

東京大学大学院 新領域創成科学研究科

先端生命科学専攻

平成 29 年度

修士論文

超音波が生体試料に与える影響の解明

2017 年 7 月 20 日提出

指導教員 尾田 正二 准教授

動物生殖システム分野

47-156451 劉 沁瑶

1. 緒言	1
2. 実験方法	5
2-1. 超音波洗浄機の超音波強度の実測	
2-2. 除菌効果	
2-3. 生体試料の水分活性、糖度、pH への影響	
2-3-1 キャベツの重さ変化	
2-3-2 野菜の水分活性測定	
2-3-3 ブドウとミニトマトの糖度、pH	
2-4. 生体試料における超音波処理の影響の検証	
2-4-1 メダカ胚の生存率	
2-4-2 ヒラマキガイの生存率	
2-5. 冷凍魚肉に与える影響	
2-5-1 オイルレッドによる脂肪の除去の組織学的評価	
2-5-2 GCMS による脂質の除去効果の確認	
2-5-3 カルボニルカの測定による過酸化脂質の除去の評価	
2-5-4 TBA 酸値の測定による過酸化脂質の除去の評価	
2-5-5 匂い分析による臭い除去の評価	
2-6. 超音波洗浄した生体試料が生体に与える影響	
2-6-1 コオロギ	
2-6-2 メダカ	
3. 結果	22
3-1. 超音波洗浄機の超音波強度の実測	
3-2. 除菌効果	
3-3. 生体試料の水分活性、糖度、pH への影響	
3-3-1 キャベツの重さ変化	
3-3-2 野菜の水分活性測定	
3-3-3 ブドウとミニトマトの糖度、pH	
3-4. 生体試料における超音波処理の影響の検証	
3-4-1 メダカ胚の生存率	
3-4-2 ヒラマキガイの生存率	
3-5. 冷凍魚肉に与える影響	
3-5-1 オイルレッドによる脂肪の除去の組織学的評価	
3-5-2 GCMS による脂質の除去効果の確認	

- 3-5-3 カルボニルカの測定による過酸化脂質の除去の評価
- 3-5-4 TBA 酸値の測定による過酸化脂質の除去の評価
- 3-5-5 匂い分析による臭い除去の評価
- 3-6. 超音波洗浄した生体試料が生体を与える影響
 - 3-6-1 コオロギ
 - 3-6-2 メダカ

4. 考察.....	35
5. 参考文献.....	46
6. 謝辞.....	49
7. 図表.....	50

1. 緒言

1. 噴流式超音波洗浄機

人間の可聴音域はおよそ 20~20000Hz とされ、これより周波数の高い音は超音波と呼ばれる。強力な超音波は生体に障害を及ぼすが、弱いパワーであれば生体に対し無侵襲とされており、医療の現場におけるエコー検査に多用されている^[1]。超音波洗浄とは超音波を用いて洗浄液中で機械的な攪拌現象をおこし、被洗浄物の汚れを除去する表面洗浄方法である。16 キロヘルツ以上の高周波が液体中を伝播する際に疎密波として伝わり、液体が膨張と圧縮運動とを繰り返して受け、キャビテーション現象と界面攪乱現象が起こる。キャビテーション気泡が消滅する際に、気泡界面が持つエネルギーが瞬時に放出されるため、大きな衝撃力が発生し、気泡破裂時の衝撃力による機械的剥離が汚れを落とす^[2]。超音波洗浄は、一般的な洗浄が困難である複雑な形状を有する部品、あるいは部品の内部、極小の部品、電子機器部品、内燃機関用部品などの洗浄に用いられる^[3]。

産業洗浄や半導体洗浄の世界では超音波洗浄は広く普及しており、一般家庭でも、眼鏡、ネックレスなどの装飾品の洗浄に安価な卓上型超音波洗浄機が使用されている。また、工業以外にも、掘り出した直後の野菜や産み落とされた直後の鶏卵などの食品関連の洗浄用途もあり、超音波洗浄は広い分野において

人々の身近に浸透している^[4]。近年では野菜、果物などの生鮮食料品などの洗浄に超音波洗浄機が適用される所も増加している。その代表的なものは、矩形の洗浄槽の内部に洗浄籠を着脱自在に備えた物であって、洗浄槽の内部全体に洗浄効果を行き渡らせるために多数の超音波振動子が洗浄槽の底部外面に取り付けられている。このような超音波洗浄装置は洗浄効果に優れる反面、多数の超音波振動子を必要とするため、構成が複雑で値段も高価である^[5]。

本研究で用いた食品洗浄用として設計開発された噴流式超音波洗浄機は開発者と東京大学が共同で特許を取得している。円筒形の洗浄槽の底部中心に洗浄水を供給するための吐出孔が設けられ、洗浄槽に充填された洗浄水を洗浄籠に収容された洗浄対象物が浸漬された状態で超音波洗浄されるようにしたことを特徴とする装置である^[5]。この特徴により、常に清浄な水道水を流し続けることで洗浄効果を高めるだけでなく、キャビテーションによる水温の上昇を防ぎ、生体試料である食材を加温による品質の劣化なく超音波処理することが可能となっている。

2. 食品問題

世界人口が70億人を突破し、1年で約7千万人増加していると推測される。食糧問題が各国にとっての大きな課題となり、作物の生産量を上げるため

に農薬の使用が増加している。また、野菜や果物の表面に付着する細菌類は食中毒の原因の一つにもなっている。食料品に対して不安感と不信感を人々が抱くのは、食料品が極めて複雑な経路を通過して消費者の元に届く点に大きな原因がある^[6]。

食品を安全に安心して食すことが出来るように、微生物の汚染防止と増殖阻止は重要な問題である。食品によって、細菌数や大腸菌についての成分規格として生菌数が設定されている、一般的に、日常食べている食品には、103～106/g 程度の生菌が存在しているが、107～108/g に達した食品は初期腐敗と判断される^[7]。家庭において農薬や細菌類を手洗いより強力に洗浄除去するため、より高い洗浄効果と効率を実現できる洗浄方法が有効である。

そこで、超音波による食品食材の洗浄が発案された。強い超音波処理によって、細菌酵母などの細胞が破壊されることは公知の事実であるが、細胞が破壊され、組織が死滅した野菜類は原型を保たず、腐敗が促進され、生食に供し難い状態となるリスクがある。超音波を用いての農薬除去の実験において、超音波洗浄処理は銅イオン含有農薬の除去に対し、非常に有効であることが報告されているが、この実験に用いたサラダ菜、イチゴでは5分間以上、ブドウでは10分間以上超音波処理することにより、外見上に明らかな組織的損傷が起こっている^[8]。

その点、新規に開発された噴流超音波式食品洗浄機は従来型の超音波洗浄機と比べ、超音波強度が低いことを一つの特徴とする。通常の超音波洗浄機よりも超音波強度が弱い噴流超音波式食品洗浄機の洗浄効果を検証し、超音波洗浄に伴う生体試料へのダメージを従来型超音波洗浄機と比較し、噴流超音波式食品洗浄機を用いた食品・生体試料の超音波洗浄の効果・効用を検証し、超音波による食品の洗浄法のための基礎的知見を得ることを本研究の目的とした。更に、従来の超音波洗浄機より弱い超音波処理が生体試料の内部成分に与える諸影響を解明するとともに、超音波洗浄した食材を食した生体が受ける影響の解明を試みた。

2. 実験方法

2-1. 超音波洗浄機の超音波強度の実測

超音波メーター（SM1000、新科産業）は超音波洗浄槽の液中に発生する超音波エネルギーの強度を測る測定器であり、超音波照射時洗液中の物体がその表面に受けた周囲液体からの圧力（音圧）を超音波洗浄機の洗浄力として測定する。リアルタイムで超音波洗浄機の洗浄力を測定でき、超音波洗浄機の洗浄力の平均値も測定できる。超音波メーターのプロープ（センサー付き）を噴流式超音波洗浄機（28 kHz）と従来型超音波洗浄機（SHARP UT-205S, 40 kHz）の洗浄層内に入れて固定し、各測定条件（出力、噴流の有無、容器の材質、水面からの深さ、洗浄槽内での位置）における 10 秒間の平均圧力を測定した。測定を 5 回繰り返して、その数値の平均値を超音波洗浄機の強度とした。

2-2. 除菌効果

実験方法：

水浸法：超音波処理群として噴流式超音波洗浄機（28 kHz）の洗浄槽に水道水を満たし、噴流ありの状態ですべて 10 分間超音波処理した試料（イチゴ（n=2 粒）、レタス（n=2 粒）、パセリ（n=4 粒）、ミニトマト（n=2 個））を 50 ml の滅菌水に浸して得た洗液から 100 μ l を取り、LB プレートに播種した。37 $^{\circ}$ Cにおい

て24時間培養し、LBプレートに生着したコロニー数を計測した。水に10分浸した試料についても同様に処理し、水洗い群とした。

綿棒拭き取り法：超音波処理群として噴流式超音波洗浄機（28 kHz）の洗浄槽に水道水を満たし、噴流ありの状態です10分間超音波処理した試料（コマツナ（n=4枚）から、1 cm²の面積を無菌綿棒でふき取り LB プレートに塗布した。37℃において24時間培養し、LBプレートに生着したコロニー数を計測した。水に10分浸した試料についても同様に処理し、水洗い群とした。

2-3. 生体試料の水分活性、糖度、pH の測定

2-3-1. キャベツの重さの測定

市販のキャベツを用いて、保存中の重量減少率を測定した。コントロール群と超音波処理群（28 kHz 噴流式超音波洗浄機、10分間洗浄）の各3枚のキャベツの葉をビニール袋に入れ、冷蔵庫4℃の環境において保存し、超音波処理後0, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 14日の重さを電子天秤（PG203-S、Mettler Toledo）を用いて測定した。野菜重量減少率は重量減少量/最初の重量×100%の数式に基づいて計算した。

2-3-2. 野菜の水分活性測定

試料を恒温密封容器に入れて静置すると試料の表面と周囲空気との間で自由水の吸脱着が行われ、最終的に平衡状態に達する。水分活性測定装置は平衡状態の容器内の湿度を電解質式湿度センサーでモニターし、水分活性値を測定する装置である。今回の測定では水分活性測定装置 (SP-W、アズワン) を使用した。

市販の5種類の野菜キャベツ、レタス、モヤシ、オオバ、ミツバを噴流式超音波洗浄機 (28 kHz) を用いて10分間処理した後、適量のコントロールと超音波の野菜を分取し、測定専用のプレートに載せて、装置の添付説明書に従って測定した (n=3)。野菜をビニール袋に入れて、冷蔵庫で3日保存し、3日後にもう一回各野菜の水分活性を測定した (n=3)。

2-3-3. ブドウ、ミニトマトの糖度、pHの測定

果実では、甘みと酸味が品質を左右する最も大きな要素であり、糖と酸の調和のとれた味が最も好まれ、その調和の目安として糖酸比がよく使用される。人間の味覚は糖の持つ甘味に対して寛大で、糖含量の高いほど嗜好性も高まるが、酸味に対して極めて厳しく、ある濃度を限界にして、それ以上になると急激に嗜好性が低下する傾向を持っている^[9]。糖度は、果実飲料に含まれる果糖、ぶどう糖及びショ糖などの糖類の含有量であり、「果実飲料の日本農林規格」では^[10]、糖度を糖用屈折計で測定し、単位を° Brix (ブリックス) で表す (10° はショ糖 10%)

に相当)。ブリックス糖度は果物の甘さの評価に用いられる指標である。

市販のブドウ（デラウェア (n=330 粒)、キョホウ (n=24 粒)、トリプソン (n=20 粒)、スチューベン (n=50 粒)）とミニトマト (n=32 個) をハサミでブドウを傷つけずに房から一粒ずつ切り離し、個数が同じになるように、半分に分けた。超音波処理群は噴流式超音波洗浄機 (28 kHz) で 10 分間洗浄し、コントロール群は水道水の中に 10 分間浸した。処理後、水を拭き取り、密閉性のプラスチック製のタッパーに入れて冷蔵庫 (4°C) で 3 日保存した。

カッターナイを用いてブドウの粒を赤道面で半分にカットし、半分に分けて手で果汁を絞り出して、糖度計 (C02439-C-BLK、F.G.S.) の測定部に果汁を滴下して糖度を測定した。室温に応じて温度による補正を行った。

ミニトマトについても同様に処置を行った。

pH の測定

市販のブドウ（デラウェア (n=120 粒)、トリプソン (n=20 粒)、スチューベン葡萄 (n=50 粒) とミニトマト (n=32 個) について、糖度測定と同じ手順で果実の前処理を行った。噴流式超音波洗浄機 (28 kHz) を使用して 10 分間超音波処理したものを超音波処理群とし、コントロール群は水道水の中に 10 分間浸したものをコントロール群とした。処理後、水を拭き取り、プラスチック製のタッパーに入れて冷蔵庫 (4°C) で 3 日保存した。

カッターナイフを用いてブドウの粒を赤道面で半分にカットし、半分に分けて手で果汁を絞り出して、pH計（LAQUAtwin B-712、HORIBA社製）の測定部に果汁を滴下してpHを測定した。

ミニトマトについても同様に処置を行った。

2-4. 生体試料における超音波処理の影響の検証

2-4-1. メダカ胚の生存率

東京大学柏キャンパスに所在する屋外メダカ飼育場において系統維持している野生集団由来のクローズドコロニーのうち、秋田県大館市において採集されたメダカ（*Oryzias latipes*、大館系統）を新領域生命棟内の屋内飼育室（1N06）（26℃、14時間と10時間の明暗サイクル）にて飼育した。受精卵を回収してプラスチックシャーレ内にて発生させ、発生ステージが6-7と9-10^[11]のメダカ胚、また近交系メダカであるHd-rR系統の発生ステージ2-4、4-5、8-10、11-12、16、25、35^[11]の胚（n=20）を同様に処置して実験に供した。2 mlのマイクロチューブに入れ、2 mlのメチレンブルー水（0.00005%）を加えた。

メダカ胚を入れたマイクロチューブを洗浄槽の中央に固定し、噴流式超音波食品洗浄機を使用して超音波処理（10分間）した。処理直後（5分内）に顕微鏡（MULTIZOOM AZ100, Nikon）を用いてメダカ胚を観察して生死を判定し（図-

3B)、当日の生存率を算出した。超音波処理二日目以後の生存状況は変化しなかったため (図-4)、一日後のメダカ胚の生存率を最終の生存率として示した。

超音波処理に最も感受性が高い発生ステージが受精7時間後のステージ10という結果を得たため、次にこの発生ステージのメダカ胚 (大館系統) を噴流式超音波洗浄 (28 kHz) と従来型超音波洗浄機 (SHARP UT-205S, 40 kHz) を使用して超音波処理し、影響を検討した。メダカ胚 (n=20) を入れた2mlマイクロチューブを洗浄槽中央に固定し、超音波メーターのプローブの先端部分 (センサー) をチューブ内に挿入して固定し、1分間の超音波処理の間に、10秒間の平均圧力を測定した (n=5)。

2-4-2. ヒラマキガイの生存率

新領域生命棟の屋内メダカ飼育室(1N06)の水槽に生息するインドヒラマキガイ (*Indoplanorbis exustus*) を採集し、大きさが均一な個体を選抜した。アルミ製の金網 (茶こし) を洗浄槽の中央に固定し、一匹ずつヒラマキガイを置いて、超音波メーターのプローブの先端部分 (センサー) を網の中央に固定し、1分間超音波処理を行うと同時に、10秒間の平均圧力を測定した (n=5)。

2-5. 冷凍魚肉に与える影響

2-5-1. 冷凍魚肉切片のオイルレッド染色による脂肪の除去の組織学的評価

①切片製作方法：クリオスタット（Thermo Fisher Scientific k.k:Waltham, Massachusetts, USA）を用いて、市販の冷凍塩サバ（ノルウェー産）のブロックを-27℃に冷却し、100 μ mの厚さに薄切りし、切片をスライドガラスにのせた。

②オイルレッド染色方法

Oil Red O 染色は、脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化を確認する方法の一つに用いている。オイルレッド O は、アゾ色素の 1 種で、無極性・脂溶性であるため、脂肪細胞に触れると細胞内脂質(トリグリセリド)の溶媒に溶け込むとされている。

試薬

10% ホルマリン溶液(37% Formaldehyde Solution を Milli Q で希釈)

60% イソプロパノール

PBS

Oil Red O (SIGMA O-0625)

オイルレッド O 染色液 (オイルレッド O イソプロピルアルコール飽和溶液)の作製は青山ら（筑波大学・深水研究室）の方法に従って行った^[12]。

Oil Red O 68mg と 100% イソプロパノール 22.27 ml を 50 ml チューブに加え、10 分振蕩し、60% に DW で希釈した上で、1 回濾過した。

この様に調整したオイルレッド O 染色液を切片上に加え、10 分間染色を行い、顕微鏡で観察した。

2-5-2. GCMS による脂質の除去効果の確認

脂肪酸抽出方法

抽出から分析まで Takeshita らの方法に基づいて行った^[13]。

サンプル（市販塩サバの一部）100 mg をハサミで細かく刻み、強化ガラス管（15mLST-SCR 16-100、IWAKI）に採取した。これに 1.5ml のメタノール（和光特級）、5mL の MTBE（t-ブチルメチルエーテル（和光一級））の順に加え、ボルテックスで攪拌した。次に超音波細胞破碎機（5203FZT、大岳製造所）を用いて 30 秒×2 回の破碎処理を行った。超音波処理による加熱を防ぐため、サンプルを入れたガラス管を常に氷で冷やしながら、2 回の処理間に 8 秒のインターバルを取りつつ超音波破碎処理を行った。

次に室温にて振蕩培養器（BIO-SHAKER BR-40LF,TAITEC）を用いて 2 時間振蕩（150 回/分）した後、遠心（2000 rpm）により不溶物を沈殿分離し、上清を有機溶媒耐性の注射器（2-4031-03,アズワン）に採取し、注射器に取り付けた PTFE 濾過フィルター（穴径 0.45 μ m, Millex:SLLHH04NL）を使用して濾過した。濾過後の溶液を 30mL バイアル（1-3501-06,アズワン）に採取した。内部標準として

これに炭素数 19 のノナデカン酸 (72332-1G-F SIGMA ALDRICH) を 0.5mL 加え、その後オーブンを使用し、50°C窒素環境下で一晩乾固させた。乾固したサンプルに 1mL の 3N-MeOH HCl (メタノール塩酸 3M HCl in Methanol) (33355 SUPELCO,SIGMA ALDRICH)を加え、ウォーターバスを使用して 85°Cで 2 時間インキュベートし、蓋を閉めたまま室温まで冷却した。次に水 (DW) 0.5mL、ヘキサン (n-hexane,和光特級) 1 mL の順に加え、十分に攪拌した後、上層のヘキサン層をパスツールピペットで回収した。更に 2 回 1 mL のヘキサンを加えて抽出を繰り返し、合計で 3 mL を回収した。

GC-MS 分析

抽出されたサンプル (1 μ L) をガスクロマトグラフィー質量分析計 (QP-2010Plus、島津製造所) を使用して分析した。カラムとして DB-23 (121-2323 内径 0.18mm、長さ 20m 膜厚 0.20 μ m Agilent J&W DB Series、アジレント・テクノロジー) を用いた。

分析条件

サンプル注入 1 μ L

キャリアガス (ヘリウム) 24.2 cm/s

メイクアップガス (ヘリウム) 20 mL/min

注入器と検出器 250°C

オープン温度 140°Cで1分後、4°C/minで220°Cまで

2-5-3. カルボニル価の測定による過酸化脂質の除去の評価

総脂質の抽出

脂質には極性の低い中性脂質と極性の高いリン脂質と呼ばれる膜脂質があり、それらは生体中において脂質相互で、あるいはタンパク質と水素結合、疎水結合、イオン結合等をしている。水素結合、疎水結合はエーテル、クロロホルム、ベンゼン・ヘキサンなどの非極性溶媒で弱めることができ、イオン結合は、極性の高いメタノール、エタノールなどの極性溶媒で弱めることができるので、これらの溶媒が脂質の抽出に用いられる^[14]。

ほとんどの天然脂質は生体中で疎水結合並びに親水結合を形成しているため、抽出は非極性溶媒と極性溶媒を組み合わせ、両者を混合して行われる。混合溶媒系としてはエーテル—エタノール (1:3)、クロロホルム—メタノール (2:1)、クロロホルム-メタノール-水 (1:2:0.8) などが代表的なものとされる。Folch 法はクロロホルム:メタノール:水 (ホモジネート試料) 比が 40:20:3 となる均一の溶媒で脂質を抽出し、水を加えて2層に分離させる方法であり、上層には水・メタノールなど水溶性の成分が、下層にはクロロホルム・脂質など脂溶性の成分が含まれる^[15]。

塩サバ 0.3 - 0.5g を細かく刻み、2 ml のマイクロチューブにパスツールピペットで取り秤量し、クロロホルム - メタノール (2 : 1) を約 1.5 ml 加えた。酵素が活性化され脂質の分解・酸化の危険を防ぐため、0.05% ブチル化ヒドロ キシトルエン (BHT) を添加し氷上で行った。蓋を密閉して手で 30 秒間激しく攪拌し、その後の 10 分間に 30 秒毎に攪拌して脂質を抽出した。遠心 (15,000 rpm、5 分間)

し、パスツールピペットで上澄み (水層) を捨てた。別のパスツールピペットを用いて、下層 (クロロホルム層) を別のマイクロチューブに取り、0.9% KCl 溶液を 0.5ml 加えてよく攪拌し、遠心 (15,000 rpm、5 分間) した。

マイクロチューブの 2ml の線までクロロホルム - メタノール (2 : 1) をパスツールピペットで加えてよく攪拌し、上と同じ条件で遠心した。上層とフラッフをパスツールピペットで取り去り、下層 (クロロホルム層) を、あらかじめ秤量した別のマイクロチューブに移した。うまく回収できなかつた場合には、ある程度までクロロホルム層を別のチューブに移した後、クロロホルムをさらに 0.5ml 加えてボルテックスミキサーで攪拌し、再度遠心 (15,000 rpm 5 分間) した。

クロロホルム層をマイクロチューブに分取し、蓋を開けた状態でエバポレータ (VEC-161、IWAKI) にセットし、無酸素状態で溶媒を蒸発させ、得られた脂

質を計量した。

カルボニル価

カルボニル価は油脂の酸化一次生成物であるヒドロペルオキシドが分解してできるカルボニル類の蓄積量を示す油脂の酸化劣化の指標の一つとされる。測定の原理はカルボニル類が 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (DNPH) と反応してヒドラゾンを作り、これが塩基性下で赤紫色のキノイドイオンになることを利用する。

3.5ml の HCl を含む 100 ml の 1-ブタノールに 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン 5 mg を溶解し、これを 1 ml とサンプル (試料油脂) 5~50 mg を含むブタノール溶液 1ml を混合し、40°C で 20 分反応させた。反応終了後、8% KOH の 1-ブタノール溶液 8ml を加えてアルカリ性にし、室温で遠心分離(3000 rpm, 5min)後、上層を回収し、440nm もしくは (420nm) の吸光度を測定した。440 nm はカルボニル化合物と 2, 4-ジニトロフェニルヒドラジンの反応で生成した 2, 4-ジニトロフェニルヒドラゾンの吸収波長である。

また t-2 デセナール 15 mg を 1-ブタノールを加えて 50 ml としたものを適宜希釈し、t-2 デセナール標準原液とし、同時に反応させて 440 nm の吸光度を測定し、検量線を得た。

2-5-4. TBA 酸値の測定による過酸化脂質の除去の評価

チオバルビツール酸値は食品中の脂質の酸化劣化の指標に使われる。酸化脂質からできるマロンジアルデヒド (MDA) など種々の酸化二次生成物がチオバルビツール酸 (TBA) と酸性下で反応して赤色色素を形成することを利用する。

TBARS (2-チオバルビツール酸反応性物質)は、酸化ストレスに応答して濃度が上昇する物質の総称で、脂質ヒドロペルオキシドやアルデヒドなどが含まれる。

通常、TBARS は多価不飽和脂肪酸脂質過酸化物の分解物である MDA

(malondialdehyde : マロンジアルデヒド) の量として測定される。2-チオバルビツール酸と MDA を酸性条件下で室温にて反応させることにより、生成される色素 (MDA-TBA 2 付加体) は 531 nm 付近に強い吸収を示し、この吸光度を測定する。TBARS アッセイは、脂質過酸化の測定方法として広く利用される

TBARS キット (FR40、Oxford biomedical research 社製)

酸試液は一度 4°C の冷蔵庫から出して、室温で一時間放置した。10ml の酸試液に指示薬一袋 (サンプル 20 個の分量) を加え、完全にパウダーが解けるまで攪拌し、これを指示液とした。20 μ M の MDA スタンダードは 20 μ l の 10mM MDA に 9.98 ml の dH₂O を加えて希釈 (1:500) した。

200 μ l のサンプルに 200 μ l の指示液を加え、65°C の水浴に入れて 45 分間保温した後、150 μ l を分取し、分光光度計 (U-2010、HITACHI) を使用して 540nm

(532nm) の吸光度を測定した。

スタンダードも同じように処理した。

2-5-5. 匂い分析による臭い除去の評価

匂い成分は揮発性成分であるため、その分析には移動相に気体（ヘリウム、窒素、水素など）を使用するガスクロマトグラフィーが主に用いられる。匂いは多くの成分から構成されているが、注入口で気化した化合物群はカラム内部にコーティングされた固定相との親和性および各化合物の揮発性等の条件にカラム内を移動する時間に差が生じ、分離されてカラム末端から流出する。ガスクロマトグラフのカラムの出口を分岐させ、一方は検出器（MS）へ、もう一方は匂いを嗅ぐことのできるポートへ接続し、匂いの特性を明らかにすると同時にその匂いをもたらすは学物質の同定を行う。この匂いの分析方法を GC スニッフィングという^[16]。

魚介類の匂いに関係する成分は、アンモニア、アミン類、アルデヒド・アルコール類などで、特に鮮度低下に伴って生成するものの代表としてアミン類のトリメチルアミンがある（生鮮なときは無流の地理メチルアミンオキシドとして存在）^[17]。超音波洗浄により、魚介類(塩サバ、生エビ)の臭い成分が減少するかを GC スニッフィングの方法を用いて検証した。

市販冷凍塩サバの切り身 (n=2)、生エビ(n=2)を噴流式超音波洗浄機 (28 kHz) を用いてそれぞれ 3 分間、10 分間洗浄した。塩サバは洗浄後に、通常食する際と同様に切り身深部に火が通るまで焼いた。各サンプル (約 5g) をガラス瓶に入れ、捕集剤 (MonoTrap RGPS TD、GL Science) を用いて 1 時間静置し、匂い成分の捕集を行った。

捕集された匂いサンプルをガスクロマトグラフィー質量分析計 (TQ-8030、島津製造所) を使用して分析した。カラムとして Stabilwax (121-2323 内径 0.32 mm、長さ 60 m 膜厚 0.50 μm 、GL Science) を用いた。

GCMS 分析条件：キャリアガス (ヘリウム) 50.0 ml/分

注入器と検出器 250°C

オープン温度 50°C で 2 分後、10°C/分で 230°C まで

この実験は東原研究室 (東京大学農学生命科学研究科・生物化学研究室) の協力の下で行われた。

2-6. 超音波洗浄した生体試料が生体の行動に与える影響。

2-6-1. コオロギ

フタホシコオロギ (*Ryllus bimaculatus* DEGEER) の成体を先端生命科学専攻の分子認識化学分野研究室 (永田晋治准教授) より分譲して頂き、実験に供した。

30°Cのインキュベーター内に照明設備を設置し、14 時間と 10 時間の明暗サイクルの条件において飼育した。超音波洗浄前後の生体試料をプラスチック製ケースの両端の対角の位置におき、コオロギ(n=10)を一匹ずつケースに入れ一回約 4 時間、ビデオカメラ (HDR-HC9、SONY) と録画ソフト Time viewer を用いて撮影し (ニボシの場合 17 回、キャベツ 16 の場合回、キャットフード (ピュリナワン キャット 避妊・去勢した猫の体重ケア) の場合 14 回)、一回の撮影中における摂食回数を目視で計算した。噴流式超音波洗浄機 (28 kHz) を用いてこれらの試料を 10 分間洗浄し、風乾して給餌した。

2-6-2. メダカ

β -アクチンプロモーター下で筋肉に GFP もしくは DsRed を発現する遺伝子組み換えメダカ (d-rR:actin::GFP、d-rR:actin::DsRed) 各 8 匹を水槽 (幅 21 cm × 高さ 25 cm × 奥行き 35cm、水量:4L) に入れ、野菜投与の前後併せて一ヶ月、間連続して 24 時間のビデオ撮影を行った。撮影装置としてコオロギの実験に使用したシステムを使用した。投与したコマツナは噴流式超音波洗浄機 (28 kHz) を用いて 10 分間洗浄処理を行い、乾燥を防ぐためにビニール袋に入れて 4°Cの冷蔵庫において保存した。コマツナを 10 分間水に浸し、コントロールとした。小松菜約 5 g を乳鉢を使用して液状になるまで磨り潰し、一日二回 (昼間 13~14 時と夜間 17 時~18 時) 14 日給餌した。前後の各 3 日 (野菜の給餌を開始

する前のランダムに選択した3日と野菜投与1日目、8日目、14日目)の09:00、15:00、21:00時からの5分間のデータをソフトUMA-tracker (<http://ymnk13.github.io/UMATracker>)を用いて分析し、算出された位置座標に基づいて一秒当たりの遊泳距離を計算した。メダカ飼育室(生命棟1N06)の明暗周期を、明期09:00-23:00(14h)23:00-09:00(10h)とした。

3. 結果

3-1. 超音波洗浄機の超音波強度の実測

噴流式超音波食品洗浄機（28 kHz）及び従来型の超音波洗浄機（40 kHz; UT-205S、SHARP）が発生する超音波の強度を超音波測定メーター（SM1000、新科産業）を使用して測定した。噴流式超音波洗浄機では、噴流がない状態での洗浄槽の中央水深 3 cm、中央水深 4 cm、中央水深 7 cm、噴流がある状態での中央水深 7 cm、振動子直上水深 7 cm、振動子間水深 7 cm、振動子間水深 4 cm、中央水深 4 cm の各条件において、超音波の強度はそれぞれ 4.48、6.10、12.45、3.87、3.59、8.10、7.74、6.23 psi (pond square inch)であった（図-1A）。一方、従来型の超音波洗浄機（UT-205S、SHARP）では、出力 100%の設定とした状態での洗浄槽内の振動子直上水深 8 cm、振動子直上水深 4 cm、中央水深 8 cm、中央水深 4 cm、および出力 50%の設定とした状態での洗浄槽内の中央水深 4 cm 各条件においての超音波強度はそれぞれ 38.55、22.76、14.87、22.80、18.75 psi であった（図-1B）。

次に、様々な素材の容器を出力 100%に設定した従来型超音波洗浄機（UT-205S、SHARP）の洗浄槽にセットして水を満たし、洗浄槽の中央水深 4 cm に相当する位置において各容器の中の超音波出力を測定したところ、1 L ガラス製ビーカー、ポリプロピレン製 CD ケース、ポリプロピレン製 2 ml マイクロチューブ、金属ケース、紙製弁当箱、紙製牛乳パック、発泡スチロール製カップ麺パックの超音

波強度はそれぞれ、25.05, 12.21、10.23, 9.23, 3.80, 2.24, 0 psi であった (図 1-B)。ポリプロピレン製マイクロチューブに入れると超音波強度が半分以下になることが判明した。紙製の容器、発泡スチロール製の容器中では、超音波が大きく減弱することが判明した。

3-2. 除菌効果

噴流式超音波洗浄機の除菌効果を検証するため、水浸法と綿棒拭き取り法の二通りの実験を行った。水浸法では、イチゴ、レタス、パセリ、ミニトマトの四種類の生体試料の水洗い前後および 10 分間の超音波洗浄前後の 50ml 洗液から 100 μ l を取り、LB プレートに播種して 37°C において 24 h 培養し、発生したコロニー数を測定した。イチゴ (n=2)、レタス (n=2)、パセリ (n=4)、ミニトマト (n=2) における水洗いでの残菌率はそれぞれ 10%、7%、35%、4% であり、これに対して超音波洗浄では 0%、1%、1%、1% であった(図-2C)。構造が複雑なパセリにおいては、超音波洗浄後のコロニー数は水洗い後の 4.4% であり、噴流超音波式食品洗浄機は水洗いに比較して顕著な除菌効果を示した。次に直接洗浄効果を見るため、コマツナ (n=4) でスメアテスト (綿棒拭き取り法) を行った。1 cm² の面積を無菌綿棒でふき取り、LB プレートに塗布した。結果、水洗い群の平均コロニー数は 265 に対し、超音波洗浄後は 65 であった(図-3C)。

また、野菜果物だけでなく、魚介類の市販のアサリ（熊本県産）（n=3）、冷凍赤エビ（アルゼンチン産）（n=3）で実験を行った。目視で確認した結果、両者において、超音波処理後のプレート上のコロニーが明らかに少なかった。（図-3D, 3E）

3-3. 生体試料の水分活性、糖度、pH への影響

3-3-1. キャベツの重さ変化

超音波処理より植物試料の保水性を促進できるかを検証するため、キャベツの葉の重さの変化を検討した。コントロール（水洗い）と噴流式超音波処理群において各3枚のキャベツの葉の重さを電子天秤（PG203-S、Mettler Toledo）を使用して測定した（図-4A）。測定重量に基づいて、前測定回に比した重量減少率を算出した（図-4B）。測定初日と最終日の重さの変化の割合は噴流式超音波処理群において44%、53%、85%であり、コントロール群では49%、55%、69%であった。平均値は超音波61%、コントロール57%であり、超音波処理群の保水性はコントロールと比較して大きな差がなかった（図-4C, 4D）。

3-3-2. 野菜の水分活性測定

超音波が生体試料の保水性に与える影響を解明することを目的として、水分

活性測定装置（SP-W、アズワン）を用いて、噴流式超音波洗浄機での洗浄前後の野菜の水分活性を測定した。キャベツ、レタス、モヤシ、オオバ、ミツバ（n=3）における超音波洗浄当日の水分活性はそれぞれ 0.93、0.93、0.94、0.91、0.93 であり、コントロール当日の水分活性はそれぞれ 0.94、0.94、0.94、0.93、0.93 であった。また、超音波洗浄三日後の水分活性はそれぞれ 0.93、0.94、0.94、0.92、0.93 であり、コントロール 3 日後の水分活性はそれぞれ 0.93、0.94、0.94、0.92、0.93 であった。両者に差は認められず、超音波処理による野菜の水分活性への影響は認められなかった（図-5）。

3-3-3. ブドウ、ミニトマトの糖度、pH

噴流式超音波食品洗浄機（28 kHz, 40 kHz）が生体試料の内部に対する影響を見るため、ブドウとミニトマトにおける糖度と pH を糖度計（C02439-C-BLK、F.G.S.社製）と pH 計（LAQUAtwin B-712、HORIBA 社製）を使用して測定した。28 kHz の超音波を発生する噴流式超音波洗浄機を用いて、4 種類のブドウ、デラウェア（n=165 粒）、キョホウ（n=12 粒）トリプソン（n=10 粒）、スチューベン（n=25 粒）とミニトマト（n=16 個）の洗浄前後の糖度をポケット糖度計（C02439-C-BLK、F.G.S.社製）で測定した。コントロールの平均糖度はそれぞれ 17.5 ± 2.1、17.6 ± 0.7、17.8 ± 0.5、18.5 ± 1.2、7.6 ± 0.4° Bx であり、超音波処理 10 min

後の平均糖度はそれぞれ 17.4 ± 2.2 、 17.7 ± 0.4 、 17.9 ± 0.6 、 19.0 ± 0.9 、 $7.6 \pm 0.5^\circ$ Bx であり、超音波処理群とコントロール群の間に有意な差は認められなかった (図-7A)。糖度のヒストグラム分布においては、糖度が低い個体数が減少したスチューベン葡萄(t 検定、 $p_{片側} = 0.036 < 0.05$)を除き、超音波処理に伴う違いは検出されなかった (図-7B, 7C, 7D)。

デラウエア (n=60 粒)、トリプソン (n=10 粒)、ミニトマト (n=16 個) の pH を pH 計 (LAQUAtwin B-712、HORIBA 社製) で測定した結果、コントロールの pH はそれぞれ 3.2 ± 0.3 、 3.1 ± 0.0 、 4.3 ± 0.5 、 4.0 ± 0.4 であり、それぞれの超音波処理群における pH は 3.3 ± 0.5 、 3.1 ± 0.1 、 4.4 ± 0.3 、 3.8 ± 0.2 であり、超音波処理群とコントロール群の間に顕著な差は見られなかった(図-8A)。スチューベン葡萄 (n=25) のコントロールの pH は 4.3 ± 0.5 と超音波処理での 4.4 ± 0.3 は t 検定の結果において、超音波処理後の pH の分散における有意差 ($p = 0.02 < 0.05$) が認められた (図-8B)。

また、超音波の周波数による影響の違いを見るため、40 kHz の噴流式超音波洗浄機を用いて超音波処理した二種類のブドウ：トリプソン (n=10 粒)、レッドグローブ (n=20 粒) とミニトマト (n=10 個) の糖度と pH を同様に測定した。コントロールの糖度はそれぞれ 16.0 ± 2.7 、 20.6 ± 1.4 、 $6.6 \pm 0.5^\circ$ Bx に対し、超音波の糖度は 18.3 ± 2.6 、 20.7 ± 1.5 、 $6.6 \pm 0.5^\circ$ Bx であった (図-9A)。コントロ

ールの pH は 3.6 ± 0.1 、 3.9 ± 0.3 、 4.3 ± 0.1 ° Bx であり、超音波の pH は 3.7 ± 0.1 、 4.0 ± 0.2 、 4.3 ± 0.1 ° Bx であった。その中、トリプソンにおいて、糖度 pH の微かな上昇が見られ、(図-9C) 糖度が高い個体が増加した(図-9B)。

3-4. 生体試料における超音波処理の影響の検証

3-4-1. メダカ胚の生存率

秋田県大館市において採集された野生集団に由来し、その後に東京大学においてクローズドコロニーとして系統維持されているメダカ(大館系統)の様々な発生段階の胚それぞれ(n=20)を得て、噴流式超音波食品洗浄機を使用して超音波処理(10分間)した。ステージ2-4、4-5、8-10、11-12、16、25、35における生存率はそれぞれ0.90(18/20)、1.00(20/20)、0.75(15/20)、1.00(20/20)、1.00(20/20)、1.00(20/20)、1.00(20/20)であった(図-11A, 11B)。卵割期を終えて細胞の分化が始まる初期胞胚(受精後7時間、ステージ10)が超音波処理に最も高い感受性を示すことが明らかとなった(図-11B)。

超音波処理に最も高い感受性を示した発生段階10のメダカ胚を従来型の超音波洗浄機(UT-205S、SHARP)と噴流式超音波食品洗浄機で超音波処理(10分間)した。1日後の生存率はそれぞれ30%(6/20)、70%(14/20)であった(図-12)。

従来型の超音波洗浄機であるSHARP社製UT-205Sは超音波出力を最大100%

からその 50%まで 10%刻みで設定することが可能である。まず、出力を変化させた場合に洗浄槽内の超音波強度がどのように変化するかを検討した。超音波強度はそれぞれ 16.68 ± 1.19 , 12.90 ± 0.82 , 10.85 ± 0.56 , 10.67 ± 0.50 , 10.19 ± 0.33 , 9.89 ± 0.43 psi であった (図-13A)。また、超音波出力を 100、90、80、70、60、50%と設定して従来型超音波洗浄機 (UT-205S、SHARP) を作動させた場合の 1 分間超音波処理した場合のメダカ胚 (ステージ 10) の 1 日後生存率はそれぞれ 37(8/19)、32(6/19)、20(4/20)、45(9/20)、50(10/20)、50(10/20)であった。一方、噴流式超音波食品洗浄機では、超音波強度は 3.40 ± 0.27 psi であり、この超音波強度で 1 分間超音波処理したメダカ胚 (ステージ 10) の 1 日後生存率は 100% (29/29) であった (図-13B)。

3-4-2. ヒラマキガイの生存率

超音波処理が生体に与えるダメージを検討するため屋内メダカ飼育室の水槽内に生息しているヒンドラマキガイ (*Indoplanorbis exustus*) (n=3)を対象とした。各出力の従来型の超音波洗浄機 (UT-205S、SHARP) と噴流式超音波食品洗浄機を使用してインドヒラマキガイを超音波処理 (1 分間) し、同時に超音波強度を測定した。超音波出力を 100、90、80、70、60、50%に設定した従来型超音波洗浄機 (UT-205S、SHARP) を使用した場合と噴流式超音波洗浄機を使用した

場合のインドヒラマキガイの1日後の生残率は80、80、60、20、60、80、100%であり、4日後の生残率はそれぞれ、40、40、20、0、40、60、100%であった(図-14C)。超音波強度はそれぞれ 15.02 ± 9.31 , 15.47 ± 11.13 , 13.20 ± 9.33 , 12.66 ± 9.51 , 12.80 ± 9.87 , 11.03 ± 8.41 , 4.64 ± 3.11 psi であった(図-14B)。

3-5. 冷凍魚肉に与える影響

魚介類を -10°C 以下に凍結貯蔵すると細菌の腐敗作用はほぼ停止し、魚介組織中に含まれる各種酵素作用も著しく阻害されるが、冷凍貯蔵中にも主として脂質成分の酸化に起因する変色や油焼け臭の発生による品質低下は進行する。また、凍結貯蔵魚介において、カルボニル類の増加が最も顕著となることが知られ、その中カルボニル化合物を主とした臭気は内臓区より筋肉区で多く発生することが知られている。

魚あるいはその加工品中の嫌な匂いを除去又は減少させることができれば気にせず食べることができる。魚の調理や加工に際して、水洗いはもっとも基礎的なもので、これほど簡単で有効な方法はないとされている^[18]。

そこで、冷凍魚介類の表層の酸化された脂質が超音波により除去されるか否かを明らかにするために、以下の実験を行った。

3-5-1. オイルレッド染色による脂肪の除去の組織学的評価

市販の冷凍塩サバ（ノルウェー産）の切り身を 28 kHz の噴流式超音波洗浄機で処理（3 分間）した。超音波処理後、クリオスタット（Thermo Fisher Scientific k.k:Waltham, Massachusetts, USA）で厚さ 100 μm に薄切りし、Oil-Red O（ソルベントオレンジ 7）で染色した後に、光学顕微鏡で切片を観察した。コントロールでは表皮直下の細胞の中に Oil-Red O で赤く染色された皮下脂肪が多数観察され、また筋肉組織の細胞においても、脂肪の存在が確認された。一方、超音波処理した塩サバの切片においては、ほぼ全ての皮下脂肪が消失し、筋肉細胞でも脂肪が除去されているのが確認された（図-15B）。従って、28 kHz の噴流式超音波洗浄機により、冷凍塩サバの切り身の表層の脂肪が除去されることが示された。

3-5-2. GC-MS による脂質の除去効果の確認

超音波洗浄による除去された油脂の成分を分析するため、GC-MS を用いて実験を行った。Takeshita ら^[13]の方法に基づいて、冷凍塩サバとサンマ（各 1 枚）の切り身から脂肪酸を抽出し、GC-MS（QP2010 Plus, 島津製作所製、カラム DB-23）で分析した結果、3 分間の超音波洗浄によりサバの約 60%、サンマの約 90% の脂肪酸が除去されていた（図-16A）。更にプラスチックトレイからの移り込みと思われる可塑剤フタル酸ジブチル（DBP）のピーク（time=30.6, 41.6）がサバ

切り身から消失した(図-16B)。

3-5-3. カルボニル価の測定による過酸化脂質の除去の評価

超音波洗浄により、冷凍塩サバの表層より除去された脂肪が過酸化脂質であるかを調べるため、冷凍サバ切り身から脂肪酸をクロロホルム-メタノール法(ホルチ法)で有機抽出し、カルボニル価の測定を行った。しかし、標的の波長(420 nm)では赤紫のキノイドイオンによるピークが観察されず、460 nmの波長においてピークが出現し、正確に評価することが出来なかった(図-17)。

3-5-4. TBA 酸値の測定による過酸化脂質の除去の評価

カルボニル価を指標として過酸化脂質の除去を確認することができなかったため、次にTBA酸値をTBATBARSキット(FR40、Oxford biomedical research社製)を用いて測定した。冷凍塩サバのコントロールにおけるMDA推測量は1.63、0.65、7.93、-0.63、6.74 μM であり、超音波のMDA推測量は2.22、0.55、13.59、1.11、3.35 μM であった。しかし、サバ個体によるばらつきが激しいため、コントロールと超音波での比較は難しいと思われた。同じく、冷凍サケで重複実験を行い、コントロールのMDA推測量は-0.41、-0.71、1.71、1.34 μM 超音波のMDA推測量は2.86、1.84、0.41、1.41 μM であり(図-18)、切り身の元の状態に左右さ

れることが強く示唆され、超音波による過酸化脂質の除去効果を検証するに至らなかった。

3-5-5. 匂い分析による臭い除去の評価

東京大学院農学生物科学研究科・東原和成教授の協力を頂き、超音波洗浄により、魚介類(塩サバ、生エビ)の臭い成分が減少するかを GC スニッフイングの方法を用いて検証した。噴流式超音波洗浄機 (28 kHz) を用いて洗浄処理を行った焼き塩サバの切り身 (n=2) と生エビ(n=2)の匂い成分の GC-MS 結果を分析した結果、焼き塩サバにおいて、ガスクロマトグラムの約 7.51 分 (保持時間) のところに魚臭を認識し、ガスクロマトグラムの同じ保持時間に異臭の元となるトリメチルアミンのピークが観察された。生エビにおいて、ガスクロマトグラムの約 7.31 分 (保持時間) のところに魚臭を認識し、ガスクロマトグラムの同じ保持時間に異臭の元となるトリメチルアミンのピークが観察された。また、焼き塩サバと生エビの超音波洗浄群のサンプルにおいて、トリメチルアミンのピークの高さがコントロール群より低下したのが確認された (図-19)。トリメチルアミンは魚介類の鮮度低下による魚臭の元となる主要な匂い成分の一つであり、超音波処理によってトリメチルアミンの量が減少したことから、魚介類の臭いを和らげる効果があるものと期待できる。

3-6. 超音波洗浄した生体試料が生体の行動に与える影響

超音波処理した生体試料を食した生体への影響を調べるため、コオロギとメダカを用いて以下の様な実験を行った。

3-6-1. コオロギ

噴流式超音波洗浄機（28 kHz）を用いて各試料（ニボシ、キャベツ、キャットフード）を 10 分間洗浄処理し、風通しの良いところで風乾させた。超音波洗浄前後の生体試料を箱の両端に置き、コオロギを一匹ずつ箱に入れ一回 4 時間撮影し（ニボシ 44 回、キャベツ 21 回、キャットフード 14 回）、一回の撮影中における摂食回数を目視で計測した。その結果、キャベツのコントロール摂食回数が 28 回であり、超音波処理したキャベツの摂食回数が 24 回であった。キャットフードのコントロール摂食回数は 12 回であり、超音波処理したキャットフードの摂食回数が 6 回であった。コントロールのニボシの摂食回数が 60 回であったのに対し、超音波処理したニボシの摂食回数が 87 回であり（図-21B）、超音波洗浄後の方を摂食する回数が多い傾向が観察された。ニボシにおいては超音波洗浄により、コオロギが好まない物質が除去されたことが考えられる。

3-6-2. メダカ

超音波処理後野菜の投与が生体へ与える影響について実験するため、メダカ各 8 匹を水槽に入れ、24 時間連続のビデオ撮影を野菜（コマツナ）投与前後併せて一か月間行った。野菜投与前後の各 3 日の 9 時~22 時のビデオデータをソフト UMA-tracker で分析し、座標に基づいて一秒当たりの遊泳距離を計算した。野菜投与前のコントロールと超音波群の遊泳速度は 34.9 および 33.1 mm/s に対し、野菜投与後の遊泳速度は 48.5 および 42.5 mm/s であった（図-27）。超音波洗浄の有無による差は観察されなかったが、遊泳速度が野菜投与前と比べ顕著な増加が観察され、t 検定において有意差が認められた ($p = 0.0001 < 0.05$) ことから、野菜投与はメダカの遊泳速度の増加と関係し、メダカの身体状況をよりよくすることが示唆された。

4. 考察

本研究では、新規に開発された噴流式超音波洗浄機を用いて、超音波洗浄に伴う生体試料へのダメージを従来型超音波洗浄機と比較し、噴流式超音波洗浄機を用いた食品・生体試料の超音波洗浄の効果・効用を検証し、超音波による食品の線情報のための基礎的知見を得ることを目的とした。更に、従来の超音波洗浄機より弱い超音波処理が生体試料へ与える諸影響を解明するとともに、超音波洗浄した食材を食した生体が受ける影響の解明を試みた。

4-1. 超音波洗浄機の超音波強度の実測

液体中に放射された超音波の強さなどを数値化するには、超音波発振機から超音波振動子に供給された電力や電流値などで定量する方法や、市販されている圧電素子を利用した音圧計などで測定する方法がある²⁾(日本産業洗浄協議会洗浄技術委員会、2006)。今回の実験の超音波出力の測定に超音波メーター(音圧センサー式)を用いた結果、噴流式超音波(28 kHz)の各条件における出力強度はそれぞれ 4.48、6.10、12.45、3.87、3.59、8.10、7.74、6.23 psi (pond square inch)であったのに対し、従来型超音波強度はそれぞれ 38.55、22.76、14.87、22.80、18.75 psi であった。各測定回においてのばらつきが大きいのは測定メーターの音圧センサーは形状の都合上、ピンポイントの測定しかできな

い点による。また、超音波洗浄機の洗浄槽の位置によって、超音波強度が大きく異なることによると考えられる^[19]。超音波音圧センサーの応答性や信頼性の点で課題は残るが、従来型超音波洗浄機と比べ噴流式超音波洗浄機の出力が顕著に弱いことを確認できた。

4-2. 除菌効果

食中毒とは有害生物・微生物や有毒物質の含まれた飲食物を接種することによっておこる健康障害の総称である。食中毒最近はその物、または細菌が産生する毒素が病原性を示す。サルモネラ、ブドウ球菌、腸炎ビブリオ菌などの微生物性食中毒は今日発生する食中毒の発生件数の約 8 割であり、最も頻繁に発生している食中毒である。食中毒細菌は食品中で増殖しても異臭を発しないことが多いので、その食品を食べてしまう。また、腸管出血性大腸菌やカンピロバクターなどは食品中で増殖しなくても、食品に付着した数十～数百個の少量の菌量を摂取しても発症することがある。細菌性食中毒予防三原則は食中毒菌を「付けない、増やさない、殺す」と言われ^[20]、家庭においては事前の洗浄が極めて有効である。

過去に超音波洗浄機（W118T、本多電子）を用いて、ミニトマトを洗浄する際の洗浄効果の検証が行われている。28 kHz の超音波照射と水の入れ替えを併

用した場合、10分の時間において約80%の残留農薬（クロロタロニル）が除去されたことが認められた。また、一般生菌数の実験において、28 kHzの超音波を10分間照射した場合、コントロールに比べコロニー数が約75%除去されている^[21]。他にも、20 kHzの超音波洗浄機（N-50-4、東洋理工製作所）を用いて10分間の処理を行った後、パセリの細菌残留率が13.5%であり、86.5%の除菌効果を示したとの報告もあった^[22]。

噴流超音波式食品洗浄機（28 kHz）では超音波強度が従来型より弱いため、超音波洗浄の効果が弱まっている可能性が強く懸念された。そこで、本研究では除菌効果を検証するための実験を行った。水浸法による市販のイチゴ、レタス、パセリ、ミニトマトの水洗い群の残菌率はそれぞれ10%、7%、35%、4%であり、これに対して超音波洗浄群では0%、1%、1%、1%と顕著な差が見られた。また、拭き取り法によるコマツナ、アサリ、エビの結果においても、超音波洗浄群の除菌効果が大きかった。

先行研究では、噴流超音波式食品洗浄機（28 kHz）を用いてハウレンソウに付着した残留農薬の除去効果を検証した実験において、噴流がある条件では噴流がない条件と比べ、16.8%の洗浄効果の上昇が見られている。また、通常の水洗いに比較して、噴流がない場合で74%、噴流がある場合で103%の洗浄効果の向上が得られている^[23]。従って、噴流式超音波洗浄機を用いて、野菜果物類の

細菌、農薬を除去し、食をより安全にすることが出来ると期待できる。

4-3. 生体試料の水分活性、糖度、pH への影響

超音波は縦波の振動であり、振動を吸収する物質も多いが、超音波の振動をウイスキーなどの酒改質（味向上）、焼酎熟成の促進に使用する例もある^[4]。また、超音波洗浄機（KQ-700DE、昆山超音波）による超音波処理がナツメ果実の硬度や皮の色を維持し、活性酸素種の含有量を減少させ、抗酸化酵素の含有量を増加させる報告もある^[24]。その一方、20 kHz の超音波処理により野菜のビタミン C とビタミン B1 が損失することも報告されている^[25]。また、MRI により、超音波処理後のモヤシの細胞内の結合水が増加することを示唆する結果が得られている（尾田、未発表）。

水は結合水と自由水の二種類があり、水分活性は全体の水に対する自由水の割合を示す（自由水/自由水+結合水）。微生物は水分活性が低下すると次第に増殖が悪くなり、ある A_w 値以下になると全く増殖できなくなる。その値は微生物の種類によっても異なるが、一般細菌では 0.90、カビでは 0.8 以下では増殖ができなくなり、0.60 以下になるとあらゆる微生物は増殖できなくなる。食中毒菌の多くは 0.94~0.93 が最低水分活性であるので、水分活性は食品の保存性を検討するために使用されている^[26]。

ナツメ果実の硬さを維持し、保存性を高めたデータ^[24]以外に、超音波洗浄機 (KQ-3200DV, 昆山超音波) を用いた超音波処理がスモモの硬度や皮の色を維持し、コントロールより保存期間を延長させることが報告されている^[27]ことから、超音波処理が野菜の水分活性に変化をもたらすかどうか検証した。しかし、今回の実験では、キャベツの葉の水分の蒸発による重量の減少の平均値は超音波群、コントロール群において 61%と 57%であり、キャベツの葉を含む 5 種類の野菜の水分活性も全て 0.94 前後であり、本研究では野菜の保存性を支持するデータは得られなかった。

ブドウやミニトマトの糖度のデータにおいて、スチューベン葡萄 (n=25)、コントロールの pH は 4.3 ± 0.5 と超音波処理での 4.4 ± 0.3 であり、f 検定の結果において、超音波処理後の pH の分散の違いが認められた。トリプソン (n=10 粒)、コントロールの糖度は $16.0 \pm 2.7 \text{ Bx}$ に対し、超音波の糖度は $18.3 \pm 2.6 \text{ Bx}$ であった。t 検定(片側検定)を行った結果、糖度の上昇が認められた。しかし、上記のスチューベンの pH とトリプソンの糖度を除く他の果実の糖度と pH のデータにおける超音波処理による変化が認められず、再現性を認めがたい結果であると言わざるを得ない。今後より精度の高い分析方法による更なる追試の必要がある他、超音波の作用が野菜や果実などの鮮度状態に依存する可能性もあるため、今後は実験サンプルの選択も慎重に考慮することが必要と考えら

れる。

4. 生体試料における超音波処理の影響の検証

超音波を照射することにより洗浄液を振動させると、洗浄液の粒子の加速度が非常に大きくなり、キャビテーションによって破壊した汚れを被洗浄物から引き剥がすことができる^[28]。超音波のキャビテーションによる物理的な衝撃が生じるため、超音波洗浄機（N-50-4, 東陽理工製作所）を用いた実験では、10分間の超音波処理を行ったパセリでは、葉緑体の破壊を招来し、15分間の処理は細胞の死滅が観察されている^[8]。噴流式超音波洗浄機では超音波強度が弱いため、生体組織、細胞を破壊することなく超音波処理を行うことが出来るものと期待される。

生体試料における超音波の影響を検証するために、本研究ではメダカ胚やインドヒラマキガイを実験試料として選んだ。噴流式超音波（28 kHz）を用いて、超音波に対する感受性が最も高い発生ステージ 10 のメダカ胚を処理した結果、1分間処理後の生存率は100%であり、10分間処理後の洗浄率は70%であった。それに対し、従来型超音波洗浄機出力50%の条件におけるメダカ胚の1分間処理後生存率は50%、10分間処理後の生存率は30%であった。ヒラマキガイにおいても、従来型と噴流式の1分間処理後生存率はそれぞれ60%、100%であった。

従って噴流式超音波洗浄機（28 kHz）は 従来型超音波洗浄機（SHATP、UT-205S）より動物生体に与えるダメージが弱く、生きた状態にある脊椎動物・無脊椎動物の個体を殺すことなく超音波処理することが可能であることが示された。

5. 冷凍魚肉に与える影響

長期冷凍保存された魚介類では脂質の過酸化が認められ、冷凍焼けと呼ばれる悪臭の発生による食味の劣化が大きな問題となっている。ある文献ではハマチ（-18℃）中の TBA 酸値の変化を調べた結果冷凍中において、0 日目の血合肉及び普通肉の TBA 酸値は冷蔵の試料と同じであるが、15 及び 30 日と期間が長くなるに従い増加し、30 日後では血合肉及び普通肉はそれぞれ 2.9 及び 2.8 倍に増加すると報告されている^[29]。

動物実験では過酸化脂質は成長に悪影響をもたらし、発がん性も確認されている^[30]。現在では、過酸化脂質生成に関わる基本的な反応機構は明らかとなっている。不飽和脂質はラジカル連鎖反応あるいは非ラジカル反応である LOX 反応や一重項酸素（singlet molecular oxygen ; ^1O ）酸化反応によって分子状酸素を結合し、LOOH を生成する。生じた LOOH は安定な化合物であるが、銅、鉄などの遷移金属イオンやヘムタンパク質と容易に反応し（1 電子還元）、

alkylperoxyl radical (LOO·), alkoxyl radical (LO·) を経由して反応性に富む多種類の活性カルボニル化合物 (leactive carbonyls) を生じる。この活性カルボニル化合物が生体毒性の本体とされ、タンパク質や核酸との反応が研究されている^[31]。現在流通している一般冷凍魚肉の大部分では凍結の過程で生じた氷晶が直接筋肉組織を破壊し、また氷結に伴い二次的に派生した濃縮系が魚肉の品質を劣化させていると報告されている^[32]。本研究のオイルレッド染色と GCMS 分析により、超音波洗浄により、細胞構造が破壊された冷凍魚介類の表層の細胞より脂質を除去できることが証明された。

本研究では更に、長期の保存期間により過酸化脂質となった冷凍魚介類表層の脂質が超音波により除去されることを検証するため、超音波処理前後の表面の魚肉より脂肪を抽出し TBA 酸値を測定したが、洗浄前後の酸化状態の変化を示すデータを得ることが出来なかった。市販されている冷凍魚の新鮮状態のばらつきが大きいと考えられる。匂い成分の分析実験においては、焼き塩サバと生エビの両方の超音波洗浄群のサンプルにおいて、魚介類の鮮度低下による魚臭 (トリメチルアミン) のピークがコントロール群より低下した傾向が見られた。超音波処理によるサバ、エビのトリメチルアミンの量が減少したことは、サバ、エビの匂いが改善したことを示した。更に、超音波前後の塩サバと生エビの生臭さが低減したことは官能試験においても確認され、超音波洗浄により魚

介類の臭いを改善することが期待される。

6. 超音波洗浄した生体試料が生体の行動に与える影響

動物にとって摂食行動は個体の生命維持のために欠くことのできない最も重要な本能行動であり、動物の摂食行動は多種の脳ペプチドによって制御されると考えられる^[33]。ショウジョウバエなどの昆虫では、餌を発見して集まる行動に、触角上に存在する嗅覚需要期が大きな役割を果たして、また匂い物質を感じる能力は非常に高いと言われる^[34]。メダカ類は雑食性の強い魚類で、その食物は多岐にわたっている。アオミドロや緑藻からプランクトン動物、イトミミズまで食べる。しかし、この様なメダカ類の食性の幅広さとは、彼らの餌利用の可能性の大きさを意味しているのもであって、常にこれらの餌を無選択に摂食していることを示すものではない。メダカ類の摂食は外的諸要因の影響を受け、餌生物相の状態変化はメダカ類の接触活動に影響を及ぼすと言われている^[34]。

本研究では超音波処理前後の生体試料を食することにより、生体に与える影響をコオロギとメダカで検証した。コオロギの場合、ニボシにおいて、コントロールに比較し、超音波処理したニボシの摂食回数が多かった。超音波処理により、ニボシの表面の過酸化脂質が除去され、ニボシの匂いが改善し、コオロギがより多く摂食した可能性がある。キャベツに対する摂食回数に変化が生じなかった

理由は、超音波処理がキャベツの匂いに影響を与えなかったと考えられる。一方、キャットフードの超音波処理後の摂食回数が減少したのは、洗浄の過程においてコオロギの好む成分が除去された可能性が考えられる。

動物はある種の餌を他の餌よりも好んで利用するという性質を有するが、これは生得的な性質とみなされている。しかし同時に摂食に対して種々な程度に影響を及ぼす環境条件、中でもある定まった種類の餌の実際上入手可能性を左右する条件の作用の下では、餌料成分に対する元々の好みは著しい変化を受けることがありうると言われている^[35]。

本研究でコオロギやメダカに与えた試料は入手可能性においては全く同じ条件であり、彼らが示した試料への選択性は生得的な性質由来と考えられる。従って、コオロギが超音波処理後のニボシを選択的に摂食したことは、超音波処理したニボシがより彼らの健康に良いことを示すと考えられる。

メダカの行動実験において、普段給餌しているメダカフードより野菜の方への嗜好性が観察されたことにより、メダカは新鮮な状態の試料を好み、それがメダカの体に良いと考えられる。また、普段の飼育下において、死亡前のメダカは行動が緩やかになり、遊泳する能力が徐々に衰え、死亡直前には口以外動かさないことが観察された。従って、メダカの遊泳速度から反映される遊泳能力は健康の指標の一つと見做すことが出来、メダカの場合、野菜を摂食することが、メダ

カの身体状況に良い影響を与えたと思われるが、超音波処理の有無による嗜好性の違いは今回の実験では認められなかった。

本研究では、噴流と超音波の組み合わせによる噴流式超音波洗浄機が洗浄効率を向上させ、また適切な超音波強度により生体試料を破壊することなく、洗浄対象の表面に付着している細菌や残留農薬を洗浄除去することを可能とした。噴流式の超音波洗浄により、野菜果物における水分活性と糖度、pH が変らぬことから、生体試料の保存性や味を低下させないことが示唆された。また、長期冷凍保存された魚肉類への洗浄において、表層の過酸化脂質を除去することにより、匂いを改善することが認められ、コオロギが超音波洗浄後の煮干しに対する嗜好性を示したことから、洗浄後のニボシにおける成分の変化がコオロギの健康によいと考えられる。

5. 参考文献

- 1 甲子乃人: 超音波の基礎と装置・四訂版. ベクトル・コア. 2014
- 2 日本産業洗浄協議会洗浄技術委員会: トコトンやさしい洗浄の本. 日刊工業新聞社. 2006
- 3 清水伸二: 超音波洗浄. 日本大百科全書 ニッポニカ. 2017
- 4 日本産業洗浄協議会: はじめての洗浄技術. 工業調査会. 2005
- 5 日本国特許庁: 特許第 5863557 号. 特許公報 (B2). 2016
- 6 伊藤恭彦: 食の人権. リベルタス. 2010
- 7 吉田勉: 新食品衛生学. 学文社. 2014
- 8 木村友子: 超音波処理による野菜類の洗滌について. 栄養と食糧. 1969. 22 (9):69-73
- 9 伊藤三郎: 果実の機能と科学. 朝倉書店. 2012.
- 10 農林水産省: 果実飲料の日本農林規格. 農林水産省告示第 489 号. 2016
- 11 Iwamatu.T: Stages of normal development in the medaka *Oryzias latipes*. Mechanism of Development. 2004. 121(7-8):605-18.
- 12 青山久範: Oil Red O 染色 筑波大学生命領域学際研究センター・深水研究室. 2017
- 13 Takeshita.T, Ota.S, Yamazaki.T, Hirata.A, Zachleder.V, Kawano.S: Starch and lipid accumulation in eight strains of six chlorlla species under comparatively high light intensity and aeration culture conditions. Bioresource Technology. 2014. 158:127-134
- 14 藤野安彦: 脂質分析法入門. 学会出版センター. 1987

- 15 藤野泰郎: 脂質・酸化脂質分析法入門. 学会出版センター. 2000
- 16 長谷川香料株式会社: 香料の科学. 講談社. 2013
- 17 坂口守彦: どんな魚がうまいか. 成山堂書店. 2012
- 18 魚臭・畜肉臭: においの化学とマスキング. 太田静行恒星社厚生閣. 1981
- 19 日本国特許庁: 特許第 6095087 号. 特許公報 (B1). 2017
- 20 藤井建夫: 食品微生物学の基礎. 講談社. 2013.
- 21 山下正純: 超音波洗浄による農作物中残留農薬類の低減除去. 環境化学. 2009. 19(3):389-393
- 22 中島けい子, 福本順子, 中野典子, 小川政禧: 超音波洗浄による野菜に付着する細菌の除去. 栄養と食糧. 1976. 29(5):261-268
- 23 日本国特許庁: 登録実用新案第 3187858 号. 登録実用新案公報 (U) .2013
- 24 Zhi.H, Liu.Q, Xu.J, Dong.Y, Liu.M, Zong.W: Itrasound enhances calcium absorption of jujube fruit by regulating the cellular calcium distribution and metabolism of cell wall polysaccharides. Science of Food and Agriculture. 2017. 10:1002-1010
- 25 松谷康子: 超音波処理がビタミン C 並びにビタミン B1 に及ぼす影響. 栄養と食糧. 1969 22(1):43-46
- 26 藤井建夫: 微生物制御の基礎知識. 中央法規出版. 2004
- 27 Cao.S, Hu.Z, PangB, Wang.H, Xie.H, Wu.F: Effect of ultrasound treatment on fruit decay and quality maintenance in strawberry after harvest. Food Control. 2010. 21:529-532
- 28 石井一英: 超音波洗浄器徹底ガイド. INFECTION CONTROL. 2009. 18(8):784-787

- 29 細谷計助: 市販魚類中ビタミン A 含量の冷蔵および冷凍貯蔵における変化と過酸化脂質. 生活衛生. 1990. 34:70-75
- 30 内山充, 松尾光芳, 嗟峨井勝. 過酸化脂質と生体. 学会出版センター. 1985
- 31 寺尾純二: 生体内における過酸化脂質の発生と消去. 生物試料分析. 2009. 32(4):257-264
- 32 日本水産学会: 食品の水—水分活性と水の挙動. 恒星社厚生閣. 1979
- 33 松田恒平, 中町 智哉, 今野 紀文: 魚類の摂食行動・情動行動と脳ペプチド. 日本水産学会誌. 2015. 81(5):870
- 34 森田弘道, 久保田競: 摂食行動のメカニズム. 産業図書. 1982
- 35 B.C.イヴレフ:魚類の栄養生態学 (児玉康雄、吉原友吉訳) . 新科学文献刊行会. 1965

6. 謝辞

本研究を進めるにあたり、素晴らしい研究環境を与えて頂くとともに、多大なる御指導・ご助言を賜りました三谷啓志先生に深甚たる謝意を表します。

本論文を査読して頂くとともに、研究を進めていくにあたり終始懇切丁寧なご指導を頂き、日ごろから実験結果について議論をして頂きました尾田正二先生に深く御礼申し上げます。

日々の実験および解析において、ご助言をいただいた浅香智美博士、保田隆子博士、永田晋二先生、東原和成先生、平澤佑啓様に深く感謝いたします。

研究生活全般にわたり、ご協力およびご支援をいただきました三谷研究室の皆様、味の素奨学会の皆様感謝の意を表します。

最後に、今日に至るまでの学生生活を様々な面から支えていただいた、家族、友人に心から感謝の意を表します。

平成 29 年 7 月 20 日

劉 沁瑤

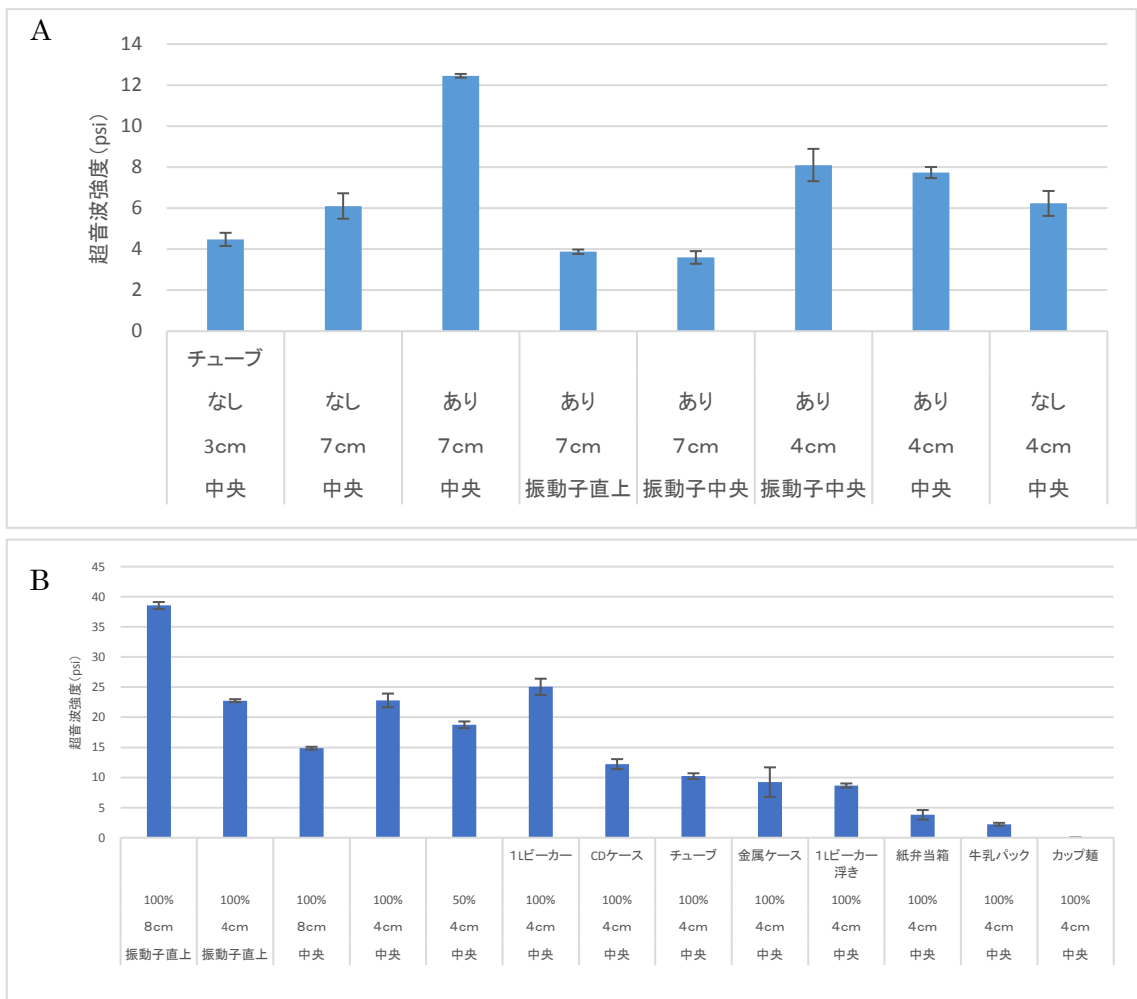


図-1 A 噴流式超音波洗浄機 (28 kHz) における超音波強度の測定 (測定回数 n=5)

B 従来型超音波洗浄機 (UT-205S, SHARP) における超音波強度の測定 (n=5)

*ポリプロピレン製の 2ml マイクロチューブにメダカ胚を入れて超音波処理し、超音波メーターを使用して処理中の超音波強度を測定した。振動子中央とは二つの振動子を直線で結んだ中央点である。ビーカー(浮き)はビーカーを洗浄槽底部に沈ませない状態。

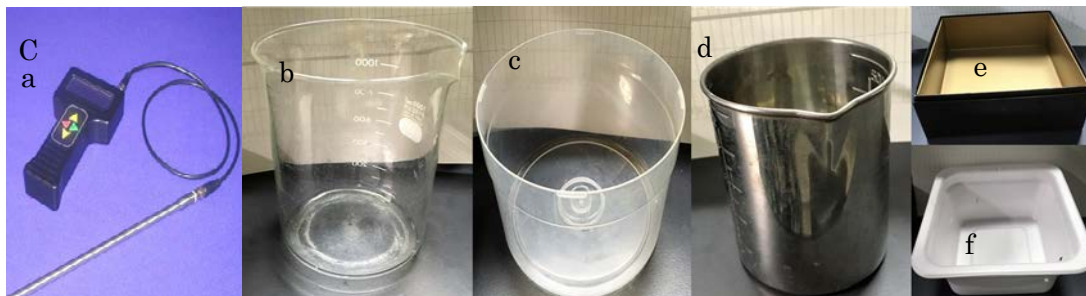


図-1C (a)超音波メーター、(b)ガラス製 1 L ビーカー、(c)ポリプロピレン製 CD ケース、(d)金属製ケース、(e)紙製弁当箱、(f)発泡スチロール製カップ麺ケース



図-2A 水浸法による除菌効果検証（試料：イチゴ、レタス、パセリ、ミニトマト）

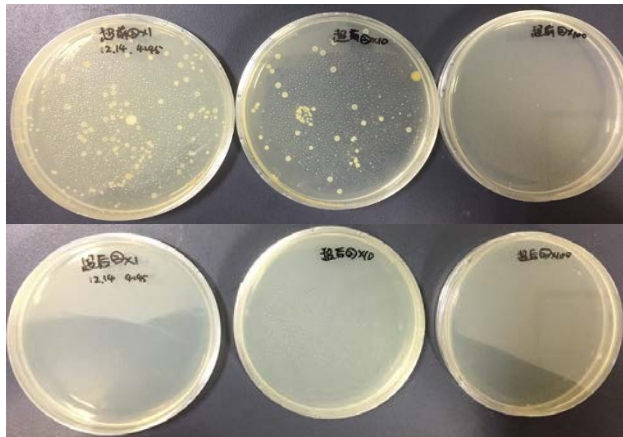


図-2B 水浸法を用いた除菌効果検証

(24h 培養後の LB プレート、上：コントロール 下：超音波洗浄)

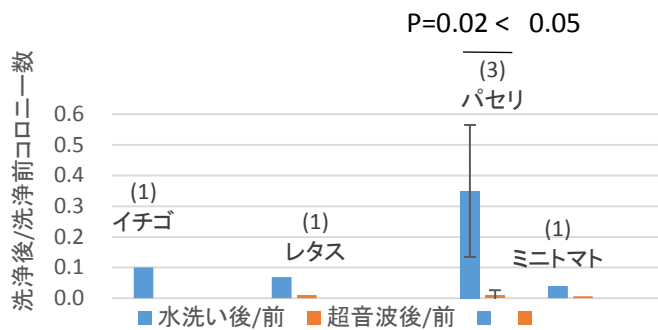


図-2C 水浸法による除菌効果の検証(洗浄前後のコロニー数比率)



図-3A 拭き取り法による除菌効果の検証 (試料：コマツナ 道具：綿棒)

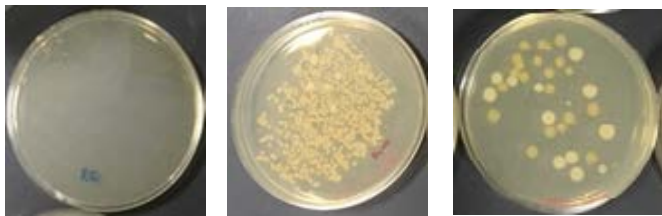


図-3B 拭き取り法による除菌効果の検証

(24h 培養後の LB プレート、左から：blank、水洗い、超音波洗浄)

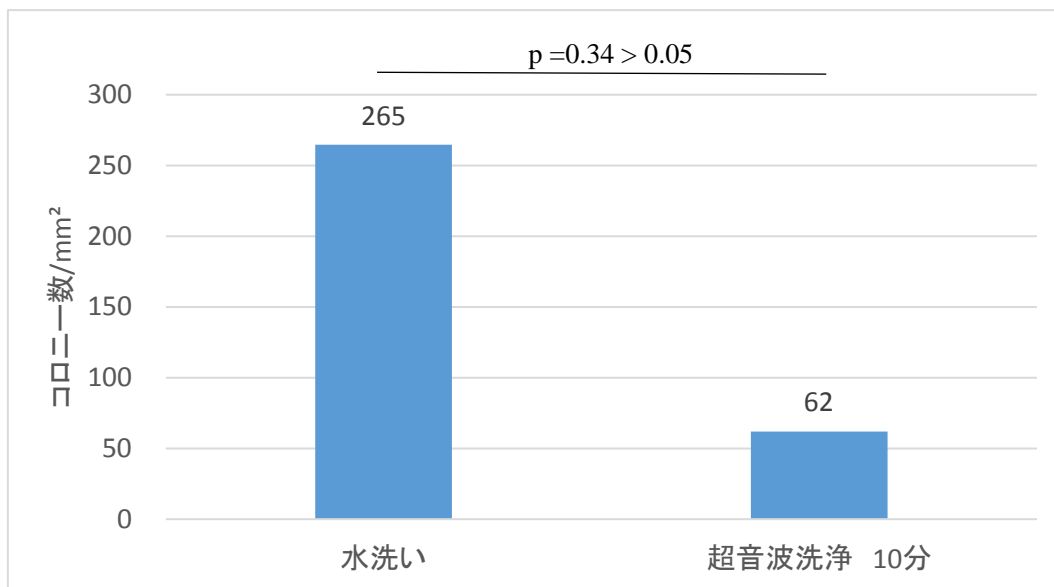


図-3C 拭き取り法による除菌効果の検証 (洗浄後前後のコロニー数)



図-3D 拭き取り法による除菌効果の検証

(試料:アサリ LBプレート:コントロール、水洗い、超音波)



図-3E 拭き取り法による除菌効果の検証

(試料:アルゼンチン産赤エビ LBプレート:コントロール、水洗い、超音波洗浄)

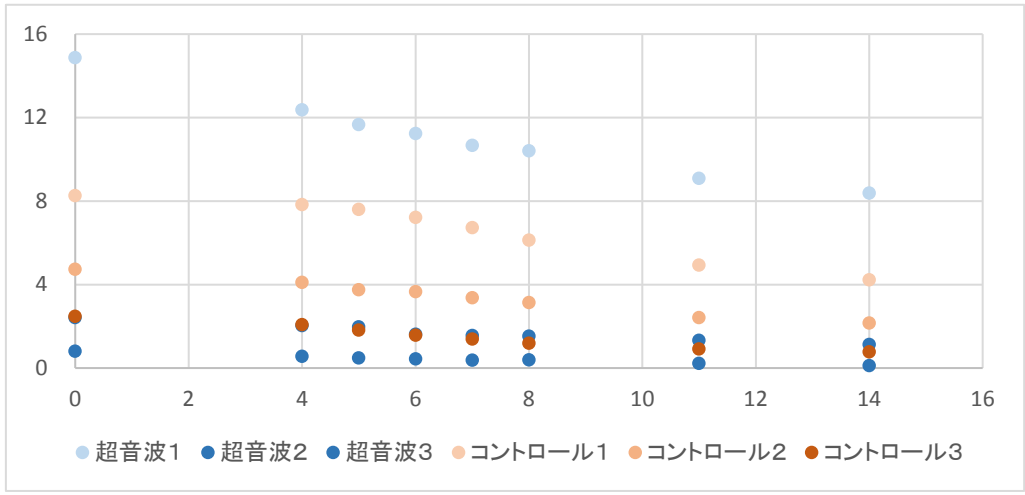


図-4A キャベツの重さ変化 (計測重量)

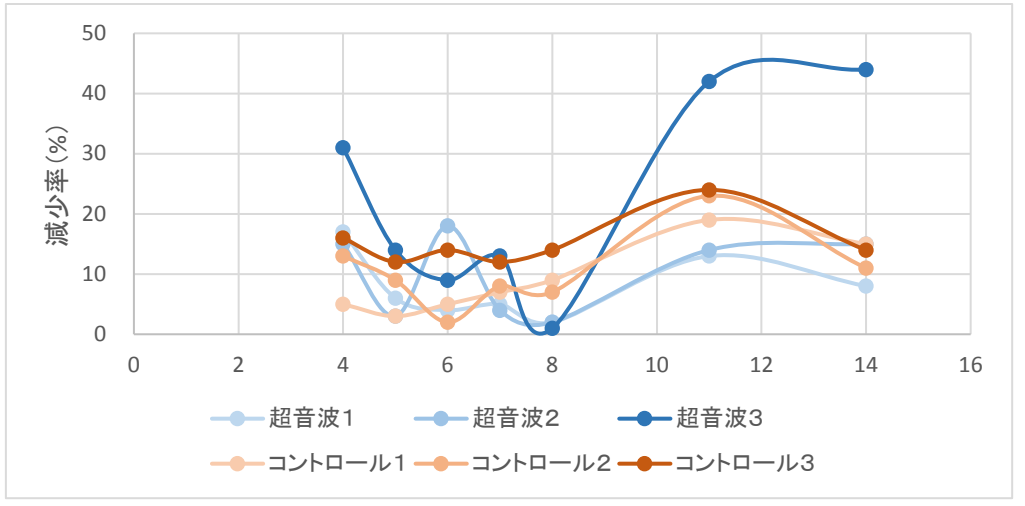


図-4B キャベツの重さ変化 (重量減少率)

*8日目のコントロール群の重量減少率は超音波処理群を上回った。

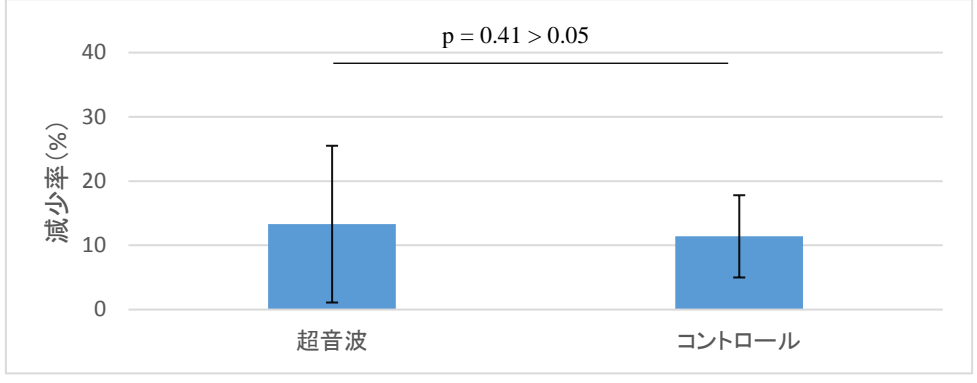


図-4C キャベツの重さ変化 (平均重量減少率, n=3)

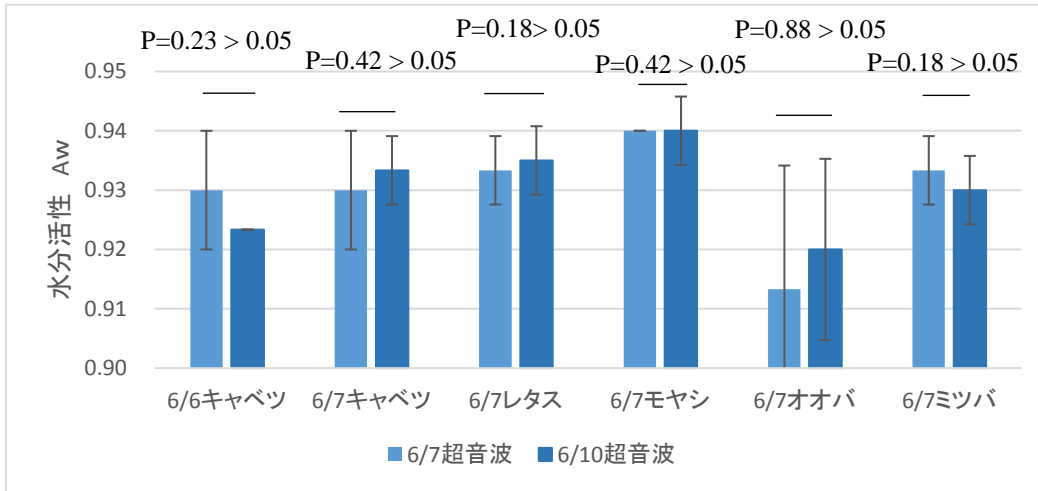


図-5A 野菜 5 種類の水分活性 (日数による変化, n=3)

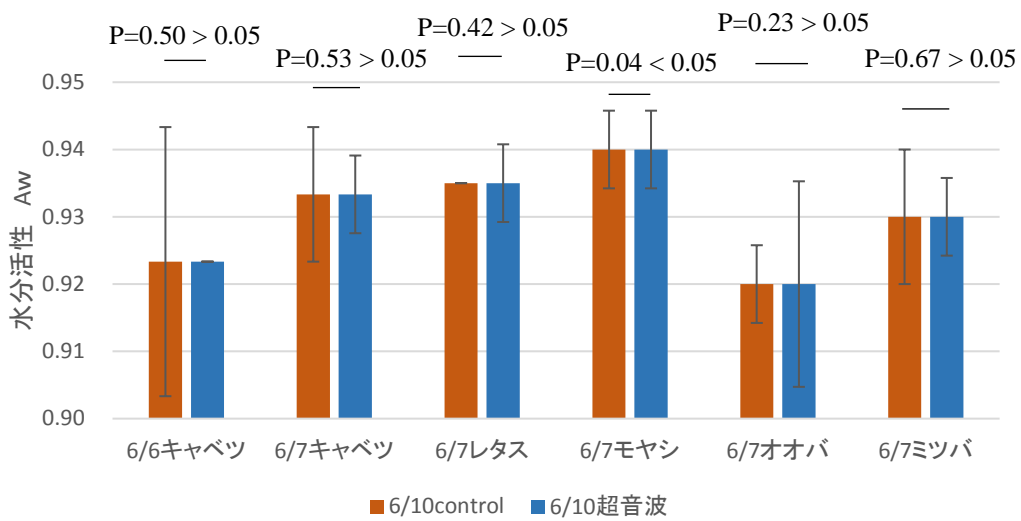


図-5B 野菜 5 種類の水分活性 (超音波処理による変化, n=3)



図-6 糖度、pH 測定に用いたブドウとミニトマト

*上から下、左から右へ：

ミニトマト、トリブソン（オーストラリア産）、レッドグローブ（チリ産）、キョホウ（国内産）、スチューベン、デラウェア

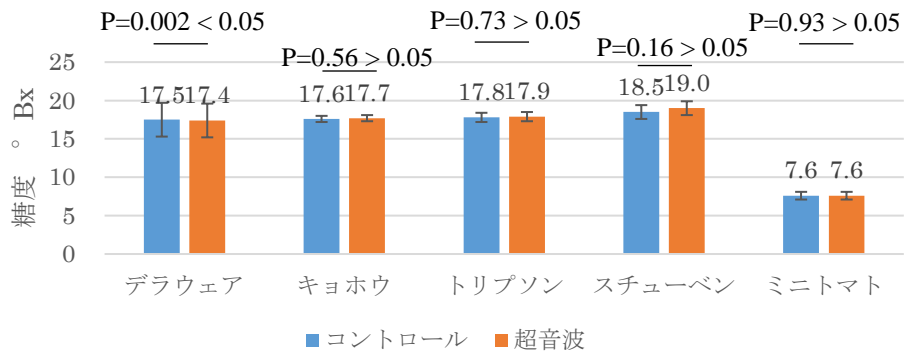


図-7A 噴流式超音波(28 kHz)処理後の糖度

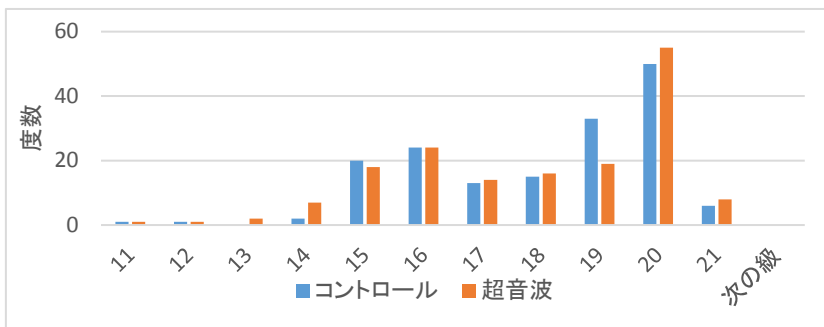


図-7B 噴流式超音波(28 kHz)処理後の糖度 (デラウェアのヒストグラム)

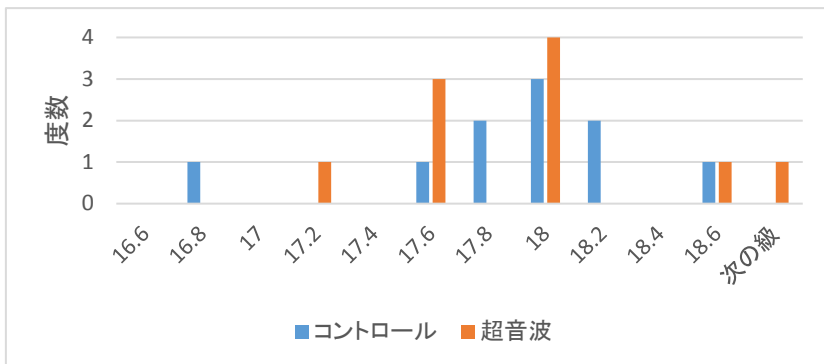


図-7C 噴流式超音波(28 kHz)処理後の糖度 (トリプソンのヒストグラム)

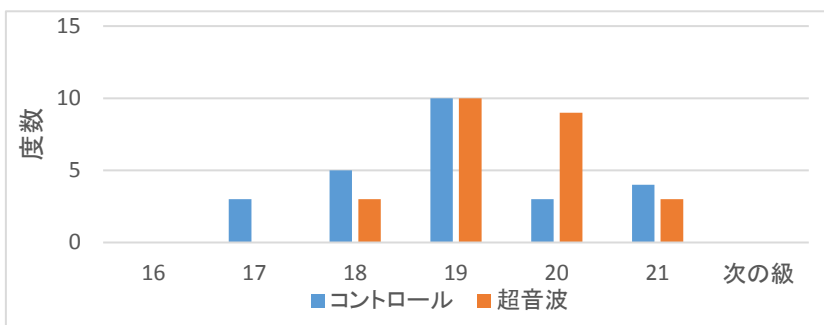


図-7D 噴流式超音波(28 kHz)処理後の糖度 (スチューベンのヒストグラム)

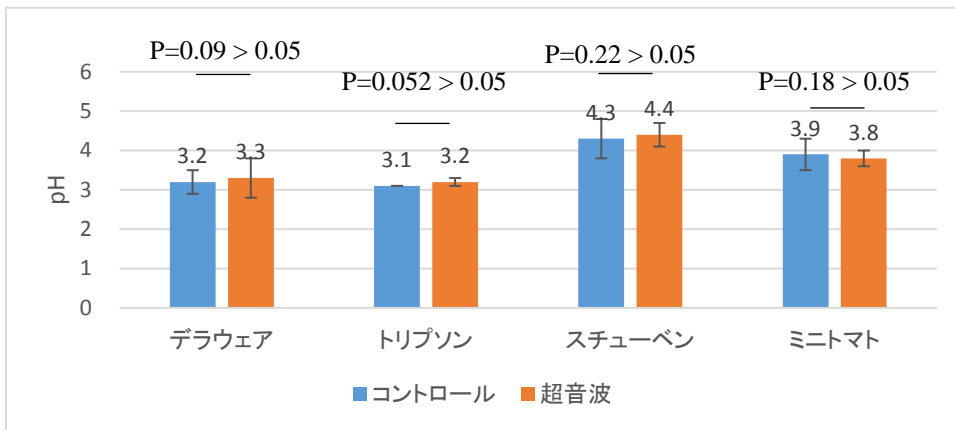


図-8A 噴流式超音波(28 kHz)処理後の pH

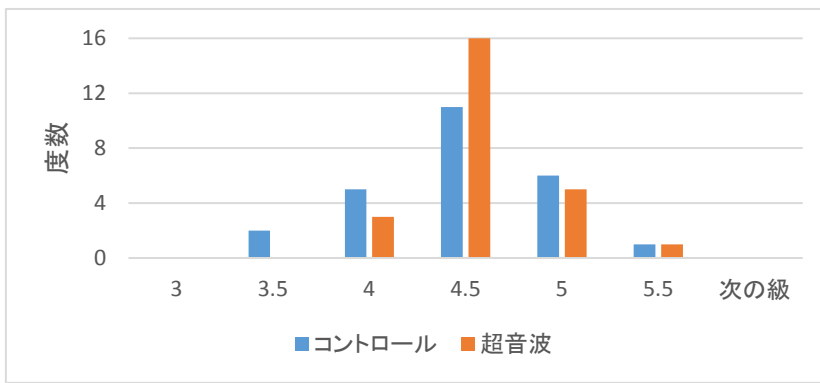


図-8B 噴流式超音波(28 kHz)処理後の pH (スチューベンのヒストグラム)

*スチューベンの pH におけるコントロールと超音波の分散に有意差があると認められた ($p = 0.02 < 0.05$)。

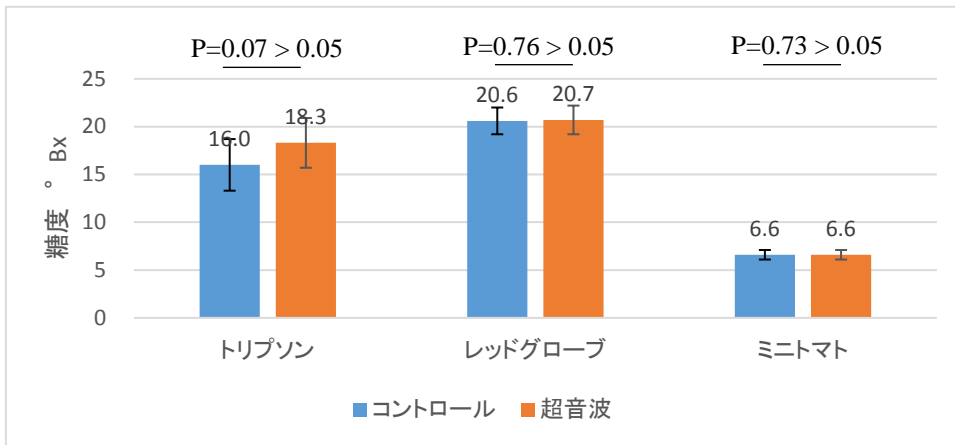


図-9A 噴流式超音波（40 kHz）処理後の糖度

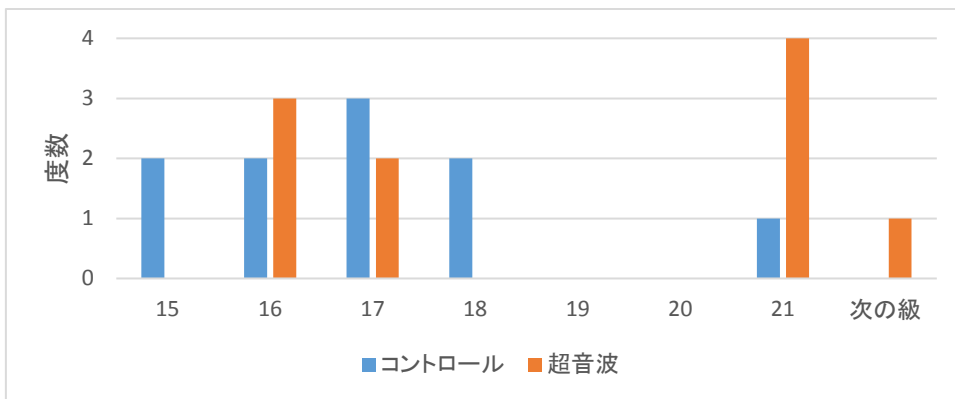


図-9B 噴流式超音波（40 kHz）処理後の糖度(トリプソンのヒストグラム)

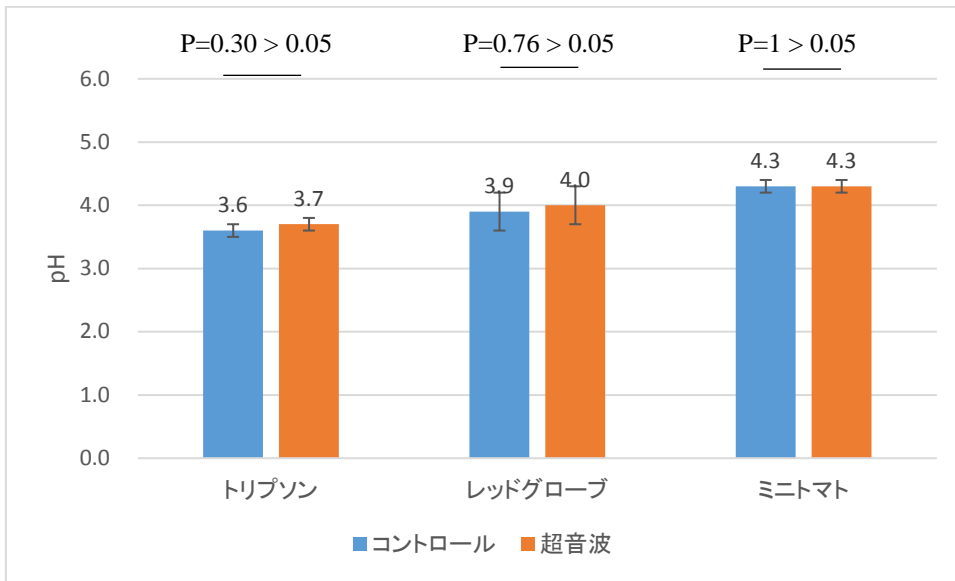


図-10 噴流式超音波（40 kHz）処理後の pH（ブドウとミニトマトの pH）



図-11A 超音波処理し発生ステージ 10 の生存胚と死胚（左：正常 右：死亡）

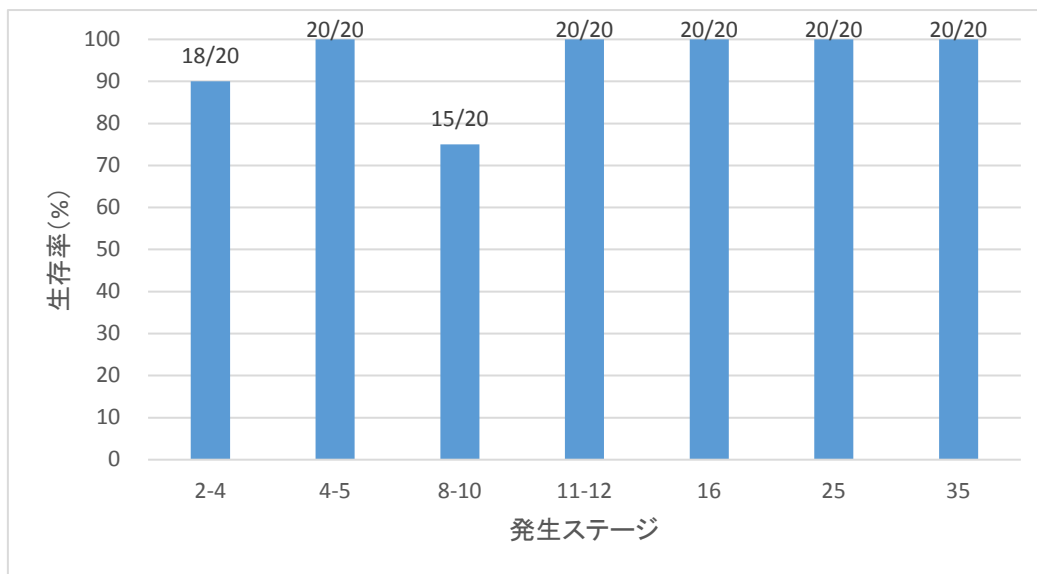


図-11B ステージ別 メダカ胚の1日後生存率

*発生ステージは Iwamatsu (2004) による。各発生ステージのメダカ胚を 2 ml メチレンブルー水入りのマイクロチューブに入れて、超音波処理を行った。

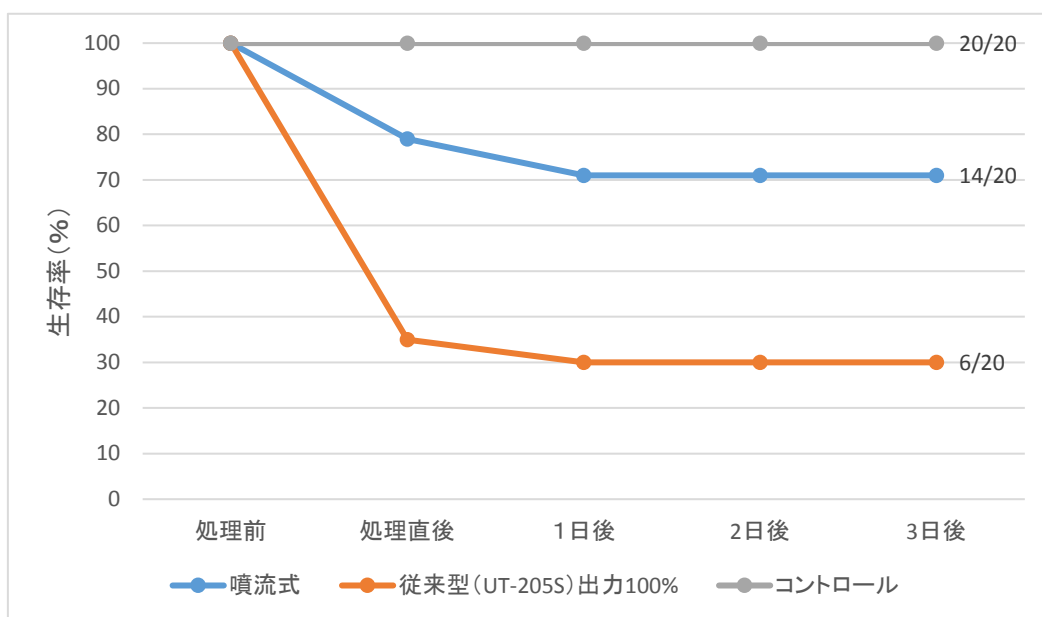


図-12 超音波処理したメダカ胚の生存率

*発生ステージ 10 のメダカ胚を処理し、処理後の生存率を調べた。

超音波処理 1 日後にメダカ胚の生存率が確定し、噴流式は従来型超音波洗浄機よりメダカ胚の生存率が高かった。

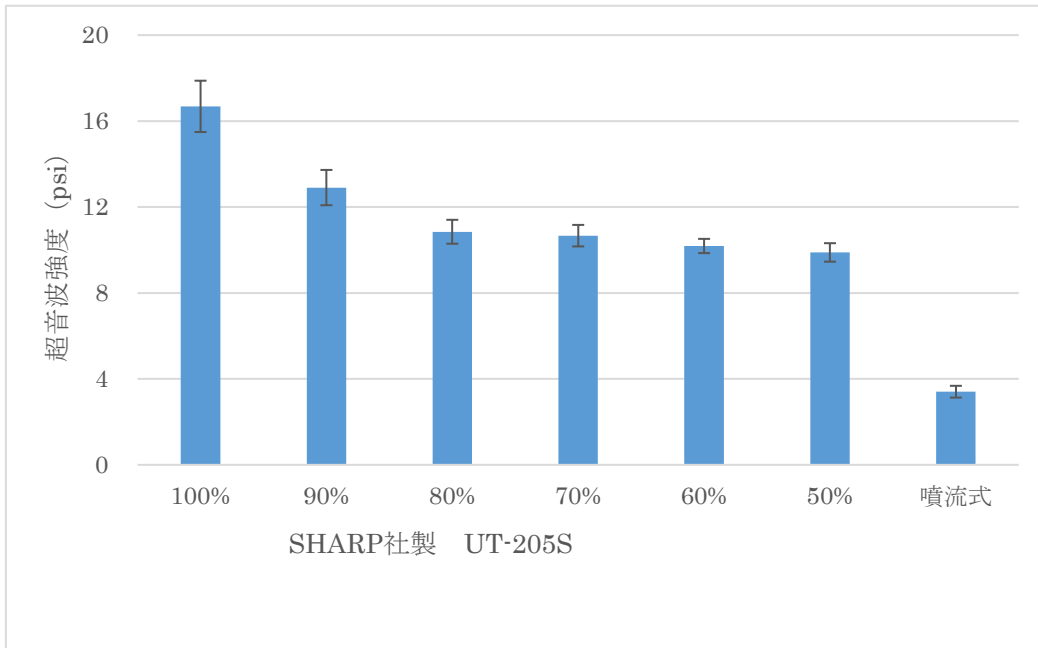


図-13A 超音波洗浄機の出力と超音波強度関係性 (平均超音波強度、測定回数 n=5)

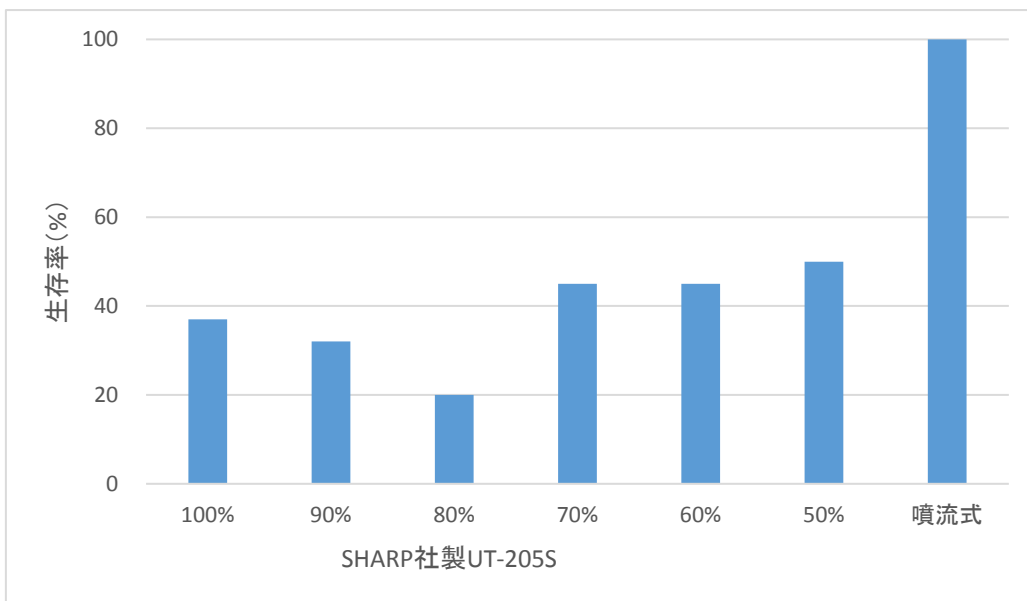


図-13B 超音波強度とメダカ胚の生存率 (メダカ胚生存率, n=20)



図-14A 超音波強度とヒラマキガイの生残率 (インドヒラマキガイ, *Indoplanorbis exustus*)

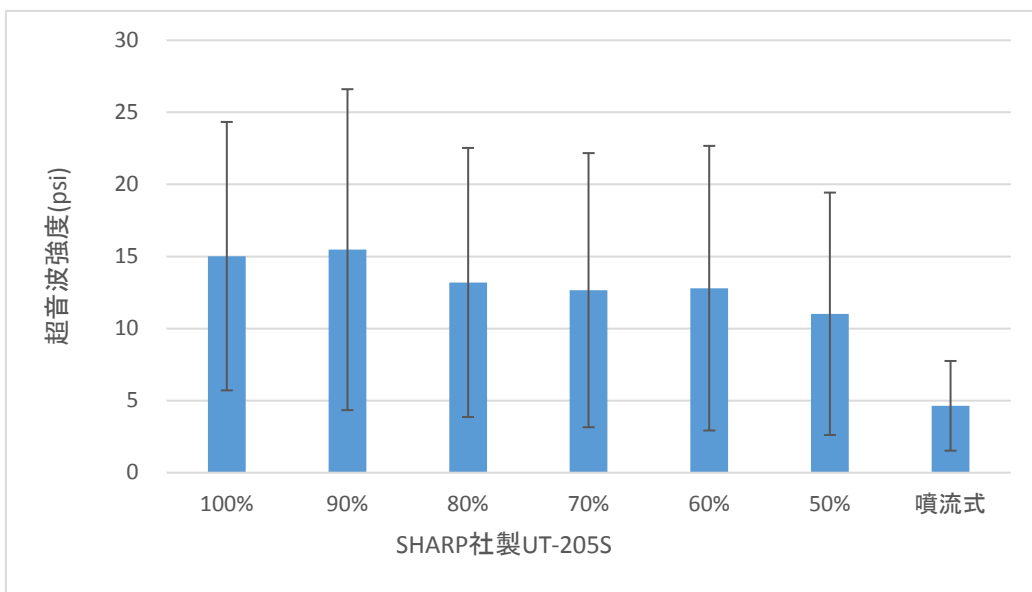


図-14B 超音波洗浄機の出力と超音波強度関係性 (平均超音波強度、測定回数 n=5)

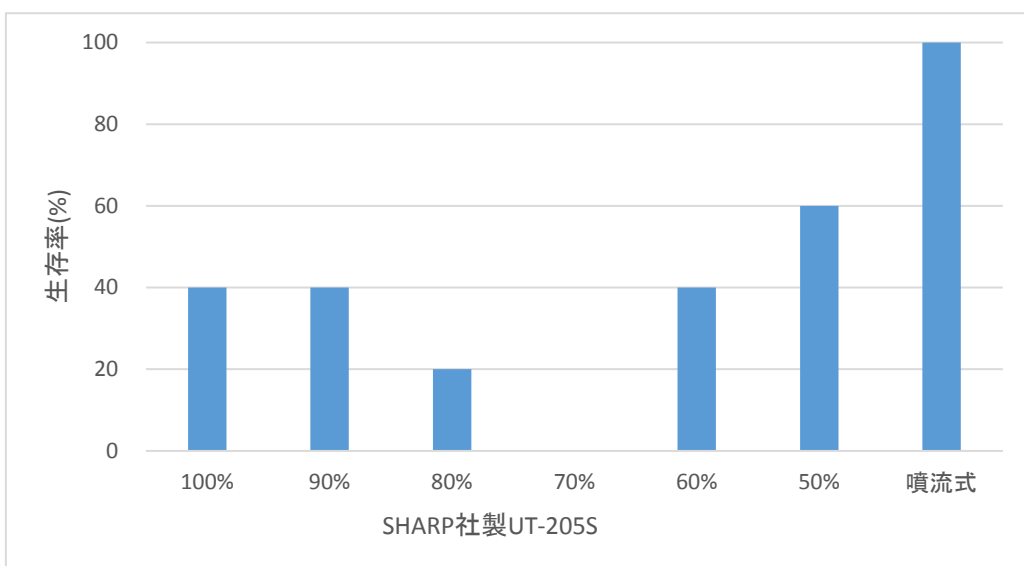


図-14C 超音波強度とヒラマキガイ生存率 (4日後生存率,n=5)



図-15A 噴流式超音波洗浄機(28 kHz)を用いた冷凍塩サバの洗浄

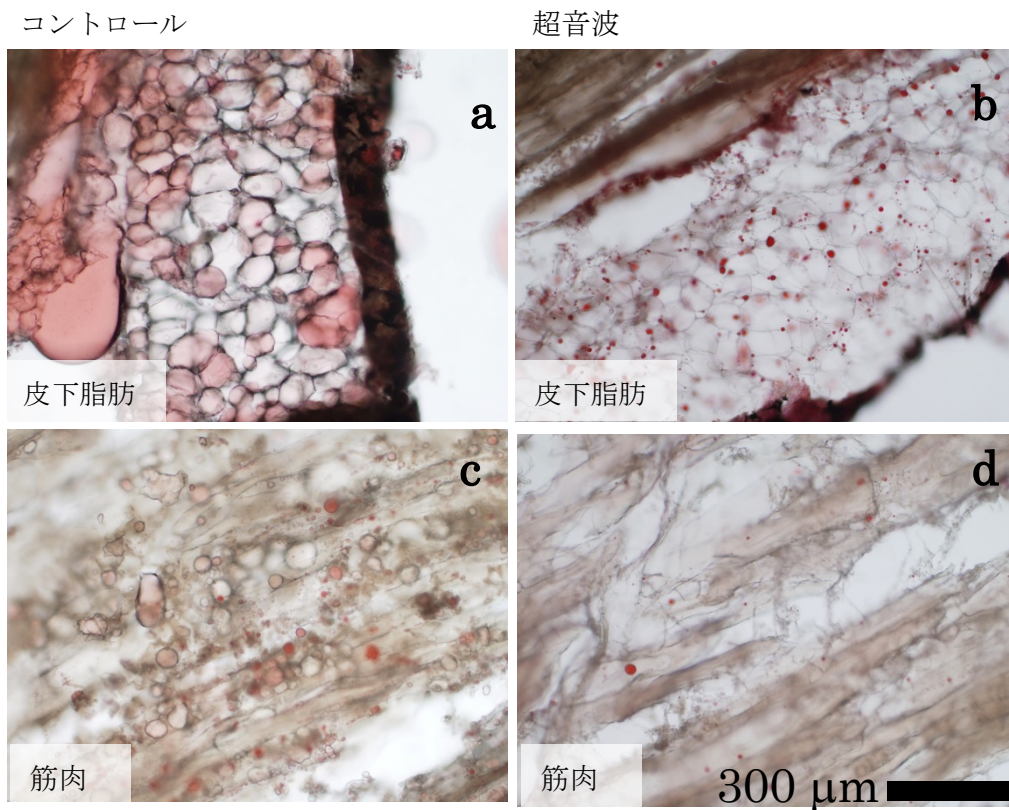


図-15B 噴流式超音波 (28 kHz) 処理後の塩サバ凍結切片の Oil-Red O 染色図

- (a) コントロールの皮下脂肪
- (b) 噴流式超音波 (28 kHz) 洗浄 3 分間後の皮下脂肪
- (c) コントロールの筋肉組織
- (d) 28 kHz 噴流式超音波洗浄 3 分間後の筋肉組織

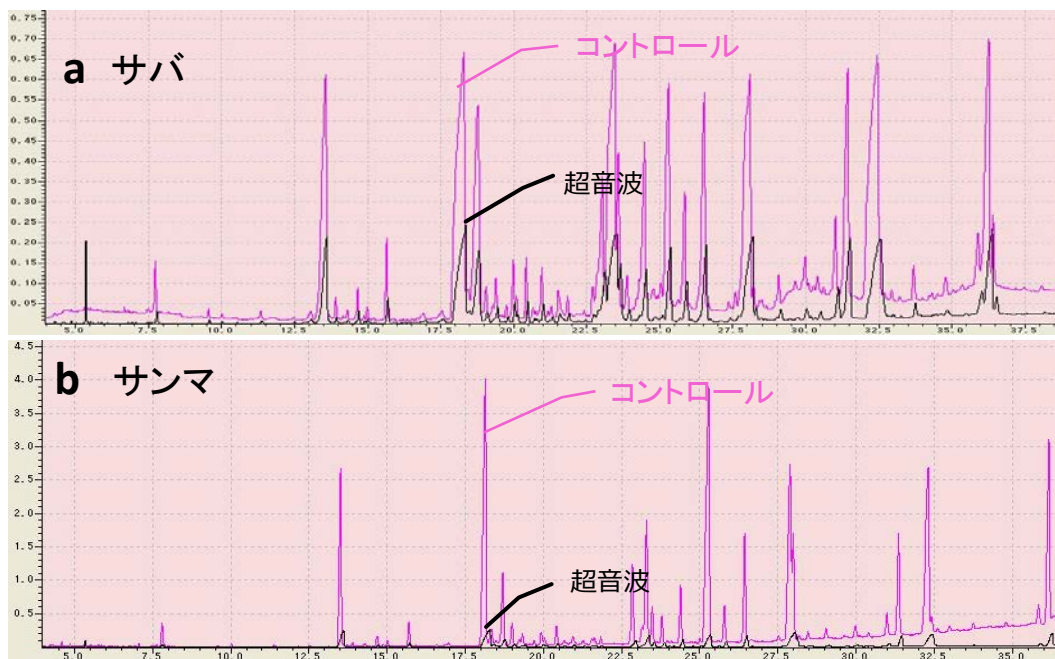


図-16A 噴流式超音波処理 (28 kHz) 3分間後のガスクロマトグラム (GCMS)

a サバ

b サンマ

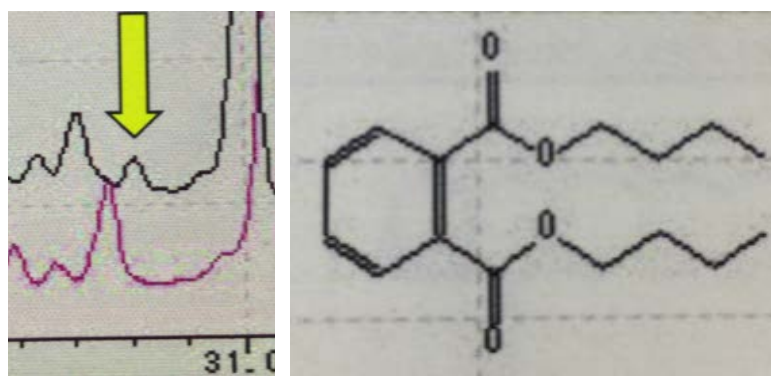


図-16B 噴流式超音波処理 (28 kHz) 3分間後のガスクロマトグラム (サバにおける可塑剤の消失)

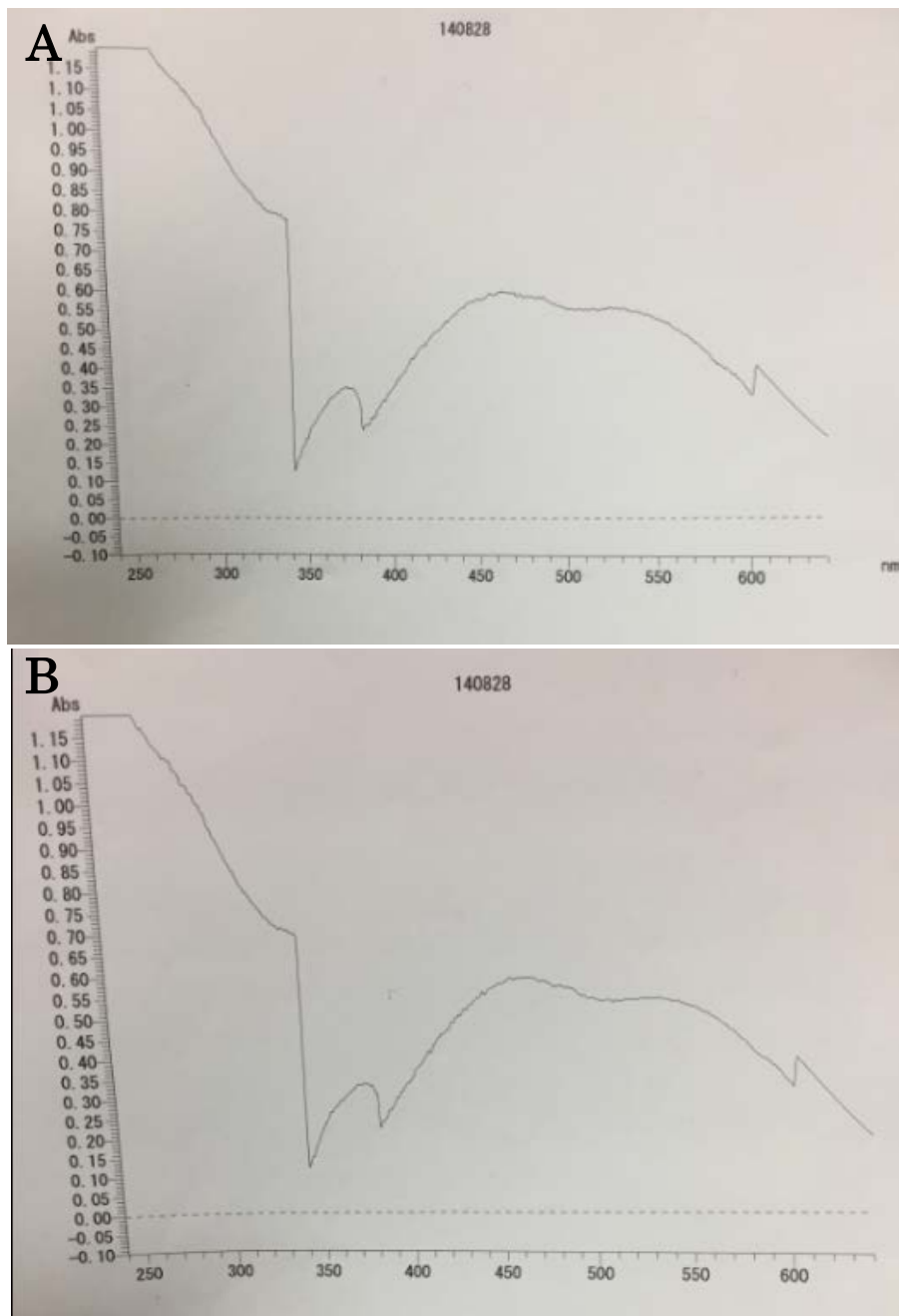


図-17 カルボニル価測定の吸収スペクトル

A コントロール

B 28 kHz 噴流式超音波洗浄 3 分間後

*波長 340 nm におけるベースラインの不連続変化は分光光度計の高原ランプの切り替え (ハロゲンランプ→水銀ランプ) が原因である。

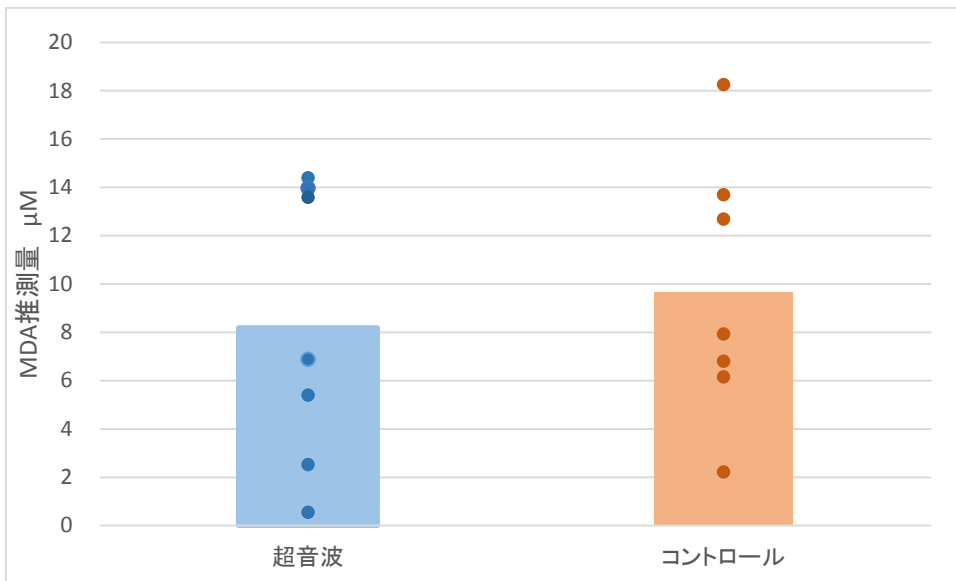


図-18A サバの TBA 酸値測定結果

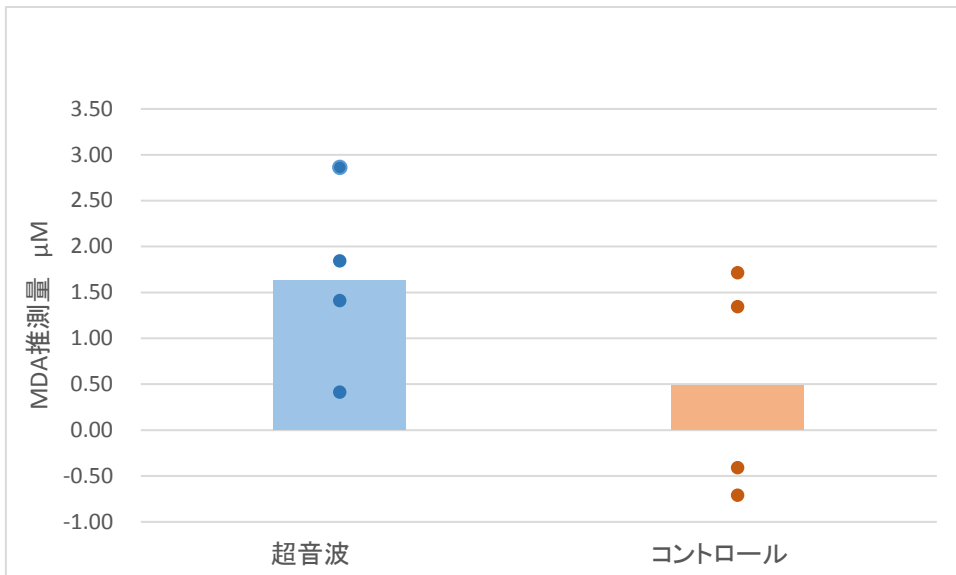


図-18B サケの TBA 酸値測定結果

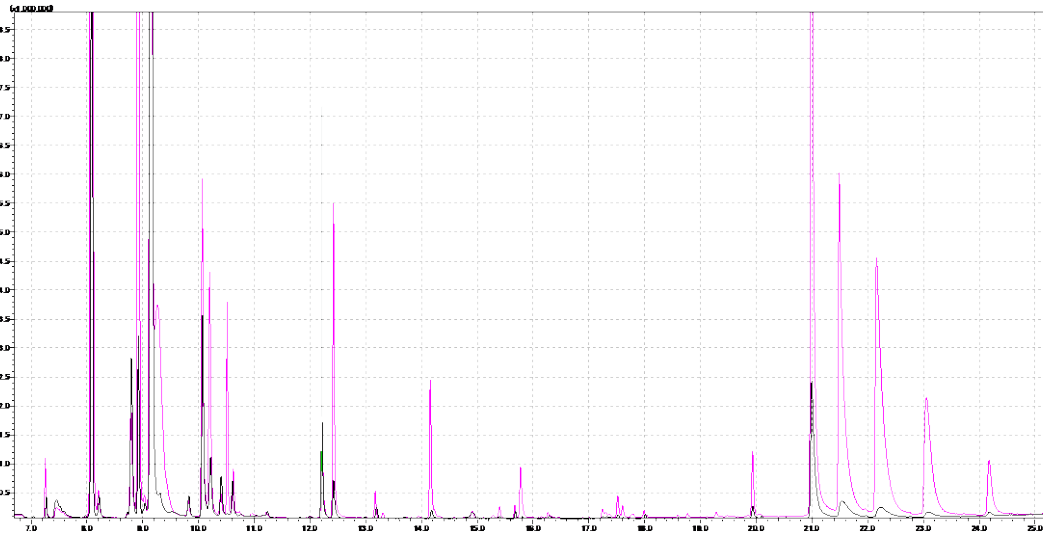


図-19A サバの匂いクロマトグラム (全体図 黒：コントロール ピンク：超音波)

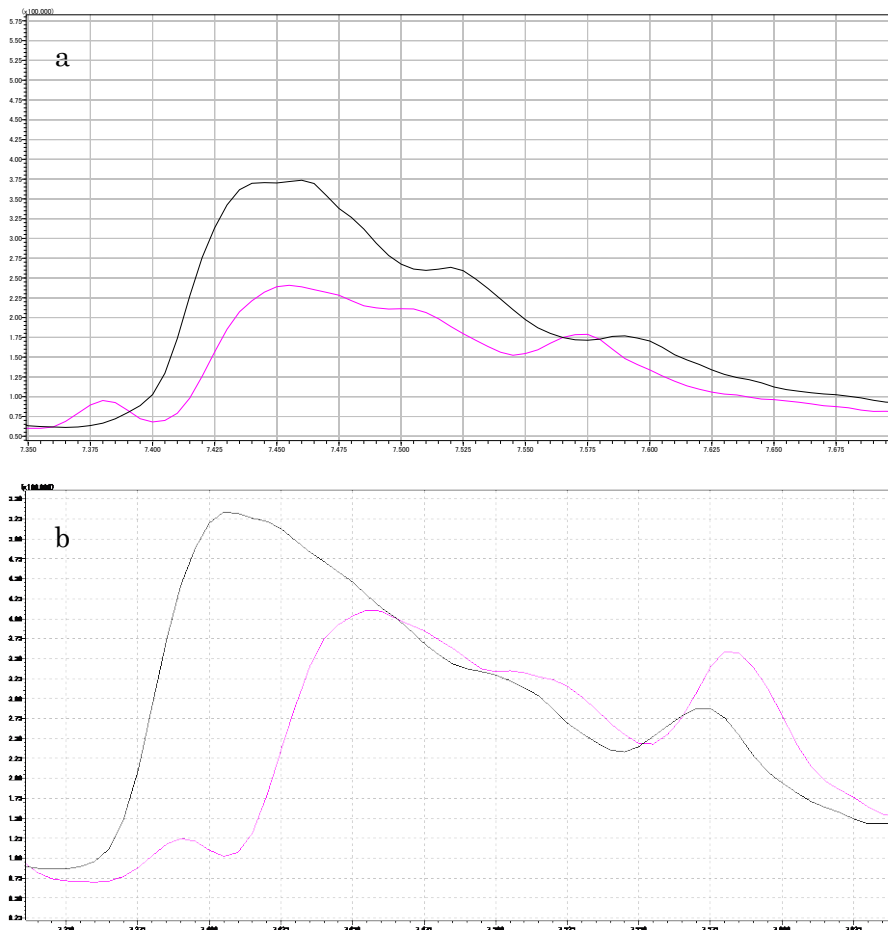


図-19B サバの匂いクロマトグラム (黒：コントロール ピンク：超音波)
トリメチルアミンのピーク (a) 測定1回目 (b)測定2回目

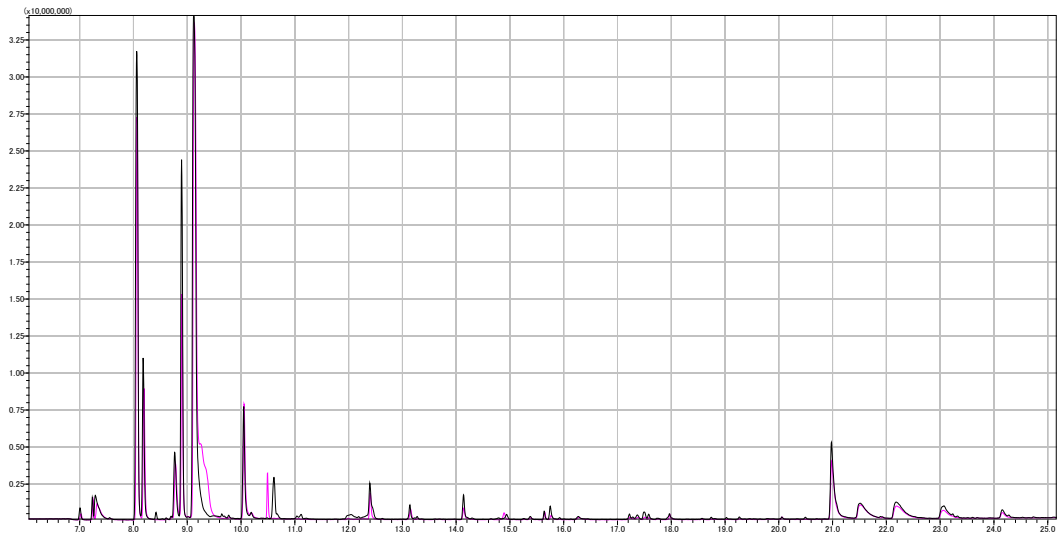


図-10A エビの匂いクロマトグラム (黒：コントロール ピンク：超音波)

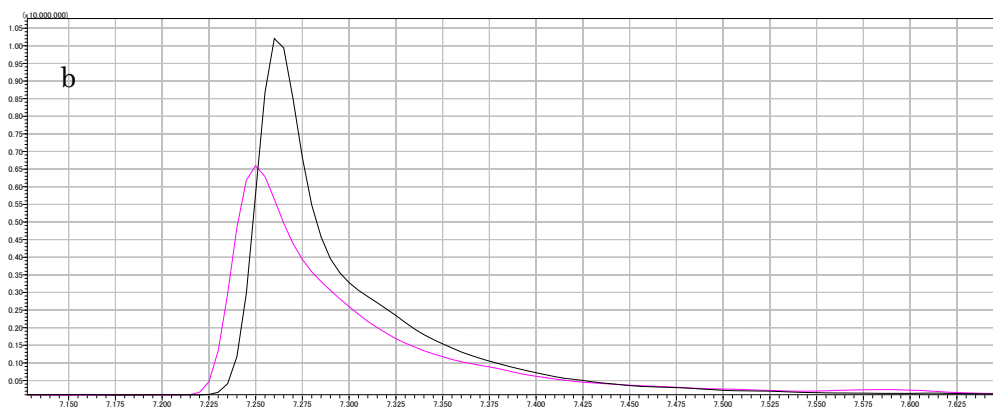
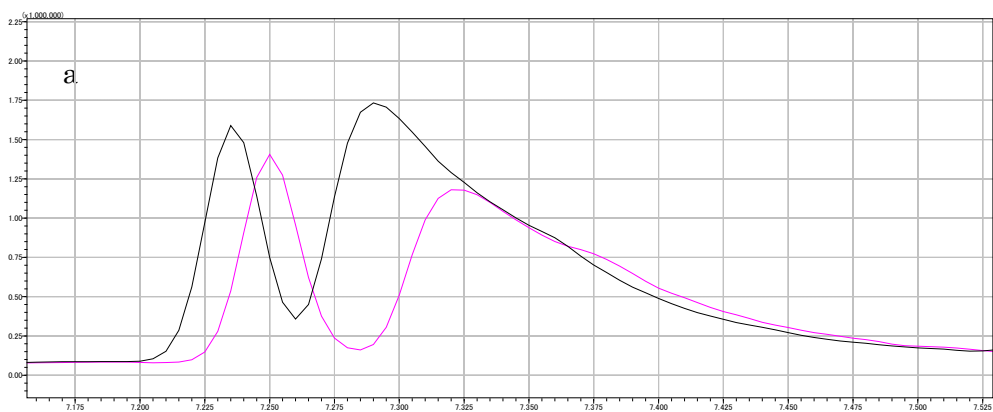


図-20B エビの匂いクロマトグラム (黒：コントロール ピンク：超音波)
トリメチルアミンのピーク (a) 測定1回目 (b)測定2回目



図-21A コオロギの摂食回数 (試料：ニボシ、キャベツ、キャットフード)

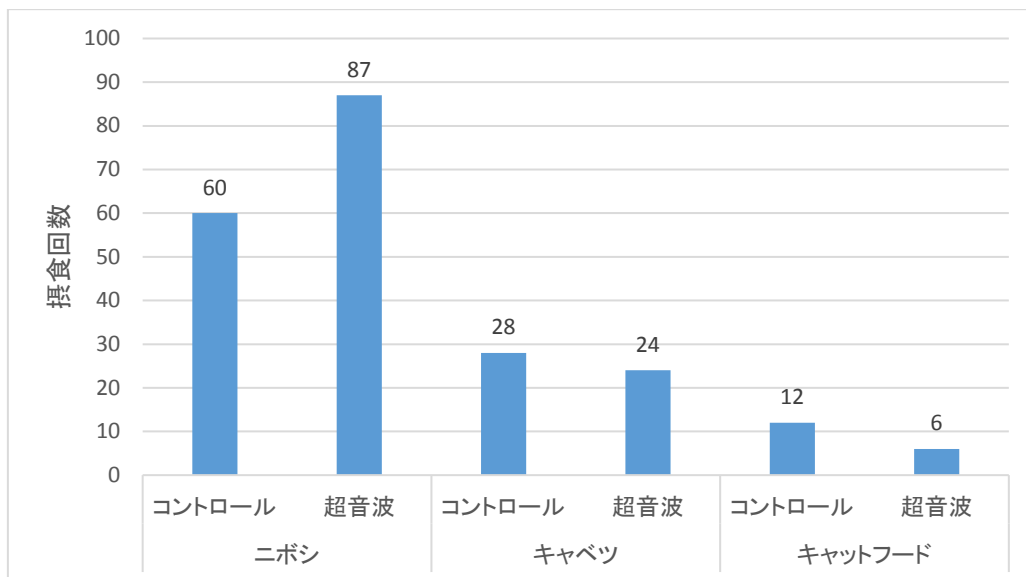


図-21B コオロギの摂食回数

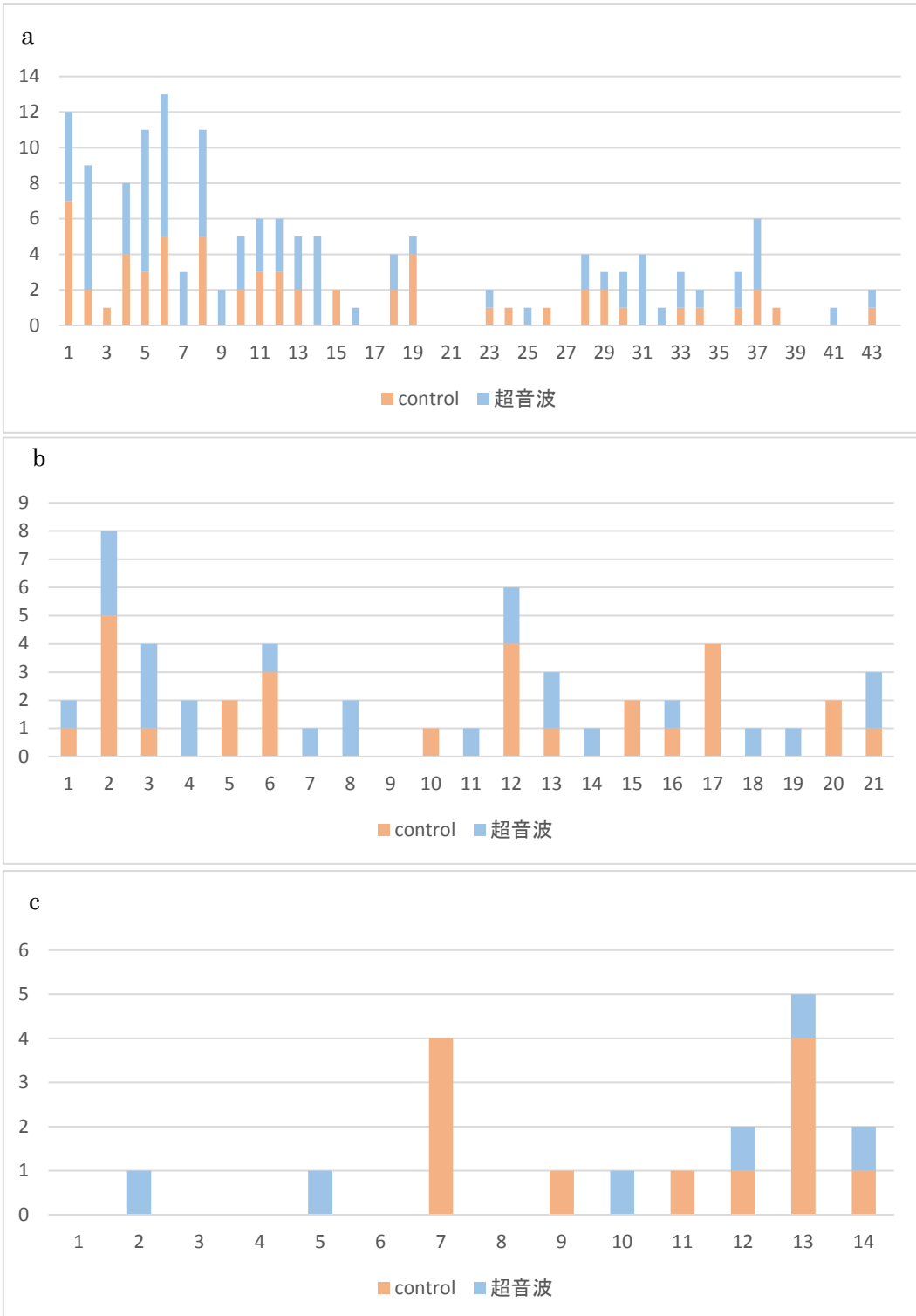


図-22 コオロギの各撮影回の摂食回数 (a)ニボシ(b)キャベツ(c)キャットフード

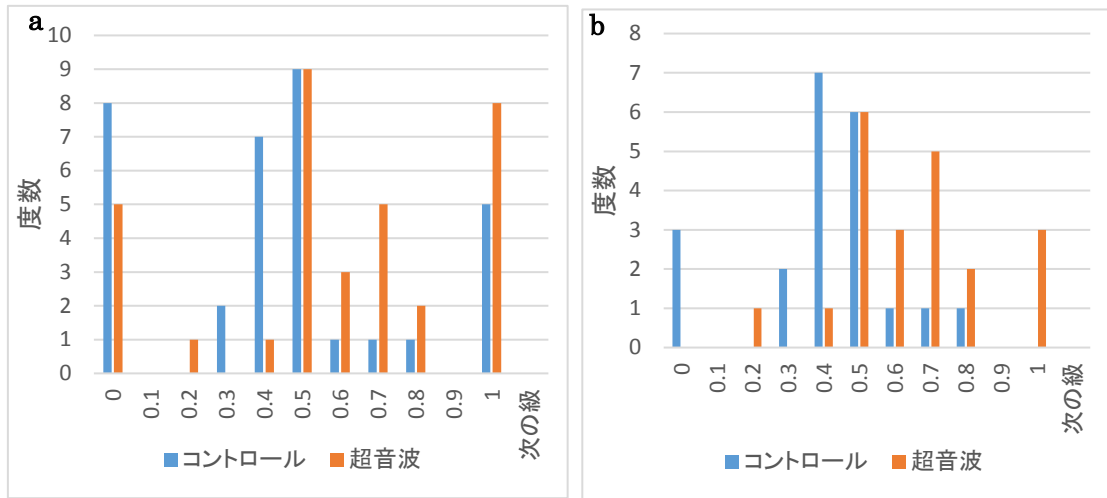


図-23A コオロギのニボシ摂食回数（各撮影回の摂食割合のヒストグラム）

a 全摂食回のヒストグラム

b 摂食回収が3回以上の摂食回のヒストグラム

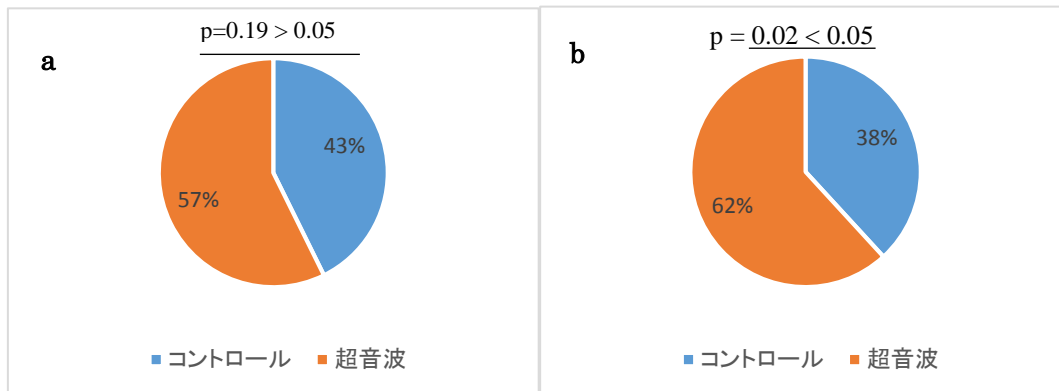


図-23B コオロギのニボシ摂食回数（摂食の割合）

a 全摂食回の摂食回の統計

b 摂食回収が3回以上の摂食回の統計

*t検定において、コントロール群と超音波群の摂食回数における有意差が認められた。

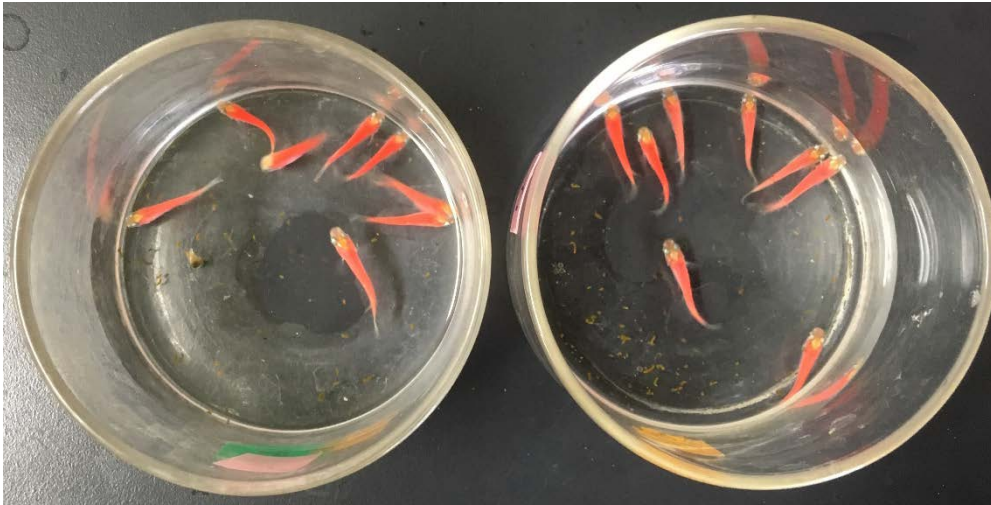


図-24A メダカの野菜投与（野菜投与後の超音波群、コントロール群）

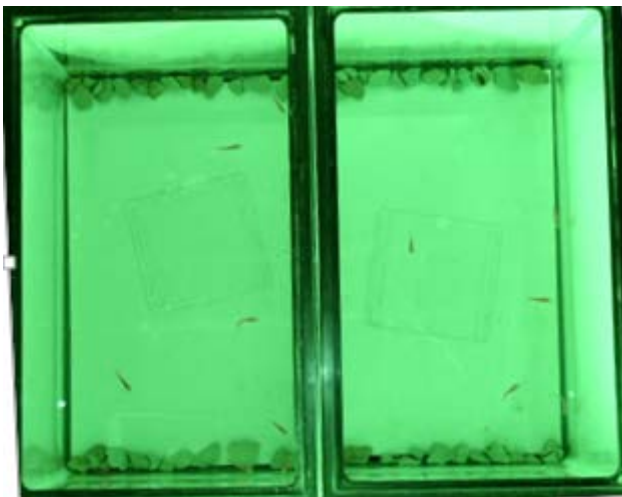


図-24B メダカの野菜投与（撮影環境）

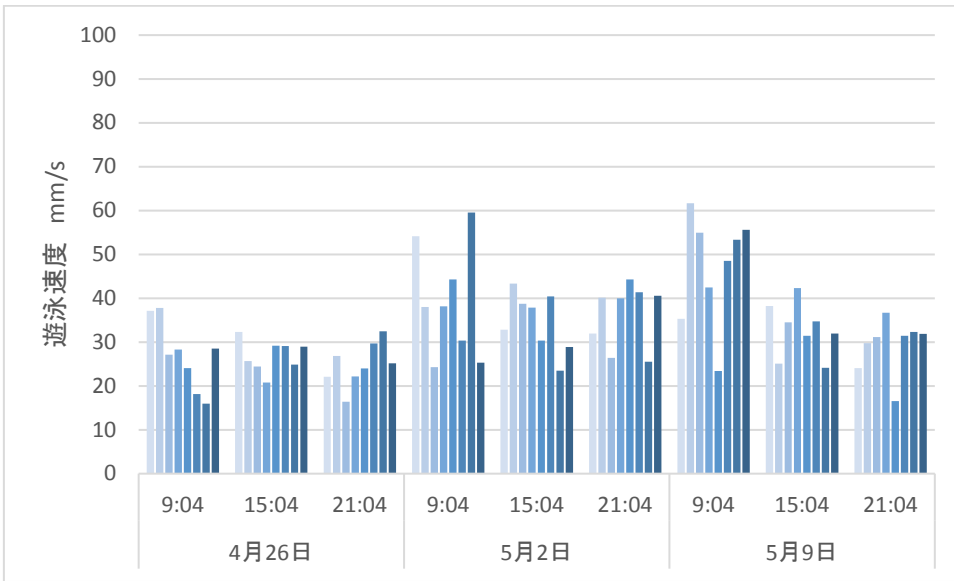


図-25A メダカの遊泳速度（野菜投与前の超音波群）

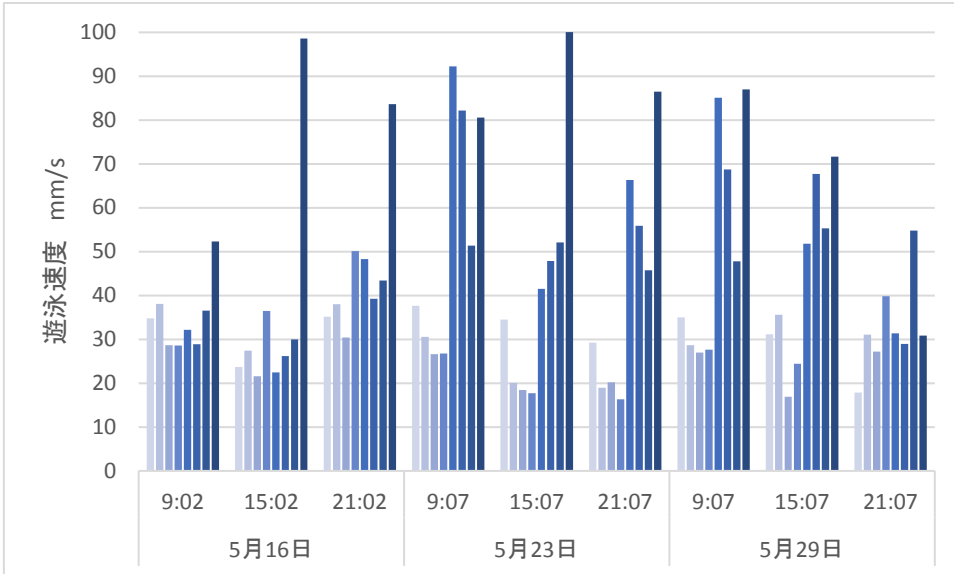


図-25B メダカの遊泳速度（野菜投与後の超音波群）

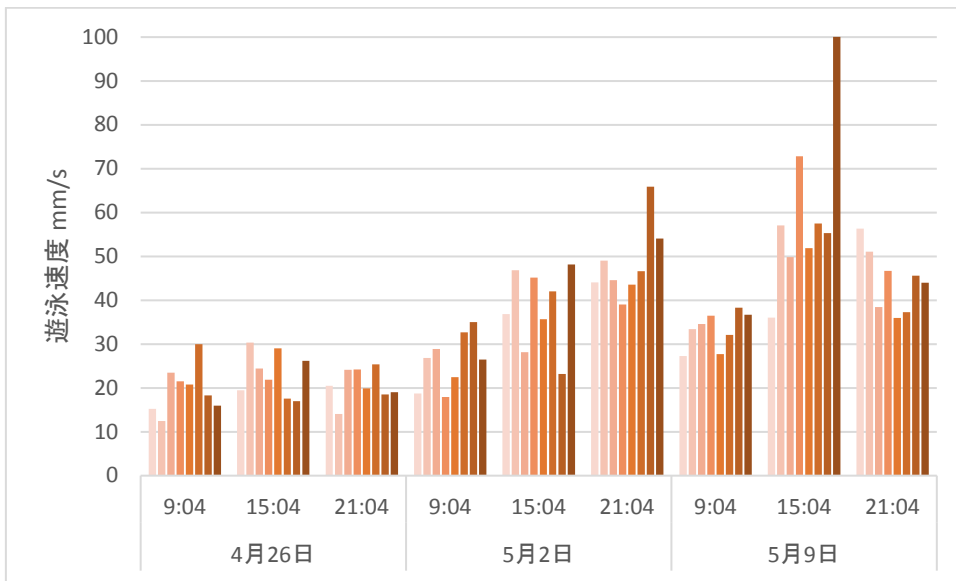


図-26A メダカの遊泳速度（野菜投与前のコントロール群）

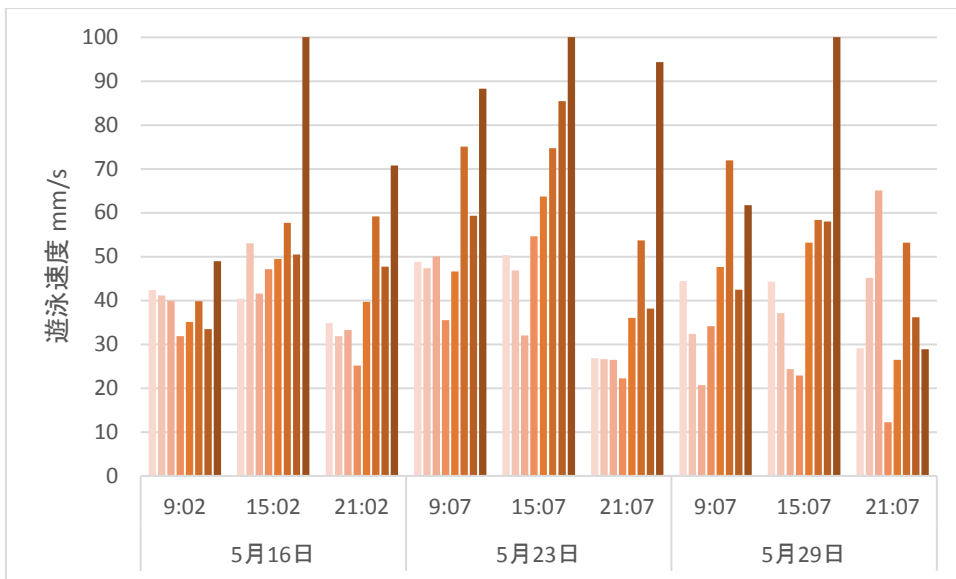


図-26B メダカの遊泳速度（野菜投与後のコントロール群）

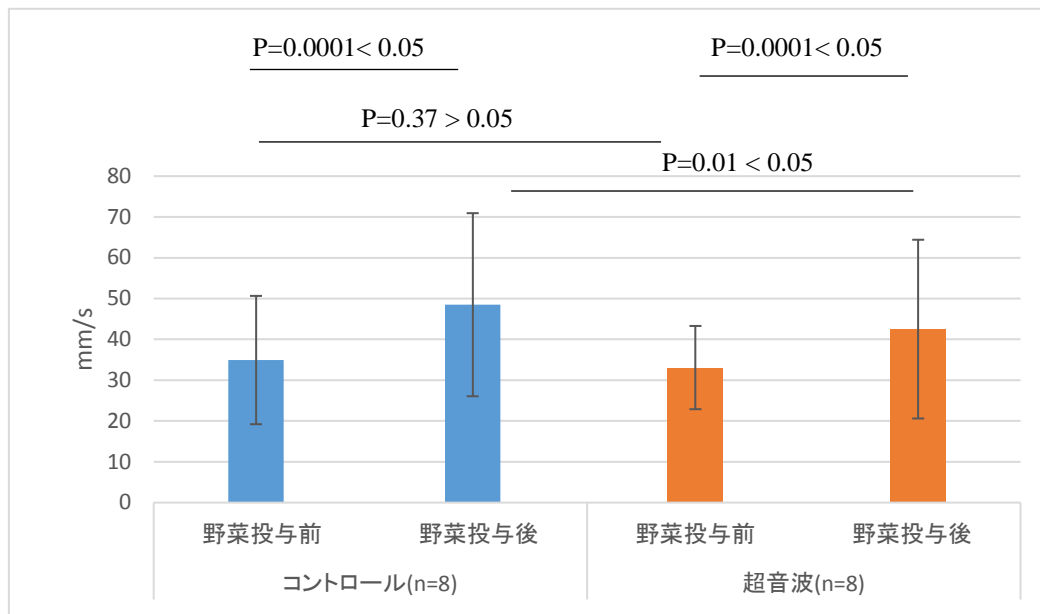


図-27 メダカの平均遊泳速度

*コントロール群と超音波群において、野菜投与後の遊泳速度の上昇が認められ、コントロール群と超音波群の遊泳速度の違いは認められなかった。