

大麦焼酎蒸留粕に含まれる乳酸菌・ビフィズス菌 増殖促進因子の探索

古田 吉史^{1*}・外菌 理佐¹・高下 秀春¹・大森 俊郎¹
石崎 文彬^{2**}・園元 謙二^{2,3}

(2006年12月27日受付 2007年3月2日受理)

Growth Stimulator of Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria in By-product of Barley *Shochu*

Yoshifumi Furuta^{1*}, Risa Hokazono¹, Hideharu Takashita¹, Toshirou Omori¹, Ayaaki Ishizaki², and Kenji Sonomoto^{2,3} (*Research Laboratory, Sanwa Shurui, Co., Ltd., 2231-1 Yamamoto, Usa, Oita 879-0495*¹; *Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Graduate School, Kyushu University*²; *Department of Functional Metabolic Design, Bio-Architecture Center, Kyushu University*³, 6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581) *Seibutsu-kogaku* **85**: 161-166, 2007.

The ethanol-insoluble (EI) fraction from the supernatant of a by-product of barley *shochu* had a growth-stimulating effect on lactic acid bacteria and bifidobacteria. By adding the EI fraction, we found that glucose consumption and lactate production were also accelerated. The EI fraction retained its growth-stimulating effect even after autoclaving at 110°C for 10 min. As the amount of the EI fraction added was increased, cell density also increased. The EI fraction was further separated by reversed phase and gel-filtration chromatography to obtain two active fractions, whose main component was an oligosaccharide consisting of glucose, xylose, and arabinose and whose minor component was a peptide.

[**Key words:** barley *shochu*, by-product, lactic acid bacteria, bifidobacteria, growth stimulator]

焼酎製造に伴って蒸留工程後に排出される副産物“焼酎蒸留粕”は現在、焼酎業界全体で推定年間80万トン以上にも達している。焼酎蒸留粕は水分90%以上BOD値で数万ppmと高濃度の有機物を含むため、その処理はきわめて困難であるとされてきた。しかしながら、国際的な地球環境保全の高まりから、各メーカーは鋭意開発を重ね、従来行ってきた海洋投入による処理から脱却し、濃縮・乾燥による肥料や飼料化、焼却処理およびメタン発酵などの陸上処理への転換を随時図っている^{1,2)}。

その一方で、焼酎蒸留粕には原料・麴菌・酵母に由来するアミノ酸、ペプチド、タンパク質、オリゴ糖を含むさまざまな糖類、有機酸、ビタミン、ミネラル、ポリフェノールなど多くの有用成分が含まれており、これまで厄介者扱いされてきた廃棄物という概念から一転して、各種の食品素材・機能性食品素材としての有効活用を目指したさまざまな研究開発が近年盛んに行われている³⁻⁵⁾。

このような焼酎蒸留粕の新規利用用途開発の一環として、我々は大麦焼酎蒸留粕に含まれる乳酸菌およびビフィズス菌の増殖促進物質の探索を行ってきた。乳酸菌およびビフィズス菌はその栄養要求性が複雑なこともあり、これまでにさまざまな種類の増殖促進成分が報告されている⁶⁻⁸⁾。元来、焼酎蒸留粕中には上記のような栄養素が豊富に含まれており、そのままの状態でも各種微生物にとっての良好な培地源となる。そこで我々は特に大麦焼酎蒸留粕の上清液をエタノール処理して得られる不溶性沈殿画分(ethanol insoluble: EI画分)に、乳酸菌とビフィズス菌の増殖を促進する成分が存在することを確認した⁹⁾。

本稿では、大麦焼酎蒸留粕に含まれるEI画分の乳酸菌・ビフィズス菌の増殖促進効果とその増殖促進成分について詳細に検討した。

*連絡先 ¹三和酒類株式会社研究所 (〒879-0495 大分県宇佐市山本2231-1)
TEL. 0978-33-3844 FAX. 0978-33-5811 E-mail: furuta-y@kokuzo.co.jp

²九州大学大学院農学研究院生物機能科学部門応用微生物学講座、

³九州大学バイオアーキテクチャーセンター機能デザイン部門食品機能デザイン分野 (〒812-8581 福岡市東区箱崎6-10-1)

**現在、株式会社新世紀発酵研究所

実験方法

大麦焼酎蒸留粕上清液の調製 減圧蒸留後の新鮮な大麦焼酎蒸留粕からガーゼろ過、遠心分離 (12,000 × g, 10 min) により酵母、麹菌体、繊維質などの不溶性物を取り除き、清澄な上清液 (Brix8) を得た。この上清液 (水分 90%以上) をエバポレーター (40°C, 30 hPa) により水分約 21% (Brix25) になるまで濃縮した。

エタノール処理 上記の大麦焼酎蒸留粕上清濃縮液 (Brix25) にエタノールを終濃度 90% (v/v) になるように添加した。得られたエタノール不溶性画分 (ethanol insoluble : EI 画分) とエタノール溶性画分 (ethanol soluble : ES画分) をろ紙ろ過 (セルロース、保留粒子径 6 μm) により分け、それぞれの画分を凍結乾燥した。

活性画分の前処理および HPLC 分画試験 EI 画分を脱イオン水に 10% (w/v) 濃度で再溶解し、この溶解液 2 ml を HPLC 前処理用の Waters 社製 Sep-Pak® Plus C₁₈ カートリッジに供して、10 ml の蒸留水と 10 ml の 50% メタノールで溶出した。得られた水溶出画分とメタノール溶出画分をそれぞれ 2 ml まで減圧濃縮し、それぞれを YMC Pack Diol-60 ゲルろ過カラムを備えた HPLC 分析 (蒸留水, 1.0 ml/min) に供した。254 nm および 450 nm でモニタリングしながら分画した。

サンプルの組成分析 得られたそれぞれの画分の成分組成を以下のように調べた。遊離の糖、有機酸およびアミノ酸を測定した。また、画分を 2N 塩酸で 95°C・3.5 時間加水分解処理して全糖量を測定し、全糖量から遊離の糖量を差し引いた値をオリゴ糖量とした。さらに、画分を 6N 塩酸で 110°C・6 時間加水分解処理して全アミノ酸量を測定し、全アミノ酸量から遊離のアミノ酸量を差し引いた値をペプチド量とした。

使用菌株 指標菌として、乳酸菌には *Lactobacillus fermentum* NBRC 3071, *Lactobacillus plantarum* NBRC 3070, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NBRC 12007 の 3 株を、ビフィズス菌には *Bifidobacterium longum* JCM 1217^T および *Bifidobacterium bifidum* JCM 1254 の 2 株を使用した。

培養試験 対照培地として、乳酸菌には CMG 培地 (0.5% yeast extract, 0.5% polypeptone, 0.5% NaCl, 1.0~6.0% glucose) を、ビフィズス菌にはビフィズス培地 (1.0% casein, 0.5% meat extract, 0.5% yeast extract, 1.0% ascorbic acid, 0.3% K₂HPO₄, 0.05% cysteine hydrochloride, 0.1% Tween 80, 1.0% glucose) を用いた。対照培地にそれぞれの画分を添加し、*Lb. fermentum* NBRC 3071 については 37°C, *Lb. plantarum* NBRC 3070

と *Lc. lactis* subsp. *lactis* NBRC 12007 については 30°C で、振とう (100 strokes/min) または発酵ジャーを使用した攪拌 (250 rpm) 培養を行い、Abs_{560nm} を測定することで菌の増殖を評価した。また、ビフィズス菌については、37°C で嫌気ガスパック内での静置培養または窒素ガス置換しつつ三角フラスコを用いた静置培養⁷⁾ を実施し、同じく Abs_{560nm} を測定することで菌の増殖を評価した。なお、すべての培養試験において菌の増殖値 Abs_{560nm} については、培地自体の吸光度の影響をなくすために、菌接種前の培地 Abs_{560nm} (ブランク値) を差し引いた値で示した。また、乾燥菌体重量 (dry cell weight) については、抜き出した培養液を遠心分離 (10,000 × g, 10 min) して集菌し、その菌体を培養液と等量の脱イオン水で 3 回洗浄後、乾熱器 (121°C) で一晚乾燥して求めた。

糖・有機酸およびアミノ酸分析 培養液ならびに焼酎蒸留粕由来の各画分中の糖・有機酸についてはカラムに BIO RAD 社製 AminexHPX-87H を備えた HPLC (Waters 2690) 分析計、アミノ酸についてはアミノ酸分析計 (Hitachi L-8800A) により測定した。

実験結果および考察

大麦焼酎蒸留粕上清液、EI および ES 画分の成分組成

凍結乾燥後の EI 画分および ES 画分の大麦焼酎蒸留粕からの取量はそれぞれ 23% (w/w) と 47% (w/w) であった (Fig. 1)。Table 1 に EI, ES 画分および大麦焼酎粕上清液の成分組成を示す。全糖と全アミノ酸の含有率と、さらに糖とアミノ酸については遊離型とオリゴ糖やペプチドなど結合型の含有率も併せて比較して示した。単位はすべて % (w/w) で表記した。大麦焼酎粕上清液、EI および ES 画分の 3 つのサンプルの間で、全糖・有機酸・アミノ酸の含有率にそれほど大きな差異は見られなかったが、EI 画分には特にオリゴ糖 (構成糖として主にキシロース、アラビノース、グルコースが含まれる) の含有率が 24% (w/w) と高く、逆に ES 画分にはグリセロールや遊離の糖 (主にグルコース) の含有率が 25% (w/w) と高かった。

EI および ES 画分の乳酸菌・ビフィズス菌増殖促進活性の評価

上記 EI および ES 画分をそれぞれ所定の対照培地に 1% (w/v) 添加して試験管培養を実施し、それらの菌体量 (Abs_{560nm}) を対照培地のものと比較したところ、今回使用したいずれの菌株についても EI 画分を添加した場合に菌体量が対照に比べて 1.3 ~ 3.7 倍になった (Table 2)。このことから、大麦焼酎粕上清液の EI 画分には、乳酸菌およびビフィズス菌の増殖を促進する何らかの生長促進因子が存在することが明らかとなった。

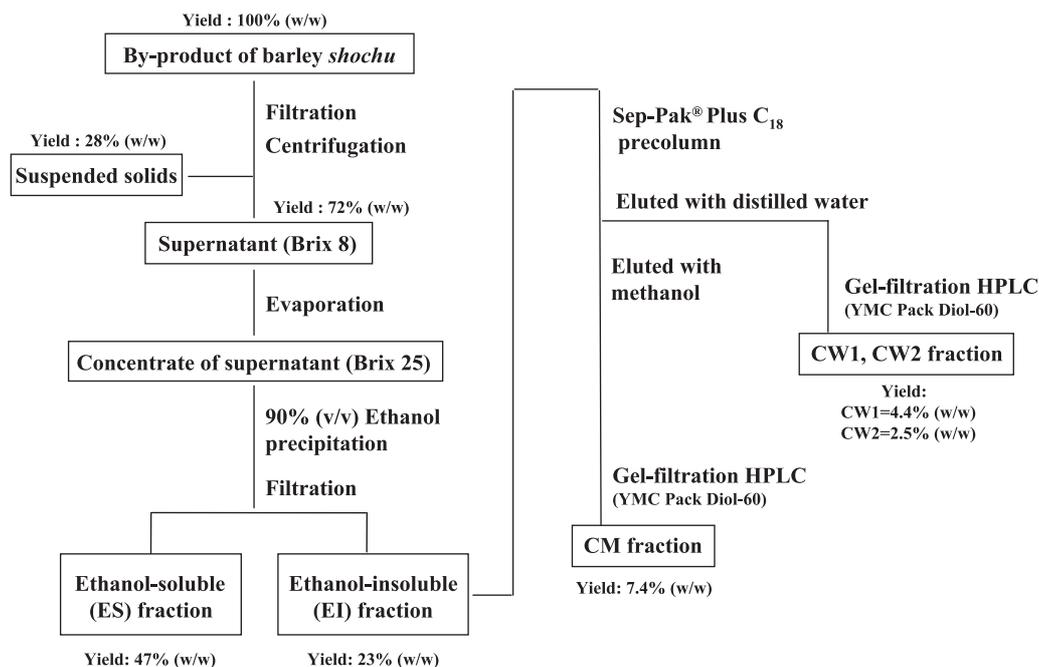


Fig. 1. Fractionation of by-product of barley shochu.

Table 1. Components of supernatant, ES and EI fractions.

Component		Supernatant	ES	EI
Amino acids (%)	Total	45	44	47
	Free	12	12	13
	Bound	33	32	34
Saccharides (%)	Total	37	39	29
	Free	19	25	5
	Bound	18	14	24
Organic acids (%)		11	12	12
Others (%)		7	5	12

Amino acids were analyzed after being hydrolyzed with 6 N HCl at 110°C for 6 h. Saccharides were analyzed after being hydrolyzed with 2 N HCl at 95°C for 3.5 h. %, % (w/w); supernatant, supernatant of by-product of barley shochu; ES, ethanol-soluble fraction of supernatant; EI, ethanol-insoluble fraction of supernatant.

EI 画分の増殖促進効果の濃度依存性および熱安定性試験 指標菌に *Lb. fermentum* NBRC 3071 を用いて、EI 画分を 0.5, 1.0, 2.0% (w/v) の各濃度で対照培地に添加し 24 時間試験管培養を行ったところ、EI 画分の添加量が増加するに従って菌の増殖 (Abs_{560nm}) も増大する傾向にあった (Fig. 2)。また、EI 画分を対照培地添加後に、オートクレーブ滅菌 (110°C, 10 min) した場合と滅菌済みフィルター (0.2 μm) でろ過滅菌した場合で菌の増殖を比較したが、菌体増殖はどちらの場合もほぼ同じで (Fig. 2)、EI 画分中に含まれる増殖促進成分は熱に安定

であることが示された。

EI 画分添加による培養挙動の変化 EI 画分添加の効果をより詳細に検討するために、*Lb. fermentum* NBRC 3071 と *Lc. lactis* subsp. *lactis* NBRC 12007 については 2 l 発酵槽を用いた攪拌 (250 rpm) 培養を実施し、また *B. bifidum* JCM 1254 についてはフラスコ培養を実施して培養の経時変化を調べた。EI 画分は上述の試験と同様にそれぞれの対照培地に 1% (w/v) 添加し、初発のグルコース濃度を *Lb. fermentum* と *Lc. lactis* subsp. *lactis* については 60 g/l、*B. bifidum* については 10 g/l に設定した。EI 画分

Table 2. Effect of ES and EI fractions on growth of lactic acid bacteria and bifidobacteria in test tubes.

Strain	Cell growth (at 560 nm)		
	Control	ES	EI
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NBRC 12007	1.1	0.9	1.4
<i>Lb. fermentum</i> NBRC 3071	0.9	1.1	3.1
<i>Lb. plantarum</i> NBRC 3070	1.2	1.3	4.4
<i>B. bifidum</i> JCM 1254	1.5	1.4	2.3
<i>B. longum</i> JCM 1217 ^T	4.6	5.2	6.4

Each fraction was added to the control medium at 1% (w/v) concentration. Control medium for lactic acid bacteria consisted of 10 g of glucose, 5 g of polypeptone, 5 g of yeast extract, 5 g of NaCl per l (CMG medium). Control medium for bifidobacteria consisted of 10 g of glucose, 10 g of casein, 5 g of meat extract, 5 g of yeast extract, 10 g of ascorbic acid, 3 g of K₂HPO₄, 0.5 g of cysteine hydrochloride, 1 ml of Tween 80 per l (bifidobacterium medium). Cell concentration was measured as absorbance at 560 nm. Culture for lactic acid bacteria was carried out for 24 h at 30 or 37°C with shaking at 100 strokes per min. Culture for bifidobacteria was carried out for 48 h at 37°C, statically in anaerobic jar.

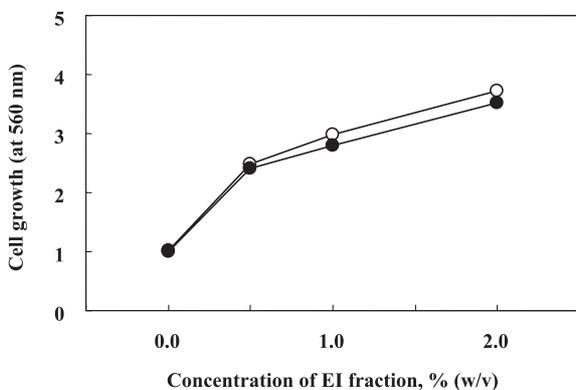


Fig. 2. Dose-dependence and heat stability of growth-stimulating effect of EI fraction for *Lb. fermentum* NBRC 3071. The EI fraction was added to CMG medium at 0.5–2.0% (w/v). Cell concentration was measured as absorbance at 560 nm. Lactic acid bacterial cells were cultured in test tubes for 24 h at 37°C with shaking at 100 strokes/min. Symbols: ○, EI fraction sterilized by autoclaving (110°C, 10 min); ●, EI fraction sterilized by filtration (0.2 μm, cellulose acetate).

の添加は、いずれの菌についても対数増殖中期から後期での菌の増殖を促進し、それに同調して糖の消費や乳酸の生産速度も増大していた。Fig. 3 は代表例として、*Lc. Lactis* subsp. *lactis* NBRC12007 の培養経時変化を示す。また、それぞれの菌における対照培地およびEI画分添加培地での最大比増殖速度 μ_{Max} (h⁻¹) は、*Lb. fermentum* については 0.60, 0.66, *Lc. lactis* subsp. *lactis* については 0.47, 0.57, *B. bifidum* については 0.11, 0.13 であった。

EI画分の分画と増殖促進効果試験 増殖促進効果が確認されたEI画分の Pre-column および HPLC によるさらなる分画試験を実施した (Fig. 1)。EI画分を脱イオン水に溶解し、この溶解液を C₁₈ Sep-Pak® カラムに供して蒸留水で溶出される画分 (水溶出画分) と 50% メタノールで溶出される画分 (メタノール溶出画分) に分割した。エバポレーターによる濃縮後、この二つの画分それぞれをゲルろ過カラムを備えた HPLC 分析に供した。その際の HPLC のクロマトグラムを Fig. 4 に示す。水溶

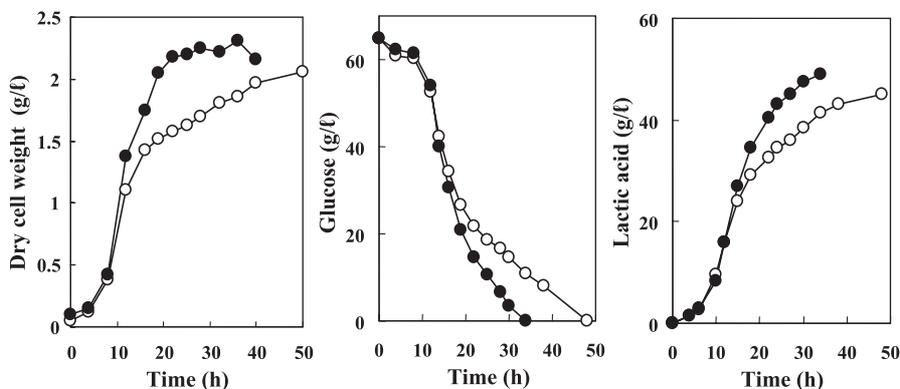


Fig. 3. Fermentation profile of *Lc. lactis* subsp. *lactis* NBRC 12007 in the presence of EI fraction. Cells were cultured in a 2 l jar fermentor. The inoculum volume was 5% (v/v). Temperature, agitation rate and pH were maintained at 30°C, 250 rpm, and 7.0, respectively. Symbols: ○, control; ●, the EI fraction was added at 1% (w/v).

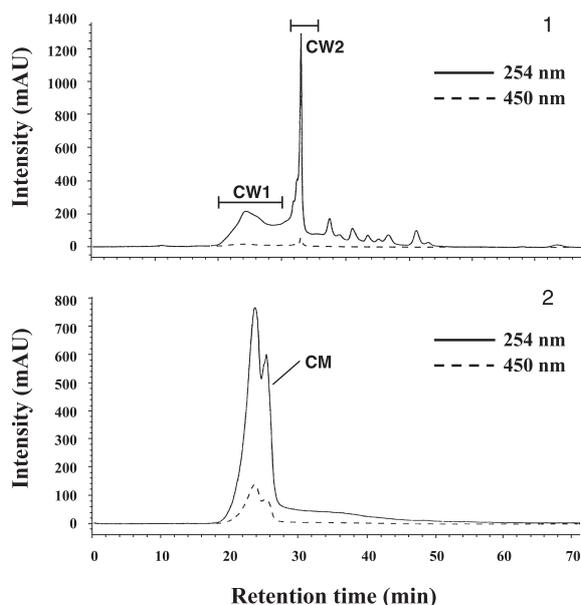


Fig. 4. Gel-filtration HPLC chromatogram of pretreated EI fraction using Sep-Pak® Plus C₁₈ precolumn. 1, Sample eluted from Sep-Pak® Plus C₁₈ precolumn using distilled water; 2, sample eluted from Sep-Pak® Plus C₁₈ precolumn using 50% methanol. The samples were subjected to gel-filtration chromatography under the following conditions: column, YMC-Pack Diol-60; running solution, distilled water; flow rate, 1.0 ml/min.

出画分のクロマトグラム上のブロードなピークとシャープなピークをそれぞれCW1, CW2画分とし、またメタノール溶出画分のクロマトグラム上の着色度の高い大きな画分をCM画分として、それぞれを分取し凍結乾燥した。

CW1, CW2およびCM画分のEI画分からの取率はそれぞれ19% (w/w), 11% (w/w) および32% (w/w)であった。*Lb. fermentum* NBRC 3071および*B. longum* JCM 1217^Tを用いた増殖促進効果試験は試験管培養にて実施し、それぞれの画分をEI画分1% (w/v) から派生する量、つまりCW1については0.19% (w/v), CW2は0.11%

(w/v), CMは0.32% (w/v)となるように対照培地に添加して行った。比較として、対照培地とEI画分1% (w/v) 添加区の増殖を示した。*Lb. fermentum* NBRC 3071 および*B. longum* JCM 1217^T どちらについてもCM画分の添加効果はほとんど見られず、CW1およびCW2画分を添加した場合に対照と比べ菌の増殖が1.2~2.9倍に増大した (Table 3)。

CW1およびCW2画分の成分組成 CW1およびCW2画分には遊離の糖およびアミノ酸は含まれていなかった。そこで、塩酸加水分解しHPLCによりその組成を調べた結果、CW1画分はグルコース、キシロース、アラビノースからなるオリゴ糖を94% (w/w), アミノ酸を6% (w/w) 含有し、CW2画分はグルコース、キシロース、アラビノースからなるオリゴ糖を88% (w/w), アミノ酸を12% (w/w) 含有していた (Table 4)。Fig. 4のCW1およびCW2画分の254 nmにおける吸収は、それぞれの画分中に6および12%存在するペプチドによるものと考えられた。また、今回結果に示していないが、CW1およびCW2画分を限外ろ過 (分画分子量3000) しても、処理前後でHPLCのクロマトグラムにまったく変化が見られなかったことから、これら画分に含まれる増殖促進成分は分子量3000以下の低分子物質であると推定された。

以上の結果から、大麦焼酎蒸留粕中に含まれる乳酸菌・ビフィズス菌の増殖促進に関与する成分としてオリゴ糖またはペプチドが考えられる。特にビフィズス菌については、これまでにさまざまなオリゴ糖やペプチドが増殖促進物質として報告されている¹⁰⁻¹⁵⁾。中でも大麦焼酎蒸留粕と同じ原料の大麦に由来するものとして、麦芽エキス由来のペプチド画分にビフィズス菌の増殖促進因子が存在すること¹⁶⁾、またヘミセルロース高含有の発芽大麦を唯一の炭素源とした培地でビフィズス菌や乳酸菌による短鎖脂肪酸の生産が見られ、かつ発芽大麦の摂取によりヒト糞便中のビフィズス菌数が顕著に増大することな

Table 3. Yield and growth-stimulating effect of CW1, CW2 and CM fractions separated from EI fraction.

Sample	Yield % (w/w)	Cell growth (at 560 nm)	
		<i>Lb. fermentum</i> NBRC 3071	<i>B. longum</i> JCM 1217 ^T
EI	100	3.5	6.0
CW1	19	2.6	5.0
CW2	11	2.9	5.1
CM	32	1.2	4.4
Control	—	1.0	4.3

EI, CW1, CW2, and CM fractions were added to the control medium (CMG medium for *Lb. fermentum*, bifidobacterium medium for *B. longum*) at 1, 0.19, 0.11, and 0.32% (w/v), respectively. *Lb. fermentum* cells were cultured in test tubes for 24 h at 37°C with shaking at 100 strokes per min. *B. longum* cells were cultured in test tubes for 48 h at 37°C statically in an anaerobic jar.

Table 4. Components of CW1 and CW2 fractions.

Component		CW1	CW2
Saccharides (%)	Total	94	88
	Glucose	15	42
	Xylose	55	31
	Arabinose	24	15
Amino acids (%)	Total	6	12

Saccharides were analyzed after being hydrolyzed with 2 N HCl at 95°C for 3.5 h.

Amino acids were analyzed after being hydrolyzed with 6 N HCl at 110°C for 6 h.

%, % (w/w).

どが報告されている¹⁷⁾。しかしながら、本報を含めていずれの報告でも具体的な活性成分の同定まではされていないため、互いに類似する化合物であるかは不明である。今後さらに精製を進め具体的な成分の特定に努めたいと考えている。

一方、原料は異なるが大麦焼酎蒸留粕と同様な発酵物として、酒粕の水抽出物¹⁸⁾ および米糠麴¹⁹⁾ に乳酸菌・ビフィズス菌の増殖促進物質が存在するという報告がある。恐らく、大麦焼酎蒸留粕中に存在する増殖促進成分についても、大麦に麹菌が作用することで生成しているのではないかと推測している。実際に我々は、大麦または大麦糠に水と麹菌 (*Aspergillus kawachi* および *A. oryzae*) を加えて振とう培養を行った際に、培養液の上清部に大麦焼酎蒸留粕と同様の乳酸菌・ビフィズス菌増殖促進効果が見られることを確認している (データ未発表)。今後は、大麦と麹菌を利用した増殖促進成分の効率的な生産方法についても併せて検討を行いたいと考えている。

要 約

大麦焼酎蒸留粕上清液のエタノール不溶性画分 (EI 画分) に、乳酸菌 (*Lactobacillus fermentum* NBRC 3071, *Lactobacillus plantarum* NBRC 3070, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NBRC 12007) およびビフィズス菌 (*Bifidobacterium longum* JCM 1217^T および *Bifidobacterium bifidum* JCM 1254) の増殖を促進する効果が見られた。EI 画分添加により、菌の増殖に付随して糖の消費および乳酸の生産も

増大した。EI 画分に含まれる増殖促進成分は熱に安定で、培地への添加量の増加に伴い *Lb. fermentum* NBRC 3071 に対する増殖促進効果も増大した。EI 画分から逆相およびゲルろ過クロマトグラフィーにより分離して得られた2つの活性画分は、組成分析の結果、オリゴ糖を主要な構成成分とし、ペプチドも少量含まれていることが分かった。

文 献

- 1) 下田雅彦, 長野壮一, 和田久継: 醸協, **90**, 897-901 (1995).
- 2) 飯島吉広: 醸協, **98**, 481-490 (2003).
- 3) 望月 聡, 宮本安紀子, 萩原美和子, 竹嶋直樹, 大森俊郎: 醸協, **96**, 559-563 (2001).
- 4) 外園英樹, 猫垣加奈子, 梶原康博, 高下秀春, 岡崎直人, 大森俊郎: 醸協, **100**, 877-881 (2005).
- 5) 関 孝弘, 森村 茂, 重松 亨, 前田 浩, 木田建次: 醸協, **98**, 869-874 (2003).
- 6) Poch, M. and Benzkorovainy, A.: *J. Agr. Food Chem.*, **39**, 73-77 (1991).
- 7) Oiki, H., Sonomoto, K., and Ishizaki, A.: *J. Ferment. Bioeng.*, **82**, 165-167 (1996).
- 8) Kaneko, T., Mori, H., Iwata, M., and Meguro, S.: *J. Dairy Sci.*, **77**, 393-404 (1994).
- 9) Furuta, Y., Takashita, H., Omori, T., Sonomoto, K., Shimoda, M., and Wada, H.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **864**, 276-279 (1998).
- 10) György, P., Norris, R. F., and Rose, C. S.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **48**, 193-201 (1954).
- 11) György, P., Kuhn, R., Rose, C. S., and Zilliken, F.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **48**, 202-208 (1954).
- 12) György, P. and Rose, C. S.: *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.*, **90**, 219-223 (1955).
- 13) Kehagias, C., Jao, Y. C., Mikolajcik, E. M., and Hansen, P. M. T.: *J. Food Sci.*, **42**, 146-150 (1977).
- 14) Azuma, N., Yamauchi K., and Mitsuoka, T.: *Agr. Biol. Chem.*, **48**, 2159-2162 (1984).
- 15) Poch, M. and Bezkorovainy, A.: *J. Agr. Food Chem.*, **39**, 73-77 (1991).
- 16) 藤野舜一, 丹波博之: ビフィズス1, p.123-128 (1987).
- 17) Kanauchi, O., Fujiyama, Y., Mitsuyama, K., Araki, Y., Ishii, T., Nakamura, T., Hitomi, Y., Agata, K., Saiki, K., Andoh, A., Toyonaga, A., and Bamba, T.: *Int. J. Mol. Med.*, **3**, 175-179 (1999).
- 18) 島村誠一, 石橋憲雄, 宮川 博, 阿部文明, 桐原郁子: 特願3-197001 (1991).
- 19) 細山 浩, 大沢 学, 浜野光年: 日食工誌, **38**, 940-944 (1991).