

平成 25 年度戦略的基盤技術高度化支援事業

「ミネラル吸収促進作用を有する高機能甘味料 D F A IV の製造技術開発」

研究開発成果等報告書

平成 26 年 3 月

委託者 北海道経済産業局

委託先 株式会社 北海道バイオインダストリー

目 次

第1章 研究開発の概要	1
1-1. 研究開発の背景・研究目的及び目標	3
1-1-1. 研究開発の背景	3
1-1-2. 開発の狙い	5
1-2. 研究体制	6
1-2-1. 研究組織及び管理体制	6
1-2-2. 研究開発体制図	8
1-2-3. 研究実施場所一覧	9
1-2-4. 管理・研究者氏名	9
1-3. 成果概要	10
1-3-1. DFAIVの生産性向上法の開発	10
1-3-2. DFAIV量産化のための生産システム構築	10
1-3-3. DFAIVの閾値の検証	11
1-3-4. DFAIVの安全性評価	11
1-3-5. DFAIVの機能性評価	12
1-3-6. DFAIVの市場性評価と製品規格化	12
1-3-7. 研究開発全体の管理・運営	13
1-4. 当該研究開発の連絡窓口	13
第2章 本論	15
1. 研究開発の背景および目的	17
2. DFAIVの生産性向上法の開発	17
2-1. 研究概要	17
2-2. 発酵時間の短縮法検討	17
2-2-1. ショ糖濃度による発酵時間の検討	17
2-2-2. シード量の検討	19
2-3. DFAIVの収率向上法の検討	20
2-3-1. 消泡剤 L G109 の DFAIV生産に与える影響の検討	20
2-3-2. DFAIV生産における消泡剤 L G109 の添加量の影響	23
2-3-3. ジャーファーマンターを用いた生産での評価	24
2-3-4. 通気量および攪拌速度の検討	26
2-4. 研究成果	28
2-5. 考察	28

3.	DFAIV量産化のための生産システム構築	28
3-1.	研究概要	28
3-2.	生産性向上条件に基づくパイロットラインの構築	29
3-3.	蔗糖およびグルコースの除去方法検討	29
3-3-1.	酵母による糖除去の検討	29
3-3-2.	酵母処理後の精製法検討	30
3-4.	製造コスト削減化検討	34
3-5.	研究成果	35
3-6.	考察	35
4.	DFAIVの閾値の検証	35
4-1.	研究概要	35
4-2.	研究方法	36
4-3.	研究結果	36
4-4.	考察	36
5.	DFAIVの安全性評価	38
5-1.	研究概要	38
5-2.	毒性試験の実施	38
5-2-1.	単回毒性試験	38
5-2-2.	変異原性試験	40
5-3.	リスク要因の検証	45
5-4.	研究結果	46
5-5.	考察	47
6.	DFAIVの機能性評価	47
6-1.	研究概要	47
6-2.	急性相タンパクの動態確認による機能性評価	47
6-3.	ミネラル不足に対する改善作用の検証	48
6-4.	研究成果	57
6-5.	考察	57
7.	DFAIVの市場性評価と製品規格化	58
7-1.	研究概要	58
7-2.	サンプル提供による外部評価の実施	58
7-3.	製品規格の確立	58
7-4.	研究成果	59
7-5.	考察	59
最終章	全体総括	61

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

1-1-1. 研究開発の背景

高度化指針で定める川下の課題及びニーズ

発酵に係る技術において達成すべき高度化目標

(1) 食品製造業に関する事項

①川下製造業者等の抱える課題及びニーズ

ウ.高品質化

川下事業者のニーズ

日本は未だかつてない超高齢社会に直面しており、2015年には65歳以上が25%を超え、70歳以上は19%を超えると推計されている。高齢になると栄養の摂取・吸収・排泄および身体活動量が低下する現象が見られる他、自立した生活を送ることができない要介護者も増加する。実際、現在65歳以上の高齢者の16%が要介護認定を受けており、介護サービスの利用者は350万人に上る。

鉄分等ミネラルの吸収は胃酸の分泌が関与しているため、加齢によって胃酸の分泌が減少する高齢者では、貧血症状は男女ともに2割にのぼり、同じ理由で胃を切除した患者の多くに貧血症状が生じる。カルシウム不足による骨粗しょう症なども同様である。また貧血症状を例に挙げると、高齢者だけではなく競技スポーツやプロアスリート等、激しい運動負荷が生じる場合にも、貧血や潜在性鉄欠乏の者の割合が大きいという調査結果があり、特に女子選手や高校生選手では半数以上が鉄分不足に陥っていると推定されている。さらに、1990年以降、中学校並びに高校女子生徒において、貧血有病率は増加傾向にあり成長期の子供たちにとっても深刻な問題となりつつある。

このような背景下に、病院食や学校給食など配膳食や中食産業等、医療介護・食品事業者よりミネラル不足を解消することができる食品原料の要望は日に日に強くなっており、早急に対応しなければならない課題である。

これらのニーズがある中で、ミネラル吸収促進作用を持ち、食事に無理なく使用できる甘味料であるDFAIVは、学校給食や中食事業者、さらには機能性食品製造業者からも大いに期待されている機能性甘味料であり、事業化を求める声があがっていた。

②高度化目標

イ.発酵・精製工程の効率化・高精度化に係る技術の高度化

開発の技術背景

・砂糖を原料として微生物発酵技術を用いて1回の培養でDFAIVを製造することが可能になった

本事業に活用する難消化性オリゴ糖のDFAIVは、動物に与えた時にカルシウムやマグネシウム、亜鉛の吸収を増大し、しかも他に知られている難消化性オリゴ糖のどれよりも活性が高かった。このDFAIVは、多糖類のレバンから酵素レバンシュクラゼによって作ることができるが、この方法では、レバンのコストおよび製造コストが高価であった。そこで今回活用するシーズは、安価で大量に入手可能な砂糖を原料としてDFAIVを生成する方法の発明であり、納豆のネバネバがレバンを含むことから発想し、納豆菌を宿主として酵素レバンシュクラゼを導入することで1回の培養でDFAIVの発酵製造に成功している。

これは本事業に参画している北海道大学 浅野教授の独自の技術（特開 2008-307010「ダイフラクトースアンハイドライドⅣ（DFAⅣ）の製造方法」）であり、DFAⅣの事業化を考えた場合に最も製造コストを抑えることができる手法である。

【 問題点 】

DFAⅣは、多糖類のレバンから酵素レバンシュクラゼによって作ることができるが、この方法では、レバンのコストおよび製造コストが高価であった。今回活用するシーズは、安価で大量に入手可能な砂糖を原料として DFAⅣを生成する方法の発明であり、納豆菌を宿主として酵素レバンシュクラゼを導入することで1回の培養で DFAⅣの発酵製造に成功している。しかし、収率が20%以下であること、発酵に要する時間も96時間と長時間であることから、販売価格が20,000 円/kgとなっており、川下事業者の要望である5,000 円/kg以下の価格実現には、収率の向上と発酵時間の短縮が必要な開発要素である。課題である製造コストを低下させる手段として、用いる枯草菌は極めて好氣的であるため、発酵時の通気量によって糖消費を加速させ、発酵時間を短縮させることができる可能性を見出しており、課題解決の可能性は高い。

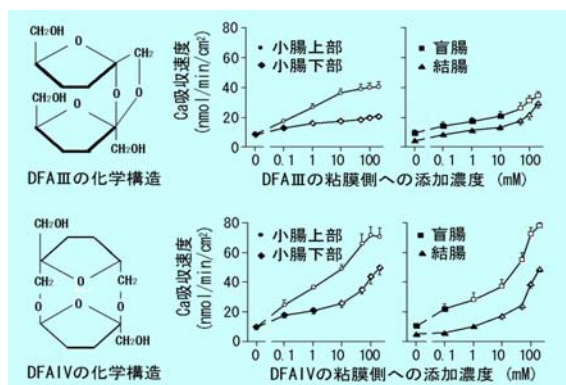
また、DFAⅣの本格的な製造ラインはこれまでに無かった。そのため、生産効率の高いライン構築は必要な開発項目である。製造ラインには不純物を除去する工程が必要になるが、使用した菌体を除去する手法は連続遠心分離で可能である。しかし、副産物として生じるグルコースや発酵に使用されなかった蔗糖を、DFAⅣと分離する方法は確立できていなかったため、DFAⅣの純度を高めた規格は非常に困難となっていた。

・ DFAⅣの摂取によってミネラル吸収が促進し、貧血症状などのミネラル不足が解消される

DFAⅣの機能性として、ラットの胃・小腸では分解されず、大腸まで達する難消化性オリゴ糖であることがあげられる他、腸管で鉄分やカルシウム等のミネラル類の吸収促進作用があることが確認されている。この機能性は既に事業化されているフラクトオリゴ糖や DFAⅢと比較しても優れており（表1-1）、DFAⅢよりも食味が良く、酸や熱に安定な扱いやすい甘味料でもある。

（表1-1）ミネラル吸収促進作用を持つ難消化性オリゴ糖の機能比較表

	フラクトオリゴ糖	DFAⅢ	DFAⅣ
機 能 性 (ミネラル吸収促進作用)	+	++	+++
味	++	+	+++



（図1-1）DFAⅢおよびDFAⅣのカルシウムの吸収促進作用の比較

フラクトオリゴ糖は小腸での吸収がないため、DFAⅢ・DFAⅣと比較すると機能性が大きく劣る。

DFAⅢは結腸粘膜に直接作用しミネラル吸収を促進するが、DFAⅢの構造異性体であるDFAⅣの効果はさらに強い。（図1-1）

DFAⅢは後味に苦みを感じるため美味しさの点でフラクトオリゴ糖に劣る。

これらのことから、ミネラル吸収促進作用を持つ機能性甘味料としてのDFAⅣの競争力は高いものと考えられる。

・急性相タンパクの変動は摂食を含む生体環境の恒常性維持を反映する尺度に使うことができる

肝臓で合成され血管に送られる血漿タンパクのうち、銅を補酵素とするセルロプラスミン (Cp) や鉄担体トランスフェリン (Tf) 等の、急性相タンパクと呼ばれる特定金属を運搬する血清成分があるが、本事業実施者らは肺結核病巣切除後安定期患者の血中に含まれる Cp の値を調べた際に、健常人はもとより他疾病患者の Cp 値の間に有意な増大差を認め、それが各被験者の多形核白血球のスーパーオキシド (O_2^-) 産生亢進と関連することを確認した。結核菌細胞壁 (BCGCW) を静脈注射し、肺結核症肉芽腫を持つ健常結核モデルマウスを用いて上記の血中 Cp 値動態を実験的に再現し、急性相タンパク Cp の役割を疾患に伴い活性化した多形核白血球域は、マクロファージから放出される過剰の O_2^- を消滅する意味を持つものと説明できた。

これを演繹すると、急性相タンパクの変動は摂食を含む生体環境の変化に対する恒常性維持 (ホメオスタシス) を反映する尺度に使うことも可能である。そのため、DFAIVの摂取によってミネラル不足が解消されると、恒常性が維持されて急性相タンパクの活性が安定化することが予想される。

近年、治療医学から予防医学に国民の意識が変化していく中で、食事と健康はもはや切り離せない状況にある。このような背景下で、機能性食品の役割は国民の健康維持に大きく貢献していくものと考えられるが、そこに求められるのは摂取による効果のエビデンスであり、このエビデンスの充実は機能性食品開発には必須事項と言ってよい。本事業で事業化を目指す DFAIVの機能性はミネラル吸収促進作用であるから、細かなモニタリングをすることによって DFAIVの有効性を明らかにしていく必要がある。そのため上記の考えを基に、急性相タンパクの変動をモニタリングすることで、有効な活用法について深く検討していくことを計画した。

1-1-2. 開発の狙い

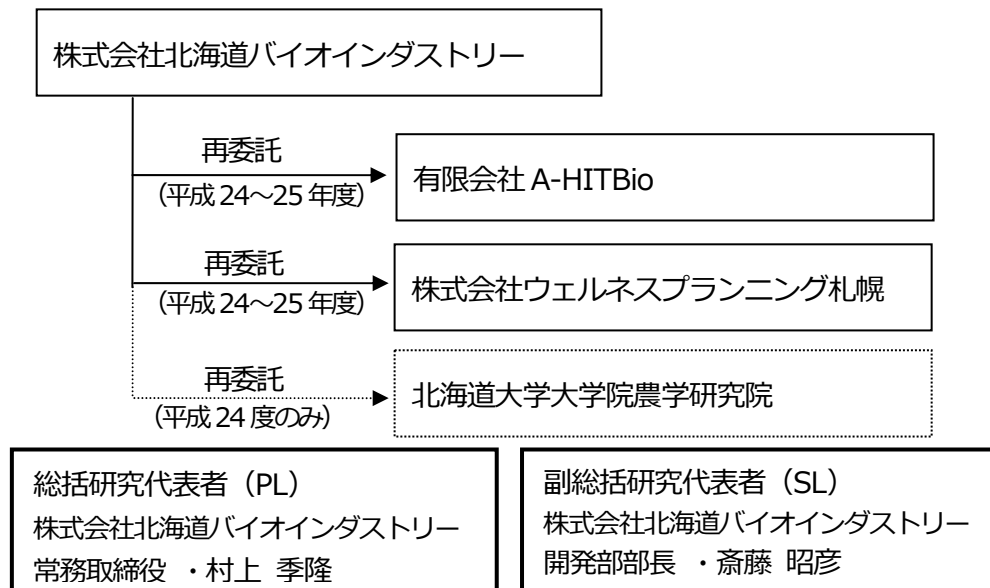
甘味料は様々な食品に使用されているにもかかわらず、これまでの甘味料市場ではカロリーゼロの異性化糖や、食品の物性を良くするための機能を持つ糖があり、そこに生体調節機能を持つものとして整腸作用があるとされるオリゴ糖市場が成長してきている。日本における砂糖の摂取量は1日当たり約65gと決して少なくないだけの量を摂取 (異性化糖の摂取を除く) しており、小学生を対象にした調査では1日当たり200gを超えるというデータもある。砂糖の過剰摂取はカロリーだけを摂取することにつながり、ミネラルなど微量栄養素の欠乏を引き起こす一つの要因になっていると考えられる。日本人の摂取する炭水化物の40%が砂糖によるというデータもあるように、甘味料は食の機能性として「美味しさ」があることからもはや日本人の食生活には欠かせないものと言える。つまり、この欠かせない甘味料自体に生体調節機能を持たせること、さらに微量栄養素の吸収促進という機能性を持たせることは、砂糖の過剰摂取のリスクを低下させるだけでなく、貧血や加齢によるミネラル不足などの高齢社会の問題に対する解決手段として大いに貢献することが見込まれる。

難消化性オリゴ糖の中でも最も優れたミネラル吸収促進作用を持つ DFAIVは、川下事業者が採用する基準となる価格をクリアすることができれば、機能性甘味料としての市場を十分に構築できるものと考え、最終的に DFAIV含有甘味料 (DFAIV40%含有) の価格を従来法の 1/4 の 5,000 円/kg以下である 2,000 円/kgでの上市を実現することを目的として研究開発を実施した。また、本事業では機能性食品原料としても DFAIVを上市することを計画しており、精製法についても検討を行い、最終的に DFAIVの含有率を 80%にまで高めた規格実現のための製法についてもあわせて確立することを目的としている。

1-2. 研究体制

1-2-1. 研究組織及び管理体制

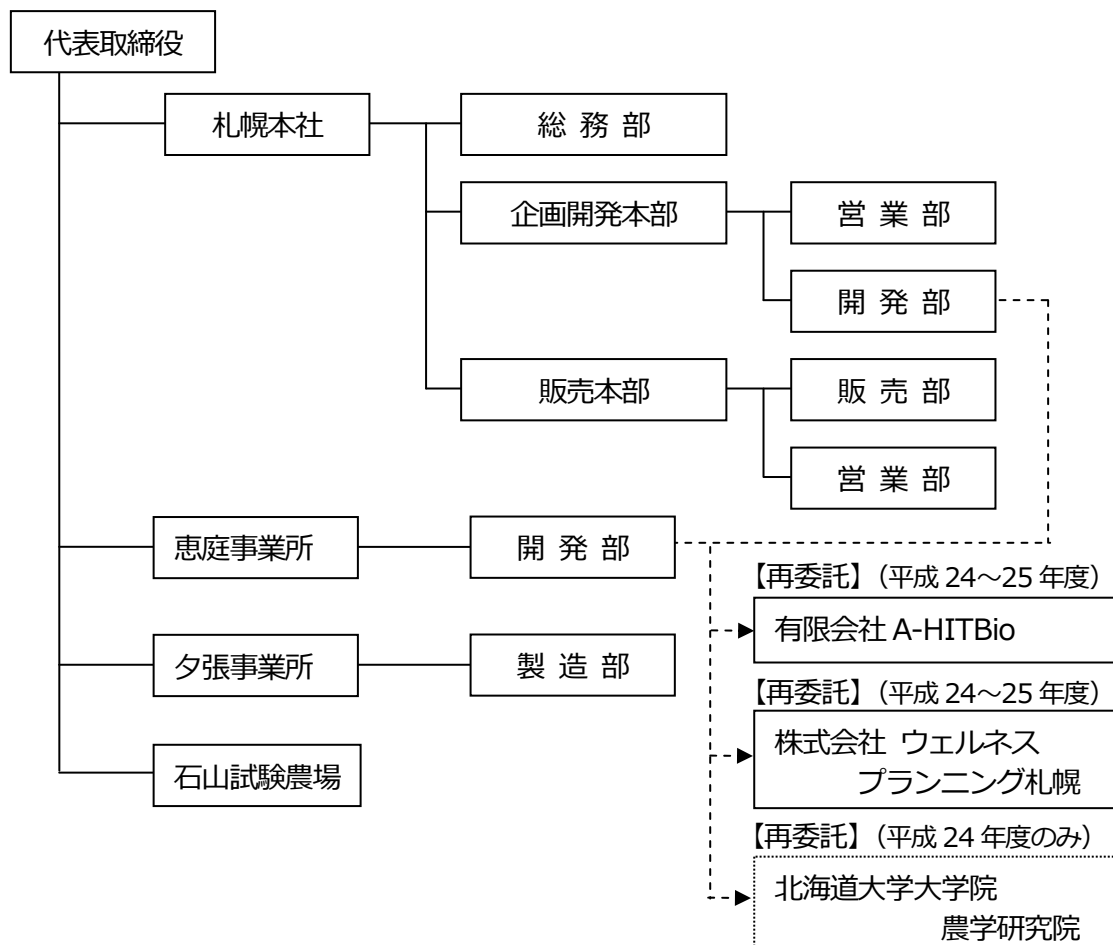
(1) 研究組織（全体）



(2) 管理体制

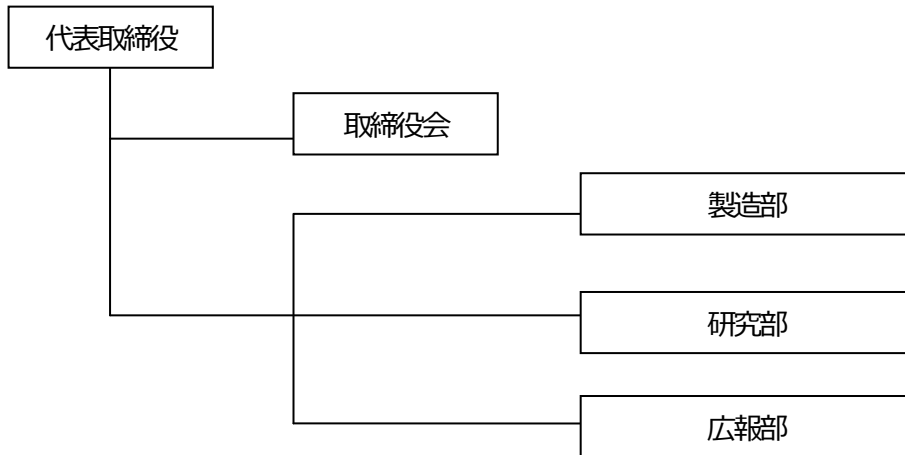
①事業管理者

管理法人〔株式会社北海道バイオインダストリー〕

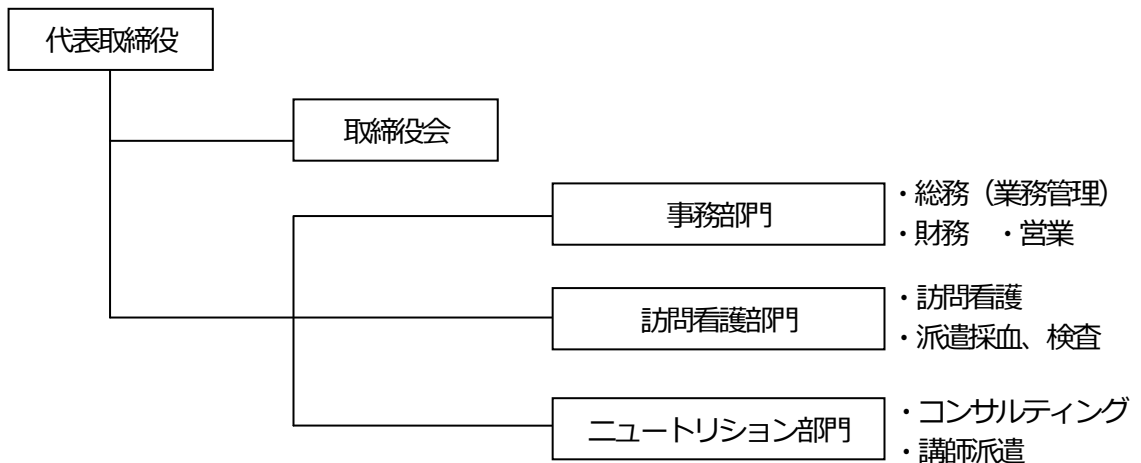


②（再委託先）

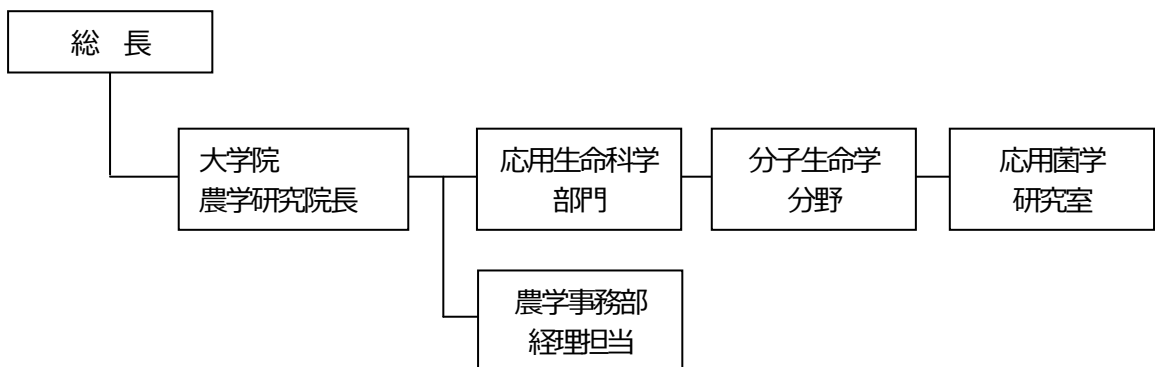
[有限会社 A-HITBio]（平成 24～25 年度）



[株式会社ウェルネスプランニング札幌]（平成 24～25 年度）



[国立大学法人 北海道大学 大学院 農学研究院]（平成 24 年度のみ）



1-2-2. 研究開発体制図

			研究項目	研究機関
管理法人 株式会社 北海道バイオインダストリー	総括研究代表者 村上 季隆 (株式会社 北海道バイオインダストリー 常務取締役)	①DFAIVの生産性向上法の開発	①-1 発酵時間の短縮法検討	・株式会社北海道バイオインダストリー ・国立大学法人 北海道大学 大学院 農学研究院
			①-2 DFAIVの収率向上法検討	・株式会社北海道バイオインダストリー ・国立大学法人 北海道大学 大学院 農学研究院
		②DFAIV量産化のための生産システム構築	②-1 生産性向上条件に基づくパイロットラインの構築	・株式会社北海道バイオインダストリー ・有限会社 A-HITBio
			②-2 蔗糖およびグルコースの除去方法検討	・株式会社北海道バイオインダストリー ・有限会社 A-HITBio
			②-3 製造コスト削減化検討	・株式会社北海道バイオインダストリー ・有限会社 A-HITBio
		③DFAIVの閾値の検討	③-1 閾値の検討による開発成果の摂取目安量の検討	・株式会社北海道バイオインダストリー ・国立大学法人 北海道大学 大学院 農学研究院
		④DFAIVの安全性評価	④-1 毒性試験の実施	・株式会社北海道バイオインダストリー ・国立大学法人 北海道大学 大学院 農学研究院
			④-2 リスク要因の検証	・株式会社北海道バイオインダストリー ・株式会社ウェルネスプランニング札幌
		⑤DFAIVの機能性評価	⑤-1 急性相タンパクの動態確認による機能性評価	・株式会社北海道バイオインダストリー
			⑤-2 ミネラル不足に対する改善作用の検証	・株式会社北海道バイオインダストリー ・国立大学法人 北海道大学 大学院 農学研究院 ・株式会社ウェルネスプランニング札幌
		⑥DFAIVの市場性評価と製品規格化	⑥-1 サンプル提供による外部評価の実施	・株式会社北海道バイオインダストリー
			⑥-2 製品規格の確立	・株式会社北海道バイオインダストリー ・株式会社ウェルネスプランニング札幌
		⑦研究開発全体の管理・運営		・株式会社北海道バイオインダストリー

1-2-3. 研究実施場所一覧

組 織 名	所 在 地
株式会社北海道バイオインダストリー 札幌本社	北海道札幌市豊平区平岸 7 条 14 丁目 3-43
株式会社北海道バイオインダストリー 恵庭事業所	北海道恵庭市恵み野北 3 丁目 1-1 恵庭 RBP センタービル内
有限会社 A-HITBio	北海道札幌市西区発寒 4 条 5 丁目
株式会社ウェルネスプランニング札幌	北海道札幌市中央区南 4 条西 16 丁目 1-25
国立大学 大学法人 北海道大学 大学院 農学研究院	北海道札幌市北区北 9 条西 9 丁目

1-2-4. 管理・研究者氏名

【事業管理者】株式会社北海道バイオインダストリー

①管理員

氏 名	所属・役職	実施内容
村上 季隆 伊藤 和男	常務取締役 兼 開発部研究員 総務部 部長	⑦研究開発全体の管理・運営

②研究員

氏 名	所属・役職	実施内容
村上 季隆 (再)	常務取締役 兼 開発部研究員	①DFAIVの生産性向上法の開発 ②DFAIV量産化のための生産システム構築
斎藤 昭彦	開発部部長 兼 恵庭事業部主任研究員	③DFAIVの閾値の検討 ④DFAIVの安全性評価
田島 健	開発部研究員	⑤DFAIVの機能性評価
木村 卓郎	開発部研究員	⑥DFAIVの市場性評価と製品規格化

【再委託先】

有限会社 A-HITBio

氏 名	所属・役職	実施内容
富田 房男 小綱 久美 西原 由佳	代表取締役 研究部 研究員 研究部 研究員	②DFAIV量産化のための生産システム構築

株式会社ウェルネスプランニング札幌

氏 名	所属・役職	実施内容
小松 信隆	代表取締役	④DFAIVの安全性評価 ⑤DFAIVの機能性評価 ⑥DFAIVの市場性評価と製品規格化

国立大学法人北海道大学 大学院農学研究院

氏 名	所属・役職	実施内容
浅野 行蔵	応用生物化学 教授	①DFAIVの生産性向上法の開発
曽根 輝雄	応用生物化学 准教授	③DFAIVの閾値の検討
田中 みち子	応用生物化学 特任准教授	④DFAIVの安全性評価

1-3. 成果概要

1-3-1. DFAIVの生産性向上法の開発

DFAIVは、多糖類のレバンから酵素レバンシュクラゼによって作ることができるが、この方法では、レバンのコストおよび製造コストが高価であった。今回活用するシーズは、安価で大量に入手可能な砂糖を原料として DFAIVを生成する方法の発明であり、納豆菌を宿主として酵素レバンシュクラゼを導入することで1回の培養で DFAIVの発酵製造に成功している。しかし、収率が 20%以下であること、発酵に要する時間も 96 時間と長時間であることから、販売価格が 20,000 円/kgとなっており、川下事業者からは採用できない価格であるとの評価をされていた。これは、配膳食などの原価として 10 円程度の価格でなければ採用ができないという根拠からである。DFAIVは、その機能性が期待できる摂取量がこれまでの研究では 2g の摂取が必要と考えられており、現状の 20,000 円/kgであれば 40 円となる。そのため、1 kgあたりの DFAIVの価格を 1/4 の 5,000 円/kg以下の価格実現が必要である。

そこで本研究テーマでは、発酵時間の短縮方法を検討することによって人件費等の製造コストを削減し、さらに DFAIVの収率を改善する方法を検討することで原料原価を引き下げること、この 2 つの開発要素を検討することで、最終的な DFAIVの製造コストを大幅に引き下げる生産性向上のための技術開発を行った。

①発酵時間の短縮法検討

生産効率の向上法として、発酵時の培地条件等について改善策を検討し、従来法では 96 時間かかっていた発酵速度を通気量、攪拌速度の条件の最適化と PMSF や消泡剤 LG109 の使用によって、約 60 時間にまで短縮する事が可能となった。

②DFAIVの収率向上法検討

生産効率の向上法として、発酵条件が与える DFAIVの収率を検討し、従来法では 20%以下であった収率を、発酵時の通気量や攪拌速度の調整によって安定して 40%以上まで収率を上げることが可能となった。

1-3-2. DFAIV量産化のための生産システム構築

DFAIVは機能性が優れていることが明らかであるにもかかわらず、製造コストがかかるために事業化されておらず、本格的な生産システムはこれまでに無かった。そのため、生産効率の高いシステムの構築は必要な開発項目であった。

そこで本開発テーマでは、DFAIV含有率 40%以上、DFAIV含有率 80%以上の二つの規格の DFAIV含有甘味料の、量産化のための生産システムに関して技術開発を行ったが、DFAIVの結晶化が事業化レベルで製造可能であると考えられたため、結晶製造ラインの構築に取り組んだ。

①生産性向上条件に基づくパイロットラインの構築

既存の発酵処理設備を用いて、原料を 600g 仕込むことが可能なラインを確保することができた為、さらにライン数を増やしながら、スケールアップラインの検討を合わせて実施し、最終的な生産コスト削減につながる製造ラインの完成を目指し、研究開発を実施した。

研究の結果、5 L ジャー発酵槽を用いたパイロットラインに、精製工程を加えて 40 g/L の DFAIVの結晶を得ることが可能なラインを構築する事が出来た。

②蔗糖およびグルコースの除去方法検討

蔗糖およびグルコースを効率良く除去する工程に関して、低コストでの DFAIV 精製方法について検討した。

研究の結果、酵母とイオン交換樹脂を使用して DFAIV の精製が可能となり DFAIV を純度の高い結晶にすることができた。

③製造コスト削減化検討

パイロットラインを稼働させながら、設備、工程の無駄等をチェックし、製造コスト削減を図ることを目的として、研究開発を実施した

研究の結果、精製に使用するイオン交換樹脂は、少なくとも 30 回以上の再利用が可能であることが明らかとなり、大きく製造コストを上げることなく DFAIV の結晶化が可能であるとの判断をすることができた。

1-3-3. DFAIV の閾値の検証

これまでの動物試験等の研究成果から、DFAIV のミネラル吸収促進作用が期待できる摂取量としては成人一人当たり 1 日 2~3g あれば十分であると考えているが、閾値に関するデータがなかったため、最適摂取量に関するデータを得ることを目的とし、研究開発を行った。

○閾値の検証による開発成果の摂取目安量の検討

動物試験による DFAⅢのデータを基に、ラットの消化管を用いて吸収効率を比較し、DFAⅣの作用閾値を推定した。

研究の結果、DFAⅣは DFAⅢの吸収効率より 40% 高いため、DFAⅣの推定閾値を 0.5g/成人と推定した。これは、開発予定である DFAⅣ40% 含有甘味料としては 1.5g 程度となり、予定していた 2~3g 以下での運用ができる可能性がでてきたと言える。

1-3-4. DFAIV の安全性評価

DFAIV 含有甘味料として本研究開発成果物を上市する場合、その安全性を確認することは必要な開発要素であると考えられるため、本研究テーマでは食品原料としての DFAIV の安全性を確認することを目的として、研究開発を行った。

①毒性試験の実施

単回毒性試験の実施により、DFAIV の致死量は 2,000 mg/kg 以上であり、運用予定の 2g は十分な安全性が確保できると考えられた。さらに、摂取量を増やした単回毒性試験の実施を行い、一時的にお腹がゆるくなる可能性があるものの DFAIV の致死量は 4,000 mg/kg 以上でありことが明らかとなり、さらに突然変異誘発の可能性もないという結果が得られ、DFAIV は極めて安全性が高いと判断できた。

②リスク要因の検証

想定される用量の範囲で、ミネラルの過剰摂取が起こり得ないための運用法を検討し、安全性を確保することを目標として、研究開発を実施した。

DFAIV 摂取によるメリットおよび、想定されるリスクを検討した結果、現状では慢性腎疾患や糖尿病などの場合にはメリットよりも疾患によるデメリットが上回る恐れがあるため、これらを考慮した注意喚起文を製品規格書用に作成した。

1-3-5. DFAIVの機能性評価

本事業によって得られる DFAIVの機能性は『ミネラル吸収促進作用』であるが、実際にヒトが摂取した際に同様の結果が得られるかはまだ検証できていない。また、評価系としてはこれまで貧血モデルマウス等を用いてきたが、微量ミネラルの動きなどの詳細データが充実していなかった。

そこで本研究テーマでは、細胞を用いた評価や臨床試験による評価によって、DFAIVの有効性を明らかにすることを目的として、研究開発を行った。

①急性相タンパクの動態確認による機能性評価

DFAIV摂取に伴う Tf、Cp 等のミネラル運搬タンパクの血中濃度を正確にモニターできる系（電気泳動マップ、蛍光免疫測定法等）を用いて、被験者の急性相タンパクの動態を調べることによって、DFAIVの経口摂取によるミネラル吸収促進作用の有効性を証明することが可能となるように、本格評価の準備として、急性相タンパクの動態を確認するための評価系の確立を目指し、研究開発を実施した。

その結果、急性相タンパクの動態確認によって、ミネラル吸収促進作用の有無や強弱について、多量のサンプルを一度に処理する事が可能な評価系を確立した。機能性評価の簡便化につながるもので、今後の事業化に向けたエビデンスの充実に役立つ評価技術の開発ができたと考える。

②ミネラル不足に対する改善作用の検証

DFAIVの機能性について尿中 Ca の排泄量を評価する事によって、Ca の吸収促進作用を確認する事が出来た。DFAIVでの臨床データは初めてのことであり、貴重な情報である。今後 DFAIVを事業化するに当たり、北海道食品機能性表示制度（ヘルシーDo）申請に向けた基礎データを得ることができたものとする。

1-3-6. DFAIVの市場性評価と製品規格化

開発した製法によって製造された DFAIVに関して、サンプル提供による外部評価の結果を反映させ、必要な製品規格項目を設定し規格確立を目的として、研究開発を行った。

①サンプル提供による外部評価の実施

試作した DFAIVの結晶を川下事業者候補に提供し、物性や味などの使用感を外部評価によって評価し、最終的な製品規格へ反映させることが可能なデータを得ることを目標に、研究開発を実施した。

その結果、結晶化した DFAIVについては、味や色、香りなど、大きな問題はなかった。また、機能性食品に使用を考えた場合に不純物は極力無い方が望ましいため、結晶自体の製品化を望む声も聞かれた。結晶化した DFAIVの価格については、6,000 円/kg～7,000 円/kgでの製品化が望ましいとの評価を得た。

②製品規格の確立

川下事業者候補の原料登録に必要な項目を情報収集し、機能性甘味料として求められる原料製品規格項目についてピックアップすることを目的として、研究開発を実施した。

一般生菌数・大腸菌群などの衛生規格の他、Brix や粘度、色などの物性に関する項目をに

対して規格項目を設定して分析を行い、製品規格案を作成した。また、ミネラル吸収促進に対するリスクに関する表記を規格書にも記載すべきとの意見もあったため、分析値以外を記載した最終的な規格書原案が完成した。

1-3-7. 研究開発全体の管理・運営

研究開発の進捗管理、成果報告書の作成、今後の研究課題に向けて進めるべき方向などを議論する研究開発委員会を開催しながら適切なプロジェクト管理・運営を行う計画であったが、委員会はひらかず、PL が各研究項目担当者と週一回以上の進捗確認と意見交換を実施することで、より詳細にプロジェクトの管理を実施するように努めた。

1-4. 当該研究開発の連絡窓口

法人名：株式会社 北海道バイオインダストリー
代表者役職・氏名：代表取締役・佐渡 宏樹
住所：〒062-0937 北海道札幌市豊平区平岸 7 条 14 丁目 3-43
連絡担当者名・所属役職：伊藤 和男・総務部部長
TEL：011-812-2512 FAX：011-812-6895
E-mail：kitou@bio-do.com

第2章

『本論』

1. 研究開発の背景および目的

超高齢社会をむかえた日本は、今後もさらに高齢化が進むと予想されており、今後は高齢者に求められる機能性食品が必要になることは明らかである。高齢者の特徴として、身体活動や代謝の低下などの要因による栄養の吸収力低下がおり、鉄やカルシウムなどのミネラル分が不足しやすいことが考えられる。加齢による胃酸の分泌量減少が関与しているとも考えられ、同様の理由で胃を切除した患者の多くに貧血症状が生じる。さらに野菜のミネラル含有量自体が減少していることや、食品添加物の使用によるミネラル吸収阻害、体外排泄の促進等の食品による要素や、他にも激しい運動負荷が生じる場合には、貧血や潜在性鉄欠乏の者の割合が大きいという調査結果がある。

このような背景下で、本研究開発事業の川下事業者となる食料品、医療・健康産業では、不足しているミネラルを過剰摂取するのではなく、吸収を促進する機能性を持つ作用のある機能性食品素材を求めており、現在ミネラル吸収促進作用を持つ甘味料としてフラクトオリゴ糖や DFAⅢ等のオリゴ糖を機能性、味で上回る DFAⅣは大きな期待を持たれているが、現在の製造技術では製造コストが高いため事業化に至っていない。

そこで本研究開発事業では、DFAⅣの製造法について発酵時間の短縮法や DFAⅣの収率の改善法等の諸条件を検討し、効率の良い DFAⅣ製造法を検討することによって新たな製法を確立し、ミネラル吸収促進作用を有する新規機能性甘味料として事業化することを目的として研究開発を実施した。

2. DFAⅣの生産性向上法の開発

2-1. 研究概要

DFAⅣは、多糖類のレバンから酵素レバンシュクラゼによって作ることができるが、この方法では、レバンのコストおよび製造コストが高価であった。今回活用するシーズは、安価で大量に入手可能な砂糖を原料として DFAⅣを生成する方法の発明であり、納豆菌を宿主として酵素レバンシュクラゼを導入することで1回の培養で DFAⅣの発酵製造に成功している。しかし、収率が20%以下であること、発酵に要する時間も96時間と長時間であることから、販売価格が20,000円/kgとなっており、川下事業者からは採用できない価格であるとの評価をされていた。これは、配膳食などの原価として10円程度の価格でなければ採用ができないという根拠からである。DFAⅣは、その機能性が期待できる摂取量がこれまでの研究では2gの摂取が必要と考えられており、現状の20,000円/kgであれば40円となる。そのため、1kgあたりのDFAⅣの価格を1/4の5,000円/kg以下の価格実現が必要である。

そこで本研究テーマでは、発酵時間の短縮方法を検討することによって人件費等の製造コストを削減し、さらに DFAⅣの収率を改善する方法を検討することで原料原価を引き下げること、この2つの開発要素を検討することで、最終的な DFAⅣの製造コストを大幅に引き下げる生産性向上のための技術開発を行った。

2-2. 発酵時間の短縮法検討

2-2-1. ショ糖濃度による発酵時間の検討

(1) 研究目的

発酵時間の短縮法として、ショ糖濃度が発酵時間に与える影響について検証することを目的として本試験を実施した。

(2) 研究方法

【シード培地】

Yeast extract	2.5 g/l	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.33 g/l	
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	11.3 g/l	(別殺菌)
シヨ糖	50 g/L	

培養条件 : 60ml/300ml 三角フラスコ 振盪培養、 37℃、120spm (往復振盪)
12-18 時間培養

【DFAIV生産培地】

Yeast extract	2.5 g/l	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.33 g/l	
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	11.3 g/l	(別殺菌)
シヨ糖	400 g/L~800 g/L	(5 濃度を設定)

培養条件 : 3L/5L Jar、37℃、通気 3L/min、攪拌 500 rpm、
消泡剤 LG109 (ポリエーテル型非イオン界面活性剤 ; ADEKA)
0.1 ml/3L
シード量は、2% (60ml/ 3L 発酵培地)
シヨ糖濃度は400g/L、500 g/L、600 g/L、700g/L、800 g/L の
5 濃度を設定し、それぞれの濃度における発酵時間と DFAIVの収量を
確認した。

(3) 研究結果

各濃度による発酵時間と DFAIVの収量を、(表 2 - 1) に示す。

表に示す通り、シヨ糖の濃度を薄くすることによって、発酵時間は短縮するが DFAIVの収量も減少する傾向が確認できた。

(表 2 - 1) シヨ糖濃度と発酵時間と DFAIV収量の関係

シヨ糖濃度(g/L)	発酵時間 (hr)	DFAIV (g/L)
400	72	25
500	72	35
600	84	42
700	84	45
800	96	48

(4) 考察

シヨ糖濃度を薄めることで発酵時間の短縮は可能と考えられたが、DFAIVの収量も減少するため、(表 2 - 1) にあるように最終 DFAIV濃度と合わせて考えると 600g/l が最適であるとの結論に達した。この場合 72 時間かかるが、この間に乾燥空気を入れることによる濃縮効果もあって、発酵時間の大幅な短縮は望めないが同様の効率化の効果があるとの結論に達した。即ち、シヨ糖 600g/L で 72 時間培養が最適であるとの結論に達した。

2-2-2. シード量の検討

(1) 研究目的

シードの量は、発酵条件の中でも大きな影響を与えることは、様々な発酵生産で既に経験されていることであり、ここでも、その影響は大きいものと予想して実験を行なった。

(2) 研究方法

【シード培地】

Yeast extract	2.5 g/l	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.33 g/l	
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	11.3 g/l	(別殺菌)
シヨ糖	50 g/L	

培養条件 : 60ml/300ml 三角フラスコ 振盪培養、 37℃、120spm (往復振盪)
12-18 時間培養

【DFAIV生産培地】

Yeast extract	2.5 g/l	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.33 g/l	
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	11.3 g/l	(別殺菌)
シヨ糖	600g/L	

培養条件 : 3L/5L Jar、37℃、通気 3L/min、攪拌 500 rpm、
消泡剤 LG109 (ポリエーテル型非イオン界面活性剤 ; ADEKA)
0.1 ml/3L
シード量は、2%、5%、10%、20%の4種を設定した
(60ml/ 3L 発酵培地)

(3) 研究結果

各シード量による発酵時間と DFAIVの収量を、(表2-2) に示す。
表に示すようにシード量を増加させると発酵時間に悪影響を与えることなく
DFAIVの収量を大幅に増やすことができることが確認できた。

(表2-2) シード量と発酵時間と DFAIV収量の関係

シード(%)	発酵時間 (hr)	DFA IV (g/L)
2	72	28
5	84	40
10	72	45
20	72	43

(4) 考察

シード量を 10%にすることで、発酵時間の短縮が可能であることが明らかになった。

2-3. DFAIVの収率向上法検討

2-3-1. 消泡剤 LG109 の DFAIV 生産に与える影響の検討

(1) 研究目的

DFAIV の発酵時間の短縮法を検討するに当たり、使用する培地が泡立ちやすいためジャー培養時に通気量や攪拌速度などの条件を変えることで、培地が吹きこぼれてしまうことが想定されるため、流出を防ぐために消泡剤の添加が必要であると考えられた。しかし、消泡剤はしばしば微生物の生育阻害や酵素の活性を阻害して、DFAIV の生産性を低下させる可能性がある。そこで、まず消泡剤の DFAIV 生産に与える影響を明らかにするため、攪拌効率がとても良く、酸素の供給力に優れる「坂口フラスコ」(発酵学創始者、坂口謹一郎先生が発案して作ったので先生の名前が付いたフラスコがある)を用いて消泡剤の DFA IV 生産に与える影響を調べた。

使用する消泡剤は、食品としても使用でき、発酵生産にはしばしば使用されている LG109 (ポリエーテル型非イオン界面活性剤; ADEKA) を用いた。

(2) 研究方法

【使用培地と抗生物質】

Luria-Bertani broth (LB 培地)
Polypeptone 10.0 g/l
yeast extract 5.0 g/l
NaCl 10.0 g/l
pH 7.0 (NaOH を添加して pH を調整した)

固体培地の場合、伊那寒天 20 g/l を添加した。
また、121 °C で 15 分間、オートクレーブ滅菌した。
抗生物質は chloramphenicol (終濃度 10 mg/ml、以下 Cm と称する)を添加した。
特に指定のない限り、この終濃度で培地に添加した。

【使用したショ糖】

基質となるショ糖は、甜菜由来のグラニュー糖(日本甜菜製糖)を使用した。グラニュー糖は還元糖や灰分がほぼ 0% であり、試薬よりも安価である。
純度が低く還元糖を約 1% 含む上白糖を用いた場合、グラニュー糖を用いた場合よりも DFA IV 生産量が減少した。
よって特に指定のない場合、培地として使用するショ糖はグラニュー糖とする。

【前培養】

微生物 (*B. subtilis*/pLFT-SD36) は、グリセロールストックから LB 寒天培地 (Cm を含む) に塗抹し、37°C で一晚培養した。
翌朝、菌体 1 白金耳を 10 ml の LB 培地 (Cm を含む) に接種し、37°C で 12 時間振盪培養した。この培養液を前培養液とした。

【DFAIVの生産】

B. subtilis/pLFT-SD36 の前培養液を以下の組成の生産培地（以降、「DFAIV生産培地；Cmを含む」と称する）60 ml に 1%接種し、坂口フラスコを用いて 37℃、120 rpm で 96 時間振盪培養した。

消泡剤の試験として、消泡剤 LG109 を種々の濃度およびタイミングで添加して、その効果と阻害作用の有無を調べた。

添加せずに、もしくは培養開始時、3 時間後、または 12 時間後に LG109 を 20 ml（約 1 滴）添加して培養を行った。菌体生育量（OD660）および培養上清中の DFAIV濃度、シヨ糖濃度を測定し、消泡剤 LG109 の DFAIV生産に与える影響を調べた。

DFA IV 生産培地

yeast extract	2.5 g/l
MgSO ₄ ・7H ₂ O	0.33 g/l
Na ₂ PO ₄ ・12H ₂ O	11.3 g/l
シヨ糖	200 g/l

Yeast extract および MgSO₄・7H₂O は混合後、坂口フラスコまたはジャーファーマンターに分注し、前者の場合は 121 °C で 15 分間滅菌、後者の場合は 121 °C で 20 分間滅菌した。Na₂PO₄・12H₂O およびシヨ糖は別々に滅菌後混合した。

【DFAIVの濃度およびシヨ糖濃度の測定方法】

培養液を 1 ml 採取し、15,000 x g、2 分間遠心し、上清を得た。

その後、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）によって、培養上清中の DFAIV濃度およびシヨ糖濃度を測定した。HPLC の条件を以下に示す。

カラム	: Mightysil RP-18 GP Aqua 4.6 mm×250 mm (関東化学)
カラム温度	: 35℃
溶媒	: H ₂ O (超純水)
流速	: 1.0 ml/min
検出器	: Refractive Index Detector (JASCO) 型番 RI-1530

（３）研究結果

坂口フラスコを用いた *B. subtilis*/pLFT-SD36 の DFAIV生産に対する消泡剤 LG109 の影響について、結果を（図 2-1）に示した。

（図 2-1）に示されるように、菌体生育量は 12 時間後に定常期に入った。LG109 を添加したもののうち、培養開始時および培養開始から 3 時間後に添加したものは、添加しなかったものとほとんど変わらなかった。

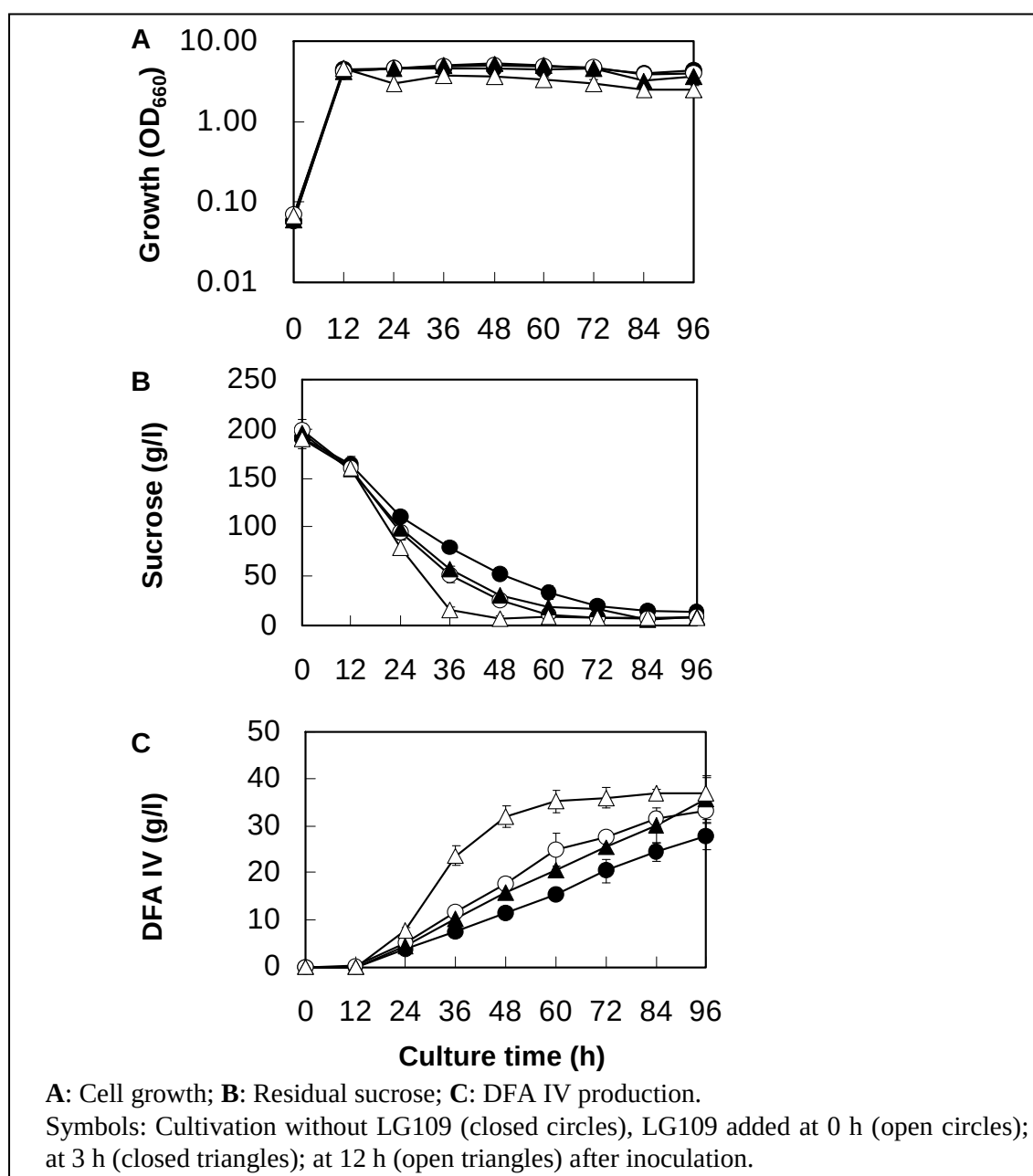
また、12 時間後に添加したものは菌体生育量が若干減少した。シヨ糖については、定常期に達した後も消費されていることから、シヨ糖は炭素源として菌に取り込まれているだけでなく、確実にレバンの基質として利用されている。特に対数増殖期後期以降の方がシヨ糖消費量は多いということからも、シヨ糖消費は主にレバンの基質として使用されており、そ

の消費の経時変化からレバン生産について評価することが可能である。

ショ糖消費量は LG109 を添加した場合もほとんど変わらず、添加した場合の方がショ糖消費速度は上昇した。

DFAIV生産速度も増加し、96 時間後の DFAIV生産量は、LG109 を添加しなかったものは 27.7 g/l、培養開始時に添加したものは 33.3 g/l、3 時間後に添加したものは 35.8 g/l、12 時間後に添加したものは 37.0 g/l であった。

96 時間後のショ糖消費量に対する DFA IV 生産量を収率として算出したところ、消泡剤 LG109 を添加しなかったものは 15.6%、培養開始時に添加したものは 17.6%、3 時間後に添加したものは 19.2%、12 時間後に添加したものは 20.4% であった。



(図2-1) *B. subtilis*/pLFT-SD36 の DFAIV生産に対する消泡剤 LG109 の影響

(4) 考察

今回の結果から消泡剤 LG109 の添加は、*B. subtilis*/pLFT-SD36 の DFAIV 生産を阻害しないことが示され、消泡剤として LG109 の利用が可能であることが明らかになった。また、LG109 を添加することによって、ショ糖消費速度、DFAIV 生産速度、DFAIV 生産量および収率が増加した。この原因としては 2 つの事が考えられ、まずは LG109 により培地の泡立ちが抑えられ、培地中への通気条件が変わったからというものである。これは *B. subtilis* は好気性細菌であるため、酸素条件の違いが影響を与える可能性は大いにある。

もう一つは LG109 そのものが菌もしくは酵素に働きかけて DFAIV 生産を向上させる要因となっているというものである。菌体生育量は変わらないことから、LG109 を栄養源として利用している可能性は低い。LG109 により菌体の酵素生産や酵素分泌が促進されている、もしくは酵素作用に影響を与えていることが考えられる。

そこで LG109 自体が要因なのかを調べるため、次節にて LG109 の添加量が DFAIV 生産に影響を与えるかどうか検討することにした。

2-3-2. DFAIV 生産における消泡剤 LG109 の添加量の影響

(1) 研究目的

2-3-1. での実験では、消泡剤 LG109 を添加したところ、*B. subtilis*/pLFT-SD36 の DFA IV 生産は、阻害するどころか向上した。そこで LG109 そのものがプラスの効果があるのか否かを明らかにするため、消泡剤の添加量を変えて違いが出るかどうかを調べた。

(2) 研究方法

前培養の条件は 2-3-1. (2) と同様とした。

生産培地においては、*B. subtilis*/pLFT-SD36 の前培養液を DFA IV 生産培地 (Cm を含む) 60 ml に 1% 接種し、坂口フラスコを用いて 37°C、120 rpm で 96 時間振盪培養した。

この時、培養開始時に LG109 をそれぞれ 20 μ l、50 μ l、100 μ l、200 μ l 添加して培養を行った。

菌体生育量 (OD660) および培養上清中の DFAIV 濃度、ショ糖濃度を測定し、LG109 の添加量が与える影響を調べた。

培養上清中の DFAIV 濃度およびショ糖濃度は、2-3-1. (2) と同様の条件で HPLC を用いて測定した。

(3) 研究結果

菌体生育量は LG109 の添加量による違いは見られず、ショ糖消費に関しても違いが見られなかった。DFAIV 生産量も LG109 を 20 μ l 添加したものは 38.8 g/l、50 μ l 添加したものは 33.8 g/l、100 μ l 添加したものは 33.5 g/l、200 μ l 添加したものは 37.0 g/l であり、LG109 の添加量との相関性は見られなかった。

以上の結果より、LG109 添加による DFAIV 生産の向上は LG109 自体によるものではないことが示された。

(4) 考察

LG109 の添加量と DFAIV 生産の間に相関性は見られなかった。

このことから、2-3-1. における LG109 添加による DFAIV 生産の向上は LG109 そのものにより引き起こされているわけではないことが示された。

培地 60 ml に対して LG109 を最大 200 μ l 添加しても DFAIV 生産が阻害されないことが確認された。今回の結果から LG109 添加による DFAIV 生産の向上は、消泡効果による通気条件などの違いによるものであることが示唆された。通気条件を検討するには、条件のコントロールが可能なジャーファーマンターを用いる方が適している。そのため、LG109 を添加する条件で安定した DFAIV 生産が可能であるか、また、いつ LG109 を添加するのがより良いのかを調べることにした。

2-3-3. ジャーファーマンターを用いた生産での評価

(1) 研究目的

2-3-1. より *B. subtilis*/pLFT-SD36 の DFAIV 生産において LG109 を消泡剤として利用できることがわかった。また、2-3-2. より通気条件が DFAIV 生産において重要かもしれないことが示された。通気条件の検討のためには条件のコントロールが可能なジャーファーマンターを用いるべきであり、そのためには安定した DFAIV 生産が可能であることを確認しなければならない。また、大量生産までのステップとして、安定したジャー培養は必須である。そこで、LG109 を消泡剤として使用し、ジャーファーマンターによる培養を試みた。

(2) 研究方法

前培養の条件は 2-3-1. (2) と同様とした。

B. subtilis/pLFT-SD36 の前培養液を DFAIV 生産培地 (Cm を含む) 600 ml に 1% 接種し、1 リットル容ジャーファーマンター (BMJ-01PI, エイブル) を用いて、96 時間培養した。培養は 37°C、通気量は 1.0 v.v.m、攪拌速度は 400 rpm とした。

pH コントロールは行わなかった。この時、培養開始時、または 4 時間後に LG109 を 200 μ l 添加して培養を行った。菌体生育量 (OD660) および培養上清中の DFAIV 濃度、ショ糖濃度を測定し、LG109 の添加時間の差による影響を調べた。

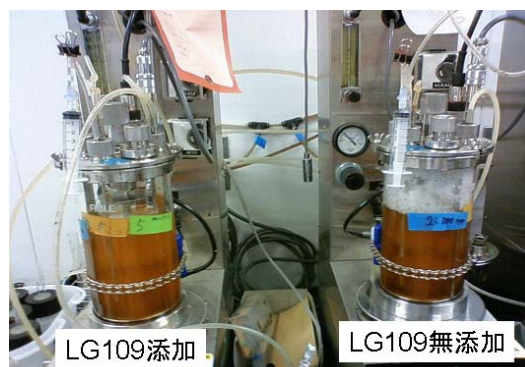
培養上清中の DFAIV 濃度およびショ糖濃度は、2-3-1. (2) と同様の条件で HPLC を用いて測定した。

(3) 研究結果

DFAIV 生産培地を使用したジャー培養において、培地が泡立ち外へ流出する恐れのある時間は、培養開始から 4 時間後であった。

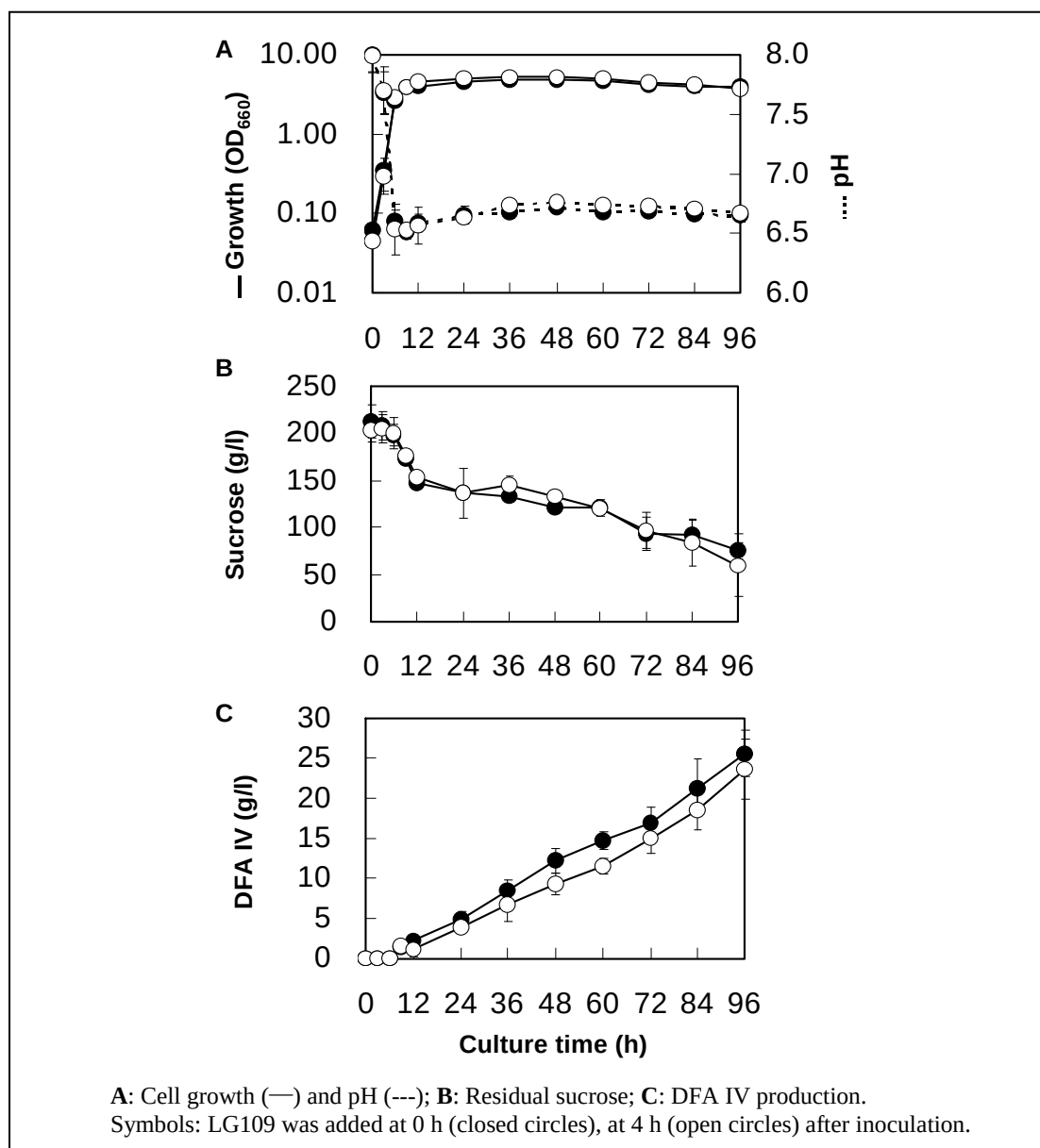
そこで、LG109 の添加時間を培養開始時または 4 時間後とし、その違いを調べた。

右図は LG109 添加したものと無添加のものの 4 時間後の様子である。(図 2-2)



(図 2-2) LG109 を添加したもの、無添加のものの 4 時間後の状態

ジャーファーマンターを用いた *B. subtilis*/pLFT-SD36 の DFAIV 生産における LG109 添加とその添加時間の影響について、結果を（図 2-3）に示す。



（図 2-3）ジャーファーマンターを用いた *B. subtilis*/pLFT-SD36 の DFA IV 生産における LG109 添加とその添加時間の影響

菌体生育量は 12 時間で定常期に達した。
最大菌体生育量は坂口フラスコの場合もジャーファーマンターの場合も 4～5 程度であり、ほとんど差は見られなかった。

また、LG109 の添加時間によって菌体生育量は変わらなかった。
pH については、培養開始時は 8.0 前後で、9 時間後まで低下し続けた後上昇し、12 時間後の定常期に達した後はおよそ 6.6 ～ 6.7 で安定した。pH についても、LG109 の添加時間による差は見られなかった。

坂口フラスコではほぼ全てのショ糖を消費したのに対し、今回のジャーファーマンターを用いた培養では、培養開始時に LG109 を添加したものは 75.4 g/l、4 時間後に添加したものは 60.0 g/l のショ糖が消費されずに残った。LG109 の添加時間によるショ糖消費に関する差は見られなかった。

DFAIVについても、培養開始時に LG109 を添加したものは 25.5 g/l、4 時間後に添加したものは 23.6 g/l となり、LG109 の添加時間による差は見られなかったが、坂口フラスコで培養した場合よりも生産量が低かった。

(4) 考察

培地 600 ml に対して LG109 を 200 μ l 添加することで、96 時間後まで消泡効果が持続し、大きく結果がずれることなく安定した結果が得られた。

添加時間については、培養開始時と培地が流出する直前である 4 時間後との間に差は見られなかった。

今回の結果より、以降ジャーファーマンターで培養を行う時は、培養開始時に LG109 を添加することが好適であると判断した。しかし、今回の条件でジャーファーマンターを用いた培養を行ったところ、坂口フラスコで培養した場合よりもショ糖消費速度および DFAIV 生産は低下した。これは通気量や攪拌速度の条件が最適でないことが原因の一つと考えられる。

そのため、*B. subtilis*/pLFT-SD36 の DFAIV 生産における最適な条件を模索するため、通気量および攪拌速度の検討を行うことにした。

2-3-4. 通気量および攪拌速度の検討

(1) 研究目的

これまでの研究によって、安定したジャー培養が可能となった。

しかし、通気量などのエアレーション条件が *B. subtilis*/pLFT-SD36 の DFAIV 生産に影響を与える可能性があることから、通気量および攪拌速度の影響について調べることにした。

(2) 研究方法

グリセロールストックから LB 寒天培地 (Cm を含む) に *B. subtilis*/pLFT-SD36 を塗抹し、37°C で一晚培養した。その後、菌体 1 白金耳を 10 ml の LB 培地 (Cm を含む) に接種し、37°C で 12 時間振盪培養した。この前培養液を DFAIV 生産培地 (Cm を含む) 600 ml に 1% 接種し、1 リットル容ジャーファーマンターを用いて 96 時間培養した。培養は 37°C とし、pH コントロールは行わなかった。

通気量、攪拌速度は 0.5 v.v.m~2.0 v.v.m、300 rpm~600 rpm の範囲で組み合わせて培養を行った。

消泡剤 LG109 は培養開始時に 200 μ l 添加した。菌体生育量 (OD660) および培養上清中の DFAIV 濃度、ショ糖濃度を測定し、通気量および攪拌速度の DFAIV 生産への影響を調べた。DFAIV 濃度およびショ糖濃度は HPLC で測定した。

(3) 研究結果

①菌体生育量および pH

B. subtilis/pLFT-SD36 の DFAIV 生産における、通気量および攪拌速度の菌体生育量と pH に与える影響を調べた結果、菌体生育量には大きな差は見られなかった。また、いずれの条件も 12 時間後には定常期に達した。pH に関しては 400 rpm よりも 500、600 rpm の場合の方が、すなわち攪拌速度が大きい方が、pH が低下してから再び上昇するまでが早く、12 時間後以降およそ pH 6.8 ~ 6.9 で安定した。安定したときの pH も 400 rpm の場合 (およそ 6.7 ~ 6.8) よりも若干高い値となった。

②シヨ糖消費

シヨ糖消費については、回転数 300 rpm および 400 rpm の場合培養 96 時間後もシヨ糖が全て消費されず残ってしまったのに対し、500 rpm、600 rpm ではほぼ全て消費された。このことから、攪拌速度を大きくするとシヨ糖消費速度が増加することがわかった。

③ DFAIV 生産

培養 96 時間後の DFAIV 生産量の結果について、通気量 0.5 v.v.m、回転数 300 rpm では DFAIV 生産量は 24.5 g/l であった。

通気量 1.0 v.v.m、回転数 400 rpm では DFAIV 23.7 g/l、さらに通気量 1.0 v.v.m、回転数 500 rpm では DFAIV 生産量 42.1 g/l、通気量 1.0 v.v.m、回転数 600 rpm では 47.1 g/l、通気量 1.5 v.v.m、回転数 400 rpm では DFAIV 生産量 32.4 g/l、1.5 v.v.m、500 rpm では 50.6 g/l、1.5 v.v.m、600 rpm では 53.9 g/l、2.0 v.v.m、400 rpm では 32.6 g/l であった。

通気量については、1.0 v.v.m よりも 1.5 v.v.m の方が DFAIV 生産量は多かった。通気量 1.5 v.v.m と 2.0 v.v.m の間には大きな差は見られなかった。

また、攪拌速度が大きいほど DFAIV 生産量が多くなり、特に 400 rpm と 500 rpm、600 rpm との差が著しかった。1.5 v.v.m の場合、500 rpm と 600 rpm の差はほとんどなかった。

④ 収率

収率の結果について、0.5 v.v.m、300 rpm では 15.4%、1.0 v.v.m、400 rpm では 18.6%、1.0 v.v.m、500 rpm では 25.6%、1.0 v.v.m、600 rpm では 24.7%、1.5 v.v.m、400 rpm では 25.9%、1.5 v.v.m、500 rpm では 28.0%、1.5 v.v.m、600 rpm では 29.0%、2.0 v.v.m、400 rpm では 35.2% であった。

通気量が多いほど、収率も高くなった。

攪拌速度が大きいほど収率は高くなったが、500 rpm と 600 rpm との差は 400 rpm との差ほど大きくなかった。

(4) 考察

B. subtilis/pLFT-SD36 の DFAIV 生産において、通気量と攪拌速度は重要であることがわかった。

また、通気量および攪拌速度が大きいほど DFAIV 生産が向上する傾向が見られた。収率のみで見ると 2.0 v.v.m、400 rpm が最も高いが、通気量が多く培地の蒸発量が増加してしまう上、シヨ糖消費量および DFAIV 生産量が少なかったため、シヨ糖消費量、DFAIV 生

産量、収率いずれも高い値だった 1.5 v.v.m、500 rpm もしくは 1.5 v.v.m、600 rpm が最適な条件だといえる。両者の差がわずかであったこと、より結果が安定していたこと、攪拌速度を上げればその分コストがかかることから、今後 1.5 v.v.m、500 rpm を最適な条件として使用することにした。

2-4. 研究成果

本研究テーマでは、DFAIV製造時の発酵時間と収率を向上させるための方法を検討することで、事業化レベルまで製造コストを引き下げることが目的として研究開発を実施した。

その結果、発酵時間に関してはショ糖濃度を 600 g/L、シード量を 10%にすることによって DFAIVの収率を落とすことなく、発酵時間を現状の 96 時間から 72 時間にまで短縮することが可能となった。さらに、組換え枯草菌のプラスミド不安定性の影響と、枯草菌の分泌するプロテアーゼの影響について検討し、プロテアーゼ活性を減少させるセリンプロテアーゼ阻害剤 PMSF の添加によって、発酵に要する時間を昨年度の研究実績からさらに 12 時間程度短縮する事が可能となった。

また収率向上法については、消泡剤 LG109 を使用することによって、DFAIVの生産に悪影響を与えるどころか生産性を向上させる結果が得られた。さらに収率を向上させるために行った、発酵時の通気量と攪拌速度についての条件検討では 1.5 v.v.m、500 rpm が最適な条件であるという結果が得られた。

これらの成果により、従来の DFAIV製造コストを大幅に減少することが可能となった。

2-5. 考察

通気量、攪拌速度の最適条件と、PMSF や消泡剤 LG109 の使用などによって、発酵時間に関しては従来 96 時間を要していたところを約 60 時間にまで短縮する事が可能となり、また、収率も従来では 20%程度であったものを安定して 40%程度にまで向上する事が出来た。あくまでもパイロットラインでの再現性であるが、スケールアップしても通気量や攪拌速度に関しては、再現が可能であると判断しており、製造に関しては事業化レベルまで達したと考える。

3. DFAIV量産化のための生産システム構築

3-1.研究概要

DFAIVは機能が優れていることが明らかであるにもかかわらず、製造コストがかかるために事業化されておらず、本格的な生産システムはこれまでに無かった。そのため、生産効率の高いシステムの構築は必要な開発項目であった。DFAIVの製造には不純物を除去する工程が必要になるが、使用した菌体を除去する手法は連続遠心分離で可能である。

しかし、副産物として生じるグルコースや発酵に使用されなかったショ糖を、DFAIVと分離する方法は確立できていなかったため、DFAIVの純度を高めた規格は非常に困難となっていた。川下事業者からの要求としては DFAIVの含有率 80%以上の規格も必要であると考えられたため、精製法についても検討しなければならない。そこで本開発テーマでは、精製方法を含めた DFAIVの量産化のための生産システムに関して技術開発を行った。

3-2. 生産性向上条件に基づくパイロットラインの構築

(1) 研究目的

これまでに得られた DFAIVの製造条件をもとに、大量生産ラインの構築につなげるための条件設定の確かさを試験することが可能な、パイロットラインの構築を目指して研究開発を実施した。

(2) 研究方法

得られた製造条件を基にして 5 L ジャー発酵槽を用いたパイロットラインを構築し、さらに DFAIV結晶化のための精製工程を組み込み、DFAIVの結晶の試験製造を繰り返しながら、ラインの改善点を抽出し、改良を加えながら安定的に結晶化した DFAIVを得ることが可能なラインの検討を行った。

(3) 研究結果

5 L ジャー発酵槽を用いて、40 g/L 以上の DFAIVの結晶を得ることが可能なパイロットラインを構築する事が出来た。また、スケールアップについても検討したところ、発酵槽の容量をアップした際も精製ラインの稼働回数を増やすことで、十分に対応が可能であることが確認できた。

(4) 考察

DFAIVの結晶化が可能なラインの構築ができ、さらに事業化に向けたスケールアップも可能であると考えられる成果が得られたことから、目標としていた既存設備を使用した本製造ラインについても、大きく設備投資をすることなく対応する事が可能であると考えられた。

3-3. 蔗糖およびグルコースの除去方法検討

3-3-1. 酵母による糖除去の検討

(1) 研究目的

本方法では、どうしても最終段階でグルコースが残存することになる。得られる機能性甘味料の DFAIV含有率を上げるためには、このグルコースを除去する必要がある。そこでグルコース除去のために、酵母を利用してグルコースを消費させて DFAIV の収率を上げることを試みた。

(2) 研究方法

①対数期酵母の利用

酵母にとって最も生育状態が良い対数増殖期後期の酵母の前培養液を使用することを試みた。培地には、ポテトデキストロー寒天培地 (PDA 培地)とポテトデキストロースブロス培地を用いた。*S. cerevisiae* AHU 3188 (北大応用菌学教室保存) については、グリセロールストックから PDA 培地に *S. cerevisiae* AHU 3188 を塗抹し、30℃で一晩培養した。市販のドライイーストについては、酵母の粉末を少量 PDA 培地に塗抹し、30℃で一晩培養した。これらを用いたところ予想通り、いずれの酵母も DFAIVを消費せず、グルコースのみが消費された。しかしながらこの条件ではその消費速度は遅く、酵母の培養方法の検討が必要と判明した。また、このような前培養では、DFAIV 発酵生産培地と大きく異なるため正しい情報が得られないと判断して、DFAIV 発酵後のブロスを模擬したもので試験を行うこととした。

②市販パン酵母の利用

市販のパン酵母を用いて、DFAIV 発酵後のブロスに各種栄養物を補填してグルコースの除去を試みた。当初のフラスコ実験では、酵母エキス、肉エキス、硫酸の添加が効果のあることが分かっていたので、これらの最適濃度の検討を試みたところ、酵母エキス 5g/L が最適であること、また硫酸については 10g/L が最もよかった。この時の酵母量は 10g/L を使用した。

(3) 研究結果

DFAIV 発酵生産終了ブロスを用いて、これに硫酸の酵母エキスを加えることでグルコースの除去がうまくできた。さらに、酵母エキス 5g/L、硫酸 5g/L 加えることでグルコースを完全に除去できた。

(4) 考察

グルコースの除去に関しては、データを示していないが、市販酵母 3g/L の使用で、12 から 16 時間でほぼ完全に除去できることが分かった。この場合には通気量をこれまで以上にすることが重要であり、今後精細に詰める必要がある。

また、市販酵母は、安価であるが、この量の最適化も必要であると考えられる。

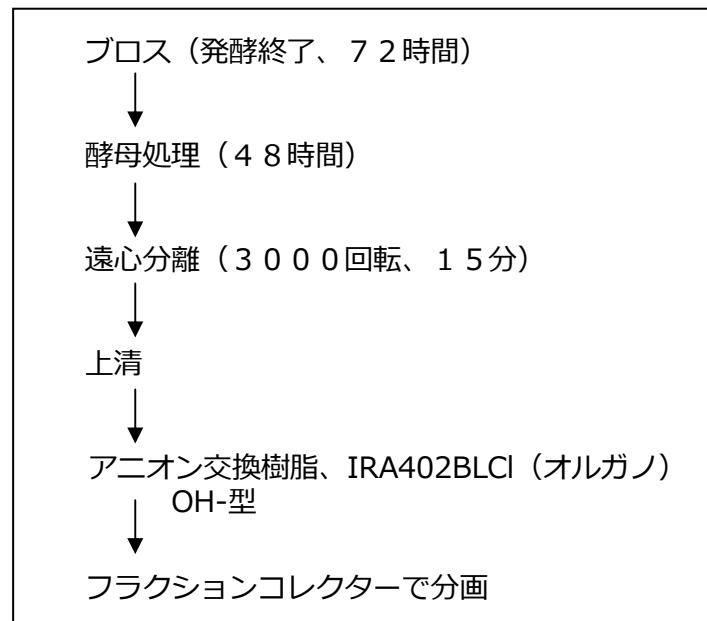
3-3-2. 酵母処理後の精製法検討

(1) 研究目的

安価に入手が可能である市販の酵母を用いて、グルコースの大部分を除去することが可能であることが明らかとなったが、使用した酵母残さ等の除去が完全にできないなどの課題が残っていたため、不純物除去などの条件をさらに検討することによって、さらにコストパフォーマンスの良い精製法を確立することを目標に研究開発を実施した。

(2) 研究方法

DFAIVの発酵生産終了液（以下ブロスと称する）は、残存する DFAIV以外の糖類および各種塩類が含まれているため、ブロスから DFAIVを選別して取得する事が重要な課題である。糖類の除去は、平成 24 年度に確立したように酵母（市販のパン酵母など）を使って消費することで、大幅に減らすことが可能である。酵母を用いた精製の流れを（図 3-1）に示す。

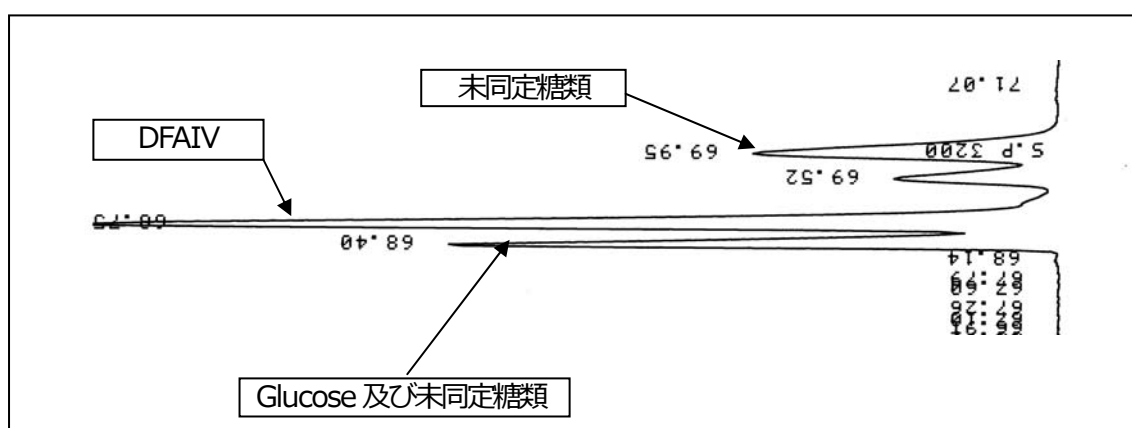


（図 3-1）一般的なカラムクロマト精製実験の流れ

①DFAIVの分析手法

DFAIVの精製度合いを評価するために、液体クロマトグラフィーによって下記の条件で分析を行った。典型的な分析例を（図 3-2）に示す。

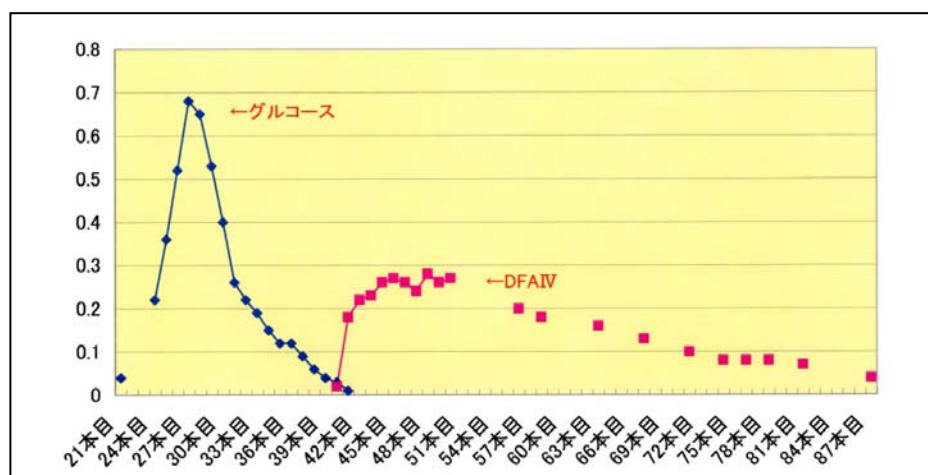
- ・使用カラム：逆相HPLCカラム
(Mightsil RP18GP Aqua 250-4.6 (5μ m))
- ・カラム温度：40℃
- ・流速：10 ml/hour
- ・溶媒：水



（図 3-2）典型的な DFAIV の分析結果例

②精製予備試験

酵母処理ブロスを（図 3-1）に示す方法で DFAIV の分離濃縮を試みた。ブロスには、公衆処理の際に酵母エキスと 10g/L の硫酸を加えてあるため、イオン類と色素を除去する目的も兼ねてアニオン交換樹脂とカチオン交換樹脂に通塔することで分離が可能かどうかを検討した。その結果、カチオン交換樹脂では、カチオンを除去できるものの糖の分別は全くできなかった（結果を示さない）が、アニオン交換樹脂（IRA402BLCI（オルガノ）OH-型）では、（図 3-3）に示すように DFAIV の分離が可能であるとともに色素の除去もある程度可能であった。しかも大量のアニオンを除去できるとともに残ってくるカチオンの大部分はアンモニアであるため、次の段階になる減圧濃縮の段階での留去が可能であるので好適であると考えた。



（図 3-3）アニオン交換樹脂による分画の例

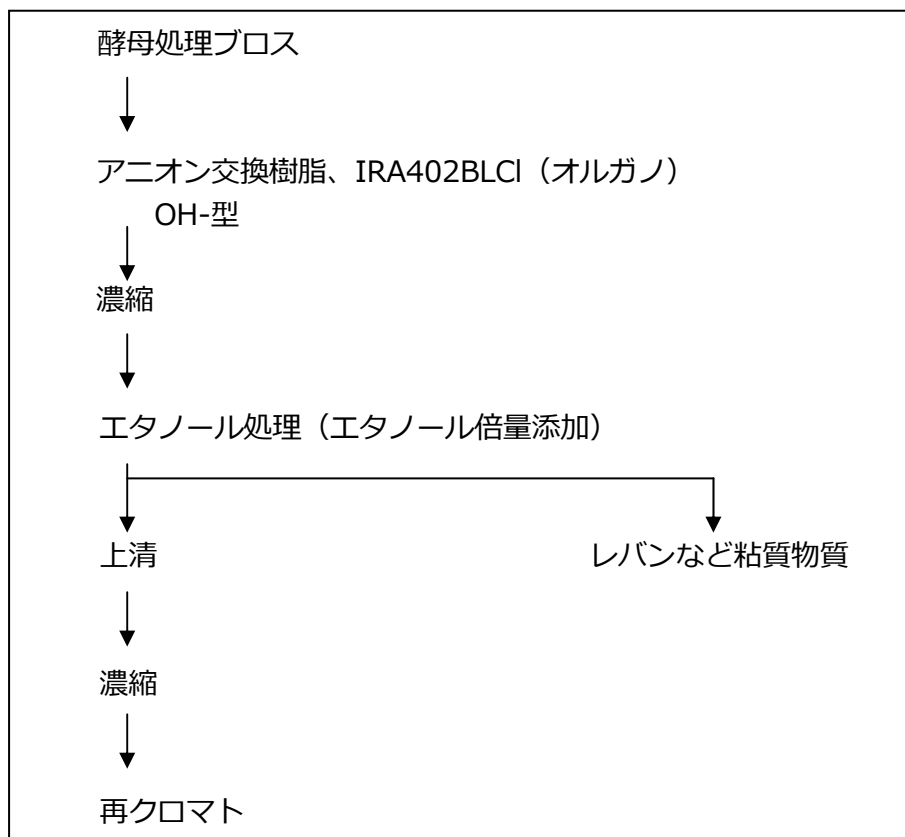
アクリル樹脂製のカラムに樹脂を 600 ml 充填し、酵母処理ブロス 50ml を添加してクロマト処理を行った。20ml を 1 分画として分析を行った。酵母処理ブロス中の DFAIV とグルコースとの比が、100g/l 対 20g/l であった。

（図 3-3）に示す DFAIV が多い画分を集めて濃縮すると粘濁な液体が得られた。これに 2 倍量のエタノールを加えることで、レバンを主体とする粘質物質を巻き取りながら除去し、さらにこれを 4℃ で一夜放置することでさらに不純物の除去を行った。不純物が粘質物質であるため、除去は上清をとることで簡単に行うことが可能であり、この上清を濃縮し、低温に放置することで結晶を得ることができた。よって、この予備試験で得られた結果をもとに本精製試験を実施した。

（3）研究結果

予備試験で得られた結果をもとに更に大量の処理を行ったところ、必ずしも（図 3-3）に示す結果が得られなかった。結果が異なる要因を検討したところ、酵母処理ブロスの DFAIV とその他（特にグルコース等）との存在比が異なると、分離状況は大きく変化することが明らかになった。更に DFAIV の存在濃度によっても変化することが分かったが、ここではアニオンを除くことと、その後のエタノール処理でレバン等の粘質不純物を除くことを主体に考え、また、DFAIV の存在量を調節できるような溶液が得られることに重点を置いて、（図 3-4）に示す行程をとり、ここで得たアルコール溶液をさらに濃縮するこ

とで DFAIVを主成分とする液体をえることと、濃縮で得られたエタノールを回収再利用できることに重点を置き、以下の行程を最終精製方法の第一段とした。使用するカラムは、大カラム（d=10.8cm）を用いて樹脂量を8Lとし、酵母処理ブロス6Lを用いた。



(図 3-4) 酵母処理ブロスの前処理

再クロマトで得られたものの濃縮液は、pH がアルカリ側にあるのでこれを塩酸で調整して結晶化の条件を検討した。結果を（表 3-1）に示す。使った母液は、140g/L : 190g/L であった。（表 3-1）に示す通り、結晶化には中性が良いと考えられた。

(表 3-1) pH と結晶化

p H	結晶化
12	△
10	△
7	◎
5	○

◎ : 良好、○ : 良、△ : あまりよくない、× : 悪い

また、DFAIV濃度とグルコース濃度についても、結晶化の条件検討を行った。母液には、再クロマトしたものを用いた。濃度は大凡のものである。pH7.0 とした。結果を（表 3-2）に示す。

(表 3-2) DFAIVおよびグルコース濃度と結晶化

DFAIV(g/L)	Glucose(g/L)	結晶化
100	20	◎
100	50	◎
100	100	◎
100	200	○
100	300	△
◎ : 良好、○ : 良、△ : あまりよくない、× : 悪い		

上記の結果から、グルコースが倍量存在までは結晶化が可能であると考えられた。

(4) 考察

DFAIVの結晶化が可能となったことから、川下事業者からの要望であった製品規格として、DFAIVの含有率が 40%以上の規格と、80%以上の規格の 2 つの規格の原料製品化を予定していたが、結晶を原料として要望に応じた濃度に調製する事が可能となったため、複数の規格在庫を持つリスクを回避する事が出来ると考えられた。

3-4. 製造コスト削減化検討

(1) 研究目的

DFAIVの結晶化が可能となったが、精製工程のためのコストがかかる。そこで精製する際に使用するカラムに関して、繰り返しの使用が可能であれば、製造コストを下げる事ができると考え、カラムの再利用の可能性について検討を行った。

(2) 研究方法

イオン交換樹脂（アニオン交換樹脂（IRA402BLCI（オルガノ）CI-型））は、比較的高価で、20 kg 75,000 円である。本来のイオン交換のために使用する場合は3～5回しか使用できないが、DFAIVの精製として使用した場合にどの程度繰り返しの使用が可能かを、実際にパイロットラインを稼働させて、最大量の製造を行った場合の劣化度を評価した。

(3) 研究結果

構築したパイロットラインで未使用のイオン交換樹脂で分離したサンプルと、10 回目の製造時、20 回目の製造時、30 回目の製造時に分離したサンプルについて、DFAIVの分離率と脱色能の比較を行ったが、どのサンプルもほとんど差がなく、DFAIVの結晶化を進めることができた。

つまり、本来のイオン交換以外の利用であるため、繰り返しの使用でも目的とする

DFAIVの分離と脱色の能力は少なくとも 30 回の使用では劣化しないものと考えられた。

(4) 考察

精製工程でのカラムの使用は、製造コストが高くなると考えていたが、イオン交換樹脂を少なくとも 30 回以上使用する事が可能であることが明らかとなったため、酵母を用いた糖の除去と DFAIVの精製までが従来よりもはるかに低コストで実現できる可能性が見えてきた。また、さらに酵母の自家製造と発酵装置のスケールアップでも、効率化を図ることが可能である。

培養容量を大きくすることで発酵のスケール効果も期待できる他、電力などの諸経費についても、用量を倍にするたびに通常 1/3 にすることが可能であるため、今後は事業化に向けたスケールアップとともに、製造コストの確認も並行して進めていく。

3-5. 研究成果

DFAIVの事業化のためには、DFAIV生成の際に生じる糖類を、極力低コストで除去する事が出来るラインの構築が必須であった。酵母を使用する事によって DFAIV以外の糖類を大幅に減少する事が可能であったが、酵母を使用する事によって生じる異物除去や脱色が必要となり、精製工程が必要となったため、さらにパイロットラインに精製ラインを組み込んだものの構築に取り組んだ。精製には高価なカラムが必要と考えていたが、イオン交換樹脂が繰り返し使用する事ができることが明らかになったため、ほとんど初期コストのみで処理する事が可能であり、DFAIVの結晶を得ることが可能な 40 g/L のパイロットラインを構築することができた。

3-6. 考察

DFAIVの結晶化が可能なラインの構築ができ、さらに事業化に向けたスケールアップも可能であると考えられる成果が得られたことから、川下事業者からの要望であった製品規格として、DFAIVの含有率が 40%以上の規格と、80%以上の規格の 2 つの規格の原料製品化を予定していたが、結晶を原料として要望に応じた濃度に調製する事が可能となったため、複数の規格在庫を持つリスクを回避する事が出来、一層のコストの削減につながったものとする。

4. DFAIVの閾値の検証

4-1. 研究概要

これまでの動物試験等の研究成果から、DFAIVのミネラル吸収促進作用が期待できる摂取量としては成人一人当たり 1 日 2~3g あれば十分であると考えている。しかし、これは 4 週間の摂取期間での効果を求めた場合であり、長期的な摂取を考えた場合は摂取量をより少なくすることができる可能性がある。摂取量が少なく済むのであれば 1 食当たりの DFAIVの価格を抑えることが可能となるため、本研究テーマでは、長期摂取を前提とした最適摂取量に関して研究開発を行った。

閾値については DFAⅢの研究データが存在しているため、DFAⅢと DFAIVの吸収効果を比較することによって、予定している機能性評価試験での摂取量を決定するための DFAIVの閾値を想定することを試みた。

4-2. 研究方法

作用閾値を算出するにあたって、それぞれの臓器でのミネラルの吸収感度を求めた。6週齢の SD ラットを日本クレア社より購入し、実験室での数週間の予備飼育を行い体重が 220～290g になったラットを実験に供した。

ラットを麻酔下でと殺した後、消化管を摘出した。消化管は氷冷中の生理的食塩水中で洗浄した。小腸、大腸に分けたのち、筋肉部分を切除して、腸管内に面した細胞層（Mucosa）を取りだしてユッシング・チャンバーに取り付けて、細胞層のミネラル吸収能力を測定した。ユッシング・チャンバーの左右は Mucosa 層だけで隔てられており、左側のチャンバーが、腸管内にあたる。ユッシングチャンバーに設置した Mucosa を 37℃で 30 分間左側のチャンバーにミネラルと実験に供するオリゴ糖を入れて、右側のチャンバーに移行したミネラルの濃度を原子吸光分析機で定量することによって吸収性を求めた。

4-3. 研究結果

対象区として用いたのは、既に実験の進んでいるオリゴ糖を用いた。オリゴ糖を種々の濃度で左側のチャンバーに入れた場合に移行したミネラル量をプロットして図とした。

DFAⅢと DFAⅣを比較すると、消化管のいずれの部分でも DFAⅣの方が、より低濃度のオリゴ糖でより高濃度のカルシウムの吸収が起こっていることを示した。

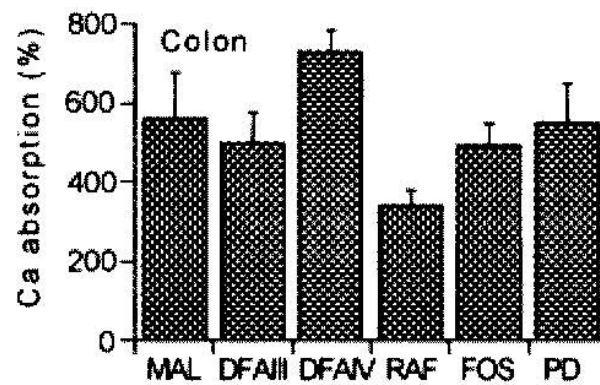
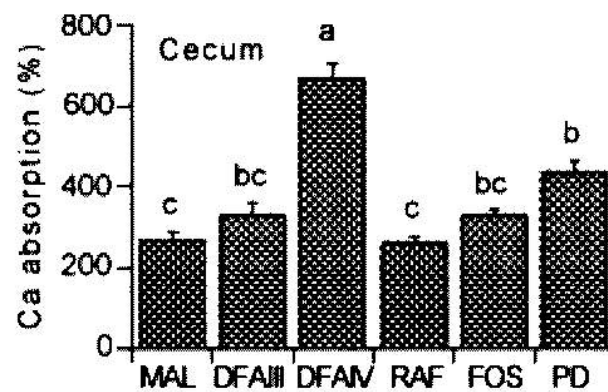
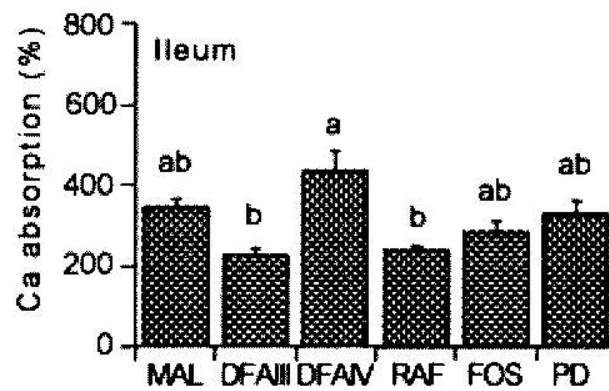
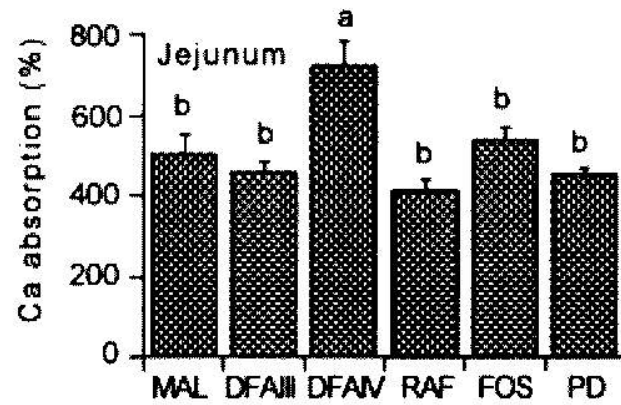
同様の手法で、他の糖類も調べたが DFAⅣが最もカルシウム吸収力が効果的なのが明確になった。

さらに、ユッシング・チャンバーを用いて調べた吸収力を分かり易く各オリゴ糖を比べた結果を（図 4-1）に示す。消化管のいずれの場所においても、DFAⅣは有意にカルシウム吸収の効率が高い。別途研究を進めていた DFAⅢの吸収量よりもおよそ 40%さらに効率が高いことがわかる。このことは、それに伴って、使用域値も閉架することを意味している。

これまでの研究で、DFAⅢについては、ヒト試験で、作用量が求められていた。カルシウム 300mg を摂取したコントロール区と比較して、同時にオリゴ糖が存在すると、カルシウム吸収がどの様に変化するかを尿中に排出されたカルシウムでモニターしたデータがある。データにおいて、フラクトオリゴ糖 3 g の摂取で、4-8 時間でわずかにカルシウム吸収の増加がみられており、DFAⅢでは 1 g の摂取でも有意な吸収量の増加が 0-2 時間でも観察され 2-6 時間で大きな差となっていた。DFAⅢの効果の閾値は、1 g 以下であることは明白である。よってこれらのデータを基に、DFAⅣの閾値を考察することとした。

4-4. 考察

本研究のデータから、DFAⅣの作用閾値を考察することができる。各臓器での吸収効率は、DFAⅣは、DFAⅢの吸収効率より、およそ 40%高い。その 40%を DFAⅢの 1 g 摂取に単純にかけると 0.6 g/成人となる。上記のデータのように DFAⅢの閾値は明らかに 1 g 以下なので、それを考慮すると DFAⅣの効果の閾値は、0.5 g/成人とすることができると考える。



※MAL : マルトース、RAF : ラフィノース、FOS : フラクトオリゴ糖、PD : ポテトデンプン

(図4-1) 各種オリゴ糖のカルシウム吸収効率の比較

5.DFAIVの安全性評価

5-1. 研究概要

発酵による DFAIVの生成に用いる枯草菌は自然界に広く分布し食品中にも通常的に存在する微生物で、FDA（米国食品医薬品局）が GRAS（Generally Recognized as Safe）微生物と認めるグラム陽性のバクテリアである。寄生性、定着性等において問題は認められておらず、挿入される遺伝子の構造、塩基配列、性質は明らかにされており、有害な塩基配列は含まれておらず安全上問題はないと考えられるが、食品原料としての上市する形態での安全性を確認することは必要な開発要素であると考えられるため、本研究テーマでは食品原料としての DFAIVの安全性を確認することを目的として研究開発を行った。

5-2. 毒性試験の実施

5-2-1. 単回毒性試験

（1）研究目的

DFAIVの安全性評価の一環として、ラットに単回経口投与した時の毒性を検討することを目的として本試験を実施した。

（2）研究方法

【試験試料】

DFAIVは精製し結晶状態となったものを使用し、日本薬局方注射用水（大塚蒸留水）（㈱大塚製薬工場、ロット番号：3D86N、室温保存）を媒体として加え試験試料とした。

【使用動物】

5 週齢の Crl:CD(SD)(SPF)ラット、雌雄各 19 匹（発注数：雌雄各 18 匹）

【投与経路、投与量及び群構成】

本被験物質は食品であるため投与経路は経口投与とし、投与回数は 1 回、投与期間は 1 日とした。また、投与日を投与 0 日として投与後 14 日までを観察期間とした。

群構成、投与量、濃度、動物数及び動物番号を（表 5 - 1）に示す。本試験では、対照、低及び高用量の計 3 群を設定した。

（表 5 - 1）試験試料の投与量及び群構成表

群	投与量 (mg/kg)	投与液濃度 (mg/mL)	投与液量 (mL/kg)	雄		雌	
				動物数	動物番号	動物数	動物番号
対照 ^{a)}	0	0	8	5	101-005	5	151-155
低用量	3000	375	8	5	201-205	5	251-255
高用量	4000	500	8	5	301-305	5	351-355

a)：対照群には媒体を投与した。

【検査項目】

①一般状態観察

投与日から観察期間終了日まで、一般状態を観察した。

投与日（投与 0 日）は投与前に 1 回観察した。投与後 4 時間まで継続的に観察し、症状の発現及び回復した時点（死亡時も含む）で所見を記録した。投与翌日からは毎日 1 回以上、投与後 14 日間まで観察した。全例について、投与日（投与 0 日）は投与前及び投与後 4 時間まで継続して観察を行った。

なお、人道的エンドポイント（瀕死動物の判定基準及び処置）を適用した動物は発生しなかった。

②体重測定

投与日の投与前及び投与後 1、3、7、10、14 日にパーソナル電子天秤（EW-12Ki、株式会社エー・アンド・デイ）を用いて測定した。

③病理解剖学的検査（剖検）

観察期間終了時の生存例（本試験では全例）について、イソフルラン（マイラン製薬株式会社、ロット番号：M040AV4）麻酔下で放血し安楽死させた後、頭部及び胸腹部の器官・組織を観察した。

④写真撮影

剖検時に全例異常が認められなかったため、撮影は実施しなかった。

【統計処理】

観察期間中の死亡率から概略の致死量を求めた。

体重は各群で平均値及び標準偏差を算出した。有意差検定は対照群と被験物質投与各群との間で行った。

Bartlett 法により等分散性の検定を行い、等分散の場合は更に一元配置分散分析を行った。不等分散の場合は Kruskal-Wallis の H 検定を行った。有意水準は、Bartlett 法、一元配置分散分析及び Kruskal-Wallis の H 検定共に危険率 5%とした。

（3）研究結果

①一般状態観察

試験期間を通じ対照及び、被験物質投与各群の雌雄共に死亡は認められなかったが、投与後 4 時間までの一般状態観察時に、泥状便が低用量群の雌 1 例、高用量群の雄 1 例に認められ、投与後 1 日から投与後 14 日までの一般状態観察においても、投与後 1 日に泥状便が低用量群の雄 2 例、高用量群の雄 3 例及び雌 2 例に認められた。

②体重

対照群と比較して被験物質投与各群の雌雄共に有意差は認められなかった。

③病理解剖学的検査

対照及び被験物質投与各群の雌雄に異常は認められなかった。

(4) 考察

機能性甘味料 DFAIVの安全性評価の一環として、6 週齢の Crl:CD(SD)(SPF)ラット雌雄に単回経口投与したときの毒性を検討した。

その結果、被験物質を 4000 mg/kg まで投与しても死亡例は認められなかった。また、一般状態観察では、泥状便が投与後 3～4 時間で、低用量群の雌 1 例、高用量群の雄 1 例、投与後 1 日に低用量群の雄 2 例、高用量群の雄 3 例及び雌 2 例に認められた。

いずれも被験物質投与群に認められていることから、被験物質に起因するものと考えられた。体重推移では、被験物質投与各群の雌雄共に対照群とほぼ同様の推移を示し、対照群と比較して有意差は認められなかった。また、病理解剖学的検査では、対照及び被験物質投与各群の雌雄共に異常は認められなかった。なお、本試験前に 2000 mg/kg の投与による単回毒性試験を実施したが、その際は一般状態観察において泥状便は確認されていない。

以上の結果より、本試験条件下で機能性甘味料 DFAIVをラットに単回経口投与した際の影響は、一過性の泥状便排泄はみられたものの体重推移や解剖所見に影響することなく、概略の致死量は 4000 mg/kg を超える量であると推察された。

5-2-2. 変異原性試験

(1) 研究目的

DFAIVの安全性評価の一環として、細菌に対する突然変異誘発能の有無を検索することを目的として本試験を実施した。

(2) 研究方法

【試験試料】

最も多く使用することが想定される食品用の DFAIV含有率 40%の規格について安全性を確認するため、精製した DFAIVに注射用水を加え 40%濃度になるように調製して使用した。

【使用菌株】

変異原性物質に対する感受性が高く、細菌を用いる変異原性試験に最も一般的に使用されている菌株である以下の 5 種類の菌株を用いた。

塩基対置換型

Salmonella typhimurium TA100、TA1535

Escherichia coli WP2 *uvrA*

フレームシフト型

Salmonella typhimurium TA98、TA1537

【菌株の保存】

菌懸濁液 0.8 mL に対して、DMSO（紫外吸収スペクトル用）0.07 mL の割合で加え、0.3mL ずつ分注した後-85~-80℃にて凍結保存した。

【特性検査】

特性検査として、生菌数、アミノ酸要求性、紫外線感受性、膜変異 *rfa* 特性、薬剤耐性因子 R-factor プラスミドの有無、陽性対照試験(用量反応性)を確認し、良好なものをテスト菌株として使用した。

【対照物質】

①陰性対照

被験物質の調製に用いた注射用水を使用した。

②陽性対照

「医薬品の遺伝毒性試験及び解釈に関するガイダンスについて」に準じて（表 5-2）に示すように選定した。

（表 5-2）陽性対照

菌株	代謝活性化を必要としないもの (μg/プレート)	代謝活性化を必要とするもの (μg/プレート)
TA100	AF-2 (0.01)	B[a]P (5.0)
TA1535	NaN ₃ (0.5)	2AA (2.0)
WP2 <i>uvrA</i>	AF-2 (0.01)	2AA (10.0)
TA98	AF-2 (0.1)	B[a]P (5.0)
TA1537	ICR-191 (1.0)	B[a]P (5.0)
AF-2	2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (和光純薬工業株式会社 ; JIS 規格 試薬特級 純度 95%以上, Lot No. STQ3987)	
NaN ₃	Sodium azide (和光純薬工業株式会社 ; JIS 規格 試薬特級 純度 95%以上, Lot No. ALL2016)	
ICR-191	2-Methoxy-6-chloro-9-[3-(2-chloroethyl)aminopropylamino]acridine·2HCl (Polysciences, Inc. ; Lot No. 534652)	
2AA	2-Aminoanthracene (和光純薬工業株式会社 ; JIS 規格 試薬特級 純度 95%以上, Lot No. ALP5557)	
B[a]P	Benzo[a]pyrene (Sigma-Aldrich Co. ; 純度 95%以上(HPLC), Lot No. 090M1401V)	

【溶媒】

AF-2、ICR-191、2AA、B[a]P は、DMSO（和光純薬工業株式会社、Lot No. WEQ0191、WEF4000）を溶媒として溶解した。NaN₃ は、注射用水（光製薬株式会社、Lot No. C1ZSS0）を溶媒として溶解した。なお、調製溶液は分注した後-35~-25℃で凍結保存し、使用時に解凍して使用した。

【試験材料】

① S9 mix

i) S9

名称	S9
製造元	オリエンタル酵母工業株式会社
ロット番号	13012511
製造日	2013 年 1 月 25 日
種・系統	ラット・SD 系
性	雄
週齢	7 週齢
体重	209.3±9.7 g
誘導物質	フェノバルビタール(PB)及び 5,6-ベンゾフラボン(BF)
投与方法	腹腔内投与
投与期間及び投与量 (mg/kg 体重)	PB 4 日間 30+60+60+60 mg/kg BF 1 日間 80 mg/kg
保存方法	冷凍保存 (-80℃以下)

ii) Cofactor

名称	Cofactor- I
製造元	オリエンタル酵母工業株式会社
ロット番号	999202
保存方法	冷蔵保存 (4℃以下)

iii) S9 mix の組成 (1 mL 中)

水	0.9 mL
S9	0.1 mL
MgCl ₂	8.0 µ mol
KCl	33.0 µ mol
グルコース-6-リン酸	5.0 µ mol
NADPH	4.0 µ mol
NADH	4.0 µ mol
ナトリウム-リン酸緩衝液(pH7.4)	100.0 µ mol

② トップアガー

使用寒天

名称	BACTO-AGAR
製造元	DIFCO LABORATORIES
ロット番号	1192052

③最少グルコース寒天平板培地

名称	テスメディア A N 培地
製造元	オリエンタル酵母工業株式会社
ロット番号	ANI730LB
使用寒天	
名称	伊那寒天 BA-30A
製造元	伊那食品工業株式会社
ロット番号	20322
保存方法	室温保存

【溶媒】

名称	注射用水(日本薬局方)
製造元	光製薬株式会社
ロット番号	C1ZSS0

【被験液の調製】

秤量した被験物質に所定量の溶媒を加え充分攪拌し溶解させ、最高用量用被験液を調製した。低用量の被験液は、最高用量用被験液から段階希釈し、所定の濃度に調製した。
なお、本試験に使用する DFAIV は純度 40% のため、秤量重量に 0.40 を乗じた換算重量で試験を実施した。また、本被験液は紫外線吸収膜付蛍光ランプ下で使用時に調製した。
各試験の最高用量用被験液の調製に使用した被験物質質量及び溶媒量を以下に示す。

用量設定試験 [最高調製濃度 : 50 mg/mL]

被験物質質量	: 576.3 mg(0.5 mL) × 0.40 = 230.520 mg
溶媒(注射用水)量	: 4.610 mL - 0.5 mL = 4.110 mL

本試験 [最高調製濃度 : 50 mg/mL]

被験物質質量	: 583.5 mg(0.5 mL) × 0.40 = 233.400 mg
溶媒(注射用水)量	: 4.668 mL - 0.5 mL = 4.168 mL

【前培養条件】

①ニュートリエントブロス

名称	Nutrient Broth No.2
製造元	OXOID LIMITED
ロット番号	941971

②振盪培養装置

型式	COOL BATH SHAKER ML-10F
製造元	タイテック株式会社

③前培養方法

ニュートリエントブロス 10 mL の入った L 字管 (容量 35 mL) に、*S.typhimurium* TA 株については 20 μ L、*E.coli* 株については 5 μ L 接種し、前培養開始まで 4℃ 水浴中で放置した。37℃ で 8 時間往復振盪培養 (100 回/分) した後吸光度を測定し、生育曲線より菌数を算出した。なお、前培養後の菌液は試験開始まで室温にて放置した。

【前培養終了時の生菌数】

テスト菌株の生菌数は、前培養終了時に測定した O.D. 値より換算した。

	用量設定試験	本試験
<i>S.typhimurium</i> TA100	3.34×10^9 /mL	3.46×10^9 /mL
<i>S.typhimurium</i> TA1535	3.85×10^9 /mL	4.53×10^9 /mL
<i>E.coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	5.80×10^9 /mL	5.91×10^9 /mL
<i>S.typhimurium</i> TA98	3.70×10^9 /mL	3.99×10^9 /mL
<i>S.typhimurium</i> TA1537	2.91×10^9 /mL	2.81×10^9 /mL

【被験物質用量の設定】

本試験における用量段階を設定するために、7 用量（1.2、4.9、20、78、313、1250、5000 μ g/プレート）の用量設定試験を実施した。

その結果、本被験物質による生育阻害は、代謝活性化の有無にかかわらずいずれの菌株においても認められなかった。また、プレート上における被験物質の沈澱も代謝活性化の有無にかかわらず認められなかった。

このため、本試験における被験物質用量は、代謝活性化の有無にかかわらずいずれの菌株についても 5000 μ g/プレートを最高用量として以下公比 2 で 4 段階希釈した計 5 用量とした。

【操作方法（プレインキュベーション法）】

被験液 0.1 mL に、代謝活性化しない場合には 0.1 M ナトリウム-リン酸緩衝液（pH 7.4）0.5 mL、代謝活性化する場合においては S9 mix 0.5 mL を加え、さらに各菌液 0.1 mL を加えた。37℃で 20 分間振盪しながらプレインキュベーションし、これにトップアガーを 2.0 mL 加えた後に最少グルコース寒天平板培地に重層した。また、無菌試験として調製した被験液の最高用量 0.1 mL 及び調製した S9 mix 0.5 mL をそれぞれ試験管に取り、これに トップアガーを 2.0 mL 加えた後に最少グルコース寒天平板培地に重層した。なお、これら一連の操作は紫外線吸収膜付蛍光灯下で実施した。

37℃で 48 時間培養した後、出現した復帰変異コロニー数を計数し、テスト菌株の生育阻害の有無も実体顕微鏡を用いて観察した。

トップアガーは、*S.typhimurium* TA 株を用いる場合には 0.5 mM ビオチン-0.5 mM ヒスチジン溶液を 1/10 容、*E.coli* 株を用いる場合には 0.5 mM トリプトファン溶液を同割合で軟寒天液（0.6% Agar, 0.5% NaCl）に加えたものを用いた。また、最少グルコース寒天平板培地は各用量につき 2 枚設けた。

【測定方法】

復帰変異コロニー数の計測は、自動コロニーカウンターを用いて行った。

①測定機器

型式	自動コロニーカウンター CA-11
製造元	システム・サイエンス株式会社

②補正方法

数え落とし補正

③補正係数	1 ～ 100 コロニー	: 1.11 倍
	101 ～ 400 コロニー	: 1.16 倍
	401 ～ コロニー	: 1.25 倍

【判定基準】

結果の判定は、用量設定試験、本試験の結果より原則として被験物質処理群の復帰変異コロニー数が、自然復帰変異コロニー数に対して顕著な増加が認められ（陰性対照の 2 倍を目安とする）、用量反応性及び再現性が認められた場合に陽性と判定した。なお、判定においては特に統計学的処理は行わなかった。

（3）研究結果

用量設定試験、本試験ともに代謝活性化の有無にかかわらず、塩基対置換型、フレームシフト型のいずれの菌株においても、本被験物質処理による復帰変異コロニー数は、いずれの用量においても陰性対照と比較して 2 倍以上には増加せず、用量反応性も認められなかった。

一方、陽性対照はそれぞれの菌株に対して陰性対照の 2 倍以上の復帰変異コロニーを出現させ、試験が適切に実施されたことを示した。

（4）考察

試験結果から、本被験物質の変異原性は陰性と判定した。

なお、本被験物質の菌に対する生育阻害は認められず、プレート上における被験物質の沈澱も代謝活性化の有無にかかわらず認められなかった。

また、被験液及び S9 mix についての無菌試験を行った結果、菌の生育は認められなかった。以上の結果より、本試験条件下において DFAIV は、突然変異誘発能を有しないと判断した。

5-3. リスク要因の検証

（1）研究目的

DFAIV 過剰摂取によってミネラルの過剰吸収が起こる可能性は、日常の食事に含まれているミネラル分を 100% 吸収したとしても耐容上限量を超えることは無いと考えられるが、過剰摂取による影響についても考慮する必要がある。また、DFAIV は難消化性オリゴ糖であるため、過剰に摂取した場合の影響についても考慮する必要があると考えられる。

そのため、DFAIV を摂取することによるメリットだけではなくリスクに関しても検討し、運用法に活用することができるよう情報を収集するとともに、課題抽出を行うために本研究項目を実施した。

（2）研究方法

想定される用量の範囲で、ミネラル吸収促進作用がもたらすリスクを文献検索などによって想定し、平成 24 年度に得られた情報をもとに DFAIV の適切な運用方法に関する検討を行った。平成 24 年度に実施した単回毒性試験では、DFAIV の 2000mg/kg 摂取では、一般状態観察での異常は確認されなかったが、本年度に実施した摂取量設定を増やした単回毒性試験では、3000mg/kg 群および 4000mg/kg 摂取群のいずれも一過性の泥状便排泄がみ

られたことから、DFAIVを販売する際には難消化性オリゴ糖として一度に多量に摂取した場合、おなかを壊すことがあるなどの注意喚起の表示が必要であると考えられた。

そのため、本事業で得られたデータをもとに、管理栄養士や医師と十分に意見交換を行い、DFAIV摂取に想定されるリスクの抽出と、安全な運用に対する課題解消のための今後の検証試験へのアドバイスなどを受けるとともに、DFAIVを事業化する際の摂取上の注意文に関する検討も行った。

(3) 研究結果

これまでに得られた DFAIVの機能性として、ミネラル吸収促進作用および整腸作用が、実際の摂取によって期待される機能性であるが、ミネラル吸収促進作用はミネラル制限が必要な病態に対して禁忌であると考えられるし、糖であることから糖尿病などの等の摂取に注意が必要な疾患にも注意が必要と考えられる。また、難消化性であることから、過剰な摂取によってお腹がゆるくなる可能性に関しても注意喚起すべきと考えられた。一般的な難消化性オリゴ糖は、オリゴ糖の種類や摂取する人の個人差などがあるものの、一度に 1~15g 以上摂取すると一過性でお腹がゆるくなることが知られている。

DFAIVは、2000mg/kg の摂取までは泥状排便が確認されなかったことから、最大無作用量を現状では 0.3g/kg 程度と設定した。以上のことから、DFAIVの機能性食品原料としての製品規格書内に記載する注意喚起文を、下記のように設定した。

DFAIVは「ミネラルの吸収を促進する機能を有する甘味料（糖）」です。
従って、本製品および本製品を含有する食品の摂取には、「ミネラル」や「糖」の摂取に注意が必要な疾患をお持ちの方には、主治医にご相談の上、摂取するように注意喚起が必要です。特に慢性腎不全等により「カリウムの制限」が必要な方や、糖尿病等により血糖値のコントロールが必要な方は、DFAIVのメリットよりも疾患へのデメリットが上回る恐れがありますので、十分に注意が必要です。
また DFAIVは難消化性ですから、一度に多量摂取すると一過性ですがお腹がゆるくなる場合がございます。DFAIVの最大無作用量は 0.3 g /kg です。

(4) 考察

DFAIV摂取によるメリットおよび、想定されるリスクを検討した結果、現状では慢性腎疾患や糖尿病などの場合にはメリットよりも疾患によるデメリットが上回る恐れがあるため、これらを考慮した注意喚起文を製品規格書用に作成した。また、難消化性オリゴ糖であることを考慮し、2 度の単回毒性試験から得られた情報をもとに、安全率を考慮した最大無作用量を 0.3 g /kg と設定したが、閾値と同様に事業終了後も検証試験を続けることで、より安全で適切な活用ができるようにしたいと考える。

5-4. 研究成果

毒性試験については単回毒性試験の結果から、4000 mg/kgまでの安全性を確認することができ、また、変異原性試験の結果についても、突然変異誘発能を有しないと判断できたことから、DFAIVの食品原料としての安全性は極めて高いものと考えられた。

5-5. 考察

摂取量の設定を増やした単回毒性試験の実施によって、DFAIVが機能性甘味料として既存の甘味料と同様に安全に使用することができることが明らかとなったが、同時に難消化性オリゴ糖としての整腸作用が示唆されたため、過剰摂取による注意喚起が必要であることも想定されたことから、製品規格設計の際にこれらの情報を記載する事とした。

6. DFAIVの機能性評価

6-1. 研究概要

本事業によって得られる DFAIVの機能性は『ミネラル吸収促進作用』であり、高齢化や胃切除等の要因によって生じる鉄分不足の改善作用などが動物試験によって確認されている。しかし、実際にヒトが摂取した際に同様の結果が得られるかはまだ検証できておらず、機能性甘味料として事業化するためには確認が必要な開発要素となっている。また、評価系としてはこれまで貧血モデルマウス等を用いてきたが、微量ミネラルの動きなどの詳細データが充実していなかった。そこで本研究テーマでは、細胞を用いた評価や臨床試験による評価によって、DFAIVの有効性を明らかにすることを目的として研究開発を行った。

6-2. 急性相タンパクの動態確認による機能性評価

(1) 研究目的

DFAIVのミネラル吸収促進作用を評価するために、急性相タンパクの動態確認によって評価ができるのではとの着想により、新たな評価法を確立することを目的として研究開発を実施した。

(2) 研究方法

【免疫電気泳動法に依る血液 Tf の定量】

免疫電気泳動は、例えば被験貧血患者血清を試料として、泳動槽に水平に置いた寒天板を支持体に、pH8.6 の緩衝液で直流電流を通電する事で行った。まず、支持体のプレートに小円孔をあけて 1~2μ l 程度の血清を満たし電気泳動を開始し、開始から 1 時間程度で泳動を終了させてプレートを取り出し水平に湿室に置いた。

原点の横 0.5~1.0cm のところに、幅 1mm 程度の溝を泳動方向に沿ってスリット状につくり、ここに 100μ l 程度の抗血清を満たす。抗原と抗体の拡散が始まり、両者が出合った境界に沈降線が形成される。沈降線は不溶性のため、それ以外の可溶性のタンパクを洗条し、固定化された沈降線を乾燥して、クマジー・ブリリアント・ブルーで染色した。

免疫電気泳動法は、本来沈降線の出来方による抗原性の異同を調べる定性反応法であるが、例えば沈降線の長さは量化のパラメータになり得るので、後述のロケット泳動法に応用される。

【ロケット免疫泳動法】

抗血清を含ませた泳動支持体の中で被験血清を泳動することにより、多数試料の同時分析を迅速に行うことが可能であり、定量性にも勝っている。8×11cm 程度のガラス板に、pH8.6 ベロナール緩衝液で 1%アガロースゲルプレートを作る直前に、液温が 60℃を切ったら 1%程度の抗血清を混合して抗体寒天版を作り、これに 1 列に直径 2.5mm の孔を並べて穿ち、各々の孔に濃度飽和被験血清（2～3μ l）漸次入れた。

その後、200V 定電圧で電気泳動を始めると、試料は抗体と反応してロケット状の沈降物を作りながら陽極の方へ動き始める、抗原抗体複合体が最適比になると沈降物は動かなくなり、ロケットの長さが濃度のパラメータになるため、そこで通電を止め mm 単位で表した数で記録した。

（3）研究結果

血液中の鉄分（血清鉄）は、Tf タンパクと結合して血液中を運ばれるから、Tf と結合していない鉄結合予備能（不飽和鉄結合能：UIBC）を測り、両者の比である Tf 飽和率を求めた。不飽和鉄結合能比が有意に高い血清資料は、即ち、DFAIV 摂取に伴い増量したであろう血中遊離鉄を取り込む Tf の推定値と考えられる。そこで、軽度の鉄欠乏性貧血の人の中から任意に選んだ成人女性 20 名を対象に採血し、血清を分離して、抗 Tf Apo Tf 抗血清ロケット免疫泳動および、抗 Tf 抗血清ロケット免疫泳動を行い、ロケット長の比較を行った。

その結果、いずれの被験者も抗 Tf 抗血清ロケット長に対して、抗 Tf Apo Tf 抗血清ロケット長の方が長かった。これは抗 Tf 抗血清ロケット長が鉄と結合している Tf だけを表しているのに対し、抗 Tf Apo Tf 抗血清ロケット長は鉄と結合していない Tf も含めた Tf を表しているためである。

つまり、ミネラル吸収促進作用を有する DFAIV を摂取した場合、増加すると考えられる血中鉄を取り込むことで、抗 Tf 抗血清ロケット長は抗 Tf Apo Tf 抗血清ロケット長との差が少なくなっていくと考えられる。よって、この比率を比較する事によってミネラル吸収促進作用の有無や強弱を評価する事が可能である。

（4）考察

急性相タンパクの動態確認によって、ミネラル吸収促進作用の有無や強弱について、多量のサンプルを一度に処理する事が可能な評価系を確立した。機能性評価の簡便化につながるもので、今後の事業化に向けたエビデンスの充実に役立つ評価技術の開発ができたと考える。

6-3. ミネラル不足に対する改善作用の検証

（1）研究目的

動物試験においても吸収率の向上が確認されているカルシウムを、評価対象のミネラルとして短期間で評価が可能な試験を設計し、これまでに臨床データが得られていなかった DFAIV に関するヒトの摂取によるミネラル吸収促進作用の機能性評価を実施することを目的として、研究開発を行った。

(2) 研究方法

【試験食品】

被験食品として DFAIV を、対照食品として砂糖（商品名：すずらん印グラニュー糖、日本甜菜製糖(株)製）を使用した。DFAIV と砂糖は見た目で見分けがつかないように、（表 6 - 1）に示すように蒸留水（(株)大塚製薬工場）を加えて調製後、被験者に配布した。

（表 6 - 1）試験食品の組成

	被験食品	対照食品
原材料	機能性甘味料 DFAIV	砂糖
容 量	3g	3g
摂取量	200mL の水溶液とした	200mL の水溶液とした
性 状	無色透明	無色透明

負荷するカルシウム剤は Ca を 38% 含有するホタテ粉末カルシウム（商品名：ホタテ末カルシウム、(株)エヌ・シー・コーポレーション製）を 1 包 800 mg（Ca として 300 mg）に個包装して用いた。

また、試験中の朝食には焼きおにぎり（50g×2 個、ニチレイ(株)）を、昼食にはたらかスパゲティー（186g、日清食品(株)）を、被験者全員に提供した。

【被験者条件】

説明同意文書により本試験の内容を説明し、参加に同意した者で事前検査（理学的検査、医師の問診、血液検査、食物摂取頻度調査等）を行い、次項の選抜基準に該当し、除外基準に該当しない成人男性 10 名を被験者とした。

<抜粋基準>

- ① 満 20 歳以上満 50 歳未満（スクリーニング同意取得時）の日本人男性
- ② 規則正しい食事をしている者
- ③ 試験予定日に通院可能な者
- ④ 本試験参加を自分の意志で同意し、同意書を提出した者

※設定根拠：

- ① 本試験の成績として性差は想定していないが、性周期の無い男性で確認する事とした。
- ②～④ 臨床検査の一般的配慮および倫理的配慮より設定した。

<除外基準>

- ① 重篤な既往歴がある者
- ② 消化管手術歴（盲腸切除を除く）がある者
- ③ スクリーニング検査時の値に大きな逸脱値を示した者
- ④ 治療やカルシウム吸収に影響を及ぼす健康食品等を常用している者（スクリーニング日から試験終了まで利用を中断出来ない者）

- ⑤深夜及び不規則時間帯でのシフト勤務者
 - ⑥日常的にアルコールや喫煙に依存している者
 - ⑦摂取開始前 12 週間以内に 400 mL 献血か、4 週間以内に 200 mL 献血または 2 週間以内に成分献血（血漿成分献血及び血小板成分献血）を行った者
 - ⑧試験責任医師より本試験参加が適切でないと判断された者
- ※設定根拠：いずれも被験者の安全性確保のため設定した。

【被験者の同意】

本試験に先立って志願者に対し下記の説明等を行い、試験参加の同意を文書で得た。

- ①この試験の目的
- ②試験が研究を伴うこと
- ③この試験に関する連絡先
- ④試験の方法
- ⑤スクリーニング検査、前観察期間で除外された場合でも異存のないこと
- ⑥予想される副作用等について
- ⑦試験への参加予定期間
- ⑧試験に参加する予定の被験者数
- ⑨試験への不参加あるいは参加を取りやめる場合であっても不利益は受けないこと
- ⑩プライバシーについて、その秘密は保全されること
- ⑪健康被害が発生した場合について
- ⑫試験協力費
- ⑬お願い事項
- ⑭その他

【被験者の選抜方法】

被験者候補は検査前日の夕食を 21 時までに摂取し、その後は絶飲食（少量の水のみ摂取可）とした。検査当日は試験実施施設に来院し、医師診察、理学的検査、血液検査および尿検査を実施し、その結果が「被験者条件」に挙げた条件に適合し、かつ試験責任医師が適格であると認めた者 10 名を選抜した。

【試験スケジュール】

試験スケジュールを（図 6 - 1）に示す。被験者選抜より 3 週間の期間をおき、試験を開始した。試験デザインは、シングルブラインド 2 群 2 期クロスオーバーテストとした。

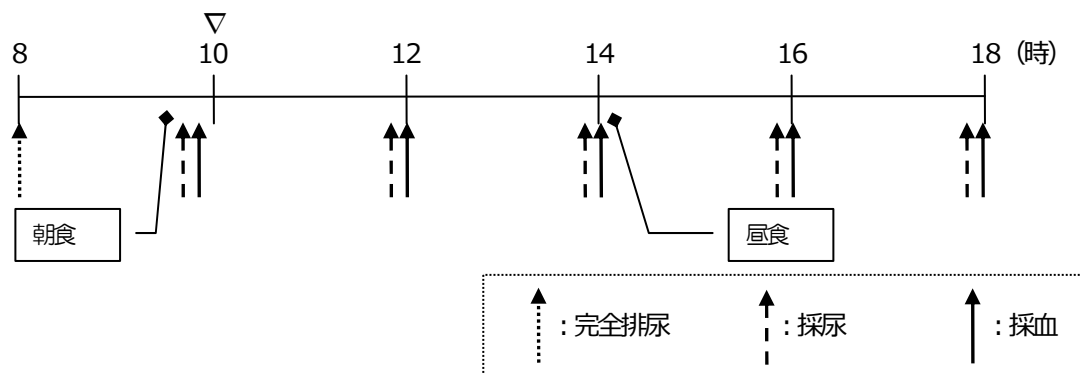
被験者は検査前日の夕食を 21 時までに済ませ、その後は水のみ可として絶食とした。翌朝 8 時より 17 時まで毎時 200mL の蒸留水を摂取させた。8 時に完全排尿し、その後 18 時迄 2 時間置きに尿を全量回収した。10 時少し前に 5 分以内で朝食を摂取し、10 時を目処に試験食品のいずれかとカルシウム剤を同時に摂取させた。カルシウム剤の摂取直前から 2 時間置きに 5 回採血を行った。また、昼食は試験食品摂取 4 時間後の採血を済ませた後に 20 分以内で摂取させた。

※試験食品摂取スケジュール

		試験食品 非摂取期間 (3週間)	第Ⅰ期	休止期 (1週間)	第Ⅱ期
A群	スクリーニング		被験食品		対照食品
B群			対照食品		被験食品

※1期あたりのスケジュール

試験食品摂取 (単回クロス)



(図6-1) 試験スケジュール

【検査項目】

スクリーニング時検査

- ①医師診察
問診・聴打診
- ②理学的検査 (計測検査)
身長、体重、体脂肪率、体温、血圧及び脈拍
- ③血液学的検査 (1回 2 mL)
WBC、RBC、Hb、Ht、Plt
- ④血液生化学的検査 (1回 11 mL)
TP、Alb、T-Bil、AST、ALT、ALP、LDH、 γ -GTP、T-Cho、
LDL-Cho、HDL-Cho、TG、BUN、UA、CRE、BS、Na、K、
Ca、Cl、Fe、IP、Mg
- ⑤尿検査 (1回約 8 mL)
蛋白、糖、ウロビリノーゲン、ビリルビン、ケトン体、潜血、
比重、pH

本試験時検査

- | |
|---|
| <ul style="list-style-type: none">①医師診察
問診・聴打診②血液生化学的検査（1期あたり5回、2期合計50 mL）
Na、K、Ca、Cl、Fe、IP、Mg③尿検査（2期とも10時から18時までの全量採取）
2時間置きの尿量、Ca、Crn、Mg、IP、DPD |
|---|

【被験者管理上の遵守事項並びに摂取を制限又は禁止する食品及び薬剤】

- ①試験実務中は提供する食品以外は摂取しない事とした。
- ②試験の参加中は健康管理に注意し、暴飲暴食を避け、激しい運動・肉体労働等も避けることとし、試験期間中の食事および運動量は、試験期間前と可能な限り一定に維持させた。
- ③試験期間中は、これまでの生活状況を大きく変化させないこととした。なお、病気等により治療の必要がある場合には、試験受託担当者に連絡し、その指示に従うものとした。
- ④試験期間中は、鉄吸収促進作用を標榜する医薬品及び食品類は利用しないこととした。
- ⑤試験のスケジュールを確認し、来院日を厳守する事とした。
- ⑥来院前日は脂質の多い食事を控え、飲酒を禁止する事とした。
- ⑦来院前日の夕食は21時までに済ませ、来院日は絶飲食で来院する事とした（水のみ可）。
- ⑧来院中は、試験責任医師、看護師及び試験受託担当者等の指示に従う事とした。
- ⑨本試験で用いる資料や試験食品を第三者に渡したり見せたりしない事とした。

【評価方法及び統計処理】

試験食品毎に本試験検査時のデータについて平均値及び標準偏差を求め、対応する時間毎並びにAUCで対応のあるt検定で解析を行う事とした。危険率5%未満を有意水準とした。また、以下に該当する場合は解析対象から除外する事とした。

- ①被験者として不適切であることが判明した場合
- ②試験食品と無関係な理由で途中脱落した場合

【試験の中止・脱落基準、追跡調査及び被験者の除外基準】

①試験の中止・脱落と追跡調査

被験者の都合により試験受託者に試験中止の申し出があった時は、以後の試験を中止し脱落者として扱う事とした。被験者の健康状態に異常が認められた場合は、被験者本人又はその家族が直ちに試験受託者に連絡し、試験責任医師が継続又は中止を判断する事とした。また、試験を中止する場合は、被験者を第一に考えた処置を施し、健康状態について追跡調査を行う事とした。複数の被験者が同様の症状を訴えた場合は、試験責任医師の判断により直ちに試験を中止し、必要な処置を施す事とした。

②試験開始後における被験者の除外

被験者条件の除外基準に該当した者は、判明した時点で試験から除外する事とした。

③試験の中止・脱落及び除外時の処置

被験者の中止・脱落及び除外が生じた場合は、原則として追加補充は行わないこととした。また、被験者脱落により補充の必要がある場合、試験実施期間を延長することができるものとした。

【倫理】

①被験者の人権及び安全性・不利益に対する配慮

本試験は「ヘルシンキ宣言」及びその他関係法規等の精神に則り、十分な配慮の下に実施した。試験実施に関わる生データ類及び同意書等を取り扱う際は、被験者の秘密保護に十分配慮した。試験の結果を公表する際は、被験者を特定できる情報を含まないようにした。また、試験の目的以外に、試験で得られた被験者のデータを使用しないものとした。重篤な有害事象が発生した場合には、速やかに適切な診察と処置を行事とした。

②健康被害の補償及び保険への加入

被験食品摂取に由来する健康被害が発生した場合は、賠償責任保険等で補償する事とした。

(3) 研究結果

①被験者の脱落について

本試験では中止や脱落の事例は発生しなかった。

②被験者の背景

【被験者の身体特性】

被験者の身体特性は（表6-2）に示す通りであり、全ての項目においてA群とB群の間に有意差は認められなかった。よって、被験者の割付は妥当であった。

（表6-2）被験者の身体特性

	A群 (n=5)	B群 (n=5)	全体 (n=10)
性別 (男/女)	5 / 0	5 / 0	10 / 0
年齢 (歳)	43.2±10.1	38.4±15.6	40.8±12.7
身長 (cm)	169.2±2.7	172.5±5.9	170.9±4.7
体重 (kg)	61.1±7.1	63.9±5.7	62.5±6.2
体脂肪率 (%)	20.2±2.6	18.9±4.1	19.6±3.3
BMI (kg/m ²)	21.3±2.2	21.6±2.2	21.4±2.1
収縮期血圧 (mmHg)	110.9±13.1	115.0±7.9	113.0±10.4
拡張期血圧 (mmHg)	68.4±8.2	67.8±10.2	68.1±8.7
脈拍数 (回/m)	70.2±6.7	73.8±13.9	72.0±10.5
体温 (°C)	36.4±0.1	36.3±0.2	36.3±0.2

【被験者の血液データおよび尿データ】

被験者の血液データおよび尿データは、全ての項目において A 群と B 群の間に有意差は認められなかった。

よって、身体特性同様、被験者の割付は妥当であった。

③DFAIVカルシウム負荷試験

i) 血清クレアチニン

DFAIVおよびカルシウム摂取後の血清クレアチニンの推移は、被験食品摂取者と対照食品摂取者の間に差異を認めなかった。

ii) 血清 Na

DFAIVおよびカルシウム摂取後の血清 Na の推移は、被験食品摂取者と対照食品摂取者の間に差異を認めなかった。

iii) 血清 Cl

DFAIVおよびカルシウム摂取後の血清 Cl の推移は、被験食品摂取者と対照食品摂取者の間に差異を認めなかった。

iv) 血清 K

DFAIVおよびカルシウム摂取後の血清 K の推移は、被験食品摂取者と対照食品摂取者の間に差異を認めなかった。

v) 血清 Ca

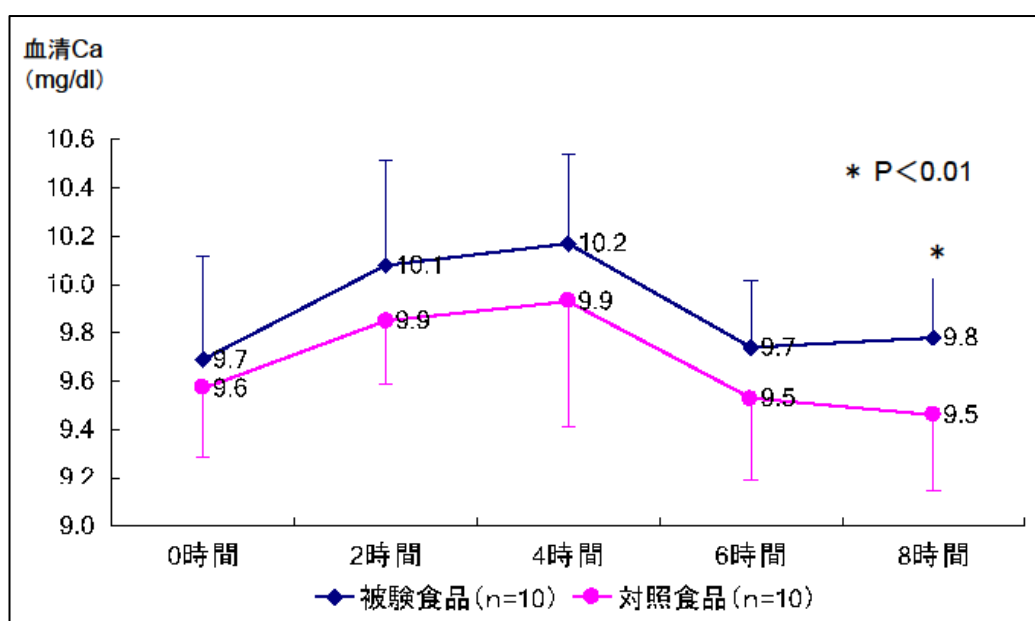
DFAIVおよびカルシウム摂取後の血清 Ca の推移は（表 6-3）及び（図 6-2）に示す通りであり、DFAIVおよびカルシウム摂取 8 時間後の血清 Ca において被験食品摂取者と対照食品摂取者の間に有意差を認めた（ $P<0.01$ ）。

vi) 血清 P

DFAIVおよびカルシウム摂取後の血清 P の推移は、被験食品摂取者と対照食品摂取者の間に差異を認めなかった。

(表6-3) 被験食品および対照食品摂取後の血清 Ca の推移

	被験食品 (n=10)	対照食品 (n=10)	P 値
0時間 血清Ca (mg/dl)	9.69±0.43	9.57±0.29	n.s.
2時間 血清Ca (mg/dl)	10.08±0.43	9.85±0.26	0.071
4時間 血清Ca (mg/dl)	10.17±0.37	9.93±0.52	n.s.
6時間 血清Ca (mg/dl)	9.74±0.28	9.53±0.34	n.s.
8時間 血清Ca (mg/dl)	9.78±0.24	9.48±0.31	<0.01



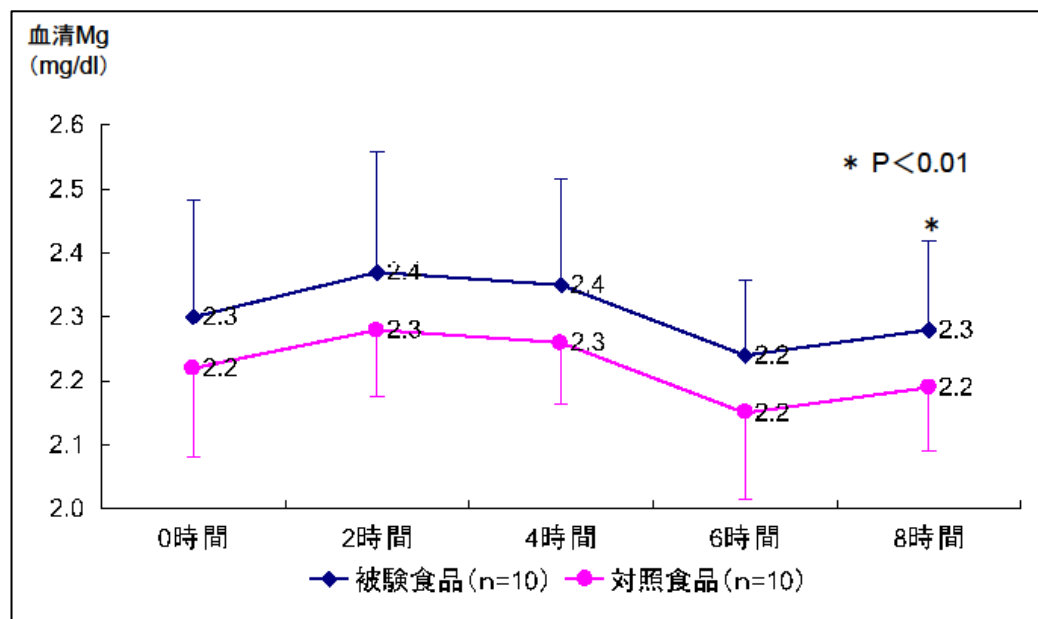
(図6-2) 被験食品および対照食品摂取後の血清 Ca の推移

vii) 血清 Mg

DFAIVおよびカルシウム摂取後の血清 Mg の推移は (表6-4) 及び (図6-3) に示す通りであり、DFAIVおよびカルシウム摂取 8 時間後の血清 Mg において被験食品摂取者と対照食品摂取者の間に有意差を認めた (P<0.05)。

(表6-4) 被験食品および対照食品摂取後の血清 Mg の推移

	被験食品 (n=10)	対照食品 (n=10)	P 値
0時間 血清Mg (mg/dl)	2.30±0.18	2.22±0.14	n.s.
2時間 血清Mg (mg/dl)	2.37±0.19	2.28±0.10	n.s.
4時間 血清Mg (mg/dl)	2.35±0.16	2.26±0.10	n.s.
6時間 血清Mg (mg/dl)	2.24±0.12	2.15±0.14	0.068
8時間 血清Mg (mg/dl)	2.28±0.14	2.19±0.10	<0.05



(図6-3) 被験食品および対照食品摂取後の血清 Mg の推移

viii) 血清鉄

DFAIVおよびカルシウム摂取後の血清鉄の推移は、被験食品摂取者と対照食品摂取者の間に差異を認めなかった。

ix) 尿中クレアチニン

DFAIVおよびカルシウム摂取後の尿中クレアチニンの推移は、被験食品摂取者と対照食品摂取者の間に差異を認めなかった。

x) 尿中 Ca

DFAIVおよびカルシウム摂取後の尿中 Ca の推移は、被験食品摂取者と対照食品摂取者の間に差異を認めなかった。

xi) 尿中 P

DFAIVおよびカルシウム摂取後の尿中 P の推移は、被験食品摂取者と対照食品摂取者の間に差異を認めなかった。

xii) 尿中 Mg

DFAIVおよびカルシウム摂取後の尿中 Mg の推移は、被験食品摂取者と対照食品摂取者の間に差異を認めなかった。

(4) 考察

被験食品摂取群と対照食品摂取群の間に摂取 8 時間後において、血清 Ca および血清 Mg 値に有意差が認められた。このことより、DFAIVのカルシウム吸収促進の可能性が示唆された。本試験では、DFAIVおよびカルシウム摂取後の 8 時間までの血清と尿の採取を行い、その推移を追跡する事によって DFAIVのミネラル吸収促進作用を評価する事を試みたが、今回、単回摂取での有効性が示唆されたことから、機能性甘味料としての実用化に向けて貴重なデータを得ることができた。

今後、8 時間以降の血清、尿中のカルシウム、マグネシウムの推移を確認することで、DFAIVがどのように作用しているのかを明らかにすることも可能であると考えられ、また継続的に摂取することによって慢性的なミネラル不足の改善につながる可能性も期待できるため、DFAIVの事業化および市場獲得のためのエビデンスの充実を図りたいと考える。

6-4. 研究成果

本研究テーマでは、DFAIVの機能性について尿中 Ca の排泄量を評価する事によって、Ca の吸収促進作用を確認する事が出来た。また、急性相タンパクの動態確認によって、ミネラル吸収促進作用を、より詳細に評価するための評価系についても確立する事が出来たことから、今後の DFAIVの事業化に向けたさらなるエビデンスの充実を図ることができると考えられ、事業化に向けて大きく前進することができた。

6-5. 考察

本研究テーマでは、DFAIVを摂取することによってミネラル不足の症状を持つ被験者に対して、改善作用があることを臨床試験によって検証することを目的としていた。これまで動物での試験では、難消化性オリゴ糖の中でも最もミネラル吸収促進作用が高いと考えられていた DFAIVでの臨床試験データがなかったことから、本研究は DFAIVの新たなエビデンスを得られるものと期待していたが、期待通り臨床試験においても摂取したカルシウム製剤の吸収促進が確認された。今後の課題として、DFAIV長期摂取による慢性的なミネラル不足に対する改善作用など、本研究開発で確立した急性相タンパクの動態確認と臨床試験を組み合わせ、さらなるエビデンスの取得を進めていきたいと考える。

7. DFAIVの市場性評価と製品規格化

7-1. 研究概要

これまで事業化を前提とした DFAIVの大量生産ラインが無かったことから、事業化可能なレベルの DFAIVを川下事業者実際に提供したことは無く、DFAIVの機能性については大いに興味を持っていても、実際の活用法や試験的な使用が出来ていない状況にあった。そこで本研究テーマでは、開発した製法によって製造された DFAIVに関して、サンプル提供による外部評価の結果を反映させ、必要な製品規格項目を設定し規格確立を目的として研究開発を行った。

7-2. サンプル提供による外部評価の実施

(1) 研究目的

抽出された課題からその解決法を検討することによって、本研究の成果物の品質を市場ニーズに最適なものにすることを目的として、研究開発を実施した。

(2) 研究方法

川下事業者候補である外部企業からは、機能性食品向けに DFAIVの高含有甘味料として 80%以上含有の規格と、一般食品向けに 40%含有の最低でも 2 種の規格化が必要であるとの意見を抽出していたため、本研究開発着手時には DFAIVの含有規格が達成できていれば、不純物を完全に除去しないことも選択肢として考えていた。しかし、DFAIVの結晶化が可能な製法を確立する事が出来たため、DFAIVの結晶を試作し、これを通常の砂糖のように使用する事が可能なように、粉碎してパウダー状態に加工したものを大手食品企業に持ち込み、実際の使用感（味・色・性状）についての意見収集を行い、そこから課題を抽出して本研究にフィードバックさせた。

(3) 研究結果

結晶化した DFAIVについては、味や色、香りなど、大きな問題はなかった。また、機能性食品に使用を考えた場合に不純物は極力無い方が望ましいため、結晶自体の製品化を望む声も聞かれた。結晶化した DFAIVの価格については、6,000 円/kg～7,000 円/kgでの製品化が望ましいとの評価を得た。

(4) 考察

DFAIVの結晶について、具体的な価格の提示や規格の要望などの情報を抽出する事が出来たため、今後は事業化に向けたスケールアップ後の生産ラインでの製造コストなどを精査していき、本事業終了後の事業化に向けて準備を進めていきたいと考える。

7-3. 製品規格の確立

(1) 研究目的

本研究の成果物として予定している DFAIV含有甘味料は、DFAIVの含有率によって含有率 40%以上および、含有率 80%以上の二つの規格を設定している。一般の食品や機能性食品を製造する際の原料として採用されるためには、機能性甘味料としての製品規格を構築する

必要があるため、この製品規格についても川下事業者候補企業が現在使用している原料の仕様書や、工場の使用原料登録に必要な項目などを事前に調査し、今後構築する DFAIV 含有機能性甘味料の製品規格に反映させるために研究開発を実施した。

(2) 研究方法

川下事業者候補の原料登録に必要な項目を実際の企業訪問によって情報収集するとともに、機能性甘味料という視点で必要と考えられる項目のピックアップを実施した。また、DFAIV の結晶化が事業化レベルで可能であるとの目処が立ったため、結晶での製品規格の検討も行った。

(3) 研究結果

川下事業者候補や有識者へのヒアリングによって、必要な項目として検討していた一般生菌数・大腸菌群などの衛生規格の他、Brix や粘度、色などの物性に関する項目をに対して規格項目を設定して分析を行い、製品規格案を作成した。また、胸らる吸収促進に対するリスクに関する表記を規格書にも記載すべきとの意見もあったため、分析値以外を記載した最終的な規格書原案が完成した。

(4) 考察

規格書に記載する項目が決定し、今後は項目ごとの規格値について設定していく必要がある。そのためには製品レベルの試作が必要であり、今後予定している製造ラインのスケールアップや機能性評価等と並行して、分析を行わなければならない。安定した分析結果が得られた時点で誤差を考慮した規格値の決定まで、本研究開発テーマでは補完研究を実施していく予定である。

7-4. 研究成果

DFAIV 含有甘味料を機能性甘味料として事業化するために、事業化するための使用感などに関する課題抽出と、事業化後を見据えた食品工場などへの原料登録のために必要となる規格項目の抽出を実施し、必要な情報を十分に収集することができ、かつ、規格書のフォームまでは作成する事が出来た。

7-5. 考察

得られた情報に関しては、今後の研究時に反映させることによって、本研究終了後スムーズに製品化、上市することができるよう事業化のための動きを並行して進めて行く予定である。スケールアップの検討など、事業化に向けた諸課題に関しては継続して対応していくとともに、規格書についても準備を進め、早期の事業化に向けた対応をしていきたい。

最終章

『全体総括』

今後さらに高齢化が進むと予想される日本では、高齢者に対応した機能性食品が必要となってくることは明白であり、中でも加齢に伴うミネラル吸収力の低下などによるミネラル不足を解消することができる機能性甘味料 DFAIVの事業化は、本研究開発事業の川下事業者となる食料品、医療・健康産業からは、大いに期待されている機能性食素材の一つである。

しかし、現在の製造技術では製造コストが高いため事業化に至っていなかったが、本研究開発事業では、DFAIVの製造法について発酵時間の短縮法や DFAIVの収率の改善法等の諸条件を検討し、効率の良い DFAIV製造法を検討することによって新たな製法を確立し、ミネラル吸収促進作用を有する新規機能性甘味料として事業化することを目的として研究開発を行った。

研究開発する項目として DFAIVコストダウンのための製造法の確立と、得られる DFAIV含有機能性甘味料の用法確立のための閾値の検証、安全性、機能性の確認などを計画し、それぞれに目標値を設定し、平成 24 年度での研究成果も考慮しながら、本年度も各研究開発項目に関して継続して研究開発を実施した。

研究の結果として、まず DFAIVコストダウンのための製造法については、発酵時の通気量や攪拌速度等の条件の最適化を検討するとともに、PMSF や消泡剤 L G 109 を使用する事によって、発酵時間を従来では 96 時間要していたのに対し、およそ 60 時間にまで短縮する事が可能となり、収率に関しても安定的に 40%の収率が確保できるようになった。さらに、課題となっていた DFAIV生成時に生じる糖類の除去に関しては、昨年度検討した酵母による等の除去を改良し、再利用が可能なイオン交換樹脂を持ちた精製工程を加えて、DFAIVの結晶を得ることができるパイロットラインの構築に成功した。

結晶が得られたことによって、予定していた DFAIVの含有率 40%規格および 80%規格についても、不純物を含まない製品化が可能となったほか、いずれも結晶から調製することが可能であるため、複数種の規格在庫を持たなければならぬリスクを回避する事も出来た。

安全性についても平成 24 年度で実施した単回毒性試験の設定摂取量を増やした毒性試験を実施することで食品としての安全性を確保し、機能性に関しても DFAIVで初めてとなる臨床試験を実施し、実際にカルシウムの吸収が促進されたことを確認する事が出来た。

微量なミネラルの吸収を促進する DFAIVの評価を継続して行い、北海道食品機能性表示制度（ヘルシーDo）への申請も考慮したことから、より簡便により詳細に機能性評価が可能であると考えた、急性相タンパクの動態確認によるミネラル吸収の状態確認法についても、実際に評価が可能であると考えられる手法を確立できたことから、今後は実際の事業化に向けて川下事業者候補企業等と継続して意見交換やサンプル提供などの実施を続けるとともに、事業化に向けたパイロットラインのスケールアップなどの具体的な動きを進めていく。

今回、本研究開発を実施す事によって、高齢者に不足しがちなミネラルの吸収促進作用を持ち、且つ、難消化性オリゴ糖の中でもっともその機能性が高いと考えられる DFAIVの製造に関する課題と製品規格や安全性に関する課題を解決し、臨床試験による機能性評価においても有効性が確認できたことなどの成果を得ることができた。今後の我が国の国民の健康寿命の延伸を考えていくに当たり、本研究はこれに貢献できる機能性甘味料として大いに期待が持てるものであり、迅速な事業化に向けて補完研究と市場開拓の準備を進めていきたいと考える。