サケ中骨のカルシウム吸収に対する加工方法の影響

秋野雅樹[§], 蛭谷幸司*, 今村琢磨, 内山智幸**, 松嶋景一郎**, 原 博***

北海道立網走水産試験場加工利用部

* 北海道立網走水産試験場加工利用部 (現: 釧路水産試験場利用部)

** 北海道立工業試験場

*** 北海道大学大学院農学研究院

Effects of Salmon Bone Processing Methods on Intestinal Calcium Absorption in Rats

Masaki Akino[§], Kouji Ebitani*, Takuma Imamura, Tomoyuki Uchiyama**,

Keiichiro Matsushima** and Hiroshi Hara***

Processing and Utilization Division, Hokkaido Abashiri Fisheries

Experiment Station, 7-8-5 Minato-cho, Monbetsu 094-0011

* Processing and Utilization Division, Hokkaido Abashiri Fisheries Experiment Station, 7-8-5

Minato-cho, Monbetsu 094-0011 (Present : Utilization Division, Hokkaido Kushiro

Fisheries Experiment Station, 4-25 Nakahama-cho, Kushiro 085-0027)

** Hokkaido Industrial Research Institute, Kita-19, Nishi-11, Kita-ku, Sapporo 060-0819

*** Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, Kita-9, Nishi-9, Kita-ku, Sapporo 060-8589

The aim of the present study was to utilize salmon bones, by-products of salmon processing, as a calcium supplement. We examined the effects of processing methods of salmon bones, especially degrees of pulverization and refining, on calcium absorption using a rat balance study (5-week-old male Sprague-Dawley rats). Using different pulverization and refining conditions, salmon bone powders were prepared and added to test diets based on mineral formulation of the AIN-93G diet. We found that ultrafine pulverization of salmon bones improved calcium absorption in rats and that semi-refined salmon bone powder, i.e., materials containing calcium with a large amount of salmon bone protein, had the potential to enhance calcium absorption. Thus, salmon bone may be an excellent resource for a calcium supplement, and the ultrafine pulverization and preparation, including that of bone protein, can enhance bioavailability of salmon bone calcium.

(Received Aug. 27, 2008 ; Accepted Dec. 12, 2008)

Keywords : calcium, calcium absorption, processing method, rat, salmon bone

キーワード : カルシウム, カルシウム吸収, 加工方法, ラット, サケ中骨

北海道はサケの産地としてよく知られている。サケの漁獲量や漁業生産額は高く、北海道の水産業に果たす役割は大きい。サケの用途は広く、生鮮や冷凍の他、塩蔵品（新巻、山漬）、乾製品（トバ）、フレーク、缶詰等の加工製品の原料としても利用される。

近年、サケの流通形態がラウンドやドレス出荷に加えてフィレー形態での出荷も増加していることから、中骨等の加工残滓が多量に産出されている。サケ中骨（以下中骨）については、食品素材としての利用は非常に少ない。しかし、魚骨は食用することが可能ならば極めて優秀な天然カ

ルシウム (Ca) ソースであり¹⁾、天然 Ca にこだわりを持つユーザーには人気がある²⁾。そのうえ、Ca の主な供給源である乳製品や小魚、大豆などは、現在の食事では減少傾向にあり、日本人の Ca 平均摂取量はかなり低い摂取レベルにあるといえる。将来、骨粗鬆症など骨疾病の大幅な増加が危惧される³⁾。このため中骨は天然 Ca 素材としての栄養補助食品への利用が期待される。

中骨の利活用の際して、中骨は食品素材として好まれる外観ではなく、なにより直接可食することが難しいことから、食用に適した形状にすることが必要とされる。さらに魚骨の栄養学的な利用効率、すなわち消化吸収性の優れた加工・調理または摂取方法の技術開発が望まれる。これまで、魚骨の軟化や可食化に関する研究は、いくつか報告されているが^{4)~6)}、実際に Ca 補助食品として利用するため

〒094-0011 紋別市港町 7-8-5

* 〒085-0027 釧路市仲浜町 4-25

** 〒060-0819 札幌市北区北 19 条西 11 丁目

*** 〒060-8589 札幌市北区北 9 条西 9 丁目

[§] 連絡先 (Corresponding author), akinom@fishexp.pref.hokkaido.jp

の詳細な加工方法、特に粉碎や精製の条件について言及され、それらが Ca 吸収に及ぼす影響に関して報告されているものはない。

本研究では、微細化食品素材の開発の一環として、サケ中骨の加工方法がラットの Ca 吸収に及ぼす影響について検証した。

実 験 方 法

1. 供試試料

北海道紋別市内の水産加工場から入手したシロサケ *Oncorhynchus keta* 中骨の加工残滓を用いた。これらは試験に供するまで -30°C で保存した。

2. 中骨 Ca 素材の調製

(1) 酵素処理

中骨を包丁で細切した後、電動式ミートチョッパー（大道産業(株)製、OMC-22）で粉碎した。この粉碎物に残存するサケ筋肉組織等の共雑物を簡易的に除去するために、試料重量に対して 3 倍量の水と 0.5% (v/w) のアルカラゼ（ノボザイムズジャパン(株)）を加え混合して 45°C で 3 時間、酵素処理した。その後、沈殿物を回収し、沸騰水で 10 分間加熱して酵素を失活させた。酵素処理した中骨の一部は、 50°C で約 20 時間熱風乾燥した後、石臼式摩砕機（増幸産業(株)製、スーパーマスコロイダー MKZA6-5）、次にアトマイザーミル（ホソカワミクロン(株)製、マイクロバンタムミル AP-B 型）で微細化し、さらにジェットミル（日清エンジニアリング(株)製、CJ-10）により超微細化処理を行った。これを骨タンパク質を含有する粗精製超微細化サケ中骨粉末（以下 SR-USBP）の Ca 素材とし、動物試験（実験 2）への供試試料とした。

(2) アルカリ処理

酵素処理した中骨の残りは、骨タンパク質を徹底的に除去するためアルカリ処理を行った。アルカリ処理の条件は、酵素処理物を円筒形プラスチックカラム（ $\phi 70 \times 425$ mm）に充填し、試料重量に対して 4 倍量の 2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を 40°C に保温し、定量送液ポンプ（東京理科器械(株)製、RP-2000）を使用して 300 mL/min で 6 時間循環させた。アルカリ処理後、円筒形プラスチックカラムを水道蛇口に接続し流水により pH が中性付近になるまで洗浄した。その後、カラム内からアルカリ処理物をビーカーに回収し、蒸留水でデカンテーションを数回繰り返して洗浄した。アルカリ処理した中骨は、 50°C で約 18 時間熱風乾燥した後、乳鉢を用いて摩砕した。摩砕した中骨は、ステンレス製ふるい（東京スクリーン(株)製）を用いてふるい分けし、目開き 125~250 μm の範囲で回収したサイズを微細化サケ中骨粉末（以下 FSBP, 実験 1）の Ca 素材とした。

一方、目開き 125 μm 以下で回収した中骨は、ジェットミルにより超微細化処理を行い、超微細化サケ中骨粉末

Table 1 Characteristics of raw material and salmon bone powders

	Raw material	SR-USBP	FSBP	USBP
Particle size, D_{50} (μm)	—	3.8	128.4	1.9
Moisture (%)	58.0	2.2	6.7	4.2
Crude protein (%)	18.6	28.3	0.5	0.6
Crude fat (%)	6.6	0.6	0.2	0.2
Crude ash (%)	15.9	62.9	85.2	88.1
Ca (%)	5.90	26.25	33.22	35.80
P (%)	2.91	11.76	15.30	15.82
Mg (%)	0.11	0.40	0.55	0.51
Na (%)	0.22	0.20	0.21	0.43

SR-USBP, semi-refined ultrafine salmon bone powder; FSBP, fine salmon bone powder; USBP, Ultrafine salmon bone powder.

（以下 USBP, 実験 1, 2）の Ca 素材とした。これら二つの Ca 素材は動物試験への供試試料とした。

3. 中骨 Ca 素材の粒径評価

中骨 Ca 素材の粒度分布をレーザー回折・散乱法（日機装(株)製、9320HAR (X-100)）により測定し、その平均粒径 D_{50} を求めた（Table 1）。

4. 中骨の成分分析

水分量は 105°C における常圧乾燥法、粗タンパク質量はケルダール法によって全窒素量を求め、係数 6.25 を乗じて算出した。粗脂肪量はソックスレー抽出法により定量した。無機成分は 550°C で 24 時間、乾式灰化して原子吸光度法により定量した。ただし、リン (P) については上記条件にて灰化後塩化物として、バナドモリブデン酸吸光度法⁷⁾で定量した。

5. 実験動物および飼育条件

5 週齢の Sprague-Dawley 系雄ラット（日本 SLC(株)）、初体重 120 g 程度のものを用いた。ラットの飼育は、個別のステンレス製金網ケージにて、室温 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 40~60%、明暗周期（明期 8:00~20:00、暗期 20:00~8:00）で行った。予備飼育として上記条件にて 1 週間程度 AIN-93G⁸⁾ を基本とした標準飼料と脱イオン水を自由摂取させた。また、飼料給餌は粉末給餌器を使用して行った。試験はすべて北海道大学大学院農学研究科実験動物委員会の承認を得た上で、北海道大学実験動物ガイドラインに沿って行われた。

6. Ca 出納実験

(1) 中骨 Ca 素材の粉碎程度の差異がラットの Ca 吸収に及ぼす影響（実験 1）

実験 1 では、ラットを予備飼育後、平均体重が均一になるように 1 群 8 匹で 4 群に分けた。ラットには飼料として、AIN-93G をそのまま用いた標準食 (Control 1)、ミネラル組成を中骨群に合わせて改変した対照食 (Control 2)、

Table 2 Mineral mixes that supply the concentrations of minerals for the test diets

Ingredient	Control 1-MX* ¹	Control 2-MX* ²	SR-USBP- MX* ²	FSBP- MX* ²	USBP- MX* ²
g/kg mix					
Calcium carbonate, anhydrous, 40.04% Ca	357.00	357.00	—	—	—
SR-USBP, 26.25% Ca ; 11.76% P ; 0.40% Mg ; 0.20% Na	—	—	544.52	—	—
FSBP, 33.22% Ca ; 15.30% P ; 0.55% Mg ; 0.21% Na	—	—	—	430.29	—
USBP, 35.80% Ca ; 15.82% P ; 0.51% Mg ; 0.43% Na	—	—	—	—	399.27
Potassium phosphate, monobasic, 22.76% P ; 28.73% K	196.00	207.67	7.90	—	11.73
Sodium dihydrogenphosphate, dihydrate, 19.85% P ; 14.63% Na	—	93.54	—	—	—
Potassium citrate, tri-potassium, monohydrate, 36.16% K	70.78	61.50	220.21	26.50	217.18
Sodium chloride, 39.34% Na ; 60.66% Cl	74.00	39.20	71.24	71.70	69.64
Magnesium oxide, 60.32% Mg	24.00	—	18.49	18.50	17.62
Magnesium chloride hexahydrate, 11.96% Mg ; 17.44% Cl	—	121.05	9.60	8.00	15.20
Potassium sulfate, 44.87% K ; 18.39% S	46.60	46.60	46.60	46.60	46.60
Ferric citrate, 16.5% Fe	6.06	6.06	6.06	6.06	6.06
Zinc carbonate, 52.14% Zn	1.65	1.65	1.65	1.65	1.65
Manganous carbonate, 47.79% Mn	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63
Cupric carbonate, 57.47% Cu	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
Potassium iodate, 59.3% I	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
Sodium selenate, anhydrous, 41.79% Se	0.0103	0.0103	0.0103	0.0103	0.0103
Ammonium paramolybdate, 4 hydrate, 54.34% Mo	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008
Sodium meta-silicate, 9 hydrate, 9.88% Si	1.45	1.45	1.45	1.45	1.45
Chromium potassium sulfate, 12 hydrate, 10.42% Cr	0.275	0.275	0.275	0.275	0.275
Lithium chloride, 16.38% Li	0.0174	0.0174	0.0174	0.0174	0.0174
Boric acid, 17.5% B	0.0815	0.0815	0.0815	0.0815	0.0815
Sodium fluoride, 45.24% F	0.0635	0.0635	0.0635	0.0635	0.0635
Nickel carbonate, 45% Ni	0.0318	0.0318	0.0318	0.0318	0.0318
Ammonium vanadate, 43.55% V	0.0066	0.0066	0.0066	0.0066	0.0066
Powdered sucrose	221.026	62.846	70.846	187.816	212.166

Abbreviations are explained in the first footnote in Table 1.

*¹ The control 1-mix was prepared in accordance with the AIN-93G-mix formulation.

*² These mineral mixes supply only 2304 mg P/kg diet. The remainder comes from casein which contains an average of 0.72% P. The amount of total phosphorus in test diets is 3744 mg/kg.

FSBP 食, USBP 食のいずれか一つを摂食させた。標準食を除いた他の飼料のミネラル混合物組成は、中骨から調製した各中骨 Ca 素材の無機成分の分析結果 (Table 1) を基に飼料間の P 含有量を一定にし、P を除く他のミネラル成分が AIN-93G のミネラル混合物と等量になるように設定した (Table 2)。なお、これら飼料での Ca/P はモル比で 1.0 となった。飼料の配合組成は Table 3 に示した。試験飼育は 2 週間行い、脱イオン水は自由摂取とした。Ca 出納を調査するために試験飼育を開始して 4 日目と 11 日目からケージ下のトレイに Ca を含まない紙を敷き、それぞれ連続して 4 日間の糞便を採取した。4 日間の期間で 2 回に亘って集められた糞便は凍結乾燥した後、重量を測定した。各ラットの体重と摂食量は毎日測定した。試験飼育終了日に、ラットをネブタール麻酔下で開腹し、腹部大動脈からヘパリン採血した。大動脈より放血屠殺した後、腎臓および左大腿骨を摘出した。血漿は血液を 4℃ で遠心分離 (3000 rpm, 10 分間) することにより分離し、分析まで

−40℃ で凍結保存した。腎臓および大腿骨は凍結乾燥した後、重量を測定した。

(2) 中骨の精製処理の差異がラットの Ca 吸収に及ぼす影響 (実験 2)

実験 2 では、飼料の配合組成以外の条件および手順についてはすべて実験 1 と同様に行った。飼料については、中骨 Ca 素材を超微細化した効果をより明確にするために、炭酸水素ナトリウムを添加することで消化性を抑える飼料の配合組成を設計した (Table 3)。炭酸水素ナトリウムの添加量は、AIN-93G のミネラル混合物に含まれるナトリウム量と炭酸水素ナトリウムのナトリウム量が等量になるよう設定した。ラットには飼料として、標準食 (Control 1)、対照食 (Control 2)、SR-USBP 食, USBP 食のいずれか一つを摂食させた。

7. 動物実験試料の Ca 量分析と Ca 吸収率の算出

凍結乾燥した糞便、腎臓、大腿骨の Ca 量は原子吸光光度法により定量した。血漿の Ca 濃度は、カルシウム C-テ

Table 3 Compositions of test diets

Ingredient	Expreiment 1 Expreiment 2	
	g/kg diet	
Casein ^{*1}	200.0	200.0
Dextrin ^{*2}	529.5	525.8
Sucrose	100.0	100.0
Soybean oil	70.0	70.0
Mineral mix ^{*3}	35.0	35.0
Vitamin mix ^{*4}	10.0	10.0
Choline bitartrate	2.5	2.5
L-Cystine	3.0	3.0
Tert-butylhydroquinone	0.014	0.014
Crystallized cellulose ^{*5}	50.0	50.0
Sodium hydrogen carbonate ^{*6}	—	3.7

^{*1}ALACID (New Zealand Dairy Board, Wellington, New Zealand).

^{*2}TK-16 (Matsutani Chemical Industry Co., Ltd., Hyogo, Japan).

^{*3}The mineral mix for control 1 diet was prepared in accordance with the AIN-93G formulation. Mineral mixes for other test diets were prepared in accordance with the composition shown in Table 2, and it provided (mg/kg diet): Ca 5000, P 2304, K 3600, S 300, Na 1019, Cl 1571, Mg 507, Fe 35.0, Zn 30.0, Mn 10.0, Cu 6.0, I 0.2, Mo 0.15, Se 0.15, Si 5.0, Cr 1.0, F 1.0, Ni 0.5, B 0.5, Li 0.1, V 0.1.

^{*4}The vitamin mix was prepared in accordance with the AIN-93G formulation.

^{*5}Avicel PH102 (Asahi Chemical Industry Co., Ltd., Tokyo, Japan).

^{*6}It provided (mg/kg diet): Na 1019.

ストワコー (和光純薬工業(株)) で測定した。

Ca 吸収率は次の式により算出した:

Ca吸収率(%)

$$= ([\text{摂取Ca量} - \text{糞中排泄Ca量}] / \text{摂取Ca量}) \times 100$$

8. 統計学的処理

図および表の各値は平均値±標準誤差 (SEM) で示した。群間の差を一元もしくは二元配置の分散分析で解析し、有意差 ($p < 0.05$) が認められた場合、個々の群間の差を Duncan の多重比較検定法により解析した。

実験結果

1. 中骨 Ca 素材の粉碎程度の差異がラットの Ca 吸収に及ぼす影響 (実験 1)

実験 1 でのラットの成長パラメータを Table 4 に示した。2 週間の試験飼育で体重増加、飼料摂取量に関して、4 群間での有意差はみられなかった。

実験 1 でのラットの Ca 吸収量と Ca 吸収率については、4 群間での有意差は認められなかった (Table 5)。

さらに、FSBP 群と USBP 群の Ca 吸収率値を抽出し、出納期間と粉碎程度を変動要因とする二元配置分散分析で解析した結果、前者 ($p = 0.397$) についての有意差は認められなかったが、後者 ($p < 0.05$) については有意差が認められ、中骨 Ca 素材の粒径が Ca 吸収に影響を及ぼした (Fig. 1)。また、両者の相互作用 ($p = 0.911$) は認められなかった。

実験 1 で試験飼育後のラットの大腿骨と腎臓の相対重量および大腿骨、腎臓、血漿中の Ca 濃度について 4 群間での有意差はみられなかった (Table 6)。

Table 4 Growth parameters in rats fed test diets (Experiment 1 and 2)

Diet group	Initial body weight	Final body weight	Body weight gain	Food intake
Experiment 1	g	g	g/day	g/day
Control 1	161±3	274±6	8.1±0.3	18.2±0.5
Control 2	161±3	273±5	8.0±0.3	18.5±0.5
FSBP	161±2	279±8	8.4±0.4	18.6±0.7
USBP	161±2	276±4	8.2±0.2	18.8±0.3
one-way ANOVA				
P value	1.000	0.875	0.662	0.869
Experiment 2	g	g	g/day	g/day
Control 1	168±2	274±5	7.5±0.3	18.1±0.4
Control 2	168±2	286±5	8.4±0.3	19.3±0.6
SR-USBP	169±2	281±5	8.2±0.2	18.7±0.4
USBP	169±2	284±4	8.1±0.3	18.9±0.3
one-way ANOVA				
P value	0.993	0.309	0.125	0.282

All values are means±SEM, n=8 except for the group of rats fed the USBP diet of experiment 2 (n=7).

Abbreviations are explained in the first footnote in Table 1.

Table 5 Calcium absorption in rats fed test diets diets in the 1st period (d 4-7 of the feeding period) and 2nd period (d 11-14 of the feeding period) (Experiment 1 and 2)

Diet group	Net Ca absorption		Ca absorption rate	
	days 4-7	days 11-14	days 4-7	days 11-14
Experiment 1	$\mu\text{mol}/4\text{d}$		%	
Control 1	6.46 ± 0.19	7.33 ± 0.25	76.4 ± 1.6	74.1 ± 1.4
Control 2	6.62 ± 0.16	7.60 ± 0.22	78.7 ± 1.6	75.5 ± 1.1
FSBP	6.56 ± 0.18	7.22 ± 0.16	75.3 ± 2.7	73.3 ± 2.5
USBP	6.54 ± 0.20	7.34 ± 0.20	79.7 ± 1.5	78.2 ± 1.2
one-way ANOVA				
<i>P</i> value	0.948	0.631	0.360	0.194
Experiment 2	$\mu\text{mol}/4\text{d}$		%	
Control 1	7.27 ± 0.19	7.54 ± 0.32	$77.4 \pm 2.2\text{c}$	$72.4 \pm 2.8\text{b}$
Control 2	7.42 ± 0.19	8.18 ± 0.22	$78.2 \pm 1.7\text{bc}$	$73.8 \pm 1.5\text{b}$
SR-USBP	6.86 ± 0.13	7.39 ± 0.23	$85.0 \pm 1.3\text{a}$	$80.9 \pm 1.6\text{a}$
USBP	6.93 ± 0.16	7.60 ± 0.23	$80.2 \pm 1.8\text{b}$	$78.1 \pm 1.6\text{a}$
one-way ANOVA				
<i>P</i> value	0.081	0.155	0.021	0.018

All values are means $\pm$ SEM, $n=8$ except for the group of rats fed the USBP diet of experiment 2 ($n=7$).

Abbreviations are explained in the first footnote in Table 1.

Values in a column not sharing a common letter are significantly different at $p < 0.05$.

Fig. 1 Calcium absorption rate in rats fed the fine salmon bone powder (FSBP) or ultrafine salmon bone powder (USBP) diets in the 1st period (d 4-7 of the feeding period) and 2nd period (d 11-14 of the feeding period) (Experiment 1).

Values are means $\pm$ SEM, $n=8$. Values not sharing a common letter are significantly different at $p < 0.05$. *P*-values estimated by two-way ANOVA were 0.397 for period, 0.033 for pulverization and 0.911 for period $\times$ pulverization.

2. 中骨の精製処理の差異がラットのCa吸収に及ぼす影響 (実験2)

実験2でのラットの成長パラメータは、実験1の結果と同様に4群間での有意差はみられなかった (Table 4).

実験2で4群間のCa吸収量については有意差が認められなかったが、Ca吸収率については有意差が認められ、SR-

USBP群が最も高い値を示した (Table 5).

さらに、SR-USBP群とUSBP群のCa吸収率値を抽出し、出納期間と精製処理を変動要因とする二元配置分散分析で解析した結果、前者 ($p=0.051$) についての有意差は認められなかったが、後者 ($p < 0.05$) については有意差が認められ、USBP群よりSR-USBP群でCa吸収率が有意に高値であった (Fig. 2). また、相互作用 ($p=0.517$) は認められなかった.

実験2で試験飼育後のラットの大腿骨と腎臓の相対重量および大腿骨、腎臓、血漿中のCa濃度について4群間での有意差は認められなかった (Table 6).

考 察

魚骨のCaは、主に結晶性ヒドロキシアパタイト (HAp) $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ と呼ばれるリン酸カルシウムの形で存在し、骨中のCa:P比率は、ほぼ2:1である⁹⁾.

本研究では、中骨素材をCaソースとする0.5%Ca飼料を調製したため、飼料中のP含有量は、AIN93-G飼料より多くなった。AIN-93G飼料では、Ca/Pはモル比で1.3に設定されているが⁸⁾、本研究で使用した飼料では1.0であった。そのため、試験を実施するに当たり、ミネラル混合の改変による試験飼育への影響を調べるため、ミネラルを中骨群に合わせて改変した対照群 (Control 2) の他に、AIN-93Gをそのまま用いた標準食とする1群 (Control 1) を加えて実験系を設定した。

実験1では、これら2群間でのラットの体重増加、飼料

Table 6 The relative weights of femur and kidney and calcium concentrations in femur, kidney and plasma in rats fed test diets (Experiment 1 and 2)

Diet group	Femur dry weight	Ca concentration in femur	Kidney dry weight	Ca concentration in kidney	Plasma Ca concentration
Experiment 1	mg/100 g body wt	mmol/g dry femur	mg/100 g body wt	μmol/g dry kidney	mg/dL
Control 1	126±2	5.31±0.03	162±4	5.42±0.15	12.6±0.3
Control 2	123±2	5.39±0.04	162±3	5.43±0.18	13.0±0.2
FSBP	122±3	5.37±0.06	159±2	5.34±0.26	12.7±0.2
USBP	123±2	5.34±0.06	162±2	5.56±0.12	12.7±0.3
one-way ANOVA					
P value	0.563	0.660	0.756	0.870	0.547
Experiment 2	mg/100 g body wt	mmol/g dry femur	mg/100 g body wt	μmol/g dry kidney	mg/dL
Control 1	125±2	5.25±0.04	165±3	7.33±0.20	12.2±0.4
Control 2	122±3	5.27±0.05	163±2	7.39±0.21	12.9±0.2
SR-USBP	122±3	5.24±0.07	168±3	7.05±0.16	12.4±0.3
USBP	123±3	5.23±0.06	163±2	7.59±0.64	12.6±0.3
one-way ANOVA					
P value	0.731	0.959	0.503	0.730	0.415

All values are means±SEM, n=8 except for the group of rats fed the USBP diet of experiment 2 (n=7). Abbreviations are explained in the first footnote in Table 1.

Fig. 2 Calcium absorption rate in rats fed the semi-refined ultrafine salmon bone powder (SR-USBP) or ultrafine salmon bone powder (USBP) diets in the 1st period (d 4-7 of the feeding period) and 2nd period (d 11-14 of the feeding period) (Experiment 2).

Values are means±SEM, n=8 in the SR-USBP diet group; n=7 in the USBP diet group. Values not sharing a common letter are significantly different at $p<0.05$. P-values estimated by two-way ANOVA were 0.051 for period, 0.022 for refining and 0.517 for period × refining.

摂食量についての有意差はみられず、ラットは順調に成長した。また、すべての群間において飼育後の大腿骨と腎臓の相対重量および大腿骨、腎臓、血漿中のCa濃度についても群間での有意差はみられなかった。これらのことから、ミネラル混合を改変したことによる成長面での影響はほとんどないと考えられ、飼料に配合した中骨Ca素材は有効に利用されていることが示唆された。

実験1でのラットのCa吸収率については、有意差はみられなかった。この結果は、中骨群のミネラルとして使用した中骨Ca素材が、Control群に使用した特級試薬の炭酸カルシウム（和光純薬工業(株)）と比較しても遜色のない優れたCa素材であることを示している。

一方、中骨の処理を比較するため、FSBP群とUSBP群のCa吸収率を二元配置分散分析により解析した結果、粉碎程度によって有意差が認められ、中骨の超微細化処理がCa吸収を改善させることが確認された。

一般的に、Caはイオンの状態で腸管内より吸収されると考えられている。そのため生体におけるCa吸収では、Caの溶解性が重要な決定要因の一つである¹⁰⁾¹¹⁾。そして胃酸は、食品中のCaの大半を占める不溶性Ca塩を溶かして吸収させるために重要な役割を持っている¹²⁾。胃切除ラットでのCa吸収率は、溶解性の塩化カルシウムより不溶性の炭酸カルシウムで著しく低下することが報告されている¹³⁾。本研究において中骨Ca素材を超微細化したことが、胃でのCaの可溶化に対して有益に作用したと推察される。

実験2において、ラットの体重増加と飼料摂食量、そして試験飼育後の大腿骨と腎臓の相対重量および大腿骨、腎臓、血漿中のCa濃度については、群間での有意差はみられず、実験1と同様に中骨Ca素材の有効性が示唆された。

実験2でのラットのCa吸収率は、第1期および第2期の出納期間で有意差が認められ、両期間においてControl群よりSR-USBP群で有意に高く、Ca素材としてのSR-USBPの生体利用効率が高いことが確認された。また、実験2では消化を抑制するために飼料に炭酸水素ナトリウムを添加したが、実験1の結果と比較して、Control群や

USBP 群の Ca 吸収率がほとんど低下していないことから、十分な効果は得られなかった。これについては、飼料中の Ca ソースである炭酸カルシウム試薬と USBP の平均粒径が、それぞれ 11.9 および 1.9 μ m (レーザー回折・散乱法分析) と、粒子サイズが非常に微細であるために、Ca の消化性での差は出にくいことが推察されるが、炭酸水素ナトリウムの添加量が少なすぎた可能性もある。しかし、得られた結果については、実験 1 と同様の傾向を示し、値も近似していることから再現性のあることが確認された。

一方、中骨の処理を比較するため、SR-USBP 群と USBP 群の Ca 吸収率を二元配置分散分析により解析した結果、精製処理によって有意差が認められ、SR-USBP 群の Ca 吸収率が USBP 群より有意に高値であった。すなわち、この結果は中骨を Ca 素材として利用する場合、骨タンパク質を含有させて素材化することで、Ca 吸収亢進作用が付加されることを示唆している。

通常、骨基質はコラーゲンを主体とした有機基質とそこに沈着した HAp から構成されていることから、この骨タンパク質に関してもコラーゲンが主体であると考えられる。コラーゲンについては、その分解物であるペプチドが Ca 吸収を促進することが報告されている¹⁴⁾。また、Jung らは、魚骨タンパク質の分解物を HAp 処理等で分離した Ca 親和性の高いペプチドが不溶性 Ca 塩の生成を抑制し、卵巣切除ラットでの Ca の生体利用性を高めることを報告している¹⁵⁾。よって、本研究においても SR-USBP が Ca 吸収を亢進させた要因として、骨タンパク質の分解物である Ca 親和性のペプチドが Ca と結合して可溶性複合体を形成したことで、Ca がリン酸と不溶性沈澱を形成することを防止し、小腸下部での拡散輸送による Ca 吸収が高まったと推察される。SR-USBP に施した超微細化処理は、その骨タンパク質の消化性を高め、ペプチドへの分解速度やペプチド量を増加させる可能性があり、Ca とペプチドの可溶性複合体の形成を促進させたと考えられる。また、SR-USBP のような骨タンパク質と Ca 塩 (HAp) が結着した形態は、Ca 生体利用性に優れている可能性が示唆された。これは、SR-USBP の飼料中に含まれる中骨由来のタンパク質量が飼料組成より算出して飼料 1 kg 当たり 5.4 g と少量であったにもかかわらず、効果がみられたことがこの可能性を支持する。しかしながら、本研究では、中骨 Ca 素材に含まれる骨タンパク質が Ca にどのように作用して Ca 吸収を亢進させるのかについては、詳細な検証をしていないためその吸収機構は不明であり、今後の研究における検討課題である。

以上のことから、本研究において開発した中骨 Ca 素材は、超微細化処理の効果によって Ca 吸収が改善され、骨タンパク質を含有させることで Ca 吸収亢進作用を付加されることが示唆され、栄養補助食品としてそれ自体で、あるいは他の食品と複合して利用することが期待できる。

要 約

本研究において、我々は、中骨の食用化への利用を図るため、中骨の Ca 素材を開発し、ラットでの Ca 出納実験よりその消化吸収性を評価した。

実験 1 において、Ca 吸収は、FSBP 群より USBP 群で有意な高値が認められ、超微細化処理された中骨 Ca 素材が Ca 吸収を改善する効果が確認された。

実験 2 において、Ca 吸収は、USBP 群より SR-USBP 群で有意な高値が認められ、骨タンパク質を含有した中骨 Ca 素材が Ca 吸収亢進作用を有することが示唆された。また、実験を通して超微細化サケ中骨粉末が、特級試薬レベルの炭酸カルシウムと比較しても遜色のない優れた Ca 素材であることが明らかとなった。

本研究を遂行するに当たり、動物試験についてのご指導、ご助言を頂きました北海道大学大学院農学研究院食品栄養学研究室石井麻友氏、ならびに解剖等にご助力頂きました食品栄養学研究室の皆様へ深謝します。

文 献

- 1) 太田静行, 魚の骨, New Food Industry, **23**, 66-72 (1981).
- 2) ミネラル食品・素材の市場動向, 「食品と開発」, (CMC ジャパン, 東京) **42**, pp. 75-84 (2007).
- 3) 原 博, カルシウムの役割とその吸収—新しい展開, 化学と生物, **46**, 412-419 (2008).
- 4) 渡辺尚彦, 武輪正彦, 高井陸雄, 酒井愿夫, 魚の骨のクッキングによる軟化速度, 日水誌, **51**, 2047-2050 (1985).
- 5) 畑江敬子, 大沼葉子, 島田淳子, サケ鼻軟骨のテクスチャーに及ぼす食酢浸漬の影響, 日食工誌, **37**, 505-510 (1990).
- 6) 平岡芳信, 城 敦子, 成田公義, 平山和子, 菅 忠明, 養殖ハマチ中骨のレトルト処理によるコラーゲンのゼラチン化と軟化, 日水誌, **67**, 261-266 (2001).
- 7) 安井明美, リン, 「新・食品分析法」, 新・食品分析法編集委員会編, (光琳, 東京), pp. 257-259 (1996).
- 8) Reeves, P.G., Nielsen, F.H. and Fahey, G.C.Jr., AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet, *J. Nutr.*, **123**, 1939-1951 (1993).
- 9) Hamada, M., Nagai, T., Kai, N., Tanoue, Y., Mae, H., Hashimoto, M., Miyoshi, K., Kumagai, H., and Saeki, K., Inorganic constituents of bone of fish, *Fish.sci.*, **61**, 517-520 (1995).
- 10) Duflos, C., Bellaton, C., Pansu, D. and Bronner, F., Calcium solubility, intestinal sojourn time and paracellular permeability codetermine passive calcium absorption in rats, *J.Nutr.*, **125**, 2348-2355 (1995).
- 11) Bronner, F. and Pansu, D., Nutritional aspects of calcium absorption, *J.Nutr.*, **129**, 9-12 (1999).
- 12) 原 博, 難消化性食品成分とそのミネラル吸収促進作用, New Food Industry, **35**, 35-44 (2001).
- 13) Hara, H., Suzuki, T., Kasai, T., Aoyama, Y. and Ohta, A., Ingestion of guar gum hydrolysate, a soluble fiber, increases calcium absorption in totally gastrectomized rats, *J.Nutr.*, **129**, 39-45 (1999).

-
- 14) 吉岡和男, 杉原富人, 山本憲朗, 中野清一, 室山幸太郎, カルシウム吸収促進剤およびその製造方法, 特許第 3881453 号 2006.11.17). increases calcium solubility and bioavailability in ovariectomised rats, *B.J.Nutr.*, **95**, 124-128 (2006).
(平成 20 年 8 月 27 日受付, 平成 20 年 12 月 12 日受理)
- 15) Jung, W.K., Lee, B.J. and Kim, S.K., Fish-bone peptide
-