

平成 29 年度

戦略的基盤技術高度化・連携支援事業

戦略的基盤技術高度化支援事業

「多機能性天然素材ソホロリピッドの超分子形成技術による

高純度ソホロリピッドの開発」

研究開発成果等報告書

平成 30 年 5 月

担当局 近畿経済産業局

補助事業者 一般財団法人 大阪科学技術センター

目次

第1章	研究開発の概要	
1-1	研究開発の背景	2
1-2	研究目的および目標	2
1-3	研究体制	2
1-4	成果概要	3
1-5	当該研究開発の連絡窓口	4
第2章	ソホロリピッドの発酵生産および高度精製技術の確立	
2-1	ソホロリピッドの発酵生産	5
2-2	ソホロリピッドの高度精製技術の確立	5
第3章	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評価	6
3-2	3次元培養皮膚モデルを用いたソホロリピッドの刺激性試験	6
3-3	ヒトパッチテスト	6
第4章	多機能性ソホロリピッドの利用技術の確立	
4-1	高純度ソホロリピッドの乳化特性評価	7
4-2	高純度ソホロリピッドのゲル化特性評価	8
第5章	製剤開発	
5-1	クレンジング製剤の製剤化検討	10
5-2	化粧水製剤の製剤化検討	10
5-3	クリーム製剤の製剤化検討	10
5-4	3次元培養皮膚モデルを用いた安全性評価	10
第6章	研究開発後の課題・事業化展開	
6-1	高純度ソホロリピッドの可能性	12
6-2	事業化展開へ向けての現状と今後の課題	12
6-3	まとめ	12
参考文献		12

第1章 研究開発の概要

1-1 研究開発の背景

界面活性剤は、洗浄力や乳化能、あるいは他の成分との相乗効果を目的として様々な化粧品や医薬品に汎用される。一方、界面活性剤が皮膚に吸着し、残留して蓄積されると、皮膚タンパクの変性や乾燥化、ツッパリ感等の原因をもたらすことが知られている¹⁾。

微生物発酵によって生産される糖脂質型バイオサーファクタントであるソホロリピッド（以下、SL）は、親水部分（糖質；ソホロース）と疎水部分（脂肪酸；オレイン酸）から構成される²⁾。SLは、1) 石油由来の合成界面活性剤と同様に界面活性能を有し、2) より毒性が低いことが見出されている。さらに、3) 製造時に高温・高圧を必要としない。そのため、環境にもヒトにも優しい素材であり、次世代型界面活性剤として注目されている^{3),4)}。しかしながら、SLの発酵には微生物制御の工業技術や生産性の向上が求められている。また、粗精製SLは含水物として得られるが、不快な臭気や刺激の原因となる発酵副産物が含まれ、化粧品のように皮膚に塗布する商品では、その使用が制限されていた。

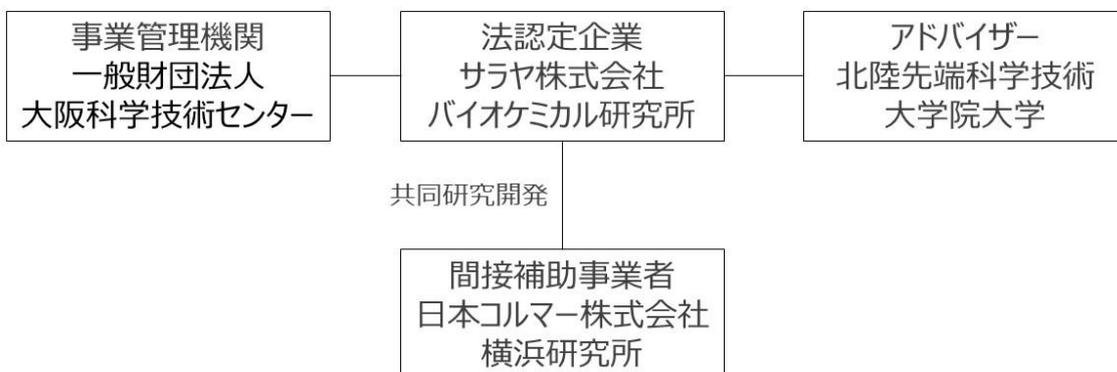
本事業では、多機能性を有するSLを利用したスキンケア製剤の開発を目指す。

1-2 研究目的および目標

従来までのSLは発酵副産物による不快な臭気や刺激性を有し、これらの発酵副産物を除去することは非常に困難であった。本事業では、発酵副産物とSLの精製技術を飛躍的に向上させ、純度95%以上の高度に精製したSL（以下、高純度SL）を85%以上で回収する。

得られた高純度SLの安全性評価および機能性評価を実施し、高純度SL配合した敏感肌向け化粧品を開発する。

1-3 研究体制



1-4 成果概要

1) ソホロリピッドの発酵生産および高度精製技術の確立

坂口フラスコおよび 5 L ジャーファーマンターを用いて、培地組成および培養条件を決定した。決定した条件で中間プラントの 30 L ジャーファーマンターで培養試験を行い、残留疎水性基質を抑制させることに成功した。

実機スケール (5 kL 培養) にスケールアップした結果、残留疎水性基質が 10%以下となり目標を達成した。また、含水 SL 生産量は 10%以上となり、現行と同等であった。その他の物性値もパスレベルをクリアし、目標をすべて達成した。

培養で得られた SL を加水分解した後、SL に含まれる発酵副産物 (臭気成分や色相成分) を除去するため、クロマト分離法を検討した。その結果、発酵副産物と SL を分離させる条件を決定し、発酵副産物を除去した純度 95%以上の高純度 SL を 90%で回収し、目標値を達成した。

2) 安全性評価

高純度 SL およびポリソルベート 80 の線維芽細胞に対する毒性評価を行った結果、高純度 SL の IC50 は外用剤などの医薬品添加物グレードのポリソルベート 80 の約 3 倍、注射剤用の医薬品添加物グレードの約 10 倍、食品添加物グレードの約 4 倍高かった。

3 次元培養皮膚モデルを用いた皮膚刺激性試験を実施した。高純度 SL は液性に関わらず生細胞率 50%以上であったことから、非刺激性と判断した。また、ヒトパッチ試験を実施した結果、高純度 SL は刺激性が低いことがわかった。

3) 多機能性ソホロリピッドの利用技術の確立

高純度 SL について、界面活性剤としての特性である乳化やゲル化特性について評価した。高純度 SL、各種油および水の三成分系処方では高圧乳化処理することで、乳化粒子径を小さく、乳化安定性や使用感の嗜好性が高い乳化物が得られた。

高純度 SL は偏光性構造体を形成することを確認され、この偏光構造体を荒れ肌に塗布すると、経皮水分蒸散量 (TEWL) および肌のキメが改善された。また、グリセリンと高純度 SL を混合した水溶液を皮膚に塗布し、それぞれの単独水溶液と比較すると水分量は高くなる傾向が認められた。グリセリン水溶液中に高純度 SL を配合するとグリセリンの保湿力を高める効果があることが示唆された。

4) 製剤開発

高純度 SL を利用したクレンジング剤、化粧水、乳液およびクリームの製剤化を検討し、それぞれのベース処方を決定した。それぞれの製剤については、皮膚刺激および防腐力を確認し、使用上問題ないと判断された。また、安定性についても、40℃、3 か月以上クリアし、目標を達成した。

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 荒木道陽

電話: 072-977-8000 / Fax: 072-977-2224

E-mail: araki-mc@saraya.com

第2章 ソホロリピッドの発酵生産および高度精製技術の確立

2-1 ソホロリピッドの発酵生産

高純度 SL は、従来の界面活性剤に比べ、100 倍以上の低毒性を有する。これを実現するには、残留疎水性基質を 10%以下に抑制する必要がある。

坂口フラスコを用いて、培地組成を決定した。残留疎水性基質を抑制するため、5 L ジャーファーマンターにて培養条件の検討を行い、条件を決定した。決定した条件で中間プラントの 30 L ジャーファーマンターで検証した結果、実機スケールでの生産が可能であり、残留疎水性基質が抑制された。これらの結果をもとに、実機スケールでの培養（5 kL 培養）を行い、残留疎水性基質が 10%以下となる培養方法を確立した。また、含水 SL 生産量は 10%以上となり、現行と同等であった。その他の物性値もパスレベルをクリアし、目標をすべて達成した。以上の結果から、実機スケールにおいても安定製造が可能であることがわかった。

2-2 ソホロリピッドの高度精製技術の確立

2-1 で得られた SL を加水分解した後、SL に含まれる発酵副産物（臭気成分や色相成分）を除去するため、ラボスケールでクロマト分離法を検討した。決定した条件にて、樹脂吸着塔にスケールアップした結果、ラボとの溶出挙動とほぼ同等であり、スケールアップに成功した。SL の回収率は目標の 90%を達成した。得られた高純度 SL の規格測定の結果、規格値を満たした。

第3章 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評価

各種被験物質（界面活性剤を含む培地）について、正常ヒト皮膚繊維芽細胞を用いた MTT アッセイを行い、細胞生存率を算出した。結果を表 1 に示す。高純度 SL の IC50 は外用剤などの医薬品添加物として使用されているポリソルベート 80 の約 3 倍、注射剤用の医薬品添加物として使用されているポリソルベート 80 の約 10 倍、食品添加物として使用されるポリソルベート 80 よりも約 4 倍高かった。この結果、正常ヒト皮膚繊維芽細胞において高純度 SL はこれら高い安全性を必要とされるポリソルベート 80 より、細胞毒性が低いことがわかった。

表 1 正常ヒト皮膚繊維芽細胞に対する各界面活性剤の IC50 および表面張力

原料名	グレード	IC50 (mg/L)
高純度 SL	化粧品原料	10,000<
粗精製 SL	化粧品原料	840
ポリソルベート 80	医薬品添加物 (外用剤などで使用)	5,650
	食品添加物	4,310
	医薬品添加物 (注射剤などで使用)	1,550

3-2 3次元培養皮膚モデルを用いたソホロリピッドの刺激性試験

高純度 SL の 3 次元培養皮膚モデルを用いた皮膚刺激性試験を実施した。この試験は OECD TG439 (*in vitro* 皮膚刺激性試験) に準拠しており、生細胞率 50%以上で非刺激性と判断される。

高純度 SL は液性に関わらず生細胞率 50%以上であったことから、非刺激性と判断した。

3-3 ヒトパッチテスト

ヒト皮膚刺激性試験結果を取得するため、高純度 SL のヒトパッチテストを実施した。

被検物質剥離 60 分後および剥離 24 時間後に、すべての被験者で陰性であった。高純度 SL は刺激性が低いことがわかった。

第4章 多機能性ソホロリピッドの利用技術の確立

4-1 高純度ソホロリピッドの乳化特性評価

4-1-1 攪拌力がソホロリピッドの乳化特性に及ぼす影響

高純度 SL/ホホバ油/水の処方系においてホモジナイザーによる乳化処理条件を変化させた時の乳化挙動について調べた。全ての乳化処理条件において乳化相が出現したが、試料調製直後より水相の分離が生じた。得られた乳化相は O/W 型タイプの挙動を示した。6500 rpm でホモジネートした場合、処理時間が長くなるにつれ乳化率が大きくなった。一方、9500 rpm の場合は時間に依存せず乳化率はほぼ一定であった。乳化率とマイクロスコープによる観察結果から、ホモジネートによる乳化処理においては 6500 rpm よりも 9500 rpm の方が適切であると思われる。

4-1-2 pH がソホロリピッドの乳化特性に及ぼす影響

高純度 SL/ホホバ油/水の処方系において乳化実験を行った。乳化処理時のホモジネート条件は 9500 rpm で1分間とした。処方の pH を 3.4、5.0、6.0、7.0 と変化させた。全ての試料で乳化相が出現したが、試料調製直後より水相の分離が生じた。得られた乳化相は O/W 型タイプであった。pH を 5.0、6.0、7.0 に調整すると pH3.4 と比べて乳化率が高くなった。乳化相をマイクロスコープで観察した結果、pH3.4 と pH5.0 以上の粒子形状に差異が認められた。pH5.0 では pH3.4 と同程度の大きさの粒子と共に数 10~数 100 μm 程度のさらに大きな粒子が現われ、pH6.0 と 7.0 では pH 未調整時の小さな粒子が消失し数 10~数 100 μm 程度の大きさの粒子のみが認められた。SL は pH に依存して乳化特性が変化することが示された。

4-1-3 ホモジナイザー乳化および高圧乳化法がソホロリピッドの乳化特性に及ぼす影響

高純度 SL/ホホバ油/水の処方系で乳化実験を行った。処方の pH は 3.5 あるいは pH7.1 とした。pH3.5 において乳化処理の方法をホモジナイザー法あるいは高圧乳化法と変えたところ、乳化方法によって得られる乳化粒子の大きさに差異が生じた。高圧乳化処理の方がホモジナイザー処理よりも小さな乳化粒子を得た。顕微鏡観察の結果、乳化粒子は全体的にブラウン運動するのを認めるほど微細粒子であった。しかしながら、試料はいずれも調製直後より分離が生じ、1日経過後には水相と油相の2相に分離した。

次に、pH7 に中和した処方について高圧乳化処理すると、pH 未中和時と同様にホモジナイザー処理よりも小さな粒子（粒子径約 200 nm）が観察されたが、本試料は pH3.5 の試料よりも乳化安定性が向上し試料調製1日後においても水相や油相の分離が起こらなかった。本試料を顕微鏡観察すると、粒子のブラウン運動が一部の領域で観察されるが他の領域は結晶状であった。これは乳化粒子を形成するのに必要な高純度 SL 量よりも過剰な量が添加されていると思われるため、高純度 SL 量を減らした処方系かつ pH7.1 で高圧乳化処理を行

った。顕微鏡観察の結果、全体にブラウン運動している状態が観察された。これらの結果から、ホホバ油を乳化させるのに最適な高純度 SL の量が分かり、乳化安定性の高い処方を見出した。

4-1-4 ソホロリピッド乳化物の粒子径と使用感との関連性について

高純度 SL/油/水の三成分系処方を異なる方法で乳化処理（高圧乳化処理あるいはホモジナイザー乳化）した試料について、使用感の差異を調査した。高圧乳化処理した試料の方がホモジナイザー処理の試料よりも「のびの良さ」、「なじみのよさ」、「べたつきのなさ」の使用感に優れることがわかった。高圧乳化処理により乳化粒子径を小さくすることは、乳化が安定化することのみならず、使用感の嗜好性向上にもつながり、高圧乳化処理法のメリットである。

4-2 高純度ソホロリピッドのゲル化特性評価

4-2-1 高純度ソホロリピッドのゲル形成能

高純度 SL、グリセリンおよびミネラルオイルの 3 成分でのゲル形成の可否を確認した。グリセリンに高純度 SL を加え、70~80℃まで加温して褐色透明の溶液を作製し、40~50℃まで冷却後、攪拌しながらミネラルオイルを少しずつ添加した。ミネラルオイルを添加していく段階でゲルを形成し、ある量以上はミネラルオイルが入らなくなり、分離状態となることがわかり、最適濃度を決定した。

4-2-2 各種ジオール系ポリオールに対するゲル形成能

グリセリンからジオール系ポリオールに変えていくつかの割合でゲル形成能を確認した。高純度 SL と化粧品に汎用的に使用されるジオール系ではゲル形成はしないことがわかった。また、グリセリンがメインであっても他のジオール系ポリオールが混入するとゲル形成はされないことがわかった。次いで、グリセリンでゲル形成させた後、ジオール系ポリオールを練り込んでゲルが維持するか確認した。高純度 SL、グリセリン及びミネラルオイルでゲルを作製後、各ジオール系ポリオールを加えて全体が均一になるまで混合した。一度ゲルが形成された後であれば、多少のジオール系ポリオールを練り込んでもやや粘度は下がるがゲルは維持されることがわかった。

4-2-3 ノニオン界面活性剤がゲル形成に及ぼす影響

ゲル形成後、ノニオン界面活性剤（5 種）を練り込んでゲルが維持するか確認した。すべての活性剤で、ゲルは崩壊して粘度が急激に低下しオイル油が分離した。一度ゲル化した系であっても後からノニオン系の界面活性剤を添加すると少量でも減粘が生じゲル崩壊、油が分離した。

4-2-4 ゲル化組成物の顕微鏡観察

表2に示す組成に基づき作製したオイルゲルを顕微鏡観察した（400倍観察）。1%高純度SLのゲルと3%のゲルでは、3%の方がより細かい粒子が集まってゲルを形成し、ゲルの安定性、粘度に寄与していると推察される。

表2 顕微鏡観察結果

組成	配合率 (%)	配合率 (%)
高純度 SL	1.0	3.0
グリセリン	50.0	50.0
ミネラルオイル	49.0	47.0
倍率：400倍		

第5章 製剤開発

5-1 クレンジング製剤の製剤化検討

高純度 SL の少量配合で非水ゲル形成能を形成する事を活かしたオイルクレンジングゲル処方の開発を目的とし、油性成分と保湿成分を配合したクレンジング製剤の製剤化検討を行った。そのクレンジング効果について敏感肌向けとして市場で販売されている製品と共に性能評価を行い、また肌に必要な成分は残しメイク汚れを落とすという選択的洗浄効果についても評価を行った。

クレンジング性能について、比較した敏感肌向け市場品よりも高い性能を示した。また選択的洗浄性効果についても確認することができた。高純度 SL を使用する事で少ない界面活性剤量で製剤化し低刺激性かつクレンジング力の高い処方を開発した。

5-2 化粧水製剤の製剤化検討

高純度 SL 水溶液をグリセリンと同時に皮膚に作用させると、保湿力が高まることが明らかになった。このことを踏まえて化粧水の処方を検討した。防腐成分の異なる数種類の処方を調製し 3 次元培養皮膚モデルを用いて安全性の評価を行った。その結果、より安全性の高い処方を決定した。

5-3 クリーム製剤の製剤化検討

高圧乳化処理における高純度 SL の乳化能について、医薬品にも利用される汎用的な界面活性剤およびその他既存のバイオサーファクタントについても同様に検討し、微細粒子形成能の比較を行った。また、高純度 SL を pH 中性領域で油と共に高圧乳化処理を行うことで微細粒子を形成することを利用し、保湿効果を実感でき使用感の良いクリーム製剤を開発することを目的とした。油性成分と保湿成分等を配合したクリームの製剤化検討を行い敏感肌向けとして市場で販売されている製品と共に使用感評価を行った。

高圧乳化処理における微粒子形成能の比較においてはその他のバイオサーファクタントよりも明らかに小さな粒子を安定的に形成し、医薬品にも利用される汎用的な界面活性剤との比較についても同等の微粒子形成能および同等以上の安定性を確認した。また、開発したクリーム製剤の使用感評価において、より使用感の良い評価を得る結果となる処方を開発した。

5-4 3次元培養皮膚モデルを用いた安全性評価

本事業における開発品は、低刺激であり肌が敏感な方にも安心して利用できる化粧品であることを特長としている。このことを確認するために、今回処方化した製剤の安全性を、より低刺激であることを検出できる方法で評価した。また、敏感肌訴求他社品の各製剤と比較することで、安全性を確認することを目的とした。

ヒトの皮膚の構造をもつ 3 次元培養皮膚モデルを用いて、安全性評価を行った。3 次元

【公開版】

培養皮膚モデルは通常モデルより角層が未熟なモデルを用いた。また、通常の皮膚刺激性試験より暴露時間を長くした過酷な試験条件で評価を行った。さらに、試料の暴露によって細胞が培地に分泌する炎症性サイトカインである IL-1 α 量を測定した。その結果、開発したクレンジング、化粧水およびクリームのいずれの製剤も細胞毒性はなく、IL-1 α も低い値であったことから、安全性が高いと判断された。

第6章 研究開発後の課題・事業化展開

6-1 高純度ソホロリピッドの可能性

微生物発酵によって生産される SL は、環境にもヒトにも優しい素材であり、次世代型界面活性剤として注目されていたが、SL の発酵には微生物制御の工業技術や生産性の向上が求められている。また、粗精製 SL は含水物として得られるが、不快な臭気や刺激の原因となる発酵副産物が含まれ、化粧品のように皮膚に塗布する商品では、その使用が制限されていた。本事業の検討の結果、高純度 SL の高品質で安定供給可能な精製プロセスを確立した。得られた高純度 SL の安全性について確認した結果、食品添加物および医薬品添加物として利用されるポリソルベート 80 よりも安全性が高いことがわかった。したがって、化粧品製剤にも配合可能となった。

6-2 事業化展開へ向けての現状と今後の課題

敏感肌化粧品の上市において、商品コンセプト、市場トレンド、販売チャネルについて調査している。当面の課題として、商品ラインナップの拡充、SL の医薬部外品新添加物申請および 4P 戦略の強化が必要である。

6-3 まとめ

本事業における研究開発により、化粧品用途の高純度 SL の量産化プロセスを構築し、高純度 SL の安全性が確認された。高純度 SL 含有化粧品（クレンジング、化粧水およびクリーム）の有効性および安全性を確認し、既存品よりも同等以上の試作品が完成した。高純度 SL 含有化粧品の社会実装に向け、実現可能性の高いプロジェクトを進めていく体制が構築された。

参考文献

- 1) 芋川玄爾, フレグランスジャーナル No. 74, 38~47 (1985)
- 2) Cooper, D. G. and Zajic, J. E. *Adv. Appl. Microbiol.*, 26, 229-253 (1980)
- 3) A.Fiechter, *Trends Biotechnol.*, Vol, 10, 208-217 (1992)
- 4) M.J. Brown *Int J Cosmet Sci.*, 13, 61, (1991)