

地域農産物の機能性表示のための 手引書



農林水産省戦略的プロジェクト研究推進事業

「市場開拓に向けた取組を支える研究開発」

地域の農林水産物・食品の機能性発掘のための研究開発

ー地域農産物発掘コンソーシアムー

改訂履歴

版 数	発行日	改訂者	改訂内容
第 1 版	2021 年 7 月 12 日	小堀 真珠子	初版発行

2021 年 7 月 12 日版

目次

はじめに	1
免責事項	1
I 機能性表示食品の現状と課題	2
II 農産物およびその加工品の機能性表示食品届出に向けた技術のポイント	4
1. 対象とする農産物・食品、機能、関与成分の想定	4
2. 科学的根拠（ヒト試験（または研究レビュー）、メカニズム解明）の提示	5
3. 分析法の整備	6
4. 成分含量の評価と規格の決定での留意点	7
III 研究事例	11
1. 納豆	11
（1）対象とする食品、機能、関与成分の選定理由	11
（2）科学的根拠（ヒト試験（または研究レビュー）、メカニズム解明）の提示	12
（3）分析法の整備	20
（4）成分含量の評価と規格の決定	26
（5） γ -PGA 高含有納豆製造を安定化する試み	27
（6）機能性表示食品の届出、マーケティング戦略など	28
2. 野沢菜漬	37
（1）対象とする食品、機能、関与成分の選定理由	37
（2）科学的根拠（ヒト試験（または研究レビュー）、メカニズム解明）の提示	38

(3) 分析法の整備	44
(4) 成分含量の評価と規格の決定	49
(5) 機能性表示食品の届出、マーケティング戦略など	50
3. 沖縄野菜	54
(1) 対象とする食品、機能、関与成分の選定理由	54
(2) 科学的根拠（ヒト試験（または研究レビュー）、メカニズム解明）の提示	55
(3) 分析法の整備	55
(4) 成分含量の評価と規格の決定	56
(5) 機能性表示食品の届出、マーケティング戦略など	60
IV 参考事例	63
リンゴ（生鮮および加工食品）	63
(1) 対象とする食品、機能、関与成分の選定理由	63
(2) 科学的根拠（ヒト試験（または研究レビュー）、メカニズム解明）の提示	64
(3) 分析法の整備	65
(4) 成分含量の評価と規格の決定	66
(5) 期待される効果	68
担当窓口、連絡先	71

はじめに

我が国の65歳以上の人口の割合は、2020年9月時点で約29%に達しています。高齢化が進む中で、健康寿命延伸に寄与する食生活には常に関心が集まっています。2015年の機能性表示食品制度の開始に伴い、地域特産物を機能性表示食品として付加価値を高める取り組みを促進するため、2016年から5年間、農林水産省委託プロジェクト「市場開拓に向けた取り組みを支える研究開発 地域の農林水産物・食品の機能性発掘のための研究開発」が実施されました。同プロジェクトでは多目的コホート研究の結果等から大豆食品やアブラナ科野菜の摂取が健康の維持・増進に寄与する可能性が示されてきた背景を受けて、茨城県の納豆、長野県の野沢菜漬け、沖縄県のへちまについて機能性表示に向けた研究を実施し、最終年度に、へちまの機能性表示食品の届出が完了しました。本手順書では、新たな地域特産物の機能性表示に向けた取り組みにご活用いただけるよう、農産物等の機能性表示食品届出に向けた技術のポイントとプロジェクトで実施した研究事例を紹介すると共に、参考事例として、複数の生鮮食品と加工食品の機能性表示食品が販売されているリングを紹介いたします。

■ 免責事項

- 地域特産物発掘コンソーシアム（代表機関 農研機構）は、利用者が本手順書に記載された技術を利用したこと、あるいは技術を利用できないことによる結果について、一切責任を負いません。
- 本手順書に記載の図表は地域特産物発掘コンソーシアム参画機関が著作権を有するか、許諾を得る等して使用を認められたものです。

I. 機能性表示食品の現状と課題

2015年4月に開始された**機能性表示食品制度**では、国が有効性や安全性の審査をして個別に許可を受けて機能性を表示する**特定保健用食品制度**、およびビタミン等の特定の栄養成分の機能を決められた基準に基づいてパッケージに表示する**栄養機能食品制度**に加えて、事業者の責任で、科学的根拠に基づいた機能性を商品パッケージに表示できるようになりました。**機能性表示食品**は「バランスのとれた食生活を基本として、消費者が正しい情報を得て選択できるように、機能性をわかりやすく表示した食品」であり、国の定めるルールに基づき、事業者が食品の安全性と機能性に関する科学的根拠などの必要な事項を、販売前に消費者庁長官に届け出ることによって、機能性を表示することができます。

保健機能食品：健康の維持・増進に役立つ機能や栄養成分の機能を表示することができる食品

特定保健用食品



健康の維持増進に役立つ機能性や安全性について国が審査を行い、消費者庁長官が表示を許可した食品。

栄養機能食品

すでに科学的根拠が確認された栄養成分を一定の基準量含み、国が定めた表現によって機能性を表示する食品。

機能性表示食品

事業者の責任において、科学的根拠に基づいた(健康の維持・増進に役立つ)機能性を表示した食品。

図 I -1 機能性を表示できる食品

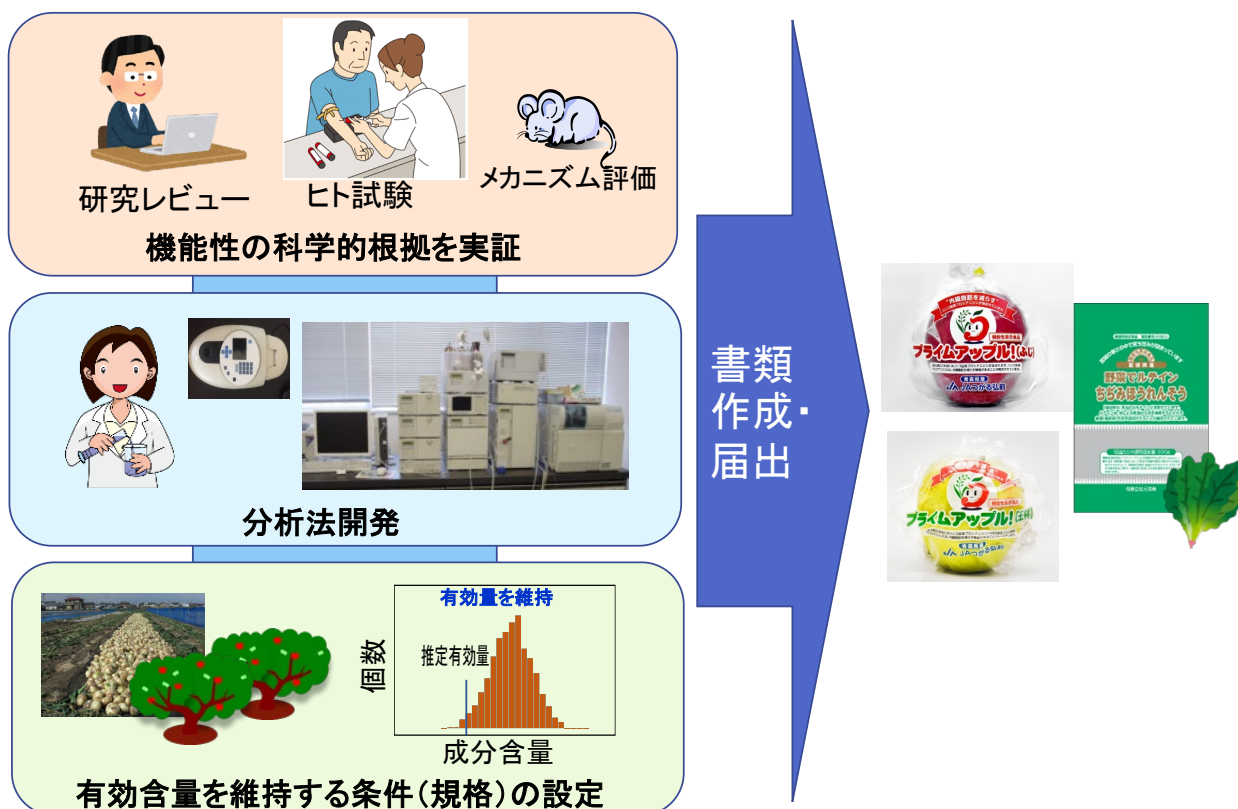
機能性表示食品の市場規模は急速に伸びて 2500 億円を超え、特定保健用食品に並んでいます。さらに 2020 年度は 3000 億円を超えると予測されています。機能性表示食品では、特定保健用食品では対象となっていなかった生鮮食品も含めたすべての食品が対象となり、2021 年 3 月 30 日現在、消費者庁の届出情報検索のウェブサイト (<https://www.fld.caa.go.jp/caaks/cssc01/>) に掲載されている機能性表示食品は 3875 件に達しました。そのうちサプリメントが 1970 件、その他の加工食品が 1800

件、生鮮食品は 105 件です。届出日が 2020 年 4 月以降の生鮮食品は 39 件で、件数は増加してきたもののその割合はまだ少ないのが現状です。機能性表示食品の届出には、健康機能性に関わる成分（機能性関与成分）の含有量を明らかにして、1 日当たりの摂取目安量を設定する必要があります。しかし、生鮮農林水産物やその簡易な加工食品では、その 1 つ 1 つに含まれる分量が大きく異なることから、一般的な加工食品とは異なる検討が必要です。また、機能性の科学的根拠はその他のサプリメントや加工食品と同様に、最終製品または機能性関与成分に関する人を対象とする臨床試験の研究レビューで説明する必要があり、農林水産物の機能性表示食品の届出は容易とはいえません。

「地域の農林水産物・食品の機能性発掘のための研究開発」では、コホート研究の結果等から健康の維持・増進に関わることが期待される 3 地域の農産物について、機能性表示等による高付加価値化の実現を目指して研究を行いました。また、「革新的技術開発・緊急展開事業（うち経営体強化プロジェクト）」ではリンゴの機能性表示食品の届出を目指した研究を行い、現在までに生鮮、ドライフルーツ、ジュースでリンゴの機能性表示食品の届出・販売を実現しています。本手引書では、地域の農林水産物の高付加価値化と農林水産業の活性化に貢献するため、機能性表示食品届出に向けた技術のポイントを示すと共に、納豆（茨城県）、野沢菜漬（長野県）、沖縄野菜（沖縄県）およびリンゴの研究事例を報告します。

Ⅱ. 農産物およびその加工品の機能性表示食品届出に向けた技術のポイント

農産物およびその加工品の機能性表示食品届出に向けた研究では、**1. 対象とする農産物またはその加工食品を決め、その健康機能性や関与成分を想定した後、2. 科学的根拠の提示、3. 分析法の開発・整備、4. 機能性関与成分の含量評価と規格の決定、**が必要です。



図Ⅱ-1 機能性表示食品の届出に向けた研究

1. 対象とする農産物・食品、機能、関与成分の想定

ごはんを中心に多様な副食を組み合わせた日本型食が、健康的で栄養バランスに優れた食生活として注目されています。コホート研究等様々な調査・研究の結果から、各地域で

生産される農産物・食品の健康機能性にも期待が高まっています。機能性表示を目指す農産物・食品を決め、文献検索等により、健康機能性および機能性関与成分を推定して、機能性表示の届出に向けた以下の検討を行います。

2. 科学的根拠（ヒト試験（または研究レビュー）、メカニズム解明）の提示

機能性表示食品では、国が安全性と機能性の審査を行うことはなく、事業者は消費者庁がウェブサイト等で公表する「機能性表示食品の届出等に関するガイドライン」（以下ガイドライン）¹⁾に基づいて届出を行い、容器包装への表示を行います。特定保健用食品では、機能性の科学的根拠は**人を対象とする臨床試験**で説明する必要がありますが、機能性表示食品では、それに加えて、**最終製品または機能性関与成分に関する研究レビュー**で説明することができます。生鮮食品では、その殆どが科学的根拠を機能性関与成分に関する研究レビューで説明しています。研究レビューは専門知識を持った複数の人で実施する必要があり、その基本的考え方、実施手順、様式等はガイドラインに詳しく記載されています。農林水産物の機能性表示に広く利用できるように、農研機構では、複数の農林水産物の機能性関与成分について研究レビューを行って、その結果を届出様式作成例としてウェブ上で公開しています（表Ⅱ-1）²⁾。依頼に応じてファイルを提供しており、生鮮の農林水産物やその加工品の機能性表示の届出への取組みに役立ちます。これまでに、ウンシュウミカンおよび生鮮（または一次加工品）のリンゴのすべてで、農研機構の研究レビューが用いられている他、緑茶やホウレンソウ、大麦、また GABA の研究レビューは、バナナやキノコ等の様々な農産物の機能性表示食品の届出に用いられています。

一方、最終製品を用いた人を対象とする臨床試験は、客観性を確保する観点から、原則として、試験食摂取群とプラセボ食摂取群を対照とした二重盲検並行群間比較試験を行います。「特定保健用食品の表示許可等について」の別添 2「特定保健用食品申請に係る申請書作成上の留意事項」に準拠する他、ガイドラインと「機能性表示食品の届出

等に関する質疑応答集」³⁾ に留意点が記載されています。

表Ⅱ-1 農研機構のウェブページに掲載された農産物の研究レビュー²⁾

公開スケジュール	品目	機能性関与成分	機能表示	システマティックレビュー
公開中	緑茶	メチル化カテキン	本品にはメチル化カテキン（エピガロカテキン-3-O-(3-O-メチル)ガレート）が含まれています。メチル化カテキンは、ハウスダストやほこりなどによる目や鼻の不快感を軽減することが報告されています。	メチル化カテキン1 , メチル化カテキン2
	ウンシュウミカン	β-クリプトキサンチン	本品にはβ-クリプトキサンチンが含まれています。β-クリプトキサンチンは、骨代謝の働きを助けることにより骨の健康維持に役立つことが報告されています。	β-クリプトキサンチン1 , β-クリプトキサンチン2
	ホウレンソウ	ルテイン	本品にはルテインが含まれています。ルテインは、光による刺激から目を保護するとされる網膜（黄斑部）色素を増加させることが報告されています。	ルテイン1 , ルテイン2
	りんご	プロシアニジン	本品にはりんご由来プロシアニジンが含まれます。りんご由来プロシアニジンには体脂肪（内臓脂肪）を減らす機能があることが報告されています。	プロシアニジン1 , プロシアニジン2
	米、野菜、果実、キノコ	GABA	本品にはGABAが含まれています。GABAには高めの血圧を低下させる機能があることが報告されています。	GABA1 , GABA2
	大麦	β-グルカン	本品には大麦由来β-グルカンが含まれています。大麦由来β-グルカンは食後の血糖値の上昇をおだやかにすることが報告されています。	大麦β-グルカン1 , 大麦β-グルカン2
	大豆	イソフラボン	本品には大豆イソフラボンが含まれています。大豆イソフラボンには骨の成分の維持に役立つ機能があることが報告されています。	大豆イソフラボン1 , 大豆イソフラボン2
	緑茶	エピガロカテキンガレート (EGCG)	本品にはエピガロカテキンガレート(EGCG) が含まれます。エピガロカテキンガレート(EGCG) には食後血糖値の上昇をおだやかにする機能が報告されています。	EGCG1 EGCG2
	鶏、魚など	イミダゾールジペプチド	本品にはイミダゾールジペプチドが含まれます。イミダゾールジペプチドには、日常生活での疲労感や日常の身体活動(散歩、家事)程度の運動による一時的な疲労感を軽減する機能があることが報告されています。	イミダゾールジペプチド1 , イミダゾールジペプチド2
	トマトなど	リコピン(リコペン)	本品にはリコピンが含まれています。リコピンにはLDLコレステロールを低下させる機能があることが報告されています。	リコピン1 , リコピン2
	鶏、魚など	アンセリン	本品にはアンセリンが含まれます。アンセリンには尿酸値が高め(尿酸値5.5~7.0mg/dL)の方の尿酸値を低下させるのに役立つ機能があることが報告されています。	アンセリン1 , アンセリン2
	魚	DHA	本品にはDHAが含まれます。DHAには中高齢の方の認知機能の一部である記憶力(数字などの情報を一時的に記憶し思い出す力、日常における建物や物の場所を記憶し思い出す力)を維持する機能が報告されています。	DHA1 , DHA2
	魚	DHA・EPA	本品にはDHA・EPAが含まれています。DHA・EPAには、中性脂肪を低下させる機能があることが報告されています。	DHA・EPA1 , DHA・EPA2

3. 分析法の整備

機能性表示をしようとする農産物や食品に含まれる機能性関与成分量を明示するため、その分析法は妥当性確認により信頼性を証明する必要があります。「妥当性確認された分析法」とは、その性能（精確さ、定量限界、適用可能な濃度範囲など）が、国際的な基

準に基づき客観的に確認された分析法のことで、この方法を正しく用いれば、誰でも同じような分析結果を得ることができます⁴⁾。まだ多くはありませんが、農産物中の機能性成分について妥当性が確認された試験方法が、食品・農林水産品やこれらの取り扱い等の方法などについての規格である日本農林規格（JAS）に制定されています⁵⁾。これらの分析法を用いて第三者の試験機関が実施した分析試験の成績書は、機能性表示の届出に用いることができます。

表Ⅱ-2 農産物中の機能性成分について妥当性が確認された試験方法として制定されている日本農林規格（JAS）⁵⁾

番号	名称
1	べにふうき緑茶中のメチル化カテキンの定量－高速液体クロマトグラフ法（JAS 0002）
2	ウンシュウミカン中のβ-クリプトキサンチンの定量－高速液体クロマトグラフ法（JAS 0003）
3	ほうれんそう中のルテインの定量－高速液体クロマトグラフ法（JAS 0008）
4	生鮮トマト中のリコペンの定量－吸光光度法（JAS 0009）

4. 成分含量の評価と規格の決定での留意点

農林水産省では、機能性表示食品制度の開始当初より、どのように機能性関与成分の含有量を測定して 1 日当たりの摂取目安量を設定したらよいか、またどのように生産・品質管理したらよいか、を資料にまとめて、「農林水産物の機能性表示に向けた技術的対応について－生鮮食品などの取り扱い－」として公開しています⁴⁾。

この資料の III. 研究事例では、1) 表示しようとする食品をサンプリング・分析し、機能性表示に必要な「1 日摂取目安量当たりの関与成分含有量」としての下限值を計算する方法、2) 届出後に、関与成分が必要量含まれていることを確認するためのモニタリングの

方法、および3) 機能性関与成分量のばらつきを小さくし、成分量を揃えるための方法を解説しています。

1) サンプルングでは、表示しようとする食品について、品種、産地、栽培方法等の成分濃度に影響する要因をなるべく揃えて絞り込み、関与成分の含量の個体差を小さくすること、また分析法は「妥当性確認」によりその性能が示されていることが重要です。サンプルングした食品の分析値を統計解析して含量を推定した結果から、表示する食品の機能性関与成分の「1日摂取目安量当たり」の下限値を設定します。1日摂取目安量当たりの成分含有量の計算に利用できるエクセルファイルもウェブ上で公開されています。

(<http://www.affrc.maff.go.jp/kinousei/gijyututekitaio.htm>)

2) 届出後のモニタリングでは、サンプルング計画に準じてモニタリングを計画し、必要な成分量が含まれていることを確認します。必要な成分量が含まれていなかった場合には、原因を特定して改善するか、あるいは天候等による年次変動等の理由で改善出来ない場合は表示を止めるか、規格を見直して新規の届出を行う必要があります。

3) 機能性関与成分量のばらつきを小さくし、成分量を揃えるための方法として、成分含量が高い品種を選択する方法、栽培や加工等の生産管理マニュアルの作成、非破壊分析や代替指標の測定により選別する方法等が挙げられています。

生鮮食品として最初に届出された機能性表示食品のうちの1つであるウンシュウミカンでは、関与成分であるβ-クリプトキサンチンの濃度が糖度との相関が高いことを示し、非破壊選果機で測定される糖度が一定以上のウンシュウミカンを出荷することにより下限値を保証する出荷管理の方法を示しました⁵⁾。さらに全国の主要な産地における調査で、品種や産地に関わらず一定以上のβ-クリプトキサンチン量が含まれ、その含有量と糖度との相関が高かったことが報告され⁶⁾、届出は三ヶ日町農業協同組合から静岡県、広島県、和歌山県、愛媛県の農業協同組合や個人農園へと広がり、令和3年1月1日現在で生鮮食品95

件のうち 21 件と最も多くの届出がされています。また、30 件の加工食品が大麥 β-グルカン
を機能性関与成分とする機能性表示食品として届出、公開されており、農研機構では、
β-グルカンを高含有するもち性大麥の品種、栽培管理、導入効果等を示した、もち性大麥
品種標準作業手順書を公表しています⁷⁾。その他、メチル化カテキンを関与成分とする 20
件の加工食品が、メチル化カテキンを多く含む「べにふうき」緑茶を原材料とする機能性表示
食品として届出・公開されており、農研機構では「べにふうき」緑茶の栽培・加工マニュアル⁸⁾
も公開しています。

1) 消費者庁「機能性表示食品の届出等に関するガイドライン（令和2年11月30日一部改正）」

https://www.caa.go.jp/policies/policy/food_labeling/foods_with_function_claims/pdf/foods_with_function_claims_201130_0002.pdf（2021年3月現在）

2) 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構（農研機構）「農産物の研究レビュー」

https://www.naro.affrc.go.jp/project/f_foodpro/2016/063236.html（2021年3月現在）

3) 消費者庁「機能性表示食品に関する質疑応答集（令和2年11月30日一部改正）」

https://www.caa.go.jp/policies/policy/food_labeling/foods_with_function_claims/pdf/foods_with_function_claims_201130_0004.pdf（2021年3月現在）

4) 農林水産省技術会議事務局「農林水産物の機能性表示に向けた技術的対応について－生鮮食品などの取り扱い－（平成27年8月）」

http://www.affrc.maff.go.jp/docs/kinousei_pro/pdf/150824_reference_fix.pdf
（2021年3月現在）

5) 農林水産省「JAS 一覧：試験方法」

http://www.maff.go.jp/j/jas/jas_kikaku/kikaku_itiran2.html#shiken (2021年3月現在)

6) 杉浦実. 国産カンキツ類に多いβ-クリプトキサンチンと機能性食品の開発生鮮物で初めての機能性表示食品. 化学と生物. 2017; 55(8): 566-571.

7) 農研機構「もち性大麦標準作業手順書(2020年5月)」

https://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/publication/laboratory/naro/sop/135015.html (2021年3月現在)

8) 農研機構「べにふうき栽培・加工マニュアル」

https://www.naro.go.jp/publicity_report/press/files/vegetea050317-1_1.pdf
(2021年3月現在)

Ⅲ. 研究事例

1. 納豆

(1) 対象とする食品、機能、関与成分の選定理由

茨城県は、耕地面積比率（耕地面積／総面積）全国一位の農業県で、納豆の生産量日本一です。また、健康寿命が全国上位に位置し、男性 72.50 歳（全国 9 位 1 位は山梨県 73.21 歳）、女性 75.52 歳（全国 8 位 1 位は愛知県 76.32 歳）（2016 年）です。また、疫学研究では、納豆の摂取量が心筋梗塞、脳卒中などの心血管疾患による死亡リスクの低下と関係することなどが示されました¹⁾。これらのことから、茨城県民の納豆摂取が、県民の健康寿命に有益な効果をもたらしていると考えられました。そこで、納豆を機能性表示食品の開発のターゲットとしました。納豆および納豆成分には種々の機能が報告されています。上述の疫学研究では、心血管疾患リスク低下に納豆摂取が関連している可能性が示されています。さらに最近も、多目的コホート研究で納豆の摂取量が多いほど、循環器疾患のリスクが低下することが示されました²⁾。心血管疾患リスクには脂質代謝が関与するため、当初、脂質代謝改善効果についても納豆の機能性ターゲットの一つとして考えましたが、動物試験で有効性が認められませんでした。一方、健常男性を対象とした食事負荷試験では、米飯と納豆を同時に摂取した場合の食後 120 分間の血糖上昇曲線下面積（インクリメンタル AUC（IAUC））が米飯のみを摂取した場合と比べて有意に低く、納豆の食後血糖上昇抑制効果が示唆されています³⁾。また、耐糖能異常を有する肥満者を対象とした食事負荷試験では、米飯に粘りの少ない野菜と煮豆を組み合わせた食事（対照食）を摂取した場合に比べ、米飯に

粘りを有する野菜と納豆を組み合わせた食事（粘性食）を摂取した場合に、食後 60 および 120 分間の血糖 IAUC が低値を示したことが確認されています⁴⁾。なお、野菜類等に含まれる水溶性食物繊維には血糖上昇抑制効果がある⁵⁾とされていますが、上述の試験では、食物繊維をはじめとした栄養成分含量は二つの食事の間で差がなく、粘り成分の影響で血糖上昇が抑制されたものと推察されています。納豆に特徴的な粘りの主成分は γ -PGA（ポリ- γ -グルタミン酸）です。そこでこれらの研究成果を参考にして、納豆の γ -PGAの血糖上昇抑制作用を明らかにし、 γ -PGA 高含有納豆を機能性表示食品として開発することにしました。

（２）科学的根拠（ヒト試験（または研究レビュー）、メカニズム解明）の提示

γ -PGA の血糖上昇抑制効果に関する研究レビューに採用可能な既報はなかったため、 γ -PGA の機能性の科学的根拠を新たに取得する必要がありました。そこで、メカニズム解明試験と、最終製品である γ -PGA 高含有納豆を用いたパイロットおよび検証的なヒト試験を実施しました。

①メカニズム解明試験

機能性納豆を用いたヒト試験では、 γ -PGA 高含有納豆の食後血糖上昇抑制効果をターゲットとしています。そこで、 γ -PGA の食後血糖上昇抑制メカニズム解明のために動物試験で、マウスの澱粉負荷試験の検討を行いました。

方法 ICR 系オスマウス各 7 匹を二つのグループに分けました。マウスはステンレスのケージにおいて個別飼育とし（図Ⅲ-1-1）、水は自由に与えました。一週間の予備飼育後、 γ -PGA 群には、 γ -PGA（（株）明治フードマテリア）を 0.1%の割合で動物飼育用粉末餌に添加した餌を与えて飼育しました。対照群には、 γ -PGA を含まない動物飼育用

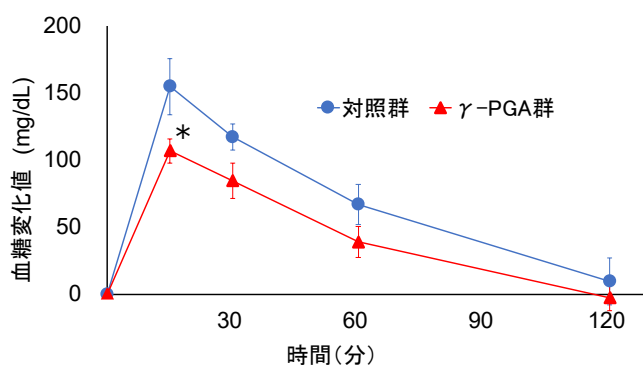
粉末餌を与えて飼育しました。試験食給餌開始後 8 週間目に澱粉負荷試験を行いました。澱粉負荷試験では、対照群にはマルトースもしくは澱粉を水に溶解して作成した溶液を、ゾンデを用いて 1 g/kg となるようにマウスに経口投与し、 γ -PGA 群には、8% γ -PGA にマルトースもしくは澱粉を 1 g/kg 溶解して、マウスへ経口投与しました。



図Ⅲ-1-1. ステンレスのケージにおけるマウスの飼育

結果と考察 澱粉負荷試験において、 γ -PGA 投与群は対照群に比べて澱粉投与後 15 分目の血糖値が、有意に低値を示しました ($P < 0.05$) (図Ⅲ-1-2)。また、食後の経過時間に伴う血糖値の増加量を、血糖値と時間の関係を示したグラフ内の面積で示す、IAUC は、0 分から 60 分間で γ -PGA 群が有意に低値を示しました ($P < 0.05$) (図Ⅲ-1-3)。このことから γ -PGA は澱粉摂取後の血糖値の上昇を穏やかにする可能性が示唆されました⁶⁾。 γ -PGA は水溶性で粘性を有する高分子ポリマーであり、水溶性食物繊維と似た性質を持つと考えられます。水溶性食物繊維は消化管内容物の粘性を増し、内容物の輸送速度を低下させ、さらに糖や消化酵素を吸着することで糖の消化・吸収を遅延させるとの報告があり⁵⁾、 γ -PGA も水溶性食物繊維と同様に消化管内

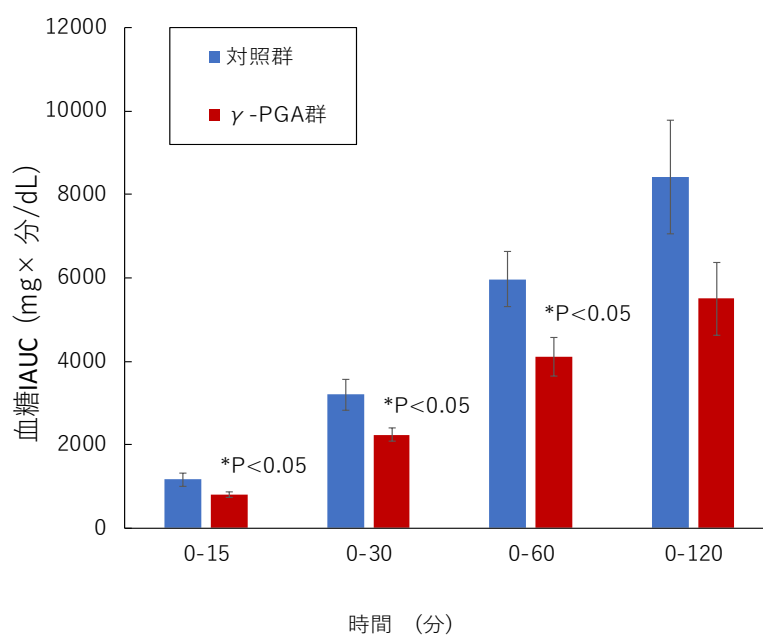
での食物の移動を抑制すると共に、消化吸収を遅延させて血糖値の上昇を抑制すると推察されました。



図Ⅲ-1-2 澱粉負荷試験におけるマウスの血糖値の変化

データは7匹の平均±標準誤差で示しました。* P<0.05

負荷後15分間の血糖変化値は、γ-PGA群が有意に低値を示しました (P<0.05)



図Ⅲ-1-3 マウス澱粉負荷試験時における血糖値上昇曲線下面積（インクリメンタル AUC (IAUC)) の変化

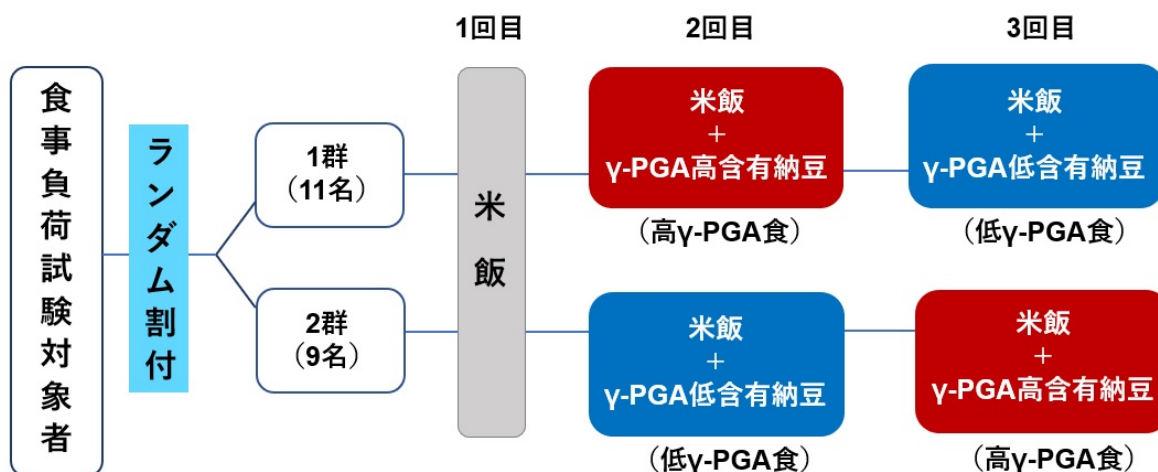
IAUC は、0分から60分間でγ-PGA群が有意に低値を示しました (P<0.05)

②パイロット的なヒト試験

γ -PGA 高含有納豆の食後血糖上昇抑制効果を明らかにするためには、ヒトを対象とする臨床試験（ヒト試験）による検証が必要です。 γ -PGA 高含有納豆のヒトでの効果はこれまで検討されていなかったことから、まず小規模のパイロット試験を行いました。

方法

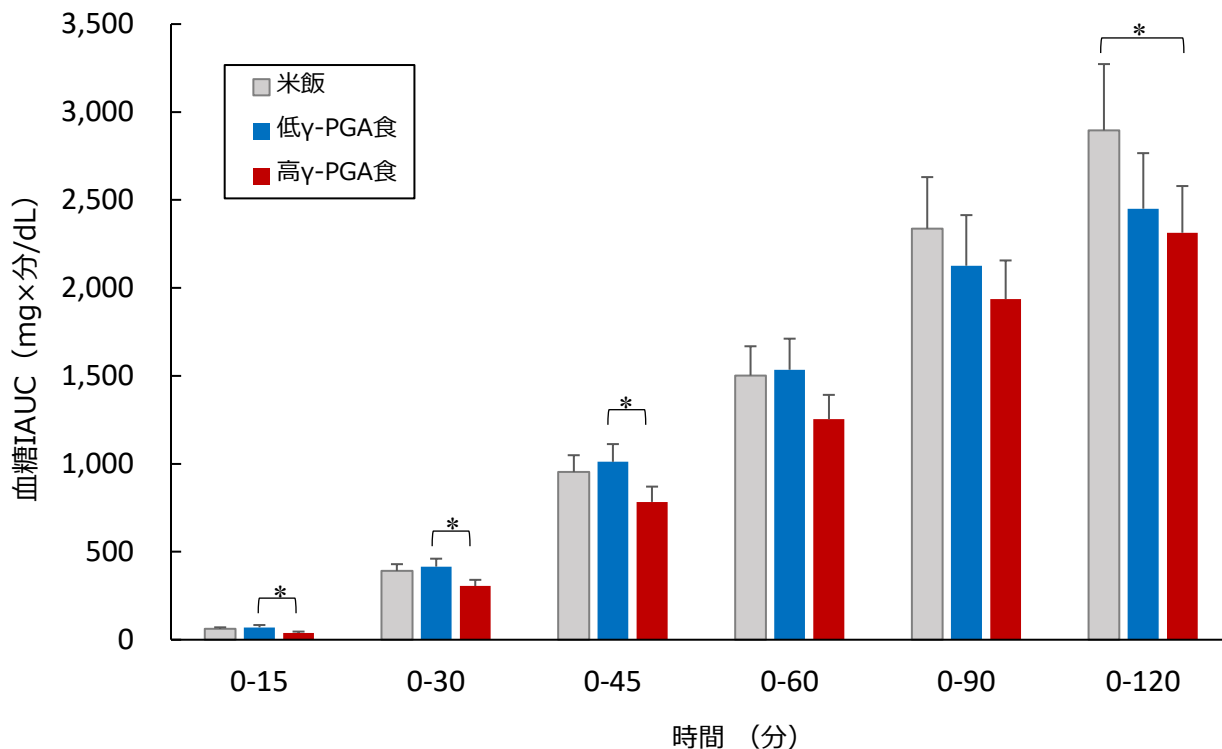
非肥満かつ非糖尿病の 20-64 歳男女 20 名を対象とし、市販の納豆に比べて γ -PGA 含量の多い γ -PGA 高含有納豆と、 γ -PGA 含量の少ない γ -PGA 低含有納豆を用いたランダム化 2 群単盲検クロスオーバー比較試験を実施しました（大学病院医療情報ネットワーク（UMIN）試験 ID：UMIN000030182）（図Ⅲ-1-4）。同一被験者に対し、4 日以上の間隔をあけて、「50 g 相当量の炭水化物を含む米飯 150 g（米飯）」、「米飯+ γ -PGA 低含有納豆 40 g（低 γ -PGA 食）」、「米飯+ γ -PGA 高含有納豆 40 g（高 γ -PGA 食）」を用いた計 3 回の食事負荷試験を実施しました。食事負荷試験の 1 回目は、全員共通で米飯を摂取することとし、2 回目と 3 回目のどちらで γ -PGA 高含有納豆を摂取するかについては、無作為に割り付けました。各測定日には、空腹時（0 分）および摂取 15, 30, 45, 60, 90, 120 分後の血糖値を測定し、血糖 IAUC を算出しました。主要評価項目（最も重視する評価項目）は、0-120 分の血糖 IAUC としました。



図Ⅲ-1-4 パイロット試験の概要

結果と考察

試験食間の血糖 IAUC の比較には、個々人における経時的推移の反映や、欠損値への対応が可能な線形混合モデルを用いました。高 γ -PGA 食では、主要評価項目とした血糖 IAUC₀₋₁₂₀ 分が、米飯に比べて有意に低値でしたが、低 γ -PGA 食との間には有意な差を認めませんでした。ただし、0-15, 0-30, 0-45 分の血糖 IAUC は、低 γ -PGA 食と比べて高 γ -PGA 食で有意に低値を示しました(図Ⅲ-1-5)。これらの結果から、 γ -PGA 高含有納豆が、食後初期の血糖上昇抑制に有効となる可能性が期待されました⁷⁾。



図Ⅲ-1-5 パイロット試験における食事負荷後の IAUC の変化

データは 20 名の推定平均±標準誤差で示しました。* P<0.05

0-15, 0-30, 0-45 分の血糖 IAUC は、低γ-PGA 食に比べて高 γ-PGA 食で低値を示しました。

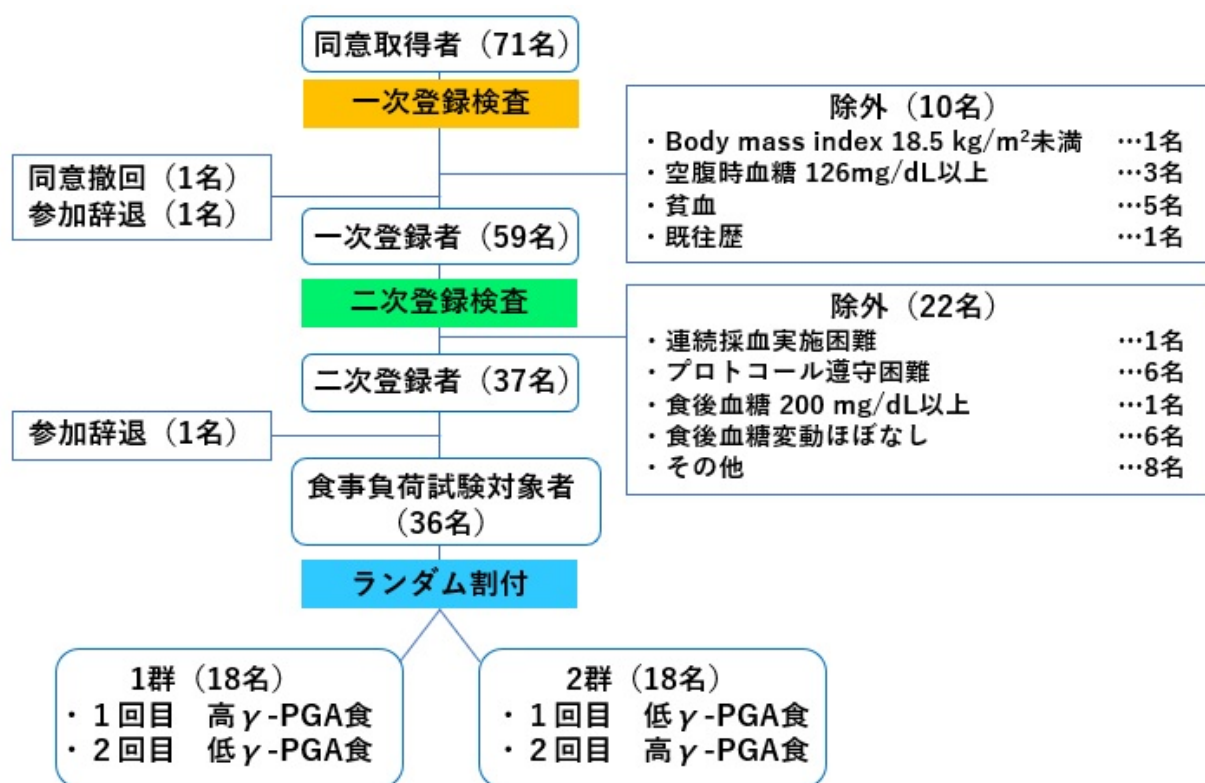
③検証的なヒト試験

パイロット試験の結果から、γ-PGA 高含有納豆との同時摂取が、食後初期の血糖上昇抑制に有効となる可能性が期待されました。そこで、検証試験を実施し、γ-PGA 高含有納豆の食後血糖上昇抑制効果のエビデンスを得ることとしました。

方法

検証試験 (UMIN 試験 ID : 000037449) では、パイロット試験の結果をふまえ、主要評価項目を 0-30 分の血糖 IAUC としました。また、パイロット試験における主要評価項目の効果量とばらつきから算出した値を基に、食事負荷試験対象者の目標数を 36

名としました。試験デザインは、パイロット試験と同様にランダム化 2 群単盲検クロスオーバー比較試験としましたが、検証試験では、米飯負荷を二次登録検査と位置づけ、米飯摂取後の血糖値が比較的高めの集団（随時血糖 140 mg/dL 以上を優先して登録）でのみ納豆を用いた食事負荷試験を実施した点が、パイロット試験とは異なります（図Ⅲ-1-6）。試験食に含まれる γ -PGA量は、高 γ -PGA食が 439.6 ± 15.1 mg、低 γ -PGA食が 57.6 ± 8.4 mg でした。

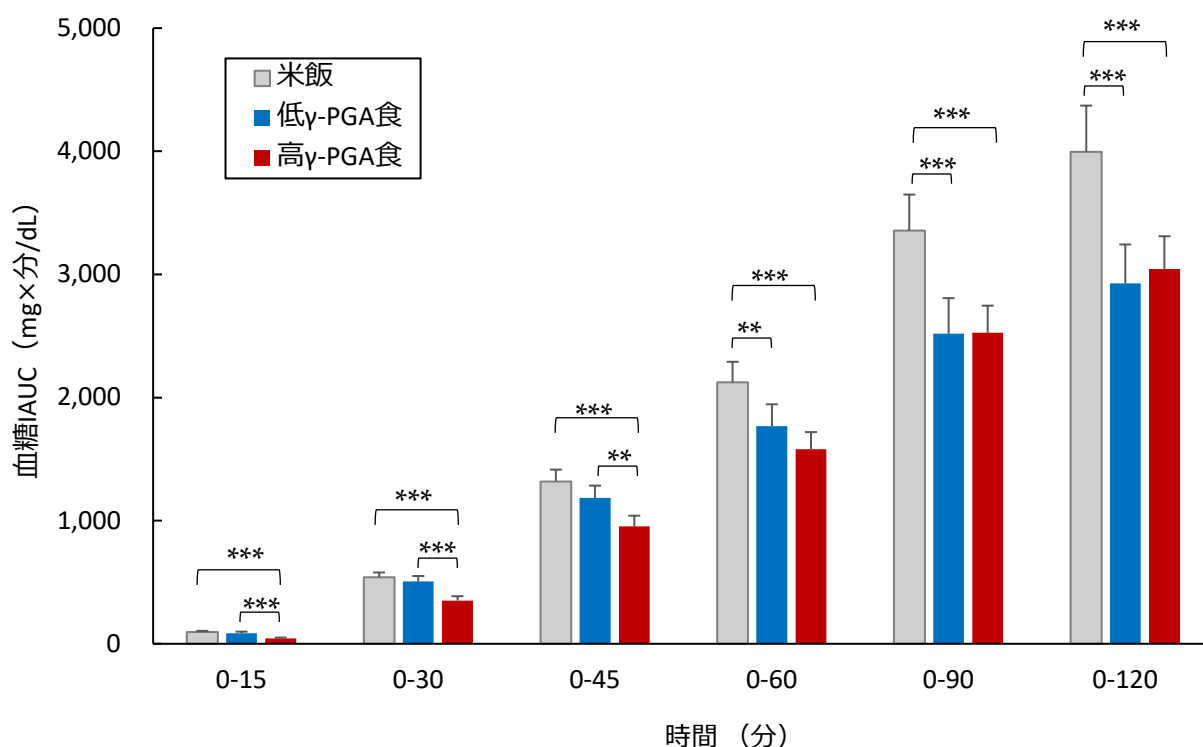


図Ⅲ-1-6 検証試験の被験者登録・実施フロー

結果と考察

パイロット試験と同様に、線形混合モデルを用いて試験食間の血糖 IAUC を比較しました。高 γ -PGA食の血糖 IAUC は、全時点で米飯に比べて低値（いずれも $P < 0.001$ ）、

0-15, 0-30, 0-45 分では低 γ -PGA 食と比べても低値（0-15, 0-30 分: $P<0.001$ 、0-45 分: $P<0.01$ ）であり、 γ -PGA 高含有納豆が、特に食後初期の血糖上昇抑制に有効であることが明らかになりました（図Ⅲ-1-7）。



図Ⅲ-1-7 検証試験における食事負荷後の IAUC の変化

データは 36 名の推定平均 \pm 標準誤差で示しました。** $P<0.01$, *** $P<0.001$

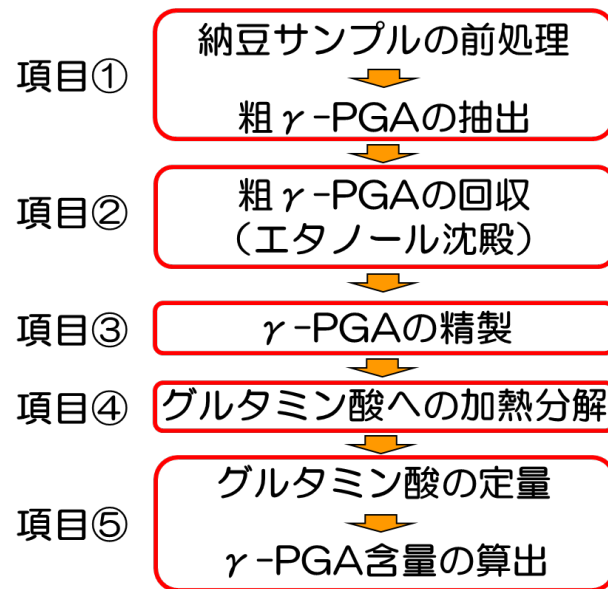
0-15, 0-30, 0-45 分の血糖 IAUC は、低 γ -PGA 食に比べて高 γ -PGA 食で低値を示しました。

検証試験により、 γ -PGA 高含有納豆の食後血糖上昇抑制効果に関する科学的根拠が得られました⁸⁾。動物試験の結果から、 γ -PGA は澱粉摂取後の血糖値の上昇を穏やかにすることが明らかとなっています。そのメカニズムとしては、 γ -PGA の食物繊維様効

果が考えられます。水溶性食物繊維は、粘性のある高分子で、食後血糖値の上昇を抑える効果が知られています⁶⁾。粘性を有する高分子である γ -PGA は、水溶性食物繊維と同様のメカニズムで食事中の糖の吸収を抑えて、食後の血糖値の上昇をおだやかにすると推察されました。

(3) 分析法の整備

これまで報告されている測定方法⁹⁾を γ -PGA 高含有納豆に試したところ、納豆の大豆由来の夾雑タンパク質やペプチド等が測定値に影響して、定量性に問題がありました。また、サンプルの均一性や γ -PGA の抽出効率も課題となることが分かりました。そのため γ -PGA 高含有納豆中の γ -PGA 含量を正確に定量するために、従来よりも高精度かつ広範囲に適用できる納豆中 γ -PGA 含量の測定方法を開発する必要性がありました。そこで、まず分析の基本的な流れ（図Ⅲ-1-8）を構築した後、各項目で γ -PGA 含量の測定に最適な条件を検討することで、 γ -PGA 高含有納豆に適用可能な γ -PGA 含量の測定方法の開発に取り組みました。



図Ⅲ-1-8 納豆中 γ -PGA 含量測定の基本スキーム

既報を参考にして全体の手順を構築した後、項目①から項目⑤まで γ -PGA 含量測定に最適な条件を検討しました。

検討項目① サンプル前処理と γ -PGA 抽出方法

サンプルの均一性と γ -PGA の抽出効率を上げるため、凍結乾燥、粉末化処理を行って γ -PGA を抽出する方法を検討し、納豆表面から γ -PGA を洗い出して抽出する方法と比較しました（項目①）。その結果、納豆サンプルを凍結乾燥・粉末化することで γ -PGA の抽出効率、測定精度ともに向上したことから、凍結乾燥・粉末化処理を導入することにしました。

検討項目② エタノール沈殿時の塩の種類

γ -PGA の回収効率を上げるため、エタノール沈殿を行って γ -PGA を回収する際に添加する塩の種類を検討しました（項目②）。その結果、酢酸ナトリウム添加時に γ -PGA

の回収効率が最大となることが明らかになったため、エタノール沈殿時に添加する塩は酢酸ナトリウムに決定しました。

検討項目③ γ -PGA 精製方法

測定誤差の原因となる納豆の大豆由来の夾雑タンパク質やペプチド等を取り除くため、クロロホルム抽出、トリクロロ酢酸沈殿の組み合わせによる最適な γ -PGA の精製条件を調べました（項目③）。その結果、クロロホルム抽出を行わず、トリクロロ酢酸沈殿のみ行ったときに精製効果が最大となることが分かりました。クロロホルムに毒性があることにも考慮して、トリクロロ酢酸沈殿を単独で行う精製方法を採用しました。

検討項目④ 酸分解時間

γ -PGA はグルタミン酸の重合体であることから、酸分解によって γ -PGA をグルタミン酸に分解し、分解によって生じた γ -PGA 由来のグルタミン酸量を測定することで、目的の γ -PGA 含量を算出することができます。そのため、 γ -PGA が分解されることを予め確認した分解条件（3M 塩酸、110 °C加熱）において、 γ -PGA が完全にグルタミン酸に分解され、かつ他の夾雑タンパク質等の分解による影響を最小限に抑える分解時間を検討しました（項目④）。その結果、3M 塩酸、110 °C加熱時での最適な分解時間は4時間であることを突き止めました。

検討項目⑤ 高速液体クロマトグラフ(HPLC)を用いたグルタミン酸の定量

測定の精度を高めるため、HPLC を用いたグルタミン酸の定量前に遠心分離を行う場合と遠心分離を行わない場合について、それぞれのグルタミン酸含量を比較しました（項

目⑤)。その結果、どちらの場合もグルタミン酸含量に違いはありませんでした。ただし、HPLC 分析には遠心分離後の上清サンプルを用いる方が望ましいことから、遠心分離による上清回収を行うことにしました。

以上の 5 項目について最適な条件を明らかにすることで、納豆中 γ -PGA 含量の新たな測定方法を開発しました。

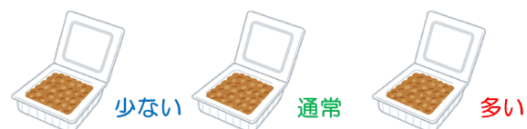
検討項目⑥ 妥当性の確認試験

開発した納豆中 γ -PGA 含量測定方法の信頼性を示すには、分析方法の妥当性確認が必要です¹⁰⁾。妥当性確認とは、試験方法に用いる分析法が、分析法を使用する意図に合致していること、すなわち、分析法の誤差が原因で生じる試験の判定の誤りの確率が許容できる程度であることを科学的に立証することです。そのため、 γ -PGA 含量が異なる 3 種類の納豆（ γ -PGA 高含有納豆、 γ -PGA 通常含量の納豆、 γ -PGA 低含有納豆）を用いて、検量線（検量線の直線性）、精度（併行精度、室内再現精度）および真度（添加回収率）について、単一試験室における妥当性の確認試験を行いました（図Ⅲ-1-9）。

検量線（検量線の直線性）

グルタミン酸標準試薬による検量線から、濃度とピーク面積より得られる回帰直線の直線性を確認

精度（併行精度，室内再現精度）



γ -PGA含量が異なる納豆を各濃度3点×3日間で測定し、併行精度および室内再現精度を算出

真度（添加回収率）



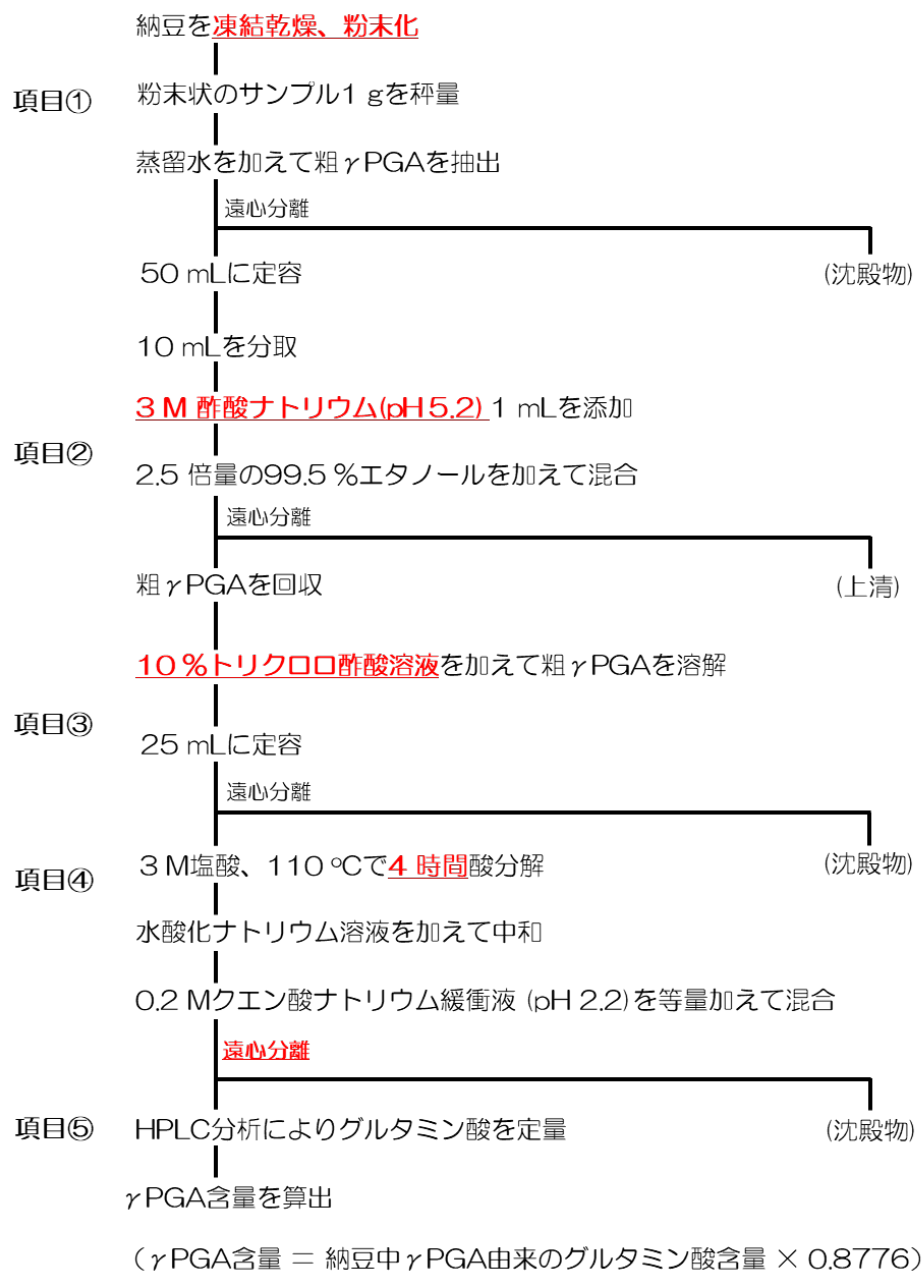
γ -PGA標準溶液を添加した納豆（添加区）から未処理の納豆（無添加区）の γ -PGA含量を差し引き、回収率を算出

図Ⅲ-1-9 妥当性確認試験の概要

開発した納豆中の γ -PGA 含量測定方法の妥当性を確認するため、単一試験室における妥当性確認試験を行いました。

妥当性確認試験を行った結果、検量線の直線性は良好(相関係数 0.999 以上)で、併行精度は 1.9–4.3 %、室内再現精度は 1.8–3.9 %、添加回収率は 98.5–101.0 %でした。いずれの項目ともコーデックス委員会の手続マニュアル¹¹⁾で定める範囲内の性能であったことから、開発した納豆中 γ -PGA 含量測定方法は高い精度と再現性を示すことが分かりました。

以上の結果から、開発した納豆中 γ -PGA 含量測定方法を用いることで、 γ -PGA 高含有納豆中の γ -PGA 含量を高精度に測定することが可能となりました¹²⁾。最終的な分析手順を図Ⅲ-1-10 に示します。



図Ⅲ-1-10 開発した納豆中γ-PGA 含量測定方法

5つの項目でγ-PGA含量測定に最適な条件を明らかにすることで、納豆中のγ-PGA含量測定方法を開発しました。各項目で最適化した条件を赤文字で示しました。

(4) 成分含量の評価と規格の決定

製品の規格としては、検証的な単回摂取試験で γ -PGA 高含有納豆の食後血糖上昇抑制効果のエビデンスを得ることが確認された量を考慮し、 γ -PGA を 1 日摂取目安量 (40 g = 1 パック) 当たり 439.6 mg 以上含む食品としました。一方、 γ -PGA は D 体と L 体のグルタミン酸が重合した高分子構造を持つため、機能性表示食品の届出に関するガイドラインでの機能性関与成分の分類においては、「成分が一定の特徴的な構造を持つ (一定の構造式で表せる) 高分子 (分子量 1,500 程度以上) であり、基原に加え、構造式、重合度や分子量等で化合物群を規定でき、成分の定性が可能である場合」に該当すると考えられます。そのため機能性表示食品の届出には、 γ -PGA の定量分析に加え、 γ -PGA 高含有納豆由来の γ -PGA の特徴を示す定性分析が必要になります。

そこで、 γ -PGA 含量測定時と同様の方法で抽出した γ -PGA 高含有納豆由来の γ -PGA 溶液および入手可能な最大分子量のプルラン標準品を用いて、ゲル濾過クロマトグラフを行いました。そして、ゲル濾過クロマトグラフにより得られたクロマトグラムピークのおよびピーク終わりの保持時間から分子量を算出しました。その結果、 γ -PGA 高含有納豆由来の γ -PGA の分子量は 435,000 以上で、ガイドラインで定める機能性関与成分の分類 (分子量 1,500 以上) に該当することを確認し、届出に必要な定性分析データを取得しました (表Ⅲ-1-1)。

表Ⅲ-1-1 γ -PGA 高含有納豆由来 γ -PGA の分子量

サンプル	分子量 ($\times 10^3$)
	P800 640
プルラン標準品 (SHODEX P-82)	P200 190
	P50 50
	P5 6
γ -PGA高含有納豆 由来 γ -PGA	ピークトップ 342,000 (最大)
	∴ ∴
	ピーク終わり 435 (最小)

(5) γ -PGA 高含有納豆製造を安定化する試み

納豆製造における工夫としては、 γ -PGA を高生産させるために、A.納豆菌株の種類
 の選択、B.煮豆へ添加する副原料（煮豆と共に発酵させる事で、品質向上、又は機能
 性成分をより高生産させるための素材）の選定、C.適切な大豆品種選定を行いました。
 これらの製法を組み合わせることにより、 γ -PGA 量が、従来品よりも中粒で 1.5 倍程度
 多くなりました。また、納豆の長期冷凍下での γ -PGA 量の変化調査を実施しました。測
 定は、納豆製造 2 日後、冷凍 3 か月後、冷凍 6 か月後としたところ、製造 2 日後、冷
 凍 3 か月後、冷凍 6 か月後においても γ -PGA 量の減少が見られないことを確認し、冷
 凍保存時の γ -PGA 量が安定であることを確認しました。また、納豆の製造段階において、
 工場内の発酵室での棚の位置によって納豆中の γ -PGA 含有量が異なる可能性が示さ
 れました。発酵室上段の製造サンプルの γ -PGA 含量は 856.7 ± 29.2 (mg/納豆 100
 g)、発酵室下段の製造サンプルの γ -PGA 含量は 685.9 ± 80.7 (mg/納豆 100 g)

でした。現場では製造環境の違いにより製品中の γ -PGA 含量が異なる場合があるということが明らかになったため、現在、発酵棚の位置の違いによる納豆の γ -PGA 生産量の均一化についても検討を行っています。



図Ⅲ-1-11 納豆用大豆の蒸煮工程の外観 図Ⅲ-1-12 納豆の充填工程の外観



図Ⅲ-1-13 納豆の発酵工程時の発酵棚の外観

(6) 機能性表示食品の届出、マーケティング戦略など

機能性表示食品の届出にあたって、①安全性に関する資料、②生産・製造および品質管理に関する資料、③食品の分析に関する資料、④表示しようとする機能性の科学的根拠を説明するもの、が必要となります。そのため、 γ -PGA 高含有納豆の機能性表示

食品届出に際して実施した①-④を以下に記載しました。また、マーケティング戦略についても記載しました。

①安全性に関する資料

安全性の評価については、喫食実績による食経験の評価、既存情報を用いた食経験および安全性試験の評価、安全性試験の実施などの情報を提供しますが、 γ -PGA 高含有納豆の機能性表示食品届出に際しては、当該製品の機能性関与成分 γ -PGA は、納豆の粘りの主成分であり、一般的に全ての納豆に含まれていて、納豆の発祥は、弥生時代という説もあるように古くから日本で食べられている食品であり、食経験が十分ありますので、喫食実績による食経験の評価、既存情報を用いた評価を行いました。

市販納豆中の γ -PGA 含量は納豆 100 g 当たり約 328 mg との報告があり¹²⁾、40 g (1 パック相当) 当たりの含量は、約 131 mg でした。また新たに分析を行った結果、市販納豆中の γ -PGA 含量は 1 パック当たり 114-402 mg で平均 262 mg でした。また当該食品は、摂取目安量(40 g = 1 パック) 当たり γ -PGA を 439.6 mg 含む食品であり、本届出品を 20-70 歳の健康な男女に、1 日摂取目安量を 6 週間摂取させ、安全性を評価した結果、Body mass index (BMI)、血圧、生化学検査、日誌による体調変化において、被験者への有害な作用は認められませんでした。以上より、当該製品は納豆という範疇からいえば、喫食実績による食経験は、ほぼ十分と考えられました。

②生産・製造および品質管理に関する資料

生産・製造および品質管理に関する資料については、製造施設・従業員の衛生管理体制、機能性関与成分を含有する原材料として丸大豆、グルタミン酸ナトリウム、納豆菌、また、アレルギー物質、異物、大腸菌群などの届出をしようとする食品の製品規格、を記載して提出します。その際に、機能性関与成分の分量の規格の下限値（安全性

を担保する上で必要な場合は上限値も設定)、すなわち、1 パック(40 g) 当たりγ-PGA を 439.6 mg 含む、等が適切に定められていることが必要です。

③食品の分析に関する資料

食品の分析に関する資料には、(i) 機能性関与成分に関する定性試験及び定量試験の分析方法(ここでは、(4) 成分含量の評価と規格の決定に記載した定性試験、及び(3) 分析法の整備に記載した定量法)を示す、第三者機関において分析可能な資料、及び(ii) 機能性関与成分が表示された量含まれていることを示す第三者の試験機関において実施した分析試験の成績書を添付します。

④表示しようとする機能性の科学的根拠を説明するもの

表示しようとする機能性の科学的根拠を説明するものとして、(i) 最終製品を用いた臨床試験(ヒト試験)の結果、もしくは、(ii) 最終製品又は機能性関与成分に関する研究レビューを用いることが可能です。γ-PGA 高含有納豆の食後血糖上昇抑制効果については、(ii) にあたる科学的根拠となる既存のヒト試験の報告が無いことから、(i) にあたる、最終製品を用いた臨床試験(ヒト試験)を行い、その内容を記載しました(上述のヒト試験を参照)。(i)、(ii) のヒト試験の研究論文の公表・活用で留意すべき事項は、

- ・UMIN 臨床試験登録システムに事前登録していること、
- ・研究計画について事前に倫理審査委員会の承認を受けていること、
- ・当該倫理審査委員会の名称について論文中に記載されていること、
- ・国際的にコンセンサスの得られた指針に準拠した公表された査読付き論文を添付すること(文献)、

・掲載雑誌の著者等との間の利益相反が否定できること、
などです。これらの提出資料の詳細に関しては「機能性表示食品の届出等に関するガイドライン（Ⅱ 参考資料 1）を御参照ください。

⑤マーケティング

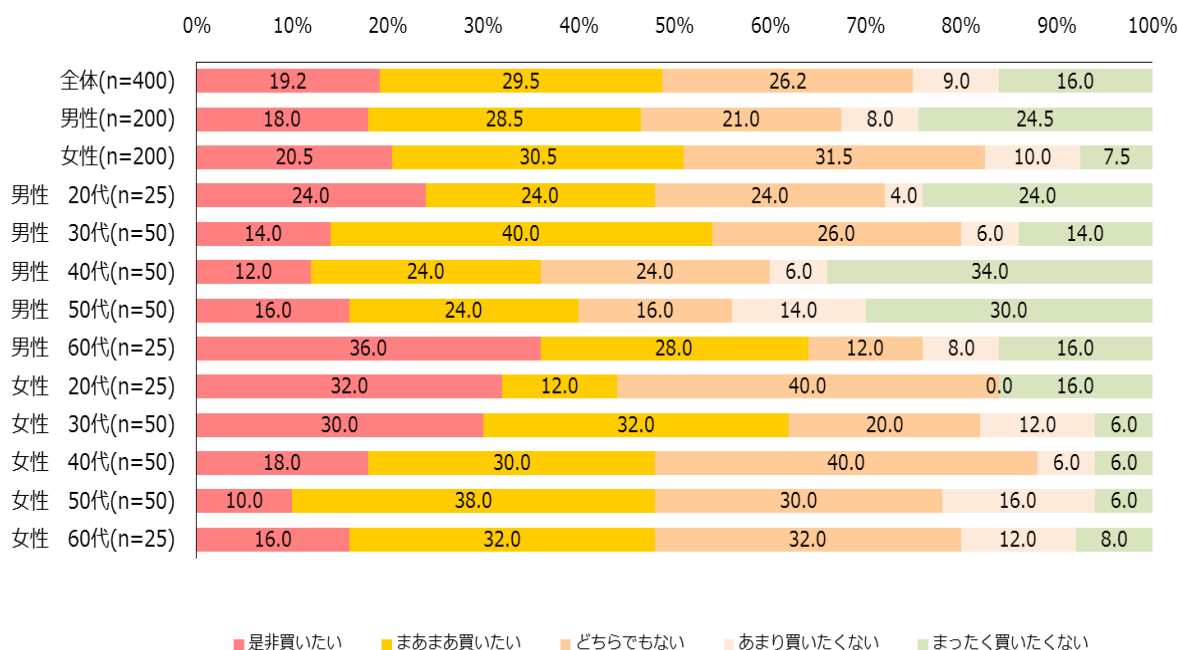
マーケティングについては、以下(1)→(3)の手順で行いました。

- (1) 想定される機能性関与成分であるγ-PGA の機能として、「食後血糖上昇抑制」、「脂質代謝改善（HDL コレステロールの増加）」、「カルシウム吸収促進」について調査し、それぞれの認知度、魅力度について、アンケートを利用して情報収集を行います。
- (2) 機能候補商品のコンセプト、市場性、商品ポジション（既存の製品との差別化等、競合商品との関連の中での位置づけ）、ターゲットの設定をするために、商品の受容性についてアンケートを利用して情報収集を行います。
- (3) 商品の販売戦略を練ってから最終的な商品設計や機能性表示申請を実施します。

アンケート調査により、想定される機能性関与成分であるγ-PGA の機能「食後血糖上昇抑制効果」、「脂質代謝改善（HDL コレステロールの増加）」、「カルシウム吸収促進」についての関心度を調査すると、「脂質代謝改善」の関心が最も高く、次いで「カルシウム吸収促進」、「食後血糖上昇抑制」の順となりました。納豆の摂取意向の調査では、やや好き以上が約 80 %であり、週 1 回以上摂取する割合は 51 %でした。納豆が、摂取割合も頻度も高い食品であることが確認できました。

また、受容性についてのアンケートを実施しました。機能性表示納豆の購入意向では、【是非買いたい+まあまあ買いたい】の割合は 49 %でした。男女別では、女性の方が関

心度が高い結果となりました（図Ⅲ-1-14）。



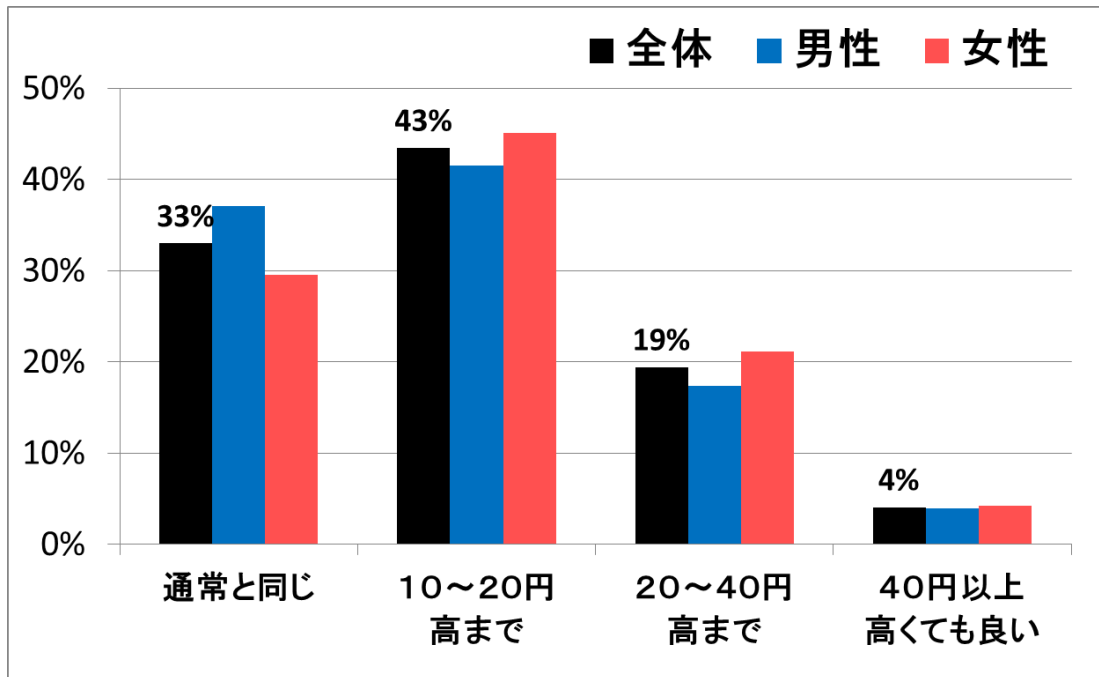
図Ⅲ-1-14 年代別の機能性表示納豆の購入意向についてのアンケート結果

年代としては、50 歳以上がメインターゲットと思われましたが、女性全般の関心度が高く、女性層を取り込む検討の余地もありました。納豆摂取の魅力では「普段食べる納豆で血糖値の上昇を制御できることが魅力的」「糖質の吸収を抑えて糖尿病予防として」等が挙がっており、日常の食事で体調管理ができる点が評価されました。消費者アンケートの結果、糖尿病に対して健康不安を感じて生活されている方は約半分程度おり、比較的男性に多いことがわかりました。様々な症状に対し、日常的な食品である「納豆」で健康対策できることへの期待値は非常に高く、全体の約 7 割で興味関心があることがわかりました。

マーケティングの最終段階として、これまでのアンケート調査を参考に商品ターゲットを設定し、商品コンセプトを完成させました。商品設計（販売価格、パッケージ等）ですが、

納豆市場は販売売価が非常に大事です。納豆売場のほとんどの商品が 100 円未満の商品で構成されていて、売れ筋商品も 100 円未満に集中しており、圧倒的に 100 円未満の商品が多い市場です。高単価商品のマーケットが広がってきており、機能性表示食品を販売するには良い状況となってきています。今回、糖質の吸収を穏やかにし、食後の血糖値の上昇を抑える納豆と、通常の納豆製品との許容できる価格差はいくらですか？というアンケート調査（図Ⅲ-1-15）では、機能性表示納豆に対し、「少し高い価格でも買いたい」という消費者ニーズが確認できたため、120-159 円売価での販売を目指すこととしました。

販売価帯から逆算し外国産大豆の使用することとしましたが、この納豆の発売により大きな成果が見込めることが確認できれば、さらに国産大豆を使用した商品の需要が見込めます。販売戦略の立案には、販売エリア、販売業態、目標販売数等を検討します。マーケティングにおいては、商品設計（販売価格、パッケージ等）とともに機能性表示における、文言設計（買い続ける動機付けに繋がる表現方法等）も重要な要素です。このコンセプトを元に、商品パッケージを制作し、コンセプトの完成度を確認するため消費者アンケート調査を行い、50 代以上の血糖値ケア顕在層は勿論、40 代以上の潜在層にも期待の持てる商品ということが確認でき、幅広い層での商品の購入意向を確認することができました。以上の活動から商品設計を固め、機能性表示申請の準備ができました。



図Ⅲ-1-15 納豆の価格弾力性(納豆製品の価格が変動することによって生じる需要と供給の変化の度合いを定量的に表したもの)

糖質の吸収を穏やかにし、食後の血糖値の上昇を抑える納豆と、通常の納豆製品との許容できる価格差はいくらですか?というアンケート調査に対する回答結果を示しました。

- 1) Nagata C, Wada K, Tamura T, Konishi K, Goto Y, Koda S, Kawachi T, Tsuji M, Nakamura K. Dietary soy and natto intake and cardiovascular disease mortality in Japanese adults: the Takayama study. *Am J Clin Nutr*, 2016; 105:426-431. doi: 10.3945/ajcn.116.137281.
- 2) Katagiri C, Sawada N, Goto A, Yamaji T, Iwasaki M, Noda M, Iso H, Tsugane S. Association of soy and fermented soy product intake with total and cause specific mortality: prospective cohort study. *BMJ*. 2020; 368:m34. doi: 10.1136/bmj.m34.
- 3) 石川 篤志, 岸 幹也, 山上 圭吾. 納豆、大豆が健常成人の食後血糖値に与える影響. *生活衛生* 2009 ; 53:257-260.

- 4) Taniguchi-Fukatsu A, Yamanaka-Okumura H, Naniwa-Kuroki Y, Nishida Y, Yamamoto H, Taketani Y, Takeda E. Natto and viscous vegetables in a Japanese-style breakfast improved insulin sensitivity, lipid metabolism and oxidative stress in overweight subjects with impaired glucose tolerance. *Br J Nutr.* 2012;107:1184-1191. doi: 10.1017/S0007114511004156.
- 5) Regand A, Chowdhury Z, Tosh SM, Wolever TMS, Wood P. The molecular weight, solubility and viscosity of oat beta-glucan affect human glycemic response by modifying starch digestibility. *Food Chem* 2011; 129:297-304.
- 6) Tamura M, Hori S, Inose A, Kobori M. Effects of γ -Polyglutamic Acid on Blood Glucose and Caecal Short Chain Fatty Acids in Adult Male Mice. *Food Nutr Sci* 2020; 11:8-22.
- 7) Araki R, Fujie K, Yuine N, Watabe Y, Maruo K, Suzuki H, Hashimoto K. The Possibility of Suppression of Increased Postprandial Blood Glucose Levels by Gamma-Polyglutamic Acid-Rich Natto in the Early Phase after Eating: A Randomized Crossover Pilot Study. *Nutrients.* 2020; 12:915. doi:10.3390/nu12040915.
- 8) Araki R, Yamada T, Maruo K, Araki A, Miyakawa R, Suzuki H, Hashimoto K. Gamma-Polyglutamic Acid-Rich Natto Suppresses Postprandial Blood Glucose Response in the Early Phase after Meals: A Randomized Crossover Study. *Nutrients.* 2020; 12:2374. doi: 10.3390/nu12082374.
- 9) 菅野 彰重, 高松 晴樹. セチルトリメチルアンモニウムブロミドを用いた納豆の γ -ポリグルタミン酸の定量. *日本食品科学工学会誌.* 1995; 42:878-886. doi.org/10.3136/nskkk.42.878
- 10) 安井明美. 食品分析における信頼性確保. *The Chemical Times.* 2004; 1: 13-18.
- 11) FAO/WHO. General criteria for the selection of single-laboratory validated 369

methods of analysis. In "Codex alimentarius commision procedural manual 26th edition". 2018; 79-90.

12) Kubo Y, Kobori M, Nakagawa R, Yoshiura T, Asano T, Takeda A, Noguchi T. A high-accuracy method for quantifying poly-gamma-glutamic acid content in natto. Food Sci Technol Res. 2021; 27:463. doi: 10.3136/fstr.27.463.

2. 野沢菜漬け

(1) 対象とする食品、機能、関与成分の選定理由

長野県の平均寿命は男性 81.75 歳（全国 2 位）女性 87.67 歳（全国 1 位）となっており¹⁾、健康長寿の県として知られています。一方、国民健康栄養調査では、長野県の野菜摂取量は男性 352 g（全国 1 位）女性 329 g（全国 5 位）であり²⁾、非常に多くの野菜類を摂取している県としても知られています。国立がん研究センターによる長年にわたる多目的コホート研究などから、健康の維持・増進に関わる農産物として、アブラナ科野菜がクローズアップされてきています。野沢菜は、特に長野県で生産・消費されるアブラナ科野菜です。野沢菜のほとんどは、野沢菜漬けとして消費されています。野沢菜漬け中に含まれる乳酸菌、あるいは、野沢菜中に含まれるグルコシノート類、もしくはそれらの相乗作用により健康機能性を発揮している可能性が考えられました。乳酸菌には、腸内細菌叢を整える機能が期待できます。また、アブラナ科野菜に含まれるグルコシノートやその分解物であるイソチオシアネートには、肝機能を改善する作用³⁾や動脈硬化を予防する機能⁴⁾などが期待できます。そこで、グルコシノート類等の機能性成分を高含有する野沢菜品種、機能性を持つ植物性乳酸菌を選定し、それらを含有する野沢菜加工品を製造するとともに、機能性のエビデンスを取得することとしました。



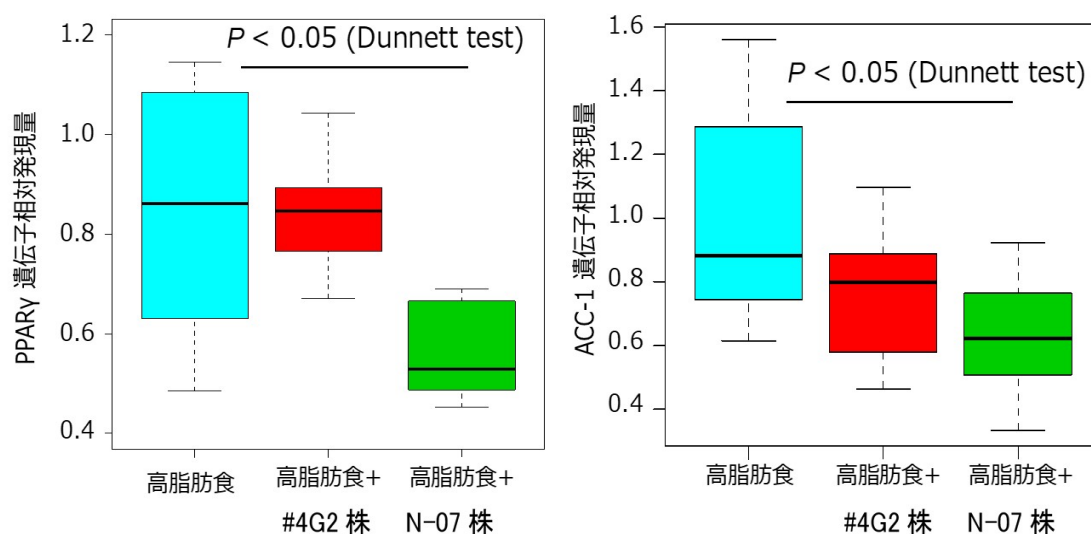
図Ⅲ-2-1 健康増進に寄与する野沢菜戦略

(2) 科学的根拠（ヒト試験（または研究レビュー）、メカニズム解明）の提示

①抗メタボリックシンドローム作用を有する新規な野沢菜漬け由来乳酸菌 Shinshu N-07 株

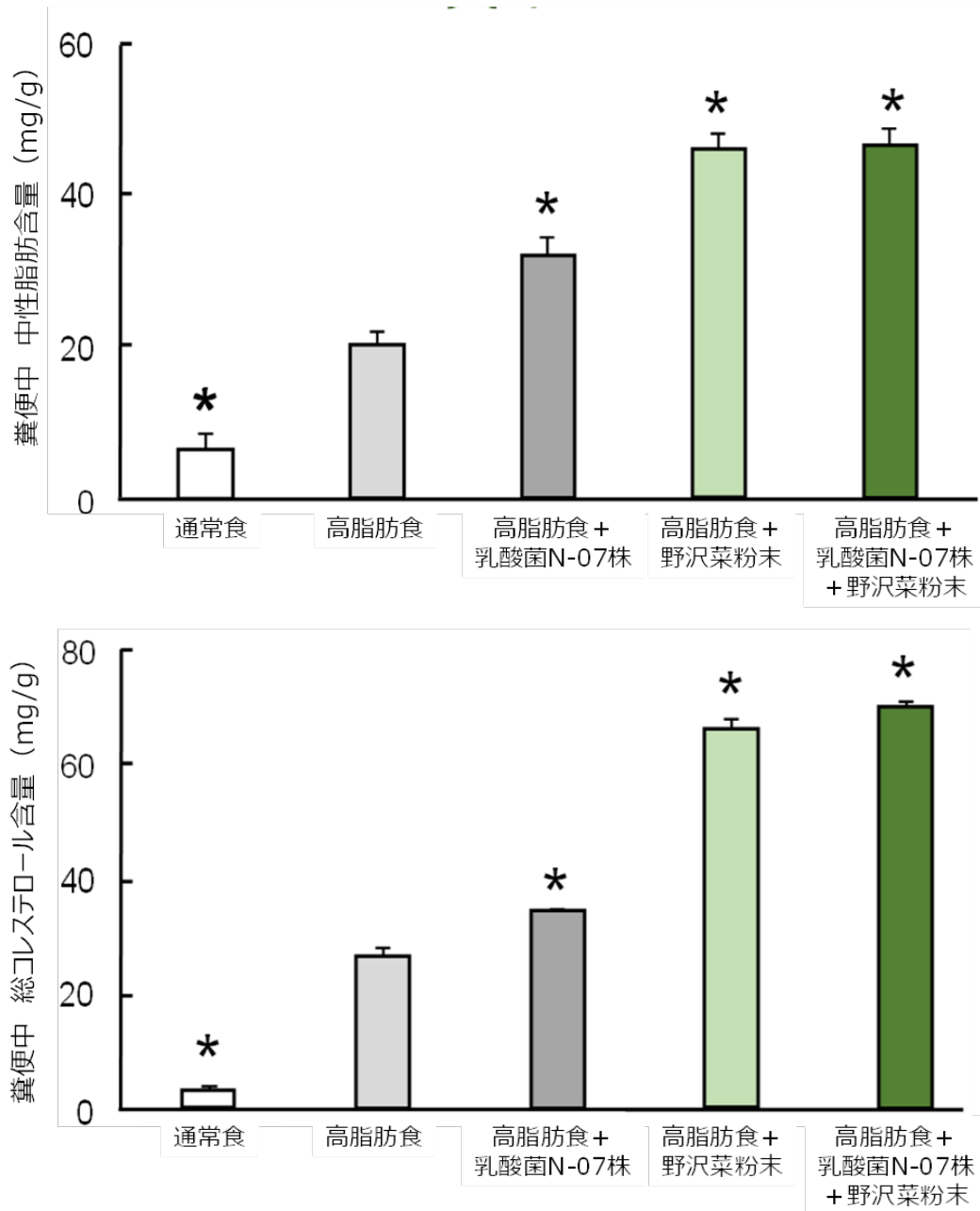
乳酸菌は様々な発酵食品や腸内に存在する細菌の一群であり、発酵させた野菜漬物に含まれる乳酸菌は日本人にとって最も馴染み深いもののひとつです。乳酸菌を食品として摂取することで、整腸作用や免疫調節作用といった有益な保健機能が報告されており、プロバイオティクスという言葉で広く知られるようになってきました。ただし、乳酸菌という分類には極めて多くの微生物種が含まれており、すべてが一様に保健機能を示すわけではありません。そのため、優れた効果を示す固有の菌株を選び、その効果を実験により確かめることが、科学的な根拠を示すために不可欠です。本研究では、発酵した野沢菜漬けから分離した多数の乳酸菌の中から、動物試験で抗メタボリックシンドローム作用を有するラクトバチルス・プランタラム (*Lactobacillus plantarum*、2020 年に *Lactiplantibacillus plantarum* に再分類) Shinshu N-07 株を発見しました。この菌株は、生きて腸まで届くための特徴（胃酸・胆汁酸耐性）を有しており、マウスで高脂肪食による体重増加を抑制することが確認されたことにより特許出願されました（特開 2020-162595、菌株受託番号 NITE P-02868）。具体的には、高脂肪食給餌下でも N-07 株を摂取したマウス試験群は摂取しない試験群に比べて体重が小さくなる傾向を示し、副睾丸脂肪組織重量においては統計学的な有意差が確認されました。このとき、N-07 株摂取群において、脂肪の合成に関わるペルオキシゾーム増殖因子活性化受容体 γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ (PPAR γ)) 遺伝子とアセチル CoA カルボキシラーゼ 1 (Acetyl-CoA carboxylase 1 (ACC-1)) 遺伝子の発現が有意に抑制されています（図 III-2-2）。また、N-07 株にはコレステロールの吸着作用があり、動物実験において糞便へのコレステロールおよび中性脂肪の排出を促進する

効果が認められました（図Ⅲ-2-3）。したがって、N-07 株摂取による脂肪の合成と吸収の抑制が、本菌株が抗メタボリックシンドローム作用を発揮するメカニズムであると考えられました。なお、動物実験においてもヒト試験においても、糞便解析により、N-07 株摂取群は非摂取群に比べて *Lactobacillus* 属の占有率が有意に大きいことが示され、こうした動物実験では本菌株が生きて腸まで届いていることが示されました（図Ⅲ-2-4、5）。



図Ⅲ-2-2 マウス肝臓における脂質代謝関連遺伝子発現

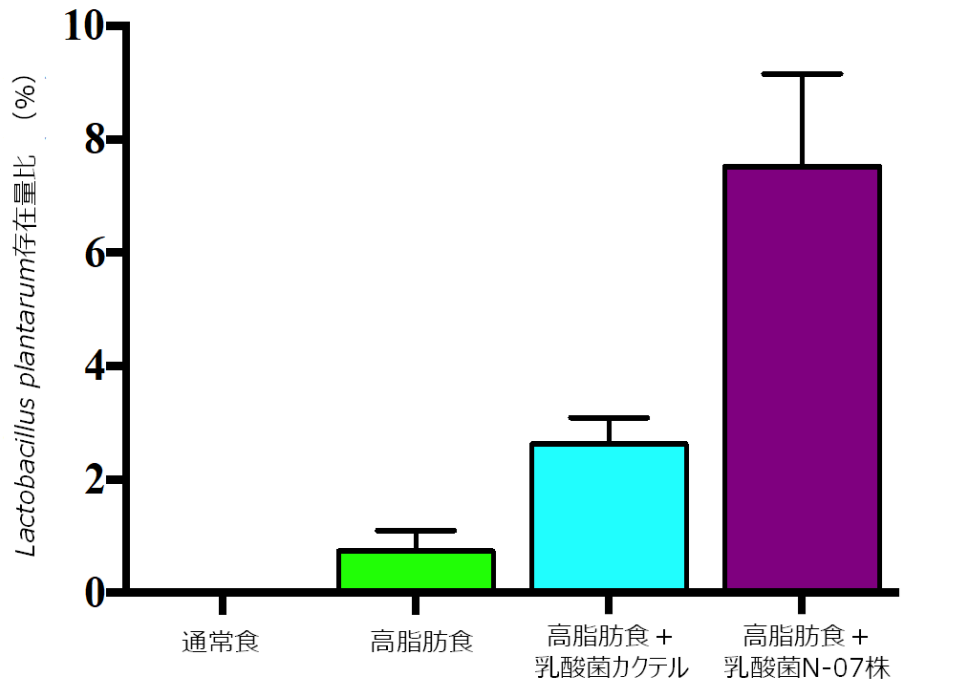
（左：ペルオキシゾーム増殖因子活性化受容体 γ (PPAR γ) 遺伝子発現、右：アセチル CoA カルボキシラーゼ 1 (ACC-1) 遺伝子発現)



図Ⅲ-2-3 N-07 株と野沢菜粉末を併用摂取させたときの脂質の排出効果

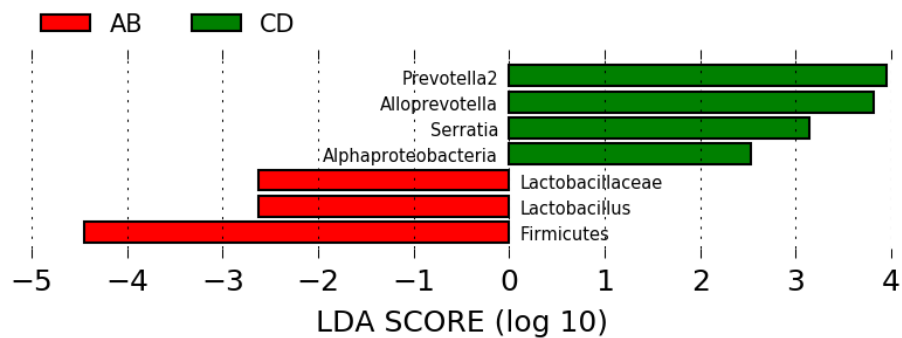
(上：糞便中の中性脂肪、下：糞便中のコレステロール)

データは5匹の平均±標準誤差で示しました。* P<0.05



図Ⅲ-2-4 動物実験における N-07 投与群（紫）と非投与群（緑）の腸内 *Lactobacillus plantarum* 存在量比較

データは 8 匹の平均±標準誤差で示しました。



図Ⅲ-2-5 ヒト試験における N-07 摂取群（赤）と非摂取群（緑）を比較して有意に異なった菌分類の LDA スコア

図は、各群の介入後の糞便試料において、LDA スコア（線形判別分析値）が 2.0 以上であった菌分類を示しています。P<0.05

②グルコシレート

グルコシレートは、アブラナ科植物に多く含まれる弱い苦味を持つ配糖体化合物の総称であり、内在性酵素ミロシナーゼによる加水分解により揮発性のイソチオシアネートになります。イソチオシアネートは、ワサビのツンとする辛味風味としてよく知られています。アブラナ科植物の植物体、もしくはその抽出物に肥満予防・改善効果、特に生体内の脂質代謝を改善し、体重を低減させる効果があることを見出しています。グルコシレートの機能性に関するメカニズムについては、今後の追加研究が必要となります。

③ヒト試験

野沢菜由来のグルコシレートおよび野沢菜漬け由来乳酸菌の機能性のエビデンスを得るために、BMI 25 kg/m^2 以上 30 kg/m^2 未満で20歳以上65歳未満の健常な男女を対象に、体脂肪率を主要評価項目としたヒト試験（ランダム化比較試験）を行いました。副次評価項目としては、血清脂質値、体重、BMI、腸内細菌叢、便回数/週と形状を設定しました。図Ⅲ-2-6に示すシート状の野沢菜加工品を1日2枚（計 5.0 g ）、3か月間摂取としました。試験参加人数はグルコシレートの有無に関して各群50名、乳酸菌有無で各50名として解析できるようにするために、「高グルコシレート・乳酸菌 Shinshu N-07 株（ $1 \times 10^{10}\text{ CFU/g}$ ）あり」25名、「高グルコシレート・乳酸菌なし」25名、「低グルコシレート・乳酸菌あり」25名、「低グルコシレート・乳酸菌なし」25名、脱落を考え、全体で110名になるように計画を立てました。

2020年1月6日から2020年8月31日（約8か月間）に、37名のエントリーがあり、「高グルコシレート・乳酸菌あり」8名、「高グルコシレート・乳酸菌なし」11名、「低グルコシレート・乳酸菌あり」11名、「低グルコシレート・乳酸菌なし」7名にふりわけて試験を実施しました。試験の結果、重篤な有害事象の報告はありませんでした。しか

し新型コロナウイルス感染症拡大懸念の影響もあり、十分な介入試験参加への広報活動ができなかったことや、自粛による来院控えにより、計画通りの 110 名の参加者を集めることができませんでした。その結果、主要評価項目である体脂肪率において、乳酸菌含有野沢菜加工品やグルコシルート高含有野沢菜加工品は、改善効果が認められませんでした（表Ⅲ-2-1）。副次評価項目である総コレステロールにおいても、乳酸菌含有野沢菜加工品やグルコシルート高含有野沢菜加工品は、改善効果が認められませんでした。一方、副次評価項目である中性脂肪値において、グルコシルート高含有野沢菜加工品に、改善効果が認められました。介入前計測で、高脂血症が疑われる値の 8 名を除いて解析したものを表Ⅲ-2-2 に示します。副次評価項目である便通改善については、介入前段階において便通の悪い人、硬い便の人が少なかったため、有効な解析ができませんでした。



図Ⅲ-2-6 シート状野沢菜加工品

1 枚当たりの塩分量は約 0.1 g です。

表Ⅲ-2-1 12週間介入による体脂肪率の変化

	上昇した人数	低下した人数	総数
乳酸菌あり	8(42.1 %)	11(57.9 %)	19
乳酸菌なし	8(44.4 %)	10(55.5 %)	18
Risk ratio(95 %信頼区間)	1	0.98(0.45-1.98)	
高グルコシルレート	9(47.4 %)	10(52.6 %)	19
低グルコシルレート	7(38.9 %)	11(61.1 %)	18
Risk ratio(95 %信頼区間)	1	1.22(0.58-2.57)	

表Ⅲ-2-2 12週間介入による空腹時中性脂肪値の変化

	上昇した人数	低下した人数	総数
乳酸菌あり	5(50.0 %)	5(50.0 %)	10
乳酸菌なし	6(50.0 %)	6(50.0 %)	12
Risk ratio(95 %信頼区間)	1	1	
高グルコシルレート	2(22.2 %)	7(77.8 %)	9
低グルコシルレート	9(69.2 %)	4(30.8 %)	13
Risk ratio(95 %信頼区間)	0.32(0.09-1.15)	2.53(1.04-6.14)*	

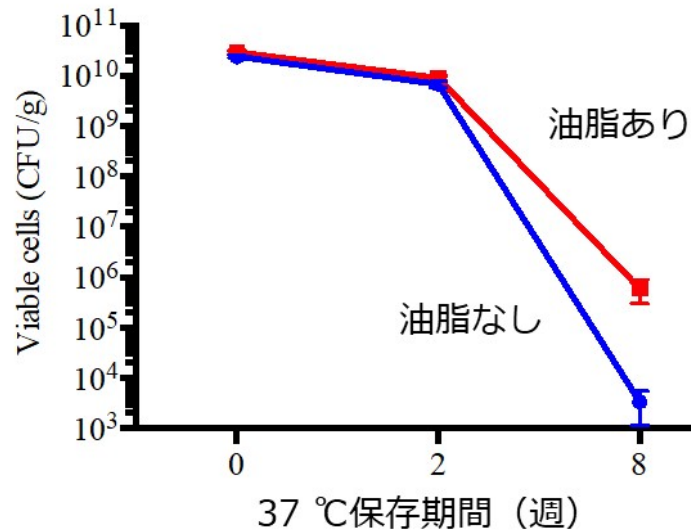
* :P<0.05

(3) 分析法の整備

①ラクトバチルス・プランタラム (*Lactobacillus plantarum*) Shinshu N-07 株の分析法

この乳酸菌は、一般的な乳酸桿菌の生育培地である MRS 培地で良好な増殖を示します。ほとんど N-07 株のみが生残していると想定される製品（殺菌した原料を N-07 株を用いて発酵させた場合、N-07 株の生菌の乾燥粉末を添加した場合など）では、試料を適宜希釈した懸濁液を MRS 寒天培地に接種して培養することで、N-07 株の生菌

数を測定することができます。N-07 株以外の乳酸菌が含まれる場合は、MRS 寒天培地に生育した各コロニーがN-07 株であるかどうか判別する必要があります。N-07 株の判別は、菌株特異的プライマーを用いた PCR 法により簡便に行うことができます。全ゲノムの解読により、N-07 株は公開データベース上にあるいずれの菌株とも異なることが明らかとなっています。本菌株は、独立行政法人製品評価技術基盤機構 バイオテクノロジーセンター 特許微生物寄託センターに申請すれば、入手することが可能です。凍結乾燥粉末における本菌株の生残性（初発 2.4×10^{10} CFU/g）について検討したところ、 -20 °Cで保存した場合には13か月間にほとんど生菌数の低下を認めず、長期間安定的に保存可能であると確認されています。37°Cの過酷条件で保存した場合、2週間後では 6.7×10^9 CFU/g の生菌数を維持していましたが、8週間後には 3.4×10^3 CFU/g に大きく低下しました（図Ⅲ-2-7）。したがって、製品の生菌数を一定期間保つためには高温を避けることが重要です。生菌粉末をサラダ油に浸した場合、過酷条件の8週間後でも 6.0×10^6 CFU/g の生菌数を維持したことから、油脂には保護効果があることが確認されています。保存温度に加えて、パッケージや製造法によって酸素や紫外線等から保護することも有効と考えられます。



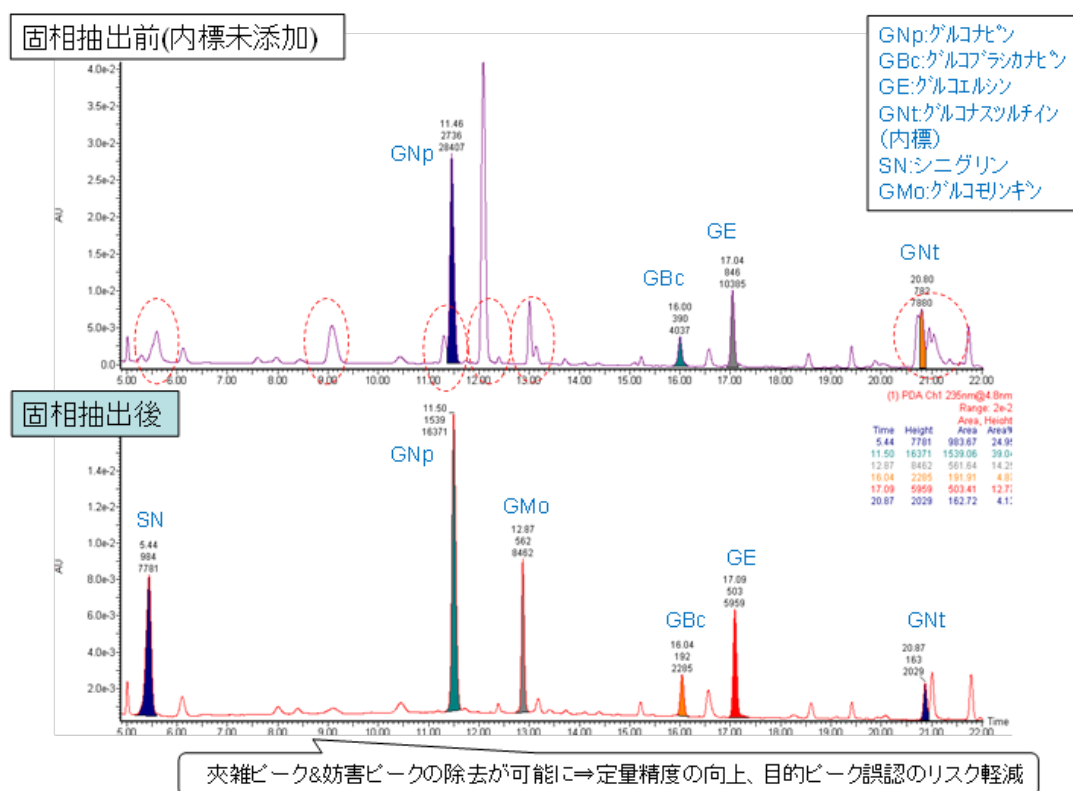
図Ⅲ-2-7 油脂添加による Shinshu N-07 株生残性の向上

37 °Cでの保存試験を行い、油脂の添加が N-07 株生残性の向上に有効であることを明らかにしました。

②グルコシルート類の分析法

グルコシルート類分析について、これまでは「デスルホ化法」と呼ばれる方法が広く用いられていましたが、前処理に2日程度要し、またその手順も非常に煩雑でした。機能性表示食品の開発および届出を行うには、迅速に結果が得られ、かつ簡易な方法で誰もが共通した結果が得られる方法を開発する必要性がありました。そこで、メタノール水溶液を用いて抽出する簡易な前処理と、汎用的な逆相系カラムと紫外可視吸光光度検出器を組み合わせた高速液体クロマトグラフィーにより分離、定量する方法を考案しました。また複数のグルコシルート類を一度に測定できるように、質量分析計によりグルコシルートのピークを同定し、代表的なグルコシルート（シニグリン等）に換算した数値で定量することにしました。さらには、夾雑成分による定量値への影響を低減するため、固相抽出法による精製条件を検討し、良好な精製条件が得られました（図Ⅲ-2-8）。また固相抽出の

際に、標準試料となるグルコシルレート（シニグリン等）を添加してから精製を行う内部標準法を用いました。以上により開発された分析方法（図Ⅲ-2-9）は、前処理の所要時間が30分から1時間程度と従来法に比べて非常に迅速かつ簡易なものです。この分析方法について、添加回収試験および日中・日間の繰り返し精度の検証を行った結果、およそ AOAC（Appendix K）の定める許容範囲（成分濃度 0.1–1 % の場合：回収率 90–108 %、併行相対標準偏差 3 % 以下。成分濃度 0.01–0.1 % の場合：回収率 85–110 %、併行相対標準偏差 4 % 以下）に収まっていた（図Ⅲ-2-10）。さらには、機能性成分としてグルコシルレート類を対象とし、介入試験用野沢菜漬および関連する試料のグルコシルレート等の消長に関するデータを蓄積しました。



図Ⅲ-2-8 固相抽出により精製された野沢菜抽出液の HPLC クロマトグラム

赤い破線の丸で囲まれたピークは、除去された主な夾雑成分ピークです。

○抽出

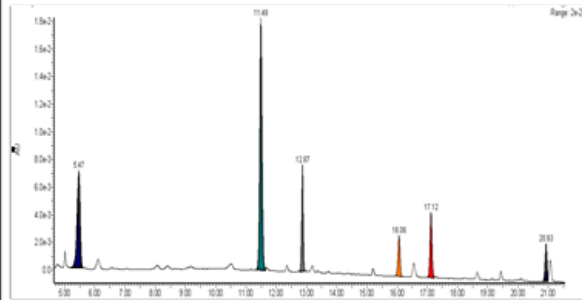
- ① 野沢菜凍結乾燥粉末0.2g + 50%(v/v)メタノール5mL
- ② 超音波処理(50°C 10min)
- ③ 放冷後、遠心分離し、上清採取
- ④ 沈殿に50%メタノール2mL加え、振り混ぜ、遠心分離→上清採取 2回繰り返し、10mLに定容

○固相抽出

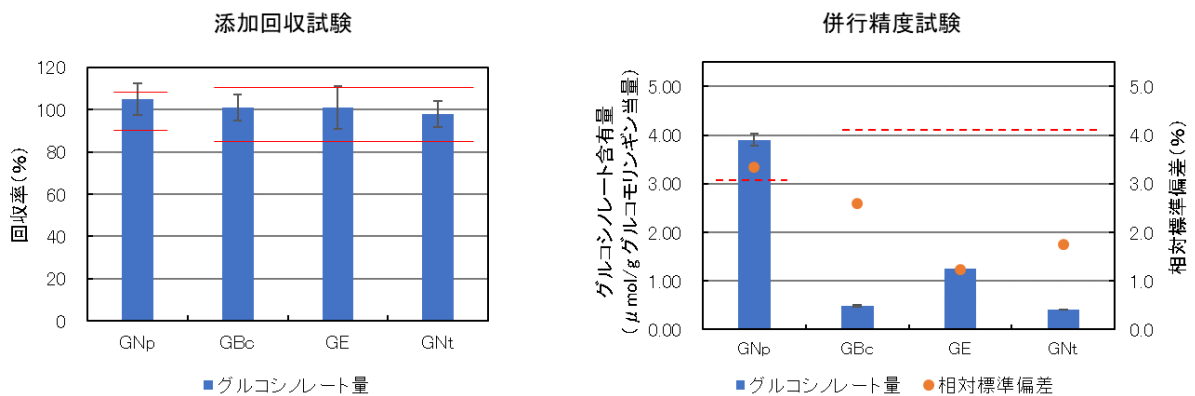
- ⑤ メンブレンフィルター(0.45μm)を通し、試料液2.5mL+内標液0.5mL
- ⑥ 50%メタノールでコンディショニングした固相カラムに液を2回に分けて通す(1.5mL×2)
- ⑦ 通過液2mLと純水2mLを合わせ、LC/MS測定に供する。

○LC/MS

- ・カラム: Cadenza CD-C18
- ・カラム温度: 40°C
- ・検出波長: 235nm
- ・溶離液: A 5mM ギ酸アンモニウム (1%アセトニトリル)
B アセトニトリル
- A 100%(0-5min)→90%(5-15min) →70%(15-30min)
- ・MS: ESI(Negative)



図Ⅲ-2-9 グルコシレート類分析方法の手順および代表的な HPLC クロマトグラム



図Ⅲ-2-10 グルコシレート類分析方法の添加回収試験および併行精度試験

データは 3 サンプルの平均±標準偏差で示しました。赤の実線は回収率、赤の破線は相対標準偏差の、それぞれ AOAC の定める精度範囲を表しています。

GNp:グルコナピン GBc:グルコブラシカナピン GE:グルコエルシン GNt:グルコナスツルチン

(4) 成分含量の評価と規格の決定

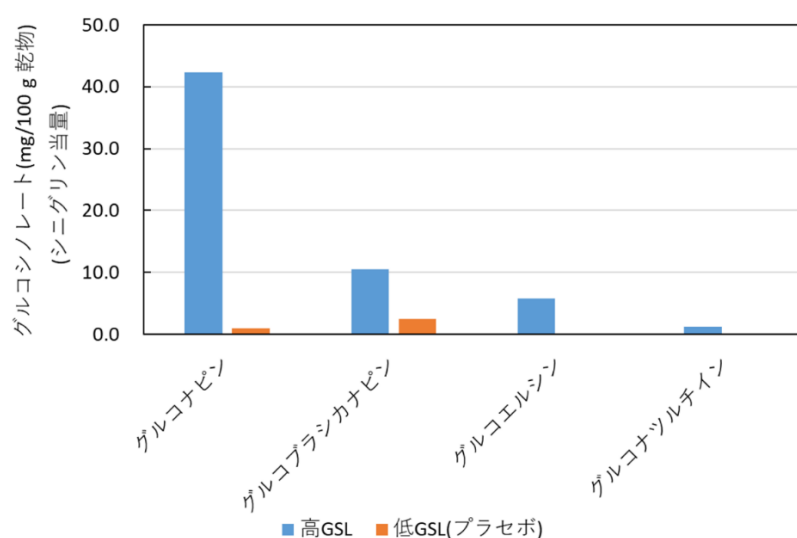
①ラクトバチルス・プランタラム (*Lactobacillus plantarum*) Shinshu N-07 株の規格

ヒト試験において、乳酸菌摂取群では、Shinshu N-07 株凍結乾燥粉末を 120 mg/食 (= 2×2^{10} CFU/食) 摂取してもらいました。機能性を証明するには規模の小さなヒト試験でしたので、規格を確定するには至っておりません。

②グルコシレート類の含有量と規格

ヒト試験において、グルコシレート高含有食（高 GSL）摂取群では、シニグリン当量として 2.5 mg/日のグルコシレートを摂取してもらいました（図Ⅲ-2-12）。すでに機能性成分として認められているスルフォラファングルコシレートの 24 mg/日に対し、10 分の 1 程度となります。機能性を証明するには規模の小さなヒト試験でしたので、規格を確定するには至っておりません。しかし、小規模ながら有意差が出ていることから、グルコシレート類 2.5 mg 以上/日が規格値となることが期待できます。

介入試験食のグルコシレート



図Ⅲ-2-11 介入試験食のグルコシレート含有量

(5) 機能性表示食品の届出、マーケティング戦略など

届出のためには、十分な人数で実施したヒト試験における主要評価項目での有意な効果を示すことが必須です。100名の目標症例数に対して、2021年3月現在、37名での介入試験実施にとどまっており、症例数を確保すべく追加の試験が必要です。不十分な症例数とはいえ、グルコシレートによる中性脂肪値低下の可能性も示唆されています。中性脂肪値の低下を主要評価項目として新たな介入試験を実施する必要があります。

機能性表示の届出には、製品の安全性にかかわる部分があります。仮に機能性があるとしても、食品の安全性に問題があれば届出できません。漬物は塩分があるため、塩分摂取が問題となってきます。従来の野沢菜漬けを摂取すると、摂取塩分量が多くなります。漬物の機能性表示をする上で、この点は避けて通れません。塩味を維持しつつ、摂取量を抑えるために、塩っぱさが食品中に含まれる水分量と塩分量に依存することを利用し、野沢菜を乾燥させ、シート状（あるいは煎餅状）に加工した食品を設計しました。野沢菜カット品（湿重量）25gにでんぷん2.5g、調味液（塩分8%）0.5gを十分に混ぜたのちに、薄くのばし乾燥させました。その結果、食感が良く、手で持ってもたやすく壊れないシート状食品を作ることができました。1食分が約3gとなり、従来からあった「食べる量が多い」という懸念が払しょくされました。

本試験ではグルコシレートを高含有するシート状野沢菜加工品、低含有するシート状野沢菜加工品それぞれに、乳酸菌を付着させたもの、付着させないものを組み合わせ、4種の介入試験食を準備しました。

商品仕様の決定に向けて、全国300名に対し消費者調査を実施し商品形態や商品パッケージ、想定価格などの調査を実施しました。具体的には、スクリーニング調査より漬物購入者層を抽出し、健康意識の高低に属性を分け、それぞれのカテゴリーで購入意

向や商品形態を分析しました。野沢菜漬けに「本品には乳酸菌〇〇が含まれるため、内臓脂肪を減らす効果があります」といった機能性表示がされた場合の消費者の関心は、健康意識の高い消費者のうち、67.8 %の高い関心度を示しました。このうち購入意向者は 21.8 %に上り、高い関心が明らかとなりました。おいしさはそのまま減塩加工がされた野沢菜漬けに対する関心では、健康意識の高い消費者のうち、68.9 %の高い関心が示され、このうち購入意向者は 27 %にのぼり、機能性表示食品以上の高い関心が示されました。機能性表示食品として販売される野沢菜漬けの商品形態の希望を聞いたところ、購入が見込まれる「健康意識の高い消費者」で見ても、最も高く選択されたのが「カットされているもの（3 から 4 cm 程度）（48.3 %）」次いで「カットされているもの（みじん切り）（29.3 %）」、「カットされていないもの（28.7 %）」でした。一回分の摂取量に個別包装されている商品はいずれも選択率が低くなりました。

以上の調査結果を総括すると、機能性表示野沢菜漬けは健康意識の高い消費者に対し強く訴求するとともに、減塩などの付加価値を強調し、おいしさを追求した商品設計が強く求められていると言えます。また、商品形態では、従来の販売形態（カットしていないもの、3 から 4 cm にカットしているもの、みじん切り）のものが求められており、既存の商品ラインナップで十分対応できることが明らかとなりました。新商品の受容性を確認し、今後の新商品開発の指針を得るために、介入試験に用いた野沢菜加工品と同等の食品を用いて、ホームユーステストを実施しました。シート状のものおよびそれらをフレーク状に砕いたものの 2 形態を用意しました（図Ⅲ-2-12）。家庭にて 1 日当たり 2 食、1 週間自由に調理等をして食べてもらい、意見を収集しました。その際、A：「機能性成分グルコシルレートを多く含む、体脂肪率が抑制されることが期待できる、有用乳酸菌が含まれているとの機能性説明をあらかじめ与えた群」と B：「機能性説明を与えなかった群」の 2 群

に分けました。その結果、機能性説明を受けた人たちからは、「〇〇を加えて食べたい」といったポジティブな意見が多く、味についてもおおむね許容している一方、機能性説明を受けなかった人からは、見た目や味、食感に対するネガティブな意見が多いことがわかりました。このことから、機能性の表示をすることで、製品を肯定的に受け取られると推察され、機能性表示の届出をすることは有益であると考えられました。今回の調査参加者がどのように本製品を摂取したのかを見てみると、海苔と同じような食べ方（おむすびや汁ものに載せる）を試す例が多く見られました。さらには、「鮮やかな緑色である方が望ましい」という意見が多くみられ、製品の見栄えが期待されていることがうかがえました。



図Ⅲ-2-12 ホームユーステスト用食品および試験デザイン

販売戦略として、本シート状の野沢菜加工品を薄く曲がりやすいシートとして成型したもの、ふりかけサイズにまでフレーク状に成型したものを先行発売し、いままで漬物としてしか流通されなかった野沢菜の新商品を展開する予定です。引き続き、十分な規模のヒト試験を実施し、その結果に従い、機能性表示を追加する予定です。

1) 厚生労働省「平成 27 年都道府県別生命表の概況」

<https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/life/tdfk15/index.html>（2021 年 3 月現在）

2) 厚生労働省「平成 28 年国民健康・栄養調査報告」

<https://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/eiyou/h28-houkoku.html>

(2021 年 3 月現在)

3) Yoshida K, Ushida Y, Ishijima T, Suganuma H, Inakuma T, Yajima N, Abe K, Nakai Y. Broccoli sprout extract induces detoxification-related gene expression and attenuates acute liver injury. *World J Gastroenterol.* 2015; 21: 10091-10103.

4) Zhao JF, Shyue SK, Kou YR, Lu TM, Lee TS. Transient Receptor Potential Ankyrin 1 Channel Involved in Atherosclerosis and Macrophage-Foam Cell Formation. *Int J Biol Sci.* 2016; 12: 812-823.

3. 沖縄野菜

(1) 対象とする食品、機能、関与成分の選定理由

沖縄県は古くは長寿で知られており、平均寿命の都道府県別順位は男性が1980年から1985年まで全国1位であり、女性は1975年から2005年まで全国1位でした。その一因として考えられるのが、他県と比較して特徴的に消費量の多いにがうりやへちまなどの沖縄伝統野菜の存在です。へちまは東南アジア原産で、熱帯から亜熱帯にかけて広く栽培されているウリ科の高温性一年生草本です。日本に渡来したのは17世紀ごろと考えられており、以来、沖縄県、鹿児島県、宮崎県など温暖な地域で栽培されています。沖縄県では年間で1400トン生産されています。

また、へちまは高めの血圧を低下させる機能があることが報告されている GABA（ γ -アミノ酪酸）を多く含むため健康機能が期待されます。

全国的に消費が拡大しているにがうりと比較するとへちまの生産量は少なく、へちまの更なる消費拡大を目指し機能性を PR するために、GABA を機能性関与成分としたへちまの機能性表示食品の開発を目指すこととしました。



図Ⅲ-3-1 へちまの味噌煮（ナーベールンブシー）

(2) 科学的根拠（ヒト試験（または研究レビュー）、メカニズム解明）の提示

科学的根拠の提示は農研機構のウェブサイトに公開されている GABA を機能性関与成分としたシステマティックレビューを利用しました。本システマティックレビューに基づき、「本品には GABA が含まれています。GABA には高めの血圧を低下させる機能があることが報告されています。」と機能性を表示することが可能です。

また、本システマティックレビューにおいて、群間差が認められ「効果あり」とした文献より、GABA としての 1 日当たりの摂取目安量は 20 mg 以上としました。

(3) 分析法の整備

GABA はアミノ酸の一種であり、遊離アミノ酸と同じ分析法を用いて分析されます。遊離アミノ酸は種類が多く、試料中に混合して含有するため、通常は高速液体クロマトグラフなどを用いて個々の遊離アミノ酸をカラムによって分離して分析します。また、遊離アミノ酸は検出器による検出が困難であるため、誘導体化されて分析される方法が一般的であり、誘導体化の方法もカラムで分離する前に誘導体化する方法（プレカラム法）と、カラムで分離した後に誘導体化する方法（ポストカラム法）と 2 種類が存在します。

機能性表示食品の分析方法はウェブサイトで公開されており、GABA を機能性関与成分として届出されている機能性表示食品の GABA 分析は、アミノ酸自動分析計を用いたポストカラム誘導体化法による依頼分析によって届出されている例が多くを占めていました。しかし、少数ですがプレカラムの誘導体化法を用いた分析方法によって届出される例も見られるようになってきています。

今回は、すでに多くの届出に使用されているアミノ酸自動分析計を用いたポストカラム誘導体化法により、農研機構九州沖縄農業研究センターで GABA 含量の下限値の設定を行いました。

(4) 成分含量の評価と規格の決定

① 安定生産を目的としたへちまの施設栽培

沖縄ではへちまの多くは夏秋期に露地で栽培されていますが、機能性表示食品として安定生産するためには冬春期にも施設栽培などにより生産できることが必須と考えられました（図Ⅲ-3-2）。



図Ⅲ-3-2 へちまの露地・地這栽培（左）と施設・立体栽培（右）

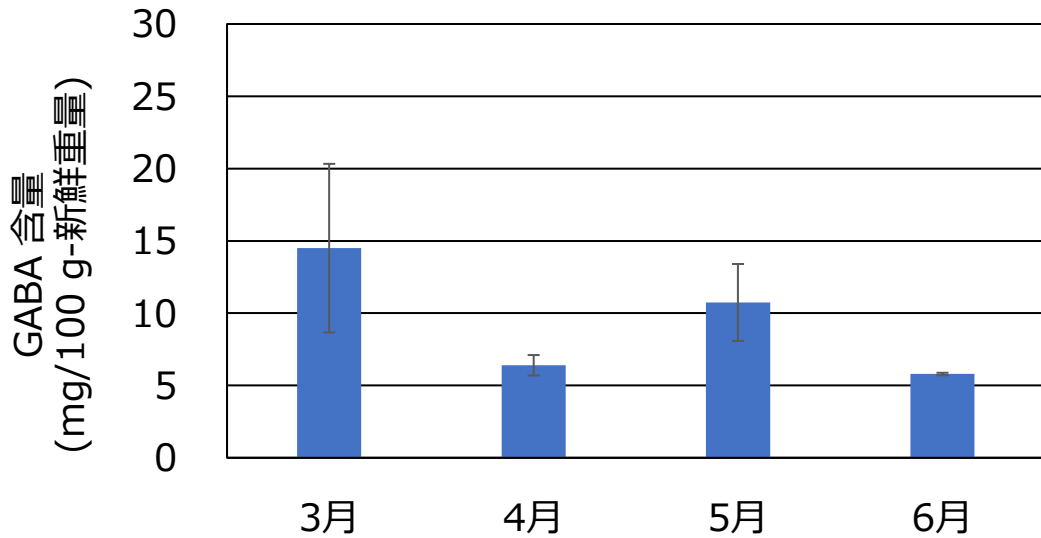
露地栽培では、果実の着果を促す受粉は、ミツバチ等の花粉媒介昆虫により行われますが、閉鎖的な施設栽培では、人工受粉作業が必要となります。へちまでは受粉後の生理落果も多いため、施設栽培での人工受粉作業は毎日行われ、多大な時間と労力を要していました。さらに、露地栽培では問題とならない害虫が多発し、農薬散布作業の増加やこれらの被害により栽培の継続が困難となり、安定供給の課題となっていました。そこで、受粉作業の省力化を図るため、イチゴやトマトなどで利用されている花粉媒介昆虫クロマルハナバチの利用を検討しました。また、各種害虫に対する天敵製剤および土着天敵の防除効果を検討しました。その結果、クロマルハナバチを利用した虫媒受粉と人工受粉における収量および果実品質に差はなく、また、天敵製剤および土着天敵を利用する

ことで害虫被害が抑制され、農薬散布の回数が大幅に減少しました。さらに、天敵利用により農薬散布が減少したことで、クロマルハナバチが栽培期間を通して利用することができるため（クロマルハナバチも農薬の影響を受ける）、人工受粉作業を完全に省略することができました。

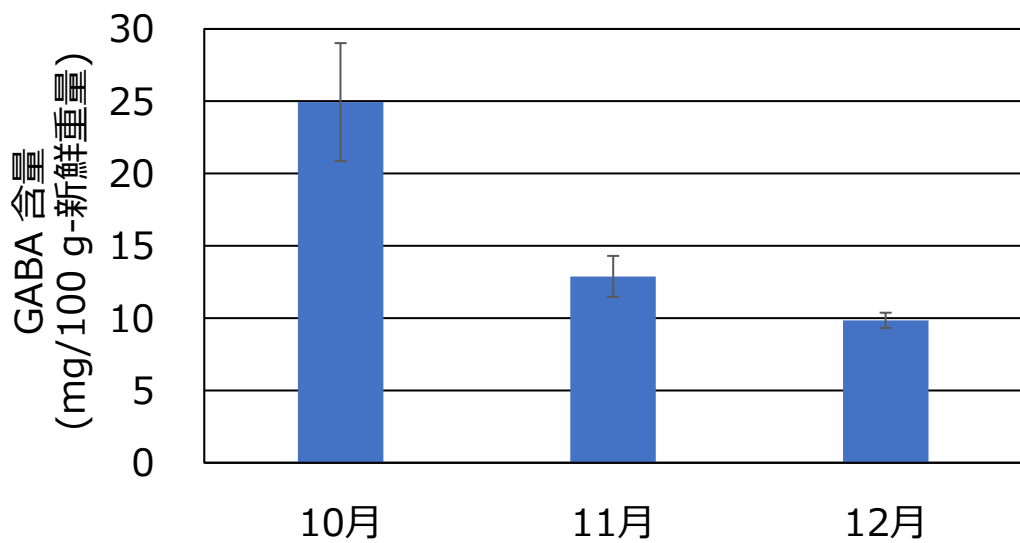
また、調理の際に変色しないへちま品種の育成も行われています。沖縄県農業研究センターでは、2014年から調理後に果肉が褐変しない無褐変形質を付与した品種の育成に取り組み始めています。育成系統「沖農 N1 号」は現在、新品種候補として生産農家や市場の評価を受けているところです。

②GABA 含量の評価と規格の決定

沖縄県南城市内の栽培農家からへちま試料の提供を受け、施設栽培されたへちま（3-6月）と露地栽培されたへちま（10-12月）について GABA 含量の測定を行いました。へちまの GABA 含量は、収穫月によってばらつきが多く、着果する際の気象条件などの影響を強く受けることが推測されました（図Ⅲ-3-3、4）。へちまの1日当たりの摂取量は生鮮へちまとして 200 g（約 1 個）を想定していますが、その際に年間を通して安定的に GABA を 20 mg/200 g 以上含有することは難しいと考えられたため、機能性表示のためには、収穫後のへちまの GABA 含量を増加させる加工技術が必要と考えられました。



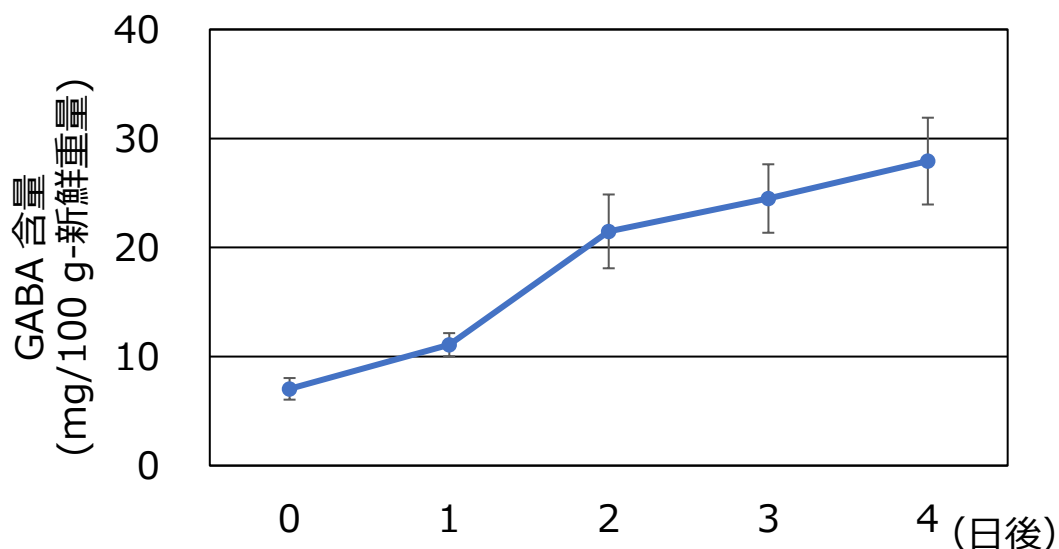
図Ⅲ-3-3 施設栽培された生鮮へちま（3-6月）の GABA 含量



図Ⅲ-3-4 露地栽培された生鮮へちま（10-12月）の GABA 含量

GABA は従来よりチャやジャガイモなどにおいて、酸素の少ない条件下で増加することが知られており、この知見を参考にして、収穫した生鮮へちまを真空包装し、GABA の増加を経過観察することとしました。10 °Cで冷蔵すると、へちまの GABA は真空包装後 4 日後まで増加し続けることがわかりました。この結果から、真空包装して 2 日間冷蔵してから

機能性表示食品として販売を開始し、さらに 2 日間は店頭で販売が可能と考えられました (図Ⅲ-3-5、6)。



図Ⅲ-3-5 真空包装した生鮮へちまの GABA 含量の経時変化



図Ⅲ-3-6 真空包装へちま

以上の結果に基づき、真空包装へちまを GABA を機能性関与成分とした機能性表示食品とすることとし、GABA 含量の下限值を設定するための試験を行いました。

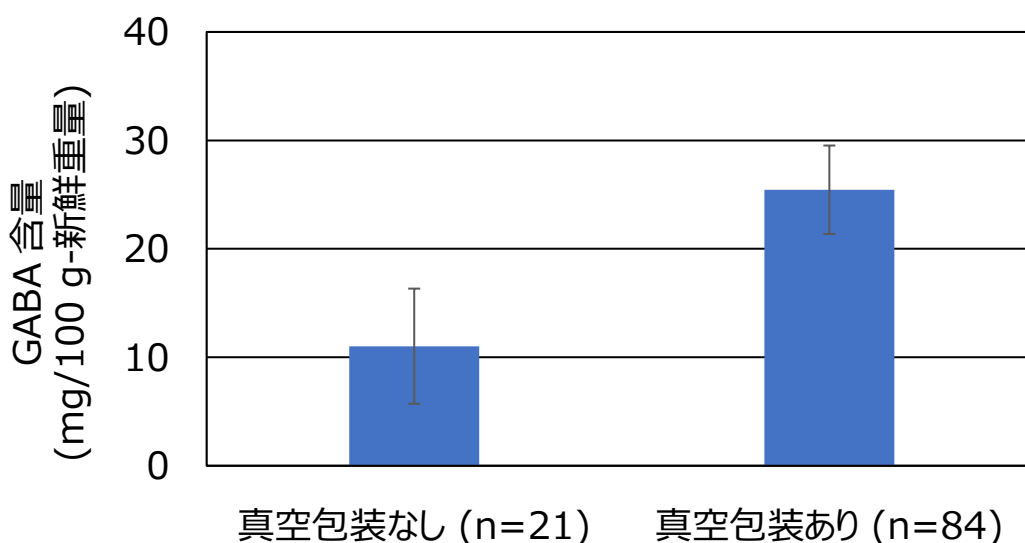
へちま試料については 2020 年 3-6 月にかけて JA おきなわ管内の 1 か所の生産者のハウスにおいて栽培された沖縄県育成系統「沖農 N1 号」をサンプリングして試験に用いました。

収穫日 : 2020/3/15, 3/22, 3/29, 4/21, 5/11, 5/25, 6/8

各収穫日にへちま 12 本を真空包装して冷蔵保管し、2 日後に開封して皮をむき、可食部を凍結乾燥後に GABA 分析に供試しました。真空包装には富士インパルス製 V-301 を用いました。

真空包装していないへちまも準備し、真空包装したへちまは、真空包装していないへちまよりも GABA 含量が多いことを確認しました（図Ⅲ-3-7）。

得られた分析結果について、農林水産省技術会議による【農林水産物の機能性表示に向けた技術的対応】にしたがって正規分布していることを確認するとともに、真空包装したへちま全品について平均値（25.4 mg/100 g-新鮮重量）および下限値（17.5 mg/100 g-新鮮重量）を求めました。

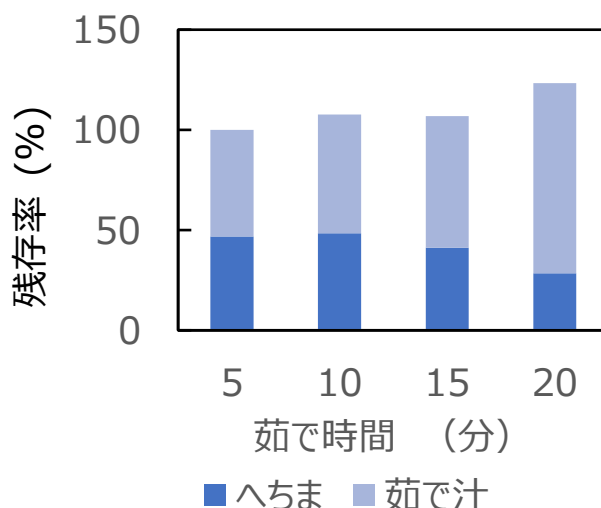


図Ⅲ-3-7 2 日間真空包装したハウスへちまの GABA 含量

（5）機能性表示食品の届出、マーケティング戦略など

表示規格は、可食部 200 g（約 1 個）中に、機能性関与成分の効果が期待できる 1 日摂取目安量である 20 mg を上回る GABA が含まれるものとし、商品名「ギャバへちま」として機能性表示食品の届出を行いました。

なお、へちま中の GABA は、調理試験において、皮を剥いてカットしたへちまを 15 分程度水煮することにより、約 2/3 が煮汁へ移行することがわかっているため、摂取の方法としては、「加熱調理する場合は汁物などに入れて茹で汁もすべてお召し上がりください。」としています（図Ⅲ-3-8、9）。



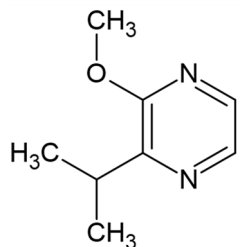
図Ⅲ-3-8 茹で調理におけるへちま中 GABA の残存率



図Ⅲ-3-9 へちまの味噌汁

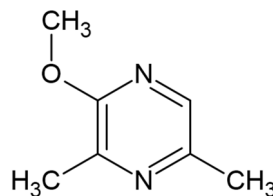
また、へちまは加熱調理により独特の土臭いにおいを呈するものがあり、調理加工時の課題となっていました。ガスクロマトグラフを用いた研究により、この土臭いにおいは、主にメトキシピラジンである 2-メトキシ-3,5-ジメチルピラジンや 2-メトキシ-3-イソプロピルピラ

ジンによるものであることがわかりました。これらの成分は、ヘーゼルナッツやピーマンにも含まれており、調理法では加熱温度が高くなる炒めで、電子レンジや茹でに比べて、このおおいが強くなることわかりました（図Ⅲ-3-10）。



2-methoxy-3-isopropylpyrazine

(土様、ナッツ様)



2-methoxy-3,5-dimethylpyrazine

(ナッツ様、チョコレート様)

図Ⅲ-3-10 加熱調理したヘチマに含まれる特徴フレーバーに寄与する香気成分

「ギャバヘちま」は、2021 年については、沖縄県南城市内（面積 200 坪）において、4 月から 6 月まで 3 トン程度生産予定であり、さらに 2022 年以降は JA おきなわ管内において生産者を増やす予定にしています（図Ⅲ-3-11）。



図Ⅲ-3-11 表示見本

IV 参考事例

リンゴ（生鮮および加工食品）

（1）対象とする食品、機能、関与成分の選定理由

国内落葉果樹で最も生産量の多いリンゴは、「ふじ」、「王林」など多くの品種が青森県や長野県などを中心に栽培されています。リンゴの生産地域では就農人口の減少や高齢化が進んでおり、国内生産量は平成2年の105.3万トンから令和2年には70.1万トンに減少しています（農水省果樹生産出荷統計）。果実の食べ易さや高い価格が消費者離れを引き起こし、国産リンゴの需要は停滞していますが、東南アジアを中心に輸出は増加傾向にあります。一方、環太平洋連携協定（TPP）が合意され、海外からの安価な果汁などの加工品の輸入などによって、リンゴ関連産業を主産業とする生産地域への経済的な打撃は甚大であることが想定されることから、リンゴ販売価格の安定、生産量の維持のため、より一層の新市場開拓による消費拡大、国際競争力の強化や高付加価値化が課題となっています。農研機構果樹・茶業研究部門では、公設研究所などと連携し、新品種の開発や、リンゴ栽培における省力化、供給期間を延長するための新たな貯蔵方法などを検討しており、より一層の効率化や経済性の向上に貢献するため研究開発を行っています。また、リンゴの機能性成分であるポリフェノールの一種であるプロシアニジンは、カテキンやエピカテキンが重合したもので、ポリフェノール総量の約60%を占めています。農研機構では、このプロシアニジンに着目し、動物試験やヒト試験において、糖・脂質代謝の改善による血糖値上昇の抑制や肥満予防などの生活習慣病予防効果の活性成分であることを示す等、本成分に関する研究を行っています。リンゴの健康機能性に関する科学的エビデンスを蓄積するとともに、高付加価値化による機能性表示食品などの

開発を目指した研究を実施しています。

機能性表示食品では、1 日摂取目安量当たりの関与成分含有量の下限值を表示する必要があります。そのため、リンゴ生果では、リンゴの糖度や着色などによる等級や、リンゴの大きさによる階級ごとに分け、プロシアニジン量の調査を実施しています。また、ジュースやドライフルーツの加工食品では、品種による加工適性の評価、加工工程におけるプロシアニジン量の変化や保存試験による減少量を検討し、賞味期限内の変動を明らかにしています。

(2) 科学的根拠（ヒト試験（または研究レビュー）、メカニズム説明）の提示

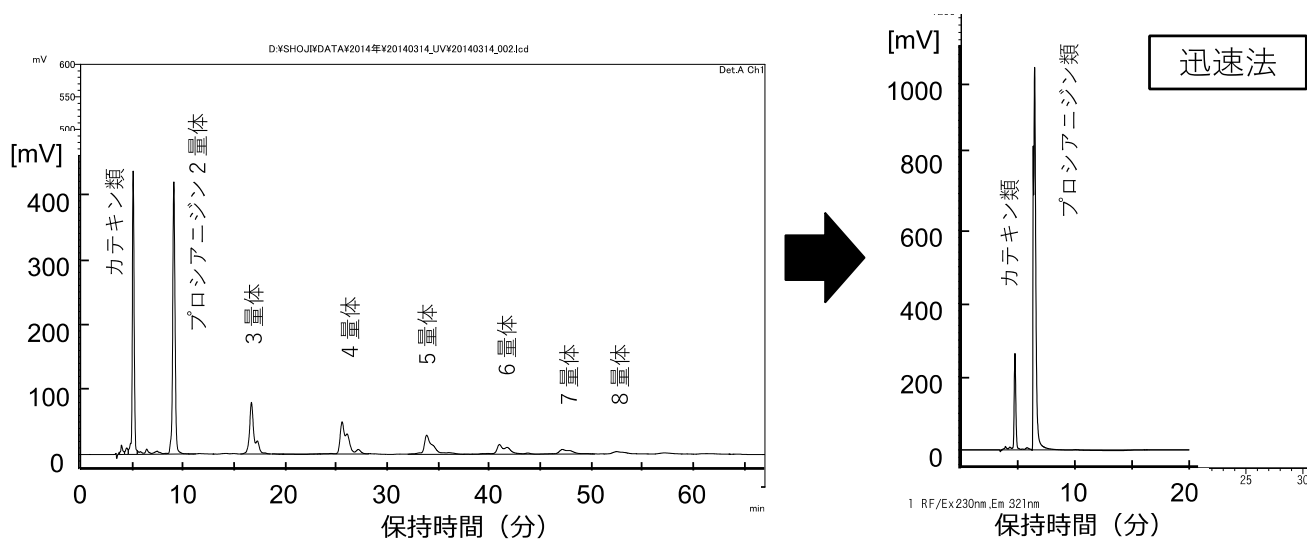
リンゴ由来プロシアニジン機能を機能性関与成分とする研究レビューに基づき、「本品にはリンゴ由来プロシアニジンが含まれます。リンゴ由来プロシアニジンには、内臓脂肪を減らす機能があることが報告されています。」の機能性表示が可能です。なお、本システムティックレビューは、農研機構のウェブサイトにおいて公開されています。上記研究レビューにおいて、群間差が認められ「効果あり」とした文献より、リンゴ由来プロシアニジンとしての1日当たりの摂取目安量は110 mg 以上と想定されました。

その作用機序としては、リンゴ由来プロシアニジン類が腸管における腓リパーゼの働きを阻害し、脂質の吸収を抑制することや、脂肪細胞における脂肪分解に関与する遺伝子発現を増加させることなどが報告され、肥満予防や脂質代謝を改善していることが報告されています。

(3) 分析法の整備

①リンゴ中のプロシアニジン量の迅速分析法の開発

リンゴ中のプロシアニジン類の分析では、糖類や他のポリフェノールの影響がなく、重合度別に定量できる順相 HPLC 法が用いられています。従来の HPLC 法では、1 検体の分析に約 75 分掛かることや、標準品が高価で入手しにくいこと、更に 15 量体までであるうちの 8 量体程度までしか検出できないことなど、機能性表示食品で想定される多数の検体を分析する場合に問題となっていました。そこで、HPLC 分析で使用するカラムや溶出条件を検討し、従来法の 3 分の 1 の時間で分析できる迅速法を開発しました (図IV-1)。また、蛍光検出器を用い、プロシアニジン類に特異的な蛍光波長 (励起波長 321 nm、蛍光波長 230 nm) で検出することで、リンゴに含まれる他のポリフェノールによる影響なく、検出することができます¹⁾。



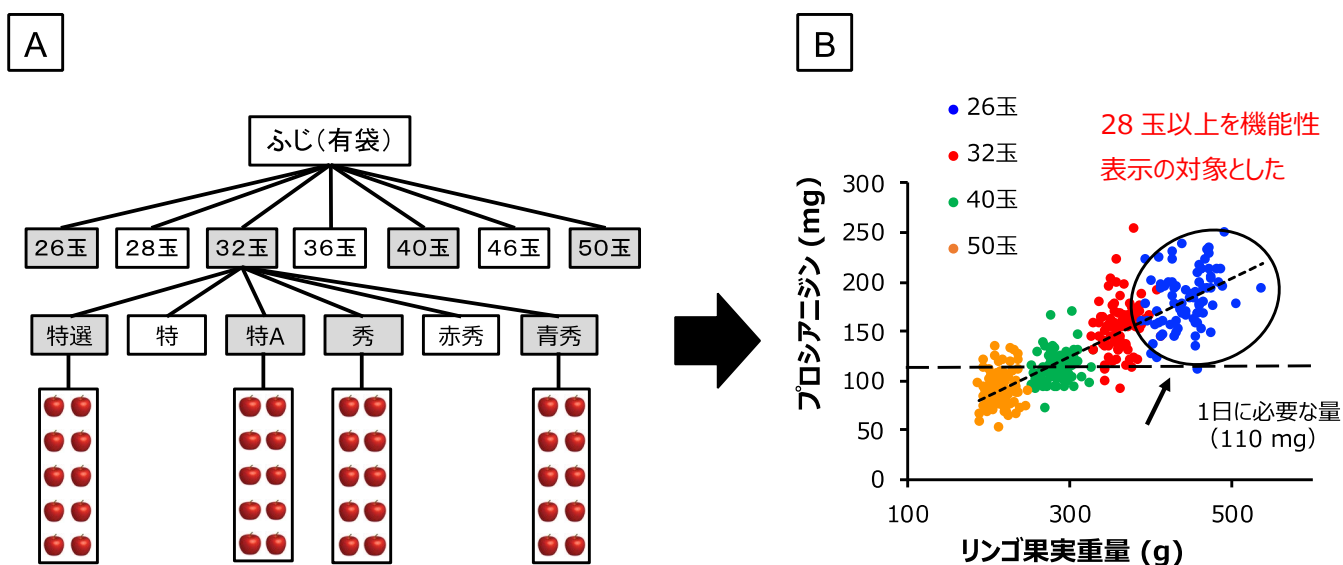
図IV-1 迅速 HPLC 法によるリンゴ由来プロシアニジンの分析

従来法では、リンゴ由来プロシアニジンの分析に 75 分掛かっていましたが、迅速 HPLC 法では 20 分で分析することが可能になります。

(4) 成分含量の評価と規格の決定

①リンゴ生鮮中のプロシアニジン量の評価

リンゴ中のプロシアニジン量は、生産年、生産地、品種、果実の成熟過程、栽培法、貯蔵などによって影響を受けることから、農林水産省が発表している「農林水産物の機能性表示に向けた技術的対応について」（Ⅱ 参考資料 2）にしたがって試料を採取、測定しています。JA つがる弘前管内で栽培され、選果場に集められたリンゴは、大きさ（階級）や、着色や糖度などの品質（等級）ごとに分けられます。各等階級のリンゴを 10 から 12 個程度無作為に採取し、リンゴ可食部（果皮、果芯を除く）に含まれるプロシアニジン量を測定します（図Ⅳ-2）。データが正規分布していることを確認するとともに、95 %下限値を求め 1 日に必要な摂取量を算出し規格を決定します。

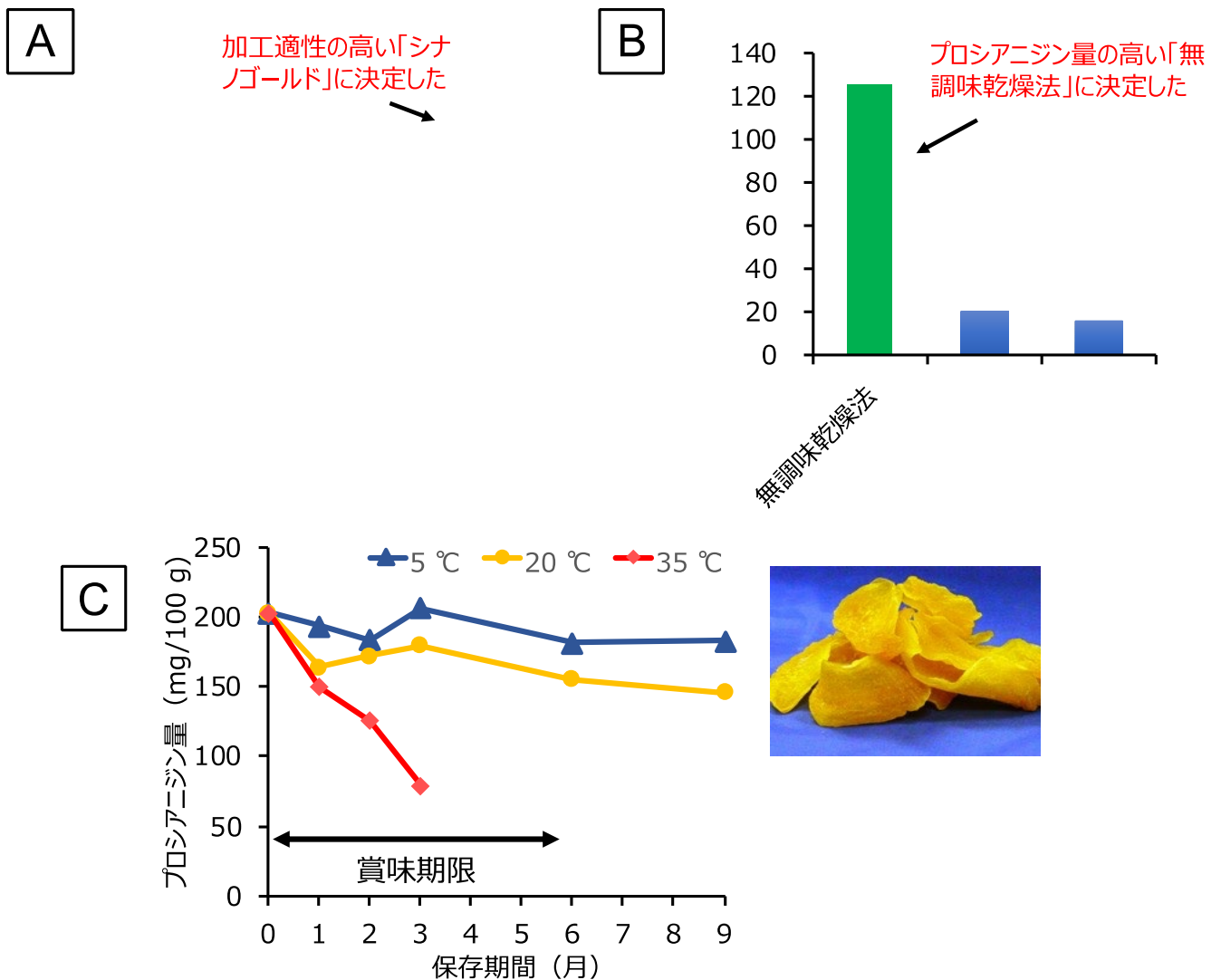


図Ⅳ-2 「ふじ」の階級別プロシアニジン量の分布

リンゴの大きさ（階級）や等級ごとにリンゴを採取し（A）、関与成分プロシアニジン量のばらつきを評価して、28玉以上を表示対象とする規格（階級）に決定しています（B）。

②リンゴ加工食品のプロシアニジン量の評価

リンゴ加工食品では、プロシアニジンなどのポリフェノールが加工工程においてリンゴ中の酸化酵素や空気中の酸素による影響を受け、含有量が変わります。そこで、ドライフルーツやジュースでは、プロシアニジン量や加工適性を参考に品種の選定や、製造法によるプロシアニジン量の違いを検討します（図IV-3 A、B）。また、製造後の加工食品を使った保存試験を行って、プロシアニジン量がどのくらい変動するかを評価して賞味期限や必要な摂取量を決定します。（図IV-3 C）。



図IV-3 リンゴドライフルーツの機能性表示食品の開発事例

ドライフルーツの機能性表示食品では、長野県産リンゴからプロシアニジン量が高く、加工適性が高い「シナノゴールド」を選び、プロシアニジン量の減少が少なかった「無調味乾燥法」で製造しています。また、ドライフルーツを包装し、5℃、20℃、35℃の条件で保存試験を行い、賞味期限を6か月に決定しました。

(5) 期待される効果

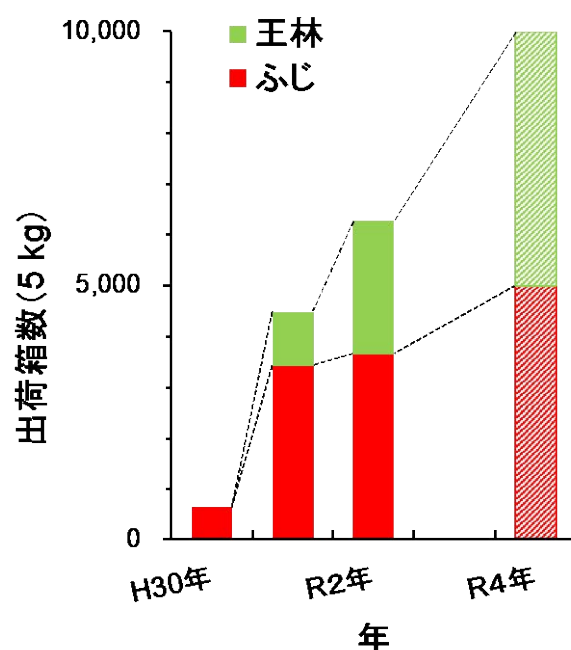
リンゴの機能性表示食品は届出されてから3年しか経過しておらず、JAつがる弘前から届出された「プライムアップル！」について限られた経済効果の評価しかできませんが、販売数量・金額とも順調に拡大しています。「プライムアップル！（ふじ）」の販売が開始された平成30年の販売数量は650箱（5kg箱）、売上げ270万円でしたが、令和元年に「プライムアップル！（王林）」の届出が追加され、令和2年には販売数量は約10倍の6300箱に増加しています（図IV-4）。JAつがる弘前の販売予測では、令和4年には、今年度の約2倍の市場規模に拡大すると予測しています。通常、リンゴの果実単価は220円程度ですが、平成30年の「プライムアップル！」では300円で取引されており、生産者の収益向上が期待されています。一方、青森県では、「ふじ」を中心に貯蔵性が高い有袋栽培で生産されていましたが、就農人口の減少や高齢化のため平成30年には有袋栽培で生産されるリンゴは全体の20%以下に大きく減少し、国産リンゴの周年供給ができなくなる可能性が出てきています。弘前大学と共同でJAつがる弘前管内のリンゴ生産農家に行ったアンケートでは、機能性表示食品の販売による収入の増加や、「プライムアップル！（ふじ）」が、プロシアニジン含量が比較的高く、個別包装に対応可能な有袋栽培された「ふじ」に限定されたことによる「ふじ」の有袋栽培の生産意欲の向上など、生産者の関心が高まっていることも明らかになりました（図IV-5）。

一方、加工食品では、リンゴドライフルーツ「毎日アップル（シナノゴールド）」（森食品工業）やリンゴジュース（ストレート）「毎日アップル りんごジュース（ストレート）」（長野興農）、「スマートアップルジュース」（届出準備中、JA アオレン）など取組が進められ、リンゴ関連商品の高付加価値化の推進が見込まれます。長野県内の加工品では、「毎日アップル」シリーズとしてブランド戦略を立て、中小の企業でも効果が得られるよう工夫をしており、さらなる経済的波及効果が期待されています（図IV-6）。

A

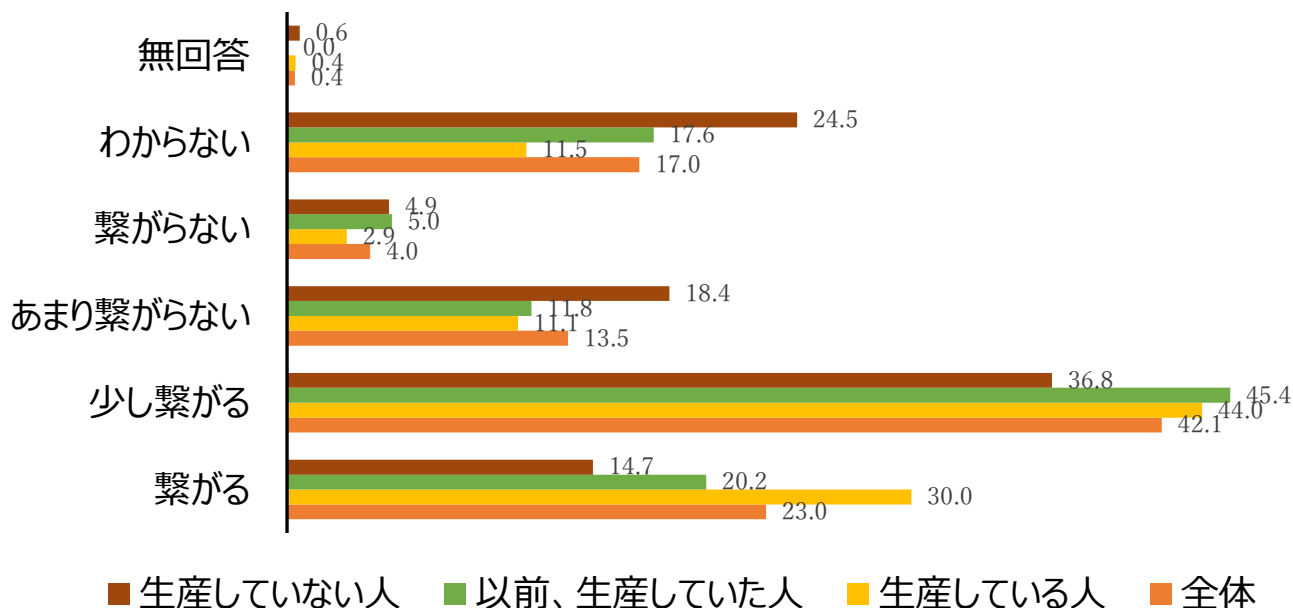


B



図IV-4 プライムアップル！の販売実績

A：「プライムアップル！（ふじ）」の販売、B：「プライムアップル！」の出荷箱数の変化



図IV-5 リンゴの機能性表示食品が「ふじ」有袋栽培の生産意欲への影響

JA つがる弘前管内の生産者 525 名に「リンゴの機能性表示食品が有袋栽培の生産向上に繋がるか？」という質問を行い、リンゴ有袋栽培の生産状況毎に集計しました。



図IV-6 リンゴの機能性表示食品の事例

プライムアップル（ふじ）（届出番号：C385）；プライムアップル（王林）（届出番号：D399）；
 毎日アップル（シナノゴールド）（届出番号：E155）；毎日アップル りんごジュース（ストレート）
 （届出番号：E622）。

1) 庄司 俊彦, 升本 早枝子. 「プロシアニジン類の分析方法および分析システム」（特許第 6508741 号、2019 年 4 月 12 日）

地域農産物発掘コンソーシアム参画機関（順不同）

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品研究部門、九州沖縄農業研究センター

国立研究開発法人 国立がん研究センター 社会と健康研究センター

茨城県産業技術イノベーションセンター

国立大学法人 筑波大学医学医療系

タカノフーズ株式会社

国立大学法人 信州大学 農学研究科、学術研究院（農学系）

長野県工業技術総合センター

長野県野菜花き試験場

株式会社竹内農産

沖縄県農業研究センター

国立大学法人 琉球大学 農学部、熱帯生物圏研究センター、大学院医学研究科

株式会社サンエー

普及・実用化支援組織（順不同）

株式会社ツルヤ

農業法人有限会社グリーンフィールド

株式会社農協直販

株式会社ローソン沖縄

担当窓口、連絡先

外部からの受付窓口：

農研機構 食品研究部門 研究推進部 研究推進室 029-838-7991

技術的な問い合わせ先：

農研機構 食品研究部門 食品健康機能研究領域

（担当者名 小堀）