

平成 23 年度戦略的基盤技術高度化支援事業
「植物由来の機能性成分生成に利用するストレス負荷型
装置のデータベース化の研究開発」

研究開発成果等報告書

平成 25 年 3 月

委託者 近畿経済産業局

委託先 公益財団法人滋賀県産業支援プラザ

第1章 研究開発の概要	1
1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標	1
1) 研究の背景・研究目的	1
2) 研究の概要	1
3) 所在地	3
(2) 委託期間	3
1-2 研究体制	4
(1) 研究組織及び管理体制	4
1) 研究組織（全体）	4
2) 管理体制	4
(2) 管理員及び研究員	6
(3) 経理担当者及び業務管理者の所属、氏名	7
(4) その他	8
1-3 成果概要	9
1-4 当該研究開発の連絡窓口	9
第2章 本論	10
2-1 環境制御システム構築案	10
2-1-1 環境制御システム構築	10
2-1-2 画像処理システム構築	12
2-2 機能性成分の検証	13
2-2-1 ストレスと機能性成分	13
2-2-2 ピニトール（イノシトール類）の検証	15
2-2-3 アイスプラントに含まれる新規脂肪代謝促進物質	16
2-3 ピニトール成分抽出技術	17
2-3-1 概要	17
2-4 アイスプラント濃縮成分と安全性	18
2-4-1 成分比較	18
2-4-2 重金属検査	19
2-4-3 急性毒性試験	19
2-4-4 復帰突然変異試験（Ames 試験）	19
2-5 予防医学的評価（糖尿病モデルマウスに対するアイスプラント抽出物の機能性評価）	20
2-6 素材評価と健康食品及び化粧品石鹸の試作	22
2-6-1 ピニトールの生理活性調査	22
2-6-2 健康食品および化粧品の試作	22
2-7 知的所有権について	23
第3章 全体総括	24

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) 研究の背景・研究目的

これまでの植物育成においては、環境（温度、湿度）、照明（光量、波長）、養液制御などの多岐にわたる環境パラメータに関して、植物育成を早めるということに固定し制御されてきた。今回の研究開発のストレス負荷型植物栽培のデータベース化では、時系列を含んだ複雑な環境条件の可変性を必要としている。各種環境ストレスの条件と植物の機能性成分生成の間の実験結果をデータベース化した組み込みソフトウェアの開発を必要とし、植物に合わせた最適環境条件を自動的に抽出すると共に、コスト削減、省エネルギー、省資源性を持ち合わせた制御システムの構築が必要となる。

本研究開発では、環境制御（温度、湿度、光量、波長、養液ミネラル濃度）を可能とするストレス負荷型植物栽培装置に組み込む環境制御アルゴリズムをデータベース化することにある。従来技術としては、植物栽培の好適環境制御技術のみであるが、本高度化技術では、機能性成分を増加させるストレス負荷型環境制御技術を開発することで、天然機能性成分抽出の生産性を向上化させることにある。さらには、省エネルギー・省資源化されたストレス負荷型植物栽培装置を試作し、植物由来の機能性成分の分析と機能性評価をおこない予防医学的効果と安全性を検証する。

2) 研究の概要

有益な天然機能性成分を植物に生成させるストレス負荷型植物栽培装置に組み込む環境制御アルゴリズムのデータベース化手法を研究開発する。植物の生育を早める好適環境と機能性成分を増加生成させるストレス環境を人工的に作り出す環境制御アルゴリズムをデータベース化することになる。生成された植物本来の天然素材から機能性食品原料・サプリメント・化粧品原料の試作、さらに機能解析と安全性評価をおこないその実用化を目標とする。

実施内容

①. 植物のストレス負荷型栽培制御装置のハードウェア及びソフトウェア基本設計・施行

アイスプラントのイノシトール類含有量を増加させるための成長速度と好適環境制御（温度、湿度、光量・波長、養液）の関係からデータベース構築のために、環境条件と機能性成分の相関性について検証し、ハードウェアの構築を検討した結果を踏まえ、ストレス負荷型栽培制御装置のハードウェア及びソフトウェアの試作を

行い環境制御アルゴリズムを完成させる。

②. ストレス負荷型栽培装置による機能性評価

ストレス負荷型栽培装置によって栽培された植物（アイズプラント）の機能性成分含有量の測定、及び動物実験による予防医学的評価を行う。具体的な成分測定項目としては、ピニトール（イノシトール類）、ポリフェノール、有機酸及びビタミン含有量を測定する。

③. 健康食品及びサプリメントの試作

健康食品、サプリメントの試作では、生活習慣病予防を視野に入れた商品として、アイズプラントのカプセル化や錠剤化を行う。各種乾燥方法（熱風乾燥、凍結乾燥、真空乾燥など）における機能性成分の保持率や粉末の回収率、粒度を検証し、機能性成分を損なわない加工方法を確立させ、もって健康食品とサプリメントの試作を実施する。

④. プロジェクトの管理・運営

本プロジェクト事業が適切かつ効果的に運営され、所期の目的が達成されることと共に大きな成果がえられるよう、また適切な経費の執行がなされるようプロジェクトの運営・管理を実施する。

3) 所在地

①事業管理機関

公益財団法人滋賀県産業支援プラザ（最寄り駅：西日本旅客鉄道 東海道本線 膳所駅）

〒520-0806 滋賀県大津市打出浜町2番1号コラボしが21内

②研究実施場所

ソジコー株式会社 野洲事業部（最寄り駅：西日本旅客鉄道 東海道本線 野洲駅）

〒520-2362 滋賀県野洲市市三宅457

株式会社日本ジー・アイ・ティー（最寄り駅：西日本旅客鉄道 東海道本線 草津駅）

〒520-3024 滋賀県栗東市小柿6丁目9番2号

学校法人関西文理総合学園 長浜バイオ大学（最寄り駅：西日本旅客鉄道 東海道本線 田村駅）

〒526-0829 滋賀県長浜市田村町1266番地

独立行政法人 産業技術総合研究所つくばセンター（最寄り駅：首都圏新都市鉄道 つくばエクスプレス つくば駅）

〒305-8566 茨城県つくば市東1丁目1番1号

滋賀県東北部工業技術センター（最寄り駅：西日本旅客鉄道 東海道本線 長浜駅）

〒526-0024 滋賀県長浜市三ツ矢元町27番39号

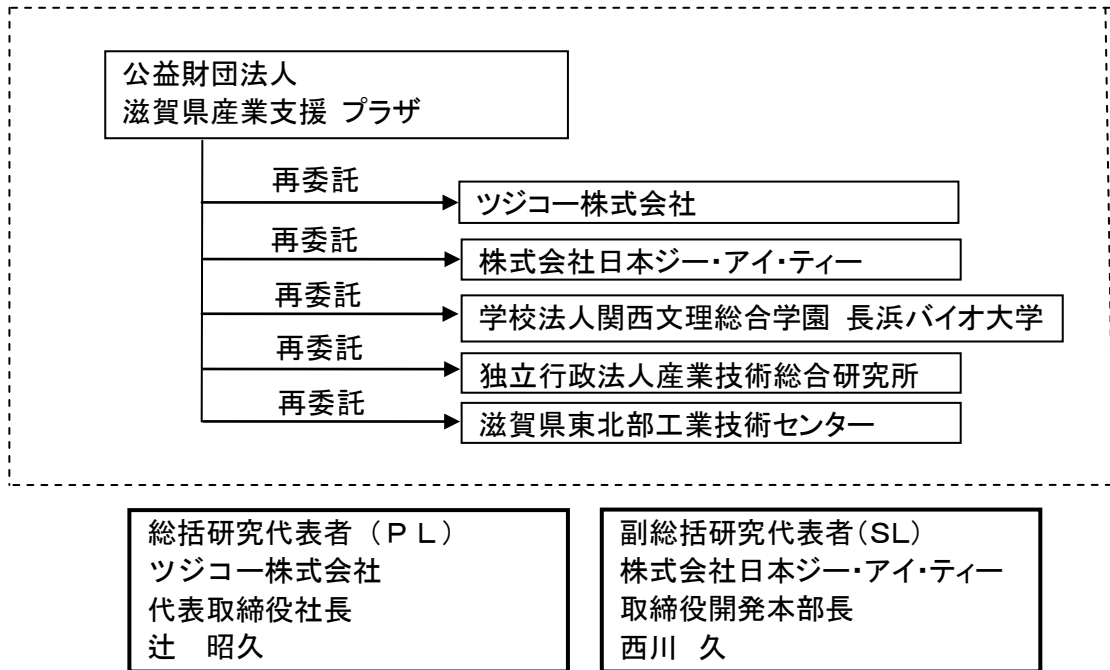
(2) 委託期間

平成23年8月18日～平成25年3月31日まで

1-2 研究体制

(1) 研究組織及び管理体制

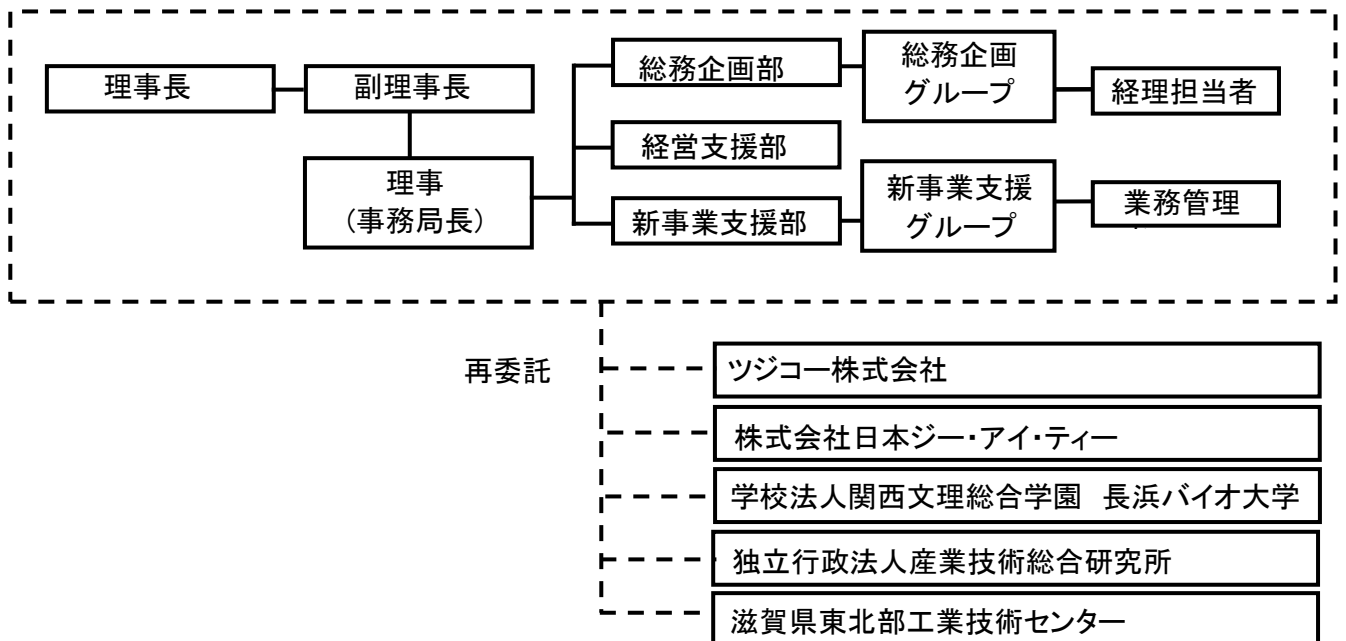
1) 研究組織（全体）



2) 管理体制

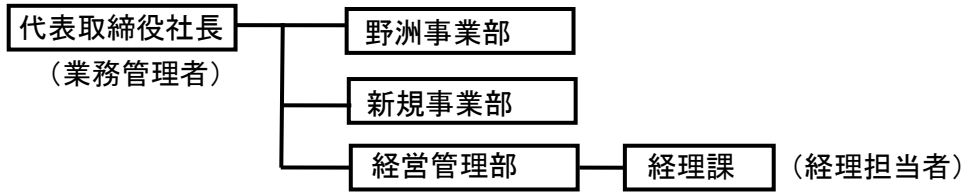
① 事業管理機関

[公益財団法人滋賀県産業支援プラザ]

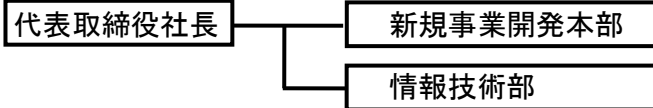


② (再委託先)

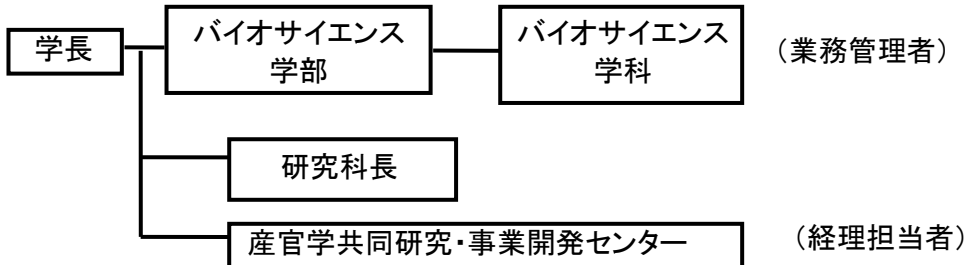
ツジコー株式会社



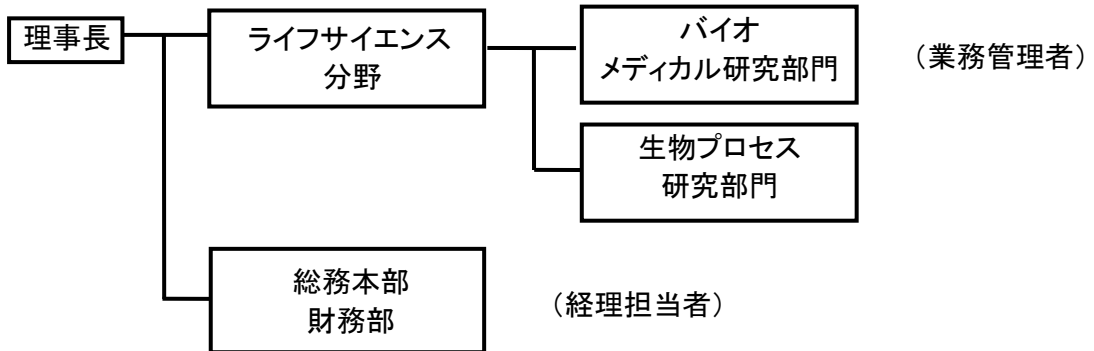
株式会社日本ジー・アイ・ティ



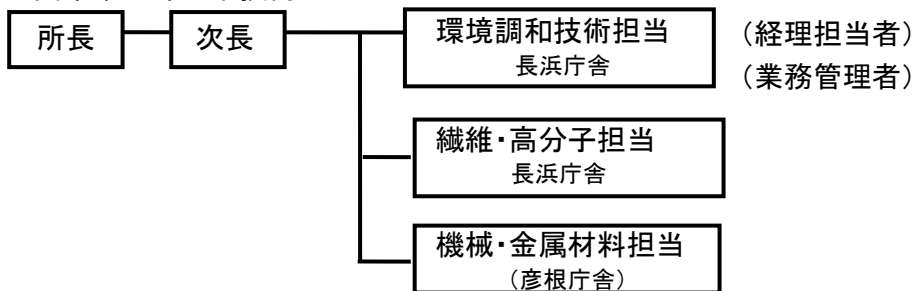
学校法人関西文理総合学園 長浜バイオ大学



独立行政法人 産業技術総合研究所



滋賀県東北部工業技術センター



(2) 管理員及び研究員

【事業管理機関】 公益財団法人滋賀県産業支援プラザ

①プロジェクト管理員

氏名	所属・役職	実施内容(番号)
篠原 弘美	新事業支援部新事業支援グループ グループリーダー 主幹	④
山中 義文	新事業支援部新事業支援グループ 参与	④

【再委託先】

ツジコー株式会社

氏名	所属・役職	実施内容(番号)
辻 昭久	代表取締役社長	①②③
山本 将嗣	新規事業部 開発エンジニア 主任	①②③
辻 侑資	新規事業部 開発エンジニア	①②③
中野 彰彦	野洲事業部係長	①②③
西尾 和憲	野洲事業部班長	①②③

株式会社日本ジー・アイ・ティー

氏名	所属・役職	実施内容(番号)
西川 久	新規事業開発本部 取締役開発本部長	①②
武藤 大助	新規事業開発本部 情報技術部長	①②
寺田 勝	新規事業開発本部 開発エンジニア	①②
中川 義徳	新規事業開発本部 開発エンジニア	①②

学校法人関西文理総合学園 長浜バイオ大学

氏名	所属・役職	実施内容(番号)
蔡 晃植	バイオサイエンス学部 バイオサイエンス学科教授 農学博士	①②③

独立法人行政法人産業技術総合研究所

氏名	所属・役職	実施内容(番号)
石田 直理雄	バイオメディカル研究部門上席研究員 医学博士	①③
鈴木 馨	バイオメディカル研究部門 生物プロセス部門主任研究員 理学博士	①③

滋賀県東北部工業技術センター

氏名	所属・役職	実施内容(番号)
松本 正	主任専門員 工学博士	①②③
脇坂 博之	主査 工学博士	①②③

(3) 経理担当者及び業務管理者の所属、氏名
(事業管理機関)

公益財団法人滋賀県産業支援プラザ

(経理担当者)	総務企画部総務企画グループ グループリーダー 主幹	山元 政明
(業務管理者)	新事業支援部新事業支援グループ グループリーダー 主幹	篠原 弘美

(再委託先)

ツジコー株式会社

(経理担当者)	経営管理部 経理課 経理主任	宗時 早苗
(業務管理者)	代表取締役社長	辻 昭久

株式会社日本ジー・アイ・ティー

(経理担当者)	情報技術部長	武藤 大助
(業務管理者)	取締役開発本部長	西川 久

学校法人関西文理総合学園 長浜バイオ大学

(経理担当者)	産官学共同研究・事業開発センター 係員	南部 祐身
(業務管理者)	バイオサイエンス学部 バイオサイエンス学科 教授	蔡 晃植

独立行政法人 産業技術総合研究所

(経理担当者)	総務本部 財務部 経理室長	井佐 好雄
(業務管理者)	バイオメディカル研究部門長	織田 雅直

滋賀県東北部工業技術センター

(経理担当者)	環境調和技術担当 副主幹	中村 清美
(業務管理者)	繊維・高分子担当 主任専門員	阿部 弘幸

(4) その他

他からの指導・協力者名及び 指導・協力事項

①推進委員会

氏名	所属・役職	備考
辻 昭久	ツジコー株式会社 代表取締役社長	P L
山本 将嗣	ツジコー株式会社 新規事業部 開発エンジニア主任	
辻 侑資	ツジコー株式会社 新規事業部 開発エンジニア	
中野 彰彦	ツジコー株式会社 野洲事業部係長	
西尾 和憲	ツジコー株式会社 野洲事業部班長	
西川 久	株式会社日本ジー・アイ・ティー 新規事業開発本部 取締役開発本部長	S L
武藤 大助	株式会社日本ジー・アイ・ティー 新規事業開発本部 情報技術部長	
寺田 勝	株式会社日本ジー・アイ・ティー 新規事業開発本部 開発エンジニア	
蔡 晃植	学校法人関西文理総合学園 長浜バイオ大学 バイオサイエンス学部 バイオサイエンス学科 教授	
石田 直理雄	独立行政法人産業技術総合研究所 バイオメディカル研究部門上席研究員 医学博士	
鈴木 馨	独立行政法人産業技術総合研究所 生物プロセス部門主任研究員 理学博士	
松本 正	滋賀県東北部工業技術センター 主任専門員 工学博士	
脇坂 博之	滋賀県東北部工業技術センター 主査 工学博士	
藤原 澄久	丸紅株式会社 機能化学品部 課長	アドバイザー
米谷 俊	学校法人 近畿大学農学部 食品栄養学科 教授	アドバイザー
藤本 眞一	株式会社 GSI クレオス 香粧品部 部長	アドバイザー
三井 雅之	三井コンサルティング 代表 医学博士	アドバイザー
仲尾次 浩一	ピラス株式会社 スキンケア研究部 副部長	アドバイザー

②アドバイザーの指導・協力

氏名	指導・協力事項
藤原 澄久	川下事業者(ストレス負荷型植物栽培装置)のニーズに関するアドバイス。
米谷 俊	川下事業者(機能性素材)のニーズに関するアドバイス。
藤本 眞一	川下事業者(化粧品素材)のニーズに関するアドバイス。
三井 雅之	天然機能性素材機能解析と安全性評価に関するアドバイス。
仲尾次 浩一	川下事業者(スキンケア化粧品)のニーズに関するアドバイス。

1-3 成果概要

今年度は環境制御システムのデバッグ検証から始まり、要件定義に基づく環境制御システムを完成させるとともに、これを本格稼働させ、ストレス負荷による植物の育成を行った。そして、植物の機能性成分を上昇させるための環境制御アルゴリズムと成分動態の相関関係を解析し、どのような条件下において、機能性成分が増加するのかを具体的に明らかにした。また、それらのアルゴリズムを時系列化した制御条件をデータベース化することで、植物栽培アプリケーションとしての汎用性も高めている。ストレス負荷によって栽培されたアイスプラントの機能性評価としては、小動物実験による予防医学的評価および機能性評価、そして安全性に関する試験を実施し、その生理的意義を明らかにした。また、本事業から得られた知的所有権を申請することで、発明者の権益を保護するとともに、植物工場産業の発達へ資する情報の公開を行った。

1-4 当該研究開発の連絡窓口

公益財団法人滋賀県産業支援プラザ

新事業支援部

滋賀県大津市打出浜 2 番 1 号コラボしが 2 1 2 階

電話 (077)511-1414

FAX (077)511-1418

第2章 本論

2-1 環境制御システム構築案

2-1-1 環境制御システム構築

〈制御系の全機能をワンボードに集約〉

高機能性野菜の量産を前提とする場合、低コストで必要な機能を網羅したシステムをいかに構築出来るかが重要な課題となる。環境制御システムの目標では制御すべき対象（温度・湿度・EC・pH・溶存酸素、CO2）が複雑で、これらをマトリックスで自由にコントロールする必要がある。このためのハードウェアの構築手法としては、今回のシステムでは中小規模栽培システムに相当するため、コストメリットを優先して、全制御機能を一枚のボードに集約し機材のコストを徹底的に抑えるアプローチを採用した。大規模システムへの発展性については、既の実証実験で無線を通じた制御方法を確立しているため、必要に応じて拡張が可能である。したがって、我々は昨年と本年度のプロジェクトを通じて、中小から大規模までの野菜工場を自動制御する手法が完成したことになる。図2-1-1-1は、栽培システムの全体像である。

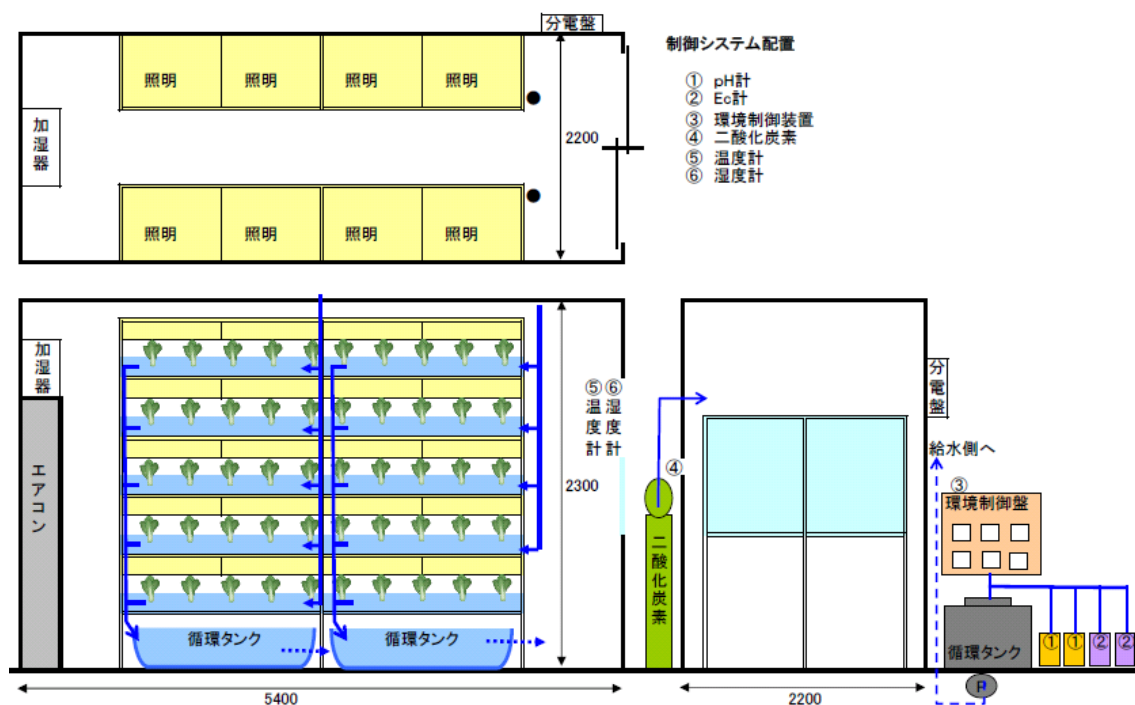


図 2-1-1-1 環境制御型植物栽培システムの全体像

制御端末とネットワークに接続されたコントロールPC間の接続にZigBeeを使用した無線接続を採用している。これにより、野菜工場とオフィスの間通信線を敷設することなしにリモート制御を行うことが可能となる。コントロールPCをインターネットに接

続すれば、世界中のどこからでも工場の状態をモニターし、必要に応じてリモートで環境パラメータを調節することができることが本システムの特徴である。図 2-1-1-2 は、各制御システムのフロー図を示している。

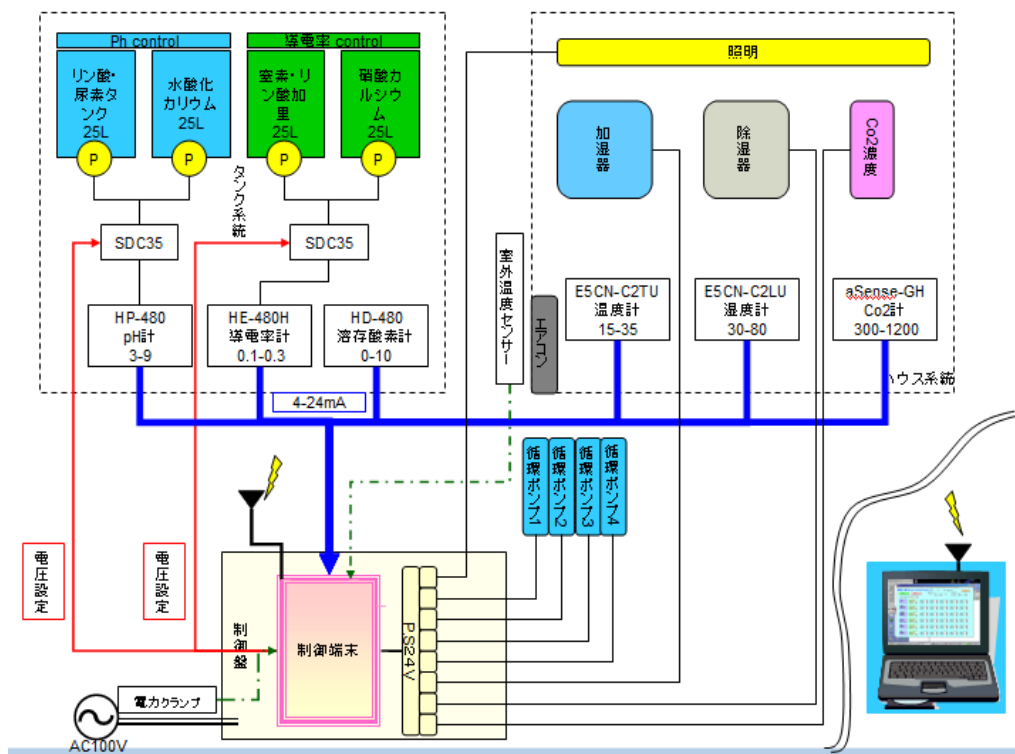


図 2-1-1-2 各制御システムのフロー

実運用での利便性を重要視し、コントロールPC内のソフトウェアで無線を通じて制御端末の動作設定とモニタリングを行う仕組みで構築している。図 2-1-1-3 は、操作画面の一例である。

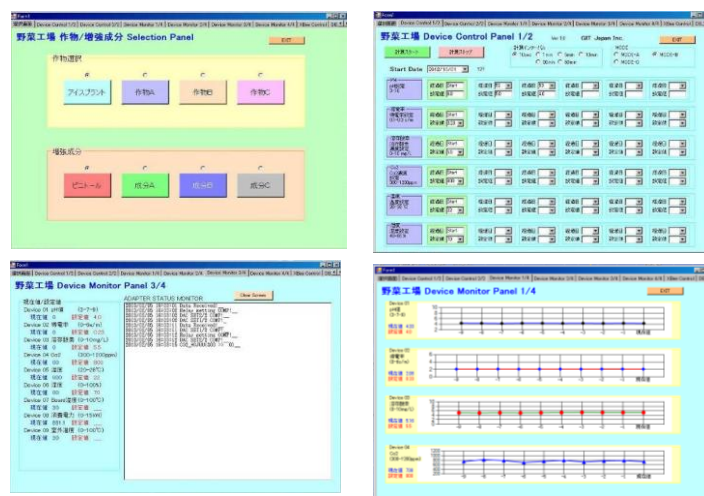


図 2-1-1-3 環境制御ソフトのインターフェース

2-1-2 画像処理システム構築

アイスパラント栽培において環境ストレスに曝されると生育は抑制され、先端伸長部や葉周縁部が萎縮し、葉面は濃緑化することが明らかになった。このような形態変化を『変移』と呼ぶことにし、変移の程度は葉緑素計（SPAD-502:コニカミノルタセンシング）による SPAD 値で数値化できることが確認できた。また、SPAD 値とアイスパラントが含有する機能性成分ピニトール量の関係においても相関性が確認され、SPAD 値を測定することでピニトール含有量を推定できる重要な指標になることが明らかになった。

SPAD 値の測定方式は葉の葉緑素の分光特性である 400～500nm（青）と 600～700nm（赤）に吸収のピークがあり 700nm 以上の光はほぼ吸収しないことから、600～700nm の赤領域と 700nm 以上の赤外域の 2 波長で濃度比較を行い SPAD 値が算出されている。赤領域の光の透過量を赤外域の光の透過量で正規化するため葉を挟まなければいけない測定方式となっている（写真 2-1-4-2）。

本画像処理システムの構築は、カメラ画像中のアイスパラントの葉の色をサンプリングし RGB 値から葉緑素含有量を示す SPAD 値に変換(写真 2-1-4-3)することを目的としている。これによって、アイスパラントの葉を挟み SPAD 測定を行う従来の煩瑣な作業を行わずに、カメラ画像の確認によって SPAD 値が測定でき、また変移の状況や収穫時期が簡易に判断できるようになる。



写真 2-1-2-1 葉緑素計と測定方式

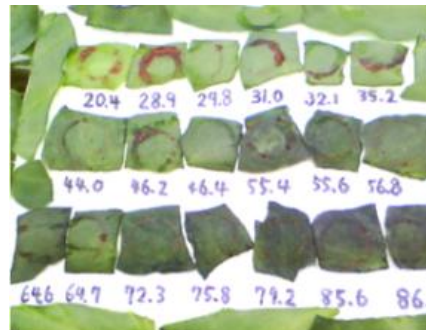


写真 2-1-2-2 SPAD 値見本



写真 2-1-2-3 画像処理システム上の監視モニター画面例

2-2 機能性成分の検証

2-2-1 ストレスと機能性成分

環境制御装置を用いた高機能アイスプラント栽培のために設定されるストレス負荷パラメータを有効に選定する目的で、昨年（平成23年）度は、単独パラメータ制御による本植物の機能性成分の変動を解析し、いくつかの有効なストレス負荷パラメータを得た。そして、本年（平成24年）度は、更なる有効パラメータを求め、様々な条件下での栽培実験を試みた。始めにその研究概要を図2-2-1-1に示し、概説する。

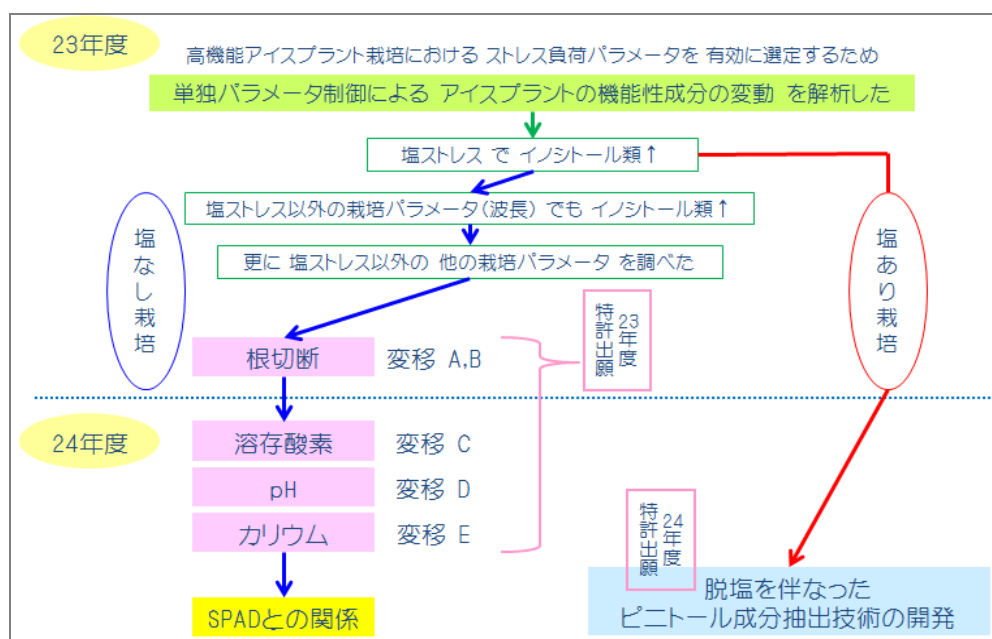


図 2-2-1-1 ストレスと機能性成分の関係解析における研究の流れ

本研究を開始するにあたり、まず、アイスプラントの貴重な機能性成分であるピニトール（イノシトール類）に注目し、当成分が増加するストレス負荷条件を検討した。その結果、本栽培システムにおいても、高い塩ストレス負荷がピニトールを増加させることが分かり、その有効性が示された。しかし、高い塩ストレス負荷は、同時に植物体へ多量の塩の蓄積も引き起こしてしまい、結果的に生食利用や濃縮利用が妨げられてしまうという問題があった。

そこで塩ストレス以外でのストレス負荷方法を探索することにし、その結果、栽培液に塩を添加しない栽培（塩なし栽培）において、本植物の根を切断する方法が有効であることを見出した。本法を用いると、2%NaCl ストレス負荷と同等のピニトール含量が得られるが、これは1%NaCl での通常栽培の成分値と比べると6倍以上も高い値であった。このようにピニトール含量を高める新規なストレス負荷パラメータが見つかったため、本法で栽培した検体において、他の機能性成分も分析した。その結果、いずれの成分も大きな増加が認められ、更に本法の有効性を裏付ける結果を得た。しかしながら、本法のストレス負

荷方法は、当研究開発の最終目的である栽培環境の自動制御には適さない処理方法であった。

そこで本年度は、この課題を解決するため、根の切断ストレス（水ストレス）と類似し、かつ自動制御可能なストレス負荷方法を探索することにした。その結果、循環停止処理【変移 C】において、その有用性が確認出来た。また、その他のストレス負荷方法として、急激な pH 変動ストレスを与える方法【変移 D】や、NaCl ストレスの代わりに K（カリウム）でストレスを与える方法【変移 E】においても有用性が確認出来たので、併せて報告する。

照明	HEFL 照明	青系白色 8 灯
	照射時間	24 時間
	光量	150±10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
空調	室温	22±1 °C
	湿度	70±10 %
	二酸化炭素	800±100 ppm

表 2-2-1-1 新規ストレス負荷方法における栽培条件

養液	液温	22±2 °C
	EC	0.25±0.02 dS/m
	pH	6.0±0.5
	溶存酸素	6.5±0.5 ppm
	肥料	大塚 A 処方
栽培密度		40.7 株/m ²

表 2-2-1-2 各栽培実験におけるストレス負荷の方法

		養液	負荷ストレス
昨年度	対照	塩あり	なし（通常栽培）
	変移 A		根の切断処理
	変移 B		
本年度	変移 C	塩なし	溶存酸素の低下
	変移 D		調整液にて pH 6.1 → pH 3.2
	変移 E		カリウム

カリウムでストレスを与える方法【変移 E】の栽培実験におけるストレス負荷は、表 2-2-1-1 に示す条件（基準とした栽培の条件）に硫酸カリウム肥料を段階的（図 2-2-1-2）に加え栽培をし、播種より 65 日目に植物体を収穫し、機能性成分分析に供した。本実験では、256.5mM K₂SO₄ 区において全株枯死してしまったので、171mM K₂SO₄ 区の分析 DATA を【変移 E】の結果とした。

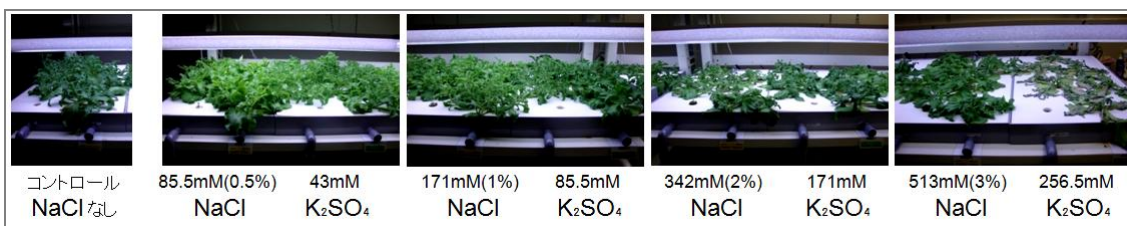


図 2-2-1-2 カリウムでストレスを与える方法【変移 E】の栽培実験

機能性成分の分析は、昨年度と同様の方法（表 2-2-1-3）で行った。

表 2-2-1-3 機能性成分の分析方法

		n
ピニトール	「栄養表示基準における栄養成分等の分析方法等について」(平成11年4月26日 衛新第13号)に準拠	4
プロリン	Bates, L.S., R.P. Waldren, I.D. Teare, Plant and Soil 39, 205-207 (1973)	6
BHA換算・抗酸化能 (β-カロテン退色法)	池羽智子, 鹿島恭子, 茨城県農業総合センター園芸研究所 研究報告 第14号, 27-33 (2006)	4
総ポリフェノール	Folin-Denis法を用い、カテキン換算にて算出	6
ビタミンC	2,4-ジニトロフェニルヒドラジン吸光光度法 (五訂増補日本食品標準成分表分析マニュアル)	6
β-カロテン	「栄養表示基準における栄養成分等の分析方法等について」(平成11年4月26日 衛新第13号)に準拠	4
ビタミンK ₁	「栄養表示基準における栄養成分等の分析方法等について」(平成11年4月26日 衛新第13号)に準拠	4
有機酸 (クエン酸、リンゴ酸)	有機酸(BTB法)分析システム(日立ハイテックHPLC)を使用	4

2-2-2 ピニトール（イノシトール類）の検証

各栽培実験（変移 C、変移 D、変移 E）のピニトール分析結果のみ図 2-2-2-1 に示す。

また、各栽培実験におけるピニトールの増加率を表 2-2-2-1 に示す。

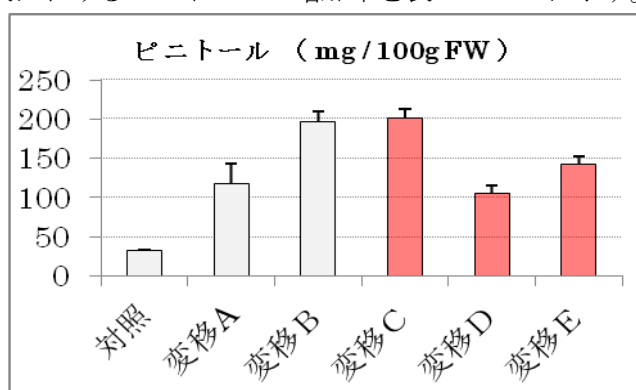


図 2-2-2-1 ピニトール分析結果

表 2-2-2-1 ピニトール増加率（倍）

	対照	変移 A	変移 B	変移 C	変移 D	変移 E
増加率	1	3.7	6.2	6.3	3.3	4.5

各栽培実験においてピニトール含量を調べた結果、循環停止処理【変移 C】が自動制御可能なストレス負荷方法としての有用であることが明らかとなった。また、急激な pH 変動ストレスを与える方法【変移 D】や、NaCl ストレスの代わりに K (カリウム) でストレスを与える方法【変移 E】においてもストレス負荷パラメータとしての有用性が確認された。

2-2-3 アイスプラントに含まれる新規脂肪代謝促進物質

これまでの本研究で、植物工場で栽培したアイスプラントは老化防止や疲労回復効果のあるβカロテン、骨へのカルシウム定着を促進するビタミン K、保湿効果を高めコラーゲンを生成に効果のあるプロリンなど様々な機能性成分を含んでいることが明らかになった。さらに、近年、アイスプラントを肥満モデルのゼブラフィッシュの飼料に混ぜて飼育したところ、体重が減少したということが報告された。このことから、アイスプラントには脂肪蓄積抑制物質または脂肪代謝促進物質が含まれている可能性が示された。そこで、植物工場で栽培したアイスプラントに脂肪蓄積抑制物質または脂肪代謝促進物質が存在しているかどうかについて調べた。

アイスプラントに含まれる脂肪蓄積抑制物質または脂肪代謝促進物質を同定するにあたり、まず、簡便で効率の良い生物検定系の構築を試みた。近年、脊椎動物から脂肪代謝、炎症、分化増殖を制御するペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 (peroxisome proliferator or activated receptor ; PPAR) として新たに PPAR α 、PPAR β/δ 、PPAR γ の 3 つが同定された。これらの受容体のうち、PPAR α は主に肝臓や骨格筋、褐色脂肪細胞のような脂肪異化の能力の高い組織において発現しており、脂肪酸酸化の標的遺伝子の転写をコントロールすることによって脂肪酸酸化の主要制御因子として作用することが明らかとなった。実際に、この受容体を活性化することによって肝臓における脂肪酸酸化が増加し、脂肪細胞と血中における脂肪濃度が減少する。このことから、PPAR α の活性の制御は肥満を改善し、肝臓における脂肪代謝の機能障害に関連する慢性疾患の改善につながると予想される。一方、PPAR γ は糖尿病を改善する機能や、脂肪細胞への分化を制御する機能を有している。このことは、PPAR α や PPAR γ の活性を制御することが出来れば、脂肪蓄積抑制や脂肪代謝促進を起こすことができ、肥満が解消される可能性があることを示している。アイスプラントの脂肪蓄積抑制物質または脂肪代謝促進物質について、この二つの受容体の活性を指標として調べた

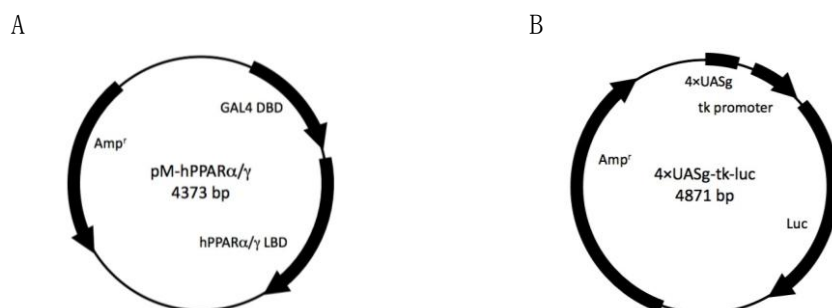


図 2-2-3-1 本研究で使用したベクターの模式図

A. PPAR α / δ を発現させるための pM-hPPAR α / γ のベクターマップ。

B. ルシフェラーゼ発現用の 4×UASg-tk-luc のベクターマップ

ところ、通常条件で栽培したアイスプラントとストレスを与えて栽培したアイスプラントにはそれぞれ水溶性の PPAR α アゴニスト物質、PPAR γ アゴニスト物質、脂溶性の PPAR γ アゴニスト物質が含まれている可能性が示された。

2-3 ピニトール成分抽出技術

2-3-1 概要

本研究開発で得られるアイスプラントは、一義的には食用として市場への流通が考えられる。しかし、食用に適する部位は茎部から葉にかけてであり、それ以外の部位は廃棄される。しかし、機能性成分は廃棄部にも一定の割合で含まれており、ピニトールなどの機能性成分を何らかの手法で回収、濃縮出来れば、化粧品への添加やサプリメントへの利用など他用途への効率的な応用展開が可能となる。

特に機能性成分の回収技術において課題となるのは、低コスト化はもちろんのこと、技術的には含有する NaCl などの塩類の除去である。この課題の解決は、①未利用部位の有効利用に資するだけでなく、②昨年度の研究成果の一つである高塩ストレス負荷栽培による高機能化アイスプラントの利用の途を切り開く（従って、環境制御アルゴリズムに組込む栽培パラメータが一つ増える）ことにつながっていく。

そこで、アイスプラントからの機能性成分の濃縮方法についての検証を行い、アイスプラントからピニトールを抽出する技術を得た。操作フロー図は 2-3-1 に示す。



図 2-3-1-1 アイスプラント抽出フロー

2-4 アイスプラント濃縮成分と安全性

2-4-1 成分比較

表 2-4-1

分析項目 (/100gD.W.)	H23 年度	H24 年度	分析項目 (/100gD.W.)	H23 年度	H24 年度
水分	3.1g	3.7g	ナイアシン	4.60mg	5.62mg
たんぱく質	19.0g	23.8g	パントテン酸	1.82mg	2.31mg
糖質	15.3g	23.5g	葉酸	0.31mg	0.68mg
食物繊維	18.3g	16.5g	イノシトール	2049mg pinitol	3816mg pinitol
灰分	38.1g	25.1g	コエンザイム Q10	2.7mg	3.5mg
エネルギー	230Kcal	289Kcal	β-トコフェロール	0.5mg	1.2mg
脂質	6.2g	7.4g	γ-トコフェロール	0.8mg	2.0mg
マンガン	14.8mg	8.1mg	総ポリフェノール	0.44g	0.56g
カルシウム	641mg	410mg	ゼアキサントニン	4.8mg	3.0mg
鉄	8.02mg	7.8mg	ルテイン	44.8mg	56.9mg
亜鉛	2.5mg	2.3mg	イソロイシン	0.48g	0.03g
リン	677mg	540mg	ロイシン	0.85g	0.07g
マグネシウム	230mg	180mg	リジン	0.67g	0.11g
銅	0.62mg	0.4mg	メチオニン	0.13g	0.04g
クエン酸	3.79g	5.55g	チロシン	0.40g	0.07g
リンゴ酸	2.16g	3.24g	スレオニン	0.45g	0.06g
ビタミン B1(チアミン)	0.55mg	0.90mg	トリプトファン	0.25g	0.13g
ビタミン B2	1.00mg	1.55mg	バリン	0.67g	0.05g
ビタミン B6	1.82mg	1.93mg	アラニン	0.75g	0.08g
クロロフィル a	363mg	534mg	アスパラギン酸	1.03g	0.06g
クロロフィル b	129mg	160mg	グリシン	0.61g	0.01g
カロチン	46.34mg(β)	38.3mg(β)	プロリン	2.90g	2.90g
ビタミン C	50.4mg	154mg	セリン	1.26g	0.08g
ビタミン E	12.2mg	28.7mg	グルタミン酸	1.62g	0.11g
ビタミン K1	2.38mg	3.43mg	総フェルラ酸	—	95mg

葉物野菜にはほとんど含まれていないピニトールの含量が突出していることが分かる。ビタミン総量を比べても、アイスプラントパウダーは、ケールやクロレラサプリメントよりも優れた含有量を示し、栄養価の高い食品であることがうかがえる。

2-4-2 重金属検査

重金属検査について株式会社日吉にて測定を行った。

下表 2-4-2-1 がその結果である。カドミニウム、総水銀はともに不検出であったが、鉛、ヒ素、総クロムについては検出された。これらは、養液中に含まれる微量元素が吸収されかつパウダー化することで濃縮されたと考えられるが、鉛、ヒ素については問題ないと思われる。一方総クロムは、大きく分けて人体に有害な六価クロムとそうでない三価クロム

表 2-4-2-1 重金属測定結果

検査項目	検査結果	検出限界
カドミニウム	不検出	0.01mg/kg
鉛	0.14mg/kg	
ヒ素	0.02mg/kg	
総クロム	0.43mg/kg	
総水銀	不検出	0.01mg/kg

に分けられる。このうち六価クロムはめっき工場などで発生する人工物であり、自然界にはほとんど存在しない。

栽培に使用している水道水に含まれる六価クロム化合物は 0.05mg/L 以下（平成 22 年度長浜市水道局調査結果による）であり、栽培設備資材にもめっき製品を使用していないことから、おそらく養液の原料となる化学肥料の微量元素としての

クロムをアイスプラントが吸収し、パウダー化されることで濃縮された結果であるものと推測している。なお、食品に含まれるクロムのほとんどが三価クロムであり、体内では微量ながら糖質やたんぱく質代謝維持に関係している。

2-4-3 急性毒性試験

新規素材として市場を開拓する中で、需要側から最初に訊かれることは、毒性試験の実施有無である。そこで、H23 年度我々は基本的な毒性を調べるため、ラットによる強制経口急性毒性試験を実施した。（株式会社ボゾリサーチセンターにて委託実施）

1 群雄 5 匹の Sprague-Dawley 系 SPF ラットを用い、1,000mg/kg（低用量）、3,000mg/kg（中用量）、5,000mg/kg（高用量）の 3 用量に対象群を加え 2 週間の経過観察を行った結果として、いずれの群にも死亡例は見られなかった。高用量を投与した群は、体重 60kg のヒトに換算すると、実に 300g ものアイスプラントパウダーを摂取した計算となるが、剖検した結果、全く異常が見られなかった。したがって、アイスプラントパウダーを雄ラットに単回投与したときの最小致死量は 5,000mg/kg を上回り、毒性は極めて低いと判断された。

2-4-4 復帰突然変異試験（Ames 試験）

H24 年度は、パウダーの発ガン性の有無を確認するため Ames 試験を実施した。試験は医薬品に関する GLP および厚生省のガイドラインに基づき信頼性を確保したため、「細菌を用いる復帰突然変異試験」という表記がなされている。

事前に外部アドバイザーより、Ames 試験は 5 菌株を使用する試験のため、アミノ酸であるトリプトファンとヒスチジンの影響により陽性あるいは擬陽性（発ガン性が有ること）が検出される可能性がある」と指摘頂いた。それを試験に際しての懸念事項として、

委託先企業に相談したところ、本試験に先立ち検討用試験を実施することで影響が出ないであろう投与量を絞り込むことで解決した。

Ames 試験では、検体が変異原性物質（発ガン性物質）であるかどうかを評価するが、直接作用する物質か、代謝後の物質に間接的に作用する物質か、両側面から評価が可能である。

結果、代謝活性化の有無に関わらずいずれの菌株においても、評価基準となる復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。また、陽性対象群での反応および用量検討試験でみられた菌株の養育阻害と沈殿が正常であると判断された。従って、アイスプラントパウダーは、細菌に対する遺伝子突然変異誘発能を有さない（陰性）であると判断された。

2-5 予防医学的評価（糖尿病モデルマウスに対するアイスプラント抽出物の機能性評価）

アイスプラント抽出物には脂肪細胞の分化抑制作用があることが、培養細胞を用いた実験から報告されている。そこで糖尿と肥満を呈する TSOD マウスにアイスプラントパウダーを摂取させ、生体においても同様の効果があるか検討することにした。

【方法】

動物は、6 週齢の雄自然発症肥満型糖尿病モデル TSOD マウスとの対象動物として TSNO マウスを動物繁殖研究所より購入した。1 週間の順化期間を設けた後、7 週齢からアイスプラントパウダー添加粉末飼料を給餌した。順化期間は、通常飼料（CE2；日本クレア）を自由摂取とした。アイスプラントパウダー負荷試験においては、提供頂いたアイスプラントパウダーと、MF 粉末飼料（オリエンタル酵母）をよく混ぜ、粉末給餌器にて給餌した。飼育期間中の飲水については、自由摂取とした。

動物は、アイスプラントパウダーの添加濃度によって、コントロール群（0%）、0.5% 添加群、2% 添加群、4% 添加群の 4 群に分けた。アイスプラントパウダーと、それに含まれるピニトールの摂取量については、表 1 に記した。1 ケージに 5 匹（1 群）飼育した。

7 週齢のより負荷試験を開始した。その間、摂餌量測定（毎日）、飲水量測定（毎日）、体重測定（3 日に 1 回）を行った。

組織のサンプリングは、9 週間の粉末飼料給餌期間の後に行った。マウスは、絶食 6 時間後イソフルランによる吸入麻酔後、心採血にて約 1mL 採血した。採血した血液は、血清分離採血管（セパラピッド）に入れた後、4°C 3500rpm 15 分間遠心分離した。得られた血清は 500 μ L チューブ 2 本に半分ずつ分注した。

採血後、直ちに腹腔内脂肪と肝臓をサンプリングし、液体窒素にて凍結した。

脂肪組織中における GPDH 活性を測定するため、精巢上体脂肪 500 \pm 20mg を 2mL チューブにとり、0.25M ショ糖溶液を 1mL 加え、超音波破碎機にてホモジナイズした。ホモジナイズしたサンプルは、さらに 0.25M ショ糖溶液を加え、Total 4.2mL のホモジナイズ溶液を作成した。すべてのサンプルは、使用時まで -80°C にて凍結保存した。

GPDH 活性測定

脂質合成に関わる GPDH 活性を GPDH 活性測定キット (Primary Cell) により測定した。測定方法は、プロトコルに従った。

ホモジナイズサンプルを解凍後、4℃ 700G 10 分間遠心を行い、上清を採取した。採取した上清をさらに 4℃ 54000G 30 分間遠心分離し、サイトゾル分画を採取した。これを酵素抽出液で 20 倍希釈し、サンプルとした。

測定には、マルチプレートリーダー (Thermo Fisher Scientific ; Varioskan flash) を用いて吸光度を測定した。

リアルタイム qRT-PCR

脂肪組織における遺伝子発現を調べるにあたり、リアルタイム RT-PCR を行った。使用したプライマーは、以下の通りである。コントロール遺伝子として、36B4 を用いた。PPAR γ には、PPAE γ 1, γ 2, γ 3 の 3 種類が知られているが、今回用いたプライマーは、 γ 1, γ 2 の両方を増幅させる配列である (PPAR γ 3 を増幅させるかどうかは、確認できなかった)。

表 2-5-1 リアルタイム RT-PCR で使用したプライマー

名前	サイズ (bp)	配列	PMID PrimerBank ID
F-PPAR γ	350	TCAGCTCTGTGGACCTCTCC	18719589
R-PPAR γ		ACCCTTGCATCCTTCACAAG	
F-CEBPa	124	CAAGAACAGCAACGAGTACCG	18719589
R-CEBPa		GTCACTGGTCAACTCCAGCAC	
F-GLUT4	127	GTGACTGGAACACTGGTCCTA	6678015a1
R-GLUT4		CCAGCCACGTTGCATTGTAG	
F-CD36	190	AATGGCACAGACGCAGCCT	17935225
R-CD36		GGTGTCTGGATTCTGGA	
F-36B4	239	TTTGGGCATCACCACGAAAA	18719589
R-36B4		GGACACCCTCCAGAAAGCGA	

cDNA の作成は、ReverTra Quick RT-Kit (Toyobo) を使用し、それを 3 倍希釈したものをサンプルとした。

リアルタイム qRT-PCR は、Applied Biosystems FAST 7500 Real-Time PCR システムサーマルサイクラー (Applied BioSystems) を使用し、THUNDERBIRD SYBRR qPCR Mix (TOYOBO) により行なった。PCR は、全て duplicate で行なった。

結論

詳細は割愛するが、自然発症肥満型糖尿病モデルマウスTSODとそのコントロールマウスTSNOを用いてアイSprant抽出質物の機能性を評価した結果、遺伝子レベルではむしろ糖尿病モデルマウスより、正常マウスの脂質代謝改善等の健康増進効果が見出される結果となった。

2-6 素材評価と健康食品及び化粧石鹸の試作

2-6-1 ピニトールの生理活性調査

ピニトールは、血糖値を低下させるのに効果的な天然の化合物である。工業的には、大豆やキャロブのような食用資源から抽出するのが一般的な製造方法であるが、この製法では抽出効率の悪さや、脱塩・分離精製など複雑な製造工程を辿らなければならない、製造コストに課題がある。そこで、米糠やトウモロコシ澱粉から精製されるイノシトールからのバイオコンバージョンなどの手法によって安価に提供するための手段が現在研究されている。一方、ピニトール単体としての作用機序は、科学的な見地から十分な評価が為されており、特に糖尿病と関連した学術論文は今までに40件以上報告されているなど、医学界からのニーズは大きい。ピニトールは特定保健用食品に多く認められる様な、いわゆる食後血糖の上昇を抑える作用機構とは異なったメカニズムによって血糖値を調整する希少な物質である。ピニトールは、体内に摂取されるとメチル基が外れた環状糖であるカイロイノシトールという物質に変換されることが確認されているが、このカイロイノシトールは、インスリン代謝の主要メッセンジャーであることが分かっている。（インスリンメッセンジャーとは、膵臓から分泌されたインスリンがブドウ糖を筋肉細胞に取り込む様に指示を發した後に展開されるインスリン代謝サイクル上の情報伝達物質であり、カイロイノシトールのほかにもmyo-イノシトールなどが知られている。）また、ピニトールは糖輸送担体を刺激してグルコースの細胞膜内への移行を促進することで血糖値調整に寄与するとの研究成果もあり、インスリン代謝との関係が深い。

2-6-2 健康食品および化粧品の試作

ストレス負荷によって、ビタミン類が高められたアイSprant末とピニトールを配合したサプリメントの試作を行った。また、アイSprantエキス配合の化粧石けんも試作した。（写真2-6-2-1）アイSprantエキスはINCI名をメセンブリアンテムム・クリスタリヌムエキス（mesembryanthemum crystallinum extract）と呼び、保湿成分として化粧品への配合が認可されている。アイSprantエキスは、固形アイSprant粉末100gを50%EtoH900 mLに10日間浸漬し、十分に水溶性物質を溶媒側に移行させた上でろ過を行うことで得た。

2-7 知的所有権について

本事業の研究開発において、昨年度から本年度にかけ、単独パラメータ制御によるアイスプラントの機能性成分の変動解析を実施し、いくつかの有効なストレス負荷パラメータを得ることができた（変移 A～E：図 2-2-2-1、2-2-2-1-1～2-2-2-4-1）。これらの栽培技術の確立には多大な時間と労力を要したため、ノウハウとして秘匿することも可能である。しかしながら、発明者の利益は当然保護されるべきものではあるが、同時にこれらの成果を開示することで、技術の累積的進歩に貢献することにつながる。そしてこれは、本事業の根底にある趣旨（基盤技術の高度化）に沿うものでもあり、更には、発明の保護及び利用を図ることにより、発明を奨励し、もって産業の発達に寄与することを目的とする我国の特許法（1 条）の趣旨にも合致する。そこで我々は、権利保護に加え、植物の人工制御栽培に関する産業の発達に寄与する目的で、これら技術成果を特許出願することにした。

平成 23 年度は、上述したアイスプラントの変移 A～E の栽培方法およびその植物体、この植物体から得られる天然機能性素材、この天然機能性素材を含むサプリメントに関して特許を出願した。そして表 2-9-1 に示す通り、本法から得られる植物体中の機能性成分の含有比率を指定することにより、特許権者の利益保護を図った。

表 2-9-1 出願方法により栽培されたアイスプラント中の機能性成分の含有比率

ピニトール	β -カロテン	ビタミン K	プロリン
1	0.01～0.05	0.001～0.005	0.2～1.2

更に、平成 24 年度は、アイスプラントからの脱塩を伴ったピニトール成分抽出技術を開発し（極性有機溶媒法：図 2-2-2-1、2-3 本文）、この手法に冷却技術を加える方法をもって特許を出願した。本法は、アイスプラント抽出ピニトールに限定した点と、これまでの一般的な脱塩・抽出方法（電気透析法やイオン交換樹脂法など）に比べ製造コストが格段に低い点で、特許権者の利益保護を図った。つまり、もし本出願の特許権が設定され、本権の存続期間中に特許侵害が疑われるアイスプラント抽出ピニトールが製造・販売された場合は、その販売価からの推定や製造コストの開示請求などにより侵害を証明できると思われる。

一方、これら 2 つの技術は、アイスプラントに限定して出願を行っているが、これらは、他の植物や他の技術分野に応用の利くものである。そのため、本件の出願公開と同時に技術文献としての役割を多いに果たすと思われる。そして、技術の累積的進歩に貢献し、ひいては産業の発達に寄与すると考える。

以上、2 年間にわたる本事業の成果として、2 件の特許出願を為し得た。

第3章 全体総括

平成23年度から始まった本基盤技術高度化支援事業は、環境制御システムの構築と、機能性物質を高めるためのストレス栽培方法の検証、その成分動態調査、そして機能性及び安全性に関する評価の実施をもって、一連の事業目的が完結した。

本事業成果は、主に以下の点からその新規性を有する。一つ目は、植物工場の高度IT化が図られている点である。ストレス負荷型装置（ソフトウェア）は、リモートシステムと植物画像解診断システムが採用されており、遠隔からの操作と判断が可能となることで作業管理性の向上が図られている。植物工場は365日24時間の連続運転を前提とするため、リモート管理のもつ意義は大きい。そして、次に特筆すべきがストレス因子を外部環境のパラメータとして定義付けしている点である。作物の生長促進や味覚向上を目的として好適環境を検証することは一般によくあるが、機能性成分の産出を目的としたストレス因子の検証は、過去事例が少ない。今回の研究では、ストレス因子がどういった機能性物質の上昇と相関性を有するのかを明らかにしており、学術的貢献も非常に大きいと考えられる。さらに、本事業を通じて2件の技術特許を出願したことも成果である。

翌年度からは、本事業成果を活用した機能性食品などの食品開発に取り組み、その販売促進に繋げる具体的活動を展開する計画である。

最後に本研究開発の推進にあたり2年間に渡ってご支援を頂いた各関係機関、並びに本稿の執筆に尽力頂いた関係者各位には、謝意を表したい。