

カマンベールチーズの熟成と抗変異原性
に関する研究

1998年

岐阜大学大学院
連合農学研究科
生物生産科学
(信州大学)

山田 正子

カマンベールチーズの熟成と抗変異原性 に関する研究

山田 正子

目 次

第I編 緒 論	1
第II編 本 論 カマンベールチーズの熟成と抗変異原性に関する研究	
第1章 カマンベールチーズの熟成中の低分子ペプチドの分布に関する研究	
第1節 緒 言	8
第2節 実験方法	10
2-1 カマンベールチーズの製造方法	
2-2 化学組成の分析	
2-3 水溶性窒素化合物の定量	
2-4 熟成率の測定	
2-5 低分子ペプチドの分子篩による分画	
2-6 アミノ酸分析	
2-7 限外ろ過分析	
2-8 等速電気泳動分析	
第3節 結果および考察	21
3-1 カマンベールチーズ熟成中の生化学的変化	
3-2 カマンベールチーズ熟成中の水溶性窒素化合物の変化	
3-3 カマンベールチーズ熟成中のトリクロール酢酸可溶性窒素化合物 の変化	
第4節 要 約	36
第2章 各種市販ナチュラルチーズの抗変異原性に関する研究	
第1節 緒 言	38

第2節	実験方法	39
2-1	試料	
2-2	化学組成の分析	
2-3	抗変異原性試験	
2-4	市販カマンベールチーズの部位別の抗変異原性試験	
2-5	市販カマンベールチーズの部位別加熱処理後の抗変異原性試験	
第3節	結果および考察	47
3-1	各種ナチュラルチーズの一般組成	
3-2	各種ナチュラルチーズの抗変異原性	
3-3	市販カマンベールチーズの部位別の熟成率	
3-4	市販カマンベールチーズの部位別の抗変異原性	
3-5	市販カマンベールチーズの加熱処理後の抗変異原性	
第4節	要約	60
第3章	カマンベールチーズの熟成にともなう抗変異原性の変化に関する研究	
第1節	緒言	62
第2節	実験方法	64
2-1	試料	
2-2	化学組成の分析	
2-3	抗変異原性試験	
第3節	結果および考察	68
3-1	化学組成	
3-2	熟成にともなう抗変異原性の変化	
第4節	要約	82

第4章 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis*
biovar *diacetylactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus*
lactis subsp. *lactis* および *Penicillium candidum* を用いて製造した発酵
乳の抗変異原性と *Penicillium candidum* 菌体に対するTrp-P-1の吸着
効果に関する研究

第1節 緒言	83
第2節 実験方法	86
2-1 乳酸菌および <i>Penicillium candidum</i> を用いた発酵乳の調製	
2-2 各発酵乳発酵中のpH、乳酸酸度および菌数測定	
2-3 抗変異原性試験	
2-4 <i>Penicillium candidum</i> 菌体へのTrp-P-1の吸着試験	
第3節 結果および考察	92
3-1 乳酸菌により製造した発酵乳の発酵中のpH、乳酸酸度および 乳酸菌菌数の経時的変化	
3-2 <i>Penicillium candidum</i> により製造した発酵乳の発酵中のpH および <i>Penicillium candidum</i> 菌数の経時的変化	
3-3 乳酸菌により製造した発酵乳の抗変異原性	
3-4 <i>Penicillium candidum</i> により製造した発酵乳の抗変異原性	
3-5 <i>Penicillium candidum</i> 菌体のTrp-P-1に対する吸着効果	
第4節 要約	109

第5章 ラットのTrp-P-1排泄におよぼすカマンベールチーズ投与の影響

第1節 緒言	110
第2節 実験方法	112
2-1 動物実験	

2-2	ラットの尿および糞の抽出液の調製	
2-3	高速液体クロマトグラフィによるラットの尿および糞中のTrp-P-1 の分析	
2-4	ラットの尿および糞抽出液の変異原性試験	
第3節	結果および考察	123
3-1	ラットの体重変化	
3-2	ラットの尿および糞の排出量	
3-3	高速液体クロマトグラフィによるラットの尿および糞中の Trp-P-1の分析	
3-4	ラットの尿および糞抽出液の変異原性試験	
第4節	要 約	148
第Ⅲ編	総合考察	150
第Ⅳ編	総 括	158
謝 辞		160
引用文献		161

第I編 緒論

チーズは、5000年以上の歴史を持ち、世界の食文化の中でも最も卓越した食品として乳文化の最高位に位置している。チーズの歴史や文化をほとんど持たなかった日本でも、1904年に北海道でソフトチーズおよびゴーダチーズの製造、1932年にプロセスチーズが試製(87)されて以来、チーズの製造量は増加の一途をたどり、また、近年の急速なライフスタイルの変化や、国際化の影響により、チーズの普及が促進している。農林水産省畜産局の報告(66,93)によると、平成9年度のナチュラルチーズの輸入量はプロセスチーズ原料用として67,140t、直接消費用としては100,727t、合計では過去最高の167,867tであった。国内におけるナチュラルチーズの生産量も増加しており、プロセスチーズ原料用として20,378t、直接消費用としては13,808t、合計では34,186tであり、直接消費用においては対前年比は117.8%と大幅に生産量が増加した。また、消費量においても、直接消費用ナチュラルチーズ114,535t(対前年比100.2%)と増加している。その中でも、カマンベールチーズは、主なナチュラルチーズのうち、最も販売数量が多く、224g/1000人であった(ゴーダチーズ:12.8g/1000人、チェダーチーズ:10.0g/1000人)(92)。また、生産量も平成8年度では昭和60年度の174%増と激増している(20)ことからみても、わが国におけるカマンベールチーズの人気の高さを伺える。

カマンベールチーズは、フランスを代表するチーズの一つであり、フランスの西北、ノルマンディー地方原産であるが、現在では、ヨーロッパの全ての国、アメリカ、オーストラリア、ニュージーランド、近年においては日本でも製造されている。カマンベールチーズは、表面白かび熟成型軟質チーズであり、チーズ表面に生育した白かびの生産する酵素の作用によって熟成が行われることが大きな特徴である。スターターとしては、乳酸菌である *Lactococcus*

lactis subsp. *cremoris* や *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* などが用いられ、通常は、2~3種類の乳酸菌を用いた複合スターターが用いられている。セカンドスターターとしては白かびである *Penicillium camemberti*, *Penicillium caseicolum* または *Penicillium candidum* が用いられる。これら白かびはいずれも、Ascomycetes綱-Plectacales目-*Aspergillaceae*科-*Penicillium*属に属している。これらは、形態学的には、藻菌類でペニチラス形成し、また、生化学的には、タンパク質および脂肪分解、ブドウ糖および乳糖発酵を行うことが特徴である。

カマンベールチーズの一般的な製造方法(87)は、次に示す順序で行われるが、他のチーズとは異なり、クッキングおよび圧縮は行わない。

原料乳の標準化 → 殺菌 (63℃、30分間のLTLT法または72℃、15秒間のHTST法) → 冷却 (30~34℃) → 塩化カルシウム添加および攪拌 → スターター添加および攪拌 → レンネット添加および攪拌 → カッティング → 静置 → ホエイ排除 → モールディング (型詰め) → ドレイニング (ホエイ排除) → デモルディング (型外し) → 加塩 → 白かび噴霧 → 一次熟成 (12~14℃、9~12日間、湿度95~98%) → 包装 → 二次熟成 (8~10℃、3~4週間、湿度90%程度) → 冷蔵

大きさは、通常、直径約12cm、厚さ約3cm、重量は300g程度であるが、大小種々のものが作られており、また、成分組成としては、水分43~54%、脂肪24~28%、タンパク質17~21%、食塩1.5~3.0%である。

チーズの熟成は、その固有の風味を醸し出すために必須な製造工程である。グリーンチーズは水溶性の低分子成分をほとんど含まないため、牛乳を酸沈殿処理により得られる酸カゼインと酷似して風味に乏しい。白かびや青かびチーズなどのかびを用いて熟成させるチーズは、チーズ製造のために接種されたかび類が好気性であるために、通気性の良い表面から徐々にチーズ組織内に

浸透し、他のチーズに比較して熟成がきわめて速やかに行われ、特有の風味が生成されることとタンパク質分解度が高いことが特徴である。タンパク質分解は、原料乳由来の乳酸菌から生産されるプロテアーゼ、凝乳酵素のレンニン由来のキモシン、白かびから生成されるプロテアーゼ、また、スターターとして添加された乳酸菌から生成されるプロテイナーゼおよびアミノペプチターゼなどの種々の酵素の働きにより、徐々にカゼインが分解され、プロテオースペプトン、低分子ペプチド、さらにはアミノ酸へと分解されることにより水溶性窒素化合物が増加していき、チーズ固有の旨味が醸し出される。また、乳脂肪は、乳酸菌や白かびからのリパーゼによる分解作用で揮発性物質が生成され、チーズ固有の風味を生じさせる。熟成をカゼイン分解過程からみると、カマンベールチーズは β -カゼイン分解の β -型熟成チーズで、エメンタールなどの主な硬質チーズは α -カゼインを主として分解する α -型熟成チーズ、ロックフォール、リンブルガーは非特異型熟成チーズに分類できる(118)。このように、チーズは主にチーズ製造に用いられる微生物によって熟成が行われており、それら微生物は、その生育に必要な全ての酵素系をチーズ内に持ち込んでいることになり、多くの生化学的反応がチーズ内で起こっているといえよう。

このように作られたチーズは、栄養的には、タンパク質、脂質、無機質およびビタミンに富み、また生命活動に必要な微量元素も含まれているため、日本人の食生活において欠乏しがちな栄養成分を含有する食品として、欠かすことのできない食品の一つとなっている。しかし、1990年代に入り、日本人の食生活は、飽食の時代から健康志向の時代に変わってきたといわれているが、肥満や動脈硬化を考えると、タンパク質や脂肪を減らす傾向が増え、そのために、かえって太ったり老化を早めたりしている人が少なくない。このような傾向の中で、栄養だけでなく、食品が有する機能として体調調節機能が注目を集めている。食物の機能は一般的に、1次機能（栄養機能）、2次機能（感覚機能）、

3次機能（体調調節機能）の3つに分類されている(6)。1次機能では生命の維持に必要な栄養素を補給し、2次機能では味、香り、色、食感など食欲と嗜好に影響を与え、3次機能では生体防御、体調リズム調節、疾病の防止と回復および老化制御など、高次の生命活動を支える。チーズは、タンパク質、脂質、無機質およびビタミンに富み、また生命活動に必要な微量元素も含まれている食品として、十分な栄養価値（1次機能）を有している。また、熟成により生成するチーズ固有の物性や風味、また調理による物性の変化や香りの増加が食欲に刺激を与え、その種類については1,000種類を越すとされている程多種多様である（2次機能）。そして、3次機能については、マウスの腫瘍細胞の成長をチーズが抑制する作用(129)やラットの胃潰瘍の再発の予防作用(97)についての報告はあるが、例えば、チーズと同じ乳製品である発酵乳の機能に比較し、まだ不明な点が多い。

一方、発酵乳については、3次機能として抗腫瘍作用(9)、抗変異作用(84,89,104)、整腸効果(29,30,77)、抗コレステロール作用(28)、抗菌作用(11,13,21,27,80)、乳糖不耐症(4)に対する効果など、多くの有用な機能が解明されてきた。とくに、抗変異原性については、Hosonoら(42,44,49,120,130)によって多くの報告がなされている。例えば、化学薬品および動物の糞中の変異原物質(44)、ニトロソ化合物(42)、アミノ酸加熱分解物(43)、アフラトキシン(40,41)に対する発酵乳の持つ抗変異原性について明らかにしている。また、発酵乳だけではなく、発酵乳の発酵に用いられる乳酸菌菌体にも抗変異原性の存在が報告されている(54,56,112,127)。食品中には、変異原物質や発癌物質に対して、その作用を減弱させる性質のあるものも多く見いだされており、このような性質は抗変異原性と呼ばれている。抗変異原性には、変異原物質に直接作用しその変異原性を減弱または、不活化させる作用をもった変異原不活化因子（desmutagen）と、細胞に作用して細胞の突然変異誘発を著しく低下さ

せる作用をもった抗突然変異因子 (antimutagen) の二つに分けられる。これまで、明らかにされてきた変異原物質が持つ変異原性を減弱させる物質では変異原不活化因子が圧倒的に多く、発酵乳も変異原不活化因子として前述のとおり、Hosonoら(40,41,42,43,44)によって報告されている。さらには、抗変異原性作用とは異なる作用として、乳酸菌菌体の変異原物質および発癌性物質を吸着する作用があることが報告されており(51,53,63,111,113,124,128)、乳酸菌の諸機能の中でも興味深いものの一つである。したがって、チーズにおいても発酵乳と同様に、乳酸菌をスターターとして用いていることから、抗変異原性の特性があることが充分期待できる。ここに、本研究の目的の一つがある。

チーズの熟成は、チーズ固有の物性や風味を生成するために重要であるばかりでなく、熟成に介在する微生物が生産する多様の酵素により乳タンパク質や脂質が分解されるため、人の体内で吸収しやすくなる。また、ビタミンは原料乳中に含まれているビタミン以外に、微生物のビタミン合成作用によっても増加する。このことから、チーズにおいても3次機能の追求は、チーズの普及上の面からも大きな意味を持っている。近年わが国におけるチーズの消費量が増加傾向を示していることから、チーズの栄養価値や美味しさだけでなく、生理的機能を明らかにすることは、チーズを日常生活に安全により有効的に取り入れ、食生活の質を向上させていく上で重要である。

さて、これまでに多くの変異原物質または発癌物質が、食品やその加工品を中心にスクリーニングがされてきた。例えば、2-[(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)] acrylamide (AF-2) (芳香族ニトロ化合物) のような合成食品添加物、aflatoxin のようなかび毒、ふきのとうに含まれている petasitenine などとともに食品成分として含まれている物質などである。しかし、食品の調理および加工中に生成する変異原物質もあり、これらは加熱調理をする限り少なからずも生成してしまうもので、摂取することを回避できない場合もある。こ

のような変異原物質はタンパク質やアミノ酸を加熱することにより生成され、とくにトリプトファン、セリン、グルタミン酸、リジンなどの加熱分解物が強い変異原性を示すことがわかっている(115,116)。さらに、トリプトファンの加熱分解物中の変異原物質を精製し得られたヘテロサイクリックアミンである Trp-P-1 (3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole) および Trp-P-2 (3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole) は、非常に強い変異原性を有している。日常的に加熱調理が行われている中で、これらアミノ酸加熱分解物は身近に存在する危険な変異原物質といえる。

一方、食品中には発酵乳の他にも、変異原物質や発癌物質に対してその毒性を不活性化させる効果のある因子が存在していることが知られている。例えば、ゴボウ(81,82)やビタミンC(98)などがあり、また前述した発酵乳の他にも、Hosonoらにより、シイタケ(52)、種々の薬草(46)、くぬぎ葉(45)、ジャスミン茶(121)などに変異原不活性化作用があることが認められている。その中において、チーズに関する抗変異原性の報告は少なく、ゴーダチーズの抗変異原性に関する報告(61)はあるもののカマンベールチーズについては全く報告はない。また、カマンベールチーズは熟成させるタイプのチーズの中では、熟成期間が約4週間と他のチーズに比較し短かいことから、チーズの最も重要な工程である熟成による化学組成変化に伴う抗変異原性の変化を追求することも意義がある。熟成中に増加する乳タンパク質の分解物である低分子ペプチドは、カゼインの分解物に関する抗変異原性についての報告(12,50,84,132)もされていることから、チーズの抗変異原性にも影響を与えられとされる。さらに、チーズから分離された乳酸菌(17,137)、セカンドスターターとしてリンブルガーの製造に用いられる *Brevibacterium linens* (55) およびエメンタルチーズの製造に用いられているプロピオン酸菌(134)の抗変異原性に関する報告はあるが、カマンベールチーズに用いられる白かびについての報告はない。一般的に、

白かび部分は敬遠されがちであることから、安全性を確認する上でも白かびの抗変異原性を知ることは重要である。

本研究では、カマンベールチーズ熟成中の乳蛋白質分解物である低分子ペプチドの分解物の分布の変化を追求するかたわら、*in vitro* で Trp-P-1 の有する変異原性に対する熟成過程における抗変異原性、カマンベールチーズの製造に用いられている乳酸菌および白かびにより製造された発酵乳の Trp-P-1 への抗変異原性、白かびの Trp-P-1 に対する吸着効果および生体内のカマンベールチーズの摂取効果を知るためにラットを用い *in vivo* で検索を行うことを本研究の目的とした。

長い間わが国の3大死因は、癌、脳血管疾患および心疾患であり、平成7年においては全死亡のうち6割がこれら疾病によるものであった(66)。さらに癌は、長年死因の第一位であり、いまだ増加傾向にある。これら疾病を含む成人病の発症の要因としては遺伝要因、外部要因および生活習慣などが挙げられる。中でも生活習慣のうち、食生活は生命を維持していく上で最も重要な役割を果たすべきではあるものの、成人病予備群である若い世代に油脂類および肉類の摂取量が多いのが現実である(67)。また、このような食生活の欧米化に伴い、胃癌が減少し、大腸癌が増加していることから、食習慣の改善を図ることも疾病予防につながると考えられる。また、近年、病原体やダイオキシンなどの有害物質の外部要因も大きな問題となっている中で、発酵乳のような機能性の高い食品の役割も大きくなり、また、機能性の高い食品を見い出していく必要性があり、本研究の意義を見い出すことができる。

なお、チーズの熟成と抗変異原性との検索については、全く新しい分野の検討であり、未知の部分も多く検討が期待される。

第Ⅱ編 本論 カマンベールチーズの熟成と抗変異原性に関する研究

第1章 カマンベールチーズの熟成中の低分子ペプチドの分布に関する研究

第1節 緒言

チーズは、それら固有にもつ独特の味、香りなどの風味や物性が高い人気の理由の一つである。これらチーズの個性は、熟成中に起こるタンパク質や脂質の代謝によって生成され、とくに、タンパク質の代謝による水溶化は、旨味成分の生成や物性を変化させる上で、重要な現象といえる。チーズ熟成中の加水分解による主たる変化はタンパク質分解によるものであり、タンパク質は、高分子ペプチドから水溶性窒素、水溶性非タンパク態窒素、プロテオース態窒素、アミノ態窒素、およびアンモニア態窒素に分解される(7,24,32,131)。細野ら(48)は、水溶性窒素の生成にともない、チーズの風味が増大することを報告しており、Astonら(8)は、チーズの風味の強さはペプチドおよびアミノ酸含量と相関関係があると報告している。また、水溶性窒素は熟度の指標ともなっていることから、チーズ熟成中の水溶性窒素化合物の変化を調べることは、チーズの風味生成や熟成の複雑な現象を解明する一つの手がかりになると考えられる。

また、チーズ中のカゼインやカゼインから分解されるペプチドやアミノ酸の同定についても報告されているが、これらはゴーダチーズ(62)やチェダーチーズ(108,109)、パルメザンチーズ(2,3)などの乳酸菌熟成タイプのチーズであり、セカンドスターターを用いたチーズについての報告は少ない。中でも、カマンベールチーズの熟成中のタンパク質分解物の変化に関する報告は少なく(59)、

解明されていない部分が多い。

そこで、本章では、カマンベールチーズの熟成中のタンパク質分解物の動向を知るために、カマンベールチーズを製造し、熟成にともなう低分子窒素化合物の変化について検索を行った。

第2節 実験方法

2-1 カマンベールチーズの製造方法

2-1-1) スターター

カマンベールチーズの製造に用いた乳酸菌スターターには、*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*、*Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis*、*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* および *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* の4種類の乳酸菌の混合スターター (DRI-VAC, NORMAL-01, Chr. Hansen's Laboratory Ltd, England) を用いた。また、白かびは、*Penicillium candidum* (DRI-VAC, PC, Chr. Hansen's Laboratory Ltd., England) を用いた。

2-1-2) 製造方法

供試試料として本研究に用いたカマンベールチーズは、よつば乳業株式会社 (札幌) で実験室レベルで製造したものをを用いた。

カマンベールチーズの製造方法を、Fig. 1-1 に示した。すなわち、新鮮な牛乳を63℃で30分間の殺菌処理後、乳酸菌スターターを1%となるように添加し、pH6.1~6.3となるまで32℃で30~40分間の発酵を行った。発酵終了後、CaCl₂ (20mg/100ml) とレンネット (4mg/100ml、HA-LA, Chr. Hansen's Laboratory Ltd., England) を添加し、32℃で30~40分間の発酵を行った。凝固したカードを15mm四方の大きさに切り (カッティング)、ホエーを排除後、カードの型詰め (モールディング) を行い、さらにホエーを排除した。100~130gの大きさにまとまったカードを食塩水に侵漬し、白かびスターターを噴霧し12℃で熟成 (一次熟成) を2週間行い、ポリプロピレンで包装後、さらに8℃で熟成 (二次熟成) を2週間行った。

カマンベールチーズは、熟成開始直後、熟成1週間、2週間、3週間およ

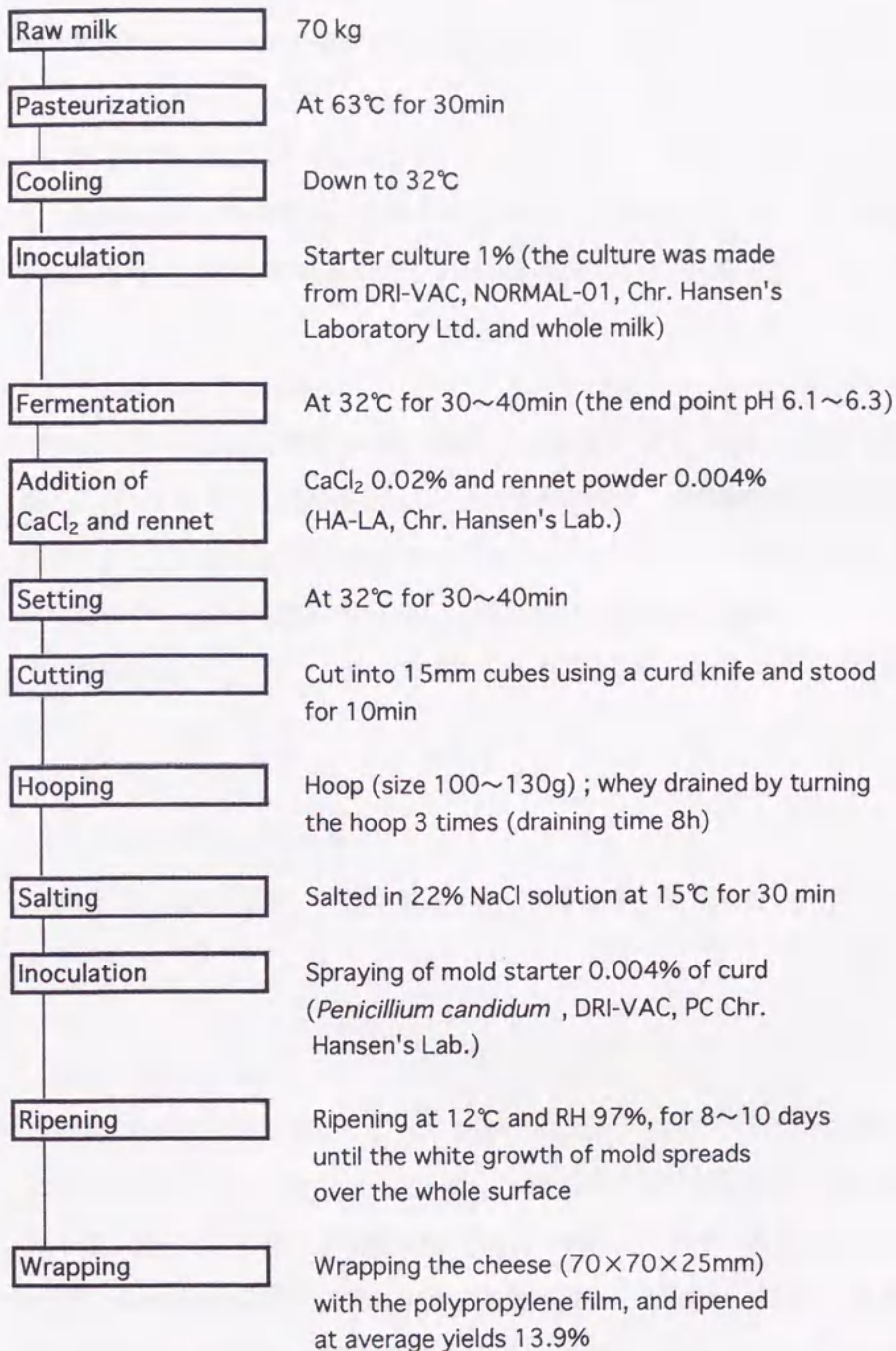


Fig.1-1 Manufacture of Camembert cheese production

び4週間行ったチーズを分析に供した。

2-2 化学組成の分析(94,96,118)

化学組成は、熟成開始時のグリーンカードの全固形分、タンパク質、脂肪、灰分、塩分、pHおよび乳酸酸度、また、熟成中のpH、乳酸酸度について測定を行った。

2-2-1) 全固形分の定量

アルミ製の秤量缶に精製ケイ砂15gとガラス棒を入れ、99℃±1℃で1時間乾燥し、デシケーターで放冷後秤量した。この秤量缶に、供試試料を入れ秤量し、沸騰水浴上で加熱し、ガラス棒でかたまりができないように静かに混合した。ケイ砂がさらさらの状態になったら、99℃±1℃で4時間乾燥後、デシケーターで放冷後秤量した。恒量となるまで99℃±1℃の乾燥、冷却、秤量とを繰り返した。

2-2-2) タンパク質の定量

供試試料0.5gを採取し、ケルダール法により窒素の定量を行い、タンパク質量を求めた。

2-2-3) 脂肪の定量

供試試料の脂肪の定量は、シュミット・ボンジンスキー・ラツラフ法およびレーゼ・ゴットリーブ法により行った。すなわち、供試試料1gを100mlのコニカルビーカーに計り取り、塩酸10mlを加え、時計皿で蓋をし沸騰湯浴上で静かに回転させて加熱し、内容物を完全に溶解させた。内容物の溶解後、湯浴上で20分間放置し、冷却し、脂肪抽出管に移し、ビーカーを95%エタノール10ml、エーテル25mlで洗浄し、この洗液も脂肪抽出管に入れよく混合した。さらに、

石油エーテル25mlを加え、30秒間激しく振り混ぜた。上層が透明で2層が完全に分離するまで1時間以上放置したのち、上層を沸石を入れた重量既知のコニカルビーカーに流し込んだ。ついで、抽出管内をエーテル・石油エーテル等量混合液数mlで洗浄し、洗液も完全にコニカルビーカーに流し込んだ。抽出管の残液に、再びエーテル25mlおよび石油エーテル25mlを加え、30秒間激しく振り混ぜ、上澄液をビーカーに流し込み、エーテル・石油エーテル等量混合液数mlで洗浄し、洗液も完全にコニカルビーカーに流し込んだ。できるだけ多くの溶剤を回収し、100~105℃で1時間ビーカーを乾燥後、冷却、秤量した。ビーカーが恒量となるまで乾燥、冷却、秤量を繰り返し、得られた結果から脂肪量を求めた。

2-2-4) 灰分の定量

供試試料2gを、重量既知のろつぼに精秤し、はじめはガスバーナーで加熱し、試料が炭化したら、550℃で1時間加熱後、デシケーター内で冷却して秤量した。恒量となるまで、550℃の加熱、冷却、秤量とを繰り返し、得られた結果から脂肪量を求めた。

2-2-5) 塩分の定量(34)

供試試料1gを採取し、N/50-硝酸銀25ml、硝酸10ml、蒸留水50mlおよび過マンガン酸カリウム5mlと混合し、ドラフト内で加熱した。さらに、過マンガン酸カリウムを過マンガン酸カリウムの色が消えなくなるまで、数回添加した。これを40℃まで冷却し、サッカロースを3g添加後、ろ過をした。沈殿物は蒸留水を加え洗浄を行い、その洗液はろ液と混合した。このろ液を、硫酸第二鉄アンモニウムを指示薬とし、N/10-チオシアン酸アンモニウムで滴定を行い、塩分量を求めた。

2-2-6) pH測定

pHは、供試試料 3 gに10mlの蒸留水を加えよく磨碎し、pHメーター (HM-26S、東亜電波工業) を用い測定を行った。

2-2-7) 乳酸酸度測定

乳酸酸度は、供試試料10gに少量の蒸留水を加えよく磨碎し、ろ液部分をメスフラスコに移し、これを反復し全量を流し込み100mlに定容した。このろ液25mlについて0.1N-NaOHで中和滴定を行い、酸度を求めた。

2-2-8) 生菌数の測定

供試試料中の乳酸菌および*Penicillium candidum* 菌数を総生菌数としての測定した。供試試料は、10gを滅菌生理食塩水で10倍に希釈し、この希釈液をさらに滅菌生理食塩水で適当な倍率に希釈した。各希釈倍率の希釈液1mlと標準寒天培地をシャーレ中で混合し、30℃で3日間培養し、出現したコロニー数を計測し、供試試料1g中の菌数を求めた。標準寒天培地は、標準寒天培地 (栄研) 23.5gに1000mlの蒸留水を加え121℃で15分間滅菌後、45℃位まで冷却し用いた。

2-3 水溶性窒素化合物の定量 (94,96,118)

チーズ中の窒素化合物の分布状態は、チーズの熟成の指標となる。そこで、水溶性窒素、水溶性非タンパク態窒素、水溶性タンパク態窒素、プロテオース態窒素、アミノ態窒素およびアンモニア態窒素の定量を行った。

2-3-1) 全窒素

供試試料0.5gを採取し、ケルダール法により窒素の定量を行った。

2-3-2) 水溶性窒素の定量

水溶性窒素は、供試試料50gを精製白砂とともに細碎し、約50℃の温湯で300mlフラスコに流し込み、これにホルマリンを数滴加え2時間振とうした。これを、3000rpmで15分間遠心分離を行い、上澄液を500mlに定容し、この溶液10mlについてケルダール法により窒素の定量を行った。

2-3-3) 水溶性非タンパク態窒素

本節 2-3-2) の水溶性窒素定量過程で得られる上澄液150mlに、20%トリクロール酢酸30mlを加えてろ過し、ろ液100mlを200ml容三角フラスコに入れ、3時間湯浴中で煮沸後、ろ過し、ろ液を100mlに定容した。このろ液10mlについてケルダール法により窒素の定量を行った。

2-3-4) 水溶性タンパク態窒素

本節 2-3-2) で求められた水溶性窒素量と本節 2-3-3) の水溶性非タンパク態窒素量の差を水溶性タンパク態窒素とした。

2-3-5) プロテオース態窒素

本節 2-3-3) で得られた2回目のろ液に、無水硫酸ナトリウム55gを添加し、35℃で1時間放置後、30℃でろ過を行い、ろ液を100mlに冷却定容した。このろ液10mlについて窒素量をケルダール法により求め、本節 2-2-4) で求めた水溶性タンパク態窒素との差をプロテオース態窒素量とした。

2-3-6) アミノ態窒素

本節 2-3-2) で得られた上澄液50mlに、25%硫酸30ml、蒸留水10mlおよび19%リンタングステン酸溶液10mlを加え、24時間放置後、ろ過し、ろ液を

200mlに定容し、このろ液の一定量をヴァンスライク法(94)で定量した。

2-3-7) アンモニア態窒素

本節 2-3-2)で得られた上澄液50mlに蒸留水を加え全量を250mlとし、気泡を防ぐためにアルコール100mlを添加した後、アンモニア態窒素減圧蒸留装置を用い減圧蒸留を行い、蒸留終了後、回収した1/10N-硫酸を0.1N-NaOHで滴定し、得られた結果からアンモニア態窒素量を求めた。

2-4 熟成率の測定

熟成率は、本節 2-3-2)で得られた水溶性窒素量と本節 2-3-1)で得られた全窒素量から以下の式により求めた。

$$\text{熟成率(\%)} = \text{水溶性窒素量} / \text{全窒素量} \times 100$$

2-5 低分子ペプチドの分子篩による分画

2-5-1) トリクロール酢酸可溶性画分の分画

トリクロール酢酸(TCA)により窒素化合物を分画する方法は広く用いられ、また、チーズにも使用されてきた(69,70,105,133)。Revilleら(105)は、12%TCAの可溶性画分には、低分子ペプチド、12~20のアミノ酸残基や、遊離アミノ酸が含まれており、それよりも高分子のペプチドは沈殿していくことを報告している。また、12%TCA可溶性画分はチーズの熟度の指標としても用いられている(133)ことから、TCAを用い分画を行う方法は、チーズの低分子ペプチドの分画を行う方法として適しているといえ、本研究でも、TCAによる処理を行い、TCA可溶性画分の分画を行った。

供試試料より、トリクロール酢酸可溶性画分として窒素化合物を分画し、Dowx-50多段式カラムによる分子篩を行った。すなわち、供試試料50gと精製

白砂少量を乳鉢内でよく細碎し、これに、トリクロール酢酸（和光純薬）の最終濃度が12.5%となるようTCA水溶液を少量ずつ加えさらによく細碎した後、30分間室温で放置した。これを、3,000rpmで30分間遠心分離を行い、上澄液をろ過（No.2, Advantec Toyo）し、ろ液を500mlに定容し、TCA可溶性画分とした。

2-5-2) Dowex-50 多段式カラムによる低分子ペプチドの分子篩

本節 2-5-1) で得られたTCA可溶性画分を、さらに分子量別に分画するために、Dowex-50 多段式カラムによる分子篩を行い、分子量別に分画を行った。イオン交換樹脂 Dowex-50 (Dow Chemical Co. Ltd., U.S.A) は、X-16、X-12、X-8、X-4、X-2、X-1を用いた。まず、イオン交換樹脂の活性化を行った。すなわち、各イオン交換樹脂を充填した各カラムを接続し、流速5ml/minで、1M-水酸化ナトリウムをイオン交換樹脂が十分にアルカリ性になるまで流し、その後、蒸留水を中性になるまで流した。次に、1M-塩酸をイオン交換樹脂が十分に酸性になるまで流し、その後、蒸留水を中性になるまで流し、イオン交換樹脂の活性化を行った。次に、試料溶液を流し、さらに蒸留水を200ml流し洗浄を行ったのち、各カラムを分離し、それぞれのカラムに1M-アンモニアを200mlおよび蒸留水250mlを流し、樹脂に吸着していた物質を溶出した。これら溶出液は、それぞれX-16画分、X-12画分、X-8画分、X-4画分、X-2画分、X-1画分とした。

X-16~X-1のイオン交換樹脂から得られる物質の分子重合度としては、Nakazawaら(86)らにより測定されており、X-16は1.1~2.6、X-12は3.3~4.5、X-8は5.0~7.8、X-4は10.1~16.1、X-2は19.3~26.4、X-1は27.8~36.3、またイオン交換樹脂の未吸着画分は38.1~87.4であり、本研究においてもこの値を引用した。

2-6 アミノ酸分析

2-6-1) 試料

試料としては、本節 2-5-1) で得られたTCA可溶性画分をそれぞれ5mlに濃縮し、分析に用いた。

2-6-2) アミノ酸分析

TCA可溶性画分中の遊離アミノ酸の種類を確認するために、高速液体クロマトグラフ (HPLC) を用い、アミノ酸分析を行った。分析装置には、日本電子JLC-300型アミノ酸分析計を用い、分析は、JEOL LC-Rカラム(内径6mm、長さ91mm)を用いた。カラム温度は、36℃ (0~26min)、46℃ (26~63min)、70℃ (63~120min)とし、反応槽温度は120℃とした。移動相には、アミノ酸自動分析用クエン酸リチウム緩衝液キット (日本電子) を用い、反応液にはニンヒドリン溶液を用いた。流速は、移動相 0.58ml/min、反応液 0.36ml/minとし、波長は570nmとした。

2-7 限外ろ過分析

2-7-1) 試料

試料としては、本節 2-5-1) で得られたTCA可溶性画分をそれぞれ濃縮し、これを200mlに定容した溶液を試料として用いた。

2-7-2) 限外ろ過

各画分の粒径別低分子ペプチドの分布を調べるために、2種類の限外ろ過装置およびろ過膜 (シートタイプおよびモジュールタイプ) を用いて限外ろ過を行った。一つは、限外ろ過装置UHP-43 (東洋科学) を用い、ろ過膜にはシートタイプろ過膜としてUK-10 (2nm)、UH-1 (1.5nm) および UH-05 (1nm)

(東洋科学) を用いた。もう一つは、ペンシル型モジュール用卓上ろ過装置 PS-24001 (旭化成工業) を用い、ろ過膜にはモジュールタイプろ過膜として SEP-0013 (1.5nm)、SIP-0013 (2nm) および SLP-0053 (2.5nm) (旭化成工業) を用いた。いずれも、注入温度10℃、窒素ガスの圧力は1.0~3.0kg/cm² とした。

モジュールをろ過装置に接続し、蒸留水200mlで十分に洗浄を行った。試料溶液を流し、分画された溶液は、濃縮し25mlに定容した。排出された溶液は、次の限外ろ過に用いた。

2-8 等速電気泳動分析

2-8-1) 試料

試料としては、本節 2-5-1) で得られたTCA可溶性画分を5mlに濃縮し、分析に用いた。

2-8-2) 等速電気泳動分析

各画分中のアミノ酸の定性を行うために、細管式等速電気泳動装置IP-3A (島津製作所) を用い分析を行った。検出には、電位勾配(PGD)検出器および紫外外部吸収(UV)検出器を用い、UV検出の波長は254nmとした。電気泳動分離用には、内径0.7mm、長さ80mmのテフロンチューブを、検出用には内径5mm、長さ200mmのフューズドシリカチューブを使用した。泳動相としては、リーディング液に、10mM塩酸-アメジオール (pH_L8.7)、および10mM塩酸-エタノールアミン (pH_L9.3、9.5) を用い、ターミナル液として、10mM β-アラニン-水酸化バリウム (pH10.0) を用いた。各物質の定性には、β-アラニンをインターナルスタンダードとしてR_E値 (relative potential gradient) を算出し、R_E値は次の式から求めた。

$$R_E = mL/mS$$

mL : リーディングカチオンの移動度

mS : 試料の移動度

第3節 結果および考察

3-1 カマンベールチーズ熟成中の生化学的变化

熟成前のグリーンチーズの化学組成をTable 1-1に示した。すなわち、全固形分46.92%、タンパク質20.04%、脂質21.71%、灰分3.52%、塩分1.34%、pH4.76、乳酸酸度1.50%であった。

次に、熟成中の生化学的变化を検索するために、熟成中のpH、乳酸酸度および総生菌数の測定を行った。Fig. 1-2は、その結果を示している。生菌数は、乳酸菌および*Penicillium candidum*の総菌数を示しており、熟成とともに増加した。pHも熟成とともに緩やかに上昇し、一方、乳酸酸度は減少した。この結果は、第3章でも後述するが、乳酸菌および*Penicillium candidum*により順調な熟成が行われていることを示している。

3-2 カマンベールチーズ熟成中の水溶性窒素化合物の変化

熟成にともなうの窒素化合物の変化を知るために、各窒素化合物の定量を行った。Fig. 1-3は、熟成にともなう水溶性窒素、水溶性非タンパク態窒素、プロテオース態窒素、アミノ態窒素および熟成率の変化を示している。すべての窒素化合物が熟成が進むにつれ増加した。水溶性窒素量は、熟成4週目において6.30mg/mlであり、水溶性窒素中の水溶性非タンパク態窒素の割合は49%と最も多く、プロテオース態窒素は33%、アミノ態窒素は29%であった。また、これら窒素化合物の増加にともない、熟成率も著しい上昇を示しており、水溶性窒素化合物の増加がチーズの熟成に大きく関与していることが明確となった。アンモニア態窒素はほとんど検出されなく、熟成4週目に0.01mg/g検出されただけであった。

3-3 カマンベールチーズ熟成中のTCA可溶性窒素化合物の変化

Table 1-1 Compositional characteristics of Camembert cheese curd before ripening
(average, n=5)

Total solids (g/100g)	Protein (g/100g)	Fat (g/100g)	Ash (g/100g)	Sodium chloride (g/100g)	pH	Lactic acid (g/100g)
46.90	20.04	21.71	3.52	1.34	4.76	1.50

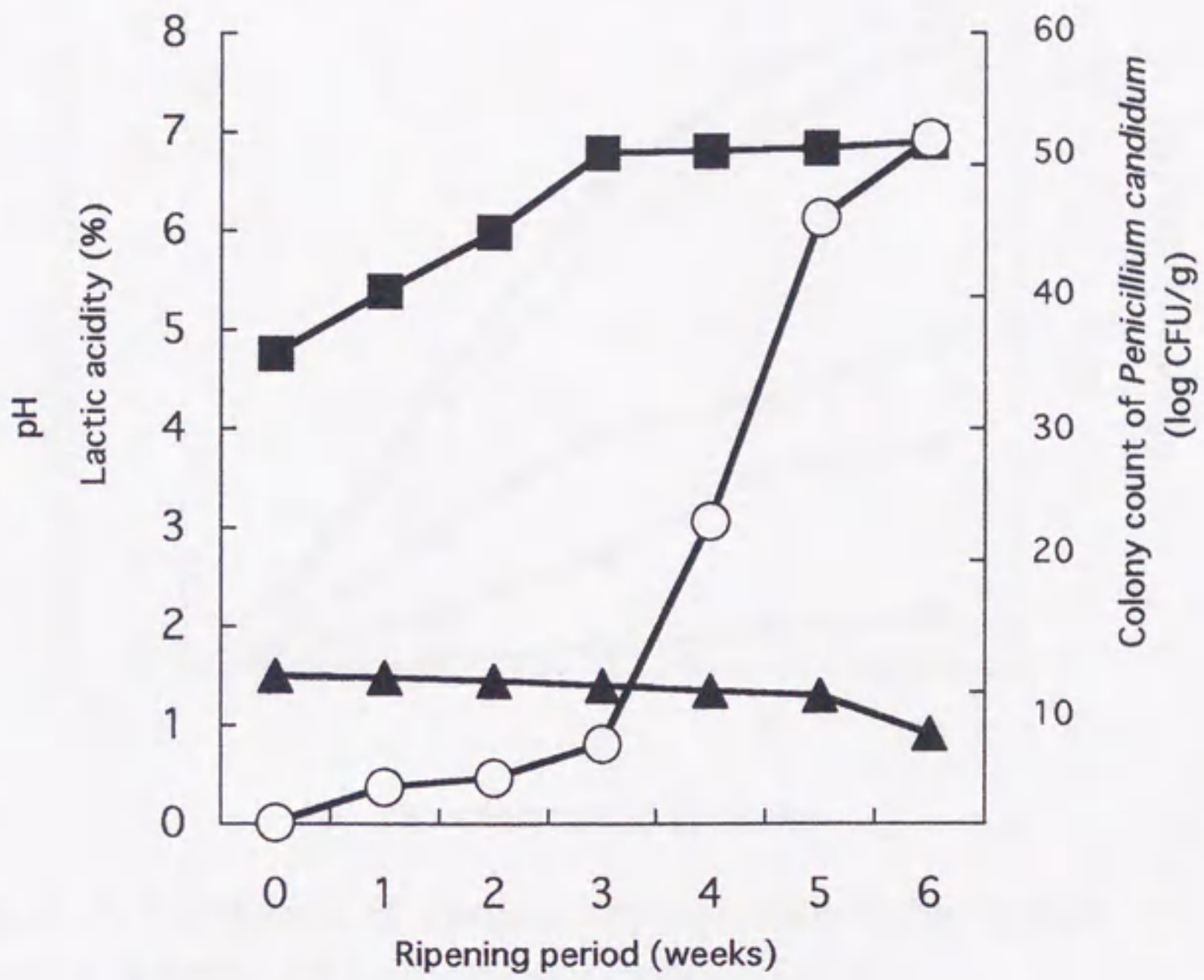


Fig. 1-2 Changes in the general characteristics of Camembert cheese during ripening (n=6):
 ■, pH; ▲, lactic acid; ○, colony count.

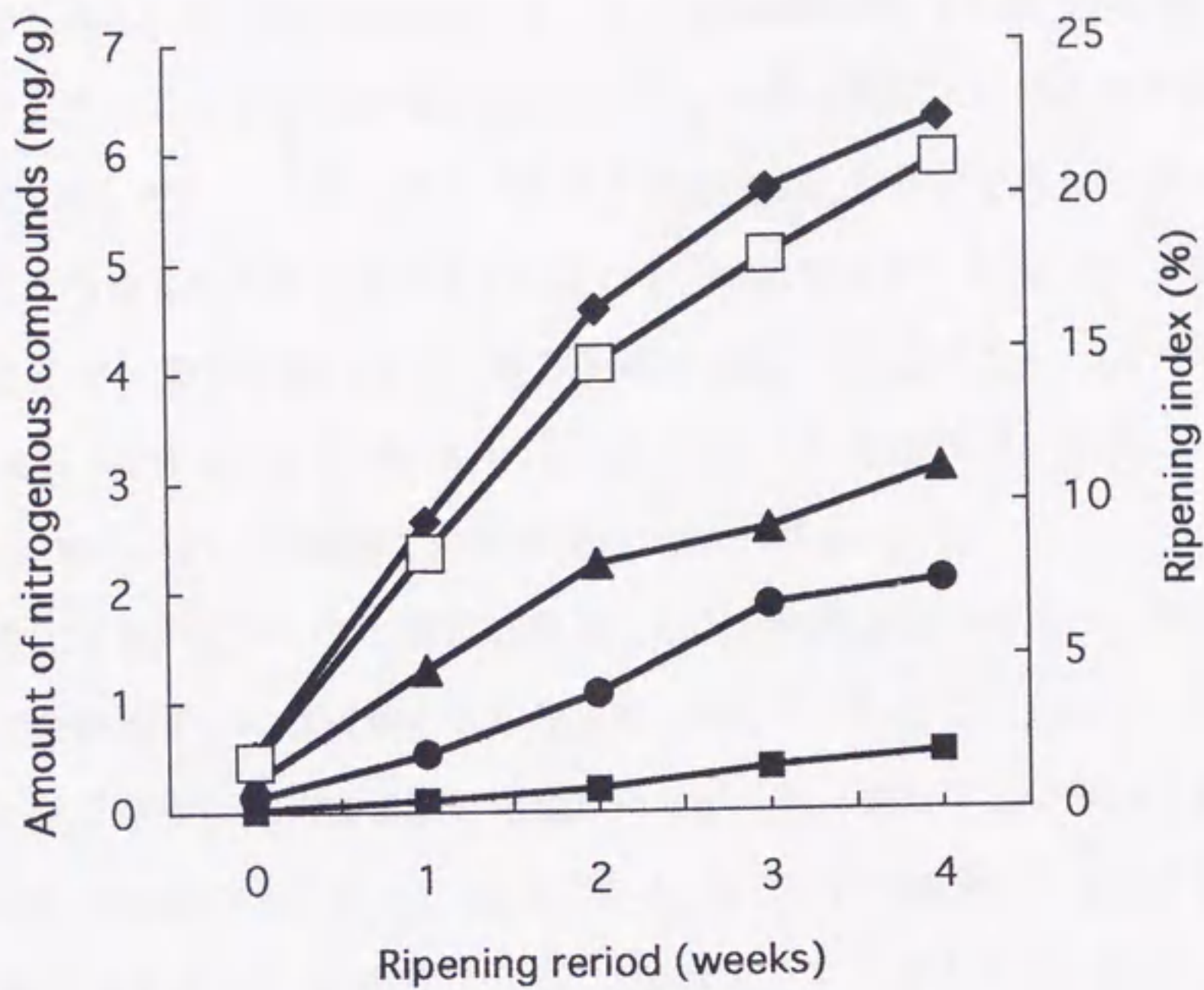


Fig. 1-3 Contents of various nitrogenous compounds during ripening of Camembert cheese (n=5):

- ◆, water soluble N; ▲, water soluble non-protein N;
 - , proteose pepton N; ■, amino N; □, ripening index*.
- *Ripening index (%) means soluble N as % of Total N

次に、さらに低分子物質の熟成中の変化を知るために、供試試料をTCAで処理し得られたTCA可溶性画分を、イオン交換樹脂を用いたDowex-50多段式カラムによる分子篩を行った画分について、熟成過程における窒素量の変化を検索した。Fig. 1-4は、アミノ酸分子重合度別に分子篩を行った画分中の、熟成にともなう窒素量の変化を示している。本章第2節2-5-2)でも示したように、各イオン交換樹脂のアミノ酸分子重合度は、X-16は1.1~2.6、X-12は3.3~4.5、X-8は5.0~7.8、X-4は10.1~16.1、X-2は19.3~26.4、X-1は27.8~36.3、またイオン交換樹脂の未吸着画分は38.1~87.4とした。

全ての画分において、熟成が進むにしたがい窒素量が増加し、熟成により窒素化合物がタンパク質から水溶性窒素へ移行していることがわかった。とくに、熟成2週間以降の窒素量の増加が大きかった。最もアミノ酸分子重合度が小さいX-16画分では、X-12、X-8、X-4、X-2、X-1画分中の窒素量の熟成による変化に比較し、熟成0、1、2、4週目で、それぞれ7.0、10.3、21.9、74.6mg/100gと、急激な窒素量の増加が認められ、熟成によりアミノ酸やジペプチド、トリペプチドの増加が著しいことがわかった。

そこで、どれくらいアミノ酸が増加しているか知るために、X-16画分についてアミノ酸分析を行い、熟成によるアミノ酸量の変化について検索を行った。アミノ酸は、20種類について測定を行った。Table 1-2は、熟成にともなう各アミノ酸量の変化を示している。シスチンを除いた全てのアミノ酸が、熟成が進むにしたがい増加し、総アミノ酸量としては、熟成開始直後で0.0084 g/gであったのが、熟成4週目では0.0424 g/gと、5倍にも増加していた。このことから、熟成により増加した水溶性窒素化合物中には、アミノ酸も多く存在していることがわかった。

これまでの検索から、熟成により、乳タンパク質が低分子の窒素化合物へと分解されることがわかったが、乳蛋白質の分子の大きさについても、大きな

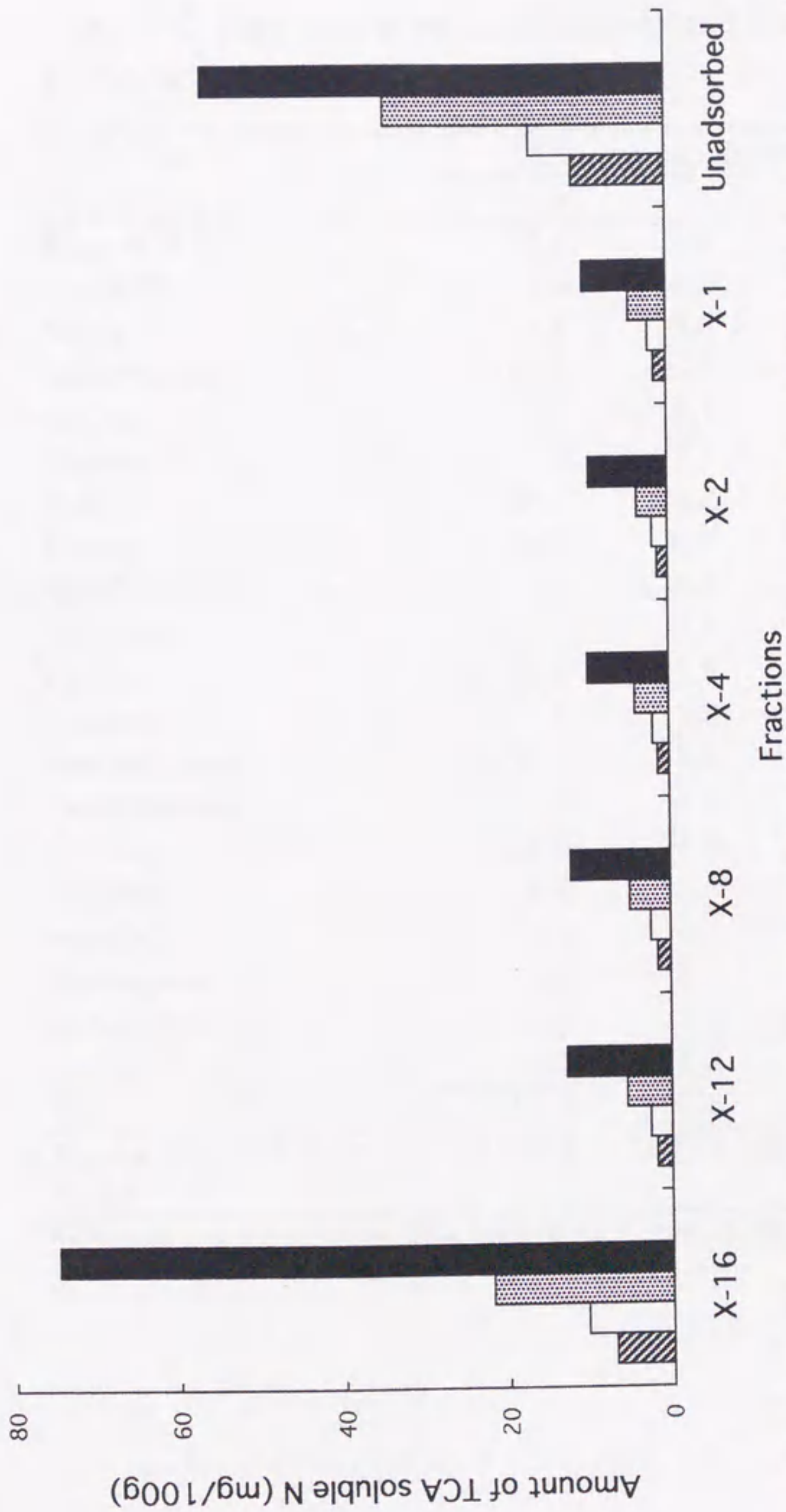


Fig. 1-4 Distribution of nitrogen content in the group fractionated lower molecular weight peptides of Camembert cheese during ripening: ▨, 0W; □, 1W; ▩, 2W; ■, 4W.

Polymerization degree of amino acids of fractions: X-16, 1.1-2.6; X-12, 3.3-4.5; X-8, 5.0-7.8; X-4, 10.1-16.1; X-2, 19.3-26.4; X-1, 27.8-36.3; unadsorbed, 38.1-87.4.

Table 1-2 Free amino acids in Camembert cheese during ripening (n=3)

Amino acids (mg/100g)	Ripening period (weeks)			
	0	1	2	4
Aspartic acid	8.5	12.8	19.2	48.1
Threonine	3.0	4.8	9.6	20.2
Serine	2.5	3.8	7.5	15.2
Glutamic acid	30.5	45.8	83.9	175.6
Glycine	4.0	6.1	11.4	24.2
Alanine	5.1	7.7	16.5	30.1
Valine	10.1	16.2	30.4	64.3
Cystine	nd*	nd*	nd*	nd*
Methionine	3.2	4.9	9.4	20.1
Isoleucine	6.1	9.5	17.8	36.5
Leucine	37.5	39.8	78.1	105.2
Tyrosine	2.5	3.8	7.6	14.6
Phenylalanine	12.6	18.9	34.8	75.3
Tryptophane	1.0	1.2	2.3	4.1
lysine	23.5	34.0	60.8	110.9
Histidine	4.0	6.5	11.9	24.8
Arginine	1.5	2.3	4.1	9.0
Asparagine	4.3	6.4	11.3	23.1
Glutamine	1.0	1.8	3.9	5.2
Proline	7.5	11.3	20.8	44.1
Total	168.4	237.6	441.3	850.6
Total amino acids /protein (g/g)	0.0084	0.0119	0.0220	0.0424

*nd means non-detected (the limit of detection, 1 mg/100ml solution)

タンパク質分子が酵素により小さな分子に切断されていく、つまり、酵素作用を受けながら分子の大きさも熟成とともに変化していくと推測できる。そこで、熟成にともなう窒素化合物の粒子の大きさの変化について限外ろ過による検索を行った。限外ろ過には、ろ過膜にシートタイプとペンシル型モジュールタイプ2種類のろ過膜を用い、ろ過により得られたろ液中の窒素量を比較した。Fig. 1-5 および Fig. 1-6 は、熟成にともなうX-16、X-12、X-8 画分の限外ろ過を行い得られたろ液中の粒径別窒素量の変化を示しており、Fig. 1-5 はシートタイプ、Fig. 1-6 はモジュールタイプの限外ろ過膜を用いたときの結果を示している。限外ろ過を行い採取できる物質の粒径のサイズは、シートタイプのろ過膜で <1nm、1~1.5nm、1.5~2nm および >2nm、モジュールタイプのろ過膜では <1.5nm、1.5~2nm、2~2.5nm および >2.5nm であった。いずれのシートタイプにおいても、熟成が進むとともにほとんどの粒径の窒素量が増加傾向を示した。Fig. 1-5 に示したシートタイプでは、熟成直後および1週目では、いずれも分画別および粒径別窒素量は少なく、熟成2週目からX-16画分の窒素量が増加し、粒径別では粒径が最も小さい <1nm の窒素量が最も多かった。熟成4週目になると、さらにX-16画分の窒素量は急激に増加し、粒径 <1nm の窒素量が最も多かった。Fig. 1-6 に示したモジュールタイプの限外ろ過膜を用いた結果も同様の傾向を示した。これらのことから、熟成により、タンパク質分子は細分化され、熟成4週目では極めて小さい粒径の物質が存在していることがわかった。

さらに、熟成中に低分子物質が増加するか確認するために、等速電気泳動法による低分子物質の検出を行った。Table 1-3 は、アミノ酸およびペプチドの標準物質をpHの異なるリーディング液で泳動したときに得られた R_E 値を示しており、これら値を物質の定性に用いた。Fig. 1-7 は、熟成中のX-8画分の等速電気泳動による $pH_{L} 9.3$ における泳動図を示している。熟成1 および 3週目では、

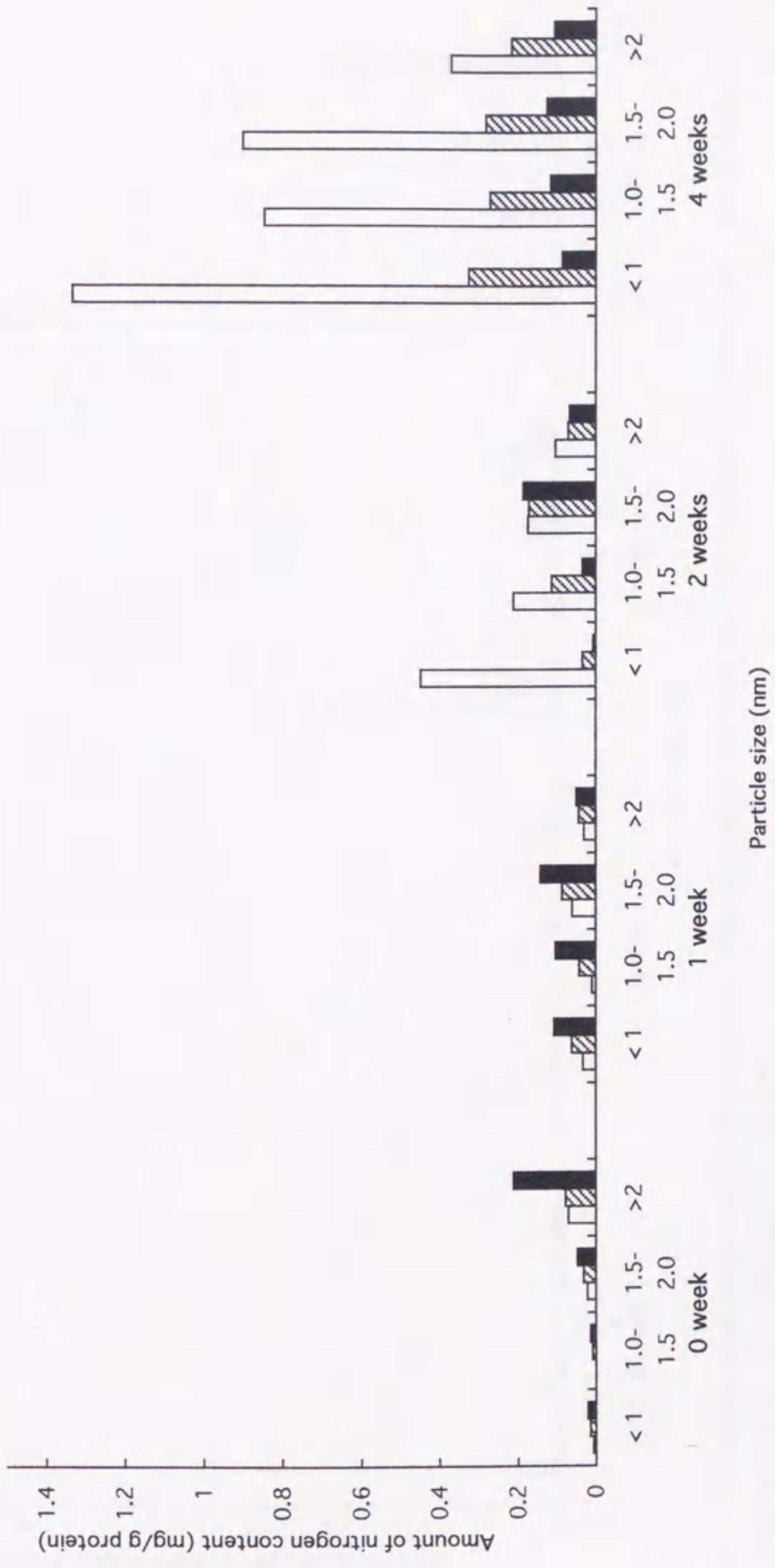


Fig. 1-5 Particle size distribution of fractionated oligopeptides (X-16, X-12 and X-8 fractions) in Camembert cheese during ripening (n=5): □, X-16; ▨, X-12; ■, X-8. The use of ultrafilter-sheet type membranes (in the shape of sheet). Polymerization degree of amino acids of fractions: X-16, 1.1-2.6; X-12, 3.3-4.5; X-8, 5.0-7.8.

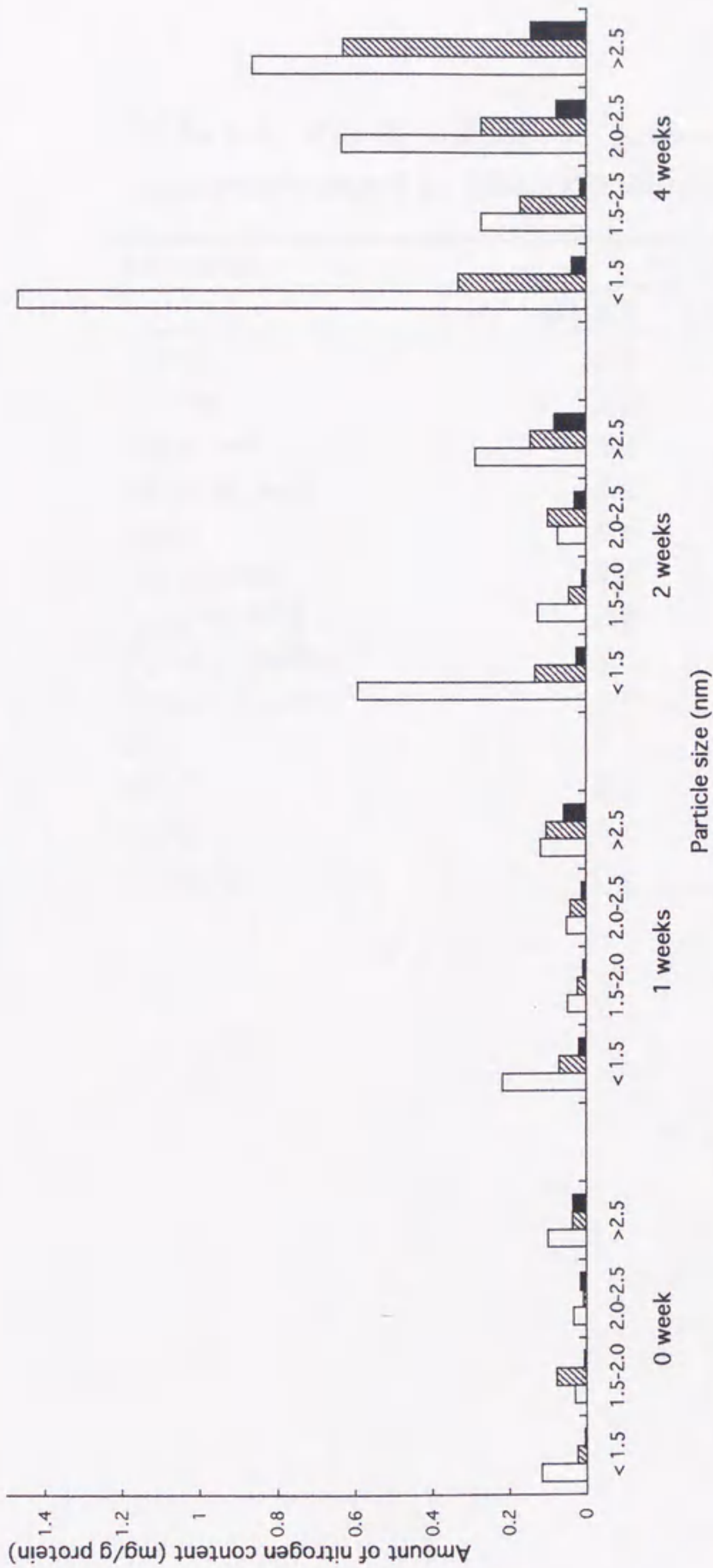


Fig. 1-6 Particle size distribution of fractionated oligopeptides (X-16, X-12 and X-8 fractions) in Camembert cheese during ripening (n=5): □, X-16; ▨, X-12; ■, X-8.
 The use of ultrafilter-fiber module type membranes (in the shape of sheet)
 Polymerization degree of amino acids of fractions: X-16, 1.1-2.6; X-12, 3.3-4.5; X-8, 5.0-7.8.

Table 1-3 The R_E values of authentic samples obtained by isotachopheresis

Standards	R_E values		
	pH _L 8.7	pH _L 9.3	pH _L 9.5
Lysine	14.7	7.4	6.7
Leucine	7.8	4.9	4.5
Glutamine	5.1	3.6	3.4
Glutamic acid	2.8	2.3	2.2
Serine	4.6	3.2	3.0
Asparagine	4.2	3.1	3.0
Aspartic acid	2.6	2.2	2.1
Glycyl-L-alanine	3.5	3.5	3.3
Glycyl-L-leucine	3.9	3.9	3.7
GG	3.2	3.3	3.1
GGG	3.8	3.6	3.4
GGGG	4.2	3.9	3.7
β -alanine	10.2	5.6	5.1

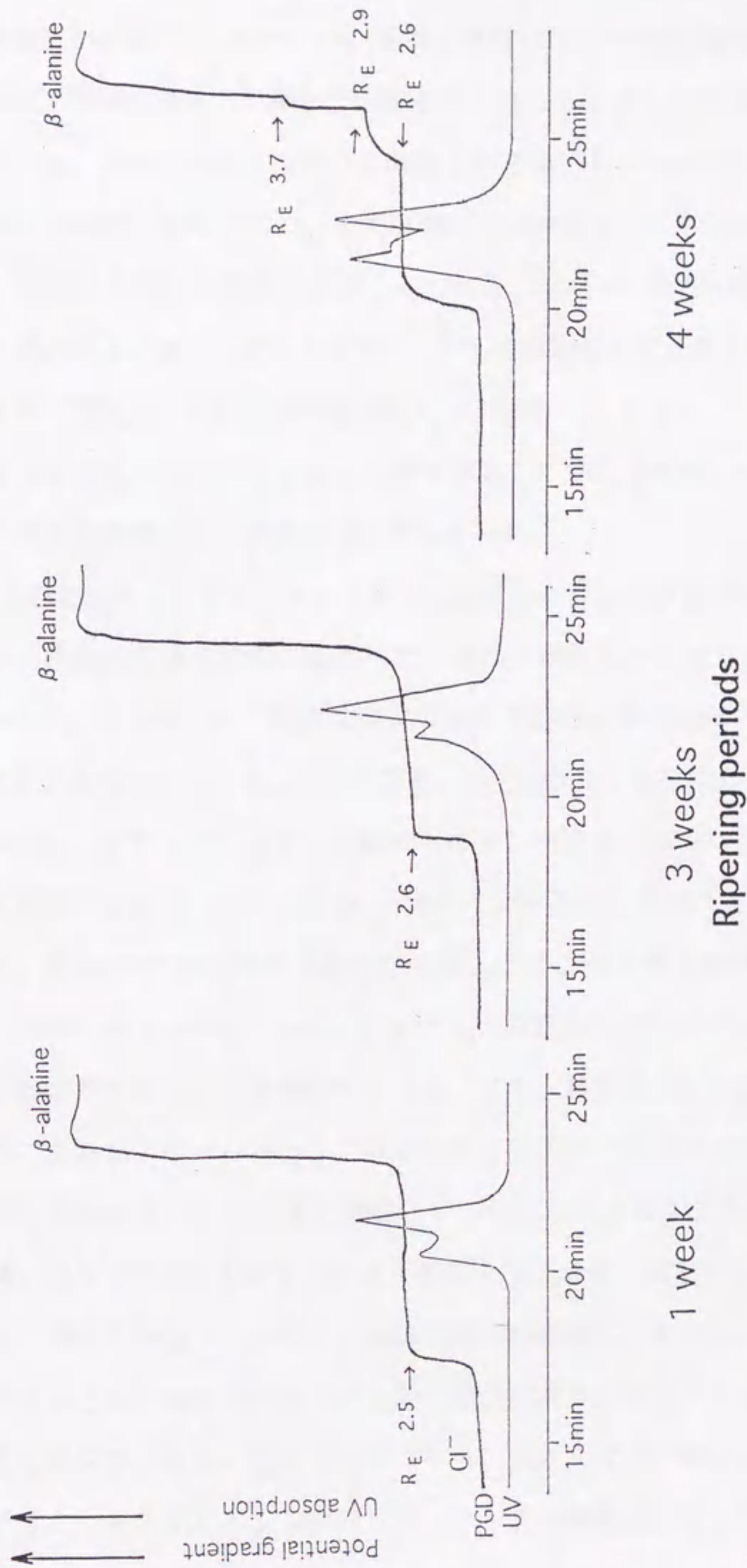


Fig. 1-7 Isotachoelectrophoresis of the X-8 fractionated extracts at pH_L 9.3 of Camembert cheese during ripening

PGD: Potential gradient detection, UV: UV (245nm) detection

一つの物質しか泳動されていないが、熟成4週目では三つの物質が泳動された。Fig. 1-8は、熟成中のX-16画分の等速電気泳動によるpH_L9.3における泳動図を示している。熟成1週目では一つの物質しか泳動されていないが、熟成2週目では四つの物質が泳動された。熟成3週目では泳動された物質の数に変化はないが、泳動されている距離が長くなっていることから、物質の量が増加していることがわかる。また、Fig. 1-7で示したX-8画分中の物質数より、Fig. 1-8で泳動されてきたX-16画分中の物質数の方が多かったことから、熟成によりより小さな物質が存在していると判断できる。しかしながら、本実験では、泳動されてきた物質について定性はできなかった。

以上のことから、カマンベールチーズ熟成中にタンパク質が低分子物質に分解され、水溶性窒素化合物が増加していることが明らかとなり、また、Fig. 1-4、1-5および1-6から、熟成2週目以降に水溶性窒素化合物の中でもより小さなアミノ酸やジペプチド、トリペプチドの生成が多くなることがわかった。岩澤ら(59)も、カマンベールチーズ熟成中のタンパク質分解物の分析をしており、熟成初期にはレンットにより α_{s1} -カゼインが作用を受け α_{s1} -Iカゼインを生成し、熟成10日目以降は白かびが生成したタンパク質分解酵素により β -カゼインが γ -カゼインに、 α_{s1} -Iカゼインがさらに低分子ペプチドやアミノ酸に分解されていくことを報告している。また、高藤(122)も同様の報告をしており、さらにスターターとして添加される乳酸菌が低分子窒素化合物の生成に重要な役割を果たしていることを報告している。これらのことから、熟成2週目以降に低分子ペプチドおよびアミノ酸が生成されると判断できる。

一方、緒言でも述べたように、水溶性窒素の生成にともない、チーズの風味が増大するという報告(48)や、チーズの風味の強さはペプチドおよびアミノ酸含量と相関関係があると報告(8)されている。また、アミノ酸に関しては、遊離のメチオニンおよびロイシンがチェダーチーズの香気成分として必要であり

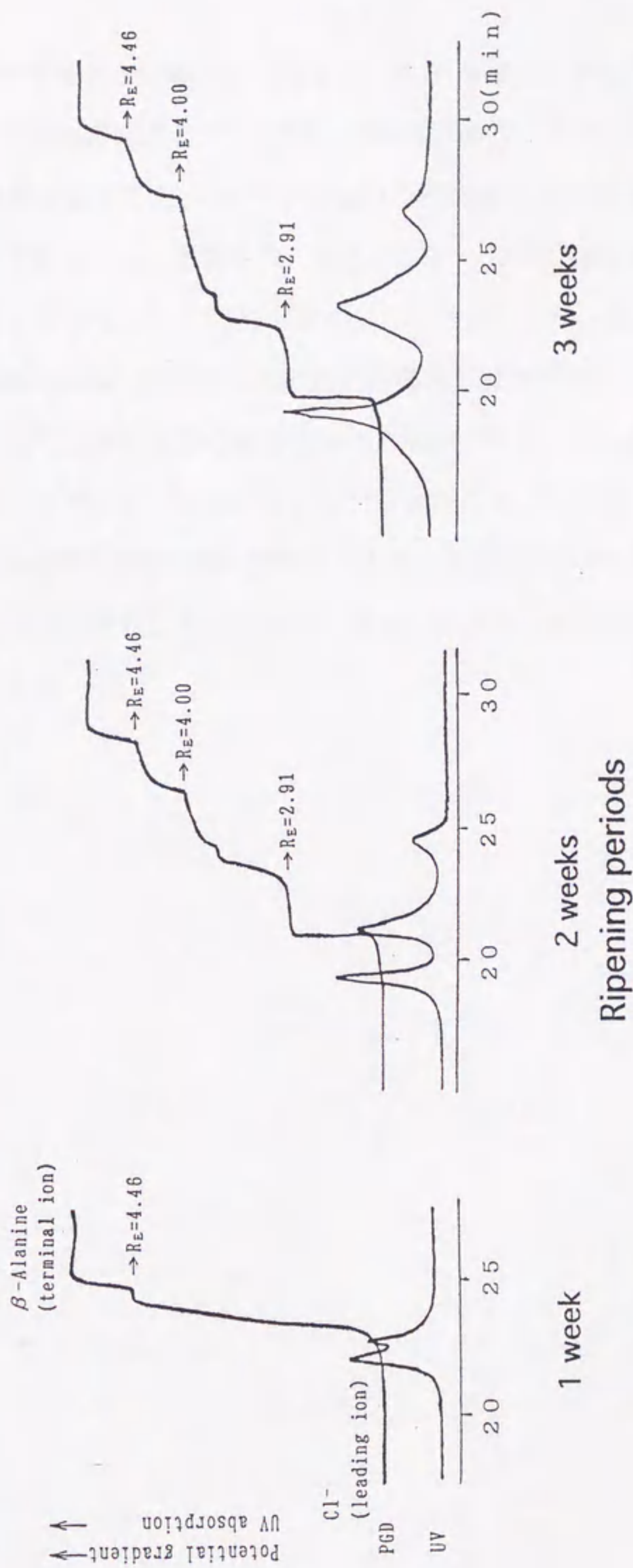


Fig. 1-8 Isotachoelectrophoresis of the X-16 fractionated extracts at pH 9.3 of Camembert cheese during ripening

PGD: Potential gradient detection, UV: UV (245nm) detection

(7,68)、芳香族アミノ酸であるフェニールアラニン、チロシンおよびトリプトファンの存在が確認されたこと(7)、チーズ中のグルタミン酸は香気成分として有効な物質であること(110)や、プロリンや短鎖ペプチドはスイスチーズの甘い香成分である(14)と報告され、さらに、チーズの苦味にもアミノ酸やペプチドが関与しているという報告も多くされている(19,24,33)。また、物性に関しても、Nakazawaら(88)が、本研究と同様の方法で製造したカマンベールチーズの熟成中の物性の変化の検索を行い、熟成により硬さが減少し柔らかさが増加することを報告している。これらのことから、タンパク質の分解物がチーズ固有の風味や物性に深く関与しており、本研究で製造したカマンベールチーズの風味および物性にも、熟成中に増加した低分子窒素化合物が関与していると判断できる。

第4節 要 約

カマンベールチーズの熟成中におけるタンパク質の分解の様子を探るために、カマンベールチーズを製造し、熟成にともなう低分子窒素化合物の変化について検索を行った。

まず、カマンベールチーズ熟成中の水溶性窒素、水溶性非タンパク態窒素、プロテオース態窒素、アミノ態窒素、アンモニア態窒素および熟成率の変化について検索を行ったところ、全ての窒素化合物が熟成にともない増加し、熟成率も上昇し、熟成と水溶性窒素化合物量に相関関係があることがわかった。水溶性窒素のうち、とくに水溶性非タンパク態窒素量が最も多く、水溶性窒素中の49%を占めていた。

次に、TCA可溶性画分について、分子重合度別にX-16、X-12、X-8、X-4、X-2、X-1に分画を行い、熟成にともなう各画分中の窒素量の変化について検索を行ったところ、全ての画分中の窒素量は熟成とともに増加した。とくに、最も分子重合度が小さいX-16画分の熟成による窒素量の増加が著しかった。このことから、熟成によりアミノ酸および低分子ペプチドが増加していることがわかった。そこで、アミノ酸がどれくらい増加しているか知るために、X-16、X-12、X-8画分中の20種類のアミノ酸量について分析を行った。その結果、シスチンを除いた全てのアミノ酸が検出され、全てのアミノ酸が熟成にともない増加した。

次に、熟成にともなう粒径別窒素化合物の窒素量の変化をX-16、X-12およびX-8について検索を行ったところ、全ての画分において熟成とともに窒素量が増加し、とくに熟成4週目では全ての粒径において窒素量が著しい増加を示し、さらに最も小さい粒径画分の窒素量が最も多く、タンパク質が形状の面からも細分化されていることがわかった。

最後に、等速電気泳動法によりX-16およびX-8分画中の物質の定性を試み

た結果、いずれの画分においても熟成が進むにつれ、出現したゾーンが増加し、熟成により物質が増加していることが示されたが、これら物質が何であるか特定はできなかった。

以上のことから、カマンベールチーズ熟成中に不溶性の乳タンパク質が分解され、熟成にともない水溶性窒素化合物量が増加していることが明らかとなった。とくに、アミノ酸およびジペプチドの増加が著しかった。

第2章 各種ナチュラルチーズの抗変異原性に関する研究

第1節 緒言

チーズは種類によって様々な微生物が製造に用いられている。チーズ内では、タンパク質代謝、糖質代謝、脂質代謝、クエン酸代謝など多くの代謝が微生物によって行われているが、これら代謝による生成物は、微生物の種類および製造条件の違いにより異なってくる。牛乳は乳酸菌の代謝を受け発酵乳となるが、この発酵乳の生理的機能については緒論でも述べたように、Hosonoら(40,41,42,44)により多くの報告がされている。チーズも、牛乳を原料としたものが多く、微生物の代謝が、カゼイン凝固やその凝固物(カード)の熟成に大きく関与している。しかし、微生物の生理活性は種類により異なり、微生物の種類や製造条件によって生成される代謝産物も異なってくるため、用いられる微生物の種類によりチーズの生理作用も異なると推測される。

チーズの生理機能についての報告は少なく(97,129)、中でも抗変異原性の報告はほとんどないことから(61)、本章では、チーズの種類による抗変異原性の相違をみるために、微生物による熟成タイプの異なるナチュラルチーズについて抗変異原性の検索を行った。また、第1章で明らかにしたように、チーズは熟成中に乳タンパク質が分解され水溶性窒素化合物が増加することから、熟成による乳タンパク質の分解物が抗変異原性に関与しているかどうか知るために、表面熟成タイプであるカマンベールチーズを取り上げ、部位別の抗変異原性、さらに微生物の影響をみるために微生物の死滅および酵素の不活化を行ったチーズについて抗変異原性の検索を行った。抗変異原性試験としては、指標菌として*Salmonella typhimurium* TA98株から造成したストレプトマイシン依存株 SD510 を用い、変異原物質としては Trp-P-1 (3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole) を用いた。

第2節 実験方法

2-1 試料

供試試料には市販各種ナチュラルチーズを用い、全て東京都内の販売店で購入した。供試試料の種類、原産国および輸入年月日から実験に用いるまでの日数をTable 2-1に示した。チーズは微生物熟成タイプ別に分け選択を行い、かび熟成タイプのチーズとして、カマンベールチーズ（フランス産）およびブルーチーズ（イタリア産）を、乳酸菌熟成タイプのチーズとして、ゴータチーズ（オランダ産）、チェダーチーズ（イギリス産）、エダムチーズ（オランダ産）およびパルメザンチーズ（イタリア産）を、プロピオン酸菌熟成タイプのチーズとしては、エメンタールチーズ（オランダ産）およびグリュイエールチーズ（オランダ産）を、プレバクテリウム熟成タイプのチーズとしては、ポンレヴェックチーズ（フランス産）を用いた。チーズは購入後、実験に用いるまで4℃で保存した。

2-2 化学組成の分析(94,96,118)

2-2-1) pH測定

供試試料3gを乳鉢に取り、10mlの蒸留水を加えよく磨砕した後、pHメーター（HM-26S、東亜電波工業）を用い測定を行った。

2-2-2) 乳酸酸度測定

供試試料10gに少量の蒸留水を加えよく磨砕し、ろ液部分をメスフラスコに移し、これを反復し全量を流し込み100mlに定容した。このろ液25mlについて0.1N-NaOHで中和滴定を行い、乳酸酸度を以下の式から求めた。

$$\text{乳酸酸度(\%)} = A \times 0.9 \times F / S$$

A:0.1N-NaOHの適定値(ml)

Table 2-1 General characteristics of cheeses (n= 4)

	Mould-ripened cheeses		Lactic acid bacteria-ripened cheeses				Propionic acid bacteria-ripened cheeses		Brevibacterium - ripened cheese
	Camembert cheese	Blue cheese	Cheddar cheese	Gouda cheese	Edam cheese	Parmesan cheese	Emmental cheese	Gruyere cheese	Pont-l'Eveque cheese
Country of origin	France	Italy	England	Holland	Holland	Italy	Holland	Holland	France
Year of production	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997
Experimental period (months)	0.2	0.3	0.4	0.4	0.4	1.0	0.4	0.4	0.2

F:0.1N-NaOHの力価

S:供試試料の重量(g)

2-2-3) 熟成率の測定

第1章 2-4 と同様の方法で求めた。

2-2-4) 白かびの菌数測定

供試試料10gを滅菌生理食塩水で10倍に希釈し、この希釈液をさらに滅菌生理食塩水で適当な倍率に希釈した。各希釈倍率の希釈液1mlとポテトデキストロース寒天培地をシャーレ中で混合し、25℃で5日間培養した。出現した白かびのコロニー数を計測し、供試試料1g中の菌数を求めた。ポテトデキストロース寒天培地は、ポテトデキストロース寒天培地（栄研）39gに1000mlの蒸留水を加え121℃で15分間滅菌後、45℃位まで冷却し用いた。

2-3 抗変異原性試験

2-3-1) 試料の調製

供試試料は、2%となるように蒸留水を加え、ホモジナイザーで攪拌し、懸濁液とした。

2-3-2) 変異原物質

変異原物質には、アミノ酸加熱分解物から分離されたTrp-P-1を用いた。Trp-P-1は、2mg/mlとなるように蒸留水で水溶液に調製した。

2-3-3) 指標菌

抗変異原性を調べるための指標菌として、*Salmonella typhimurium* TA98

から造成されたストレプトマイシン依存株SD510株を用いた。

本章では抗変異原性試験として、Ames法(5)を改良した方法で行った。すなわち、Ames法ではヒスチジン要求型 (*his*⁻)からヒスチジン非要求型 (*his*⁺)への復帰変異を指標としている *Salmonella typhimurium* TA98株を、Hosonoら(47)が改良し、TA98株にストレプトマイシン依存 (SMd) 性の形質を有する菌、つまり *Salmonella typhimurium* TA98株からストレプトマイシン依存株 SD510株 (以下SD510株)を造成した。本研究で供試試料として用いるチーズはヒスチジンを含むタンパク質食品であることから、このSD510株を指標菌として用い検索を行った。

2-3-4) 培地

2-3-4)-① SM液体培地 (SM liquid)

NUTRIENT BROTH No.2(Oxoid) 2.5gを蒸留水 1 0 0 mlに溶解し、オートクレーブで滅菌後、無菌的に硫酸ストレプトマイシン水溶液(20mg/ml、明治製菓)を100 μ l添加した。

2-3-4)-② SM寒天培地 (SM agar)

NUTRIENT BROTH No.2 2.5gと粉末寒天 (BA-10, 伊那食品) 1.5gを蒸留水 1 0 0 mlに溶解し、オートクレーブで滅菌後、無菌的に硫酸ストレプトマイシン(20mg/ml)を100 μ l添加した。

2-3-4)-③ OX 寒天培地 (OX agar)

NUTRIENT BROTH No.2 2.5gと粉末寒天1.5gを蒸留水 1 0 0 mlに溶解し、オートクレーブで滅菌した。

2-3-5) CFテスト (ストレプトマイシン依存性確認試験)

CFテストは、本実験で用いた指標菌SD510株のストレプトマイシン依存性の性質を確認するために行った。

すなわち、SD510株をSM液体培地で、37℃で吸光度(O.D.660nm)が60~65になるまで振とう培養し、培養液をリン酸緩衝液で 10^2 ~ 10^7 倍に希釈した。そのうち、 10^2 ~ 10^5 倍希釈液をOX寒天培地に、 10^4 ~ 10^7 倍希釈液をSM寒天培地に、それぞれ0.1mlずつ塗抹し、これらのプレートを37℃で48時間培養した。培養後、それぞれの希釈率のコロニー数を測定し、OX寒天培地とSM寒天培地上に出現したコロニー数を比較し、自然復帰変異の確率が1000分の1以下のコロニーを、ストレプトマイシン依存性の形質が保持されているものと判断した。CFテスト後、マスタープレートを作成し抗変異原性試験に用いた。

2-3-6)抗変異原性試験

2-3-6)-① 指標菌SD510株の培養

SD510株の培養には、SM液体培地を用い、菌体接種後37℃で振とうを行い、吸光度(O.D.660nm)が60~65 (5.0×10^8 CFU/ml)になるまで培養した。

2-3-6)-② 抗変異原性試験

抗変異原性試験はMaron and Ames(76)の方法に準じ、スポット法で行った。すなわち、Trp-P-1水溶液(2mg/ml) 30 μ l、供試試料懸濁液(以下チーズ懸濁液) 50、150、250または350 μ l、および蒸留水を全量が500 μ lとなるように加え滅菌試験管内で混合し、37℃で30分間のプレインキュベーションを行った。プレインキュベーション後、フィルター(0.45 μ m、富士フィルム)で滅菌ろ過した。本節2-3-6)-①で培養したSD510株の培養液は、リン酸バッファー(pH6.98)で 10^3 倍に希釈し、OX寒天培地に100 μ l塗抹した。この上に

ペーパーディスク(ϕ 8mm)を置き、滅菌ろ過したろ液を40 μ lずつ染み込ませ、37 $^{\circ}$ Cで48時間培養した。培養終了後、復帰変異コロニー数を計測し、以下の式により求めた抑制率(PI)を抗変異原性として表わした。コントロールとして、Trp-P-1、または、チーズ懸濁液の代わりに蒸留水を用いた。

$$PI(\%) = (B-C/A-C) \times 100 / 100$$

A: Trp-P-1により誘導された復帰変異コロニー数

B: チーズ懸濁液を添加したTrp-P-1により誘導された復帰変異コロニー数

C: Trp-P-1またはチーズ懸濁液の代わりに蒸留水を用いたコントロールにより出現した自然復帰コロニー数

2-4 市販カマンベールチーズの部位別の抗変異原性試験

2-4-1) 供試試料の部位別分類方法

供試試料には、本節2-1のカマンベールチーズと同様の市販カマンベールチーズを用いた。カマンベールチーズの部位の分類は、岩澤ら(59)の方法に従った。すなわち、Fig. 2-1に示すように、直径55mmのステンレス製の円筒でチーズの中心をくり抜き、くり抜いたチーズの上下10mmの厚さのチーズをナイフで切り取り、残った中心部縦10mm、幅55mmの部位(以下 内部)と、それ以外の切り取った部分(以下 外部)とに分類した。また、部位別に分類しないそのままチーズ(以下 全体)も用いた。

カマンベールチーズの各部位は、2%となるように蒸留水を加え、ホモジナイザーを用い懸濁液とした。

2-4-2) 試料の調製

本節2-4-1)で分類したチーズの各部位は、本節2-3-1)と同様の方法で調製を行った。

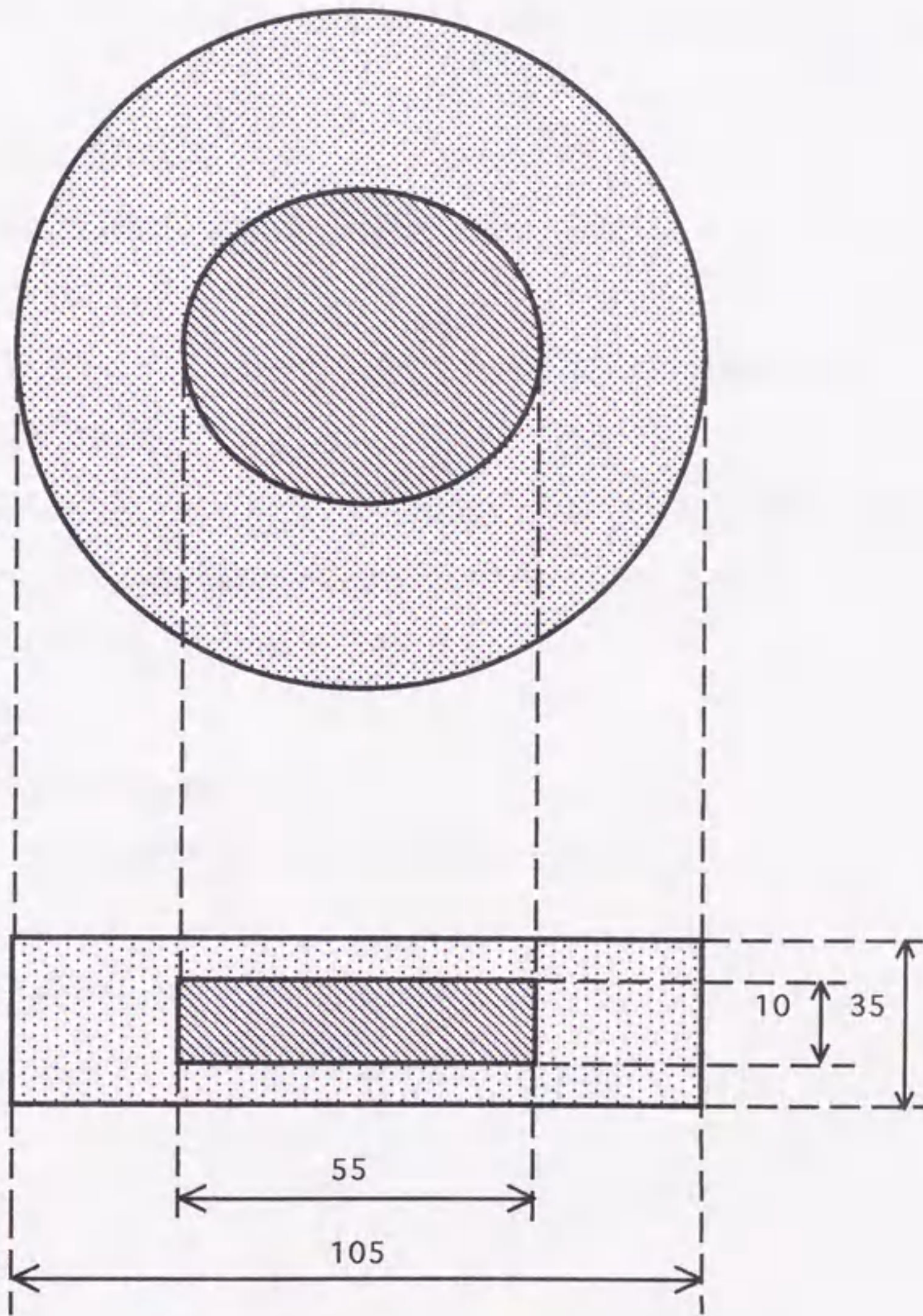
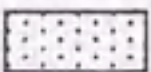



Fig. 2-1 Location of Camembert cheese analysed
 (Unit; mm): , surface ; , center

2-4-3) 熟成率の測定

チーズの各部位の熟成率の測定は、第1章 2-4 と同様の方法で行った。

2-4-4) 抗変異原性試験

抗変異原性試験は本節 2-3-6)-② と同様の方法で行った。

2-5 市販カマンベールチーズの部位別加熱処理後の抗変異原性試験

2-5-1) 試料の調製

供試試料のカマンベールチーズの調製は、本節 2-3-1)と同様の方法で行った。部位別のチーズ懸濁液の加熱処理は、調製したチーズ懸濁液を121℃で15分間の加熱を行った。

2-5-2) 抗変異原性試験

抗変異原性試験は本節 2-3-6)-②と同様の方法で行った。

2-5-3) 有意差検定法

有意差の検定は、F検定による検定後、t検定を行い求めた。

第3節 結果および考察

3-1 各種ナチュラルチーズの一般組成

各種ナチュラルチーズの一般組成は、pH、乳酸酸度および熟成率について求め、結果はTable 2-2に示した。全てのチーズにおいて標準的な値を示した(26,75,87)。pHおよび熟成率については、カマンベールチーズ、ブルーチーズおよびボンレヴェックチーズの値が、他のチーズに比較しいずれも高い値を示しており、それぞれ6.60と77.4%、6.64と51.3%、7.65と63.3%であった。このことは、これらチーズはセカンドスターターを用いているためと考えられる。熟成を行うタイプのチーズは、スターターとして乳酸菌を添加するが、乳酸菌スターターの他にセカンドスターターを添加するチーズがある。pHおよび熟成率が高かったカマンベールチーズ、ブルーチーズおよびボンレヴェックチーズは、それぞれ *Penicillium camanberti*、*Penicillium roqueforti*、*Brevibacterium linens*などの微生物がセカンドスターターとして用いられる。これら微生物は、乳酸菌よりもいずれも強いタンパク質分解性を持つため、本章で用いた他のチーズに比較し、熟成中の乳タンパク質の分解によるペプチドやアミノ酸などの水溶性窒素が増加しているものと考えられる。エメンタールチーズおよびグリュイエールチーズのセカンドスターターとして用いられているプロピオン酸菌については、炭水化物分解性はあるものの、タンパク質分解性はきわめて低いことから、乳酸菌熟成タイプのチーズと同様に、pHおよび熟成率が低かったと考えられる。

3-2 各種ナチュラルチーズの抗変異原性

チーズの種類による抗変異原性の相違をみるために、微生物による熟成タイプの異なるチーズについて抗変異原性の検索を行った。各種ナチュラルチーズのTrp-P1に対する抗変異原性試験は、チーズ懸濁液量50、150、250、350

Table 2-2 General characteristics of cheeses (n=4)

	Mould-ripened cheeses		Lactic acid bacteria-ripened cheeses					Propionic acid bacteria-ripened cheeses		<i>Brevibacterium</i> - ripened cheese
	Camembert cheese	Blue cheese	Cheddar cheese	Gouda cheese	Edam cheese	Parmesan cheese	Emmental cheese	Gruyere cheese	Pont-l'Eveque cheese	
pH	6.60	6.64	5.48	5.69	5.04	5.54	5.28	5.26	7.65	
Lactic acidity (%)	0.84	1.28	1.02	1.160	1.82	1.72	1.11	1.07	0.76	
Ripening index (%)*	77.4	51.3	27.1	28.9	27.3	24.5	26.5	30.2	63.3	

* Ripening index(%) means water soluble N as % of Total N

μl について行った。Fig. 2-2 に、微生物熟成タイプ別チーズの抗変異原性を示した。いずれのチーズにおいても抗変異原性が現われ、チーズ懸濁液量の増加にともない抗変異原性も上昇した。また、微生物熟成タイプによる抗変異原性活性の相違もみられた。かび熟成タイプであるカマンベールチーズおよびブルーチーズが最も強い抗変異原性を示し、チーズ懸濁液量の増加にともない、著しい上昇を示した。すなわち、カマンベールチーズでは、チーズ懸濁液量が $150\ \mu\text{l}$ 、ブルーチーズではチーズ懸濁液量が $250\ \mu\text{l}$ で100%の抗変異原性を示し、他のチーズと比較し低いチーズ濃度でも強い抗変異原性を示した。次に、プレバクテリウム菌熟成タイプであるポンレヴェックチーズおよびプロピオン酸菌熟成タイプであるエメンタールチーズおよびグリィエールチーズの抗変異原性が強く、チーズ懸濁液量 $350\ \mu\text{l}$ では、それぞれ抗変異原性が93.0、89.3、100.0%であった。乳酸菌熟成タイプのチーズであるゴータチーズ、チェダーチーズ、エダムチーズおよびパルメザンチーズの抗変異原性は、チーズ懸濁液量の増加にともなう抗変異原性の変化は緩やかではあったものの、チーズ懸濁液量 $350\ \mu\text{l}$ では、それぞれ抗変異原性が64.6、69.8、61.1、74.7%と高い値を示した。

カマンベールチーズ、ブルーチーズ、ポンレヴェックチーズ、エメンタールチーズおよびグリィエールチーズが、ゴータチーズ、チェダーチーズ、エダムチーズおよびパルメザンチーズよりも高い抗変異原性を示しことは、チーズ製造に用いられている乳酸菌スターターと、白かび、青かび、*Brevibacterium*、プロピオン酸菌などのセカンドスターターの相互作用によるものではないかと考えられる。これら微生物は、チーズ熟成中に、それぞれのチーズの異なる製造条件下で、様々な異なる代謝産物を生成する。そのため、熟成に伴う抗変異原性の出現は、実験的にも理論的にも、非常に複雑な現象といえる。Hosonoらは、インドネシアの発酵乳から分離された*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*,

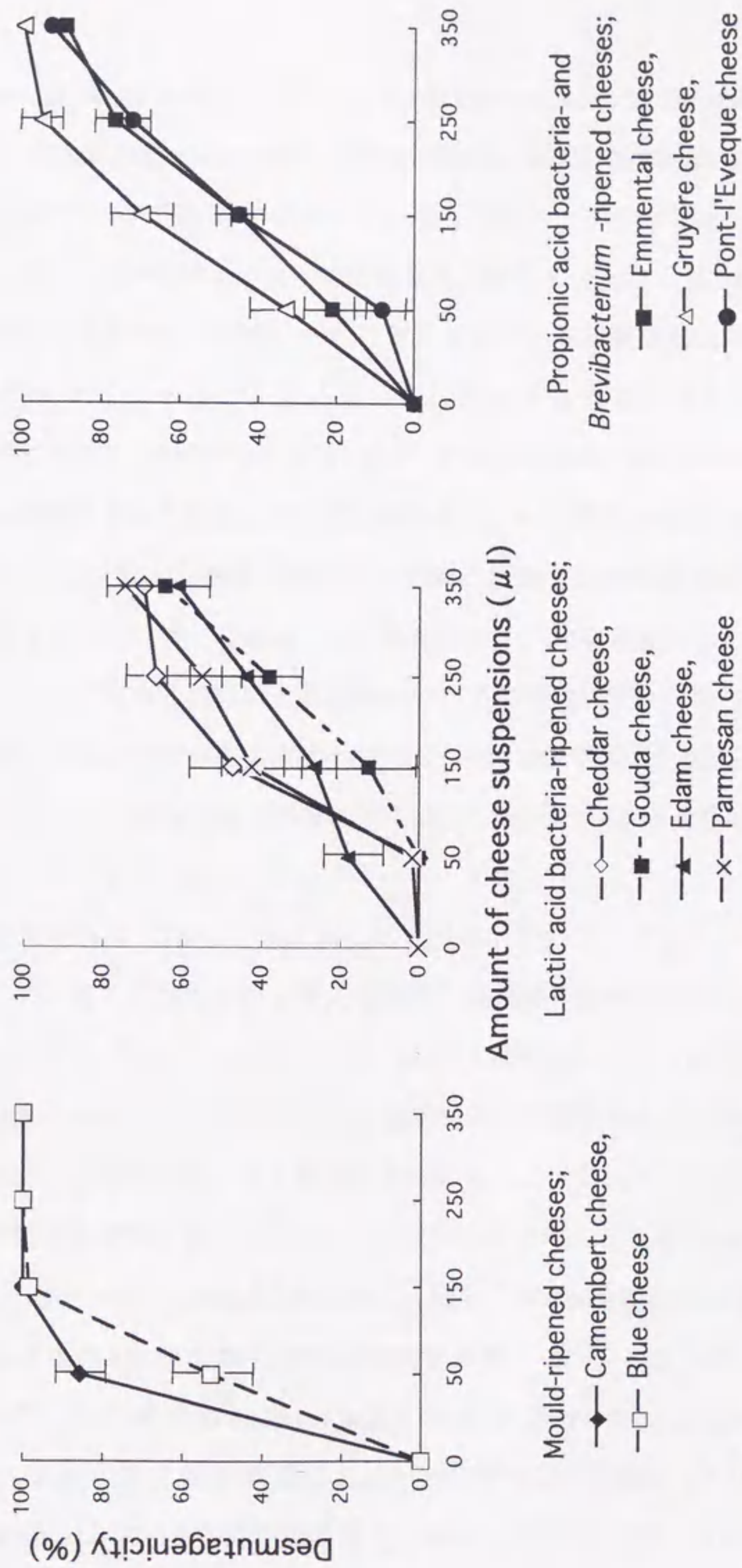


Fig. 2-2 Dose response of desmutagenicity of cheese suspensions to Trp-P-1 on *Salmonella typhimurium* SD510 (n=4)

Lactococcus lactis subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* の菌体(54)および *Streptococcus thermophilus* で発酵させた発酵乳の抗変異原性(44)についての報告をしている。また、Nadathurら(84)は、*Lactobacillus helveticus* によって発酵した発酵乳のアセトン抽出画分の抗変異原性について報告している。これら報告されている乳酸菌は、いずれもチーズ製造にスターターとしてよく用いられている乳酸菌である。さらに、Hosonoら(55)は、Trp-P-1およびTrp-P-2に対する *Brevibacterium linens* の生成する菌体を含めた粘性物質の抗変異原性について報告しており、Vorojevaら(134)は、プロピオン酸菌の菌体の分子量の異なる透析物質の抗変異原性についての報告をしている。このように、乳酸菌およびその発酵乳と、セカンドスターターとして用いられている微生物についての抗変異原性の報告があることから、セカンドスターターを用い製造されたチーズの高い抗変異原性は、乳酸菌とセカンドスターターの併用が高い抗変異原性を示す一つの要因であると考えられる。

また、カマンベールチーズ、ブルーチーズおよびボンレヴェックチーズの強い抗変異原性は、Table 2-2に示したような、他のチーズより高い熟成率とも関与しているのではないかと考えられる。熟成率の測定基準となる水溶性窒素は、カゼインなどの乳タンパク質が、乳酸菌、白かび、青かび、*Brevibacterium*、プロピオン酸菌または酵母などの微生物から生産される酵素により熟成中に分解されることにより生成する。この熟成による水溶性窒素量の増加が抗変異原性に関与しているのではないかと考えられる。van Boekelら(132)は、カゼインのbenzo[a]pyrene (B[a]P)、N-metylnitrosourea および nitrosated 4-chloroindole に対する抗変異原性、ペプシンで加水分解を行ったカゼインの分解物のsodium azide および N-nitroquinoline-1-oxide (4NQO) に対する抗変異原性を *Salmonella typhimurium* TA100 または *Escherichia coli* K-12-343を指標菌とし報告している。また、Bosselaersら

(16)は、カゼインおよびそのペプシンによる加水分解物が1-methyl-nitroso-3-nitroguanidine (MNNG)に対する抑制作用があることを明らかにした。さらに、Abdelali (1)らは、ペプシンによる加水分解生成物の増加にともなうカゼインの抗変異原性活性はペプチドの形成によるものであると報告している。これら報告からも、カゼインの分解物が抗変異原性を示す要因の一つであると判断できる。一方、チェダーチーズ、ゴーダチーズ、エダムチーズおよびパルメザンチーズは、他のチーズに比較し熟成率は低いが抗変異原性を示している。乳製品の主要成分であるカゼインの抗変異原性については、ニトロソ化合物(12,132)やコショウの抽出物(50)に対する抗変異原性について報告されていることから、カゼインにも何らかの抗変異原作用があると考えられる。このように、チーズの抗変異原性は、チーズの熟成に関与している様々な微生物、それらが生成する酵素、さらにカゼインおよびカゼインから生成される低分子ペプチドおよびアミノ酸などのタンパク質分解物が関与していると推測できる。

3-3 市販カマンベールチーズの部位別の熟成率

そこで、熟成による乳タンパク質の分解物が抗変異原性に関与しているかどうか知るために、表面熟成タイプであるカマンベールチーズを取り上げ、検索を行った。まず、熟成の進度を確認するために、カマンベールチーズの部位別の熟成率を測定した。その結果をFig. 2-3に示した。内部、外部、全体の熟成率は、それぞれ57.3%、85.0%、77.4%であり、内部の熟成率が最も低く、外部の熟成率がもっとも高い値を示した。Table 2-3は、カマンベールチーズの部位別の白かびの菌数を示している。外部では 53.2×10^5 CFU/g、内部では 15.0×10^2 CFU/gであり、外部の白かび菌数が圧倒的に多かった。これらのことから、チーズ表面に生育した白かびによる熟成が、表面から進んでおり、タ

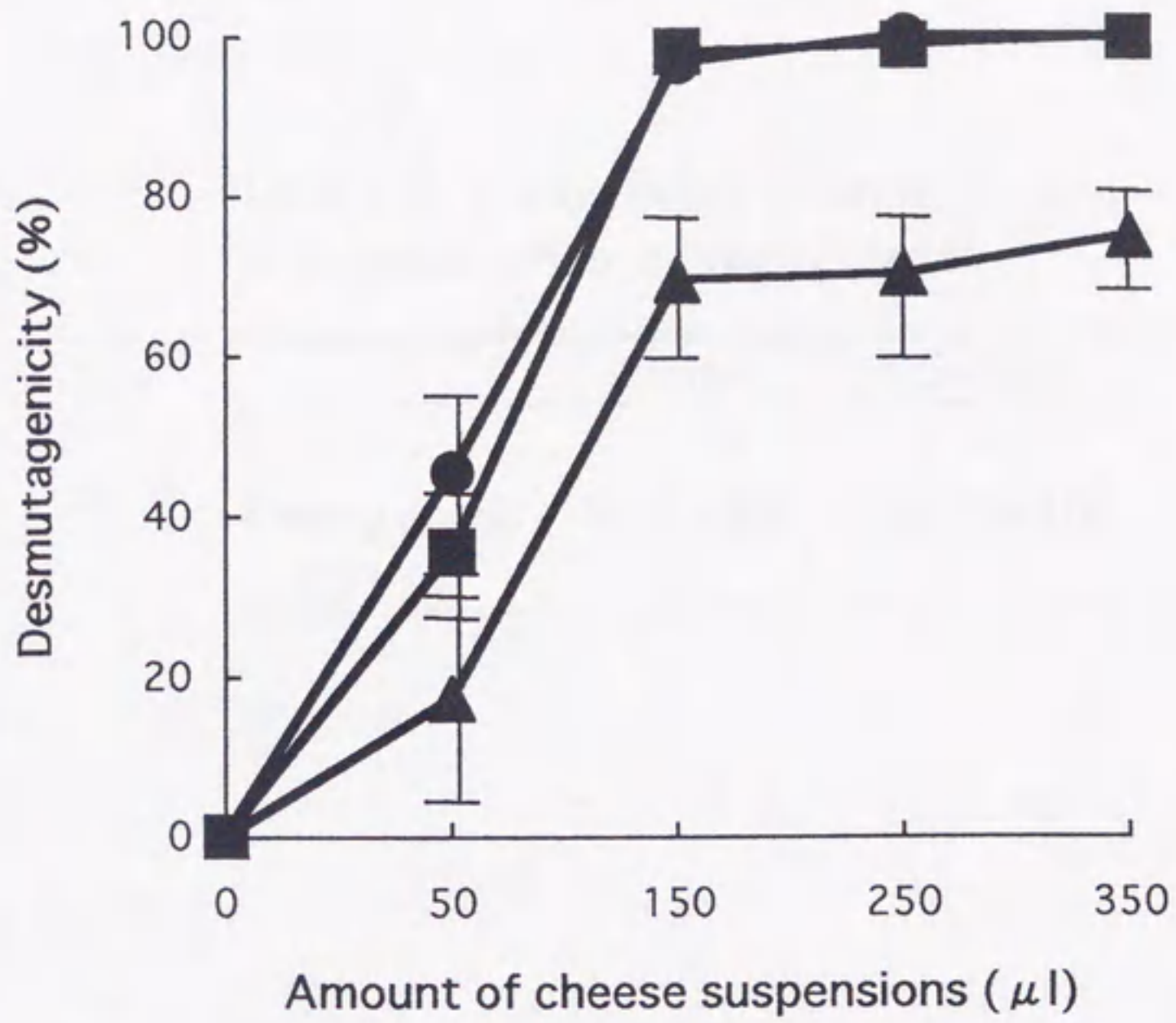


Fig. 2-3 Dose response of desmutagenicity of the divisions of cheese suspensions (n=4):
 ▲, center; ■, surface; ●, whole.

Table 2-3 Colony count of white mould
of divisions of Camembert cheese

	Center	Surface
Colony count (CFU/g)	15.0×10^2	53.2×10^5

ンパク質分解物が内部より外部に多いことが確認できた。

3-4 市販カマンベールチーズの部位別の抗変異原性

次に、カマンベールチーズの部位別の抗変異原性の検索を行った。市販カマンベールチーズのチーズ懸濁液量にともなう抗変異原性の変化をFig. 2-4に示した。表面および全体は、抗変異原性の値に顕著な差はみられず、いずれも高い値を示した。内部は、表面および全体の抗変異原性に比較し、低い値を示した。熟成率の結果を合わせると、熟成率が高いと抗変異原性も高くなった。これは、本節 3-2でも示した各種ナチュラルチーズの抗変異原性と熟成率の結果と類似しており、つまり、乳タンパク質が分解され生じた水溶性窒素化合物量が抗変異原性の活性を高める大きな一つの要因と判断した。

一方、熟成率が低かった内部においても、抗変異原性が57.3%と抗変異原性の活性を示している。これは、酵素による作用を受けなかったカゼインにも抗変異原性があると考えられる。この結果も、市販ナチュラルチーズの中の、乳酸菌熟成タイプのチーズの低い熟成率と高い抗変異原性を示した結果に類似している。カゼインについては、前述(12,50,132)の抗変異原性活性の他に、Yoshidaら(136)によりホールカゼイン、 α_s -カゼイン、 β -カゼインおよび κ -カゼインの Trp-P-1、Trp-P-2 (3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole) および Glu-P-1 (2-amino-6-methyldipyrido[1,2-a:3',2'-d]imidazole) に対する強い吸着作用があることが報告されている。このことから、カゼインにも、変異原物質の変異原性を減弱させる作用があると考えられる。

3-5 市販カマンベールチーズの加熱処理後の抗変異原性

カマンベールチーズには、表面に白かびが一面に生育している。前述のカ

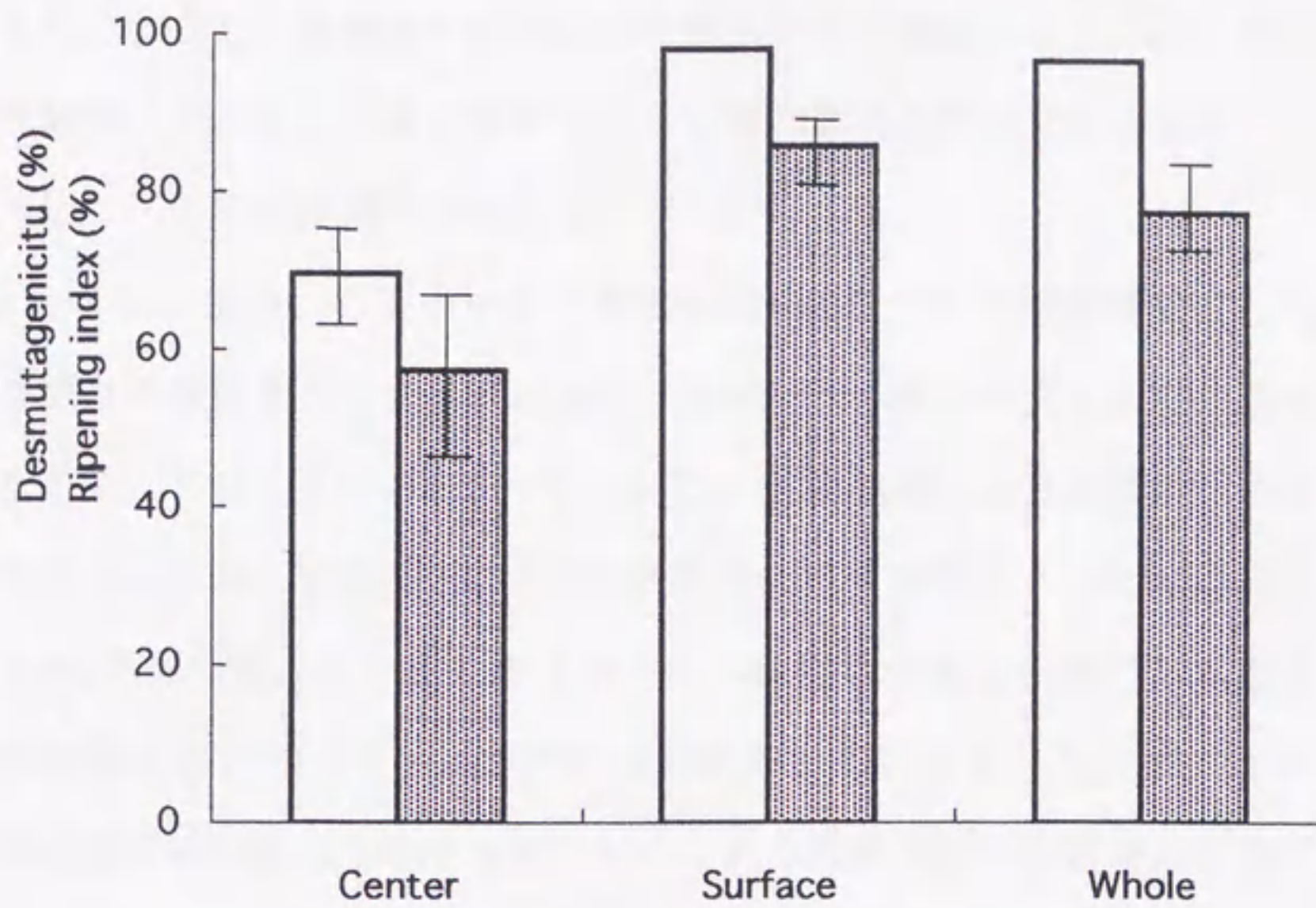


Fig. 2-4 Desmutagenicity (□) and ripening index* (▨) of the divisions of Camembert cheese (n=4).

* Ripening index (%) means soluble N as % of Total N

マンベールチーズの部位別の抗変異原性試験では、表面が最も強い高変異原性を示していた。そこで、その白かびが強い抗変異原性の要因であるかどうか確認するために、また、乳酸菌や諸酵素の影響も併せて確認するために、白かびおよび乳酸菌、またこれら微生物が生産した諸酵素を不活化させたカマンベールチーズについて抗変異原性の検索を行った。

Fig. 2-5 に、部位別の生チーズと加熱処理後のチーズの懸濁液量にともなう抗変異原性の変化を示した。表面および全体では、生チーズと加熱処理後のチーズとの間に有意な差はみられず($P < 0.05$)、加熱処理による影響は認められなかったが、内部は、加熱処理により抗変異原性が有意に低下した($P < 0.05$)。

Hosonoら(50)は、コショウのエタノール抽出液の変異原性に対するカゼインの抗変異原性について、121℃で15分間の加熱処理をしたカゼインは、100℃で30分間の加熱処理を行ったカゼインより抗変異原性が低下しており、これはカゼインの熱による変性が原因であろうと報告している。また、van Boekelら(132)および Bosselaersら(16)は、カゼインのペプシンによる分解作用を受け生成したペプチドは、カゼインよりも抗変異原性が強くなっていると報告している。これらのことから、内部の抗変異原性が加熱処理により低下したことは、まだ熟成による酵素作用を受けずに残っていたカゼインが、加熱により変性したためではないかと考えられる。また、外部および全体の抗変異原性に加熱による変化が見られなかったことは、熟成中の酵素作用により生成したカゼインの分解物、つまり水溶性窒素が多いためと考えられる。

しかしながら、加熱処理により低下した内部の抗変異原性は、62.3% (チーズ懸濁液350 μ lの場合) とかならずしも低い値とはいえない。van Boekelら(132)は、130℃で20分間の加熱処理を行ったカゼインには、未加熱のカゼインと抗変異原性に変化はなく、このことは加熱によりカゼイン分子に脱リン酸や加水分解が起るためと報告している。内部の加熱処理により著しい抗変異原性

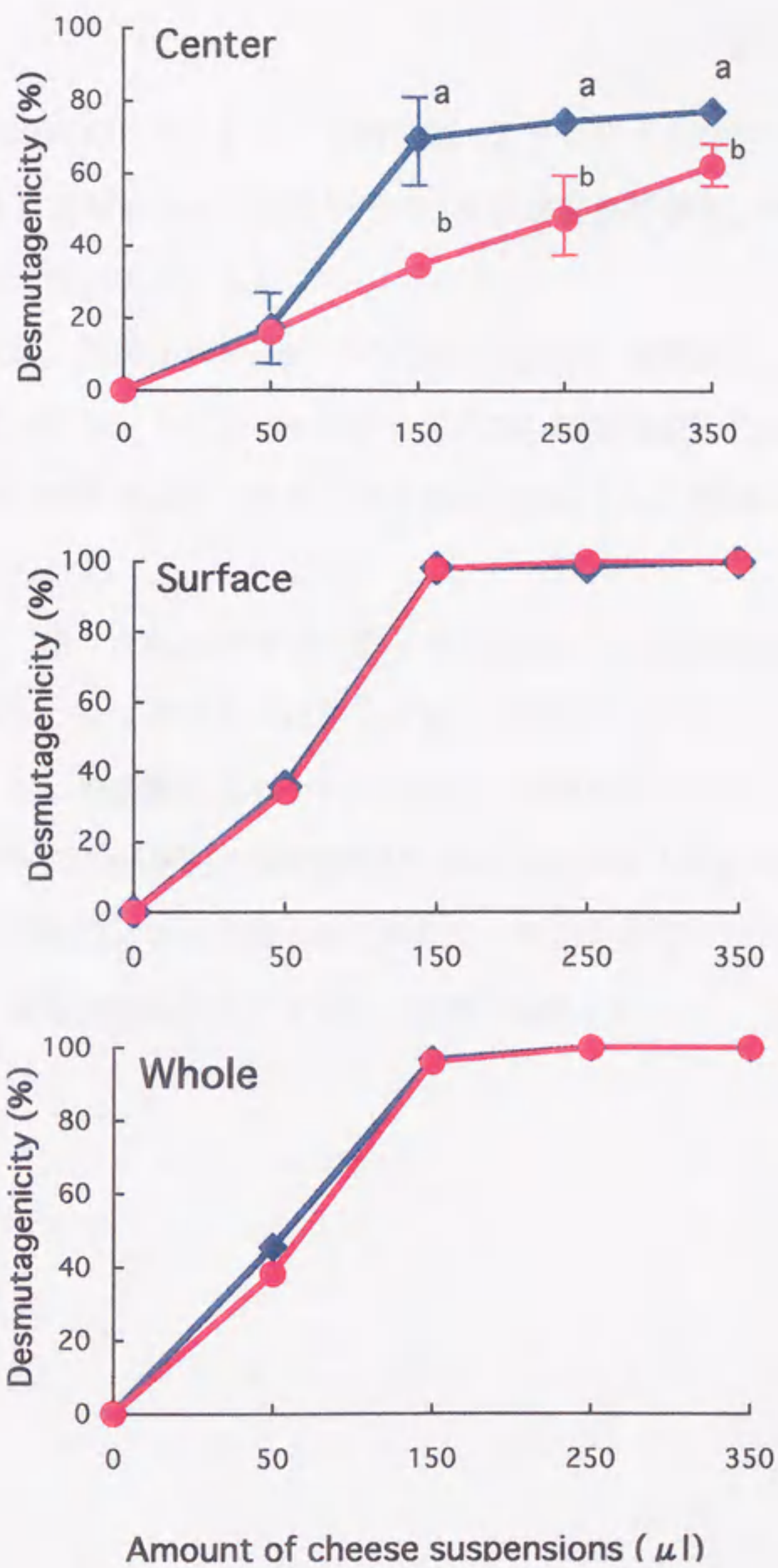


Fig. 2-5 Dose response of desmutagenicity of Camembert cheese suspensions to Trp-P-1 on *Salmonella typhimurium* SD510 (n=4):

●, sterilized cheese; ◆, raw cheese

^{a,b}Means with different letters differ ($P < 0.05$)

の低下がみられなかったことは、加熱処理によりカゼインの変性が起った一方で、加熱によりカゼインから遊離したペプチドが変異原物質に作用したためではないかと考えられる。

以上の結果、カマンベールチーズの加熱による抗変異原性の低下はほとんどなかったことから、カマンベールチーズの強い抗変異原活性は白かびと乳酸菌の菌体および諸酵素以外の乳タンパク質をはじめとした諸成分による作用が大きいと考えられた。

本章では、様々な熟成タイプのチーズのTrp-P-1に対する抗変異原性について検索を行い、全てのチーズにおいて強い抗変異原性があるという結果が得られた。とくに、熟成率が高いチーズに強い抗変異原性が示された。また、カマンベールチーズの部位別の抗変異原性も熟成率が高い外部の抗変異原性が強く、さらに加熱処理による影響もみられなかったことからチーズの抗変異原性は乳タンパク質の分解物が大きな要因であると判断した。

第4節 要 約

Salmonella typhimurium TA98から造成されたストレプトマイシン依存株SD510株のTrp-P-1の変異原性に対する各種市販チーズの抗変異原性、カマンベールチーズの部位別の抗変異原性および加熱処理による抗変異原性の変化について検索を行った。

その結果、全てのチーズに抗変異原活性が現われたが、微生物熟成タイプにより差がみられた。つまり、乳酸菌熟成タイプのチーズであるゴータチーズ、チェダーチーズ、エダムチーズおよびパルメザンチーズに比較し、かび熟成タイプのチーズのカマンベールチーズおよびブルーチーズ、プロピオン酸菌熟成タイプのチーズのエメンタールチーズおよびグリュイエールチーズ、*Brevibacterium*による熟成タイプのチーズのポンレヴェックチーズが高い抗変異原性を示した。とくに、カマンベールチーズが最も強い抗変異原性を示した。カマンベールチーズ、ブルーチーズおよびポンレヴェックチーズの強い抗変異原性は、それらの高い熟成率と関与しており、熟成により生成される水溶性窒素化合物が強い抗変異原性の要因の一つと考えられた。また、乳酸菌熟成タイプ以外のチーズに強い抗変異原性が現われたことは、スターターとして、乳酸菌の他にセカンドスターターを用いているためと考えられた。

次に、熟成率と抗変異原性との関与を検索するために、表面熟成タイプのカマンベールチーズについて部位別の抗変異原性の検索を行った結果、熟成率が低い内部に比較し、熟成率が高い外部の抗変異原性が強かった。

さらに、白かびの影響を検索するために、加熱処理をした部位別のカマンベールチーズについて抗変異原性の検索を行った結果、加熱処理による抗変異原性の著しい変化はみられなかった。

これらのことから、チーズの強い抗変異原性は、チーズ製造にスターターとして用いられた乳酸菌およびセカンドスターターの代謝によって生成される

乳タンパク質の分解物によるものが大きな要因であると考えられた。

第3章 カマンベールチーズの熟成にともなう抗変異原性の変化に関する研究

第1節 緒言

カマンベールチーズは、わが国で販売されている主なナチュラルチーズの中で最も販売量が多く(92)、チーズの中で最も人気の高いチーズといえる。しかし、緒論でも述べたように、チーズと同じ乳製品である発酵乳には多くの生理機能についての報告がされており、とくに抗変異原性についてはHosonoらにより多くの有用性が確認されているが、チーズの抗変異原性の報告は、Jongenら(61)によるゴータチーズの抗変異原性の報告しかされておらず、カマンベールチーズについては全くない。カマンベールチーズは、前述したように、わが国で最も販売量が多いナチュラルチーズであり、近年、欧米の食生活に近づき、癌をはじめとする成人病で死亡する人が増加している中、カマンベールチーズが、肉や高脂肪食の代わりに機能性食品として果たす役割は大きくなると考えられる。そこで、本章では、カマンベールチーズについて、とくに熟成中の抗変異原性の変化について検索を行った。

第1章でカマンベールチーズ熟成中に低分子ペプチドが増加することを明らかにし、第2章では、各種ナチュラルチーズの熟成率と抗変異原性とに相関関係があることを明らかにした。しかし、カゼインの分解物の抗変異原性に関する報告(16)はあるものの、熟成中におけるカゼインから生成された水溶性窒素化合物の増加が抗変異原性にどのように影響を与えるかはわかっていない。第2章の結果からも、水溶性窒素化合物の抗変異原性への影響は大きいと考えられる。乳タンパク質由来のペプチドの生理活性がいくつか報告(18,74,99)されていることから、熟成とともにチーズ中に増加する水溶性窒素化合物にも何らかの生理活性があると考えられる。近年、熟成させるタイプのナチュラルチーズの人気の高まる中で、熟成中の抗変異原性の変化を知ることは、ナチュ

ラルチーズの価値を高める上でも重要なことであり、また、チーズの複雑な熟成現象を解明する一つの手がかりになると考えられる。

そこで、本章では、カマンベールチーズを製造し、熟成にともなう抗変異原性と熟成率の変化について検索を行った。抗変異原性試験としては、指標菌として *Salmonella typhimurium* TA98株から造成したストレプトマイシン依存株 SD510 を用い、変異原物質としては Trp-P-1 (3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole) および Trp-P-2 (3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole) を用いた。

第2節 実験方法

2-1 試料

供試試料には、第1章2-1と同様の方法で製造したカマンベールチーズを用いた。

2-2 化学組成の分析

化学組成としては、全固形分、タンパク質、脂質、塩分、pH、乳酸酸度、熟成率、白かび菌数および乳酸菌菌数の測定を行った。

2-2-1) 全固形分の定量

第1章2-2-1)と同様の方法で行った。

2-2-2) タンパク質の定量

第1章2-2-2)と同様の方法で行った。

2-2-3) 脂肪の定量

第1章2-2-3)と同様の方法で行った。

2-2-4) 塩分の定量

第1章2-2-5)と同様の方法で行った。

2-2-5) pH測定

第1章2-2-6)と同様の方法で行った。

2-2-6) 乳酸酸度測定

第1章2-2-7)と同様の方法で行った。

2-2-7) 熟成率の測定

第1章 2-4)と同様の方法で行った。

2-2-8) 白かびの菌数測定

第2章 2-2-4)と同様の方法で行った。

2-2-9) 乳酸菌菌数測定 (94)

供試試料は、10gを滅菌生理食塩水で10倍に希釈し、この希釈液をさらに滅菌生理食塩水で適当な倍率に希釈した。各希釈倍率の希釈液1mlとBCP加プレートカウント寒天培地をシャーレ中で混合し、37℃で3日間培養した。出現したコロニーの中で、周りが黄色く変色したコロニーのコロニー数を計測し、供試試料1g中の菌数を求めた。BCP加プレートカウント寒天培地は、BCP加プレートカウント寒天培地（栄研）24.6gに1000mlの蒸留水を加え121℃で15分間滅菌後、45℃位まで冷却し用いた。

2-3 抗変異原性試験

2-3-1) 供試試料の調製

チーズは、0.5、1、2、10%となるように、蒸留水を加え、ホモジナイザーで攪拌し、懸濁液とした。

2-3-2) 供試試料の部位別分類方法

供試試料の部位別分類は、第2章 2-4-1)と同様の方法で行った。

2-3-3) 変異原物質

変異原物質には、アミノ酸加熱分解物から分離されたTrp-P-1 および

Trp-P-2を用いた。Trp-P-1およびTrp-P-2は、2mg/mlとなるように蒸留水を加え水溶液に調製した。

2-3-4) 指標菌

抗変異原性を検索するための指標菌として、第2章 2-3-3)と同様の *Salmonella typhimurium* TA98から造成されたストレプトマイシン依存株 SD510 株を用いた。

2-3-5) 培地

培地はSM liquid、SM agar、OX agar を用い、第2章 2-3-4)と同様に調製した。ただし、Top agarは次に示すように調製した。

Top agar

粉末寒天0.5g、NUTRIENT BROTH No.2 2.5gを蒸留水100 mlに溶解し、オートクレーブで滅菌した。

2-3-6) 指標菌の培養

第2章 2-3-6)-①と同様の方法で行った。

2-3-7) 抗変異原性試験

抗変異原性試験は、Maron and Ames(76)の方法に準じ、スポット法およびプレートインコーポレーション法で行った。スポット法は、第2章 2-3-6)と同様の方法で行った。プレートインコーポレーション法は、Trp-P-1水溶液(2mg/ml)30 μ lまたはTrp-P-2(2mg/ml)60 μ l、10%供試試料懸濁液100 μ lおよび蒸留水を全量が900 μ lとなるように加え滅菌試験管内で混合し、37℃で30分間のプレインキュベーションを行った。プレインキュベーション後、フィ

ルター (0.45 μ m、富士フィルム) で滅菌ろ過した。このろ液900 μ lと前項で培養したSD510株をリン酸バッファー(pH6.98)で 10^4 倍に希釈した培養液100 μ lおよび top agar 2mlを混合後、すみやかにOX 寒天培地に流し込んだ。この混合液の凝固後、37°Cで48時間培養した。培養終了後、第2章2-3-6)-②に示した計算式により抗変異原性を求めた。

第3節 結果および考察

3-1 化学組成

熟成前のグリーンチーズの化学組成をTable 3-1 に示した。すなわち、全固形分49.60%、タンパク質21.15%、脂質21.71%、灰分3.52%、塩分1.34%、pH4.92、乳酸酸度1.88%であり、第1章で製造したチーズと極めて類似した値であった。

次に、カマンベールチーズの熟成中のpH、乳酸酸度、熟成率、*Penicillium candidum* 菌数および乳酸菌菌数の変化について検索を行い、その結果をFig. 3-1 に示した。pHおよび乳酸酸度の変化も、第1章の結果と類似した傾向を示した。pH、熟成率および*Penicillium candidum* の菌数は、熟成とともに上昇した。乳酸菌菌数も類似の傾向を示したが、熟成3週目以降はほとんど増加はみられなかった。一方、乳酸酸度は減少した。

熟成1週目以降からpH、熟成率、*Penicillium candidum* 菌数の急激な上昇および乳酸酸度の減少がみられたことは、熟成1週目以降から、*Penicillium candidum* により生成されるタンパク質分解酵素による乳タンパク質の分解が顕著に行われはじめたことを示している。高藤(122)は、カマンベールチーズの熟成開始から10日以降が、カマンベールチーズ製造に用いられる*Penicillium camemberti* および *Penicillium caseicolum* から精製したタンパク質分解酵素の作用しやすいpH条件であることを報告している。チーズの製造条件にとって、タンパク質分解の速度は異なるが、本研究で製造したカマンベールチーズも、熟成1週目以降に、*Penicillium candidum* が増加しやすく、またその増加とともに生成されるタンパク質分解酵素が作用しやすいpHになったために、急激な熟成率の上昇がみられたのではないかと考えられる。

熟成によるpHの上昇は、乳タンパク質が乳酸菌および*Penicillium candidum* から生成される酵素の作用を受けることにより生成した水溶性窒素

Table 3-1 Compositional characteristics of Camembert cheese curd before ripening
(average, n=6)

Total solids (g/100g)	Protein (g/100g)	Fat (g/100g)	Ash (g/100g)	Sodium chloride (g/100g)	pH	Lactic acid (g/100g)
49.60	21.15	21.71	3.52	1.34	4.92	1.88

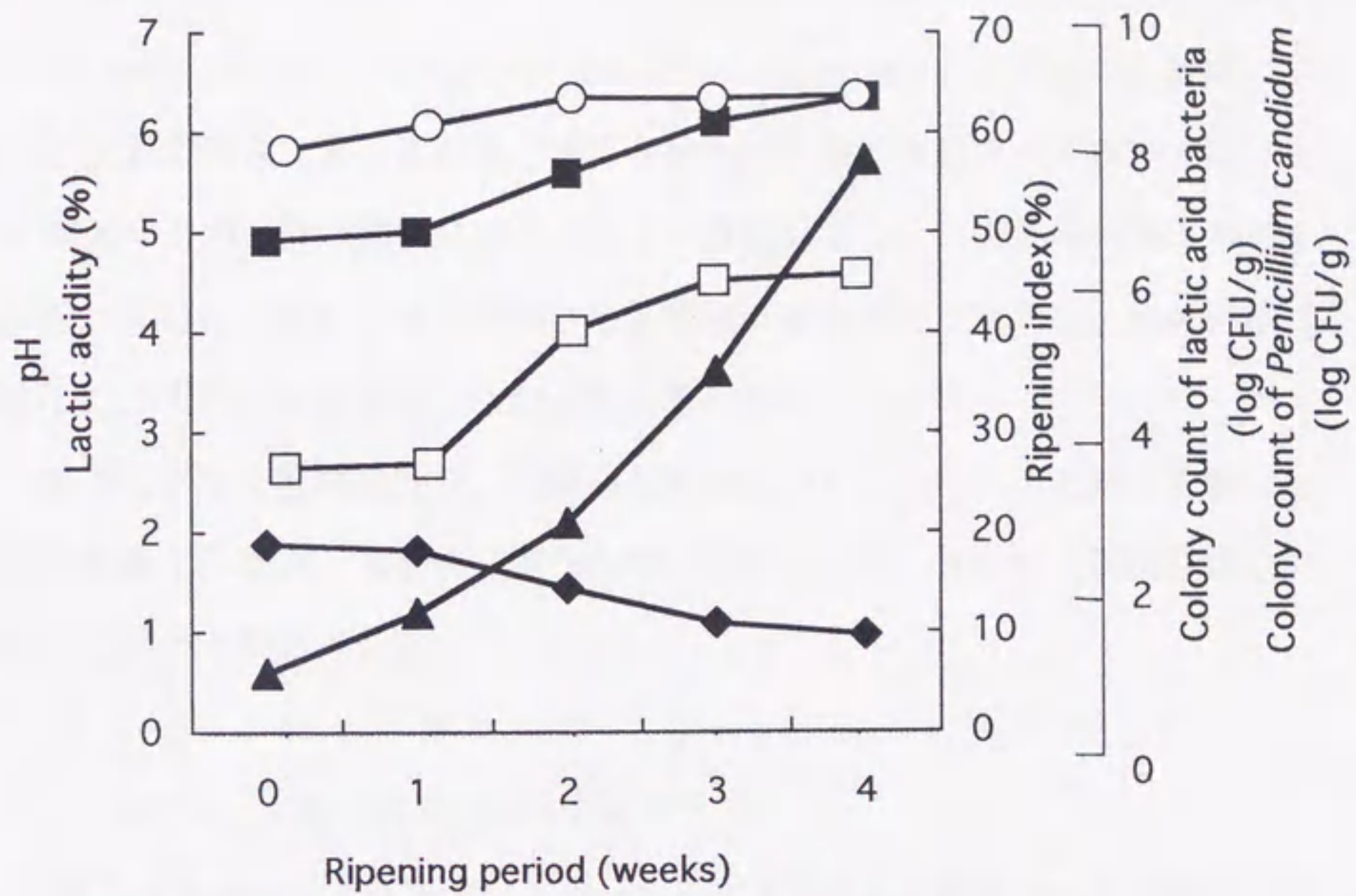


Fig. 3-1 Changes in the general characteristics of Camembert cheese during ripening (n=6):

■, pH; ◆, lactic acid; ▲, ripening index*;
 ○, lactic acid bacteria; □, *Penicillium candidum*.

*Ripening index (%) means soluble N as % of Total N

化合物の増加がpHを上昇させていると判断した。

また、乳酸菌菌数が熟成3週目以降、顕著な増加を示さなかったことは、本章で乳酸菌スターターとして用いた *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* および *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* の4種の乳酸菌は、いずれも乳酸球菌であったためと考えられる。乳酸球菌はチーズ製造工程において増殖するが、熟成期間にはいるとその数は減少し、一方乳酸桿菌は増加する(26)。このことから、本章で用いた乳酸菌は球菌であったため、熟成初期は増加したがそれ以降は増加しなかったと考えられる。

減少を示した乳酸酸度は、乳酸菌菌数が減少していないことから乳酸の生成は行われていたが、水溶性窒素化合物の増加により、見かけ上乳酸酸度の減少がみられたと判断できる。

3-2 熟成にともなう抗変異原性の変化

第2章において、市販カマンベールチーズの抗変異原性は、抗変異原性試験に用いたチーズ懸濁液のチーズ濃度が2%でもチーズ懸濁液量350 μ lにおいて100%と高い抗変異原性を示していた。そこで、熟成にともなう抗変異原性の明確な変化をみるために、チーズ濃度2%の他に、チーズ濃度1%と0.5%についても抗変異原性試験を行った。プレインキュベーションは行わなかった。Fig. 3-2は、熟成にともなうチーズ濃度の違いによる抗変異原性の変化を示している。チーズ濃度2%では、熟成開始直後から抗変異原性91.1%を示し、熟成1、2、3、4週目では、それぞれ99.7、99.8、100、100%と著しく高い抗変異原性を示し、また、熟成による抗変異原性の顕著な変化はみられなかった。チーズ懸濁液1%では、熟成開始直後で抗変異原性18.1%を示し、熟成1、2、3、4週目では、それぞれ35.6、49.5、60.4、64.4%の抗変異原性を示し、

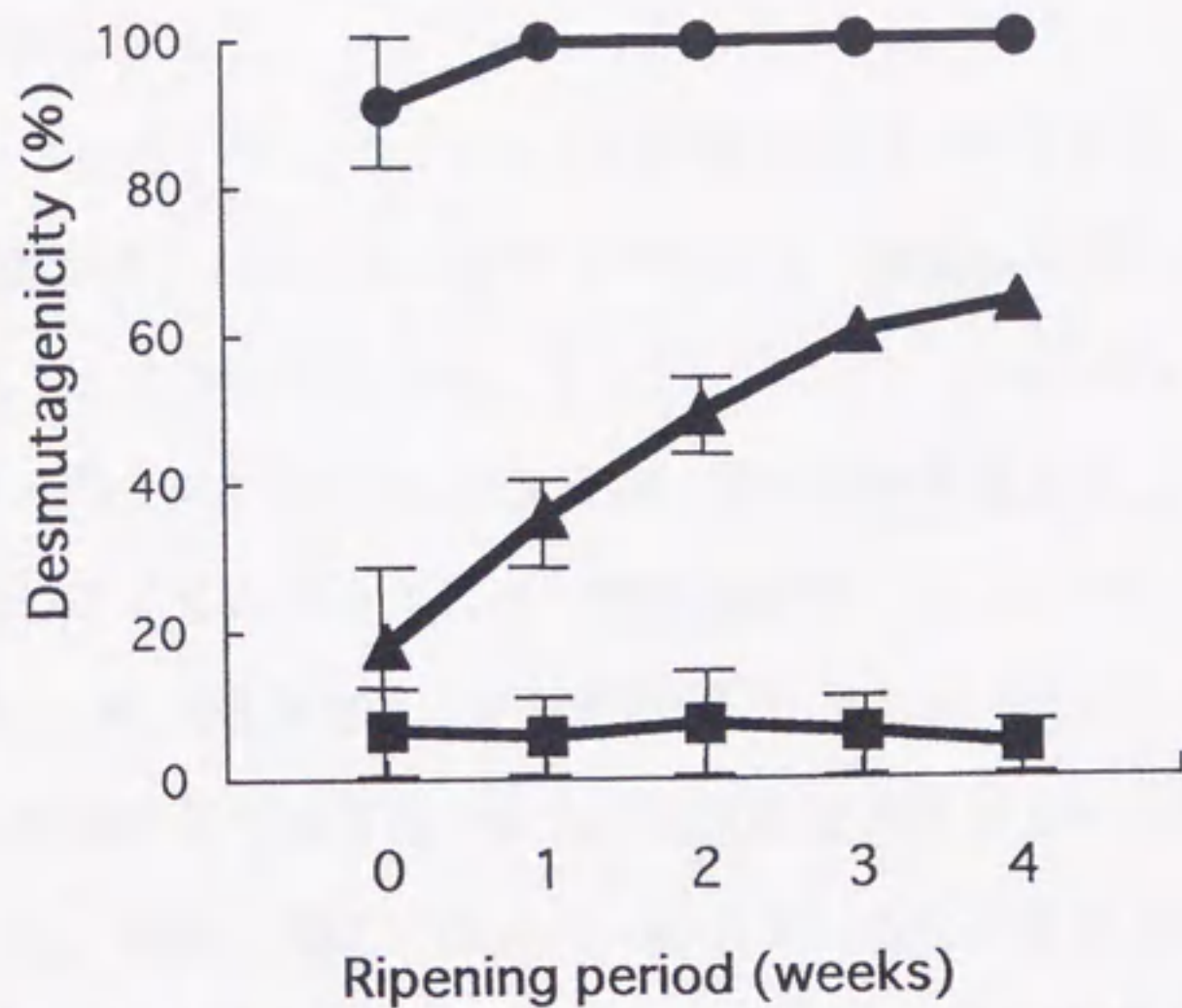


Fig. 3-2 Changes in the desmutagenicity of Camembert cheese during ripening to Trp-P-1 on *Salmonella typhimurium* SD510 by the cheese suspension (average, n=6) : ●,2%; ▲,1%; ■,0.5%.

熟成にともなう明確な抗変異原性の上昇が示された。チーズ濃度0.5%では、抗変異原性の値がいずれの熟成期間においても低く、熟成による抗変異原性の変化は見られなかった。

次に、ブレインキュベーションの影響について検索を行った。Table 3-2は、熟成期間別チーズのブレインキュベーション時間の影響を示しているおり、チーズ濃度2%について行った。ブレインキュベーションは、0、30、60、90分間行った。Fig. 3-1でも示したように、熟成開始直後では、ブレインキュベーションを行わなくても91.1%の高い抗変異原性を示し、ブレインキュベーション時間が30、60、90分では、それぞれ93.2、96.5、98.3%と、ブレインキュベーション時間が長くなるにつれ徐々に抗変異原性が上昇したが、顕著な変化ではなかった。熟成1週間では99.7~99.9%、熟成2週目では99.2~99.9%、熟成3週目では99.3~100%、熟成4週目では全てのブレインキュベーション時間において100%を示し、ブレインキュベーション時間による相違はみられず、チーズ懸濁液とTrp-P-1混合直後から抗変異原性が発現していることがわかった。

次に、熟成にともなう抗変異原性と熟成率の変化について検索を行った。すでに、Fig. 3-2において熟成にともない抗変異原性が強くなることは述べたが、その強い抗変異原性を発現させる要因は明らかにされていない。しかし、第2章において、熟成率が高いチーズに強い抗変異原性活性があったことから、本研究で製造したカマンベールチーズにおいても、熟成により上昇する熟成率が抗変異原性の発現に関与していると考えられる。Fig. 3-3は、熟成にともなう抗変異原性と熟成率の変化について示している。チーズ濃度は1%について示した。熟成が進むにつれ、熟成率とともに抗変異原性も上昇し、熟成率が抗変異原性の発現に強く関与していることが確認することができた。つまり、熟成による水溶性窒素の増加が抗変異原性活性を高めていると判断できる。さら

Table 3-2 Effect of incubation time and ripening periods on the desmutagenicity of Camembert cheese to Trp-P-1 on *Salmonella typhimurium* SD510 (n=6)

Preincubation time (min)	Desmutagenicity (%)				
	Ripening period (weeks)				
	0	1	2	3	4
0	91.1	99.7	99.8	100	100
30	93.2	99.8	99.9	99.3	100
60	96.5	99.8	99.2	100	100
90	98.3	99.9	99.6	100	100

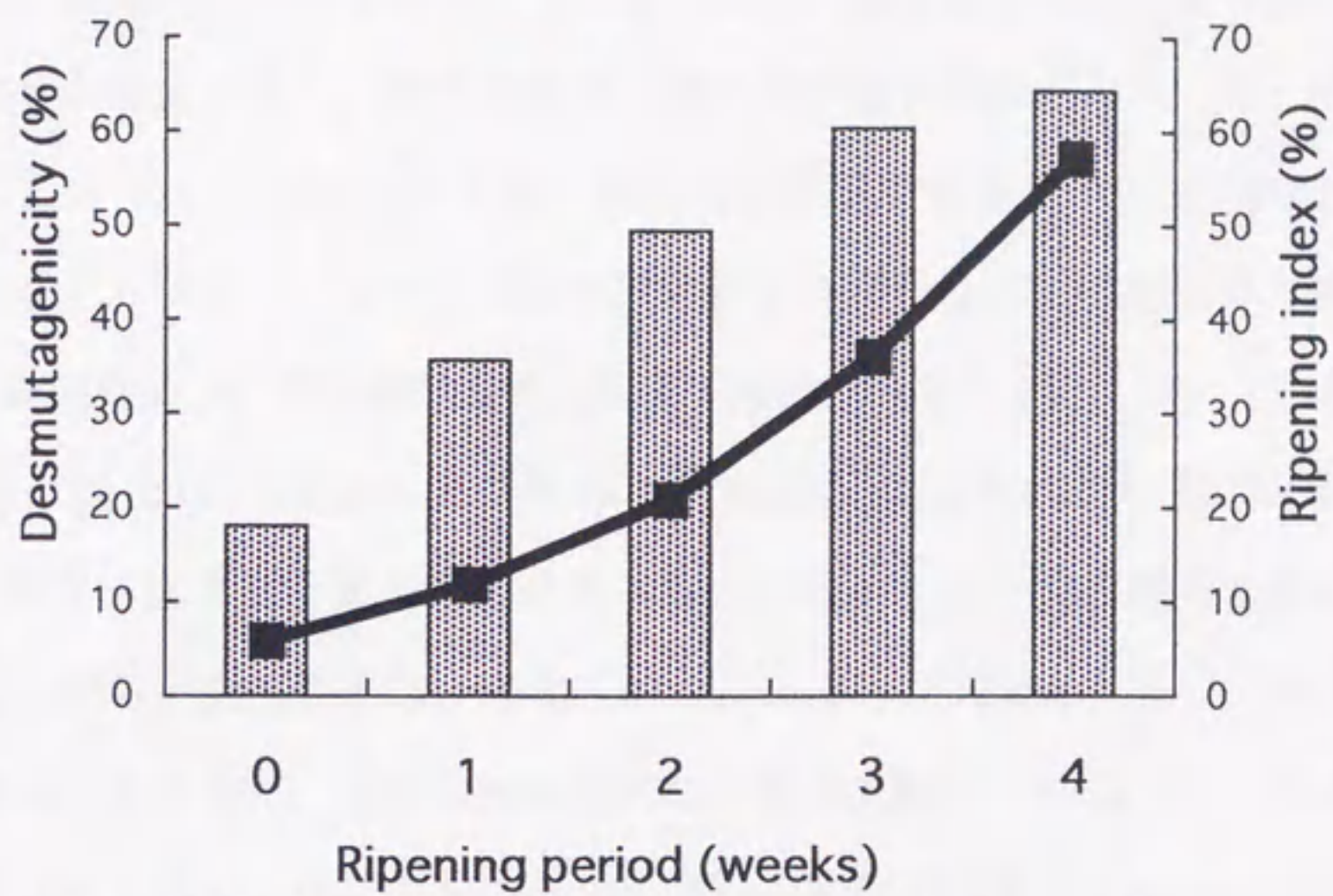


Fig. 3-3 Changes of desmutagenicity and ripening index* during ripening (n=6):

■, Desmutagenicity; ■, Ripening index.

* Ripening index (%) means soluble N as % of Total N

に熟成率と抗変異原性との相関関係を確認するために、カマンベールチーズの熟成にともなう部位別の抗変異原性の変化について検索を行った。カマンベールチーズは表面熟成タイプのチーズであるため、第2章で示したように、外部の熟成率が内部より高く、抗変異原性も熟成率が高い外部が高かった。本研究で製造したカマンベールチーズも、類似の抗変異原性を示すと推測できる。Fig. 3-4は、カマンベールチーズの熟成にともなう部位別の抗変異原性を示している。熟成期間は、熟成開始直後、熟成1週目、熟成4週目について示した。熟成開始直後では、内部および外部の抗変異原性はそれぞれ24.7%および37.7%であり、顕著な抗変異原性の差は見られなかった。熟成期間2および4週目では内部の抗変異原性は、それぞれ25.6%および92.0%を示し、熟成にともない著しく上昇した。外部の抗変異原性も熟成2週目では59.6%、熟成4週目では96.2%を示し、いずれも内部より高い抗変異原性を示した。これらのことから、チーズ内部の抗変異原性は外部に比較し低いものの、熟成が内部まで進行すると、内部の抗変異原性も上昇することがわかった。

これまで、抗変異原性試験としては、スポット法により、変異原物質はTrp-P-1を用い行ってきたが、他の方法および変異原物質についてもカマンベールチーズの抗変異原性が示されるかどうか確認するために、プレートインコーポレーション法によりTrp-P-1およびTrp-P-2について検索を行った。Fig. 3-5は、プレートインコーポレーション法による熟成直後、熟成2、4週目のカマンベールチーズのTrp-P-1およびTrp-P-2の変異原性に対する抗変異原性試験の結果を示している。Trp-P-1に対するカマンベールチーズの抗変異原性は、熟成直後で30.7%、熟成2週目では67.4%、熟成4週目では98.1%であった。Trp-P-2に対するカマンベールチーズの抗変異原性は、熟成直後で11.6%、熟成2週目では55.4%、熟成4週目では71.2%であった。Trp-P-1およびTrp-P-2に対するカマンベールチーズの抗変異原性はスポット法同様に、熟成

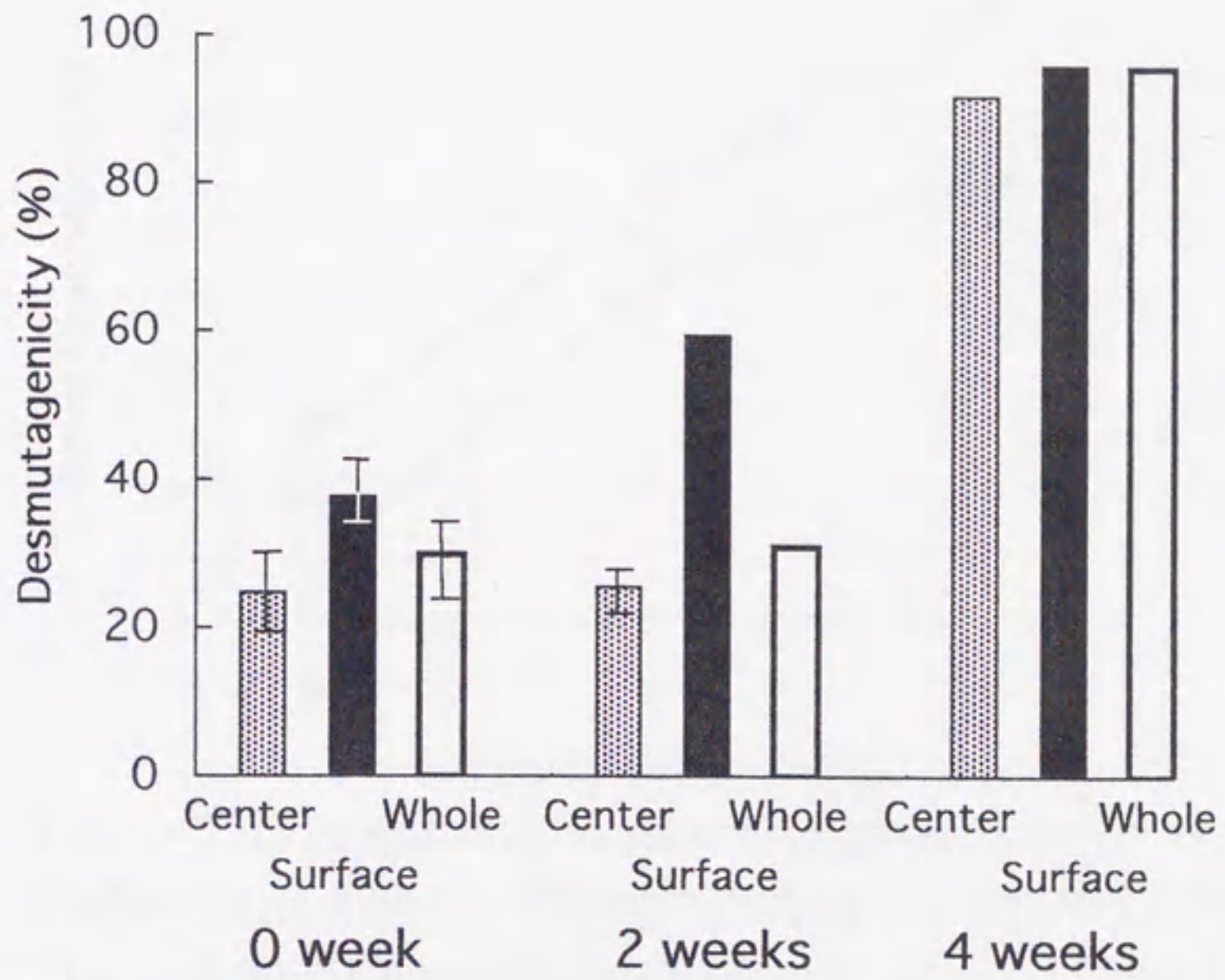


Fig. 3-4 Changes in the desmutagenicity of the location of Camembert cheese during ripening to Trp-P-1 on *Salmonella typhimurium* SD510 (n=6).

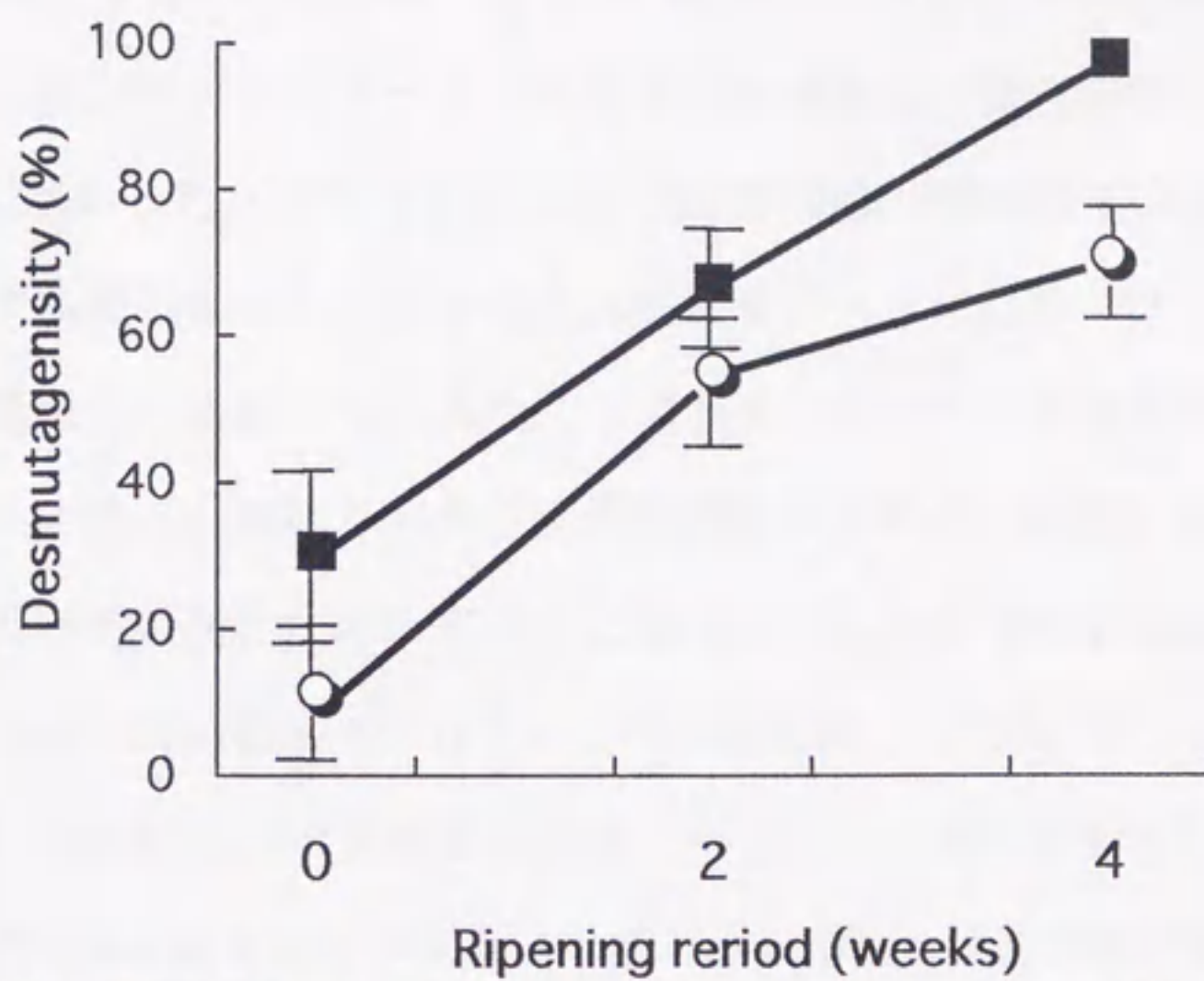


Fig. 3-5 Changes in the desmutagenicity of Camembert cheese during ripening to Trp-P-1 and Trp-P-2 on *Salmonella typhimurium* SD510 (n=6): ■, Trp-P-1; ○, Trp-P-2.

にともない強い抗変異原性を示し、スポット法と類似の結果を得ることができた。

本章で得られた結果は、第2章の結果を裏付けるものとなった。第2章において、熟成率が低いチーズの抗変異原性は低く、熟成率が高いチーズの抗変異原性は高かった。本章においても、熟成率が低い熟成開始直後のグリーンチーズの抗変異原性よりも、熟成が進み熟成率が上昇したカマンベールチーズの方が抗変異原性が高かった。また、カマンベールチーズの部位別の抗変異原性についても、熟成が進む外部から抗変異原性が上昇し、内部においても、熟成が進むと強い抗変異原性を示すようになった。第2章でも示したように、カゼインの benzo[a]pyrene (B[a]P)、N-metylnitrosourea および nitrosated 4-chloroindole に対する抗変異原性、ペプシンで加水分解を行ったカゼインの分解物の sodium azide および N-nitroquinoline-1-oxide (4NQO) に対する抗変異原性(132)、カゼインおよびそのペプシンによる加水分解物の 1-methyl-nitroso-3-nitroguanidine (MNNG) に対する抗変異原性(16)、さらにペプシンによる加水分解生成物の増加にともなうカゼインの抗変異原性活性はペプチドの形成によるものであると報告(1)があることから、熟成によりカゼインが分解され増加する水溶性窒素化合物が抗変異原性活性を示す最も大きな要因と判断できる。

また、第2および3章のいずれの結果においても、熟成が進んでいないチーズについて抗変異原性が示されていた。この結果については、いくつかの要因が考えられる。Hosonoら(50)は、コショウのエタノール抽出液の変異原性に対する牛乳由来のカゼインの抗変異原性について報告しており、ホールカゼイン、 α_{s1} -カゼイン、 β -カゼイン、 κ -カゼインに抗変異原性があることを示し、なかでも β -カゼインの抗変異原性が最も強かったことを示している。また、Yoshidaら(136)は牛乳由来の α_s -カゼイン、 β -カゼインおよび κ -カゼイ

ンのTrp-P-1、Trp-P-2 および Glu-P-1 (2-amino-6-methyldipyrido [1,2-a:3',2'-d]-imidazole) に対する強い吸着効果についての報告をしておいた。これらのことから、熟成により分解されていないカゼインや、高分子のペプチドにも抗変異原性があると推測できる。次に、Tamaiら(123)は、本実験で用いた *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*、*Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis*、*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* および *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* の他に、*Lactococcus salivarius* subsp. *thermophilus*、*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*、*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*、*Lactobacillus acidophilus*、*Lactobacillus casei*、*Lactobacillus helveticus*、*Bifidobacterium longum*、*Saccharomyces cerevisiae* (酵母) を混合し製造した発酵乳が、*Saccharomyces cerevisiae* と他一種類の乳酸菌と組み合わせて製造した乳酸菌よりも抗変異原性が強かったことを報告している。本研究でもチーズ製造に4種類の乳酸菌を混合した混合スターターを用いており、これら乳酸菌の共生作用により製造されたカードにも抗変異原性が示される要因であると考えられる。さらに、Hayatsuら(35)は、オレイン酸およびリノール酸にヘテロサイクリックアミンの変異原性を抑制する作用があることを報告している。乳脂肪にはオレイン酸が多く含まれていることから、微生物の酵素により分解されていないオレイン酸を含むグリーンチーズが抗変異原性を示す要因の一つかもしれない。

以上のことから、チーズの熟成によりカゼインから生成された水溶性窒素化合物は、チーズ固有の風味生成や物性の変化を起こすだけでなく、水溶性窒素化合物の生成と抗変異原活性の間には正の相関があることが明らかとなった。乳成分の生理機能に関する報告として、発酵乳(42,44,49,120,130)、カゼイン(12,50,132)、カゼインの分解物(1,16)についての抗変異原性の報告の他にも、カゼイン由来の免疫賦活ペプチドについての報告(99)や、乳タンパク質由

来の鎮痛麻酔作用をもつオピオイドペプチドについての報告(18,74)がある。さらに、Ross(106)は、動物実験により高タンパク質（カゼイン）食は、成長条件の初期の摂取において寿命を延ばし、低タンパク質食は寿命を短くすることを報告している。本章では、チーズ中の水溶性窒素化合物および乳タンパク質が抗変異原性活性を示す一つの要因でがあと考えられた。乳成分、とくにタンパク質由来の物質には様々な生理活性があることが報告されており、チーズが乳タンパク質の凝集物であることから、さらなる生理機能があることが期待できる。

第4節 要 約

Salmonella typhimurium TA98から造成されたストレプトマイシン依存株SD510株のTrp-P-1およびTrp-P-2の変異原性に対する熟成にともなうカマンベールチーズの抗変異原性の変化について検索を行うために、カマンベールチーズを製造し、抗変異原性試験に用いた。カマンベールチーズの熟成は4週間行い、実験には、熟成開始直後、熟成1、2、3、4週間のものを用いた。

その結果、熟成にともない熟成率とともに抗変異原性も上昇した。また、プレインキュベーションの時間による影響はなく、チーズと変異原物質を混合した直後から、抗変異原性が発現していた。カマンベールチーズの部位別の抗変異原性については、熟成が進むにしたがい、外部から抗変異原性が上昇し、熟成4週目では内部においても高い抗変異原性を示した。Trp-P-2の変異原性に対するカマンベールチーズの抗変異原性の検索もおこなったところ、Trp-P-1に対する抗変異原性と同様に、熟成にともない強い抗変異原性を示した。

これらのことから、熟成率の上昇、つまり水溶性窒素化合物の増加が、カマンベールチーズの強い抗変異原性を示す最も大きな要因であると判断した。

第4章 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*,
Lactococcus lactis biovar *diacetylactis*, *Lactococcus*
lactis subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
および *Penicillium candidum* を用いて製造した発酵乳の抗
変異原性と *Penicillium candidum* 菌体に対する Trp-P-1 の
吸着効果に関する研究

第1節 緒 言

チーズの製造には、乳酸菌スターターが不可欠であり、また、チーズの種類によっては、白かびや *Brevibacterium lines* などのセカンドスターターも必須の材料の一つである。乳酸菌スターターの役割としては、レンネットによるカード形成およびホエー排除の促進、チーズ製造中や熟成時における有害微生物の汚染の防止、さらに熟成中の酵素作用に適したpHを与える働きをする。セカンドスターターは、そのチーズ独特の個性を醸し出すために用いられる。セカンドスターターに用いられる微生物の種類は、チーズの種類によって異なり、表面熟成タイプのチーズには、白かび (*Penicillium camemberti*) や *Brevibacterium lines* などのタンパク質分解性が強い微生物が用いられることが多く、脂肪分解性が強い青かび (*Penicillium roqueforti*) はブルーチーズの製造に用いられ、スイスチーズには、チーズアイを作るためにプロピオン酸発酵を行うプロピオン酸菌 (*Propionibacterium freudenreichii*) が用いられる。また、乳酸菌スターターも、熟成中にタンパク質分解および脂肪分解を行っている。チーズの独特の風味や物性は、これら微生物の代謝によって生成され、それぞれのチーズの個性を決定する重要な要素といえる。

一方、チーズの製造に用いられる乳酸菌スターターは、単菌、または2種類以上の乳酸菌を混合した混合スターターが用いられる。混合スターターの使

用目的としては、個々の乳酸菌の長所を加味して、良質のスターターとするためであり、また、菌種間の共生作用を利用するためである。本研究でカマンベールチーズの製造に用いた乳酸菌スターターも、*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*、*Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis*、*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* および *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* の4種類の乳酸菌を混合した混合スターターである。これら混合スターターと *Penicillium candidum* を用いて製造したカマンベールチーズに強い抗変異原性があったことは、すでに第3章で明らかになっていることから、抗変異原性の発現に際しては、これら微生物間に拮抗作用はなく、共生作用が有用に働いていたといえる。

一方、乳酸菌についてはその発酵乳および乳酸菌菌体に関する抗変異原性の報告(40,41,42,43,44)や、他のチーズにセカンドスターターとして用いられる *Brevibacterium lines* が生成する粘性物質(55)やプロピオン酸菌の細胞内物質の透析を行った低分子物質の抗変異原性(134)についての報告はあるが、白かびについては全く報告がないため、白かびがどれくらい抗変異原性に関与しているかわかっていない。本研究でカマンベールチーズ製造に使用した各微生物の抗変異原性活性を知ることは、それぞれの微生物のチーズ製造上における特性を知る上でも重要である。さらに、乳酸菌には変異原物質に対するや吸着作用(51,53,63,111,124,128)の報告があるが、白かびにはない。白かび部分は、敬遠されがちなことから、変異原物質に対するその抗変異原性や吸着作用を明らかにすることは、安全性を確認する上でも重要である。

そこで本章では、本研究でカマンベールチーズ製造にセカンドスターターとして用いた *Penicillium candidum* により製造した発酵乳の抗変異原性および *Penicillium candidum* の菌体の変異原物質に対する吸着効果について検索を行った。また、乳酸菌スターターとして用いた *Leuconostoc*

mesenteroides subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis*,
Lactococcus lactis subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* につい
ても *Penicillium candidum* の抗変異原性との比較をするために、これら乳酸
菌で製造した発酵乳の抗変異原性についても検索を行った。

抗変異原性試験としては、指標菌として *Salmonella typhimurium* TA98
株から造成したストレプトマイシン依存株 SD510 を用い、変異原物質としては
Trp-P-1 (3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b] indole) を用いた。
Penicillium candidum 菌体の吸着試験にも、変異原物質として Trp-P-1 を用
いた。

第2節 実験方法

2-1 乳酸菌および*Penicillium candidum*を用いた発酵乳の調製

2-1-1) 乳酸菌を用いた発酵乳の調製

供試菌には、*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*、*Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis*、*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* および *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (DRI-VAC, NORMAL-01, Chr. Hansen's Laboratory Ltd, England)を用いた。乳酸菌はそれぞれ、滅菌した10%脱脂粉乳溶液に少量を無菌的に接種し、30℃で12時間発酵を行った。さらに、この発酵乳を滅菌した10%脱脂粉乳溶液に1%接種し、30℃で12時間発酵を行った。この発酵乳を凍結乾燥し、使用するまで-20℃で保存した。

各乳酸菌による発酵乳の凍結乾燥粉末は、滅菌した10%脱脂粉乳溶液に少量を無菌的に接種し、30℃で12時間発酵させ、さらに、この発酵乳を滅菌した10%脱脂粉乳溶液に1%接種し、30℃で12時間発酵を行い、乳酸菌の活性化させた。この活性化させた発酵乳をスターターとして用い、抗変異原性試験を行った。つまり、活性化させた発酵乳を滅菌した10%脱脂粉乳溶液に1%接種し、30℃で発酵を行い、経時的に発酵乳の抗変異原性を求めた。

2-1-2) *Penicillium candidum*を用いた発酵乳の調製

供試菌には、*Penicillium candidum* (DRI-VAC, PC, Chr. Hansen's Laboratory Ltd, England)を用いた。*Penicillium candidum*のバルクスターターは、食パンを坦体に用いて調製した。つまり、1cm角に切った市販食パンを3角フラスコに適量入れ、121℃、15分間の滅菌を行い、この食パンに*Penicillium candidum*を少量添加し、よく混合後、25℃でパンの表面全体に*Penicillium candidum*が生育してくるまで培養した。これを、室温で真空乾燥し水分を除去し、乳鉢で無菌的に粉碎し粉末とし、使用するまで-20℃で

保存した。

この *Penicillium candidum* のバルクスターターを、滅菌した10%脱脂粉乳溶液に0.004%接種し、よく攪拌した後、25℃で発酵を行い、経時的に、ホモジナイザーで粉碎した発酵乳の抗変異原性を求めた。

2-2 各発酵乳発酵中のpH、乳酸酸度および菌数測定(118)

2-2-1) pH測定

乳酸菌により製造した発酵乳のpHは発酵終了後直接、また、*Penicillium candidum* により製造した発酵乳のpHは発酵終了後、ホモジナイザーで攪拌し、pHメーター (HM-26S、東亜電波工業) を用い測定を行った。

2-2-2) 乳酸酸度測定

乳酸酸度は、乳酸菌による発酵乳についてのみ測定を行った。供試試料10gに蒸留水40mlを加え攪拌したものに、0.1N-NaOHで中和滴定を行い、酸度を求めた。

2-2-3) 乳酸菌菌数測定

第3章 2-2-9)と同様の方法で行った。

2-2-4) *Penicillium candidum* 菌数測定

第2章 2-2-4)と同様の方法で行った。

2-3 抗変異原性試験

2-3-1) 供試試料の調整

各発酵乳は、各菌菌体の内容物を溶出させるために、超音波菌体破碎装置

(USP-3000、島津製作所) を用い、4℃で20KHz、100分間の処理を行った。乳酸菌による発酵乳は発酵終了後そのまま、*Penicillium candidum* による発酵乳は、発酵終了後、ホモジナイザーで攪拌し超音波処理を行ってから、抗変異原性試験に用いた。

2-3-2) 変異原物質

変異原物質には、アミノ酸加熱分解物であるTrp-P-1を用いた。Trp-P-1は2mg/mlとなるように蒸留水に溶解させて調製した。

2-3-3) 指標菌

抗変異原性を調べるための指標菌として、第2章 2-3-3)と同様の *Salmonella typhimurium* TA98から造成されたストレプトマイシン依存株 SD510 株を用いた。

2-3-4) 培地

培地はSM liquid、SM agar、OX agar を用い、第2章 2-3-4)と同様に調製し、Top agarは、第3章2-3-5)と同様に調製した。

2-3-5) 指標菌の培養

第2章 2-3-6)-①と同様の方法で行った。

2-3-6) 抗変異原性試験

各発酵乳の抗変異原性試験は、プレートインコーポレーション法で行い、第3章 2-3-7)と同様の方法で行った。

2-4 *Penicillium candidum* 菌体へのTrp-P-1の吸着試験

2-4-1) 培地

Penicillium candidum の菌体を得るために、液体培養を行った。

Penicillium candidum の培養には、Czapek 液体培地を用いた。Czapek 液体培地は、 NaNO_3 3g、 K_2HPO_4 1g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g、KCl 0.5g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01g、Sucrose 30g、蒸留水 1000ml を混合し、121℃、15分間の滅菌を行った。試薬は全て、ナカライテスク製（特級）を用いた。

2-4-2) *Penicillium candidum* の凍結乾燥菌体の調製

滅菌した Czapek 液体培地に、本節 2-1-2) で調製した *Penicillium candidum* のバルクスターターを無菌的に少量添加し、25℃で5日間振とう培養を行い、培養液をろ紙 (No.1, Advantec Toyo) でろ過し、液体培地を除去後、菌体を回収した。回収した *Penicillium candidum* の菌体はリン酸バッファー (pH6.98) で2回洗浄し、最後に蒸留水で1回洗浄したものを凍結乾燥し、実験に用いた。なお、この凍結乾燥菌体の生菌数を Potato Dextrose Agar (栄研) を用いて測定したところ、 15×10^7 CFU/g であった。

2-4-3) *Penicillium candidum* の菌体へのTrp-P-1の吸着試験

2-4-3)-① *Penicillium candidum* 菌体量増加にともなう吸着率の測定

Penicillium candidum の菌体量の増加にともなう Trp-P-1 への吸着率の測定は、Sreekumarら(112)の方法に従って行った。すなわち、*Penicillium candidum* の菌体1~10mgに、Trp-P-1水溶液 (2mg/ml) を50 μ l、つまり Trp-P-1量として100 μ g 添加されるように加え、さらに全量が1mlとなるように滅菌水を加えた。この混合溶液を、37℃で30分間緩やかに振とうした。振とう後、フィルター (0.45 μ m、富士フィルム) で滅菌ろ過した。得られたろ液

を試料液とし、試料液中に含まれているTrp-P-1量をHPLCを用い測定した。

2-4-3)-② Trp-P-1の濃度変化による吸着率の測定

Penicillium candidum 菌体の一定量に対する濃度が異なるTrp-P-1の吸着率について測定を行った。すなわち、*Penicillium candidum* の菌体6 mgに、Trp-P-1水溶液 (2mg/ml) を50~250 μ l、つまりTrp-P-1量として100~500 μ g添加されるように加え、さらに全量が1mlとなるように滅菌水を加えた。この混合溶液を、37℃で30分間緩やかに振とうし、以下、本節 2-4-3)-① と同様の操作を行った。

2-4-3)-③ pHの変化による吸着率の測定

Penicillium candidum 菌体の一定量に対するTrp-P-1の吸着率のpHの影響について検索を行った。すなわち、*Penicillium candidum* の菌体6 mgに、Trp-P-1水溶液 (2mg/ml) を50 μ l、つまりTrp-P-1量として100 μ g添加されるように加え、全量が1mlとなるようにpH1~11に調整した緩衝液を加えた。この混合溶液を、37℃で30分間緩やかに振とうし、以下、本節 2-4-3)-① と同様の操作を行った。

緩衝液の調製としては、pH1および2の緩衝液は、1/15M-グリシンと塩酸を目的のpHになるように調製した。pH3~6の緩衝液は、1/10M-クエン酸一水和物と1/15M-リン酸水素二ナトリウムを、pH7および8の緩衝液は、1/15M-リン酸二水素ナトリウムと1/15M-リン酸水素二ナトリウムを、pH9~11の緩衝液は、1/15M-グリシンと1/15M水酸化ナトリウムを目的のpHになるように調製した。試薬は全てナカライテスク製 (特級) を用いた。

2-4-3)-④ 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

本節 2-4-3)-①、②、③で得られた試料溶液中のTrp-P-1は、HPLCを用い検出を行った。送液ユニットにはSimazu LC-6A (島津製作所) を用い、検出器には紫外線分光光度検出器 SPD-6A (島津製作所)、カラムはODS逆相系カラム Shim-pack CLC-OD (島津製作所)、記録計はクロマトパック C-R6A (島津製作所) を用いた。

分析条件としては、移動相は、アセトニトリル (ナカライテスク)、1/5 M Na₂HPO₄-1/10M クエン酸 (pH3.0、ナカライテスク) およびトリエチルアミン (ナカライテスク) を50 : 50 : 0.05の割合で調製し用いた。また、カラム温度は室温、流速は1 ml/min、波長は263 nmとした。試料溶液は、等量のアセトニトリルを混合し、その混合液20 μlについて泳動を行った。

2-4-3)-⑤ 吸着率の算出

HPLCで得られたピークエリアから *Penicillium candidum* 菌体への Trp-P-1 の吸着率を次の式により求めた。

$$\text{吸着率 (\%)} = (1 - \text{Penicillium candidum 菌体とTrp-P-1水溶液の混合溶液のピークエリア} / \text{Trp-P-1水溶液のみのピークエリア}) \times 100$$

第3節 結果および考察

3-1 乳酸菌で製造した発酵乳の発酵中のpH、乳酸酸度および乳酸菌菌数の経時的変化

抗変異原性試験を行う前に、4種類の乳酸菌の発酵中の特性について知るために、発酵中のpH、乳酸酸度および乳酸菌菌数について経時的に測定を行った。Table 4-1、4-2、4-3 および 4-4 に、それぞれ *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*、*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* および *Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis* で製造した発酵乳の発酵中のpH、乳酸酸度および乳酸菌菌数の変化をそれぞれ示した。pH、乳酸酸度および乳酸菌菌数の経時的な変化は、いずれの乳酸菌の発酵により製造された発酵乳も、類似した傾向を示した。すなわち、pHは、発酵開始から発酵12時間まで急激な低下を示し、それ以降は緩やかに低下した。乳酸酸度は、発酵開始から発酵12時間まで急激な上昇を示し、それ以降は緩やかに上昇した。このことから、それぞれの乳酸菌の乳酸生成が、発酵12時間まで著しく行われ、それにともないpHが下がったことが判った。また、乳酸菌菌数は、*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* が発酵12時間で最も菌数が多くなり他の乳酸菌でも発酵16時間で菌数の最高値を示し、速やかに増殖したことが判った。乳酸菌の増殖にともなう速やかな乳酸酸度の上昇とpHの低下は、緒言でも述べたように、レンネットによるカード形成およびホエー排除の促進、チーズ製造中や熟成時における有害微生物の汚染の防止、さらに熟成中の酵素作用に適したpHを与えるために、チーズを製造する上で重要なことである。このことから、本研究でカマンベールチーズ製造に用いた4種の乳酸菌は、チーズ製造に適した乳酸菌といえる。*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* および *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* は、伝統的にもカマンベールチーズの製造に用いられており(26)、これら乳酸菌のチーズ製

Table 4-1 Changes in colony count of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, pH and lactic acidity of skim milk cultured by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*

	Incubating periods (days)						
	0	4	8	12	16	20	24
Colony count (SPC*/g)	25.2 × 10 ⁶	27.9 × 10 ⁷	67.7 × 10 ⁷	94.3 × 10 ⁷	10.5 × 10 ⁸	97 × 10 ⁷	96.3 × 10 ⁷
pH	6.66	5.69	5.21	4.71	4.96	4.5	4.26
Lactic acidity (%)	0.076	0.159	0.289	0.408	0.425	0.450	0.512

*SPC(Standard plate count agar with BCP)included lactic acid bacteria

Table 4-2 Changes in colony count of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, pH and lactic acidity of skim milk cultured by *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*

	Incubating periods (days)						
	0	4	8	12	16	20	24
Colony count (SPC*/g)	45.7×10^6	67.8×10^6	89.7×10^6	37.2×10^7	44.3×10^7	42.7×10^7	29.3×10^7
pH	6.67	5.86	5.40	5.10	4.94	4.8	4.35
Lactic acidity (%)	0.076	0.156	0.241	0.307	0.352	0.383	0.477

*SPC(Standard plate count agar with BCP)included lactic acid bacteria

Table 4-3 Changes in colony count of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, pH and lactic acidity of skim milk cultured by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*

	Incubating periods (days)						
	0	4	8	12	16	20	24
Colony count (SPC*/g)	17.7 × 10 ⁶	18.9 × 10 ⁷	38 × 10 ⁷	49.3 × 10 ⁷	45 × 10 ⁷	45 × 10 ⁷	23.2 × 10 ⁷
pH	6.64	5.76	5.40	5.12	4.91	4.75	4.30
Lactic acidity (%)	0.076	0.165	0.231	0.318	0.355	0.395	0.504

*SPC(Standard plate count agar with BCP)included lactic acid bacteria

Table 4-4 Changes in colony count of *Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis*, pH and lactic acidity of skim milk cultured by *Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis*

	Incubating periods (days)						
	0	4	8	12	16	20	24
Colony count (SPC*/g)	16.9×10 ⁶	21.0×10 ⁷	27.3×10 ⁷	48.0×10 ⁷	58.2×10 ⁷	23.2×10 ⁷	14.0×10 ⁷
pH	6.67	5.89	5.31	4.81	4.72	4.53	4.28
Lactic acidity (%)	0.077	0.144	0.275	0.384	0.423	0.439	0.502

*SPC(Standard plate count agar with BCP)included lactic acid bacteria

造における有用性が改めて確認できた。

3-2 *Penicillium candidum* により製造した発酵乳の発酵中のpHおよび *Penicillium candidum* 菌数の経時的変化

抗変異原性試験を行う前に、乳酸菌と同様に、*Penicillium candidum* の発酵中の特性について知るために、発酵中のpHおよび菌数について経時的に測定を行った。Fig. 4-1はその結果を示している。発酵時間の経過とともに、pHは低下し、菌数は増加した。このことは、*Penicillium candidum* の増殖とともに、*Penicillium candidum* が生成する酵素により乳タンパク質の分解が進んでいると判断できる。

3-3 乳酸菌により製造した発酵乳の抗変異原性

次に、各乳酸菌で製造した発酵乳について抗変異原性試験を行った。Fig. 4-2は、各乳酸菌で製造した発酵乳の経時的な変化を示している。全ての発酵乳が発酵の経過とともに抗変異原性が上昇した。発酵18時間では、*Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis*、*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* および *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* の発酵乳の抗変異原性は、それぞれ93.6、97.4、94.2%と強い抗変異原性を示した。*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* の発酵乳は、発酵18時間では抗変異原性64.0%と、他の乳酸菌と比較し低い値であったが、発酵24時間では99.4%と高い抗変異原性を示した。本実験で用いた乳酸菌と同様の種類の乳酸菌を用い製造した発酵乳に関して、いくつか報告されている。Suronoら(120)は、*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* および *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* で製造した発酵乳のインドネシアの発酵食品のTerasi 中の変異原物質に対する抗変異原性について報告しており、また、Hosonoら(54)は、*Lactococcus*

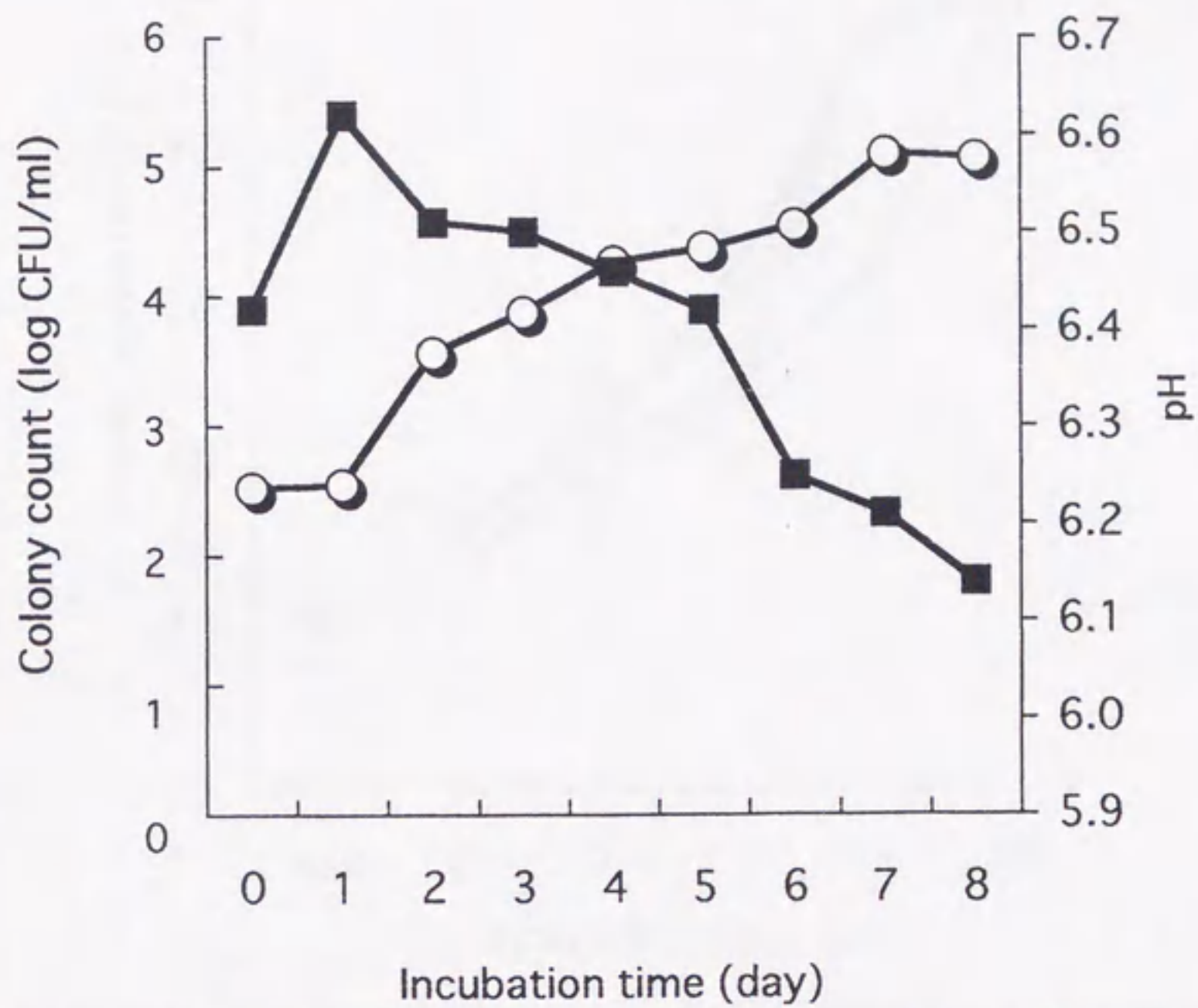


Fig. 4-1 Changes in pH and colony count of *Penicillium candidum* of milk cultured by *Penicillium candidum*:
 ■, pH; ○, colony count.

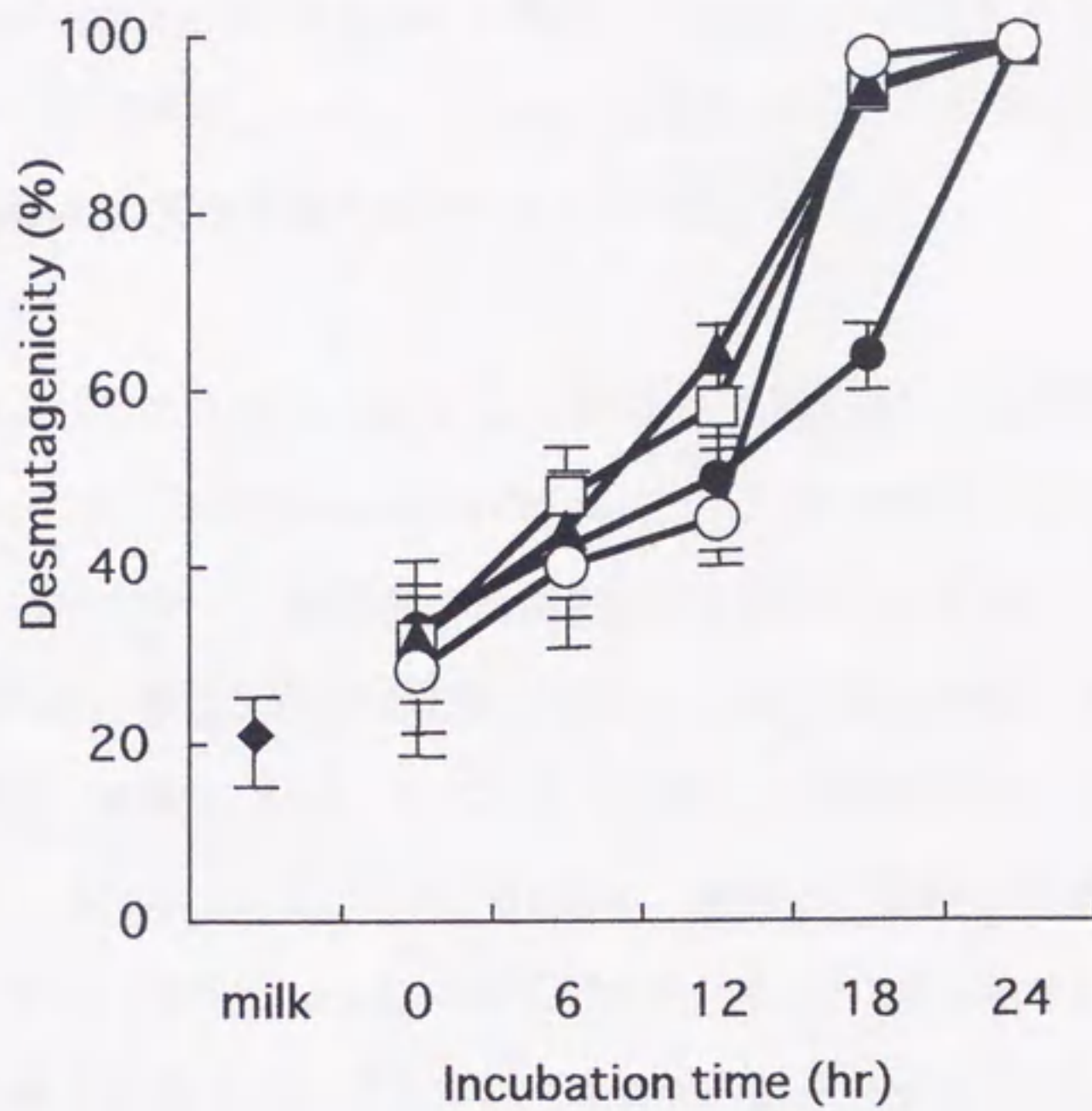


Fig. 4-2 Desmutagenicity of milk fermented by lactic acid bacteria used for Camembert cheese production to Trp-P-1 on *Salmonella typhimurium* SD510 :

- , *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* ;
- , *Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis* ;
- ▲, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ;
- , *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*; ◆, milk.

lactis biovar *diacetylactis*、*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* および *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* の菌体の揮発性ニトロソアミンに対して抗変異原性について報告をしいる。これらのことから、本実験で用いた乳酸菌で製造した発酵乳に抗変異原性があることが確認できた。

3-4 *Penicillium candidum* により製造した発酵乳の抗変異原性

Fig. 4-3 は、*Penicillium candidum* で製造した発酵乳の超音波処理を行った発酵乳と行わなかった発酵乳の抗変異原性の経時的な変化を示している。いずれの発酵乳も、類似した抗変異原性を示し、超音波処理を行った発酵乳では、発酵開始直後、発酵1、2、3、4、5、6、7日目の抗変異原性が、それぞれ30.1、31.6、43.0、52.9、55.3、50.6、41.2%、超音波未処理の発酵乳では、それぞれ21.6、26.0、37.7、48.7、56.6、53.5、46.8、42.6%であり、いずれの発酵乳も発酵開始後4または5日目で最も強い抗変異原性を示した。しかし、超音波処理後の発酵乳と超音波未処理の発酵乳との抗変異原性の値の間には有意な差($P < 0.05$)は見られなかったことから、*Penicillium candidum* 菌体内成分の抗変異原性への影響はなかったと判断できる。発酵開始後、6日目以降に抗変異原性が低下したことは、この実験の結果からのみでは判断しにくいだが、本実験では発酵温度を25℃としたため、*Penicillium candidum* の生育が早く、それにともない酵素も早く生成されたことにより、乳タンパク質が早く分解され、アミン類が生成したためではないかと推測できる。

以上のことから、*Penicillium candidum* を用い発酵を行った発酵乳に、乳酸菌のそれに比較すると弱い抗変異原性があることが認められた。

本章では、それぞれの発酵乳を製造するときの培養基に脱脂粉乳を用いたが、最近では、市販の発酵乳に生乳を用いている製品も多く出ている。牛乳中の酵素について、Yamadaらは(135)、乳汁のペルオキシダーゼであるラクトペ

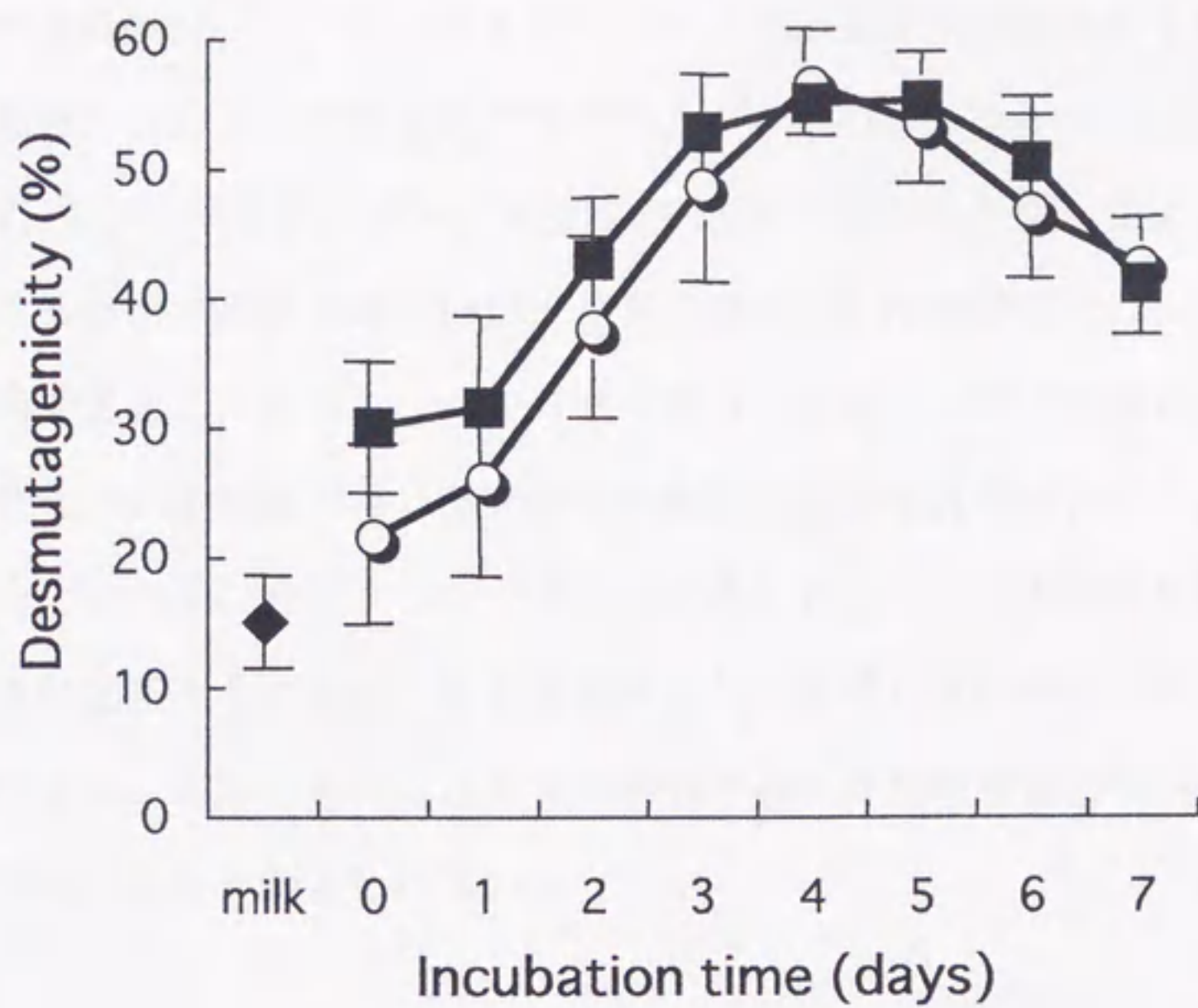


Fig. 4-3 Desmutagenicity of milk cultured by *Penicillium candidum* to Trp-P-1 on *Salmonella typhimurium* SD510: ■; without ultrasonication, ○; ultrasonication, ◆; milk.

ルオキシダーゼ(lactoperoxidase)のような脱水素酵素のペルオキシダーゼ(Peroxidase)に、ヘテロサイクリックアミンを不活性化させる作用があることが報告している。牛乳中のペルオキシダーゼは、レンネットの処理により溶液中に残る(117)ため、チーズにおいてはヘテロサイクリックアミンを不活性化させる作用は期待できないが、牛乳を原料とした発酵乳では、この酵素は耐熱酵素であることもあり、ヘテロサイクリックアミンの不活性化作用があるかもしれない。本実験では、各発酵乳の製造に脱脂粉乳を用いたため、ペルオキシダーゼのヘテロサイクリックアミンであるTrp-P-1の不活性化作用は起こっていないと考えられるが、牛乳を原料として製造した発酵乳には、この作用が期待できる。このことは、これまで報告されてきた発酵乳の強い抗変異原性の要因の一つとなるかもしれない。

3-5 *Penicillium candidum* 菌体のTrp-P-1に対する吸着効果

本章3-4において、*Penicillium candidum*により製造した発酵乳に抗変異原性があることがわかった。次に、*Penicillium candidum*の変異原物質に対する減弱作用があるかどうかを知るために、乳酸菌菌体について報告されている変異原物質に対する吸着効果(51,53,63,111,113,124,128)と同様の作用があるかどうか検索を行った。まず、*Penicillium candidum*菌体量の増加にともなう吸着率の変化について検索を行った。Fig. 4-4は、その結果を示している。*Penicillium candidum*菌体量が増加するとともに吸着率も上昇し、*Penicillium candidum*菌体量6mgの時に吸着率83.7%と最も高い値を示した。*Penicillium candidum*菌体量6mg以上では、ほとんど吸着率の変化はなかった。

次に、異なるTrp-P-1濃度に対する吸着率への影響について検索を行った。本章3-5において、*Penicillium candidum*菌体量6mgの時にTrp-P-1に対す

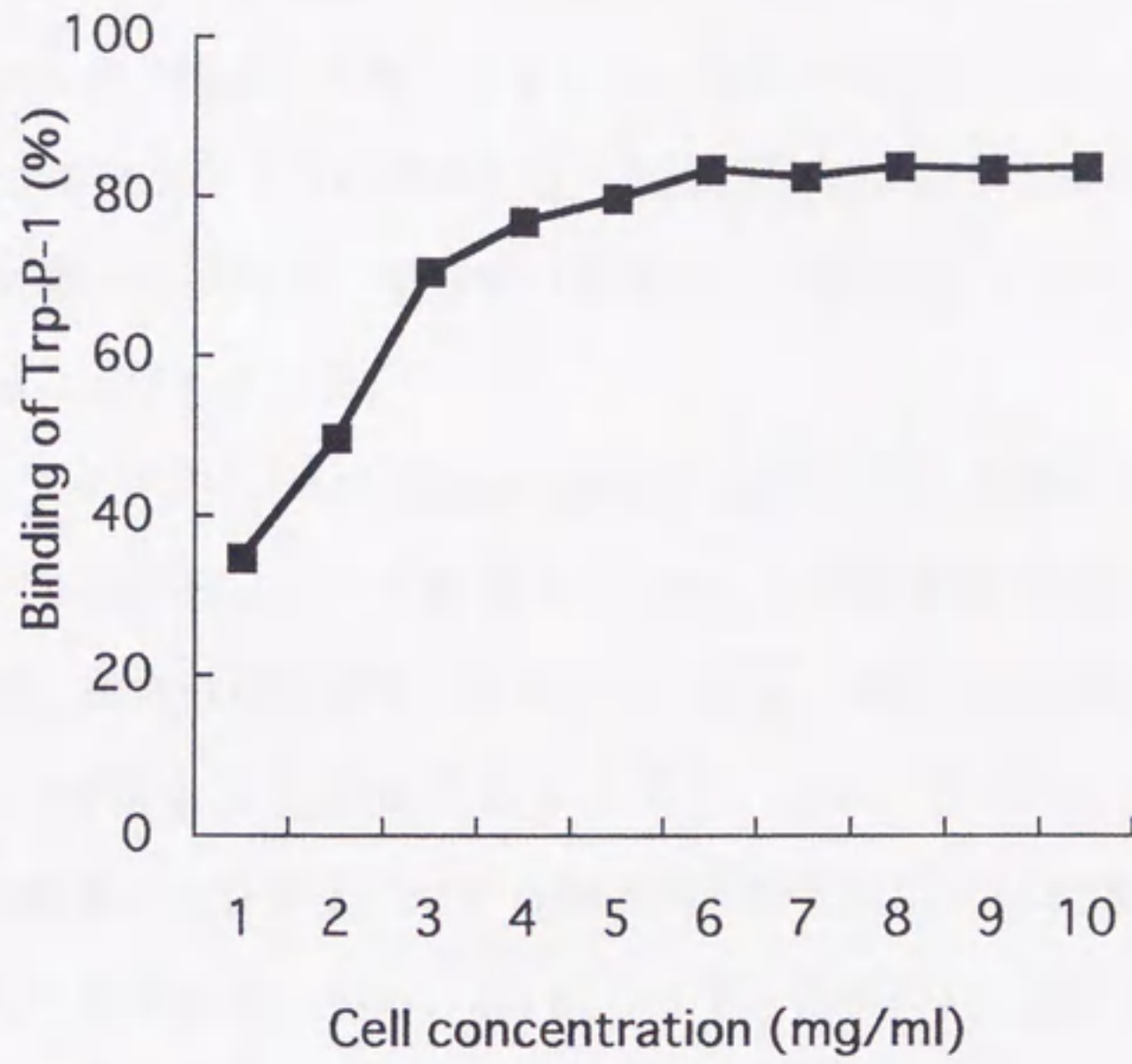


Fig. 4-4 Effect of different cell concentrations of *Penicillium candidum* on the binding of Trp-P-1.

る吸着率が最高値を示したので、本実験での*Penicillium candidum* 菌体量は6mgとした。Fig. 4-5は、Trp-P-1濃度の増加にともなう吸着率の変化を示している。Trp-P-1濃度の上昇にともない、吸着率は減少した。

Fig. 4-4 および 4-5の結果から、*Penicillium candidum* 菌体のTrp-P-1に対する吸着作用は強く、吸着率の発現は、*Penicillium candidum* 菌体の量依存であることがわかった。

次に、人の体内に*Penicillium candidum*を摂取した場合を想定し、pHの吸着率に対する影響について検索を行った。人の胃酸のpHは1~5の間(22)であり、また、腸内はほぼ中性である(58)。また、酸性領域の対照としてアルカリ性領域の検索を行う必要があると考え、pH1~11における*Penicillium candidum*菌体のTrp-P-1に対する吸着率の変化について検索を行った。Fig. 4-6は、その結果を示している。pH 6、7、8、9において高い吸着率を示し、それぞれの吸着率は、68.2%、75.9%、77.3%、66.0%であった。酸性領域であるpH 1、2、3、4、5では低い値を示し、吸着率はそれぞれ0.9%、7.1%、5.9%、27.0%、48.0%であった。また、アルカリ性の強いpH10および11でも、それぞれ41.4%、31.6%と低い吸着率であった。

人は、食物を最初の消化器官である口腔内に入れる。口腔内の唾液のpHは、6.4~7.0であり(78)、Fig. 4-6の結果からも、食物中に調理過程で生成したアミノ酸加熱分解物と*Penicillium candidum*を一緒に摂取した時に、アミノ酸加熱分解物と*Penicillium candidum*の吸着が起こることが推測できる。しかし、胃内のpHは低いため、吸着作用は低下すると考えられる。腸では再びpH7位になるため、再び吸着活性が生ずるかもしれない。

Tanabeら(124)らは、乳酸菌である*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* 菌体の細胞壁の糖ペプチドのTrp-P-1に対する吸着効果について報告をしており、糖ペプチド量およびpHの吸着率に対する影響に関して、本

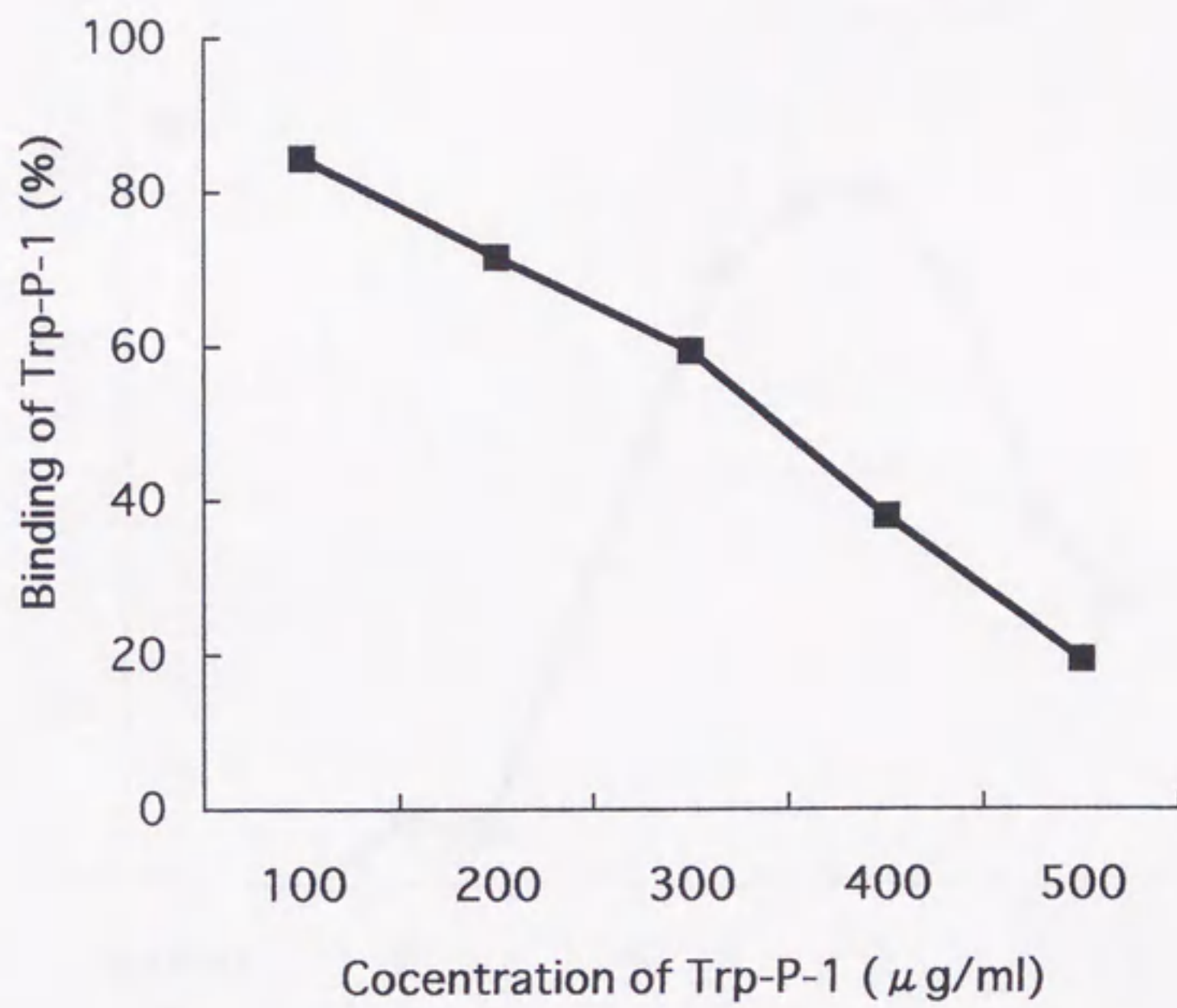


Fig. 4-5 A dose-response of the binding of *Penicillium candidum* with Trp-P-1

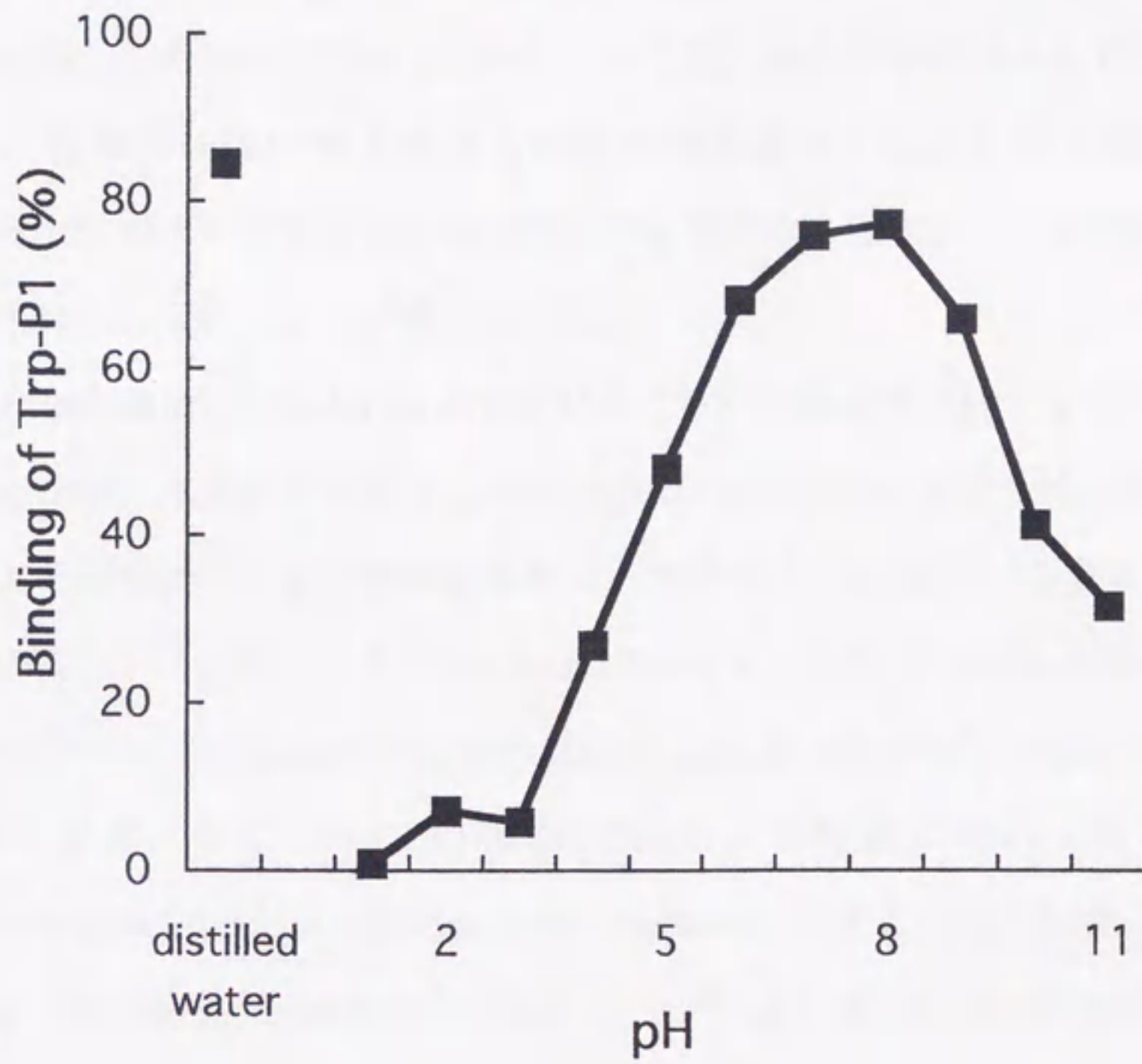


Fig. 4-6 Effect of pH on the binding of Trp-P-1 to the cells of *Penicillium candidum*.

実験の結果と同様の傾向を示していた。乳酸菌と*Penicillium candidum*は形態が異なるため、吸着作用の機構は異なると考えられるが、乳酸菌菌体のアミノ酸加熱分解物に対する吸着効果については、多くの報告がされていることから、乳酸菌菌体の吸着効果と同様の傾向を示したことは、*Penicillium candidum*がチーズ製造のためだけに利用されるのではなく、生理機能の面でも有用に用いられることが期待できる。

*Penicillium candidum*のTrp-P-1に対する吸着率に関する報告は全くないことから、本実験の結果は、*Penicillium candidum*の安全性の面からも意義のある結果といえる。牛乳由来の α_s -カゼイン、 β -カゼインおよび κ -カゼインのTrp-P-1、Trp-P-2 (3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole)およびGlu-P-1 (2-amino-6-methyldipyrido[1,2-a:3',2'-d]-imidazole)に対する強い吸着効果についての報告(136)や、本実験においても用いた、*Lactococcus lactis*、*Lactococcus cremoris* または*Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*がTrp-P-1およびTrp-P-2に対して強い吸着作用があり(51,53,126)、さらに*Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* および*Lactococcus cremoris*の凍結乾燥菌および死滅菌もまたTrp-P-1およびTrp-P-2に対して強い吸着作用がある(137)ことが報告されていることから、第2および3章においてチーズが抗変異原性を示した要因として挙げた水溶性窒素化合物の作用の他に、*Penicillium candidum*、乳酸菌およびカゼインの変異原物質に対する吸着作用も、Trp-P-1の変異原性を減弱化させている要因と考えられる。第2および3章で、熟成率が低かったチーズにも抗変異原性活性が示されたことは、酵素分解を受けていないカゼインが、Trp-P-1に対する吸着効果を示したためかもしれない。

*Penicillium candidum*のTrp-P-1に対する抗変異原性は、乳酸菌の抗変異原性に比較すると弱く、また吸着率も、Hosonoら(51,53) およびTanabeら

(126) の乳酸菌菌体の Trp-P-1 および Trp-P-2 に対する吸着率の報告から比較すると、乳酸菌菌体よりも弱いと判断できる。しかし、*Penicillium candidum* のチーズ製造における主な役割は、*Penicillium candidum* が生成した酵素によるタンパク質分解であり、その作用により生成した水溶性窒素化合物のカマンベールチーズにおける強い抗変異原性活性については、すでに第3章で示したとおりである。*Penicillium candidum* にタンパク質分解作用の他に、乳酸菌よりは弱いながらも Trp-P-1 に対する抗変異原性活性と吸着効果が認められたことは、カマンベールチーズチーズにおける *Penicillium candidum* の安全性と生理的機能の有用性の一つが確認できたといえる。

以上のことから、4種の乳酸菌、*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*、*Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis*、*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* および *Penicillium candidum* で製造した発酵乳全てに抗変異原性が認められ、*Penicillium candidum* の Trp-P-1 に対する強い吸着率があることが明らかとなった。

第4節 要 約

Salmonella typhimurium TA98から造成されたストレプトマイシン依存株SD510株のTrp-P-1の変異原性に対する*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*、*Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis*、*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* および *Penicillium candidum* を用いて製造した発酵乳の経時的な抗変異原性の変化について検索を行った。

その結果、4種の乳酸菌による発酵乳にはそれぞれ強い抗変異原性が認められ、発酵時間の経過とともに抗変異原性は上昇し、抗変異原性の経時的な変化は同様の傾向を示した。*Penicillium candidum* により発酵を行った発酵乳は、乳酸菌の発酵乳よりも低い抗変異原性を示したが、発酵5日目までは発酵時間の経過とともに抗変異原性は上昇した。また、*Penicillium candidum* により発酵を行った発酵乳と超音波処理後の発酵乳との抗変異原性の相違はみられず、*Penicillium candidum* の菌体内成分は抗変異原性に影響を与えないことがわかった。

次に、*Penicillium candidum* 菌体に対するTrp-P-1の吸着試験を行った結果、*Penicillium candidum* 菌体に対するTrp-P-1の強い吸着作用が認められ、最も強い吸着率で84.4%を示した。また、pHの吸着率への影響は大きく、pH1~5、6~9、10~11ではそれぞれ0.9~48.0%、68.2~66.0%、41.4~31.6%の吸着率であり、pH6~9で強い吸着率を示した。

これらのことから、本研究のチーズ製造にスターターとして用いた4種の乳酸菌 および *Penicillium candidum* で発酵を行った発酵乳にTrp-P-1に対する抗変異原性あることがわかった。さらに、*Penicillium candidum* 菌体にTrp-P-1に対する吸着効果があることが明らかとなった。

第5章 ラットのTrp-P-1排泄におよぼすカマンベールチーズ投与の影響

第1節 緒言

第2、3、4章では、それぞれ各種ナチュラルチーズ、カマンベールチーズ、カマンベールチーズの製造に用いた乳酸菌と*Penicillium candidum*の抗変異原性について*in vitro*で検索を行い、いずれも抗変異原性を示す結果が得られ、とくにカマンベールチーズについては市販品においても本研究で製造したカマンベールチーズにおいても著しく強い抗変異原性を示したが、*in vivo*において、チーズがどのような作用を示すか不明である。

一方、本研究で用いてきたTrp-P-1をはじめとするアミノ酸加熱分解物は、調理中に少なからず発現する物質であり、Trp-P-1 (3-amino-1,4-dimethyl-5*H*-pyrido[4,3-*b*] indole) および Trp-P-2 (3-amino-1-methyl-5*H*-pyrido[4,3-*b*] indole) は、マウスに肝臓癌を誘発する報告(79,116)もされている我々の最も身近に存在する危険な変異原物質であるといえる。これら変異原物質の摂取を回避できない状況の中で、体内において変異原物質の変異原性を減弱したり失活させる作用がある食物を見い出すことは重要なことといえる。その中で、乳酸菌およびその発酵乳についていくつか報告されている。川瀬ら(64)は、ラットに乳酸菌菌体とTrp-P-1を一緒に摂取させた時、糞および尿中へのTrp-P-1の排出が促進されたことを報告しており、また、乳酸菌や発酵乳の摂取によって糞尿自体の変異原性が軽減する結果が報告されている(37,39,72)。チーズについては、癌細胞の増殖抑制作用(129)や胃潰瘍の進行を抑制する働き(97)についての報告はあるものの、チーズと変異原物質を一緒に摂取したときの糞および尿へのチーズの排泄効果に関する報告は全くない。チーズも乳酸菌を用いた発酵乳製品であるため、乳酸菌やその発酵乳と類似した作用を示すことが期待できる。

そこで本章では、ラットにカマンベールチーズとTrp-P-1を投与し、排出された尿および糞から変異原物質を抽出し、それら抽出液中のTrp-P-1量の測定および変異原性試験を行い、カマンベールチーズのTrp-P-1の変異原性への影響について検索を行った。ラットの尿および糞抽出液中のTrp-P-1の測定には高速液体クロマトグラフィ(HPLC)を用いた。また、変異原性試験としては指標菌として*Salmonella typhimurium* TA98株を用いた。

第2節 実験方法

2-1 動物実験

2-1-1) 動物飼育

本研究では、8週齢雄wistar系ラット（日本SLC）を、1群5匹ずつ用いた。ラットの飼育条件としては、室温22℃、湿度55%、午前5:00～午後7:00まで点灯、午後7:00～午前5:00まで消灯とし、明暗14-10時間サイクルで飼育した。また、飲料水は水道水を用い、自由給水とした。

ラットは環境に慣れさせるために3日間予備飼育を行い、4日目に代謝ケージ（夏目製作所）に移し、1ケージで1匹のラットを飼育した。

2-1-2) 動物実験

ラットの餌は、粉末飼料 CE-2（日本クレア）を基礎飼料として用いた。カマンベールチーズは、凍結乾燥後、粉末にした。基礎飼料のみを与えた群はコントロール群、基礎飼料にTrp-P-1のみ添加し与えた群をTrp-P-1投与群、基礎飼料に凍結乾燥粉末チーズを10%または30%の割合になるように添加し与えた群は、それぞれチーズ10%投与群、チーズ30%投与群とした。また、基礎飼料にチーズ30%のみ添加した群は、チーズのみ投与群とした。餌は、16gの制限食とした。Trp-P-1は2mg/mlの水溶液とし、500 μ lを餌にしみこませ、Trp-P-1として1mgを摂取させた。予備飼育終了後のラットの飼育日程はFig. 5-1に示した。つまり、1日目から3日目までは基礎飼料を与え、4日目から10日目まではコントロール群には基礎飼料、Trp-P-1投与群にはTrp-P-1を浸み込ませた飼料、チーズ10%または30%投与群には基礎飼料にTrp-P-1とチーズを添加した飼料、チーズのみ投与群には基礎飼料にチーズのみ添加した飼料を与えた。ラットの尿および糞は、1日目から3日目までの3日間分および9日目から11日目までの3日間分を採取後混合し、それぞれ phase-1 および

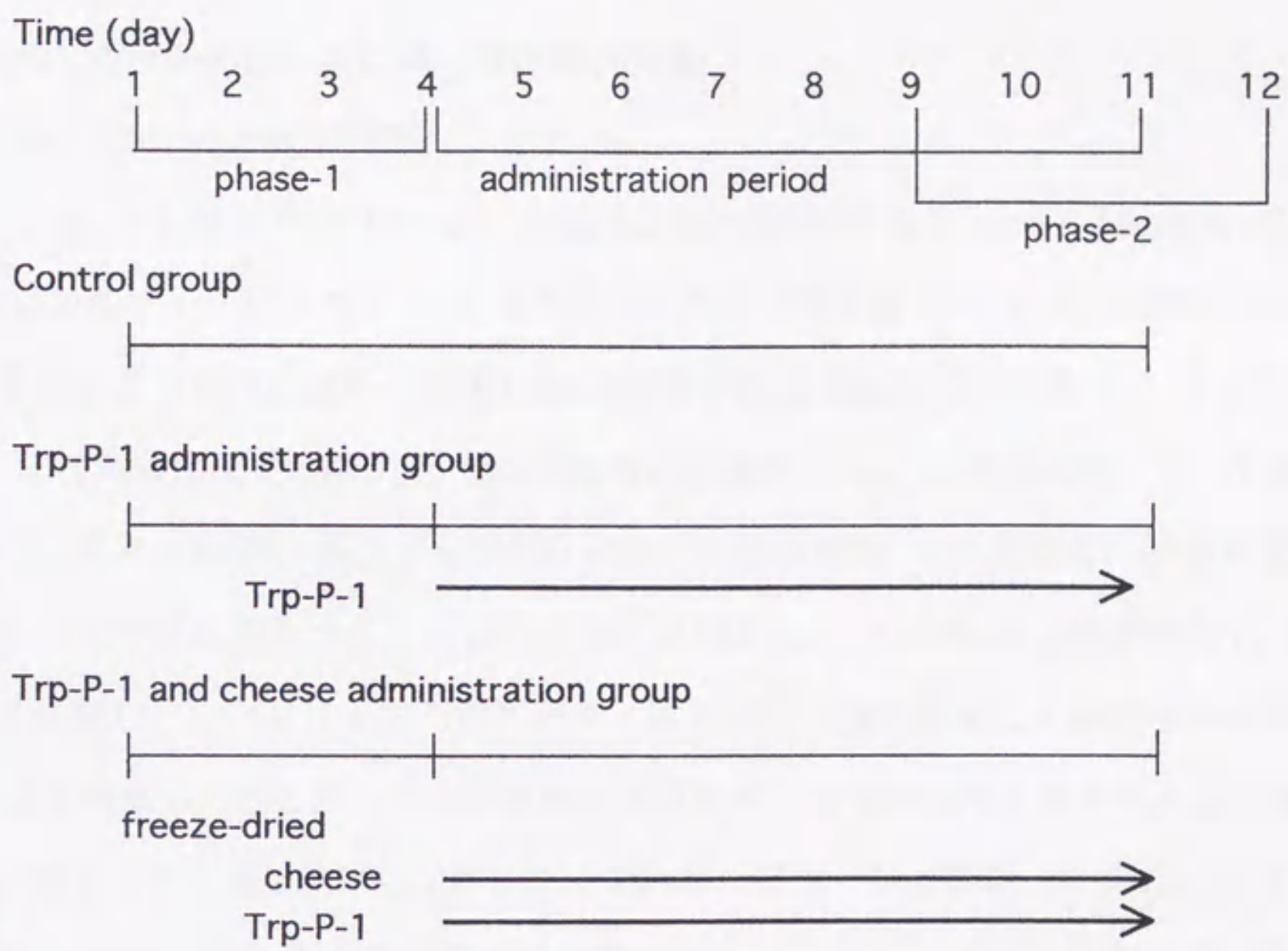


Fig. 5-1 Schedule for rat's feeding and administration

phase-2 とし尿および糞の抽出物の調製を行うまで-20℃で保存した。

2-2 ラットの尿および糞の抽出液の調製

2-2-1) 尿の抽出液の調製

ラットの尿中の Trp-P-1 を HPLC にて定量するために、Hayatsu ら (37,38) のブルーレイオン 吸着法およびそれを一部変更して用いた川瀬ら (64) の方法により HPLC 試料を調製した。調製方法は Fig. 5-2 に示した。すなわち、3日間分の尿を 2000rpm で 20 分間遠心分離を行い、上清を分離した。沈殿物にメタノール-アンモニア水 (28%) = 50:1 の混合溶液 50ml を加え、30 分間室温にて緩やかに振とうした。振とう後、2000rpm で 20 分間遠心分離を行い上清を分離し、ロータリーエバポレーターにて 40℃ で減圧乾固し、残渣を蒸留水 50ml に溶解し回収した。この回収液とはじめの上清を共栓付三角フラスコに移し、蒸留水で全量を約 100ml にした。これに、ブルーレイオン (フナコシ) を 400mg 加え、30 分間室温で緩やかに振とうし、ブルーレイオン に Trp-P-1 を吸着させた後、ブルーレイオン を回収し、新たにブルーレイオン を 200mg を加え、同様の操作を行った。この操作をさらに 2 回繰り返す、合計 1000mg のブルーレイオン を用いて Trp-P-1 を吸着させた。回収したブルーレイオン は 150ml の蒸留水でよく洗浄し、同様の操作を 3 回繰り返した。この洗浄液はガラス繊維ろ紙 (GA100, Toyo Roshi) を用いてろ過し、ブルーレイオン を完全に回収した。回収したブルーレイオン は、メタノール-アンモニア水 (28%) = 50:1 の混合溶液 100ml を加え、30 分間室温にて緩やかに振とうし、Trp-P-1 を溶出した。この溶出液はガラス繊維ろ紙を用いてろ過し、ブルーレイオン に新たにメタノール-アンモニア水混合溶液 100ml を加え同様の操作を行った。この操作をさらに 2 回繰り返した。ろ過された溶出液は、減圧乾固を行った。残渣はジメチルスルホキシド (ナカライ) 1ml および蒸留水 9ml で溶解した。

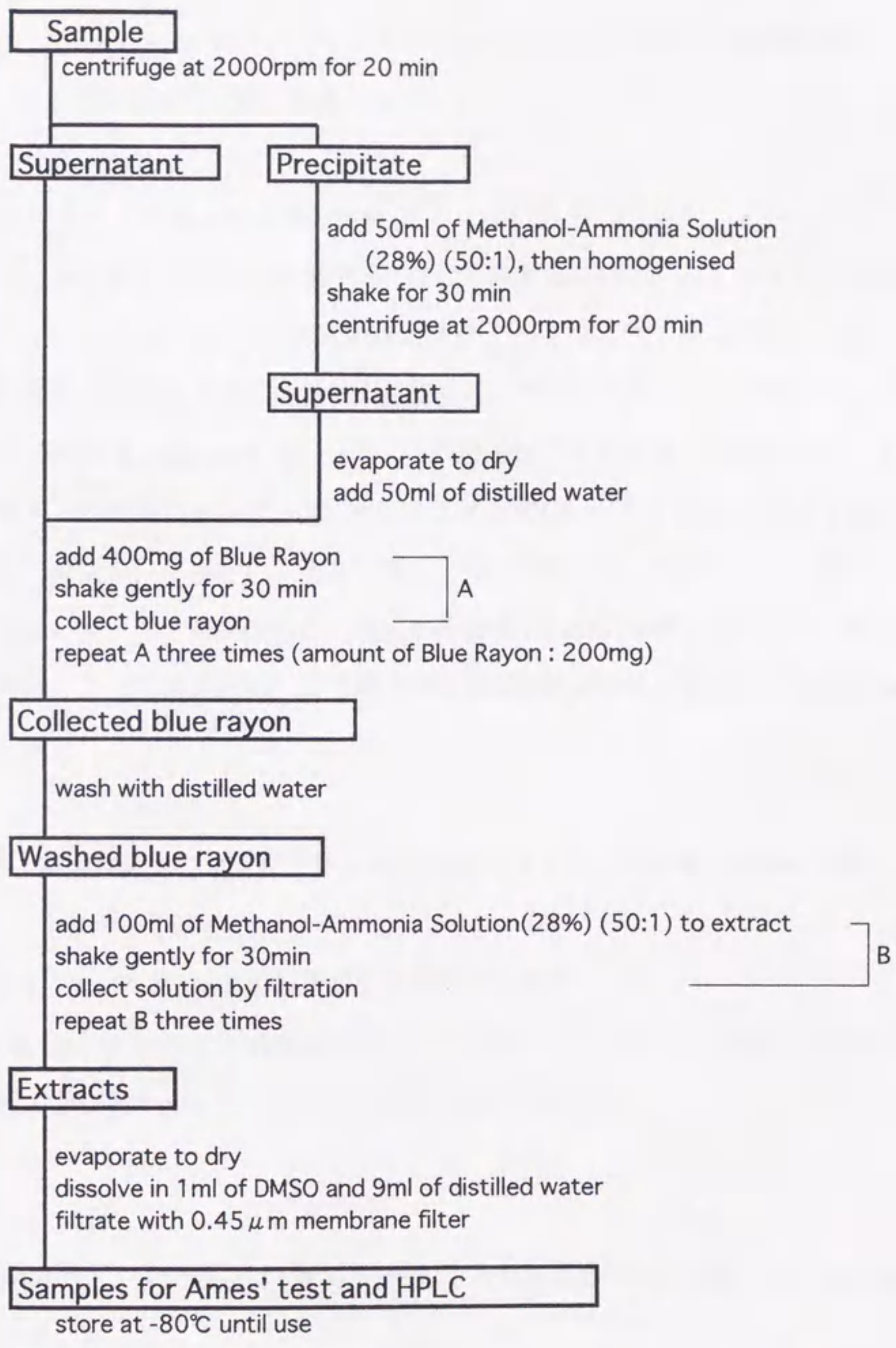


Fig. 5-2 Method for the preparation of rat's urine extracts

これを、孔径 $0.45\mu\text{m}$ のメンブランフィルター（富士フィルム）で滅菌ろ過し、HPLCおよび変異原性試験の試料とした。

2-2-2) ラットの糞の抽出液の調製

ラットの糞中のTrp-P-1をHPLCにて定量するために、Fig. 5-3に従い調製を行った。すなわち、3日間分の糞にメタノール-アンモニア水(28%) = 50:1の混合溶液 100mlを加え、乳鉢でよく粉碎し共栓付三角フラスコに移した。これを30分間室温で緩やかに振とうし、2000rpmで20分間遠心分離を行い、上清を得た。沈殿物にメタノール-アンモニア水(28%) = 50:1の混合溶液 100mlを加え、同様の操作を行い上清を分離し、はじめの上清と混合し、ロータリーエバポレーターにて減圧乾固し、残渣を蒸留水 100mlに溶解し回収した。以下の操作は、尿と同様に行い、得られた抽出液はHPLCおよび変異原性試験の試料とした。

2-3 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によるラットの尿および糞中のTrp-P-1の分析

2-3-1) Trp-P-1の尿および糞からの添加回収実験

糞 5g、尿 25g に20ppmになるようにTrp-P-1を添加し、HPLC分析を行い、尿および糞からのTrp-P-1の添加回収率を測定した。

2-3-2) 試料

試料には、本節 2-2-1) および 2-2-2) で調製したラットの尿および糞の抽出液を用いた。

2-3-3) HPLC測定

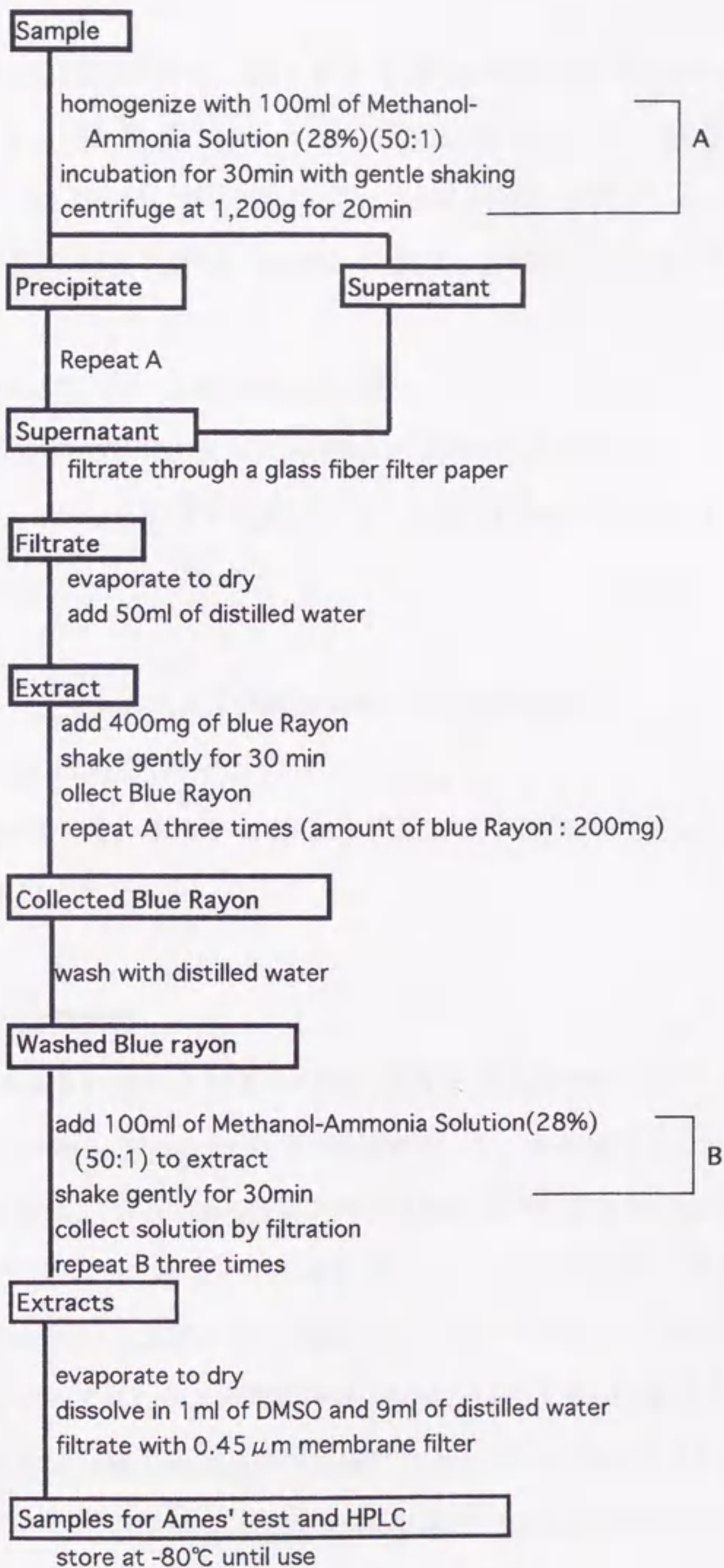


Fig. 5-3 Method for the preparation of rat's feces extracts

HPLC測定条件は、第4章2-4-3)-④と同条件で行った。

ただし、移動相は、アセトニトリル、リン酸緩衝液 [1/15M Na_2HPO_4 -1/15M KH_2PO_4 buffer (pH6.98)]およびトリエチルアミンを50 : 50 : 0.05の割合で調製し用いた。試薬は、いずれもナカライテスク製を用いた。

2-3-4) Trp-P-1標準溶液の検量線

Trp-P-1標準溶液 (10~100 $\mu\text{g}/10\text{ml}$) とアセトニトリルを1:1の割合で混合し、その20 μl をHPLCに注入し、得られたピークエリアより検量線を作成した。

2-4 ラットの尿および糞抽出液の変異原性試験

2-4-1) 試料

試料には、本節2-2-1)および2-2-2)で調製したラットの尿および糞の抽出液を用いた。

2-4-2) 指標菌

ラットの尿および糞抽出液の抗変異原性を調べるための指標菌として、*Salmonella typhimurium* TA98株を用いた。本株は、カリフォルニア大学バークレー校のB.N.Ames教授(5)から分譲を受けたものを用いた。

第2、3および4章において、抗変異原性試験に *Salmonella typhimurium* TA98株から造成したストレプトマイシン依存株SD510を用い検索を行ってきたが、本実験においてSD510株を用いて検索を行った結果、ラットの尿および糞の抽出液の変異原性によるSD510株の変異復帰コロニーを検出することができなかつたため、*Salmonella typhimurium* TA98株 (以下TA98株) を用い変異原性試験を行った。その結果、TA98株の変異復帰コロニーを

検出することができ、ラットの尿および糞の抽出液に変異原性があることが確認できたため、本実験では、TA98株を用い検索を行うことにした。

2-4-3) 指標菌の培養

試標菌として用いた TA98株の培養には、OX液体培地 (OXOID NUTRIENT BROTH No.2, pH7.0) を用い、-80℃で保存していたTA98株培溶液を接種後、37℃で振とう培養を行った。振とう培養は、吸光度 (O.D.660nm) で60~65 (5.0×10^8 CFU/ml) になるまで培養した。

2-4-4) 培地

2-4-4)-① OX液体培地

NUTRIENT BROTH No.2 (OXOID) 2.5gを蒸留水100mlに溶解し、オートクレーブで滅菌した。

2-4-4)-② Vogel-Bonner (VB) 培地

硫酸マグネシウム10g、クエン酸一水和物100g、リン酸水素二カリウム500g、リン酸水素アンモニウムナトリウム四水和物175gを、記載順に蒸留水670mlに溶解し、オートクレーブで滅菌した。試薬は全てナカライテスク製 (特級) を用いた。

2-4-4)-③ 最小グルコース (MG) 培地

粉末寒天 (伊那食品) 7.5gを、蒸留水465mlに溶解し、オートクレーブで滅菌した。その後、VB培地10mlと滅菌済みの40%グルコース溶液25mlを無菌的に添加した。完全に攪拌後、シャーレに分注した。

2-4-4)-④ 0.5mMヒスチジン/ビオチン溶液

D-ビオチン (ナカライ) 0.0112g、L-ヒスチジン (ナカライ) 0.0078gを蒸留水100mlに溶解し、オートクレーブで滅菌した。

2-4-4)-⑤ 軟寒天 (Soft agar)

粉末寒天 0.6g、塩化ナトリウム (ナカライ) 0.5gを蒸留水100mlに溶解し、オートクレーブで滅菌した。その後、凝固する前に、本節 2-3-4)-④で記した方法により調製した0.5mヒスチジン/ビオチン溶液10mlを無菌的に加えた。

2-4-4)-⑥ S-9 mix の調製

Cofactor (オリエンタル酵母) を、9 mlの蒸留水に溶解した後、フィルター (DISMIC-25CS, 0.45 μ m, ADVANTEC) を用い、ろ過滅菌を行った。これに、ラット S-9, Phenobarbital & 5,6-Benzoflavone-Induced (オリエンタル酵母) を、1 ml無菌的に加え調製し、これをS-9 mix とした。S-9 mix は、実験中氷冷下に置いた。

2-4-5) CFテスト

CFテストは、本実験で用いた指標菌の性質を確認するために行った。つまり、TA98株はヒスチジン依存性、R-factorの存在、uvrB変異およびrfa変異の存在に対する確認を行った。各指標菌はCFテスト後、マスタープレートを作成し、変異原性試験に用いた。

2-4-5)-① ヒスチジン要求性確認試験

0.1Mヒスチジン溶液および 0.5mMビオチン溶液をそれぞれ0.1ml塗抹し

たMG培地、0.5mMビオチン溶液のみを0.1ml塗沫したMG培地、なにも塗沫しないMG寒天培地に、OX液体培地で37℃約10時間培養したTA98株の培養液を、白金耳を用い塗沫し、37℃48時間の培養後、ヒスチジンを塗沫したプレートのみコロニーが形成されていることを確認し、ヒスチジン要求性株と判断した。

2-4-5)-② R-factor (pK101) の確認 (アンピシリン耐性) 試験

0.1Mヒスチジン溶液、0.5mMビオチン溶液をそれぞれ0.1ml、およびアンピシリン溶液(8mg/ml)を62.5 μ l塗沫したMG培地に、TA98株の培養液を白金耳を用い塗沫し、37℃48時間培養、生育したコロニーをR-factor存在株と判断した。

2-4-5)-③ uvrB変異の確認 (紫外線に対する感受性) 試験

OX寒天培地2枚に、TA98株の培養液を白金耳を用い塗沫した。15Wの殺菌性(紫外線)ランプを33cmの間隔で6秒間照射したOX培地と照射しないOX培地を、37℃で24時間培養後、照射した培地上にコロニーの生育が見られず、照射しなかった培地に生育が見られた場合、uvrB変異が存在すると判断した。

2-4-5)-④ rfa変異の確認(クリスタルバイオレットに対する感受性)試験

TA98株の培養液0.1mlと45℃に保っておいた軟寒天2mlを混合し、OX寒天培地上に重層した。この培地上にペーパーディスク(ϕ 8mm)を置き、クリスタルバイオレット溶液(1mg/ml)10 μ lを染み込ませ、37℃で24時間培養後、ペーパーディスクの周りに阻止円が形成されている場合、rfa変異が存在するものと判断した。

2-4-6) 変異原性試験

変異原性試験はMaron and Ames(76) の方法に準じ、プレートインコーポレーション法で行った。すなわち、試料溶液100 μ l、S-9 mix 300 μ lおよびTA98株の培養液100 μ lを滅菌試験管内で混合し、37°Cで30分間のプレインキュベーションを行った。プレインキュベーション後、45°Cに保持されたSoft agar 2mlを加え、直ちに最小グルコース培地に均一広がるように注いだ。培地表面が凝固したら、37°Cで48時間培養した。培養終了後、変異復帰コロニー数を計測した。コントロールとして、試料溶液の代わりにTrp-P-1、または蒸留水を用いた。

2-4-7) 有意差検定法

有意差の検定は、第2章 2-5-3) と同様の方法で行った。

第3節 結果および考察

3-1 ラットの尿および糞の排出量

各群の基礎飼料投与期間であるphase-1 およびTrp-P-1またはチーズの投与期間であるphase-2 で採取した尿および糞量をTable 5-1に示した。尿量はコントロール群以外はphase-1 より phase-2 の量が増加し、糞量は全ての群においてphase-1 より phase-2 の量が減少の傾向を示したが、いずれの群にも有意な差はみられなかった。

3-2 HPLCによるラットの尿および糞中のTrp-P-1の分析

3-2-1) Trp-P-1の尿および糞からの添加回収実験

ラットの尿および糞中のTrp-P-1分析を行う前に、基礎飼料のみを与えたラットの糞および尿を用い、濃度既知のTrp-P-1を添加し、回収率の測定を行った。糞5g、尿25gに20ppmになるようにTrp-P-1を添加し、HPLC分析を行い、尿および糞からのTrp-P-1の添加回収率を測定した結果をTable 5-2に示した。回収率は、糞では83.5%、尿では86.6%であり、同様の方法で回収試験を行った川瀬ら(64)の結果と類似した結果を得ることができた。

3-2-2) Trp-P-1標準溶液の検量線

HPLCにより求めたラットの尿および糞抽出液中のTrp-P-1の定量を行うために、Trp-P-1の標準液を調製し、Fig. 5-4 に示す検量線を作成し、Trp-P-1の定量に用いた。

3-2-3) ラットの尿および糞中のTrp-P-1の分析

Fig. 5-5 は、尿抽出液のHPLCのクロマトグラムを示している。Aはコントロール群、BはTrp-P-1投与群、Cはチーズ10%投与群、Dはチーズ30%投

Table 5-1 Urinary and fecal weight of rats on phase 1 and phase 2

	Control		Trp-P-1		10%cheese		30%cheese		Cheese	
	Urine	Feces	Urine	Feces	Urine	Feces	Urine	Feces	Urine	Feces
Phase 1	30.64±6.4	15.22±2.46	26.08±3.0	16.35±1.02	26.68±2.2	15.12±0.90	23.38±2.2	17.73±1.82	20.68±2.8	15.38±0.75
Phase 2	27.94±5.7	12.10±1.70	29.42±5.0	13.33±1.17	31.82±5.4	12.10±0.75	33.3±3.9	10.74±0.92	33.28±2.5	10.14±0.66

Average amount of daily excreted urine and feces for three days. Values were means ± SD (n=5)

Table 5-2 Recoveries of Trp-P-1 from the samples

Samples	Recovery(%)
Feces	83.5±0.07
Urine	86.6±0.02

Average of three observations. Values were means ±SD.

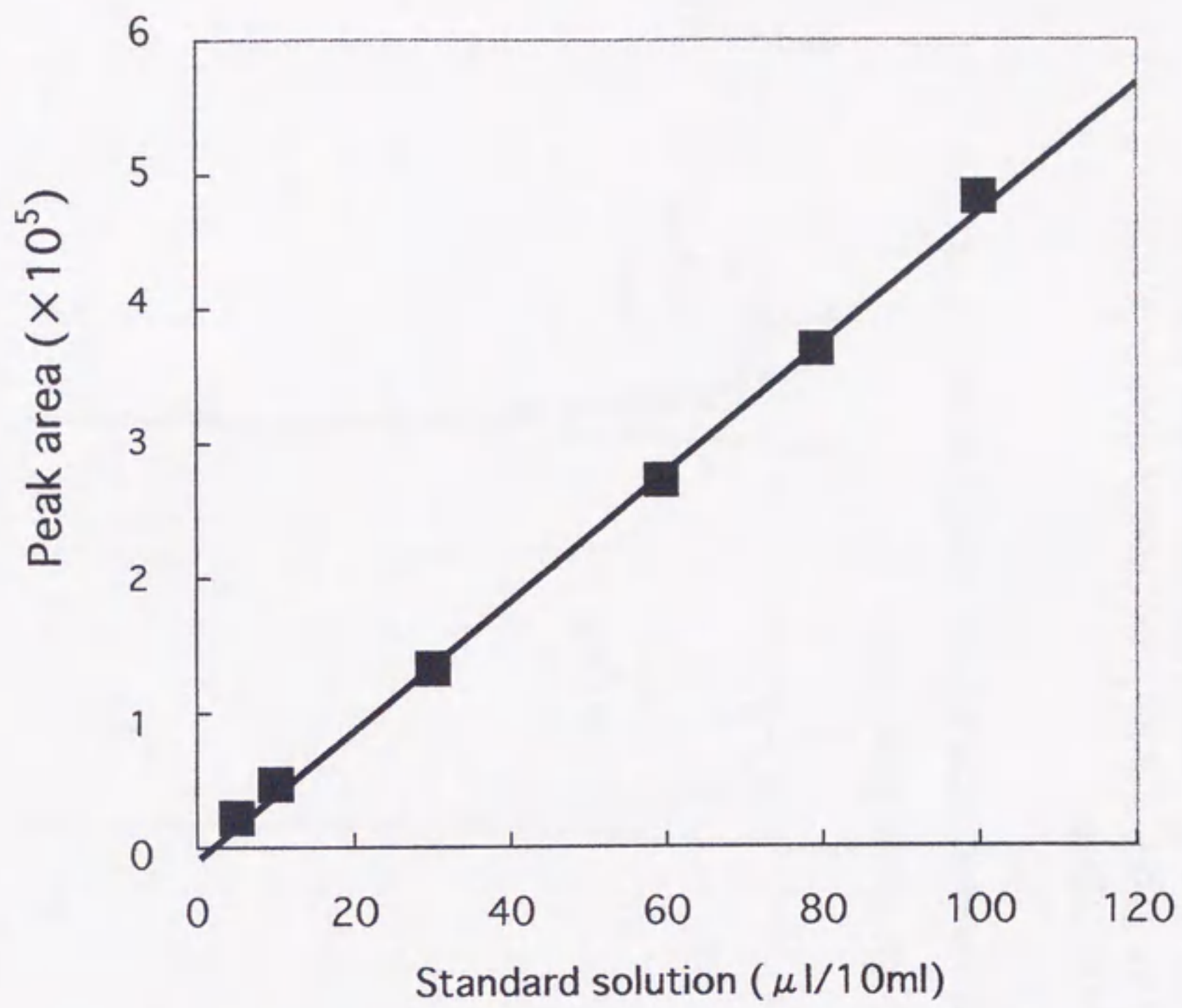


Fig. 5-4 Calibration curve of Trp-P-1 by HPLC

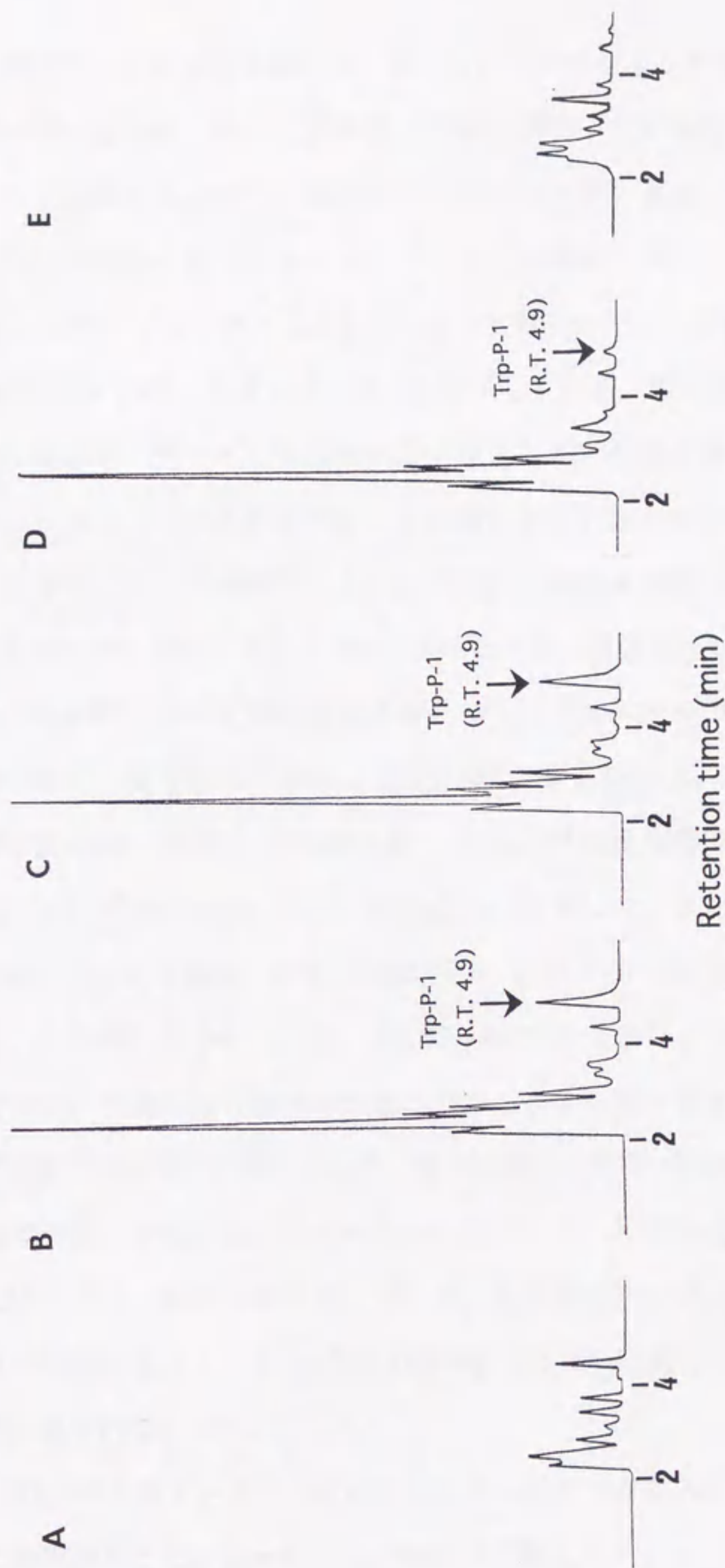


Fig. 5-5 HPLC chromatograms of the urine extract of rat.

- A: Control
- B: Administred with Trp-P-1
- C: Administred with Trp-P-1 and 10% freeze-dried cheese
- D: Administred with Trp-P-1 and 30% freeze-dried cheese
- E: Administred with 30% freeze-dried cheese

与群、Eはチーズのみ投与群を示している。リテンションタイム4.9分のピークは、Trp-P-1投与群、チーズ10%投与群およびチーズ30%投与群に検出され、コントロール群およびチーズ投与群には検出されず、また、Trp-P-1のみを泳動しピークが現われたリテンションタイムと同様のリテンションタイムであったため、リテンションタイム4.9分のピークはTrp-P-1と同定した。Fig. 5-6は、糞抽出液のHPLCのクロマトグラムを示している。糞の抽出液においても、Trp-P-1投与群、チーズ10%投与群およびチーズ30%投与群のクロマトグラムのリテンションタイム4.9分にピークが現われ、Trp-P-1が検出された。これらのことから、ラットが摂取したTrp-P-1が、尿および糞中に排泄されていることがわかった。次に、これらTrp-P-1のピークの定量を行った。Fig. 5-7は、Trp-P-1投与群、チーズ10%投与群およびチーズ30%投与群の尿および糞抽出液中のTrp-P-1量を示している。尿抽出液中から検出されたTrp-P-1量は、Trp-P-1投与群、チーズ10%投与群、チーズ30%投与群はそれぞれ47.84 μ g/cage、47.66 μ g/cage、は12.32 μ g/cageであった。また、糞抽出液中から検出されたTrp-P-1量は、Trp-P-1投与群、チーズ10%投与群、チーズ30%投与群で、それぞれ41.94、38.25、24.85 μ g/cageであり、Trp-P-1投与群の尿と糞のTrp-P-1量は近い値を示しており、尿および糞に排泄されるTrp-P-1量はほぼ同量だということがわかった。尿抽出液において、Trp-P-1投与群とチーズ10%投与群とでは変化は見られなかったが、チーズ30%投与群では有意に減少した($P < 0.05$)。糞抽出液では、Trp-P-1投与群のTrp-P-1量に比較し、チーズ10%投与群は低下し、チーズ30%投与群ではさらに低下したが、いずれも有意な差は見られなかった。

HPLCのクロマトグラムには、Trp-P-1のピーク以外にも、いくつか泳動された物質があった。Trp-P-1は、体内で代謝されることが知られていることから(102)、HPLCのクロマトグラムに泳動されたTrp-P-1以外のTrp-P-1の

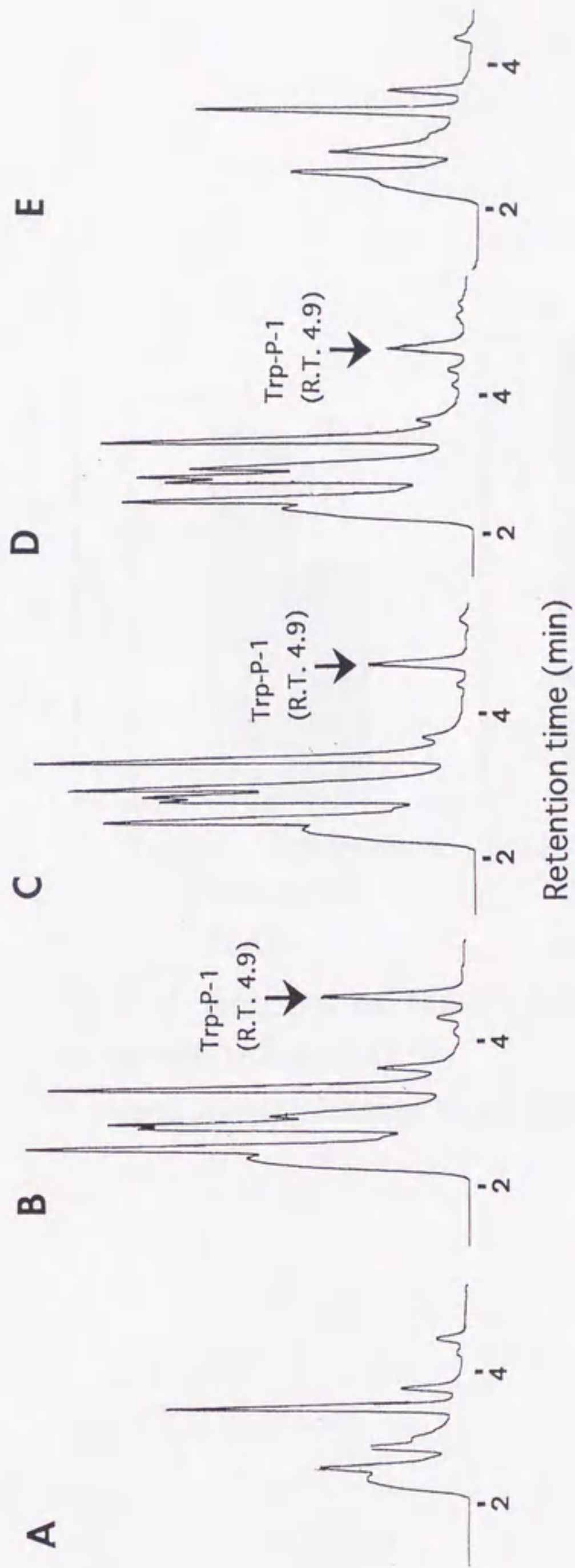


Fig. 5-6 HPLC chromatograms of the fecal extract of rat.

- A: Control
- B: Administrated with Trp-P-1
- C: Administrated with Trp-P-1 and 10% freeze-dried cheese
- D: Administrated with Trp-P-1 and 30% freeze-dried cheese
- E: Administrated with 30% freeze-dried cheese

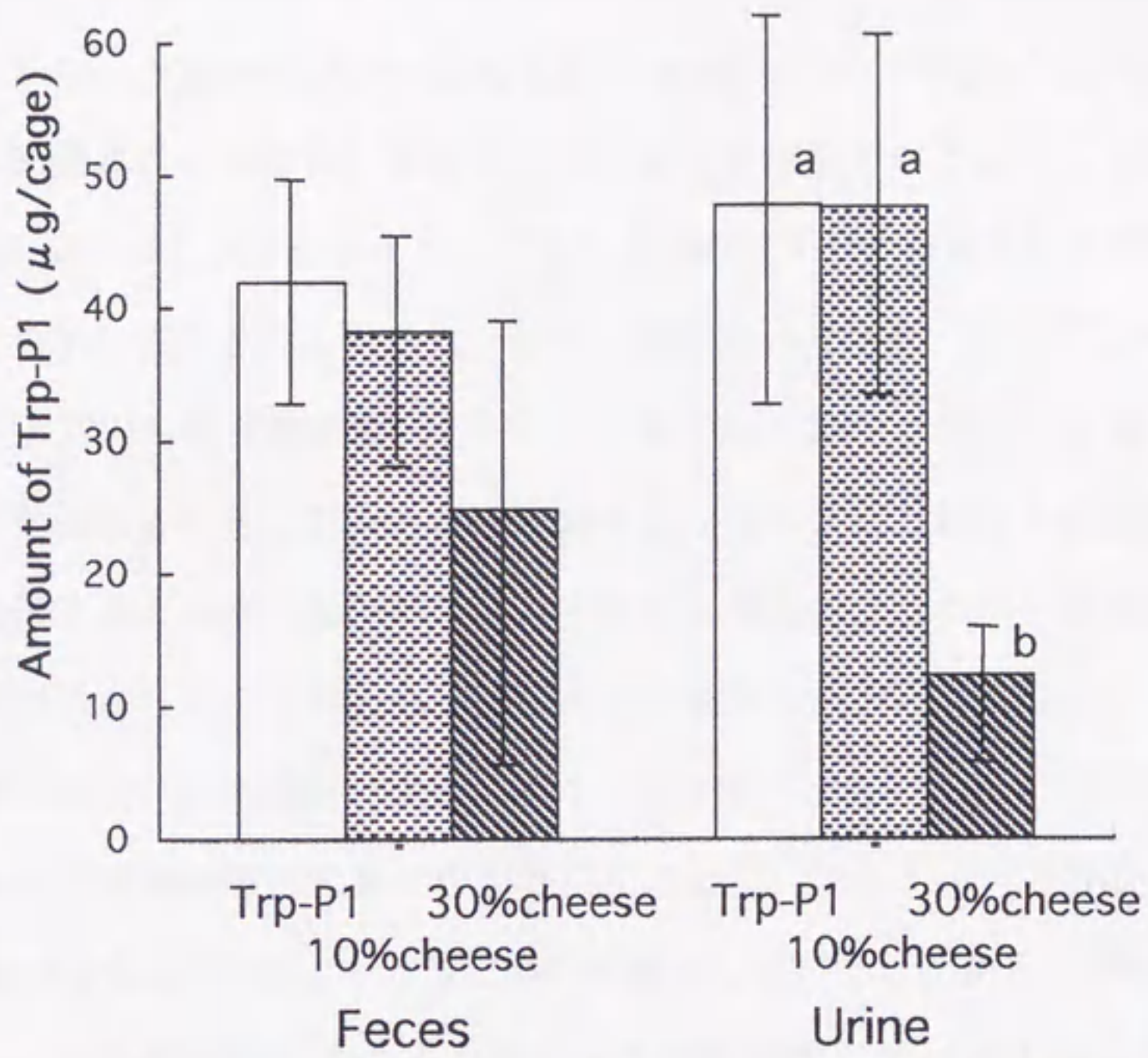


Fig. 5-7 Amount of Trp-P1 extracted from feces and urine of rats

^{a,b} Means with different letters differ ($P < 0.05$)

代謝物と考えられる物質について比較を行った。Fig. 5-8 は、尿抽出液のリテンションタイム 2.6 分に泳動された物質ののピークエリアを示している。この物質は、Trp-P-1投与群、チーズ10%投与群およびチーズ30%投与群に検出され、コントロール群およびチーズ投与群には検出されていないことから、このピークに泳動された物質は、Trp-P-1の代謝物と推測できる。Fig. 5-9 は、同様に尿抽出液のリテンションタイム 2.4分 および 2.7分に泳動された物質のピークエリアを示している。これらピークは、Trp-P-1投与群、チーズ10%投与群およびチーズ30%投与群に検出され、コントロール群およびチーズ投与群にも少量ながら検出された。コントロール群およびチーズ投与群にも検出されたことは、後述するように、基礎飼料のみを投与し得られた尿からの尿抽出液にも変異原性が示されたことから、はじめから尿中の成分として存在していた変異原物質ではないかと推測できる。また、Trp-P-1投与群、チーズ10%投与群およびチーズ30%投与群に多く検出されたことは、コントロール群およびチーズ投与群のピークエリアより有意に多い値を示していることから ($P < 0.01$)、このピークに泳動された物質もTrp-P-1の代謝物ではないかと考えられる。Fig. 5-10も同様に、尿抽出液のリテンションタイム 2.9 分に泳動された物質のピークエリアを示している。この物質は、Fig. 5-9 同様に、全ての群に泳動されたが、コントロール群、チーズ投与群および30%投与群に比較し、Trp-P-1投与群およびチーズ10%投与群は有意に多い値を示し ($P < 0.01$)、このピークに泳動された物質もTrp-P-1の代謝物ではないかと考えられる。

Fig. 5-8 において泳動された物質量は、Trp-P-1投与群、チーズ10%投与群およびチーズ30%投与群の間に差は見られなかったが、Fig. 5-9 において泳動された物質量は、顕著な差は見られないものの、チーズ投与による低下が示された。また、Fig. 5-10で泳動された物質量は、チーズ30%投与群において、Trp-P-1投与群およびチーズ10%投与群に比較し有意に低い値を示してい

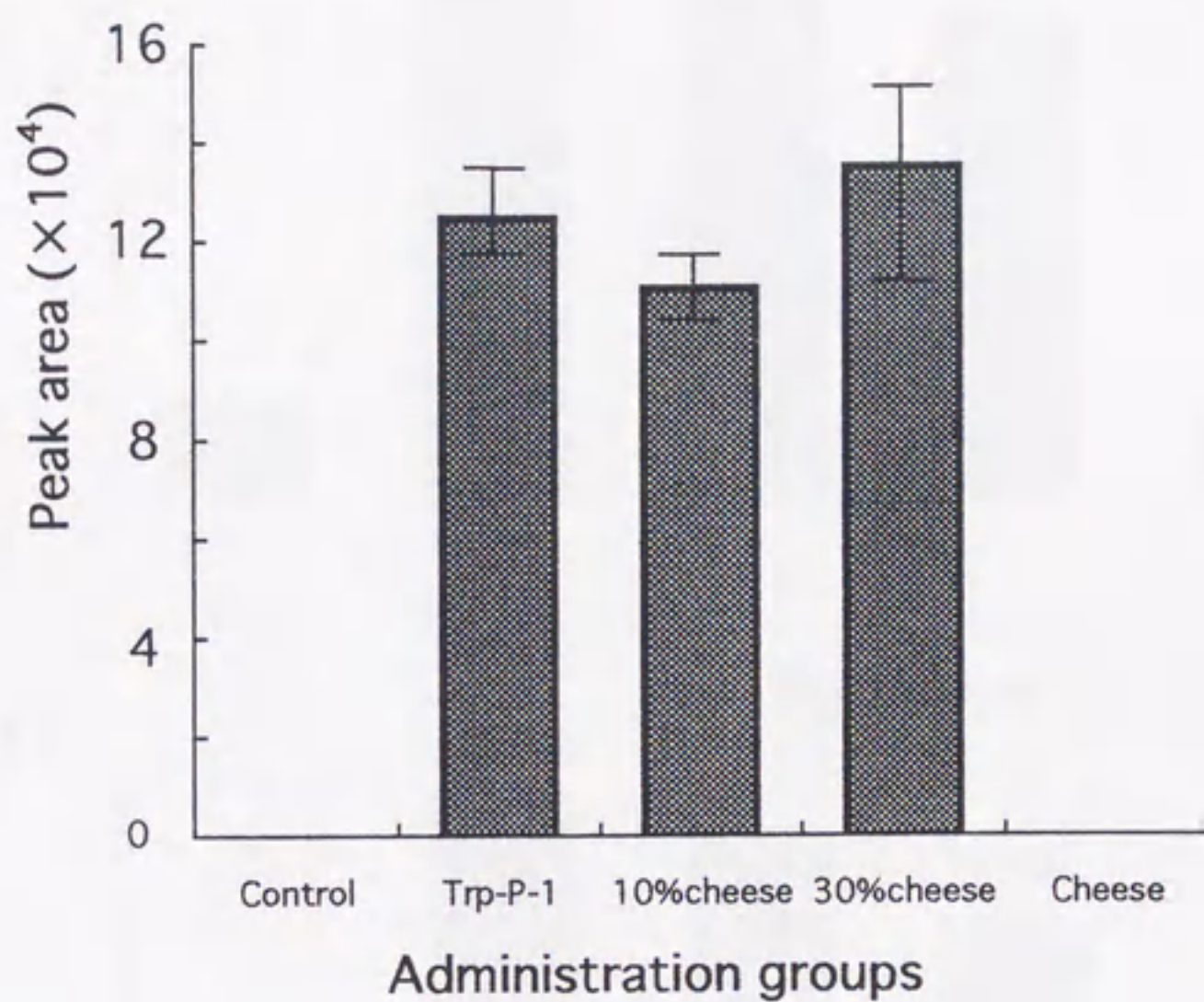


Fig. 5-8 Concentration of Trp-P-1 metabolites from the urinary extract of rat at retention time 2.6 min by HPLC analysis.

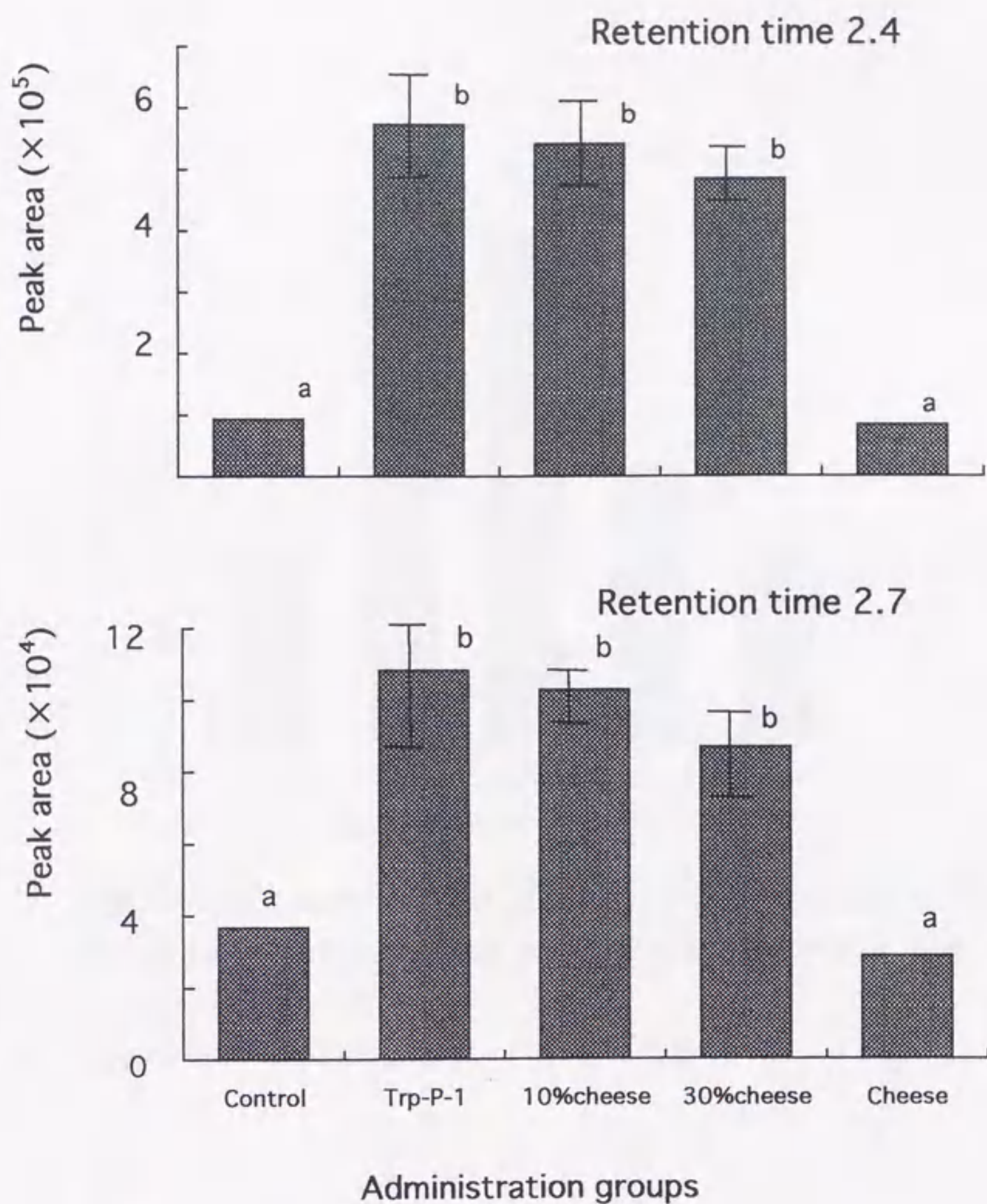


Fig. 5-9 Concentration of Trp-P-1 metabolites from the urinary extract of rat at retention time 2.4 and 2.7 min by HPLC analysis

^{a,b}Mean with different superscript letters differ ($P < 0.01$)

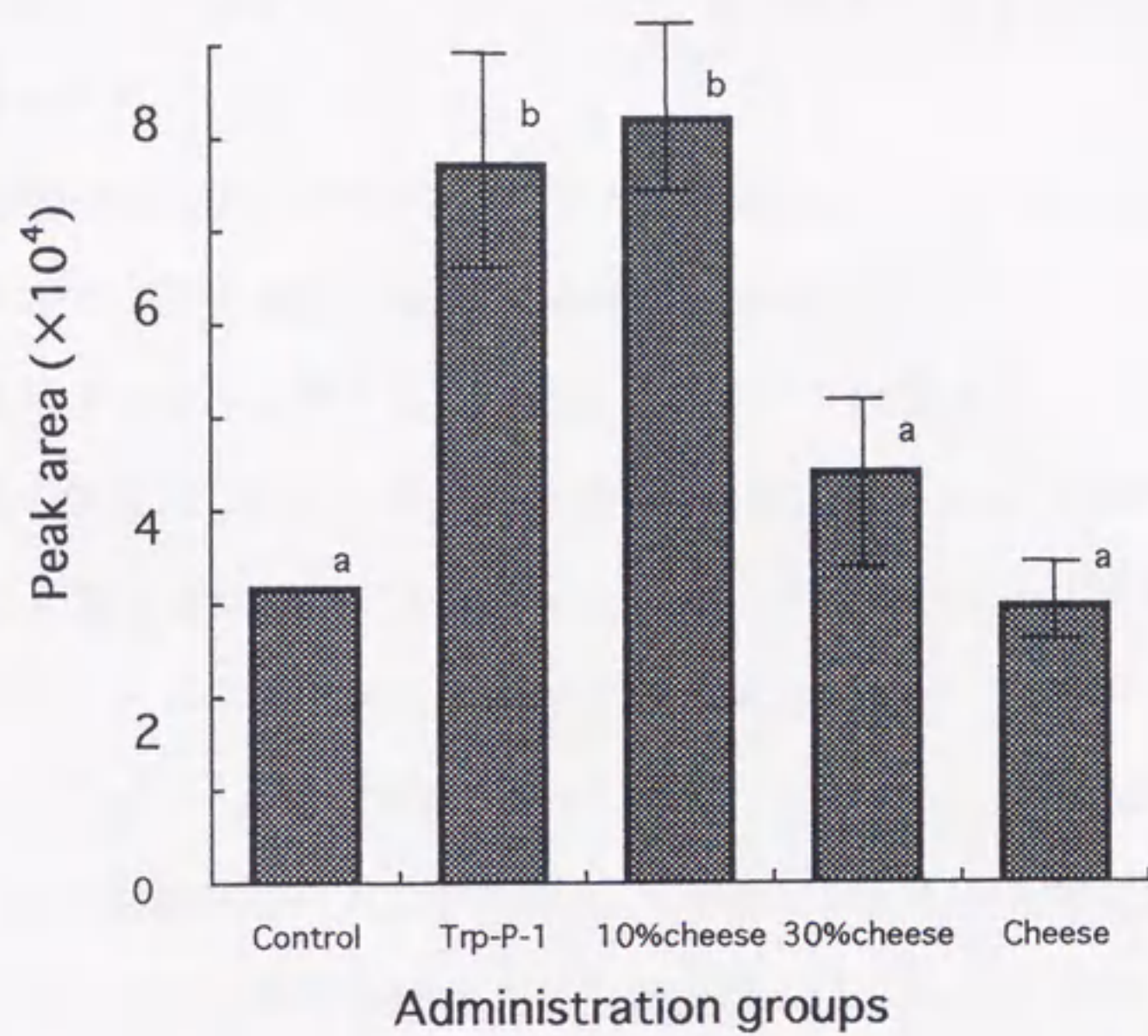


Fig. 5-10 Concentration of Trp-P-1 metabolites from the urinary extract of rat at retention time 2.9 min by HPLC analysis

^{a,b}Mean with different superscript letters differ ($P < 0.01$)

た($P < 0.01$)。Fig. 5-7において、尿抽出液中のTrp-P-1量がチーズ投与により有意に減少したことからも、これらの結果は、チーズの投与により、ラットの尿中に排出されるTrp-P-1 およびTrp-P-1の代謝物と考えられる物質の量が減少するといえる。

糞抽出液のHPLCのクロマトグラムに泳動されたTrp-P-1以外のTrp-P-1の代謝物と考えられる物質も尿抽出液と類似の傾向を示した。Fig. 5-11は、糞抽出液のリテンションタイム2.9分に泳動された物質のピークエリアを示している。この物質は、Fig. 5-8同様、Trp-P-1投与群、チーズ10%投与群およびチーズ30%投与群に検出され、コントロール群およびチーズ投与群には検出されていないことから、このピークに泳動された物質は、Trp-P-1の代謝物と推測できる。Fig. 5-12は、糞抽出液のリテンションタイム2.7分および3.4分に泳動された物質のピークエリアを示している。Fig. 5-9同様に、コントロール群およびチーズ投与群にも検出された物質は、はじめから尿中の成分として存在していた変異原物質であり、また、Trp-P-1投与群、チーズ10%投与群およびチーズ30%投与群に検出された物質は、コントロール群およびチーズ投与群のピークエリアより多い値を示していることから、このピークに泳動された物質もTrp-P-1の代謝物ではないかと考えられる。Fig. 5-13は、糞抽出液のリテンションタイム2.4分に泳動された物質のピークエリアを示している。この物質は、Fig. 5-10同様に、全ての群に泳動されたが、コントロール群、チーズ投与群に比較し、Trp-P-1投与群、チーズ10%投与群および30%投与群に有意に多い値を示し($P < 0.05$)、このピークに泳動された物質もTrp-P-1の代謝物ではないかと考えられる。また、チーズ30%投与群は、Trp-P-1投与群およびチーズ10%投与群とも有意に少ない値を示した($P < 0.05$)。

糞抽出液のHPLCのクロマトグラムに泳動されたTrp-P-1以外のTrp-P-1の代謝物と考えられる物質も尿抽出液と類似の傾向を示したことから、チーズ

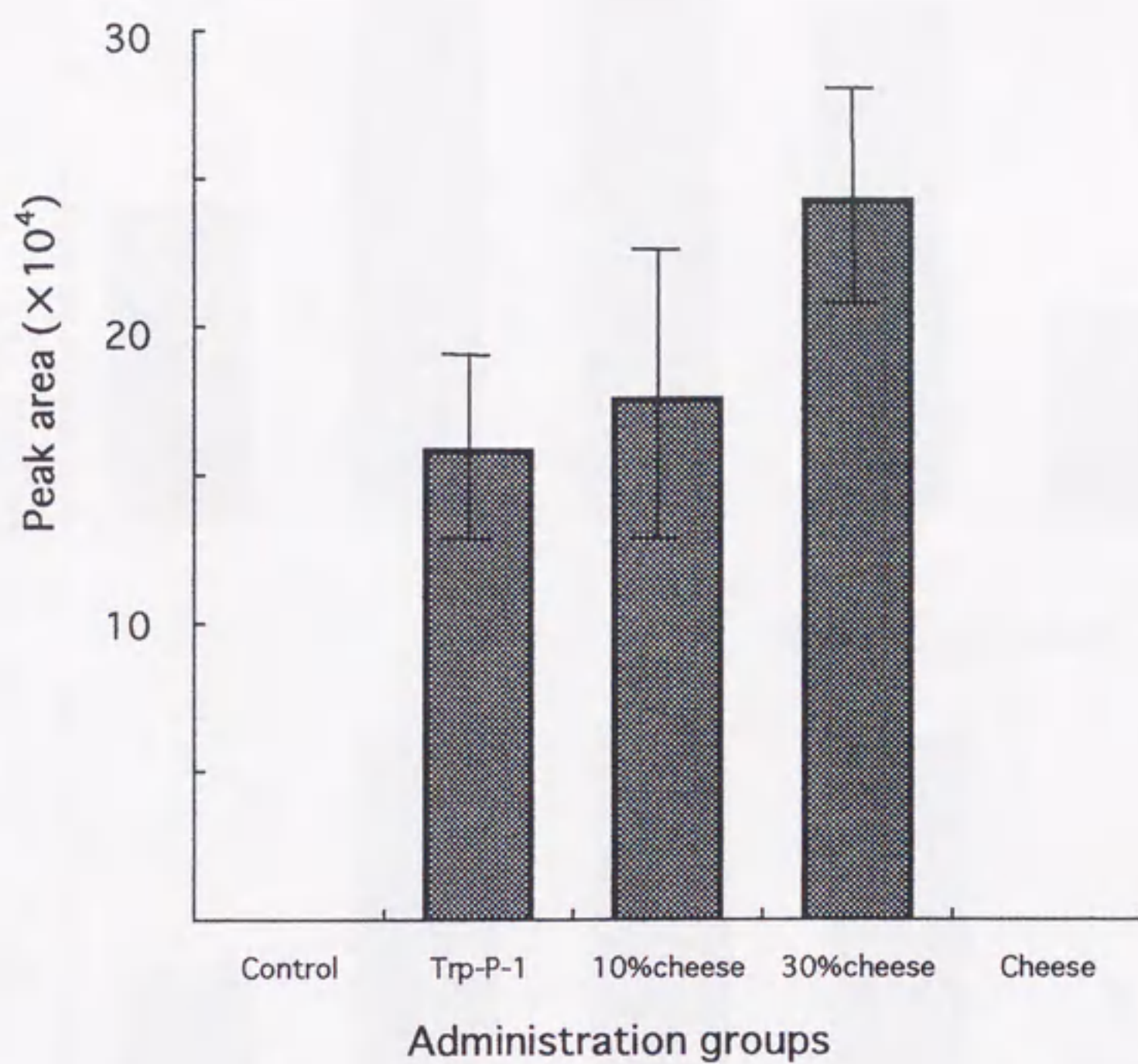


Fig. 5-11 Concentration of Trp-P-1 metabolites from the fecal extract of rat at retention time 2.9 min by HPLC analysis.

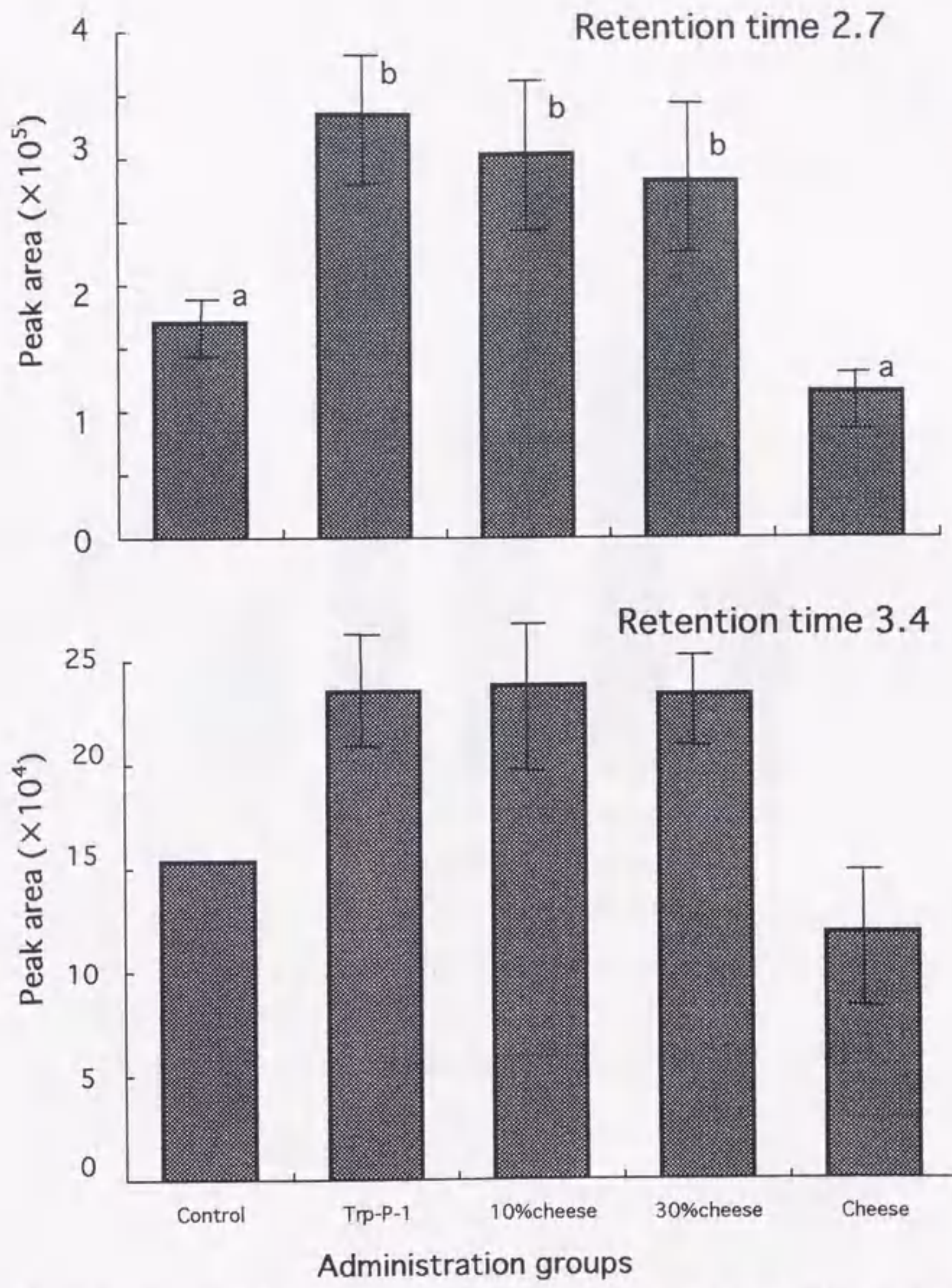


Fig. 5-12 Concentration of Trp-P-1 metabolites from the fecal extract of rat at retention time 2.7 and 3.4 min by HPLC analysis.

^{a,b}Mean with different superscript letters differ ($P < 0.01$)

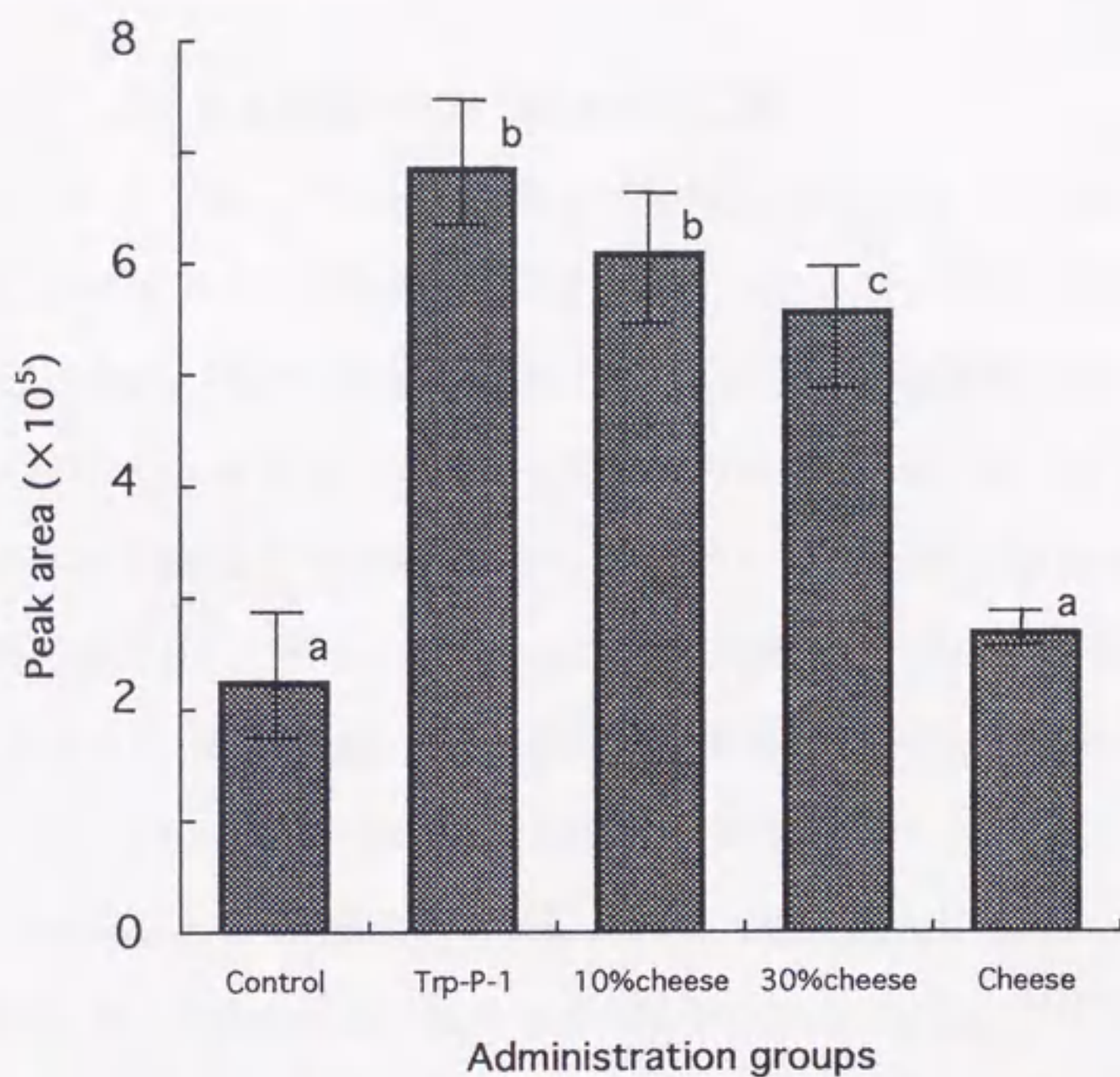


Fig. 5-13 Concentration of Trp-P-1 metabolites from the fecal extract of rat at retention time 2.4 min by HPLC analysis.

^{a,b,c}Mean with different superscript letters differ ($P < 0.05$)

の投与により、ラットの糞中に排出されるTrp-P-1およびTrp-P-1の代謝物と考えられる物質量が減少すると考えられた。

3-3 ラットの尿および糞抽出液の変異原性試験

本章 3-2-3) では、ラットの尿および糞抽出液中のTrp-P-1量は、チーズ投与により減少するという結果が得られた。しかし、Trp-P-1の代謝物も生成していることから、それら物質が尿および糞抽出液の変異原性に影響を与えているかもしれない。そこで、本章 3-2 で得られたチーズ投与によるTrp-P-1の減少にともなう変異原性の変化をみるために、*Salmonella typhimurium* TA98株を指示菌とし、ラットの尿および糞抽出液の変異原性試験を行った。

Fig. 5-14は、尿抽出液の変異原性により出現したTA98株の変異復帰コロニー数を示している。全ての群において、基礎飼料のみを投与していた phase-1に出現したTA98株の変異復帰コロニー数に変化はなく、いずれも少ない値を示した。Trp-P-1またはチーズを投与した phase-2 においては、コントロール群およびチーズ投与群に、phase-1との顕著な差はみられず、チーズのみ投与による尿の変異原性の発現は示されなかった。Trp-P-1投与群、チーズ10%投与群およびチーズ30%投与群では、TA98株の変異復帰コロニー数が著しく増加し、変異原性が示され、尿のTrp-P-1の投与による影響が明らかに示され、中でもTrp-P-1投与群の変異原性が最も強かった。チーズ投与による影響としては、チーズ10%投与群の変異原性はTrp-P-1投与群と顕著な差は見られなかったが、チーズ30%投与群では有意に減少し($P < 0.05$)、また、抑制率はそれぞれ4.2、22.9%であった。次に、糞抽出液についても同様の検索を行った。Fig. 5-15は、糞抽出液の変異原性により出現したTA98株の変異復帰コロニー数を示している。有意差は示されなかったものの、尿抽出液の結果と同様に、チーズ10%投与群の変異原性はTrp-P-1投与群と顕著な差は見られ

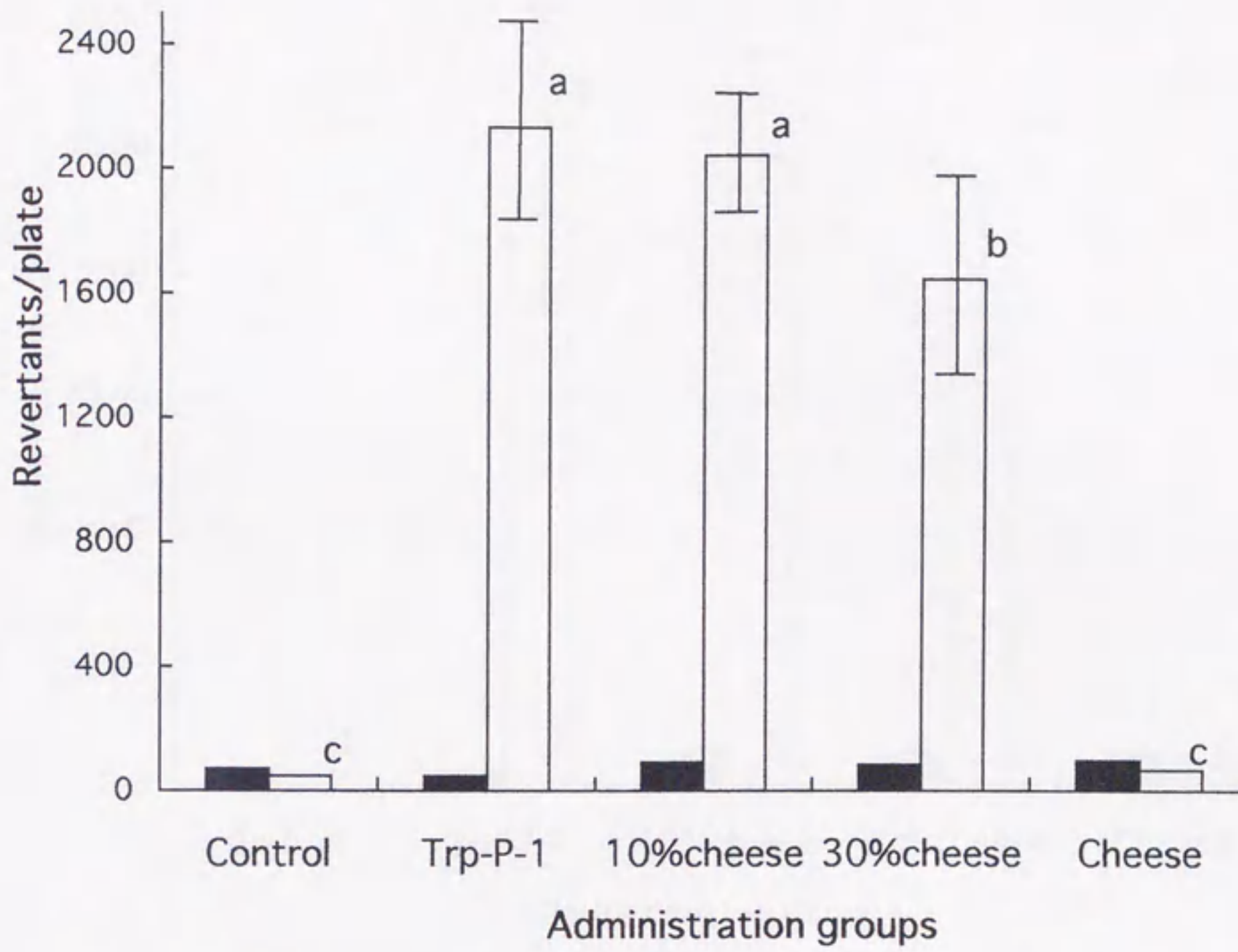


Fig. 5-14 Mutagenicity of urine extracts of rats to *Salmonella typhimurium* TA98:

■, phase-1; □, phase-2.

^{a,b,c} Means with different letters differ ($P < 0.05$)

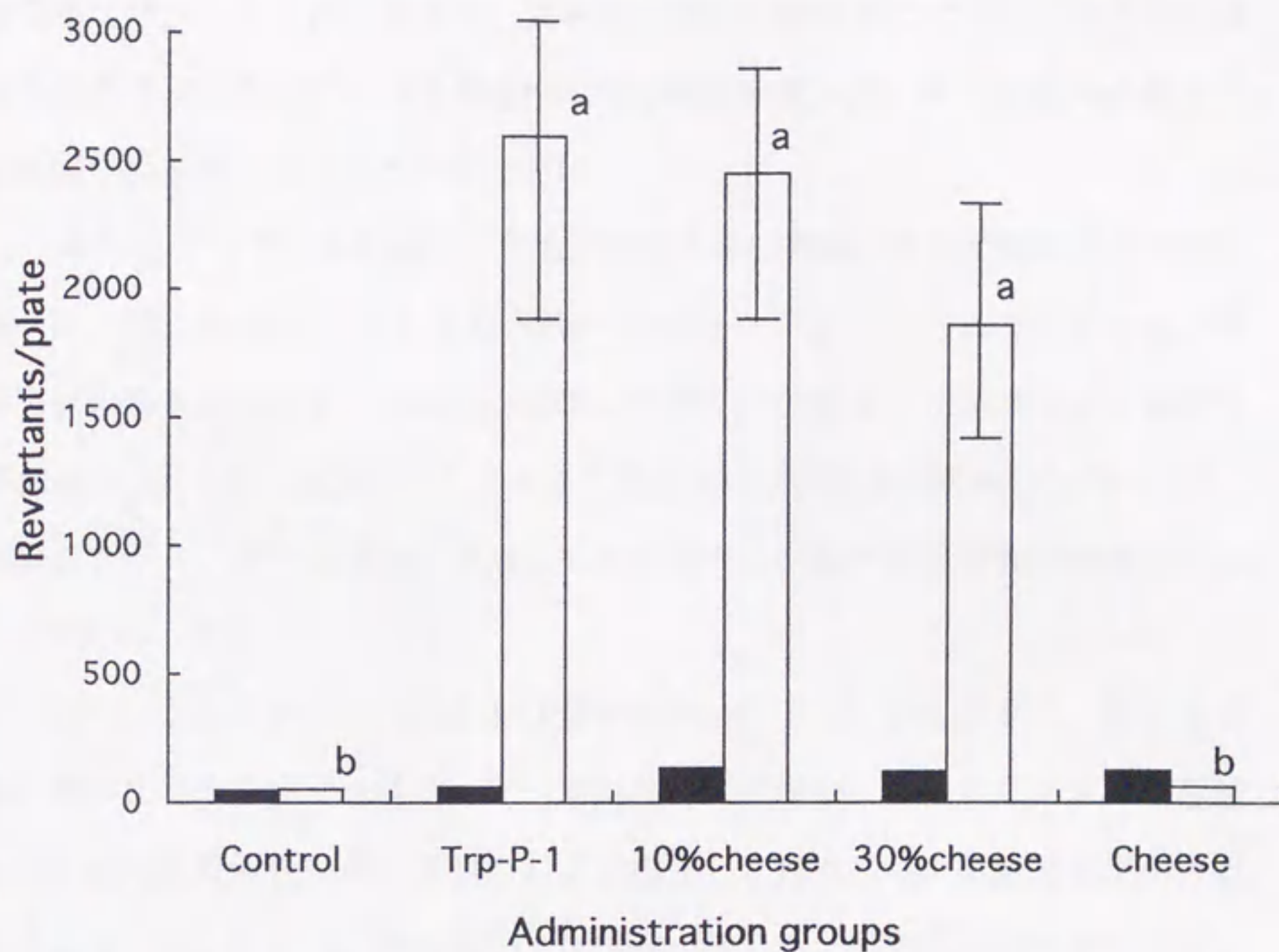


Fig. 5-15 Mutagenicity of fecal extracts of rats to *Salmonella typhimurium* TA98:

■, phase-1; □, phase-2.

^{a,b} Mean with different superscript letters differ ($P < 0.05$)

なかったが、チーズ30%投与群では減少を示し、抑制率はそれぞれ5.5、28.3%であった。これらのことから、尿および糞抽出液いずれにおいても、チーズ10%の投与ではTrp-P-1の変異原性への影響は少ないが、チーズ30%の投与では減弱作用が働いていると判断できた。

次に、チーズのみを投与した場合の尿および糞抽出液の変異原性の相違を調べた。Fig. 5-16は、チーズ投与群のphase-1および2における尿および糞抽出液の変異原性を示している。尿および糞のいずれも、phase-2の変異原性がphase-1に比較し減少を示し、とくに糞抽出液では有意に減少した($P<0.05$)。このことから、チーズのみを摂取しても、尿および糞の変異原性が減弱されることがわかった。

HPLCによるラットの尿および糞中のTrp-P-1の分析結果では、尿および糞に排泄されたTrp-P-1量は、チーズ投与により減少した。また、尿および糞の抽出液の変異原性もチーズ投与により低下し、HPLCによる結果を裏付けるものとなった。とくに、尿においてはHPLC測定および変異原性試験のいずれにおいても、チーズ30%投与により有意($P<0.05$)にTrp-P-1量および変異原性が減少したことから、チーズの何らかの作用があったと推測できる。Lidbeckら(72)は、*Lactococcus acidophilus*で製造した発酵乳と揚げた牛肉を人に投与し、排泄された糞の変異原性に比較し、尿の変異原性は顕著に減少したことを報告している。Hayatsuら(37)も、*Lactobacillus casei*の凍結乾燥粉末と焼肉を人に投与し、排泄された尿の変異原性が低下したことを報告している。本章はラットを用いた検索であるが、Fig. 5-14および5-15の結果も尿および糞に変異原性の低下がみられたことから、チーズも人に対して発酵乳および乳酸菌と類似した効果があるかもしれない。また、Fig. 5-16にも示したように、チーズ投与群では、チーズ投与後の尿および糞の変異原性がチーズ投与まえより減少していたことは、Hosodaら(39)が、*Lactobacillus acidophilus* LA-2で

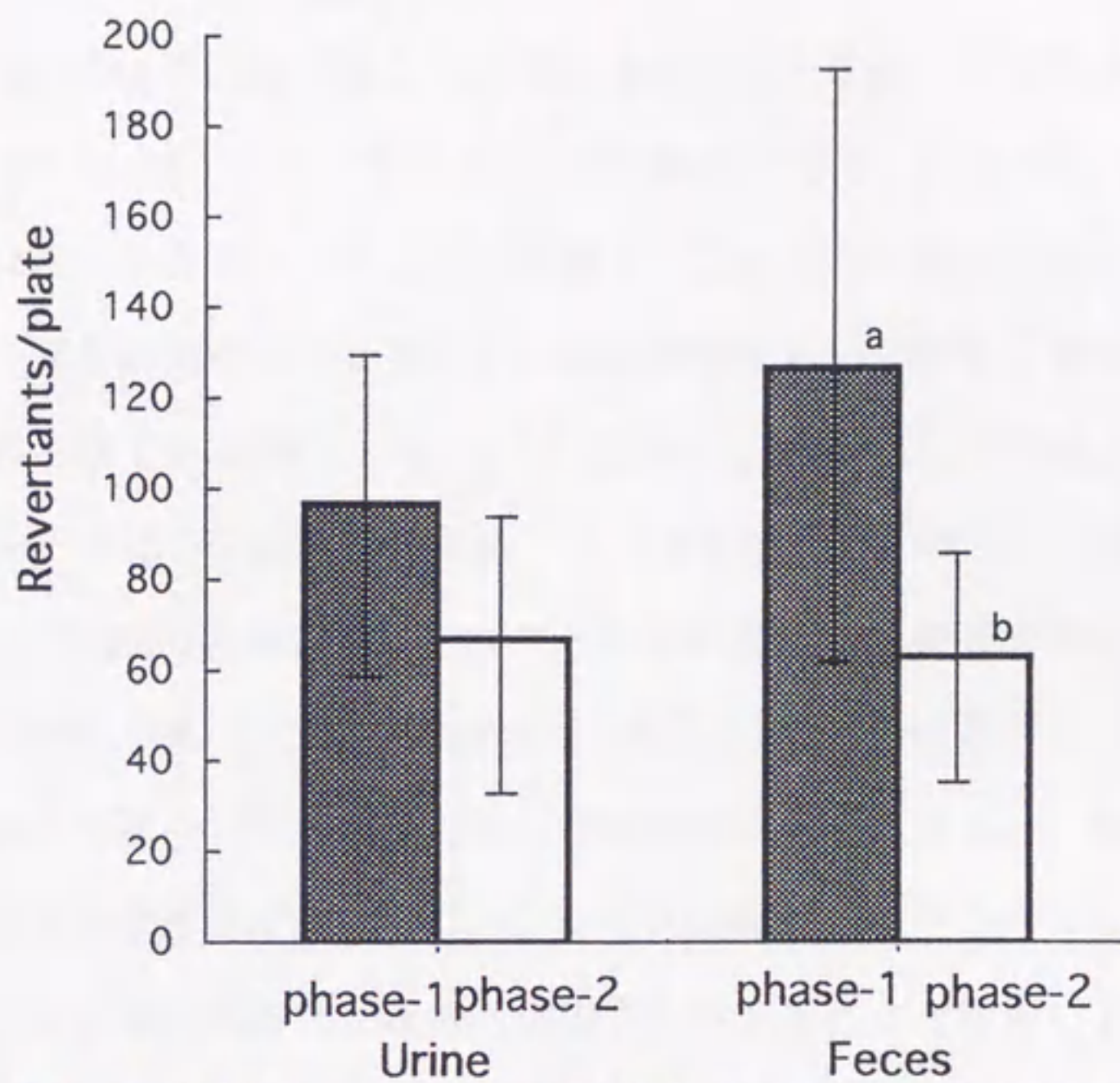


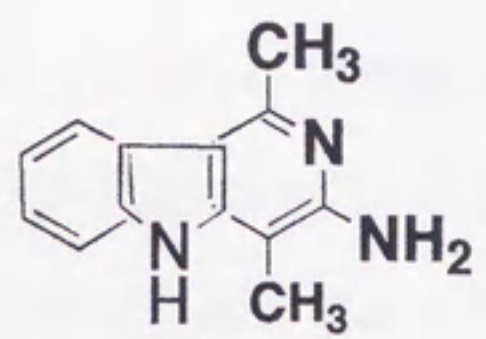
Fig. 5-16 Mutagenicity of fecal and urinary extracts on group administrated cheese to *Salmonella typhimurium* TA98

^{a,b} Means with different letters differ ($P < 0.05$)

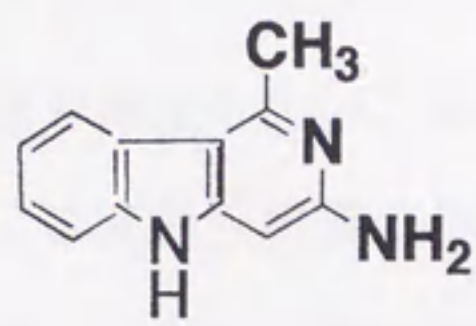
製造した発酵乳を人に投与し、排泄された糞の変異原性が発酵乳投与前より減少たことを報告していることから、発酵乳と同様の発酵乳製品であるチーズにも類似した作用があると推測できる。

一方、Trp-P-1を投与した3群に検出されたTrp-P-1以外の物質は、Fig. 5-8、5-9、5-10、5-11、5-12、5-13の結果にも示したように、Trp-P-1の代謝物ではないかと考えられる。本実験で、Trp-P-1の抽出に用いたブルーレイヨンは、平面構造をもつ3環以上の環状構造をもつ化合物を特異的に吸着することが知られている(36)。Fig. 5-17に示すように、Trp-P-1および第3章で用いたTrp-P-2は、三環性の芳香族アミンである。したがって、HPLCで検出されたTrp-P-1以外の物質は、Trp-P-1の基本骨格である環状構造をもつ代謝物である可能性が高い。また、Rafterら(102)は、Trp-P-1をラットに投与し、胆汁、尿および糞中に代謝を受けずに排泄されるTrp-P-1と、肝臓や小腸中の酵素により代謝を受け、ヒドロキシレイト代謝物とN-アセチルレイト代謝物やその他にも多種の代謝物が糞尿へ排泄されていることを報告していることから、Trp-P-1以外に泳動された物質がTrp-P-1の代謝物であると判断できる。

今回の実験では、チーズ投与により、ラットの尿および糞のTrp-P-1量の低下および変異原性の減少が認められ、発酵乳の投与による人の尿の変異原性の減少についてのLidbeckら(72)の報告と、乳酸菌の凍結乾燥菌体の投与による人の尿の変異原性が減少についてのHayatsuら(37)の報告と類似した結果となった。発酵乳については、すでに3次機能として抗腫瘍作用(9)、抗変異作用(84,89,104)、整腸効果(29,30,77)、抗コレステロール作用(28)、抗菌作用(11,13,21,27,80)などさまざまな生理機能があることが報告されており、発酵乳投与による排泄物の変異原性の減少という同様の結果がカマンベールチーズについても得られたことは、*in vivo*においてカマンベールチーズにも発酵乳と同様の生理機能が期待できる。



Trp-P-1



Trp-P-2

Fig.5-17 Tryptophan pyrolysates

川瀬ら(64)は、乳酸菌菌体とTrp-P-1をラットに投与し、乳酸菌菌体投与が尿に排泄されるTrp-P-1量が促進される効果があったことを報告している。また、尾花ら(95)は、食物繊維について、ゴボウ繊維はわずかではあるが糞へのTrp-P-2排泄量が増加させたことを報告しており、乳酸菌菌体や食物繊維に変異原物質の排泄効果があることが報告されている一方で、蜂谷ら(31)は、トウモロコシ精製ふすまにTrp-P-1を吸着させて、ラットに経口投与したときの尿および糞へのTrp-P-1の排泄量を変異原活性により測定を行い、尿および糞へのTrp-P-1の排泄量はわずかであり、消化管内での変異原物質の食物繊維への吸着効果は期待できないであろうと報告している。しかし、チーズは、食物繊維とは構成成分も構造も異なるため、食物繊維とは異なる作用が生体内で起こることが推測できる。*in vitro*におけるチーズの抗変異原性活性を示す主たる要因は、第2、3、4章でも示したように、カゼインおよびその分解物である水溶性窒素化合物によるものであると考えられるが、その他の要因としても、乳酸菌およびその発酵乳の抗変異原性活性、カルシウムの抗変異原性、乳酸菌菌体およびカゼインの変異原物質に対する吸着効果、また、第4章で示した *Penicillium candidum* 菌体の変異原物質に対する吸着効果など、さまざまな要因が挙げられる。本章において、ラットの排泄物に対するカマンベールチーズ投与による影響がみられたことは、これらさまざまな要因の相互作用によるものではないかと推測できる。

Trp-P-1の *in vivo* における代謝経路については、解明されつつあり(23,102)、また、Kimuraら(65)は、Trp-P-2は胃から吸収されにくいものの、小腸や大腸で急速に吸収されることを明らかにしている。Trp-P-1の構造はTrp-P-2と類似していることから、Trp-P-1においても同じ吸収経路をたどると推測できる。Trp-P-1に対するカマンベールチーズの作用が消化管内で起っているか、吸収後に起っているかは不明であるが、抗変異原性には変異原物

質に直接作用しその変異原性を減弱または、不活化させる作用をもった変異原不活化因子 (desmutagen) と、細胞に作用して細胞の突然変異誘発を著しく低下させる作用をもった抗突然変異因子 (antimutagen) の二つに分けられることから、消化管内での変異原物質への変異原不活性化作用と消化官から変異原物質とともに吸収された後のチーズ成分の変異原不活化作用が働いているかもしれない。また、糞の Trp-P-1 量および変異原性の低下が示されたことは、大腸癌予防に対しても有効であると考えられる。消化器官はさまざまな pH や酵素、また腸内微生物が存在し、物質の代謝も複雑であることから、*in vivo* におけるさらなる検索が要求される。

本実験においてはカマンベールチーズの凍結乾燥粉末を10%および30%投与したことから、給餌としては偏りのあるものとなった。人に対して同条件で投与することは不可能と考えられるが、チーズのどの成分に排泄物に対する変異原性の低下作用が解明されれば、その成分だけの投与により、さらに排泄物に対する変異原性の低下作用が高まるかもしれない。本実験におけるカマンベールチーズのラットの排泄物への影響についての結果が、チーズの新たな生理機能の発見につながることを期待する。

第4節 要 約

カマンベールチーズの *in vivo* におけるラットの Trp-P-1 排泄におよぼすカマンベールチーズ投与の影響について検索を行った。ラットは、8週齢雄 wister系ラットを用いた。1日目から3日目までは基礎飼料を与え、4日目から11日目まで Trp-P-1 またはカマンベールチーズの凍結乾燥粉末を与えた。2日目から4日目までの3日分の尿および糞を採取し、これを phase-1 とし、10日目から12日目までの尿および糞を採取し、これを phase-2 とした。試験群は、phase-2 において基礎飼料のみを与えた群（コントロール群）、Trp-P-1のみを与えた群（Trp-P-1投与群）、Trp-P-1およびチーズ10%を与えた群（チーズ10%投与群）、Trp-P-1およびチーズ30%を与えた群（チーズ30%投与群）、チーズのみを与えた群（チーズ投与群）の5群にわけ検索を行った。尿および糞からの Trp-P-1 の分離は、ブルーレイオン吸着法により行い、得られた各抽出液中の Trp-P-1 の定量は HPLC を用い、変異原性試験は *Salmonella typhimurium* TA98 を指示菌とし行った。

その結果、HPLC による尿および糞中の Trp-P-1 量は、Trp-P-1 投与群が最も多く $47.84 \mu\text{g}/\text{cage}$ であり、チーズ10%投与群における Trp-P-1 量もほぼ同じ値を示した。チーズ30%投与群における Trp-P-1 量は $12.32 \mu\text{g}/\text{cage}$ であり、有意に減少した ($P < 0.05$)。また、糞抽出液中から検出された Trp-P-1 量は、Trp-P-1 投与群、チーズ10%投与群、チーズ30%投与群で、それぞれ 41.94 、 38.25 、 $24.85 \mu\text{g}/\text{cage}$ であり、チーズ投与量の増加にしたがい Trp-P-1 量も減少したが、有意な差はみられなかった。また、Trp-P-1 の代謝物もチーズ投与により減少した。一方、尿および糞の抽出液の変異原性もチーズ投与により減少し、とくに、尿抽出液の変異原性は有意に低下した ($P < 0.05$)。チーズ投与による変異原性の抑制率は、尿抽出液におけるチーズ10%投与群、チーズ30%投与群でそれぞれ 4.2 、 22.9% であり、糞抽出液ではそれぞれ 5.5 、 28.3% で

あり、チーズ投与量の増加により尿および糞の変異原性が減少した。

これらのことから、ラットにおけるTrp-P-1排泄におよぼすカマンベールチーズ投与の効果は、チーズ10%投与群では糞および尿中に排泄されたTrp-P-1量および糞および尿の変異原性におよぼす影響は少なかったが、チーズ30%投与群ではいずれも減少し、カマンベールチーズの投与効果があったといえる。

第Ⅲ編 総合考察

本研究では、*in vitro*において、カマンベールチーズに強い抗変異原性があることが明らかとなった。この抗変異原性を示す要因として、第2、3章で示したように、熟成率の増加、つまり水溶性窒素化合物量の増加とともにチーズの抗変異原活性も強くなったことや熟成を行う前のグリーンチーズにも強い抗変異原性が示されたことから、カゼインおよびカゼインから派生する水溶性窒素化合物がチーズの強い抗変異原性を示す最も大きな要因であると判断した。しかし、本研究では、カゼイン、ペプチドおよびアミノ酸について個別に検索を行っておらず、またチーズ中にはカルシウム、脂肪酸など、タンパク質以外の物質も多く含まれていることから、タンパク質由来の物質のみが抗変異原性を示す要因であるとは言えない。第4章においても明らかになったように、カマンベールチーズ製造に用いた *Penicillium candidum* には変異原物質に対する吸着作用が示されたことからチーズ中の乳タンパク質以外の脂肪、カルシウム、微生物などの物質もチーズの抗変異原性の発現の要因であると推測できる。これら成分にも後述するように、生理機能活性について、さまざまな報告がされていることから、最終的にはこれら全ての成分の相互作用がチーズの抗変異原性の発現に関与していると考えられる。本章では、チーズの抗変異原性の発現の要因と考えられる物質について、それぞれ考察していく。

まず、チーズの主成分であり、また本研究でチーズの強い抗変異原性の最も大きな要因であると判断した乳タンパク質成分について、カゼインとアミノ酸を含んだ低分子ペプチドの抗変異原性の考察を行った。カゼインの抗変異原性についてはいくつか報告がされている。Hosonoら(50)は、コショウのエタノール抽出液の変異原性に対する牛乳由来のカゼインの抗変異原性について報告しており、全カゼイン、 α_{s1} -カゼイン、 β -カゼイン、 κ -カゼインに抗変

異原性があることを示し、なかでも全カゼインと β -カゼインの抗変異原性が最も強かったことを示している。van Boekelら(132)はカゼインの benzo[a]pyrene (B[a]P)、*N*-metylnitrosourea および nitrosated 4-chloro-indole に対する抗変異原性、ペプシンで加水分解を行ったカゼインの分解物の sodium azide および *N*-nitroquinoline-1-oxide (4NQO) に対する抗変異原性、Bosselaersら(16)は、カゼインおよびそのペプシンによる加水分解物が 1-methyl-nitroso-3-nitroguanidine (MNNG) に対する抑制作用があることを明らかにしている。Jongenら(61)は、脱脂したゴータチーズおよびカゼインの胃癌の原因となっている feva bean のもつ変異原性に対する抗変異原性について、いずれにも胃酸が存在する条件下で強い抗変異原性活性があったことを報告しており、カゼインが示した抗変異原性は、カゼインと変異原物質との強い結合作用によるものであり、胃から腸へ通過する過程でもカゼインからの分離は起こらないだろうと示唆している。さらに、Adbelaliら(1)は、発酵乳の他にもスキムミルク、カルシウムおよびカゼインに Benzo[a]pyrene に対して抗変異原性効果があったことから、スキムミルクの抗変異原性を示す要因はカルシウムとカゼインによるものではないかと報告している。吸着作用についても報告があり、Yoshidaら(136)が牛乳由来の α_s -カゼイン、 β -カゼインおよび κ -カゼインの Trp-P-1 (3-amino-1,4-dimethyl-5*H*-pyrido [4,3-*b*]indole)、Trp-P-2 (3-amino-1-methyl-5*H*-pyrido[4,3-*b*]indole)、および Glu-P-1 (2-amino-6-methyldipyrido[1,2-*a*:3',2'-*d*]-imidazole) に対する強い吸着効果についての報告をしている。Bosselaers(16)らは、カゼインが抗変異原性活性を示すのは、カゼインがいくつかの特殊な特性をもっており、高次構造をもたず、また他の物質と結合しやすい傾向があることから、カゼインの変異原物質との吸着性が要因ではないかと示唆している。カゼインの抗変異原性は、カゼインが変異原物質に吸着する

ことにより、変異原物質の変異原性が防御されるためであろうと推測できる。この吸着のメカニズムについては明らかにされていないが、カゼインの疎水性によるものではないかと考えられる。カゼインとは物質が異なるが、尾花ら(95)は、ゴボウ中のリグニンがフェニルプロパノイドが重合した構造を持つために疎水性が高く、非特異的な吸着効果を示す可能性が高いと報告している。また、Tanabeら(125)は、乳酸菌菌体へのTrp-P-1の吸着効果について報告しており、アミノ酸加熱分解物としてTrp-P-1を用いた場合、SDSの濃度を上げていくと、濃度依存的にTrp-P-1の菌体への結合が著しく阻止されることが認められ、このことは結合様式が疎水結合である可能性を示唆していることから、物質の変異原物質への吸着メカニズムは、その物質のもつ疎水性が要因であると判断できる。カゼインの中で、 β -カゼインはBigelow (15)の平均残基疎水性が1330とタンパク質の中で最も高い値を持つことをはじめとし、 α_{s1} -カゼインはプロリンのような疎水性アミノ酸残基が多いため、疎水性アミノ酸残基が分子表面に露出されている可能性が高く、またパラ- κ -カゼインも疎水性残基を比較的多く含んでおり、分子全体がきわめて疎水的であることは明らかである(91)。これらのことから、カゼインが変異原物質に対して強い抗変異原性を示したことは、これら疎水性の性質を持つカゼインが変異原物質へ吸着することにより、変異原物質の変異原性が防御されるためであると考えられた。

チーズ中のカゼインは、熟成中の酵素作用により減少していくが、最終的に水溶性窒素に分解されるのはカゼイン全体の30~40%にとどまる(87)。分解作用を受けずに残るカゼイン量は、チーズの種類や熟成状態によって異なるが、本研究で製造したカマンベールチーズでは、熟成率が熟成4週目においても57.2%であり(第3章 Table 3-1より)、残りの43%程が不溶性のタンパク質として残っていることになる。このことから、チーズ中の窒素化合物の中で

もカゼインの占める割合は多く、チーズ中でカゼインが抗変異原性の発現に果たす役割は大きいと推測できる。

一方、本研究においては、熟成率が低いグリーンチーズおよび乳酸菌熟成タイプのチーズよりも水溶性窒素量が多い熟成が進んでいるチーズの方が強い抗変異原性を示していた。カゼインの分解物についての抗変異原性も多く研究されている。Bosselaers(16)らは、カゼインおよびそのペプシンによる加水分解物がMNNGに対して抑制作用があることを明らかにしているが、カゼインよりもカゼインの分解物に強い抗変異原性が示されたと報告している。van Boekelら(132)は、ペプシンで加水分解を行ったカゼインの分解物のsodium azide および 4NQOに対する抗変異原性が、カゼインの分解物が増加するとともに強くなることを報告している。低分子ペプチドは大きなカゼイン分子よりも変異原物質との反応を起こしやすいと推測している。さらに、Abdelali(1)らは、ペプシンによる加水分解生成物の増加にともなうカゼインの抗変異原性活性はペプチドの形成によるものであると報告している。低分子ペプチドの変異原物質に対する抗変異原性のメカニズムは、カゼイン同様に明らかにされていないが、やはりアミノ酸や低分子ペプチドの疎水性部分が関与しているのではないかと考えられる。アミノ酸には、プロリンをはじめとし、バリン、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、トリプトファンといった疎水性アミノ酸がある。カゼインの分解により生じる疎水性アミノ酸も変異原物質に吸着作用を示しているかもしれない。つまり、カゼインから生成された疎水性のアミノ酸やそれを多く含むペプチドが変異原物質への吸着または抱合をすることによりその変異原性が減弱化されたのではないかと考えられる。

Tsuruら(129)は、マウスに移植された癌細胞が、マウスにチーズを摂取させることでその増殖が抑えられ、このことは、マウスの血清中の鉄量が増加していたことから、チーズ中に含まれていた鉄結合性タンパク質であるラクト

フェリンによる作用であると報告している。Ross(106)は、動物実験により高タンパク質（カゼイン）食は、成長条件の初期の摂取において寿命を延ばし、低タンパク質食は寿命を短くすることを報告している。これらの報告および本研究の結果からも、チーズのタンパク質が有効な生理機能を有していると考えられる。一方、近年牛乳由来の生理活性ペプチドも注目されており、鎮痛麻酔作用をもつオピオイドペプチド(18,74)、カルシウムの腸管吸収を高めるホスホペプチド(107)、ピフィズス菌増殖作用をもつカゼイノマクロペプチド(57)についての報告があり、チーズの主成分であるタンパク質およびその分解物のもつ生理機能上の役割は大きくなっていくであろう。

チーズは良質の乳タンパクの供給源としての役割の他に、カルシウムがチーズ中に豊富に含まれていることから、カルシウム供給としても取り上げられることが多く、また、チーズ製造においてカードを凝固させる成分として、重要な役割を果たしている。カルシウムの抗変異原性についても、前述したように、Adbelaliら(1)により抗変異原性効果があったことが報告されている。しかし、そのメカニズムは明らかにされていない。一方、カルシウムの生理活性についても報告がいくつかされている。Penceら(100)は、*in vivo*において結腸に癌を発現させる発癌物質である1,2-dimethylhydrazineを投与したラットの結腸の腫瘍の発生率を減少させる働きがあったことを報告しており、Lipkinら(73)も、カルシウムの摂取が、結腸癌になる危険性のある結腸の粘膜の上皮細胞の増殖を不活発にし、その状態を保たせる働きがあることを報告している。さらに、Pereiraら(101)は、異なるカルシウム塩に腫瘍の前駆病巣の発生を防ぐ作用があることを報告している。これらのことから、チーズ中のカルシウムにも抗変異原性の発現に関与していることが推測される。

チーズは、高タンパク質、高カルシウム食品として推奨されることが多いが、脂質の含量も高いことから敬遠されることも多い。しかし、チーズ中の脂

質は、熟成により分解され消化されやすい状態になっており、また、脂質が分解され生成した水溶性および揮発性物質は、チーズ風味の生成に極めて重要な役割を果たしている。Adbelaliら(1)は、牛乳中の脂肪はB[a]Pに対して抗変異原性が示されなかったと報告している。しかし、チーズの脂質は前述したように、熟成中に分解されているものもある。Nadathurら(85)は、ステアリン酸およびパルミチン酸がニトロソ化合物に対して抗変異原性があることを報告している。Hayatsuら(35)は、オレイン酸およびリノール酸にヘテロサイクリックアミンの変異原性を抑制する作用があることを報告している。ステアリン酸およびパルミチン酸はチーズに多く含まれていることから、これら脂肪酸も抗変異原性の発現に関与していると考えられる。

最後に、セカンドスターターとして用いた*Penicillium candidum* についてであるが、本研究では、*Penicillium candidum* により製造した発酵乳について抗変異原性およびTrp-P-1に対する吸着作用が明らかになった。*Penicillium candidum* の生理機能についての報告は少ないが、*Penicillium camanberti* の *Listeria monocytogenes* および *Salmonella typhimurium* に対する抗菌作用(71)や、他のかびの生育を抑制する働きがあることが報告されている(90)。これらのことから、*Penicillium camanberti* と同様の効果が *Penicillium candidum* にもあると考えられる。このような作用を白かびがもつことは、白かびがチーズ熟成中における乳タンパク質分解のみではなく、製造上においても安全なチーズの製造を行うための重要な働きをしており、さらに本研究で得られた結果からもカマンベールチーズの製造における白かびの果たす役割は大きいといえる。

本研究の*in vivo* における結果は、カマンベールチーズを投与し排泄されたラットの糞および尿のTrp-P-1量および変異原性の減少が示された。このことは、カマンベールチーズ中の諸成分の持つ抗変異原性や吸着作用、さらにそ

の他の生理機能が、ラットのTrp-P-1排泄におよぼすカマンベールチーズ投与の影響を示したと推測できるが、川瀬ら(64)が示した乳酸菌菌体が排泄物へのTrp-P-1の排泄を促進させた効果は示されなかったことから、乳酸菌や*Penicillium candidum*へのTrp-P-1の吸着による排泄効果よりも、チーズの主成分である乳タンパク質およびその分解物による作用が最も大きいのではないかと考えられる。前述したように、カゼイン、低分子ペプチドおよびアミノ酸は疎水性をもつものがある。このような疎水性をもつ物質が、Trp-P-1に結合、または抱合することによりその変異原活性を減少させ、さらに疎水性をもつ物質の吸着または抱合作用により、Trp-P-1としてのブルーレイオンへの吸着が起こらないのではないかと考えられる。Lidbeckら(72)は、*Lactococcus acidophilus*で製造した発酵乳と揚げた牛肉を人に投与し、排泄された糞の変異原性に比較し、尿の変異原性は顕著に減少したことを報告している。Hosodaら(39)も、*Lactobacillus acidophilus* LA-2で製造した発酵乳を人に投与し、排泄された糞の変異原性が発酵乳投与前より減少したことを報告している。これらのことから、乳製品における排泄物の変異原性の減弱化は、乳タンパク質およびその分解物による作用が大きいのではないかと考えられた。

以上のように、チーズの抗変異原性発現の要因として、タンパク質、ペプチド、カルシウム、脂質を挙げた。中でも本研究の結果から、タンパク質およびその分解物が最も抗変異原性の発現に関与していると考えられたが、本研究ではカゼイン、ペプチドおよびアミノ酸についての個別の検索を行っていないため、タンパク質およびその分解物だけが関与していると確定はできなかった。また、低分子ペプチドの分子量別に分画を行った各画分の抗変異原活性の相違についても明確にはできなかったことから、今後は、各成分の個別の抗変異原性および低分子ペプチドの分子量別に分画を行った各画分の抗変異原性についてさらに検索を進めることにより、カマンベールチーズの抗変異原活性物

質の特定をする必要がある。チーズ製造過程には、乳酸菌を用い発酵を行うという発酵乳と同様の過程があり、すでに乳酸菌および乳酸菌で製造された発酵乳にも多くの生理活性があることが明らかにされ、そのメカニズムも解明されつつある。チーズにも発酵乳と類似した生理活性のメカニズムがあると推測できるものの、チーズ内では熟成中にはさまざまな複雑な反応が起こっているため、その解明にはさらなる探究が必要である。

なお、本研究で得られた結果は、単にカマンベールチーズについてのみならず、チーズ全般の新たな機能性を切り開く糸口を見い出したことに大きな意義がある。近年、Stantonら(114)は、チェダーチーズの熟成に関与する細菌のプロバイオティクスとしての役割と新技術の導入を提唱している。つまり、チェダーチーズ中の乳酸菌が長い熟成中にも活性を持ち続け、さらに体内の胃腸を通過してもその生育が認められたことから、人体に有用な乳酸菌を腸まで輸送する手段として、probiotic cheese としてチェダーチーズにもヨーグルトと同じ効果が期待できると報告している。この点から、今後カマンベールチーズにおいても、この視点に立っての展開が必要と思われる。この意味からも、本研究での成果は大きな意義を有していると考えられる。

第IV編 総括

これまでチーズは、良質のタンパク質性食品であることから、栄養価の高い食品として取り上げられることが多かったが、癌細胞の増殖抑制(129)や胃潰瘍の進行を抑える働き(97)などがあることが報告され、優れた生理機能についての解明がなされつつある。しかし、カマンベールチーズに関する近年の報告は、カマンベールチーズ製造中に増殖し、急性熱性疾患などの感染症として引き起こすリステリア菌のチーズ中における生育要因究明(10,103)や生育抑制に(119)についての報告が多く、生理機能についての報告はなかった。本研究において、極めて強い抗変異原性があることが明らかとなったが、発酵乳について明らかとなっている生理機能に比較すると、まだ未知なる部分が多いといえる。

発酵乳における生理機能の発現は、乳酸菌による作用が大きいですが、チーズにおいては、乳酸菌以外の微生物も製造に用いられているチーズもあることから、さまざまな反応が起こり、さまざまな物質も生成されている。近年では、セカンドスターターとして用いられる微生物についても検索がなされ、有用な生理活性について明らかにされつつある(55,71,134)。

総合考察でも述べたように、チーズの成分には様々な生理機能があることが明らかとなっており、そのような生理機能はそれらを含むチーズ全般に共通する活性であるといえる。チーズ内では、極めて多種多様の酵素が、試験管内とは異なる環境下で複雑に反応しているため、それらの正確なことは不明な点が多い。熟成過程で、さらに新たな機能性新成分を生成するかもしれず、これからその解明が期待される場所である。チーズの熟成にともなう生理活性について熟考することは、チーズが日常的な食品として摂取されるようになった今日、チーズの高齢者への投与効果(83)などさまざまな試みがなされており、

人類の健康増進に寄与できる新しい発見をもたらすことになるであろう。

カマンベールチーズは、緒論でも述べたように、わが国で最も消費量の多いナチュラルチーズである。本研究からカマンベールチーズの抗変異原性が明らかになったことは、カマンベールチーズのもつ食品としての一次機能、二次機能に続き三次機能ももつ食品であることが明らかになったということである。近年、食への意識が高まる中で、カマンベールチーズのその風味や栄養価の高さと同時に、その生理機能を目的に摂取される傾向になるかもしれない。乳製品と野菜食の人の糞および尿の変異原性がその食事を摂取する前に比較し減少し、魚、肉、卵など加えた混合食に戻したときには再び糞の変異原性が増加したという報告がある(60)。近年、欧米の食生活に近づき、癌をはじめとする成人病で死亡する人が増加している中、カマンベールチーズをはじめとする各種チーズが、肉や高脂肪食の代わりに機能性食品として果たす役割は大きくなるであろう。

謝 辞

本研究の遂行および本論文の作成にあたり、終始ご懇篤なご指導、ご鞭撻を賜りました主指導教官の信州大学農学部 食科生産科学科 細野 明義 教授に厚く御礼申し上げます。また、常に大変貴重なご助言を頂きました信州大学 農学部 食科生産科学科 大谷 元 教授、岐阜大学農学部生物資源利用学科 渡邊 乾二 教授ならびに 静岡大学農学部 生物資源化学科 碓氷 泰市 教授に厚く御礼申し上げます。

岐阜大学大学院連合農学研究科への入学に際し快いご承諾ならびにご指導頂きました共立女子大学 中澤 勇二 教授に厚く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、カマンベールチーズの製造にご協力頂きましたよつ葉乳業株式会社 司城 不二 取締役研究開発部長に厚く御礼申し上げます。

また、様々な場面でご助言を頂きました、信州大学農学部 畜産製造学研究室のUsmanさん、Sreekmar Othumpangatさんならびに研究室諸氏に深く感謝の意を表します。

最後に、常に影で心の支えとなってくれました両親に感謝の意を表します。

引用文献

- (1) Abdelali, H., Cassand, P., Soussotte, V., Koch-Bocabeille, B. and Narbonne, J. F. (1995). Antimutagenicity of components of dairy products. *Mutat. Res.*, 331, 133-141.
- (2) Addeo, F., Chianese, L., Sacchi, R., Apagna, S., Ferranti, P. and Malorni, A. (1994). Characterization of the oligopeptides of Parmigiano-reggiano cheese soluble in 120g trichloroacetic acid/l. *J. Dairy Res.*, 61, 365-374.
- (3) Addeo, F., Garro, G., Intorcchia, N., Pellegrino, L., Resmini, P. and Chianese, L. (1995). Gel electrophoresis and immunoblotting for the detection of casein proteolysis in cheese. *J. Dairy Res.*, 62, 297-309.
- (4) Alm, L. (1982). Effect of fermentation on lactose, glucose, and galactose content in milk and suitability of fermented milk products for lactose intolerant individuals. *J. Dairy Sci.*, 65, 346-352.
- (5) Ames, B.N., Mc Cann, J. and Yamasaki, E. (1975). Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.*, 31, 347-364.
- (6) 荒井綜一. (1990). 食品の新しい機能. *New Food Industry*, 32 (5), 1-4.
- (7) Aston, J.W. and Creamer, L.K. (1986). Contribution of the components of the water-soluble fraction to the flavour of

- Cheddar cheese. *New Zealand J. Dairy Sci. Technol.*, 21, 229-248.
- (8) Aston, J. W., Durward, I. G. and Dulley, J. R. (1983). Proteolysis and flavour development in Cheddar cheese. *Aust. J. Dairy Technol.*, 38 (2), 55-59.
- (9) Ayobo, A. D., Shahani, K. M., Dam, R. and Friend, B. A. (1982). Ion exchange separation of the antitumor component (s) of Yogurt Dialyzate. *J. Dairy Sci.*, 65, 2388-2390.
- (10) Back, J. P., Langford, S. A. and Kroll, R. G. (1993). Growth of *Listeria monocytogenes* in Camembert cheese and other soft cheeses at refrigeration temperatures. *J. Dairy Res.*, 60 (3), 421-429.
- (11) Barefoot, S. F. and Klaenhammer, T. R. (1983). Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46 (6), 1808-1815.
- (12) Berg, H.E., van Boekel, M.A.J.S., Jongen, W.M.F.(1990). Heating milk: a study of mutagenicity. *J. Food Sci.*, 55, 1000-1003.
- (13) Bhatia, S. J., Kochar, N., Abraham, P., Nair, N. G. and Mehta, A. P. (1989). *Lactobacillus acidophilus* inhibits growth of *Campylobacter pylori* in vitro. *J. Clinical Microbiol.*, 27 (10), 2328-2330.
- (14) Biede, S. L. and Hammond, E. G. (1979). Swiss cheese flavor: II. Organoleptic analysis. *J. Dairy Sci.*, 62, 238-248.
- (15) Bigelow, C. C. (1967). On the average hydrophobicity of proteins and the relation between it and protein structure. *J. Theor. Biol.*, 16 (2), 187-211.

- (16) Bosselaers, I. E. M., Caessens, P. W. J. R., Van Boekel, M. A. J. S. and Alink, G. M. (1994). Differential effects of milk proteins, BSA and soy protein on 4NQO- or MNNG-induced SCEs in V79 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 32, 905-909.
- (17) Boubekri, K. and Ohta, Y. (1996). Antimutagenicity of lactic acid bacteria from El-Klila cheese. *J. Sci. Food Agric.*, 72, 397-402.
- (18) Brantl, V., Teschemacher, H., Henschen, A. and Lottspeich, F. (1979). Novel opioid peptides derived from casein (beta-casomorphins). *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 360 (9), 1211-1216.
- (19) Champion, H. M. and Stanley, D. W. (1982). HPLC separation of bitter peptides from Cheddar cheese. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, 15, 283-288.
- (20) 中央酪農会議, (1997). 国産ナチュラルチーズ製造技術マニュアル・第7集, p2-4, 蔵王酪農センター, 宮城.
- (21) Collins, E. B. and Aramaki, K. (1980). Production of hydrogen peroxide by *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.*, 63 (3), 353-357.
- (22) Conway, P.L., Gorbach, S. L. and Goldin, B.R. (1987). Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *J. Dairy Sci.*, 70, 1-12.
- (23) Dolara, P., Caderni, G. and Benetti, D. (1982). Activation of Trp-P-1 and Trp-P-2 in vitro and vivo. *Nutr Cancer*, 3 (3), 168-171
- (24) Edwards, J. and Kosikowaki, F. V. (1983). Bitter compounds from

- Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.*, 66, 727-734.
- (25) Fox, P. F. (1989). Proteolysis during cheese manufacture and ripening. *J. Dairy Sci.*, 72, 1379-1400.
- (26) Fox, P. F. (1993). Cheese : Chemistry, Physics and Microbiology Volume 2. Chapman & Hall. USA.
- (27) Gibbs, P. A. (1987). Novel uses for lactic acid fermentation in food preservation. *J. Appl. Bacteriol.*, 63, 51S-58S.
- (28) Gilliland, S. E. (1989). Acidophilus milk products: a review of potential benefits to consumers. *J. Dairy Sci.*, 72, 2483-2494.
- (29) Goldin, B. R. and Gorbach, S. L. (1977). Alterations in fecal microflora enzymes related to diet, age, *Lactobacillus* supplements, and dimethylhydrazine. *Cancer*. 40, 2421-2426.
- (30) Goldin, B. R., Swenson, L., Dwyer, J., Sexton, M. and Gorbach, S. L. (1980). Effect of diet and *Lactobacillus acidophilus* supplements on human fecal bacterial enzymes. *J. Natl. Cancer Inst.* 64 (2), 255-261.
- (31) 蜂谷紀之, 権太浩, 滝沢行雄. (1989). ダイエタリーファイバーの変異原吸着作用 : in vitro と in vivo の比較. *環境変異原研究*, 11, 59-65.
- (32) Harper, J., Iyer, M., Knighton, D. and Lelievre, J. (1989). Effect of whey proteins on the proteolysis of Cheddar cheese slurries (a model for the maturation of cheeses made from ultrafiltered milk). *J. Dairy Sci.*, 72, 333-341.
- (33) Harwalkar, V. R. and Elliot, J. A. (1965). Isolation and partial purification of bitter components from Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.*, 48, 784-787.

- (34) 林弘通, (1977). 乳業技術綜典 上巻, p357-358. 酪農技術普及学会, 東京.
- (35) Hayatsu, H., Arimoto, S., Togawa, S. and Makita, M. (1981).
Inhibitory effect of the ether extract of human feces on activities of mutagens: inhibition by oleic and lioleic acids. *Mutat. Res.*, 81, 287-293.
- (36) Hayatsu, H. and Hayatsu, T. (1989). Mutagenicity arising from boiled rice on treatment with nitrous acid. *Jpn. Cancer Res.*, 80 (11), 1021-1023.
- (37) Hayatsu, H., and Hayatsu, T. (1993). Suppressing effect of *Lactobacillus casei* administration on the urinary mutagenicity arising from ingestion of fried ground beef in the human. *Cancer Letters*, 73, 173-179.
- (38) Hayatsu, H., Hayatsu, T., Wataya, Y., and Mower, H. F. (1985). Fecal mutagenicity arising from ingestion of fried ground beef in the human. *Mutation Res.*, 143, 207-211.
- (39) Hosoda, M., Hashimoto, H., He, F., Morita, H. and Hosono, A. (1996). Effect of administration of milk fermented with *Lactobacillus acidophilus* LA2 on fecal mutagenicity and microflora in the human intestine. *J. Dairy Sci.*, 79, 745-749.
- (40) Hosoda, M., Hashimoto, H., He, F., Yamazaki, K. and Hosono, A. (1997). Inhibitory effect of milk cultured with Lactobacills strains on the aflatoxin mutagenicity. *Animal Sci. Tech. (Jpn)*, 68 (6), 555-562.
- (41) 細田正孝、橋本英夫、平松 優、森田裕嗣、細野明義. (1993). アフラ

- トキシシンB1の変異原性に対するLactobacillus acidophilus LA106(LA2)培養乳の減弱効果. 酪科食研., 42 (1), A1-5.
- (42) Hosoda, M., Hashimoto, H., Morita, H., Chiba, M. and Hosono, A. (1992). Antimutagenicity of milk cultured with lactic acid bacteria against N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *J. Dairy Sci.*, 75 (4), 976-981.
- (43) Hosoda, M., Hashimoto, H., Morita, M., Chiba, M, and Hosono, A. (1992). Studies on antimutagenic effect of milk cultured with lactic acid bacteria on the Trp-P2-induced mutagenicity to T98 strain of *Salmonella typhimurium*. *J. Dairy Res.*, 59 (4), 543-549.
- (44) Hosono, A., Kashina, T. and Kada, T. (1986). Antimutagenic properties of lactic acid-cultured milk on chemical and fecal mutagens. *J. Dairy Sci.*, 69 (9), 2237-2242.
- (45) Hosono, A., Kishi, T. and Otani, H. (1989). Inhibitory effects of leaf-extracts from Fagaceae on mutation in a streptomycin-dependent mutant of *Salmonella typhimurium* TA98 under assay conditions without S-9mix. *Agric. Biol. Chem.*, 53 (10), 2807-2808
- (46) 細野明義, 西澤純也, 大谷 元. (1991). 中国産薬用植物のアミノ酸加熱分解物に対する抗変異原性. 酪科食研, 40 (4), 154-159.
- (47) Hosono, A., Omote, E., Izawa, Y., Tokita, F. and Kada, T. (1986). Isolation of spontaneous induced-streptomycin dependent mutants of *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 strains and desmutagenicity tests *in vitro* of cultured milk. *Lebensm.-Wiss. und.-Technol.*, 19, 161-163.

- (48) 細野明義, 大谷元. (1984). 発酵乳製品製造におけるタンパク質の凝固と分解. *New Food Industry*, 26 (7), 17-28.
- (49) Hosono, A., Sagae, S. and Tokita, F. (1986). Desmutagenic effect of cultured milk on chemically induced mutagenesis in *Escherichia coli* B/r WP2 trp⁻ hcr⁻. *Milchwissenschaft*, 41 (3), 142-145.
- (50) Hosono, A., Shashikanth, K.N., Otani, H. (1988). Antimutagenic activity of whole casein on the pepper-induced mutagenicity to streptomycin-dependent strain SD510 of *Salmonella typhimurium* TA98. *J. Dairy Res.*, 55, 435-442.
- (51) Hosono, A., Tanabe, T. and Otani, H. (1990). Binding properties of lactic acid bacteria isolated from kefir milk with mutagenic amino acid pyrolyzates. *Milchwissenschaft*, 45 (10), 647-651.
- (52) Hosono, A., Umehara, H. and Tokita, F. (1985). Inhibitory effect of milk whey cultured with *Flammulina velutipes* M-105 mutant strain on N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine-induced mutation in *Escherichia coli* B/r WP2 trp⁻. *Jpn. J. Zootech. Sci.*, 56 (1), 78-80.
- (53) Hosono, A., Wardoyo, R. and Otani, H. (1990). Binding of amino acid pyrolyzates by lactic acid bacteria isolated from "Dadih". *Lebensmitt.-Wiss. und-Tech.*, 23 (2), 149-153.
- (54) Hosono, A., Wardoyo, R. and Otani, H. (1990). Inhibitory effects of lactic acid bacteria from fermented milk on the mutagenicities of volatile nitrosamines. *Agric. Biol. Chem.*, 54 (7), 1639-1643.
- (55) Hosono, A., Yamazaki, H., Otani, H. (1988). Antimutagenicity of

- slimy substance separated from the culture of *Brevibacterium linens*. *Jpn. J. Zootech. Sci.*, 60, 679-685.
- (56) Hosono, A., Yoshimura, A. and Otani, H. (1988). Desmutagenic property of cell walls of *Streptococcus faecalis* on the mutagenicities induced by amino acid pyrolyzates. *Milchwissenschaft*, 43 (3), 168-170.
- (57) Idota, T., Kawakami, H. and Nakajima, I. (1994). Growth-promoting effect of N-acetylneuraminic acid-containing substances on Bifidobacteria. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58, 1720-1722.
- (58) Ishikawa, T. S., Takayama, T., Kitagawa, T., Kawashi, M., Kinebushi, M., Matsukura, E. and Sugimura, E. (1979). In vivo experiments on tryptophan pyrolysis products. In: Naturally Occurring Carcinogen-Mutagens and Modulator of Carcinogenesis. p159. University Park Press, Baltimore, MD, USA.
- (59) 岩澤秀樹, 平田明弘, 木村卓司, 山内邦男. (1996). カマンベールチーズ熟成中におけるタンパク質分解. *日本食品工学会誌*, 43 (6), 703-711.
- (60) Johansson, G., Holmen, A., Persson, L., Hogstedt, B., Wassen, C., Ottova, L. and Gustafsson, J. A. (1998). Long-term effects of a change from a mixed diet to a lacto-vegetarian diet on human urinary and faecal mutagenic activity. *Mutagenesis*, 13 (2), 167-171.
- (61) Jongen, W.M.F., van Boekel, M.A.J.S., van Broekhoven, L.W. (1987). Inhibitory effect of cheese and some food constituents on

- mutagenicity generated in *vicia feba* after treatment with nitrite.
Food Chem. Toxic., 25, 141-145.
- (62) Kaminogawa, S., Tan, T.R., Azusa, N. and Yamaguchi, K. (1986). Identification of low molecular weight peptides in Gouda-type cheese and evidence for the formation of these peptides from 23 N-terminal residues of α s1-casein by proteases of *Streptococcus cremoris* H61. *J. Food Sci.*, 51, 1253-1256.
- (63) Kawase, M. and Hosono, A. (1995). Binding stability of lactic acid bacterial cells with mutagenic tryptophan pyrolysates. *Anim. Sci. Tech. (Jpn)*, 66 (5) 430-435.
- (64) 川瀬学, 細野明義. (1996). ラットのトリプトファン加熱分解物(Trp-P1)排泄に及ぼす乳酸菌菌体投与の影響. *日畜会報*. 67 (9), 801-804.
- (65) Kimura, T., Nakayama, T., Kurosaki, Y., Suzuku, Y., Arimoto, S., Hayatsu, H. (1985). Absorption of 3-amino-1-methyl-5H-pyrido [4,3-b] indole, a mutagen-carcinogen present in tryptophan pyrolysate, from the gastro-intestinal tract in the rat. *Jpn. Cancer Res.*, 76 (4), 272-277.
- (66) 厚生省大臣官房統計情報部. (1998). 厚生統計要覧平成9年版, p44-46. 厚生統計協会, 東京.
- (67) 厚生省保険医療局, (1997). 平成9年版国民栄養の現状, p29, 第一出版株式会社. 東京.
- (68) Kowalewsk, J., Zelazowska, H., Babuchowski, A., Hammond, E.G., Glatz, B.A. and Ross, F. (1985). Isolation of aroma-bearing material from *Lactobacillus helvericus* culture and cheese. *J. Dairy Sci.*, 68, 2165-2171.

- (69) Kuchroo, C. N. and Fox, P. F. (1982). Fractionation of the water-soluble-nitrogen from Cheddar cheese: chemical methods. *Milchwissenschaft*, 37, 651-653.
- (70) Kuchroo, C. N. and Fox, P. F. (1982). Soluble nitrogen in Cheddar cheese: Comparison of extraction procedures. *Milchwissenschaft*, 37, 331-335.
- (71) Larsen, A. G. and Knochel, S. (1997). Antimicrobial activity of food-related *Penicillium* sp. against pathogenic bacteria in laboratory media and a cheese model system. *J. Appl. Microbiol.*, 83, 111-119.
- (72) Lidbeck, A., Overvik, E., Rafter, J., Nord, C. E. and Gustafsson, J-A. (1992). Effect of *Lactobacillus acidophilus* supplements on mutagen excretion in feces and urine in humans. *Microbiol Ecology in Health and Disease*, 5, 59-67.
- (73) Lipkin, M. and Newmark, H. (1985). Effect of added dietary calcium on colonic epithelial-cell proliferation in subjects at high risk for familial colonic cancer. *New Engl. J. Med.*, 313, 1381-1384.
- (74) Loukas, S., Varoucha, D., Zioudrou, C., Streaty, R. A. and Klee, W. A. (1983). Opioid activities and structures of alpha-casein-derived exorphins. *Biochemistry*, 22 (19), 4567-4573.
- (75) Mair-Waldburg. (1974). Handbuch der Käse. p666-668. Volkswirtschaftlicher Verlag GmbH. Deutschland.
- (76) Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983). "Revised method for the *Salmonella* mutagenicity test". *Mutat. Res.*, 113, 173-215.

- (77) Marteau, P., Pochart, P., Flourie, B., Pellier, P., Santos, L., Desjeux, J. F. and Rambaud, J. C. (1990). Effect of chronic ingestion of a fermented dairy product containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* on metabolic activities of the colonic flora in humans. *Am. J. Clin. Nutri.* 52 (4), 685-688.
- (78) 真島英信. (1978). 生理学, 第17版. p 419. 文光堂. 東京.
- (79) Matsukura, N., Kawachi, T., Morino, K., Ohgaki, H. and Sugimura, T. (1981). Carcinogenicity in mice of mutagenic compounds from a tryptophan pyrolyzate. *Science*, 213 (17), 346-347.
- (80) Mc Cormick, E. L. and Savage, D. C. (1983). Characterization of *Lactobacillus* sp. strain 100-37 from the murine gastrointestinal tract: ecology, plasmid content, and antagonistic activity toward *Clostridium ramosum* H1. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46, 1103-1112.
- (81) Morita, K., Kada, T. and Namiki, M. (1984). A desmutagenic factor isolated from burdock (*Arctium lappa* Linne). *Mutat. Res.*, 129 (1), 25-31.
- (82) Morita, K., Nishijima, Y. and Kada, T. (1985). Chemical nature of desmutagenic factor from burdock. *Agric. Biol. Chem.*, 49 (4), 925-932.
- (83) Mykkanen, H. M. and Karhunen, L. J. (1995). High cheese intake and faecal bacteria enzyme activities in the elderly. *Int. Dairy J.*, 5, 259-264.
- (84) Nadathur, S. R., Gould, S. J. and Bakalinsky, A. T. (1994).

- Antimutagenicity of fermented milk. *J. Dairy Sci.*, 77, 3287-3295.
- (85) Nadathur, S. R., Zhou, L., Lowry, R. R. and Bakalinsky, A. T. (1998). Effects of hydrolysis of milk glycerides on the antimutagenicity of a hexane extract of milk. *J. Dairy Sci.*, 81 (3), 664-671.
- (86) Nakazawa, Y., Asano, J. and Tokimura, A. (1990). Manufacture and chemical properties of low sodium yoghurt. *Milchwissenschaft*, 45 (2), 88-91.
- (87) Nakazawa, Y. and Hosono, A. (1989). Recent advances in cheese science and technology. p72. Shokuhin Shizai Kenkyukai. Tokyo.
- (88) Nakazawa, Y., Yamada, M., Michishita, J., Nakagawa, S. and Tsukasaki, F. (1993). Changes in rheological properties during ripening of Camembert cheese. *Indian J. Dairy Sci.*, 46 (7), 311-316.
- (89) National Dairy Council. (1990). Yogurt—its nutritional and health benefits. *Dairy Counc. Dig.* 61, 1-12.
- (90) Nielsen, M. S., Frisvad, J. C. and Nielsen, P. V. (1998). Protection by fungal starters against growth and secondary metabolite production of fungal spoilers of cheese. *Int. J. Microbiol.*, 42, 91-99.
- (91) 二木良哉, (1980). 乳タンパク質の構造. *New Food Industry*, 22 (11), 2-16.
- (92) 農畜産業振興事業団. (1998). 畜産の情報 国内編 11月号, 109, 資料51, 55. 農畜産振興事業団. 東京.
- (93) 農林水産省経済局統計情報部, (1998). 平成9年牛乳乳製品統計.

- p162-163, 181. 農林統計協会. 東京.
- (94) 乳業技術講座編集委員会編. (1964). 牛乳・乳製品検査 乳業技術講座 5. p34-35, 48-51, 135-136, 218. 朝倉書店. 東京.
- (95) 尾花裕孝, 西宗高弘. (1992). ラットにおけるTrp-P-2の排泄に対する食物繊維の効果. *食衛誌.*, 33 (5), 437-441.
- (96) 小原哲二郎, 鈴木隆雄, 岩尾裕之. (1977). 食品分析ハンドブック, p50-58. 健帛社, 東京.
- (97) Okabe, S. and Pfeiffer, C.J. (1973). Effects of propantheline bromide and milk plus cheese on healing of chronic gastric ulcers in rats. *Digestive Diseases*, 18 (9), 746-750
- (98) Osawa, T., Ishibashi, H., Namiki, M. and Kada, T. (1980). Desmutagenic actions of ascorbic acid and cysteine on a new pyrrole mutagen formed by the reaction between food additives; sorbic acid and sodium nitrite. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 95 (2), 835-841.
- (99) Parker, F., Migliore-Samour, D., Floc'h, F., Zerial, A., Werner, G. H., Jolles, J., Casaretto, M., Zahn, H. and Jolles, P. (1984). Immunostimulating hexapeptide from human casein: amino acid sequence, synthesis and biological properties. *Eur. J. Biochem.*, 145 (3), 677-682.
- (100) Pence, B. C. and Buddingh, F. (1988). Inhibition of dietary fat promoted colon carcinogenesis in rats by supplemented calcium or vitamin D. *Carcinogenesis*, 9, 187-190.
- (101) Pereira, M. A., Barnes, L. H., Rassman, V. L., Kelloff, G. V. and Steele, V. E. (1994). Calcium inhibits the damaging and

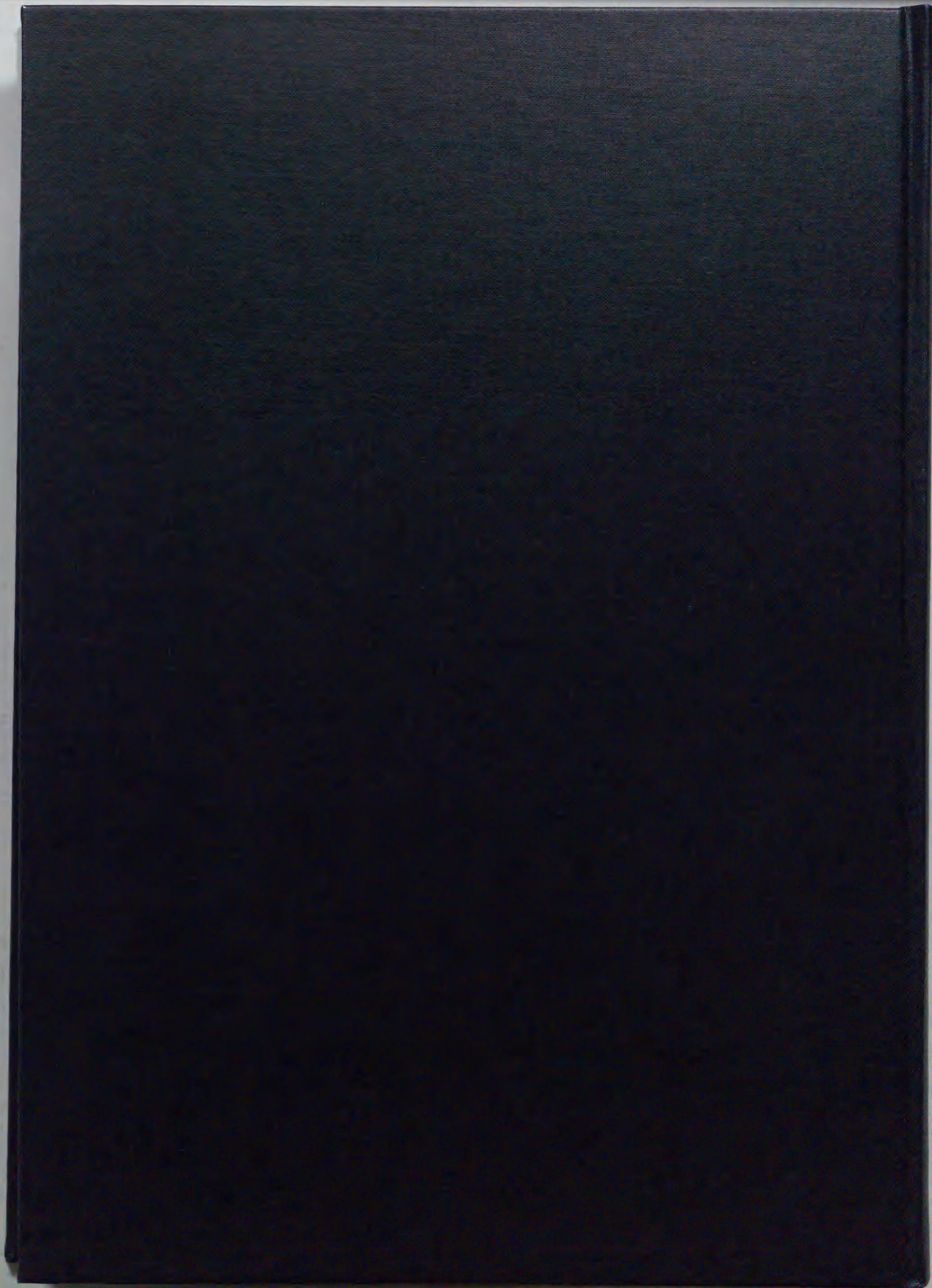
- compensatory effects of fatty acids on mouse colon epithelium. *Cancer Lett.*, 23, 253-258.
- (102) Rafter, J. J. and Gustafsson, J. A. (1986). Metabolism of the dietary carcinogen TRP-P-1 in rats. *Carcinogenesis*. 7 (8), 1291-1295.
- (103) Ramsaran, H., Chen, J., Brunke, B., Hill, A. Griffiths, M. W. (1998). Survival of bioluminescent *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in soft cheese. *J. Dairy Sci.*, 81 (7), 1810-1817.
- (104) Reddy, G. N., Friend, B. A., Shahani, K. M. and Farmer, R. E. (1983). Antitumor activity of yoghurt components. *J. Food Protec.*, 46, 8-11.
- (105) Reville, W. J. and Fox, P. F. (1978). Soluble protein in Cheddar cheese: a comparison of analytical methods. *Irish J. Food Sci. and Technol.*, 2, 67-76.
- (106) Ross, M.H. (1976). Dietary practices and growth responses as predictors of longevity. *Nature*, 262, 548-553 .
- (107) Sato, R., Noguchi, T. and Naito, H. (1986). Casein phosphopeptide (CPP) enhances calcium absorption from the ligated segment of rat small intestine. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 32 (1), 67-76.
- (108) Sing, T. K. and Fox, P.F. (1997). Isolation and identification of further peptides in the diafiltration retentate of the water-soluble fraction of Cheddar cheese. *J. Dairy Res.*, 64, 433-443.
- (109) Singh, T. K., Fox, P. F. and Healy A. (1995). Water-soluble peptides in Cheddar cheese: isolation and identification of

- peptides in the diafiltration retentate of the water-soluble fraction. *J. Dairy Res.*, 62, 629-640.
- (110) Solms, J. (1969). The taste of amino acid, peptides, and proteins. *J. Agr. and Food Chem.*, 17, 686-688
- (111) Sreekumar, O. and Hosono, A. (1998). Amino acid pyrolysates competitive and combination binding with *Lactobacillus gasseri* cells. *Milchwissenschaft*, 53 (2), 73-76.
- (112) Sreekumal, O. and Hosono, A. (1998). Antimutagenicity and the influence of physical factors in binding *Lactobacillus gasseri* and *Bifidobacterium longum* cells to amino acid pyrolysates. *J. Dairy Sci.*, 81, 1508-1516.
- (113) Sreekumal, O. and Hosono, A. (1998). The heterocyclic amine binding receptors of *Lactobacillus gasseri* cells. *Mutat. Res.*, 421, 65-72.
- (114) Stanton, C. Gardiner, G., Lynch, P. B., Collins, J. K., Fitzgerald, G. and Ross, R. P. (1998). Probiotic cheese. *Int. Dairy J.*, 8, 491-496.
- (115) Sugimura, T., Kawachi, T., Nagao, M., Yahagi, T., Seino, Y., Okamoto, T., Shudo, K., Kosuge, T., Tsuji, K., Wakabayashi, K., Iitaka, Y. and Itai, A. (1977). Mutagenic principle(s) in tryptophan and phenylalanine pyrolysis products. *Proc. Jpn. Acad.*, 53, 58-61.
- (116) Sugimura, T. (1985). Carcinogenicity of mutagenic heterocyclic amines formed during the cooking process. *Mutat. Res.*, 150, 33-44.
- (117) 祐川金次郎. (1971). MILK PROTEIN. p 129. 酪農技術普及学会, 東京.

- (118) 祐川金次郎, (1976). 乳業技術便覧 下巻, p127, 135-138, 161-162.
酪農技術普及学会, 東京.
- (119) Sulzer, G. and Busse, M. (1991). Growth inhibition of *Listeria* ssp. on Camembert cheese by bacteria producing inhibitory substances. *Int. J. Microbiol.*, 14, 287-296.
- (120) Surono, I. S. and Hosono, A. (1996). Antimutagenicity of milk cultured with lactic acid bacteria from dadih against mutagenic Terasi. *Milchwissenschaft*, 51 (9), 493-497.
- (121) Surono, I.S. and Hosono, A. (1996). Bacterial mutagenicity of terasi and antimutagenicity of Indonesian jaslline tea against terasi. *Int. J. Food Microbiol.* 32, 49-58.
- (122) 高藤慎一, (1987). カマンベールチーズ熟成中におけるたんぱく質分解過程. 酪農・科学食品の研究, 36 (6), 275-282.
- (123) Tamai, Y., Oishi, H., Nakagawa, I., Watanabe, Y., Shinmoto, H., Kuwabara, Y., Yamamoto, K. and Nagai, S. (1995). Antimutagenic activity of the milk fermented by mixed-cultured with various lactic acid bacteria and a yeast. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 42 (5), 383-387.
- (124) Tanabe, T., Otani, H. and Hosono, A. (1991). Binding of mutagens with cell wall peptidoglycan of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* T-180. *Milchwissenschaft*, 46 (10), 622-625.
- (125) Tanabe, T., Suyama, K. and Hosono, A. (1994). Effect of sodium dodecylsulphate on the binding of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* T-80 cells with Trp-P1. *J. Dairy Res.*, 61, 311-315.

- (126) Tanabe, T., Suyama, K. and Hosono, A. (1994). Effect of pepsin, trypsin or bile acid on the binding of tryptophane pyrolysates by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* T-80. *Milchwissenschaft*, 49 (8), 438-441.
- (127) Thyagaraja, N. and Hosono, A. (1993). Antimutagenicity of lactic acid bacteria from "Idly" against food - related mutagens. *J. Food Protect.*, 56 (12), 1061-1066.
- (128) Thyagaraja, N. and Hosono, A. (1994). Binding properties of lactic acid bacteria from "Idly" towards food borne mutagens. *Food and Chem. Toxicol.*, 32 (9), 805 - 809.
- (129) Tsuru, S., Shinomiya, N., Taniguchi, M., Shimazaki, H., Tanigawa, K. and Nomoto, K. (1988). Inhibition of tumor growth by dairy products. *J. Clin. Lab. Immunol.*, 25, 177-183.
- (130) Usman and Hosono, A. (1998). Desmutagenicity of milk cultured with *Lactobacillus acidophilus* strains against mutagenic heated tauco. *Food and Chem. Toxicol.*, 36, 805 - 810.
- (131) Vafopoulou, A., Alichanidis, E. and Zerfiridis, G. (1989). Accelerated ripening of Feta cheese, with heat-shocked cultures or microbial proteinases. *J. Dairy Res.*, 56, 285-296
- (132) van Boekel, M. A. J. S., Weerens, C. N. J. M., Holstra, A., Scheidtweiler, C. E., Alink, G. M. (1993). Antimutagenic effects of casein and its digestion products. *Food Chem. Toxic.*, 31, 731-737.
- (133) Venema, D. P., Herstel, H. and Elenbass, H. L., (1987). Determination of the reipening time of Edam and Gouda cheese

- by chemical analysis. *Netherland Milk Dairy J.*, 41, 215-226.
- (134) Vorobjeva, L.I., Cherdinceva, T.A., Abilev, S.K., Vorobjeva, N.V. (1991). Antimutagenicity of propionic acid bacteria. *Mutat. Res.*, 251, 233-239.
- (135) Yamada, M., Tsuda, M., Nagao, M., Mori, M. and Sugimura, T. (1979). Dgradation of mutagens from pyrolysates of tryptophan, glutamic acid amd globulin by myeloperoxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commum.*, 90, 769-771.
- (136) Yoshida, S. and Ye-Xiuyun. (1992). The binding ability of bovine milk caseins to mutagenic heterocyclice amines. *J. Dairy Sci.*, 75, 958-961.
- (137) Zhang, X. B., Ohta, Y. and Hosono, A. (1990). Antimutagenicity and binding of lactic acid bacteria from a Chinese cheese to mutagenic pyrolyzates. *J. Dairy Sci.*, 73, 2702-2710.



inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19

