

博士學位論文

未利用食料資源の有効利用に関する研究

石川県立大学大学院 生物資源環境学研究科

西 正人

2015年

目次

序論	1
第1章 オカラの高温高压水処理	
1. 1 緒言	4
1. 2 実験材料および高温高压水連続処理方法	7
(1) 高温高压水連続処理実験装置	7
(2) 原料大豆	9
(3) オカラの調製と亜臨界水条件下による処理	9
(4) オカラピュールの物性	10
第2章 亜臨界水処理後のオカラによる糖質消化酵素への影響と血糖値上昇抑制作用	
2. 1 緒言	12
2. 2 実験材料および実験方法	13
(1) 糖質消化酵素阻害性試験	13
(1) -1 スクララーゼ酵素液	13
(1) -2 糖質消化酵素活性測定	14
(2) 糖質負荷試験	14
(2) -1 実験動物および飼育条件	14
(2) -2 マウスを用いた糖質負荷試験	15
(2) -3 被験試料による血糖値の変動	15
(2) -4 胃内ゾンデ及び尾静脈採血誘発ストレスによる血糖値の変動	16
(2) -5 被験試料のショ糖負荷血糖値への影響	16
(3) オカラピュール長期投与による血糖値上昇抑制効果の検討	16
(3) -1 実験動物	16

(3) -2 被験試料	16
(3) -3 方法	17
(4) 統計分析	18
2. 3 結果	18
(1) 糖質消化酵素阻害性	18
(2) 糖質負荷試験	19
(3) オカラピューレ長期投与による血糖値上昇抑制効果	23
2. 4 考察	26
第3章 亜臨界水処理後のオカラにおけるアンジオテンシン変換酵素活性の阻害作用と血圧調節作用	
3. 1 緒言	29
3. 2 実験材料および実験方法	31
(1) アンジオテンシン変換酵素活性阻害性の検討	31
(1) -1 アンジオテンシン変換酵素 (ACE) と基質の調製	31
(1) -2 サンプル抽出液の調製	31
(1) -3 酵素活性阻害性の測定	31
(1) -4 HPLC 条件	32
(2) オカラピューレ長期投与による血圧上昇抑制効果の検討	32
(2) -1 実験動物	32
(2) -2 被験試料	33
(3) 統計分析	33
3. 3 結果	34
(1) アンジオテンシン変換酵素活性阻害性の検討	34
(2) オカラピューレ長期投与による血圧上昇抑制効果	35

3. 4 考 察	3 9
第4章 亜臨界水処理後のオカラの抗酸化作用の検討	
4. 1 緒 言	4 1
4. 2 実験材料および実験方法	4 2
(1) DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)ラジカル消去能の測定	4 2
4. 3 結 果	4 3
4. 4 考 察	4 4
第5章 亜臨界水処理後のオカラの抗プロモーター作用および抗腫瘍性の検討	
5. 1 緒 言	4 6
5. 2 実験材料および実験方法	4 7
(1) マウス上皮細胞による抗プロモーター活性の検討	4 7
(1) -1 Dimethylsulfoxide(DMSO)抽出	4 7
(1) -2 ソフトアガーアッセイ	4 7
(1) -3 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dipheyl tetrazolium bromide)法	4 8
(2) 動物実験による抗腫瘍効果の検討	4 9
(3) 統計処理	4 9
5. 3 結 果	4 9
(1) マウス上皮細胞による抗プロモーター活性の検討	4 9
(2) マウスによる抗腫瘍効果の検討	5 1
5. 4 考 察	5 4
第6章 <i>Bacillus coagulans</i> による食品残さ発酵物の食材化	
6. 1 緒 言	5 6
6. 2 実験材料および実験方法	5 8

(1) 試料	58
(2) 実験動物	58
(3) 実験飼料	59
(4) 飼育方法	60
(5) 採血および臓器の採取	60
(6) 盲腸内フローラの検索	61
(7) 血漿及び血漿中サイトカインの測定	61
6. 3 統計処理	62
6. 4 結果	62
6. 5 考察	66
第7章 <i>Bacillus coagulans</i> によるオカラ発酵物の抗アレルギー作用の検討	
7. 1 緒言	68
7. 2 実験材料および実験方法	69
(1) 試料	69
(2) 実験動物及び方法	69
7. 3 統計処理	70
7. 4 結果	70
7. 5 考察	73
総括	76
参考文献	80
謝辞	91
研究業績	92

序 論

近年、地球環境の温暖化など世界規模での環境問題が報じられており、これらの諸問題に対応するためには大量生産と大量消費（廃棄）といったこれまでの経済システムを見直し、限りある資源を効率よく利用・再利用する新たな循環型の経済システムを構築する必要がある。わが国では2000年から環境・リサイクルに関連する法律の整備が行われている。また、企業の自主的な取り組みや一般家庭における環境意識の高まりなど様々な方面からの取り組みが進められている。

これらの取り組みの一つに、亜臨界水を用いたバイオマスの高速分解により選択的に化学原料を回収する研究が進められてきている¹⁾。

超臨界流体は、臨界温度・臨界圧力以上の条件下で非凝縮性の高密度な流体である。臨界点においては、液相と気相の密度が等しくなり、臨界点を超えると液相と気相の区別がつかない状態となる。臨界点以上の高温・高圧水は超臨界水と呼ばれ、臨界点には達しないが、臨界点に近い領域の水は亜臨界水と呼ばれている。超臨界水や亜臨界水は常温常圧における水とは大きく異なる性質を持つようになる。化学的性質では、水のイオン積 (K_w) は飽和蒸気圧の下において 250~270 °Cで最大となる。このような条件下では触媒なしでも加水分解反応が短時間で起こることが知られている²⁾。臨界点付近またはそれ以上の高温高圧条件下における水は液体の水に匹敵する分子密度と水蒸気と同レベルの運動エネルギーを備えた流体といえる。このような流体では、水の比誘電率が 10 以下となり、炭化水素等の有機化合物を溶解することが出来るようになる。超臨界水や亜臨界水といった高温高圧水を用いて廃棄されていた食品副産物やバイオマスを有価物や他のプロセスの原料素材として有効利用する研究が行われているが、超臨界水では有価物を回収した後には残さがみられ、まるごと再利用することは難しい。著者らは、亜臨界水域の高温高圧水を用いてオカラを低分子化または可溶化することにより、食感や風味を改善した

ペースト状の新たな食材として再生利用する研究を行い、ゼロエミッションを提案してきた³⁾。

一方、高温高压水による食品廃棄物再資源化技術は、エネルギー効率を如何に高めてコストを抑えるかが実用化に向けて取り組まなければならない課題であるが、余剰エネルギーや焼却熱、排熱などを熱回収し、利用していくことで熱効率の向上が図られると考えられる。また、食品廃棄物の再資源化技術の実用化において重要と考えられるのは、再資源化のコストに見合う高付加価値なものを得ることにある。オカラについてはタンパク質を加水分解して得られる可溶性タンパク質やペプチド、繊維質を加水分解して得られる可溶性多糖類を食材として利用することなどが行われている⁴⁾。また、亜臨界水や超臨界水などの高温高压水条件下においては、分解反応だけではなく有機化合物の合成反応についての報告がある^{5),6)}ことから、未処理のオカラにはない新たな生体調節機能をもった成分が生成されている可能性も考えられる。

そこで、本研究では超臨界水や亜臨界水が生成可能な高温高压水連続処理装置によってオカラを短時間に連続処理したペースト状のオカラの生理機能性について検討した。

次に本研究では、オカラを食料資源として再生利用する技術普及におけるもう一つの取り組みとして、微生物による発酵後のオカラの生体調節機能について検討した。

食生活の歴史において、ヒトは微生物の力を利用して食品を加工・保存する方法を獲得してきた。微生物を利用して発酵した食品は比較的保存性がよく、病原菌や腐敗菌の増殖を抑えることができ、長期間の保存に耐えることができる食品もある。これらの発酵食品の多くには、乳酸菌がよく利用されている。

近年、食品の3次機能として食品に含まれる成分の生体調節機能が注目されてお

り、一部は特定保健用食品や栄養機能食品といった保健機能食品として市販されている。なかでもプロバイオティクスと呼ばれる生菌剤は、宿主の腸内環境や免疫系に対して有利に働くことで注目されている。また、生菌剤（プロバイオティクス）は、家畜の成長を促進するために添加されてきた抗生物質が厳しく規制されるようになったため、これらに代わるものとして飼料添加物や治療薬として用いられるようになった⁷⁾。生菌剤には腸内常在菌やそれ以外のものも使用されている⁷⁾。これらの菌は腸内において定着しなくても、経口投与することにより腸内の細菌叢バランスが改善され、家畜の発育促進、ヒトや家畜の腸炎予防や治療に有効である。生菌剤として用いられている中には孢子を形成し、糖を分解し乳酸を多量に生成する *Bacillus coagulans* という菌種があり、商品名「動物用ラクリス」として市販されている。また、*Bacillus coagulans* は孢子に耐熱性、保存性があることから整腸剤や食品にも添加され利用されている⁸⁾。*Bacillus coagulans* は耐熱性の孢子を形成し、その孢子は 90 °C、30 分間程度の加熱には耐性があり⁹⁾、このことは添加した *Bacillus coagulans* の殆どが食品加工や調理における加熱工程でも死滅せずに残存し、生菌剤として添加することの有効性を期待させるものである。また、食後胃内の pH はヒトの場合 3.5~5.0 とされており¹⁰⁾¹¹⁾、このような酸性条件下においても *Bacillus coagulans* は安定してよく生存することが報告されている¹²⁾。このことから *Bacillus coagulans* は通常の食事において、胃内の低 pH 条件下においても死滅することなく、腸に達して生体調節機能を発揮することが考えられる。プロバイオティクスの生体調節機能としては、腸内環境改善作用、便性改善として下痢の改善、便秘改善などがある。また、栄養素の消化吸收改善作用として乳糖の吸収改善、カルシウムの吸収性向上、ビタミン類の合成などがある。その他に血圧降下に関する作用、脂質代謝改善に関する作用、免疫調節作用などがある¹³⁾。

著者は、タンパク源としても優れた食糧資源である大豆の有効活用を促進し、循

環型経済システムへの転換を進めるために、亜臨界水などの高温高压水を利用した低分子化、可溶化技術および、微生物による発酵技術によって新たな食材として再生されたオカラの付加価値について検討した。

第2章では亜臨界水処理後のオカラについて糖質消化酵素に対する影響と血糖値上昇抑制作用、糖尿病抑制作用について検討した。亜臨界水処理後のオカラは処理温度が高くなるにつれて糖質消化酵素の活性阻害が強くなった。また、亜臨界水処理後のオカラにおいて食後の血糖値上昇を抑制することが明らかとなったが亜臨界水処理後のオカラの長期投与では、糖尿病抑制効果は確認できなかった。

第3章では亜臨界水処理後のオカラについて、アンジオテンシン変換酵素活性阻害作用を明らかにした。また、亜臨界水処理後のオカラを高血圧自然発症ラットに長期間投与し、血圧上昇抑制作用について検討した。第4章では、亜臨界水処理後のオカラの抗酸化性をDPPHラジカル消去活性について調べ、明らかにした。また、第5章では抗プロモーター作用をマウス上皮細胞由来のJB6 C1 41細胞を用いて明らかにした。さらに結腸がん細胞を移植したマウスを用いて、亜臨界水処理後のオカラの抗腫瘍性について検討した。第6章では芽胞を形成し乳酸を産生する *Bacillus coagulans* によって発酵し保存性を高めたオカラの利用を促進することにより、これまで廃棄されていた食糧資源の有効利用を図るため、オカラ発酵物の付加価値について、腸内細菌叢に対する影響や免疫調節作用について検討した。第7章では、接触性過敏症を誘導したアトピー性皮膚炎自然発症マウスに *Bacillus coagulans* によるオカラ発酵物を経口投与し、即時型アレルギーの症状や血漿中サイトカイン、IgE抗体などへの影響を調べ、抗アレルギー作用について検討した。

第1章 オカラの高温高压水処理

1.1 緒言

豆腐・油揚げ等の副産物として年間 66 万トンに達するオカラは、産業廃棄物とされ、一部が家畜飼料や肥料等に処理されている。オカラは高水分で腐敗しやすく、食感がざらつくことから、食品素材として敬遠されている。しかし、オカラには大豆と同様なタンパク質や生体調節作用を示す有用な成分が残存しており^{14)~16)}、有用な食料資源であるといえる。また、オカラの処理においては廃棄物であるオカラの収集にコストをかけることは現実的ではない。そこで腐敗しやすく大量に排出されるオカラを連続的に処理し、新たな食材として有効利用するため、オカラを高温高圧水（亜臨界水や超臨界水等）で処理する研究開発を始め、これまでに栄養上の 1 次機能（栄養）、2 次機能（嗜好性）を明らかにし、一部、機能性が向上する可能性を示した³⁾。また、亜臨界水処理によって粘度や保水性が高まったペースト状のオカラ（以下、オカラピューレまたは OP）を用いて通常と遜色ない全粒豆腐を試作し、ゼロエミッションを実現した³⁾。

しかし、常温の水を亜臨界水条件下まで加熱するには相当量のエネルギーを要する。そのため反応後の処理液を冷却する際の熱を再利用できたとしてもその熱利用効率は高くないため、亜臨界水を用いた処理が実用的か否かは亜臨界水処理後の生成物がどれだけ付加価値をもっているかが重要と考えられる。そこで本研究では亜臨界水処理されたオカラピューレの付加価値を明らかにするため、その 3 次機能（機能性・生理活性）について詳細に検討した。

亜臨界水は、大気圧における水の沸点である 100 °C から水の臨界温度である 374 °C までの温度域において圧力を加えることにより、加圧しなければ気体となる水を液体状態に保った水のことを指す。亜臨界水の特徴をみると水の比誘電率は温度が高くなるに連れて低下し、200°C~300°C では常温・常圧におけるメタノールやアセトンの値と同程度となる。よって亜臨界水では常温の水よりも疎水性物質を高濃度に溶解することが可能となる。またイオン積は常温常圧条件下の水では、 $1 \times$

10^{-14} (mol)² であるが、200°C以上になるとイオン積の値が大きくなり水素イオンおよび水酸化物イオンの濃度は常温の約 30 倍にもなる。高濃度の水素イオンや水酸化物イオンは、酸または塩基触媒として常温・常圧の水において起こらないような化学反応が亜臨界水中では起こることが予想される。これらの亜臨界水の特質を利用し、食物繊維を始めとする難消化性多糖類やタンパク質などが含まれている食品残さや非食部、残飯などの未利用資源や廃棄物から単糖やアミノ酸、またはそれらが数個結合したオリゴ糖やペプチドなどを得ることができる。これによって、これまで未利用だった食料資源を有効に利用することができるようになると考えられる。

食品残さや非食部などの農産廃棄物では廃棄物の収集にコストをかけることは難しく、また特にオカラ等のように水分が 80%前後となるようなものでは腐敗しやすく運搬効率が悪い場合には、集積せずに大量の廃棄物を短時間で処理する必要があるといえる。本研究で用いた亜臨界水処理装置の反応時間は数秒と短く、連続処理が可能であることから、このようなオカラの処理には適していると考えられる。

亜臨界水以上の高温高压水条件をつくり出す場合、常温の水を 200°C以上の温度に加熱しなければならないが、この場合にはかなりのエネルギーを要する。亜臨界水処理反応後に処理物を冷却する時に回収されるエネルギーを再利用できるとはいえ、熱エネルギーの回収は効率がよいとは言えない。亜臨界水処理技術の実用性や普及においては亜臨界水処理後の生成物にどれだけの付加価値（機能性）があるかということと処理費用との兼ね合いについて考えなければならない。現在、亜臨界水処理技術の実用化が特定の分野に限られているのは、この点が一因として考えられる。

著者は、高温高压水を利用したオカラの再生に取り組んできた結果、亜臨界水条件下における処理によってオカラ特有の風味や食感が改善されることを報告し、一

次機能、二次機能について検討し、ゼロエミッションを実現してきた³⁾。しかし、前述のように亜臨界水処理技術による食品残さの再生利用における実用化には亜臨界水処理後の生成物についてさらなる価値を明らかにすることが必要と考えられる。そこで本研究では、第2～5章で亜臨界水処理後のオカラの三次機能について検討した。

また、常温常圧条件下での水とは性質が異なり、亜臨界水処理の過程ではきわめて複雑な事象が起こるため、その事象のメカニズムを説明することは難しいと考えられる。本研究結果が数多くの知見の一つとしてそれらの事象のメカニズムを導くことに役立つかもしれない。そのことが、亜臨界水反応の過程を解明する一つのアプローチとして貢献できることも期待される。

1.2 実験材料および高温高压水連続処理方法

(1) 高温高压水連続処理実験装置

実験に使用した高温高压水連続処理装置 (Figure 1) は、試料と高温高压水を連続的に圧送し、両者を高温高压水条件下で連続的に混合して反応させ、反応後は直ちに冷却器にて冷却し大気圧に降圧する装置である。

試料タンクには加圧した空気を送り込み、脱気したスラリー状の試料を送る高压ポンプが連続的に最後まで試料を送れるようにした。また、背圧制御弁は2段 (Figure 2、Control valve 1、2) とすることにより、高压から圧力を段階的に下げ、圧力開放によるエロージョンによって弁座シートが劣化することを緩和し、圧力の安定保持と弁座の交換頻度を低減させ、高温高压水反応状態の安定を図った (Figure 1、2)。高温高压水反応における圧力の設定は、背圧制御弁1 (Figure 2) のバルブ開度を反応部の圧力をモニターしながら調節した。一方、高温高压水反応温度は電気炉 (Figure 2) の設定温度により調節した。

高温高压水は蒸留水を高压ポンプで連続的に送り込み、85℃まで予備加熱し、その後電気炉により目標温度まで昇温した。

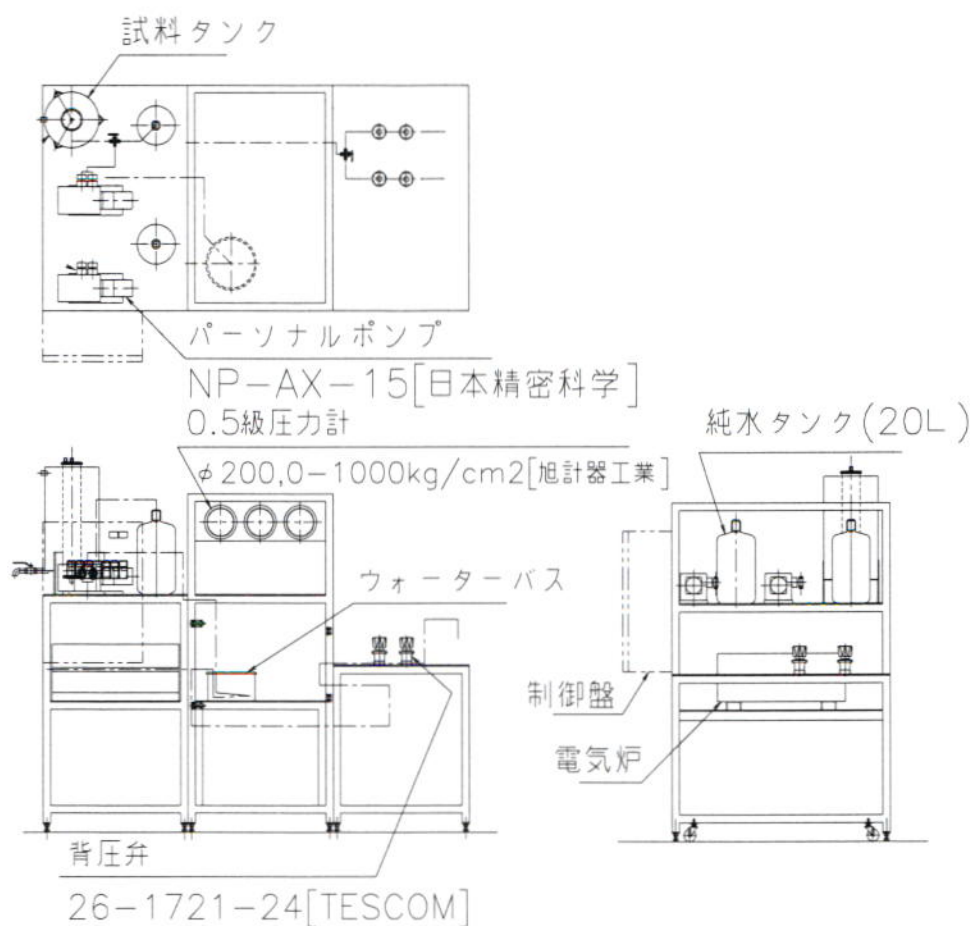


Figure.1 Schematic diagram of a continuous flow-type experimental device

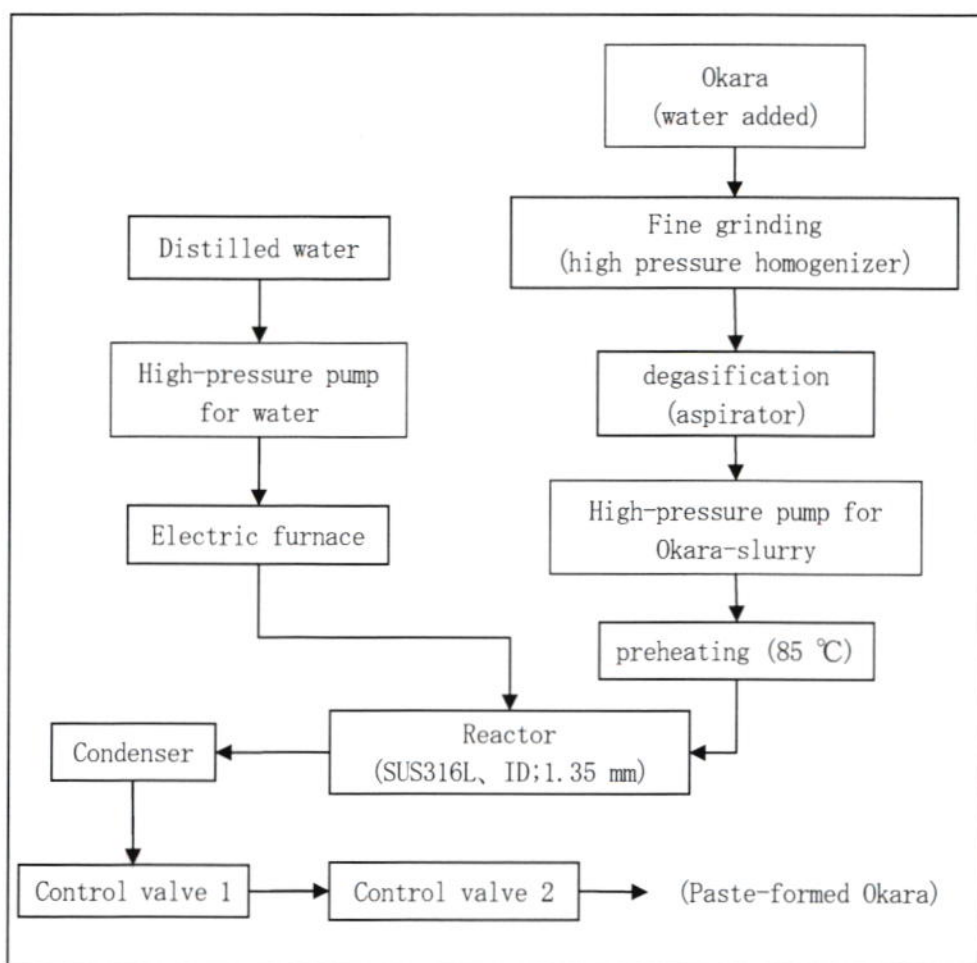


Figure 2 Schematic diagram of continuous flow-type reactor

(2) 原料大豆

石川県能美市辰口町産エンレイ大豆（中粒）を使用した。エンレイ大豆は北陸地域での作付面積が最も多く、2008 年度では国内における作付面積がフクユタカに次いで第2位の品種で国内では生産量が多く、豆腐、煮豆、味噌などに多く用いられている。エンレイ大豆を使用した豆腐は一般的に白色かつ硬さを得やすく凝固剤適量範囲が広い事が特徴である。

(3) オカラの調製と亜臨界水条件下による処理

14℃の水に 20 時間、大豆を浸漬し、豆乳製造プラント NS2000-S(株式会社高井製作所製)、豆乳とオカラの分離装置(シリウス；株式会社高井製作所製)を用いて

行った。オカラは、通常絹ごし豆腐製造に用いる糖度を測定する屈折計を用いた濃度測定で 12% brix に相当する豆乳調製時のものを用いた。また、通常豆腐製造時に添加する消泡剤は無添加として調製した (Figure 2)。

オカラは、約 1.5 倍加水後、高圧ホモジナイザー (Niro Soavi 社、NS2000L PONY 最大圧力 150MPa、処理能力 40 リットル/時) で 20 MPa で処理後、40 MPa で処理し、さらに 60 MPa で処理し、段階的に粉碎時の圧力を上げて微粉碎した。微粉碎後のスラリーをアスピレーターにて減圧脱気して、亜臨界水処理を行った (Figure 2)。また、亜臨界水処理を行わない微粉碎したオカラを未処理のオカラとした。

亜臨界水連続処理は前述の前処理を施したオカラスラリー、蒸留水をそれぞれ 10 ml/分、6 ml/分で高圧ポンプ (Figure 1、日本精密科学製パーソナルポンプ NP-AX-15) で圧送した。電気ヒーターで加熱された熱水とウォーターバス (Figure 1) にて約 85 °C に予備加熱した試料を連続的に混合し、亜臨界水条件下 (約 30MPa、220~340°C、約 2.7sec) で反応させた後、反応管出口で冷却水によって間接的に冷却し反応を停止させた。

反応温度は熱水炉温度を PID 制御によって所定温度に制御した。圧力は背圧制御弁 (テスコム社製) によって調整した。装置各部温度 6 点 (熱水用電気炉、熱水、予備加熱時の試料、熱水・試料混合時、冷却水、熱交換後) と圧力値を記録計でモニターした。

(4) オカラピューレの物性

以下にオカラピューレの物性と特徴について述べる。尚、低亜臨界は 220 °C 未満、中亜臨界は 220 °C 以上 300 °C 未満、高亜臨界 300 °C 以上 374 °C 未満を指す。

粘度は B 型粘度計 (東京科学計器製 B8L) で BL アダプタを使用し、室温で測定し、色調は色彩色差計 (ミノルタ CR-100)、粒度分布は粒度分布測定装置 (Horiba

製 LA-700) で分析したデータに基づく。

オカラピューレの粘度は低亜臨界における反応温度で極大を示し、亜臨界水温度が高くなるにつれて、低下する傾向がみられる。

オカラピューレの色調は中亜臨界条件では低亜臨界条件より b 値の増加(黄色移動)がみられ、a 値のわずかな低下がみられ、高亜臨界条件では L 値(明度)の低下、a 値の増加(赤色移動)がみられる。目視による観察では低亜臨界～中亜臨界にかけては乳白色で色調の変化は殆どみられず、高亜臨界以上の温度域では、黄土色～褐色へと色調の変化がみられる (Photo 1)。

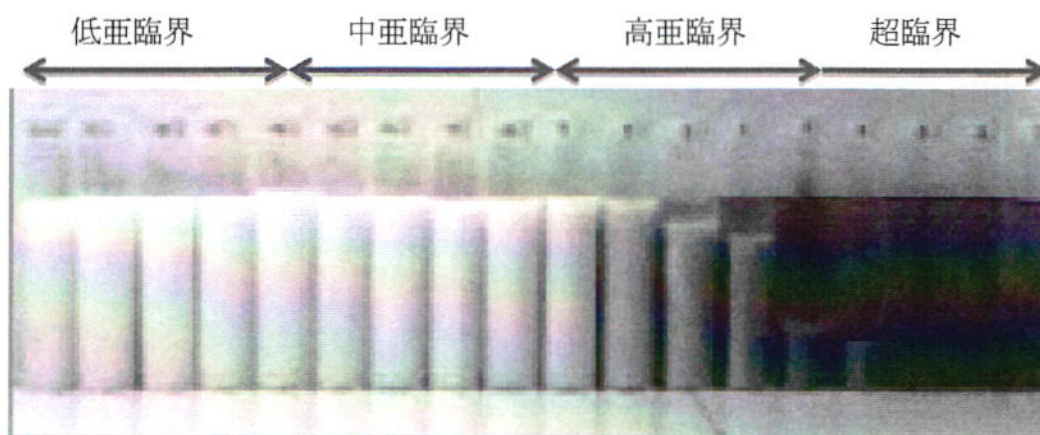


Photo 1. Changes of color tone in Okara-puree with temperature.

30 MPa, 200 °C~400 °C,

粘度は低亜臨界条件下で最大となり、亜臨界水温度が高くなるにつれて低下する傾向がみられる。

オカラピューレの粒度は亜臨界水処理後に低下するが、低亜臨界から中亜臨界条件では粒度にあまり変化がみられないが、中亜臨界水から超臨界水条件下では反応温度の上昇にしたがい粒度がさらに小さくなる傾向がみられる³⁾。また、亜臨界水処理後には、オカラ特有のざらつきは減少し、滑らかとなる³⁾。

第2章 亜臨界水処理後のオカラによる糖質消化酵素への影響と血糖値上昇抑制作用

2.1 緒言

ヒトは慢性的な高エネルギー摂取、運動不足などの生活を長期間にわたって続けることにより、脂肪の蓄積やそれに伴う糖尿病、脂質代謝異常、高血圧さらに動脈硬化や心疾患を招く危険性が増大する。これらは生活習慣病と称され、近年は若年者における発症もみられる。特に日本における糖尿病患者の90%以上を占める2型糖尿病は、食事やストレス、運動などの環境要因と遺伝的要因が相互に作用して発症するといわれており、膵臓のランゲルハンス島β細胞からのインスリン分泌低下や骨格筋、脂肪組織、肝臓におけるインスリン感受性の低下などの影響がみられる。

現在、機能性食品は「単なる栄養源としての働き以外の特別な医学的あるいは生理学的利点をもつような特定の成分を含んでいる食品」と認識されており、血糖値の上昇を抑制するものとして、でんぷんの消化遅延や糖質の吸収遅延などの作用機序をもつ成分を含んだ食品が市販されている。また、機能性成分によっては複数の機能性が認められているものもある。その中にはヒトの消化酵素では消化されない糖質、いわゆる食物繊維とよばれるものがある。大豆には、糖質が約30%含まれ、そのうちの50~60%はヒトの消化酵素では消化されない食物繊維である。大豆に含まれる糖質は主に可溶性の糖質と不溶性の多糖類に分類することができる。水に可溶性糖質としては単糖類がわずかに含まれているが、ショ糖が約5%、オリゴ糖ではラフィノース、スタキオースがそれぞれ約1%、4%含まれている。さらにベルバスコースが微量ではあるが含まれている¹⁷⁾。一方、大豆に含まれる多糖類はデンプンと細胞壁成分に含まれる食物繊維に大別される。デンプンはアミロースと

アミロペクチンからなる。細胞壁成分は、大豆を水に浸漬した後磨砕した後、または磨砕し加熱後に豆乳と不溶性の画分が分離されるが、不溶性画分がオカラである。オカラは大豆の外皮にあるセルロースが主要な成分であり、その他ガラクトマンナンが含まれている。子葉部ではセルロース、ヘミセルロース、ペクチン等が含まれている。亜臨界水処理後のオカラはペースト状であり、オカラに含まれる食物繊維は低分子化や可溶化がみられる。これらの分解反応において生成すると考えられるオリゴ糖などには、小腸におけるスクラーゼ阻害性を示したという報告がある¹⁸⁾。また、亜臨界水反応において温度が高くなるにつれ反応後のペースト状のオカラの色調が乳白色から褐色へと変化することから³⁾、亜臨界水反応の過程においてメイラード反応による生成物の蓄積が予想される。メイラード反応生成物は α および β -アミラーゼ、スクラーゼ、マルターゼなどを阻害することが知られている¹⁹⁾。また、メイラード反応生成物は難消化性高分子物質であり、食物繊維にも類似した作用を示すといわれている²⁰⁾。亜臨界水反応により、処理後のオカラに含まれる水溶性食物繊維は未処理のオカラに比べ3倍も増加したとの報告もある²¹⁾。水溶性食物繊維は食後の血糖値の急激な上昇を抑制する作用が知られており、本実験では亜臨界水処理後のオカラにおいて食後の血糖値上昇抑制作用や糖尿病抑制効果について検討した。

2.2 実験材料および実験方法

(1) 糖質消化酵素阻害性試験

(1)-1 スクラーゼ酵素液

ラットの小腸粘膜を0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.8) に懸濁し、ポリトロンホモジナイザーを用いてホモジナイズした。これを3,000 g、10分間遠心分離し、得られた上清を粗酵素液とした。

(1)-2 糖質消化酵素活性測定

反応液 (0.1 ml) は 100 mM リン酸緩衝液 (pH 6.5)、25 mM スクロース、蒸留水、未処理のオカラ、30 MPa で 220°C、260°C、300°C、340°C (いずれも反応時間約 2.7 秒) における亜臨界水反応後のオカラ上清液 (0.05ml) とした。これらを含む反応系で 37 °C、30 分反応させた。沸騰浴中で 3 分加熱により酵素反応を停止した。その後、遠心分離 (3000 g、5 分間) により得られた上澄み中のグルコース量を測定し活性を求めた。グルコースの定量は、食品グルコース測定キット (J. K. インターナショナル、HK-G6PDH 法) を用いた。

(2) 糖質負荷試験

(2)-1 実験動物および飼育条件

糖質負荷試験には、4 週齢の CDF1 雌性マウス (近交系間交配マウス、三共ラボ) を購入し、固形飼料 (Table 1) で 1 週間予備飼育した後、実験に用いた。

オカラピューレ長期投与による血糖値上昇抑制効果の検討では、OLETF (糖尿病自然発症) ラットを大塚製薬研究所より 6 週齢で購入し、1 週間予備飼育後に実験に用いた。

予備飼育期間中および試験期間中は、飼育室の室温 $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $60 \pm 10\%$ 、照明は、明暗サイクル 6:00~18:00 が点灯、18:00~翌 6:00 までが消灯とした。

Table 1. Composition experimental diets

Component		Experimental diet
Moisture	(%)	8.4
Crude protein	(%)	27.1
Crude fat	(%)	5.0
Crude fiber	(%)	3.5
Crude ash	(%)	7.6
Nitrogen Free Extract	(%)	48.4
Energy	(kcal)	347.2

(2)-2 マウスを用いた糖質負荷試験

予備飼育した5週齢のCDF1雌性マウス(体重約20g)を一晩絶食させ、翌朝9時に被験試料(オカラピューレ)0.2ml(10ml/kg)を胃内ゾンデ(胃内へ直接注入)にて投与した。対照には水道水を投与した。被験試料投与30分後にスクロースを2g/体重kg投与した(0.2g/mlを0.2ml)。被験試料投与後の血糖値への影響をみるため、採血は被験試料投与前、投与30分後、スクロース投与後30分ごとに120分まで尾静脈より行い血糖値を測定した。血糖値の測定には簡易血糖測定器アキュチェックアクティブ(許可番号14BY5011,三光純薬株式会社)を用いた。

(2)-3 被験試料による血糖値の変動

CDF1雌性マウスを一晩絶食させ、翌朝9時に220℃処理オカラピューレ(OPA)、320℃処理オカラピューレ(OPB)、340℃処理オカラピューレ(OPC)及び亜臨界水処理前段階である未処理のオカラ(OH60)を胃内ゾンデにて、それぞれ0.2ml(10ml/kg)投与した。OPA、OPB、OPC及びOH60投与後の血糖値への影響をみるため、

採血は投与前、投与から30分毎に120分後まで尾静脈より行い血糖値を測定した。

(2)-4 胃内ゾンデ及び尾静脈採血誘発ストレスによる血糖値の変動

CDF1 雌性マウスを一晩絶食させ、胃内ゾンデを30分間隔で2回行った。胃内ゾンデの血糖値への影響をみるため、採血は投与前、投与から30分毎に120分後まで尾静脈より行い血糖値を測定した。

(2)-5 被験試料のショ糖負荷血糖値への影響

CDF1 雌性マウス（体重約20g）を一晩絶食させ、翌朝9時に30 MPa、220°Cの条件下で処理したオカラピューレ（OPA）、30 MPa、340°C条件下で処理したオカラピューレ（OPC）及び60 MPa条件下で処理したオカラホモジナイズ（OH60）を胃内ゾンデにて、それぞれ0.2 ml（10 ml/kg）投与した。対照には水道水を投与した。OPA、OPC、OH60及び水道水投与30分後にスクロースを2g/体重kg投与した（0.2g/mlを0.2 ml）。OPA、OPC、OH60及び水道水投与後の血糖値への影響をみるため、採血は被験試料投与前、投与後30分毎に120分後まで尾静脈より行い血糖値を測定した。

(3) オカラピューレ長期投与による血糖値上昇抑制効果の検討

(3)-1 実験動物

OLETF（Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty Rat;糖尿病自然発症）ラットを大塚製薬研究所より6週齢で購入し、実験に用いた。予備飼育期間中および試験期間中は、飼育室の室温を $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $60 \pm 10\%$ 、照明は、明暗サイクル6:00~18:00が点灯、18:00~翌6:00までを消灯とした。

(3)-2 被験試料

コントロール群はオカラホモジナイズ (60 MPa) で固形分をオカラピューレと同様に調製した原液を 5 倍希釈して使用した。オカラピューレ群グループ 1 はオカラピューレ (亜臨界水 300°C、30 MPa) 原液を 5 倍希釈し、グループ 2 はオカラピューレ (亜臨界水 340°C、30 MPa) 原液を 5 倍希釈して使用した。オカラピューレの栄養分析結果から、30 MPa、300 °C の亜臨界水条件下で得られたオカラピューレは水溶性食物繊維の含有割合が多いことが確認された。水溶性食物繊維は粘性が高くこの性質により、消化管内での栄養素の移動が制限され、消化・吸収部位へ達することへの抑制につながると考えられている²²⁾が、由来の異なるペクチンを用いた空腸灌流試験でグルコースの拡散量を最も強く阻害したペクチンで血糖値上昇抑制効果が最も弱くなったとの報告もあり、血糖値上昇抑制効果は水溶性食物繊維の粘度だけでは説明できない部分もあると考えられる²³⁾。本実験では水溶性食物繊維の含有割合が最も高くなる条件 (グループ 1) と水溶性食物繊維の含有割合が最も低い条件 (グループ 2) のオカラピューレを用いた。

(3)-3 方法

実験群はそれぞれ、コントロール群、オカラピューレ群グループ 1、オカラピューレ群グループ 2 の 3 群とし、コントロール群は未処理のオカラの固形分をオカラピューレと同様になるよう調製した原液を 5 倍希釈して連日飲水摂取 (n=6)、オカラピューレ群グループ 1 はオカラピューレ原液を 5 倍希釈して連日飲水摂取 (n=6)、オカラピューレ群グループ 2 は 340 °C 処理したオカラピューレ原液を 5 倍希釈して連日飲水摂取 (n=6) を行った。

飲水は給水瓶にて自由に給水を行い、飲水量は一日一回確認してその都度追加投与とした。食餌は通常の固形飼料 (Table 1) を各実験群に等量与えた。

ヘモグロビン A1c (HbA1c : ヘモグロビン A にグルコースが結合したもの) はラテックス凝集濁法にて測定し、糖尿病の発症および重症度を評価した。採血は、実

験開始後 2-3 週間間隔で頸部皮膚切開し、頸静脈より直接採血を行った。

(4) 統計分析

糖質消化酵素阻害性については、コントロール群で測定されたグルコース量を示した場合をスクラーゼ活性 100%として、実験結果から得られたグルコースの相対量によってスクラーゼ活性を表して阻害性とした。

糖質負荷試験については、血糖値の経時変化を平均値±標準偏差で示した。また、各実験群間やコントロール群と実験群などの 2 群間の比較は等分散を仮定した Student-*t* 検定により分析した。

2.3 結果

(1) 糖質消化酵素阻害性

Figure 3 はスクラーゼ活性に及ぼすオカラピューレ抽出液の影響について示したものである。未処理のオカラ抽出液についても活性の阻害作用が認められた。また、処理温度の上昇に比例して活性の阻害作用が高くなる傾向となった。スクラーゼ活性の阻害作用は未処理のオカラと比較し、亜臨界水処理温度 220 °C では同じレベルで、亜臨界水処理温度が 260 °C を超えると処理温度に比例して活性の阻害作用は強くなる傾向が見られた。これらのことは、オカラ成分にもスクラーゼ活性を阻害する成分が含まれていることを示唆している。さらに、温度上昇に比例して活性の阻害作用が増大したことから、大豆イソフラボンのアグリコンやその代謝産物、生成したメラノイジン¹⁹⁾ などの生成量が増加することによって活性の阻害作用が強くなったことも考えられる。

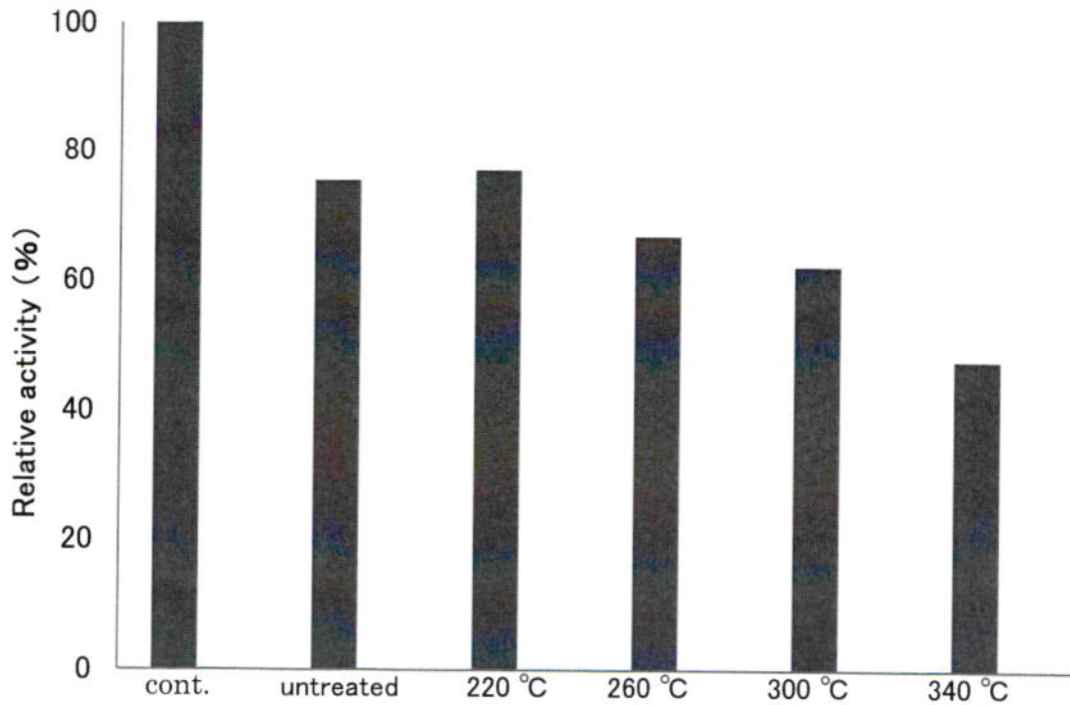


Figure 3. Effect of Okara-puree extraction liquor on sucrase activity

(2) 糖質負荷試験

スクロース投与試験の前に被験試料に含まれている糖質の影響を調べるために、オカラピューレ単独で投与した場合の血糖値の経時変化を調べた所、OPA で、他の条件のオカラピューレやコントロールと異なるパターンを示し、OPA に含まれる糖質が吸収されにくいパターンを示した(Figure 4)。この結果から、糖負荷試験に用いるオカラピューレをコントロールと比較的類似したパターンを示した OPC と他の試料とは異なるパターンを示した OPA の 2 種類とした。

糖負荷後の血糖値の経時変化を各群で比較すると、オカラピューレ投与群とコントロール、水を投与した群で、60 分、90 分後の血糖値ではオカラピューレ投与群の方が有意に低くなった (Figure 5)。

また、血糖値の経時変化から、吸収曲線下面積 (AUC) を比較するとオカラピューレ投与群がコントロールや水を投与した群に比べ有意に低くなった (Figure 6)。

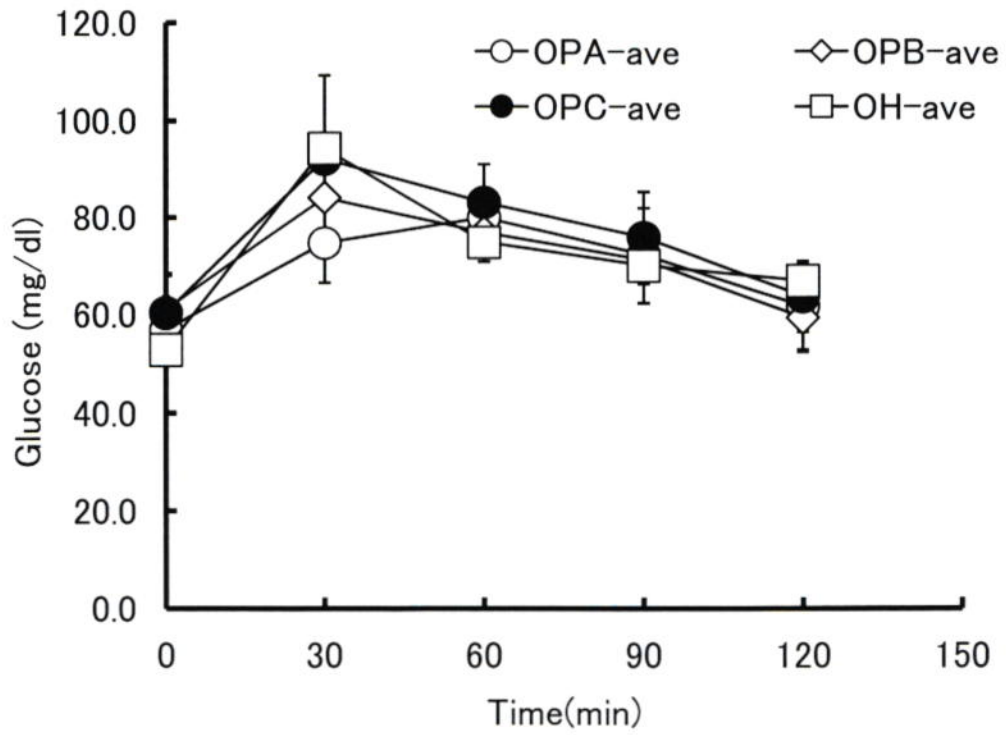


Figure 4. Changes in blood glucose concentration after the ingestion of only Okara puree

Values are the means \pm SD shown by vertical bars. Mean values were significantly different from those of OH group

*:Significantly different from OH at $P < 0.05$

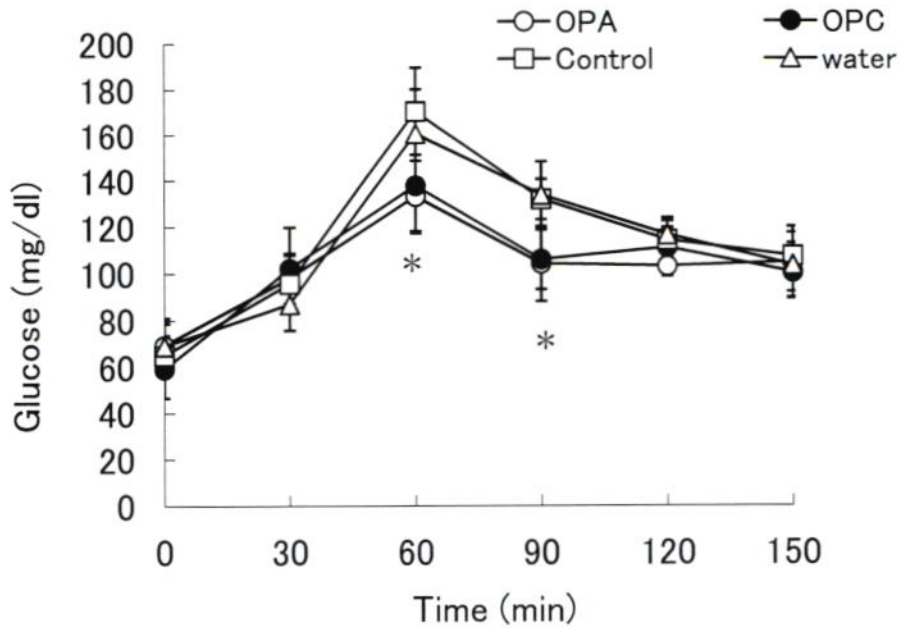


Figure 5. Changes in blood glucose concentration after the sugar injection. Fasting CDF1 mice were ingested OPA, OPC, OH60, water (control) each by 0.2 ml (10 ml/kg body weight) by sound. After 30 min by the test samples ingestion, the mice were ingested sucrose (2 g/kg body weight). The blood glucose concentration in the plasma was determined before, and every 30 minutes until 120 minutes after the sucrose ingestion. Values are the means with their SD shown by vertical bars.

*: Significantly different from OH60 and PC at $P < 0.05$

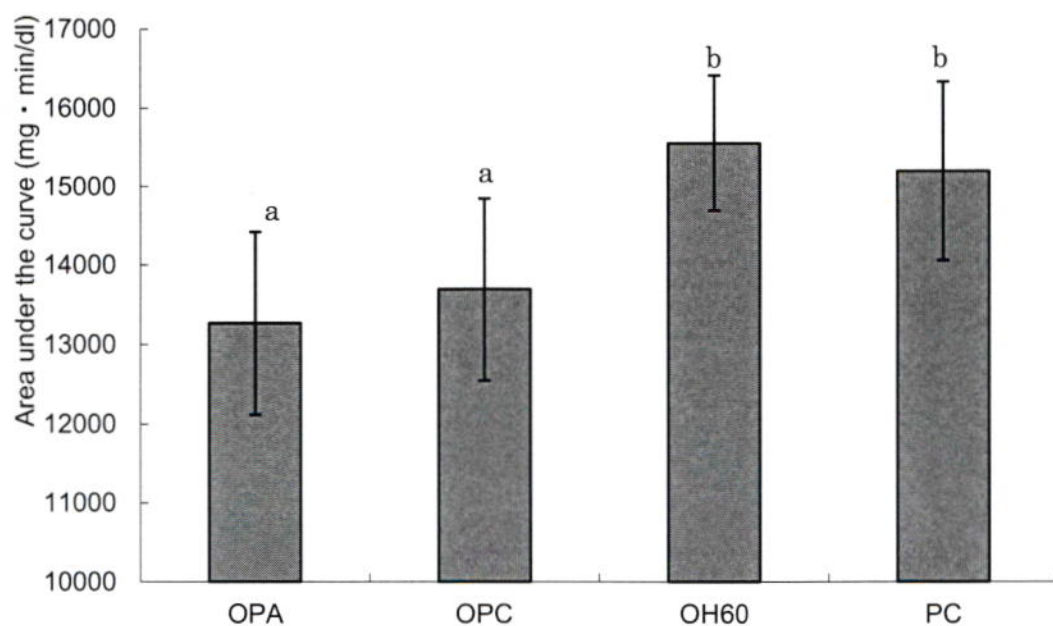


Figure 6 The area under absorption curve after sucrose loaded
 OH60: Control, PC: Water, The blood glucose concentration in the plasma was determined every 30 minutes until 120 minutes after the sucrose loaded. Values are the means with their SD shown by vertical bars. Values with unlike letters were significantly different ($P < 0.05$).

スクロース負荷後 30 分の血糖値と OPA, OPC, OH60 及び水道水投与後 30 分の血糖値の差で比較した場合, OH60 に対して OPA は 53.1%, OPC は 52.2%と顕著に減少した。水道水に対しても OPA で 52.5%, OPC で 51.6%とその減少は顕著であった。OH60 と水道水との比較において差はみられなかった。

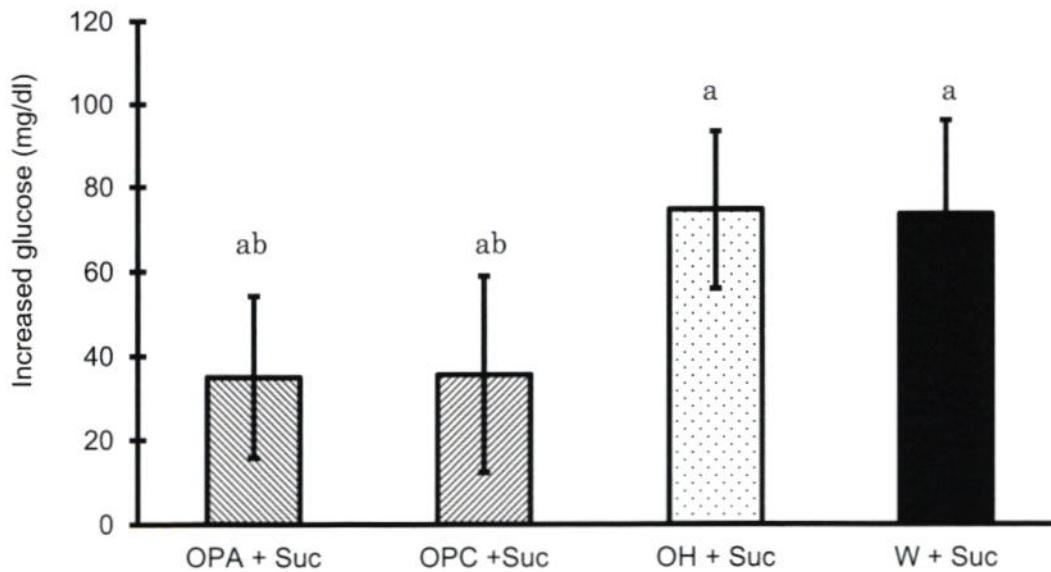


Figure 7. Okara-puree inhibits Sucrose-Induced glucose increase
Mice were loaded sucrose at 30 min after administration of Okara-puree.
Values were obtained from the blood glucose level from 30 min after sucrose loading. Values are the mean±SD shown by vertical bars. Values with unlike letters were significantly different ($P < 0.05$).

(3) オカラピューレ長期投与による血糖値上昇抑制効果

糖尿病自然発症ラットにオカラピューレを長期投与し、体重、HbA1c を測定した結果を Figure 8、9 に示す。

Figure 8 の Group 1 は 30MPa、300°C で処理したオカラピューレ投与群。Group 2 は 30MPa、340°C で処理したオカラピューレ投与群を示しているが、コントロール群に対し、Group 2 で体重が有意に大きくなる結果となった。これは、未処理のオカラに対し、糖質の含有量がオカラピューレ群で増加している栄養分析結果を反映する結果となった (Figure 10)。オカラピューレを添加した水の飲水量はどの群も同等であった。

糖尿病の病態では通常、体重増加が見られた後、病態の進行によって体重減少がみられることから、重度の糖尿病まではどの群においても進行していなかった。

HbA1c は4週から7週にかけてどの群も低下する傾向が見られた(Figure 9)。しかし、最終的に各群間において HbA1c の血中レベルに有意差は見られなかった。

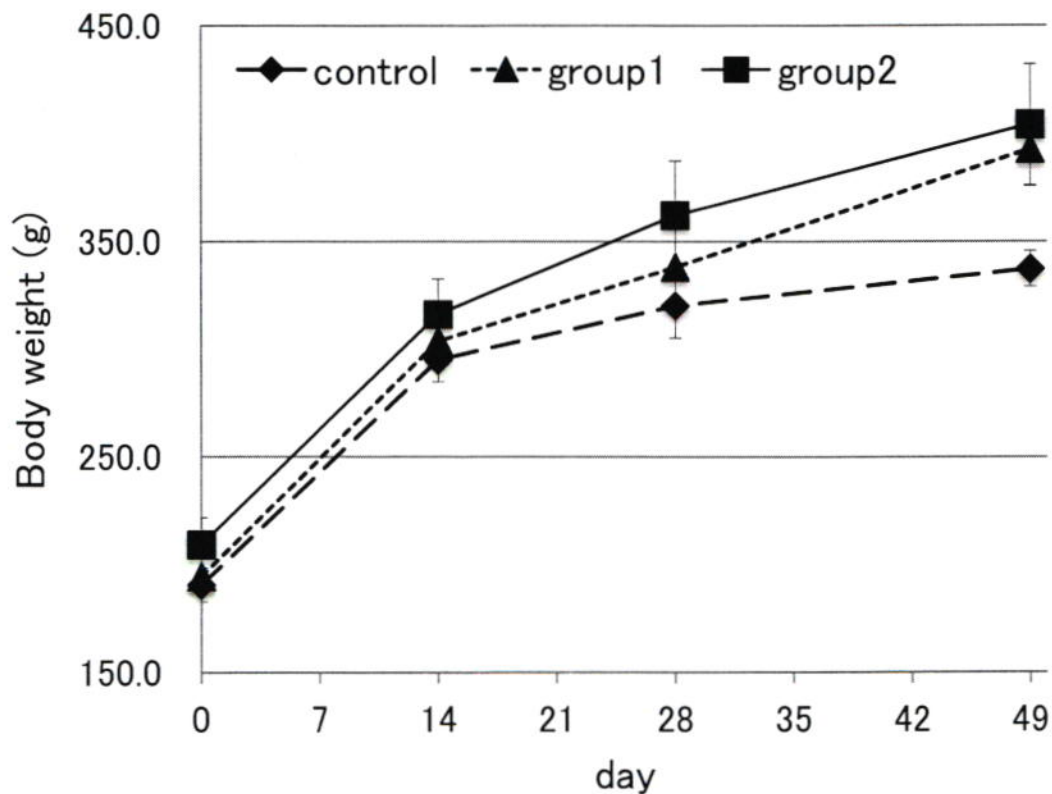


Figure 8. Changes of body weight of OLETF rat

The value showed means with SD shown by vertical bars.

*: Significantly different from control group at $p < 0.05$

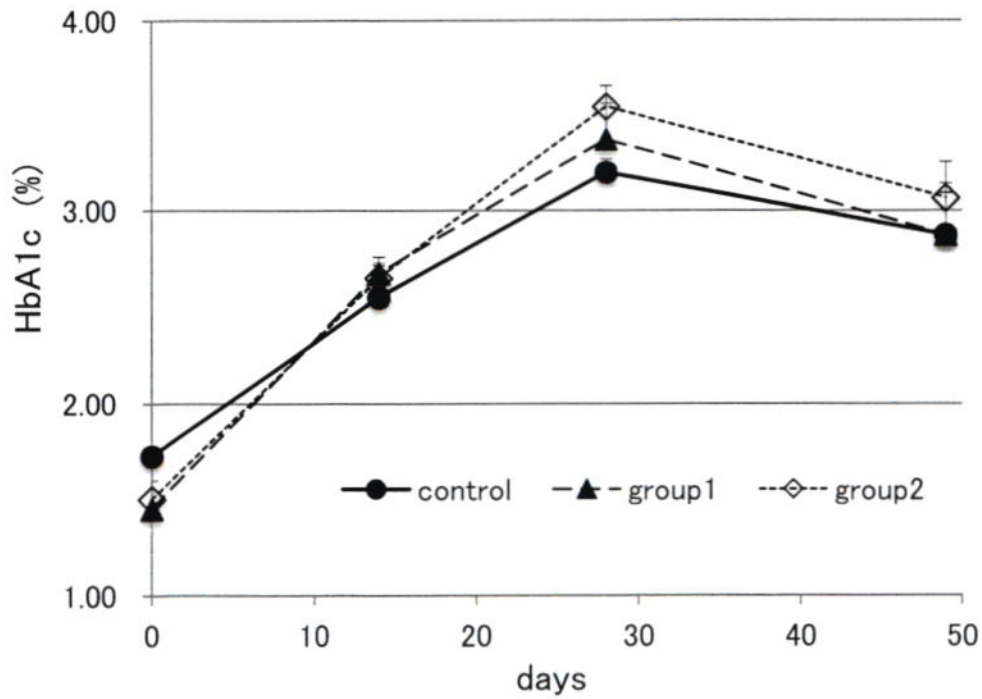


Figure 9. Changes HbA1c in OLETF rat

The value showed means with SD shown by vertical bars.

*: Significantly different from control group at $p < 0.05$

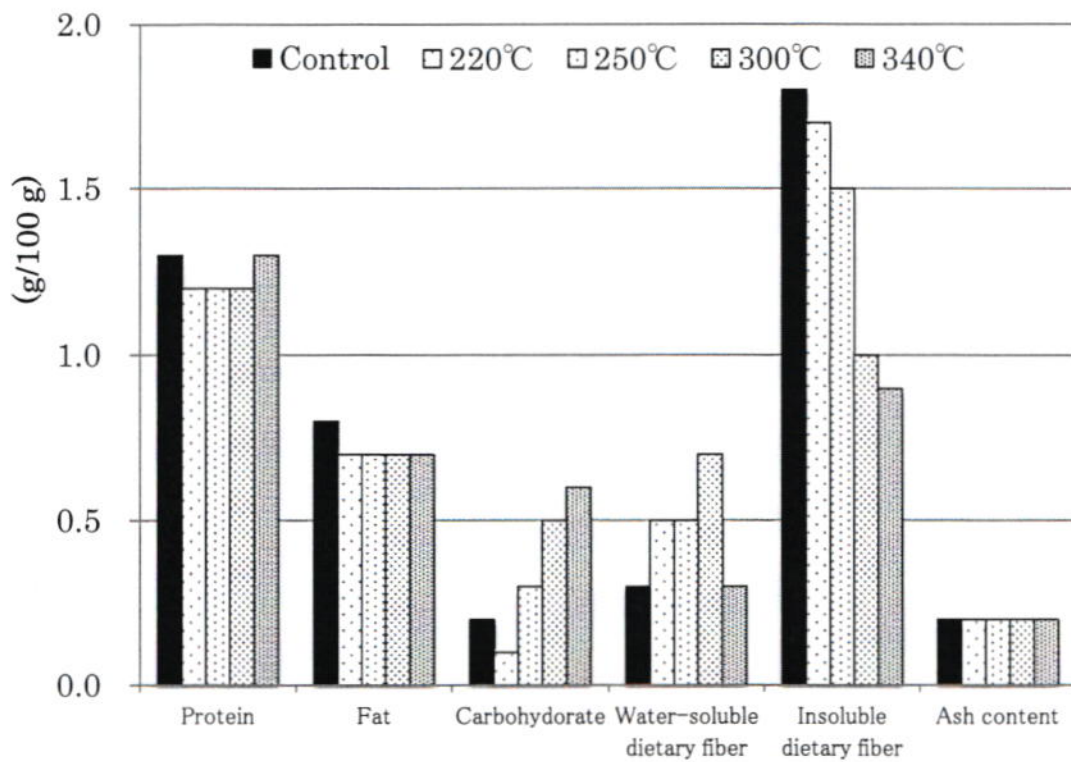


Figure 10. Nutritional information of Okara-puree

2.4 考察

オカラピューレ抽出液によるスクラーゼ活性阻害作用は、Figure 3に示すように亜臨界水処理温度上昇に比例して強くなる傾向がみられた。スクロースは小腸刷子縁膜上に局在するスクラーゼの作用により、グルコースとフルクトースに加水分解される。スクラーゼ活性を阻害することによってスクロースの消化・吸収が抑制される。スクラーゼ活性を阻害することにより、ラットにおいてスクロース多量摂取による内臓脂肪の蓄積や高脂血症が抑制され、さらに肝臓における脂肪酸合成が抑制されることが報告²⁴⁾されている。オカラピューレ長期投与試験においてラットの体重変化をみると実験開始第4週から7週にかけてオカラピューレ群の体重がコントロール群より有意に増加していることから、本実験で見られたスクラーゼ阻害作用は、通常の食事で抗肥満作用を示すレベルではなかった。しかし生体内では、食物摂取してから、多種多様な栄養素やpH、消化吸収・代謝、微生物などによる代謝といった酵素活性に対する影響因子は多いことから、本実験の *in vitro* における実験結果にみられたスクラーゼ活性阻害と *in vivo*における糖質消化酵素活性阻害作用については更なる検討が必要である。

スクラーゼ阻害作用は、大豆イソフラボン配糖体の代謝産物である 8-Hydroxydaidzein, 8-Hydroxygenistein などについての報告がある²⁵⁾。糖質消化酵素の活性阻害とメラノイジンとの関連については、褐色色素メラノイジンがトリプシン²⁶⁾および、ヒト唾液 α -アミラーゼ活性を阻害するといった報告²⁷⁾がある。一方、ブタ膵液 α -アミラーゼやブタ小腸 α -グルコシダーゼなどの酵素活性の阻害作用について、味噌の褐色度が低くなるほどその活性を阻害するといった報告もある²⁸⁾。メラノイジンは化学構造が非常に多岐にわたり、メラノイジンの生成反応条件により生成する褐色色素の成分において分子量や組成などが異なり、そのことが消化酵素の活性阻害に影響することが考えられている。

オカラピューレは亜臨界水処理温度が高くなるに比例して褐色の色調が濃くなることから、メラノイジンの生成が処理温度に比例して多くなることが考えられる。これまでの研究で、亜臨界水処理温度が高くなる程、グルコースの生成量が増加し、タンパク質も分解してペプチドやアミノ酸の生成量も増加することを示した³⁾。生成したグルコースとアミノ酸やペプチドがアミノカルボニル反応により褐色色素を生成した可能性が考えられる。本実験でみられた亜臨界水処理温度の上昇に比例して糖質消化酵素の活性阻害が強くなった結果については、メラノイジンを含む褐色色素や大豆イソフラボンの亜臨界水による反応生成物といった複数の因子による可能性が考えられる。これらのことから、生成したペプチドやアミノ酸と糖質の熱反応によって生成した褐変物質などが相乗的に働き、スクラーゼ活性の阻害作用が亜臨界水処理温度に比例して強くなったと思われる。

スクロース負荷試験の結果 (Figure 5~7) から 30 MPa、220°Cのオカラピューレに血糖値上昇抑制作用が期待される結果となった。糖質消化酵素活性の阻害作用 (Figure 3) における未処理のオカラと 30 MPa、220°Cで処理したオカラについて糖質消化酵素活性における阻害作用は差が見られなかったことから、本実験におけるスクロース負荷試験の結果は、糖質消化酵素活性の阻害作用ではなく糖質が小腸から吸収されにくくなった可能性が高いことを示しており、亜臨界水処理による水溶性食物繊維の増加やオカラピューレの粘性 (保水性) が影響していることも考えられる²⁹⁾。水溶性食物繊維の血糖値上昇抑制効果は多くの場合その粘度に比例し、その効果は、水溶性粘性物質による粘度上昇に伴って溶質としての消化酵素や基質である食物の拡散が抑えられることより結果として消化酵素の活性が抑制された状態となること^{30), 31)}や胃内滞留時間の遅延効果が示され^{32), 33)}、このことによって食後の急激な血糖値の上昇を抑え、インスリン分泌量の節約効果も期待できる³⁴⁾。

事実、摂取した食物の移動速度が抑制され、さらに水溶性食物繊維の持つ粘性によって食後血糖値上昇抑制効果を示すことが報告されている^{35), 36)}。この粘度はペクチン質や不溶性食物繊維等の高分子成分の高次構造変化や部分分解によるものと考えられた(Figure 10)。

糖尿病自然発症ラットを用いたオカラピューレ長期投与試験においては、全ての群において実験開始後4週から7週の間でHbA1cの血中レベルが低下する傾向が見られたが、実験最終日において各群間における有意差は見られなかった。このことは、未処理のオカラやオカラピューレに含まれる食物繊維の影響が考えられる。また、枯草菌を用いて発酵させた大豆より抽出されたイソフラボンのアグリコンは脂肪細胞におけるインスリンの刺激によるGLUT4(グルコーストランスポーター)の細胞膜への移行を促進し、ダイゼインはインスリンによるグルコースの取り込みをより増加させることが報告されている³⁷⁾。このことから、大豆イソフラボンによる影響の可能性も考えられる。

Gicacco ら³⁸⁾は、低GI、高食物繊維食を摂取した群は低食物繊維食群のヒトに比べて平均日中血糖値、HbA1cを低下させ、さらには低血糖発作の回数も減少させることを報告している。本実験の結果、HbA1cレベルの低下傾向が見られたが、体重の測定結果から、抗肥満作用は実験群においてみられなかった。本実験に用いたオカラピューレは糖質消化酵素活性阻害作用が未処理のオカラより強い作用を示したものを選択して行ったが、それらの酵素活性阻害作用では抗肥満作用や有意なHbA1cの血中レベルの低下作用や抗肥満作用などは認められなかった。

以上の結果から、オカラピューレは亜臨界水処理温度が高くなるに連れて糖質消化酵素の活性阻害作用が強くなるものの、動物実験において抗肥満作用について明確にすることは出来なかった。糖尿病の血糖値コントロール状態の指標として用いられるHbA1cは、全ての群において実験開始4週以降で低下傾向が見られたものの

各群間における有意差は見られず、HbA1cの低下傾向は未処理のオカラやオカラピューレに含まれる食物繊維や大豆イソフラボンによる影響の可能性が考えられる。300℃以上の亜臨界水処理温度で得られたオカラピューレにおいては未処理のオカラと比較し、糖質消化酵素活性阻害作用はみられるものの抗肥満作用や血糖値コントロールについては本実験の結果から有効性は示されなかった。オカラピューレの投与量や投与方法の検討が今後の課題である。

一方、亜臨界水処理温度が220℃と比較的低温で処理されたオカラピューレについては、食後の血糖値上昇抑制効果が期待できる結果となった。食後の血糖値上昇を抑制できれば、インスリンの血中レベルを抑える効果が期待できる。高血糖は糖毒性や慢性的な酸化ストレスにより膵臓のインスリン分泌細胞であるβ細胞に対して傷害的に作用する。また、血糖値を下げるためにβ細胞からのインスリンの分泌を促進し高インスリン血症を招く。このような過度のインスリン分泌刺激が継続されるとβ細胞は疲弊してしまい、血糖値のコントロールが破綻してしまう。インスリンにはこの他、脂肪細胞の増殖や肥大、脂肪合成促進も知られており、抗インスリン血症は肥満への影響も懸念されている。このように食後の血糖値上昇を抑え、コントロールすることは糖尿病やその合併症の発症を予防する上でも重要であり、30 MPa, 220℃で処理されたオカラピューレには食後血糖上昇を抑制することで、糖尿病や肥満を予防する効果が期待される。

第3章 亜臨界水処理後のオカラにおけるアンジオテンシン変換酵素活性の阻害作用と血圧調節作用

3.1 緒言

血圧の調整は、主に心拍出量と末梢血管抵抗によって支配されており、血管抵抗の増大や心拍出量の増大は、血圧上昇を招くと考えられる。このうち血管抵抗の増

大の要因としては、血管収縮、動脈硬化、血液粘性の増大などが挙げられる。この内、血管収縮については交感神経の緊張や副腎髄質ホルモン、或はレニン・アンギオテンシン系の活性化などの原因がわかっている。レニン・アンギオテンシン系およびアルドステロン系は、生体の血圧および体液量の調節において重要な働きを果たしている。腎臓から分泌されるレニンは血漿グロブリンに含まれるアンギオテンシノーゲンをアンギオテンシン I にし、アンギオテンシン変換酵素 (Angiotensin converting enzyme; ACE) によってアンギオテンシン I がアンギオテンシン II に変換される。アンギオテンシン II は血管平滑筋を収縮させることによって末梢血管抵抗を増大させ、血圧上昇をきたす。このため、アンギオテンシン変換酵素阻害剤が強力な降圧剤として臨床に応用されている。レニン・アンギオテンシン系の遮断には、レニン阻害薬、ACE 阻害薬およびアンギオテンシン II 受容体拮抗薬などがある。このうち ACE 阻害薬はアンギオテンシン II 産生低下により血管収縮性を弱め、腎臓における近位尿細管におけるナトリウム再吸収の低下、さらに副腎皮質ホルモンであるアルドステロンの分泌低下による腎臓の集合管におけるナトリウム再吸収の低下に伴う体液量増加を抑制するなどの作用によって降圧作用を示す。また、ACE 阻害薬によるキナーゼ II の阻害作用によってキニン代謝が阻害され、キニン増加とカリクレイン・キニン・プロスタグランジン系の活性化を導き降圧作用を示す。

高血圧が持続することにより様々な二次障害を引き起こすことがわかっている。主な二次障害には心臓負荷の増大による心室肥大や心室拡張とともに結合組織の増加、末梢血管抵抗の増大などにより冠状動脈の硬化を促進して心不全、狭心症、心筋梗塞などのリスクが増大する。また、末梢血管負荷の増大により、血管平滑筋肥大から血管抵抗が増大し高血圧がさらに悪化する。腎臓血管障害を引き起こし、腎機能にも障害を及ぼす。したがって血圧を適切な値にコントロールすることは重要である。しかし、ACE 阻害薬の副作用には骨髄抑制、血球減少、皮疹、腎障害、

肝障害、顔面浮腫、低血圧などがあり注意が必要である。これらのことから副作用のない食品（食生活）によって高血圧を予防し、長期にわたり血圧をコントロールすることができれば有意義である。

ACE 活性阻害を持つ成分は多数の食品に存在することが明らかになっている³⁹⁾。なかでもイワシ由来ペプチド⁴⁰⁾、鯉節由来ペプチド⁴¹⁾、乳タンパク質由来ペプチド⁴²⁾などは、特定保健用食品の成分として用いられている。また、大豆についても ACE 活性阻害性を有する報告がある⁴³⁾。亜臨界水処理後のオカラにも大豆由来の ACE 活性阻害性成分を有する可能性が考えられ、亜臨界水処理後のオカラについて ACE 活性阻害作用や長期投与による血圧上昇抑制作用についての検討を行った。

3.2 実験材料および実験方法

(1) アンジオテンシン変換酵素活性阻害性の検討

(1)-1 アンジオテンシン変換酵素 (ACE) と基質の調製

ACE (ACE 0.25 unit) を 10 ml の pH 8.5 リン酸緩衝液で溶かし、酵素液とした。ヒプリル-ヒスチジル-ロイシン 4 水和物 11.8 mg を 10 ml の pH 8.5 リン酸緩衝液で溶かし、2.35 mM の基質を調製した。

(1)-2 サンプル抽出液の調製

遠沈管にオカラピューレを 0.25 ml 入れ、pH 8.5 リン酸緩衝液を 10 ml 加えて、振盪抽出した。抽出したサンプルを、メンブランフィルター(孔径 0.45 μm 、ミリポア社製)で約 2 ml 濾過した。メンブランフィルターにて濾過した抽出液を 1/5、1/10、1/20 にそれぞれ、pH 8.5 リン酸緩衝液で希釈した。

(1)-3 酵素活性阻害性の測定

測定試料に 50 μl の基質を加えた。また、pH 8.5 リン酸緩衝液を、コントロールに 100 μl 、サンプルブランクに 200 μl 、コントロールブランクに 300 μl を

加えた。

希釈調製済みの抽出液を、サンプルとサンプルブランクにそれぞれ 100 μ l ずつ加え、よく攪拌した。37°Cで、5 分間プレインキュベートし、30 秒おきにブランク以外に ACE を 200 μ l 加えた。それぞれ 60 分間反応後、3 %メタリン酸ナトリウム溶液を 100 μ l 加えて反応を停止した。反応停止後、生成した馬尿酸を HPLC にて定量した。ACE 活性を 50%阻害する被検試料を IC₅₀ として阻害活性を表した。

(1)-4 HPLC 条件

HPLC、LC-10ADVP (島津製作所製)、カラム STR ODS (4.6×250mm, SHINWA CHEMICAL)、移動相 A 0.01M potassium phosphate 緩衝液 (pH2.8)、B 100% acetonitrile A:B=80:20、流速 1.0 ml/分、カラム温度 40°C、検出波長 226 nm で測定した。

(2) オカラピューレ長期投与による血圧上昇抑制効果の検討

(2)-1 実験動物

高血圧自然発症ラット (SHR) を用い、一週間予備飼育した後、生後 6 週齢より観察を開始した。予備飼育期間中および試験期間中は、飼育室の室温を 22±1°C、湿度 60±10 %、照明は、明暗サイクル 7:00~19:00 が点灯、19:00~翌 7:00 までを消灯とした。Table 2 に示した乾燥餌で予備飼育期間と実験期間飼育した。

Table 2. Composition experimental diets

Component		Experimental diet
Moisture	(%)	8.4
Crude protein	(%)	27.1
Crude fat	(%)	5.0
Crude fiber	(%)	3.5
Crude ash	(%)	7.6
Nitrogen Free Extract	(%)	48.4
Energy	(kcal)	347.2

(2)-2 被験試料および測定方法

コントロールはオカラホモジナイズ原液(60 MPa、固形分をオカラピューレと同様に調製した)を5倍希釈して連日飲水摂取した(n=6)。Group 1はオカラピューレ(亜臨界水 220 °C、30 MPa)原液を5倍希釈して連日飲水摂取させた(n=6)。Group 2は、オカラピューレ(亜臨界水 290°C、30MPa)原液を5倍希釈して連日飲水摂取させた(n=6)。すなわち、オカラピューレ固形分約1%水を連日飲水摂取させた。いずれも摂取開始後8週間継続観察し、血圧測定は投与前、および飲水開始後2週間間隔で尻尾を用いて体血圧を測定した。測定装置は、ソフトラン (softron) 非観血的自動血圧測定器 BP-98A を用いた。

(3) 統計分析

ACE活性阻害作用はACE活性を50%阻害するオカラピューレ抽出液の量で示した。オカラピューレ長期投与による血圧上昇抑制試験については、実験期間における収縮期血圧、拡張期血圧、体重、心拍数をそれぞれの群において平均値±標準誤

差で示した。得られた結果における実験群間の比較は Student-t 検定により解析した。なお、有意水準は危険率 5 %以下とした。

3.3 結果

(1) アンジオテンシン変換酵素活性阻害性の検討

オカラピューレの ACE 活性阻害作用について Figure 11 に IC_{50} で示した。実験の結果、未処理のオカラには ACE 活性阻害作用は認められなかったが、オカラピューレではいずれも、ACE 活性阻害作用は認められた。Figure 11 に見られるように IC_{50} は、亜臨界水処理温度に比例して減少し、オカラピューレの ACE 活性阻害作用は亜臨界水処理温度に比例して上昇したことが認められた。本実験で認められた ACE 活性阻害作用は、亜臨界水処理によって大豆タンパク質が分解されたことによって生じた ACE 活性阻害作用を有するペプチドまたは、セルロース等の多糖類の分解物とタンパク質分解物の反応により生じた褐変物質（メイラード反応生成物）などによる可能性も考えられる。

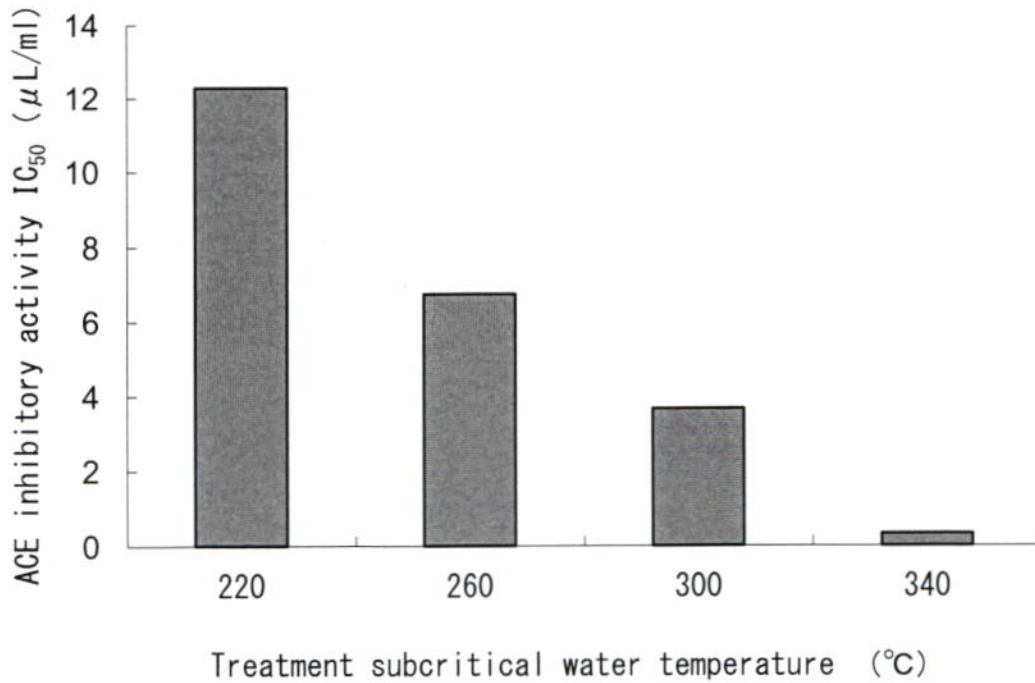


Figure 11. ACE inhibitory activities of subcritical water-treated Okara
The amount of sample needed to inhibit 50 % of ACE activity (IC₅₀ value)

(2) オカラピューレ長期投与による血圧上昇抑制効果

SHR に 8 週間にわたり、オカラピューレを投与し、収縮期血圧と拡張期血圧、体重、心拍数を測定した結果をそれぞれ Figure 12~15 に示した。尚、オカラピューレは一匹当たり、オカラピューレ原液を 5 倍希釈した試料（オカラピューレ固形分約 1%）を平均して約 10 ml/日摂取していた。

8 週間にわたるオカラピューレ長期投与における収縮期血圧の変化は、すべての群において実験開始から 6 週までは、血圧の上昇傾向が見られた。その後、6 週から 8 週においては、すべての群で収縮期血圧は低下する傾向が見られた。6 週から 8 週にかけての拡張期血圧の低下は、control 群で -6.03 mmHg, group 1 で -13.83 mmHg, group 2 で -18.34 mmHg となり、オカラピューレ群で収縮期血圧の低下が大きくなる傾向がみられた。8 週の収縮期血圧も有意差はみられなかったが、control 群の 178.80 mmHg に対し group 2 では、173.33 mmHg と低くなった。一方、拡張期

血圧も収縮期血圧と同様に、6週から8週にかけて低下する傾向がみられたが、拡張期血圧の低下は、control 群で-22.03 mmHg, group 1で-7.5 mmHg, group 2で-25.33 mmHg となり、血圧低下は group 1で他の群に比べ小さくなり、control 群と group 2で血圧の低下割合は同様な傾向を示した。また、8週における拡張期血圧の値は control 群で 127.80 mmHg, group 2で 127.00 mmHg と同レベルであった。血圧測定における各群間の有意差はいずれも認められなかった。また、control 群だけが、収縮期血圧と拡張期血圧の両方において、2週から3週にかけて血圧が一旦低下する傾向がみられた。

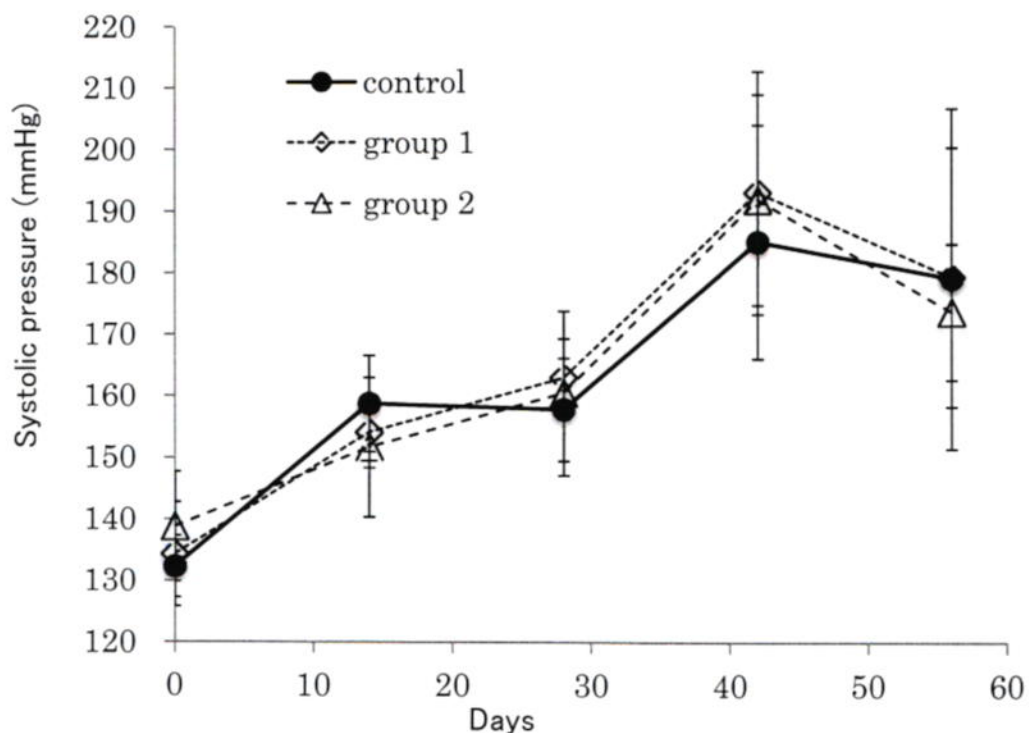


Figure 12. Changes of systolic pressure in SHR with feeding experimental diet Each point indicates the mean and vertical bars represent S.E.M.

*: Significantly different from control group at $p < 0.05$

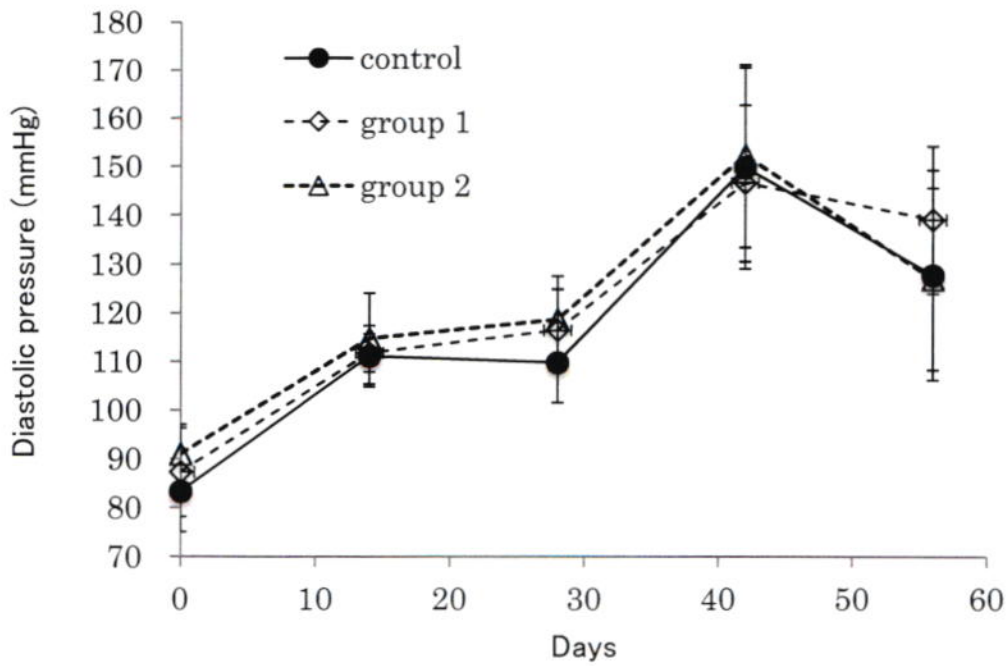


Figure 13. Changes of diastolic pressure in SHR with feeding experimental diet
Each point indicates the mean and vertical bars represent S. E. M.

*: Significantly different from control group at $p < 0.05$

Figure 14 に示した SHR の体重変化は全ての群で同様な増加傾向を示し、各群間における有意差はみられなかった。

Figure 15 に示した SHR の心拍数の変化において、各群間における有意差はみられなかったが、control 群では6週から8週にかけて大きく増加する傾向がみられ、group 1、group 2 とは異なるパターンを示した。

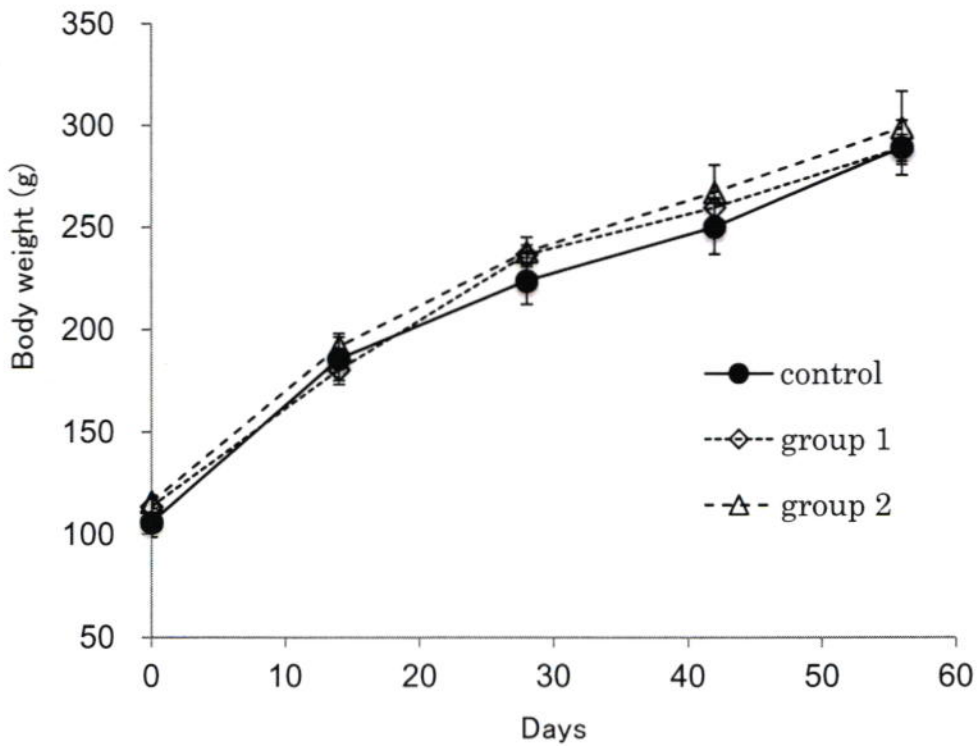


Figure 14. Changes of body weight in SHR with feeding experimental diet
 Each point indicates the mean and vertical bars represent S.E.M.
 *: Significantly different from control group at $p < 0.05$

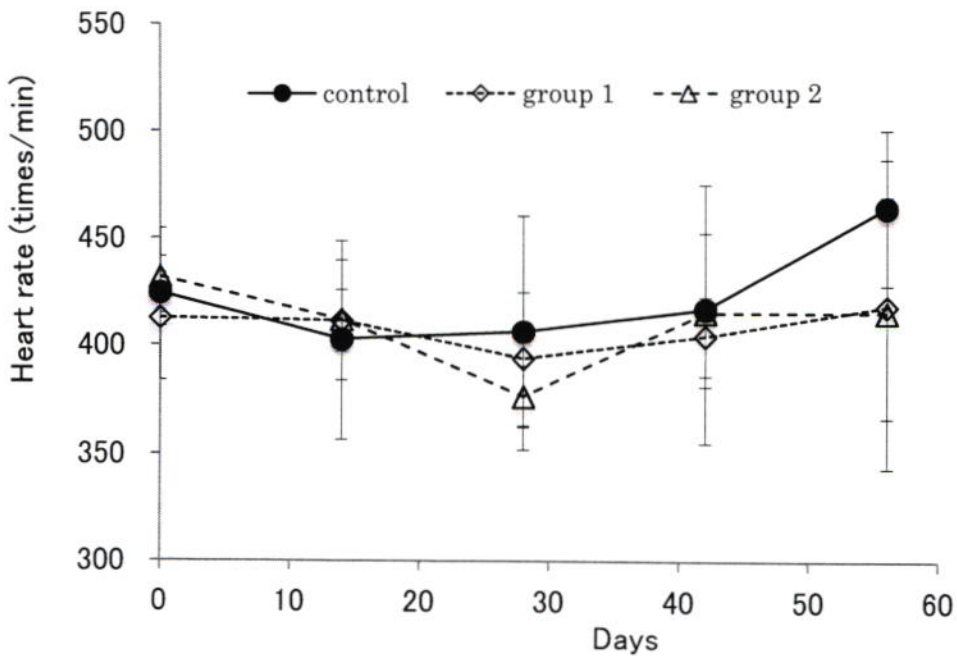


Figure 15. Changes of heart rate in SHR with feeding experimental diet
 Each point indicates the mean and vertical bars represent SEM
 *: Significantly different from control group at $p < 0.05$

3.4 考 察

アンジオテンシン変換酵素 (Angiotensin converting enzyme; ACE) は、アンジオテンシン I から強力な血圧上昇作用を有するアンジオテンシン II への変換を司る酵素であり、血圧調節の重要な生体因子の一つであり、ACE 活性を阻害する物質は高血圧に対する治療薬剤として臨床応用されている^{44),45)}。

アンジオテンシン変換酵素 (ACE) の活性阻害性は、未処理のオカラではみられず、亜臨界水処理温度が高くなるに比例して強くなる傾向が見られた (Figure 11)。大豆には、大豆タンパク質由来の ACE 活性阻害性を有するペプチドが報告されているが⁴⁶⁾、ACE 活性阻害性が、亜臨界水による処理温度が高くなるに連れて強くなる傾向がみられた結果については、亜臨界水処理による可溶化、低分子化をもたらす分解反応によって、オカラに含まれる大豆タンパク質から ACE 活性阻害性を有するペプチドが生成された可能性が考えられる。ACE 活性阻害性を有する大豆タンパク質由来ペプチドに関しては、トリペプチド (Leu-Lys-Tyr, Val-Ala-Trp) などが報告されている⁴⁷⁾。これらの ACE 活性阻害性をもつペプチドは低分子であり、総ペプチド量は亜臨界水処理温度が高いほど増加することを平成 11 年度フードシステム連携強化・循環推進技術確立事業において示した³⁾。このことから、ACE 活性阻害性は亜臨界水処理温度が高くなるにつれて強く³⁾なった本実験結果は、オカラに残存していた大豆タンパク質が亜臨界水処理により分解して生成したと考えられる低分子のペプチドなどによる可能性が推察される。

また、大豆にはニコチアナミンと呼ばれる ACE 活性阻害性を示すタンパク質非構成アミノ酸が含まれている。ニコチアナミンは多くの植物に含まれているが、植物の細胞においてニコチアナミンは金属イオンとキレートを形成し、細胞内における鉄の移動や代謝に重要である⁴⁸⁾。ニコチアナミンは生大豆や水に浸漬した大豆に比べ、121 °C、30 分間蒸煮した場合において ACE 活性の阻害性が低下しているこ

とが報告されている⁴⁹⁾。また、ニコチアミンは、タンパク質非構成アミノ酸であり、亜臨界水処理による分解反応によって増加することは考えにくい。このことから本実験で示された亜臨界水処理温度が高くなるにつれて ACE 活性阻害性が強くなった結果は、亜臨界水処理によって低分子化された大豆たんぱく質由来のペプチドの作用による可能性が高いと考えられる。

in vitro で ACE 活性阻害性を示したオカラピューレを高血圧自然発症ラットに長期間投与した実験の結果、実験開始 6 週から 8 週にかけて、全ての実験群で収縮期血圧、拡張期血圧ともに低下する傾向がみられた。しかし、それぞれの実験群間において収縮期血圧および拡張期血圧の変化には有意差がみられなかった (Figure 12, 13)。ACE 活性阻害性を有するペプチドを生体に長期投与した報告では、投与後一貫して徐々に血圧が低下し続けることが報告されているが⁴⁷⁾、動物 (SHR) 試験において同様の血圧上昇抑制効果は認められなかった。また、未処理のオカラとオカラピューレを投与した群で血圧は同様な経時変化を示したことから、オカラピューレが *in vitro* で示した ACE 活性阻害性を *in vivo* では示すことはできなかった。本実験と同様に *in vitro* で ACE 活性阻害を示すペプチドであっても経口投与で血圧低下を示すとは限らない場合もある⁵⁰⁾。これらの結果は消化吸収による ACE 阻害性ペプチドの消化分解や体内における安定性が問題となると考えられる。さらにオカラピューレが示した ACE 活性阻害性物質の解明とそれらの物質の体内における濃度の検討も今後の課題といえる。

オカラピューレには、前述のとおり食後血糖値の上昇抑制効果がみられたが、このことは、食後血中インスリン濃度の上昇を抑制することが期待できる。インスリン抵抗性や高インスリン血症が将来的に高血圧症を発症するリスクが大きい可能性があるとしており⁵¹⁾、食後血糖値の上昇を抑制することは、糖尿病の予防のみならず、高血圧症の予防においても意義があると考えられる。SHR を用いた本実

験ではオカラピューレ投与による血圧上昇抑制効果を示すことはできなかったが、インスリン抵抗性や高インスリン血症のリスクを抑え、高血圧症の発症を予防する観点からオカラピューレの有効性が考えられる。

オカラピューレに含まれる ACE 活性阻害性成分については、大豆加工品の抽出液を脱イオン水で透析した場合、内液で ACE 活性阻害性が低下することから、ACE 活性阻害性を示す物質は透析性の低分子であることが報告されている⁵²⁾。このことから、本実験で亜臨界水温度が高くなるに連れて ACE 活性阻害性が強くなった結果は、亜臨界水反応による分解反応によってオカラ成分が低分子の物質へと変化した結果、それらの中に ACE 阻害性を示す物質が生成した可能性が考えられる。

第4章 亜臨界水処理後のオカラの抗酸化作用の検討

4.1 緒言

大豆やその加工食品の生体調節機能をもった成分（機能性成分）には、抗酸化性やがんのリスクを低減するものなども知られている^{53)~56)}。抗酸化性機能を有する物質は、酸化ストレスから生体を保護する作用があり、スーパーオキシドやヒドロキシラジカルの消去活性、一重項酸素を補足する能力を有している。

活性酸素やフリーラジカルは好中球やマクロファージによる病原性微生物の殺菌に重要な役割を果たしている。一方、これらの活性酸素やフリーラジカルによる酸化的ストレスは、低密度リポタンパク質（LDL）の酸化による動脈硬化発症のリスクや炎症、老化、発がんなどの様々な疾病に関わっていると考えられている⁵⁷⁾。また、酸化ストレスによって食品成分、特に脂肪酸から生成される過酸化物が、食品の栄養価を低下させ、風味の悪化を招き、品質を劣化させる。よって加工食品には抗酸化性を有する食品添加物が利用されている。また、食生活において抗酸化性機能を有する成分を日常的に摂取することは、体内で生成した過剰な活性

酸素やフリーラジカルを消去し、疾病のリスクを低減するうえで重要と考えられる。

抗酸化性機能を有する大豆の機能性成分には、サポニンやフラボノイド、トコフェロールなどが知られている。また、活性酸素との反応基を比較的多く有するタンパク質やペプチドは抗酸化性物質として作用すると考えられている。さらに、味噌や醤油などの製造過程においてアミノ酸やペプチドなどのアミノ基とグルコースといった糖のカルボニル基とのメイラード反応によって多種多様なメイラード反応生成物（メラノイジン）が生成される。メイラード反応生成物には、抗酸化作用を有するものがあることが明らかになっている^{58),59)}。大豆加工食品の副産物であるオカラには大豆の栄養成分などが残存しているが、亜臨界水条件下では高温であることから、オカラに残存しているタンパク質や多糖類などが亜臨界水による分解反応によって低分子化されると同時にアミノカルボニル反応（メイラード反応）が起こっていることが考えられる。このことについて著者は食品副産物の高温高压水を用いた植物残さの有効利用技術の開発の研究において温度が高くなるほど反応後のオカラは乳白色から褐色へと変化することを示した³⁾。

これらのことから、亜臨界水反応後のオカラには未処理のオカラに比較し抗酸化性に違いがみられることが予想される。そこで亜臨界水温度を変化させて得られた亜臨界水反応後のオカラにおける抗酸化性について検討した。

4.2 実験材料および実験方法

(1) DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)ラジカル消去能の測定

実験に用いたオカラピューレの反応条件は、30 MPa, 220 °C、260°C、300 °C、340 °Cの4種類の亜臨界水条件で、反応時間は約2.7 secとした。

抗酸化性は1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)を用いた須田らの方法⁶⁰⁾に

準じて測定した。まず、メンブランフィルター(孔径 0.45 μm 、ミリポア社製)でオカラピューレ希釈液を濾し、濾液を 1 ml とり、80 %エタノールを 1 ml 加えた。さらに MES(2-morpholinoethanesulphonic acid) buffer (pH 6.0) を 1 ml 加え、さらに 100 %エタノールを 1.7 ml 加えた。次に蒸留水を 0.3 ml 加え、よく混合し、測定用試料とした。

次に、3.94 mg の DPPH を 100 ml 三角フラスコにいれ、50 ml の 100 %エタノールを加え、パラフィルムにて三角フラスコを密閉してさらに、三角フラスコ全体をアルミホイルで覆った。スターラーにて約 60 分攪拌した後、200 μM の DPPH 溶液として実験に用いた。

吸光度は、測定用試料を DPPH 溶液に添加し、2 分後に 520nm で測定した。なお、抗酸化活性(ラジカル消去能)は、吸光度を 50 %退色させる濃度 (IC_{50}) を没食子酸相当量として示した。

4.3 結果

未処理のオカラおよびオカラピューレの DPPH ラジカル消去活性について Figure 16 に示す。未処理のオカラでは 0.003 $\mu\text{mol/ml}$ と DPPH 消去活性が殆どみられなかった。DPPH ラジカル消去活性が最も低い 220 $^{\circ}\text{C}$ で処理したオカラピューレと比較しても DPPH ラジカル消去活性は 1/10 であった。

オカラピューレでは 220 $^{\circ}\text{C}$ 条件下では 0.03 $\mu\text{mol/ml}$ 、260 $^{\circ}\text{C}$ 条件下では 0.09 $\mu\text{mol/ml}$ 、300 $^{\circ}\text{C}$ 条件下では 0.12 $\mu\text{mol/ml}$ 、340 $^{\circ}\text{C}$ 条件下では 0.92 $\mu\text{mol/ml}$ と亜臨界水温度が高くなるにつれて DPPH 消去活性が強くなる傾向となった。DPPH ラジカル消去活性は、220 $^{\circ}\text{C}$ 、260 $^{\circ}\text{C}$ 、300 $^{\circ}\text{C}$ では緩やかに上昇したが、300 $^{\circ}\text{C}$ から 340 $^{\circ}\text{C}$ にかけては急激な DPPH ラジカル消去活性の上昇がみられ、他のオカラピューレよりも強い DPPH ラジカル消去活性を示した。

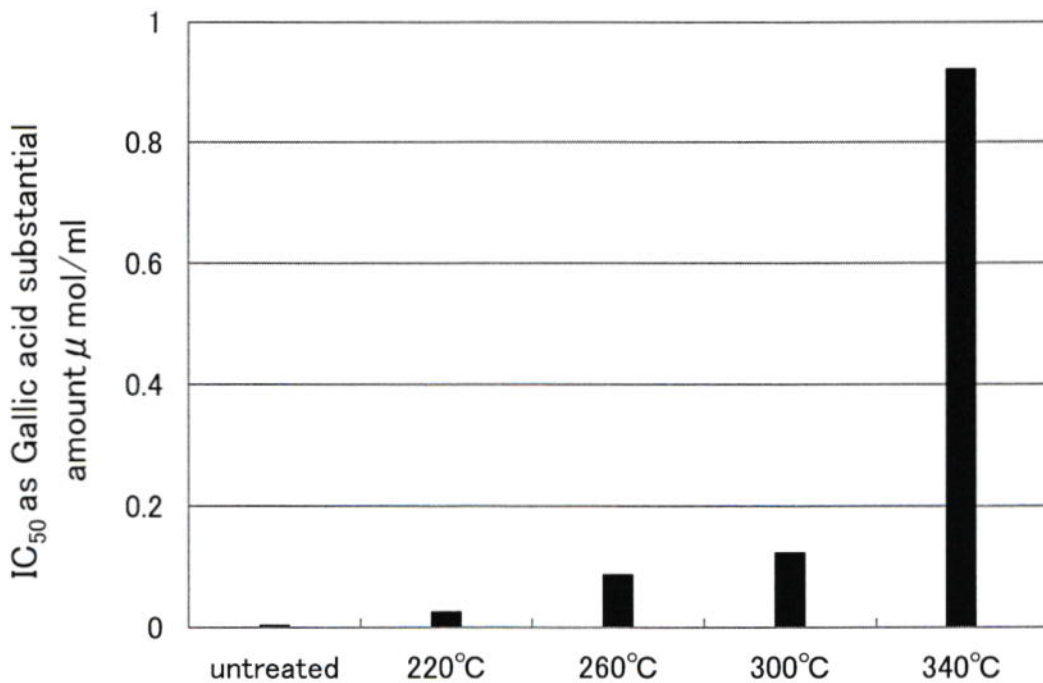


Figure 16. DPPH radical scavenging ability of okara puree
Each value expressed IC₅₀ as gallic acid substantial amount.

4.4 考 察

Figure 16 から、未処理のオカラには抗酸化性があまりみられなかった。亜臨界水処理後のオカラでは、処理温度が高くなるにつれて抗酸化性も強くなった。なかでも 340 °C で処理した後のオカラでは他の亜臨界水条件に比べて非常に強い抗酸化性を示した。大豆における抗酸化性を示す機能性成分では大豆タンパク質由来のペプチド⁶¹⁾や大豆イソフラボン、トコフェロール、ソヤサポニン A⁶²⁾などが知られている。また大豆加工食品中には前記の抗酸化成分に加えてメイラード反応によって生じる生成物も抗酸化性を示すことが知られている。味噌では、その熟成が進行するに伴って味噌の明度が低下し、赤褐色化が進む。明度が低下し赤褐色化が進んだ味噌の抗酸化性は褐色度が低い味噌に比較して強いことが報告されている⁶³⁾。本実験の結果においてオカラの亜臨界水処理温度が上昇するにつれて抗酸化性が強くなっていることや未処理のオカラにはあまり抗酸化性がみ

られなかったことなどから、Figure 16 に示した本実験結果においては、前記のような大豆に元々存在する抗酸化性成分の影響は大きくはないと予想される。亜臨界水処理温度が 220 °C から 300 °C までは、亜臨界水温度が高くなるにつれて比較的緩やかに抗酸化性が強くなっており、340 °C で反応させた後のオカラでは急激に抗酸化性が強くなっている。オカラに含まれる抗酸化性物質については、サポニン類、イソフラボン類及びトコフェロール類などが知られているが、オカラより得られた分画物の抗酸化性では大豆に含まれる既知の抗酸化性成分よりも大豆タンパク質由来のペプチドやアミノ酸が抗酸化性に大きく関与している可能性が高いとの報告がある⁶⁴⁾。このことから、亜臨界水温度が 220 °C から 300 °C までの抗酸化性が強くなった変化は亜臨界水反応によって生じた大豆タンパク質由来の低分子のペプチドやアミノ酸が主体となり、300 °C から 340 °C でみられた抗酸化性の急激な上昇は分解物によるメイラード反応生成物が主体となって関与している可能性が考えられる。著者らは亜臨界水処理温度が高くなるにつれて、処理後のオカラの色調において赤みが強くなり、褐色化が進行することを報告しており³⁾、このことからオカラの亜臨界水処理によって低分子化したタンパク質の分解物とオカラに含まれる食物繊維の分解物によるメイラード反応により、メイラード反応生成物（メラノイジン）が生成していると考えられる。また、メラノイジンはその分子量が大きくなるにつれて褐色度や抗酸化力が強くなるといわれている⁶⁵⁾が、このことは本実験でみられた亜臨界水処理温度と抗酸化性の変化の要因であると考えられる。また、亜臨界水温度が 260~270 °C 付近では、水のイオン積が極大になるため、生成したメラノイジンが同時に分解されていることが予想される。メラノイジンは褐色に着色しているため、抗酸化性の食品素材としての利用に制限を受けることが考えられるが、メラノイジンの抗酸化性は、オゾンによって酸化、脱色をした場合や微生物による脱色などにおいてもメラノイジンの抗酸化性

は脱色する前と比較して変化しなかったとの報告があり^{66),67)}、脱色することで抗酸化性食品素材としての用途を広げることも可能と考えられる。

第5章 亜臨界水処理後のオカラの抗プロモーター作用および抗腫瘍性の検討

5.1 緒言

第4章において、未処理のオカラには殆ど抗酸化性は認められず、亜臨界水処理後のオカラにおいて30 MPa条件下では処理温度が220~340 °Cと高くなるに従い抗酸化性が強くなることを報告した。抗酸化性を示したオカラピューレ中の有効成分についてはメイラード反応生成物や抗酸化性ペプチドやアミノ酸などの可能性が考えられるが、抗酸化性を示す物質自身が酸化を受ける反応過程で生じる化学的に不安定な中間生成物によって腫瘍細胞のDNAを分解することが抗腫瘍性の作用機序の一つであると考えられている⁶⁸⁾。また、抗腫瘍性を示す物質には、フラボン、アントシアン等のフラボノイド類もあり、これらの化合物についてもCu²⁺が存在する条件下において、腫瘍細胞のDNAを分解する作用をもつものがある⁶⁸⁾。また、メイラード反応生成物には発がん性物質であるニトロソアミンの生成抑制作用がある。さらに、タンパク質、アミノ酸の熱分解によって強い変異原性をもつヘテロ環アミン類が生成することが知られており、これらの変異原性物質に対してその作用を抑制するメイラード生成物の存在が明らかにされている⁶⁵⁾。

抗腫瘍性を示す物質には、多糖類としてペクチンが知られており^{69),70)}、特にペクチンの加熱後の生成物やガラクトuron酸などに細胞増殖抑制作用が報告されている⁷¹⁾。大豆や大豆の加工食品の副産物であるオカラにもガラクトuron酸や難消化性多糖類などが含まれており、それら難消化性多糖類やガラクトuron酸の亜臨界水反応後の生成物においても同様な細胞増殖阻害作用を有する可能性が考えられる。

これらのことから、本実験では亜臨界水処理後のオカラにおける抗プロモーター作用や抗腫瘍性について検討した。

5.2 実験材料および実験方法

(1) マウス上皮細胞による抗プロモーター活性の検討

(1)-1 Dimethylsulfoxide (DMSO) 抽出物の調製

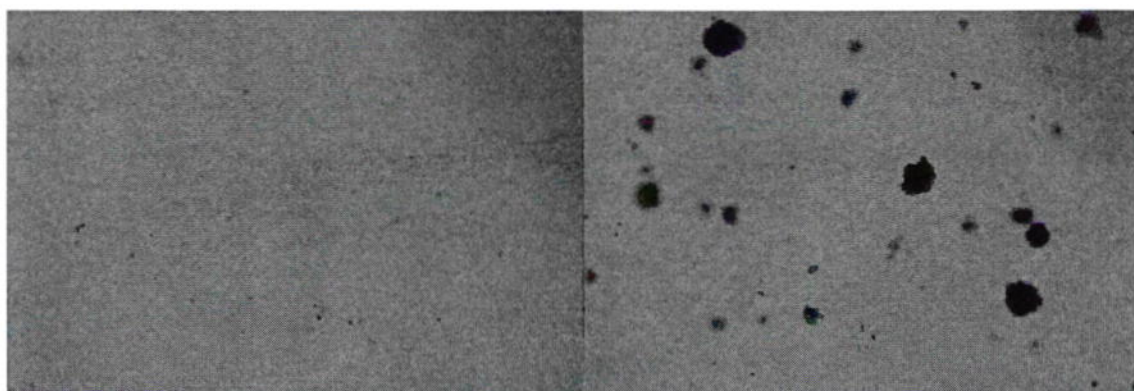
凍結乾燥したオカラピューレ（亜臨界水条件；30 MPa、310 °C、反応時間約 2.7 sec）50 mg を 1 ml の DMSO に懸濁させた後、約 2 時間振盪し、15,000 rpm で 15 分遠心した上清をオカラピューレ 1（以下、OP1）として実験に用いた。OP1 を DMSO で 10 倍希釈したものをオカラピューレ 1-0.1（以下、OP1_0.1）とした。

凍結乾燥したオカラピューレ（亜臨界水条件；30 MPa、310 °C、反応時間約 2.7 sec）50 mg を 1 ml の DMSO に懸濁させた後、約 30 分振盪し、15,000 rpm で 15 分遠心した上清をオカラピューレ 2（以下、OP2）とした。OP2 を DMSO で 10 倍希釈したもの（以下、OP2_0.1）として以上 4 種類の DMSO 抽出液を実験試料として用いた。

(1)-2 ソフトアガーアッセイ

0.5%寒天を含む minimum essential medium (MEM) を下層に固化した後、上層にマウス上皮細胞由来の JB6 Cl 41 細胞 (10^4 個) を懸濁した 0.33%寒天 MEM を重層した。なお、両層の寒天培地は、(DMSO 最終濃度 0.2%) 500 倍希釈したオカラピューレ DMSO 抽出液 [OP1, OP1_0.1, OP2, OP2_0.1] と tumor promoter として用いた 20 ng/ml epidermal growth factor (EGF)、10 % fetal bovine serum (FBS; GIBCO, Rockville, MD, U. S. A.) を含み、37°C、飽湿、5%CO₂ インキュベータ (BNA111; TABAI ESPEC, 大阪) 内で培養した⁷²⁾。その後、2-3 週間後の寒天培地中に形成されるコロニーを顕微鏡下で計測した。なお、コロニーカウントは Photo 1. のような状態で観察され、細胞が 2 個以上である右の写真はコロニーが形成されている状態であり、

左の写真の状態ではコロニーカウントは行わない (Photo 2)。



↑ 10% EGF Treatment

Photo 2. Colonization in the soft agar assay

After having solidified minimum essential medium (MEM) including the 0.5% agar in the lower layer, MEM with 0.33% agar which suspended JB6 cell (10^4) were superimposed on the top. Both MEM with agar included that were extracted from okara puree by DMSO (DMSO total concentration at 0.2%) and 20 ng/ml epidermal growth factor (EGF). It was cultured with 10% FBS. It was measured the colonies more than two in the agar medium with a microscope.

(1)-3 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)

法

金沢大学大学院自然科学研究科医療薬学専攻臨床薬学講座、現、北陸大学薬学部臨床薬学教育センター 野村政明教授より譲渡された JB6 細胞 (5×10^3 個) を 96 well プレートに撒き、翌日 (DMSO 最終濃度 0.2%) 500 倍希釈したオカラピューレ DMSO 抽出液 (OP1 および OP2) を原液 (1)、10 倍希釈 (OP1-0.1、OP2-0.1)、100 倍希釈 (OP1-0.01、OP2-0.1) し処置した。3 日間培養後、MTT 試薬を添加し、4 時間後に形成される MTT formazan の比色値をマイクロプレートリーダー (540 nm) にて測定した。

(2) 動物実験による抗腫瘍効果の検討

7週齢の雌 BALB/c マウス（近交系マウス、単クローン抗体作成 日本 SLC）を購入後、1週間、水と餌（MF 飼料、オリエンタル酵母株式会社、東京、日本）を自由に与え飼育した。その後、各群の体重が均一になるよう 3 群に分け（6 匹/群）、左足蹠にマウス結腸がん colon 26/clone 20 (C20) 細胞(10^6 個)を移植した。

移植翌日から 1 日 1 回それぞれ蒸留水、コントロール（未処理オカラ）、オカラピュール（亜臨界水処理；340°C、30 MPa、2.7 sec）を 1 ml 投与し、マウス左足蹠高および担癌マウスの生存日数を測定した。なお、コントロールおよびオカラピュール 1ml は、それぞれの乾物 50mg に相当する成分を含んでいる。また、C20 細胞は、colon 26 細胞から高度に悪液質を誘導する細胞としてクローニングした細胞であり、悪液質の指標となる体重減少へのオカラピュールの効果も検討した。なお、動物実験は実験動物の飼育および保管並びに苦痛の軽減に関する基準（平成 18 年 4 月 28 日、環境省告示 88 号）に則り実施した。

(3) 統計処理

抗プロモーター活性におけるコロニーアッセイ、足蹠高と体重の経時変化は Student-t 検定、抗腫瘍性試験におけるマウス生存日数については、Wilcoxon の順位検定にて有意差検定を行った。

5.3 結果

(1) マウス上皮細胞による抗プロモーター活性の検討

オカラピュール DMSO 抽出液は、OP1 が最も JB6 Cl 41 細胞の EGF で誘導したコロニー形成を抑制し、次いで OP1_0.1、OP2、OP2_0.1 という順になった (Figure 17)。

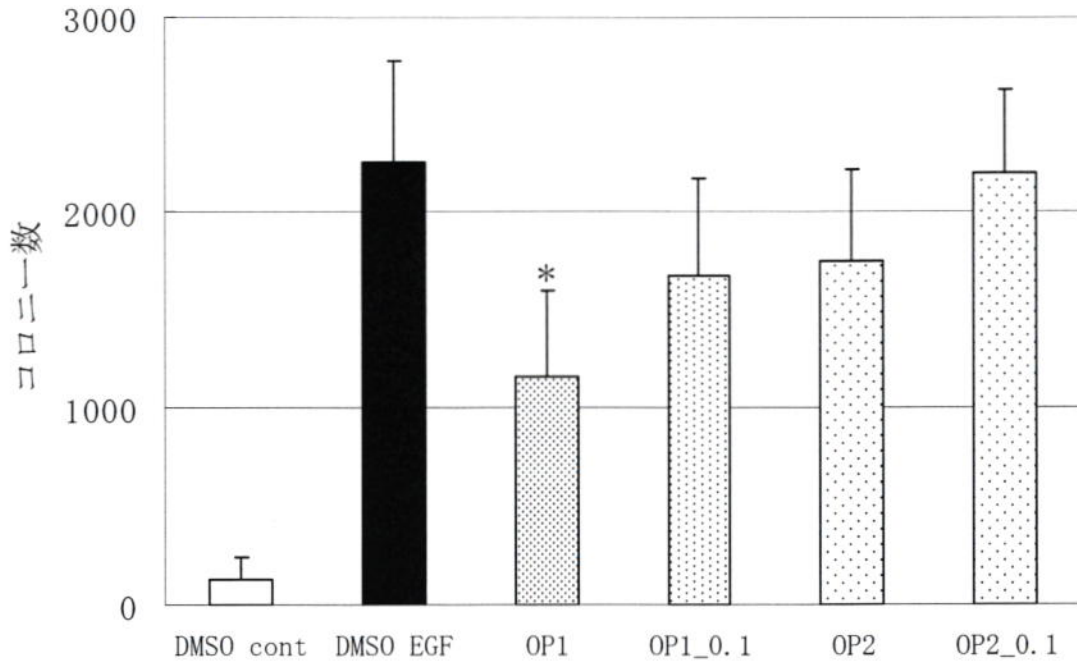


Figure 17. Effect of Okara puree DMSO extract on JB6 Cl 41 cells colony After having solidified minimum essential medium (MEM) including the 0.5% agar in the lower layer, MEM with 0.33% agar which suspended JB6 cell (10^4) were superimposed on the top. Both MEM with agar included that were extracted from Okara puree by DMSO (DMSO total concentration at 0.2%) and 20 ng/ml epidermal growth factor (EGF). It was measured the colonies more than two in the agar medium with a microscope. Values are the means with standard deviation shown by vertical bars. (n=6)

*: Significantly different from DMSO EGF group at $P < 0.05$

また、OP1 と OP1_0.1 や OP2 と OP2_0.1 の比較から、オカラピューレ DMSO 抽出液が希釈されると抑制効果は減少した。コロニー形成抑制は、OP1 > OP2 であることから、コロニー抑制効果はオカラピューレの DMSO 抽出時間にも依存する結果となった。

オカラピューレ DMSO 抽出液は、有意に JB6 Cl 41 細胞の EGF で誘導したコロニー形成を抑制した (Figure 17)。一方、オカラピューレ DMSO 抽出液は、JB6 Cl 41 細胞の細胞増殖に対しては影響を与えない結果となった (Figure 18)。

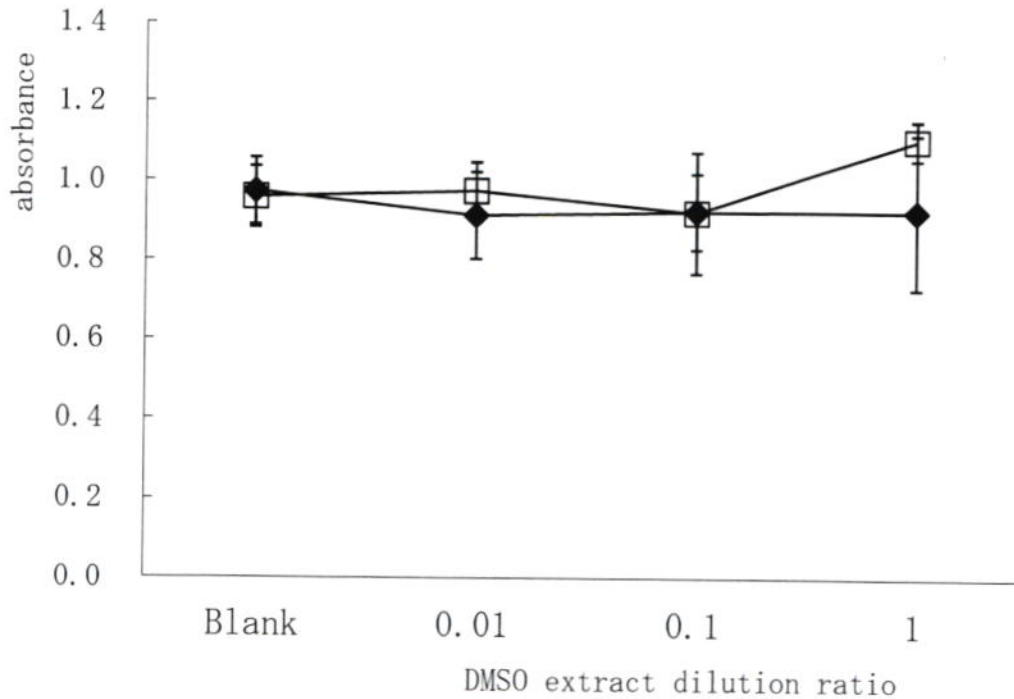


Figure 18. Effect of Okara puree DMSO extract on JB6 Cl 41 cell proliferation. It was seeded 96 well plate with JB6 Cl 41 cell (5×10^3). The next day, Okara puree DMSO extract (OP1, OP2) which diluted 500 times as undiluted solution (1), as 10 times diluted solution of undiluted solution (0.1) or as 100 times diluted solution of undiluted solution (0.01) was treated this plate. We added MTT reagent after cultivation for three days and measured a colorimetry level of formed MTT formazan. Values are the means with standard deviation shown by vertical bars.

*: Significantly different from blank at $P < 0.05$.

-□- DMSO extract from Okara puree 1; -◆- DMSO extract from Okara puree 2

(2) マウスによる抗腫瘍効果の検討

マウスの生存日数について、各群間における生存日数の平均を比較すると蒸留水群とオカラピューレ群で有意差がみられた。また、蒸留水群とコントロール群間、コントロール群とオカラピューレ群間では有意差がみられなかったが、オカラピューレ群ではコントロール群に比べ、生存率が高くなる傾向がみられた (Figure 19)。また、オカラピューレを投与した群では 10 日から 22 日目の間で他の群より生存数が多い傾向がみられ、実験開始 22 日以降ではオカラピューレを投与したマウスで

他の群より、生存期間が長くなる傾向がみられた。

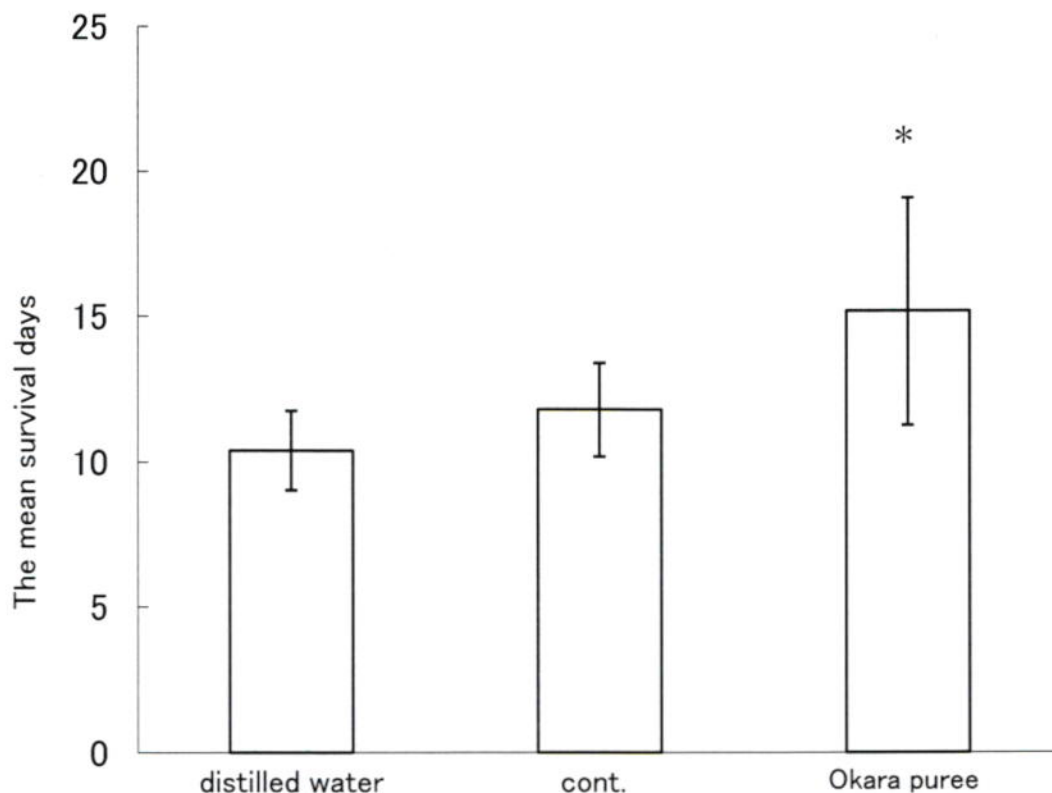


Figure 19. Survival days of mice which transplanted colon 26/clone 20 (C20) cell to their feet

Colon 26/clone 20 (C20) cell (10^6) was transfused into a BALB/c mouse left sole of the foot. It 1 ml of distilled water, untreated Okara (control) or Okara puree was given and the survival days were measured. Values are the means with standard deviation shown by vertical bars ($n=6$).

*: significantly different from other group $p < 0.05$.

一方、マウス左足蹠高の経時的変化をみるとオカラピューレ投与群では実験開始10日前後の期間で他の群より有意に足蹠高が小さくなった (Figure 20)。また、オカラピューレを投与したマウスでは実験開始20日前後で特に他の群より足蹠高が小さい傾向が見られたが、実験開始30日からは、蒸留水を投与した群と同様な変化を示した。コントロール群は実験開始18日以降で特に足蹠高の増加が他の群よ

りも著しくなる傾向が見られた。なお、16日以降は各群とも生存するマウスの減少により、有意差検定を行えなかったため、左足蹠高、体重は平均値で示した。

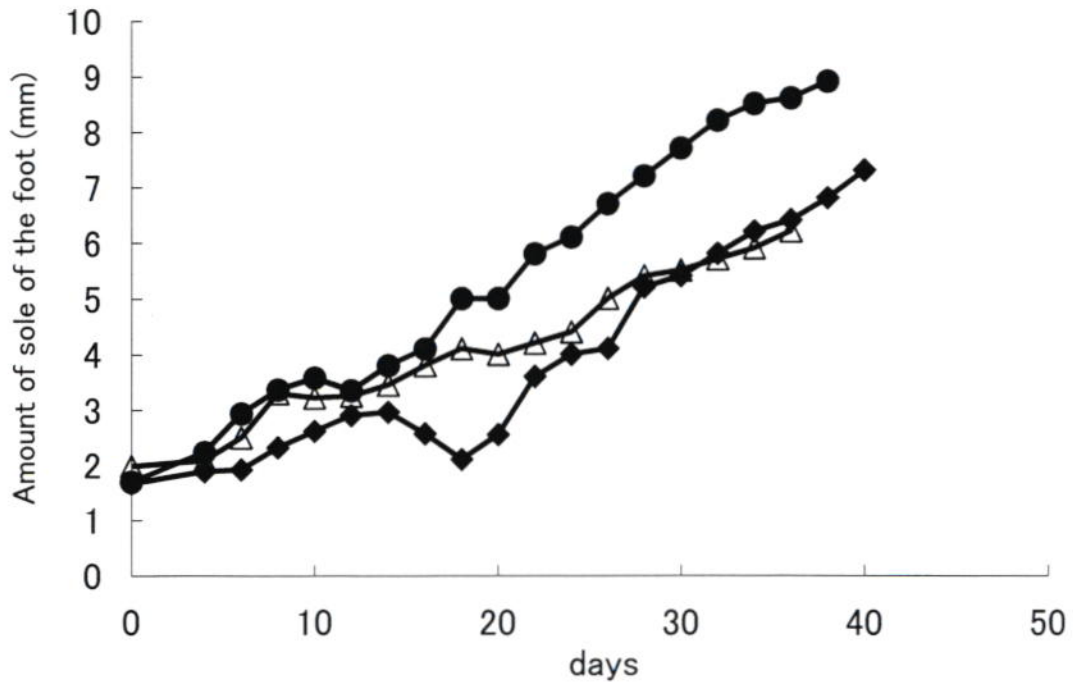


Figure 20. Process of left sole of the foot which transplanted colon 26/clone 20(C20) cell in mice

Colon 26/clone 20(C20) cell (10^6) was transfused into a female BALB/c mouse left sole of the foot. Untreated Okara(control) was given distilled water, Okara puree from the next day of transplant and the amount of mouse left sole of the foot was measured. Values are the means (n=6).

—◆— Okara puree treated group ; —●— control group ; —△—distilled water treated group

マウスの体重変化をみると、結腸がん細胞移植後2週間までは各群間で体重変化に差は見られなかった(Figure 21)。体重は結腸がん細胞移植後40日目までは各群とも減少傾向が続いたが、オカラピューレを投与したマウスで44日目以降、わずかな体重の増加が認められた。

移植後2週間までの体重には各群で著しい違いは認められないものの、オカラピューレ群では足蹠高の減少傾向が認められた。オカラピューレは悪液質の抑制より、

腫瘍の増殖を抑制することが示唆される。

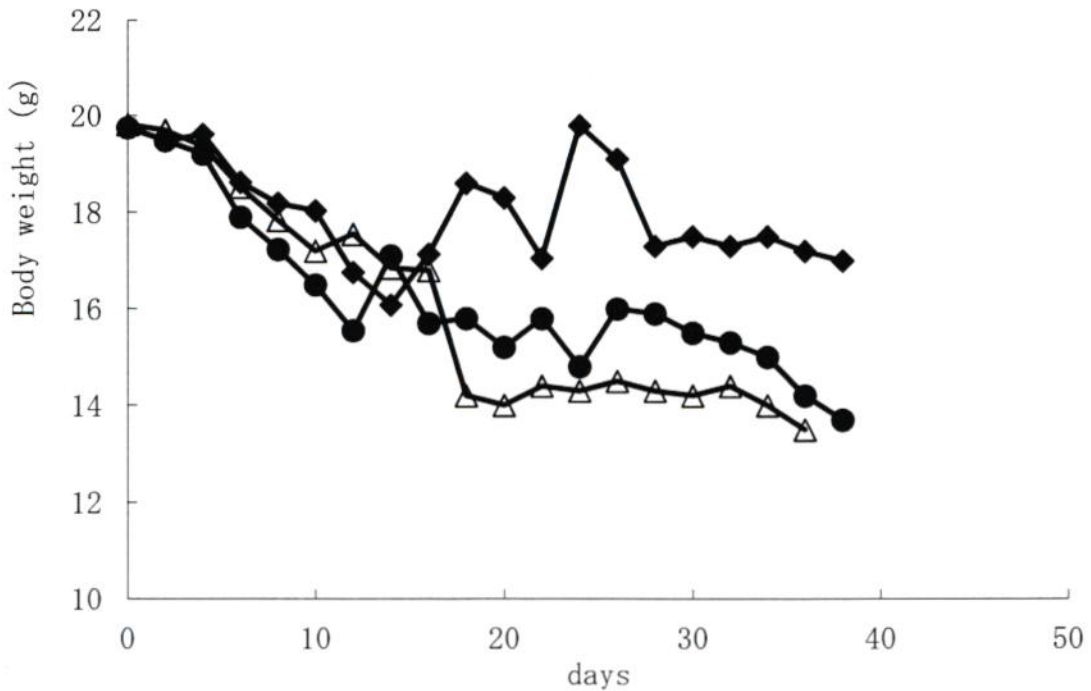


Figure 21. Process of body weight in mice transplanted colon 26/clone 20 (C20) cell in mice

Colon 26/clone 20 (C20) cell (10^6) was transfused into a female BALB/c mouse left sole of the foot. Distilled water, untreated Okara (control) or Okara puree was given from the next day of transplant. We measured the body weight of the mouse and effect of Okara puree to their weight loss was examined. Values are the means with standard deviation shown vertical bars ($n=6$).

-◆- Okara puree group ; -●- untreated Okara group (control) ; -△- distilled water group

5.4 考 察

マウス JB6 Cl 41 細胞は発癌プロモーション過程の molecular mechanism を研究する tool として確立されている細胞である。オカラピューレ DMSO 抽出液が、有意に JB6 Cl 41 細胞の EGF で誘導したコロニー形成を抑制したが (Figure 17)、その一方でオカラピューレ DMSO 抽出液は、JB6 Cl 41 細胞の細胞増殖に対しては影響を与えなかった (Figure 18)。これらの結果は、オカラピューレによるコロニー形成抑制作用は細胞のトランスフォーメーション抑制の結果である可能性を示唆し

ている。すなわち、オカラピューレ中には抗プロモーター活性を持つ成分が含まれている可能性がある。

癌患者、特に末期がん患者では食欲不振、重篤な低アルブミン血症に起因する血漿膠質浸透圧の低下、体脂肪の喪失及び肝機能の低下などの症状が観察される。これらは癌悪液質と総称され、悪液質を発現している患者では予後の悪化、QOLの低下及び生存期間の短縮をまねくと言われている。本試験において結腸がん細胞を移植したマウスによる試験で延命傾向がみられたことについて、マウスの体重における各群間に有意差は見られなかったが、オカラピューレ投与群が実験開始10日後の期間で他の群より、左足蹠高が有意に小さくなり、10日目以降の実験期間においても他の群より左足蹠高が小さい傾向がみられたことなどから、マウスの延命傾向は悪液質の抑制ではなく、腫瘍細胞の増殖抑制であることが考えられる。

また、本試験でみられた腫瘍細胞増殖抑制は、大豆由来成分の亜臨界水処理による変化と関連している可能性が考えられる。例えば、イソフラボン配糖体のアグリコン化による消化吸収の向上⁷³⁾や抗酸化性⁷⁴⁾などである。また、動物実験においてアグリコン化されたイソフラボンを投与することにより、乳がん、前立腺がん、結腸がん、メラノーマの発症率を低下させるという報告^{75),76)}がある。本試験の結果でみられたオカラピューレ群における腫瘍細胞増殖抑制や抗プロモーター活性についてもイソフラボンとの関連性を検討する必要があると思われる。さらに、大豆たん白質の部分分解や低分子化によって生成する抗酸化性ペプチドや、アミノカルボニル反応によって生じるメラノイジンなどの関与などの可能性も考えられる⁷⁶⁻⁷⁸⁾。大豆に含まれるイソフラボンではダイゼインやゲニステインとその配糖体が代表的であり、植物エストロゲン作用を示す⁷⁹⁾。ダイゼインやその配糖体は腸内細菌叢においてエクオールに代謝されることがわかっている⁸⁰⁾。エクオールはゲニステインよりもさらにエストロゲン活性が高いと考えられており、がんのリスク

に対するエクオールのは作用は明確にはないが、エクオールの尿中排泄量の多い人は乳がんを発症する危険度の低いことが報告されている⁸¹⁾。

一方、オートクレーブで加熱したペクチンは、がん遺伝子を導入した形質転換細胞の増殖を抑制するという報告例があり⁷¹⁾、オカラに比較的多く含まれるペクチン(ガラクトuron酸)の短時間亜臨界水処理による同様な成分の可能性も考えられる。今後は、腫瘍細胞増殖抑制や抗プロモーター活性を示す物質の解明が課題となる。

以上より、亜臨界水処理を用いたオカラの短時間連続処理によって腫瘍細胞増殖抑制や抗プロモーター活性といった効果を付加できることが示唆された。本技術は、オカラのみならず大量に廃棄されている他の未利用資源への利用も可能であり、新たな機能性の付加や物性の改良などさらなる発展が期待される。

第6章 *Bacillus coagulans* による食品残さ発酵物の食材化

6.1 緒言

前章までは、大豆加工食品において副産されるオカラを亜臨界水処理によって高付加価値な食材として再生利用する目的で、亜臨界水処理後のオカラの機能性について報告した。

亜臨界水は高温高压条件下であり、細菌等の微生物に対して衛生的といえる。しかし、処理後のオカラについてはその後の保存時において微生物による腐敗や変質の恐れが考えられる。

古くから、わが国では乳酸菌や酵母、麹カビなどに代表されるような微生物による発酵によって食品を加工する技術は古くより用いられており、伝統的な食品加工技術として広く利用されてきた。それら発酵によって加工された食品は、発酵に用いられた微生物によって他の菌の増殖が抑制されるため、保存性が向上することが

知られている。また発酵によって好ましい風味やテクスチャーを付与することができるといった場合もある。また、適切に発酵した食品においては病原性を有する菌や腐敗をもたらす菌に対して抵抗性を示す場合もある。発酵食品においては、乳酸菌が広く用いられていることはよく知られているが、乳酸菌はグラム陽性で炭水化物を含む培養基に繁殖し、消費したグルコースに対して50%以上の乳酸を産生する細菌とされている。*Bacillus coagulans*は、乳酸を多量に産生し、耐熱性の孢子を形成するが、現在、有孢子乳酸菌は分類学的に乳酸菌以外の他属に該当する菌として知られている⁸²⁾。*Bacillus coagulans*を含む乳酸を多量に生成する菌は、抗生物質に代わる生菌剤として飼料への添加や動物の治療薬として用いられている⁸³⁾。*Bacillus coagulans*は生育環境に適さない条件下では孢子を形成し、休眠する可能性があることで知られている。これらの孢子を形成する乳酸産生菌は経口的に投与した場合でも、胃を通過して腸内に生きてそのまま到達する可能性が考えられる。胃を通過し、腸まで到達した生菌剤の作用については、腸内で有害な菌の増殖を抑制、腸内において乳酸や酢酸などの有機酸を産生することにより腸内pHの低下を誘導して内毒素の不活性化やアミン合成抑制、グラム陰性病原菌の腸管への付着抑制、免疫システムへの作用などが知られている⁸³⁾。経口投与された生菌剤は、先住菌によって排除される場合が殆どで定着しないとされているが、定着性の如何に関わらず、腸内細菌叢のバランスが改善し家畜やヒトにおける腸炎の予防や改善、家畜の発育促進などにおいて有効であることがわかっている。

オカラは腐敗しやすいが、オカラの副産物として *Bacillus coagulans* によって発酵させることにより、他の微生物による腐敗を防ぎ、保存性を高める効果や風味やテクスチャーなどの改質などが期待出来る。また、耐熱性の芽胞形成により、加熱調理後においても生きて腸内へ到達し、生理的調節作用を示すことが期待できると考えられる。*Bacillus coagulans* によってオカラを発酵させることにより、亜臨

界水処理では得られない保存性と同時に生体調節作用を付加することが期待できる。本研究では特に腸内細菌叢と免疫系への影響について検討した。

6.2 実験材料および実験方法

(1) 試料

*Bacillus coagulans*によって発酵したオカラ（オカラ発酵物）及び発酵前のオカラは羽二重豆腐株式会社（石川県金沢市）より供与されたものを使用した。また、供与されたオカラは全て凍結乾燥し、以後の実験に用いた。Table 2 にオカラ発酵物に含まれる成分を示した。

Table 2 Composition of Okara and fermented Okara

	Okara	Fermented Okara
Water (g/100g diet)	77.23	78.04
Protein (g/100g diet)	4.50	4.42
Fat (g/100g diet)	1.48	1.33
Carbohydrate (g/100g diet)	16.01	15.38
Ash (g/100g diet)	0.78	0.83
Na (mg/100g diet)	61	67
Ca (mg/100g diet)	76	66
K (mg/100g diet)	186	151
Mg (mg/100 g diet)	36	32

(2) 実験動物

生後8週齢のSD系雄ラットを日本チャールス・リバー株式会社から購入し、実

験に供した。対照飼料による予備飼育を1週間行った後、1群6匹ずつ対照群と2%オカラ群と2%オカラ発酵物群の3群に分けて飼育した。

なお、本実験は石川県立大学動物実験委員会の承認のもとに行われ、動物愛護管理法の精神に則り実施した。

(3) 実験飼料

Table 3 に飼料組成を示した。オカラ群飼料、オカラ発酵物群飼料ともに対照群飼料にそれぞれ凍結乾燥した粉末を2%添加した。なお、飼料へのオカラ、オカラ発酵物添加による栄養成分変化を避けるため、これら飼料へのセルロース添加量はコントロール食のセルロース含量から添加したオカラまたは、オカラ発酵物含量を差し引いたものとした。

Table 3 Composition of experimental diet

	Control	2% Okara	2% Fermented Okara
	(%)		
β -Corn starch	51.12	51.12	51.12
Casein	23.18	23.18	23.18
Sucrose	10	10	10
Corn oil	6	6	6
Cellulose	5	3	3
Mineral mix (AIN-76™)	3.5	3.5	3.5
Vitamin mix (AIN-76™)	1	1	1
Choline choride	0.2	0.2	0.2
Okara	0	2	0
Fermented Okara	0	0	2

(4) 飼育方法

飼育は金網のケージにラットを2匹ずつ入れ、気温24℃、湿度40%の環境下において12時間の明暗サイクル（明期9:00～19:00）の室内で14日間行った。飼育期間中は飼料と水は自由摂取とし、7日おきに体重の測定を行い、摂餌量は毎日測定した。

(5) 採血および臓器の採取

実験期間終了後24時間絶食させ、エーテル麻酔下で安楽死させて開腹し、腹部大静脈よりヘパリン採血を行い、1000 rpm、10分間遠心分離し、血漿を得た。採血後心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓を摘出し、湿重量を測定した。

(6) 盲腸内フローラの検索

盲腸内フローラの検索に用いたラットは各群3匹とした。エーテル麻酔下で安楽死させて開腹し、採血を行った後、速やかに盲腸を切除した。盲腸内容物約0.05g（正確に秤量）を滅菌袋に採取し、希釈液4.95mLを加えて 10^2 倍希釈とした。以下順に1/10ずつ、8段希釈を行った。盲腸内フローラの検索はAnaerobic bacteriaをBL（日水製薬株式会社）、ABCM培地（栄研化学株式会社）で、Aerobic bacteria, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus*を、それぞれTS（関東化学株式会社）、TOS（栄研製薬株式会社）、MRS（関東化学株式会社）、DHL（日水製薬株式会社）、PEES培地（日水製薬株式会社）を用いて行った。培地の調製については光岡⁸⁴⁾らの方法により行った。*Enterobacteriaceae*の検索はDHL培地で37°C、24時間好氣的条件下で培養することにより行った。*Staphylococcus*, Aerobic bacteriaの検索はそれぞれPEES、TS寒天培地で37°C、48時間好氣的条件下で培養することにより行った。Anaerobic bacteria, bifidobacteria, *Lactobacillus*の検索はそれぞれBL、ABCM、TOS、MRS寒天培地で、37°C、72時間、スチールウール法により嫌気ジャー内で培養することにより行った。

菌は培養後、光岡⁸⁵⁾らの方法により、コロニー形態、グラム染色性、菌形態、芽胞の有無、好気性条件下での生育性などによって鑑別を行った。

(7) 血漿及び血漿中サイトカインの測定

血漿中のアルブミン、ALT、AST、ALP、LDH、 γ -GTP、アセチルコリンエステラーゼ、血清アミラーゼ、総コレステロール、トリグリセライド、CPK、血糖の測定は自動分析計により行った。また、血漿中のサイトカイン（IFN- γ 、IL-4）の測定は、ELISAキット（Daiiclone SAS）により行った。

6.3 統計処理

各実験の結果は平均値±標準偏差で示し、群間の有意差検定はT検定およびTukeyの多重検定により行い、 $p < 0.05$ で統計的に有意差ありとした。

6.4 結果

ラットの体重については、有意差はみられなかったが、オカラ発酵物群でコントロール群に比較して増加する傾向がみられた。また、臓器重量は各群間における有意差はみられなかった(Table 4, 5)。

Table 4 Effect of fermented Okara feeding on body weight

	Control	2% Okara	2% Fermented Okara
	(g)		
0 day	321.4±13.79	339.9±9.11	332.33±4.29
14 day	386.48±22.88	390.94±13.06	401.48±12.81

The values expressed mean±standard error. Tukey's multiple range test was used for statistical analysis. Values in the same line marked with different small letters were significantly different: $p < 0.05$

Table 5 Effect of fermented Okara feeding on organ weight.

	Control	2% Okara	2% Fermented Okara
	(g)		
Heart	1.27±0.16	1.15±0.07	1.21±0.10
Lung	1.16±0.11	1.22±0.99	1.25±0.05
Liver	9.69±0.76	9.71±0.72	9.80±0.66
Spleen	0.61±0.08	0.6±0.08	0.65±0.04
Kidney	1.14±0.15	1.21±0.11	1.23±0.12

The values expressed mean±standard error. Tukey' s multiple range test was used for statistical analysis. Values in the same line marked with different small letters were significantly different: $p<0.05$

ラットの血漿成分に対する影響では、総コレステロールの値がコントロール群に比べ、オカラ発酵物群で有意に低下していた。また、有意差はみられなかったが、オカラ群においてもコントロール群に比べ、総コレステロール値が低下する傾向がみられた。さらに、オカラ発酵物群では、オカラ群よりも総コレステロール値が低下する傾向が見られた。その他の血漿成分については、各群間に有意差はみられなかった (Table 6)。

Table 6 Effect of fermented Okara feeding on plasma composition

	Control	2% Okara	2% Fermented Okara
Albumin (g/dl)	4.29±0.21	4.25±0.19	4.32±0.10
AST (IU/l)	84.00±8.17	83.00±4.18	81.20±7.29
ALT (IU/l)	35.29±3.82	33.00±3.10	33.17±3.97
ALP (IU/l)	428.43±66.91	481.50±100.85	460.50±96.69
LDH (IU/l)	62.43±17.89	60.83±12.38	62.20±17.06
Total cholesterol (mg/dl)	92.86±13.56 ^a	84.17±16.25 ^{ab}	64.25±5.62 ^b
Triacylglycerole (mg/dl)	60.29±24.81	47.83±33.22	53.33±4.72
Glucose (mg/dl)	168.29±19.35	181.83±30.83	164.17±11.51

The values expressed mean±standard error. Tukey' s multiple range test was used for statistical analysis. Values in the same line marked with different small letters were significantly different: $p < 0.05$

ラットの盲腸内フローラに及ぼすオカラ発酵物の影響については、総菌数においてコントロール群とオカラ群やオカラ発酵物群との間に有意差はみられなかった。しかし、コントロール群に比べ、オカラ発酵物群では bifidobacteria の菌数が有意に増加していた。また、コントロール群に比べ、オカラ群においても bifidobacteria の菌数が有意に増加していた。オカラ群よりもオカラ発酵物群で bifidobacteria の菌数増加の割合が大きくなった。また、有意差はみられなかったが、*Enterobacteriaceae* は特にオカラ発酵物群で減少する傾向がみられた (Table 7)。その他、*Lactobacillus*, *Bacteroidaceae*, *Eubacterium*, *Peptococcaceae*, streptococci, staphylococci 等の菌数には各群間における有意差はみられなかった。

Table 7 Effect of fermented Okara feeding on cecum microflora

	Control	2% Okara	2% Fermented Okara
	(Log(CFU/g))		
<i>Enterobacteriaceae</i>	8.79±0.76	8.31±0.16	7.71±0.25
<i>Lactobacillus</i>	7.94±0.17	7.94±0.81	7.23±0.37
<i>Bacteroidaceae</i>	8.93±0.10	8.79±0.30	8.15±0.83
<i>Eubacterium</i>	8.19±0.19	8.15±0.90	8.17±0.18
<i>Peptococcaceae</i>	8.07±0.59	7.82±0.19	7.58±0.33
streptococci	7.75±0.71	7.75±1.21	7.95±0.30
staphylococci	5.63±0.48	5.37±0.44	5.49±0.45
bifidobacteria	5.00±0.38	6.05±0.06*	8.55±0.40*
Total	9.11	9.29	8.92

The values expressed mean±standard error of the count of logarithm.

Student' s t test was used for statistical analysis. Asterisks indicate values significantly different from control:*p<0.05

オカラ発酵物による血漿中のサイトカインへの影響については、IL-4 では対照群と比べ、オカラ群、オカラ発酵物群ともに有意差は見られなかった。しかし、IFN- γ レベルは対照群と比べ、オカラ発酵物群の値が有意に高くなった (Table 7)。

Table 8 Effect of fermented Okara feeding on plasma IFN- γ and IL-4 levels

	Control (pg/mL)	2% Okara	2% Fermented Okara
IFN- γ	23.5 \pm 0.7 ^a	21 \pm 0.8 ^a	34.8 \pm 4.3 ^b
IL-4	120.3 \pm 38.8	123.8 \pm 18.2	122.4 \pm 10.5

The results are expressed as mean \pm standard errors. Tukey' s multiple range test was used for statistical analysis. Values in the same line marked with different small letters were significantly different: $p < 0.05$

6.5 考 察

ラット血漿中の総コレステロールがオカラ発酵物群において、有意に低下したことについて、オカラに含まれる食物繊維などの成分には、腸管からのコレステロールの吸収を抑えることにより、血清コレステロール値を低下させる効果が知られている。また、ビフィズス菌 (bifidobacteria) はコレステロールなどを同化することによってコレステロールの吸収を抑制することが報告されている⁸⁶⁾。本実験においてオカラ発酵物群における総コレステロールの低下は食物繊維とビフィズス菌の増加による相乗効果の可能性が考えられる。

オカラ発酵物群において bifidobacteria がコントロール群に比べ、有意に増加したことについて、オカラに含まれる大豆オリゴ糖や食物繊維などの成分に加え、*Bacillus coagulans* の菌体由来成分が相乗的に bifidobacteria の増殖に関与している可能性が考えられる。乳酸菌の発酵による生成物が他の菌に対する定着の抑制や抗菌作用により、腸内の有用な菌の増殖を促進し、整腸作用を発揮することが知られている^{87) 88)}。また、大豆オリゴ糖に含まれるラフィノースといった難消化性オリゴ糖はヒトの消化酵素の作用を受けにくいいため、そのまま結腸まで到達し、bifidobacteria などの腸内細菌の栄養源となって、増殖を促進することが知

られている⁸⁹⁾。

近年、アレルギーの発症または、後年になってアレルギーを発症する場合には、腸内フローラのうち、bifidobacteriaが劣勢または、定着の遅れがみられるなどの報告がある^{90) 91)}。それらの報告から、bifidobacteriaが多く定着することがアレルギーの発症に抑制的に働く可能性が考えられる。本実験において、オカラ発酵物投与によって、盲腸内マイクロフローラのうち、bifidobacteriaが増加していたことは、アレルギー発症に対して抑制的に働く可能性がある。

即時型アレルギーの発症において、Th細胞の内、Th1細胞とTh2細胞のバランスが影響すると言われており、Th1細胞に対してTh2細胞が優位な状態になるとアレルギーを発症しやすくなる。IL-4はTh2細胞の代表的なサイトカインであり、IL-4レベルが高いとTh2細胞が優位な状態である可能性が高いと言える。本実験の結果、IL-4量はオカラ群、オカラ発酵物群共に対照群に比べ有意差は見られなかった。しかし、オカラ発酵物を与えたラットのIFN- γ 量が対照群に比べ有意に増加していることが分かる(Table 8)。IFN- γ はTh1細胞の代表的なサイトカインであるが、本実験でオカラ発酵物を与えた結果、Th1細胞への分化が促進され、IFN- γ レベルが上昇した可能性が考えられる。IFN- γ は、ナイーブT細胞からTh1細胞への分化を促進し、Th2細胞への分化を抑制する作用がある。一方、IL-4は、ナイーブT細胞からTh2細胞への分化を促進する作用がある。Th2細胞に分化したヘルパーT細胞はIL-4、IL-5、IL-10などのサイトカインを産生し、これらのサイトカインは肥満細胞や好酸球を活性化する。Th2細胞はIgE誘導能を有しており、誘導されたIgE抗体がIgE受容体を介して肥満細胞へ付着し、再び体内に侵入したアレルゲンがIgE抗体へ付着し架橋される。その刺激が蓄積することにより肥満細胞より炎症性の物質であるヒスタミンやロイコトリエンなどが放出され、アレルギーを発症する可能性がある。アレルゲンの摂取から、短時間の内にアレルギーの症状が現れる即

時型のアレルギーは IgE 抗体によって引き起こされると言われている。本実験の結果は、オカラ発酵物由来の成分が Th1 細胞と Th2 細胞のバランスに影響を与えた結果 IFN- γ が増加したことが考えられる。このことは、Th1 細胞が Th2 細胞に対して優位な状態になっていることが示唆され、オカラ発酵物の摂取により即時型アレルギーを抑制する可能性が考えられる。

以上により、オカラ発酵物には腸内ビフィズス菌を増加させることで、整腸作用のみならず、抗アレルギー作用など免疫系にも影響を及ぼすことが示唆され、オカラの新たな機能性素材や機能性食品としての発展が期待できる。

第7章 *Bacillus coagulans*によるオカラ発酵物の抗アレルギー作用

7.1 緒言

アレルギー疾患の増加が指摘されているが、その一因として「衛生仮説」があり、乳・幼児期において感染症等、微生物による刺激に対する曝露が少なくなることにより、Th1 細胞の分化・発達の低下が推察されている⁹²⁾。新生児期は Th2 細胞による免疫応答が優位な状態が一般的であり、アレルギーリスクが高い状態にあるといえる。微生物の刺激などを受けながら成長とともに免疫系は Th1/Th2 細胞がバランスのとれた状態へと変化していく。この変化における Th1 細胞の発達には、微生物からの刺激が重要であると考えられている。ところが近年の環境衛生の改善によって感染症リスクが低下したわが国においては腸内微生物による刺激が重要となってきている。近年、整腸作用などの機能性をもつ特定保健用食品などが市販されているが、これらのプロバイオティクスと呼ばれるものにはアトピー性皮膚炎の発症を抑制することが報告⁹³⁾されているものもあり、プロバイオティクスのアレルギー抑制効果が期待されている。

第6章において、*Bacillus coagulans*によるオカラ発酵物を経口投与したラッ

トにおいて血漿中の IFN- γ レベルが発酵前のオカラを投与した群や対照群に比較して有意に上昇し、血漿 IL-4 レベルは実験群間における差はみられなかった。Th1 細胞由来のサイトカインである IFN- γ は、未感作の Th 細胞から Th1 細胞への分化を促進し、Th2 細胞への分化を抑制する作用を有しており、即時型アレルギーの発症に対して抑制的に作用する。このことから、*Bacillus coagulans* によるオカラ発酵物のアレルギー抑制作用が示唆された。

そこで、本章ではアトピー性皮膚炎自然発症マウスを用いて即時型アレルギーの症状や血漿中のサイトカイン、IgE 抗体などへの *Bacillus coagulans* によるオカラ発酵物の影響について検討した。

7.2 実験材料および実験方法

(1) 試料

Bacillus coagulans によって発酵したオカラ（オカラ発酵物）及び発酵前のオカラは羽二重豆腐株式会社（石川県金沢市）より供与されたものを使用した。また、供与されたオカラ発酵物、発酵前オカラは全て凍結乾燥し、以後の実験に用いた。オカラ発酵物と発酵前オカラの成分は Table 2 に示した。

(2) 実験動物及び方法

生後 4 週齢の雌性 NC/Nga マウス（アトピー性皮膚炎自然発症マウス、日本 SLC 株式会社）を用いた。対照群の飼育はオリエンタル・イースト株式会社より購入した飼料で行った。マウスは 6 週間、温度 24 ± 2 °C、湿度 60 ± 10 % で 12 時間の明暗サイクル（9:00～21:00 点灯）条件下で TNCB(2, 4, 6-trinitrochlorobenzene) による塗布を行わずに各々ケージ内にて飼育した。水と餌は自由摂食とした。次にそれらのマウスを無作為に 3 群（ $n=6$ /群）に分けた。コントロール群は、標準食によって飼育し、実験群はオカラ発酵物の最終濃度がそれぞれ 1% および 2% となるよう

に標準食にオカラ発酵物を加えて与えた。

実験開始において、約 20 μ L の 5 % TNCB をマウスの腹部と足の部分に塗布した。翌週以降は Kitagaki らの方法⁹⁴⁾により週に一度、1 % TNCB を耳介と背部に塗布した。5 週間実験食で飼育し、塗布を行う前に耳介の厚さを電動キャリパーにて毎週測定した。また、全群で 60 分間の引っ掻き回数と皮膚の臨床変化について調べた。ジエチルエーテル麻酔下で下大静脈より採血を行い、直ちに氷で冷却した。遠心分離によって得られた血清中のサイトカイン (IFN- γ 、IL-4) を測定した。血清中の IFN- γ と IL-4 は、市販の ELISA キット (RD SYSTEMS 製) によって測定した。

なお、本実験は石川県立大学動物実験委員会の承認のもとに行われ、動物愛護管理法の精神に則り実施した。

7.3 統計処理

各実験の結果は平均値 \pm 標準偏差 (mean \pm SD) で示し、群間の有意差検定は T 検定および Tukey の多重検定により行い、 $p < 0.05$ で統計的に有意差ありとした。

7.4 結果

本研究において、TNCB は抗原として週に 1 度 NC/Nga マウスの耳介と背部に塗布した。TNCB によって誘導した接触性過敏症の症状がみられるマウス耳介厚は毎週測定し、全ての群で耳介厚の増加が観察された。しかし、オカラ発酵物を投与した群ではコントロール群に比べて有意に耳介厚が小さくなった (Figure 22)。

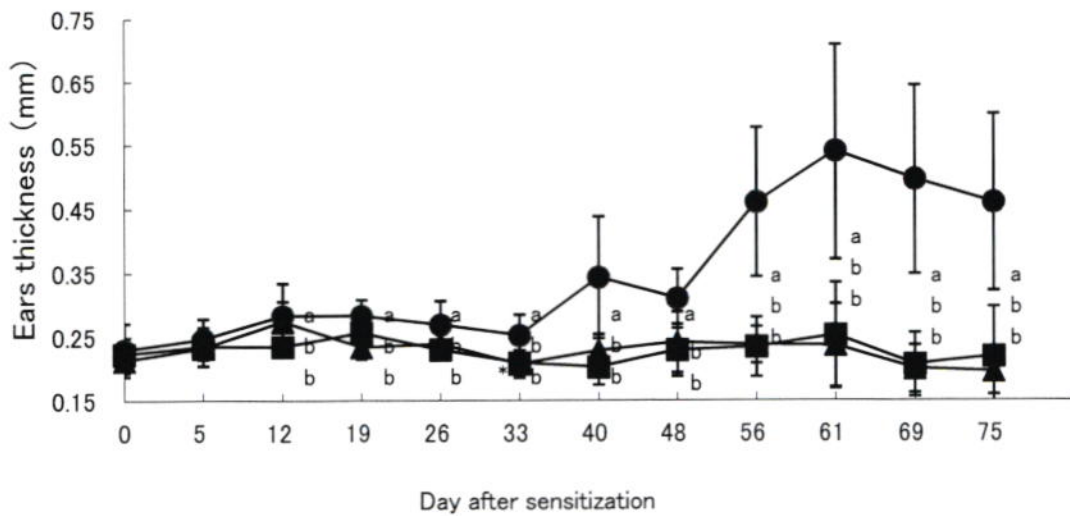


Figure 22. Effect of Okara administration on sensitized ears thickness induced by TNCB application in NC/Nga mice

Results are expressed as the mean±SD of six mice per group. Means with different small letters are significantly different at the 5 % level.

●: control diet, ▲: 1% FO diet, ■: 2% FO diet

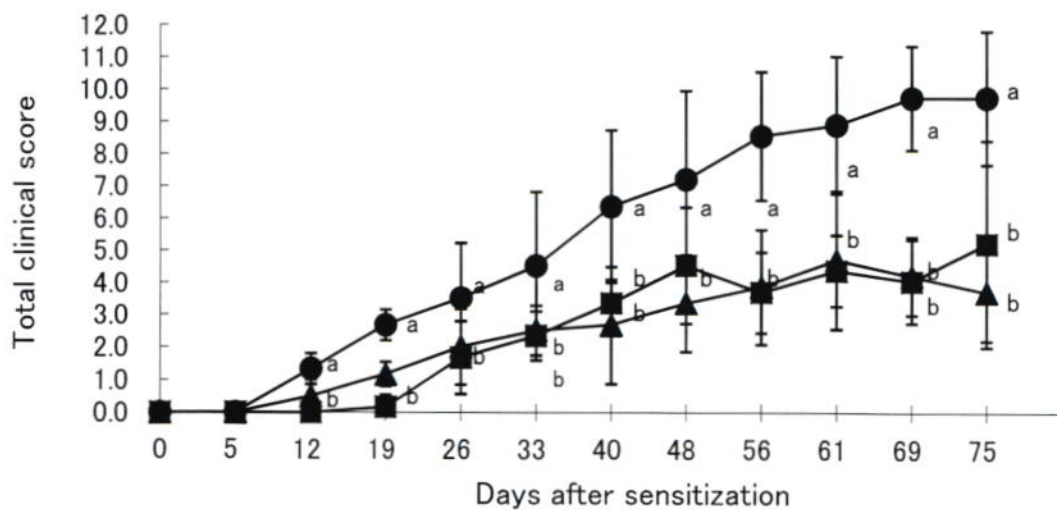


Figure 23. Effect of Okara administration on the total clinical score induced by TNCB application in NC/Nga mice

Results are expressed as the mean±SD of six mice per group. Means with the different small letters are significantly different at the 5 % level. ●:

control diet, ▲: 1% FO diet, ■: 2% FO diet

オカラ発酵物を経口投与した群では、皮膚の臨床スコアからアトピー性皮膚炎に

よる皮膚障害の進行が抑制されたが、コントロール群では臨床スコアがかなり増加していた (Figure 23)。オカラ発酵物を投与した全てのマウスは実験期間中をとおして良好な健康状態で異常性または病気の兆候などはみられなかった。コントロール群とオカラ発酵物を投与した両群間で体重増加に有意差はみられなかった。さらに実験期間終了後開腹し採取した内臓重量において3群間に差はみられなかった。オカラ発酵物を含む食餌を投与したマウスでは、TNCBで誘導した接触性過敏症の症状が軽減される結果がみられた。

アトピー性皮膚炎は血清 IgE レベルの増加と IL-4 の増加、IFN- γ の減少に伴って症状の進行がみられる。Th1 細胞由来のサイトカインである IFN- γ と Th2 細胞由来のサイトカインである IL-4 の血清における測定結果をそれぞれ Figure 24、Figure 25 に示した。

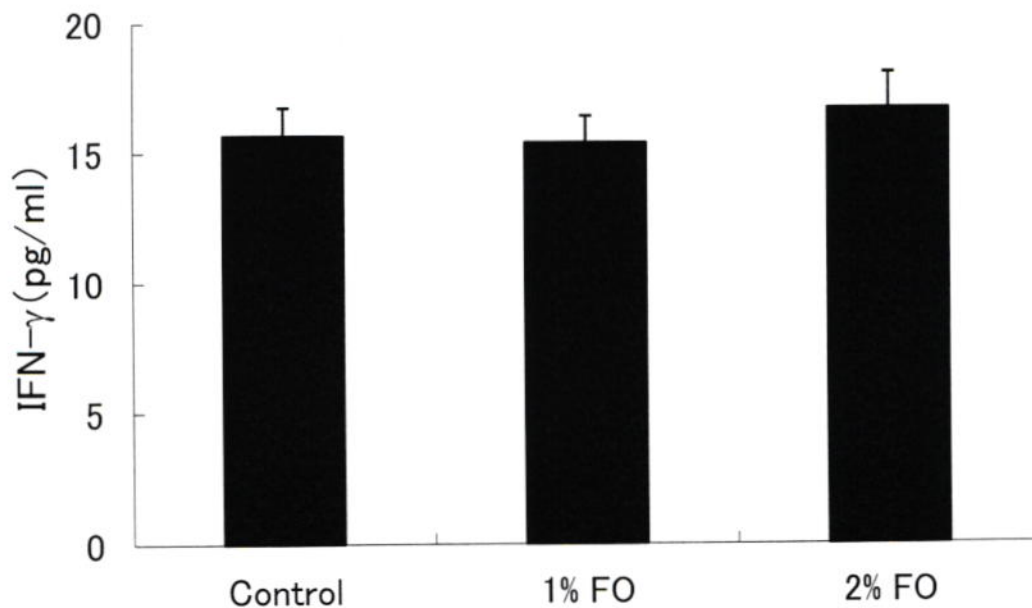


Figure 24. Effect of feeding fermented Okara on TNCB-induced IFN- γ in sera of NC/Nga mice

Results are expressed as the mean \pm SD of six mice group. Means with the different letters are significantly different at the 5% level.

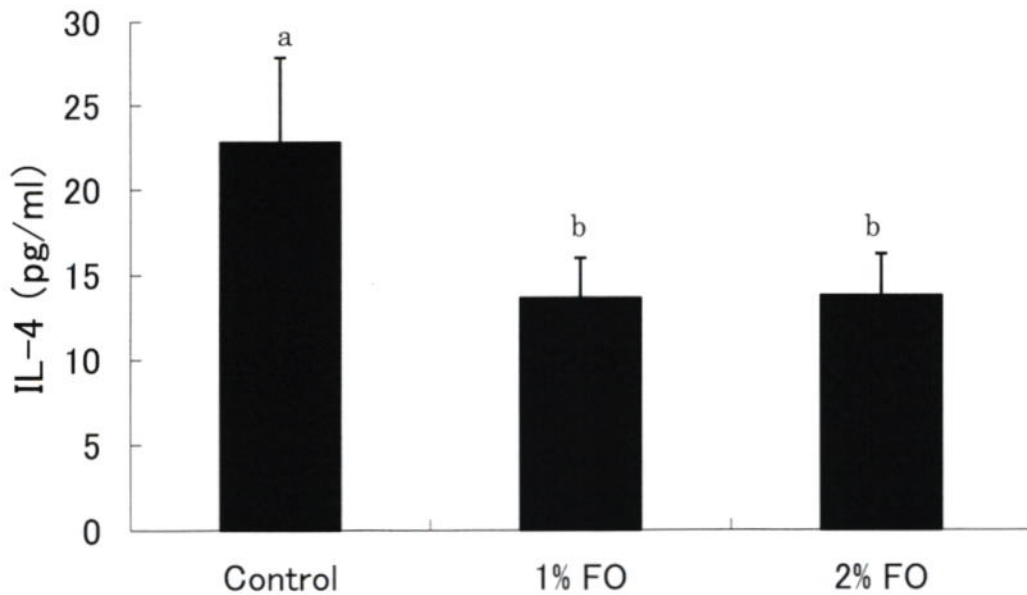


Figure 25. Effect of feeding fermented Okara on TNCB-induced IL-4 in sera of NC/Nga mice

Results are expressed as the mean \pm SD of six mice group. Means with the different letters are significantly different at the 5 % level.

オカラ発酵物投与した両群において血清 IFN- γ レベルへの影響はみられなかった。一方、IL-4 レベルはオカラ発酵物を投与した群で有意な減少がみられた。

7.5 考 察

第6章では *Bacillus coagulans* によるオカラ発酵物投与による抗アレルギー効果が示唆された。そこで本章ではオカラ発酵物の抗アレルギー効果について検証するため実験を行った。

TNCB で接触性過敏症を誘導したマウス耳介厚と臨床スコアの経時変化はともにコントロール群に対してオカラ発酵物を投与した群において両者の値が有意に小さくなったことから、オカラ発酵物経口投与により抗アレルギー作用が動物実験で示された。また、実験期間終了後における血漿サイトカインの測定結果からすべての実験群間で IFN- γ の値に差はみられなかった。しかし、コントロール群に対し

てオカラ発酵物を投与した群で血漿中の IL-4 レベルに有意な低下がみられた。このことは、オカラ発酵物を投与した群において Th1/Th2 細胞の比率がコントロール群よりも高くなっていることを示している。ゆえに、これらの結果は *Bacillus coagulans* によるオカラ発酵物投与によって、アトピー性皮膚炎における Th1/Th2 バランスの改善と Th2 細胞由来のサイトカインである IL-4 の産生抑制が示唆される。生体内の恒常性維持において Th1/Th2 細胞のバランスは、不可欠であると考えられる。Th 細胞がよいバランスを維持することは、恒常性の維持のためのサイトカイン分泌調節と関連しており、このバランスの乱れが様々な免疫疾患を誘導する。Th1/Th2 細胞のアンバランスによってアレルギー反応による炎症が起こる。そのような条件下において Th1 細胞は、自己免疫疾患を仲介し、Th2 細胞の異常な反応はアレルギー疾患を伴う^{95), 96)}。Ng/Nga マウスにおけるゲニスチンの抗炎症性はアレルギー性炎症の初期段階において鍵となる肥満細胞からの化学的伝達物質を抑制する結果であるといわれている⁹⁷⁾。同様な効果がオカラに含まれるイソフラボンにも期待される。

Th2 細胞が産生する IL-4 は即時型アレルギー発症との関連がある IgE の B 細胞からの産生を誘導することが知られている。本実験においてオカラ発酵物を投与した群でコントロール群に比べ血漿 IL-4 レベルが有意に低下し、IFN- γ レベルに差がみられなかったことから、オカラ発酵物の投与は、抗原未感作 T 細胞から Th1 細胞への分化の促進よりも Th2 細胞に対する抑制的な作用が示唆される。また、Th2 細胞に対する抑制的な作用による血漿 IL-4 レベル低下が、血漿 IgE レベルの有意な低下を誘導したことが考えられる。

これらのことから、オカラ発酵物を投与した群でコントロール群に比べ接触性過敏症による耳介厚と臨床スコアの値がともに有意に小さくなり、アレルギー症状の軽減がみられたことは、オカラ発酵物の経口投与により、Th2 細胞に対する抑制的

な作用による血漿 IL-4 レベルの低下から誘導された血漿 IgE レベル低下の影響が考えられる。

プロバイオティクスの妊娠中の母親への投与は、乳幼児アレルギーの発症を抑えるという結果が報告されており⁹⁸⁾、*Bacillus coagulans*によるオカラ発酵物の経口投与は、腸内細菌叢への影響のみならず、全身の免疫系にも影響を及ぼすことが示されたことから、*Bacillus coagulans*によるオカラ発酵物はプロバイオティクスとして、抗アレルギー作用をもつ機能性食品としての発展が期待される。

総 括

本研究では、大豆加工食品の製造過程において副産され、食料資源として殆ど未利用であるオカラを低分子化、可溶化することにより食感や風味を改善し食材としての応用範囲を広げる技術として亜臨界水反応や *Bacillus coagulans* による発酵といった処理方法について、処理後のオカラの付加価値を検討し、技術の普及を図る目的で亜臨界水反応後のオカラでは、血糖値上昇抑制効果、糖尿病抑制効果（以上 第2章）、血圧上昇抑制効果（第3章）、抗酸化性（第4章）、抗プロモーター作用、抗腫瘍性（以上 第5章）などの機能性について検討した。*Bacillus coagulans* によるオカラ発酵物では盲腸内フローラに及ぼす影響や免疫システムへの影響（以上 第6章）、抗アレルギー作用（第7章）などについて検討した。

第2章では、亜臨界水処理後のオカラについて、スクラーゼ活性に対する阻害作用、マウスを用いた食後の血糖値上昇抑制作用、糖尿病自然発症ラットを用いた亜臨界水処理後のオカラの糖尿病発症抑制作用などについて検討した。スクラーゼ活性は亜臨界水温度が高くなるに伴い低下したことから、スクラーゼ阻害性を示す作用は亜臨界水との反応によって生成された物質（メイラード反応生成物やイソフラボンアグリコンなど）の影響が考えられる結果となった。

OLETF ラットに対する亜臨界水処理後のオカラ長期投与試験においてラットの体重変化をみると実験開始第4週から7週にかけてオカラピュール群の体重がコントロール群より有意に増加していることから、本実験で見られたスクラーゼ阻害作用は、通常の食事で抗肥満作用を示すレベルではなかった。

また、OLETF ラットを用いたオカラピュール長期投与試験においては、全ての群において実験開始後4週から7週の間でHbA1cの血中レベルが低下する傾向が見られたが、実験最終日において各群間における有意差は見られなかった。このことは、

未処理のオカラやオカラピューレに含まれる食物繊維の影響が考えられる。実験に用いたオカラピューレは糖質消化酵素活性阻害作用が未処理のオカラより強い作用を示したものを選択して行ったが、それらの酵素活性阻害作用では抗肥満作用や HbA1c の血中レベルの抑制や抗肥満作用についての作用は示されなかった。

一方、亜臨界水処理温度が 220 °C と比較的低温の亜臨界水条件で処理されたオカラピューレにおいて食後の血糖値上昇抑制効果が期待できる結果となった。

第 3 章では、温度を変化させた亜臨界水条件下で反応させたオカラの ACE 活性阻害性および、亜臨界水処理後のオカラを SHR に長期投与した場合の血圧上昇抑制作用について検討した。

ACE 活性阻害性は未処理のオカラには殆どみられず、亜臨界水処理温度が高くなるにつれて ACE 活性阻害性は強くなる傾向が見られた。この結果は亜臨界水処理によるオカラに含まれる大豆タンパク質の低分子化によって ACE 活性阻害性を示すペプチドが生成した可能性が考えられる。一方、SHR を用いた亜臨界水処理後のオカラを用いた長期投与試験では、実験開始 6 週から 8 週にかけて、全ての実験群で収縮期血圧、拡張期血圧ともに低下する傾向がみられた。しかし、それぞれの実験群間において収縮期血圧および拡張期血圧の変化には有意差がみられなかった。

ACE 活性阻害性を有するペプチドを生体に長期投与した報告では、投与後一貫して徐々に血圧が低下し続けることが報告されているが、本実験における動物 (SHR) 試験結果から、同様な血圧上昇抑制効果は確認できなかった。また、未処理のオカラとオカラピューレを投与した群で血圧は同様な経時変化を示したことから、オカラピューレが示した ACE 活性阻害性は経口投与で血圧降下を示すことはできなかった。

第4章では亜臨界水処理後のオカラにおける抗酸化性を DPPH ラジカル消去活性によって検討した。また、

抗酸化性は、未処理のオカラにはほとんどみられず、亜臨界水の温度が高くなるにつれて抗酸化性も強くなる傾向が見られた。特に亜臨界水処理後のオカラが褐色を示すようになる 300 °C から 340 °C にかけては著しく抗酸化性が強くなる結果がみられた。この結果は亜臨界水反応によってオカラの成分が低分子化されたことにより、抗酸化性を示すペプチドが生成された可能性や生成されたアミノ酸と糖類によるアミノカルボニル反応による生成物（メイラード反応生成物）による可能性が考えられた。

第5章では亜臨界水処理後の抗プロモーター作用と抗腫瘍性について検討した。

抗プロモーター作用は、発癌プロモーション過程の molecular mechanism を研究する tool として確立されている細胞であるマウス上皮細胞由来の JB6 C1 41 細胞を用いてソフトアガーアッセイにて検討した。また、結腸がん細胞を足蹠に移植したマウスの延命効果から抗腫瘍性を検討した。

オカラピューレ DMSO 抽出液が、JB6 C1 41 細胞の EGF で誘導したコロニー形成を有意に抑制したが、その一方でオカラピューレ DMSO 抽出液は、JB6 C1 41 細胞の細胞増殖に対しては影響を与えなかった。これらの結果から、オカラピューレ中には抗プロモーター活性を持つ成分が含まれている可能性があると考えられた。

一方、30 MPa、340°C の亜臨界水条件で約 2.7 秒という短時間の反応で得られたペースト状のオカラ（オカラピューレ）を用いた試験において、結腸癌細胞を移植したマウスを用いた試験で延命傾向がみられた。

以上よりオカラピューレは、抗腫瘍性、抗プロモーター活性を有することが示唆され、新たな機能性を有する素材としての発展への可能性が期待される。

第6章ではオカラの有効利用を目的に、*Bacillus coagulans*により発酵させたオカラをラットに投与し、盲腸内フローラや免疫物質への影響を検討した。その結果、オカラ発酵物群ではビフィズス菌が有意に増加し、血中のIFN- γ レベルも有意に増加していた。一方、総コレステロール値については有意な低下がみられた。これらのことから、オカラ発酵物は腸内ビフィズス菌を増加させることで整腸作用のみならず、抗アレルギー作用など免疫系にも影響を及ぼすことが考えられ、機能性食品や機能性素材としての発展が期待できる結果がみられた。

第7章では第6章で*Bacillus coagulans*によるオカラ発酵物に抗アレルギー作用が示唆されたことから、NC/Ngaマウスを用いて抗アレルギー効果について検討した。

TNCBによる接触性過敏症を引き起こしたマウスではオカラ発酵物を経口投与した群で耳介厚と臨床スコア両者ともにコントロール群と比較して有意な低下がみられたことから、オカラ発酵物の経口投与はアレルギー症状を軽減した。

また、血漿中IL-4レベルの低下やそれに伴うIgEレベルの低下がみられたことからオカラ発酵物の経口投与はTh2細胞に抑制的な影響を示すことが示唆された。*Bacillus coagulans*によるオカラ発酵物には即時型アレルギーに対する抑制作用がみられたことから、機能性食品として発展が期待される。

参考文献

- 1) Sasaki M., Kabyemela B., Malaluan R., Hirose S., Takeda N., Adschiri T., Arai K. Cellulose hydrolysis in subcritical and supercritical water. (1998). *J. Supercrit. Fluids*, 13, 261-268
- 2) Akiyama N, and Philip E.S., Roles of water for Chemical Reactions in High-Temperature water (2002) *Chem. Rev.*, 102, 2725-2750.
- 3) 高井東一郎, 天野原成, 栗津透, 西正人, 笠間健二, 農林水産省フードシステム連携強化・循環推進技術確立事業成果報告書, (2000) 東京, 社団法人食品需給研究センター, 135-161.
- 4) 吉井英文, 古田 武, オカラの水溶性多糖抽出製造法に関する工学的研究, (1995) 大豆たん白質研究会会誌, 16, 41-45.
- 5) 生島 豊, 超臨界水の特性を利用した無触媒有機合成反応, 化学と工業, (2000) 第53巻, 第2号, 696-699.
- 6) Ikushima Y., Hatakeda K., Sato O., Yokoyama T., Arai M. Noncatalytic Organic Synthesis using Supercritical Water: The Peculiarity Near the Critical Point (1999) *Angew. Chem. Int. Ed.*, 38, 2910-2940.
- 7) 光岡智足, 家畜生産における生菌剤の利用, ビフィズス, (1991) 5, 1-18.
- 8) 北原覚雄 編, 乳酸菌の研究, (1966) 第1版, 東大出版会, pp.501.
- 9) 三沢 豊, 松原 良, 犬塚猛雄, 食品における有孢子乳酸菌の応用に関する研究, (1972) 日本食品工業学会誌, 19, 144-150.
- 10) 飯沼竜一, 薬剤学, (1961) 21, 48.
- 11) Fuchs C., Antacids; their function formulation and evaluation (1949) *Drug and Cosmetic Industry*, 64, 692-772.
- 12) 三沢 豊, 松原 良, 犬塚猛雄, 食品における有孢子乳酸菌の応用に関する研

- 究, (1972) 日本食品工業学会誌, 19, 144-150.
- 13) 日本乳酸菌学会編, 乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス, (2010) 京都大学学術出版会, 京都, pp. 495-541.
- 14) O' Toole D. K., Characteristics and use of okara, the soybean residue from soybean milk production—a review (1999) *J. Agric. Food Chem.*, 47, 363-371.
- 15) Jackson C. -J. C., Dini J. P., Lavandier C., Rupasinghe H. P. V., Faulkner H., Poysa V., Buzzel D. and DeGrandis S., Effects of processing on the content and composition of isoflavones during manufacturing of soy beverage and tofu (2002) *Process Biochem.*, 37, 1117.
- 16) Sung J. H., Lee S. J., Park K. H. and Moon W., Isoflavones inhibit 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in vitro (2004) *Biosci. Biotech. Biochem.*, 68, 428-432.
- 17) 小野伴忠, 下山田真, 村本光二, 大豆の機能と科学, (2012) 株式会社朝倉書店, 東京, pp27-50.
- 18) 笠井尚哉, オカラの高度酵素分解と機能性探索, (2005) 環境技術, 34, 491-497.
- 19) 五明紀春, 食品の品質と成分間反応, (1990) 並木満夫, 松下雪郎編, 講談社, 東京, pp237.
- 20) 加藤博道, メイラード反応生成物の安全性と食品機能, (1991) 澱粉科学, 38, 109-114.
- 21) 原田修, 脇田義久, 吉田和利, 大橋智子, 桑田実, 藤村庄, 高温高压水によるオカラの処理および処理物の性状, (2004) 日本食品化学工学会誌, 51, 149-154.
- 22) Ebihara K., Masuhara R., Kiriya S. and Manabe M., Correlation between

- viscosity and plasma glucose and insulin-flattening activities of pectins from vegetables and fruits in rats (1981) *Nutr. Rep. Int.* 23, 985-992.
- 23) Ebihara K. and Kiriyama S., Comparative effects of water-soluble and water-insoluble dietary fibers on various parameters relating to glucose tolerance in rats. (1982) *Nutr. Rep. Int.* 26, 193-201.
- 24) Osaki S., Kimura T., Sugimoto T., Hizukuri S., and Iritani N., (2001). *J. Nutr.* 131, 796-799.
- 25) 江崎秀雄, 石田景子, 高須萌, 大豆イソフラボン麹発酵物の糖質消化酵素に対する阻害作用, (2013) 椛山女学園大学研究論集, 自然科学篇, 44, 19-28.
- 26) Hirano M., Miura M., and Gomyo T., Kinetic Analysis of the Inhibition by Melanoin of Trypsin. (1996) *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60, 458-462.
- 27) 三浦理代, 五明紀春, 唾液 α -アミラーゼ活性測定法の開発およびその褐変食品への応用, (1994) 日栄・食糧会誌, 47, 35-41.
- 28) 百瀬晶子, 後藤直子, 早瀬文孝, 味噌の食後血糖に及ぼす影響, (2010) 日本食品科学工学会誌, 57, No. 2, 63-69.
- 29) 海老原 清, 食物繊維の栄養・生理機能に関する研究, (2008) 日栄・食糧会誌, 61, 第1号, 3-9.
- 30) Brouwer AC., and Kirsch JF., Investigation of diffusion-limited rates of chymotrypsin reactions by viscosity variation (1982) *Biochemistry*, 21, 1302-1307.
- 31) Isaksson G., Lundquist I., and Ihse I., Effect of dietary fiber on pancreatic enzyme activity *in vitro*. (1982) *Gastroenterology*, 82, 918-924.
- 32) Ebihara K., Masuhara R., Kiriyama S., and Manabe S., Correlation between viscosity and plasma glucose- and insulin-flattening activities of

- pectins from vegetables and fruits in rats (1981) *Nutr. Rep. Int.* 23, 985-992.
- 33) Ebirhara K., and Kiriyama S., Comparative effects of water-soluble and water-insoluble dietary fibers on various parameters relating to glucose tolerance in rats (1982) *Nut. Rep. Int.*, 26, 193-201.
- 34) Ebihara K., Masuhara R., and Kiriyama S., Major determinants of plasma glucose-flattening activity of a water-soluble dietary fiber : effect of konjac mannan on gastric emptying and intraluminal glucose-diffusion (1981) *Nutr. Rep. Int.*, 23, 1145-1156.
- 35) Jenkins D. J., Wolever T. M., Leeds A. R., Gassul M. A., Haisman P., Dilawari J., Goff D. V., Metz G. L. and Alberti K. G., Dietary fibers, fiber analogues, and glucose tolerance: importance of viscosity (1978) *Br. Med. J.*, 27, 1392-1394.
- 36) 土井邦紘, 食物繊維の糖尿病治療への応用IV とくに食物繊維の粘度と食後血糖上昇抑制効果. (1982) *糖尿病*, 25, 197-203.
- 37) Kwon D. Y., Jang J. S., Lee J. E., Kim Y. S., Shin D. H., Park S., The isoflavonoid aglycone-rich fractions of Chungkookjang, fermented unsalted soybeans, enhance insulin signaling and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity in vitro (2006) *Biofactors*, 26, 245-258.
- 38) Giacco R., Parillo M., Rivellese A. A., Lasorella G., Giacco A., D' Episcopio L. and Riccardi G., Long-term dietary treatment with increased amounts of fiber-rich low-glycemic index natural foods improves blood glucose control and reduces the number of hypoglycemic events in

- type 1 diabetic patients (2000) *Diabetes Care*, 23, 1461-1466.
- 39) 鈴木健夫, 石川宣子, 目黒 熙, 食品中のアンジオテンシン I 変換酵素阻害能について (1983) 日農化会誌, 57, 1143-1146.
- 40) Matsui T., Matsufuji H., Seki E., Osajima K., Nakashima M. and Osajima Y., Inhibition of angiotensin I-converting enzyme by *Bacillus lichemiformis* alkaline protease hydrolysates derived from sardine muscle (1993) *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57, 922-925.
- 41) Yokoyama K., Chiba H. and Yoshikawa M., Peptide inhibitors for angiotensin I-converting enzyme from thermolysin digest of dried bonito (1992) *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56, 1541-1545.
- 42) Yamamoto N. and Takano T., Antihypertensive peptides from milk protein, (1999) *Nahrung*, 43, 159-164.
- 43) 四十九院成子, 吉田恵子, 永野衣絵, 福場博保, 大豆の加熱調理によるアンジオテンシン変換酵素阻害活性の増加 (1997) 家政誌, 48, 443-447.
- 44) Godsel L. M., Leon J. S., Engman D. M., Angiotensin converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor antagonists in experimental myocarditis (2003) *Curr. Pharm. Des.*, 9, 723-735.
- 45) Suzuki H. (2009). Therapeutic efficacy of renin-angiotensin blockade in patients receiving dialysis. *Ther Adv. Cardiovasc. Dis.*, 3, 397-405.
- 46) 田中真実, 長内智宏, 奥村 謙, 工藤重光, 渡辺 毅, 及川和志, 打田悌治, 金澤武道, 大豆ペプチドによる高血圧自然発症ラットに対する血圧降下作用 (2003) 日臨栄会誌, 24, 203-207.
- 47) 及川和志, 田中真実, 渡辺 毅, 工藤重光, 打田悌治, 金澤武道, 大豆蛋白質由来ペプチドの長期継続投与による血圧低下作用 (2002) 日未病システム会誌, 8.

- 196-199.
- 48) Takahashi M., Terada Y., Nakai I., Nakanishi H., Yoshimura H., Mori S. and Nishizawa N.K., The role of nikotianamine in the intracellular delivery of metals and plant reproductive development (2003) *The plant Cell*, 15, 1263-1280.
- 49) 竹中哲夫, 村山崇志, 竹中陽子, 大豆煮汁からのニコチアナミンの単離と加熱処理による変動 (2009) 日食科工会誌, 56, 6-13.
- 50) Yukio K., Wholesomeness of soybean as a Fermented food material (2000) 醸協. 95, 386-394.
- 51) 久代登志男, 原澤信介, 上松瀬勝男, 高血圧とインスリン (1999) 日内会誌, 88, 223-229.
- 52) 寺中毅頼, 江澤真, 松山惇, 海老根英雄, 清澤 功, 米味噌, 麦味噌, および豆味噌抽出液のアンギオテンシン I 変換酵素抑制効果 (1995) 日農化会誌, 69, 9, 1163-1169.
- 53) 塚本知玄, 田山一平, 調理加工から見た大豆の健康機能性成分 (2007) 日本調理科学会誌, 40, 121-126.
- 54) 菅野道廣, 高松清治, 大豆の生理活性成分とその効用, (2004) 醸協, 99, 148-155.
- 55) Messina M., Legume and Soybeans, Overview of their nutritional profiles and health effects (1999) *Am. J. Clin. Nutr.*, 70, 439-450.
- 56) Messina M., Grandner C. and Barnes S., Gaining insight into the health effects of soy but a long way still go: commentary on the fourth international symposium on the role of soy in preventing and treating chronic disease (2002) *J. Nutr.*, 132, 547-551.

- 57) Halliwell B., Gutteridge J.M.C. and Gross C.E., Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? (1998) *J. Lab. Clin. Med.*, 119, 598-620.
- 58) 加藤博通, 食品・生体系におけるアミノカルボニル反応に関する研究, (1992) 日農化会誌, 66, 101-109.
- 59) Dittrich R., El-Massry F., Kunz K., Rinaldi F., Peich C.C., Beckmann M.W. and Pischetrieder M. Maillard reaction products inhibit oxidation of human low-density lipoprotein in vitro (2003) *J. Agric. Food Chem.*, 51(13), 3900-3904.
- 60) 篠原和毅, 鈴木建夫, 上野川修一編, 食品機能研究法 (2000) 東京, 光琳, pp. 218-220.
- 61) 末綱邦男, 大豆タンパク質のプロテアーゼ消化物からのペプチドの分離同定とその活性酸素消去能について (1999) 日栄・食糧会誌, 52, 225-228.
- 62) Kitagawa, I., Yoshikawa, M., Kobayashi, K., Imakura, Y., Im, K. S. and Ikenishi, Y. Saponin and saponinol (1980) *Chem. Pharm. Bull.*, 28, 296-300.
- 63) 酒向史代, 勝田啓子, 練り味噌調製による褐変化と抗酸化性 (2001) 日本調理科学会誌, 34, 73-79.
- 64) 田村貴起, 竹中陽子, 竹中哲夫, おから由来水溶性抗酸化物質の精製およびその性状 (1999) 日食科工会誌, 46, 303-310.
- 65) Kato H., Seon B. K., Hayase F. and Nguyen C., Desmutagenicity of Melanoidins against Mutagenic Pyrolysates (1985) *Agric. Biol. Chem.*, 49, 3093-3095.
- 66) 山口直彦, 岡田安司, 内藤茂三, *Coriolus versicolor* IF0 30340 により脱色されたメラノイジンの抗酸化性 (1990) 日食工会誌, 37, 676-681.
- 67) 山口直彦, アミノカルボニル反応物の抗酸化性 (1991) 澱粉科学, 38,

99-107.

- 68) 村上浩紀, 食品成分中の抗腫瘍物質 (1980) 栄養と食糧, 33, 49-60.
- 69) Ohkami H., Tazawa K., Yamashita I., Shimizu T., Muraki K., Kobashi K., Fujimaki M., Effects of apple pectin on fecal bacterial enzymes in azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis (1995) *Jpn. J. Cancer Res.* 86, 523-529.
- 70) Pienta, K. J., Naik, H., Akhtar, A., Yamazaki K., Replogle T.S., Lehr J., Donat T.L., Tait L., Hogan V. and Raz A., Inhibition of spontaneous metastasis in rat prostate cancer model by oral administration of modified citrus pectin (1995) *J. Natl. Cancer inst.*, 87, 348-353.
- 71) 市田淳治, リンゴペクチンおよびペクチンオリゴ糖の製造と生理機能, (2005) 日未病システム会誌, 11(2), 304-308.
- 72) Nomura M., Ichimatsu D., Moritani S., Koyama I., Dong Z., Yokogawa K., Miyamoto K., Inhibition of Epidermal Growth Factor-induced Cell Transformation and Akt Activation by Caffeine (2005) *Mol. Carcinog.* 44, 67-76.
- 73) Izumi T., Mariusz K.P., Osawa S., Obata A., Tobe K., Saito M., Kataoka S., Kubota Y. and Kikuchi M., Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans (2000) *J. Nutr.* 130, 1695-1699.
- 74) Pyo Y., Lee T. and Lee Y., Effect of Lactic Acid Fermentation on Enrichment of Antioxidant Properties and Bioactive Isoflavones in Soybean (2005) *J. Food Sci.*, 70, 215-220.
- 75) 西村直道, 食物繊維およびタウリンの血中コレステロール低下機構に関する

- 研究 (2008) 日栄・食糧会誌, 61, 11-19.
- 76) 長田恭一, 川上祐生, 清澤朋子, 大豆イソフラボン-アグリコン摂取による脂質代謝調節および抗酸化機能の追求: 性別による調節作用の違い (2003) 大豆たん白質研究, 6, 108-115.
- 77) 小幡明雄, 大豆イソフラボンアグリコンの有効性, (2001) *New Food Industry*, 43, 1-5.
- 78) Yokomizo A., Takenaka Y. and Takenaka T., Antioxidative activity of peptides prepared from okara protein (2002) *Food Sci. Technol. Res.*, 8, 357-359.
- 79) Miksicek R. J., Interaction of naturally occurring nonsteroidal estrogens with expressed recombinant human estrogens receptor (1994) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 49, 153-160.
- 80) Chang H.H., Robinson A.R. and Common R.H., Excretion of radioactive diadzein and equol as monosulfates and disulfates in the urine of the laying hen (1975) *Can. J. Biochem.*, 53, 223-230.
- 81) Ingram D., Sanders K., Kolybaba M. and Lopez D., Case-control study of phyto-oestrogens and breast cancer (1997) *Lancet*, 350, 990-994.
- 82) 日本乳酸菌学会編, 乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス (2010) 京都大学学術出版会, 京都, pp. 8-9
- 83) 光岡知足, 家畜生産における生菌剤の利用 (1991) *ビフィズス*, 5, pp1-18.
- 84) 光岡知足, 腸内細菌の世界 (1980) 東京, 叢文社, pp. 43-327.
- 85) 光岡知足, ヒトフローラ研究 現在と将来 (2005) *腸内細菌誌*, 19, 179-192.
- 86) 光岡知足, 乳酸菌の効用と新しい利用分野 (1984) *日食工会誌*, 31, 285-296.
- 87) Tomomi K. and Yoshikazu N., Immunomodifying Effects of Probiotics (2013)

- Jpn. J. Food Microbiol.*, 30, 1-14.
- 88) Hayakawa K., Mizutani J., Wada K., Masasi T., Yoshihara I. and Mitsuoka T., Effects of soybean oligosaccharides on human faecal flora (1990) *Microbial. Ecol. Health Dis.*, 3, 293-303.
- 89) Björkstén B., Naaber P., Sepp E. and Mikelsaar M., The intestinal microflora in allergic Estonian and Swedish 2-year old children (1999) *Clin. Exp. Allergy*, 29, 342-46.
- 90) 光岡知足, 21世紀腸内フローラ研究の新しい動向 (2010) 東京, 学会出版センター, pp. 111-125.
- 91) Bjorksten B., Naaber P., Sepp E., Mikelsaar M., The intestinal microflora in allergic Estonian and Swedish 2-year-old children (1999) *Clin. Exp. Immunol.*, 29, 342-346.
- 92) Holt P.G., Macaubas C., Prescott S.L., and Sly P.D., Microbial stimulation as an aetiological factor in atopic disease (1999) *Allergy*, 54, 12-16.
- 93) Majamaa H., Isolauri E., Probiotics : A novel approach in the management of food allergy (1997) *J. Allergy Clin. Immunol.*, 99, 179-185.
- 94) Kitagaki H., Fujisawa S., Watanabe K. and Shiohata T., Immediate-type hypersensitivity response followed by late reaction is induced epicutaneous application of contact sensitizing agents in mice (1995) *J. Invest. Dermatol.*, 105, 749-755.
- 95) Abbas A., Murphy K.M. and Sher A., Functional diversity of helper T lymphocytes (1996) *Nature*, 383, 787-793.
- 96) Neurath M.F., Finotto S. and Glimcher L.H., The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity (2002) *Nat. Med.*, 8, 563-567.

- 97) Sakai T., Kogiso M., Mitsuya K. and Yamamoto S., Effect of genistein on immune responses in NC/Nga mice used as an animal model for atopic dermatitis (2004) *Protein Resarch Japan*, 7, 130-136.
- 98) Kalliomaki M., Salminen S., Arvilommi H., Kero P. and Isolauri E., Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomized placebo-controlled trial (2001) *The Lancet*, 357, 1076-1079.

謝 辞

本論文の作成にあたり、終始御懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜りました石川県立大学大学院 榎本俊樹教授に衷心より感謝の意と御礼を申し上げます。

副査としてご審査頂きました石川県立大学大学院 石田信昭教授、小柳喬准教授に深く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、多大なるご指導、親切なご助言をいただいた金沢大学医学部附属病院薬剤部研究室 宮本謙一教授、北陸大学臨床薬学教育センター 野村政明教授、北陸大学薬学部 鍛冶聡教授、信州大学医学部小泉知展教授、北陸学院大学短期大学部食物栄養学科 坂井良輔教授に深く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、多大なるご協力を頂きました羽二重豆腐株式会社、藤原英二氏、川嶋正男氏、株式会社高井製作所、高井東一郎氏、栗津透氏、天野原成氏に深く御礼申し上げます。

研究業績

1. 学術論文

- 1) 西 正人, 榎本俊樹, 坂井良輔, 亜臨界水処理後のオカラにおける抗腫瘍性及び抗プロモーター作用 (2012) 日本補完代替医療学会誌, 9, 129-135.
- 2) 西 正人, 栗田泰典, 松井 裕, 熊谷英彦, 武 春美, 道島俊英, 笹木哲也, 川嶋正男, 藤原英二, 久田 孝, 小柳 喬, 榎本俊樹, ラット盲腸内フローラに及ぼすオカラ発酵物投与の影響 (2014) 日本補完代替医療学会誌, 11, 89-94.