

認知機能の維持・改善に資する、高溶解ヘスペリジン食品の開発

食品開発支援センター 主任研究員 中山 久之
食品開発支援センター 専門研究員 宮田 裕次

摘果されるミカン未熟果は大量に廃棄されているが、フラボノイドの一種であるヘスペリジンを豊富に含む。動物実験において、ヘスペリジンの摂取は様々な生体調節機能を有することが報告されており、健康寿命の延伸に寄与する可能性が示されているが、水への溶解性が低いため、体内への吸収が悪く、食品への展開が困難である。これまで、ミカン未熟果と茶葉を製茶機械である揉捻機と一緒に揉み込んで乾燥することにより、ヘスペリジンの溶解性を向上させた高溶解ヘスペリジン素材を開発し、本素材の摂取でヘスペリジンの体内吸収量が高まること、また、ヒトにおいて、冷えや睡眠の質などが改善されることを明らかにしてきた。

本研究では、摘果する果実だけでなく、生理現象で落果する未熟果や缶詰製造などの過程で排出されるミカン果皮を原料とした高溶解ヘスペリジン素材の製造技術確立や品質解明を行うとともに、本素材からヘスペリジンを高収率でエキスを回収する技術について検討した。さらに、高溶解ヘスペリジン素材を試験食として、ヒトでの認知機能の維持・改善効果を検証した。

1. 緒言

ミカンに含まれるヘスペリジンは、血流改善などの機能性を有することが報告されている成分で^[1]、成熟した果実よりも未熟な果実に高濃度に含まれる。しかし、ヘスペリジンは水に極めて難溶のため、体内への吸収量が少ないことから^[2]、食品への加工展開が難しい。これまでに、未熟なミカン果実を緑茶三番茶葉とともに、製茶機械である揉捻機で揉み込んで乾燥させることで、テルペン系の香りを有する発酵茶（以下、ミカン発酵茶）が製造でき、含まれるヘスペリジンの水への溶解性が向上すること^[3]、また、体内へのヘスペリジン吸収量が増加することを明らかにしてきた。そこで、本センターでは、県内外の大学や食品企業と共同で、ミカン発酵茶のヒトでの機能性を追究している。

離島・中山間地が多い長崎県では、単位面積あたりの生産性をいかに向上させるかが農業の課題となっている。特に、生産過程で廃棄される資源を有効活用することは本県の農業振興に重要な役割を果たし、生産力向上と持続性の両立を目指す「みどりの食料システム戦略」の実現に大きく貢献することが期待される。ミカンは果実が肥大する過程で、樹から自然に果実が落果する生理現象（以下、生理落果）が起き、7月上旬頃までに6割以上の果実が落果するとされる^[4]。ヘスペリジンはミカン果皮の内側のアルベド部に多く局在するため、アルベド部が最大化する6月頃に生理落果する果実はヘスペリジンが豊富に含まれると推察

される。また、缶詰加工する際に排出されるミカン加工残渣（以下、ミカン果皮）についても、アルベドを多く含むことから、豊富なヘスペリジン供給源と考えられるが、いずれも有効活用されておらず、そのほとんどが廃棄されている。

ミカン発酵茶に含まれるヘスペリジンの熱水への溶解量は未熟果のみと比べると数倍高いものの、その溶解量は20～40%程度で^[3]、ヘスペリジンの半量以上は溶解しないか、あるいは溶解しても再結晶化すると推察される。この理由から、ヘスペリジンを効率よく摂取するため、上市されているミカン発酵茶製品のほとんどが茶葉を粉末状にし、まるごと摂取する形態をとっている。茶葉は不溶性繊維が多く、水に溶けることではないため、粉末化するだけでは異なる食品に混ぜるなどの加工展開が難しい。一方で、機能性原料の多くはエキスを粉末として取引され、様々な食品に展開されていることから、ミカン発酵茶においても、ヘスペリジンを高収率にエキスを回収し、それを保持して粉末にすることができれば、加工用途の幅が広がり、取引の拡大に寄与すると考えられる。

日本の高齢者人口の割合は世界で最も高く、総人口に占める65歳以上の割合は約3割に及ぶ^[5]。人生100年時代を迎え、定年退職後も働き続けたいと考える労働者らの健康寿命の延伸は社会的問題であるが、加齢に伴い、注意力、判断力、記憶力といった脳機能（以下、認知機能）は低下する。認知機能の低下は、日常生活に多大な支障をきたすため、本機能の低下を

抑制することは重要な意義をもつ。これまでの研究で、ミカン発酵茶の摂取はヒトにおいて冷えを改善する効果があることを明らかにしているが^[4]、この効果は、ヘスペリジンによる血流改善機能と密接に関連することが推察される。加齢による慢性的な血流量不足によって、脳への血流障害が起こり、認知機能が低下することが報告されていることから^[6]、ヘスペリジンの体内吸収性を高めたミカン発酵茶が認知機能に対して改善効果を発揮する可能性がある。

本研究では、生理落果した果実やミカン果皮を有効活用するため、これらをミカン発酵茶の原料にする場合の品質評価を行うとともに、ヘスペリジンを高収率でエキス抽出する技術について検討した。さらに動物やヒトを対象に、ミカン発酵茶の摂取が認知機能に及ぼす影響について追究したので報告する。

2. 研究内容と結果

2. 1 生理落果果実の特性

生理落果果実は農林技術開発センター果樹・茶研究部門のカンキツ圃場から入手した。樹の下にネットを張り、2021年と2022年の2か年で生理落果果実を収集した（写真1）。2022年産は、5月24日から同年6月23日まで、2日から4日おきに、生理落果果実の収量を調査した。また、生理落果果実を原料として、農林技術開発センター果樹・茶研究部門の茶業研究室にて、茶葉との揉捻を行った。ヘスペリジンおよびカテキン類の定量は、ジメチルスルホキシド・メタノールの混合溶媒に試料を懸濁し、60℃のウォーターバス中で1時間恒温抽出した後、メンブレンフィルターでろ過したものをHPLC分析に供試した。

生理落果果実の累積収量を図1に示す。2022年の5月下旬から6月下旬までの1か月間で、継続して生理落果が起こることが観察され、累積で約35kg/10aの収量であった。摘果で収穫する未熟果の量は、約400kg/10aと試算されることから、生理落果果実は、摘果果実の1割に満たない収量になる。ただし、年によっては生理落果が多発し、摘果果実の減収が起こることから、生理落果果実を発酵茶の原料として用いることを想定し、ヘスペリジン量やミカン発酵茶の原料にした場合の特性について調査した。2か年の調査において、生理落果果実には、約360mg/gのヘスペリジンが含まれていた（表1）。これまでにミカン発酵茶由来のヘスペリジンを1日あたり36.7mg摂取することにより、血圧、冷え、肩のこり、疲労感および睡眠

の質が改善することを明らかにしている^[7]。これはミカン発酵茶葉あたりに換算すると約1gに相当する量で、製造現場では、通常、未熟果と茶葉を1:3の重量比で混合してミカン発酵茶葉を製造することから、未熟果1gあたり、約150mg以上のヘスペリジンを含む必要がある。生理落果果実の場合、1gあたり約360mgのヘスペリジンを含むことから、ヘスペリジン量を十分に担保できる原料であることが分かった。

発酵茶の製造においては、未熟果と茶葉を製茶機械である揉捻機と一緒に揉み込む工程がある。この揉捻により、ポリフェノール酸化酵素が活性化し、カテキン類の酸化重合が起こることで、発酵茶独特の風味が付与されるとともに、ヘスペリジンの可溶化に寄与する成分も生成される。前報において、生理落果果実は摘果果実よりもポリフェノール酸化酵素の活性が高いことが見出されたため、揉捻工程におけるカテキン類の減少率を経時的に測定した。カテキン類の酸化重合が進むと、基質であるカテキン類が減少することになるが、図2に示すとおり、生理落果果実を茶葉と一緒に揉捻すると、摘果果実の場合と比較し、カテキン類が早く減少した。これはすなわち、発酵が短時間で促進されることを意味する。ミカン発酵茶の製造現場では、摘果果実と茶葉の揉捻時間を20分としているが、生理落果果実の場合は、約5分でカテキン類が同程度減少することから、生理落果果実を発酵茶の原料に用いることで、揉捻時間を約15分短縮できると考えられる。

以上の結果から、生理落果果実は、収量こそ低いものの、ヘスペリジン量は多く、発酵茶の製造時間を短縮できるポテンシャルがあることが明らかとなった。



写真1 ネットを使った生理落果果実の収穫方法

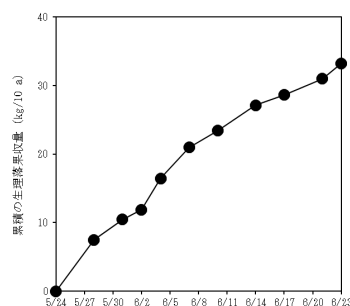


図1 生理落果果実の累積収量 (kg/10a)

表1 摘果果実と生理落果実に含まれるヘスペリジン含量 (mg/g)

	摘果果実	生理落果実
2021年	260.8	393.9
2022年	251.7	332.3
平均	256.2	363.1

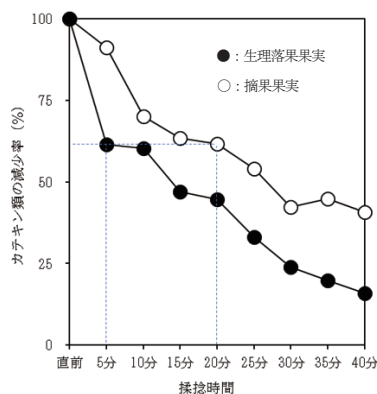


図2 生理落果実と摘果果実の揉捻時間の違いによるカテキン類の減少率

2.2 ミカン果皮の特性

ミカン果皮は、県内でミカン缶詰を製造している食品製造事業者から供与を受けた。ミカン果皮を原料とするミカン発酵茶は、農林技術開発センター果樹・茶研究部門の茶業研究室にて製造した。ヘスペリジンの定量は前項のとおりであった。香気成分の定量は、試料を遠沈管に入れ、80℃の沸騰水で5分間抽出後、3000rpmで遠心して得られた上清5 mL をガラスバイアルに移したものを、SPME-GC/MS分析に供試した。

前述のとおり、ミカン発酵茶の製造現場では、ミカン発酵茶葉1 g あたり 41.3mg（ヒト試験において、ヘスペリジン 36.7mg 以上で効果を発揮することが分かっており、サンプルに入っているミカン発酵茶の量が0.89gなので1gに換算すると41.3mgになる）以上のヘスペリジン量となることを目安としている。年毎のミカン果皮と茶葉の重量比の違いによる1g 当たりのヘスペリジン含量を表2に示す。目標とするヘスペリジン含量 41.3mg を超えるのは、令和4年のミカン果皮：茶葉の重量比＝1：1、3：2であり、年によって変動が大きく、機能性食品としてミカン果皮を使用するのは難しいと判断した。

香りは味とともに、商品の品質を決定づける重要な要素であるが、ミカン果皮と茶葉の割合が1：3の場合においても、ミカン果皮を原料とするミカン発酵茶は、d-リモネンやγ-テルピネンといった、ミカン由来

の香気成分が多く検出される（データ略）。本報にて、ミカン果皮の配合量を茶葉と同程度以上にしたミカン発酵茶の香気特性を調査したところ、表3に示すとおり、主要香気としてテルペン系の成分が多く検出され、リナロール以外は、ミカン果皮の配合量と比例関係にあった。リナロールはミカン果皮の配合量が増えるほど減少する傾向にあったが、本成分は、紅茶の主要香気であるため、茶葉の割合が相対的に少なくなったことが、リナロール減少の主要因と考えられる。一方で、ミカンの代表的香気であるd-リモネンなどの場合、ミカン果皮を使用すると、未熟果と比べ、数倍多くなることから、ミカン果皮を原料としたミカン発酵茶は、未熟果を原料とする場合より、紅茶の香りは弱いものの、ミカン由来の爽やかな香気成分が多く、嗜好性の高い商品開発などに応用できると判断された。

以上の結果から、ミカン果皮をミカン発酵茶の原料として用いる場合は、機能性食品としての利用は難しいが、品質面からミカンの香りが強い発酵茶が製造できることが明らかとなった。

表2 ミカン果皮と茶葉の重量比の違いによるミカン発酵茶に含まれるヘスペリジン含量 (mg/g)

ミカン果皮と茶葉の重量比	令和3年	令和4年	令和5年
1:2(3:30)		32.6	
1:1(6:30)	32.1	41.5	30.3
3:2(10:30)	35.2	58.9	36.5

注) ミカン果皮と茶葉の重量比は乾燥物での比

() はミカン果皮は乾燥、茶葉は生葉重量の比

表3 未熟果、果皮と茶葉の混合比率の違いによる香気成分の相対ピーク面積比

	未熟果：茶葉 1：3	果皮：茶葉 1：1	果皮：茶葉 2：1
α-テルピネン	2.87	3.16	3.60
d-リモネン	31.7	136.4	178.8
p-シメン	3.55	4.13	5.18
γ-テルピネン	6.67	6.87	8.67
リナロール	60.5	47.5	45.6
α-カリオフィレン	4.54	6.74	9.12
α-テルピネオール	6.46	7.42	11.12
酢酸ゲラニル	0.68	2.05	2.91
イソチモール	4.6	31.2	61.8

注) 数値は内部標準物質に対する相対ピーク面積比

2. 3 エキス粉末化技術

機能性原料からエキス粉末を製造するためには機能性関与成分をできる限り溶媒抽出する必要があるが、ミカン発酵茶に含まれるヘスペリジンの熱水やエタノールへの溶解量は20～40%程度である。ヘスペリジンのモデル溶液を用いた実験において、ヘスペリジンの溶解量を向上させるためには、茶の主要カテキンであるエピガロカテキンガレート（以下、EGCg）やEGCgの二量体であるテアシネンシン（以下、TS）の存在下で、オートクレーブによる抽出が有効であることを明らかにしている（図3）。オートクレーブは、約120℃の加熱を行うため、容器内部を加圧することから、ミカン発酵茶を原料として、まず、圧力によるヘスペリジン抽出率への影響を調査すべく、オートクレーブと同じ、約2気圧に設定した容器釜で95℃での抽出を行った。しかし、ヘスペリジンの抽出率に違いは認められなかったため（データ略）、抽出温度の影響を調べたところ、温度依存的にヘスペリジンの溶解量が向上した（図4）。次に抽出時間による影響を検討した結果、オートクレーブ加熱の場合、加熱時間が20分までは抽出率が向上し、その後は抽出率に変化はなかった（図5）。

以上のとおり、ヘスペリジンの溶解には加熱温度と加熱時間が関係することが分かったが、ヘスペリジンの量が多いほど、必要となる溶解熱のエネルギーも大きくなると推察される。そこで、オートクレーブ抽出において、水に対する最適なミカン発酵茶葉の割合を検討した結果を図6に示す。茶葉の割合が多いほど、抽出量は増加するものの、水に対するミカン発酵茶葉の割合が1.0%以下だと、8～9割のヘスペリジンが水に溶解するが、2.0%になると半分程度しかヘスペリジンは抽出されず、ミカン発酵茶葉の割合が増えるほどヘスペリジンの抽出率が低下した。前報において、オートクレーブと同じく加圧加熱が可能な機器である、レトルト装置や大型の加圧釜においても同様の傾向にあったことから、120℃程度の熱エネルギーでヘスペリジンを最大限可溶化する場合、水に対するミカン発酵茶葉の上限は1.0%程度が妥当であることが分かった。なお、ヘスペリジンを最大限溶解させた抽出液を原料に、スプレードライヤーで乾燥粉末にしたエキス粉末の溶け残りは少なかった。

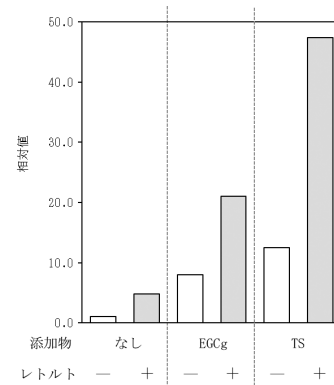


図3 EGCgとTS存在下におけるレトルトの有無の違いによるヘスペリジン溶解度の相対値

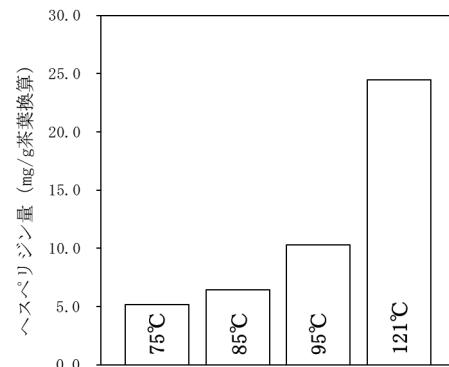


図4 抽出温度の違いによるヘスペリジン溶出量

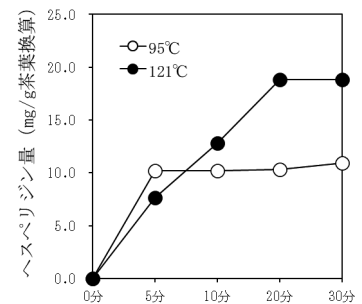


図5 抽出温度と抽出時間の違いによるヘスペリジン溶出量

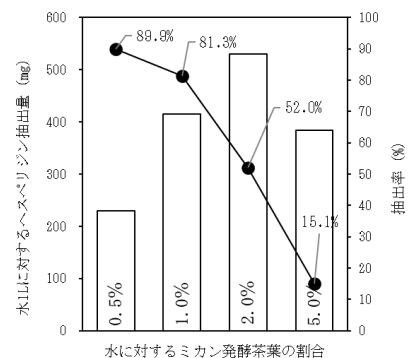


図6 水に対するミカン発酵茶の割合の違いによるヘスペリジンの抽出量と抽出率

2. 4 ヒトにおける認知機能維持・改善効果

中高齢者を対象に、ミカン発酵茶の 12 週間摂取が認知機能に及ぼす影響について検討した。

ヒト試験は、長崎県立大学一般研究倫理委員会の審査および承認を受けたうえで実施した。被験者の選択基準は、①60 歳以上 90 歳未満の男女、②認知機能の衰えを自覚している者、③試験期間中の暴飲暴食を控えることが可能な者、④試験の目的・内容について十分な説明を受け、同意能力があり、よく理解した上で自発的に参加を志願し、書面で試験参加に同意した者とした。また、被験者の除外基準は、①認知症と診断された者、②重度の脳神経疾患・精神疾患や内臓疾患の既往歴のある者、③試験期間中に紅茶や緑茶の多量摂取を止めることができない者、④紅茶あるいは緑茶にアレルギー症状を起こす恐れのある者、⑤他の食品の摂取や薬剤を使用する臨床試験、化粧品および薬剤などを塗布する臨床試験に参加中の者、参加の意思がある者、⑥カフェインを摂取することにより体調不良を起こす者、⑦アルコール依存者、⑧事前に行なわれる試験の説明に対し、その趣旨に賛同できない者、⑨その他、試験担当医師が被験者として不適当と判断した者とした。被験者には毎日の体調変化、有害事象の有無、表 4 に示す被験食品摂取の有無および医薬品等服用の有無を、試験開始から終了まで、被験者日誌に記載させた。

表 4 試験食品の詳細

	プラセボ食品	試験食品
ミカン発酵茶葉 (g)	— ^x	0.89
乳糖 (g)	0.86	—
デキストリン (g)	0.28	0.29
プルラン (g)	0.02	0.02
カラメル色素 (g)	0.04	—
合計 (g)	1.20	1.20
うち ヘスペリジン量 (mg)	検出限界未満	36.7

^x — : 配合していない

試験はランダム化二重盲検プラセボ対照並行群間比較試験で実施した。本試験に先立ち、認知機能スコアを評価する Japanese version of Montreal Cognitive Assessment (MoCA-J) を実施し、年齢、MoCA-J スコアを考慮して、被験者を試験食品群 22 名とプラセボ食品群 21 名に割り付けた。被験者の背景を表 5 に示す。群分け後の試験対象からの辞退者およびデータの欠損した者はいなかった。被験者には、試験食品ある

いはプラセボ食品 1 日 1 包を湯あるいは水に混ぜて夕食時に 12 週間摂取させるとともに、試験食品あるいはプラセボ食品を摂取することを除いて、それまでの日常生活を変えないように指導した。摂取開始日、摂取 6 週間および 12 週後の計 3 回、Trail Making Test 日本版 (TMT-J) 検査を実施し、併せて被験者に対して有害事象の確認を行った。

表 5 被験者の背景

	プラセボ食品 (n=21)	試験食品 (n=22)
男/女 (人)	4/17	8/14
年齢 (歳)	70.6 ± 6.7	67.8 ± 5.6
MoCA-J (点)	26.4 ± 0.6	26.5 ± 0.6

TMT-J は、紙にランダムに書かれた 1～26 の数字を順番通りにできるだけ早く正確に線で結んでいく検査方法で、被験者には TMT-J の課題遂行中は紙を動かさないこと、鉛筆を紙から離さないことを指示し、課題遂行時間、間違った回数 (誤反応回数) および紙から鉛筆を離した回数 (鉛筆離し回数) を記録した。TMT-J の課題遂行時間変化量の推移を図 7 に示す。摂取 6 週間および 12 週後の課題遂行時間を摂取開始日 (0 週) に対する変化量で算出したところ、摂取 12 週後で試験食品群はプラセボ食品群より有意に低値を示した。

誤反応回数に関しては、有意な変動および各測定時における群間での差は認められなかった (表 6)。鉛筆離し回数については、プラセボ食品群および試験食品群とも経時的に減少する傾向にあったが、0 週との間に差はなかった。また、いずれの測定時に関しても群間で差は認められなかった (表 7)。

以上のことから、TMT-J は、幅広い注意、空間的探索、処理速度、衝動性などを総合的に測定でき、とりわけ注意力や作業記憶の評価に特化した検査である^[8]。試験食品の摂取で、TMT-J の課題遂行時間が摂取 12 週後に短縮したことから、ミカン発酵茶の長期摂取は認知機能の一部である注意力と作業記憶を改善することが明らかとなった。

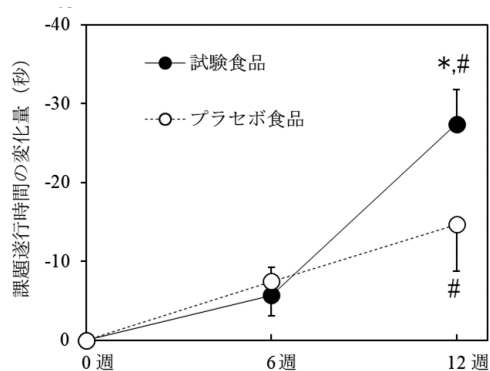


図7 課題遂行時間変化量の推移

* $p < 0.05$ (プラセボ食品と比較して有意差あり)

$p < 0.05$ (0週と比較して有意差あり)

表6 誤反応回数の推移 (単位: 回)

群	摂取開始日	摂取6週後	摂取12週後
プラセボ食品	0.10±0.07	0.14±0.08	0.05±0.05
試験食品	0.09±0.06	0.09±0.06	0.00±0.00

表7 鉛筆離し回数の推移 (単位: 回)

群	摂取開始日	摂取6週後	摂取12週後
プラセボ食品	1.71±0.66	1.10±0.46	0.86±0.57
試験食品	1.27±0.38	0.86±0.28	0.45±0.17

3. 結言

ミカン発酵茶の原料として摘果ミカンを利用しているが、生理落果実やミカン果皮も原料として適しているか、ミカン発酵茶に含まれるヘスペリジンを効率的に抽出できる条件、ミカン発酵茶に含まれるヘスペリジンがヒトにおいて、認知機能維持・改善効果があるか、これらについて検討を行った。

ミカン発酵茶の製造現場では、摘果果実と茶葉の揉捻時間を20分としているが、生理落果果実の場合は、約5分でカテキン類が同程度減少することから、生理落果果実を発酵茶の原料に用いることで、揉捻時間を約15分短縮できるとともに生理落果果実は、収量こそ低いものの、ヘスペリジン量は多く含まれていることが明らかになった。

ミカン果皮をミカン発酵茶の原料として用いる場合は、機能性食品としての利用は難しいが、品質面からミカンの香りが強い発酵茶が製造できることが判明した。

120℃程度の熱エネルギーでヘスペリジンを最大限

可溶化する場合、水に対するミカン発酵茶葉の上限は1.0%程度が妥当であり、この溶液を噴霧乾燥などを用いてエキシ化粉末にすることが妥当と考えられた。

ミカン発酵茶を12週間、継続摂取することにより、TMT-Jの遂行時間が短縮したことから、ミカン発酵茶は、認知機能の一部である注意力と作業記憶を改善することが明らかとなった。

参考文献

- [1] Jung UJ, Lee MK, Park YB, Kang MA, Choi MS, Effect of citrus flavonoids on lipid metabolism and glucose-regulating enzyme mRNA levels in type-2 diabetic mice, *Int J Biochem Cell Biol*, 38, pp. 1400-1403, 2006.
- [2] Yamada M, Tanabe F, Arai N, Mitsuzumi H, Miwa Y, Kubota M, et al, Bioavailability of glucosyl hesperidin in rats, *Biosci Biotechnol Biochem*, 70, pp. 1386-1394, 2006.
- [3] 中山久之、田中隆、宮田裕次、齋藤 義紀、松井利郎、荒牧貞幸ほか：ミカン未熟果と緑茶三番茶葉を混合して製造した可溶性ヘスペリジン含有発酵茶の開発、*日本栄養・食糧学会誌*, 67, pp. 95-103, 2014.
- [4] 尾形凡生、藤田博之、塩崎修志、堀内昭作、河瀬憲次、加藤 彰宏：AVG によるウンシュウミカン生理落果の制御、*園芸学雑誌*, 66, pp. 235-244, 1997.
- [5] 総務省統計局、高齢者の人口、<https://www.stat.go.jp/data/topics/topi1291.html>, Accessed 2022.
- [6] Franceschi M, Alberoni M, Bressi S, Canal N, Comi G, Fazio F, et al, Correlations between cognitive impairment, middle cerebral artery flow velocity and cortical glucose metabolism in the early phase of Alzheimer's disease, *Dementia*, 6, pp. 32-38, 1995.
- [7] 中山久之、宮田裕次、藤井信哉、山本咲暁子、大曲勝久、吉野豊ほか：熟ミカンと茶葉を混合揉捻して製造した発酵茶葉由来ヘスペリジン摂取が冷え、肩のこり、疲労感および睡眠の質に及ぼす影響、*薬理と治療*, 47, pp. 1471-81, 2019.
- [8] 広田千賀、渡辺美鈴、谷本芳美、河野令、樋口由美、河野公一：地域高齢者を対象とした Trail Making Test の意義、*日老医誌*, 45, pp. 647-654, 2008.