

平成24年度戦略的基盤技術高度化支援事業

「発酵乳製品副産物ホエーの機能成分を活用した高齢者用人工唾液の開発」

研究開発成果等報告書

平成 25 年 3 月

委託者 四 国 経 済 産 業 局

委託先 一般財団法人 四国産業・技術振興センター

目 次

第1章 研究開発の概要

1. 1	研究開発の背景・研究目的及び目標	1
1. 1. 1	研究開発の背景・研究目的	1
1. 1. 2	研究開発の目標	2
1. 2	研究体制	4
1. 2. 1	研究組織および管理体制	4
1. 2. 2	研究員及び管理員	7
1. 2. 3	経理担当者及び業務管理者	9
1. 2. 4	他からの指導・協力者名及び指導・協力事項	10
1. 2. 5	研究開発推進委員会	10
1. 2. 6	技術委員会（WG）	11
1. 3	成果概要	12
1. 4	当該研究開発の連絡窓口	13

第2章 本論

2. 1	余剰物質除去法の確立	14
2. 1. 1	余剰タンパク質の除去	14
(1)	研究目的	14
(2)	研究内容	14
(3)	研究成果	14
2. 1. 2	余剰脂質の除去	14
(1)	研究目的	14
(2)	研究内容	14
(3)	研究成果	14
2. 1. 3	余剰乳糖の除去	14
(1)	研究目的	14
(2)	研究内容	14
(3)	研究成果	15
2. 2	液状および粉末ホエーの殺菌方法の検討	16
2. 2. 1	液状ホエー原料および粉末ホエーの細菌数計測	16
(1)	研究目的	16
(2)	研究内容	16
(3)	研究成果	16
2. 2. 2	液状ホエー原料およびその処理過程の微高圧炭酸ガス殺菌効果	16
(1)	研究目的	16
(2)	研究内容	16
(3)	研究成果	16

2. 3	ホエー粉末化の検討	17
2. 3. 1	噴霧乾燥条件の検討	17
	(1) 研究目的	17
	(2) 研究内容	17
	(3) 研究成果	18
2. 3. 2	製造実機での製造	18
	(1) 研究目的	18
	(2) 研究内容	18
	(3) 研究成果	18
2. 4	新規人工唾液の機能性の評価	20
2. 4. 1	インビボ実験による機能性の評価	20
	(1) 研究目的	20
	(2) 研究内容	20
	(3) 研究成果	25
2. 4. 2	インビトロ実験による機能性の評価	25
	(1) 研究目的	25
	(2) 研究内容	25
	(3) 研究成果	26
2. 4. 3	口腔内微生物および消化管内微生物の種類および生息量に及ぼす影響の評価	26
	(1) 研究目的	26
	(2) 研究内容	26
	(3) 研究成果	26
2. 4. 4	人工唾液中の機能性成分の分析	27
	(1) 研究目的	27
	(2) 研究内容	27
	(3) 研究成果	27
2. 5	飲料としての試作品作製	28
2. 5. 1	試作品作製	28
	(1) 研究目的	28
	(2) 研究内容	28
	(3) 研究成果	28
2. 5. 2	ユーザー評価	28
	(1) 研究目的	28
	(2) 研究内容	28
	(3) 研究成果	29

第3章 全体総括

3. 1	余剰物質除去法の確立	30
3. 2	液状および粉末ホエーの殺菌方法の検討	30
3. 3	ホエー粉末化の検討	30
3. 4	新規人工唾液の機能性の評価	30
3. 5	飲料としての試作品作製	31
3. 6	研究開発後の課題・事業化展開	31

図表一覧

図 2.3.1-1	噴霧乾燥粉末、及び造粒粉末の電顕写真	18
図 2.4.1-1	粉末試作品が加齢に伴って萎縮する唾液腺組織へ及ぼす影響	24
図 2.4.1-2	粉末試作品が加齢に伴って萎縮する肺組織へ及ぼす影響	24
図 2.4.2-1	処理ホエー有無の下で培養した正常ヒト小腸上皮細胞	25
図 2.4.3-1	口腔内容物のトリプチケースソイⅡ血液寒天培地での培養	26
表 1.1.1-1	ホエーが含有する成分とその作用	2
表 2.3.1-1	本研究において使用した賦形剤	17
表 2.3.1-2	得られた粉末のペルオキシダーゼ活性	17
表 2.3.2-1	得られた粉末のペルオキシダーゼ活性	19
表 2.4.1-1	試験に用いた動物群の略号	20
表 2.4.1-2	溶液試作品が唾液量と唾液中の蛋白質濃度に及ぼす影響	20
表 2.4.1-3	舌下腺の抗菌性酵素遺伝子のマイクロアレイによる解析	21
表 2.4.1-4	溶液試作品が唾液 Cistatin 活性に及ぼす影響	21
表 2.4.1-5	舌下腺の Proline-rich protein と Mucin のマイクロアレイによる解析	22
表 2.4.1-6	溶液試作品が唾液中の Mucin 量に及ぼす影響	22
表 2.4.1-7	舌下腺の免疫関連蛋白質のマイクロアレイによる解析	23
表 2.4.1-8	溶液試作品が唾液中のアミラーゼ活性に及ぼす影響	23
表 2.4.1-9	粉末試作品が唾液に及ぼす影響	25
表 2.4.4-1	ホエー粉末が含む機能性成分濃度および活性	27
表 2.5.1-1	ホエー粉末の味付け検討結果	28
表 2.5.2-1	試飲後のアンケート調査結果	29
表 2.5.2-2	2 週間の継続飲用前後の唾液量	29

第1章 研究開発の概要

1. 1 研究開発の背景・研究目的及び目標

1. 1. 1 研究開発の背景・研究目的

口腔は咀嚼、嚥下、発声などの運動系の機能と、味覚、触覚、温覚などの感覚系の機能をもち、これらの機能が総合的に協調し合い、唾液によって統合されている臓器である。2つの機能を統合する中心的役割をもった唾液は、1日に1~1.5Lほど分泌され、口腔内を正常に保っている。具体的には消化酵素を含んで消化機能を担い、また、神経成長因子や抗菌性物質、抗炎症性物質を含み、口腔衛生状態の保持、歯周病、う蝕、口内炎など口腔疾患の予防、義歯の保持、口腔粘膜の保護と体温の調節なども行っている。

近年、唾液不足による諸症状（飲み込みにくい、しゃべりにくい、灼熱感がある等）を訴える人が増えている。こういった症状は高齢者に多く見られ、その唾液分泌量は1日0.5L以下にまで低下する。

唾液不足が引き起こす疾患としては、直接的には、咀嚼・嚥下の低下、誤嚥性肺炎、味覚異常、歯周病、消化管粘膜の萎縮症、逆流性食道炎の発生などが挙げられる。特に嚥下障害は誤嚥性肺炎などの直接の要因となっているが、65歳以上から肺炎による死亡率が増え始め、90歳以上になると死亡原因の第2位にまで急増するなど、唾液不足は高齢者の自立や介護の現場において大きな問題になっていると言える。また、唾液不足が成人病（動脈硬化、心筋梗塞、脳卒中、脳梗塞、糖尿病など）の罹患率を上昇させるという指摘もあり、高齢者だけでなく中高年の健康維持にも影響が大きい。また、近年では若年層（特に20~40歳代の女性）にも唾液不足が広がっている。

医師の診断を受けるほど自覚症状の重い重症患者に対しては、医薬品（飲み薬、人工唾液）が処方される。一方、自覚症状が比較的軽い人の中には、市販のマウスウォッシュやマウスジェルを使用する人もいるが、生活習慣に合わない事や使用感が悪い事（口の中での違和感がある、味がおいしくない）が原因で継続使用がなされにくく、結果、大した対策をせず放置し、悪化してしまう場合が多いと臨床医からの指摘がある。

現在までに唾液の適正な代用品を開発する目的で広範な研究が行われており、医薬品として、また一般商品として販売されているものもある。現在販売されている「人工唾液」は、1)水イオン溶液、2)水イオンとカルボキシメチルセルロース製剤、3)ムチン含有溶液、4)糖タンパク質含有薬物、5)酵素含有ゲルに分類することができる。これらの既存人工唾液は、唾液の湿潤作用と水和作用のみを模倣したものであり、本来唾液が持つ様々な役割を再現できているとはいえない。また、これらの既存人工唾液は口腔内に噴霧や塗布するものであり、作用する臓器は口腔内だけである。しかし本来唾液とは前述した通り口腔だけではなく全身に作用するものであり、人工唾液として再現するには、形態を飲料とするのが相応しいと我々は考えた。

さて一方、ホエーは、チーズやヨーグルトなどの発酵乳製品の製造中に大量に排出される副産物である。近年になってホエーの脱脂・濃縮・粉末化製造の工業化が進み、有効利用がされるようになってきてはいるが、これは総合的な乳製品工場をかまえる大手の乳製品企業に限られている。中小規模の企業ではいまだにホエーを有効活用できてい

ないだけでなく、廃棄にコストまでかかることが悩みをとなっており、この解決が望まれている。

ホエーは、糖類、脂質、タンパク質、ミネラル等多種の成分を含む複雑な溶液である。これらの成分のうち一部を、期待される作用と合わせて表に示す。

表 1.1.1-1 ホエーが含有する成分とその作用

作用	成分名
抗菌	リゾチーム、ラクトフェリン、ラクトペルオキシダーゼ
保湿	ヒアルロン酸、コラーゲン
上皮細胞成長	EGF(上皮細胞成長)
免疫増強	ラクトアルブミン、ラクトグロブリン
粘膜保護	ムチン
味覚正常化	Zn ²⁺

これらのホエー成分が示す生理活性は唾液が持つ生理活性と非常によく似ている。一般に工業的に生産・市販されているホエー粉末は、加熱処理等によって活性をほとんど失った状態で食品等に添加的に使われているに過ぎず、ホエーが本来持っている生理活性を有効活用できているとは言い難い。

ホエーの有効成分を人工唾液として活用すれば、口腔機能の恒常性（抗菌作用、咀嚼・嚥下補助作用、口腔粘膜の保護など）だけではなく、消化管機能の恒常性（免疫作用、逆流性食道炎の予防）や、ひいては全身機能の恒常性（成人病の予防）に役立つと思われる。

そこで本事業では、既存人工唾液のような単なる湿潤作用のみではなく、生理活性を持ち、かつ、一般の生活習慣に溶け込める形態である飲料としての人工唾液を、ホエーを原料として開発することを目的とする。

1. 1. 2 研究開発の目標

（１）余剰物質除去法の確立

ホエーには人工唾液としては不必要な過剰の蛋白質、糖質、脂質などが入っている。生理活性（抗菌活性）を保持したままこれらの余剰成分を除去する方法は確立する。

（２）液状および粉末ホエーの殺菌方法の検討

原料であるホエーは清潔な環境で行われているとは言え食品廃棄物に該当するため、雑菌汚染のリスクが考えられるが、人工唾液の最終製品の主成分は蛋白質であることから、加熱による殺菌は行うことができない。産総研で開発した微高压炭酸ガス殺菌技術は、簡単な耐圧容器を利用するだけで、殺菌が可能となる画期的な技術として期待されており、人工唾液の製造工程に導入出来る可能性が考えられる。

原料であるホエーは雑菌汚染のリスクが考えられるため殺菌が必要であるが、加熱に

よってホエーが有する生理活性が失活してしまうため、加熱殺菌は採用できない。産総研で開発した微高圧炭酸ガス殺菌技術は、簡単な耐圧容器を利用するだけで、殺菌が可能となる画期的な技術であり、昨年度の検討の結果、10 気圧・40℃・4 時間の条件で殺菌が可能である事が分かっている。今年度は、この条件の短時間化を検討し、生理活性の失活を最小限に留める検討を行うとともに、実際の製造工程中での最適な殺菌工程導入位置を検討する。

（３）ホエー粉末化の検討

ホエー中の機能性蛋白質の活性を保持したまま粉末化することが必要である。従来、機能性蛋白質を粉末化する手法として凍結乾燥が用いられているが、時間とコストがかかるため大量生産に向いていないことから、本開発では大量生産が可能な噴霧乾燥法を用いた機能性蛋白質の粉末化手法について検討する。

（４）新規人工唾液の機能性の評価

機能性の評価に関しては、液体及び固体（粉末）の状態において、以下の項目について検討する。

① インビボ実験による機能性の評価

処理したホエーを1～3ヶ月ラットに飲用させ、その飲用による唾液腺や消化管の変化を生化学的、組織学的にインビボ実験から評価する。生化学的には、caspaseをはじめとするアポトーシス関連酵素を中心に検討する。組織学的には、摘出した消化管をエタノールで固定し、種々の消化酵素の抗体を用いた免疫染色による水飲用と本人工唾液飲用による差異やギムザ染色による核の凝縮、断片化等を水飲用と本人工唾液飲用ラットで比較する。また マイクロアレイ法を用いた遺伝子解析も行う。

② インビトロ実験による機能性の評価

処理したホエーを上皮細胞の培養液に添加し、適時、上皮細胞の増殖、形態、培養液の生化学的な変化をインビトロ実験から評価する。

③ 口腔内微生物および消化管内微生物の種類および生息量に及ぼす影響の評価

処理したホエーを1～3ヶ月ラットに飲用させ、適時、口腔および消化管内微生物の種類や量の評価とともに、病原性微生物の種類と生息量を評価する。

④ 人工唾液中の機能性成分の分析

原料ホエー粉末化ホエーが含有する機能性成分の測定系を確立する。また将来的に、生産時に必要なHPLCでの分析検討も平行して行う。

（５）飲料としての試作品作製

① 試作品作製

生産レベルで最低限必要なホエー200L程度での試作品作製を行う。

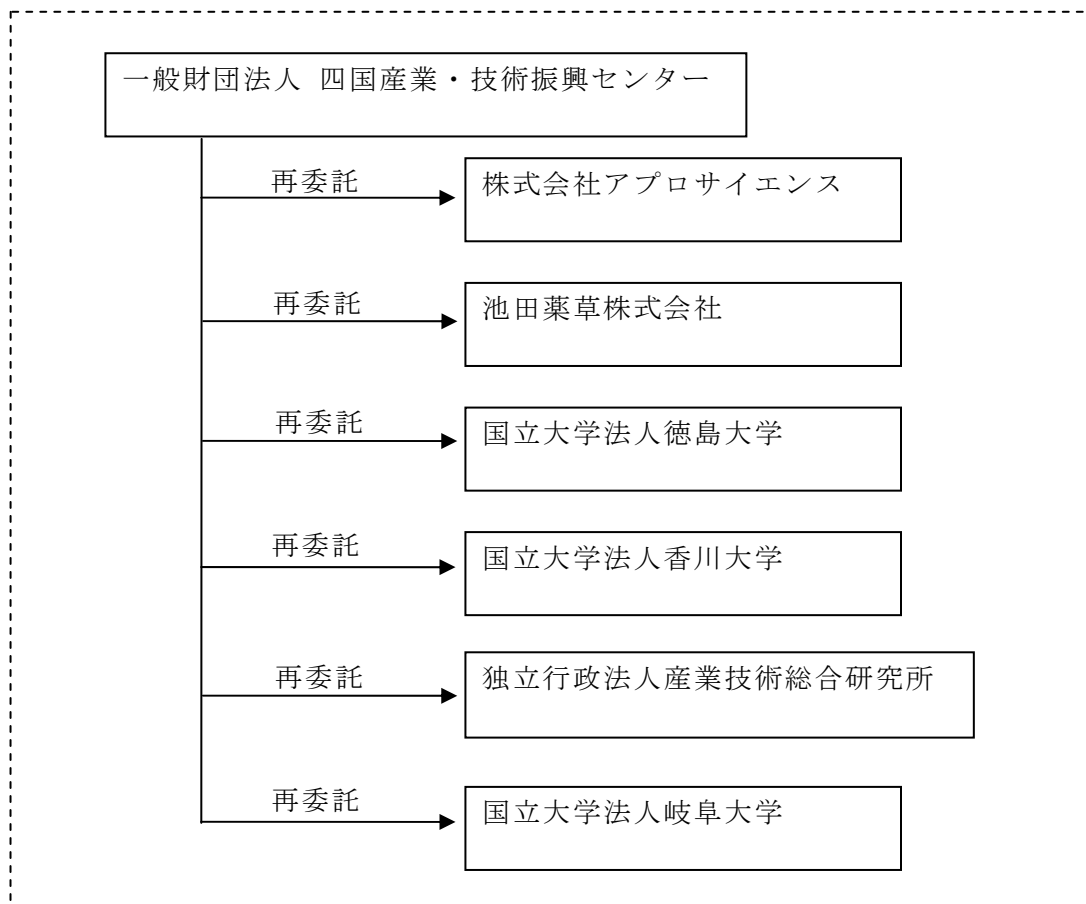
② ユーザー評価

試作品を用いてユーザー試験を行い、味、匂いなど食品に適しているか否かの評価を行う。

1. 2 研究体制

1. 2. 1 研究組織および管理体制

(1) 研究組織（全体）

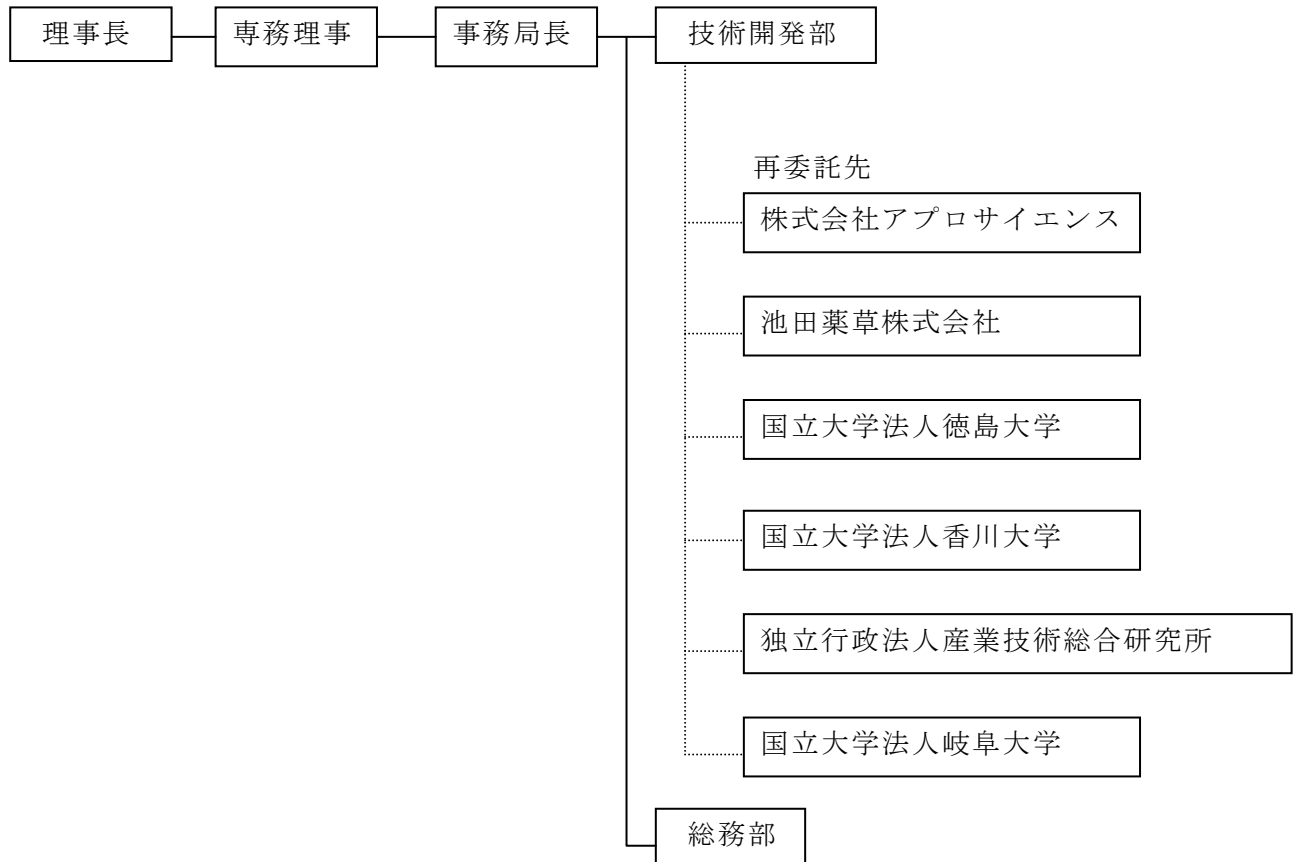


総括研究代表者（P L）
株式会社アプロサイエンス
代表取締役
金 敦 祚

副総括研究代表者（S L）
国立大学法人徳島大学
ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授
石川 康子

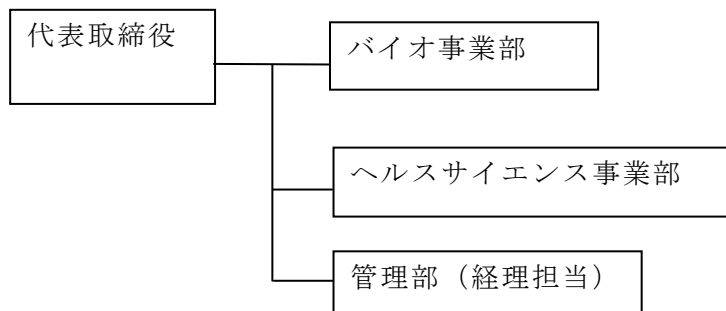
(2) 管理体制

①事業管理者（一般財団法人四国産業・技術振興センター）

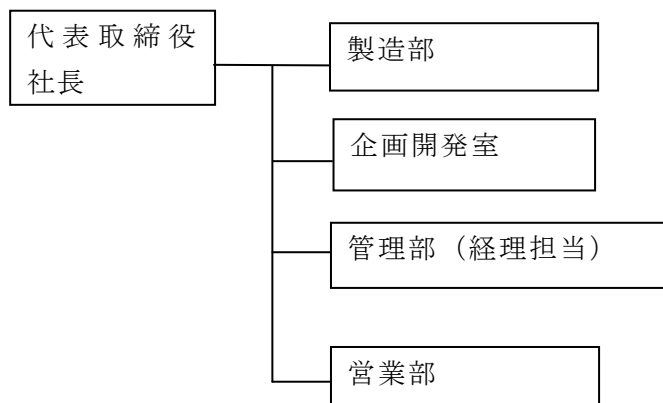


②再委託先

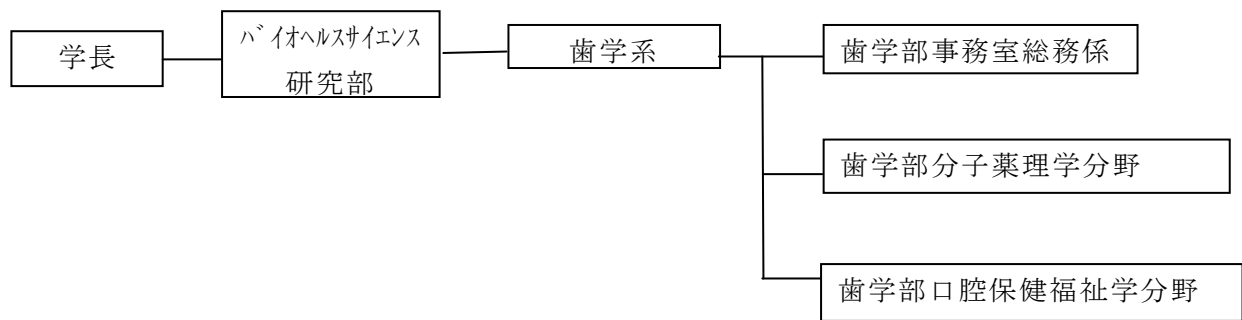
株式会社アプロサイエンス



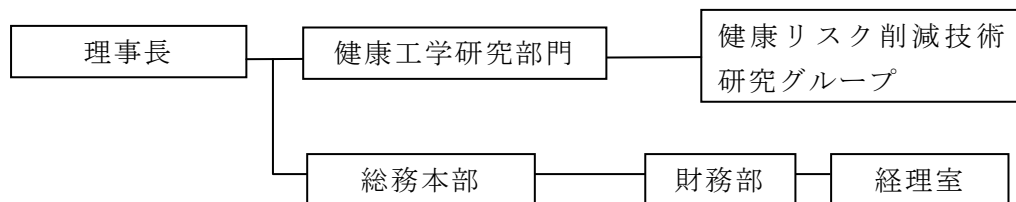
池田薬草株式会社



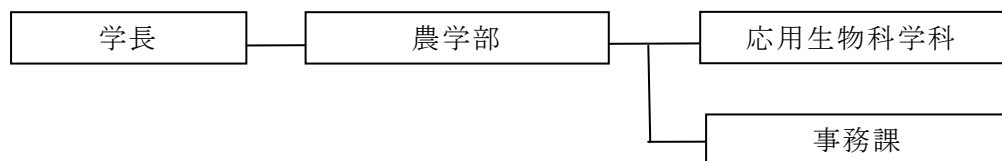
国立大学法人徳島大学



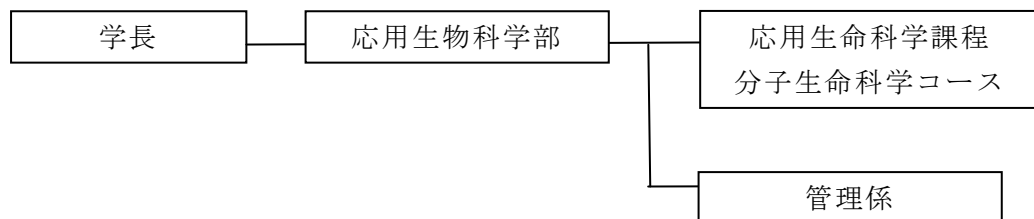
独立行政法人産業技術総合研究所



国立大学法人香川大学



国立大学法人岐阜大学



1. 2. 2 研究員及び管理員

【管理法人】

一般財団法人 四国産業・技術振興センター

氏 名	所属・役職	実施内容（番号）
白石 宏志	事務局長	⑦
武知 隆男	総括連携コーディネーター	⑦
田村 洋	連携コーディネーター	⑦
工藤 陽一	連携コーディネーター	⑦
森 久世司	連携コーディネーター	⑦
三好 純二	技術開発部長	⑦
成瀬 英明	技術開発部 部長	⑦
濱野 奉彦	技術開発部 副部長	⑦
漆原 秀樹 ※1	技術開発部 課長	⑦
田村 英樹 ※2	技術開発部 副部長	⑦
川越 信吾 ※3	技術開発部 課長	⑦
瀬戸 昌子	技術開発部	⑦

※1 平成23年9月12日～平成24年7月31日

※2 平成24年8月1日～平成25年2月28日

※3 平成25年3月1日～平成25年3月31日

【再委託先】

株式会社アプロサイエンス

氏 名	所属・役職	実施内容（番号）
金 敦祚	代表取締役社長	①－⑥
金 智蓮	バイオ事業部取締役部長	①－⑥
岡部 慎司	取締役副社長	①－⑥
渡部 有加	バイオ事業部質量分析チーム主任	①－⑥
福田 佳奈	バイオ事業部製品開発チーム	①－⑥

池田薬草株式会社

氏 名	所属・役職	実施内容（番号）
森上 建一	取締役工場長・営業部長	①、③、⑤-1
三好 隆豊	副工場長	①、③、⑤-1
敷島 康普	企画開発室 室長	①、③、⑤-1
上田 泰志	製造部 主任	①、③、⑤-1
酒巻(折田) 康明	企画開発室 研究員	①、③、⑤-1

国立大学法人 徳島大学

氏 名	所属・役職	実施内容（番号）
石川 康子	徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・分子薬理学分野・准教授	①、④、⑤-2、⑥
吉岡 昌美	徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・口腔保健福祉学分野・准教授	④、⑤-2

国立大学法人 香川大学

氏 名	所属・役職	実施内容（番号）
吉井 英文	農学部教授	③

独立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）
苑田 晃成	健康工学研究部門健康リスク削減技術研究グループ研究グループ長	②
小比賀 秀樹	健康工学研究部門 健康リスク削減技術研究グループ 主任研究員	②
垣田 浩孝	健康工学研究部門 健康リスク削減技術研究グループ 主任研究員	②

国立大学法人 岐阜大学

氏 名	所属・役職	実施内容（番号）
岩橋 均	応用生物科学部教授	②

※実施内容

- ① 余剰物質除去法の確立
- ② 液状および粉末ホエーの殺菌方法の検討
- ③ ホエー粉末化の検討
- ④ 新規人工唾液の機能性の評価
- ⑤ 飲料としての試作品作製
 - ⑤-1 試作品作製
 - ⑤-2 ユーザー評価
- ⑥ 特許出願の準備
- ⑦ 研究全体の統括、プロジェクトの管理・運営

1. 2. 3 経理担当者及び業務管理者

(管理法人)

一般財団法人四国産業・技術振興センター

(経理担当者) 副事務局長兼総務部長 松岡 義史

(業務管理者) 技術開発部長 三好 純二

(再委託先)

株式会社アプロサイエンス

(経理担当者) バイオ事業部取締役部長 金 智蓮

(業務管理者) 代表取締役 金 敦祚

池田薬草株式会社

(経理担当者) 取締役 工場長 森上 建一

(業務管理者) 企画開発室長 敷島 康普

国立大学法人 徳島大学

(経理担当者) 医歯薬事務部長 米原 壽男

(業務管理者) 大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 准教授 石川 康子

国立大学法人 香川大学

(経理担当者) 農学部 事務課長 芝軒 國一

(業務管理者) 農学部 教授 吉井 英文

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) 健康工学研究部門長 吉田 康一

国立大学法人 岐阜大学

(経理担当者) 応用生物科学部 管理係長 下通 和代

(業務管理者) 応用生物科学部 教授 岩橋 均

1. 2. 4 他からの指導・協力者名及び指導・協力事項

指導・協力者名	所属 ・ 役職	指導・協力事項
細川 純	産業総合技術研究所産官学連携コーディネーター	研究の方向性についてのアドバイスをを行う。
堤 一彦	徳島文理大学 薬学部 特任教授	商品開発のアドバイスをを行う。
野間 智子	徳島食育推進研究会代表	高齢者に対する食育実績（計画、実施、評価）に基づき食育媒体についてアドバイスをを行う。
勢井 雅子	徳島食育推進研究会	高齢者に対する食育実績（計画、実施、評価）に基づき食育媒体についてアドバイスをを行う。

1. 2. 5 研究開発推進委員会

役割	氏 名	所属・役職	備考
委員長	金 敦祚	(株)アプロサイエンス代表取締役	PL
副委員長	石川 康子	徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・分子薬理学分野・准教授	SL
委員	金 智蓮	(株)アプロサイエンスバイオ事業部取締役部長	
委員	岡部 慎司	同取締役副社長	
委員	福田 佳奈	同バイオ事業部製品開発チーム	
委員	森上 建一	池田薬草(株)取締役工場長・営業部長	
委員	三好 隆豊	同 副工場長	
委員	敷島 康普	同 企画開発室 室長	
委員	吉岡 昌美	徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・口腔保健福祉学分野・准教授	
委員	吉井 英文	香川大学農学部教授	
委員	苑田 晃成	産業総合技術研究所健康工学研究部門健康リスク削減技術研究グループ研究グループ長	
委員	岩橋 均	岐阜大学応用生物科学部教授	
委員	細川 純	産業総合技術研究所産官学連携コーディネーター	アドバイザー
委員	堤 一彦	徳島文理大学 薬学部 特任教授	アドバイザー
委員	野間 智子	徳島食育推進研究会代表	アドバイザー
委員	勢井 雅子	徳島食育推進研究会	アドバイザー

1 . 2 . 6 技術委員会 (W G)

役割	氏 名	所属・役職	備考
委員長	金 敦祚	(株)アプロサイエンス代表取締役	PL
副委員長	石川 康子	徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・分子薬理学分野・准教授	SL
委員	金 智蓮	(株)アプロサイエンスバイオ事業部取締役部長	
委員	岡部 慎司	同取締役副社長	
委員	福田 佳奈	同バイオ事業部製品開発チーム	
委員	森上 建一	池田薬草(株)取締役工場長・営業部長	
委員	三好 隆豊	池田薬草(株)副工場長	
委員	敷島 康普	池田薬草(株)企画開発室 室長	
委員	吉岡 昌美	徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・口腔保健福祉学分野・准教授	
委員	吉井 英文	香川大学農学部教授	
委員	苑田 晃成	産業総合技術研究所健康工学研究部門健康リスク削減技術研究グループ研究グループ長	
委員	小比賀 秀樹	同 主任研究員	
委員	垣田 浩孝	同 主任研究員	
委員	岩橋 均	岐阜大学応用生物科学部教授	

1. 3 成果概要

(1) 余剰物質除去法の確立

ホエーには人工唾液としては不必要な過剰の蛋白質、糖質、脂質などが入っている。生理活性を保持したままこれらの余剰な成分を除去する方法を確立できた。さらに、蛋白質、脂質については工業スケールで処理工程も検討し、条件を確立できた。乳糖除去については、工業スケールにて実施するには設備投資などがかかるため、検討に困難が生じた。しかし、製品設計を見直すことによって、具体的には、一日あたりの飲用量を見直すことによって、人工唾液に乳糖が含まれることによる悪影響は回避できたため、乳糖を除去せずに製品化の検討を進めた。

(2) 液状および粉末ホエーの殺菌方法の検討

炭酸ガス殺菌後、冷凍せずに冷蔵状態で保管した原料ホエーが無菌であることが分かった。製造直後の原料ホエーは、40 から 50℃程度と暖かく、その場で炭酸ガス処理すれば、冷凍せずに輸送することが可能で、冷凍輸送に要する費用を低減できる。安全性を担保するために殺菌工程は必要であり、最初に炭酸ガス殺菌を行うことが有効と考えられる。一方、作業工程における雑菌汚染については、適時見直す必要性はあるが、現在行われている作業工程の範囲であれば雑菌汚染が生じて、炭酸ガス殺菌が適用できるものと判断した。

(3) ホエー粉末化の検討

機能性の高い粉末人工唾液を提供するためには、ホエー中の機能性蛋白質の活性を保持したまま粉末化することが必要である。大量生産が可能な噴霧乾燥法を用いた機能性蛋白質の粉末化手法について検討した結果、含水率が 5%以下で、溶解性にも優れた粉末を得ることができた。また、生理活性保持の指標として設定したペルオキシダーゼ活性(抗菌活性)については、当初目標としていた 40Unit/g を大きく上回る 550Unit/g もの活性を保持した粉末を得ることができた。このことは、ペルオキシダーゼ活性以外の酵素活性等も維持できている可能性を示唆するものであり、高機能な粉末化人工唾液の製造工程確立ができたと考えられる。

(4) 新規人工唾液の機能性の評価

本飲料を飲用したラット唾液腺等の組織学的解析、遺伝子発現解析、生化学的解析の結果、本飲料の飲用により、組織萎縮阻止作用・抗菌作用・粘膜保護作用・免疫賦活作用が生体内で発現していることが分かった。これは、当初想定していた「不足した唾液の代わりに本飲料を飲んで嚥下を補助する」という範囲を超え、継続して飲用する事によって、「自身の唾液腺等の生体機能が向上する」という新しい製品価値を見出すことが出来た。また、抗菌活性を高く維持し、かつ、保湿作用の高い成分なども豊富に含んだ粉末飲料を作製することができており、継続飲用によるからだの機能改善という側面からも、飲用時に口腔内に与える影響という側面からも有用であると考えられる。

(5) 飲料としての試作品作製

当初の試作品は、水に溶けにくく、ホエーの牛乳臭さのある飲みにくい試作品であった。しかし、噴霧乾燥条件や味付けの検討を重ね、目標としている「手軽にさっと溶かして美味しい飲み物」にかなり近づくことができた。実際に高齢者の方にもご評価を頂いたが、概ね好評をいただくことができた。

1. 4 当該研究開発の連絡窓口

一般財団法人四国産業・技術振興センター 技術開発部 三好、川越

TEL : 087-851-7081

FAX : 087-851-7027

E-mail : miyoshi@tri-step.or.jp、kawagoshi@tri-step.or.jp

第2章 本論

2. 1 余剰物質除去法の確立

2. 1. 1 余剰タンパク質の除去

(1) 研究目的

人工唾液として不必要なタンパク質の大半はカゼインである。機能性のあるタンパク質は残しながら、カゼインを95%以上除去することを目的とする。

(2) 研究内容

入手した原料のうち複数の原料についての SDS-PAGE 結果から、原料によってタンパク質組成が異なることがわかった。分子量 30kDa 付近のカゼインが多く含まれており、人工唾液の原料としては不適切であるものや、カゼインがほとんど含まれておらず、他の機能性タンパク質は存在しているものがある事が分かった。

(3) 研究成果

目標とするカゼイン95%以上除去は原料を厳選する事で達成することができた。

2. 1. 2 余剰脂質の除去

(1) 研究目的

脂肪分が多く残っているホエーを人工唾液として日常的に摂取し続けるとカロリー過多となってしまう。また、脂肪分が多く残っていると、商業的に製造を行う際に均一な溶液になりにくい事や噴霧乾燥時に粉末が得られにくい等、スムーズな製造の妨げとなる。そこで、原料ホエーが含有する脂質量を測定し、90%以上を除去するよう除去操作条件を検討した。

(2) 研究内容

有孔壁遠心分離機（仕様：回転数：1,500rpm、ろ過方式：ろ布）、シャープレス遠心分離機（仕様：回転数：15,000rpm、ろ過方式：比重）を使用して検討した。

(3) 研究成果

遠心分離、シャープレス遠心分離、精密ろ過の工程を経ると90%以上の脂質が除去できることを確認した。

2. 1. 3 余剰乳糖の除去

(1) 研究目的

人工唾液として継続的に高齢者が飲用する場合、①カロリーの過剰摂取になる、②乳糖不耐症への配慮、③口腔内環境に悪影響などの理由から乳糖は除去した方が良い。そこで、乳糖を90%以上除去する方法を検討する。

(2) 研究内容

ラクターゼ処理による乳糖分解、限外ろ過法による除去、ゲルろ過法による除去の

3 つについてラボスケールで検討したところ、どの方法を用いても 90%以上の除去が可能であった。

次に、同方法の工業スケールでの実施を検討した。ラクターゼ処理による乳糖分解は実施可能であったが、熱履歴が加わることによって、生理活性の基準としたペルオキシダーゼ活性が著しく低下した。他の二つは設備投資などの面から工業スケールでの検討を今回は実施できなかった。

(3) 研究結果

乳糖除去法として、3 つの手法が採用できることが分かった。しかしながら、製品形態が、当初想定していたような 1 日に数 500mL～1L を飲用する設計ではなく、1 日に 300mL 程度を飲用する設定に変更したのに伴って、再度、本当に乳糖除去が必須なのかを調査したところ、乳糖除去は不要と結論付けて製品化に進むこととした。

2. 2 液状および粉末ホエーの殺菌方法の検討

2. 2. 1 液状ホエー原料および粉末ホエーの細菌数計測

(1) 研究目的

醗酵乳製品の製造中に排出されるホエーは、食品廃棄物に該当するため、雑菌汚染のリスクが存在する。原料および粉末化したホエーにどのような種類の細菌類がどの程度含有されるか計測する。

(2) 研究内容

冷凍状態で輸送した試料について、乳酸菌、一般細菌、大腸菌群、シュウドモナス菌群細菌数計測を行った。乳酸菌が 7.1×10^2 個～ 8.9×10^2 個程度で検出され、いずれのサンプルからも、大腸菌群、シュウドモナス属の菌体は検出されなかった。

次に、噴霧乾燥ホエー粉末中の細菌数計測を行った。本来ホエー中には存在しなかった細菌群が、食品衛生上問題となる量ではないが、観測された。これらの細菌群は噴霧乾燥時に使用した空気から混入した可能性が考えられる。本試験は試作機を使用した場合であり、清浄環境下で実施される製造実機を使用した場合には、空気からの細菌混入は防ぐことが可能であると考えられる。

(3) 研究成果

原料ホエーの pH が 4.2～4.3 であるため、細菌は増殖し難い環境であり乳酸菌以外の殺菌についてはその必要性が低いと考えられる。

2. 2. 2 液状ホエー原料およびその処理過程の微高压炭酸ガス殺菌効果

(1) 研究目的

原料ホエーをその場で炭酸ガス処理し細菌数を計測し、その有効性を評価した。さらに、原料の採取、輸送の工程における汚染雑菌の殺菌方法についても検討を行った。

(2) 研究内容

細菌は、冷凍時および、解凍時の温度履歴で死ぬ可能性が高いため、大山牧場でチーズホエーを採取したのち、すぐに約 2 気圧の炭酸ガスにて加圧し、常温で輸送した。輸送後、未処理、および炭酸ガス処理したものについて、乳酸菌、一般細菌、大腸菌群、シュウドモナス菌群(3 プレートづつ)について菌数を測定したところ、未処理のサンプルのみに、一般細菌を検出する培地で 16 個/3 プレート、5 日後に 18 個/3 プレートのコロニーが検出されただけだった。

(3) 研究成果

ホエーの発生場所で、低圧の加圧炭酸ガス処理が可能な容器で運搬することできれば菌の増殖を抑えたままで運ぶことが可能であった。この結果がすべてのホエーについて当てはまるとは限らないが、ホエー産地から製造工場に運ぶ際に微加圧の炭酸ガス処理できる容器で保存すれば、輸送中のホエー中の菌類の増殖を抑えることができる可能性が示唆された。

2. 3 ホエー粉末化の検討

2. 3. 1 噴霧乾燥条件の検討

(1) 研究目的

市販されているホエー粉末は、脂質や糖類を除去した後、濃縮工程を経てタンパク質濃度の高い溶液としてから噴霧乾燥することが多く、このような粉末は生理活性を失っている場合が多い。本研究では、ホエー溶液をマルトデキストリン添加、タンパク質安定化剤添加により、抗菌活性を保持した可溶性噴霧乾燥粉末を作製することを目的とし、最適な賦形剤の選択、噴霧乾燥条件の探索を行い、人工唾液可溶性粉末の開発を行った。

(2) 研究内容

噴霧乾燥機（L-8, OKAWARA）を使用し条件検討を行った。出口空気温度を 50-60℃ にするために予め蒸留水を同流量で供給しておく、液量を多めにする等により、噴霧空気出口空気温度を 60℃ 以下になるように設定した。また、外部空気をいれるためのパイプも L-8 型噴霧乾燥機に取り付け、出口空気温度を下げるための改造も行った。

ホエー溶液に賦形剤を溶解させた後、噴霧乾燥器に溶液を供給した。本研究で用いた賦形剤を表 2. 3. 1-1 に示す。賦形剤を無添加の場合についても検討した。

表 2. 3. 1-1 本研究において使用した賦形剤

	種類	製品名	製造会社
賦形剤 ①	マルトデキストリン(DE=3)	パインデックス#100	松谷化学, 伊丹市
賦形剤 ②	水溶性食物繊維	パインファイバー	松谷化学, 伊丹市
賦形剤 ③	ホエータンパク質濃縮物	ミライ 80	ミライ社, ドイツ
賦形剤 ④	高度分岐環状デキストリン	クラスターデキストリン	江崎グリコ, 大阪市
賦形剤なし	—	—	—

得られた粉末のペルオキシダーゼ活性を測定した（表 2. 3. 1-2）。賦形剤を添加せず、噴霧乾燥機に 95L/min で空気を吹き込んだ場合に 190U/ g と高い酵素活性の粉末が得られた。

表 2. 3. 1-2 得られた粉末のペルオキシダーゼ活性

用いた賦形剤			活性
賦形剤 ①			1 Unit/g
賦形剤 ②			10 Unit/g
賦形剤 ③			—
賦形剤 ④			32 Unit/ml
賦形剤なし	空気吹込なし	Out	186 Unit/g
	空気吹込なし	In	94 Unit/g
	空気吹込あり	Out	184 Unit/g
	空気吹込あり	In	190 Unit/g

また、作製した粉末の表面構造を走査型電子顕微鏡（SEM, JSM-6060, JEOL）を用いて、加速電圧 2.0 kV、スポットサイズ 30 の条件で観察を行った。

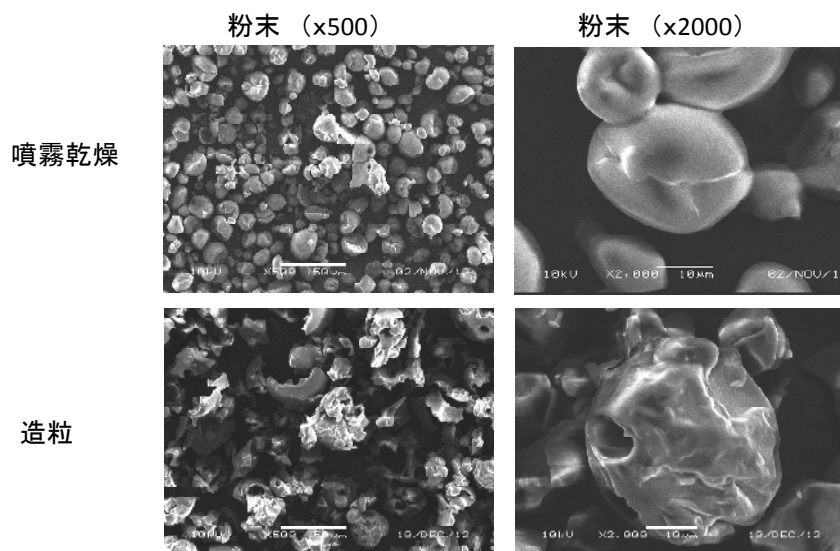


図 2.3.1-1 噴霧乾燥粉末、及び造粒粉末の電顕写真

噴霧乾燥粉末の電顕写真を、図 2.3.1-1 に示す。比較のために、造粒された粉末の電顕写真も示す。造粒すると空隙の多い流動性のよい粉末となっていることがわかる。噴霧乾燥粉末を、湿度の多い空気中に静置すると粉末の一部が潮解した。

(3) 研究成果

目標とした活性値を示すような噴霧乾燥粉末をラボレベルで得ることができた。

2.3.2 製造実機での製造

(1) 研究目的

前項目で検討した結果を踏まえて、製造実機を用いて噴霧乾燥粉末の試験製造を行う。

(2) 研究内容

スプレードライ噴霧乾燥機を使用して製造実機スケールでの噴霧乾燥粉末作製の検討を行った。エアースーパー（除湿空気）による乾燥室内壁付着物の払い落とし並びに乾燥室内壁の冷却が可能であり、除湿空気による製品の冷却が可能である噴霧乾燥機を使用した。

(3) 研究結果

ホエー100 kgを遠心分離、シャープレス遠心分離の工程に供し水不溶性蛋白や脂質の除去を行い、賦形剤は添加せずに、噴霧乾燥（入口温度：120℃、出口温度：70℃、アトマイザー回転数：10,000rpm）を実施したところ、噴霧乾燥品 5.4kg を得ることができた。得られた粉末の一部は造粒工程に供した。得られた噴霧乾燥粉末および造粒粉末

のペルオキシダーゼ活性を測定した（表 2.3.2-1）。

表 2.3.2-1 得られた粉末のペルオキシダーゼ活性

条件	活性
噴霧乾燥粉末	550.7 Unit/g
造粒粉末	95.1 Unit/g

本年度の目標値であるペルオキシダーゼ活性 40Unit/g を大きく超える活性を保持した粉末を得ることができ、また、造粒工程を実施する事によって、溶解性に優れた粉末を得ることができた。

2. 4 新規人工唾液の機能性の評価

2. 4. 1 インビゴ実験による機能性の評価

(1) 研究目的

加齢とともに唾液腺をはじめとする種々の臓器は萎縮し、機能低下をきたす。種々の臓器の機能低下や萎縮へ及ぼす新規人工唾液の影響を検討することを目的とし、余剰成分の除去を行ったものを溶液試作品、噴霧乾燥した最終段階の新規人工唾液を粉末試作品と呼び種々の臓器の機能低下や萎縮へ及ぼす効果を検討した。

(2) 研究内容

3ヶ月齢(成熟)ウィスター系雄ラットと16ヶ月齢(老齢)ウィスター系雄ラットにジャージー牛ホエーから作製中の溶液試作品、ホルスタイン牛ホエーからの調製品または水道水を2ヶ月間飲用させた後、唾液量、唾液蛋白質量、ムチン量、アミラーゼ活性を測定した。一方、舌下腺を摘出し、total RNA を抽出しマイクロアレイ発現データを得た。なお、以降の解析結果に記載する略号を表 2. 4. 1-1 にまとめた。

表 2. 4. 1-1 試験に用いた動物群の略号

齢	性	飲用物	略号
成熟ラット	雄	水道水	YC
		溶液試作品	YJ
		ホルスタインホエー	YH
老齢ラット	雄	水道水	OC
		溶液試作品	OJ
		ホルスタインホエー	OH

ホエーが発揮させる唾液分泌作用の評価

水道水飲用老齢ラット(OC)の唾液量は成熟ラット(YC)に比べると約6割に、蛋白質量も約8割に低下している。溶液試作品飲用老齢ラット(OJ)は水道水飲用老齢ラット(OC)に比べて1.7倍の唾液分泌量の増加が認められ、唾液中の蛋白質量は1.3倍の増加が見られた。

表 2. 4. 1-2 溶液試作品が唾液量と唾液中の蛋白質濃度に及ぼす影響

齢	性	飲用物	唾液量 (mg/10min)	タンパク質濃度 (mg/ml)	略号
成熟ラット	雄	水道水	296.4±13.2	9.67±0.11	YC
		溶液試作品	345.6±15.1	9.50±0.09	YJ
		ホルスタインホエー	333.9±30.2	10.58±0.55	YH
老齢ラット	雄	水道水	182.5±12.1 **	7.64±0.74 *	OC
		溶液試作品	312.7±4.9 *	9.90±0.39 *	OJ
		ホルスタインホエー	284.6±27.9	9.34±0.53	OH

* $P<0.5$, ** $P<0.1$ n=5

ホエーが発揮させる抗菌作用の評価

シスタチン S は抗ウィルス作用・抗菌作用を発揮して歯周病を抑制する蛋白質、リゾチームは溶菌効果による抗菌作用を発揮する酵素、ペルオキシダーゼは細菌の増殖を抑制して抗菌作用を示す酵素である。これらの酵素類に着目し、抗菌作用について評価を行った。

舌下腺におけるこれらの抗菌物質の遺伝子発現を解析した。加齢とともにこれら遺伝子の発現は減少するものもあるが、溶液試作品用老齢ラット (OJ) では、水道水飲用老齢ラット (OC) 比べて、シスタチン S については約 12 倍、リゾチームは約 2 倍、ラクトペルオキシダーゼは約 1.5 倍の遺伝子発現増加が見られた (表 2.4.1-3)。なお、表中の発現量比は蛍光強度を $\log_2$ 比に変換した後の数値であり、-4.5 は 1/4.5 倍を示し、12.25 は 12.25 倍を示す。

表 2.4.1-3 舌下腺の抗菌性酵素遺伝子のマイクロアレイによる解析

Gene description	Gene-symbole	蛍光強度 (log 値: 底は 2)				発現量比 (Fold Change)		
		YC	OC	OJ	OH	OC/YC	OJ/OC	OH/OC
Cystatin S	Cyss	12.1	9.92	13.5	11.4	-4.5	12.25	2.83
Lysozyme	Lyz2	11.2	11.6	12.4	11.7	1.29	1.73	1.07
Lactoperoxidase	Lpo	12.4	12.3	13.1	13.0	-1.43	1.57	-1.07
Glutathione peroxidase 1	Gpx1	12.6	12.4	12.5	12.5	1.05	-1.04	-1.17
Glutathione peroxidase 2	Gpx2	10.5	10.3	10.6	10.6	1.05	1.03	-1.17
Glutathione peroxidase 3	Gpx3	9.61	9.65	10.1	9.53	1.05	1.38	1.03
Glutathione peroxidase 4	Gpx4	9.24	8.98	9.18	8.99	1.19	-1.04	-1.21

さらに、唾液中シスタチンの活性を測定すると、溶液試作品を飲用したラットの唾液シスタチン活性は、水道水飲用ラットのその1.5倍であった (表2.4.1-4)。上記の遺伝子発現だけではなく、実際の唾液中の抗菌成分濃度が上昇していることが分かった。

表2.4.1-4 溶液試作品が唾液Cistatin活性に及ぼす影響

齢	性	飲用物	Cistatin 活性 (μ M)	略号
成熟ラット	雄	水道水	296.4 $\pm$ 13.2	YC
		溶液試作品	345.6 $\pm$ 15.1	YJ
		ホスチンホエー	333.9 $\pm$ 30.2	YH
老齢ラット	雄	水道水	182.5 $\pm$ 12.1	OC
		溶液試作品	312.7 $\pm$ 4.9	OJ
		ホスチンホエー	284.6 $\pm$ 27.9	OH

* $P < 0.5$, ** $P < 0.1$, *** $P < 0.01$ n=3

これらのことより、溶液試作品を飲用していると、唾液の抗菌活性が高まる可能性が示唆された。

ホエーが発揮させる粘膜保護作用の評価

プロリン・リッチ蛋白質には酸性、塩基性、グリコシル化されたプロリン・リッチ蛋白質があるが、なかでも舌下腺で遺伝子発現の高い酸性プロリン・リッチ蛋白質は老齢ラット(OC)では成熟ラット(YC)の1/2にまで低下していたが、溶液試作品飲用老齢ラット(OJ)では水道水飲用老齢ラット(OC)に比べて2.5倍にまで上昇した。塩基性プロリン・リッチ蛋白質の遺伝子(Prp2)の発現は加齢の影響は受けていないが、溶液試作品飲用によって37倍にまで上昇した。

ムチンには多くのサブタイプが存在するが、舌下腺で発現量の多いタイプを表2.4.1-4に記した。ムチン-4様蛋白質の遺伝子は加齢とともに発現が低下する。しかし、溶液試作品を飲用したラットでは、成熟ラットのレベルにまで回復した(表2.4.1-5)。

表 2.4.1-5 舌下腺の Proline-rich protein と Mucin のマイクロアレイによる解析

Gene description	Gene-symbole	蛍光強度(log 値:底は 2)				発現量比 (Fold Change)		
		YC	OC	OJ	OH	OC/YC	OJ/OC	OH/OC
Proline-rich protein BstNI (acidic)	Prb1	11	9.99	11.4	10.4	-1.96	2.55	1.32
Proline rich protein 2 (basic)	Prp2	7.05	7.06	12.3	7.36	1.01	37.49	1.24
Proline rich glycoprotein (glyco)	Sgp158	6.46	6.64	10.5	6.23	1.13	19.09	-1.33
Proline rich protein 15	RGD15	8.06	7.65	9.83	7.9	-1.32	4.52	1.19
Similar to Mucin-4	LOC682199	9.29	8.04	9.29	8.09	-2.39	2.38	1.04
Mucin 15	Muc15	10.6	10.5	10	10.4	-1.05	-1.41	-1.09
Mucin 19	Muc19	14.1	13.9	13.8	14	-1.16	-1.05	1.14
Mucin 20	Muc20	10.8	10.9	11	10.8	1.09	1.01	-1.09

次に、唾液中のムチン量を測定したところ、老齢ラット(OC)では成熟ラット(YC)の約8割にまで低下していたが、溶液試作品を飲用すると(OJ)、1.9倍の増加が見られた。

表 2.4.1-6 溶液試作品が唾液中の Mucin 量に及ぼす影響

齢	性	飲用物	Mucin 濃度 (mg/ml)	略号
成熟ラット	雄	水道水	1.74 ± 0.32	YC
		溶液試作品	3.23 ± 1.37	YJ
		ホルスタインホエー	1.62 ± 0.26	YH
老齢ラット	雄	水道水	1.39 ± 0.38	OC
		溶液試作品	2.62 ± 0.78	OJ
		ホルスタインホエー	1.49 ± 0.44	OH

** $P < 0.1$, $n=5$

ホエーが発揮させる免疫作用の評価

唾液中の免疫物質は、細菌の表面に付着して細菌を凝集し、細菌が口腔表面に付着するのを阻止、排除する機能を有している。免疫関連物質の遺伝子の多くは、加齢とともに発現が増加した。この増加した遺伝子の多くは、溶液試作品を飲用したラットでは低下した。反対に、加齢とともに低下した遺伝子は、溶液試作品を飲用したラットでは増加した。

表 2.4.1-7 舌下腺の免疫関連蛋白質のマイクロアレイによる解析

Gene description	Gene-symbole	蛍光強度 (log 値:底は 2)				発現量比 (Fold Change)		
		YC	OC	OJ	OH	OC/YC	OJ/OC	OH/OC
Immunoglobulin heavy chain, alpha	Igha	8.15	10.8	11.8	10.4	6.3	1.94	-1.29
Immunoglobulin heavy chain gamma	Ighg	10.7	11.3	11.4	11	1.45	-1.19	-1.18
Immunoglobulin delta heavy chain	L0C641523	6.41	8.34	8.06	6.38	3.81	-1.21	-3.91
Immunoglobulin heavy chain 6	Igh-6	11.2	12.4	12.8	12.1	2.25	1.35	-1.47
Alpha-2u globulin PGCL4	Obp3	11.1	10.3	11.2	9.77	-1.71	2	-1.5
Gamma-2a	IgG-2a	9.74	10.5	10.8	10.2	1.69	1.24	-1.19
Albumin promoter	Dbp	11.4	10.9	12.2	11.6	-1.33	1.55	2.43

ホエーが発揮させる消化作用への効果

アミラーゼは、唾液に含まれる消化酵素である。唾液中のアミラーゼ活性を測定したところ、溶液試作品飲用老齢ラット (OJ) は水道水飲用老齢ラット (OC) に比べてアミラーゼ活性が 1.4 倍に上昇する事が分かった。

表 2.4.1-8 溶液試作品が唾液中のアミラーゼ活性に及ぼす影響

齢	性	飲用物	アミラーゼ活性 (Unit/ml)	略号
成熟ラット	雄	水道水	380 ± 12	YC
		溶液試作品	368 ± 24	YJ
		ホルスタインホエー	430 ± 29	YH
老齢ラット	雄	水道水	534 ± 40	OC
		溶液試作品	730 ± 35	OJ
		ホルスタインホエー	730 ± 35	OH

* $P < 0.5$, $n=3$

粉末試作品が発揮する組織萎縮阻止作用

9ヶ月齢(老齢)雄マウスに実施項目3で作製した粉末試作品を5g/100ml濃度で3週間飲用させた。対照には水道水を飲用させた。

両マウスより唾液腺を摘出し、ホルマリンで固定後、パラフィンで包埋した組織より切片を作成し、ヘマトキシレン・エオジン染色した。光学顕微鏡で観察したところ、高齢マウスの舌下腺では粘液細胞が萎縮しているが、粉末試作品飲用のマウスの舌下腺では萎縮が認められなかった。粉末試作品を飲用することで、加齢に伴う唾液腺の萎縮が阻止、修復なされていることが分かった。

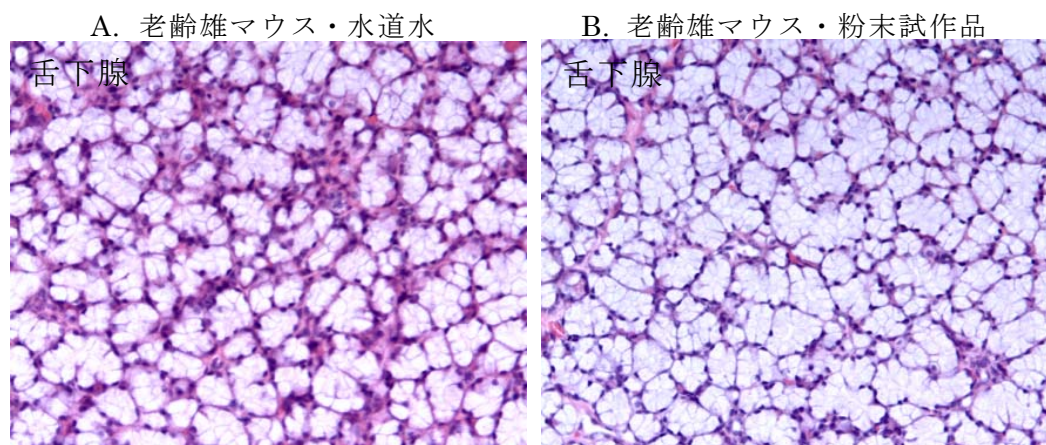


図 2.4.1-1 粉末試作品が加齢に伴って萎縮する唾液腺組織へ及ぼす影響 (10X20)

一方、肺組織においても、水道水飲用の高齢マウスの肺では細胞の萎縮や消失が認められ、肺胞腔が大きくなっていた(図 2.4.1-2, A)。しかし、粉末試作品飲用のマウスの肺では肺胞腔の周囲を取り巻いて、多くの細胞が認められなかった(図 2.4.1-2, B)。粉末試作品を飲用することで、加齢に伴う肺の萎縮が阻止され、修復がなされたと考えられた。

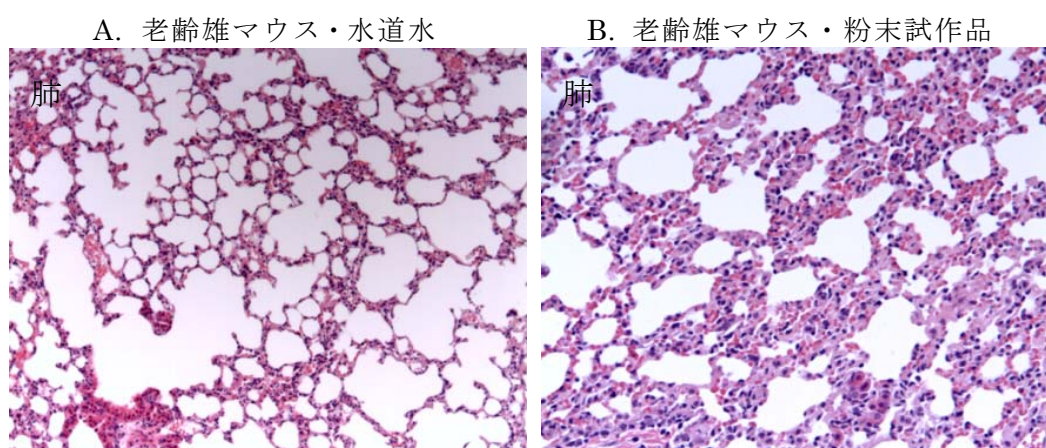


図 2.4.1-2 粉末試作品が加齢に伴って萎縮する肺組織へ及ぼす影響 (10X10)

また、粉末試作品を飲用した老齢マウスの唾液蛋白質量、ムチン量、アミラーゼ活性を測定したところ(表 2.4.1-9)、ともに上昇しており、唾液腺機能の改善が生化学的実験か

らも証明された。これらにより、実施項目 1～3 で検討・決定した製造工程において有効成分が消失していないことが確認できた。

表 2.4.1-9 粉末試作品が唾液に及ぼす影響

	蛋白質濃度 (mg/ml)	ムチン濃度 (mg/ml)	アミラーゼ活性 (Unit/ml)
水飲用マウス	7.33 ± 0.49	1.05 ± 0.02	296 ± 19
粉末試作品飲用マウス	9.15 ± 0.92*	1.51 ± 0.08*	477 ± 8**

* $P<0.5$, ** $P<0.1$, $n=3$

(3) 研究成果

本人工唾液飲料が、唾液腺の萎縮を抑制して唾液分泌が増やし、さらに、唾液の抗菌作用、粘膜保護作用、免疫作用、消化作用が上昇していることが示唆された。また、肺においても加齢に伴う萎縮が阻止された。

2. 4. 2 インビトロ実験による機能性の評価

(1) 研究目的

処理したホエーを上皮細胞の培養液に添加し、上皮細胞の増殖、形態、培養液の生化学的・組織学的な変化への影響を解析し、ホエー成分が上皮細胞への影響を検討する。

(2) 研究内容

〈方法〉 正常ヒト小腸上皮細胞(Primary Normal Human Intestinal Epithelial Cells, IE Cells)を培養し、処理したホエーを 1%濃度で添加してさらに 2 日間培養した。2%パラホルムアルデヒドで 10 分間固定し、0.2% Triton X-100 で 2 分間透過させた後、水チャネル・アクアポリン 8 の抗 AQP8 抗体と反応させた。Alexa Fluor 488 と結合した二次抗体と反応させ、蛍光強度を共焦点顕微鏡(Leica TCS NT)を用いて観察した。

〈結果〉 図 2.4.2-1 に示す通り、滅菌した処理ホエーを 1%濃度で添加して 2 日間培養しても緑色の蛍光で示した AQP8 の局在に変化は認められなかった。また、Caspase-3 活性を上述と同様に測定したが、処理ホエー添加の有無で影響はなかった。

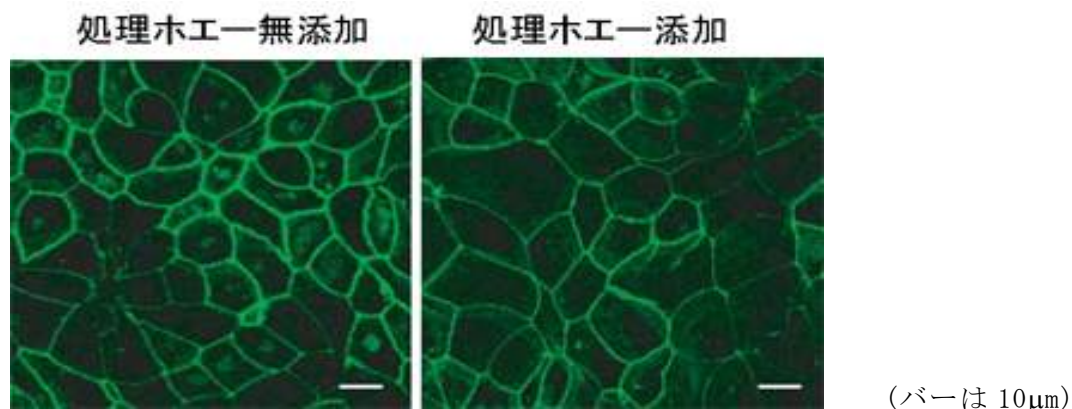


図 2.4.2-1 処理ホエー有無の下で培養した正常ヒト小腸上皮細胞

(3) 研究成果

AQP8 の局在や Caspase-3 活性への処理ホエーの影響を見る限りでは、処理ホエー成分の粘膜への直接的影響はなかった。

2. 4. 3 口腔内微生物および消化管内微生物の種類および生息量に及ぼす影響の評価

(1) 研究目的

処理したホエーを1～3ヶ月ラットに飲用させ、口腔および消化管内微生物の種類や量の評価とともに、病原性微生物の種類と生息量进行评估する。

(2) 研究内容

〈方法〉 処理したホエーまたは水道水を成熟ラットおよび高齢ラットに1.5ヶ月間飲用させ、口腔を拭った綿棒と盲腸の病原性微生物を検討した。トリプチケースソイⅡ血液寒天培地(BD)に塗布して嫌気性条件下で4日間培養した。

〈結果〉 綿棒、盲腸ともにマイコプラズマ、気管支敗血症菌、ネズミコリネ菌、肺バクテリウム、肺炎球菌、サルモネラ菌、緑膿菌の病原菌は認められなかった。

綿棒について口腔内容物をトリプチケースソイⅡ血液寒天培地(BD)に塗布して4日間培養しても、図 2.4.3-1 に示したように、成熟ラットの口腔内容物でも高齢ラットの口腔内容物でも顕著なコロニーは出現しなかった。

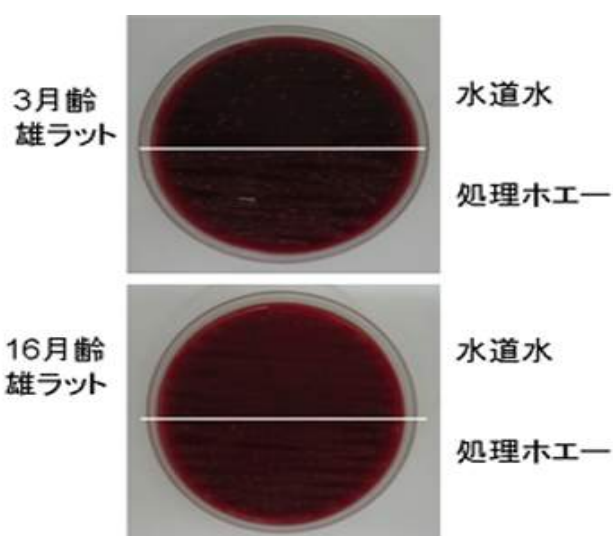


図 2.4.3-1 口腔内容物のトリプチケースソイⅡ血液寒天培地での培養

(3) 研究成果

人工唾液の原料とするホエーを1.5ヶ月間飲用しても口腔内および盲腸内に病原菌や歯周病の病因となるような嫌気性菌は出現せず、原料は安全性が高いと考えられた。

2. 4. 4 人工唾液中の機能性成分の分析

(1) 研究目的

ホエーが含有する生理活性物質のうち、①抗菌作用、②保湿作用、③免疫作用、④味覚正常化作用、を担う物質が最終製品である粉末にどの程度含まれているのか評価する。

(2) 研究内容

粉末 1g あたりの各成分値と、それを飲用時濃度（粉末 5g を 100mL に溶解する）に溶かした飲料中の各成分値を表 2. 4. 4-1 に示す。

表 2. 4. 4-1 ホエー粉末が含む機能性成分濃度および活性

物質名	作用	濃度 / 粉末 1g	飲用時濃度 / 飲料 1mL	<参照> / 唾液 1mL	<参照> 唾液との比
ラクトフェリン	①抗菌	1.8 mg	90 μ g	15 μ g	6 倍
ラクトペルオキシダーゼ	①抗菌	550 Unit	27.5 Unit	10 Unit	3 倍
ヒアルロン酸	②保湿	0.1 mg	5 μ g	0.08 μ g	60 倍
コラーゲン	②保湿	2.0 mg	100 μ g	90 μ g	1 倍
β ラクトグロブリン	③免疫	10 mg	500 μ g	—	—
α ラクトアルブミン	③免疫	5 mg	250 μ g	—	—
亜鉛	④味覚	20 μ g	1 μ g	0.45 μ g	2 倍

(3) 研究成果

粉末化したホエーには、唾液を補完する飲料として十分な機能性成分が含有されていることが分かった。

2. 5 飲料としての試作品作製

2. 5. 1 試作品作製

(1) 研究目的

最終製品を、「飲用時に 5～10 グラム程度の粉末を水に溶解してもらう形状」とし、試作品を作製する。高齢者の方にも受け入れてもらえる味付けおよび個包装について検討する。

(2) 研究内容

実施内容 3 によって作製された造粒したホエー粉末に甘味料、クエン酸、香料などを混合し、粉末 5g/100mL となるように水で溶解して評価した。粉末化ホエーの牛乳臭さを隠すため、香りの強いパイナップル味や、爽やかさのある梅風味、柑橘系を検討した。結果を表 2.5.1-1 にまとめる。

表 2.5.1-1 ホエー粉末の味付け検討結果

	評価	評価コメント
ホエー粉末そのまま	△	溶液ホエーそのものよりも牛乳臭さが気になった。
梅味	◎	口当たりもよく、飲みやすい
パイナップル味	○	香りが甘すぎる
柑橘系味 (レモン+グレープフルーツ)	○	酸味がきつい
ゆず味	△	ゆずの香りがしない
ゆず+ハチミツ味	△	人工的な味がする

好評であった梅味について、自動包装システムにて個包装を実施した。

(3) 研究成果

味付けを梅味に決定し、個包装した試作品を完成させた。

2. 5. 2 ユーザー評価

(1) 研究目的

試作した試作品を人工唾液としてユーザー評価を受ける。

(2) 研究内容

高齢者の方に試飲していただき、口腔内湿潤の実感と味付けの評価をして頂いた。徳島市内の老人保健施設において、ボランティアとして、60 歳代～90 歳代の男女計 10 名にご協力をいただき、下記のアンケート内容に答えていただいた。

- 普段の口腔内湿潤度の実感 (10 段階評価)
- 試作品を飲用後の口腔内湿潤度の実感 (10 段階評価)
- 味付け評価 (10 段階評価)

評価を表 2.5.2-1 にまとめた。味付けについては概ね好評であった。口腔内の湿潤度については、特に冬場は口が乾燥するといった声があったが、飲用後には潤った感じがすると評価いただいた。そのほかには、袋が空けにくい、少し面倒だと思う、とのご意見があり、個包装の形態についてさらに検討が必要であると思われる。

表 2.5.2-1 試飲後のアンケート調査結果

対象者	普段の 口腔内の湿潤度	飲用直後の 口腔度の湿潤度	味つけ
60 歳代女性	8	9	10
60 歳代男性	4	6	5
70 歳代女性	8	8	8
70 歳代女性	2	5	8
70 歳代女性	6	6	5
70 歳代女性	10	10	8
70 歳代女性	7	8	8
70 歳代男性	5	—	—
80 歳代女性	5	6	8
90 歳代女性	10	10	10

また、30 歳代～60 歳代の 5 名のボランティアに、試作品を一日 3 回・2 週間、継続的に飲用し、飲用前と飲用後の唾液量を測定した。結果を表 2.5.2-2 にまとめた。30 歳代～50 歳代の被験者においては特に変化が見られなかったが、60 歳代男性被験者においては唾液量の上昇が見られた。

表 2.5.2-2 2 週間の継続飲用前後の唾液量

対象者	飲用前の唾液量 (g/min)	継続飲用後の唾液量 (g/min)
30 歳代女性	2.02	2.10
30 歳代男性	1.93	1.79
30 歳代男性	1.68	1.70
50 歳代女性	1.88	1.89
60 歳代男性	1.80	2.20

(3) 研究成果

試作品をユーザーに評価してもらう事ができた。味付けについては概ね好評だったものの、個包装が空けにくいなどの問題点も明らかになり、今後の改善が必要であると考えます。また、動物実験で明らかになった継続飲用によって唾液量が上昇する点について、人でもその可能性がある事が示唆された。

第 3 章 全体総括

3. 1 余剰物質除去法の確立

ホエーには人工唾液としては不必要な過剰の蛋白質、糖質、脂質などが入っている。生理活性を保持したままこれらの余剰成分を除去する方法を確立できた。さらに、蛋白質、脂質については工業スケールで処理工程も検討し、条件を確立できた。乳糖除去については、工業スケールにて実施するには設備投資などがかかるため、検討に困難が生じた。しかし、製品設計を見直すことによって、具体的には、一日あたりの飲用量を見直すことによって、人工唾液に乳糖が含まれることによる悪影響は回避できたため、乳糖を除去せずに製品化の検討を進めた。

3. 2 液状および粉末ホエーの殺菌方法の検討

平成 23 年度は冷凍保存した原料および各処理後のサンプルを評価したが、食品衛生上問題となる細菌は認められなかった。平成 24 年度、出来立てで、まだ暖かい原料をその場で、炭酸ガス処理を行った後、冷蔵保管した試料について、評価した。食品衛生上問題となる細菌は認められなかった。

一方、上記試料を輸送後、細菌検査を行ったところ、一般細菌、セレウス菌、乳酸菌、大腸菌等の汚染の可能性が認められた。原料の採取、余剰物質除去、輸送の過程で汚染された結果と判断した。そこで当該試料を炭酸ガス 10 気圧 40℃24 時間の条件で殺菌したところ、上記微生物群の殺菌が確認された。現在行われている作業工程の範囲であれば雑菌汚染が生じて、炭酸ガス殺菌が適用できる物と判断した。

3. 3 ホエー粉末化の検討

機能性の高い粉末人工唾液を提供するためには、ホエー中の機能性蛋白質の活性を保持したまま粉末化することが必要である。大量生産が可能な噴霧乾燥法を用いた機能性蛋白質の粉末化手法について検討した結果、含水率が 5%以下で、溶解性にも優れた粉末を得ることができた。また、生理活性保持の指標として設定したペルオキシダーゼ活性（抗菌活性）については、当初目標としていた 40Unit/g を大きく上回る 550Unit/g もの活性を保持した粉末を得ることができた。このことは、ペルオキシダーゼ活性以外の酵素活性等も維持できている可能性を示唆するものであり、高機能な粉末化人工唾液の製造工程確立ができたと考えられる。

3. 4 新規人工唾液の機能性の評価

本飲料を飲用したラット唾液腺等の組織学的解析、遺伝子発現解析、生化学的解析の結果、本飲料の飲用により、組織萎縮阻止作用・抗菌作用・粘膜保護作用・免疫賦活作用が生体内で発現していることが分かった。これは、当初想定していた、不足した唾液の代わりに本飲料を飲んで嚥下を補助する、という範囲を超え、継続して飲用する事によって、自身の唾液腺等の生体機能が向上するという新しい製品の価値を生み出すことが出来た。

加えて、上記 3. 3 に示した通り、抗菌活性を高く維持した、かつ、保湿作用の高い成分なども豊富に含んだ粉末飲料を得ることができており、継続飲用によるからだの機能改

善という側面からも、飲用時に口腔内に与える影響という側面からも有用であると考えられる。

3. 5 飲料としての試作品作製

噴霧乾燥条件や味付けの検討を重ね、目標としている「手軽にさっと溶かして美味しい飲み物」にかなり近づくことができた。実際に高齢者の方にもご評価を頂いたが、概ね好評をいただくことができた。

3. 6 研究開発後の課題・事業化展開

(1) 作用機序の究明

ホエーあるいは粉末化したホエーを継続飲用することによって、自身の生体機能が改善されるという新しい発見があった。しかし、どの物質がどのような機序で作用してこういった効果効能となるのかという点まで解明するにはいたらなかった。今後、効果を発揮する物質や機序が特定できれば、その物質が濃縮されるような製造法を採用するなどしてさらに優れた製品（例えば医薬品など）の開発に期待できる。

(2) 原料の調達について

製品化に向けて、原料の安定調達が必須である。ホエー供給量の調査のため、複数の牧場・乳製品工場を訪問した。日本で多く飼育されているホルスタイン種よりもジャージー種由来ホエーの方が人工唾液としての機能が低いという結果に基づき、主にジャージー種を飼育している牧場・乳製品工場にアプローチを行った。

ホエーについては、各社季節変動(チーズの製造時期等)こそあれ、年間ある程度の数量が産出されているとのことだったが、産出された後の物流状況としては、そのまま廃棄されているものは少なく、1) 家畜の飼料、2) 既に有効利用している会社へ供給、3) チーズによっては、食塩や酸などの添加物が入っていることや蛋白が変性するような温度で熱殺菌している、などにより年間産出量の割には、人工唾液製造に有効利用できるホエーは少ないことが明らかとなった。例えば、H酪農農業協同組合様では、1週間に500kg～1200kg程度のホエーが排出されるとの事であり、仮にその総量を買取る事ができれば十分に事業化可能な量ではあるが、すでに地元企業との確約などがあり、取引させていただける量は未知数との事であった。

また、固形分含量が非常に低いホエーを大量に輸送するのは経済効率が悪く、できればホエーが排出された乳製品工場の中、あるいは近隣の工場にて粉末化できるほうがよいという声も多く頂いた。例えば、H酪農農業協同組合様では、自社で発生した脱脂乳については近隣にある別の乳業メーカーへ輸送し粉末化しているそうである。そういった商流も理解し今後の事業を進める必要があると考えた。

そこで、今後の進め方として下記のように考える。

- ① ジャージー牛飼育牧場に対して引き続き交渉し、可能な限りの原料調達を試みる。また、乳業工場とのすでにできている輸送・製造ルートを活用させていただけるよう交渉する。

- ② ホルスタイン種由来のホエーについて再考する。ホルスタイン種ホエーはジャージー種ホエーに比べ機能面で劣っていると結果が出ているが、例えばその機能性が半分なのであれば、倍量を飲んでいただいたらよいと考えられる。ホルスタイン種であれば、北海道はじめ大規模農場・乳製品工場が多数存在し、原料の確保が可能であると思われる。
- ③ 牛乳から脂肪分を除去した脱脂乳を利用することにも前向きに検討を進める。脱脂乳であれば 熱履歴が少ない、固形分が多く粉末化、大量に発生する、すでにルーチンに製造しており経済的などの理由から、もし脱脂乳がホエーと同じ効果を持つのであれば脱脂乳を採用するほうが事業化が早いと考えられる。
- ④ 欧米諸国では日本と違ってジャージー種が多く飼育されており、発生したホエーを粉末化して商品化しているものもある。それらホエー粉末を取り寄せて試験を実施し、クオリティーの合うものがあれば採用したいと考える。

（３）販売ルートについて

販売ルートは大きく二つを考えている

一つ目は、ウェブなどを活用して「健康食品として」販売するルートである。アプロサイエンスでは、化粧品や健康食品などを扱うウェブサイトを展開しており、販売ノウハウの蓄積がある。

二つ目は、老人介護施設などへ「介護食品として」販売するルートである。ユーザー評価でお邪魔した老人保健施設の担当者の方にお話を伺ったところ、施設のお食事前の準備時間にお食事が始まる合図として飲料を配るのは良いというご意見だった。上記ウェブ通販のような個人客相手ではなく施設単位で製品の導入が決まれば、定期的に一定の量が消費され、安定した事業になると考える。

以 上