

INDUSTRIAL TECHNOLOGY CENTER of SAGA

研究報告書

2024
NO.33

佐賀県工業技術センター



目 次

共 同 研 究

新規海苔由来乳酸発酵食品素材の製法確立及び用途開発	・ ・ ・ ・ ・	柘植 圭介	・ ・ ・ ・ 1
		岩元 彬	
		(佐賀大学農学部) 小林 元太	
		(株式会社オフィス・タカハシ) 高橋 勝則	

ブルーカーボン資材及び高タンパク質素材としての海苔の利用展開 (第1報)	・ ・ ・ ・	柘植 圭介	・ ・ ・ ・ 9
		吉村 臣史	
		(佐賀大学農学部) 木村 圭	
		(佐賀大学農学部) 吉田 和広	
		(佐賀大学農学部) 川村 嘉応	

醤油製造工程において生成する風味成分等の網羅的解析による品質寄与因子の解明			
ー製造工程における醤油香気の変化ー	・ ・ ・ ・ ・	吉村 臣史	・ ・ ・ ・ 15
		澤田 和敬	
		柘植 圭介	
		(宮島醤油株式会社) 水野 裕一	
		(佐賀大学農学部) 小林 元太	

佐賀県産酒のブランド力向上を目指した技術体系の構築 (第2報)	・ ・	澤田 和敬	・ ・ ・ ・ 21
---------------------------------	-----	-------	------------

大気圧プラズマ成膜法による樹脂成形品への機能性付与技術の開発 (第4報)			
ー直接式プラズマ成膜法による紫外線遮断性を有する非晶質炭素膜の形成ー	・ ・ ・ ・	河合 信次	・ ・ ・ 25
		円城寺 隆志	
		平井 智紀	

表面変質層を利用したステンレス製品の長寿命化技術開発 (第3報)	・	永石 尚昭	・ ・ ・ ・ 31
		帆秋 圭司	
		田栗 有樹	
		(株式会社香田製作所) 香田 和則	

経 常 研 究

化粧品の機能性を評価するための生体外皮膚モデルの構築および高機能素材の探索 (第3報)	・ ・ ・ ・	岩元 彬	・ ・ ・ ・ 37
		柘植 圭介	

ヒト生体環境に着目した新規皮膚細胞培養系の構築と応用 (第3報)	・ ・	岩元 彬	・ ・ ・ ・ 43
		柘植 圭介	

機能性食品・コスメ原料に関する評価技術の確立及びその応用に関する研究 (第2報)	・ ・ ・ ・	柘植 圭介	・ ・ ・ ・ 49
--	---------	-------	------------

環境に優しい水性塗料用紫外線吸収剤に関する研究（第2報）			
ー耐候性に及ぼすバイオマス成分の影響ー	久間 俊平 田栗 有樹 帆秋 圭司 矢野 昌之	・ ・ ・ ・	55
環境に優しい水性塗料用紫外線吸収剤に関する研究（第3報）			
ー紫外線吸収剤担持体へのマイクロカプセルの利用検討ー	田栗 有樹 帆秋 圭司 久間 俊平 矢野 昌之	・ ・ ・ ・	61
データ解析による生産設備の保全に関する研究（第1報）	中野 太郎 大坪 昭文	・ ・ ・ ・	67
県産木材製家具の製造における強度向上技術及び加飾技術の開発（第3報）			
ーデジタルツールを活用した立体形状設計の効率化の検討ー	佐藤 彰 辛川 洋介	・ ・ ・ ・	71

萌芽的独創研究

佐賀はがくれ酵母の焼酎製造への応用に関する研究	澤田 和敬 (宗政酒造株式会社) 宮内 洋一	・ ・ ・ ・	75
多波長レーザによる近接場光を用いた工具刃先高さ位置の高精度非接触検出	寺山 裕	・ ・ ・ ・	77
(九州工業大学知的システム工学研究系) カチョー・ンルン・ルアン・パナート			

国等外部からの交付・補助による研究

日本学術振興会 科学研究費助成事業

機器分析による食品風味の客観的評価技術確立のためのフードメタボロミックスの応用			
ー機器分析による海苔の香りの視覚化の可能性ー	吉村 臣史	・ ・ ・ ・	83

共同研究

新規海苔由来乳酸発酵食品素材の製法確立及び用途開発

食品コスメ部

柘植圭介 岩元彬

佐賀大学農学部

小林元太

株式会社オフィス・タカハシ

高橋勝則

色落ち海苔等の低品質海苔の有効活用を目指して、有明海で摘採した生海苔から発酵性の高い2種類の新規乳酸菌 *Latilactobacillus sakei* D-1 株及び *Lactococcus lactis* D-2 株を取得した。これらの菌株の性質について調べた結果、海苔の発酵性は D-1 株の方が高かったが、末梢血単核球の IgA 産生能を指標とした免疫賦活作用は D-2 株にのみ認められ、その効果は D-2 の基準株よりも高いことが明らかとなった。D-1, D-2 株で海苔発酵食品を効率よく製造するための原料の前処理法について検討した結果、海苔の構成多糖マンナンを酵素処理してマンノースとすることによる発酵性の改善や、マンナナーゼ分解前に弱酸加熱処理することによる抽出液粘性の低減に至った。確立した手法により調製した海苔抽出液における D-1, D-2 株の発酵性は基準株と比べても高く、これらの株は海苔の発酵に適した乳酸菌として活用し得ると判断された。

1. はじめに

乳酸菌は、糖を発酵して多量の乳酸を生産する細菌の総称であり、地球上の至るところに存在している。低温あるいは高温下で生育できる株、高濃度の食塩に耐性を有する株、酵素の有無を問題とせず増殖する株、産業上有用な抗菌物質を生産する株など多岐にわたる。乳酸菌は環境に対して広範に適応しているため、その分布は、土壌、海洋、河川など多種多様である。

乳酸発酵は、食品の保存性の向上、好ましい風味や生理機能の付与などの目的で古来より広く用いられ、その形態としてはヨーグルトなどの乳製品、キムチなどの漬物、サプリメントなど多岐にわたっている。

佐賀県の有明海沿岸域は、海苔（スサビノリ）の養殖が盛んであり、佐賀県の実産額は19年連続日本一を誇る。しかしながら、近年価格のつかない色落ち海苔が問題となっている。色落ち海苔は栄養塩不足等の影響を受けた低品質海苔で、市場価値が低くその多くが廃棄される。佐賀県における2022~2023年シーズンの養殖海苔は、色落ちの影響により販売額・販売枚数ともに大幅に落ち込み、大きな問題となっている¹⁾。

色落ち海苔の有効活用は食品業界にとって重要な課題であり、これまでに様々な研究がなされてきた。例えば、海苔構成多糖であり乾燥海苔重量あたり約30%を占めるポルフィランについては脂質代謝改善作用²⁾や抗腫瘍活性³⁾等が示されている。また、色落ち海苔

の乳酸発酵によるGABA生産についての報告⁴⁾や、色落ち海苔のみに含まれる糖アルコールがビフィズス菌の発酵の基質として利用されたことを示す報告⁵⁾など、色落ち海苔の有効活用手段としての「発酵」に注目が集まっている。

色落ち海苔は通常の実産海苔と比較してタンパク質量が少ない一方で、炭水化物量は多いとされている⁶⁾。そのため、色落ち海苔を乳酸発酵の基質として利用できる可能性がある。

以上の背景から、我々は、色落ち海苔の乳酸発酵により新たな付加価値を付与することを目的として、有明海からの乳酸菌の分離を試みた。その結果、分離源としてこれまで例がない、生海苔から有用な特性や機能性を有する新規乳酸菌の取得に至った。本報告では、生海苔から分離した新規乳酸菌の特性や生理機能について述べる。

2. 実験方法

2.1 分離源

有明海佐賀県エリアの6海域（図1：A~F）から生海苔を摘採し（摘採日 2020.2.5）、乳酸菌の分離源に使用した。

2.2 使用培地

分離にはMRS培地（Difco™ *Lactobacilli* MRS Broth；表1）を使用した。寒天培地の場合は、MRS液体培地

に寒天 1.5%, 炭酸カルシウム 0.5%を添加した。

2.3 分離方法

分離源を液体培地に懸濁後、アネロパック®・ケンキ（三菱ガス化学）を用いて 30℃で嫌気培養を行った。その後、炭酸カルシウム含有のプレート培地に塗布し、同様に嫌気培養した。酸の生成能を有しクリアゾーンを形成しているコロニーを釣菌し、炭酸カルシウム含有のプレート培地に接種後、嫌気培養を行った。コロニーに 3%過酸化水素水を 10 μ L 加えカタラーゼ試験を行った。カタラーゼ陰性を示したコロニーを、グリセロールと培養液を 1:1 の割合で混合したものに添加し、凍結保存した。

2.4 菌株の選抜

コロニー形状、クリアゾーン形成能、培養液の観察により、分離源の海域ごとに代表株を 5 株ずつ釣菌し、そのうち異なる特性を有する菌株を区域あたり 2 株ずつ選抜した。

2.5 菌の同定

表 2 に記載の 16S rRNA 領域のプライマーを用い、表 3 及び 4 に記載の条件で Colony direct PCR を行った。16S rRNA 領域を増幅後、アガロースゲル電気泳動で DNA 断片を確認した。ISOSPIN PCR Product（ニッポンジーン）を用いて PCR 産物を精製した。サイクルシーケンス反応は、BigDye™ Terminator v3.1 Cycle



図 1 生海苔の摘採場所

表 1 MRS 培地組成

Protease peptone No. 3	10 g/L
Beef extract	10 g/L
Yeast extract	5 g/L
Dextrose	20 g/L
Polysorbate 80	1 g/L
Ammonium citrate	2 g/L
Sodium acetate	5 g/L
Magnesium sulfate	0.1 g/L
Manganese sulfate	0.05 g/L
Disodium phosphate	2.0 g/L

Sequencing Kit（Applied Biosystems）を用いて表 5 及び 6 に記載の条件で行った。DNA シーケンシングは 3130 Genetic Analyzer（Applied Biosystems）で実行した。

National Center for Biotechnology Information NCBI のデータベースを対象にした BLAST 検索により塩基配列の相同性を解析した。

2.6 分離株の乳酸発酵能の評価

分離培地である MRS 培地と色落ち海苔成分を抽出して作成した海苔抽出液培地を使用した。海苔抽出液は、色落ち海苔乾燥物 100 g に水 1.4 kg を添加し、数

表 2 プライマー組成

Primer Name	Sequences (5'→3')
8-519S (Forward)	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
8-519A (Reverse)	ATTACCGCSGCTGCTG

表 3 PCR 反応液組成

10x Ex Taq Buffer	5 μ L
dNTPs	2 μ L
Forward Primer (8-519S) (10 μ M)	2.5 μ L
Reverse Primer (8-519A) (10 μ M)	2.5 μ L
Ex Taq HS	0.2 μ L
dH ₂ O	37.8 μ L

表 4 PCR 反応条件

94℃	5 min
94℃	30 s
55℃	30 s
72℃	1 min
72℃	5 min

表 5 サイクルシーケンス反応液組成

Sequencing RR-100 433691 (ABI)	0.25 μ L
5×Sequencing Buffer P/N: 4336697 (ABI)	1.875 μ L
10 μ M Primer	0.3 μ L
Template*	1 μ L
dH ₂ O	6.575 μ L
Total	10 μ L

表 6 サイクルシーケンス反応条件

96℃	1 min	} 25cycles
96℃	10 sec	
50℃	10 sec	
60℃	4 min	
4℃	pause	

回攪拌しながら2時間静置して抽出し、ろ布を用いて圧搾した。これを海苔抽出液培地（以下、NE培地）とした。

MRS培地に1%にて接種後、30℃で24時間培養したものを前培養液とした。MRS培地、NE培地それぞれに、前培養液を終濃度 $OD_{660} = 0.1$ になるよう接種し、30℃で培養した。

MRS培地における培養では2日後、NE培地における培養では4日後に培養液を1mL採取し、遠心分離（4℃, 13,000 x g, 5 min）及び精密ろ過によって上清を回収した。培養上清の乳酸濃度を有機酸分析システム（島津製作所）により測定した。

カラムは Shim-pack SCR 102H（300 mm L. × 8.0 mm I.D.; 島津製作所）を3本直列で用いた。移動相は5 mM p トルエンスルホン酸水溶液を、緩衝相は5 mM p トルエンスルホン酸及び100 mM EDTAを含む20 mM Bis tris 水溶液を使用した。移動相と緩衝相ともに流速0.8 mL/min、カラム温度は35℃とした。検出器は電気伝導度検出器 CDD 10（島津製作所）を用いた。培養は各1回実施した。ブランクとして培養初期の培地の乳酸濃度も測定し、培養上清の乳酸濃度から差し引くことで正味の乳酸生産量とした。

2.7 ナチュラルキラー細胞の細胞障害性の評価

菌株選抜の指標として、ナチュラルキラー（NK）細胞の細胞障害活性の評価を行った。供試試料は、各菌株の培養上清とし以下に準じて調製した。

MRS培地に凍結保存していた乳酸菌懸濁液を接種後、30℃で24時間培養したものを前培養液とし、MRS培地に前培養液を終濃度 $OD_{660} = 0.1$ になるよう接種し30℃で培養した。培養48時間の培養液1mLを採取し、遠心分離（4℃, 13,000 × g, 5 min）により上清を回収しフィルター滅菌したものを試料とした。調製は同一菌株を3反復して実施した（n=3）。

NK細胞障害活性は、以下により評価した。培地としてフェノールレッド不含 RPMI 1640 + 1% FBS 培地を使用した。NK細胞傷害性のモデルであるヒトNK様細胞 KHYG-1 を100 U/mL のIL-2を含む培地に懸濁し、 1.5×10^4 cells/well の細胞密度で100 µL ずつ96 well プレートに播種した。所定濃度に希釈した試料10 µL を添加して24時間培養（37℃-5% CO₂）し、別途培養したヒト慢性骨髄性白血病細胞株 K562 を 1.5×10^4 cells/well の密度で100 µL ずつ96 well プレートに播種した。培養4時間後に上清を回収し、マイクロプレートリーダーで蛍光強度を測定した（Ex: 485 nm, Em: 520 nm）。1菌株あたりの反復は3（n=3）とした。

2.8 末梢血単核球の免疫賦活作用の評価

選抜株の免疫賦活作用の指標として、Kawashima らの方法⁷⁾に準じて末梢血単核球（PBMC）の抗体（Immunoglobulin A; IgA）産生能を評価した。

10% FBS 含有 RPMI1640 培地で前培養（37℃-5% CO₂）したヒトPBMC（クラボウ）を細胞培養用96 well プレートに250 µL ずつ分注し、所定濃度の乳酸菌存在下5日間培養した。PBMCの細胞密度は 2×10^5 cells/mL とした。培養後の培養上清のIgAレベルを常法に従いELISA法にて測定した。乳酸菌無添加の培養上清を対照区とし、IgA産生量を比較した。乳酸菌は70℃で30分加温して殺菌したものをを用いた。1試験区あたりの反復は4（n=4）とした。

2.9 NE培地の製法改善及び選抜株の乳酸発酵試験

NE培地の糖質含量の増加及び粘性低減を目的としてNE調製時の糖質分解酵素処理及び弱酸加熱処理の併用について検討した。

50 mL容のコニカルチューブに0.07%硫酸30 gを入れ、2×5 mm程度に細断した乾燥海苔2.5 gを加えてよく混合した。チューブをヒートブロックにセットして、95℃で20分反応し弱酸加熱処理を行った。

次に、25 mgの酵素を1 mLの水に溶かして添加し、55℃に加熱したヒートブロックに入れ24時間酵素反応させた。反応後、100℃に加熱したヒートブロックに移して酵素を失活させた後、15,000 × g で15分遠心分離して上清を得た。この上清の固形分、タンパク質濃度、粘度及び遊離糖濃度を測定した。

2.10 統計解析

得られたデータは、GraphPad prism 9を用い、Tukeyの多重比較で有意差検定を行った。

3. 結果及び考察

3.1 NK細胞の細胞障害性

有明海6海域の生海苔から各5株ずつ計30株を単離した。さらに、地点ごとに分離株のコロニー形状や培養液の観察を行い、異なる形状を示すもの2株ずつを代表株とし、計10株を選抜し、16S rRNA 遺伝子の相同性解析により菌種を同定した（表7）。

有明海の生海苔からの乳酸菌の分離の例はこれまでになく、初めて海苔からの分離に成功し、乳酸菌が海苔に付着して生育している可能性が示された。B地点から単離した5株はすべてカタラーゼ陽性を示し、コロニー直径が小さくクリアゾーンの形成能が低いなど同様の特性を示していた。代表株として同定したB1株は *Staphylococcus warneri* であった。これらのことから、B地点の生海苔は他の地点に比べ *Staphylococcus* 属の細菌が優位に生育している可能性が考えられた。

分離株 10 株について、分離培地である MRS 培地、NE 培地でそれぞれ乳酸生産能を評価した。図 2 に示すように、MRS 培地において分離株は培養 2 日間で 6.6 ~10.8 g/L の乳酸濃度となり、特に *Latilactobacillus sakei* D-1 株で高い生成量を示した。また、図 3 に示すように、NE 培地においては、0.8~1.5 g/L の乳酸濃度となり、特に D-1 株及び *Leuconostoc mesenteroides* E-5 株で高い生成量を示した。

3.2 NK 細胞の細胞障害性の評価

図 4 に NK 細胞の細胞障害性を示した。10 菌株のうち、D-1 株、*Lactococcus lactis* D-2 株及び *Lactococcus lactis* F-2 株で有意に高い細胞障害性を示した。

3.3 PBMC の免疫賦活活性の評価

培養上清において NK 細胞の細胞障害性を向上させた菌株のうち、NE 培地での発酵性が最も高かった D-1 株と、発酵性が比較的高かった D-2 株の 2 菌株を選抜し、PBMC の免疫賦活活性を評価した。比較として、D-1 及び D-2 株の分類学上の基準株 (Type strain; NBRC 提供菌) の活性も評価した。

その結果、図 5 に示すように D-1 株及びその基準株は乳酸菌無添加に比して特段の IgA 濃度の増強は見られなかったが、D-2 株及びその基準株は、 10^7 及び 10^8 Colony Forming Unit (CFU) の添加量で乳酸菌無添加より明らかに高い IgA 濃度を示した。低濃度 (10^6 CFU) における IgA 濃度は、D-2 株が最も高かった。この結果は、海苔由来乳酸菌の中でも D-2 株に強い PBMC の免疫賦活作用を有する可能性があり、その性質は基準株とは異なるものであることを示唆していた。

3.4 弱酸加熱及び酵素処理の併用による NE 培地の製法改善

NE 培地で乳酸発酵する際に抽出液の「糖質含量の

低さ」と「粘性の高さ」がデメリットとなっている。そこで、これらを解消するため、海苔固有の粘性多糖類の低分子化が期待される弱酸加熱処理と糖質分解酵素処理について検討した。

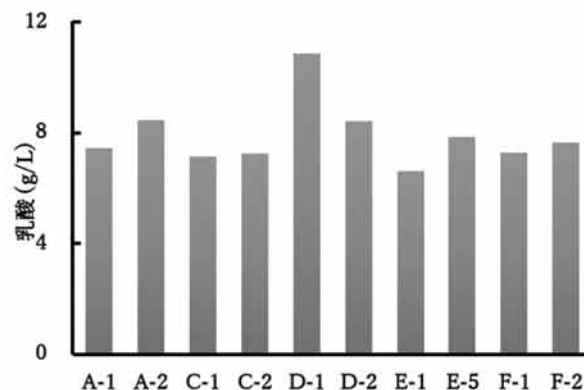


図2 MRS 培地における分離株の乳酸生産量

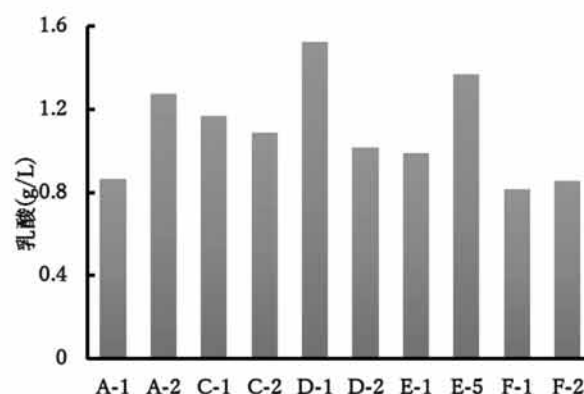


図3 NE 培地における分離株の乳酸生産量

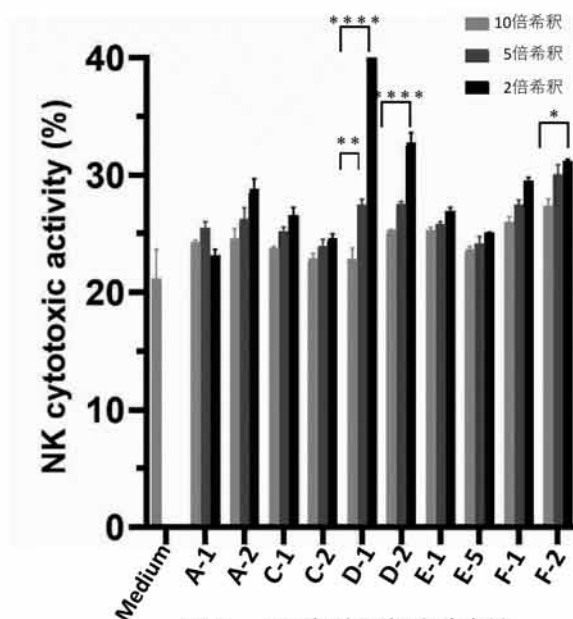


図4 NK 細胞の細胞障害性

各乳酸菌の培養上清を希釈して細胞に添加した。

p<0.01, *p<0.0001 vs Medium

表7 生海苔から単離・同定された乳酸菌

	同定菌株
A-1	<i>Lactococcus lactis</i>
A-2	<i>Lactocaseibacillus manihotivorans</i>
C-1	<i>Enterococcus faecium</i>
C-2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
D-1	<i>Latilactobacillus sakei</i>
D-2	<i>Lactococcus lactis</i>
E-1	<i>Lactococcus lactis</i>
E-5	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
F-1	<i>Lactococcus lactis</i>
F-2	<i>Lactococcus lactis</i>
B-1	<i>Staphylococcus warneri</i>

※B-1 株はカタラーゼ陽性を示した株。

まず、使用酵素を選定するため種々の糖質分解酵素で海苔を処理した。抽出物の遊離糖含量を比較したところ、表8に示すように、濃度が最も高かったのは、マンナナーゼの一種であるセルロシン GM5（エイチアイビィ）であった。さらに、他社のマンナナーゼ2

種類と比較しても遊離糖の濃度が最も高かったのはセルロシン GM5 であったため（データ示さず）、酵素処理はセルロシン GM5 で行うこととした。

次に、弱酸加熱処理の有無で NE 培地の固形分、タンパク質濃度、粘度及び遊離糖濃度を比較した結果を

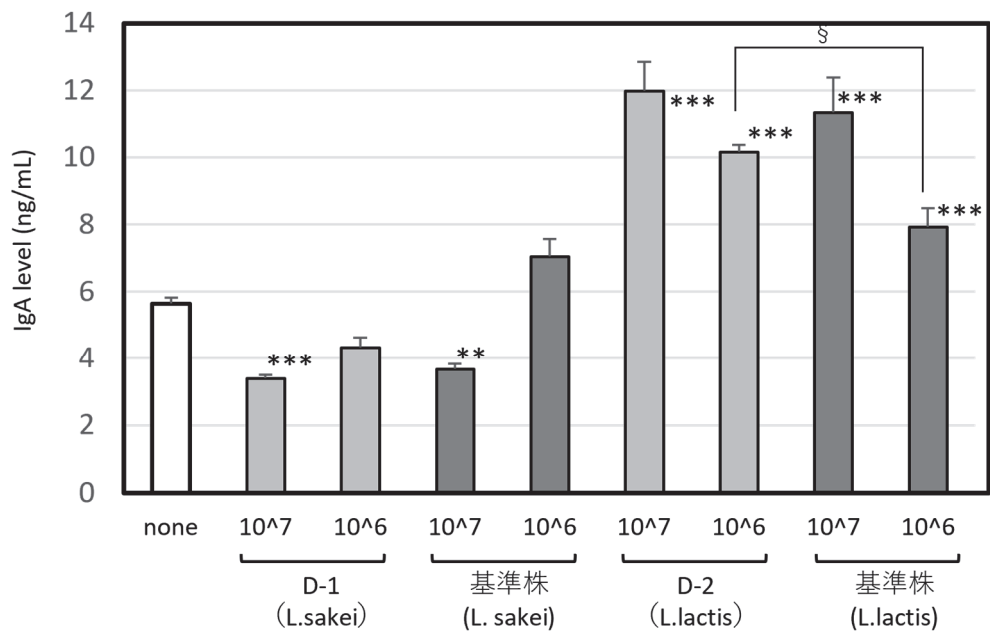


図5 ヒト末梢血単核球のIgA産生能に及ぼす乳酸菌（死菌）の影響
, * Data are statistically significant vs “none” as p<0.01, <0.001 respectively (Tukey), § p<0.001 (Tukey).

表8 種々の糖質分解酵素で処理した海苔抽出液の性状

	酵素名	pH	DM %	CP %	粘度 mPa・s	遊離糖, mg/mL						総糖, mg/mL					
						Fuc	Gal	Glc	Man	Xyl	Total	Fuc	Gal	Glc	Man	Xyl	Total
1	スミチーム C	3.70	2.76	0.12	9.2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2	スミチーム AC	3.71	4.18	0.36	30.8	0.0	0.6	4.2	10.1	0.0	14.9	0.2	23.6	4.8	9.2	0.0	37.8
3	スミチーム MC	3.70	3.09	0.25	15.9	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4	スミチーム X	3.67	3.11	0.17	16.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5	スミチーム NX	3.72	4.02	0.41	33.2	0.0	1.5	4.2	7.2	0.0	12.9	0.2	24.4	5.2	7.1	0.0	36.8
6	スミチーム ACH	3.74	4.18	0.41	37.5	0.0	1.5	4.4	3.2	0.0	9.1	0.2	24.7	5.3	10.6	0.0	40.9
7	セルロシン HC100	3.74	4.29	0.44	49.4	0.0	3.5	5.1	7.2	0.0	15.8	0.3	24.7	5.9	7.1	0.0	37.9
8	セルロシン GM5	3.76	4.18	0.48	44.4	0.0	3.7	3.2	10.7	0.0	17.7	0.3	25.6	4.1	10.5	0.0	40.6
9	酵素無添加	3.67	2.86	0.15	6.6	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.1	0.1	19.8	0.0	0.0	0.0	19.9

DM：固形分濃度、CP：タンパク質濃度（全窒素 x 6.25）、Fuc：フコース、Gal：ガラクトース、Glc：グルコース、Man：マンノース、Xyl：キシロース

表9 酵素反応前の弱酸加熱による粘度低下

条件	上清回収量 g	pH	粘度 mPa・s	DM %	CP %	遊離糖濃度, mg/mL			
						ガラクトース	グルコース	マンノース	Total
弱酸加熱なし	17.7	3.62	93.5	5.93	1.04	1.54	2.20	6.29	10.02
弱酸加熱あり	23.8	3.62	38.5	5.65	1.03	1.56	2.18	5.63	9.37

表9に示す. pH, 固形分, タンパク質濃度及び遊離糖濃度においては, 両者に大きな違いは認められなかった. 一方, 粘度においては, 弱酸加熱処理することで93.5 mPa・sから38.5 mPa・sに低下した. さらに粘度の低下により固液分離効率が向上したことで, NEの上清回収量も向上し, 抽出液の製造コストの低減に寄与すると考えられた.

以上の結果は, 抽出時に弱酸加熱処理とマンナナーゼ処理を併用することにより, 粘性が低く, 糖質源が豊富な海苔発酵原料を製造できることを明示するものであった.

3.5 D-1及びD-2株の改良NE培地での乳酸発酵試験

弱酸加熱処理とマンナナーゼ処理を併用して調製した改良NEを原料とする乳酸発酵過程における乳酸生成量及び遊離糖(ガラクトース, グルコース及びマン

ノース)の濃度の推移を図6A~Dに示した.

図6Aに示すように, 乳酸生成量はD-1株が発酵2日で, D-1基準株が発酵1日でプラトーに達し, 両方とも問題なく発酵していると判断された. また, D-2株も発酵1日でプラトーに達したが, D-1株より乳酸生成量がやや低い推移を示した. D-2基準株はさらに遅い立ち上がりを示した.

図6Bに示すように, ガラクトースの濃度はD-1株のみ発酵と共に低下し, 乳酸菌によって消費されているものと思われた. 一方, D-2株およびその基準株においては低減が見られず, これらの菌株はガラクトースの資化性が低いものと思われた.

図6Cに示すように, グルコースは4菌株全てにおいて発酵1日で検出されなくなり, 全株が資化性を有するものと思われた.

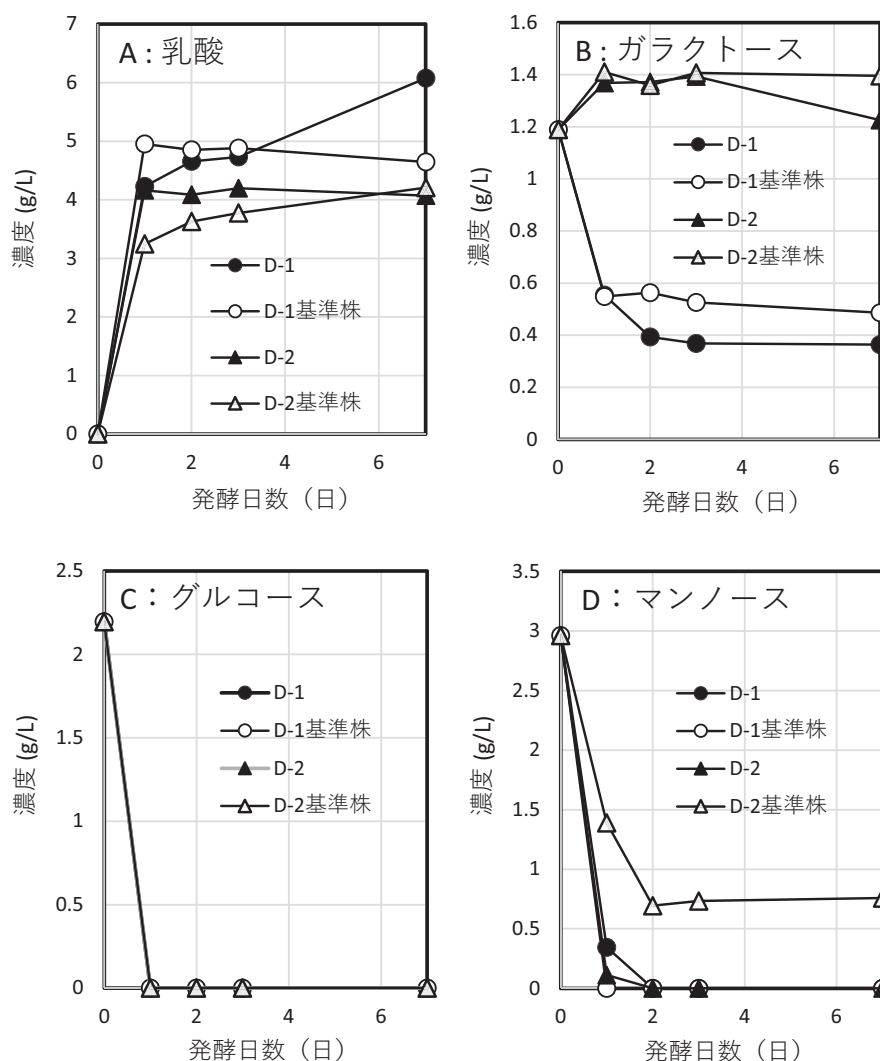


図6 乳酸発酵における乳酸及び遊離糖含量の推移

図 6D に示すように、マンノースは D-2 基準株以外の菌株は発酵 1~2 日で検出されなくなり、D-2 基準株以外はマンノースの資化性を有するものと思われた。

海苔が属する紅藻類は、陸上植物と違ってグルコースで構成されるデンプンが少なく、マンノースで構成されるマンナンや、ガラクトースで構成されるポルフィランを多く含んでいる。海苔の乳酸発酵においては、マンノースやガラクトースなど非グルコースの資化性が高い乳酸菌の方が有利である。海苔由来の培地を使った発酵試験の結果から、D-1 株や D-2 株は、それらの基準株に比べても海苔の発酵により適した乳酸菌であることが示唆された。

4. おわりに

乳酸菌は、現在までに 400 種近くが命名され⁸⁾、その一部は、食品の保存性や風味の向上のために古来より利用されてきたが、近年はプロバイオティクス（整腸作用）や免疫賦活作用などの生理機能性も見出され、ヒトの健康維持や体調改善に貢献している。

本研究では、低品質の海苔の付加価値向上を目指して、生海苔からの乳酸菌の取得を試みた結果、海苔の発酵性が高い乳酸菌株を初めて単離し、その同定に至った。同定した乳酸菌のなかでも *Latilactobacillus sakei* D-1 株は、海苔を最もよく発酵し、海苔由来の発酵食品の生産に適していると考えられた。一方、D-1 株にも NK 細胞の障害性向上作用が見られたが、PBMC の IgA 抗体産生能は *Lactococcus lactis* D-2 株の方が強く、その作用は D-2 の基準株を凌駕するものであった。したがって、海苔発酵食品を機能性食品として商品化するには、機能性が高い D-2 株を使用の方が好ましいと考える。ここで、実際の製造を意識した 50 kg スケールの発酵試験の結果から、発酵初期の菌数を増やすことで D-2 株でも海苔を十分発酵し得ることが明らかとなっている（データ示さず）。

最近では乳酸菌の整腸作用だけでなく、免疫調節作用も報告されており、PBMC の IgA 産生に働きかける乳酸菌としてはすでに *Pediococcus acidilactici* K15 株が報告されている⁷⁾。また、大手食品会社が、免疫の司令塔とされるプラズマサイトイド樹状細胞を直接活性化新しい乳酸菌（プラズマ乳酸菌）の取得に成功し⁹⁻¹²⁾、免疫賦活機能を訴求する機能性表示食品¹³⁾への産業利用につながっている。

先述した *Pediococcus acidilactici* K15 株の PBMC 活性化作用は、菌体を構成する成分が直接 PBMC に作用することが明らかとなっている⁷⁾が、我々が見出した *Lactococcus lactis* D-2 株の PBMC 活性化作用のメカニ

ズムは現段階では明らかでない。今後、免疫賦活にはたらく機能性食品として D-2 株を産業利用するためには、免疫賦活の作用メカニズムの解明や、実験動物及びヒトに対する作用のエビデンス取得を積み重ねていくことが重要である。併せて、有明海沿岸域が抱える色落ち海苔の問題解決に貢献し、地域産業や人々の暮らしを支える視点が必要不可欠であると考ええる。本乳酸菌や、乳酸菌で発酵させた新規海苔発酵食品が実用化され、サステナブルな未利用資源の有効活用や新産業創出に結実することを強く期待するものである。

なお、研究を実施するにあたって使用したマイクロプレートリーダーは、電源立地地域対策交付金で導入した。

本研究の遂行にあたりご協力を賜った佐賀大学農学部修士課程（研究当時）木下千鶴氏に多大なる感謝を申し上げる。本当にありがとうございました。

参考文献

- 1) NHK NEWS WEB 2023 年 1 月 12 日
<https://www3.nhk.or.jp/lnews/saga/20230112/5080013614.html>
- 2) Tsuge et al, Dietary effects of porphyran from *Porphyra yezoensis* on growth and lipid metabolism of Sprague Dawley rats, *Food Sci. Technol. Res.*, **10**, 147-151 (2004)
- 3) Yoshizawa et al, Macrophage stimulation activity of the polysaccharide fraction from a marine alga (*Porphyra yezoensis*) structure function relationships and improved solubility, *Biosci Biotechnol Biochem.* **59** 1933-1937 (1995)
- 4) Tsuchiya et al, GABA production from discolored laver by lactic acid fermentation and physiological function of fermented laver, *Food Preserv. Sci.*, **33** 121-125 (2007)
- 5) Muraoka et al, Fermentation properties of low quality red alga *Susabinori Porphyra yezoensis* by intestinal bacteria, *Biosci Biotechnol Biochem.*, **72**, 1731-1739 (2008)
- 6) 二羽 恭介, ノリの化学, 朝倉書店 (2020)
- 7) Kawashima et al, The molecular mechanism for activating IgA production by *Pediococcus acidilactici* K15 and the clinical impact in a randomized trial, *Scientific Reports.* **8**, 5065 (2018)
- 8) 辨野義己 プロバイオティクスとして用いられる乳酸菌の分類と効能, モダンメディア. **57** (10), 277-287 (2011)
- 9) Tsuji et al, The Effects of dietary supplementation of *Lactococcus lactis* strain Plasma on Skin Microbiome and Skin conditions in Healthy Subjects—A Randomized,

- Double-Blind, Placebo-Controlled Trial, *Microorganisms*. **9**, 563 (2021)
- 10) Sugimura et al, Effects of oral intake of plasmacytoid dendritic cells-stimulative lactic acid bacterial strain on pathogenesis of influenza-like illness and immunological response to influenza virus, *Br J Nutr.* **114**, 727-733 (2015)
- 11) Sugimura et al, Immunomodulatory effect of *Lactococcus lactis* JCM 5805 on human plasmacytoid dendritic cells, *Clin Immunol.* **149**, 509-518 (2013)
- 12) Sugimura et al, Plasmacytoid dendritic cell dysfunction caused by heat stress is improved by administration of *Lactococcus lactis* strain Plasma in mice, *Biosci Biotech Biochem.* **83** (11), 2140-2143 (2019)
- 13) キリン・プラズマ乳酸菌 免疫ケアスペシャルサイト, <https://www.imuse-p.jp/plasma/>
- ※本研究は令和4年度に実施しましたが、知的財産保護の観点から令和6年度の報告書に掲載しました。

ブルーカーボン資材及び高タンパク質素材としての海苔の利用展開（第1報）

食品コスメ部

柘植圭介 吉村臣史

佐賀大学農学部

木村圭 吉田和広 川村嘉応

海藻や植物プランクトンなど、海の生物の作用で海中に取り込まれて貯留する炭素のことをブルーカーボンと称する。「2050年カーボンニュートラルに伴うグリーン成長戦略（経済産業省）」に基づき、佐賀県の特産品であるノリのブルーカーボン資材としての可能性を追求することを目的として、高炭素吸収能を示すノリ品種の選抜を試みた。併せて、海藻の中でも格段に高いタンパク質含量であるノリの栄養学的特徴に着目し、高窒素吸収能を示す品種の選抜を試みるとともに、高タンパク質食品素材としてのノリの新たな活用を志向して、ノリを原料とした動物資源フリー食品（Plant Based Food；PBF）の展開可能性についても検討を行った。その結果、保有株18種の中から、ブルーカーボン資材とPBFの両方に適するノリとして、CFMS®F2及びU-51®を選抜した。この2株は、成長性、炭素含有率及び窒素含有率のいずれにおいても高値を示し、これらの株を核としたブルーカーボン向けノリ品種の作出が期待された。

1. はじめに

経済産業省が2020年10月に策定した「2050年カーボンニュートラルに伴うグリーン成長戦略¹⁾」では、産業政策とエネルギー政策の両面から成長が期待される14の重要分野について実行計画が策定されている。重要分野のうち「9 食料・農林水産業²⁾」では、大気中の温室効果ガスを回収・除去する「ネガティブエミッション」に向けた森林及び木材、海洋等の活用に関する目標が具体化され、海藻や光合成プランクトン等の海洋生態系による炭素貯留（ブルーカーボン）の大きなポテンシャルが期待されている。

同戦略には、ブルーカーボンに関する今後の取組として、2023年度までに海藻藻場によるCO₂の吸収・貯留量の計測方法を確立し、国連気候変動枠組条約等への反映を目指すとともに、産・官・学による藻場・干潟の造成・再生・保全の一層の取組を推進することが明記されている。さらに、海藻等の商業利用を進めるとともに、カーボンオフセット制度を利用した収益化を図り、CO₂吸収を自律的に推進する計画である。

日本には古来より海藻類の食文化があり、海苔（スサビノリ；以下ノリと称する）をはじめ、コンブやワカメなど約100種類の海藻が食されているといわれている。海藻類の生産量は年間33万6千トン（生重量、2021年）に達し³⁾、なかでもノリの生産量が最も多く、年間約22万9千トンを占める。

有明海沿岸域は干満差が6mにも達する遠浅の干潟

で、潮間帯に自生するノリの養殖に適した地形である。そのため海苔の養殖が盛んに行われ、特に佐賀県は全国でもトップの生産量を誇る（表1）。

本研究では、ブルーカーボンの資材としてのノリの有用性に着目し、その炭素吸収能を把握するとともに、

表1 ノリの都道府県別生産量

都道府県	生産量(生重量;t)
宮城	12,782
千葉	3,173
神奈川	390
愛知	6,977
三重	5,400
大阪	71
兵庫	46,034
岡山	5,487
広島	1,926
山口	242
徳島	1,191
香川	6,432
愛媛	1,023
福岡	45,071
佐賀	56,938
長崎	221
熊本	35,767
大分	58
鹿児島	112
有明海合計	138,055
総計	229,294

令和3年海面漁業生産統計調査（農林水産省）より抜粋

高い炭素吸収能を示すノリ品種の選抜を試みた。

併せて、海藻の中でも格段に高いタンパク質含量であるノリの栄養学的特徴に着目し、窒素吸収能が高い品種の選抜を試みるとともに、高タンパク質食品素材としてのノリの新たな活用を志向して、ノリを原料とした動物資源フリー食品（Plant Based Food ; PBF）の展開可能性についても検討を行った。PBFの主要なタンパク質源としてノリのみを用いた場合、ノリを高配合しなければならず、結果的に原料コストの上昇やノリ独特の風味の発現を招いてしまう。そこで、植物性原料として佐賀特産の高オレイン酸大豆「HO1 号」も採り入れて、PBFのモデル食品を設計した。

ここで、HO1 号とは、佐賀大学が育種開発³⁾したオリブオイル並みに高いオレイン酸含量（総脂肪酸の80%以上）の油脂を生産するダイズ品種である。リノール酸含量が従来品種の10分の1以下と極めて低いため、従来品種と比較して高い酸化安定性を示す。また、大豆特有の青臭みの原因物質である *n*-ヘキサナールがほとんど発生しないことも明らかになっている。HO1 号のこのような特性を活用することで、酸化安定性や風味に優れた PBF が調製できると考えられる。

2. 実験方法

2.1 供試株の選定

佐賀大学で管理している250以上のノリ株を対象に、高成長性、色素変異性、色落ち耐性を指標として各株の大まかな特徴に基づき24株を選定した。さらに問題なく成熟し、かつ培養終期まで維持できた18株を選定し（表2）、培養試験に供した。

2.2 培養試験

ノリ葉状体の特性を比較するためには、糸状体を培

表2 供試株

番号	株管理名	純系	備考
1	CFMS(B)F1(P)	○	色落ち耐性株
2	G9HG		高成長
3	D-56-0	○	緑芽
4	S18正常1(P)	○	佐賀大学基準株
5	野間3号(P)	○	
6	U51(P)	○	実験株
7	CFMS(A)		色落ち耐性株、元株
8	CFMS(B)		色落ち耐性株、元株
9	A-混(P)		
10	S-18正常11(P)	○	佐賀大学基準株
11	オオバグリーン	○	
12	佐賀6号②(P)	○	
13	CFMS(A)F2		色落ち耐性株、2代選抜
14	前の株 A-混	○	
15	橙(P)	○	橙色芽
16	J-22R-1(P)	○	赤色芽
17	佐賀1号(P)	○	
18	G9(P)	○	

養して大きく育て、さらに成熟させることでタネ（殻胞子）を放出させ、その殻胞子から葉状体世代の培養に移るという手順が必要になる。そこで、糸状体で長期保存しているノリ18株を、①糸状体培養→②カキ殻糸状体培養→葉状体培養の順に培養した。各培養期の条件を以下に示した。

①糸状体培養：培地として人工海水 SF-1 に SWM-III 改変培地（表3）を添加した強化海水を用い、白色 LED を $50 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で照射した。明暗周期は 12L / 12D の中日条件に設定し、18℃で培養した。培養容器として腰高シャーレを用い、培養期間は1-2ヶ月間とした。

②カキ殻糸状体培養：大きく育った糸状体を裁断し、カキ殻上に静置培養することで、糸状体をカキ殻に穿孔させ、カキ殻表面に海苔糸状体が十分繁茂するまで、再度1-2ヶ月間18℃で培養した（図1）。十分に育った後は、カキ殻糸状体を培養容器ごと26℃に調整し、1ヶ月の高温処理を行った。その後、カキ殻糸状体を培養容器ごと18℃に戻すことで、ノリ糸状体を成熟させ、胞子嚢の形成を促した。

表3 SWM-III 改変培地組成

A液	
NaNO ₃	85 g
NaHPO ₄ · 12H ₂ O	18 g
Na ₂ EDTA	5.58 g
FeCl ₃ · 6H ₂ O	0.19 g
B液	
H ₃ BO ₄	6.183 g
MnCl ₂ · 4H ₂ O	1.0885 g
ZnCl ₂	54.5 mg
CoCl ₂ · 6H ₂ O	2.38 mg
CuCl ₂ · 2H ₂ O	17 μg
pH7.5	

海水1LにA液とB液を各2mLずつ添加



図1 カキ殻糸状体培養の様子
カキ殻が黒いノリ糸状体で覆われている

③葉状体培養：18℃培養 1 週間程度で殻胞子放出が確認された株をカキ殻ごとマリンフラスコ内に移し、培養糸を入れて通気攪拌培養して、ノリの殻胞子を培養糸に付着させた（図2）。顕微鏡下で培養糸に十分量の殻胞子が付着したことを確認した後、フラスコ内に培養糸を戻し、培養糸ごと殻胞子を培養した。殻胞子の培養開始日を0日目とし、全ての株を45日間培養することで各株の葉状体試料とした。この間、5日に1回の培地の交換を行い、30日目には酸処理をすべての株で実施した。酸処理条件は以下の通り；培養したノリ葉体を0.5%クエン酸含有培地に90秒浸して処理し、その後SF-1人工海水で2回洗浄した。ノリの培養状況を表4に、培養終盤のノリ葉状体を図2に示した。

2.3 炭素/窒素含量分析

葉状体を45日間培養後、1株あたり20枚の葉状体を不作為に取り出して葉長、葉幅を測定し、写真撮影を行った。その後、葉状体の水分をペーパータオルで

吸水し、各葉をマイクロチューブに入れて、分析するまで-80℃で保存した。炭素/窒素（C/N）測定試料においては、葉状体を凍結乾燥し、燃焼式窒素/炭素タンパク質分析装置（Sumigraph NC-Trinity，住化分析センター）にてC/N含量を測定した。1株あたりの反復数は3とした（n=3）。

2.4 PBF モデル食品の試作

PBF のコンセプトにご同意いただいた2社の佐賀県内の食品製造企業と協力し、各企業のアイデアを取り入れて海苔及び高オレイン酸大豆 HO1 号を高配合するモデル食品を試作した。

3. 結果及び考察

3.1 培養試験結果（成長性）

培養終期まで維持できた18株について、表4のスケジュールで1サイクル6株ずつ培養することで、最終的に18株全ての葉状体試料を得た。各株について、ラ



図2 葉状体培養の様子

左：培養初期、右：培養終期

表4 選定したノリ株の培養状況

	株名	糸状体培養 開始日	高温処理 開始日	成熟培養 開始日	葉状体培養 0日目	スケールアップ (500mL)	酸処理日	培養終了日
1	CFMS®F1®	2022/3/15	2022/8/30	2022/10/4	2022/10/13	2022/10/26	2022/11/10	2022/11/27
2	G9 HG	2022/5/11	2022/8/30	2022/10/4	2022/10/12	2022/10/26	2022/11/10	2022/11/26
3	D-56-O	2022/5/11	2022/8/30	2022/10/4	2022/10/11	2022/10/26	2022/11/10	2022/11/25
4	S18正常 I®	2022/6/15	2022/8/30	2022/10/4	2022/10/11	2022/10/26	2022/11/10	2022/11/25
5	野間3号®	2022/5/11	2022/8/30	2022/10/4	2022/10/12	2022/10/26	2022/11/10	2022/11/26
6	U51®	2022/6/15	2022/8/30	2022/10/4	2022/10/11	2022/10/26	2022/11/10	2022/11/25
7	CFMS®A	2022/1/19	2022/8/30	2022/10/19	2022/10/26	2022/11/10	2022/11/25	2022/12/10
8	CFMS®B	2022/3/15	2022/8/30	2022/10/19	2022/10/28	2022/11/10	2022/11/25	2022/12/12
9	A-混	2022/3/15	2022/8/30	2022/10/19	2022/10/26	2022/11/10	2022/11/25	2022/12/10
10	S-18正常 II®	2022/5/25	2022/8/30	2022/10/19	2022/10/26	2022/11/10	2022/11/25	2022/12/10
11	オオバグリーン	2022/6/16	2022/9/7	2022/10/19	2022/10/28	2022/11/10	2022/11/25	2022/12/12
12	佐賀6号®②	2022/6/21	2022/9/7	2022/10/19	2022/10/26	2022/11/10	2022/11/25	2022/12/10
13	CFMS®AF2	2022/3/15	2022/8/30	2022/11/3	2022/11/10	2022/11/25	2022/12/10	2022/12/25
14	前の株 A-混®	2022/3/15	2022/8/30	2022/11/3	2022/11/12	2022/11/25	2022/12/10	2022/12/27
15	橙®	2022/1/19	2022/8/30	2022/11/3	2022/11/11	2022/11/25	2022/12/10	2022/12/26
16	J-22R-1®	2022/1/19	2022/8/30	2022/11/3	2022/11/11	2022/11/25	2022/12/10	2022/12/26
17	佐賀1号®	2022/6/21	2022/9/7	2022/11/3	2022/11/10	2022/11/25	2022/12/10	2022/12/25
18	G9®	2022/6/17	2022/9/7	2022/11/3	2022/11/10	2022/11/25	2022/12/10	2022/12/25

ンダムに20枚の葉の葉長と葉幅を測定した結果、表5に示すように、株ごとに葉のサイズ特性が大きく異なっていた。平均葉長については、最小17.57mmから最大161.66mmと、約10倍の差が生じ、長い方から順に”CFMS(A)F2”, ”U-51(P)”, ”前の株A-混(P)”となった。平均葉幅についても、最小1.51mmから最大17.55mmと、約10倍以上の差が生じ、広い方から順に”前の株A-混(P)”, ”佐賀6号②(P)”, ”G9HG”となった。葉長の大きい株と葉幅の広い株は必ずしも一致しなかった為、各株の平均長幅比 [葉長/葉幅] を算出した結果、最小1.54から24.58と、長く伸びやすい株と丸く広がりやすい株が存在することが明らかになった。長幅比は、大きい方から順に”橙(P)”, ”CFMS(A)F2”, ”U-51(P)”となった。

葉状体の高成長性は、炭素吸収性に優れるノリを選抜するうえで重要な特性である。ノリは細胞層が1層であり、葉の厚さは大差ないと考えられることから、葉面積が大きいことがこの特性を満たすことに繋がる。しかしながら、各株で葉の面積を正確に計測することは極めて難しいため、本研究では海苔の葉を楕円と仮定し、葉長と葉幅から楕円の面積を算出することで、便宜的な葉の面積とした。

概算葉面積の平均値は、最小24.58mm²から最大1733.52mm²と、大差が生じ、面積の大きい方から順に”前の株A-混(P)”, ”CFMS(A)F2”, ”U-51(P)”となった。葉面積を指標にブルーカーボン資材として活用の見込まれるノリを選定すると、”前の株A-混-P”, ”CFMS(A)F2”, ”U-51-P”となる。しかしながら、”前の株A-混-P”

に関しては、幅広い葉の特徴を有することから、養殖ノリと同様に網などに付着させて育てる場合には、隣の葉に干渉してしまうことが栽培上のデメリットとなることも予想される。このことから、”前の株A-混-P”は、網などの基質に固定しないバイオリクター等での生育に適しており、養殖同様に網を基質に用いる場合には、”CFMS(A)F2”及び”U-51(P)”が適していると結論づけられた。

3.2 培養試験結果（炭素/窒素含有率）

続いて、選定した海苔株についてC/N測定を行った。平均窒素含有率については、最小3.66%から最大6.85%の株が存在した（図3）。含有率が6%以上の株は、大きい方から順に”オオバグリーン”, ”CFMS(B)”, ”CFMS(A)F2”, ”S-18正常Ⅱ(P)”, ”U-51(P)”, ”佐賀6号②(P)”, ”S18正常Ⅰ(P)”であった。平均炭素含有率については、最小32.32%から最大38.75%の株が存在した（図4）。含有率が36%以上の株は、大きい方から順に”A-混”, ”佐賀6号②(P)”, ”U-51(P)”, ”S-18正常Ⅱ(P)”, ”オオバグリーン”, ”G9(P)”, ”橙(P)”, ”CFMS(A)F2”となった。しかしながら、全ての株において、炭素含有率には大きな差は無く、多くの株で35%程度以上の値を示していた。

窒素含有率は、海苔の色素及びタンパク質含有量と関連がある。つまり、タンパク質含有量が大きければ、窒素含有率も大きくなるため、ブルーカーボン資材としてのみならず、高タンパク質食品原料としての海苔の利活用を考える上では、高窒素含有率性は重要である。

表5 選定したノリ株の培養結果（成長指数）

	株名	U-51(P)	S-18正常Ⅰ(P)	D-56-O	G9HG	野間3号(P)	CFMS(B)F1(P)	S-18正常Ⅱ(P)	佐賀6号②(P)	A-混
葉長	平均値	127.65	23.73	51.94	17.57	55.70	49.88	45.61	23.16	22.01
	標準偏差	21.65	8.30	16.39	6.96	21.27	13.88	18.20	11.70	6.97
葉幅	平均値	12.25	3.57	6.49	12.42	9.02	8.75	8.93	14.84	9.06
	標準偏差	2.03	0.96	1.78	3.35	2.80	2.05	2.22	5.74	1.03
長幅比	平均値	10.86	7.18	8.17	1.40	6.67	5.71	5.07	1.54	2.46
	標準偏差	3.51	3.30	2.02	0.24	3.20	0.86	1.22	0.33	0.77
葉面積	平均値	1215.01	67.27	279.98	186.66	397.63	360.80	343.95	314.97	156.73
	標準偏差	217.15	33.27	192.33	131.55	228.22	194.60	234.38	297.89	55.81

	株名	CFMS(A)	CFMS(B)	オオバグリーン	佐賀1号(P)	G9(P)	CFMS(A)F2	J-22R-1(P)	橙(P)	前の株A-混(P)
葉長	平均値	26.04	30.10	40.60	30.96	90.33	161.66	18.07	20.25	117.34
	標準偏差	5.03	6.08	17.52	7.83	12.92	37.65	3.63	4.39	42.49
葉幅	平均値	6.19	8.50	9.08	5.83	9.93	9.84	2.48	1.51	17.55
	標準偏差	1.99	2.08	2.03	1.22	1.83	1.87	0.32	0.44	4.52
長幅比	平均値	4.46	3.68	4.52	5.47	9.38	16.89	7.42	24.58	6.67
	標準偏差	1.29	0.89	1.60	1.53	2.09	4.75	1.92	10.38	1.32
葉面積	平均値	129.96	204.48	301.51	143.45	708.09	1254.08	35.22	24.58	1733.52
	標準偏差	67.55	80.19	196.68	55.12	186.86	374.43	8.33	10.38	1189.64

網掛けの赤色が濃い方が高値を、青色の濃い方が低値を示す。

図3 選定したノリ株の培養結果（窒素含有率）

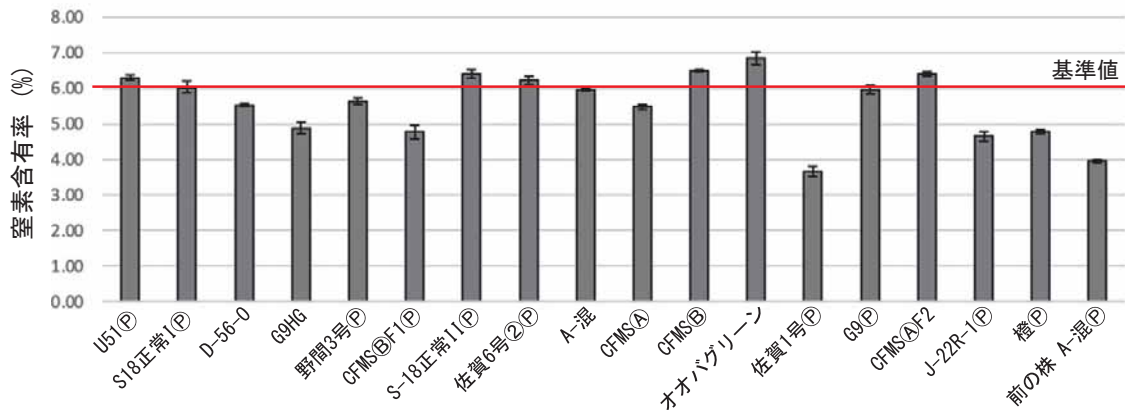


図4 選定したノリ株の培養結果（炭素含有率）

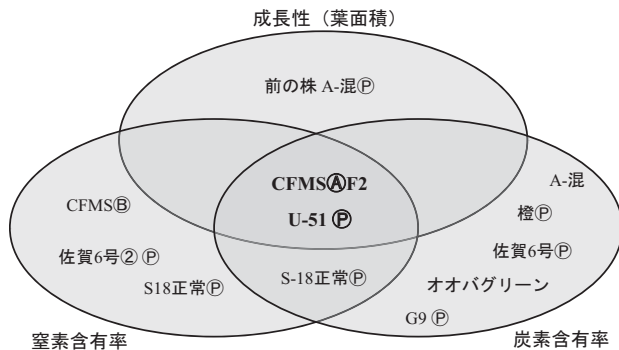
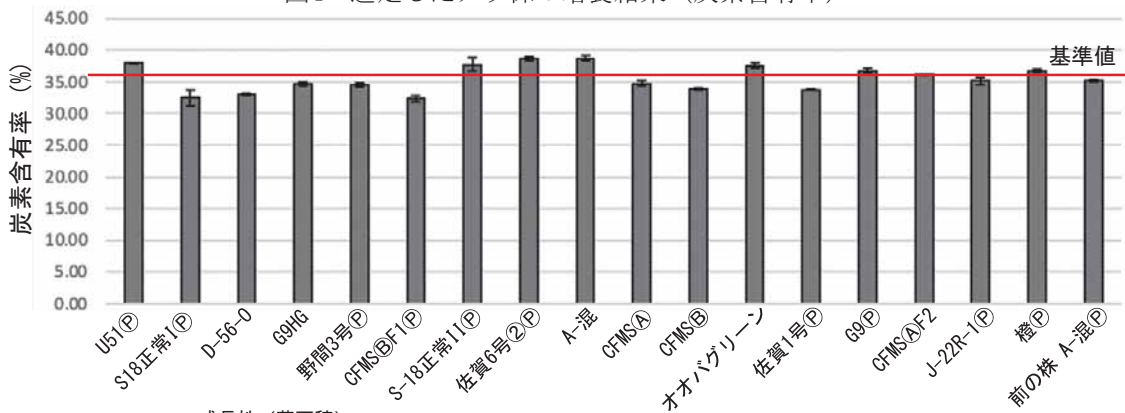


図5 成長性及び窒素／炭素含有率を指標としたブルーカーボン資材としてノリ株の選抜

これらの結果を総合的に評価した結果、図5に示すように、ブルーカーボン資材と高タンパク質食品原料の両方に適するノリとして、“CFMS(A)F2”及び“U-51(P)”を選抜した。なお、“CFMS(A)F2”は、色落ち耐性変異株として佐賀大学において作出された株であり、本研究により本株の新規有用性が見出された。

3.3 PBF モデル食品の試作

佐賀県内企業のご協力により試作したPBFモデル食品「えごま生姜味噌の海苔はさみスナック」及び「Yasai Bou Nori」をそれぞれ図6及び図7に示した。「えごま

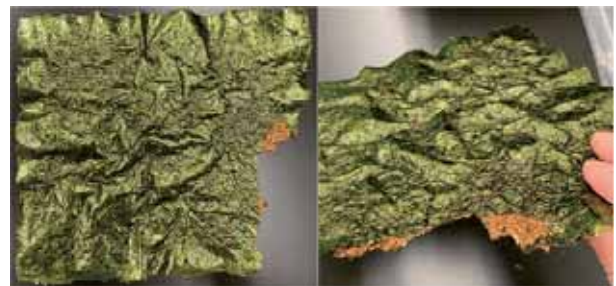


図6 えごま生姜味噌の海苔はさみスナック



図7 Yasai Bou

右図左側が “SOY & NORI”

生姜味噌の海苔はさみスナック」は、えごま生姜味噌を2枚の焼成板海苔で挟んで乾燥させたもので、味噌の原料として高オレイン酸大豆 HO1 を使用している。

また、「Yasai Bou Nori」は、大豆水煮と焼成海苔粉末を生地に練りこみ焼き上げたもので、いずれの試作品も動物性原料は不使用である。今後はこれらの食品に含まれる海苔由来の成分含量やタンパク質含量を分析し、PBFとしての優位性を明示する計画である。

4. おわりに

本研究では、ブルーカーボン資材としてのノリの有用性に着目し、高炭素吸収能を示すノリ品種の選抜を試みた。併せて、海藻の中でも格段に高いタンパク質含量であるノリの栄養学的特徴に着目し、高窒素吸収能を示す品種の選抜を試みるとともに、高タンパク質食品素材としてのノリの新たな活用を志向して、ノリを原料とした動物資源フリー食品(Plant Based Food; PBF)の展開可能性についても検討を行った。

その結果、長期保存株18種の中から、ブルーカーボン資材とPBFの両方に適するノリとして、CFMS®F2及びU-51®を選抜した。この2株は、成長性、炭素含有率及び窒素含有率のいずれにおいても評価した中ではトップクラスの数値であった。今後は、CFMS®F2及びU-51®の栽培適性や栄養学的指標を詳細に調査し、ブルーカーボン資材に適したノリ品種の作出を目指していく。

また、試作したモデルPBF食品について、今後は栄養学的調査を実施し、PBFとしてのポテンシャルを明示していくことで、ノリのPBFへの応用に展開する予定である。

本研究の遂行にあたりご協力を賜った井手食品有限会社 鶴恵美子氏、有限会社たたら 多々良珠枝氏に多大なる感謝を申し上げる。本当にありがとうございました。

参考文献

- 1) 2050年カーボンニュートラルに伴うグリーン成長戦略
https://www.meti.go.jp/policy/energy_environment/global_warming/ggs/pdf/green_honbun.pdf
- 2) 政府統計・海面漁業生産統計調査
http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/kaimen_gyosei/index.html
- 3) 穴井豊昭, 突然変異体を用いたダイズの油脂成分改変, 日本食品科学工学会誌, 70(1), 47-51 (2023)

※本研究は令和4年度に実施しましたが、知的財産保護の観点から令和6年度の報告書に掲載しました。

醤油製造工程において生成する風味成分等の 網羅的解析による品質寄与因子の解明

－製造工程における醤油香気の変化－

食品コスメ部

吉村臣史 澤田和敬 柘植圭介

宮島醤油株式会社

水野裕一

国立大学法人佐賀大学農学部

小林元太

本研究では、醤油の製造工程の中でも重要な工程である醤油諸味の発酵、熟成段階において、品質に大きな影響を及ぼす揮発性成分の生成挙動及び消長について、ノンターゲットによる網羅的解析により評価を行った。今回の結果から、564個のピークを検出することができ、全てのピークに対して主成分分析及び非階層的クラスター分析による統計解析を行ったところ、発酵における管理段階（冷却期、加温期、発酵期）及び熟成期において、関与成分が変化している可能性が示唆された。また、特に熟成期において多くの揮発性成分が影響を及ぼしている傾向が確認され、熟成期における諸味の管理が醤油本来の香りに大きく影響を及ぼしている可能性が示された。

1. はじめに

醤油は古来より個々の家庭に必ず常備されている調味料であり、日本人にとって切り離せない調味料の一つである。世界的にもユネスコの無形文化遺産に登録された「和食：日本人の伝統的な食文化」において、醤油は非常に重要な役割を担っている。

醤油の製造は、伝統的な技法に沿った造りを基本としている。近年においては、納豆等の発酵食品がその機能性について脚光を浴びているが、醤油も発酵食品の一つであり、様々な微生物の力を応用した食品の一つとしてよく知られている。

発酵食品の製造において常に問題となり得るが、微生物の作用を十分に発揮するためには、微生物の特徴や利用する環境（温度や湿度等）の適正な維持が重要である。一方、適切な製造環境の維持、管理は、施設に対する投資を増大させ得る因子となることから、立地している地域の温度や湿度等の環境因子に沿った製造ノウハウに基づき生産活動を行っている醤油蔵も多い。

適切な醤油製造を行う上で、把握すべき重要なポイントとして以下の項目が挙げられる。

- (1) 発酵及び熟成において使用する複数の微生物の増殖パターン（微生物叢）に関して、発酵等の経過に伴う微生物叢の変化を適切に把握す

ること。

- (2) 微生物叢の変化に起因する醤油諸味及び醤油製品の風味を、発酵等の経過において適切に把握し、微生物叢の変化が風味等品質に及ぼす影響を明確化すること。
- (3) 醤油諸味の仕込み開始時期の違いに伴う外的因子（気温等）の影響により、微生物叢の変化及び醤油諸味等の品質変化が受ける影響を明確にすること。

これらの事象を明らかにすることにより、醤油製造における微生物関与メカニズムの解明に繋がり、将来的には製造工程の効率化や新規調味料の製造開発のための基礎データの蓄積等に活用可能と考えている。

食品の風味評価に関しては、食品素材に含まれる成分の含量を直接測定することにより、その対象となった成分の特徴を、食品素材の風味の方向性として反映することが多かった（例えば、〇〇が多く含まれるから「うま味が強い」など）。課題としては、個々の成分が持つ特性と含有量から推察した風味の方向性が、対象の食品素材を代表する風味とは、必ずしもイコールとならないことである。

近年では、味覚を「うま味」や「苦味」等の味言語を指標として、直接それらを測定できる機器が複数販売されている。これらの機器は、センサー工学の観点

から取り組まれており¹⁴⁾、「うま味」「苦味」「塩味」といった個別の味言語に対して、測定されたセンサー応答値から算出され、客観的な数値が提供される。この方法は、味覚の種類及びその強度について、具体的なデータを取得することにより、購買者に対する視覚的訴求が可能なデータを提供できることがメリットとなる。弱みとしては、特定のセンサーに応答した成分群に対する反応値を基にしていることから、どの成分が関係しているのかわかりにくいことが挙げられる。

このような機器分析による食品風味の評価は一長一短があり、これまでも多くの研究者において「食品風味の可視化」に取り組まれている³⁾⁻¹⁵⁾。

機器分析は、特定のメカニズムに基づき設計された機器を用いて分析を行うことであり、分析を行うことのできる範囲は非常に広い。水分や糖度、pHといった比較的簡便な項目から、糖であってもクロマトグラフィーに基づく個別の糖含量の測定、といった項目など、測定したい項目にあわせて選択することができる。

このような状況を背景として、近年では食品の風味評価に対して、機器分析を応用したノンターゲット（何を測定するのかを特定せずに分析する考え方）による網羅的解析を行い、風味に直接的に影響を及ぼしている成分の探索、解明に取り組んでいる事例も多い。

本研究では、醤油諸味の発酵、熟成段階における風味寄与成分の把握及び寄与因子の解明を目的に、ノンターゲットによる網羅的解析を試み、醤油製造の一助となる技術の確立を図ることを目的としている。

2. 実験方法

2.1 被験試料

被験試料は、共同研究機関である宮島醤油株式会社より提供された醤油諸味を使用した。詳しくは下記のとおりである。

屋外醤油発酵タンク 306 の醤油諸味を仕込日の4月13日から熟成終了日の8月22日にかけて経時的に500 mL採取した（表1）。採取した醤油諸味をフードプロセッサを用いて均質化後、使用するまで冷凍保存した。

2.2 揮発性成分 (volatile organic compound; VOC) 分析前処理

冷凍状態である被験試料（プラスチック製ボトルに保存している状態）を水浴中で解凍した。解凍後、遠心分離（25,000 xg, 15分間, 4℃）により固液分離を行い、液体試料を得た。

揮発性成分分析では、固液分離後の液体試料 1 mL をサンプリングし、ガスクロマトグラフ質量分析装置

（GC-MS）に接続したオートサンプラー用バイアル（容量 20 mL）に入れ、分析に供するまで室温環境下の専用ユニットに静置した。

2.3 VOC 分析

サンプリング法をベースとし、閉区間（密閉したバイアル）の気相空間に揮発した成分を固相マイクロ抽出（Solid Phase Microextraction; SPME）により抽出した。使用機器、サンプル処理条件等詳細条件を表2に示した。

分析は、SPME ファイバーに吸着した VOC を GC-MS に供することにより分析を行った。使用機器、分析条件等詳細条件を表3に示した。

2.4 GC-MS データに基づいたピークのアサイン

表1 醤油諸味採取時期及び生物添加時期

採取日	仕込 日数	添加微生物	管理段階
4/13	0	—	冷却期
4/15	2	—	
4/22	9	耐塩性乳酸菌	
4/27	14	熟成酵母	
5/6	23	—	加温期
5/11	28	—	
5/18	35	—	
5/24	41	主発酵酵母	
5/31	48	—	発酵期
6/7	55	—	
6/14	62	—	
6/24	72	—	
7/23	101	—	熟成期
8/22	131	—	

表2 醤油諸味由来揮発性成分の SPME 条件

Conditions	Name or value
Apparatus	AOC-5000plus
Incubation temperature	60°C
Preincubation time before VOC sampling	10 min
Extraction time by SPME	30 min
Desorption time on GC injection port	15 min
Agitator speed during VOC sampling	500 rpm
SPME fiber assembly	DVB/CAR/PDMS
Size of SPME fiber	50/30 mm, 23 Ga

GC-MS による測定データに基づいたピークのアサインは、国立研究開発法人理化学研究所がフリーソフトウェアとして配布されている MS-DIAL (4.9.221218) を使用した。MS-DIAL 上では、アサインされたデータについて、複数の分析データ間のアサインピークについて、ピークエリア等を比較できるとともに、csv ファイル等にアウトプットできることから、アウトプットしたデータファイルを以後の統計解析ソフトウェアである R において使用することが可能である。

本研究では、MS-DIAL を用いて、

- ・ GC-MS 分析により検出されたピークについてアサインを行う。
- ・ アサインされたピークについて、全ての GC-MS データから関係するピークのピークエリアを算出する。

表3 醤油諸味由来揮発性成分の分析等条件

Conditions	Name or value
Apparatus	GCMS-TQ8030
Carrier gas	He
Carrier gas control	Constant linear velocity
Linear velocity of Carrier gas	30.0 cm/sec
VOC introduction to GC column	Split introduction
Split ratio	5
Carrier gas pressure (initial value)	21.6 kPa
Carrier gas flow rate (total, initial value)	7.2 mL/min
Column oven temperature (initial)	30°C
Column oven temperature program	Start temperature; 30°C. Temperature program; 5°C/min to 230°C.
Ionization source temperature	200°C
Interface temperature	230°C
Measured <i>m/z</i> region	from 35 to 300
Column	VF-WAXms
Column size	30 m x 0.25 mm i.d., film thickness 0.25 mm

- ・ 全 GC-MS データにおけるアサインされたピークのピークエリアを csv ファイルとしてアウトプットする。

ことにより、醤油諸味発酵・熟成における時系列な揮発性成分の変化を追跡するためのデータとして活用した。

2.5 統計解析

統計解析は、フリーソフトである R を使用して行った。R を用いて、主成分分析及び階層的クラスター分析を行い、諸味発酵及び諸味熟成中における揮発性成分の変化を追跡した。

3. 結果及び考察

3.1 醤油諸味から検出された VOC

図1には発酵開始日にサンプリングした醤油諸味から検出した VOC のトータルイオンクロマトグラム (total ion chromatogram; TIC) を、図2には発酵49日目にサンプリングした醤油諸味から検出した VOC の TIC を、図3には発酵開始から102日目にサンプリングした醤油諸味から検出された VOC の TIC を示している。

これらの結果より、諸味の発酵から熟成に至るまでの間に醤油諸味から検出される VOC について、その組成、含量が大きく変化していることが明らかである。そこで、VOC の個別成分に関して、その生成から消失までの消長挙動をより詳細に検討するために、ノンターゲットによる網羅的解析を試みた。

3.2 醤油諸味から検出された VOC に対する主成分分析

MS-DIAL を用いた検出ピークのアサインにより564個のピークをピックアップすることができた。

前述のように、MS-DIAL を用いることにより、アサインされたピークについて、サンプル間のピークエリアの比較等ができることから、評価の対象となる全ての測定データに対して、アサインしたピークのピークエリアを算出した。この各サンプルに対する GC-MS 分析データから算出されたピークエリア (今回の分析では、39回の GC-MS 分析から得られたデータ (13 (被験試料数) × 3 (分析回数))) を集約し、統計解析ソフトウェアである R の解析用データとして使用している。

図4では、醤油諸味から検出された VOC の成分、検出量に基づいて、主成分分析 (principal component analysis; PCA) を行った結果を示している。この結果から、以下の傾向が推察される。

- (1) 諸味発酵における管理段階ごとにおいて、グルー

プ化する傾向が示された。

- ア 冷却期は、第3象限にグループ化されている。
 - イ 加温期は、第2象限にグループ化されている。
 - ウ 発酵期は、第4象限にグループ化されている。
 - エ 熟成期以降は、X軸上から第1象限にかけてグループ化されている。
- (2) Loading plot より、管理段階の進行に伴い、関与成分が変化している可能性が高い。
- (3) Loading plot より、熟成期において多くの VOC が揮発性に強く関与又は新たに生成している

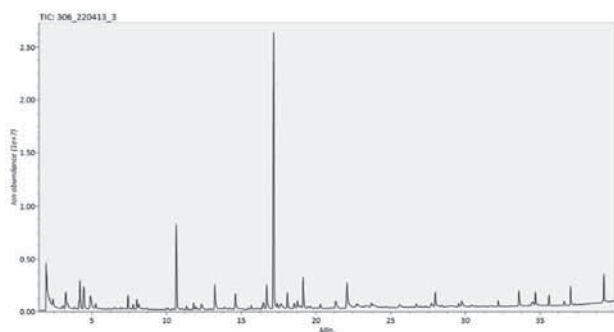


図1 発酵初日の醤油諸味から発生する VOC

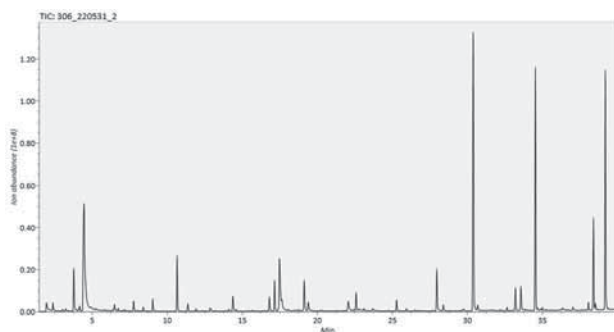


図2 発酵49日目の醤油諸味から発生する VOC

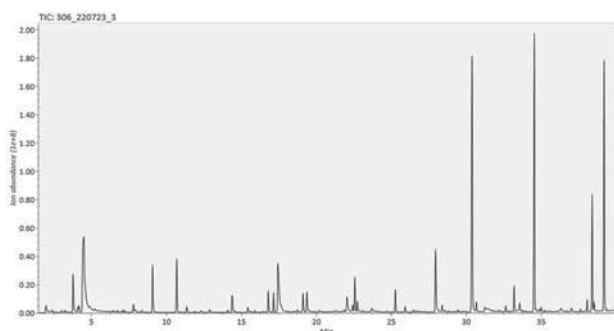


図3 発酵102日目の醤油諸味から発生する VOC

可能性が高い。

3.3 醤油諸味から検出された VOC に対する非階層的クラスター分析

図5に主成分分析に用いたデータを用いて、非階層的クラスター分析の結果をヒートマップとして表したものを示している。

この解析では、各ピークの検出量を標準化する (Z-score として表示) ことにより、ピーク間の検出量の大小よりも個別のピークにおける検出量の変化量を軸として表示している。また、非階層的クラスター分析の条件として、仕込日数のクラスター数を4に、検出された VOC のクラスター数を6に設定している。

この結果から、仕込日数に関して管理段階ごとにクラスターに分類される傾向が示された。特に冷却期及び加温期、発酵期及び熟成期の2つに大きく分類される傾向であった。

また、成分に関しても、Cluster C1 及び Cluster C2 は主に冷却期及び加温期に検出される VOC が主たる構成成分として確認されている一方、Cluster C3 は加温期以降検出量が増加する成分が主たる構成成分としてクラスター化されている。

Cluster C4 及び Cluster C5、Cluster C6 において Z-score が高い成分は、冷却期及び加温期ではほとんど検出されておらず、発酵期以降において多く検出されている。これは、PCA の分析と類似した傾向を示しており、Cluster C4 及び Cluster C5、Cluster C6 にクラスター化された成分が、醤油諸味、ひいては醤油製品の香気に大きく影響を及ぼしている可能性が高いことが推察された。

また、Cluster C6 については、熟成期において検出量が減少している成分が分類されており、これら成分の消長についても今後の検討の材料として注視していきたい。

4. おわりに

今回の結果を踏まえて、他の発酵タンクにおける挙動の調査や仕込の季節における挙動の違いを詳細に検討していく予定としている。

これまで、職人の勘に頼っていた部分を科学的に解明することによって、製造現場から品質管理の広い範囲での応用に繋がる技術として基礎データの蓄積及び関連技術の確立に取り組んでいきたい。

本研究を実施するにあたって、GC-MS/MS 構造解析システムは、電源立地地域対策交付金で導入した機器を使用した。

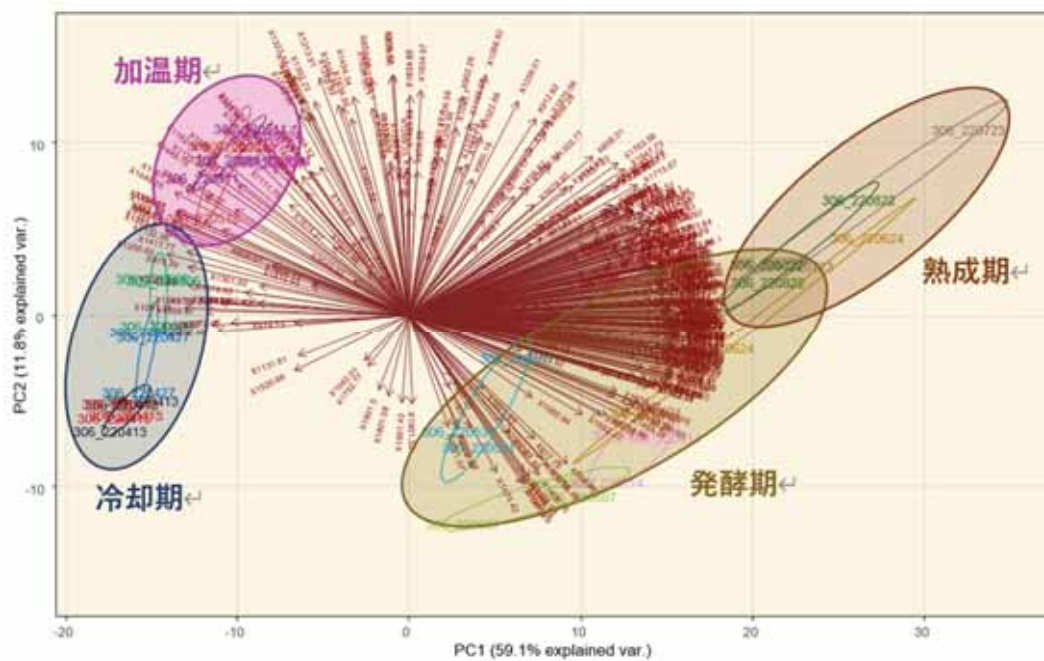


図4 醤油諸味から検出された VOC に基づく主成分分析

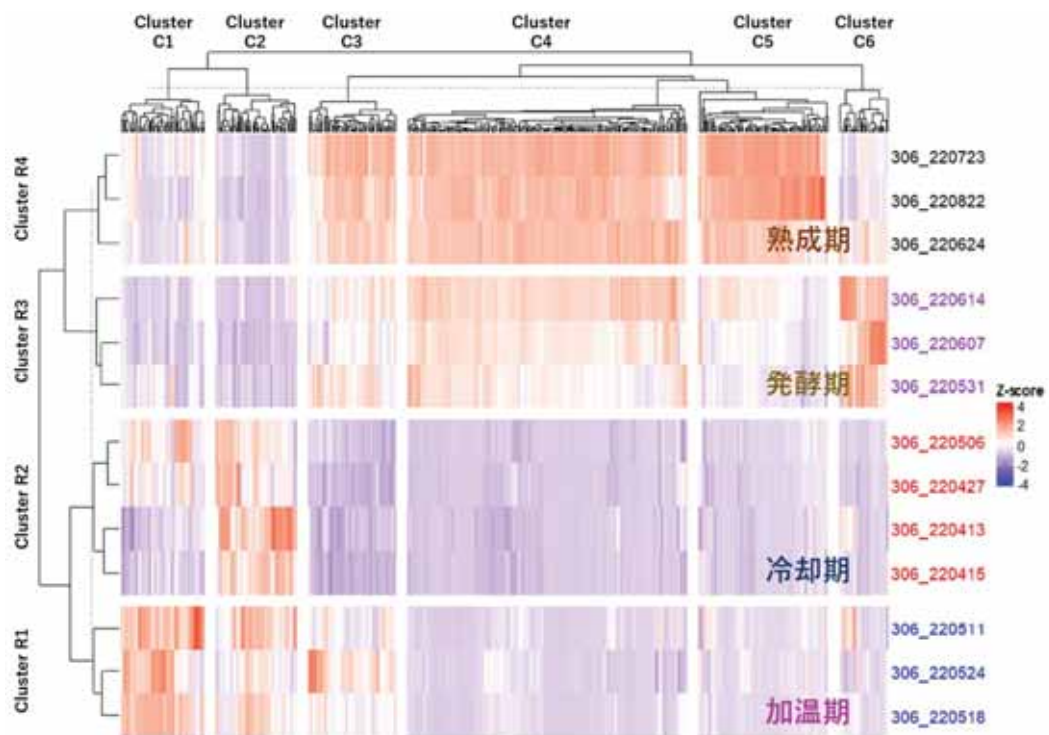


図5 醤油諸味から検出された VOC に基づく非階層的クラスター分析

参考文献

- 1) Hayashi et al., Sens. Actuators, B, 2, 205, 1990.
- 2) Legin et al., Sens. Actuators, B, 65, 232, 2000.
- 3) 小泉幸道ら: 日本食品工業学会誌, 33, 316, 1986.
- 4) 玉野まり子ら: 日本食品工業学会誌, 39, 357, 1992.
- 5) 下田満哉, 箴島豊: 日本調理科学会誌, 34, 236, 2001.
- 6) 今村美穂, 牛尼翔太, 宮田慎吾: 日本調理科学会誌, 52, 67, 2019.

- 7) 武田珠美ら: 日本調理科学会誌, 52, 93, 2019.
 - 8) 中島章裕: 乳業技術, 68, 29, 2018.
 - 9) 菅野洋一朗ら: 電気学会論文誌 E, 140, 294, 2020.
 - 10) 森田亜紀, 早川文代, 香西みどり: 日本食品科学工学会誌, 67, 13, 2020.
 - 11) 森田亜紀, 早川文代: 日本調理科学会誌, 55, 105, 2022.
 - 12) 飯島陽子: 化学と生物, 55, 593, 2017.
 - 13) 飯島陽子: 化学と生物, 58, 210, 2020.
 - 14) Iijima.Y et al.: Biosci. Biotechnol. Biochem., 80, 2401, 2016.
 - 15) 河原崎正貴: 化学と生物, 55, 538, 2017.
- ※本研究は令和 4 年度に実施しましたが, 知的財産保護の観点から令和 6 年度の報告書に掲載しました.

佐賀県産酒のブランド力向上を目指した技術体系の構築（第2報）

食品コスメ部
澤田和敬

次世代シーケンサーを用い、佐賀はがくれ酵母5菌株（F4株、F7株、F401株、SAWA-1株、SGH株）の全ゲノム解析を行った。得られたデータから、*FAS2* 遺伝子と *AWA1* 遺伝子の SNP について比較を行った。その結果、*FAS2* 遺伝子では、佐賀はがくれ酵母の中でカブロン酸エチル高生産である F7 株及び SAWA-1 株に SNP が見られた。また、*AWA1* 遺伝子では、F7 株、F401 株、SGH 株にストップゲイン変異が確認された。しかし、SAWA-1 株は他の菌株と異なる SNP を有していたことから、その他の菌株と異なる機構で高泡を形成していないことが示唆された。

1. はじめに

佐賀県は、県産酒の原産地呼称管理制度や GI 佐賀を取得し、官民一体となった需要開発やブランド構築に取り組んでいる。

佐賀県の清酒の特徴として、「濃醇甘口」「ふくよかな米の旨味」などが挙げられる。これらの味わいが消費者に評価され、佐賀県の特産名称酒の比率は約 74%と全国の特産名称酒比率約 33%を大きく上回っている。国内外の市場では、オリジナリティの高い商品や地域固有の文化を活かしたような商品が求められている。

佐賀県は技術的支援の一環として、県が開発した酵母を「佐賀はがくれ酵母」として商標登録を行い、県酵母のバリエーション強化と共にブランド構築に取り組んでいる。

佐賀はがくれ酵母には、熊本酵母 KA-1 を親株に用い分離した F4 株、F4 株を親株とし分離・育種した F7 株、F401 株、SAWA-1 株がある。その他に、県産品種のいちごから分離した SGH 株、SAWA-1 株と SGH 株の 1 倍体を交雑育種して取得した StyP 株、StyG 株、StyY 株がある。これら 8 菌株の香味のタイプはそれぞれ異なり、清酒メーカー各社の商品設計と醸造特性を鑑み、酵母の使い分けを行っている。

現在、佐賀はがくれ酵母は県内 24 社のうち、19 社が使用している。2023 年度に工業技術センターが頒布した酵母培養液量から、本県で課税出荷している特定名称酒のうち約 25%に佐賀はがくれ酵母が使用されている計算となる。このことから佐賀はがくれ酵母の特徴は県産酒の特徴を構成する重要なファクターであり、県産酒のより一層の高品質化には各酵母への知見を深めるとともに、酵母の安定的な維持管理が不可欠である。

当センターでは頒布前に佐賀はがくれ酵母の小仕込み試験を行い、醸造特性を指標に菌株の維持管理を行っている。より精度よく微生物を管理するためには酵母の判別技術が不可欠であり、生理的性質を利用した培地組成の異なるプレートでの生育や単一

炭素源としての糖の資化性等により菌株の判別を行ってきた。清酒酵母間では、 β -アラニン培地による協会 7 号酵母の判別などがある^{1,2)}。

さらに、PCR を用いた醸造用酵母の判別のほか清酒酵母の菌株間で多型が報告されている遺伝子を用いて各機関が開発した酵母ときょうかい酵母の判別を行う手法の開発が各地で行われている³⁾。佐賀はがくれ酵母においては、菌株そのものの生理的性質や PCR による判別技術の確立は今後の検討課題である。

一方、バイオインフォマティクス技術の革新に伴い、次世代シーケンサー（以下、NGS）による各生物種の全ゲノム解析が可能になった。清酒酵母では、赤尾らが NGS を用いて実験室酵母と清酒酵母の比較ゲノム解析を行い、清酒酵母特有の染色構造等や清酒酵母間での塩基置換（以下、SNP）による系統分化と醸造特性の関連性について様々な検討を行っている。

全ゲノム解析では菌株の特性だけでなく菌株の保護に有用な情報が得られる。そこで、本研究では佐賀はがくれ酵母の全ゲノム解析を行い、佐賀はがくれ酵母の特徴的な遺伝子の探索に取り組んでいる。本報では佐賀はがくれ酵母 5 菌株間で *AWA1* 遺伝子と *FAS2* 遺伝子について比較した結果を報告する。

2. 実験方法

2.1 実験材料

佐賀はがくれ酵母のうち、F4 株、F7 株、F401 株、SAWA-1 株、SGH 株を用いた。

2.2 佐賀はがくれ酵母のゲノム解析

きょうかい酵母 7 号をリファレンス配列とした佐賀はがくれ酵母の全ゲノムリシーケンス解析を行った。シーケンスは 2×150 ペアエンド (PE) 構成を用い、Illumina NovaSeq X Plus（イルミナ株式会社）で実施した。

データ解析はシーケンスリードの品質確認を Fast QC ver 0.11.7、トリミングは Trimmomatic ver 0.38 を用い、クオリティの低い塩基やアダプター配列

を除去し、その結果極端に短くなったリードを除外した。その後、BWA ver 0.7.17を用いてトリミング後のシーケンスリードをリファレンスゲノムへマッピングし、Picard ver 2.18.11を用いて重複リード及びN塩基を除去した。freebayesを用いてDuplicationリードを除去したbamファイルを作成した。bamファイルからShort Variant (1~10塩基程度のゲノム変異)を抽出した。Short Variantとして、SNVs (single nucleotide variant), small indels (insertions・deletions), MNVs (multi-nucleotide variants), 複合的なイベント (composite insertion・substitution events)を抽出した。検出された変異について、リファレンスゲノム上の位置とその変異の内容などをVCFファイルとして作成し、SnPEff ver4.3tを用いて遺伝子、アミノ酸情報等のアノテーションを付与し、全サンプルのVCFファイルを統合した。また、IGV 2.19.1を用いてSNPの可視化を行った。

3. 結果及び考察

3.1 *FAS2* 遺伝子の比較

図1にIGVで可視化した*FAS2*遺伝子領域を、表1にそれぞれの菌株の変異について示した。

*FAS2*遺伝子は脂肪酸合成酵素複合体のサブユニットをコードしており、カプロン酸エチルの前駆体であるカプロン酸などの細胞内の合成に参与する。カプロン酸エチル高生産酵母は*FAS2*遺伝子に変異を持つことが多く、酵母の育種ではセルレニンへの耐性を指標に選抜されることが多い⁴⁾。

*FAS2*遺伝子には3箇所のSNPが存在した。①はすべての菌株に、②はF7株とSAWA-1株に、③はF7株が有していた。佐賀はがくれ酵母のうち、F7株とSAWA-1株はカプロン酸エチル高生産酵母であることから、②の変異がカプロン酸エチル高生産に参与していることが推測される。

一方、①の変異はカプロン酸エチル高生産能に関わらず変異を有しており、リファレンスゲノムのきょうかい7号と佐賀はがくれ酵母の違いを明確に分ける際に使用できる可能性がある。F7株のみに見られたSNPはF7株を判別する際に使用できる可能性が示された。

3.2 *AWA1* 遺伝子の比較

図2にIGVで可視化した*AWA1*遺伝子領域を、表2にそれぞれの菌株の変異について示した。

*AWA1*遺伝子は清酒酵母の高泡形成能に関与する遺伝子として知られており、実験室酵母や一般的な酵母株には存在しない清酒酵母に特有の遺伝子である⁵⁾。

*AWA1*遺伝子には7箇所のSNPが存在した。このうち、高泡を形成しないF7株、F401株、SGH株に変異が確認された⑤にはストップゲイン変異が確認され、*AWA1*タンパク質に変異が生じていることが明らかになった。一方、高泡を形成しないSAWA-1株は、⑤にSNPがなく、⑧及び⑩に変異が生じており、F401株等と異なる機構で高泡を形成していないことが示唆された。

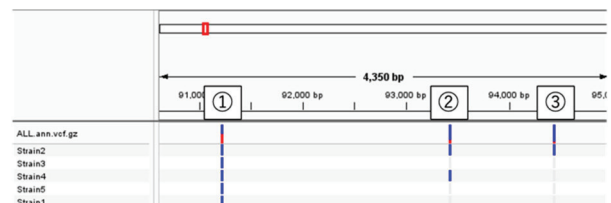


図1 *FAS2*遺伝子領域周辺

表1 各菌株の*FAS2*遺伝子の変異

	①	②	③
F4株	A→G	—	—
F7株	A→G	G→A	G→T
F401株	A→G	—	—
SAWA-1株	A→G	G→A	—
SGH株	A→G	—	—

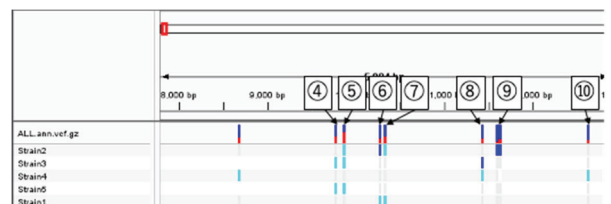


図2 *AWA1*遺伝子領域周辺

表2 各菌株の*AWA1*遺伝子の変異

	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨	⑩
F4株	-	-	G→A	G→A	-	-	-
F7株	-	C→A	G→A	G→A	-	A→T	-
F401株	G→A	C→A	-	-	A→G	-	-
SAWA-1株	-	-	-	-	A→G	-	T→C
SGH株	G→A	C→A	-	-	-	-	-

4. おわりに

本研究では、*FAS2*、*AWA1* 遺伝子の2つの遺伝子について報告したが、今回取得した5菌株のゲノム情報にはきょうかい7号と異なる SNP が染色体全体で確認された。今後、これらの変異について詳細な解析に取り組む予定である。また、F7 株、F401 株、SAWA-1 株の親株である F4 株は熊本酵母 KA-1 株したものである。KA-1 株をリファレンスゲノムに用いた遺伝学的アプローチにより、佐賀はがくれ酵母の特徴的な醸造特性を見出せることが期待される。さらに、2023 年以降に頒布を開始した StyP 株、StyG 株、StyY 株は SAWA-1 株と SGH 株の交雑により育種した酵母であり、自然界から分離した酵母を用いて交雑育種した報告が少ないことから興味深い知見が得られることが期待される。丸山らは遺伝学的特性と醸造学的特性を三重酵母の包括的な評価として報告している⁶⁾。当センターにおいても、佐賀はがくれ酵母の醸造学的データの取得と遺伝学的特性の関連について検討を進めたい。

参考文献

- 1) 渡辺誠衛, 田口隆信, 高橋仁, 大野剛. 色素含有平板培地を用いた清酒酵母の判別と酵母混合発酵. 日本醸造協会誌, 104(9), 712-721,(2009).
- 2) 野白喜久雄. 清酒醸造微生物学の進歩 (2). 日本醸造協会雑誌, 79(2), 106-110, (1984).
- 3) 福田央. "PCR 法による清酒酵母の判別." 202-211, (2014)
- 4) 吉田清: 日本醸造協会誌, 101, p910-922 (2006)
- 5) 下飯仁. 清酒酵母の高泡形成に関与する遺伝子 *AWA1*. 日本醸造協会誌, 97(7), 474-480, (2002)
- 6) 丸山裕慎, 小澤敦揮, 山崎栄次, 赤尾 健. 日本醸造協会. 三重県清酒酵母の遺伝的及び醸造特性の包括的評価. 日本醸造協会誌/日本醸造協会, 日本醸造学会 [編], 118(2), 115-127,(2023).

大気圧プラズマ成膜法による樹脂成形品への 機能性付与技術の開発（第4報）

—直接式プラズマ成膜法による紫外線遮断性を有する非晶質炭素膜の形成—

材料環境部

河合信次 円城寺隆志 平井智紀

プラスチック製品の表面に低摩擦、紫外線遮断の機能性膜を低コストで形成することを目指し、ネオン変圧器及びナノパルス電源をプラズマ用電源とし、エチレン（ C_2H_4 ）を原料ガスに用いた直接式大気圧プラズマ成膜法により、機能性非晶質炭素膜の形成を試みた。ナノパルス電源を用いたプラズマ発生部において、成膜装置の構造を変えることによって成膜速度の向上を図り、ネオン変圧器を用いた成膜と比較した。ネオン変圧器で成膜した方が成膜速度は速いが、ナノパルス電源でも成膜装置の構造を変えることで、成膜速度を5倍に向上させることができた。また、ナノパルス電源とネオン変圧器のいずれも紫外線遮断性を有しており、ナノパルス電源の方が膜厚が薄いものの良好であった。微小押し込み硬さは、ネオン変圧器を用いた成膜はポリカーボネート（PC）の2倍以上の値を示し、動摩擦係数は、PCから約7%低減することができた。本研究における非晶質炭素膜の形成により、樹脂へ紫外線遮断性や低摩擦性の機能を付与できる可能性が高まった。

1. はじめに

自動車産業における使用部品の軽量化への取り組みとして樹脂部品の利用が多くなっているが、樹脂部品は表面硬度が低く、紫外線に脆弱などの課題がある。この課題の解決策の一つとして樹脂部品の表面に低摩擦性、紫外線遮断性などを有する機能膜を形成することが挙げられ、機能膜にはダイヤモンドライクカーボン（DLC ; Diamond-Like Carbon）に代表される非晶質炭素膜がある。

DLC膜はグラファイト構造に由来する sp^2 成分及びダイヤモンド構造に由来する sp^3 成分、さらに水素との結合を含む構造から形成されており¹⁾、これらの構成比率を変えることで膜特性を変化させることができる。DLCの特性には、高硬度、高赤外線透過性、高ガスバリア性、高生体親和性などがあり、電気・電子機器、切削工具、金型、自動車部品、光学部品、医療用機材などに幅広く利用されている。

DLC等の非晶質炭素膜の形成は、通常、数Pa程度の低真空下のプラズマを利用して成膜されることが多い。ここで、大気圧下で成膜が可能になれば真空装置が不要になるため、装置の小型化やコスト削減が図られるだけでなく、真空容器などによる空間制限がなくなり大面積処理が可能になるなどの利点がある。本研究では、真空装置を必要とせず、かつ気体の温度が低い大気圧非熱平衡プラズマ（以下、大気圧プラズマという）を使用する成膜法に注目し、

低コストでの機能性非晶質炭素膜の形成に取り組んでいる²⁾⁵⁾。

これまでにアルゴン（Ar）大気圧プラズマによる非晶質炭素膜の形成に取り組み、プラズマ発生用電源に安価なネオン変圧器を用いたリモート式成膜法において、膜形成が実現できることを実験により確認した³⁾⁵⁾。また、リモート式成膜法より広い面積を成膜可能な直接式成膜法において、ネオン変圧器と原料ガス（炭化水素ガス）であるエチレン（ C_2H_4 ）の組合せにより、ポリカーボネート（PC）上への非晶質炭素膜の形成を確認した。さらに、直接式成膜法において、成膜時の発熱を抑止するためにプラズマ用電源としてナノ秒幅のパルス高電圧を供給できるナノパルス電源を用いたものの、成膜速度の向上が課題として残った⁵⁾。

本報では、ナノパルス電源を用いた成膜において、プラズマ発生部（成膜装置）の構造を検討し、成膜速度の向上を図った。次に、形成した膜の紫外線遮断性と耐摩耗性に関与する硬さをネオン変圧器による形成膜と比較した。さらに、低摩擦性を目指して、膜の摩擦係数を評価した。本報ではこれらの結果について述べる。

2. 実験方法

2.1 直接式大気圧プラズマ成膜装置

2.1.1 ネオン変圧器及びナノパルス電源向けの成膜

装置

ネオン変圧器を用いたプラズマ発生部には、上部金属電極と下部金属電極のそれぞれに誘電体を設け、その間でプラズマを発生させる誘電体バリア放電方式を用いた。その間には基板など被成膜物を直接配置するため成膜室を兼ねている（以降直接式成膜装置と呼ぶ）。作製した直接式成膜装置の構造を図1に示す。上部誘電体にはポリスチレン（PS）、下部誘電体にはPSに加えシリコンを用いた両側誘電体構造である。上部誘電体の外側に上部金属電極（Cuテープ、長さ60mm、幅15mm）を設け、成膜基板との距離を4mmとした。

一方、ナノパルス電源を用いたプラズマ発生部には、ネオン変圧器の構造と同様の両側誘電体構造に加え、片側の誘電体を金属電極に変えた構造（片側金属電極構造）と両側の誘電体を金属電極に変えた構造（両側金属電極構造）を用いた。これらの違いを図2に示す。発生部に金属を配置することで、ナノ秒のパルス高電圧の印加によって高電界が発生し、ネオン変圧器よりも高密度なプラズマの生成を目指した。図2(a)は図1と同じ両側誘電体構造、図2(b)に片側金属電極構造（誘電体－金属電極構造）、図2(c)に片側金属構造（金属－誘電体構造）、図2(d)に両側金属電極構造の模式図をそれぞれ示す。

2.1.2 摩擦試験のための成膜装置（両側誘電体）

ボールオンディスク方式など回転運動により摩擦係数を測定できる膜形状を成膜するために、図1の直接式大気圧プラズマ成膜装置を基本構造とし、上部金属電極の形状を30mm×30mmに変えた成膜装置を試作した。また、上部誘電体及び下部誘電体を石英ガラスとした。

2.2 基材及び成膜方法

成膜用基材として、エンジニアリングプラスチック材料の一種であるPC（76mm×26mm×1mmと25mm×25mm×1mm）を基材として用いた。PCは耐衝撃性、耐熱性、耐候性、透明性などの優れた特性を有しており、自動車やオートバイのヘッドランプ、カメラの本体等に利用されている。また、形成膜の紫外線遮断性を評価するために、紫外から赤外の波長領域において高い透過性を有する石英ガラス（76mm×26mm×1mm）を基材として用いた。

プラズマ発生用電源には、ネオン変圧器（レシップ製、ALPHANEON M-5）及びナノパルス電源（末松電子製作所製、PPM1000S-1KESP）を用いた。これらの電源の特徴については、先行研究⁵⁾に記載して

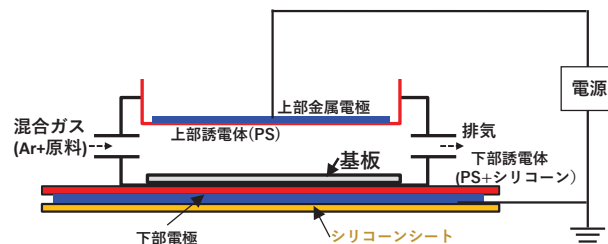


図1 直接式大気圧プラズマ成膜装置（ネオン変圧器）



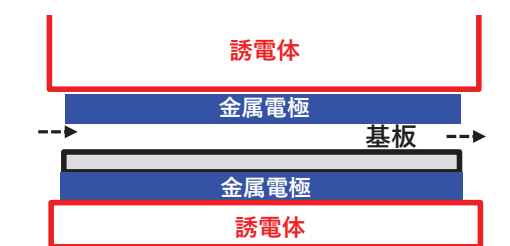
(a)両側誘電体構造(誘電体－誘電体)



(b)片側金属電極構造(誘電体－金属電極)



(c)片側金属電極構造(金属電極－誘電体)



(d)両側金属電極構造(金属電極－金属電極)

図2 ナノパルス電源向けに検討した直接式成膜装置の構造

いる。実際に印加した電圧は電圧・電流測定装置（テクトロニクス&フルーク製，P6015 プローブ，MSO 2-BW-200）により測定した。

放電ガスには Ar，原料ガスにはエチレン（ C_2H_4 ）を用いた。実験は成膜室に Ar と C_2H_4 の混合ガスを導入し，高電圧を印加することにより PC 基板及び石英ガラス基板に 60 分間成膜を行った。

2.3 形成した膜の評価方法

2.3.1 成膜速度とその分布（PC，石英ガラス）

あらかじめ基板の一部にメンディングテープを貼り，膜を形成した後にテープを剥がし，生じた段差をレーザー顕微鏡（オリンパス製，OLS-4100）で膜厚を測定することで，成膜時間と膜厚の関係から成膜速度を算出した。

2.3.2 紫外線遮断性評価（石英ガラス）

膜の光透過率は，石英ガラス基板上へ形成した膜について，紫外可視分光光度計（島津製作所製，OLS-4100）を用いて測定した。

2.3.3 微小押し込み硬さ試験（PC）

膜の硬さは，超微小押し込み硬さ試験機（エリオニクス製，ENT-NEXUS）を用いて微小押し込み硬さ $H_{IT}^{(4)}$ を測定した。PC 基板の影響を避けるために，試験位置は最大成膜速度を示した近傍の 3 箇所とし，その平均値を算出した。なお，試験荷重は 1mN を基本とし，膜厚が薄い場合，基板の影響を避けるため，最小 0.1mN まで荷重を小さくして測定した。

2.3.4 摩擦係数測定（PC）

膜の摩擦係数は，PC 基板上へ形成した膜について，ボールオンディスク型摩擦摩耗試験機（日東科学製，TYPE:20）を用いて，動摩擦係数を測定した。PC 基板は，摩擦試験用に $25\text{mm} \times 25\text{mm} \times 1\text{mm}$ とした。摩擦試験は，接触するボールに直径 5mm の高炭素クロム軸受鋼（SUSJ2）を使用し，試験荷重 100g，回転速度 30rpm とした。

3. 結果及び考察

3.1 膜の外観と成膜速度（PC，石英ガラス）

これまでネオン変圧器を電源とする成膜には図 1 に示す直接式成膜装置を使用し，放電ガス Ar 流量 2L/min，原料ガス C_2H_4 濃度 3% で誘電体－基板間距離 4mm という成膜条件において，ソーダ石灰ガラス基板上及び PC 基板上への透明性非晶質炭素膜の形成を確認した⁵⁾。本報ではネオン変圧器を電源にし，同じ成膜条件により PC 基板と石英ガラス基板への成膜を行った。図 3 に石英ガラス基板上の膜の



図 3 ネオン変圧器を用いて石英ガラス基板上へ形成した膜の外観

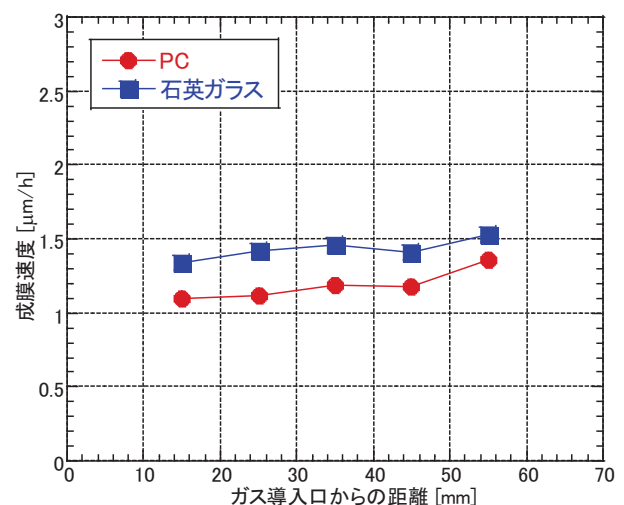


図 4 ガス導入口からの成膜速度分布（ネオン変圧器）

外観を示す。膜は前報の PC 基板上の膜と同様に透明性が高い。また，図 4 にガス導入口からの距離と各基板における成膜速度との関係を示す。いずれの基板においても導入口から 55mm まで成膜速度がほぼ均一になっている。ここで，石英ガラス基板に対する成膜速度の平均値は $1.4\mu\text{m/h}$ であり，PC 基板に対する成膜速度の平均値は $1.2\mu\text{m/h}$ となっていることから，成膜速度は基板の材料に影響されることが考えられる。さらに，成膜速度の違いは PC 及び石英ガラスの誘電率（PC 3.1F/m ，石英ガラス 3.8F/m ）やプラズマ耐性の違いに起因していると推察している。

これまでの研究の結果，ナノパルス電源を用いた成膜速度は $0.15\mu\text{m/h}$ であり，ネオン変圧器に比べ遅いことがナノパルス電源を用いた成膜の課題となっている⁵⁾。そこで，プラズマ発生装置の構造を図 2(a) の両側誘電体構造から，図 2(b)及び図 2(c)に示す片

側金属電極構造と図 2(d)に示す両側金属電極構造に変えることで、成膜速度が向上するか検討した。

ナノパルス電源を用いて Ar 流量 2L/min を発生装置に導入し、ナノパルス電源の最大出力電圧 25kV、パルス幅 25ns、繰り返し周波数 1kHz の時のプラズマの生成状態を確認した。図 2(b)の誘電体－金属構造では安定したグロー放電のプラズマが生成したが、図 2(c)の金属－誘電体構造と図 2(d)の両側金属構造では大電流が流れ、火花が散るアーク放電状態になり成膜できないため、発生装置の構造を図 2(b)の片側金属電極構造（誘電体－金属電極構造）とした。

片側金属電極構造（誘電体－金属電極構造）に Ar 流量 2L/min、 C_2H_4 濃度 3%として、PC 基板及び石英ガラス基板へ非晶質炭素膜の形成を行った。図 5 に C_2H_4 導入後のプラズマの状態を示す。プラズマには光の筋（ストリーマ）が少なく⁶⁾、グロー放電状態である空間に様々の淡い色の発光となっていることが分かる。図 6 にガス導入口からの距離と各基板における成膜速度との関係を示す。それぞれの基板上には均一性のある膜が形成されており、その平均成膜速度は同様に $0.8\mu\text{m/h}$ であり、これまでのナノパルス電源の平均成膜速度 $0.15\mu\text{m/h}$ ⁵⁾の 5 倍以上であり、発生装置の構造を変えることで、成膜速度を向上させることができた。

3.2 紫外線遮断性（石英ガラス）

ネオン変圧器及びナノパルス電源を用いて石英ガラス基板へ形成した膜の光透過スペクトルを図 7 に示す。紫外線遮断性はナノパルス電源及びネオン変圧器を用いた形成膜のいずれも良好であることが分かる。波長 300nm の紫外光をネオン変圧器による形成膜は約 40%，ナノパルス電源を用いた形成膜は約 60%を吸収することができた。ナノパルス電源による膜厚（約 $0.8\mu\text{m}$ ）はネオン変圧器による膜厚（約 $1.4\mu\text{m}$ ）より薄いにもかかわらず、ナノパルス電源の方が高い紫外線遮断性を有している。また、ナノパルス電源とネオン変圧器の光透過スペクトルは形状が異なっている。Lazar⁷⁾や Morshed 等⁸⁾は膜厚 $0.4\mu\text{m}$ 以上の非晶質炭素膜の紫外線遮断性について、 sp^3 成分量と水素含有量に影響されることを報告しており、図 7 のスペクトルの形状の違いは本報告と合致した結果である。一方、安価なネオン変圧器と C_2H_4 を組み合わせた大気圧プラズマ成膜法でも、紫外線の波長領域で段階的に透過率が上っていることから、一定の紫外線遮断性の非晶質炭素膜を形成可能である

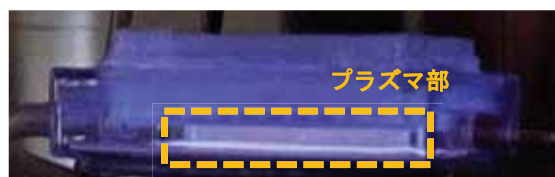


図 5 ナノパルス電源により発生させたプラズマ

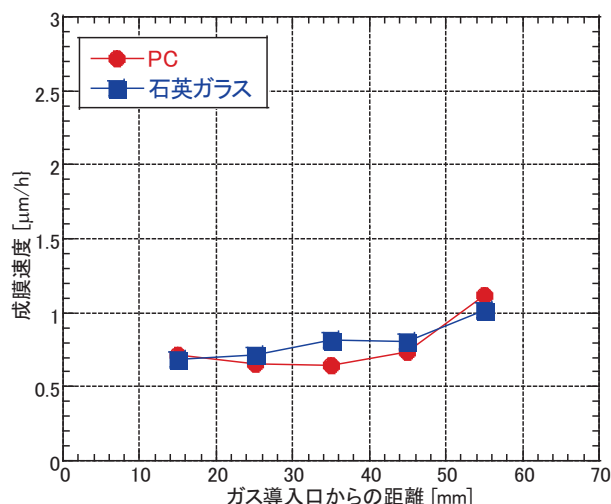


図 6 ガス導入口からの成膜分布(ナノパルス電源)

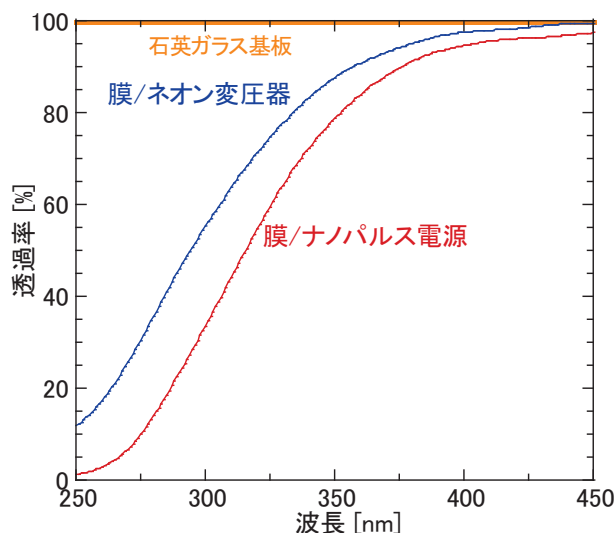


図 7 石英ガラス基板上膜の光透過スペクトル

ことを示している。

3.3 硬さ（PC）

ネオン変圧器及びナノパルス電源を用いて PC 基板上へ形成した膜について、最大試験荷重 0.1mN で微小押し込み硬さ試験を行い、得られた荷重と変位

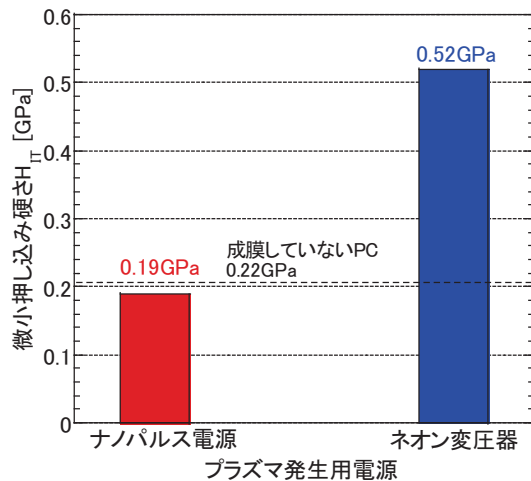
図8 微小押し込み硬さ H_{IT} の電源依存性

表1 形成膜及びPC基板の動摩擦係数

	形成膜	PC基板(比較)
動摩擦係数	0.55	0.59

の関係より算出した微小押し込み硬さ H_{IT} をそれぞれの電源に関して図8に示す。ネオン変圧器を用いて作製した膜の微小押し込み硬さは 0.52GPa であり、成膜していないPCの微小押し込み硬さ $H_{IT}=0.22\text{GPa}^4)$ の2倍以上を示している。ナノパルス電源を用いて作製した膜の微小押し込み硬さは 0.19GPa であり、PCの硬さと同じレベルであることが分かった。

3.4 動摩擦係数 (PC)

3.3で前述したとおり、PC基板上へ形成した膜の微小押し込み硬さ H_{IT} が高いネオン変圧器による形成膜について、摩擦試験を実施し動摩擦係数を測定した結果を表1に示す。PC基板のみの動摩擦係数と比較すると、成膜していないPC基板が 0.59 、成膜したPCが 0.55 であり、膜の形成により動摩擦係数を約7%低減することができた。

4. おわりに

本研究では樹脂部品に低コストで機能性を付与することを目的として、直接式大気圧プラズマ成膜法による非晶質炭素膜の形成について取り組んだ。プラズマ発生用電源としてナノパルス電源とネオン変圧器を用いて、成膜用原料ガスとして C_2H_4 を使用し、PC及び石英ガラスの基板に成膜を行い、形成した

膜の成膜速度分布、紫外線遮断性、硬さ、動摩擦係数をそれぞれ評価した。その結果、次のことを明らかにした。

- (1) ネオン変圧器をプラズマ発生用電源に用いた方が成膜速度は速い。また、ナノパルス電源を用いた場合においても、プラズマ発生装置の構造を変えることで5倍に向上させることができた。
- (2) ナノパルス電源とネオン変圧器のいずれでも紫外線遮断性を有しており、ナノパルス電源は膜厚が薄いにもかかわらず良好であった。
- (3) 微小押し込み硬さは、ネオン変圧器による成膜で、成膜していないPCの2倍以上の硬さが得られた。
- (4) 動摩擦係数は、ネオン変圧器による成膜で、成膜していないPCから約7%低減することが確認できた。

以上のことより、機械的特性はネオン変圧器の方が優れ、光学的特性はナノパルス電源の方が優れている。両方の特性を併せ持つには、ネオン変圧器をプラズマ発生用電源として用いることが望ましいと考える。

本研究を実施するにあたって使用した高電圧・電流測定装置及び摩擦摩耗試験機は公益財団法人JKAの補助により導入し、レーザー顕微鏡及び紫外可視分光光度計は電源立地地域対策交付金により導入した。また、超微小押し込み硬さ試験機は福岡県工業技術センター機械電子研究所が公益財団法人JKAの補助により導入した機器を使用した。

最後に、微小押し込み硬さ試験に関する助言、機器利用でご尽力いただいた福岡県工業技術センター機械電子研究所材料技術課の南守課長及び菊竹孝文主任技師に感謝の意を表する。

参考文献

- 1) J. Robertson, Mat. Sci. Eng. R **37**, 129-281 (2002).
- 2) 平井智紀, 河合信次, 円城寺隆志, 江口良寿, 三沢達也, 令和3年度佐賀県工業技術センター研究報告書, No.30, 5-10 (2022).
- 3) 平井智紀, 円城寺隆志, 河合信次, 江口良寿, 三沢達也, 令和4年度佐賀県工業技術センター研究報告書, No.31, 5-9 (2023).
- 4) 円城寺隆志, 平井智紀, 河合信次, 江口良寿, 三沢達也, 令和4年度佐賀県工業技術センター研究報告書, No.31, 11-14 (2023).
- 5) 河合信次, 円城寺隆志, 平井智紀, 三沢達也, 令

- 和5年度佐賀県工業技術センター研究報告書,
No.32, 1-5 (2024).
- 6) 高木浩一, 浪平隆男, 電気学会誌, Vol.126,
781-787 (2006).
- 7) G. Lazar, Mater. Lett. **57**, 586-588 (2002).
- 8) M. M.Morshed *et al.*, J, Mater. Process. Tech., **169**,
219-222 (2005).

表面変質層を利用したステンレス製品の長寿命化技術開発（第 3 報）

材料環境部

永石尚昭 帆秋圭司 田栗有樹

株式会社香田製作所

香田和則

本研究では、切削時に加工部に生じる表面変質層を利用し、ステンレス鋼を高強度化する加工技術（DEM 法）の確立を目指している。形状変化部に対する DEM 法適用の可能性を評価するために、形状変化部（U 溝部、球面部、テーパ部、角部）を有する機械部品を模擬した試験片を DEM 法で作製し、それらに対して硬さ試験と組織観察を行った。その結果、形状変化部に対しても単純形状と同様の硬い表面変質層を生成することが可能であることを明らかにした。さらに、DEM 法がステンレス鋼の耐孔食性に及ぼす影響を電気化学測定法により評価した結果、耐孔食性の劣化は確認されなかった。すなわち、DEM 法はステンレス鋼の耐孔食性を損なうことなく加工部の耐久性の向上を実現する技術であることを示した。

1. はじめに

ステンレス鋼は建造物や機械部品、家庭用品にいたる様々な場面で多用されている。昨今注目を集めている半導体関連産業や水素エネルギー関連機器の主要な材料としても利用されていることから、現代の工業製品に必要な鉄鋼材料と言える。

我々はこれまでに、機械加工時に生じる表面変質層を利用することでステンレス鋼を高強度化し、耐久性を向上させ長寿命化するための加工技術として、Durability Enhancement Machining(以下、DEM 法と称する)を提案し、その技術を適用することでもたらされる効果について検討を行ってきた。その結果、1. オーステナイト系ステンレス鋼(以下、 γ 系 SUS と称する)の疲労強度を向上することができ、特に応力集中が起きる形状変化部への効果が顕著である¹⁾。2. 高硬度化と同時に圧縮残留応力が付与されることで、耐応力腐食割れ性が向上する²⁾。3. γ 系 SUS の耐摩耗性を向上する効果がある³⁾。以上の 3 点を明らかにした。つまり、回転や往復運動などによって繰返し荷重がかかる機械部品やその摺動部および引張応力が作用した状態で腐食環境にさらされる部材に対して本技術を適用することで、疲労破壊や摩耗による機能喪失、応力腐食割れの発生リスクを低減し、製品の長寿命化を低コストで実現できる可能性がある。

一方、これまでの実験対象は比較的単純形状かつ一部の領域(丸棒外径部および端面)に限られており、実際の機械部品に見られるような段付き部、溝部、テーパ部などの形状変化部に対して同様の表面変

質層が得られるかは明確でなかった。また、 γ 系 SUS の最大の特徴である「耐食性」への影響についても未検討のままであり、DEM 法の実用化に向けて優先的に取り組むべき課題であると言える。

本報では、形状変化部に対し高品質な表面変質層を付与する加工方法の確立に向け、機械部品に多く見られる形状変化部（U 溝部、球面部、テーパ部、角部）への DEM 法の適用を試みた。さらに、DEM 法による加工面に対して電気化学測定を行い、 γ 系 SUS の孔食電位に及ぼす影響を実験的に評価した。

2. 実験方法

2.1 形状変化部に対する DEM 法の適用可能性検討

2.1.1 供試材

供試材は固溶化熱処理を施したオーステナイト系ステンレス鋼 SUS316L 丸棒 ϕ 20mm を用いた。化学成分(mass%)は 0.024C-0.53Si-1.32Mn-0.036P-0.017S-12.05Ni-17.25Cr-0.16Co であり、代表的な機械的性質は耐力 $\sigma_{0.2}$ =270MPa、引張強さ σ_B =574MPa、ビッカース硬さ 179HV0.01、平均結晶粒径は 24 μ m である。

2.1.2 試験片形状

試験片は U 溝部、球面部、テーパ部、角部を有する機械部品を模擬した形状とし、それぞれの形状および寸法を図 1 に示す。なお、左端部の ϕ 20mm、厚さ 5mm の”つば”は、硬さ試験や組織観察のための断面試料調製作業を容易にする目的のものであるため、DEM 法は適用していない。

加工には(株)ツガミ製ターニングセンタ TMA-8 を用いた。基本的には全て同じ条件(切込み量、切削速

度, 送り速度等)で加工を行ったが, 切削速度を一定に保つには, 加工面外径に合わせて主軸回転数を変更する必要がある。理論上, 球面凸部試験片では凸先端(直径 0mm)で主軸回転数は ∞ になるが, 加工機の主軸回転数の設定上限(約 4000rpm)で加工を行った。

2.1.3 金属組織観察および硬さ試験

図1に示した試験片の断面に対して硬さ試験および組織観察を行うために, DEM法による試験片中心軸を通る面を回転砥石で湿式切断後, 導電性を有する熱硬化性樹脂に埋包し, エメリー紙, ダイヤモンドスラリ, コロイダルシリカ懸濁液を用いて鏡面に研磨した。

金属組織観察には走査電子顕微鏡(株式会社日立ハイテク製 SU5000)を用いた。加速電圧は 15kV とし, 結晶粒径の変化および塑性変形領域を可視化するために電子線後方散乱回折法(EBSD)による結晶方位解析を行った。検出器は AMETEK 製 Digiview5, 解析ソフトウェアは OIM-Analysis 8 を用いた。観察時の加速電圧は 15kV とし, ビームステップサイズは $0.1\mu\text{m}$ とした。CI(Confidence Index: 算出された結晶方位の確からしさを示す値)⁴⁾が 0.1 以下の点はデータから除外した。塑性変形領域の表現には, GROD(Grain reference orientation deviation)⁴⁾マップを用いた。GROD は塑性ひずみと相関があると言われている。本研究では, 1 結晶粒内の平均方位から測定点毎の GROD を求め, コンター図として表現した。また, 加工の影響を受けていない領域で GROD を測定し, GROD の平均値 μ と標準偏差 σ^2 を求めた。すなわち, GROD が $\mu+2\sigma^2$ 以上の領域を塑性変形領域とみなした。

硬さ試験にはマイクロビッカース硬さ試験機(株式会社フューチャテック製 FM-ARS9000)を用いた。負荷試験力は 5gf, 保持時間は 10 秒とした。加工面から深さ $10\mu\text{m}$ の位置を開始点とし, 材料内部に向かって複数列の硬さを測定し, 深さ方向硬さ分布を取得した。また, 加工面から深さ $10\mu\text{m}$ の位置において, 外形に沿った線上の硬さを測定し, 硬さ分布を取得した。

2.2 電気化学測定による DEM 法適用面の耐食性評価(孔食電位測定)

2.2.1 供試材

供試材は固溶化熱処理を施した SUS304 の $\phi 20\text{mm}$ 丸棒を用いた。化学成分(mass%)は 0.050C-0.34Si-1.09Mn-0.035P-0.022S-8.25Ni-18.07Cr である。代表的な機械的性質は耐力 $\sigma_{0.2} = 326\text{MPa}$, 引張強さ $\sigma_B = 638\text{MPa}$, ビッカース硬さ 203HV0.01, 平均結晶粒径

は $25\mu\text{m}$ である。

2.2.2 試験片

図2に試験片形状および寸法を示す。評価面の仕上げ状態が異なる3種の試験片(a)TP-1(DEM法適用試験片, 研磨なし), (b)TP-2(DEM法適用試験片, 研磨あり), (c)TP-3(通常加工試験片)を調製した。図3にそれぞれの調製手順を示す。TP-1は, 丸棒端面をDEM法で調製し, 切り落として試験片としたものである。TP-2はDEM法で加工したものだが, 旋削加工の際に残る周方向加工痕を除去する目的でわずかに研磨仕上げしたものである。これまでの研究で, この程度の研磨ではDEM法によって生じた表面変質層はなくなることが分かっている。なお, DEM法で調製された平面部の硬さ分布や金属組織の状態は, 先行研究³⁾ですでに報告しているため, ここでは説明を割愛する。

TP-3は比較対象として一般的な加工法で調製されたものであり, TP-3とTP-1およびTP-2の孔食電位を比較することで, DEM法がステンレス鋼の耐食性の指標である孔食電位に及ぼす影響を明らかにできると考えた。

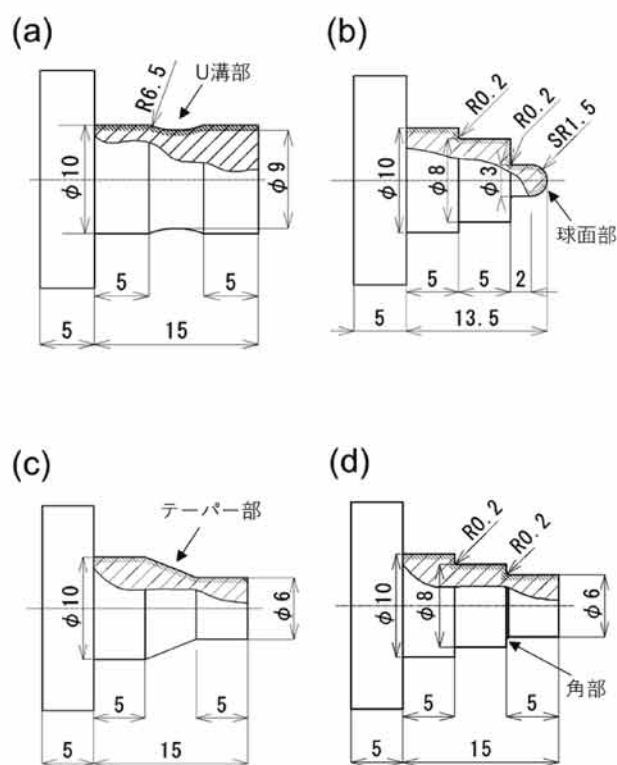


図1 試験片形状および寸法
(a)U溝部, (b)球面部, (c)テーパ部, (d)角部

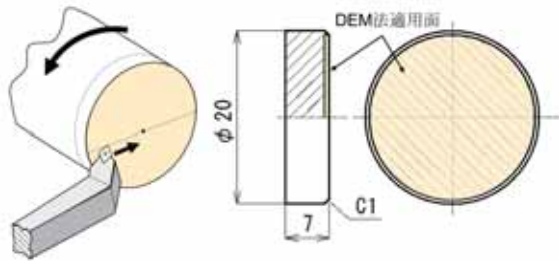


図2 電気化学測定用試験片の形状および寸法

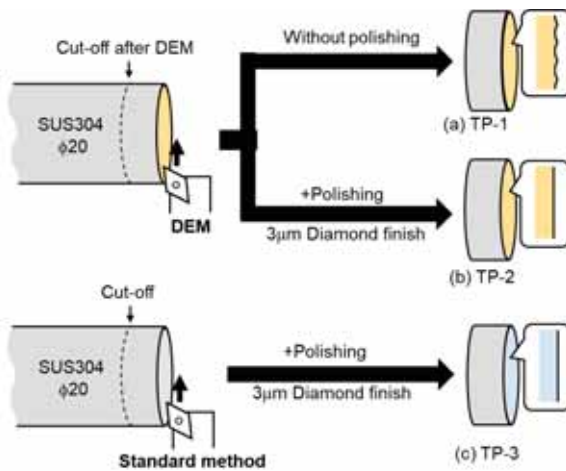


図3 電気化学測定用試験片の調製手順

2.2.3 孔食電位測定法

孔食電位測定は、日本産業規格「ステンレス鋼の孔食電位測定方法 JIS G0577 (2014)⁵⁾」に規定されている試験 A 方法を参考にして実施した。

測定は、電気化学測定システム HZ-7000 (明電北斗株式会社製) と専用ガラス電解槽 HX-102 (明電北斗株式会社製) を用いて行った。対極は白金電極、照合電極は銀-塩化銀電極をそれぞれ用い、照合電極と電解槽は、寒天を封入したルギン管を通じて塩橋を行った (図4)。

試験片は、50℃の 30wt%硝酸水溶液に 1 時間浸漬し、不動態化処理を行った。その後、測定用試料ホルダーに固定し、1cm²の測定面を残してそれ以外の面については耐水テープで被覆を行った。測定前に 600 番研磨紙で測定面を注意深く乾式研磨することで測定試料とした。

測定はそれぞれ複数回行った。測定用試料ホルダーに固定した測定試料を電解槽に移し、高純度アルゴンガス脱気後の 24℃、1mol/dm³ NaCl 水溶液に 10 分静置した後に行った。電位走引速度は 20mV/min で、アノード電流密度が自然電位から 10³μA/cm² に

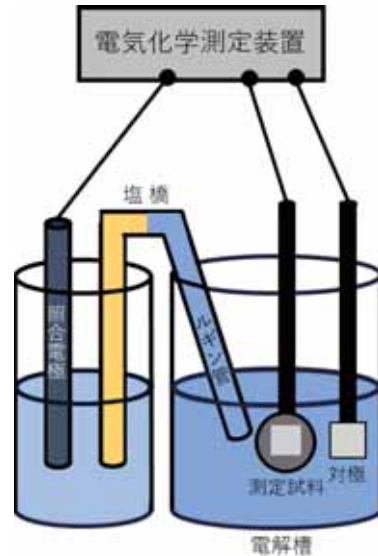


図4 孔食電位測定のシステム図

達するまで電位を走査させた。電流密度 10μA/cm² に対応する電位を V'_{c10} 、電流密度 10²μA/cm² に対応する電位を V'_{c100} とし、それぞれ最も高い値を孔食電位とした。 V'_{c10} 、 V'_{c100} の値は大きいほど耐孔食性に優れると判断する。

3. 結果および考察

3.1 形状変化部に対する DEM 法の適用可能性検討

図5に DEM 法で加工した形状変化部の加工面近傍における硬さ分布を示す。外形に沿って加工面から 10μm 内部の位置の硬さを複数点で測定し、これらのデータを硬さ分布として整理した。縦軸はビッカース硬さ、横軸は基準測定点からの距離である。

球面部を除く全ての形状変化部において加工面は 300HV 以上の硬さを持つことを確認した。これはもとの材料硬さ (179HV) に対して約 1.7 倍にあたる。

(a)U 溝部、(c)テーパ部、(d)角部は硬さのばらつきが少なく、形状変化部全体に硬い領域が安定して生じていることが分かった。一方、(b)球面部では、硬さに大きなばらつきが見られ、平滑部から曲面部、さらに先端部に近づくにつれ硬さが低下し、先端手前で最も低い値となった。その後、先端部で再び硬さが上昇するという特徴的な分布であった。

図6に深さ方向の硬さ分布を示す。(a)U 溝部、(c)テーパ部については、測定開始位置が異なる 3 本の測定ライン(Line1,2,3)に沿って硬さを測定した。測定ラインは主軸と直交する向きに統一し、得られたデータを深さ方向の硬さ分布として整理した。3 つの測定ライン上の分布はおおむね一致しており、深

さ方向にも硬い領域が安定して生じていることを確認した。(b)球面部、(d)角部については、外形線と直角に交わる測定ライン上を、表面から材料内部に向かって測定し、硬さ分布とした。先述の(a)U溝部、(c)テーパ部と比べ、球面部および角部は硬さの分布のばらつきが大きい傾向がみられるとともに、250HV以上の領域が狭い(加工面に近い)ことが確認された。特に(d)角部においては、300HV以上なのは加工面から10 μ mの深さまでであり、DEM法による硬さの上昇が限定的であることが認められた。

図7にEBSDで取得したGRODマップを示す。ここで、コンターバンドの値はGROD値である。GROD値 $\mu+2\sigma^2=0.8$ 以上を塑性変形領域とし、赤い部分が特に塑性変形量が多い領域となる。(a)U溝部および(c)テーパ部は、加工面に沿ってほぼ均一な深さ(幅)の塑性変形領域が生じていた。特に硬さの値が高く、ばらつきも少なかった(a)U溝部は、表面から約80 μ mまで赤い領域がみられた。一方、(b)球面部では塑性変形領域の深さ(幅)にばらつきが大きかった。また、(d)角部は赤い領域が表面から20 μ m程度であり、他の形状に比べ塑性変形領域が局所的であることが示された。

旋削で丸棒の外径を同じ寸法に加工する場合、最初に指定の量を切り込んだ後、主軸に対して工具が平行に動くため被削材とチップの接触状態がほぼ変化せず、加工面にDEM法の効果が均一に得られると考えられる。一方、形状変化部を加工する場合、工具は送り方向だけでなく軸直角方向にも移動しながら切削を行う必要があり、被削材とチップの接触状態が逐次的に変化し、それに伴って切削抵抗も変わるため、DEM法の効果が変化することが予想される。

今回の試験片のうち、比較的形状が単純な(a)U溝部や(c)テーパ部の加工では、工具の軸直角方向への移動は限定的であるため、単純形状の場合と同様にDEM法の効果が均一に得られたと考えられる。

一方、(b)球面部の加工では、外径から球面、さらに球面先端部への移行に伴い、工具の軸直角方向への移動量が大きくなることから、被削材とチップの接触状態が変化し、切削抵抗の変動が大きくなるため、DEM法の効果が均一に得られないことが考えられる。

また、(d)角部において硬さの上昇が限定的であった原因は、曲率半径とチップノーズRが同じであったため、送りが取れずノーズ形状が転写されただけで、広範囲かつ大きな塑性変形(GROD値>3.2)が生じ

るほどの荷重が被削部にかからなかったことが考えられる。つまり、曲率半径がチップノーズRの寸法に近い場合、DEM法の適用が困難であり、効果が薄いことが明らかになった。

以上、形状変化部に対するDEM法の適用について検討した結果、様々な製品形状に対応できる可能性は示されたが、加工部に対し均一な効果を得るという点で課題が残った。特に球面や深いU字溝部などは軸直角方向への移動量変化が大きくなる傾向にあるため、解決には加工条件や工具の動きを工夫する必要があると考えられる。

DEM法は硬い表面変質層を積極的に生じさせ、被削部の耐久性向上に利用する技術である。表面変質層の状態と切削抵抗の値には密接な関係があることが指摘されており⁶⁾、製品形状に合わせて加工条件や工具の動きを決定し、一定の切削抵抗値となるよう逐次補正することができれば、DEM法の効果が最大限生かされた製品を製造可能になると期待される。今後実施する研究の中で優先的に解決すべき課題として取り組む予定である。

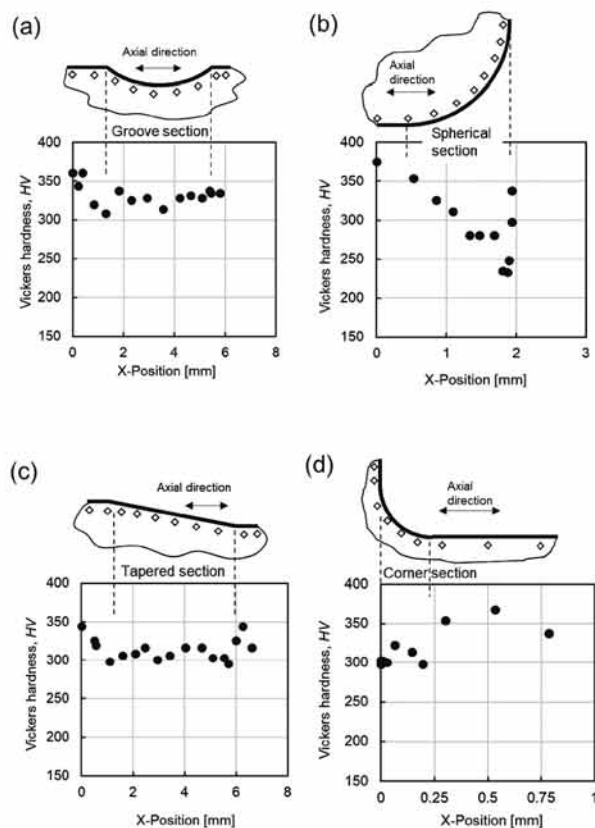


図5 形状変化部の硬さ分布
(a)U溝部、(b)球面部、(c)テーパ部、(d)角部

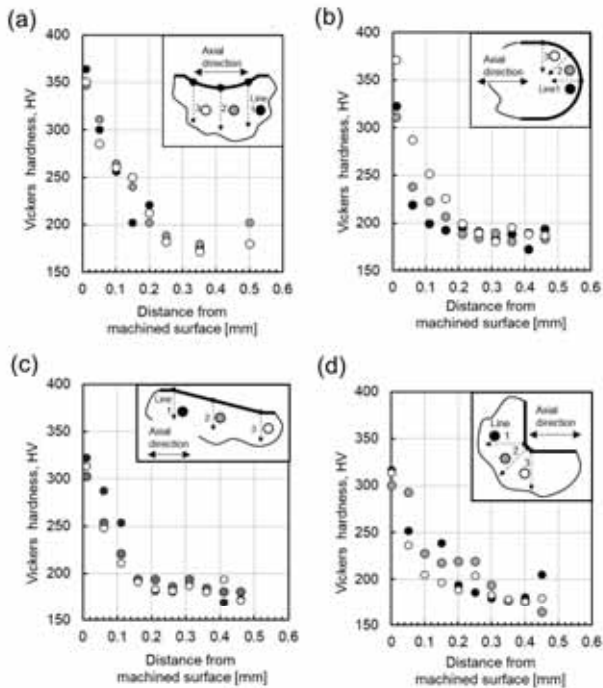


図6 形状変化部の硬さ分布(深さ方向)
(a)U 溝部, (b)球面部, (c)テーパ部, (d)角部

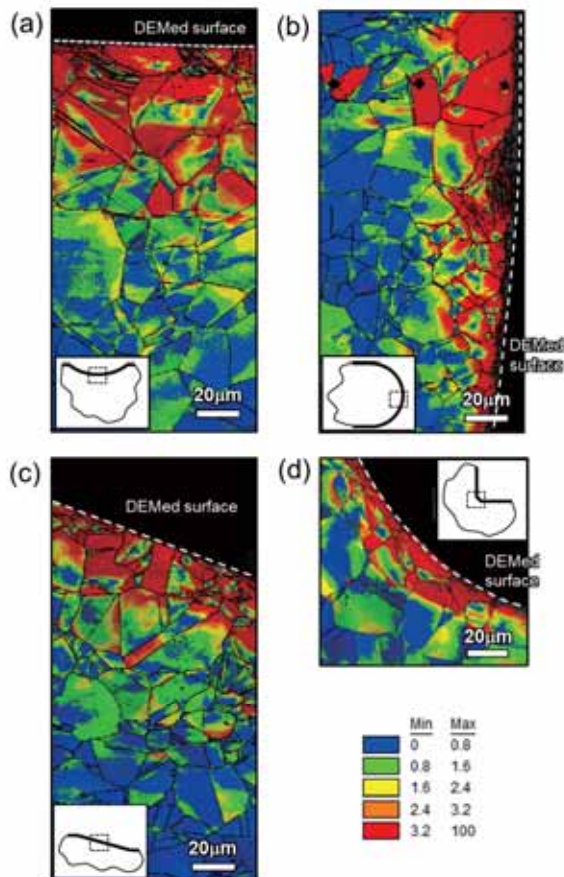


図7 GROD マップ
(a)U 溝部, (b)球面部, (c)テーパ部, (d)角部

3.2 DEM 法がステンレス鋼の孔食電位に及ぼす影響評価

図8に3種類の試験片に対する孔食電位測定のアノード分極曲線を示す。自然電位から掃引開始後の安定域(約 $-0.15\text{V} \sim +0.02\text{V}$)、および孔食の連続発生と不動態膜の再生が繰り返される活性域(約 $0.02\text{V} \sim$)において、3種の試験片の挙動に差は見られなかった。

次に、図8より算出した V'_{c10} および V'_{c100} を図9に示す。DEM法適用試験片(TP-1,TP-2)および通常加工試験片TP-3共に、 $V'_{c10}=360\text{mV}$ 、 $V'_{c100}=380\text{mV}$ となり、DEM法を適用した試験片は通常加工試験片と同等の耐孔食性を維持していることから、DEM法による耐孔食性の劣化はないと考えられる。

一般的に、ステンレス鋼は表面に極めて薄い不動態皮膜を形成することで高い耐食性を保持することが知られている。孔食は、NaClに代表される塩化物イオンを含む水溶液中で不動態被膜が局部的に破壊された箇所に発生する局部腐食の一種である。つまり、不動態被膜の形成能が高いほど耐孔食性は高いとされる。不動態被膜の形成能の優劣は、材料の化学組成のほか、結晶粒径や介在物の影響も大きい⁷⁾とされている。

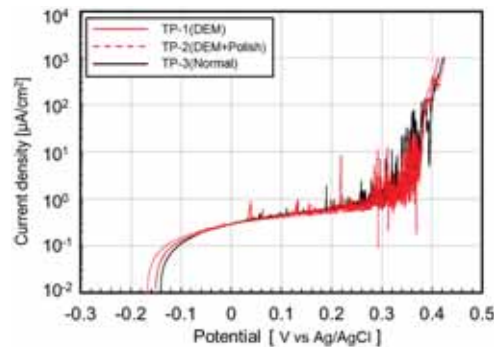


図8 アノード分極曲線

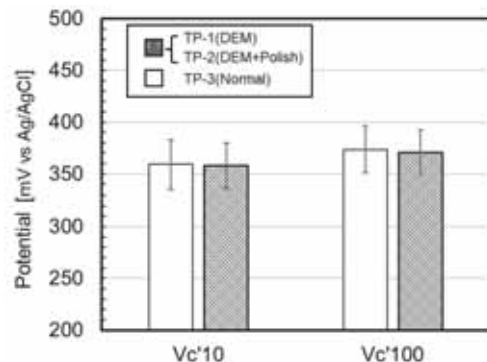


図9 孔食電位(V'_{c10} , V'_{c100})の比較

DEM法を適用した場合、微細な結晶粒を持つ表面変質層が形成されるため、通常加工試験片とは異なる孔食挙動を示すと予想していたが、ほぼ同じ挙動を示した。今後、この結果についてDEM法適用部の金属組織や残留応力の状況を踏まえた考察を進めていきたい。

4. おわりに

形状変化部に対し高品質な表面変質層を付与する加工方法の確立に向け、機械部品に多く見られる形状変化部（U溝部、球面部、テーパ部、角部）へのDEM法の適用を試みた。その結果、様々な製品形状に対応できる可能性は示されたが、加工部に対し均一な効果を得るという点では課題が残った。

さらに、DEM法が適用された平面部に対して電気化学測定を行い、耐孔食性へ及ぼす影響を実験的に評価した。その結果、通常加工品と同じアノード分極挙動を示し、孔食電位に有意な差はみられなかったことから、DEM法適用によって γ 系SUSの耐孔食性の劣化はないことが明らかとなった。つまり、DEM法はステンレス鋼の耐食性を損なうことなく加工部の耐久性の向上を実現する技術である可能性が示唆された。

本研究グループは2020年4月からDEM法の研究を開始し、加工現場での実施に必要なノウハウを蓄積してきた。また、DEM法適用によってステンレス

鋼製品にもたらされるメリットを実験結果とともに明らかにし、研究開始当初に策定したロードマップに基づき計画を着実に進めてきた。今後は、DEM法の実用化を加速させるとともに、そのメリットを最大限に活かす技術開発に取り組む予定である。

最後に、本研究で使用したマイクロビッカース硬さ試験機、自動研磨機、走査電子顕微鏡は電源立地地域対策交付金により導入した機器である。

参考文献

- 1) N. Nagaishi, K. Hoaki, Y. Taguri, T. Hirai, 佐賀県工業技術センター 研究報告書 (2022) 11–16.
- 2) N. Nagaishi, K. Hoaki, T. Hirai, K. Koda, 佐賀県工業技術センター 研究報告書 (2023) 25–29.
- 3) N. Nagaishi, K. Hoaki, K. Koda, 佐賀県工業技術センター 研究報告書 (2024) 7–11.
- 4) S. Suzuki, EBSD読本 改訂第4版, 2021.
- 5) 日本産業規格調査会, ステンレス鋼の孔食電位測定法 JIS G0577(2014), 2014.
- 6) R. Hikiji, E. Kondo, N. Kawagoshi, M. Arai, TRANSACTIONS OF THE JAPAN SOCIETY OF MECHANICAL ENGINEERS Series C 68 (2002) 2169–2174.
- 7) ステンレス協会, ステンレス鋼便覧, 3rd ed., 日刊工業新聞社, 1995.

經常研究

化粧品の機能性を評価するための 生体外皮膚モデルの構築および高機能素材の探索（第3報）

食品コスメ部

岩元彬 柘植圭介

これまでに化粧品及びその素材の美容効果を調べるため、皮膚ダメージを定量的に評価できる生体外皮膚モデルの検討を行ってきた。その結果、3次元培養表皮に紫外線 UVB を照射し、経皮水分蒸散量 (TEWL) を指標とすることで被験試料の保湿・バリア機能への影響を評価可能な生体外皮膚モデルを構築した。本報では、生体外皮膚モデルを用いてアスパラガス抽出物の評価を行った。その結果、UVB を照射した3次元培養表皮では TEWL が上昇したのに対し、アスパラガス抽出物を添加したものは TEWL の上昇が抑制された。続いて、タイトジャンクション形成因子への影響を調べたところ、アスパラガス抽出物は UVB 照射による Claudin1 発現量の低下を有意に抑制した。また、同様にセラミド合成関連因子を解析したところ、アスパラガス抽出物は CerS3 及び SMS2, SPT2 発現の低下を有意に抑制した。したがって、アスパラガス抽出物は Claudin1 や CerS3, SMS2, SPT2 といった生体因子の発現低下を抑えることにより UVB 照射による TEWL の上昇を抑制していることが示唆された。

1. はじめに

近年の化粧品市場では、紫外線などの外的要因や加齢などの内的要因で起こる皮膚ダメージやトラブルの改善・解消効果を訴求した高機能化粧品が市場を急成長させている。このような化粧品の開発では、動物実験を行わずに3次元培養表皮等を用いる代替法による試験が世界中で強く求められているが、現状は安全性の評価に留まり、機能評価への応用に至ったケースは少ない¹⁾。このような背景から、高機能化粧品の開発にはヒト皮膚の反応を忠実に再現した生体外皮膚モデルの構築が望まれている。

表皮は皮膚の最外層として外界と接し、体内の水分の蒸散や異物等から人体を防御する機能を有している。この表皮を構成する細胞の95%は角化細胞であり、成熟に伴い上層に移行していき、深部から基底層、有棘層、顆粒層、角層を構成している。皮膚のバリア機能や保湿には顆粒層のタイトジャンクションや角層の形成脂質であるセラミドが重要な役割を果たしていることがよく知られ、これらの生体因子の発現が皮膚のバリア機能や保湿性に影響を与えることが多くの研究で示されている²⁻⁶⁾。

そこで筆者らは、皮膚老化の最大環境要因である近紫外線（波長 200 - 400 nm）の中でも、特に強い皮膚傷害を引き起こす UVB（波長 280 - 320 nm の近紫外線）を3次元培養表皮に照射することにより保湿

機能やバリア機能が低下した状態を作り出し、被験試料の皮膚機能への影響を定量的に評価可能な生体外皮膚モデルの構築を行ってきた。その結果、UVB の照射強度に依存して経皮水分蒸散量 (Transepidermal water loss; TEWL) が上昇し皮膚バリア性が低下すること、また UVB の照射による TEWL の上昇が代表的な抗酸化剤である Ascorbyl glucoside (AG)により抑制されることを報告してきた²⁾。加えて、本試験系では TEWL とタイトジャンクション形成因子やセラミド合成関連因子発現の相関性が極めて高く、これらの生体因子の変動を TEWL に忠実に反映する可能性を明らかにしてきた³⁾。

一方、佐賀県では「さがフード&コスメラボ」や「唐津コスメティック構想」など、県内の農林水産資源を活用したコスメティック素材の開発支援の取り組みが活発に行われている。当センターでも、これまでに化粧品・健康食品としての佐賀県未利用素材の活用を目指して研究を行ってきた。その結果、レンコンポリフェノールが炎症性サイトカインやコラゲナーゼ産生を抑制することや⁷⁾、褐藻綱ノコギリモクが抗炎症成分 Sargahydroquinonic acid や Sargaquinonic acid を含むことを明らかにしてきた⁸⁾。また、アスパラガス成分中の糖脂質とリン脂質がアレルギーの予防・緩和に有用である可能性を報告し

てきた⁹⁾。

本報では、佐賀県を代表する農作物であるアスパラガス（収穫量全国2位（令和2年））の新産業活用を目指し、生体外皮膚モデルを用いて TEWL 及びタイトジャンクション形成因子、セラミド合成関連因子への影響を評価した。

2. 実験方法

2.1 アスパラガス抽出物の調製（前処理）

アスパラガス（JA さが）は、スチームコンベクションオーブンをを用いて、100℃の水蒸気で7分間加熱処理した後に、凍結乾燥させた。得られた乾燥物は粉碎し、アスパラガス粉末試料とした。続いて、このアスパラガス粉末試料に80%（v/v）エタノール水溶液を加え、室温で4時間攪拌した。これを遠心分離（12,000×g, 30分間）し、得られた上澄み液をアスパラガス抽出物とした。

2.2 被験試料の3次元培養表皮への影響評価

3次元培養表皮は、ヒト表皮角化細胞を用いて作製された LabCyte EPI-MODEL24（J-TEC）を使用した。LabCyte EPI-MODEL24 を用いた皮膚刺激性試験は経済協力開発機構（OECD）テストガイドライン439に記載されており、その LabCyte EPI-MODEL24 は皮膚刺激性の評価に適した培養表皮モデルとされている。

まず、LabCyte EPI-MODEL24 の培養カップを500μL のアッセイ培地を分注したアッセイプレートに移し、CO₂ インキュベーター内で培養した。18時間培養後、培養カップをアッセイ培地またはアスパラガス抽出物を含むアッセイ培地を分注したアッセイプレートに移し、CO₂ インキュベーター内で培養した。4時間培養後、これにUVB（280-320 nm, ランプ：Toshiba SH1002MA, フィルター：Asahi spectra SH0325）を150 mJ/cm²の強度で照射した後に、新しく1.0 mL のアッセイ培地またはアスパラガス抽出物を含むアッセイ培地を分注したアッセイプレートに培養カップを移し、インキュベーター内で培養した。2日間及び8日間培養後、TEWL を測定した。また、2日間培養表皮の mRNA 発現量を RT-qPCR 法により評価した。

2.3 3次元培養表皮モデルの経皮水分蒸散量測定

LabCyte EPI-MODEL24 を32℃に保った HIENAI MAT（コスモ・バイオ）上で5分間フタを空けて静置した。その後、Tewitro TW24（Courage+Khazaka）をセットし、これが入る W340×H320×D275 mm の箱を覆いかぶせ、900 秒間経皮水分蒸散量を測定し

た。解析には測定値が安定する881～900秒の20秒間の経皮水分蒸散量を使用した。なお、これらの操作は、テーブルコーチ（興研）を用いた無菌環境下で行った。

2.4 RT-qPCR 法による遺伝子発現の検討

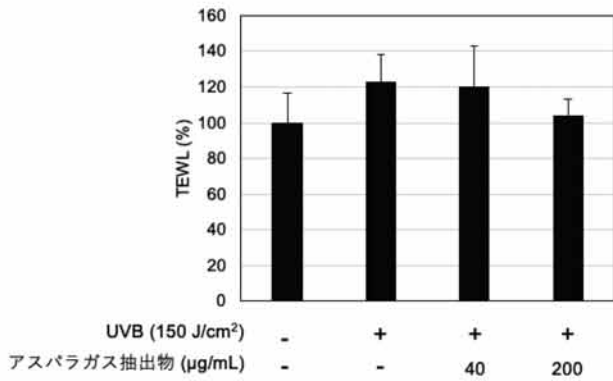
培養表皮の mRNA 発現量の変化を調べるため、培養表皮をバイオマッシャーII を用いて破碎後、TRIzol[®] Reagent（Thermo）を用いて総 RNA を抽出し、PrimeScript[™] RT Master Mix（Takara）により cDNA を合成した。この cDNA を鋳型として、TB Green[®] Premix EX Taq[™]（Takara）を用いてリアルタイム PCR を行うことにより、遺伝子発現量を比較した。評価に使用した遺伝子は claudin1, claudin4, ceramide synthase 3（CerS3）, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase（GAPDH）, sphingomyelin synthase 1（SMS1）, SMS2, serine palmitoyltransferase 1（SPT1）, SPT2 であり、使用したプライマーは表1に示した。得られたデータは、BIO-RAD CFX Manager version 3.1 を用いて GAPDH を内部標準として比較 CT 法により解析した。これらの操作は製造プロトコールに従って行った。

2.5 MTT アッセイによる生細胞率の測定

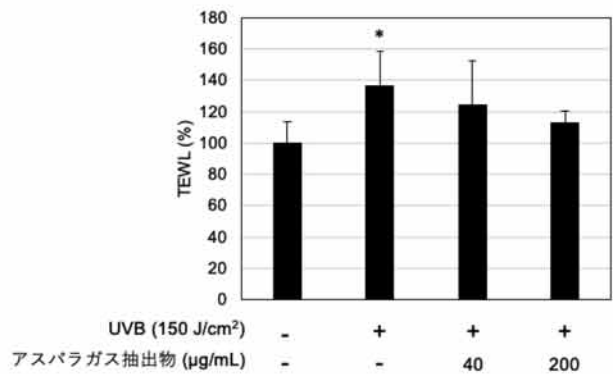
3次元培養表皮の生細胞率は MTT アッセイに従って評価した。まず、24 ウェル培養プレートにアッセイ培地で0.5 mg/mL に調製した3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide（MTT, Dojindo）を500μL ずつ分注し、CO₂ インキュベータ

表1 プライマーリスト

プライマー	配列 (5'-3')
Claudin1 sense	5'-GAAGTGTATGAAGTGCTTGG-3'
antisense	5'-GGGTCATAGGGTCATAGAAT-3'
Claudin4 sense	5'-TATGGATGAAGTGCCTGGTG-3'
antisense	5'-GATGATGVTGATGATGACGAG-3'
CerS3 sense	5'-CCAGGCTGAAGAAATTCAG-3'
antisense	5'-AACGCAATTCAGC AACAGT-3'
GAPDH sense	5'-CTTCGCTCTCTGCTCCTCTG-3'
antisense	5'-CGCCCAATACGACCAATCCG-3'
SMS1 sense	5'-CAACATTGGCGTAGACAT-3'
antisense	5'-TAGGAGGTACTCGTTCGTG-3'
SMS2 sense	5'-ACTACTCTACCTGTGCCTGG-3'
antisense	5'-AGCAGCCAGCAGATTAAATG-3'
SPT1 sense	5'-GCGCGCTACTTGGAGAAAGA-3'
antisense	5'-TGTTCCACCGTGACCAACAAC-3'
SPT2 sense	5'-AGCCGCCAAAGTCCTTGAG-3'
antisense	5'-CTTGTCAGGTTTCCAATTTCC-3'



(a) 2日間培養



(b) 8日間培養

図1 アスパラガス抽出物の TEWL への影響
測定値は 6 連の平均値であり、エラーバーは標準誤差を示す。
* $p < 0.05$ vs UVA (-) アスパラガス抽出物 (-)を示す。

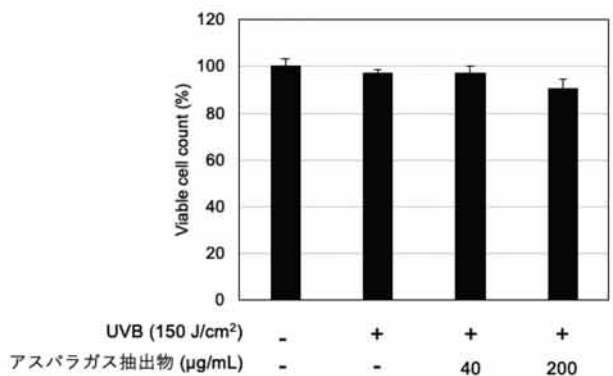
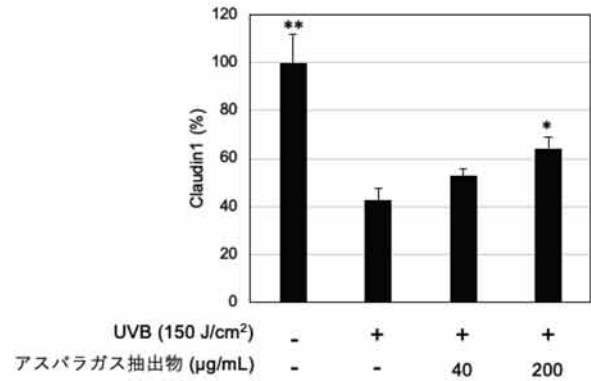
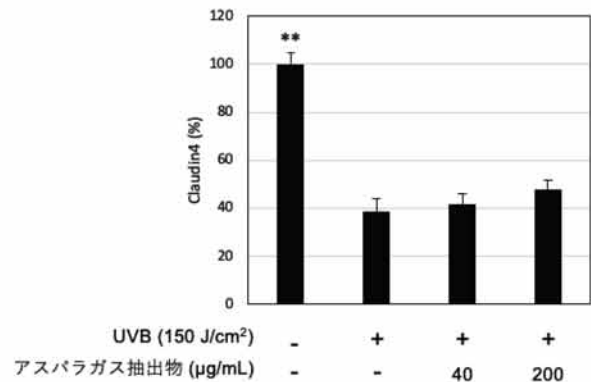


図2 アスパラガス抽出物の生細胞率への影響
測定値は 6 連の平均値であり、エラーバーは標準誤差を示す。

一内で加温した。これに培養カップを移し、CO₂ インキュベーター内で静置した。4 時間反応後、培養カップから培養表皮を回収し、0.04 mol/L の塩酸 (Fujifilm) を含むイソプロピルアルコール (Fujifilm) に浸漬させ、室温で 16 時間色素を抽出した。その後、抽出液を 96 ウェルマイクロプレートに移し、570-650 nm の吸光度を測定することにより、生細胞率を算出した。



(a) Claudin1 発現量



(b) Claudin4 発現量

図3 アスパラガス抽出物のタイトジャンクション形成因子への影響

測定値は 3 連の平均値であり、エラーバーは標準誤差を示す。
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs UVA (+) アスパラガス抽出物 (-)を示す。

2.6 統計解析

得られたデータは、Statcel4 (OMS Publishing Inc.) を用い、Turkey-kramer 法で解析した。

3. 結果及び考察

3.1 アスパラガス抽出物の経皮水分蒸散量への影響

アスパラガス抽出物の 3 次元培養表皮への影響は、経皮水分蒸散量 (TEWL) を測定することにより評価した。図 1 (a) に UVB 照射 2 日後の 3 次元培養表皮の TEWL を示した。UVB を照射したものでは未照射のものに比べ TEWL が上昇するのに対し、200 µg/mL のアスパラガス抽出物を添加したものについては、TEWL の上昇が抑制される傾向にあった。さらに、8 日間培養後の 3 次元培養表皮では、UVB 照射による有意な TEWL の上昇がアスパラガス抽出物の添加により、著しく抑制されることが確認された (図 1 (b))。なお、MTT アッセイを行った結果、アスパラガス抽出物は生細胞率には影響を及ぼさないことを確認している (図 2)。これらの結果から、

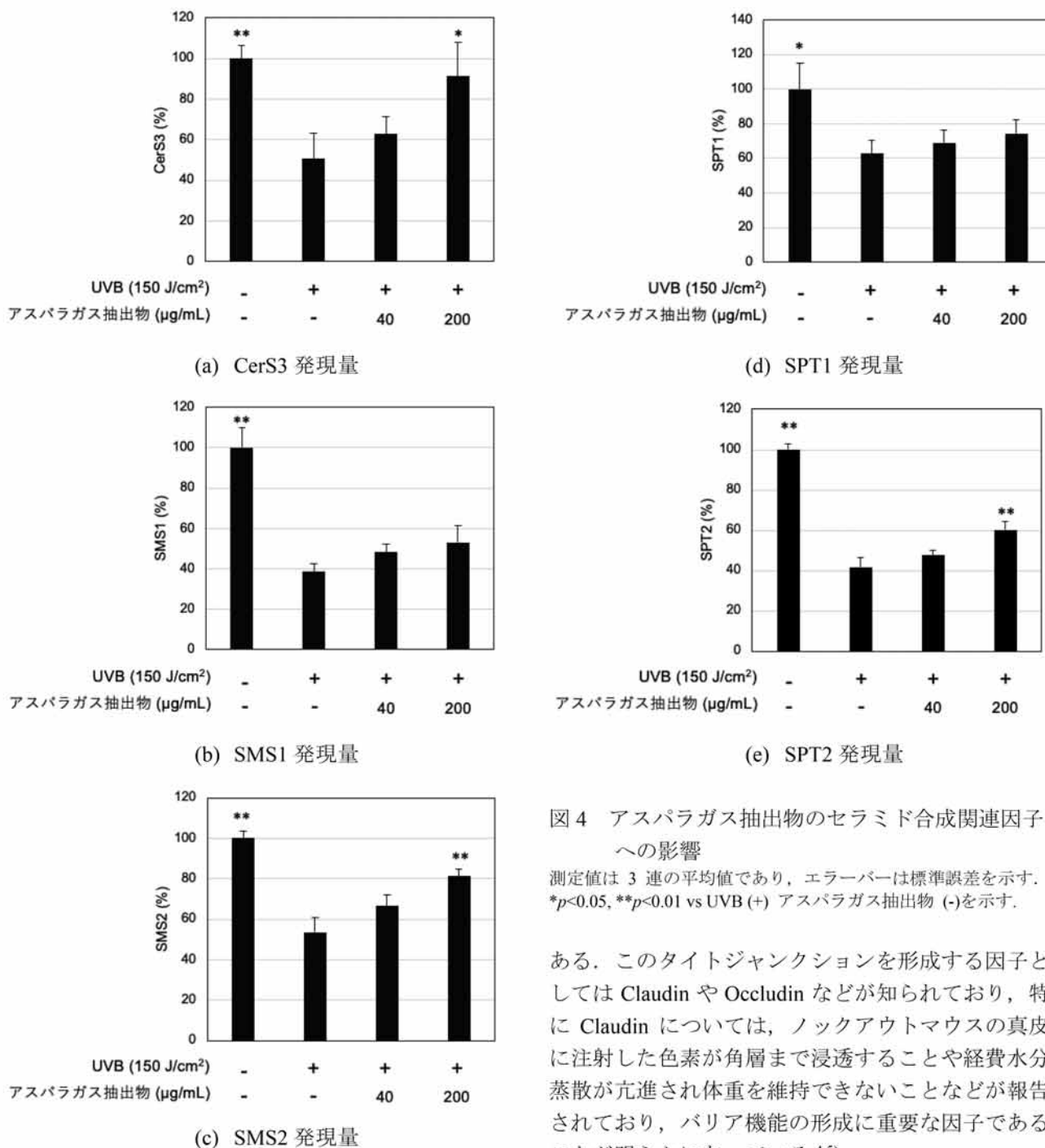


図4 アスパラガス抽出物のセラミド合成関連因子への影響

測定値は3連の平均値であり、エラーバーは標準誤差を示す。
* $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs UVB (+) アスパラガス抽出物 (-)を示す。

ある。このタイトジャンクションを形成する因子としては Claudin や Occludin などが知られており、特に Claudin については、ノックアウトマウスの真皮に注射した色素が角層まで浸透することや経費水分蒸散が亢進され体重を維持できないことなどが報告されており、バリア機能の形成に重要な因子であることが明らかになっている^{4,5)}。

そこで、アスパラガス抽出物の Claudin1 への影響を調べたところ、UVB 照射した3次元培養表皮では発現量が低下したのに対し、アスパラガス抽出物添加培地で培養したものは、発現量の低下が抑制された(図3(a))。また、この傾向は Claudin4 でも同様に確認された(図3(b))。そのため、アスパラガス抽出物は Claudin の発現量低下を抑制することにより、タイトジャンクションの低下を緩和し、最終的に TEWL の上昇を抑制している可能性が示された。

アスパラガス抽出物は TEWL に密接に関係する皮膚バリア機能や保湿機能に影響を及ぼして、TEWL の上昇を抑制していることが示唆された。

3.2 タイトジャンクションへの影響

皮膚は、外界と生体を隔てる最大の臓器であり、外部からの刺激や異物の侵入、体内の水分等の漏出を防ぐバリア機能を有している。皮膚のバリア機能の維持には、表皮の顆粒層表面に存在する脂肪表面タンパク質が結合したタイトジャンクションが重要で

3.1 セラミド合成関連因子への影響

皮膚の保湿にはセラミドや天然保湿因子が重要な役割を果たしている。特にセラミドは角層脂質重量の30~40%を占め、皮膚の保湿やバリア機能に重要な細胞間脂質であることが報告されている^{4,5)}。また、角層中のセラミドレベルが低下するとバリア機能が低下することが報告されている⁶⁾。そのため、セラミドの摂取や合成の誘導は皮膚の保湿に重要であると考えられており、その関連性について研究が活発に行われている。

そこで、アスパラガス抽出物のセラミドの合成関連酵素の遺伝子発現量を評価したところ、UVBを照射した3次元培養表皮と比べ、アスパラガス抽出物を含む培地で培養した培養表皮では、CerS3, SMS2, SPT2の発現量が有意に増加した(図4(a)(c)(e))。表皮のセラミドの合成には、様々な酵素が関与しており、まずSPTがセラミド合成の第一段階であるセリンとパルミトイル-CoAの縮合を触媒し、CerS3が脂肪酸のN-アシル化によりセラミドの基本構造(セラミド前駆体)を形成する。ここからセラミドを合成する経路は二つあり、一つはセラミド前駆体からGCSとGBAの働きによりグルコシルセラミドを合成、分解を経由してセラミドができる経路、もう一つはSMSとAcid sphingomyelinase (SMase)によりスフィンゴミエリンを介する経路である。

本研究では、アスパラガス抽出物の添加により、SPT2及びCerS3, SMS2発現量が増加したことから、少なくともセリン+パルミトイル Co-A/セラミド前駆体/スフィンゴミエリン/セラミド経路での角層セラミド合成が活性化されたことが示唆された。アスパラガス抽出物がセラミド合成を促進することについては、ヒトケラチノサイトのSMaseが活性化されることが報告されているが、それ以上の知見はなかった¹⁰⁾。そのため、本法で見出したアスパラガスのSPT及びCerS, SMS合成の活性化に関する機能は新たな知見であった。

4. おわりに

本研究では、3次元培養表皮に紫外線UVBを照射し、経皮水分蒸散量(TEWL)を指標とすることで被験試料の保湿・バリア機能への影響を評価可能な生体外皮膚モデルを構築した。

本報では、3次元培養表皮を用いた生体外皮膚モデルを用いて、UVB照射によるTEWLの上昇をアスパラガス抽出物が抑制することを初めて見出した。続いて、タイトジャンクション形成因子のmRNA発

現を調べた結果、アスパラガス抽出物がUVB照射によりClaudin1発現量の低下を抑えることを確認した。また、同様にセラミド合成関連因子のmRNA発現の解析では、CerS3とSMS2, SPT2発現の低下がアスパラガス抽出物の添加により緩和されることを明らかにした。そのため、アスパラガス抽出物はこれらタイトジャンクション形成因子やセラミド合成関連因子の発現低下を抑えることにより、TEWLの上昇を抑制している可能性が示された。

本研究で構築した生体外皮膚モデルや新たに見出したアスパラガスの美容・健康機能に関する知見が、佐賀県の産業振興に繋がることが期待される。

なお、研究を実施するにあたって使用した紫外線照射装置及び培養細胞用経皮水分蒸散量センサー(Tewitro TW24)は、電源立地地域対策交付金で導入した。

参考文献

- 1) 岩崎泰夫, 化粧品将来と課題, 化学と生物, 46(5), 346-351(2008)
- 2) 岩元彬, 柘植圭介, 化粧品の機能性を評価するための生体外皮膚モデルの構築および高機能素材の探索(第1報), 令和元年佐賀県工業技術センター, 33-36(2019)
- 3) 岩元彬, 柘植圭介, 化粧品の機能性を評価するための生体外皮膚モデルの構築および高機能素材の探索(第2報), 令和2年佐賀県工業技術センター, 31-35(2020)
- 4) 久保亮治, 皮膚バリアとランゲルハンス細胞の動態, 日本臨床免疫学会会誌, 34(2), 76-84(2011)
- 5) 下豊留芳枝, 辻村久, 石川准子, 藤村努, 北原隆, 日本人女性の角層セラミドプロファイルの部位差解析, 日本化粧品学会誌, 38(1), 3-8(2014)
- 6) Imokawa G, Abe A, Jin K, Higaki Y, Kawashima M, Hidano A, Decreased level of ceramides in stratum corneum of atopic dermatitis: An etiologic factor in atopic dry skin? *J Invest Dermatol*, 96(4), 523-526(1991)
- 7) Iwamoto A, Yamauchi R, Oogai S, Tsuruta Y, Tsuge K, Nagata Y, Yanagita T. Lotus root extract inhibits skin damage through suppression of collagenase production in vitro, *Cytotechnology*, 74, 309-317 (2022)
- 8) 柘植圭介, 岩元彬, 鶴田裕美, 山内良子, 藻類の産業利用に関する可能性研究(第2報), 平成30

年佐賀県工業技術センター，19-31(2018)

- 9) Iwamoto A, Hamajima H, Tsuge K, Tsuruta Y, Nagata Y, Yotsumoto H, Yanagita T. Inhibitory effect of green asparagus extract, especially phospholipids, on allergic responses in vitro and in vivo, *J Agric Food Chem*, 68(51), 15199-15207(2020)

- 10) 特許第 4601088 号「セラミド合成促進剤、及びそのセラミド合成剤を含む化粧品、医薬部外品、皮膚外用剤」

※本研究は令和 3 年度に実施しましたが，知的所有権取得のため掲載を遅らせて令和 6 年度の報告書に掲載しました。

ヒト生体環境に着目した新規皮膚細胞培養系の構築と応用（第3報）

食品コスメ部

岩元彬 柘植圭介

ヒト表皮中の酸素濃度である0.5~5%での表皮細胞の機能を調べるため、マルチガスインキュベーターを用いて酸素濃度1%、3%、5%の培養環境を作り出し、ヒト3次元培養表皮のミトコンドリア活性及びmRNA発現を評価した。48時間培養した3次元培養表皮のミトコンドリアの代謝活性をMTTアッセイにより調べたところ、酸素濃度1%、3%では低下したことから、これらの濃度では生細胞率もしくは細胞の代謝活性が低下したことが示された。また、セラミド合成酵素のmRNA発現解析の結果、CerS3は酸素濃度1%、SMS1は1%及び3%で発現量が低下したことから、低酸素条件下ではスフィンゴミエリンを介したセラミド合成が抑制されることが示唆された。一方、タイトジャンクションに關与するCluadin1は酸素濃度1%、Cluadin4とOccludinは1%と3%でmRNA発現量が増加したことから、低酸素条件下ではタイトジャンクション形成タンパク質が増強される可能性が示された。これらの結果は、一般的な酸素濃度21%と低酸素条件では、表皮細胞の機能が変化することを示すものであり、よりヒトへの外挿性の高い結果を得るためには、低酸素条件下で研究を行う必要があることを示唆するものであった。

1. はじめに

佐賀県では、地域創生の取り組みとして、「美と健康に関するコスメティック産業を集積させ、コスメに関連する自然由来原料の供給地となることを目指すコスメティック構想」を推進しており、当センターでも県内素材の美容効果の検証を行ってきた。その結果、レンコンポリフェノールが炎症性サイトカインやコラゲナーゼ産生を抑制することや^{1,2)}、キヌアがコラーゲン産生増強効果や分解阻害効果を有すること³⁾、褐藻綱ノコギリモクが抗炎症成分Sargahydroquinonic acidやSargaquinonic acidを含むこと等を見出してきた⁴⁾。

このような化粧品の開発では、倫理上の配慮から、実験動物を使用せず、培養細胞等を用いた動物実験代替法の活用が世界中で重視されている。しかしながら、現状は安全性の評価に留まり、機能評価への応用に至ったケースは少ない。そのため、化粧品の機能評価・開発にはヒト皮膚の反応を忠実に再現した生体外皮膚モデルの構築が望まれる。

一方、近年の報告でヒト表皮内の酸素濃度は生理的範囲から低酸素状態の0.5~5%であることが明らかになってきた⁵⁾。一般に表皮由来細胞を用いた試験は大気中と同程度の酸素濃度で行われているが、生体に近い評価のためには低酸素条件下での試験が必要であることが示唆されている。実際に、Tashiroらはアレルギー性炎症や痒みの原因となるTSLP発

現が低酸素条件下では抑制されることを示し、約21%の酸素条件と1%の低酸素条件下では表皮細胞の反応量が変わることを報告している⁶⁾。

そこで、本研究ではヒト表皮由来角化細胞により形成された3次元表皮を用いて低酸素条件がセラミド合成関連酵素やタイトジャンクション形成因子の遺伝子発現に与える影響を評価した。

2. 実験方法

2.1 低酸素条件下における3次元培養表皮の培養

3次元培養表皮は、LabCyte EPI-MODEL24 (J-TEC)を使用した。まず、LabCyte EPI-MODEL24の培養カップを500 μ Lのアッセイ培地を分注した24 well培養プレートに移し、CO₂インキュベーター(Thermo)で培養した。18時間培養後、培養カップを1.0 mLのアッセイ培地を分注した24 well培養プレートに移し、マルチガスインキュベーター(PHCbi)で酸素濃度1%、3%、5%でそれぞれ培養した。また、同様に酸素濃度を制御していないCO₂インキュベーターで培養したものをコントロールとした。48時間培養後、培養表皮の生細胞率をMTTアッセイ、mRNA発現量をRT-qPCRにより解析した。

2.2 MTTアッセイ

24 well培養プレートにアッセイ培地で0.5 mg/mLに調製した3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT, Dojindo)を500 μ Lず

つ分注し、CO₂ インキュベーター内で加温した。これに培養カップを移し、CO₂ インキュベーター内で静置した。4 時間反応後、培養カップから培養表皮を回収し、0.04 mol/L の塩酸 (Fujifilm) を含むイソプロピルアルコール (Fujifilm) に浸漬させ、室温遮光条件下で一晩色素を抽出した。その後、抽出液を 96 ウェルマイクロプレートに移し、570-650 nm の吸光度を測定することにより、ミトコンドリアの代謝活性を評価した。

2.3 RT-qPCR 法による mRNA 発現の評価

3 次元培養表皮の mRNA 発現量の変化を調べるため、TRIzol[®] Reagent (Thermo) を用いて総 RNA を抽出し、PrimeScript[™] RT Master Mix (Takara) により cDNA を合成した。この cDNA を鋳型として、TB Green[®] Premix EX Taq[™] (Takara) を用いてリアルタイム PCR を行うことにより、遺伝子発現量を比較した。使用したプライマーは表 1 に示した。PCR 反応は 95°C 30 秒を 1 サイクル、95°C 5 秒、60°C 30 秒を 40 サイクルの条件で行った。増幅産物は 60°C から 90°C まで 0.5°C 毎に Melt curve 解析を行い、シングルピークであることを確認した。得られたデータは、BIO-RAD CFX Manager version 3.1 を用いて比較 CT 法により解析した。

表 1 プライマー配列

プライマー	配列 (5'-3')
aSMase sense	5'-TGGCTCTATGAAGCGATGG-3'
antisense	5'-AGGCCGATGTAGGTAGTTGC-3'
Claudin1 sense	5'-GAAGTGATGAAGTGCTTGG-3'
antisense	5'-GGGTCATAGGGTCATAGAAT-3'
Claudin4 sense	5'-TATGGATGAAGTGCCTGGT-3'
antisense	5'-GATGATGVTGATGATGACGAG-3'
CerS3 sense	5'-CCAGGCTGAAGAAATCCAG-3'
antisense	5'-AACGCAATTCCAGC AACAGT-3'
GAPDH sense	5'-CTTCGCTCTCTGCTCCTCCTG-3'
antisense	5'-CGCCCAATACGACCAAATCCG-3'
GCS sense	5'-CTTCGCTCTCTGCTCCTCCTG-3'
antisense	5'-CGCCCAATACGACCAAATCCG-3'
SMS1 sense	5'-CAACATTGGCGTAGACAT-3'
antisense	5'-TAGGAGGTACTCGTTCGTG-3'
SPT1 sense	5'-GCGCGCTACTTGGAGAAAGA-3'
antisense	5'-TGTTCCACCGTGACCAAC-3'
Occludin sense	5'-CTGGATCAGGGAATATCCAC-3'
antisense	5'-TCAGCAGCAGCCATGTAC-3'
ZO-1 sense	5'-GATGGTGCTACAAGTGATG-3'
antisense	5'-TCCGTGCTATACATTGAGT-3'

2.4 統計解析

得られたデータは、GraphPad PRISM 10 (GraphPad Software Inc.) を用い、*student's t test* で解析した。

3. 結果及び考察

3.1 培養ガス環境が培養表皮のミトコンドリア代謝活性に与える影響

マルチガスインキュベーターを用いて酸素濃度 1%、3%、5% で培養した培養表皮のミトコンドリア代謝活性を MTT アッセイにより測定した。図 1 に示すように、酸素濃度 21% で培養した培養表皮と 5% で培養したものでは生細胞率に変化は認められなかった。一方、酸素濃度 1% と 3% で培養した培養表皮では、21% の酸素濃度で培養したものとは比べ、有意に生細胞率が低下した。MTT アッセイは、細胞のミトコンドリアに存在する還元酵素活性を指標として生細胞率を測定する方法である。そのため、酸素濃度 1% 及び 3% で培養した培養表皮では、生細胞が減少した、もしくは細胞の代謝活性が低下したことが示唆された。

3.2 培養ガス環境が培養表皮のセラミド合成関連酵素の mRNA 発現に与える影響

皮膚の保湿にはセラミドや天然保湿因子が重要な役割を果たしている。特にセラミドは角層脂質重量の 30~40% を占め、皮膚の保湿やバリア機能に重要な細胞間脂質であることが報告されている^{7,8)}。また、角層中のセラミドレベルが低下するとバリア機能が低下することが報告されている⁹⁾。そのため、セラミドの摂取や合成の誘導は皮膚の保湿に重要であると考えられており、その関連性について研究が活発に行われている。

図 2 に角層セラミドの合成経路を示す。表皮のセラミドの合成には、様々な酵素が関与しており、まず基底層から顆粒層にかけてセリンパルミトイルトランスフェラーゼ (serine palmitoyltransferase (SPT) がセラミド合成の第一段階であるセリンとパルミト

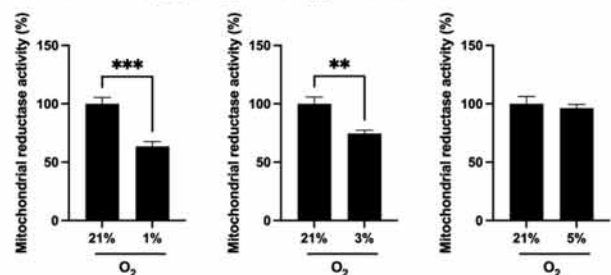


図 1 培養表皮のミトコンドリア活性

測定値は 3 匹の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。

p*<0.05, *p*<0.01, ****p*<0.001 vs 酸素濃度 21% を示す。

イル-CoA の縮合を触媒し、セラミドシンセターゼ (ceramide synthase (CerS)) が脂肪酸の N-アシル化によりセラミド (セラミド前駆体) を形成する¹⁰⁾。ここから角質層セラミドを合成する経路は二つあり、一つはセラミド前駆体からグルコシルセラミドシンセターゼ (GCS) と β グルコセレブロシダーゼ (BGCase) の働きによりグルコシルセラミドを合成、分解を経由してセラミドができる経路、もう一つはスフィンゴミエリンシンセターゼ (sphingomyelin synthase (SMS)) とスフィンゴミエリナーゼ (acid sphingomyelinase (SMase)) によりスフィンゴミエリンを介する経路である。

本研究では、培養ガス環境がセラミドに与える影響を調べるため、セラミド合成に関与する酵素の mRNA 発現を評価した。その結果を図 3 に示した。SPT-1 及び SMase, BGCase は酸素濃度 1%, 3%, 5% の間で発現量に変化はなかった。CerS3 は、酸素濃度 1%では 21%と比べ発現量が低下したが、3%及び 5%では変化はなかった。SMS1 は、酸素濃度 1%及び 3%で発現量が低下したが、5%では変化しなかった。GCS は酸素濃度 1%で発現量が増加したが、3%と 5%では変化しなかった。

これらの結果から、低酸素条件下では培養表皮の CerS3 や SMS1 といったセラミド合成関連酵素の mRNA 発現が低下したことから、スフィンゴミエリンを介した角層セラミド経路は抑制されている可能性が示唆された。このことから、最終的な角層セラミドの合成が抑制される可能性が示された。

3.3 培養ガス環境がタイトジャンクション関連因子の mRNA 発現に与える影響

皮膚は、外界と生体を隔てる最大の臓器であり、外部からの刺激や異物の侵入、体内の水分等の漏出

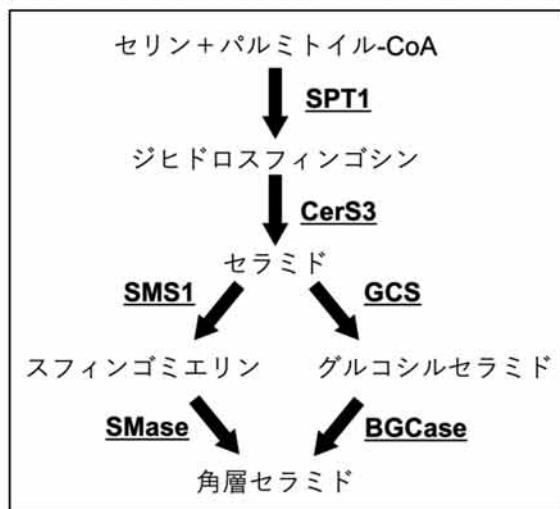


図 2 角層セラミド合成経路

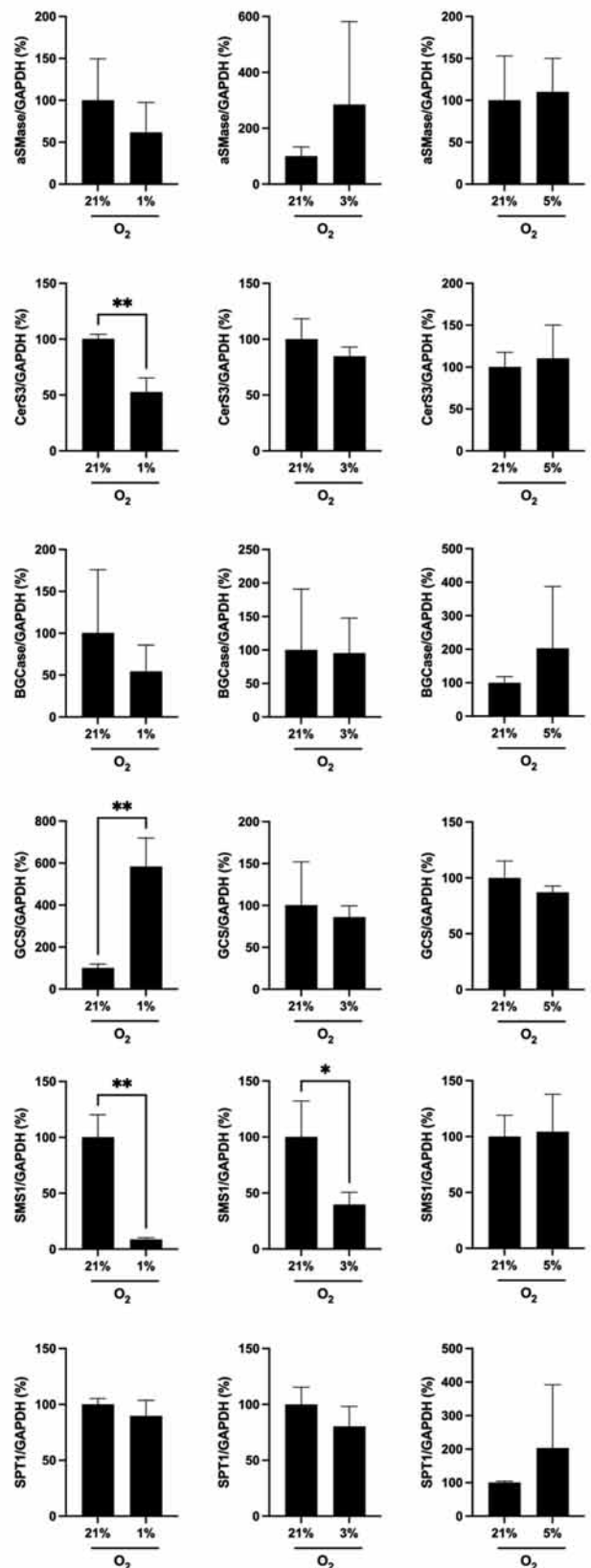


図 3 培養ガス環境がセラミド合成関連酵素の mRNA 発現に与える影響

測定値は 3 匹の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。

* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs 酸素濃度 21%を示す。

を防ぐバリア機能を有している。皮膚のバリア機能の維持には、表皮の顆粒層表面に存在する脂質表面タンパク質が結合したタイトジャンクションが重要である。このタイトジャンクションを形成する因子としてはクロードイン (claudin) やオクルディン (occludin)、ゾニュラオクルディン (zonula occludins-1 (ZO-1)) などが知られており、特に Claudin については、ノックアウトマウスの真皮に注射した色素が角層まで浸透することや経費水分蒸散が亢進され体重を維持できないことなどが報告されており、バリア機能の形成に重要な因子であることが明らかになっている^{7,8)}。

培養ガス環境がタイトジャンクションに与える影響を調べるため、タイトジャンクション形成タンパ

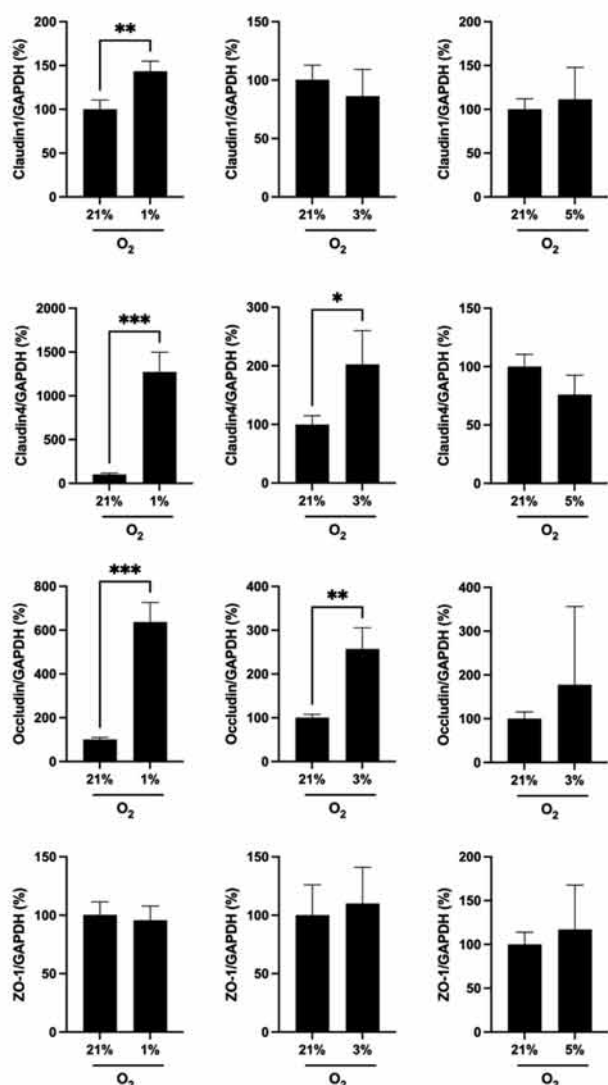


図4 培養ガス環境がタイトジャンクション関連因子の mRNA 発現に与える影響

測定値は 3 匹の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs 酸素濃度 21%を示す。

ク質の mRNA 発現を評価した。その結果、図 4 に示すように、酸素濃度 21%と比べ Claudin 1 は 1%で発現量が増加し、Claudin 4 及び Occludin は酸素濃度 1%と 3%で発現量が増加した。ZO-1 は、酸素濃度 1%, 3%, 5%の間で発現量に変化はなかった。これらの結果から、低酸素条件下では培養表皮の Claudin 1 や Claudin 4, Occludin の mRNA 発現量が増加したことから、タイトジャンクション形成タンパク質が増強される可能性が示された。

本報では、低酸素条件下におけるヒト培養表皮のセラミド合成酵素及びタイトジャンクション形成因子の mRNA 発現を調べ、一般的な *in vitro* 皮膚モデルとして用いられてきた酸素濃度 21%の評価とヒト表皮のガス環境に近い低酸素条件下での評価では、mRNA 発現量が異なることを明らかにした。これらの結果は、酸素濃度 21%での研究データがヒト皮膚に外挿できない可能性を示すものであった。これまでに低酸素条件下における皮膚細胞の研究については、Tashiro らが角化細胞の TNF- α 誘導性 TSLP 発現が抑制されることを報告しているが⁶⁾、セラミド及びタイトジャンクションに着目した研究の報告はない。本研究で明らかにしたセラミドやタイトジャンクション関連遺伝子の発現変化による保湿機能やバリア機能の変動を明らかにするためには、更なる研究が必要である。

4. おわりに

本研究では、ヒト表皮の酸素濃度でのヒト培養表皮の機能変化を調べた。その結果、低酸素条件下ではセラミド合成関連遺伝子の発現が減少したことから、保湿機能を担うセラミド合成が抑制されることが示唆された。一方で、肌バリア機能を担うタイトジャンクション関連因子の遺伝子発現を調べたところ、低酸素条件下ではタイトジャンクションを形成する主要なタンパク質である Claudin 1 や Claudin 4, Occludin の発現が増加したことから、タイトジャンクション形成タンパク質が増強されることが示唆された。

今後は、本研究で再現した低酸素条件下で、植物エキスなどの化粧品原料の機能を評価することにより、よりヒト表皮に近い美容試験が実施できることが期待される。

参考文献

- 1) 山内良子, 岩元彬, 吉村裕美, 柘植圭介, 炎症性サイトカイン産生抑制用の組成物, 2020; 特許

第 6667773 号

- 2) Iwamoto A, Yamauchi R, Oogai S, et al. Lotus root extract inhibits skin damage through suppression of collagenase production in vitro. *Cytotechnology*. 2022;74(2):309-317.
- 3) 岩元彬, 柘植圭介, 鶴田裕美, 三田かおり, コラゲナーゼ活性阻害用組成物及びコラーゲン産生促進用の組成物, 2022:特開 2022-139538
- 4) 柘植圭介, 岩元彬, 鶴田裕美, 山内良子, 藻類の産業利用に関する可能性研究 (第 2 報), 2018;平成 30 年佐賀県工業技術センター:19-31.
- 5) Evans SM, Schrlau AE, Chalian AA, Zhang P, Koch CJ. Oxygen levels in normal and previously irradiated human skin as assessed by EF5 binding. *J Invest Dermatol*, 126(12), 2596-606(2006)
- 6) Tashiro N, Segawa R, Tobita R, Asakawa S, Mizuno N, Hiratsuki M, Hirasawa N, Hypoxia inhibits TNF- α -induced TSLP expression in keratinocytes. *PLoS One*, 14(11), e0224705(2019)
- 7) 久保亮治, 皮膚バリアとランゲルハンス細胞の動態, 日本臨床免疫学会会誌, 34(2),76-84(2011)
- 8) 下豊留芳枝, 辻村久, 石川准子, 藤村努, 北原隆, 日本人女性の角層セラミドプロファイルの部位差解析, 日本香粧品学会誌, 38(1), 3-8(2014)
- 9) Imokawa G, Abe A, Jin K, Higaki Y, Kawashima M, Hidano A, Decreased level of ceramides in stratum corneum of atopic dermatitis: An etiologic factor in atopic dry skin?. *J Invest Dermatol*, 96(4), 523-526(1991)
- 10) Takeda S, Shimoda H, Takarada T, Imokawa G, Strawberry seed extract and its major component, tiliroside, promote ceramide synthesis in stratum corneum of human epidermal equivalents. *PLoS One*, 13(10), e0205061(2018)

機能性食品・コスメ原料に関する 評価技術の確立及びその応用に関する研究（第2報）

食品コスメ部
柘植圭介

九州北西部に多く自生する芳香性樹木アオモジの機能性食品化を目指し、機能性成分の抽出率等に及ぼすアオモジ葉の乾燥及び抽出条件の影響について検討した。熱水抽出物及び50% (v/v) エタノール抽出物において、蒸煮処理葉の抽出物は、未蒸煮のものとは比して褐変が顕著に抑えられた。一方、エタノール抽出物においては、蒸煮処理葉は、未蒸煮のものとは比して緑色の退色が認められた。熱水抽出及び50% (v/v) エタノール抽出においては、蒸煮無しに比して総ポリフェノール含量並びに抗酸化活性が顕著に増大した。熱水抽出物及び50% (v/v) エタノール抽出物は高粘性を有していたが、80% (v/v) エタノール抽出物には認められなかった。アオモジ葉抽出物の粘性と糖質含量は正の相関を示したことから、アオモジ葉には水溶性多糖類や糖タンパク質が含まれることが示唆された。

1. はじめに

アオモジ (*Litsea cubeba*; 図1) は、クスノキ科ハマビワ属の落葉小高木で、九州以南から中国、マレーシア、インドに分布する¹⁾。別名「ショウガノキ」「コショウノキ」とも呼ばれ、花、果実、葉、根などのそれぞれにレモンのような芳香がある。中国や東南アジア諸国では、果実から精油を抽出して香料にしたり、果実そのものを「馬告 (マーガオ: 台湾)」「木姜子 (ムージャンズ: 中国貴州省)」と称し、香辛料や食油に加工したりして幅広く利用されている。佐賀県や長崎県はアオモジの生育密度が高く、山間道路の法面や雑木林の明るい場所に多くみられる雑木である。しかし、アオモジは3~4月の花期に芳香を発する樹木として知られてはいるものの、国内ではこれまでほとんど利用されてこなかった。

近年、アオモジ葉の生理機能性に関する研究が進展している。これまでに、葉の乾燥粉末の摂取がラットの血清ペントシジン濃度を低下させ、生体内の抗糖化

にはたらく²⁾ことや、血清脂質濃度を低下させ、脂質代謝を改善³⁾すること、エタノール抽出物がマクロファージにおける caspase-1 や IL-1 β 分泌の抑制を介して NLRP3 インフラマソームの活性化を抑える⁴⁾こと等が報告されている。これらの知見は、アオモジ葉が、メタボリックシンドロームの基礎疾患である糖・脂質代謝異常の予防に役立つ機能性食品の有望な素材である可能性を示唆している。

以上の背景から、アオモジの機能性食品化を目指し、佐賀県産アオモジ葉の乾燥条件及び抽出条件が機能性成分の抽出率等に及ぼす影響について検討した結果を報告する。

2. 実験方法

2.1 試料の調製

佐賀県太良町に自生するアオモジより葉を採取し、スチームコンベクションオープン ((株) エフエムアイ UNOX XV-706ONE) にて 95°C・4 分間蒸煮した後に熱風乾燥機 (木原製作所製 SM10S-EH-DPC) にて乾燥した。乾燥葉を粉砕機にて粉砕したものをアオモジ葉乾燥粉末とした。乾燥条件の比較のため、無蒸煮で乾燥させたものも調製した。

2.2 抽出物の調製

熱水、50% (v/v; 以後省略) エタノール及びエタノールの3種の溶媒にてアオモジ葉乾燥粉末から抽出物を得た。それぞれの抽出条件を表1に示した。

2.3 抗酸化性

活性酸素吸収能 (ORAC) を指標としてアオモジ葉抽出物の抗酸化活性を測定した。測定方法は、国立研究



図1 アオモジ

開発法人農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所の H-ORAC 分析法標準作業手順⁵⁾ に準じた。96 ウェルマイクロプレートにブランク（リン酸緩衝液）及びリン酸緩衝液で希釈した抽出物（1 試料あたり 4 反復）もしくは Trolox 35 μL を分注し、各ウェルに 100.7 nM fluorescein sodium salt 溶液 115 μL を加えた。10 分間のプレインキュベーション後、31.7 mM AAPH 50 μL を加えて攪拌後、蛍光マイクロプレートリーダー（TECAN 製 Infinite 200 PRO）により蛍光強度を測定した。ORAC 値は、蛍光強度の減衰曲線下面積を算出し、検量線から試料の乾燥重量当たりの Trolox 当量として表した。蛍光測定の場合は既報⁶⁾ に準じた。

2.4 成分分析

アオモジ葉抽出物の総ポリフェノール含量及び構成糖含量をそれぞれ Folin-Ciocalteu 法及びパルスドアンペロメトリック検出-陰イオン交換高速液体クロマトグラフィー法（HP-AEC/PAD）にて測定した。Folin-Ciocalteu 法は既報⁷⁾を一部改変して実施した。すなわち、96 ウェルマイクロプレートに 10 μL の試料溶液を加え、10 倍希釈した Folin-Ciocalteu 試薬 75 μL を加えて攪拌し、室温で 5 分間静置した。さらに、2%炭酸ナトリウム溶液 75 μL を加えて攪拌し、室温で 60 分間静置後、マイクロプレートリーダーにて 750 nm の吸光度を測定した。試料溶液は各試料を抽出溶媒で溶解し、純水で適宜希釈した。総ポリフェノール含量は、抽出

物の乾燥重量当たりの没食子酸当量として表した。

HP-AEC/PAD による構成糖分析に先立ち、アオモジ葉抽出物溶液をねじ口試験管に入れ、2.6 mol/L トリフルオロ酢酸存在下密栓して 100℃で 7 時間加熱し、結合型糖を単糖まで加水分解した。この試料を所定濃度に希釈し、表 2 に示す条件で分析に供した。

3. 結果及び考察

3.1 アオモジ葉の諸特性に及ぼす蒸煮処理の影響

抽出物の外観、固形分抽出率、総ポリフェノール量及び抗酸化活性に及ぼすアオモジ葉の乾燥前の蒸煮処理の有無影響について、図 2～5 に示した。

図 2 に示すように、熱水抽出及び 50% エタノール抽出物において、蒸煮葉由来の抽出物は未蒸煮のものとは比べて褐変が顕著に抑えられていた。一方、エタノール抽出物においては、蒸煮葉由来の抽出物において、未蒸煮のものに比べて緑色が褪せており、色素の退色が認められた。

また、図 3A に示すように、固形分の抽出率は蒸煮ありとなしとでは差が認められなかった。抽出溶媒の違いで比較した場合、熱水抽出及び 50%エタノール抽出では差が認められなかったが、エタノール抽出においては抽出率の顕著な低下を示した。さらに、図 3B に示すように抽出物の総ポリフェノール含量は、熱水抽出及び 50%エタノール抽出においては、蒸煮なしに比し

表 1 アオモジ葉からの抽出条件

	抽出温度 (°C)	抽出時間 (分)	攪拌	試料量 (g)	溶媒量 (mL)		固液分離
					1st	2nd	
熱水	80	15-2回	なし	8	300	300	遠心分離
50% エタノール	25	30-2回	あり	8	160	80	遠心分離
エタノール	25	30-2回	あり	8	160	80	遠心分離

表 2 HP-AEC/PAD 条件

項目	条件
装置	ICS5000plus (Thermo Fisher Scientific Dionex)
カラム	Carbopac PA200, $\phi 3 \times 250$ mm with guard (Thermo Fisher)
移動相	A: water, B: 0.1 mol/L NaOH, C: 0.1 mol/L NaOH/0.6 mol/L CH ₃ COONa. 0→7.5 min: A80%/B20%, 7.5→9.5 min: B20%→100%, 9.5→12 min: B100%→C100%, with linear gradient, 12→15 min: hold at C100%.
流量	0.5 mL/min
検出	Pulsed amperometric detection
カラム温度	30°C
注入量	25 μL

て蒸煮ありにおいて顕著に増大した。エタノール抽出においては、逆に蒸煮ありにおいて顕著なポリフェノール含量の低下を示した。

抗酸化活性についても、図3Cに示すように、総ポリフェノール含量の増大に伴い蒸煮ありにおいて増大した（エタノール抽出においては評価せず）。

このような蒸煮の有無による外観や成分値の違いは、ポリフェノールの酸化に伴う褐変や成分の変質に起因するものと考えられる。アオモジ葉に含まれるポリフェノールオキシダーゼが蒸煮により失活することが、ポリフェノールの酵素的褐変を抑え、ポリフェノールや抗酸化活性の保持に働いたものと推察された。

アオモジ葉熱水抽出物及び50%エタノール抽出物において、曳糸性を伴う高粘性が認められたため、水抽出物における粘度を蒸煮処理の有無で比較したところ、蒸煮ありにおける粘度の上昇が認められた（図4、表3）。アオモジ葉における粘性成分として多糖類や糖タンパク質が考えられ、蒸煮処理はこれらの粘性高分子の抽出を促進する効果があるものと思われた。

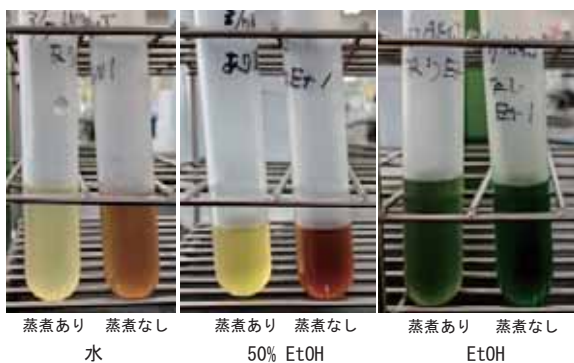


図2 アオモジ葉抽出物の外観

3.2 機能性成分の抽出率を志向した抽出条件の決定

アオモジ葉には粘性成分が含まれており、抽出条件によっては、抽出物の粘度上昇を引き起こすことが明らかとなった。抽出物を出発原料としてアオモジ由来ポリフェノール類の分画・精製を行う場合、粘性の高さは、作業効率を著しく低下させてしまう。一方、粘性高分子は、それ自体が水溶性食物繊維的な作用により生理機能性を有する可能性も考えられる。以上のことから、アオモジ葉の機能性評価試験やポリフェノール類の分画・精製を行う場合は、抽出条件と、ポリフェノール類及び粘性成分との関係性を把握しておくことが重要となる。そこで、抽出条件がポリフェノール類の抽出効率及び粘性に及ぼす影響について検討した。

乾燥アオモジ葉（蒸煮あり）を85℃熱水抽出、常温50%エタノール抽出及び常温80%エタノール抽出の3条件で抽出し、抽出物を得た。各抽出物の性状、ポリフェノール類の含量及び糖質含量を比較した。その結果、表4に示すように、熱水抽出物及び50%エタノール抽出物は高い粘性及び曳糸性を有しており、80%エタノール抽出物には粘性は認められなかった。また、表5に示すように、固形分当たりの総ポリフェノールの含量は、50%エタノール抽出物及び80%エタノール抽出物において熱水抽出物に比して上昇傾向を示した。糖質含量は、熱水抽出物が最も多く、50%エタノール抽出物、80%エタノール抽出物の順に低下した。エタノール抽出において認められた固形分抽出率の低下は、80%エタノール抽出においては認められなかった。

以上の結果から、適切な抽出溶媒を用いることによって、抽出物に含まれる機能性成分の量をコントロールすることが可能であり、粘性を排除し、高ポリフェノールを志向する場合は80%エタノール、粘性高分子を志向する場合は熱水抽出が望ましいと判断された。

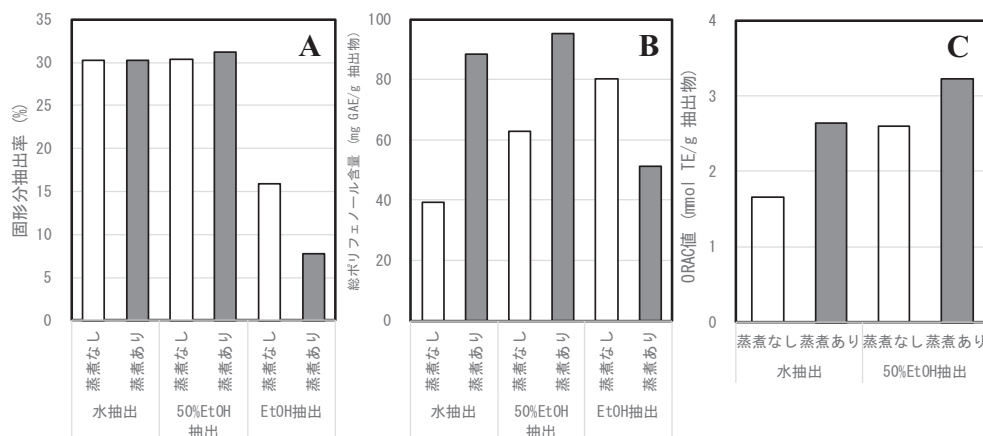


図3 アオモジ葉抽出物の固形分回収率、総ポリフェノール含量及びORAC値
EtOH：エタノール

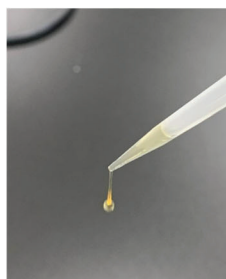


図4 アオモジ葉
熱水抽出物の粘性
(チップの先端に付けて
垂らしている状態)

表3 アオモジ葉熱水抽出物の粘度

粘度 (mPa・sec)	
蒸煮あり	2.56
蒸煮なし	1.93

表4 アオモジ葉抽出物の粘性比較

抽出条件	性状
熱水抽出	高い粘性と曳糸性
50%エタノール抽出	粘性と曳糸性が残存
80%エタノール抽出	粘性なし

表5 アオモジ葉熱水抽出物における成分含量の比較

	熱水	50%エタノール	80%エタノール
固形分抽出率 (%)	22.4	22.9	23.6
総ポリフェノール (mg GAE/g抽出物)	96.9	118.4	116.6
総糖 (mg/g抽出物)			
Fucose	N.D.	N.D.	N.D.
Rhamnose	8.1	40.4	20.8
Arabinose	243.2	50.0	4.0
Galactose	24.6	13.7	16.2
Glucose	182.1	128.8	60.2
Mannose	6.7	N.D.	1.9
Xylose	84.4	16.7	0.5
Galacturonic/glucuronic acid	N.D.	N.D.	N.D.
Total sugars	549.1	249.6	103.6

N.D.: 不検出

4. おわりに

アオモジはレモンのような芳香が特徴の植物で、これまで東南アジアを中心に、香辛料や精油など、香り特徴とする製品に広く用いられている。一方、日本国内において、アオモジ葉については、ハーブティーとして上市されているものの、食品としての活用は限定的であった。近年の研究の進展によりアオモジ葉の生理機能が明らかとなり、機能性食品の原料としての利用可能性が期待されている。

本研究では、アオモジ葉に多く含まれる抗酸化物質であるポリフェノール類及び粘性物質をターゲット成分とし、アオモジ葉の乾燥条件や抽出条件がこれらの成分の抽出率等に及ぼす影響について検討した結果、以下のことが明らかになった。

- 1) 熱水抽出物及び 50%エタノール抽出物において、蒸煮処理した葉から得られた抽出物は未蒸煮のものに比して褐変が顕著に抑えられた。一方、エタノール抽出物においては、蒸煮葉由来の抽出物において、未蒸煮のものに比して色素の退色が認めら

れた。

- 2) 総ポリフェノール含量並びに抗酸化活性は、熱水抽出及び 50%エタノール抽出においては、蒸煮無しに比して蒸煮有りにおいて顕著に増大した
- 3) 熱水抽出物及び 50%エタノール抽出物において、粘性の上昇が認められた。粘性は 80%エタノール抽出物においては消失していた。抽出物の粘性と糖質含量は正の相関を示したことから、アオモジ葉における多糖類や糖タンパク質の存在が示唆された。

これらの知見は、アオモジ葉を原料とした機能性食品の加工方法を確立するうえで有用な情報と考えられる。今後は、本知見を踏まえて他の研究機関とも連携しながらアオモジの種々の生理機能性と加工条件との関係性について検討を進める。また、新たな生理機能性の検証や有効成分の特定化に向けて研究開発を進展させる予定である。

なお、本研究に使用したマイクロプレートリーダー及び蛍光マイクロプレートリーダーは電源立地地域対

策交付金により導入した。

参考文献

- 1) 北村ら, 原色日本植物図鑑, 保育社, 545 (1979).
- 2) 古場ら, アオモジ葉の機能性に関する研究, 長崎県立大学 令和 3 年度学長裁量研究成果報告書 (様式 3 号) 3-3.
- 3) Asija et al, Study on Hypolipidaemic activity of *Litsea cubeba* leaves in rats, *Chemistry Research Journal*, 7(2):100-115 (2022).
- 4) Wong et al, The leaves of the seasoning plant *Litsea cubeba* inhibit the NLRP3 inflammasome and ameliorate dextran sulfate sodium-induced colitis in mice, *Front. Nutr. Sec. Nutr. Immunology*, 9 (2022).
- 5) 渡辺純, 沖智之, 竹林純, H-ORAC 分析法標準作業手順書, 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所 (2013).
- 6) 柘植圭介, 鶴田裕美, 佐藤真佐恵, 吉村臣史, 海藻由来脂質における抗炎症作用の解明とその活用 (2) -スサビノリにおける抗炎症性脂質の特定-. 平成 25 年度佐賀県工業技術センター報告, 19-28 (2014).
- 7) 鶴田裕美, 吉村臣史, 澤田和敬, 柘植圭介, 農産物の機能性を強化する加工条件の構築と応用, 平成 28 年度佐賀県工業技術センター報告, 49-53 (2017).

※本研究は令和 5 年度に実施しましたが, 知的財産保護の観点から令和 6 年度の報告書に掲載しました。

環境に優しい水性塗料用紫外線吸収剤に関する研究（第2報）

—耐候性に及ぼすバイオマス成分の影響—

材料環境部

久間俊平 田栗有樹 帆秋圭司

矢野昌之

近年、気候変動等の環境問題から、カーボンニュートラルの達成と同時に産業競争力を高める取組みが重要になってきている。このような中、県内の家具・木工、建築、塗料産業では、低環境負荷でありながら、木質感を損なわない水性クリア塗料が求められており、耐候性の向上と更なる環境負荷の低減が必要である。本研究では、バイオマス含有成分を利用した下塗り塗料について耐候性向上を検討した。その結果、紫外線吸収や酸化防止の機能を有するルチンを利用することで、耐候性試験初期において色差変化を抑制できることが明らかとなった。また、シリコーンを樹脂成分とすることで、撥水度の劣化を抑制できることが確認できた。

1. はじめに

近年、気候変動や地球温暖化等の環境問題から、カーボンニュートラルの達成と同時に産業競争力を高める取組みが重要になってきている。国においては「2050年カーボンニュートラルに伴うグリーン成長戦略」が策定されており、佐賀県においても、GX（グリーントランスフォーメーション）の推進に取り組んでいる。

このような中、県内の家具・木工、建築、塗料業界では、低環境負荷でありながら、木質感を損なわない塗料が求められている。水性クリア塗料は、木質感を損なわず VOC（揮発性有機化合物）排出量も少ないため低環境負荷であるが、耐候性に課題がある。また、持続可能なバイオマス資源由来材料の利用等、より一層の環境負荷低減に対する要求も大きい。

木材用水性塗料の耐候性劣化の原因は、紫外線や熱及び水による分解、水分吸収に伴う木材の寸法変化による塗膜剥離や割れ等が考えられる。特にクリア塗料は紫外線を透過させるため基材の木質部まで劣化するため、塗装物の耐候性に対し更に影響を与える¹⁾。

当センターでは環境に優しい木材用水性塗料の耐候性向上を目指して研究を行っており、バイオマス資源由来原料を用いた木材用水性塗料の機能性添加剤の中で、撥水度と初期の保色性に対して紫外線吸収剤(UVA)の影響が大きいことを明らかにした²⁾。

また、高強度・高比表面積・分散性向上等の様々な

特性を有するセルロースナノファイバー(CNF)³⁾の利用により木材の色変化及び塗膜割れ等の劣化が抑制されることを報告した⁴⁾。これまでに得られた知見を基にして、昨年度は、木材用水性塗料の更なる環境負荷の低減を実現するため、CNFと共にバイオマス資源に含有され紫外線吸収能を有する芳香族化合物⁵⁾であるフェルラ酸について検討を行ったが、光反応性や添加方法等から十分な耐候性向上効果を得ることはできなかった⁶⁾。

本報では、CNFと共にソバや柑橘類等に含有され、紫外線吸収能や酸化防止能を有するルチンをUVAとして利用した塗料に関し木材塗装物の耐候性への影響について検討した結果を報告する。

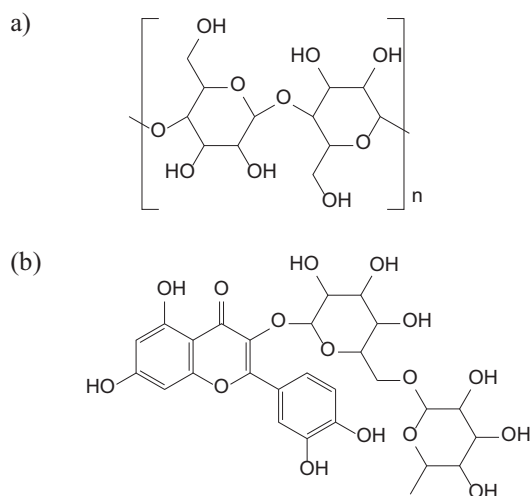


図1 構造式 (a)セルロース, (b)ルチン

2. 実験方法

2.1 試薬

低環境負荷のUVAとしてルチン（富士フイルム和光純薬製）をミキサーミル（ヴァーダー・サイエンティフィック製，MM 500 VARO）にて微細化して使用した。樹脂補強材及びルチンの水分散剤としてCNF（中越パルプ工業製，nanoforest-S B-SB1，竹原料，濃度 1.13%）を選定した。セルロース及びルチンの構造式について，図1に示す。また，水性クリア塗料の樹脂成分として，耐候性に優れるシリコンエマルジョン（信越化学工業製，KM-9772，濃度 40wt%）を用いた。その他，希釈溶剤としてイオン交換水（IEW）を使用した。

2.2 塗料の調製

樹脂成分，CNF 分散液，UVA，IEW のうち，2 種以上を混合振盪し，種々の水性塗料を調製した。それらの組成を表1に記載する。

2.3 吸光度測定

試薬の吸光度測定は，試薬をエタノールへ溶解させた後，石英セルを用いて，紫外可視分光光度計（島津製作所製，UV-3600）により測定した。

2.4 試験片

屋外暴露試験を実施するため，75mm×50 mm のスギ材（板目，厚さ 5mm，研磨紙#240 で研磨）に，始めに下塗りとして塗料①又は②を片面のみに1回塗布（刷毛，塗布量 100g/m²）し乾燥させた。次に塗料③を1回塗布（刷毛，塗布量 100g/m²）することで2層の試験片を作製した。比較試料として，下塗りなしに塗料③を1回（刷毛，塗布量 100g/m²）のみ塗布した試験片を作製した。

一般的な木製品を想定した促進耐候性試験を実施するため，100mm×50 mm のレッドオーク材（板目，厚さ 10mm，研磨紙#240 で研磨）に，始めに下塗りとして塗料②又は④を片面のみに1回塗布（刷毛，塗布量 100g/m²）し乾燥させた。次に上塗りとしてUVAを含有する市販アクリル系水性クリア塗料を2

回塗布（刷毛，塗布量 100g/m²）した。比較試料として，下塗りなしに市販アクリル系水性クリア塗料を2回（刷毛，塗布量 100g/m²）のみ塗布した試験片を作製した。ここで，1 回目の市販アクリル系水性塗料の塗布乾燥工程後に研磨紙#400 で研磨を行った。また，裏面及び端面にも同じ市販塗料を塗布し試験片を各2枚ずつ合計6枚を作製した。

2.5 表面観察

塗膜表面形状の観察には，走査電子顕微鏡（日立ハイテク製，SU5000）を用いて塗粒の分散状態を観察した。

2.6 色差評価

色差 (ΔE^*ab) の評価のために， $L^*a^*b^*$ 色空間における明度 L^* ，色度 a^* ， b^* について，試験片毎に4か所ずつ測色計（コニカミノルタジャパン製，CM-700d）により測定し，平均値を計算に用いた。それぞれの塗装後の木材試験片を基準に，屋外暴露試験及び促進耐候性試験を実施した後の試験片の変化量 ΔL^* ， Δa^* ， Δb^* を求め，計算式 (1) から色差を算出した。色差 (ΔE^*ab) は値が小さいほど色変化が小さい。

$$\Delta E^*ab = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2} \cdots (1)$$

2.7 撥水度

塗膜の保護機能を確認するために，撥水度を測定した。森林総研法⁷⁾により塗装面に約 1g の IEW を滴下し，1 分後に拭き取り，滴下前と拭き取り直後の試験片の質量を測定し，試験片に浸透しなかった脱イオン水の質量百分率を撥水度とした。数値が高いほど撥水度は高くなる。

2.8 屋外暴露試験

佐賀市において，試験片を南向き傾斜 45 度で，光酸化反応による色変化の大きい初期 15 日間 (12 月) に屋外暴露した。耐候性の評価として 5 日ごとの色差変化を測定した。

2.9 促進耐候性試験

屋外暴露試験を再現性良く，より短時間に試験するために，促進耐候性試験機（Q-Lab 製，Q-SUN Xe-3-HSE）を用いた。試験条件は，JIS K 5600-7-7（キセノンランプ法）に基づき放射照度を 60W/m²（ディライトフィルター利用，300nm - 400nm），ブラックパネル温度を 50℃（色の変化を試験するため），試験槽空気温度を 38℃，乾燥期間中の相対湿度を 50% に設定し，ぬれ時間 18 分・乾燥期間 102 分のサイクルで実施した。耐候性の評価として試験開始前，100 時間，500 時間，700 時間及び 1000 時間経過時の色差変化及び撥水度を測定した。

表1 塗料の組成 (wt%)

試料名	シリコンエマルジョン	CNF 分散液	ルチン	IEW
塗料①	—	88.5	—	11.5
塗料②	—	88.5	1.0	10.5
塗料③	50	—	—	50
塗料④	12.5	44.2	0.5	42.8

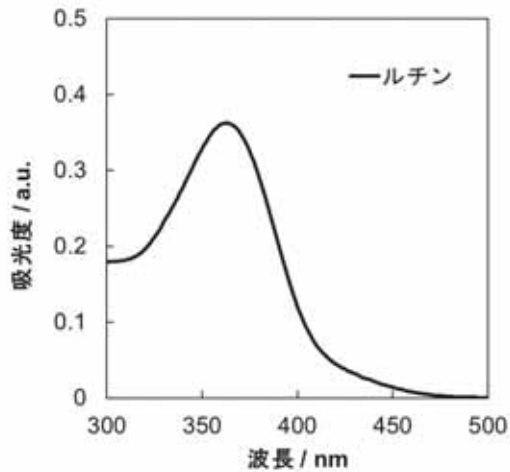
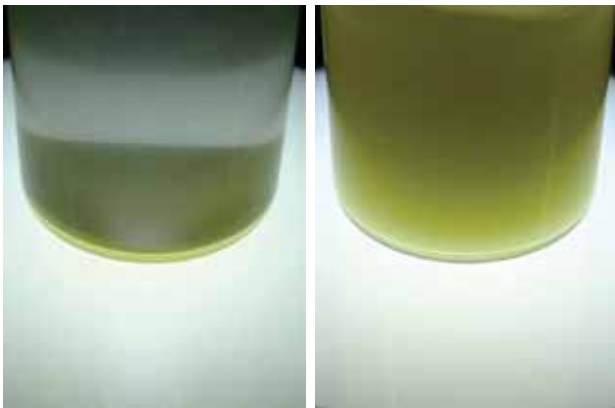


図2 ルチンの吸光度

図3 ルチンの水分散に対する CNF の効果
(左：CNF 無し，右：CNF あり)

3. 結果及び考察

3.1 下塗り塗料としての評価

ルチンのエタノール溶液中での吸光度を図2に示す。このことから、ルチンは300nm～400nmの波長範囲で紫外線吸収能を有するため、紫外線による劣化を減少し、耐候性の向上が期待できることがわかる。

また、木材用塗料は一般的に複数の塗料を使った重ね塗りが行われている。下塗り塗料は塗装物外観への影響が小さいため、耐候性向上効果があれば、より多くの施工場面での利用が見込まれる。そこで、今回の塗料を下塗り塗料として検討を行った。

ここで、ルチンを IEW へそのまま添加した場合、溶解せず沈殿し UVA として利用できないため、CNF 分散液を利用することを検討した。試薬ルチンの水分散に対する CNF の効果を図3に示す。CNF 分散液を利用することにより、ルチンを水中に分散できることが確認された。

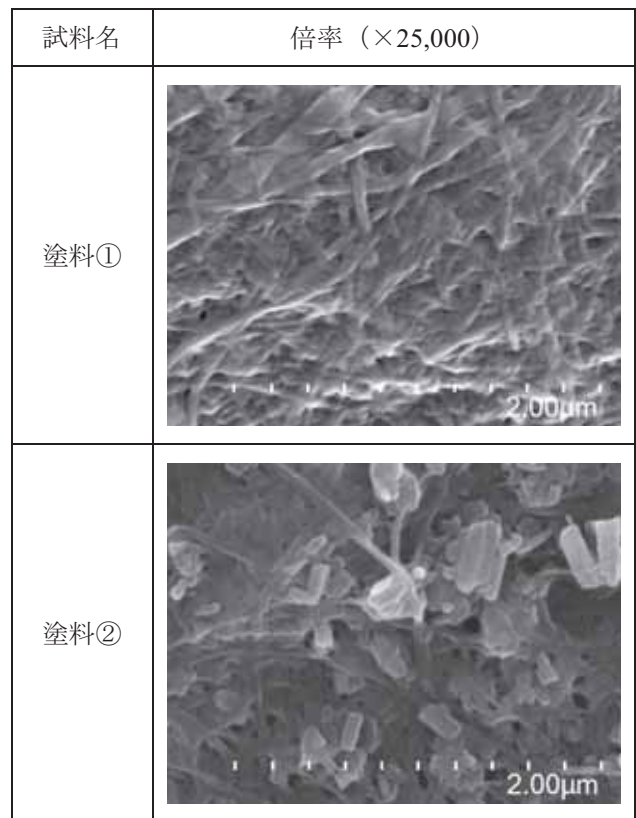


図4 表面観察結果

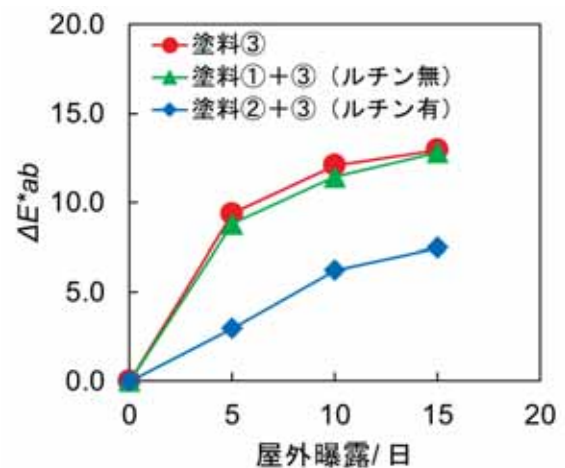


図5 塗装木材の屋外暴露試験による色差変化

また、ルチンの耐候性向上効果を検証するため、ルチンを含有する塗料②と、含有しない塗料①を調製した。下塗りとして塗料①又は②を木材へ塗布した表面観察結果を図4に示す。塗料①ではCNFのみが観察されるのに対して、塗料②では数百 nm サイズのルチン微粒子が均一に分散していることが確認できる。また、塗料②を塗布した試料について、わずかに黄緑色の着色が確認された。これは、図2に

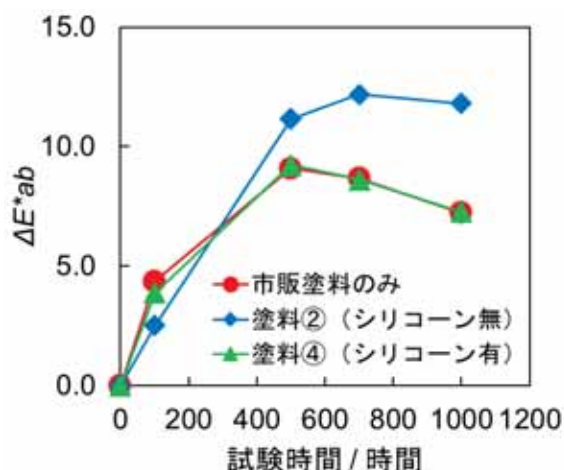


図6 塗装木材の促進耐候性試験による色差変化

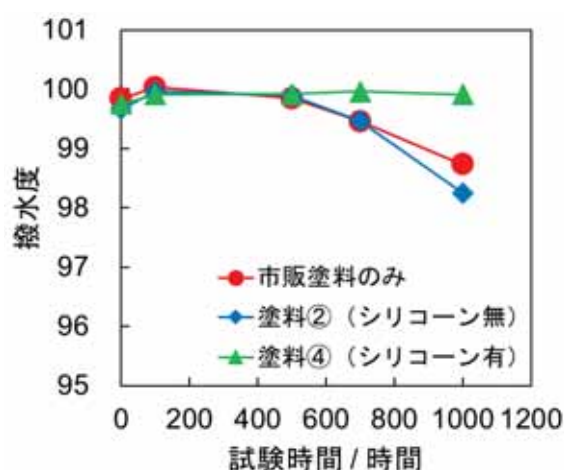


図7 塗装木材の促進耐候性試験による撥水度変化

示す 400nm～470nm の波長範囲における、ルチンの光吸収によると考えられる。

その後、上塗りとして塗料③を塗布し、耐候性評価のために屋外暴露試験を実施しながら、色差測定を行った時の色差の変化を図5に示す。その結果、ルチンの添加により色差変化を大きく減少させることが確認された。このことから、屋外暴露試験初期において、ルチンに耐候性向上効果があることが確認できた。

3.2 促進耐候性試験による評価

下塗り塗料として、短期間での屋外暴露試験においてはルチンの耐候性効果が確認できたが、長期間にわたり耐候性が維持されるか確認する必要がある。そこで、レッドオーク材への下塗りとして塗料②又は④を塗装後、上塗りとして市販水性クリア塗料を塗布し、促進耐候性試験を行った。なお、塗料④はシリコーン樹脂により耐水性の向上をねらっている。促進耐候性試験後における、色差と撥水度の評価を

それぞれ図6及び図7に示す。

結果として、塗料②（シリコーン無し）は、市販塗料のみと比較して 100 時間後には色差変化が少なく、耐候性が向上していることが確認されたが、試験時間の増加とともに色差は大きく変化することから耐候性の悪化がみられた。しかし、塗料④（シリコーン有り）は、色差について 100 時間後では僅かに抑制され、試験時間が増加することで市販塗料のみの場合と同程度の色差となっており、市販塗料と同等の耐候性を有していることがわかった。一方、塗料④の撥水度は長時間の試験において低下せず、改善効果が確認できた。しかし、シリコーンは撥水性が高く、上塗り塗料の種類によっては塗料のハジキを発生してしまうため、樹脂成分について更なる検討が必要である。

ここで、塗料②の色差変化の理由として、ルチンは紫外線吸収能を有し、初期には木材の変色を防止するが、ルチン自体が紫外線や水分により劣化すること、CNF は親水性であるために吸水し、ルチンが徐々に溶出すること等が考えられる。塗料④の撥水度低下を抑制する理由として、シリコーンを樹脂成分とすることで、ルチンの溶出や劣化が防止されていることが考えられる。

4. おわりに

本研究では木材用の塗料に関して、環境負荷の低減及び耐候性の向上を実現するため、バイオマスに含有される CNF 及びルチンを水性クリア塗料の原料として用い、短期的な屋外暴露試験や促進耐候性試験による長期的な耐候性について検討を行った。

その結果、ルチンを利用することにより、短期的に耐候性の色差変化を抑制できることが明らかとなった。ただし、色差変化に対して長期的な耐久性等に課題があることから、今後更なる検討が必要である。

また、シリコーンを樹脂成分とし、ルチンを添加した塗料では、色差変化は市販品と同等を維持すると共に、木材の撥水度低下を抑制できることが明らかとなった。

本研究を実施するにあたって使用したミキサーミル、走査電子顕微鏡、紫外可視分光光度計、促進耐候性試験機は電源立地地域対策交付金により導入した。

参考文献

- 1) 木口実, 改訂版木材の塗装, 木材塗装研究会編,

- 海青社, 235-237 (2010).
- 2) 久間俊平, 田栗有樹, 帆秋圭司, 平井智紀, 矢野昌之, 福元豊, 佐賀県工業技術センター研究報告書, No.29, 41-45 (2021).
 - 3) (a) 矢野浩之, 今井友也, 工業材料, Vol.65, No.8, 18-23 (2017). (b) 近藤哲男, 工業材料, Vol.65, No.8, 40-45 (2017).
 - 4) 久間俊平, 帆秋圭司, 矢野昌之, 平井智紀, 田栗有樹, 佐賀県工業技術センター研究報告書, No.31, 47-51 (2023).
 - 5) (a) Douglas R. Hayden, Heleen V. M. Kibbelaar, Arnout Imhof, Krassimir P. Velikov, RSC Adv., 8, 25104-25111 (2018). (b) Yongfang Qian, Mengjie Qi, Laijiu Zheng, Martin W. King, Lihua Lv, Fang Ye, Materials, 9, 504 (2016). (c) S. Saijo, M. Shibata, C. Izawa, J. Jpn. Soc. Colour Mater., Vol.96, No.3, 108-112 (2023).
 - 6) 久間俊平, 帆秋圭司, 矢野昌之, 田栗有樹, 佐賀県工業技術センター研究報告書, No.32, 41-45 (2024).
 - 7) (財) 日本住宅・木材技術センター: マニュアル作成事業報告書 (木材保護着色塗料品質評価) (1998).

環境に優しい水性塗料用紫外線吸収剤に関する研究（第3報）

－紫外線吸収剤担持体へのマイクロカプセルの利用検討－

材料環境部

田栗有樹 帆秋圭司 久間俊平

矢野昌之

木材用水性塗料の耐候性向上のため、バイオマス資源由来の紫外線吸収剤（UVA）を塗料成分から隔離し、塗膜中で長期に渡り保持することを目的としてバイオマス資源由来 UVA をマイクロカプセルに固定化する方法を検討した。本報告では、多孔質マイクロカプセルの合成条件について検討し、ホモジナイザー利用により粒径をより小さくできること、多孔質マイクロカプセル表面状態への塩の種類の影響及び凝集を防ぐ分散剤濃度の影響について明らかにした。また、UVA 担持体の合成ではマイクロカプセルの原料溶液を UVA 共存下で重合させて UVA 担持体を得る方法及び多孔質マイクロカプセルに UVA を担持させる方法を検討し、紫外線吸収能を保持した UVA 担持体を得た。

1. はじめに

近年、気候変動や地球温暖化等の環境問題から、カーボンニュートラルの達成と同時に産業競争力を高める取組みが重要になってきている。国においては「2050年カーボンニュートラルに伴うグリーン成長戦略」が策定されており、佐賀県においても、GX（グリーントランスフォーメーション）の推進に取り組んでいる。

このような中、県内の家具・木工、建築、塗料業界では、低環境負荷でありながら、木質感を損なわない塗料が求められている。水性クリア塗料は、木質感を損なわず VOC（揮発性有機化合物）排出量も少ないため低環境負荷であるが、耐候性に課題がある。また、持続可能なバイオマス資源由来材料の利用等、より一層の環境負荷低減に対する要求も大きい。

木材用水性塗料の耐候性劣化の原因は、紫外線や熱及び水による分解、水分吸収に伴う木材の寸法変化による塗膜剥離や割れ等が考えられる。特にクリア塗料は紫外線を透過させるため基材の木質部まで劣化が容易に進行し、塗装物の耐候性に対し更に影響を与える¹⁾。

当センターでは環境に優しい木材用水性塗料の耐候性向上を目指して研究を行っており、バイオマス資源由来原料を用いた木材用水性塗料の機能性添加剤の中で、撥水度と初期の保色性に対して紫外線吸収剤(UVA)の影響が大きいことを明らかにした²⁾。また、高強度・高比表面積・分散性向上等の様々な

特性を有するセルロースナノファイバー(CNF)³⁾の利用により木材の色変化及び塗膜割れ等の劣化が抑制されることを報告した⁴⁾。これまでに得られた知見を基に、昨年度は木材用水性塗料の更なる環境負荷の低減を実現するため、CNFと共にバイオマス資源に含有される芳香族化合物を UVA とした時の耐候性への影響について検討を始めた⁵⁾。今年度はバイオマス資源由来 UVA であるルチンを用いて木材塗装物の耐候性向上についての検討を進めている。

UVA は紫外線の強いエネルギーが塗膜成分や木材成分を劣化・分解する代わりに、そのエネルギーを吸収し熱として放出することにより塗膜や木材を保護する役割がある⁶⁾。そのため長時間の紫外線照射にも安定で、塗料中では溶媒に分散し易く塗膜中では滲出などによる流出がないことが望まれる。一方、バイオマス資源由来 UVA の添加剤機能に関する事前調査で、塗膜成分の重合阻害及び塗膜からの流出が確認された。そこで本研究では、バイオマス資源由来 UVA を塗料成分から隔離し、塗膜中で長期に渡り保持することを目的としてマイクロカプセルに固定化する方法を検討した。なお、マイクロカプセルはマイクロサイズの粒子であり、外殻を形成するシェルやそこに内包させる芯物質を選択することにより様々な機能を持たせることが可能であり、既に情報記録、化粧品、医薬品、農業土木分野等において利用されている⁷⁾。本報では、多孔質マイクロカプセルの合成及びそれら UVA 担持体の紫外線吸収能について検討した結果を報告する。

2. 実験方法

2.1 多孔質マイクロカプセルの合成

トリメチロールプロパントリメタクリラート (3.4 g), 2,2'-アゾビス (4-メトキシ-2,4-ジメチルバレロニトリル) (0.06 g), 縮合リシノレイン酸ヘキサグリセリン (0.18 g) 及びトルエン (0.4 g) を混合させた溶液に NaCl 又は KNO₃ 水溶液 (1.5 M, 530 µl) を加え, スターラー又はホモジナイザーで攪拌することで一次エマルションを調整した. ポリビニルアルコール (PVA) とドデシル硫酸ナトリウム (0.02 g) の混合溶液に一次エマルションを加え二次エマルションとし, 重合のため 60℃ で 1 時間保持した. 得られた白色固体を単離し, イオン交換水及びエタノールで洗浄後, 60℃ で一晩乾燥させて目的物 (MC1~MC4) を得た. 合成に用いた塩の種類, 攪拌方法及び分散剤濃度については表 1 に示す.

2.2 UVA 担持体の調整

2.2.1 多孔質マイクロカプセルを利用した UVA 担持体の調整

金属塩 (塩化鉄(III)六水和物, 硝酸銅(II)三水和物) のエタノール溶液に一晩浸漬させた多孔質マイクロカプセル (MC1~MC4) を単離後, イオン交換水及びエタノールで洗浄した. これらを UVA のエタノール溶液に一晩浸漬し, 単離後, イオン交換水及びエタノールで洗浄し, 65℃ で乾燥させて目的物を得た. 試料番号については表 2 に示す. なお, 蛍光 X 線分析から金属元素が含まれていることを確認している.

2.2.2 直接混合による UVA 担持体の調整

多孔質マイクロカプセルの UVA 担持体との比較のために, 多孔質マイクロカプセルの骨格樹脂と UVA を直接混合させて得られる UVA 担持体を合成した.

トリメチロールプロパントリメタクリラート (3.4 g), 2,2'-アゾビス (4-メトキシ-2,4-ジメチルバレロニトリル) (0.06 g) の混合物に UVA のトルエン (0.4 g) 溶液をスターラーで 10 分間攪拌した. 得られた混合溶液を 2%PVA 水溶液 (26 ml) へ滴下, 室温で 10 分, 60℃ で 1 時間攪拌しながら重合させた. 得られた固体を単離し, イオン交換水及びエタノールで洗浄後, 65℃ で一晩乾燥させて目的物を得た. UVA としてケルセチンを直接担持させた化合物を MC-Q, フェルラ酸を直接担持させた化合物を MC-F と表記する.

2.3 多孔質マイクロカプセル及びその UVA 担持体の評価

粒子の形状は走査電子顕微鏡 ((株) 日立ハイテク, SU5000) の低真空モードで観察し, 拡散反射は

表 1 多孔質マイクロカプセル合成条件の詳細

試料番号	攪拌方法	塩の種類	分散剤
MC1	スターラー	NaCl	2wt%PVA
MC2	スターラー	KNO ₃	2wt%PVA
MC3	ホモジナイザー	KNO ₃	2wt%PVA
MC4	ホモジナイザー	KNO ₃	4wt%PVA

表 2 多孔質マイクロカプセル UVA 担持体の詳細

試料番号	MC の試料番号	金属種	UVA
MC1-Fe-Q	MC1	Fe(III)	ケルセチン
MC1-Cu-Q		Cu(II)	ケルセチン
MC1-Fe-F		Fe(III)	フェルラ酸
MC1-Cu-F		Cu(II)	フェルラ酸
MC2-Fe-Q	MC2	Fe(III)	ケルセチン
MC2-Cu-Q		Cu(II)	ケルセチン
MC2-Fe-F		Fe(III)	フェルラ酸
MC2-Cu-F		Cu(II)	フェルラ酸
MC3-Fe-Q	MC3	Fe(III)	ケルセチン
MC3-Cu-Q		Cu(II)	ケルセチン
MC3-Fe-F		Fe(III)	フェルラ酸
MC3-Cu-F		Cu(II)	フェルラ酸
MC4-Fe-Q	MC4	Fe(III)	ケルセチン
MC4-Cu-Q		Cu(II)	ケルセチン
MC4-Fe-F		Fe(III)	フェルラ酸
MC4-Cu-F		Cu(II)	フェルラ酸
MC-Q			ケルセチン
MC-F			フェルラ酸

紫外可視分光光度計 ((株) 島津製作所, UV-3600) で測定した. 細孔分布測定は細孔分布測定装置 ((株) 島津製作所, オートポア 9520) により測定した.

3. 結果及び考察

3.1 多孔質マイクロカプセルの形状に及ぼす合成条件の検討

エマルション合成時の攪拌にスターラーまたはホモジナイザーを選択した時の, 多孔質マイクロカプセルの粒径への影響について, 電子顕微鏡で観察した結果を図 1 に示す. スターラーを使用した MC1 及び MC2 (図 1 (a), (b)) は粒径が 50~100 µm だったのに対し, ホモジナイザーを使った MC3 及び MC4 (図 1 (c), (d)) は 50 µm 以下とホモジナイザーで攪拌した方が粒径が小さかった.

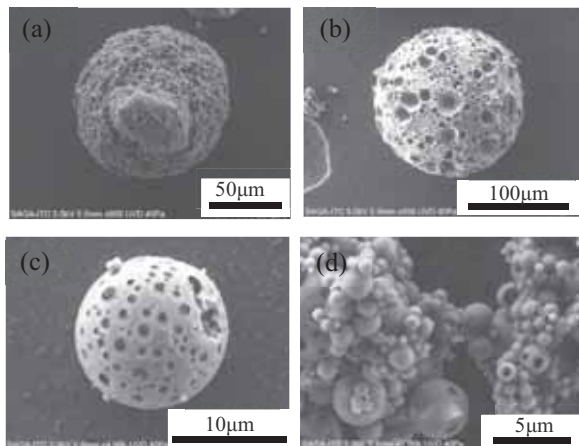


図1 多孔質マイクロカプセルの電子顕微鏡画像
(a) MC1, (b) MC2, (c) MC3, (d) MC4

NaCl 又は KNO_3 水溶液は一次エマルションの芯物質であり、重合過程で排出されることにより多孔質マイクロカプセルに孔を形成する⁸⁾。スターラーで攪拌して得た多孔質マイクロカプセルにおいて、 KNO_3 水溶液を用いて得られた MC2 は、NaCl 水溶液を用いた MC1 よりも表面が滑らかな球状で、孔もはっきりと確認できている。

重合して生成する多孔質マイクロカプセルの分散安定剤である PVA の影響を検討するために、PVA 濃度を変化させホモジナイザーで攪拌して得た多孔質マイクロカプセル MC3 及び MC4 を得た。どちらも多孔質マイクロカプセル内部には球状の空隙が見られたが、PVA の濃度が高い場合 (MC4) は、PVA の濃度が低い場合 (MC3) に比べて小さい粒子 ($10\ \mu\text{m}$ 以下) が凝集しており、表面に見られる孔は明らかに MC3 よりも少なかった。

3.2 多孔質マイクロカプセルの細孔分布

水銀圧入法で測定した多孔質マイクロカプセルの細孔分布プロットを図2に示す。MC4 以外は $0.1\sim 100\ \mu\text{m}$ の領域に大きく2つのピークを示している。水銀圧入法から得られる細孔直径は隣り合うマイクロカプセル間の空隙と多孔質マイクロカプセルが有する細孔直径を含む細孔分布となっている。従って、電子顕微鏡観察の画像から、 $1\ \mu\text{m}$ 付近のピークは多孔質マイクロカプセルが有する細孔直径であり、 $100\ \mu\text{m}$ 付近に見られるピークは多孔質マイクロカプセル間に生じる空隙に由来する分布と考えられる。

MC1 の細孔直径に由来するメディアン径は $0.2\ \mu\text{m}$ 、MC2 は $0.8\ \mu\text{m}$ 、MC3 は $0.7\ \mu\text{m}$ で、MC1 は鋭

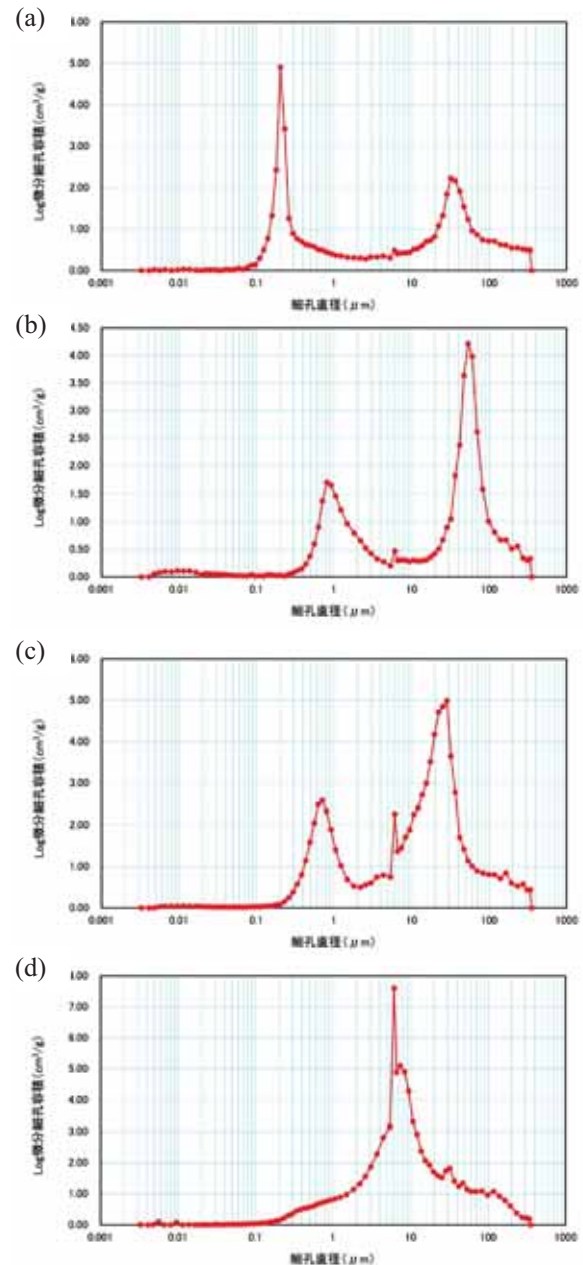


図2 水銀圧入法による多孔質マイクロカプセルの細孔分布プロット
(a) MC1, (b) MC2, (c) MC3, (d) MC4

いピークであることから均一な細孔直径を持つ孔が分布していることが推定される。

ここで、MC4 の細孔分布は細孔直径 $6.1\ \mu\text{m}$ 付近に幅広く分布している。これは、図1の電子顕微鏡の観察結果からも明らかなように、MC4 は他3つのマイクロカプセルと異なり微細粒子が密に凝集しているため、多孔質マイクロカプセル間の隙間と多孔質マイクロカプセルが有する細孔が混在した分布となっているためと考えられる。

3.3 UVA 担持体の紫外線吸収能の検討

当センターにおける水性塗料に関連する研究では、材料として環境負荷の低いバイオマス資源由来物質を活用してきた。本研究でも同様の観点から UVA として玉ねぎの皮等の食物に含まれるケルセチン、玄米や米糠に多く含まれるフェルラ酸を用いた。担持方法には、多孔質マイクロカプセルに UVA を担持させる方法とマイクロカプセル合成時に UVA を混合することにより担持させる方法の2つの方法で UVA 担持体を合成した。以下、それぞれ、多孔質マイクロカプセル担持体、直接担持体と表記し比較検討を行う。

UVA 担持後も紫外線吸収能力が保持されているか確認するために、拡散反射スペクトルを測定した。拡散反射率(R%)が高いほど“光を反射＝光を吸収しにくい”，低いほど“光を反射しにくい＝光を吸収しやすい”ことを示す⁹⁾。

図3には多孔質マイクロカプセル担持体の拡散反射スペクトルを示した。なお、比較のためにマイクロカプセルに担持していないフェルラ酸またはケルセチン、担体とした多孔質マイクロカプセルについては MC1～MC4 の拡散反射スペクトルがほぼ一致していたため MC3 のスペクトルを示した。

紫外線領域において、全ての多孔質マイクロカプセル担持体の拡散反射率は担体とした多孔質マイクロカプセル(図3では代表して MC3 を示している)よりも低く、UVA 担持後には紫外線吸収能が付与されていることが確認できた。いずれの結果においても MC4 を担体とした場合が最も拡散反射率が高く、MC4 は微細粒子の集合体であり表面に細孔がほとんど確認できない等、MC1～MC3 とは異なる特徴が影響していると考えられる。Fe(III)化合物(図3(a)及び(c))の方が Cu(II)化合物(図3(b)及び(d))よりも拡散反射率が低く、金属イオンにより紫外線吸収能に違いが見られた。多孔質マイクロカプセルに対する金属イオンの反応量は算出できていないが、合成時の目視による確認で Fe(III)化合物が明らかに茶色に着色しているのに対して Cu(II)化合物は殆ど着色が確認できなかった。このことから、Cu(II)の反応量が微量のため UVA も微量となり、紫外線吸収能も低くなったと推察される。以上より、多孔質マイクロカプセル担持体では UVA の担持には金属イオンが関わっていることが示唆された。

図4には直接担持体の拡散反射スペクトルを示した。直接担持体のスペクトルはUVA を含まない MC3 のスペクトルとは大きく異なり、UVA 自身と同等の

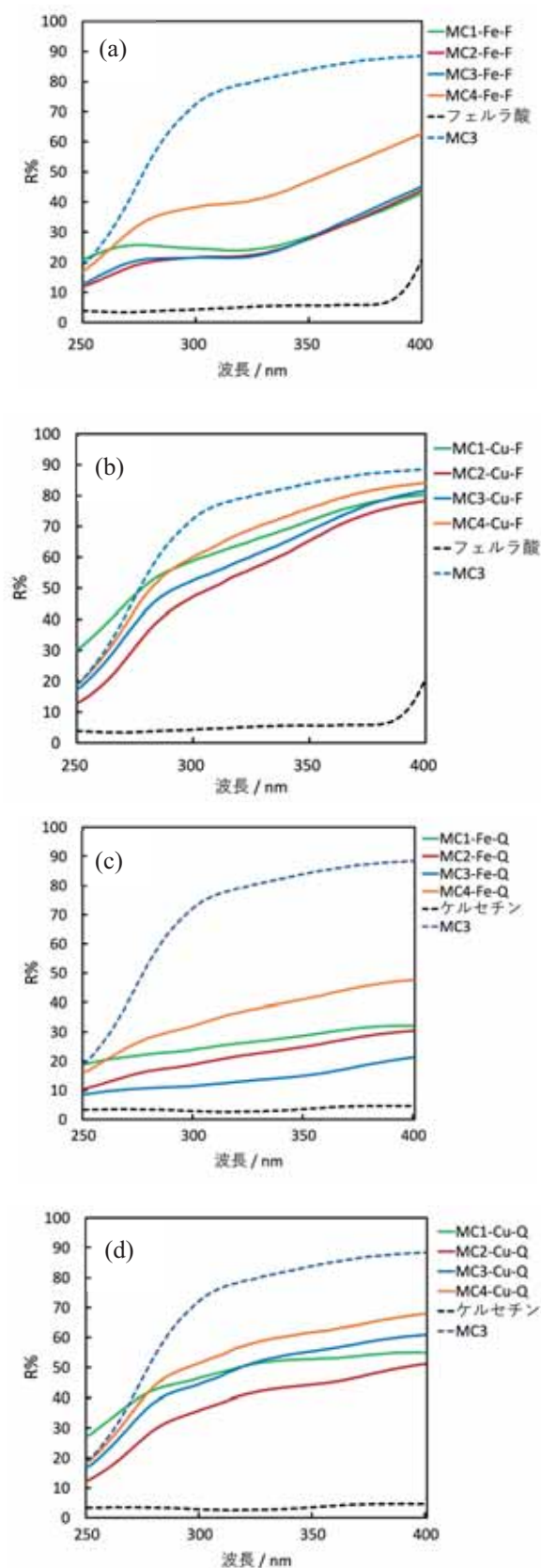


図3 拡散反射スペクトル
(a)MC_n-Fe-F, (b)MC_n-Cu-F,
(c)MC_n-Fe-Q, (d)MC_n-Cu-Q (n = 1~4)

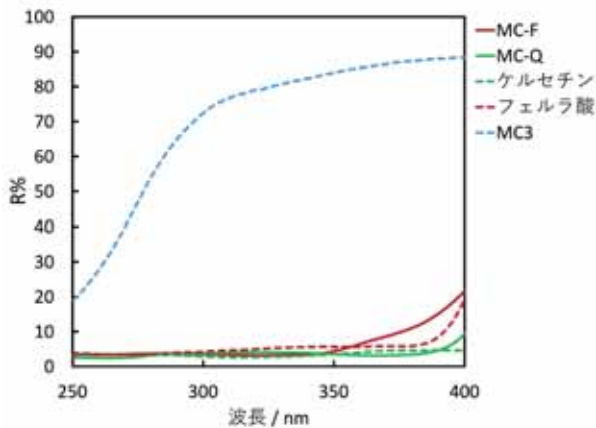


図4 MC-Q及びMC-Fの拡散反射スペクトル

紫外線吸収能を有していた。

今後は本研究で合成したそれぞれの担持体に対して、粒子中に取り込まれたUVAの安定性について検討を行う予定である。

4. おわりに

バイオマス資源由来UVAを塗料成分から隔離し、塗膜中で長期に渡り保持することを目的として、バイオマス資源由来UVAをマイクロカプセルに固定化する方法を検討した。直径約30～50μmの多孔質マイクロカプセルにCu(II)及びFe(III)とUVAの反応を利用してUVAを担持させる方法とマイクロカプセルの重合反応の際にUVAを共存させUVAが分散された球状粒子を得る方法でUVA担持体を得た。

UVA担持体の拡散反射スペクトルから、得られた化合物はいずれも紫外線吸収能を維持していることが確認できた。特に、直接担持体は担持させたUVA自身と同程度の紫外線吸収能を維持しており、今後、担持体となったことによる性質の変化の解明に取り組む予定である。また、本研究で合成したUVA担持体の塗膜中における安定性及び塗料に混合した時の塗膜の耐候性に対する影響について検討していく予定である。

本研究に使用した走査電子顕微鏡及び紫外可視分

光光度計は電源立地地域対策交付金で導入した。

最後に、本研究の実施にあたり、マイクロカプセルの合成方法をご指導いただいた独立行政法人 国立高等専門学校機構 都城工業高等専門学校の清山史朗教授に感謝いたします。また、細孔分布及び比表面積測定を実施いただいた佐賀県窯業技術センターの釘島特別研究員に感謝いたします。

参考文献

- 1) 木口実, 改訂版木材の塗装, 木材塗装研究会編, 海青社, 235-237 (2010).
- 2) 久間俊平, 田栗有樹, 帆秋圭司, 平井智紀, 矢野昌之, 福元豊, 佐賀県工業技術センター研究報告書, No.29, 41-45 (2021).
- 3) (a) 矢野浩之, 今井友也, 工業材料, Vol.65, No.8, 18-23 (2017). (b) 近藤哲男, 工業材料, Vol.65, No.8, 40-45 (2017).
- 4) 久間俊平, 帆秋圭司, 矢野昌之, 平井智紀, 田栗有樹, 佐賀県工業技術センター研究報告書, No.31, 47-51 (2023).
- 5) 久間俊平, 帆秋圭司, 矢野昌之, 田栗有樹, 佐賀県工業技術センター研究報告書, No.32, 41-45 (2024).
- 6) (a) 飛田成史, 小林敦, 吉原利忠, 島田博文, オレオサイエンス, 第7巻第9号 363-370 (2007). (b) 高木功男, 色材協会誌, 44(10), 483-490 (1971).
- 7) 田中真人, 日本画像学会誌, 第59巻, 第4号, 367-375 (2020).
- 8) (a) 清山史朗, 塩盛弘一郎, 河野恵宣, 幡手泰雄, 宮崎大学工学部紀要 第31号, 1-16. (b) 塩盛弘一郎, 河野恵宣, 清山史朗, 吉田昌弘, 幡手泰雄, 粉体と工業, Vol.37, No.6, 37-46 (2005). (c) 河野恵宣, 幡手泰雄, J. Soc. Powder Technol., Japan, 40, 736-745 (2003).
- 9) 平雅之, 若狭邦夫, 山木昌雄, 山我貴之, 赤川安正, 広島大学歯学雑誌, Vol.26, 217-220 (1994).

データ解析による生産設備の保全に関する研究（第1報）

生産技術部

中野太郎 大坪昭文

製造業において、生産設備の摩耗や疲労・劣化による不具合は避けられない現象である。従来、熟練技術者が装置の稼働音を聞く、あるいは掌で振動を感じるといった官能評価によって機器類の不調を捉え維持管理を行っていたが、信頼性・再現性に課題があった。また、少子高齢化に伴う人手不足や技能伝承問題が深刻化し、属人的な保全活動の維持が困難になってきており、IoT や AI などを活用した設備保全の省力化や自動化が急務となっている。本研究では、加速度センサやマイク・電流計等の IoT センサを用いて収集した生産設備の稼働データに基づき、異常状態の兆候を検知し、装置の故障・劣化予測を行う解析技術の研究・開発に取り組む。本年度は、設備状態の分析における情報処理の高度化を図るため、従来の環境データに加え、振動や音響などの時系列データの収集に対応した汎用的な計測用エッジデバイスの試作開発を行い、生産現場での各種センサデータの収集および送信システムを効率的に構築できることを確認した。

1. はじめに

製造業において、主要な装置に故障が発生すると、修理のために生産ラインを長時間停止せざるを得ず、納期の遅延や生産計画の変更等、企業の生産活動に多大な影響を及ぼす。一方、生産設備の摩耗、疲労および劣化による不具合は避けられない現象であるため、従来は、熟練技術者による装置の稼働音の聴診や振動の触診等の官能評価によって、機器類の状態監視および維持管理が実施されてきた。しかしながら、これらの手法には信頼性および再現性の確保に課題がある。また、少子高齢化に伴う人手不足や技能伝承問題が深刻化し、属人的な保全活動の維持が困難になってきており、IoT (Internet of Things) や AI (Artificial Intelligence) などを活用した自動化や設備保全が急務とされている。

本研究では、加速度センサ、マイクロフォンおよび電流センサ等の汎用 IoT センサにより収集された生産設備の稼働データに基づき、異常状態の兆候を検知し、装置の故障および劣化を予測する解析技術の開発を行う。本年度は、解析対象となる時系列データを収集するためのエッジデバイスの設計および実装に取り組んだ。

2. データ収集システムの構築

2.1 時系列データ収集システム

本システムでは、監視対象となる設備機器にセンサ類（加速度センサやマイクロフォンなど）を設置

し、エッジデバイスを介してデータの収集および転送処理を実行する自動計測機能を実装する。その際、一定周期でサンプリングされた加速度や音響などの時系列データは、温度、湿度、圧力といった静的な環境データと比較して、データ量が顕著に大きくなる傾向がある。このような大容量データを無線通信で収集する場合、高速通信が可能で、多様なデータ形式を取り扱うことができる Wi-Fi を用いたデータ転送が有効である¹⁾。

2.2 計測データの形式と通信プロトコル

センサなどで計測したデータを Web 経由で保存するデータ蓄積システムの概要を図1に示す。工場内の設備機器に設置されたエッジデバイスから、Wi-Fi 通信を介して効率的にデータを収集するために、Linux 系サーバ上に、HTTP プロトコルを基盤とした Web API (Application Programming Interface) を設計・実装した。Web API とは、サーバ上の特定のエンド

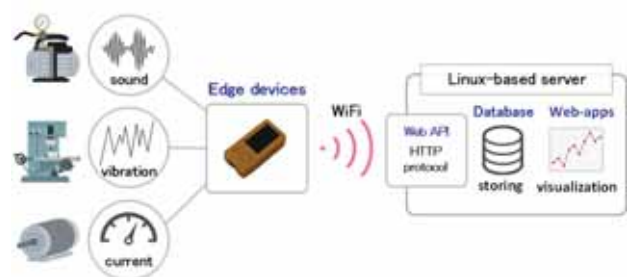


図1 データ収集システムの概略図

ポイントに対して、データの取得（GET）や作成・更新（POST）などのリクエストメソッドを定義したものであり、JavaScript Object Notation（JSON）や Extensible Markup Language（XML）形式などを用いて、データを体系的に送受信するインターフェース仕様である。

センサで収集したデータの処理を Web API を介してサーバに委譲する際、時系列データ配列、各種識別子、および関連するパラメータをオブジェクト内に構造化して格納し、HTTP POST 通信によって送信する。サーバ側では、受信した構造化データを、データベースへの格納やファイル保存、解析処理など、各種の処理要件に応じて活用することが可能である。データの構造化形式としては JSON を採用した。JSON はシンプルな構造を有し、多くのプログラミング言語でサポートされているため、異なるシステム間でのデータ交換が容易である。さらに、JSON はスキーマ（データ構造）が固定されていないため、将来的なメタデータや付加的な情報の拡張性を確保し、新規要素を容易に追加可能な柔軟な設計を実現できる。

3. 計測用エッジデバイスの開発

3.1 計測デバイスの仕様

IoT デバイスに適用される主な要件は 6A（Anything, Anytime, Anyone, Anyplace, Any service, Any network）と呼ばれており、ワイヤレス環境における信頼性の高い遠隔通信とデータ転送を保証する効果的な接続性を提供することにある^{2,3)}。本検討では、設備状態監視における情報処理の高度化を目的として、振動、音響等の生波形データを収集するデバイスの開発に取り組んだ。計測用エッジデバイスの開発における主要な仕様は以下の通りである。

- ・計測信号の状態を現場で視覚的に確認できること
- ・複数センサから時系列データを収集し、API サーバに送信可能なこと
- ・安価で入手が容易な機器構成とし、拡張性と汎用性を確保すること

これらの機能を効率的に実装するために、エッジデバイスのベースとなる小型のマイコンモジュールとして、M5Stack 社製「M5StickC Plus」を採用した⁴⁾。M5StickC Plus は、安価でありながら高性能かつ低消費電力のマイコンチップ「ESP32」（Espressif Systems 社製）を搭載し、無線通信機能（WiFi および Bluetooth）を備えている。また、Grove インターフェース（汎用コネクタ）を搭載するなど拡張性も

高く、スマートホームデバイスや環境モニタリングシステムなど、さまざまな IoT アプリケーションの開発に広く利用されている⁵⁾。

3.2 振動センサおよび音響センサ

振動の計測センサには、M5Stick に内蔵された慣性計測装置（IMU ; Inertial Measurement Unit）を利用した。IMU から取得した加速度値をマイコン制御により定期的にサンプリングし、振動に関わる指標値とする。

音響データの収集に関しては、小型のエレクトレットコンデンサマイク（ECM）による計測を試みたが、各マイクの感度に大きな個体差が存在し、ばらつきが問題となった。感度調整により一定程度の誤差には対応可能であったものの、設置時の手間や設置後の感度変動の可能性、さらに感度差が大きすぎて調整では対処できないなどの課題が残った。そこで、より安定した音響収録を実現するために、個体差の影響が少ないデジタルマイクロフォン（SPM1423）の適用を検討した。

SPM1423 は音響信号を PDM（Pulse Density Modulation）方式でデジタル化する MEMS マイクロフォンであり、I2S（Inter-IC Sound）規格のシリアル通信でデジタル信号を伝送する。I2S による通信には、M5StickC Plus（ESP32）に内蔵された PDM モジュール⁶⁾を利用した。このモジュールを用いて伝送した PDM 信号を PCM（Pulse Code Modulation）信号に変換処理することで、最大約 50 kHz までの音響信号が受信可能である。SPM1423 を用いて実験的に計測した音響データ（正弦波）を図 2 に示す。音響計測時と無音時の SN 比を用いて ECM との性能を比較した結果、ECM が 10.4db であったのに対し、SPM1423 は 34.8db と、品質面においても安定していることが確認されたため、本検討における音響計測用センサとして採用した。最終的に選定した計測デバイスの機器構成を表 1 に示す。

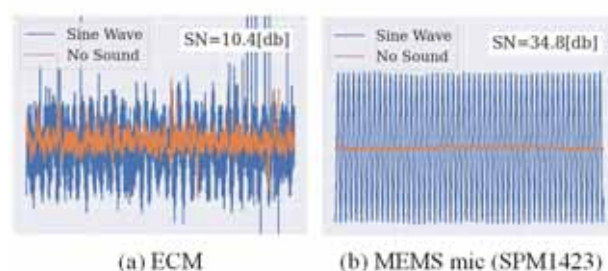


図 2 SN 比によるマイク性能の比較

表1 計測エッジデバイスの構成機器

Type	Part number
Device controller	ESP32
M5StickC Plus	Espressif Systems
Accelerometer	MPU6886
Inertial Measurement Unit	InvenSense
Microphone	SPM1423
Pulse Density Modulation	SiSonic

表2 マルチコアへのタスクの割り当て

Core 0 : 時系列データ収集タスク
・定期的にセンサからデータを収集 ・データをバッファに保存 ・必要に応じたデータの前処理(センタリング等)
Core 1 : データ送信および描画タスク
・バッファに蓄積されたデータを定期的にPOST ・送信エラーの検出と再送処理 ・簡易的なデータの統計処理(FFT等) ・液晶画面表示内容の更新

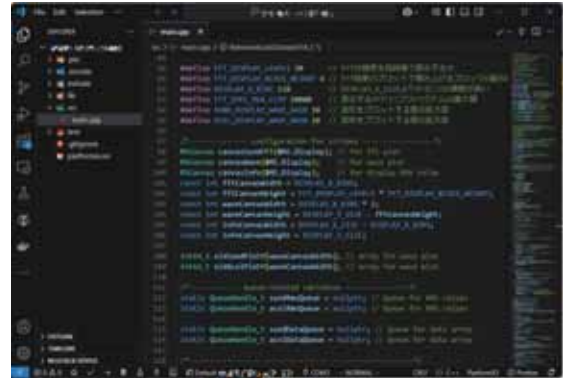


図3 制御プログラムの統合開発環境

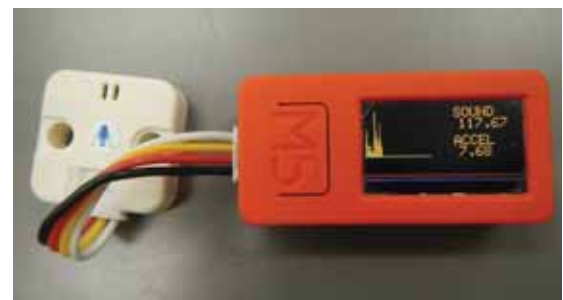


図4 開発した計測エッジデバイス

4. 計測制御プログラミング

4.1 開発環境

ESP32 のプログラム開発言語には、C 言語、MicroPython, Lua, JavaScript など用途に応じた多様な選択が可能であるが、本検討ではソフトウェア開発の拡張ライブラリが充実している Arduino プラットフォームを利用する。Arduino は C++を基盤とした言語構文が採用されており、初心者でも比較的容易に習得可能である。また、オープンソースコミュニティやサードパーティによって開発された多数のライブラリが存在し、デジタル I/O, シリアル通信などの基本機能に加え、センサ操作やネットワーク通信など、特定の用途に特化したライブラリも多岐にわたって公開されている。

プログラミングの統合開発環境 (IDE) としては、Microsoft 社の Visual Studio Code (VS Code) を選択した。VS Code はコード補完、デバッグ機能、ソースコード管理など、豊富な拡張機能を有し、開発の効率化に繋がる高度な開発支援環境が提供されている (図3)。

4.2 並列処理の実装

ESP32 はリアルタイムオペレーティングシステム (RTOS) である FreeRTOS⁷⁾を搭載している。RTOS は、時間的制約のある処理を正確に実行することを

目的として設計された制御システムであり、組み込みシステムなどのリアルタイム性が要求されるアプリケーションに利用されている。ESP32 は、タイマーや通信機能など各種周辺機能を内蔵するデュアルコアの高機能集積回路であるが、FreeRTOS を介してこれらのハードウェアリソースを管理することにより、複数のプログラムの並列処理や割り込み処理の実装が容易になる。

本検討で開発する計測用エッジデバイスにおいては、計測精度の確保が最も重要である。データ収集時のリアルタイム性と要求仕様を両立するために、表2に示すように各コアに適切な処理を割り当て、ESP32 に搭載された二つの CPU を有効活用するマルチプロセス並列処理プログラムを実装した。開発した計測エッジデバイスを図4に示す。

シングルコアのチップを用いて疑似的な並列処理によってタスクを分担した場合、各タスクのトリガーが優先度によって制御されるため、予期せぬブロッキングによりデータサンプリングが妨げられる可能性がある。一方、ESP32 のようなマルチコアシステムでは、各 CPU コアにタスクを割り当てることにより、プロセスごとに高いリアルタイム性を確保することができる。

5. おわりに

生産設備の状態監視における情報処理の高度化を目的とし、振動や音響などの波形データを収集し、一括送信する計測デバイスの開発に取り組んだ。従来、振動センサ等を用いた時系列データの計測システムは高コストであることから、まず小型のIoTマイコンと低価格なセンサを組み合わせた構成により、拡張性および汎用性の確保を試みた。また、小型ディスプレイに時系列データの波形やFFT解析結果等を簡易的に表示する機能を実装し、現場における設置時および設置後のモニタリングの利便性を向上させた。さらに、複数の要求仕様に対応し、かつ時系列データの計測精度を確保するために、マルチプロセスの並列処理によるリアルタイム性の向上に取り組んだ。その結果、汎用マイクロコントローラ（ESP32）の機能特性を並列処理によって引き出し、デバイス開発に応用することで、信頼性に優れたデータ収集および送信システムを効率的に構築できることを確認した。

現在、開発したデバイスを用いて生産現場でのデータ収集を実施しており、今後は収集された生産設備の稼働データに基づいて異常状態の兆候を検知し、装置の故障および劣化を予測するための解析技術の開発に着手する予定である。

参考文献

- 1) 河野光一郎, et al. 音響データ収集による機器異常検知のためのデータ分析及び可視化手法, 電子情報通信学会技術研究報告, 2024, 123.422: IA2023-88.
- 2) Li, S., et al. The internet of things: a survey, Information systems frontiers, 2015, 17, pp.243-259.
- 3) Maier, A., et al. Comparative analysis and practical implementation of the ESP32 microcontroller module for the internet of things, Internet Technologies and Applications, 2017, pp. 143-148.
- 4) StickC-Plus,
https://docs.m5stack.com/en/core/m5stickc_plus
- 5) Foltýnek, P., et al. Measurement and data processing from Internet of Things modules by dual-core application using ESP32 board. Measurement and Control, 52(7-8), 2019, pp. 970-984.
- 6) ESP32-I2S-Controller(I2S),
https://www.espressif.com/sites/default/files/documentation/esp32_technical_reference_manual_en.pdf#i2s
- 7) FreeRTOS, <https://www.freertos.org/>

県産木材製家具の製造における強度向上技術及び加飾技術の開発（第3報）

—デジタルツールを活用した立体形状設計の効率化の検討—

生産技術部

佐藤彰 辛川洋介

諸富家具産地では、県内の森林資源であるスギ材やヒノキ材といった針葉樹の活用が進められている。しかしながら、これらの針葉樹は、特有の木目や質感、色調が意匠の幅を広げる上での制約となっていることから、意匠性を高める木材表面の塗装技術および加飾技術の開発が求められている。本報では、家具の表面加飾技術としてデジタルツールの活用に着目し、検討を行った。具体的には 3DCAD で作成した複数の三次元自由曲線に基づく NC 切削加工を行い、形成された自由曲面を組み合わせることで複雑な立体形状を作成できることを確認した。さらに、複雑な立体形状の設計効率を高めるため、パラメータとアルゴリズムを用いたビジュアルプログラミングツールを活用し、自由曲面形状上により微細で複雑な立体形状を作成・編集する手法について検討した。その結果、これらの複雑な形状を効率的に作成・編集できることを確認した。また、これらの手法を用いて表面加飾を施した立体サンプルおよび家具の CG プロトタイプを作成した。

1. はじめに

諸富家具産地では、地域資源である県産木材のスギ材やヒノキ材などの針葉樹を活用した家具づくりが進められている。しかしながら、これらの針葉樹は、広葉樹と比較して強度が低いため、多くの消費者やデザイナーが求める、細い部材や少ない部材で構成された形状に対応することが難しい。

また、針葉樹特有の木目や質感、色調は、意匠の幅を広げる上での制約となっており、多様な意匠の家具を展開する上での課題となっている。そのため、意匠性を高める木材表面の加飾技術および塗装技術の開発が求められている。

このような背景から、本研究では、強度向上技術と表面加飾技術、塗装技術の開発に取り組んでいる。本報では、3DCAD や NC 切削加工機などを活用して木材表面に精緻で複雑な立体形状を作成する新たな表面加飾技術の開発に取り組み、加えて立体形状設計の効率化について検討した結果を報告する。

2. 三次元の自由曲線を用いた表面加飾

前年度の研究¹⁾において、加工時間の短縮や加飾パターンの多様化を目的に、3DCAD で作成した三次元自由曲線に沿った NC 切削加工により、立体形状の作成が一本のカッターパスだけで実現可能であることを CAM によるシミュレーションで確認した。

本年度はこの手法を応用し、3DCAD で複数の三

次元自由曲線を作成し、一種類の刃物（丸面 φ30mm）のみを使用して複雑な立体形状を作成した。図1に三次元自由曲線を、図2に立体形状の3DCAD データを示す。また、CAM で作成した三次元自由曲線のカッターパスに基づき人工木材（RAMPF 社製 RAKU® TOOL MB-0720）を NC 切削加工した立体サンプルを図3に示す。

これらの試みの結果、一種類の刃物でも複数の三次元自由曲線を用いることで、複雑な立体形状の表面加飾が可能なが分かった。また、加工工程の簡素化により、製作コストの低減が期待できる。家具の引出し前板に立体形状の表面加飾を施した CG プロトタイプを図4に示す。

3. 複雑な立体形状設計の効率化の検討

3DCAD による従来の立体形状の設計では、形状の作成段階から形状の修正や変更、他アイテムへの転用に至るまで、手作業が多く大きな労力を要する。

そこで本年度は、パラメータとアルゴリズムを用いたビジュアルプログラミングツールを活用し、複雑な立体形状の設計において、容易かつ即時に形状の作成や修正・変更が行える手法について検討を行った。

3.1 自由曲面形状の設計

3DCAD で自由曲面形状を設計する際は、基本的に複数の自由曲線を作成・配置し、隣合う曲線を補

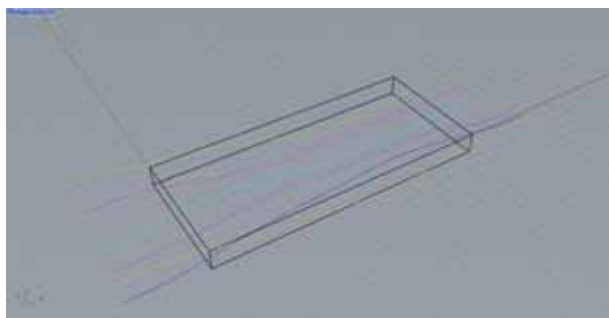


図1 3DCAD で作成した三次元の自由曲線



図2 三次元の自由曲線を基に作成した立体形状の3DCAD データ



図3 NC 切削加工した立体サンプル



図4 自由曲面形状を施した家具のCG プロトタイプ

間接続することで自由曲面形状を作成していく。したがって、元となる自由曲線を変更すると、自由曲面形状を作成するまでの作業を初めからやり直す必要があり、意図する面形状を得るには多くの労力を要する。

そこで、3DCAD ソフトウェアである Rhinoceros (Robert McNeel & Associates 社製) とビジュアルプログラミングツール (ノーコードプログラム) である Grasshopper を用いて設計作業の効率化を図る。

形状の特徴を決める構成情報を選定して変数とし、これらをパラメータとしたアルゴリズムを自由曲面形状の作成に適用する。図5に本設計手法の流れを示す。

- ① 自由曲線の構成点の座標を設定
- ② 構成点に基づく自由曲線を作成
- ③ 自由曲線の特長 (始点・終点、次数、制御点数、接線方向など) を設定
- ④ 自由曲面形状作成の条件 (面を構成する曲線の曲率、次数、制御点数、接続補間方法など) を設定
- ⑤ 自由曲線から自由曲面形状 (サーフェス) を作成
- ⑥ 最終的な立体形状を作成

この設計手法により、パラメータを変更するだけで自由曲面形状を即時に修正・変更することが可能となる。サンプルとして作成した自由曲面形状の3DCAD データを図6に示す。

3.2 自由曲面形状上に立体形状を作成する設計

自由曲面形状上に複雑な立体形状を作成する作業は、手作業では非常に困難である。そこで、自由曲面形状の構成情報に基づき、自由曲面形状上に連続する立体形状を作成する設計手法を検討した。具体的な手順を図7に示す。

- ① 自由曲面形状を作成 (図5の作成フロー)
- ② 自由曲面形状を分割する割合の階調 (数列の初項・公差・項数、値の範囲など) を設定
- ③ 自由曲面形状を分割する自由曲線を作成
- ④ 自由曲面形状を分割
- ⑤ 分割した自由曲面形状上に作成する立体形状の概形を作成
- ⑥ 立体形状の条件 (分割曲面の境界線、頂点、中心点、法線方向、変形方法、変形量など) を設定
- ⑦ 各パラメータが連動
- ⑧ 自由曲面形状上に立体形状を作成

このように自由曲面形状の構成情報を変数としたパラメータとアルゴリズムによって、分割した自由曲面形状に連動した複雑な立体形状を自動的に作成することができる。

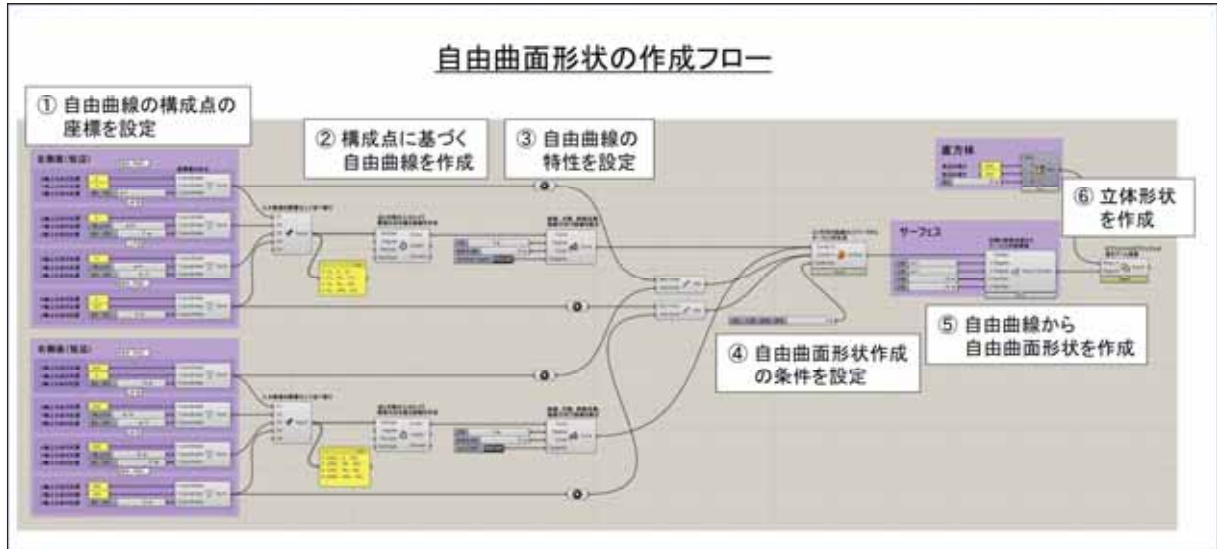


図5 設計した手法（自由曲面形状の作成）

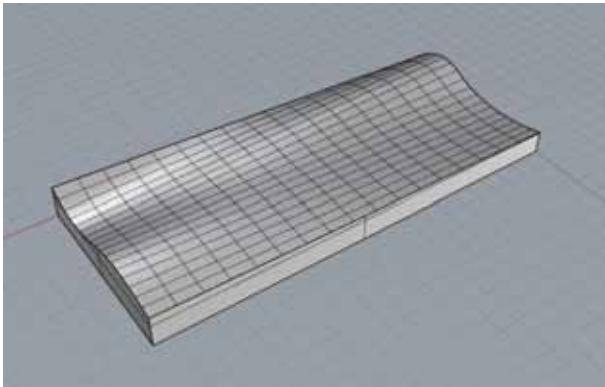


図6 自由曲面形状の3DCAD データ

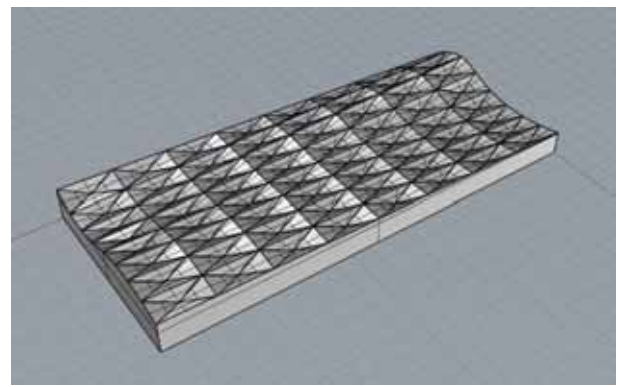


図8 自由曲面形状上に施した立体形状の3DCAD データ

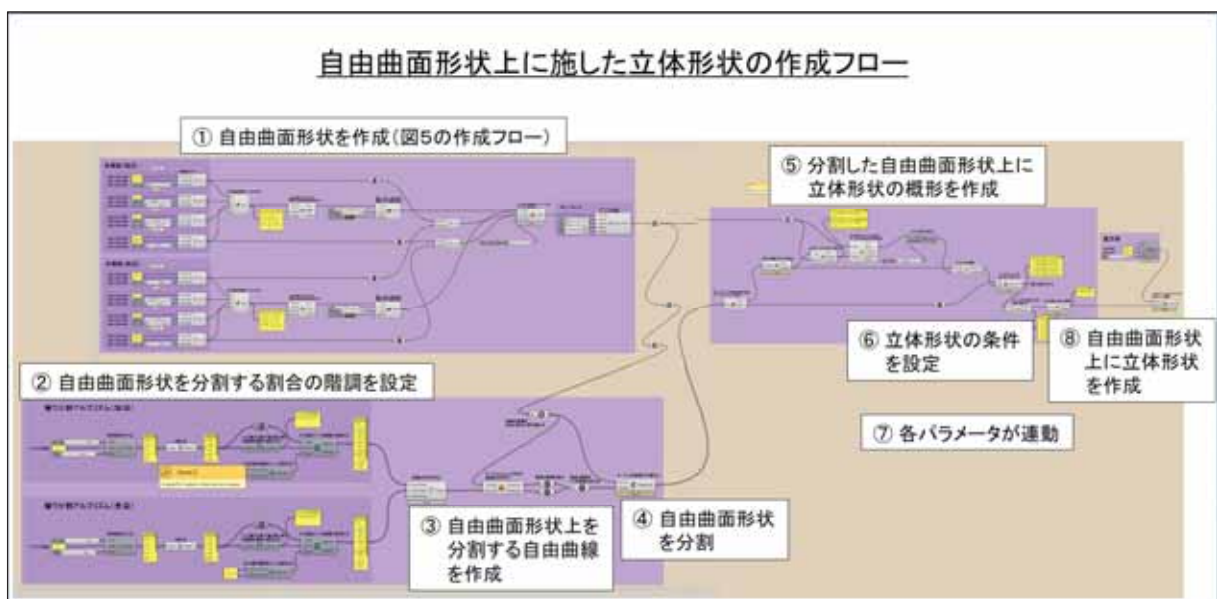


図7 設計した手法（自由曲面形状上の立体形状の作成）

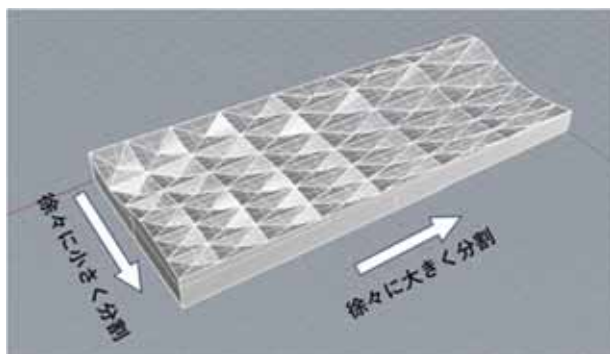


図9 自由曲面形状上に複雑な立体形状を作成した3DCAD データ

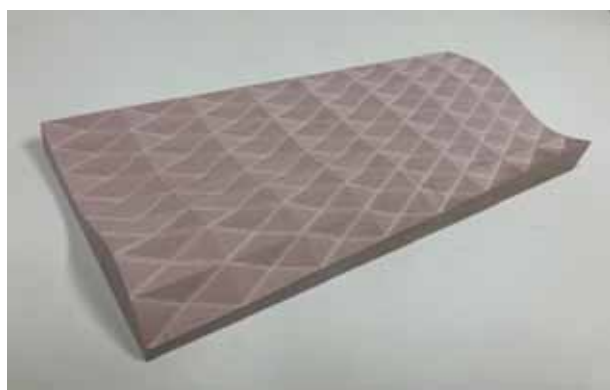


図10 NC 切削加工した立体サンプル



図11 自由曲面形状上に立体形状を編集した表面加飾を施した家具のCG プロトタイプ

この設計手法により、パラメータの変更に応じて、自由曲面形状の作成と分割、ならびに自由曲面形状上により微細で複雑な立体形状の作成・編集を同時かつ即時に行うことが可能となった。図8に自由曲面形状上に複雑な立体形状を作成した3DCAD デー

タを示す。また、図9に自由曲面形状上に作成する立体形状の分割幅を変化させた3DCAD データを、図10にCAD データを活用してNC 切削加工した立体サンプルを示す。さらに、図11に複数の立体形状を組み合わせて作成した表面加飾を家具の前板に施したCG プロトタイプを示す。これらの手法で作成した立体サンプルおよびCG プロトタイプについては、諸富デザインセンターにて展示し、県内企業への技術支援に活用している。

4. おわりに

本研究では、デジタルツールを家具の表面加飾に活用する技術の検討を行った。

その結果、3DCAD で作成した三次元自由曲線に基づくNC 切削加工によって得られる自由曲面を複数組み合わせることで複雑な立体形状を作成可能であることを確認した。

また、3DCAD 上での複雑な立体形状の設計効率を高めるため、パラメータとアルゴリズムを用いたビジュアルプログラミングツールであるGrasshopper を活用することで、自由曲面形状の作成・編集や、その曲面形状上に複雑な立体形状の作成・編集がパラメータを変更するだけで効率的に実施可能であることを確認した。

さらに、3DCAD データを活用してNC 切削加工した立体サンプルや家具のCG プロトタイプを作成し、展示することで本研究成果の普及を図っている。

本手法を活用することにより、設計プロセスの可視化やデータの保存、他者との共有が容易になり、従来は多くの労力を要していた3DCAD による複雑な形状の作成・修正・変更・編集作業の効率化が図られるとともに、様々な製品の表面加飾に応用展開することが期待できる。今後は、これらの設計手法のさらなる改善を図り、県内企業において、実製品への展開および普及に向けた取り組みを進めていく予定である。

参考文献

- 1) 辛川洋介, 佐藤彰: 県産木材製家具の製造における強度向上技術及び加飾技術の開発 (第2報) 令和5年度佐賀県工業技術センター研究報告書, No.32, p.51-54

萌芽的独創研究

佐賀はがくれ酵母の焼酎製造への応用に関する研究

食品コスメ部
澤田和敬
宗政酒造株式会社
宮内洋一

佐賀県工業技術センターが開発した清酒醸造用酵母「佐賀はがくれ酵母」の焼酎製造への適応性について諸種検討した。佐賀はがくれ酵母はクエン酸存在下で問題なく増殖し、上立ち香も菌株ごとの特徴が感じられた。実地スケールの試験醸造では、一次醪の水歩合を増やし、醪温度の冷却を徹底し、適宜追水を行い、アルコール濃度の上昇を抑制するような醪操作を行った。その結果、取得した製成酒は菌株毎に異なる特徴を表しており、「香りの特徴が菌株ごとにはっきりしていて面白い」という官能評価の結果を得た。

1. はじめに

本県では「佐賀はがくれ酵母」として県が開発した酵母を主に清酒醸造用として頒布している。佐賀はがくれ酵母は清酒醸造で優れた香味を有し、清酒醸造メーカーから高い評価を受けている。^{1~3)}

宗政酒造株式会社（以下、宗政酒造）では、焼酎製造において日本醸造協会が頒布している焼酎酵母の他にワイン酵母を用いて市場での差別化を図っている。しかし、全国的に流通している菌株を使用しているため、様々な検討に取り組み上市した商品が他社と類似してしまい、商品の他社との明確な差別化ができないことが課題であった。

宗政酒造の清酒醸造では、佐賀はがくれ酵母のうち、F401株、SAWA-1株、SGH株、StyP株を使用しており、市場ではそれぞれで異なる特徴の商品として評価されている。しかし、佐賀はがくれ酵母が焼酎に適した性質を有するかは不明である。

焼酎製造に適した酵母はクエン酸耐性、高アルコール分生成能、高温発酵性といった清酒酵母と異なる特性が求められる。そこで、本研究では佐賀はがくれ酵母の焼酎製造の適応性を検討するため、20kgスケールのパイロット試験と実醸造試験を実施した。

2. 実験方法

2.1 佐賀はがくれ酵母のクエン酸の適応性評価

清酒醸造での使用実績から SAWA-1株、SGH株、StyP株の3株を用いた。

実製造の一次仕込みに順じ、白麹 150g に 200mL の精製水を加え、酵母培養液を 10mL 添加し、25℃で 5 日間静置培養し、発泡性、上立ち香の官能評価により、酵母の適応性の評価を行った。

2.2 22kg スケールパイロット試験

22kg スケール焼酎の小仕込試験の仕込配合を表 1 に示す。

一次仕込みは 20℃で 5 日間行った後、二次仕込みは 20℃で 13 日間発酵した。

蒸留は減圧条件下で行った。

2.3 実製造スケールでの試験醸造

実製造スケールの仕込み配合を表 2 に示す。
一次仕込みは 20℃で 5 日間行った後、二次仕込みは 20℃で 13 日間発酵した。追水は適宜行った。
蒸留は減圧条件下で行った。

2.4 製成酒の香気成分分析

2.3 の製成酒の香気成分分析は、ガスクロマトグラフ質量分析装置（Agilent 社製 5977B GC/MSD）を用いて行った³⁾。

3. 実験結果及び考察

3.1 佐賀はがくれ酵母のクエン酸の適応性評価

佐賀はがくれ酵母のクエン酸の適応性評価を行った結果、どの菌株も白麹のクエン酸存在下でも問題なく発酵した。上立ち香は SAWA-1株、SGH株、StyP株のそれぞれの菌株に特徴的な香りを感じ、問題なく一次仕込みに使用できると判断した。

表 1 22kg スケールパイロット試験 仕込配合

原料	1 次	2 次	計
麦麹 (kg)	7		22
麦 (kg)		15	
水 (L)	9	25	34

表 2 実製造スケール 仕込配合

原料	1 次	2 次	追水	計
麦麹(kg)	1,500			4,700
掛麦(kg)		3,200		
水(L)	2,100	5,335	790	8,225

3.2 試験醸造

22kg スケールパイロット試験では、宗政酒造が、ア

アルコールが16%以上生成しており、2次醪3日目にはアルコールが12%以上生成されていた。

日本醸造協会が頒布している焼酎酵母と同様の仕込み配合、温度管理を行った。その結果、いずれの酵母も醪8日目にはアルコールが16%に達していた。そのため、香りを生成する期間が短くなり、20kg スケール試験の製成酒は、いずれの酵母を使用した試験区でも官能的に香りが低かった。その原因は、焼酎酵母に比べ佐賀はがくれ酵母の3菌株がアルコールの生成が早く、焼酎製造と並行複発酵のバランスが異なるためと推測した。

そこで、実製造スケールでの試験醸造では仕込配合の一次仕込の水歩合を増やし、二次仕込では醪の冷却を早めに行うとともに適宜追水を行うことで、アルコールによる酵母へのダメージを軽減させるような醪操作を行った。

実地醸造スケールで取得した製成酒の香気成分分析の結果を表3に示す。それぞれの酵母を用いた製成酒の特徴は以下の通りまとめられる。

- SAWA-1 株はバナナ様の香気成分である酢酸イソアミルがSGH株と同程度生成し、青リンゴ様の香気成分であるカブロン酸エチルがStyP株と同程度生成し、厚みのある香りの酒質の製成酒が得られた。
- SGH株は酢酸イソアミルをよく産生し、カブロン酸エチルは3菌株の中で最も低く、重厚な香りの酒質の製成酒が得られた。
- StyP株は3菌株の中で最も酢酸イソアミルの産生が少なかったが、カブロン酸エチル及びパイナップル様の香気成分であるオクタン酸エチルが多く産生されており、軽快な香りの酒質の製成酒が得られた。

宗政酒造における官能評価の結果、いずれの酵母も「香りが特徴的でそれぞれの菌株ごとに特徴がはっきりしていて面白い」という評価であった。

4. おわりに

佐賀はがくれ酵母の焼酎製造への適応性について以下の検討を行った。クエン酸存在下での佐賀はがくれ酵母の増殖能を確認するため、小スケールでの一次仕込みを行った。

その結果、いずれの酵母も問題なく増殖し、上立ち香も菌株ごとの特徴が感じられ、パイロット試験に供した。

通常の仕込み配合でパイロット試験醸造を行った結果、それぞれの菌株で官能的に香気成分に違いがなかった。これは焼酎酵母より佐賀はがくれ酵母のアルコール生成が早かったため、二次醪の初期にアルコール16%以上に達し、酵母の活性が低下したことから、香気成分を生成する期間が短くなったためと考えた。

表3 実地醸造試験の製成酒の香気成分分析結果

	酢酸 エチル	酢酸 イソアミル	カブロン酸 エチル	オクタン酸 エチル
SAWA-1	449	37	9.68	4.35
SGH	509	38	3.72	2.69
StyP	450	30	11.22	4.74

(単位: mg/L)

次に実地醸造スケールの試験醸造では、一次醪の水歩合を増やし、醪温度の冷却を徹底し、適宜追水を行い、アルコール濃度の上昇を抑制するような醪操作を行った。その結果、取得した製成酒の香気成分は菌株ごとに特徴を表しており、「香りが特徴的でそれぞれの菌株ごとに特徴がはっきりしていて面白い」という官能評価の結果を得た。

福田らはワイン酵母や清酒酵母を用いた焼酎製造を行っても揮発性成分組成はほぼ菌株の特徴を示すという報告⁴⁾を行った。佐賀はがくれ酵母を焼酎製造に使用した場合も同様の傾向であることが示唆された。一方で、商品化するためには、最適な仕込み配合や追水の操作、醪品温の管理方法や蒸留時の条件検討などいくつかの課題がある。今後はこれらの課題解決に取り組むことで、早期の商品化を目指す。

なお、本研究を実施するにあたり使用したガスクロマトグラフ質量分析装置は、電源立地地域対策交付金で導入した。

参考文献

- 1) 澤田和敬. 佐賀県産オリジナル醸造微生物の育種及び佐賀県産酒類の品質向上に関する研究: 佐賀酵母 F4 泡なし酵母の育種開発. 佐賀県工業技術センター研究報告書, 2014, 23: 27-31.
- 2) 澤田和敬. "佐賀酵母"の育種とその醸造適性評価ーさがほのかからの醸造用酵母の分離ー. 佐賀県工業技術センター研究報告書, 2017, 27:47-50
- 3) 澤田和敬. "新" 佐賀酵母"の育種とその醸造適性評価 (第6報) 交雑育種株の実地における醸造特性評価." 佐賀県工業技術センター研究報告書 2022, 31: 35-38.
- 4) 福田央, 周延, 韓錦順. "ワイン酵母・清酒酵母による焼酎醸造試験及び揮発性成分の比較." 2016: 611-624.

※本研究は令和5年度に実施しましたが、知的財産保護の観点から令和6年度の報告書に掲載しました。

多波長レーザによる近接場光を用いた工具刃先高さ位置の高精度非接触検出

生産技術部

寺山裕

九州工業大学大学院 情報工学研究院

知的システム工学研究系 先進機械分野

カチヨーンルンルアン・パナート

超精密加工の高能率加工を実現するためには、加工直前の工具刃先高さ位置（工具長）の高精度な機上計測が重要である。接触式計測は工具刃先の破損などの課題があり、近年は非接触式計測が注目されている。九州工業大学では、測定基準表面でレーザ光を全反射させた際に表面から数百ナノメートル発生する近接場光を用いて、刃先高さ位置を非接触かつナノスケール精度で検出する手法が提案されていた。本研究では、九州工業大学と共同研究を行い、同手法を用いた光学系観測装置を独自に設計製作した。多波長の近接場光領域において検出可能な高さ方向範囲を検証した結果、マイクロ工具（外径 0.05 mm）の刃先高さ位置は、測定基準表面から 160 nm の範囲までは、 ± 18 nm (2σ) の不確かさで測定されることが確認できた。

1. はじめに

高性能かつ微細な光学製品、医療機器、半導体製造装置の構成部品を生産するため、製造業では金型や微細な部品を、高品質に加工する技術が求められている¹⁻³⁾。一般に精密加工には NC（数値制御式）加工機が用いられ、図面に基づいて、小径工具刃先位置の移動量（加工パス）が設定されている。しかし、周囲温度・工具摩耗現象、回転時の工具振れなどによって工具刃先高さ位置（工具長）は随時変化している。そのため、加工直前に工具刃先高さ位置を工作機械上で高精度に検出し、高さ位置を事前に補正する必要がある。

そこで通常、工具の刃先高さ位置を機上で把握するために、工作機械内部に設置されたツールセッタが用いられており、接触式計測と非接触式計測がある。接触式計測では特に小径工具の先端を破損させる恐れがあり、非接触式計測（レーザ方式、撮像方式）では光の回折限界の要因で繰り返し測定精度が実質 1 μ m レベルで限界と、それぞれに課題がある。

このことから、小径工具の刃先高さ位置を、より高精度かつ非破損に計測する技術が求められている。これまで、レーザ回折光を用いた工具先端と被加工物表面間の距離計測手法⁴⁾やダイヤモンド工具刃先の表面から発生させた近接場光に被加工物が侵入した時の散乱光を検出する手法⁵⁾などが提案されていた。本研究では、近接場光によって、よりナノスケール精度に小径工具刃先位置を非接触で計測する手

法を検討し、マイクロ工具（外径 0.05 mm）において、その刃先高さ位置検出精度を検証した。

2. 工具刃先高さ位置の測定原理・手法

2.1 近接場光の発生方法

図 1 に近接場光の発生原理を示す。レーザ光を高屈折率 n_{high} 媒質（例えば、ガラス基板など）側から低屈折率 n_{low} 媒質（例えば、大気など）側に向けて入射角 θ_i ($\theta_i > \theta_c = \arcsin[n_{\text{low}}/n_{\text{high}}]$) の全反射条件で照射する。この時、自由空間伝搬をしない近接場光と呼ばれる光が、基準面近傍（境界面から数百ナノメートル程度）のみに局在して発生する^{6,7)}。近接場光は、自由空間伝搬レーザ光の最小スポット径（数 μ m 程度）よりも薄く、必然的に焦点深度外の物体には照明されない。そのため、表面近傍の物体のみに限定して照明され、一般的な光学的回折限界よりも高い検出精度での計測が可能となる。

また、近接場光の光強度は、式(1)で示され、発生面から垂直方向へ指数関数的に減衰する。つまり、基準面からの高さに応じた光強度をもつ。ここで、 $I_{ev}(z, \lambda)$ は表面から高さ z における近接場光の光強度、 λ はレーザ光波長を表し、 $I_{z=0}$ は表面での光強度、すなわち照射レーザの光強度そのものになる。

$$I_{ev}(z, \lambda) = I_{z=0} \times \exp \left[-\frac{z}{z_L(\lambda)} \right] \quad (1)$$

このとき z_c は、しみこみ深さ定数距離（近接場光強度が $I_{z=0}/e$ になる時の高さ; e はネイピア数）であり、式(2)に示すように、照射するレーザ光波長 λ と入射角 θ_i 、各媒質の屈折率 n に依存して定められる。

$$z_c(\lambda) = \frac{\lambda}{4\pi \sqrt{(n_{\text{high}})^2 \sin^2 \theta_i - (n_{\text{low}})^2}} \quad (2)$$

2.2 工具刃先の非接触ナノスケール測定原理

この限定された近接場光内に物体が存在した時、物体から散乱伝搬光が発生するため、その散乱光を光学的に検出することで、基準面近傍においてナノスケールの現象を観測することができる^{8,9)}。

本研究における、近接場光を小径工具の刃先非接触検出に適用した場合の原理^{10,11)}を図2に示す。工具刃先が基準面（ガラス基板の表面等）から数百nm 近傍へ侵入するのを検知し、刃先が基準面に接近するほど大きな散乱光量 I_{sc} が検出される。しかし、この検出のみでは刃先が基準面に接触するまで基準位置が不明であった。

そこで、本手法を応用し多波長の近接場光を用いた工具刃先高さ位置の高精度検出手法¹²⁾を図3に示す。レーザ光の波長ごとに近接場光のしみ込み深さ距離定数 z_c が異なるため、散乱光検出タイミングや散乱光量比によって、刃先高さ位置 z_{edge} を高精度に検出できる。レーザ光波長が λ_1, λ_2 の場合の工具刃先からの散乱光量は、式(3)、(4)と表せる。

$$I_{sc}(z_{\text{edge}}, \lambda_1) = K I_{sc,0}(\lambda_1) \exp \left[-\frac{z_{\text{edge}}}{z_c(\lambda_1)} \right] \quad (3)$$

$$I_{sc}(z_{\text{edge}}, \lambda_2) = K I_{sc,0}(\lambda_2) \exp \left[-\frac{z_{\text{edge}}}{z_c(\lambda_2)} \right] \quad (4)$$

ここで、 K は刃先高さ位置への換算係数である。式(3)と(4)を連立させると、 $I_{sc,0}(\lambda)$ は同じ光量、 $z_c(\lambda)$ は既知数のため、カメラで検出された散乱光量 $I_{sc}(\lambda_1)$ と $I_{sc}(\lambda_2)$ の比によって、基準面からの工具刃先高さ位置（工具長）を式(5)のように、換算係数なしで算出することが可能となる¹³⁾。

$$z_{\text{edge}} = \frac{z_c(\lambda_1) z_c(\lambda_2)}{z_c(\lambda_1) - z_c(\lambda_2)} \log_e \left[\frac{I_{sc}(\lambda_1)}{I_{sc}(\lambda_2)} \right] \quad (5)$$

3. 多波長近接場光による工具刃先高さ位置のナノスケール精度測定

3.1 観測装置の設計と製作

小径工具刃先高さ位置の非接触検出手法の基礎検証のために製作した観測装置の概要図を図4に示す。また、光学系の各種実験パラメータを表1に示す。

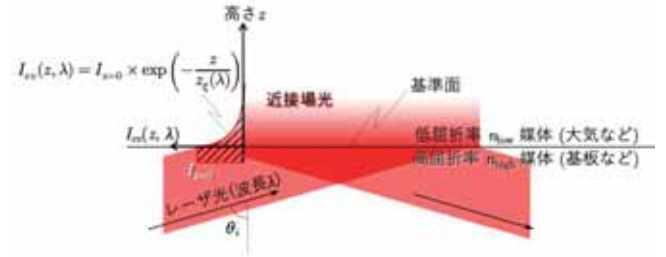


図1 近接場光の局所的な発生

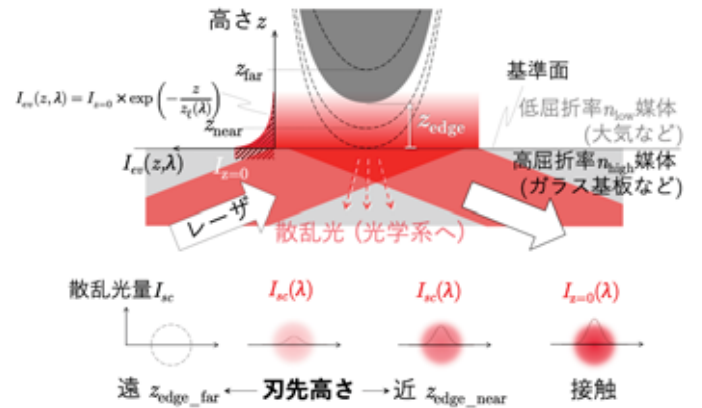


図2 小径工具刃先の検出原理

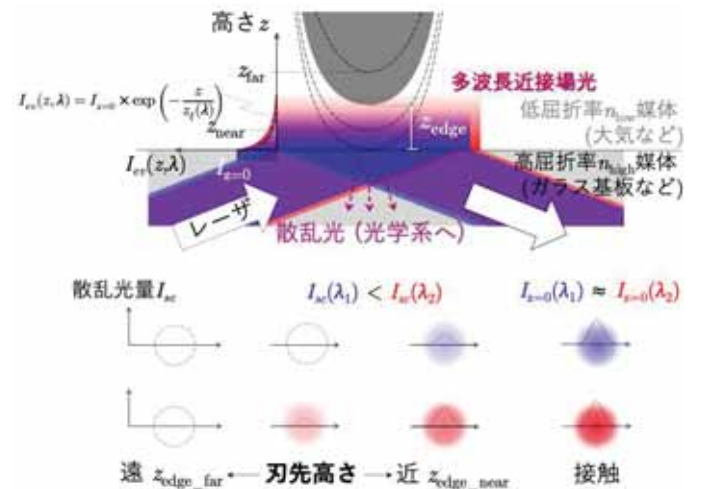


図3 小径工具刃先高さ位置の測定原理

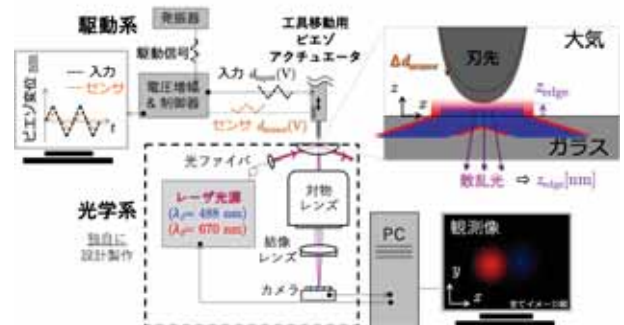


図4 観測装置(駆動系・光学系)の概要図

駆動系において、小径工具は高精度位置決めピエゾアクチュエータに取り付けて、ナノメートル精度で刃先をガラス基準面に接近させた。なお、レーザ光源は（株）島津製作所製4波長レーザモジュールを使用し、ピエゾアクチュエータは九州工業大学が保有する設備を利用した。

近接場光内に工具が侵入すると工具刃先から散乱光が発生する。その散乱光は光学系で集光・結像され、撮像素子で可視化かつ刃先位置が検出される。

現在は基礎検証の段階であり、製作した観測装置の大きさは高さ220 mm、幅150 mm、奥行き100 mmである。将来、非接触ツールセッタとして加工機内に設置し、インプロセス測定を実現するために、光学系の更なる小型化を目指している。

表1 実験パラメータ

Laser illumination		(λ_{blue})	(λ_{red})
- wavelength λ	nm	488	670
- incident angle θ_i	deg	50	
- penetration depth z_c		69	94
CMOS camera			
- pixel size	μm^2	5.48×5.48	
- exposure time	ms	25	
- recording speed	fps	40	
Optical system			
- total magnification		30×	
- numerical aperture		0.4	

3.2 検出高さ方向範囲の検証

製作した観測装置の光学系を用いた場合の、検出高さ範囲を検証するために、マイクロ工具（外径0.05 mm、材質：超硬合金）を、ピエゾアクチュエータに取り付け、印加電圧によって変位量 d_{input} を指示した。本実験では、マイクロ工具をガラス基準面に一定速度 320 nm/s で接近させ、工具刃先を観測しつつ、アクチュエータ内部に搭載されたひずみゲージを用いた実質的なアクチュエータの変位量 d_{sensor} を測定した。撮影条件は露光時間 25 ms、撮影速度 40 fps で、背景ノイズ除去後の観測像および変位量に対する散乱光量推移を図5に示す。

検出可能な高さ方向範囲は、工具刃先が各波長 λ の近接場光に侵入し、散乱光が検出され始めた時点から、刃先がガラス基準面に接触するまでのピエゾアクチュエータの高さ方向相対変位量であり、これが近接場光領域となる。

結果として、本実験条件で検出可能な刃先高さ範囲は、波長 λ_{red} の近接場光では約 300 nm、波長 λ_{blue} の近接場光では約 200 nm であった。なお、各波長におけるしみこみ深さ定数距離 z_c の約3倍であった。

これらの結果により、使用したマイクロ工具の刃先高さ位置がナノスケール範囲で検出可能であることが確認された。また、水平 XY 方向における観測範囲は、光学系による拡大率や撮像センサの大きさに依存するが、本実験装置では約 $0.2 \times 0.2 \text{ mm}^2$ であり、外径 0.05 mm 工具刃先の検出に十分な検出範囲であった。

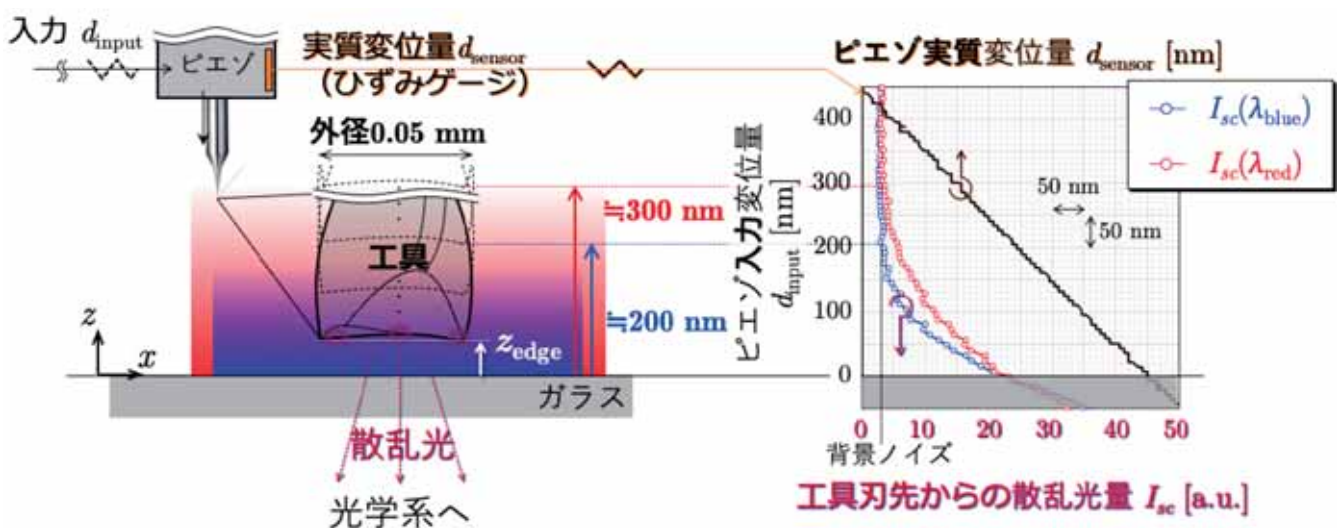


図5 多波長近接場光による工具刃先の検出範囲

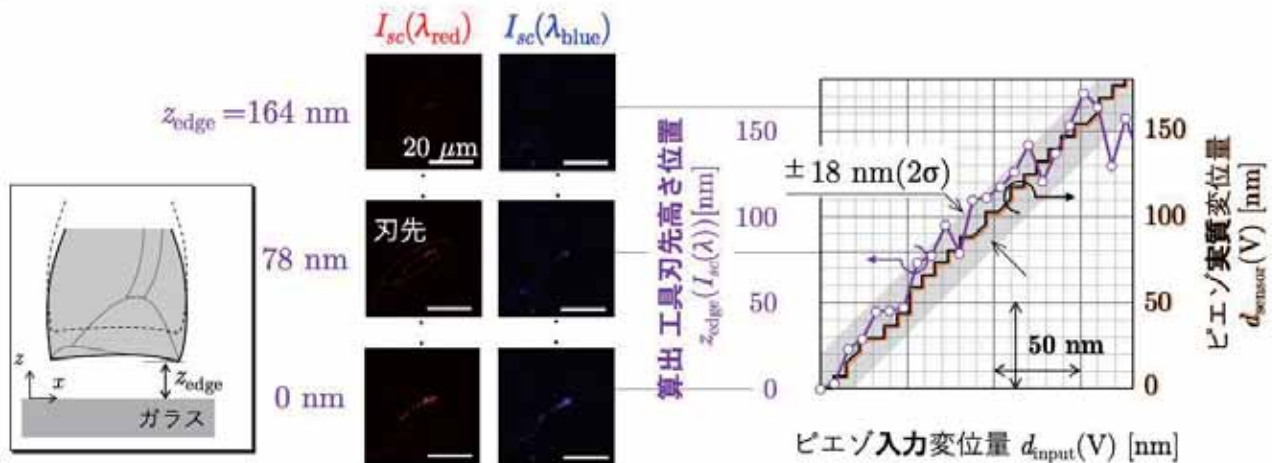


図6 算出された工具刃先高さ位置

3.3 小径工具刃先高さ位置の測定

刃先がガラス基準面に接触した時点を刃先高さ位置 $z_{\text{edge}} = d_{\text{sensor}} = 0 \text{ nm}$ とし、式(5)を用いて表面からの刃先高さ位置（工具長）を算出した結果を図6に示す。本実験では、表面から 160 nm の範囲まで $\pm 18 \text{ nm} (2\sigma)$ の不確かさで刃先高さ位置が測定されていることから、本手法の有効性が確認された。

4. おわりに

本研究では、多波長レーザによる近接場光（全反射時にガラス表面から数百 nm 近傍で低屈折率側へ発生する光）を用いて、小径工具の刃先から発生した散乱光量を検出するため、独自に開発した光学系の観測装置を設計製作した。

本光学系で、外径 0.05 mm のマイクロ工具から発生した散乱光を結像させて観測像を取得した結果、近接場光での検出可能な高さ範囲は、波長 λ_{blue} (488 nm) で約 200 nm 、波長 λ_{red} (670 nm) で約 300 nm であった。また、2波長の散乱光量から算出した刃先高さ位置は、基準面から 160 nm の範囲において、 $\pm 18 \text{ nm} (2\sigma)$ の不確かさで測定され、本手法の有効性が確認された。

今後は、刃先高さ位置測定の繰り返し精度の検証や、様々な工具材質ごとの光学的特性評価などについて検討し、本手法の基礎検証を進めていきたい。

参考文献

- 1) 高谷裕浩: 非接触機上計測のこれまでと展望, 精密工学会誌, 90 巻, 5 号 (2024) pp.387-393.
- 2) 福田将彦: 自動車用部品精密部品の超精密加工を支える機上測定, 精密工学会誌, 85 巻, 7 号 (2019) pp.628-631.

- 3) 田中克敏, 福田将彦, 甲斐義章, 鈴木清, 植松哲太郎: 超精密加工機械の高精度化の研究 -第 3 報: 超精密非球面加工機の開発と性能-, 砥粒加工学会誌, 51 巻, 9 号 (2007) pp.553-558.
- 4) カチョーニルンルアンパナート, 木村景一, 鈴木恵友: レーザ回折光による高速回転中の工具先端と被加工物間の距離計測, 2010 年度精密工学会春季大会学術講演会公演論文集 (2010) pp.765-766.
- 5) 吉岡勇人, 井手隼人, 澤野宏, 新野秀憲: 光学的手法を用いた工具-工作物接触状態検知に関する研究, 2012 年度精密工学会秋季大会学術講演会公演論文集 (2012) pp.829-830.
- 6) E.J. Ambrose: A surface Constant Microscope for the study of Cell Movements, *Nature*, Vol. 178, No.4543 (1956) p.1194.
- 7) S. Takahashi, R. Nakajima, T. Miyoshi, Y. Takaya and K. Takamasu: Development of an evanescent light measurement system for Si wafer microdefect detection, *Key Engineering Materials*, Vol. 295 (2005) pp.15-21.
- 8) カチョーニルンルアンパナート: 近接場光(エバネッセント光)による壁面近傍のナノ粒子観測方法, 精密工学誌, 90 巻, 2 号 (2024) pp.184-188.
- 9) Y. Terayama, P. Khajornrungruang, J. Seo, S. Hamada, Y. Wada, H. Hiyama: Direct Observation of Removal of Sub-100 nm Silica Particle Detachment: Lateral Force and Evanescent Microscopy Study, *ECS Journal of Solid Science and Technology*, Vol. 14 (2025) 044004.
- 10) 井上智樹, カチョーニルンルアンパナート, 鈴木恵友: 近接場光を応用した工具刃先検出法の

確立-工具先端位置検出精度の検討-, 第24回精密工学会学生会員卒業研究発表講演会論文集 (2017) pp.9-10.

- 11) 甲斐 雅貴, カチョーンルンルアンパナート, 鈴木恵友: 近接場光を応用した工具刃先計測の数値シミュレーションによる散乱光特性の評価 – 第二報: 工具材への金属モデルの適用-, 2021 年度精密工学会春季大会学術講演会公演論文集

(2021) pp.635-636.

- 12) カチョーンルンルアンパナート, 鈴木恵友, シンソムブーン カウィー, 井上智樹: 超近接スイッチ, 特開 2019-164205, 2019.9.26 公開.
- 13) 寺山裕, カチョーンルンルアンパナート: マイクロ工具長の非接触ナノスケール検出手法の精度検証, 型技術誌, 39 巻, 13 号 (2024).

国等外部からの交付・補助による研究

機器分析による食品風味の客観的評価技術確立 のためのフードメタボロミクスの応用

－機器分析による海苔の香りの視覚化の可能性－

食品コスメ部
吉村臣史

本研究では、海苔をモデル食品とし、海苔の風味を機器分析により評価する技術を確立するため、まずは香りの観点から機器分析の応用可能性を評価した。「磯の香り」「焙煎香」「泥臭さ」「香りのバランス」の観点から官能評価を行い、今回被験対象となった10種類の海苔をランク付けした。固相マイクロ抽出を応用した静的ヘッドスペースサンプリングによるガスクロマトグラフ質量分析により、421個のピークをアサインすることができた。これらのデータを主成分分析及び部分的最小二乗判別分析、階層的クラスター分析により統計解析を行うことで、今回実施した官能評価の結果と機器分析による結果との相関性を検証した。

1. はじめに

消費者が食品を選択する上で「おいしさ」等の風味は、重要なファクターとなる。製品開発や流通等において、風味に係る視覚的データのニーズはあるものの、大部分は専門家による官能試験の結果や非破壊分析によるデータが多く、消費者が食品全体の風味を容易に想像できるデータとは言い難い。これら手法には以下の課題もあげられる。

- ・ **【官能試験】** 専門的知識を持ち、経験の豊富なパネラーの確保が困難。一般人のパネラーであれば、結果に主観性が大きく反映し、結果のバラツキが発生。
- ・ **【非破壊分析】** 糖度分析など測定可能な項目が限定。

食品の風味評価に関しては、成分分析による評価又は味覚認識装置による評価があげられる。前者では、難揮発性成分分析（主に味に関与）と揮発性成分分析（主に香りに関与）の2つに大別され、特定された成分から「旨味が強い」、「柑橘臭が強い」といった評価が行われる。これは、個々の成分が持つ特性と含有量から推察した結果であり、食品全体の風味を示したものとは言えない。後者は、複数のセンサーにより食品全体の風味を総合的に評価できる技術である。当該機器は、センサー工学の観点から取り組まれ^{1),2)}、数機種市販されている。得られるデータは客観的なものであるものの、苦味、旨味などおおまかな味覚の方向性を示し、食品独自の風味を示していない。より正確な「おいしさ」の評価を行うためには、得られたデータ

と官能評価における表現との相関性を十分に吟味することが肝要である。これまでも、多くの研究者において、「食品風味の可視化」に取り組みされており、時代を問わずニーズは非常に高い³⁾⁻¹⁵⁾。

近年、生体中の代謝物を網羅的に解析するメタボロミクス解析を食品分析に応用し、食品成分等を測定対象とした「フードメタボロミクス解析」が行われるようになった。質量分析装置（MS）の高感度化・低価格化により、食品成分の網羅的な分析手法として期待が高い。MSのフロントエンドとして、ガスクロマトグラフ（GC）や液体クロマトグラフ（LC）、キャピラリー電気泳動など幅広く適用でき、様々な成分を測定可能というメリットもある。複数のデータを比較するために、主成分分析等の統計解析を応用することによって、多くの情報を得られる研究手法となっている。

これまで、食品中に含まれる特徴的な成分や汚染成分の解明に応用した取組が報告される^{16),17)}とともに、農産物の品種間における特定成分の差異や食品加工工程における成分の動態等について、フードメタボロミクス解析を応用した事例は見受けられる。一方で、本研究のように、食品の「おいしさ」に関する客観的解析という観点において、官能試験の結果と統計解析との相関性を踏まえて、「おいしさ」に寄与する特徴を評価、検討した事例は少ない。Pongsuwanらは、茶葉から有機溶媒にて抽出された成分の網羅的解析の結果と官能試験の結果との相関性について検討している¹⁸⁾⁻²⁰⁾。しかしながら、それ以外の素材について報告例は見当たらない。

本研究は、機器分析による食品風味の可視化に繋げることを目的とする。食品の「おいしさ」に関して客観的な評価技術を構築するためには、網羅的な食品成分に関するデータの解析（データ解釈のための統計解析技術の応用を含む）と官能試験結果との相関性評価が不可欠であり、これまでの論文等の報告から鑑みても、ほとんど取り組まれていない。機器分析による食品風味の可視化に繋げるためには、これらデータの蓄積及びデータに基づいた解析技術の構築が重要である。これにより、風味に主眼をおいた新製品や新品種の開発、品質管理など様々な分野に展開可能な基盤技術となる。

2. 実験方法

2.1 被験試料

被験試料は、株式会社ヤマコより恵与された成型済乾海苔（入荷後焼き工程を1回実施した海苔）を使用した。

2.2 官能評価

官能評価は、健康人18名を対象に行った。官能評価は、被験者の評価参加の承諾を得た上で実施した。

今回の官能評価は、被験者の所在地が県境を越えるため実施場所を1箇所限定せず、被験者の所在地において実施した。官能評価は、被験者において一般的に摂食する環境であると判断した場所にて個別に実施した。実施期間を、2022年7月から8月の間としている。被験試料は、2.1に記載した海苔とし、そのまま摂食することで官能評価を行った。

官能評価項目は、「磯の香り（磯のさわやかさ～酸化臭）」「焙煎香」「泥臭さ（珪藻臭）」「香りのバランス」の4項目とし、下記の判断基準により採点を行った。

- (1) 風味の基準となる海苔（基準海苔）を設定し、基準海苔との比較により採点する。基準海苔は、高品質な海苔を設定した。
- (2) 「香りのバランス」以外の3項目については、基準となる点数を2点設定し、11段階評価を行った。基準となる点数の設定は下記ア及びイの通りとした。
- ア 基準海苔と同等を7点に設定し、基準海苔よりも高い評価のうち最大の点数を10点に設定した。
- イ 被験者が通常（良くも悪くもない）と評価する点数を4点に設定し、通常よりも低い評価のうち最小の点数を0点に設定した。
- (3) 「香りのバランス」は、基準海苔を5点と設定し、基準海苔との相対評価により、最小0点、最高10点の11段階評価を行った。

2.2 揮発性成分 (volatile organic compound; VOC) 分析前処理

成型された状態である乾海苔を粉砕機を用いて粉末状とした。粉末化した海苔 0.5 g をガスクロマトグラフ質量分析装置 (GC-MS) に接続したオートサンプラー用バイアル（容量 20 mL）に入れ、分析に供するまで室温環境下の専用ユニットに静置した。

2.3 VOC 分析

ヘッドスペースサンプリング法をベースとし、閉区間（密閉したバイアル）の気相空間に揮発した成分を固相マイクロ抽出（Solid phase microextraction; SPME）により抽出した。使用機器、サンプル処理条件等詳細条件を表1に示した。

分析は、SPME ファイバーに吸着した VOC を GC-MS に供することにより分析を行った。使用機器、分析条件等詳細条件を表2に示した。

2.4 GC-MS データに基づいたピークのアサイン

GC-MS による測定データに基づいたピークのアサインは、国立研究開発法人理化学研究所からフリーソフトウェアとして配布されている MS-DIAL (4.9.221218) を使用した。MS-DIAL 上では、アサインされたデータについて、複数の分析データ間のピークエリア等を比較できるとともに、csv ファイルにアウトプットできることから、アウトプットしたデータファイルを以後の統計解析に使用することが可能である。

本研究では、MS-DIAL を用いて、

- ・ GC-MS 分析により検出されたピークについてアサインを行う
- ・ アサインされたピークについて、全ての GC-MS データから関係するピークのピークエリアを

表1 海苔由来 VOC のサンプリング等条件

項目	Name or value
Apparatus	AOC-5000plus
Incubation temperature	60°C
Preincubation time before VOC sampling	10 min
Extraction time by SPME	30 min
Desorption time on GC injection port	15 min
Agitator speed during VOC sampling	500 rpm
SPME fiber assembly	DVB/CAR/PDMS
Size of SPME fiber	50/30 mm, 23 Ga

表2 海苔由来 VOC の分析等条件

Conditions	Name or value
Apparatus	GCMS-TQ8030
Carrier gas	He
Carrier gas control	Constant linear velocity
Linear velocity of Carrier gas	30.0 cm/sec
VOC introduction to GC column	Split introduction
Split ratio	5
Carrier gas pressure (initial value)	21.6 kPa
Carrier gas flow rate (total, initial value)	7.2 mL/min
Column oven temperature (initial)	30°C
Column oven temperature program	Start temperature; 30°C. Temperature program; 5°C/min to 230°C.
Ionization source temperature	200°C
Interface temperature	230°C
Measured <i>m/z</i> region	from 35 to 300
Column	VF-WAXms
Column size	30 m x 0.25 mm i.d., film thickness 0.25 mm

算出する

- 全 GC-MS データにおけるアサインされたピークのピークエリアを csv ファイルとしてアウトプットする

ことにより、個々の海苔から検出される揮発性成分の差異を追跡するためのデータとして活用した。

2.5 統計解析

前項により得られたデータから、統計解析は Web 解析ツールである MetaboAnalyst 5.0 を用いて、主成分分析及び部分的最小二乗判別分析、階層的クラスター分析を行った。

3. 結果及び考察

3.1 海苔の官能評価

図1に、海苔の香りに関する官能評価の結果を示し

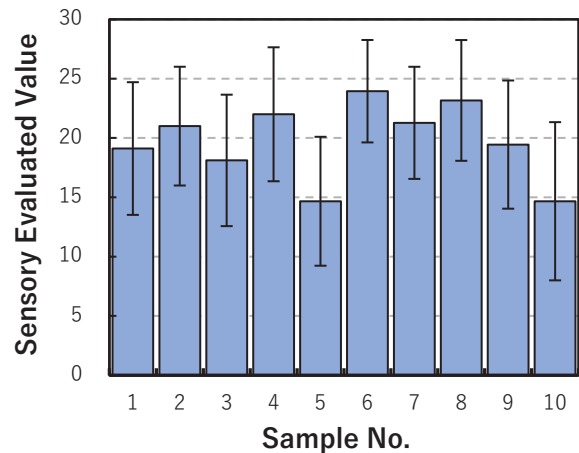


図1 海苔の香りに関する官能評価

ている。

この結果より、最も高い評価を受けたサンプル6において 23.94 ポイント、低い評価を受けたサンプル5及び10において 14.67 ポイントの点数が付けられた（全てが基準海苔と同等の香りであると判断した場合のポイントは26となる。）。

項目ごとに比較した場合、サンプル間の差異は図1と同様の傾向を示していた。すなわち、高い評価を受ける海苔は「磯の香り」や「香ばしさ」が強く感じられる一方、「泥臭さ」が比較的弱く感じられ、結果として高評価を受けていることが示された。「磯の香り」が強い一方、「香ばしさ」の評価が低い、といった特徴を示す海苔は確認されず、海苔の香り自体が一定のバランスを維持しながら、品質の高低に影響していることが想定された。

3.2 海苔から検出された VOC

図2にはサンプル2の海苔から検出された VOC のトータルイオンクロマトグラム (total ion chromatogram; TIC) を、図3にはサンプル5の海苔から検出された VOC の TIC を、図4にはサンプル6の海苔から検出された VOC の TIC を示している。

これらの結果より、サンプルごとにおいてクロマトグラムの差異は認められるものの、この結果から官能評価で示された違いを具体的に説明することは非常に困難である。そこで、検出されたピーク全てに対して統計学的手法等による解析を適用することにより、官能評価による結果との関連性を検証した。

3.3 主成分分析 (Principal component analysis method; PCA)

全ての GC-MS のデータから MS-DIAL を用いてアサインしたピークのエリアに基づき、PCA を行った結果を図5に示している。



図2 サンプル No.2 から検出された VOC



図3 サンプル No.5 から検出された VOC



図4 サンプル No.6 から検出された VOC

この結果から、官能評価において高評価を受けたサンプル（図5内Aで示している部分）については、第2象限（一部第3象限を含む）に向けて広い範囲に分布していることが示された。このグループにおいても、大きく2つに分類されることも考えられるが、この推論については次年度以降に得られたデータを踏まえて評価したい。

また、最も評価の低かったサンプル5及び10については、両方とも第4象限に位置し、他のサンプルと比較して組成が特異的である可能性が示唆されている。

3.4 部分的最小二乗判別分析 (Partial least squares-discriminant analysis method: PLS-DA)

図6は、PCAに供したデータを用いて PLS-DA を行

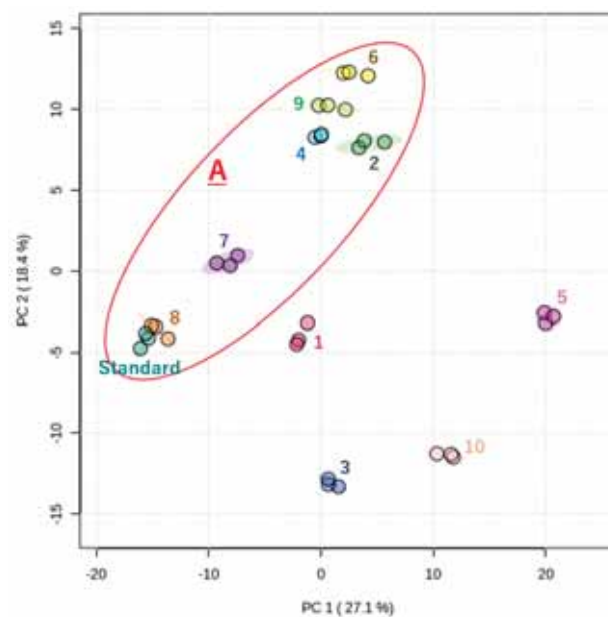


図5 海苔由来 VOC に対する PCA

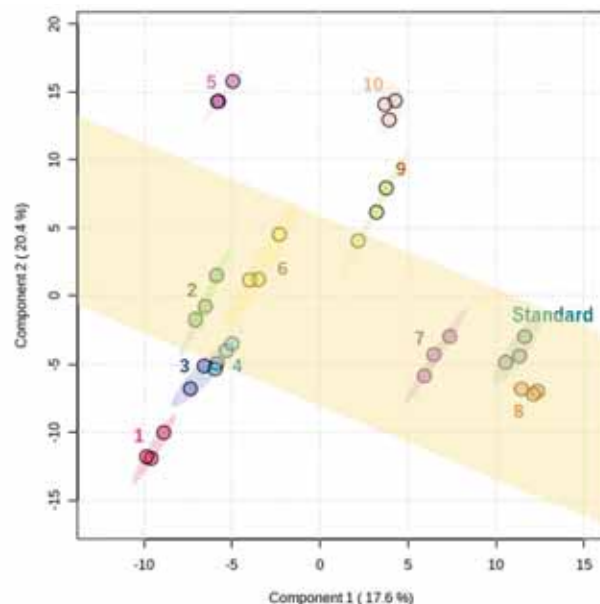


図6 海苔由来 VOC に対する PLS-DA

った結果である。この結果から、高評価を受けたサンプルは図中の色を付けた領域に集約している可能性が示された。これ以外のサンプルは、この領域から上下に離れて配置されていた。

PCAの結果では、サンプル9のデータが官能評価において高評価を受けたグループに配置されていたものの、PLS-DAの結果では当該領域から離れて配置されており、高評価群と分類される可能性が示されている。一方、PCAでは高評価群と離れて位置していたサンプル3が PLS-DA では高評価群の近傍に配置されるなど、解析手法の違いの影響が見られている。この現

象についても、今後のデータの蓄積を踏まえて検証を行いたい。

3.5 階層的クラスター分析 (Hierarchical cluster analysis method; HCA)

さらに、HCA を行った結果を図 7 に示している。HCA は、同一サンプルに対して 3 回測定を行っているが、測定された 3 回のピークエリアを平均した値を用いて解析した。解析は、ユークリッド距離を使用し、最遠隣法 (complete) により行っている。行方向については、検出されたピークを示しているが、今回のデータでは全体の概要を評価するために、個別ピークを紐づけるデータ (保持指標) は省略している。個々のバーの色 (図中「class」と記載) は、同一ピークについて、サンプルごとのピークエリアを標準化した値を示している。すなわち、赤色が濃いバーは、他のサンプルよりもピークエリアが大きいことを示している。

この結果から、今回測定されたデータにおいて、

- (1) 低評価を受けた海苔 (C2) では、R1 に分類されたピーク群の検出量が少なく、R2 及び R3 に分類されたピーク群の検出量が多い。
- (2) 高評価を受けた海苔 (C1 及び C4) では、PCA や PLS-DA でも示されたように、大きく 2 つのパターンに分類される。
- (3) C1 及び C4 を量的に評価すると、C1 は R5 に分類されたピーク群が多く検出され、C4 のグループでは R1 及び R4 に分類されているピーク群が多く検出されている。

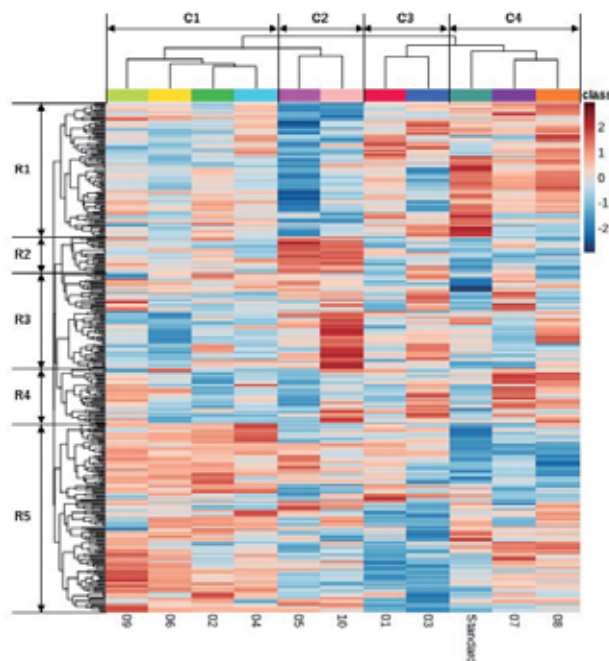


図 7 海苔由来 VOC に対する HCA

- (4) C1 及び C4 において、量的な一様の傾向が認められず (C1 では R2 のピーク群が多く検出され、C4 では R3 のピーク群が多く検出される)、今後のデータの蓄積が必要である。

- (5) その他の海苔 (C3) では、R5 の一部のピーク群が小さく、C2 よりも検出量が少ない傾向である。

ことが示されている。

以上の結果から、高評価を受けた海苔では、R1 及び R5 に分類されたピーク群の検出量が多く、低評価を受けた海苔では、R2 及び R3 に分類されたピーク群の検出量が多い可能性が示された。

4. おわりに

これまで行った PCA 及び PLS-DA, HCA の結果から、GC-MS による分析結果を官能評価の結果に繋ぐ傾向が示されている。一方で、前述したように、今回の測定データが単年度により得られたデータであることから、年度の異なるサンプルにおいて同様の検証を行い、今回のデータと同様の傾向が見られるかどうか等の再現性や解析の妥当性、有用性などを評価する必要がある。今後についても、機器分析による「食品風味の可視化」に繋がる検討を継続して取り組んでいきたい。

本研究において使用した GC-MS/MS 構造解析システムは、電源立地地域対策交付金により導入したものである。また、本研究の実施にあたって海苔を御恵いただいた株式会社ヤマコ様に厚く感謝申し上げます。また、研究の実施について、本研究は JSPS 科研費 JP22K02109 の助成を受けたものです。

参考文献

- 1) Hayashi et al., Sens. Actuators, B, 2, 205, 1990.
- 2) Legin et al., Sens. Actuators, B, 65, 232, 2000.
- 3) 小泉幸道ら: 日本食品工業学会誌, 33, 316, 1986.
- 4) 玉野まり子ら: 日本食品工業学会誌, 39, 357, 1992.
- 5) 下田満哉, 筏島豊: 日本調理科学会誌, 34, 236, 2001.
- 6) 今村美穂, 牛尼翔太, 宮田慎吾: 日本調理科学会誌, 52, 67, 2019.
- 7) 武田珠美ら: 日本調理科学会誌, 52, 93, 2019.
- 8) 中島章裕: 乳業技術, 68, 29, 2018.
- 9) 菅野洋一朗ら: 電気学会論文誌 E, 140, 294, 2020.
- 10) 森田亜紀, 早川文代, 香西みどり: 日本食品科学工学会誌, 67, 13, 2020.
- 11) 森田亜紀, 早川文代: 日本調理科学会誌, 55, 105,

2022.

- 12) 飯島陽子: 化学と生物, 55, 593, 2017.
- 13) 飯島陽子: 化学と生物, 58, 210, 2020.
- 14) Iijima.Y et al.: Biosci. Biotechnol. Biochem., 80, 2401, 2016.
- 15) 河原崎正貴: 化学と生物, 55, 538, 2017.
- 16) Robledo and Smyth, Electrophoresis, 30, 1647, 2009.
- 17) Sawalha et al., Food Chem., 116, 567, 2009.

18) Pongsuwan et al., J. Agric. Food Chem., 56, 10705, 2008.

19) Pongsuwan et al., J. Agric. Food Chem., 56, 744, 2008.

20) Pongsuwan et al, J. Agric. Food Chem., 55, 231, 2007.

※本研究は令和4年度に実施しましたが、知的財産保護の観点から令和6年度の報告書に掲載しました。

令和 6 年度 佐賀県工業技術センター 研究報告書

発 行	令和 7 年 1 0 月
発行所	佐賀県工業技術センター 〒849-0932 佐賀県佐賀市鍋島町八戸溝 114 TEL : 0952-30-8161 FAX : 0952-32-6300 URL : https://www.saga-itc.jp/ 報告書は上記 URL でもご覧いただけます。
印 刷	有限会社みくりやプリンティング 〒840-0027 佐賀県佐賀市本庄町大字本庄 575-5 TEL : 0952-28-0761 FAX : 0952-97-9256

