

平成 22 年度戦略的基盤技術高度化支援事業

「北海道の未利用資源活用による整腸作用等を有する高機能発酵青汁の加工技術開発」

## 研究開発成果等報告書

平成 23 年 12 月

委託者 北海道経済産業局

委託先 株式会社北海道バイオインダストリー

## 第 1 章

### 研究開発の概要

## 1-1. 研究開発の背景・研究目的及び目標

### 1-1-1. 研究開発の背景

#### 1. 高度化指針で定める川下の課題及びニーズ

発酵に係る技術において達成すべき高度化目標

##### (1) 食品製造業に関する事項

##### ① 川下製造業者等の抱える課題及びニーズ

ウ. 高品質化

#### 川下事業者のニーズ

医療や介護が必要な高齢者の多くは、「活動量の低下」に伴い食欲が減退し、絶対的な食事摂取量（重量）の低下による「栄養状態の低下」が認められる。また、「食物繊維や水分の摂取量低下」と「活動量の低下」による便通異常を認めることも多い。特に北海道における冬季間の積雪に伴う活動量の低下は避けることができず、室内での活動量の確保や食物繊維や水分の摂取が排便コントロールには必要不可欠である。そのため、医療、介護法人向の現場では、要介護者・高齢者等の食事におけるカロリー制限の中での十分な栄養確保や、整腸トラブルを抱えている多くの患者の食事による改善、また年齢により食事量が減少した人たちの補助食品が求められているという事実がある。さらに女性の場合、閉経後のホルモンバランスが崩れることで骨粗しょう症に陥るケースが多く、野菜だけではなくカルシウムの摂取等にも配慮する必要がある。

また、高齢者のみならず本事業申請者が20～34歳の女性合計200名を対象に実態調査を行ったところ、5人に一人は理想的と言われている1日1回の排便を実行できていないという結果が得られた。便秘は老廃物を体内にため込んでいる状態のため、腸内で腐敗が進みガスが充満して、お腹が張る、腹痛、肌荒れなどのトラブルを引き起こすため、スムーズな排便は便秘に悩む女性にとって深刻な問題である。

これらのニーズがある中で、北海道産のヤーコン、植物性乳酸菌ホッカイドウ株という2つの北海道産機能食材の組み合わせによる腸内細菌叢の改善、便通改善作用は既に本研究開発申請者のこれまでの研究によって明らかにしている。本事業では、さらにヤーコンの持つ抗アレルギー作用に着目し、発酵技術を活用して「整腸作用」に加え「抗アレルギー」等の複数の機能性を持つ「高機能発酵食品」の開発を目指し、研究開発を行った

##### ② 高度化目標

イ. 発酵・精製工程の効率化・高精度化に係る技術の高度化

エ. 未利用バイオマス等の高度利用に係る技術の高度化

#### 開発の技術背景

##### 発酵豆乳と北海道産のヤーコン芋を摂取すると排便状態が良くなる

これまでの研究で、北海道の保有特許である植物性乳酸菌ホッカイドウ株を用いた発酵豆乳を乾燥粉末化し、フラクトオリゴ糖を豊富に含む北方系機能性野菜のヤーコン芋乾燥粉末と組み合わせることによって機能性混合顆粒を開発し、これを便秘と自覚している人を対象に摂取試験を行い、排便状態が改善傾向を示すことを確認している。また、乳酸菌はカルシウムの吸収を促進する働きがあり、豆乳に含まれるイソフラボンは、骨からカルシウムが溶け出すのを抑制する働きがあるため、発酵豆乳には骨粗鬆症の予防効果も期待できる。

##### 【問題点】

機能性は確認されているが、ヤーコンのポリフェノールが乳酸発酵に与える影響、植物性乳酸菌ホッカイドウ株がヤーコンに含まれるフラクトオリゴ糖の量を減少させてしまわないか等の未確認事項があるため、それぞれを単独で乾燥粉末化している現状がある。そのため、機能性が確認されているにもかかわらず、製造コストが問題となって事業化に至っていない。

##### ヤーコン頂葉部分は優れた抗アレルギー作用を有する可能性が高い

アンデス原産のキク科植物ヤーコン (yacon, *Smallanthus sonchifolius*) は、貯蔵糖としてフラクトオリゴ糖を豊富に含むことや、ポリフェノール化合物の含有率が非常に高い（換算で mg/100 g）ことから注目されている。その主要なポリフェノール化合物は、キク科植物に一般的に含まれているクロロゲン酸類の他に、天然では珍しいアルトラル酸とオクツロソソ酸誘導体を骨格としてこれに1～3分子のカフェ酸が結合した化合物であることを明らかにした。

ヤーコンはこれらの希少な化合物を含め、高い活性を有する抗酸化成分の供給源として有用な作物であるといえる。その中でも、ヤーコンの頂葉部は他の葉部分や根、貯蔵根、莖と比較して、抗酸化能が極めて高く、機能性食素材としての期待が持てる素材である。また、このヤーコン頂葉部分の熱水抽出物は、花粉症の症状を持つボランティア 20 名に摂取してもらったところ、18 名に症状の軽減・改善がみられているため、抗アレルギー作用も期待できる素材であると推定される。

#### 【 問題点 】

非常に苦味があるために呈味性が悪く、呈味改善のために焙煎処理を行うと、花粉症の諸症状の緩和作用が極端に落ちるため、機能性食素材としての活用を考えると、非加熱による呈味改善が必須となる。また、頂葉部分は成長点であるため、収穫時期、収量に限りがあり事業化には至っていない。

#### ポリフェノール配糖体は発酵することにより成分変化し吸収効率が良くなる

ポリフェノールは糖が付加されている配糖体と、糖が付加されていないアグリコン型があり、アグリコン型の方が糖が付加されていないため分子量が小さく、吸収率が高いとされる。例えばゲニスチン、ダイゼイン、グリシチンを総称して大豆イソフラボン配糖体と称し、煮豆や豆腐等の大豆製品に含まれている。これはマロニル配糖体、アセチル配糖体等の形で存在しており、そのため腸内でβ-グルコシダーゼによって糖が外され、アグリコン型に分解されて吸収される。しかし、腸内フローラには個人差があるため吸収は人によって差がある。

一方、味噌や納豆等の大豆発酵食品には、発酵することによって配糖体から糖が分離したゲニステイン、ダイゼイン、グリシチンのアグリコン型イソフラボンが多く含まれており、腸内細菌の働きに関係なく、胃で配糖体よりも効率良く吸収される。

このように、植物中に安定的に存在するポリフェノール配糖体は、発酵処理を施すことによってアグリコン型のポリフェノールと変化させることにより、吸収率を高め機能性を向上することが可能と想定される。

#### 1-1-2.開発の狙い

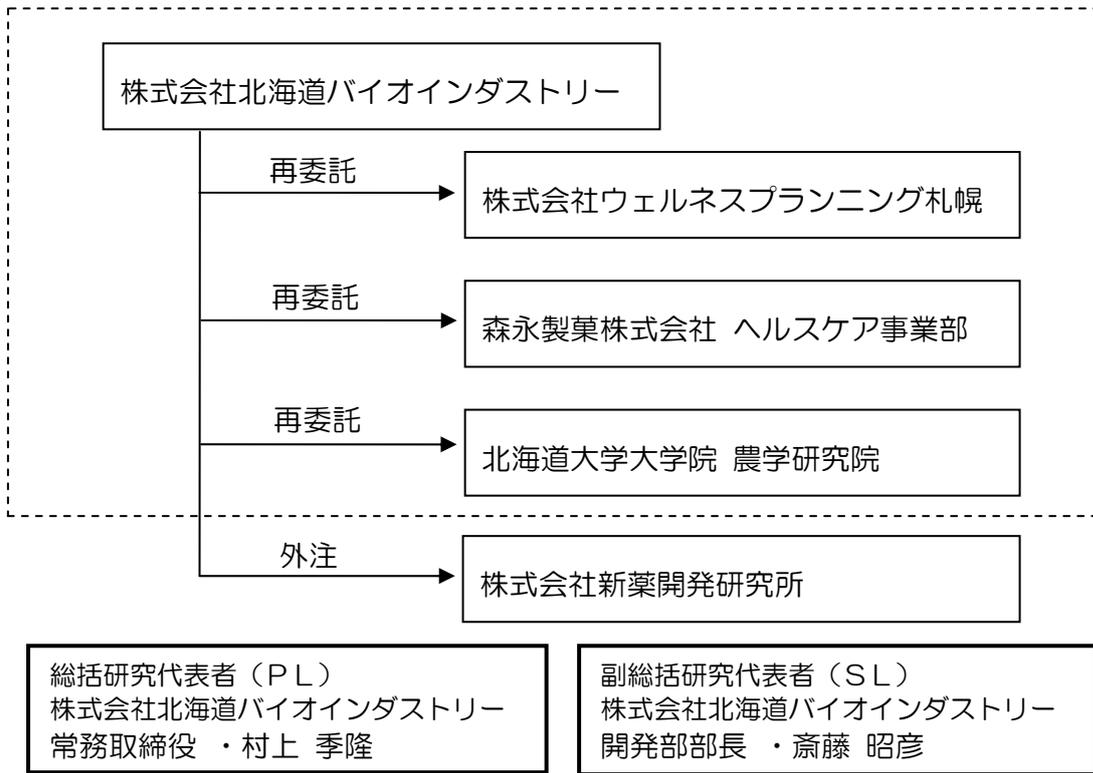
青汁市場は 2009 年の市場規模は凡そ 460 億円と予想されており（富士経済）、ここ数年横這いとなっているがカテゴリーとしては健康食品の中で継続してトップクラスの活況を呈している。横這いの主な要因は淘汰の時期にあり次へのステップ、過渡期と判断している。その理由は、相変わらず青汁商品の新規参入は止まることがなく、大企業の顔触れも揃いつつある現状に見てとれる。商品傾向としては過渡期にふさわしく様々であるが、フルーツを組み合わせるなどの“飲みやすさ”を強調し、“おいしさ”を訴えるものが目立っている。今後もこの傾向はつづくと考えられるが、一方では、“原料素材”そのものの信頼性を最重視する動きや“栄養価の高いもの”を比較して購入する消費者の動きもあり、将来の市場はこの2つの傾向が並立してすすむものと判断している。本研究開発事業で開発する青汁は、本研究開発申請者が提唱している『コンディショニング食品』として、「美味しく」、「栄養価に富み」、「身体に良い（生体調節機能を持つ）」製品とすることによって、従来の青汁製品とは一線を画すものであり、主たるターゲットを女性に設定した「便秘改善」、「骨粗鬆症予防」等の他、ヤーコン頂葉を組み合わせることによる「抗酸化」あるいは「抗アレルギー」等、複数の生体調節機能を持つ製品の開発を目標とした。

また、ヤーコン頂葉部分はポリフェノールの吸収性を向上させるため、発酵処理を行う計画であるが、風味良く発酵茶として仕上げることであった場合は、花粉症予防のお茶原料としての製品化も狙い研究開発の成果目標とした。

1-2. 研究体制

1-2-1. 研究組織及び管理体制

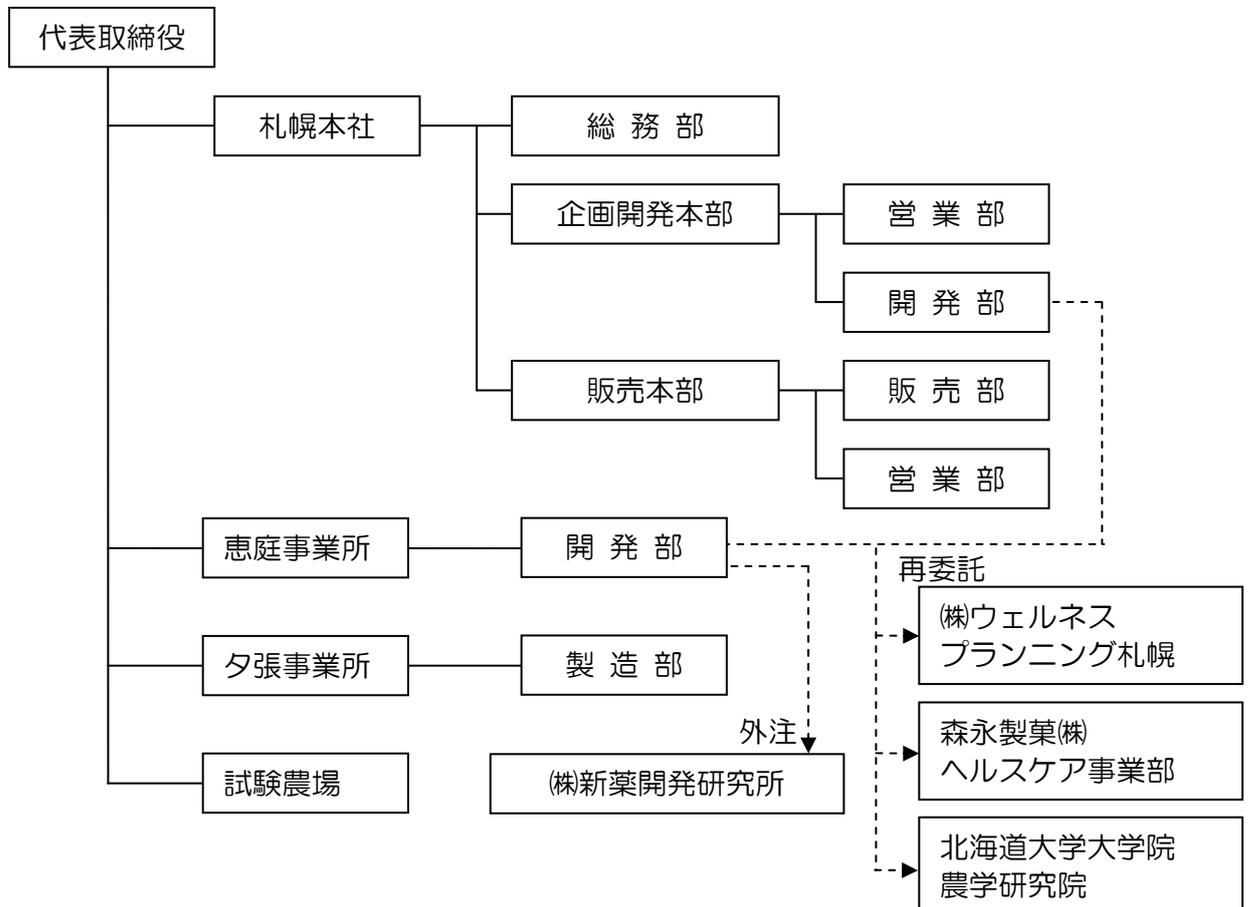
(1) 研究組織（全体）



(2) 管理体制

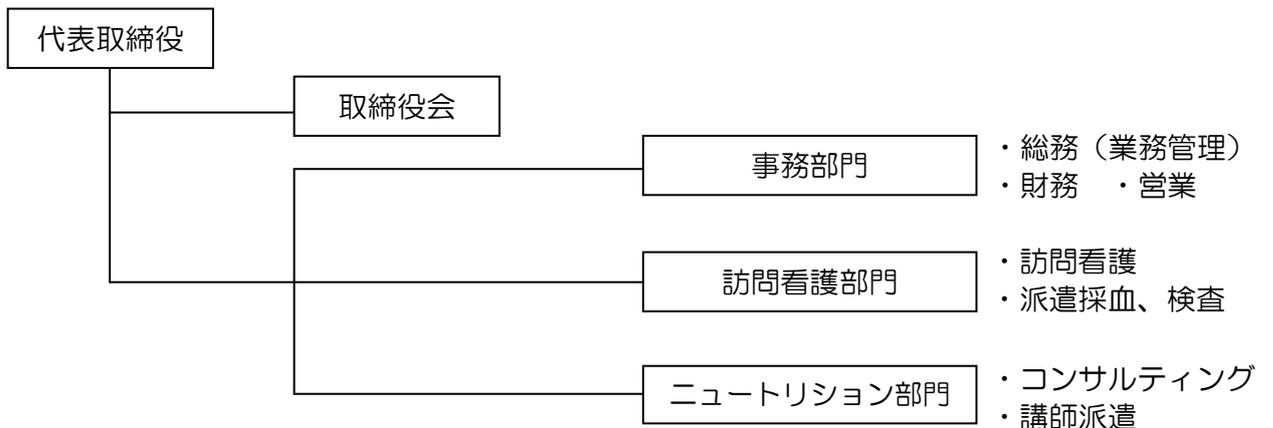
①事業管理者

管理法人 [株式会社北海道バイオインダストリー]

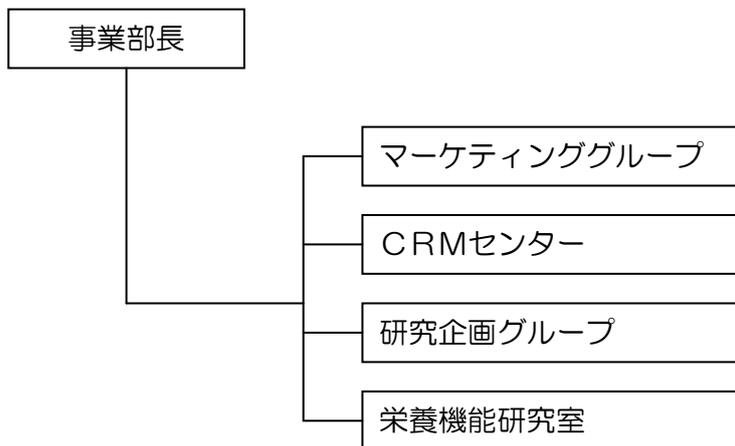


②（再委託先）

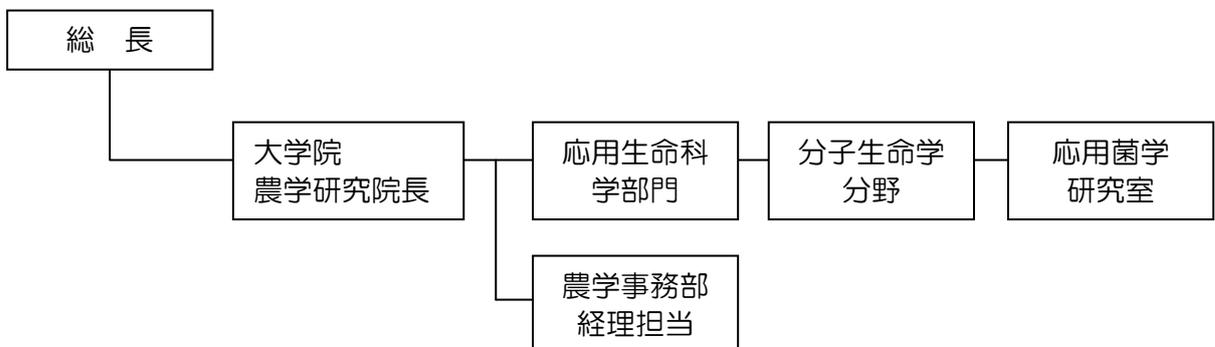
[株式会社ウェルネスプランニング札幌]



[森永製菓株式会社 ヘルスケア事業部]



[北海道大学大学院 農学研究院]



1-2-2. 研究開発体制図

		研究項目	研究機関	
株式会社 北海道バイオインダストリー 管理法人	総括研究代表者 村上 季隆 (株式会社 北海道バイオインダストリー 常務取締役)	①豆乳とヤーコン芋の同時発酵工程の確立	①-1 豆乳とヤーコン芋の発酵条件の検討	・株式会社北海道バイオインダストリー ・北海道大学大学院農学研究院
			①-2 豆乳とヤーコン芋の発酵ラインの検討	・株式会社北海道バイオインダストリー ・北海道大学大学院農学研究院
		②ヤーコン頂葉の発酵茶製造法の確立	②-1 ヤーコン頂葉の前発酵処理の検討	・株式会社北海道バイオインダストリー
			②-2 ヤーコン頂葉の後発酵処理の検討	・株式会社北海道バイオインダストリー
		③発酵によるヤーコン頂葉茶に含まれるポリフェノールの変化の検討	③-1 発酵前のヤーコン頂葉の含有ポリフェノール分析	・株式会社北海道バイオインダストリー
			③-2 各種発酵後のヤーコン頂葉の含有ポリフェノール分析	・株式会社北海道バイオインダストリー
		④各種発酵後のヤーコン頂葉の抗酸化能評価	④-1 発酵前のヤーコン頂葉の抗酸化能評価	・株式会社北海道バイオインダストリー
			④-2 各種発酵後のヤーコン頂葉の抗酸化能評価	・株式会社北海道バイオインダストリー
		⑤発酵ヤーコン豆乳および発酵ヤーコン頂葉の安全性確認	⑤-1 発酵ヤーコン豆乳の急性毒性試験	・株式会社北海道バイオインダストリー (株式会社新薬開発研究所)
			⑤-2 各種発酵後のヤーコン頂葉の急性毒性試験	・株式会社北海道バイオインダストリー (株式会社新薬開発研究所)
		⑥発酵ヤーコン豆乳および発酵ヤーコン頂葉の機能性評価	⑥-1 細胞を用いた免疫機能性向上作用の評価	・株式会社北海道バイオインダストリー ・森永製菓株式会社ヘルスケア事業部
			⑥-2 整腸作用の評価	・株式会社北海道バイオインダストリー ・北海道大学大学院農学研究院
			⑥-3 その他の機能性評価	・森永製菓株式会社ヘルスケア事業部 ・株式会社ウェルネスプランニング札幌
		⑦ヤーコン頂葉部の安定的生産方法の検討	⑦-1 組織培養による頂葉生産の検討	・株式会社北海道バイオインダストリー
			⑦-2 組織培養による頂葉に含まれるポリフェノールの分析	・株式会社北海道バイオインダストリー
		⑧研究全体の管理		・株式会社北海道バイオインダストリー

1-2-3. 研究実施場所一覧

組織名	所在地
株式会社北海道バイオインダストリー 札幌本社	北海道札幌市豊平区平岸7条14丁目3-43
株式会社北海道バイオインダストリー 恵庭事業所	北海道恵庭市恵み野北3丁目1-1 恵庭RBPセンタービル内
株式会社ウェルネスプランニング札幌	北海道札幌市清田区美しが丘2条8丁目
森永製菓株式会社 ヘルスケア事業部	神奈川県横浜市鶴見区下末吉2-1-1
北海道大学大学院 農学研究院	北海道札幌市北区北9条西9丁目

1-2-4. 管理・研究者氏名

【事業管理者】株式会社北海道バイオインダストリー

①管理員

氏名	所属・役職	実施内容
村上 季隆	常務取締役 兼 開発部研究員	⑧研究開発全体の管理
伊藤 和男	総務部 部長	

②研究員

氏名	所属・役職	実施内容
村上 季隆 (再)	常務取締役	①豆乳とヤーコン芋の同時発酵工程の確立 ②ヤーコン頂葉の発酵茶製造法の確立 ③発酵によるヤーコン頂葉茶に含まれる ポリフェノールの変化の確認 ④各種発酵後のヤーコン頂葉の抗酸化能評価 ⑤発酵ヤーコン豆乳および発酵ヤーコン頂葉 の安全性確認 ⑥発酵ヤーコン豆乳および発酵ヤーコン頂葉 の機能性試験 ⑦ヤーコン頂葉部の安定的生産方法の検討
斎藤 昭彦	兼 開発部研究員 開発部部長	
田島 健	兼 恵庭事業部主任研究員	
岩間 秀夫	開発部研究員	
	開発部研究員	

【再委託先】

株式会社ウェルネスプランニング札幌

氏名	所属・役職	実施内容
小松 信隆	代表取締役	⑥発酵ヤーコン豆乳および発酵ヤーコン頂葉 の機能性試験

森永製菓株式会社ヘルスケア事業部

氏名	所属・役職	実施内容
齋 政彦	研究企画グループ マネジャー	⑥発酵ヤーコン豆乳および発酵ヤーコン頂葉 の機能性試験

国立大学法人北海道大学 大学院農学研究院

氏名	所属・役職	実施内容
浅野 行蔵	教授	①豆乳とヤーコン芋の同時発酵工程の確立 ⑥発酵ヤーコン豆乳および発酵ヤーコン頂葉 の機能性試験

### 1-3. 成果概要

#### 1-3-1. 豆乳とヤーコン芋の同時発酵工程の確立

従来技術では発酵豆乳とヤーコン芋粉末を個別に製造していたため、機能性評価のために試作した際の製造コストは 35,000 円/kg にもなり、事業化は困難となっていた。これは、豆乳とヤーコン芋を混合させて発酵させることを考えた場合、ポリフェノールを多量に含む食品の中には、乳酸菌などの微生物発酵を阻害する等の影響を与える可能性のあるものが存在することから、ポリフェノールを赤ワインと同じレベルで含むヤーコンも植物性乳酸菌ホッカイドウ株の発酵を阻害する可能性があると考えたことと、乳酸菌は発酵によって糖類から乳酸を生産するため、ヤーコンの機能成分の一つであるフラクトオリゴ糖が減少する可能性も考えられたためである。

そこで、本サブテーマでは、機能性を損なうことの無いように豆乳とヤーコン芋のホッカイドウ株による同時発酵工程の確立を目指し、下記の 2 つの課題について研究開発を行った。

##### ①豆乳とヤーコン芋の発酵条件の検討

従来技術で発酵豆乳を調整する場合は、ホッカイドウ株の初発菌数を  $1 \times 10^7$  CFU/ml とし、30℃、1 日間の発酵によって約  $2 \times 10^9$  CFU/ml に増え、その後時間の経過とともに減少する。よって、豆乳とヤーコン芋とを同時発酵を行った場合にも同様の菌数を持たせるための研究開発を行った。

研究の結果、ヤーコンのポリフェノールがホッカイドウ株の増殖を抑制する心配がないことや、ホッカイドウ株の増殖にフラクトオリゴ糖が消費されないことなどが明らかとなり、菌数  $2 \times 10^9$  CFU/ml を含む発酵ヤーコン豆乳を同時に発酵させることは、従来製法のアレンジで十分に可能であることが明らかになった。

##### ②豆乳とヤーコン芋の発酵ラインの検討

発酵豆乳粉末とヤーコン粉末の混合顆粒は、試作の段階では 35,000 円/kg であり、これを同時発酵工程の確立によって乾燥コスト等の製造コストダウン法を検討し、同時発酵ラインの構築によって 15,000 円/kg にすることを目標として研究開発を行った。

研究の結果、テーマ①で確立した新製法は従来の工場設備のまま、新たに設備投資をすることなく製造ラインの構築が可能であったため、試験製造を行い製造コストを計算した結果、十分目標の 15,000 円/kg で製造可能であると判断できた。

#### 1-3-2. ヤーコン頂葉の発酵茶製造法の確立

ヤーコン葉を活用した健康茶は、これまで不発酵茶として活用されていたが、苦みや青臭みが強く他のお茶との混合や、焙煎による呈味改善がなされていた。最も抗酸化作用が強い頂葉部分は、さらに苦味が強くそのまま健康茶として使用することは困難であったため、抗酸化作用が高いにもかかわらず未利用資源となっていた。これまでの研究で頂葉部分の熱水抽出物には花粉症の諸症状を緩和する作用が確認されたが、この作用は焙煎すると効果が弱まってしまうため、焙煎以外の呈味性改善法の開発が活用のための課題となっていた。

そこで、本サブテーマではヤーコン頂葉部分の発酵処理による呈味性の改善を目指し、下記の 2 つの課題について研究開発を行った。

##### ①ヤーコン頂葉の前発酵処理の検討

収穫したヤーコン頂葉を乾燥前に効果的に自身の酵素反応を進めるための温度、湿度条件を検討し、官能試験による呈味性の評価を行いながら、前発酵によって加熱することなく呈味性の優れたヤーコン頂葉茶の製造条件を確立する。また、これを機能性食品原料として活用することも可能なものとするため、一般生菌数を 3,000 個/g 以下の状態で製造するための手法を開発することを目標に研究開発を行った。

研究の結果、一般生菌数 3,000 個/g 以下の茶葉を製造することは可能であったが、自家酵素発酵の反応状態を均一にするための条件開発が難航したこと、官能評価結果が良くなかったことなどから、前発酵法による呈味性改善法の確立は、難しいと判断し、後発酵法を重点に研究開発を行う事にした。

##### ②ヤーコン頂葉の後発酵処理の検討

ヤーコン頂葉の非加熱による呈味改善の方法として発酵処理を検討する際に、微生物を用いた後発酵処理を用いて、呈味性の優れた健康茶の開発条件（発酵条件）を確立することを目標に研究開発を行った。

研究の結果、*Aspergillus* 属を用いた後発酵茶が呈味性を大きく改善させることができると考えられた。また、これらの微生物を用いた発酵茶の製造条件も確立することができた。

### 1-3-3. 発酵によるヤーコン頂葉茶に含まれるポリフェノールの変化の確認

本サブテーマでは、発酵前後、あるいは品種によるヤーコン頂葉に含まれるポリフェノールの違いを明らかにすることで、目的別の製品開発を開発するための指標とするため、下記の 2 つの課題について研究開発を行った。

#### ①発酵前のヤーコン頂葉の含有ポリフェノール分析

発酵前のヤーコン頂葉部分に含まれるポリフェノールの成分分析を行い、その種類と、含有量の比率を明らかにすること、また、品種間の含有ポリフェノールの違いも明らかにすることを目標に研究開発を行った。

研究の結果、ヤーコンの品種間で総ポリフェノールの量に大きな違いがあることが明らかになったため、製品の機能性と総ポリフェノールを製品開発の基準の一つと考えることが可能となった。

#### ②各種発酵後のヤーコン頂葉の含有ポリフェノール分析

発酵によってポリフェノールの配糖体は糖が外れてアグリコン型になると考えられる他、他のポリフェノールが生じる可能性も考えられる。そのため各種発酵後のヤーコン頂葉部分に含まれるポリフェノールの分析を行い、発酵前の情報との比較によってその変化を明らかにすることを目標に研究開発を行った。

研究の結果、発酵によって総ポリフェノール量は減少することが確認できた。また、発酵に使用する微生物によってもポリフェノールの減少率に差があることが明らかになった。この現象は異なる品種でも同じ傾向を示し、発酵による苦みの緩和などはポリフェノールの含有量に影響されることが明らかになった。

### 1-3-4. 各種発酵後のヤーコン頂葉の抗酸化能評価

本サブテーマでは発酵前後、あるいは品種によるヤーコン頂葉の抗酸化能の違いを明らかにすることで、目的別の製品開発を開発するための指標とするため、下記の 2 つの課題について研究開発を行った。

#### ①発酵前のヤーコン頂葉の抗酸化能評価

発酵前のヤーコンの頂葉部分の抗酸化能を *in vitro* で評価し、品種間による違いも含めて頂葉部分の抗酸化能を明らかにすることを目標に研究開発を行った。

研究の結果、抗酸化活性について、IC50 および濃度による DPPH 消去率をポイントに評価すると、品種間で IC50 は大きな違いはないと考えられたが、濃度による DPPH 消去率では、若干の差が確認されたため抗酸化能を期待する製品開発には品種の選定が必要と考えられた。

#### ②各種発酵後のヤーコン頂葉の抗酸化能評価

前発酵、及び後発酵の各種の発酵処理によって、ヤーコン頂葉部分の抗酸化能がどのように変化するかを発酵前の頂葉部分の抗酸化能を基本として比較データをとり、最も優れた抗酸化能を持つ発酵法を確定することを目標に研究開発を行った。

研究の結果、発酵処理を施した場合発酵に用いる真菌の種類によって、その抗酸化活性が変化することが確認できた。IC50 および濃度による DPPH 消去率をポイントにその抗酸化活性を比較した場合、*Aspergillus* 属を発酵に用いた発酵茶が機能性に優れている可能性が高いと考えられた。

### 1-3-5. 発酵ヤーコン豆乳および発酵ヤーコン頂葉の安全性確認

本サブテーマでは各種の発酵処理物の安全性試験を確認し、食品としての安全性を確認することを目標に、下記の 2 つの課題について研究開発を行った。

#### ①発酵ヤーコン豆乳の急性毒性試験

ヤーコンと豆乳を同時発酵処理することにより生じる生成物、あるいは増加する菌による毒性が無いことを確認することを目標にしていたが、本事業で確立した発酵ヤーコン豆乳粉末の品質が従来製法のものと同品質であると考えられたため、既に毒性試験のデータがある前提で、微生物試験やカビ毒、重金属などの分析を行う事とした。

分析の結果、食品としての安全性は十分に確保されていると考えられた。

#### ②各種発酵後のヤーコン頂葉の急性毒性試験

抗酸化能に優れたもの、あるいは新規ポリフェノールが検出されたものについて、発酵処理により生じる生成物、あるいは増加する菌による毒性が無いことを確認することを目標に研究開発を行った。

研究の結果、単回毒性試験、14日間反復投与試験のいずれも安全性を確認することができ、微生物試験やカビ毒、重金属などの分析結果も問題なかったため、食品としての安全性は十分に確保されていると考えられた。

#### 1-3-6. 発酵ヤーコン豆乳および発酵ヤーコン頂葉の機能性評価

開発した発酵豆乳粉末と発酵ヤーコン茶について、含有ポリフェノールや抗酸化能のデータをもとに機能性を推定し、in vitro、in vivo 試験によって下記の3課題について機能性評価を行った。

##### ①細胞を用いた免疫機能性の向上作用の評価

花粉症予防等の免疫機能に対する評価のため細胞レベルでの評価を行い、機能性を確認することを目標として研究開発を行った。

研究の結果、ヤーコン葉にヒスタミン遊離抑制作用があることを確認し、さらに発酵させた発酵茶は機能性が向上することが明らかとなった。

##### ②整腸作用の評価

便秘の症状を自覚する被験者を対象に、発酵ヤーコン豆乳を主原料とした発酵青汁の摂取試験によって排便を採取し腸内細菌叢についても分析を行い、腸内フローラが改善されることも確認することを目標として研究開発を行った。

研究の結果、ラットにおいてもヒトにおいてもヤーコン芋およびヤーコン芋を活用した発酵ヤーコン豆乳粉末の摂取は、腸内発酵を活発にして腸内において有機酸生成を増大させ、pHを下げてより健康によい状況を作り出した。摂取期間も毎日連続して4週間を続けることが効果をより明確にする方法であることも明らかになった。

##### ③その他の機能性評価

開発した発酵ヤーコン茶について、血圧に対する機能性の in vitro 試験による評価、食後の血糖上昇抑制作用、および臨床試験による抗アレルギー作用について各機能の評価を行う事を目標として研究開発を行った。

研究の結果、まず血圧に関しては今回確立した評価系では発酵前も発酵後もヤーコン頂葉に活性は確認できなかったが、食後の血糖上昇抑制作用については、発酵前、発酵後ともに機能性があることが確認できた。また、臨床試験による抗アレルギー作用については、免疫作用に対する好適な影響が確認できることを期待していたが、今回の試験では有意差が確認できず、一方で有意な体脂肪の減少が確認され、ダイエットやメタボリックシンドロームの予防・改善などに効果が期待できると考えられた。

#### 1-3-7. ヤーコン頂葉部の安定的生産方法の検討

ヤーコン頂葉部分は成長点であるため、ももとの収穫物である塊根部を活用できる大きさに成長させるためには限られた時期にしか採取することができない。また、抗酸化能が優れているのは限られた部分であるため、手摘みで選別しながら収穫しなければならない。そのため頂葉の収穫には非常にコストがかかり、現状頂葉部分を乾燥して茶葉に加工した場合を試算すると、12,000円/kg程度と高額になる。そこで、本サブテーマではヤーコン頂葉の安定した原料供給法の確立することを目標として、下記の2つの課題について研究開発を行った。

##### ①組織培養による頂葉生産の検討

組織培養による頂葉部分の増殖法を確立し、植物工場による安定的な原料供給を実現するための生産方法を確立することを目標に研究開発を行った。

研究の結果、組織培養による頂葉生産は可能であったが、変異の可能性があることから、品種によって機能性が異なる抗アレルギー作用等を期待する場合、組織培養は原料入手手段としては適していないと考えられた。

##### ②組織培養による頂葉に含まれるポリフェノールの分析

組織培養頂葉と従来の頂葉との成分比較を行い、抗酸化作用および抗アレルギー作用に差のない原料確保のための的確な栽培方法（培地の組成、生育期間等）を確立することを目標に研究開発を行った。

研究の結果、組織培養で得られた頂葉は総ポリフェノールが極端に少なく、機能性食品の原料として使用するには、さらなる研究が必要であるという結論に達した。

1-4.当該研究開発の連絡窓口

法人名：株式会社 北海道バイオインダストリー

代表者役職・氏名：代表取締役・佐渡 宏樹

住所：〒062-0937 北海道札幌市豊平区平岸 7 条 14 丁目 3-43

連絡担当者名・所属役職：伊藤 和男・総務部部长

TEL：011-812-2512

FAX：011-812-6895

E-mail：kitou@bio-do.com

## 第2章

### 本 論

## 1. 研究開発の背景及び目的

医療や介護が必要な高齢者の多くは、「活動量の低下」に伴い食欲が減退し、絶対的な食事摂取量（重量）の低下による「栄養状態の低下」が認められる。また、「食物繊維や水分の摂取量低下」と「活動量の低下」による便秘異常を認めることも多い。特に北海道における冬季間の積雪に伴う活動量の低下は避けることができず、室内での活動量の確保や食物繊維や水分の摂取が排便コントロールには必要不可欠である。そのため、医療、介護法人向の現場では、要介護者・高齢者等の食事におけるカロリー制限の中での十分な栄養確保や、整腸トラブルを抱えている多くの患者の食事による改善、また年齢により食事量が減少した人たちの補助食品が求められているという事実がある。さらに女性の場合、閉経後のホルモンバランスが崩れることで骨粗しょう症に陥るケースが多く、野菜だけではなくカルシウムの摂取等にも配慮する必要がある。

また、高齢者のみならず本事業申請者が20～34歳の女性合計200名を対象に実態調査を行ったところ、5人に一人は理想的と言われている1日1回の排便を実行できていないという結果が得られた。便秘は老廃物を体内にため込んでいる状態のため、腸内で腐敗が進みガスが充満して、お腹が張る、腹痛、肌荒れなどのトラブルを引き起こすため、スムーズな排便は便秘に悩む女性にとって深刻な問題である。

これらのニーズがある中で、北海道産のヤーコン、植物性乳酸菌ホッカイドウ株という2つの北海道産機能食材の組み合わせによる腸内細菌叢の改善、便秘改善作用は既に本研究開発申請者のこれまでの研究によって明らかにしている。本事業では、さらにヤーコンの持つ抗アレルギー作用に着目し、発酵技術を活用して「整腸作用」に加え「抗アレルギー」等の複数の機能性を持つ「高機能発酵食品」の開発を目指して研究開発を行った。

これまでの研究において、植物性乳酸菌ホッカイドウ株を用いて製造した発酵豆乳の乾燥粉末と北海道産の無農薬栽培ヤーコン芋の乾燥粉末をあわせて混合顆粒を開発し、これを摂取することによって腸内環境改善による便秘の改善傾向が確認している。この混合顆粒を活用することによって、「便秘改善」や「骨粗鬆症予防」、「大腸がん予防」等の複数の機能を有する青汁タイプの製品開発を目指し加工法や機能性について検討した。

従来技術では、発酵豆乳の乾燥粉末とヤーコン芋の乾燥粉末を別個に製造し、これをさらに顆粒状に加工する工程を経ていたが、本研究開発では豆乳とヤーコンとをあらかじめホモジナイズし、植物性乳酸菌ホッカイドウ株をもちいて同時に発酵処理を行い、得られた発酵物を顆粒状に加工する製造工程の開発を行うことで、製造コストの飛躍的削減を図った。

またヤーコンの茎と葉は、これまで血糖上昇抑制作用を有するヤーコン茶として活用してきたが、部位別にみた場合に最も抗酸化活性が高いヤーコンの頂葉部分に花粉症予防等の抗アレルギー作用が期待できることが摂取試験により想定されたため、植物性乳酸菌ホッカイドウ株の免疫力向上作用をさらに強化する素材として活用法を確立する。ヤーコン頂葉自体も発酵処理することによってポリフェノールの吸収率を向上させることが可能と考え、発酵技術の開発と、頂葉部分の安定的な原料確保についても生産技術を確立し、機能性の高い製品開発を行う事を目的として、従来あった課題点をテーマごとに課題解決のため研究開発を行った。

## 2.豆乳とヤーコン芋の同時発酵工程の確立

### 2-1.豆乳とヤーコン芋の発酵条件の検討

#### 2-1-1.試験概要

フラクトオリゴ糖を豊富に含むヤーコン芋と、植物性乳酸菌ホッカイドウ株を用いて発酵させた発酵豆乳を組み合わせた乾燥粉末は、便秘気味の人が1日6gを目安として摂取すると、排便数が増加したり便の状態が改善する等の機能性があることを確認していた。しかし、従来の製造技術では発酵豆乳とヤーコン芋粉末を個別に製造していたため、機能性評価のために試作した際の製造コストは35,000円/kgにもなり、事業化は困難となっていた。

そこで本研究テーマでは、ヤーコンと豆乳を一度に発酵処理、乾燥処理することが可能な新たな製造技術の確立を目指して研究開発を行った。求める製品のスペックは、既に整腸作用が確認されている従来の製造方法で得られた発酵ヤーコン豆乳粉末と同様のものであり、含有するホッカイドウ株の菌数が菌数 $2 \times 10^9$  CFU/mlになること、ヤーコン芋に含まれているフラクトオリゴ糖が残存していることの2つをポイントに、条件の検討を行った。

#### 2-1-2.試験方法

##### (1) ホッカイドウ株によるオリゴ糖種類の資化性確認

ヤーコン芋と豆乳をミックスしたものを一度に発酵処理することを考えた場合、得られる発酵物に、ヤーコン芋に含まれているフラクトオリゴ糖が残存していること、つまりホッカイドウ株の増殖に、ヤーコンに含まれるフラクトオリゴ糖が消費されないことが絶対条件となる。そこで本研究テーマではホッカイドウ株によるオリゴ糖の資化性を確認することで、豆乳とヤーコン芋を同時に発酵した場合、機能性に变化があるか否かを検証した。

資化性評価はヤーコンに含まれる機能性糖であるフラクトオリゴ糖を添加した培地に、植物性乳酸菌ホッカイドウ株を接種し、嫌気培養後のpHを測定することによって資化性の有無及び強弱を確認した。比較対照として接種菌は *Lactobacillus salivarius*、*Lactobacillus casei* の2種を、オリゴ糖として大豆オリゴ糖とラフィノース（ビートオリゴ糖）の2種を用いて比較評価した。

##### (2) ヤーコンポリフェノールがホッカイドウ株の増殖に与える影響の確認

ヤーコン芋に含まれるポリフェノールが腸内発酵を抑制する働きがある可能性も想定されたため、ヤーコン芋のペーストと豆乳をミックスしたものにホッカイドウ株を接種して、従来法と同じ発酵時間である24時間発酵させた後のホッカイドウ株の菌数を測定することによって、ホッカイドウ株がもたらす機能性に变化があるか否かを検証した。乳酸菌数は *Lactobacilli* MRS 寒天培地を用い、平板培養法によりコロニー数から算出した。

##### (3) 豆乳とヤーコン芋の同時発酵条件の検討

従来製法で製造した発酵ヤーコン豆乳粉末と同じスペックとして、評価基準を見た目と殺菌前に含まれるホッカイドウ株の菌数とを基準として製造条件を検討した。

従来製法で製造した発酵ヤーコン豆乳の見た目は、やや緑がかかった粉末であるため、発酵の際に褐変しないことや、菌の接種から24時間後に菌数 $2 \times 10^9$  CFU/mlとなるための、各工程の手順や条件などを検討した。

#### 2-1-3.試験結果

##### (1) ホッカイドウ株によるオリゴ糖種類の資化性確認

資化性の比較結果を（表.2-1-1）に示す。

（表.2-1-1）ホッカイドウ株によるオリゴ糖種類の資化性比較

	ホッカイドウ株 <i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus salivarius</i>	<i>Lactobacillus casei</i>
フラクトオリゴ糖		++	-
大豆オリゴ糖		++	-
ラフィノース	+	++	+

この結果から、ホッカイドウ株はフラクトオリゴ糖を消費しないと考えられ、ヤーコン芋ペーストと豆乳をミックスした後もホッカイドウ株接種が可能であると考えられた。

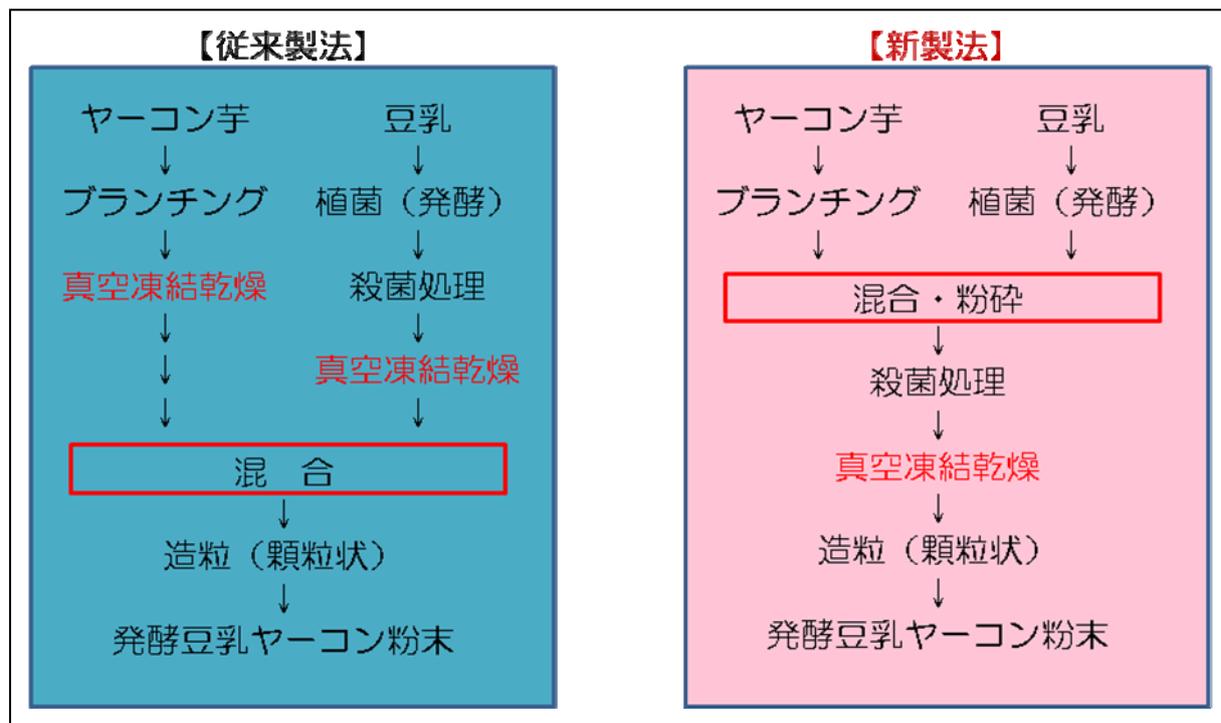
(2) ヤーコンポリフェノールがホッカイドウ株の増殖に与える影響の確認

ヤーコン芋ペーストと豆乳をミックス混ぜ合わせ、ブランチング処理をした後にドラフト内で冷却し、ホッカイドウ株の初発菌数を  $1 \times 10^7$  CFU/ml として添加した。30℃インキュベーター内で24時間の発酵させた後、ホッカイドウ株の菌数を定量した結果、菌数は目安としていた約  $2 \times 10^9$  CFU/ml に増えていることを確認した。さらに24時間発酵を継続させた後、ホッカイドウ株の生存菌数を定量した結果、菌数の減少が確認できた。

この結果より、ヤーコンに含まれるポリフェノールは、ホッカイドウ株の増殖を抑制させることは無いものと考えられ、また、ホッカイドウ株の増殖を促す影響もないものと考えられた。そのため、ヤーコンと豆乳を混合した状態での接種を考えていたが、発酵豆乳の殺菌のタイミングでヤーコンと混合させる方がより生産性を向上させることができると考えた。

(3) 豆乳とヤーコン芋の同時発酵条件の検討

ヤーコン芋と豆乳をミックスした状態でホッカイドウ株を接種しても、ヤーコンやホッカイドウ株の生体調節機能を損なうことは無いと考えられたため、製造工程および加工条件を検討し、新たな同時発酵法としての製造工程を構築した(図.2-1-1)。



(図.2-1-1) 発酵豆乳ヤーコン粉末の従来製法と新製法の比較

2-1-4.考察

ヤーコンのポリフェノールがホッカイドウ株の増殖を抑制する心配がないことや、ホッカイドウ株の増殖にフラクトオリゴ糖が消費されないことなどが明らかとなり、菌数  $2 \times 10^9$  CFU/ml を含む発酵ヤーコン豆乳を同時に発酵させることは、従来製法のアレンジで十分に可能であることが明らかになった。

2-2.豆乳とヤーコン芋の発酵ラインの検討

2-2-1.試験概要

開発した発酵豆乳ヤーコン粉末の新製法の条件を、既存の工場設備で大量生産するための工程整理と、実際に試作を行うことで製造原価を決定するための研究開発を行った。製造原価は、従来製法による試作の段階では 35,000 円/kg であり、これを 15,000 円/kg にすることを目標値とした。

## 2-2-2.試験方法

### (1) 既存工場設備による発酵ラインの構築

(図.2-2-1) で示した、開発した新製法を既存の工場施設に工程として落とし込むことを検討課題とし、既存工場設備で可能な作業と作業の工程に求められるスペックとを照らし合わせながら、製造フローを構築した。

### (2) 新製法ラインによる発酵ヤーコン豆乳粉末の試作

既存工場設備で構築した製造ラインを実際に稼働させて、量産化を想定した試作を行い加工に係るコスト計算を行った。

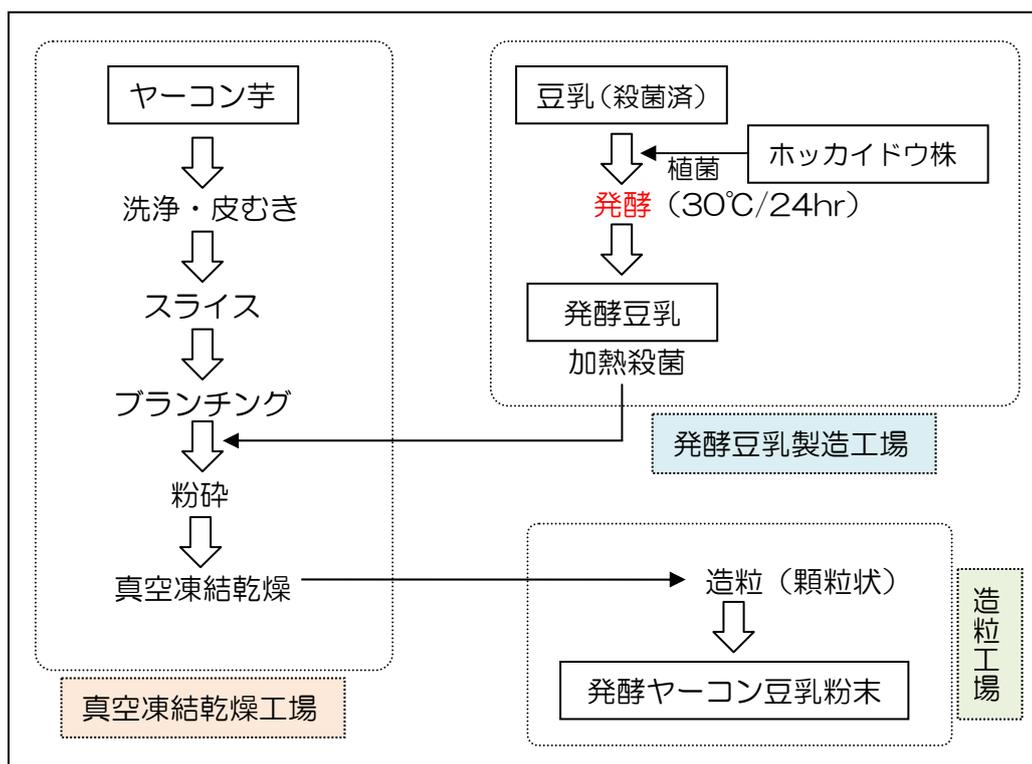
### (3) 試作した発酵ヤーコン豆乳粉末のコスト計算

既存工場設備での加工に係るコストに、試作によって明らかになった歩留りをもとにした原材料のコストなどを加え、最終的な発酵ヤーコン豆乳粉末を計算した。

## 2-2-3.試験結果

### (1) 既存工場設備による発酵ラインの構築

(図.2-2-1) で示した、開発した新製法を既存の工場施設に工程として落とし込むことを検討した結果、発酵豆乳製造ラインで豆乳の発酵と殺菌処理を行い、殺菌された発酵豆乳をブランチング後のヤーコン芋に加えてからヤーコンペーストを調製することに変更し、最終的に(図.2-1-2)のような製造ラインを確立した。



(図.2-1-2) 既存工場設備による発酵ラインの構築

### (2) 新製法ラインによる発酵ヤーコン豆乳粉末の試作

(図.2-1-2) に示したように、発酵豆乳製造工場、真空凍結乾燥工場、造粒工場のそれぞれの工場設備において、既存の工場設備を活用した新たな製造ラインを構築し、試作を実施した。3回試作を行った結果、平均歩留りは乾燥前重量に対して12%であった。原料価格を除いた加工費は9,000円/kg~10,000円程度になると試算された。

### (3) 試作した発酵ヤーコン豆乳粉末のコスト計算

試作の結果、平均歩留りは原料の乾燥前重量に対して12%であったので、1kgの発酵ヤーコン豆乳粉末の原料として必要になる原料重量は8kg~8.5kg程度と想定できる。ヤーコン芋と発酵豆乳を混合させたものの価格は550円/kg~600円/kg程度となる見込みであり、価格が600円/kgの原料を8.5kg使用すると仮定すると、5,100円であり、原料価格を除いた加工費が9,000円/kg~10,000円/kg程度となる見込みであるから、新製法による最終的な発酵ヤーコン豆乳粉末の価格は、目標値としていた15,000円/kgを達成したと考えられる。

#### 2-2-4.考察

本研究テーマでは、ヤーコンと豆乳を一度に発酵処理、乾燥処理することが可能な新たな製造技術の確立を目指して研究開発を行い、さらに既存の工場設備での製造ラインを構築することによって、新たな設備投資をすることなく製法を簡易化し、製造コストを削減することによって、従来製法では35,000円/kgとなっていた発酵ヤーコン豆乳粉末の価格を15,000円/kgにすることを最終目標としていた。

従来別々に処理していたヤーコン芋と豆乳を同時に発酵させることで、真空凍結乾燥や発酵、殺菌などの工程を簡易化し人件費や加工期間を改善することができると考えていたが、ヤーコンの機能成分であるフラクトオリゴ糖が発酵によって減少してしまわないか、あるいはプロバイオティクス素材として機能性を期待しているホッカイドウ株の増殖をヤーコン芋に含まれるポリフェノールが阻害してしまわないか等、懸念事項があったため新製法の確立がすすんでおらず、整腸作用が確認されているにもかかわらず、発酵ヤーコン豆乳粉末は事業化出来ていなかった。

本研究テーマによって、既存の工場設備を使用して目標値の15,000円/kgで、既存の技術で製造したものと同スペックの発酵ヤーコン豆乳粉末を製造することが可能となり、医療・介護の現場に提供することが可能な製品開発が可能になったと考える。

### 3.ヤーコン頂葉の発酵茶製造法の確立

#### 3-1.ヤーコン頂葉の前発酵処理の検討

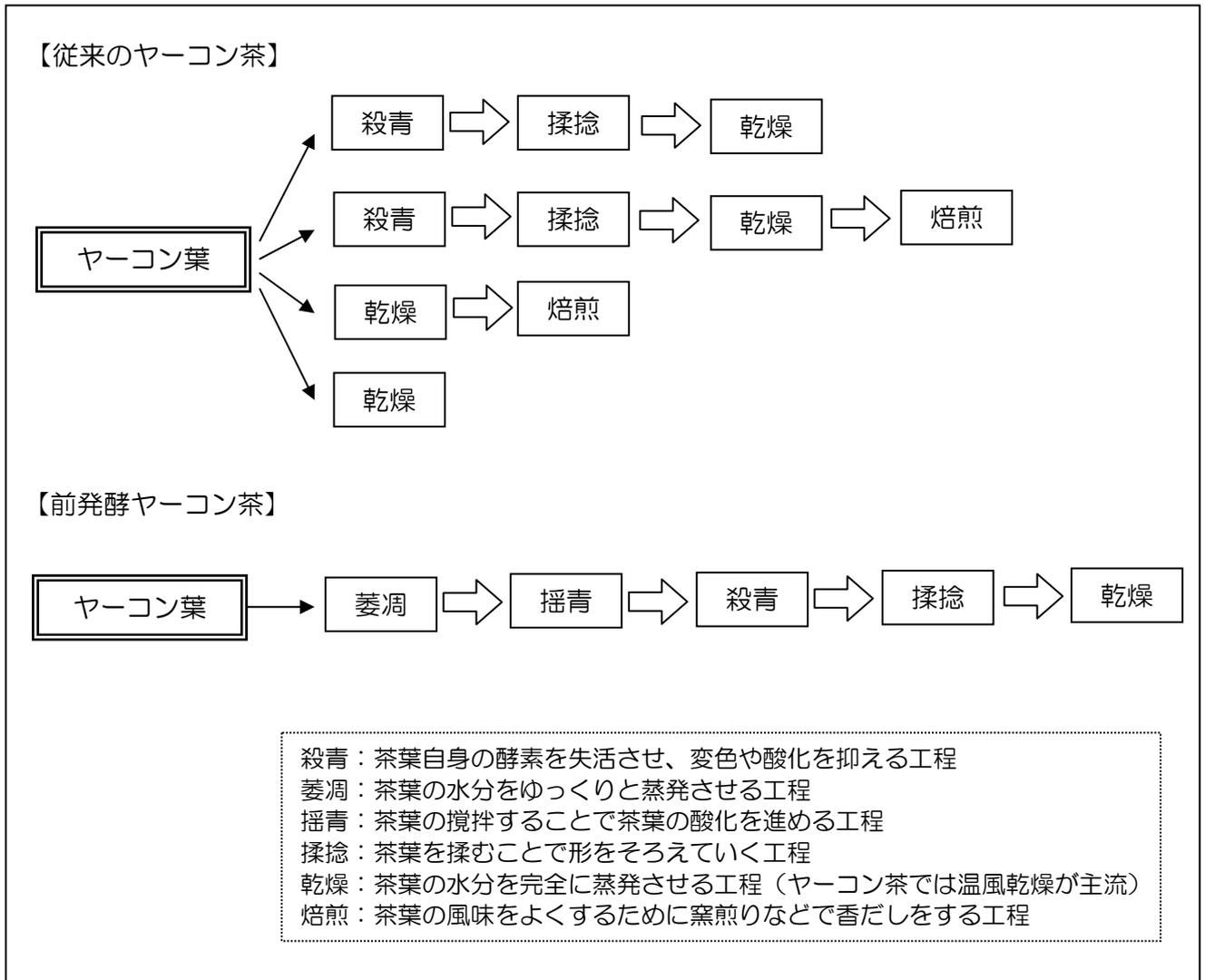
##### 3-1-1.試験概要

ヤーコン葉を活用した健康茶は、これまで不発酵茶として活用されていたが、苦みや青臭みが強く他のお茶との混合や、焙煎による呈味改善がなされていた。最も抗酸化作用が強い頂葉部分は、さらに苦味が強くそのまま健康茶として使用することは困難であったため、抗酸化作用が高いにもかかわらず未利用資源となっていた。これまでの研究で頂葉部分の熱水抽出物には花粉症の諸症状を緩和する作用が確認されたが、この作用は焙煎すると効果が弱まってしまうため、焙煎以外の呈味性改善法の開発が活用のための課題となっていた。

そこで、本研究テーマではヤーコン頂葉部分を自身の酵素を働かせることによって加熱することなく呈味性の優れたヤーコン頂葉茶の製造条件を確立することを目標に、ヤーコン頂葉の前発酵処理について検討した。

##### 3-1-2.試験方法

ヤーコンの頂葉を茶葉に加工する際に、殺青処理を行う前に萎凋、揺青工程を行うことによって、自身の酵素を働かせて前発酵処理を行った(図3-1-1)。工程ごとの処理時間や処理温度を変更しながら、複数回、複数種の試作を行い、出来上がった前発酵茶は10名の男女(29歳~64歳)による官能評価を実施して味の確認を行いながら、美味しく機能性に優れた製品開発をめざして、工程ごとの加工条件を検討していった。



(図.3-1-1)前発酵ヤーコン茶の製造フローと従来のヤーコン茶の製造フロー比較

### 3-1-3.試験結果

事業化を考えた場合に重要であるポイントの一つとして、製品規格をしっかりと設定し、常に安定した品質を提供するということが挙げられる。

この点において、前発酵ヤーコン茶は萎凋工程、揉青工程の反応時間や温度を一定にしても、得られる発酵茶の官能評価が一定にならなかったため、製品規格の設定は難しいと考えられた。また、官能評価において、従来のヤーコン茶の特徴であった苦みや青臭みなどは若干改善しているものの、自身の酵素による発酵によって、別の臭みが感じられ発酵前よりもクセが強くなってしまう場合もあったことなどの理由から、前発酵による発酵ヤーコン茶の開発は、後述の後発酵を検討後に継続するか否かを判断することとした。

### 3-1-4.考察

本研究テーマにおいて使用する発酵茶の原料として、抗酸化作用が最も強いヤーコン頂葉部分（成長点を含めて上から4枚めまでの葉）を用いて研究開発を行ったが、発酵工程の時間や条件などを一定にしても、発酵具合が一定にならず10名の男女による官能評価の結果も、発酵前よりも評価が低い場合もあったため、再現性が高いと考えられる後発酵処理による発酵茶の検討を優先して行う事にした。

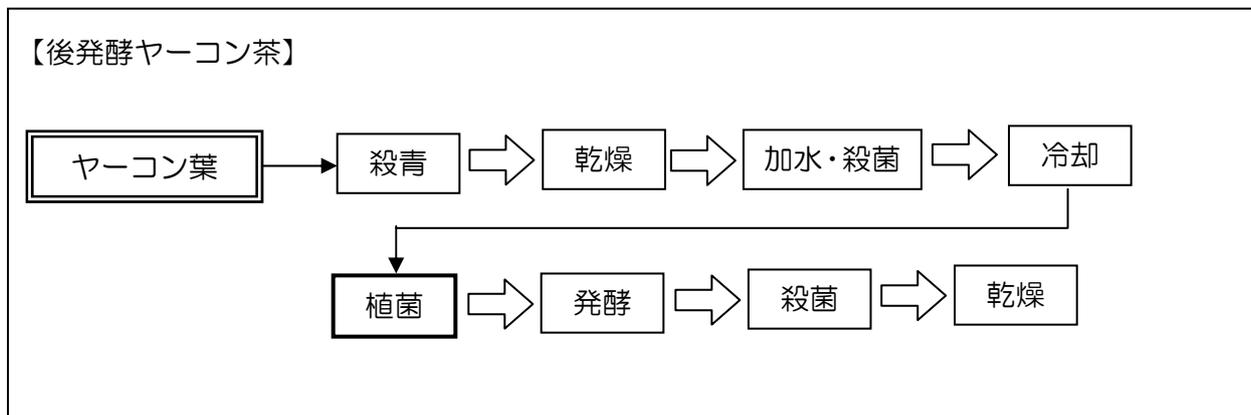
### 3-2.ヤーコン頂葉の後発酵処理の検討

#### 3-2-1.試験概要

ヤーコン頂葉部分を加熱することなく呈味性の優れたヤーコン頂葉茶の製造条件を確立することを目標に、呈味性の良い発酵ヤーコン茶を製品化することを目標に研究開発を進めていく中で、自身の酵素によって発酵させる前発酵処理は、安定した品質の製品化は極めて困難であると判断された。そこで、本研究テーマでは微生物を用いた発酵処理による後発酵茶の開発によって呈味性が良く、安定した品質の発酵茶を開発することを目標に、研究開発を行った。

#### 3-2-2.試験方法

ヤーコンの頂葉を茶葉に加工する際に、殺青処理を行った後に温風乾燥させ、乾燥茶葉を調製した。得られた乾燥茶葉に同重量の蒸留水を加えて水分を乾燥茶葉にしみこませた後、加熱処理をした後、速やかに取出しにドラフト内で室温まで冷まし、微生物を植菌して発酵させた。発酵後殺菌処理を行い、温風乾燥機で水分が10%以下になるまで乾燥させて発酵ヤーコン茶の試作を行った（図.3-2-1）。植菌には（表.3-2-1）に示す8種の微生物を使用し、8種の発酵茶を試作し、10名の男女（29歳～64歳）による官能評価を実施して味の確認を行いながら、美味しく機能性に優れた製品開発をめざして、工程ごとの加工条件を検討していった。



（図.3-2-1）後発酵ヤーコン茶の製造フロー

（表.3-2-1）発酵に使用した微生物一覧表

No.	試作発酵茶名	発酵に使用した微生物名
1	6052	<i>Mucor javanicus</i>
2	6536	<i>Rhizopus oryzae</i>
3	7146	<i>Aspergillus oryzae</i>
4	7475	<i>Aspergillus niger</i>
5	8056	<i>Penicillium roqueforti</i>
6	9085	<i>Monascus anka</i>
7	9448	<i>Geotrichum candidum</i>
8	9517	<i>Botrytis cinerea</i>

#### 3-2-3.試験結果

前発酵茶の開発とは異なり、発酵条件（温度・発酵時間）を一定にすることで、官能評価も条件ごとに安定した結果が得られたため、安定した品質の製品を事業化することを考えた場合、呈味性を改善させた発酵ヤーコン茶の加工法としては後発酵茶の方が適していると考えられた。後発酵での製品化を実現させるためには、発酵に使用する微生物の選定と発酵条件の確立が必要になる。そこでまず、発酵に用いる微生物の選定から検討を行った。

発酵に用いる微生物によって増殖のスピードは異なるため、完全に発酵が進むまでに36時間以上かかってしまう微生物は、事業化を考えた場合製造コストが高くなってしまふと考えられるため、ヤーコン頂葉に植菌した際の発酵のスピードを比較した結果を（表.3-2-2）に示す。また、官能試験の評価結果を（表.3-2-3）に示す。

（表.3-2-2）発酵に使用した微生物と発酵速度

試作発酵茶名	発酵に使用した微生物名	発酵速度
6052	<i>Mucor javanicus</i>	++
6536	<i>Rhizopus oryzae</i>	+++
7146	<i>Aspergillus oryzae</i>	+++
7475	<i>Aspergillus niger</i>	+++
8056	<i>Penicillium roqueforti</i>	-
9085	<i>Monascus anka</i>	--
9448	<i>Geotrichum candidum</i>	-
9517	<i>Botrytis cinerea</i>	+

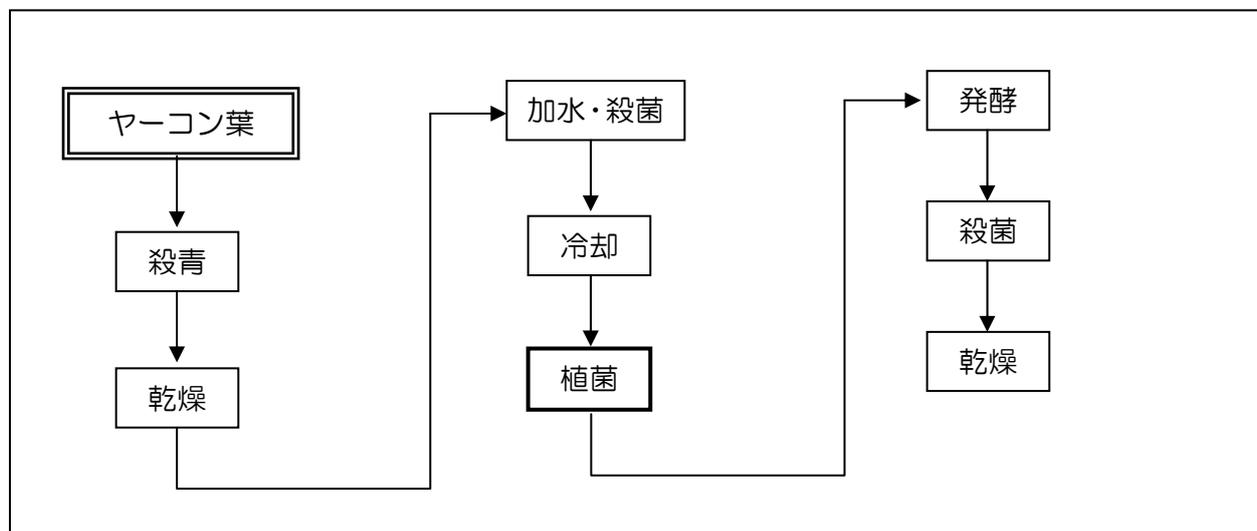
（表.3-2-3）発酵に使用した微生物と発酵速度

試作発酵茶名	発酵に使用した微生物名	官能評価
6052	<i>Mucor javanicus</i>	-
6536	<i>Rhizopus oryzae</i>	-
7146	<i>Aspergillus oryzae</i>	++
7475	<i>Aspergillus niger</i>	+++
8056	<i>Penicillium roqueforti</i>	--
9085	<i>Monascus anka</i>	-
9448	<i>Geotrichum candidum</i>	-
9517	<i>Botrytis cinerea</i>	+

以上の結果から、ヤーコン茶の発酵による呈味改善には、生産性から考えても官能評価の結果から考えても *Aspergillus* 属の微生物を用いるのが適していると考えられた。

### 3-2-4.考察

本研究開発事業では、*Aspergillus oryzae*、*Aspergillus niger*の2種の微生物を用いた後発酵茶が呈味性を大きく改善させることができると考えられた。また、これらの微生物を用いた発酵茶の製造条件として、（図.3-2-2）に示すフローに示した通りに条件設定した。



（図.3-2-2）*Aspergillus*属を用いたヤーコンの後発酵茶製造フロー

#### 4.発酵によるヤーコン頂葉茶に含まれるポリフェノールの変化の確認

##### 4-1.発酵前のヤーコン頂葉の含有ポリフェノール分析

###### 4-1-1.試験概要

呈味性改善のために、ヤーコン頂葉の後発酵処理を行った場合の前後で、頂葉に含まれるポリフェノールにいかなる変化が起こるのかを明らかにするため、総ポリフェノール量を指標として変化を検証することを考え、発酵前の頂葉乾燥物について総ポリフェノール量を測定した。

###### 4-1-2.試験方法

総ポリフェノールの分析には、Folin-Denis 法を用いた。Folin-Denis 法は、ターゲットとなる化合物の還元性を利用して、アルカリ性でタングステン酸、リンモリブデン酸を還元して生じる青色を比色定量する分析法である。

###### 【使用試薬】

- ・炭酸ナトリウム（無水）：20%水溶液を調製
- ・フェノール試薬：タングステン酸Na（ $2H_2O$ ）100g、リンモリブデン酸20g、リン酸50ml を700mlの水に溶解した後2hr 還流したものを冷却後1L に定容した

###### 【試験試料の調製】

乾燥頂葉5.0g に対し500mL の蒸留水を沸騰させた熱湯（100℃）をガラスビーカーに注ぎ、3 時間室温で放置した。放置後、濾紙（ADVANTECNo.2）にてろ過を行い、試験試料（原液）とした。使用は試験原液をろ過滅菌し使用した。調製した試験試料は直射日光を避け、室温にて保存した。なお、品種間による差を確認するため、2つの品種について評価を行った。

###### 【試験手順】

試験試料を適宜水で希釈し、試験管に入れる  
↓  
フェノール試薬を5ml加えて攪拌する  
↓  
20%炭酸Na 溶液を5ml加えて攪拌する  
↓  
室温で20分静置する  
↓  
700mlで比色する

（検量線はカテキンを用いた） ※得られた値は、総ポリフェノール量をカテキン相当量で示した値

###### 4-1-3.試験結果

分析結果を（表.4-1-1）に示す。表に示した通り、発酵前のヤーコン A およびヤーコン B の 2 品種の頂葉に含まれる総ポリフェノール量を比較すると、大きな差があることが確認できた。

（表.4-1-1）発酵前の品種別総ポリフェノール量

試料名	濃度 (mg/100mL)
ヤーコン A種	184.5
ヤーコン B種	87.5

#### 4-1-4.考察

分析に用いた2つの品種の頂葉をそれぞれ比較した場合、まず外見が大きく異なっており、ヤーコン A種はヤーコン B種に比べると紫がかかった濃い色をしており、乾燥茶葉に加工した状態で熱水抽出物の味を比較しても、強い苦みを感じる特徴を持つ。

今回の品種による総ポリフェノールの比較結果は、これらの差異をポリフェノールで説明することができるデータであると考えられる。

得られたデータを発酵前のスタンダードなポリフェノール量と設定し、発酵することによってどのように変化をするのか確認するための基準とした。

#### 4-2.各種発酵後のヤーコン頂葉の含有ポリフェノール分析

##### 4-2-1.試験概要

呈味性改善のために、ヤーコン頂葉の後発酵処理を行った場合の前後で、頂葉に含まれるポリフェノールにいかなる変化が起こるのかを明らかにするため、総ポリフェノール量を指標として変化を検証することを考え、発酵前同様、発酵後のヤーコン頂葉乾燥物についても2品種の総ポリフェノール量をそれぞれ測定した。

##### 4-2-2.試験方法

総ポリフェノールの分析には、Folin-Denis 法を用いた。

分析に使用した試験試料の原料として、官能評価の結果が高かった

*Aspergillus oryzae*、*Aspergillus niger* 比較対照として *Penicillium roqueforti* を発酵させる微生物として使用し、2品種のヤーコンを発酵させた発酵茶を製造した計6サンプルを用いた。

##### 【試験試料の調製】

それぞれの発酵茶葉5.0g に対し500mL の蒸留水を沸騰させた熱湯（100℃）をガラスビーカーに注ぎ、3時間室温で放置した。放置後、濾紙（ADVANTEC No.2）にてろ過を行い、試験試料（原液）とした。使用は試験原液をろ過滅菌し使用した。調製した試験試料は直射日光を避け、室温にて保存した。

##### 4-2-3.試験結果

分析結果を（表.4-1-2）に示す。表に示した通り、発酵前の頂葉に含まれる総ポリフェノール量を比較すると、ヤーコン A種はヤーコン B種の2倍以上のポリフェノールを含んでいることが明らかとなった。

（表.4-1-2）発酵後の品種別総ポリフェノール量

試料名	濃度 (mg/100mL)	
ヤーコン A種 発酵茶 <i>Aspergillus oryzae</i>	68.8	発酵前ヤーコン A種
ヤーコン A種 発酵茶 <i>Aspergillus niger</i>	67.9	184.5mg/100mL
ヤーコン A種 発酵茶 <i>Penicillium roqueforti</i>	92.5	
ヤーコン B種 発酵茶 <i>Aspergillus oryzae</i>	16.5	発酵前ヤーコン B種
ヤーコン B種 発酵茶 <i>Aspergillus niger</i>	17.0	87.5mg/100mL
ヤーコン B種 発酵茶 <i>Penicillium roqueforti</i>	25.6	

#### 4-2-4.考察

発酵の前後で総ポリフェノール量を基準として比較してみた場合、発酵前の総ポリフェノール量に対して、すべての発酵茶で総ポリフェノール量の減少が確認された。

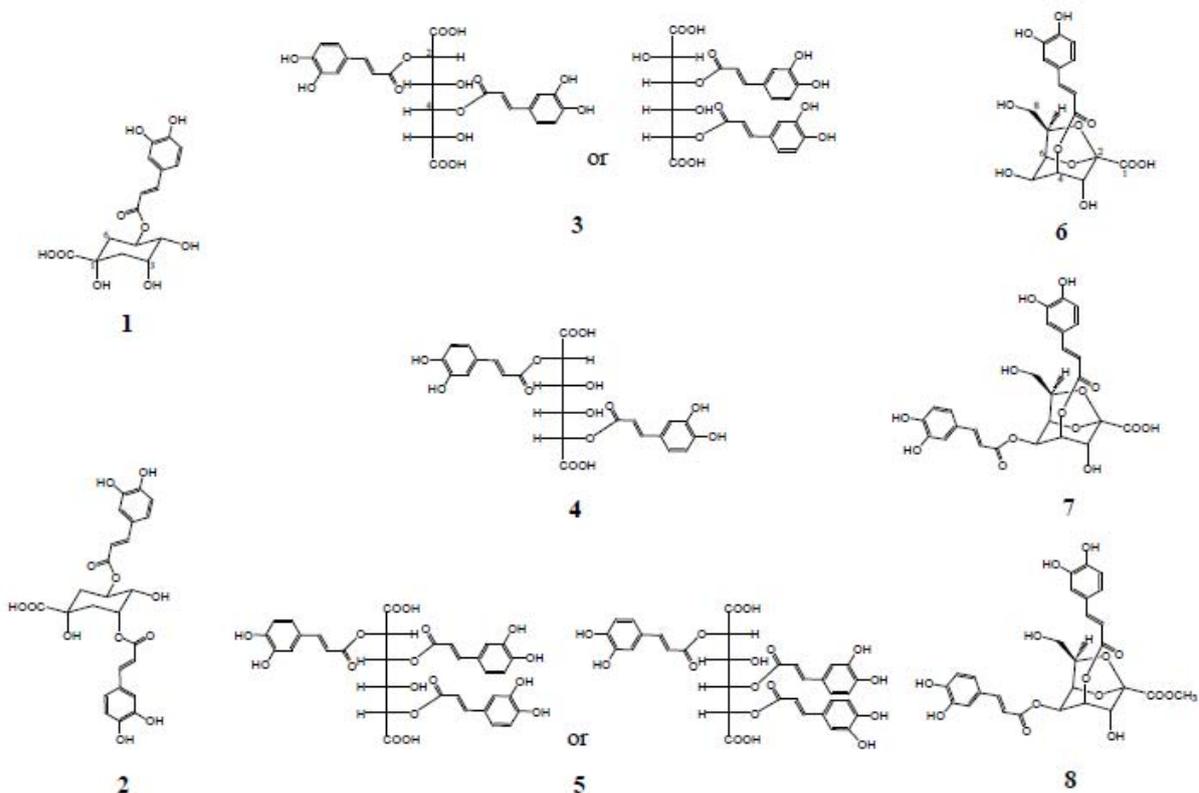
2つの品種を比較した場合、ヤーコンA種の3試料平均のポリフェノール残存率が41.4%であるのに対し、ヤーコンB種の3試料平均のポリフェノール残存率は22.5%であり、ヤーコンB種の方が発酵によるポリフェノールの減少率が大きいことが分かった。

また、発酵に用いた微生物に着目した場合、*Aspergillus*属の2種は*Penicillium roqueforti*と比較してポリフェノールの減少率が、2品種ともに大きいことが分かった。

官能評価で発酵前に強く感じた苦みや青臭みが最も緩和されたと評価された*Aspergillus*属の2種が総ポリフェノールの減少率が大きいことは、官能評価の結果と総ポリフェノールの量が大きく関係していると考えて間違いのないと思われるが、総ポリフェノールの減少が生体調節機能の減少につながる可能性も考えられるため、機能性評価では*Aspergillus oryzae*、*Aspergillus niger*を発酵に用いる微生物とする発酵茶を重点的に評価することとした。

なお、これまでにヤーコンで確認されている特徴的なポリフェノールは(図.4-1-1)に示すように8種類が報告されている(日本食品科学工学会誌, 53, 603-611 (2006))が、これらの8種類のポリフェノールに限定して定量比較した場合、2品種ともに極端にこれらのポリフェノールが減少していることを確認した。その減少率は(表.4-2-1)に示した数値と比べても極端に減少しており(8種類の合計含有量で比較すると発酵後は2%以下にまで減少する)、含有ポリフェノールが発酵前後で変化していることが予想される。

このポリフェノールの減少が生体調節機能にどのような変化をもたらすのか、機能性評価の中で明らかにしていくとともに、詳細な成分分析を継続して行っていくことによって、実態を明らかにしていく予定である。



(図.4-1-1) ヤーコンに含まれる主要なポリフェノール化合物 1~8 の化学構造

## 5.各種発酵後のヤーコン頂葉の抗酸化能評価

### 5-1.発酵前のヤーコン頂葉の抗酸化能評価

#### 5-1-1.試験概要

ヤーコン葉にはポリフェノールが豊富に含まれており、抗酸化作用があることが知られている。これまでの研究におけるヤーコン部位別の抗酸化能の比較によって、頂葉部分の抗酸化能が優れていることを明らかにしているが、頂葉部分を発酵処理した場合、発酵前と発酵後での抗酸化能を確認しておく必要がある。そこで本試験項目では、発酵による抗酸化作用の変化を検証するため、2品種について発酵前の抗酸化活性の検証を行った。

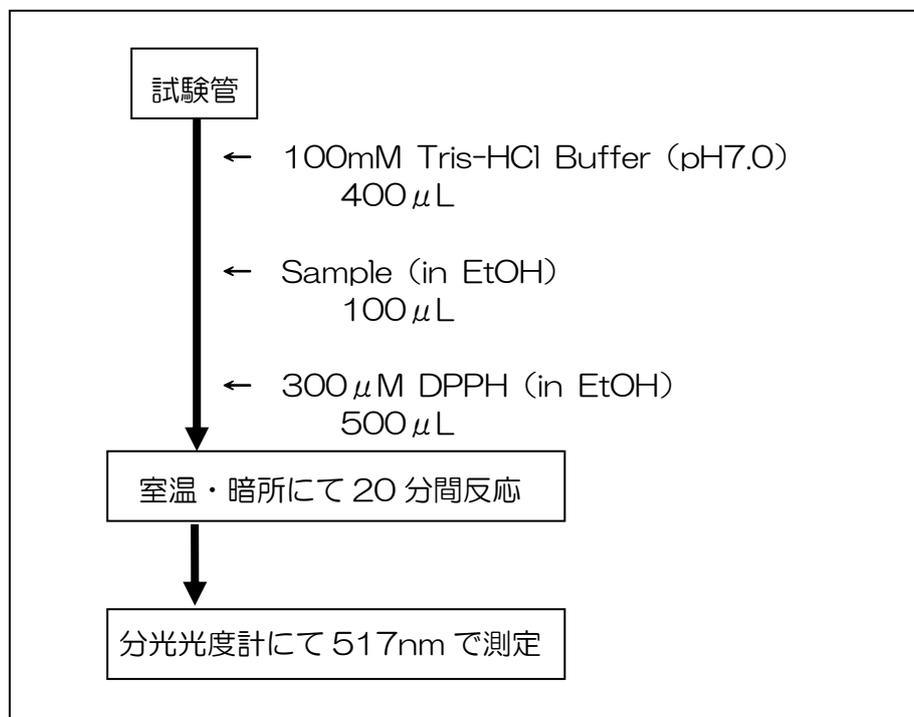
#### 5-1-2.試験方法

##### ①試験試料の調製

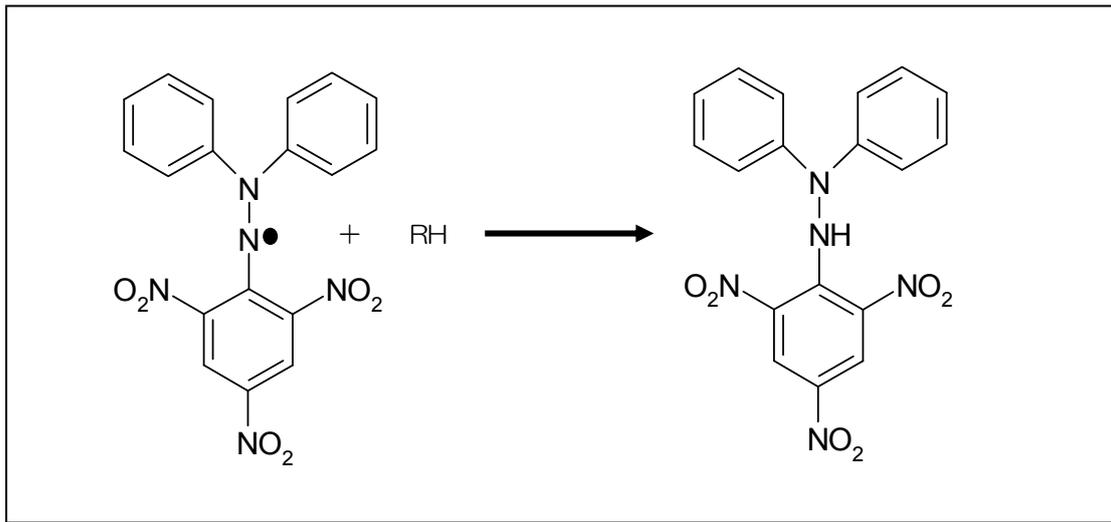
乾燥頂葉5.0g に対し500mL の蒸留水を沸騰させた熱湯(100℃)をガラスビーカーに注ぎ、3時間室温で放置した。放置後、濾紙(ADVANTEC No.2)にてろ過を行い、試験試料(原液)とした。使用は試験原液をろ過滅菌し使用した。調製した試験試料は直射日光を避け、室温にて保存した。

##### ②DPPH法による抗酸化活性評価

試験管に100 $\mu$ Lのサンプル(in Ethanol)、400 $\mu$ Lの0.1M tris-HCL buffer(pH7.4)、500 $\mu$ Lの300 $\mu$ M DPPH(in Ethanol)を加えて攪拌し、暗所で20分間静置した後、分光光度計にて波長517nmで測定する(図.5-1-1、図5-1-2)。DPPH溶液のブランクは試料溶液の代わりにエタノールを100 $\mu$ L加え、サンプルのブランクにはDPPH溶液の代わりにエタノールを500 $\mu$ L加えた。DPPHラジカルを50%消去する試料濃度IC(Inhibitory Concentration)<sub>50</sub>にて比較することで、各試料の抗酸化活性を比較した。



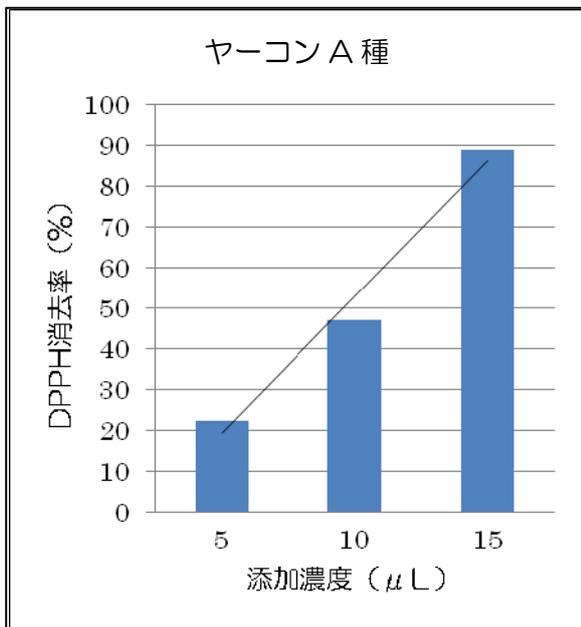
(図.5-1-1) DPPH ラジカル補足活性試験手順



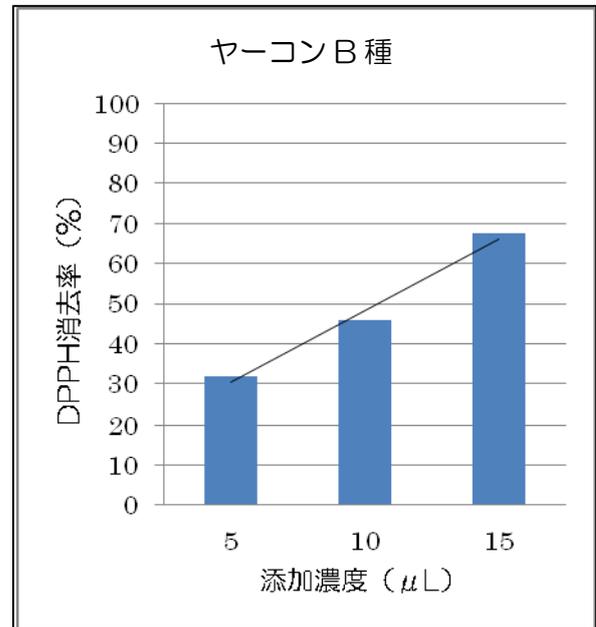
(図.5-1-2) DPPH ラジカル補足反応様式

### 5-1-3.試験結果

ヤーコン A 種および B 種の頂葉乾燥物より抽出した熱水抽出物について、抗酸化活性力価をその添加濃度 ( $\mu\text{L}$ 、横軸)、その添加濃度に対する DPPH 消去率 (%、縦軸) とし、グラフに示した (図.5-1-3、図.5-1-4)。いずれも  $\text{IC}_{50}$  は  $10\mu\text{L}$  前後と推定されるが、グラフから読み取れるようにレスポンスの速さで比較すると A 種の方が抗酸化能は優れていると考えられた。



(図.5-1-3) ヤーコン A 種の抗酸化能



(図.5-1-4) ヤーコン B 種の抗酸化能

### 5-1-4.考察

これまで部位別にみた場合に、ヤーコンの頂葉部分は抗酸化作用に優れていることを明らかにしていたが、品種による抗酸化能の差異について明らかにはしていなかった。今回、2 品種間の頂葉同士の抗酸化能を比較してみると、同条件で調製した熱水抽出物 (お茶) の  $\text{IC}_{50}$  の濃度は、あまり差がないように考えられるが、濃度を上げて考えた場合にはヤーコン B 種よりもヤーコン A 種の抗酸化活性が強く、濃度を下げて考えた場合は逆に A 種よりも B 種の方が抗酸化活性は強く出るといような、“効き方” に差がみられることが明らかとなった。

## 5-2.各種発酵後のヤーコン頂葉の抗酸化能評価

### 5-2-1.試験概要

ヤーコン頂葉部分の抗酸化活性は、品種によって異なる“効き方”をする可能性があると考えられたため、頂葉を発酵処理した場合も抗酸化活性に影響があるのではないかと考え、ヤーコンA種を原料として試作した8種類の発酵頂葉茶葉について抗酸化活性の検証を行った。

#### ①試験試料の調製

ヤーコンA種を原料に(表.5-2-1)に示す8種類の発酵頂葉茶葉を試作し、それぞれの乾燥頂葉5.0g に対し500mL の蒸留水を沸騰させた熱湯(100℃)をガラスビーカーに注ぎ、3時間室温で放置した。放置後、濾紙(ADVANTEC No.2)にてろ過を行い、試験試料(原液)とした。使用は試験原液をろ過滅菌し使用した。調製した試験試料は直射日光を避け、室温にて保存した。

(表.5-2-1) ヤーコンA種を原料に試作した8種の発酵頂葉茶葉

No.	試験試料名	発酵に使用した微生物名
1	6052	<i>Mucor javanicus</i>
2	6536	<i>Rhizopus oryzae</i>
3	7146	<i>Aspergillus oryzae</i>
4	7475	<i>Aspergillus niger</i>
5	8056	<i>Penicillium roqueforti</i>
6	9085	<i>Monascus anka</i>
7	9448	<i>Geotrichum candidum</i>
8	9517	<i>Botrytis cinerea</i>

#### ②DPPH 法による抗酸化活性評価

8種類の発酵頂葉茶葉の抗酸化活性については、発酵前の抗酸化活性評価と同様、DPPH ラジカルを50%消去する試料濃度 IC (Inhibitory Concentration) <sub>50</sub>にて比較することで、各試料の抗酸化活性を比較した。

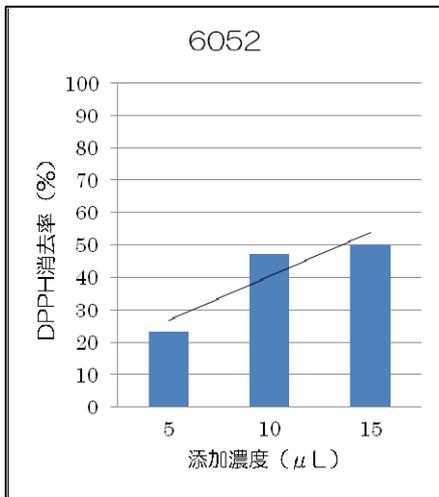
### 5-2-3.試験結果

ヤーコンA種を原料とした8種類の発酵頂葉茶葉より抽出した熱水抽出物について、酸化活性力価をその添加濃度(μL、横軸)、その添加濃度に対するDPPH消去率(%、縦軸)とし、グラフに示す(図.5-2-1~図.5-2-8)。また、発酵前の頂葉乾燥物より抽出した熱水抽出物の結果を、対照データとして(図.5-2-9)に示す。

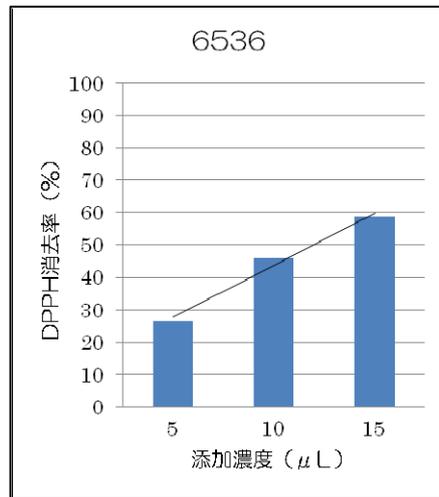
発酵前の頂葉で確認されたように、抗酸化活性の違いをIC<sub>50</sub>および濃度によるDPPH消去率の2つのポイントで比較すると、8種類の発酵頂葉茶葉で異なる結果が得られた。まず、IC<sub>50</sub>を基準に比較した場合、「発酵茶【7146】」が最も抗酸化能が強いと考えられ、発酵前の頂葉とほとんど変わらない値であった。逆に最も抗酸化能が低くなってしまったものは「発酵茶【9517】」であった。また、濃度によるDPPH消去率をポイントに比較して考えると、低濃度で発酵前より高いDPPH消去率を示したものは「発酵茶【7146】」および「発酵茶【7475】」、「発酵茶【6536】」、「発酵茶【6052】」などがあるが、濃度を上げて考えた場合、DPPH消去率が最も低濃度で80%となる「発酵茶【7146】」が最も優れた抗酸化活性を持つと判断できた。

### 5-2-4.考察

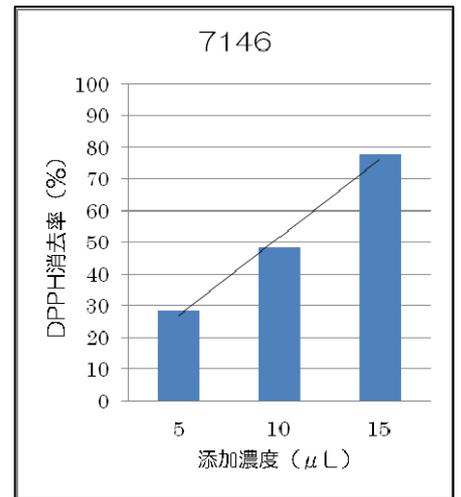
優れた抗酸化活性を持つヤーコンの頂葉は、発酵処理を施した場合発酵に用いる真菌の種類によって、その抗酸化活性が変化することが確認できた。IC<sub>50</sub>および濃度によるDPPH消去率をポイントにその抗酸化活性を比較した場合、最も抗酸化活性の優れているものは今回試作した8種類の発酵茶の中では、*Aspergillus oryzae*を発酵に用いた「発酵茶【7146】」であると考えられ、次点としては*Aspergillus niger*を発酵に用いた「発酵茶【7475】」、*Rhizopus oryzae*を発酵に用いた「発酵茶【6536】」などが挙げられる。この結果から、機能的評価に使用する試験試料として、細胞を用いた血圧に対する評価には最も抗酸化活性が強いと考えられる「発酵茶【7146】」を、臨床試験による抗アレルギー作用の評価には、継続摂取が必要であるため最も味の評価が良く、抗酸化活性も強い「発酵茶【7475】」を用いて評価を行う事とした。



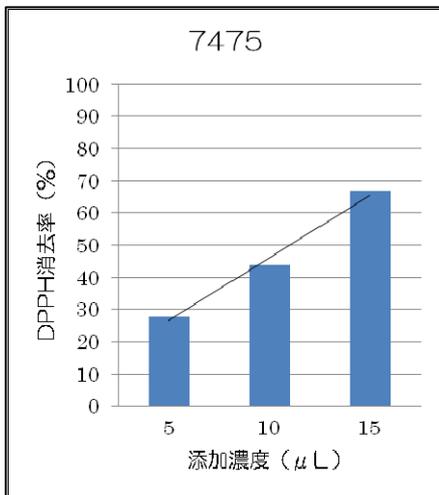
(図.5-2-1) 6052 の抗酸化能



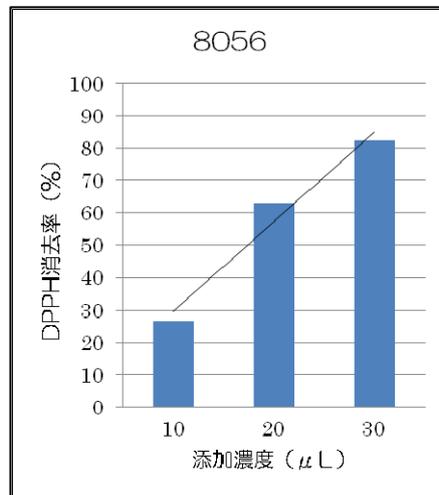
(図.5-2-2) 6536 の抗酸化能



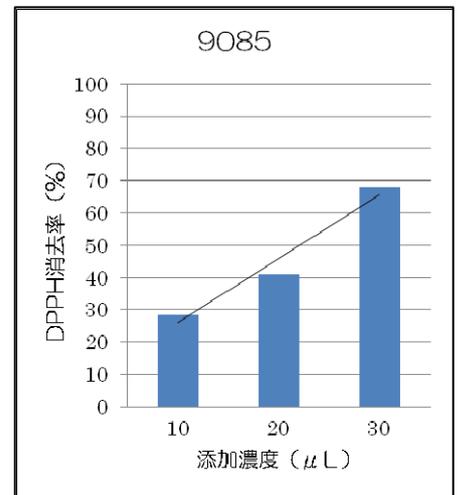
(図.5-2-3) 7146 の抗酸化能



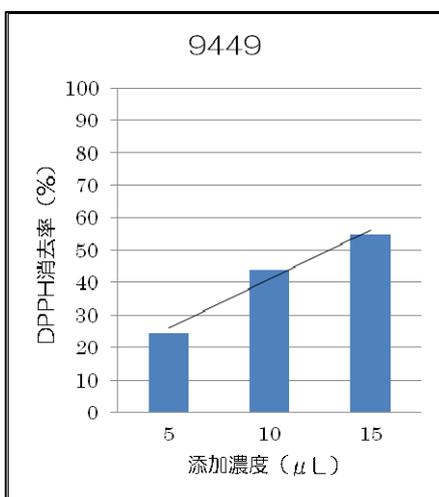
(図.5-2-4) 7475 の抗酸化能



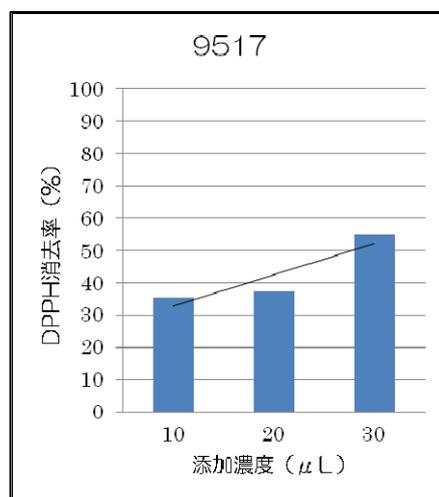
(図.5-2-5) 8056 の抗酸化能



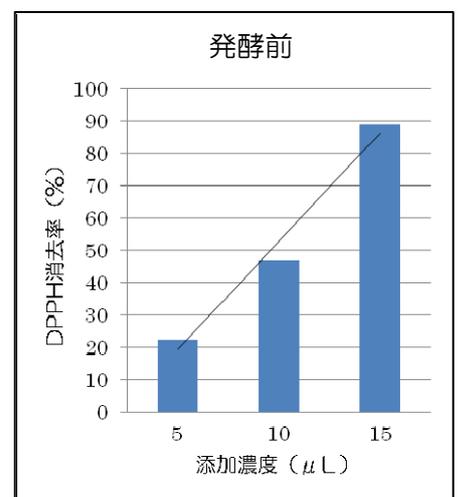
(図.5-2-6) 9085 の抗酸化能



(図.5-2-7) 9449 の抗酸化能



(図.5-2-8) 9517 の抗酸化能



(図.5-2-9) 発酵前の抗酸化能

## 6.発酵ヤーコン豆乳および発酵ヤーコン頂葉の安全性確認

### 6-1.発酵ヤーコン豆乳の急性毒性試験

#### 6-1-1.試験概要

ヤーコンと豆乳を同時発酵処理で製造した際の安全性の確認を行った。当初は、同時発酵による影響を確認することを計画していたが、確立した製造条件において発酵工程は、使用する菌（ホッカイドウ株）、発酵させる原料、発酵条件が従来の製法と変わらないため、急性毒性試験は従来製法で製造した際に確認したデータが適用できるものと考えた。

そのため本研究テーマでは、新製法で得られた発酵ヤーコン豆乳粉末を、機能性食品原料としての製品規格用に細菌検査および重金属の試験をおこなった。

#### 6-1-2.試験方法

##### ①一般生菌数

標準寒天培地法

##### ②大腸菌群

デソキシコレイト培地法

##### ③カビ毒（アフラトキシン）

高速液体クロマトグラフ-質量分析計（LC-MS/MS）法

##### ④重金属

- ・鉛                         : 酸分解-ICP-OES
- ・カドミウム             : 酸分解-ICP-OES
- ・水銀                     : 加熱気化-原子吸光光度法

##### ⑤ヒ素

酸分解-水素化 ICP-OES

#### 6-1-3.試験結果

新製法で製造した発酵ヤーコン豆乳粉末の分析結果を以下に示す。

##### ①一般生菌数

1,000 個/g 以下

##### ②大腸菌群

陰性

##### ③カビ毒（アフラトキシン）

検出無し

##### ④重金属

- ・鉛                         : 検出無し（定量下限値 0.1mg/kg）
- ・カドミウム             : 検出無し（定量下限値 0.01mg/kg）
- ・水銀                     : 検出無し（定量下限値 0.01mg/kg）

##### ⑤ヒ素

検出無し（定量下限値 0.1mg/kg）

#### 6-1-4.考察

試験結果から、機能性食品原料としての安全性については、問題がないものと考えられた。今後、新製法での試験製造を複数回行い、製品規格を作成する予定である。

## 6-2.各種発酵後のヤーコン頂葉の急性毒性試験

### 6-2-1.試験概要

発酵ヤーコン頂葉茶の安全性評価の一環として、毒性を検討した。また、食品の安全性の一環として製品規格用に細菌検査および重金属の試験を行った。

### 6-2-2.試験方法

#### (1) ラットにおける単回経口投与毒性試験

##### 【被験物質及び対照物質】

被験物質は、ヤーコンB種の頂葉を原料として *Aspergillus niger* を発酵に用いて製造した「発酵茶【7475】」を用いた。

被験物質は茶葉加工した後、高温多湿を避けて、ドライキャビ内で室温保存（許容範囲：温度10～30℃、湿度50%以下）した。対照物質は注射用水（㈱大塚製薬工場、ロット番号：1B78）を使用した、注射用水は検体調製室にて室温保存した。

##### 【使用動物】

5週齢のCri:CD(SD) (SPF)ラット、雌雄各15匹（発注数：雌雄各14匹）を日本チャールス・リバー(株)（日野飼育センター）より購入した。選択理由としては、「医薬品毒性試験法ガイドライン」では、単回投与毒性試験には通常げっ歯類のデータが必要とされており、本系統は背景データが豊富であるために選択した。動物は入荷から投与開始まで馴化した。ただし、入荷日を0日として7日までの期間は検疫を行った。

一般状態観察を毎日行い、体重を入荷1（入荷翌日）、3及び7日に測定した。動物は入荷日に耳パンチ法により個体識別した。各ケージには、入荷から群分け前までは試験番号、性別及び個体識別番号（耳パンチ番号）を記入したカードを、群分け後は試験番号、群、性別、動物番号、投与物質名、抽出比、投与経路、投与日、剖検日及び個体識別番号を記入したカードを付けた。

##### 【飼育条件】

飼育室は106動物室を使用した。動物は温度 $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ （実測値：19.7～22.7℃）、湿度 $50\pm 20\%$ （実測値：36.4～75.5%、試験中に1日（計75分間）最大湿度が逸脱した。）。換気回数13～17回/時間、照明時間8:00～20:00（明12時間、暗12時間）の環境下で、ステンレス製可動ラック（1790W×470D×1650H mm）に装着したステンレス製金網2連ケージの1区画（255W×185D×200H mm）に個別に収容した。

飼料はステンレス製固型飼料給餌器により固型飼料CRF-1（ロット番号：110607A3、オリエンタル酵母工業(株)）を絶食期間を除き、試験期間を通じて自由に与えた。飲料水はポリサルフォン製給水器（先管ステンレス製）により水道水を試験期間を通じ自由に与えた。

固型飼料CRF-1については、ロットごとに有害物質分析はEurofins Analytics K.K.で、栄養分析、微生物検査はオリエンタル酵母工業(株)で分析した成績書をいずれもオリエンタル酵母工業(株)より入手し、それぞれ標準操作手順書に定めた基準値の許容範囲内であることを確認した。器材はいずれも使用に先立ってオートクレーブで高圧蒸気滅菌し、汚物受け皿は週3回以上、給水器は週2回の頻度で交換した。

##### 【投与物質の調製】

被験物質5gをビーカーに入れ、95℃以上（実測値：98℃）に熱した注射用水500mLを入れ、2時間以上（実施時刻：7:58～10:05）静置して抽出した。

##### 【動物の選択及び群分け法】

群に割り付けた動物は、検疫・馴化期間中の一般状態観察において異常のなかった動物より、体重推移（入荷1日から7日）を基準に選択した。すなわち、検疫・馴化期間中の平均体重と体重増加量を、群分け対象動物全体における平均値と不偏分散によって規準化し、その値が小さい（群分け対象動物の特性からより近い）順に雌雄各10匹を選択した。選択した動物は馴化期間終了時（雌雄共に入荷7日）の体重による層別連続無作為化法により対照群及び被験物質群に雌雄各5匹ずつ割り付けた。群分け後の残余動物は試験から除外し、群分け実施日にエーテルによる過量麻酔で安楽死させた。投与時の週齢は雌雄とも6週齢、体重は雄が167～184g、雌が144～156gであった。

【投与経路及びその選択理由】

本被験物質は食品であるため、投与経路は経口投与とした。

【投与量及び群構成】

群構成、抽出比、投与液量、動物数を（表.6-2-1）に示す。本試験では、対照及び被験物質の計2群を設定した。

（表.6-2-1）投与量及び群構成

群	抽出比 (mL/袋)	投与液量 (mL/kg)	動物数 (雄)	動物数 (雌)
対照	-	50	5	5
被験物質	500	50	5	5

※対照群には注射用水を投与した

【投与回数、投与期間及びその選択理由】

投与期間は1日間とし、投与回数は2回とした。投与回数の選択理由としては、投与可能な最大量としたため対照及び被験物質群の50 mL/kgの液量を一度に投与することは、動物に対する負担が大きくなると考え、1/2の液量で2回の分割投与（25 mL/kg×2回）とした。

【投与液量、投与方法及びその選択理由】

投与液量は50 mL/kg（25 mL/kg×2回）とした。各動物の投与液量は投与日における体重を基準に、1回あたりの投与液量で小数第2位を四捨五入し小数第1位まで算出した。対照群は、被験物質群と同一の投与液量とした。

投与方法はラットへの経口投与方法として最も一般的で、確実な方法である経口ゾンデ（ディスポーザブル経口ゾンデ、有フチガミ器械）と注射筒（ディスポーザブルシリンジ、テルモ㈱）を用いて強制経口投与した。

【投与時間、観察期間、絶食及び給餌】

各動物は投与前日より約16時間以上（絶食実施時刻16:52～16:55）の絶食を施した。初回投与開始時間を9:00～13:00（実施時刻10:33～10:41）とし、2回目の投与は2時間以上の間隔を設けて投与した（実施時刻12:33～12:41）。最終投与後約4時間（給餌実施時刻16:43～16:52）より給餌した。観察期間は投与後14日間とした。

【検査項目】

i. 一般状態観察

投与日（投与0日）は投与前に1回（実施時刻9:50～10:00）。初回投与から最終投与後4時間（実施時刻10:33～16:41）まで継続的に観察した。投与後1日から毎日1回以上（実施時刻9:19～10:45）観察を行った。

なお、死亡例はなく、人道的エンドポイントを適用した動物も発現しなかった。

ii. 体重測定

投与日の投与直前及び投与後1、3、7、10及び14日にパーソナル電子天秤（EW-12Ki、㈱エー・アンド・デイ）を用いて、9:00～14:00（実施時刻9:39～10:00）に測定した。

iii. 病理解剖学的検査（剖検）

観察期間終了後の全生存例について、エーテル麻酔下で放血し安楽死させ、頭部及び胸腹部の器官・組織を観察した。

【統計処理】

観察期間中の死亡率から概略の致死量を求めた。

体重は各群で平均値及び標準偏差を算出した、有意差検定は対照群と被験物質群との間で行った。F検定により等分散性の検定を行い、等分散の場合はStudentのt検定を、不等分散の場合はAspin-Welchのt検定を行った、F検定では危険率5%とした。t検定では危険率5%及び1%とした。

## (2) ラットにおける 14 日間反復経口投与毒性試験

### 【被験物質及び対照物質】

被験物質 1：ヤーコン A 種（未発酵）

被験物質 2：ヤーコン A 種（未発酵・焙煎）

被験物質 3：ヤーコン B 種（未発酵）

被験物質 4：ヤーコン B 種（発酵 *Aspergillus niger*）

被験物質は試験期間を通じて室温保存した。

媒体として注射用水（大塚蒸留水、㈱大塚製薬工場、ロット番号：1C94）を使用した。

### 【使用動物】

5 週齢のラット〔CrI:CD(SD)(SPF)〕雄 31 匹（発注数：雄 30 匹）を日本チャールス・リバー（株）より入手した。動物は入荷日に耳パンチ法により個体識別した。動物は入荷後 1 週間を検疫・馴化期間とした。検疫・馴化期間中は一般状態の観察を毎日行い、体重はパーソナル電子天秤（EW-12Ki, ㈱エー・アンド・デイ、SOP コード：INS-010-05-3）を使用して、入荷 1（入荷翌日）、3 及び 7 日に測定した。

各ケージには、入荷から群分けまでは試験番号、性別及び個体識別番号（耳パンチ番号）を記入したカードを、群分け後は試験番号、投与物質、群、投与量、投与経路、個体識別番号、動物番号、投与期間、剖検日及び性別を記入したカードを付けた。

### 【飼育方法】

動物は温度  $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $50 \pm 20\%$ 、換気回数 13~17 回/時間、照明時間 8:00~20:00（明 12 時間、暗 12 時間）の環境下にある 108 動物室で飼育し、ステンレス製可動ラック（1790W×470D×1650H mm）に装着したステンレス製金網 2 連ケージの 1 区画（255 W×185D×200H mm）に個別に収容した。飼料はステンレス製固型飼料給餌器により固型飼料 CRF-1（オリエンタル酵母工業（株））を、試験期間を通じて絶食時を除き自由に与えた。飲料水はポリサルフォン製給水器（先管ステンレス製）により水道水を、試験期間を通じて自由に与えた。器材はいずれも使用に先立ってオートクレーブで高圧蒸気滅菌した。汚物受け皿（アルミ製）は 3 回以上/週、給水器は 2 回/週、給餌器及びその他の器材（汚物受け皿を除く）は、2 回/月の頻度で交換した。

### 【投与物質の調製】

被験物質 1 袋（内容物：約 2 g）をビーカーに入れ、 $95^{\circ}\text{C}$ 以上で熱した注射用水 200 mL を入れ、10 分間以上静置して抽出した後、室温付近に冷却した。対照群に投与する媒体は、購入したものをそのまま使用した。

### 【動物の選択及び群分け法】

検疫・馴化期間中の観察結果より、体重推移及び一般状態に異常のみられない動物を選択し、群分けに使用した。入荷 1 日から 6 日の体重推移を基準に、30 匹を選択した。すなわち、検疫・馴化期間中の平均体重（入荷 1 日と 6 日の体重の平均）と体重増加量を、それぞれの値の入荷動物全体における平均値と不偏分散によって規準化し、その値が小さい（全入荷動物の特性に最も近い）順に選択した。選択した動物は、入荷 6 日に測定した体重による層別連続無作為化法により各群に 6 匹ずつ割り付けた。なお、群分け後の残余動物については群分け日に試験から除外し、エーテルの過剰麻酔により安楽死させた。

### 【被験物質の投与経路及び投与条件の設定】

本被験物質は食品であるため、投与経路は経口投与とした。投与回数は 1 回/日、14 日間とした。投与量は 10 mg/kg/day とした。

### 【投与量及び群構成】

群構成、抽出比、投与液量、動物数を（表.6-2-2）に示す。本試験では、対照及び被験物質の計 5 群を設定した。

（表.6-2-2）投与量及び群構成

群	投与液量 (mL/kg/day)	動物数
対照	10	6
被験物質 1	10	6
被験物質 2	10	6
被験物質 3	10	6
被験物質 4	10	6

※対照群には注射用水を投与した

各動物に対する投与液量は、投与日における投与直前の体重を基準に、小数点第 2 位を四捨五入し、小数点第 1 位まで算出した。

### 【投与方法】

経口ゾンデ（ディスポーザブル経口ゾンデ、(有)フチガミ器械）と注射筒（ディスポーザブルシリンジ、テルモ(株)）を用いて強制経口投与した。

### 【試験装置の概要】

血糖値は血糖測定器（簡単測糖 G チェッカー、グンゼ(株)）を用いて測定した。

簡単測糖 G チェッカーに、G チップ（サイクリック GB センサー）をセットし、ラット尾静脈から得た血液を G チップに吸入させて測定した。

### 【検査項目】

#### i. 一般状態観察

投与開始日から観察期間終了日まで、一般状態を観察した。

#### ii. 体重測定

投与日の投与直前、投与 2、4 日に、パーソナル電子天秤（EW-12Ki, (株)エー・アンド・デイ、SOP コード：INS-010-05-3）を用いて測定した。

#### iii. 血糖値測定

投与日の投与直前に血糖値を測定した。

### ③製品規格用検査

#### i. 一般生菌数

標準寒天培地法

#### ii. 大腸菌群

デソキシコレイト培地法

#### iii. カビ毒（アフラトキシン）

高速液体クロマトグラフ-質量分析計（LC-MS/MS）法

#### iv. 重金属

- ・鉛 : 酸分解-ICP-OES
- ・カドミウム : 酸分解-ICP-OES
- ・水銀 : 加熱気化-原子吸光光度法

#### v. ビ素

酸分解-水素化 ICP-OES

### 6-2-3.試験結果

#### (1) ラットにおける単回経口投与毒性試験

発酵ヤーコン頂葉茶を50mL/kg まで投与しても、死亡例は認められなかった。

一般状態、体重推移及び病理解剖学的検査では、いずれも発酵ヤーコン頂葉茶投与による影響を示唆する変化は認められなかった。

以上の結果より、本試験条件下における発酵ヤーコン頂葉茶の単回経口投与での概略の致死量は雌雄共に50 mL/kg を超える量と推察された。

#### (2) ラットにおける 14 日間反復経口投与毒性試験

投与 14 日経過後の一般状態観察の結果では、各群全例とも死亡及び瀕死動物の発生はなく、一般状態の変化も認められなかった。体重測定も、被験物質投与群共に順調な推移を示した。

また、ヤーコンは血統上昇抑制作用が知られているが、血糖についても測定値に以上は低くなりすぎるなどの異常は見られなかった。

以上のことから、本試験条件下でヤーコン頂葉を原料としたヤーコン茶は、品種の違いや焙煎、発酵の有無にかかわらず、安全性は極めて高いものであると推察された。

#### (3) 製品規格用検査

分析結果を(表.6-2-3)に示す。この結果より健康茶としての安全性については、問題がないものと考えられた。今後、製品化に向けて試験製造を複数回行い、製品規格を作成する予定である。

	A 種 未発酵	A 種 未発酵・焙煎	B 種 未発酵	B 種 発酵 <i>Aspergillus niger</i>
i.一般生菌数	3,000 個/g 以下	1,000 個/g 以下	3,000 個/g 以下	3,000 個/g 以下
ii.大腸菌群	陰性	陰性	陰性	陰性
iii.カビ毒	検出無し	検出無し	検出無し	検出無し
iv.重金属 ・鉛 ・カドミウム ・総水銀	検出無し 検出無し 検出無し	検出無し 検出無し 検出無し	検出無し 検出無し 検出無し	検出無し 検出無し 検出無し
v.ヒ素	検出無し	検出無し	検出無し	検出無し

### 6-2-4.考察

発酵ヤーコン頂葉茶の安全性評価の一環として、6 週齢のCrI:CD(SD) (SPF)ラット雌雄に50 mL/kg の投与量で単回経口投与したときの毒性および、ラットに 14 日間反復経口投与したときの毒性を検討した。単回経口投与では、発酵ヤーコン頂葉茶を 50mL/kg まで投与しても死亡例は認められず、一般状態観察、体重推移及び病理解剖学的検査でも、いずれも発酵ヤーコン頂葉茶投与による影響を示唆する変化は認められなかった。

また、14 日間反復経口投与においても、一般状態観察の結果では各群全例とも死亡及び瀕死動物の発生はなく、一般状態の変化も認められなかった。体重測定でも、被験物質投与群共に順調な推移を示し、体重への影響はないものと予想される。

さらに健康茶として販売をする場合に食品衛生の観点から考えて、十分に衛生的な製品であると考えられた。

以上の結果から発酵ヤーコン頂葉茶投与の毒性影響を示唆する変化はなく、発酵ヤーコン頂葉茶をラット雌雄に単回経口投与した本試験条件下における概略の致死量は雌雄共に50mL/kgを超える量であると推察されたため、体重50kgのヒトで換算すると2,500mLに相当する。

実際に健康茶として製品化する場合は、今回試験に用いた抽出物の1/7濃度程度となる予定であるため、予定している濃度で計算すると、体重50kgのヒトで換算すると17.5 Lに相当する。

以上のことから、ヤーコン茶の安全性は極めて高いものであると考えられた。

## 7.発酵ヤーコン豆乳および発酵ヤーコン頂葉の機能性評価

豆乳とヤーコン芋を同時に発酵処理した発酵食品と、ヤーコン頂葉を各種の発酵処理した発酵頂葉について、含有ポリフェノールや抗酸化能のデータをもとに機能性を推定し、優れた機能性を有すると考えられるものについては、in vitro、in vivo 試験によって機能性評価を行った。

### 7-1.細胞を用いた免疫機能性の向上作用の評価

#### 7-1-1.試験概要

ヤーコン頂葉の熱水抽出物を摂取すると、花粉症の諸症状、特に鼻水やくしゃみ、目のかゆみなどが緩和される傾向は確認していたが、その作用機構がいかなるものなのか、また品種による機能性の違いがあるのかなどという点については、これまで明らかになってはいなかった。

そこで、本研究開発ではヤーコン A 種およびヤーコン B 種の発酵前の 2 品種と、発酵させたヤーコン B 種の 3 種について、これらを添加することによる KU812 細胞分化好塩基球のヒスタミン遊離抑制への効果を検討した。

#### 7-1-2.試験方法

KU812 細胞を IL-4 添加培地で培養することにより、好塩基球へ分化誘導し、分化した細胞を試験品含有の培地にて 24 時間培養した。

培養後、細胞を回収し、カルシウムイオノフォア試薬にて処理した後、上清を回収し、ELISA 法にてヒスタミンを定量した。

定量したヒスタミン量を対照群と比較することで試験品の持つヒスタミン遊離抑制への効果を検討した。

#### (1) 試験品および試験細胞・試薬の準備

##### ①試験品の調製

(表.7-1-1) に示す 3 種類の茶葉 5.0g に対し 500mL の蒸留水を沸騰させた熱湯 (100°C) をガラスビーカーに注ぎ、3 時間室温で放置した。放置後、濾紙 (ADVANTEC No.2) にてろ過を行い、試験試料 (原液) とした。使用は試験原液をろ過滅菌し使用した。調製した試験試料は直射日光を避け、室温にて保存した。

(表.7-1-1) 試験品の原料 3 種と調製後の試験品名

	原料名	試験品名
1	ヤーコンA種 頂葉乾燥茶葉	A
2	ヤーコンB種 頂葉乾燥茶葉	B
3	ヤーコンB種 頂葉発酵茶葉 (AHU7475使用) <i>Aspergillus niger</i>	7475

##### ②使用細胞

KU-812 細胞 (ヒト骨髓性白血病・好塩基球様)

- ・ DS ファーマバイオメディカル社
- ・ 培養条件、環境：37°C・CO<sub>2</sub> 5%濃度
- ・ 基礎培養液：10%FBS 含有RPMI1640 培地

##### ③Assay Kit

#### i. トリパンプルー溶液 (細胞数カウント用生細胞染色色素)

- ・ メーカー名 : ナカライテスク株式会社
- ・ Lot. No. : L9H6035

#### ii. Histamine EIA Kit

- ・ メーカー名 : Bertin pharma
- ・ Lot. No. : 0211

#### ④試薬類

##### i. カルシウムイオノフォア (A23187)

- ・メーカー名 : SIGMA
- ・Lot. No. : 048K2500
- ・使用終濃度 : 10  $\mu$ M

##### ii. IL-4

- ・メーカー名 : SIGMA
- ・Lot. No. : 128K1055
- ・使用終濃度 : 1nM

##### iii. Tyrode Buffer

- ・メーカー名 : SIGMA
- ・Lot. No. : 029K8304

##### iv. FBS

- ・メーカー名 : GIBCO
- ・Lot. No. : RNBB8002
- ・使用終濃度 : 10% (V/V)

##### v. トリパンブルー染色試薬

- ・メーカー名 : ナカライテスク
- ・Lot. No. : L9H6035
- ・使用終濃度 : 0.25% (PBS 希釈)

#### ⑤培地

##### RPMI1640

- ・メーカー名 : SIGMA
- ・Lot. No. : RNBB8002

#### (2) 細胞毒性確認

① KU-812 細胞を基礎培養し、必要量の細胞数を確保

↓

② KU-812 細胞をIL-4 (1nM) 添加10%FBS 含有RPMI1640 培地で培養し、好塩基球へ  
↓ 分化誘導

③ 試験品を10%FBS 含有RPMI1640 培地に添加し、公比5 倍で希釈系列を作成

↓

④ ③で作成した培地に $3 \times 10^3$  cell / mL / well に調整したKU812 細胞分化好塩基球を96 穴  
↓ マイクロプレートへ播種

⑤ 播種後、24 時間 (37°C・CO<sub>2</sub> 5%濃度) 培養

↓

⑥ 培養後、トリパンブルー染色液にて生細胞を染色

↓

⑦ セルカウンター (バイオラッド製) を用いて細胞生存率を測定

#### (3) ヒスタミン遊離抑制活性確認

① KU-812 細胞をIL-4 (500U/mL) 添加 10%FBS 含有 RPMI1640 培地で培養し、抗塩  
↓ 基球へ分化誘導

② 細胞毒性が認められない試験品の濃度から、公比5 倍で希釈系列 (最終濃度は $\times 1/100$ )  
↓ 10%FBS 含有RPMI1640 培地を作成

③ ②で作成した培地に、 $1.0 \times 10^6$  cell / mL / well に調整したKU812 細胞分化好塩基球を  
↓ 24 穴マイクロプレートへ播種

④ 播種後、24 時間 (37°C・CO<sub>2</sub> 5%濃度) 培養

↓

⑤ 培養後、細胞を回収し、Tyrode Buffer で洗浄

↓

⑥ 洗浄後、10  $\mu$ M カルシウムイオノフォアを加え、30 分間、37°Cでインキュベート

↓

⑦ インキュベート後、氷上にて反応を停止させ、培養上清を回収し、ELISA 法にてヒスタミン  
↓ 量を定量 (定量方法はHistamine EKISA Kit に従って行った)

⑧ 対照群 (試験品添加なし) と試験品添加群での産生ヒスタミン量を比較

↓

⑨ 反復数は3 回測定の3 反復行った。

(4) 統計処理

数値データの表記は平均値±標準誤差で示した。

ヒスタミン遊離抑制(%)は下式で算出を行った。

ヒスタミン遊離抑制(%)

$$= \{ (\text{試験品添加ヒスタミン量}) - (\text{カルシウムイオノフォア無添加ヒスタミン量}) \}$$

$$\div \{ (\text{試験品無添加ヒスタミン量}) - (\text{カルシウムイオノフォア無添加ヒスタミン量}) \} \times 100$$

統計処理は、遊離ヒスタミン濃度 (ng/mL)、ヒスタミン遊離抑制率 (%) を指標に各試験品間および試験品濃度間で実施した。ヒスタミン遊離濃度の検定はstudent-t 検定法、ヒスタミン遊離抑制率 (%) は、得られた数値を自然対数変換し、student-t 検定にて実施した危険率はいずれの場合も両側5%とし実施した。

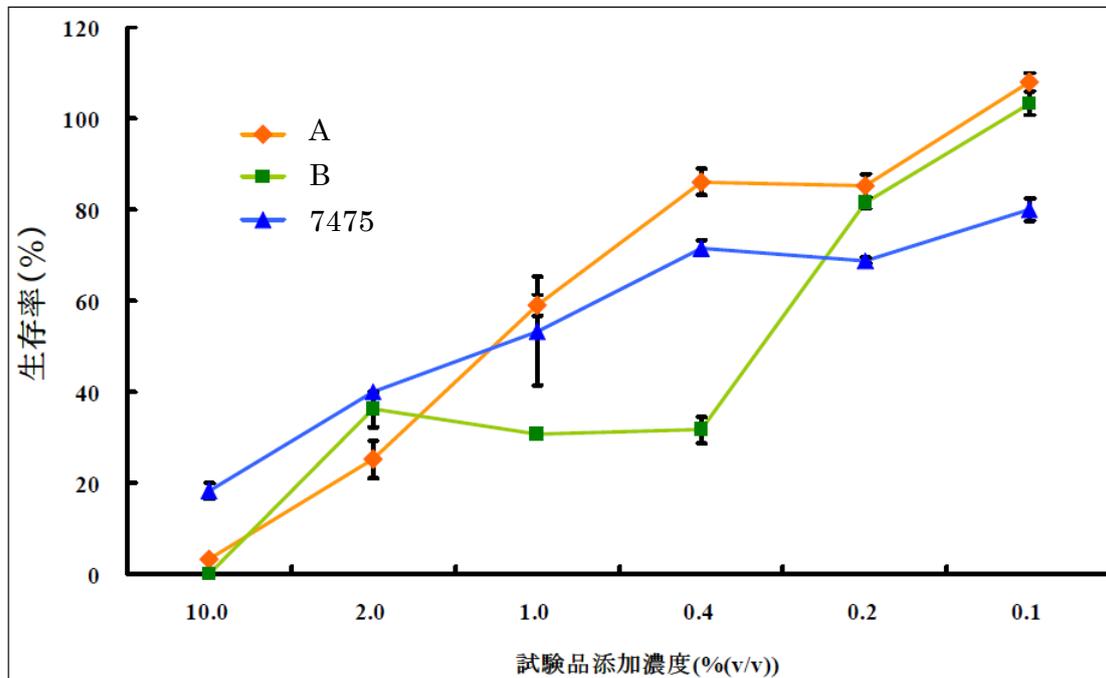
7-1-3.試験結果

(1) 細胞毒性試験結果

(表.7-1-2) および (図.7-1-1) に細胞毒性試験結果を示す。試験品A および試験品Bは0.2%以上で、細胞毒性が示された。また、試験品7475 では0.1%以上では細胞毒性が示された。この結果をもとに、試験品A および試験品Bは0.2%から、試験品7475 は0.1%を試験の初期濃度として (表.7-1-3) に示すように各検体の濃度表を作成した。

(表.7-1-2) 細胞毒性試験結果 (細胞生存率)

試験品添加濃度 (% (v/v))	10.0	2.0	1.0	0.4	0.2	0.1
試験品名						
A	3.20±0.50	25.15±4.15	58.95±2.25	86.10±2.90	85.20±2.60	107.97±1.99
B	0.00±0.00	36.15±3.85	30.70±0.00	31.65±2.95	81.50±1.20	107.97±1.99
7475	18.30±1.80	40.00±0.00	53.37±11.81	71.55±1.65	68.85±0.65	79.95±2.55



(図.7-1-1) 細胞毒性試験結果 (細胞生存率)

(表.7-1-3) 各試験品の濃度表

試験品名	濃度①	濃度②	濃度③	濃度④	濃度⑤	濃度⑥
Control						
公比	x1	x1/5	x1/10	x1/25	x1/50	x1/100
A	0.2%	0.04%	0.02%	0.008%	0.004%	0.002%
B	0.2%	0.04%	0.02%	0.008%	0.004%	0.002%
7475	0.1%	0.02%	0.01%	0.004%	0.002%	0.001%

## (2) ヒスタミン遊離抑制活性試験結果

(表.7-1-4)、(図.7-1-2、図.7-1-3)に遊離ヒスタミン濃度(ng/mL)を示す。また、(表.7-1-5)にヒスタミン遊離抑制率を示す。各濃度において、濃度依存的な遊離抑制は認められなかったが、試験品間に違いが認められた。試験品7475については、他の2試験品と有意な差が認められ、活性が高いことが示された。一方、試験品Aについては、設定濃度において、ヒスタミン遊離抑制は認められなかった。

(表.7-1-4) 各試験品の遊離ヒスタミン濃度 (ng/mL)

試験品添加濃度 (% (v/v))	0.20	0.04	0.02	0.008	0.004	0.002
試験品名						
A	71.18±1.51	70.54±1.59	70.87±1.49	72.11±0.84	71.39±1.18	68.18±0.96
B	63.06±0.81	65.51±0.88	67.10±1.61	66.22±0.55	67.57±0.92	67.28±0.77
無添加(cont.)	69.11±1.03	69.11±1.03	69.11±1.03	69.11±1.03	69.11±1.03	69.11±1.03

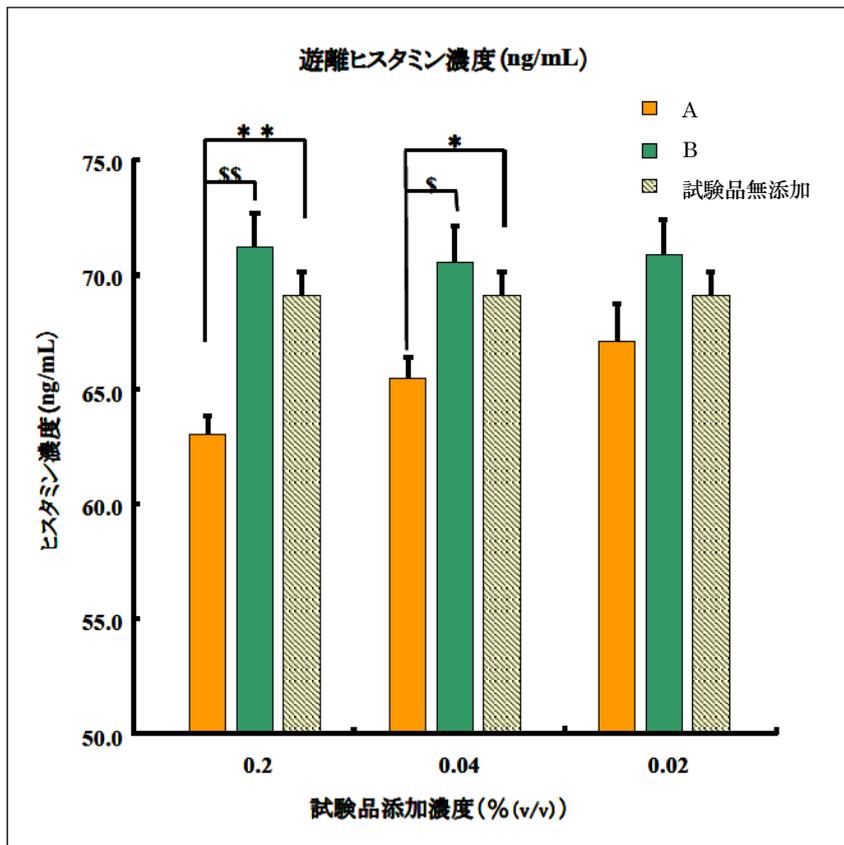
試験品添加濃度 (% (v/v))	0.10	0.02	0.01	0.004	0.002	0.001
試験品名						
7475	56.62±0.87	57.02±0.74	62.98±0.58	61.33±1.08	59.07±1.47	60.44±1.21
無添加(cont.)	69.11±1.03	69.11±1.03	69.11±1.03	69.11±1.03	69.11±1.03	69.11±1.03

(表.7-1-4) 各試験品のヒスタミン遊離抑制率 (%)

試験品添加濃度 (% (v/v))	0.20	0.04	0.02	0.008	0.004	0.002
試験品名						
A	102.91±0.69	101.98±0.82	102.49±0.86	104.39±0.86	103.31±1.04	98.69±0.70
B	91.27±0.59	94.81±0.33	96.99±1.00	95.92±1.02	97.79±0.52	97.42±0.81

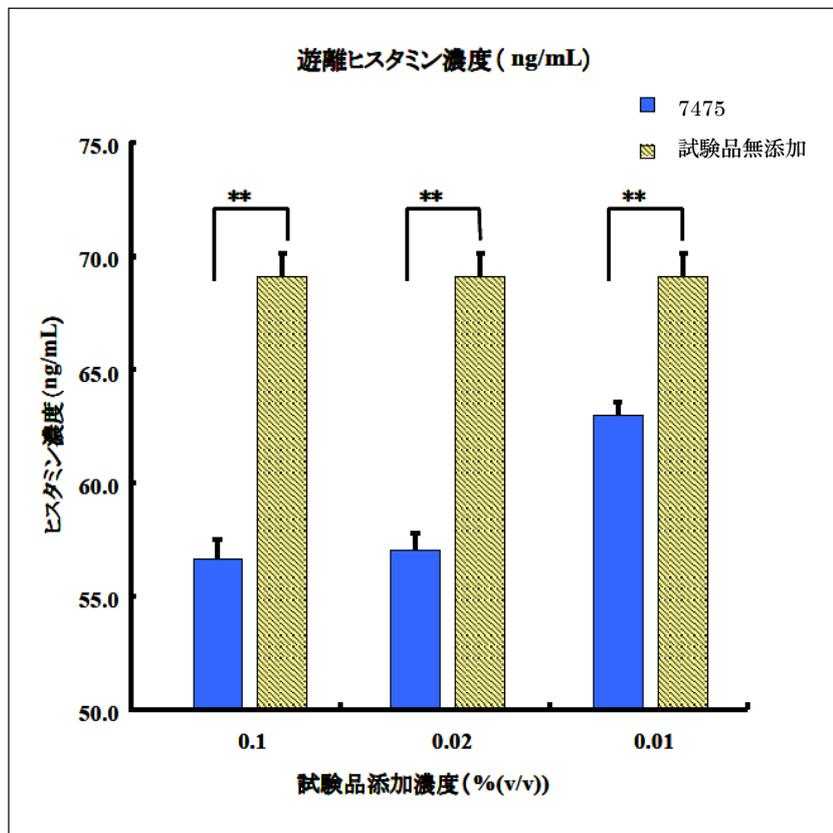
  

試験品添加濃度 (% (v/v))	0.20	0.04	0.02	0.008	0.004	0.002
試験品名						
7475	81.93±0.44	82.55±0.78	91.28±1.55	88.76±1.03	85.40±1.19	87.42±0.65



n=9, bar ; 標準誤差

(図.7-1-2) 遊離ヒスタミン濃度 (A 及び B)



n=9, bar ; 標準誤差

(図.7-1-3) 遊離ヒスタミン濃度 (7475)

#### 7-1-4.考察

KU812 細胞を用いて、カルシウムイオノフォアによるヒスタミン遊離に対する抑制効果を測定した。その結果、試験品7475 の0.1%濃度で最大18.07%、0.01%濃度で9.72%のヒスタミン遊離抑制効果が認められた。

また、試験品Bに0.2%濃度で最大8.73%のヒスタミン遊離抑制効果が認められたことから、僅かではあるが抑制効果があるものと考えられたが、試験品Aでは抑制効果は認められなかった。

以上の結果から、試験品7475 は抗炎症および抗アレルギー効果を有する可能性が示唆された。試験品7475 をKU812 細胞分化好塩基球と培養をすることで遊離ヒスタミン濃度が試験品無添加処理と比較し低値を示すことから、抑制メカニズムの可能性の1 つとして、試験品7475 に含まれる、発酵による何かしらのアグリコンがIgE 受容体結合を競合的に阻害する作用を有する事が考えられた。

また、これまでの総ポリフェノール量分析データなどから考えると、総ポリフェノールがヤーコンA種の半分以下であったヤーコンB種の方にヒスタミン遊離抑制効果が確認されていることから、A種に少なく、B種に多く含まれている特定のポリフェノールが存在する可能性があるとも考えられた。

### 7-2.整腸作用の評価

#### 7-2-1.試験概要

ヤーコンの塊根部分（芋）はフラクトオリゴ糖（FOS）を豊富に含むことが知られているが、これまでフラクトオリゴ糖そのものとヤーコン芋の乾燥粉末との機能性を比較検証したデータはなかったため、本研究開発ではヤーコン芋の乾燥粉末を継続摂取した際のFOS との機能性比較を行い、そのデータをもとに発酵ヤーコン豆乳粉末を主原料とした『発酵ヤーコン青汁』を試作して、臨床試験による整腸作用の評価を行った。

#### 7-2-2.試験方法

##### (1) ヤーコン芋乾燥粉末とフラクトオリゴ糖の機能性比較

###### ①分析試料と使用薬品

ヤーコン芋乾燥粉末は、北海道札幌市で無農薬栽培したヤーコン芋を、収穫後水洗し、風乾、皮むき、スライスし、凍結乾燥したものを、コーヒー豆粉砕機を用い、1 mm のふるいに通る大きさまで粉砕して分析試料とした。得られたヤーコン芋乾燥粉末は室温でシリカゲルの入った、密封容器にて保存した。

食餌に加えられた FOS 量を計算する際に消化可能なフラクションは考慮した。FOS は 1-ケトース (GF2)、ニストース (GF3)、と 1-β-フルクトフラノシルニストース (GF4) から成り、本試験では和光純薬社製の試薬を用いた。

###### ②ヤーコン粉末のレジスタントスターチと消化性デンプンの分析

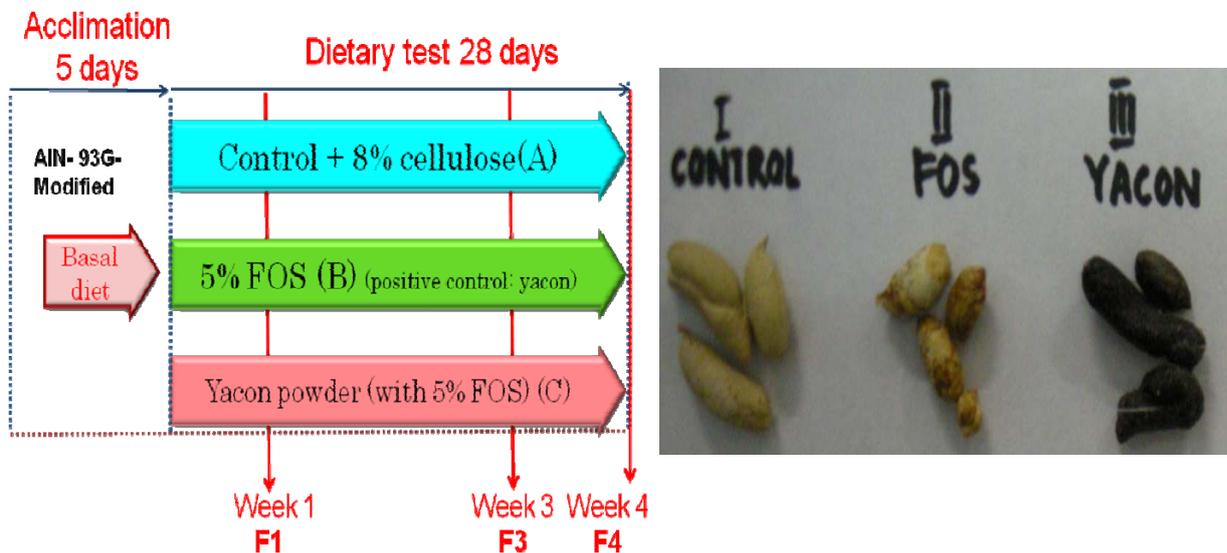
用いたサンプルの組成、すなわちタンパク質、脂質、炭水化物、水分、食物繊維そして灰分の近似分析は AOAC の手順を用いて行った。レジスタントスターチと消化可能なデンプンの定量には Megazyme International Ireland Ltd (Bray Business Park, Bray, Wicklow, Ireland) 社製の Resistant Starch Assay Kit (K-RSTAR) を用いて、その手順書通りに分析した。

###### ③試験動物と食餌

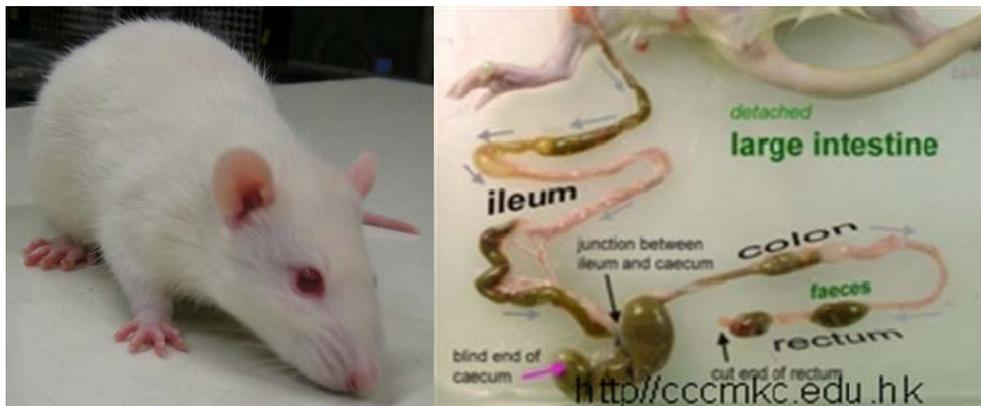
試験に用いたラットは、4 週齢で初期体重 70~90g の Sprague-Dawley (SD) 系雄ラット 30 匹で SLC (Hanamatsu, Japan) から購入した。ラットは、ステンレスメッシュケージで、室温 22±2℃、湿度 40~60%、明暗周期 12 時間の条件下で飼育した。5 日間の予備飼育後、ラットはランダムなデザインのブロックを用いて、体重による有意差が初めにできないように体重により 5 つのグループに分けた。体重と摂食量は毎日測定した。コントロール群は、8%セルロースを含む低食物繊維食を与え、試験群はそこに 5%FOS と 5%FOS 相当のヤーコン粉末が添加された食餌を与えた。飼料と水は自由に摂取できるように与えられ、毎日体重と摂食量を測定した。試験動物の取り扱いについては、倫理委員会のガイドラインに従って行った。

#### ④糞便サンプルの採取

糞便サンプルは1週目、3週目、そして解剖日前日に採取（図.7-2-1）し、後の分析のため-80℃で保存した。摂食試験の最後にラットは麻酔下で致死させた。盲腸と結腸は脂肪や腸間膜組織を丁寧に取り除き解剖し（図.7-2-2）、重量と長さを測定した後、液体窒素で凍らせ、後の分析のため-80℃で保存した。



（図.7-2-1） 採取した糞便サンプル



（図.7-2-2） 盲腸と結腸

#### ⑤血清脂質分析

試験期間の最後に、抗凝固剤を用いず血液サンプルをチューブに採取した。2時間室温で静置させたあと、1,500rpmで3分遠心分離し、血清を得た。血清中のコレステロール、トリグリセリドとHDL濃度は市販の試薬（Wako, Japan）を用いて酵素的に測定した。

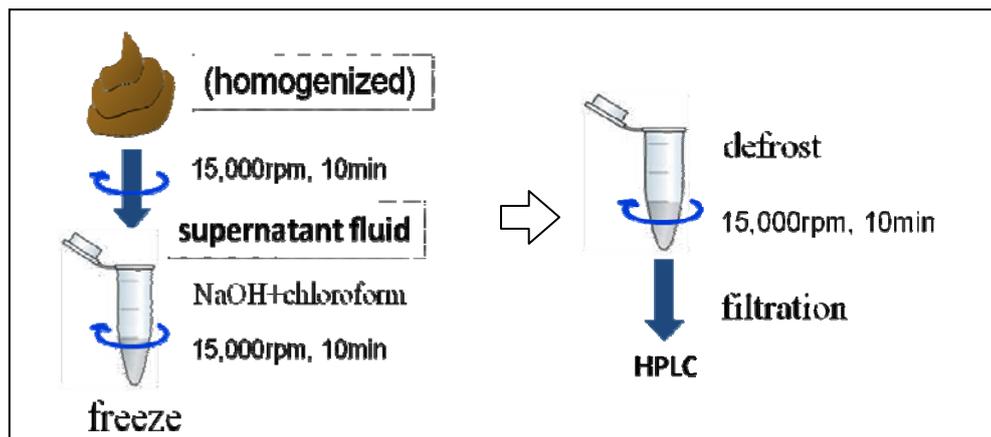
#### ⑥短鎖脂肪酸とpH

糞便と盲腸内容物のSCFA（短鎖脂肪酸）の分析にはHPLCを用いた。糞便サンプルは蒸留水により、希釈して十分に均一化した。遠心分離（15,000rpm, 4℃, 10分）の後、上清500μLに、100μLの50mM NaOHと500μLのクロロホルムを加えてSCFAを抽出した。クロロホルムを加える前にNaOHで糞便内容物を中和することで、クロロホルムが個々の標的有機酸を抽出してしまうのを防いだ。

15,000rpmで10分遠心分離をしたのち、上層の450μLを採取し、一晩-80℃で保存した。サンプルを解凍し、15,000rpmで10分遠心分離し、水層（200μL）をメンブレンフィルター（Cellulose Acetate; 東洋濾紙株式会社）に通して濾過した（図.7-2-3）。

8種の有機酸（スクシニル酸、乳酸、酢酸、プロピオン酸、i-ブチル酸、n-ブチル酸、i-吉草酸、n-吉草酸）は二つの Shodex RSpax KC-811 カラム（8 mm, i.d. ×30 cm long; 昭和電工）、Shodex RSpax KC-G（昭和電工）、多重波長検出器（MD-1510; Jasco）を備え付けた HPLC により測定した。移動相には、3 mM HCl、5%のアセトニトリル（51ml/L）を使用し、流速は 1.0 ml/L、カラムの温度は 55°C に設定した。ポストカラム反応溶液は、0.2 mM BTB（プロモチモールブルー 125 ml/L をエタノールに溶かした）と、1.5 mM Na<sub>2</sub>HP O<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O（5.3 g/L）を用い、反応溶液の流速は 1.5 ml/分に設定した。移動相は PTFE 0.5 μL、47mm（ADVANTEC）で濾過し、反応溶液は Mixed Cellulose Ester 0.45 μL、47 mm（ADVANTEC）で濾過した。

糞便サンプルは 10 倍量の蒸留水で希釈し、ビーズショッカー（2,500 rpm, 4°C, 30 秒）を用い均一化した。懸濁液の pH は ISFET pH meter KS701（Shindengen Electric Manufacturing Co., Ltd., Tokyo, Japan）を用いて測定した。



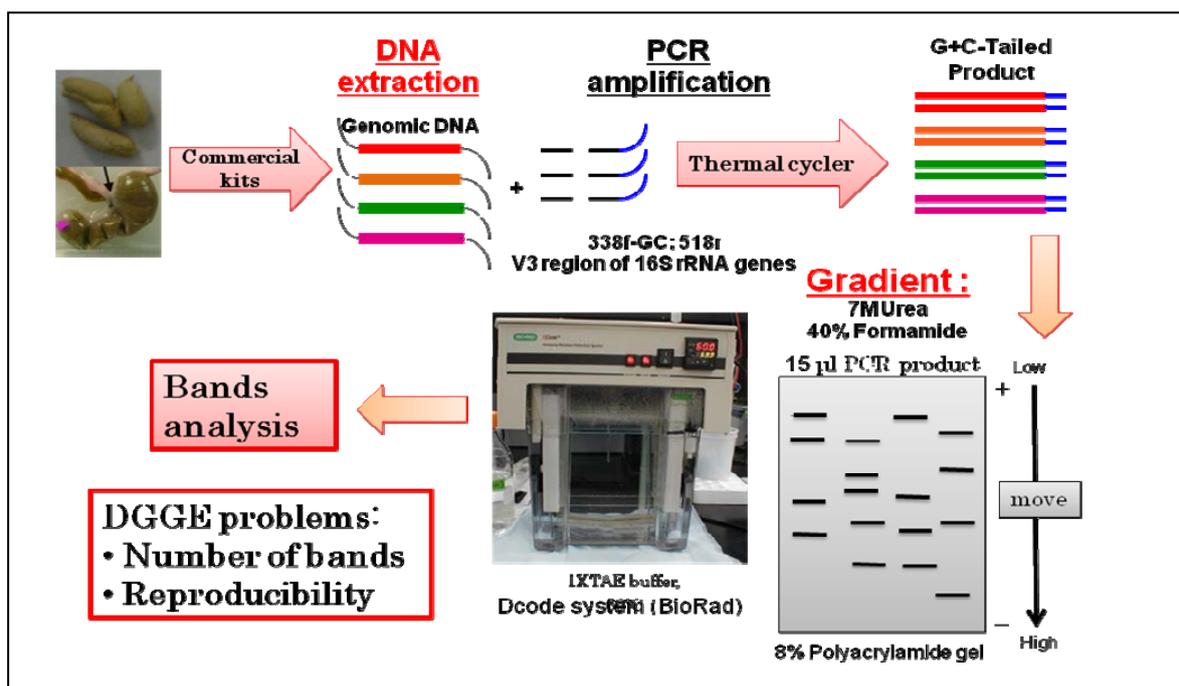
(図.7-2-3) 糞便サンプルの調製法

⑦統計的分析

全データは標準偏差を利用して分析した。試験グループ間の有意差は t 検定により定めた。p<0.05 で有意とみなした。

⑧微生物コミュニティの分析

微生物コミュニティの分析には、PCR-DGGE 法を用いた。分析方法の詳細およびフローの概要図（図.7-2-4）を以下に示す。



(図.7-2-4) PCR-DGGE 法による微生物コミュニティ分析の概要図

## (2) 発酵ヤーコン青汁の試作

本研究開発で製造した発酵ヤーコン豆乳粉末をベースとして『発酵ヤーコン青汁』を試作した。発酵ヤーコン豆乳粉末の機能性は継続摂取による腸内環境改善にあるため、継続して無理なく摂取することができるように“美味しさ”を重視したレシピを目指した試作を行った。

現在の青汁市場においては、美味しさを強調した製品が主流となっており、甘味成分を原材料に加えているものが市場を獲得している。発酵ヤーコン豆乳粉末は FOS を多く含んでいるため、甘味成分を添加することなく“美味しい”レシピとすることが可能である点で優位性を持っている。本研究開発では、1日6gの発酵ヤーコン豆乳粉末を無理なく摂取できる青汁レシピを検討した。

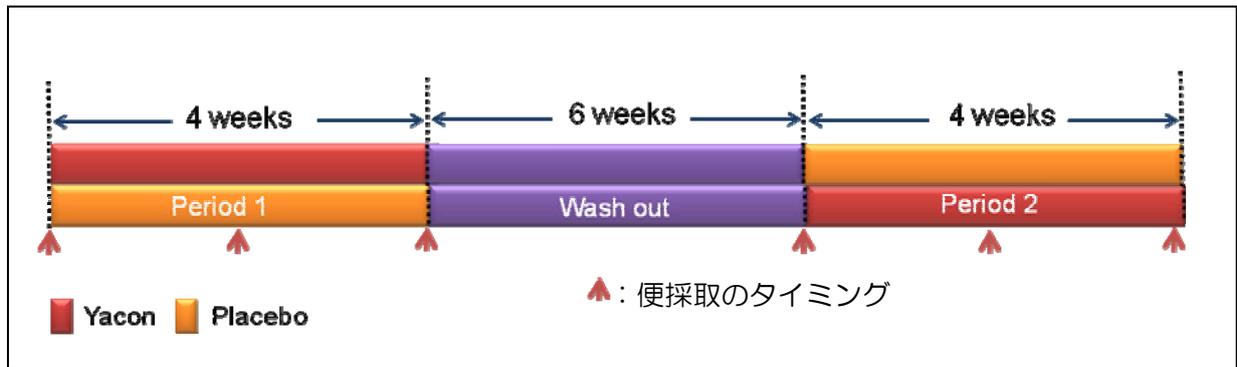
## (3) 発酵ヤーコン青汁の整腸作用検証

試作した『発酵ヤーコン青汁』を1日2包(計10g)、便秘気味の12名の男女(28歳~65歳)に4週間摂取させて、摂取前、摂取開始から2週間後、摂取開始から4週間後に便を採取し、PCR-DGGE法による微生物コミュニティの分析、便に含まれる有機酸の量を測定し、『発酵ヤーコン青汁』の整腸作用を評価した。

評価方法は、ヤーコン芋乾燥粉末とフラクトオリゴ糖の機能性比較の際と同様の手法を用いた。

試験の方法として、被験者12名を6名ずつ無作為に2群にわけて、Yacon群(発酵ヤーコン青汁摂取)とPlacebo群とし、4週間継続摂取させた後、両群ともに6週間Wash out期間を設け、それぞれ摂取する青汁を交換して4週間摂取させ、(図.7-2-5)に示すタイミングで便を採取して腸内環境の変化を摂取前後で比較・評価することで機能性を判断した。

また、排便の回数を毎日記録し、排便回数に対する影響についても評価した。

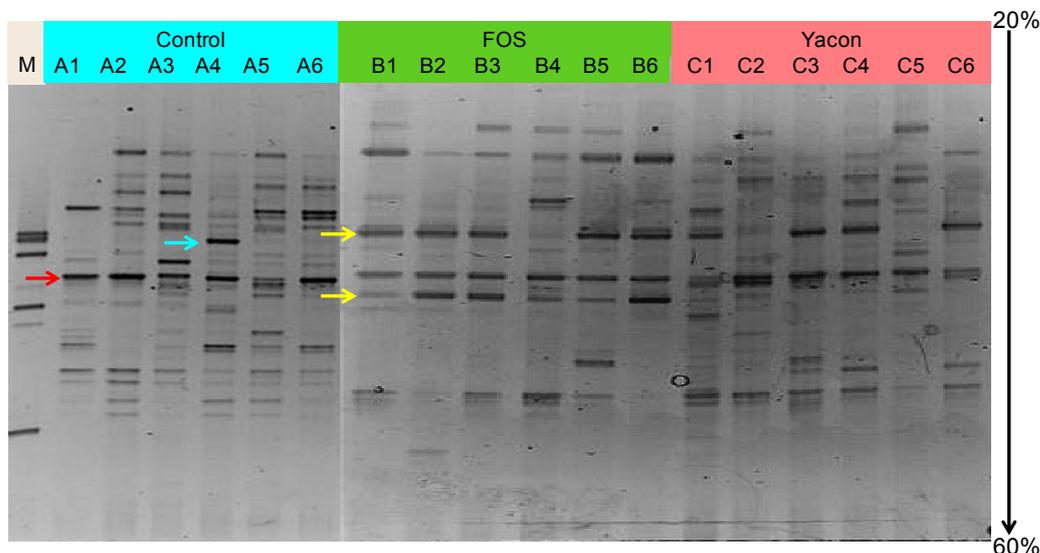


(図.7-2-5) 試験スケジュールと便採取のタイミング

## 7-2-3.試験結果

### (1) ヤーコン芋乾燥粉末とフラクトオリゴ糖の機能性比較

実験に用いたラットは、実験区1つにつき6匹を用いた。対象区、FOS摂取区、ヤーコン摂取区と各6匹の糞便内の微生物叢の違いについてDGGE法を用いて調べた(図.7-2-6)。



(図.7-2-6) 対象区及び2つの実験区のラット糞便内容物に含まれる微生物

(図.7-2-6) に示したゲルにおいて対象区 (Control) の A1 から A6 のレーンは、6匹それぞれのラットの糞便内細菌叢を示している。多数のバンドが現れているが、それぞれのバンドが異なる GC 含量を持った微生物を表している。図の上の方から DNA を電気泳動しており、上の方に止まっているバンドは、GC 含量が低い微生物を、より下方まで流れているバンドは、より GC 含量の高い微生物が作るバンドである。

対象区では、中程より上方により多くのバンドが現れている。またバンドの総数も多い。一方、FOS 摂取区およびヤーコン摂取区では、バンドの総数はやや少なくなり、さらに下方のより長く電気泳動されたバンドがはっきりと現れてきている。

対象区に比べてバンド総数が少なくなったということは、菌のバリエーションがやや減少して、一方で GC 含量の高い菌が増殖してきたことを示している。

それぞれのバンドの高さを比較してみると、ゲル中程に赤色の矢印で示したバンドは、対象区だけでなく2つの実験区にも共通に現れているように見える。食事の状況に影響されず存在している腸内細菌のように見える。もちろん高さが同じだからといって同じ菌と言うわけではないので、それぞれのゲルを小さな刃物で切り出して、抽出して、それをサンプルとして DNA 塩基配列を決定して、同じものかどうかを知ることができる。

2つの黄色矢印で示した2種類のバンドは、対象区には無く、FOS 摂取区とヤーコン摂取区に高頻度で現れている。食事の違いで明確な変化が出ている。一方、空色の矢印で示したバンドは、対象区のラットの中でも1頭にだけ現れており、この個体特有の菌であるといえる。

## (2) 発酵ヤーコン青汁の試作

本研究開発で製造した発酵ヤーコン豆乳粉末をベースとして『発酵ヤーコン青汁』を試作した。発酵ヤーコン豆乳粉末を1日6g摂取できる製品を想定し、大麦若葉、キダチアロエ、明日葉を加えて1包5g入りの粉末青汁とした(図.7-2-7)。使用した原材料は(表.7-2-1)の通り。



(図.7-2-7) 試作した発酵ヤーコン青汁

(表.7-2-1) 試作した発酵ヤーコン青汁の主原料

主原料名
発酵ヤーコン豆乳乾燥粉末
大麦若葉乾燥粉末
キダチアロエ乾燥粉末
明日葉乾燥粉末

また、機能性評価試験実施のため、プラセボ食品として発酵ヤーコン豆乳乾燥粉末を大豆粉末に変更したプラセボ青汁の試作も並行して行った(図.7-2-8)。配合比は(表.7-2-2)の通り



(図.7-2-8) 試作したプラセボ青汁

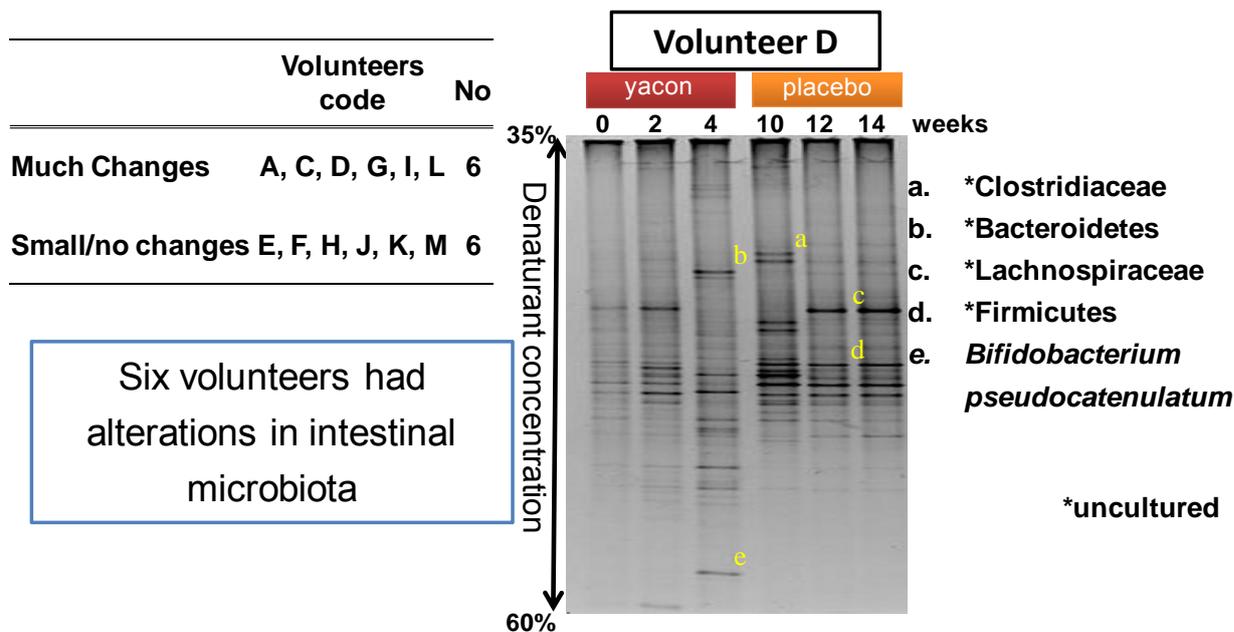
(表.7-2-2) 試作したプラセボ青汁の主原料

主原料名
大豆粉末
大麦若葉乾燥粉末
キダチアロエ乾燥粉末
明日葉乾燥粉末

## (3) 発酵ヤーコン青汁の整腸作用検証

ヒト12人にヤーコン青汁を摂取した期間とプラセボを摂取した期間においてその差をまとめたところ、DGGE法で得られるバンドパターンが大きく変化したのは半数の6人で、残りの6人は変化が比較的小さかった。

大きく変化したグループから一人の変化例を(図.7-2-9)で示した。プラセボ区の時期においては多くのバンドが見られ、ゲルの上の方によりはっきりしたバンドが観察される。即ち GC 含量が低い菌がより多く生育していることを意味している。ヤーコン摂取期間では、より GC 含量の高い菌が増加しており、しかも摂取4週間目で顕著にその傾向が観察された。それぞれのバンドの一部は切り出して DNA 塩基配列を調べて、その情報から可能性の高い菌属名を示した。



(図.7-2-9) ヤーコン発酵青汁によるバンドパターンの変化例

また、9人の被験者における糞便中の有機酸の種類と濃度を分析した結果、ヤーコン発酵青汁を摂取した場合、糞便中の有機酸量は2倍以上に増加していた。それに伴って当然のように便中 pH も優位に下がってきて pH6 台となり良い状況へと改善されている。9人の中の差も少なく、どの人でも変化が起きていることが明瞭に解った。

#### 7-2-4.考察

ラットにおいてもヒトにおいてもヤーコン芋およびヤーコン芋を活用した発酵ヤーコン豆乳粉末の摂取は、腸内発酵を活発にして腸内において有機酸生成を増大させ、pH を下げてより健康によい状況を作り出した。摂取期間も毎日連続して4週間を続けることが効果をより明確にする方法であることも明らかになった。

本研究によって明らかになったデータをもとに、最終的な製品化、あるいは発酵豆乳ヤーコン粉末の機能性食品原料化に向けた製品開発を進めていく予定である。

### 7-3.その他の機能性評価 ①（血圧に対する機能性評価）

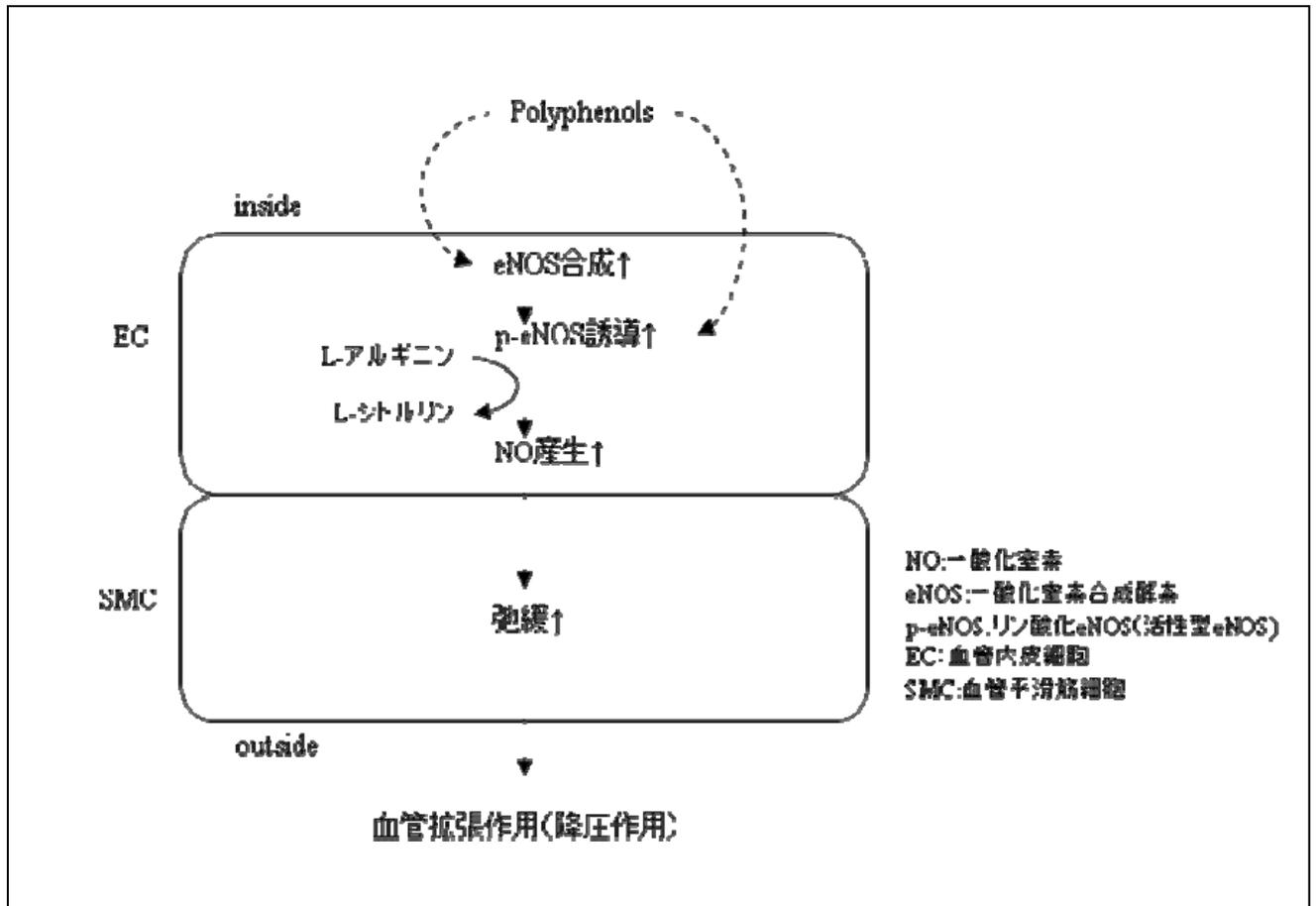
#### 7-3-1.試験概要

NO（一酸化窒素）は血管の平滑筋を弛緩させる作用があり、それによって動脈を拡張させ血流量を増やす働きがあることが知られている。また、NOは血球が血管壁に接着するのを抑制したり、血管の肥厚抑制、悪玉コレステロール（LDL）の酸化を抑制することで動脈硬化予防抑制にも重要な働きをしていることが知られている。体内に吸収されたポリフェノールの中には、アルギニンからNOを合成する酵素(eNOS)を活性化するシグナルとなりNO産生を促進するものが知られている。

（図.7-3-1）

また、一部のポリフェノールにはeNOSの量を増やすこと（タンパク合成）も知られている。

ヤーコン頂葉を用いた健康茶には、血圧の安定化等の機能性があることがこれまでの研究の中で明らかになっており、ポリフェノールも豊富に含まれる素材であることから、今回、培養血管内皮細胞を用いてeNOSの検出方法を検討し、その評価系を用いてヤーコン素材を評価することで、ヤーコン頂葉のeNOS誘導活性を評価した。



（図.7-3-1） eNOS 誘導と血管拡張作用の関係

## 7-3-2.試験方法

### (1) 培養細胞を用いたウエスタンブロッティングによる eNOS 検出条件の検討

#### ①正常ヒト血管内皮細胞 (HUVEC) の培養



【条件】 細胞：KURABO 社および BD 社 HUVEC  
培地：HuMedia (2%FBS 含有)  
コンフルエント後、刺激開始

【播種】 予め HuMedia 1.5ml を入れておいた 6well プレートに 0.5ml ずつ細胞液を添加  
コラーゲンコートした 6well プレート×9 枚に播種し、30℃・5%CO<sub>2</sub> 下にて培養  
(final 5.5×10<sup>4</sup> cells/well)

【刺激】 4 日後 ⇒サブコンフルエントに達したことを確認  
↓ 培地を除去し、PBS にて wash  
↓ PBS を除去し、新しい培地 (FBS 有無) を 1.5 mL/well ずつ添加  
⇒各濃度の被験物質に含有培地を 0.5 mL/well ずつ添加し、刺激スタート  
⇒24hr 後、サンプル回収 (24hr 刺激)  
⇒48hr 後、サンプル回収 (48hr 刺激)  
⇒72hr 後、サンプル回収 (72hr 刺激)  
⇒終了

#### ②株化血管内皮細胞 (EA.hy926) の培養



【条件】 細胞：EA.hy926  
培地：High Glucose DMEM (10% FBS 含有)  
コンフルエント後、刺激開始

【播種】 6well plate に 0.5 mL/well 添加。  
プレートを水平に揺らして細胞を均一に分散させた。  
6well plate x 7 枚 (コラーゲンコートなし)  
1.1×10<sup>5</sup> cells/well

【刺激】 4 日後 ⇒サブコンフルエントに達したことを確認  
↓ 培地を除去し、PBS にて wash  
↓ PBS を除去し、新しい培地 (FBS 有無) を 1.5 mL/well ずつ添加  
⇒各濃度の被験物質に含有培地を 0.5 mL/well ずつ添加し、刺激スタート  
⇒24hr 後、サンプル回収 (24hr 刺激)、または刺激培地交換  
⇒48hr 後、サンプル回収 (48hr 刺激)、または刺激培地交換  
⇒72hr 後、サンプル回収 (72hr 刺激)  
⇒終了

### ③細胞からのタンパク質の抽出

【細胞回収】 ⇒培地を抜き取り、氷冷した PBS で 2 回洗浄

↓  
〈以下氷上操作〉

⇒Lysis buffer 添加後 15min 静置

⇒セルスクレーパーで細胞を回収

⇒ソニケーション 30min、ボルテックス 3 回、遠心 15,000rpm で 20min

⇒測定時まで-80℃で保存

#### 【試薬組成】

Lysis buffer	
20mM	Tris-HCL (pH 7.5)
150mM	NaCl
10mM	NaPPi (sodium pyrophosphate)
20mM	NaF
10 $\mu$ M	オカダ酸
2mM	オルトバナジウム酸
1%	Triton X-100
	protease inhibitor Mix

### ④電気泳動およびウエスタンブロットティング

#### SDS-PAGE

↓ 転写 (ブロットティング)

↓ ブロッキング (3%BSA)

↓ 1hr

↓ 一次抗体溶液

↓ over night

↓ 二次抗体溶液

↓ 1hr

↓ ECL (発色)

ゲルアナライザー測定 (eNOS/  $\beta$ -tubulin)

#### 【電気泳動 (SDS-PAGE)】

eNOS 検出 泳動槽: CompactPAGE-twin (ATTO)

ゲル: Tris-Glycine gel (7.5%、6x6cm)

泳動条件: 2gel (30min)

アプライ量: 1.5  $\mu$ g protein/4  $\mu$ L

#### 【ブロットティング (セミドライ)】

Trans Buffer: Tris-Glycine Buffer (MeOH 10%)

転写条件: 145mA 定電流 面積 x 2mA x 2枚 (切り上げ)

250V limit

300W limit

#### 【抗体】

・一次抗体 Mouse anti-eNOS 1 : 1000 (20  $\mu$ L a.b./20mL)  
Mouse anti- $\beta$ -tubulin 1 : 20000 (1  $\mu$ L a.b./20mL)

・二次抗体 eNOS anti-mouse IgG-HRP 1 : 5000 (4  $\mu$ L a.b./20mL)  
 $\beta$ -tubulin anti-mouse IgG-HRP 1 : 40000 (0.5  $\mu$ L a.b./20mL)

**【検出】**

反応試薬：ECL prime

ATTO ゲル：ATTO ゲルを転写したメンブレン（6x6cm）を 2 等分した場合、500  $\mu$ L/枚

反応時間：5min

**(2) ヤーコンエキスの調製と細胞毒性の確認による添加量の検討****①ヤーコン素材の抽出液の調製****【抽出原料】** ①ヤーコン B 種 乾燥頂葉

②ヤーコン A 種 乾燥頂葉

③発酵ヤーコン A 種 乾燥頂葉 (AHU7146)

④発酵ヤーコン B 種 乾燥頂葉 (AHU7146)

**【調製方法】**

各抽出原料を 2g ずつ 100mL 三角フラスコに計り取る

↓ 水 60mL

↓ 100°C、1hr

↓ 中身を 50mL 遠沈管に移し取り、遠心分離 (3,000rpm、30min)

↓ 5A 125mm ろ紙でろ過し、200mL ナスフラスコに移す

↓ 凍結乾燥機で凍結乾燥

各種抽出物を得る

**【サンプル収量】 (表.7-3-1)**

	サンプル名	重量
①	ヤーコン B 種 乾燥頂葉抽出物	0.4939g
②	ヤーコン A 種 乾燥頂葉抽出物	0.7291g
③	発酵ヤーコン A 種 乾燥頂葉抽出物	0.4185g
④	発酵ヤーコン B 種 乾燥頂葉抽出物	0.6136g

**【ヤーコンエキス調製<sup>(※)</sup>】**

10mg/mL ①：14.9mg/1.49mL (medium containing FBS)

10mg/mL ②：16.0mg/1.60mL (medium containing FBS)

10mg/mL ③：15.6mg/1.56mL (medium containing FBS)

10mg/mL ④：14.5mg/1.45mL (medium containing FBS)

↓ それぞれフィルター (0.22  $\mu$ M) をかける

10mg/mL ストック溶液

**②細胞毒性の検討**3x10<sup>3</sup>cells/50  $\mu$ L/well in 96 well plate↓ 37°C、5% CO<sub>2</sub>、24hr↓ Sample、50  $\mu$ L/well<sup>(※)</sup>↓ 37°C、5% CO<sub>2</sub>、72hr↓ medium、100  $\mu$ L/well↓ WST-8、10  $\mu$ L/well

↓ 30min 後に 450nm で測定

↓ 37°C、5% CO<sub>2</sub>、30min

450nm

**(3) ヤーコンエキスを用いた eNOS 誘導活性の評価**

調製した各種のヤーコンエキスを細胞毒性の結果から導き出した量について、eNOS 誘導活性を測定した。

### 7-3-3.試験結果

#### (1) 培養細胞を用いたウエスタンブロッティングによる eNOS 検出条件の検討

クラボウ社の正常ヒト血管内皮細胞 (HUVEC) を文献的に知られているレスベラトロールを用いて eNOS の発現条件の検討を行った。レスベラトロールを 10~50  $\mu$ M で 24 時間刺激し、ウエスタンブロッティングによって eNOS の発現が誘導されるか検討を行った。また、同様に 48 時間、72 時間についても検討を行った。しかし、これらの結果はレスベラトロールによって eNOS が誘導される傾向はあるものの有意な発現誘導は確認されなかった。

そこで、別のロットとして BD 社の HUVEC で検討を行うこととした。レスベラトロールを 10、50  $\mu$ M で 18 時間刺激し、ウエスタンブロッティングによって eNOS の発現が誘導されるか検討した。また、同様に 72 時間についても検討を行った、しかし、この場合も、レスベラトロールによる eNOS の発現誘導は確認できなかった。

KURABO 社、BD 社のいずれの HUVEC でも、レスベラトロールによって eNOS 誘導がはっきりと確認できなかったため、HUVEC ではなくヒト由来の血管内皮細胞の株化細胞として比較的研究のされている EAhy926 という株化細胞で検討することとした。レスベラトロールを 10、20  $\mu$ M で 72 時間刺激し、ウエスタンブロッティングによって eNOS の発現が誘導されるかを検討した。その結果これまでの HUVEC での検討に比べてレスベラトロールによって eNOS が誘導される傾向が確認された。しかし、有意差までは確認できなかった。その後、論文調査を進めたところ、培地中のグルコース濃度を低くすると、もともとの eNOS の発現量が抑えられるということから、低グルコースでの検討を行った。通常用いている高グルコース DMEM は 4500mg/L であるのに対して、1000mg/L の低グルコース DMEM を使い、レスベラトロールを 10、20  $\mu$ M で 72 時間刺激し、ウエスタンブロッティングによって eNOS の発現が誘導されるかを検討した。レスベラトロール 20  $\mu$ M でコントロールに比較して有意に eNOS 量が増加していることが確認できた。

以上の結果から、eNOS の検出条件として、細胞としては EAhy926 を使い、培地としては低グルコース DMEM 条件下で、レスベラトロール 20  $\mu$ M 以上で刺激することによって eNOS の誘導が確認できると結論した。この条件下において、ヤーコンエキスの eNOS 誘導活性が確認できるかを検討することとした。

#### (2) ヤーコンエキスの調製と細胞毒性の確認による添加量の検討

下記の 4 種類の試験物質を用いて、それぞれを 2 g 秤量し、60ml の熱水で 1 時間抽出を行い、それをろ過して得られた抽出液を凍結乾燥した。得られた凍結乾燥粉末について細胞毒性のチェックを EA.hy926 細胞で行った。この結果から、未発酵のヤーコン B 種およびヤーコン A 種については 200  $\mu$ g/ml 以上で細胞毒性はないものと、発酵物については 500  $\mu$ g/ml 以上で細胞毒性はないものと判断した。この結果をもとに、実際に EA.hy926 を刺激する場合は、検討濃度の一段階低い値を採用することとした。

よって、未発酵物については 100  $\mu$ g/ml、発酵物については 200  $\mu$ g/ml で刺激することとした。

細胞：EA.hy926

試験物質：

①ヤーコン B 種

②ヤーコン A 種

③発酵ヤーコン A 種 (AHU7146)

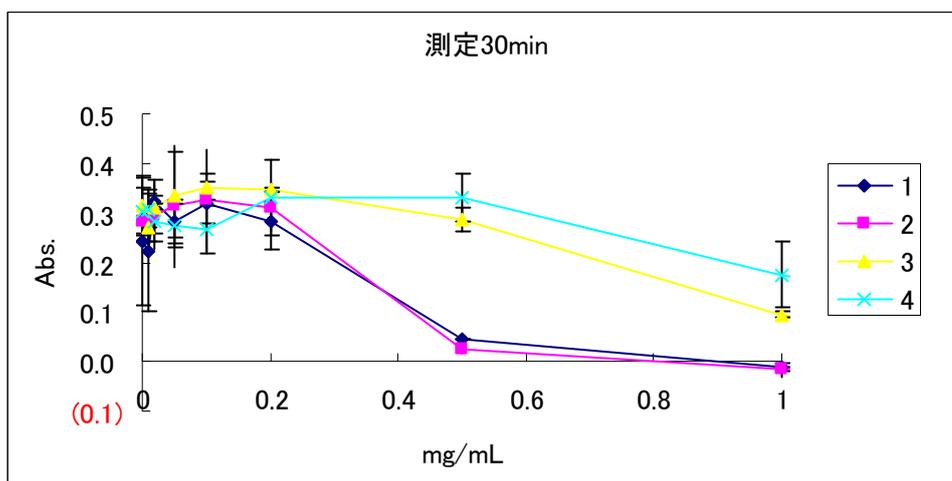
④発酵ヤーコン B 種 (AHU7146)

培地：DMEM (gibco) (10% FBS 含有)

Low Glucose ; 1.0g/L D-Glucose

細胞数試薬：

Cell counting Kit-8

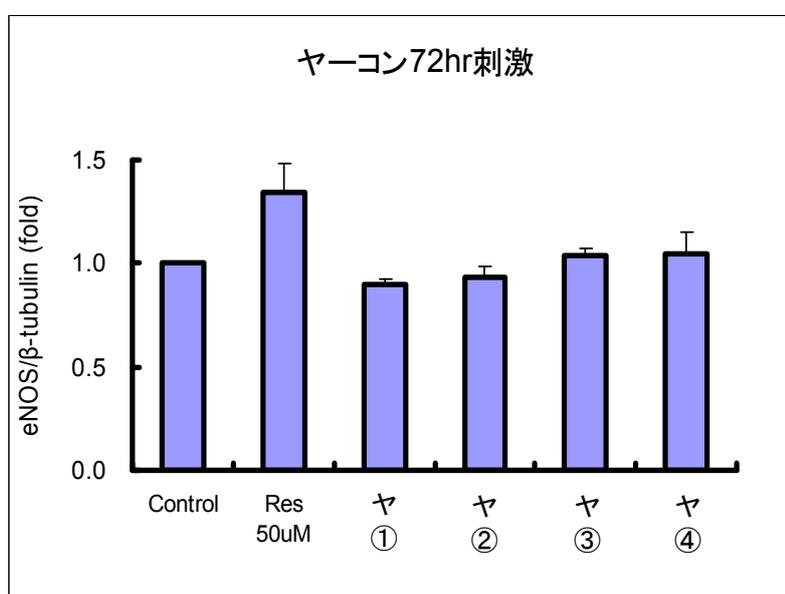


(図.7-3-2) ヤーコン抽出エキスの EA.hy926 を用いた細胞毒性結果

(3) ヤーコンエキスを用いた eNOS 誘導活性の評価

eNOS の検出条件として、細胞としては EAhy926 を用い、培地としては低グルコース DMEM 条件下で、レスベラトロール 50  $\mu$ M を対照として、細胞毒性の確認されなかった濃度のヤーコンエキスで 72 時間の刺激を行った (図.7-3-3)。その結果、対照に用いたレスベラトロールでは有意に eNOS の誘導が確認されたが、今回調製したヤーコン頂葉未発酵物 100  $\mu$ g/ml、ヤーコン頂葉発酵物 200  $\mu$ g/ml いずれにおいても、どちらの品種も eNOS の発現誘導は確認することができなかった。

細胞：EA.hy926  
 播種濃度： $1.1 \times 10^5$  cell/well (6well プレートに播種)  
 培地：Low Glucose DMEM  
 刺激時間：72hr  
 ポジコン：Resveratrol 50  $\mu$ M  
 被験物質濃度：  
 ヤ①：『ヤーコン B 種』 … 100  $\mu$ g/mL  
 ヤ②：『ヤーコン A 種』 … 100  $\mu$ g/mL  
 ヤ③：『発酵ヤーコン A 種 (AHU7146)』 … 200  $\mu$ g/mL  
 ヤ④：『発酵ヤーコン B 種 (AHU7146)』 … 200  $\mu$ g/mL



(図.7-3-3) ヤーコン抽出エキスによる eNOS 誘導の結果

#### 7-3-4. 考察

今回の検討した条件では、残念ながらヤーコン素材の eNOS 誘導活性は確認できなかったため、ヤーコン頂葉がもたらす血圧の安定化作用の作用機構が eNOS 誘導活性によるものであるという結論は導き出すことができなかった。

NO の産生については、eNOS タンパクの誘導も重要であるが、それ以上に NO 産生活性を発揮するリン酸化された p-eNOS の誘導も重要であるため、今回の検討期間の中では、p-eNOS 検出条件の検討についても一部検討したが、期間内に検出条件を決めることはできなかった (Data Not Shown)。

また、培養細胞で影響を確認する場合は、できるだけ不純物の含まれないサンプルで検討する方が、一般的に添加量を増やすことができ影響が見やすいといわれている。今回はヤーコンエキスでの誘導は確認されなかったが、不純物を多く含むエキスを用いて試験を行ったことが影響していることも考えられ、今後ヤーコン頂葉に含まれる抗アレルギー作用を持つ成分が特定されれば、その成分の eNOS 誘導活性については興味もたれるところである。

### 7-4. その他の機能性評価 ② (免疫機能に対する機能性評価)

#### 7-4-1. 試験概要

細胞試験によってヒスタミン遊離抑制作用を有することが明らかになった発酵ヤーコン茶について、軽度のアレルギー性鼻炎を有する被験者を対象として、発酵ヤーコン茶の免疫機能向上に関するヒト試験を実施して、摂取による免疫機能への機能性を評価した。

#### 7-4-2. 試験方法

##### 【試験飲料】

細胞試験においてヒスタミン遊離抑制作用が確認されたヤーコン B 種の頂葉発酵茶葉 (*Aspergillus niger* 使用) 「発酵ヤーコン茶【7475】」を原料茶葉として用いた。

被験者には発酵ヤーコン茶 5g 入りのティーバッグを 1 日料として提供し、1 ティーバッグに対して 500mL のお湯を注いで熱水抽出し、全量を 1 日分として摂取させた。

##### 【スケジュール】

鼻水など鼻炎の症状を有する 15 名の被験者候補を採決の結果によって 8 名の被験者に絞り込み、試験品を 1 日数回に分けて抽出した 500mL の試験飲料を全量摂取させた。被験者には摂取期間中、摂取完了時間、自覚症状および生活習慣について毎日日誌を記入させた。開始日および 3 週目に来院させ、医師診察等の検査を行った。(表.7-4-1)

(表.7-4-1) 試験スケジュール

検査項目	スクリーニング	開始日	摂取 4 時間後	3W
臨床検査	○	○	○	○
診察	○	○	○	○
理学的検査	○	○	○	○
同意説明	○	-	-	-
アンケート(生活習慣)	○	○	○	○
日誌	-	日誌記載期間		

【検査項目（本試験時検査）】

- ①医師による診察  
アレルギー性鼻炎の程度・健康状態・既病歴の確認等
- ②アンケート  
試験飲料について
- ③食物摂取頻度調査
- ④理学的検査  
身長、体重、体脂肪率、Body mass index (BMI)、体温、収縮期および拡張期血圧、脈拍
- ⑤臨床検査項目  
Th1 / Th2 (INF- $\gamma$  × IL-4 · CD4) 、 好酸球数

【臨床検査】

検体は㈱エスアールエルに搬入して検査を行い、検査後の倦怠の扱いについては6か月間保存し、保存期間後は適切に破棄される。

【統計処理】

医師による診察およびその他の自覚症状について、異常の有無を確認した。それ以外の数値データについては、平均値および標準誤差で示すこととした。有意差検定は、データによる最適な検定方法を適用し実施した。ただし、いずれの検定法においても危険率5%未満を有意とした。

7-4-3.試験結果

(1) 試験開始時の被験者データ

①対象者の背景

スクリーニング志願者15名（男性2名、女性13名）のうち、マルチアレルゲン・イネ科、マルチアレルゲン・カビ、マルチアレルゲン・雑草の3項目の1項目以上が0.34UA/ml以上でアレルゲンが確認された8名（男性1名、女性7名）を対象者とした。

②試験開始時のアレルギー性鼻炎の状況

試験開始時の被験者8名のマルチアレルゲン3項目の数値を（表.7-4-1）に示す。

表に示した通り、マルチアレルゲン・イネ科において、0.34UA/ml以上の者は6名（11.49±16.42UA/ml）、マルチアレルゲン・カビにおいて、0.34UA/ml以上の者は2名（2.19±1.53UA/ml）、マルチアレルゲン・カビにおいて、0.34UA/ml以上の者は5名（3.40±5.19UA/ml）であった。

（表.7-4-1）試験開始前の被験者のマルチアレルゲン測定値

PRE <sup>+</sup>	好酸球 <sup>+</sup>	マルチアレルゲン（イネ科） <sup>+</sup>	マルチアレルゲン（カビ） <sup>+</sup>	マルチアレルゲン（雑草） <sup>+</sup>
A <sup>+</sup>	70~440/ $\mu$ L <sup>+</sup>	170 <sup>+</sup>	0.34UA/mL以下 <sup>+</sup> 43.3 <sup>+</sup>	0.34UA/mL以下 <sup>+</sup> - <sup>+</sup> 0.34UA/mL以下 <sup>+</sup> - <sup>+</sup>
B <sup>+</sup>	70~440/ $\mu$ L <sup>+</sup>	120 <sup>+</sup>	0.34UA/mL以下 <sup>+</sup> - <sup>+</sup>	0.34UA/mL以下 <sup>+</sup> 3.27 <sup>+</sup> 0.34UA/mL以下 <sup>+</sup> - <sup>+</sup>
C <sup>+</sup>	70~440/ $\mu$ L <sup>+</sup>	510 <sup>+</sup>	0.34UA/mL以下 <sup>+</sup> 5.23 <sup>+</sup>	0.34UA/mL以下 <sup>+</sup> - <sup>+</sup> 0.34UA/mL以下 <sup>+</sup> 0.58 <sup>+</sup>
D <sup>+</sup>	70~440/ $\mu$ L <sup>+</sup>	70 <sup>+</sup>	0.34UA/mL以下 <sup>+</sup> 1.58 <sup>+</sup>	0.34UA/mL以下 <sup>+</sup> - <sup>+</sup> 0.34UA/mL以下 <sup>+</sup> - <sup>+</sup>
E <sup>+</sup>	70~440/ $\mu$ L <sup>+</sup>	180 <sup>+</sup>	0.34UA/mL以下 <sup>+</sup> 15.1 <sup>+</sup>	0.34UA/mL以下 <sup>+</sup> - <sup>+</sup> 0.34UA/mL以下 <sup>+</sup> 12.6 <sup>+</sup>
F <sup>+</sup>	70~440/ $\mu$ L <sup>+</sup>	510 <sup>+</sup>	0.34UA/mL以下 <sup>+</sup> - <sup>+</sup>	0.34UA/mL以下 <sup>+</sup> - <sup>+</sup> 0.34UA/mL以下 <sup>+</sup> 1.32 <sup>+</sup>
G <sup>+</sup>	70~440/ $\mu$ L <sup>+</sup>	310 <sup>+</sup>	0.34UA/mL以下 <sup>+</sup> 2.36 <sup>+</sup>	0.34UA/mL以下 <sup>+</sup> 1.10 <sup>+</sup> 0.34UA/mL以下 <sup>+</sup> 0.43 <sup>+</sup>
H <sup>+</sup>	70~440/ $\mu$ L <sup>+</sup>	170 <sup>+</sup>	0.34UA/mL以下 <sup>+</sup> 1.34 <sup>+</sup>	0.34UA/mL以下 <sup>+</sup> - <sup>+</sup> 0.34UA/mL以下 <sup>+</sup> 2.05 <sup>+</sup>
AVG <sup>+</sup>	- <sup>+</sup>	255.0	- <sup>+</sup> 11.49	- <sup>+</sup> 2.19 - <sup>+</sup> 3.40
SD <sup>+</sup>	- <sup>+</sup>	171.4	- <sup>+</sup> 16.42	- <sup>+</sup> 1.53 - <sup>+</sup> 5.19

③試験開始時の血液検査結果

試験開始時の被験者 8 名の Th1/Th2 及び好酸球の数値を（表.7-4-2）に示す。

（表.7-4-2）試験開始時の被験者の Th1/Th2 及び好酸球の数値

PRE	Th1/Th2	好酸球
A	11.0	140.0
B	6.0	140.0
C	14.0	380.0
D	17.1	100.0
E	11.1	90.0
F	10.9	470.0
G	12.6	400.0
H	8.4	90.0
AVG	11.4	226.3
SD	3.1	150.5

④試験開始時の身体状況

試験開始時の被験者 8 名の身体状況を（表.7-4-3）に示す。

（表.7-4-3）試験開始時の被験者の身体状況

PRE	身長	体重	体脂肪率	LBM	体温	収縮期血圧	拡張期血圧	脈拍
A	156	47.9	21.1	37.8	36.9	138	81	71
B	172	80.6	27.2	58.7	36.6	144	88	114
C	158	54.3	29.5	38.3	36.3	103	69	72
D	165	58	28.5	41.5	36.4	148	101	68
E	159	60.4	34.3	39.7	36.6	102	61	66
F	161	76.1	36.6	48.2	37	122	77	89
G	168	75	35.2	48.6	36.7	131	76	72
H	165	65.5	31.3	45.0	36.8	109	61	78
AVG	163.0	64.7	30.5	44.7	36.7	124.6	76.8	78.8
SD	5.5	11.6	5.1	7.0	0.2	18.4	13.6	15.9

⑤試験開始時の栄養摂取状況

栄養摂取状況の評価は食物摂取頻度調査法（エクセル栄養君 FFQg）を用い、a.摂取エネルギー量、b.摂取たんぱく質量、c.摂取脂質量、d.摂取炭水化物量、および e.たんぱく質エネルギー比、f.脂質エネルギー比、g.炭水化物エネルギー比によって評価した。

試験開始時の被験者 8 名の栄養摂取状況を（表.7-4-4）、（表.7-4-5）に示す。

（表.7-4-4）試験開始時の被験者の栄養摂取状況

PRE	Energy (kcal)	P (g)	F (g)	C (g)
A	1475	28.2	35.5	234.5
B	1462	37.3	34.2	210.5
C	1906	70.3	76	211.3
D	1645	45.9	57.1	231.6
E	1196	43.5	44.5	152.0
F	1311	51.3	42	176.5
G	1581	68.6	54	206.3
H	-	-	-	-
AVG	1511	49.3	49.0	203.2
SD	231.6	15.6	14.7	29.6

(表.7-4-5) 試験開始時の被験者の栄養摂取状況 (エネルギー費)

PRE	P(%)	F(%)	C(%)
A	7.7	21.7	70.7
B	10.2	21.1	68.7
C	14.8	35.9	49.4
D	11.2	31.2	57.6
E	14.6	33.5	52
F	15.7	28.8	55.5
G	17.4	30.8	51.9
H	-	-	-
AVG	13.1	29.0	58.0
SD	3.5	5.7	8.5

## ⑥試験開始時の抑うつ度

抑うつ度の測定はPOMSを用い、a.緊張-不安、b.抑うつ-落込み、c.怒り-敵意、d.活気、e.疲労、f.混乱の6項目について、それぞれ評価を行った(表.7-4-6)。

(表.7-4-6) 試験開始時の被験者の抑うつ度状況

PRE	緊張不安	抑うつ落込み	怒り敵意	活気	疲労	混乱
A	6	2	5	21	12	6
B	6	7	4	15	0	6
C	16	15	14	17	7	10
D	2	0	0	2	2	1
E	3	3	1	10	1	2
F	8	8	16	7	10	3
G	6	11	12	12	10	6
H	1	2	0	8	1	2
AVG	6.0	6.0	6.5	11.5	5.4	4.5
SD	4.7	5.2	6.5	6.1	4.9	3.0

## ⑦試験飲料についてのアンケート

試験飲料につき、a.風味、b.量、c.飲み続けたいと思うかの3項目について0を非常に悪い、10を非常に良いとして11段階評価でアンケートを行った。

初めて試験飲料を摂取した際の被験者8名のアンケート結果を(表.7-4-7)に示す。

(表.7-4-7) 摂取1回目の試験飲料に対する評価

PRE	風味	量	飲み続けたいか
A	5	5	5
B	10	10	8
C	2	4	5
D	4	5	4
E	4	5	5
F	5	5	5
G	5	8	5
H	5	7	4
AVG	5.0	6.1	5.1
SD	2.3	2.0	1.2

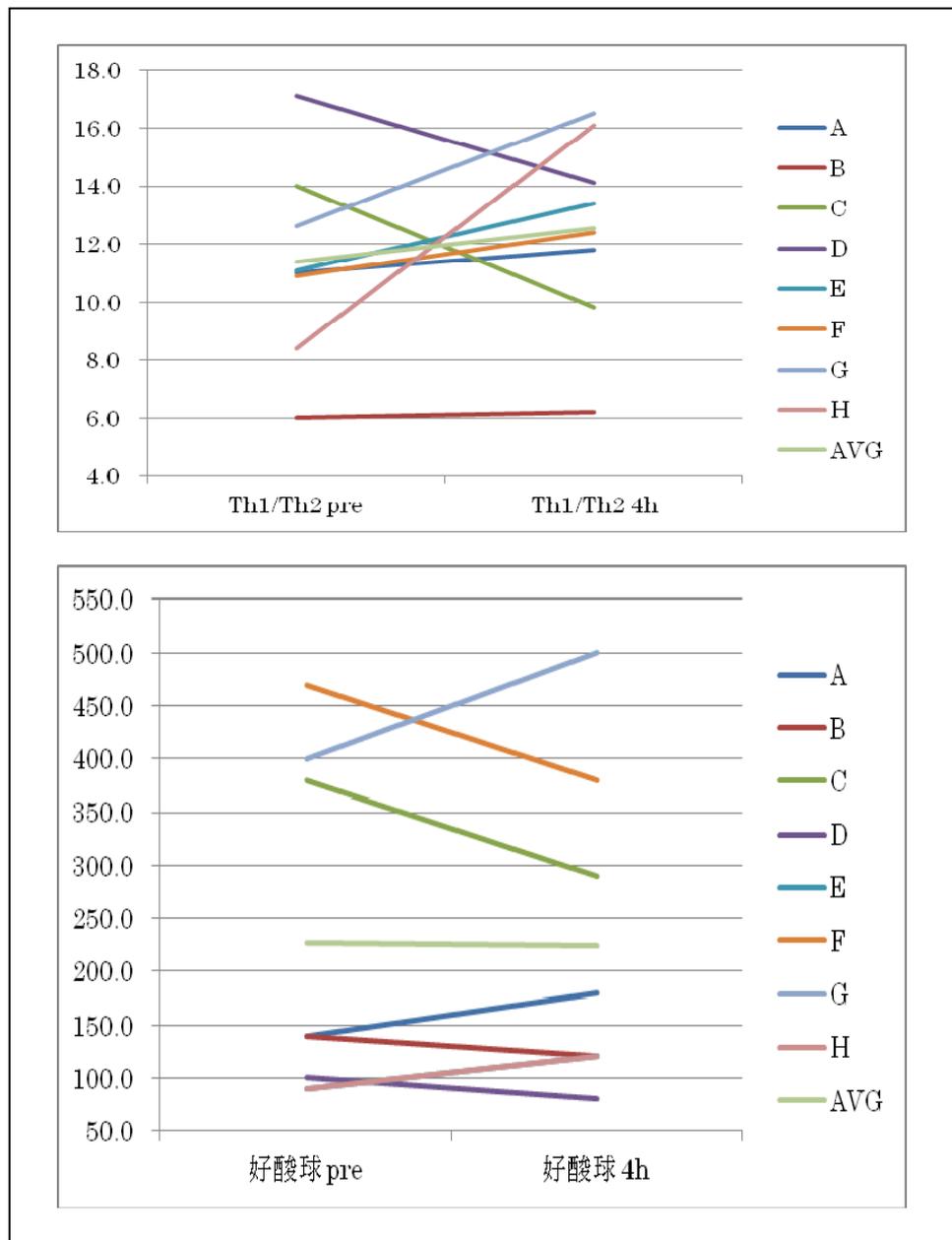
(2) 試験飲料飲用 4 時間後の変化

試験飲料飲用 4 時間後の変化を (表.7-4-8)、(図.7-4-1) に示す。

(表.7-4-8) 試験飲料飲用 4 時間後の血液検査結果

POST 4h	Th1/Th2 4h	好酸球 4h	Th1/Th2Δ	好酸球Δ
A	11.8	180.0	-0.8	-40
B	6.2	120.0	-0.2	20
C	9.8	290.0	4.2	90
D	14.1	80.0	3	20
E	13.4	120.0	-2.3	-30
F	12.4	380.0	-1.5	90
G	16.5	500.0	-3.9	-100
H	16.1	120.0	-7.7	-30
AVG	12.5	223.8	-1.2	2.5
SD	3.2	141.4	-1.15	-40

試験飲料飲用の短期 (4 時間) での変化は認めなかった。



(図.7-4-1) 試験飲料飲用 4 時間後の血液変化

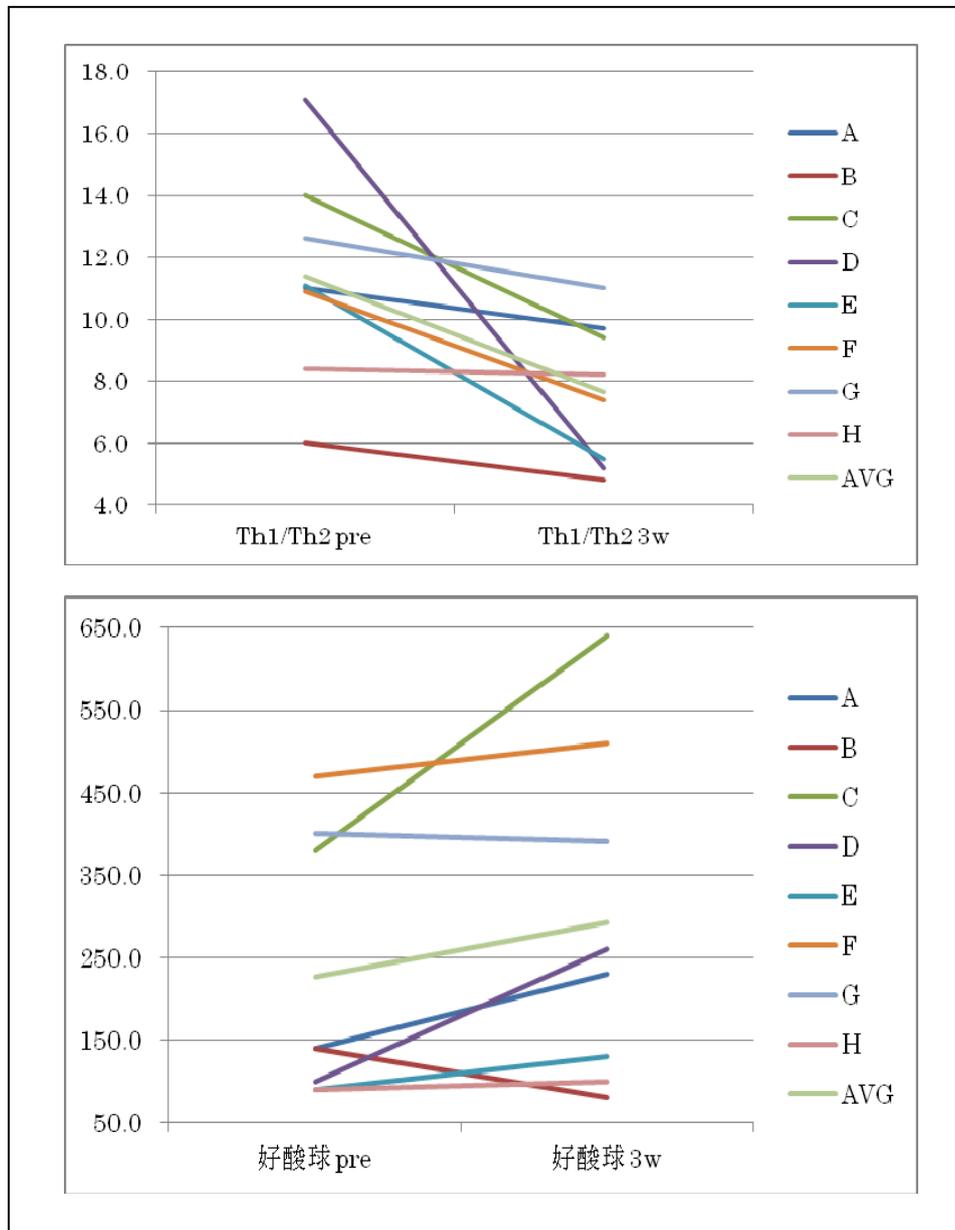
(3) 試験飲料飲用 3 週間後の変化

① 試験飲料飲用 3 週間後の血液検査結果

試験飲料飲用 3 週間後の変化を (表.7-4-9)、(図.7-4-2) に示す。

(表.7-4-8) 試験飲料飲用 3 週間後の血液検査結果

POST	3w	Th1/Th2	3w	好酸球	3w	Th1/Th2Δ	好酸球Δ
A		9.7		230.0		-1.3	90.0
B		4.8		80.0		-1.2	-60.0
C		9.4		640.0		-4.6	260.0
D		5.2		260.0		-11.9	160.0
E		5.5		130.0		-5.6	40.0
F		7.4		510.0		-3.5	40.0
G		11.0		390.0		-1.6	-10.0
H		8.2		100.0		-0.2	10.0
AVG		7.7		292.5		-3.7	66.3
SD		2.2		190.8		3.5	95.6



(図.7-4-2) 試験飲料飲用 3 週間後の血液変化

②試験飲料飲用 3 週間後の身体状況

試験飲料飲用 3 週間後の身体状況を（表.7-4-10）に示す。

（表.7-4-10）試験飲料飲用 3 週間後の身体状況

POST	体重	体脂肪率	LBM	体温	収縮期血圧	拡張期血圧	脈拍
A	47.4	19.8	38.0	36.8	125	80	74
B	80.0	26.5	58.8	36.3	146	95	98
C	54.5	27.8	39.3	36.4	97	64	75
D	57.7	28.4	41.3	37.0	140	92	63
E	61.6	33.5	41.0	36.1	102	57	63
F	74.6	35.6	48.0	37.0	138	83	81
G	74.1	35.4	47.9	36.7	110	80	60
H	65.1	29.7	45.8	36.2	118	69	92
AVG	64.4	29.6	45.0	36.6	122.0	77.5	75.8
SD	11.2	5.3	6.8	0.4	18.3	13.3	14.0

試験飲料飲用 3 週間後に体脂肪率の有意な低下を認めたことから、試験飲料による脂肪燃焼の可能性が示唆された。

③試験飲料飲用 3 週間後の栄養摂取状況

試験飲料飲用 3 週間後の栄養摂取状況を（表.7-4-11、表.7-4-12）に示す。

（表.7-4-11）試験飲料飲用 3 週間後の栄養摂取状況

POST	Enagy (kcal)	P (g)	F (g)	C (g)
A	885	20.9	18.7	147.7
B	1462	37.3	34.2	210.5
C	2084	71.3	75.8	250.5
D	1276	39.3	38.9	187.2
E	1286	43.8	39.9	182.7
F	1298	45.9	44.7	172.3
G	2574	143.9	120	224.6
H	-	-	-	-
AVG	1552	57.5	53.2	196.5
SD	576.2	40.9	34.1	34.5

（表.7-4-11）試験飲料飲用 3 週間後の栄養摂取状況（エネルギー比率）

POST	P(%)	F(%)	C(%)
A	9.5	19	71.5
B	10.2	21.1	68.7
C	13.7	32.7	54
D	12.3	27.4	60.3
E	13.6	27.9	58.4
F	14.2	31	54.9
G	22.4	41.9	35.7
H	-	-	-
AVG	13.7	28.7	57.6
SD	4.2	7.6	11.7

④試験飲料飲用 3 週間後の抑うつ度

試験飲料飲用 3 週間後の抑うつ度を（表.7-4-13）に示す。

(表.7-4-13) 試験飲料飲用 3 週間後の抑うつ状況

PRE	緊張不安	抑うつ落込み	怒り敵意	活気	疲労	混乱
A	5	0	6	20	10	6
B	4	7	5	8	1	2
C	17	14	12	16	6	9
D	5	2	5	7	6	4
E	1	3	1	6	0	2
F	4	8	9	4	7	3
G	10	15	18	10	6	3
H	1	0	0	10	1	2
AVG	5.9	6.1	7.0	10.1	4.6	3.9
SD	5.3	5.9	5.9	5.4	3.5	2.5

## ⑤試験飲料についてのアンケート

試験飲料飲用 3 週間後の試験試料に対するアンケート結果を (表.7-4-13) に示す。

(表.7-4-7) 摂取 3 週間後の試験飲料に対する評価

PRE	風味	量	飲み続けたいか
A	2	4	1
B	5	5	7
C	2	5	5
D	7	5	5
E	8	6	4
F	4	5	5
G	7	7	10
H	4	4	3
AVG	4.9	5.1	5.0
SD	2.3	1.0	2.7

## 7-4-4.考察

今回の試験において、発酵ヤーコン茶による免疫機能向上は確認できなかった。しかし、試験前後において、栄養摂取状況および体重、除脂肪体重に変化が認められない中、体脂肪率の低下が認められたことは、何らかの作用により発酵ヤーコン茶に脂肪燃焼の効果がある可能性が示唆された。

試験飲料の風味や量については、対象者の負担になるものではないことが、アンケートおよび抑うつ度の調査により確認された。

個人では自覚症状の軽減が認められた者がいることや、発酵ヤーコン茶を飲用後 4 時間から好酸球および Th1/Th2 に変化が見られ、3 週間後には Th1/Th2 に顕著な変化が認められた。しかし、有意差は無いものの Th1/Th2 において基準値を逸脱する者が減少したことは、対象者数を増やして試験することにより、一定の効果が期待できる可能性が考えられた。

また、対象者の選定がマルチアレルゲン・イネ科、マルチアレルゲン・カビ、マルチアレルゲン・雑草と多様なアレルゲンを持つ者で試験を行ったため、一定の効果が得られなかった可能性も考えられる。対象者数を増やし、3 つのアレルゲンそれぞれにおける変化を確認する必要性があると思われる。今後は、発酵によるヤーコンのポリフェノールの変化の詳細なども検証しながら、製品開発を進めていく予定である。

## 7-5.その他の機能性評価 ③（食後血糖上昇に対する機能性評価）

### 7-5-1.試験概要

発酵前のヤーコン頂葉には、食後の血糖上昇を穏やかにする働きがあることが明らかになっていた。本研究テーマでは、発酵後のヤーコン頂葉を用いた食後の血糖上昇抑制作用を評価することによって、発酵前後の血糖上昇抑制作用に変化があるかを確認した。

### 7-5-2.試験方法

#### ①コントロールの作成

健常な男女各5名の計10名に対してショ糖を投与し、30分後、1時間後、1時間30分後、2時間後の血糖値を自己検査用のグルコース測定機によって測定し、血糖推移を確認し、コントロールとした。

#### ②試験物質の調製

細胞試験においてヒスタミン遊離抑制作用が確認されたヤーコンB種の頂葉発酵茶葉（*Aspergillus niger*使用）「発酵ヤーコン茶【7475】」を原料茶葉として用いた。被験者には発酵ヤーコン茶5g入りのティーバッグを1日料として提供し、1ティーバッグに対して500mLのお湯を注いで熱水抽出し、全量を摂取させた。

#### ③試験物質による血糖上昇抑制作用の検証

コントロールと同量のショ糖を投与し、発酵ヤーコン茶を500mL摂取し、30分後、1時間後、1時間30分後、2時間後の血糖値を自己検査用のグルコース測定機によって測定し、血糖推移を確認した。

#### 【測定に使用した機器】

ジョンソン・エンド・ジョンソン株式会社製 ワンタッチウルトラビュー

### 7-5-3.試験結果

10名の被験者中、5名が食後の血糖値が有意に低い値を示し、3名は有意差が無いものの血糖上昇が緩やかになった。残りの2名については、測定値にばらつきがあり評価対象外とした。

### 7-5-4.考察

被験者の有効数の半数以上で有意差が出たことで、発酵後のヤーコン茶についても血糖上昇抑制作用は期待できると考えられた。

## 8.ヤーコン頂葉部の安定的生産方法の検討

### 8-1.組織培養による頂葉生産の検討

ヤーコン頂葉部分は成長点であるため、もともとの収穫物である塊根部を活用できる大きさに成長させるためには限られた時期にしか採取することができない。また、抗酸化能が優れているのは限られた部分であるため、手摘みで選別しながら収穫しなければならない。そこで本研究テーマでは、組織培養による頂葉部分の増殖法を確立し、安定的な原料供給を実現するための生産方法を検討した。

#### 8-1-2.試験方法

8月下旬にペルーAの頂葉から2~3節目の葉を採取した。洗浄した葉を70%エタノールに30秒間、5%次亜塩素酸ナトリウム溶液に15分間浸した後、滅菌蒸留水で洗浄した。中肋を含まない葉身部分を5mm角の正方形に切断し外葉体を得た。得られた外葉体を用いて植物育成装置にて水耕栽培が可能な苗を多量に生産するための検討を行った。培地の選択など具体的な検討方法についてはアドバイザーの茨城大学の協力のもと実施した。

### 8-1-3.試験結果

得られた外葉体は  $50\text{IU} \cdot \text{mL}^{-1}$  ペニシリンと  $50\mu\text{g} \cdot \text{mL}$  ストレプトマイシンが含まれる溶液に5分間浸して殺菌した後、カルス誘導培地に置床した。

培地はオーキシンとサイトカイニンを追加したMS培地を使用し、カルスを誘導した。

カルスを  $1.0\text{mg} \cdot \text{liter}^{-1}$  BAPと  $0.1\text{mg} \cdot \text{liter}^{-1}$  GA<sub>3</sub> を追加した HaR 培地で培養すると、不定芽に由来するシュートがカルス上に形成された。得られたシュートを用いて  $0.1\text{mg} \cdot \text{liter}^{-1}$  NAA を追加した 1/2MS 培地で発根させることができた。

そのまま水耕栽培へと移行し順調に成長させることができたため、4枚目の葉が形成されたところで既存の頂葉と比較するためのサンプルとして採取した。

なお、水耕栽培の HEFL 照明機を通常灯の白色に加え、青色灯、赤青混合灯で照射して成長速度の差を比較したが、成長速度、外見共に大きな差は見られなかった。

### 8-1-4.考察

ヤーコンの組織培養自体は可能であったが、アドバイザーの茨城大学のこれまでの研究では、外葉体からの培養はソマクローナル変異が生じることを示唆するデータが得られており、抗アレルギー作用が品種間による差を生じていることから、変異を生じる本手法での原料確保は障害があると考えられた。

## 8-2.組織培養による頂葉に含まれるポリフェノールの分析

### 8-2-1.試験概要

組織培養による頂葉の栽培については、従来の露地栽培の頂葉が貯蔵根の採取直前の10月頃に限られることから、生育期間が短くなること、また、培地では露地栽培と栄養条件が違うこと等が影響する可能性がある。そのため、組織培養頂葉と従来の頂葉との総ポリフェノール量の比較を行い原料として使用可能かを評価した。

### 8-2-2.試験方法

総ポリフェノールの分析には、Folin-Denis 法を用いた。

### 8-2-3.試験結果

白色に、青色灯、赤青混合灯それぞれの照射環境で栽培したヤーコン頂葉の総ポリフェノール量には大きな差は確認できなかった。しかし、その含有量は少なく、10月上旬に採取した露地栽培の頂葉とを比較すると1/10以下であった。

### 8-2-4.考察

今回、抗アレルギー作用等は総ポリフェノールの量に左右されるものではないとも考えられたが、組織培養では変異が起こる可能性があることから、原料確保の手法としては即実用化とはいかず、課題が残る結果となった。

## 第3章

### 全体総括

医療や介護が必要な高齢者の多くは、「活動量の低下」に伴い「食事摂取量（重量）の低下による栄養状態の低下」や「食物繊維や水分の摂取量低下による便秘異常」が認められている。

また、20～34歳の女性5人に一人は理想的と言われている1日1回の排便を実行できていないという結果があり、老廃物を体内にため込んでいることで腸内での腐敗が進み、ガスが充満してお腹が張る、腹痛、肌荒れなどのトラブルを引き起こすため、スムーズな排便は便秘に悩む女性にとって深刻な問題である。このような問題に対処する方法として採られる手段の中で、下剤は多用すると薬に慣れ服用量が増加するなどの弊害があり、固くなった便をかき出す排便は肛門周辺を傷つけるリスクがある。このような背景下において、本事業の川下産業である北海道内の医療、介護法人の現場からは、北海道産の植物資源を活用した、副作用の無い安全で安心な機能性食品の摂取によって、腸内の環境を快適に保ち、スムーズな排便を促すようなものを日常の食事に取り入れたいという要望があった。

そこで、本研究開発事業では、これまでの研究によって腸内細菌叢の改善、便秘改善作用を明らかにしている北海道産ヤーコンと植物性乳酸菌ホッカイドウ株を用いた発酵豆乳との組み合わせをベースとして、さらに北海道の未利用資源を有効活用することによって「整腸作用」に加え「抗アレルギー」や「血糖上昇抑制」等の複数の機能性を持つ「高機能発酵食品」の開発を目指して研究開発を行った。

研究の成果として、まず発酵ヤーコン豆乳については、ヤーコンのポリフェノールがホッカイドウ株の増殖を抑制する心配がないことや、ホッカイドウ株の増殖にフラクトオリゴ糖が消費されないことなどが明らかとなり、菌数  $2 \times 10^9$  CFU/ml を含む発酵ヤーコン豆乳を同時に発酵させることは、従来製法のアレンジで十分に可能であることが明らかになったため、新製法を開発することができ、さらに既存の工場設備を使用して目標値の15,000円/kgで、既存の技術で製造したものと同等スペックの発酵ヤーコン豆乳粉末を製造することが可能となった。その結果、医療・介護の現場に提供することが可能な製品開発が可能になったと考えている。

また、ヤーコン頂葉については品種による成分や機能性の違いが明らかになり、抗アレルギー作用が期待できる発酵茶を開発することができた。

発酵ヤーコン豆乳粉末、発酵ヤーコン茶ともに食品としての安全性も確認し、最終製品として製品エビデンスや製品の完成度を高めていくという作業は残るものの、具体的な製品化のスケジュールが見えてきたと言える。

一方で、成長点である頂葉部分の大量確保の手段として、組織培養による調達を計画していたが、組織培養には機能性が低い可能性があることや、変異の可能性が懸念されることなどから、別手段を講じる必要があることも次の課題として明確になってきた。

しかし、ヤーコンの成長点を採取した場合、脇芽が新たな成長点として成長を続けることが確認できたため、計画的な栽培、採取を行う事で解決できる可能性が見えてきた。

今後は本事業の研究結果をもとに、北方系機能性植物であるヤーコンを活用した機能性食品原料、機能性食品を早急に事業化し、経済活性化に貢献するため尽力していきたいと考えている。