

# 博士論文

マルトビオン酸カルシウムの  
物性および生理機能性に関する研究

令和3年2月

深見 健

# 目次

第1章 序論.....	1
1.1 糖質および機能性糖質.....	1
1.2 糖酸.....	2
1.3 マルトビオン酸.....	4
1.4 本研究の目的.....	5
第2章 マルトビオン酸Caの生産.....	6
2.1 序.....	6
2.2 方法.....	6
2.3 金属触媒法.....	8
2.4 酵素法.....	14
2.5 マルトビオン酸およびマルトビオン酸Ca高純度品の製造.....	16
2.6 マルトビオン酸Caを主成分とするオリゴ糖製品(工業生産製品)の製造.....	18
2.7 まとめ.....	19
第3章 マルトビオン酸Ca粉末の物性.....	20
3.1 序.....	20
3.2 マルトビオン酸Caおよびマルトビオン酸のガラス転移挙動.....	22
3.2.1 背景および目的.....	22
3.2.2 方法.....	22
3.2.3 結果および考察.....	23
3.3 マルトビオン酸Ca-マルトース混合系のガラス転移挙動.....	33
3.3.1 背景および目的.....	33
3.3.2 方法.....	33
3.3.3 結果および考察.....	34
3.4 マルトビオン酸Caを主成分とするオリゴ糖製品のガラス転移挙動.....	44
3.4.1 背景および目的.....	44
3.4.2 方法.....	44
3.4.3 結果および考察.....	45
3.5 まとめ.....	49

第4章 マルトビオン酸Caの難消化性糖質としての機能.....	51
4.1 序.....	51
4.2 マルトビオン酸の <i>in vitro</i> 消化性.....	52
4.2.1 背景および目的.....	52
4.2.2 方法.....	52
4.2.3 結果.....	56
4.2.4 考察.....	62
4.3 腸内細菌増殖選択性.....	63
4.3.1 背景および目的.....	63
4.3.2 方法.....	63
4.3.3 結果.....	65
4.3.4 考察.....	67
4.4 ヒトに対する便通改善効果.....	69
4.4.1 背景および目的.....	69
4.4.2 方法.....	69
4.4.3 結果.....	73
4.4.4 考察.....	82
4.5 まとめ.....	83
第5章 マルトビオン酸Caの骨密度改善機能.....	84
5.1 序.....	84
5.2 方法.....	86
5.3 結果.....	89
5.4 考察.....	103
5.5 まとめ.....	105
第6章 結論.....	106
引用文献.....	109
謝辞.....	118

# 第1章 序論

## 1.1 糖質および機能性糖質

食品には3つの機能、即ち栄養（一次機能）、嗜好（二次機能）、生体調節機能（三次機能）がある。その食品を構成する5大成分として、糖質、脂質、タンパク質、ビタミン、ミネラルが挙げられる。糖質は生物のエネルギー源として最も重要な栄養素の一つである。特にブドウ糖（グルコース）は、エネルギーの通貨として生命活動の維持に利用されている（一次機能）。また、脳における唯一のエネルギー源であり、記憶維持に重要な役割（三次機能）を果たしている。

一方、糖質が呈する甘みはヒトに好まれるものであり（二次機能）、食品産業では様々な形で利用されている[1]。日本の甘味市場において、ショ糖（スクロース）の需要は減少傾向にあったが、2019年ではおおよそ年間183万トンが消費されている。また、糖化製品もショ糖と同程度の市場を占めている。糖化製品とは、原料となる澱粉を糖化酵素等によって加水分解した製品であり、2018年度は176万トン（このうち異性化糖は80万t）が消費されている[1, 2]。糖化製品は飲料類、冷菓類、菓子類などに利用されている。しかしながら、近年では糖質の過剰摂取に伴う肥満や糖尿病などの疾病が世界的な問題となっており、高甘味度甘味料（アスパルテーム、スクラロース、ステビアなど）や糖アルコール（エリスリトール）などを利用した低糖質、或は無糖の食品が市場を賑わせている。また、糖質においてはオリゴ糖や食物繊維を対象とした三次機能に関する研究開発が盛んに進められている。

機能性糖質として開発されたオリゴ糖の一例としてカップリングシュガーが挙げられる。これは

澱粉とスクロースの混合溶液に *Bacillus megaterium* や *Bacillus macerans* 由来のシクロマルトデキストリングルカノトランスフェラーゼを作用させることによって合成されたオリゴ糖であり、スクロースにグルコースが1~3個結合してできている[3]。カップリングシュガーは不溶性のグルカンを生成しないことから虫歯になり難い甘味料として利用が広がった。その後、日高らは $\beta$ -フラクトフラノシダーゼをスクロースに作用させることでフラクトオリゴ糖を開発した[4]。フラクトオリゴ糖はヒトの消化酵素で加水分解されず、腸内でビフィズス菌に利用されるものであり、整腸効果を有する機能的糖質として広がりを見せた。また、 $\beta$ -ガラクトシダーゼの転移反応を利用して乳糖(ラクトース)から製造されたガラクト糖オリゴ糖にもビフィズス菌の増殖効果に関する報告がなされており[5]、乳児の便性改善や腸内ビフィズス菌の増殖促進を目的として乳児用粉ミルクに配合されている。この他、乳果オリゴ糖[6]、キシロオリゴ糖[7]、イソマルトオリゴ糖[8]なども特定保健用食品として整腸効果を謳った商品に利用されている。これらのオリゴ糖は、豊富に存在する安価な糖質原料である澱粉、スクロース、ラクトースを原料に、加水分解酵素や糖転移酵素を用いて、機能的性を付与した点に特徴がある。

## 1.2 糖酸

これまでに製品化されたオリゴ糖の大半は電荷を持たない中性糖であり、負電荷を持つ糖酸が食品に使用された例はほとんどない。これは、安価な糖質原料(澱粉やスクロースなど)から酵素処理等によって糖酸を製造するための研究報告に乏しく、そのことによって有用性(物性や機能的性)に関する研究も十分に行われていなかったためである。

糖酸 (Table1-1) とはアルドースのアルデヒド基がカルボキシ基に酸化されたアルドン酸や、アル

ドースの末端のヒドロキシ基がカルボキシ基に酸化されたウロン酸、アルドースの両端がカルボキシ基に酸化されたアルダル酸に分類される。近年、日本ではこの糖酸をターゲットとした研究が着目されつつあり、ユニークな性質が報告され始めている。

アルドン酸にはグルコース、ガラクトース、キシロースなどのアルドースの還元末端にあるアルデヒド基が、カルボキシ基に酸化されたグルコン酸、ガラクトン酸、キシロン酸などがある。グルコン酸は1886年に *Boutroux* によってブドウ糖を発酵させる過程で発見されたものであり[9]、近年ではハチミツ、ワイン、酢、味噌、醤油などの発酵食品に存在することが知られている[10]。日本では食品添加物リストに記載されており、まろやかな酸味を呈する有機酸であることから pH 調整剤として、また、ラクトンとなる性質を利用して豆乳の凝固剤として利用されている。グルコン酸はミネラル成分と安定な塩を形成し、グルコン酸 Ca、グルコン酸 Na、グルコン酸 K などの形態としても利用されている。グルコン酸 Ca は炭酸 Ca と比べ溶解性に優れていることから、カルシウムを強化した飲料に利用される。また、グルコン酸 K は獣臭や大豆臭を和らげるマスキング剤として利用されている。キシロン酸は植物病原菌 *Erwinia milletiae* によって産生されることが知られているが[11]、物性や機能性に関する知見は殆ど無い。その他のアルドン酸（アラボン酸やガラクトン酸など）においても研究報告は少ないが、アルドン酸を含有したオリゴ糖であるラクトビオン酸やセロビオン酸については有用な研究報告がある。例えばラクトビオン酸（ラクトースの還元末端が酸化）はカスピ海ヨーグルトに含有されており、医薬品であるエリスロマイシンの溶解性向上や[12]、移植臓器の保存剤成分としての利用報告がある[13]。また、セロビオン酸（セロビオースの還元末端が酸化）は、糸状菌によるセルロースの分解資化過程の代謝産物として知られている。これらのオリゴ糖はいずれも  $\beta$  結合型のオリゴ糖であり、ラクトースやセロビオースが原料となる。しかし、

これらよりも安価なマルトースを原料として製造可能なマルトピオン酸については研究報告が殆どなかった。そこで筆者らはマルトピオン酸に着目し、研究を開始した。

Table 1-1. Sugar acid.

分類	構造	物質名
アルドン酸	アルドースのアルデヒド基がカルボキシ基へ酸化されたもの	グルコン酸、ガラクトン酸、キシロン酸、アラボン酸 など
ウロン酸	アルドースの末端のヒドロキシ基がカルボキシ基へ酸化されたもの	グルクロン酸、ガラクツロン酸、イズロン酸 など
アルダル酸	アルドースの両端がカルボキシ基へ酸化されたもの	グルカル酸、ガラクトアル酸 など
アルドン酸含有オリゴ糖	アルドン酸を含有するオリゴ糖	マルトピオン酸、セロピオン酸、ラクトピオン酸、マルトトリオン酸、マルトテトラオン酸 など

### 1.3 マルトピオン酸

マルトピオン酸 (4-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-D-グルコン酸) を食品素材として開発する上で、食経験を確認しておくことが必要であった。筆者は様々な食品を対象にマルトピオン酸をスクリーニングした結果、国産の天然ハチミツの中にマルトピオン酸とその異性体 (イソマルトピオン酸、ニゲロピオン酸、コージピオン酸) が含まれていることを確認した[14]。これらの成分は、ハチの巣で熟成過程に生成したグルコースやマルトースが、 $\alpha$ -グルコシダーゼの働きでグルコン酸へ転移、或は縮合反応して生成したと推察される。国産の純粋ハチミツにおいて、マルトピオン酸は0.013%、その異性体も含めると0.14%程度が見出された。日本では年間45,000t程度のハチミツが消費されていることから[15]、おおよそ年間6t程度のマルトピオン酸が、異性体を含めると63t程度が消費されていると見積もることができる。マルトピオン酸は甘さが弱く、おだやかな酸味を呈

する。クエン酸などの有機酸と比べると、酸味の立ち上がりが穏やかで持続する味質が特徴的である[16]。また、酢酸と比べると、マルトビオン酸は糖質であるため揮発し難く、酸臭がない。こうしたマルトビオン酸の特徴から、風味のエンハンス効果や不快味のマスキング効果も期待される。一方、マルトビオン酸は負電荷を持つため、正電荷を持つ Ca イオンとの静電的相互作用の結果、マルトビオン酸 Ca の形態となる。マルトビオン酸 Ca においては酸味が消失し、僅かな苦みを与える粉あめ風味の味質特性が認められる。クエン酸 Ca やグルコン酸 Ca などの有機酸 Ca は溶解安定性に劣り、結晶化し易いのに対して、マルトビオン酸 Ca は溶解安定性に優れ、高濃度溶液下においても結晶化しない挙動が伺える[14]。

#### 1.4 本研究の目的

マルトビオン酸の“糖”と“酸”に基づくハイブリットな性質より、これまで数多く開発されてきた電荷を持たない中性糖には無かった新規用途が期待される。そこで本研究ではマルトビオン酸 Ca の工業生産技術を確立した上で、その物性と生理機能性を明らかにすることを目的とした。

本論文は全6章で構成される。1章(本章)では本論文の背景および目的を述べた。2章ではマルトビオン酸 Ca を工業生産することを念頭に、金属触媒法と酵素法についてその方法と有用性を整理した。3章ではマルトビオン酸 Ca のガラス転移温度と水分収着の観点から非晶質粉末としての基礎物性を評価した。4章ではマルトビオン酸 Ca の難消化性オリゴ糖としての生理機能性に着目し、消化耐性、腸内細菌の利用性、ヒトに対する便秘改善効果について検討した。5章ではマルトビオン酸 Ca の優れたカルシウム溶解性に基づく生理機能性に着目し、ヒトに対する骨密度改善効果について検討した。6章では上記の研究結果をまとめ、今後の展望に向けた考察を行った。

## 第2章 マルトビオン酸Caの生産

### 2.1 序

グルコース（還元末端側）のアルデヒド基がカルボキシ基に変換されることでアルドン酸が生成する。グルコン酸においては、発酵法や酵素法等を用いた製造方法が実用化されている。ラクトビオン酸やセロビオン酸などのアルドン酸含有オリゴ糖に関しては、アシネトバクター属、ブルクホルデリア属、酢酸菌などの微生物変換による製法や[17-20]、金担持酸化チタン、ビスマス-パラジウム担持炭素などの金属触媒を用いた製法について報告がある[21-23]。アシネトバクター属やブルクホルデリア属は、細胞膜にグルコースデヒドロゲナーゼを持つ。回分培養による発酵生産では、96時間で200 g/Lの乳糖をラクトビオン酸へ変換することができる。発酵法の場合、生産に長い時間を要することや、精製工程で廃棄される菌体などの処理が大きな課題となる。筆者らはマルトビオン酸Caを工業生産することを念頭に、金属触媒法および酵素法の有用性を比較した。

### 2.2 方法

#### HPLC法（糖分析）

各種糖分析にはパルスドアンペロメトリー検出を搭載したDX-500糖分析システム（Dionex, Sunnyvale, CA）を使用し、以下の条件で測定した。

カラム：CarboPac PA-1 guard column (50×4.0 mm)、CarbonPac PA-1 (250×4.0 mm)

検出器：パルスドアンペロメトリー

カラム温度：30℃

流速：1.0 ml / min

注入量：10  $\mu$ L

溶離液：(a) 0.1 M 水酸化ナトリウム、(b) 0.1 M 水酸化ナトリウム / 1 M 酢酸ナトリウム

グラジエントプログラム

Time (min)	(a) 0.1 M NaOH	(b) 0.1 M NaOH / 1 M AcONa
0.0	100	0
5.0	100	0
35.0	80	20
35.1	0	100
45.0	0	100

#### Somogyi-Nelson 法 (還元糖)

小試験管 (13.0×105 mm) に試料 (0~200  $\mu$ g/ml) を 0.25 ml 入れ、ソモギ銅試薬 (富士フィルム和光純薬 (株)) を 0.25 ml 加えて攪拌し、沸騰浴中 (100°C) で 15 分間加熱した。アイスバスで冷却後、ネルソン試薬 (富士フィルム和光純薬 (株)) を 0.5 ml 加えて攪拌し、15 分間静置した。蒸留水 (4 ml) を加え攪拌し、分光光度計 (UV-1800, (株) 島津製作所) にて吸光度 (660 nm) を測定した。グルコース (0~200  $\mu$ g/ml) を標品として検量線を作成し、還元糖量を求めた。

#### キレート滴定法 (カルシウム)

試料を 80°C で 3 時間乾燥した後、約 0.25 g を 550°C で 8 時間灰化处理した。これを 20% 塩酸 (1.5 ml) で溶解し、ろ過後に脱イオン水を加えて 100 ml にメスアップした。この滴定検液から 10 ml を正確に採り、4% 水酸化ナトリウム溶液 (10 ml) を加えて 50°C で 1 分間攪拌した後、5% 塩化ヒドロキシルアンモニウム溶液 (1 ml)、NN 指示薬 (0.1 g) を加え、直ちに 0.01 mol/l エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム溶液で滴定した。滴定は、紫色の溶液が青色となることを終点とした。カルシ

ウム含量は次式によって決定した。

<計算式>

$$\text{カルシウム含量 (\%)} = (D \times 0.010/1000 \times 40.078 \times V) / E \times F \times 100$$

D: 0.01 mol/L エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム溶液の消費量 (ml)

V: 滴定検液量 (ml)

E: 本品の重量 (g)

F: 0.01 mol/L エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム溶液のファクター

## 2.3 金属触媒法

金属触媒を使用した食品製造には、ソルビトールなどの糖アルコール[24]やマーガリンなどの油脂の製造[25]において、ニッケル触媒を使った水素添加反応があるが、それ以外の金属触媒の利用実績はない。筆者は製造用剤として食品添加物リストに記載されている白金炭素、パラジウム炭素、ルテニウム炭素およびニッケル触媒を用いて、マルトビオン酸の効率的な生産方法を検討した。

糖アルコールであるマルチトールは、マルトース溶液を原料としてニッケル触媒存在下で反応槽へ水素ガスを注入し、加圧下で高温反応を行う方法で製造されている。この製法を参考に、酸素供給、pH および反応温度に関する最適化を進めた結果、パラジウム炭素を用いた手法が最も効率的であることを見出した[26]。本手法は30%(w/w)マルトース溶液に6%(w/w)炭素触媒(5%パラジウム担持)および1M炭酸水素ナトリウムを添加し、0.2 vvmの空気通気下、60°Cで酸化反応を行うものである(Fig. 2-1)。反応1時間後のクロマトグラムおよびHPLC測定により決定した変換率の経時変化をFig. 2-2に示す。クロマトグラムより、副生成分が出ることなく、マルトースが特異的にマルトビオン酸へ変換されることが分かった。本反応によって、1.5時間で全てのマルトースがマル

トビオン酸 Na へと変換することを確認した。

一方、ニッケル触媒を用いることで、マルトースからマルトビオン酸とマルチトールが等量高収率で得られる酸化還元反応を見出した[27]。本手法の特徴は空気や水素等の通気が不要であり、30%(w/w)マルトース溶液に20%(w/w)ニッケル触媒を入れ、60℃でpH 9.0となるように35%水酸化ナトリウムで中和するというシンプルな反応系にある(Fig. 2-3)。反応1時間後のクロマトグラムおよび Somogyi-Nelson 法により決定した酸化還元反応によって減少する還元糖量の経時変化を Fig. 2-4 に示す。クロマトグラムより、マルトースが特異的にマルチトールとマルトビオン酸へ変換されていることが分かった。また、反応2時間後には還元糖量が3%以下となり、マルトースからマルトビオン酸とマルチトールへ等量変換することを確認した。

これら2つの酸化反応は、いずれも2時間程度で反応が終わるためバッチ数を稼ぐことが可能であり、発酵法と比べて小さな反応スケールで設備設計が可能な点に有意性がある。しかし酸化反応過程でマルトビオン酸が生成すると pH が低下するため、反応低下を防ぐために、水酸化 Na の滴下中和や、予め炭酸水素 Na を加えて弱アルカリ条件になるように反応を進める必要がある。そのため、反応生成物はマルトビオン酸 Na となる。ここから、マルトビオン酸 Ca を得るには、イオン交換樹脂等で Na を脱塩処理し、マルトビオン酸を得た後、炭酸 Ca を添加反応させ、マルトビオン酸 Ca に変換する必要があるため、工程が煩雑な点に課題がある。

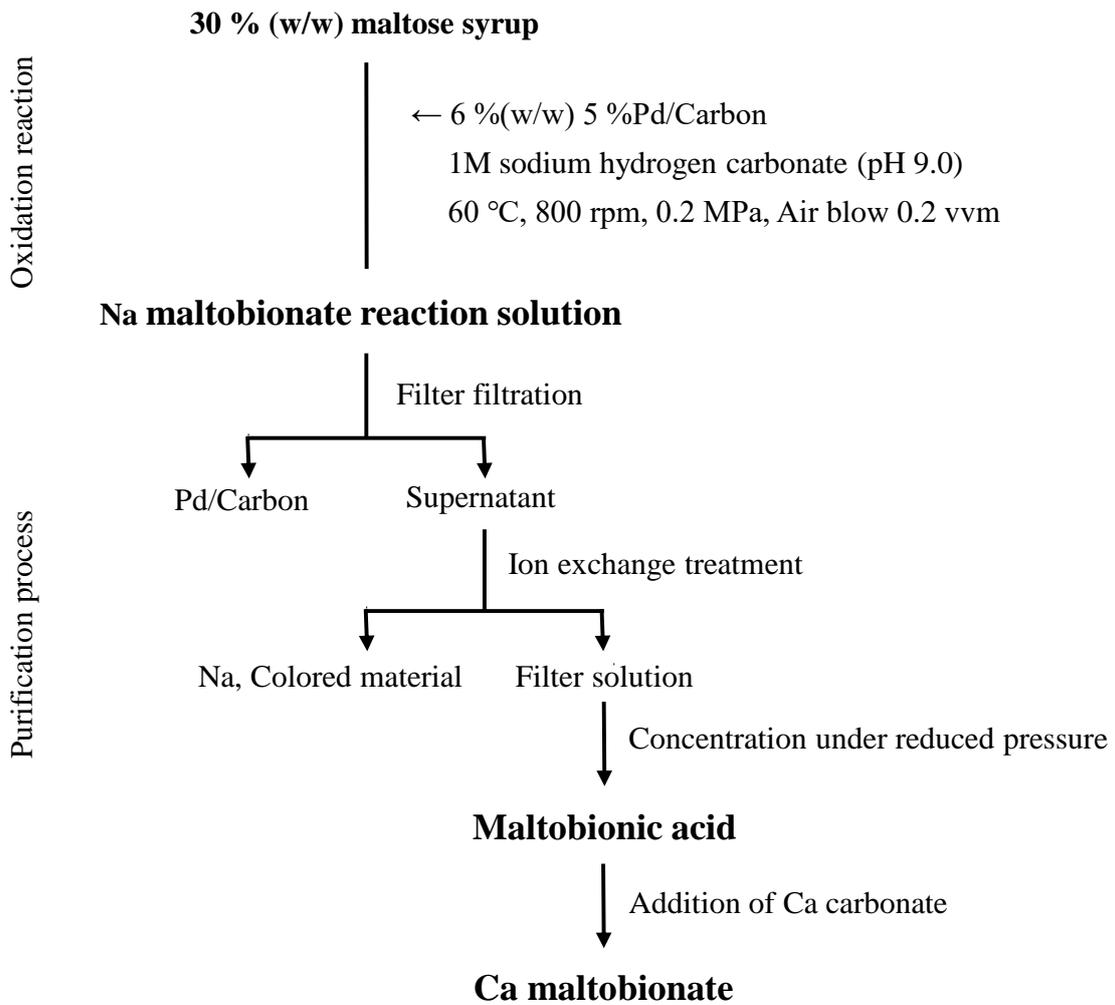


Fig. 2-1. Production flow of calcium maltobionate by palladium-catalyzed oxidation reaction.

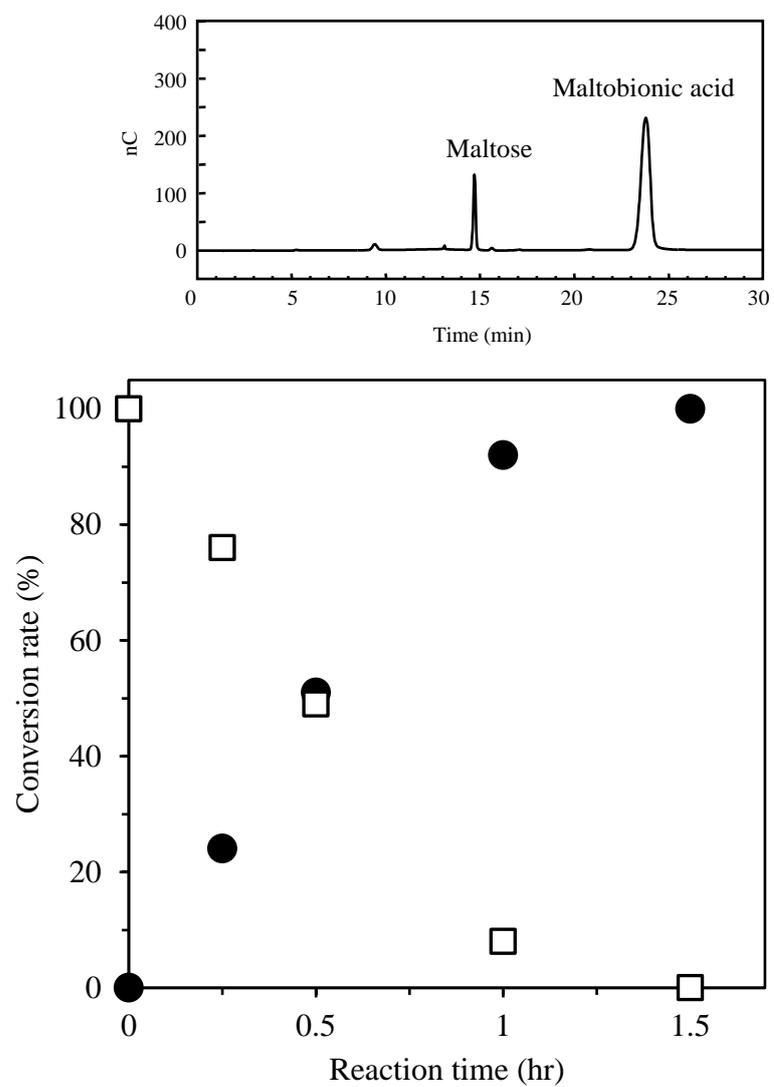


Fig. 2-2. Oxidation reaction with palladium catalyst over time.

Maltobionic acid (closed circle) and Maltose (open square).

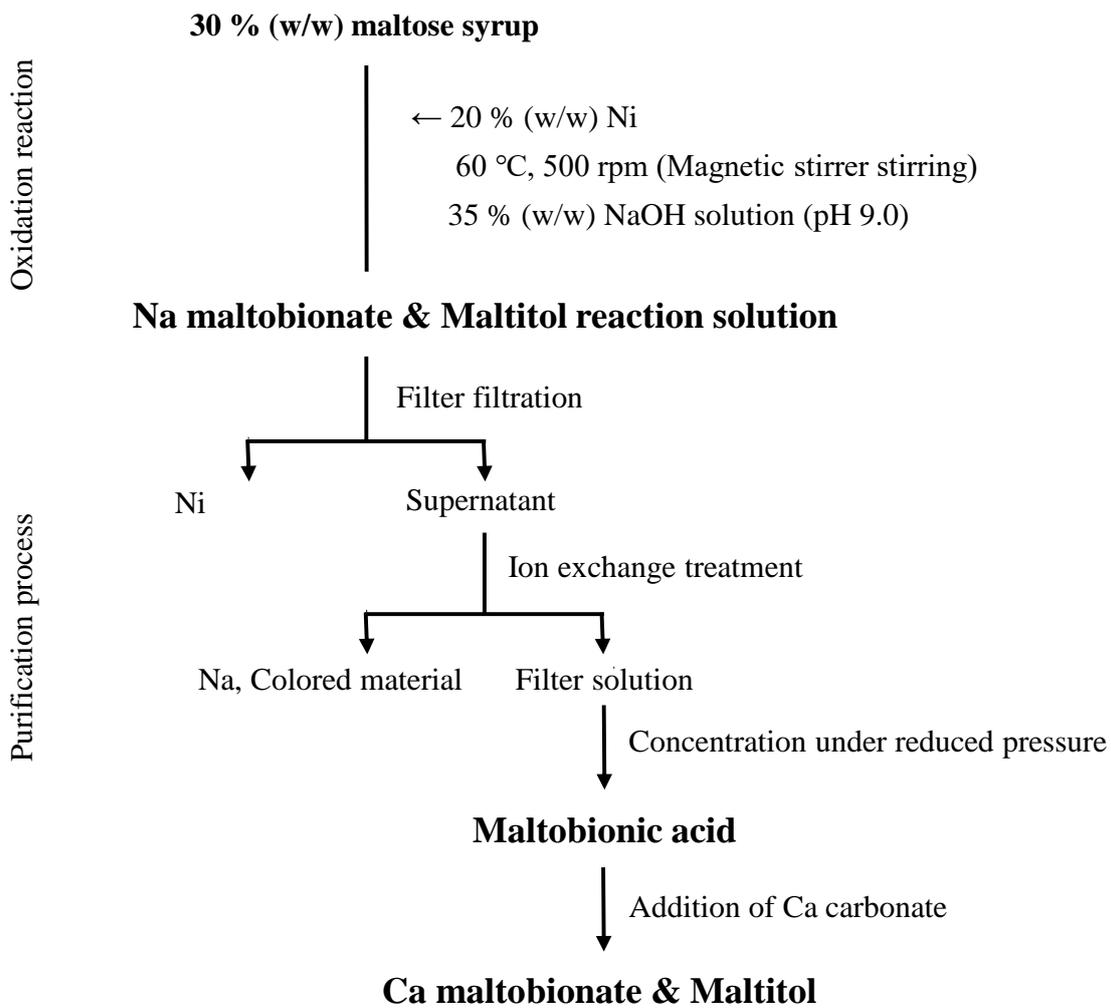


Fig. 2-3. Production flow of calcium maltobionate and maltitol by nickel-catalyzed oxidation reaction.

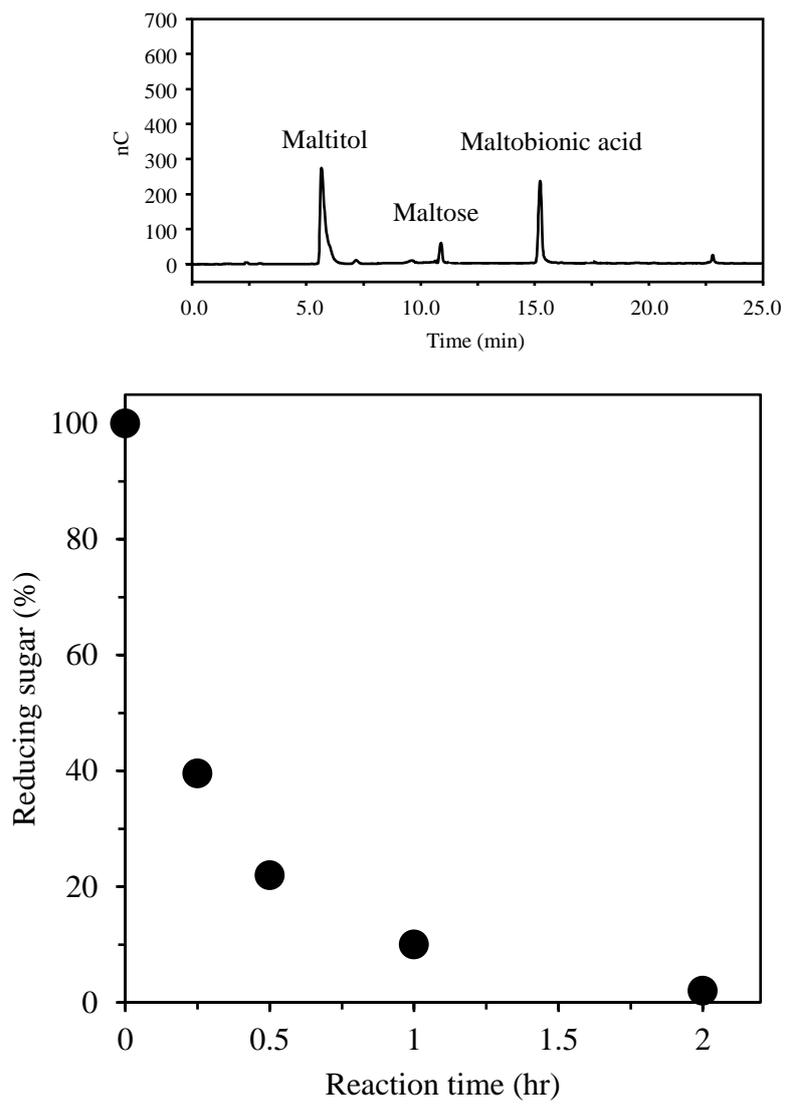
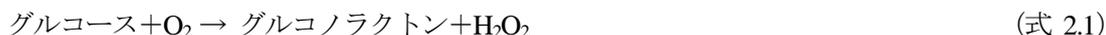


Fig. 2-4. Oxidation reaction with nickel catalyst over time.

## 2.4 酵素法

グルコースオキシダーゼを用いることで、グルコースからグルコン酸が得られる[28]。この酸化反応では、酸素存在下でグルコースにグルコースオキシダーゼを作用させることで、グルコノラクトンと過酸化水素を生成させる(式 2.1)。グルコノラクトンは水溶液下で加水分解され、グルコン酸となる(式 2.2)。副生した過酸化水素は時間と共に水と酸素に分解されるが(式 2.3)、過酸化水素が一定量存在するとグルコースオキシダーゼが失活するため、カタラーゼによって過酸化水素を速やかに分解する必要がある。即ち、2種類の酵素が必要となる。



従来利用されてきたグルコースオキシダーゼはグルコースに特異的に作用するため、マルトースを酸化できなかった。そこで筆者らは酵素メーカーと連携し、基質範囲の広いグルコースオキシダーゼを獲得した。一般にカビから酵素を生産した場合、 $\alpha$ -グルコシダーゼなどマルトースに対する加水分解作用の高い酵素が夾雑物として含まれる。工業的な酵素生産において、酵素を精製することはコスト面から困難なため、マルトースを加水分解する酵素を限外ろ過や熱処理等によって許容範囲まで低減する必要があった。マルトースを加水分解させず、マルトビオン酸を得るために、グルコースオキシダーゼ並びにカタラーゼ中の夾雑酵素活性の含有許容範囲を決定した[29]。

一方、マルトビオン酸が生成すると反応 pH が低下するため、酵素反応を円滑に進めるためには中和剤にて pH 調整しながら反応させる必要がある。一般に中和剤には先の金属触媒で使用した水酸化 Na が用いられるが、その場合、得られる生成物がマルトビオン酸 Na になるため、最終製品を



## 2.5 マルトビオン酸およびマルトビオン酸 Ca 高純度品の製造

先述の酵素法を用いて、マルトビオン酸およびマルトビオン酸 Ca を調製し、次章以降の実験試料とした。その具体的な製造方法を以下に示す。

2L 容量ジャーフェーマンター (エイブル (株)) に、純度 98% 以上のマルトース水和物 (富士フィルム和光純薬 (株)) 300 g と蒸留水 700 g を加え、約 30 % (w/w) マルトース水溶液とした。ここに炭酸 Ca 55 g、*Acremonium chrysogenum* 由来グルコースオキシダーゼ 3 ml (900 U、天野エンザイム (株))、*Aspergillus* 属由来のカタラーゼ 1.2 ml (60,000 U、天野エンザイム (株)) を加えて 35 °C、空気通気 1 L/min、攪拌 500 rpm の条件で酸化反応を行った。Fig. 2-6 に本反応における溶存酸素とマルトビオン酸変換率の経時変化を示す。反応開始以降、溶存酸素 3 ppm 前後を維持することで反応 8 時間までに約 5 割がマルトビオン酸へ変換し、24 時間で完全変換された。反応終了後、反応液に活性炭 (大阪ガスケミカル (株)) を固形分あたり 1% (v/v) になるように添加し、80 °C で 30 分間マグネティックスターラーにて攪拌した。これを GF/F ガラスフィルター (Whatman) と 0.2 μm メンブレンフィルター (アドバンテック東洋 (株)) によって濾過することで、タンパク質を除去した。精製されたマルトビオン酸 Ca 溶液を約 -50 °C の冷凍庫内に入れ、一晩予備凍結した。その後、凍結乾燥装置 (EYELA、FDU-1110) にてトラップ温度 -45 °C、5 Pa の真空度にて、2 日間凍結乾燥し、マルトビオン酸 Ca 粉末を得た。得られたマルトビオン酸 Ca 粉末品は、純度 99.5% 以上、カルシウム含有量 5.28 % (無水換算) であることを HPLC 法およびキレート滴定法によって確認した。

マルトビオン酸水溶液は、マルトビオン酸 Ca 水溶液をカチオン交換樹脂 400 ml (Dowex88、Dow Chemical Company)、アニオン交換樹脂 100 ml (WA30、三菱ケミカル (株))、カチオン交換樹脂 100 ml (Dowex88、Dow Chemical Company) の順で通液し、脱塩処理することで得られた。これを 0.2

$\mu\text{m}$  メンブレンフィルター (アドバンテック東洋 (株)) によって濾過した後、エバポレーターにて溶質濃度が 70% になるように濃縮し、シロップを得た。得られたマルトビオン酸は純度 99.5% 以上であることを HPLC によって確認した。

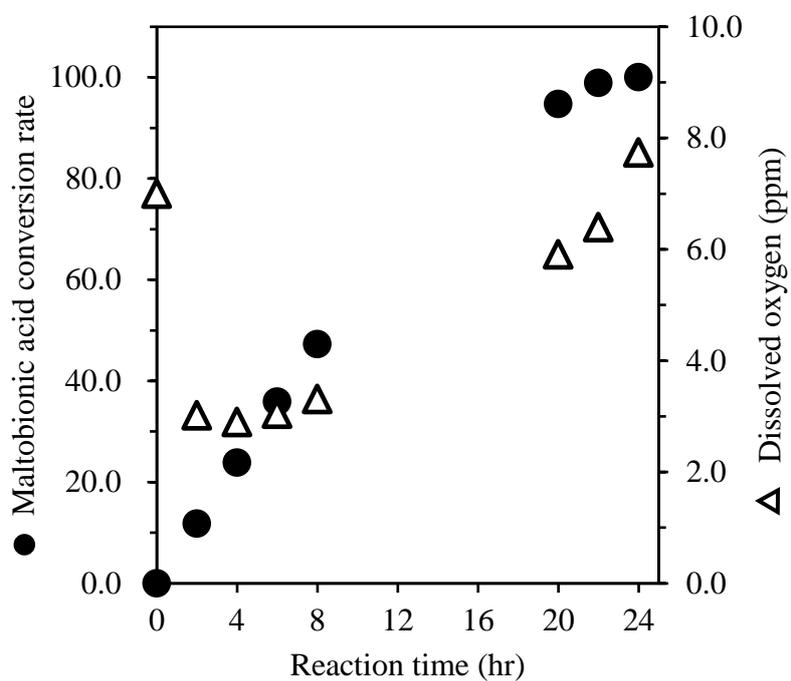


Fig. 2-6. Effect of microbubbles on maltobionic acid conversion rate. Maltobionic acid (closed circle) and Dissolved oxygen (open triangle).

## 2.6 マルトビオン酸 Ca を主成分とするオリゴ糖製品（工業生産製品）の製造

先述の酵素法を用いた工業生産プロセスを構築するために、①原料、②酸化反応システム、③精製・粉末化の3つの工程を検討し、製造スキームを完成させた (Fig. 2-7)。

原料として用いるマルトースは、数十トン単位での仕込みが必要となることから、結晶化し難いマルトース純度が70%のハイマルトース水飴を使用することで、原料輸送や溶解作業の効率化を図った。酸化反応では予め炭酸 Ca (中和剤) を全量投入し、炭酸 Ca の均一分散、溶存酸素を確保する攪拌、空気通気手法などを最適条件で実施し、大容量反応槽での酸化反応システムを構築した。また、活性炭処理による精製を経た後、スプレードライによって粉末化した。こうして得られた粉末を“サワーオリゴ<sup>®</sup>C”として製品化した。サワーオリゴ<sup>®</sup>Cは、マルトビオン酸60%以上、カルシウム4.0~5.0%、水分7%以下が製品規格となっており、第3章~6章で使用した試料の成分組成は、水分5.3%、カルシウム4.4%、マルトビオン酸60.3%、マルトトリオン酸16.7%、その他四糖以上のマルトオリゴ糖酸13.3%であった。

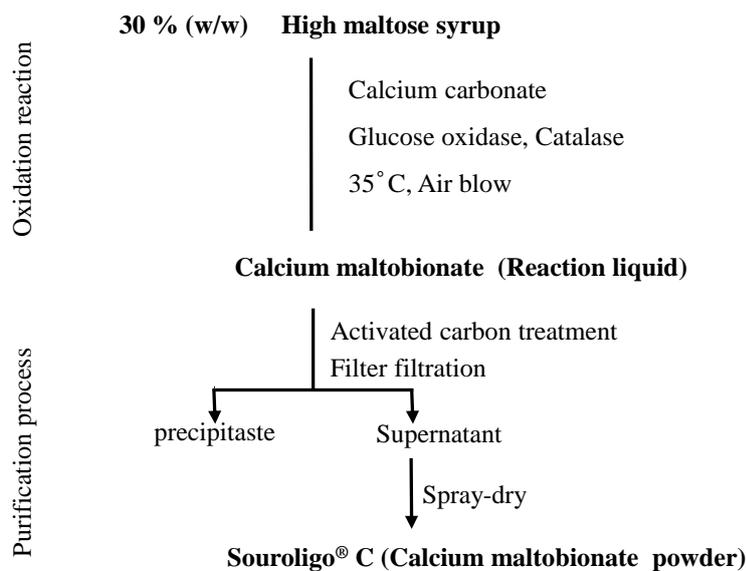


Fig. 2-7. Production flow of Souroligo<sup>®</sup>C.

## 2.7 まとめ

本章ではマルトビオン酸、マルトビオン酸 Ca、サワーオリゴ<sup>®</sup>C の製造方法について説明した。金属触媒法と酵素法の長所・短所を整理し、工業生産時の課題を考慮した上で、酵素法を採用するに至った。これにより、マルトースからワンステップでマルトビオン酸 Ca を得るプロセスが構築された。

## 第3章 マルトビオン酸 Ca 粉末の物性

### 3.1 序

粉末の物理的性状は結晶質と非晶質（アモルファス）とに大別される。結晶質は構成分子が規則正しく配列した、物理的に安定な状態である。一方、非晶質は構成分子が無秩序に配置した状態にあり、分子運動性の相違によって流動状態、ラバー状態（過飽和）、ガラス状態に分類される。流動状態にある物質を融点以下まで温度低下させると、分子運動性が低下し、ラバー状態になる。更に温度が低下し、分子運動性が低下すると、キャンディのように見かけ上固まった状態になる。これがガラス状態であり、ガラス状態とラバー状態の間で起こる状態変化はガラス転移と呼ばれる。ガラス転移はガラス転移温度 ( $T_g$ ) で起こる。また、親水性成分の  $T_g$  は水分含量の増加によって低下するため（水の可塑効果）、ガラス転移は一定温度条件でも、水分含量が変化することで起こる。この挙動は  $T_g$  の水分含量依存性 ( $T_g$  曲線) として整理されている (Fig. 3-1)。非晶質粉末はガラス状態にあることでサラサラとした流動性を示す。温度上昇や水分収着によってラバー状態になると、べたつきが発生し、更には潮解する。したがって、非晶質粉末を扱う上で、 $T_g$  曲線の理解は必要不可欠といえる。これまでに様々な糖質の  $T_g$  並びに  $T_g$  曲線が明らかにされてきた[31, 32]。しかし、マルトビオン酸やマルトビオン酸 Ca に関する報告は無かった。本章では、マルトビオン酸、マルトビオン酸 Ca、サワーオリゴ<sup>®</sup>C の  $T_g$  曲線を解明し、類似の糖質と比較した。また、マルトビオン酸 Ca-マルトース混合粉末での挙動も明らかにした。

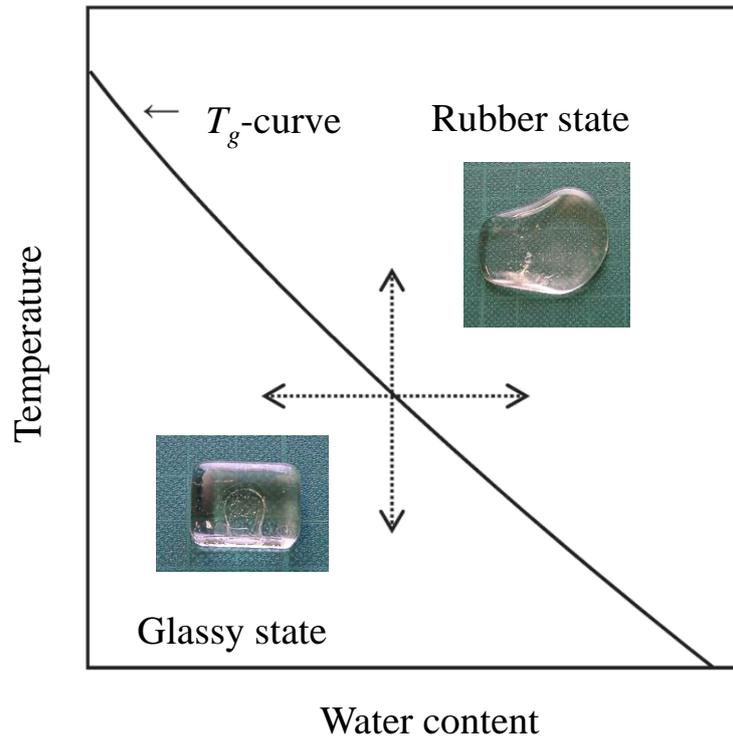


Fig. 3-1. Typical  $T_g$ -curve of amorphous food system.

## 3.2 マルトビオン酸 Ca およびマルトビオン酸のガラス転移挙動

### 3.2.1 背景および目的

マルトビオン酸 Ca には機能性オリゴ糖としての産業利用が期待されるが、非晶質粉末であることから、乾燥、保存、使用時の取り扱いに注意を要する。また、マルトビオン酸はスプレードライが困難であったため、現状はシロップとして使用している。これは  $T_g$  が低いことが要因であり、 $T_g$  を理解することで乾燥条件や乾燥基材の配合条件などを見積もることが可能になる。本節ではマルトビオン酸 Ca およびマルトビオン酸のガラス転移挙動を解明することを目的とした。

### 3.2.2 方法

#### 試料調製

2章で説明した方法にしたがい、マルトビオン酸 Ca 水溶液およびマルトビオン酸水溶液を調製した（純度 99 %以上）。比較として、マルトースー水和物（富士フィルム和光純薬（株））を用いた。各 10%水溶液を調製し、家庭用冷凍庫にて予備凍結した。これを予備冷却した凍結乾燥装置の試料ステージに置き、 $-35^{\circ}\text{C}$  から  $5^{\circ}\text{C}$  まで 2.5 日間かけて昇温しながら 70 Pa 以下の圧力にて凍結乾燥した。

#### 水分収着挙動

各試料をアルミ皿にとり、 $80^{\circ}\text{C}$  で 8 時間減圧乾燥することで、十分に脱水した。飽和塩によって一定の水分活性 ( $a_w$ ) に調節した小型デシケーターにセットし、 $25^{\circ}\text{C}$  に設定したインキュベーター

内で1週間以上静置した。飽和塩には塩化リチウム( $a_w=0.11$ )、酢酸カリウム( $a_w=0.23$ )、塩化マグネシウム( $a_w=0.33$ )、炭酸カリウム( $a_w=0.43$ )、硝酸マグネシウム( $a_w=0.53$ )、臭化ナトリウム( $a_w=0.58$ )、塩化ナトリウム( $a_w=0.75$ )、塩化カリウム( $a_w=0.84$ )、硝酸カリウム( $a_w=0.94$ )を用いた。試料の一部は示差走査熱量 (DSC) 測定に用いた。残りの試料を用いて平衡水分含量を常圧乾燥法 (105 °C) によって求めた。各試料2回の実験を実施し、平均値を得た。

### 示差走査熱量測定 (DSC)

上記試料の  $T_g$  を示差走査熱量計 (DSC120、セイコーインスツル(株)) によって調べた。試料 (4 ~10mg) を DSC パン (アルミニウム製耐圧容器) に封入した。また、無水  $T_g$  を決定するため、予め減圧乾燥によって乾燥した試料を DSC パンに採り、105 °Cで最大6時間保持した後、オープン内で蓋を被せ、直ちに封入した。各 DSC パンを装置にセットし、0~180 °Cの温度範囲を5 °C/minで昇温走査した。ガラス状態の試料は非平衡状態にあり、試料調製時の熱履歴によってガラス転移挙動が変化する[33]。試料の熱履歴による影響を除くため、試料を一旦  $T_g$  以上まで昇温 (ファーストスキャン) した後、 $T_g$  以下に冷却し、再び昇温 (セカンドスキャン) することで得られた吸熱シフトのオンセットから  $T_g$  を決定した[33-35]。各試料2回の実験を実施し、平均値を得た。

## 3.2.3 結果および考察

### 水分収着挙動

各試料 (マルトビオン酸、マルトビオン酸 Ca、マルトース) の  $a_w$  と平衡水分含量との関係を Fig. 3-2 に示す。マルトビオン酸およびマルトビオン酸 Ca は  $a_w$  の増加と共に平衡水分含量がシグモイ

的に増加する傾向を示した。これは澱粉やタンパク質など、多くの食品素材に認められる一般的な傾向である[36,37]。一方、マルトースは $a_w$ が0.43まではマルトビオン酸およびマルトビオン酸Caと同様の傾向を示したが、それ以上では著しく低い値を示した。これはマルトースが結晶化したことを意味する。同様の挙動は他の二糖類でも認められている[38]。非晶質粉末は、水分収着によって $T_g$ が低下し、やがてラバー状態( $T_g < 25^\circ\text{C}$ )になると、分子運動性が回復した結果、熱力学的により安定な結晶状態へと自発的に変化する傾向にある。

図中に示す実線(水分収着等温線)はBrunauer-Emmett-Teller(BET)式(式3.1)およびGuggenheim-Anderson-de Boer(GAB)式(式3.2)をフィッティングすることによって得られたものである。

$$W = \frac{W_m C a_w}{(1 - a_w)(1 - a_w + C a_w)} \quad (\text{式 3.1})$$

$$W = \frac{W_m C K a_w}{(1 - K a_w)(1 - K a_w + C K a_w)} \quad (\text{式 3.2})$$

ここで、 $W$ は平衡水分含量(g/100g-DM)を示す。また、 $W_m$ 、 $C$ 、 $K$ はいずれも定数であり、それぞれ単分子層吸着における飽和吸着水分(g/100g-DM)、単分子吸着熱と気体の凝縮熱の比を表すパラメーター(無次元)、補正係数(無次元)を意味する[39,40]。BET式は単分子層吸着量や比表面積を求める目的で広く利用されており、食品素材であれば $a_w$ がおおよそ0.45までの範囲で適用される[41-45]。GAB式はBET式に $K$ を導入したものであり、高 $a_w$ 領域でのBET式からのずれが補正されるため、全 $a_w$ 域で適用可能となる。しかし、3つの定数がお互いに影響を及ぼし合うため、フィッティング解析結果に変動を与え得る[45]。本研究では高 $a_w$ 域で結晶化したマルトースに対してはBET式( $a_w = 0 \sim 0.42$ )のみを、全 $a_w$ 領域で非晶質を維持したマルトビオン酸Caおよびマルトビオン酸に対してはBET式( $a_w = 0 \sim 0.42$ )とGAB式( $a_w = 0 \sim 0.94$ )の両方を適用し、水分収着パラメーターを求めた。

得られたパラメーター ( $W_m$ 、 $C$ 、 $K$ ) および決定係数 ( $R^2$ ) を Table 3-1 に示す。いずれも良好な回帰分析結果 (BET:  $R^2 > 0.662$ 、GAB:  $R^2 > 0.952$ ) であった。各試料の  $W_m$  を比較すると、マルトース (5.59 g/100g-DM)、マルトビオン酸 Ca (6.45~6.68 g/100g-DM)、マルトビオン酸 (6.93~7.58 g/100g-DM) の順により高い値を示した。 $W_m$  は単分子層吸着水分含量であり、この値が高いことは、親水基による比表面積が高いことに関係する。マルトビオン酸 Ca およびマルトビオン酸は非晶質電解質であり、電離した状態にあるため、非電解質であるマルトースよりも値が高くなったと考えられる。また、マルトビオン酸 Ca とマルトビオン酸との相違は、カチオンの相違が反映した結果と考えられる。 $C$  は溶質と水との相互作用の強度を表すと解釈される。各試料の  $C$  を比較すると、マルトビオン酸 (2.47~2.75)、マルトース (4.75)、マルトビオン酸 Ca (8.55~9.19) の順により高い値を示した。マルトビオン酸 Ca の高い  $C$  値は、二価のカチオンによってもたらされる強い静電的相互作用を反映した結果と考えられる。

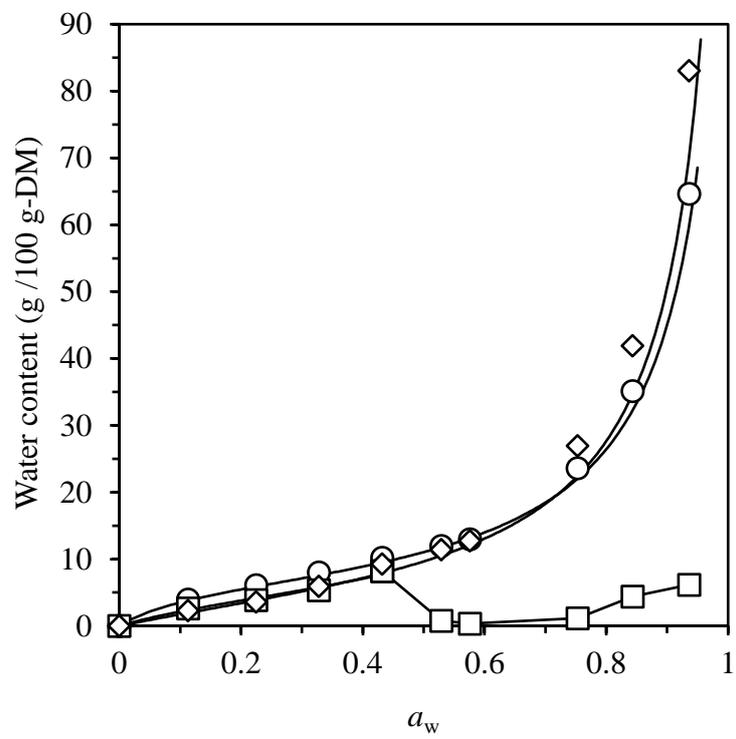


Fig. 3-2. Water sorption isotherm for calcium maltobionate (circle), maltobionic acid (diamond), and maltose (square) at 25 °C.

Table 3-1. BET and GAB parameters for calcium maltobionate, maltobionic acid, and maltose.

	BET			GAB			
	$W_m$ (g/100 g-DM)	$C$	$R^2$	$W_m$ (g/100 g-DM)	$C$	$K$	$R^2$
Maltose	5.59	4.75	0.8853	-	-	-	-
Maltobionic acid	7.58	2.46	0.6619	6.93	2.75	0.967	0.9523
Calcium maltobionate	6.68	8.55	0.9998	6.45	9.19	0.954	0.9884

## ガラス転移挙動

結果の代表例として、マルトビオン酸 Ca の DSC 曲線（セカンドスキャン）を Fig. 3-3 に示す。いずれの試料においてもガラス転移を反映した吸熱シフトが検知され、その開始点から  $T_g$  を決定することができた。無水マルトビオン酸 Ca ( $a_w=0$ ) は  $T_g$  以上の高温度域で発熱ピークを示した。これは熱分解によるものと考えられる。マルトビオン酸 Ca の  $T_g$  は  $a_w$  の増加と共に低下した。これは親水性非晶質素材において一般に認められる現象であり、水の可塑効果によるものである。他の試料も同様の結果であり、それぞれの  $T_g$  を決定した。

各試料の  $T_g$  と水分含量との関係を Fig. 3-4 に示す。 $T_g$  は水分含量の増加と共に低下した（水の可塑効果）。図中に示す実線（ $T_g$  曲線）は、Gordon-Taylor (GT) 式 (式 3.3) をフィッティングすることによって得られたものである。

$$T_g = \frac{W_s T_{gs} + k W_w T_{gw}}{W_s + k W_w} \quad (\text{式 3.3})$$

ここで  $T_{gs}$  および  $T_{gw}$  は無水試料および純水の  $T_g$  (K) を、 $W_s$  および  $W_w$  は固形分および水の質量分率（無次元）を、 $k$  は定数（無次元）をそれぞれ表す。 $T_{gs}$  には本研究で得られた実測値を、 $T_{gw}$  (136 K) は文献値[46,47]をそれぞれ使い、 $k$  をフィッティングパラメーターとして求めた。GT 式によって  $T_g$  曲線を作成することで、critical water content ( $w_c$ ) を決定することができた。 $w_c$  は、 $T_g$  が 25°C となるときの水分含量を表す。また、先述の BET 式（マルトースに対して）或いは GAB 式（マルトビオン酸 Ca およびマルトビオン酸に対して）を用いることで、 $w_c$  を critical water activity ( $a_{wc}$ ) に変換した。 $a_{wc}$  は、 $T_g$  が 25°C になるときの  $a_w$  を表す。これらの値は、一定温度での水分収着に伴う物理変化を議論する上での重要な指標となる[48]。以上の結果より得られた各パラメーター（ $T_{gs}$ 、 $k$ 、 $w_c$ 、 $a_{wc}$ ）は Table 3-2 に整理される。

各試料の  $T_g$  を比較すると、マルトビオン酸 (73.7°C) はマルトース (95.5°C) よりも低いことが分かった。マルトースは酸化によってマルトビオン酸へと、還元によってマルチトールへとそれぞれ変化する。文献[49]によると、マルチトールの  $T_g$  は 47.3 °C であり、やはりマルトースよりも低いことが分かる。一方、マルトビオン酸 Ca の  $T_g$  (148.1°C) はマルトースよりも高かった。アルドロン酸 Ca が無水  $T_g$  を高める傾向は、他の糖質においても確認できる。例えば、グルコースの  $T_g$  は 37~38 °C であるのに対し[49, 50]、グルコン酸 Ca の  $T_g$  は 103 °C である[51]。また、ラクトースの  $T_g$  は 112°C であるのに対し[49, 50]、ラクトビオン酸 Ca の  $T_g$  は 137°C である[51]。Ca イオンはグリセロールと相互作用し、 $T_g$  を引き上げるという報告もある[52]。これらの結果は、Ca イオンがもたらす強力な静電的相互作用が、共存する水素結合性液体の分子運動性を低下させることによると考えられる。

GT 式のパラメーター  $k$  は水分含量の増加に伴う  $T_g$  低下の度合いを表す定数であり、 $k$  が高いほど、水分含量の変化に対して  $T_g$  はより敏感に応答することを意味する[53]。各試料の  $k$  値を比較すると、マルトビオン酸 Ca (5.7) およびマルトビオン酸 (4.7) はマルトース (7.4) よりも低いことが分かった。低分子の糖質において、 $k$  値は  $T_g$  (単位は°C) との間に正の相関関係 (式 3.4) があることが知られている[53]。

$$k = 0.0293 T_g + 3.61 \quad (\text{式 3.4})$$

この式は経験則であり、各係数に物理的意味は与えられていない。しかし、 $T_g$  から  $k$  を推定できる ( $T_g$  の水分含量依存性を予測できる) ため、利便性は高い。本研究で実験的に求めた無水  $T_g$  の値を用いて各試料の  $k$  を算出すると、マルトビオン酸およびマルトースはそれぞれ 5.8 および 6.4 となり、実験的に求めた  $k$  値に近かった。一方、マルトビオン酸 Ca の計算値は 7.9 であり、実験的に求

めた値はこれよりも低いことが分かった。このことは、マルトビオン酸 Ca は他の低分子の糖質と比較して、水の可塑効果による  $T_g$  低下に対して、優れた耐性を有した非晶質素材であることを意味する。これは、Ca イオンによる強い水和力が影響するものと考えられる[54, 55]。

$T_g$  曲線から決定された  $w_c$  ( $T_g=25^\circ\text{C}$ となる水分含量) の比較より、マルトビオン酸 Ca (13.3 g/100g-DM) はマルトビオン酸 (6.41 g/100g-DM) およびマルトース (5.86 g/100g-DM) より、著しく高い  $w_c$  を有することが分かった。また、BET 式および GAB 式を介して  $w_c$  から変換した  $a_{wc}$  ( $T_g=25^\circ\text{C}$  となる  $a_w$ ) も同様の傾向 (マルトビオン酸 Ca=0.56、マルトビオン酸 =0.37、マルトース =0.35) を示した。マルトビオン酸 Ca の高い  $w_c$  および  $a_{wc}$  は、その高い  $T_{gs}$  と低い  $k$  を反映した結果といえる。

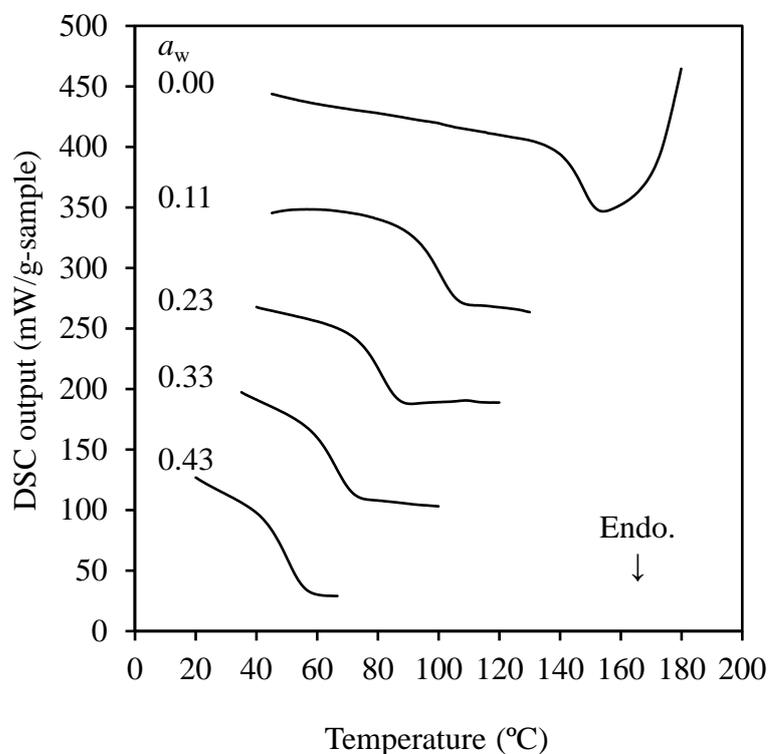


Fig. 3-3. DSC curve of calcium maltobionate adjusted to various  $a_w$ .

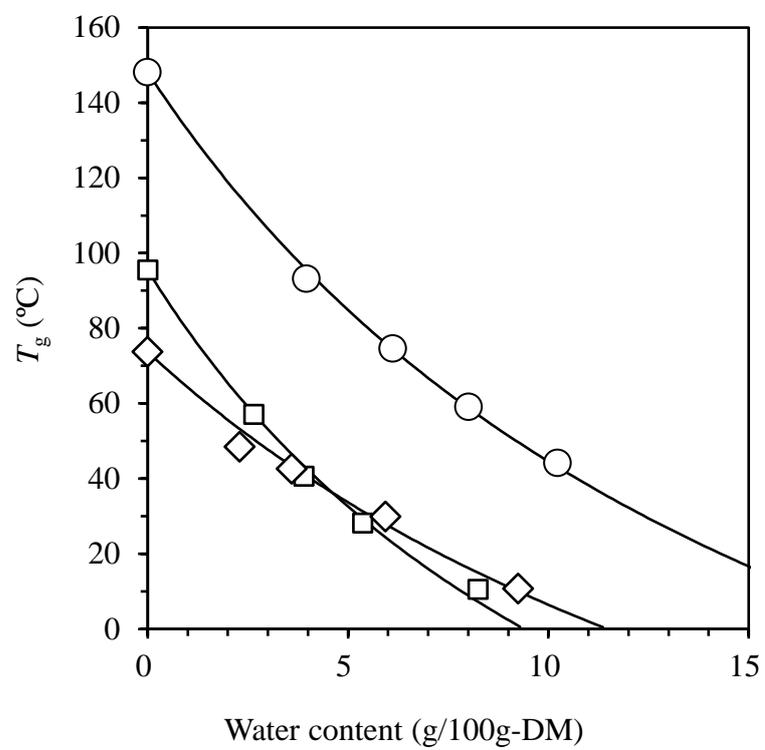


Fig. 3-4.  $T_g$ -curves for calcium maltobionate (circle), maltobionic acid (diamond), and maltose (square).

Table 3-2. Glass transition characteristic values of each sample.

	$T_{gs}$ (°C)	$k$	$w_c$ (g/100 g-DM)	$a_{wc}$
Maltose	95.5	7.4	5.86	0.35
Maltobionic acid	73.7	4.7	6.41	0.37
Calcium maltobionate	148.1	5.7	13.3	0.56

### 3.3 マルトビオン酸 Ca - マルトース混合系のガラス転移挙動

#### 3.3.1 背景および目的

前節ではマルトビオン酸 Ca のガラス転移挙動を明らかにした。本節では様々な割合で混合したマルトビオン酸 Ca - マルトース混合物を試料とし、糖質混合系における  $T_g$  変化を解明した。また、本節では凍結濃縮ガラス転移温度 ( $T_g'$ ) の変化も調べた。

#### 3.3.2 方法

##### マルトビオン酸 Ca-マルトース混合試料の調製

マルトビオン酸 Ca とマルトースを、様々なモル分率で混合した 20 % (w/w) 水溶液を調製し、約  $-30^{\circ}\text{C}$  で予備凍結した。これを約  $-30^{\circ}\text{C}$  の冷凍庫内に入れ、一晩予備凍結した。その後、予め棚温度を  $-35^{\circ}\text{C}$  に設定した凍結乾燥装置内に移し、70 Pa 以下の圧力で 2.5 日間かけて  $10^{\circ}\text{C}$  に至るまで徐々に加熱しながら凍結乾燥した。得られた混合試料を、本論文ではマルトースの略 (Mal) とモル分率とで表記する。例えば、マルトースをモル分率 0.2 で混合した試料は“0.2 Mal”と表記する。

##### 水分収着等温線および $T_g$ 曲線

前節と同じ方法で測定した。

##### 凍結濃縮ガラス転移温度 ( $T_g'$ ) 測定

各試料から蒸留水を用いて 10 % (w/w) 水溶液を調製し、 $T_g'$  を DSC (前記) によって調べた。試料

(4~10 mg) を DSC パン (アルミニウム製シール容器) に採り、シールした。これを装置にセットし、常温から最大-40℃まで5℃/min で冷却した後、25℃まで5℃/min で昇温走査した。得られた吸熱シフトの開始点から  $T_g'$  を決定した。各試料2回の実験を実施し、平均値を得た。

### 3.3.3 結果および考察

#### マルトビオン酸 Ca-マルトース混合系の水分収着特性

各試料の平衡水分含量と  $a_w$  との関係 (25℃) を Fig. 3-5 に示す。前節にてマルトビオン酸 Ca はシグモイド挙動を、マルトースは 0.43 以上の  $a_w$  で結晶化することを明らかにした。0.2Mal (マルトビオン酸 Ca : マルトース = 0.8 : 0.2) および 0.4Mal はマルトビオン酸 Ca と同様の挙動を示した。一方、0.6Mal および 0.8Mal は  $a_w = 0.58$  で平衡水分含量が著しく低下した。これは、マルトースの結晶化によってもたらされた結果と考えられる。

前節と同様に、各試料の水分収着特性 ( $W_m$ ,  $C$ ,  $K$ ) を BET 式および GAB 式によって解析した。得られた結果を Table 3-3 に示す。各試料の  $W_m$  はマルトース含量の増加によって低下した。一方、 $C$  は例外もあったが、概ねマルトース含量の増加によって低下する傾向が認められた。マルトビオン酸 Ca は電離した状態にあり、静電的相互作用によって水と強く相互作用することができる。しかし、非電解質であるマルトースの含有量が高まることで、その効果は軽減したと考えられる。

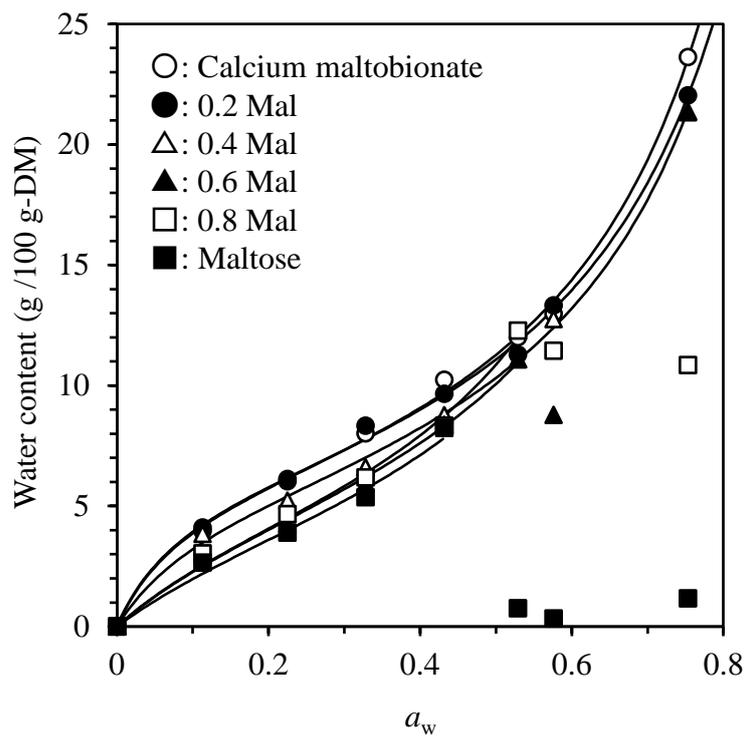


Fig. 3-5. Water sorption isotherms of calcium maltobionate-maltose mixtures at 25 °C.

Table 3-3. GAB parameters of calcium maltobionate-maltose mixtures.

	BET		GAB	
	$W_m$ (g/100 g-DM)	$C$	$W_m$ (g/100 g-DM)	$C$
Calcium maltobionat	6.68	8.55	6.45	9.19
0.2 Mal	6.27	11.07	6.26	12.33
0.4 Mal	5.40	11.65	5.91	8.86
0.6 Mal	5.57	5.98	5.77	4.65
0.8 Mal	5.45	7.43	5.39	4.67
Maltose	5.59	4.75	5.33	4.05

### マルトビオン酸Ca-マルトース混合系の $T_g$

前節と同様に DSC 曲線から  $T_g$  を決定し、水分含量に対してプロットした。得られた  $T_g$  の水分含量依存性を GT 式によって解析し、 $T_{gs}$  および  $k$  を決定した (Fig. 3-6)。各試料の  $T_{gs}$  はマルトース含量の増加と共に低下した。マルトースはマルトビオン酸 Ca よりも  $T_g$  が低いため、可塑効果によって  $T_{gs}$  が低下したと考えられる。一方、 $k$  はマルトース含量の増加によって増加した。 $k$  が高いことは水分含量増加に伴う  $T_g$  低下の度合いが高いことを意味しており、水の可塑効果に対して敏感になることを意味する。

各試料の  $T_g$  曲線から  $w_c$  ( $T_g = 25^\circ\text{C}$  での水分含量) を決定した。また、GAB 式を用いて  $w_c$  を  $a_{wc}$  ( $T_g = 25^\circ\text{C}$  での  $a_w$ ) に変換した (Table 3-4)。得られた  $w_c$  および  $a_{wc}$  とマルトース含量との関係を Fig. 3-7 に示す。 $w_c$  および  $a_{wc}$  はマルトース含量に対して、直線的に低下することが示された。先述の通り、 $w_c$  および  $a_{wc}$  は非晶質粉末の物理的安定性の指標となる。例えば、常温 ( $25^\circ\text{C}$ ) において、非晶質粉末の水分含量および  $a_w$  が  $w_c$  および  $a_{wc}$  を超えたとき、粉末の固着や再結晶化が起こる [56, 57]。Fig. 3-7 に示す直線関係より、マルトース含量からマルトビオン酸 Ca-マルトース混合粉末の  $w_c$  および  $a_{wc}$  を理解できることは、実用的に重要な意味を持つ。マルトースが他の糖質であっても同様の結果 (糖質の混合濃度と共に直線的に変化) が期待されることから、様々な糖質と混合した系での効果に関する予測も容易である。

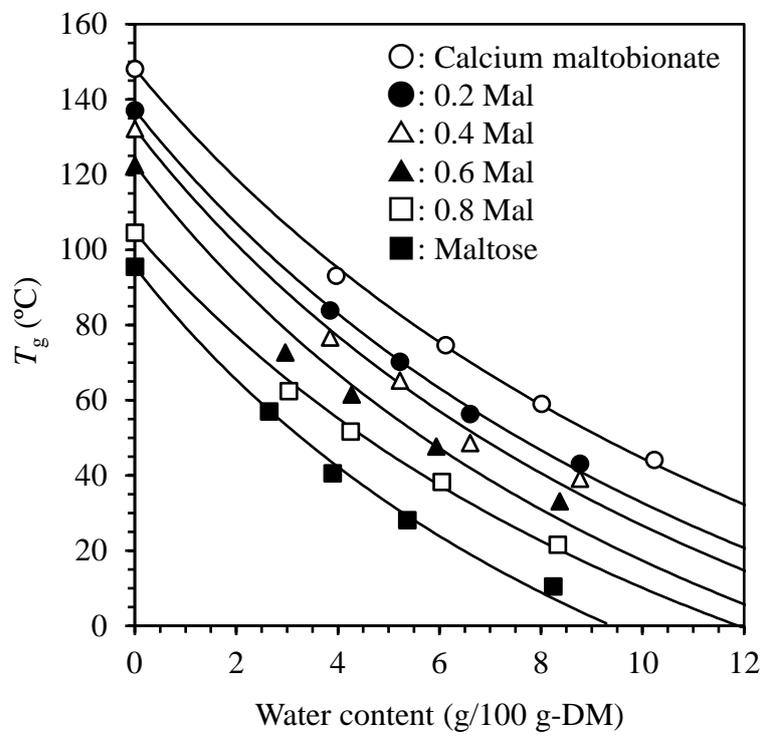


Fig. 3-6.  $T_g$ -curves for calcium maltobionate-maltose mixtures.

Table 3-4. Values of  $T_{gs}$ ,  $k$ ,  $W_c$ , and  $a_{wc}$  for calcium maltobionate-maltose mixtures.

Sample	$T_{gs}$ (°C)	$k$	$w_c$ (g/100 g-DM)	$a_{wc}$
Calcium maltobionate	148.1	5.70	13.32	0.56
0.2 Mal	137.1	6.15	11.25	0.51
0.4 Mal	132.2	6.44	10.25	0.5
0.6 Mal	122.6	6.81	8.83	0.45
0.8 Mal	104.6	6.27	7.64	0.39
Maltose	95.5	7.41	5.86	0.35

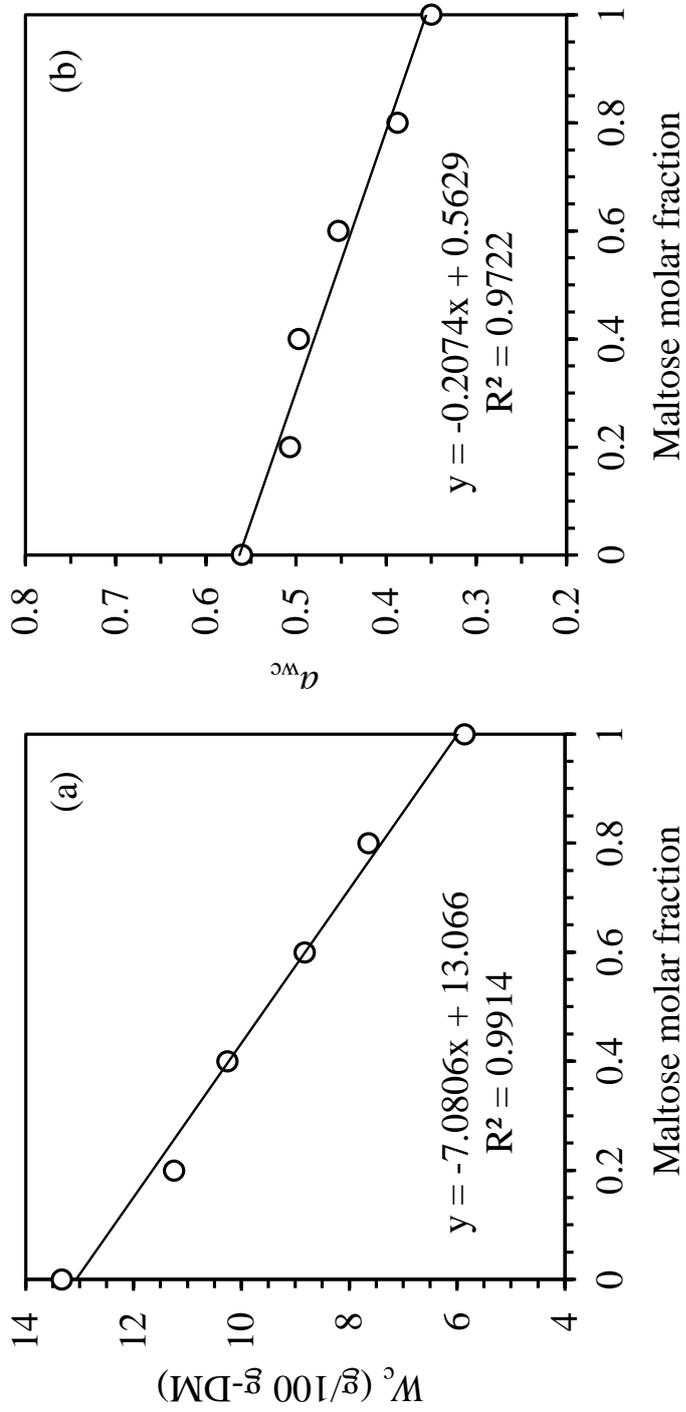


Fig. 3-7. Effect of maltose molar fraction on  $W_c$  and  $a_{wc}$  values of calcium maltobionate-maltose mixtures.

### マルトビオン酸 Ca-マルトース混合系の $T_g'$

各試料の低温 DSC 曲線結果の代表例を Fig. 3-8 に示す。いずれの試料も低温で吸熱シフトを、高温で吸熱ピークをそれぞれ示した。低温の吸熱シフトは凍結濃縮ガラス転移を、高温の吸熱ピークは氷の融解をそれぞれ意味する。水溶液の低温 DSC 測定において、ガラス転移を示唆する吸熱シフトは 2 つ確認されることがある [58-62]。低温で認められる吸熱シフトは熱的応答が低く、希薄溶液では検出されない。一方、高温の吸熱シフトは熱的応答が高く、低温の吸熱シフトより 10~15°C 程度高い。Fig. 3-8 で認められた吸熱シフトは高温で検出される吸熱シフトに該当するものであり、低温の吸熱シフトは検出されなかった。高温で認められる吸熱シフトは溶質の再結晶化や凍結乾燥時のコラプス発生と密接に関係しており、実用的に重要な意味を持つことから、この吸熱シフトに注目した。

得られた吸熱シフトの開始点から凍結濃縮ガラス転移温度 ( $T_g'$ ) を決定し、溶質におけるマルトースのモル分率に対してプロットした結果を Fig. 3-9 に示す。マルトースの  $T_g'$  は -31.4°C であり、文献値 (中点で読み取った  $T_g'$  として -29.5°C) と一致した [63]。一方、マルトビオン酸 Ca の  $T_g'$  は -15.4°C であり、マルトースと比べて非常に高いことが分かった。 $T_g'$  は  $T_g$  と同様にモル質量の増加によって高くなることが知られている [33]。マルトビオン酸 Ca (モル質量 754 g/mol) の  $T_g'$  はマルトヘキソース (モル質量 991 g/mol) と同程度であり [33, 63]、マルトビオン酸 Ca は先述の  $T_g$  と同様に、モル質量が低いにもかかわらず  $T_g'$  が高いことが分かった。

マルトースの混合比率が高いほど  $T_g'$  は低下した。この挙動は上述の Gordon-Taylor (GT) 式 (式 3.3) を改変した次式 (式 3.5) によって表すことができた。

$$T_g' = \frac{T_{g1}' + k'T_{g2}'}{M_1 + k'M_2} \quad (\text{式 3.5})$$

ここで  $T_{g1}$ 'および  $T_{g2}$ 'はマルトビオン酸Caおよびマルトースの  $T_g$ ' (K) を、 $M_1$ および  $M_2$ はマルトビオン酸Caおよびマルトースのモル分率（無次元）を、 $k$ 'は定数（無次元）をそれぞれ表す。マルトビオン酸Caおよびマルトースの  $T_g$ ' (K) は実測値として得られているため、フィッティングパラメーターとして  $k=0.60$  が得られた。これによりマルトビオン酸Ca-マルトース混合溶液の  $T_g$ 'を把握することができる。 $T_g$ 'は凍結乾燥時のコラプス発生と関わるため、凍結乾燥時の最適棚加熱制御などに役立つものと期待される。

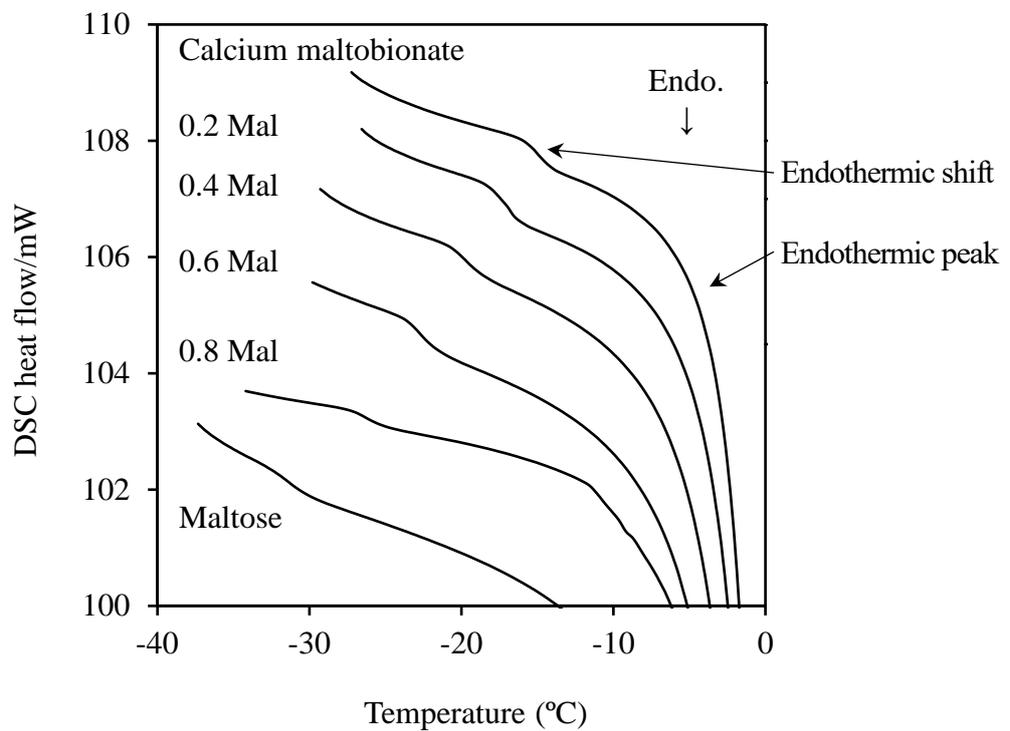


Fig. 3-8. Typical DSC thermograms for freeze-concentrated aqueous calcium maltobionate-maltose solutions.

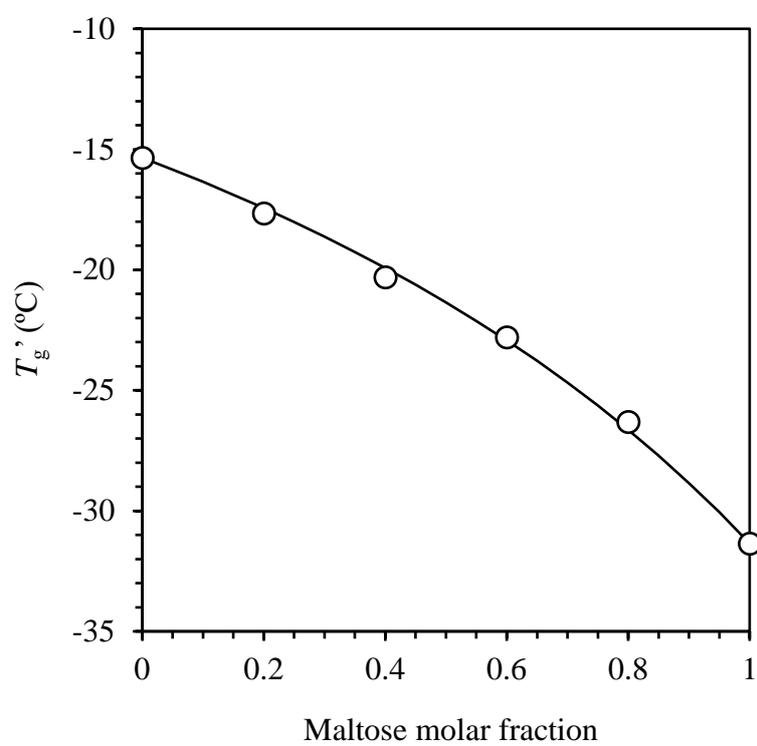


Fig. 3-9. Effect of maltose molar fraction on  $T_g'$  of aqueous calcium maltobionate-maltose solutions.

### 3.4 マルトビオン酸 Ca を主成分とするオリゴ糖製品のガラス転移挙動

#### 3.4.1 背景および目的

糖質素材の産業利用においては粉末形態にすることが望ましい。一般にマルトースなどの二糖類は、噴霧乾燥や凍結乾燥によって非晶質粉末を調製すると、直ちに吸湿し、アメ状（ラバー状態）になる。しかし、マルトビオン酸 Ca は  $T_g$  が高く、非晶質粉末としての安定性が十分に高いことを明らかにした。本節では 2 章で示した工業生産製品であるサワーオリゴ<sup>®</sup>C のガラス転移特性を評価した。

#### 3.4.2 方法

##### 試料

2 章で説明した方法にしたがい、サワーオリゴ<sup>®</sup>C を調製した。その構成成分は、水分 5.3 %、カルシウム 4.4 %、マルトビオン酸 60.3 %、マルトトリオン酸 16.7 %、その他四糖以上のマルトオリゴ糖酸 13.3 %であった。比較として、澱粉加水分解の度合い（dextrose equivalent, DE）が異なる粉あめ〔ピュアトース P (DE33)、ニポデックス 25 (DE25)〕およびマルトデキストリン〔NSD700 (DE20)〕の 3 製品を用いた（いずれもサンエイ糖化(株)の製品）。尚、DE とは固形分に対する還元糖の割合を百分率で表した値であり、糖化業界では一般に、 $DE < 10$  はデキストリン、 $10 < DE < 20$  はマルトデキストリン、 $DE > 20$  は粉あめと呼ばれる。

## $T_g$ 測定および水分収着特性

前節と同じ方法で測定した。

### 3.4.3 結果および考察

#### サワーオリゴ<sup>®</sup>Cの $T_g$ および粉末安定性

サワーオリゴ<sup>®</sup>Cの $T_g$ 曲線を Fig. 3-10 に示す。前節のマルトビオン酸 Ca と同様に $T_g$ は水分含量の増加と共に低下した（水の可塑効果）。サワーオリゴ<sup>®</sup>Cの $T_{gs}$ は151.9°Cであり、マルトビオン酸 Ca よりも約4°C高い値を示した。その要因として、サワーオリゴ<sup>®</sup>Cにはマルトトリオン酸などの三糖類以上の酸化物が3割程度含まれていたことが挙げられる。

他素材と比較した $T_{gs}$ および粉末安定性を Table 3-5 に示す。また、紙の上にとったサンプルを温度20°C、湿度65%で1週間保管した後、紙を傾けた時の各素材の状態写真と水分含有量を Table 3-6 に示す。各相対湿度下で保存したときの粉末安定性評価において、相対湿度32%ではいずれの試料も粉末状態を維持した。相対湿度65%ではDE33およびDE25の粉あめは、シロップ状、或いは固結したのに対し、DE20のマルトデキストリンやサワーオリゴ<sup>®</sup>Cは粉末状態を維持した。

実際の製造現場において、DE33やDE25の粉あめは、スプレードライから包装工程で付着しやすく作業性が悪い。特に夏場の湿度が高い季節は製造が難しい。一方、サワーオリゴ<sup>®</sup>CはDE20のマルトデキストリンよりも $T_g$ が高いため、それと同等かそれ以上の優れた粉末安定性が期待される。事実、スプレードライから包装工程での付着によるトラブルは殆ど無く、作業効率に優れている。

従来の粉あめ製品は、吸湿によって粉同士が凝集（固着）し、粉体表面がラバー状態になり易いため水分含量4%以下で賞味期限は1年で設定されている。一方、サワーオリゴ<sup>®</sup>Cは、粉あめ製品

よりも 1.5 倍量以上水分を多く含んでも粉末状態を維持しており、優れた吸湿耐性を有していることが確認された。実際に使用される紙袋で梱包した製品を工場倉庫で保存した結果、水分規格 7% 以下で賞味期限 3 年に設定することが可能であった。

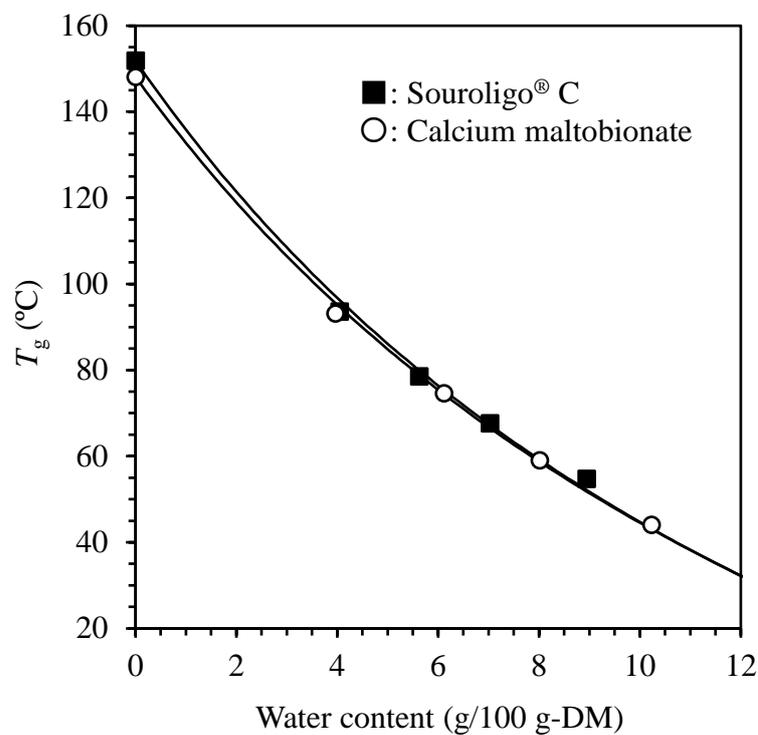


Fig. 3-10.  $T_g$  curves for Souroligo® C.

Table 3-5. Powder stability of Souroligo<sup>®</sup> C.

Carbohydrate material	DE	$T_{gs}$	Relative humidity			
			32%	52%	65%	79%
Corn syrup powder (1)	33	105.43	○	×	×	×
Corn syrup powder (2)	25	118.98	○	○	△	×
Maltodextrin	20	139.65	○	○	○	×
Souroligo <sup>®</sup> C	45	151.89	○	○	○	×

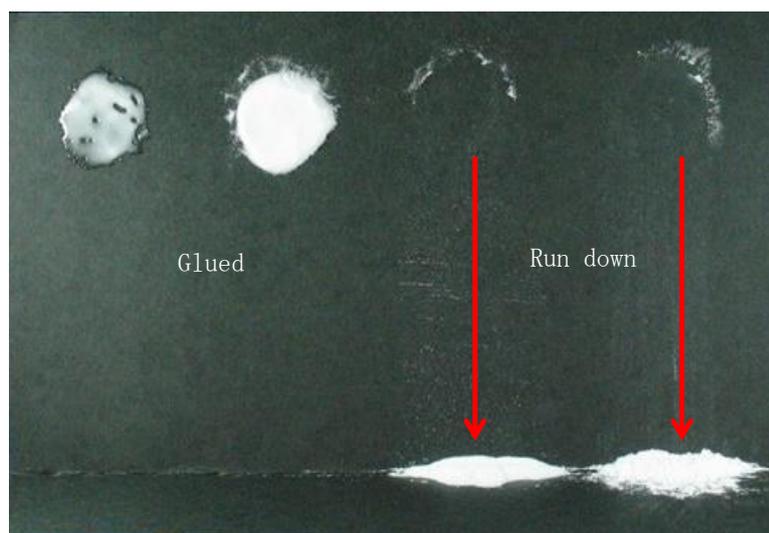
After vacuum drying at 60 °C for 24 hours, the powders were store at 20 °C for 1 week under each relative humidity condition. ○; Powder, △; Caking, ×; Syrup.

Table 3-6. Moisture content and visual observation of the samples.

Carbohydrate material	Corn syrup powder (1)	Corn syrup powder (2)	Maltodextrin	Calcium maltobionate
DE	33	25	20	45
Water content (%)	9	11	11	14

Syrup                      Caking                      Powder                      Powder

Condition



The samples were stored at 20 °C for 1 week under 65 % relative humidity.

### 3.5 まとめ

本章ではマルトビオン酸 Ca の非晶質特性を評価した。3.2 ではマルトビオン酸 Ca の水分収着およびガラス転移特性を明らかにした。マルトビオン酸 Ca は非晶質粉末であり、結晶と比べると物理的に不安定といえる。しかし、高い  $T_g$  と低い  $k$  から裏付けられたように、高い吸湿耐性を有していることが明らかとなった。このことは、非晶質粉末として流通・販売するうえで、大きなアドバンテージとなる。本研究により、マルトビオン酸 Ca の  $w_c$  および  $a_{w_c}$  をそれぞれ 13.3 g/100g-DM および 0.56 と決定した。この水分含量および  $a_w$  が、非晶質マルトビオン酸 Ca 粉末を取り扱う上での指標となる。

3.3 ではマルトビオン酸 Ca-マルトース混合系における水分収着およびガラス転移特性を明らかにした。マルトビオン酸 Ca-マルトース混合系においては、概ね加成性が成立しており、マルトビオン酸 Ca の水分収着特性、ガラス転移特性、凍結濃縮ガラス転移特性はマルトース含量の増加と共に、マルトースのそれらに近づくことを確認した。これらの結果は、マルトビオン酸 Ca-マルトース混合系として利用において物理的安定性を予測するための指針をもたらすものと期待される。

3.4 ではサワーオリゴ<sup>®</sup>C のガラス転移特性と粉末安定性を明らかにした。サワーオリゴ<sup>®</sup>C はマルトビオン酸 Ca よりも若干高い  $T_g$  を示し、実際に工業生産されている粉あめよりも、粉末安定性に優れていることが明らかになった。

マルトビオン酸 Ca は  $T_g$  が高く、吸湿耐性に優れる事実より、サプリメント分野での利用も期待される。サプリメントの剤形には、顆粒剤、錠剤、カプセル剤などがある。そこに利用される栄養機能成分には吸湿性が高いものが多いため、顆粒化、或いは錠剤化するには賦形剤が必要となるが、マルトビオン酸 Ca を賦形剤に利用することは有意義と考えられる。本章で示した  $T_g$  曲線はその際

の品質設計および予測にも役立つものであり、マルトビオン酸 Ca の新たな用途が期待される。

## 4章 マルトビオン酸 Ca の難消化性糖質としての機能

### 4.1 序

日本では 2017 年に慢性便秘症診療ガイドラインが日本消化器病学会において発行された。この中で便秘症は「本来体外に排出すべき糞便を十分量かつ快適に排出できない状態」と定義されている[64]。便秘には、排便回数や排便量が少ないために糞便が大腸内に滞っている状態と、直腸内にある糞便を快適に排出できない状態とがある。その原因は様々であり、食事の時間が不規則な場合だけでなく、薬や大腸がんなどの病気を原因とする場合もある。平成 28 年国民生活基礎調査によると、便秘の有症率は高齢になるほど高くなり、65 歳以上では 6.5~8 %程度、80 歳以上で 10 %を超えることが示されている[65]。高齢者の便秘対策は QOL (Quality Of Life) 向上に必要不可欠といえる。

マルトビオン酸の構成糖であるグルコン酸は、ビフィズス菌などの腸内細菌に利用され、腸内環境を改善することが報告されている[66]。マルトビオン酸においても同様の効果が期待されるが、そのことを実証した報告は無かった。本章ではマルトビオン酸 Ca の糖質部分に値するマルトビオン酸を研究対象とし、その *in vitro* 消化性、腸内細菌増殖選択性、ヒトにおける生理効果を調べた。

## 4.2 マルトビオン酸の *in vitro* 消化性

### 4.2.1 背景および目的

一般にプレバイオティクス素材は、体内で消化されずに、大腸へ到達し、腸内細菌によって資化される。例えば澱粉などの糖質の消化吸収は、先ず口腔内の唾液に存在する  $\alpha$ -アミラーゼにより加水分解され、胃液内の低 pH 条件下で加水分解された後、小腸部位に存在する  $\alpha$ -グルコシダーゼを含む複数の酵素により加水分解されて、小腸で吸収される。本節ではこの 4 つの消化過程を再現した評価系を採用し、マルトビオン酸の *in vitro* 消化性を明らかにした。

### 4.2.2 方法

#### 材料および試料調製

マルトビオン酸の消化性評価にマルトビオン酸 Ca を使用した場合、消化試験成分に含まれる pH 緩衝液成分と Ca イオンとが反応し、それが析出したため、正確な分析を行うことができなかった。そこで本試験では、マルトビオン酸 Na を用いてマルトビオン酸の消化性を評価した。比較のため、マルトトリオン酸 Na、マルトテトラオン酸 Na、マルトペンタオン酸 Na、マルトース（富士フィルム和光純薬工業（株））、マルチトール（富士フィルム和光純薬工業（株））、グルコン酸 Na（富士フィルム和光純薬工業（株））についても同様に評価した。

バッフル付きフラスコ（100 ml）に 30% (w/w) マルトース溶液（30 g）、グルコースオキシダーゼ（27 U）、カタラーゼ（1800 U）、炭酸水素 Na（2.2 g）を入れ、35 °C、300 rpm の振盪条件下で溶存酸素を供給し、酸化反応を行った。反応終了後、反応液に活性炭（大阪ガスケミカル（株））を固形

分あたり 1 % (w/w) となるように添加し、80 °C で 30 分間マグネティックスターラーにて攪拌した。これをガラスフィルター (GF/F, Whatman) と 0.2 μm メンブレンフィルター (アドバンテック東洋 (株)) によって濾過することでタンパク質除去を行い、マルトビオン酸 Na 溶液を得た。同様に、3 % (w/w) マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオースからそれぞれマルトトリオン酸 Na、マルトテトラオン酸 Na、マルトペンタオン酸 Na を調製した。

## 消化性試験

岡田らの方法に従い [67]、1) ヒト唾液 α-アミラーゼ、2) 人工胃液、3) 豚すい臓 α-アミラーゼ、4) ラット小腸粘膜酵素を用いて評価した。各評価方法は次の通りである。

### 1) ヒト唾液 α-アミラーゼによる消化性評

ヒト唾液由来の α-アミラーゼ (type IX-A, Sigma-Aldrich Co.) を用意した。緩衝溶液として、1 mM 塩化 Ca を含んだ 50 mM Tris-マレイン酸緩衝液 (pH 6.0) を調製した。これを用いて調製した 5 ml の 10 % (w/v) 試料水溶液と 1 ml のヒト唾液 α-アミラーゼ溶液 (40 units/ml) とを混ぜ合わせ、37 °C の温浴中で 30 分間反応させた。沸騰浴中で 5 分間の酵素失活処理を行った後、HPLC で残存糖量を測定した。尚、ヒト唾液 α-アミラーゼ酵素の活性単位は、0.1 % (w/v) の可溶性澱粉から 37 °C、pH 6.9 の条件にて、1 分間に 1 μmol のグルコースを遊離する酵素量とした。試料溶液 10 μl、蒸留水 920 μl、内部標準 (1000 μg/ml グリセリン) 70 μl を混合し、更に蒸留水で 10 倍に希釈した溶液を分析に供した。

## 2) 人工胃液による消化性評価

4 ml の 2.2% (w/v) 試料水溶液と 2 ml の 50 mM HCl-KCl 緩衝液 (pH 2.0) とを混ぜ合わせ (緩衝液の終濃度 16.7 mM)、37 °C で 100 分間反応させた。その後、10 mM NaOH を滴下して中和し (pH 6.0)、HPLC で残存糖量を測定した。試料溶液 10  $\mu$ l、蒸留水 920  $\mu$ l、内部標準 (1000  $\mu$ g/ml グリセリン) 70  $\mu$ l を混合し、分析に供した。

## 3) 豚すい臓 $\alpha$ -アミラーゼによる消化性評価

豚すい臓  $\alpha$ -アミラーゼ (type I-A Sigma-Aldrich Co.) を用意した。緩衝溶液として、1 mM 塩化カルシウムを含んだ 50 mM マレイン酸緩衝液 (pH 6.6) を調製した。これを用いて調製した 5 ml の 1% (w/v) 試料溶液と 0.5 ml の豚すい臓  $\alpha$ -アミラーゼ (20 units/ml) とを混ぜ合わせ、37 °C で 6 時間反応させた。沸騰浴中で 5 分間の失活処理を行った後、HPLC で残存糖量を測定した。尚、豚すい臓  $\alpha$ -アミラーゼ酵素の活性単位は、0.1% (w/v) の可溶性澱粉から 37 °C、pH 6.9 の条件にて 1 分間に 1  $\mu$ mol のグルコースを遊離する酵素量とした。試料溶液 30  $\mu$ l、蒸留水 770  $\mu$ l、内部標準 (1000  $\mu$ g/ml グリセリン) 100  $\mu$ l を混合し、分析に供した。

## 4) ラット小腸粘膜酵素による消化性評価

ラット小腸粘膜酵素 (Sigma-Aldrich Co.) を用意した。緩衝溶液として、50 mM マレイン酸緩衝液 (pH 6.6) を調製した。これを用いて調製した 5 ml の 1% (w/v) 試料溶液と 1 ml のラット小腸粘膜酵素 (3.8 units/ml) とを混ぜ合わせ、37 °C で 3 時間反応させた。沸騰浴中で 5 分間の失活処理を行った後、HPLC で残存糖量を測定した。尚、小腸粘膜の酵素活性単位は、1.0% (w/v) マルトースか

ら 37°C、pH 6.0 の条件にて 1 分間に 1  $\mu\text{mol}$  のグルコースを遊離する酵素量とした。試料溶液 30  $\mu\text{l}$ 、蒸留水 820  $\mu\text{l}$ 、内部標準 (1000  $\mu\text{g/ml}$  グリセリン) 50  $\mu\text{l}$  を混合し、分析に供した。

### 糖分析および消化率の算出

糖分析にはパルスドアンペロメトリー検出を搭載した DX-500 糖分析システム (Dionex, Sunnyvale, CA) を使用し、以下の条件にて分析を行った。

カラム : CarboPac PA-1 guard column (50  $\times$  4.0 mm)、CarbonPac PA-1 (250  $\times$  4.0 mm)

検出器 : パルスドアンペロメトリー

カラム温度 : 30 °C

流速 : 1.0 ml / min

注入量 : 10  $\mu\text{L}$

溶離液 : (a) 0.1 M 水酸化ナトリウム、(b) 0.1 M 水酸化ナトリウム / 1 M 酢酸ナトリウム

グラジエントプログラム

Time (min)	(a) 0.1 M NaOH	(b) 0.1 M NaOH / 1 M AcONa
0.0	100	0
5.0	100	0
35.0	80	20
35.1	0	100
45.0	0	100

得られた各試料のピーク面積から次式によって消化率を評価した。

$I_a$  : 反応前の内部標準のピーク面積

$I_b$  : 反応後の内部標準のピーク面積

$S_a$  : 反応前の試料のピーク面積

$S_b$  : 反応後の試料のピーク面積

$$\text{消化率 (\%)} = 100 \cdot \{(S_a I_a / I_b) - S_b\} / (S_a I_a / I_b)$$

### 4.2.3 結果

各試料のクロマトグラフを Fig. 4-1 から Fig.4-7 に、分析結果から算出した消化率を Table 4-1 に、それぞれ示す。本試験条件において、マルトースは人工唾液 ( $\alpha$ -アミラーゼ)、人工胃液、人工膵液 ( $\alpha$ -アミラーゼ) には加水分解されなかったが、人工腸液 (小腸粘膜酵素) によって 76.4%がグルコースへと加水分解された。一方、マルチトールは人工唾液、人工胃液、人工膵液には加水分解されず、人工腸液により 3.8%が加水分解された。マルトビオン酸 Na は、人工唾液、人工胃液、人工膵液には加水分解されず、人工腸液によって 3.3%が加水分解された。このことから、マルトビオン酸 Na はマルチトールに近い消化耐性挙動を示すことが明らかとなった。マルトトリオン酸 Na およびマルトテトラオン酸 Na は、人工唾液、人工胃液、人工膵液には加水分解されなかったが、人工腸液における加水分解率はそれぞれ 49.3 %および 100 %であった。これらの分解は非還元末端側のグルコースから進行し、グルコースとマルトビオン酸が生成することがクロマトグラムより確認された。また、マルトペンタオン酸 Na については、人工胃液での加水分解は確認されなかったが、人工唾液、人工膵液、人工腸液により分解され、グルコース、マルトース、マルトビオン酸、マルトトリオン酸などの分解物が確認された。

Table 4-1. Hydrolysis rate (%) of maltobionic acid with artificial digestive juices *in vitro*.

	Artificial saliva	Artificial digestive juices	Artificial pancreatic juice	Small intestinal mucosal juice
Maltose	0.0	0.0	0.0	76.4
Maltitol	0.0	0.0	0.0	3.8
Maltobionic acid Na salt	0.0	0.0	0.0	3.3
Maltotriionic acid Na salt	0.0	0.0	0.0	49.3
Maltotetraonic acid Na salt	0.0	0.0	0.0	100.0
Maltopentaonic acid Na salt	68.6	0.0	100.0	100.0

Digestibility of the samples was assessed *in vitro* at 37 °C.

Glycerol was used as the internal standard.

Digestibility (%) =  $100 \cdot \{(S_a \cdot I_a / I_b) - S_b\} / (S_a \cdot I_a / I_b)$ . Peak areas are represented by  $I_a$  (internal standard sample before treatment),  $I_b$  (internal standard sample after treatment),  $S_a$  (sample before treatment), and  $S_b$  (test sample after treatment).

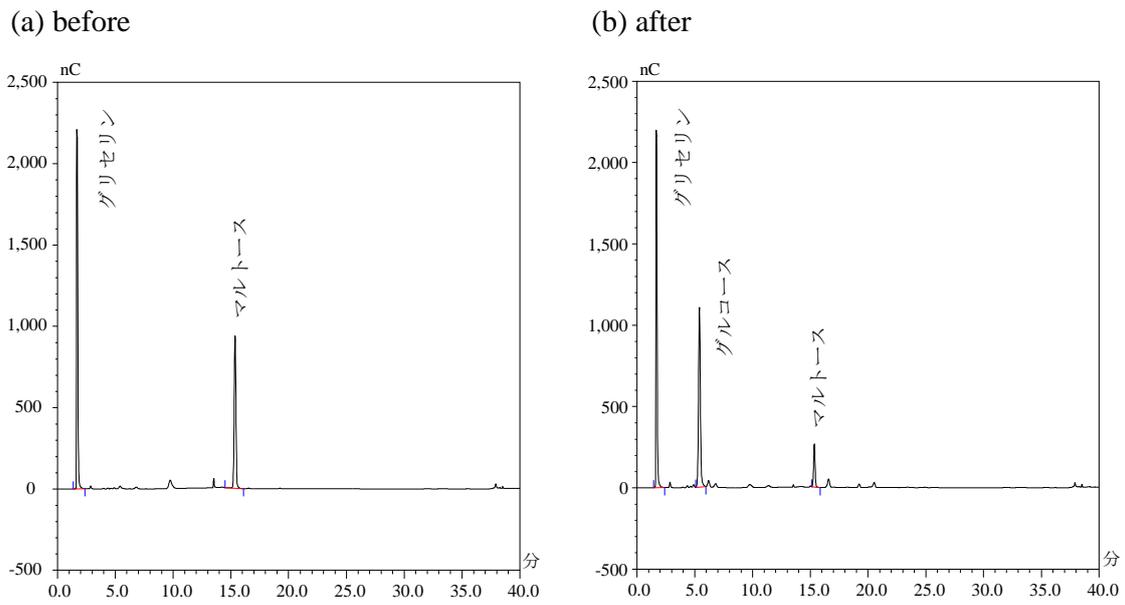


Fig. 4-1. HPLC chromatograms before (a) and after (b) digestion reaction of maltose by small intestinal mucosal enzyme.

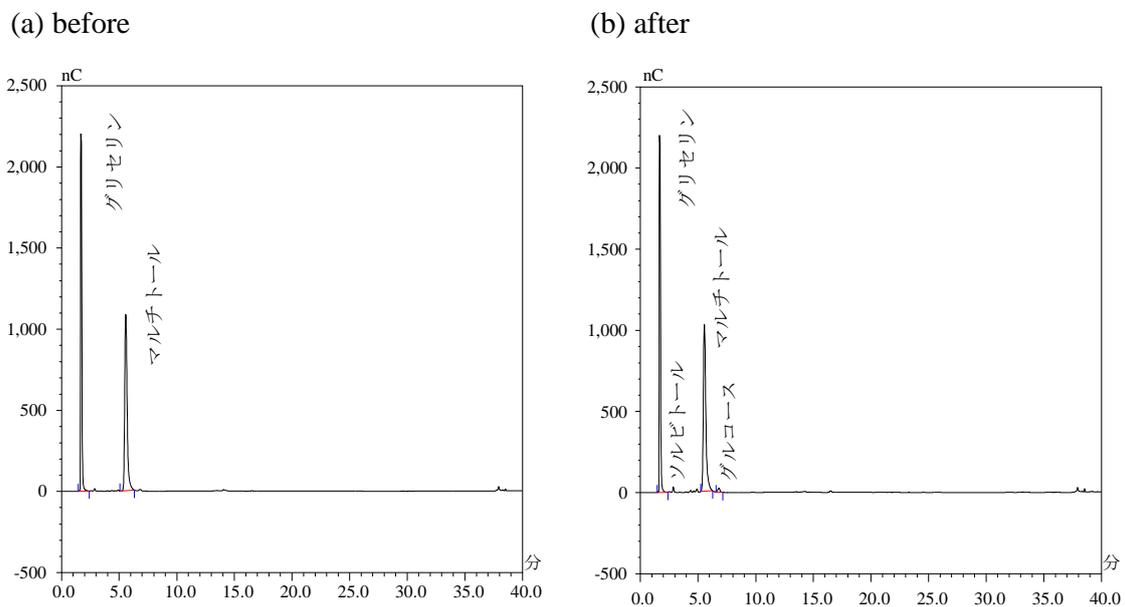
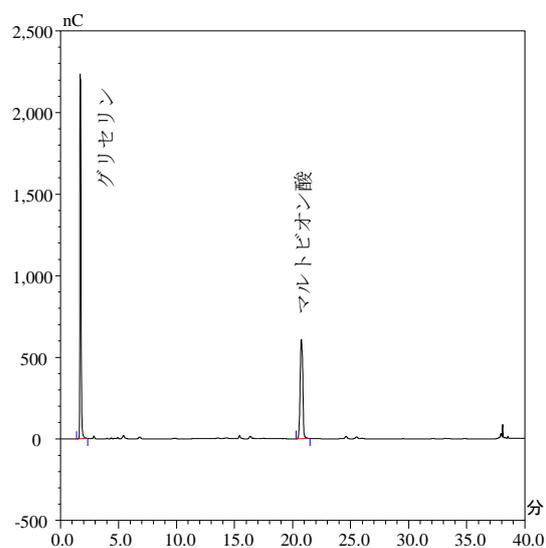


Fig. 4-2. HPLC chromatograms before (a) and after (b) digestion reaction of maltitol by small intestinal mucosal enzyme.

(a) before



(b) after

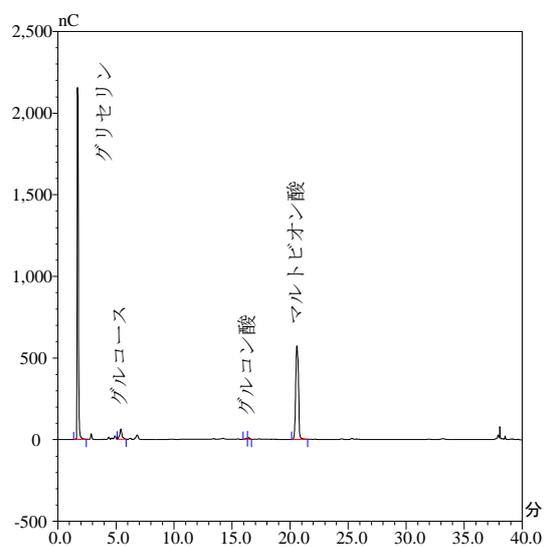
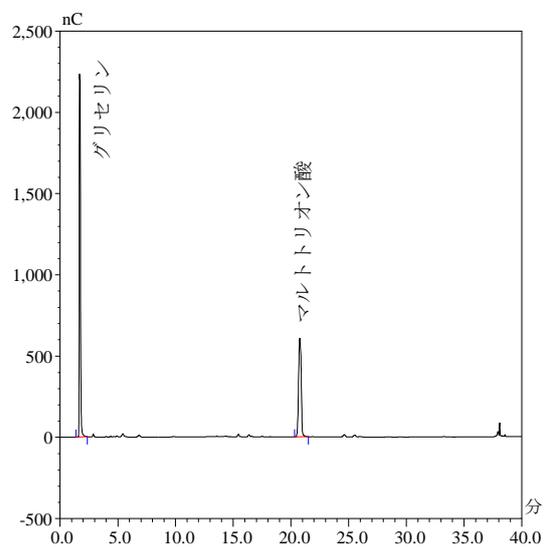


Fig. 4-3. HPLC chromatograms before (a) and after (b) digestion reaction of Na maltobionate by small intestinal mucosal enzyme.

(a) before



(b) after

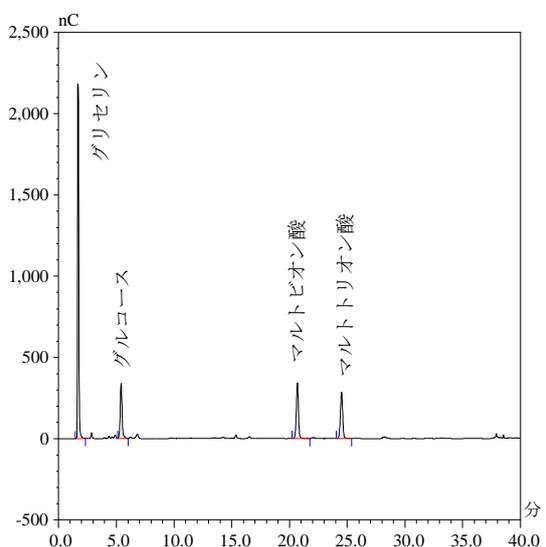
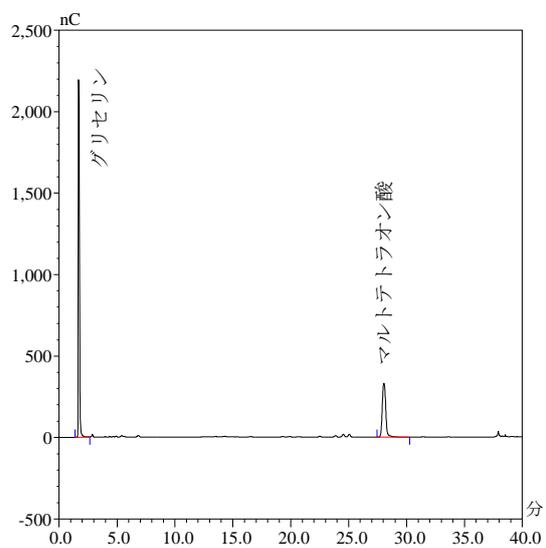


Fig. 4-4. HPLC chromatograms before (a) and after (b) digestion reaction of Na maltotriionate by small intestinal mucosal enzyme.

(a) before



(b) after

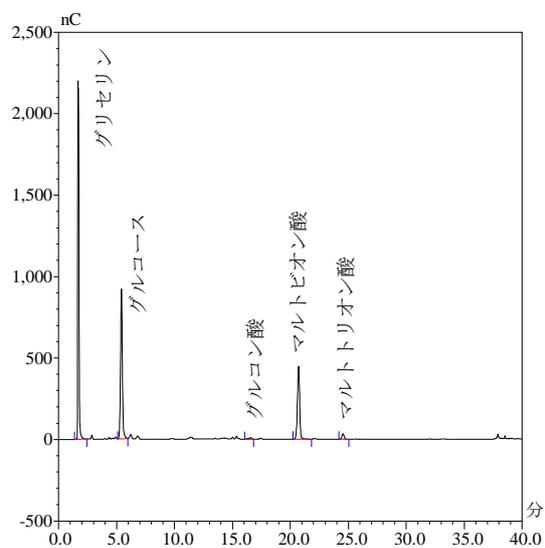
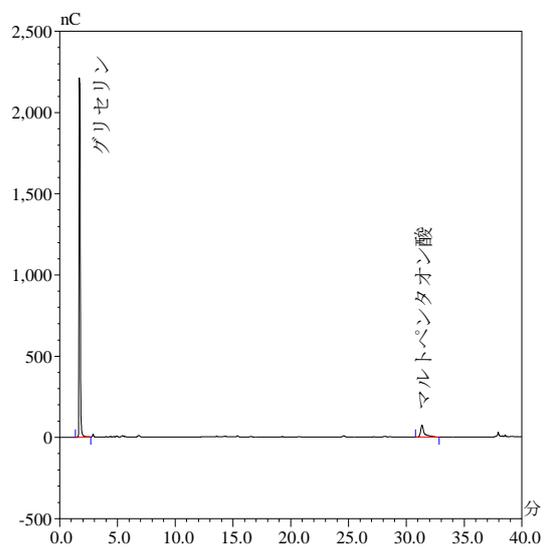


Fig. 4-5. HPLC chromatograms before (a) and after (b) digestion reaction of Na maltotetraonate by small intestinal mucosal enzyme.

(a) before



(b) after

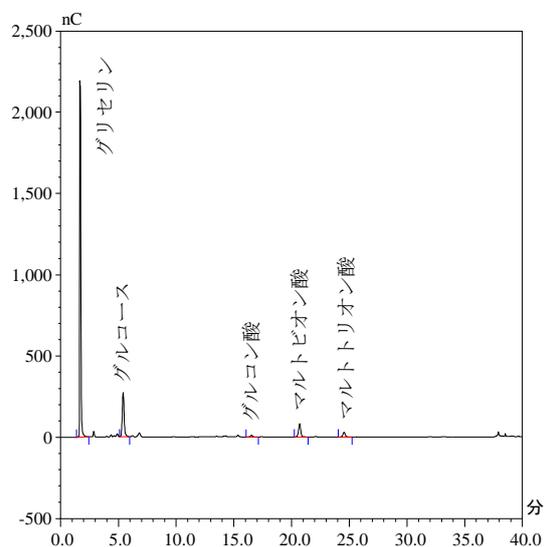
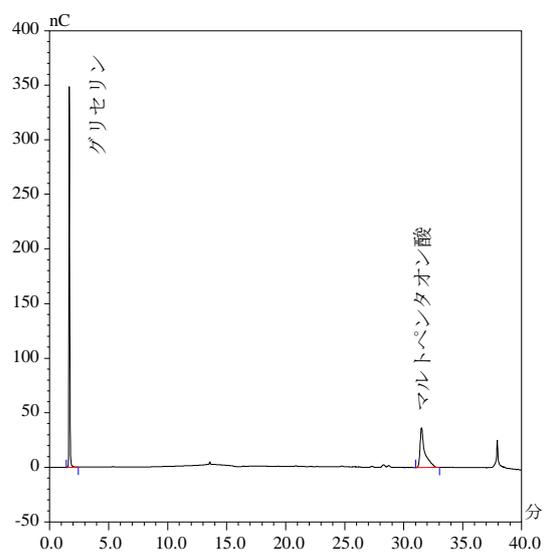


Fig. 4-6. HPLC chromatograms before (a) and after (b) digestion reaction of Na maltopentaonate by small intestinal mucosal enzyme.

(a) before



(b) after

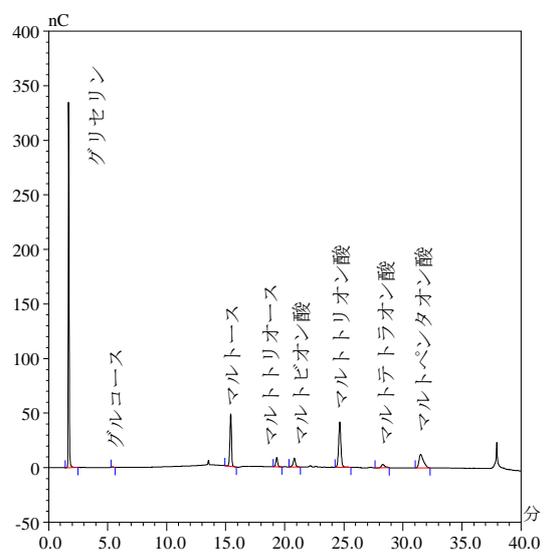
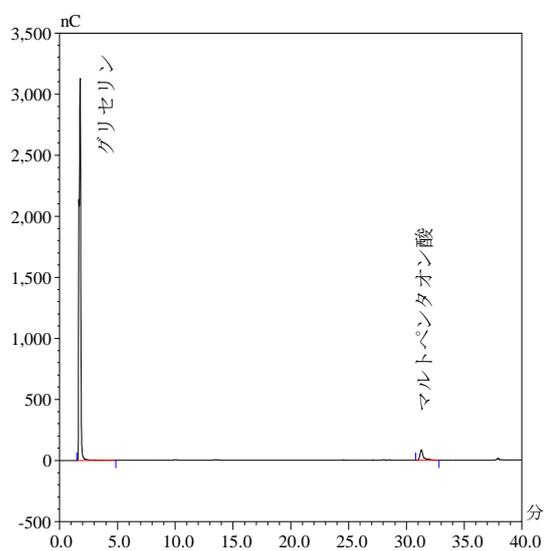


Fig. 4-7. HPLC chromatograms before (a) and after (b) digestion reaction of Na maltopentaonate by salivary  $\alpha$ -amylase.

(a) before



(b) after

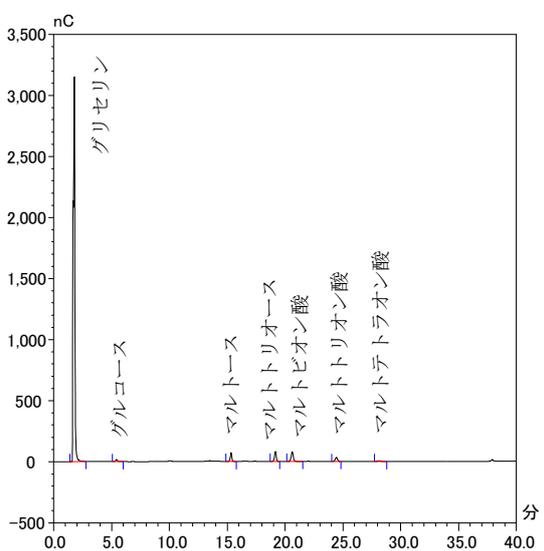


Fig. 4-8. HPLC chromatograms before (a) and after (b) digestion reaction of Na maltopentaonate by porcine pancreas  $\alpha$ -amylase.

#### 4.2.4 考察

Dahlqvist は、白ネズミの小腸粘膜酵素によるマルチトールの分解はマルトースの 1/30 程度、ヒトの小腸粘膜酵素では 1/40 程度であることを報告している[68]。今回の試験結果では、マルトースの消化率が 76.4 %であったのに対して、マルチトールの消化率は 3.8 %であった。マルチトールの消化率はマルトースの 1/20 程度であったことから、本試験は *in vivo* よりも加水分解し易い条件で実施されたと考えられる。この試験条件において、マルトビオン酸 Na の消化率は 3.3 %であったことから、*in vivo* においてはマルチトールと同等かそれ以上の消化耐性を持つものと推察される。また、三糖類以上のオリゴ糖酸（マルトトリオン酸 Na、マルトテトラオン酸 Na、マルトペンタンオン酸 Na）は消化酵素によって加水分解されたが、最終的な分解物はグルコースとマルトビオン酸であったため、生体内ではマルトビオン酸の機能が期待される。

吉沢らは小腸粘膜酵素によるマルチトールの僅かな分解はマルターゼによるものと報告しており[69]、マルトビオン酸においても同様の機序が推察される。一方、奥らはマルチトールの一部は尿中で検出されることを報告している[70]。これは、一部のマルチトールは吸収されることを示しており、マルトビオン酸においても同様の評価が必要と考えられる。

## 4.3 腸内細菌増殖選択性

### 4.3.1 背景および目的

マルトビオン酸の構成成分であるグルコン酸は腸内のビフィズス菌によって選択的に資化されることが知られている[66]。マルトビオン酸においても、消化耐性を持つ難消化性糖質であったことから、大腸内に到達して腸内細菌に利用されると推察される。また、前節でマルトビオン酸と同程度の消化性を有することを示したマルチトールとは、マルトースの還元末端側の1位のヒドロキシ基部分が異なるのみであり、この構造上の違いが、腸内細菌による資化性に及ぼす影響については興味深い課題である。本研究ではグルコン酸に加えてマルチトールを比較対照とし、マルトビオン酸の腸内細菌増殖選択性について調べた。

### 4.3.2 方法

#### 材料および試料調製

マルトビオン酸 Ca を本試験に用いた場合、前節と同様に培地成分に含まれる pH 緩衝液成分等と Ca イオンとが反応析出するため、適切な評価は困難であった。そこで本試験においても、マルトビオン酸 Na を試料とした。また、比較対照としてグルコース (サンエイ糖化 (株))、マルトース (富士フィルム和光純薬工業)、マルチトール (富士フィルム和光純薬工業 (株))、グルコン酸 Na (扶桑化学工業製) を用いた。

資化性試験には理化学研究所バイオリソース研究センターより分譲した腸内細菌標準株である 24 株を用いた。即ち、*Bifidobacterium adolescentis* (JCM1275)、*Bi. breve* (JCM1192)、*Bi. Infantis* (JCM

1222)、*Bi. longum* (JCM 1217)、*Bi. catenulatum* (JCM 1194)、*Bi. bifidum* (JCM 1255)、*Bi. pseudocatenulatum* (JCM 1200)、*Bi. dentium* (JCM 1195)、*Bi. angulatum* (JCM 7096)、*Lactobacillus acidophilus* (JCM 1132)、*L. gasserii* (JCM 1131)、*L. salivarius* (JCM 1231)、*Bacteroides vulgatus* (JCM 5826)、*Ba. ovatus* (JCM 5824)、*Ba. thetaiotaomicron* (JCM 5827)、*Parabacteroides distasonis* (JCM 5825)、*Eubacterium aerofaciens* (JCM 7790)、*E. aerofaciens* (JCM 7790)、*E. limosum* (JCM 7790)、*Clostridium butyricum* (JCM 7840)、*C. difficile* (JCM 1296)、*C. paraputrificum* (JCM 1293)、*C. ramosum* (JCM 1298)、*C. coccoides* (JCM 1395) を用いた。これら菌株は、BL 寒天培地にて 37°C でのガスパック法 (嫌気バック、三菱ガス化学製) で嫌気培養を行った後、GAM 培地で嫌気培養を行い、活性化させた。

#### 供試培地

資化性試験の培地組成は、PYF medium を改良したものを用いた[71]。即ち、1.0% (w/v) ポリペプトン (日本製薬 (株))、0.5% (w/v) 肉エキス (極東化成工業 (株))、0.5% (w/v) 酵母エキス (アサヒグループ食品製)、0.3% (w/v) リン酸水素二カリウム (関東化学 (株))、0.1% (w/v) Tween 80 (関東化学 (株))、0.5% (w/v) 糖質基質 (グルコース、マルトース、マルチトール、グルコン酸 Na、マルトビオン酸 Na) を混合溶解し、滅菌処理した後、フィルター濾過 (0.2 μm) したアスコルビン酸 Na (関東化学 (株)) および L-リシン塩酸 (富士フィルム和光純薬工業 (株)) をそれぞれ終濃度 1.0% (w/v) および 0.05% (w/v) になるように添加した。

#### 資化性試験

各供試菌株の前培養液 (10 μl) を培地 (2 ml) に植菌した後、37°C で 3 日間嫌気培養した。培養

後の培地の濁度 (OD 660 nm) から、糖無添加培地の培養後の濁度を差し引いた吸光度が、0.2 以下は (-)、0.2 以上 0.4 以下は (±)、0.4 以上 0.6 以下は (+)、0.6 以上 1.0 以下は (++)、1.0 以上は (+++) として判定した。

### 4.3.3 結果

各供試菌体による試料の資化性試験結果を Table 4-2 に示す。グルコースは 24 株すべてに資化され、マルトースは *C. difficile* および *C. paraputrificum* 以外の 22 株に資化された。マルチトールは、*Bi. adolescentis*、*Bi. pseudocatenulatum*、*Bi. dentium*、*Ba. vulgatus*、*Eu. aerofaciens*、*Eu. limosum*、*C. butyricum*、*C. ramosum* および *C. coccoides* によって特に良好に、*Ba. ovatus* によって良好に資化された。また、*Bi. Infantis*、*L. acidophilus*、*L. gasseri*、*Ba. thetaiotaomicron* および *P. distasonis* によっても軽度な資化が確認された。グルコン酸は *Bi. adolescentis*、*Bi. catenulatum*、*Bi. pseudocatenulatum*、*Bi. dentium*、*L. acidophilus*、*Ba. vulgatus*、*Eu. aerofaciens* および *Eu. limosum* によって特に良好に、*C. butyricum* および *C. difficile* によって良好に資化された。一方、マルトビオン酸は *Bi. adolescentis*、*Bi. dentium* によって特に良好に、*C. ramosum*、*C. coccoides* によって良好に資化された。また、*Bi. infantis*、*Bi. longum*、*Bi. pseudocatenulatum*、*Bi. gallicum*、*L. acidophilus*、*L. gasseri* および *C. butyricum* による軽度な資化性が確認された。一方、*Bacteroides* 属や *Eubacterium* 属には全く資化されなかった。

Table 4-2. Utilization of maltobionic acid by intestinal bacteria *in vitro*.

	Origin	Glucose	Maltose	Maltitol	Gluconic acid		Maltobionic acid	
					Na salt	Na salt	Na salt	Na salt
<i>Bifidobacterium</i>	<i>adolescentis</i>	JCM 1275	+++	+++	+++	+++	+++	++
	<i>breve</i>	JCM 1192	++	++	-	-	-	-
	<i>Infantis</i>	JCM 1222	+++	+++	±	-	±	±
	<i>longum</i>	JCM 1217	+++	+++	-	-	±	±
	<i>catenulatum</i>	JCM 1194	+++	+++	-	+++	-	-
	<i>bifidum</i>	JCM 1255	++	++	-	-	-	-
	<i>pseudocatenulatum</i>	JCM 1200	+++	+++	++	+++	±	±
	<i>dentium</i>	JCM 1195	+++	+++	++	+++	+++	+++
	<i>gallicum</i>	JCM 8224	+++	+++	-	-	±	±
	<i>angulatum</i>	JCM 7096	+++	+++	-	-	-	-
	<i>acidophilus</i>	JCM 1132	+++	+++	±	++	±	±
	<i>Lactobacillus</i>	<i>gasseri</i>	JCM 1131	+++	+++	±	-	±
<i>salivarius</i>		JCM 1231	+++	++	-	-	-	-
<i>vulgatus</i>		JCM 5826	+++	+++	++	++	-	-
<i>Bacteroides</i>	<i>ovatus</i>	JCM 5824	+	+	+	-	-	-
	<i>thetaiotaomicron</i>	JCM 5827	±	±	±	-	-	-
<i>Parabacteroides</i>	<i>distasonis</i>	JCM 5825	±	±	±	-	-	-
	<i>aerofaciens</i>	JCM 7790	+++	+++	+++	+++	-	-
<i>Eubacterium</i>	<i>limosum</i>	JCM 6421	+++	+++	++	+++	-	-
	<i>butyricum</i>	JCM 7840	+++	+++	+++	+	±	±
<i>Clostridium</i>	<i>difficile</i>	JCM 1296	++	-	-	+	-	-
	<i>paraputrificum</i>	JCM 1293	+++	-	-	-	-	-
	<i>ramosum</i>	JCM 1298	+++	+++	++	-	+	+
	<i>coccoides</i>	JCM 1395	+++	+++	++	-	+	+
			+++	+++	++	-	+	+

Growth activity of intestinal bacteria was assessed *in vitro* in the presence of maltobionic acid. Judgement of bacterial growth: ++++,  $\Delta OD \geq 1.0$ ; ++,  $1.0 < \Delta OD \leq 0.6$ ; +,  $0.6 < \Delta OD \leq 0.4$ ; ±,  $0.4 < \Delta OD \leq 0.2$ ; -,  $0.2 < \Delta OD$ ;  $\Delta OD = (\text{test OD}) - (\text{control OD})$ .

#### 4.3.4 考察

本節ではマルトビオン酸の資化性を、マルトビオン酸の構成成分であるグルコン酸やマルトビオン酸と同等の消化耐性を持ち、骨格構造が似ているマルチトールと比較した。その結果、マルトビオン酸は腸内細菌によって利用され難く、選択性の高い難消化性糖質であることが分かった。

ヒト腸管から検出される主なビフィズス菌 (*Human-Residential Bifidobacteria*; HRB) は 10 菌種程度であり、乳児と成人で棲息する菌種も異なっている[72]。キシロオリゴ糖[71]、ガラクトオリゴ糖[73, 74]、フラクトオリゴ糖[75]はビフィズス菌およびラクトバチルスなどの多くの真菌種によって選択的に利用されることが知られているが、特に乳児から成人まで幅広い年齢層で優勢な *B. longum* への選択的利用性が高いことが報告されている[76]。ビフィズス菌株に対する資化性は、マルトビオン酸、グルコン酸、マルチトール間で度合いが異なり、各々4~6割程度のビフィズス菌種によって資化された。特に、乳児から成人まで幅広い年齢層で優勢な *B. longum* による資化が期待されたが、グルコン酸およびマルチトールでは資化されず、マルトビオン酸では僅かに資化されるに留った。グルコン酸では *Bi. catenulatum*、*Bi. pseudocatenulatum*、*Bi. adolescentis*、*Bi. dentium* に強く資化された。これら 4 株のビフィズス菌は成人の腸内で優勢な HRB でもあり、グルコン酸骨格を持つ糖を選択的に利用する機構があると考えられる。この 4 株の中で、成人腸内で 2 番目に優勢な HRB である *B. adolescentis* と *B. dentium* の 2 株は、マルトビオン酸とマルチトールに対しても強い増殖活性があることが確認された。この 2 株は  $\alpha$ -グルコシド結合の二糖を加水分解する酵素を持ち、基質に対する選択性が高い性質を持つと考えられる。*B. adolescentis* や *B. dentium* は葉酸の生合成能力が高いと報告されている[77]。葉酸は核酸代謝や DNA メチル化などの細胞代謝において重要な役割を果たしている[78]。また、*B. dentium* には GABA ( $\gamma$ -アミノ酪酸) 生産能力があると報告

されている[79]。GABAは神経の抑制性伝達物質[80]であり、自律神経活動の活性[81]や血圧降下作用[82]を示す。マルトビオン酸の摂取によってHRBの活性が増加することで、様々な生体調節機能の向上が期待される。

ビフィズス菌以外の腸内優勢菌である *Bacteroides*、*Eubacterium*、*Clostridium* において、マルトビオン酸はマルチトールやグルコン酸と大きく異なる資化挙動を示した。*Eubacterium* はマルチトールやグルコン酸に対して強い資化性を、*Bacteroides* は特にマルチトールに対して資化性を示したが、マルトビオン酸は全く資化されなかった。また、*Clostridium* はマルチトールに対して良好な資化性を示したが、グルコン酸およびマルトビオン酸に対しては弱い資化性を示した。*C. ramosum* および *C. coccooides* の培養後の培養液をHPLCで確認したところ、マルトビオン酸の分解に由来するグルコン酸のピークは検出されたが、グルコースのピークは検出されなかった。この2つの菌株はグルコン酸を資化しなかったことから、菌が持つ $\alpha$ -グルコシダーゼでマルトビオン酸を加水分解し、グルコースのみを資化したものと考えられる。

ガラクトオリゴ糖およびフラクトオリゴ糖は、*Bacteroides* に良好に利用されることが知られている[74,75]。一方、*Bacteroides* において、マルトビオン酸が資化されないのは特異的であり、この機構解明には更なる検討が必要である。

## 4.4 ヒトに対する便通改善効果

### 4.4.1 背景および目的

グルコン酸をヒトが摂取した場合、腸内細菌叢が変化し、ビフィズス菌などが増加する[66]。先述の通り、マルトビオン酸はマルチトールと同等の *in vitro* 消化耐性を持ち、マルチトールやグルコン酸よりも腸内細菌増殖選択性が高いことから、腸内細菌に利用され難い糖質であると考えられた。そこで、ヒトがマルトビオン酸を摂取した場合に起こる、お腹の調子や排便に関する変化を明らかにすることにした。

### 4.4.2 方法

#### 試験参加者

本試験はランダム化プラセボ対照二重盲検クロスオーバー比較試験で実施した。試験参加者は、40歳以上69歳以下で、1週間の平均排便回数が3～5回程度の便秘傾向者を対象とし、次の除外基準に抵触しない者を選抜した。即ち、(a) 悪性腫瘍、心不全、心筋梗塞の治療の既往歴がある者、(b) 不整脈、肝障害、腎障害、脳血管障害、リウマチ、糖尿病、脂質異常症、高血圧、その他の慢性疾患等の疾患がある者、(c) アレルギー（医薬品・試験食品関連食品）がある者、を除外した。なお、本試験実施計画は、中部大学（愛知県春日井市）の倫理委員会にて2018年9月21日に承認（承認番号300019-2）を得た。また、ヘルシンキ宣言（2013）および人を対象とする医学系研究に関する倫理指針の趣旨にのっとり、医学的倫理に十分配慮し実施した。本試験は大学病院医薬情報ネットワーク（UMIN-CTR）に登録した（登録番号UMIN000034257）。

試験参加に同意した参加者 68 名から、前記項目 (a) ~ (c) に該当しない便秘傾向者に該当する 35 名を選抜し、年齢と BMI が大きく異ならない介入食品先行群 18 名とプラセボ食品先行群 17 名にそれぞれ割付けた。割付けは、Statlight #11 ((株)ユックムス) を用い、介入実施者の試験コントロールにより実施した。

### 介入およびプラセボ食品

本研究の介入に用いた食品は、マルトビオン酸 Ca を主成分とするオリゴ糖 (商品名:サワーオリゴC、サンエイ糖化 (株)) の顆粒粉末 1 包 (4g) を用いた。介入食品の成分組成は、固形分が 94.7%、カルシウム 4.4 %、マルトビオン酸 60.3 %、マルトトリオン酸 16.7 %、その他四糖以上のマルトオリゴ糖酸 13.3%であった。また、プラセボ食品は、89.0%含水結晶マルトース ((株) 林原) と 11.0%炭酸カルシウム (三共製粉 (株)) の混合顆粒粉末 1 包 (4g) を用い、カルシウム含有量配合量が 176 mg (同一カルシウム量) となるように配合した。試験食品の形状はいずれも粉状で、同型のスティック包装であり、試験開始前の倫理審査時に介入食品とプラセボ食品は、色およびにおいによって区別できないことを確認した。試験参加者は、試験食品 1 日 1 包 (4g) を食後のタイミングで水またはぬるま湯と共に摂取した。なお試験スケジュールは、試験期間 I 期 (4 週間)、ウォッシュアウト期間 (2 週間)、試験期間 II 期 (4 週間) とした。

### 評価

日本語版便秘評価尺度 (Constipation Assessment Scale MT version; CAS-MT) [83-85] および便形式スケール [86-88]、便通日誌を用いた便通の有無と排便量についての排便状況を、試験開始から終了ま

での間、全ての試験参加者が記載した。排便量はたまごの大きさを基準とした。CAS-MT は便秘に関する 8 つの検査項目についてそれぞれ 0~2 点の 3 段階で評価し、得点が高値であるほど便秘傾向であると判断した。各項目は、「お腹が張った感じ（膨腹感）」、「排ガス量が少ない（放屁量）」、「便の回数が少ない（排便数）」、「直腸に便が充満している感じ（残便感）」、「排便時に肛門の痛みがある（排便痛）」、「便の量が少ない（排便量）」、「便が固くて出にくい（便硬度）」、「にじみ出る水様便がある（水様便）」であり、合計得点を CAS 得点として評価した。ブリストルスケール（Bristol stool scale）は、便形状を「コロコロ便」、「硬い便」、「やや硬い便」、「普通便」、「やや柔らかい便」、「泥状便」、「水様便」の 7 通りに分類し、該当するものを選択させた（Table 4-3）。その中で「筒状でなめらかな表面」に近づいた場合は『改善』とし、変化なし、或は遠ざかった場合は『未改善』としてそれぞれの該当者数を示した。介入開始前および介入終了後には簡易型自記式食事暦法質問票（BDHQ）によって、直近 1 か月間の摂取栄養素のアンケート調査を実施した。

## 統計解析

すべてのアウトカムは平均値±標準偏差で示した。クロスオーバー試験の妥当性は、排便回数を指標として、群および食品を固定因子、各試験参加者の測定値を変数因子とした一般化線形モデルによる分散分析により評価した。排便日数、排便量、CAS スコアは、摂取前、摂取 2 週間後、摂取 4 週間後のアンケート集計結果より、群内比較と群間比較で検討した。群内比較は、時期と試験参加者を固定因子とした Dunnett 検定を用いて、摂取前と摂取 2 週間後、摂取前と摂取 4 週間後の測定値を比較した。群間比較は、各時点の測定値と変化量を介入食品群とプラセボ食品群とで比較し、変化量は摂取 2 週間後または摂取 4 週間後の測定値から摂取前の測定値を減算した値とした。摂取

前の測定値および変化量は Student の t 検定、摂取 12 週間後と摂取 24 週間後の測定値は、摂取前の測定値を共変量とした ANCOVA を用いて群間比較した。また Bristol stool scale については、「Like a sausage or snake, smooth and soft」に近づいた場合は「Improvement」とし、変化なしあるいは遠ざかった場合は「No improvement」として該当者数を示し、Wilcoxon 符号付順位検定を実施した。すべての統計解析は両側検定で有意水準 5% に設定し、エクセル統計 2012（株）社会情報サービス）および Microsoft Excel 2010（日本マイクロソフト株）を用いて実施した。なお、他時点、他項目における多重性は考慮しないこととした。

Table 4-3. Bristol stool scale to determine flight status.

1 コロコロ便		硬くてコロコロの兔糞状の便
2 硬い便		ソーセージ状であるが硬い便
3 やや硬い便		表面にひび割れのあるソーセージ状の便
4 普通便		表面が滑らかで柔らかいソーセージ状、あるいは蛇のようなとぐろを巻く便
5 やや柔らかい便		はっきりとしわのある柔らかい半分固形の便
6 泥状便		境界がほぐれて、ふにゃふにゃの不定形の小方便、泥状の便
7 水様便		水様で、固形物を含まない液体状の便

#### 4.4.3 結果

試験参加者の追跡フローチャートを Fig. 4-8 に示す。試験参加者 35 名のうち 1 名が自己都合により試験を中止し、試験完了者は 34 名であった。症例検討会において、日誌の未提出者および摂取食品の摂食率が 80%を下回る 11 名を解析対象から除外し、24 名を解析対象とした。解析対象者 24 名の背景を Table 4-4 に示す。

試験開始前と終了後の BDHQ 解析結果を Table 4-5 に示す。介入食品摂取群およびプラセボ食品摂取群間において摂取栄養成分に有意差は無かった。便秘改善効果を評価する上で影響を及ぼし易い食物繊維に関しては、介入食品摂取群では 1 日あたり試験前  $10.1 \pm 3.3$  g、試験後  $9.6 \pm 3.3$  g、プラセボ食品摂取群では試験前  $10.2 \pm 3.5$  g、試験後  $9.7 \pm 2.9$  g であり、ほぼ同一摂取量であったことから、食物繊維摂取量の影響は無いことが担保された。

排便日数と排便回数を Table 4-6 に示す。排便回数には、プラセボ群では摂取前  $4.79 \pm 0.93$  日/週であったのに対し、2 週間後  $5.50 \pm 1.29$  日/週、4 週間後  $5.46 \pm 1.72$  日/週であり、摂取 2 週間後で増加傾向となったが、変化量  $0.71 \pm 0.91$  日/週には有意差が認められなかった ( $p=0.131$ )。一方、介入食品摂取群では摂取前  $4.54 \pm 0.66$  日/週であったのに対し、2 週間後  $5.29 \pm 1.90$  日/週、4 週間後  $5.88 \pm 1.39$  日/週であった。摂取 2 週間後の変化量  $0.75 \pm 1.59$  日/週に有意差は無かったが ( $p=0.125$ )、増加傾向にはあった。また、4 週間後の変化量  $1.33 \pm 1.05$  日/週には有意差が認められた ( $p=0.003$ )。群間での変化量を比較すると、摂取 2 週後に有意差 ( $p=0.912$ ) は認められなかったが、摂取 4 週後に有意差 ( $p=0.043$ ) が確認された。

排便量は、プラセボ群は摂取前  $2.24 \pm 1.14$  個/日であったのに対し、2 週間後  $2.48 \pm 1.25$  個/日、4 週間後  $2.36 \pm 1.20$  個/日であり、2 週間後の変化量  $0.24 \pm 0.66$  個/日 ( $p=0.705$ ) および 4 週間後の変化

量  $0.12 \pm 0.55$  個/日 ( $p = 0.919$ ) に有意差は認められなかった。また、介入食品摂取群は摂取前  $2.19 \pm 1.10$  個/日であったのに対し、2週間後  $2.34 \pm 1.08$  個/日、4週間後  $2.47 \pm 1.42$  個/日であった。増加傾向ではあったが、2週間後の変化量  $0.16 \pm 0.65$  個/日 ( $p = 0.866$ ) および4週間後の変化量  $0.28 \pm 0.68$  個/日 ( $p = 0.631$ ) に有意差は認められなかった。群間で変化量を比較した場合も、摂取2週目 ( $p = 0.644$ ) と摂取4週目 ( $p = 0.358$ ) に有意差は認められなかった。

CAS スコア結果を Table 4-6 および Fig. 4-9 に示す。8項目のうち、群内比較において介入食品群で有意差が認められた項目は、摂取前と摂取4週間後の間での変化量で「便の回数が少ない (排便数)」  $-0.33 \pm 0.70$  ( $p = 0.035$ )、「便の量が少ない (排便量)」  $-0.33 \pm 0.56$  ( $p = 0.039$ )、「便が硬くて出にくい (便硬度)」  $-0.42 \pm 0.83$  ( $p = 0.049$ ) の3項目であった。また、8項目の総得点  $-1.63 \pm 2.89$  においても有意差が認められた ( $p = 0.017$ )。群間比較において介入食品群で有意差が認められた項目は、摂取4週間後において「便の回数が少ない (排便数)」 (介入食品群  $0.13 \pm 0.34$  vs プラセボ食品群  $0.48 \pm 0.51$ ,  $p = 0.007$ )、「便の量が少ない (排便量)」 (介入食品群  $0.13 \pm 0.48$  vs プラセボ食品群  $0.57 \pm 0.51$ ,  $p = 0.001$ ) の2項目あり、8項目の総得点においても有意差 (介入食品群  $1.46 \pm 1.59$  vs プラセボ食品群  $3.30 \pm 3.02$ ,  $p = 0.011$ ) が認められた。

便形スケール結果を Table 4-7 に示す。また、Table 4-7 の結果を基にした摂取前と摂取後の改善指数を Table 4-8 に示す。摂取2週間後において、プラセボ食品群の改善者は2名に対し、介入食品群の改善者は5名であり、両者に有意差 ( $p = 0.220$ ) は認められなかった。しかし、摂取4週間後において、プラセボ食品群の改善者は3名に対し、介入食品群の改善者は11名であり、群間有意差 ( $p = 0.011$ ) が認められた。

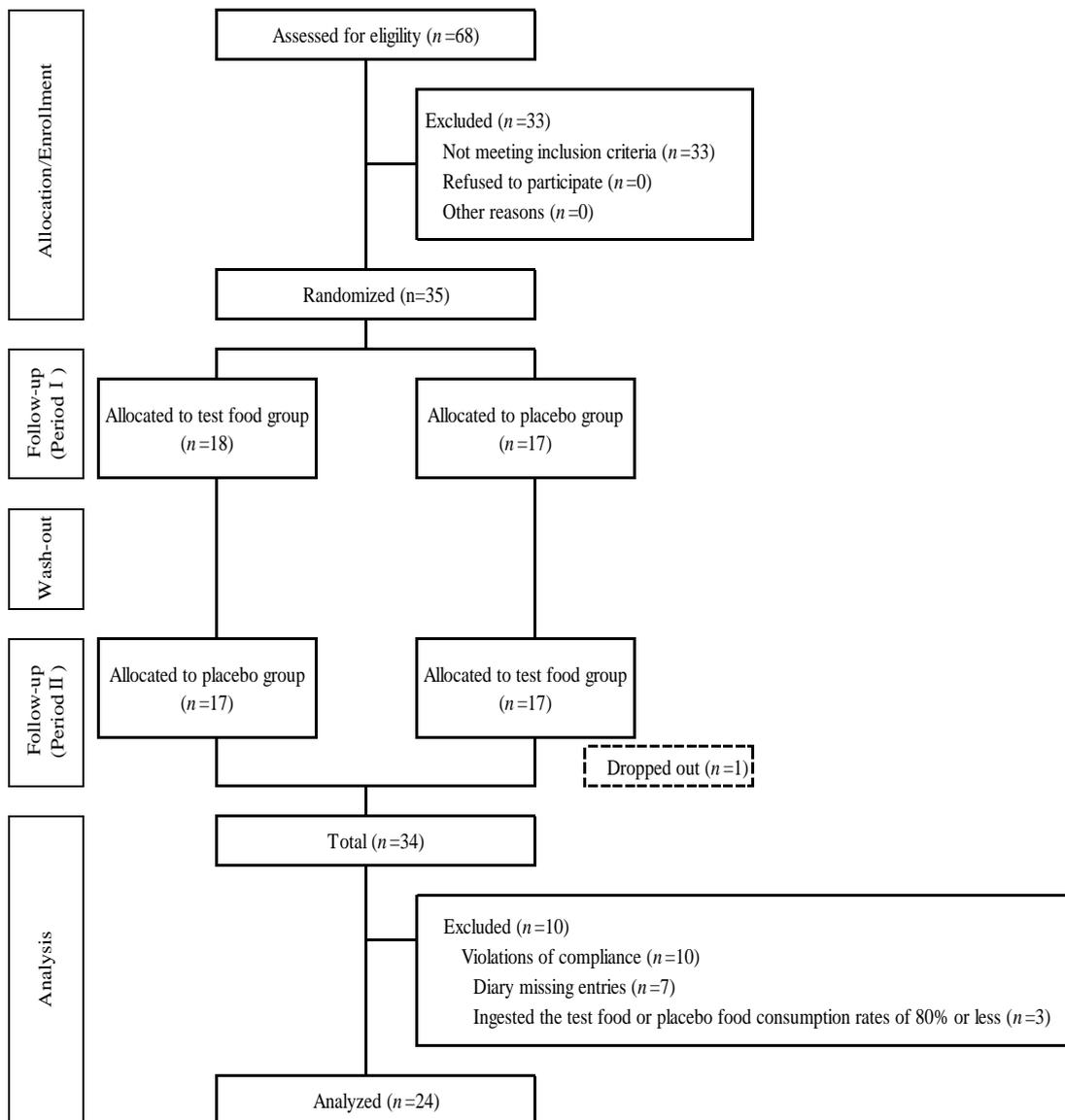


Fig. 4-8. Flow diagram of subject recruitment and retention throughout the course of the study.

Table 4-4. Baseline age and anthropometric characteristics of healthy adolescent women analyzed in the maltobionic acid defecation improvement study.

		Analytical subject population ( <i>n</i> =24)	
Age		51.6	± 5.7
Body height	(cm)	160.2	± 4.8
Body weight	(kg)	53.8	± 7.0
BMI	(kg/m <sup>2</sup> )	21.0	± 2.7

Values are mean ± SD.

Table 4-5. Results of the diet survey of analyzed subjects using a brief-type self-administered diet history questionnaire (BDHQ).

Item	Ingested food	<i>n</i>	Pre-ingestion	Post-4W
Calories	Test food	24	1549 ± 380	1388 ± 406
	Placebo food		1493 ± 437	1414 ± 363
Carbohydrate	Test food	24	197 ± 51	177 ± 54
	Placebo food		199 ± 66	183 ± 48
Protein	Test food	24	61.2 ± 19.6	56.1 ± 19.5
	Placebo food		58.7 ± 20.1	58.0 ± 17.6
Fat	Test food	24	53.9 ± 14.1	48.0 ± 15.8
	Placebo food		48.5 ± 14.2	47.4 ± 14.4
Dietary Fiber	Test food	24	10.1 ± 3.3	9.6 ± 3.3
	Placebo food		10.2 ± 3.5	9.7 ± 2.9

A brief-type self-administered diet history questionnaire (BDHQ) was filled out by participants before the study and after 4 weeks. Values are mean ± SD.

Table 4-6. Results from the analysis of the bowel movement diary and Japanese version of the Constipation Assessment Scale Middle Term version (CAS-MT) of healthy adolescent women who ingested maltobionic acid for 4 weeks.

Item	Ingested food	n	Pre-ingestion	Post-2W	Post-4W	Amount of change	
						Pre-ingestion vs. Post-2W	Pre-ingestion vs. Post-4W
Defecation days (day/week)	Test food	24	4.54 ± 0.66	5.29 ± 1.90	5.88 ± 1.39	0.75 ± 1.59	1.33 ± 1.05 <sup>##</sup>
	Placebo food		4.79 ± 0.93	5.50 ± 1.29	5.46 ± 1.72	0.71 ± 0.91	0.67 ± 1.17
Fecal amount (piece/day)	Test food	24	2.19 ± 1.10	2.34 ± 1.08	2.47 ± 1.42	0.16 ± 0.65	0.28 ± 0.68
	Placebo food		2.24 ± 1.14	2.48 ± 1.25	2.36 ± 1.20	0.24 ± 0.66	0.12 ± 0.55
CAS score	Test food	24	3.08 ± 2.57	2.54 ± 2.02	1.46 ± 1.59 <sup>#</sup>	-0.54 ± 2.36	-1.63 ± 2.89 <sup>##</sup>
	Placebo food		3.17 ± 3.33	3.26 ± 2.38	3.30 ± 3.02	0.09 ± 3.48	0.13 ± 3.48
Abdominal distention or bloating	Test food	24	0.58 ± 0.65	0.54 ± 0.66	0.50 ± 0.59	-0.04 ± 0.62	-0.08 ± 0.72
	Placebo food		0.48 ± 0.73	0.65 ± 0.78	0.52 ± 0.59	0.17 ± 0.49	0.04 ± 0.47
Change in amount of gas passed rectally	Test food	24	0.08 ± 0.28	0.17 ± 0.48	0.13 ± 0.34	0.08 ± 0.28	0.04 ± 0.36
	Placebo food		0.22 ± 0.60	0.30 ± 0.56	0.39 ± 0.66	0.09 ± 0.42	0.17 ± 0.39
Less frequent bowel movements	Test food	24	0.46 ± 0.66	0.21 ± 0.41	0.13 ± 0.34 <sup>#</sup>	-0.25 ± 0.68	-0.33 ± 0.70 <sup>##</sup>
	Placebo food		0.43 ± 0.66	0.39 ± 0.50	0.48 ± 0.51	-0.04 ± 0.71	0.04 ± 0.64
Rectal fullness or pressure	Test food	24	0.42 ± 0.58	0.38 ± 0.58	0.25 ± 0.44	-0.04 ± 0.62	-0.17 ± 0.64
	Placebo food		0.43 ± 0.66	0.57 ± 0.59	0.39 ± 0.50	0.13 ± 0.69	-0.04 ± 0.64
Rectal pain with bowel movement	Test food	24	0.29 ± 0.62	0.25 ± 0.61	0.04 ± 0.20	-0.04 ± 0.46	-0.25 ± 0.68
	Placebo food		0.30 ± 0.56	0.17 ± 0.49	0.30 ± 0.63	-0.13 ± 0.46	0.00 ± 0.60
Small stool size	Test food	24	0.46 ± 0.59	0.33 ± 0.48	0.13 ± 0.34 <sup>#</sup>	-0.13 ± 0.61	-0.33 ± 0.56 <sup>##</sup>
	Placebo food		0.48 ± 0.59	0.43 ± 0.51	0.57 ± 0.51	-0.04 ± 0.47	0.09 ± 0.60
Urge but inability to pass stool	Test food	24	0.67 ± 0.82	0.63 ± 0.65	0.25 ± 0.44	-0.04 ± 0.69	-0.42 ± 0.83 <sup>##</sup>
	Placebo food		0.48 ± 0.67	0.61 ± 0.66	0.52 ± 0.67	0.13 ± 0.63	0.04 ± 0.71
Oozing liquid stool	Test food	24	0.13 ± 0.34	0.04 ± 0.20	0.04 ± 0.20	-0.08 ± 0.28	-0.08 ± 0.28
	Placebo food		0.04 ± 0.21	0.04 ± 0.21	0.04 ± 0.21	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

The study food was evaluated in a crossover study in which one pack (4 g) per day was consumed for 4 weeks and the Wash out times were 2 weeks apart. The CAS-MT includes eight items, each of which is self-rated by the participants as 'no problem' (score of 0), 'some problem' (score of 1), or 'severe problem' (score of 2). The item ratings are then summed, so the overall score may range from 0 (no constipation) to 16 (worst possible constipation). Values are mean ± SD. <sup>#</sup> $P < 0.05$  (vs. Pre-ingestion). <sup>##</sup> $P < 0.05$  (vs. Placebo food).

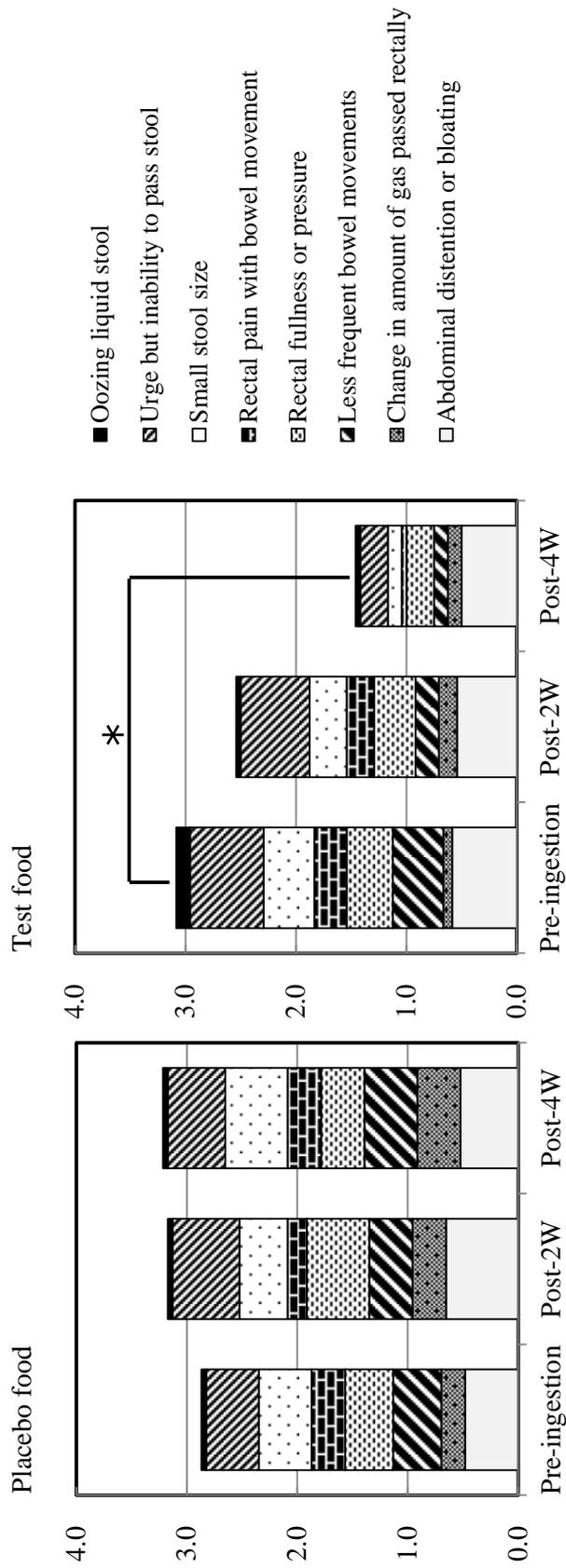


Fig. 4-9. Effect of ingestion of maltobionic acid on improving the subjective symptoms of constipation in healthy adolescent women.  
\* $P < 0.05$  (vs. Pre-ingestion).

Table 4-7. Serial changes in Bristol stool scale in healthy adolescent women who ingested maltobionic acid for 4 weeks.

Ingested food	<i>n</i>	Watery, no solid pieces, entirely liquid	Fluffy pieces with ragged edges, a mushy stool	Soft blobs with clear cut edges	Like a sausage or snake, smooth and soft	Like a sausage but with cracks on its surface	Sausage-shaped, but lumpy	Separate hard lumps, like nuts
Pre-ingestion								
Test food	24	0	0	2	8	5	7	2
Placebo food		0	1	2	9	7	3	2
Post-2W								
Test food	24	0	1	1	10	3	7	2
Placebo food		0	0	2	12	2	5	3
Post-4W								
Test food	24	0	0	2	13	6	2	1
Placebo food		0	1	2	8	4	5	4

Bristol stool scale scores for participants at three timepoints.

Table 4-8. Improvement in Bristol stool scale in healthy adolescent women who ingested maltobionic acid for 4 weeks.

	Ingested food	<i>n</i>	Improvement	No improvement	<i>p</i> value
Pre-ingestion vs. Post-2W	Test food	24	5	19	0.220
	Placebo food		2	22	
Pre-ingestion vs. Post-4W	Test food	24	11	13	0.011
	Placebo food		3	21	

Distribution of participants showing improvement or no improvement during study intervals. Patient scores moving towards "Like a sausage or snake, smooth and soft" were defined as "Improvement", otherwise scores moving away or with no change were defined as "No improvement". The number of relevant participants is indicated.

#### 4.4.4 考察

本試験は便秘傾向にある日本人成人女性を対象としたものであり、マルトビオン酸による便通改善効果の検証を目的として実施した。その結果、マルトビオン酸 Ca を主成分とするオリゴ糖 4g を 4 週間摂取することで有意な便通改善効果が認められた。女性は男性と比較して幅広い世代で便秘症状を持つ人の割合が多く、また加齢に伴い便秘症状を持つ人は顕著になることが知られている [65]。女性に便秘が多いのは筋力が低く、腸の蠕動運動が弱いことに加えて、女性ホルモンによる影響が考えられる。便秘症状がある人は、便秘症状がない人と比べて、死亡リスクや心血管疾患（心筋梗塞、脳卒中などの心臓・血管系の病気）の発症リスクが高いことが報告されており、健康寿命の延伸という観点においても、便秘の改善は重要である [89]。

マルトビオン酸 Ca を主成分とするオリゴ糖 4g の摂取で Bristol stool scale は、カチカチ状からバナナ状に近づき、CAS スコアについても「便の回数が少ない（排便数）」、「便の量が少ない（排便量）」、「便が硬くて出にくい（便硬度）」の 3 つで有意な改善が確認された。先述の腸内細菌増殖選択性試験では、マルトビオン酸は腸内細菌の増殖選択性が高く、腸内細菌に資化され難い結果が得られたことから、ヒト腸内において腸内細菌叢への働きが緩やかであり、有意差が得られるまでに 4 週間を要した可能性がある。水溶性食物繊維においては腸管内の水を吸収し、便の保水性の増加により、便の硬さや容積が改善することが知られている [90,91]。マルトビオン酸 Ca は腸内細菌による資化性が低く、腸管内に留まることで浸透圧差が発生し、水を便に引き寄せると考えられる。このためマルトビオン酸 Ca を継続摂取することで、便中の水分が増加し、排便し易い適度な柔らかさに移行し、便秘の自覚症状に改善が見られたと推察される。

今後、マルトビオン酸による便通改善効果並びに生体調節機能のメカニズムを解明するには、マ

ルトビオン酸摂取前後の糞便を次世代シーケンサー等で分析し、ヒトの腸内細菌叢に及ぼす影響を調べる必要がある。

#### 4.5 まとめ

本章ではマルトビオン酸の *in vitro* 消化性、腸内細菌増殖選択性、ヒトにおける生理効果を調べた。マルトビオン酸はマルチトールと同等かそれ以上の消化耐性を持ち、腸内細菌増殖選択制が高いことが明らかとなった。また、便秘傾向の健常者に対して、マルトビオン酸 Ca を含むオリゴ糖 4g (マルトビオン酸として 2.4g) を継続摂取することで便秘改善効果が認められた。日本人女性は幅広い世代で便秘に悩んでいることから、マルトビオン酸は特に女性の QOL 向上に役立つものと期待される。

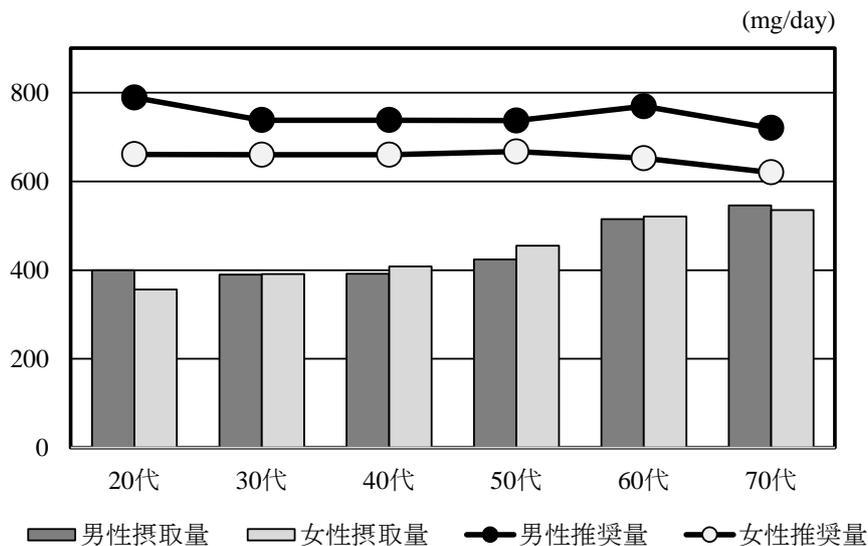
## 第5章 マルトビオン酸 Ca の骨密度改善機能

### 5.1 序

健康な骨の維持には成長期における十分な最大骨量の確保と、骨量がピークを迎えた 20 代以降の骨量維持が重要であり、骨の主成分であるカルシウムの適切な摂取が求められる。しかしながら、カルシウムは厚生労働省により実施されている国民健康栄養調査結果 (Fig. 5-1) において、すべての年代で推奨摂取量を下回っている。骨の疾患である骨粗鬆症は、「低骨量と骨組織の微細構造の異常を特徴とし、骨の脆弱性が増し、骨折の危険性が增大する疾患」[92]、或いは「骨強度の低下を特徴とし、骨折のリスクが増大しやすくなる骨格疾患」[93]と定義されている。日本の骨粗鬆症患者数は、男性 300 万、女性 980 万人、合計 1280 万人と推定されており[94]、特に 50 代以降の高齢女性に多い疾患である。現在、日本では少子高齢化が進んでいる。2035 年には 50 歳以上の人口は総人口の半分以上になると予想されており[95]、生活習慣病者の増加によって、これまで以上に医療費が必要になることが懸念されている。そのため、高齢者の健康寿命を如何に伸ばすかが重要視される。特に高齢者の骨折は QOL を大きく低下させるため、骨折リスクを低減させる必要がある。

カルシウムの貯蔵庫である骨は、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成の繰り返しによって維持されており、骨密度の低下は、骨吸収の亢進が骨形成を上回るために起こる[96-98]。女性においては、閉経に伴うエストロゲンの欠乏が破骨細胞の活性化を誘導することが知られている[99]。男性においても、骨密度低下作用は加齢に伴うエストロゲンの減少によるものと報告されている[100]。また、加齢に伴うカルシウムの吸収能低下も骨密度低下の要因となる[101, 102]。骨粗鬆症予防においては、骨代謝のバランスを整え、カルシウムを効率良く摂取することが重要である。

マルチビオン酸はカルシウムなどのミネラル塩の可溶化に優れており[14]、腸管内においてもその効果を維持する。したがって小腸内のカルシウムは吸収され易い状態にあり、カルシウムの体内吸収を増進させる働きを持つと考えられている[103]。また、マウス大腿骨から採取した骨髄細胞を用いた初代培養細胞分化系において、マルチビオン酸やマルチビオン酸 Ca は破骨細胞分化を抑制することが明らかにされている[104]。こうした背景の下、本章ではマルチビオン酸 Ca をヒトが継続的に摂取した場合の骨代謝マーカーおよび骨密度への影響を明らかにすることを目的とした。



平成30年度 国民健康栄養調査[105], 日本人の食事摂取基準(2020年度版)[106]より作図

Fig. 5-1. Calcium intake status of Japanese classified by generation.

## 5.2 方法

### 試験参加者

本試験はランダム化プラセボ対照二重盲検・並行群間非盲比較試験で実施した。試験参加者は 50 歳以上 69 歳以下で、閉経（自然閉経）後 1 年以上経過したと自覚する日本人成人女性を対象とし、次の除外基準に抵触しない者を選抜した。(a) 悪性腫瘍、心不全、心筋梗塞の治療の既往歴がある者、(b) 疾患等がある者（不整脈、肝障害、腎障害、脳血管障害、リウマチ、糖尿病、脂質異常症、高血圧、その他の慢性疾患）、(c) 医薬品（漢方薬を含む）・サプリメントを常用している者、(d) 特定保健用食品、機能性表示食品を日頃から摂取している者、(e) カルシウム、ビタミン D、ビタミン K、マグネシウム、イソフラボン(ダイゼイン、ゲニステイン、エクオール等も含む)などの骨代謝に影響を及ぼすサプリメント・特定保健用食品、機能性表示食品、栄養機能食品を 1 週間当たり 1 回以上食べている者、(f) アレルギー(医薬品・試験食品関連食品)がある者、(g) 同意書の取得日以前の 3 ヶ月以内に他の臨床試験に参加した者、(h) その他、試験責任医師が本試験の対象として不適切と判断した者。尚、本試験実施計画は、医療法人社団盛心会タカラクリニック（東京都品川区）の倫理委員会にて 2016 年 12 月 9 日に承認（承認番号 1612-1611-ST03-04-TC）を得た。また、ヘルシンキ宣言（2013）および人を対象とする医学系研究に関する倫理指針の趣旨にのっとり、医学的倫理に十分配慮して実施した。

試験参加同意した試験参加者 45 名のうち、スクリーニング兼摂取前検査時の骨密度測定の結果、左大腿骨頸部または腰椎正面総量の若年成人平均値（YAM 値）が 72～100%の者を試験適格者とした。なお骨密度は個人別に数値の低い部位の値を採用した。その後、スクリーニング検査時の左大腿骨頸部および腰椎正面総量の骨密度の平均値と標準偏差、年齢が大きく異ならないように介入食

品群またはプラセボ食品群に 17 名ずつ割付けた。割付けは、Statlight #11 ((株)ユックムス) を用い、介入実施者の試験コントローラーにより実施した。

### 介入およびプラセボ食品

介入食品にはマルトビオン酸 Ca を主成分とするオリゴ糖 (商品名:サワーオリゴ C、サンエイ糖化 (株)) の顆粒粉末 1 包 (4 g) を用いた。この介入食品は、固形分 94.7%、カルシウム 4.4%、マルトビオン酸 60.3%、マルトトリオン酸 16.7%、その他四糖以上のマルトオリゴ糖酸 13.3%であった。また、プラセボ食品は 89.0%含水結晶マルトース ((株) 林原) と 11.0%炭酸カルシウム (三共製粉 (株)) の混合顆粒粉末 1 包 (4 g) を用い、カルシウム含有配合量が 176 mg (介入食品と同じカルシウム量) となるように配合した。試験食品の形状はいずれも粉状で、同型のスティック包装であり、試験開始前の倫理審査時に介入食品とプラセボ食品は、色、においによって区別できないことを確認した。試験参加者は、試験食品 1 日 2 包 (8 g) を食後のタイミングで、水またはぬるま湯と共に摂取した。介入期間は 24 週間とした。

### 評価

骨に関する測定では、X 線検査は Discovery X 線骨密度測定装置 (Hologic, Inc、米国) を用いて、二重エネルギー X 線吸収測定法 (DEXA 法) により、腰椎正面総量 (L2~L4 レベル) および、左大腿骨 (頸部、転子、インター、総量、ワーズ) の骨密度、骨面積、骨塩量、YAM 値、T-スコア、Z スコアを摂取前検査、摂取 12 週間後、摂取 24 週間後にメディカルスキャニングにて測定した。YAM 値は、若年齢の平均骨密度値を 100 %として、被験者骨密度値と比較した値であり、80%以上が正

常、70%以下は骨粗鬆症と診断される。Tスコアは、若年齢の平均骨密度値を0として、この平均値からどのくらい隔たっているかを標準偏差として表した値であり、-1以上が正常であり、-2.5以下が骨粗鬆症と診断されている。Zスコアは、同年齢の平均骨密度値からどのくらい隔たっているかを標準偏差として表した値である。

骨代謝マーカーに関する末梢血液の測定は、試験参加者より静脈血を約19 ml採血し、酵素免疫測定法(EIA)にて、骨型酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ(TRACP-5b)、オステオカルシン(OC)、骨型アルカリフォスファターゼ(BAP)を測定した。TRACP-5bは破骨細胞にのみ存在する酵素であり、骨吸収の亢進に伴って血中に漏出することから、骨の破骨活性を推測することができ、骨吸収マーカーとして利用されている。OCおよびBAPはいずれも骨芽細胞に存在し、主にBAPは骨芽細胞分化の初期から中期、OCは後期に働く酵素である。その測定により骨形成活性を推測することができ、骨形成マーカーとして利用されている。

摂取前検査、摂取12週間後、摂取24週間後に、簡易型自記式食事暦法質問票(BDHQ)によって直近1か月間の摂取栄養素のアンケート調査を実施した。

## 統計解析

すべてのアウトカムは摂取前、摂取12週間後、摂取24週間後の群内比較と群間比較で検討した。群内比較は、時期と試験参加者を固定因子としたDunnnett検定を用いて、摂取前と摂取12週間後、摂取前と摂取24週間後の測定値を比較した。群間比較は、各時点の測定値と変化量を介入食品群とプラセボ食品群とで比較し、変化量は摂取12週間後または摂取24週間後の測定値から摂取前の測定値を減算した値とした。摂取前の測定値および変化量はStudentのt検定、摂取12週間後と摂取

24 週間後の測定値は、摂取前の測定値を共変量とした ANCOVA を用いて群間比較した。すべての統計解析は両側検定で有意水準 5% に設定し、Windows 版 SPSS (Ver.23.0、日本 IBM) および Microsoft Excel 2007、2013 (日本マイクロソフト (株)) を用いて実施した。なお、他時点、他項目における多重性は考慮しないこととした。

### 5.3. 結果

試験参加者の追跡フローチャートを Fig. 5-2 に示す。本試験参加に同意した 49 名のうち試験責任医師の間診や選抜基準により 15 名を除外したため、34 名を本試験に組み入れ、全員が試験を完遂した。ビタミン D、ビタミン K およびカルシウムは骨量、骨密度を維持することが知られており [107-109]、本試験の介入食品と類似した効果が期待される。したがって、これらの栄養素を目安量および推奨量を越えて摂取した場合、試験食品の効果が正しく評価できないと考えた。このため、試験終了後の症例検討会にて試験前に設定した基準である介入期間中にビタミン D、ビタミン K の目安摂取量およびカルシウムの推奨摂取量 [107] を超過した 11 名と、日誌の提出並びに試験食品の返却がなく、遵守事項を守っているか判断できない 4 名とを解析対象から除外し、プラセボ食品群 11 名 (56.5 ± 5.8 歳)、介入食品群 8 名 (55.5 ± 3.5 歳) を解析対象者とした。解析対象者数 19 名の背景を Table 5-1 に示す。

左大腿骨の骨密度測定結果を Table 5-2 に示す。群内比較において介入食品群では摂取前と摂取 24 週間後との間での左大腿骨転子の Z-スコア (+39.5%、 $p=0.037$ ) に有意な増加が認められた。一方、プラセボ食品群では、摂取前と摂取 12 週間後との間での左大腿骨ワーズの骨面積 (-4.3%、 $p=0.028$ )、左大腿骨ワーズの骨塩量 (-11.0%、 $p=0.043$ ) に有意な低下が認められた。また、摂取前と摂取 24

週間後との間での左大腿骨頸部の Tスコア (-12.4%、 $p=0.048$ )、左大腿骨頸部の Zスコア (-108.3%、 $p=0.028$ )、左大腿骨インターの YAM (-1.9%、 $p=0.035$ ) にも有意な低下が確認された。群間での比較では、摂取 24 週間後における介入食品群の左大腿骨頸部の Zスコア ( $p=0.047$ ) は、プラセボ食品群の値よりも有意に高い結果を示した。また、群間での変化量も、摂取 24 週間後において介入食品群の左大腿骨頸部の Zスコア ( $p<0.050$ ) は、プラセボ食品群の結果より有意に高い値が確認された。

腰椎正面の骨密度測定結果を Table 5-3 に示す。群内比較において、介入食品群では摂取前と摂取 12 週間後との間での腰椎正面 L3 の骨面積 (+3.7%、 $p=0.007$ )、摂取前と摂取 24 週間後との間での腰椎正面 L2 の骨面積 (+1.9%、 $p=0.043$ ) に有意な増加が認められた。一方、プラセボ食品群では摂取前と摂取 12 週間後との間での腰椎正面 L2 の骨密度 (-2.4%、 $p<0.050$ )、腰椎正面 L4 の骨密度 (-2.9%、 $p=0.033$ )、腰椎正面 L4 の Tスコア (-13.3%、 $p=0.040$ )、腰椎正面総量の骨密度 (-2.7%、 $p=0.010$ )、腰椎正面総量の Tスコア (-13.3%、 $p=0.008$ )、腰椎正面総量の YAM (-2.7%、 $p=0.015$ )、腰椎正面総量の Zスコア (-71.4%、 $p=0.040$ )、腰椎正面総量の AM (-2.1%、 $p=0.044$ ) に有意な低下が確認された。また、摂取前と摂取 24 週間後との間では、腰椎正面総量の Tスコア (-10.1%、 $p=0.043$ ) に有意な低下が認められた。群間比較では、摂取 12 週間後において介入食品群の腰椎正面 L3 の骨塩量 ( $p=0.019$ ) および腰椎正面総量の AM ( $p=0.039$ ) にてプラセボ食品群よりも有意に高い結果を示した。また、摂取 24 週間後において、介入食品群の腰椎正面 L4 の骨密度 ( $p=0.012$ )、腰椎正面 L4 の Tスコア ( $p=0.006$ )、腰椎正面 L4 の YAM ( $p=0.009$ )、腰椎正面 L4 の Zスコア ( $p=0.005$ )、腰椎正面 L4 の AM ( $p=0.012$ )、腰椎正面総量の骨密度 ( $p=0.038$ )、腰椎正面総量の Tスコア ( $p=0.036$ )、腰椎正面総量の YAM ( $p=0.043$ )、腰椎正面総量の Zスコア ( $p$

=0.025)、腰椎正面総量の AM ( $p=0.029$ ) はプラセボ食品群よりも有意に高い結果を示した。群間での変化量を比較すると、摂取 12 週間後において介入食品群の腰椎正面 L3 の骨塩量 ( $p=0.027$ )、腰椎正面総量の骨密度 ( $p<0.050$ )、腰椎正面総量の T-スコア ( $p=0.047$ )、腰椎正面総量の AM ( $p=0.030$ ) はプラセボ食品群よりも有意に高い結果を示した。また、摂取 24 週間後では、介入食品群の腰椎正面 L2 の骨塩量 ( $p=0.042$ )、腰椎正面 L4 の骨密度 ( $p=0.008$ )、腰椎正面 L4 の T-スコア ( $p=0.004$ )、腰椎正面 L4 の YAM ( $p=0.006$ )、腰椎正面 L4 の Z-スコア ( $p=0.003$ )、腰椎正面 L4 の AM ( $p=0.008$ )、腰椎正面総量の骨密度 ( $p=0.031$ )、腰椎正面総量の T-スコア ( $p=0.029$ )、腰椎正面総量の YAM ( $p=0.035$ )、腰椎正面総量の Z-スコア ( $p=0.021$ )、腰椎正面総量の AM ( $p=0.022$ ) はプラセボ食品群より有意に高い結果が確認された。

腰椎正面の骨密度変化量を Fig. 5-3 に示す。プラセボ摂取群は摂取 12 週間後 $-2.805\pm 0.915$ 、24 週間後 $-2.125\pm 0.759$  と骨密度が低下傾向となっていたのに対して、介入食品摂取群では摂取 12 週間後 $+0.452\pm 1.145$ 、24 週間後 $+0.759\pm 0.638$  と骨密度が有意に増加することが確認された。

骨代謝マーカーに関する末梢血液検査結果を Table 5-4 に示す。群内比較において介入食品群で有意差が認められた項目は、摂取前と摂取 12 週間後との間での骨型アルカリフォスファターゼ (BAP;  $-23.6\%$ 、 $p=0.048$ ) であった。プラセボ食品群については、摂取前と摂取 12 週間後との間での BAP ( $-12.8\%$ 、 $p<0.001$ ) であった。群内比較においては、摂取 12 週間後にて介入食品群の BAP ( $p=0.035$ ) はプラセボ食品群の結果よりも有意に低かった。

TRACP-5b の経時変化を Fig. 5-4 に示す。プラセボ食品群は摂取前から摂取 24 週間までに変動しなかったが、介入食品群では摂取前から摂取 24 週間までの間で徐々に低下し、摂取 24 週間後 ( $p=0.095$ ) および摂取前から摂取 24 週間後の変化量 ( $p=0.096$ ) において群間傾向差が確認された。

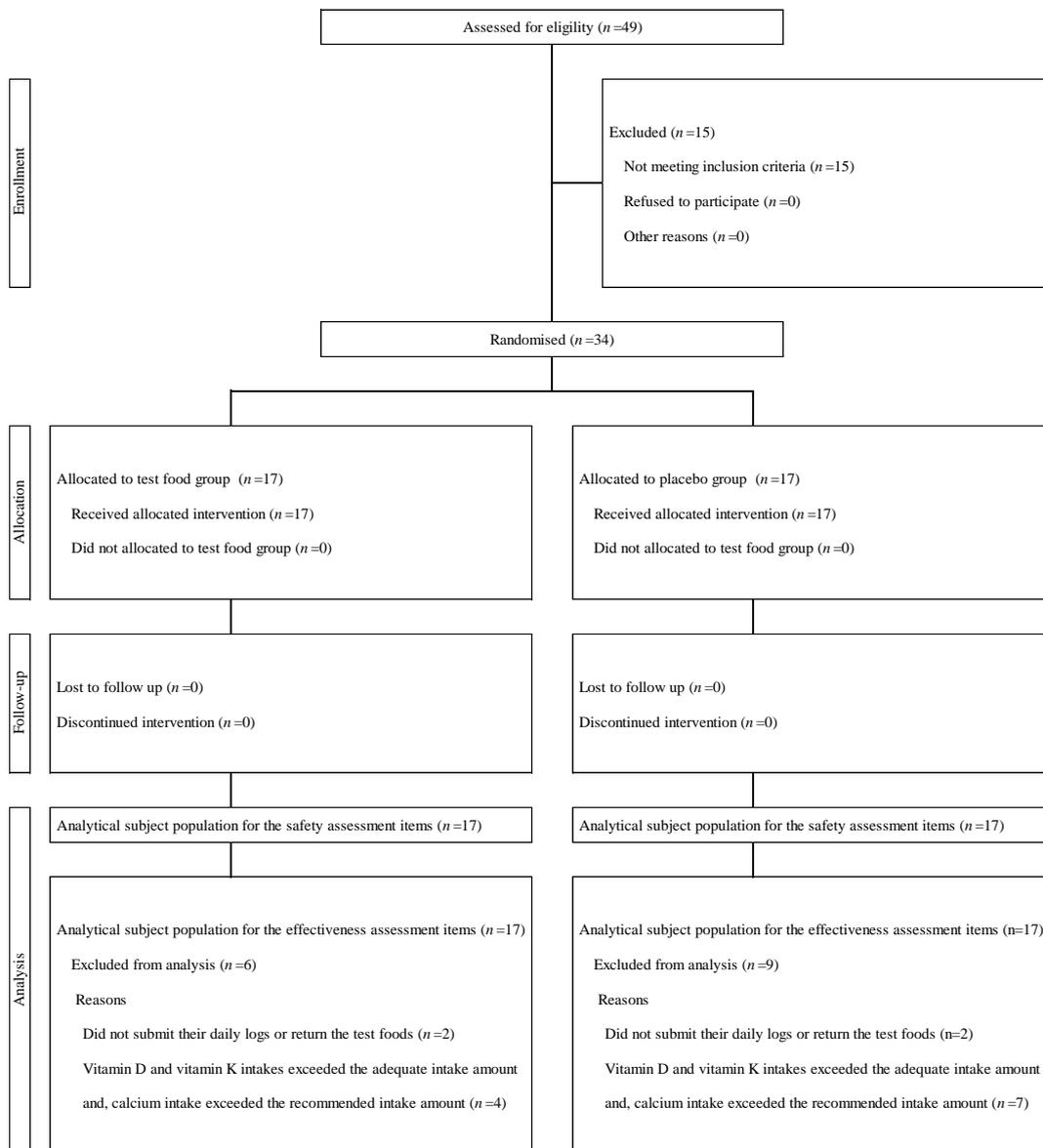


Fig. 5-2. Follow-up flow chart for the participants.

Table 5-1. Characteristics of subjects.

		Test food group ( <i>n</i> =8)	Placebo group ( <i>n</i> =11)
Body height	cm	157.9 ± 6.9	153.9 ± 4.3
Body weight	kg	49.0 ± 2.1	52.7 ± 7.4
BMI	kg/m <sup>2</sup>	19.8 ± 2.0	22.2 ± 2.7
Body fat percenta	%	23.7 ± 5.6	27.1 ± 5.3
BP	mmHg	115.1 ± 6.5	129.2 ± 17.7
Diastolic BP	mmHg	73.6 ± 8.6	78.0 ± 11.9
Pulse	bpm	73.9 ± 13.0	67.5 ± 6.7

Values are mean ± SD.

Table 5-2. Changes in Left femur (neck, trochanter, inter, Ward's and total mass).

	Group	n	Pre-ingestion	Post-12W	Post-24W	Pre-ingestion vs. Post-12W		Pre-ingestion vs. Post-24W	
						Amount of change	Rate of change (%)	Amount of change	Rate of change (%)
BMD (neck)	Test food	8	0.64 ± 0.04	0.64 ± 0.024	0.63 ± 0.02	0.00 ± 0.01	0.41	0.00 ± 0.02	-0.56
	Placebo	11	0.63 ± 0.07	0.64 ± 0.024	0.62 ± 0.02	0.00 ± 0.03	-0.39	-0.02 ± 0.02	-2.77
Bone area (neck)	Test food	8	4.35 ± 0.39	4.49 ± 0.136	4.51 ± 0.14	0.02 ± 0.13	0.55	0.05 ± 0.08	1.09
	Placebo	11	4.57 ± 0.21	4.51 ± 0.134	4.50 ± 0.14	0.02 ± 0.13	0.44	0.01 ± 0.17	0.16
BMC (neck)	Test food	8	2.80 ± 0.30	2.88 ± 0.151	2.89 ± 1.02	0.03 ± 0.12	0.89	0.02 ± 0.09	0.62
	Placebo	11	2.90 ± 0.38	2.86 ± 0.150	2.78 ± 0.12	0.00 ± 0.16	0.06	-0.07 ± 0.15	-2.54
T-score (neck)	Test food	8	-1.33 ± 0.37	-1.33 ± 0.230	-1.39 ± 0.20	0.04 ± 0.12	2.83	-0.03 ± 0.23	-1.89
	Placebo	11	-1.39 ± 0.63	-1.40 ± 0.230	-1.53 ± 0.20	-0.04 ± 0.27	-2.61	-0.17 ± 0.21	-12.42 *
YAM value (neck)	Test food	8	81.75 ± 5.23	72.54 ± 16.90	80.27 ± 2.02	-8.25 ± 25.37	-10.09	-0.63 ± 3.11	-0.76
	Placebo	11	80.45 ± 8.72	80.88 ± 16.89	78.90 ± 2.87	-0.27 ± 3.47	-0.34	-2.18 ± 2.89	-2.71
Z score (neck)	Test food	8	-0.15 ± 0.45	-0.15 ± 0.26	-0.18 ± 0.24	0.04 ± 0.18	25.00	0.01 ± 0.26	8.33
	Placebo	11	-0.22 ± 0.73	-0.18 ± 0.26	-0.42 ± 0.24	0.01 ± 0.29	4.17	-0.24 ± 0.25	-108.33 *
AM value (neck)	Test food	8	97.75 ± 6.48	97.98 ± 3.63	96.91 ± 3.02	0.75 ± 2.43	0.77	-0.25 ± 4.03	-0.26
	Placebo	11	96.82 ± 11.14	-0.18 ± 0.26	94.97 ± 3.62	-0.18 ± 4.12	-0.19	-2.27 ± 3.29	-2.35
Bone density (trochanter)	Test food	8	0.57 ± 0.06	0.54 ± 0.019	0.56 ± 1.02	0.00 ± 0.02	-0.55	0.02 ± 0.03	2.67
	Placebo	11	0.53 ± 0.08	0.55 ± 0.019	0.55 ± 0.02	0.01 ± 0.02	1.16	0.00 ± 0.01	0.07
Bone area (trochanter)	Test food	8	10.09 ± 1.38	10.04 ± 0.708	10.25 ± 0.81	-0.09 ± 0.65	-0.93	0.10 ± 0.79	0.95
	Placebo	11	10.19 ± 0.86	10.10 ± 0.708	10.24 ± 0.81	-0.07 ± 0.83	-0.64	0.09 ± 0.81	0.92
Bone mineral content (trochanter)	Test food	8	5.70 ± 0.96	5.48 ± 0.415	5.76 ± 2.02	-0.08 ± 0.29	-1.40	0.21 ± 0.43	3.75
	Placebo	11	5.44 ± 0.88	5.58 ± 0.414	5.60 ± 0.50	0.04 ± 0.47	0.69	0.05 ± 0.51	0.90
T-score (trochanter)	Test food	8	-1.71 ± 1.08	-2.07 ± 0.366	-1.74 ± 0.37	-0.04 ± 0.34	-2.19	0.29 ± 0.46	16.79
	Placebo	11	-2.27 ± 1.36	-1.92 ± 0.364	-2.03 ± 0.37	0.13 ± 0.36	5.60	0.02 ± 0.25	0.80
YAM value (trochanter)	Test food	8	85.50 ± 9.17	82.45 ± 2.822	85.37 ± 3.02	-0.38 ± 2.88	-0.44	2.50 ± 3.96	2.92
	Placebo	11	80.82 ± 11.43	83.77 ± 2.810	82.73 ± 3.14	1.00 ± 2.57	1.24	0.00 ± 2.14	0.00
Z score (trochanter)	Test food	8	0.95 ± 1.01	0.57 ± 0.347	0.98 ± 0.39	-0.04 ± 0.37	-3.95	0.38 ± 0.49	39.47 *
	Placebo	11	0.35 ± 1.41	0.70 ± 0.346	0.61 ± 0.38	0.11 ± 0.30	31.58	0.02 ± 0.26	5.26
AM value (trochanter)	Test food	8	110.63 ± 11.17	107.81 ± 3.684	111.57 ± 4.02	-0.13 ± 3.80	-0.11	3.63 ± 5.34	3.28
	Placebo	11	105.82 ± 19.28	109.14 ± 3.677	108.59 ± 4.06	1.36 ± 3.44	1.29	0.82 ± 2.60	0.77

Table 5-2. (continued).

	Group	n	Pre-ingestion	Post-12W	Post-24W	Pre-ingestion vs. Post-12W		Pre-ingestion vs. Post-24W	
						Amount of change	Rate of change (%)	Amount of change	Rate of change (%)
Bone density (inter)	Test food	8	0.89 ± 0.08	0.88 ± 0.035	0.89 ± 2.02	-0.01 ± 0.05	-0.93	-0.01 ± 0.04	-0.93
	Placebo	11	0.90 ± 0.06	0.89 ± 0.035	0.88 ± 0.03	0.00 ± 0.02	-0.13	-0.02 ± 0.03	-1.83
Bone area (inter)	Test food	8	16.89 ± 3.36	18.04 ± 1.203	18.01 ± 1.12	0.77 ± 1.84	4.54	0.37 ± 1.19	2.19
	Placebo	11	18.14 ± 1.89	18.63 ± 1.198	17.74 ± 1.11	0.76 ± 1.56	4.20	0.14 ± 0.97	0.75
Bone mineral content (inter)	Test food	8	14.98 ± 3.09	16.14 ± 1.632	15.94 ± 3.02	0.64 ± 2.05	4.25	0.14 ± 0.82	0.95
	Placebo	11	16.26 ± 2.18	16.55 ± 1.624	15.55 ± 0.94	0.66 ± 1.47	4.09	-0.12 ± 1.01	-0.74
T-score (inter)	Test food	8	-1.56 ± 0.79	-1.60 ± 0.337	-1.58 ± 0.30	-0.09 ± 0.45	-5.60	-0.08 ± 0.35	-4.80
	Placebo	11	-1.48 ± 0.62	-1.53 ± 0.337	-1.68 ± 0.30	-0.01 ± 0.20	-0.61	-0.15 ± 0.27	-10.43
YAM value (inter)	Test food	8	84.50 ± 7.82	84.26 ± 3.239	84.31 ± 4.02	-0.75 ± 4.33	-0.89	-0.75 ± 3.11	-0.89
	Placebo	11	85.36 ± 6.25	85.00 ± 3.238	83.32 ± 2.79	0.00 ± 1.90	0.00	-1.64 ± 2.62	-1.92 *
Z score (inter)	Test food	8	0.70 ± 0.85	0.70 ± 0.378	0.69 ± 0.35	-0.03 ± 0.51	-3.57	-0.04 ± 0.38	-5.36
	Placebo	11	0.74 ± 0.67	0.71 ± 0.378	0.57 ± 0.35	-0.01 ± 0.22	-1.23	-0.15 ± 0.33	-19.75
AM value (inter)	Test food	8	108.25 ± 9.50	108.96 ± 4.300	109.30 ± 5.02	-0.88 ± 5.72	-0.81	-0.63 ± 4.44	-0.58
	Placebo	11	111.00 ± 11.64	109.85 ± 4.294	108.24 ± 4.09	0.00 ± 2.53	0.00	-1.55 ± 3.64	-1.39
Bone density (Ward's triangle)	Test food	8	0.52 ± 0.09	0.48 ± 0.069	0.48 ± 3.02	-0.03 ± 0.04	-4.85	-0.03 ± 0.04	-5.41
	Placebo	11	0.50 ± 0.11	0.47 ± 0.069	0.48 ± 0.04	-0.04 ± 0.08	-7.17	-0.02 ± 0.05	-4.05
Bone area (Ward's triangle)	Test food	8	1.14 ± 0.10	1.14 ± 0.096	1.12 ± 0.07	-0.01 ± 0.14	-0.77	-0.05 ± 0.09	-4.28
	Placebo	11	1.19 ± 0.08	1.13 ± 0.096	1.15 ± 0.07	-0.05 ± 0.07	-4.34 *	-0.03 ± 0.05	-2.21
Bone mineral content (Ward's triangle)	Test food	8	0.60 ± 0.12	0.56 ± 0.104	0.54 ± 4.02	-0.03 ± 0.09	-5.04	-0.06 ± 0.07	-9.24
	Placebo	11	0.59 ± 0.14	0.53 ± 0.104	0.56 ± 0.06	-0.07 ± 0.11	-11.04 *	-0.03 ± 0.06	-5.67
T-score (Ward's triangle)	Test food	8	-1.69 ± 0.65	-1.95 ± 0.532	-1.98 ± 0.33	-0.18 ± 0.33	-10.37	-0.20 ± 0.31	-11.85
	Placebo	11	-1.87 ± 0.81	-2.07 ± 0.532	-1.95 ± 0.33	-0.26 ± 0.64	-14.08	-0.15 ± 0.37	-7.77
YAM value (Ward's triangle)	Test food	8	70.38 ± 11.76	65.47 ± 9.391	64.78 ± 5.02	-3.38 ± 5.76	-4.80	-4.00 ± 5.35	-5.68
	Placebo	11	67.09 ± 14.53	63.30 ± 9.379	65.44 ± 5.64	-4.91 ± 11.32	-7.32	-2.82 ± 6.19	-4.20
Z score (Ward's triangle)	Test food	8	1.04 ± 1.09	0.59 ± 0.954	0.59 ± 0.57	-0.33 ± 0.75	-31.33	-0.33 ± 0.66	-31.33
	Placebo	11	0.75 ± 1.40	0.38 ± 0.953	0.58 ± 0.57	-0.45 ± 1.12	-60.98	-0.25 ± 0.63	-34.15
AM value (Ward's triangle)	Test food	8	117.50 ± 17.92	110.09 ± 15.389	109.96 ± 6.02	-5.25 ± 10.51	-4.47	-5.38 ± 9.52	-4.57
	Placebo	11	112.55 ± 22.53	106.66 ± 15.370	110.48 ± 8.97	-7.45 ± 18.52	-6.62	-3.64 ± 10.42	-3.23

Table 5-2. (continued).

	Group	n	Pre-ingestion	Post-12W	Post-24W	Pre-ingestion vs. Post-12W		Pre-ingestion vs. Post-24W	
						Amount of change	Rate of change (%)	Amount of change	Rate of change (%)
Bone density (total mass)	Test food	8	0.75 ± 0.06	0.75 ± 0.03	0.75 ± 4.02	0.00 ± 0.03	0.25	0.00 ± 0.02	-0.07
	Placebo	11	0.75 ± 0.07	0.75 ± 0.03	0.74 ± 0.02	0.01 ± 0.02	0.72	-0.01 ± 0.02	-1.44
Bone area (total mass)	Test food	8	31.33 ± 4.14	32.66 ± 1.13	32.79 ± 1.07	0.70 ± 1.54	2.23	0.52 ± 1.07	1.65
	Placebo	11	32.90 ± 1.82	33.17 ± 1.12	32.46 ± 1.06	0.72 ± 1.33	2.19	0.24 ± 0.98	0.72
Bone mineral content (total mass)	Test food	8	23.48 ± 4.07	24.59 ± 1.77	24.57 ± 5.02	0.58 ± 2.00	2.47	0.38 ± 0.85	1.60
	Placebo	11	24.60 ± 3.02	24.91 ± 1.76	23.94 ± 1.07	0.70 ± 1.66	2.86	-0.14 ± 1.23	-0.58
T-score (total mass)	Test food	8	-1.04 ± 0.51	-1.05 ± 0.24	-1.09 ± 0.16	0.00 ± 0.31	0.00	-0.04 ± 0.21	-3.61
	Placebo	11	-1.05 ± 0.61	-1.01 ± 0.24	-1.16 ± 0.16	0.04 ± 0.17	3.45	-0.11 ± 0.15	-10.34
YAM value (total mass)	Test food	8	86.63 ± 6.59	86.58 ± 3.45	86.32 ± 6.02	0.00 ± 4.17	0.00	-0.25 ± 2.71	-0.29
	Placebo	11	86.55 ± 7.72	87.13 ± 3.45	85.31 ± 2.19	0.55 ± 2.66	0.63	-1.27 ± 2.20	-1.47
Z score (total mass)	Test food	8	0.05 ± 0.50	0.12 ± 0.26	0.12 ± 0.20	0.05 ± 0.31	100.00	0.05 ± 0.23	100.00
	Placebo	11	0.08 ± 0.82	0.14 ± 0.26	0.03 ± 0.20	0.07 ± 0.20	88.89	-0.04 ± 0.17	-44.44
AM value (total mass)	Test food	8	100.88 ± 7.90	101.95 ± 4.10	101.72 ± 7.02	0.75 ± 5.06	0.74	0.50 ± 3.42	0.50
	Placebo	11	101.45 ± 13.05	102.58 ± 4.10	100.66 ± 3.05	1.36 ± 3.01	1.34	-0.55 ± 2.62	-0.54

Values are mean ± SD.

\* $P < 0.05$  (vs. Pre-ingestion), # $P < 0.05$  (vs. Placebo group).

Table 5-3. Changes in anterior surface of lumbar vertebrae (L2, L3, L4, L2-L4).

	Group	n	Pre-ingestion	Post-12W	Post-24W	Pre-ingestion vs. Post-12W		Pre-ingestion vs. Post-24W	
						Amount of change	Rate of change (%)	Amount of change	Rate of change (%)
Bone density (L2)	Test food	8	0.80 ± 0.12	0.81 ± 0.03	0.81 ± 0.03	0.00 ± 0.04	0.23	0.00 ± 0.02	0.06
	Placebo	11	0.81 ± 0.12	0.79 ± 0.03	0.79 ± 0.03	-0.02 ± 0.02	-2.43 *	-0.02 ± 0.03	-2.17
Bone area (L2)	Test food	8	13.42 ± 1.44	13.20 ± 0.47	13.30 ± 0.41	0.19 ± 0.35	1.39	0.25 ± 0.17	1.88 *
	Placebo	11	12.76 ± 1.07	13.36 ± 0.46	13.23 ± 0.41	0.31 ± 0.51	2.41	0.19 ± 0.49	1.52
Bone mineral content (L2)	Test food	8	10.86 ± 2.48	10.72 ± 0.50	10.77 ± 0.26	0.15 ± 0.53	1.38	0.19 ± 0.20	1.78
	Placebo	11	10.36 ± 1.91	10.60 ± 0.50	10.51 ± 0.26	0.02 ± 0.45	0.18	-0.07 ± 0.29	-0.65
T-score (L2)	Test food	8	-2.04 ± 1.17	-2.01 ± 0.29	-2.01 ± 0.28	0.00 ± 0.37	0.00	0.00 ± 0.23	0.00
	Placebo	11	-1.99 ± 1.16	-2.19 ± 0.29	-2.15 ± 0.28	-0.18 ± 0.20	-9.13	-0.14 ± 0.30	-6.85
YAM value (L2)	Test food	8	78.75 ± 12.21	79.35 ± 3.14	78.97 ± 3.06	0.25 ± 3.77	0.32	-0.13 ± 2.10	-0.16
	Placebo	11	79.36 ± 12.13	77.20 ± 3.14	77.38 ± 3.06	-1.91 ± 2.43	-2.41	-1.73 ± 3.47	-2.18
Z score (L2)	Test food	8	0.53 ± 1.05	0.68 ± 0.28	0.70 ± 0.28	0.08 ± 0.35	14.29	0.09 ± 0.20	16.67
	Placebo	11	0.66 ± 1.51	0.45 ± 0.28	0.50 ± 0.28	-0.15 ± 0.20	-23.29	-0.10 ± 0.32	-15.07
AM value (L2)	Test food	8	107.38 ± 15.33	110.10 ± 3.86	110.63 ± 3.81	0.75 ± 4.83	0.70	1.25 ± 2.96	1.16
	Placebo	11	110.82 ± 24.17	107.38 ± 3.85	108.18 ± 3.80	-2.00 ± 2.72	-1.80	-1.18 ± 4.12	-1.07
Bone density (L3)	Test food	8	0.84 ± 0.15	0.84 ± 0.13	0.84 ± 0.14	0.00 ± 0.03	0.25	0.00 ± 0.02	0.27
	Placebo	11	0.83 ± 0.13	0.81 ± 0.14	0.81 ± 0.13	-0.02 ± 0.03	-2.31	-0.02 ± 0.03	-2.31
Bone area (L3)	Test food	8	14.33 ± 1.40	14.87 ± 1.59	14.52 ± 1.46	0.54 ± 0.47	3.74 *	0.19 ± 0.42	1.32
	Placebo	11	14.26 ± 1.60	14.41 ± 1.58	14.49 ± 1.45	0.15 ± 0.52	1.04	0.23 ± 0.65	1.61
Bone mineral content (L3)	Test food	8	12.08 ± 2.96	12.52 ± 2.63 #	12.27 ± 2.94	0.43 ± 0.60	3.59	0.19 ± 0.50	1.57
	Placebo	11	11.85 ± 2.25	11.70 ± 2.26	11.78 ± 2.22	-0.15 ± 0.46	-1.29	-0.07 ± 0.54	-0.63
T-score (L3)	Test food	8	-1.94 ± 1.35	-1.93 ± 1.15	-1.91 ± 1.30	0.01 ± 0.31	0.65	0.02 ± 0.22	1.29
	Placebo	11	-1.99 ± 1.21	-2.17 ± 1.25	-2.15 ± 1.15	-0.18 ± 0.26	-9.13	-0.16 ± 0.26	-8.22

Table 5-3. (continued).

	Group	n	Pre-ingestion	Post-12W	Post-24W	Pre-ingestion vs. Post-12W		Pre-ingestion vs. Post-24W	
						Amount of change	Rate of change (%)	Amount of change	Rate of change (%)
YAM value (L3)	Test food	8	79.63 ± 14.15	80.00 ± 12.06	79.88 ± 13.79	0.38 ± 3.07	0.47	0.25 ± 2.31	0.31
	Placebo	11	79.18 ± 12.42	77.36 ± 13.02	77.45 ± 12.17	-1.82 ± 2.48	-2.30	-1.73 ± 2.61	-2.18
Z score (L3)	Test food	8	0.39 ± 1.27	0.45 ± 1.02	0.45 ± 1.22	0.06 ± 0.31	16.13	0.06 ± 0.23	16.13
	Placebo	11	0.38 ± 1.62	0.26 ± 1.68	0.28 ± 1.59	-0.12 ± 0.26	-30.95	-0.10 ± 0.30	-26.19
AM value (L3)	Test food	8	105.13 ± 17.30	105.88 ± 14.02	106.38 ± 17.19	0.75 ± 4.06	0.71	1.25 ± 3.11	1.19
	Placebo	11	107.09 ± 24.48	105.36 ± 25.45	105.64 ± 24.24	-1.73 ± 3.50	-1.61	-1.45 ± 3.91	-1.36
Bone density (L4)	Test food	8	0.83 ± 0.16	0.83 ± 0.15	0.84 ± 0.15	0.00 ± 0.03	0.26	0.01 ± 0.02	# 1.42
	Placebo	11	0.87 ± 0.16	0.85 ± 0.16	0.86 ± 0.16	-0.03 ± 0.04	-2.87 *	-0.02 ± 0.02	-1.76
Bone area (L4)	Test food	8	15.80 ± 2.38	16.20 ± 3.46	15.46 ± 1.56	0.40 ± 1.23	2.53	-0.34 ± 1.10	-2.14
	Placebo	11	15.83 ± 2.59	15.55 ± 2.22	15.81 ± 2.88	-0.28 ± 1.11	-1.77	-0.02 ± 0.67	-0.14
Bone mineral content (L4)	Test food	8	13.23 ± 3.73	13.57 ± 4.08	13.12 ± 3.28	0.34 ± 0.97	2.59	-0.11 ± 1.08	-0.82
	Placebo	11	14.13 ± 4.83	13.40 ± 3.87	13.90 ± 5.08	-0.72 ± 1.71	-5.13	-0.23 ± 0.56	-1.60
T-score (L4)	Test food	8	-1.98 ± 1.36	-1.96 ± 1.29	-1.85 ± 1.31	0.01 ± 0.25	0.63	0.13 ± 0.18	# 6.33
	Placebo	11	-1.57 ± 1.42	-1.78 ± 1.34	-1.72 ± 1.40	-0.21 ± 0.34	-13.29 *	-0.15 ± 0.18	-9.25
YAM value (L4)	Test food	8	78.38 ± 14.82	78.63 ± 14.12	79.63 ± 14.16	0.25 ± 2.96	0.32	1.25 ± 2.19	# 1.59
	Placebo	11	82.82 ± 15.41	80.73 ± 14.80	81.27 ± 15.35	-2.09 ± 3.75	-2.52	-1.55 ± 1.69	-1.87
Z score (L4)	Test food	8	-0.16 ± 1.24	-0.11 ± 1.14	0.01 ± 1.17	0.05 ± 0.27	30.77	0.18 ± 0.18	# 107.69
	Placebo	11	0.31 ± 1.58	0.13 ± 1.54	0.21 ± 1.58	-0.18 ± 0.36	-58.82	-0.10 ± 0.17	-32.35
AM value (L4)	Test food	8	97.75 ± 16.87	98.38 ± 16.03	100.00 ± 16.48	0.63 ± 3.46	0.64	2.25 ± 2.31	# 2.30
	Placebo	11	104.91 ± 22.02	102.64 ± 21.74	103.91 ± 22.08	-2.27 ± 4.78	-2.17	-1.00 ± 2.32	-0.95

Table 5-3. (continued).

	Group	n	Pre-ingestion	Post-12W	Post-24W	Pre-ingestion vs. Post-12W		Pre-ingestion vs. Post-24W	
						Amount of change	Rate of change (%)	Amount of change	Rate of change (%)
Bone density (L2-4) g/cm <sup>2</sup>	Test food	8	0.82 ± 0.14	0.84 ± 0.03	0.84 ± 0.02 #	0.00 ± 0.03 #	0.26	0.005 ± 0.02 #	0.62
	Placebo	11	0.84 ± 0.12	0.81 ± 0.03	0.82 ± 0.02	-0.02 ± 0.02	-2.72 *	-0.02 ± 0.02	-2.04
Bone area (L2-4) cm <sup>2</sup>	Test food	8	43.55 ± 4.89	44.26 ± 1.55	43.27 ± 0.91	1.12 ± 1.45	2.58	0.10 ± 0.91	0.23
	Placebo	11	42.86 ± 4.74	43.34 ± 1.55	43.53 ± 0.91	0.18 ± 1.56	0.41	0.40 ± 0.91	0.93
Bone mineral content (L2-4) g	Test food	8	36.18 ± 8.95	37.19 ± 1.82	36.54 ± 1.08	0.93 ± 1.49	2.56	0.27 ± 1.23	0.76
	Placebo	11	36.34 ± 7.92	35.42 ± 1.82	35.90 ± 1.08	-0.86 ± 2.03	-2.36	-0.37 ± 0.91	-1.01
T-score (L2-4) -	Test food	8	-1.59 ± 1.19	-1.48 ± 0.22	-1.45 ± 0.18 #	0.03 ± 0.24 #	1.57	0.05 ± 0.15 #	3.15
	Placebo	11	-1.44 ± 1.01	-1.69 ± 0.22	-1.65 ± 0.18	-0.19 ± 0.20	-13.29 *	-0.15 ± 0.19	-10.13 *
YAM value (L2-4) %	Test food	8	81.38 ± 14.01	82.47 ± 2.64	82.97 ± 2.09 #	0.13 ± 2.59	0.15	0.63 ± 1.60 #	0.77
	Placebo	11	83.09 ± 11.97	80.12 ± 2.64	80.84 ± 2.08	-2.27 ± 2.57	-2.74 *	-1.55 ± 2.30	-1.86
Z score (L2-4) -	Test food	8	-0.34 ± 0.93	-0.22 ± 0.19	-0.15 ± 0.15 #	0.04 ± 0.18	11.11	0.10 ± 0.12 #	29.63
	Placebo	11	-0.19 ± 1.07	-0.39 ± 0.19	-0.33 ± 0.15	-0.14 ± 0.19	-71.43 *	-0.07 ± 0.16	-38.10
AM value (L2-4) %	Test food	8	94.38 ± 15.09	97.21 ± 2.77 #	97.85 ± 2.37 #	0.88 ± 2.80 #	0.93	1.50 ± 1.60 #	1.59
	Placebo	11	97.82 ± 18.53	94.31 ± 2.77	95.20 ± 2.37	-2.09 ± 2.63	-2.14 *	-1.18 ± 2.68	-1.21

L2-L4: total anterior surface of the lumbar vertebrae.

Values are mean ± SD.

\* $P < 0.05$  (vs. Pre-ingestion), # $P < 0.05$  (vs. Placebo group).

(vs. Pre-ingestion, %)

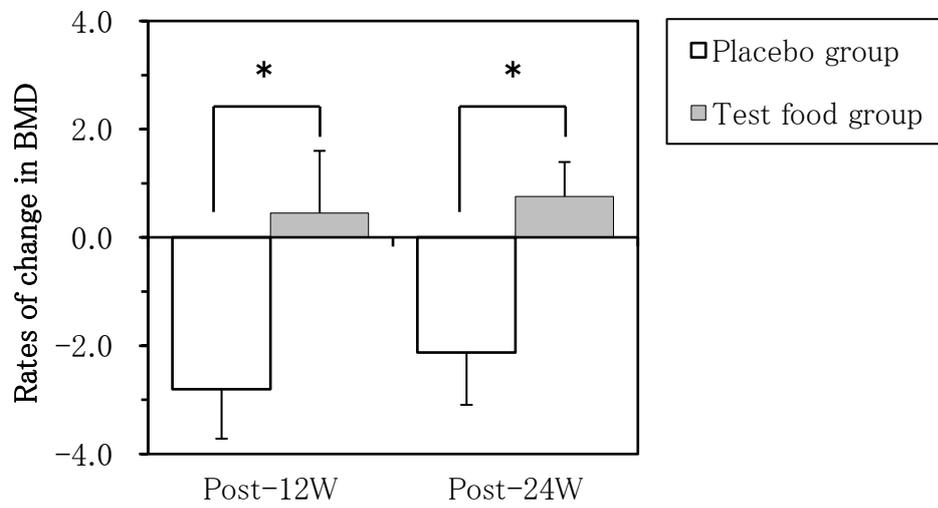


Fig. 5-3. Rates of change in BMD of the lumbar vertebrae anterior surface.

\* $P < 0.05$  (vs. Placebo group).

Table 5-4. Changes in bone metabolism markers.

Group	n	Pre-ingestion	Post-12W	Post-24W	Pre-ingestion vs. Post-12W		Pre-ingestion vs. Post-24W		
					Amount of change	Rate of change (%)	Amount of change	Rate of change (%)	
TRACP-5b mU/dL	Test food	8	515.38 ± 188.07	430.35 ± 88.57	419.83 ± 121.12	-79.00 ± 132.04	-15.33	-90.13 ± 173.80	-17.50
	Placebo	11	503.36 ± 198.43	496.47 ± 88.56	519.58 ± 121.11	-11.27 ± 38.61	-2.24	12.27 ± 73.65	2.44
OC ng/mL	Test food	8	18.73 ± 7.85	18.28 ± 5.02	17.42 ± 4.29	-0.81 ± 5.58	-4.34	-1.74 ± 5.05	83.67
	Placebo	11	19.55 ± 7.21	17.69 ± 5.02	19.11 ± 4.29	-1.59 ± 4.83	-8.14	-0.12 ± 3.52	-0.60
BAP µg/L	Test food	8	15.86 ± 7.43	12.29 ± 1.80 #	13.00 ± 2.89	-3.75 ± 4.68	-23.64 *	-3.03 ± 5.59	4.78
	Placebo	11	16.45 ± 3.10	14.22 ± 1.80	15.28 ± 2.89	-2.10 ± 1.15	-12.77 *	-1.05 ± 2.12	-6.36

Values are mean ± SD.

\* $P < 0.05$  (vs. Pre-ingestion), # $P < 0.05$  (vs. Placebo group).

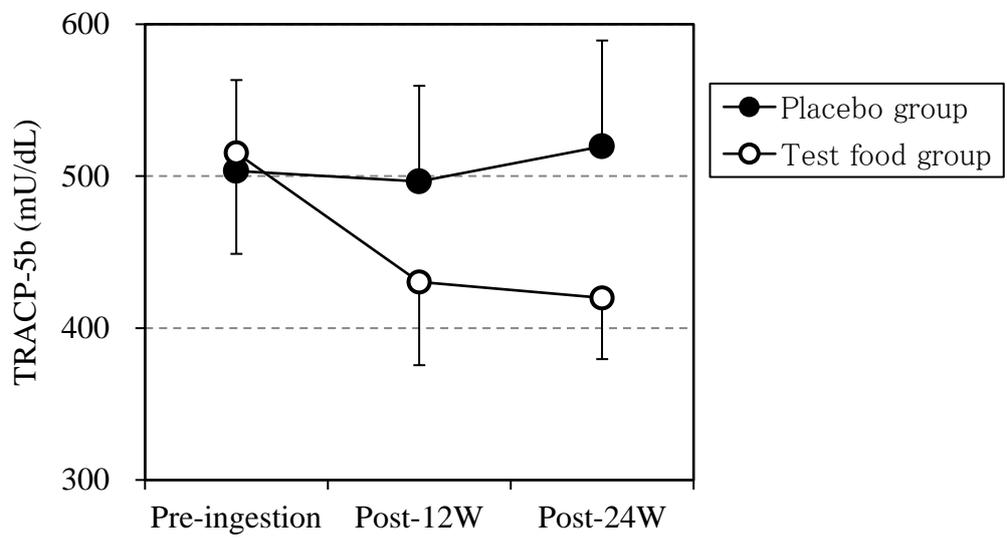


Fig. 5-4. Changes in TRACP-5B (absolute values).

## 5.4 考察

骨粗鬆症は骨代謝のバランスが崩れ、骨吸収の優位な状態が長時間継続することで引き起こされる疾患である[109]。日本においては、骨粗鬆症の患者が年々増加しており、その数は1280万人と推定されている[94]。特に女性は骨粗鬆症の有病率が高いことが報告されている[110,111]。女性は50歳前後での閉経に伴う女性ホルモン(エストロゲン)の急激な枯渇に伴い、閉経後10年ほどの間に骨量は著しく減少し、骨粗鬆症と判断される事例が多い[112]。女性においては閉経前後の早期から骨粗鬆症対策を行うことが重要である。

本試験では、主要アウトカムとして左大腿骨および腰椎正面のX線検査を行った。左大腿骨および腰椎正面の骨密度は骨粗鬆症や骨折リスクの診断指標として用いられる[113]。腰椎正面のX線検査では、群内比較においてプラセボ食品群で介入期間中に骨面積、骨塩量および骨密度が有意に低下した。一方、介入食品群では介入期間中に有意に低下した項目はなく、L2、L3腰椎の骨面積が有意に上昇した。また、群間比較においては、介入期間中に介入食品群のL4腰椎および腰椎正面総量の骨密度がプラセボ食品群の結果よりも有意に高かった。一方、大腿骨では統計的な有意差が認められなかった。これは「骨密度」や「骨塩量」が身体の中で均一ではないため、部位による差が生じている可能性が考えられる。また今回は健常者を対象とした試験であったため、介入の効果が検出できなかった可能性がある。今後更なる検討が必要とされるが、マルチビオン酸Caの摂取によって、骨密度や骨塩量の改善効果は大いに期待される。

マルチビオン酸はラットへの投与試験において、カルシウムの吸収増進効果が確認されている[103]。したがって、マルチビオン酸の働きで、カルシウムの吸収が増進されたことで、骨密度、骨面積および骨塩量が維持や増加に寄与したものと推察される。また、本試験で副次的アウトカムと

して使用した血中マーカーは、骨型酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ (TRACP-5b) が骨吸収マーカーであり、オステオカルシン (OC) および骨型アルカリフォスファターゼ (BAP) が骨形成マーカーである。TRACP-5b は破骨細胞にのみ存在する酵素で、骨吸収の亢進に伴って血中に漏出することから、骨吸収マーカーとして利用される[113]。OC および BAP は骨芽細胞に多く存在する酵素である。骨芽細胞は、前骨芽細胞から分化し、石灰化能を有する細胞へと成熟していく。この過程で、BAP は骨芽細胞分化の初期から中期にかけてのマーカー、OC は後期のマーカーと考えられている[113,114]。血液検査では、群内比較において両群で摂取 12 週間後に骨形成マーカーの BAP が有意に低下した。群間比較においては摂取 12 週間後に介入食品群の BAP がプラセボ食品群の結果よりも有意に低かった。しかし、介入期間中における BAP の変動はいずれも基準値内であり、OC に有意な変動は認められなかった。したがって、両群において、介入期間中の骨形成マーカー変動は軽微なものであったと考えられる。また、TRACP-5b は摂取前には両群で基準値 (120~420mU/dL) [113] よりも高値であった。プラセボ食品群では介入期間を通して基準値よりも高値であったが、介入食品群では介入期間中に低下し、基準値内へと変動した。さらに、群間比較では摂取 24 週間後および摂取前から摂取 24 週間後の変化量に傾向差が認められ、介入食品群はプラセボ食品群よりも低値にあった。介入食品に含有されるマルトビオン酸やマルトビオン酸 Ca は *in vitro* において、破骨細胞の増殖を抑制することが確認されている[104]。即ち、マルトビオン酸 Ca が破骨細胞の活性を抑制したことで、TRACP-5b の分泌を低下したと推測される。マルトビオン酸 Ca の摂取によって、カルシウムの吸収が増進されただけでなく、破骨細胞の活性抑制により骨代謝のバランスが改善されたことで、骨密度、骨面積および骨塩量の維持や増加に寄与したことが示唆される。

今回の試験では介入期間中の食事の中で骨量および骨密度に影響をもたらす得るビタミンD、ビタミンKの目安摂取量およびカルシウムの推奨摂取量を管理することが難しく、最終解析対象者数は19名となった。今後は被験者の栄養管理を行いながら、より多くの対象人数で検証することが望ましいと考えられる。

## 5.5 まとめ

本章では閉経後の高齢女性に対して、マルトビオン酸Caを含むオリゴ糖8g（マルトビオン酸Caとして5.08g）を継続摂取することで骨密度改善効果が得られることを明らかにした。マルトビオン酸のカルシウムに対する可溶化特性を活かしたカルシウム吸収増進機能以外に、骨を壊す破骨細胞の活性を抑制する効果が寄与したものと示唆されるが、その作用機序の解明には更なる研究が必要である。機能性素材に関しては、日々の生活の中で消費者が継続的に摂取する意欲を持つことが重要といえるが、ダイエット（体重変化）などとは異なり、骨の健康増進を体感することは難しい。マルトビオン酸には日常生活の中で実感しやすい便秘改善効果もあるため、骨に対する効果も印象付けることが期待される。骨の健康が気になる高齢女性は便秘に悩む層とも一致することから、1つの素材で2つの効果が期待できる点は、消費者にとっても大きなメリットといえる。

## 第6章 結論

これまで機能性オリゴ糖として研究されてきたフラクトオリゴ糖、ガラクトオリゴ糖、イソマルトオリゴ糖は、スクロース、ラクトース、澱粉などの加水分解酵素や糖転移酵素を用いて合成されている。これらはグルコース、ガラクトース、フラクトースを構成糖とする電荷をもたない中性糖である。一方、負の電荷を持つ酸性糖を構成糖とする研究は非常に少なかった。本論文はアルドン酸オリゴ糖のCa塩であるマルトビオン酸Caの製品化を視野に入れた製法を確立した上で、その物性および機能性を明らかにすることを目的とした。

第2章では、マルトビオン酸Caを製品として生産することを念頭に、2つの方法（金属触媒法および酵素法）の有用性を検証した。金属触媒法において、食品添加物として収載されているパラジウム触媒を用いた方法では、酸化反応効率が非常に良好であり、2時間程度でマルトースからマルトビオン酸への完全変換が可能であった。また、糖アルコール用の還元触媒として利用されているニッケル触媒を用いた方法（酸化還元反応）では、マルトースからマルトビオン酸とマルチトールが短時間且つ高収率で等量得られることを見出した。しかし、いずれにおいてもマルトビオン酸がマルトビオン酸Naの形態で生成するため、製品化においては脱塩精製工程が課題であった。一方、グルコースオキシダーゼによる酵素酸化では、マルトースを加水分解する酵素に存在する夾雑酵素の含有量、中和手法、溶存酸素などの条件を最適化することで、マルトースからワンステップでマルトビオン酸Caを得るプロセスを構築することができた。本手法が工業生産に最適であると判断し、製品化に着手した。

マルトビオン酸Caは低分子でありながら結晶化しない特性を有している。これを製造後に保管、

流通、販売するには、非晶質としての性質を理解しておく必要があった。そこで第3章では、マルトビオン酸 Ca の水分収着特性およびガラス転移挙動を明らかにし、マルトビオン酸およびマルトースと比較した。その結果、マルトビオン酸 Ca の無水  $T_g$  は 148.1 °C であり、マルトース（無水  $T_g = 95.5$  °C）よりも非常に高いことが分かった。また、マルトビオン酸 Ca は水分含量の増加に伴う  $T_g$  低下の度合いが低い（水の可塑効果に対する耐性が高い）ことが明らかとなった。これを裏付ける結果として、マルトビオン酸 Ca を主成分とする工業生産品サワーオリゴ<sup>®</sup>C は、粉あめ（DE25）よりも粉末安定性に優れ、マルトデキストリン（DE20）と同等かそれ以上の物理的安定性を有することが確認された。また、マルトビオン酸 Ca の凍結濃縮ガラス転移温度（ $T_g'$ ）は -15.4 °C であり、マルトース（ $T_g' = -31.4$  °C）と比べ非常に高かった。 $T_g'$  は凍結乾燥における温度操作の指標であり、この値が高いことは凍結乾燥物がコラプスし難いことを意味する。マルトビオン酸 Ca の優れた物理的安定性は、Ca イオンがもたらす強力な静電的相互作用が、共存する水素結合性液体の分子運動性を低下させることに由来すると考えられる。

第4章では、マルトビオン酸 Ca の難消化性糖質としての性質を理解するため、*in vitro* 消化性、腸内細菌増殖選択性、ヒトにおける生理効果を評価した。その結果、マルトビオン酸はマルチトールと同等かそれ以上の消化耐性を持つこと、成人腸内で2番目に優勢なビフィズス菌である *B. adolescentis* に資化能があること、フラクトオリゴ糖と比べて増殖選択性が極めて高いことなどが明らかとなった。また、便秘傾向の健常者に対して、マルトビオン酸 Ca を含むオリゴ糖 4g（マルトビオン酸として 2.4g）を継続摂取することで便秘改善効果が認められた。

第5章では、マルトビオン酸のカルシウム吸収促進機能の深堀として、マルトビオン酸 Ca の継続摂取が、閉経後の健常女性に対して骨代謝や骨密度に及ぼす影響を評価した。マルトビオン酸 Ca

を含むオリゴ糖 8g (マルトビオン酸 Ca として 5.08g) を 24 週間継続摂取することで、破骨細胞のみに存在する酵素である TRACP-5b (骨吸収マーカー) が低下すると共に、骨密度の改善効果が確認された。これらの結果から、マルトビオン酸はカルシウムの吸収を促進し、骨形成を促進するだけでなく、破骨細胞の過剰な分化を抑制し、骨代謝を正常にすることで骨密度改善効果に寄与することが推察された。機能性素材は、日々の生活の中で消費者が継続的に摂取する意欲を持つことが重要だが、骨の健康増進を体感することは難しい。マルトビオン酸 Ca には日常生活の中で実感しやすい便通改善効果もあるため、骨に対する効果を印象付けることができる。骨の健康が気になる高齢女性は便秘に悩む層でもあることから、1つの素材で2つの効果が期待できる点は、消費者にとっても大きなメリットとなると考えられた。

以上、本研究はマルトビオン酸が持つ“糖”と“酸”に基づくハイブリットな性質は、従来開発されてきた中性オリゴ糖とは異なるユニークな物性や生理機能を有していることが明らかになった。日本国内において少子高齢化が進む中、膨らみ続ける医療費を削減するには、高齢者の健康寿命を延ばす必要がある。高齢者は食品摂取量が限られているため、普段の食事から栄養成分を効果的に摂取しなければならない。マルトビオン酸は骨と腸の健康をおいしくサポートすることが可能な食品素材として、高い潜在性を有していると考えられる。

## 引用文献

1. 農林水産省；令和元砂糖年度における砂糖及び異性化糖の需給見通し(第4回(令和2年6月)), (2020) <https://www.maff.go.jp/j/seisan/tokusan/kansho/attach/pdf/satou-19.pdf> (2020年12月24日参照)
2. 農林水産省；令和元年度でん粉の需給見通しについて(令和2年3月), (2020) <https://www.maff.go.jp/j/seisan/tokusan/kansho/attach/pdf/denpunR2-3.pdf> (2020年12月24日参照)
3. 岡田 茂孝, 竹内 光春；蔗糖を結合した水飴の製造と性質, 日本食品工業学雑誌, 22(9), 420-424 (1975)
4. 日高 秀昌, 栄田 利章, 足立 堯, 斉藤 安弘；フラクトオリゴ糖の工業生産とその利用開発, 日本農芸化学会誌, 61(8), 915-923 (1987)
5. 松本 圭介, 小林 洋一, 田村 なつ子, 渡辺 常一, 菅 辰彦； $\beta$ -ガラクトシダーゼによるガラクトオリゴ糖の生産, 澱粉科学, 36(2), 123-130 (1989)
6. 荒川 勝隆, 青山 葉子, 池田 宏, 三國 克彦, 藤田 孝輝, 原 耕三；乳果オリゴ糖の生産技術の開発と特定保健用食品を中心とする用途開発, *J. Appl. Glycosci.*, 49(1), 63-72 (2002)
7. 藤川 茂昭, 岡崎 昌子, 松元 信也, 古賀 邦正；キシロオリゴ糖の製造と性質, 澱粉科学, 37(2), 69-77 (1990)
8. 菅野 智栄；イソマルトオリゴ糖の機能特性とその応用, 澱粉科学, 37(2), 87-97 (1990)
9. L. BOUTROUX；Sur une fermentation acide du glucose., *Compt. rend.*, 102, 924-927 (1886)
10. 永井 照和；グルコン酸およびその塩類の特徴・機能について, ミツバチ科学, 22(4), 171-174 (2001)
11. 内田 綱, 鈴木 幸雄；植物病原菌の生理に関する研究 第3報 *Erwinia milletiae* によるD-ガラクトン酸, 2-ケト-D-ガラクトン酸およびペントン酸の生成, 農学研究, 55, 177-187 (1976)
12. M.A. Neaverson；Intravenous administration of erythromycin: serum, sputum and urine levels., *Curr. Med. Res. Opin.*, 4, 359-364 (1976)
13. R. Sumimoto, K. Dohi, T. Urushihara, N. V. Jamieson, H. Ito, K. Sumimoto, and Y. Fukuda；An examination of the effects of solutions containing histidine and lactobionate for heart, pancreas and liver

- preservation in the rat., *Transplantation*, 53 (6), 1206-1210 (1992)
14. 深見 健 ; 蜂蜜中に含まれるオリゴ糖酸『マルトビオン酸』糖質と酸により生まれた新素材., *化学と生物*, 50, 857-858 (2012)
  15. 農林水産省 生産局 畜産部 ; 養蜂をめぐる情勢(令和元年 11 月)., (2019)  
<https://www.maff.go.jp/j/chikusan/kikaku/lin/sonota/attach/pdf/hachimeguji.pdf> (2020 年 12 月 24 日参照)
  16. 深見 健, 林佳 奈子 ; 酸っぱい水飴“オリゴ糖酸”の力 (チカラ) ～果汁感・不快味マスキング・減塩へのアプローチ～., *食品と開発*, 54, 17-20 (2019)
  17. H. Murakami, J. Kawano, H. Yoshizumi, H. Nakano, and S. Kitahata ; Screening of lactobionic acid producing microorganisms., *J. Appl. Glycosci.*, 49 (4), 469-477 (2002)
  18. H. Murakami, A. Seko, M. Azumi, N. Ueshima, H. Yoshizumi, H. Nakano, and S. Kitahata ; Fermentative production of lactobionic acid by *Burkholderia cepacia*., *J. Appl. Glycosci.*, 50 (2), 117-120 (2003)
  19. H. Murakami, A. Seko, M. Azumi, T. Kiso, T. Kiryu, S. Kitahata, Y. Shimada, and H. Nakano ; Microbial conversion of lactose to lactobionic acid by resting cells of *Burkholderia cepacia* No. 24., *J. Appl. Glycosci.*, 53 (1), 7-11 (2006)
  20. T. Kiryu, K. Yamauchi, A. Masuyama, K. Ooe, T. Kimura, T. Kiso, H. Nakano, and H. Murakami ; Optimization of lactobionic acid production by *Acetobacter orientalis* isolated from Caucasian fermented milk, “Caspian Sea yogurt”., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 76 (2), 361-363 (2012)
  21. A. Mirescu, and U. Pruβe ; A new environmental friendly method for the preparation of sugar acids via catalytic oxidation on gold catalysts., *Applied Catalysis B: Environmenta*, 70, 644-652 (2007)
  22. E.V. Murzina, A.V. Tokarev, K. Korda's, H. Karhu, J.-P. Mikkola, and D.Y. Murzin ; D-Lactose oxidation over gold catalysts. *Catalysis Today*, 131, 385-392 (2008)
  23. E. J. Henricus, B. F. M. Kuster, and G. B. Marin ; The effect of bismuth on the selective oxidation of lactose on supported palladium catalysis., *Carbohydr. Res.*, 204, 121-129 (1990)
  24. 玉手 英四郎 ; ファインケミカル工業と触媒., *有機合成化学協会誌*, 33(3), 198-203 (1975)
  25. 高橋 喜和, 依田 稔 ; 油脂の水素添加., *日本油化学会誌*, 48(10), 1141-1149 (1999)
  26. 深見 健, 渡辺 純, 大塚 正盛, 本多祐司, 谷口 肇, 伊藤 進 ; マルトビオン酸カルシウムの調製と諸性質., *J. Appl. Glycosci.*, 56, Suppl., 54, 札幌 (2009)

27. 深見 健, 田原 豊之; ニッケル触媒を用いた酸化還元反応によるマルトビオン酸とマルチトールの同時製造, *応用糖質科学*, 6, suppl., 47, 福山 (2016)
28. M. OHSUGI, and Y. Inoue ; D-Glucose oxidation by micrococcus sp. grown on acetate., *Agric. Biol. Chem.*, 45 (8), 1877-1878 (1981)
29. 深見 健; 糖カルボン酸の製造方法, 特許第 6321857 号, 2018-05-09
30. 深見 健; 糖カルボン酸の製造方法, 特許第 6417060 号, 2018-10-31
31. F. Avaltroni, P.E. Bouquerand, and V. Normand ; Maltodextrin molecular weight distribution influence on the glass transition temperature and viscosity in aqueous solutions., *Carbohydr. Polym.*, 58 (3), 323-334 (2004)
32. 川井 清司; ガラスおよびラバー食品におけるガラス転移温度の役割., *低温生物工学会誌*, 62 (1), 25-29 (2016)
33. K. Kawai, K. Fukami, P. Thanatuksorn, C. Viriyarattanasak, and K. Kajiwara ; Effects of moisture content, molecular weight, and crystallinity on the glass transition temperature of inulin., *Carbohydr. Polym.*, 83 (2), 934-939 (2011)
34. B. C. Hancock, S. L. Shamblin, and G. Zografi ; Molecular mobility of amorphous pharmaceutical solids below their glass transition temperature., *Pharm. Res.*, 12 (6), 799-806 (1995)
35. K. Kawai, and Y. Hagura ; Discontinuous and heterogeneous glass transition behavior of carbohydrate polymer-plasticizer systems., *Carbohydr. Polym.*, 89 (3), 836-841 (2012).
36. 高橋 浩司, 白井 邦郎, 和田 敬三, 川村 亮; 比較的低水分下でのタンパク質の熱的性質., *日本農芸化学会誌*, 54 (5), 357-359 (1980)
37. 陶 慧, 鈴木 功; 食パンの水分活性の測定ならびに吸着式による検討., *日本食品保蔵科学会誌*, 29 (6), 329-334 (2003)
38. N. Potes, J. P. Kerry, and Y. H. Roos ; Additivity of water sorption, alpha-relaxations and crystallization inhibition in lactose-maltodextrin systems., *Carbohydr. Polym.*, 89 (4), 1050-1059 (2012)
39. J. E. Zimeri, and J. L. Kokini ; The effect of moisture content on the crystallinity and glass transition temperature of inulin., *Carbohydr. Polym.*, 48 (3), 299-304 (2002)
40. J. E. Zimeri, and J. L. Kokini ; Phase transitions of inulin-waxy maize starch systems in limited moisture environments., *Carbohydr. Polym.*, 51 (2), 183-190 (2003)

41. G. Balasubrahmanyam, and A. K. Datta ; Prevention of moisture migration in coated biscuit., *J. Food Eng.*, 21 (2) , 235-244 (1994)
42. E. Palou, A. López-Malo, and A. Argaiz ; Effect of temperature on the moisture sorption isotherms of some cookies and corn snacks., *J. Food Eng.*, 31 (1) , 85-93 (1997)
43. S. S. Arogba ; Effect of temperature on the moisture sorption isotherm of a biscuit containing processed mango (*Mangifera indica*) kernel flour., *J. Food Eng.*, 48 (2) , 121-125 (2001)
44. W. A.M. McMinn, D. J. McKee, and T. R. A. Magee ; Moisture adsorption behaviour of oatmeal biscuit and oat flakes., *J. Food Eng.*, 79 (2) , 481-493 (2007)
45. M. Z. Islam, Y. Kitamura, Y. Yamano, and M. Kitamura ; Effect of vacuum spray drying on the physicochemical properties, water sorption and glass transition phenomenon of orange juice powder., *J. Food Eng.*, 169, 131-140 (2016)
46. G. P. Johari, A. Hallbrucker, and E. Mayer ; The glass-liquid transition of hyperquenched water., *Nature*, 330, 552-553 (1987)
47. S. Sastry ; Going strong or falling apart?, *Nature*, 398, 467-470 (1999)
48. A.K. Shrestha, T. Howes, B.P. Adhikari, and B.R. Bhandari ; Water sorption and glass transition properties of spray dried lactose hydrolysed skim milk powder., *LWT – Food Science and Technology*, 40 (9) , 1593-1600 (2007)
49. S. Kadoya, K. Fujii, K. Izutsu, E. Yonemochi, K. Terada, C. Yomota, and T. Kawanishi ; Freeze-drying of proteins with glassforming oligosaccharide-derived sugar alcohols., *Int. J. Pharm.*, 389, 107-113 (2010)
50. P. D. Orford, R. Parker, and S. G. Ring ; Aspects of the glass transition behaviour of mixtures of carbohydrates of low molecular weight., *Carbohydr. Res.*, 196, 11-18 (1990)
51. M. Erber, and G. Lee ; Cryopellets based on amorphous organic calcium salts: production, characterization and their usage in coagulation diagnostics., *Powder Technology*, 280, 10-17 (2015)
52. D. R. MacFarlane, J. Pringle, and G. Annat ; Reversible self-polymerizing high T<sub>g</sub> lyoprotectants., *Cryobiology*, 45 (2) , 188-192 (2002)
53. Y. Roos ; Melting and glass transitions of low molecular weight carbohydrates., *Carbohydr. Res.*, 238, 39-48 (1993)
54. B. A. Bolton, and J. R. Scherer ; Raman spectra and water absorption of bovine serum albumin., *J. Phys.*

- Chem.*, 93 (22), 7635-7640 (1989)
55. P. P. Lewicki ; Water as the determinant of food engineering properties. A review., *J. Food Eng.*, 61 (4), 483-495 (2004)
  56. J. Aguilera, J.d. Valle, and M. Karel ; Caking phenomena in amorphous food powders., *Trends Food Sci. Technol.*, 6(5), 149-155 (1995)
  57. S. Palzer ; The effect of glass transition on the desired and undesired agglomeration of amorphous food powders., *Chem. Eng. Sci.*, 60(14), 3959-3968 (2005)
  58. A. MacKenzie ; Non-equilibrium freezing behavior of aqueous systems., *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 278(959), 167-189 (1977)
  59. S. Ablett, M. J. Izzard, and P. J. Lillford ; Differential scanning calorimetric study of frozen sucrose and glycerol solutions., *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 88(6), 789-794 (1992)
  60. E. Y. Shalaev, and A. N. Kanev ; Study of the solid-liquid state diagram of the water-glycine-sucrose system., *Cryobiology*, 31 (4), 374-382 (1994)
  61. A. Pyne, R. Surana, and R. Suryanarayanan ; Enthalpic relaxation in frozen aqueous trehalose solutions., *Thermochim Acta*, 405 (2), 225-234 (2003)
  62. H.D. Goff, and M.E. Sahagian ; Glass transitions in aqueous carbohydrate solutions and their relevance to frozen food stability., *Thermochim Acta*, 280-281, 449-464 (1996)
  63. H. Levine, and L. Slase ; Thermomechanical properties of small-carbohydrate-water glasses and 'rubbers'. Kinetically metastable systems at sub-zero temperatures., *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 84 (8), 2619-2633 (1988)
  64. 日本消化器病学会関連研究会 ; 慢性便秘の診断・治療研究会編 ; 慢性便秘症診療ガイドライン2017, 南江堂, 東京, pp.1-95 (2017)
  65. 厚生労働省 ; 平成28年国民生活基礎調査の概況., (2016)  
<https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/k-tyosa/k-tyosa16/dl/16.pdf> (2020年12月24日参照)
  66. 浅野 敏彦, 湯浅 一博, 櫻田 清彦, 寺地 務, 光岡 知足 ; グルコン酸のヒト腸内菌叢に及ぼす影響., *ビフィズス*, 8(1), 29-35 (1994)
  67. 岡田 勝秀, 米山 勝, 万代 隆彦, 阿賀 創, 堺 修造, 市川 富夫 ; プルランの消化性と発酵性., *日本栄養・食糧学雑誌*, 43 (1), 23-29 (1990)

68. A. Dahlqvist ; Method for assay of intestinal disaccharidases., *Anal. Biochem.*, 7(1), 18-25 (1964)
69. S. Yoshizawa, S. Moriuchi, and N. Hosoya ; The effects of maltitol on rat intestinal disaccharidases., *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 21, 31-37 (1975)
70. 奥 恒行, 金 順姫, 細谷 憲政 ; マルチトールの分解におよぼすマルトースならびに食餌の影響., *栄養と食糧*, 34(2), 145-151 (1981)
71. M. Okazaki, S. Fujikawa, and N. Matsumoto ; Effect of xylooligosaccharide on the growth of bifidobacteria., *Bifidobact. Microflora.*, 9(2), 77-86 (1990)
72. CB. Wong, H. Sugahara, T. Odamaki, and JZ. Xiao ; Different physiological properties of human-residential and non-human-residential bifidobacteria in human health., *Benef. Microbes.*, 9(1), 111-122 (2018)
73. 大塚 耕太郎, 辨野 義己, 遠藤 希三子, 上田 弘嗣, 小澤 修, 内田 隆次, 光岡 知足 ; 4'ガラクトシルラクトースのヒトの腸内フローラに及ぼす影響., *ビフィズス*, 2(2), 143-149 (1989)
74. 松本 一政, 高田 敏彦, 結城 功勝, 川上 幸治, 酒井 隆史, 野本 康二, 木村 一雅, 松本 圭介, 飯野 久和 ; 新ガラクトオリゴ糖含有液糖がヒト腸内菌叢に及ぼす影響., *腸内細菌学雑誌*, 18(1), 25-35 (2004)
75. H. Hidaka, T. Eida, and T. Takizawa ; Effects of fructooligosaccharides on intestinal flora and human health., *Bifidobacteria Microflora.*, 5(1), 37-50 (1986)
76. F. Turroni, E. Foroni, P. Pizzetti, V. Giubellini, A. Ribbera, P. Merusi, P. Cagnasso, B. Bizzarri, GL. de'Angelis, F. Shanahan, D. van Sinderen, and M. Ventura ; Exploring the diversity of the bifidobacterial population in the human intestinal tract., *Appl. Environ. Microbiol.*, 75(6), 1534-1545 (2009)
77. H. Sugahara, T. Odamaki, N. Hashikura, F. Abe, and Jz. Xiao ; Differences in folate production by bifidobacteria of different origins., *Biosci. Microbiota, Food Health*, 34(4), 87-93 (2015)
78. KS. Crider, TP. Yang, RJ Berry, and LB. Bailey ; Folate and DNA Methylation: A Review of Molecular Mechanisms and the Evidence for Folate's Role., *Adv. Nutr.*, 3(1), 21-38 (2012)
79. K. Pokusaeva, C. Johnson, B. Luk, G. Uribe, Y. Fu, N. Oezguen, R. K. Matsunami, M. Lugo, A. Major, Y. Mori-Akiyama, E. B. Hollister, S. M. Dann, and X. Z. Shi ; GABA-producing *Bifidobacterium dentium* modulates visceral sensitivity in the intestine., *Neurogastroenterol. Motil.*, 29(1), e12904 (2017).
80. K. Krnjević, and S. Schwartz ; The action of  $\gamma$ -aminobutyric acid on cortical neurones., *Exp. Brain Res.*,

3(4), 320-336 (1967)

81. 藤林 真美, 神谷 智康, 高垣 欣也, 森谷 敏夫; GABA 経口摂取による自律神経活動の活性化., 日本栄養・食糧学会誌, 61 (3), 129-123 (2008)
82. 梶本 修身, 平田 洋, 中川 聡史, 梶本 佳孝, 早川 和仁, 木村 雅行; GABA 含有はっ酵乳製品の正常高値血圧者に対する降圧効果., 日本食品科学工学会誌, 51 (2), 79-86 (2004)
83. S.C. McMillan, and F.A. Williams ; Validity and reliability of the constipation assessment scale., *Cancer Nurs.*, 12(3), 183-188 (1989)
84. 深井 喜代子, 杉田 明子, 田中 美穂; 日本語版便秘評価尺度の検討., 看護研究, 28(3), 201-208 (1995)
85. A. Tsunoda, K. Yamada, M. Takano, and H. Kusanagi ; The translation and validation of the Japanese version of the patient assessment of constipation quality of life scale., *Surg. Today*, 46(4), 414-421 (2016)
86. K.W. Heaton, J. Radvan, H. Cripps, R.A. Mountford, F.E. Braddon, and A.O. Hughes ; Defecation frequency and timing, and stool form in the general population: a prospective study., *Gut*, 33(6), 818-824 (1992)
87. S.J. Lewis and K.W. Heaton ; Stool form scale as a useful guide to intestinal transit time. *Scand. J. Gastroenterol.*, 32(9), 920-924 (1997)
88. G. Riegler and I. Esposito ; Bristol scale stool form. A still valid help in medical practice and clinical research., *Tech. Coloproctol.*, 5(3), 163-164 (2001)
89. K. Sumida, M. Z. Molnar, P. K. Potukuchi, F. Thomas, J. L. Lu, K. Yamagata, K. Kalantar-Zadeh, and C. P. Kovesdy ; Constipation and risk of death and cardiovascular events., *Atherosclerosis*, 281, 114-120 (2019)
90. 奥 恒行, 中村 禎子, 岡崎 光子; 低分子化アルギン酸ナトリウムの排便及び便性に対する改善効果., 栄養学雑誌, 56(2), 89-99 (1998)
91. 杉浦 陽子, 高妻 和哉, 安増 毅, 時光 一郎, 植松 幹雄, 細谷 哲男; 機能性便秘者に対する低分子化アルギン酸ナトリウムおよびグアーガム部分分解物の混合物の便通ならびに腹部不快感の改善に関する最小有効量の検討., 日本家政学会誌, 59(3), 143-153 (2008)
92. World Health Organization ; Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis., *WHO technical report series 843*, Geneva (1994), pp. 1-129
93. National Institutes of Health Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and

- Therapy ; Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy., *J. Am. Med. Assoc.*, 285 (6), 785-795 (2001)
94. 骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン作成委員会編 ; 骨粗鬆症の定義・疫学および成因. 「骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン 2015 年度版」, ライフサイエンス出版, 東京 (2015), pp.1-15
95. 国立社会保障・人口問題研究所 ; 人口統計資料「II.年齢別人口」., (2017)  
<http://www.ipss.go.jp/syoushika/tohkei/Popular/Popular2017.asp?chap=0> (2020 年 12 月 24 日参照)
96. TD. Rachner, S. Khosla, and LC. Hofbauer ; Osteoporosis ; now and the future., *Lancet.*, 377 (9773), 1276-1287 (2011)
97. N. Yoshimura, T. Hashimoto, K. Sakata, S. Morioka, T. Kasamatsu, and C. Cooper ; Biochemical markers of bone turnover and bone loss at the lumbar spine and femoral neck: the taiji study., *Calcif. Tissue Int.*, 65 (3), 198-202 (1999)
98. M. Iki, T. Akiba, T. Matsumoto, H. Nishino, S. Kagamimori, Y. Kagawa, and H. Yoneshima ; Reference database of biochemical markers of bone turnover for the Japanese female population., Japanese Population-based Osteoporosis (JPOS) Study, *Osteoporosis Int.*, 15 (12), 981-991 (2004)
99. RM. Zebaze, A. Ghasem-Zadeh, A. Bohte, S. Iuliano-Burns, M. Mirams, RI. Price, EJ. Mackie, and E. Seeman ; Intracortical remodelling and porosity in the distal radius and post-mortem femurs of women: a cross-sectional study., *Lancet.*, 375 (9727), 1729-1736 (2010)
100. 森 聖二郎 ; 男性骨粗鬆症., 基礎老化研究, 34(3), 13-17 (2010)
101. B. Dawson-Hughes ; Calcium throughout the life cycle., *Calcium in Human Health*, chapter, 24, 371-385 (2006)
102. JR. Bullamore, R. Wilkinson, JC. Gallagher, BE. Nordin, and DH. Marshall ; Effect of age on calcium absorption., *Lancet.*, 296 (7672), 535-537 (1970)
103. 末廣 大樹, 岡田 美沙都, 深見 健, 大塚 正盛, 中川 智之, 早川 享志 ; ラットにおけるマルトビオン酸カルシウムのカルシウム吸収増進効果., ルミナコイド研究, 21 (1), 1-7 (2017)
104. A. Nishio, Y. Ugai, H. Yamaguchi, D. Suehiro, S. Abe, K. Fukami, and M. Onishi ; The inhibitory effect maltobionic acid has on osteoclast differentiation., *Jap Assn Animal Cell Technol Ann Conf Abstracts*, 30 (Suppl), 88 (2017)
105. 厚生労働省 ; 平成 30 年度 国民健康栄養調査報告., (2020)  
<https://www.mhlw.go.jp/content/000681200.pdf> (2021 年 1 月 25 日参照)

106. 厚生労働省；「日本人の食事摂取基準(2020年版)」策定検討会報告書, (2019)  
<https://www.mhlw.go.jp/content/10904750/000586553.pdf> (2021年1月25日参照)
107. R. Prince, A. Devine, I. Dick, A. Criddle, D. Kerr, N. Kent, R. Price, and A. Randell ; The effects of calcium supplementation (milk powder or tablets) and exercise on bone density in postmenopausal women., *J Bone Mineral Res.*, 10 (7), 1068-1075 (1995)
108. 久保田 恵；カルシウム摂取による骨折・骨粗鬆症予防のエビデンス., *日本衛生学雑誌*, 58 (3), 317-327 (2003)
109. AM. Parfitt ; Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone., *J. Cell. Biochem.*, 55 (3), 273-286 (1994)
110. N. Yoshimura, S. Muraki, H. Oka, A. Mabuchi, Y. En-Yo, M. Yoshida, A. Saika, H. Yoshida, T. Suzuki, S. Yamamoto, H. Ishibashi, H. Kawaguchi, K. Nakamura, and T. Akune ; Prevalence of knee osteoarthritis, lumbar spondylosis and osteoporosis in Japanese men and women: the research on osteoarthritis/osteoporosis against disability study., *J. Bone Miner. Metab.*, 27 (5), 620-628 (2009)
111. N. Yoshimura, S. Muraki, H. Oka, H. Kawaguchi, K. Nakamura, and T. Akune ; Cohort Profile: Research on Osteoarthritis/osteoporosis Against Disability (ROAD) Study., *Int. J. Epidemiol.*, 39 (4), 988-995 (2010)
112. KP. Chang, JR. Center, TV. Nguyen, and JA. Eisman ; Incidence of hip and other osteoporotic fractures in elderly men and women: Dubbo osteoporosis epidemiology study., *J. Bone Miner. Res.*, 19, 532-536 (2004)
113. Y. Nishizawa, H. Ohta , M. Miura, M. Inaba, S. Ichimura, M. Shiraki, J. Takada, O. Chaki, H. Hagino, S. Fujiwara, M. Fukunaga, T. Miki, and N. Yoshimura ; Guidelines for the use of bone metabolic markers in the diagnosis and treatment of osteoporosis (2012 edition) ., *J. Bone Miner. Metab.*, 31, 1-15 (2013)
114. 太田 博明；骨形成マーカー「骨型アルカリフォスファターゼ」測定の意義と測定法に関する新たな進展., *Modern Media*, 58, 143-148 (2012)

## 謝辞

本研究を遂行し学位論文を纏めるにあたり、終始御懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜りました広島大学 大学院統合生命科学研究科 教授 川井清司先生に心より御礼申し上げます。また、本論文の本審査を実施して頂きました広島大学 大学院統合生命科学研究科 教授 浅川 学先生、教授 上野 聡先生、教授 鈴木卓弥先生、教授 羽倉義雄先生（50 音順）に厚く御礼申し上げます。

本研究は、サンエイ糖化株式会社 素材開発部を拠点に、社外の多くの共同研究者に支えられ得られた成果です。第 2 章のマルトビオン酸 Ca の製法においては、天野エンザイム株式会社による酵素開発の助けがあり、事業化に結びつける製法を確立させることができました。岡田正通部長を初めとする天野エンザイム株式会社関係者の皆様には厚く御礼を申し上げます。第 3 章のマルトビオン酸 Ca の非晶質粉末として物性研究においては、広島大学の食品工学研究室の皆様によるサポートによって進めることができました。竹内沙耶花氏、原田吉人氏、福壽友哉氏に厚く御礼を申し上げます。第 4 章の便通改善評価に関するヒト試験は中部大学にて実施した研究成果であり、ご指導を賜りました中部大学 応用生物学部 教授 大西素子先生に厚く御礼を申し上げます。第 5 章の骨密度改善効果に関するヒト試験において、ご指導を賜りました医療法人社団盛心会 タカラクリニック 高良 毅先生に厚く御礼を申し上げます。第 4 章の便通改善評価に関するヒト試験、第 5 章の骨密度改善効果に関するヒト試験においてサポート頂きましたサンエイ糖化株式会社 末廣大樹博士に心より感謝申し上げます。また、本研究を遂行するにあたり、サンエイ糖化株式会社関係者の皆様のご理解とご支援に心より感謝申し上げます。