

平成 25 年度戦略的基盤技術高度化支援事業

「経口摂取可能なソホロリピッドの発酵技術と
その食品等への利用における高度化技術の開発」

研究開発成果等報告書

平成 26 年 3 月

委託者 近畿経済産業局

委託先 サラヤ株式会社

目 次

第1章 研究開発の概要.....	2
1-1 研究開発の背景.....	2
1-2 研究目的及び目標.....	2
1-3 研究体制.....	2
1-4 成果概要.....	4
1-5 当該研究開発の連絡窓口.....	5
第2章 経口摂取可能なソホロリピッドの発酵生産とその成分・組成分析および規格設定.....	6
2-1 フラスコスケールでの発酵条件の検討.....	6
2-2 成分および組成分析および規格設定.....	6
2-3 スケールアップのための条件検討(中間プラント).....	6
2-4 実機スケールでの試作.....	6
第3章 多面的な安全性評価.....	7
3-1 培養細胞を用いたソホロリピッドの毒性緩和効果.....	7
3-2 経口摂取におけるソホロリピッドの安全性評価.....	7
第4章 ソホロリピッド複合体の構造解析とその形成メカニズムの解明.....	8
4-1 ソホロリピッド自己集合体の特性解析.....	8
4-2 機能性成分との複合分子集合体の特性及び構造解析.....	8
第5章 有効性の評価.....	9
5-1 ソホロリピッドと機能性成分の分子集合体の消化性の測定.....	9
5-2 ソホロリピッドと機能性成分のキャリアとしての機能性評価.....	9
5-3 ソホロリピッド-羅漢果配糖体の吸収性及び有効性の評価.....	10
5-4 ソホロリピッド-ラクトフェリンの吸収性及び有効性の評価.....	11
第6章 加工条件の検討.....	13
6-1 粉末製剤としての加工条件の検討.....	13
6-2 液剤としての加工条件の検討.....	13
第7章 全体総括.....	14
7-1 研究開発成果.....	14
7-2 研究開発後の課題・事業化展開.....	15

第1章 研究開発の概要

1-1 研究開発の背景

微生物発酵によって生産される天然糖脂質ソホロリピッド(図1:SL)は、糖質(ソホロース:グルコースが β 1-6結合した二糖)と脂肪酸(主にオレイン酸)からなるバイオサーファクタントであり、化学物質と比べて安全な素材である。本事業の管理法人であるサラヤ株式会社は、SLの大量生産法を確立し、家庭用、業務用および医療用など広範な分野で利用可能にした。

SLは自己凝集体形成能を有し、有効成分の安定化・保護作用・有効量の低減化など、新規なキャリアとしての効能発現が期待される。この性能を医薬品・食品等に応用することにより、少量、安全、高機能なキャリア素材として高齢福祉社会に資することができると考えられる。

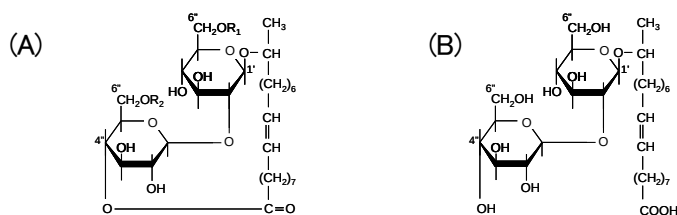


図1. ソホロリピッド(SL)の化学構造: The 1',4'-lactone form, a non-ionic surfactant (A), was hydrolyzed and converted to the acidic form (B). R1 and R2 indicate either an acetyl group or the hydrogen.

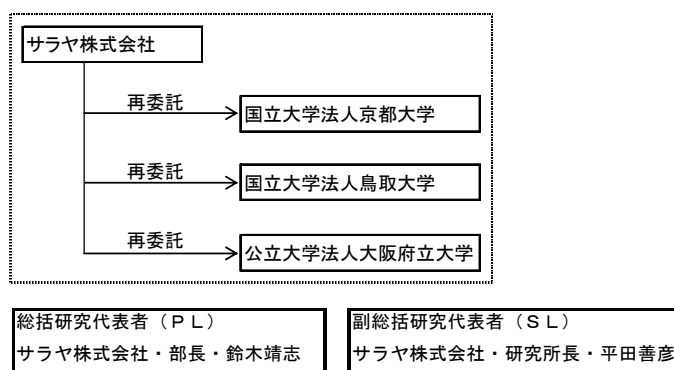
1-2 研究目的及び目標

本事業は「(19)発酵に係る技術に関する事項」における「イ. 発酵製品の高品質化に資するための発酵・精製技術システムの開発」を高度化目標とし、経口摂取可能なソホロリピッド(edible SL; eSL)の発酵生産技術を開発することを目的とする。本事業において、eSLの発酵・精製技術を確立し、組成分析、規格設定を行うと同時に、多面的な安全性評価、機能性評価を実施し、eSL含有製剤の加工技術を確立する。

1-3 研究体制

(1) 研究組織及び管理体制

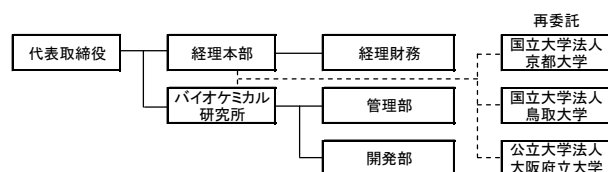
1) 研究組織(全体)



2) 管理体制

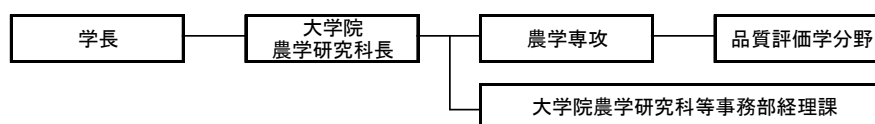
①事業管理機関

サラヤ株式会社

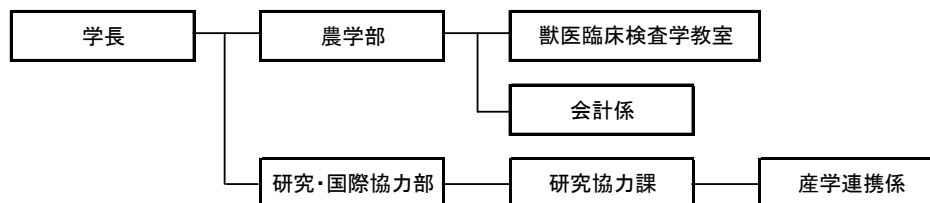


②(再委託先)

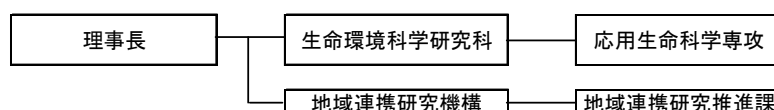
国立大学法人京都大学



国立大学法人鳥取大学



公立大学法人大阪府立大学



(2) 研究者氏名・所属・役職

【事業管理機関】サラヤ株式会社

①管理員

氏 名	所属・役職
鈴木 靖志	バイオケミカル研究所 開発部 部長

②研究員

氏 名	所属・役職
平田 善彦	バイオケミカル研究所 所長
鈴木 靖志(再)	バイオケミカル研究所 開発部 部長
竜 瑞之	バイオケミカル研究所 開発部 次長
田端 宏充	バイオケミカル研究所 開発部 課長補佐
伊藤 仁	バイオケミカル研究所 開発部 係長
石井 七瀬	バイオケミカル研究所 開発部 主任
荒木 道陽	バイオケミカル研究所 開発部 主任
植田 晶子	バイオケミカル研究所 開発部 主任

【再委託先】

国立大学法人京都大学

氏 名	所属・役職
松村 康生	大学院農学研究科農学専攻品質評価学分野・教授
松宮 健太郎	大学院農学研究科農学専攻品質評価学分野・助教

国立大学法人鳥取大学

氏 名	所属・役職
竹内 崇	農学部獣医学科・教授
杉山 晶彦	農学部獣医学科・准教授

公立大学法人大阪府立大学

氏 名	所属・役職
乾 博	生命環境科学研究科応用生命科学専攻・教授

(3) 経理担当者及び業務管理者の所属、氏名

(事業管理機関)

サラヤ株式会社

(経理担当者)	経理本部 取締役副本部長	熱田 裕司
(業務管理者)	バイオケミカル研究所 管理部 部長	梶谷 康一

(再委託先)

国立大学法人京都大学

(経理担当者)	北部構内共通事務部研究支援課第二産官学連携掛 掛長	白神 照広
(業務管理者)	大学院農学研究科 研究科長	宮川 恒

国立大学法人鳥取大学

(経理担当者)	農学部会計係 係長	岡本 智
(業務管理者)	研究・国際協力部研究協力課 係長	大塚卓弥

公立大学法人大阪府立大学

(経理担当者)	地域連携研究推進課産官連携室 主事	林 加奈子
(業務管理者)	地域連携研究推進課産官連携室 室長	角谷 佳則

1-4 成果概要

(1) 経口摂取可能なソホロリピッドの発酵生産とその成分・組成分析および規格設定

フラスコスケールでは洗浄用ソホロリピッドに使っていた培地成分を全て食品・食添グレードへ変更して検討を行い、ソホロリピッド生産量 10%の目標を達成した。

洗浄用ソホロリピッドの規格項目に加え、食品・食添グレードに必要な規格項目として臭気、重金属試験、ヒ素試験、一般生菌数、大腸菌群を追加した規格項目を設定した。

5L、30L、5t の各スケールで、グリシン培地など食添グレードの培地で培養試験を行い、ソホロリピッド生産量として 10%の目標を達成した。

(2) 多面的な安全性評価

角質層細胞、HeLa 細胞における天然型 SL の IC50 はそれぞれ 26mg/L、78mg/L であり、他の界面活性剤の IC50(1~14mg/L)よりも高く、安全性の高さが示された。また腸管上皮(Caco-2)細胞を用いた毒性試験でもショ糖脂肪酸エステルよりも毒性が低く、腸管の細胞を傷つけにくいことを見出した。

げっ歯類を用いた 13 週間反復経口毒性試験、イヌ、ヒトでの 4 週間反復経口投与試験でいずれも毒性は認められず、哺乳類培養細胞を用いた染色体異常試験においても陰性の結果が得られ、ソホロリピッドが食品、食添グレードとしての使用に適することが示された。

(3) ソホロリピッド複合体の構造の解析とその形成メカニズムの解明

ソホロリピッドの表面張力低下能、臨界ミセル濃度、その他基礎物性、乳化特性、界面特性を詳細に解析した。乳化剤として食品用にしようするための性能は有していることが示された。また、界面粘弾性計を使用して油水界面および気水界面の特性を測定したところ、ソホロリピッドの pH 依存的な起泡性・乳化活性等の性質変化は界面張力の変化によるものだけではなく、界面の弾性的性質の変化によるものであることが証明され、ソホロリピッドのユニークな性質の基礎的知見が得られた。

ソホロリピッドとラクトフェリンの複合体について特性解析、構造解析を行った。CD 測定と表面疎水性測定の結果から、ソホロリピッドとラクトフェリンは複合体を形成するが、ソホロリピッドの吸着によりラクトフェリンの二次構造は変化せず、三次構造だけが変化するため、相互作用自体は弱いことが明らかになった。ソホロリピッド、ラクトフェリン、油で構成される乳化製剤の構造を共焦点レーザー顕微鏡と、Cryo-SEM により観察したところ、ラクトフェリンはソホロリピッドが存在しない場合は油滴の表面

に吸着するが、ソホロリピッドが存在する場合、油滴の表面にはほとんど吸着しないという特徴を明らかにした。

(4) 有効性の評価

乳化物のペプシンによる消化率は 55%となり、目標の 50%以下には到達しなかったが、Lf単独の 84%、ソホロリピッド+ラクトフェリン混合液の 78%よりも消化耐性が高いことが示された。

ソホロリピッドを用いた乳化液中に、構成因子とサイズの異なる 3 種類の構造体が存在していることが示唆され、そのうちの少なくとも 1 種類の構造体は保存安定性が良く、内包成分を胃液から守り、経腸吸収を高めていると考えられる。これら分画した構造体フラクションの吸収効率を測定するところまで検討を進めることはできなかったため、今後の検討課題として残された。

ソホロリピッドを用いた乳化液に羅漢果配糖体を配合した試料をラット経口投与試験に供し、モグロシンド V の小腸での分解とモグロシンド V、モグロシンド I、モグロールの吸収量を評価した結果、ソホロリピッドを用いることによってモグロシンド V が門脈に吸収されることが示された。また、小腸内部ではモグロシンド V が分解されて脂溶性が高く、吸収性が高いモグロシンド II とモグロールが作られるが、ホロリピッドを用いることでこれらの物質の生成量が有意に高められることを見出し、目標が達成された。

食用成分のみで調製した乳化ソホロリピッド+ラクトフェリン製剤は腸管からの bLf 吸収を有意に増大させた。乳化ソホロリピッド+ラクトフェリン製剤は Tail-flick test による鎮痛活性の評価によって、機能的にも有意な増強効果を発揮することが確認された。以上よりラクトフェリン単独の状態から吸収率、鎮痛作用を倍増させるという目標は達成された。

(5) 加工条件の検討

酸型ソホロリピッドについて、一般的な食品乳化剤としての特性、乳化剤共存下での加工食品の物性に及ぼす影響を評価した。加工食品へ配合する際に起泡性低下効果、食感改変効果などの特性に配慮する必要がある。

微粒子粉末や錠剤のコーティングにより、苦味マスキング、腸溶性性能の付与を目指し、新規なコーティング方法を見出した。特許出願中である。

ラクトフェリンの鎮痛効果が増強された乳化製剤はスプレードライ装置で粉末化し、固結試験やカプセル化の検討を行ったが、粉末としての流動性の改善が今後の課題である。この乳化製剤を含有するチョコレートを試作し、ソホロリピッドの臭みをマスキングすることができた。今後、試作品の安定性評価を行なう予定である。

(6) プロジェクトの管理・運営

再委託先の研究実施者を含めた実行委員会を 3 回開催し、相互の連絡調整、予算管理等のプロジェクトの管理及び運営を行った。委託先研究員のみの進捗報告会を 5 回開催し、個別研究テーマに関する情報共有と方向修正を行なった。

1-5 当該研究開発の連絡窓口

サラヤ株式会社 バイオケミカル研究所 鈴木靖志

電話 072-977-8000 / Fax: 072-977-2224 / E-mail: suzuki-y@saraya.com

第2章 経口摂取可能なソホロリピッドの発酵生産とその成分・組成分析および規格設定

2-1 フラスコスケールでの発酵条件の検討

経口投与可能なソホロリピッドの生産を目指し、洗浄用ソホロリピッド(SL)用の培地成分をすべて食品・食添グレードへ見直し、フラスコスケールで酵母エキス増量またはアミノ酸であるグリシンおよびグルタミン酸を添加した3種類の食品・食添グレードの培地を選定することができた。また、全ての培地において、SL生産量が10%であり、目標を達成した。

2-2 成分および組成分析および規格設定

汎用されている食品用乳化剤や食品原料を参考に、洗浄用SLの規格項目に加え、食品・食添グレードに必要な規格項目である臭気、重金属試験、ヒ素試験、一般生菌数、大腸菌群を追加した規格項目を設定した(表1)。

表1. eSLの暫定規格値

	規格項目	規格値
一般規格	性状	褐色透明の粘ちよう性沈殿物
	香味	酢酸臭
	pH	室温下で2.5~3.5
	乾燥残分	45wt%以上
	n-ヘキサン抽出物	乾燥残分に対し2.0wt%
	SL組成	ラクトン55%以上
	以下参考項目	
	エタノール不溶分	乾燥残分に対し3.0wt%
純度試験	重金属	20ppm以下
	ヒ素	2ppm以下
微生物試験	一般生菌数	3000個/g以下
	大腸菌群	陰性

※ 赤字は新たに追加された項目及び規格値

2-3 スケールアップのための条件検討(中間プラント)

5Lのミニジャースケールでの培養を行い、酵母エキス増量培地およびグリシン培地のSL生産量がそれぞれ10.1%、9.6%であり、目標をクリアできた。また、培養中の油脂消費や発泡性も洗浄用SLの製造時と同等であることが分かった。中間プラントの30Lジャーで培養を行った場合は、酵母エキス増量培地およびグリシン培地でのSL生産量はそれぞれ7.5%、9.5%であった。酵母エキス増量培地で強い発泡性が確認され、SL生産量も目標値を下回った。一方、グリシン培地はSL生産量の目標をクリアし、発泡性も許容範囲内であった。グリシン培地は精製工程でのSL分離性も良好であり、洗浄用培地と同様に製造できることが分かった。また、30Lジャーのグリシン培地から得られたSLは設定した規格範囲内に収まった。

2-4 実機スケールでの試作

中間プラントで実施可能だったグリシン培地を使用して実機スケール(5t)で培養を行ったところ、SL生産量として12.2%得られ、中間プラント以上の生産量を得ることができた。また、規格範囲内に収まっていることも確認でき、実機スケールにおいても食品・食添グレードのSLが生産可能であることが分かった。また、食品・食添グレードのために、精製工程中の生菌数確認や移送ラインなどの仕様変更を実施し、安定製造のための条件を確立できた。また、メタボローム解析を実施することで、培地成分内の疎水性基質から牛脂由来脂肪酸を除いたり、精製工程中の加熱処理を除いたり、水洗処理の回数を増やすことで、SLの臭気を改善できることが分かった。

第3章 多面的な安全性評価

3-1 培養細胞を用いたソホロリピッドの毒性試験

発酵生産から得られる天然型 SL および、天然型 SL をアルカリ加水分解した粗精製酸型 SL の HeLa 細胞を用いた細胞毒性試験の結果では、細胞生存率が 50%となる濃度 IC_{50} (ppm) はそれぞれ、78 ppm、2,500 ppm、であった。酸型 SL は天然型 SL に比べて IC_{50} が 32 倍高かった。一方、マイドール 10、レボン 2000、LAS の IC_{50} は、それぞれ 700 ppm、207 ppm、<10 ppm であり、酸型 SL は市場に流通している他の界面活性剤と比較しても IC_{50} は高かった。また、酸型 SL の表皮角化細胞、線維芽細胞の IC_{50} はそれぞれ 280 ppm、32 ppm であり、いずれも他の界面活性剤よりも高い IC_{50} を示した。また、腸管上皮 (Caco-2) 細胞を用いた毒性試験も実施し、最大添加可能濃度は酸型 SL ではが 1,000ppm、天然型 SL が 100ppm であり、シュガーエステルよりも高い値が得られ、さらに高濃度でも腸管の細胞層を傷つけづらいたことが分かった。

ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験 を実施したところ、酸型 SL は陰性であることも確認された。

3-2 経口摂取におけるソホロリピッドの安全性評価

げっ歯類を用いた 13 週間反復経口投与毒性試験で高純度酸型 SL の無毒性量が 1000 mg/kg より大きいことが分かった。また、イヌを用いた 4 週間反復経口投与試験でも、粗精製酸型 SL 300mg/kg において、状態や体重、血液学検査問題ないことが分かり、ヒトでの 28 日間の反復経口投与試験でも、粗精製酸型 SL 30mg、LF300mg の錠剤投与で体重や血液学検査、尿検査に問題は生じなかった。これまでに得られていた安全性評価と総合して(表 2 参照)、SL が食品・食添グレードとしての使用に耐えうると判断される。

表 2. 安全性試験まとめ

試験項目	健康食品 一般食品	ソホロリピッド 実施状況	備考
ラットを用いる単回経口投与毒性試験	○	○	
ラットを用いる4週間反復経口投与用量設定試験	○	○	本事業にて実施
ラットを用いる13週間反復経口投与毒性試験	○	○	本事業にて実施
細胞を用いる復帰突然変異試験	○	○	
哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験	○	○	本事業にて実施
マウスを用いる小核試験	○		染色体異常試験が優先
イヌの4週間反復経口投与試験		○	本事業にて実施
ヒトの4週間反復経口投与試験		○	本事業にて実施
ヒトの小腸細胞に対する毒性評価		○	本事業にて実施

第4章 ソホロリピッド複合体の構造解析とその形成メカニズムの解明

4-1 ソホロリピッド自己集合体の特性解析

洗浄用 SL と食品・食添グレードの SL の表面張力低下能および臨界ミセル濃度は同等であり、洗浄用と同等の界面活性能を持つことが分かった。また、基礎物性として 29 項目の測定を実施し、これまで不明瞭だった SL の物性を明確に示すことができるようになった。シュガーエステルとの活性比較を行うことで、塩類があっても SL は可溶化すること、水溶性が高いこと、酸やアルカリにも安定であることが分かり、製品配合上で使いやすい原料であることが分かった。

京都大学における検討では、主にソホロリピッドの乳化特性と界面特性の解析を行った。ソホロリピッドの乳化特性を解析した結果からは、ソホロリピッドは高分子系の乳化剤よりも、シュガーエステル等の低分子の乳化剤と同じような乳化挙動を示すことがわかった。しかしながら、ソホロリピッドの乳化活性はシュガーエステルほど高くはなく、十分な乳化を行うためには、高速攪拌型の乳化機ではなく、高圧処理型の乳化機が必要であることが明らかになった。高速ブレンダーあるいは高圧ホモジナイザーで調製したエマルションでは、クリーミングを起こすものの、相分離は観察されなかった。SL を使用すると比較的細かい油滴が形成されることから、増粘剤を添加すること等により、油相に大豆油を用いた SL 食品の製造が可能であることが示された。また、ソホロリピッドはこれまでに pH 依存的に起泡性や乳化活性等の性質が変化することが明らかになっているが、界面粘弾性計を使用してさまざまな pH 条件下で経時的に界面張力を測定することで、その性質の変化を説明することができた。同じ機器を用いて油水界面と気水界面の物性を測定したところ、ソホロリピッドの pH 依存的な起泡性・乳化活性等の性質変化は、界面張力の変化によるものだけではなく、主に界面の弾性的性質の変化によるものであることが証明された。界面粘弾性計を使用して得られたデータは、ソホロリピッドのユニークな性質がどのようにして発現するかを基礎的に解明したものであり、今後のソホロリピッドの応用を考えるにあたって、大変意義深いデータである。

4-2 機能性成分との複合分子集合体の特性及び構造解析

ソホロリピッドとラクトフェリンの複合体がどのようにして生理機能性を発揮するのかを検証するという観点から実験を行った。

CD 測定と表面疎水性測定の結果から、ソホロリピッドとラクトフェリンは複合体を形成するが、ソホロリピッドの吸着によりラクトフェリンの二次構造は変化せず、三次構造だけが変化するため、相互作用自体はそれほど強くないことが明らかになった。

先行研究から、ソホロリピッドはリボン状の構造を取ることが知られているが、我々の行った SEM 観察の結果より、ラクトフェリンと混合した場合も同様の構造を取ることが示された。

本プロジェクトでは、ソホロリピッドとラクトフェリンは、油が存在する条件下、すなわち乳化製剤になることで、油が存在しない時よりも、生理活性が非常に高くなることが明らかになった。そのような現象が明らかになる理由を探るため、乳化製剤の構造を共焦点レーザー顕微鏡と、Cryo-SEM により観察したところ、ラクトフェリンはソホロリピッドが存在する場合、油滴の表面にはほとんど吸着していないこと、そして、油滴の中には水相が存在しないことが明らかになった。また、酵素分解実験を行ったところ、ソホロリピッドがラクトフェリンの分子全体を被覆するような構造は取っていないことも明らかになった。油が存在しない状態での実験結果と合わせて考えると、ソホロリピッドと油が共存する場合のラクトフェリンの生理機能性の増強は、ラクトフェリンが完全に未分解のまま腸で吸収されることに起因するものではないことが示された。

ラクトフェリンが腸で吸収されるまでには、消化過程で界面活性のある胆汁酸塩(bile salts)が関与する。ソホロリピッドと油が胆汁酸塩と競合的に相互作用し、ラクトフェリンの分解を阻害・遅延するような効果があれば、ラクトフェリンの生理機能性増強が起こる可能性がある。

今後は体内で起こるソホロリピッドとラクトフェリン間の相互作用を検討することが課題となるであろう。

第5章 有効性の評価

5-1 ソホロリピッドと機能性成分の分子集合体の消化性の測定

ソホロリピッドと乳化させたラクトフェリン溶解液、または乳化液を粉末化したサンプルのペプシン消化に対するラクトフェリンの耐性を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により比較した。ペプシンを添加しない条件を 0% とした場合の消化率はラクトフェリン溶液が 84%、ラクトフェリン含有酸型ソホロリピッド乳化液は 55%、ラクトフェリン含有酸型ソホロリピッド乳化液粉末は 64%、ラクトフェリンと高純度酸型ソホロリピッド混合液は 78%であった。乳化液は消化率が低く抑えられたが、目標値の 50%以下には到達しなかった。しかし、ラクトフェリンとソホロリピッドを乳化することによってラクトフェリンのペプシン消化に対する耐性が高くなっていることが示された。

5-2 ソホロリピッドと機能性成分のキャリアとしての機能性評価

(1) 乳化処方決定

化粧品原料の処方から食品原料へと試作を進め、動物試験の結果、吸収量が高く、生体における効果が最も高い処方(処方 14: 食品成分のみを使用し、酸型 SL2.5%、Lf5%を配合)を選定した。

(2) 乳化処方の評価

1) W/O/W 構造

油や他の界面活性剤の存在下で SL により形成される乳化物中の分子集合体は W/O/W 構造を形成し有効成分の内包や外部 pH および酵素刺激からの保護を予想し、SL の作るベシクルの乳化タイプを調べるため、油性色素オイルレッド O および水溶性色素キャベツ色素を用いて調査した。オイルレッド O に染まりにくく、乳化粒子中は水相である可能性が高く、一方キャベツ色素による染色では中も外も染まっている粒子が見られ、両方とも水相であり、W/O/W であることが示唆された。

2) 膜流動性

乳化製剤に DPH テトラヒドロフラン溶液を添加し蛍光偏光を蛍光強度計で測定し分子集合体の強固さを評価した(励起波長 351nm、発光波長 430nm)。SL の配合量が多く、さらに Lf を乳化時に添加した処方 14 はほかの処方や製法よりも粒子径が小さかった。また、シヨ糖脂肪酸エステルよりも SL を用いた処方で膜流動性が低く強固な傾向であった。pH3 における膜流動性は組成による差はなかった。

3) ベシクルからの漏出の評価

分子集合体形成に寄与する活性剤および乳化剤による内包率の差を評価した。乳化製剤を限外ろ過カラムに通し、分子量が大きな層に回収したものを内層、分子量が小さな層に回収されたものを外層とし蛍光強度を測定し(37°C、励起波長 494nm、発光波長 521nm)、内包率を算出した。さらに限外ろ過カラムにより、消化を想定した pH の変化により内容物の漏出を評価した。限外ろ過カラムや pH の調整後に蛍光強度を測定し、漏出率を算出した結果、乳化製剤において、SL の配合が多いほど内包率は高く、また pH7 における漏出率も少なかった。また、SL により形成される構造体に内包された内容物は pH3 においてほとんど漏出しないことが示された。

4) カラムによるフラクション分離(カラム: C10/40、担体: Sephacryl S-100)

ゲルろ過により分子サイズによる分離を行い、Lf や蛍光物質を定量し組成物中の Lf の分布および組成物の構造について考察した。SL を用いた乳化製剤中に、構成因子とサイズの異なる 3 種類の構造体が存在していることがわかり、そのうちの少なくとも 1 種類の構造体は保存安定性が良く、内包成分を胃液から守り、経腸吸収を高めていることを明らかにした。従って、SL は経口摂取時の有効性を高めるキャリアとして適していると考えられる。

5-3 ソホロリピッド-羅漢果配糖体の吸収性及び有効性の評価

羅漢果(*Siraitia grosvenorii* Swingle)は、中国広西チワン族自治区で栽培されるウリ科の植物であり、強い甘味を呈する羅漢果配糖体(モグロシド類)が含まれており、肥満者や糖尿病患者向け低カロリー甘味料として利用されている。主要成分であるモグロシド V(M-V)は、アグリコンであるモグロール(MgL)にグルコースが5つ結合した配糖体である。羅漢果は、古来より咳止め、気管支炎などに有用な民間薬として知られており、近年抗糖尿病作用や抗アレルギー効果が報告されており、活性成分は M-V やその分解物(MgL など)と考えられる。ところが、ラットに M-V を投与すると、大半は腸内細菌によりモグロシド I(M-I; グルコースが1つ結合した配糖体)や MgL に分解され糞便中に排泄され、体内には MgL、M-I として僅かに取り込まれるだけであった。したがって、M-V やその分解物の吸収を高めると、生理活性が向上できると考えられる。そこで、ソホロリピッド(SL)の持つ自己凝集体形成能、ハイドロゲル形成能を応用して、M-V の消化・吸収を向上させることを試みた。

(1)ソホロリピッドの羅漢果配糖体吸収促進作用に関する小腸モデル細胞系を用いたインビトロでの検証

Caco-2 細胞による小腸モデル系を用いて、M-V の腸管吸収におよぼす SL の影響について検討を行った。具体的には、Caco-2 小腸モデル系の管腔側にサンプルとなる様々な M-V-SL 乳化物を添加し(添加量は培地の 1/10)、2時間後に基底膜側に透過した M-V 量を LC-MS を用いて測定した。その結果、水相に酸型 SL と M-V をそれぞれ 0.5%、2.1%になるように溶解し、油相としてサラダ油を 0.5%混合した乳化物をサンプルとすると、M-V の透過率は 0.51%となり、調べた乳化物のなかで最も高い値となった。一方で M-V 単独での透過率は 0.1%以下であり、また SL の代わりにレシチンを用いて乳化させた場合は 0.3%程度であった。これらの結果から、M-V を乳化させることで腸管における吸収率が大幅に上昇する可能性が示された。また、乳化剤としてレシチンより SL が優れていることも分かった。さらに、M-V と同時に SL も基底膜側に透過しており、M-V と SL の透過率には相関性が見られた(なお、上記組成の乳化物における SL の透過率は 0.56%であった)。

(2)ソホロリピッドの羅漢果配糖体吸収促進作用に関する実験動物を用いた検証

Caco-2 細胞を用いたインビトロでの実験結果から、M-V の腸管吸収は SL によって促進される可能性が示された。そこで、次にラットに M-V-SL 乳化物を経口投与し、M-V およびその分解物の腸管吸収を検討した。具体的には、9週齢のオスラットを2群に分け、SL 群には M-V-SL 乳化物を、コントロール群(C 群)には M-V 水溶液(8.4%)を経口投与(1 mL)し、1時間後の門脈血中の M-V、M-I および MgL 濃度を測定した。乳化物の組成は、処方 14 をベースに M-V 8.4%を添加した(pH:6.2、粒度:2.2 nm)。なお、M-V の投与量は両群ともに 66 μ mol である。その結果、C 群では門脈血中に M-V は全く検出されなかったが、SL 群では複数のラットで M-V が検出された。したがって、SL によって M-V の腸管吸収が促進されることがインビボでも確認された。一方、分解物である M-I と MgL は、C 群、SL 群ともに門脈血中に検出され、両群間に特に有意な差は見られなかった。

次に小腸内のモグロシド類について分析した。その結果、投与1時間の小腸内には C 群、SL 群ともに未消化の M-V が多く(投与量の 80%以上)見いだされたが、SL 群では C 群に比べて明らかに分解物が増加していた。特に、モグロシド II(M-II; グルコースが2つ結合した配糖体)と MgL は大幅に増加していた($p<0.01$)。したがって、SL は M-V の腸管吸収を促進するだけでなく、消化酵素による分解も活性化していることが明らかになった。MgL は脂溶性であり比較的速やかに腸管から吸収されるので、M-V を SL とともに投与すると MgL としての吸収量が大幅に増加するものと考えられる。残念ながら、本実験においては門脈血中の MgL 濃度が大幅に増加していなかったが、おそらく消化と吸収の間に若干のタイムラグがあるためと考えられる。MgL にはインスリン分泌促進活性や脂肪細胞分化抑制作用が最近明らかになってきており、大変興味深い結果である。

5-4 ソホロリピッド-ラクトフェリンの吸収性及び有効性の評価

(1) 腸管からの乳化 SL-bLf 複合体吸収動態の評価

胃内投与した非乳化または乳化ソホロリピッド-ラクトフェリン(SL-bLf)複合体の吸収動態を明らかにする目的で、ラットの胸管リンパ液を連続採取し、腸管から吸収された bLf 濃度を測定するとともに、bLf 分画を Western-blotting 法により解析した。16 時間絶食した Wistar 系ラット(♂、8 週齢)にウレタンおよびペントバルビタールナトリウム麻酔を施し、未修飾 bLf、非乳化 SL-bLf (SL:bLf=1:2 および SL:bLf=1:10)、あるいは乳化 SL-bLf(処方 8、9、14-6 および 14-8)を各 300mg/kg となるように胃内へ投与し、その後 4 時間まで胸管リンパ液を採取した。なお、処方 8、9 は化粧品原料を使用して調製したものであり、処方 14-6、14-8 は前項記載の処方 14 に賦形剤を加え、粉末化したものである。

その結果、リンパ液中への bLf 吸収量は、非乳化 SL:bLf=1:10 投与群において約 100~200 ng/ml の範囲で増加傾向を示した(図 2)。一方、乳化 SL-bLf である処方 8 および 9 では、bLf 吸収量は顕著に増加し、特に投与後 1 時間での吸収量は著しい高値であった。さらに、乳化 SL-bLf 処方 14-6 および 14-8 においても bLf 吸収量は明らかに増加しており、投与後 3 時間で最大となった(図 2)。投与後 4 時間の bLf 吸収総量を比較すると、未修飾 bLf および非乳化 SL:bLf に比べて、乳化 SL-bLf 投与後群では明らかに増加しており、特に、処方 8 では有意な増加となった(図 3)。

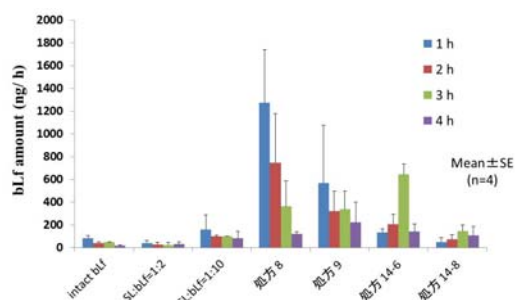


図 2 胃内投与後の胸管リンパ液中 bLf 吸収量の変化(1 時間毎)

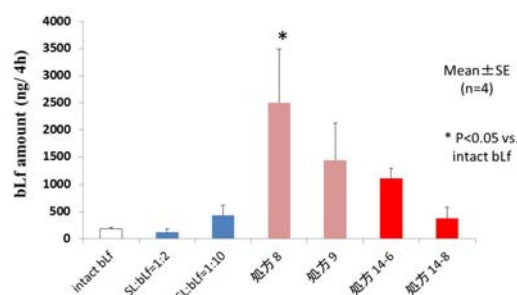


図 3 胃内投与後の胸管リンパ液中 bLf 吸収量の変化(4 時間総量)

ラットの胃内投与後に採取した胸管リンパ液の Western-blotting では、すべての乳化 SL-bLf において、約 50 kDa のバンドが主要な分子サイズであった。また、処方 8 においては約 80kDa のバンドが比較的多く認められた。処方 17 は SL 未添加であるが、80kDa のバンドの比率がやや高い傾向にあった(図 4)。

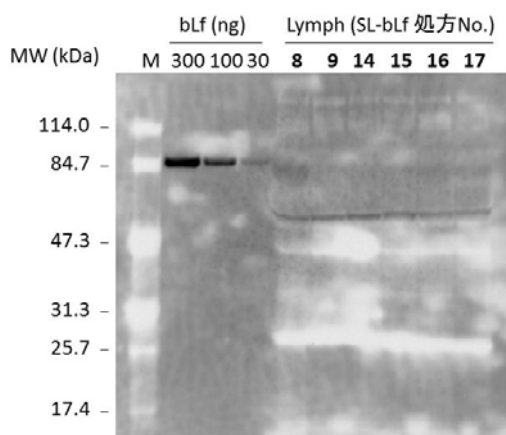


図 4 リンパ液の Western-blotting 像

(2) 鎮痛活性の評価

経口投与した非乳化および乳化 SL-bLf 複合体の生理活性を明らかにする目的で、マウスの Tail-flick test による鎮痛活性の比較解析を行った。実験には ICR 系マウス(♂、5週齢)を使用した。塩酸モルヒネ(3 mg/kg)を腹腔内投与するとともに、生理食塩水または乳化 SL-bLf (300 mg/kg)を経口投与し、30, 90, 180 分後に 48°C の温水による Tail-flick test を実施した。なお、処方 14-1~14-5、および 14-7 は、いずれも処方 14 を基本処方とした派生処方である。

その結果、乳化 SL-bLf である処方 14-6 では、投与後 90 分において鎮痛効果の延長が認められ、処方 14-8 では投与後 30 分での鎮痛活性のピーク値が有意に増大した(図 5)。

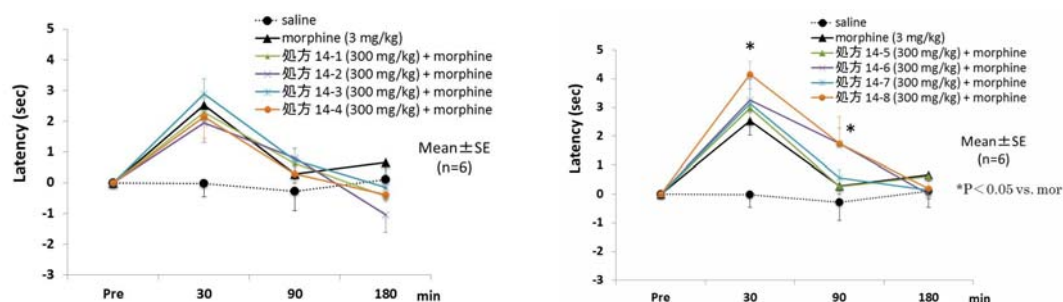


図 5 乳化 SL-bLf(処方 14-1~14-8)による鎮痛活性の比較

以上のように、乳化 SL-bLf は腸管からの bLf 吸収を有意に増大させ、処方 14-6 および 14-8 では、吸収のピークが投与後3時間となったことから、持続的な腸管吸収増強効果を発揮すると考えられた。同時に、処方 14-6 および 14-8 では有意な鎮痛活性の増強が確認された。

第6章 加工条件の検討

6-1 粉末製剤としての加工条件の検討

(1) 食用乳化剤としての加工特性

酸型ソホロリピッドについて、一般的な食品乳化剤としての特性の評価、乳化剤共存下での加工食品の物性に及ぼす影響の評価を実施した。具体的にはスポンジケーキ、クッキーを用いてクリーミングと吸水性の試験を行った。酸型ソホロリピッドはスポンジの起泡性を低下させる働きがあり、乳化剤無添加の場合の70%まで低下させることが分かった。スポンジの官能評価の結果、食感と総合的な嗜好性は有意に良好であった。焼成後に経時的に硬さが上昇したが、風味の低下は認められなかったことから、酸型ソホロリピッドによるでんぷんの老化防止効果に関しては評価系を含めて今後の課題と考えられる。

クッキーの破断性と食感に及ぼす酸型ソホロリピッドの影響としては、配合量を増やすほどソフトクッキーからビスケットのような食感に変化することが示された。また酸型ソホロリピッドにはクッキーの油じみを低減させる効果は認められず、吸水率についても口だけ改善を期待できるほどの効果は認められなかった。

酸型ソホロリピッドを加工食品へ配合する際はこれらの特性にも配慮して処方検討する必要がある。

(2) ソホロリピッドの微粒子コーティング

ソホロリピッドの苦味マスキングを目的として羅漢果配糖体をイーストラップ(酵母細胞壁製剤)に溶解したコーティング液を用いて、微粒子コーティング装置で加工した。コーティング率として123%までコーティング液を噴霧した結果、甘味が強く、苦味の弱い製剤となったが、苦味を完全にマスキングすることはできなかった。そこで、微粒子腸溶性コーティングや錠剤として打錠した表面のコーティングを試みた。微粒子腸溶性コーティングの検討では、十分な腸溶性効果を得るには至らなかったが、微粒子多層コーティングを行うことによって顕著な改善効果が見られた。

(3) 錠剤の表面コーティング

これまで天然型ソホロリピッドの製剤化検討はほとんど行われていなかったが、発酵生産物をそのまま粉末製剤化して食品原料とすることを念頭に、天然型ソホロリピッドを多孔質でんぷん、結晶セルロース、シクロデキストリンなどに吸着させて打錠検討を行い、適切な賦形剤成分を確定した。続いて、打錠物のコーティング条件を検討し、錠剤の縁まできれいにコーティングされる条件を見出した。錠剤の表面の多層コーティングについても検討を行い、腸溶性性能、マスキング効果の高いコーティング技術を確立した。

6-2 液剤としての加工条件の検討

(1) 乳化製剤の作成および評価

羅漢果配糖体やラクトフェリンを有効成分としてソホロリピッドをキャリアとして機能させるための製剤化検討を行った。ソホロリピッドに油脂成分を適量加えることで動物実験での吸収性が格段に高まることが見出され、乳化製剤の処方と作成方法、安定性などを評価した。特にラクトフェリンとソホロリピッドの乳化製剤についてはラクトフェリンの鎮痛効果を指標にした有効性において顕著な上昇が見られたので、これを粉末化し、具体的な最終商品の試作まで進めた。

スプレードライした乳化液粉末に固結防止剤を添加し、50℃2週間の安定性試験をした結果、炭酸Mg1%を加えることにより、固結防止効果が得られた。40℃での保存安定性試験を実施することはできなかったため、目標達成には至らず、今後の検討課題として残された。

乳化粉末をチョコレートに配合し、ソホロリピッドの苦味マスキングを試みた。作成したチョコレートを官能試験で評価した結果、ソホロリピッドを未配合の試作品と識別できないレベルのチョコレートが完成した。これをプロトタイプとして、安定性の評価、風味改良などを進め、商品として完成させることが今後の課題である。

第7章 全体総括

7-1 研究開発成果

(1) 経口摂取可能なソホロリピッドの発酵生産と規格設定

経口投与可能なソホロリピッドの生産を目指し、洗浄用ソホロリピッド(SL)用の培地成分をすべて食品グレードへ見直し、食品グレードの培地を用いて、SL 生産量 10%の目標を達成した。洗浄用 SL の規格項目に加え、食品グレードに必要な規格項目である臭気、重金属試験、ヒ素試験、一般生菌数、大腸菌群を追加した規格項目を設定し、目標を達成した。これらの結果を踏まえて 30L、および 5t スケールで SL の発酵生産を行い、実機スケールにおいても食品グレードの SL を安定生産する技術を確立した。

(2) 多面的な安全性評価

げっ歯類を用いた 13 週間反復経口投与毒性試験で、酸型 SL の無毒性量が 1000 mg/kg より大きく、イヌを用いた 4 週間反復経口投与試験では、酸型 SL 300mg/kg において、状態、体重、血液学検査に問題は生じず、ヒトでの 28 日間の反復経口投与試験では、酸型 SL30mg、Lf300mg の錠剤投与で体重や血液学検査、尿検査に問題は生じなかった。ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験 においても、酸型 SL は陰性であり、これまでに得られた安全性評価と総合して、酸型 SL は食品として安全に利用可能であることが示された。

(3) ソホロリピッド複合体の構造の解析とその形成メカニズムの解明

1) ソホロリピッド自己集合体の特性解析

洗浄用 SL と食品グレードの SL の表面張力低下能および臨界ミセル濃度は同等であり、洗浄用と同等の界面活性能を持つことが分かった。界面粘弾性計を使用して SL の油水界面と気水界面の物性を測定したところ、SL の pH 依存的な起泡性・乳化活性等の性質変化は、主に界面の弾性的性質の変化によるものであることが証明された。界面粘弾性計のデータは、SL のユニークな性質の基礎的な解釈を可能にし、意義深いデータである。

2) 機能性成分との複合分子集合体の特性及び構造解析

SL とラクトフェリン(Lf)は複合体を形成するが、SL の吸着により Lf の二次構造は変化せず、三次構造だけが変化する、緩い相互作用をしていることが明らかになった。有効性の高い乳化製剤の構造観察の結果、Lf は SL が存在する場合、油滴の表面にはほとんど吸着していないという特徴が明らかになった。

(4) 有効性の評価

SL と Lf は乳化製剤になることで、ペプシン消化に対する耐性が高くなる。乳化製剤中には構成因子とサイズの異なる 3 種類の構造体が存在しており、そのうちの 1 種類の構造体は保存安定性が良く、内包成分を胃液から守り、経腸吸収性を高めることが示唆された。また、SL と羅漢果配糖体の組み合わせにより、羅漢果配糖体の生理活性成分の吸収性が高まることが示唆された。経口摂取した Lf のラットリンパへの吸収性は、SL と Lf と油から構成される乳化製剤では明らかに増加し、Lf の鎮痛活性も乳化製剤では有意に高くなることが示された。SL 含有製剤は、有効成分の吸収性や生理活性を倍増させるという目標が達成され、応用展開への道が拓かれた。

(5) 製剤化

食品処方における乳化製剤の処方を確立した。乳化製剤を粉末化し、錠剤やチョコレート処方の検討を行い、SL の苦味、臭気のマスキングが十分になされた試作品が完成した。今後、これらのプロトタイプから商品化の検討を進める予定である。

7-2 研究開発後の課題・事業化展開

(1) ソホロリピッド含有食品の可能性

栄養生理機能エンハンス技術(腸管吸収率向上)が示され、低栄養者が少量の摂取で効率的に栄養補給することが可能になる。また、吸収率が向上するため、摂取量が低減できるため、摂取量の低減(経済的効果)、服用負担を減らすことが可能になる。生体吸収率の低い栄養成分を効率的に吸収させることや油溶性物質を可溶化させ、様々な食品形態、将来的には高機能食品(特定保健用食品)や医薬品添加物(DDS)への展開、応用も期待できる。

(2) 事業化展開へ向けての現状と今後の課題

商品化の検討において、具体的に 2 アイテムについて、商品コンセプト、商品形態のアイデアを抽出し、市場トレンドの分析、ターゲット層、販売チャネルの設定、成功の可能性に関する分析と討議を実施した。当面の課題として、製造工程における有効成分の損失率の確認、製品形態での安定性と効果の検証(使いやすさ、機能、味、体感効果など)が必要であり、関連する他社との協業によるプロモーション強化策などを検討している。

(3) まとめ

本事業における研究開発により、食品用途の SL 発酵が量産レベルで可能となり、食品利用のための SL の安全性試験が完了し、SL 含有乳化製剤の動物レベルでの有効性を示し、乳化製剤の構造的な特徴を明らかにし、商品プロトタイプ of 検討では風味良好な試作品が完成した。ソホロリピッド含有食品の上市に向け、実現可能性の高いプロジェクトを進めていく体制が整えられた。