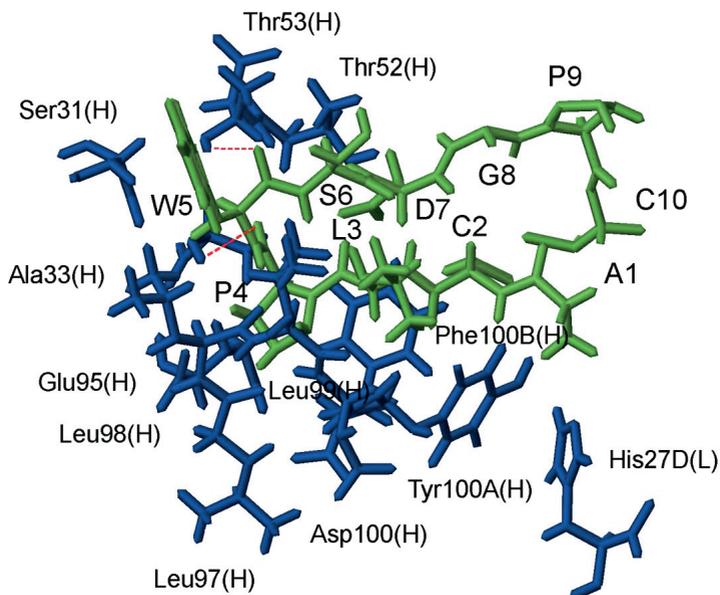


図 11 分子モデリング法によるジベレリン模倣ペプチド (緑色) - 抗ジベレリン抗体 (青色) 複合体モデルにおける分子間相互作用領域の分子モデル。分子間水素結合は赤い波線で図示。

を作製するための有効な抗原としての模倣ペプチドを作製することが可能であることが分かった。ただし、実際には模倣ペプチドの疎水性の度合いが疎水性化合物に比べて十分でない場合が考えられるので、その点については十分留意する必要がある。

3.4 NMR による R 型レクチン C 末端ドメイン糖結合部位の結合活性測定¹⁷⁾

R 型レクチンファミリーと呼ばれる糖認識ドメインは、 β -trefoil という共通の構造を持つにもかかわらず、そのリガント結合活性はさまざまであり、しかもその機能は多岐にわたることが知られている。その糖鎖認識メカニズムを解明することは、その機能を知る上で重要であるとともに、グライコプロテオミクスにおける糖鎖プロファイラーや糖鎖・糖タンパク質関連のバイオマーカーの開発等への基盤研究としても重要である。R 型レクチンファミリーに属するタンデムリピート型タンパク質のレクチンは、一般に、単独ドメインでは赤血球凝集活性を持たないと考えられているが、ここで用いた R 型レクチン C 末端ドメイン (EW29Ch) は、単独ドメインでも赤血球凝集能を持つ。そこで本研究においては、R 型レクチンファミリーの糖鎖認識メカニズム解明のために、EW29Ch 中に存在する 2 つの糖結合部位それぞれの糖結合活性を NMR 法により測定した。その結果、NMR 滴定実験法 (図 5) により、EW29Ch は分子内に 2 つの糖結合部位 (α 糖結合部位と γ 糖結合部位) を持ち、それぞれラクトースとの結合において異なる化学交換速度 (α 糖結合部位は遅い交換、 γ 結合部位は速い交換) を持つことがわかった (図 12)。この糖結合部位は、最近報告された EW29Ch - ラクトース複合体の X 線結晶構造¹⁸⁾ で示された 2 つの糖結合部位と一致する。結晶構造では、糖との相互作用において 2 つの糖結合部位でほとんど差が見られなかったが、今回の NMR 滴定実験では 2 つの糖結合部位において化学交換速度に大きな違いが認められた。速い化学交換を示す γ 糖結合部位の糖結合活性については、通常の NMR 滴定実験法により解離定数 (= $1 / \text{結合定数}$) を求めた。一方、遅い化学交換を示す α 糖結合部位については通常の NMR 滴定実験法では糖結合活性を算出することは難しかった。そこで、タンパク質濃度を常法に比べ非常に低くして測定を行ったが、低濃度でのシグナル強度低下によって解離定数を求める式へのフィッティングが良くなかったことから、その式から得られる解離定数の理論曲線を用いることにより α 糖結合部位の解離定数を算出した (図 13)。その結果、2 つの糖結合部位においてラクトースに対する糖結合活性が約 100 倍違うことがわかった (表 1)。さらに、STD-NMR 法により、EW29Ch に対する糖の相互作用部位 (エピトープ) を解析したところ (図 14)、上記の複合体 X 線結晶構造から得られた糖のエピトープとほぼ同じであることが分かった。このように、通常の NMR 滴定実験法に加えて、今回改良を行った NMR 滴定実験法により、同一分子内に存在する化学交換速度の異なる複数のリガント結合部位のそれ

A

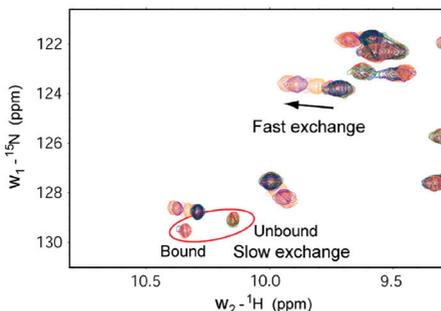
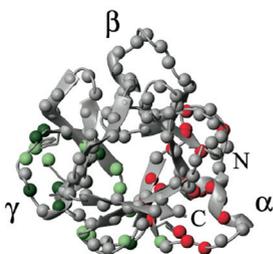


図 12 (A)EW29Ch に ラク トースを添加した時の NMR 滴定実験における HSQC スペクトルの変化

B



速い交換を示すシグナルと遅い交換を示すシグナルが観測された。(B)すでに報告されている EW29Ch の結晶構造 (PDB:2ZQN) に、今回 NMR 滴定実験でシグナルが変化した残基をマッピングした構造の図。赤は、遅い交換、緑は速い交換が見られた残基を示す。

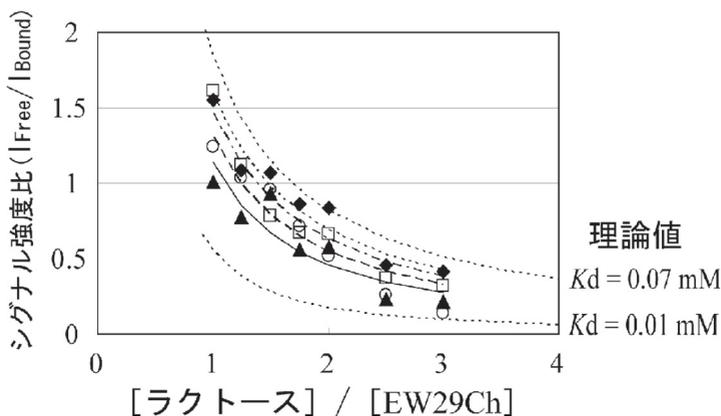


図 13 今回改良した NMR 滴定実験法による EW29Ch の α 糖結合部位とラクトースとの ^{15}N - ^1H HSQC スペクトル解析の結果

ラクトース添加に伴う α 糖結合部位中の各残基 (アスパラギン酸-18 (\square), セリン-28 (\blacktriangle), トリプトファン-33 (\blacklozenge), グルタミン-44 (\circ)) の遊離状態と結合状態との NMR シグナル強度比の変化と $K_d = 0.01\text{mM}$ または $K_d = 0.07\text{mM}$ とした場合の解離定数を求める式から得られた理論曲線。

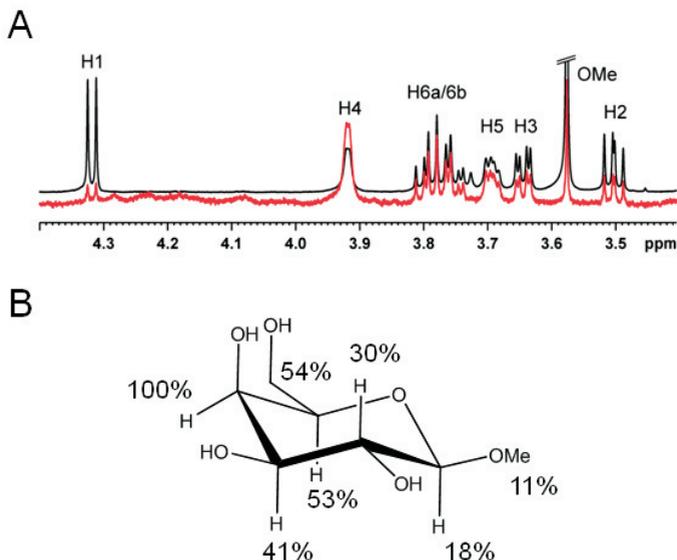


図 14 (A) メチル β -D-ガラクトピラノシド (β -Me-Gal) と EW29Ch の混合溶液の 1 次元 STD-NMR スペクトル (赤) とプロトン NMR スペクトル (黒)。(B) β -Me-Gal の構造に STD-NMR スペクトルで一番大きなシグナル (H4 プロトン) を 100% としたときの各シグナルの相対強度をマッピング。相対強度が高い程, EW29Ch との相互作用が強い。

表 1 NMR 滴定実験法により算出した α 糖結合部位及び γ 糖結合部位の各種糖に対する解離定数 (K_d)。なお, α 糖結合部位とガラクトースの結合では, 中間の化学交換を示すことから, K_d を算出できなかったため, 概算で表す。

糖	K_d (mM)	
	α 糖結合部位	γ 糖結合部位
ラクトース	0.01 - 0.07	2.66 ± 0.30
ガラクトース	$\sim 10^1$	3.89 ± 0.37
メチル β -D-ガラクトピラノシド	0.02 - 0.08	2.88 ± 0.21

ぞれのリガント結合活性を同時に算出することが可能になった。しかし, 解離定数が nM 以下の強い結合活性を持つリガントに対しては適用できず, 今後の検討が必要である。

4. おわりに

今回、本稿で紹介した NMR 解析法以外でも、最近、各種測定法が開発されており、その代表的なものに、生きた細胞中における生体高分子の直接解析技術 (In-cell NMR 法)¹⁹⁾がある。最近、その方法を用いて生きた大腸菌細胞内でのタンパク質の立体構造決定²⁰⁾や生きたヒト細胞内の細胞質にラベルしたタンパク質を導入しての NMR スペクトルの測定に成功し²¹⁾、今後、薬物の設計やスクリーニング等に役立つ手法になる可能性を示している。また、最近ホットな分子間相互作用解析法として R₂ 分散法が挙げられる。R₂ 分散法は、ミリ秒からサブミリ秒の化学交換 (構造変化) を解析できる手法であり、この時間領域には、タンパク質-リガンド相互作用や酵素反応などが含まれるためタンパク質の機能を調べる上で大変有効な測定法である²²⁾。この様な最新の NMR 測定法の導入や新規 NMR 測定法の開発・改良を行っていくことにより、今後とも食品関連タンパク質等の新規機能創出のための基盤的研究を進めて行きたいと考えている。

本稿で紹介した研究のうち、抗菌ポリペプチドについては、独立行政法人農業生物資源研究所山川稔先天性免疫研究チーム長 (現、特任上級研究員) 及び石橋純博士 (現、生体防御研究ユニット長) 等との共同研究で、STD - NMR 法によるジベレリンのエピトープ解析及びジベレリン模倣ペプチド-抗体間相互作用の解析については、東京大学大学院農学部生物制御科学研究室の山口五十磨教授 (現、前橋工科大学教授)、鈴木義人准教授 (現、茨城大学教授) の研究グループ及び東京大学大学院農学部生物情報工学研究室の中村周吾准教授との共同研究によるものである。さらに、NMR による R 型レクチン C 末端ドメイン糖結合部位の結合活性測定については、独立行政法人産業技術総合研究所糖鎖医工学研究センターの久野敦博士等との共同研究である。なお、NMR による R 型レクチン C 末端ドメインに関する研究は、日本学術振興会「科学研究費補助金基盤研究 (C) (20580373)」の助成を受けて進められたものである。

(食品分析研究領域 状態分析ユニット 逸見 光)

文 献

- 1) 安藤喬志, 宗宮 創: これならわかる NMR, 化学同人, 1997.
- 2) クラリッジ, T. D. W.: 有機化学のための高分解能 NMR テクニック (竹内敬人・西川実希訳), 講談社, 2004.
- 3) Wüthrich, K.: タンパク質と核酸の NMR (京極好正・小林祐次訳), pp. 139-173, 東京化学同人, 1991.
- 4) 3) と同書, pp. 189-213.
- 5) Cordier, F. and Grzesiek, S. Direct observation of hydrogen bonds in proteins by interresidue ³J_{NC} scalar couplings. J. Am. Chem. Soc. **121**,

- 1601-1602 (1999).
- 6) Brünger, A. T. A system for X-ray crystallography and NMR, Yale University Press, 1992.
 - 7) Brünger, A. T., et al. Crystallography & NMR System (CNS), A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Cryst.D* **54**, 905-921 (1998).
 - 8) Günter P. Automated NMR protein structure calculation with CYANA. *Meth. Mol. Biol.* **278**, 353-378 (2004).
 - 9) Takahashi, H., Nakanishi, T., Kami, K., Arata, Y. and Shimada, I. A novel NMR method for determining the interfaces of large protein-protein complexes. *Nature Structural and Molecular Biology* **7**, 220-223 (2000).
 - 10) Mayer, M. and Meyer, B. Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 6108-6117 (2001).
 - 11) Hemmi, H., Ishibashi, J., Hara, S. and Yamakawa, M. Solution structure of moricin, an antibacterial peptide, isolated from the silkworm *Bombyx mori*. *FEBS Letters* **518**, 33-38 (2002).
 - 12) Murata, T., Hemmi, H., Nakajima, M., Yoshida, M. and Yamaguchi, I. Epitope mapping of gibberellin to the anti-gibberellin A₄ monoclonal antibody by saturation transfer difference NMR spectroscopy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **307**, 498-502 (2003).
 - 13) Ueguchi-Tanaka, M., et al. Gibberellin insensitive DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellins. *Nature* **437**, 693-698 (2005).
 - 14) Murata, T., Fushinobu, S., Nakajima, M., Asami, O., Sassa, T., Wakagi, T. and Yamaguchi, I. Crystal structure of the liganded anti-gibberellin A₄ antibody 4-B8(8)/E9 Fab fragment. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **293**, 489-496 (2002).
 - 15) Murata, T., Hemmi, H., Nakamura, S., Shimizu, K., Suzuki, Y. and Yamaguchi, I. Structure, epitope mapping, and docking simulation of a gibberellins mimic peptide as a peptidyl mimotope for a hydrophobic ligand. *FEBS J.* **272**, 4938-4948 (2005).
 - 16) Sekimoto, H., Suzuki, Y. and Yamaguchi, I. Identification of peptidyl mimics of bioactive gibberellins recognized by an antibody. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**, 2408-2410 (2004).
 - 17) Hemmi, H., Kuno, A., Ito, S., Suzuki, R., Hasegawa, T. and Hirabayashi, J. NMR studies on the interaction of sugars with the C-terminal domain of an R-type lectin from the earthworm *Lumbricus terrestris*. *FEBS J.* 2095-2105 (2009).

- 18) Suzuki, R. et al. Sugar complex structure of the galactose-binding lectin EW29 C-half domain from the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Acta Crystallogr. D* **65**, 49-57 (2009).
- 19) Serber, Z., Corsini, L., Durst, F. and Dötsch, V. In-cell NMR spectroscopy. *Methods Enzymol.* **394**, 17-41 (2005).
- 20) Sakakibara, D., et al. Protein structure determination in living cells by in-cell NMR spectroscopy. *Nature* **458**, 102-105 (2009).
- 21) Inomata, K., et al. High-resolution multi-dimensional NMR spectroscopy of proteins in human cells. *Nature* **458**, 106-109 (2009).
- 22) 菅瀬謙治「天然変性状態と遭遇複合体」蛋白質核酸酵素, **52**, 945-951 (2007)

VI 多点シートセンサシステムで解析した食品の咀嚼性と力学特性

1. はじめに

本誌 38 号¹⁾で、「新しい食品テクスチャー計測の試み」という題で、生体計測を利用した食品のテクスチャー評価について述べた。筆者らは、その後も一貫して、ヒトの咀嚼挙動の直接計測を研究してきた。とくに、多点シートセンサシステムについては、定法であるインストロン型一軸圧縮装置の力学検出器としての利用、あるいは口の中で使用しやすい数種類のセンサの設計、咀嚼時に口腔部にかかる圧力測定などに進展した。この間のシートセンサシステムの進歩とテクスチャー評価技術を中心に述べたい。

2. 食品テクスチャーの測定法

食品のテクスチャー測定法として、古く 50 年位前から物理化学的な機器測定と心理学に基づく官能評価とが行われてきた²⁾。しかし、機器測定では摂食前の食品の状態を調べることはできないので、少なくとも食べ始めた後に官能評価によって示される、テクスチャー感覚に合った客観的数値を求めるのは困難なことが多い。そこで近年、食品テクスチャーの解明には、機器測定で求めた食品の物理化学特性値とヒトの感覚とを結びつける口腔過程の研究が必要(図 1)と言われるようになった^{2,3)}。2010 年 7 月に英国 Leeds 大学で、Food Oral Processing – Physics, Physiology and Psychology of Eating と呼ばれる国際会議が初めて開催される⁴⁾など、世界的にも物理学、生理学、心理学的なアプローチを組み合わせた、摂食途中の研究が注目されるようになってきている。

口腔過程の測定は、非接触で使うビデオ観察などを除けば、摂食中のヒトに

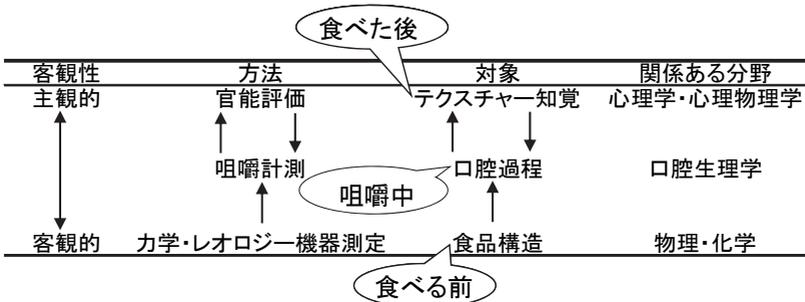


図 1. 食品テクスチャーの研究法

力や運動を検出できるセンサあるいはグローブを装着して行う。得られるヒトのデータは、個人差や疲労の影響がある等、官能評価データと同じ特色がある。官能評価は言葉と尺度でテクスチャーを表現するが、生体計測法では、その代わりに生体に取り付けたセンサの出力値、つまり客観的方法の最大利点である単位のついた数値、が得られる⁵⁾。もともと被験者の特徴を示すのに医学生理学分野で使われてきた方法であることから、センサの数値から例えば咀嚼力の大きさを被験者間で比較し、絶対評価することも可能である。通常の官能評価では他者の感覚を絶対値で示すことは困難で、標準試料に対する相対値となる。一般にテクスチャーや味の強度感覚においてはよく見られることであるが、ある個人の特徴がどの食品に対しても同じ傾向で増減する場合、個人間の感覚の差は相対評価では表せない。このことを利用すれば、同一被験者内で試料の相対値を計算するか、統計解析に個人差を考慮した方法を用いることによって、食品試料の評価ができる。一方、絶対値をそのまま用いれば、食品による差よりも大きいことが多い、被験者の個人差を見られるのが特徴である。乳幼児、小児、高齢者、病者などの摂食機能が発達期、減退期にあつて(図2)、食品研究・開発・製造者などと異なる感覚を持った対象者向け食品のテクスチャー評価には、生体計測は特に有効であろう⁶⁾。

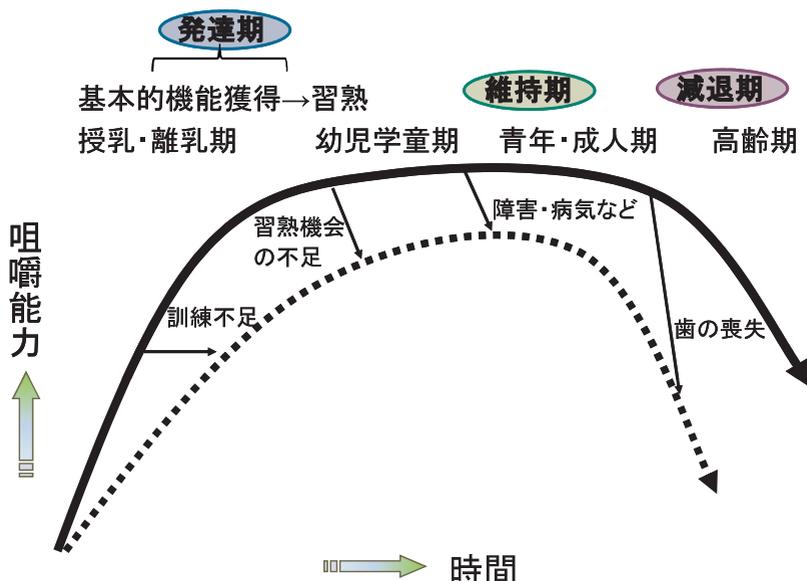


図2. ライフステージにおける咀嚼能力の変化

主な生体計測法として、口腔内での力または圧力の測定、咀嚼や嚥下運動の測定、咀嚼運動に用いられる筋肉の筋電位測定、の三種がある。この三種の方法はそれぞれ、物理的機器測定で行われる、力または応力の検出、変位や変形の検出、運動に要する動力の検出に相当するものと考えられる。どれも、時間変化が追えるので、咀嚼中における食品テクスチャーの変化に対応できる。食品を噛む歯にかかる力とその歯の運動を同時に測定することによって、機器測定で得られる力と変位の関係がヒトの咀嚼データとして得られる。また、何か一つの測定法で咀嚼条件が正確に求められれば、機器測定において、よりテクスチャー感覚に近い条件を決めるのに役立つ。測定結果を用いて、咀嚼条件をアニメーションや装置（咀嚼シミュレータあるいはロボット）で再現させ、シミュレーション計算を行うことができる。現在、高齢者の誤嚥（飲食物を嚥下するとき、口腔から咽頭を経て食道に移送されるところ、何らかの原因で気道に入ってしまうことをいう。健常者では、誤嚥を起こすと反射的にむせて食物を気道から戻すが、嚥下困難者ではそのままになり、肺炎を誘発し死に至る重篤な状態に至ることが多い。）や、幼児の窒息事故が大きな問題となっているが、被験者が実際に摂食しなくても、安全に嚥下出来るかが検討できる意義は大きい。

3. 多点シートセンサシステムの仕組み

咀嚼力の測定に筆者は、皮膚表面と同じように多数の感圧点を有する極薄シート状のセンサ（ニッタ株式会社製、I-SCAN システム）を用いている^{5, 7-12)}。このセンサの特徴は、シートセンサ上の多数の感圧点における圧力分布を時系列で追跡できることである^{5, 12)}。すなわち、一点にかかる圧力の時間変化のみを測定する他のセンサと異なり、圧力の空間分布も測定できる点に特徴がある¹¹⁾。このセンサの空間分解能は最高で1mm だが、食品には mm 単位で力学特性の異なる試料は多数ある。これら構造や力学的性質が不均質な試料を部位に分けずに、力学特性の分布を観察することは意義がある。またヒトの皮膚や粘膜における圧感覚の二点弁別閾は、最も感度が高いとされる指先や舌先でも1～2mm である¹³⁾ことから、テクスチャー感覚を議論するには十分な感度であると考えられる。

一方、大きさや形が不定な青果物等の天然物に由来する試料では、試料全体にかかる力は測れても、形状が不規則なので、応力（=荷重/接触面積）を得るのは困難である⁸⁾。従来は、このような不均一な構造の試料の力学特性解析には、細いプローブを用いて、貫入試験を行うことが多かったが、同一試料で隣り合うような場所の評価は不可能である。また破壊後の試料がプローブ下には存在しなくなるために、破壊後や大変形条件での測定は困難だった。この多点シートセンサでは、多数の圧力センサを利用して、圧を検出している面積を計算できる。そのため、荷重と接触面積との両方を直接計測でき、試料が押されて伸展し、全体積が変化するような大きな歪条件であっても、応力が計算でき、試料の形に制約

されない。

図3は、この圧力センサを模式的に描いたものである⁵⁾。二枚のポリエチレン薄膜に、電極が表面に行、裏面に列が直交するように多数配置されている。各電極の内側には、加圧により電気抵抗値が変化するインクが積層されている。センサの厚さは0.1mm以下で、曲げて使うこともできる。感圧面上のある場所に圧力がかかると、その点を含む行および列電極の出力電圧が変化する。実際にはコンピュータが列方向の電極を高速でスキャンし、各感圧点にかかる圧力値を、飽和圧を255(10⁸段階)とした相対値で示し、平面状の圧分布をディスプレイ上に示す。飽和圧感度は、インクの配合や電極幅により変えることができる。時間分解能(スキャン速度)は市販品で100～250Hz程度である。

用いたセンサを挙げる。正方形に1.27mm間隔で44行×44列の感圧点をもつセンサ(I-scan50)で、機器による食品試料の圧縮過程を調べた。同じセンサを切歯部(前歯)による食品の咬断試験、同じ感度だが感圧点の個数が100個の小型のセンサ(10×10)で臼歯部(奥歯)による咀嚼試験を行った。また、センサはスクリーン印刷で作られるので、形状や行列の数を目的に応じて設計することも可能である。当研究室では、市販の正方形のセンサの他に、ヒトの咀嚼用に切歯部から片側臼歯部を覆うMSCAN、同様の形だが毎秒1000回以上の高速サンプリングを可能にしたMSCAN2、感圧面は食品に合わせた単純な円形で電極幅を細かくし食品の詳細な分析を可能にしたMSCAN3、および半液状食品用にスプーンに貼り付けて用いる直線上に感圧点が並んだセンサを設計した。

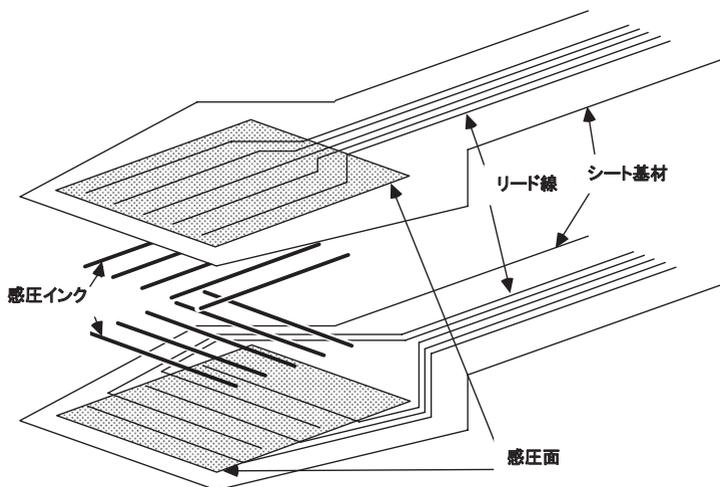


図3. 多点シートセンサの模式図

ヒトのテクスチャー感覚では、触れる対象物の表面の力学的性質と幾何学的性質を、一緒に検知する。それは、圧感覚器が多数あるから可能になるはずであり、本センサと同じような機構と考えられる。

図4は、咀嚼中の圧力変化を計測している様子を示している¹⁰⁾。被験者は、シートセンサとその上に置かれた固体状食品試料を口腔内に挿入し、実験者の指示により、シートと試料を一緒に一噛みする。通常の商品試料は咀嚼により破壊されるが、シートは噛み切れない。通常の咀嚼と異なりシートの残存感が発生し、舌の運動や唾液と食品との混合がプラスチックシートで阻害されてしまう¹¹⁾。しかし、ほとんどの被験者は、何度か試行を繰り返した後は、シートの存在により咀嚼挙動がばらつくことはなくなり、よい再現性を示すようになる。

図5は、同じ大きさ(24mm×16mm)のシリコンゴム板がある被験者が切歯部または臼歯部で噛んだとき、最大咀嚼力を示した時点における咀嚼圧分布の例である¹⁰⁾。ナイフの刃のような形をした切歯部では、圧力が生じる点が歯列に沿って左右に細長い形に分布しているが、平たい臼歯部での咀嚼圧は、より広い面積に渡っている。ゴム板は全く均一な試料だが、歯列の形によっていずれの場合でも大きな咀嚼圧分布が認められる。

噛み切れない試料は、センサと一緒に何回か繰り返して噛むことができる。図6はシリコンゴム板を臼歯部で、5回噛んだときの咀嚼力と接触面積を時間に対してプロットしたものである¹⁰⁾。試料を噛むとき、接触面積は咀嚼力よりも若干早く最高値に達し、その後で力のピークが現れる。歯が開くのに伴い、力と面積は同時に0まで下がる。咀嚼の速度は個人個人で異なるが、同一人であれば試料にはあまり依存せず、ほぼ一定のリズムで繰り返される。

以上は、ゴムという噛み切れない均質な試料の例であるが、実際の食品では、

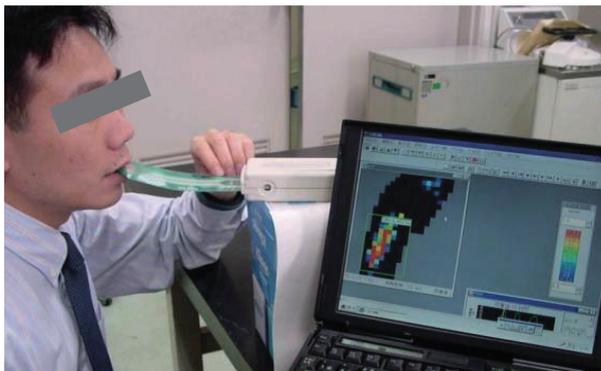


図4. 咀嚼圧測定用センサを用いた実験風景

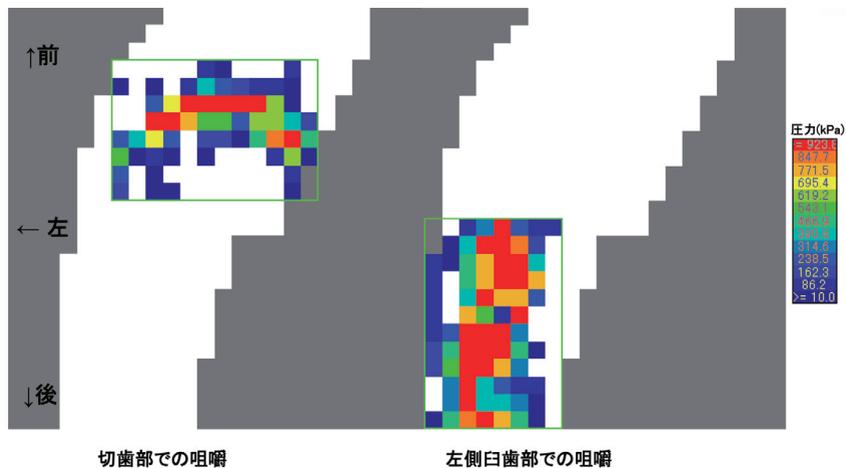


図 5. シリコンゴムを噛んだときの咀嚼圧分布

切歯部から片側の臼歯部を覆う感圧範囲を持つセンサーで、モザイクの一点は 2mm 角の一感圧点を示す。感圧範囲外は灰色、圧を生じなかった感圧点は白色で示されている。シリコンゴム直下（緑色で囲んだ部分）の 12×8 点を解析し、切歯部（左）と左側臼歯部（右）による咀嚼圧の和がピークを示した一瞬の咀嚼圧分布を図にした。

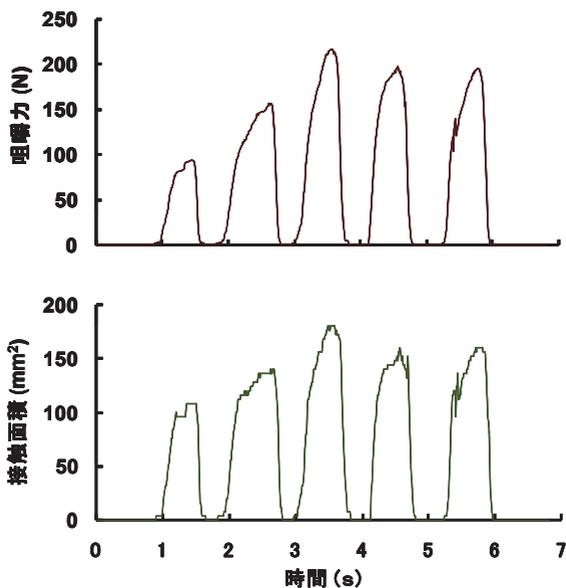


図 6. シリコンゴムを臼歯部で続けて 5 回噛んだときの咀嚼曲線

ゴムでピークが現れた上下歯が接触する時より前に、試料が破壊されピークが出現する。さらに、体温による温度変化や唾液吸収による水分量変化のために、著しく物性が変化するため、さらに複雑な圧力分布が観察される⁵⁾。

他の口腔内圧測定法は、義歯に小型圧力計を装着するなど、被験者毎に製作したセンサを用いる場合が多いのに対し、本法では食品を載せたセンサを被験者の口腔内に入れて圧力の測定を行う。そのため、被験者を選ばないだけでなく、同じ被験者で噛む歯の位置を変えて測定ができるという特長がある。口腔内で測られた圧力は、機器測定で得られる応力と同じ次元をもつ。力学物性測定装置で既知の荷重を与え、センサをキャリブレーションすれば、ヒトの咀嚼計測値と機器測定値との直接比較ができ、最適なテクスチャーの食品を提示しやすい。

4. 不均質な食品の圧縮試験における応力分布の解析

円柱形食品試料を、インストロン試験機の平板型プローブの間に挟んで1mm/sで等速圧縮した¹⁴⁾。図7に示したように、羊羹は、円形状に中央部が高い円状の応力分布を示すが、気泡を多く含む構造をもつ食パンの内層部やクラッカーでは、応力が点状に分散し、気泡が全部つぶれるまで変形させないと円状の接触面

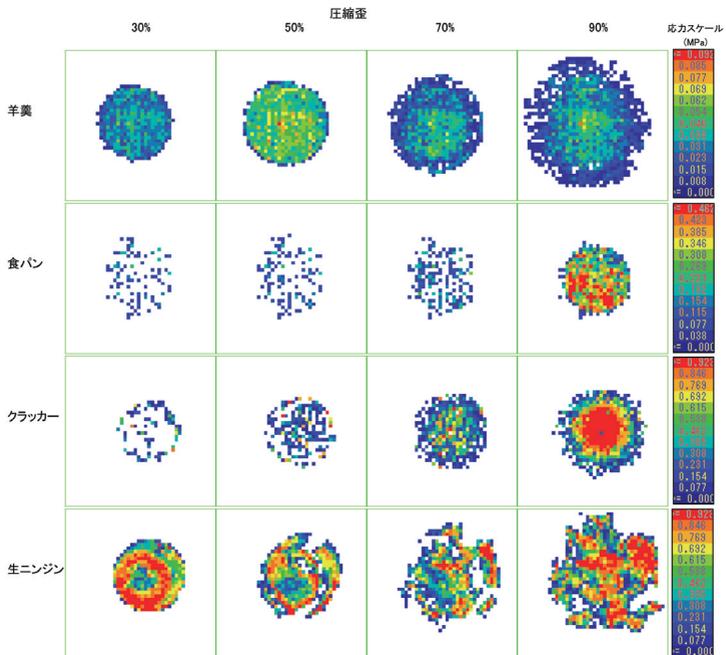


図7. 円柱型食品試料の圧縮過程における応力分布

積が得られない。また、生ニンジンと羊羹は約 40% 歪で破壊されるが、それ以降、ばらばらの破片が観察される。

多点シートセンサでは、多数の感圧点で検出した応力の空間分布が示される。このデータから、全応力を加えて、通常の機器で求められる荷重値が求められる¹⁴⁾。図 8 A は 10% 歪毎に、荷重値をプロットしたもので、通常の機器で得られる荷重曲線と等価である。また、感圧点数から、プローブと試料との接触面積がわか

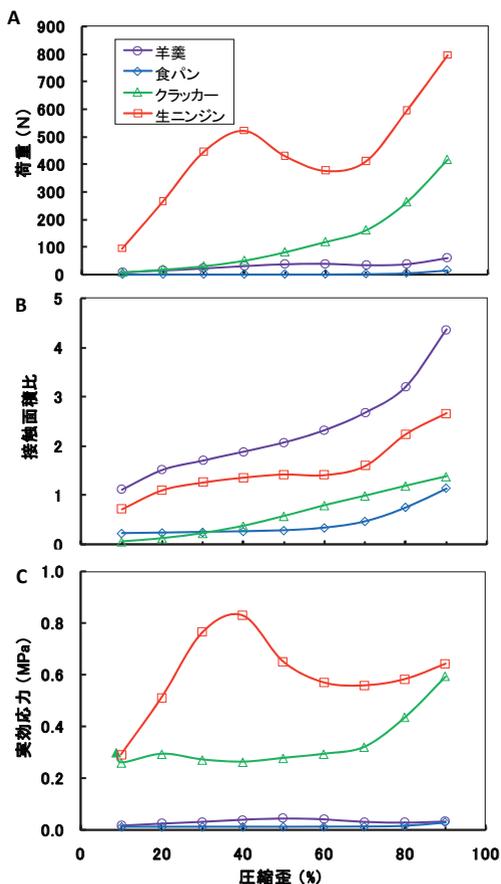


図 8. 圧縮試験中における荷重，接触面積，および実効応力の変化

実効応力は実測した荷重値を接触面積で除して求めた。クラッカーの実効応力における塗りつぶした記号は、破壊点を示す。生ニンジンと羊羹の破壊は、圧縮歪がそれぞれ 40% 前後、50% 前後で起こる。食パンは明確な破壊点を示さない。

る。図8Bは、初期の試料直径から計算した初期断面積に対して、実測した接触面積の比をプロットしたものである。セル状構造をもった試料では、接触面積が小さく、クラッカーでは70%、食パンでは80%以上まで圧縮しないと、計算値には達しない。一方、羊羹等、密な構造をもつ試料では、圧縮された分だけ、直角方向に試料が流れ、断面積が徐々に増していく。荷重を接触面積で割ると、試料が受ける平均的な応力が実測でき、これを実効応力と呼ぶことにする(図8C)。どの試料においても、接触面積が一定ではないので、実効応力曲線は荷重曲線とは異なる形を示した。極めて不均質な構造をもつ故に、変形初期に局所的な破壊が起こるクラッカーでは、小数の点に応力が集中するために、荷重値が低いにもかかわらず、実効応力値は高くなる。これは、テクスチャー感覚で言えば、指や舌で試料を破壊させない程度に押したとき、クラッカーは生ニンジン同様に硬いと感じることに対応していると思われる。指の面積全体に試料は当たらなくても、触れている少数の点の応力が高いからである。一方、極めて高い歪では、どの試料でも荷重値は急上昇するが、実効応力の上昇度は、接触面積も増加するために、緩やかである。この大小関係は、歯で食物を噛む場合の歯ごたえに対応するものと考えられる。

キュウリ等の青果物は複数の組織から構成され、各組織の力学物性の差から、特徴的な2次元の分布パターンが観察される。図9は、一般的なキュウリ4品種

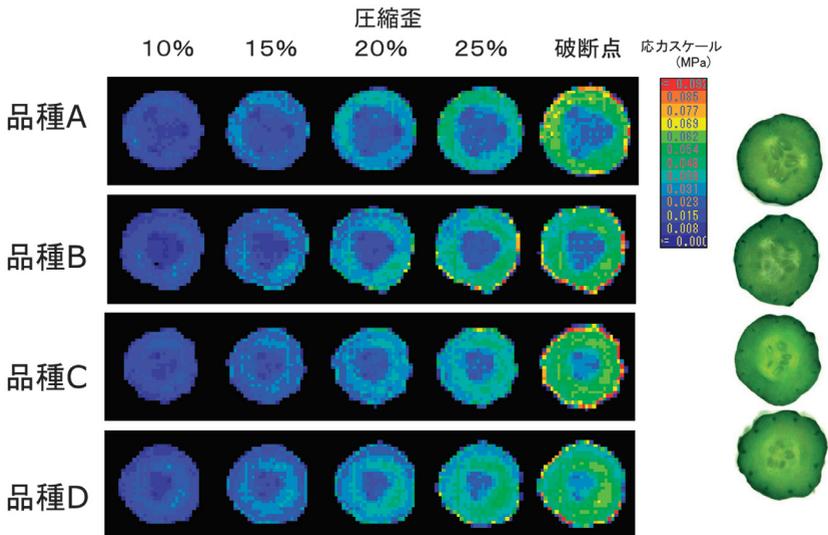


図9. 異なる品種のキュウリを圧縮したときの2次元応力分布

破断点はいずれの品種も約30%であった¹⁵⁾。右側は圧縮する前の試料断面。

について、厚さ 10mm の輪切試料を試験機で圧縮する過程での応力分布を示したものである¹⁵⁾。圧縮中の破断に至るまでの各時点において、外側の果皮部で最も応力が高く、中央の子実部で低く、その間に位置する果肉部は中間的な応力を示した。輪切全体にかかる荷重の総和は、図 9 の 4 品種のいずれでも有意な差がなかったが、応力分布のパターンは品種によって異なり、低応力の領域が大きい 2 品種 (A, B) と小さい 2 品種 (C, D) とに分かれた。品種間のテクスチャー差は、試食した専門家パネルは判別できたが、一般消費者では判らないレベルであった。このことから、専門家は官能評価時に、各組織の平面的分布を分析していたことが示唆される。

5. テクスチャーの異なる固体状食品の第一咀嚼のパターン

ヒトが臼歯部で食品を噛み切る時の応力分布を測定した。同じ食品に対しても咀嚼による力は個人差が大きく、同じ年齢層で比べても、大きな差が見られる。決められた形のプローブで等速に押す機械と違って、一人一人歯の形も、噛む速さも違うからであろう。咀嚼力は男性が女性より大きい傾向にあり、臼歯部では切歯部よりずっと大きいのが、これは、口腔や歯の大きさが男性の方が大きいこと、歯の形が違うことに由来していると考えられる。歯の形状は複雑なため、従来の計測法では、歯一本またはセンサ全体にかかる平均的咀嚼力か、食品の断面積当りが受ける平均応力しか求められなかった。本法で実測した咀嚼力を接触面積で除すれば、実際に歯と食品間に生じている平均的な圧力を計算できる。これを実効咀嚼圧と呼ぶことにするが、第一ピークにおける実効咀嚼圧は、個人差が小さいことから、試料の破壊応力を反映するものと考えられる^{13,17)}。

咀嚼力の強度や一噛みにかかる時間は個人差があるが、健康な成人が同じ食品を同じ量噛む場合は、咀嚼の挙動は似ている¹²⁾。図 10 のように、咀嚼力を咀嚼時間に対してプロットすると、食品の特色は咀嚼曲線のパターンに現れる¹⁶⁾。すなわち、生ニンジンのような弾性率の高い (変形しにくいことを指すので、簡単に言えば「かたい」という意味になるが、実際には破壊力の高いものを「かたい」と感じたり、破壊された後の一噛み中の最大力が高いものを「かたい」と表現したりすることがあるので、あえて弾性率と書くことにする。) 食品では、咀嚼曲線の初期における傾きが急、ゲルや食パンのように弾性率が低い試料では傾きが小さい。また、クラッカーのような破壊歪が小さく破碎されやすい食品ではギザギザの曲線、羊羹のように比較的均一な食品では滑らかな曲線が得られた。

一方、噛み切れない試料では、破壊にともなう第一ピークに相当するものが存在しないので、一つのピークしか現れない。食パンは明確な破壊点が咀嚼曲線に現れず、一山の咀嚼曲線を示すが、このパターンは、噛みにくい食品として知られる餅やスルメイカ、昆布などでも同様であった。ピークの高さが違うだけで、咀嚼力曲線の形は共通である。

生ニンジンのように弾性率が高く破壊歪が比較的小さい試料（多くの生野菜や果実が相当する）を除くと、多くの食品において一回の咀嚼動作のうち最大力は、試料が破壊された後に噛みしめている時、上下の歯が開き始める直前に出現した（図10）¹⁶⁾。食パンのように極めて柔らかい食品であっても噛み切りにくいものは、咀嚼曲線後期の咀嚼力は高くなる。ここでは咀嚼運動では咬合相と呼ばれるが、上下の歯が接触しているか、間に食物が入っていても極薄く潰されている⁵⁾。機器で食品の力学特性を調べる場合には、食品が破壊されてしまえば試験を止めることが多いが、これではヒトが咀嚼中に感じる噛みごたえに対応する値は得られないことが示唆される。

一方、生野菜や果実は、噛み切るときに最大咀嚼力が現れる食品である。例えばキュウリでは、官能評価や機器測定で明らかに硬いとされた品種の試料については、強い咀嚼力を要した。図11は、キュウリを10mm厚さの輪切にして、切歯部で一噛みした時の咀嚼力曲線¹⁸⁾である。AとBは物性が似ている生食用品種で、Cは硬い加工用の品種である。非専門家パネルはAとBのテクスチャーの判別ができなかった。C品種は機器測定による硬さも官能評価による噛み切りにくさも、高値を示した。大きな二つのピークが現れたが、第一ピークがキュウリ試料が破壊される点である。キュウリが割れても歯はさらに噛み込んでいき、第二ピークが現れる。ここでは、キュウリは上下切歯の間には存在せず、歯が接触している。

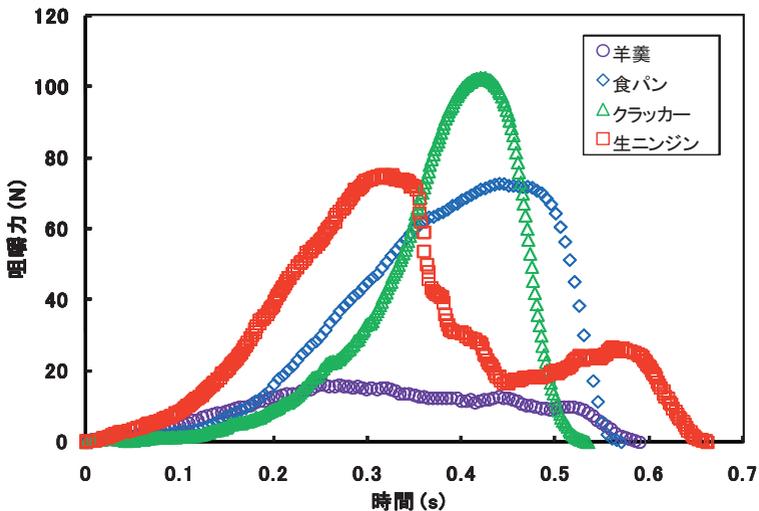


図10. 異なる物性をもつ食品試料の臼歯部による咀嚼力曲線

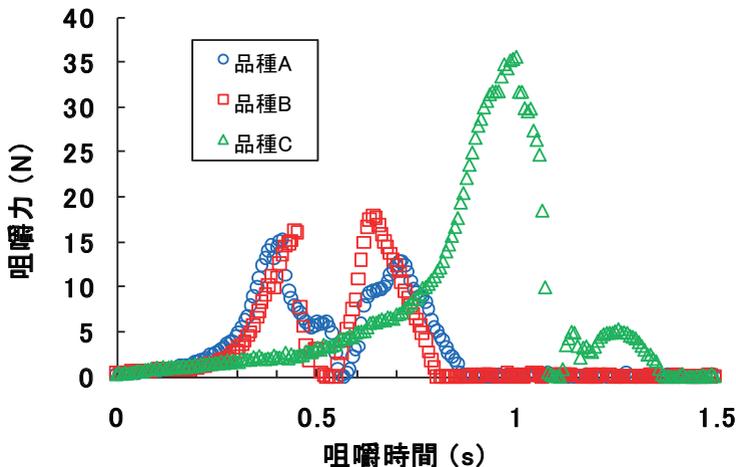


図 11. 異なるキュウリ品種の切歯部による咀嚼力曲線

同じ方法を用いて、品種差よりも、一個体の中での部位差が大きく、最も硬い果皮を剥いただけで、咀嚼力が大きく減少することを実証できた¹⁹⁾。一本のキュウリの隣合う部位を輪切りとし、常温 23 度と低温 4 度で供した場合、低温の方が有意に咬断力や破壊に必要なエネルギーが低くなり、キュウリは冷やした方が歯切れが良いことが示唆された¹⁹⁾。

カマボコやチーズなどのゲル状食品では、咀嚼力曲線に野菜類よりは滑らかな二つのピークが現れる。図 12 は、直径 25mm 高さ 10mm の円柱状に切った異なる種類のカマボコを臼歯部で一噛みした時の、試料直下の感圧点で検出した力の総和をプロットした咀嚼力曲線である。切歯部の時と同じく、第一ピークは食品の破壊によるもの、第二ピークは噛みごたえに対応しているものと推定される。3 種の試料のゲル強度を機器測定したところ、破壊荷重 (N)、破壊変形 (mm)、それらの積で表されるゲル強度 ($N \cdot mm$) は、試料 A で 10.9, 15.2, 165, 試料 B で 12.3, 15.3, 187, 試料 C で 6.0, 9.9, 59 であった。どの被験者でも第一ピークは、機器によるゲルの破壊荷重が高い試料で大きく、破壊歪の大きい試料でより遅い時間に出現した¹⁷⁾。これは、羊羹やデザートゼリーのように、歯で噛むが軟らかいゲルに対してはより小さな第一ピークとなって観察された。

食品破壊時の実効咀嚼圧を、食品によって比較しておこう^{13, 20)}。歯で噛まなくても食べられるゼリーでは $2 \times 10^4 N/m^2$ 以下と小さく、飯や調理した大根はもう少し大きく ($5 \times 10^4 N/m^2$ 前後)、クッキーや生大根は $1 \sim 4 \times 10^5 N/m^2$ 、あわびやタクアンのように噛みにくいものは極めて高い値 ($6 \times 10^5 N/m^2$ 以上) を

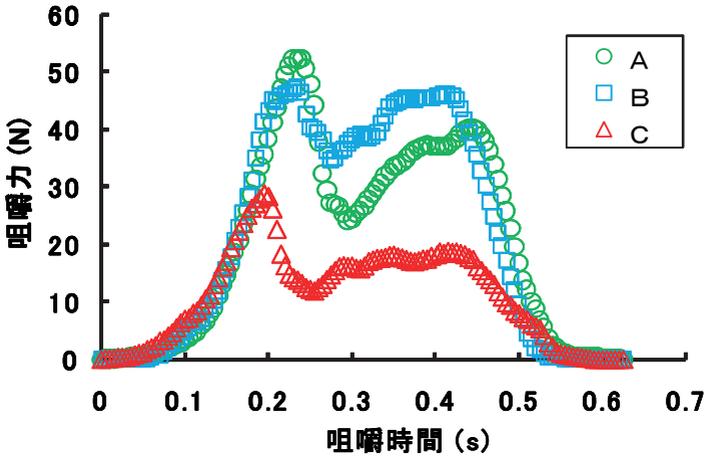


図 12. 異なる物性をもつカマボコの臼歯部による咀嚼力曲線

示す。1994年版の厚生労働省の高齢者用食品の基準（2009年より廃止）では、一軸圧縮装置を用いて決められた方法（円柱型の棒で厚さ15mmの食品を毎秒10mmの速度で10mm食い込むまで押す）で測定し、 $5 \times 10^4 \text{N/m}^2$ 以下であれば、咀嚼困難者用と認可されていた。この値は、おおむね歯で噛まなくても歯茎でつぶせるものと推定されるが、実際の咀嚼圧を測定しても合致している。

一般の機器測定で条件を一定に定めて測定した圧縮抵抗値は、ヒトの咀嚼圧は羊羹のように楽に噛み切れる食品で $1 \times 10^5 \text{N/m}^2$ 位、生ニンジンや煎餅のようにかたい食品でその数倍程度であり、機器による値よりも差が小さい。破壊点ではなく、一噛みのうち最大咀嚼圧であっても、 10^6N/m^2 より大きくなることは稀で、かたい食品であっても、噛み切れない食品であっても、その人が持っている最大限の噛みしめ力（最大咬合力）は使わず、その20%くらいまでの力で噛むことが知られている¹³⁾。

一回噛んでも噛み切れない食品、パン、餅、肉や昆布などの繊維の多い食品が多いが、上記の噛みしめ時の応力を出しても噛み切れない場合は、食品は壊れていなくても歯は一度開く¹³⁾。その場合でも、噛みしめることで、食品が本来もっている構造を弱め、唾液水分や体温により食物を軟らかくする効果がある。硬い食品でも何回も噛んでいるうちに軟らかくなり、いずれは構造がはっきりと壊れるので、咀嚼の進行にともない噛む力は減少する。食品の物性が変わっても一定の速度条件で食品を圧縮する機器と異なり、ヒトの咀嚼では食品の特性に応じて噛み方を変えていくのである。

6. 咀嚼力に及ぼす試料大きさの影響

物質の性質を対象とするレオロジー等の物性測定では、試料の大きさを標準化し、歪や応力で示すが、ヒトのテクスチャー感覚を考えると、食品試料の大きさの影響は避けられない。咀嚼と食品の物性の関係を知りたい場合、食品の形状は一定にするのが常套手段である。しかし、通常ヒトが食べる行動においては、食品の大きさや形は様々である。健全な成人が摂食経験のあるものを食べる場合、個人個人で一口大の大きさはほぼ決まっており、その咀嚼力や嚥下する時の食物（これを食塊という）の状態も一定である。それが、成長期にある子供ではばらつきが大きいことが知られている。最大の大きさは顎関節の可動範囲や口腔の容積に規定されるが、それ以下のものであれば噛むことができる。我々は日常的に、大きい食品が噛みにくいとを感じるが、咀嚼計測により示せたので紹介する。

多点シートセンサの特長を応用して、歯と食品の接触面積をリアルタイムで計測した²¹⁾。力学特性に特徴のある食品として、弾性率が高く破壊歪の小さい生ニンジン、弾性率は低いが破壊歪の大きいカマボコを選んだ。断面積を変えた場合、食品と歯との接触面積はほぼ断面積に比例した。そのため、咀嚼力は接触面積が大きくなる広い面積をもつ試料で大きくなるが、実効咀嚼力は断面積の影響がなかった。

またこの多点シートセンサは0.1mm未満と極めて薄いため、試料厚さの影響も検討できる。一回目の咀嚼中に生じる力に及ぼす厚さの効果は、食品の物性に影響されている。噛んでいる間に物性が変化しないシリコーンゴムをモデルとして用い、試料厚さと咀嚼力との関係を調べた²²⁾。

図13はその結果である。切歯部でも臼歯部でも、咀嚼の周期はほぼ一定で、試料厚さに依存しなかった(図13D)。切歯部で試料を噛むと、厚さが増すほど咀嚼力も上がり(図13A)、厚い試料を薄く切ることで、噛みやすくなることが実証できた。興味深いことに、厚いゴム試料は変形も大きくなり、歯と試料との接触面積も増す(図13B)。よって、咀嚼力を接触面積で除した実効応力は、厚さが変わっても変化しなかった(図13C)。一方、臼歯部では、2mm厚さの試料を噛むときに最も咀嚼力が高く、それ以上の厚さでは顕著に咀嚼力及び実効応力が低下した(図13A, C)。16mm厚さのゴムを臼歯部で噛むことはできなかった。切歯部で同じ試料を噛むときよりも、臼歯部の場合はずっと高い咀嚼力および実効咀嚼圧が生じていた²²⁾。

臼歯部は切歯部よりも、上下の歯の間隔が狭いので、厚い食品を噛むときに力が入らない。厚さを変えたシリコーンゴムの実験から、最も強い力を出せるのが2mm以下の狭い隙間になった時であることがわかった。大きな力をかけなくても、容易にそれ以下の厚さにつぶせる食品はよいが、かたくて大きな食品の場合には、臼歯部で噛む前に、ナイフや切歯を使って小さくしないと、効率の良い咀嚼

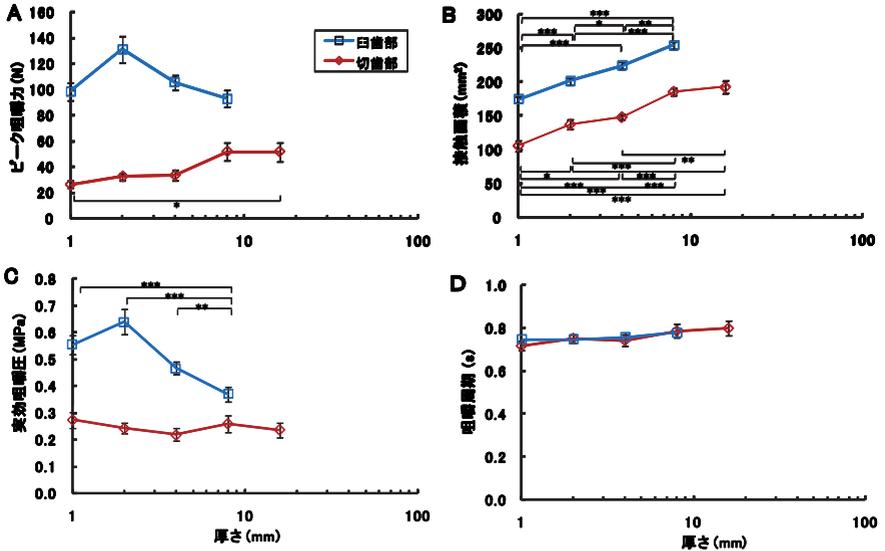


図 13. 厚さの異なるシリコンゴム試料を噛んだ時の咀嚼曲線解析

横線で結んだ厚さの異なる試料間には, *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ で有意差あり。

ができないと考えられた。

2品種(ふじ, 王林)のリンゴを, 異なる厚さ(5, 10, 15, 20mm)に切った試料を用いて, ヒト切歯部による咬み切りと切歯に似せた楔型プローブでの機器による圧縮破壊試験とを比較した²³⁾。咀嚼試験では, 厚さが増加するのに伴い, 最大咀嚼力が増加し, 咀嚼時間が延長する傾向が両品種で認められた(図14, 図15 A)。このことは, 厚さの増加に伴って, リンゴはかたく, また噛み切りにくく感じられる要因と考えられた。一方, 機器による圧縮試験では, 最も薄い場合を除いて, 厚さが異なっても最大荷重値の変化は見なかった(図14 B)。従って, 食品の厚さによる咀嚼力の変化はヒトの咀嚼に特有であり, 機器測定では調べるのできない現象であることが示唆された。このことは, 食品の咀嚼力を変えたい場合, 必ずしも物性を変える必要はなく, 食品の形状を変えるだけで達成可能ということを示している。咀嚼力の弱い高齢者や子供のための食事を工夫する際には, このような知見が役立つと思われる。

全ての食品がリンゴと同じ結果を示すのではない。実食品を用いた場合, 一回目の咀嚼中に生じる力に及ぼす厚さの効果は, 食品のレオロジー特性と関係があった。弾性率が高いが, 破壊歪がそれほど大きくないリンゴや生ニンジンでは, 試料が厚いほど咀嚼力, 接触面積, 実効咀嚼圧の全てが大きな値を示した^{23, 24)}。

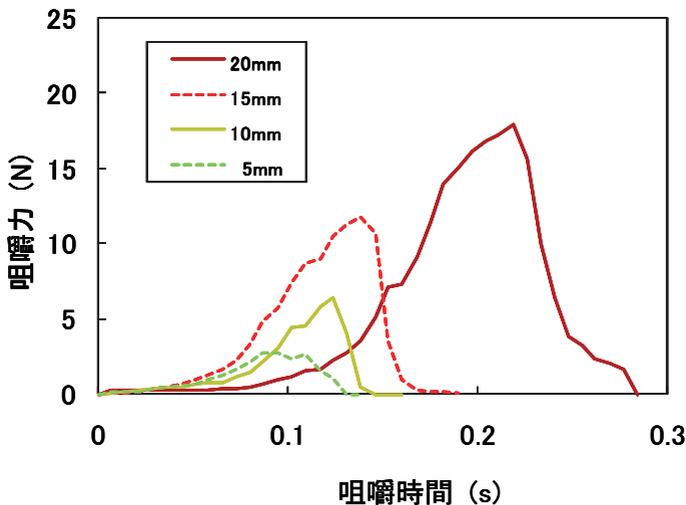


図 14. 厚さの異なるリングの咀嚼力曲線

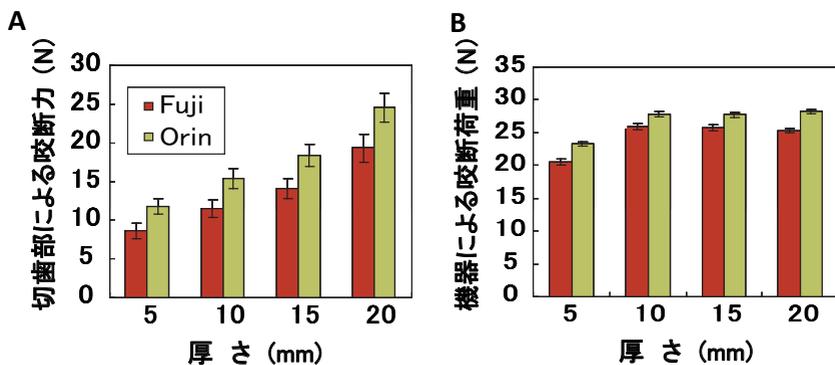


図 15. リングの咀嚼力と機器による破断荷重の厚さ依存性

一方、弾性率が低く軟らかいが破壊歪が大きく噛み切りにくい食品であるカマボコでは、破壊時の実効咀嚼圧は有意には厚さに依存しないという、シリコンゴムと同様の現象が観察された²⁴⁾。

近年上市されたある一口サイズのプロセスチーズは、従来品よりも薄くなった。筆者はこのチーズを初めて食べた時、テクスチャーが全く違うように感じたが、配合は変わっていないという。厚さを変えて切ったチーズで確かめたとこ

る、プロセスチーズの咀嚼力曲線は典型的なゲル状食品のパターンを示し、破壊時の実効咀嚼圧が厚さに依存しないことがわかった。チーズを噛み切る時に感じるテクスチャーは、咀嚼圧よりも咀嚼力の影響を強く受けるようである。大きい試料が噛みにくく感じるのは、歯根膜にかかる圧の大小よりも、顎を閉じるときの抵抗力が大きくなるためではないかと推察される。

7. 食べ方によるテクスチャー感覚の変化

噛み方によっても口腔内に生じる力は変化する。ある被験者が同じ大きさ（20×20×10mm）のチーズ試料を異なる条件、すなわち①通常通り（通常条件）に、②噛み切るときにかかる力を官能評価しながら（噛切条件）、及び③歯が試料に貫入していく瞬間の力を評価しながら（貫入条件）、噛んだときの咀嚼力曲線を図16に示す²⁵⁻²⁷。第5節でも述べたように、いずれの官能評価でも曖昧な「かたい」という用語は用いていない。一噛みにかかる時間は①<②<③の順になり、通常時の自然な咀嚼に比べて、官能評価を行う場合には食品の性質に注意を向けるため、咀嚼速度が遅くなると考えられた。とくに、③貫入条件の官能評価は難しいので、被験者は注意して少しずつ噛むため、試料の破断に要する咀嚼時間が通常の場合の二倍以上に増加した。反対に、かたさ評価に無関係と考えられる、第一ピークの出現後に出る第二ピークにかかる時間は短縮された。第一ピーク時間の延長は、評価対象をよりの確に知覚するための認知機能の働きによるものと推測された。

咀嚼曲線からパラメータを抽出し、被験者の回答との対応を調べた。すべての被験者で、破壊咀嚼力と回答との間に、統計的に有意な対応が見られた。口腔内

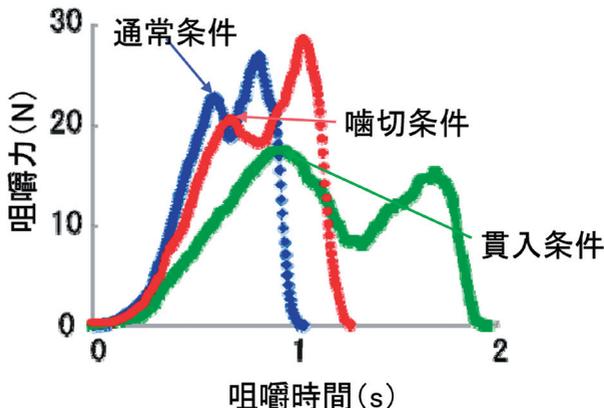


図 16. チーズの異なる噛み方による咀嚼力曲線

現象とテクスチャー知覚の関係性を直接的に示したことになる。一方、かたさ定義と無関係と思われる咀嚼パラメータは、被験者の回答と有意な対応関係がなかった。

シートセンサは接触圧を測定するものなので、食品が歯に接触してから破壊されるまで、また噛み切られるまでの時間が直接測定できる。チーズの機器測定で得た破壊変形（図 17 A）には、チーズの種類 A, B, C による差は認められたが、1～8mm/s の範囲では圧縮速度依存性はなかった。そこで、破壊変形値を食品が歯によって破壊される咀嚼曲線の第一ピークまでの時間（図 17 B）で除して、ヒトの歯がチーズを破壊する時の速度を見積もった（図 17 C）²⁵⁾。食品破壊までの平均速度は、チーズの弾性率と有意な逆相関を示し、噛む速度が無意識のうちに食品の力学的性質によって変えられていることが示唆された。弾性率が高い、すなわち小変形時に高い応力を示す試料の咀嚼速度は低下した。もっと大きな差は、官能評価を行うかどうかという噛み方に現れた。また、食品の初期厚さを噛み切るまでの時間で割れば、食品を噛み切る時の平均速度が計算できる。チーズ試料を噛み切るまでの平均速度には、有意な試料差が認められなかった。また、一噛み目の歯の速度は、連続してリズムカルに咀嚼する時に対して報告されている値（数十 mm/s）よりも、大幅に遅いことが示唆された。一噛み目は、連続した咀嚼よりも速度が遅く、ヒトは食品のテクスチャーを探りながら噛んでいくことが示唆される。また、一般の咀嚼運動測定装置は、支点である顎関節からの距離が遠い切歯部の運動速度を、食品に触れていない間も含めて平均するため、シートセンサのように食品を噛んでいる位置で圧を生じている間のみの測定では、遅く算出される。

被験者は食品をすべて同じ様に咀嚼するのではなく、噛み始めに得られた感覚情報に応じて、その後の咀嚼を変化させていると考えられる。食品によって咀嚼速度が変化する場合、一定速度で行った機器測定結果は、咀嚼測定結果と対応しなくなる可能性がある。実際、市販の 4 種のチーズを試料として試験を行ったところ、被験者の最大咀嚼力は、一定速度で行った食品の破断荷重より、ヒトの咀

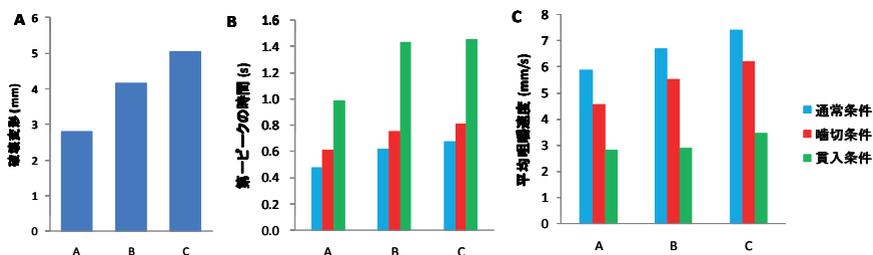


図 17. チーズの咀嚼測定から見積もった平均咀嚼速度

嚼速度での破断荷重に対して、より高い相関を示した²⁵⁾。このように、ヒトの咀嚼中の破壊現象に関しては、咀嚼速度の影響を考慮して解析する方が望ましいと考えられる。

8. かたさ分布の知覚

日本人が最も多く用いるテクスチャー表現は、「かたいーやわらかい」である²⁸⁾。一般的な機器による圧縮試験でも、ヒトの感じるかたさ感覚は、比較的表しやすいと言われている。テクスチャーと、その口腔内情報源の関係を調べるためのモデルケースとして、物性の安定したシリコンゴムを用いた実験を試みた²⁹⁾。

ここでは、圧覚感度が臼歯部よりも高いと知られている切歯部¹³⁾で、モデル食品である硬度の異なるシリコンゴムを噛んだ時、かたさの違いをどのような咀嚼パラメータで判断しているかを調べた。試料として、4段階の硬度の異なるシリコンゴム（JIS 硬度 10, 30, 50, 70）から二つを一对とし、シートセンサ上に左右に並べて設置し、切歯部で一度噛んだ後、左右どちらがかたいかを答えさせた。その時の咀嚼曲線を、左右のシリコンゴムについてそれぞれ作成した。シリコンゴムはヒトの切歯では噛み切れないので、被験者には、かたさの判断ができた時点で噛むのをやめるように指示した。図 18 に咀嚼曲線の例を示すが、ピークが一つで滑らかな曲線を示した。官能評価を伴わない一般的な食品を一噛みする場合よりは、咀嚼時間が長くなっている。被験者が咀嚼をやめる直前に最大咀嚼力が出現することから、その時点で被験者がかたさの判別ができたと考えた。そこで、最大咀嚼力、最大咀嚼力出現時の接触面積、最大咀嚼力が出

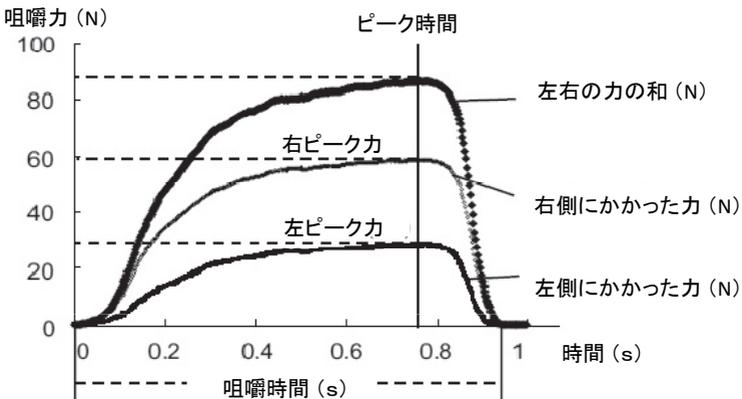


図 18. シリコンゴムのかたさ判別時の咀嚼力曲線

現した時の平均咀嚼圧である平均実効咀嚼圧（最大咀嚼力を接触面積で除したものの）、その時に最大圧を示した一感圧点の圧力である最大ピーク圧力の4つのパラメータを抽出し、いずれのパラメータがかたさ判別の手がかりとなったのか調べた。

最大咀嚼力での接触面積以外のパラメータについては、左右のゴム硬度が異なるすべての対において、有意差が認められた（図19）。これらのうち、シリコンゴムの弾性率ともっとも強い関係が見出されたのは、最大ピーク圧力であった。咀嚼中に、切歯の歯根膜機械受容器などで感知される最大圧の左右差が試料のかたさの違いを知覚する手がかりとなっていることが示唆された。噛み切れず、薄いゴム板で観察された現象が、破壊を伴う咀嚼中の食品のテクスチャー感覚と合致するかどうかは今後検討しなくてはならない。

9. おわりに

食品の物性、咀嚼中の口腔内過程、それによってヒトに知覚されるテクスチャーの関係を調べるためには、それぞれの要因を定量的に測定することが必要である。力学特性については、従来多くの研究がなされたため、機器測定による定量化が進んでおり、テクスチャー知覚についても、訓練された被験者（パネル）に官能評価を課すことにより定量的な情報が得られる。最も遅れているのは、歴史の浅い口腔内現象の定量化である。

機器で食品の力学的性質を調べても、食べたときのテクスチャー感覚とはどこか合わない点があるため、生理学的方法を取り入れた咀嚼の研究に取り組んできた。個人個人で咀嚼挙動は異なっているものの、成人が食経験のある食品を咀嚼する時には、意識しなくても食べ方に再現性があるのも不思議であった。

以上で紹介したように、機器測定とヒトの咀嚼測定で得られるデータは、対応するものも、対応しないものもあった。対応しない場合は、食品の力学特性の不均一性、低水分食品で多く見られる食品咀嚼初期0.2～0.3秒以内に起こる高速な物性変化、上下歯が接触する時に現れる性質など、通常の機器で測れないか測りにくい物性によることが多いと思われる。

咀嚼は脳幹部にある咀嚼中枢により制御されているパターン化された運動だが、咀嚼中に食品の特性は感覚情報として捉えられ、その情報が咀嚼のフィードバック制御に用いられることで、食品の物性に最適化した咀嚼行動が発生する。

一方咀嚼中に口腔内で発生した感覚情報は、テクスチャー知覚の情報源になり、食品のテクスチャーを意識することができる。感覚情報の意識化は、咀嚼制御に必須ではないものの、食品を知覚し認知するためには不可欠で、テクスチャー感覚と口腔内感覚情報源をリンクさせることが可能になる。

さらに、咀嚼は、対象特性を積極的に知覚するための探索行動としての機能も持っている。また、感覚情報をフィードバックさせることで咀嚼運動が変容し、

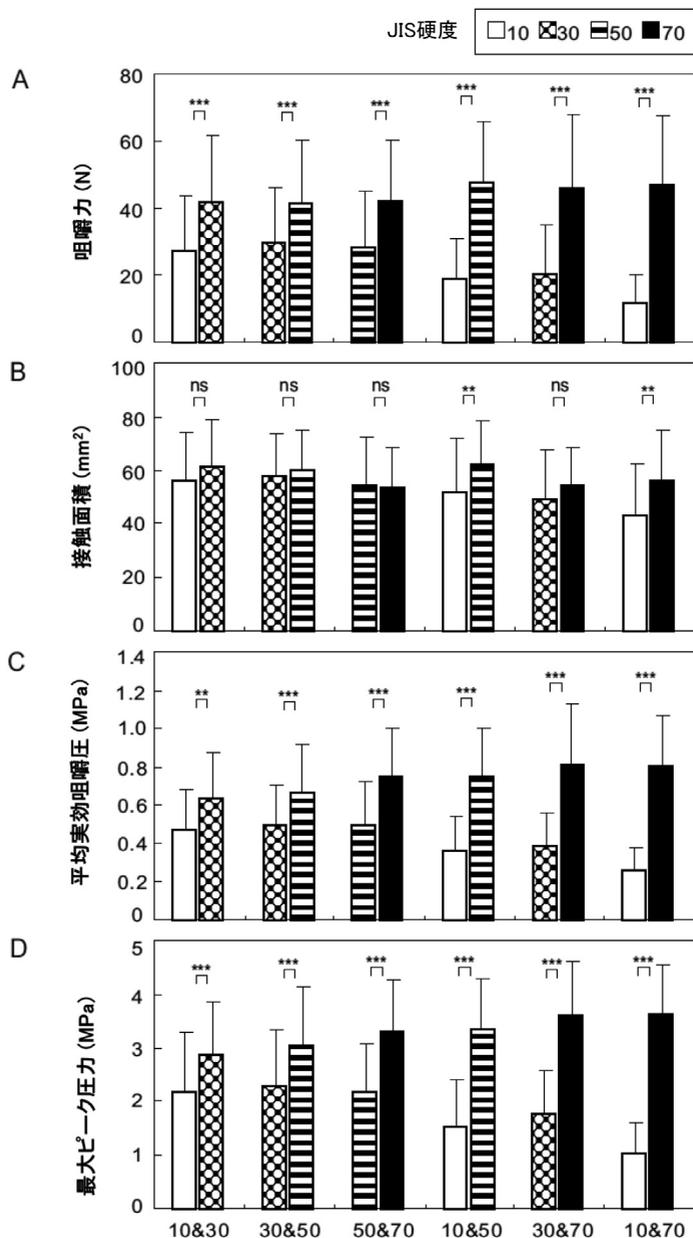


図 19. 左右に硬度の異なるシリコンゴムを噛んだ時の咀嚼パラメータの値
 , $p < 0.01$; *, $p < 0.001$ で試料間に有意差あり。ns は $p > 0.05$ で有意差なし。

テクスチャー感覚の元となる、食品のレオロジー挙動を変化させる。咀嚼における歯による食品の破壊は、機器測定のような一定の運動ではなく、試料の物性や形状に応じて、咀嚼状況に応じて、合目的に変化する。咀嚼はヒトと食品特性という動的な性質を持つ両者の相互作用によって発生するので、きわめて複雑な現象であるといえる。

咀嚼は、このような多数の要因に影響を受ける複雑なシステムであるが、それは咀嚼の持つ役割、情報量が膨大であることを意味する。多点シートセンサを用いれば、口腔感覚の個人差、食べやすさや噛みにくさ等の感覚の数値化、咀嚼中食品の物性変化等、従来法になかった解析ができる。本センサの適用は、被験者や測定者に制約がなく、多数の被験者による多種の食品の咀嚼過程データから、個人や食品による違いを数値化し、テクスチャー感覚の個人差の解明ができると考える。

今後、咀嚼圧分布データと官能評価値や機器測定値との関係をさらに解明していく必要がある。生体計測でしかわからない点もあるが、一般の機器測定でヒトのテクスチャー感覚を表現できるデータが得られれば、広く食品産業界で役立つ。とくに近年問題になっている、高齢者や病者が安全に食べられる食品や、乳幼児の窒息事故を防ぐ食品開発にもつながり、今後の発展が期待される。このように、多点センサは、複雑な食品テクスチャーを基礎的に解明するだけでなく、咀嚼性という新観点からの食品開発へ応用できる、重要なツールである。

(食品機能研究領域 食品物性ユニット 神山 かおる)

文献

- 1) 神山かおる, 新しい食品テクスチャー計測の試み, 食糧, **38**, 85-102 (1999).
- 2) 神山かおる, テクスチャー解析によるおいしさの評価, 化学と生物, **47**, 133-137 (2009).
- 3) Wilkinson, C., Dijksterhuis, G. B., and Minekus, M., From food structure to texture, Trends in Food Science and Technology, **11**, 442-450 (2000).
- 4) Food Oral Processing - Physics, Physiology and Psychology of Eating: <http://www.food.leeds.ac.uk/fop/> (引用日 2011年2月1日).
- 5) 神山かおる, 多点センサーによるテクスチャー評価技術, 食感創造ハンドブック, サイエンスフォーラム, 西成勝好, 大越ひろ, 神山かおる, 山本隆編, pp.245-250 (2005).
- 6) 神山かおる, 高齢化に対応した食品の咀嚼・テクスチャー研究, 農林水産技術研究ジャーナル, **32**(5), 39-43 (2009).
- 7) 神山かおる, 多点圧力センサーで計測した食品レオロジー, 日本バイオレオロジー学会誌, **17**, 130-139 (2003).

- 8) 神山かおる, 多点計測による食品テクスチャーの評価, 日本食品科学工学会誌, **52**, 45-51 (2005).
- 9) 神山かおる, 多点シートセンサによる食品咀嚼の研究, 食品工業, **48**(16), 49-55 (2005).
- 10) 神山かおる, ヒトの歯による咀嚼, レオロジーデータハンドブック, 日本レオロジー学会編, 丸善, pp.425-427 (2006).
- 11) 檀はるか, 神山かおる, 多点シートセンサを用いた咀嚼解析, FFIジャーナル, **212**, 583-594 (2007).
- 12) 神山かおる, 多点シートセンサを用いた食品咀嚼圧の計測, 農研機構発一農業新技術シリーズ, IV, 独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構編, 農林統計出版, pp.268-271 (2011).
- 13) 日本咀嚼学会編, 咀嚼の本一噛んで食べることの大切さ一, 口腔保健協会 (2006).
- 14) Kohyama, K., Sasaki, T. and Dan, H., Active stress during compression testing of various foods measured using a multiple-point sheet sensor, Biosci., Biotechnol. Biochem., **67**, 1492-1498 (2003).
- 15) Dan, H., Okuhara, K. and Kohyama, K., Visualization of planar stress distributions in cucumber cultivars using a multiple-point sheet sensor, J. Sci. Food Agric., **84**, 1091-1096 (2004).
- 16) Kohyama, K., Sakai, T., and Azuma, T., Patterns observed in the first chew of foods with various textures, Food Sci. Technol. Res., **7**, 290-296 (2001).
- 17) Kohyama, K., Sakai, T., Azuma, T., Mizuguchi, T. and Kimura, I., Pressure distribution measurement in biting *surimi* gels with molars using a multiple-point sheet sensor, Biosci., Biotechnol., Biochem., **65**, 2597-2603 (2001).
- 18) Dan, H., Okuhara, K. and Kohyama, K., Discrimination of cucumber cultivars using a multiple-point sheet sensor to measure biting force, J. Sci. Food Agric., **83**, 1320-1326 (2003).
- 19) Kohyama, K., Nagata, A., Tamaki, Y., and Sakurai, N., Comparison of human-bite and instrument puncture tests of cucumber texture, Postharv. Biol. Technol., **52**, 243-246 (2009).
- 20) Takahashi, T., Hayakawa, F., Kumagai, M., Akiyama, Y., and Kohyama, K., Relations among mechanical properties, human bite parameters, and ease of chewing of solid foods with various textures, J. Food Eng., **95**, 400-409 (2009).
- 21) Kohyama, K., Sasaki, T., Hayakawa, F. and Hatakeyama, E., Effects of sample cross-sectional area on human bite studied with raw carrot and

surimi gel, Biosci., Biotechnol. Biochem., **68**, 2104-2110 (2004).

- 22) Kohyama, K., Hatakeyama, E., Sasaki, T., Azuma, T. and Karita, K., Effect of sample thickness on bite force studied with a multiple-point sheet sensor, J. Oral Rehabil., **31**, 327-334 (2004).
- 23) Dan, H., Watanabe, H. and Kohyama, K., Effects of sample thickness on the bite force for apples, J. Texture Stud., **34**, 287-302 (2003).
- 24) Kohyama, K., Hatakeyama, E., Dan, H. and Sasaki, T., Effects of sample thickness on bite force for raw carrots and fish gels, J. Texture Stud., **36**, 157-173 (2005).
- 25) Dan, H. and Kohyama, K., Interactive relationship between the mechanical properties of food and the human response during the first bite, Arch. Oral Biol., **52**, 455-464 (2007).
- 26) Dan, H., Okamoto, M., Wada, Y., Dan, I. and Kohyama, K., First bite for hardness judgment as haptic exploratory procedure, Physiol. Behav., **92**, 601-610 (2007).
- 27) Dan, H., Hayakawa, F. and Kohyama, K., Modulation of biting procedures induced by the sensory evaluation of cheese hardness with different definitions, Appetite, **50**, 158-166 (2008).
- 28) 早川文代, 井奥加奈, 阿久澤さゆり, 齋藤昌義, 西成勝好, 山野善正, 神山かおる, 日本語テクスチャー用語の収集, 食科工, **52**, 337-346 (2005).
- 29) Dan, H., Azuma, T., Hayakawa, F. and Kohyama, K., Measurement of bite force variables related to human discrimination of left-right hardness differences of silicone rubber samples placed between the incisors, Arch. Oral Biol., **50**, 517-526 (2005).