

平成27年度戦略的基盤技術高度化支援事業

「生理活性物質特定と作用メカニズム解析による
生産プロセスの最適化と発酵産物高機能化に寄与する技術開発」

研究開発成果等報告書

平成28年3月

委託者 関東経済産業局

委託先 公益財団法人千葉県産業振興センター

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	7
1-3 成果概要	12
1-4 当該研究開発の連絡窓口	14
第2章 本論	15
2-1 生物資源、生産プロセスの改良課題への対応	18
2-2 有効成分特定等によるヒト用を目的とする発酵製品の高機能化への対応	19
2-3 機能性評価による科学的根拠付与と更年期障害等における有効性検証への対応	21
最終章 全体総括	24
専門用語等の解説	25

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) 研究開発の背景

川下製造業者である富士産業(株)は、更年期障害改善を目指したヒト健康補助食品(サプリメント)を開発する目的で、(株)牛越生理学研究所が供給する畜産用「リゾープス菌由来発酵産物 RU」の孢子除去と無菌化を行った製剤を使用し、有効性等についてモニター調査を実施した。43歳～56歳の女性23名の回答から、ホットフラッシュ軽減が40～50%程度あり、更年期障害の全体の症状改善率が70%を超えていた。

こういったパイロット試験の結果や更年期障害に悩まされる人々の声から、リゾープス菌由来発酵産物のヒト健康補助食品(サプリメント)としての産業利用のニーズがあると判断された。

また、(株)牛越生理学研究所が外部機関に委託して20歳～43歳の健常人について最大74日までの安全性モニター試験を外部機関で実施したところ、安全であり大きな問題は発生しなかったという報告を受けた。

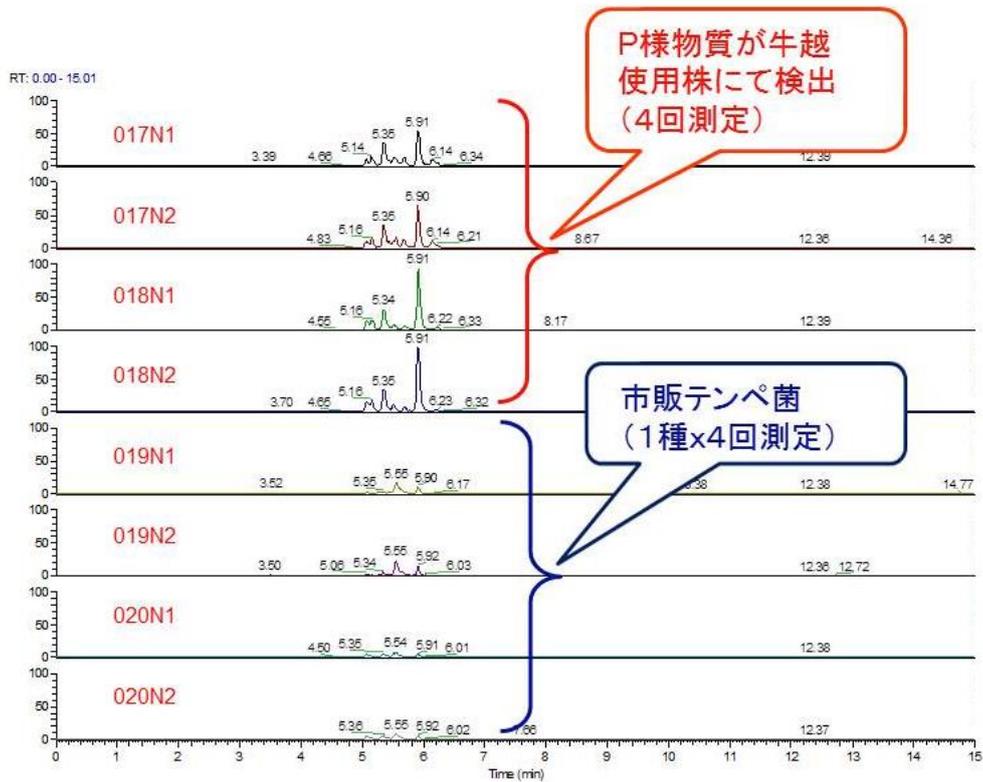
近年、健康食品による未病状態での体調のコントロールが着目されるようになり、川下製造業者である富士産業(株)や(株)常磐植物化学研究所等から、更年期障害改善やホルモン作用の安定化(育毛養毛にも関連する)等に有用なヒト健康補助食品(サプリメント)の供給が求められるような状況となって来ている。

一方、動物用のリゾープス菌由来発酵産物 RU については、既にホルモンの安定化、育毛養毛の効果が認められ国内で1.25億円/年の売り上げがある。川下製造業者である日本全薬工業(株)から、動物用のリゾープス菌由来発酵産物 RU の生殖機能、更には肝機能や免疫機能強化など各種機能と効果指標を解明し科学的根拠を付与することが求められている。更に、動物用医薬品開発についても日本全薬工業(株)、共立製薬(株)等から製品ニーズが有る。日本全薬工業(株)の中国等海外販売拠点に於いて、アジアなど海外向け製品として科学的根拠を付与した健康補助食品(サプリメント)や畜産用飼料添加剤としての新型のリゾープス菌由来発酵産物の国外向け製品が求められている。

日本国内や東南アジア等で大豆発酵食品製造に使用するテンペ菌(カビの一種、学名：*Rhizopus oligosporus*)や(株)牛越生理学研究所が供給する畜産用「リゾープス菌由来発酵産物 RU」製造に使用するリゾープス属菌株の菌(*Rhizopus U-1*株：特許寄託株)、あるいは関連するリゾープス属の8種の菌株が産生するリゾープス菌代謝産物の網羅的解析の結果から、*Rhizopus U-1*株にホルモン作用に影響を及ぼすと考えられる生理活性脂肪酸(P様物質)等の化合物ピークが強く検出された。*Rhizopus U-1*をオミックス解析(18S遺伝子配列解析)により再同定すると、*Rhizopus oryzae*と同定された。

平成24年度に、牛越生理学研究所の製造用菌株(*Rhizopus oryzae*の1つのストレイン)由来発酵生産物(RU)の活性物質を絞り込むことを目的とし、かずさDNA研究所バイオ産業技術支援センターにおいて、その発酵生産物の、高分解能・高質量精度の液体クロマト質量分析計(LC-Orbitrap-MS)を用いた最新の分析方法を適用してメタボローム解析を実施した。その解析結果から、ホルモン誘導など生理活性に関わる化合物では、生理活性脂肪酸(P様物質)関連物質の数ピークが含まれていた。牛越生理学研究所の生産株と異なる種類の9種リゾープス菌(テンペ菌や*Rhizopus oryzae*の2ストレインも含む)を由来とした発酵生産物の成分の網羅的解析を行った。その結果から、生理活性脂肪酸(P様物質)関連物質の数ピークについて、牛越生産株(*Rhizopus oryzae*の1つのストレイン)で最も高く、テンペ菌(*Rhizopus oligosporus*)でわずかに検出され、その他の菌株では殆ど検出されなかった。

生理活性脂肪酸(P様物質)マスキロマトグラム



更に、牛越生産株 (*Rhizopus oryzae*) とテンペ菌と他の *Rhizopus oryzae* 2 ストレインを含む9種リゾープス菌の発酵生産物成分の網羅的解析結果から、牛越生産株のみに認められる104ピークが検出された。その中には、主要ピークであるにもかかわらず、化学式が不明な化合物も含まれていた。P様物質やその他の生理活性物質を指標とした最適となる製造法・品質管理を確立する研究開発を行ったが、特許解析の結果から問題となる特許は見出されなかった。

(2) 研究目的及び目標

【研究目的】

本研究開発の目的は、動物用リゾープス菌発酵生産物（現製品）のヒト用健康補助食品（サプリメント）の転換を目指した高品質化を実現するために、オミックス解析により生理活性物質特定や機能解明を行い、それらを指標として生産プロセスを改良し、高機能化と安全性・有効性を担保できる製造技術を確立することである。

研究の目標として、生物資源、生産プロセスの改良課題への対応に関し、フィルターろ過装置開発による不溶物・胞子のマイルドな条件での除去、脂肪酸等の生理活性物質の高活性を保持できる病原微生物不活化法の確立、及び非通気式固体培養法を用いた発酵工程の最適化を行う。また、有効成分特定等によるヒト用を目的とする発酵製品の高機能化への対応に関し、生理活性脂肪酸等を特定するとともに、ヒトに対する安全性評価方法及びヒト健康食品レベルの品質管理方法の確立を行う。さらに、機能性評価による科学的根拠付与と更年期障害等における有効性検証への対応に関し、分子レベルでの機能性評価とヒト有効性評価を実施し、ヒト用原体の有効性を検証することとする。

【研究の概要】

新技術を実現するために、研究開発は「高度化指針」に定められた高度化目標に対応した下記サブテーマ毎に行い解決した。

① 生物資源、生産プロセスの改良課題への対応

フィルターろ過装置開発による不溶物・胞子のマイルドな条件で除去、脂肪酸等の生理活性物質の高活性を保持できる低温での病原微生物不活化法の確立、及び非通気式固体培養法を用いた発酵工程の最適化を行う。

② 有効成分特定等によるヒト用を目的とする発酵製品の高機能化への対応

生理活性脂肪酸等を特定し評価方法を確立し、ヒトに対する安全性評価とヒト健康食品レベルの品質管理を行う。

③ 機能性評価による科学的根拠付与と更年期障害等に於ける有効性検証への対応

分子レベルでの機能性評価とヒト有効性評価を実施し、ヒト用原体の有効性を検証する。

【従来技術と新技術の比較】

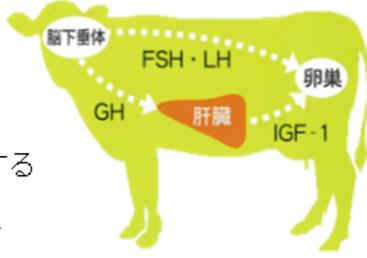
従来技術(むろ内固体培養,製造法で管理)

A)テンペ菌 (*Rhizopus oligosporus*)
 ・日本国内や東南アジア等で大豆発酵食品製造に使用
 (栄養機能性: 抗菌活性、抗酸化性など)

B)リゾープス菌由来発酵産物RU
 (牛越株、*Rhizopus oryzae*の一種)

【1】生産プロセスの検討
 ・温水抽出・減圧濃縮・滅菌工程
 (品質保証: 製造法で規定)
品質: 製品にむらが出る

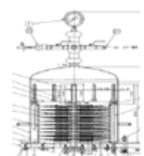
【2】RUの効果は主に動物個体に対する
 現場試験で証明
発情誘導や受胎向上、育毛など
動物で効果確認 <繁殖に関わるホルモンとIGF-1の模式図>



- 課題**
- ・伝統的食品や家畜用,品質や製品にむらが出る
 - ・生理活性物質が不明,定量的活性評価方法が不在
 - ・機能解明と科学的根拠が不十分

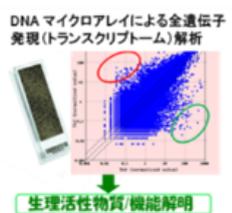
新技術(微生物培養,ろ過装置,オミックス解析)

【1】生物資源、生産プロセスの改良(≥2倍)
 「発酵」: 非通気式固体培養(微生物性)
 「ろ過装置」: 効率化と高生理活性を実現
 ・指標: 生理活性脂肪酸
 ・品質: 高品質で安定 **ヒト安全性**



【2】品質管理方法の確立による高度化・高品質化(オミックス解析による生理活性物質特定、評価法確立)
 ・物質特定による**評価系確立**

【3】性能性評価による高度化・高品質化(分子レベルでの解析など)
 ・**機能性評価** **ヒト有効性試験**



DNA マイクロアレイによる全遺伝子発現(トランスクリプトーム)解析

生理活性物質/機能解明

生産プロセスに反映

- 特徴**
- ・ヒト用に生産プロセス最適化(高品質化)
 - (期待される成果) ・活性物質特定と評価法確立(ヒト用製品/高機能化)
 - ・機能解明とヒト有効性検証(用途拡大,知財権確保)

(3) 実施内容及び目標

研究開発では、各サブテーマごとに技術的目標値を設定した。

① 生物資源、生産プロセスの改良課題への対応（実施：株式会社牛越生理学研究所）

①-1 生産プロセスを最適化する為のフィルターろ過装置の開発

直径5ミクロン程度の不溶物・孢子除去が99%以上できるレベルのフィルターろ過装置を開発する。

①-2 生産プロセスの最適化

生理活性物質の含有量、生理活性を指標として生産プロセスを最適化する。生産プロセス全体を通じて100℃以下とし活性物質の高活性を維持できる処理法とする。生理活性脂肪酸（P様物質）等を指標として、従来品より高い活性を保持する発酵産物RU生産プロセスを確立する（脂肪酸リッチ製造法の確立、生産性向上2倍以上）。

② 有効成分特定等によるヒト用を目的とする発酵製品の高機能化への対応（実施：株式会社牛越生理学研究所、国立研究開発法人産業技術総合研究所、学校法人麻布獣医学園）

②-1 メタボローム解析による生理活性物質の特定とその測定法の確立

生理活性脂肪酸（P様物質）等を特定し、その誘導体を含む関連分子を同定する。また、これらの含有量（ピーク高など）、生理活性を測定する系を構築し、品質管理方法を確立する。

②-2 トランスクリプトーム解析による関与遺伝子解明と評価系構築

リゾープス菌由来発酵産物RUまたはP様物質などの有効成分のHepG2細胞への添加刺激により変動する遺伝子を網羅的に解析した後、変動の大きい遺伝子群を約10個に絞り込み、これらのレポーターアッセイ用のプラスミドをそれぞれ構築し、遺伝子発現制御を解析する。また、これら約10個の遺伝子のリアルタイムPCRによる定量的発現解析を行う。これらにより、生産プロセスを最適化、品質管理できるレベルの評価系構築を行い、有意な変動値以上の効果等といった基準値を定める。

②-3 ヒトに対する安全性評価

最適化した製造方法で生産した製品について、動物及びヒトに対する安全性評価を実施し、肝・腎機能検査、その他の生化学検査、血液検査等に於いて健常人の基準値内等によりヒト食品レベルの安全性を証明する。

③ 機能性評価による科学的根拠付与と更年期障害等に於ける有効性検証への対応（実施：株式会社牛越生理学研究所、国立研究開発法人産業技術総合研究所、学校法人麻布獣医学園、学校法人片柳学園 東京工科大学）

③-1 分子レベルでの発酵生産物の有効性評価

新型RUのマウス個体や培養細胞に対する効果の検証を行う。マウス個体あるいは細胞による育毛養毛あるいはホルモン関連安定化といった評価試験に於いて、②-2で定める基準値以上の効果を示す。

③-2 新型発酵産物RUが機能制御する細胞に於けるシグナル伝達系の解析

細胞内シグナル伝達系として、MAPキナーゼ系及びSmad系に関連する細胞内情報伝達因子のうち、約15種類についてリアルタイムPCRによる定量的発現解析を行う。mRNA変動の見られた因子についてはウエスタンブロット法によるタンパク発現解析等により新型発酵産物RUの生理活性物質の機能性評価を行い、ホルモン安定性等の機能性について科学的根拠を示す。

③-3 ヒトに対する有効性評価

最適化した製造方法で生産した製品について、ヒトに対する更年期障害等(ホットフラッシュ低減を指標)の有効性評価を実施し、有効性を証明する。

④ プロジェクトの管理・運営（実施：公益財団法人千葉県産業振興センター）

④-1 事業管理機関・公益財団法人千葉県産業振興センターにおいて、本プロジェクトの管理を行う。プロジェクトの研究経緯と成果について取りまとめ、成果報告書1部及び電子媒体（CD-ROM）一式を作成する。

④-2 本研究の実用化に向けた到達の度合いを検証するとともに、事業化に向けての課題等について研究実施者と調整を行う。

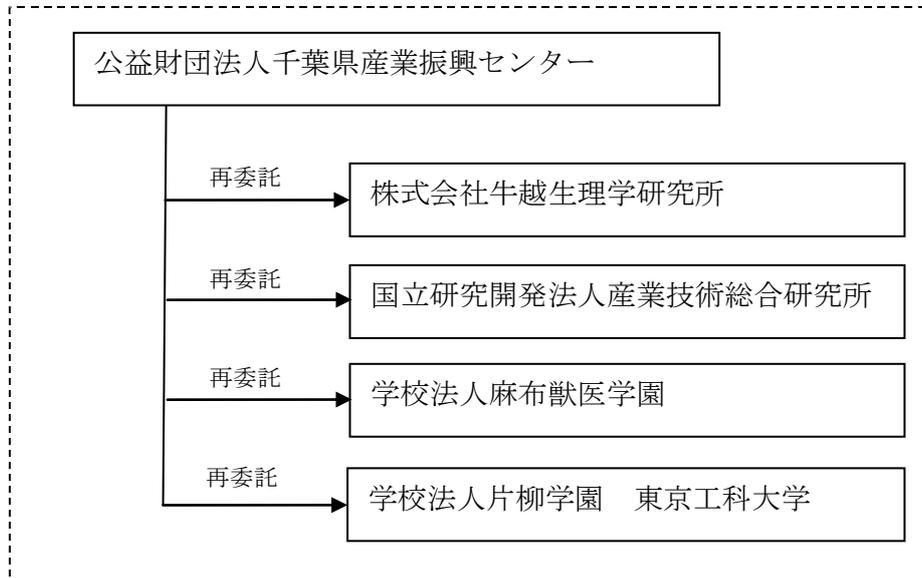
④-3 再委託先事業者が作成する証憑書類について、指導・確認を行う。

④-4 研究開発推進委員会を委託契約期間内に4回程度開催する。

1-2 研究体制

(1) 研究組織及び管理体制

1) 研究組織（全体）



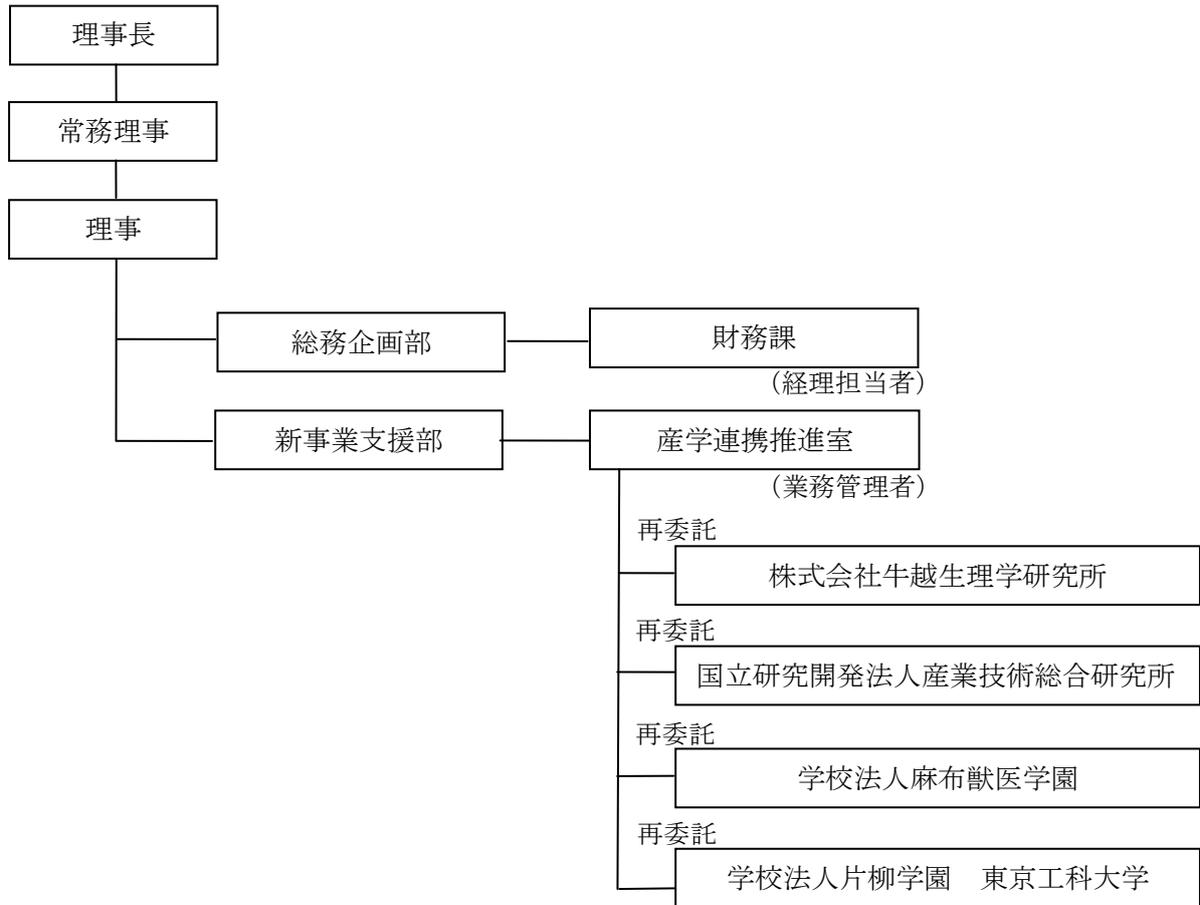
総括研究代表者（PL）
株式会社牛越生理学研究所
代表取締役 牛越 設男

副総括研究代表者（SL）
学校法人片柳学園 東京工科大学
応用生物学部 細胞制御研究室
教授 今村 亨

2) 管理体制

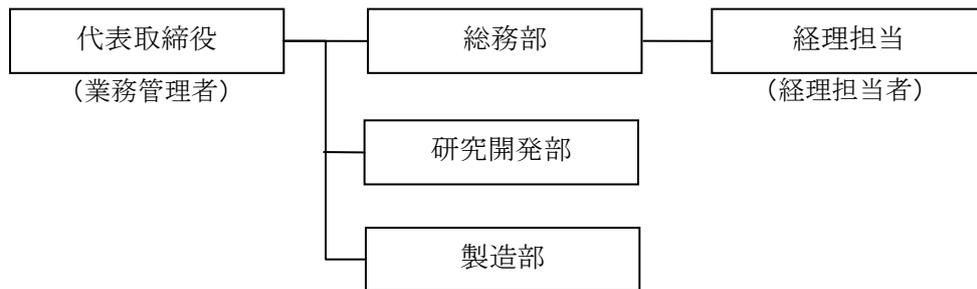
①事業管理機関

[公益財団法人千葉県産業振興センター]



②再委託先

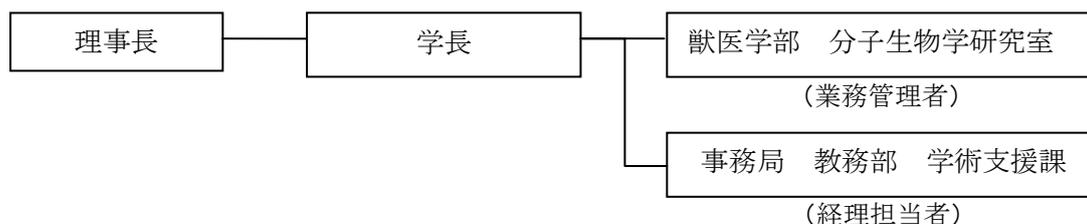
[株式会社牛越生理学研究所]



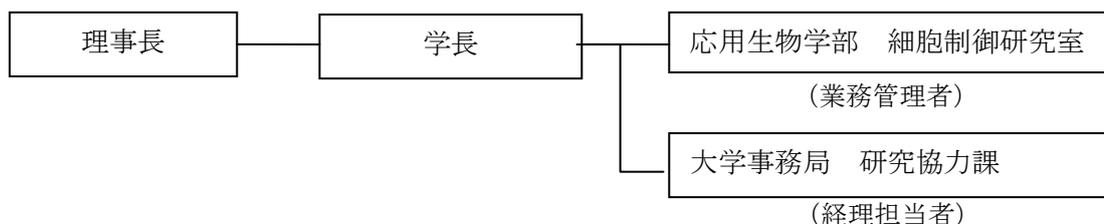
[国立研究開発法人産業技術総合研究所]



[学校法人麻布獣医学園]



[学校法人片柳学園 東京工科大学]



(2) 研究員及びプロジェクト管理員 (実施内容(番号)は1-1 (3) 項参照)

【事業管理者】 公益財団法人千葉県産業振興センター

①管理員

氏名	所属・役職	実施内容 (番号)
木村 雅昭 (平成 27 年度)	新事業支援部 産学連携推進室 研究開発コーディネーター	④
富岡 登 (平成 25, 26 年度)	新事業支援部 産学連携推進室 研究開発コーディネーター	④
西海 みどり	新事業支援部 産学連携推進室 専任主事	④
中島 まどか (平成 25 年度)	新事業支援部 産学連携推進室 専任主事	④
鶴岡 俊幸 (平成 27 年度)	新事業支援部 産学連携推進室 副室長	④
齊藤 重光 (平成 25, 26 年度)	新事業支援部 産学連携推進室 副室長	④
長島 智	新事業支援部 産学連携推進室 研究開発コーディネーター	④
横山 直也	新事業支援部 産学連携推進室 研究開発コーディネーター	④
市橋 俊彦 (平成 27 年度)	新事業支援部 産学連携推進室 研究開発コーディネーター	④
田畑 靖司 (平成 27 年度)	新事業支援部 産学連携推進室 研究開発コーディネーター	④

【再委託先】

①研究員

株式会社牛越生理学研究所

氏名	所属・役職	実施内容 (番号)
牛越 設男	代表取締役	①②③
牛越 建治	専務取締役	①②③
牛越 康一郎	研究開発部 部長	①②③
小檜山 幸平	研究開発部	①②③
倉持 明子	研究開発部	①②③
上原 ゆり子	研究開発部	①②③
行方 保次	製造部	①②③
窪谷 静夫	製造部	①②③

国立研究開発法人産業技術総合研究所

氏名	所属・役職	実施内容 (番号)
浅田 眞弘	創薬基盤研究部門 主任研究員	②③
鈴木 理	創薬基盤研究部門 副研究部門長	②③
隠岐 潤子	創薬基盤研究部門 第2号契約職員 (テクニカルスタッフ)	②③

学校法人麻布獣医学園

氏名	所属・役職	実施内容 (番号)
村上 賢	麻布大学 獣医学部 分子生物学研究室 教授	②③
下河 史枝	麻布大学 獣医学部 分子生物学研究室 研究補助員	②③

学校法人片柳学園

氏名	所属・役職	実施内容 (番号)
今村 亨	東京工科大学 応用生物学部 細胞制御研究室 教授	③

(3) 他からの指導・協力者

表1-2-1に示す委員、アドバイザー（指導・協力者）が参加する委員会を適宜開催した。

表1-2-1

氏名	所属・役職	備考
牛越 設男	株式会社牛越生理学研究所 代表取締役	P L
今村 亨	学校法人片柳学園 東京工科大学 応用生物学部 細胞制御研究室 教授	S L
牛越 建治	株式会社牛越生理学研究所 専務取締役	
牛越 康一郎	株式会社牛越生理学研究所 研究開発部 部長	
小檜山 幸平	株式会社牛越生理学研究所 研究開発部	
倉持 明子	株式会社牛越生理学研究所 研究開発部	
上原 ゆり子	株式会社牛越生理学研究所 研究開発部	
行方 保次	株式会社牛越生理学研究所 製造部	
窪谷 静夫	株式会社牛越生理学研究所 製造部	
浅田 眞弘	国立研究開発法人産業技術総合研究所 創薬基盤研究部門 主任研究員	
鈴木 理	国立研究開発法人産業技術総合研究所 創薬基盤研究部門 副研究部門長	
村上 賢	学校法人麻布獣医学園 麻布大学 獣医学部 分子生物学研究室 教授	
岡崎 孝映	公益財団法人かずさDNA研究所 先端研究部 細胞工学研究室 主任研究員	アドバイザー
宮城 淳 (平成26, 27年度)	千葉県産業支援技術研究所 食品・バイオ応用室 主席研究員	アドバイザー
井原 直 (平成25年度)	千葉県産業支援技術研究所 食品・バイオ応用室	アドバイザー
石原 茂正	株式会社常磐植物化学研究所 取締役品質保証室長	アドバイザー
嶋田 典基	株式会社常磐植物化学研究所 品質管理部リーダー	アドバイザー
小畷 正聖	富士産業株式会社 取締役 企画室長 ウェルベスト事業部長	アドバイザー
高野 慎哉 (平成26, 27年度)	日本全薬工業株式会社 研究開発本部 開発部 開発企画チーム チームリーダー	アドバイザー
北田 誠 (平成25年度)	日本全薬工業株式会社 執行役員 国際本部 企画部長	アドバイザー
丸山 進 (平成25年度)	独立行政法人産業技術総合研究所 イノベーション推進本部 産学官連携推進部	アドバイザー

(注) P L : Project Leader、S L : Sub Leader

1-3 成果概要

① 生物資源、生産プロセスの改良課題への対応

①-1 生産プロセスを最適化するためのフィルターろ過装置の開発

ろ過速度の向上を目指したろ過前処理装置を組み込んだフィルターろ過システムにより、直径 5 μ m 程度の不溶物・胞子除去が 99%以上 (99.4%) を達成し、フィルターろ過システムが完成した。

①-2 生産プロセスの最適化

ろ過前処理装置を組み込んだフィルターろ過装置システムを用いて生産プロセスの最適化を試み、生理活性脂肪酸 (P 様物質) の含有量や生理活性を指標とし、活性物質の高活性を維持できる生産プロセスの最適化を行った。

② 有効成分特定等によるヒト用を目的とする発酵製品の高機能化への対応

②-1 メタボローム解析による生理活性物質の特定とその測定法の確立

液体クロマト質量分析計 (LC-Orbitrap-MS) による解析で、生理活性脂肪酸 (P 様物質) やその誘導体を含む関連分子の分析を行った。更に、生理活性の測定系構築と品質管理法の確立を目指した検討を実施した。

培養細胞を用いて、細胞内シグナル、MAPK のリン酸化を検出することで、RU の活性検出が可能となった。RU 至適濃度は 0.5%程度であり、刺激時間は 30 分の条件で活性の定量が可能である。RU の活性については、P 様物質の活性と比較すると、それ以外の作用も含まれることが示唆された。

②-2 トランスクリプトーム解析による関与遺伝子解明と評価系構築

HepG2 細胞によるトランスクリプトーム解析より、CYP1A1 遺伝子は、RU の濃度依存的に発現を増加した。CYP1A1 について、レポーターアッセイ構築により、転写レベルでも促進することを確認し、生産プロセスの最適化、品質管理できるレベルの評価系の構築と基準値設定を完了した

②-3 ヒトに対する安全性評価

RU のヒトに対する有効性 (③-3) と共に安全性評価を実施した。

③ 機能性評価による科学的根拠付与と更年期障害等における有効性検証への対応

③-1 分子レベルでの発酵生産物の有効性評価

RU 経口投与によるマウス個体に対する活性評価法の確立を目指し、RU 投与後の腸内細菌叢の変化を検討することを目的として、糞を採取後菌叢の DNA 解析を行い、評価する試験系を整備した。

組織由来の異なる培養細胞株を用いて、RU 添加による遺伝子発現を評価した。

⇒HUVEC 細胞 (ヒト正常血管内皮細胞) において、RU 刺激による Apelin 遺伝子 (ホットフラッシュ関連遺伝子の一つ) の発現増加は認められなかった。

⇒HepG2 細胞において、エストロゲン作用を評価するレポーターアッセイ系を構築した。本評価系での RU よるエストロゲン作用は認められなかった。

⇒MCF7 細胞 (ヒト乳癌由来細胞) において、RU 刺激によりアロマターゼ遺伝子プロモーター領域の発現が増加した。

⇒マクロファージ系細胞である RAW264.7 及び J774 細胞において、RU 刺激により免疫サイトカインである IL6、COX2、TNF α 遺伝子の発現が増加した。

⇒HepG2 細胞を用いた CYP1A1 レポーターアッセイ系では、RU の活性成分として同定された P 様物質（または類似物質）は、RU のような転写活性促進反応を示さなかった。

③-2 新型発酵産物 RU が機能制御する細胞におけるシグナル伝達系の解析

（研究目標：MAP キナーゼ系及び Smad 系に関連する細胞内情報伝達因子のリアルタイム PCR による定量的発現解析法を確立し、タンパク発現解析等も含め、生理活性物質の機能性評価）

MAP キナーゼ系及び Smad 系に関連する細胞内情報伝達因子の約 10 種類についてリアルタイム PCR による定量的発現解析を実施した。また、CYP1A1 遺伝子発現制御機序を探索した。

⇒RU によって変動する遺伝子として Smad6 に絞り込み、定量的発現評価系構築を完了した。

⇒CYP1A1 プロモーター解析により、RU による応答領域の特定を試み、XRE 領域以外にも重要な応答領域があることを示した。

⇒RU は Arylhydrocarbon receptor (AhR) のアゴニストである 3-メチルコラントレン (MC) とは異なる作用機序で CYP1A1 を増加させる可能性を示した。

③-3 ヒトに対する有効性評価

新製法による RU 試料を用いて、ヒトに対する安全性、有効性試験：更年期症状を有する女性に対する安全性・有効性を検討した。

⇒安全性評価：試験品摂取と関連がある有害事象は認められず、臨床検査値についても、試験群、プラセボ群ともに特異的な変動は認められなかった。

⇒有効性評価：クッパーマン更年期指数による評価で、トータルスコア、血管運動神経障害症状、ゆううつ、頭痛などの項目において有意な改善が認められた。

* 特許出願： 1 件

* 外部発表： 4 件

1-4 当該研究開発の連絡窓口

(1) 研究者

所 属：株式会社牛越生理学研究所
役職・氏名：代表取締役 牛越 設男
連絡先：TEL:043-485-2324 FAX:043-485-6643
E-mail : ru-ushikoshi@ushikoshi.com

(2) 事業管理者

所 属：公益財団法人千葉県産業振興センター
役職・氏名：研究開発コーディネーター 木村雅昭
連絡先：TEL:047-426-9200 FAX:047-426-9044
E-mail : m-kimura@ccjc-net.or.jp

第2章 本論

本事業「生理活性物質特定と作用メカニズム解析による生産プロセス最適化と発酵産物高機能化に寄与する技術開発」は、図2-1に示すプロジェクト概要及び実施体制、図2-2に示す研究開発概要に基づいて実施された。

プロジェクトの概要及び実施体制

プロジェクトの概要

- 健康社会(健康立国)に向けて、ヒト健康食品産業では更年期障害に関わる商品開発ニーズがある。
- 動物用リゾープス菌発酵生産物(現製品)のヒト用健康補助食品(サプリメント)へ転換を目指した高品質化を実現するために、オミックス解析により生理活性物質特定や機能解明を行い、それらを指標として生産プロセスを改良し高度化を図る。
- 高機能化と安全性・有効性を担保できる製造技術を確立し、川下企業の用途拡大ニーズに応える。
- 今年度の研究開発では、生理活性物質の含有量、生理活性を指標とした生産プロセスの最適化を確立し、そのために必要となる生理活性脂肪酸等の特定とその知的財産化検討並びに評価方法の確立及び分子レベルでの機能性評価とヒト有効性評価に関わる開発を行う。

実施体制

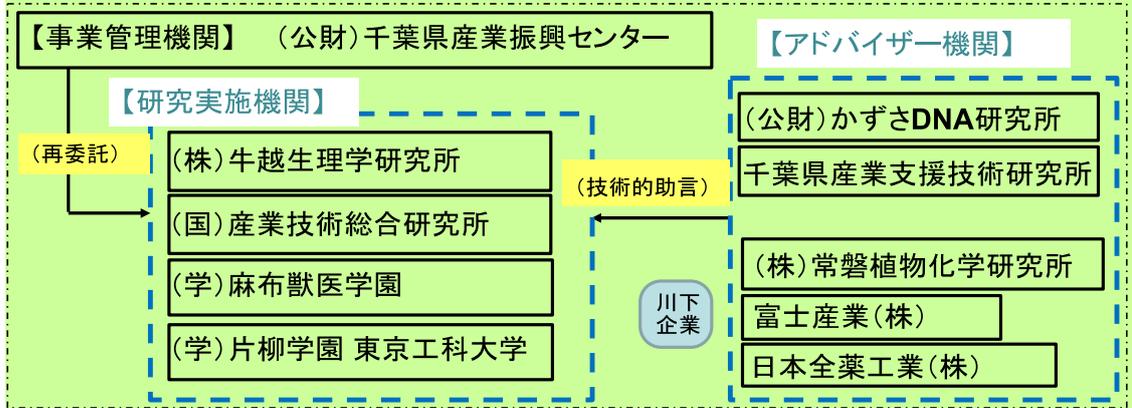
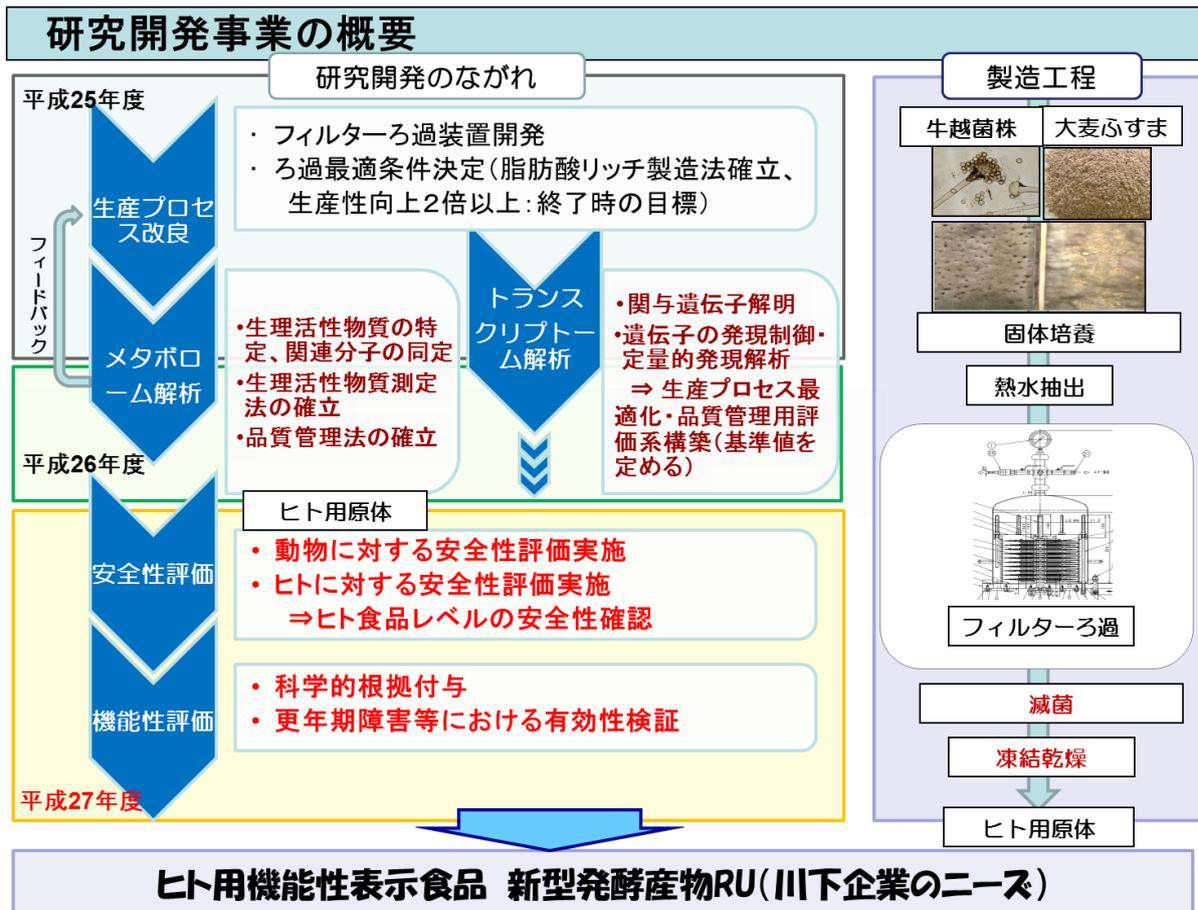


図2-1 プロジェクトの概要及び実施体制



ヒト用機能性表示食品 新型発酵産物RU(川下企業のニース)

図 2 - 2 研究開発事業の概要

○新技術を実現するために解決すべき研究課題について

「高度化指針」に定められた高度化目標に対応した研究課題（サブテーマ）とその解決方法を下記に示した。

① 生物資源、生産プロセスの改良課題への対応

フィルターろ過装置開発による不溶物・胞子をマイルドな条件で除去、脂肪酸等の生理活性物質の高活性を保持できる低温での病原微生物不活化法の確立、及び非通気式固体培養法を用いた発酵工程の最適化を行う。

ろ過前処理装置を組み込んだフィルターろ過装置のシステムを用いて、生理活性脂肪酸の含有量や生理活性を指標とした生産プロセスの最適化を行う。（事業終了までの目標値：脂肪酸リッチ製造法の確立、生産性向上2倍以上）。

② 有効成分特定等によるヒト用を目的とする発酵製品の高機能化への対応

メタボローム解析の結果をさらに解析して、生理活性脂肪酸やその誘導体を含む関連分子の特定を試み、それらの含有量等から、生理活性測定系を構築し、品質管理方法を確立する。また、トランスクリプトーム解析から発現変動する遺伝子解明とそれを利用した生産プロセスの最適化、品質管理できるレベルの評価系の構築と基準値設定を完了する。最適化した製造方法で生産した製品について、ヒトに対する安全性評価を実施する。その結果から、知的財産化の検討を行う。

③ 機能性評価による科学的根拠付与と更年期障害等に於ける有効性検証への対応

マウス個体や肝臓由来細胞、ヒト正常血管内皮細胞に対する活性評価法の確立、MAP キナーゼ系及び Smad 系に関連する細胞内情報伝達因子のリアルタイム PCR による定量的発現解析法を確立し、タンパク発現解析等も含めた検討により新型発酵産物 RU の生理活性物質の機能性評価を行う。そして、最適化した製造方法で生産した製品について、更年期障害等（ホットフラッシュ低減を指標）といったヒトに対する有効性を検証する。

2-1 生物資源、生産プロセスの改良課題への対応

サブテーマ①-1 生産プロセスを最適化するためのフィルターろ過装置の開発

サブテーマ①-2 生産プロセスの最適化

(1) 研究開発の概要

サブテーマ①-1 では、試作したフィルターろ過装置のろ過速度の向上を目指し、ろ過前処理装置を組込んだフィルターろ過システムの試作を行い、システム全体としてろ過速度の向上を図った。これにより、不溶物・孢子除去が99%以上となりフィルターろ過システム全体としての完成度を高めた。

サブテーマ①-2 では、ろ過前処理装置を組込んだフィルターろ過装置のシステムを用いて、生理活性脂肪酸（P 様物質）の含有量や生理活性を指標とした生産プロセスの最適化を行った。活性物質の高活性を維持できる処理法を検討し、滅菌処理の条件についても検討し、生理活性脂肪酸（P 様物質）含有量の増加を実現した。

(2) 研究開発の詳細

【サブテーマ①-1 生産プロセスを最適化するためのフィルターろ過装置の開発】

生産プロセスを最適化するためのフィルターろ過装置の開発は度完了し、フィルターろ過装置のろ過速度の向上を目指し、ろ過前処理装置を組込んだフィルターろ過システムにより、直径 $5\mu\text{m}$ 程度の不溶物・孢子除去99%以上を達成した。これにより、フィルターろ過システムが完成し、当初の研究目標を完全に達成した。



図2-1-1 フィルターろ過装置（右）および溜液タンク（左）

【サブテーマ①-2 生産プロセスの最適化】

図2-1-1に示したろ過前処理装置を組み込んだフィルターろ過装置のシステムを用いて、生理活性脂肪酸の含有量や生理活性を指標とした生産プロセスの最適化を検討した。抽出時間及び温度、ろ過時の圧力及び温度、濃縮工程、滅菌温度及び時間などの詳細な検討を行い、サンプル液中の生理活性物質の含量は、1.63倍に増加した。また、CYP1A1 レポーターアッセイ系による比活性評価では約2倍（1.93倍）の含量を達成した。

2-2 有効成分特定等によるヒト用を目的とする発酵製品の高機能化への対応

サブテーマ②-1 メタボローム解析による生理活性物質の特定とその測定法の確立

サブテーマ②-2 トランスクリプトーム解析による関与遺伝子解明と評価系構築

サブテーマ②-3 ヒトに対する安全性評価

(1) 研究開発の概要

サブテーマ②-1 では、メタボローム解析の詳細な解析を行い、生理活性脂肪酸（P様物質）やその誘導体を含む関連分子の特定を試みた。その結果から、知的財産化の検討を行い、また、それらの含有量（ピーク高等）等から、生理活性の測定系を構築し、品質管理方法の確立を目指した検討を実施した。

その結果、培養細胞を用いて細胞内シグナル（MAPK のリン酸化）を検出することで、RUの活性検出が可能となり、RUの至適濃度は0.5%程度、刺激時間は30分（～120分）の条件で活性の定量が可能であった。RUの活性については、標準のP様物質単独の活性と比較すると、それ以外の作用も含まれることが示唆された。

サブテーマ②-2 では、リゾープス菌由来発酵産物RUや生理活性脂肪酸（P様物質）等の有効成分のHepG2細胞への添加刺激により発現変動する遺伝子解明とそれを利用した生産プロセスの最適化、品質管理できるレベルの評価系の構築と基準値設定について検討を行った。

これにより、RUの濃度依存的に遺伝子発現が増加する代表的遺伝子はCYP1A1であり、タンパク量においても濃度依存的に増加することを確認した。また、CYP1A1のレポーターアッセイ系を構築し、何れの系も品質管理できるレベルの評価系として確立できた。

サブテーマ②-3 では、最適化した製造方法で生産した製品について、ヒトに対する安全性評価を実施した（ヒトに対する安全性評価はヒトに対する有効性評価と共に③-3に一括して記述した）。

動物に対する安全性評価は、マウスの急性経口投与毒性において、RUの経口投与による概算のLD50値は雌雄ともに2000mg/10mL/kg以上（ヒト想定投与量は、2mg/kg）であった。また、投与後14日目の剖検で、各臓器に異常な所見は認められなかった。

(2) 研究開発の詳細

【サブテーマ②-1 メタボローム解析による生理活性物質の特定とその測定法の確立】

<生理活性物質特定及び生理活性物質測定法の確立>

これまでの研究により、RU に含有される生理活性物質として、「生理活性脂肪酸（P 様物質）」が候補とされた。そこで、この P 様物質に着目した生理活性評価系の構築を図った。

RU に対し逆相カラムを用いてカラムクロマト分離・分画を実施し、得られた画分について MS 分析及び ELISA 測定を行った結果を示した。P 様物質は、脂溶性画分に主要なピークとして検出された。

液体クロマト質量分析計（LC-Orbitrap-MS）による解析で、関連分子の分析（メタボローム解析）を実施し、活性成分のひとつを同定した。ELISA を用いた定量系を確立し、その受容体を発現する細胞の細胞内シグナルを指標として、活性評価系を確立した。これらの結果より、上記定量系と活性評価系を活用し、品質管理の基盤を構築した。RU の活性については、標準の P 様物質単独の活性と比較すると、それ以外の作用も含まれることが示唆された *in vitro* で MAPK のリン酸化の比較的簡便な RU の生理活性を評価する方法を確立することができた。

<メタボローム解析>

RU を逆相カラムクロマトグラフィーによって分画し、MS 解析や ELISA 測定によって、P 様物質の含量評価を行った。図 2-2-3 に、かずさ DNA 研究所における MS 解析法を用いた、P 様物質の検出とピーク高による含量評価方法を示した。

化合物の網羅的検出システム(かずさDNA研究所)

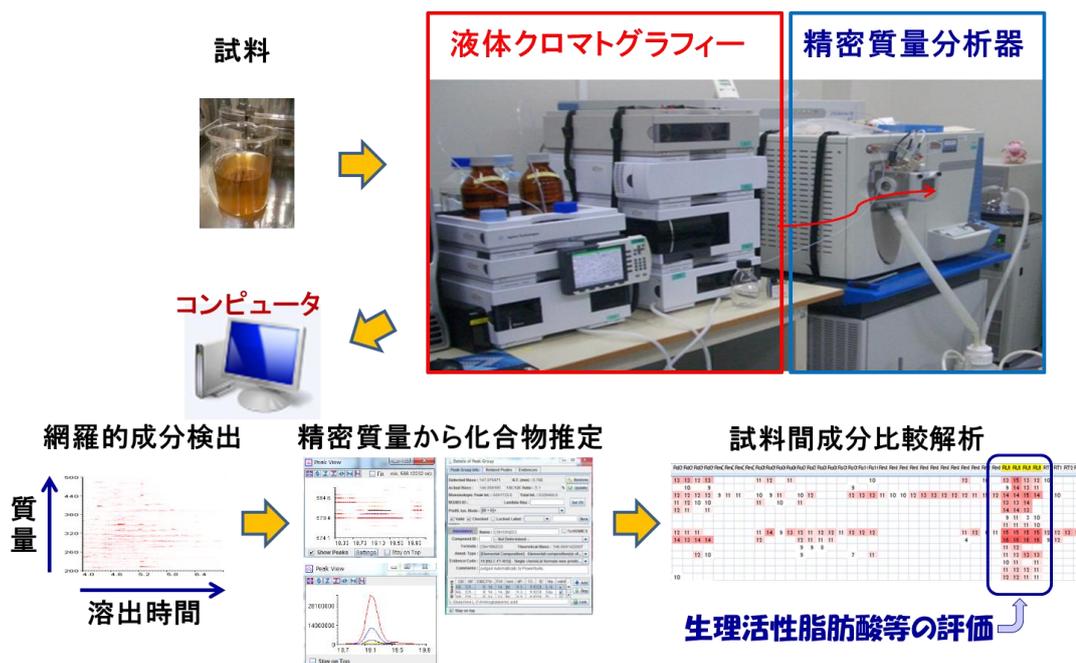


図 2-2-3 かずさ DNA 研究所における検出方法

【サブテーマ②-2 トランスクリプトーム解析による関与遺伝子解明と評価系構築】

ヒト由来肝細胞株 HepG2 細胞において、RU 濃度依存的に変動する代表的遺伝子 CYP1A1 の発現量変化を検討した。ウェスタンブロット法によるタンパク量発現においても、同様に RU 濃度依存的に発現量が増加することを確認した。転写レベルでの発現を評価する CYP1A1 のレポーターアッセイ系を構築し、RU の品質管理できる評価系として確立した。レポーターアッセイ系では、ルシフェラーゼの発光を指標としており、細胞から RNA を抽出して逆転写反応を行うなどの煩雑な作業をすることなく、転写レ

ベルでの制御を感度よく測定、評価できた。その系を用いて、新製法により作製した RU サンプルの活性を測定したところ、CYP1A1 遺伝子発現活性が 1.93 倍（約 2 倍）であることを確認した。

【サブテーマ②-3 ヒトに対する安全性評価】

最適化した製造方法で生産した製品について、動物に対する安全性評価としてマウスによる急性経口投与毒性試験を実施した。

試験はハムリー株式会社へ委託して行った。7 週齢の雄性 Balb/c マウス（雄 10 匹、雌 10 匹×2 群）RU 2000mg/kg 投与群と対照群に設定し、両性マウスによる急性経口投与毒性試験を行った。RU の経口投与による概算の LD50 値は雌雄ともに 2000 mg/10mL/kg 以上（ヒト想定投与量は、2mg/kg）であった。また、投与後 14 日目の剖検では、各臓器に異常な所見は認められなかった。

ヒトに対する安全性評価はヒトに対する有効性評価と共に③-3 に一括して記述した。

2-3 機能性評価による科学的根拠付与と更年期障害等における有効性検証への対応

サブテーマ③-1 分子レベルでの発酵生産物の有効性評価

サブテーマ③-2 新型発酵産物 RU が機能制御する細胞におけるシグナル伝達系の解析

サブテーマ③-3 ヒトに対する有効性評価

(1) 研究開発の概要

サブテーマ③-1 では、新型発酵産物 RU 添加によるマウス個体における活性評価の確立や RU による各種細胞株における遺伝子発現活性評価を行った。

マウスを用いた有効性評価法の検討：RU 経口投与によるマウス個体に対する活性評価法の確立を目指し、RU 投与後の腸内細菌叢の変化を検討する評価系を整備した。網羅的・定量的な解析には、より多くのクローンを解析する必要があるが、系の確立は完了した。

細胞を用いた有効性評価法の検討：HUVEC 細胞（ヒト正常血管内皮細胞）、ヒト乳がん由来細胞（MCF-7 細胞）、マウスマクロファージ由来細胞（RAW264.7 細胞、J774 細胞）、ヒト肝臓細胞（HepG2 細胞）を用いて、新製法 RU の生理活性及びその作用機序解析のための評価試験系の整備を行った。

サブテーマ③-2 では、細胞内シグナル伝達系として、MAP キナーゼ系及び Smad 系に関連する細胞内情報伝達因子のリアルタイム PCR による定量的発現解析法を確立し、タンパク発現解析等も含めた検討により新型発酵産物 RU の生理活性物質の機能性評価を行った。

HepG2 細胞を用いたレポーターアッセイ系にて RU が応答する CYP1A1 プロモーター領域の解析を行った。

サブテーマ③-3 では、最適化した新製法で生産した試料を用いて、サブテーマ②-3 ヒトに対する安全性に対する安全性の検討も含め、更年期障害等（ホットフラッシュ低減を指標）といったヒトに対する有効性を検証した。有効性評価の検討において、クッパーマン更年期指数による評価で、トータルスコア、血管運動神経障害症状、ゆ

ううつ、頭痛などの項目において有意な改善が認められた。安全性評価の検討において、試験品摂取と関連がある有害事象は認められず、臨床検査値についても、試験群、プラセボ群ともに特異的な変動は認められなかった。

(2) 研究開発の詳細

【サブテーマ③-1 分子レベルでの発酵生産物の有効性評価】

<マウスを用いた有効性評価法の検討>

産業技術総合研究所において、4系統のマウス、雄雌それぞれに、8週間、RUを連続投与し、マウス個体に対する活性評価法の確立を目指し、RU投与後の腸内細菌叢の変化を検討することを目的として、投与した群の糞便を採取後、菌叢のDNA解析を行い、評価する試験系を整備した。網羅的・定量的な解析には、より多くのクローンを解析する必要がある。

<細胞を用いた有効性評価法の検討>

麻布大学において、HUVEC細胞、MCF-7細胞、RAW264.7細胞、J774細胞、HepG2細胞における新製法RUの生理活性及びその作用機序解析のための評価試験系の整備を行った。

HUVEC細胞において、RU刺激によるApelin遺伝子（ホットフラッシュ関連遺伝子の一つ）の発現増加は認められなかった。MCF-7細胞においては、RUによるアロマターゼ遺伝子プロモーター領域（p1.3: Exon1）の発現が増加した。

RAW264.7細胞及びJ774細胞において、RU刺激により免疫サイトカインであるIL6、COX2、TNF α 遺伝子の発現が増加した。

HepG2細胞においては、エストロゲン作用を評価するレポーターアッセイ系を構築し、RUによるエストロゲン作用を検討したが、本評価系でのRUによるエストロゲン作用は認められなかった。

HepG2細胞において、RUの活性成分として同定されたP様物質（類似物質）は、構築したHepG2細胞を用いたCYP1A1レポーターアッセイ系では、RUのような転写活性促進反応を示さなかった。

【サブテーマ③-2 新型発酵産物RUが機能制御する細胞におけるシグナル伝達系の解析】

麻布大学に於いて、RUが機能制御する細胞における細胞内シグナル伝達系として、MAPキナーゼ系及びSmad系に関連する細胞内情報伝達因子に注目し、約15種類のこれら遺伝子についてリアルタイムPCRによる定量的発現評価系の構築をし、HepG2細胞へのRU刺激におけるこれら遺伝子の定量的発現解析を実施した。その結果、Smad6の遺伝子発現変動が顕著であり、その遺伝子発現は24時間のRU刺激において濃度依存的に減少した。RUによって変動する遺伝子としてSmad6に絞り込み、定量的発現評価系構築を完了した。

HepG2細胞を用いたレポーターアッセイ系にてRUが応答するCYP1A1プロモーター領域の解析により、XRE領域以外に主要なRU応答領域があること、及び一般のAhRアゴニストとは異なる作用機序でRUはCYP1A1遺伝子発現を促進することが示唆された。CYP1A1プロモーター解析により、RUによる応答領域の特定を試み、XRE領域以外にも重要な応答領域があることを示した。また、RUはArylhydrocarbon receptor (AhR)のアゴニストである3-メチルコラントレン(MC)とは異なる作用機序でCYP1A1遺伝子発現を促進することが示唆された。

【サブテーマ③-3 ヒトに対する有効性評価】

最適化した製造方法で生産した製品について、更年期障害等（ホットフラッシュ低減を指標）といったヒトに対する有効性を検証するため、新製法によるRU試料を用いたヒトに対する安全性、有効性試験：更年期症状を有する女性に対する安全性・有効性を検討した。

安全性評価：試験品摂取と関連がある有害事象は認められず、臨床検査値についても、試験群、プラセボ群ともに特異的な変動は認められなかった。

有効性評価：クーパーマン更年期指数による評価で、トータルスコア、血管運動神経障害症状、ゆううつ、頭痛などの項目において有意な改善が認められた。

株式会社牛越生理学研究所の製造用菌株 (*Rhizopus oryzae* の 1 菌株) 由来発酵生産物 (RU) の活性物質を絞り込むことを目的とし、公益財団法人かずさ DNA 研究所における高分解能・高質量精度の液体クロマト質量分析計 (LC-Orbitrap-MS) を用いたメタボローム解析を実施した。その結果、RU にはホルモン誘導などに関わる生理活性脂肪酸関連物質のピークが複数含まれていた。その一部は、牛越製造用とは異なる 9 種のリゾプス菌株を用いた発酵産物では、明確に異なる挙動を示した。そこで、これら生理活性脂肪酸関連物質を指標として、製造法、品質管理を至適化し、ヒト健康補助食品への展開を目指した研究開発を行った。

研究開発は、①～③の研究課題及びそれぞれのサブテーマ毎に実施され、すべての目標が達成された。

①生産プロセスの最適化項目において、ろ過前処理装置を組み込んだフィルターろ過システムを開発し、孢子・粒子を 99.4%除去することに成功し、その後の処理工程の改善で高純度の発酵産物を得ることができ、生理活性物質含量 1.63 倍、比活性で 1.93 倍を達成した。

②有効成分特定等によるヒト用を目的とする発酵製品の高機能化への対応項目において、メタボローム解析を用いて、生理活性成分を 1 つ同定しその定量法を確立した。また、免疫学的方法及び培養細胞を利用した活性評価系を確立し、品質管理基盤を構築した。トランスクリプトーム解析による関与遺伝子解明と評価系構築では、RU の投与によって発現変動する遺伝子及びタンパク質を選択し、そのレポーターアッセイ系の構築により、RU の活性評価系を確立した。安全性評価については、マウスを用いた急性経口投与毒性試験を実施し、新製法 RU は十分に安全であることを示した。

③機能性評価による科学的根拠付与と更年期障害等における有効性検証項目において、分子レベルでの発酵生産物の有効性評価について、マウスにおける腸内細菌叢の変化を指標として個体における活性評価法を整備した。細胞を用いた有効性評価について、RU が制御するシグナル伝達系の解析から、細胞内情報伝達因子の遺伝子発現を定量解析する系を構築し、これらを対象とした RU の定量的評価系を構築した。作用機序については完全な解明には至っていないが、それを示唆する結果を得た。ヒトに対する有効性・安全性評価について、RU のヒトに対する臨床試験を実施した結果、RU の安全性が確認され、更年期症状に対して有意な改善効果を示した。

従来品と事業により達成した開発品のスペック比較を下記表にまとめた。

従来品と開発品のスペック比較

特徴	従来品	開発品
純度	低	高
品質管理	不可	可
動物実験結果	有	有
ヒト臨床試験結果	無	有

これらの成果をもとに特許出願を完了した。今後、保健機能食品 (特定保健用食品、機能性表示食品等) としての製品化及び事業化を進める基盤が十分に整った。

専門用語等の解説

1. 【リゾープス属菌】 微生物の一種であり、クモノスカビ属に分類される。酒や味噌などを生産物とする発酵では通常、麹菌を使うが、中国酒の製造やインドネシアでは、大豆発酵食品（テンペ）の製造に利用されている
2. 【RU】（株）牛越生理学研究所で開発された、リゾープス属菌の生産する生理活性物質を含む製品の名称。肉牛や乳牛を再生産するためには、効率よく繁殖させる必要があるが、飼育下での発情誘導や受胎率向上は困難な課題である。これに対し、RUを餌に混ぜると、発情を誘導し、受胎率が向上することが現場で知られている。その効果に関する学術論文もある。
3. 【生理活性脂肪酸（P様物質）】 代謝産物の網羅的な解析から低分子の化合物（主に二次代謝産物）を検出・比較解析することで、リゾープス属菌の生産する生理活性物質として、ホルモン誘導など生理活性に関わる生理活性脂肪酸（P様物質：秘匿する）の数ピークが検出された。その他にも、2，3種の生理活性物質が含まれていることが示された。
4. 【ヒト用健康補助食品（サプリメント）】 品質管理などの技術開発により、安全性、有効性、安定した品質を兼ね備える、有効成分の表示などにより高機能化が必要とされる。リゾープス菌発酵生産物RUについても、生理活性物質特定と作用メカニズム解析を実施し経済効果を示した上で訴求力ある製品開発が望まれている。平成27年4月より、機能性が表示できる食品（保健機能食品）として、特定健康食品及び栄養機能食品に加えて「機能性表示食品」制度が始まった。
5. 【オミックス解析】 オミックス(Omics)とは、ゲノム (Genomics) や蛋白質 (Proteomics) 、メタボロミクス (Metabolomics) などの生物データの「すべて」を集約し、解析する研究領域を言う。
6. 【メタボローム解析】 細胞の活動によって生じる特異的な分子（代謝産物）を網羅的に解析すること。メタボロームとは、ある生物の持つ全ての代謝産物（低分子の有機化合物からなる）を表わす。
7. 【トランスクリプトーム解析】 特定の細胞の活動状況下の細胞中に存在する全ての mRNA（トランスクリプト）を網羅的に解析すること。トランスクリプトームとはある細胞の持つ全ての転写産物を表わす。
8. 【シグナル伝達】 細胞によって、ある種のシグナルが別種のシグナルに変換される過程を繰り返して情報が伝達されること。細胞増殖等で細胞膜上の受容体に細胞外シグナル分子が結合し、細胞質中の因子が次々にシグナルを受け渡し、最終的には特定遺伝子の転写調節と細胞の変化などの効果をもたらす。
9. 【LC-Orbitrap-MS】 Orbitrap は、高周波や強磁場を必要としない、新しい原理に基づくイオントラップ型質量分析計で、高分解能（最大 10 万）と安定した質量精度が特徴。かずさ DNA 研究所で開発した植物・微生物由来メタボライト解析システムに基づいた分析・解析方法適用すると、代謝産物の網羅的な解析から低分子の化合物（主に二次代謝産物）を検出・比較解析、検出した化合物の分子式や構造の推定・予測が可能。

リサイクル適性 (A)

この印刷物は、印刷用の紙へ
リサイクルできます。