

平成22年度(経済危機対応・地域活性化予備費事業)  
戦略的基盤技術高度化支援事業  
「米糠を利用した免疫賦活発酵食品素材の開発」

研究開発成果等報告書

平成 24 年 1 月

委託者 四 国 経 済 産 業 局  
委託先 財団法人四国産業・技術振興センター

# 目 次

## 第 1 章 研究開発の概要

|     |                           |   |
|-----|---------------------------|---|
| 1-1 | 研究開発の背景・研究目的及び目標          | 1 |
| 1-2 | 研究体制（研究組織・管理体制、研究者氏名、協力者） | 2 |
| 1-3 | 成果概要                      | 6 |
| 1-4 | 当該研究開発の連絡窓口               | 7 |

## 第 2 章 本論

|       |                                  |    |
|-------|----------------------------------|----|
| 2-【1】 | 米糠発酵抽出物の微生物の選択                   |    |
| 【1-1】 | 食用植物からの、有用糖脂質を有するグラム陰性細菌のスクリーニング | 8  |
| 【1-2】 | 糖脂質の分析と米糠発酵抽出物のグラム陰性細菌の選択        | 8  |
| 【1-3】 | 新規糖脂質の構造解析                       | 8  |
| 2-【2】 | 米糠発酵抽出物の製造法の確立                   |    |
| 【2-1】 | 製造法の確立                           | 14 |
| 【2-2】 | 規格決定（保存安定性試験を含む）                 | 17 |
| 2-【3】 | 米糠発酵抽出物の品質管理技術の確立                |    |
| 【3-1】 | 有効成分糖脂質に対する特異的モノクローナル抗体の取得       | 18 |
| 【3-2】 | 当該特異的モノクローナル抗体を用いた ELISA 法の確立    | 18 |
| 【3-3】 | 当該 ELISA 法による有効成分糖脂質分析           | 22 |
| 【3-4】 | 安全性試験                            | 23 |
| 2-【4】 | 効果実証試験                           |    |
| 【4-1】 | 末端製品の試作                          | 26 |
| 【4-2】 | ヒトでの効果実証試験                       | 26 |

|       |      |    |
|-------|------|----|
| 第 3 章 | 全体総括 | 27 |
|-------|------|----|

# 第1章 研究開発の概要

## 1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標

### (1) 背景

発酵食品メーカーは、発酵において基質と微生物と製造法で独自性を出し、オンリーワン商品がつけられることが強みである。我が国の発酵食品メーカーは、ものづくりにおいて高いノウハウを有している。設備の近代化も進み、風味を時代のニーズに合わせて調整することも、反対に伝統的な手法を踏襲することで独特の風味を一貫して守ることもできる経験と技術を有している。さらに、これらの技術力を利用して、食品、化粧品分野の末端商品の製造・販売への事業拡大・多角化に進んでいる製造業者も多い。しかし今や、酒、味噌、しょうゆなど伝統的食品以外の機能性食品領域でも、基質では種々のポリフェノール含有植物・果物・乳、微生物では麴・酵母・乳酸菌を使う限りにおいては、類似商品となりやすく、技術水準が揃っているだけに国内市場が飽和しつつある。このような背景にあって、発酵食品メーカーのニーズは、時代にマッチし、かつ差別化できる高付加価値商品の開発である。

### (2) 研究目的

時代にマッチし、かつ差別化できる高付加価値商品「米糠発酵抽出物」を開発する。

自然免疫応用技研㈱が世界で初めて開発した糖脂質による自然免疫賦活技術（安全なグラム陰性細菌の糖脂質を発酵培養で調整し、食品、外用剤に配合して摂取することで動植物の免疫力を高める技術）を適用し、免疫賦活市場をターゲットとし、発酵微生物に、従来の麴、酵母、乳酸菌に代わり、糖脂質を持つグラム陰性細菌を使うことで、「自然免疫賦活」機能を持たせた「米糠発酵抽出物」をつくる。

### (3) 目標

#### 【1】米糠発酵抽出物用の微生物の選択

【1-1】食用植物からの、有用糖脂質を有するグラム陰性細菌のスクリーニング→終了

【1-2】糖脂質の分析と米糠発酵抽出物用のグラム陰性細菌の選択→終了

【1-3】新規糖脂質の構造解析

本事業で採用する稲パントエア菌糖脂質について、構造の異なる他の糖脂質と比較し、マクロファージ細胞に対する反応特異性、生物学的特性を明確にする。

#### 【2】米糠発酵抽出物の製造法の確立

##### 【2-1】製造法の確立

新規糖脂質製品を普及させるためには、高収率・低コストで生産する製造法を確立する必要がある。本事業では、1.5 トンタンク（仕込み量1トン）使用で、有効成分糖脂質の回収量1kg以上を目指す。さらにダウンストリームの精製・加工工程で有効成分糖脂質のロスを抑え、収率85%を目標とする（既存の糖脂質商品では収率50%以下）。この収率を高めることにより、食品用米糠発酵抽出物粉体品における有効成分糖脂質あたりの直接製造原価を350万円/kg以下とする（既存の糖脂質商品では約750万円/kg）。すなわち糖脂質を1%含有する食品用米糠発酵抽出物粉体品では、直接製造原価を3.50万円/kg以下とする。

##### 【2-2】規格決定（保存安定性試験を含む）

有効成分糖脂質が、最低2年間安定となる、pH、最終形態、糖脂質含有量を決定する。

#### 【3】米糠発酵抽出物の品質管理技術の確立

【3-1】有効成分糖脂質に対する特異的モノクローナル抗体の取得→終了

【3-2】当該モノクローナル抗体を用いたELISA法の確立

糖脂質を、効果が期待できる容量で含む製品の含量は、低い場合で数十ng/gとなる。そこで有効成

分糖脂質を 1ng/g まで検出できる測定法を確立する。

【3-3】当該 ELISA 法による、有効成分糖脂質分析

米糠発酵抽出物中およびこれを配合した末端製品中の有効成分糖脂質の分析技術を確立する。

【3-4】安全性試験

米糠発酵抽出物素材について、染色体異常、復帰突然変異、単回投与毒性、反復投与毒性の有無を調べる。

【4】効果実証試験

【4-1】末端製品の試作

有効成分糖脂質を主剤とするプロトタイプ食品

(BFSS(Blow Fill Seal System:成形同時充填システム)容器に入れたドリンク)を試作する。

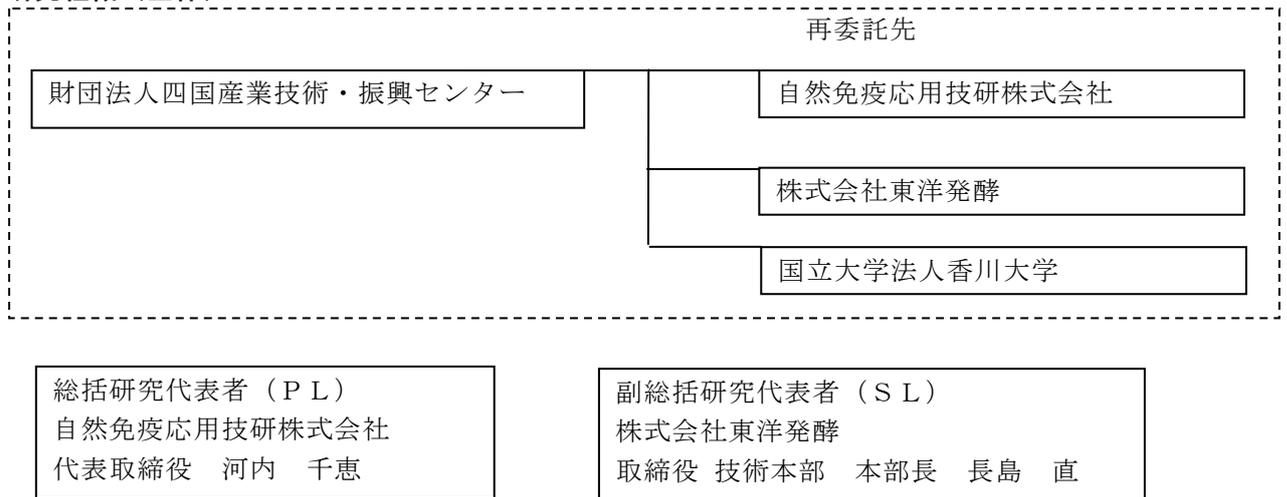
【4-2】ヒトでの効果実証試験

プロトタイプ食品のヒトでの安全性、効果を明らかにする。

## 1-2 研究体制

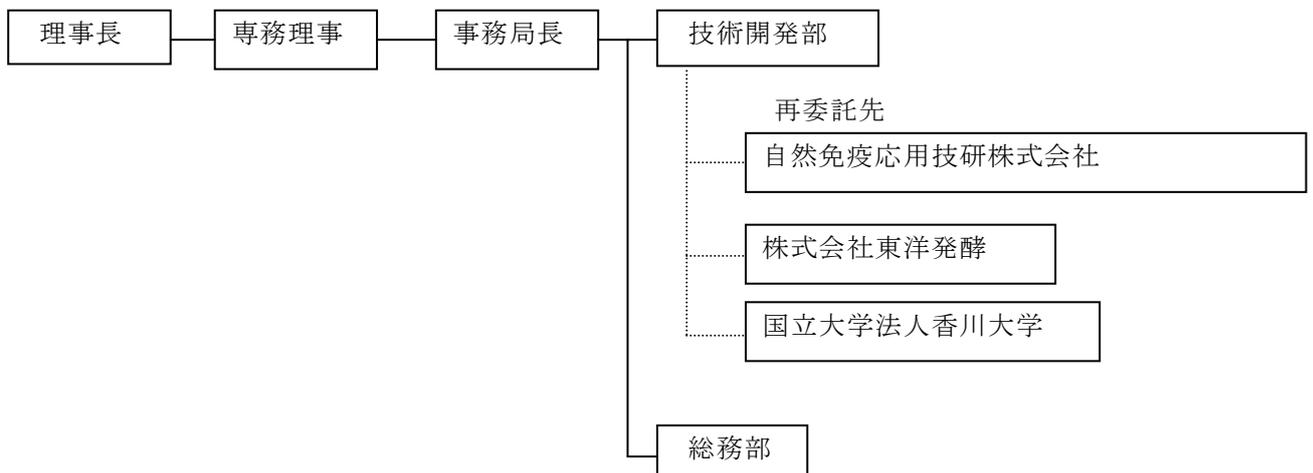
### (1) 研究組織

#### 1) 研究組織(全体)



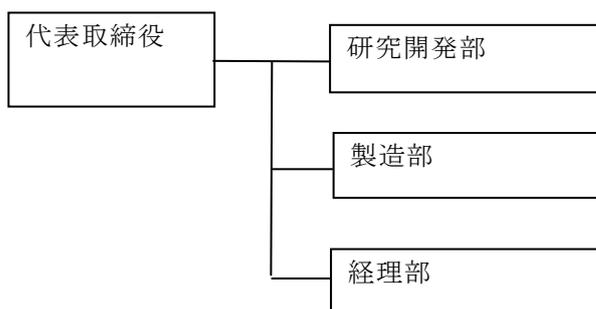
### 2) 管理体制

#### ①事業管理者(財団法人四国産業・技術振興センター)

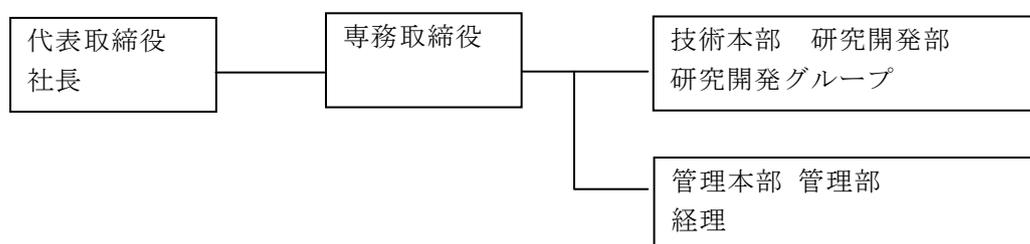


## ②（再委託先）

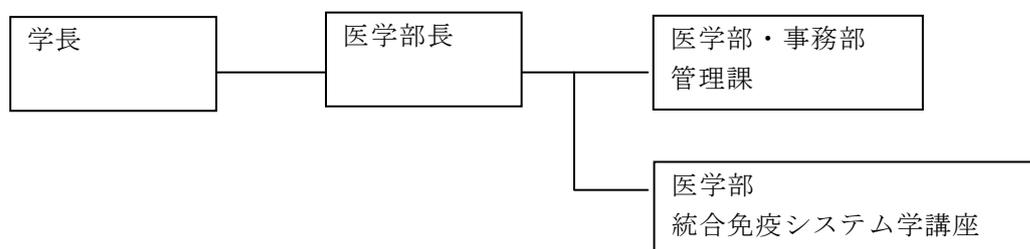
自然免疫応用技研株式会社



株式会社東洋発酵



国立大学法人香川大学



## （２）管理員及び研究員

【事業管理者】 財団法人四国産業・技術振興センター

| 氏名    | 所属・役職    | 実施内容（番号） |
|-------|----------|----------|
| 橋本 誠一 | 事務局長     | ⑤        |
| 都築 秀典 | 技術開発部長   | ⑤        |
| 成瀬 英明 | 技術開発部 部長 | ⑤        |
| 濱野 奉彦 | 技術開発部 課長 | ⑤        |
| 漆原 秀樹 | 技術開発部 課長 | ⑤        |
| 瀬戸 昌子 | 技術開発部    | ⑤        |

【再委託先】

自然免疫応用技研株式会社

| 氏名     | 所属・役職              | 実施内容（番号） |
|--------|--------------------|----------|
| 河内 千恵  | 代表取締役              | ③        |
| 西澤 孝志  | 製造部・部長             | ③        |
| 吉田 彩   | 研究開発部・主任研究員（経理部兼務） | ③        |
| 中田 陽子  | 研究開発部・研究員          | ③        |
| 新田 久美子 | 製造部・研究員            | ③        |

株式会社東洋発酵

| 氏名    | 所属・役職           | 実施内容（番号） |
|-------|-----------------|----------|
| 長島 直  | 取締役、技術本部 本部長    | ④        |
| 村上 雅紀 | 技術本部 研究開発部 部長代行 | ②、④      |
| 平松 直人 | 技術本部 研究開発部 研究員  | ②        |

国立大学法人香川大学

| 氏名    | 所属・役職               | 実施内容（番号） |
|-------|---------------------|----------|
| 柚 源一郎 | 医学部統合免疫システム学講座・客員教授 | ①        |

※実施内容

- ① 米糠発酵抽出物用の微生物の選択
- ② 米糠発酵抽出物の製造法の確立
- ③ 米糠発酵抽出物の品質管理技術の確立
- ④ 効果実証試験
- ⑤ 研究全体の統括、プロジェクトの管理・運営

（3）経理担当者及び業務管理者の所属、氏名

（事業管理者）

財団法人 四国産業・技術振興センター  
 （経理担当者） 総務部長 山地 清隆  
 （業務管理者） 技術開発部長 都築 秀典

（再委託先）

自然免疫応用技研株式会社

（経理担当者） 経理部 吉田 彩  
 （業務管理者） 代表取締役 河内 千恵

株式会社東洋発酵

（経理担当者） 管理本部管理部長 福田 麗  
 （業務管理者） 専務取締役 高田 敦士

国立大学法人香川大学

（経理担当者） 医学部事務部長 前川 正  
 （業務管理者） 医学部統合免疫システム学講座 客員教授 柚 源一郎

**(4) 他からの指導・協力者名及び指導・協力事項**

| 指導・協力者名 | 所属・役職              | 指導・協力事項                |
|---------|--------------------|------------------------|
| 森 宏之    | (株)LSI 代表取締役       | マーケティング、認知度向上に関するアドバイス |
| 柳澤 昊永   | (株)プロマ研究所<br>代表取締役 | マーケティング、認知度向上に関するアドバイス |

**(5) 研究開発推進委員会**

| 役割   | 氏名     | 所属・役職                   | 備考     |
|------|--------|-------------------------|--------|
| 委員長  | 河内 千恵  | 自然免疫応用技研(株)代表取締役        | PL     |
| 副委員長 | 長島 直   | (株)東洋発酵 取締役技術本部本部長      | SL     |
| 委員   | 柚 源一郎  | 香川大学医学部統合免疫システム学講座・客員教授 |        |
| 委員   | 村上 雅紀  | (株)東洋発酵 技術本部 研究開発部・部長代行 |        |
| 委員   | 平松 直人  | 同 技術本部 研究開発部・研究員        |        |
| 委員   | 吉田 彩   | 自然免疫応用技研(株) 研究開発部・主任研究員 |        |
| 委員   | 中田 陽子  | 同 研究開発部・研究員             |        |
| 委員   | 西澤 孝志  | 同 製造部・部長                |        |
| 委員   | 新田 久美子 | 同 製造部・研究員               |        |
| 委員   | 森 宏之   | (株)LSI 代表取締役            | アドバイザー |
| 委員   | 柳澤 昊永  | (株)プロマ研究所 代表取締役         | アドバイザー |

**(6) 技術委員会 (WG)**

| 役割   | 氏名     | 所属・役職                   | 備考 |
|------|--------|-------------------------|----|
| 委員長  | 河内 千恵  | 自然免疫応用技研(株)代表取締役        | PL |
| 副委員長 | 長島 直   | (株)東洋発酵 取締役技術本部本部長      | SL |
| 委員   | 柚 源一郎  | 香川大学医学部統合免疫システム学講座・客員教授 |    |
| 委員   | 村上 雅紀  | (株)東洋発酵 技術本部 研究開発部・部長代行 |    |
| 委員   | 平松 直人  | 同 技術本部 研究開発部・研究員        |    |
| 委員   | 吉田 彩   | 自然免疫応用技研(株) 研究開発部・主任研究員 |    |
| 委員   | 中田 陽子  | 同 研究開発部・研究員             |    |
| 委員   | 西澤 孝志  | 同 製造部・部長                |    |
| 委員   | 新田 久美子 | 同 製造部・研究員               |    |

## 1-3 成果概要

### 【1】米糠発酵抽出物用の微生物の選択

#### 【1-3】新規糖脂質の構造解析（生物活性解析も含む）

##### 1. マクロファージ細胞からのサイトカイン誘導：

- ・ 稲共生グラム陰性細菌由来 LPS (LPSa46) は小麦共生グラム陰性細菌由来 LPS (LPSp) よりもマクロファージ細胞からのサイトカイン (IL-12、IL-10、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ ) 誘導量が有意に高い。

##### 2. 抗体との反応性から見た構造の違い：

- ・ 抗体の結合性より、LPSa46 は、LPSp とは LipidA 部分は類似性が高いが、O 抗原多糖部分が異なることが示唆された。

##### 3. ゲノム解析：

- ・ パントエア菌と共通する酵素群と特異的な酵素群があることが分かった。
- ・ LPS が、ABC transporter によって cytoplasm から periplasm へ膜転移するところは、パントエアと同じと推定される。
- ・ 配列から読み取った糖転移酵素の種類から LPSa46 は 3~4 種類の糖で構成されていることが、推定された。

##### 4. 糖鎖のメチル化分析：

- ・ O 抗原多糖部分のラムノースの結合様式が示唆された。

### 【2】米糠発酵抽出物の製造法の確立

#### 【2-1】製造法の確立

平成 21 年度までの検討において 30L Jar (15L 仕込み) での製造試験を終了していたが、基質として使用していた米糠の割合が 7%であった。この条件下では、後工程（培養以降の工程）における米糠の除去操作に時間がかかり、結果的に製造コストが高くなることが懸念された。そこで昨年度の培養条件を踏まえ、米糠の割合（低減）、培地条件および培養条件（攪拌速度、pH 制御等）、LPS 抽出温度等を 5, 30, 300LJar スケールにて再検討を行った。さらに得られた条件を元に、実製造を見据えた 1.5t タンクでの培養にスケールアップさせ、製造コスト削減の観点から各工程にかかる時間、処理のしやすさ、ロス の程度、糖脂質の収率を比較検討し、製造工程を確立した。最終的に米糠の割合を 1%としたが、LPS 濃度は昨年度の 5 倍以上にまで増加した。さらに全工程に要した製造時間も以前の 2/3 にまで短縮でき、結果的に製造原価として約 15%の削減を達成した。

#### 【2-2】規格決定

確立した生産法で調整した糖脂質の品質規格を設定した。糖脂質以外の品質規格については、一般的な食品規格に合わせる事とした。また糖脂質の評価については、再現性のあるリムラス試験での LPS の値を採用した。

### 【3】米糠発酵抽出物の品質管理技術の確立

#### 【3-2】当該特異的モノクローナル抗体を用いた ELISA 法の確立

- ・ マウスモノクローナル抗体の結合性が低いことから、ウサギポリクローナル抗体を使い、直接 ELISA 法の系を確立した。
- ・ 現時点の直接 ELISA 法の感度は  $2\mu\text{g/g}$  で、今後、感度増幅の必要あり。
- ・ 直接 ELISA 法の感度を補う測定方法としてトキシノメーター測定を導入を行った。LPSa46 特異的ではないものの、LPS 成分を  $5\text{pg/g}$  以下の感度で測定可能である。

### 【3-3】当該 ELISA 法による有効成分糖脂質分析

- ・ 確立した直接 ELISA 法及びトキシノメーター測定により、(株)東洋発酵製造品及び配合品中の LPSa46 の測定を行った。

### 【3-4】安全性試験（その他を含む）

- ・ 4 種の安全性試験により、変異原性、毒性がないことが確認された。
- ・ A46 株の生菌をマウスに摂取し、毒性がないことを確認した。
- ・ A46 菌株の葉酸の産生能力を調べたが、大腸菌と差がないことが示された。
- ・ A46 菌株の電子顕微鏡像を得ることにより外見的特徴（1 ミクロン長の桿菌）を確認した。

## 【4】効果実証試験

### 【4-1】末端製品の試作

ヒトでの試験に供する目的で、製造した米糠発酵抽出物（LPS として 1.2mg、ただしリムラス活性換算）を配合した 50ml 容量のドリンクを試作した。

### 【4-2】ヒトでの効果実証試験

試作ドリンクについて、20 歳以上 65 歳未満の男女 20 名を対象にしたオープントライアル試験により、試作ドリンクにより得られる体感の評価をおこなった。慢性自覚症状に関するアンケート調査および血液検査（13 項目）を実施し、有害事象が出ないことが確認できた。体感としては、朝の目覚めが良くなった、便通が良くなった、肩こりが楽になった、鼻炎症状が治まった、などが得られた。

## 1-4 当該研究開発の連絡窓口

財団法人四国産業・技術振興センター 技術開発部 都築、漆原

TEL : 087-851-7081

FAX : 087-851-7027

E-mail : tsuzuki@tri-step.or.jp、urushihara@tri-step.or.jp

## 第2章 本論

### 【1】米糠発酵抽出物用の微生物の選択

本項目では、稲に共生するグラム陰性細菌 A46 株に由来する糖脂質の構造と生物活性を、既存の糖脂質と比較しつつ調査した。

#### 【1-1】食用植物からの、有用糖脂質を有するグラム陰性細菌のスクリーニング

平成 21 年度に取得し、報告済み。

安全で有用な機能性糖脂質を得るため、食用植物あるいは発酵産物（蕎麦、ホワイトソルガム、稲、藍すくも、自然薯、およびその栽培土壌）からグラム陰性細菌を 91 種スクリーニングライブラリー化した。うち 28 株について同定を行なった。同定した菌のうち、米糠発酵に適する菌として稲の根由来のグラム陰性細菌 A46 株を選択した。

#### 【1-2】糖脂質の分析と米糠発酵抽出物用のグラム陰性細菌の選択

平成 21 年度に取得し、報告済み。

A46 株の糖脂質（LPSa46）を精製し、その生物活性と構造解析を行なった。LPSa46 は、既存の糖脂質である LPSp に比較して分子量が小さいことがわかった。また単位重量あたりの、マクロファージ活性化能は既存の糖脂質である LPSp の 3 倍であった。構造的には、Lipid A 部分、O 抗原多糖部分とも LPSp と異なる可能性が生物活性の結果から示唆された。また構成糖分析により、LPSa46 には、グルコース、ラムノース、マンノース、ガラクトースを含有することがわかった。

#### 【1-3】新規糖脂質の構造解析

##### （研究目的）

本事業で採用する稲パントエア菌糖脂質について、構造の異なる他の糖脂質と比較し、マクロファージ細胞に対する反応特異性、生物学的特性を明確にする。

##### （研究内容）

LPSa46 について、マクロファージ細胞から誘導されるサイトカインの種類と量等生物学的特性を比較し、別種グラム陰性細菌の糖脂質との差別化を図る。

##### （研究成果）

#### 1. マクロファージ細胞からのサイトカイン誘導

##### （1）材料と方法

###### <細胞>

- ・ Human acute monocytic leukemia cell line (ATCC)
- ・ ヒト末梢血由来単核球

###### <試薬>

- ・ phorbol 12-myristate 13-acetate (Sigma)
- ・ Human Macrophage Colony Stimulating Factor (Peprotech)
- ・ Human Granulocyte/ Macrophage Colony Stimulating Factor (Chiron)
- ・ LPS derived from *Pantoea agglomerans* (LPSp, Macrophil)
- ・ Ultra pure LPS derived from *Escherichia Coli* O111:B4 (LPSe, Invivogen)
- ・ Ultra pure LPS derived from *Porphyromonas gingivalis* (LPSg, Invivogen)
- ・ Ficoll-Hypaque (IBL)
- ・ RNeasy Mini kit (Qiagen)
- ・ ReverTra Ace- $\alpha$  (Toyobo)

- iQ sybr green supermix (Bio-rad)
- RPMI-1640 medium (Wako)
- penicillin and streptomycin sulfate (Invitrogen)
- Fetal Calf Serum (Moregate Biotech)
- 2-mercaptoethanol (Wako)
- Cell scraper (TPP)

#### <器具>

- 24 well plate
- 60mm dish
- Opticon monitor 3 (Bio-rad)

#### <マクロファージ細胞の調整>

マクロファージ細胞から誘導されるサイトカインの種類と量等生物学的特性を比較検討するために、4種類のマクロファージ系細胞を用いた。具体的には、THP-1、THP-1をPMAにより分化誘導したマクロファージ (PMA-THP-1)、ヒト末梢血をM-CSFあるいはGM-CSFにより分化誘導したマクロファージ (M-PBDM, GM-PBDM)をそれぞれ用いた。具体的には、THP-1をPMA (5 ng/ml)添加し、48時間培養することで、PMA-THP-1とした。末梢血からFicoll-Hypaqueを用いて、末梢血単核球を得たのちに、M-CSF (10 ng/ml)あるいはGM-CSF (10 ng/ml)をそれぞれ添加し、1週間培養することで、M-PBDM、GM-PBDMとした。培養液は、3日目に半量、6日目に全量交換した。

#### <サイトカインの測定>

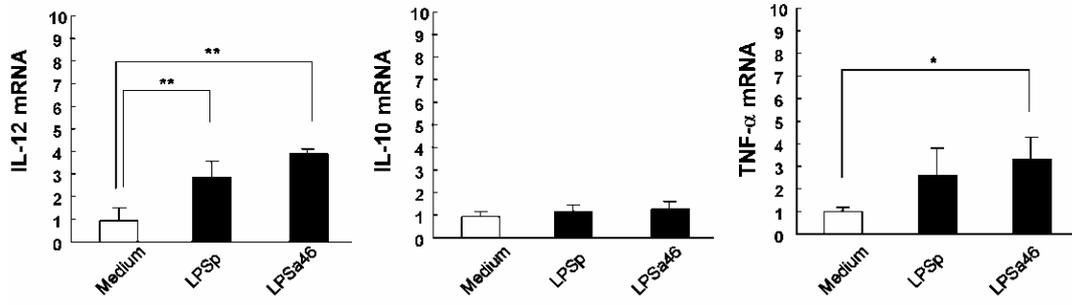
分化後のマクロファージに、各種LPS (100 ng/ml)を添加し、4時間後にRNeasy Mini kitを用いてRNAを抽出し、ReverTra Ace- $\alpha$ を用いて逆転写反応を行い、これを鋳型として各種サイトカインに対応するプライマーを用いてリアルタイムPCRにより、サイトカイン mRNAの発現量を定量した。内在性コントロールとして、Cyclophilinを用いた。

### (2) 結果

THP-1、PMA-THP-1、M-PBDM、GM-PBDMに種々の糖脂質を添加培養し、4時間後のサイトカイン mRNAの発現について、リアルタイムPCRにより定量化した (図1)。

- THP-1細胞に対しては、LPSa46添加によって有意にIL-12、TNF- $\alpha$ のmRNA発現量が増加した。一方、パントエア菌由来のLPS (LPSp)添加では、IL-12 mRNAにおいてのみ、発現量の増加が認められた。また、IL-10 mRNAの発現量はいずれのLPSを用いても変化が認められなかった。
- PMA-THP-1細胞に対しては、LPSa46、LPSp添加により、IL-12、IL-10、TNF- $\alpha$ のmRNA発現量が増加した。また、これらの誘導される遺伝子発現量は、LPSpが誘導する発現量よりもLPSa46が誘導する発現量の方が有意に高かった。
- M-PBDMに対しては、LPSa46、LPSp、LPS<sub>e</sub>添加により、IL-12、IL-10、TNF- $\alpha$ のmRNA発現量が増加した。また、LPSa46が誘導するTNF- $\alpha$  mRNAの発現量は他のLPSが誘導する発現量よりも有意に高かった。
- GM-PBDMに対しては、LPSa46、LPSp、LPS<sub>e</sub>添加により、IL-12、TNF- $\alpha$  mRNAの発現量が増加した。また、LPSa46が誘導するTNF- $\alpha$  mRNA発現量は他のLPSが誘導する発現量よりも有意に高かった。

**THP-1 cells**



**PMA-THP-1 cells**

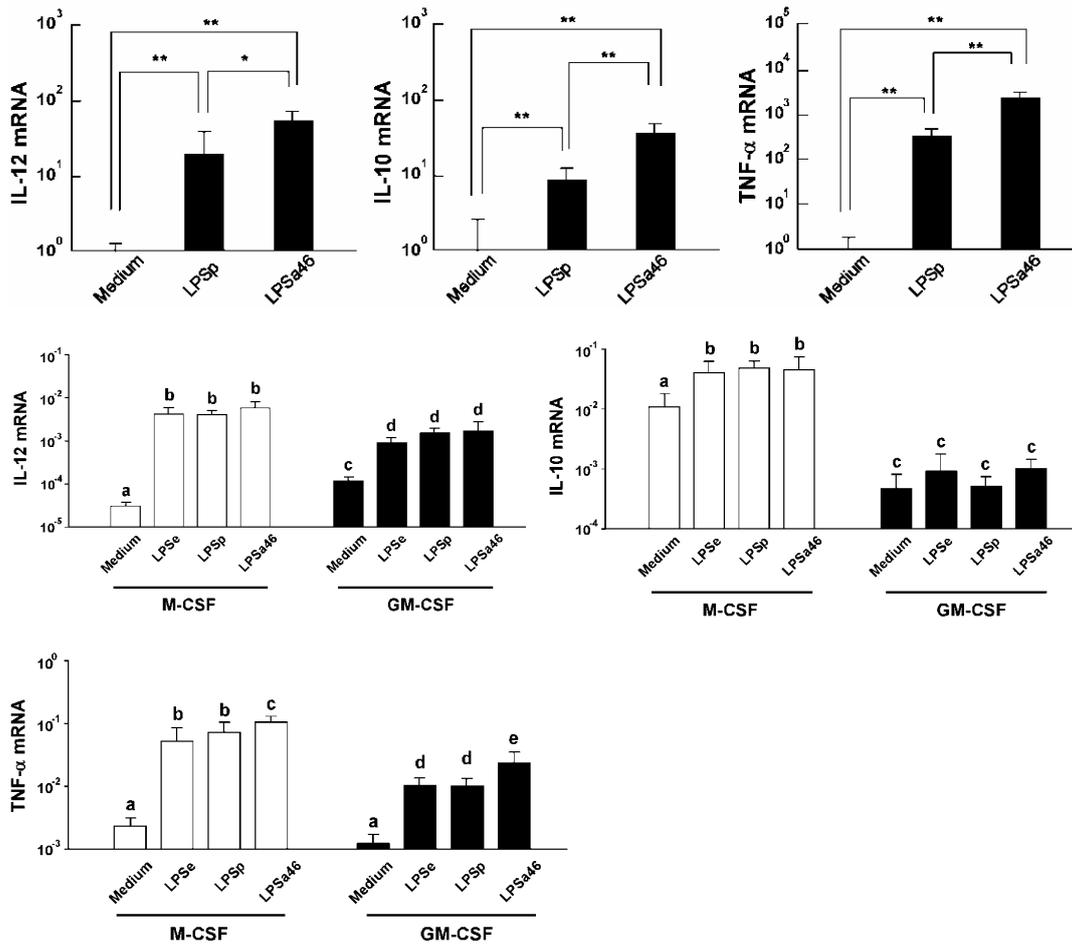


図 1 : LPS の種類によるサイトカイン発現誘導の比較

## 2. 抗体との反応性からみた構造の違い

### (1) 材料と方法

#### <試薬>

- ・ LPS は 1 と同様
- ・ ドデシル硫酸ナトリウム (ナカライテスク)
- ・ トリシン (AppliChem)
- ・ トリス (ナカライテスク)
- ・ APS (Wako)
- ・ TEMED (Wako)
- ・ 銀染色 II キットワコー (Wako)
- ・ ECL Blocking Reagent (GE ヘルスケア)
- ・ PVDF フィルター (Bio-rad)
- ・ 大塚蒸留水 (大塚製薬)
- ・ Prestained protein marker (NEB)
- ・ NBT (Wako)
- ・ BCIP (Wako)
- ・ ジメチルホルムアミド
- ・ 塩化マグネシウム
- ・ Lipid A mAb (Abcam)
- ・ アルカリフォスファターゼ標識 Anti mouse IgG Ab (Sigma)
- ・ Anti LPSp antibody (自然免疫応用技研)
- ・ illustra bacteria genomicPrep Mini Spin Kit (GE ヘルスケア)

#### <ウェスタンブロット解析>

トリシンを用いたドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル (ポリアクリルアミドの濃度 15%) 電気泳動 (Tricine-SDS-PAGE) により、精製糖脂質を分画した。糖脂質は  $5\mu\text{g}/\text{lane}$  あるいは  $10\mu\text{g}/\text{lane}$  で泳動した。銀染色は銀染色 II キットワコーを用いて染色した。また、ウェスタンブロットは、Tricine-SDS-PAGE により展開したゲルを PVDF 膜に、108 mA 90 分転写した。次いで、2% ECL Blocking Reagent in TBS により、一晚  $4^{\circ}\text{C}$  でブロッッキングしたのちに、抗 Lipid A 抗体、抗 LPSp 抗体を用いて染色し、NBT/BCIP 法により可視化した。

### (2) 結果

- ・ Lipid A に対する抗 LipidA mAb は、全ての LPS に結合した。一方、LPSp の O 抗原多糖に対する抗 LPSp mAb は、LPSp のみに結合した (図 2)。これらの結果から、LPSa46 は、Lipid A 部分が他の LPS と保存性が高く、O 抗原多糖部分が異なることが示唆された。
- ・ 平成 21 年に取得した LPSa46 に対する抗 LPSa46 mAb は LPSe、LPSp および LPSa46 に結合した。今回、ウサギを用いて作製した LPSa46 に対する抗 LPSa46 pAb は LPSg と交差する可能性がみられたが、その他の LPS には結合しなかった (図 3)。

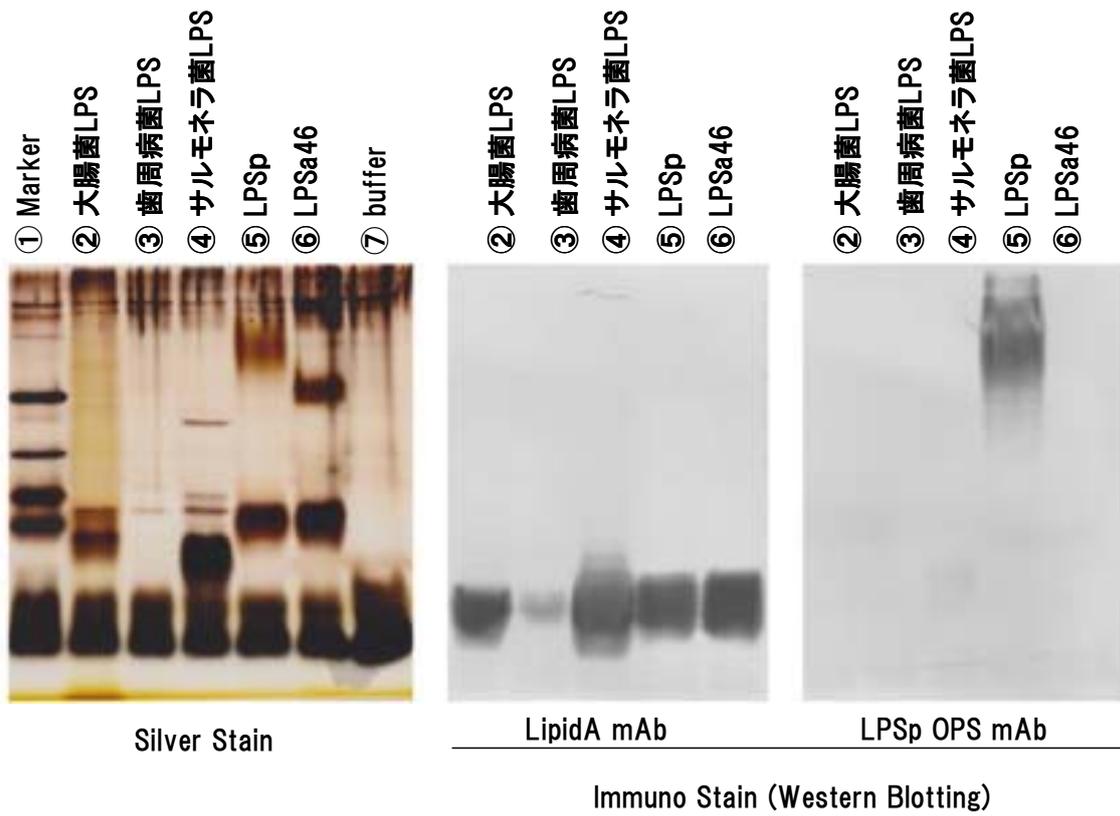


図 2 : 抗 LipidA mAb 及び LPSp mAb を使ったウエスタンブロット解析

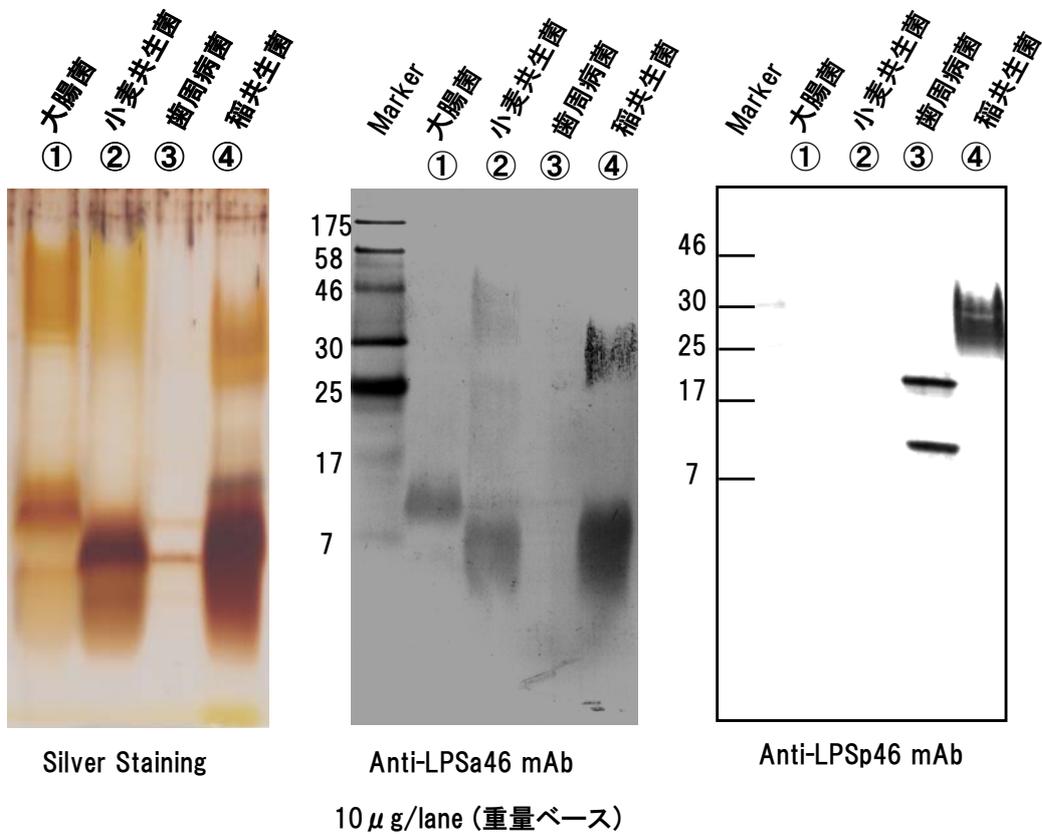


図 3 : 抗 LPSa46 mAb 及び pAb を使ったウエスタンブロット解析

### 3. ゲノム解析

#### (1) 方法

A46 株を LB 培地で一晚培養した。この菌液を、illustra bacteria genomicPrep Mini Spin Kit を用いて、ゲノム DNA を抽出し、全ゲノム解析の鋳型とした。全ゲノム解析は九州大学の協力を得て、実施した。

#### (2) 結果

これまでに示唆されている構造の違いを、それぞれが持つ転移酵素の種類から検討するために、ゲノム解析を行った。その結果、A46 株は Pantoea agglomeranse と共通する酵素群と、異なる特異的な酵素群を持つことがわかった。

### 4. 糖鎖のメチル化分析 (外注)

#### (1) 材料と方法

- ・ サンプルは、LPSa46 0.98mg に精製水 980  $\mu$ l を添加後、超音波処理 (5min、37°C) にて溶解し、1mg/ml 濃度に調整した。
- ・ 測定には、ガスクロマトグラフ HP5890 (Hewlett-Packard 社) 使用した。

#### (2) 結果

平成 21 年度の解析から LPSa46 には、ラムノース、マンノース、ガラクトース、グルコースが存在することがわかっていて、メチル化分析のクロマトグラフのスペクトルのピーク値が存在量 (比率) に相当すると仮定すると、ピーク値が低いものは Lipid A、コア多糖由来の糖に該当すると考えられる。これまでの抗体との反応性結果と併せて考えられる A46 の構造パターンとして、「 $\rightarrow$ 4 GlcN 1 $\rightarrow$ 」と「 $\rightarrow$ 6 GlcN 1 $\rightarrow$ 」は Lipid A 由来であり、「 $\rightarrow$  3 GlcN 1 $\rightarrow$ 」はコア多糖由来であること、Rha は O 抗原多糖にあり、4, 1 位結合タイプと 3, 4, 1 位結合タイプの②パターンあること、一部は Hex でキャップされている構造が推定された (図 4)。

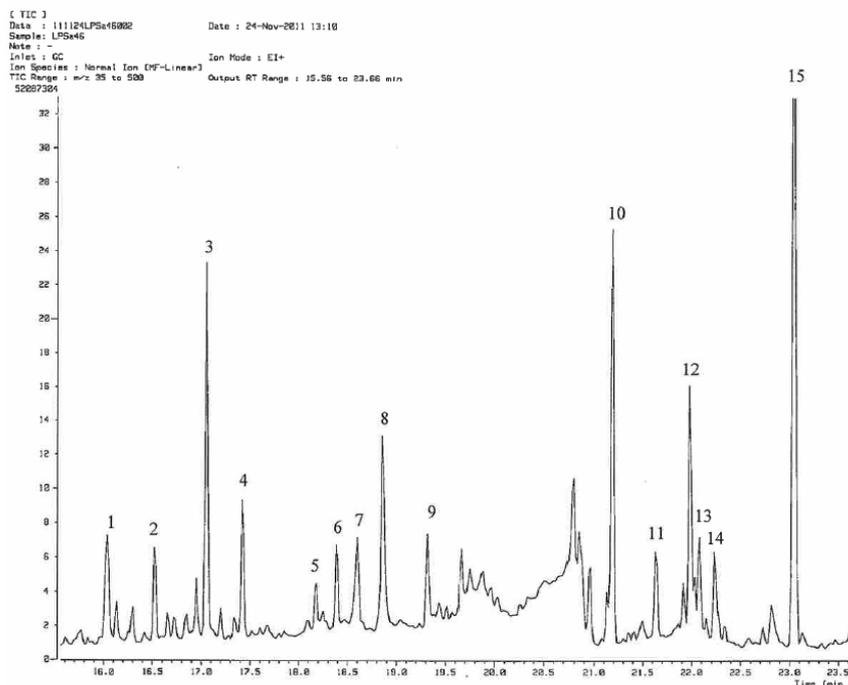


図 4：メチル化分析カレントクロマトグラフ (16min から 23min 付近の拡大図)

## 【2】米糠発酵抽出物の製造法の確立

スクリーニングしたグラム陰性細菌 A46 株を使用し、農産廃棄物である米糠を発酵基質として、免疫活性化能を持つ高付加価値化発酵食品素材（以下、「米糠発酵抽出物」という。）の 1500L フェーメンターを用いた実製造スケールでの製造法を確立した。

### 【2-1】製造法の確立

#### （研究目的）

平成 21 年度の検討において 30L ジャー（15L 仕込み）での製造試験を終了していたが、基質として使用していた米糠の割合が 7%であった。この条件下では、後工程（培養以降の工程）における米糠の除去操作に時間がかかり、結果的に製造コストが高くなることが懸念された。そこで昨年度の培養条件を踏まえ、米ぬかの割合（低減）、培地条件および培養条件（培地成分、攪拌速度等）、糖脂質抽出温度等の再検討を行う。さらに 1500L フェーメンターを用いて、製造コスト削減の観点から、培養後各工程にかかる時間、それに続く工程の処理のし易さ、ロスの程度、糖脂質の収率を比較検討し、実製造を見据えた製造工程を確立することを目的とした。

#### （研究内容）

5L から 1500L のフェーメンターを用いて、米糠発酵抽出物の製造を行った。

#### （研究成果）

##### 1. 培養工程における検討項目及び結果

＜米糠の添加量＞

使用する米糠の割合の低減を目的として、米糠添加量を 1～7%の間で割り振り、5L ジャーにて培養検討を行った。上記の割合で米糠を添加した液体培地に、事前に LB 培地で前培養させた A46 株を移植し、通気させながら培養を行った。培養終了後、加温し有効成分である糖脂質を抽出した。その後遠心分離により上清を回収し、リムラス試験により糖脂質量の測定を行った結果、米糠の割合を変化させても糖脂質量に差は見られなかった。以上より、後工程での処理のしやすさを考慮し米糠の添加量は 1%とすることとした。

＜培地成分＞

以前の検討では、基質として使用する米糠のみでの培養であったが、別途 C 源や N 源の添加による菌の生育および LPS 量の変化について検討した。米糠に炭素源としてグリセリンとグルコース、さらに窒素源として酵母エキスを不使用し、LB 培地で前培養した A46 株を 5L ジャーに移植後、培養を行った。なお、酵母エキス添加による培地の発泡を抑制するために、非シリコン系消泡剤を少量添加した。培養終了後、糖脂質を抽出しその濃度を測定した結果、グルコースと酵母エキスを添加したときに最も高い値を示した。以上より、培地成分を米糠、グルコース、酵母エキスに決定した。

＜攪拌・通気条件＞

平成 21 年度の報告ではフラスコスケールにおいて緩やかな振とう培養を行った際に糖脂質量が多くなったという見解に至ったが、フェーメンターを用いた培養では攪拌翼の回転と曝気によって培地の混合を行うことになり、穏やかな培養では添加した米糠がタンク底面に滞留することも懸念された。そこで攪拌条件について 5L ジャーを用いて検討した。回転数を低速、高速とし、A46 株を LB 培地で前培養した後米糠含有培地に移植し、攪拌培養した。その結果、回転数が高速のときの方が低速のときに比べて約 2 倍糖脂質の値が高くなった。なお、通気量についても検討を行ったが、糖脂質の値に差は見られなかった。過剰な曝気は培地の発泡を誘発する可能性があるため、通気量は発泡しない程度の量とした。

### <糖脂質抽出温度>

平成 21 年度の検討では、糖脂質の抽出は 90℃（オートクレーブ使用）での保温が最適と判断したが、ファーマンターでの加温は、その機構上オートクレーブのように瞬時に達温するわけではないため、熱履歴がフラスコスケールとは異なる（長くなる）ことが想定された。そこでファーマンターでの糖脂質抽出を見越して、再度抽出温度を検討した。5L ジャーで培養した培養液をオートクレーブにて 90℃、95℃、105℃で加温し、糖脂質の濃度を比較した。その結果、90℃と 95℃では糖脂質の値に差が見られなかったが、105℃では上記 2 つに比べて 10%以上低くなった。糖脂質は加熱により消失するという報告があるが、それと一致した結果となった。以上より、糖脂質抽出温度は 95℃を採用することとした。

## 2. 後工程における検討項目及び結果

### <固形分除去および残渣成分の除去>

固形分除去および残渣成分の除去として、遠心分離機による条件検討を行った。

自社で保有している遠心分離機には 2 種類のタイプがあり、1 つは固形分を自動排出する機能を備える分離板型の遠心機で、もう 1 つはシャープレスと呼ばれる内部の回転筒に固形分を蓄積させるタイプである。それぞれ一長一短があり、シャープレスは回転数が高く遠心力をかけられるため、微細な固形分の除去には適しているが、処理量能力が 60L/h と低く、また固形分が回転筒内部に溜まるため、一定時間ごとに機械を止め回転筒内の固形分を取り除かなければならない。一方、分離板型の遠心機では、遠心力は弱いと 200L/h 以上の処理が可能であり、さらに固形分自動排出機能を有するため、機械を停止させる必要がない。以上の機械の特性を踏まえた上で工程確立を行った。

培養液中の固形分としては、主に米糠、菌体の 2 種類であり、固形分の割合としては合わせて 2～3%程度になる。そこで 1st STEP として分離板型遠心機によって米糠とある程度の菌体を除去することとした。結果、遠心後の上清には米糠は残存せず、固形分は約 1%まで減少した。なおこれをシャープレスで処理すると、200L ごとに機械を止めて内部の固形分を取り除かなければならず、相当の時間と手間を要することとなったため不適とした。

続いて 2nd STEP として、シャープレスにより微細な固形分を除去する工程を検討した。ただし大量の液を本機に供するのは機械特性上適さないため、濃縮によって液の容量を減らす工程を考えた。濃縮はあるレベルまで行くと液の粘性が上がり、膜の目詰まりによるパフォーマンスの低下が起こりうるため、膜の能力と処理時間の低減も踏まえて検討した。最終的に分離板型遠心機によって遠心した 1t の液体を 4～5 倍濃縮したときに、濃縮工程とシャープレス処理工程の製造時間が最短となった。なおこの濃縮液を、シャープレスを介さず直接フィルタープレスに供し清澄ろ過を行ったが、すぐに目詰まりが生じたため本工程は不適とした。

### <上澄みからの残渣の除去>

遠心分離機では除去しきれない微細な固形分を除くために、ろ過助剤を用いた清澄ろ過法の検討を行った。使用する助剤としては、細孔の大きさが異なる 3 種類の珪藻土を選択した。試料溶液に各助剤を添加（ボディフィード）し、さらにプレコートをしたフィルタープレス機に通液させ、その上清を 15000rpm, 5min で遠心後、残存固形分を測定した。なお、清澄ろ過は助剤のプレコーティングや試料溶液の調製に時間を要するため、何回も行うことは時間的ロスとなる。そのため、原則 1 度の処理で固形分を除去できる条件設定を目的とした。その結果、細孔の大きさが最小の助剤を使用した場合には、処理時間は多少長くなるものの固形分を完全に除去することができた。また上清の電気伝導度も低値を示した。

### <濃縮工程>

溶液中の固形分濃度 (Brix) を指標として濃度設定を検討した。濃縮は上記でも述べているように、あるレベルまで濃縮させると液の粘性が上がり固形分濃度が増加するため、膜の目詰まりによるパ

フォーマンズの低下が考えられる。そこで膜の能力と処理時間を踏まえたうえで固形分濃度を検討した結果、最終固形分濃度として約 10%まで濃縮した際に、処理時間が最短となった。

#### <pH 条件>

後工程の処理では開放系での作業となるため、雑菌によるコンタミネーションが懸念された。そこでpHを酸性条件にて後工程の処理を行い、最後に中和することとした。当初は添加する酸のボリュームを考慮して 1 次濃縮後に添加していたが、最終粉末品において一般細菌数が  $10^3$ 個/gとかなり多く検出された。そこで、加温して糖脂質を抽出した後に酸を添加し処理したところ、最終粉末品中の一般細菌数は  $10^1$ 個/gまで減少した。以上より、酸の添加は糖脂質抽出後に行うこととした。

#### <粉末化>

できる限りロスが少ない粉末化の方法についての検討を行った。糖脂質は熱をかけることで消失するとの報告があるため、糖脂質の品質規格値を担保するために、あらかじめ規格値よりも高い濃度となるように賦形剤を添加することとした。また、賦形剤にはサンプルとの相性を考慮し、食経験の豊富な水溶性デキストリンを選択した。スプレードライの温度条件については、上述しているとおり糖脂質が熱に弱いので噴霧温度を高くすることはできないが、逆に低すぎると粒子が形成されず綿飴状になりやすい。さらに水分を飛ばすためにより多くの時間を要するため、結果製造時間が長くなってしまふことが懸念された。以上を踏まえた条件下でスプレードライを行った結果、均一な粒度の粉末が得られ、スプレードライ工程における歩留まりは 98%と良好な結果が得られた。米糠発酵抽出物は濃縮後の液の粘性が非常に低いためスプレードライとの相性はよく、またある程度の粒度をもつため粉体混合にも適していた。スプレードライ製造工程を下記に示す。

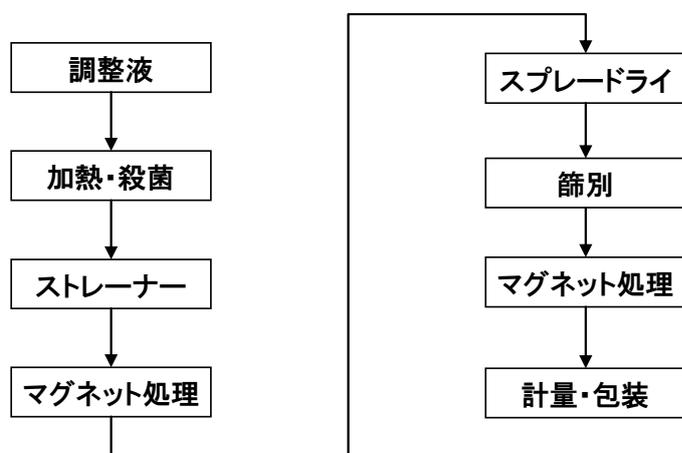


図 5：米糠発酵抽出物スプレードライ製造工程

#### <300L ファーマンターによる米糠発酵抽出物の製造>

検討した結果を踏まえ、より実製造に近い 300Lファーマンターを用いた米糠発酵抽出物の試験製造を行った。LB培地で前々培養したA46 株を、米糠、グルコース、酵母エキス、非シリコン系消泡剤を添加した滅菌済み前培養培地に移植し、NaOHと $H_2SO_4$ を適宜添加しながら攪拌培養を行った。さらに 300Lファーマンターに米糠、グルコース、酵母エキス、シリコン系消泡剤を添加した滅菌済み本培養培地に前培養液を移植し、NaOHと $H_2SO_4$ 、非シリコン系消泡剤を適宜添加しながら攪拌培養を行った。培養後、95℃で加熱し糖鎖を遊離させ、糖脂質濃度が  $1000 \mu g/mL$ 以上の抽出液を得た。この抽出液を遠心分離機、ろ過機、濃縮機を用いて精製し、さらに得られた濃縮液をスプレードライに供し、最終的に  $10mg/g$ 以上の米糠発酵抽出物粉末を得た。得られた粉末を安全性試験に供した。

### <1500L フェーマンターによる米糠発酵抽出物の製造>

検討した結果を踏まえ、実製造スケールである 1500Lフェーマンターを用いた米糠発酵抽出物の試験製造を行った。LB培地で前々培養したA46 株を、米糠、グルコース、酵母エキス、非シリコン系消泡剤を添加した滅菌済み前培養培地に移植し、NaOHとH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、非シリコン系消泡剤を適宜添加しながら攪拌培養を行った。さらに 1500Lフェーマンターに米糠、グルコース、酵母エキス、シリコン系消泡剤を添加した滅菌済み本培養培地に前培養液を移植し、NaOHとH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、非シリコン系消泡剤を適宜添加しながら攪拌培養を行った。培養後、95℃で加熱し糖鎖を遊離させ、糖脂質濃度が約 1000 μg/mL以上の抽出液を得た。続いて遠心分離機、ろ過機、濃縮機を用いて精製し、米糠発酵濃縮液を得た。この濃縮液を用いて効果実証試験用のドリンクを試作した。さらに残った濃縮液をスプレードライに供し、最終的に約 20mg/g以上の米糠発酵抽出物粉末が完成した。

1500L フェーマンターによる米糠発酵抽出物の製造においては、昨年度に検討していた米糠の割合を 1/5 程度に削減し、さらにグルコース、酵母エキスの添加により、培養後の糖脂質濃度においては昨年度の 5 倍以上となった。さらに全工程に要した製造時間においても 30%程度短縮でき、結果的に製造原価として 10%以上の削減を達成した。

## 【2-2】規格決定

### （研究目的）

3 回以上の試行により、糖脂質含量、菌数、金属イオン等のデータを取り、規格を決定する。糖脂質含量については、リムラス法と ELISA 法にて測定する。また、40℃、60℃における加速試験を行い、糖脂質の長期保存安定性を調べることを目的とした。

### （研究内容）

1500L フェーマンターによる実製造スケールで製造した糖脂質の品質規格を設定した。

### （研究成果）

5L～1500L フェーマンターにより試作製造したサンプルを用いて、品質検査項目のデータ取りを行った。最終的に糖脂質以外の品質規格については一般的な食品規格に合わせる事とした。また糖脂質の評価については再現性のあるリムラス試験での糖脂質の値を採用することとした。糖脂質の長期保存安定性については、40℃、60℃における加速試験を現在も継続して行っているが、現時点では品質規格を担保している結果が得られている。

表 1：米糠発酵抽出物・規格

| 項目    | 規格          |
|-------|-------------|
| 糖脂質   | 20mg/g 以上   |
| 外観、形状 | 白濁色         |
| 重金属   | 20 ppm 以下   |
| ヒ素    | 2 ppm 以下    |
| 一般生菌数 | 1000 個/g 以下 |
| 大腸菌群  | 陰性          |
| カビ、酵母 | 100 個/g 以下  |
| 水分量   | 7.0% 以下     |
| 異物    | 異物を含まないこと   |

### 【3】米糠発酵抽出物の品質管理技術の確立

本項目では、米糠発酵抽出物中の有効成分となる LPSa46 を特異的に測定する ELISA 法の確立を行い、本方法を用いて、製造された米糠発酵抽出物の含量の測定を行った。また、品質管理の観点から、米糠発酵抽出物の安全性を種々の方法にて確認した。

#### 【3-1】有効成分糖脂質に対する特異的モノクローナル抗体の取得

平成 21 年度に取得し、報告済み。

マウスに LPSa46 を免疫した上で、脾臓を摘出し、当該抗体を産生するハイブリドーマを 5 種スクリーニングした。このうち安定的に抗体を産生する株として 2 種が確認された。

#### 【3-2】当該特異的モノクローナル抗体を用いた ELISA 法の確立

##### （研究目的）

糖脂質を、効果が期待できる容量で含む製品の含量は、低い場合で数十 ng/g となる。そこで有効成分糖脂質を 1ng/g まで検出できる測定法を確立する。

##### （研究内容）

既に取り得た有効成分糖脂質を認識するモノクローナル抗体について、アイソタイプの決定、腹水化による抗体の量産化を行う。さらに測定感度を上げるためにウサギのポリクローナル抗体の組み合わせを検討する。これら 2 種類の抗体を組み合わせ、サンドイッチ方式の高感度 ELISA 測定法を開発する。

##### （研究成果）

#### 1. 品質保証を可能にする糖脂質の測定技術概念

糖脂質 (LPS) は、lipidA と呼ばれる脂質部分と糖鎖からなる。LPS を測定する方法として、脂質部分の生物活性を利用するリムラス法が一般的である。しかしリムラス法は、LPS 全般を測定するものであり、LPS の種類を特定することはできない。これに対し、LPS の糖鎖に対する抗体を利用して測定することで、異なる LPS を区別して測定することが可能となる。そこで、本項目では、抗体を使う ELISA (Enzyme Linked Immuno Solvent Assay) 法の確立をめざした。

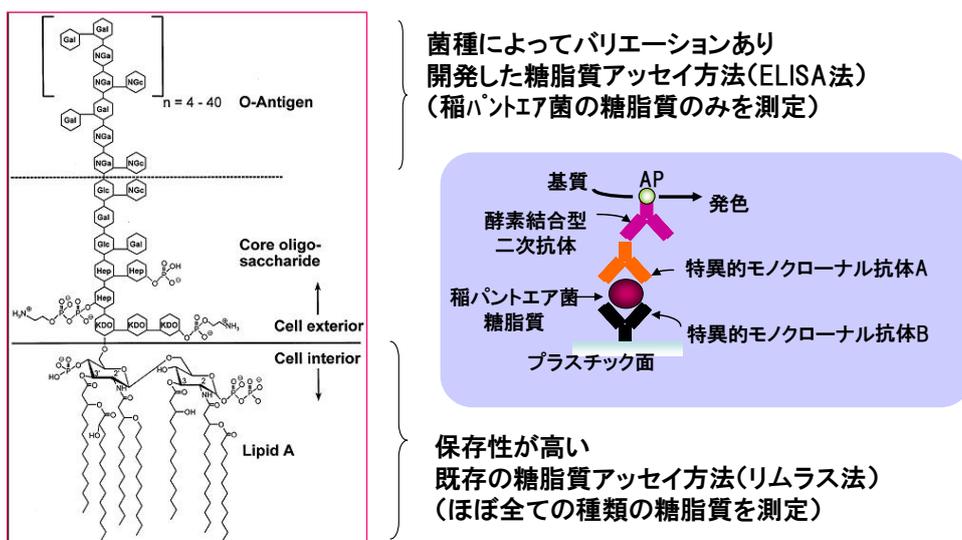


図 6：品質保証を可能にする糖脂質の測定技術概念

## 2. これまでの状況と今回の方針

平成 21 年度に、A46 株由来の LPSa46 に結合するモノクローナル抗体を 2 種取得した。2 種のうち、1 種はハイブリドーマの増殖が悪く大量調整ができなかった。もう一方のモノクローナル抗体は、LPSa46 に対する結合性、特異性が十分でないことが明らかとなったため、加えてウサギのポリクローナル抗体を調整し、モノクローナル抗体との組み合わせ、またはポリクローナル抗体単独の ELISA 法の確立をめざすこととした。

## 3. ポリクローナル抗体の取得

抗体作製は株式会社ベックスに外注したが、方法は下記のとおりである。

免疫用の抗原として精製 LPSa46 を用い、ウサギ 2 羽にそれぞれ体重当たり  $10 \mu\text{g}/\text{kg}$  の用量で皮下投与した。初回免疫時は、精製 LPSa46 をフロイトのコンプリートアジュバンドと共に投与した。二回目以降は精製 LPSa46 溶液のみを投与した。免疫は、初回免疫後、2 週間間隔で、5 回、計 6 回免疫した。5 回目と 6 回目の最終免疫では投与量を 2 倍とした。

3 回目の免疫後、1 週間目に 1 回目の試採血を実施し、各ウサギより抗血清 1ml を得た。免疫前に各ウサギから採血した血液より調製した血清を免疫前血清として、これらを用いて、ELISA により抗体価測定を行った。4 回目の免疫後、1 週間目に 2 回目の試採血を実施し、ELISA により抗体価測定を行った。6 回目の最終免疫の 1 週間後に全採血を実施し、LPSa46 に対する抗体を含む抗血清をそれぞれ 55ml 取得した。抗体価測定の ELISA は、通常のタンパク質を免疫した場合と基本的には同様で、下記の方法で行った。

### ELISAプロトコール

1. 抗原の固相化：抗原濃度  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $100 \mu\text{L}/\text{well}$ , room temp 2h
2. 抗血清希釈：Tween20 - PBSにて1,000~128,000倍希釈,  $100 \mu\text{L}/\text{well}$ , room temp 2h
3. 抗Rabbit IgG - HRPO：Tween20 - PBSにて希釈、至適濃度で反応,  $100 \mu\text{L}/\text{well}$ , room temp 2h
4. TMBによる発色： $100 \mu\text{L}/\text{well}$ , room temp 20min
5. 反応停止：1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,  $100 \mu\text{L}/\text{well}$ , room temp 20min
6. 450nm での測定：after room temp 20min

図 7 は、ウサギ血清中の LPSa46 に対する抗体価を確認したものである。この抗体の各種 LPS に対する特異性を調べた結果、LPSa46 に対して特異性が高いことが確認できたので (図 8)、このウサギポリクローナル抗体を使い、ELISA 法を構築することとした。

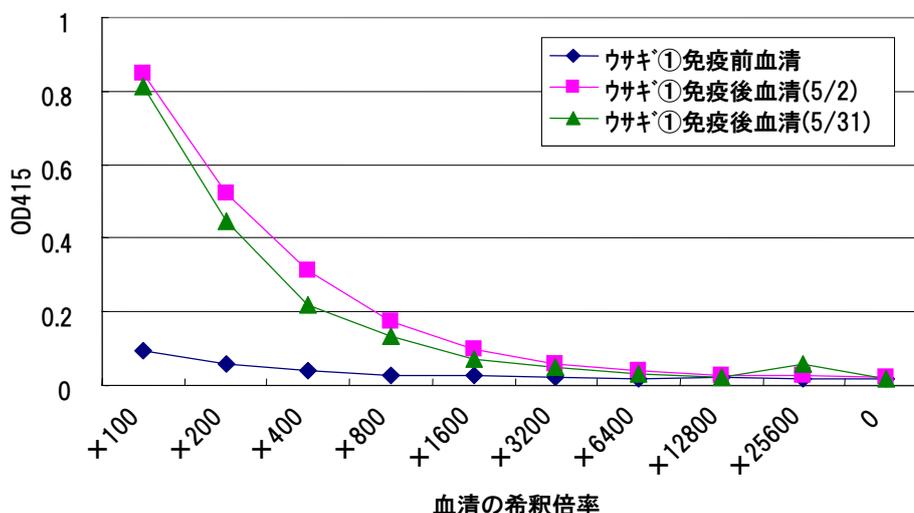


図 7：ウサギポリクローナル抗体の取得（抗体価の上昇）

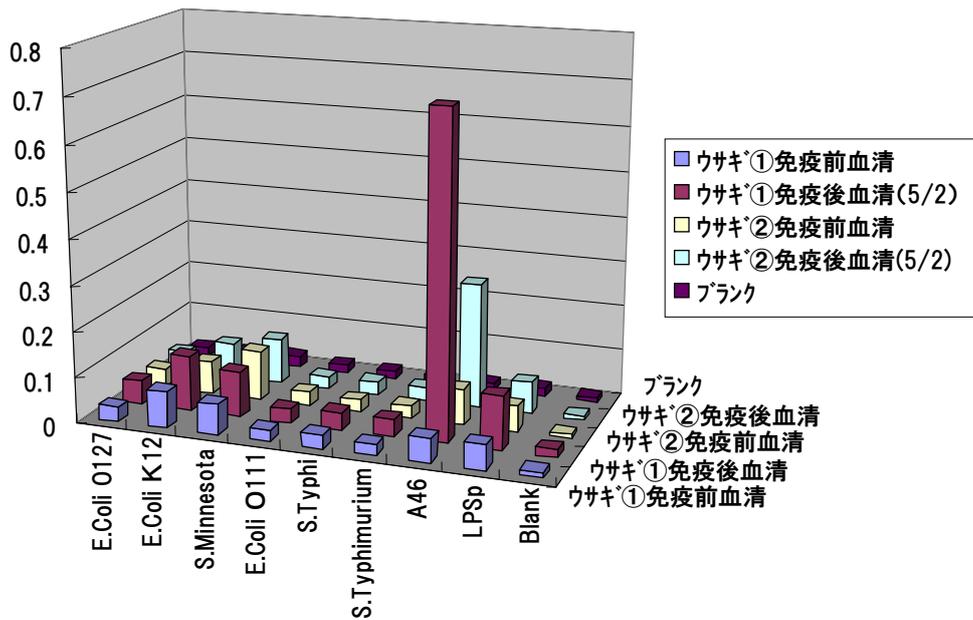


図 8：ウサギポリクローナル抗体の取得（特異性）

#### 4. 2種のELISA法

ELISA法には、2種の抗体ではさむサンドイッチELISAと1種の抗体を使う直接ELISA法がある（図9）。予備検討において、モノクローナル抗体とポリクローナル抗体の2種で行うサンドイッチELISA法では、感度が低いことがわかった。これはモノクローナル抗体の質の問題と考えられる。そこで、最終的にポリクローナル抗体1種を使う直接ELISA法を構築することとした。

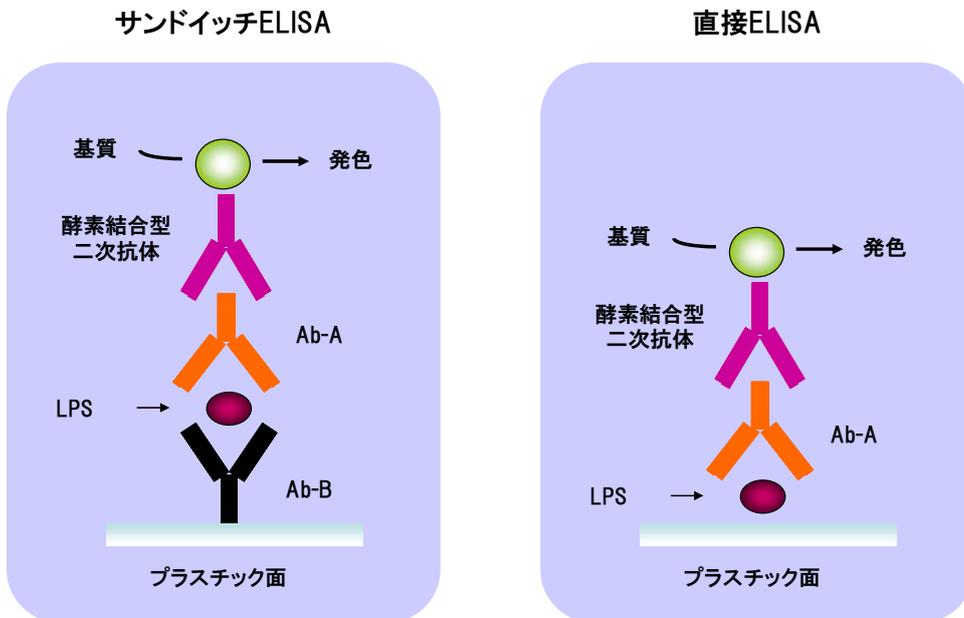


図 9：2種のELISA法

## 5. 直接 ELISA 法プロトコール

直接 ELISA 法では、測定する LPS を ELISA プレートに固定化し、その上に抗体を結合させ、結合した抗体量を測定することで、LPS 量を測定する。結合した抗体量を測定するためには、抗体のアイソタイプを認識する 2 次抗体に、アルカリフォスファターゼなど酵素活性を持たせ、最終的に、酵素の活性を測定する。固定化する LPS の量、ポリクローナル抗体の希釈度、抗体を結合させる際に非特異的な結合を防ぐためのブロッキング時間の検討等を行ない、最終プロトコールの決定を行った（下記）。

ELISA プレート

- ↓ ←LPS 0~40  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ l/well
- ↓ 37°C2 時間 or 4°C一晩
- ↓ 固相化プレートの LPS 溶液をデカンテーション（よく水分をきる）
- ↓ ←ブロッキング溶液（3%BSA-PBS）…200  $\mu$ l/well
- ↓ 室温、30min 以上
- ↓ T-TBS 200  $\mu$ l/well で 3 回 wash（プレートウォッシャー）（洗浄後よく水分を切る）
- ↓ ←一次抗体(100  $\mu$ l/well)  
T-TBS で 100 倍希釈して使用（希釈 U 字プレートを使用）
- ↓ 室温、1 時間
- ↓ T-TBS 200  $\mu$ l/well で 3 回 wash（プレートウォッシャー）（洗浄後よく水分を切る）
- ↓ ←二次抗体添加 100  $\mu$ l/well)  
T-TBS で 1000 倍に希釈して使用
- ↓ 室温で 1 時間インキュベート
- ↓ T-TBS 200  $\mu$ l/well で 5 回 wash（プレートウォッシャー）（洗浄後軽く水分をきる）
- ↓ ←発色基質（100  $\mu$ l/well）  
1mg/ml p-NPP（パラニトロフェニルリン酸二ナトリウム） in 1mM MgCl<sub>2</sub> 50mM NaCO<sub>3</sub>
- ↓ 室温、30min~1 時間
- ↓ OD415nm 測定

本プロトコールで、LPSa46 標品を測定したグラフを見ると（図 10）、20  $\mu$ g/ml までの LPS 量を測定できることがわかる。検出感度は 2  $\mu$ g/ml であり、1ng/ml 感度には至っていない。

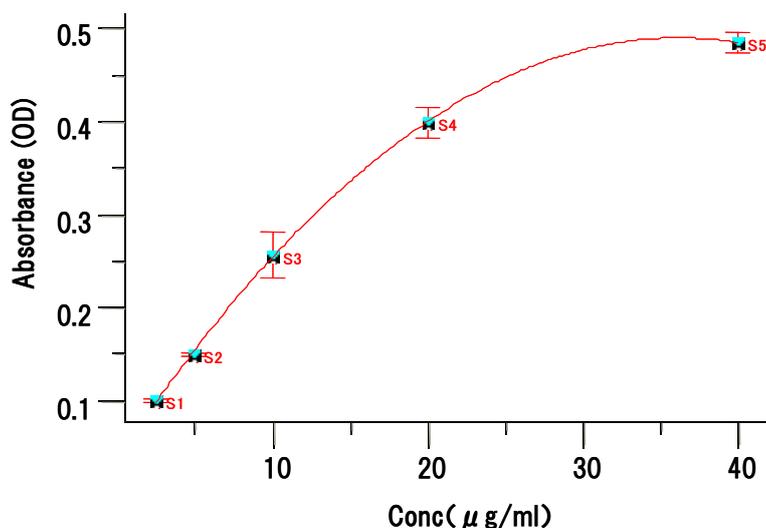


図 10 : LPSa46 をスタンダードとする検量線例（直接 ELISA 法）

### 【3-3】当該 ELISA 法による有効成分糖脂質分析

#### （研究目的）

米糠発酵抽出物中およびこれを配合した末端製品中の有効成分糖脂質の分析技術を確立する。

#### （研究内容）

前項で開発した測定法を用いて、開発製品中の有効成分糖脂質を測定し、品質管理技術の確立を図る。

#### （研究成果）

前項で開発した測定法を用いて各製造段階の米糠発酵抽出物中の LPSa46 を測定した。想定される米糠発酵抽出物の有効成分規格（10mg/ml～）であれば、十分に測定可能であった。課題としては、前項で述べたように、本 ELISA 法は、感度が低い。従って、発色の増感試薬を使うなど、今後の改善が必要である。現時点では、リムラス法を原理とするトキシノメーター（図 11）による測定が考えられる。

トキシノメーターでの測定は、LAL 試薬の LPS によるゲル化機構を利用し、ゲル化に伴って生じる濁度を透過光量比として、前もって設定した閾値に達するまでの時間をゲル化時間（Tg）とし、Tg と LPS 濃度の関係から濃度を算出する（図 12）。比色リムラス法に比較し、毎回標準品 LPS で検量線と比較する必要がない点、測定濃度範囲が広いため、細かく希釈する必要がなく、従って誤差も生じにくい点で優れている。



図 11：トキシノメーター（エンドトキシン測定装置）

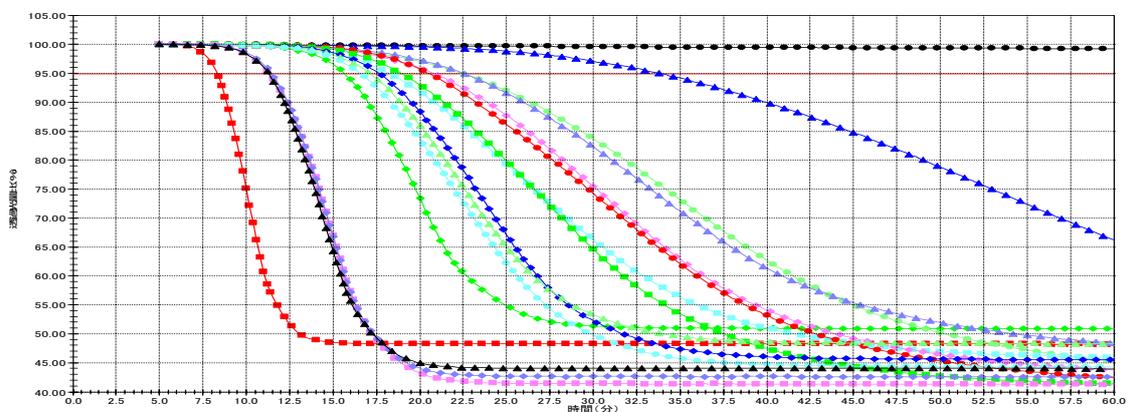


図 12：トキシノメーターによる測定例

### 【3-4】安全性試験

#### （研究目的）

米糠発酵抽出物素材について、染色体異常、復帰突然変異、単回投与毒性、反復投与毒性の有無を調べる。

#### （研究内容）

開発製品の安全性を、細胞を用いた染色体異常・バクテリアを用いた復帰突然変異・ラットを用いた単回投与毒性・反復投与毒性試験の実施により確認する。発酵に用いる稲パントエア菌が分泌する有用成分（葉酸、アミノ酸など）の有無を、発酵培養液の成分分析により調査する。さらに稲パントエア菌について、他の菌体との可視的な区別のために、操作型電子顕微鏡を用いて菌体画像を取得する。

#### （研究成果）

##### 1. 染色体異常、復帰突然変異、単回投与毒性、反復投与毒性の有無

###### ＜染色体異常試験＞

本試験は、岩瀬コスファ株式会社に外注し、実施した。米糠発酵抽出物の染色体異常誘発性について、チャイニーズ・ハムスター雌肺由来繊維芽細胞株（CHL/IU 細胞）を用いて試験を行った。最高用量 5,000  $\mu$ g/ml とし、以下公比 2 で 2 用量を設定した。結果、各処理系列における被験物質のいずれの用量において、染色体異常を持つ細胞の出現頻度は 5% 未満であり、陰性対照群（蒸留水）と比較して統計的な有意性は認められなかった。よって、米糠発酵抽出物は染色体異常を誘発しないと判断された。

###### ＜復帰突然変異試験＞

本試験は、岩瀬コスファ株式会社に外注し、実施した。米糠発酵抽出物の変異原性について、ネズミチフス菌のヒスチジン要求性菌株である TA98, TA100, TA1535, TA1537 菌株および大腸菌のトリプトファン要求性菌株である WP2uvrA(pKM101) 菌株を用いて試験を行った。最高用量 5,000  $\mu$ g/プレートとし、以下公比 2 で 4 用量を設定した。結果、代謝活性化非存在下および存在下において、各菌株のいずれの用量においても復帰変異コロニー数は陰性対照群（蒸留水）の 2 倍を超えず、用量依存的な増加も示されなかった。よって、米糠発酵抽出物は遺伝子突然変異を誘発しないと判断された。

###### ＜単回経口投与毒性試験＞

本試験は、岩瀬コスファ株式会社に外注し、実施した。米糠発酵抽出物を雌雄 6 週齢の Sprague-Dawley (Cr1:CD(SD)) 系ラットに単回経口投与して、その毒性兆候を観察すると共に概略の致死量を検討した。群構成は、2,000mg/kg 投与群および対照群の 2 群とし、1 群雌雄各 5 匹を用いた。結果、2,000mg/kg 投与群で死亡例は見られなかった。また、一般状態、体重および剖検において、被験物質投与による影響は認められなかった。よって、米糠発酵抽出物のラットにおける単回経口投与において、概略の致死量は雌雄とも 2,000mg/kg を上回ると結論された。

###### ＜反復投与毒性試験＞

本試験は、株式会社イナリサーチに外注し、実施した。米糠発酵抽出物の 1,000mg/kg/day を雌雄各 5 匹の Cr1:CD(SD) ラットに 90 日間連日経口投与して、その反復投与毒性を調べた。結果、一般状態、体重、摂餌量、眼科的検査、血液学的検査、血液性科学的検査、尿検査、剖検、器官重量および病理組織学的検査のいずれにも被験物質投与による毒性変化は認められなかった。よって、米糠発酵抽出物のラットへの 90 日間連日経口投与において、1,000mg/kg/day は無毒性量と判断された。

## 2. A46 株の菌の安全性

米糠発酵抽出物の安全性に関する知見を得る試験の一環として、発酵培養に用いる菌株A46 の生菌の  $4 \times 10^9$ 、 $4 \times 10^{10}$ 、 $4 \times 10^{11}$ /kgをBALB/c雄マウスに単回経口投与し、その毒性・安全性について検討した。

### <菌溶液の調整>

A46 株を 100mlのLB培地で、35℃にて 3 時間振盪培養し、分光光度計でOD600nmが 1.0 になった時点で集菌した (OD600=1.0 の時、 $0.6 \times 10^9$ CFU/mlのコロニーが認められる)。この培養液を整理食塩水で希釈し、マウスに与える生菌溶液を調整した。

### <投与>

健康状態に問題が無いマウスを選び、体重により群分けした (マウスは絶食しなかった)。ゾンデを用いて生菌溶液を投与した。最高投与量は  $4 \times 10^{11}$ 個/kgに相当するので、体重 60kgのヒトに当てはめた場合、 $2.4 \times 10^{13}$ 個/bodyとなる。ヒトでは、個体あたり  $1 \times 10^{14}$ 個の微生物がいるといわれており、この投与量は、その 1 割以上に相当する。

### <確認項目>

投与日を 0day として 14day まで毎日、一日 1 回(午前中)体重測定と一般状態の観察を行った。14day に体重測定後、全例、剖検した。剖検の際に、生化学的検査用に血液を採取した。採取した血液より血清を分離し、 $-80^\circ\text{C}$ にて保存した。採血した動物をさらに放血して安楽死させた後、肉眼的に器官・組織を観察した。

### <一般状態および体重>

投与後の観察期間中に死亡した動物はなく、観察期間中に異常は認められなかった。投与後の全期間を通して生理食塩水投与のコントロール群と  $1 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10}$ /マウスの投与群で体重変化に有意な差は認められなかった。 $1 \times 10^8$ /マウス投与群では、投与後 13 日目までは、コントロール群と比較して群間で差は認められず、投与後 14 日目においては、 $1 \times 10^8$ /マウス投与群は、コントロール群より、むしろ高い体重が認められた (図 13)。

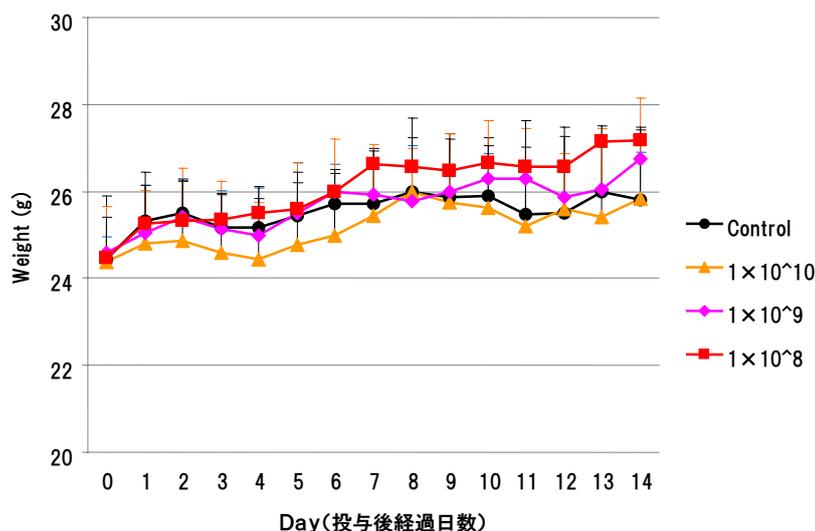


図 13 : A46 株生菌摂取後の体重変化

<剖検における所見>

大腸、小腸、脾臓、胃、腎臓(左腎)、肝臓、心臓および肺の剖検時の所見において、全てのマウスで器官・組織に異常は認められなかった。

<臓器重量>

大腸、小腸、脾臓、胃、腎臓(左腎)、肝臓、心臓および肺の臓器重量については生理食塩水投与のコントロール群と $1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ /マウスの投与群で有意な差は認められなかった。 $1 \times 10^{10}$ /マウス投与群では、小腸の重量がわずかに重かった(有意差5%)。

<血清の生化学的検査値での比較>

血清の生化学データ(TP、ALB、BUN、CRE、Na、K、Cl、Ca、IP、AST(GOT)、ALT(GPT)、LDH、AMY、 $\gamma$ -GT、T-CHO、TG、HDL-C、GLU、T-BIL)においては、生理食塩水投与のコントロール群と $1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ /マウスの投与群で有意な差は認められなかった。 $1 \times 10^{10}$ /マウス投与群では、総ビリルビン(T-BIL)がコントロールに比較してわずかに低かった(有意差5%)。

以上の結果より、本試験条件下においては、菌株A46の生菌をマウスに経口投与した場合に無毒性量は $1 \times 10^{10}$ /マウス( $4 \times 10^{11}$ /kg/回)以上と判断され、安全性が高いことが推定された。

### 3. A46株による葉酸産生の有無

葉酸(ようさん)はビタミンM、ビタミンB9、プテロイルグルタミン酸とも呼ばれ、水溶性ビタミンに分類される生理活性物質である。体内で還元を受け、ジヒドロ葉酸を経てテトラヒドロ葉酸に変換された後に補酵素としてはたらく。葉酸の栄養所要量は、推定平均必要量が $200 \mu\text{g}$ 、推奨量が $240 \mu\text{g}$ 、上限量が $1,000 \mu\text{g}$ (いずれも成人男女)とされている。葉酸はアミノ酸や核酸の合成に必要となる補酵素であるため、細胞分裂の盛んな箇所において欠乏症が現れやすい。症状は、貧血、免疫機能減衰、消化管機能異常などが見られる。また、心臓病や大腸ガン、子宮頸ガンのリスクがあるとの報告がある。また、妊娠期に葉酸が欠乏すると、神経管閉鎖障害が起こり、重度の場合は死に至る。また、無脳児の発生のリスクが高まる。過剰症はビタミンB12の欠乏を隠すため、悪性貧血が潜在化する危険性が指摘されている。

ところで、グラム陰性細菌は葉酸を産生することが知られている。そこで、米糠発酵抽出物製造に使用するA46株の葉酸産生能力について確認を行った。その結果、A46株は葉酸を産生する能力があるが、その能力は他のグラム陰性菌と同レベルである。またその産生量は、ヒトが1日に必要とする量に比較して少ない事から、安全性に影響はなく、また同時に葉酸供給の意味合いからのポジティブな特徴もないことがわかった。

### 4. パントエア菌の電子顕微鏡写真

StrainA46菌を標準寒天培地プレートに一白金耳塗抹し、 $37^\circ\text{C}$ 、48時間培養後の菌体を撮影した。撮影は、日本食品分析センターへ依頼した。

## 【4】効果実証試験

製造した米糠発酵抽出物を配合したドリンクを試作し、少人数に試飲してもらい、有害事象が生じないことを確認すると同時に、体感の調査を行った。

### 【4-1】末端製品の試作

#### （研究目的）

有効成分糖脂質を主剤とするプロトタイプ食品

（BFSS(Blow Fill Seal System:成形同時充填システム)容器に入れたドリンク）を試作する

#### （研究内容）

有効成分糖脂質を主成分とするプロトタイプ食品（ドリンク）を企画・試作する。

#### （研究成果）

米糠発酵抽出物の糖脂質を主成分とする末端製品の企画および試作を行った。試作にあたり、ドリンクタイプ、カプセルタイプ、ウエハース（バー）タイプなど様々な形態を検討したが、老若男女問わず手軽に摂取できることを考慮してドリンクタイプとした。風味については、爽やかさと飲みやすさの点からピーチフレーバーを選択し、さらに果汁感を増強させるために桃果汁を、また甘みに関しては喉越しの良さを持たせるため液糖を使用した。糖脂質の添加量については、*in vitro*でのマクロファージ活性試験および安全性試験の結果を踏まえて決定した。容量については、毎日継続して飲めるよう栄養ドリンクでスタンダードな50mL量に設定した。製造方法は、原料を混合してビンに充填し、加熱殺菌を行うこととした。試作したドリンクを無作為にピックアップし品質検査を行ったが、一般細菌、カビ・酵母、大腸菌群と全て非検出であり、糖脂質も規定量含有した。

### 【4-2】ヒトでの効果実証試験

#### （研究目的）

プロトタイプ食品のヒトでの安全性、効果を明らかにする。

#### （研究内容）

有効成分糖脂質配合試作品について、オープントライアル臨床試験法を用いて、試作品の有害事象の有無、得られる体感を調査する。

#### （研究成果）

本試験では、20歳以上65歳未満の男女で、アレルギー、倦怠感・疲労感、肩こり、腰痛、目の疲れ、便秘、不眠などの慢性症状を有する者20名を対象に、米糠発酵抽出物を配合した試験品を1日1回30日間試飲することで得られる慢性症状に対する効果を抽出し、あわせて、安全性の確認を行った。

試験品の試飲により、試験開始前と比較して、「倦怠感・疲労感、肩こり、目の疲れ、便秘」の慢性自覚症状に関するVAS値（Visual Analog Scale）が有意に低下する結果が得られた。この結果より、試験品は「倦怠感・疲労感、肩こり、目の疲れ、便秘」の慢性自覚症状に対して、改善効果を有する可能性が示唆された。ただし、本試験は対照品をおかないオープントライアル試験であるため、米糠発酵抽出物の効果であるかどうかは不明である。

一方、血液検査項目（AST、ALT、 $\gamma$ -GTP、クレアチニン、CRP、中性脂肪、LDLコレステロール、空腹時血糖値、白血球数、赤血球数、血色素量、ヘマトクリット値、血小板数）では、すべての項目で毒性変化は認められなかったことから、試験品の安全性が示された。

### 第3章 全体総括

本事業では、免疫賦活市場をターゲットとし、発酵微生物に、従来の麴、酵母、乳酸菌に代わり、糖脂質を持つグラム陰性細菌を使うことで、「自然免疫賦活」機能を持たせた「米糠発酵抽出物」をつくることを目的とした。

成果として、発酵基質として米糠、発酵微生物として稲共生グラム陰性細菌 A46 株を選択し、LPSa46 を有効成分とする「米糠発酵抽出物」の低コストの製造法、品質管理技術が確立された。さらに「米糠発酵抽出物」の安全性、効果等を確認し、また LPSa46 の学術的見地からの分析を行なうことができた。今後、品質管理技術の感度向上、LPSa46 の構造と機能の補完研究を継続しつつ、マーケティングに注力する。

高齢化社会の到来とアレルギーや感染症など現代病の増加の中で、食による美と健康増進が時代のニーズと言える。機能性食品分野では、整腸作用のほかメタボリックシンドロームの予防改善に資する食品が多く開発されてきたが、免疫が健康維持全般に係わって重要であることが明らかとなってきた近年、免疫に対する消費者の意識も高まっている。また、免疫賦活は、食品市場（日本市場：1.8兆円）のみならず、化粧品（日本市場：1兆円）、ペット食（日本市場：3,000億円）、無薬養殖での飼料（日本市場：1兆円）、また農薬低減下での植物用資材等広範な分野に適用できるものであり、発酵食品メーカーが、独創的な製品で参入することで、大きく成長させ、かつリードしうるターゲットである。

現在、免疫賦活素材としては、アガリクス等キノコ、種々の乳酸菌が主流であるが、環境中に存在するグラム陰性細菌由来の糖脂質は、免疫賦活物質として前者を凌ぐ極めて優れた物質である。この糖脂質の基本特許は、日本オリジナルであり、日本の発酵技術及び科学技術と融合して、国内のみならず、世界に向けて技術移転できる位置づけにある。今後 ASEAN 諸国においても日本と同様に、高齢化社会が加速することは明確であり、日本発の技術を持って、高齢化社会対策に貢献できる。また、養殖は東南アジア、南米、スカンジナビア諸国において重要な産業であるが、糖脂質素材は飼料に配合することで、養殖における抗生物質の使用を低減させうるものであり、現地での合弁会社の設立など産業の進展が期待できる。加えて健康産業分野でアジア等海外市場への進出促進が期待できる素材であることから、新成長戦略とも関連するものである。

今後、何種類かの糖脂質素材が市場化されることで、本素材の市場が形成される。また応用例が増えることにより、糖脂質のさらに発展した活用方法が生み出されることが期待できる。将来的には、糖脂質の医薬品への応用と、そのための糖資質の糖鎖を含む完全合成技術の開発が期待できる。