

ISSN 2185-6699

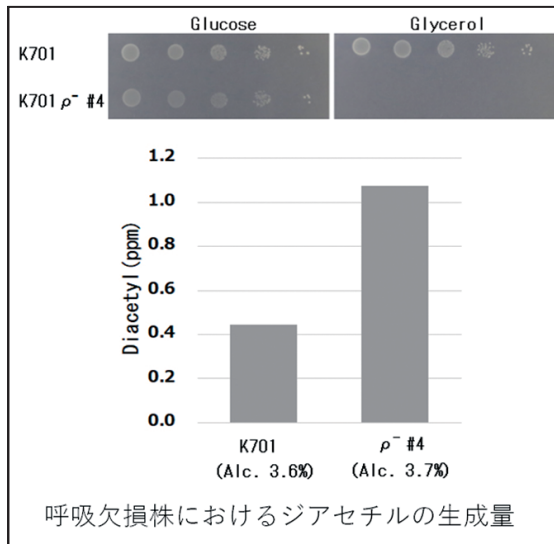
秋田県総合食品研究センター報告

第 23 号

令和 3 年 (2021 年)

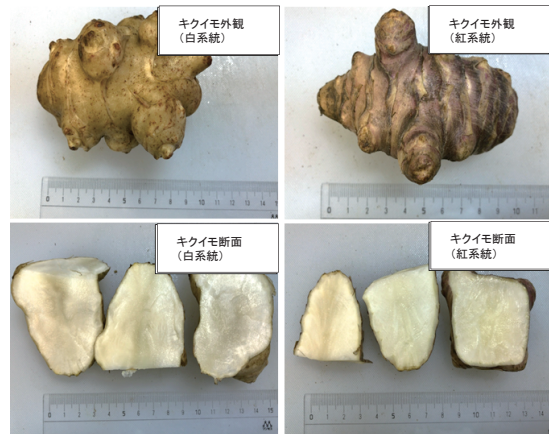
Bulletin of the Akita Research
Institute of Food and Brewing
(*ARIF*)

No. 23, 2021



呼吸欠損株におけるジアセチルの生成量

清酒醸造過程におけるジアセチルの消長
 福田敏之他、No.23, 1-7 (2021)



キクイモの遊離アミノ酸
 戸松誠、No.23, 23-26 (2021)



しよつる由来耐塩性乳酸菌のヒスタミン蓄積抑制効果
 上原健二他、No.23, 8-14 (2021)



いぶりがっこの製造方法に関する研究
 佐々木康子他、No.23, 27-30 (2021)

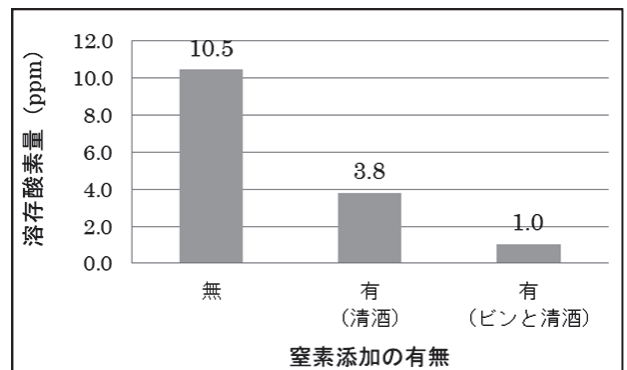


秋田県内の味噌蔵・醤油蔵から分離した住みつき酵母の多麴味噌の活用
 渡辺隆幸他、No.23, 31-35 (2021)

やまとしずく
 純米吟醸生原酒
 ヤマトルネード

遠心分離（もろみ上槽システム）の清酒

上槽方法の違いが清酒の溶存酸素濃度と酒質に与える影響について
 渡邊誠衛他、No.23, 15-21 (2021)



窒素添加が清酒の品質に与える影響について
 渡邊誠衛他、No.23, 36-309 (2021)

目 次

1. 原著論文（報文）（3件）	1
1) 清酒醸造過程におけるジアセチルの消長 ○福田敏之、杉本勇人、進藤昌	
2) しょつつる由来耐塩性乳酸菌のヒスタミン蓄積抑制効果 ○上原健二、渡辺隆幸、高橋徹	
3) 上漕方法の違いが清酒の溶存酸素濃度と酒質に与える影響について ○渡邊誠衛、黒崎文華、佐々木大地*、佐渡高智*（*秋田清酒株式会社）	
2. 原著論文（研究ノート）（4件）	23
1) キクイモの遊離アミノ酸 - 特にアルギニンについて - ○戸松誠	
2) いぶりがっこの製造方法に関する研究 - 漬床への食酢の使用と天然色素の安定性の検討 - ○佐々木康子、上原健二、渡辺隆幸	
3) 秋田県内の味噌蔵・醤油蔵から分離した住みつき酵母の多麴味噌への活用 ○渡辺隆幸、上原健二、中村勇之介、佐々木康子	
4) 窒素添加が清酒の酒質に与える影響について ○渡邊誠衛、黒崎文華、大友理宣*、佐藤治*（*秋田銘醸株式会社）	
3. 特許の概要（1件）	41
4. 学会発表要旨（8件）	43
5. 外部発表論文概要（10件）	49
6. 外部発表論文再掲載（4件）	55
7. 秋田県総合食品研究センター報告指針	78

1. 原著論文（報文）（3件）

- 1) 清酒醸造過程におけるジアセチルの消長・・・・・・・・・・・・・・・・ 1
○福田敏之、杉本勇人、進藤昌
- 2) しょつつる由来耐塩性乳酸菌のヒスタミン蓄積抑制効果・・・・・・・・ 8
○上原健二、渡辺隆幸、高橋徹
- 3) 上漕方法の違いが清酒の溶存酸素濃度と酒質に与える影響について・・ 15
○渡邊誠衛、黒崎文華、佐々木大地*、佐渡高智*（*秋田清酒株式会社）

清酒醸造過程におけるジアセチルの消長

福田敏之、杉本勇人、進藤昌
(秋田県総合食品研究センター)

Toshiyuki FUKUDA, Hayato SUGIMOTO, and Sho SHINDO

【要約】

本研究では、清酒の醸造過程でジアセチルがどのように生成、消失するのかを解析するとともに、清酒で火落ち香が確認された場合に、その発生原因となる微生物が何であるか推定する方法について検討した。清酒醸造過程での経時的なジアセチルの濃度変化を解析したところ、醪（もろみ）中のジアセチル量は発酵の前半にピークがあることが分かった。一方で、ジアセチル(DA)の同族体であるペンタンジオン(PD)との量比(DA/PD)は、発酵の後半にピークがあり上槽時には、ほぼ0に近い値になることが分かった。また、火落ち菌検査で陰性であった清酒と陽性であった清酒のDA/PD値を測定したところ、火落ち菌検査で陽性であった清酒ではDA/PD値が0に近い値となったことから、清酒が火落ち菌汚染したかどうかの判別にDA/PD値が参考になると考えられた。

【緒言】

アルコール耐性のある乳酸菌（火落ち菌）が清酒中で増殖し、混濁や異臭などを引き起こす現象を火落ちという。火落ちによって発生する異臭の原因は、火落ち菌が生成するジアセチルであるとされる。ジアセチルは、醪が火落ち菌汚染した場合以外にも醪の発酵が未熟な場合にも生成することが報告されている^{1,2)}。この他にも飲料中のジアセチルについて多くの研究報告がなされているが³⁾、「ジアセチル」として測定されているにも関わらず、実際にはその同族体も含んでいたりするなど不正確なものが多く、清酒におけるジアセチルについての正確な知見は乏しいのが現状である。そこで、本研究では新たに清酒中のジアセチルの分析法を開発するとともに、開発した分析法を用いて、清酒醸造過程における当該物質およびその関連物質の消長を解析した。

【実験方法】

清酒中のジアセチルの分析は、清酒にジクロロメタンを添加し4℃で溶媒抽出した後、内部標準を添加しGC-MSにより解析する方法により行った。また、総米

表 1 GC-MS 測定条件

GC-MS	島津製作所 GC-MSQP2010
カラム	DB-WAX(0.25×0.25×60m)
昇温	45°C(10min)→10°C/min→230°C(5min)
注入量	1μL
測定モード	SIM
ジアセチル	m/z 43(定量),86(確認)
ペンタンジオン	m/z 43(定量),29(確認)
ナフタレン <i>d8</i> (内標)	m/z 136(定量)

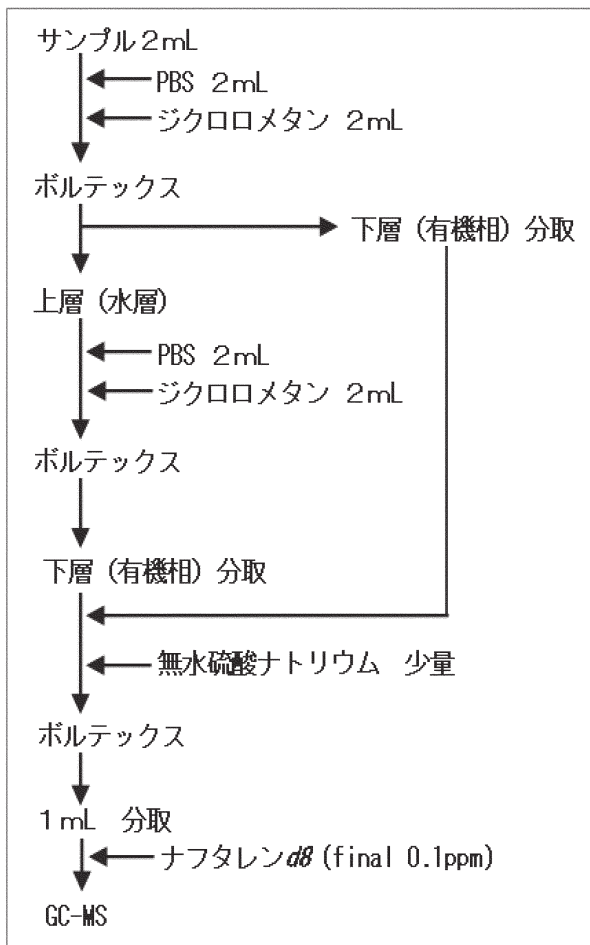


図 1 抽出操作手順

40kg での試験醸造および総米 10g の小仕込み試験を実施し、ジアセチルとペンタンジオンの清酒醸造過程における消長を解析した。

GC-MS の分析条件については表 1 に、抽出操作の具体的な手順は図 1 に示した。総米 40kg の醸造試験では、原料米に精米歩合 40% の秋田酒こまち、酵母は協会 1801 号、種麹菌はグルコ S (秋田今野商店) を用いた。小仕込み試験では、原料米に精米歩合 40% の秋田酒こまち、酵母は協会 701 号、種麹菌はグルコ S を用いた。協会 701 号の呼吸欠損株 (K701p-) の分離は、YPD 培地 (グルコース 2.0%、酵母エキス 1.0%、ポリペプトン 2.0%、寒天 2.0%) にエチジウムブロマイドを 5.0μg/ml になるように添加したプレートに協会 701 号酵母を塗抹し、25°C、2~3 日間培養して形成されたコロニーのうち、最小培地 (グルコース 2.0%、Yeast nitrogen base w/o amino acid 0.67%、寒天 2.0%) では生育できて、グリセロール培地 (グリセロール 2.0%、Yeast nitrogen base w/o amino acid

0.67%、寒天 2.0%) では生育できない株を呼吸欠損株 (K701p-) とした。

【結果と考察】

図 2 に示したように、ジアセチルは酵母における分岐鎖アミノ酸バリンの生合成過程で生成したアセト乳酸の非酵素的な脱炭酸反応によって生成する。同様に、ペンタンジオンは分岐鎖アミノ酸イソロイシンの生合成過程で生成するアセトヒドロキシ酪酸の非酵素的な脱炭酸によって生

成する。ジアセチルの生成については酵母と乳酸菌で報告はあるが²⁾、ペントタンジオンについては乳酸菌に起因した生成は報告が無く、また、イソロイシンの生合成経路が乳酸菌には無いことから、火落ち菌（乳酸菌）はペントタンジオンを生成しないものと考えられる。このような理由から、ペントタンジオンとジアセチルの存在比を火落ち菌汚染したかどうかの判別

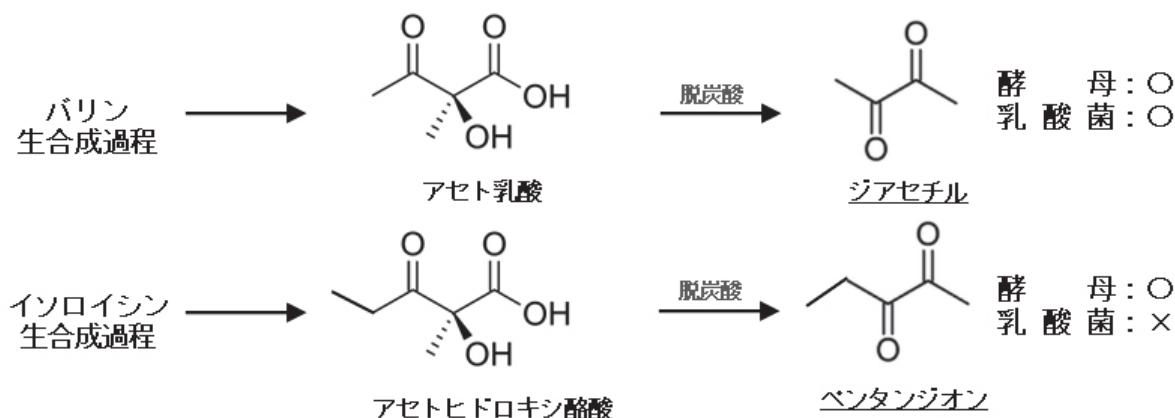


図2 ジアセチルとペンタンジオンの生成経路

に利用できるのではないかと考えた。そこで、ジアセチルとペンタンジオンの分析法の開発を行うこととした。

まず始めに、標準溶液でのGC-MSクロマトグラムの確認を行ったところ、検量線の最小濃度0.05ppmでも明瞭なピークが得られた(図3)。

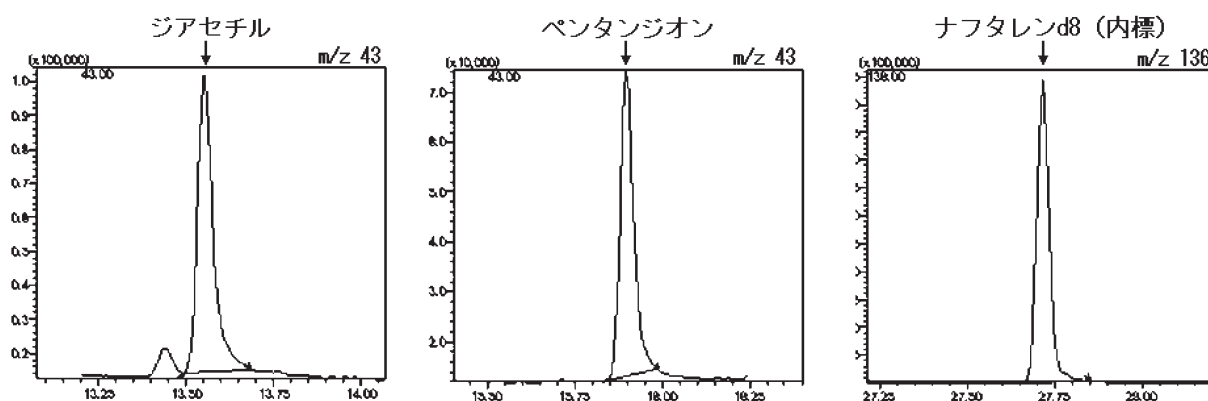


図3 標準溶液(各0.05ppm)のクロマトグラム

図4に検量線の結果を示した。定量濃度0~1ppmの範囲で直線性が得られた。また、表2に純米酒を用いた添加回収試験の結果を示した。アルコール添加酒に比べて夾雑物の多い純米酒で良好な回収率が得られたことから、アル添酒を用いた場合にも同等の回収率が得られると考えられる。以上の結果から、今回開発した分析法を用いることで、清酒中のジア

セチルとペンタンジオンを再現性良く定量できることが分かった。

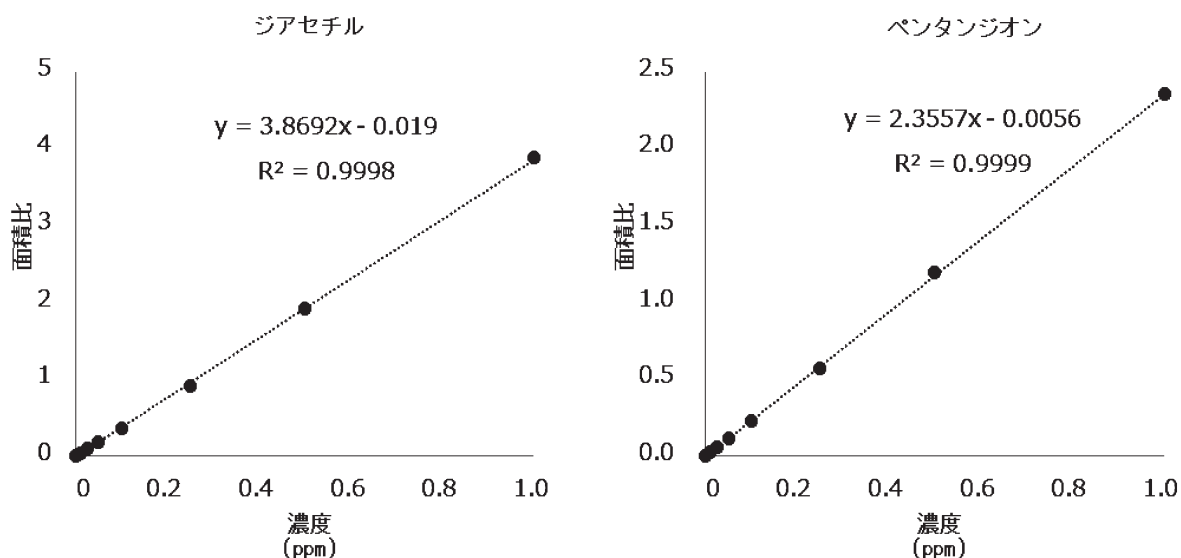


図4 ジアセチルとペンタンジオンの検量線

添加濃度	ジアセチル	ペンタンジオン
0.1ppm	平均回収率 93.0%	平均回収率 101.6%
	標準偏差 1.4	標準偏差 2.5
	変動係数 1.5%	変動係数 2.4%
0.5ppm	平均回収率 93.7%	平均回収率 102.2%
	標準偏差 2.0	標準偏差 2.7
	変動係数 2.1%	変動係数 2.6%

表2 添加回収試験結果

(n=5)

図5に小仕込み試験におけるジアセチルとペンタンジオンの定量結果を示す。ジアセチルは、アルコール度数が6%程度をピークに増加を続けその後は減少していくのに対して、ペンタンジオンについては明確なピークは見られなかった。ペンタンジオン(PD)濃度をジアセチル(DA)濃度で割った値、DA/PD値は醗後半にピークを迎え、上槽時にはほぼ0になることが分かった。同様の傾向は、総米40kgの試験醸造における分析結果(図6)でも観察された。ジアセチルの前駆物質であるアセト乳酸は非常に不安定な化合物であり、低温でも容易に脱炭酸しジアセチルに変換されるため、本研究で測定されたジアセチル濃度の値はアセト乳酸がほぼ完全にジアセチルに変換した後の濃度であると考えられる。

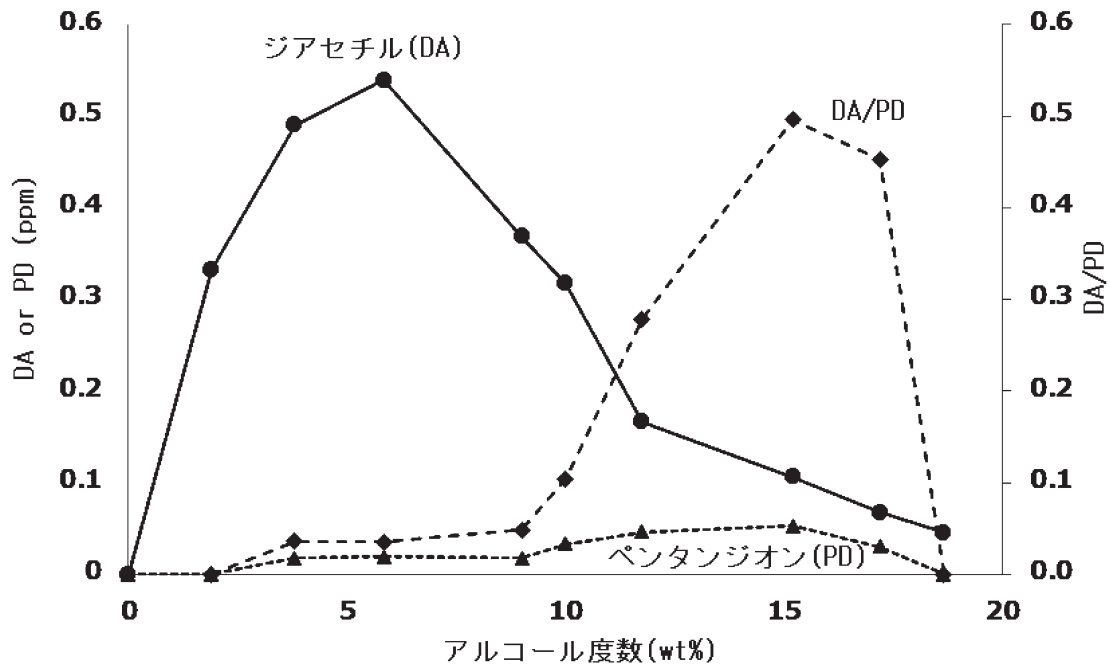


図5 小仕込み試験でのジアセチル等の消長

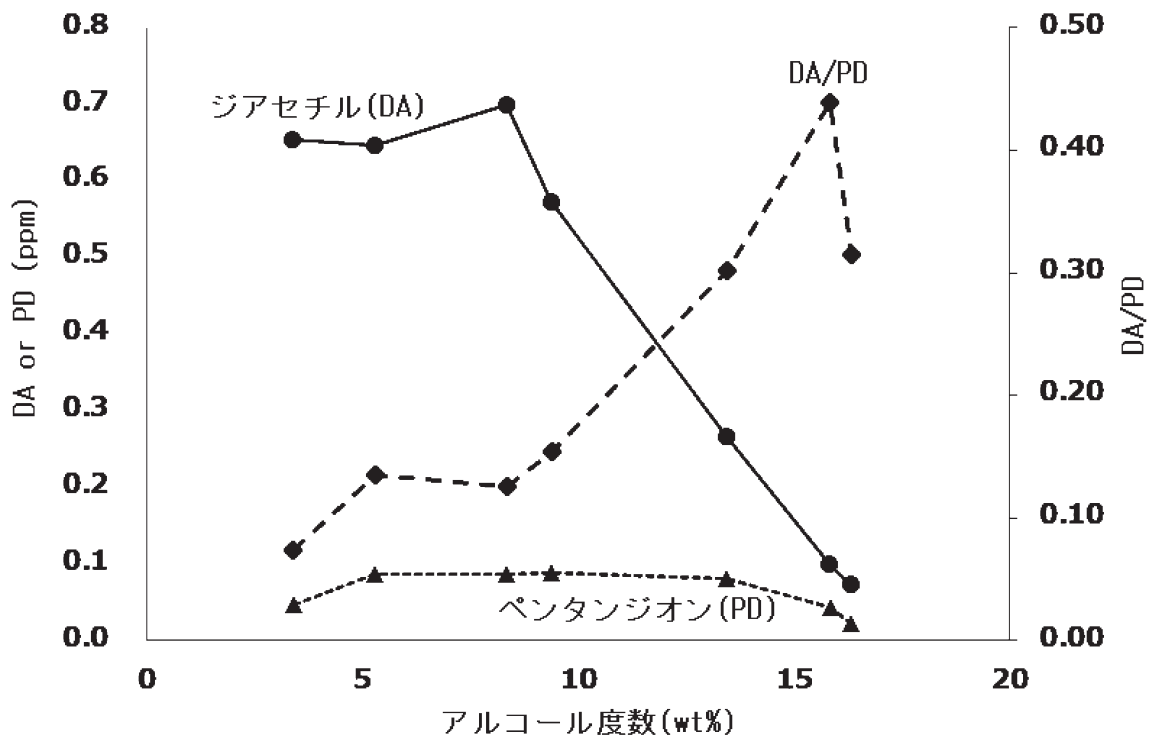


図6 総米 40kg 試験醸造におけるジアセチル等の消長

図7に、火落ち菌検査陽性の市販酒や試験醸造醪での DA/PD 値の測定結果を示す。醪および火落ち菌検査陰性の清酒では DA/PD 比が 0.1～1.0 の間にあるのに対して、火落ちした清酒では DA/PD 比が 0.1 未満になるこ

とが明らかとなり、清酒の火落ち菌汚染の判別に DA/PD 比が有効であることが示唆された。

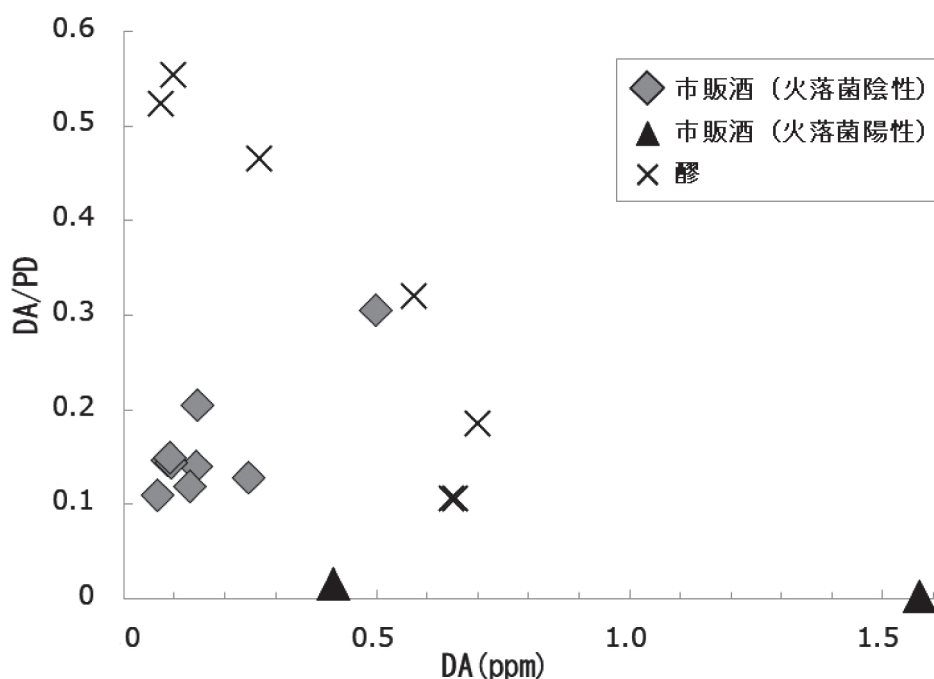


図 7 市販酒等における DA/PD 比

最後に、ジアセチル生成量に対するミトコンドリア活性の影響を解析するために、協会 701 号 (K701) 酵母の呼吸欠損株を作成し、当該酵母でのジアセチル生成量を小仕込み試験により解析した。呼吸欠損株は、エチジウムブロマイド処理によるグリセロール代謝能の欠損を指標にスクリーニングし取得した。図 8 に示すように、K701 の呼吸欠損株 (K701p-#4) では K701 に比べて、醪前半 (アルコール度数 5% 未満) におけるジアセチル生成量が倍以上に増加していることが明らかになった。呼吸欠損株ではミトコンドリアが脱落し TCA 回路が存在しないため、細胞内での NADH の供給不足が起きていると考えられる。NADH の供給が減ると、ピルビン酸からアセチル CoA となりクエン酸回路で代謝されにくくなるため、結果としてピルビン酸が蓄積することになると予想される。高濃度のピルビン酸は、アセト乳酸合成酵素のバリリンによるフィードバック制御 (抑制) を阻害するため⁴⁾、呼吸欠損株ではジアセチルの前駆物質であるアセト乳酸が高濃度に蓄積し、その結果ジアセチルが高濃度に生成すると考えられた。何らかの理由でミトコンドリア活性が低下し NADH の供給不足が起きている酵母で醸造した場合には、ジアセチル生成量が通常よりも多くなるものと考えられた。

DA/PD 値のみでジアセチルの生成要因を断定することは難しいが、要

因を探る際の一助となることを期待したい。

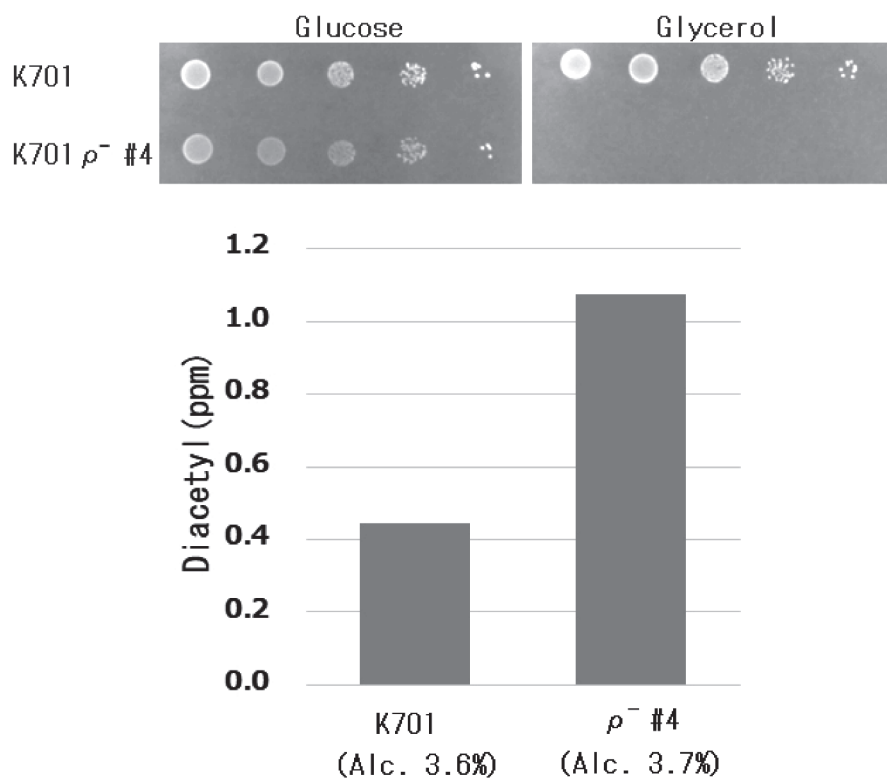


図8 呼吸欠損株におけるジアセチルの生成

【引用文献】

- 1) 井上喬(2004) 食品とジアセチル - 古くて新しいトピック - 日本醸造協会誌, 99(5), 315-323.
Doi: 10.6013/jbrewsocjapan1988.99.315
- 2) 小武山温之、岩田知栄子、清水敏世(1962) 醸造物の異臭に関する研究 第3報 Acetoin系生産物の消長について 日本醸造協会誌、57(7), 607-616.
- 3) Magee P. T. and Robichon-Szulmajster H. De (1968) The Regulation of Isoleucine-Valine Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*.
3. Properties and regulation of the activity of acetohydroxyacid synthetase. *European J. Biochem.*, 3, 507-511.
Doi: 10.1111/j.1432-1033.1967.tb19560.x
- 4) 井上喬 著 (2001), ジアセチル ～発酵飲食料製造のキーテクノロジー～ 幸書房, 東京

しよつつる由来耐塩性乳酸菌のヒスタミン蓄積抑制効果

上原健二、渡辺隆幸、高橋徹
(¹秋田県総合食品研究センター)

Kenji UEHARA, Takayuki WATANABE, and Toru TAKAHASHI

【要約】

近年、魚醤油製造において好塩性乳酸菌によるヒスタミン蓄積が問題となっている。魚醤油のヒスタミン蓄積抑制技術としては、ヒスタミンを生成しない乳酸菌を発酵スターターとして添加する方法が報告されているが、単独菌株での利用はフェージ感染などにより無力化する可能性があるため、安定的な効果を期待するには複数株の利用が望ましい。そこで、本研究では、しよつつる由来耐塩性乳酸菌の実験室レベルでのヒスタミン蓄積抑制効果を評価し、発酵スターターとして利用可能性のある菌株の選抜を行った。その結果、しよつつる含有培地での生育も良好で、且つ乳酸菌用醤油培地を用いたヒスタミン蓄積抑制評価でも高い抑制率を示したしよつつる由来耐塩性乳酸菌 5SA-23 株が、しよつつる製造における有用な乳酸菌スターターとして利用できる可能性が示された。

【緒言】

しよつつるは日本三大魚醤油のひとつで、秋田県の伝統的な特産品である。近年、魚醤油製造において好塩性乳酸菌（主に *Tetragenococcus spp.*）によるヒスタミン蓄積が問題¹⁾となっている。ヒスタミンは、ヒスチジンが脱炭酸されることで生じ、過剰摂取した場合、急性的にアレルギー症状が起きる可能性があることから、国際食品規格委員会（CODEX）ではその基準値を 400ppm と定めている。これまでに、しよつつるへのヒスタミン蓄積事例の報告はないが、近年の減塩・低塩傾向の中、安易なしよつつるの低塩化は、ヒスタミン蓄積を招くことが危惧されるためにその対策も求められる。魚醤油のヒスタミン蓄積抑制技術としては非ヒスタミン生成乳酸菌発酵スターターを添加する方法が報告されており²⁾、実際のしよつつる製造環境下においても食塩濃度が 20%以上の条件であれば非ヒスタミン生成乳酸菌をスターターとして添加することでヒスタミン蓄積量を基準値以下に抑えることが可能であることが明らかとなっている^{3,4)}。したがって、発酵スターター添加により発酵初期の非ヒスタミン生成乳酸菌を優占種とすることができれば、ヒスタミン蓄積が起らない低塩しよつつる製品の製造も可能であると考えられる。一方で、単独菌株の発酵スターター添加はフェージ感染などで無力化する可能性もあり、安定的な効果を期待するのであれば複数菌株の利用が望ましい。

そこで、本研究では、しよつつる由来耐塩性乳酸菌の生育能やヒスタミン蓄積抑制効果を実験室レベルで評価し、発酵スターターとして利用可能性のある菌株の選抜を行った。

【実験方法】

1. 実験で使用した培地

MRS10 培地は、Difco Lactobachili MRS Broth (BD 社製) 5.5g、食塩 10g を超純水 90ml に加え溶解後、NaOH を用いて pH7.0 に調整した。100ml に定容後、121°C で 15 分間オートクレーブ滅菌した。

しょつつる含有培地は、しょつつる (ひより会製) 50ml、グルコース 0.5g、食塩 4g、ヒスチジン 0.1g を超純水 40ml に加え溶解後、NaOH を用いて pH6.0 に調整した。100ml に定容後、121°C で 15 分間オートクレーブ滅菌した。

乳酸菌用醤油培地は、濃口醤油 (キッコーマン社製) 25ml、グルコース 1g、食塩 6g を超純水 90ml に加え溶解後、NaOH を用いて pH8.0 に調整した。100ml に定容後、121°C で 15 分間オートクレーブ滅菌した。

2. 乳酸菌のヒスタミン蓄積抑制能評価

2-1. しょつつる含有培地を用いた評価

MRS10 培地 5ml に評価する乳酸菌を植菌し、30°C で 5 日間静置培養した (=前培養液)。前培養液の OD₆₆₀ を測定し、OD₆₆₀=1 となるように同培地で調整した。しょつつる含有培地 5ml に OD₆₆₀=1 とした前培養液 0.1ml および OD₆₆₀=0.001 としたヒスタミン生成乳酸菌培養液 0.1ml を植菌し、30°C で 20 日間静置培養した (=本培養液)。本培養液の OD₆₆₀ 測定、pH 測定およびヒスタミン生成確認を行った。ヒスタミン生成確認は、チェックカラーヒスタミン測定キット (キッコーマンバイオケミファ社製) を用いて発色させ、470nm の吸光度 (OD₄₇₀) を測定することで行った。

2-2. 乳酸菌用醤油培地を用いた評価

乳酸菌用醤油培地 5ml に評価する乳酸菌を植菌し、30°C で 5 日間静置培養した (=前培養液)。前培養液の OD₆₆₀ を測定し、OD₆₆₀=1 となるように同培地で調整した。ヒスチジン含有乳酸菌用醤油培地 (乳酸菌用醤油培地 100ml にヒスチジン 1g を加えたもの) 5ml に OD₆₆₀=1 とした前培養液 0.1ml および OD₆₆₀=0.001 としたヒスタミン生成乳酸菌培養液 0.1ml を植菌し、30°C で 8 日間静置培養した (=本培養液)。本培養液のヒスタミン生成確認、OD₆₆₀ 測定および pH 測定を行った。ヒスタミン生成確認は、2-1. と同様に行った。ヒスタミン蓄積抑制率 (%) は、 $100 - [(試験株での OD_{470} 吸光度 / ヒスタミン生成株での OD_{470} 吸光度) \times 100]$ の計算式で算出した。

3. 乳酸菌の 16S rDNA シーケンス解析による菌種の推定

MRS10 寒天培地に乳酸菌を植菌し、30°C で 5 日間嫌気培養した。生育してきたコロニーをピックアップし、滅菌水 30μl に懸濁後、1μl を PCR 反応のテンプレートとして使用した。ポリメラーゼとして KOD FX NEO (東洋紡社製) を、プライマーとして 16S_27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') と 16S_1492R (5'-

GGTTACCTTGTTACGACTT-3') を用いて PCR 反応を行った。PCR 反応物を 1.5% アガロースゲルにて電気泳動し、1.5kbp 付近のゲルを回収後、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (プロメガ社製) を用いて増幅断片を精製した。精製後の増幅断片のシーケンス解析は、上記 PCR 反応に使用したプライマーに加え、16S_F2 (5'-GGATTAGATACCCTGGTAGTC' -3') 及び 16S_R2 (5'-CTTGCGGTCGTACTCC-3') を用い、秋田県立大学バイオテクノロジーセンターに委託し行った。解析後の配列は blastn 解析 (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_SPEC=GeoBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch) に供し、菌種の推定を行った。

【結果と考察】

1. 疑似しょつつる製造環境下でのヒスタミン蓄積抑制効果の検証

しょつつる製造に使用する発酵スターターの特性としては、しょつつる製造環境下で生育し、且つヒスタミン生成菌の存在下でもヒスタミン蓄積を抑える能力があることが求められる。そこで、しょつつる製造環境下でも生育する可能性の高いしょつつる由来耐塩性乳酸菌を用い、ヒスタミン蓄積抑制効果を評価することで、発酵スターター候補株を選抜することにした。評価には、しょつつる製造環境を模した培地であるしょつつる含有培地を用い、ヒスタミン生成菌共存下で各菌株を培養した際の生育確認や pH 変化、ヒスタミン生成量の測定を行った。

尚、選抜に使用するしょつつる由来耐塩性乳酸菌 13 株 (5SA-3、5SA-19、5SA-20、5SA-21、5SA-22、5SA-23、5SA-24、5SA-31、5SA-32、5SB-4、5SB-5、5SB-6、5SB-11 ; 全て PCR により *Tetragenococcus muriaticus* と簡易同定) およびヒスタミン生成菌 (BF4 株、FS4 株) は国立研究開発法人水産研究・教育機構 水産技術研究所より供与していただいた。また、対照として、味噌由来の耐塩性乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* T30 株 (センター保有) や、ヒスタミン蓄積抑制能を持つことが分かっている *T. halophilus* 14-1 株 (水産技術研究所より供与) の評価も併せて実施した。結果を図 1 に示した。

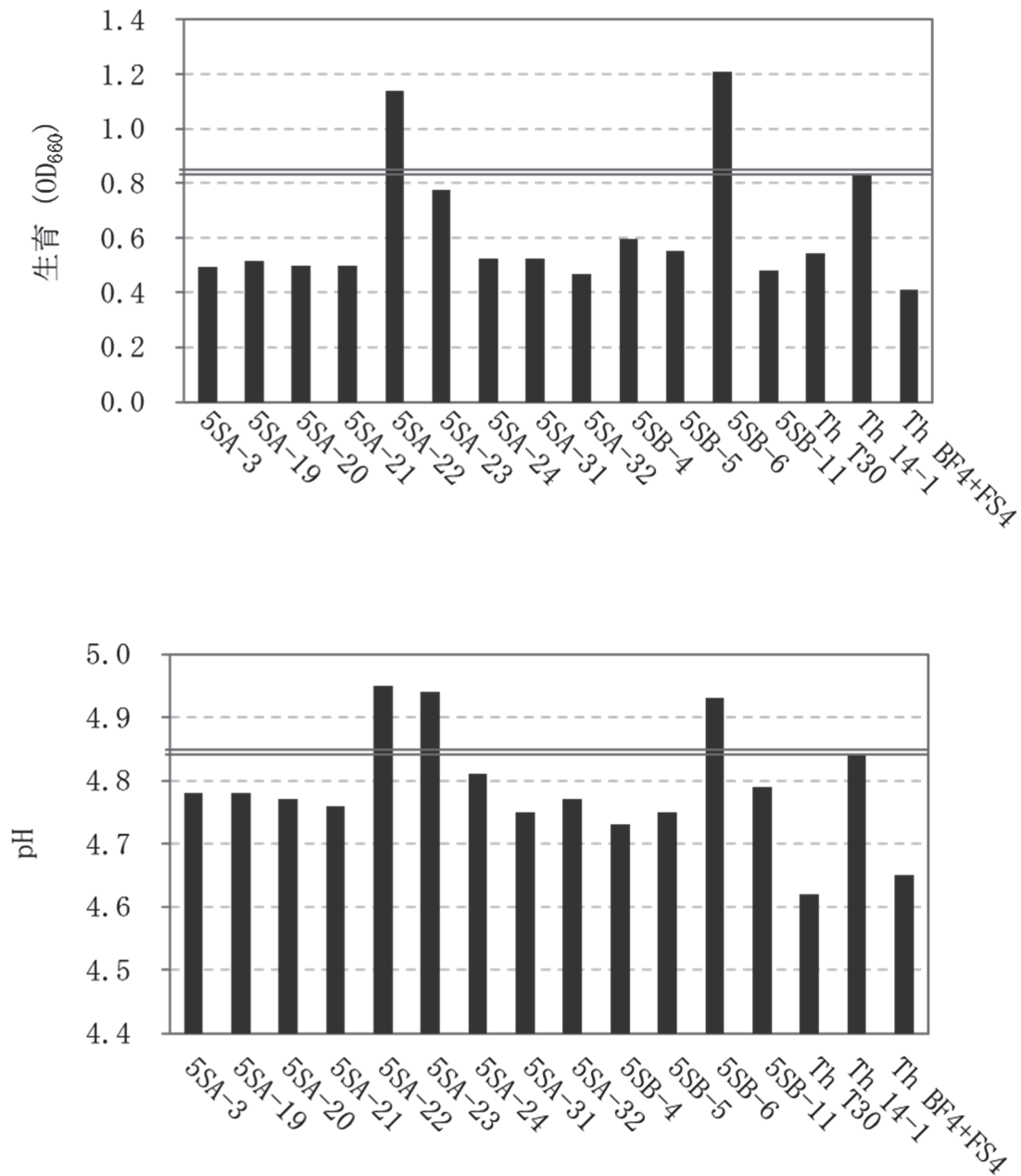


図1 しょつつる含有培地での生育（上）及び pH 変化（下）
 （図中の二重線：ヒスタミン蓄積抑制能を有する *T. halophilus* 14-1 株の結果）

しょつつる含有培地において、既にヒスタミン蓄積抑制効果が明らかとなっている乳酸菌発酵スターター *T. halophilus* 14-1 株と同程度もしくはそれ以上に生育する株が 3 株存在した（5SA-22、5SA-23、および 5SB-6）。これらしょつつる含有培地において生育が良好であった 3 株の pH はいずれも 4.9 以上と高く、pH が高くなる傾向は *T. halophilus* 14-1 株と同様であった。一方で、各培養液のヒスタミン生成量を確認したところ、ヒスタミン生成菌のみを添加した試験区（Th BF4+FS4）を含む全て

の試験区において生成が確認できなかった（データ未掲載）。基質であるヒスチジン添加量（0.1%添加）が不足していた可能性も考えられるが、原因は不明であった。したがって、しょつたる含有培地ではヒスタミン蓄積抑制能の評価はできなかったが、同培地で生育の良好な株が含まれていたことは、しょつたる製造環境下でも優占種となり得る菌株が含まれている可能性を示唆していた。

2. ヒスタミン生成条件下におけるヒスタミン蓄積抑制効果の検証

0.1%ヒスチジンを含むしょつたる含有培地ではヒスタミンが生成されず、ヒスタミン生成菌が確実にヒスタミン生成を行う条件下で試験を行う必要が生じた。予備試験の結果、1%ヒスチジンを含む乳酸菌用醤油培地を用いるとヒスタミン生成が起こることから、同培地で再度ヒスタミン蓄積抑制効果を確認した。結果を図 2 に示した。

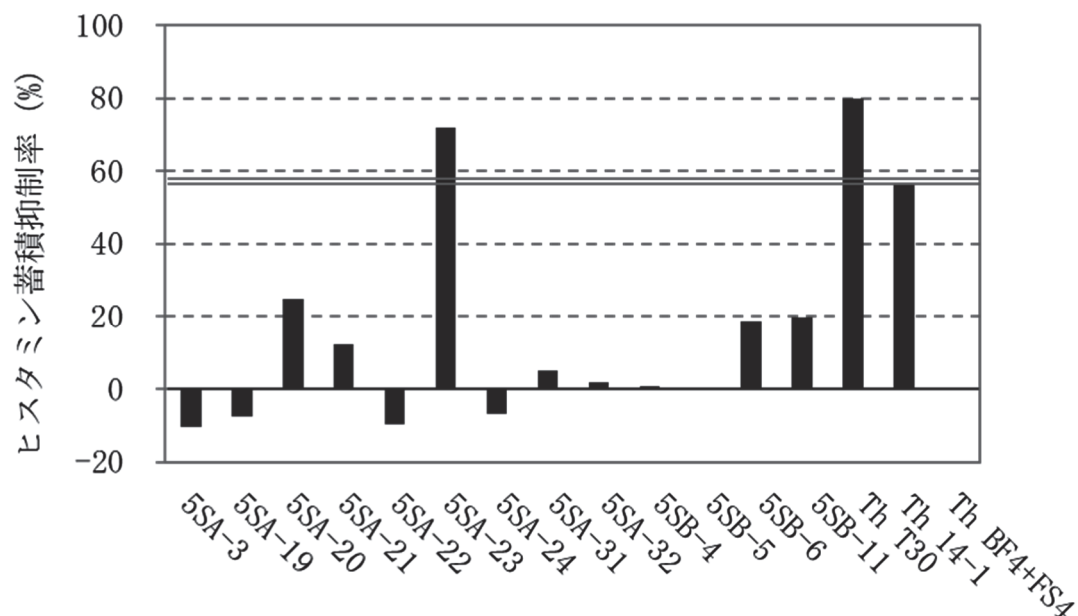


図 2 乳酸菌用醤油培地におけるヒスタミン蓄積抑制効果
(図中の二重線：ヒスタミン蓄積抑制能を有する *T. halophilus* 14-1 株の結果)

図 2 に示したとおり、既にヒスタミン抑制効果が明らかとなっている *T. halophilus* 14-1 株では約 60%のヒスタミン蓄積抑制率を示したが、しょつたる由来耐塩性乳酸菌 5SA-23 株では約 70%、味噌由来耐塩性乳酸菌 *T. halophilus* T30 株では約 80%と、14-1 株以上に高い抑制率を示す菌株も存在した。さらに、1%ヒスチジンを含む乳酸菌用醤油培地での生育および pH 変化を確認した。結果を図 3 に示した。

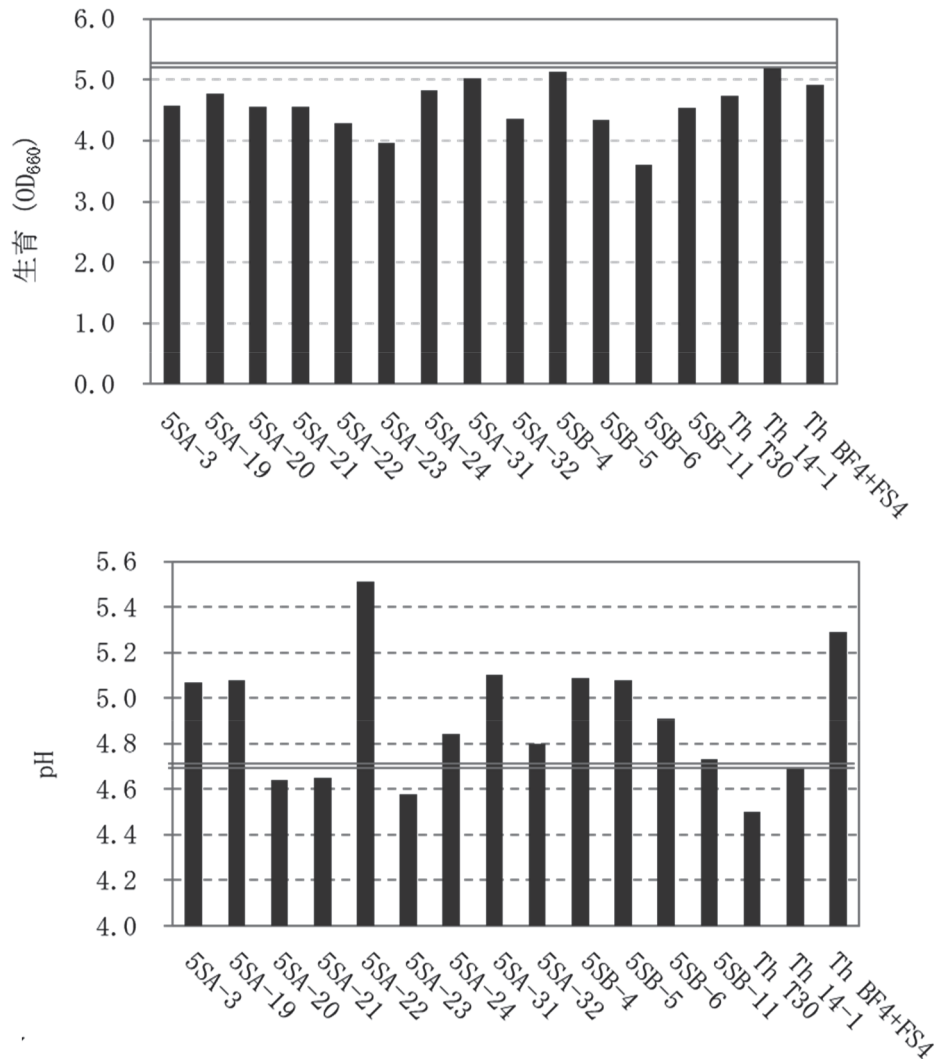


図3 乳酸菌用醤油培地での生育（上）および pH 変化（下）
 （図中の二重線：ヒスタミン蓄積抑制能を有する *T. halophilus* 14-1 株の結果）

図3に示したとおり、培地中での生育に大きな違いは見られなかったことから、生育の良さがヒスタミン蓄積抑制に影響している可能性は低いと考えられた。pH 変化に関しては、ヒスタミン蓄積抑制率の高い5SA-23株、*T. halophilus* T30株、14-1株などでは低く、逆に抑制率が低い株では高い傾向を示した（抑制率20%未満の計11株の平均pH=5.0、抑制率20%以上の計5株の平均pH=4.6）。乳酸菌によるヒスタミン生成は低pHへのストレス応答であることが報告されている¹⁾。ヒスタミン蓄積抑制能が低い菌株共存下ではヒスタミン生成菌によるヒスタミン生成が起きてしまい、その結果、pHが上昇したものと推定される。

さらに、ヒスタミン蓄積抑制率の高い5SA-23株に関しては、16S rDNA シーケンス解析により菌種の推定を行った。5SA-23株はPCRにより *T. muriaticus* と簡易同定された株ではあるが、16S rDNA シーケンス解析からも *T. muriaticus* であることが推定され、5SA-23株は *T. muriaticus* である可能性が高まった。

以上の結果を総合すると、しょつつる含有培地での生育も良好で、且つ乳酸菌用醤油培地を用いたヒスタミン蓄積抑制評価でも高い抑制率を示したしょつつる由来耐塩性乳酸菌 5SA-23 株 (*T. muriaticus* であると推定) が、しょつつる製造における有用な乳酸菌スターターとして利用できる可能性が示された。

【謝辞】

本研究はイノベーション強化推進事業 (28026C 日本産水産発酵食品の製造に特化したヒスタミン蓄積抑制乳酸菌スターターの開発) で実施した。また、しょつつる由来耐塩性乳酸菌 13 株 (5SA-3、5SA-19、5SA-20、5SA-21、5SA-22、5SA-23、5SA-24、5SA-31、5SA-32、5SB-4、5SB-5、5SB-6、および 5SB-11)、*T. halophilus* 14-1 株、およびヒスタミン生成菌 (BF4 株、FS4 株) は国立研究開発法人水産研究・教育機構 水産技術研究所より恵与された。

【引用文献】

- 1) 里見正隆 (2012) 魚醤油のヒスタミン蓄積機構と除去法について 日本醸造協会誌, 107(11), 842-852 (2012).
Doi: 10.6013/jbrewsojapan.107.842
- 2) 木村メイコ、舊谷亜由美、福井洋平、柴田由起、根井大介、矢野豊、里見正隆 (2015) 魚醤油発酵時のヒスタミン蓄積に関わる原因菌の同定および乳酸菌発酵スターター接種によるヒスタミン蓄積抑制効果について 日本水産学会誌, 81(1), 97-106.
Doi: 10.2331/suisan.81.97
- 3) 高橋徹、佐々木康子、上原健二、須藤あさみ、渡辺隆幸、塚本研一、里見正隆 (2019) 発酵スターターの添加がしょつつるの品質に与える影響 水産物の利用に関する共同研究, 59, 12-15. (第 66 回 日本海水産物利用担当者会議)
- 4) 高橋徹、佐々木康子、上原健二、須藤あさみ、渡辺隆幸、塚本研一、里見正隆 (2020) 発酵スターターの添加がしょつつるの品質に与える影響 (第 2 報) 水産物の利用に関する共同研究, 60, 5-7. (第 67 回 日本海水産物利用担当者会議)

上槽方法の違いが清酒の溶存酸素濃度と酒質に与える影響について

渡邊誠衛、黒崎文華、佐々木大地^{*}、佐渡高智^{*}

(秋田県総合食品研究センター、^{*}秋田清酒株式会社)

Seiei WATANABE, Fumika KUROSAKI, Daichi SASAKI, and Takanori SADO

【要約】

我々は、清酒の上槽方法と溶存酸素量と熟成後の酒質との関係を検討している。本報では、現場における上槽方法の違いにより、清酒の溶存酸素や香気成分の量が異なることが明らかになり、それらの清酒の熟成加速試験を行った結果、溶存酸素量と熟成によるオフフレーバーの発生には関連性があることが分かった。

【諸言】

清酒は濾す(こす)工程が必須であり、大きく分類すると自動圧搾機、槽搾り(ふねしぼり)、袋吊り(ふくろつり)、遠心分離の4種類の上槽方法がある。酒蔵では、それらの上槽方法を、設備や仕込みの内容や商品設計により使い分けている。

例えば、自動圧搾機や槽搾りの方法では、流れ出てくる清酒の順番によって“荒走り(あらばしり)”、“中垂れ(なかだれ)”、“責め(せめ)”と呼び、濁りの度合いも含め、それぞれの香りと味の違う商品の特徴を消費者に提供している。また、袋吊りは、圧力をかけずに吊るした酒袋から清酒が滴り落ちる方法で、多くは斗瓶で受け、雑味の少ない出品酒などに用いることが多い。さらに、最新の上槽方法の遠心分離搾りは、密閉で遠心分離する方法で、香気の飛散防止や袋クセの防止、自動運転等の特徴を持つ。一方、清酒は、時間の経過と共に温度、酸素、光などの要因により香味が変化することが知られており、多くの研究が報告されている。^{1)~6)}

本報では、酒蔵において様々な上槽方法によって搾られた清酒について、一般成分や香気成分の違いと、上槽方法の違いによる溶存酸素量と熟成後の酒質への影響について知見を得たので報告する。

【実験方法】

1. 醪と上槽方法

秋田清酒株式会社系列の出羽鶴酒造株式会社の協力のもと、酒蔵で仕込んだ2種類の醪を使用した。

A：秋田酒こまち、精米歩合45%、M310酵母、醪日数35日、純米大吟醸酒

B：秋田酒こまち、精米歩合55%、秋田酵母No.12、醪日数31日、純米吟醸酒

A仕込みはM310酵母を使用した高カプロン酸エチルの清酒に対して、B仕込みは秋田酵母No.12を使用した高酢酸イソアミルの清酒のタイプを試料とした。

上槽の方法を図1に示した。Aの醪は、袋吊り法と槽搾り法、Bの醪は、自動圧

搾法と遠心分離法で、いずれも出羽鶴酒造株式会社で上槽した。

袋吊り法は、吊り下げた袋からの垂れの順番に“斗ビン1本目”、“斗ビン2本目”、“斗ビン3本目”を試料とした。槽搾り法は、製成酒を集めたタンク（上げ桶）の清酒を試料とした。

Bの醪の自動圧搾機は、藪田産業株式会社製を用いて“荒走り”、“中垂れ”、“責め”の3区分を試料とし、遠心分離法は、株式会社コクサン製の“吟醸もろみ上槽システム”を用いた。

いずれの方法でも、香气成分の飛散や酸化を防ぐ目的で、上槽は、低温で速やかに行い、上槽後直ちに約250mlを取り、密栓し以後の試験に供した。



図1 さまざまな上槽方法

2. 製成酒の成分分析と酸素濃度測定

一般成分は、国税庁所定分析法注解⁷⁾、香气成分はガスクロマトグラフィーを用いたヘッドスペース法⁸⁾、溶存酸素濃度は、開栓直後にメトラー・トレド社製のSeven2Go™を用いて測定した。

3. 熟成加速試験

上槽後の各清酒180mlを密栓して、生酒と65℃達温の火入れ酒の2種類を、熟成スピードを早めるため、遮光環境下で45℃、50日間の熟成加速試験を行った。

熟成酒について、熟成の指標である、着色度⁷⁾、3-デオキシグルコソン(3-DG)⁹⁾、遊離脂肪酸¹⁰⁾を測定した。官能試験は、当センターのパネラー5名で、特に熟度について5点法(1:若~5:熟)で評価した。

【結果と考察】

1. 袋吊り法と槽搾り法による清酒の成分変化

Aの醪を袋吊り法と槽搾り法の2通りで上槽し、一般成分と香气成分を表1と図2に示した。袋吊り法と槽搾り法を比較すると、一般成分は違いはなかったが、吟醸香の主成分である酢酸イソアミルとカプロン酸エチルは、槽搾り法に比べ袋吊り法のほうがやや多く、槽搾り法の上げ桶でも減少していた。斗ビンの中でも斗ビン1本目より斗ビン2本目と3本目の香气成分が高い結果となった。袋吊り後の斗ビンに比べ、槽搾り法の上槽後の清酒の移動時の香气成分の飛散が原因と推察された。

表1 袋吊り法と槽搾り法による清酒の成分

上槽方法	区分	一般成分				香气成分 (ppm)					
		エタノール(%)	日本酒度	酸度	アミノ酸度	EtOAc	n-PrOH	i-BuOH	i-AmOAc	i-AmOH	EtOCap
袋吊り	斗ビン1	16.4	2.5	1.5	1.0	41.4	98.7	24.3	1.8	112.8	7.8
	斗ビン2	16.4	2.5	1.5	1.1	45.4	98.7	24.3	2.1	113.2	8.4
	斗ビン3	16.4	2.5	1.5	1.1	44.4	98.7	24.5	2.0	113.7	8.3
槽搾り	槽上げ桶	16.4	2.3	1.5	1.1	40.5	98.4	24.2	1.8	111.8	6.8

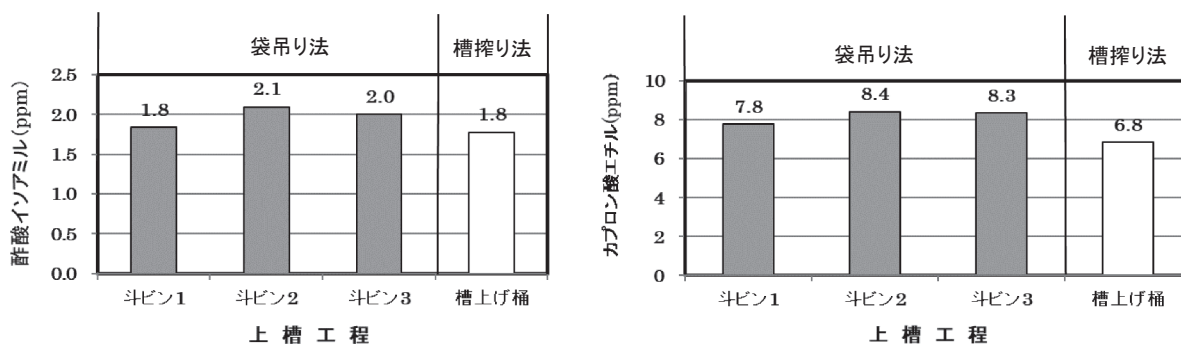


図2 袋吊り法と槽搾り法による清酒の香气成分

溶存酸素量を図3に示した。袋吊り法と槽搾り法の溶存酸素量を比べると、大きな違いはなかったが、袋吊り法で、斗ビン1本目、2本目、3本目の垂れの順番に溶存酸素量は少なくなった。袋に醪を入れて、初めに勢いよく清酒が流れ、空気と触れることで溶存酸素が高くなり、その後、徐々に流れが弱くなることで溶存酸素が低くなったと推察された。

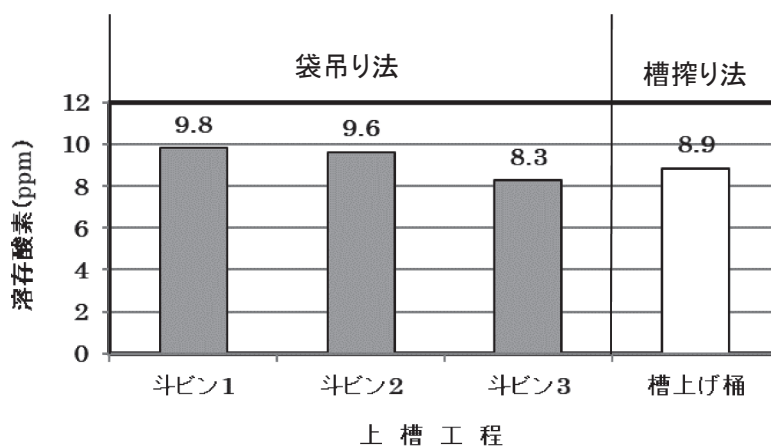


図3 袋吊り法と槽搾り法による溶存酸素量

2. 自動圧搾法と遠心分離法による清酒の成分変化

Bの醪を自動圧搾法と遠心分離法の2通りで上槽し、垂れた順番の清酒の一般成分と香气成分を表2に示した。一般成分はほぼ同じだったが、吟醸香の主成分である酢酸イソアミルとカプロン酸エチルは、いずれも上槽直後はほぼ同じだったが、いずれも上げ桶では減少していた。上槽後の清酒の移動時の香气成分の飛散と推察された。

表2 自動圧搾法と遠心分離法による清酒の成分

上槽方法	区分	一般成分				香気成分(ppm)					
		エタノール(%)	日本酒度	酸度	アミノ酸度	EtOAc	n-PrOH	i-BuOH	i-AmOAc	i-AmOH	EtOCap
自動圧搾	荒走り	16.9	4.2	1.6	1.0	85.0	79.3	51.3	4.6	150.9	2.9
	中垂れ	16.9	4.2	1.6	1.0	86.6	81.6	52.3	4.8	153.2	2.8
	責め	16.9	4.2	1.6	1.0	86.9	82.0	52.5	4.6	153.8	2.9
	上げ桶	16.9	4.2	1.6	1.0	84.9	77.6	50.7	4.2	148.7	2.6
遠心分離	上槽直後	16.9	4.2	1.6	1.1	89.4	82.4	53.3	5.1	155.5	2.9
	上げ桶	16.8	4.2	1.7	1.0	90.7	77.6	53.3	4.4	155.0	2.3

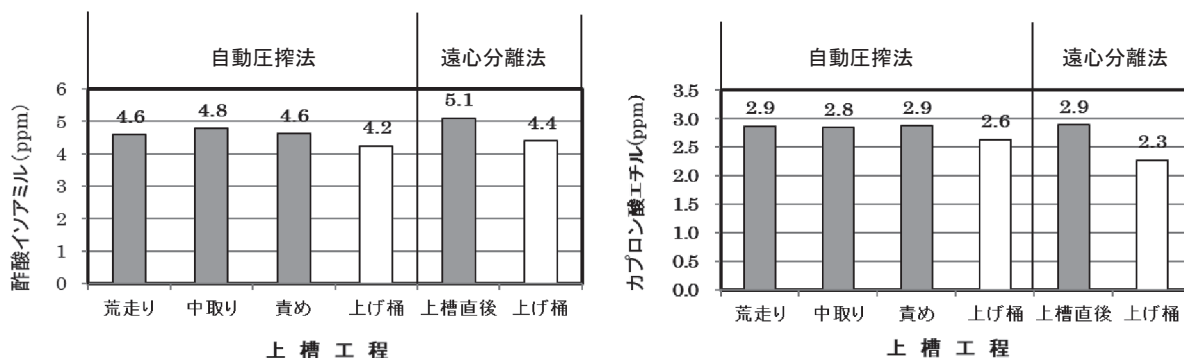


図4 自動圧搾法と遠心分離法による香気成分

溶存酸素量を図5に示した。自動圧搾法では、荒走り、中垂れ、責めの順番に溶存酸素量は少なくなった。自動圧搾法では、醪を直接圧搾機に入れるため、空気に触れる機会が少なく、その結果溶存酸素量が少くなると推察された。遠心分離法では、分離中は密閉で空気に触れることはないが、上槽時の空気の巻き込みやその後の清酒の移動により溶存酸素量が高くなったと推察される。両上槽方法を比べると、遠心分離法に比べて自動圧搾法の方が溶存酸素量が少なく、いずれの方法でも清酒の移動が原因で、上げ桶で高くなるのが分かった。

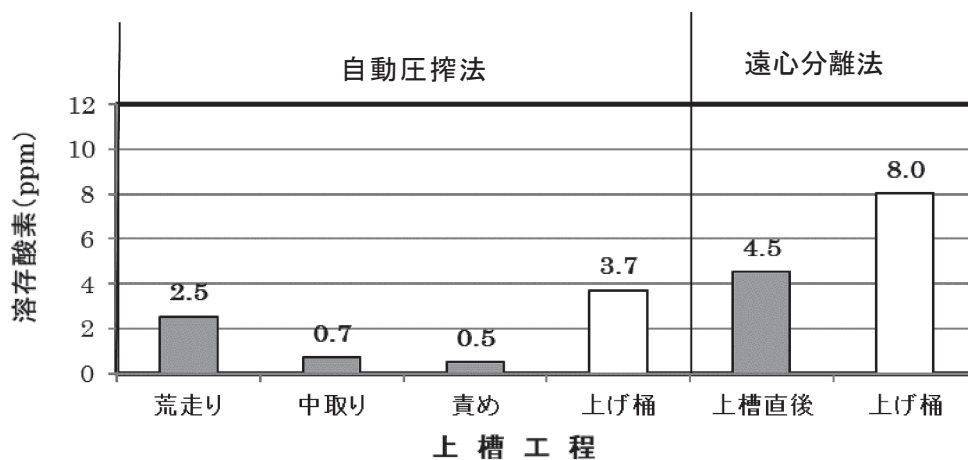


図5 自動圧搾法と遠心分離法による溶存酸素量

上槽方法の違い、つまり袋吊り法と槽搾り法、自動圧搾法と遠心分離法の溶存酸素量を比較すると、袋吊り法と槽搾り法は同じ程度で、遠心分離法より自動圧搾法が少ない結果となった。A醪とB醪の違いはあるものの、図3と図5を比較すると、溶存酸素量は自動圧搾法 < 遠心分離法 << 槽搾り法 ≤ 袋吊り法の順に高くなることが確認された。

2. 熟成後の成分と官能結果

1) 袋吊り法と槽搾り法の比較

A仕込み（秋田酒こまち、精米歩合 45%、M310 酵母、純米大吟醸酒）を袋吊り法と槽搾り法の2通りで上槽した生酒と火入酒を、45℃で50日間熟成させた熟成酒の成分と官能試験の結果を図6に示した。

袋吊り法と槽搾り法の上槽方法の違いによる、着色度、3-DG、遊離脂肪酸には大きな違いはなかった。生酒と火入酒を比較すると、着色度は、火入れ時の加熱の影響のせい、火入酒がわずかに高い傾向があった。遊離脂肪酸は、M310酵母の生成する高カプロン酸エチルの由来のカプロン酸の影響で、全体的に高い値となり、生酒のほうがわずかに高い傾向があるが、大きな差はなかった。

熟度を中心とした官能試験では、生酒は“生老香（なまひねか）”が強く、火入酒は“老香（ひねか）”が強く、かなり熟度が進んでいて、生酒と火入れ酒を比較した場合、熟度には大きな差はなかった。しかし、生酒と火入れ酒のいずれも、斗ビン1本目 < 斗ビン2本目 < 斗ビン3本目 < 槽搾り法 の順に熟成が進む傾向が確認されたが、図3の上槽直後の溶存酸素量との明らかな関連は確認されなかった。

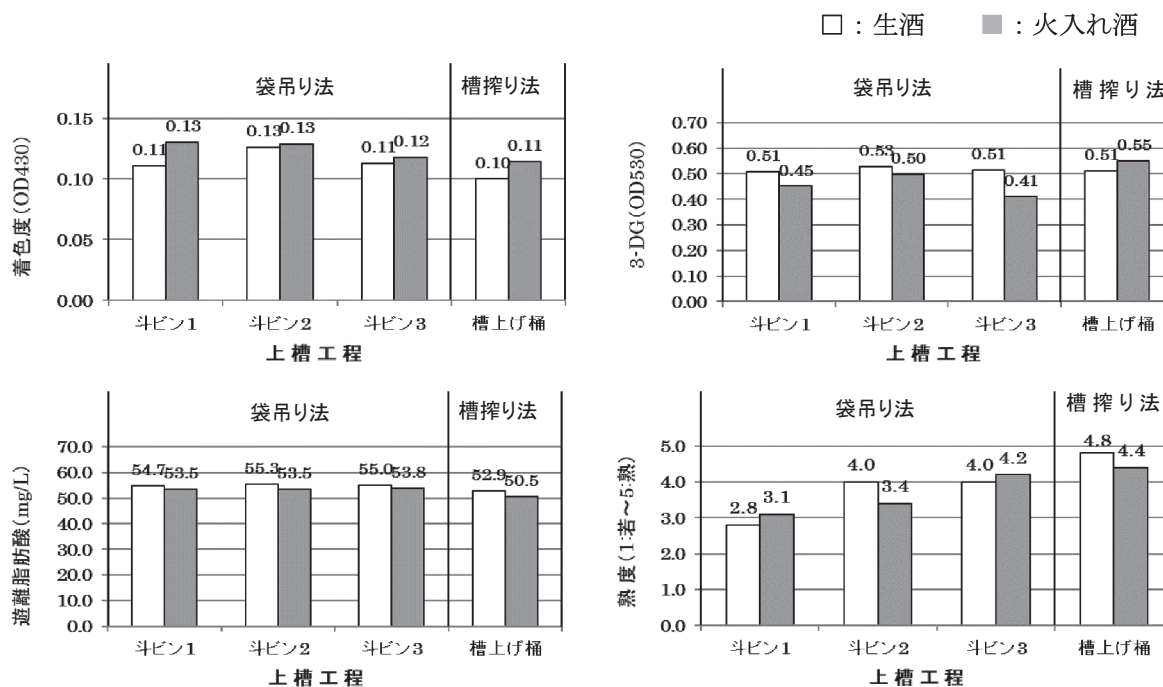


図6 袋吊り法と槽搾り法の熟成酒の成分と官能結果

2) 自動圧搾法と遠心分離法の比較

B仕込み（秋田酒こまち、精米歩合 55%、秋田酵母No.12、純米吟醸酒）を自動圧搾法と遠心分離法の 2 通りで上槽した生酒と火入酒を、45℃で 50 日間熟成させた熟成酒の成分と官能試験結果を図 7 に示した。

自動圧搾法と遠心分離法の上槽方法の違いによる、着色度、3-DG、遊離脂肪酸には大きな違いはなかった。生酒と火入酒を比較すると、着色度と 3-DG は、火入れ時の加熱の影響のせい、火入酒がわずかに高い傾向があった。遊離脂肪酸は、上槽方法の違いと火入れの有無による差はなかったが、仕込みの種類は違うが A仕込み（図 6）と比較すると酢酸イソアミル系の秋田酵母No.12 により、全体的に低い値となった。

熟度を中心とした官能試験では、生酒は“生老香（なまひねか）”、火入酒は“老香（ひねか）”が強く、かなり熟度は進んでいた。自動圧搾法と遠心分離法を比較すると、大きな差はなかったが、自動圧搾の製成の順番の 荒走り < 中垂れ < 責め の順に熟度が進んでいた。自動圧搾法と遠心分離法のいずれの清酒も上槽後の上げ桶で熟度が進んでいた。

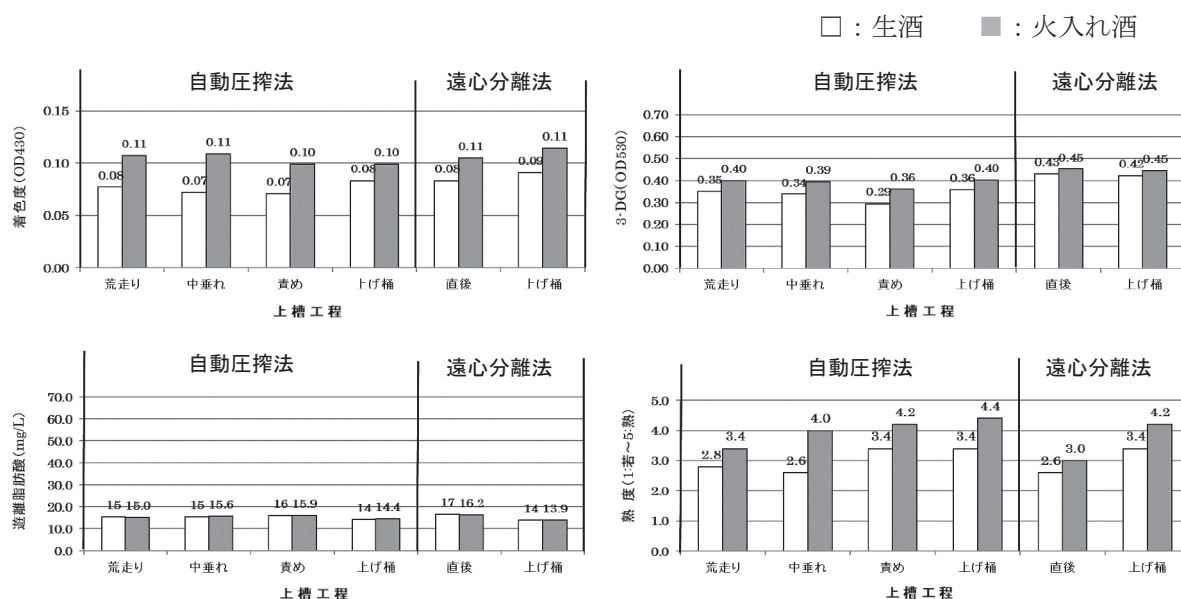


図 7 自動圧搾法と遠心分離法の熟成後の成分と官能結果

酒蔵の現場において、2 種類の醪を袋吊り法と槽搾り法、自動圧搾法と遠心分離法で製成された清酒の溶存酸素量と成分や官能試験との関連を検討した結果、新たな知見が確認されたが、溶存酸素量のみからの明らかな有意性は確認されなかった。現場のさまざまな上槽方法は、上槽の圧力や上槽時間の影響などが異なり、その結果、溶存酸素量を含め、酵母の死滅などによる複雑な成分が清酒の熟成に関与していると考えられる。

【 引用文献 】

- 1) 永井英雄 (2003) 清酒醸造における溶存酸素の影響 清酒酵母の研究 90 年代の研究 p138-143, 清酒酵母・麴研究会.
- 2) 岡本匡史、山内徹、矢野駿太郎、黒瀬直孝、川北貞夫、高橋康次郎、中村輝也 (1999) 溶存酸素低減による清酒の品質保持(第 1 報) 日本醸造協会誌 94(10), 827-832. Doi: 10.6013/jbrewsocjapan1988.94.827
- 3) 岡本匡史、山内徹、川北貞夫 (2002) 溶存酸素低減による清酒の品質保持 日本醸造協会誌 97(3), 172-177. Doi: 10.6013/jbrewsocjapan1988.97.172
- 4) 小川慶治、山中寿城、岡本匡史、黒瀬直孝、川北貞夫、高橋康次郎、中村輝也 (2001) 溶存酸素低減による清酒の品質保持(第 2 報) 日本醸造協会誌 96(10), 719-725. Doi: 10.6013/jbrewsocjapan1988.96.719
- 5) 小泉亜希子、山中寿城、岡本匡史、平井信行、黒瀬直孝、小川慶治、川北貞夫、垂水彰二、高橋康次郎 (2003) 溶存酸素低減による清酒の品質保持(第 3 報) 日本醸造協会誌 98(2), 125-131. Doi: 10.6013/jbrewsocjapan1988.98.125
- 6) 渡邊誠衛、大野剛、小林忠彦、佐渡高智 (2016) 清酒のビン内気相とビンの色が熟成に与える影響について 秋田県総合食品研究センター報告 18, 9-16.
- 7) 注解編集委員会編 (1993) 第四回改定国税庁所定分析法注解 日本醸造協会 p7 - 33.
- 8) 吉沢淑 (1973) Head space 法による清酒香気成分の迅速定量法 日本醸造協会誌 68(1), 59-61.
- 9) 岩野君夫、衣山陽三、中村伝市、大町得蔵、河地元彦 (1970) 清酒の出荷管理に関する研究(第 2 報) 清酒中の 3-D-G 含量と官能熟度との相関について 日本醸造協会誌 65(1), 63-65.
- 10) 栗林喬、金桶光起、渡邊健一 (2012) 酵素法による清酒の遊離脂肪酸の定量 -カプロン酸エチル濃度の簡易推定法への利用- 日本醸造協会誌 107(9), 624-631. Doi: 10.6013/jbrewsocjapan1988.107.624

2. 原著論文（研究ノート）

- 1) キクイモの遊離アミノ酸 - 特にアルギニンについて - 23
○戸松誠
- 2) いぶりがっこの製造方法に関する研究
- 漬床への食酢の使用と天然色素の安定性の検討 - 27
○佐々木康子、上原健二、渡辺隆幸
- 3) 秋田県内の味噌蔵・醤油蔵から分離した住みつき酵母の
多麴味噌への活用 31
○渡辺隆幸、上原健二、中村勇之介、佐々木康子
- 4) 窒素添加が清酒の酒質に与える影響について 36
○渡邊誠衛、黒崎文華、大友理宣*、佐藤治* (*秋田銘醸株式会社)

キクイモの遊離アミノ酸

－ 特にアルギニンについて －

戸松 誠

(秋田県総合食品研究センター 食品加工研究所)

Makoto TOMATSU

【緒言】

キク科のキクイモ (*Helianthus tuberosus*) 塊茎にはデンプンがほとんど存在せず、代わりにフルクトース重合体であるイヌリンが多く含まれている。著者はこれまで秋田県産キクイモの熱水抽出液中にはフラクトオリゴ糖を主成分とする鎖長の短いフルクトース含有糖質 (重合度: 3~5) が多量に含まれていること等を明らかにしてきた^{1,2)}。本報では、キクイモ生鮮品およびいくつかの加工品について遊離アミノ酸の測定を行い、生鮮品のサイズ・形状等の違い、および加工品の加工法による含量の差異について検討した。

【実験方法】

1) 試料・試薬

キクイモ生鮮試料は表1に、加工品試料は表2に示した。液体試料を除き、水分はハロゲン水分計 (OHAUS、MB35) で115°C、Autoモードで測定し、乾燥物重量を求めた。キクイモ生鮮試料は厚さ約5 mmにスライスして凍結乾燥 (東京理化器械、FDU-1110) 後、粉碎 (岩谷産業、ミルサー300DG) し、暗所でデシケーター中に保存した。凍結乾燥粉碎物についても水分測定し、乾燥物重量を求めた。アミノ酸は全自動高速アミノ酸分析機 (日本電子、JLC-500/V) で測定した。

2) 試料抽出液の調製

各凍結乾燥粉碎物に10 mg/mLになるよう85°Cの熱水を加え、85°Cで1時間加熱抽出した。放冷後、10,000 rpmで5 min遠心分離した上清を0.04 N塩酸で希釈後、0.45 µmフィルターで濾過し、抽出液とした。なお、熱水の代わりに1%スルホサリチル酸で抽出、除タンパク質の処理をしたもののアミノ酸組成とほぼ同じ結果であった (データ非表示)。

【結果と考察】

生鮮品の凍結乾燥 (Freeze Dry: FD) 物100 gあたりの遊離アミノ酸量を図1に示した。生産地あるいは生産者が異なると遊離アミノ酸総量に3倍以上の差があった一方、いずれの試料もアルギニン (Arg) が最も多く、次いでグルタミン (Gln)、アスパラギン (Asn)、アスパラギン酸 (Asp) の順に多かった。加工品でも調味液漬け (試料2-7) を除き、同様にアルギニンが最も多く含まれていた (図2)。加工法別に比べると、焙煎 (試料2-5) では遊離アミノ酸はほぼ含まれていないことがわかった。また、同様の加工法、例えば茶・パウダー (試料2-4、2-6、2-8、2-9) で、加工者が異なると2倍以上の差があることが

表1 キクイモ生鮮品試料のリスト

No.	販売者所在地(産地)	備考	入手年月
1-1	秋田県 鹿角市(同)	洗浄済み、長型	2018.11
1-2	〃	〃、丸型	〃
1-3	〃	〃、大型	〃
1-4	〃	〃、小型	〃
1-5	〃	軽く洗浄	2020.01
1-6	〃	微酸性電解水洗浄	〃
1-7	〃	1-6の除皮した実	〃
1-8	〃	1-6の皮	〃
1-9	秋田県 北秋田市(同)	土付き、白系統	2018.11
1-10	〃	土付き、紅系統	〃
1-11	秋田県 三種町(同)	砂地土壌、水はけ良	2018.11
1-12	〃	〃、水はけ不良	〃
1-13	秋田県 横手市(同)	洗浄あり、サイズ大	2018.11
1-14	〃	〃、サイズ小	〃
1-15	〃	洗浄なし	〃
1-16	〃		2020.01

表2 キクイモ加工品試料のリスト

No.	販売者所在地(産地)	形態(名称表記)	備考	入手年月
2-1	秋田県 鹿角市(同)	チップス		2020.01
2-2	〃	ペースト		〃
2-3	秋田県 北秋田市(同)	チップス(紅系統)		2019.12
2-4	〃	茶(粉末、紅系統)		〃
2-5	秋田県 三種町(同)	粗粉碎、焙煎		2019.12
2-6	〃	パウダー		〃
2-7	〃	しょうゆ漬け		〃
2-8	秋田県 横手市(同)	パウダー(2018加工)		2020.01
2-9	〃	パウダー(2019加工)		〃
2-10	〃	茶:ティーバッグ、焙煎	熱湯抽出 ^{*1)}	〃
2-11	〃	〃、焙煎	冷水抽出 ^{*2)}	〃

*1):熱湯抽出:tea bag1包(3g)を熱湯500mLに5分浸漬後、bagを取出し、放冷した

*2):冷水抽出:tea bag1包(3g)を冷水500mLに一晩浸漬後、bagを取出した

わかった。ティーバッグ入りの茶を抽出する際、熱湯(試料2-10)と冷水(試料2-11)を比較した結果でほとんど差がなく、この場合もアルギニンが最も多く含まれていた(図3)。

アルギニンはもともと塩基性の高いアミノ酸で、生体内では尿素回路の中間体として生合成されるが、速やかに分解されるため、特に必要量を合成できない子どもでは必須アミノ酸になっており、代謝産物である一酸化窒素(NO)を介して、成長ホルモンの分泌促進、免疫機能の向上、脂肪代謝の促進など、生体内で種々の機能に関与している³⁾。これまで報告されている食品の遊離アミノ酸含量をまとめたデータベース⁴⁾によると、乾物100gあたりの遊離アルギニンを最も多く含むものはニンニク(Kashu Bansei,

Aomori Field Crops) の 3.3 g であるが、それを超える約 3.6 g を含有している試料 (1-6) があることが示された。これまで、キクイモはイヌリンやフラクトオリゴ糖などの糖について注目されてきたが、今後は、遊離アミノ酸、特にアルギニンに注目した利用法の開発も望まれる。

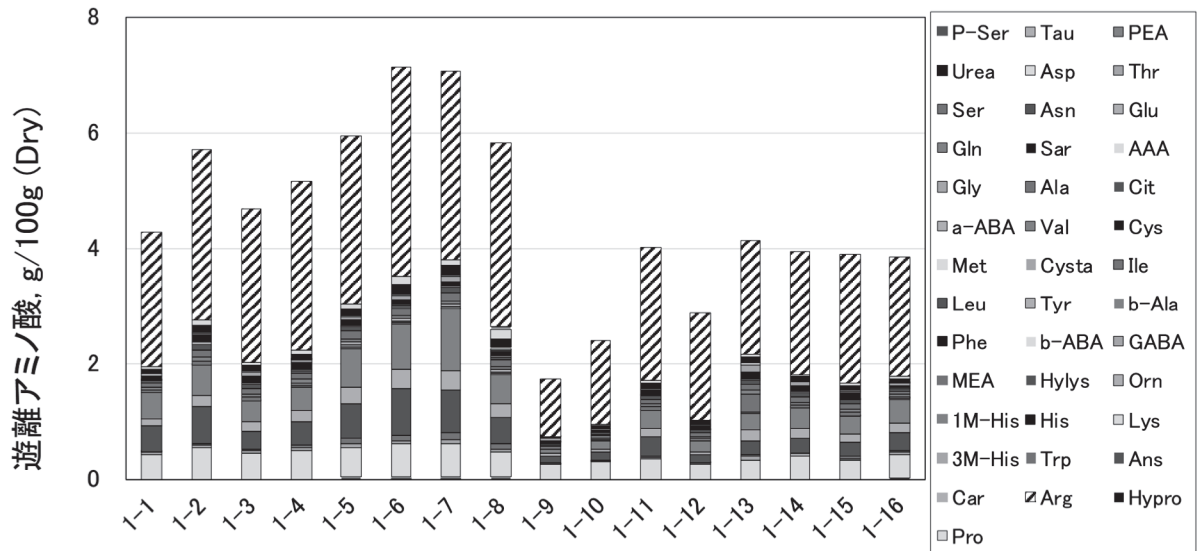


図1 産地別キクイモ生鮮品のFD重量あたりの遊離アミノ酸

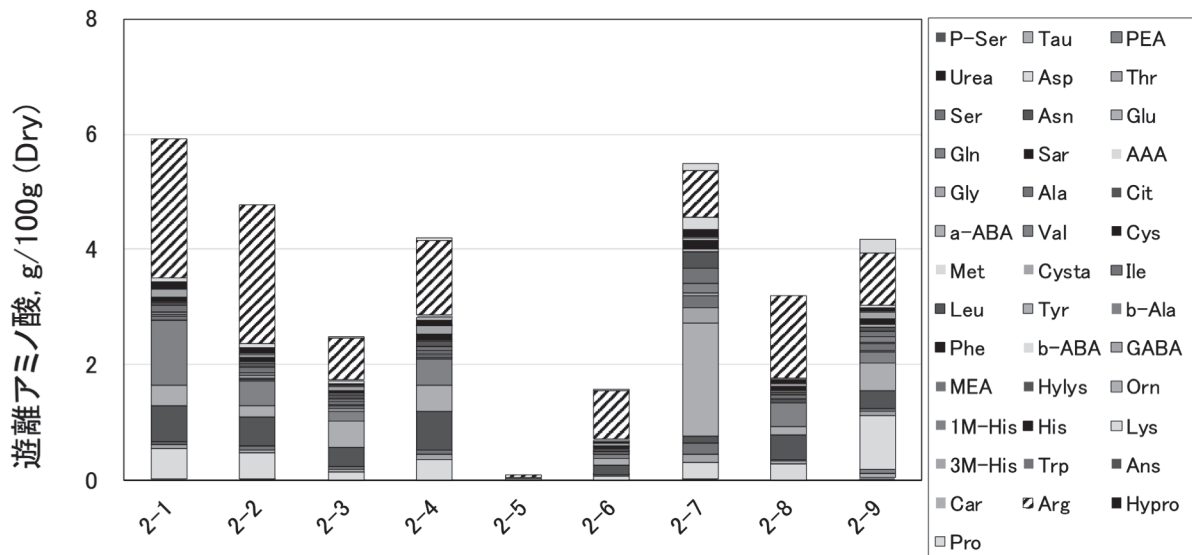


図2 キクイモ加工品中のFD重量あたりの遊離アミノ酸

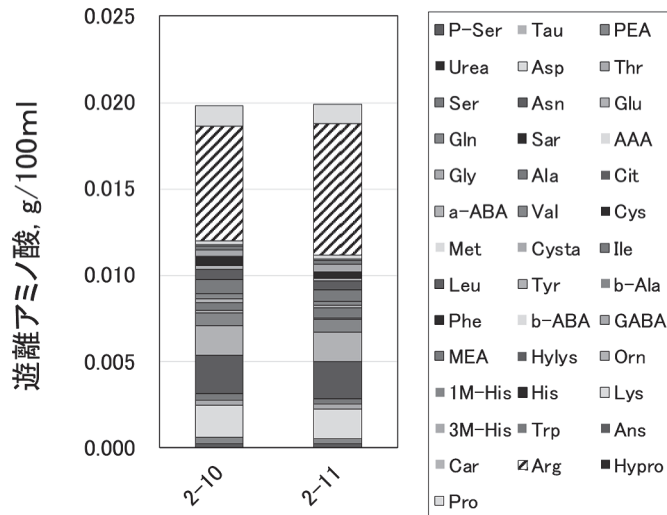


図3 キクイモ茶中の遊離アミノ酸

【謝辞】

本研究は、あきた菊芋プロジェクト（オフィス NORIMAKI、株式会社栄物産、食 Navi ステーション、畠山農園、株式会社村木組しらかば農園）の協力をいただいで実施したものであり、同プロジェクト会員諸氏に感謝いたします。また、討議・助言をいただいた当センター主任研究員 松井ふゆみ博士、及びアミノ酸分析を協力いただいた須藤あさみ氏に感謝いたします。

【引用文献】

- 1) 戸松誠（2016）キクイモ熱水抽出液のフルクトース含有糖質 秋田県総合食品研究センター報告 **18**, 17-20.
- 2) 戸松誠（2020）キクイモのイヌリン糖鎖重合度組成比と遊離糖 秋田県総合食品研究センター報告 **22**, 1-20.
- 3) 国立健康・栄養研究所、「健康食品」の素材情報データベース：アルギニン（2020-06-04 更新）<https://hfnet.nibiohn.go.jp/contents/detail601.html>（参照 2021-8-17）
- 4) 社団法人日本栄養・食糧学会、食品の遊離アミノ酸含量表（2013-1-18 更新）https://www.jsnfs.or.jp/database/database_aminoacid.html（参照 2021-9-24）

いぶりがっこの製造方法に関する研究

—漬床への食酢の使用と天然色素の安定性の検討—

佐々木康子、上原健二、渡辺隆幸

(秋田県総合食品研究センター)

Koko SASAKI, Kenji UEHARA, and Takayuki WATANABE

【緒言】

いぶりがっこ製造における品質管理を目的として、食酢による菌の抑制効果および色素の安定性について検討した。現在、いぶりがっこ製品の原料ダイコンとして数品種のダイコンが使用されていることから、本漬時の漬床への食酢添加による一般生菌の抑制効果および官能評価に与える影響について、ダイコン品種毎に試験を行った。また、市販のいぶりがっこの中には天然色素が使用されているものがあるが、製造業者から、天然色素は色が不安定で品質が安定しないという相談があったことから、各種天然色素の安定性に対する温度と光の影響について検討した。

【実験方法】

(1) 食酢濃度を変えた漬込試験

ダイコン品種毎に漬床の食酢濃度を変えた漬込試験を行い、各漬込区分における漬け上がり後の一般生菌数を検査した。まず、収穫した3品種のダイコン（秋農試39号、秋試交10号、香漬の助）を通常の方法で3日間燻し、2ヶ月間本漬を行った。本漬の漬床の配合は、米糠4%、砂糖12%、食酢0~5%（0%、1%、2%、3%、4%、5%）で行った。菌検査は、ペトリフィルム（スリーエム社製；一般生菌数測定用培地）を用いて行った。また、各試験区について官能検査を実施した。官能検査は、5点法（1：非常に良い、2：良い、3：普通、4：悪い、5：非常に悪い）により行った。

(2) 天然色素の退色試験

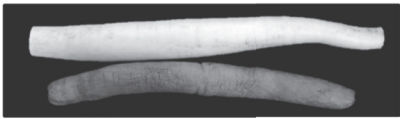
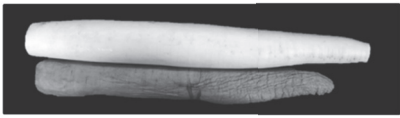
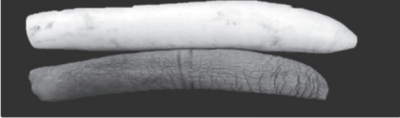
黄色系の食品添加物の天然色素5種類：ウコン；フィンガーイエロー（ヤエガキ醗酵技研）、クチナシ色素；KCイエロー KL-10A（神戸化成）、クチナシ色素；AY（タイショーテクノス）、ベニバナ色素；TSイエロー（タイショーテクノス）、ベニコウジ色素；TSイエローM（タイショーテクノス）を用いて、0.2%水溶液をそれぞれ調製し、低温加熱処理（80℃、30分間）、オートクレーブ処理（121℃、15分間）、直射日光下室温保存（100日間）を行い、吸光度計（JASCO社製；V-550）を用いて、色の変化を調べた。

【結果と考察】

(1) 食酢濃度を変えた漬込試験

使用した原料ダイコンの特徴は表1に示した。菌検査の結果、39号は、食酢濃度が高くなるほど一般生菌数が減少することが分かった(図1)。10号は、どの区分においても菌数が少なかった(図2)。香漬の助では、食酢濃度3%(酢酸として0.126%)以上の区分で菌数が少なくなった(図3)。食酢と一般生菌数の関係は、ダイコン品種による差が大きいことが分かった。官能検査の結果、食酢なし区分の評価は悪くはなかったが、食酢あり区分の方がより評価が高かった。ただし、食酢5%区分になると、酸味がきつく感じられることから、やや評価が下がった。味に関する評価が最も高かった区分は、39号では食酢濃度3%区分と4%区分、10号では4%区分、香漬の助では4%区分であった(表2、表3、表4)。色に関しては、ダイコン品種に関係なく、食酢濃度が高いほど色の評価が高くなる傾向があった。したがって、ダイコン品種による差はあるものの、一般生菌数抑制と食味の両立のためには、漬床に食酢を3~4%(酢酸として0.126~0.168%)添加することが望ましいと考えられる。

表1 原料ダイコンの特徴

	特徴	上：生ダイコン 下：燻し後のダイコン
秋農試39号 (新秋田いぶりこまち)	白首系 細い 長い 曲がりやすい 先端が細い	
秋試交10号 (秋田いぶりおぼこ)	白首系 やや太め やや長め 先端細め 曲がりが少ない	
香漬の助	青首系 太い やや短め まっすぐ 先太り	

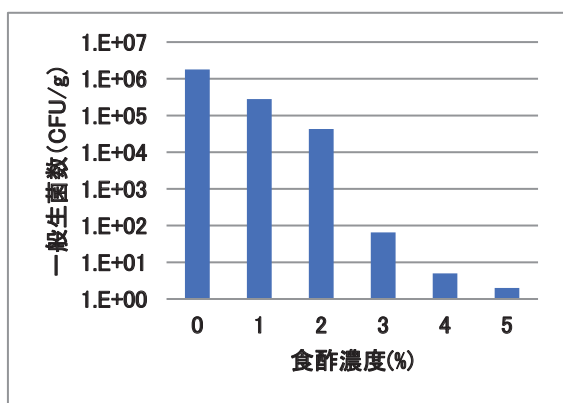


図1 39号の一般生菌数

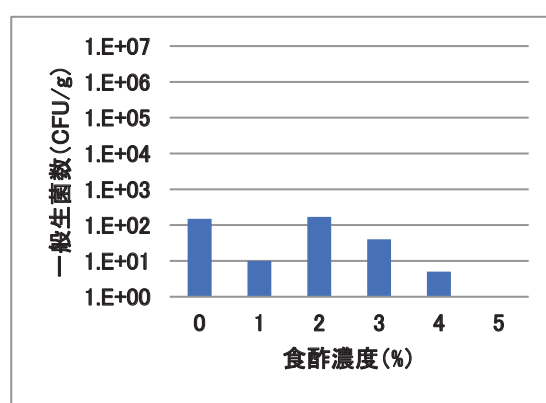


図2 10号の一般生菌数

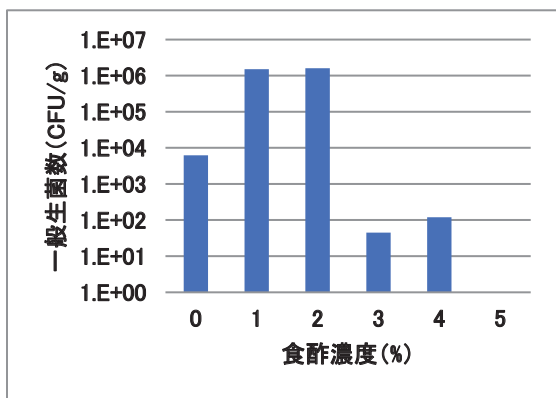


図3 香漬の助の一般生菌数

表2 39号の官能検査結果

食酢(%)	色	香り	食感	酸味	味	総合
0	2.0	1.7	2.3	3.3	2.7	2.7
1	1.7	1.7	2.3	2.3	2.0	2.0
2	2.0	2.3	2.3	2.0	2.0	2.0
3	2.0	2.0	2.3	1.7	1.7	1.7
4	2.0	2.7	2.0	1.7	1.7	1.7
5	2.0	2.7	2.0	2.3	2.3	2.3

(n=3)

表3 10号の官能検査結果

食酢(%)	色	香り	食感	酸味	味	総合
0	2.0	2.0	2.7	3.0	2.7	2.7
1	2.0	2.3	2.7	3.3	3.0	3.0
2	1.7	2.3	2.7	2.7	2.7	2.7
3	1.7	2.0	2.7	2.0	2.7	2.7
4	1.3	2.0	2.7	2.3	2.3	2.3
5	1.3	2.3	2.7	3.0	3.0	3.0

(n=3)

表4 香漬の助の官能検査結果

食酢(%)	色	香り	食感	酸味	味	総合
0	3.0	3.0	1.7	3.0	3.0	3.0
1	3.0	2.7	2.0	2.7	2.7	2.7
2	3.0	2.3	2.0	2.3	2.0	2.0
3	2.7	2.7	2.0	2.3	2.3	2.3
4	2.3	2.3	1.7	2.0	2.0	2.0
5	2.0	2.3	1.7	2.7	2.7	2.7

(n=3)

(2) 天然色素の退色試験

低温加熱処理、オートクレーブ処理、直射日光下室温保存の各条件下では、どの色素においても、退色が認められた(図5)。退色は、直射日光下常温保存100日間の条件で著しかった。ウコン色素、クチナシ色素、ベニコウジ色素は色の残存率が低く、ベニバナ色素は色の残存率が高かった。今回試験に用いた天然色素の中で最も退色しにくいのはベニバナ色素であることが分かったが、ベニバナ色素は他の色素と比較して黄色の着色が弱かった(図4、5)。いぶりがっこの着色には、最も退色しにくいベニバナ色素が適していることが分かったが、ベニバナ色素を用いて他

の天然色素と同等の強さの黄色を出すには、添加濃度を高くしなければならない。一方で、いぶりがっこの色は使用する色素の種類や添加量のほか、漬込条件、漬込環境などを含めた様々な要因に左右されるため、製造者毎に現場製造試験を行い、製造者が求める色となるよう製造者毎にベニバナ色素添加量を決定する必要があるものと考えられる。

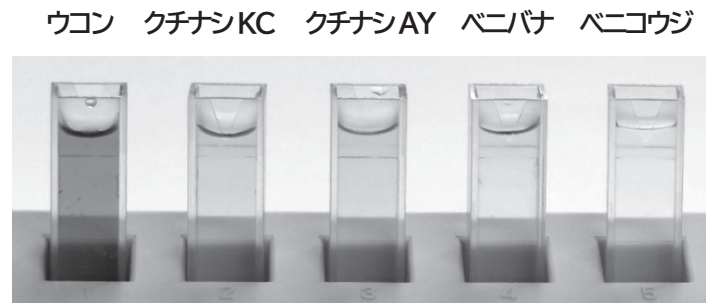


図4 試験開始時の0.2% (w/v)天然色素溶液

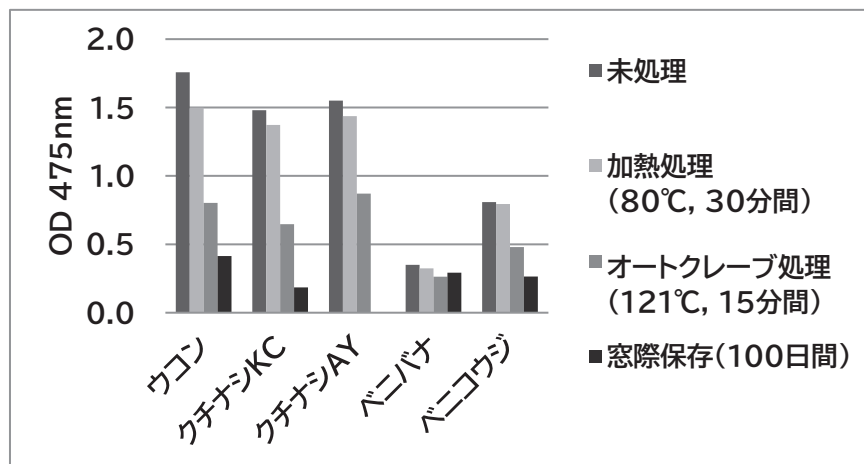


図5 各条件下における天然色素の吸光度

【引用文献】

- 1) 菅原久春、吉田明美、高橋均、小笠原泰 (1980) いぶりたくあん漬に関する研究 (第2報) - 市販のいぶりたくあん漬の一般成分及び遊離アミノ酸組成について - 秋田県醸造試験場報告 12, 37-48.
- 2) 菅原久春 (1984) いぶりたくあん漬に関する研究 (第5報) - 一般成分及び有機酸の消長- 秋田県醸造試験場報告 16, 52-55.
- 3) 菅原久春、小笠原博信 (1989) いぶりたくあん漬に関する研究 (第10報) - 最適乾燥条件の検討 - 秋田県醸造試験場報告 21, 52-55.
- 4) 守谷磐村 (1972) 秋田の漬物 調理科学 5(2), 98-101.
Doi: 10.11402/cookeryscience1968.5.2_98
- 5) 佐々木康子、渡辺隆幸 (2018) いぶりがっこの品質調査と製造工程に関する研究, 秋田県総合食品研究センター報告 20, 37-42.

秋田県内の味噌蔵・醤油蔵から分離した 住みつき酵母の多麴味噌への活用

渡辺隆幸、上原健二、中村勇之介、佐々木康子
(秋田県総合食品研究センター)

Takayuki WATANABE, Kenji UEHARA, Yunosuke NAKAMURA,
and Koko SASAKI

【緒言】

酵母は、麴菌、乳酸菌と並んで味噌の発酵を支える重要な微生物¹⁾であり、4-Hydroxy-2 (or 5)-ethyl-5 (or 2)-methyl-3 (2H)-furanone (HEMF) やコハク酸などの物質生産により、味噌の香りや味に大きな影響を与える。秋田県においては、平成5年以降、県内で分離選抜された「秋田酵母ゆらら」²⁾が、秋田県味噌醤油工業協同組合加盟企業において、現在でも多く活用されている。

一方、県内には、酵母添加を通常は行っていない味噌製造企業も多く、住みつき酵母の活動により各社独自の風味が醸成されている。我々は、秋田県内29社の味噌醤油醸造蔵(企業)より耐塩性酵母の分離を行い、各蔵から選択された優良な酵母を「住みつき酵母群」と命名した。選択された住みつき酵母群は県内11社の蔵で活用されており、一部の蔵では既に製品への活用を開始している。一方、県内では県南地区を中心として甘口タイプの多麴味噌も多く生産されているが、多麴味噌はグルコース量が多いことから浸透圧が高くなり、その結果、酵母の発酵が緩慢になり、発酵香が穏やかになる傾向がある。したがって、多麴味噌において発酵香を増強するためには、新たな酵母利用技術の開発が必要である。本報では、住みつき酵母の効率的な活用方法として、住みつき酵母のアミノ酸アナログ耐性株を分離選抜することにより、多麴味噌の香気成分増強と風味向上を図ることができたので報告する。

【方法】

1) アミノ酸アナログ耐性株の取得

多麴味噌を主力製品とする味噌蔵から分離された住みつき酵母を親株とした。当センターでは麴菌の育種に関して熱ストレス処理²⁾により、変異株の取得を行った実績があり、緩やかな変異誘導処理として、麴菌に実施したような高温処理を行い、続いて秋田³⁾および小金丸ら⁴⁾の方法に準じてアミノ酸アナログ耐性株を取得した。具体的な方法としては、10%食塩水を用いて 10^6 cells/ml

に調整した酵母懸濁液を生存率 1%程度になるように 52°C、10 分間の熱ストレス処理を行った後、選抜用プレートに塗抹して選抜を行った。選抜用培地プレートの組成は Yeast Nitrogen Base w/o A.A. (Difco 社) 0.67%、グルコース 2%、DL-p-フルオロフェニルアラニン 0.018%、寒天 2%とした。選抜用プレートに生育した耐性株を 3 回選抜プレートに植え継ぎ純化し、YPD 培地に保存して選抜株とした。

2) アミノ酸アナログ耐性株を用いた味噌の小仕込み試験

味噌の仕込みは、秋田県産大豆リュウホウとあきたこまちを原料として、麴歩合 30 歩（原料大豆：原料米=1：3）、食塩 10.5%、水分 35.5%、対水食塩濃度 22.7%、仕込み量 3.6kg の条件で行った。酵母添加は、仕込み味噌 1g あたり 1×10^5 CFU として仕込み時に行った。30°C、1 か月間熟成させて、切り返しを行い、さらに 5 か月間熟成後に分析を行った。使用した酵母 AM1、AM2、AM3 はゆらら酵母であり、E2-1、F6-1、E13-1、E11-1 は多麴味噌を主に製造している味噌蔵の住みつき酵母である。

表 1 小仕込み試験の配合表

配合表			
原料使用量 (kg)			
処理大豆	1.00	麴歩合	30.00
米麴	1.80	水分(%)	35.54
食塩(合計)	0.38	食塩濃度(%)	10.47
種水添加菌含	0.45	対水食塩濃度(%)	22.75
仕込み総量	3.63		

3) 味噌に含まれる香気成分の定量

香気成分の測定は、標準添加法により以下の手順で実施した。味噌サンプルに等量の飽和食塩水を加え、ポリトロンホモジナイザー PT3100 (KINEMATICA 社製) を用いて 10000rpm、30 秒、ホモジナイズした。5ml を 20ml ヘッドスペースバイアルに入れ、1000ppm 標準品混合液 (1-Propanol, 1-Propanol, 2-methyl (Isobutyl alcohol), 1-Butanol, 3-methyl- (Isoamyl alcohol), Acetic acid, Phenylethyl Alcohol および 2-phenylethyl ester (Phenethyl acetate) の 5 成分) を各成分の終濃度が 10ppm になるように 50 μ l 添加した。ボルテックスにて攪拌後、ガスクロマトグラフ質量分析計 TQ-8040 (島津製作所製) を用いて SIM モードにて香気成分を分析した。カラムは

InertCap Pure-WAX (GLサイエンス社製) を用い、カラムオープン温度 60°C で 5 分保持後、8°C/1 分の昇温レートで 220°C まで昇温後、さらに 10 分間保持した。気化室温度は 250°C、注入モードはスプリットモード (スプリット比 10) で実施した。香気成分のサンプリング方法は固相マイクロ抽出法 (SPME) により行った。SPME の条件は、80°C で 10 分間サンプルバイアルを予備加熱後、Polyacrylate SPME ファイバーをバイアル内に刺し、攪拌しながら 30 分間香気成分をファイバーに吸着させ、吸着後の SPME ファイバーを注入口 (気化室) で 1 分間加熱し、香気成分を脱離させた。各香気成分の標準品添加前後の面積値により、各香気成分の含有量を定量した。

4) 味噌の官能評価

熟成終了後の味噌の官能検査は、検査に熟練した 4 名により 5 点法 (点数が低いほど良い) で実施した。

【結果と考察】

1) アミノ酸アナログ耐性株の取得

多麴味噌を主力製品とする味噌蔵の酵母 E2-1 から、アミノ酸アナログ耐性株の取得ができた。E2-1 の生存率が 1% 程度になる熱ストレス処理を行った後、選抜用プレートに塗抹し、30°C、5 日~7 日で生育した複数のコロニーを釣菌し選抜した。同様の操作を 3 回繰り返して純化し、DL-p-フルオロフェニルアラニン耐性株 E2-1-pF1、E2-1-pF2、E2-1-pF3、E2-1-pF4 を選抜した。

2) アミノ酸アナログ耐性株を用いた味噌の製造試験

味噌製造試験に使用した酵母を表 2 に、熟成終了時の香気成分の測定結果を表 3 に、官能検査の結果を表 4 に示した。味噌の代表的な香気成分であり⁵⁾、比較的生産量が多い Isoamyl alcohol の生成量を比較すると、区分 A9 (F6-1)、A10 (E13-1)、A2 (AM2)、A1 (AM1) の順に多く、A4 (E2-1) で最も低かった。しかし、E2-1 由来の選抜株の試験区 A5 (E2-1-pF1)、A6 (E2-1-pF2)、A7 (E2-1-pF3)、A8 (E2-1-pF4) では E2-1 よりも Isoamyl alcohol 量が多く、育種選抜株による香気成分の増強が確認でき、育種の効果が示された。アミノ酸アナログを用いる育種による香気成分の改良は耐塩性酵母においても報告⁶⁾されており、DL-p-フルオロフェニルアラニン耐性株は親株よりも Phenylethyl Alcohol の生産力が高くなることが期待される。A4 (E2-1) と A5~8 の区分を比較すると、A6 (E2-1-pF2) において明らかに高い生成量を示していることが確認された (表 3)。官能検査の結果においても、A4 よりも A5~8 の区分の香り、味、総合の評価は高く、多麴味噌製造に関する選抜株の

有効性が示された。官能検査により香りの評価の最も高かった A11 区分には多趣味噌由来の E11-1 が用いられているが、今回の試験では他の酵母よりも明らかに生成量の多い香気成分は認められなかった。E11-1 の香気成分の特性解明については今後の課題としたい。味噌の総合評価の高かった E2-1-pF2 は、Phenylethyl Alcohol 高生産に加え、味噌の香りや味の評価に関しても親株よりも優れていた。今回、優れたアミノ酸アナログ耐性株の選抜に成功したことにより、この手法を活用することで、今後も香気成分に優れた酵母の改良につながることを期待される。

表 2 使用酵母

	仕込み区分	酵母名
ゆらら酵母	A1	AM1
	A2	AM2
	A3	AM3
住みつき酵母	A4	E2-1
分離株	A5	E2-1-pF1
	A6	E2-1-pF2
	A7	E2-1-pF3
	A8	E2-1-pF4
住みつき酵母	A9	F6-1
	A10	E13-1
	A11	E11-1

表 3 香気成分の分析結果

仕込 区分	(ppm)				
	1-Propanol	1-Propanol, 2- methyl- (Isobutyl alcohol)	1-Butanol, 3-methyl- (Isoamyl alcohol)	Phenylethyl Alcohol	Acetic acid, 2- phenylethyl ester (Phenethyl acetate)
A-1	2.8	5.6	12.8	4.8	0.2
A-2	3.1	5.9	13.2	5.1	0.1
A-3	2.5	4.4	10.0	4.1	0.1
A-4	2.5	4.6	7.7	3.6	0.1
A-5	2.7	4.6	9.5	3.6	0.1
A-6	2.3	4.6	9.7	5.5	0.0
A-7	2.3	4.2	8.0	2.7	0.1
A-8	2.7	4.3	9.7	3.5	0.0
A-9	2.8	6.2	13.9	3.7	0.1
A-10	2.7	5.9	13.7	3.9	0.1
A-11	2.8	4.8	9.1	3.1	0.1

表 4 官能検査の結果

	色	香り	味	総合
A1	2.50	3.25	2.50	3.00
A2	2.50	2.50	2.25	2.00
A3	2.50	3.00	2.75	3.00
A4	2.50	3.00	2.75	3.13
A5	2.25	2.13	2.25	2.25
A6	2.25	2.00	2.00	1.75
A7	2.25	2.00	2.13	2.25
A8	2.75	2.38	2.38	2.50
A9	2.25	2.25	2.50	2.25
A10	2.75	2.25	2.25	2.25
A11	2.50	1.63	2.38	2.25

【引用文献】

- 1) 渡辺隆幸 (1998) 味噌用酵母「秋田香り酵母ゆらら」の開発と利用、日本醸造協会誌、**93**、22-27.
- 2) 小笠原博信、佐々木康子、渡辺隆幸、佐藤勉、瓜生撰、今野宏、高橋砂織 (2013) トランスポゾン技術を利用した白色麹菌株の育種と発酵食品への応用、秋田県総合食品研究センター報告、**15**、19-28.
- 3) 秋田修 (1989) カナバニン耐性を利用した優良酵母取得法、日本醸造協会誌、**84**、96-99.
- 4) 小金丸和義、墨利久、神田康三、加藤富民雄、田代康介、久原哲 (2003) β -フェネチルアルコール高生産清酒酵母の分離とその生成機構、日本醸造協会誌、**98**、201-209.
- 5) 菅原悦子、米倉雄一 (1998) 各種味噌の香気成分組成の比較、日本食品科学工学会誌、**45**、323-329.
- 6) 久壽米木一裕 (1998) アナログアミノ酸耐性酵母による香気成分生成、日本醸造協会誌、**93**、606-614.

窒素添加が清酒の品質に与える影響について

渡邊誠衛、黒崎文華、佐藤治^{*}、大友理宣^{*}、
(秋田県総合食品研究センター、^{*}秋田銘醸株式会社)

Seiei WATANABE, Fumika KUROSAKI, Osamu SATO, and Masanobu OHTOMO

【要約】

我々は、清酒の品質保持と様々な要因との関係を検討している。前報¹⁾では、ラボスケールで清酒への窒素添加が貯蔵中のオフフレーバーの発生抑制効果が認められた。本報では、現場規模で清酒への窒素置換を行い、貯蔵温度や貯蔵期間を変えた熟成加速試験を行った結果、各成分やオフフレーバー発生に窒素添加の効果があることが確認できた。

【諸言】

清酒は時間の経過と共に、温度、酸素、光などの要因により香味が変化することが知られており、多くの研究が報告されている²⁾。岡本ら^{3), 4)}、小川ら⁵⁾、小泉ら⁶⁾は、溶存酸素低減による清酒の品質保持を確認しており、さらに鮮度保持のためには最適な溶存酸素濃度があることを報告しており、我々も同様に窒素添加が清酒の鮮度保持に効果があることを確認している。¹⁾

前報¹⁾のラボスケールの試験では、未処理に比べ、二酸化炭素置換と窒素置換の清酒は、ビン内空間の酸素濃度と溶存酸素の濃度が低く、熟成中のオフフレーバーの発生にも抑制効果が認められた。

本報では、酒蔵の現場醸造において、清酒への窒素置換が経時的に熟成中の品質にどのような変化を及ぼすのか、新たな知見を得たので報告する。

【実験方法】

1. 試料

清酒への窒素添加試験は、秋田銘醸株式会社にて同社の協力により行った。清酒に増田商事株式会社の脱酸素装置 PKS-2 で窒素を添加し、株式会社レイメイ製作所の瓶詰機で充填した。その後、ビン殺菌をした火入酒を試料とした。

窒素添加の予備試験として、無添加、直接清酒に添加、清酒を入れる前のビンに添加後さらに添加清酒を入れた3種類の試料について溶存酸素量を測定した。

貯蔵試験の試料は、普通酒、1.8Lの火入酒のビン貯蔵酒を供した。貯蔵試験は、貯蔵温度を-5℃、15℃、30℃の3区分、および、貯蔵期間を30日、60日、90日の3区分で行った。

1) 窒素置換：無し、有り・・・・・・・・・・2区分

2) 貯蔵温度：-5℃、15℃、30℃・・・・・・・・・・3区分

3) 貯蔵期間：30日、60日、90日・・・・・・・・・・3区分

2. 溶存酸素濃度の測定

清酒中の酸素濃度は、開栓直後にメトラー・トレド社製の Seven2Go™ を用いて測定した。

3. 官能試験

熟成期間に達した清酒は、-15℃で保存し、最長貯蔵期間の90日終了後に一括で行った。パネラーは、当センターの8名で、特にオフフレーバーについて5点法（1：若～5：熟）で評価した。

【 結果と考察 】

1. 窒素添加予備試験

窒素添加後の清酒の溶存酸素量を図1に示した。無添加に比べ、清酒への添加、ビンと清酒への添加の順番に、明らかに窒素添加により清酒中の溶存酸素量の軽減が認められた。

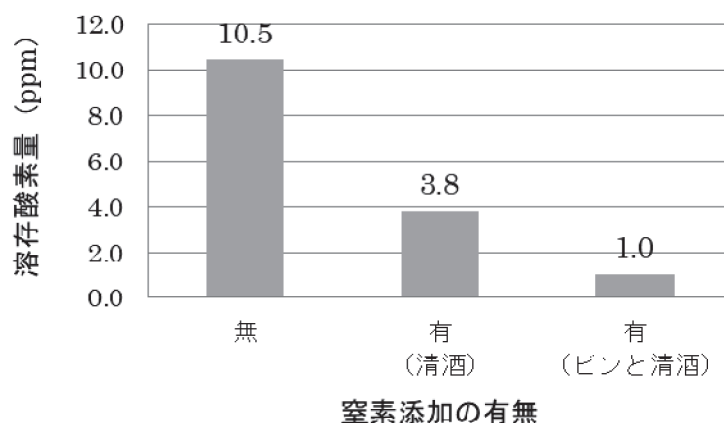


図1 窒素添加後の溶存酸素量

2. 貯蔵中の溶存酸素

窒素添加無しと窒素添加有りの貯蔵酒の溶存酸素濃度の変化を図2に示した。

窒素添加無しの貯蔵酒は、貯蔵温度が高くなるにつれてやや減少傾向があったが、貯蔵期間による影響はなく、溶存酸素濃度は高く推移した。窒素添加有りの貯蔵酒は、貯蔵温度と貯蔵期間の影響はなく、清酒中の溶存酸素濃度は低く推移した。

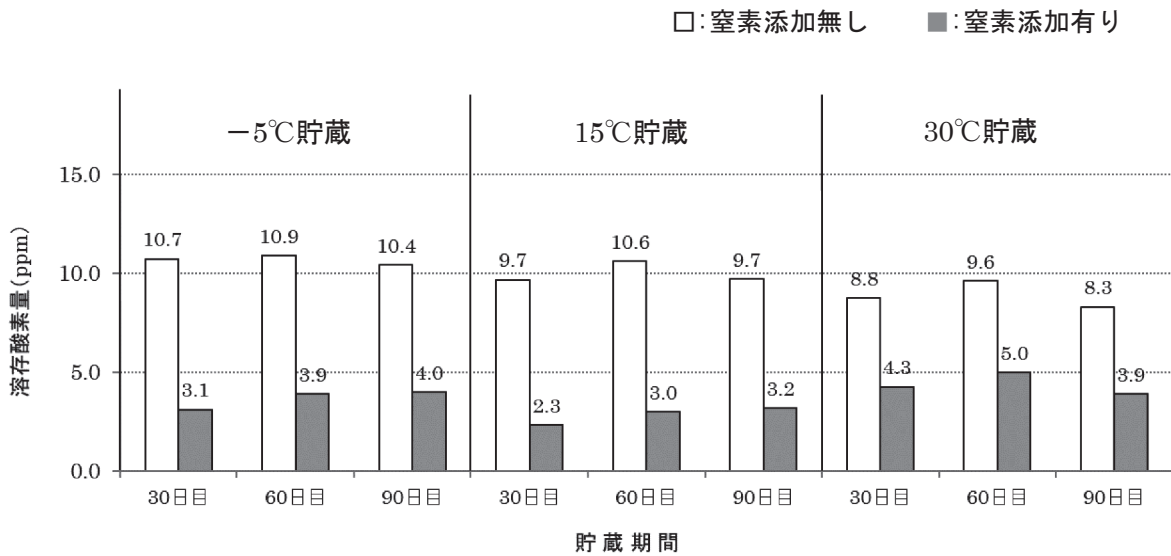


図2 窒素添加無しの清酒の溶存酸素量

3. 官能試験結果

窒素添加無しと有りの清酒を、貯蔵温度と貯蔵期間を変えた貯蔵酒を熟度を中心に官能試験を行った結果を図3に示した。

熟度を指標とした官能試験の結果、熟度は予想通り、貯蔵温度が高いほど、また、貯蔵期間が長いほど進んでいた。“老香”や“熟成香”の指摘が多く、窒素添加の有無では、いずれの貯蔵酒も窒素添加有りの貯蔵酒の熟度が抑えられている傾向があった。特に、低温貯蔵では抑制の効果はわずかであったが、高温貯蔵の方が抑制効果が顕著であることが分かった。

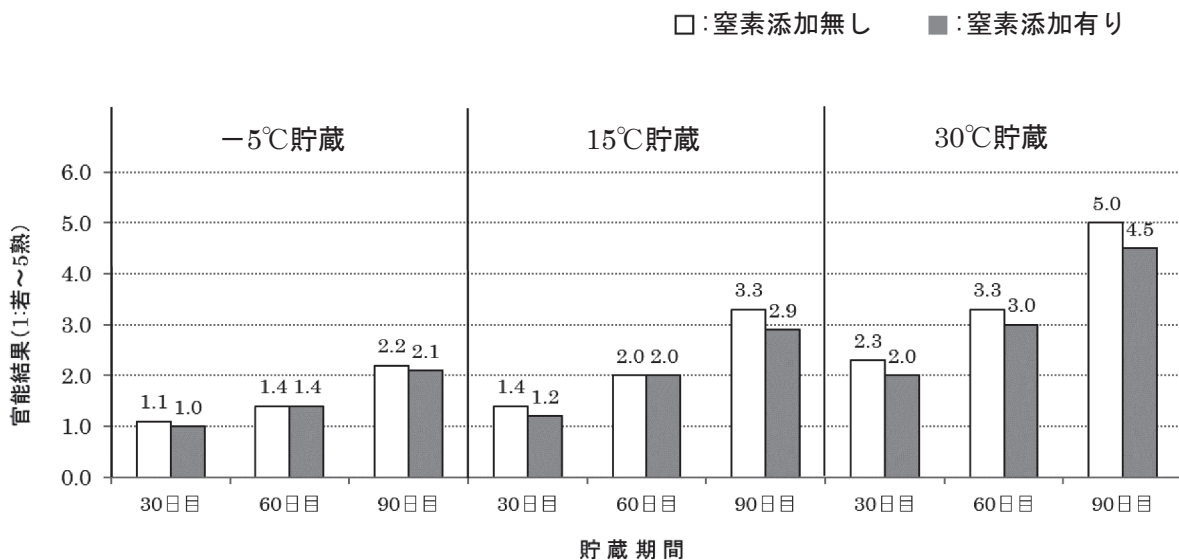


図3 貯蔵後の官能試験結果

【 引用文献 】

- 1) 渡邊誠衛、大野剛、小林忠彦、佐渡高智 (2016) 清酒のビン内気相とビンの色が熟成に与える影響について 秋田県総合食品研究センター報告 18, 9-16.
- 2) 永井英雄 (2003) 清酒醸造における溶存酸素の影響 清酒酵母の研究 90 年代の研究 p138-143 清酒酵母・麴研究会.
- 3) 岡本匡史、山内徹、矢野駿太郎、黒瀬直孝、川北貞夫、高橋康次郎、中村輝也 (1999) 溶存酸素低減による清酒の品質保持(第1報) 日本醸造協会誌 94(10), 827-832. Doi: 10.6013/jbrewsocjapan1988.94.827
- 4) 岡本匡史、山内徹、川北貞夫 (2002) 溶存酸素低減による清酒の品質保持 日本醸造協会誌 97(3), 172-177. Doi: 10.6013/jbrewsocjapan1988.97.172
- 5) 小川慶治、山中寿城、岡本匡史、黒瀬直孝、川北貞夫、高橋康次郎、中村輝也 (2001) 溶存酸素低減による清酒の品質保持(第2報) 日本醸造協会誌 96(10), 719-725. Doi: 10.6013/jbrewsocjapan1988.96.719
- 6) 小泉亜希子、山中寿城、岡本匡史、平井信行、黒瀬直孝、小川慶治、川北貞夫、垂水彰二、高橋康次郎 (2003) 溶存酸素低減による清酒の品質保持(第3報) 日本醸造協会誌 98(2), 125-131. Doi: 10.6013/jbrewsocjapan1988.98.125

3. 特許の概要 (1件)

1) 発明の名称：ヒト脂肪肝モデル細胞

発明者：畠 恵司、戸松 さやか、佐々木 玲、梅川 結 (秋田県総食研)
加国雅和、高橋真生 (株式会社フェニックスバイオ)

公開番号：特開2021-29174

公開日：2021年3月1日

1) 発明の名称：ヒト脂肪肝モデル細胞

発明者：畠 恵司、戸松 さやか、佐々木 玲、梅川 結（秋田県総食研）
加国雅和、高橋真生（株式会社フェニックスバイオ）

公開番号：特開2021-29174

公開日：2021年3月1日

【要約】

【特許の概要】

脂肪肝は、肝細胞内に中性脂肪等の脂質が過剰に蓄積して、肝障害を生じる疾患の総称である。近年では、非アルコール性脂肪性肝障害が注目され、脂肪肝から非アルコール性脂肪肝炎、肝硬変、肝臓がんへと移行する例もあることが明らかにされている。このため脂肪肝を適切に治療することが必要とされており、その病理に関する機能的な解明や、有効な治療薬の開発が試みられている。脂肪肝の発症メカニズムやその予防及び治療の研究を効率的に行うために、ヒト脂肪肝の *in vitro* 評価系、すなわちヒト脂肪肝モデル細胞が切望されている。本発明は、脂肪肝の肝組織の症状を呈するヒト脂肪肝モデル細胞を提供することを目的とする。

【課題の解決】

発明者らは上記課題を解決すべく、鋭意検討した結果、脂肪肝由来のヒト肝細胞を、ジメチルスルホキシドを含む培地中にて培養することによって、脂肪滴の蓄積、脂質の分泌・蓄積、脂肪肝関連遺伝子の発現等が観察され、脂肪肝の症状を維持するヒト脂肪肝モデル細胞が得られることを見出した。

4. 学会発表要旨（8件）

1) 発表学会：日本生化学会東北支部 第86回例会・シンポジウム

発表日と場所：2020年5月30日（要旨誌上発表）

演題名：Identification of B38-CAP as an ACE2-like enzyme to suppress hypertension and cardiac dysfunction.

発表者：湊隆文¹、佐藤輝紀^{1, 2}、菰澤悟³、山口智和¹、今井由美子⁴、高橋砂織⁵、渡邊博之²、久場敬司¹（¹秋田大・院医・分子機能、²秋田大・院医・循内、³国際農研センター、⁴医薬基盤・健康・栄養研、⁵秋田県総食研）

2) 発表学会：第93回日本生化学会大会

発表日と場所：2020年9月14日～16日、オンライン開催

演題名：キメラマウス由来ヒト新鮮肝細胞および肝がん細胞株の比較トランスクリプトーム解析

発表者：○梅川結¹、高橋真生²、須藤あさみ¹、加国雅和²、畠恵司¹（¹秋田県総食研、²フェニックスバイオ（株））

3) 発表学会：第93回日本生化学会大会

発表日と場所：2020年9月14日～16日、オンライン開催

演題名：ヒト皮膚ケラチノサイト HaCaT における秋田県内バイオマス抽出物による抗酸化活性

発表者：○佐藤友紀¹、上原健二¹、工藤真二²、林潤一郎²、進藤昌²（¹秋田県総食研、²九州大）

4) 発表学会：令和2年度日本醸造学会大会

発表日と場所：令和2年10月21日～27日、オンライン開催

演題名：酒造工程中に存在する微生物の同定とPCRによる検出

発表者：○上原智美、佐藤友紀、進藤昌（秋田県総食研）

5) 発表学会：令和2年度日本醸造学会大会

発表日と場所：令和2年10月21日～27日、オンライン開催

演題名：清酒醸造過程におけるジアセチルおよびその関連物質の消長

発表者：○福田敏之、杉本勇人、進藤昌（秋田県総食研）

6) 学会発表：令和2年度日本醸造学会大会

発表日と場所：2020年10月21～27日、オンライン開催

演題名：天然醸造味噌由来 *Zygosaccharomyces rouxii* YAMAMO 001 株のコハク酸生成能について

発表者：○高橋泰¹、上原健二²、渡辺隆幸²、木村貴一²

(¹高茂合名会社、²秋田県総食研)

7) 発表学会：第 94 回日本薬理学会年会

発表日と場所：2021年3月9日（札幌コンベンションセンター）

演題名：COVID-19 マウスモデルにおける ACE2 様カルボキシペプチダーゼ B38-CAP による SARS-CoV-2 誘発肺障害の抑制 (Suppression of SARS-CoV-2-induced lung injury by ACE2-like carboxypeptidase B38-CAP in COVID-19 mouse model.)

発表者：○山口智和¹、湊隆文¹、星崎みどり^{1,2}、浅賀正充³、蕨澤悟⁴、新山真由美⁵、今井正樹⁶、高橋砂織⁷、内海大知³、安健博¹、永田諭志⁵、鎌田春彦⁵、河岡義裕⁶、保富康弘³、今井由美子²、久場敬司¹（¹秋田大・院医・分子機能、²医薬基盤・健康・栄養研(NIBIOHN)、³筑波霊長類センター、NIBIOHN、⁵抗体デザインラボ NIBIOHN、⁴国際農研、⁶東京大・医薬研、⁷秋田県総食研)

8) 発表学会：第 55 回日本水環境学会年会

発表日と場所：2021年3月10日～12日、オンライン開催

演題名：下水処理水を無希釈で活用した水稻栽培における栽培特性と環境影響評価

発表者：○増田周平¹、藤林恵²、大野剛³、高階史章⁴、岡野邦弘⁴、Phung Luc⁵、Pham Dung⁵、渡部徹⁵（¹秋田高専、²九州大、³秋田県総食研、⁴秋田県大、⁵山形大）

1) 発表学会：日本生化学会東北支部 第86回例会・シンポジウム

発表日と場所：2020年5月30日（要旨誌上発表）

演題名： Identification of B38-CAP as an ACE2-like enzyme to suppress hypertension and cardiac dysfunction.

発表者：湊隆文¹、佐藤輝紀^{1, 2}、菰澤悟³、山口智和¹、今井由美子⁴、高橋砂織⁵、渡邊博之²、久場敬司¹（¹秋田大・院医・分子機能、²秋田大・院医・循内、³国際農研センター、⁴医薬基盤・健康・栄養研、⁵秋田県総食研）

要旨：アンギオテンシン変換酵素2 (ACE2) は、レニン・アンギオテンシン系における負の調節因子として、循環器疾患などの病態改善に寄与する。今回、私達は *Paenibacillus* sp. B38 由来のカルボキシペプチダーゼ B38-CAP が ACE2 と同様の活性を持つことを見出した。立体構造解析により、B38-CAP ホモログが配列同一性なしに哺乳類 ACE2 と構造類似性を持つことを明らかとした。In vitro において組換え ACE2 は、ヒト ACE2 と同じ酵素活性でアンギオテンシン II をアンギオテンシン 1-7 に変換することを認めた。アンギオテンシン II 投与マウスあるいは TAC 心不全マウスにおいて、B38-CAP は、血漿アンギオテンシン II 濃度を減少させ、循環器病態を改善することを明らかとした。さらに、B38-CAP 投与による肝臓や腎臓に対する毒性も認めないことを示した。私達の結果は、微生物由来 ACE2 様酵素 B38-CAP が、in vitro、in vivo において ACE2 と同様の機能を持つことを明らかとした。微生物工学は、高血圧や心不全に対するタンパク質医薬品の設計に有効である可能性が示唆された。

2) 発表学会：第93回日本生化学会大会

発表日と場所：2020年9月14日～16日、オンライン開催

演題名：キメラマウス由来ヒト新鮮肝細胞および肝がん細胞株の比較トランスクリプトーム解析

発表者：○梅川結¹、高橋真生²、須藤あさみ¹、加国雅和²、畠恵司¹（¹秋田県総食研、²フェニックスバイオ（株））

要旨：ヒト肝細胞が必要な種々の研究においては、ヒト初代肝細胞のコストやドナー不足などの諸問題から、ヒト肝がん細胞が代替されてきた。一方、ヒト肝細胞キメラマウス由来新鮮ヒト肝細胞 PXB-cells は、ドナー由来肝細胞の代替に有望である知見が得られており、現在、主に薬物動態研究や、薬剤スクリーニングなどに利用されている。本研究においては、ヒト肝がん細胞株との比較を通して PXB-cells の特徴を理解することを目的に、これらの細胞における網羅的な発現遺伝子解析を行った。具体的には、移植後 16 週目のキメラマウス肝臓から単離し、さらに 13 日間培養した PXB-cells、並びにヒト肝がん細胞株 HepG2 および HuH-7 から精製した RNA を用いてマイクロアレイ解析を行った。その結果、全ての細胞群で共通に発現した 18,728 個の遺伝子群のうち、肝がん細胞群より PXB-cells において 2 倍以上有意に高い発現を示した遺伝子は 1,984 個、反対に、肝がん細胞群より PXB-cells において 0.5 倍以下の有意に低い発現を示した遺伝子は 2,189 個であった。これらの遺伝子群についてエンリッチメント解析を行った結果、PXB-cells は肝機能として重要な種々の代謝経路（例：metabolism of xenobiotics by cytochrome P450, complement and coagulation cascades）に関

連する遺伝子を高く保持していることが示唆された。さらに、肝臓特異的な代謝である尿素回路とクレアチン経路に着目した解析を行った結果、PXB-cells はこれらの代謝に関する遺伝子を高発現していることが判明した。細胞培養上清に分泌される尿素およびアンモニアの定量において、PXB-cells の上清中では、低濃度のアンモニア、および高濃度の尿素が観察されたことから、PXB-cells は、肝がん細胞より高いアンモニアの解毒作用を保持していると考えられる。これらの結果は、PXB-cells が多様な肝機能研究に対して高いポテンシャルを有することを示唆している。

3) 発表学会：第93回日本生化学会大会

発表日と場所：2020年9月14日～16日、オンライン開催

演題名：ヒト皮膚ケラチノサイト HaCaT における秋田県内バイオマス抽出物による抗酸化活性

発表者：○佐藤友紀¹、上原健二¹、工藤真二²、林潤一郎²、進藤昌²

(¹秋田県総食研、²九州大)

要旨：(背景) 農林水産業系未利用資源を原料とする化学産業を創出する上でのボトルネックは、基幹化合物を安価かつ安定供給するシステムが未だ確立できていない点にある。このボトルネックを解消するためには未利用資源の構成成分から付加価値の高い有用成分・バイオ素材を回収、又は製品に変換することが重要となる。本研究では、未利用資源を素材とした機能性消毒剤の開発を目指すにあたり、秋田県内の未利用資源である稲わら、もみ殻、廃菌床抽出物の、ヒト皮膚における抗酸化活性を評価した。

(方法) 秋田県産の稲わら、もみ殻、廃菌床について 80℃または 180℃の熱水抽出を行い、得られたサンプルについて分析を行った。*In vitro* の実験として、抗酸化活性は DPPH ラジカル消去活性、ポリフェノール含量はフォーリンチオカルト法で分析した。細胞実験においては、ヒト皮膚ケラチノサイト HaCaT を過酸化水素に暴露して酸化ストレスを誘導し、各バイオマス抽出物存在下の抗酸化活性を DCFH-DA アッセイで、細胞活性は WST-1 アッセイで評価した。

(結果と考察) DPPH ラジカル消去活性で求めた各バイオマス抽出物の抗酸化活性は、いずれのバイオマスにおいても 80℃熱水抽出よりも 180℃熱水抽出で得られたものが高値であった。稲わら、もみ殻、廃菌床の 180℃熱水抽出物間においては、バイオマス重量あたりの抗酸化活性は廃菌床が際立って高値であり、次いでもみ殻が高値であった。また、各バイオマス抽出物中のポリフェノール濃度は抗酸化活性と相関しており、バイオマスあたりのポリフェノール抽出量は廃菌床が特に優れていた。

過酸化水素処理によって HaCaT の細胞内酸化ストレスは顕著に増加したが、各バイオマス抽出物の添加により酸化ストレスが顕著に抑制された。特に、細胞内酸化ストレスの低減効果はもみ殻 180℃熱水抽出物で強い傾向があった。

以上の結果から、秋田県産の稲わら、もみ殻、廃菌床を 180℃熱水抽出して得られた抽出物はポリフェノール含量に優れ、高い抗酸化活性を有しており、ヒト皮膚ケラチノサイトの細胞内でも酸化ストレス低減効果を示すことが示唆された。

4) 発表学会：令和2年度日本醸造学会大会

発表日と場所：令和2年10月21日～27日、オンライン開催

演題名：酒造工程中に存在する微生物の同定とPCRによる検出

発表者：○上原智美、佐藤友紀、進藤昌（秋田県総食研）

要旨：(目的) 酒造工程中に醸造に不必要な微生物が混入することで4-ビニルグアヤコール(4-VG)などのオフフレーバーが発生し、商品価値の低下を招くことがある。我々は、以前より秋田県内の清酒製造場の麴の微生物検査を定期的に行うことで、麴室を中心とした製造場内の衛生環境の改善を支援していた。これまでは製造場内の微生物叢を調べるために培養法を用いていたが、同法は結果が出るまでに時間がかかることやコロニーの形態から微生物を同定するのは困難であることから、PCRを用いた微生物の検出法について検討することとした。

(方法) 本県の清酒製造場内の拭き取り検査を実施(約150点)し、寒天培地を用いて培養した。生育したコロニーからダイレクトPCRを行った。プライマーは一般的な16S rDNA検出用(バクテリア)と26S rDNAのD1/D2領域(真菌)検出用を使用した。次に、PCRの最適化を行うために、反応系に米麴懸濁液(PCR阻害を想定)を添加/非添加でPCRを行い、ポリメラーゼの評価を行った。さらに米麴を試料として、単離した微生物に特異的なプライマーを設計し、PCRによる検出を試みた。

(結果) 県内の製造場内の拭き取り検査の結果から、単離した83点の微生物を同定したところ、その多くは*Bacillus*属や*Staphylococcus*属および*Kocuria*属の細菌、または野生酵母であり、これまでの研究と同様の結果であった。PCR条件の検討に用いた5つのポリメラーゼでは増幅効率に最大で2.4倍の差が見られた。また同定結果を基に16S rDNA配列内で特異的なプライマーを設計し、米麴に生育する*Staphylococcus*属や*Bacillus*属などの検出を行ったところ、定性的な検出は可能であることが分かった。

5) 発表学会：令和2年度日本醸造学会大会

発表日と場所：令和2年10月21日～27日、オンライン開催

演題名：清酒醸造過程におけるジアセチルおよびその関連物質の消長

発表者：○福田敏之、杉本勇人、進藤昌（秋田県総食研）

要旨：(目的) ジアセチルは、ほとんどすべての発酵飲食品の品質を左右する重要な香味成分である。これまで飲料中のジアセチルに関して多くの研究報告がなされている。しかしながら、「ジアセチル」として測定されているにも関わらず、実際にはその前駆体や同族体も含んでいたりするなど不正確なものが多く、ジアセチルについての正確な知見は乏しい。本研究では新たに開発したジアセチルの分析法を用いて、清酒醸造過程における当該物質およびその関連物質の消長を明らかにする目的で解析を実施した。

(方法と結果) 清酒中のジアセチルの分析は、清酒にジクロロメタンを添加し4℃で溶媒抽出した後、内部標準を添加しGC-MSにより解析する方法により行った。また、

総米 40kg での醸造試験を実施し、ジアセチルとペンタンジオンの消長を解析した。ジアセチルおよびペンタンジオンを 0.1ppm の濃度で添加した清酒を用いて添加回収試験を実施したところ、回収率はそれぞれ 93%、102%と良好な結果が得られた。また、清酒醸造過程でのジアセチルとペンタンジオンの消長についても定量分析を実施した。さらに、清酒もろみでのジアセチル (DA) とペンタンジオン (PD) の量比 DA/PD は 0.1~1.0 の間にあるのに対して、火落ちした清酒では DA/PD 比が 0.1 未満になることが明らかとなり、火落ちした清酒の判別に DA/PD 比が有効であることが示唆された。

6) 学会発表：令和 2 年度日本醸造学会大会

発表日と場所：2020 年 10 月 21~27 日、オンライン開催

演題名：天然醸造味噌由来 *Zygosaccharomyces rouxii* YAMAMO 001 株のコハク酸生成能について

発表者：○高橋泰¹、上原健二²、渡辺隆幸²、木村貴一²

(¹高茂合名会社、²秋田県総食研)

要旨：(目的) 天然醸造味噌は、発酵蔵や木樽の住み付き酵母による複雑な発酵が進むことで知られている。高茂合名会社の味噌製造場において、木樽仕込み天然醸造味噌より分離されたリンゴ様の香りが良好な耐塩性味噌用酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* YAMAMO 001 株の多用途化を検討したところ、優れたコハク酸生成能を見出した。コハク酸生成能をはじめとする菌学的諸性質や応用について検討したので報告する。

(方法) 味噌や醤油を分離源とする市販の耐塩性酵母 *Z. rouxii* NBRC 0505 株、NBRC 0506 株、NBRC 1876 株、NBRC 1877 株の 4 株を対照として用いた。5%食塩を含む YPD 培地にて、30℃で 48 時間静置培養したものを前培養液とした。自作の甘酒や市販の果汁飲料を用意し、終濃度 10%となるように食塩を加えたものを培地とした。培地体積の 1/100 量の前培養液を添加し、30 度で 30 日間以上静置培養して本培養とした。本培養中は経時的にサンプリングを行い、有機酸とエタノールの測定を行なった。

(結果) 10%食塩を含む甘酒を YAMAMO 001 株で発酵させた発酵塩麴中のエタノール生成量を検討したところ、最大で 3.39%であった。続いて、発酵塩麴中における YAMAMO 001 株のコハク酸生成能を検討した。本培養 31 日目の嫌氣的な培養では 107.1mg/100ml、好氣的な培養では 227.3mg/100ml のコハク酸を系中に生成することがわかった。これは、対照株の最高値と比べて 1.5~1.7 倍のコハク酸を生成し、かつ、コハク酸のうま味を明確に感じる事ができた。コハク酸生成経路について、培養初期に生成した酢酸が後半になると検出されない事や好氣的な培養でコハク酸生成量が増加することから、酢酸はアセチル CoA を介して TCA サイクルに取り込まれ、コハク酸を生成する可能性が示唆された。

7) 発表学会：第 94 回日本薬理学会年会

発表日と場所：2021年3月9日（札幌コンベンションセンター）

演題名：COVID-19 マウスモデルにおける ACE2 様カルボキシペプチダーゼ B38-CAP による SARS-CoV-2 誘発肺障害の抑制 (Suppression of SARS-CoV-2-induced lung injury by ACE2-like carboxypeptidase B38-CAP in COVID-19 mouse model.)

発表者：○山口智和¹、湊隆文¹、星崎みどり^{1,2}、浅賀正充³、菰澤悟⁴、新山真由美⁵、今井正樹⁶、高橋砂織⁷、内海大知³、安健博¹、永田諭志⁵、鎌田春彦⁵、河岡義裕⁶、保富康弘³、今井由美子²、久場敬司¹（¹秋田大・院医・分子機能、²医薬基盤・健康・栄養研(NIBIOHN)、³筑波霊長類センター、NIBIOHN、⁵抗体デザインラボ NIBIOHN、⁴国際農研、⁶東京大・医薬研、⁷秋田県総食研）

要旨：Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) is a receptor for cell entry of SARS-CoV-2, and recombinant soluble ACE2 protein inhibits SARS-CoV-2 infection as a decoy. ACE2 is the carboxypeptidase to degrade angiotensin II (Ang II) to angiotensin 1-7 and improves the pathologies of cardiovascular disease and acute lung injury. To address whether the carboxypeptidase enzymatic activity of ACE2 is protective against COVID-19, we investigated the effects of B38-CAP, an ACE2-like enzyme, on SARS-CoV-2-induced lung injury. Expression of ACE2 protein was significantly downregulated in the lungs of SARS-CoV-2-infected hamsters. Recombinant S1 domain or receptor-binding domain (RBD) of the SARS-CoV-2 spike protein also directly downregulated ACE2 expression and elevated Ang II levels and considerably worsened acid-induced lung injury in hamster. Treatment with B38-CAP downregulated Spike RBD-induced high Ang II levels, severe inflammation and pulmonary edema through its ACE2-like enzyme activity. Consistently, elevated cytokine mRNA levels and impaired lung functions were improved by B38-CAP treatment. Moreover, in SARS-CoV-2-infected humanized ACE2 transgenic mice, B38-CAP significantly improved the pathologies of lung injury, alleviated the cytokine storms and downregulated viral RNA levels. These results provide the first experimental *in vivo* evidence increasing ACE2-like enzymatic activity is a potential and powerful therapeutic strategy for lung pathologies in COVID-19.

8) 発表学会：第 55 回日本水環境学会年会

発表日と場所：2021年3月10日～12日、オンライン開催

演題名：下水処理水を無希釈で活用した水稻栽培における栽培特性と環境影響評価

発表者：○増田周平¹、藤林恵²、大野剛³、高階史章⁴、岡野邦弘⁴、Phung Luc⁵、Pham Dung⁵、渡部徹⁵（¹秋田高専、²九州大、³秋田県総食研、⁴秋田県大、⁵山形大）

要旨：下水処理水の活用による資源循環型農業システムの構築を目指し、本研究グループでは下水処理水を活用した水稻栽培手法の確立を目指して研究を行っている。技術の普及にあたっては、栽培特性や収穫物の安全性・品質評価に加え、水田生態系に与える影響を含めた総合的な評価が必要である。しかし、下水処理水の投入が水質、土壌、底生生物などの水田環境に及ぼす影響については、知見が不足している。そこで本研究では、下水処理水投入による水田環境への影響を評価することを目的として、実水田において水稻栽培試験を行った。

5. 外部発表論文概要 (10件)

1) 論文題名 : 「潤彩小町」摂取による健康および皮膚状態に与える影響の性別年代別の違い

著者名 : 戸松さやか¹、高嶋亜希子²、佐野宗孝²、成田琢磨³、梅川結¹、須藤あさみ¹、畠恵司¹ (¹秋田県総食研、²(株)サノ、³あきた東内科クリニック)
雑誌名 : *New Food Industry*, **62**, 237-243.

2) 論文題名 : ネギ (*Allium fistulosum* L.) エキス摂取による高齢者の健康状態改善効果

著者名 : 高嶋亜希子¹、佐野宗孝¹、成田琢磨²、熊谷昌則³、畠恵司³ (¹(株)サノ、²あきた東内科クリニック、³秋田県総食研)
雑誌名 : *New Food Industry*, **62**, 325-330.

3) 論文題名 : High-Temperature Tolerance of Flowers

著者名 : Satisha Hegde¹, Yui Umekawa^{2,3}, Etsuko Watanabe^{2,4}, Ichiro Kasajima⁵ (¹Dr. Prabhakar Kore Basic Sci. Res. Cent., KLE Acad. High. Edu. and Res., India,²Cryobio. Res. Cent., Fac. Agri., Iwate Univ.,³Present Address: Akita Res. Inst., Food and Brew.,⁴Dept. Pathophysiol. and Metab., Kawasaki Med. Univ.,⁵Agri-Innov. Cent., Iwate Univ.)
雑誌名 : *Plant Ecophysiology and Adaptation under Climate Change: Mechanisms and Perspectives I*, (Mirza Hasanuzzaman, eds), p343-371, SpringerLink.
https://doi.org/10.1007/978-981-15-2156-0_12

4) 論文題名 : Molecular Cloning and Heterologous Expression of Manganese(II)-Oxidizing Enzyme from *Acremonium strictum* Strain KR21-2

著者名 : Fuyumi Tojo¹, Ayumi Kitayama², Naoyuki Miyata², Kunihiro Okano², Jun Fukushima³, Ryuichiro Suzuki⁴ and Yukinori Tani⁵ (¹Akita Res. Inst. Food and Brew.,²Dept. Biol. Env., Akita Pref. Univ.,³Dept. Biotech., Akita Pref. Univ.,⁴Dept. Biol. Prod., Akita Pref. Univ.,⁵Dept. Env. Health Sci., Grad. Sch. Nutr. Env. Sci., Univ. Shizuoka)
雑誌名 : *Catalysts*, **10** (6), 686 (2020) Open Access.
<https://doi.org/10.3390/catal10060686>

5) 論文題名 : Degradation of mitochondrial alternative oxidase in the appendices of *Arum maculatum*

著者名 : Kikukatsu Ito¹⁻³, Takafumi Ogata¹, Takanari Seito¹, Yui Umekawa³, #, Yusuke Kakizaki³, Hiroshi Osada⁴, and Anthony L. Moore⁵ (¹Fac. Agri., Iwate Univ.,²Agri-Innov. Cent., Iwate Univ.,³United Grad. Sch. Agri. Sci., Iwate Univ.,⁴Fac. Sci. and Engineer., Iwate Univ.,⁵Sch. Life Sci., Univ. Sussex, U.K., #Present Address: Akita Res. Inst. Food and Brew.)
雑誌名 : *Biochemical Journal*, **477**, 3417-3431.

<https://doi.org/10.1042/BCJ20200515>

6) 論文題名 : 秋田県における保健機能食品開発: 栄養機能食品としてのエゴマ種子油

「翡翠®」

著者名 : 戸松さやか¹、加藤咲子²、若泉裕明²、佐々木玲¹、畠恵司¹

(¹秋田県総食研、²東商事(株))

雑誌名 : *New Food Industry*, **62**, 791-795.

7) 論文題名 : 未利用資源の秋田スギ葉をボタニカルに用いたクラフトジンの開発

著者名 : 杉本勇人¹、進藤昌¹、野下浩二²、上松仁³

(¹秋田県総食研、²秋田県大、³秋田高専)

雑誌名 : 月刊フードケミカル, **36** (11), 102-106 (2020).

8) 論文題名 : **Plasma lipoprotein profile from nonalcoholic steatohepatitis model rats**

著者名 : Gen Toshima¹, Takanobu Kikuchi¹, Haruna Ohru¹, Fumiko Kimura¹, Shiho Nakagawa¹, Akira Sasaki², Kazuyuki Hiwatashi², Keishi Hata², and Junichiro Takahashi¹

(¹Skylight Biotech, Inc., ²Akita Res. Inst. Food and Brew.)

雑誌名 : *Biomedical Research*, **41**, 289–293.

<https://doi.org/10.2220/biomedres.41.289>

9) 論文題名 : **Anti-dyslipidemic effects of water extract from the leaves of *Petasites japonicus* subsp. *giganteus* (Akitabuki)**

著者名 : Gen Toshima¹, Takanobu Kikuchi¹, Yuka Iwama¹, Haruna Ohru¹, Fumiko Kimura¹, Shiho Nakagawa¹, Akira Sasaki², Kazuyuki Hiwatashi², Keishi Hata², Junichiro Takahashi¹

(¹Skylight Biotech, Inc., ²Akita Res. Inst. Food and Brew.)

雑誌名 : *Journal of Biological Macromolecules*, **21**, 33–44.

<https://doi.org/10.14533/jbm.21.33>

10) 論文題名 : **PXB-cells, fresh primary hepatocytes from humanized mouse livers, exhibit nonalcoholic fatty liver like properties, including large very low density lipoprotein**

著者名 : Sayaka Tomatsu¹, Masaki Takahashi², Masakazu Kakuni², Gen Toshima³, Fumiko Kimura³, Junichiro Takahashi³, Yui Umekawa¹, Akira Sasaki¹, Keishi Hata¹

(¹Akita Res. Inst. Food and Brew., ²PhoenixBio Co., Ltd., ³Skylight Biotech, Inc.)

雑誌名 : *Journal of Biological Macromolecules*, **21**, 51–52.

<https://doi.org/10.14533/jbm.21.51>

1) 論文題名：「潤彩小町」摂取による健康および皮膚状態に与える影響の性別・年代別の違い

著者名：戸松さやか¹、高嶋亜希子²、佐野宗孝²、成田琢磨³、梅川結¹、須藤あさみ¹、
 畠恵司¹（¹秋田県総食研、²（株）サノ、³あきた東内科クリニック）

雑誌名：New Food Industry, **62**, 237-243.

発行日：2020年4月1日

要旨：秋田県の北西部に位置する三種町では、減反政策の転作作物としてスイレン科の水生物であるジュンサイ (*Brasenia schreberi*) 作付けが奨励され、同町は日本一の産地として知られるまでに至った。舟に乗り、手摘みで収穫する風景は、観光資源として地域おこしの要でもある。また、秋田県は全国有数の清酒製造が盛んで、副産物の酒粕も多量に産出される。我々は、秋田県産特産物であるジュンサイの腸内環境正常化作用と、酒粕に含まれるレジスタントタンパク質に着目し、ジュンサイエキスと酒粕乾燥粉末からなる便通改善用途のサプリメントを開発した（商品名：潤彩小町®）。「潤彩小町®」の機能性については、健康な成人女性を対象としたプラセボ対照二重盲検やオープン試験を行い、便通改善作用と美肌作用を独自に検証した。さらに4カ月以上の定期購入者を対象に後ろ向きのアンケート試験を実施し、便通改善や肌の乾燥、毛穴の引き締めといった肌状態改善効果が、「潤彩小町®」の主な購入目的であることを明らかにした。

しかしながら、健常男性に対する「潤彩小町®」の有用性や、年代毎の作用の違いについては不明な点が多い。そこで本研究では、20代から50代の健康な男女117名を対象に、「潤彩小町®」による健康状態および肌状態改善効果を調べ、性別、年代毎にどのような違いが認められるかを検討した。

2) 論文題名：ネギ (*Allium fistulosum* L.) エキス摂取による高齢者の健康状態改善効果

著者名：高嶋亜希子¹、佐野宗孝¹、成田琢磨²、熊谷昌則³、 畠恵司³

（¹（株）サノ、²あきた東内科クリニック、³秋田県総食研）

雑誌名：New Food Industry, **62**, 325-330.

発行日：2020年5月1日

要旨：感染や炎症により粘り気の増した痰は気道にとどまりやすく、炎症をさらに悪化させるため、スムーズな排痰は気道内感染予防や肺泡を無菌状態に保つ観点からも重要である。

“体力の低下”や“寝たきり状態”が原因で、自力での排痰や痰の飲みこみが困難となった高齢者にとって、粘り気が増した痰は、より排出しづらく、上気道炎、気管支炎、肺炎などの感染症の原因となるほか、最悪、窒息や呼吸困難に至るケースもある。痰の粘性成分は、気道上皮組織から分泌されるムチンと呼ばれる糖タンパク質である。去痰薬として処方されるカルボシステイン (*S*-carboxymethyl-L-cysteine) は、気道炎症時のムチン過剰産生を正常化することで痰の粘り気を抑え、排出しやすくする。我々はこれまでNCI-H292ヒト気道上皮細胞（ヒト気道上皮細胞）におけるムチン産生測定系を構築し、ムチン産生抑制作用、即ち去痰作用のある食品素材の探索を行った。その過程で、ネギ (*Allium fistulosum* L.) 抽出物に、ヒト気道上皮細胞におけるムチン過剰産生を抑制することを見出した。国内で生産されるネギ 46.5万トン（平成28年度産）のおよそ2.7%にあたる1.2万トンが秋田県内で生産されている。収穫されたネギのうち3割程度が、歪みが生じた形状のもの、切断により不均一な長さになったものとして出荷されずに廃棄されるため、この規格外品の有効活用は急務である。ネギの

生理活性機能については、抗酸化、抗糖化作用あるいは抗腫瘍活性など幾つかの先行研究例がある。日本ではネギは伝統的に風邪に良いとされ、事実、ネギに含まれるフルクタンの抗インフルエンザAウイルス活性が報告されている。しかしながら、我々が見出したネギの去痰作用に関しては知見がなかったため、高齢者食市場というあらたな販路開拓を目的に研究を進めた。

本研究では、60～74歳の健常高齢者を対象に、ネギエキスの去痰作用を含む健康状態改善効果を検討した結果を報告する。

3) 論文題名 : High-Temperature Tolerance of Flowers

著者名 : Satisha Hegde¹, Yui Umekawa^{2,3}, Etsuko Watanabe^{2,4}, Ichiro Kasajima⁵

(¹Dr. Prabhakar Kore Basic Sci. Res. Cent., KLE Acad. High. Edu. and Res., India,

²Cryobio. Res. Cent., Fac. Agri., Iwate Univ., ³Present Address: Akita Res. Inst

Food and Brew., ⁴Dept. Pathophysiol. and Metab., Kawasaki Med. Univ., ⁵Agri-Innov.

Cent., Iwate Univ.)

雑誌名 : Plant Ecophysiology and Adaptation under Climate Change: Mechanisms and Perspectives I, (Mirza Hasanuzzaman, eds), p343-371, SpringerLink.

https://doi.org/10.1007/978-981-15-2156-0_12

発行日 : 2020年6月2日

要旨 : Similar to the other crops, production of floricultural plants (crops for ornamental purposes) is susceptible to high temperature. High temperature changes flowering time, causing problems in the schedule of shipment to the market. Consistent with the idea of plant adaptation to climate, induction of long-day spring flowers (*Arabidopsis*/thale cress) is accelerated by high temperature, whereas induction of short-day autumn flowers (*chrysanthemum*) is delayed by high temperature. High temperature also reduces flower size and causes paler petal colors (e.g. *chrysanthemum*, rose, and *Eustoma*) and fruit skin colors (e.g. grape and apple), thus decreasing the quality of flowers and fruits. The reasons for high-temperature caused disorders are not necessarily clear, but high temperature influences part of gene expressions involved in flowering time (FT, Flowering Locus T) and pigment synthesis (such as CHS, chalcone synthase). High-temperature-tolerant cultivars are identified or selected in floricultural and pomological (fruit) crops. High-temperature effects could be alternatively attenuated by shading or supplementation of magnesium. Heat is sometimes required for flowers: some plant species generate heat in flowers by themselves. Petal color affects flower temperature. Relationships between flower and heat in these various aspects are illustrated by photographs and illustrations of the representative studies in this research field.

4) 論文題名 : Molecular Cloning and Heterologous Expression of Manganese(II)-Oxidizing Enzyme from *Acremonium strictum* Strain KR21-2

著者名 : Fuyumi Tojo¹, Ayumi Kitayama², Naoyuki Miyata², Kunihiro Okano², Jun Fukushima³, Ryuichiro Suzuki⁴ and Yukinori Tani⁵ (¹Akita Res. Inst. Food and Brew., ²Dept. Biol. Env., Akita Pref. Univ., ³Dept. Biotech., Akita Pref. Univ., ⁴Dept. Biol. Prod., Akita Pref. Univ., ⁵Dept. Env. Health Sci., Grad. Sch. Nutr. Env. Sci., Univ. Shizuoka)

雑誌名 : *Catalysts*, **10** (6), 686 (2020) Open Access.

<https://doi.org/10.3390/catal10060686>

発行日 : 2020 年 6 月 18 日

要約 : Diverse ascomycete fungi oxidize manganese(II) [Mn(II)] and produce Mn(III, IV) oxides in terrestrial and freshwater environments. Although multicopper oxidase (MCO) is considered to be a key catalyst in mediating Mn(II) oxidation in ascomycetes, the responsible gene and its product have not been identified. In this study, a gene, named *mcoI*, encoding Mn(II)-oxidizing MCO from *Acremonium strictum* strain KR21-2 was cloned and heterologously expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Based on the phylogenetic relationship, similarity of putative copper-binding motifs, and homology modeling, the gene product McoI was assigned to a bilirubin oxidase. Mature McoI was predicted to be composed of 565 amino acids with a molecular mass of 64.0 kDa. The recombinant enzyme oxidized Mn(II) to yield spherical Mn oxides, several micrometers in diameter. Zinc(II) ions added to the reaction mixture were incorporated by the Mn oxides at a Zn/Mn molar ratio of 0.36. The results suggested that McoI facilitates the growth of the micrometer-sized Mn oxides and affects metal sequestration through Mn(II) oxidation. This is the first report on heterologous expression and identification of the Mn(II) oxidase enzyme in Mn(II)-oxidizing ascomycetes. The cell-free, homogenous catalytic system with recombinant McoI could be useful for understanding Mn biomineralization by ascomycetes and the sequestration of metal ions in the environment

5) 論文題名 : **Degradation of mitochondrial alternative oxidase in the appendices of *Arum maculatum***

著者名 : Kikukatsu Ito¹⁻³, Takafumi Ogata¹, Takanari Seito¹, Yui Umekawa^{3, #}, Yusuke Kakizaki³, Hiroshi Osada⁴, and Anthony L. Moore⁵ (¹Fac. Agri., Iwate Univ., ²Agri-Innov. Cent., Iwate Univ., ³United Grad. Sch. Agri. Sci., Iwate Univ., ⁴Fac. Sci. and Engineer., Iwate Univ., ⁵Sch. Life Sci., Univ. Sussex, U.K., [#]Present Address: Akita Res. Inst. Food and Brew.)

雑誌名 : *Biochemical Journal*, **477**, 3417-3431.

<https://doi.org/10.1042/BCJ20200515>

発行日 : 2020 年 8 月 28 日

要旨 : Cyanide-resistant alternative oxidase (AOX) is a nuclear-encoded quinol oxidase located in the inner mitochondrial membrane. Although the quality control of AOX proteins is expected to have a role in elevated respiration in mitochondria, it remains unclear whether thermogenic plants possess molecular mechanisms for the mitochondrial degradation of AOX. To better understand the mechanism of AOX turnover in mitochondria, we performed a series of in organelle AOX degradation assays using mitochondria from various stages of the appendices of *Arum maculatum*. Our analyses clearly indicated that AOX proteins at certain stages in the appendices are degraded at 30°C, which is close to the maximum appendix temperature observed during thermogenesis. Interestingly, such temperature-dependent protease activities were specifically inhibited by E-64, a cysteine protease inhibitor. Moreover, purification and subsequent nano LC-MS/MS analyses of E-64-sensitive and DCG-04-labeled active mitochondrial protease revealed an ~30 kDa protein with an identical partial peptide

sequence to the cysteine protease 1-like protein from *Phoenix dactylifera*. Our data collectively suggest that AOX is a potential target for temperature-dependent E-64-sensitive cysteine protease in the appendices of *A. maculatum*. A possible retrograde signaling cascade mediated by specific degradation of AOX proteins and its physiological significance are discussed.

6) 論文題名：秋田県における保健機能食品開発：栄養機能食品としてのエゴマ種子油「翡翠®」

著者名：戸松さやか¹、加藤咲子²、若泉裕明²、佐々木玲¹、畠恵司¹

(¹秋田県総食研、²東商事(株))

雑誌名：New Food Industry, **62**, 791-795.

発行日：2020年11月1日

要旨：エゴマ (*Perilla frutescens var. japonica* Hara) はシソ科の1年草で、種子は和え物、ふりかけ、薬味などに利用されてきた。エゴマ種子は46~50%の乾性油を含み、食用以外にも灯明油ならびに油紙、雨傘、提灯などの防水加工や、ペイントなどの原料として用いられてきたが、不飽和度が高いため、酸化劣化しやすく、食味変化が大きいことから、食用としての用途が限られてきた。一般的な食用油は、オレイン酸やリノール酸を多く含み、n-3系脂肪酸である α -リノレン酸含量が10%以下であるため、 α -リノレン酸を60%前後含むエゴマ種子油は特徴的な脂肪酸組成と言える。n-3系脂肪酸はヒトの体内で合成できないため、食事として摂取しなければならず、不足すると欠乏症—特に、鱗状皮膚炎、出血性皮膚炎、結節性皮膚炎などの皮膚疾患—を引き起こす。そのため、n-3系脂肪酸は必須脂肪酸と呼ばれ、2015年度に栄養機能食品として追加された成分である。従って、n-3系脂肪酸を含む食品は、基準を満たせば、皮膚の健康維持を助ける栄養素と表示可能である。

東商事(株)は2018年から秋田県大仙市協和で収穫されたエゴマ種子や葉から、「えごま麺」や「えごま味噌」などの加工食品の販売を手がけてきた。さらに、「六次産業化・地産地消法」に基づく総合化事業計画の認定を受け、自社搾油所で搾油を開始し、2019年5月に食用エゴマ油を商品化した(商品名:「翡翠®」)。エゴマ種子油は、産地ごとに香りや味わいが異なる。現在は、秋田県内4地域毎に収穫したエゴマ種子を使用した「翡翠」4種類を販売している。本稿では、エゴマ種子油「翡翠」の栄養機能食品としてリニューアル商品化と、購入者にアンケートを実施し、購入理由や使用方法、満足度を調査した結果を報告する。

7) 論文題名：未利用資源の秋田スギ葉をボタニカルに用いたクラフトジンの開発

著者名：杉本勇人¹、進藤昌¹、野下浩二²、上松仁³

(¹秋田県総食研、²秋田県大、³秋田高専)

雑誌名：月刊フードケミカル, **36** (11), 102-106 (2020).

発行日：2020年11月1日

要旨：秋田ブランドを世界に発信し、秋田県の経済の活性化や未利用資源であるスギ葉を有効活用するために、秋田スギ葉の香りの商品化を考えた。秋田スギ葉のエタノール蒸溜液の香り成分はリラックス度を向上させる効果が高いと推察され、この効果は秋田スギのブランドの増強に貢献することが期待できる。秋田スギ葉で香付けしたエタノール蒸溜液がジンの

香りに似ていることから、スギ葉をアルコールに浸漬し、蒸溜して得られたサンプルの香り成分を GC-MS で分析した。その結果、ジュニパーペリーの香りを安価なスギ葉で代用できることが示唆された。この分析結果を基に作成した 3 種類の香りサンプルをさまざまな比率でブレンドし、その最適な比率から、ジュニパーペリーの一部をスギ葉で代替し、コリアンダーシードの比率を上げて、ジン製造試験した。これにより、ボタニカルとボタニカルの間でスギ葉が香り、森林浴をしているかのような癒しを感じるクラフトジンとなった。

8) 論文題名 : **Plasma lipoprotein profile from nonalcoholic steatohepatitis model rats**

著者名 : Gen Toshima¹, Takanobu Kikuchi¹, Haruna Ohrui¹, Fumiko Kimura¹, Shiho Nakagawa¹, Akira Sasaki², Kazuyuki Hiwatashi², Keishi Hata², and Junichiro Takahashi¹ (¹Skylight Biotech, Inc., ²Akita Res. Inst. Food and Brew.)

雑誌名 : *Biomedical Research*, **41**, 289–293.

<https://doi.org/10.2220/biomedres.41.289>

発行日 : 2020 年 12 月 1 日

要旨 : We recently revealed that increases in particle sizes of very-low-density lipoproteins (VLDL) are highly correlated with the progression of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD)/nonalcoholic steatohepatitis (NASH), and VLDL particle size may be a minimally invasive indicator of these hepatic disorders. Methionine and choline-deficient (MCD) diet fed animals are usually used as a NASH model; however, the application of this minimally invasive biomarker in MCD diet fed animals remains unclear. In the present study, we measured the levels of liver disease markers and plasma lipoprotein profiles in MCD diet fed rats, and compared them with those of normal diet fed rats. Assessing lipoprotein profiles showed marked increases in VLDL particle sizes in MCD diet fed rats with pathologically and biochemically NASH-like features.

9) 論文題名 : **Anti-dyslipidemic effects of water extract from the leaves of *Petasites japonicus* subsp. *giganteus* (Akitabuki)**

著者名 : Gen Toshima¹, Takanobu Kikuchi¹, Yuka Iwama¹, Haruna Ohrui¹, Fumiko Kimura¹, Shiho Nakagawa¹, Akira Sasaki², Kazuyuki Hiwatashi², Keishi Hata², Junichiro Takahashi¹ (¹Skylight Biotech, Inc., ²Akita Res. Inst. Food and Brew.)

雑誌名 : *Journal of Biological Macromolecules*, **21**, 33–44.

<https://doi.org/10.14533/jbm.21.33>

発行日 : 2021 年 1 月 20 日

要旨 : We studied the anti-dyslipidemic effects of *Petasites japonicus* subsp. *giganteus* (PJG) *in vitro* and *in vivo*. A water extract from the leaves of PJG (PJGL-WE) markedly inhibited lipoprotein production from Caco-2 human colonic carcinoma cells differentiated into intestinal epithelium-like cells and from HepG2 human hepatoma cells. We examined the effects of PJGL-WE on the expression of lipogenic enzymes in both cells at the mRNA level. As a result, PJGL-WE suppressed gene expression involved in transacylation, such as monoacylglycerol acyltransferase 2 and diacylglycerol acyltransferase 2; however, it did not affect enzymes involved in fatty acid synthesis. PJGL-WE also attenuated the expression of microsomal triglyceride transfer protein and apolipoprotein B100, elements

required for lipoprotein synthesis. Furthermore, we studied the actions of PJGL-WE on adipose tissue accumulation, intrahepatic lipid content, and plasma parameters *in vivo*. PJGL-WE suppressed mesenteric adipose tissue accumulation and normalized intrahepatic triglyceride content and plasma triglyceride levels in mice fed a high-fat diet. These findings suggested that PJGL-WE attenuated the expression of genes required for lipid and lipoprotein synthesis, thereby suppressing lipid absorption from the small intestine, and participating in the improvement of fatty liver and normalization of plasma triglyceride levels.

1 0) 論文題名 : PXB-cells, fresh primary hepatocytes from humanized mouse livers, exhibit nonalcoholic fatty liver like properties, including large very low density lipoprotein

著者名 : Sayaka Tomatsu¹, Masaki Takahashi², Masakazu Kakuni², Gen Toshima³, Fumiko Kimura³, Junichiro Takahashi³, Yui Umekawa¹, Akira Sasaki¹, Keishi Hata¹

(¹Akita Res. Inst. Food and Brew., ²PhoenixBio Co., Ltd., ³Skylight Biotech, Inc.)

雑誌名 : *Journal of Biological Macromolecules*, **21**, 51–52.

<https://doi.org/10.14533/jbm.21.51>

発行日 : 2021 年 1 月 20 日

要旨 : We previously examined lipoprotein profile in PXB-cells, fresh primary human hepatocytes from humanized mouse livers, and demonstrated that they are suitable for screening anti-lipidemic agents. The accumulation of numerous oil droplets — a hallmark of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) — was observed in PXB-cells immediately after their isolation from humanized murine livers 16 weeks after transplantation, but markedly decreased in an *in vitro* culture of more than 10 days. Some studies demonstrated that the size of very low-density lipoproteins (VLDL) in the plasma of patients NAFLD or non-alcoholic steatohepatitis significantly increased, suggesting that increases in the size of VLDL have potential as a minimally invasive biomarker for the diagnosis and/or progression of NAFLD.

To clarify whether hepatocytes with numerous oil droplets secrete larger size of VLDL, we investigated intra- and extracellular lipid levels and lipoprotein profiles of PXB-cells isolated at several post-transplantation durations, which seem to be closely related to cytosolic oil droplet accumulations. As the results, intracellular triglyceride levels and the particle size of VLDL of PXB-cells markedly increased with longer post-transplantation durations. These results suggest that the post-transplantation duration affects intracellular triglyceride levels in PXB-cells, and the accumulation of intracellular oil droplets may be associated with the size of VLDL secreted from cells. Increases in the size of VLDL have potential as a minimally invasive plasma biomarker for the diagnosis and/or progression of NAFLD.

6. 外部発表論文再掲載（4件）

1) 論文題名：**Plasma lipoprotein profile from nonalcoholic steatohepatitis model rats.**

著者名：Gen Toshima¹, Kazuyuki Hiwatashi², Junichiro Takahashi¹, Kikumi Ogihara³,
Yuko Naya³, Akira Sasaki², Keishi Hata² (¹Skylight Biotech Inc., ²Akita Res.
Inst Food & Brew., ³School Environ. Sci. Azabu Univ.)

雑誌名：Biomedical Research (Tokyo) **41**(6), 289-293 (2020)

<https://doi.org/10.2220/biomedres.41.289>

発行日：2020年12月1日

2) 論文題名：「潤彩小町」摂取による健康および皮膚状態に与える影響の性別・年代別の 違い

著者名：戸松さやか¹、高嶋亜希子²、佐野宗孝²、成田琢磨³、梅川結¹、須藤あさみ¹、
畠恵司¹ (¹秋田県総食研、²(株)サノ、³あきた東内科クリニック)

雑誌名：*New Food Industry*, **62**, 237-243.

発行日：2020年4月1日

3) 論文題名：ネギ (*Allium fistulosum* L.) エキス摂取による高齢者の健康状態改善効果

著者名：高嶋亜希子¹、佐野宗孝¹、成田琢磨²、熊谷昌則³、畠恵司³
(¹(株)サノ、²あきた東内科クリニック、³秋田県総食研)

雑誌名：*New Food Industry*, **62**, 325-330.

発行日：2020年5月1日

4) 論文題名：秋田県における保健機能食品開発：栄養機能食品としてのエゴマ種子油 「翡翠®」

著者名：戸松さやか¹、加藤咲子²、若泉裕明²、佐々木玲¹、畠恵司¹
(¹秋田県総食研、²東商事(株))

雑誌名：*New Food Industry*, **62**, 791-795.

発行日：2020年11月1日

Plasma lipoprotein profile from nonalcoholic steatohepatitis model rats

Gen TOSHIMA^{1*}, Kazuyuki HIWATASHI^{2*}, Junichiro TAKAHASHI¹, Kikumi OGIHARA³, Yuko NAYA³, Akira SASAKI², and Keishi HATA²

¹ Skylight Biotech Inc., 100-4 Sunada, Iijima, Akita 011-0911, Japan; ² Akita Research Institute of Food & Brewing, 4-26 Sanuki, Araya-machi, Akita 010-1623, Japan; and ³ Azabu University, School of Life and Environmental Science, Azabu University, 1-17-71 Fuchinobe, Chuo-ku, Sagami-hara, Kanagawa 252-5201, Japan

(Received 5 October 2020; and accepted 22 October 2020)

ABSTRACT

We recently revealed that increases in particle sizes of very-low-density lipoproteins (VLDL) are highly correlated with the progression of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD)/nonalcoholic steatohepatitis (NASH), and VLDL particle size may be a minimally invasive indicator of these hepatic disorders. Methionine and choline-deficient (MCD) diet fed animals are usually used as a NASH model; however, the application of this minimally invasive biomarker in MCD diet fed animals remains unclear. In the present study, we measured the levels of liver disease markers and plasma lipoprotein profiles in MCD diet fed rats, and compared them with those of normal diet fed rats. Assessing lipoprotein profiles showed marked increases in VLDL particle sizes in MCD diet fed rats with pathologically and biochemically NASH-like features.

Excessive intake of dietary sugars and lipids, such as cholesterol and triglycerides, causes visceral fat accumulation leading to metabolic syndrome, which includes glucose intolerance, hypertension, dyslipidemia, and obesity. Nonalcoholic fatty liver in itself is not a serious disease, but progression to nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD)/nonalcoholic steatohepatitis (NASH) from nonalcoholic fatty liver leads to hepatic cirrhosis or hepatocellular carcinoma without appropriate care. The development of minimally invasive single blood biomarkers is important in drug discovery as well as those of *in vitro* or *in vivo* assay systems; however, there have been no fully validated biomarkers selective for NAFLD/NASH.

Some studies have revealed that increases in large very-low-density lipoproteins (VLDL) are highly correlated with the progression of NAFLD/NASH (Fujita *et al.* 2009; Rinella and Sanyal 2015), and more recently, we demonstrated that human primary

hepatocytes with numerous oil droplets, a hallmark of NAFLD, produce larger sized VLDL than normal hepatocytes (Tomatsu *et al.* in press). Methionine and choline-deficient (MCD) diet is found to cause some features of steatohepatitis such as hepatic lipid depositions and fibrosis; however, it remains unclear whether VLDL particle size is useful as a plasma biomarker of the NAFLD/NASH model animal induced by continuous MCD diet feeding (Zhong *et al.* 2020). In this study, we evaluated lipoprotein profiles in MCD diet fed rats, and investigated whether VLDL particle sizes were also useful as minimally invasive indicators for induced NASH-like experimental animals.

Animal experiments were carried out at the Animal Research Laboratory, Bioscience Education and Research Center, Akita University (Akita, Japan) and NASH model rats were prepared as follows. Sprague-Dawley (SD) rats (6-week-old males) were purchased from CLEA Japan (Tokyo, Japan). They were housed in groups of 4 or 5 in wire-topped, polycarbonate cages with wood shavings for bedding in a room at a constant temperature (23 ± 2°C)

Address correspondence to: Gen Toshima, Skylight Biotech Inc., 100-4 Sunada, Iijima, Akita 011-0911, Japan
Tel: +81-18-880-5060, Fax: +81-18-880-5061
E-mail: gtoshima@skylight-biotech.com

*These authors equally contributed to this study.

Table 1 Body and liver weights, food intake, and intrahepatic lipid levels in the control and MCD groups

	Control group	MCD group	<i>P</i> -value
Food intake (g/day/head)	30.0	6.0	–
Energy intake (kcal/day/head)	103.0	25.0	–
Body weight (g/head)	581.9 ± 57.2	201.1 ± 16.2	< 0.001
Body weight gain (g/day/head)	5.4 ± 0.7	0.3 ± 0.1	< 0.001
Liver weight (g/head)	14.0 ± 0.8	9.5 ± 0.3	< 0.001
Liver weight/100 g body weight (g/head)	2.5 ± 0.4	4.8 ± 0.6	< 0.001
Intrahepatic lipid contents			
Cholesterol (mg/g tissue)	2.4 ± 0.3	7.4 ± 1.4	< 0.001
Triglycerides (mg/g tissue)	12.9 ± 7.3	180.9 ± 31.0	< 0.001

and humidity (50 ± 10%) with a 12/12 h light–dark cycle (lights on at 7.00 am). They had free access to fresh diet and sterile drinking water during the experimental period. They were fed normal diet (CE-7; CLEA Japan, Tokyo, Japan) for the first 1 week, and divided into 2 groups: a normal diet fed group (control group, *n* = 7) and an MCD diet (A02082002B; Research Diets Inc., New Brunswick, NJ, USA) fed group (MCD group, *n* = 7). The control and MCD groups were administered normal diet or MCD diet, respectively, for 10 consecutive weeks, then both groups were fed normal diet for another 1 week. Food intake was recorded every 2 or 3 days, and body weights were measured every week. At the end of the experimental period, rats were sacrificed under light isoflurane anesthesia after 16 h of fasting. Blood was collected from the abdominal aorta, and the heparinized plasma obtained was stored at –80°C for later analysis. Livers were excised and weighed. Animal experimentation protocols were previously approved by the Animal Research Committee, Akita University (approval number: a-1-2638). The entire experiment closely followed the University's Regulations for Animal Experimentation, which are in strict accordance with government legislation in Japan.

The liver specimens were fixed in 4% paraformaldehyde for microscopic photographs. After sectioning, thin tissue sections were observed by a microscopy with hematoxylin and eosin and Azan-Mallory staining. Liver tissues were homogenized in chloroform/methanol (2 : 1, v/v), and lipid extracts were prepared using the Folch method (Folch *et al.* 1957). Intrahepatic cholesterol and triglycerides levels were measured using enzymatic assay kits Cholestest CHO and Cholestest TG (Sekisui Medical, Tokyo, Japan), respectively. Plasma hyaluronan concentration was determined using a Hyaluronan Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, Abingdon, United Kingdom) in according to the manufacturer's instructions.

Plasma levels of albumin, alanine transaminase, aspartate transaminase, γ -glutamyl transferase, and glucose were measured using an automatic analyzer (FUJI DRI-CHEM 3500V; FUJIFILM, Tokyo, Japan). Plasma non-esterified fatty acids were measured using enzymatic methods (NEFA C-Test Wako; Wako Pure Chemicals, Osaka, Japan). The cholesterol and triglyceride profiles in plasma lipoproteins were analyzed using a gel-permeation HPLC method (LipoSEARCH[®]; Skylight Biotech, Akita, Japan) (Usui *et al.* 2002; Toshima *et al.* 2013). The particle sizes of each lipoprotein were determined using the retention times of the peaks observed on a chromatogram with a linear calibration curve (Usui *et al.* 2000). Cholesterol and triglyceride levels of the major classes of lipoproteins were defined using component peak analyses on the basis of lipoprotein particle sizes with the Gaussian curve fitting technique (Okazaki *et al.* 2005, 2006). Data are expressed as means ± standard deviation (*n* = 7). The significance of differences was analyzed using the Mann–Whitney U-test (BellCurve for Excel, Social Survey Research Information), and significant differences are set at <5%.

Table 1 summarizes body and liver weights, and intrahepatic lipid levels. Food intake of MCD diet fed rats was reduced and body weight slightly increased during the experimental periods. This phenomenon is a characteristic of MCD diet feeding (Canet *et al.* 2014; Yalcin *et al.* 2014), and is presumed to be a growth disorder due to a decrease in cell membrane phospholipid synthesis. The body weight of the MCD group was lower than that of control group, but the liver-to-body weight ratio of the MCD group was 1.9-fold higher than that of the control group. MCD fed rats showed significantly high levels of alanine transaminase and γ -glutamyl transferase, which are liver injury markers, and a significantly low level of albumin (hepatic functional marker) (Table 2). Furthermore, we found some

Table 2 Plasma levels of liver injury and functional markers in the control and MCD groups

	Control group	MCD group	P-value
Albumin (g/dL)	4.0 ± 0.3	3.5 ± 0.2	0.008
Alanine transaminase (U/L)	30.0 ± 20.1	41.7 ± 8.3	0.047
Aspartate transaminase (U/L)	66.6 ± 23.0	63.0 ± 9.7	0.654
γ-Glutamyl transferase (U/L)	3.4 ± 0.8	5.1 ± 1.2	0.017

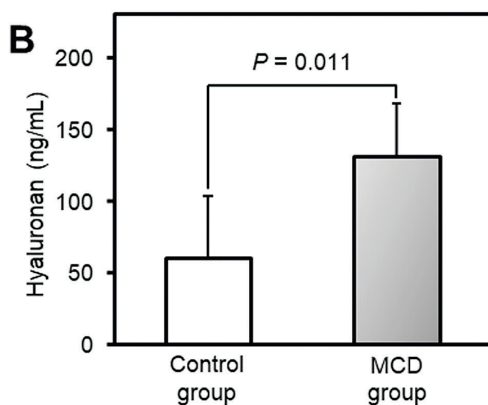
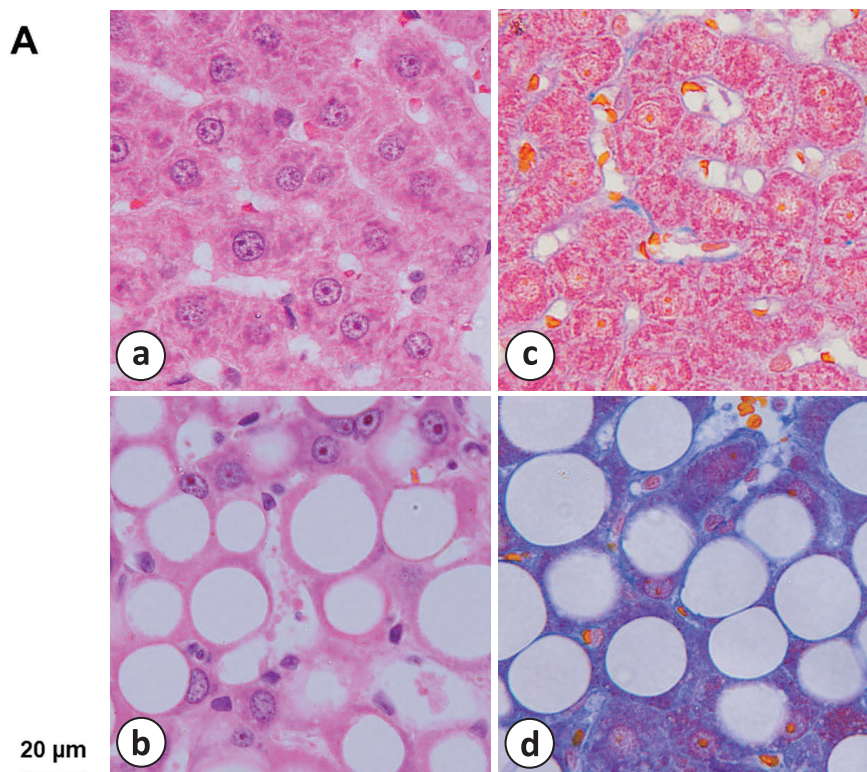


Fig. 1 Induction of NASH in MCD diet fed rats. **A:** Hematoxylin and eosin staining and Azan-Mallory staining of control (a and c) and MCD groups (b and d) were shown. NOTE: centrilobular severe fatty degeneration (b) and fibrosis progression stained blue around the cells (d) were observed in the MCD group. **B:** Plasma levels of hyaluronan in the control and MCD groups.

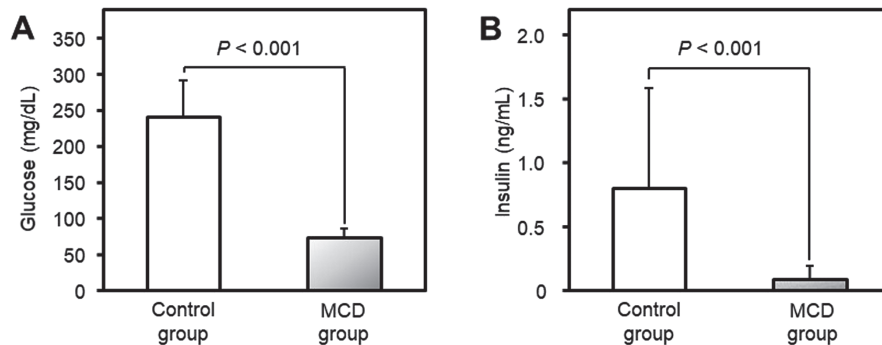
features of NAFLD/NASH in the MCD group in comparison with the control group in terms of macrovesicular lipid accumulation and fibrosis in liver

tissues (Fig. 1A), increase in plasma hyaluronan (2.2-fold) (Fig. 1B), which is a hallmark of fibrosis in chronic liver diseases (Orasan *et al.* 2016), and

Table 3 Cholesterol and triglyceride contents in major classes of lipoprotein and plasma non-esterified fatty acid levels in the control and MCD groups

	Control group	MCD group	<i>P</i> -value
Cholesterol (mg/dL)			
Total	56.6 ± 7.1	66.7 ± 10.0	0.259
Chylomicron	0.2 ± 0.1	1.0 ± 0.4	< 0.001
VLDL	5.1 ± 1.7	8.8 ± 1.8	0.007
LDL	11.3 ± 3.3	16.9 ± 2.8	0.017
HDL	39.9 ± 4.3	40.1 ± 6.8	1.000
Triglycerides (mg/dL)			
Total	75.7 ± 25.4	120.2 ± 25.2	0.011
Chylomicron	2.5 ± 1.4	12.7 ± 5.3	< 0.001
VLDL	61.5 ± 24.4	88.3 ± 21.0	0.026
LDL	9.6 ± 2.1	15.0 ± 0.8	< 0.001
HDL	2.2 ± 0.4	4.2 ± 1.1	< 0.001
VLDL particle size (diameter, nm)	44.3 ± 2.3	51.3 ± 0.9	< 0.001
Non-esterified fatty acid (mEq/L)	0.6 ± 0.2	1.2 ± 0.3	< 0.001

VLDL particle sizes were determined using LipoSEARCH[®] analysis results from triglycerides chromatograms in both groups. Abbreviations: VLDL, very-low-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; HDL, high-density lipoprotein

**Fig. 2** Plasma levels of glucose (A) and insulin (B) in the control and MCD groups.

intrahepatic cholesterol (3.1-fold) and triglycerides (14.0-fold) (Table 1). These results suggested that continuous MCD diet feeding resulted in NAFLD/NASH features, and we studied this model rats to search for plasma biomarkers for NAFLD/NASH.

LipoSEARCH[®] and enzymatic assay showed that cholesterol and triglyceride levels in chylomicron, VLDL, and low-density lipoprotein in MCD diet fed rats were higher than those of the control group, and plasma non-esterified fatty acids in the MCD group increased. Furthermore, the lipoprotein profile showed an increase in VLDL particle size in MCD diet fed rats as we expected (Table 3). However, plasma glucose and insulin levels were lower in the MCD group than in the control group (Fig. 2). Large VLDL overproduction is thought to be upregulated by metabolic syndrome events such as fatty liver or dyslipoproteinemia of insulin resistance and type 2 diabetes

(Adiels *et al.* 2006, 2008). These results suggested that increases in VLDL particle size in MCD diet fed rats are probably due to hyperaccumulation of hepatic oil droplets but not insulin resistance and type 2 diabetes.

In the present study, we firstly demonstrated that continuous MCD diet feeding increased not only plasma lipoprotein levels but also VLDL particle size in rats with NASH-like features, and these findings agreed with those in NAFLD/NASH patients and NAFLD-like hepatocytes. Further investigations are required to clarify relationships between progressions of NAFLD/NASH and increase in VLDL size; however, measurement of VLDL particle size may be a useful tool for accessing anti-NAFLD/NASH agents using MCD diet fed experimental animals.

CONFLICT OF INTEREST

GT and JT are employees of Skylight Biotech Inc., KH, KO, YN, AS and KH have no conflicts of interest.

REFERENCES

- Adiels M, Olofsson S-O, Taskinen M-R and Borén J (2008) Overproduction of very low-density lipoproteins is the hallmark of the dyslipidemia in the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**, 1225–1236.
- Adiels M, Taskinen M-R, Packard C, Caslake MJ, Soro-Paavonen A, *et al.* (2006) Overproduction of large VLDL particles is driven by increased liver fat content in man. *Diabetologia* **49**, 755–765.
- Canet MJ, Hardwick RN, Lake AD, Dzierlenga AL, Clarke JD, *et al.* (2014) Modeling human nonalcoholic steatohepatitis-associated changes in drug transporter expression using experimental rodent models. *Drug Metab Dispos* **42**, 586–595.
- Folch J, Lees M and Stanley GHS (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* **226**, 497–509.
- Fujita K, Nozaki Y, Wada K, Yoneda M, Fujimoto Y, *et al.* (2009) Dysfunctional very-low-density lipoprotein synthesis and release is a key factor in nonalcoholic steatohepatitis pathogenesis. *Hepatology* **50**, 772–780.
- Okazaki M, Usui S, Fukui A, Kubota I and Tomoike H (2006) Component analysis of HPLC profiles of unique lipoprotein subclass cholesterol for detection of coronary artery disease. *Clin Chem* **52**, 2049–2053.
- Okazaki M, Usui S, Ishigami M, Sakai N, Nakamura T, *et al.* (2005) Identification of unique lipoprotein subclasses for visceral obesity by component analysis of cholesterol profile in high-performance liquid chromatography. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**, 578–584.
- Orasan OH, Ciulei G, Cozma A, Sava M and Dumitrascu DL (2016) Hyaluronic acid as a biomarker of fibrosis in chronic liver diseases of different etiologies. *Clujul Medical* **89**, 24–31.
- Rinella ME and Sanyal AJ (2015) Genetics, diagnostics and therapeutic advances in NAFLD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **12**, 65–66.
- Tomatsu S, Takahashi M, Kakuni M, Toshima G, Kimura F, *et al.* PXB-cells, fresh primary hepatocytes from humanized mouse livers, exhibit nonalcoholic fatty liver like properties, including large very low density lipoprotein. *J Biol Macromol*, in press.
- Toshima G, Iwama Y, Kimura F, Matsumoto Y, Miura M, *et al.* (2013) LipoSEARCH®; Analytical GP-HPLC method for lipoprotein profiling and its applications. *J Biol Macromol* **13**, 21–32.
- Usui S, Hara Y, Hosaki S and Okazaki M (2002) A new on-line dual enzymatic method for simultaneous quantification of cholesterol and triglycerides in lipoproteins by HPLC. *J Lipid Res* **43**, 805–814.
- Usui S, Nakamura M, Jitsukata K, Nara M, Hosaki S, *et al.* (2000) Assessment of between-instrument variations in a HPLC method for serum lipoproteins and its traceability to reference methods for total cholesterol and HDL-cholesterol. *Clin Chem* **46**, 63–72.
- Yalcin M, Akarsu M, Celik A, Sagol O, Tunali S, *et al.* (2014) A comparison of the effects of infliximab, adalimumab, and pentoxifylline on rats with non-alcoholic steatohepatitis. *Turk J Gastroenterol* **25**, 167–175.
- Zhong F, Zhou X, Xu J and Gao L (2020) Rodent models of nonalcoholic fatty liver disease. *Digestion* **101**, 522–535.

「潤彩小町」摂取による健康および皮膚状態に 与える影響の性別・年代別の違い

戸松 さやか (TOMATSU Sayaka)¹,
高嶋 亜希子 (TAKASHIMA Akiko)², 佐野 宗孝 (SANO Munetaka)², 成田 琢磨 (NARITA Takuma)³,
梅川 結 (UMEKAWA Yui)¹, 須藤 あさみ (SUTO Asami)¹, 畠 恵司 (HATA Keishi)¹

Key Words: ジュンサイ, 潤彩小町, 便通改善, 美肌作用

Effects of JUNSAIKOMACHI, a dietary supplement from water shield extract and sake cake powder, on heath and skin conditions in adult females and males of different ages

Sayaka Tomatsu¹, Akiko Takashima², Munetaka Sano², Takuma Narita³, Yui Umekawa¹, Asami Suto¹, Keishi Hata¹

Corresponding author: Sayaka Tomatsu¹ email: sayaka@arif.pref.akita.jp

Affiliated institutions:

¹Akita Research Institute of Food & Brewing, 4-26 Sanuki, Araya-machi, Akita 010-1623, Japan

²Sano Inc., 3-4-2 Oroshi-machi, Akita, 010-0061, Japan

³Akita-Higashi Medical Clinic, 50-1 Kondosekizoe, Hiroomote, Akita 010-0041, Japan

Key Words: water shield (*Brasenia schreberi*), JUNSAIKOMACHI, defecation frequency improvement, skin conditions

Abstract

Background and aims

We previously demonstrated that administration of a dietary supplement containing water shield (*Brasenia schreberi*) extract and sake cake dry powder (termed JUNSAIKOMACHI) increased the number of days with defecation and defecation frequency in female subjects compared with a placebo group. Furthermore, the skin condition of adult females was improved by JUNSAIKOMACHI in open-label trials. However, its effects in male subjects and differences in improvement with age remained unclear. In this study, we investigated the effects of JUNSAIKOMACHI on health and skin conditions in 117 healthy adult subjects in their 20s to 50s (55 females and 62 males) by open-label trials.

Methods

This clinical trial was performed in accordance with the 6th revision of the Declaration of Helsinki (2008). Subjects provided written informed consent and the study was approved by the ethics committee of Akita Research Institute of Food and Brewing (Approval No. H30-04), who played no role in the clinical trial. The clinical trial was performed based on the following schedule: 117 subjects were administered one packet/ day of JUNSAIKOMACHI for 28 days, and their subjective reports of 12 health conditions and 8 skin conditions were assessed using visual analogue scores (VAS), ranging from 0 mm (representing a markedly poor condition) to 100 mm (representing a markedly good condition). VAS were measured before the intervention (Day 0), and on Days 14 and 28.

Results and discussion

The VAS revealed significant differences in symptoms of “defecation,” “skin texture,” “skin firmness,” and “dry skin” in females of all ages. In males, marked differences in “dull skin /clarity” and “oily face” were observed. We calculated differences in VAS between day 28 and day 0 (Δ VAS28), and examined differences in effects among age groups. As a result, significant differences were noted for “dry eyes” between subjects in their 20s and those in their 40s, and for “skin texture” and “dry skin” between subjects in their 20s and those in their 30s. In addition, comparison of Δ VAS28 between males and females suggested that JUNSAIKOMACHI improved the following four conditions in females: “skin texture,” “skin firmness,” “noticeable pores,” and “dry skin.” Furthermore, males were more sensitive to “oily face.”

戸松 さやか (Sayaka Tomatsu)* (筆頭著者) e-mail: sayaka@arif.pref.akita.jp

¹ 秋田県総合食品研究センター 食品機能グループ (〒010-1623 秋田県秋田市新屋町字砂奴寄 4-26 TEL: 018-888-2000)

² 株式会社サノ (〒010-0061 秋田県秋田市卸町 3-4-2), ³ あきた東内科クリニック (〒010-0041 秋田県秋田市広面字近藤堰添 50-1)

1. 緒言

秋田県の北西部に位置する三種町では、減反政策の転作作物としてスイレン科の水生植物であるジュンサイ (*Brasenia schreberi*) 作付けが奨励され、同町は日本一の産地として知られるまでに至った。舟に乗り、手摘みで収穫する風景は観光資源として地域おこしの要でもある。また、秋田県は全国有数の清酒製造が盛んで、副産物の酒粕も多量に産出される。我々は、秋田県産特産物であるジュンサイの腸内環境正常化作用¹⁾と、酒粕に含まれるレジスタントプロテイン²⁾に着目し、ジュンサイエキス（オリザ油化株式会社、愛知県一宮市）と酒粕乾燥粉末（秋田銘醸株式会社、秋田県湯沢市）からなる便通改善用途のサプリメントを開発した³⁾（商品名：潤彩小町[®]）。「潤彩小町[®]」の機能性については、健康な成人女性を対象としたプラセボ対照二重盲検やオープン試験を行い、便通改善作用と美肌作用を独自に検証した^{4,5)}。さらに4カ月以上の定期購入者を対象に後ろ向きアンケート試験を実施し、便通改善や肌の乾燥、毛穴の引き締めといった肌状態改善効果が、「潤彩小町[®]」の主な購入目的であることを明らかにした⁶⁾。

しかしながら、健常男性に対する「潤彩小町[®]」の有用性や、年代毎の作用の違いについては不明な点が多い。そこで本研究では、20代から50代の健康な男女117名を対象に、「潤彩小町[®]」による健康状態および肌状態改善効果を調べ、性別、年代毎にどのような違いが認められるかを検討した。

2. 方法

2-1. ヒト介入試験

本研究におけるヒト介入試験はヘルシンキ宣言に基づき計画し、秋田県総合食品研究センター倫理委員会で承認された（承認番号 H30-4）。さらに、対象者（事前アンケートで除外となったボランティアも含む）から書面でインフォームドコンセントを得て、平成31年2月1日から2月28日に試験を実施した。

事前アンケートにおいて、試験の参加除外とした条件を下記に示す。

- ◆試験に影響を与える可能性があると考えられる医薬品を日常的に服用している者
- ◆試験に影響を与える可能性があると考えられる健康食品等を日常的に摂取している者



図1 ジュンサイエキスおよび酒粕乾燥粉末からなる「潤彩小町[®]」

- ◆妊娠中または妊娠している可能性のある者、および授乳中の者
- ◆被験品成分によってアレルギー症状を起こす恐れのある者（過去にコメ、リンゴ含有食品で症状を示したことがある者）
- ◆アトピー性皮膚炎等、慢性的なアレルギー性疾患のある者
- ◆他の臨床試験に参加している者
- ◆重篤な肝障害、腎障害、心筋梗塞の既往歴のある者
- ◆肝炎、腎炎の既往歴・現病歴のある者
- ◆高度の貧血のある者

上記基準で選抜された試験対象者は、20代女性13名、20代男性19名、30代女性15名、30代男性14名、40代女性15名、40代男性14名、50代女性12名、50代男性15名の8群、計117名であった。

「潤彩小町[®]」28日間摂取後、表1～4に示した健康状態12項目および肌状態8項目について14日目と28日目の変化を主観的に評価した。試験参加者の主観評価の数値化は既報⁴⁾に従いVAS（visual analog scale）を用いた。また、Day28とDay0間のVASの差を Δ VAS28とし、VASおよび Δ VAS28は、実測値 \pm 標準誤差で表記した。

2-2. 統計解析

本研究の統計解析は、エクセル統計2015（Bell Curve Inc.）を用いて行った。試験参加者のDay0、Day14およびDay28におけるVASの比較解析は、Friedman検定後にScheffeの方法により多重比較を行った（表1～4）。表5に示した項目間の相関係数はSpearmanの順位相関分析により算出した。表6に示した男女間の Δ VAS28の比較は、Mann-Whitney検定を用いた。さらに図2の世代間の Δ VAS28間の比較は、Kruskal-Wallis検定後にSteel-

表1 (20代)

項目	女性			男性		
	VAS (mm, means ± SEM)			VAS (mm, means ± SEM)		
	Day 0	Day 14	Day 28	Day 0	Day 14	Day 28
健康状態						
腹囲	40.3 ± 3.7	40.2 ± 3.7	41.6 ± 4.1	37.6 ± 4.4	39.5 ± 4.0	42.4 ± 4.4
目の疲れ	36.8 ± 3.7	37.6 ± 3.8	39.1 ± 4.3	38.8 ± 5.4	40.6 ± 5.4	41.4 ± 5.6
肩こり	42.2 ± 6.4	43.7 ± 6.8	44.2 ± 6.9	46.6 ± 5.2	45.8 ± 5.0	47.9 ± 4.8
目の乾燥	29.2 ± 4.1	30.5 ± 3.8	32.1 ± 3.9	42.6 ± 4.6	43.1 ± 4.3	42.3 ± 4.5
便の回数	41.7 ± 6.8	52.2 ± 4.5	60.3 ± 4.8**§	60.2 ± 5.1	63.8 ± 4.9	64.7 ± 4.5*
足のむくみ	43.4 ± 5.2	47.3 ± 4.6	48.8 ± 5.4	58.1 ± 3.5	58.3 ± 3.3	58.7 ± 3.3
胃部不快感	47.2 ± 6.2	49.3 ± 5.2	49.6 ± 5.1	52.1 ± 3.9	54.7 ± 3.6	57.5 ± 3.2
手足の冷え	38.4 ± 5.9	40.4 ± 5.7	40.7 ± 5.7*	44.5 ± 4.9	44.7 ± 4.7	45.9 ± 4.4
目覚め	45.5 ± 6.3	46.0 ± 6.3	46.5 ± 6.5	48.3 ± 5.1	48.5 ± 4.9	49.5 ± 4.7
眠りの深さ	49.2 ± 4.8	49.2 ± 4.7	50.4 ± 4.9	49.5 ± 3.1	50.7 ± 3.3	53.7 ± 3.6
疲労感	37.5 ± 4.8	38.2 ± 4.9	39.0 ± 5.0	38.5 ± 4.6	41.2 ± 4.3	43.4 ± 3.9
排便感	40.2 ± 6.0	49.7 ± 3.0	56.8 ± 3.8*	53.9 ± 4.3	57.1 ± 4.2	61.9 ± 3.7**
肌状態						
肌のくすみ	40.8 ± 4.1	44.7 ± 5.1	48.4 ± 4.3	40.0 ± 3.7	42.9 ± 3.7	45.1 ± 3.9***
顔が脂っばい	47.7 ± 5.2	49.0 ± 4.7	53.8 ± 4.7	43.2 ± 3.7	46.5 ± 3.7	48.5 ± 3.6**
肌のキメ	34.6 ± 4.2	39.8 ± 3.1	45.4 ± 4.3**	44.2 ± 4.2	46.0 ± 4.0	46.8 ± 4.2
肌のハリ	41.7 ± 5.2	47.1 ± 3.9	53.1 ± 4.1**§	47.1 ± 4.0	49.3 ± 4.0	50.6 ± 4.2**
毛穴が気になる	27.4 ± 4.5	32.1 ± 4.0	39.0 ± 3.5***	52.1 ± 3.5	52.3 ± 3.5	52.3 ± 3.6
肌の乾燥	21.9 ± 4.1	29.8 ± 4.9	36.1 ± 5.2*	43.3 ± 4.6	44.0 ± 4.6	45.6 ± 4.5
ニキビ・吹き出物	37.8 ± 5.8	45.5 ± 4.9	51.6 ± 5.7**	49.1 ± 4.0	51.5 ± 3.6	52.7 ± 3.6
シミ・ソバカス	57.0 ± 6.6	57.1 ± 6.5	57.2 ± 6.5	49.3 ± 4.2	49.4 ± 4.4	51.1 ± 4.5

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs Day 0, §p<0.05 vs Day 14

表2 (30代)

項目	女性			男性		
	VAS (mm, means ± SEM)			VAS (mm, means ± SEM)		
	Day 0	Day 14	Day 28	Day 0	Day 14	Day 28
健康状態						
腹囲	39.2 ± 4.9	42.1 ± 5.5	43.5 ± 5.6	39.9 ± 3.9	39.9 ± 3.7	40.0 ± 3.6
目の疲れ	35.1 ± 3.9	35.6 ± 4.0	36.3 ± 4.0	35.8 ± 3.8	42.1 ± 4.1	43.5 ± 4.3**
肩こり	41.4 ± 6.9	42.3 ± 6.7	44.9 ± 6.8*	36.6 ± 4.9	41.9 ± 5.3*	43.4 ± 5.3**
目の乾燥	39.8 ± 5.5	40.1 ± 6.2	42.9 ± 5.6*	37.6 ± 2.9	42.4 ± 3.7	42.4 ± 4.1*
便の回数	47.7 ± 8.3	54.3 ± 7.6	57.6 ± 7.4*	52.4 ± 3.0	56.7 ± 3.7	61.0 ± 4.4***
足のむくみ	38.1 ± 4.2	40.1 ± 4.3	41.9 ± 5.2	54.8 ± 4.2	57.9 ± 3.9	59.1 ± 3.9**
胃部不快感	41.5 ± 5.9	44.5 ± 5.7	46.3 ± 5.8***	36.6 ± 4.5	39.6 ± 4.4	41.0 ± 4.4*
手足の冷え	24.5 ± 4.8	26.7 ± 4.8	32.1 ± 5.5**	52.7 ± 3.7	53.9 ± 3.8	56.7 ± 4.1*
目覚め	40.1 ± 6.2	41.7 ± 6.1	44.1 ± 5.7	33.7 ± 3.4	41.4 ± 3.3	43.8 ± 4.9*
眠りの深さ	41.1 ± 6.7	42.7 ± 6.9	44.6 ± 7.4	40.8 ± 4.5	43.1 ± 4.9	43.9 ± 4.8*
疲労感	33.3 ± 4.4	38.3 ± 4.8	41.3 ± 5.6	34.2 ± 4.3	37.8 ± 4.8	38.4 ± 5.1*
排便感	42.5 ± 7.2	47.7 ± 6.6	53.0 ± 6.5**	52.1 ± 4.0	55.9 ± 3.9	59.5 ± 4.8*
肌状態						
肌のくすみ	38.8 ± 4.5	45.3 ± 4.8	51.0 ± 5.8**	37.6 ± 2.5	43.4 ± 2.9	48.7 ± 4.7**
顔が脂っばい	51.6 ± 5.3	53.2 ± 5.5	54.3 ± 5.3*	46.3 ± 3.7	48.1 ± 4.1	52.6 ± 4.6*
肌のキメ	37.3 ± 3.9	45.9 ± 4.8	51.9 ± 5.5***	37.7 ± 3.1	42.5 ± 2.4	49.0 ± 3.3***
肌のハリ	37.6 ± 4.3	45.3 ± 5.0	51.5 ± 6.3***	39.0 ± 2.7	43.6 ± 2.3*	48.2 ± 3.5**
毛穴が気になる	35.7 ± 4.4	39.2 ± 4.2	42.4 ± 4.5**	48.9 ± 4.4	51.6 ± 4.2	54.9 ± 4.4*
肌の乾燥	29.5 ± 4.3	38.6 ± 4.9	45.1 ± 5.5***§	38.1 ± 4.1	45.6 ± 4.4*	52.4 ± 3.9***
ニキビ・吹き出物	41.9 ± 5.4	50.9 ± 5.0*	52.9 ± 4.9**	42.8 ± 3.4	46.9 ± 3.8	49.4 ± 3.6**
シミ・ソバカス	30.8 ± 4.8	33.5 ± 4.5	33.9 ± 4.6*	42.3 ± 3.5	43.4 ± 3.3	44.6 ± 3.1*

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs Day 0, §p<0.05 vs Day 14

表 3 (40 代)

項目	女性			男性		
	VAS (mm , means ± SEM)			VAS (mm , means ± SEM)		
	Day 0	Day 14	Day 28	Day 0	Day 14	Day 28
健康状態						
腹囲	26.6 ± 4.4	29.5 ± 4.4	30.7 ± 4.9	34.4 ± 3.9	35.4 ± 3.7	36.1 ± 3.8
目の疲れ	29.6 ± 4.7	35.0 ± 4.7	38.9 ± 4.5*	36.6 ± 5.4	41.4 ± 4.9	44.2 ± 4.9**
肩こり	25.5 ± 4.6	31.1 ± 5.4	30.7 ± 4.8	42.3 ± 6.2	42.6 ± 6.2	46.1 ± 5.8
目の乾燥	24.1 ± 4.5	33.1 ± 5.1	38.5 ± 6.6**	42.6 ± 5.3	45.1 ± 4.7	49.6 ± 4.6*
便の回数	48.5 ± 6.0	59.8 ± 6.5	58.7 ± 7.2**	54.4 ± 4.9	58.0 ± 5.3	58.8 ± 5.2
足のむくみ	41.9 ± 6.0	44.1 ± 5.9	45.9 ± 6.0	51.9 ± 3.7	52.4 ± 3.7	53.4 ± 4.3
胃部不快感	55.1 ± 7.1	58.8 ± 7.1	58.3 ± 7.3	55.4 ± 4.5	57.8 ± 5.0	57.9 ± 4.9
手足の冷え	37.5 ± 5.8	42.3 ± 6.4	45.4 ± 6.1*	48.7 ± 6.6	50.1 ± 6.2	50.5 ± 6.1
目覚め	38.3 ± 6.0	39.3 ± 6.1	42.3 ± 5.6	54.7 ± 4.6	55.3 ± 4.8	58.7 ± 4.5
眠りの深さ	46.7 ± 6.4	49.1 ± 6.6	52.2 ± 6.0	54.5 ± 5.1	60.1 ± 4.7	61.4 ± 5.0*
疲労感	35.5 ± 5.4	38.1 ± 5.3	40.7 ± 5.1**	40.0 ± 4.4	42.0 ± 3.7	44.1 ± 3.9*
排便感	49.2 ± 7.2	54.7 ± 7.3	62.1 ± 7.3*	59.3 ± 4.7	59.9 ± 4.4	60.4 ± 4.3
肌状態						
肌のくすみ	39.3 ± 3.2	45.1 ± 2.7	48.1 ± 3.0***	41.7 ± 3.2	47.4 ± 2.9	51.1 ± 3.0*
顔が脂っぽい	58.1 ± 4.9	59.4 ± 4.9	60.5 ± 4.5	45.2 ± 3.3	49.7 ± 3.7	51.7 ± 3.9*
肌のキメ	33.2 ± 4.5	42.3 ± 4.4*	43.9 ± 4.4**	45.6 ± 4.4	50.7 ± 3.7	53.5 ± 4.4**
肌のハリ	36.1 ± 3.8	41.7 ± 4.9	43.7 ± 4.8**	46.1 ± 3.0	47.8 ± 2.7	49.3 ± 3.0
毛穴が気になる	33.5 ± 5.4	39.5 ± 5.0	42.7 ± 4.8***	56.3 ± 4.7	58.4 ± 4.0	61.1 ± 4.2
肌の乾燥	35.5 ± 5.9	42.7 ± 6.6	46.0 ± 6.7**	46.1 ± 4.5	50.9 ± 3.5	51.9 ± 3.9**
ニキビ・吹き出物	57.4 ± 5.8	61.7 ± 5.6	64.3 ± 4.3	54.6 ± 5.7	62.8 ± 4.9	64.3 ± 5.0*
シミ・ソバカス	36.1 ± 6.1	36.4 ± 5.9	37.0 ± 5.5	54.5 ± 6.2	55.7 ± 5.6	56.3 ± 5.5

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs Day 0

表 4 (50 代)

項目	女性			男性		
	VAS (mm , means ± SEM)			VAS (mm , means ± SEM)		
	Day 0	Day 14	Day 28	Day 0	Day 14	Day 28
健康状態						
腹囲	35.5 ± 5.2	36.8 ± 5.3	37.7 ± 5.3	42.3 ± 3.7	44.5 ± 3.5	46.7 ± 3.4
目の疲れ	34.7 ± 6.1	40.3 ± 6.1	44.3 ± 5.4	26.5 ± 4.3	32.4 ± 3.9*	34.7 ± 4.3**
肩こり	35.1 ± 5.4	40.9 ± 4.4	43.8 ± 5.4	46.4 ± 6.9	50.7 ± 6.5	54.4 ± 5.7**
目の乾燥	24.9 ± 6.6	29.5 ± 6.6	33.8 ± 6.6	42.9 ± 5.6	47.4 ± 5.2	49.9 ± 5.3**
便の回数	46.7 ± 9.3	53.0 ± 7.9	58.1 ± 8.7	59.5 ± 5.1	61.9 ± 5.2*	66.3 ± 3.7**
足のむくみ	45.6 ± 2.6	47.8 ± 2.3	49.0 ± 2.4	53.5 ± 5.6	56.8 ± 5.1	59.6 ± 4.6*
胃部不快感	53.8 ± 8.2	53.8 ± 8.2	61.0 ± 8.9 [§]	53.7 ± 5.2	62.7 ± 4.7	63.2 ± 4.6*
手足の冷え	40.2 ± 5.9	40.8 ± 6.1	45.5 ± 7.0*	44.9 ± 4.9	47.1 ± 4.7	48.0 ± 4.8*
目覚め	47.9 ± 5.4	50.8 ± 5.1	55.0 ± 5.3*	49.8 ± 5.0	55.5 ± 4.1**	55.5 ± 4.4*
眠りの深さ	46.1 ± 4.8	49.0 ± 4.5	53.3 ± 4.9*	53.0 ± 5.5	56.5 ± 4.7	56.6 ± 4.8*
疲労感	33.3 ± 5.8	37.3 ± 5.9	39.3 ± 6.3	41.4 ± 4.1	46.5 ± 3.1*	47.5 ± 3.3**
排便感	48.3 ± 7.1	55.5 ± 7.3	61.3 ± 8.1*	56.9 ± 5.9	69.3 ± 4.3	70.0 ± 4.1**
肌状態						
肌のくすみ	39.4 ± 4.7	47.4 ± 5.5	48.8 ± 5.6**	42.3 ± 2.9	44.1 ± 2.7	46.5 ± 3.1*
顔が脂っぽい	56.2 ± 6.3	59.3 ± 5.8	59.6 ± 5.6	42.0 ± 4.4	48.6 ± 3.8	51.2 ± 3.6**
肌のキメ	39.3 ± 6.5	52.3 ± 6.1	53.9 ± 5.8**	44.0 ± 2.9	45.5 ± 2.4	47.3 ± 3.0
肌のハリ	35.7 ± 5.0	45.1 ± 5.9	51.3 ± 6.2**	46.0 ± 2.1	47.5 ± 2.4	48.7 ± 2.9
毛穴が気になる	44.3 ± 7.5	51.0 ± 6.2	53.3 ± 5.8	50.3 ± 3.8	50.9 ± 3.8	51.3 ± 3.9
肌の乾燥	38.1 ± 5.6	43.9 ± 6.2	49.9 ± 5.8**	42.7 ± 4.1	43.9 ± 3.3	46.9 ± 3.8
ニキビ・吹き出物	57.1 ± 8.1	71.6 ± 6.4*	73.4 ± 6.6**	50.3 ± 5.3	52.3 ± 4.5	54.3 ± 4.2*
シミ・ソバカス	31.1 ± 7.8	38.3 ± 6.9	46.9 ± 7.8†	53.0 ± 4.6	54.5 ± 5.0	54.7 ± 5.0

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs Day 0, [§]p<0.05 vs Day 14

Dwass 法による多重比較を行った。いずれの統計解析においても有意水準を 0.05 未満とした。

3. 結果および考察

3-1. 年代毎の試験参加者の健康および肌状態への影響

28 日間「潤彩小町[®]」(図 1) の継続摂取が、20 代～50 代男女の健康状態および肌状態に与える影響を表 1～4 にまとめた。年代毎に試験結果について、有意な改善効果が認められた項目のうち、 Δ VAS28 が大きい上位 3 項目については、計算値 \pm 標準誤差を含めて本文中に記載した。

(1) 20 代男女の健康状態および肌状態に対する影響

20 代の女性は 28 日間の継続摂取で健康状態 12 項目中、“便の回数”(Δ VAS28=18.6 \pm 6.8), “排便感”(Δ VAS28=16.6 \pm 7.3), “手足の冷え”(Δ VAS28=2.3 \pm 1.0) の 3 項目, “肌の乾燥”(Δ VAS28=14.1 \pm 6.4), “ニキビ・吹き出物がきでやすい”(Δ VAS28=13.8 \pm 6.1), “毛穴が気になる”(Δ VAS28=11.6 \pm 4.1) を含む肌状態 5 項目に、摂取前と比較して有意に改善効果が認められた(表 1)。20 代男性は 28 日間の摂取で“排便感”(Δ VAS28=8.0 \pm 3.6), “便の回数”(Δ VAS28=4.5 \pm 2.6) の健康状態 2 項目および, “顔が脂っぽい”(Δ VAS28=5.3 \pm 1.6), “肌のくすみ・透明感”(Δ VAS28=5.1 \pm 2.1), “肌のハリ”(Δ VAS28=3.5 \pm 2.1) の肌状態 3 項目が有意に改善された。20 代の試験参加者における「潤彩小町[®]」4 週間摂取前後の有意な改善項目は、女性 8 項目、男性で 5 項目と他の年代と比較して少なかった。

(2) 30 代男女の健康状態および肌状態に対する影響

30 代の女性は 28 日間の摂取で“便の回数”(Δ VAS28=9.9 \pm 4.2), “排便感”(Δ VAS28=10.5 \pm 4.3), “胃部不快感”(Δ VAS28=4.8 \pm 1.7) を含む 8 項目の健康状態において有意な改善が観察された。また、30 代男性参加者は“腹囲”以外の“便の回数”(Δ VAS28=8.6 \pm 2.3), “排便感”(Δ VAS28=7.4 \pm 3.0), “肩こり”(Δ VAS28=6.8 \pm 2.1) を含む 11 健康状態項目で, 「潤彩小町[®]」摂取による改善効果を報告した。また、男女ともすべての肌状態項目において、摂取前後比較における有意な改善効果が認められた(表 2)。

(3) 40 代男女の健康状態および肌状態に対する影響

40 代の女性の健康状態項目改善効果は, “目の乾燥”(Δ VAS28=14.4 \pm 5.6), “排便感”(Δ VAS28=12.9

\pm 7.2), “目の疲れ”(Δ VAS28=9.3 \pm 3.3) を含む 6 項目で有意な差が認められた(表 3)。さらに男性試験参加者は, “目の疲れ”(Δ VAS28=7.5 \pm 2.8), “目の乾燥”(Δ VAS28=7.0 \pm 3.2), “眠りの深さ”, (Δ VAS28=6.9 \pm 4.0), など 4 項目で改善作用を認め, 男女とも「潤彩小町[®]」による“目の乾燥”の改善効果を上位に挙げている点が興味深い。肌状態に関しては, 女性が“肌のキメ”(Δ VAS28=10.7 \pm 3.2), “肌の乾燥”(Δ VAS28=10.5 \pm 4.4), “毛穴が気になる”(Δ VAS28=9.2 \pm 3.0) といった 5 項目に摂取前後間における有意な改善効果が認められたに対して, 男性では“ニキビ・吹き出物ができやすい”(Δ VAS28=9.6 \pm 6.4), “肌のくすみ・透明感”(Δ VAS28=9.4 \pm 4.2), “肌のキメ”(Δ VAS28=7.9 \pm 3.7) の 5 個の肌状態項目で摂取前と比較して有意に改善効果が認められた。

(4) 50 代男女の健康状態および肌状態に対する影響

50 代男女の健康状態および肌状態に対する影響を表 4 に示した。50 代の女性は, “排便感”(Δ VAS28=13.0 \pm 5.9), “胃部不快感”(Δ VAS28=7.3 \pm 3.2), “眠りの深さ”(Δ VAS28=7.3 \pm 3.6) を含む健康状態 5 項目, “ニキビ・吹き出物ができやすい”(Δ VAS28=16.3 \pm 8.4), “シミ・ソバカスが気になる”(Δ VAS28=15.8 \pm 7.5), “肌のハリ”(Δ VAS28=15.6 \pm 5.8) などの肌状態 6 項目で有意な改善効果が認められた。50 代男性は“排便感”(Δ VAS28=13.2 \pm 5.2), “胃部不快感”(Δ VAS28=9.5 \pm 4.2), “目の疲れ”(Δ VAS28=8.2 \pm 3.7) を含む健康状態 11 項目(つまり“腹囲”以外のすべての項目)および, “顔が脂っぽい”(Δ VAS28=9.2 \pm 3.5), “肌のくすみ・透明感”(Δ VAS28=4.3 \pm 2.0), “ニキビ・吹き出物ができやすい”(Δ VAS28=4.0 \pm 2.3) の肌状態 3 項目で摂取前と比較して, 有意に改善効果が認められた。

(5) 項目間の相関解析

試験参加者全員の全項目における Δ VAS28 について Spearman 法による順位相関解析を行い, 相関係数が 0.5 以上, 危険率 0.01 未満の 2 項目を表 5 に示した。便秘とは排便回数減少, 排便困難感および残便感を有する機能性腸障害と World Gastroenterology Organization により規定されている⁷⁾。「潤彩小町[®]」摂取により改善された項目間で, “便の回数”と“排便感”に最も高い正の相関が認められたことから, 本サプリメント摂取は便秘という機能性腸障害の症

表5 「潤彩小町[®]」摂取前後における健康ならびに肌状態の変化の相関

項目	相関係数	p 値
便の回数 排便感	0.757	$p < 0.001$
肌のくすみ 肌のキメ	0.688	$p < 0.001$
肌のキメ 肌のハリ	0.68	$p < 0.001$
肌のくすみ 肌のハリ	0.65	$p < 0.001$
肌のキメ 肌の乾燥	0.607	$p < 0.001$
目の疲れ 目の乾燥	0.592	$p < 0.001$
肌のハリ 肌の乾燥	0.573	$p < 0.001$
肌のハリ 毛穴	0.518	$p < 0.001$
毛穴 肌の乾燥	0.515	$p < 0.001$

状全般に有効だと思われる。また、肌の状態改善が認められた項目間では、“肌のくすみ”、“肌のキメ”、“肌のハリ”および“肌の乾燥”の4項目間の相関係数が高かった。我々が「潤彩小町[®]」の肌状態に対する影響を調べたオープン試験でもこれら4項目間の相関は高く、本試験結果と一致した⁸⁾。今後は肌の画像診断や水分値測定など、“肌のキメ”および“肌の乾燥”に関して客観的な評価が必要だと考えている。一方、興味深いのは、“目の疲れ”と“目の乾燥”の項目間での高い正の相関で、有意な差が認められた40代女性、20代を除くすべての男性参加者で、両項目間には因果関係があると推定された。

3-2. 年代毎の「潤彩小町[®]」摂取の影響の差異

「潤彩小町[®]」摂取による作用は、全ての年代でほぼ同様なのか、年代毎に作用が異なるのかを検討するため、全ての項目におけるΔVAS28について、年代間における有意な差を統計解析した(図2)。その結果、20代と40代参加者の“目の乾燥”におけるΔVAS28間で有意な差が認められた。涙の分泌は加齢とともに減少することが⁹⁾、20代よりも40代

表6 「潤彩小町[®]」摂取による改善作用における男女間差異

	ΔVAS28 (mm)		p 値
	女性 (n=55)	男性 (n=62)	
顔が脂っぼい	3.6 ± 1.3	6.7 ± 1.5	0.021
肌のキメ	12.7 ± 2.7	6.0 ± 1.6	0.023
肌のハリ	12.0 ± 2.6	4.5 ± 1.3	0.003
毛穴が気になる	9.0 ± 1.8	2.8 ± 1.1	$p < 0.001$
肌の乾燥	13.0 ± 2.5	6.3 ± 1.6	0.027

の方が“目の乾燥”に敏感になる一因と考えられる。また、“肌のキメ”と“肌の乾燥”において20代と30代間で有意な差が認められた。加齢による皮膚の保湿機能の低下が考えられるが¹⁰⁾、特に男性参加者20代と30代間での差が大きい理由は不明である。

3-3. 男女毎の影響の差異

次に、4週間の「潤彩小町[®]」摂取前後の男女毎のΔVAS28間をMann-Whitney検定を行い、各項目に対する男女間の感受性の違いを調べた(表6)。本解析により、健康状態12項目全てにおいて、男女間のΔVAS28間の感受性に差異は認められなかった。しかしながら、肌質改善効果(ΔVAS28が大きい)は、男性よりも女性の方が大きい、即ち女性の方が「潤彩小町[®]」の肌質改善作用を敏感に捉えている。一方、“顔が脂っぼい”の改善効果に対しては、男性参加者の方が、より感受性が高い結果となった。これは、男性の方が女性より皮脂量が多い¹¹⁾に、サプリメント摂取の影響を実感しやすいのではないかと推察される。

3-4. 総括

健常男女試験参加者117名に対して、「潤彩小町[®]」摂取前後の健康状態および肌状態変化について

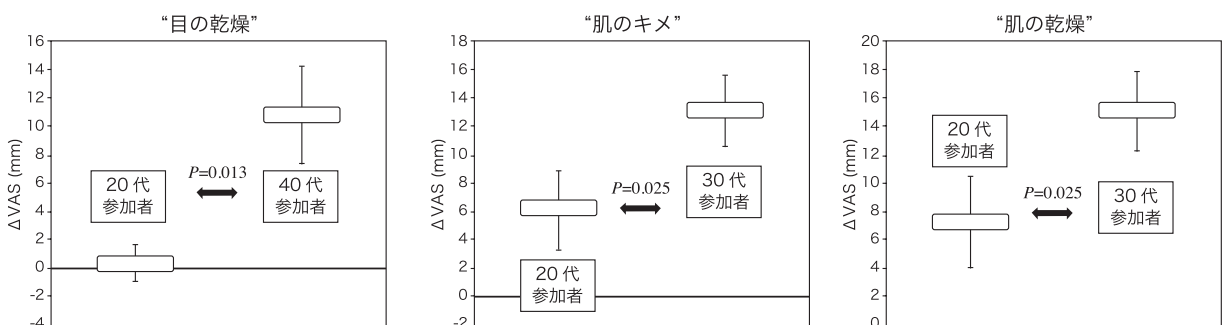


図2 年代間で有意差が認められた3項目

てVAS試験を行った。今回の試験で初めて健常男性参加者への影響を調べたが、女性同様に便通および肌質改善作用が確認できた。特に、皮脂量がより多い男性参加者が、女性参加者と比較して“顔が脂っぽい”の改善効果を実感したことは非常に興味深い結果である。

「潤彩小町[®]」の新たな生理機能として、加齢に

伴う“目の乾燥”の改善作用が抽出された。当該機能についてはプラセボ対照二重盲検などにより、より精度の高い検証を行う予定である。

謝辞

本研究の一部は「あきた中小企業みらい応援ファンド事業」の助成を受け行った。

参考文献

1. 渡辺敏郎：健康と美容に貢献する「酒粕」の成分。醸協，**107**: 282-291, 2012.
2. 下田博司：白キクラゲとジュンサイの腸内環境改善作用。Food style 21, **18**: 76-79, 2014.
3. Takashima A, Sano K, Murakami M, Matsui F, Sasaki A *et al.*: JUNSAIKOMACHI, a dietary supplement with water shield and sake cake. *J Biol Macromol*, **18**: 11-12, 2018.
4. 高嶋亜希子, 佐野公彦, 村上正代, 上原健二, 佐々木玲 他：ジュンサイエキスと酒粕粉末から調製したサプリメント摂取による成人健康女性に対する便通改善作用。生薬学雑誌，**71**: 94-99, 2017.
5. 高嶋亜希子, 佐野公彦, 村上正代, 畠恵司：「ジュンサイ + 酒粕」サプリメント摂取による肌の毛穴引き締め効果。食品と開発，**52**: 72-74, 2017.
6. Takashima A, Sano M, Sasaki M, Umekawa Y, Sasaki A *et al.*: Retrospective user survey of JUNSAIKOMACHI for improving human health and skin conditions. *J Biol Macromol*, **18**: 11-12, 2018.
7. Lindberg G, Hamid SS, Malfertheiner P: World gastroenterology organisation global guideline: Constipation--a global perspective. *J Clin Gastroenterol*, **45**: 483-487, 2011.
8. 畠恵司：酒粕とジュンサイが原料のご当地サプリメント。日本醸造協会誌，**114**: 174-180, 2019.
9. 平瀬久美子, 清水章代, 横井則彦, 西田幸二, 木下茂：健常者の涙液動態の加齢変化の検討。日眼会誌，**98**: 575-578, 1994.
10. 傳田光洋：表皮機能の老化，加齢変化，およびその対策について。J Soc Cosmet Chem Japan, **30**: 377-387, 1996.
11. Nazzaro-Porro M, Passi S, Boniforti L, Belsito F: Effects of aging on fatty acids in skin surface lipids. *J Invest Dermatol*, **73**: 112-117, 1979.

ネギ (*Allium fistulosum* L.) エキス摂取による 高齢者の健康状態改善効果

高嶋 亜希子 (TAKASHIMA Akiko)¹, 佐野 宗孝 (SANO Munetaka)¹, 成田 琢磨 (NARITA Takuma)²,
熊谷 昌則 (KUMAGAI Masanori)³, 畠 恵司 (HATA Keishi)^{3*}

Key Words: ネギ, 高齢者, 健康改善

Beneficial effects of Welsh onion (*Allium fistulosum* L.) extract on the health condition of elderly volunteers

Authors: Akiko Takashima¹, Munetaka Sano¹, Takuma Narita², Masanori Kumagai³, Keishi Hata³

Corresponding author: Keishi Hata³ email: hata@arif.pref.akita.jp

Affiliated institutions:

¹Sano Inc., 3-4-2 Oroshi-machi, Akita, 010-0061, Japan

²Akita-Higashi Medical Clinic, 50-1 Kondosekizoe, Hiroomote, Akita 010-0041, Japan

³Akita Research Institute of Food & Brewing, 4-26 Sanuki, Arayamachi, Akita 010-1623, Japan

Key Words: Welsh onion (*Allium fistulosum* L.), elderly, health improvement

Abstract

Background and aims:

Approximately 480,000 tonnes of Welsh onion (*Allium fistulosum* L.) are harvested each year in Japan. Welsh onion exhibits a number of biological activities, including activation of immune responses; it also presents anti-oxidant, anti-glycation, and anti-cancer effects. Welsh onion is regarded as an effective treatment for colds in Japan, and the anti-influenza A activity of its fructan has been demonstrated.

Highly viscous sputum is difficult to clear from the airways. The elderly are more susceptible to congestion with viscous sputum than their younger counterparts. We previously examined the suppressive effects of Welsh onion extract on mucus hyper-production in human airway cells and revealed the potential of this extract to attenuate such hyper-production. In the present study, we performed clinical tests and investigated whether administration of dietary supplements with Welsh onion extract improves the health condition of the elderly.

Methods:

Twenty female and 20 male subjects aged between 60 and 74 years participated in this study. Lifestyle assessments and health questionnaires revealed no medical history of serious disease or allergic dermatitis. The subjects were administered 2 tablets/day of dietary supplements containing Welsh onion extract (20 subjects) or dextrin (20 subjects, placebo) for 20 days, and their subjective reports of 15 parameters of health were assessed by using a visual analogue scale with scores ranging between 0 mm (extremely poor condition) and 100 mm (extremely good condition). Scores were assessed pre-intervention (Day 0) and on Day 20.

Results and discussion:

Comparisons with the placebo group revealed that administration of Welsh onion extract markedly ameliorates 'bowel movement' and 'tired eyes' and enhances 'feel alert' ($P < 0.05$). It also slightly attenuated 'dry eye' and 'foot swelling' ($0.05 \leq P < 0.1$). The dietary supplement ameliorated 'bowel movement' more extensively in females than in males and 'tired eyes' more extensively in male than in females. Spearman's rank correlation test revealed a strong positive correlation between 'tired eyes' and 'feel alert'. The present results demonstrated that Welsh onion extract ameliorates not only bowel movements but also tiredness in the elderly.

畠 恵司 (Keishi Hata)^{3*} (責任著者) e-mail: hata@arif.pref.akita.jp

¹株式会社サノ (〒010-0061 秋田県秋田市卸町 3-4-2), ²あきた東内科クリニック (〒010-0041 秋田県秋田市広面字近藤堰添 50-1)

³秋田県総合食品研究センター 食品機能グループ (〒010-1623 秋田県秋田市新屋町字砂奴寄 4-26 TEL: 018-888-2000)

1. 緒言

感染や炎症により粘り気の増した痰は気道にとどまりやすく、炎症をさらに悪化させるため、スムーズな排痰は気道内感染予防や肺胞を無菌状態に保つ観点からも重要である。“体力の低下”や“寝たきり状態”が原因で、自力での排痰や痰の飲みこみが困難となった高齢者にとって、粘り気が増した痰は、より排出しづらく、上気道炎、気管支炎、肺炎などの感染症の原因となるほか、最悪、窒息や呼吸困難に至るケースもある。痰の粘性成分は、気道上皮組織から分泌されるムチンと呼ばれる糖タンパク質である¹⁾。去痰薬として処方されるカルボシステイン(S-carboxymethyl-L-cysteine)は、気道炎症時のムチン過剰産生を正常化することで痰の粘り気を抑え、排出しやすくする。我々はこれまでNCI-H292ヒト気道上皮細胞(ヒト気道上皮細胞)におけるムチン産生測定系を構築し、ムチン産生抑制作用、即ち去痰作用のある食品素材の探索を行った²⁾。その過程で、ネギ(*Allium fistulosum* L.)抽出物に、ヒト気道上皮細胞におけるムチン過剰産生を抑制することを見出した³⁾。

国内で生産されるネギ46.5万トン(平成28年度産)のおよそ2.7%にあたる1.2万トンが秋田県内で生産されている。収穫されたネギのうち3割程度が、歪みが生じた形状のもの、切断により不均一な長さになったものとして出荷されずに廃棄されるため、この規格外品の有効活用は急務である。ネギの生理活性機能については、抗酸化、抗糖化作用あるいは抗腫瘍活性など幾つかの先行研究例がある^{4,6)}。日本ではネギは伝統的に風邪に良いとされ、事実、ネギに含まれるフルクタンは抗インフルエンザAウイルス活性が報告されている⁷⁾。しかしながら、我々が見出したネギの去痰作用に関しては知見がなかったため、高齢者食市場というあらたな販路開拓を目的に研究を進めた。

本研究では、60～74歳の健常高齢者を対象に、ネギエキスの去痰作用を含む健康状態改善効果を検討した結果を報告する。

2. 材料と方法

2-1. ネギエキスおよび試験食の調製

規格外品として生じたネギ(有限会社平沢ファーム、図1)を、70℃の温風乾燥で水分含量10%未



図1 ネギ規格外品の選別

表1 ネギエキス栄養成分分析ならびにシクロアリン含量

分析項目	分析値
エネルギー	389 kcal/100 g
水分	2.2 g/100 g
タンパク質	5.7 g/100 g
脂質	2.2 g/100 g
炭水化物	86.6 g/100 g
灰分	3.3 g/100 g
ナトリウム	85 mg/100 g
シクロアリン	518 mg/100 g

満まで乾燥させ、エキス調製まで室温で保管した。ネギエキスの調製は株式会社常磐植物化学研究所に委託し、以下の工程で行った。8.0 kgの乾燥ネギ乾燥物を50%(v/v)の食添用エタノール160 Lで抽出、セライト No503(Linjiang Sailite Diatomite Co., Ltd.)を用いた珪藻土濾過後、0.45 μmのフィルターによる精密濾過を行った。濾過液を減圧濃縮後に、濃縮液(固形重量2.68 kg)に対してオクテニルコハク酸デンプン(松谷化学工業株式会社)2.68 kgを加えて、凍結乾燥した(凍結乾燥粉末5.28 kg)。ネギエキスの栄養成分分析ならびにシステインスルホキシドの一つであるシクロアリンの定量は、株式会社マシス 食品医薬品安全評価分析センターに委託した(表1)

試験食とプラセボ食は外観および風味から区別できないように、表面を酵母細胞壁などでコートし、試験食として一粒あたりネギエキス125 mgを含む270 mg/粒の錠剤を、プラセボ食として、ネギエキスの代わりにデキストリンを同量混合した270 mg/粒の錠剤を調製した(表2)。

表2 試験食およびプラセボ食組成表

原料名	配合量 (mg/粒)	
	試験食	プラセボ食
・素錠		
ネギエキス	125.0	0.0
デキストリン	0.0	125.0
還元麦芽糖水飴	43.8	43.8
セルロース	75.0	75.0
デンプン	1.3	1.3
ステアリン酸カルシウム	2.5	2.5
二酸化ケイ素	2.5	2.5
小計	250.0	250.0
・被膜		
酵母細胞壁	16.2	16.2
グリセリン	1.9	1.9
酸化チタン (着色料)	1.9	1.9
小計	20.0	20.0
合計	270.0	270.0

2-2. 試験参加者の選抜

ネギエキスサプリメントの健康状態改善作用を調べた試験は、ヘルシンキ宣言の趣旨に基づいて計画し、秋田県総合食品研究センター倫理審査委員会の承認 (H30-05) を受け行った。試験参加者 (60～74歳の男女) は、試験目的、方法などに関する詳細な説明を行い、書面による同意書を得た後に、以下の除外項目により選抜した。

- 試験に影響を与える可能性があると考えられる医薬品を日常的に服用している者
- 試験に影響を与える可能性があると考えられる健康食品等を日常的に摂取している者
- 妊娠中または妊娠している可能性のある者、および授乳中の者
- 被験品成分によってアレルギー症状を起こす恐れのある者 (過去に大豆含有食品で症状を示したことがある者)
- アトピー性皮膚炎等、慢性的な皮膚疾患のある者
- 他の臨床試験に参加している者
- 重篤な肝障害、腎障害、心筋梗塞の既往歴のある者
- 肝炎、腎炎の既往歴・現病歴のある者
- 高度の貧血のある者

2-3. 試験方法

ネギエキスの機能性評価はプラセボ対照二重盲検比較試験により行った。試験食区およびプラセボ食

表3 試験参加者の年齢構成

	年齢 (参加者数)	
	試験食区	プラセボ区
参加者全体	65.6 ± (n=20)	65.7 ± (n=20)
女性	66.3 ± 0.6 (n=9)	66.2 ± 0.7 (n=9)
男性	65.0 ± 1.1 (n=11)	65.2 ± 1.3 (n=11)

区にランダムに振り分けられた試験参加者 (表3) は、時間を規定せず20日間摂取した。なお、試験食の継続的な摂取による有害事象の報告はなかった。試験参加者は、15項目の健康状態評価に対する自身の主観評価を、非常に悪い状態を0mm、非常によい状態を100mmとするvisual analog scale (VAS) 試験用紙の任意な位置にマークする。ネギエキス摂取による効果の検証は、試験食およびプラセボ食摂取0日目と20日目のVASの差 (Δ VAS) を試験参加者自身の健康状態改善値とし、各々の Δ VAS間の有意差検定をMann Whitney U検定 (GraphPad Prism5, GraphPad Software 株式会社) で行うことで評価した。有意差水準は、 $P < 0.05$ を有意な改善、 $0.05 \leq P < 0.1$ を改善傾向が認められるとした。さらに、改善傾向あるいは有意な改善が認められた項目間の相関解析をSpearmanの順位相関解析を行った。

3. 結果

3-1. ネギエキス摂取による試験参加者の健康状態変化

表2に、試験食およびプラセボ食摂取前後の試験参加者の15項目の健康状態変化を、 Δ VASで示した。プラセボ区と比較して、試験食摂取区の参加者において“便通”、“目の疲れ”、“目覚め”の3項目に有意な改善効果が認められた。また、“目の乾燥”、“足のむくみ”、“手足の冷え”の3項目については、プラセボ食区との比較において、ネギエキス摂取による改善傾向が認められた。次に、有意な改善作用および改善傾向が認められた6項目間の相関を調べるために、Spearman検定を行った (表4)。“眼の疲れ”、“眼の乾燥”、“目覚め”の3項目間での相関が認められたが、特に“目の疲れ”および“目覚め”間の相関係数が高く、両項目には深い因果関係が存在すると思われる。

表4 ネギエキス食摂取による高齢者試験参加者の健康状態改善作用

項目	ΔVAS (mm)		危険率
	試験食摂取区	プラセボ食摂取区	
食欲	3.3 ± 2.6	-0.3 ± 0.4	0.220
腹囲	1.4 ± 1.0	1.1 ± 1.1	0.350
便通	7.8 ± 2.1	0.8 ± 3.5	0.033
肩こり	3.5 ± 1.6	0.3 ± 2.1	0.194
目の疲れ	4.5 ± 2.1	0.9 ± 1.3	0.038
目の乾燥	2.3 ± 1.5	-0.8 ± 0.7	0.063
足のむくみ	1.5 ± 1.2	-0.7 ± 0.6	0.051
歩行	2.4 ± 1.6	2.6 ± 2.5	0.433
胃部不快感	2.8 ± 2.3	-2.3 ± 2.6	0.484
手足の冷え	7.0 ± 2.8	1.3 ± 1.1	0.092
肌の乾燥	2.8 ± 1.9	1.1 ± 1.9	0.987
目覚め	2.1 ± 2.0	0.3 ± 0.4	0.048
関節の違和感	1.0 ± 1.1	1.1 ± 1.6	0.985
痰が絡む	0.6 ± 0.6	1.9 ± 1.5	0.434
頻尿	3.0 ± 1.9	0.8 ± 1.9	0.638

3-2. 健康状態変化の男女間の差の解析

次に、男女毎にΔVASについて試験食およびプラセボ摂取間で統計解析を行った結果、ネギエキスを含む試験食を摂取した女性の参加者では”便通”、男性の参加者については”目の疲れ”の項目で有意な改善作用が認められた(図2)。次に、試験食摂取区の試験者について、全ての項目において男女間

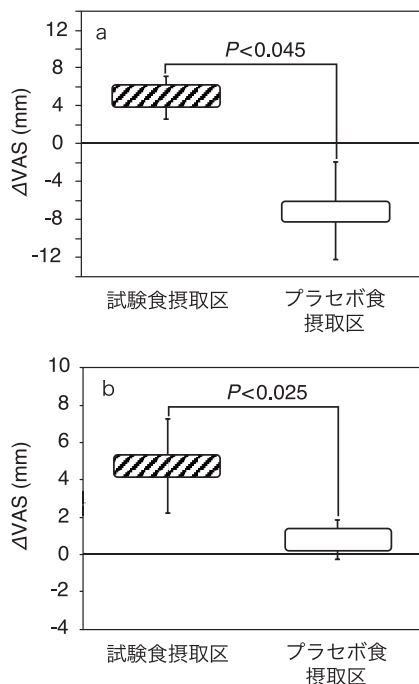


図2 有意に改善効果が認められた男女別項目
a: 女性試験参加者の”便秘”, b: 男性試験参加者の”目の疲れ”

のΔVAS値を比較したところ、ネギエキスを摂取した男性参加者はネギエキス摂取区の女性よりも、明らかに”目の疲れ”が改善されたと考えられる(図3)。

4. 考察

本研究において、我々はネギエキス継続摂取が、60～74歳の高齢男女試験参加者の健康状態15項目に与える影響を調べた。これまでの研究から、痰の主成分で粘性に関わるヒト気道上皮細胞におけるムチン過剰産生を、ネギエキスが正常化する知見を得ていたため、去痰作用を期待して、試験をデザインした。しかしながら、高齢試験参加者の”痰が絡む”という項目には改善効果が認められなかった。この理由として、試験の安全性を優先し、健常な高齢者を選抜したため、元々”痰がからむ”と訴える人が少なかったためだと推察している。一方、”目の疲れ”や”目覚め”の項目において、ネギエキスを含む試験食摂取区は、プラセボ食区と比較して有意な改善作用が認められた。ネギエキスに含まれるシクロアリインなどのシステインスルホキシドは、「活力、社会生活機能、日常役割機能(精神)および心の健康」や「睡

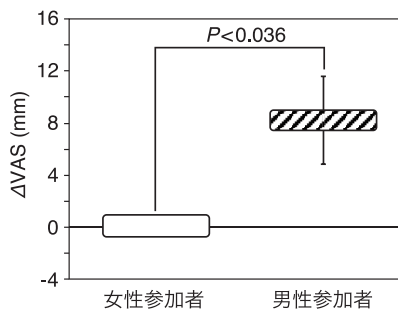


図3 ”目の疲れ”改善作用における男女間差異
試験食区のすべての項目におけるΔVASを男女間で比較した結果、ネギエキスの”目の疲れ”改善作用は、男性に限定された。

表5 健康状態改善が認められた2項目間の相関解析

正の相関(相関係数 > 0.4)が認められた2項目	相関係数	危険率
目の疲れ vs 目覚め	0.823	< 0.01
目の疲れ vs 目の乾燥	0.533	0.023
目の乾燥 vs 目覚め	0.475	0.023



図4 秋田県内のスマイルケア食識別マーク利用許諾商品

眠」改善効果が報告されており^{8,9)}、本研究で得られたネギエキスの“目の疲れ”や“目覚め”改善効果には、シクロアリインなどが関与していると思われる。

ネギエキスの“目の疲れ”改善効果は、男性参加者に限定され、女性参加者にはほとんど認められなかった。中山らはシステインスルホキシド類を強化したタマネギエキスによる男性更年期症状緩和作用を、aging males' symptom スコア (AMS スコア) などで評価した¹⁰⁾。タマネギエキスを4週間摂取 (システインスルホキシド類として 30 mg/日, 4週間摂取) した更年期男性では、AMS スコア (総スコアおよび心理的因子) の改善が認められ、この男性更年期障害緩和作用が、本研究における“目の疲れ”改善効果が男性に限定される原因の一つと推定された。また、ネギエキス試験食に含まれるシクロアリインは 1.3 mg/日と、タマネギエキスの介入試験におけるシステインスルホキシド類の摂取量とはかなりの差があるため、ネギエキスに含まれるシクロアリイン以外のシステインスルホキシド類や、他の成分の関与が考えられる。

平成 28 年 11 月に農林水産省は、従来、「介護食品」と呼ばれてきた“かむこと、飲み込むことが難しい人のための食品”に代わり、“低栄養の予防につながる食品、生活をより快適にする食品という広い領域”としてとらえたもの（「スマイルケア食」とい

う名称を公募により決定）を発表した。都道府県別の人口に占める 65 歳以上の割合（高齢化率）が全国で最も高い秋田県（平成 27 年国勢調査）では、県産農林水産物を活用したスマイルケア食の開発や利用普及と啓発を通じて、元気で長生きできる健康づくりを総合的に推進することを目的に「県内の医療・福祉関連事業者、農林漁業者、食品製造業者、流通・販売業者、関係団体、大学、研究機関、金融機関、行政機関および個人の方々」をもって、平成 29 年 7 月にあきたスマイルケア食研究会を設立した（図 4）¹¹⁾。これまでの先行研究のネギの生理活性機能および我々が本研究において見出したネギエキスについても、あきたスマイルケア研究会事業を通じた中高年層の健康改善の一助となるよう研究を継続させたい。

謝辞

本研究の一部は「あきた農商工応援ファンド」ならびに内閣府地方創生推進事務局「あきたスマイルケア食研究開発事業」（企業版ふるさと納税対象事業、平成 29 年 6 月認定）の助成を受け行った。「あきたスマイルケア食研究開発事業」にご協力いただいた株式会社京急百貨店およびあいおいニッセイ同和損害保険株式会社に深謝いたします。

利益相反 特筆すべき利益相反はなし。

参考文献

1. Rose MC, Nickola TJ, Voynow JA: Airway mucus obstruction: mucin glycoproteins, MUC gene regulation and goblet cell hyperplasia. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **25**: 533-537, 2001.
2. Iwashita J, Iguchi N, Takashima A, Watanabe D, Sano K *et al.*: Citrus jabara extracts suppress MUC5AC mucin production in human lung epithelial cells. *Adv Biol Chem*, **7**: 139-150, 2017.
3. 畠恵司, 岩下淳, 高嶋亜希子: 去痰作用を有する食品素材探索～ネギエキスは気道上皮細胞におけるムチン過剰産生を正常化する～. *食品と開発*, **54**: 78-80, 2019.
4. Ueda H, Takeuchi A, Wako T: Activation of immune responses in mice by an oral administration of bunching onion (*Allium fistulosum*) mucus. *Biosci Biotechnol Biochem*, **77**: 1809-1813, 2013.
5. Ramkissoon JS, Mahomoodally MF, Ahmed N, Subratty AH: Antioxidant and anti-glycation activities correlates with phenolic composition of tropical medicinal herbs. *Asian Pac J Trop Med*, **6**: 561-569, 2013.
6. Arulselvan P, Wen CC, Lan CW, Chen YH, Wei WC: Dietary administration of scallion extract effectively inhibits colorectal tumor growth: Cellular and Molecular Mechanisms in Mice. *PLoS One*, **7**: e44658, 2012.
7. Lee JB, Miyake S, Umetsu R, Hayashi K, Chijimatsu T *et al.*: Anti-influenza A virus effects of fructan from Welsh onion (*Allium fistulosum* L.). *Food Chem*, **134**: 2164-2168, 2012.
8. 抜井一貴, 田中啓子: QOL改善剤, 特開 2018-152083, 2018.
9. 永田奈々恵, 牧田美希, 菊池洋介, 福留真一, 中山優也 他: 睡眠改善剤, 特開 2019-23179, 2019.
10. 中山優也, 稲川裕人, 抜井一貴, 田中啓子, 平本茂 他: システインスルホキシド類高含有タマネギエキスによる男性更年期症状の改善効果—プラセボ対照ランダム化二重盲検並行群間比較試験, *薬理と治療*, **45**: 595-608, 2017.
11. 松井ふゆみ, 畠恵司, 佐々木玲, 上原健二, 熊谷昌則: あきたスマイルケア食研究会の取り組みについて. *秋田県総合食品研究センター報告*, **20**: 49-55, 2018.

秋田県における保健機能食品開発： 栄養機能食品としてのエゴマ種子油「翡翠[®]」

戸松 さやか (TOMATSU Sayaka)^{1,*}, 加藤 咲子 (KATO Sakiko)², 若泉 裕明 (WAKAIZUMI Hiroaki)²,
佐々木 玲 (SASAKI Akira)¹, 畠 恵司 (HATA Keishi)¹

Key Words: エゴマ, 種子油, α -リノレン酸, 栄養機能食品, 購入者アンケート調査

Development of food with health claims in Akita: HISUI[®], perilla seed oil as a food with nutrient function claim

Authors: Sayaka Tomatsu¹, Sakiko Kato², Hiroaki Wakaizumi², Akira Sasaki¹, Keishi Hata¹

*Corresponding author: Sayaka Tomatsu¹

Affiliated institutions:

¹Akita Research Institute of Food & Brewing, Sanuki, Araya-machi, Akita 010-1623, Japan.

²Azuma Trading Corporation, 14-1 Utou, Kyowa Funaoka, Daisen-city, Akita 019-2401, Japan.

Key Words: perilla, seed oil, α -linolenic acid, food with nutrient function claims, customer survey

Background and aims: α -Linolenic acid comprises >50% of perilla (*Perilla frutescens* var. *japonica* Hara) and flax (*Linum usitatissimum*) seed oils, and was reported to have biological functions such as maintaining skin moisture, preventing ischemic heart disease, and anti-inflammatory activity. We developed bottled perilla seed oil (termed HISUI[®]) by squeezing it under pressure at room temperature. In the present study, we investigated the α -linolenic acid content in HISUI[®] to guarantee its quality. Furthermore, as clarification of why users purchase HISUI[®] and their feedback is important and useful for product promotion, we surveyed HISUI[®] users.

Methods: The analysis of α -linolenic acid was performed at a third-party analytical institution. The user survey was approved by the ethics committee of Akita Research Institute of Food and Brewing (Approval No. R2-03). The questionnaires including 7 questions about HISUI[®] were distributed to users at physical stores.

Results and discussion: Analysis of HISUI[®] demonstrated that the α -linolenic acid content in HISUI[®], which was stored at room temperature in a dry place away from direct sunlight, remained over 57% (w/w) for 14 months after bottling, and we renewed it as a food with nutrient function claims. The subjective survey revealed that reasons for HISUI[®] usage were “taste” (14.8%), “supply of specific nutrients” (11.1%), “staying healthy” (11.1%), “skin condition” (14.8%), “slimming” (7.4%), “anti-aging” (7.4%), “a gift” (11.1%), and “miscellaneous” (22.2%). This suggested that over 40% users use HISUI[®] to improve health or skin conditions.

* 責任著者: 戸松 さやか (Sayaka Tomatsu) e-mail: sayaka@arif.pref.akita.jp

¹ 秋田県総合食品研究センター (〒010-1623 秋田県秋田市新屋町字砂奴寄 4-26)

² 東商事株式会社 (〒019-2401 秋田県大仙市協和船岡善知島 14-1)

はじめに

エゴマ (*Perilla frutescens* var. *japonica* Hara) はシソ科の1年草で、種子は和え物、ふりかけ、薬味などに利用されてきた。原産地はインドや中国南部とされるが、日本でも古くから栽培されており、縄文時代の遺跡からも出土する¹⁾。地方によっては、「じゅうねん食べると十年長生きできる」との言い伝えから「ジュウネン」とも呼ばれる。エゴマ種子は46～50%の乾性油を含み、食用以外にも灯明油ならびに油紙、雨傘、提灯などの防水加工や、ペイントなどの原料として用いられてきたが、不飽和度が高いため、酸化劣化しやすく、食味変化が大きいため、食用としての用途が限られてきた。一般的な食用油は、オレイン酸やリノール酸を多く含み、n-3系脂肪酸であるα-リノレン酸含量が10%以下であるため、α-リノレン酸を60%前後含むエゴマ種子油は特徴的な脂肪酸組成と言える²⁾(図1)。エゴマ種子油と似た脂肪酸組成はアマニ種子油で、繊維用として栽培されていた亜麻 (*Linum usitatissimum*) の種子を原料としている。同じく多価不飽和脂肪酸のn-3系脂肪酸としては、魚油に多く含まれるドコサヘキサエン酸(DHA)、エイコサペンタエン酸(EPA)があげられる。

多価不飽和脂肪酸が高いエゴマ種子油や魚油は、1990年代以降、栄養学的見地から注目されるよう

になった。グリーンランド地方のイヌイットを対象とした食生活と健康についての疫学調査に端を発し³⁾、魚油に多く含まれるn-3系脂肪酸のDHAやEPAの生理機能の解明が急速に進むにつれ、n-3系脂肪酸には抗炎症作用や心血管保護作用があることが知られてきた。エゴマ種子油に多く含まれるα-リノレン酸は体内に吸収された後、EPA→ドコサペンタエン酸(DPA)→DHAと代謝される。これらは局所で活性代謝物(レゾルビンやプロテクチン、マレシン)に変換され、炎症の抑制や収束に関わる⁴⁾。また、エゴマ種子油には虚血性心疾患の予防⁵⁾やアレルギー制御作用^{6,7)}、脳機能の維持⁸⁾に重要な役割があることも報告されている。n-3系脂肪酸はヒトの体内で合成できないため、食事として摂取しなければならず、不足すると欠乏症—特に、鱗状皮膚炎、出血性皮膚炎、結節性皮膚炎などの皮膚疾患—を引き起こす⁹⁾。そのため、n-3系脂肪酸は必須脂肪酸と呼ばれ、2015年度に栄養機能食品として追加された成分である。従って、n-3系脂肪酸を含む食品は、基準を満たせば、皮膚の健康維持を助ける栄養素と表示可能である。

東商事(株)は2018年から秋田県大仙市協和で収穫されたエゴマ種子や葉から、「えごま麺」や「えごま味噌」などの加工食品の販売を手がけてきた。さらに、「六次産業化・地産地消法」に基づく総合化事業計画の認定を受け(2018年9月)、自社搾油

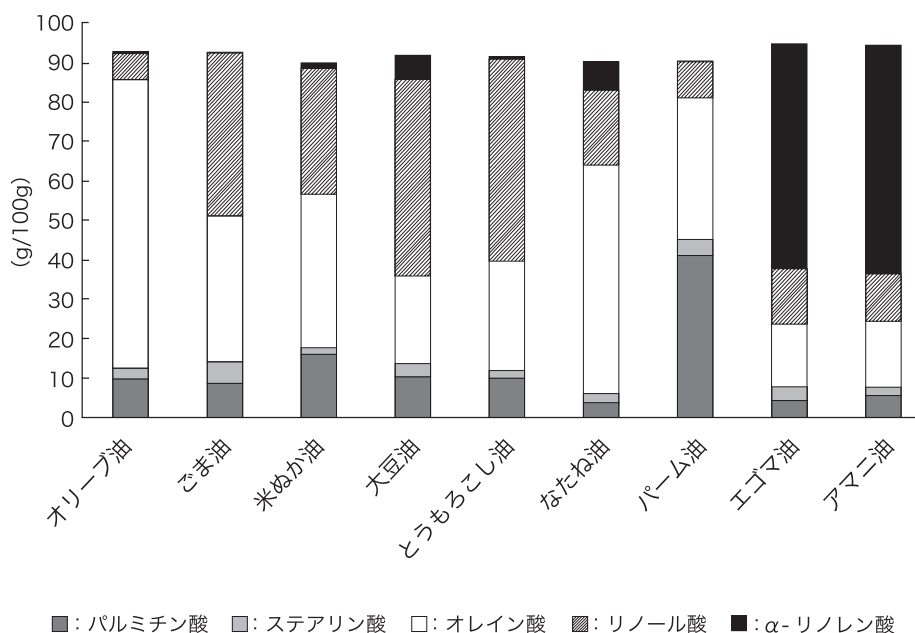


図1 食用油の脂肪酸組成

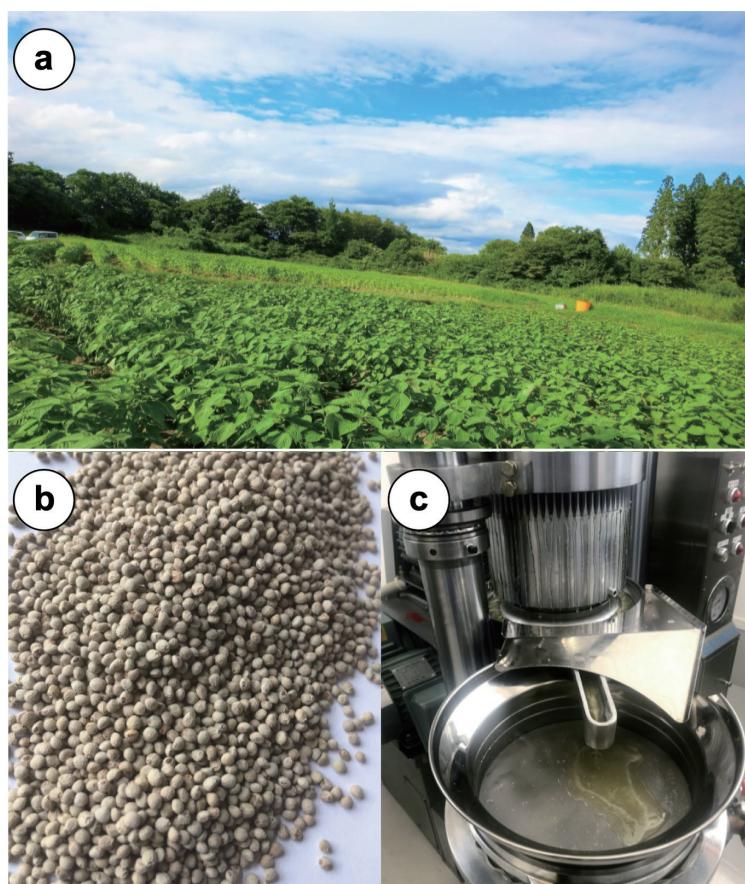


図2 エゴマ栽培風景および搾油工程
a: エゴマ自社農園 b: エゴマ種子 c: 搾油工程

所で搾油を開始し、2019年5月に食用エゴマ油を商品化した（商品名：「翡翠[®]」）。エゴマ種子油は、産地ごとに香りや味わいが異なる。現在は、秋田県内4地域（大仙市協和，東成瀬村，由利本荘市，大館市）毎に収穫したエゴマ種子を使用した「翡翠[®]」4種類を販売している。

本稿では、エゴマ種子油「翡翠[®]」の栄養機能食品としてリニューアル商品化と、購入者にアンケートを実施し、購入理由や使用方法、満足度を調査した結果を報告する。

1. 材料と方法

1-1. エゴマ種子油製造および栄養成分分析

エゴマ種子は、2018年10月秋田県大仙市で収穫されたものを用いた。エゴマ種子油の抽出は、種子を洗浄後、水分含量6%（W/W）以下になるまで風乾し、低温圧搾による搾油を行った（図2）。エゴマ種子油「翡翠[®]」の栄養成分分析および α -リノレン酸の定量は、日本食品分析センターに委託

した。また、 α -リノレン酸の変化は、搾油後に常温・暗所で、14カ月間保存したサンプルを用いて測定した。

1-2. 購入者調査

「翡翠[®]」に関するアンケート調査は秋田県総合食品研究センター倫理委員会の承認（R2-03）を得て、以下の要領で行った。「翡翠[®]」販売店舗における購入者17名を対象に、年齢、性別に加えて、7項目に対する無記名アンケートを実施した。試験参加の意思は、アンケート用紙の無記名郵送により確認した。

2. 結果および考察

2-1. 「翡翠[®]」栄養成分と栄養機能食品としての上市

栄養機能食品とは、身体の健全な成長、発達、健康の維持に必要な栄養成分の補給・補完を目的とした食品であり、高齢化、食生活の乱れなどにより、通常の食生活を行うことが難しく、1日に必要な栄

表1 エゴマ種子油「翡翠®」の栄養成分表示(100g当たり)

エネルギー (kcal)	900
たんぱく質 (g)	0
脂質 (g)	100
n-3系脂肪酸 (g)	57.4
炭水化物 (g)	0
食塩相当量 (g)	0



図3 エゴマ種子油「翡翠®」

養成分を摂れない場合に利用する食品である。n-3系脂肪酸は、2015年度に栄養機能食品として追加された成分で（一日当たりの摂取目安量は、n-3系脂肪酸として0.6～2.0g），“皮膚の健康維持を助ける栄養素”と表示可能である。n-3系脂肪酸を多く含むエゴマ種子油「翡翠®」に含まれるn-3系脂肪酸は、製造直後では57.4%（表1）、14カ月の保存した後も、57%以上の含有量を保持できたため（賞味期限12カ月）、栄養機能食品としてリニューアルした（図3）。

2-2. 「翡翠®」購入者調査結果

購入者調査結果を表2に示した。本試験参加者は女性11名、男性6名の計17名（平均年齢47.5歳）で、6割近くの参加者は、購入回数が“初めて”と回答した。一方、“三回目以上”の回答が約3割で、“二回目”の購入と合わせて約4割であった。購入目的として、「翡翠®」に高含有されるα-リノレン酸の生理機能に対応した回答項目-“特定の栄養素の補給”，“美容”，“老化防止”-を期待した回答が3割強だった。使用頻度は“ほぼ毎日”が約4割

表2 「翡翠®」購入者を対象としたアンケート調査結果

問1. 「翡翠®」の購入理由（複数回答可）					
味が気に入っている	14.8%	疲労回復	0.0%	特定の栄養素の補給	11.1%
体調の維持・病気の予防	11.1%	美容	14.8%	ダイエット	7.4%
老化予防	7.4%	贈答用	11.1%	その他	22.2%
問2. 「翡翠®」の購入回数					
初めて	58.8%	二回目	11.8%	三回目以上	29.4%
問3. 「翡翠®」の使用頻度					
ほぼ毎日	37.5%	一週間に2～3度	31.3%	一週間に1度	12.5%
二週間に1度	0.0%	それ以下	18.8%		
問4. 「翡翠®」のお召し上がり方法（複数回答可）					
そのまま	3.8%	野菜にかける	50.0%	和風料理	15.4%
洋風料理	7.7%	中華風料理	3.8%	その他	19.2%
問5. 「翡翠®」の満足度					
非常に満足している	43.8%	まあまあ満足している	25.0%	普通	25.0%
あまり満足していない	6.3%	まったく満足していない	0.0%		
問6. 「翡翠®」の容器の使いやすさ					
非常に使いやすい	31.3%	使いやすい	37.5%	普通	25.0%
使いづらい	6.3%	非常に使いづらい	0.0%		
問7. 「翡翠®」以外の健康食品（サプリメントを含む）					
摂取している	56.3%	摂取していない	31.3%	摂取した時期はあるが現在は摂取していない	12.5%

で、次いで“一週間に2～3度”となった。摂取方法は“野菜にかける”が最も多く、“和風料理”や“洋風料理”に使用され、ヨーグルトやコーヒー、青汁、味噌汁に入れていると回答もあった。エゴマ種子油「翡翠[®]」の商品満足度は“非常に満足している”と“まあまあ満足している”を合わせると約7割になった。容器は“非常に使いやすい”と“使いやすい”を合わせると7割近くになり、容器の使いやすさには、概ね満足している結果となった。「翡翠[®]」以外の健康食品の摂取率は約7割で、健康食品に関心がある参加者が多かった。n-3系脂肪酸の栄養機能性に関しては、消費者庁ホームページにおける解説などで周知されており¹⁰⁾、健康食品に関

心が高い本試験参加者が、エゴマ種子油に含まれるn-3系脂肪酸に対する期待が購入に繋がっていると考えられた。

東商事(株)は、2016年1月に食のブランド“Cocopelli”を立ちあげた。アメリカン・インディアン、ホビ族には、「精霊“Kokopelli”が美しい音色の笛を吹けば、草花が芽吹き、木は生い茂る」との言い伝えがあり、“Kokopelli”は『豊穡の神』として信仰されてきた。東商事(株)の食のブランド“Cocopelli”は、この“Kokopelli”のように、人々の豊かな暮らしを願い、秋田の食材を、作り手や同士の想いとともにお届けしたいと考えている。

引用文献

1. 堀田満, 緒方健, 新田あや, 星川清親, 柳宗民 他: 世界有用植物辞典. 平凡社.
2. 日本食品標準成分表 2015 版 (七訂). 文部科学省.
3. Dyerberg J, Bang H.O and Hjorne N: Fatty acid composition of the plasma lipids in Greenland Eskimos. *Am. J. Clin. Nutr.* **28**: 958-966, 1975.
4. Nagatake T and Kunisawa J: Emerging roles of metabolites of ω 3 and ω 6 essential fatty acids in the control of intestinal inflammation. *Int. Immunol.* **31**: 569-577, 2019.
5. Ezaki O, Takahashi M, Shigematsu T, Shimamura K, Kimura J, *et al.*: Long-Term Effects of Dietary α -Linolenic Acid from Perilla Oil on Serum Fatty Acids Composition and on the Risk Factors of Coronary Heart Disease in Japanese Elderly Subjects. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **45**: 759-772, 1999.
6. Okamoto M, Mitsunobu F, Ashida K, Mifune T, Hosaki Y, *et al.*: Effects of Dietary Supplementation with n-3 Fatty Acids Compared with n-6 Fatty Acids on Bronchial Asthma. *Intern. Med.* **39**: 107-111, 2000.
7. 池本敦: 抗アレルギー作用を有する食品成分. 秋田大学教育文化学部研究紀要 自然科学. **68**: 7-16, 2013.
8. 池本敦: 脳機能における n-3 系脂肪酸の必須性 - 行動科学的評価と分子基盤の解析. 脂質栄養学. **21**: 17-25, 2012.
9. 江崎治, 佐藤真一, 窄野昌信, 三宅吉博, 三戸夏子 他: n-3 系多価不飽和脂肪酸の摂取基準の考え方. 日本栄養・食糧学会誌. **59**: 123-158, 2006.
10. 消費者庁食品表示課: 脂質と脂肪酸のはなし (2010). https://www.caa.go.jp/policies/policy/food_labeling/health_promotion/trans_fatty_acid/pdf/100910_3.pdf

7. 秋田県総合食品研究センター報告指針

【総則】

- 1 秋田県総合食品研究センター報告は、食品研究に関する幅広い分野の原著論文（報文及び研究ノート）、総説、特許の要約、学会発表要旨及び外部発表論文要約等を掲載する。原著論文（報文及び研究ノート）は独創的なものであり、価値ある新事実や結論を含むものでなければならない。
- 2 投稿者は、原則として秋田県総合食品研究センターの職員とする。
- 3 論文の用語は、原則として日本語とする。

【掲載論文の種類】

原著論文（報文及び研究ノート）と総説の2種類とする。原著論文は、論文として未発表のものに限る。ただし、講演要旨、会議議事録などに発表した内容を投稿することは妨げない。

【掲載論文等のページ数と注意事項】

（報文及び総説）

論文自身が独立しており、完結した内容でなければならない。論文の長さは特に限定しないが、10 ページ程度であることが望ましい。

（研究ノート）

限られた部分の発見や、新しい実験方法など、報文としてはまとまらないものであっても、報告する価値のあるもの。論文は、4 ページ以内にまとめること。

（特許の要約） 1/2 ページにまとめること。

（学会発表要旨） 1 ページ以内にまとめること。

（外部発表論文要約） 外部発表論文や著書等について、論文題名、著者名、雑誌もしくは著書名、巻、最初と最後のページ及び発表年を記載するとともに、要約を1 ページ以内に記載する。

（外部発表論文再掲載） 当研究センター職員が筆頭著者もしくは責任著者となっている外部発表論文について、出版社等の了解が得られた場合は再掲載出来るものとする。

【審査】

- 1 原著（報文及び研究ノート）及び総説に関しては、複数の編集委員によりその論文の価値判断がなされ、掲載の可否が決定される。
- 2 編集委員は、論文の内容、文章などについて著者に改正を助言し、あるいは疑義の解明を求めることが出来る。
- 3 編集委員の質問や意見に対して明確な回答がなされた場合には、速やかに修正原稿を提出しなければならない。

【原稿の書き方】

- 1 一般的注意事項：文章は平易且つ簡潔な「である」調とする。数字や英字は原則として半角とする。論文の記述は正確を期し、全編にわたり簡潔明瞭である。
- 2 原稿は、「Word」を用いて作成し、A4 版縦長様式とする。
- 3 原稿の書体は、原則として MS 明朝体を用い、表題は 18 ポイント、本文は 12 ポイントとする。文章中（全角）では句点「。」及び句読点「、」を用いる。半角のは、終止符「.」及びカンマ「,」を用いる。
- 4 原稿の上下、左右には 2.5 cm の余白を設ける。

【論文の形式】

- 1 報文は、次の形式をとる。
【要約】、【緒言】、【実験方法】、【結果】、【考察】、【引用文献】の順とする。
【謝辞】は、【引用文献】の前に入れる。
- 2 研究ノートは、次の形式をとる。
【緒言】、【実験方法】、【結果と考察】、【引用文献】とする。
- 3 総説は、特に形式にこだわらないが、最初に要約を付ける。
- 4 図表は、本文中では図 1 あるいは表 1 などと表記する。
- 5 引用文献は、本文中の該当人名や事項の後に上付き小文字で、秋田県¹⁾、や総食研²⁻⁴⁾などのように番号を付し、そのリストを一括して引用文献の項に記載する。
- 6 投稿中の論文、私信、未発表結果は、引用文献に入れず本文中に括弧で示し引用する。
- 7 本文中に他の論文の著者名を引用する場合には、混乱の起こらない限り姓のみとする。著者が 2 名の論文は、両者の姓を併記し、3 名以上の場合には、筆頭著者以外を他¹⁾もしくは「ら」と略記する。
- 8 定義を必要とする略号や記号の使用は、最小限にとどめる。使用するときには、初出の箇所に正式名を書き、続けて括弧内に略号をいれる。用いた略号は文末（引用文献のあと）に一括して表示する。また、表題には略号を用いない。

【引用文献記載方法】

- 1 雑誌は、著者名、(年号)、論文表題、雑誌名、巻、ページ（最初と最後）、の順に記載する。
- 2 単行本は、著者名、(年号)、論文表題、書名、(編者)、ページ（最初と最後）、出版社、出版都市とする。
- 3 著者名は、姓名とも記し、全著者名を記載する。
- 4 欧文雑誌の略記は、Index Medicus による。誌名はイタリックとし、巻はボールドとする。
- 5 和文誌名は略記しない。

- 6 ウェブサイト中の記事に関しては、著者名、「ウェブサイトの題名」・ウェブサイト名称、更新日、入手日付を記載する。
- 7 引用文献に doi (Digital Object Identifier)番号が付与されている場合は、その旨を併せて記載する。
(例 : *J. Biochem.*, 164(2), 103-112. doi:10.1093/jb/mvy033)

(引用文献記載例)

- 1) Tomatsu M, Shimakage A, Shinbo M, Yamada S, Takahashi S (2013) Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from soya milk. *Food Chem*, **135**, 612-616. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.08.080
- 2) Inagami T (1998) Angiotensin receptors: molecular biology and signaling. In: Renin-Angiotensin. (Ulfendahl HR, Aurell M, eds), p25-35, Portland Press Ltd, London.
- 3) 小笠原博信、高橋砂織 (2000) STS-PCR 法によるあきたこまち等の 1 粒品種判別
日本食品科学工学会誌 **47**, 632-637. doi: org/10.316/nskkk.47.632
- 4) 作田庄平 (2004) アロサミジンとキチナーゼ：キチン・キトサンの開発と応用 (平野茂博監修) p153-164, 株式会社シーエムシー出版、東京.
- 5) 特許庁、特許情報プラットフォーム (J-PlatPat) の刷新について (平成 31 年 4 月)
https://www.jpo.go.jp/support/j_platpat/sassin_190425html (参照 2019-11-19)

【単位と物質の名称】

種々の物質単位及びその用語や記号は、国際単位系・SI(metric system)を基本とする。常用的に用いられている物質名のうち、極めて使用頻度が高く、使い方が国際的に統一されている物質名は、定義なしで使用できる。

【学名】

学名は、イタリックを用いる。

本規定は平成 11 年 4 月 1 日より施行する。

平成 21 年 4 月 1 日、一部改正。

平成 23 年 4 月 1 日、一部改正。

平成 25 年 4 月 1 日、一部改正。

令和 元年 11 月 22 日、一部改正。

令和 2 年 9 月 25 日、一部改正。

秋田県総合食品研究センター報告 第23号

発行日 令和3年12月1日

発行者 秋田県総合食品研究センター報告 編集委員会

〒010-1623

秋田市新屋町字砂奴寄 4-26

電話：018-888-2000（代）

FAX：018-888-2008

<http://www.arif.pref.akita.jp/>

【無断複製を禁ず】