日本食品保蔵科学会誌

VOL. 42　NO. 1

会　　長　高井　陸雄　副　会　長　太田　英明　小宮山美弘　早坂　　薫
編集委員長　太田　英明
編 集 委 員　稲熊　隆博　井上　茂孝　今堀　義洋　恩田　　匠　竹永　章生
古庄　　律　松田　茂樹　宮本　敬久

＜報　　文＞
アルファ化玄米が肥満モデルラットにおける血中コレステロール値に及ぼす影響
……（3）
／小林謙一・山岸彩乃・中川　徹・前田雪恵
伊藤有紗・山田千晴・徳永洸貴・藤田沙也
鈴木　司・辻井良政・高野克己・山本祐司

＜報　　文＞（英文）
小麦グリアジン（グリアA）の生地形成および
製パン性に及ぼすPDI-ERO1によるS-S結合形成の作用 ……（9）
／野口智弘・塩野弘二・岡　大貴
野口治子・高野克己

＜技術報告＞
未利用モモ花弁の茹でこぼし処理による色調ならびにシアン化合物の変化……（15）
／樋口かよ・尾形美貴・木村英生
中川裕子・仲尾玲子・飯野久和

オリーブ葉由来ヒドロキシチロソール蛍光化誘導物を用いた細胞内動態解析法について……（23）
／小林謙一・茂木裕暉・高橋明日香
相澤有美・鈴木　司・山本祐司

＜総　　説＞
包装資材の特性に基づいた青果物の輸送並びに貯蔵中の品質保持に関する研究……（29）
／石川　豊

＜文献抄録＞……（35）
＜本会記事＞……（36）
＜会　　告＞……（39）

Food Preservation Science

CONTENTS OF VOL. 42 NO. 1 (2016)

<Article> (Japanese)

Effect of Pregelatinized Brown Rice on Serum Cholesterol Levels in Obese Model Rats
KOBAYASHI Ken-Ichi, YAMAGISHI Ayano, NAKAGAWA Toru, MAEDA Yukie, ITOH Arisa, YAMADA Chiharu, TOKUNAGA Kouki, FUJITA Saya, SUZUKI Tsukasa, TSUJII Yoshimasa, TAKANO Katsumi and YAMAMOTO Yuji ····· (3)

<Article> (English)

The Action of the SS Bond Formation Due to the PDI-ERO1 to Wheat Gliadin (Glia. A) on the Dough Formation and Baking Quality
NOGUCHI Tomohiro, SHIONO Koji, OKA Daiki, NOGUCHI Haruko and TAKANO Katsumi ····· (9)

<Technical Report> (Japanese)

Effect of Boiling on Color and Cyanogenic Compound Content of Unused Peach Petals
HIGUCHI Kayo, OGATA Miki, KIMURA Hideo, NAKAGAWA Yuko, NAKAO Reiko and IINO Hisakazu ····· (15)

Intracellular Kinetic Analysis Using Fluorescence Labeling Olive Leaf Polyphenol
KOBAYASHI Ken-Ichi, MOGI Yuki, TAKAHASHI Asuka, AIZAWA Yumi, SUZUKI Tsukasa and YAMAMOTO Yuji ····· (23)

<Review> (Japanese)

Study on the Packaging Materials for Maintaining Postharvest Quality of Fresh Produce during Transportation and Storage
ISHIKAWA Yutaka ····· (29)

アルファ化玄米が肥満モデルラットにおける血中コレステロール値に及ぼす影響

小林謙一[*1§]・山岸彩乃[*1§]・中川　徹[*2]・前田雪恵[*1,*3]
伊藤有紗[*1]・山田千晴[*1]・徳永洸貴[*1]・藤田沙也[*1]
鈴木　司[*1]・辻井良政[*1]・髙野克己[*1]・山本祐司[*1]

＊1　東京農業大学応用生物科学部生物応用化学科
＊2　日立健康管理センタ
＊3　アルファー食品㈱

Effect of Pregelatinized Brown Rice on Serum Cholesterol Levels in Obese Model Rats

KOBAYASHI Ken-Ichi[*1§], YAMAGISHI Ayano[*1§], NAKAGAWA Toru[*2], MAEDA Yukie[*2,*3], ITOH Arisa[*1], YAMADA Chiharu[*1], TOKUNAGA Kouki[*1], FUJITA Saya[*1], SUZUKI Tsukasa[*1], TSUJII Yoshimasa[*1], TAKANO Katsumi[*1] and YAMAMOTO Yuji[*1]

＊1　*Department of Applied Biology and Chemistry, Faculty of Applied Bioscience, Tokyo University of Agriculture, 1-1-1, Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo　156-8502*
＊2　*Hitachi Health Management Center, 4-3-16, Osecho, Hitachi-shi, Ibaraki　317-0076*
＊3　*Alpha Food Co., Ltd., 645, Kitaaraki, Taisya-cho, Izumo, Shimane　699-0722*

The purpose of this study was to evaluate the effects of pregelatinized brown rice on cholesterol metabolism in obesity using Zucker fatty（ZF）rats. Six-week-old male ZF rats and their lean littermates were divided into four experimental groups;（1）Lean: Zucker lean rats fed the AIN93G;（2）Control: ZF rats fed the AIN93G;（3）WR: ZF rats fed the AIN93G in which cornstarch was replaced with pregelatinized white rice;（4）BR: ZF rats fed the AIN93G in which cornstarch was replaced with pregelatinized brown rice. The rats were fed each diet for 10 weeks. Significant decreases in serum and hepatic cholesterol levels were observed in the WR and BR groups compared with the control group. In particular, this cholesterol-lowering effect was more remarkable for the BR than WR group. Gene expression of HMG-CoA reductase was significantly increased in the WR and BR groups relative to the control group. In addition, CYP7A1m RNA levels showed a significant increase in the BR compared with the WR group. Our results indicate that pregelatinized brown rice has a serum cholesterol-lowering effect in obesity.

（Received Jun. 29, 2015；Accepted Oct. 30, 2015）

Key words：*pregelatinized brown rice, cholesterol, CYP7A1, obesity, Zucker fatty rat*
α化玄米，コレステロール，コレステロール7α水酸化酵素，肥満，Zuckerラット

近年，日本では食生活の欧米化および運動不足によって，内臓脂肪型肥満とそれによって引き起こされるメタボリックシンドロームの罹患者の増加が問題となっている[1)]。メタボリックシンドロームの最終的な症状として動脈硬化症がある。動脈硬化症は，血管壁にコレステロールが粥状に蓄積した結果，血管をふさぐことで起こる。したがって，高コレステロール血症は，メタボリックシンドロームや動脈硬化症のリスクファクターといえる[2)]。

＊1　〒156-8502　東京都世田谷区桜丘1－1－1，E-mail：yujiya@nodai.ac.jp
＊2　〒317-0076　茨城県日立市会瀬町4－3－16，E-mail：tohru.nakagawa.rh@hitachi.com
＊3　〒699-0722　島根県出雲市大社町北荒木645
§　両者の貢献は同等である。（Equal Contribution）

従来，食事性コレステロールの摂取量に注意が払われてきたが，日本人の食事摂取基準（2015年版）では，コレステロールの目標量が，科学的根拠に欠けることを理由に撤廃された[3]。しかし，適正な血中コレステロール値の管理が重要であることには変わりなく，薬理学的な手法での改善が積極的に行われている。実際に，スタチン系の薬剤は，高コレステロール血症の治療薬として広く用いられている[4]。しかし，スタチン系の薬剤は，血中コレステロール低下には劇的な効果を示す一方で，2型糖尿病のリスクを高めるという報告もある[4]。このような薬剤による改善は，副作用の問題をはらんでいるだけでなく，医療経済上の圧迫要因となることから，コレステロール代謝を適正化する食品素材の探索が重要となっている。

コメは，アジアを中心に世界の人口の約半数が主食としている重要な穀物である。日本でも，主食源としての地位はゆるぎないものの，近年の食生活の多様化によってコメの消費量が減少の一途をたどっている。そこで，コメの主食源以外の付加価値が模索されてきている。玄米は，未搗精のコメであり含有している糠成分にさまざまな生体調節機能があることが注目されている。これらの効果が，糠に含まれている食物繊維[5]，植物ステロール[6]やγ-オリザノール[7]，γ-アミノ酪酸（GABA）[8]，ビタミンE[9]などの作用であると報告されている。

熱風乾燥アルファ化（以下α化）米は，米飯から急速に水を熱風で取り除き，水分を15%以下にした米飯加工米である。その保存性や利便性の高さなどから学校給食，備蓄米そして病院食などに利用されている[10)~14)]。従来，α化米は，白米を中心に生産されてきたものの，近年では玄米についても生産されはじめ，単なる主食源だけでなく，生体調節機能も含めて期待されている。もしα化玄米に生体調節機能とくにコレステロールの代謝改善機能があることを明らかにできれば，α化玄米のみならずコメの消費量の向上に寄与するものと考えられる。しかしながら，α化玄米のコレステロール代謝改善効果に関する研究報告は，ほとんどなされていないのが実情である。

一方，玄米の機能性に関する動物実験は，数多く行われているが，抽出成分を用いた報告は多いのに対し，玄米本体を用いた検討については少ない。それに加えて，玄米本体を用いる動物実験にしても，玄米の炊飯やα化などの加工に関しては考慮されておらず，統一的な評価がなされていない。

本報告では，私たちの食生活に即した玄米であるα化玄米が，肥満における体内の高コレステロール状態に対して改善効果を有するのかどうかを明らかにする目的で，肥満モデル（Zucker Fatty）ラットを用いた検討を行った。

実験材料および方法

1．実験動物および飼育方法

6週齢の雄性Zucker-Fatty（ZF）ラット（日本チャールス・リバー㈱30匹を，AIN93Gで4日間予備飼育した後，Control群，α化白米（WR）群，α化玄米（BR）群の3群に分け，各群10匹として10週間飼育した。なお，ZFの比較対照として，ZFの野生型である雄性Zucker-Leanラット10匹を用い同様に飼育したものをLean群とした。表1に飼料組成を示した。Lean群とControl群には，AIN-93Gを給餌した。WR群用飼料またはBR群用飼料は，AIN93-Gを基本飼料として，炭水化物源であるコーンスターチとα化コーンスターチをすべてα化白米またはα化玄米に置き換えたもの（53重量%）を調製した。α化白米およびα化玄米ともに，アルファー食品㈱より供給されたものを使用し，それらをジェット粉砕機（㈱セイシン工業）にて，粒度150㎛以下（100メッシュパス）に粉砕した粉末を飼料に用いた。

飼育に関しては，東京農業大学高次生命機能解析センターのクリーン飼育室を使用した。飼育期間中，動物飼育室は，温度25±3℃，湿度55±10%に保持し，照明時間は8：00～20：00の12時間とし，飼料と飲料水は自由摂取とした。飼料摂食量は毎日，体重は1日おきに測定した。実験最終日は16時間の絶食後，ペントバルビタール麻酔下で開腹し，心臓より採血した。採取した血液は，血清分離管（クロットチューブ-A，極東製薬工業）を用いて1,000×gで15分間遠心分離して血清を得た。肝臓は摘出後直ちに秤量し，生理食塩水を用いて灌流し，血液を十分に除去した後，その後の実験に供するまで

表1　各飼料組成表

組　成	Control Lean	WR	BR
カゼイン	200.0	200.0	200.0
コーンスターチ	397.5	−	−
α-コーンスターチ	132.0	−	−
ショ糖	100.0	100.0	100.0
大豆油	70.0	70.0	70.0
食物繊維	50.0	50.0	50.0
ミネラル（Mineral mixture）	35.0	35.0	35.0
ビタミン（Vitamin mixture）	10.0	10.0	10.0
L-シスチン	3.0	3.0	3.0
重酒石酸コリン	2.5	2.5	2.5
tert-ブチルヒドロキノン	0.014	0.014	0.014
アルファ化白米粉末	−	529.5	−
アルファ化玄米粉末	−	−	529.5
合　計	1,000	1,000	1,000

LeanはZucker LeanラットにAIN93Gを給餌した群，ControlはZucker FattyラットにAIN93Gで給餌した群，WRはZucker Fattyラットにアルファ化白米を給餌した群，BRはZucker Fattyラットにアルファ化玄米を給餌した群を表す。

－80℃で保存した。

なお，動物実験に関しては，「実験動物の飼養および保管等に関する基準」（平成18年４月28日，環境省告知第88号）に則り，また東京農業大学動物実験委員会の承認のもとで実施した。

２．血清総コレステロールおよびHDL-コレステロールの測定

血清脂質中の総コレステロール，HDL-コレステロールは，オリエンタル酵母㈱に解析を委託した。

３．肝臓コレステロールの測定

肝臓脂質は，FOLCH *et al.* の方法[16]に準じて抽出した。具体的には，肝臓0.5ｇにメタノール15mℓを加えて摩砕し，クロロホルム30mℓを加え，40℃で30分間振とう抽出した。その後，クロロホルム：メタノール（２：１v/v）で50mℓに調製後，ろ過してろ過液を得た。そのろ過液に対し，0.88%塩化カリウム水溶液12.5mℓを加えて，軽く振とう後，４℃で一晩静置した。上層を取り除き，下層30mℓをナスフラスコに移して減圧乾固し，石油エーテル20mℓで溶解した。その後，溶解液から２mℓを分取し乾固後，２-プロパノール500μℓで再溶解し，それぞれの分析試料とした。

分析試料中の総コレステロールはコレステロールE-テストワコー（和光純薬工業㈱）を用いて測定した。

４．総RNAの抽出

肝臓組織100mgにRNAiso Plus（タカラバイオ㈱）１mℓを加えて摩砕した後，クロロホルム200μℓを加えて懸濁させ，室温５分間静置した。この懸濁液を12,000×gで15分間，４℃で遠心分離後，回収した上清に２-プロパノール１mℓを加えて混合して，室温で10分間静置後，12,000×g，10分間，４℃で遠心分離して，沈殿物を回収した。沈殿物を75%エタノールで洗浄した後に，乾燥させ，RNase-free水で溶解した。

５．肝臓コレステロール代謝関連遺伝子発現量の測定

総RNA500ngにPrimeScript RT Master Mix（タカラバイオ㈱）を加えて，15分間37℃で反応後，５秒間98℃で反応させて，cDNAを合成した。

このcDNAとFast SYBR Green Master Mix（Applied Biosystems）とを反応させて，OneStep Real Time PCR System（Applied Biosystems）を用いて，定量的PCRを行った。

定量的PCRのプライマーとして，3-ヒドロキシメチルグルタリルCoAレダクターゼ（HMGR）に関しては，5'-TGTGGGAACGGTGACACTTA-3'（Forward），5'-CTTCAAATTTTGGGCACTCA-3'（Reverse）の配列のものを用いた。7α-水酸化酵素（CYP７A１）に関しては，5'-GCTTTACAGAGTGCTGGCCAA-3'（Forward），5'-CTGTCTAGTACCGGCAGGTCATT-3'（Reverse）の配列のものを用いた。内部標準として用いたβ-actinのプライマーは，5'-CTGACAGACTACCTCATGAAGATCC-3'（Forward），5'-TAGCACAGCTTCTCTTTAATGTCAC-3'（Reverse）の配列のものを用いた。

６．統 計 処 理

測定値は，平均値±標準偏差で示した。多群間の比較は，一元配置分散分析（ANOVA）後，Tukey-Kramer法を用いて行い，有意水準を危険率５%未満とした。

実 験 結 果

１．飼料摂食量，初体重，終体重および体重変化の比較

実験期間中の飼料総摂食量，初体重，終体重および体重変化を表２に示した。

まず，肥満モデルであるZFラット（Control群）とその比較対照となるZucker Leanラット（Lean群）と比較した結果，Control群（1,761±81ｇ/10週間）がLean群（1,222±46ｇ/10週間）に対して，総摂食量に有意な増加が認められた（$p<0.01$）。また，Control群は初体重が164.6±10.4ｇ，終体重が538.5±32.2ｇ，そして体重変化が378.2±26.4ｇであった。Lean群は，初体重が138.6±6.2ｇ，終体重が391.1±37.2ｇ，そして体重変化が273.1±21.3ｇであった。これら初体重，終体重および体重変化については，Control群がLean群に対していずれも有意な増加（ともに$p<0.01$）が認められた。

次にα化白米およびα化玄米食での影響を検討した。WR群は，総摂食量が1,666±108ｇ，初体重が161.5±9.4ｇ，終体重が562.1±45.4ｇ，そして体重変化が404.1±46.4ｇであった。また，BR群は，総摂食量が1,674±119ｇ，初体重が159.3±16.5ｇ，終体重が576.4±33.3ｇ，そして体重変化が417.1±28.3ｇであった。これら，総摂食量，初体重，終体重そして体重変化は，WR群およびBR群ともに，Control群と有意な差はなかった。

表２　摂食量，体重変化

群	Lean	Control	WR	BR
摂食量（g/10週間）	1221.9± 46.3[a]	1761.4± 80.9[b]	1666.2±107.6[b]	1674.3±119.2[b]
初体重（g）	138.55± 6.17[a]	164.57±10.44[b]	161.47± 9.35[b]	159.33±16.51[b]
終体重（g）	391.07±37.24[a]	538.49±32.16[b]	562.10±45.37[b]	576.42±33.34[b]
体重変化（g）	273.08±21.26[a]	378.24±26.38[b]	404.07±46.40[b]	417.09±28.28[b]

数値は平均値±標準偏差を示した。他群間の比較は，一元配置分散分析（ANOVA）後，Tukey-Kramer法を用いて，有意差を判定した。異符号間で$p<0.01$で有意差あり。

2．α化玄米が血清コレステロール値に及ぼす影響（図1）

各群の血清中の総コレステロールならびにHDL-コレステロールの濃度を図1a，bに示した。

Lean群，Control群，WR群，BR群の血清コレステロール濃度は，それぞれ71.90±16.56，273.33±44.19，212.30±25.09，192.00±15.41mg/dℓであり，HDL-コレステロール濃度は，それぞれ23.50±4.38，57.63±3.93，51.10±3.67，47.60±4.40mg/dℓであった。

この結果を検討したところ，Control群がLean群に対して総コレステロール値およびHDLコレステロール値の有意な増加（ともに$p<0.01$）が認められた。また，WR群ならびにBR群はControl群に比べて有意な減少（$p<0.01$）が認められた。また，HDLコレステロール値についても，WR群，BR群はControl群に比べて有意な減少（WR；$p<0.05$，BR；$p<0.01$）が認められた。しかし，WR群とBR群の間では，総コレステロール，HDLコレステロールともに有意な差はなかった。

2．α化玄米が肝臓コレステロールに及ぼす影響（図2）

肝臓脂質中の総コレステロール含量の結果を図2に示した。

Lean群，Control群，WR群，BR群の肝臓コレステロール量は，それぞれ12.67±2.86，23.02±3.92，15.19±4.32，12.56±1.06mg/Liverであった。

この結果を検討したところ，Lean群に対してControl群では，総コレステロール含量の有意な増加（$p<0.01$）が認められた。

一方，WR群およびBR群ともに，Control群に比べて肝臓コレステロール値の有意な減少（$p<0.01$）が認められた。また，WR群とBR群の間には有意な差はないもののBR群に低値傾向がみられた。

3．α化玄米が肝臓コレステロール代謝関連酵素遺伝子発現に及ぼす影響（図3）

内因性のコレステロールの合成経路の律速酵素であるHMGRおよびコレステロールから胆汁酸への異化経路の律速酵素であるCYP7A1の遺伝子発現量の解析結果を図3a，bに示した。

各遺伝子発現量を内部標準であるβ-actin遺伝子発現量で除した後に，Control群を1とした相対値で示した結果，Lean群，Control群，WR群，BR群のHMGR遺伝子発現量は，それぞれ1.26±0.72，1.00±0.24，1.76±0.58，1.66±0.62であり，CYP7A1遺伝子発現量は，それぞれ1.27±0.91，1.00±0.66，1.21±0.79，2.34±1.38であった。

この結果を検討したところ，HMGRに関しては，Control群とLean群間には有意な差はなかった。また，Control群に比べ，WR群およびBR群で有意な遺伝子発現量の増加が認められた（WR群；$p<0.01$，BR群；$p<0.05$）。一方，WR群とBR群間では，発現量の有意な差はなかった。

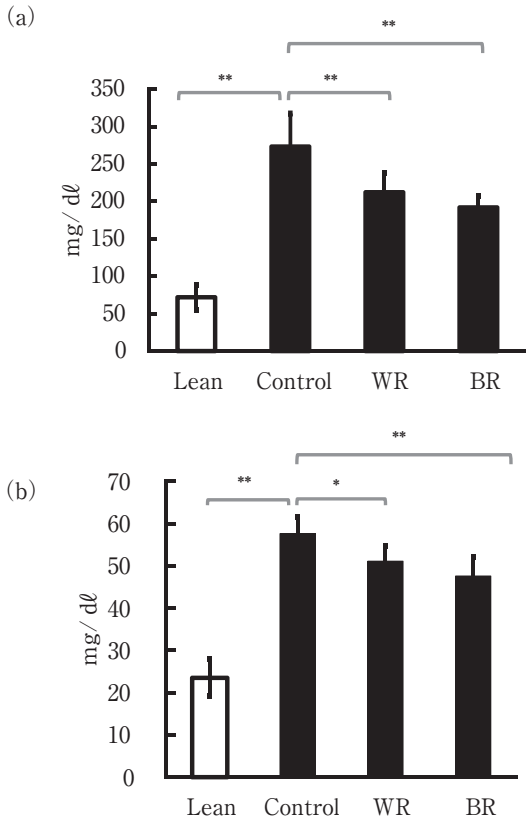

図1　各飼料摂取後の血清コレステロール濃度の比較

(a)　総コレステロール濃度　(b)　HDL-コレステロール濃度
数値は平均値±標準偏差を示した。他群間の比較は，一元配置分散分析（ANOVA）後，Tukey-Kramer法を用いて，有意差を判定した。＊は$p<0.05$，＊＊は$p<0.01$で有意差あり。

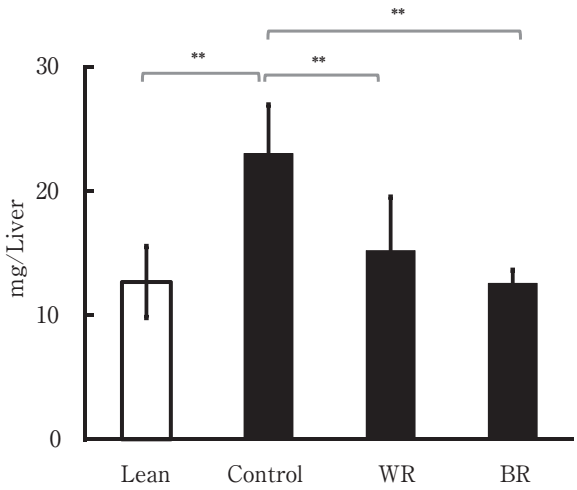

図2　各飼料摂取後の肝臓中総コレステロール量の比較

数値は平均値±標準偏差を示した。他群間の比較は，一元配置分散分析（ANOVA）後，Tukey-Kramer法を用いて，有意差を判定した。＊は$p<0.05$，＊＊は$p<0.01$で有意差あり。

CYP7A1に関しては，Lean群とControl群間に有意な差はなかったのに対し，BR群でControl群およびWR群に比べて有意な遺伝子発現量の増加（$p<0.01$）が認め

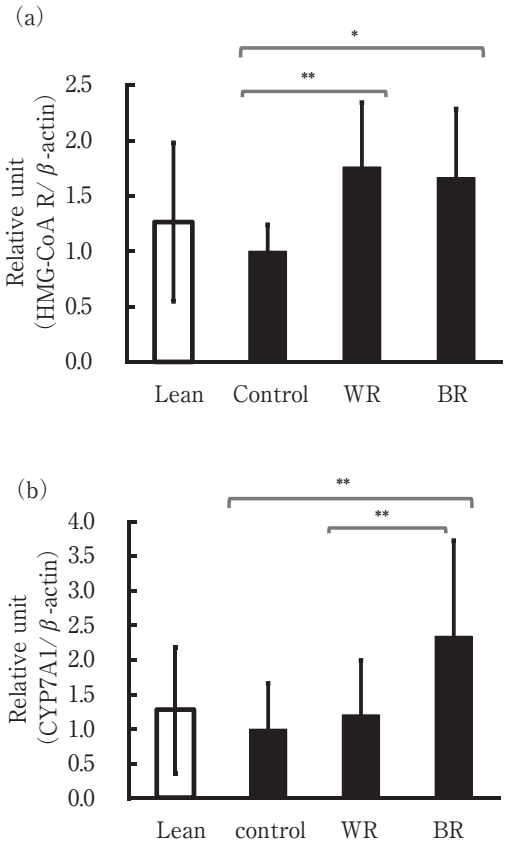

図３　各飼料摂取後のラット肝臓コレステロール代謝関連酵素遺伝子発現量の変化

(a) HMGR遺伝子発現量（b）CYP７A１遺伝子発現量
結果は，それぞれの遺伝子発現量を内部標準であるβ-actin遺伝子発現量で除した後に，Controlを１とした相対比較で示した。数値は，平均値±標準偏差を示した。他群間の比較は，一元配置分散分析（ANOVA）後，Tukey-Kramer法を用いて，有意差を判定した。＊は$p<0.05$，＊＊は$p<0.01$で有意差あり。

られた。

以上の結果より，α化白米およびα化玄米摂取が肝臓内のコレステロール代謝機構を変化させる可能性が示唆された。

考　　察

本研究は，α化玄米摂取が肥満状態におけるコレステロール代謝に及ぼす影響について評価することを目的とした。本研究では，肥満モデルとしてレプチン受容体変異ラットであるZFラットを用いた。このラットは，成長とともに内臓脂肪が蓄積し，インスリン抵抗性を伴った肝臓脂肪蓄積がみられ，さらに血中のコレステロール濃度も増加することが知られている[17]。したがって，ZFラットを用いることが，肥満状態のコレステロール代謝におけるα化玄米の効果を評価するうえで適していると判断した。

本実験では，まずZFラットとその比較対照としてZucker Leanラットを用いて，血中，肝臓中のコレステロール値を比較したところ，いずれも有意に増加していたので，ZFラットは肥満状態でありかつ高コレステロール状態であることを確認した。

その結果を踏まえ，α化玄米の効果を検討したところ，α化玄米摂取で顕著な血清および肝臓中のコレステロール値の減少が認められた。また，興味深いことにα化白米でも，同様の影響が認められた。Justoらは，水溶性米糠抽出物をZFラットに摂取させると血中コレステロールは減少するものの，肝臓中のコレステロールは逆に増加したと報告している[18]。したがって，α化玄米が有するこの効果は，従来報告の多い米糠に含まれる機能成分の影響だけではなく，白米由来の成分の影響も受けているものと推察した。

白米には，比較的多くのタンパク質が含有しており，白米からのコメタンパク質抽出物を摂取させると，血中および肝臓コレステロール値が減少するという報告がある[19),20]。これは，コメタンパク質の消化性がカゼインなどに比べて低いこと，コメタンパク質の消化後の難消化性ペプチド，難消化性タンパク質であるグルテリンやプロラミンなどのレジスタントプロテインの影響であるとされている。本研究で得られた効果は，これらのレジスタントプロテインの影響も受けている可能性が考えられる。

また，私たちは本研究において肝臓中のコレステロール量の減少によって，コレステロール代謝関連遺伝子も変動していることを見い出した。白米に比べて食物繊維を多く含む玄米を摂取することで，胆汁酸は食物繊維と結合して胆汁酸の腸肝循環が阻害され，糞中への胆汁酸排泄が増大すると考えられる。その結果，肝臓でコレステロールから胆汁酸への異化経路を亢進する必要性が高まり，CYP７A１遺伝子発現量が増加したものと推察された。また，HMGR遺伝子発現量が，α化白米・玄米ともに増加していたのは，肝臓中のコレステロールが低下したのに伴い，コレステロールの恒常性を維持するために生じているものと考えられる。

以上のように，本報告では，実際の食生活に即したα化玄米が，肥満モデルラットおける血清コレステロール低減効果を有し，その影響が遺伝子レベルにまで及んでいる可能性があることを示した。また，この効果が，玄米由来の機能性成分に加え，白米由来の機能性成分の相加的効果による可能性が示唆された。

本結果は，α化米とくにα化玄米といった米飯加工米が，主食源以外の機能性を有することを示したものであり，この機能性の詳細が今後解明されれば，生体調節機能と関連づけた新たな加工法の開発に寄与するのみならず，コメの消費量回復にもつながることが期待される。

文　　献

１）Eckel, R.H., Alberti, K.G., Grundy, S.M. and Zimmet, P.Z.: The metabolic syndrome., *Lancet*, **375**（9710）, 181～183（2010）

2）Bays, H.: Statin safety: an overview and assessment of the data--2005., *Am J Cardiol*, **97**（8A), 6C～26C（2006）
3）厚生労働省：日本人の食事摂取基準（2015年版）策定検討会報告書（第一出版，東京），pp.125～126（2014）
4）Sattar, N., Preiss, D., Murray, H.M., Welsh, P., Buckley, B.M., De Craen, A.J., Seshasai, S.R., McyMurray, J.J., Freeman, D.J., Jukema, J.W., Macfarlane, P.W., Packard, C.J., Stott, D.J., Westendorp, R.G., Shepherd, J., Davis, B.R., Pressel, S.L., Marchioli, R., Malfisi, R.M., Maggioni, A.P., Tavazzi, L., Tobnoni, G., Kjekshus, J., Pedersen, T.R., Cook, T.J., Gotto, A.M., Clearfield, M.B., Downs, J.R., Nakamura, H., Ohashi, Y., Mizuno, K., Ray, K.K. and Ford, I.: Statins and risk of incident diabetes: a collaborative meta-analysis of randomized statin trials., *Lancet*, **375**（9716), 735～742（2010）
5）Brown, L., Rosner, B., Willett, W.W. and Sacks, F.M.: Cholesterol-lowering effects of dietary: a meta-analysis., *Am J Clin Nutr*., **69**（1), 30～42（1999）
6）Ha, T.Y., Han, S., Kim, S.R., Kim, I.H., Lee, H.Y. and Kim, H.K.: Bioactive components in rice bran oil improve lipid profiles in rats fed a high-cholesterol diet., *Nutr Res*., **25**, 597～606（2005）
7）Cicero, A.F. and Gaddi, A.: Rice bran oil and gamma-oryzanol in the treatment of hyper-lipoproteinaemias and other conditions., *Phytother Res*., **15**（4), 277～289（2001）
8）Kozuka, C., Yabiku, K., Sunagawa, S., Ueda, R., Taira, S., Ohshiro, H., Ikema, T., Yamakawa, K., Higa, M., Tanaka, H., Takayama, C., Matsushita, M., Oyadomari, S., Shimabukuro, M. and Masuzaki, H.: Brown rice and its component, γ-oryzanol, attenuate the preference for high-fat diet by decreasing hypothalamic endoplasmic reticulum stress in mice., *Diabetes*., **61**（12), 3084～3093（2012）
9）Sugano, M. and Tsuji, E.: Rice bran oil and cholesterol metabolism., *J Nutri*., **127**（3), 521S～524S（1997）
10）新井貞子・澤山　茂・川端晶子：α化米飯の老化特性と調味料添加の影響について，家政学雑誌，**33**（10），559～562（1982）
11）新井貞子・澤山　茂・川端晶子・谷村和八郎：学校給食におけるα化米の利用とその食味特性についてのイメージ，栄養学雑誌，**40**（1），11～19，（1982）
12）沼田邦雄・宮村　茜：備蓄食に関する調査結果について，東京都立食品技術センター研究報告，**11**，30～34（2002）
13）田淵満幸：加工米飯類とその製造技術，澱粉科学，**40**（2），169～175（1993）
14）伊藤秀朗：米の加工利用（6）保存食（保存食＝非常食としてのアルファ化米），食器と容器，**53**（2），92～96，（2012）
15）Folch, J., Lees, M. and Sloane-Stanley, G. H.: A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues., *J. Biol. Chem*., **226**, 497～509（1957）
16）Raz, I., Eldor, R., Cernea, S. and Shafrir, E.: Diabetes: insulin resistance and derangements in lipid metabolism. Cure through intervention in fat transport and storage., *Diabetes Metab Res Rev*., **21**（1), 3～14（2005）
17）Justro, M.L., Rodriguez-Rodriguez, R., Claro, C.M., Alvarez, D.E. Sotomayor, M., Parrado, J. and Herrera, M.D.: Water-soluble rice bran enzymatic extract attenuates dyslipidemia, hypertension and insulin resistance in obese Zucker rats., *Eur J Nutr*., **52**（2), 789～797（2013）
18）Yang, L., Kumagai, T., Kawamura, H., Watanabe, T., Kubota, M., Fujimura, S., Watanabe, R. and Kadowaki, M.: Effects of rice proteins from two cultivars, Koshihikari and Shunyo, on cholesterol and triglyceride metabolism in growing and adult rats., *Biosci Biotechnol Biochem*., **71**（3), 694～703（2007）
19）Um, M.Y., Ahn, J., Jung, C.H. and Ha, T.Y.: Cholesterol-lowering effect of rice protein by enhancing fecal excretion of lipids in rats., *Prev Nutr Food Sci*., **18**（3), 210～213（2013）

（平成27年6月29日受付，平成27年10月30日受理）

平成27・28年度役員

（五十音順）

会　　長	高井陸雄（東京海洋大名誉教授）		
副 会 長	太田英明（中村学園大）	小宮山美弘（テクノ・サイエンスローカル）	早坂　薫（白松がモナカ本舗）
顧　　問	片岡榮子（東京農大名誉教授）	小嶋秩夫（東京水大名誉教授）	高野光男（大阪大名誉教授）
	露木英男（日大名誉教授）	中村怜之輔（岡山大学名誉教授）	藤木正一（元味の素冷食）
	松本信二（東京聖栄大）	三浦　洋（実践女子大名誉教授）	
監　　事	菊池修平（東京農大）	中村賢一（中村技術士事務所）	
事務局長	内野昌孝（東京農大）		
理　　事	阿部一博（帝塚山学院大）	池戸重信（宮城大名誉教授）	泉　秀実（近畿大）
	板村裕之（島根大）	稲熊隆博（帝塚山大）	今井秀明（エバラ食品）
（会長・副	内野昌孝（東京農大）	江原　司（味の素冷食）	椎名武夫（千葉大）
会長を含	鈴木　徹（東京海洋大）	鈴木敏郎（東京農大）	平　　智（山形大）
め40名以	髙野克己（東京農大）	竹永章生（日大）	辻　政雄（山梨学院大）
内）	仲尾玲子（山梨学院大）	中西載慶（東京農大名誉教授）	長谷川美典（農研機構）
	深井洋一（長野農村工研）	藤田　孝（雪印メグミルク）	諸藤　圭（日本食品分セ）
	山内直樹（山口大）	山田雄司（山崎製パン中研）	和田浩二（琉球大）
評 議 員	赤浦和之（島根県立大短大）	秋永孝義（琉球大名誉教授）	浅野目謙之（山形農総研セ）
	阿部　申（日大）	飯野久和（昭和女子大）	石川　豊（食総研）
（80名以内）	石丸　恵（近畿大）	井上茂孝（山崎製パン）	今堀義洋（大阪府大院）
	江口文陽（東京農大）	太田　徹（盛岡大）	大坪研一（新潟大）
	荻原博和（日大）	於勢貴美子（大阪大谷大）	尾崎嘉彦（近畿大）
	恩田　匠（山梨工技セ）	河野澄夫（鹿児島大）	橘田浩二（大阪環農水総研）
	小疇　浩（帯広畜大）	佐藤広顕（東京農大）	鮫島陽人（鹿児島加技研セ）
	ウェンダコーン スミトラ（龍谷大）	鈴木康生（名城大）	竹安宏匡（香川短大）
	竹中哲夫（玉川大名誉教授）	多田耕太郎（東京農大）	谷口亜樹子（鎌倉女子大）
	谷本守正（山梨大）	棚橋勝道（棚橋食品）	玉川浩司（はくばく）
	辻井良政（東京農大）	筒井知己（東京聖栄大）	津布楽洋和（カゴメ）
	鶴永陽子（島根大）	寺原典彦（南九州大）	冨田信一（玉川大）
	豊福　肇（山口大）	鳥居恭好（日大）	中野龍平（岡山大）
	中村ゆり（農研機構）	西川正純（宮城大）	野口智弘（東京農大）
	橋口　亮（長崎女子短大）	馬場　正（東京農大）	濱渦康範（信州大）
	広瀬直人（沖縄農研セ）	弘中和憲（琉球大）	藤島廣二（東京聖栄大）
	藤田修二（佐賀大名誉教授）	古庄　律（東京農大短大）	古田道夫（新潟県央研）
	不破利勝（ニチレイフーズ）	穂坂　賢（東京農大）	松田茂樹（熊本みそ醤油工）
	三森一司（聖霊女子短大）	宮尾茂雄（東京家政大）	宮本敬久（九州大院）
	三輪章志（石川農総研）	村山秀樹（山形大）	矢口行雄（東京農大）
	山﨑雅夫（東京農大）	山脇和樹（静岡大）	柏木崎千鶴子（宮崎県庁）

維持・団体会員名簿

（維持会員）

カネク㈱
㈱建帛社
㈱興人
ダイキン工業㈱
㈱ニチレイフーズ研究開発部
㈱明治研究本部
山崎製パン㈱中央研究所
雪印メグミルク㈱技術研究所

（団体会員）

秋田県総合食品研究センター
アサマ化成㈱
味の素冷凍食品㈱
㈱アンデルセン・パン食品文化研究所
伊那食品工業㈱
㈱エーゼット
エム・シーシー食品㈱
㈱おがた
㈱オシキリ湘南工場
神奈川県立川崎図書館
カルビー㈱
㈱紀伊國屋書店
岐阜大学図書館
キユーピー㈱研究所
㈱極洋塩釜研究所
㈱くらし科学研究所
国際学院埼玉短期大学図書館
㈱シャトレーゼ
昭和産業㈱総合研究所
㈱白松がモナカ本舗
全国農業協同組合連合会営農・技術センター
㈱タイショーテクノス
大和製罐㈱総合研究所
㈱立野商店
㈱棚橋食品
千葉県立保健医療大学図書館
中部大学付属図書館
テーブルマーク㈱
東罐興業㈱
東京家政大学板橋図書館
東京聖栄大学図書館
東京農業大学食料資源理化学研究室
東京農業大学図書館
富山県農林水産総合技術センター食品研究所
㈱日清製粉グループ本社研究推進部
日東ベスト㈱
日東富士製粉㈱
日本缶詰びん詰レトルト食品協会
日本食品分析センター
日本デルモンテ㈱研究開発部
日本パン技術研究所
日本冷凍食品協会
農業・食品産業技術総合研究機構中央農業総合研究所
農業・食品産業技術総合研究機構野菜茶業研究所
㈱はくばく
長谷部商事㈱
二葉栄養専門学校
フタバ食品㈱
北海道総合研究機構花・野菜技術センター
北海道立総合研究機構食品加工研究センター
北海道立総合研究機構中央農業試験場図書館
丸善㈱
三井食品工業㈱
南九州大学・南九州短期大学図書館
宮崎化学薬品㈱
酪農学園生活協同組合
和歌山県農林水産総合技術センター
㈱渡辺オイスター研究所
和洋女子大学メディアセンター

（平成27年12月末現在）

原　稿　送　状

発送年月日　　年　　月　　日	原稿種別：　報　文　　研究ノート　　技術報告　　資　料　　情　報　　総　説
表　　題 ランニングタイトル（15字以内）	
著者氏名 所属機関 所　在　地　〒	
表　　題（英文）	
著者氏名（英文） 所属機関（英文） 所　在　地（英文）	

連絡先	所在地　〒 所　属 氏　名　　TEL. E-mail　　FAX.	原稿枚数	本　　文　　枚 英文要旨　　枚 同　和　訳　　枚 原図・写真　　枚 図説明原稿　　枚 表　　枚

別　刷	部	受付番号		受付年月日	年　　月　　日（　　）
備　考					

・太線内は全て御記入下さい。　・英文はワープロソフトを使用し御記入下さい。

・コピーしてお使い下さい。

日本食品保蔵科学会

「日本食品保蔵科学会誌」投稿規定

第１条　本誌は本学会規約に基づき，総説，報文，研究ノート，技術報告，資料，情報，その他編集委員会が必要と認めたものを掲載する。

第２条　投稿は本会会員に限る。ただし共著者はこの限りではない。

第３条　投稿は本会編集委員会事務局宛とし，到着日をもって受付日とし，審査終了日をもって受理日とする。

第４条　論文は和文または英文とする。

第５条　総説は，原則として編集委員会より依頼する。報文，研究ノートおよび技術報告は原著とし，他誌に未発表のものに限る。研究ノートは報文にまとめ得ないが，公表することにより学会に寄与するものとする。技術報告は，報文にまとめ得ないが，有用なデータを含み，本学会関連分野の技術向上に寄与するものとする。資料は，調査，統計などをその内容とし，本会員の研究に役立つものとする。情報は，解説記事，国内外の食品産業の動向，国際会議報告，研究所の紹介記事など本会員に有用なものとする。

第６条　報文その他の掲載は，原則として受理順とするが，その採否および順序は編集委員会の判定による。

第７条　編集委員会は，投稿原稿の内容および字句について不適当と認めた場合は，著者に訂正または検討を求めることがある。

第８条　再提出を求められた原稿は，返送日から２カ月以内に編集委員会事務局へ返却する。２カ月以上経過した場合は，新規受付として取り扱う。

第９条　１）報文，技術報告，資料および情報は刷り上がり６頁以内，研究ノートは４頁以内（図，表を含む）とする。これを超えた場合は，１頁につき20,000円を徴収する。図はトレースする必要のない鮮明な原稿を添付する。トレースが必要な場合およびカラー写真を掲載するときなどは実費を徴収する。

２）審査終了後，編集委員会において英文校閲を専門機関に依頼する。なお，費用については実費を徴収する。

第10条　原稿は「投稿論文記載要領」（毎年１号に記載）に従い作成し，原稿の他，鮮明なコピー２部を添付する。なお，原稿には和英両文の題目，著者名，所属などを記入した送状（学会誌に綴じ込みのもの）を添付する。

第11条　原稿はワープロソフトを用いて作成し，掲載可になった後，そのフロッピーディスクを事務局へ送付する。

第12条　初校の校正は，著者が行う。その際，投稿原稿は送付しない。

第13条　別刷りは実費を徴収する。

第14条　本誌に掲載された論文の著作権は，日本食品保蔵科学会に属する。

付　記　　原稿送付先は次の通りとする。

〒156-8502　東京都世田谷区桜丘1－1－1
東京農業大学　生物応用化学科
食料資源理化学研究室内
「日本食品保蔵科学会」編集委員会　事務局

（平成22年５月22日一部改正）
平成22年10月１日改正施行

◆複写される方へ◆

本誌に掲載された著作物を複写したい方は，㈳日本複権センターと包括複写許諾契約を締結されている企業の従業員以外は，図書館も著作権者から複写権等の行使の委託を受けている次の団体から許諾を受けて下さい。著作物の転載・翻訳のような複写以外の許諾は，直接本会へご連絡下さい。

〒107-0052　東京都港区赤坂9-6-41　乃木坂ビル
学術著作権協会
TEL：03-3475-5618　FAX：03-3475-5619
E-mail : info@jaacc.jp

◆アメリカ合衆国における複写については次に連絡して下さい。
Copyright Clearance Center, Inc.
222 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923 USA
Phone：(978) 750-8400　FAX：(978) 750-4744

■別刷代金■

部　　数	和　　文	欧　　文
50部まで	15,000円	20,000円
100部まで	20,000円	30,000円
200部まで	30,000円	40,000円
400部まで	40,000円	40,000円

（注）端数部の場合でも，上記金額となります。

■会費規定■

正会員会費　年額　6,000円
学生会員会費　年額　1,000円
団体会員会費　年額１口　20,000円
維持会員会費　年額１口　50,000円

日本食品保蔵科学会誌　第42巻第１号　平成28年１月30日印刷発行

編集発行者　日本食品保蔵科学会　東京農業大学 生物応用化学科 食料資源理化学研究室内
〒156-8502
東京都世田谷区桜丘 1-1-1　TEL(03)3426-3979　FAX(03)5477-2619
郵便振替口座　00120-9-115327
銀 行 口 座　三井住友銀行経堂支店　普通5200100
発行取扱所　㈱建帛社　〒112-0011　東京都文京区千石 4-2-15

（亜細亜印刷）

The Action of the SS Bond Formation Due to the PDI-ERO1 to Wheat Gliadin (Glia. A) on the Dough Formation and Baking Quality

NOGUCHI Tomohiro*1§, SHIONO Koji*2, OKA Daiki*1, NOGUCHI Haruko*2 and TAKANO Katsumi*2

＊1 *Food Processing Center, Faculty of Applied Bioscience, Tokyo University of Agriculture, 1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156-8502*

＊2 *Department of Applied Biology and Chemistry, Faculty of Applied Bioscience, Tokyo University of Agriculture, 1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156-8502*

Not only gluten but also gliadin plays an important role in improving the baking quality of wheat. The property changes and bread improving effects resulting from the formation of S-S bonds were analyzed by investigating the action of PDI-ERO 1 on Glia A. Although the time required to form wheat flour dough is short and the gas-leakage rate from the dough was reduced, the addition of non-treated Glia A to the dough did not have a significant effect on the specific volume of bread. Dough containing TaPDI-TaERO1-treated Glia A has a higher extent of S-S bond formation and a reduced gas-leakage rate than that containing non-treated Glia A; moreover, the specific volume of the bread significantly increased compared to that formed by dough containing non-treated Glia A. TaPDI processing increased intramolecular S-S bond formation in gliadin, and hence, decreased the surface hydrophobicity of Glia A. To confirm the effect of gliadin on dough formation and baking quality, it is suggested that surface hydrophobicity of gliadin has a large influence on the baking quality.

(Received Jul. 30, 2015 ; Accepted Oct. 21, 2015)

Key words : *dough, bread, gliadin, protein disulfide isomerase, disulfide bond*
生地，パン，グリアジン，プロテインジスルフィドイソメラーゼ，ジスルフィド結合

In the current bakery industry, various agents are used as bread improvers. Gluten is one such bread improver. High-quality breads can be produced even with flour that is poorly suitable for bread-making if gluten is added to such flours. It has also been reported that the addition of gliadin, along with gluten, to wheat flour further improves the bread-making quality of the flour by improving the extensibility of the dough[1]. Previously, the use of recombinant protein disulfide isomerase (TaPDI) and endoplasmic reticulum oxidoreductase 1 (TaERO1), which were expressed in an *E. coli* mass gene-expression system, was reported to improve the baking quality of bread. It has been found that gliadin increases intramolecular disulfide (S-S) bond formation owing to its action with TaPDI-TaERO1[2),3)]. These results suggested that the baking quality of bread improving effect with gliadin was enhanced by TaPDI-ERO1 treatment to gliadin. This report examines the bread-improving effect of S-S bond formation when commercial gliadin is reacted with TaPDI and TaERO1.

Materials and methods

1. Samples

The flour used in this study was Camellia flour (Nisshin Flour Milling Co., Ltd., Japan), made of hard wheat grains. Gliadin preparation was used to obtain "Glia A" (Asama Chemical Co., Ltd., Japan). Recombinant wheat PDI (TaPDI)[4] and recombinant wheat ERO1 (TaERO1)[5] were prepared using an *E. coli* expression system.

2. Assay for PDI activity

The PDI activity was measured by the Holmgren[6),7)] method using insulin in the same way as described previously[2].

3. TaPDI-TaERO 1 treatment for Glia A (gliadin)

The flour was kneaded after adding a mixture (2 mℓ) of TaPDI (8 U, 1.47 nmol), TaERO1 (14.70 nmol), and flavin adenine dinucleotide (FAD; 1.5

§ Corresponding auther, E-mail : tomo@nodai.ac.jp

μmol) in Glia A (2 g). The resulting dough was left to stand for 3 h at 25℃, after which 0.1 M acetic acid solution was added to the dough. The dough was then homogenized using an ultrasonic homogenizer (Hisukotoron, Microtec Co., Ltd., Japan) and was centrifuged (10,000 rpm, 20 min, 4℃). The resulting supernatant was dialyzed with pure water and then freeze-dried.

4. Diagonal electrophoresis analysis (non-reducing/reducing two-dimensional SDS/gel electrophoresis)[8]

The formation of S-S bonds was determined using non-reducing/reducing two-dimensional SDS/gel electrophoresis. Acetic acid solution (20 mℓ, 0.1 M) was added to 2 g of TaPDI-TaERO1 treated with Glia A, homogenized with an ultrasonic homogenizer, and dialyzed overnight in water. The extracted solution was electrophoresed by SDS-PAGE under non-reducing conditions (Me^-). After electrophoresis, the gel was cut to separate each sample lane, and was then subjected to a reduction treatment with 2-mercaptoethanol. These reduced first dimension gel samples were then electrophoresed in a second dimension gel (acrylamide concentration: 12.5% (w/v)). After electrophoresis, the second dimension gel was stained with SYPRO ruby protein gel stain.

5. Extent of S-S bond formation

The extent of SS bond formation was determined by using the method described by Andrews, D.C.[9], which involves measurement of free SH groups.

6. Measurement of surface hydrophobicity of the protein

The surface hydrophobicity of the protein was measured by using the method described by HAYAKAWA[10] and BONOMI[11]. In brief, a 2 mℓ protein solution was adjusted to 0.1 mg/mℓ by adding 40 μℓ of 2 mM 8-anilino-1-naphthalene sulfonic acid magnesium/0.1 M Tris-HCl buffer solution (pH 7.0). After reacting the above solution for 30 min in the dark, its fluorescent intensity (E_x= 380 nm, E_m= 480 nm) was measured using a fluorescence spectrophotometer (RF-5000, Shimadzu Co., Ltd., Japan). The fluorescence intensity of the dough per milligram of protein was calculated in order to determine the surface hydrophobicity of the protein.

7. Bread-making test

(1) Bread-making method Bread-making tests were carried out by using the straight dough method, which is used in standard white bread production. The recipe for standard white bread is as follows: hard flour, 200 g; Glia A (nontreated or PDI treated), 2 g; sugar, 10 g; yeast, 8 g; shortening, 8 g; salt, 4 g; and water, 137 mℓ. The wheat dough was mixed for 6 min at 20 ℃ by using a pin-type mixer (National MFG Co., Ltd., US). The dough was then fermented under 75% humidity for 120 min at 27 ℃ and 200 g of the resulting dough was molded in a molder (Wide Fine Moulder, Oshikiri Machinery Ltd., Japan). The dough was then put in a pan (15 cm × 5 cm) under 85% humidity for 60 min and proofed at 38 ℃. The bread was then baked in a 200 ℃ oven for 20 min.

(2) Evaluation of bread

1) Physical properties and gas-holding capacity of the dough The physical properties of the kneaded dough were analyzed using Dougraph (ATTO, Co., Ltd., Japan). The gas-holding capacity of the fermented dough was measured using Fermograph (ATTO, Co., Ltd., Japan). In brief, 30 g of the prepared dough was fermented at 27 ℃ for 120 min. The resulting dough was then proofed for 60 min at 38 ℃, and the total amount of gas generated (T) and dough endogenic gas (U) was measured at 10-min intervals. The gas leakage rate (%) was calculated by the following equation:

$$\text{Gas leakage rate } (\%) = (T - U)/T \times 100$$

2) Measurement of the specific volume of a bread loaf The volume (㎤ of a bread loaf was measured by the rapeseed displacement method after cooling the baked bread for 3 h at room temperature. The specific volume (㎤/g of a bread loaf was determined by measuring the volume and weight.

Results and discussion

1. Effect of TaPDI-TaERO 1 processing on the bread-making property of Glia A-containing dough

The time required to form dough was reduced by adding untreated Glia A to the flour (Fig. 1). Moreover, the gas-leakage rate of the dough after proofing also decreased from 32.2% to 27.2%; hence, it can be suggested that proofing improves gas retention (Fig. 2). When Glia A is added, the specific volume of bread (㎤/g; ±SD) becomes 5.34 ± 0.11, which is not a significant increase compared to that of the dough without any Glia A (Fig. 3). Although the dough-formation time and gas-leakage resistance in Glia A-containing dough

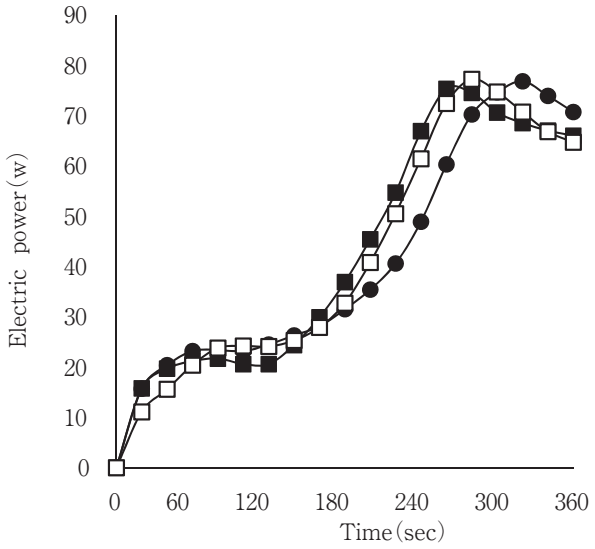

Fig.1 Effects of TaPDI-and TaERO1-processed commercial gliadin (Glia A) addition on dough properties

● Non-added ■ Glia A added
□ TaPDI and TaERO1 treated Glia A added

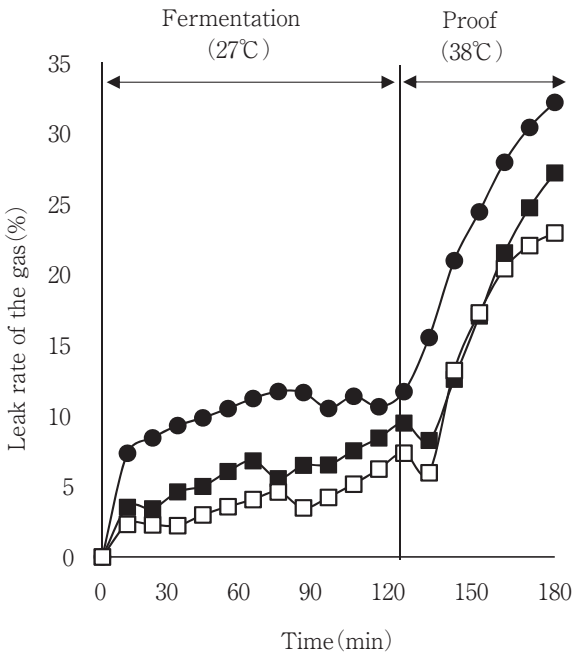

Fig.2 Effects of TaPDI-and TaERO1-processed commercial gliadin (Glia A) addition on the fermentation process of wheat dough and its gas-leakage rate

● Non-added ■ Glia A added
□ TaPDI and TaERO1 treated Glia A added

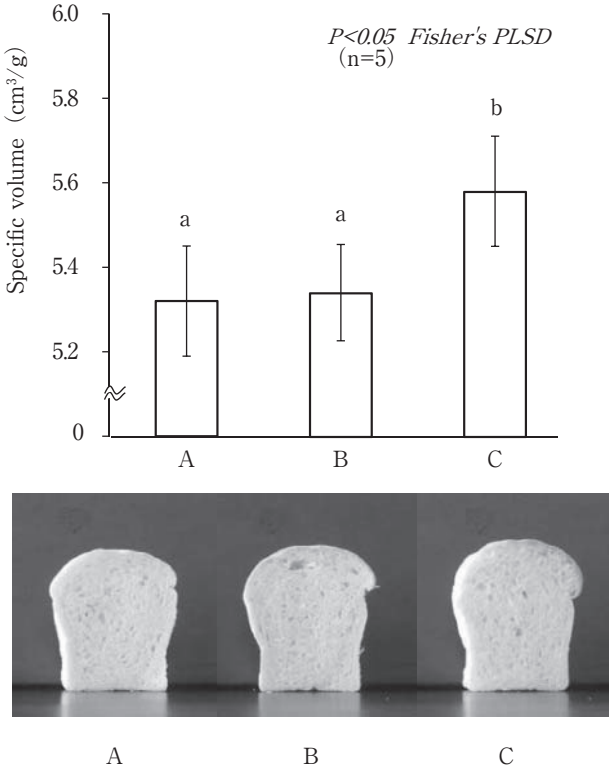

Fig.3 Effects of TaPDI-and TaERO1-processed commercial gliadin (Glia A) addition on the specific volume of a bread loaf

A: Non-added, B: Glia A added, C: TaPDI and TaERO1 treated Glia A added

improved during mixing and fermentation, the specific volume of bread did not increase. The specific volume of bread, dough-formation time, and gas-leakage rate of dough with TaPDI-TaERO1-processed Glia A were compared to dough without Glia A and untreated Glia A (Figs. 1-3). Although the dough-formation time was the same in dough containing untreated Glia A and in that containing treated GliaA, the gas-leakage rate decreased significantly from 27.2% in the former to 22.9% in the latter. The specific volume of a bread loaf also increased by 5% in the Glia A-treated dough (5.58 ± 0.13) compared to that in the untreated dough. Gliadin improves the properties of wheat dough by favorably affecting dough properties and baking quality[1]. The TaPDI-TaERO1 treatment of Glia A exerts a significant effect on the dough-formation time, and also increased the specific volume of the bread by reducing the gas-leakage rate of the dough. This behavior was presumably due to the improved extension of the dough because of the action of PDI in Glia A; the stretching of the gluten films also increased due to the increase in the dough expansion force because of carbon dioxide generation by fermentation. Hence, it is believed that the gas-leakage rate decreased because the fusion of air bubbles decreased owing to the decrease in the collapse of the gluten film.

Based on the aforementioned results, it can be

concluded that the surface hydrophilicity increased by S-S bond formation owing to PDI and bond formation between glutenin and gliadin, indicating a reduction in hydrophobicity and improved baking quality.

2. Effect of TaPDI-TaERO 1 treatment on the properties of Glia A

TaPDI-TaERO1 treatment was carried out with the help of diagonal two-dimensional electrophoresis to determine why gluten acts as a bread improver. Similar to an experiment in a previous work[3] in which acetate extracts of bread flour were used, 30 ~40 kDa and 50 kDa of gliadin was more strongly detected diagonally and upward in the TaPDI-TaERO1-treated sample as compared to the non-treated samples, respectively, in the electrophoresis gel. Therefore, intramolecular S-S bonds in gliadin are likely formed by the action of TaPDI-TaERO1 (Fig. 4). The extent of S-S bond formation in TaPDI-TaERO1-processed Glia A was higher (about 26 μmol per gram of protein) that that in the untreated Glia A (Table 1). To investigate the bread-improving effect of Glia A, the relationship between the increase in S-S bond formation and surface hydrophobicity (FI / protein mg) was measured. The surface hydrophobicity of non-processed Glia A was 40.1 ± 2.1 (± SD), whereas that of TaPDI-TaERO1-processed Glia A was 30.1 ± 0.6 (± SD), which is a significantly low value. Hence, gliadin became hydrophilic owing to PDI. In this study, the molecular structure was altered by the formation of intramolecular S-S bonds in gliadin, which reduced the surface hydrophobicity. An earlier work described the effects of dough formation and baking quality of gliadin[12]. It was reported that when ω-gliadin is eliminated from gliadin subunits, the surface hydrophobicity of gliadin increases; it was also reported that the baking quality was poor when the dough was firm.

When considered in conjunction with this result, it can be confirmed that the hydrophilic and hydrophobic properties of gliadin are intimately

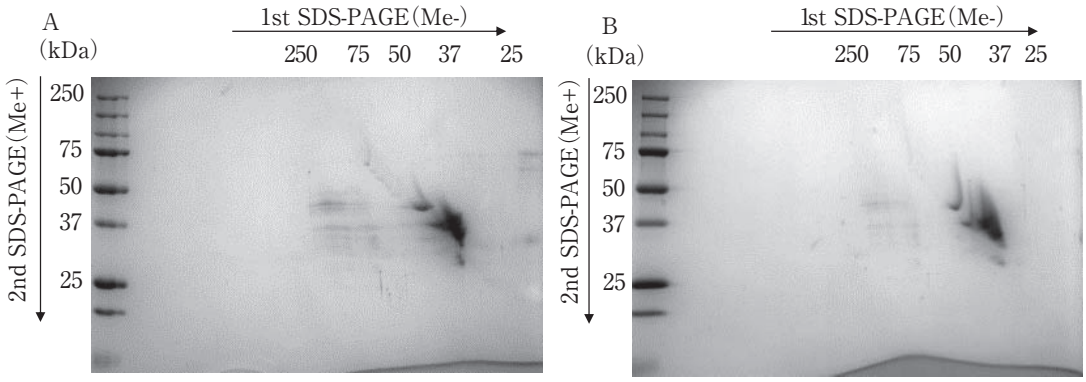

Fig.4 Two-dimensional electrophoresis of TaPDI- and TaERO1-processed commercial gliadin (Glia A)

A: Non-Treated B: TaPDI-TaEro1 treated
Gel Concentration (%): 1-D and 2-D SDS-PAGE T=15.0%
Molecular weight marker: Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards, Strep-tagged recombinant (Bio-Rad Laboratories, Inc.), 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, and 15 kDa.

Table 1 Protein surface hydrophobicity of TaPDI-and TaERO 1-processed commercial gliadin (Glia A)

	Increase of disulfide bond formation*1 (μmol/protein 1g; ±SD)	Surface hydrophobic degree of protein (μmol/protein 1mg; ±SD)
Non treated Glia A	−	40.1 ± 2.1
Treated Glia A*2	26.4 ± 1.7	30.1 ± 0.6

* 1 The extent of S-S bond formation was determined from the decrease in the amount of-SH groups, as measured by the NBD-CL method. It was calculated by subtracting the untreated Glia A from the treated Glia A.
* 2 Added1. 47nmol (8U) of TaPDI, 14.70 nmol of TaERO1, and 1.5 μmol of FAD to 2 g of Glia A and reacted at 25℃ for 3h.

related and their relationship affects dough-formation time and baking quality.

Conclusion

We examined the effect of dough-formation time and baking quality upon increasing the extent of S-S bond formation under the effect of recombinant TaPDI and TaERO1 to obtain improved dough by adding Glia A for bread baking. Although the addition of Glia A reduced the dough-formation time as well as the gas-leakage rate, it did not have a significant effect on the specific volume of the bread loaf. Also, TaPDI-TaERO1 processing increased the extent of S−S bond formation, greatly reduced the gas-leak rate, and significantly increased the specific volume of bread as compared to those of non-processed dough. TaPDI-processed gliadin reduced the surface hydrophobicity because of intramolecular S-S bond formation. Thus, it can be concluded that the dough-formation time was reduced and the baking quality improved because of the reduction in the surface hydrophobicity of the dough owing to the addition of gliadin.

References

1) Hirose, R., Satoh, T., Arai, C., Shibata, T. and Tange, M.: Development of bread making method using Japanese domestic wheat flour., *Bulletin of Tokyo Food Tech. Res*., **13**, 1～7 (2004)

2) Noguchi, T., Arai, S., Noguchi, H., Uchino, M. and takano, K.: Purification of Protein Disulfide Isomerase from Wheat (Haruyutaka) grain., *Food Preser.Sci*., **37** (5), 245～248 (2011)

3) Nogchi, T., Nishibori, F., Shiono, K., Oka, D., Noguchi, H. and Takano, K.: Influence of disulfide bond formation via recombinant PDI-Ero 1 processing of proteins and baking quality., *Food Preser.Sci*., **41** (6), Impress, (2015)

4) Arai, S., Noguchi, T., Uchino, M. and takano, K.: Purification and Characterization of Wheat Protein Disulfide Isomerase Expressed in *Escherichia coli*, *Food Preser.Sci*., **37** (4), 173～183 (2011)

5) Noguchi, T., Tamura, R., Arai, S., Oka, D., Noguchi, H., Uchino, M. and takano, K. : Cloning and Expression of Wheat Ero1, *Food Preser.Sci*., **37** (6), 283～287 (2011)

6) Arne, H.: Thioredoxin Catalyzes the Reduction of Insulin Disulfides by Dithiothreitol and Dihydrolipoamide, *J. Bio. Chemi*., **254**, 9627～9632 (1979)

7) Johana, L. and Arene, H.: Protein disulfide-isomerase is a substrate for thioredoxin reductase and Has thioredoxin-like Activity., *J. Bio. Chemi*., **265**, 9114～9120 (1990)

8) Yano, H., Wong, H. J., Lee, M. Y., Cho, J. M. and Buchanan, B. B.: A strategy for the identification of proteins targeted by thioredoxin., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 4794～4799 (2001).

9) Andrews, D. C., Caldwell, R. A. and Quail, K. J.: Sulfhydryl Analysis. I. Determination of Free Sulfhydryls in Wheat Flour Doughs., *Cereal Chem*., **72** (3), 326～329 (1995)

10) Hayakawa, S. and Nakai, S.: Relationships of hydrophobicity and net charge to the solubility of milk and soy proteins. *J Food Sci*, **50** (2), 486～491, (1985)

11) Bonomi, F., Mora, G., Pagani, M. A. and Iametti, S.: Probing structural features of water-insoluble proteins by front-face fluorescence. *Anal Biochem*., **329** (1), 104～111, (2004)

12) Oka, D., Kikuchi, C., Shiono, K., Noguchi, T. and Takano, K.: Effect of the Molecular Interactions between β-lactoglobulin and Gliadin on the Baking Quality. *Food Preser. Sci*., **39** (6), 325～330 (2013)

小麦グリアジン（グリアA）の生地形成および製パン性に及ぼすPDI-ERO1によるS-S結合形成の作用

野口智弘[*1]・塩野弘二[*2]・岡　大貴[*1]
野口治子[*2]・髙野克己[*2]

＊1　東京農業大学応用生物科学部食品加工技術センター
（〒156-8502　東京都世田谷区桜丘１－１－１）

＊2　東京農業大学応用生物科学部生物応用化学科
（〒156-8502　東京都世田谷区桜丘１－１－１）

製パン性の改善に小麦タンパク質が用いられ，グルテンのみでなくグリアジン添加の有効性が明らかになっている。製パン改良材であるグリアAに対しPDI-ERO1を作用させS−S結合を増加させることによる性状変化と製パン性改善効果を解析した。未処理のグリアAの添加によって小麦粉生地の形成時間は短くなり，生地からのガス漏洩率は低下したが，パンの比容積には有意な影響を及ぼさなかった。TaPDIおよびTaERO1によってS−S結合を増加させたグリアAは，グリアAと比較して生地のガス漏洩率が大きく減少し，パンの比容積が有意に増加した。TaPDIおよびTaERO1処理によってグリアジンの分子内S−S結合が増加し，グリアAの表面疎水性が低くなった。以上の結果から，グリアジンの生地形成および

製パン性に与える影響を確認する共に，グリジアジンの表面疎水性が製パン性に大きな影響を及ぼすことが示唆された。

（平成27年 7 月30日受付，平成27年10月21日受理）

未利用モモ花弁の茹でこぼし処理による色調ならびにシアン化合物の変化

樋口かよ[*1§]・尾形美貴[*1]・木村英生[*1]
中川裕子[*2]・仲尾玲子[*3]・飯野久和[*4]

＊1　山梨県工業技術センター
＊2　山梨学院短期大学食物栄養科
＊3　山梨学院大学健康栄養学部
＊4　昭和女子大学大学院生活機構研究科

Effect of Boiling on Color and Cyanogenic Compound Content of Unused Peach Petals

HIGUCHI Kayo[*1§], OGATA Miki[*1], KIMURA Hideo[*1],
NAKAGAWA Yuko[*2], NAKAO Reiko[*3] and IINO Hisakazu[*4]

＊1　*The Yamanashi Prefectural Industrial Technology Center, 2094 Otsumachi, Kofu-shi, Yamanashi　400−0055*
＊2　*Food and Nutrition, Yamanashi Gakuin junior college, 2−4−5 Sakaori,Yamanashi　400−8575*
＊3　*Health and Nutrition, Yamanashi Gakuin University, 2−4−5　Sakaori, Yamanashi　400−8575*
＊4　*Graduate school, Course of Functional Studies of Basic Necessities for Living, Showa Women's University, 1−7−57 Taishido, Setagaya-ku, Tokyo　154−8533*

The purpose of this study was to evaluate color and cyanogenic compounds of raw and boiled petals of edible peaches (*Momo*) and ornamental peaches (*Hanamomo*). Petals were boiled by the following method; ① boiling for 5 min in 5 % citric acid; ② cooling for 5 min in water; ③ boiling for 5 min in hot water; ④ cooling for 5 min in water. Based on a comparison of the a* values of raw and boiled *Hanamomo* and *Momo* petals, *Hanamomo* petals were determined to be more bright pink than *Momo* petals. Raw petals contain prunasin, a type of cyanogenic glycoside; prunasin content was 4,681 and 4,372 ppm in *Momo* and *Hanamomo* petals, respectively. However, after boiling, prunasin content decreased significantly to less than 5.6 and 2.7 ppm in *Momo* and *Hanamomo* petals, respectively. The results of qualitative tests for free cyanide in both boiled petals were negative. Furthermore, a toxicity study was performed using a sample of a 10 mg/kg single dose and provided evidence that boiled *Hanamomo* petals were safe for eating. Boiled *Hanamomo* petals retain their pink color for 90 days at 25 ℃ in 1% citric acid wrapped in silver paper packaging under light shielding. These results suggest that boiled *Hanamomo* petals can be used as food materials.

(Received Aug. 19, 2015; Accepted Jan. 14, 2016)

Key words: *petals of edible peaches (Momo), petals of ornamental peaches (Hanamomo), anthocyanin, cyanogenic compound, prunasin*
食用モモ花弁，鑑賞用モモ花弁，アントシアニン，シアン化合物，プルナシン

＊1　〒400−0055　山梨県甲府市大津町2094
§　Corresponding author, E-mail：higuchi-akkt@pref.yamanashi.lg.jp
＊2　〒400−8575　山梨県甲府市酒折２−４−５
＊3　〒400−8575　山梨県甲府市酒折２−４−５
＊4　〒154−8533　東京都世田谷区太子堂１−７−57

山梨県におけるモモ栽培は，平成25年には栽培面積3,260ha，収穫量39,100tおよび出荷量36,700tでいずれも全国1位[1]となっており，モモ果実は山梨県の特産物となっている。モモ果実は，主に生果として流通・販売されているが，ピューレ，ジュース，コンポートなどの加工品にも利用されている。

その一方，近年では特徴ある加工品開発のために，摘果された未熟なモモ果実（摘果モモと称する）を活用した砂糖漬けや酢漬けに加工した商品もみられるようになった。ただし，摘果モモの多くはモモの核が生育する前に摘果されるため，含まれるシアン化合物の問題があった。筆者らは摘果モモを沸騰水中で15分間加熱することで，摘果モモの遊離シアン化合物が不検出になること，さらにラットを用いた毒性試験による安全性評価を行い，加熱による前処理を行うことで食品素材として利用できることを報告した[2]。

今回は未利用素材であるモモ花弁に注目し，その形態や色調を活かした商品開発を希求したが，摘果モモ同様食経験や先行研究が少なく，食品素材としての活用に関する知見が十分得られていなかった。

そこで本研究では，茹でこぼしによる前処理を前提条件とし，モモ花弁の加熱加工処理後の色調変化ならびに食品素材としての安全性について検討した。今回使用したモモの花は，生食用品種ならびに観賞用品種のもので，生食用品種は一重5枚の桃色花弁，観賞用品種は一般にハナモモと呼ばれ，一重～八重10枚以上の花弁をもち，花色も白，桃，紅色および咲分けなど様々な種類がある[3]。

はじめにモモの花弁が食品として活用できるか調査するため，厚生労働省の医薬品的効能効果を標ぼうしない限り医薬品と判断しない成分本質（原材料）リスト[4]を確認したところ，モモの花および葉が記載されていた。したがって，モモの花弁および葉は医薬品としてではなく食品素材として活用できる可能性が示唆された。一方で，モモ果実中の堅い核の中にあるトウニン（桃仁）は，シアン配糖体であるアミグダリンなどが含まれており，日本薬局方収載医薬品として指定されている[5),6)]。アミグダリンは鎮咳去痰薬[5)]として利用される一方，ヒト（乳児）経口最小致死量は50mg/kg[7)]との記載がみられたため，モモ花弁中のシアン化合物の定量が必要であると考えられた。また，含有するシアン配糖体が加水分解酵素や酸あるいはアルカリで処理されるとシアン化合物が遊離し，それにより中毒を引き起こす恐れがある[7)]ことから，遊離シアン化合物の定性も行うこととした。さらに安全性の確認のため，ラットを用いた単回経口投与毒性試験も行った。茹でこぼし処理したハナモモ花弁は，シャーベットやシロップ等に加工することができ，良好な桃色を付与することができたことから，食品への活用が可能であるものと考えられたので報告する。

実験方法

1．実験材料

（1）試　料　山梨県笛吹市のマルサフルーツ古屋農園から，平成24年ならびに25年の3月下旬～4月上旬に開花した生食用品種のモモの花および鑑賞用品種のハナモモの花を採取した（Fig. 1）。花はいずれも農薬散布前のものとした。モモの花は数種類の生食用品種の枝，ハナモモの花は切り花用の代表とされる‘矢口’の枝をそれぞれ約50～100本集め，手作業で花弁のみを採取し，ジッパー付冷凍保存袋に入れ，－30℃のフリーザーで冷凍保存したものを供試試料とした。ちなみに，花弁1枚あたりの重量は，モモ花弁で約12mgおよびハナモモ花弁で約2mg，また最長の長さは，それぞれ約2.1cmおよび1.6cmであった（Fig. 2）。

（2）花弁の茹でこぼし処理　モモ花弁の茹でこぼし処理は以下のように行った。すなわち，花弁20～40gを沸騰させた5％クエン酸溶液（pH1.9）1ℓ中で5分間加熱後，取り出して5分間水冷した。つぎに沸騰水中で5分間加熱5分間水冷処理して，加熱前後で花弁重量がほぼ同一になるように，水気をパルプ製使い捨てタオルで除去したものを茹でこぼし花弁とした。なお，茹でこぼしは，花弁がばらばらにならないようにするため，水切り用ネット（ポリエチレン，28×25cm）にいれ，上部を真結びして処理した。

2．花弁の色調およびアントシアニン量

（1）花弁の色調　生花弁（以下無加熱）および茹でこぼし処理のモモおよびハナモモ花弁を2枚のスライドグラス（白縁磨，No. 2）で挟み，積分球装置（日本分

Fig. 1　Flowers of the edible peach *Momo* and the ornamental peach *Hanamomo*

Fig. 2　Shape of the petals of the edible peach *Momo* and the ornamental peach *Hanamomo*

光，IJN-606）を付属した紫外可視分光光度計（日本分光，V-570）でL*a*b*値を測定した。

（２）モモおよびハナモモ花弁の色素構成の推定　モモ花弁およびハナモモ花弁の色素構成を推定するため，TLC（薄層クロマトグラフィー）を用いた確認試験[8]を行った。すなわち，モモおよびハナモモ花弁１ｇに１％塩酸メタノール100mℓを加え，静置抽出した後，エバポレーターを用いて濃縮し，試料溶液とした。シリカゲルプレート（Merck, TLCガラスプレートシリカゲル60 F_{254}）の一端から1.5cmの原線上に，濃縮した抽出液を約５μℓをスポットし，n-ブタノール/酢酸/メタクレゾール/水（２：１：２：１）を展開溶媒として，原線から約８cm展開後，白色光下でスポットの位置を確認した。

（３）アントシアニン量　無加熱および茹でこぼし処理のモモおよびハナモモ花弁のアントシアニン量の測定は，武田，林[9]および小野ら[10]の方法で行った。すなわち，各花弁0.5～１ｇを精秤し，１％塩酸メタノール10mℓを加え，常温遮光下で24時間静置抽出した。上清を25mℓメスフラスコに回収後，残留物にさらに１％塩酸メタノールを５mℓ加え，同様の操作を行った。その後，１％塩酸メタノールで25mℓに定容し，0.45μmのメンブランフィルターで濾過した溶液を測定試料とした。アントシアニン量は，cyanidin3-glucoside chloride（常盤植物化学研究所，P2102）を標準品として用い，極大吸収値である529nmにおける吸光度を紫外可視分光光度計（島津製作所，UV-1800）で測定した。

３．花弁の保存中における色調変化

花弁の保存中における色調変化は，ハナモモの茹でこぼし花弁で検討した。茹でこぼし花弁0.5ｇをポリエチレン袋に入れた後，酸性状態で保持するために１％クエン酸溶液５mℓを加え，５cm角となるようヒートシーラーで密封したものを保存用試料とした。保存条件は，－30℃暗所，４℃暗所，25℃暗所および25℃光照射（卓上蛍光灯，1,500ルクス）で，０，５，10，20，60および90日後に上記２．(1) と同様の方法を用いてL*a*b*値を測定した。なお，色調の変化は赤色度を示すa*値で評価した。

４．シアン配糖体（アミグダリン，プルナシン）の定性および定量

（１）TLCによるアミグダリンおよびプルナシンの定性　日本薬局方トウニン末の確認試験法[11]を参照しTLCを用いたアミグダリンおよびプルナシン（D-マンデロニトリル-β-D-グルコシド）の確認試験を行った。すなわち，モモおよびハナモモ花弁１gにメタノール10mℓを加え，80℃に設定した水浴上で10分間加熱還流抽出し，冷却後，濾紙（ADVANTEC, NO.2）で濾過し，濾液を試料溶液とした。シリカゲルプレートの一端から1.5cmの原線上に，メタノールで150μℓ/mℓに調製したアミグダリンを150μℓ（アミグダリンとして22.5μℓ相当），100μℓ/mℓに調製したプルナシン150μℓ（プルナシンとして15μℓ相当）および試料溶液30μℓ（モモ花弁約３mg相当）をマイクロシリンジでスポットした。酢酸エチル/メタノール/水（20：５：４）を展開溶媒として，原線から約７cm展開後，風乾した。このシリカゲルプレートに10％硫酸溶液を噴霧し，105℃で加熱後，白色光下でスポットの位置を確認した。

（２）HPLCによるプルナシンの定量　プルナシンの定量は，田森ら[12]の報告に準じて行った。すなわち，モモおよびハナモモの無加熱および茹でこぼし花弁を１ｇ精秤し，メタノールを60mℓ加え，ホモジナイザー（日立工機，AM-3）を用いて10,000rpmで５分間ホモジナイズした。つぎに濾紙（ADVANTEC, NO.2）を用いて上清のみを回収後，残留物に約15～30mℓのメタノールを用いて同様の操作を繰り返し，回収した液を100mℓに定容したものを抽出液とした。抽出液はエバポレーターを用いて適宜濃縮後0.45μmのメンブランフィルターで濾過し，HPLCで測定した。測定は，LC-10ADvp HPLCシステム（島津製作所）を用い，カラムはInertsil ODS－3，4.6mm i.d.×150mm（GLサイエンス）を使用し，温度は40℃に設定した。移動相はアセトニトリル/水（112：880v/v）を用い，流速は1.0mℓ/minとし，UV-VIS検出器（SPD-10AVvp）を用いてUV210nmで検出した。

５．遊離シアン化合物の定性試験

モモおよびハナモモの無加熱および茹でこぼし花弁の遊離シアン化合物の定性を行うため，食品衛生法食品，添加物等の規格基準第１食品Dに規定されている，豆類，生あんを対象としたシアン化合物試験法を利用して行った[13),14)]。すなわち，花弁20ｇを200mℓビーカーに量り採り，クエン酸緩衝液50mℓを加え，ホモジナイザー（日立工機，HG30）を用いて30～60秒間撹拌し均質化させた。撹拌後，pHメーター（堀場製作所，卓上型pH・水質分析計F-72）でpHを測定しながら水酸化ナトリウムでpH 5.9に再調整した後，200mℓ三角フラスコに移した。つぎに，試料を入れた三角フラスコの口の部分に10％炭酸ナトリウム溶液で潤したピクリン酸紙を栓でつるし，密栓後25～30℃で時々静かに振りまぜながら，３時間放置した。その後，酒石酸２ｇを加え，再び密栓し，時々振り混ぜながら50～60℃で１時間加熱した。遊離シアン化合物が存在すれば黄色のピクリン酸紙が淡褐色～赤褐色に変化するため，遊離シアン化合物の有無は，目視により，赤褐色は＋＋＋，褐色は＋＋，淡褐色は＋および黄色は－とし，＋＋＋～＋は検出，－は不検出と判定した。

６．ラットを用いた単回経口投与毒性試験

ハナモモの茹でこぼし花弁について，ラットを用いた単回経口投与毒性試験をシミックバイオリサーチ社において実施した。動物は，６週齢の日本チャールス・リバー製Crl:CD（SD）ラット雌雄各５匹を用い，オートクレーブ滅菌した飼料CRF-1（オリエンタル酵母工業）および水は絶食時以外自由摂取とした。動物実験倫理は，実施施設のシミックバイオリサーチ社における動物審査

委員会によって承認を受けて実施した。投与量は，被験物質を乾燥，細切，粉砕し，懸濁液として調製が可能かつ経口投与用ゾンデを通過する濃度が10mg/mℓであったことから，調製可能濃度の上限として10mg/mℓを設定した。投与試料は，0.5%メチルセルロース溶液を用いて懸濁し，投与は単回，投与量は投与日の体重から100mg/kgの割合になるように算出し，ディスポーザブル胃ゾンデおよびプラスチックシリンジを用いて経口投与した。動物は前日夕刻より絶食させ，投与約４時間後に再給餌させた。一般状態観察および体重測定は，投与日を投与０日とし14日間行い，剖検時は病理検査を実施した。病理検査については，体表面，腹膜内臓器（生殖腺含む），胸腔内臓器および頭蓋骨内の臓器について器官の異常（位置，形，大きさ，硬さ，表面および割面の性状，色調），内腔器官の性状，内容物および限局性変化等を肉眼で観察した。対象群には，本研究と同じ飼料を自由摂取させた６～８週齢のCrl:CD（SD）ラット雌雄各20匹の長期モニタリングデータ[15]（日本チャールス・リバー公表）を用いて検討した。

実験結果および考察

１．花弁の色調とアントシアニン量

サクラの花の塩漬けを製造する際，色の保持のために梅酢を用いている[16]こと，ならびにその梅酢に含有される主要な有機酸はクエン酸であったことから，クエン酸溶液による茹でこぼし処理を検討した。モモ花弁に最適なクエン酸濃度を検討するため，０，１，３および５％の濃度で予備試験を行ったところ，モモ花弁のa*値（L* a*b*値）はクエン酸濃度が高くなるほど高い傾向を示すことがわかった。そこで本研究は，５％クエン酸溶液を用いた茹でこぼし処理を行うことに決定した。

茹でこぼし前後の各花弁の桃色を評価するため，各花弁のa*値を比較したところ，ハナモモ花弁のほうがモモ花弁よりも，無加熱および茹でこぼし処理いずれにおいても高い傾向を示した（Table１）。また，目視による観察によっても，同様の傾向を示した。

モモおよびハナモモに含まれているアントシアニン量をcyanidin3-glucoside chloride換算で算出[17,18]した結果，無加熱のモモ花弁から75mg/100ｇ，ハナモモ花弁から98mg/100ｇ算出され，ハナモモ花弁の方がやや多い値を示した（Table２）。茹でこぼし後のアントシアニン量についても生花弁と比較して減少したものの，同じ傾向を示した。したがって，モモ花弁と比較してハナモモ花弁のほうが色およびアントシアニン量に優位性があり，桃色を付与する素材として利用価値が高いと考えられた。

さらに，両花弁とも茹でこぼしによりアントシアニン量が減少傾向を示したものの，a*値に大きな変化はみられなかったことから，茹でこぼし処理に５％クエン酸溶液を使用したことにより，花弁の桃色は保持されたものと考えられた。

Table 1　Color CIE L*a*b* of *Momo* and *Hanamomo* petals

	Petals	L*	a*	b*
Raw	*Momo*	89.11±2.60	11.17±1.01	−4.36±0.16
	Hanamomo	87.44±1.17	18.51±2.42	−5.16±0.55
Boiled	*Momo*	81.62±6.01	14.85±0.96	−2.34±0.60
	Hanamomo	84.04±1.53	17.38±0.12	−1.12±0.01

Data are represented as mean ±SE (n=3).

Table 2　Anthocyanin content of *Momo* and *Hanamomo* petals

	Petals	Anthocyanin content (mg/100g)		
		First measurement	Second measurement	Average
Raw	*Momo*	74.5	75.4	75.0
	Hanamomo	98.8	97.9	98.4
Boiled	*Momo*	13.9	13.8	13.8
	Hanamomo	16.2	17.3	16.7

Anthocyanun measured as cyanidin 3-glucoside.

２．ハナモモの茹でこぼし花弁の保存中における色調変化

ハナモモの茹でこぼし花弁の保存中における色調変化をFig. 3に示した。25℃光照射下で保存した場合，10日後にはa*値が３を下回り，目視によっても明らかな退色が確認された。アントシアニンは，光や熱に弱い[19]とされるため，ハナモモの色についても光の影響により退色したものと考えられた。一方，−30～25℃の暗所で保存した花弁については，いずれの保存温度においてもa*値が減少しにくい傾向を示し，保存開始から90日目においても桃色が保持されていた。したがって，１％クエン溶液中において25℃以下の遮光状態で保存することによ

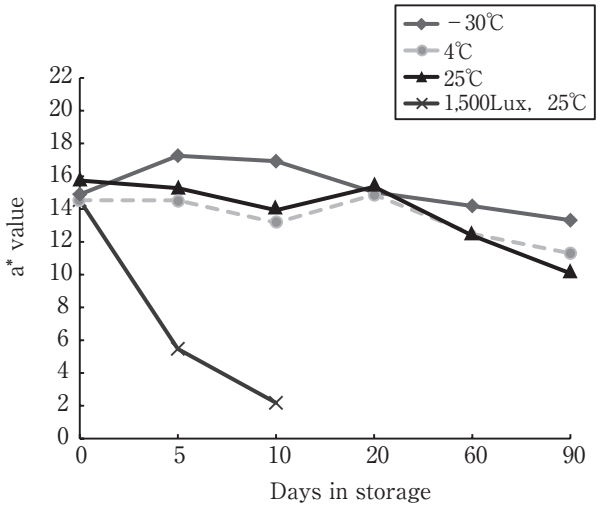

Fig. 3　Change in a* value of boiling *Hanamomo* petals over 90 days' storage

Test sample: Petals (0.5g) in 5mℓ 1% citric acid in a polyethylene bag.

り，90日程度は桃色の色調を保持できることがわかった。

3．シアン配糖体（アミグダリンおよびプルナシン）の定性

無加熱のモモおよびハナモモ花弁に含まれるシアン配糖体の定性結果をFig.4に示した。両花弁ともアミグダリン標品と同一R_f値0.4に黒色のスポットは検出されなかったが，プルナシン標品と同じR_f値0.5の位置に黒色のスポットが確認された。すなわち，TLCの結果から，モモの花弁のシアン配糖体はプルナシンであることが確認された。

4．プルナシンの定量

無加熱および茹でこぼし花弁の抽出液をHPLCで測定した結果，プルナシンは良好に分離，溶出した。その結果をTable 3に示したが，プルナシンの含有量はモモ花弁と比較してハナモモ花弁のほうがわずかに少なく，無加熱ではモモ花弁から4,681ppm，ハナモモ花弁から4,372ppm検出された。しかしながら，両花弁のプルナシン量は茹でこぼしにより急減し，モモ花弁で5.6ppm，ハナモモ花弁では不検出であった。ウメ干しでは15～85ppmのプルナシンが検出された[20]との報告があり，これと比較しても両花弁での数値は低かった。すなわち，茹でこぼし処理により，花弁のプルナシン量は大きく減少し，ウメ干しより低い検出量となった。日本中毒情報センター[7]の情報において，プルナシンが直接起因したと思われる中毒の報告は見当たらないこと，またウメ干しなどに加工された食品による中毒の報告もないことから，茹でこぼし花弁に含まれる量ならば中毒の可能性は低いものと推察された。

シアン配糖体を含む食品のこれまでの報告によると，プルナシンが含まれる摘果モモ果実では，沸騰水中での加熱時間と共にプルナシンが減少傾向を示す[2]こと，またタキシフィリンが含まれるタケノコやリナマリンが含まれる豆類やキャッサバ[21,22]では，喫食前に十分に茹でることで安全に食することができる[23]とされていることから，今回のモモ花弁においても茹でこぼし処理により安全に食用できるものと考えられた。

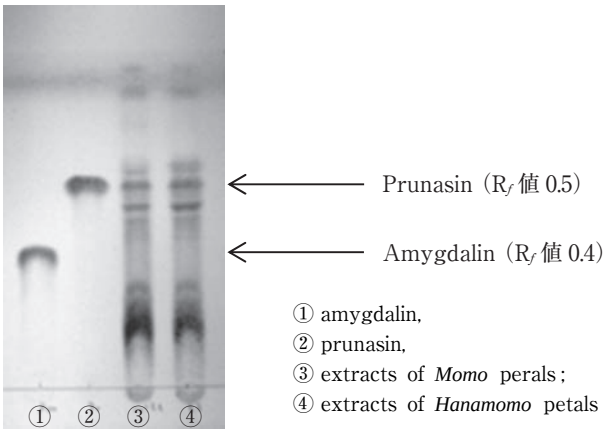

Fig. 4 TLC chromatogram of extracts of *Momo* and *Hanamomo* petals

Developing solvent: ethyl acetate : methanol : water (20 : 5 : 4).
Detection: 10% sulfuric acid, heat treatment at 105℃ under white light.
Limit of detection: amygdalin 7.5 μg/mg, prunasin 5 μg/mg.

Table 3 Prunasin and free cyanide content of *Momo* and *Hanamomo* petals (n = 2)

Petals		Prunasin (ppm)*	Free cyanide***
Raw	*Momo*	4,681 ± 59.6	+++
	Hanamomo	4,372 ± 24.0	+++
Boiled	*Momo*	5.6 ± 0.5	−
	Hanamomo	ND**	−

* Data are represented as mean ± Average Error (n = 2).
** Quantitative range of ≦ 2.7ppm.
*** Judgment of the color of the picric-acid paper: reddish brown indicates +++, brown indicates ++, light brown indicates +, yellow indicates −.

5．遊離シアン化合物の定性

遊離シアン化合物の定性試験結果をTable 3に示した。無加熱の両花弁では，ピクリン酸試験紙が赤褐色（+++）に変化し，遊離シアン化合物の検出が確認された。

一方，茹でこぼした両花弁では，ピクリン酸試験紙が変色せず黄色（−）を保持したため，不検出と判断された。食品衛生法の豆類，生あんの規定によると，生あんはシアン化合物が検出されるものであってはならない[13]とされていることから，モモの花弁についてもこの方法で確認したものを食品素材として利用することが望ましいと考えられた。さらに，今回の茹でこぼし条件では，水での茹でこぼしと比較してプルナシン量が低減される傾向を示したため，5％クエン酸を使用した茹でこぼしが望ましいと考えられた。

6．ラットを用いた単回経口投与毒性試験

これまでの検討結果から，ハナモモ花弁はモモ花弁と比較して桃色の色調が強く，茹でこぼし処理によりプルナシンが顕著に減少することがわかった。そこでさらに安全性を評価するため，ハナモモの茹でこぼし花弁について，ラットを用いた単回経口投与毒性試験を行った。すなわち，ラットに花弁を100mg/kgの割合で単回経口投与したところ，一般状態については，投与日は6時間まで頻回観察し，その後は1日1回観察したが，変化はみられなかった。次に体重は雌雄ともに観察期間中において投与前と比較して増加がみられた。本研究と同じ飼料を自由摂取させた日本チャールス・リバー公表，Crl : CD (SD) ラット雌雄各20匹，6～8週齢の長期モニタリングデータ[15]と比較しても同程度の体重増加傾向であった。すなわち，雌の2週間後の体重は，116 ± 5～189 ± 11 g，雄は154 ± 5～294 ± 16 g（mean ± SD）であった。さらに剖検時における病理検査（肉眼観察）においても，被験物質投与に起因する変化はみられなかった。

したがって，本研究で用いたハナモモの茹でこぼし花

弁は，毒性を示す可能性は低いものと推察され，食品素材として活用できることが示唆された。

要　約

モモの花弁を食品素材として利用する観点から，生食用品種のモモ花弁と観賞用品種のハナモモ花弁の色調を比較したところ，ハナモモ花弁はモモ花弁より桃色の色調を強く示した。また，アントシアニン量も多く含まれていたことから，食品等に桃色を付与するための素材として利用価値が高いものと推察された。

一方で，モモの花弁からシアン配糖体であるプルナシンや遊離シアン化合物が検出されたが，5％クエン酸溶液を用いて花弁を茹でこぼし処理することでプルナシンを顕著に減少させ，遊離シアン化合物も不検出にさせることがわかった。さらに茹でこぼし処理したハナモモ花弁について，ラットを用いた単回経口投与毒性試験を実施したところ，投与に起因する異常は確認されなかった。すなわち，モモの花弁が食品素材として活用できる可能性が示唆された。

また，茹でこぼし処理したハナモモ花弁の色調保持試験を実施したところ，1％クエン酸溶液中において，花弁の桃色の色調は，25℃以下の遮光状態であれば90日間程度保持されることがわかり，食材として長期間使用できることがわかった。

謝　辞　本研究にあたり，モモ花弁の試料提供および研究にご協力いただきましたマルサフルーツマルサマルシェ・クッキングスタジオの古屋千鶴様に心より御礼申し上げます。また，シアン化合物の分析等についてご指導およびご助言をいただきました国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所の川原信夫先生，渕野裕之先生に深く感謝いたします。

そして，本研究をまとめるにあたり丁寧にご指導くださいました元山梨県工業技術センター副所長辻政雄博士に深く感謝申し上げます。

文　献

1）農林水産省大臣官房統計部（平成26年1月14日公表）：農林水産統計，平成25年産もも，すももの結果樹面積収穫量および出荷量，〈http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/sakumotu/sakkyou_kazyu/pdf/syukaku_momo_13.pdf〉（参照2015-8-3）

2）樋口かよ・尾形美貴・木村英生・飯野久和・渕野裕之・川原信夫：摘果モモ果実のプルナシンと安全性評価の予備検討，日食化誌，**22**（1），45～50（2015）

3）塚本洋太郎総監修：園芸植物大事典5（小学館，東京），pp. 40～41（1989）

4）厚生省薬務局長通知：無承認無許可医薬品の指導取締りについて，別添1および別添2，昭和46年6月1日，薬発第476号

5）奥田拓男編：最新生薬学［第2版］（廣川書店，群馬），pp. 85～87（2011）

6）奥田拓男編：最新薬用植物学（廣川書店，群馬），pp. 121～125（2008）

7）日本中毒情報センター：保健師・薬剤師・看護師向け中毒情報【青梅】ver. 1. 00，平成16年10月1日

8）岩科　司・大谷俊二・林　孝三：顕微分光光度法による液胞および色素体の吸収スペクトルと含有色素成分の識別とについて，育雑，**33**，457～467（1983）

9）林　孝三編：植物色素―実験・研究への手引―（養賢堂，東京），p. 152（1980）

10）小野廣紀・杉原菜穂・廣瀬裕子・片桐久美子：岐阜県産黒米からのアントシアニン系色素の抽出溶媒の検討，岐阜市立女子短期大学研究紀要，**52**，135～138（2003）

11）医薬品医療機器総合機構：日本薬局方電子版トウニン末の確認試験，〈http://www.pmda.go.jp/files／000162489. pdf〉（参照2015-8-3）

12）田森純二・井坂洋司：梅加工品中の製造工程中のアミグダリンの消長，農林規格検査所調査研究報告，**11**，21～28（1987）

13）食品衛生研究会：食品衛生小六法Ⅰ　平成24年度版（新日本法規出版，愛知），pp. 1122～1123（2013）

14）厚生労働省監修：食品衛生検査指針・理化学編（日本食品衛生協会，東京），pp. 707～713（2005）

15）日本チャールス・リバー：Crl:CD（SD）SDラット長期モニタリングデータ，〈http://www.crj.co.jp/cms/pdf/info_common/62/3971076/survival_data_SD_mar_2009ca.pdf〉（参照2014-10-27）

16）吉田好男編：柳敏雄の漬物研究　別冊　暮らしの設計四号（中央公論社，東京），pp. 42～44（1980）

17）須田紘子・林　建樹・山本俊哉・前田克夫・萩原勲：ハナモモにおける花色の特性とその遺伝，園学雑別冊，**73**（1），181（2004）

18）Uematsu, C., Katayama, H., Makino, I., Inagaki, A., Arakawa, O. and Martin, C.: Peace, a MYB-like transcription factor,regulates petal pigmentation in flowering peach ‘Genpei’ bearing variegated and fully pigmented flowers, *J. Exp. Bot.*, **65**（4），1081～1094（2014）

19）片山　脩・田島　眞：食品と色（光琳，東京），p. 100，p. 121（2003）

20）玉瀬喜久雄・北田善三・佐々木美智子・山添　胖：梅肉中の青酸配糖体の定量，奈良県衛生研究所年報，**21**，95～97（1986）

21）FSANZ（2014）：cassava and bamboo shoots，〈http://www.foodstandards.gov.au/consumer/chemicals/cassava/Pages/default.aspx〉（参照2015-5-24）

22) NZFSA (2008)：Cyanogenic glycosides-information sheet, 〈http：//www.foodsafety.govt.nz/elibrary/industry/Cyanogenic_Glycosides-toxin_Which.pdf〉（参照2015-5-24）

23) 後藤哲久・佐藤吉朗・吉田　充：食品危害要因その実態と検出法（テクノシステム，東京），pp. 174～176（2014）

（平成27年８月19日受付，平成28年１月14日受理）

オリーブ葉由来ヒドロキシチロソール蛍光化誘導物を用いた細胞内動態解析法について

小林謙一*§・茂木裕暉*・高橋明日香*
相澤有美*・鈴木　司*・山本祐司*

＊　東京農業大学応用生物科学部生物応用化学科

Intracellular Kinetic Analysis Using Fluorescence Labeling Olive Leaf Polyphenol

KOBAYASHI Ken-Ichi*§, MOGI Yuki*, TAKAHASHI Asuka*, AIZAWA Yumi*, SUZUKI Tsukasa* and YAMAMOTO Yuji*

＊　*Department of Applied Biology and Chemistry, Faculty of Applied Bioscience, Tokyo University of Agriculture, 1-1-1, Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo　156-8502*

The aim of this study was to establish a novel method to assess the function of food components using fluorescently labeling strategies. In this report, we focused on olive polyphenol hydroxytyrosol (HT) as a target of fluorescent labelling. HT, one of the major polyphenols present in olive leaf and oil, is known to possess a high antioxidant and anticancer capacity. HT was conjugated with FITC to the phenolic hydroxyl group (FITC-HT). Caco-2 cells were cultured on glass bottom dishes, and then incubated with 500 μm of FITC-HT for 24 hours and subsequently incubated with LysoTracker Red (Lysosome marker) or MitoTracker Red (Mitochondria marker) with Hoechst 33342 (Nuclei marker). Thereafter, using KEYENCE BZ-X700 Series All-in-one Fluorescence Microscope, the imaging data was acquired. As a result, FITC-HT was detected in the lysosome but not in the mitochondria and nuclei of Caco-2. And, FITC and fluorescein were not detected in the Caco-2 cells, suggested this imaging data of FITC-HT is dependent on the formula of HT. Thereafter, we concluded that cellular imaging using fluorescent labeled food compounds is a powerful tool to analyze the effect of functional food constituents.

(Received Aug. 26, 2015；Accepted Dec. 18, 2015)

Key words：*polyphenol, hydroxytyrosol, olive, intracellular kinetic analysis*
ポリフェノール　ヒドロキシチロソール　オリーブ　細胞内動態解析

近年，薬物成分の細胞内での挙動を「動的」に追跡する技術の開発が，生命科学および薬物動態の分野で精力的に進められている。その中で，薬物を蛍光標識化して，細胞内や生体内での動きをイメージングする技術に注目が集まっている。その中で，近年注目を集めている観察法の１つに，Corelative light and electron microscopy (CLEM) 法がある[1]。CLEM法とは，同一の細胞を光学（蛍光）顕微鏡と電子顕微鏡の２種類の顕微鏡で観察して，最終的には重ね合わせた像を得て解析する方法である。しかし，CLEM法は，操作過程が複雑で，かつコストがかかる方法であった。私たちは，操作方法を簡便化し，かつ可能な限り道具を自作することで低コスト化したCLEM法を確立した[2]。また，抗癌剤であるシスプラチンを蛍光物質で標識し，この方法に供した結果，リソソームに蛍光標識されたシスプラチンがリソソームに取り込まれている画像を得ることに成功した。さらに，三次元電子顕微鏡画像（トモグラフィー）画像の取得を行い，シスプラチンが取り込まれたリソソームの膜構造およびその近傍の細胞内小器官の膜構造の立体的イメージングに成功した[2]。したがって，シスプラチンの細胞内での作用点を明らかにするとともに，この方法が薬理効果の有効な解析方法であることを示してきた。

そこで，この方法論を薬物動態の解析手法のみならず，食品成分の細胞内動態を追跡することを通した，機能性

＊　〒156-8502　東京都世田谷区桜丘１－１－１
§　Corresponding author, E-mail : k4kobaya@nodai.ac.jp

食品成分の新規の評価法として応用できると考えた。しかし，そのような試みは，ほとんどなされていないのが現状である。

オリーブ（*Olea europea*）は，古来より地中海世界の食生活の中心的な食品素材として利用されてきた。しかし，利用されるのはもっぱら実の部分であり，葉部はほとんど利用されることがなかった。近年，このオリーブ葉が，食品素材として注目を集めている。それは，オリーブ葉の抽出エキスに，血糖降下作用[3]，抗高血圧作用[4]，抗酸化作用[5]など生体における機能性が報告され始めてきたからである。KOBAYASHIらは，爆砕オリーブ葉粉末に，脂質の吸収および胆汁酸の再吸収促進作用があることを見い出している[6),7)]。また，オリーブ葉由来ポリフェノールであるオレウロペインが発見され，それが機能性の本体であると考えられている。実際にオレウロペインが，褐色脂肪細胞における熱産生を亢進させる機能を有することも明らかとなっている[8)]。また，近年，オレウロペインそのものが細胞内へ取り込まれることはなく，代謝産物であるヒドロキシチロソール（HT）が取り込まれることによって，機能を発揮しているとの報告もある[9)]。一方，多くのポリフェノール類が，大腸癌細胞の抗癌様作用が最近多く報告されたことから，オリーブ葉ポリフェノールにも類似の効果を有するものとの報告もある[10)～12)]。しかし，HTが細胞内のどこで作用するのかについての構造学的知見については不明である。

そこで本研究では，蛍光標識技術を用いた食品成分の新たな機能評価法を構築する一環として，オリーブ葉ポリフェノールであるHTの蛍光標識化に着手するとともに，その細胞内での動的イメージングを行った。

実験材料および方法

1．HTの蛍光標識化

HTは，オレウロペインの代謝産物であり，オレウロペインと同等それ以上の機能活性を有するということ，化学構造が単純でありフェノール系水酸基に対する蛍光標識が容易であると考えた。そこで，HTのアルコール性水酸基をフルオロセインイソシアネート（FITC）で標識したFITC-HTの作製に着手した（Fig. 1）。

反応容器に2-(3, 4-Dihydroxyphenyl) ethyl alcohol（図1の01）202 mg（1. 31 mmol）およびFluorescein 5-isothiocyanate（図1の02）522 mg（1. 34 mmol）を入れ，*N*，*N*-ジメチルホルムアミド4. 3 mℓに溶解させた。この反応溶液を120℃で1時間撹拌した後，室温まで放冷し，酢酸エチル30 mℓおよび1 mol/ℓ塩酸30 mℓで分液した。有機層を飽和食塩水20 mℓで3回洗浄後，無水硫酸ナトリウムで乾燥，ろ過，減圧下濃縮することで粗生物を得た。その粗生物を酢酸エチル3 mℓおよび塩化メチレン3 mℓを用いて再沈殿し，橙色粉末を得た。これをカラムクロマトグラフィー（シリカゲル30 g，塩化メチレン：酢酸エチル＝0：100 to 50：50，2％酢酸含有，2回）で精製し，橙色粉末を得た（図1の03）。その後，この橙色粉末をNMR（JEOL 270MHz）およびLC/MS（Waters 2695，ZQ，2996，column Inertsil ODS-3（4. 6×75 mm））に供し，構造および純度を確認した。

2．FITC-HTの蛍光顕微鏡を用いた細胞内動的イメージング

ヒト大腸癌モデル培養細胞であるCaco-2細胞をスライドガラス付き3. 5cmディッシュに6×10^4細胞を播種し，70％コンフルエントになるまで培養した。その後，Caco-2細胞にFITC-HTを500μMの濃度になるように処理して24時間反応させた。その後，リソソームマーカー（LysoTracker Red）もしくはミトコンドリアマーカー（MitoTracker Red）と30分間反応させた。その後，核マーカー（Hoechst 33342）で30分間反応後，生細胞イメージング装置（KEYENCE BZ-X 700）を用いて，6時間のイメージングムービーを取得した。

3．FITCおよびフルオロセインの細胞内取り込みおよび局在性の検討

Caco-2細胞を4 wellチャンバープレートに1 wellあたり1. 0×10^5細胞を播種し，70％コンフルエントになるまで培養した。その後，Caco-2細胞にFITCもしくはフルオロセインを500μMの濃度になるように処理して24時間反応させた。その後，リソソームマーカー（LysoTracker Red）もしくはミトコンドリアマーカー（MitoTracker Red）と30分間反応させた。その後，細胞を4％パラホルムアルデヒドで固定し，透過処理後，核マーカー（Hoechst 33342）で5分間反応させ，封入した。そして，共焦点レーザー顕微鏡（OLYNPUS FV1200）を用いて観察した。

実験結果

1．HTの蛍光標識化

HTの蛍光標識化を行った結果，図1−03の粗生物689 mgを得て，その後の精製で橙色粉末662mgを得た。その後のカラムクロマトグラフィーによる精製で最終的に図1−03の橙色粉末114mgを得た。収率は16％であった。こ

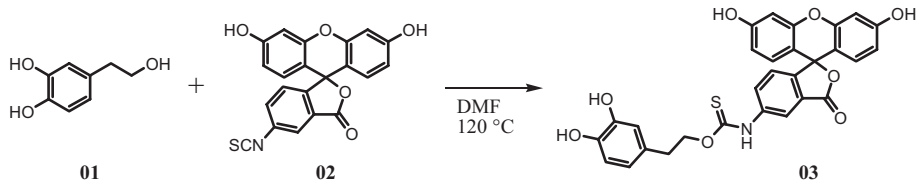

Fig. 1　ヒドロキシチロソールのFITC標識化

の橙色粉末をNMR（JEOL 270MHz）およびLC/MS（Waters 2695，ZQ，2996，column Inertsil ODS-3（4.6×75㎜））に供し，構造および純度を確認した。

NMRおよびLC/MSで化学構造を確認した。（データは示さず）。

2．FITC-HTの蛍光顕微鏡を用いた細胞内動的イメージング

Caco-2細胞をFITC-HTと反応させ，細胞内への取り込みと挙動を動的に追跡したイメージング結果をFig. 2とFig. 3に示した。

生細胞の形態を観察可能な位相差画像をFig. 2-(a) とFig. 3-(a) に示した。また，FITC-HTの蛍光画像をFig. 2-(b) とFig. 3-(b) に示した。そして，リソソームマーカーであるLysotrackerの蛍光画像をFig. 2-(c)，ミトコンドリアマーカーであるMitotrackerの蛍光画像をFig. 3-(c) に示した。また，核マーカーであるHoechst 33342の蛍光画像をFig. 2-(d) とFig. 3-(d) に示した。位相差画像，FITC-HT，そしてリソソームマーカー，核マーカーを重ね合わせた画像をFig. 2-(e) に示した。位相差画像，FITC-HT，そしてミトコンドリアマーカー，核マーカーを重ね合わせた画像をFig. 3-(e) に示した。その後，6時間継時的にイメージング画像を取得し，重ね合わせたタイムラプス画像をFig. 2-(f) からFig. 2-(l)，Fig. 3-(f) からFig. 3-(l) に示した。

その結果，FITC-HTは細胞内に存在していたことから，細胞内に取り込まれることを確認した。また，細胞内局在性を検討した結果，FITC-HTは，リソソームマーカー（Fig. 2-(e)）と一部共局在が認められたのに対し，ミトコンドリアマーカー（Fig. 3-(e)）と核マーカー（Fig. 2-(e)，3-(e)）との共局在は認められなかった。加えて，6時間の生細胞イメージング画像の取得も成功し，FITC-HTが蛍光強度を失うことなく，蛍光画像を取得できることを証明した（Fig. 2-(e) ～ (l)，Fig. 2-(e) ～ (l)）。

3．FITCもしくはフルオロセインの細胞内への取り込みの評価

FITC-HTの細胞内取り込みがHTの構造に依存したものかどうかを，FITCおよびフルオロセインを用いて検討した結果をFig. 4に示した。FITCは，わずかに細胞内に取り込まれるものの，FITC-HTに比べるとごくわずかなものであった。フルオロセインに関しては，細胞内に取り込まれることはなかった。

考　察

本研究では，蛍光標識技術を用いた食品成分の新たな機能評価法を構築する目的で，オリーブ葉ポリフェノールの一種であるHTのFITCによる蛍光標識化に着手し，その蛍光標識化合物の細胞内局在性の検討を行った。HTは，蛍光標識化が容易であることに加え，ほかの低分子のポリフェノールでも類似の構造を有していることから，評価法の構築する点ではHTが蛍光標識化にふさわしい分子種であると考えた。また，HTが細胞内に取り込まれ，機能を発揮すると考えられているので，オリーブの機能性を検討するうえでも，蛍光標識化する分子として

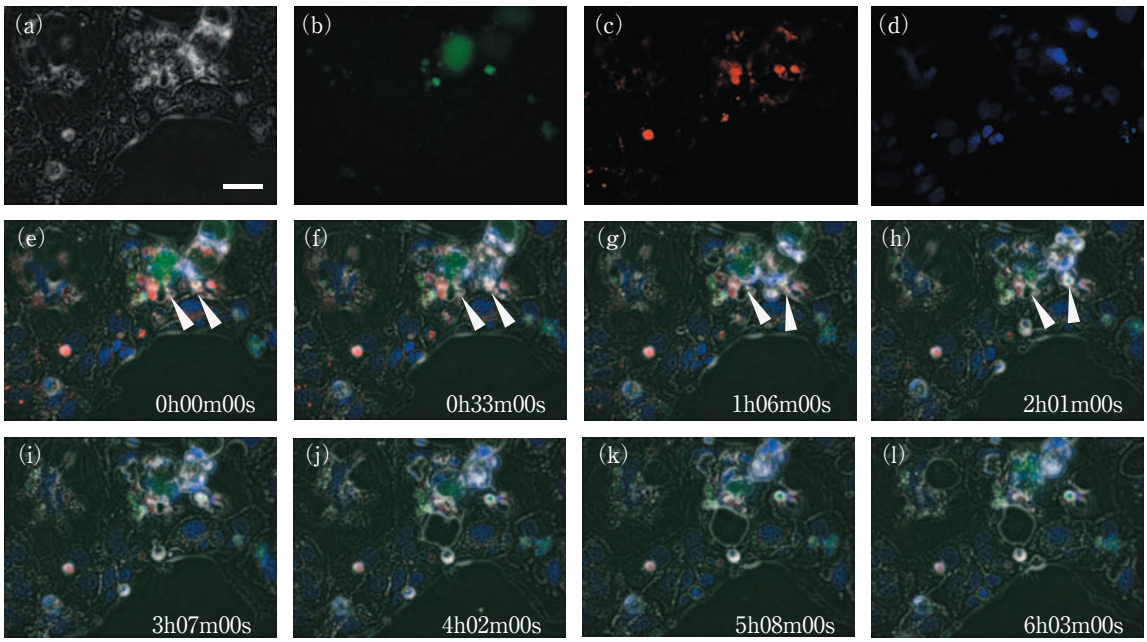

Fig. 2　FITC-HTのCaco-2細胞内におけるリソソームへの局在性の検討と動的イメージング

Caco-2細胞をFITC-HTで処理した後に，リソソームマーカー（LysoTracker）および核マーカー（Hoechst33342）で30分間反応後，生細胞イメージング装置（KEYENCE BZ-X700）を用いて，6時間イメージングムービーを取得した。
位相差画像，(b) FITC-HT（緑）画像，(c) LysoTracker（赤）画像，(d) Hoechst33342（青）画像
(e)－(l) 重ね合わせ画像のタイムラプス画像　黄色矢尻：FITC-HTがリソソームに取り込まれた部分，スケールバー：50μm

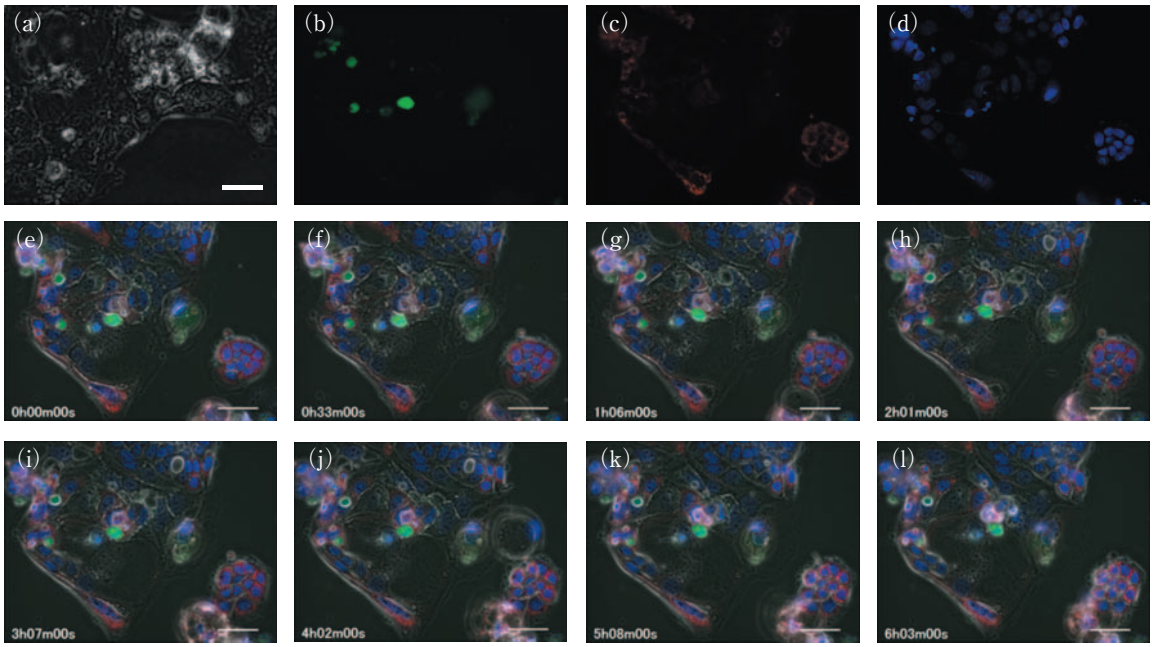

Fig. 3　FITC-HTのCaco-2 細胞内におけるミトコンドリアへの局在性の検討と動的イメージング

Caco-2 細胞をFITC-HTで処理した後に，ミトコンドリアマーカー（MitoTracker）および核マーカー（Hoechst33342）で30分間反応後，生細胞イメージング装置（KEYENCE BZ-X700）を用いて，6 時間イメージングムービーを取得した。
位相差画像，(b) FITC-HT（緑）画像，(c) MitoTracker（赤）画像，(d) Hoechst33342（青）画像
(e) − (l)　重ね合わせ画像のタイムラプス画像　スケールバー：50μm

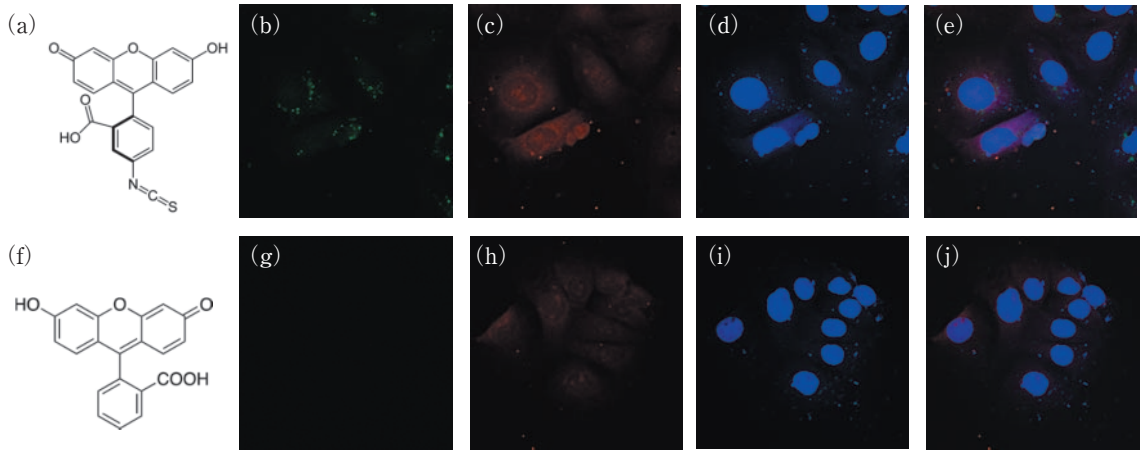

Fig. 4　FITC-HTおよびフルオロセインのCaco-2 細胞への取り込み

Caco-2 細胞をFITC-HTで処理した後に，リソソームマーカー（LysoTracker）で反応させ，固定した。その後に，核マーカー（Hoechst33342）で反応後，共焦点レーザー顕微鏡（OLYMPUS FV1200）を用いて観察した。
FITCの構造，(b) FITC-HT（緑）画像，(c) LysoTracker（赤）画像，(d) Hoechst33342（青）画像
(e) (b) − (e) の重ね合わせ画像 (f) フルオロセインの構造，(g) FITC-HT（緑）画像，(h)　LysoTracker（赤）画像，(i) Hoechst33342（青）画像

HTが最適であると考えた。そこで，HTをFITCで標識することにした。その結果，高純度の標識化合物を得ることに成功した。次に，この化合物が細胞内に取り込まれるかどうかを確認した。その結果，FITC-HTがCaco-2 細胞内に取り込まれるものの，核への局在は観察されなかった。HTが核に局在するという報告はないことから，本結果とHTの挙動は類似しているものと示唆された。また，細胞内へ取り込まれたFITC-HTは，細胞内でドット状に散在していること，その小胞状部分は，一部リソソームと共局在していた。Tokyo Greenという蛍光発色団で標識したエピガロカテキンガレート（EGCG）を用いて，ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）における細胞内動態を検討したところ，細胞内にドット上に取り込まれるという報告があり[13),14)]，本結果と類似したものであった。したがって，HTとEGCGは，細胞内で同様の動態を示す可能性があると考察した。一方

HANらは，FITCで標識したEGCGを作製（FITC-EGCG）し，L929細胞における反応性を観察した結果，FITC-EGCGが核内に移行することを報告している[15]。同じFITC標識化合物であっても，細胞種が異なると細胞内での局在や挙動が異なる可能性が考えられる。したがって，FITC-HTに関しても，ほかの細胞種での検討も行っていく必要がある。

またFITC-HTの細胞内の挙動が，FITCもしくはフルオロセインによるものか否かについても検討した結果，これらの分子は細胞内に取り込まれることはなかったので，HT部分による細胞内挙動を反映しているものと判断した。

本結果が，HTの挙動と一致しているかどうかを確かめるためには，HTの抗ハプテン抗体を作製し，この抗体を用いた免疫染色を行い，整合性を取る必要があると考えるが，今後の検討課題である。

現在，機能性食品成分の細胞内動態解析は，質量顕微鏡を用いた解析が進められているが，顕微鏡自体が高額であること，解像度の問題で正確な局在を検討できないことなどの問題点がある。また，前述の機能性食品成分の低分子ハプテン抗体を作製して，細胞内動態を追跡することも可能であるが，抗体の感度の問題もありほとんど行われていない。また上記の２つの方法論は，いずれも「生きた状態」で観察することは難しい。機能性食品成分の蛍光標識化誘導物を用いた細胞内動態解析は，「生きた」状態の細胞や動物個体での動的追跡が可能であるという長所がある。実際にASAKAWAらは，蛍光標識したカテキンのポジトロン断層撮影法（PET）による*in vivo*イメージングに成功しており，これらの技術を応用すると，FITC-HTの個体レベルでの検討も可能になるかもしれない[16]。

本研究結果によって，機能性食品成分の作用が，細胞内のどの部分で起こるのかについて，時空間的に解析することが可能になり，食品成分の新たな機能性評価法につながるであろう。

謝　辞　本研究は，科学研究費補助金基盤研究（C）「CLEM法を用いた機能性食品成分の細胞内動態解析」（研究課題番号：25450181，研究代表者：小林謙一）および公益財団法人アサヒグループ学術振興財団平成24年度研究助成金助成金を受けて実施した。

文　献

1）JAHN, K.A., BARTON, D.A., KOBAYASHI, K., RATINAC, K.R., OVERALL, R.L. and BRAET, F.: Correlative microscopy: providing new understanding in the biomedical and plant sciences. *Micron*, **43**, 565～582 (2012)

2）KOBAYASHI, K., CHENG, D., HUYNH, M., RATINAC, KR., THORDARSON, P. and BRAET, F.: Imaging fluorescently labeled complexes by means of multidimensional correlative light and transmission electron microscopy: a practical approach. *Methods Cell Biol*, **111**, 1～20 (2012)

3）AZZAWIE, H. F. and ALHAMDANI, M. S.: Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. *Life Sci*., **78**, (12), 1371～7 (2006)

4）ZARZUELO, A., DUARTE, J., JIMÉNEZ, J., GONZÁLEZ, M. and UTRILLA, M.P.: Vasodilator effect of olive leaf. *Planta Med*, **57**, 417～9 (1991)

5）SOMOVA, L.I., SHODE, F.O., RAMNANAN, P. and NADAR, A.: Antihypertensive antiatherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from Olea europaea, subspecies africana leaves. *J Ethnopharmacol*., **84**, 299～305 (2003)

6）小林謙一：新しいアプローチから見た食品機能性成分の動態研究，日本食生活学会誌，**21**，17～23 (2010)

7）小林謙一・夏川　大・尾形明日美・高田恭輔・室田友紀子・綿谷鮎子・寺本明子・牧　恒雄・山本祐司・田所忠弘：爆砕処理オリーブ葉粉末による脂肪吸収および胆汁酸再吸収の促進効果，日本食生活学会誌，**20**，121～126 (2009)

8）OI-KANO, Y., KAWADA, T., WATANABE, T., KOYAMA, F., WATANABE, K., SENBONGI, R. and IWAI, K.: Oleuropein, a phenolic compound in extra virgin olive oil, increases uncoupling protein 1 content in brownadipose tissue and enhances noradrenaline and adrenaline secretions in rats. *J Nutr Sci Vitaminol* (*Tokyo*)., **54** (5), 363～70 (2008)

9）VISSERS, M.N., ZOCK, P.L., ROODENBURG, A.J., LEENEN, R. and KATEN, M.B.: Olive oil phenols are absorbed in humans., *J Nutr*., **132** (3), 409～417 (2002)

10）RODRIGUEZ-RAMIRO, I., RAMOS, S., BRAVO, L., GOYA, L. and MARTIN, MÁ.: Procyanidin B2 and a cocoa polyphenolic extract inhibit acrylamide-induced apoptosis in human Caco-2 cells by preventing oxidative stress and activation of JNK pathway. *J Nutr Biochem*., **22** (12), 1186～1194 (2011)

11）CEREZO-GUISAD, M.I., ZUR, R., LORENZO, M.J., RISC, A., MARTIN-SERRANO, M.A., ALVAREZ-BARRIENTOS, A., CUENDA, A. and CENTENO, F.: Implication of Akt, ERK1/2 and alternative p38 MAPK signalling pathways in human colon cancer cell apoptosis induced by green tea EGCG. *Food. Chem. Toxicol*., **84**, 125～132 (2015)

12）CARDENO, A., SANCHEZ-HIDALGO, M., ROSILLO, M.A., ALARCON DE LA LASTRA, C.: Oleuropein, a secoiridoid derived from olive tree, inhibits the

proliferation of human colorectal cancer cell through downregulation of HIF-1α. *Nutr Cancer*., **65** (1), 147～156 (2013)

13) AIHARA, Y., YOSHIDA, A., FURUTA, T., WAKIMOTO, T., AKIZAWA, T., KONISHI, M. and KAN, T.: Regioselective synthesis of methylated epigallocatechin gallate via nitrobenzenesulfonyl (Ns) protecting group. *Bioorg Med Chem Lett*., **19**, (15), 4171～4174 (2009)

14) PIYAVIRIYAKUL, S., SHIMIZU, K., ASAKAWA, T., KAN, T., SIRIPONG, P. and OKU, N.: Anti-angiogenic activity and intracellular distribution of epigallocatechin-3-gallate analogs. *Biol Pharm Bull*., **34** (3), 396～400 (2011)

15) HAN, D.W., MATSUMURA, K., KIM, B. and HYON, SH.: Time-dependent intracellular trafficking of FITC-conjugated epigallocatechin-3-O-gallate in L-929 cells. *Bioorg Med Chem*., **16** (22), 9652～9659 (2008)

16) ASAKAWA, T., HIZA, A., NAKAYAMA, M., INAI, M., OYAMA, D., KOIDE, H. and KAN, T.: PET imaging of nobiletin based on a practical total synthesis. *Chem Commun* (*Camb*)., **47** (10), 2868～2870 (2011)

(平成27年8月26日受付，平成27年12月18日受理)

包装資材の特性に基づいた青果物の輸送並びに貯蔵中の品質保持に関する研究

平成27年度日本食品保蔵科学会学会賞

石川　豊*§

＊　農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所

Study on the Packaging Materials for Maintaining Postharvest Quality of Fresh Produce during Transportation and Storage

ISHIKAWA Yutaka*§

＊　*National Food Research Institute, NARO, 2−1−12 Kannondai, Tsukuba-shi, Ibaraki　305−8642*

Key words：*fresh produce, modified atmosphere packaging, cushioning packaging, quality*
青果物，*MA*包装，緩衝包装，品質

消費者の鮮度の高い（品質劣化の少ない）野菜に対する要求は強く，高品質な青果物を消費者まで届けるため，生産面では，高糖度や機能性成分を多く含んだ青果物の栽培に向けた努力がなされ，流通面では，コールドチェーンやMA（Modified Atmosphere）包装，CA（Controlled Atmosphere）貯蔵，輸送中の損傷防止のための緩衝包装などによって収穫時の品質をできるだけ保持するような工夫がされている。

一方で，FAOの報告によると農業生産から消費に至るフードサプライチェーンの中で，世界全体で人の消費向けに生産された食料の約３分の１にあたる13億ｔの食料が毎年廃棄されている。日本の流通時における青果物の減耗量に限ってみても，野菜で全体の約10％にあたる1,531千ｔ，果実で約17％にあたる1,317千ｔが毎年消費者の口に入ることなく廃棄されている。

青果物の輸送・貯蔵中の品質保持に関していえば，呼吸や蒸散といった生理活性作用による品質低下および振動・衝撃による損傷に対する対策が特に重要であると考えられる。

筆者は，このような現状を「包装」というツールを使って少しでも解決すべく研究を行ってきた。本稿では，日本食品保蔵科学会学会賞の受賞対象となった研究の概要を紹介したい。

１．MA（Modified Atmosphere）包装技術等を使った青果物の鮮度保持包装

青果物の包装を行うことは，鮮度保持の点で非常に効果的である。多くの青果物の場合，貯蔵最適ガス濃度は，低酸素，高二酸化炭素濃度であると報告されている。しかし一般に青果物は，品種や産地，収穫時期によりその性質が異なるため，一律に最適包装条件を決めることは難しい。袋内を最適なガス濃度条件にするためには，包装フィルムのガス透過性，各種の酸素濃度と二酸化炭素濃度条件下における青果物の呼吸量，青果物の品質を適正に評価するための品質評価指標が必要である。これらのデータをコンピュータ処理して種々の環境下での青果物の鮮度を予測し，最適包装設計を行った[1)~3)]。

ブロッコリーを例に袋内ガス濃度変化のシミュレーションを説明したい。ガス透過率の異なる４種類のフィルムを用い，袋表面積と空容積，試料重量を変えてそれぞれ包装し，15℃で貯蔵した。まず，各々のガス組成変化の実測値から酸素消費速度，二酸化炭素排出速度を計算し，対応する時間と酸素，二酸化炭素濃度のデータを抽出する。次に，重回帰分析により任意の包装条件における酸素消費速度，二酸化炭素排出速度を時間と酸素，二酸化炭素濃度の関数として表す呼吸モデルを作成する（表１）。このモデルを使って計算した酸素消費速度，二酸化炭素排出速度は，実測値と高い相関をもつ（図１）。最後に，任意のフィルムを使って包装したブロッコリーの袋内ガス濃度変化をシミュレーションするため，呼吸モデルおよびフィルムのガス透過量を表す式に酸素濃度，二酸化炭素濃度，時間を順次代入して計算する。予測値は実測値とよく一致しており（図２），この方法により十分な精度で比較的長期間のガス濃度変化の予測が可能

＊　〒305−8642　茨城県つくば市観音台２−１−12
§　E-mail : yishi@nfri.affrc.go.jp

表 1　呼吸モデル

Model	Rquation
1 = O_2 consumpyion rate	${}^{M}R_{O_2} = -1.882\,[O_2] - 95.03\,[CO_2]^{1/3} + 60.82\,[O_2]^{1/3} + 0.241\,[CO_2]^2 - 0.563T \cdot [O_2] + 129.02$
2 = CO_2 evolition rate	${}^{M}R_{CO_2} = 0.415\,{}^{M}R_{O_2} + 22.95$
3 = CO_2 evolition rate	${}^{M}R_{CO_2} = 55.1\,[O_2]^{1/3} - 0.366\,[O_2] \cdot [CO_2] - 0.822T \cdot [O_2] - 1.606T + 66.51T^{1/3} + 0.13\,[CO_2] - 1.464T \cdot [CO_2] - 88.91$

R_{O_2}酸素消費速度，R_{CO_2}：二酸化炭素排出速度
【O_2】酸素濃度，【CO_2】二酸化炭素濃度，T：貯蔵時間（日）

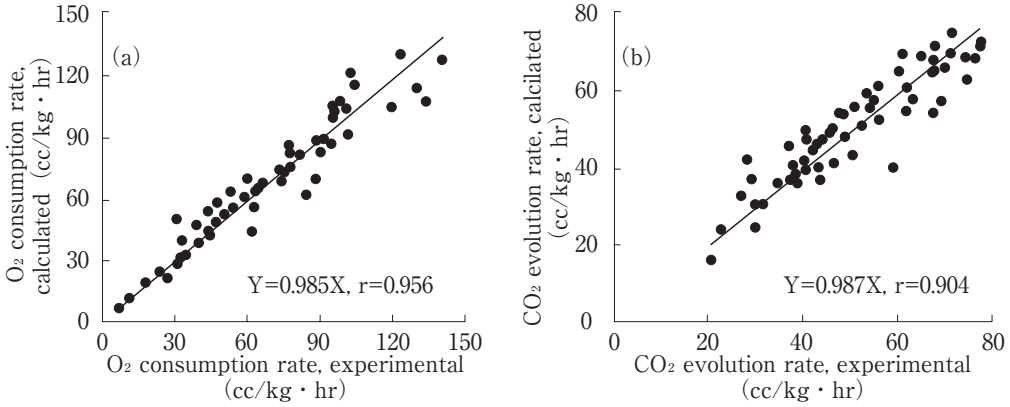

図 1　表 1 の式に基づき計算した呼吸量と実測値の相関

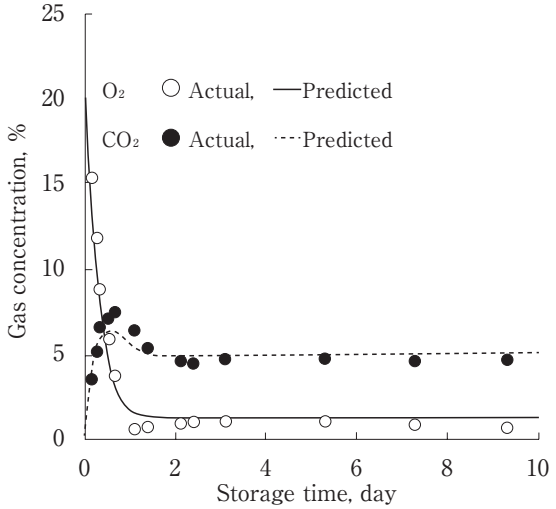

図 2　酸素および二酸化炭素濃度変化の予測値と実測値

（表 1 のモデル 1 と 2 により計算）

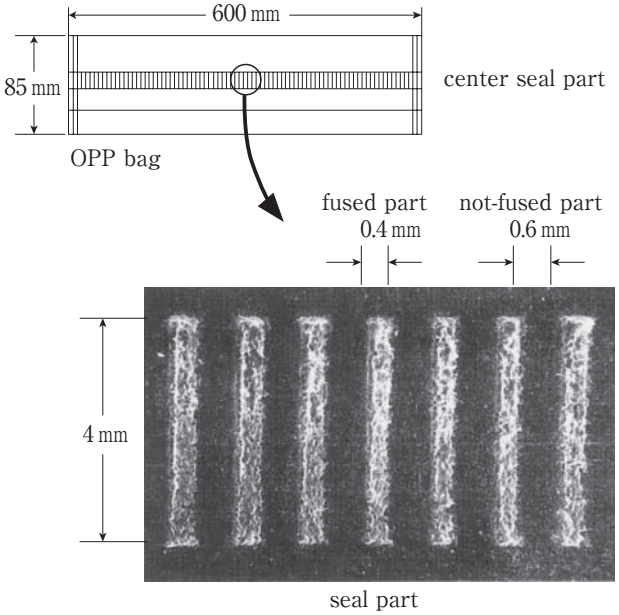

図 3　パーシャルシール包装[4)]

表 2　20℃で 5 日間貯蔵したニラの袋内ガス濃度と品質[4)]

Packaging	Gas concentration*		Occurence (%)*		Contents (%)z**			Off-flavor y* Score
	O_2 (%)	CO_2 (%)	Yellow leaves	Decay leaves	Dhlorophyll	Sugar	Ascorbic acid	
Partial seal	5.3±0.3x	11.4±0.2	0.6±0.3	0.3±0.2	94.6±1.1	79.5±5.9	83.7±1.4	0.0±0.0
complete seal	0.8±0.0	8.0±0.2	0.0±0.0	0.3±0.3	93.9±2.2	92.0±6.2	87.7±3.1	2.1±0.2
Perfpration (0.05%)	18.9±0.1	1.1±0.2	69.8±3.6	52.4±2.9	77.8±2.7	48.1±2.5	55.6±2.7	0.0±0.0

z　Percentage of initial (78.9mg/100g FW for chlorophyll, 0.92g/100g FW for sugar and 25.2mg/100g FW for ascorbic acid).
y　Score; 0: no off-flavor, 1: slight off-flavor, 2: moderate off-flavor, 3: severe off-flavor, 4: extreme off-klavor.
x　Mean±SE (*: n=10, **: n=6).

であることがわかった。

その後，それらのモデルを使って，パーシャルシール包装という青果物をフィルムに関する研究を共同で行った。横型ピロー包装機のセンターシールローラーの表面形状を変えることによって，シール部に微細な空隙をつくり（図３），袋のガス透過性を調整することで袋内ガス濃度を青果物に適した雰囲気に調節して鮮度保持を図る新たなMA包装技術である（表２）[4)~7)]。

この技術で平成18年に鈴木芳孝氏が日本保蔵学会技術賞を受賞され，現在では高知県のニラ，ネギの包装で広く実用化されている。また，オウトウ[8)]，エダマメ[9)]，シイタケ[10)~12)]などについても品質保持に最適な包装条件について簡単に設計することが可能であった。

２．青果物のための適正な緩衝包装設計

青果物のための適正な緩衝包装設計を行うためには，輸送中の振動・衝撃解析を行わなければならない。近年はトラックのサスペンション性能向上，速度制限装置の装着，道路の整備などが進み，振動・衝撃特性も大きく変化してきたことが報告されていた。そこで，実際の青果物輸送中の振動・衝撃などの環境を計測した（図４）。

さらに，実輸送環境に基づく物品の損傷性を考慮したランダム振動試験法の開発を目的として，イチゴを例に取り上げS-N曲線を用いた損傷性を考慮した加振波形の設計方法について検討を行った。単純化したPSD波形を用いて，単純平均PSD（a），ピーク値PD（b），イチゴの損傷性を考慮したPSD（c）の各波形の比較を行った結果，cに対してaでは，0.377倍，同じくbでは1.82倍であり，損傷性を考慮した振動条件の設計が可能となった（図５）。

その後，実際の輸送中の振動，衝撃を計測して多くの問題点を抽出し，改善点を提案した[15)~19)]。例えば，オウトウ500gを詰めたパック２つを入れた段ボール箱を３つ掘包した形状に比べて外装箱に２列５段，計10箱梱包した形状にすることで最下設の段ボールにおいて落下時の衝撃加速度をほぼ半分程度に軽減することが可能となり，実輸輸送時のオウトウ損傷程度も大きく改善できることが明らかとなった（図６）。

さらにこれらの条件を元に実験室での再現試験を行い，感圧フィルムを使った輸送時の段ボール内の果実が直接受ける圧力測定を行うとともに[21)~23)]，実際の果実を使って有効な緩衝包装について提案した[24)~27)]。また，最近の研究では，イチゴ，オウトウ等の長距離輸送にも十分利用可能な果実容器として，伸縮性フィルムシートを展張したプラスチック外装容器で上下から果実を挟みこむように固定する包装形態のものを共同で開発した。輸送中に果実が動かない最小限の圧力で果実を挟みこむことができるかというところが実用化のポイントとなっている。現在では，イチゴやオウトウにおいて実用化が始まっており，この容器を日本郵便のエクスパック封筒に入れて農家から直接日本全国に発送している。

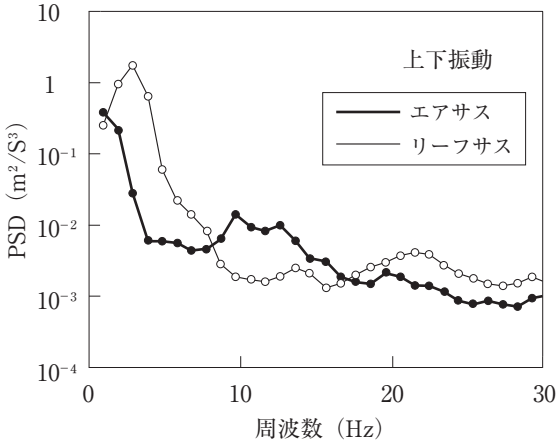

図４　サスペンションの種類による上下振動の比較[13)]

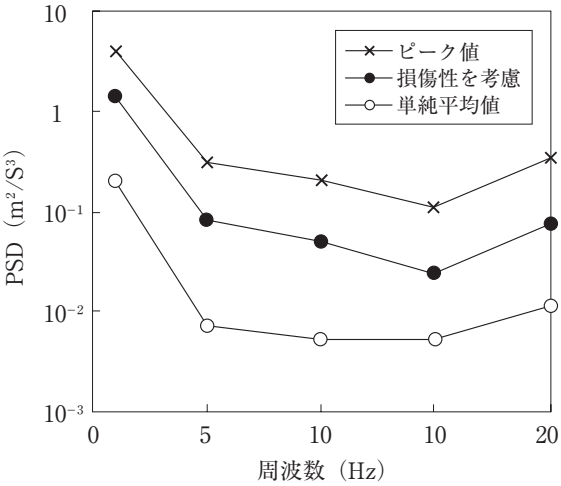

図５　波形作成法がPSDに及ぼす影響[14)]

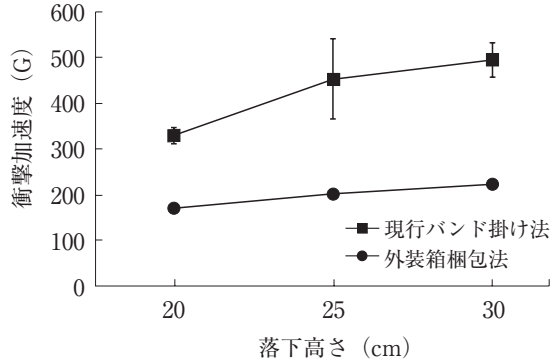

図６　包装形態の迷いが落下衝撃加速度に及ぼす影響[20)]

３．そ　の　他

レモン果実貯蔵中の腐敗，果皮障害の発生を低減するための基礎研究として，レモン果実収穫からトラック輸送，選果ラインでの搬送，箱詰めまでの間に果実が受け

る衝撃について検討した[28]。さらに，レモンの生理状態を表す指標として呼吸速度を測定し，収穫後の温度条件および収穫から選果終了までにレモン果実が受ける衝撃と積算呼吸量との関係について検討することで，貯蔵中の腐敗を低減できる条件を提示できた[29]。

4．おわりに

この度はこのような栄誉ある賞を頂き，大変喜ばしく，光栄に思っております。ご尽力いただきました皆様にはこの場をお借りして深く感謝を申し上げます。

今回このような賞を頂いたことは，今後の研究活動にとって大きな励みとなるものであり，今後とも精進していく所存でおりますので，引き続きご指導・ご鞭撻の程よろしくお願い致します。

最後に，これまでご指導頂きました諸先輩をはじめ，研究を支えて頂きました方々にはこの場を借りて厚く御礼申し上げます。

文　献

1）石川　豊・佐藤博実・石谷孝佑・平田　孝：MA（Modified Atmosphere）包装ブロッコリーの呼吸評価，日本包装学会誌，**1**（2），143～153（1992）

2）Ishikawa, Y., Hasegawa, Y., Nakajima, H. and Iba, Y.: *Prediction of In-Package Gas Composition Changes in Stored Vegetables and Fruits, *Food Preservation Science*, **25**（6），267～292（1999）

3）Ishikawa, Y. and Hirata, T.: Color Change Model for Broccoli Packaged in Polymeric Films, *Transactions of the ASAE*, **44**（4），923～927（2001）

4）鈴木芳孝・岡林秀典・石川　豊・今堀義洋・上田悦範：新簡易包装（パーシャルシール包装）によるニラの鮮度保持技術の開発，日本食品保蔵科学会誌，**29**（3），144～146（2003）

5）鈴木芳孝・宮崎清宏・石川　豊・今堀義洋・上田悦範：パーシャルシール包装によるナバナの鮮度保持技術，日本食品保蔵科学会誌，**32**（1），23～27（2006）

6）石川　豊・北澤裕明・阿部　真・胡　耀華・鈴木芳孝：CFDによる微細孔フィルムのヒートシール温度解析，日本包装学会誌，**18**（4），271～279（2009）

7）鈴木芳孝・宮崎清宏・石川　豊・鶴永陽子・今堀義洋：パーシャルシール包装による青ネギの鮮度保持技術，日本包装学会誌，**19**（3），215～222（2010）

8）石川　豊・北澤裕明・桑名陽子・高砂　健：フィルム包装によるオウトウの鮮度保持効果，日本食品保蔵科学会誌，**34**（6），311～316（2008）

9）勝見直行・石川　豊・北澤裕明・遠藤昌幸・鬼島直子・安達あい：エダマメの微細孔フィルムを用いた最適なMA包装条件，日本食品科学工学会誌，**60**(6)，295～300（2013）

10）Li, Y., Ishikawa, Y., Kitazawa, H. and Satake, T.: Effect of high-oxygen packaging compared with perforation-mediated modified atmosphere packaging on the quality of fresh shiitake mushrooms（Lentinusedodes）, *Society of Agricultural Structures, Japan*, **43**（3），89～96（2012）

11）Li, Y., Ishikawa, Y., Satake, T., Kitazawa, H. and QIU, X.: Effect of high-oxygen packaging on respiratory physiology and sensorial qualities of fresh shiitake mushrooms（Lentinus edodes）, *Journal of Food Research*, **2**（6），89～96（2013）

12）Li, Y., Ishikawa, Y., Satake, T., Kitazawa, H., Qiu, X. and Rungchang, S.: Effect of active modified atmosphere packaging with different initial gas compositions on nutritional compounds of shiitake mushrooms（Lentinusedodes）, *Post-harvest Biology and Technology*, **92**, 107～113（2014）

13）臼田浩幸・椎名武夫・石川　豊・佐竹隆顕：青果物の3次元輸送振動シミュレーションのための基礎研究，農業施設学会誌，**36**（4），205～212（2006）

14）臼田浩幸・椎名武夫・石川　豊・佐竹隆顕：青果物の損傷性を考慮したランダム振動試験法の開発，農業施設学会誌，**37**（1），3～9（2007）

15）Lu, F., Ishikawa, Y., Shiina, T. and Satake, T.: Analysis of shock and vibration in truck transport in Japan, *Packaging Technology and Science*, **21**（8），479～489（2008）

16）Ishikawa, Y., Kitazawa, H. and Shiina, T.: Vibration and shock analysis of fruit and vegetables transport －Cherry transport from Yamagata to Taipei－, *Japan Agricultural Research Quarterly*, **43**（2），129～135（2009）

17）Lu, F., Ishikawa, Y., Kitazawa, H. and Satake, T.: Effect of vehicle speed on shock and vibration levels in truck transport, *Packaging Technology and Science*, **23**（2），101～109（2010）

18）Lu, F., Ishikawa, Y., Kitazawa, H. and Satake, T.: Effects of sampling intervals on truck transport vibration levels, Journal of the Society of Agricultural Structures, *Japan (SASJ)*, **41**（3），103～110（2010）

19）石川　豊・北澤裕明・今野　勉：船便と航空便の衝撃比較，日本食品保蔵科学会誌，**39**（1），25～30（2013）

20）石川　豊・北澤裕明・高橋和博：オウトウ輸出時に荷物が受ける衝撃力と緩衝効果，日本食品保蔵科学会誌，**38**（3），135～140（2012）

21）Lu, F., Ishikawa, Y., Kitazawa, H. and Satake, T.: Measurement of impact pressure and bruising of apple fruit using pressure-sensitive film technique, *Journal of Food Engineering*, **96**（4），614

～620 (2010)
22) Lu, F., Ishikawa, Y., Kitazawa, H. and Satake, T.: Impact damage to apple fruits in commercial corrugated fiberboard box packaging evaluated by the pressure-sensitive film technique, Journal of Food, *Agriculture & Environment*, **8** (2), 218～222 (2010)
23) Lu,, F., Ishikawa, Y., Kitazawa, H. and Satake, T.: Assessment and prediction of repetitive impact damage to apple fruit using pressure-sensitive film technique, Journal of Food, *Agriculture & Environment*, **10** (2), 156～160 (2012)
24) Kitazawa, H., Ishikawa, Y., Nakamura, N., Lu, F. and Shiina, T.: Improvement of packaging to reduce deterioration of peach fruit caused by vibration, *Food Preservation Science*, **34** (6), 331～336 (2008)
25) 北澤裕明・石川　豊・中村宣貴・椎名武夫：イチゴ輸送中の損傷防止する新たな包装形態，日本食品保蔵科学会誌，**34** (1)，19～23 (2008)
26) Kitazawa, H., Ishikawa, Y., Lu, F., Yaohua, H., Nakamura, N. and Shiina, T.: Alleviation of strawberry bruising due to vibration using 1-layer packaging with cushioning, *Journal of Packaging Science & Technology, Japan*, **19** (1), 33～42 (2010)
27) 北澤裕明・石川　豊・路　　飛・胡　耀華・中村宣貴・椎名武夫：イチゴ輸送中の衝撃解析と損傷発生予測，園芸学研究，**9** (2)，221～227 (2010)
28) 池田裕朗・石川　豊・北澤裕明・路　　飛・赤坂信二・塩田俊：収穫から選果までの間にレモン果実が受ける衝撃解析，園芸学研究，**9** (1)，107～112 (2010)
29) 池田裕朗・石川　豊・赤坂信二・塩田　俊・北澤裕明・路　　飛：収穫後の衝撃がレモン果実貯蔵中の腐敗の発生に及ぼす影響，園芸学研究，**10**(1)，93～100 (2011)