神奈川工科大学　健康生命科学研究所
研究成果報告書

第　5　号

平成 26 年度

神奈川工科大学

工学教育研究推進機構

目　次

⑴ ウナギ体表粘液物質を免疫原に用いたシアル酸認識モノクローナル抗体の開発
生体機能科学研究室　　栗原　誠　・・・　　1

(2) 担子菌を用いた放射線汚染土壌からの効率的放射性セシウム除去法の開発
生体機能科学研究室　　仲亀　誠司　・・・　　4

⑶ 嚥下困難の自覚が無い高齢者の嚥下状態におよぼす粘稠液状食品の力学的特性の影響
－嚥下造影検査と官能評価による嚥下状態の検討－
食品機能科学研究室　　高橋　智子　・・・　　8

(4) 焼成ホタテ貝殻ナノ粒子の抗菌特性
ヘルス・コントロール研究室　　澤井　淳　・・１２

⑸ リパーゼを用いた含油排水処理
ヘルス・コントロール研究室　　局 俊明　・・　１６

ウナギ体表粘液物質を免疫原に用いたシアル酸認識モノクローナル抗体の開発

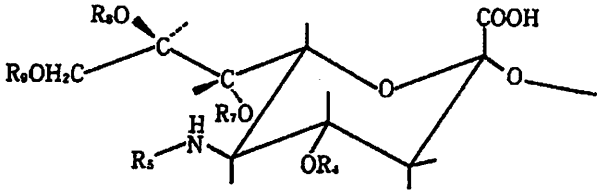
生体機能科学研究室　　栗原　誠

1．研究の目的

糖鎖の非還元末端に存在するシアル酸（*N*-アセチルノイラミン酸：Neu5Ac）をその結合様式を含めて検出、同定可能なモノクローナル抗体を開発する。

2．研究の必要性及び従来の研究

糖脂質や糖タンパク質の糖鎖の非還元末端に存在するシアル酸は細胞認識、微生物・ウイルス感染、細胞の癌化や転移といった様々な生命現象に深く関わっている。シアル酸はノイラミン酸誘導体の総称であり、動物では 17 種類以上見出されているが（図 1)、ヒトの糖脂質や糖タンパク質に存在するシアル酸は5位のアミノ基がアセチル化された*N*-アセチルノイラミン酸（Neu5Ac）であることが知られている。Neu5Ac はα2-3 やα2-6 結合でガラクトースや*N*－アセチルガラクトサミンなどに結合している。



$R_5 = -COCH_3, -COCH_2OH$

$R_4 = R_7 = H, -COCH_3$

$R_8 = H, -COCH_3, -CH_3, -SO_3H$

$R_9 = PO_3H_2$

図１．　糖鎖に見出されたノイラミン酸誘導体の構造

Neu5Ac を結合様式を含めて検出、同定することは糖鎖の生物学的機能を解析する上で極めて重要になっている。シアル酸認識ツールとしてはこれまでにレクチンが実用、販売されているが（Siaα2-3Gal 認識（*Maackia amurensis* Agglutinin)、Siaα2-6Gal / GalNAc 認識（*Sambucus sieboldiana* Agglutinin)など、J-オイルミルズ)、レクチンは特異性が然程高くないといった問題がある。一方、モノクローナル抗体は抗原特異性が極めて高いため、シアル酸に対するモノクローナル抗体が得られれば有用な同定、検出用ツールに成り得ると考えられるが、抗原の免疫に用いるマウス等の動物にはシアル酸が普遍的に発現しているため、抗体ができ難いといった問題がある。

ウナギ体表を覆う粘液にはヒト型のシアル酸である Neu5Ac をクラスター発現しているムチンが存在してことが報告されている[1)]。ウナギ体表ムチンは Neu5Ac に覆われた特殊な糖タンパク質であり（図 2)、Neu5Ac の免疫原として有効と考えられたため、ウナギ体表ムチンを免疫原に用いてモノクローナル抗体の作製を試みた。

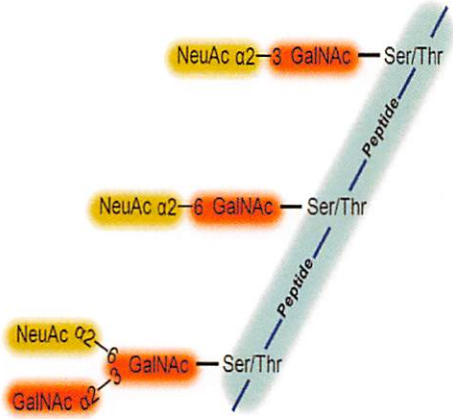


図 2. ウナギ体表ムチンの部分構造

3．期待される効果

ヒト型のシアル酸（Neu5Ac）をその結合様式を含めて認識できるクローナル抗体を開発することにより、ヒト生体試料中のシアロ糖鎖を検出し、更にその分子構造の同定が可能となる。また、インフルエンザ感染等ではウイルスによって結合するシアロ糖鎖が限定されるため、感染する可能性がある宿主細胞の識別等が可能となる。

4．研究の経過及び結果

1）免疫原（ウナギ体表ムチン）の調製

ウナギを冷凍庫内で凍死させた後。エタノールに漬け、体表粘液をゲル化させた。ゲルを遠心分離（3,500rpm、20 min）して集め、減圧乾燥したところ、ウナギ 100 g あたり粘液物質が約 0.8 g 回収された。これを水に溶かして水可溶性成分を分取した後、8 % agarose beads を用いたゲル濾過にかけ、分子量 150 万以上の高分子量画分を分取した。透析、凍結乾燥し、得られた粗精製物質をウナギ体表ムチンとした。

2）ウナギ体表ムチンに対するモノクローナル抗体の作製

ウナギ体表ムチンを BALB/c マウス 3 匹に 1 ヶ月間隔で 3 回腹腔内投与（100 μg/mouse）した後、常法に従って免疫したマウスの脾臓細胞とマウスミエローマ細胞を細胞融合した。HAT 選択の結果、合計 115 個のコロニーが出現した。そのうち免疫原と反応する抗体産生クローンが 6 つ確認されたが、そのうちの 2 クローンは培養過程で抗体産生能が消失した。最終的に 4 つのクローンについて限界希釈法によるクローニングを実施し、得られたモノクローナル抗体をそれぞれ ESM1838、ESM2305、ESM2308、ESM2423 と命名した。

3）創製した 4 抗体（ESM1838、ESM2305、ESM2308、ESM2423）の性状

抗体のエピトープを検討するため、ELISA プレートに固相化した抗原ムチンをトリプシン消化した後、各抗体との反応性を検討した。その結果、ESM2308 と ESM2423 は抗原のトリプシン消化によって顕著に反応性が低下した。ESM2308 と ESM2423 はペプ

チドを認識し、糖鎖は認識していないことが示唆されたため、ESM2308 と ESM2423 をその後の検討から除外した。

ウナギ体表ムチンは水に溶けにくく、取り扱いにくいため、ESM1838 と ESM2305 が交差反応するムチンを探索した。その結果、両抗体はラット胃、ブタ胃、ウシ小腸、ウシ大腸の各粘膜から抽出・精製したムチン画分と反応しなかったが、ウシ顎下腺ムチンと強く反応することがわかった。そこで、以後のエピトープ検討ではウシ顎下腺ムチンを抗原に用いることとした。

糖鎖からシアル酸を選択的に遊離させる温和な酸加水分解条件でウシ顎下腺ムチンを処理し、ESM1838 または ESM2305 との反応性を検討した結果、両抗体に対する抗原性は顕著に低下した。また、ウシ顎下腺ムチンをシアリダーゼで処理したところ、抗原性の低下がみられた。これらの結果から、ESM1838 と ESM2305 はいずれもエピトープ構造にシアル酸が含まれていることが示唆された。

Neu5Ac を含む 4 種の標準糖（Neu5Ac、Neu5Acα2-3Galβ-methoxyphenyl、Neu5Acα2-6Galβ-methoxyphenyl、Neu5Acα2-6GalNAcα-*p*-nitrophenyl）と ESM1838 または ESM2305 との反応性を阻止試験法により検討した。その結果、ESM1838 は検討したいずれの標準糖とも反応性がみられなかったが、ESM2305 は Neu5Acα2-6GalNAcα 誘導体によって抗原ムチンとの反応性が阻害されたことから、シアリル Tn 抗原（Neu5Acα2-6GalNAc）を認識することが示唆された。

5．今後の計画

ESM1838 抗体のエピトープ構造を解析し、有用性を検討する。

6．研究成果の発表

1）原田 侑，ウナギ体表粘液物質に対するモノクローナル抗体の作製と評価．神奈川工科大学応用バイオ科学科卒業研究発表会，2010.2.19.

2）山本 竜也，ウナギ体表粘液物質に対するモノクローナル抗体（ESM1838H10）の作製と評価．神奈川工科大学応用バイオ科学科卒業研究発表会，2010.2.19.

3）高崎 太喜，ウナギ体表粘液物質に対するモノクローナル抗体（ESM2423G7）の作製と評価．神奈川工科大学応用バイオ科学科卒業研究発表会，2010.2.19.

4）大嶋 未来也，ウナギ体表ムチンを免疫原として作製されたシアル酸認識単クローン抗体の性状．神奈川工科大学大学院　工学研究科　応用化学・バイオサイエンス専攻　博士前期課程　修士論文発表会，2015.2.20.

参考文献

1）Sumi, T., et al., Purification and further characterization of a glycoprotein from the skin mucus of Japanese eels. *J. Fish Biol,* 64：100–115, 2004.

担子菌を用いた放射線汚染土壌からの効率的放射性セシウム除去法の開発

生体機能科学研究室　仲亀　誠司

1. 研究の目的

福島第一原子力発電所事故による放射性物質の拡散により、国の基準値である追加被ばく線量年間1ミリシーベルト(mSv)以上の地域では、空間放射線量を低下させるための除染作業が行われている。空間放射線量の軽減には、放射線量の高い表土の削り取りが効果的であるが、汚染土壌の最終処理法は未定である。担子菌は、菌体内へのセシウム(Cs)移行係数が高く、高濃度 Cs 存在下でも生育可能である点や、子実体内に蓄積した放射性 Cs を採集することで、土壌中の放射性 Cs を除去できるという利点がある。本研究では、担子菌を用いた放射性物質により汚染された土壌からの効率的な放射性 Cs 除去プロセスの開発を目的として、担子菌による Cs 濃縮メカニズムの解明と、Cs 濃縮能を高めた形質転換体による放射性 Cs の除去の検討を行う。

2. 研究の必要性及び従来の研究

2011 年の東京電力福島第一原子力発電所事故（以下福島原発事故）による放射性物質の拡散により、空間放射線量が国の基準値である追加被ばく線量年間 1 mSv 以上の地域においては、放射線量を低下させるための除染作業が行われている。放射性物質により汚染された土壌（以下汚染土壌）は、物理的手法である放射線量の高い表土の削り取りや、土壌表面のリター（落葉、枝、樹皮）等の回収により、空間放射線量の軽減ができるが、放射線量を軽減するために取り除いた表土やリター等の発生量は、福島県内だけでも約 1,600～2,200 万m^3と推計されているものの、具体的な最終処分方法については決まっておらず、汚染土壌からの放射性 Cs 除去法の新規開発が求められている。担子菌の子実体への放射性物質の濃縮は、チェルノブイリ原発事故や、1960 年代の核爆弾の実験により拡散した放射性 Cs が、担子菌に濃縮されたことから明らかになった[1)]。福島原発事故においても、事故発生直後から、担子菌の子実体への放射性物質の濃縮が報告されており、福島原発事故発生から3年以上経った現在においても、野生キノコが国の基準値（100 Bq/kg）を超える放射線量を持つために、青森県から静岡県までの幅広い範囲で出荷制限となっている[2)]。生物学的手法を用いた放射性 Cs の除去法として、植物を用いた方法（ファイトレメディエーション）の研究が行われてきている[3)]。しかし、放射性 Cs の除染能が高いとされたヒマワリによる放射性 Cs の除染の検討では、Cs 移行係数［乾燥植物 1kg 当たりの放射能濃度(Bq/kg-乾燥重量)/乾燥基質 1kg あたりの放射線濃度(Bq/kg)］が、最大 0.27 と少ないことから実用化に至っていない[4)]。一方、担子菌の Cs 移行係数は 5.5-13 あるのに加え[5)]、植物は Cs 濃度が約 200 $\mu mol \cdot L^{-1}$ (2.66×10^{-3}wt%) 以下までしか生育できないのに対し[3)]、

担子菌は Cs 濃度が 2.5×10^{-1}wt%であっても子実体を形成するため[6]、高濃度 Cs の除染にも使用できると考えられる。植物における Cs 吸収メカニズムの研究は、分子生物学的手法等を用いて行われてきており、Cs 吸収に関与する遺伝子が同定されつつある[3]。植物では、Cs は同じアルカリ金属であるカリウム（K）と化学的性質が類似しているため、K 輸送系により植物内に吸収されると考えられている[3]。しかし、担子菌による Cs 吸収メカニズムは詳細については明らかになっておらず、関連する遺伝子も同定されていない。担子菌における今までの研究では、*Pleurotus ostreatus*（和名：ヒラタケ）を用いた研究において、菌体への Cs の取り込みが K 濃度の増加により低下し、Cs と K は互いに拮抗的な取り込みであることが報告されている[7]。一方で、*P. eryngii* を用いた研究では、K の増加により Cs の菌体内への取り込みが増加したという報告があり[8]、菌体内への Cs 吸収に対する K の影響はわかっていない。また、*P. eryngii* を用いた研究では、非選択的な陽イオン輸送系である VICC (voltage-insensitive cation channels) が Cs 吸収に関与していることが示唆されているが[8]、詳細は明らかになっていない。担子菌における Cs 吸収メカニズムが未解明である原因としては、担子菌の相同組換えの頻度が非常に低く、遺伝子ターゲッティングの手法を最近まで用いることができなかったことがあげられる。しかし最近の研究で、非相同末端結合に関与する遺伝子 Ku80 破壊株における相同組換えの頻度が 100%まで高まることがわかり[9]、担子菌においても遺伝子ターゲッティングが可能になった。担子菌における高い Cs 移行係数や、高濃度 Cs 存在下でも成長可能な要因を解明し、本性質を高めた担子菌を用いて汚染土壌の除染が可能になれば、震災からの復興を行う上での大きな推進力となる。本研究では、担子菌を用いた汚染土壌からの効率的な放射性 Cs 除去プロセスの開発を目的として、担子菌による Cs 濃縮メカニズムの解明を遺伝子ターゲッティングを用いて行うと共に、Cs 吸収能を高めた形質転換体による汚染土壌からの放射性 Cs の除去を行う。

3. 期待される効果

担子菌の Cs 移行係数は他の生物と比べて高く、高濃度 Cs 存在下でも生育可能であるが、担子菌による Cs の菌体内への吸収メカニズムについては明らかになっていない。本研究では、分子生物学的手法を用いた担子菌における Cs 吸収メカニズムの解明を行うと共に、Cs 吸収能を高めた形質転換体を用いて放射性 Cs の除染を行うことを特長とする。本プロセスが実用化した際には、Cs 吸収能を高めた形質転換体（セルフクローニング株）の子実体を形成させて採取することにより、森林に広範囲に拡散した放射性 Cs の除染が可能となる。また本方法は、中間貯蔵施設に保管予定の放射性廃棄物からの効率的な放射性 Cs 除去法として用いることができる。本技術は、現在福島原発事故により生産体制の維持が困難となっているキノコ栽培農家の生産技術を利用することができるため、農林水産業への雇用増進や、地域活性化にも貢献できる。

4. 研究の経過及び結果

担子菌によるCs 濃縮メカニズムの解明を、遺伝子ターゲッティングの手法を用いて効率的に行うには、菌体がCsを多く取り込む培養条件について調べ、特異的に発現する遺伝子群を調べることにより候補となる遺伝子の絞込みを行う必要がある。担子菌は液体培養と固体培養において、菌体の形態がそれぞれ菌糸体と子実体と異なっており、菌体へのCsの取り込みメカニズムが異なる可能性がある。今年度は、Csを含む液体培地（グルコース・ペプトン（GP）培地）と固体培地（木粉培地）を用いて、*P. ostreatus*によるCs吸収率について比較を行った。この結果、GP液体培地では培養1週間後の方が2週間後よりも菌体のCs吸収率が高いことがわかった(図1)。また、木粉培地を用いた場合には、菌体のCs吸収率は培養時に添加したCs濃度に関わらずほぼ同じであった(図2)。また、子実体の各部位(傘,柄）のCs吸収率を比較すると、CsClの初期濃度が0.01%の時には柄（Cs吸収率6.7%）の方が傘（Cs吸収率2.2%）よりも約3倍大きかったが、CsCl初期濃度が0.1%の時には傘（Cs吸収率5.8%）の方が、柄（Cs吸収率3.2%）よりもCs吸収率が高いことがわかった（図2)。菌体へのCs吸収率をGP液体培地と木粉培地を比較した場合には、菌体へのCs吸収率は木粉培地の方が高かった(図1, 2)。しかし、乾燥菌体重量当たりのCs吸収量を調べたところ、CsCl初期濃度が0.01%の時にはGP液体培地（1週間培養）では4.97×10^{-1}（mg/g-乾燥菌体量）だったのに対し、木粉培地では3.48×10^{-3}（mg/g-乾燥菌体量）であり、GP液体培地を用いた菌体の方がCsの吸収量が約100倍大きかった。また、CsCl初期濃度が0.1%においても、乾燥菌体重量当たりのCs吸収量はGP液体培地の菌体の方が木粉培地の菌体よりも約100倍大きかった。液体培地と固体培地で菌体へのCs吸収メカニズムが異なるため、菌体への吸収量に違いが見られている可能性が考えられた。

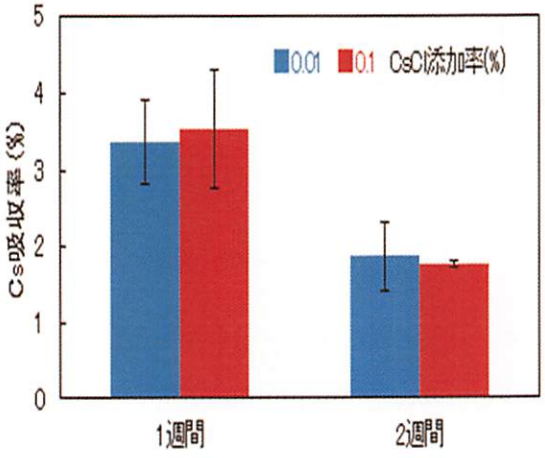


図1. GP液体培養における菌体へのCs吸収率

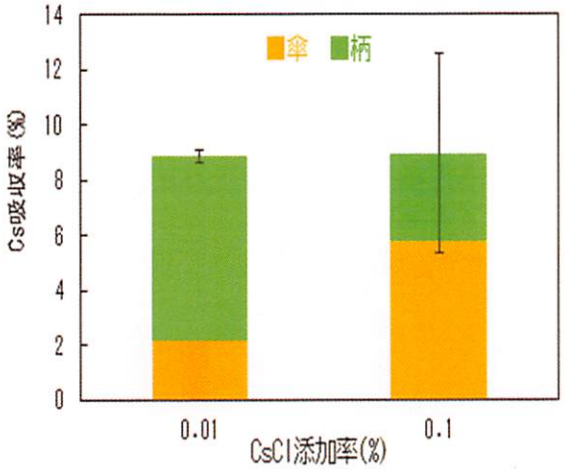


図2. 木粉培地における子実体へのCs吸収率

５．今後の計画

今年度は *P. ostreatus* を用いて Cs 吸収率の比較を液体培養と木粉培養を用いて行った。今後、他の種類の担子菌を用いて Cs 吸収量の高い菌株や培養条件を調べると共に、Cs 吸収に関与する遺伝子のクローニングを行い、相同組換法を用いた遺伝子の機能解析を行っていく。更には Cs 吸収能を高めた形質転換体を作成すると共に、放射性 Cs で汚染された土壌の除染を行っていく。

６．研究成果の発表

神奈川工科大学 応用バイオ科学科 卒業研究発表会　(2014.2.14)

(参考文献)

1) K. Haselwandter et al., "Fungi as bioindicators of radiocesium contamination: pre- and post-Chernobyl activities". Trans. Br. Mycol. Soc., 90, 171–174 (1988).

2) 林野庁ホームページ, 「きのこや山菜の出荷制限等の状況について」, アクセス日2015年10月19日, http://www.rinya.maff.go.jp/j/tokuyou/kinoko/syukkaseigen.html

3) 山口紀子ら, 土壌-植物系における放射性セシウムの挙動とその変動要因, 農環研報 31,75-129 (2012)

4) 平山孝ら、「ヒマワリ栽培による土壌の放射性セシウムに対するファイトレメディエーション効果の検証」日本作物学会講演会要旨・資料集, 234,18-19(2012).

5) S. Yoshida et al. "Radiocesium concentrations in mushrooms collected in Japan" J Environment. Radioact., 22, 141-154 (1994).

6) 杉山ら, 「キノコへの放射性セシウムの移行特性」, Radioisotopes, 42 683-690 (1993)

7) Terada, H. et.al." Influence of alkali elements on the accumulation of radiocesium by mushrooms"J. Radioanal. Nuclear Chem., 235,195-200 (1998).

8) G.Bystrzejewska-Piotrowska, M.Bazala, "A study of mechanisms responsible for incorporation of cesium and radiocesium into fruitbodies of king oyster mushroom (*Pleurotus eryngii*)" J. Environ. Radioact., 99(7), 1185-1191 (2008).

9) Salame T.M.et al., "Predominance of a Versatile-Peroxidase-Encoding Gene, mnp4, as Demonstrated by Gene Replacement via a Gene Targeting System for Pleurotus ostreatus " Appl. Environ. Microbiol. 78(15), 5341-5352 (2012).

嚥下困難の自覚が無い高齢者の嚥下状態におよぼす粘稠液状食品の力学的特性の影響　ー嚥下造影検査と官能評価による嚥下状態の検討ー[1)]

食品機能科学研究室　髙橋　智子

1．研究の目的

本研究では、キサンタンガムを主原料とする市販とろみ調整食品により調製した粘稠液状食品の力学的特性と被験者の嚥下状態の関係について、嚥下困難の自覚や咽喉頭・頸部領域の病変のない高齢被験者により検討した。

2．研究の必要性及び従来の研究

これまで、力学的特性が異なる粘稠液状食品について若年者による嚥下状態の評価を嚥下造影検査により評価してきた。本研究は嚥下障害の既往歴がない高齢者を被験者として力学的特性が異なる粘稠液状食品の嚥下状態の評価を行った。

3．期待される効果

嚥下障害の既往歴がない高齢者の液状食品に対する嚥下状態を嚥下造影検査により詳細に評価できることが本研究の特徴となる。

4．研究の経過及び結果

(1)試料調製

本実験では、キサンタンガムを主原料とした市販とろみ調整食品（トロミパーフェクト，日清オイリオグループ(株)）を、非イオン性血管造影剤（オムニパーク 300[R]，第一三共(株)）への添加濃度を変えて、異なるテクスチャー特性の粘稠液状食品を調製した。硬さ 2×10^2N/m^2 の試料（嚥下造影剤単体試料）、硬さ 4×10^2 N/m^2 の試料（市販プレーンヨーグルトを撹拌した程度：造影剤重量に対し市販とろみ調製食品の添加率を外割 1.4w/w%）、および硬さ 1.6×10^3 N/m^2 の試料（マヨネーズ程度：造影剤重量に対する市販とろみ調製食品の添加率を外割6.1w/w%）の3段階の硬さとした。市販とろみ調整食品の造影剤への添加方法は、市販とろみ調整食品を造影剤に振り入れ、手動で 60 回/分の速さで 1 分間撹拌・混合後、30 分間放置した。

(2)粘稠液状食品の力学的特性の測定方法

1)テクスチャー特性

テクスチャー特性の測定は、レオナー(RE - 33005，(株) 山電)により測定した。粘稠液状食品試料はいずれも、直径 40mm、高さ 15mm の測定用容器に試料厚 15mm で充填し、クリアランス 5mm（圧縮率 66.7%）、直径 20mm の円柱型アクリル製プランジャーにより圧縮速度 10mm/sec で試料を 2 回圧縮して測定した。得られたテクスチャー記録曲線より、硬さ、付着性、凝集性を算出した。

2)流動特性

粘稠液状食品試料の流動特性は、コーン・プレート型回転粘度計(RE550，東機産業(株))により測定した。なお、ずり速度 1.00(s^{-1})未満の低ずり速度領域はバネ緩和法により、ま

た、ずり速度 1.00(s^{-1})以上のずり速度領域は、定速回転法により測定した。

3)官能評価、および嚥下造影検査

官能評価と嚥下造影検査は、東京大学医学部附属病院放射線部で同時に行った。官能評価方法は、順位付けにより評価を行う順位法を用いた。官能評価のパネル、および嚥下造影検査の被験者は同様である。官能評価のパネル、すなわち嚥下造影検査には、嚥下困難の自覚や咽喉頭・頸部領域の病変のない高齢被験者を用いた。嚥下造影検査を開始する直前に被験者に、官能評価用紙を提示しながら、官能評価項目および評価方法の説明を行った。また、造影検査直後に評価結果を聞き取りするので、試食した際の印象を記憶しておいてもらうように伝えた。被験者には、硬さ 2×10^2N/㎡、および造影剤にキサンタンガム系市販とろみ調整食品を添加して調製した硬さ 4×10^2N/㎡、1.6×10^3N/㎡の計 3 種類の試料を 15 名の被験者に各々2 回嚥下させた (n=30)。1 試料につき、5ml を口腔前庭に注入し、合図とともに各試料一回で嚥下するよう指示した。試料の呈示温度は 20±2℃である。評価項目、および評価順序は、口中におけるべたつき感 (べたつくもの 1 位、べたつかないもの 3 位)、口から喉への入りやすさ (入りにくいもの 1 位、入りやすいもの 3 位)、喉から先の通りやすさ (通りにくいもの 1 位、通りやすいもの 3 位) とした。なお、各評価項目において、試料間の差が判別できない場合には、同順位をつけることを許した。

嚥下造影検査には透視のための造影剤として、非イオン性血管造影剤オムニパーク 300^R (第一製薬株式会社、以後、嚥下造影剤と称す) を用いた。X 線透視装置 (DR-1000X : (株) 東芝) を使用し、透視条件は自動調節とした。被験者は、頚部側面像が観察できるように X 線透視台上に立たせた。記録された嚥下造影画像より、定性的項目として①喉頭流入または誤嚥の有無を評価し、定量的項目として②口腔における食塊形成から咽頭への移送時間を示した口腔移送時間(舌の送り込み運動開始時から造影剤食塊の後端が下顎と舌根の交差した部分を通過するまでの時間)、③咽頭移動時間 (造影剤食塊の前端が下顎と舌根の交差した部分を通過してから、造影剤後端が食道入口部を通過するまでの時間)、④嚥下反射惹起遅延時間 (舌骨が急速前方運動 (急速相) を開始してから食塊が梨状陥凹に到達するまでの時間) を測定した。

(3)結果

1)粘稠液状食品の力学的特性

粘稠液状食品試料は硬くなるに従い、付着性は大きくなった。硬さ 2×10^2N/m^2 試料、硬さ 4×10^2 N/m^2 試料で凝集性は 0.97～0.99 を示したが、最も硬い 1.6×10^3 N/m^2 試料で凝集性は 0.82±0.03 を示し、他の試料よりも有意に小さいものとなった ($p<0.01$)。

粘稠液状食品試料のずり速度と粘性率の関係を検討した。いずれの試料のずり速度と粘性率の関係にも、両対数グラフ上で直線関係が示された。定速圧縮運動より得られたテクスチャー特性の硬さが硬くなるに従い粘性率も大となり、流動しにくくなることが示された。市販とろみ調整食品を添加していない硬さ 2×10^2N/m^2 試料は、ずり速度に関わらず一定であった。このことより、硬さ 2×10^2N/m^2 試料は、ずり速度が変化しても粘性率が一定

なニュートン流動を示すことがわかった。一方、嚥下造影剤に市販とろみ調整食品を添加して調製した硬さ 4×10^2N/m^2、1.6×10^3N/m^{2}の試料は、ずり速度が大きくなるに従い粘性率が減少するずり流動化流動を示すことより、非ニュートン流動を示すことがわかった。

2)官能評価

硬さ 1.6×10^3N/m^{2}の試料は、硬さ 2×10^2N/m^{2}試料、4×10^2N/m^{2}試料に比べ、有意に口中においてべたつき、口からのどへ通りにくく、また、のどから先も通りにくいと評価された($p<0.01$)。

3)嚥下造影検査

試料間に有意差が認められたのは、口腔移送時間、および嚥下反射惹起遅延時間であった（いずれも $P<0.05$)。口腔移送時間は、硬さ 1.6×10^3N/m^{2}の試料が硬さ 4×10^2N/m^{2}試料、2×10^2N/m^{2}試料に比べ、有意に延長することが認められた。一方、嚥下反射惹起遅延時間は、硬さ 2×10^2N/m^{2}試料が、硬さ 4×10^2N/m^{2}試料、1.6×10^3N/m^{2}に比べ、有意に短かった。また、硬さ 2×10^2N/m^2 の試料で、のべ 30 人の被験者中 3 人で、嚥下後の造影図に喉頭流入が認められた。

(4)考察

1)粘稠液状食品の物性と官能評価結果の関係

テクスチャー特性の硬さ、付着性が大きくなるに従い、また、流動特性の粘性率が高くなるに従い、粘稠液状食品は口中でべたつき感をより多く感じ、口からのど、また、のどから先においても通りにくくなる傾向にあることが官能評価により示された。これらのことより、テクスチャー特性値、および粘性率により、粘稠液状食品の飲み込み特性（官能評価結果）を推測可能であることが示された。

2) 粘稠液状食品の官能評価と嚥下造影検査の関係

高齢被験者による官能評価結果より、硬さ 1.6×10^3N/m^{2}試料は、硬さ 4×10^2N/m^{2}試料、および 2×10^2N/m^2 に比べ、口中でのべたつき感があり、口からのどへ、またのどから先へ通りにくいことが認められた。嚥下造影検査の結果より、粘稠液状食品試料の口腔移送時間は、硬さ 1.6×10^3N/m^{2}試料が硬さ 4×10^2N/m^{2}試料、および 2×10^2N/m^2 に比べ、有意に延長していることが認められた。このことより、嚥下造影検査より得られた口腔移送時間は、官能評価より得られた口腔で感じるべたつき感などの評価結果が反映していると考えられる。すなわち、嚥下困難の自覚が無い高齢被験者で、口腔でべたつき感をより多く感じ、口からのどへ、またのどから先へ通りにくいと感じる粘稠液状食品は、口腔における食塊形成から咽頭への移送時間が延長すると考えられることが示唆された。嚥下反射惹起遅延時間、すなわち舌骨が急速前方運動を開始してから液状食品が梨状陥凹に到達するまでの時間の長短は、喉頭挙上による気道閉鎖にどれだけ余裕があるかを示している。本研究では最も軟らかく粘性率が低い硬さ 2×10^2N/m^{2}試料の嚥下反射惹起遅延時間が、とろみをつけた硬さ 4×10^2N/m^{2}試料、および 1.6×10^3N/m^{2}に比べ、有意に短いことが認められた。このことは、気道閉鎖が十分に行われないうちに硬さ 2×10^2N/m^2 試料がとろみをつけた他の

試料に比べ、梨状陥凹に早く到達することを示しており、そのため、高齢被験者の一部に喉頭流入が認められたものと考えられる。粘稠液状食品の物性と嚥下反射惹起遅延時間の関係は、健常若年者による結果と同様であった。このことより、健常若年者においても、また、嚥下困難の自覚の無い高齢被験者においても、粘稠液状食品の物性が嚥下反射惹起遅延時間に大きく影響していることが示された。

前報[2)]で健常若年者により、硬さ 2×10^2N/㎡試料（嚥下造影剤単体試料）を含む3段階の硬さの粘稠液状食品を用いて嚥下造影検査を行ったが、硬さ 2×10^2N/㎡試料で喉頭流入を含む誤嚥は、全ての被験者において認められなかった。しかし、本研究で用いた高齢被験者の一部において、硬さ 2×10^2N/㎡試料で喉頭流入が認められた。このことより、軟らかく、粘性率が低く、ニュートン流動を示す硬さ 2×10^2N/㎡試料は、嚥下時に舌骨が急速前方運動を開始してから梨状陥凹に到達するまでの時間が短いため、一部の嚥下困難の自覚が無い高齢被験者で、気道閉鎖が十分に行われないうちに梨状陥凹に到達していることが示された。

本研究の結果より、軟らかく、粘性率が低いさらさらとした液状食品を嚥下する際、嚥下困難の自覚が無い高齢者でも誤嚥のリスクが高くなることが示唆された。このことより、嚥下困難の自覚が無い高齢者でも、さらさらとした液状食品を喫食する際、適度なとろみをつけることで、より安全な嚥下を確保できるものと考えられる。

(5) 参考文献

1) 髙橋智子, 田山二朗, 二藤隆春, 大越ひろ, 嚥下困難の自覚が無い高齢者の嚥下状態におよぼす粘稠液状食品の物性の影響ー嚥下造影検査と官能評価による嚥下状態の検討ー 日本摂食嚥下リハビリテーション学会誌, 19(1), 17-23, 2015

2) Takahashi T, Nito T, Tayama N, et al.: Effects of Physical Properties and Oral Perception on Transit Speed And Passing Time of Semiliquid Foods from the Mid-Pharynx to the Hypopharynxi, *J. Texture Studies*,33(6),585-59,2003.

5．今後の計画

本研究では嚥下困難の自覚や咽喉頭・頸部領域の病変のない高齢者を被験者として、官能評価と嚥下造影検査により嚥下状態の評価を行った。今後は、嚥下に障害を有する被験者を用い、力学的特性を把握した粘稠液状食品の嚥下状態を検討する予定である。

6．研究成果の発表

本研究は日本摂食嚥下リハビリテーション学会誌（査読あり、2015 年）に掲載された。また、2016 年 2 月発刊日本調理科学会誌講座に掲載される予定である。

焼成ホタテ貝殻ナノ粒子の抗菌特性

ヘルス・コントロール研究室　　澤井 淳

1．研究の目的

ホタテ貝殻の一部は、食品添加物、塗装材料、舗装材料等として使用されているが、大部分は産業廃棄物として扱われている。日本のホタテの収穫地域では、大量の貝殻が山積みにされ、内臓に含まれた重金属による土壌汚染、悪臭などが深刻な問題となっている。したがって、ホタテ貝殻のさらなる利用に関する研究が求められている。これまでの研究で、焼成ホタテ貝殻（HSS）粉末は、強い抗菌活性を有することが示されている。また、近年、ナノ技術の進展が著しく、医薬品、化粧品やヘルスケア製品など様々な分野ですでに応用され始めている。本研究においては、湿式ミルを用いて HSS ナノ粒子を作製し、細菌の栄養細胞および芽胞に対する抗菌活性を評価し、マイクロ粒子と比較した。

2．研究の必要性及び従来の研究

ホタテ貝殻の主成分は $CaCO_3$ であり、加熱により CaO に変化する。HSS の抗菌活性は、この CaO を生成によるものである。食品プロセスにおけるこれらの材料の使用は、ミネラル源であるとともに、食料のシェルフライフを延長し、さらに貝殻による汚染の減少にも寄与すると期待される。実際、HSS 粉末処理によるカットキャベツ、レタス、フランクフルトソーセージ、手羽先等の微生物制御における有効性が報告されている[1)]。

また、近年、ナノ技術の進展が著しく、ナノ粒子化することにより、光透過性や反応性の改善が確認され、様々な新機能の発現が報告されている。Jeong らは 50－900 nm のナノ粒子の HSS を調製し、DDS や化粧品の原料への適用への可能性を示した[2)]。しかしながら、HSS ナノ粒子の抗菌活性の定量的な評価と、マイクロ粒子との比較は行われていない。

3．期待される効果

次亜塩素酸は、その抗菌活性と低コストから消毒剤として広く使用されている。しかしながら、塩素化した有機化合物の形成および耐性菌の発生は、生鮮食品の除菌処理における次亜塩素酸の使用についての懸念を引き起こしている。生鮮食料品と調理設備の消毒に広く使用される次亜塩素酸の濃度は、ほぼ 50－200 ppm の範囲である。焼成貝殻粉末処理では 1000 ppm 以上であり、次亜塩素酸と焼成粉末の作用濃度には大きな差がある。本研究で示される焼成ホタテ粉末のサイズ減少の効果は、低粉末濃度で高い殺菌効果を発揮できることを意味し、食品での使用における次亜塩素酸との差を縮めるための重要なステップである。さらなるこの分野の研究と開発が必要である。

4．研究の経過及び結果

4.1 実験方法

ホタテ貝殻ナノ粒子は、1100℃で加熱した貝殻を湿式ミル（東京ナノバイオテクノロジー㈱）を用いて粉砕し作製した。得られたナノ粒子スラリー（40%）は、生理食塩水で希釈し、任意の濃度のスラリーを調製した。HSS ナノ粒子スラリーの主成分は、$Ca(OH)_2$ であり、$Ca(OH)_2$ の HSS マイクロ粒子も調製した。粒子サイズは、レーザー回折式粒度分布測定装置（SALD-7100、島津㈱）を用いて測定した。

大腸菌 NBRC 3301 を細菌の栄養細胞として使用した。枯草菌芽胞懸濁液は、栄研化学㈱から購入した。本研究で使用する枯草菌芽胞は、pH 1（H_2SO_4）および pH 13（NaOH）で 60 分処理しても死滅しないことを確認した。

大腸菌あるいは芽胞懸濁液を HSS スラリーに分注し実験を開始した。それぞれの初期菌濃度は約 10^5 から 10^6 CFU/mL である。定期的にサンプルリングし、普通寒天培地（栄研化

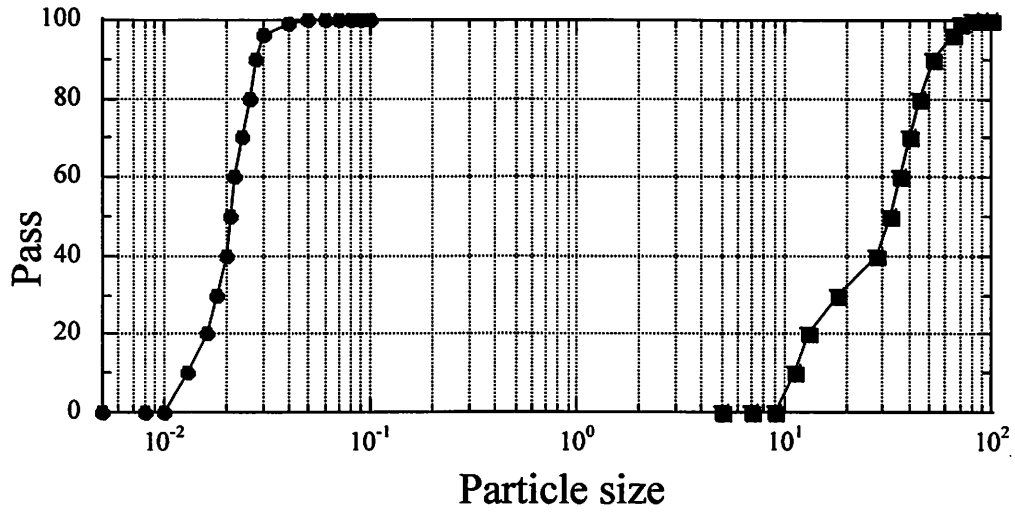


図 1　HSS ナノ粒子●と HSS マイクロ粒子■のサイズ分布

表1 大腸菌のHSSマイクロ粒子およびHSSナノ粒子処理

Powder	Conc. [mg/ml]	pH	log_{10} CFU/ml			
			0s	20 s	40 s	60 s
Micro	0.1	11.1	9.4	8.8	8.5	8.3
	0.25	12.0		8.6	8.1	7.7
	0.5	12.3		8.2	7.3	7.0
Nano	0.1	11.6		8.3	7.7	7.4
	0.25	12.1		8.2	7.5	6.3
	0.5	12.4		6.5	N.D	N.D

N.D: <2.0

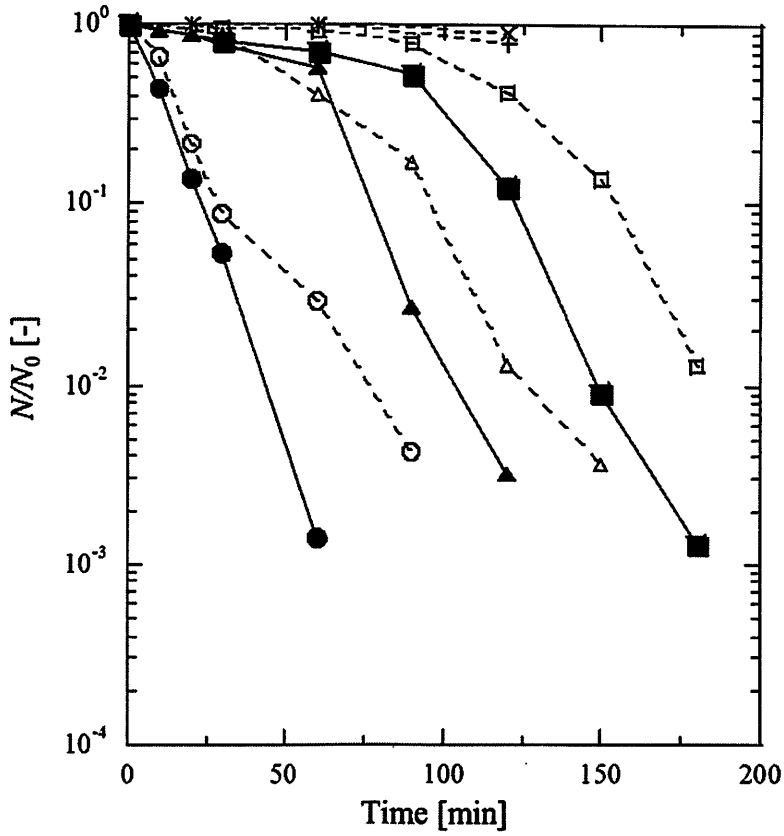


図 2　枯草菌芽胞に対する HSS (2.5 mg/mL) ナノ粒子 (黒点)、HSS マイクロ粒子 (白点) の殺芽胞活性と温度の影響.　Key : 四角、25℃ ; 三角、37℃ ; 丸、60℃ ; ＋、NaOH (pH13) ; ×、H_2SO_4 (pH1)

学) で培養した。HSS スラリー温度は、恒温槽により 25－60℃で制御した。全ての実験は、3 回行い平均値をグラフにプロットした。

4. 2 結果および考察

作製した HSS ナノ粒子の直径は約 10－60 nm の範囲に分布していた。メディアン径およびモード径はともに 21 nm であった。HSS マイクロ粒子は、直径が 9－100 μm で分布しており、メディアン径およびモード径はそれぞれ 32 と 42 μm であった (図 1)。Jeong らが調製した HSS ナノ粒子のメディアン径および最大頻度径は約 70 と 75 nm であり、本研究で使用したものよりかなり大きかった。

表 1 に大腸菌に対する HSS ナノ粒子とマイクロ粒子スラリーの抗菌活性の比較を示す。ナノ粒子とマイクロ粒子の大腸菌に対する抗菌活性は、HSS 濃度が上がると増大した。ナノ粒子はマイクロ粒子より、すべての濃度範囲で大腸菌の減少が大きかった。特にナノ粒子 0.5 mg/mL の濃度では、40 秒の処理で大腸菌は検出限界以下 ($\log_{10}$ CFU/mL < 2) となった。これらの結果は、HSS ナノ粒子がマイクロ粒子よりも著しく高い抗菌活性を持つことを示している。

細菌芽胞は高い休眠性と加熱や様々な化学物質に対する抵抗性を有しており、芽胞の不活性化は食品プロセスにおいて重要なステップである。図 2 に枯草菌芽胞に対する 2.5 mg/mL の HSS ナノ粒子と HSS マイクロ粒子の殺芽胞活性を示す。スラリーの pH は、25、37、60 ℃でそれぞれ 12.7、12.7、12.4 であった。本研究で使用している枯草菌芽胞はアルカリ処理（pH 13）に高い抵抗性を示すが、HSS は枯草菌芽胞の生存率を大きく減らすことが出来た。特にナノ粒子は、25 ℃と 37 ℃ではほぼ 1 オーダー、60 ℃では 2 オーダー以上、マイクロ粒子よりも強い殺菌芽胞活性を示した。また、60℃での 5 mg/mL、30 分処理では、3 オーダー以上の減少が確認され、温和な加熱との組み合わせは非常に有効であった。

５．今後の計画

最近、食品処理とバイオフィルムの制御のために焼成貝殻マイクロ粒子を使用した報告がある。しかしながら、ナノ粒子のバイオフィルムに関するデータはない。今後はナノ粒子によるバイオフィルムへの影響および制御を検討して行く予定である。

６．研究成果の発表

1) 高橋智輝，山口雄也，澤井淳，小林大祐，庄野厚，松山秀人，大竹勝人: キトサン/銀ハイドロゲル膜の創製と抗菌特性に及ぼす膜作製方法の影響. 日本海水学会誌, **68**, 81-88 (2014).
2) Watanabe, T., Fujimoto, R., Kikuchi, M., Sawai, J., Yahata, S., Satoh, T.: Antibacterial characteristics of heated scallop-shell nano-particles. *Biocontrol Science*, **19**, 93-97 (2014).
3) Yasue, S., Sawai, J., Kikuchi, M., Nakakuki, T., Sano, K., Kikuchi, T.: Sporicidal characteristics of heated dolomite powder against *Bacillus subtilis* spores. *Biocontrol Science*, **19**, 113-119 (2014).
4) 乾貴誌、浅川大輔、豊角浩之、瑞慶覧章朝、澤井淳、當山広幸、中田栄寿、江原由泰：海水のアルカリ化に対するマグネシウム電極を用いた電解工程の省電力化. 日本マリンエンジニアリング学会誌, **50**, 13-118 (2015).
5) 乾貴誌、瑞慶覧章朝、浅川大輔、豊角浩之、澤井淳、當山広幸、中田栄寿、江原由泰：電気分解による海水のアルカリ上昇に及ぼす海水成分の影響－海水による湿式スクラバの性能向上に関して－. 環境技術, **44**, 105-112 (2015).

（文献）

1) Sawai, J.: Antimicrobial characteristics of heated scallop shell powder and its application. *Biocontrol Science*, **16**, 95-102 (2011).
2) Jeong, M. S., Park, J.S., Song, S.H., Jang, S.B.: Characterization of antibacterial nanoparticles from the scallop, *Ptinopecten yessoensis*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **71**, 2242-2247 (2007).

リパーゼを用いた含油排水処理

ヘルス・コントロール研究室　　局　俊明

1．研究の目的

微生物を用いた含油排水処理工程においてリパーゼを添加することにより得られる効果を明確化することを目的とした。

2．研究の必要性及び従来の研究

現在、東京湾においては、集中豪雨の後などに、大きなものではサッカーボールほどの大きさの油の塊（オイルボール）が浮遊する現象が確認され、社会問題となっている。このオイルボールは、排水中に含まれる油脂分が下水道管の内部などに徐々に付着、成長したものと考えられ、排水中の油脂分を高効率に除去できる処理技術が求められている。筆者らは、下水処理施設および大学食堂グリースとラップにおいて生成したオイルボールの成分分析を行い報告した[1)]。

図１　下水管内部の状況　　図２　オイルボール
（東京都下水道局ホームページより）

一般に、含油処理技術としては活性汚泥法という微生物処理が適用されているが、微生物自体の油脂分解能力はそれほど大きくなく、また、大量の油脂が流入した場合には、微生物フロックに油脂が吸着し、活性汚泥処理自体が阻害されることが明らかになっている。このため、従来型の活性汚泥処理に変わる、高効率な含油排水処理技術の開発が、喫緊の課題となっている。

このような背景の下、筆者らは、油脂分解能力を有するリパーゼの利用に着目した。既往の研究[2)]では、含油排水中の油脂を、リパーゼで処理した後、通常の活性汚泥処理をするという２段階処理の検討が行われている。この報告では、リパーゼ添加により、油脂（中性脂肪）がグリセリンと高級脂肪酸に分解され、その後の生物処理により、グリセリンと高級脂肪酸が分解され、処理の効率化が達成されることと、リパーゼが高価であり、実用化には処理コストの低減が課題であることが述べられている。

筆者らは、既往の研究を参考に、まず、リパーゼによる油脂（菜種油）の分解を確認したうえで、リパーゼを生物処理反応タンクに投入する、１段処理での処理の可能性を探ることとした。

3．期待される効果

リパーゼの添加により、含油排水中油脂分の大半を占める中性脂肪（トリグリセリド）

の分解速度が向上し、反応タンクの小型化と、それに伴う建設費および運転費の低減が期待される。

４．研究の経過及び結果

４．１　実験方法

１）リパーゼと菜種油の反応性に関する回分実験

水 100mL、菜種油 1.5g およびリパーゼ（リパーゼ ASY アマノ）0.025g を 300mL 三角フラスコに投入したサンプルを分析回数分準備し、攪拌を行いつつ、所定経過時間ごとに、各三角フラスコ内容物を全量回収し、Bligh&Dyer 法による油脂総重量測定と、TLC 法による回収油脂の形態分析を実施した。実験は 25℃程度の室温条件化で実施した。

２）リパーゼと活性汚泥を共存させた菜種油分解実験

水 185mL、菜種油 1.5g、人工排水 5mL、リン酸緩衝液 10mL、リパーゼ（リパーゼ ASY アマノ）0.0234g および活性汚泥（乾燥重量として 0.2g）を 300mL 三角フラスコに投入したサンプルを分析回数分準備し、攪拌を行った。実験は 25℃程度の室温条件化で実施した。所定経過時間ごとに、各三角フラスコ内容物を全量回収し、Bligh&Dyer 法による油脂総重量測定と、TLC 法および GC-MS 法（島津製 QP-5050）による回収油脂の総重量測定と油脂の形態分析を実施した。

４．２　結果と考察

１）リパーゼと菜種油の反応性に関する回分実験

図３に、回収された油脂の TLC 測定結果を示す。

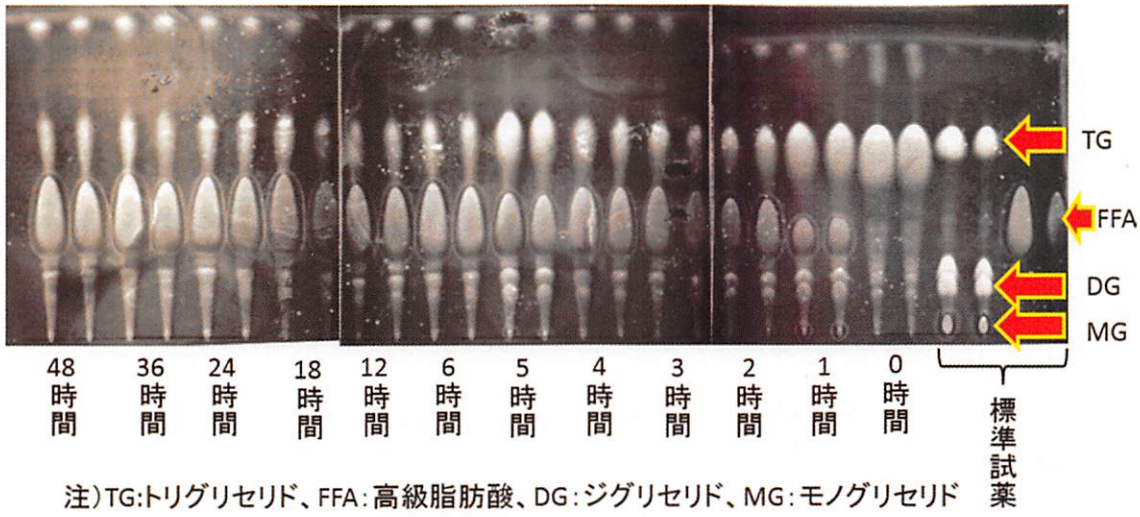


図3　菜種油にリパーゼを作用させた実験におけるTLC測定結果

図３に示されたように、実験開始当初の 3 時間程度まで、トリグリセリド（TG）のスポットサイズの現象と高級脂肪酸（FFA）の生成が確認されるが、その後、48 時間経過までは、

多少の相違はあるものの、TG、FFA、DG、MG はほぼ一定比率で存在した。リパーゼ存在条件下において、TG がほぼなくなるまで反応が進行するのではなく、各成分濃度が平衡状態に達することが確認された。リパーゼは、TG の分解のみならず、FFA からの TG の合成にも利用されており、本実験でも、TG と FFA の共存状態での反応停止（見かけ上は反応が停止しているが、実際は正反応と逆反応の速度がバランス）が確認された。この様な平衡関係あるということは、TG の分解促進のためには、反応生成物である FFA を除去すれば、TG の分解が促進されることを示唆する。

なお、ここでは詳細は省略するが、リパーゼの投入の有無、経過時間にかかわらず、油脂総量に変化は見られなかった。これは、トリグリセリドの分解産物である高級脂肪酸も、クロロホルムに溶解し、油脂重量として測定されるためと考えられる。

2）リパーゼと活性汚泥を共存させた菜種油分解実験

油脂総量の変化の測定結果を図４に、TLC 測定の結果を図５に示す。なお、TLC 測定においては、回収された油脂の一定量を用いて実験を行っているため、成分構成比較のみが可能であり、成分毎の定量的検討は図４の結果と合わせて考える必要がある。

図４に示されたように、活性汚泥単独の場合と比較して、活性汚泥にリパーゼを添加した場合には、より大きな油脂総量の低下が見られた。

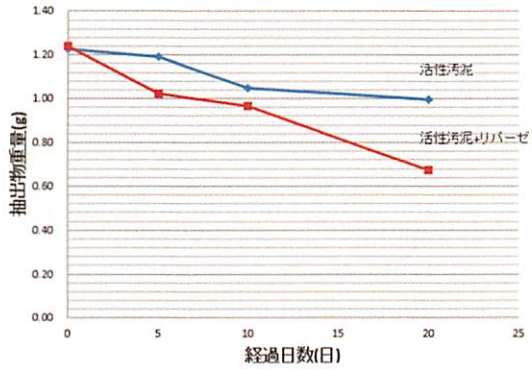


図４　油脂総量の経日変化

以上の結果から、リパーゼ投入により TG から FFA への分解が促進され、さらに、活性汚泥微生物による FFA の分解により、TG の分解がさらに進んだものと推測している。

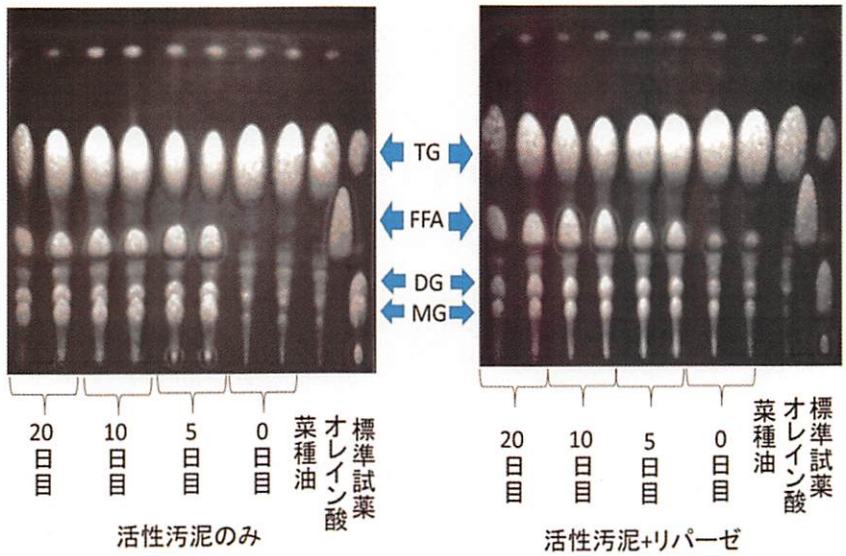


図５　TLC 測定による油脂成分比率の経日変化

次に、Bligh&Dyer 法で回収された油脂の GC-MS による成分分析結果を図５、図６に示す。両図の比較から、リパーゼ添加によりオレイン酸、リノール酸ともに分解が進んでいることがわかる。オレイン酸とリノール酸の総量はリパーゼ添加により 3 分の 1 程度まで減少しているにもかかわらず、図４では、リパーゼ添加系列において 55％程度の油脂が残存していることは、1）オレイン酸、リノール酸以外の油脂の分解率が低い、2）オレイン酸、リノール酸の分解産物が、Bligh&Dyer 法で回収される物質に変化している、ことを示唆するものである。

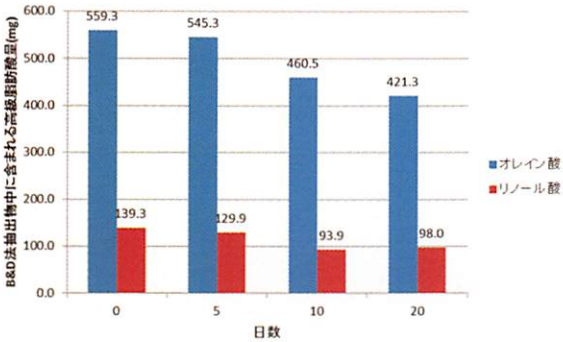


図５　油脂総量濃度の経日変化
（リパーゼ無添加系）

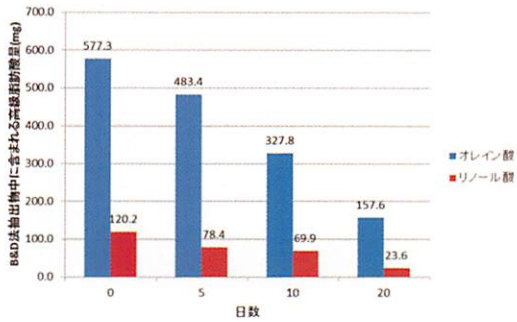


図６　油脂総量濃度の経日変化
（リパーゼ添加系）

５．今後の課題

今回の実験において、排水処理のような水系反応においてもリパーゼ添加によりトリグリセリドと高級脂肪酸の間の平衡関係が確認され、また、活性汚泥にリパーゼを添加することで、油脂の除去速度が上昇することが確認された。また、以下のような今後の課題が抽出された。

1）油脂分解過程におけるオレイン酸、リノール酸以外の成分の分解性の確認
2）種々のリパーゼの TG 分解能力の確認と、排水処理に適したリパーゼの選定
3）高価なリパーゼの使用量を最小化する技術の開発

６．研究成果の発表

・土田将貴、含油排水処理システムにおけるリパーゼ添加の実用性評価、神奈川工科大学卒業研究発表会（2015 年 2 月）

（参考文献）

1) 局俊明ら、食堂排水および下水中のオイルボール構成成分と流入水中成分の関係、用水と排水、vol.56、No.5、pp.358-363（2014）

2) 中村孝一ら、リパーゼを利用した油脂含有排水の生物処理、用水と排水、vol.37、No.4、pp.308-313（1995）