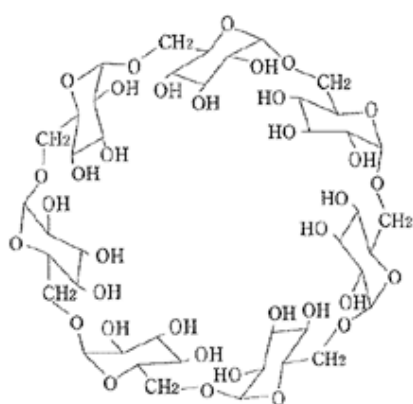


第1章 研究開発の概要

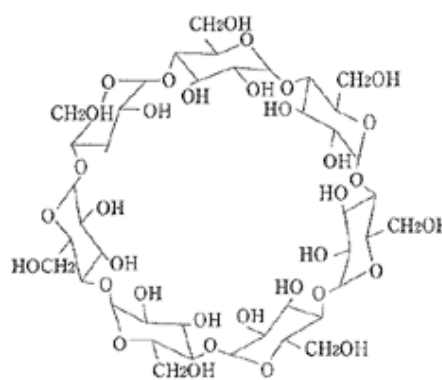
1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標

サイクロデキストラン（C I）は、グルコース分子が環状に結合したオリゴ糖である。C Iの化学構造は、サイクロデキストリン（C D）とよく似ているが、C Dの結合様式が α -1,4結合なのに対し、C Iは α -1,6結合となっている。

C Iは、7~17個のグルコース分子が環状に連結した構造を持ち、純粋なものは無色、無味、無臭で水溶性が高く、化学的に安定で、加熱や酸・アルカリにも強いという特徴がある。



サイクロデキストラン CI-7



サイクロデキストリン β -CD

C Iは、C Dと比較して口径が大きく厚みが薄く、分子のフレキシビリティが非常に高いと予想され、極めて水溶性が高く、常温で等量以下の水に溶解する。これはC Dでは可溶化できない難水溶性の物質をC Iが可溶化できる可能性を期待させるものである。また、C Iの大きな特徴の一つとして、歯垢の原因となる不溶性グルカンの合成を強力に阻害することが確認されており、虫歯の形成を抑制することが期待される。

抗う蝕性C Iを有効成分として含有することを特徴とする抗う蝕剤に関する特許は、1993年に（財）野田産業科学研究所とキッコーマン株式会社並びに農林省食品総合研究所の3者により出願され、その関連特許も多いが、その多くはサイクロデキストラン合成酵素生産菌の遺伝子組換え菌を使用するものが多く、現在のC I生産に関わる特許は、最初の原特許となった冒頭記述の特許のみである。

平成13年に原特許に関するサイクロデキストランの生産菌を譲り受けて、食品産業再生新技術創出技術開発事業の受託をはじめとして、独立行政法人食品総合研究所（現：（独）農研機構・食品総合研究所）と共同で、平成14~16年度の沖縄産学官共同研究推進事業および平成17年度の地域新生コンソーシアム研究開発事業を実施し、その間に多くの知見が得られ、現在、C Iを配合した甘味料（製品名：「黒糖はちゅら」、「C I SMGARは

ちゅらJ) が(株)シー・アイ・バイオから製品化されている。

しかし、原料に精製グラニュー糖を用いていることから原料コストが高いという課題がある。また、現在の発酵・精製工程では、C I以外の様々な副生成物が多く生成することからC Iの純度が低いという課題も有している。そのため、副生成物により包接作用などの機能性が阻害されることから、新たな製品開発のネックになっている。包接機能は、特に、物質の安定化、有効成分の除放・バイオアベイラビリティの向上、物質の可溶化など、医薬分野への応用に用途が拡大しており、C Iの用途展開としては有望な状況にある。従って、精製グラニュー糖に替わる安価な原料による製造技術の開発や、C Iの純度を向上させるための高品質化技術が求められている。現在の精製グラニュー糖を原料とした発酵・精製工程では、原料コストが高く、副生成物も多く生成されるためC Iの精製コストもかかるという課題がある。

精製グラニュー糖の代わりに、麩を製造する際に副産物として排出されるデンプンを用いることにより、原料コストの低減がはかれる可能性があるが、デンプンを原料としたC Iの発酵・精製技術は確立されていない状況である。デンプンを原料とした場合、精製グラニュー糖と比較して副生成物（主にグルコース）が少ないため、このデンプンを原料とした発酵・精製技術が確立出来ればC Iの生産効率化と高品質化だけでなく、生産コスト低減も可能となる。

そこで、製麩副産物であるデンプンを原料にした高純度C Iの発酵・精製工程に係る技術を開発することを目的とし、C I生産効率化を検討し高純度C I（純度 $\geq 50\%$ ）の製造を目標とする。

1-2 研究体制

本プロジェクトでは、図1の通り、管理法人と2機関で組織し、研究開発を実施した。また、表1には管理員、研究員、およびアドバイザーの一覧を示す。

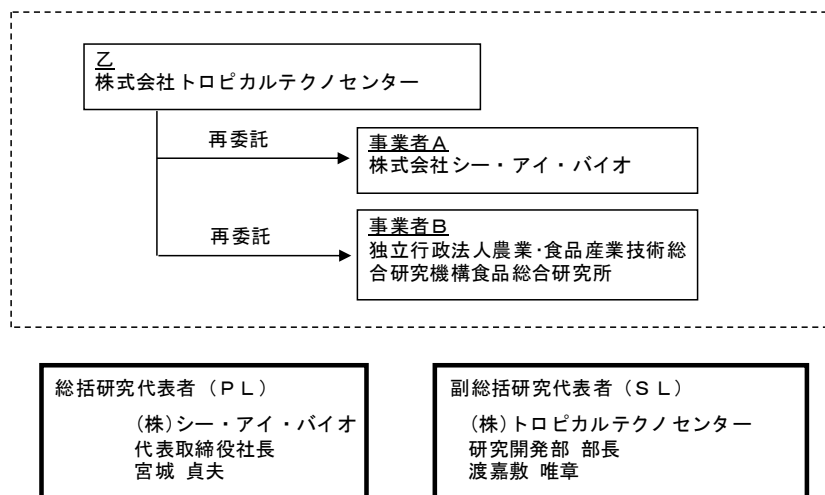


図1. 研究実施体制

表1. 研究実施担当者一覧表

氏名	所属	役職	担当
名嘉 博幸	(株)トロピカルテクノセンター	事業推進部 部長	管理員
安慶名 千賀子	(株)トロピカルテクノセンター	事業推進部 スタッフ	管理員
伊保 満月	(株)トロピカルテクノセンター	業務支援部	管理員
渡嘉敷 唯章	(株)トロピカルテクノセンター	事業推進部 マネージャー	SL
高良 亮	(株)トロピカルテクノセンター	事業推進部 スタッフ	研究員
池端 真美	(株)トロピカルテクノセンター	事業推進部 スタッフ	研究員
吉野 敦	(株)トロピカルテクノセンター	事業推進部 スタッフ	研究員
金城 健作	(株)トロピカルテクノセンター	事業推進部 臨時職員	研究補助
儀間 健司	(株)トロピカルテクノセンター	事業推進部 臨時職員	研究補助
宮城 貞夫	(株)シー・アイ・バイオ	代表取締役社長	PL
儀部 茂八	(株)シー・アイ・バイオ	開発製造部長	研究員
伊是名 信一郎	(株)シー・アイ・バイオ	開発製造部係長	研究員
舟根 和美	(独)農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所	微生物利用研究領域 醗酵細菌ユニット長	研究員
川端 康之	大阪樟蔭女子大学	学芸学部 健康栄養科 准教授	アドバイザー
照屋 隆司	(有)開発屋でいきたん	代表取締役	アドバイザー
稻福 桂一郎	金秀バイオ(株)	研究開発部 次長	アドバイザー
平良 昭	オリオンビール(株)	商品開発部 部長	アドバイザー

1-3 成果概要

本研究では、(1) C I 生産および精製技術の最適条件確立、(2) C I 転換酵素力価増強技術の確立、(3) 高純度 C I の包接機能検証、(4) 安全性の確認、を実施した。

(1) C I 生産および精製技術の最適条件確立

製麩デンプンから C I を生産するためには、2 種類の酵素を必要とする。そのため、それぞれの酵素を産生する 2 種類の微生物を培養して、C I を生産する技術を検討してきた。しかし、本事業で選抜した選抜菌株を詳細に調べた結果、この菌株だけで製麩デンプンから C I を生産できることが分かった。そこで、本年度はこの選抜菌株由来の酵素を用いて、C I 生産最適化条件を確立し、200 L プラントスケールにおいても、これまでのショ糖を原料とした製法と比較して、同等以上の C I 転換率で C I を生産することができた。

C I 精製工程において、澱粉残渣が MF 膜の根詰まりの要因となり、凍結処理や連続遠心分離により C I 反応液を処理することで、澱粉残渣を除去することができた。また、改良 NF 膜により C I 精製の最適化を検討し、改良前と比較して、C I 純度が上昇した。このときの C I 純度は 54.4% を示しており、目標としていた純度 50% 以上を達成できた。純度 50% 以上の C I を生産する場合、これまでのショ糖を原料とした方法では、夾雑物を多く含むため、NF 膜処理後にさらに合成樹脂に吸着させ、エタノールにより C I 含有画分を溶出し精製するため高コストかつ労力を要する。従って、澱粉での C I 生産では樹脂による精製を必要とせず純度 50% 以上の C I が得られることから、コスト 50% 以下で高純度 C I 生産が可能であると考えられる。

(2) C I 転換酵素力価増強技術の確立

平成 23 年度では、トロピカルテクノセンターで保管されている沖縄微生物ライブラリーや育種株などから選抜を試みた結果、従来の微生物と比較して酵素力価の高い 0C478 菌株を選抜することができた。本年度は本菌株の保存方法や培養最適化を検討し、酵素生産安定化に繋げることができた。60L プラントスケールでの実証試験を行ったところ、酵素力価は 0.61 U/mL を示しており、目標とする 0.6U/ml 以上を達成できた。また、生産した酵素の安定性も評価し、保存方法や品質安定化へのノウハウも構築することができた。

(3) 高純度C Iの包接機能検証

高純度C I素材の包接機能を明らかにすることは、C Iの利用可能性を大幅に広げるためにも極めて重要な課題である。昨年度は、包接機能の一つ、食品の味のマスクング、風味改善効果などを検証すべく、味覚センサーを用いて沖縄特産食品の食味改善効果試験方法を検討し、現行のC I-Plus30を評価した。本年度は、純度50%以上の高純度C Iを用いて、評価し既知包接剤と比較し、高純度C Iの優位性を検証した。その結果、既知包接剤とは異なる包接性を示すことを示唆するデータがいくつか得られ、優位性を示すことができた。また、C I包接の理化学特性として緑茶の退色遅延効果を評価し、特にC I-7が緑茶の緑色保持能が強いことが明らかとなった。このように、既知包接剤とは異なる、C Iの包接特性が明らかになりつつあり、今後の利活用に大きな期待が持てた。

(4) 安全性の確認

これまで、ショ糖を原料として生産されてきたC Iと異なり、本事業では小麦由来のデンプンを原料にしたC I生産技術の開発を行っている。C I自体は、グルコース分子が環状に連結したオリゴ糖であることから比較的安全性が高いと考えられるが、原材料由来の不純物等も含むことから動物試験により基本的な安全性を早期に確認する必要がある。そこで、製麩澱粉を原料に試作した高純度C Iについて、単回投与による急性毒性試験や28日間反復投与による試験を実施した。その結果、どちらの試験でも特に大きな問題はなく、澱粉を原料として生産されたC Iについても安全性が示された。

1-4 当該研究開発の連絡窓口

(株) シー・アイ・バイオ

代表取締役社長 宮城 貞夫

〒901-0205 豊見城村字根差部 671-4

TEL : (098) 850-0330 FAX : (098) 850-0330

E-mail : sd.miya@ci-bio.co.jp

(株) トロピカルテクノセンター

事業推進部 マネージャー 渡嘉敷 唯章

〒904-2234 沖縄県うるま市字州崎 5-1

TEL : (098) 982-1100 FAX : (098) 982-1103

E-mail : toka@ttc.co.jp

第2章 本論

2-1. C I 生産および精製技術の最適条件確立

2-1-1 : C I の効率的生産技術の確立

(担当 : TTC、シーアイバイオ)

(1) 目的

製麩副産物から得られる安価な澱粉（製麩澱粉）を原料に用いたC I 生産では、澱粉をデキストランに変えるデキストラナーゼ (DGase) とデキストランを環化してサイクロデキストランにするサイクロデキストラン合成酵素 (CIase) の複数の酵素が必要である。そのため、これらの酵素を得るには2種類の菌株をそれぞれ培養する必要がある。一方、昨年度の検討により、選抜したOC478 菌株由来の酵素では、単独で澱粉からC I 生産が可能であることが明らかとなった。そのため、製造工程の簡略化が可能となり生産効率化が見込める。そこで、本年度は、OC478 菌株由来酵素を用いて、C I 生産条件の検討、およびスケールアップ試験によるC I 生産性評価を実施し、C I 生産効率化を試みた。

(2) 実験方法

C I 生産効率化に向けて、C I 生産に係る酵素反応諸条件を検討した。具体的にはC I 生産性の高い条件を見出すため、図2より、酵素力価、基質濃度（澱粉原料量）、反応時間、pH、反応温度、攪拌等の諸条件がC I 生産性に与える影響を調べ評価し、これら評価結果より、スケールアップ試験を実施し事業化への応用検証を行った。

なお、評価項目は、下記の方法の通り、総C I 濃度、グルコース濃度、pHを適宜測定して評価した。

反応条件	
反応液組成	
☐ OC478菌株酵素 (CIase)	酵素力価 10、25、50、100 mU/ml
☐ 製麩澱粉(基質)	基質濃度 1、2%
☐ 酢酸Na/CaCl ₂ Buffer (pH5.5)	Buffer/Ca有無、pH(4.0、4.5、5.0、5.5、6.0)
反応時間	反応時間 3、6、16、24℃
反応温度	反応温度 15、20、25、30、40℃
攪拌/静置	スターラー回転速度 強、弱、無
酵母添加	ドライースト添加 0.001、0.01、0.1%
α 化工程	加熱様式 オートクレーブ(121℃)、湯煎(95℃)

図2. C I 生産最適化への反応条件

①試薬・試料の調製、およびC I生産性評価

i) 0.2M 酢酸Na Buffer/50mM CaCl₂ (pH5.5)

予め、1M 酢酸ナトリウム、1M 酢酸、0.5M 塩化カルシウム二水和物の水溶液を調製し、これらを適宜混合して50mM CaCl₂を含む0.2M 酢酸ナトリウム、および0.2M 酢酸の水溶液を調製した。この2つの水溶液を適宜混合してpH 5.5に調整し0.2M 酢酸Na Buffer/50mM CaCl₂とした。

ii) 4% 製麩澱粉水溶液

製麩澱粉(4g)を計量し、100mlの水道水に攪拌しながら加えて分散し、オートクレーブ(121°C、15分間)にてα化処理をした。処理後、澱粉水溶液の均一化を保持させるため使用までスターラーにて攪拌した。

iii) 0C478 菌株由来酵素

酵素生産のため培養した0C478 菌株懸濁液を、遠心分離(8,000rpm、20分、4°C)し、上清を0.2μm フィルターにてろ過し、酵素原液を得た。必要に応じて酵素原液をビバスピンの分画分子量5k Da(ザルトリウス製)により濃縮処理をした。

iv) 総C I濃度

反応停止後の反応液に等量のアセトニトリルを添加し攪拌して遠心分離後(15,000rpm、5分、室温)、上清を0.45μm フィルターにてろ過し、C I-7、C I-8、C I-9、C I-10、C I-11、およびC I-12の濃度の総和を総C I濃度として算出した。分析方法は、コロナ荷電化粒子(CAD)や示差屈折(RI)の検出器を用いてHPLCで測定し、CITase力価は反応0時間のブランク値のC I濃度を引いて算出した。

v) グルコース濃度

反応停止後の反応液を遠心分離後(15,000rpm、5分、室温)、上清を0.45μm フィルターにてろ過し、試料に用いた。グルコース濃度測定は、グルコースCIIテストワコー(Wako製)を用いた。測定方法は、付属の取扱説明書に準じて一部改変し、グルコース標準液の調製法(表2)および操作法は下記の通り実施した。

vi) pH

反応停止後の反応液を遠心分離後(15,000rpm、5分、室温)、上清を0.45μm フィルターにてろ過し、試料に用いた。pHの測定は、ツインpHメーターAS-212を用いた。

表 2. グルコース標準液の調製法

No.	濃度(mg/dL)	標準液 I	標準液 II	蒸留水
Std.1	5	250 μ l	-	750 μ l
Std.2	10	500 μ l	-	500 μ l
Std.3	20	原液	-	-
Std.4	30	-	375 μ l	250 μ l
Std.5	40	-	500 μ l	125 μ l
Std.6	50	-	原液	-

操作法

- ↓ 96Well MicroPlate に蒸留水(ブランク)、標準液、試料を 15 μ l ずつ添加.
- ↓ 発色液を 200 μ l ずつ分注.
- ↓ 混合し、室温にて 15 分間反応.
- ↓ マイクロプレートリーダーを用いて、A505nm における吸光度を測定.

(3) 結果と考察

① C I 生産の最適化検討

澱粉を用いた C I の製造では、これまで 2 種類の酵素を必要とし、2 種類の菌株をそれぞれ用いた酵素生産を行う必要があった。一方、昨年度の検討より、選抜した 0C478 菌株由来酵素を用いると、その酵素単独で C I 生産が可能であることが明らかになった。そこで本年度は 0C478 菌株由来酵素を用いた C I 生産効率化を検討するため、酵素力価、基質濃度等の諸条件による CI 生産性への影響を調べた。

酵素力価、基質濃度、および反応時間の影響：初めに、本菌株由来酵素を用いて、酵素力価、基質濃度、および反応時間の影響を調べた。その結果、図 3-1 および 2 より、基質濃度(製麩澱粉量)は 1%と比較して 2%で C I 濃度が高くなることが分かった。なお、データには示していないが、基質濃度が 1%より低い場合や 2%を超えると今回の反応条件では C I 生産性が低下することが確認されている。酵素力価においては、反応時間が 3-6hr では 100 mU/ml、16-24hr では 25-50 mU/ml で C I 濃度が高値を示した。このことから、反応時間が 3-6hr では、酵素を多く必要とすることや実製造工程での区切りが設定しにくいことを考慮して、酵素力価 25-50 mU/ml、基質濃度 2%、および反応時間 16-24hr を C I 生産における最適条件とした。

反応温度による影響：反応条件は上記結果より基質濃度を 2%、酵素力価を 30 mU/ml とし、温度を変化させて静置反応させた。その結果、反応 16-24hr において、20-30 $^{\circ}$ C で C I 濃度が高値を示した。一方、従来条件である 40 $^{\circ}$ C では反応 16hr 以降の C I 濃度が低下し、高温ほど反応後期の C I 生産性が低減することが明らかとなった(図 4-1)。さらに、夏場の工場内の気温は 30 $^{\circ}$ C を超えることがあることから、高温域での詳細な反応も試みた。その結果、35 $^{\circ}$ C 以内の反応では 30 $^{\circ}$ C と比較して C I 濃度の顕著な違いはなく

(図4-2)、C I 生産性に特に問題ないことが示唆された。このことから、反応温度は16-24hrでの反応において20-30°Cが最適条件で、35°Cを超えない設定が必要であることがわかった。

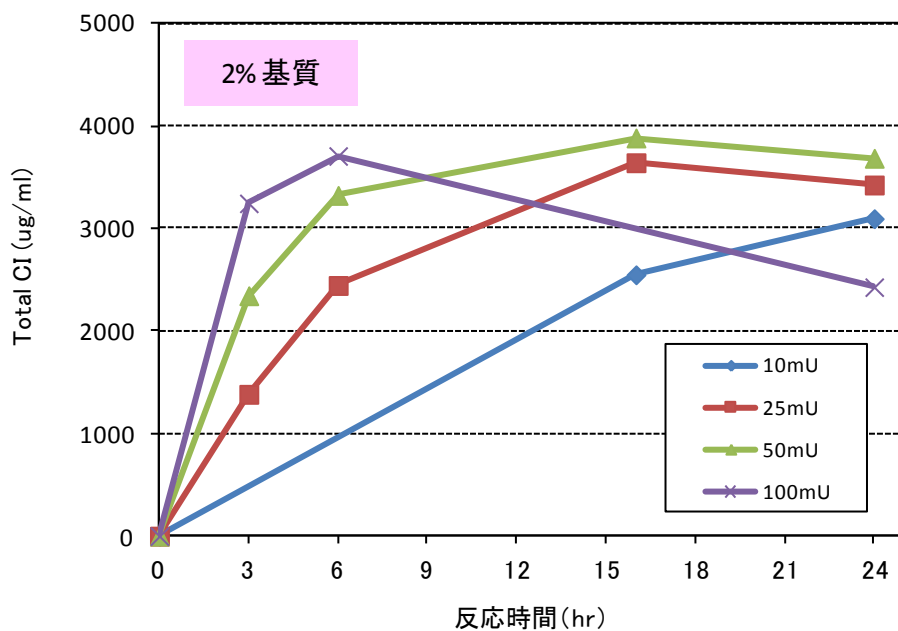


図3-1. 2%基質での酵素力価によるC I 濃度の変化

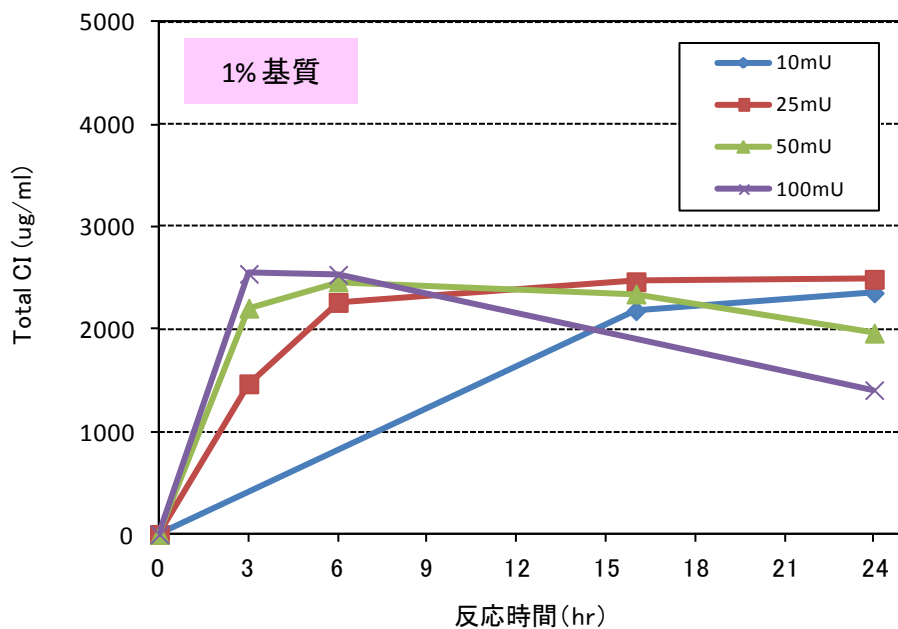


図3-2. 1%基質での酵素力価によるC I 濃度の変化

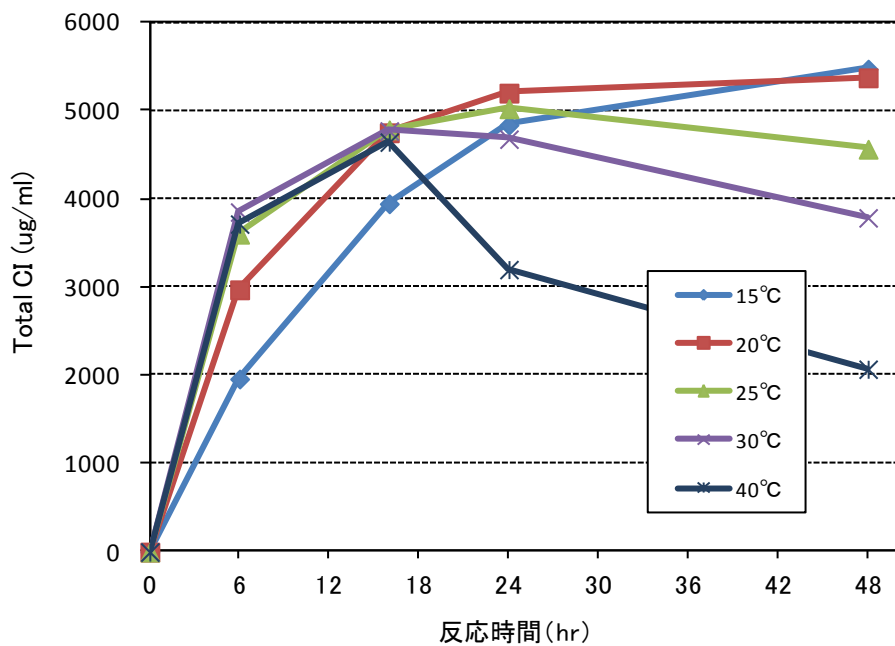


図 4-1. 反応温度による C I 濃度の変化

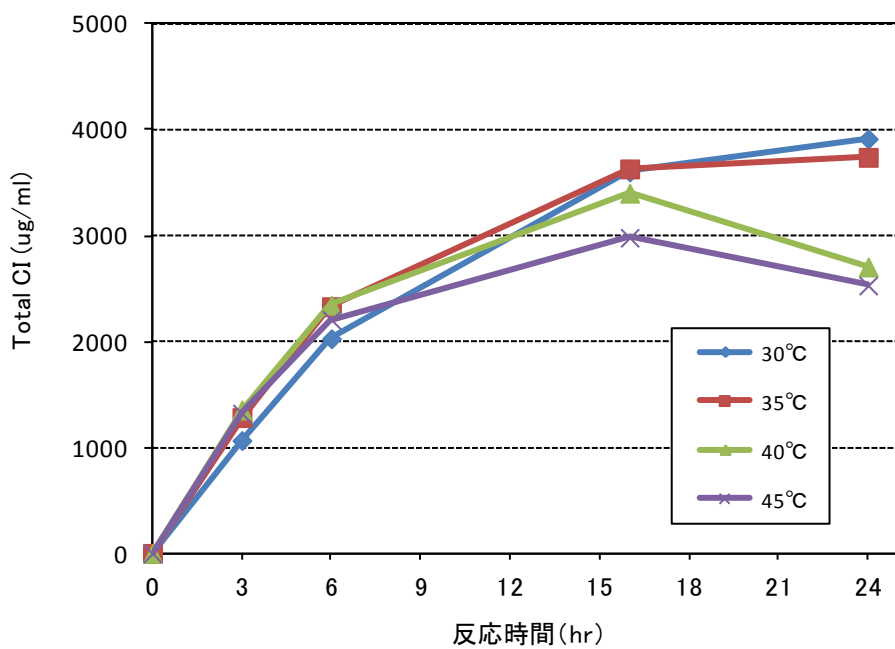


図 4-2. 高温域反応における C I 濃度の変化

pHの影響: 昨年度の研究結果では、複数の酵素を用いてC I生産反応試験を実施し、pH5.0を下回るとC I生産性が低減することが確認されている。ここでは、0C478菌株由来の酵素単独によるC I生産反応試験について、初発のpHを変えて実施し、C I生産性への影響を評価した。反応条件は、基質濃度を2%、酵素力価を30 mU/ml、反応温度を25℃（室温）として静置反応させた。その結果、図5より、0C478菌株由来の酵素単独においても、複数酵素を用いた従来製法同様に、pH5.0を下回るとC I濃度が低減し、pH4.5を下回ると激減することがわかった。このことから、初発の反応液のpHを5.0より低くならないように設定することがC I生産最適化に重要であることがわかった。

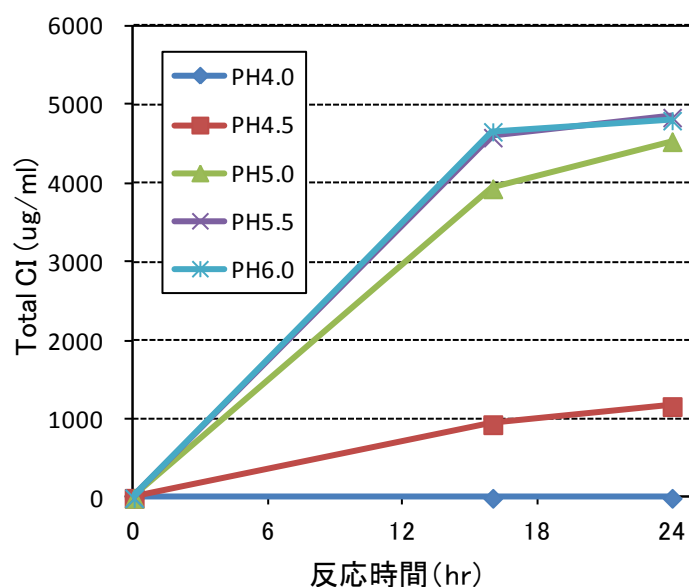


図5. pHによるC I濃度の変化

攪拌の影響: ここでは、攪拌によるC I生産性への影響を調べた。反応条件は、基質濃度を2%、酵素力価を30 mU/ml、反応温度を25℃（室温）とした。攪拌の条件は、回転摩擦による酵素失活への影響を考慮してフィッシュクリップを用いてスターラー棒を容器の底から浮かせて攪拌し、回転速度を弱（試薬を溶かす程度の通常の回転）、強（泡立つくらい激しい回転）に設定し、静置による条件と比較した。その結果、攪拌により反応16hr後のC I濃度が、静置と比較して、攪拌の強弱によらず若干高値となり、僅かながら反応速度が上がる程度であった（図6）。このことは攪拌強度によるC I生産性への顕著な影響がないことを示し、攪拌は反応液の均一化に必要最低限で済むことが示唆された。

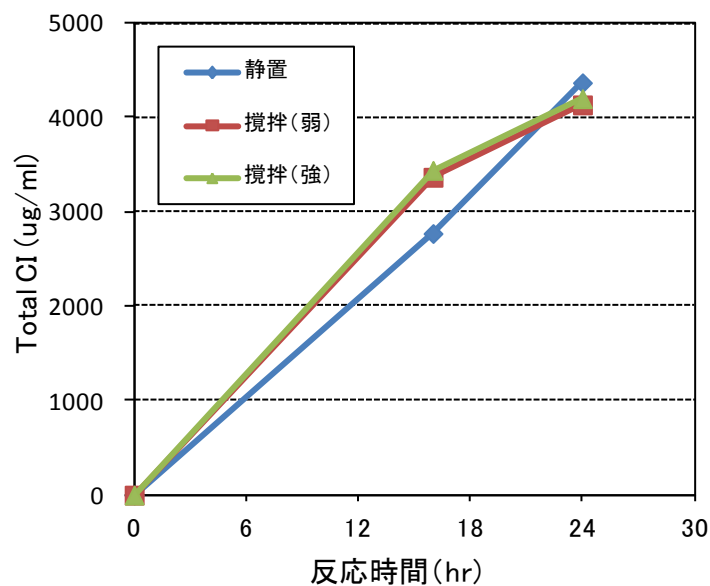


図 6. 攪拌による C I 濃度の変化

酵母添加の影響： C I 生産には、副産物としてグルコースが蓄積するため、この蓄積が C I 生産性の律速要因の一つとなっている。そこで、酵母添加により、C I 生産反応と同時にグルコースの蓄積を抑えることが出来れば C I 生産性向上が期待でき、かつ C I 純度向上にも繋がることから以下の試験を試みた。反応条件は、基質濃度を 2%、酵素力価を 30 mU/ml、反応温度を 25°C（室温）とし、ドライイーストの添加量を変えて反応させた。その結果、16hr の反応では、酵母添加による C I 濃度への顕著な影響が見られなかったが、反応時間が長くなると (24hr)、若干の C I 濃度低減が見られた (図 7-1)。一方、反応液中に蓄積したグルコース濃度は酵母の添加量に応じて低減することがわかった (図 7-2)。このことから、今回の試験では、酵母添加による C I 生産性向上は認められなかったが、グルコースの蓄積を低減することができたので C I 高純度化に応用可能であることが示唆された。

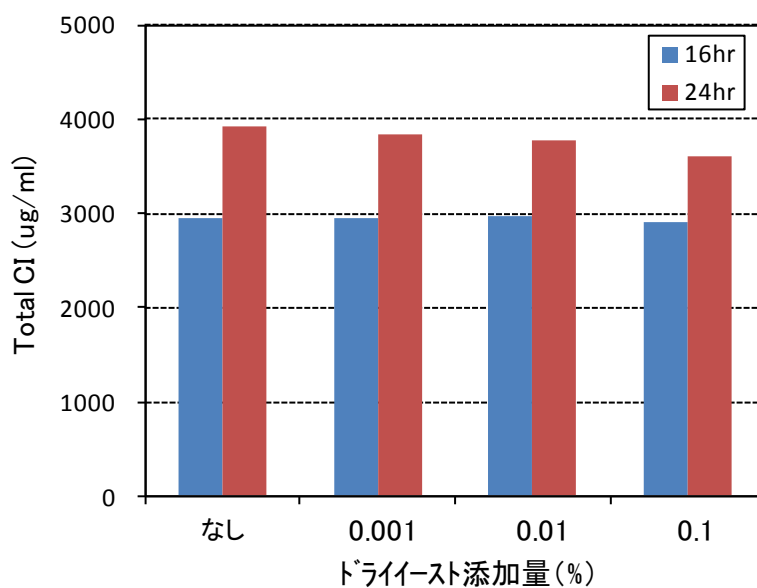


図7-1. 酵母添加によるCI濃度の変化

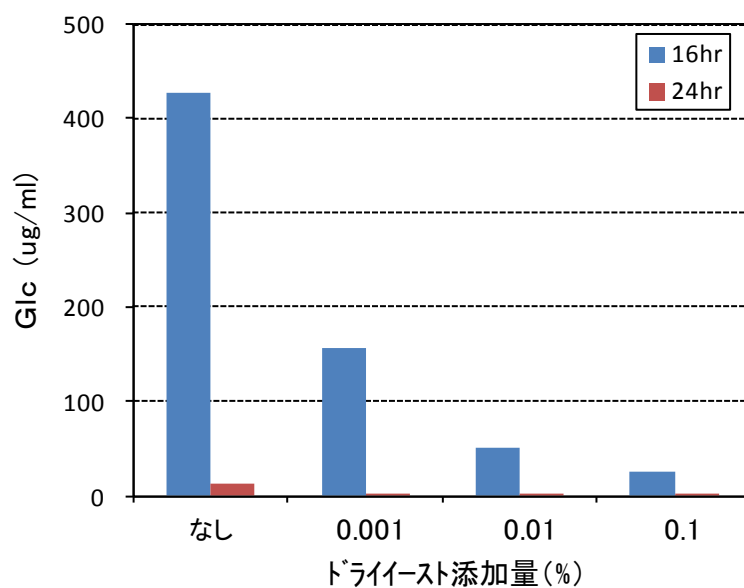


図7-2. 酵母添加によるグルコース濃度の変化

澱粉の α 化工程による影響：澱粉を原料としたC I生産において、澱粉の α 化工程が必要となる。これまでは小規模での試験であったため、簡便かつ一定条件に制御し得るオートクレーブにて α 化した澱粉にBufferを添加し、酵素を混合してC I生産反応試験を行ってきた。ここでは、実製造に即した α 化条件を検討するため、反応液組成がオートクレーブでの条件と合うように、水道水に塩化カルシウム二水和物、酢酸ナトリウムの順に添加し、酢酸にてpHを5.5に調整後、澱粉を加えて湯煎にて加熱し93-95 $^{\circ}$ Cに達した後、時々攪拌しながら30分間保持した。攪拌しながら冷却後、酵素を加え反応し、オートクレーブでの条件と比較した。なお、反応条件は、基質濃度を2%、酵素力価を30 mU/ml、反応温度を25 $^{\circ}$ C（室温）として静置反応させた。その結果、湯煎で α 化した条件においても、オートクレーブと比較して、遜色なくC Iの生産が可能であることがわかった（図8）。このことから、湯煎による α 工程をスケールアップ試験に応用し、実製造試験への可能性が期待できた。

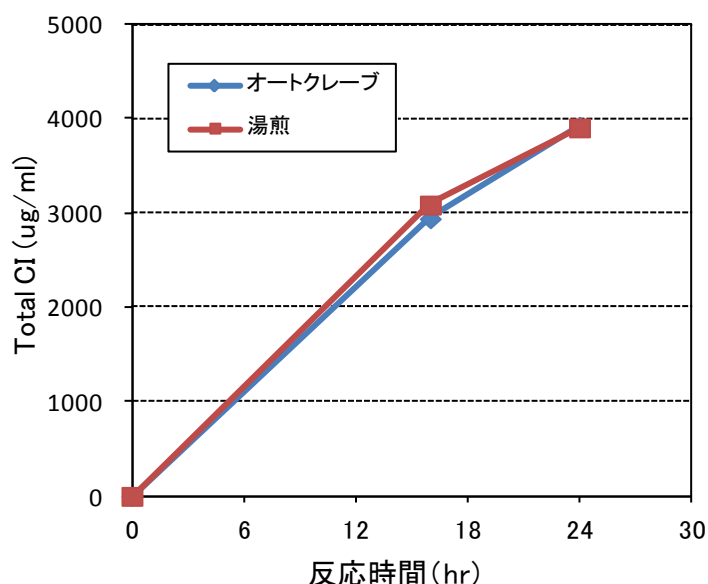


図8. α 化工程の違いによるC I濃度の変化

酢酸Na Buffer/CaCl₂の有無の影響：これまではC Iの生産安定化のため、酢酸Na BufferやCaCl₂はC I生産反応における重要な組成物の一つであった。しかしながら、Buffer由来の酸臭やCaCl₂がそのままC I製品に移行しC Iの品質に影響する可能性が出てきた。そこで、本試験ではこれら酢酸Na BufferやCaCl₂のC I生産性への影響を調べ、これら組成物を必要とするかどうか検討した。反応条件は、基質濃度を2%、酵素力価を30 mU/ml、反応温度を25 $^{\circ}$ C（室温）として静置反応させた。その結果、澱粉を水道水で α 化した溶液のみに酵素を添加してのC I生産条件（Water）でも、酢酸Na Buffer

や CaCl_2 の添加同様の結果が得られた (図 9-1)。一方、図 9-2 の pH の変化については、Buffer なしでは、初発の pH が高く、反応 24hr 後の pH が低くなることがわかった。このことから、0C478 菌株由来酵素を用いた澱粉での C I 生産反応において、反応後期の pH が低下する傾向が見られるものの、特に Buffer や CaCl_2 の添加は必要としないことがわかった。そのため、C I の生産工程簡略化や精製の負担軽減によるコスト削減が期待できる。

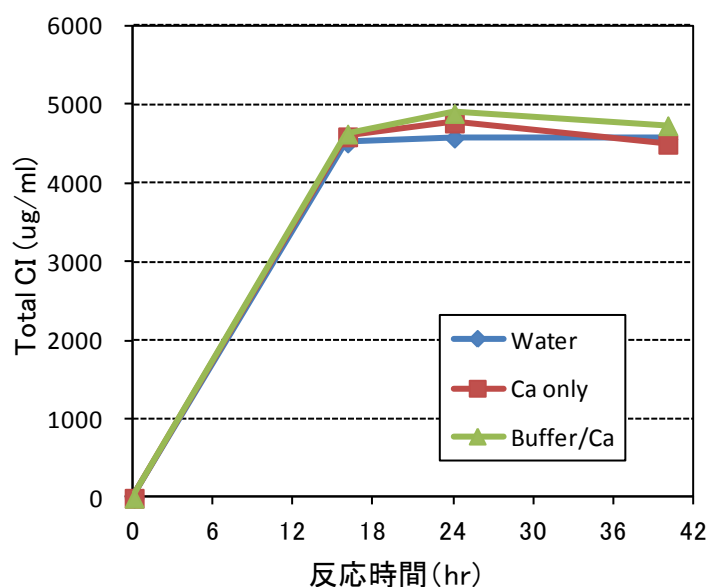


図 9-1. 酢酸 Na Buffer/ CaCl_2 の有無による C I 濃度の変化

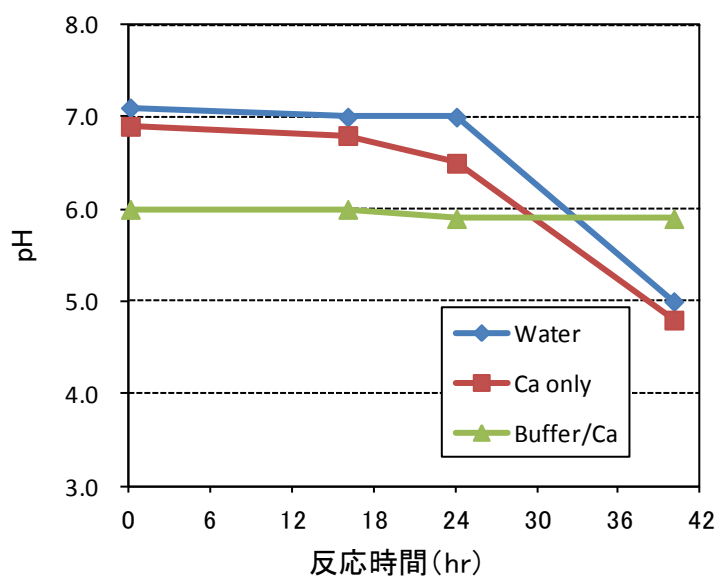


図 9-2. 酢酸 Na Buffer/ CaCl_2 の有無による pH の変化

②スケールアップC I 生産試験 (10Lスケール)

0C478 菌株由来酵素を用いたC I 生産最適化条件を見出すべく、様々な条件を検討し、小スケールによる試験では安定的に、これまでの2種類の酵素を必要とした従来法と比較して、高い水準でC I 生産が可能となった。そこで、10Lスケールアップ試験を実施し、実製造への応用可能性を検証した。前ページの湯煎による澱粉の α 化を行い、反応条件を基質濃度 2%、酵素力価 30 mU/ml、反応温度 25°C (室温) として静置反応させ、小スケール (5ml) での生産と比較した。その結果、スケールアップに伴う、C I 濃度、グルコース濃度、pH変動は、小スケールと比較して顕著な違いは見られなかった。このことから、実製造規模へのスケールアップ試験においても同等なC I 生産性が期待できる。

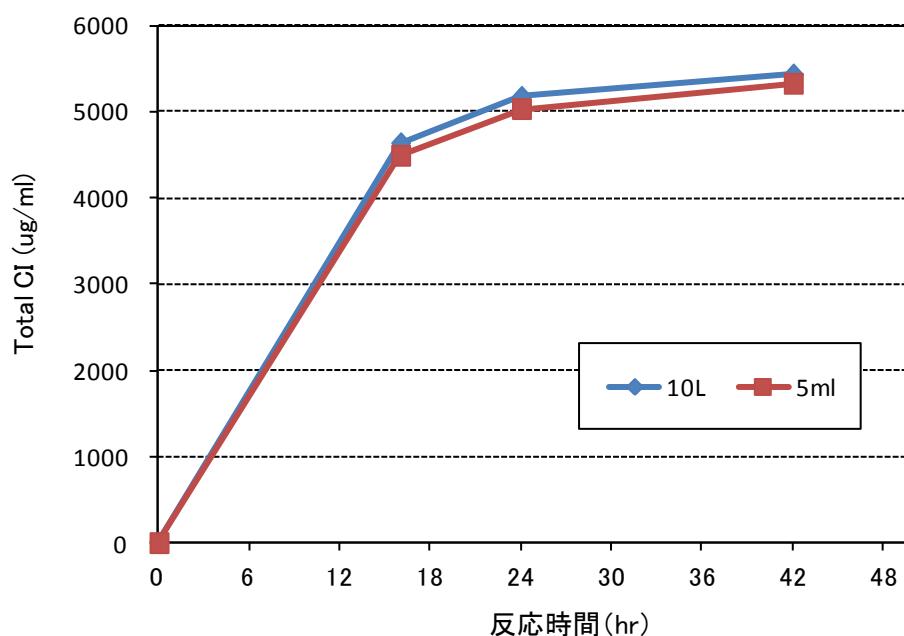


図10-1. スケールアップ試験によるC I 濃度の変化

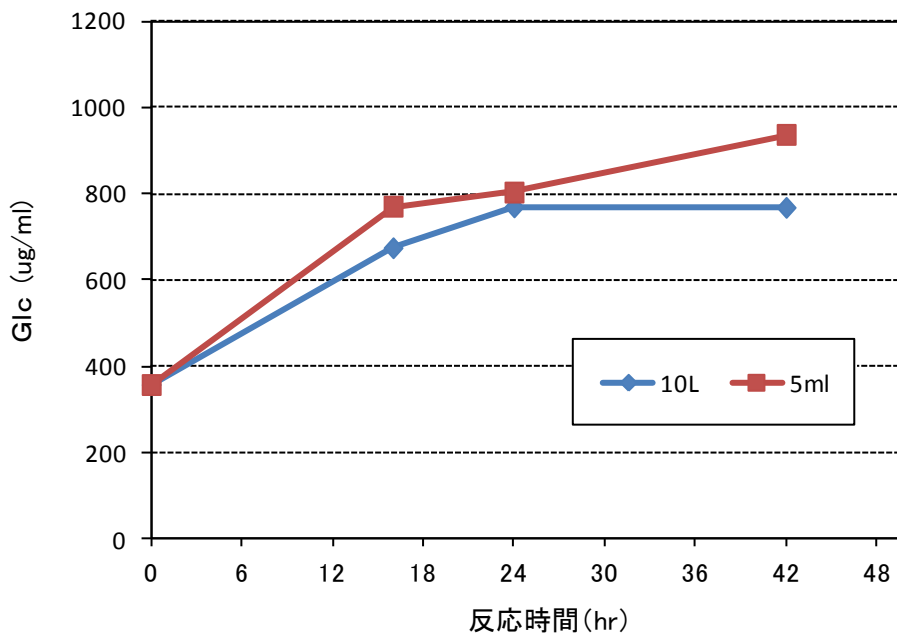


図 10-2. スケールアップ試験によるグルコース濃度の変化

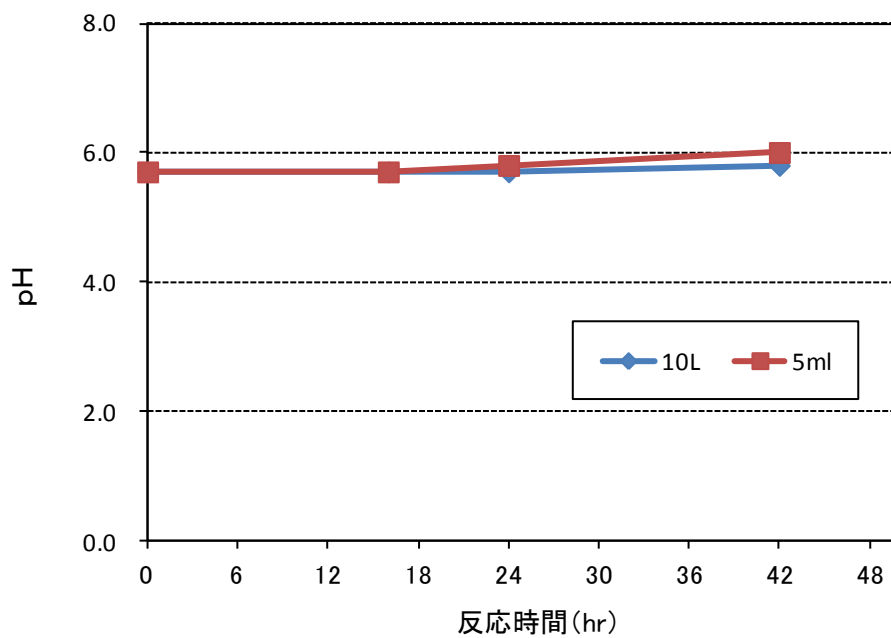


図 10-3. スケールアップ試験による pH の変化

③プラントスケールでのC I 生産実証試験（150-200L スケール）

ここでは、実製造規模であるプラントスケールでのC I 生産を実施し、事業化への応用可能性を検証した。実施条件は、水道水に塩化カルシウム二水和物、酢酸ナトリウムの順に添加し、酢酸にてpHを5.5に調整後、澱粉を加えてパス釜にて加熱して α 化処理した。攪拌しながら冷却後、JFMで培養生産したOC478 菌株由来酵素を添加して終力価 20 mU/ml、室温（30-35°C）、基質濃度 2%にて攪拌しながら200Lのスケールで反応させた。その結果、図11より、200LのスケールにおけるC I 生産について、反応17hrでC I 濃度がプラトーに達しており、ラボでの10Lスケールアップ試験での推移と類似することがわかった。一方、10Lスケールと比較してC I 生産性が低く、その要因については今後の課題として残された。しかし、従来製法であるショ糖からのC I 生産と比較すると、同基質濃度（原料量）当たりのC I 転換率は15%を超えており、従来製法の13%程度より高く、製麩澱粉を原料に用いた方が、C I 生産性が高いことがわかった。また、反応時間が長くなるに従って、重合度の大きいC I ができる傾向が示されたことから、反応時間を制御することで重合度の異なるC I を適宜製造できる可能性も見えてきた。

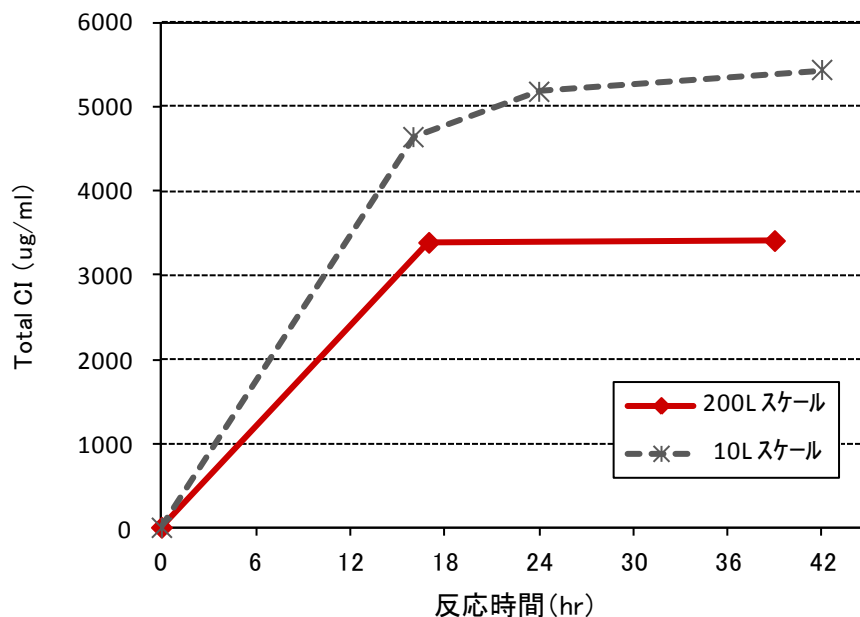


図 1 1. 200L プラントスケールでのC I 濃度の変化

表 3. 各C I 濃度の経時変化

反応時間							(ug/ml)
	CI-7	CI-8	CI-9	CI-10	CI-11	CI-12	Total
17hr	990	1488	622	180	101	0	3381
39hr	808	1272	786	200	190	146	3402

次に、C I 生産反応において、これまでは酢酸 Na Buffer や CaCl_2 を添加することで酵素力価の増強や安定化により、C I 生産性を高めることができた。一方、ラボの検討により、0C478 菌株由来酵素ではこれら製剤の添加なしでも遜色なく C I 生産が可能であることが明らかとなった (図 9-1 参照)。そこで、本試験では、酢酸 Na Buffer や CaCl_2 の添加なしでの 150L プラントスケール試験による C I 生産試験を実施した。実施条件は、水道水に澱粉のみを加えて JFM にて加熱して α 化処理した。攪拌しながら冷却後、JFM で培養生産した 0C478 菌株由来酵素を添加して終力価 25 mU/ml、室温 (30-35°C)、基質濃度 2% にて攪拌しながら反応させた。その結果、図 1 2 の C I 濃度は、酢酸 Na Buffer および CaCl_2 を添加なし (150L 18hr 反応) でも、前回プラントスケールでの C I 生産試験結果 (200L 17hr 反応) と同等な結果を示した。これにより、プラントスケールにおいても澱粉と水のみ組成液に、0C478 菌株由来の酵素を添加することで C I 生産が可能であることが示された。一方、従来製法であるショ糖を原料とした C I 生産では、ショ糖からデキストラン生産過程で微生物による処理が必要なため培地由来成分まで混入し、さらに C I 生産反応では酢酸 Na Buffer や CaCl_2 の混入により夾雑物を多く含んだ状態になっている。特に、デキストラン生産過程での夾雑物であるリン酸や二価の金属イオンは膜処理による C I 精製において課題の一つとなっている。従って、製麩澱粉を原料とした C I 生産は、従来のショ糖を原料とした製法と比較して、夾雑物の少ない C I 素材となり、精製においても優位性を示せると思われる。

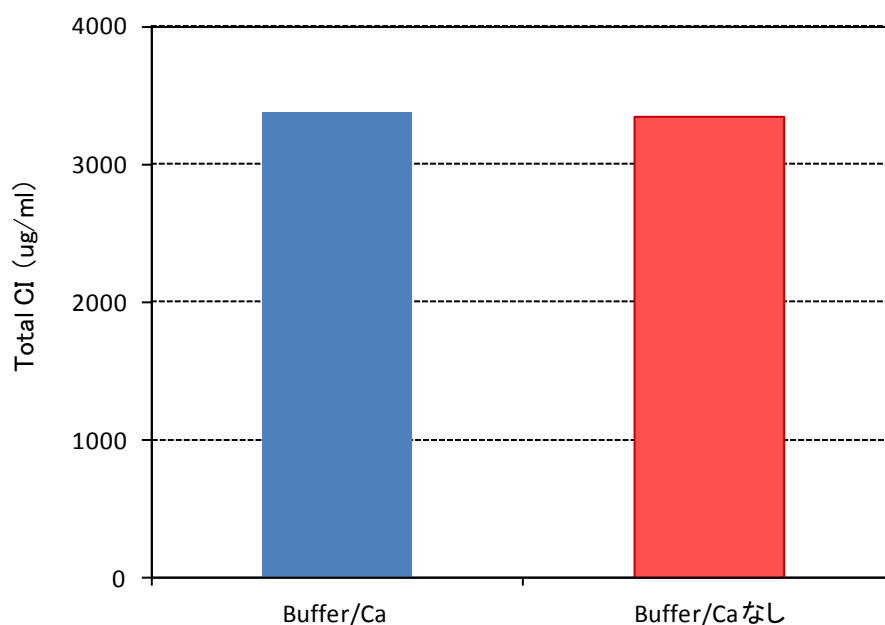


図 1 2. プラントスケールにおける Buffer/Ca 有無による C I 濃度の変化

2-1-2 : C I 精製の最適化技術開発

(担当 : TTC、シーアイバイオ)

(1) 目的

製麩澱粉を用いたC I 生産最適化検討を行ってきた結果、安定的に 200 L 規模のスケールでのC I 生産が可能であることがわかった。しかしながら、C I の精製において新たな課題として、C I 生産反応後の澱粉残渣によるMF 膜の根詰まりが出てきた。そこで、本試験では、澱粉残渣の除去方法の検討を実施すること、またC I 純度を 50%以上に上げるべく、改良 600D a NF 膜によるC I 精製最適化検討を試みた。

(2) 実験方法

①澱粉残渣の除去方法の検討

C I 生産反応液を、連続遠心分離機で処理し澱粉残渣除去を試みた。図 1 3 のとおり、初めは 10L スケールで連続的にC I 生産反応液を遠心分離により処理し、排出する上清液を回収した。なお、遠心分離条件は、回転速度 8,000rpm、15℃とした。

また、C I 生産反応液を冷却して、澱粉の老化による除去方法の検討も行った。すなわち、C I 生産反応液を室温 (25℃)、冷蔵 (4℃、0℃)、冷凍 (-30℃) に分けて数時間～一晩放置し、遠心分離後 (8,000rpm、5 分間、室温) の上清を観察し除去度を評価した。

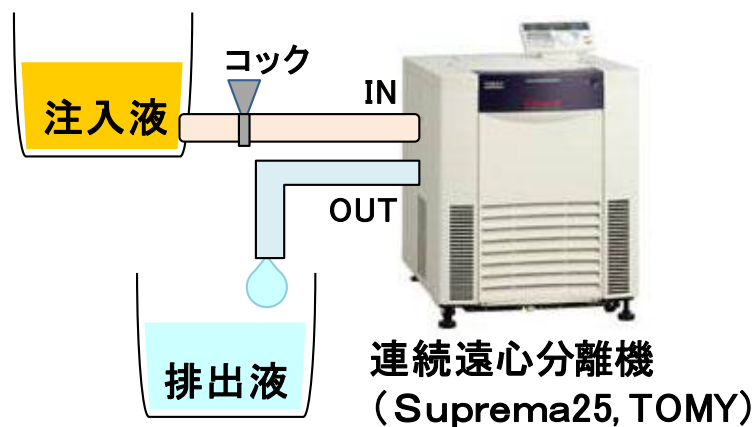


図 1 3. 連続遠心分離機による澱粉残渣の除去について

②改良 600D a N F膜によるC I精製の検討

改良 600D a N F膜装置（図 1 4）を用いて、表 4 の条件でC I精製を実施した。

表 4. 改良 600D a N F膜処理の条件

圧 力	1. 0MPa
液 温	40℃
原 液 量	200L
加 水 量	79L
濃縮倍率	20 倍
濃縮液量	約 14L
透過液量	約 265L

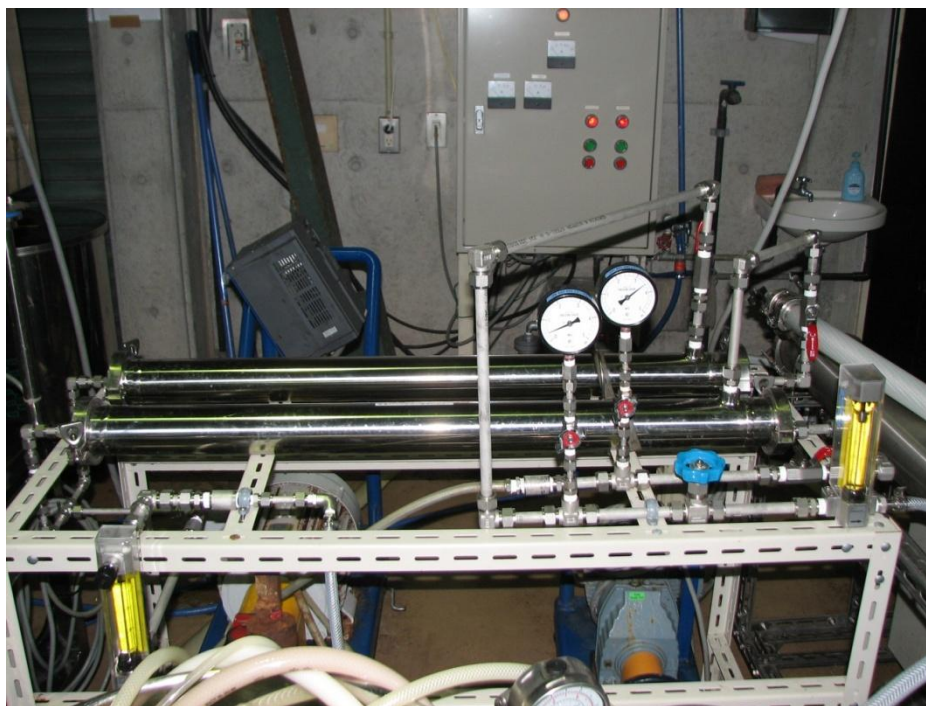


図 1 4. 改良 600D a N F膜装置（写真）

(2) 結果と考察

①澱粉残渣の除去方法の検討

連続遠心分離による除去：初めに 10L スケールにて澱粉残渣除去を検討した結果、処理後では、処理前と比較して、大部分の澱粉が除去され、澱粉残渣がローター内に蓄積していることがわかった(図 1 5)。このことから、プラントスケールでの C I 反応液 200 L を用いて同様に処理し、MF 膜装置による透過検証を実施した。このとき、連続遠心分離機は LAPX404 アルファ・ラバル製を用い、回転速度：約 6,000rpm、室温にて流速：5L/分で上清を回収した。なお、処理時間は 20 分程度であった。200 L の処理でも、10L での処理同様に澱粉が除去されており、MF 膜装置で問題なく上清を処理可能であることが期待された。しかしながら、100 L 程度透過後、根詰まりを起こした。このことから、遠心分離装置の回転速度をさらに上げるか、澱粉残渣を沈殿しやすい条件を見出すことが求められた。

凍結処理による除去：澱粉残渣の沈殿方法として、金属イオン等の薬物添加による沈殿、冷却処理による澱粉の老化による沈殿等が挙げられる。C I 素材は食品に用いられることから、ここでは冷却処理による沈殿処理を検討した。その結果、 -30°C で一晩あるいは 2hr 冷凍(凍結直後に解凍)の冷却条件で、室温や冷蔵と比較して、極めて透明度の高い上清液が得られた(図 1 6-1 および 2)。そこで、150 L の C I 反応液についても同様に -30°C にて冷凍処理し、解凍後、上清をキムワイプに通して回収した。回収した上清を MF 膜処理したところ、問題なく速やかに処理できた。このことから、C I 反応液を予め -30°C 凍結処理することが効果的に澱粉残渣を除去できることが確認された。そのため、高純度 C I を大量に生産するためには、今後、凍結や連続遠心処理システムを製造工程に組み込む必要性が課題として残された。

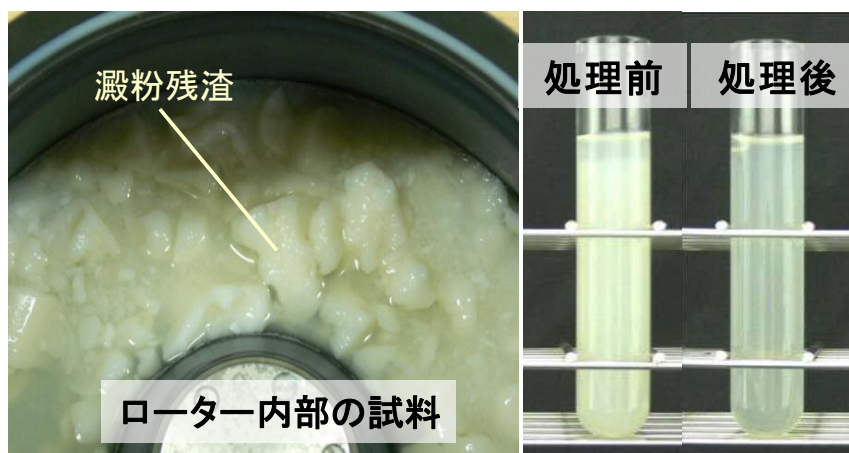


図 1 5. 連続遠心分離前後の澱粉残渣

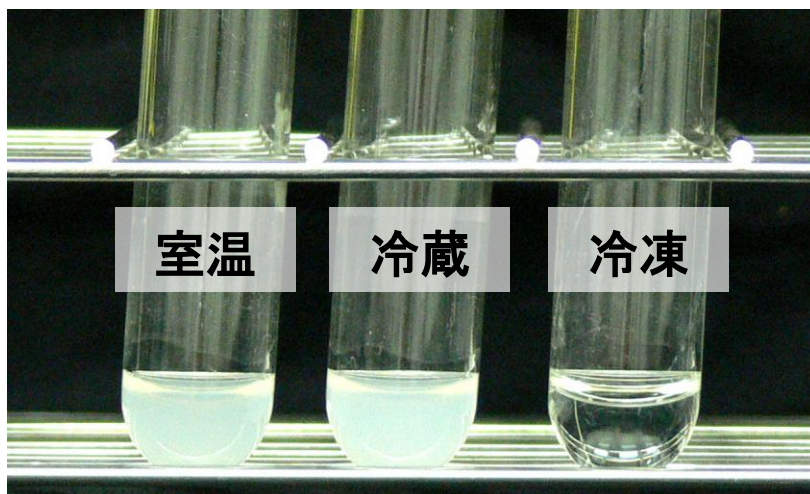


図 1 6 - 1. 冷却処理前後の C I 反応液上清 (一晚処理)

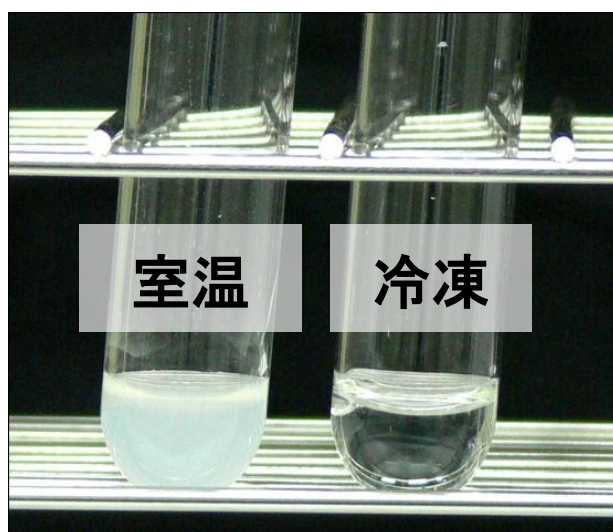


図 1 6 - 2. 冷却処理前後の C I 反応液上清 (2hr 処理)

②改良 600D a NF膜によるC I精製の検討

本試験では、改良 600D a NF膜によるC I精製の検討した結果を表5に示した。C I 7~12の含有量は改良前では14.0%に対し、改良後では35.4%に改善した。一方、灰分が処理後で高くなっているのは、灰分以外の夾雑物が抜けた分、単に相対的に増加したものと考えられる。従って、600D a NF膜では灰分が抜けにくいことを示していると考えられ、今後は灰分をどのように除去するかが課題となる。なお、後述でも示している通り、改良後の600D a NF膜より精製したC I純度は、C I-7~15を食総研にて分析して算出したところ、54.4%であったことから、目標の純度50%以上を達成できた。純度50%以上のC Iを生産する場合、これまでのショ糖を原料とした方法では、夾雑物を多く含むため、NF膜処理後にさらにHP20等の樹脂に吸着させ、エタノールによりC I含有画分を溶出し精製するため高コストかつ労力を要する。従って、澱粉でのC I生産では樹脂による精製を必要とせず純度50%以上のC Iが得られることから、コスト50%以下で高純度C I生産が可能であると考えられる。

表5. 改良前後の600D a NF膜処理によるC Iの品質比較

	改良前	改良後
C I-7~12	14.0%	35.4%
灰 分	3.8%	7.5%
水 分	6.0%	3.6%
膜処理時間 (hr)	33L	52L

2-2 : C I 転換酵素力価増強技術の確立

2-2-1 : C I 転換酵素力価増強技術の確立

(担当 : TTC、シーアイバイオ)

(1) 目的

平成23年度では、トロピカルテクノセンターで保管されている沖縄微生物ライブラリーや育種株等から選抜を試みた結果、従来の菌株と比較して酵素力価の高い菌株を選抜することができた。この選抜した菌株(OC478 菌株)により高い力価の酵素が生産可能であることがわかった。しかしながら、この OC478 菌株は、既存の菌株と比較して、培養方法や酵素生産方法に注意が必要であることから、詳細にこれら条件を検討し最適化する必要がある。そこで、本年度は、OC478 菌株での培養や酵素生産の最適化・安定化を検討し、C I の生産最適化へ繋げることを試みた。

(2) 方法

①菌株保存方法の検討

OC478 菌株の最適な保存条件を検討するため、初めに OC478 菌株の 10%グリセリン保存株をデキストラン T-40 培地にて復元し、1回の継代培養を経て OC478 菌株培養懸濁液を得た。なお、デキストラン T-40 培地組成および培養条件を表6に示した。この培養懸濁液を用いて下記の通り OC478 菌株の保存条件を検討した。

表6. デキストラン T-40 培地組成、培養条件

デキストラン T-40	1.0g
Bacto Peptone	1.0g
Yeast ext.	0.1g
NaCl	0.5g
水道水 100ml (pH8.0)	

培養条件

↓ φ16 試験管に培地 2ml を加え、保存菌を 50 μl 接種
↓ バイオリカ栓をし、30℃、3日間攪拌 (140rpm) 前培養
↓ 培養液を 50 μl とり、φ16 試験管の培地 2ml に接種
↓ バイオリカ栓をし、30℃、3日間攪拌 (140rpm) 本培養

i) 保存条件

培養懸濁液/-30°C保存：培養懸濁液をそのままセラムチューブに 1ml 加え、-30°Cにて保存した。

10% グリセリン/-80°C保存：培養懸濁液を遠心分離（3,000rpm、5 分間、室温）し、上清を半量除去し、残った液量の当量の 20%グリセリンを加えて混合し、セラムチューブに 1ml 加え、-80°Cで保存した。

10% DMSO/-80°C保存：10%グリセリン/-80°C保存と同様に培養懸濁液を処理し、20% DMSO を加えて混合し、セラムチューブに 1ml 加え、-80°Cで保存した。

BD Plate/4°C保存：表 7 の通り、ブルーデキストラン（BD） Plate を作成し、白金耳にて培養懸濁液をとり、BD Plate に画線して接種し、脱青色のハローを形成したコロニーを確認できるまで 30°Cで培養（5 日～1 週間）した。培養後、Plate をビニールテープで密閉し 4°Cで保存した。

表 7. BD Plate 組成

ブルーデキストラン	0.3g
Bacto Tryptone	1.0g
Yeast ext.	0.1g
NaCl	0.5g
Bacto Agar	1.5g
水道水 100ml (pH 無調整)	

ii) 各種保存菌株の培養

各種保存菌株について、培養懸濁液、10% グリセリン、および 10% DMSO の条件で保存した菌株は表 6 と同様な手法で培養し培養懸濁液を得た。一方、BD Plate は、菌株コロニーを白金耳で取り、デキストラン T-40 培地で 4 時間分散させた後、分散した菌株懸濁液を用いて表 6 に従い培養した。

iii) 培養懸濁液の濁度測定

各種保存条件の OC478 菌株を培養後、菌株の増殖性を評価するため、培養懸濁液の濁度 (OD 660nm) を測定した。

iv) サイクロデキストラン合成酵素 (CIase) の力価測定

培養懸濁液を遠心分離 (15,000rpm、5分間、室温) し、上清を $0.2\mu\text{m}$ フィルターにてろ過し、粗酵素液を調製した。この粗酵素液について、CIase 力価を測定した。CIase 力価の測定方法は、デキストラン T-40 ($250\mu\text{l}$)、 100mM 酢酸緩衝液・ 25mM 塩化カルシウム溶液 ($200\mu\text{l}$)、酵素試料 ($50\mu\text{l}$) を 1.5ml マイクロチューブに加え、 40°C で 2hr 静置反応した。反応終了後、沸騰水浴中で 10 分間加熱して反応を停止し、アセトニトリル ($500\mu\text{l}$) を添加し攪拌して遠心分離後 ($15,000\text{rpm}$ 、 5 分、室温)、上清を $0.45\mu\text{m}$ フィルターにてろ過し、C I-7、C I-8、C I-9、C I-10、C I-11、および C I-12 の濃度を測定した。これら C I 濃度を基に CIase 力価を算出した。すなわち、HPLC により C I 濃度を測定し、CIase 力価は反応後試料の C I 濃度からブランク (基質無添加) の C I 濃度を引いて、 1 分間に C I-7、C I-8、C I-9、C I-10、C I-11、および C I-12 の総量 $1\mu\text{mol}$ 生成する量を 1unit (U) として算出した。

②培養最適化および酵素生産安定化の検討

0C478 菌株の酵素生産に係る培養条件について、平成 23 年度より澱粉培地を用いることで力価が上昇することがわかっている。本年度は、より詳細に培養条件を検討し、酵素生産の安定化検討を行った。

i) 培養条件

使用培地は表 8 や表 9 の通り調製して使用し、培地や前培養日数の条件を変えて酵素力価増強を評価した。具体的には表 10 に示す通り、 -30°C 保存の菌体懸濁液を 200L 容バツフル三角フラスコ (培地 40ml) に 0.4ml 接種し、 30°C 、 3 日間、攪拌 (140rpm) 復元培養した。次に、復元培養した菌体懸濁液を 2ml とり、 500L 容バツフル三角フラスコ (培地 100ml) に接種し、 30°C 、 1 日/ 3 日間、攪拌 (140rpm) 培養した (前培養)。前培養懸濁液を 2ml とり、 500L 容バツフル三角フラスコ (培地 100ml) に接種し、 30°C 、 3 日間、攪拌 (140rpm) 培養した (本培養)。

ii) 菌体数の測定

BD Plate (表 7) を作成し、菌体懸濁液を滅菌した 0.5% 塩化ナトリウム水溶液で段階的に希釈し、 0.1ml を Plate に塗抹し、 30°C で 1 週間培養した。培養後、脱青色のハローを形成したコロニーを計数し菌体数を算出した。

表 8. デキストラン T-40 (Dextran) 培地組成

デキストラン T-40	1.0g
Wako Polypeptone	1.0g
Yeast ext.	0.1g
ヨネマース	0.5g
水道水 100ml (p H8.0)	

表 9. 澱粉 (Starch) 培地組成

デキストラン T-40	1.0g
Wako Polypeptone	1.0g
Yeast ext.	0.1g
ヨネマース	0.5g
水道水 100ml (p H8.0)	

表 10. 培養条件検討一覧表

試験群	復元培養		前培養		本培養	
	40ml		100ml		100ml	
	培地	日数	培地	日数	培地	日数
D-D(3)-D	デキストラン	d3	デキストラン	d3	デキストラン	d3
D-D(3)-S					製麩澱粉	d3
D-S(1)-S			製麩澱粉	d1	製麩澱粉	d3
D-S(3)-S			製麩澱粉	d3	製麩澱粉	d3
S-S(1)-S	製粉澱粉	d3	製麩澱粉	d1	製麩澱粉	d3
S-S(3)-S			製麩澱粉	d3	製麩澱粉	d3
S-D(3)-S			デキストラン	d3	製麩澱粉	d3

※試験群名称詳細 前培養-継代培養(日数)-本培養、D: Dextran、S: Starch

iii) 酵素力価測定

CIase 力価測定：前ページ参照のこと。

デキストラングルカナーゼ (DGase) 力価測定：DGase 力価の測定方法は、0.6% マツノリン M-22 (松谷化学工業製) を 250 μ l、100mM 酢酸緩衝液・25mM 塩化カルシウム溶液 (200 μ l)、酵素試料 (50 μ l) を 1.5ml マイクロチューブに加え、40°C で 3hr 静置反応した。反応終了後、沸騰水浴中で 10 分間加熱して反応を停止して遠心分離 (15,000rpm、5 分、室温) し、上清を 0.45 μ m フィルターにてろ過し、表 2 同様に、グルコース CII テストワコー (Wako 製) を用いてグルコース濃度を測定した。なお、DGase 力価として、グルコースを 1 分間に 1 nmol 生成する量を 1 unit (U) として算出した。

③ プラントスケールでの酵素生産実証試験

表 8 および表 9 と同様な、デキストラン T-40 培地および澱粉培地を調製して用いた。復元培養として、-30°C 保存の 0C478 菌株懸濁液を 40ml のデキストラン T-40 培地が入った 200ml バッフルフラスコに 0.4ml 接種し 30°C、140rpm、3 日間培養した。培養後の懸濁液を 150ml の澱粉培地が 500ml バッフルフラスコ 8 本にそれぞれ 3ml 接種し 30°C、140rpm、3 日間 前培養した。前培養後の培養液全てを 60L の澱粉培地が入ったジャーファーメンター (JFM) に接種し 30°C、150rpm、Air 流量 1.5L/min、3 日間培養した。

(3) 結果と考察

① 0C478 菌株保存方法の検討

これまでの菌株の保存方法は、10%グリセリンまたはブルーデキストラン (BD) 培地にて保存してきた。しかしながら、10%グリセリンでは復元が不安定なこと、BD 培地では復元に問題ないが特に 0C478 菌株において他の微生物のコンタミネーションが課題であった。そこで、0C478 菌株に適した保存方法を検討した。その結果、図 17-1 より、菌株の増殖性は「10%グリセリン/-80°C 保存」を除いて全て良好であった。また、培養液上清中の CIase 力価についても同様な結果となった (図 17-2)。このことから 0C478 菌株に適した保存方法は、C I 生産の効率化やコスト削減、およびコンタミネーションのリスクも考慮すると、「培養懸濁液/-30°C 保存」が望ましいと判断した。なお、従来法の「10%グリセリン/-80°C 保存」は 0C478 菌株には適した保存方法ではないことが示唆されたので、「10%グリセリン/-80°C 保存」での保存は望ましくないことがわかった。

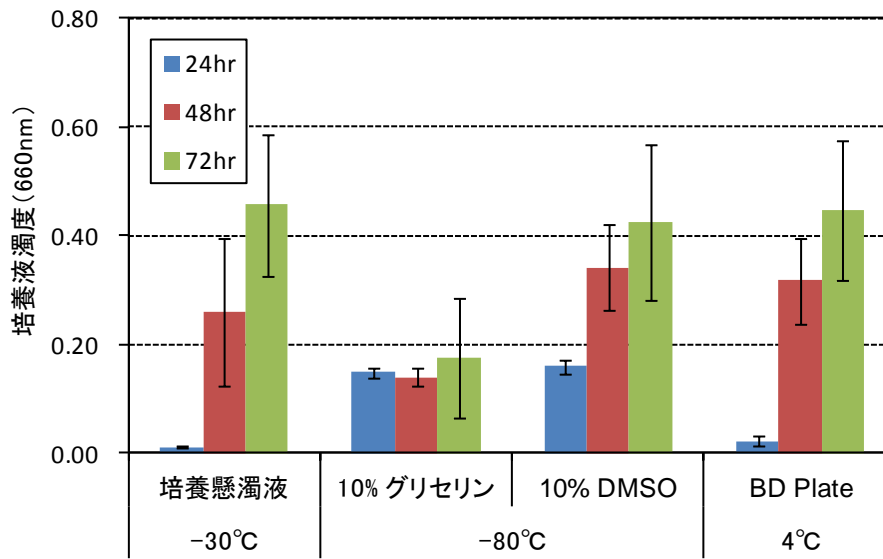


図 1 7 - 1. 各保存方法における OC478 菌株の生育について

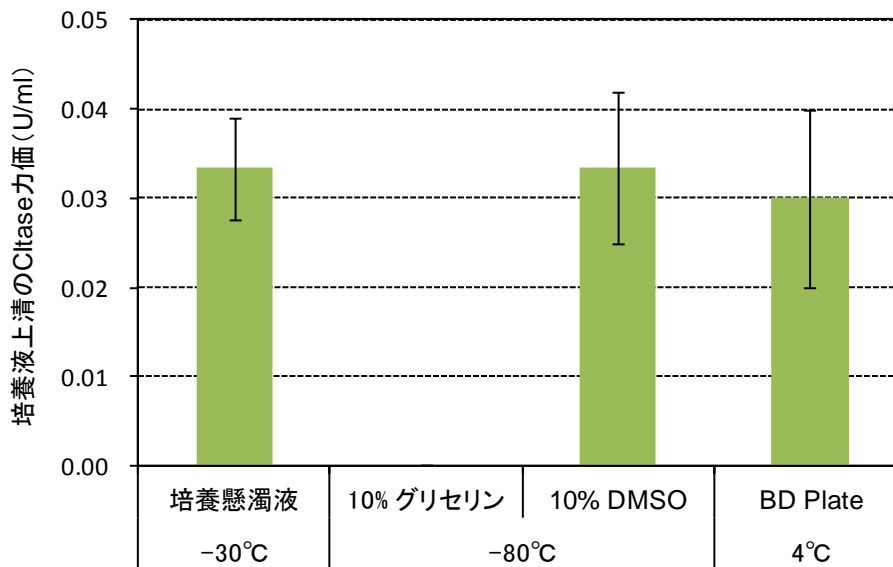


図 1 7 - 1. 各保存方法における OC478 菌株の Citase 力価について

②培養最適化および酵素生産安定化の検討

表10でも示した通り、様々な培養条件にて試験を実施し、0C478 菌株を用いた酵素生産の安定化検討を行った。その結果、復元培養：デキストラン 3 日ー前培養：製麩澱粉 1 日ー本培養：製麩澱粉 3 日 (D-S(1)-S) での培養条件が最も CIase や DGase 力価が高く、従来培養法である復元培養：デキストラン 3 日ー前培養：デキストラン 3 日ー本培養：デキストラン 3 日 (D-D(3)-D) と比較して、CIase や DGase 力価が 4 倍以上高いことがわかった (図18-1および2)。さらに、酵素の保存性を確認するため、各条件で培養した上清液を 4℃で保存し、経時的に CIase や DGase 力価を測定した結果、D-S(1)-S の条件では、CIase 力価は少なくとも 35 日間は安定であったものの、DGase 力価 (3 週間は安定) は激減する結果となった。D-S(1)-S の条件での各培養ステージにおける 0C478 菌株の菌数を BD Plate を用いて評価したところ、前培養ステージから菌数が 10^9 cfu/ml を超えており、良好な生育を示していることがわかった (図18-3)。これらの結果から、D-S(1)-S の条件を最適な培養・酵素生産条件として設定した。

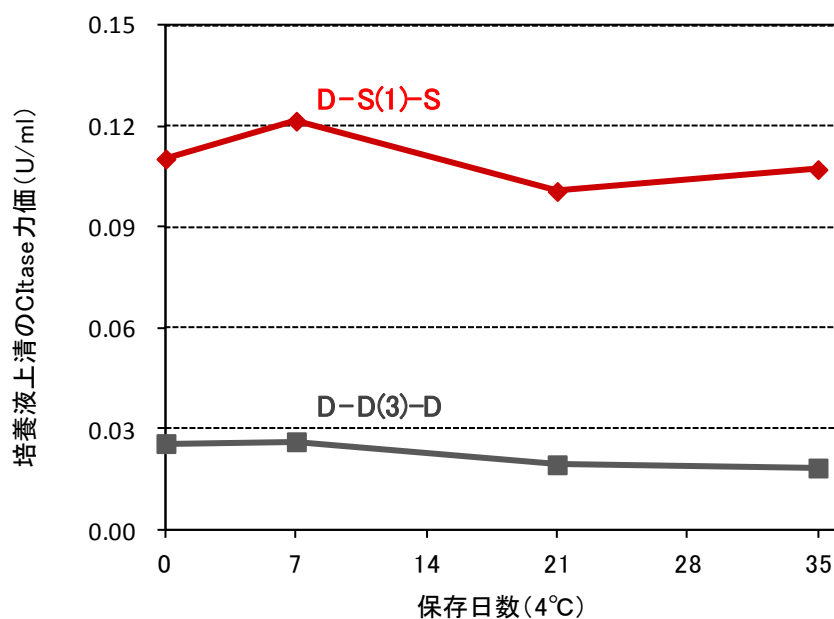


図18-1. 新規培養条件 (D-S(1)-S) における CIase の力価および安定性

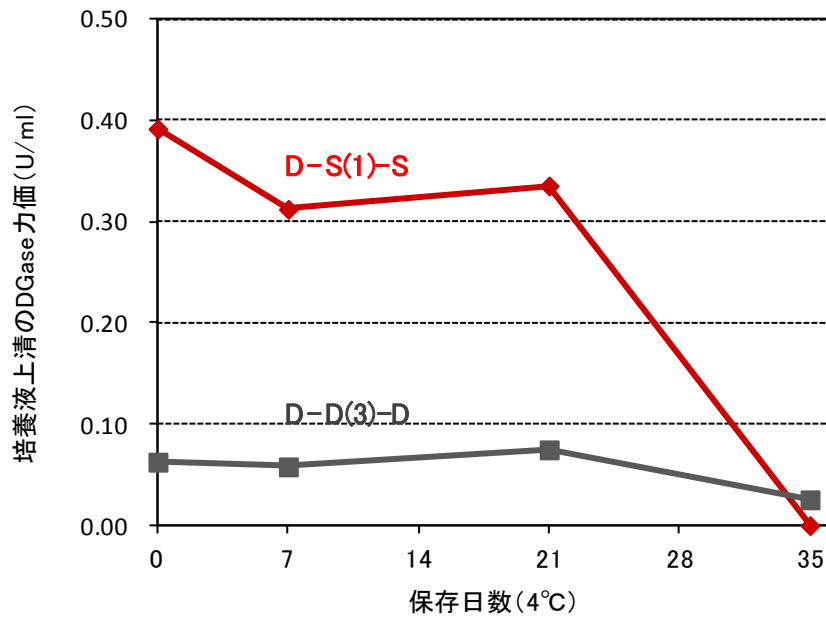


図 18-2. 新規培養条件 (D-S(1)-S) における DGase の力価および安定性

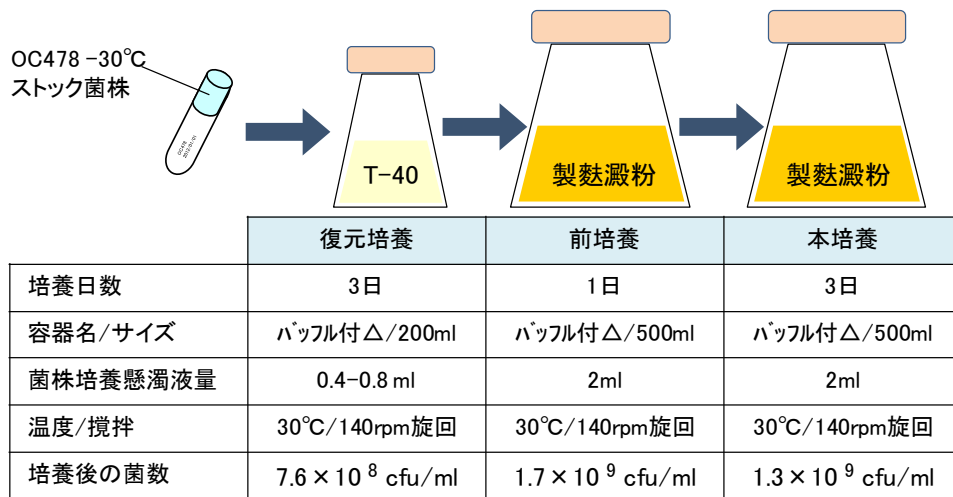


図 18-3. 新規培養条件 (D-S(1)-S) での OC478 菌株の生育性について

③プラントスケールでの酵素生産実証試験

0C478 菌株の最適な培養・酵素生産条件として、前ページで示した通り、D-S(1)-S の条件に設定した。ここでは、この条件を JFM による酵素生産に応用を試みた。その結果、培養 40hr 付近より溶存酸素量 (DO 値) および pH の低下が見られ、その後若干上昇した後、再び緩やかに低下する推移を示した (図 19)。このことから 0C478 菌株は 40hr 付近より活発に増殖し、安定・死滅期を経た後、再び 60hr 以降より緩やかに増殖しているものと思われる。この DO や pH の推移を示した培養上清液の Citase 力価を測定したところ、0.10 U/ml あり、UF 膜において通常濃縮処理 (6-10 倍) により 0.61 U/ml あることがわかった (表 11)。このことから、D-S(1)-S の条件を JFM に応用することで、60 L プラントスケールでの酵素生産が可能であり、目標の 0.6 U/ml 以上を達成できた。なお、この条件において、培養上清液の Citase 力価 0.6~1.0 U/ml が安定的に生産できることがわかった。

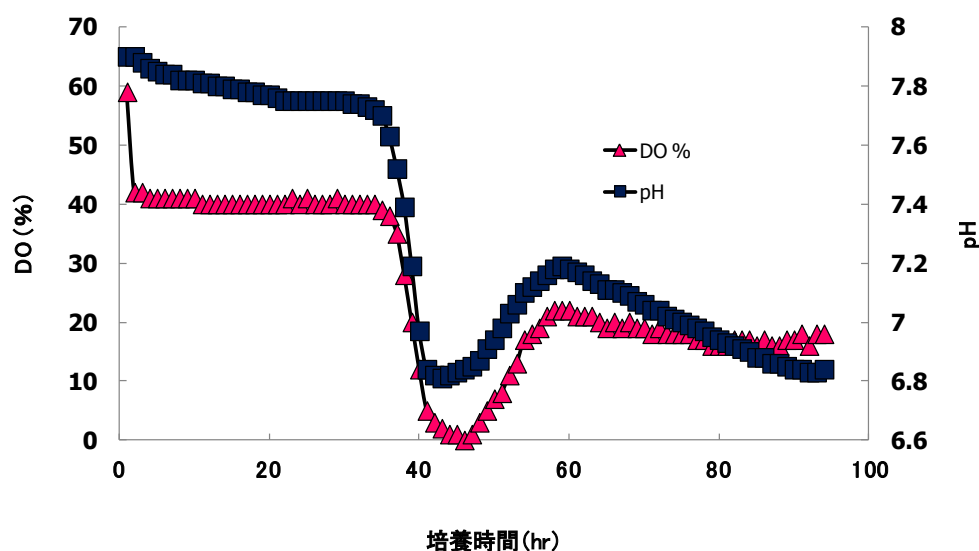


図 19. JFM による 0C478 菌株培養液の DO および pH の変化

表 11. JFM で生産した培養液濃縮前後の Citase 力価

	酵素活性 (U/ml)
培養上清液	0.10
濃縮酵素液	0.61

④酵素力価の安定性評価および安定化検討

0C478 菌株由来酵素の力価増強および安定生産に向けて培養条件を検討したところ、培地や培養日数等の条件を最適化することで、高い力価の酵素を安定的に生産可能になった。しかしながら、JFMにおいてプラントスケールによる酵素生産において、高い力価の酵素は得られるものの、これまでの4℃保存では1週間以内に何らかの要因でCI生産性が激減することがしばしば見られた。そこで、ここではこれらの要因を明らかにし、新たな保存方法を検討した。考えられる要因として、雑菌、反応残渣、およびプロテアーゼがあるが、保存日数に応じて濁りや臭いが強くなっていたことから、これまで通り4℃保存を未処理として、-30℃凍結保存、フィルター滅菌(0.2 Filter)後に4℃保存し、経時的にサンプリングし、酵素力価や一般生菌数等を測定した。その結果、CIase力価はどの処理条件においても安定しており問題なかった(図20-1)。一方、CI生産性を評価したところ、未処理では保存日数に応じてCI濃度が低減していることがわかった(図20-2)。さらに、未処理で、DGase力価では保存10日後には激減し、一般生菌数が保存5日以降急激に上昇し、それに伴いpH低減が見られた(図20-3および4)このことから、雑菌増殖によりCI生産性が低減することが明らかとなった。そのため、MF膜処理による菌体処理後やUF膜処理による濃縮処理後のラインを滅菌処理しこれまで通り4℃保存するか、凍結保存により酵素安定性が保持可能であることが考えられる。

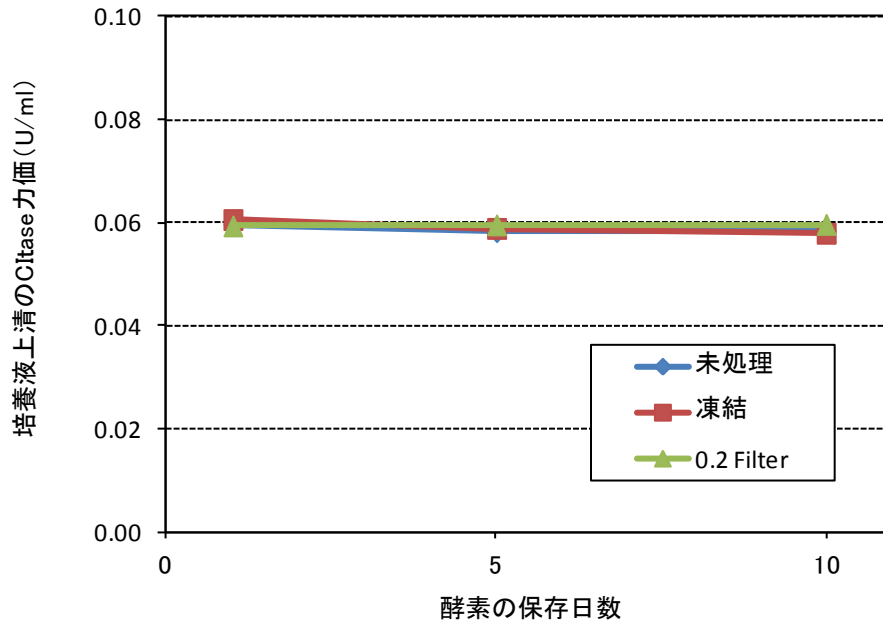


図 20-1. 各保存処理における 0C478 菌株由来酵素の Cltase の力価および安定性

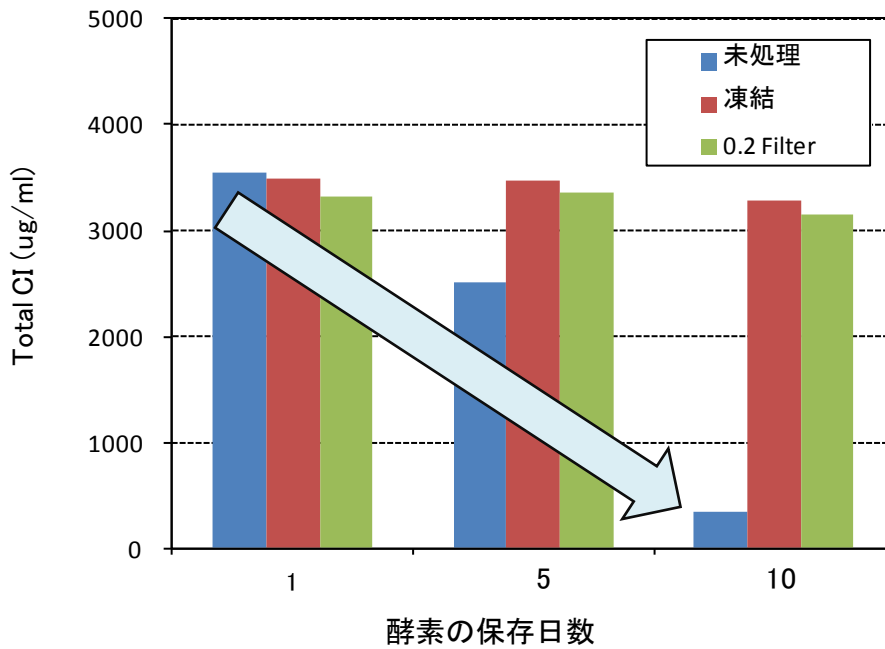


図 20-2. 各保存処理における 0C478 菌株由来酵素による CI 生産試験結果

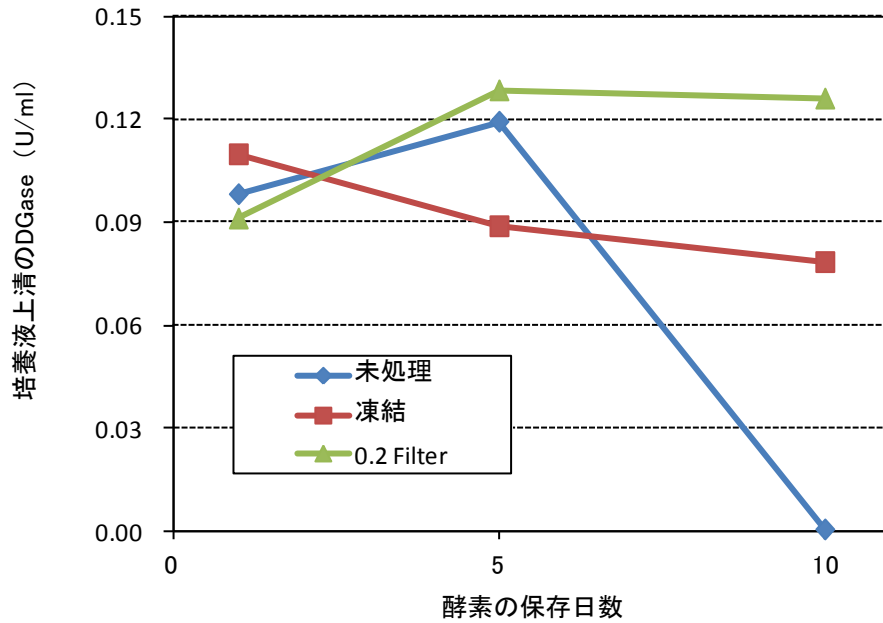


図 20-3. 各保存処理における 0C478 菌株由来酵素の Cltase の力価および安定性

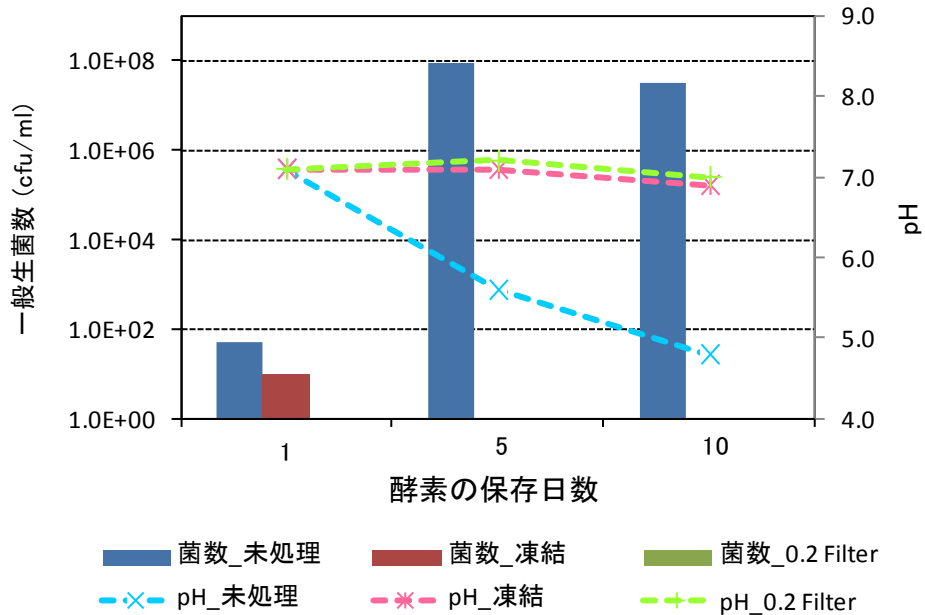


図 20-4. 各保存処理における 0C478 菌株由来酵素の一般生菌数および pH の変化

2-2-1: CI 転換酵素の作用機構の解明

(担当: 食総研)

(1) 目的

昨年度は、種類の異なる澱粉等の基質を用いて検討し、短鎖よりは長鎖の基質が CI 生産における原料として優れていることを示唆する結果が得られた。ここでは、澱粉をデキストランに転換するデキストラナーゼ (DGase) やそれを環化させて CI を合成する環状イソマルトオリゴ糖グルカノトランスフェラーゼ (CITase) の特性を見出すべく、CI 生産菌の CITase および DGase 生産誘導条件の検討、澱粉から CI を生産する際に用いる DGase の基本的な性質についても明らかにすることを目的とした。

(2) 方法

① CI 生産菌における CITase 活性および CITase+DGase 活性の培地炭素源による誘導試験

Bacillus circulans T-3040 株を、2%のグルコース、スクロース、イソマルトオリゴ糖 (イソマルトース・イソマルトトリオース・パノース混合物、ワコー社製)、フジオリゴ (マルトオリゴ糖、日本食品加工株式会社製)、デキストリン、可溶性澱粉、またはデキストラン 40 を含む Luria-Bertani 培地を pH8.0 に調整し、T-3040 株を 30°C で 1~4 日振盪培養する。培養液を遠心して培養上清を採取し、80%硫酸アンモニウムを加えて蛋白を沈殿、25 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0) で透析して 10 倍に濃縮、酵素蛋白溶液とする。デキストラン 40 から CI を生産する CITase 活性、および可溶性澱粉から CI を生産する CITase+DGase 活性を測定する。

<酵素反応系>

4%基質(デキストラン 40 または可溶性澱粉)	25 ・ L (終濃度 2%)
0.5 M 酢酸ナトリウム酸緩衝液	5 ・ L
酵素液	20 ・ L

40°C で反応を行い、100°C で 5 分間加熱処理して、反応を停止させる。等量のアセトニトリルを混合後、HPLC のサンプルとする。生成物の分析及び定量は、HPLC で行う。

② *B. circulans* T-3040 株 DGase 遺伝子のクローニング

B. circulans T-3040 株のゲノム DNA ライブラリより、*Paenibacillus* sp. 598K 株の DGase 遺伝子と相同性のある配列を検索する。DNA 塩基配列情報からアミノ酸配列を推定し 598K 株由来 DGase と比較する。T-3040 株 DGase 遺伝子発現ベクターに組み込み大腸菌中で発現させる。

③DGase における基質に対する反応性の測定

DGase を、澱粉、デキストラン、プルラン、および結合の異なるグルコ二糖と反応させる。

＜酵素反応系＞

1%基質	0.5 mL (終濃度 0.5%)
0.1 M トリスマレイン酸緩衝液	0.3 mL
0.02 % ラムノース	0.1 mL (内部標準として使用)
酵素液	0.1 mL (終濃度 0.25 μ M)

50°Cで反応を行い、100°Cで5分間加熱処理して、反応を停止させる。等量のアセトニトリルを混合後、HPLCのサンプルとする。生成物の分析及び定量は、HPLCで行う。条件は、溶離液 60%(v/v)アセトニトリル (アセトニトリル：水=60：40) とする以外は⑤に示した条件で測定する。

(3) 結果と考察

①サイクロデキストラン生産菌における DGase の探索と性質

デキストランが原料の場合には CITase 単独で CI を生産できるが、澱粉が原料の場合は、デキストラングルカナーゼ (DGase) も必要となる。これまでに *Paenibacillus* sp. 598K 株の培養液中に DGase を見だし、遺伝子をクローニング、大腸菌組換え DGase の生産・利用を行ってきたが、*B. circulans* T-3040 株についてはこれまで DGase が発見されなかった。そこで、T-3040 株のゲノム DNA 情報から 598K 株の DGase と相同性の高い蛋白をコードする遺伝子を検索した。その結果、598K 株の DGase と相同性 62.6% のアミノ酸配列を有する遺伝子配列を見いだした。しかし、T3040 株の DGase 様蛋白は 598K 株 DGase と異なりシグナルが無く、菌体内蛋白の可能性が示唆された。

T-3040 株も、598K 株も CITase は菌体外に生産される。T-3040 株の場合、CITase が菌体外、DGase が菌体内に生産されるとすれば澱粉で培養した場合の CI 生産は、定常期を過ぎて死滅・溶菌して DGase が菌体外に放出されてから CI を生産し始める可能性がある。そこで、デキストラン 40 または可溶性澱粉で T-3040 株を培養し、培養液中に生産する CI 量を測定した。表 1 2 に示すように、デキストラン 40 で培養した場合には培養 1 日目から CI 生産がみられたが、可溶性澱粉で培養した場合は 1 日目にはほとんど CI の生産が見られず、明らかな生産が見られたのは 2 日目以降であった。CITase はデキストランで生産誘導されることが報告されているが、他の炭素源では CITase および DGase はどのように生産誘導されるかを調べた。デキストランを基質として CI が生産されれば CITase が存在することがわかり、デキストランを基質とした場合にも澱粉を基質とした場合にも CI が生産されれば CITase のほかに DGase も存在するといえる。図 2 1 に示すように、デキストラン 40 を基質として CI を生産する活性は、デキストラン 40、可溶性澱粉、イソマルトオリゴ糖、デキストラン 40+グルコース、可溶

性澱粉+グルコース培地で培養した場合に検出された。しかし、可溶性澱粉を基質として CI を生産する活性は、デキストラン 40、可溶性澱粉で培養した場合にのみ検出された。さらに培養 48 時間までデキストラン 40 から CI を生産する活性、可溶性澱粉から CI を生産する活性の経時変化を測定し、図 2 2 に示した。デキストランから CI を生産する活性よりも澱粉から CI を生産する活性のほうが遅れて検出されたので、図 2 1 の培地炭素源の違いによる生産誘導の違いもあわせ、T-3040 株も CITase と DGase はおのおの別々の生産制御下にあることが示唆された。

598K 株の DGase 遺伝子、T-3040 株の DGase 遺伝子ともにそれぞれクローニングし、大腸菌中で発現したが、598K 株 DGase は可溶性蛋白として生産されるが T-3040 株 DGase は発現量も少なく、不溶性になりやすかった。酵素の基本的性質は 598K 株 DGase で調べることとした。表 1 3 に示すように、DGase はデキストランやプルランよりも澱粉に対してより効率よく作用することが示唆された。さらに表 1 4 に示すように、DGase は α -1, 4> α -1, 2> α -1, 3> α -1, 6 グルコシド結合の順番で良く分解し、 α -1, 1 グルコシド結合、 β -グルコシド結合は分解しないことが示唆された。

表 1 2. デキストラン 40 または可溶性澱粉で T-3040 株を培養した際に培養液中に生産する CI の量

培養 日数	生産された CI (mg/ g デキストラン 40)						生産された CI (mg/ g 可溶性澱粉)					
	CI-7	CI-8	CI-9	CI-10	CI-11	CI-12	CI-7	CI-8	CI-9	CI-10	CI-11	CI-12
1	2.1	3.9	3.4	0.7	1.1	1.7	0.8	1.5	1.8	0	0	0
2	9.0	19.4	13.1	7.2	8.3	10.6	7.8	6.0	9.1	2.3	2.0	1.5
3	29.2	44.7	32.9	19.4	18.6	20.7	13.2	9.0	15.1	4.8	2.1	1.6
4	40.4	52.0	45.9	27.2	24.7	25.9	14.7	12.3	18.1	3.6	3.0	2.0

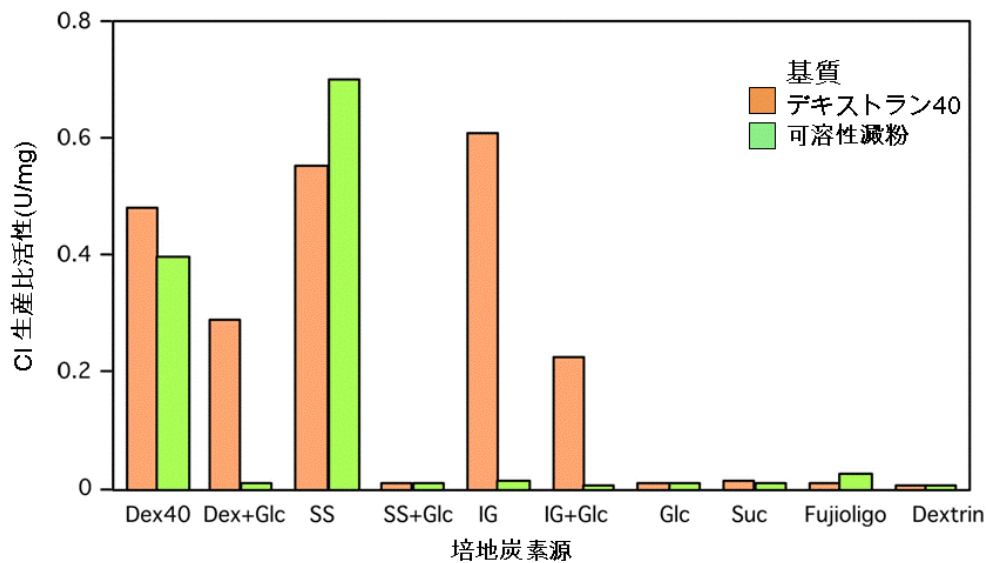


図 2.1. 各種炭素源で生育した T-3040 株培養上清における、デキストラン 40 あるいは可溶性澱粉を基質とした CI 生産活性の比較

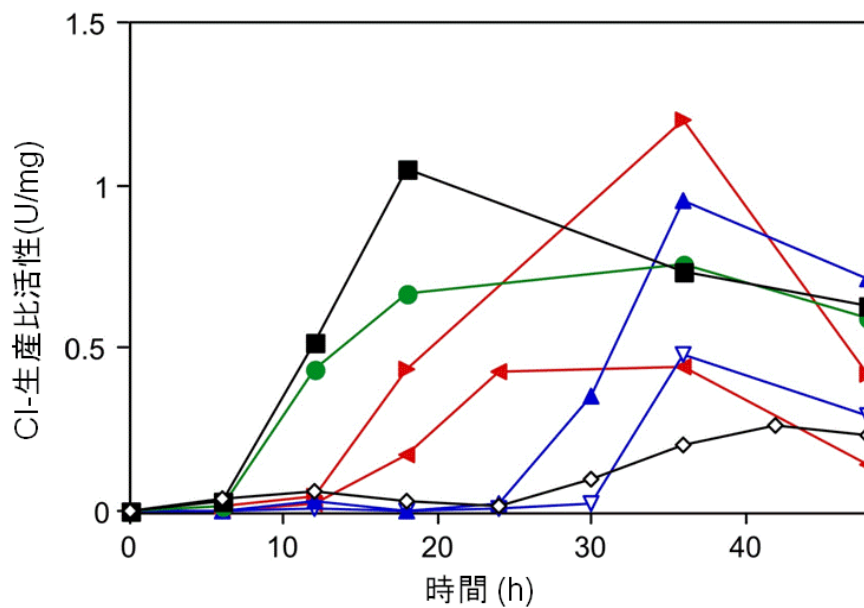


図 2.2. 炭素源デキストラン 40 (Dex40)、可溶性澱粉 (SS)、イソマルトオリゴ糖 (IG)、あるいは Dex40 または IG にグルコース (Glc) も添加して生育した T-3040 株培養上清における、デキストラン 40 あるいは可溶性澱粉を基質とした CI 生産活性の経時変化

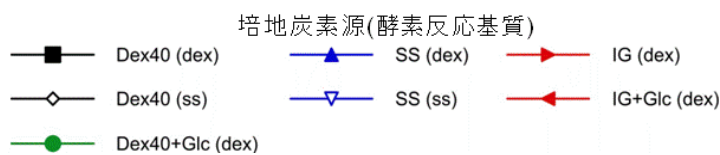


表 1 3. α -グルカンに対する DGase の分解活性

基質	比活性 ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	相対活性 (%)
澱粉	0.64	100
デキストラン	0.11	17
プルラン	0.08	13

表 1 4. グルコニ糖に対する DGase の活性

基質	k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1}\cdot\text{mM}^{-1}$)	相対活性 (%)
マルトース (Glc- α -1,4-Glc)	1108 \pm 7	100
コージビオース (Glc- α -1,2-Glc)	436 \pm 3	39
ニゲロース (Glc- α -1,3-Glc)	369 \pm 44	33
イソマルトース (Glc- α -1,6-Glc)	22 \pm 4	2
トレハロース (Glc- α , α -Glc)	N. D.	
セロビオース (Glc- β -1,4-Glc)	N. D.	
ソホロース (Glc- β -1,2-Glc)	N. D.	
ラミナリビオース (Glc- β -1,3-Glc)	N. D.	
ゲンチオビオース (Glc- β -1,6-Glc)	N. D.	

澱粉を基質にして CI 含有率 50%以上の CI 標品を生産することができた。CI は包接能を期待されながらこれまでは実用的に有効な効果が見いだされていなかったが、今回 CD では包接の難しい緑茶クロロフィルが CI で包接されることが見いだされた。しかも CI のうち、CI-7、CI-10、CI-11、CI-12 の少なくとも 4 種類が有効成分で、これらを含む混合物である CI 標品にも 1 カ月近くにも及ぶクロロフィル安定化効果が見られたことは今後の CI の需要を高める優れた成果であった。しかし、CI 生産過程で生じる不純物が緑茶成分を沈殿させて、クロロフィル安定化効果の妨げになることが示唆されたので、今後は不純物を取り除く技術開発が必要であると考えられる。澱粉から CI を生産する際に必要な酵素となる DGase については、CI 生産菌の培養後期に生産が始まるという、菌体からの酵素調製を困難にする性質が見いだされた。DGase を効率よく生産回収する技術開発が必要であると考えられる。また、DGase の α -1,4 グルコシド結合澱粉分解活性を高め、 α -1,6 グルコシド結合分解活性をより低下させることで、CITase にとって良い基質となる α -1,6 デキストランをより効率的に生産することが可能になると考えられ、この方向で変異 DGase を作出する研究開発も必要になると考えられる。

2-4. 高純度（高品質）C I の包接機能の解明

2-4-1 : 味覚センサーによる包接機能の検証

(担当 : TTC)

(1) 目的

製麩副産物（デンプン）から得られた高純度C I の包接機能を検証することを目的としている。本年度は、C I 生産・精製において最適化した条件で試作した純度C I（純度 50%以上）を用いて、いくつかの食品素材や薬剤に混合して味の変化を味覚センサーにより分析し、既知包接剤との違いを明らかにして優位性を見出すことを試みた。

(2) 実験方法

①試料および基準液の調製

i) 試料

試料は、沖縄特産食品素材の「ノニジュース」、「シークワサージュース」、「もろみ酢」、「ウコン茶」を用いた。「ノニジュース」、「シークワサージュース」、「もろみ酢」は、遠心分離後（3,000rpm、15分、室温）、上清をキムワイプで粗ろ過して超純水で適宜希釈（最終的にノニ 10 倍、シークワサー 8 倍、もろみ酢 5 倍）した。ウコン茶は 2g 秤量し沸騰直後のお湯に加え 30 分間放置後、ろ過して用いた。次に、希釈した試料に予め超純水で溶解した既知包接剤（ α -CD（シクテキストリン）、 β -CD、 γ -CD）およびC I-Plus30 の濃度を段階的に変えて添加し、味覚センサーに供した。なお、包接剤として、CDはナカライ製の特級試薬を用い、C Iは現行で最も純度の高いC I-Plus30 を用いた。

ii) 基準液

基準液とは、無味として位置づけている溶液であり、組成は表 1 5 の通りである。測定した試料は、基準液を基に補正され、基準液によって各味項目について「味があるかどうか」を判定される。

表 1 5. 基準液の組成

塩化カリウム	2.24 g
酒石酸	0.045 g
1L 超純水	

②味覚センサーの概要と測定方法

i) 味覚センサーの概要と測定の流れ (図 2 3)、および測定した味項目 (表 1 6)。

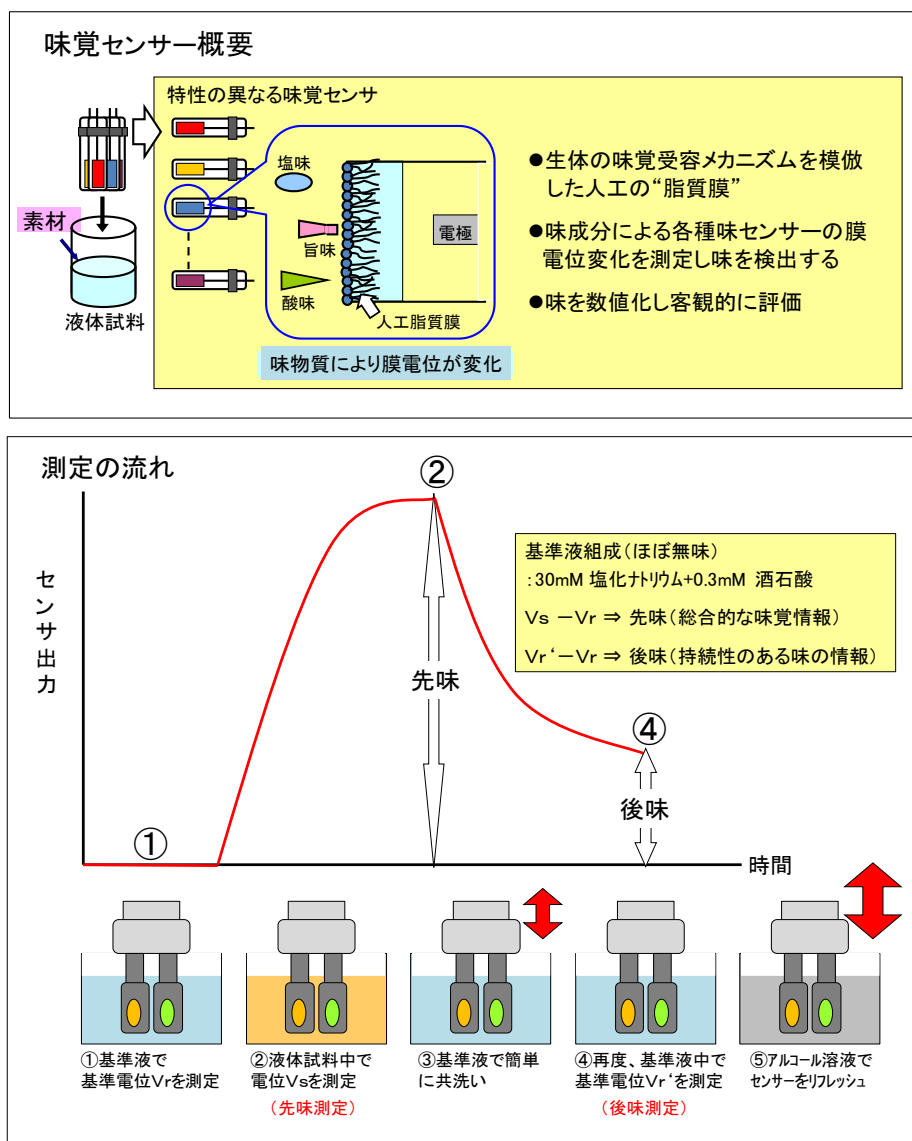


図 2 3. 味覚センサーの概要と測定の流れ

表 1 6. 各種味センサーについて

センサー名	評価できる味	
	先味 (相対値)	後味 (CPA値)
旨味センサー	旨味 (アミノ酸、核酸由来の旨味)	旨味コク (持続性のある旨味)
塩味センサー	塩味 (塩化ナトリウムなど無機塩の塩味)	無し
酸味センサー	酸味 (酢酸、クエン酸、酒石酸などの酸味)	無し
苦味センサー	苦味雑味 (苦味物質由来の苦味、雑味で、低濃度ではコク、隠し味)	苦味 (ビール、コーヒー等の一般食品の苦味)
渋味センサー	渋味刺激 (渋味物質由来の刺激、雑味で、低濃度では隠し味)	渋味 (お茶、ワイン等の渋味)

ii) 測定方法

味覚センサーの取扱い説明書に従い、測定条件は表17の通りである。

表17. 味覚センサーの測定条件

順番	溶液	時間	種類
1	洗浄液1	90秒	アルコール洗浄液
2	洗浄液2	120秒	基準液
3	洗浄液3	120秒	基準液
4	安定液	30秒	基準液
5	試料	30秒	試料溶液
6	洗浄液4	3秒	基準液
7	洗浄液5	3秒	基準液
8	CPA液	30秒	基準液

*CPA: Change of membrane Potential caused by Adsorption
→後味を測定

(3) 結果と考察

①各種包接剤の味の比較

食品の味を、包接剤によって変化を見る際、包接剤そのものの味の影響が出てくる可能性が考える。そのため、初めに使用する各種包接剤の味を味覚センサーで評価した。その結果、図24の通り、 α -CDでは他の包接剤と比較して渋味刺激、渋味の数値が高く出ており、官能的にも「イガイガ感」がするコメントがあり刺激性のある包接剤であることが示唆された。 β -CDでは他の包接剤と比較して大きな特徴は示していないが、官能的に濃度に応じて甘味が強くなる特徴を有した。この甘味は、口内にあるアミラーゼ等の糖分解酵素によりCDが分解されることで感知されると考えられるため、味覚センサーではこの甘味を捉えることは出来なかった。 γ -CDは他の包接剤と比較して味には大きな特徴は見られなかった。一方、高純度CIは他の包接剤と比較して、酸味、塩味、および旨味の数値がやや高い値を示した。このことから、高純度CIの夾雑物として灰分がやや多かったことから、この灰分が塩味に影響した可能性がある。また酸味については、Bufferや微生物由来の酸が考えられ、今後も精製を改善することで無味に近い品質に近づける取組みが必要と思われる。他の包接剤でも何らかの味は呈していることが味覚センサーや官能試験により明らかになっており、このような知見を踏まえた上で、沖縄特産食品や薬剤（漢方薬）を用いて包接機能の検証を試みた。

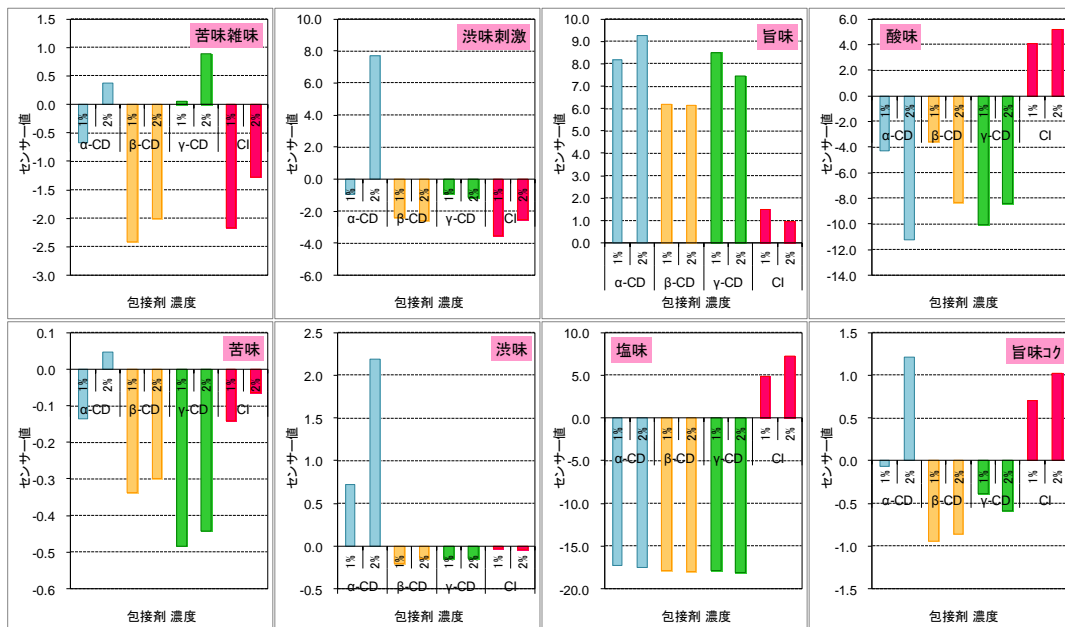


図 2 4. 味覚センサーによる各種包接剤の味の測定結果

②高純度C I の包接特性について

本試験では、数種類の沖縄特産食品や漢方薬を素材として用い、高純度C I 添加による味への影響を既知包接剤と比較して評価した。

酸味への影響：図 2 5 の結果は、ノニジュース、もろみ酢、およびシークワーサーを素材として用い、各種包接剤の添加により、味覚センサーにより酸味への応答性を評価した。その結果、既知包接剤では、添加量の応じて酸味が上昇するか、もしくは大きな変化が見られない結果であった。一方、高純度C I ではノニジュースでは酸味が上昇、もろみ酢やシークワーサーでは酸味が低減した。このことから、包接剤とは異なる包接作用があることが示唆された。各素材で酸味主成分について、ノニジュースは乳酸、もろみ酢やシークワーサーはクエン酸となっており、高純度C I は有機酸の種類によって包接が異なる可能性も考えられ、興味深い結果となった。

渋味刺激への影響：上記と同様な素材を用いて図 2 6 では、渋味刺激への影響を調べた。渋味刺激は先味として認識される渋味であり、微量では隠し味として位置づけられている。渋味刺激では、各包接剤添加に応じて低減するか変化しないかのどちらかの結果であった。高純度C I 添加では、他の包接剤と異なり、シークワーサーの渋味を低減することが明らかとなった。シークワーサーの渋味は皮や種に由来しており、これらは機能性や香りに起因する成分を含み重要な成分である。そのため、高純度C I の添加により渋味を軽減させた新たな機能性素材等の製品開発への応用にも期待できる。

漢方薬への苦味・渋味低減作用：ここでは、苦味や渋味の強い漢方薬に各包接剤を添加し、その影響について味覚センサーを用いて評価した。その結果、先味に関連する苦味や渋味ついて、高純度C Iで最も低減した（図27）。一方、後味に関連する苦味や渋味では β および γ -CDで最も低減することがわかった。製薬関連においては、苦味や渋味の低減した薬剤の需要が高まっている。高純度C Iは既知包接剤とは異なる作用を示すことが示唆されたことから、製薬関連での応用も期待できる。また、既知包接剤との混合により、相乗効果も期待できる。

その他素材への苦味雑味低減作用：高純度C Iは素材の苦味や渋味の低減効果が期待されたことから、他の素材でも評価した。図28より、素材として大麦若葉、フーチバー（ニシヨモギ）、ビール、ゴーヤー（ニガウリ）を用いた。その結果、高純度C Iの添加により、ほとんどの素材の苦味雑味が低減することがわかった。一方、ゴーヤーについて、若干、苦味雑味が上昇する結果となった。

このように、高純度C Iの包接特性について、既知包接剤とは異なる特性があることが明らかとなり、既知包接剤との優位性が示された。C Iの包接作用は、既知包接剤と比較して明らかにされていない点が多くあり、今後も様々な素材を用いて評価することで波及効果の期待できる極めて有用な素材であると思われる。

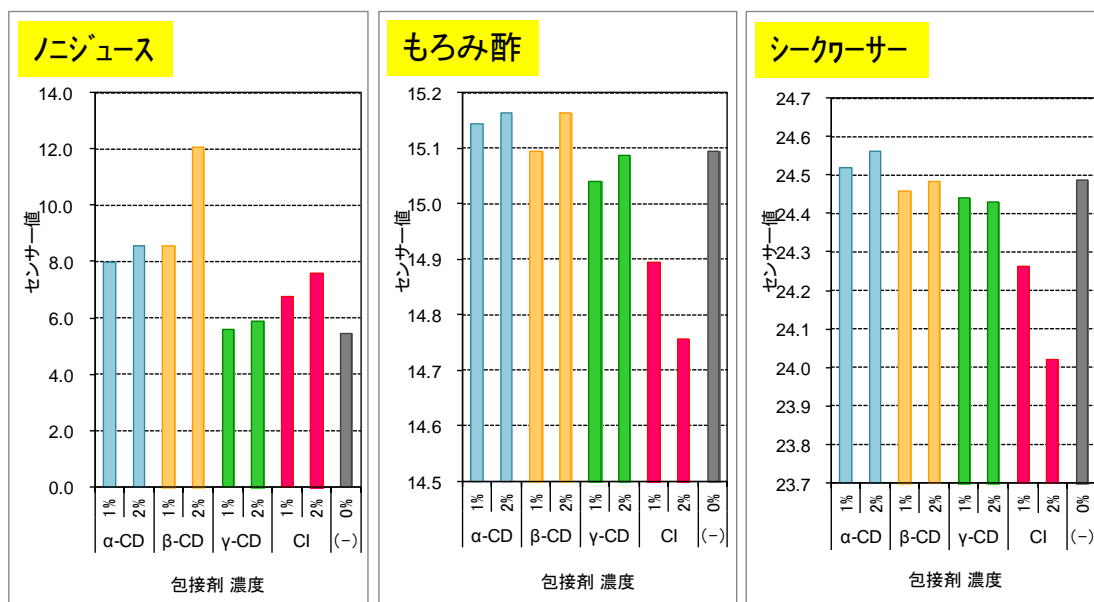


図25. 各包接剤による素材の酸味への影響

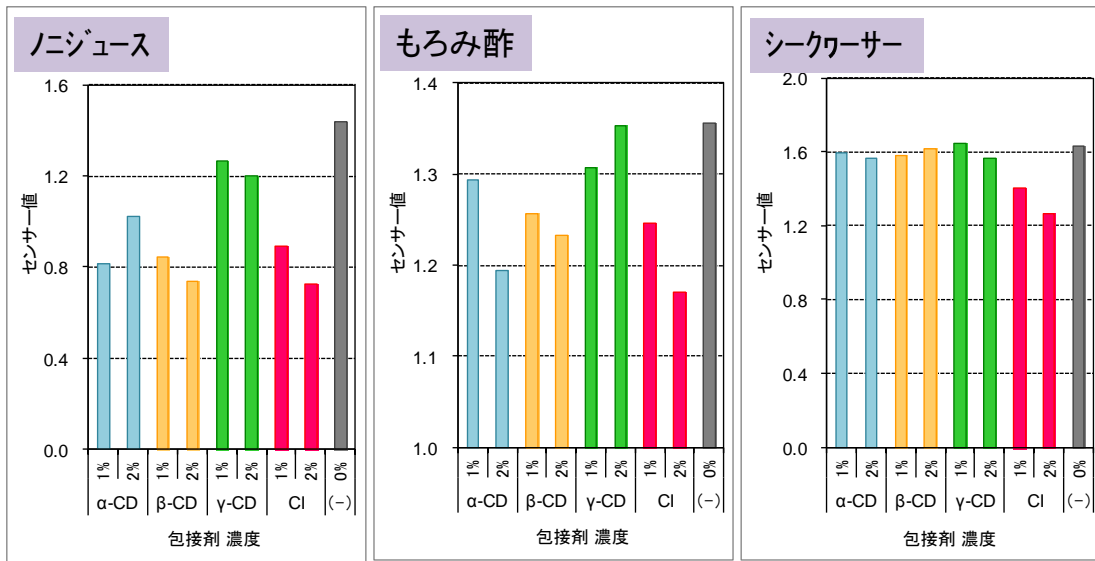


図 26. 各包接剤による素材の渋味刺激への影響

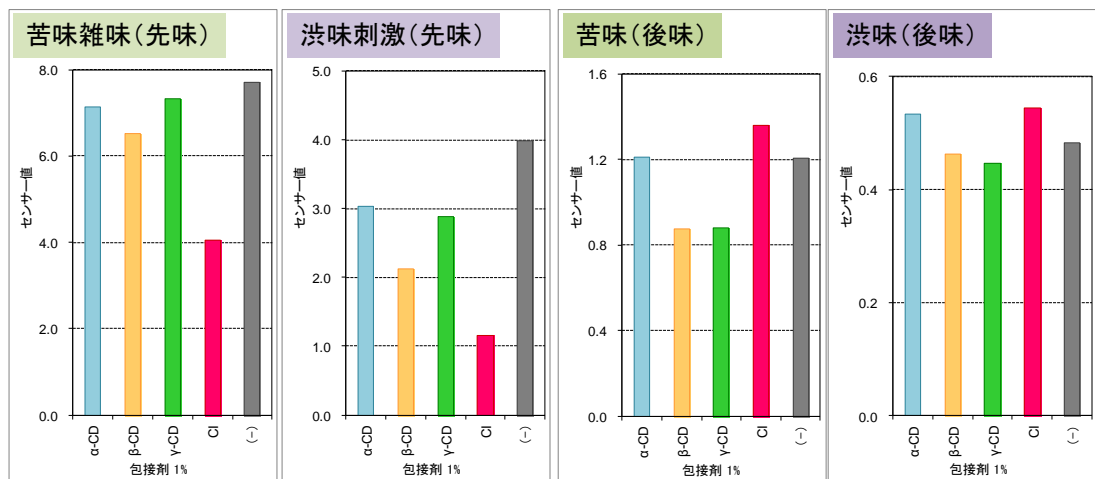


図 27. 各包接剤の漢方薬の苦味・渋味軽減特性について

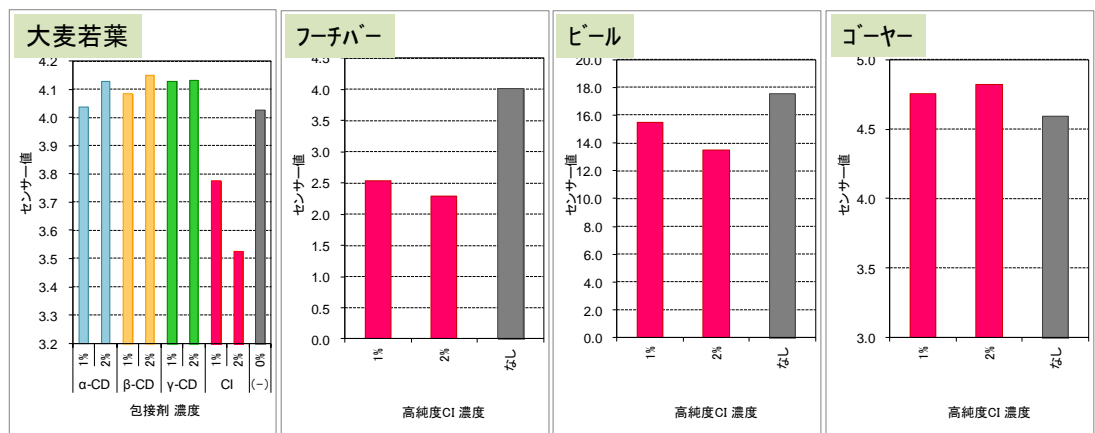


図 28. 高純度CIの素材の苦味低減特性について

2-4-3：高純度CIの包接機能の解明

(担当：食総研)

(1) 目的

サイクロデキストラン（環状イソマルトオリゴ糖、CI と省略）は、歯垢の形成を阻害する作用と、物質を取り込んで可溶化、安定化させる包接作用を有する。現時点で歯垢の形成阻害作用を生かした製品は実用化しているが、包接作用を生かした製品はまだ実用化していない。デキストランから製造されたCIは低分子化したデキストランが製品に含まれるため、高濃度で使用すると粘性が出てくるという問題がある。また、包接能が高いと報告されているCI-10 および高分子のCI(L-CI)の量が少ない。そこで、高濃度にしても粘度があがらず、L-CIの含有量の高い包接剤に適したCIの調製法を検討する必要がある。22、23年度の研究では環状イソマルトオリゴ糖グルカノトランスフェラーゼ(CITase)とCI生産菌から新規に分離したデキストラングルカナーゼ(DGase)を澱粉に作用させてCIを合成し、重合度10以上のL-CIを多く含む粗L-CIと、カラム分離で調製した高純度のL-CIと重合度7、8、9の低分子CI(S-CI)を調製し、シー・アイ・バイオ社製のCI-plusもあわせてこれらCIサンプルのビクトリアブルーBおよびイソフラボンの一種、ダイゼインの包接能を比較した。24年度は、これらのCIサンプルを用いて食品業界から要望の大きい緑茶の緑色の退色を防ぐCIの効果について詳しく調べることにした。そのほか、本研究で調製したCI標品の純度検定も調べた。

(2) 実験方法

①組換えCITaseおよびDGaseの生産と精製

CITase またはDGase発現ベクターをそれぞれ大腸菌BL21(DE3)に導入し、アンピシリンナトリウム100・g/mLを含むLB平板培地に塗抹し、37℃で12時間培養する。生育したコロニーを、アンピシリンナトリウム100・g/mLを含む100 mLのOvernight Express™ Instant TB（ノバジェン）に接種し、25℃で一晩振盪培養する。培養終了後、培養物を遠心分離することにより菌体を沈殿として回収する。続いて、回収した菌体を50 mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0)に懸濁し、超音波によって細胞破碎する。細胞破碎後、遠心によって未破碎の菌体と破碎物を取り除き、0.22 μmフィルター濾過し、粗酵素液とする。保存する場合は-80℃で冷凍し、適宜溶解して用いる。

②CITaseとDGaseによる澱粉からのCI生産の簡易測定。

①の方法で調製したDGaseおよびCITaseを用いて、2%澱粉、50 mM 酢酸ナトリウム (pH5.5) を加え、40°Cで反応させる。100°C10 分で反応を止めた後に室温まで冷却し、薄層[TLC Silica gel 60 F₂₅₄ (20 aluminium sheets 5 x 7.5 cm) MERCK (HX801501)]に1 μ l スポットし、アセトニトリル:水=70:30 の溶媒で2回展開し、5%硫酸/メタノール溶液につけた後、ホットプレートで加熱・発色させ、CI のスポットが検出されるかを確認する。スタンダードとして(株)シー・アイ・バイオ社製のCI-7、CI-8、CI-9、CI-10、CI-11、CI-12を用いる。

③澱粉から粗 L-CI の調製

1%の α 化澱粉(マツノリンM-22、松谷化学製)を50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.5)に溶解する。①で調製したDGaseとCITaseを各適量加える。振盪培養器で37°C、70 rpm、20~24時間インキュベート。②の方法で薄層クロマトグラフィーでCIが生産しているかどうかチェックする。CIができていたら、105°C、10~20分オートクレーブ後、氷水につけてさらに冷やし、さらに-20°Cで冷凍する。完全に凍結した後に融解し、遠心で上清を集め、反応液1リットルあたり、 α アミラーゼ(豚膵臓由来(25 U/mg)、シグマ)4.5 mgと、(グルコアミラーゼ(46.4 U/mg)、オリエンタル酵母)1.5 mg加え、55°C、16時間以上インキュベートする。105°C、20分オートクレーブ後、室温まで冷却(CI液)、サンプル:エタノール=1:2 (v/v)になるようエタノールを加え、攪拌する。デカンテーションで糊状の沈殿を除き、ロータリーエバポレーターで50 mLまで濃縮する。エタノールを200 mL加え[サンプル:エタノール=1:3 (v/v)]、攪拌、糊状の沈殿を集める。この操作をあと3回繰り返し、上清に残るグルコース、低分子のオリゴ糖、CI-7やCI-8など低分子CIの量を減らし、高分子のL-CIを出来るだけ回収する。沈殿をミリQ水で溶解、凍結乾燥する。これを粗L-CIサンプルとする。

④高純度 L-CI の調製

③の調製中間物である α アミラーゼ、グルコアミラーゼ処理後のCI液を、Preparative C18 (ウォーターズ、125 Å、55-105 mm)カラムに通す。水で洗浄し、残存するグルコースおよび低分子のイソマルトオリゴ糖を取り除く。ついで3.5%エタノールで洗浄し、CI-7、CI-8、CI-9を除去する。さらに、20%エタノールでL-CIを溶出する。これを回収、減圧濃縮、凍結乾燥し、高純度L-CIサンプルとする。

⑤CI サンプルの純度検定

CI サンプル乾燥標品を 2~10 mg/ml 水溶液に溶解したサンプル、およびこれに多分岐デキストラン水解酵素(HBDase)とグルコアミラーゼを加えて 40℃で1晩直鎖オリゴ糖やグルカンをグルコースまで分解したサンプルを、等量のアセトニトリルを加えて 15,000×g、10 分間遠心し、上清を TSK gel Amido-80 カラム (4.6 × 250 mm, Tosoh) を用いて高速液体クロマトグラフ(HPLC)で各分子量の CI を分離する。条件は溶離液 55%(v/v)アセトニトリル(アセトニトリル:水=55:45)、流速 1 ml/min、30℃の条件で分析する。CI は HBDase とグルコアミラーゼで分解せず、直鎖の還元糖は分解されることから、CI は HBDase とグルコアミラーゼで分解出来ない環状糖として、還元糖は分解される糖として検出される。標準の CI-7、CI-8、CI-9、CI-10、CI-11、CI-12 はシー・アイ・バイオ社製品を用いて検量線を作成し、これをもとに定量する。CI-12 より大きい CI 分子は CI-12 に換算した値で計算する。

⑥CI サンプルによる緑茶温水抽出クロロフィル安定化試験

市販の煎茶を約 70℃の温水で抽出後、CI 標品を 5%になるように加え、暗所、室温に放置、経時的に写真撮影を行う。

⑦CI サンプルによる抹茶アセトン・エタノール抽出クロロフィル安定化試験

市販の抹茶 2.4 g に対し、アセトン:エタノール=2:1 溶液を加えてクロロフィルを抽出し、300 μl 抽出液に、700 μl の CI 標品の水溶液を加え、最終 CI 標品濃度が 0.1~2.5% になるように調整する。暗所、室温に放置、経時的に写真撮影を行い、650 nm の吸光度を測定する。

(3) 結果と考察

①サイクロデキストラン標品の純度検定

サイクロデキストラン(環状イソマルトオリゴ糖、CI)は、図 2 9 に示すように、グルコースが環状に連なった構造で、グルコースの数により CI-n と表される。現在シー・アイ・バイオ株式会社より CI-7, 8, 9, 10, 11, 12 が市販されている。CI-7~CI-12 は Amide-80(Tosoh)カラムを用いた HPLC 分析で図 3 0 のように分離される。④の方法で CI-7、CI-8、CI-9 を除去し、高い包接能が報告されている CI-10 の濃度を約 30%に高めた高分子の高純度 L-CI サンプル(食総研製)は、図 3 1 のように CI-10~CI-18 が含まれた 100%L-CI であった。2009 年製のシー・アイ・バイオ社製 CI-Plus は CI-7~CI-16 が含まれていたが、CI の含有率は 9.1%と少なく、イソマルトオリゴ糖や低分子化したデキストランと思われる還元糖が 33.3%と 1/3 量を占めていた(図 3 2)。2010 年度製 CI-Plus も CI-7~CI-16 が含まれていたが、CI の含有率は 17.3%と 2 倍程度に高まり、還元糖が 9.3%と 1/3 以下に減少していた(図 3 3)。図 3 4、図 3 5 に示すように今年度 TTC が調製し

た TTC-1 および、これをイオン交換樹脂処理した TTC-2 については、CI-7~CI-14 が含まれ、CI 含有率は順に 56.4%、54.4%と、いずれも目標の 50%以上を達成していることがわかった。しかし、還元糖が順に 38.3%、39.7%と多かった。また、L-CI を多く作るようにデザインした組換え Mutant R CITase を用いてデキストランから生産した CI (MR-CI) は、シー・アイ・バイオ社で CI-Plus と同様にデキストランから生産した。MR-CI は、CI の割合が 26.7%と 2010 年度製の CI-Plus よりも 10%ほど CI の含有率が高かった。還元糖は 19.5%と、2009 年度製の CI-Plus 程度含まれていた。澱粉を原料とし、2. ③の方法で組換え Mutant R CITase と DGase を用い、エタノール沈殿法で L-CI の割合が 90%以上に高まるように調製した粗 L-CI は、CI-7~CI-26 までの高分子の L-CI が含まれていた (図 3-7)。還元糖は含まれていなかったが、CI の割合は 53.8%で、46.2%は CI-27 以上の高分子の CI であると考えられた。

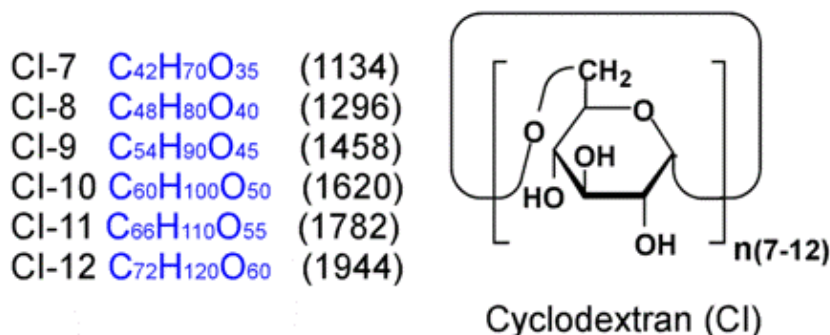


図 2 9. サイクロデキストラン (CI-7, 8, 9, 10, 11, 12) の分子式と構造

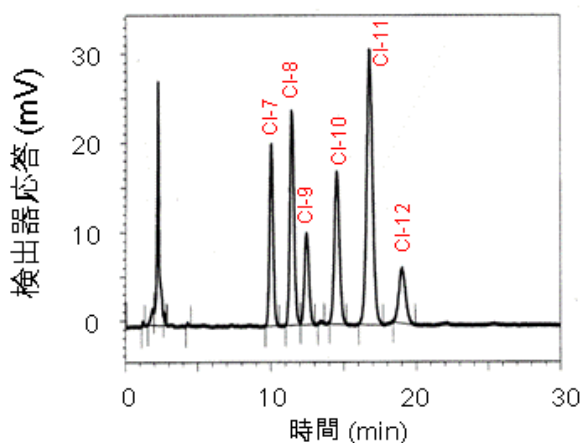
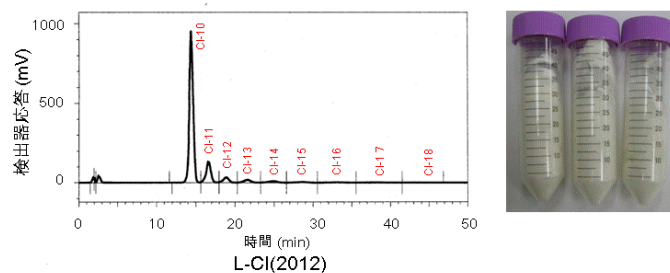


図 3 0. CI-7, 8, 9, 10, 11, 12 (高純度品) の HPLC (Amide-80 (Tosoh) カラム) 分析



C I		還元糖
CI-7 ~ CI-9	L-CI (CI-10以上)	グルコース, イソマルトオリゴ糖, デキストラン
0%	100%	0%

図 3 1. L-CI 精製品（食総研 2012 年度製）の HPLC (Amide-80 (Tosoh) カラム) 分析

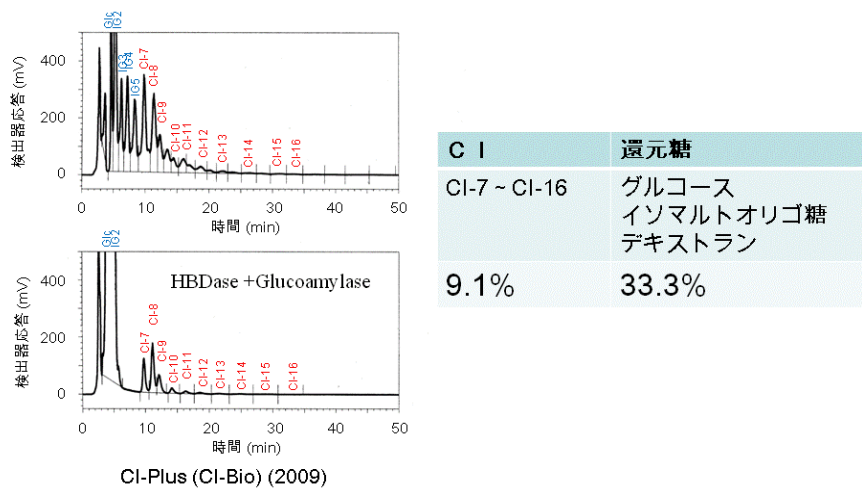


図 3 2. CI-Plus (シー・アイ・バイオ 2009 年製) の HPLC (Amide-80 (Tosoh) カラム) 分析

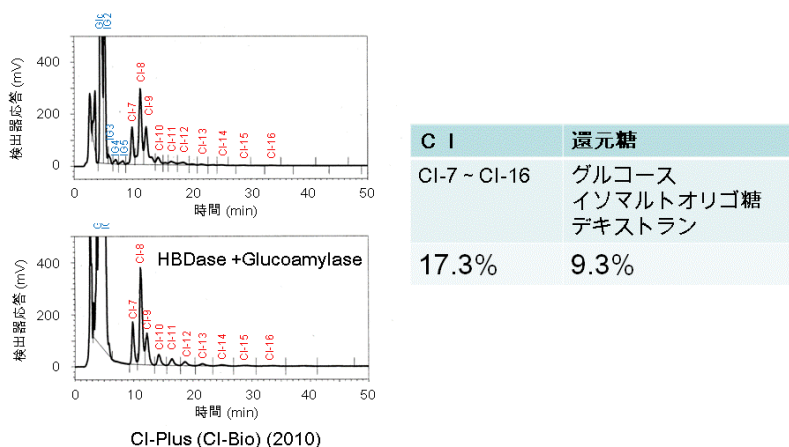
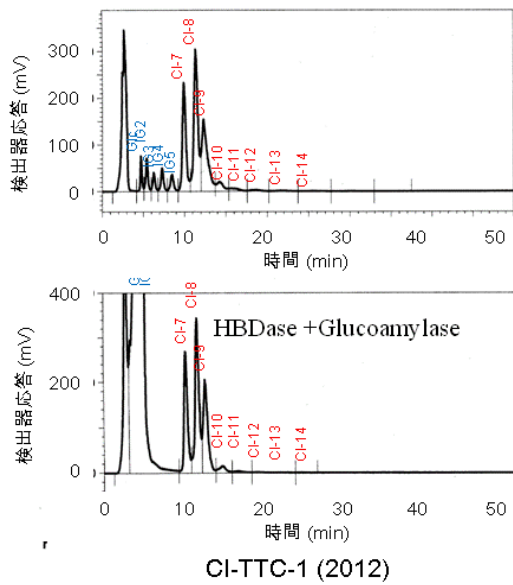
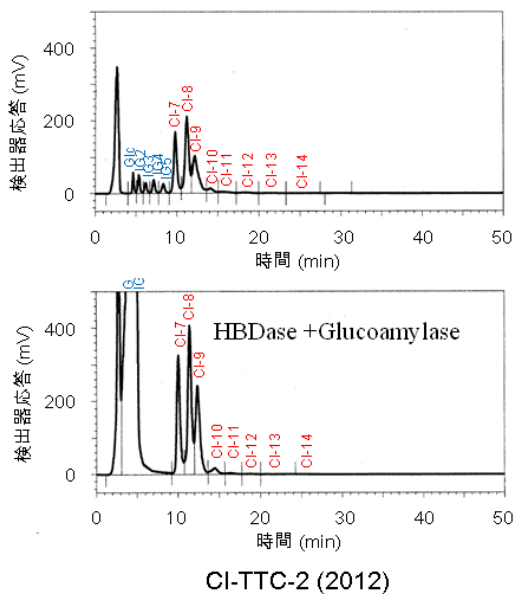


図 3 3. CI-Plus (シー・アイ・バイオ 2010 年度製) の HPLC (Amide-80 (Tosoh) カラム) 分析



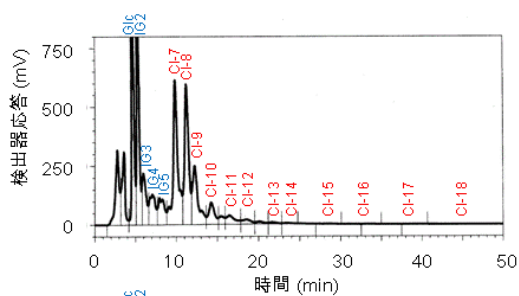
CI	還元糖
CI-7~CI-14	グルコース イソマルトオリゴ糖 デキストラン
56.4%	38.3%

図 3 4. CI-TTC-1 (TTC 2012 年度製) の HPLC (Amide-80 (Tosoh) カラム) 分析

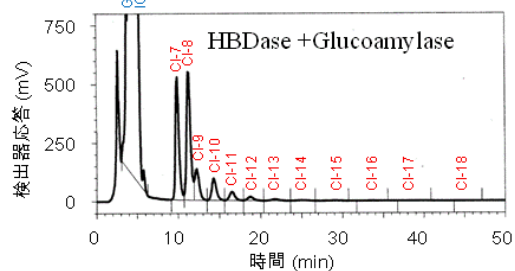


CI	還元糖
CI-7~CI-14	グルコース イソマルトオリゴ糖 デキストラン
54.4%	39.7%

図 3 5. CI-TTC-2 (カラム分離処理標品。TTC 2012 年度製) の HPLC (Amide-80 (Tosoh) カラム) 分析

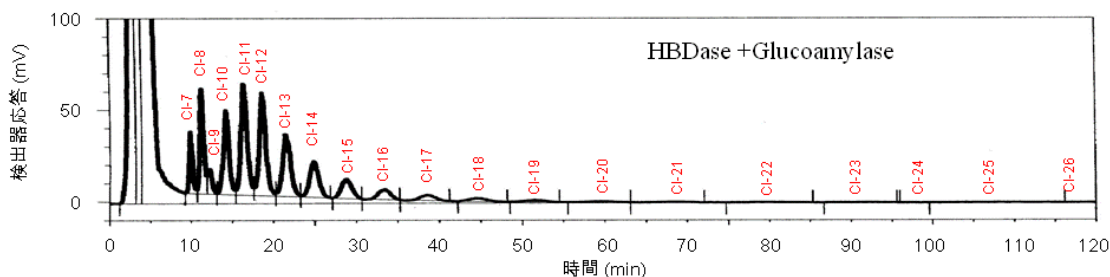
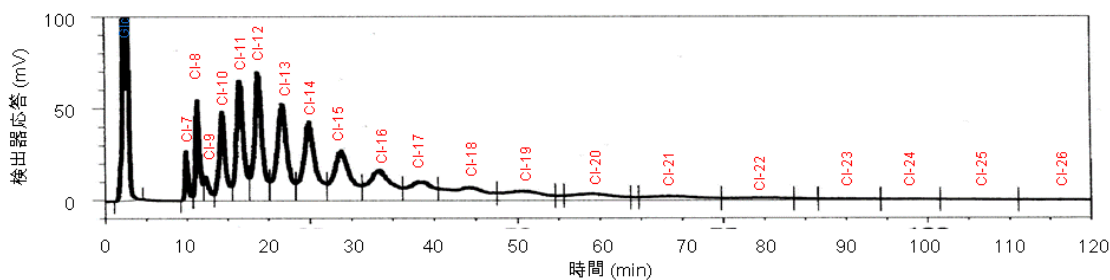


CI	還元糖
CI-7 ~ CI-18	グルコース イソマルトオリゴ糖 デキストラン
26.7%	19.5%



MR-CI (CI-Bio) (2012)

図36. MR-CI (L-CI 高生産性の変異 CIase を用いて調製した) (シー・アイ・バイオ 2012 年度製) の HPLC (Amide-80 (Tosoh) カラム) による CI 成分組成分析



粗L-CI(2012)

CI	還元糖
CI-7 ~ CI-26	グルコース, イソマルトオリゴ糖, デキストラン
53.8%	0%



図37. 粗L-CI(食総研 2012 年度品) の HPLC (Amide-80 (Tosoh) カラム) による CI 成分組成分析

②サイクロデキストラン標品による煎茶および抹茶クロロフィルの安定化試験

緑茶の緑色はサイクロデキストリン(CD)で包接できず、現在の技術では、緑茶飲料は製造後すみやかに茶色に変色してしまうため、食品業界では緑茶の緑色を退色させない包接剤のニーズが高い。そこで、CI に緑茶のクロロフィルを包接する作用があるかどうかを検定することとした。図38にクロロフィル *a* およびクロロフィル *b* の構造と吸収スペクトルを示す。

緑茶の温水抽出液にCI-Plus (2009)、CI-Plus (2010)、MR-CI、粗 L-CI を添加した。CI-Plus (2009)、CI-Plus (2010)、粗 L-CI で、無添加よりも緑色が濃くなり、7 日目までは緑色を保っていた。しかし、MR-CI は添加するとすみやかに褐色に変色した。

次に抹茶のクロロフィルをアセトン/エタノール 2 : 1 溶液で抽出し、有機溶媒 30% 濃度に調整して CI の添加効果を調べた。図40に示すように特に粗 L-CI、CI-Plus(2009)、CI-Plus(2010) が顕著に緑色を保ち、粗 L-CI では 16 日後、CI-Plus(2009)、CI-Plus(2010) では 34 日後でも完全には緑色が退色していなかった。そのほか、CI-7、CI-10、CI-11、CI-12 に若干の退色遅延効果が認められた。しかし、CI-10 の含有率の高い L-CI には顕著な効果が観察できなかった。また、CI の含有率の高い TTC-1 と TTC-2 は添加後直ちに沈殿が生じ、MR-CI や効果の高かった CI-Plus (2009)、CI-Plus (2010) でも 16 日目には沈殿が生じた。グルコース、CD、デキストラン 40、デキストリン、精製度の高い CI-7~CI-12 および L-CI や粗 L-CI では顕著な沈殿はみられなかった。さらに、抹茶クロロフィルの緑色の退色の経時変化を 650 nm の吸光度測定グラフで表した(図41)。うち、 \bullet CD は無添加と同様に退色していき、効果が無く、ついで \bullet CD、 \circ CD は若干の保護効果が見られた。L-CI については添加後 3 時間までは効果がみられたが、その後急速に退色が進み、20 時間後には \bullet CD、 \circ CD レベルにまで低下した。そのほか CI-7、CI-10、CI-11、CI-12、粗 L-CI、CI-Plus (2009)、CI-Plus (2010) では添加後 5 時間までは有効に退色を防ぎ、特に粗 L-CI、CI-Plus (2009)、CI-Plus (2010) は、20 時間経過しても 5 時間経過時と比較して吸光度の低下が少なく、長時間緑色を安定化する効果があることが示唆された。

クロロフィル安定化効果があった CI 標品のうち、CI-7、粗 L-CI、CI-Plus (2009)、CI-Plus (2010) について、濃度を変えて安定化効果を調べた。図42に示すように、CI-7 と粗 L-CI は濃度があがるほど時間を経過しても緑色が保たれ、2.5%濃度ではいずれも 23 日目でも緑色を保持していた。一方、CI-Plus (2009) では、0.5%濃度、CI-Plus (2010) では 1%濃度で最も良く緑色を保持し、2.5%になると逆に退色が進んだ。いずれの CI-Plus も 1%濃度以上では 7 日目頃から沈殿が生じ始め、これが高濃度での退色促進の原因であると考えられる。図43に 650 nm 吸光度の経時変化を示すが、CI-7 と粗 L-CI については濃度が高いほど吸光度の低下が抑制されるのに対し、2.5%濃度では CI-Plus (2009) と CI-Plus (2010) とも添加初期には高い吸光度であるが、その後吸光度が急激に低下して 23 日目には無添加のレベルにまで低下した。

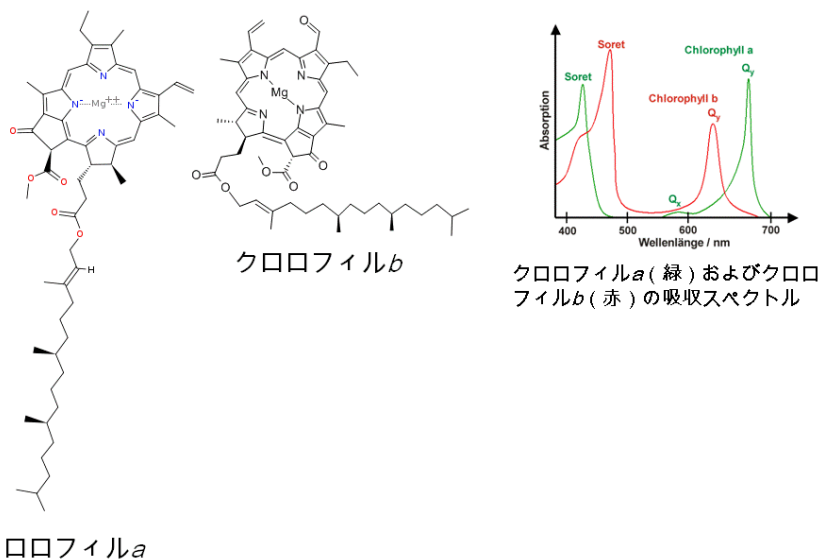


図38. ククロフィル a、ククロフィル b の構造およびそれらの吸収スペクトル

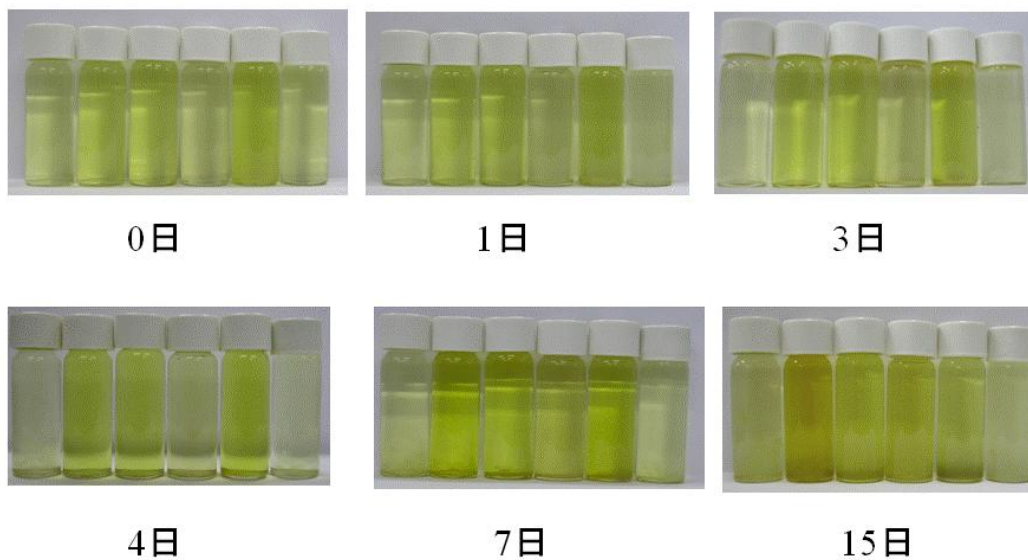


図39. 緑茶に5% CI 標品を添加した場合の色の経時変化
左より無添加、CI-Plus (2009)、CI-Plus (2010)、MR-CI (2012)、粗 L-CI、無添加

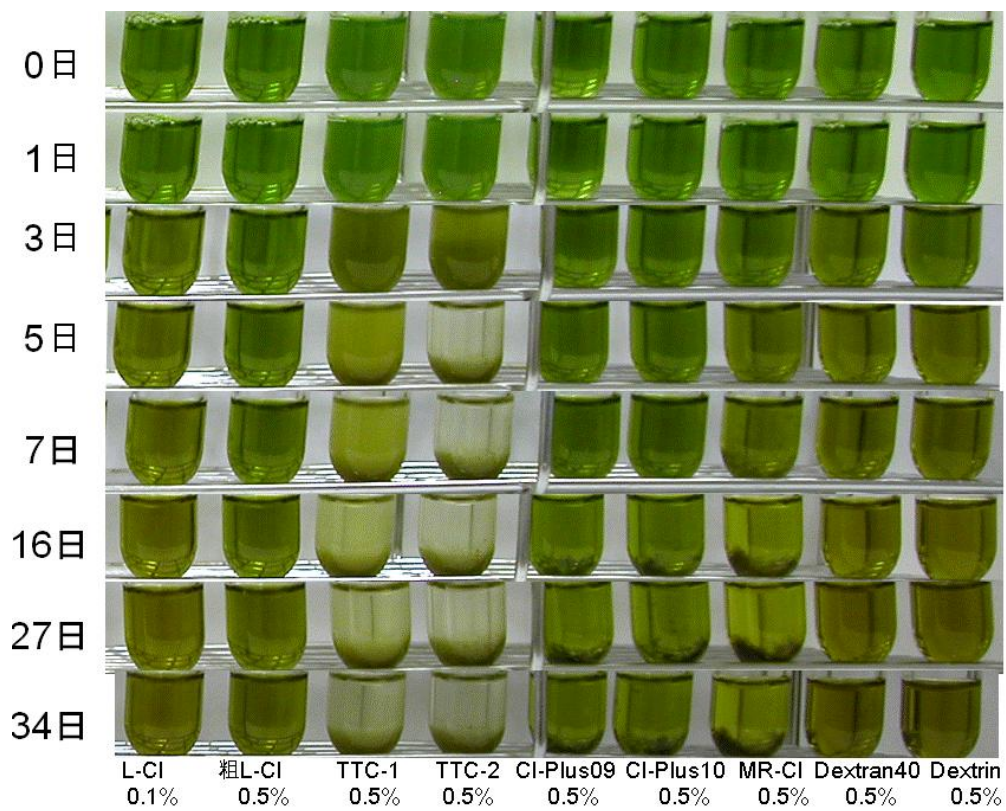
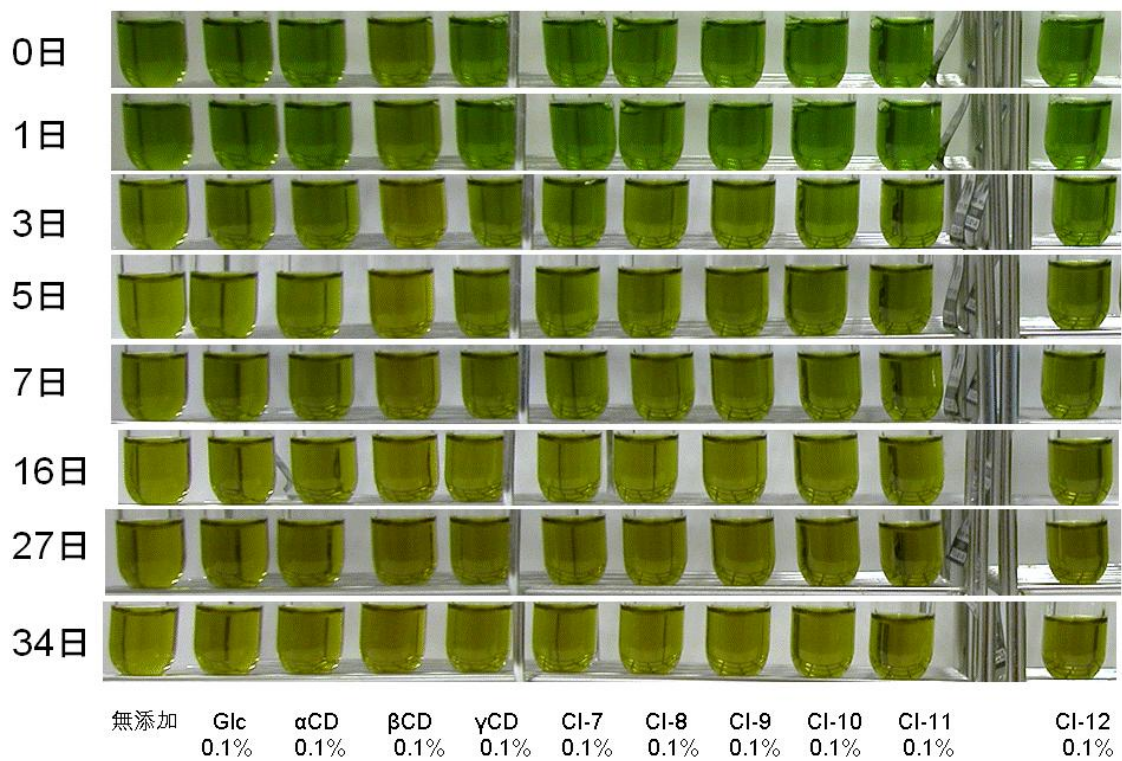


図40. 抹茶クロロフィルにCI標品を添加した場合の色の経時変化

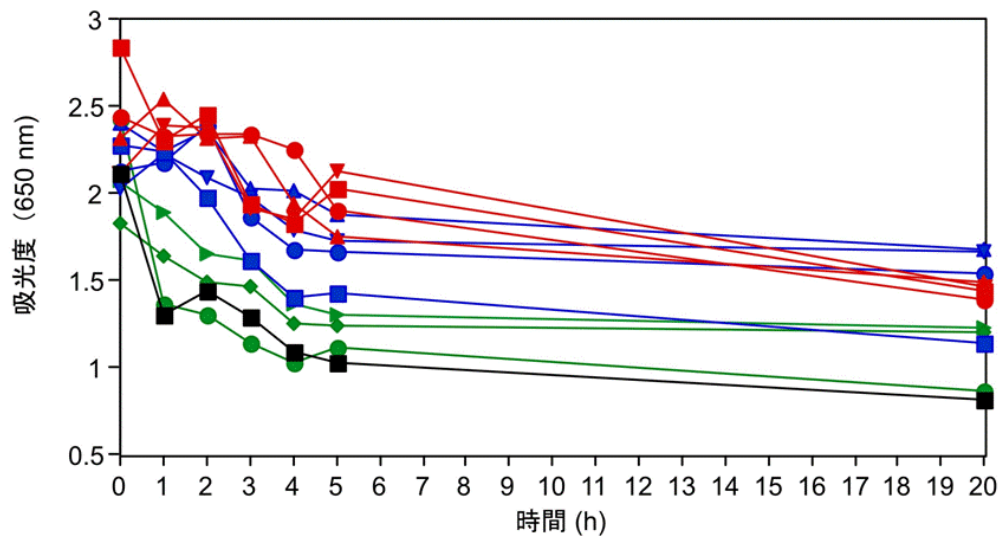


図 4 1. 抹茶クロロフィルの吸光度経時変化における CI および CD の添加効果

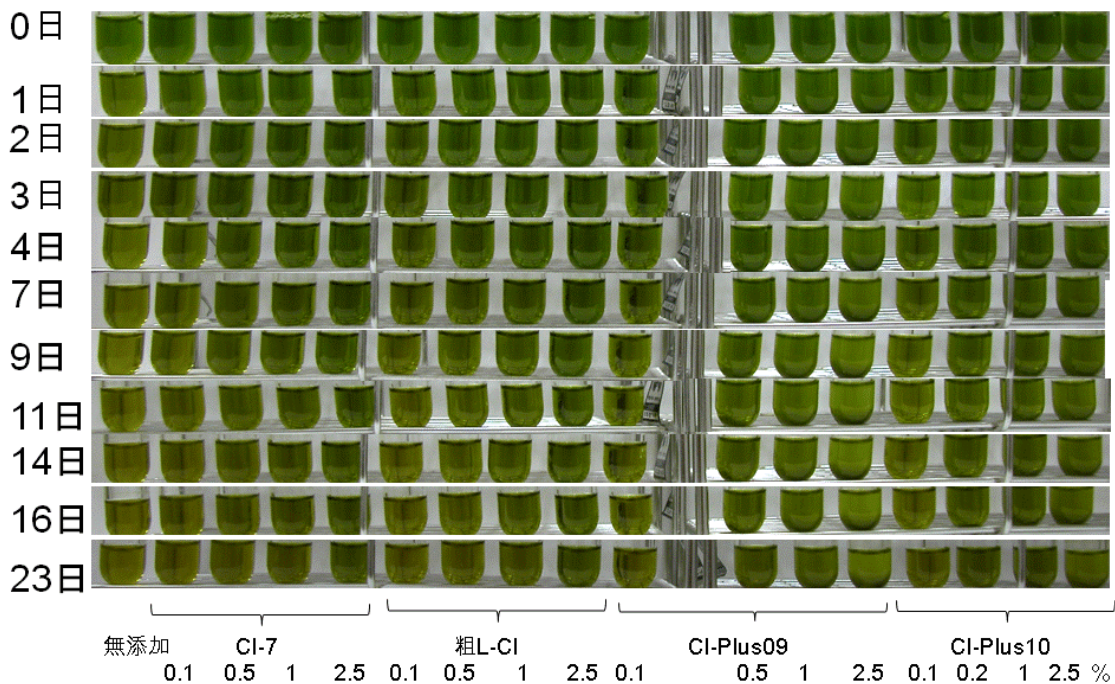
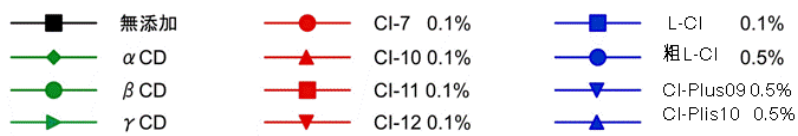


図 4 2. 抹茶クロロフィル安定化に対する CI 標品の濃度の影響

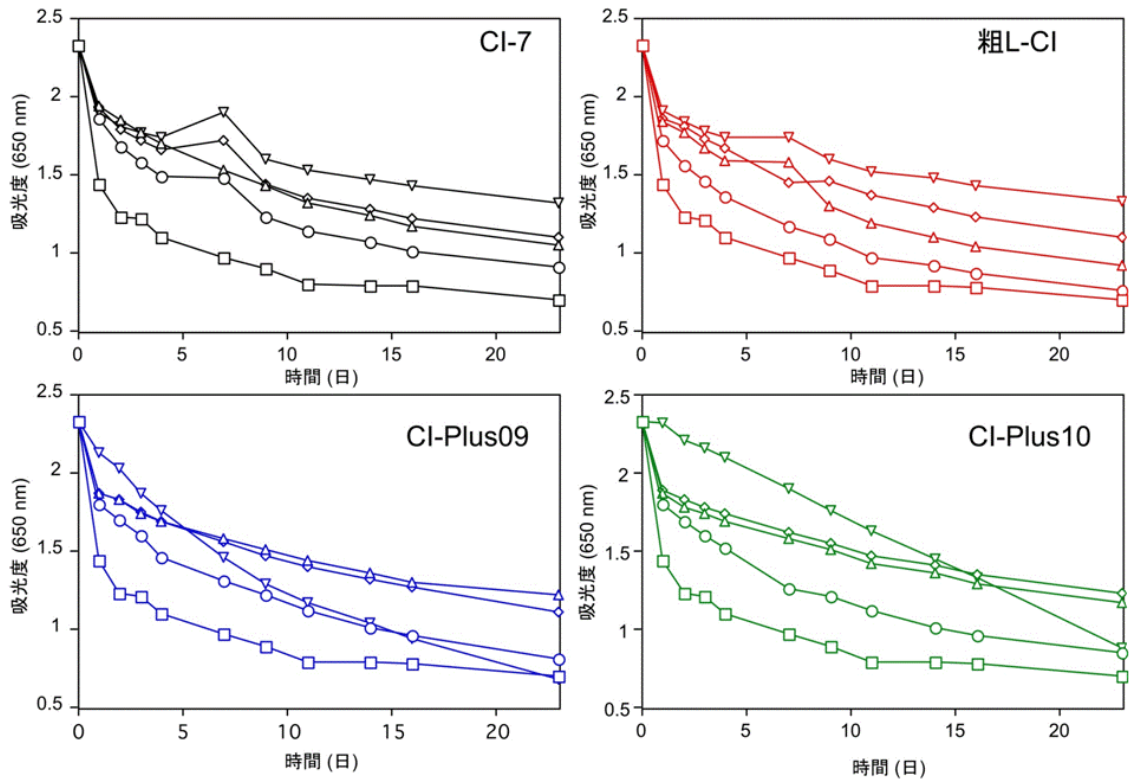


図 4 3. 抹茶クロロフィルにの吸光度経時変化における CI 標品の濃度による影響

2-4. 安全性の確認

2-4-1 : 製麩澱粉由来高純度C Iのラットにおける急性経口毒性試験

(担当 : TTC)

(1) 目的

製麩澱粉由来高純度C Iの安全性を確認するため、ラットに単回経口投与による急性毒性試験を実施した。

(2) 材料および方法

2) - 1 試験物質および溶媒

被験物質

名 称 : 製麩澱粉由来高純度C I (純度 54.4%、略名 : 高純度C I)

溶媒

名 称 : 局方注射用水

供 給 元 : 株式会社大塚製薬工場

2) - 2 試験系

種、系統および微生物学的制御

ラット、Jc1 : SD、SPF

性別および使用数

雄 15 匹

雌 15 匹

週齢および体重範囲

入手時 : 5 週齢

使用時 : 6 週齢

投与時体重範囲 : 雄 212.9~226.4 g、雌 153.0~168.8 g

供給源

供給者 : 日本クレア株式会社

馴化飼育

入荷時に一般状態を観察し、異常が認められない動物について入荷日から約7日間、馴化飼育を行った。馴化飼育期間中は毎日一般状態を観察し、異常のない健康な動物を試験に供した。

個体識別

油性マーカーペンを用いて、各動物の通し番号（ID No.）を尾部に記入した。群分け後は各ケージに、試験番号、群名称、投与物質名、性別、動物番号、ID No. および剖検日を記入したラベルを掲示した。

群分け

馴化飼育期間中に異常が認められず健康な動物について、雌雄毎に各群の平均体重が出来る限り均一になるように、体重層別無作為法にて、3群（1群あたり雌雄各5匹ずつ）に振り分けた。

2) - 3 動物飼育管理

飼育施設

動物は飼育室10で飼育した。

環境条件

室温 $22^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$ （許容範囲 $18 \sim 26^{\circ}\text{C}$ ）、相対湿度 50%（許容範囲 30~70%）、明暗各 12 時間（照明時間：午前 7 時～午後 7 時）に設定した飼育室で、ラット用プラスチック製ケージ (W26×D31×H18cm) に床敷（床敷チップ 株式会社道央理化学工業）を入れ各ケージ 1 匹ずつ飼育した。ケージおよび床敷交換は週 1 回以上行った。

飼料・飲料水

飼料は製造後 6 ヶ月以内の固型飼料 CE-2（日本配合飼料株式会社）を自由摂取させた。飲料水は施設給水除菌装置（DM3、株式会社川本製作所）を用いて約 0.5% の塩素で除菌した地下水を、5 μm フィルター濾過後給水ボトルにより自由摂取させた。給水ボトル交換頻度は週 3 回以上とした。

2) - 4 群構成

群構成を表 18 以下に示す。

表 18. 急性経口毒性試験における試験群について

群	投与物質	投与量 (mg/kg)	投与液濃度 (mg/mL)	動物数	
				雄（動物番号）	雌（動物番号）
1	溶媒	0	0	5 (101~105)	5 (151~155)
2	高純度 C I	1000	100	5 (201~205)	5 (251~255)
3		2000	200	5 (301~305)	5 (351~355)

2) - 5 試験物質の調製

被験物質を必要量秤量し、所定の濃度となるように溶媒に懸濁した。用時調製とした。

2) - 6 投与

投与経路および選択理由

投与経路：強制経口投与とした。

設定理由：本試験に用いる被験物質は食品素材として開発されているため。

投与量、投与液量および設定理由

投与量は 1000 mg/kg（低用量）および 2000 mg/kg（高用量）とした。投与液量は 10 mL/kg とした。

設定理由：OECD テストガイドライン [420] では限度量が 2000 mg/kg であることから高用量として 2000mg/kg を設定し、さらにその半量の 1000mg/kg を低用量として設定した。

投与液量については、同ガイドラインにおける原則の上限である、体重 100g 当たり 1mL とした。

投与方法

ラットを最低 16 時間絶食させた後、ディスポーザブル経口ゾンデ（有限会社フチガミ器械）およびディスポーザブル注射筒（テルモ株式会社）を用いて単回経口投与した。

2) - 7 観察、測定および検査項目

一般状態観察

全例について投与当日（投与 0 日）から投与 14 日まで、毎日、1 日 1 回以上観察した。なお、投与当日は投与直前に 1 回観察するほか、投与中から投与後 6 時間までの間、頻繁に観察した。

体重測定

投与当日を 0 日と起算して、全例について 0、1、3、7、10 および 14 日に体重を測定した。

剖検

投与後 14 日にエーテル麻酔下で放血致死させ剖検を実施した。剖検時には体外表のほか頭部および胸腹部の器官・組織について異常の有無を肉眼的に観察した。

(3) 統計学的解析

各群の雌雄毎に体重の平均値および標準偏差を算出した。さらに、StatLight#3, 4 (ユックムス㈱) を用いて Bartlett 法ならびに 1-way ANOVA による統計学的有意差の有無を確認した。

有意水準は 5%未満とした。

(4) 結果

4) - 1 一般状態観察

結果を表 19、表 20-1, 2 に示した。

製麩澱粉由来高純度 C I 2000、1000 mg/kg 投与群および対照群の雌雄いずれも投与後 14 日までに死亡は認められず、一般状態に異常は認められなかった。

4) - 2 体重

結果を図 44-1, 2、表 21、表 22-1, 2 に示した。

製麩澱粉由来高純度 C I 2000 ならびに 1000 mg/kg 投与群と対照群の雌雄いずれも順調に推移した。

投与後 14 日までの観察期間を通じ、製麩澱粉由来高純度 C I 2000 ならびに 1000 mg/kg 投与群と対照群との間に有意差は認められなかった。

4) - 3 剖検

結果を表 23、表 24-1, 2 に示した。

製麩澱粉由来高純度 C I 2000、1000 mg/kg 投与群および対照群の雌雄いずれも異常は認められなかった。

(5) 結論

製麩澱粉由来高純度 C I をラット雌雄に 2000 および 1000mg/kg で単回経口投与した結果、死亡は認められず、一般状態および剖検所見に異常は認められなかった。また、投与後の体重推移について、溶媒を投与した対照群との間に有意差は認められなかった。

以上より、本試験条件下では製麩澱粉由来高純度 C I 投与による毒性兆候は認められず、最小致死量は雌雄いずれも 2000 mg/kg 以上と判断された。

表 19. General signs in rats after single oral administration in acute toxicity study

Group	Sex	Total animal number	Mortality	Findings
Control (Vehicle)	Male	5	0/5 ^{a)}	No abnormality (5) ^{b)}
	Female	5	0/5	No abnormality (5)
高純度CI (1000 mg/kg)	Male	5	0/5	No abnormality (5)
	Female	5	0/5	No abnormality (5)
高純度CI (2000 mg/kg)	Male	5	0/5	No abnormality (5)
	Female	5	0/5	No abnormality (5)

a) Dead/treated

b) In parentheses indicate the number of cases.

表 20-1 General signs in male rats after single oral administration in acute toxicity study

Group	Animal No. (ID No.)	Time after administration (hour)							Day after administration														
		0	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
Control (Vehicle)	101 (7)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	102 (10)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	103 (3)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	104 (11)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	105 (18)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
高純度CI (1000 mg/kg)	201 (8)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	202 (6)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	203 (5)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	204 (13)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	205 (17)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
高純度CI (2000 mg/kg)	301 (16)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	302 (4)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	303 (9)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	304 (14)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	305 (1)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

N: Normal

表 20-2 General signs in female rats after single oral administration in acute toxicity study

Group	Animal No. (ID No.)	Time after administration (hour)						Day after administration																
		0	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
Control (Vehicle)	151 (2)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	152 (14)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	153 (4)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	154 (9)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	155 (11)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
高純度Cl (1000 mg/kg)	251 (15)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	252 (19)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	253 (13)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	254 (1)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	255 (10)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
高純度Cl (2000 mg/kg)	351 (6)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	352 (17)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	353 (7)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	354 (3)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	355 (8)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

N: Normal

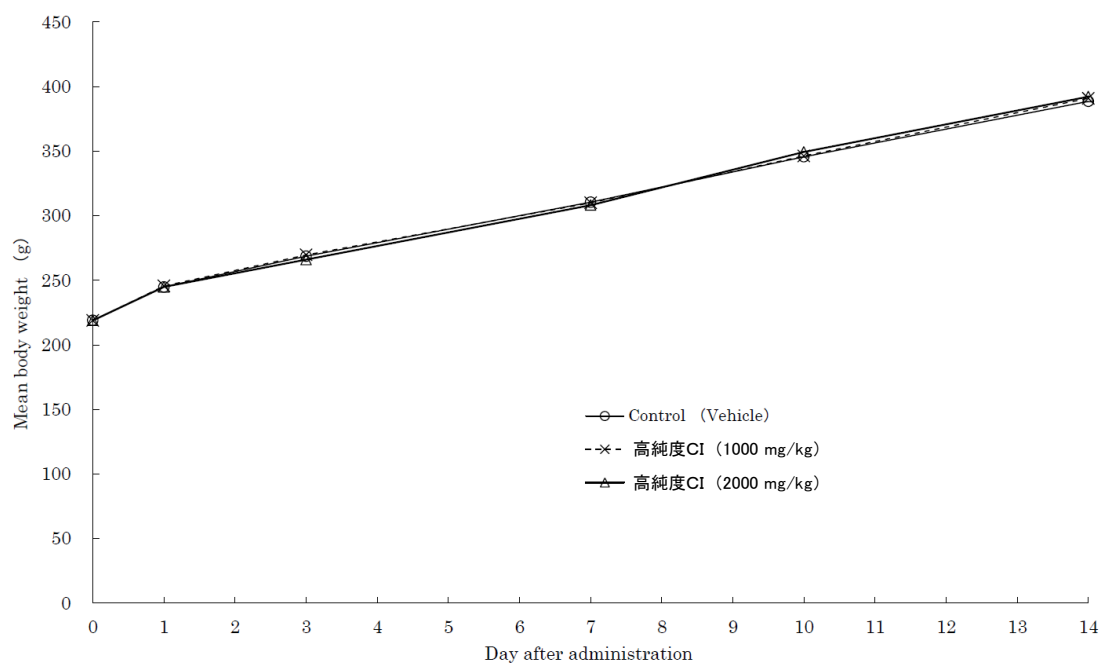


図 4 4 - 1 Body weight changes in male rats after single oral administration in acute toxicity study

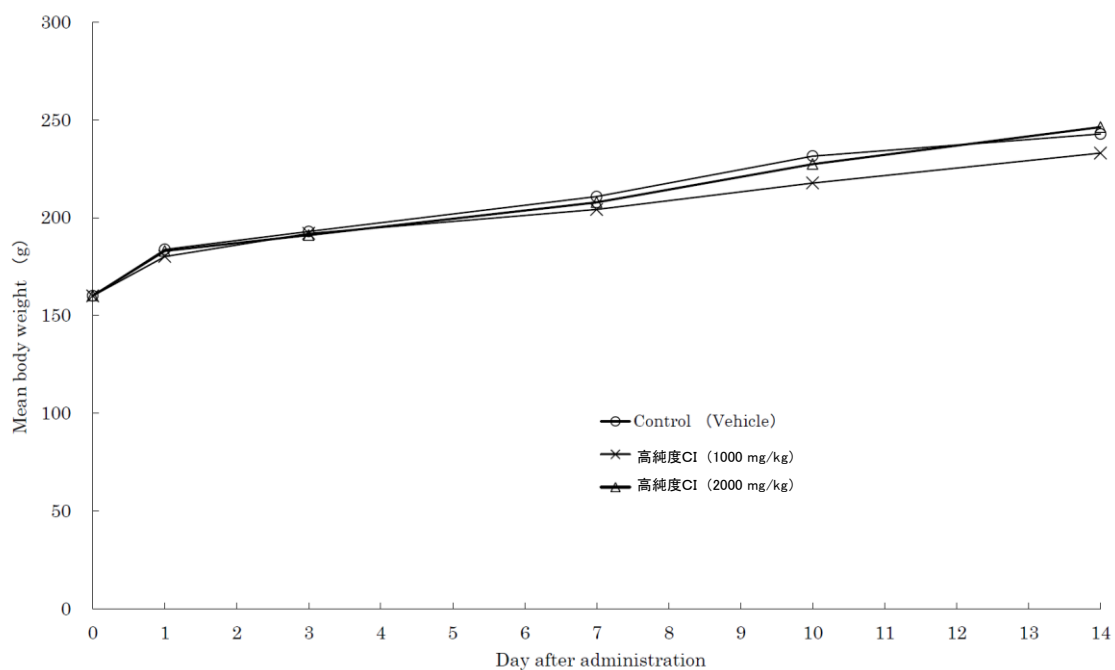


図 4 4 - 2 Body weight changes in female rats after single oral administration in acute toxicity study

表 2 1 Body weight changes in rats after single oral administration in acute toxicity study

Group	Sex	Total animal number	Day after administration						
			0	1	3	7	10	14	
Control (Vehicle)	Male	5	Mean	218.9	244.8	268.6	310.5	345.6	388.6
			±SD	4.9	5.1	5.9	9.8	9.5	14.8
	Female	5	Mean	160.1	183.8	192.9	210.8	231.5	242.7
			±SD	4.6	4.5	8.2	9.4	14.0	10.6
高純度CI (1000 mg/kg)	Male	5	Mean	218.8	245.6	269.7	310.0	346.3	390.9
			±SD	4.3	4.8	7.0	13.1	14.8	16.8
	Female	5	Mean	160.0	180.1	191.9	204.2	217.7	233.0
			±SD	5.0	4.2	8.7	9.7	13.2	14.1
高純度CI (2000 mg/kg)	Male	5	Mean	219.0	244.8	266.0	308.2	349.4	392.2
			±SD	5.2	5.7	6.0	6.6	8.3	17.4
	Female	5	Mean	160.2	183.0	191.1	207.8	227.4	246.3
			±SD	5.9	7.6	8.0	7.7	9.4	10.6

Unit : g
Significant differences were not observed.

表 2 2 - 1 Body weight changes in male rats after single oral administration in acute toxicity study

Group	Animal No. (ID No.)	Day after administration					
		0	1	3	7	10	14
Control (Vehicle)	101 (7)	226.4	250.7	276.0	324.8	358.7	409.5
	102 (10)	219.6	249.5	274.0	315.1	351.9	395.7
	103 (3)	219.2	244.0	264.6	302.0	338.4	373.3
	104 (11)	215.7	240.3	263.7	309.2	342.8	388.3
	105 (18)	213.7	239.5	264.8	301.3	336.3	376.3
	Mean	218.9	244.8	268.6	310.5	345.6	388.6
	±SD	4.9	5.1	5.9	9.8	9.5	14.8
高純度CI (1000 mg/kg)	201 (8)	224.6	251.9	281.7	331.3	369.6	416.9
	202 (6)	220.8	241.7	269.7	310.3	348.5	394.1
	203 (5)	218.8	248.5	266.5	304.8	332.9	380.2
	204 (13)	216.2	240.1	264.8	296.0	334.0	372.6
	205 (17)	213.4	245.7	265.6	307.5	346.5	390.7
	Mean	218.8	245.6	269.7	310.0	346.3	390.9
	±SD	4.3	4.8	7.0	13.1	14.8	16.8
高純度CI (2000 mg/kg)	301 (16)	224.6	249.4	272.9	308.2	353.1	393.4
	302 (4)	223.9	248.3	269.5	313.4	355.2	407.8
	303 (9)	218.5	248.4	267.9	315.6	357.6	410.6
	304 (14)	214.9	236.5	258.0	299.4	339.4	374.1
	305 (1)	212.9	241.2	261.7	304.2	341.6	375.0
	Mean	219.0	244.8	266.0	308.2	349.4	392.2
	±SD	5.2	5.7	6.0	6.6	8.3	17.4

Unit : g
Significant differences were not observed.

表 2 2 - 2 Body weight changes in female rats after single oral administration in acute toxicity study

Group	Animal No. (ID No.)	Day after administration					
		0	1	3	7	10	14
Control (Vehicle)	151 (2)	165.3	183.1	192.5	205.2	223.0	236.0
	152 (14)	164.5	189.4	199.8	212.2	228.5	245.6
	153 (4)	158.6	178.8	185.9	206.7	223.1	239.3
	154 (9)	157.4	187.2	202.5	226.5	256.2	259.7
	155 (11)	154.9	180.3	184.0	203.2	226.5	233.1
	Mean	160.1	183.8	192.9	210.8	231.5	242.7
	±SD	4.6	4.5	8.2	9.4	14.0	10.6
高純度CI (1000 mg/kg)	251 (15)	167.0	185.9	204.1	215.1	231.0	245.1
	252 (19)	162.4	174.8	185.2	198.1	207.0	223.9
	253 (13)	159.1	179.7	182.8	191.1	200.8	212.6
	254 (1)	157.9	182.2	196.7	210.8	228.0	243.1
	255 (10)	153.8	178.1	190.9	205.7	221.7	240.3
	Mean	160.0	180.1	191.9	204.2	217.7	233.0
	±SD	5.0	4.2	8.7	9.7	13.2	14.1
高純度CI (2000 mg/kg)	351 (6)	168.8	195.0	202.1	217.5	226.2	244.1
	352 (17)	162.0	185.3	193.1	207.2	233.9	254.2
	353 (7)	160.4	181.1	193.6	212.2	238.1	258.8
	354 (3)	156.7	176.0	182.1	197.0	213.5	231.9
	355 (8)	153.0	177.5	184.4	205.3	225.1	242.4
	Mean	160.2	183.0	191.1	207.8	227.4	246.3
	±SD	5.9	7.6	8.0	7.7	9.4	10.6

Unit : g

Significant differences were not observed.

表 2 3 Autopsy in rats after single oral administration in acute toxicity study

Group	Sex	Total animal number	Findings
Control (Vehicle)	Male	5	No abnormality (5) ^{a)}
	Female	5	No abnormality (5)
高純度CI (1000 mg/kg)	Male	5	No abnormality (5)
	Female	5	No abnormality (5)
高純度CI (2000 mg/kg)	Male	5	No abnormality (5)
	Female	5	No abnormality (5)

a) In parentheses indicate the number of cases.

表 2 4 - 1 Autopsy in male rats after single oral administration in acute toxicity study

Group	Animal No. (ID No.)	Findings
Control (Vehicle)	101 (7)	N
	102 (10)	N
	103 (3)	N
	104 (11)	N
	105 (18)	N
高純度CI (1000 mg/kg)	201 (8)	N
	202 (6)	N
	203 (5)	N
	204 (13)	N
	205 (17)	N
高純度CI (2000 mg/kg)	301 (16)	N
	302 (4)	N
	303 (9)	N
	304 (14)	N
	305 (1)	N

N: Normal

表 2 4 - 2 Autopsy in female rats after single oral administration in acute toxicity study

Group	Animal No. (ID No.)	Findings
Control (Vehicle)	151 (2)	N
	152 (14)	N
	153 (4)	N
	154 (9)	N
	155 (11)	N
高純度CI (1000 mg/kg)	251 (15)	N
	252 (19)	N
	253 (13)	N
	254 (1)	N
	255 (10)	N
高純度CI (2000 mg/kg)	351 (6)	N
	352 (17)	N
	353 (7)	N
	354 (3)	N
	355 (8)	N

N: Normal

2-4-2：製麩澱粉由来高純度C Iのラットを用いた28日間経口亜急性毒性試験

(担当：TTC)

(1) 目的

製麩澱粉由来高純度C Iの安全性を確認するため、ラットに28日間反復経口投与による亜急性毒性試験を実施した。

(2) 材料および方法

2) - 1 試験物質

被験物質

名称：製麩澱粉由来高純度C I（純度 54.4%、略名：高純度C I）

溶媒

名称：局方注射用水（以下、溶媒）

供給源：株式会社大塚製薬工場

2) - 2 試験系

種、系統および微生物学的制御

ラット、Jc1：SD、SPF

性別および入荷数

雄 21 匹（使用数：18 匹、予備数：3 匹）

雌 22 匹（使用数：18 匹、予備数：4 匹）

月齢

入手数：5 週齢（入荷時体重範囲：雄 162.5～176.8g、雌 125.4～140.6g）

使用時：6 週齢（投与開始時体重範囲：雄 231.7～244.3g、雌 170.2～187.6g）

供給源

供給者：日本クレア株式会社

順化飼育

入荷時に一般化状態を観察し、異常が認められない動物について入荷時から約1週間、順化飼育を行った。順化飼育期間中は毎日一般状態を観察し、異常のない動物を試験に供した。

個体識別

油性マーカーペンを用いて、各動物に通し番号（ID No.）を尾根部に記入し、各ケージに試験番号、被験物質名、投与量、性別、動物番号、ID No. および剖検日を記入したラベルを提示した。

群分け

順化飼育期間中に異常がない健康な動物について、雄雌毎に各群の平均体重が出来る限り均一になるように、体重層別無作為ほうにて3群（1群あたり雄雌各6匹ずつ）に振り分けた。

2) - 3 動物飼育管理

飼育施設

動物は飼育室 10 で飼育した。

環境条件

室温 22°C±4°C（許容範囲 18～26°C）、相対湿度 50%（許容範囲 30～70%）、明暗各 12 時間（照射時間：午前 7 時～午後 7 時）に設定した飼育室で、ラット用プラスチック製ケージ（W26×D31×H18cm）に床敷（床敷チップ 株式会社道央理科産業）を入れ各ケージ 1 匹ずつ飼育した。ケージおよび床敷交換は週 1 回以上行った。

飼料・飲料水

飼料は製造後 6 ヶ月以内の固形飼料 CE-2（日本配合飼料株式会社）を自由摂取させた。飲料水は施設給水除菌装置（DM3、株式会社川本製作所）を用いて約 0.5% の塩素で除菌した地下水を、5 μm フィルター濾過後給水ボトルにより自由摂取させた。給水ボトル交換頻度は週 2 回以上とした。

2) - 4 群構成

群構成を表 2 5 に示す。

表 2 5. 亜急性経口毒性試験における試験群について

群	投与物質	投与量 (mg/kg)	投与液濃度 (mg/ml)	動物数	
				雄(動物番号)	雌(動物番号)
1	溶媒	0	0	6(111～116)	6(161～166)
2	高純度 C I	500	50	6(211～216)	6(261～266)
3		1000	100	6(311～316)	6(361～366)

2) - 5 試験物質の調整

被験物質を必要量秤量し、所定の濃度となるように溶媒に溶解した。

2) - 6 試験物質投与

投与方法、投与経路および投与回数

ディスポーサブル胃ゾンデおよびディスポーサブルシリンジを用いて強制的に胃内へ 1 日、28 日間経口投与した。

投与方法、投与経路および投与回数の設定理由

投与量は 500mg/kg（低用量）および 1000mg/kg（高用量）とした。投与液量は 10mL/kg とした。

設定理由：サイクロデキストラン（C I）は、食品衛生法第 10 条に基づき食品添加物における既存添加物リストに掲載されているが（番号 155）、使用基準については示されていない。そのため、1000mg/kg/day の用量で反復投与しても影響は認められないと予想される。以上より、本試験では OECD テストガイドライン〔407〕における限度試験を参考にして、低用量を 500mg/kg、さらに 1000mg/kg を高用量として設定した。

2) - 7 観察、測定および検査項目

一般状態観測

全例について投与開始（投与 1 日）から投与後 28 日までを 1 日 1 回以上観察した。

体重測定

全例について投与 1、7、14、21 および 28 日の投与前ならびに剖検日に電子天秤（FX-1200I 株式会社 A&D）を用いて体重測定した。

摂餌量測定

投与開始の週より週 1 回、全例について給与量を測定した翌日に残余量を測定し、1 日分の摂取量を測定した。

2) - 8 血液学的検査

株式会社第一岸本臨床検査センター洞爺湖営業所（北海道虻田郡洞爺湖町字泉 52-3）に以下の測定を依頼した。

検査項目および検査方法：

① 赤血球数（RBC）	シーフローDC 検出法
② ヘマトクリット値（Ht）	赤血球パルス波高値検出法
③ ヘモグロビン量（Hb）	SLS ヘモグロビン法
④ 平均赤血球容積（MCV）	RBC および Ht より算出
⑤ 平均赤血球ヘモグロビン量（MCH）	RBC および Hb より算出
⑥ 平均赤血球ヘモグロビン濃度（MCHC）	Ht および Hb より算出
⑦ 血小板数（Platelet）	シーフローDC 検出法
⑧ 白血球数（WBC）	DC 検出法

2) - 9 血液生化学的検査

株式会社第一岸本臨床検査センター洞爺湖営業所（北海道虻田郡洞爺湖町字泉52-3）に以下の測定を依頼した。

検査項目および検査方法：

① AST	UV 法
② ALT	UV 法
③ アルカリファターゼ (ALP)	P-ニトロフェニルリン酸基質法
④ γ -GTP	γ -グルタミル-p-ニトロアニリド基質法
⑤ グルコース (Glucose)	酸素法
⑥ 総コレステロール (T-Cho)	酸素法
⑦ トリグリセリド (TG)	酸素法
⑧ 総タンパク (TP)	Biuret 法
⑨ 総ビリルビン酸 (T-Bil)	アゾビリルビン法
⑩ 尿素窒素 (NU)	Urease indophenol 法
⑪ クレアチニン (Crea)	酸素法
⑫ ナトリウム (Na)	電極法
⑬ カリウム (K)	電極法
⑭ クロール (Cl)	電極法
⑮ カルシウム (Ca)	OCPC 法
⑯ 無機リン (P)	モリブデン直接法
⑰ アルブミン	BCG 法
⑱ A/G 比 (A/G ratio)	BCG/Biuret 法

2) - 10 器官重量の測定

全身緒臓器の異常の有無を確認後、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、精巣および卵巣を摘出し重量を測定した。なお、左右対の器官については左右合わせて測定した。

$$\text{相対重量(\%)} = \frac{\text{絶対重量(g)}}{\text{剖検日体重(g)}} \times 100$$

2) - 11 剖検

全例を最終投与 28 日より 16 時間以上絶食を行い、翌日にエーテル麻酔下で採血後、放血により安楽死させ、体外表を観察し全身の器官・組織を肉眼的に観察した。

(3) 統計学的方法

体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査、器官の絶対重量及び相対重量の成績について群平均的及び標準偏差を算出し、Bartlett の検定法を行い、等分散性を解析した。等分散 ($p > 0.05$) の場合は一元配置分散分析法で解析し、不等分散 ($p \leq 0.05$) の場合は Kruskal-Wallis の検定法で解析した。一元配置分散分析に結果、有意差がみられた場合 ($p \leq 0.10$) は Dunnett の検定法を用いて対照群との比較を行った。なお、対照群との比較検定については、有意水準を 5%とした。

(4) 試験結果

4) - 1 一般状態観察

雄雌にいずれの例においても投与開始日から剖検日までに死亡は認められず、一般状態にも異常は認められなかった (表 26、表 27-1, 2)。

4) - 2 体重

雄雌の投与群に投与による影響は認められず、対照群とほぼ同様の体重推移を示した (図 45-1, 2、表 28、表 29-1, 2)。

4) - 3 摂餌量

雄雌ともに投与期間を通じ、有意な差は認められなかった (表 30、表 31-1, 2)。

4) - 4 血液学および血液生化学的検査

(Appendix 4-1、4-2、5-1、5-2)

各個体において、剖検時に採取した血液および血清を用い、検査を実施した結果、雌のグループにおいて、高値を示して有意差が見られたが、その他の個体において有意な差は見られなかった (表 32-1, 2、表 33-1, 2、表 34-1, 2)。

4) - 5 臓器重量および相対重量

各個体において、剖検時に心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、精巣および卵巣の重量を測定した結果、雄で心臓の臓器重量ならびに相対重量で低値を示し、さらには肺および精巣の相対重量で高値な有意差がみられたが、その他の臓器において有意な差はみられなかった (表 35-1, 2、表 36-1, 2、表 37-1, 2)。

4) - 6 剖検

雄について、1群 (溶媒) の 1例 (A.No. 116) で精巣委縮 (右) の所見を認めたが、その他の雄雌各個体に異常はみられなかった (表 38、表 39-1, 2)。

(5) 考察および結論

6週間の雄雌SD系ラットに、製麩澱粉由来高純度C Iの500および1000mg/kgについて28日間連日反復経口投与し、亜急性毒性を検討した。

剖検を実施し血液ならびに各種臓器を摘出し毒性発現の有無を確認した。

その結果、一般状態、体重推移、摂餌量、血液学的検査および剖検所見では、被験物質の投与による異常は見られなかった。

臓器重量では雄の心臓、相体重量では心臓、肺および精巣で有意な差がみられたが、心臓については、1群（溶媒）に対し、2群（低用量）で低値を示す有意な差が認められたものの3群では有意な差が認められず、用量相関性が無いことから、被験物質投与による影響ではないと考えられた。

肺については、1群（溶媒）に対し、3群（高用量）で高値を示す有意な差が認められたが、臓器重量（湿重量）に有意差が認められなかったことから被験物質投与による影響ではないと考えられた。

精巣については、1群（溶媒）に対し、3群（高用量）で高値を示す有意な差が認められたが、1群（溶媒）の1例（A.No.116）で精巣委縮（右）の所見を認めたために、平均値が低下したことで有意な差が認められたと考えられ、被験物質による影響ではないと考えられた。

血液生化学的検査については、雌2群（低用量）でグルコースの高値を示したが、用量相関性が無いことから、被験物質の投与による毒性変化ではないと考えられた。

以上のように、製麩澱粉由来高純度C Iを500および1000mg/kgの用量で反復投与を行っても、生体の機能および形態の毒性変化は認められなかった。

従って、本試験条件下における、製麩澱粉由来高純度C Iの無影響量は、雄雌ともに1000mg/kg以上と推定された。

表 2 6 General signs in rats 28days iteration oral administration in subacute toxicity study

Group	Sex	Total animal number	Mortality	Findings
control (Vehicle)	Male	6	0/6 ^{a)}	No abnormality(6) ^{b)}
	Female	6	0/6	No abnormality(6)
高純度CI (500mg/kg)	Male	6	0/6	No abnormality(6)
	Female	6	0/6	No abnormality(6)
高純度CI (1000mg/kg)	Male	6	0/6	No abnormality(6)
	Female	6	0/6	No abnormality(6)

a) Dead/treated

b) In parentheses indicate the number of cases

表 2 7 — 1 General signs in male rats 28days iteration oral administration in subacute toxicity study

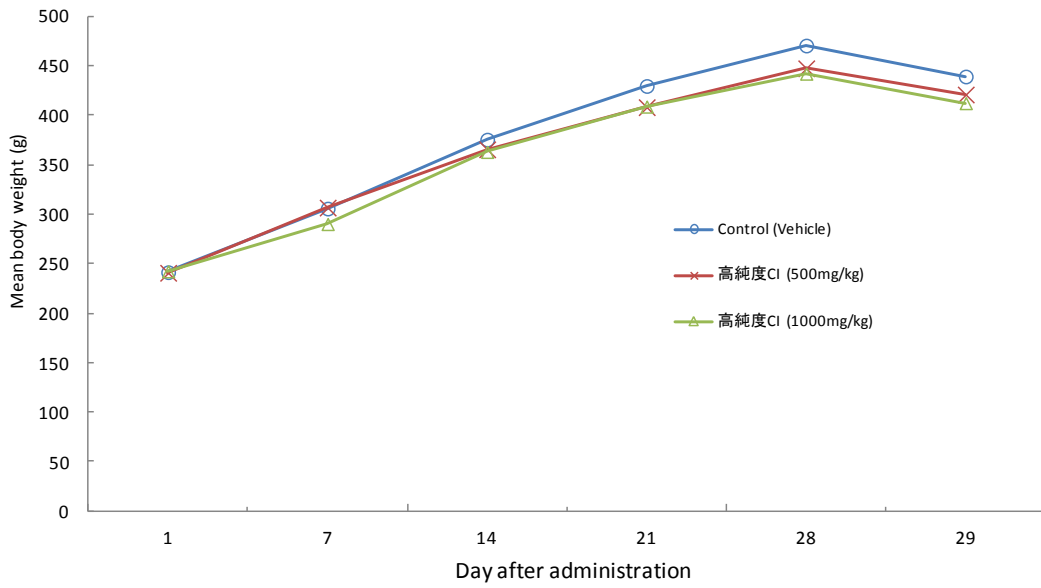
Group	Animal No. (ID No.)	Day																											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
control (Vehicle)	111 (5)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	112 (19)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	113 (10)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	114 (2)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	115 (8)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
116 (9)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
高純度CI (500mg/kg)	211 (4)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	212 (14)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	213 (13)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	214 (17)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	215 (20)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
216 (16)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
高純度CI (1000mg/kg)	311 (6)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	312 (1)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	313 (3)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	314 (18)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	315 (12)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
316 (21)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

N : Normal

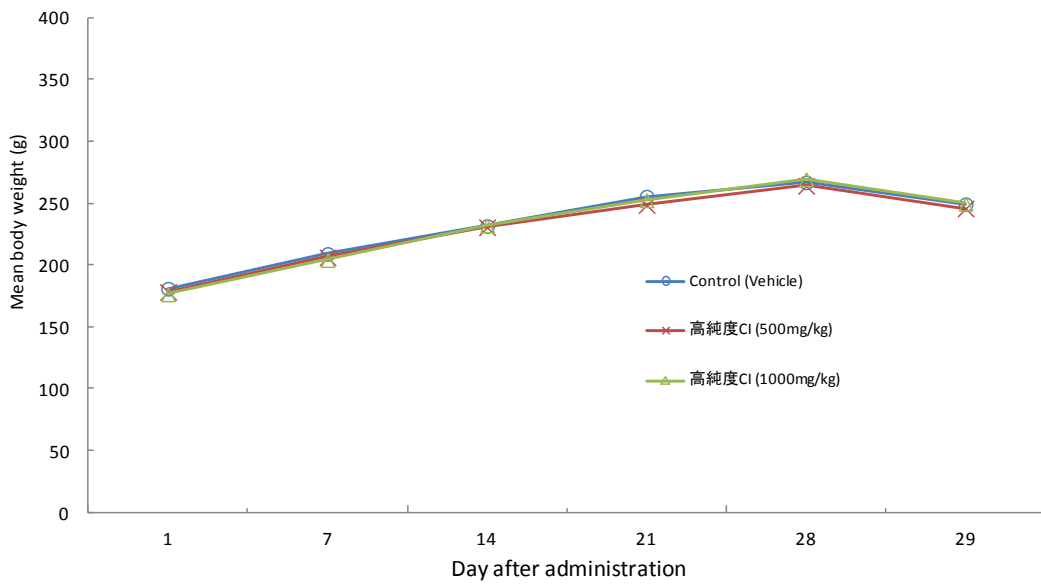
表 2 7—2 General signs in female rats 28days iteration oral administration in subacute toxicity study

Group	Animal No. (ID No.)	Day																						
		0	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
control (Vehicle)	161 (6)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	162 (1)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	163 (10)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	164 (11)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	165 (8)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	166 (4)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
高純度Cl (500mg/kg)	261 (17)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	262 (18)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	263 (13)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	264 (21)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	265 (12)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	266 (2)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
高純度Cl (1000mg/kg)	361 (20)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	362 (19)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	363 (15)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	364 (3)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	365 (16)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	366 (5)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

N : Normal



☒ 4 5 - 1 Body weight changes in male rats 28days iteration oral administration in subacute toxicity study



☒ 4 5 - 2 Body weight changes in female rats 28days iteration oral administration in subacute toxicity study

表 2 8 Body weight changes in rats 28days iteration oral administration in subacute toxicity study

Group	Sex	Total animal number		Day after administration					
				1	7	14	21	28	29
control (Vehicle)	Male	6	Mean	241.5	305.8	375.5	429.7	470.6	439.3
			±SD	4.3	6.8	11.7	20.9	27.0	28.9
	Female	6	Mean	180.9	209.0	231.6	255.4	266.9	249.2
			±SD	8.7	15.5	20.1	20.7	19.7	20.0
高純度CI (500mg/kg)	Male	6	Mean	240.9	306.8	365.7	408.3	447.6	421.1
			±SD	5.0	8.4	11.6	16.4	19.8	20.1
	Female	6	Mean	178.3	206.3	230.6	248.6	264.1	245.8
			±SD	7.3	13.8	17.6	17.7	13.4	14.5
高純度CI (1000mg/kg)	Male	6	Mean	242.4	290.2	363.1	408.9	442.2	412.4
			±SD	7.6	40.4	21.2	25.6	28.5	27.2
	Female	6	Mean	176.3	204.0	232.1	252.4	269.5	249.6
			±SD	7.8	12.0	14.8	29.0	34.9	31.5

Unit:g

Significant differences were not observed

表 2 9 - 1 Body weight changes in male rats 28days iteration oral administration in subacute toxicity study

Group	Animal No. (ID No.)	Day after administration					
		1	7	14	21	28	29
control (Vehicle)	111 (5)	249.1	312.9	387.0	447.8	488.8	449.1
	112 (19)	243.9	307.7	382.8	445.3	502.1	474.1
	113 (10)	240.6	313.0	385.0	448.1	486.5	467.5
	114 (2)	237.8	304.9	375.9	427.1	465.3	425.3
	115 (8)	238.8	297.3	360.0	400.4	430.0	401.5
	116 (9)	238.5	298.7	362.4	409.4	450.6	418.3
	Mean	241.5	305.8	375.5	429.7	470.6	439.3
	±SD	4.3	6.8	11.7	20.9	27.0	28.9
高純度CI (500mg/kg)	211 (4)	249.8	321.1	378.8	421.9	459.9	426.9
	212 (14)	241.2	306.0	356.5	397.0	428.6	392.7
	213 (13)	242.5	309.4	376.9	422.6	470.2	449.3
	214 (17)	237.9	303.4	361.3	399.8	443.0	420.6
	215 (20)	236.9	305.3	370.9	423.1	462.7	432.0
	216 (16)	236.9	295.5	350.0	385.3	421.3	405.0
	Mean	240.9	306.8	365.7	408.3	447.6	421.1
	±SD	5.0	8.4	11.6	16.4	19.8	20.1
高純度CI (1000mg/kg)	311 (6)	257.6	319.9	389.0	434.8	480.5	448.4
	312 (1)	241.7	303.2	374.8	417.8	433.3	406.0
	313 (3)	237.2	302.9	339.8	374.3	409.1	39.0
	314 (18)	240.9	307.8	375.7	433.0	465.7	433.6
	315 (12)	238.5	298.2	363.2	411.8	450.6	421.8
	316 (21)	238.4	209.2	336.1	381.5	413.8	385.6
	Mean	242.4	290.2	363.1	408.9	442.2	412.4
	±SD	7.6	40.4	21.2	25.6	28.5	27.2

Unit:g

Significant differences were not observed

表 29-1 Body weight changes in female rats 28days iteration oral administration in subacute toxicity study

Group	Animal No. (ID No.)	Day after administration					
		1	7	14	21	28	29
control (Vehicle)	161 (6)	192.6	228.3	256.2	275.0	278.0	260.3
	162 (1)	186.0	207.3	231.7	264.1	277.0	258.5
	163 (10)	184.1	226.4	253.1	275.9	288.1	274.5
	164 (11)	181.1	205.4	222.0	253.9	271.7	249.7
	165 (8)	171.3	193.5	222.6	2403.0	249.7	232.7
	166 (4)	170.1	192.7	203.7	223.3	236.3	219.5
	Mean	180.9	209.0	231.6	255.4	266.9	249.2
±SD	8.7	15.5	20.1	20.7	19.7	20.0	
高純度CI (500mg/kg)	261 (17)	191.5	231.5	261.1	282.0	285.5	270.1
	262 (18)	180.5	210.3	237.8	251.6	266.4	244.7
	263 (13)	176.8	203.9	232.6	246.5	272.6	253.7
	264 (21)	173.6	202.6	220.9	231.7	250.1	229.5
	265 (12)	170.3	192.5	213.5	241.8	253.8	234.6
	266 (2)	177.2	197.0	217.4	238.0	256.2	242.2
	Mean	178.3	206.3	230.6	248.6	264.1	245.8
±SD	7.3	13.8	17.6	17.7	13.4	14.5	
高純度CI (1000mg/kg)	361 (20)	185.8	219.3	247.5	260.9	293.5	273.6
	362 (19)	185.9	217.2	253.2	305.8	329.4	302.9
	363 (15)	171.9	204.3	228.8	232.7	256.9	233.7
	364 (3)	167.4	197.8	219.1	229.5	241.3	229.7
	365 (16)	174.4	190.2	218.5	233.0	242.9	224.7
	366 (5)	172.1	194.9	225.5	252.5	253.1	233.0
	Mean	176.3	204.0	232.1	252.4	269.5	249.6
±SD	7.8	12.0	14.8	29.0	34.9	31.5	

Unit:g

Significant differences were not observed

表 30 Food consumption in rats 28days iteration oral administration in subacute toxicity study

Group	Sex	Total animal number		Day after administration				
				0-1	7-8	14-15	21-22	27-28
control (Vehicle)	Male	6	Mean	27.2	28.3	31.5	31.7	31.8
			±SD	1.6	2.2	1.4	3.2	2.5
	Female	6	Mean	23.7	20.2	21.8	22.0	20.6
			±SD	7.7	1.6	3.4	3.2	2.3
高純度CI (500mg/kg)	Male	6	Mean	25.3	28.8	31.0	28.2	31.3
			±SD	2.7	1.8	2.9	1.6	2.7
	Female	6	Mean	22.3	18.1	22.2	21.1	20.6
			±SD	3.6	2.0	1.8	2.8	2.1
高純度CI (1000mg/kg)	Male	6	Mean	26.2	28.8	28.7	30.4	30.8
			±SD	2.7	1.5	4.0	2.0	2.3
	Female	6	Mean	19.3	20.3	20.4	23.5	22.5
			±SD	5.4	2.3	3.1	3.3	2.2

Unit:g

表 3 1 - 1 Food consumption in male rats 28days iteration oral administration in subacute toxicity study

Group	Animal No. (ID No.)	Intake(day)				
		0-1	7-8	14-15	21-22	27-28
control (Vehicle)	111 (5)	29.9	32.1	33.6	29.9	33.0
	112 (19)	28.4	29.2	31.2	36.9	32.2
	113 (10)	25.9	27.5	31.9	33.9	33.1
	114 (2)	25.7	28.3	32.4	30.3	32.7
	115 (8)	26.6	26.7	30.0	27.9	26.8
	116 (9)	26.7	25.9	29.9	31.3	33.1
	Mean ±SD	27.2 1.6	28.3 2.2	31.5 1.4	31.7 3.2	31.8 2.5
高純度Cl (500mg/kg)	211 (4)	27.6	28.0	30.9	26.9	34.0
	212 (14)	20.6	27.3	27.9	27.5	30.8
	213 (13)	26.6	31.6	29.9	30.3	34.2
	214 (17)	28.0	30.3	31.6	28.8	29.4
	215 (20)	24.8	27.6	36.3	29.7	32.3
	216 (16)	24.3	27.7	29.3	26.2	27.3
	Mean ±SD	25.3 2.7	28.8 1.8	31.0 2.9	28.2 1.6	31.3 2.7
高純度Cl (1000mg/kg)	311 (6)	29.8	28.5	27.9	31.1	33.3
	312 (1)	25.5	29.5	33.6	32.9	32.6
	313 (3)	21.9	30.0	22.8	28.0	28.1
	314 (18)	24.9	29.4	32.4	28.9	32.3
	315 (12)	28.0	29.6	29.2	32.1	30.6
	316 (21)	26.9	25.9	26.3	29.1	27.9
	Mean ±SD	26.2 2.7	28.8 1.5	28.7 4.0	30.4 2.0	30.8 2.3

Unit:g

表 3 1 - 2 Food consumption in female rats 28days iteration oral administration in subacute toxicity study

Group	Animal No. (ID No.)	Intake(day)				
		0-1	7-8	14-15	21-22	27-28
control (Vehicle)	161 (6)	24.8	20.5	22.5	24.9	17.2
	162 (1)	14.4	19.4	21.9	22.8	21.3
	163 (10)	20.3	17.7	21.6	25.3	18.7
	164 (11)	33.0	22.5	26.5	21.9	23.3
	165 (8)	17.5	20.0	15.9	20.7	20.6
	166 (4)	32.1	21.3	22.4	16.6	22.6
	Mean ±SD	23.7 7.7	20.2 1.6	21.8 3.4	22.0 3.2	20.6 2.3
高純度Cl (500mg/kg)	261 (17)	23.1	14.6	24.2	24.6	16.7
	262 (18)	25.2	18.4	21.3	20.4	21.2
	263 (13)	20.8	18.9	24.3	24.2	23.1
	264 (21)	17.5	18.8	21.9	20.7	20.9
	265 (12)	19.9	20.5	21.4	17.5	20.9
	266 (2)	27.3	17.6	19.8	19.4	20.9
	Mean ±SD	22.3 3.6	18.1 2.0	22.2 1.8	21.1 2.8	20.6 2.1
高純度Cl (1000mg/kg)	361 (20)	11.8	22.1	26.5	25.6	26.8
	362 (19)	27.4	23.7	19.5	28.2	22.5
	363 (15)	21.1	17.7	19.5	19.3	22.0
	364 (3)	15.3	18.4	20.5	20.5	20.2
	365 (16)	19.1	19.9	18.2	23.2	21.7
	366 (5)	20.9	19.9	18.2	24.3	21.7
	Mean ±SD	19.3 5.4	20.3 2.3	20.4 3.1	23.5 3.3	22.5 2.2

Unit:g

表 3 2 - 1 Measuring data of blood and serum

Group	Sex	Total animal number		Measurement item							
				RBC ($10^4/\mu\text{l}$)	Ht(%)	Hb(g/dl)	MCV(fl)	MCH(pg)	MCHC(%)	Platelet ($10^4/\mu\text{l}$)	WBC ($10^3/\mu\text{l}$)
control (Vehicle)	Male	6	Mean	772.7	47.6	15.6	62.0	20.2	32.7	78.0	9.4
			±SD	70.1	2.6	1.4	3.1	0.4	1.6	7.5	1.9
	Female	6	Mean	765.7	50.4	15.6	65.7	20.4	31.0	77.3	6.6
			±SD	17.8	2.4	0.4	2.3	0.4	0.9	13.9	2.0
高純度Cl (500mg/kg)	Male	6	Mean	791.7	49.6	15.8	62.5	19.9	31.9	83.6	6.7
			±SD	39.6	4.1	0.6	3.7	0.4	1.4	8.5	2.0
	Female	6	Mean	744.8	48.4	15.1	64.7	20.3	31.2	71.4	7.0
			±SD	36.0	2.0	0.8	1.0	0.6	0.8	12.3	2.0
高純度Cl (1000mg/kg)	Male	6	Mean	798.3	49.2	16.0	61.7	20.1	32.6	81.4	8.9
			±SD	24.5	2.3	0.4	3.4	0.6	1.3	4.6	1.9
	Female	6	Mean	766.2	50.9	15.5	66.3	20.2	30.4	81.8	7.0
			±SD	23.1	2.8	0.7	2.0	0.4	0.9	14.1	2.4

表 3 2 - 2 Measuring data of blood and serum

Group	Sex	Total animal number	Measurement item																		
			AST (U/L)	ALT (U/L)	ALP (U/L)	Y-GTP (u/L)	Glucose (mg/dL)	T-Cho (mg/dL)	TG (mg/dL)	T-Bil (mg/dL)	UN (mg/dL)	Crea (mg/dL)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)	Ca (mg/dL)	P (mg/dL)	TP (g/dL)	ALB (g/dL)	A/G	
control (Vehicle)	Male	6	Mean	144.0	27.7	499.0	1.5	117.5	60.3	61.0	0.1	21.4	0.2	144.5	5.1	102.8	10.2	9.8	5.6	2.4	0.7
			±SD	33.1	6.2	63.2	0.5	23.5	11.1	33.9	0.0	3.3	0.0	1.9	0.3	1.0	0.3	1.6	0.2	0.1	0.0
	Female	6	Mean	139.3	22.8	328.3	1.5	101.3	76.5	18.3	0.1	25.1	0.3	145.5	4.9	102.8	10.1	9.6	5.6	2.5	0.8
			±SD	20.8	6.8	40.9	0.5	13.7	15.8	4.8	0.0	3.1	0.0	1.0	0.3	1.2	0.4	1.3	0.4	0.2	0.1
高純度CI (500mg/kg)	Male	6	Mean	137.7	24.8	569.3	1.5	112.5	56.7	54.8	0.1	24.4	0.3	145.7	5.0	100.7	10.2	10.7	5.7	2.5	0.8
			±SD	33.6	7.1	108.2	0.5	4.3	6.2	26.0	0.0	4.7	0.0	2.9	0.3	2.3	0.3	2.9	0.3	0.1	0.0
	Female	6	Mean	138.5	20.3	277.8	1.3	131.5	77.5	25.8	0.1	28.0	0.3	145.3	4.9	102.7	10.1	9.0	5.7	2.6	0.8
			±SD	25.1	3.1	38.9	0.5	14.8*	16.7	11.5	0.0	6.8	0.1	1.4	0.3	1.6	0.5	1.2	0.4	0.2	0.0
高純度CI (1000mg/kg)	Male	6	Mean	146.5	28.3	594.7	1.3	118.5	57.5	49.7	0.1	22.7	0.3	145.2	5.1	101.8	10.3	10.0	5.7	2.4	0.7
			±SD	30.5	5.5	115.6	0.5	8.3	11.2	25.1	0.0	1.9	0.0	2.1	0.5	2.0	0.5	1.9	0.2	0.1	0.0
	Female	6	Mean	110.8	22.0	353.7	1.5	114.7	73.7	26.3	0.1	24.9	0.3	145.0	4.9	102.7	10.0	9.0	5.8	2.5	0.8
			±SD	20.4	5.7	72.5	0.5	23.8	16.0	11.7	0.0	3.9	0.0	1.1	0.8	2.0	0.2	1.3	0.2	0.2	0.1

* : P<0.05, Significant difference from Vehicle (female) by Dunnett test

表 3 3 - 1 Measuring data of blood and serum

Group	Animal No. (ID No.)	Measurement item							
		RBC ($10^4/\mu\text{l}$)	Ht (%)	Hb (g/d l)	MCV (f l)	MCH (pg)	MCHC (%)	Platelet ($10^4/\mu\text{l}$)	WBC ($10^3/\mu\text{l}$)
control (Vehicle)	111 (5)	801	48.9	15.7	61	19.6	32.1	72.7	6.4
	112 (19)	632	42.9	12.8	68	20.3	29.8	77.3	8.2
	113 (10)	811	50.1	16.6	62	20.5	33.1	70.3	9.2
	114 (2)	776	47.0	15.6	61	20.1	33.2	87.2	11.5
	115 (8)	807	49.1	16.7	61	20.7	34.0	87.3	11.3
	116 (9)	809	47.7	16.2	59	20.0	34.0	72.9	9.7
	Mean	772.67	47.62	15.60	62.00	20.20	32.70	77.95	9.38
±SD	70.10	2.56	1.44	3.10	0.39	1.58	7.55	1.93	
高純度CI (500mg/kg)	211 (4)	832	57.5	16.8	69	20.2	29.2	78.0	3.6
	212 (14)	790	48.9	15.8	62	20.0	32.3	88.1	5.7
	213 (13)	771	49.0	15.5	64	20.1	31.6	94.4	8.8
	214 (17)	770	47.3	15.5	61	20.1	32.8	76.2	7.6
	215 (20)	742	45.6	14.9	61	20.1	32.7	74.2	8.5
	216 (16)	845	49.3	16.1	58	19.1	32.7	90.7	6.2
	Mean	791.67	49.60	15.77	62.50	19.93	31.88	83.60	6.73
±SD	39.59	4.11	0.64	3.73	0.41	1.39	8.51	1.97	
高純度CI (1000mg/kg)	311 (6)	793	53.6	16.2	68	20.4	30.2	78.6	7.8
	312 (1)	797	48.1	16.2	60	20.3	33.7	75.2	11.0
	313 (3)	793	48.4	15.8	61	19.9	32.6	88.8	9.2
	314 (18)	803	49.5	16.6	62	20.7	33.5	83.6	11.0
	315 (12)	764	46.9	15.4	61	20.2	32.8	80.7	8.1
	316 (21)	840	48.7	15.9	58	18.9	32.6	81.5	6.3
	Mean	798.33	49.20	16.02	61.67	20.07	32.57	81.40	8.90
±SD	4.48	2.32	0.41	3.39	0.63	1.25	4.61	1.87	

表 3 3 - 2 Measuring data of blood and serum

Group	Animal No. (ID No.)	Measurement item							
		RBC ($10^4/\mu\text{l}$)	Ht (%)	Hb (g/d l)	MCV (f l)	MCH (pg)	MCHC (%)	Platelet ($10^4/\mu\text{l}$)	WBC ($10^3/\mu\text{l}$)
control (Vehicle)	161 (6)	768	50.1	15.4	65	20.1	30.7	84.1	4.0
	162 (1)	747	49.2	15.4	66	20.6	31.3	66.5	10.1
	163 (10)	775	53.8	15.8	69	20.4	29.4	99.9	6.5
	164 (11)	785	52.9	16.4	67	20.9	31.0	79.4	6.7
	165 (8)	741	48.0	15.2	65	20.5	31.7	60.6	5.3
	166 (4)	778	48.6	15.4	62	19.8	31.7	73.4	6.8
	Mean	765.67	50.43	15.60	65.67	20.38	30.97	77.32	6.57
±SD	17.75	2.38	0.44	2.34	0.39	0.86	13.94	2.04	
高純度CI (500mg/kg)	261 (17)	683	45.3	14.2	66	20.8	31.3	59.7	3.4
	262 (18)	764	49.1	15.1	64	19.8	30.8	88.8	7.7
	263 (13)	734	47.2	14.2	64	19.3	30.1	78.4	7.9
	264 (21)	756	50.0	15.3	66	20.2	30.6	62.6	9.3
	265 (12)	742	47.7	15.4	64	20.8	32.3	59.9	6.0
	266 (2)	790	50.9	16.3	64	20.6	32.0	78.7	7.5
	Mean	744.83	48.37	15.08	64.67	20.25	31.18	71.35	6.97
±SD	36.00	2.04	0.80	1.03	0.61	0.85	12.26	2.04	
高純度CI (1000mg/kg)	361 (20)	726	47.3	14.1	65	19.4	29.8	55.9	3.6
	362 (19)	789	55.0	15.9	70	20.2	28.9	87.5	10.0
	363 (15)	778	52.4	15.9	67	20.4	30.3	77.9	8.9
	364 (3)	765	50.1	15.6	65	20.4	31.1	84.4	7.7
	365 (16)	783	51.8	15.9	66	20.3	30.7	88.8	6.3
	366 (5)	756	48.8	15.3	65	20.2	31.4	96.4	5.2
	Mean	766.17	50.90	15.45	66.33	20.15	30.37	81.82	6.95
±SD	23.08	2.75	0.70	1.97	0.38	0.92	14.05	2.38	

表 3 4 - 1 Measuring data of blood and serum

Group	Animal No. (ID No.)	Measurement item																	
		AST (U/L)	ALT (U/L)	ALP (U/L)	Y-GTP (μ /L)	Glucose (mg/dL)	T-Chol (mg/dL)	TG (mg/dL)	T-Bil (mg/dL)	UN (mg/dL)	Orea (mg/dL)	Na (mg/dL)	K (mg/dL)	Cl (mg/dL)	Ca (mg/dL)	P (mg/dL)	TP (g/dL)	ALB (g/dL)	A/G
control (Vehicle)	111 (5)	195	38	544	1	90	61	0.1	17.7	0.22	145	5.2	104	9.9	10.3	5.8	2.6	0.81	
	112 (19)	131	31	489	2	114	75	0.1	20.5	0.25	147	5.3	102	10.7	11.8	5.8	2.3	0.86	
	113 (10)	166	28	517	2	95	66	0.1	20.4	0.25	146	4.7	102	10.2	10.6	5.6	2.4	0.75	
	114 (2)	135	21	381	1	148	43	0.1	27.4	0.30	144	5.4	104	9.9	10.2	5.4	2.3	0.74	
	115 (8)	98	23	559	1	142	64	0.1	22.3	0.20	143	4.8	103	10.0	7.5	5.7	2.4	0.73	
	116 (9)	139	25	504	2	116	53	0.1	20.1	0.24	142	4.9	102	10.2	8.1	5.4	2.3	0.74	
	Mean	144.00	27.67	499.00	1.50	117.50	60.33	61.00	0.10	21.40	0.24	144.50	5.05	102.83	10.15	9.75	5.62	2.38	0.74
	\pm SD	33.09	6.19	63.24	0.55	23.70	11.09	33.91	0.00	3.29	0.03	1.87	0.29	0.98	0.30	1.63	0.18	0.12	0.05
	211 (4)	161	35	594	1	105	60	0.1	31.8	0.32	151	5.3	97	10.6	16.4	6.2	2.6	0.72	
	212 (14)	184	27	596	2	112	53	0.1	23.2	0.24	143	5.1	102	9.6	9.6	5.8	2.6	0.81	
213 (13)	103	17	575	2	117	68	0.1	22.7	0.27	146	5.3	99	10.3	10.9	5.8	2.4	0.71		
214 (17)	100	29	741	2	115	53	0.1	28.3	0.30	144	4.9	103	10.2	9.4	5.4	2.4	0.80		
215 (20)	152	24	483	1	115	53	0.1	19.4	0.24	144	4.9	102	10.2	9.0	5.4	2.3	0.74		
216 (16)	126	17	427	1	111	53	0.1	20.9	0.26	146	4.6	101	10.3	8.6	5.7	2.5	0.78		
Mean	137.67	24.83	569.33	1.50	112.50	56.67	54.83	0.10	24.38	0.27	145.67	5.02	100.67	10.20	10.65	5.72	2.47	0.76	
\pm SD	33.63	7.05	108.20	0.55	4.28	6.22	25.98	0.00	4.72	0.03	2.88	0.27	2.25	0.33	2.92	0.30	0.12	0.04	
311 (6)	113	24	483	1	110	55	0.1	22.8	0.25	149	6.0	101	11.1	13.6	6.1	2.6	0.74		
312 (1)	172	37	514	2	110	50	0.1	20.4	0.24	145	4.8	105	9.7	8.9	5.6	2.4	0.75		
313 (3)	190	29	646	1	120	44	0.1	25.3	0.28	146	4.8	101	9.9	10.5	5.5	2.4	0.77		
314 (18)	131	22	487	1	127	70	0.1	21.3	0.21	143	5.1	99	10.1	88.0	5.7	2.5	0.78		
315 (12)	153	26	756	2	129	54	0.1	24.4	0.29	144	4.9	103	10.5	9.0	5.7	2.4	0.73		
316 (21)	120	32	682	1	115	72	0.1	21.7	0.28	144	5.2	102	10.6	9.0	5.5	2.3	0.72		
Mean	146.50	28.33	594.67	1.33	118.50	57.50	49.67	0.10	22.65	0.26	145.17	5.13	101.98	10.32	9.97	5.68	2.43	0.75	
\pm SD	30.49	5.54	115.64	0.52	8.26	11.17	25.14	0.00	1.89	0.03	2.14	0.45	2.04	0.52	1.89	0.22	0.10	0.02	

表 3 4 - 2 Measuring data of blood and serum

Group	Animal No. (ID No.)	Measurement item																	
		AST (U/L)	ALT (U/L)	ALP (U/L)	Y-GTP (μ /L)	Glucose (mg/dL)	T-Chol (mg/dL)	TG (mg/dL)	T-Bil (mg/dL)	UN (mg/dL)	Orea (mg/dL)	Na (mg/dL)	K (mg/dL)	Cl (mg/dL)	Ca (mg/dL)	P (mg/dL)	TP (g/dL)	ALB (g/dL)	A/G
control (Vehicle)	161 (6)	144	21	338	1	114	89	0.1	27.8	0.32	146	4.6	102	10.7	10.2	6.2	2.9	0.88	
	162 (1)	176	36	368	2	110	58	0.1	24.5	0.32	145	5.4	103	10.0	10.6	5.5	2.5	0.83	
	163 (10)	126	21	332	2	102	96	0.1	24.6	0.30	146	5.1	101	10.3	11.1	5.8	2.5	0.76	
	164 (11)	116	23	357	1	95	82	0.1	20.9	0.20	147	5.1	104	10.0	9.0	5.4	2.3	0.74	
	165 (8)	143	19	252	1	77	58	0.1	29.4	0.23	144	4.8	103	10.1	8.4	5.5	2.6	0.90	
	166 (4)	131	17	323	2	110	76	0.1	23.4	0.28	145	4.6	104	9.4	8.0	5.2	2.4	0.86	
	Mean	138.33	22.83	328.33	1.50	101.33	76.50	18.33	0.10	25.10	0.28	145.50	4.93	102.83	10.08	9.55	5.60	2.53	0.83
	\pm SD	20.84	6.77	40.88	0.55	13.74	15.82	4.80	0.00	3.06	0.05	1.05	0.32	1.17	0.43	1.26	0.35	0.21	0.07
	261 (17)	167	21	286	1	134	105	44	0.1	22.4	0.28	147	5.1	101	10.9	11.1	6.4	2.8	0.78
	262 (18)	118	20	303	2	141	81	23	0.1	34.0	0.42	147	4.7	102	10.2	9.4	5.9	2.7	0.84
263 (13)	118	26	310	2	150	77	19	0.1	36.5	0.34	145	5.2	104	9.9	8.7	5.5	2.5	0.83	
264 (21)	172	20	204	1	117	77	29	0.1	31.4	0.34	145	4.4	103	10.2	8.2	5.6	2.5	0.81	
265 (12)	137	17	270	1	111	53	10	0.1	22.7	0.23	144	5.1	105	9.5	8.2	5.2	2.4	0.86	
266 (2)	119	18	284	1	136	72	30	0.1	20.7	0.30	144	4.7	111	9.9	8.1	5.8	2.7	0.87	
Mean	138.50	20.33	277.83	1.33	131.50	77.50	25.83	0.10	27.95	0.32	145.33	4.87	102.87	10.10	8.95	5.73	2.60	0.83	
\pm SD	25.13	3.14	38.86	0.52	14.76	16.73	11.67	0.00	6.82	0.06	1.37	0.31	1.63	0.47	1.16	0.41	0.15	0.03	
361 (20)	149	33	446	2	135	72	46	0.1	28.3	0.29	144	3.9	102	10.1	7.1	6.0	2.7	0.82	
362 (19)	93	17	322	1	126	92	19	0.1	19.3	0.27	145	4.8	100	10.3	9.8	5.9	2.6	0.79	
363 (15)	115	20	423	1	114	60	14	0.1	20.8	0.31	147	4.3	103	9.9	9.0	5.8	2.5	0.76	
364 (3)	101	19	256	1	138	79	22	0.1	26.3	0.37	144	4.8	103	9.9	7.9	5.8	2.5	0.76	
365 (16)	97	23	368	2	99	88	23	0.1	28.7	0.27	145	5.8	106	10.0	9.6	5.5	2.4	0.77	
366 (5)	110	20	307	2	76	51	34	0.1	25.8	0.28	145	5.9	102	9.9	10.6	5.5	2.1	0.62	
Mean	110.83	22.00	353.67	1.50	114.67	73.67	26.33	0.10	24.87	0.30	145.00	4.92	102.67	10.02	9.00	5.75	2.47	0.75	
\pm SD	20.40	5.73	72.47	0.55	23.78	15.86	11.67	0.00	3.92	0.04	1.10	0.80	1.97	0.16	1.29	0.21	0.21	0.07	

表 3 5 - 1 Organ weight

Group	Sex	Total animal number		Heart	Lung	Liver	Spleen	Kidney	Adrenal gland	Testis or Ovary
control (Vehicle)	Male	6	Mean	1.3	1.6	13.3	0.8	3.4	0.1	3.3
			±SD	0.1	0.1	1.0	0.1	0.5	0.0	0.4
	Female	6	Mean	0.9	1.2	7.9	0.5	2.0	0.1	0.2
			±SD	0.1	0.1	0.9	0.0	0.2	0.0	0.0
高純度CI (500mg/kg)	Male	6	Mean	1.2	1.5	13.0	0.7	3.3	0.1	3.4
			±SD	0.1	0.1	1.2	0.1	0.2	0.0	0.3
	Female	6	Mean	0.9	1.2	8.1	0.5	2.0	0.1	0.2
			±SD	0.1*	0.1	0.6	0.1	0.1	0.0	0.0
高純度CI (1000mg/kg)	Male	6	Mean	1.3	1.6	12.8	0.8	3.3	0.1	3.6
			±SD	0.1	0.1	1.2	0.1	0.3	0.0	0.3
	Female	6	Mean	0.9	1.4	8.5	0.5	2.0	0.1	0.2
			±SD	0.1	0.3	1.6	0.1	0.2	0.0	0.0

Unit:g

* : P<0.05,Significant difference from Vehicle (male) by Dunnett test

表 3 5 - 2 Relative weight

Group	Sex	Total animal number		Heart	Lung	Liver	Spleen	Kidney	Adrenal gland	Testis or Ovary
control (Vehicle)	Male	6	Mean	0.31	0.36	3.02	0.18	0.77	0.02	0.74
			±SD	0.01	0.02	0.15	0.01	0.09	0.00	0.07
	Female	6	Mean	0.37	0.49	3.15	0.20	0.81	0.04	0.06
			±SD	0.02	0.03	0.12	0.01	0.05	0.00	0.01
高純度CI (500mg/kg)	Male	6	Mean	0.29	0.36	3.07	0.18	0.79	0.02	0.81
			±SD	0.01	0.01	0.17	0.02	0.06	0.00	0.07
	Female	6	Mean	0.35	0.50	3.31	0.22	0.80	0.04	0.06
			±SD	0.02	0.03	0.18	0.02	0.04	0.01	0.00
高純度CI (1000mg/kg)	Male	6	Mean	0.31	0.39	3.10	0.18	0.80	0.02	0.87
			±SD	0.01	0.02*	0.11	0.03	0.04	0.00	0.06*
	Female	6	Mean	0.37	0.56	3.38	0.21	0.81	0.03	0.06
			±SD	0.02	0.15	0.22	0.02	0.04	0.01	0.01

Unit:%

* : P<0.05,Significant difference from Vehicle (male) by Dunnett test

表 3 6 - 1 Organ weight

Group	Animal No. (ID No.)	Heart	Lung	Liver	Spleen	Kidney	Adrenal gland	Testis or Ovary
control (Vehicle)	111 (5)	1.42	1.71	13.52	0.88	4.10	0.08	3.64
	112 (19)	1.38	1.59	15.08	0.90	3.21	0.08	3.32
	113 (10)	1.42	1.69	12.93	0.89	3.76	0.08	3.70
	114 (2)	1.28	1.55	13.20	0.71	2.87	0.07	3.18
	115 (8)	1.21	1.44	12.45	0.65	3.12	0.07	3.14
	116 (9)	1.38	1.59	12.44	0.72	3.14	0.08	2.65
	Mean ±SD	1.35 0.08	1.60 0.10	13.27 0.98	0.79 0.11	3.37 0.46	0.08 0.01	3.27 0.38
高純度CI (500mg/kg)	211 (4)	1.27	1.51	13.62	0.65	3.66	0.07	3.19
	212 (14)	1.13	1.42	11.68	0.75	3.46	0.06	3.68
	213 (13)	1.31	1.70	14.33	0.80	3.35	0.07	3.67
	214 (17)	1.23	1.49	11.99	0.85	3.12	0.05	3.38
	215 (20)	1.29	1.58	14.18	0.79	3.19	0.08	3.57
	216 (16)	1.05	1.49	11.98	0.60	3.27	0.07	3.02
	Mean ±SD	1.21 0.10	1.53 0.10	12.96 1.21	0.74 0.10	2.34 0.20	0.07 0.01	3.42 0.27
高純度CI (1000mg/kg)	311 (6)	1.29	1.74	13.97	0.91	3.72	0.08	3.70
	312 (1)	1.31	1.59	12.79	0.66	3.28	0.09	3.58
	313 (3)	1.21	1.48	11.30	0.64	2.86	0.09	3.36
	314 (18)	1.38	1.58	13.59	0.77	3.68	0.09	4.20
	315 (12)	1.33	1.57	13.74	0.62	3.26	0.07	3.31
	316 (21)	1.21	1.59	11.39	0.90	3.02	0.07	3.46
	Mean ±SD	1.29 0.07	1.59 0.08	12.81 1.17	0.75 0.13	3.30 0.34	0.08 0.01	3.60 0.33

Unit:g

表 3 6 - 2 Organ weight

Group	Animal No. (ID No.)	Heart	Lung	Liver	Spleen	Kidney	Adrenal gland	Testis or Ovary
control (Vehicle)	161 (6)	1.03	1.22	8.43	0.47	1.92	0.09	0.17
	162 (1)	0.95	1.20	7.87	0.49	2.11	0.09	0.15
	163 (10)	1.02	1.40	9.14	0.53	2.36	0.09	0.17
	164 (11)	0.86	1.18	7.98	0.50	2.02	0.09	0.13
	165 (8)	0.84	1.23	7.01	0.50	2.04	0.08	0.16
	166 (4)	0.87	1.11	6.83	0.48	1.72	0.09	0.14
	Mean ±SD	0.93 0.08	1.22 0.10	7.88 0.87	0.50 0.02	2.03 0.21	0.09 0.00	0.15 0.02
高純度CI (500mg/kg)	261 (17)	0.92	1.23	8.68	0.66	2.13	0.09	0.17
	262 (18)	0.94	1.31	8.72	0.49	1.94	0.08	0.15
	263 (13)	0.89	1.32	8.70	0.55	2.04	0.09	0.14
	264 (21)	0.78	1.18	7.80	0.56	2.02	0.10	0.15
	265 (12)	0.76	1.12	7.21	0.47	1.84	0.09	0.14
	266 (2)	0.84	1.25	7.77	0.46	1.82	0.11	0.15
	Mean ±SD	0.86 0.07	1.24 0.08	8.15 0.64	0.53 0.08	1.97 0.12	0.09 0.01	0.15 0.01
高純度CI (1000mg/kg)	361 (20)	1.08	1.22	9.34	0.65	2.14	0.06	0.20
	362 (19)	1.11	1.44	11.51	0.58	2.28	0.10	0.18
	363 (15)	0.82	1.30	7.49	0.53	2.01	0.09	0.13
	364 (3)	0.84	1.19	7.30	0.46	1.85	0.07	0.14
	365 (16)	0.79	1.17	7.61	0.40	1.88	0.10	0.14
	366 (5)	0.92	2.01	7.73	0.50	1.91	0.08	0.12
	Mean ±SD	0.93 0.14	1.39 0.32	8.50 1.65	0.52 0.09	2.01 0.17	0.08 0.02	0.15 0.03

Unit:g

表 3 7 - 1 Relative weight

Group	Animal No. (ID No.)	Heart	Lung	Liver	Spleen	Kidney	Adrenal gland	Testis or Ovary
control (Vehicle)	111 (5)	0.32	0.38	3.01	0.20	0.91	0.02	0.81
	112 (19)	0.29	0.34	3.18	0.19	0.68	0.02	0.70
	113 (10)	0.30	0.34	2.77	0.19	0.80	0.02	0.79
	114 (2)	0.30	0.36	3.10	0.17	0.67	0.02	0.75
	115 (8)	0.30	0.36	3.10	0.16	0.78	0.02	0.78
	116 (9)	0.33	0.38	2.97	0.17	0.75	0.02	0.63
	Mean ±SD	0.31 0.01	0.36 0.02	3.02 0.15	0.18 0.01	0.77 0.09	0.02 0.00	0.74 0.07
高純度CI (500mg/kg)	211 (4)	0.30	0.35	3.19	0.15	0.86	0.02	0.75
	212 (14)	0.29	0.36	2.97	0.19	0.88	0.02	0.94
	213 (13)	0.29	0.38	3.19	0.18	0.75	0.02	0.82
	214 (17)	0.29	0.35	2.85	0.20	0.74	0.01	0.80
	215 (20)	0.30	0.37	3.28	0.18	0.74	0.02	0.83
	216 (16)	0.26	0.37	2.96	0.15	0.81	0.02	0.75
	Mean ±SD	0.29 0.01	0.36 0.01	3.07 0.17	0.18 0.02	0.79 0.06	0.02 0.00	0.81 0.07
高純度CI (1000mg/kg)	311 (6)	0.29	0.39	3.12	0.20	0.83	0.02	0.83
	312 (1)	0.32	0.39	3.15	0.16	0.81	0.02	0.88
	313 (3)	0.32	0.39	3.01	0.17	0.75	0.02	0.89
	314 (18)	0.32	0.36	3.13	0.18	0.85	0.02	0.97
	315 (12)	0.32	0.37	3.26	0.15	0.77	0.02	0.78
	316 (21)	0.31	0.41	2.95	0.23	0.78	0.02	0.90
	Mean ±SD	0.31 0.01	0.39 0.02	3.10 0.11	0.18 0.03	0.80 0.04	0.02 0.00	0.87 0.06

Unit: %

表 3 7 - 2 Relative weight

Group	Animal No. (ID No.)	Heart	Lung	Liver	Spleen	Kidney	Adrenal gland	Testis or Ovary
control (Vehicle)	161 (6)	0.40	0.47	3.24	0.18	0.74	0.03	0.07
	162 (1)	0.37	0.46	3.04	0.19	0.82	0.03	0.06
	163 (10)	0.37	0.51	3.33	0.19	0.86	0.03	0.06
	164 (11)	0.34	0.47	3.20	0.20	0.81	0.04	0.05
	165 (8)	0.36	0.53	3.01	0.21	0.88	0.03	0.07
	166 (4)	0.40	0.51	3.11	0.22	0.78	0.04	0.06
	Mean ±SD	0.37 0.02	0.49 0.03	3.15 0.12	0.20 0.01	0.81 0.05	0.04 0.00	0.06 0.01
高純度CI (500mg/kg)	261 (17)	0.34	0.46	3.21	0.24	0.79	0.03	0.06
	262 (18)	0.38	0.54	3.56	0.20	0.79	0.03	0.06
	263 (13)	0.35	0.52	3.43	0.22	0.80	0.04	0.06
	264 (21)	0.34	0.51	3.40	0.24	0.88	0.04	0.07
	265 (12)	0.32	0.48	3.07	0.20	0.78	0.04	0.06
	266 (2)	0.35	0.52	3.21	0.19	0.75	0.05	0.06
	Mean ±SD	0.35 0.02	0.50 0.03	3.31 0.18	0.22 0.02	0.80 0.04	0.04 0.01	0.06 0.00
高純度CI (1000mg/kg)	361 (20)	0.39	0.45	3.41	0.24	0.78	0.02	0.07
	362 (19)	0.37	0.48	3.80	0.19	0.75	0.03	0.06
	363 (15)	0.35	0.56	3.20	0.23	0.86	0.04	0.06
	364 (3)	0.37	0.52	3.18	0.20	0.10	0.03	0.06
	365 (16)	0.35	0.52	3.39	0.18	0.84	0.04	0.06
	366 (5)	0.39	0.86	3.32	0.21	0.82	0.03	0.05
	Mean ±SD	0.37 0.02	0.56 0.15	3.38 0.22	0.21 0.02	0.81 0.04	0.03 0.01	0.06 0.01

Unit: %

表 3 8 Autopsy in rats 28days iteration oral administration in subacute toxicity study

Group	Sex	Total animal number	Findings
control (Vehicle)	Male	6	No abnormality (6) ^{a)}
	Female	6	No abnormality (6)
高純度CI (500mg/kg)	Male	6	No abnormality (6)
	Female	6	No abnormality (6)
高純度CI (1000mg/kg)	Male	6	No abnormality (6)
	Female	6	No abnormality (6)

a) In parentheses indicate the number of cases.

表 3 9 - 1 Autopsy in male rats 28days iteration oral administration in subacute toxicity study

Group	Animal No. (ID No.)	Findings
control (Vehicle)	111 (5)	N
	112 (19)	N
	113 (10)	N
	114 (2)	N
	115 (8)	N
	116 (9)	Withering of a spermary Right
高純度CI (500mg/kg)	211 (4)	N
	212 (14)	N
	213 (13)	N
	214 (17)	N
	215 (20)	N
	216 (16)	N
高純度CI (1000mg/kg)	311 (6)	N
	312 (1)	N
	313 (3)	N
	314 (18)	N
	315 (12)	N
	316 (21)	N

N:Normal

表 3 9 - 1 Autopsy in male rats 28days iteration oral administration in subacute toxicity study

Group	Animal No. (ID No.)	Findings
control (Vehicle)	161 (6)	N
	162 (1)	N
	163 (10)	N
	164 (11)	N
	165 (8)	N
	166 (4)	N
高純度CI (500mg/kg)	261 (17)	N
	262 (18)	N
	263 (13)	N
	264 (21)	N
	265 (12)	N
	266 (2)	N
高純度CI (1000mg/kg)	361 (20)	N
	362 (19)	N
	363 (15)	N
	364 (3)	N
	365 (16)	N
	366 (5)	N

N:Normal