

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

「麹菌および醤油醸造粕を原料とする新規製造技術を用いた  
アンチエイジング製剤とその配合食品の開発」

研究開発成果等報告書

平成30年5月

担当局 九州経済産業局  
補助事業者 公益財団法人福岡県産業・科学技術振興財団

## 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	3
1-2	研究体制	7
1-3	成果概要	7
	1-3-1 セラミド発酵技術の開発	
	1-3-2 抽出プロセスの構築	
	1-3-3 素材化技術の開発	
	1-3-4 安全性・機能性の評価	
1-4	当該研究開発の連絡窓口	10
第2章	本論	
2-1	セラミド発酵技術の開発	11
2-2	抽出プロセスの構築	14
2-3	素材化技術の開発	16
2-4	安全性・機能性の評価	22
最終章	全体総括	
3-1	研究開発成果の総括	26
3-2	研究開発後の課題と事業化展開	27

## 第1章 研究開発の概要

### 1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標

シニア世代の健康維持・増進やアンチエイジングに対するニーズの高まり、セルフメディケーションへの意識の高まりなどを背景に、アンチエイジング素材が注目されており、これらの機能性食品が今後の健康食品市場を牽引していくと予想される。しかし、現在食品分野で利用されている天然セラミドは高価な非ヒト型のセラミドで、腸管吸収性が低く、機能性に関する科学的エビデンスも不足している。

市場では、サプリメント等の食品とスキンケア製品の組み合わせによる「内外美容」関連商品が売り上げを伸ばしており、ヒアルロン酸やコラーゲン等の美容サプリメント及びドリンクは、2014年度に1,300億円にまで拡大するなど、今後も内外美容市場の成長が見込まれている（月刊 Diet & Beauty）。また、食品市場で利用されている植物セラミドも、原料ベースで2014年に20億円を突破し、2015年には25億円を超えると予測されている（日本食品機能研究会 NEWS）（図1-1）。

加えて、セラミド素材を活用した機能性食品開発では、蒟蒻いも由来セラミドを機能性関与成分とし「肌が乾燥しがちな方に適する」をヘルスクレームとする商品が申請されており、最近、美容を訴求した機能性食品素材としてのセラミドへの注目度が高まっている。

本研究では、下記のエンドユーザーに対して世界初の天然のヒト型セラミド製造技術確立し、食品と化粧品の両方で使用することができる天然ヒト型セラミド製剤（天然ヒト型マルチセラミド）とこれを活用した食品を開発する。

エ ン ド ユ ー ザ ー	<ul style="list-style-type: none"><li>・ 20~40代の女性(働く女性)<ul style="list-style-type: none"><li>： 美肌・肌ケアに関心高い</li><li>： 「内側からキレイになりたい」内外美容の要望が高い</li></ul></li><li>・ 60~70代の高齢者(総人口の25%)<ul style="list-style-type: none"><li>： 健康に関心が高く健康食品購入額の多い年齢層</li><li>： アンチエイジングに関心が高い中高年が消費を牽引</li></ul></li></ul>	日本経済新聞:健康食品・サプリメント市場「働く女性」が牽引 オリコンモニターリサーチ:美容意識調査 健康博覧会事務局:業界ニュース
---------------------------------	--	---

図1-1.本研究のエンドユーザー

皮膚は、表皮と真皮から構成され、表皮の角質が皮膚の「保湿機能」や「雑菌などの外部刺激から肌を守るバリア機能」を果たしている。これらの機能を維持しているのがセラミドである。真皮にはコラーゲンやヒアルロン酸などが存在し、肌の支持構造を形成しているが、保湿力ではコラーゲンよりもヒアルロン酸が高く、ヒアルロン酸よりもセラミドの方がはるかに高いと言われている。特に、分子構造が人間のセラミドと同じである「ヒト型セラミ

ド」は最も効果があると言われており、アンチエイジング素材として食品及び化粧品市場からのニーズが高い。しかし、このヒト型セラミドは、市販の植物由来の天然セラミドには存在せず、ヒト型としては化学合成されたセラミドしかないのが現状である（図1-2）。当研究グループはヒト型セラミドを世界に先駆けて醤油粕から見出した（特許第5013318号、特開2012-126910）。

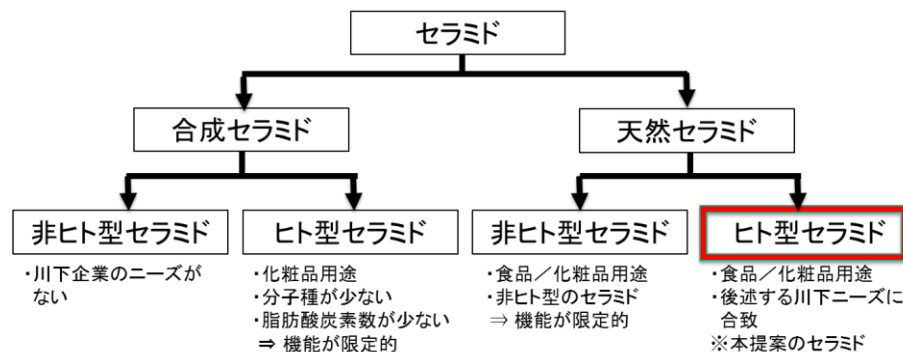


図1-2.本提案で開発対象とするセラミド

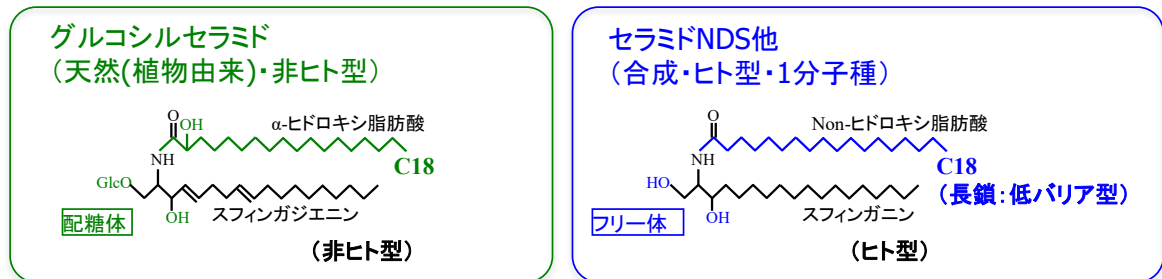
ヒト型セラミドは年齢とともに失われていき、特に保湿機能を有する「セラミド NP」とバリア機能を有する「セラミド AP」が減少することが知られている。そこで本提案では、麹菌発酵法によりセラミド NP 比率の多いヒト型セラミドを生産し、醤油粕抽出法で生産するセラミド AP 主体のヒト型セラミドと組み合わせ、食品・化粧品の両用途に使用可能な天然ヒト型マルチセラミド製剤とその配合食品を開発する。

天然ヒト型マルチセラミドの特徴を化学構造から既存のセラミドと比較した（図1-3）。既存のセラミドは水酸基（OH 基）が 2 つ、脂肪酸の炭素数が 18 であるのに対して、セラミド NP と AP は水酸基（OH 基）が 3 つから 4 つ、脂肪酸の炭素数が 24 と多く、セラミド NP は高い保湿機能を有し、セラミド AP は高いバリア機能を有している。このため、両者を複合化（マルチ化）することにより、高い保湿機能とバリア機能が発揮されることが考えられる。さらに、セラミド NP 及び AP とともに最終的に腸管吸収されるフリー体として存在しており、既存の天然セラミドに比べ吸収性が高く、高い機能を発揮することが期待される。

食品分野では、安全性の理由から合成のヒト型セラミドを用いることができないため、天然の非ヒト型セラミドが使用されているが、消化吸収性が低く、効果は限定的である。一方、化粧品分野では、合成のヒト型セラミドと天然の非ヒト型セラミドが用いられて

いるが、前者は化学合成であるため、合成可能な分子の種類が少ない。また、後者は非ヒト型であるため、食品分野と同様にいずれも効果は限定的である。

### 既存のセラミド



### 本提案の天然ヒト型マルチセラミド

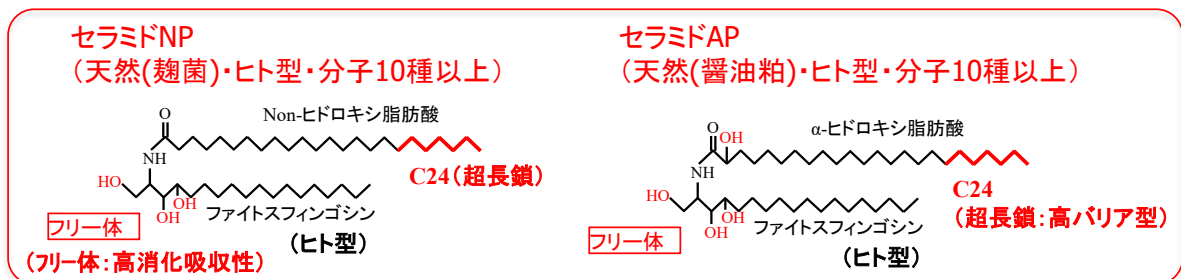


図1-3.既存セラミドと天然ヒト型マルチセラミド(セラミドNP・AP)の化学構造の比較

本提案の天然ヒト型マルチセラミドは、食品分野では消化吸収されやすいフリー体のセラミドとして、化粧品分野ではヒト型かつ分子種10以上のセラミド複合体として、それぞれの用途に最適化し、既存のセラミドに比べ高いアンチエイジング効果が期待される食品・化粧品共通素材である。

本研究では、醤油粕の天然ヒト型セラミド製造技術(従来技術:特許第5013318号、特開2012-126910)と麹菌培養によりセラミド発酵技術を開発し、醤油粕セラミドと組合せ、両者を含有する天然ヒト型マルチセラミドを開発する。さらに、天然ヒト型マルチセラミドの製剤化を図り、安全性評価及び機能性評価データを取得しこれらを配合した食品を開発する。

本研究は、4つのサブテーマから構成されており、各サブテーマの年次目標を表1-1に示す。

表1-1. 各サブテーマの技術的目標

サブテーマ	平成27年度	平成28年度	平成29年度
1. セラミド発酵技術の開発	<ul style="list-style-type: none"> <li>発酵装置の設置</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>菌体生産量 培養液あたり3%以上<sup>注1</sup></li> <li>抽出したセラミド中のファイトスフィンゴシン型 70%以上<sup>注2</sup></li> <li>セラミド蓄積条件の選定</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>セラミド蓄積量 菌体当たり0.5%以上<sup>注3</sup></li> </ul>
2. 抽出プロセスの構築	<ul style="list-style-type: none"> <li>【麹菌】</li> <li>抽出手順選定</li> <li>【醤油粕抽出】</li> <li>最終純度90%以上を安定抽出</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>【麹菌】</li> <li>抽出手順確立</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>【麹菌】</li> <li>セラミド回収率 40%以上<sup>注3</sup></li> </ul>
3. 素材化技術の開発	<ul style="list-style-type: none"> <li>【素材化】</li> <li>セラミド構造解析の実施</li> <li>品質基準の設定</li> </ul> <ul style="list-style-type: none"> <li>【モデル商品】</li> <li>ラボ調製の素材によるモデル商品の設計・試作</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>【素材化】</li> <li>セラミドの構造解析完了</li> <li>セラミド紛体 純度90%以上<sup>注2</sup></li> <li>セラミド溶液 濃度1%以上<sup>注2</sup></li> </ul> <ul style="list-style-type: none"> <li>【モデル商品】</li> <li>ラボ調製の素材によるモデル商品の設計・試作</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>【素材化】</li> <li>試験用素材の供給</li> </ul> <ul style="list-style-type: none"> <li>【モデル商品】</li> <li>導入設備で調整した素材によるモデル商品の設計・試作</li> </ul>
4. 安全性・機能性の評価	<ul style="list-style-type: none"> <li>【安全性】</li> <li>評価試料の仕様決定</li> </ul> <ul style="list-style-type: none"> <li>【機能性】</li> <li>腸管吸収性有意差あり</li> <li>評価試料の仕様決定</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>【安全性】</li> <li>食品：急性毒性なし 変異原性なし アレルギーなし</li> <li>化粧品：感作性なし 皮膚刺激性なし 眼刺激性なし</li> </ul> <ul style="list-style-type: none"> <li>【機能性】</li> <li>食品：血液動態情報蓄積</li> <li>化粧品：既存品以上の肌質改善効果</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>【機能性】</li> <li>食品： <ul style="list-style-type: none"> <li>○血液動態情報蓄積</li> <li>○ヒト臨床テスト</li> </ul> </li> <li>既存品以上の肌質改善効果を確認</li> </ul>

注1：予備実験結果の最高値、本値を持って原価計算を行った

注2：川下企業が要求する仕様

注3：製造コストから設定した目標

## 1-2 研究体制

本研究の研究体制を下記図1-4に示す。

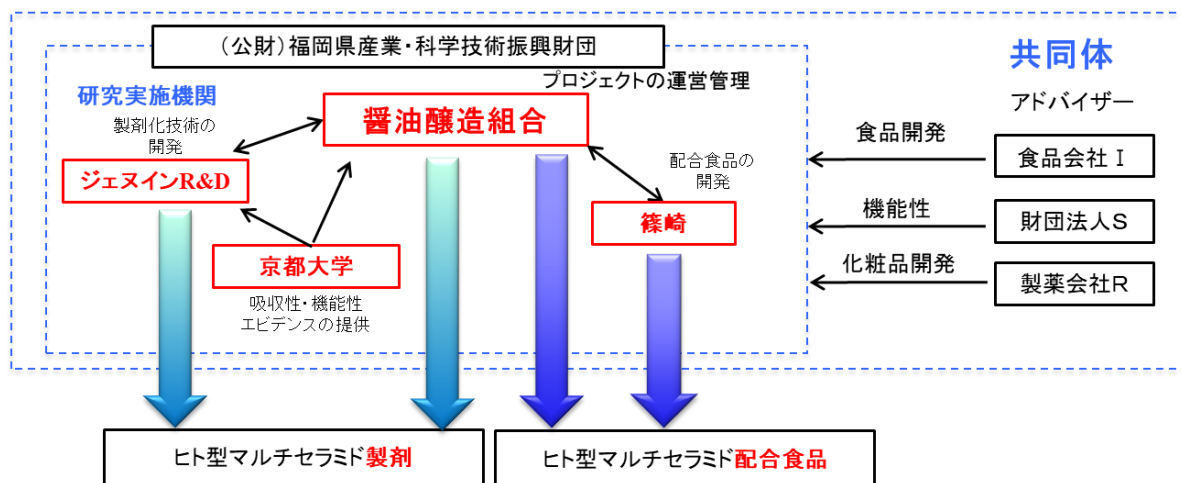


図1-4.研究体制

## 1-3 成果概要

### 1-3-1 セラミド発酵技術の開発

【平成27年度】

- ・醸造用種麹菌 25 株の菌体生産性とスフィンゴイド塩基含有量を比較し 5 株を選択した。小型培養装置の培養試験で最終菌体量が、KT 株が 1.1%、HG 株は 2.1%、WO20 株は 1.9%であった。また、スケールアップ試験用に 500L 培養装置を設置した。

【平成28年度】

- ・培地中の培地成分の制限とストレス付加により菌体中のスフィンゴイド塩基含有量が増加した。この現象は 500L 培養装置においても確認された。

【平成29年度】

- ・培養液中のグルコース濃度を制限した上でそれぞれの工程期間の最適化を試み、菌体当たりの推定セラミド量を増加させるとともに6日間の培養期間を3日間に短縮したが、菌体収量は向上せず、培養ロット当たりのセラミド収量を向上させるに至らなかった。

### 1-3-2 抽出プロセスの構築

【平成27年度】

- ・麹菌セラミドの抽出では、麹菌体のキチナーゼ処理はセラミド抽出に影響しなかった。醤油粕セラミドの抽出では、醤油粕の水分調整により不純物混入を防止した。

【平成28年度】

- ・酵素処理と自己消化処理区は対照区の約3倍であったが、両者に差がなくキチナーゼやグルカナーゼを用いても自己消化以上に抽出効率は向上しなかった。

【平成29年度】

- ・ハンマーミル処理菌体のエタノール抽出物中のスフィンゴイド塩基量は64%であり、マスコロイダー処理の85%に比べ低い値であった。しかし、ハンマーミル処理法は、マスコロイダー処理に比べ工程が簡素になる利点があり、ハンマーミル処理法の抽出効率向上について今後検討していく。

### 1-3-3 素材化技術の開発

【平成27年度】

- ・TLCでの簡易組成解析において、KT株およびHG株は共通してセラミドAPが主成分として検出した。セラミドNPは別の方法で分析することとした。セラミド配合食品として甘酒とフルーツドレッシングを試作した。

【平成28年度】

- ・菌株間で天然ヒト型セラミドの分子種が異なりM61株はKT株よりも多くの分子種で構成されていた。M61株は、醤油粕由来の天然ヒト型セラミドに比べセラミドNPの含有量が多かった。
- ・セラミド製剤を試作した結果、水系では目標値の3倍である3%まで、油系ではセラミド1%まで乳化する事ができた。
- ・天然ヒト型セラミドの耐調理性・加工性を検討したところ、酸性、アルカリ性、100℃条件下では変性しないことを確認した。
- ・セラミド配合甘酒8種類の試作を行った。これらの保存試験において、レギュラータイプでは14ヶ月経過相当品、フレッシュタイプとフリーズタイプは製造後約2ヶ月時点で成分検査、官能検査、微生物検査での以上は確認されなかった。



【平成29年度】

- セラミドの溶媒分画法による精製でセラミド以外の成分を除去し、高純度のセラミド粉末を作成した。高純度化の際に、洗浄工程を加えることに不純物を除去できた。
- セラミド配合サプリメントの脂質を一般的な脂質成分の抽出方法で抽出し、HPLCによってセラミド成分の定性および定量分析を行ったところ、サプリメントでは100%に近い添加回収率であった。しかし、甘酒では同方法による添加回収率は70%弱であり、今後検討が必要である。
- 異種麹菌等を用いてセラミド配合した甘酒を試作した。これらの試作品の消費者アンケート調査の評価は、総合評価の良好が80%以上であった。製品化の評価基準は良好70%以上でありいずれも適合した。今後、商品化について検討していく。

1-3-4 安全性・機能性の評価

【平成27年度】

- セラミド AP の腸管吸収性が高いことを細胞レベルで確認した。

【平成28年度】

- 天然ヒト型セラミドの変異原性（Ames 法）、亜急性毒性、食経験及び文献調査において、毒性及び危害情報は認められなかった。
- ICR マウスを用いた単回投与後に血漿中の天然ヒト型セラミドに主要なスフィンゴイド塩基（t18:0）が増加した。また、ヘアレスマウスを用いた飼育試験では、天然ヒト型セラミドの皮膚バリア機能向上作用は、植物グルコシルセラミドと同等以上であった。
- ヒト臨床試験のプレテストとして、2mg 天然ヒト型セラミド摂取区 15 名、10mg 天然ヒト型セラミド摂取区 15 名、プラセボ区 15 名の3群構成の試験を実施した。その結果、肌質改善等に有効な傾向が認められた。

【平成29年度】

- 健常成人における長期摂取安全性試験として 12 週間プラセボ対象二重盲検ランダム化並行群間比較試験と過剰摂取安全性試験として 4 週間プラセボ対象二重盲検ランダム化並行群間比較試験を行った。これらの試験において、セラミド含有サプリメントの摂取により健康に及ぼす影響はなく、食品としての安全性が確認された。
- 動物実験による血中動態について、単回投与後の ICR マウスの血漿から、投与した天然ヒ

ト型セラミドに含まれるセラミド分子種がほぼ同様の組成で検出された。

- 食品としての機能性試験として、前項で行った健常成人における長期摂取安全性試験と過剰摂取安全性試験に合わせて、不定愁訴アンケート、気分尺度アンケート、ピッツバーグ睡眠質問票および肌質検査を行った。

#### 1-4 当該研究開発の連絡窓口

会社名 福岡県醤油醸造協同組合

所属 技術部

氏名 植木達朗

連絡先 電話番号 092-922-3831

FAX 番号 092-928-3501

E-mail ueki@fsjk.or.jp

## 第2章 本論

### 2-1 セラミド発酵技術の開発

#### 【目的及び目標値】

#### ○麹菌の培養生産条件の検討【福岡県醤油醸造協同組合】

天然ヒト型セラミドの生産性向上のため、清酒麹菌 *Aspergillus oryzae* KT 株のスフィンゴイド塩基含有量を指標とし、高含有量の麹菌を探索する。麹菌を培養し、定常期に達した後、高塩濃度やアルコールなどのストレスを与え、麹菌を死滅期に誘導する提案者ら独自の培養条件を確立する。

#### ○麹菌からの天然ヒト型セラミド生成条件の検討【福岡県醤油醸造協同組合】

セラミド NP を蓄積させるため、前項で培養して麹菌を回収し、貧栄養条件を基本とした自己消化誘導条件下に曝し、酸性スフィンゴ脂質の分解系によるセラミド NP の増量化を図る。培養工程とヒト型セラミド蓄積工程については、コストダウンの観点からセラミド蓄積工程を同一反応槽で行える新培養システムを開発する。

#### 【平成27年度研究開発結果】

#### ○麹菌の培養生産条件の検討

醸造用種麹菌 25 株を液体培養し基準株 *A.oryzae* KT 株と菌体生産性とスフィンゴイド塩基含有量を比較し 5 株を選択した。また、小型培養装置を用い *A.oryzae* KT(基準株：短毛菌)、HG(長毛菌)、WO20(中毛菌)株の培養試験を行った。5 日間培養した KT 株の最終菌体量が 1.1%であるのに対し、HG 株は 2.1%、WO20 株は 1.9%と約 2 倍の菌体生産性を示した（図 2-1）。

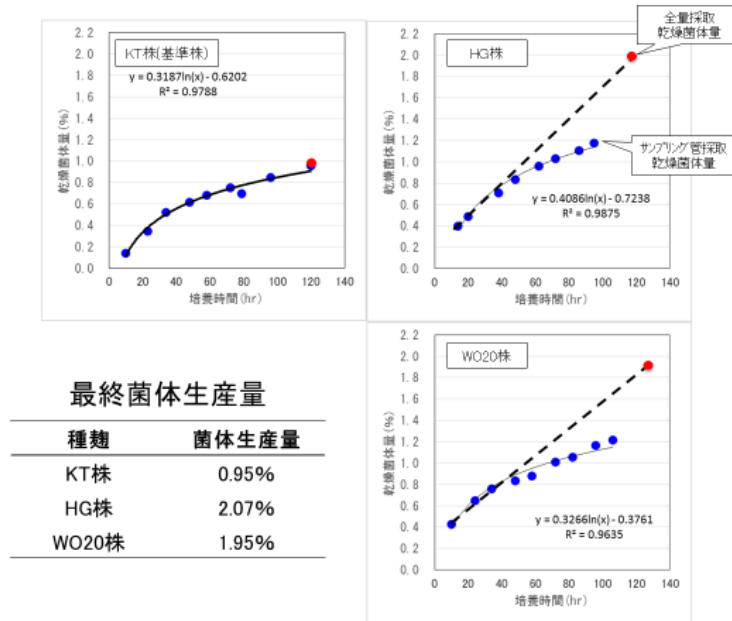


図 2-1. 麴菌 KT 株 (短毛菌), WO20 株 (中毛菌), HG 株 (長毛菌) の液体培養液の菌体回収量

【平成 28 年度研究開発結果】

○ 麴菌の培養生産条件の検討

前年度にセラミド発酵に好適な菌株として選択した麴菌 M61 株について培養試験を行った。その結果、培養液中の成分が菌体中のスフィンゴイド塩基（セラミド）含有量に影響し、低成分濃度下でスフィンゴイド塩基含有量が増加した（表 2-1）。さらに、定常期の麴菌にストレスを負荷したところストレスでスフィンゴイド塩基含有量増加する傾向を示した。

表 2-1. 麴菌の馴化培養におけるセラミド収量

種麴	培地成分の制限	菌体生産量 (g/100ml培養液)	推定セラミド量 (%:w/w)	収量 (mg/100ml培養液)
KT株	無	0.95	0.47	4.5
HG株	無	2.07	0.31	6.4
M61株	無	1.61	0.47	7.6
<b>M61株</b>	<b>有</b>	<b>1.92</b>	<b>1.40</b>	<b>26.9</b>

※推定セラミド量：t18:0-C24：0h換算

#### ○麹菌からの天然ヒト型セラミド生産条件の検討

培養液から回収した麹菌をストレス環境下に置き自己消化させることで天然ヒト型セラミドを生産させ、ストレスの種類と天然ヒト型セラミドの生産量の関係を検討した。その結果、環境要因を整えることで天然ヒト型セラミドの生産量が向上した。また、麹菌の培養とセラミドの自己消化誘導を統一装置内で行うことができた。

#### 【平成29年度研究開発結果】

#### ○麹菌の培養生産条件の検討

#### ○麹菌からの天然ヒト型セラミド生産条件の検討

麹菌によるセラミド発酵は、麹菌培養と自己消化の2つの工程からなるが、製造コスト低減の観点からこれらの工程を同一装置内で行うこととした。そこで、ここでは「セラミド発酵技術の開発」と「麹菌からの天然ヒト型セラミド生産条件の検討」に関して合わせて記述する。本年度は培養液中のグルコース濃度を制限した上でそれぞれの工程期間の最適化を試み、菌体当たりの推定セラミド量を増加させるとともに6日間の培養期間を3日間に短縮した（表2-2）。しかし、培地成分流加を検討したが、菌体収量の向上には至らず、培養ロット当たりのセラミド収量を向上させるに至らなかった。今後は、菌体収量の多い麹菌の育種改良によりセラミド発酵に適した麹菌の作出を検討する必要がある。

表 2-2. 平成 28 年度培養条件と平成 29 年度培養条件で培養した  
麹菌体の菌体収量と推定セラミド蓄積量

培養条件	培養時間	菌体収量 (%,w/v・培養液)	推定セラミド蓄積量 (%,w/w・乾燥菌体)
H28年度	6日間	2.0	1.40
H29年度	3日間	0.41	2.45

## 2-2 抽出プロセスの構築

### 【目的及び目標値】

#### ○麹菌からのセラミド NP 抽出【福岡県醤油醸造協同組合】

当開発グループでは、エタノール抽出とセラミドの非溶媒洗浄を組み合わせることで、セラミド純度 90%以上というこれまでにない高純度で安価に抽出する方法を開発し、権利化した（既存セラミド純度：3~10 %）。この技術を応用し、前項発酵技術で調整した自己消化麹菌からセラミド NP を抽出する。

#### ○醤油粕からのセラミド AP 抽出【福岡県醤油醸造協同組合】

セラミド AP の醤油粕からの抽出においても当開発グループで出願した特許技術を活用するが、着色や不純物（ステルリルグルコシド）混入による純度低下が課題であった。これまで種々検討した結果、原料となる醤油粕の水分調整が、この課題解決に有効であることが判明した。そこで、独自の乾燥工程を追加し、醤油粕セラミド抽出（純度 90%以上）の安定化を試みる。

### 【平成27年度研究開発結果】

#### ○麹菌からのセラミド NP の抽出

キチナーゼ処理は、麹菌からのセラミド抽出に影響しなかった（表2-3）。今後は、他の酵素剤の併用や粉碎などの物理的処理についても検討する。

表 2-3. キチナーゼ処理した麹菌体のセラミド抽出量比

キチナーゼ使用量	セラミド抽出量比
精製水(対象)	100%
1/10希釈液	99%
1/100希釈液	98%
1/1000希釈液	102%

## ○醤油粕からのセラミド AP の抽出

保温コンテナにデシカント式除湿機を設置し醤油粕の乾燥試験を行った。初発水分33.8%の醤油粕 300kg を 4 日間で 12.4%まで低減させた。この醤油粕を用いてヒト型セラミドの抽出を試みた。抽出物を精製し精製セラミド粉末を得た。精製セラミド粉末を TLC にて展開したところ、水分調整した醤油粕から抽出したセラミドは不純物のスポットが小さくなっており、抽出時の不純物混入が低減された（図2-2）。さらにデンストメトリーでヒト型セラミドの純度を測定したところ 90%であった。

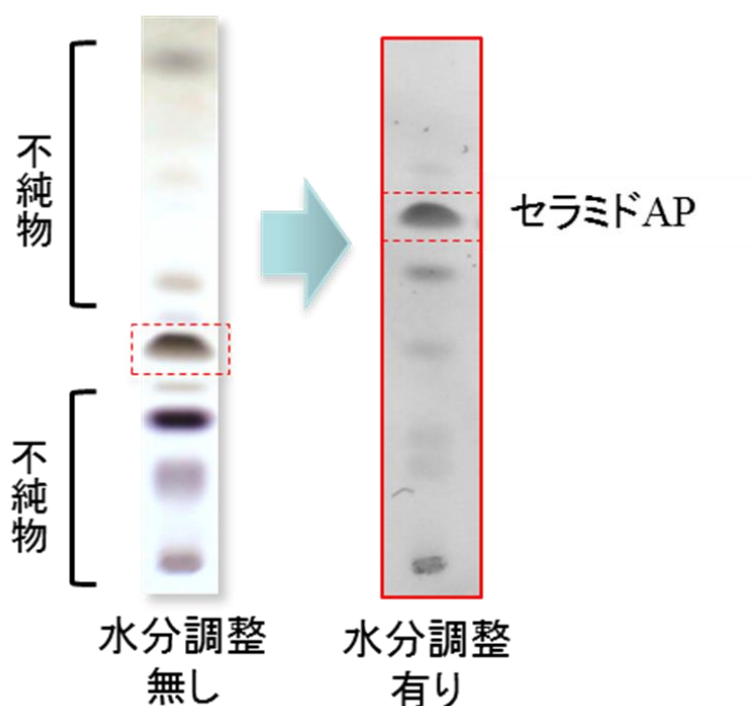


図 2-2. 醤油粕から抽出精製したセラミドの TLC

### 【平成 28 年度研究開発結果】

## ○麹菌からのセラミド NP の抽出

本年度は抽出手順として後述の手順を検討した。培養液 ⇒ 菌体回収 ⇒ 酵素処理 or マスコロイダー処理 ⇒ エタノール抽出。麹菌の菌体に対し酵素処理、自己消化処理、マスコロイダー処理を行った。これらの菌体のエタノール抽出物中のスフィンゴイド塩基量は、対照区とマスコロイダー処理区は同等で、酵素処理と自己消化処理区は対照区の約 3 倍であったが、両者に差がなくキチナーゼやグルカナーゼを用いても自己消化以上に抽出効率は向上しなかった（表 2-4）。

表 2-4. 各菌体破壊条件におけるセラミド収量の比較

試験区	推定セラミド 抽出比率
①対象区(処理無し)	1.0
②マスコロイダー処理	1.1
③酵素剤無添加 (自己酵素のみで消化)	3.2
④酵素剤処理 (2剤併用)	3.0

【平成29年度研究開発結果】

#### ○麹菌からのセラミドNPの抽出

本年度は抽出手順として後述の手順を検討した。培養液 ⇒ 菌体回収 ⇒ 物理的処理 ⇒ エタノール抽出。麹菌の菌体は回収前に自己消化し物理的に菌体を破碎した。物理的処理菌体のエタノール抽出を行ったところ、抽出物中のスフィンゴイド塩基量は64%であり、昨年度実施したマスコロイダー処理の85%に比べ低い値であった。しかし、物理的処理法は、マスコロイダー処理に比べ工程が簡素になる利点があり、同方法の抽出効率向上について今後検討していく。

### 2-3 素材化技術の開発

【目的及び目標値】

#### ○天然ヒト型マルチセラミド精製方法の検討【ジェヌイン R&D】

加工容易性向上のため、食品および化粧品用途としての品質基準（セラミド純度、色、ニオイ）を設定する。精製セラミドは、TLC、HPLC、GC-MS、LC-MS を用いて化学的特性を明らかにする。セラミド NP と AP の量比に加え、特に食品用途として美肌等に関連する生体内リガンド活性の高いファイトスフィンゴシンの量比、また化粧品用途として表皮バリア性・保湿性等に関連する超長鎖脂肪酸の量比、水酸基数の解析により、ヒト型であることの証明と機能性の化学構造上の根拠とする。



#### ○天然ヒト型マルチセラミド素材の製剤化に関する検討【ジェヌイン R&D】

天然ヒト型マルチセラミド製剤の試作では、加工容易性を可能とする製剤設計を行う。セラミドは水と油のいずれにも難溶であり、粉末そのままでは配合が難しいことから、セラミド粉末を予め高濃度で溶解した製剤を供給し、川下企業の商品開発の迅速化と多様化に応えるとともに、セラミドに更なる価値を付与したセラミド配合商品の販売につなげるため、製剤化の検討を行う。

#### ○配合モデル商品の試作【篠崎，福岡県醤油醸造協同組合】

天然ヒト型マルチセラミドの食品などへの応用について、配合モデル商品の試作を行う。商品企画、設計（原料配合など）および試作を行い、食品素材としての加工容易性（分散性など）と試作商品の保存性を検討するとともに、社内モニター等の商品評価を行う。

#### 【平成27年度研究開発結果】

#### ○天然ヒト型マルチセラミド精製方法の検討

#### ○天然ヒト型マルチセラミド素材の製剤化に関する検討

本年度は凍結乾燥菌体を使用して、セラミド産生のための基本的な条件を検討した。TLCでの簡易組成解析においては、KT株およびHG株共通してセラミドAPが主成分として検出されたが、セラミドNPについては他の共存脂質の影響で不明瞭なため、分離条件を検討する。KT株とHG株のセラミドを質量分析計により構造解析した。

#### ○配合モデル商品の試作

株式会社篠崎は、“セラミド配合甘酒”の試作を行った（図2-3）。試作品は、成分分析（pH，ブリックス，酸度，アミノ酸度など）と微生物検査、外観検査および官能評価において従来品と同等であった。その保存試験において14ヵ月経過相当時まで試作品に特に変化を認めなかった（表2-5）。

福岡県醤油醸造組合では、“セラミド配合フルーツドレッシング”を試作した（図2-3）。試作品は、成分分析（食塩，純エキス，酸度など）と微生物検査、外観検査および官能評価において従来品と同等であった。その保存試験において7ヵ月経過（賞味期限の1.5倍）時で試作品に特に変化を認めなかった。



図 2-3. セラミド配合甘酒試作品とセラミド配合フルーツドレッシング試作品

表 2-5. セラミド配合甘酒の保存試験結果

経日	香り		味		有意差		
	セラミド入り	セラミド無し	セラミド入り	セラミド無し	テスト数	正当数	有意差有無
0	1.8	2.0	1.8	1.8	30	9	有意差無し
1ヶ月後	1.8	1.8	1.8	2.0	30	11	
2ヶ月後	1.8	1.8	2.0	2.0	30	10	
3ヶ月後	1.8	2.0	1.8	1.8	30	8	
4ヶ月後	1.8	1.8	1.8	2.0	30	7	
5ヶ月後	1.8	1.8	1.8	2.0	30	12	
6ヶ月後	1.8	1.8	1.8	2.0	30	11	
7ヶ月後	2.0	2.0	2.0	2.0	30	9	
8ヶ月後	2.0	2.0	2.0	2.0	30	8	
9ヶ月後	2.0	2.0	2.0	1.8	30	12	

香り, 味 : 3点法で判定 (1:良い, 2:普通, 3:悪い) パネラー6名で評価、平均値表す。  
平均点2.0以下を合格とする。

有意差 : 3点識別法で品質の差 (セラミド入り、セラミド無し) があるかを判定。  
テスト数30であれば正答数15以上なければ有意差有りとはいえない  
(危険率5%)。

【平成28年度研究開発成果】

○天然ヒト型マルチセラミド精製方法の検討

麹菌 KT 株と M61 株のセラミド AP の構造解析を行った。KT 株と M61 株のスフィンゴイド塩基部分は同じであったが、KT 株の脂肪酸部分が 1 種のみであるのに対して M61 株は 3 種存在し、菌株間で天然ヒト型セラミドの分子種が異なり M61 株は KT 株よりも多くの分子種で構成されていた。また、麹菌の天然ヒト型セラミドには、醤油粕に含まれる不飽和型塩基は確認できなかった。麹菌 M61 株から精製した天然ヒ

ト型セラミドの純度は91%で、醤油粕由来の天然ヒト型セラミドに比べセラミドNPの含有量が多かった。

○天然ヒト型マルチセラミド素材の製剤化に関する検討

セラミド製剤を試作した結果、水系では目標値の3倍である3%まで、油系ではセラミド1%まで乳化する事ができた。また、製剤化する天然ヒト型セラミドの耐調理性・加工性を検討するため、一定量の天然ヒト型セラミドを種々の条件に晒し回収率を試験したところ、酸性、アルカリ性、100℃条件下では変性しないことを確認した（表2-6）。甘酒に対する天然ヒト型セラミド添加回収率は、甘酒の前処理としてフリーズドライで増加した。この結果を基に甘酒の天然ヒト型セラミド分析手順を作成した。

表2-6. 各処理条件で処理したセラミドの回収率

処理方法	回収率 (%)
pH3 (酸性)	96.45
pH11 (アルカリ性)	96.26
100℃ 10分	97.88
100℃ 60分	95.52
コントロール (6119WSS)	97.48

○配合モデル商品の試作

下表のセラミド配合甘酒8種類の試作を行った。これらの保存試験を実施中であるが、レギュラータイプでは14ヶ月経過相当品、フレッシュタイプとフリーズタイプは製造後約2ヶ月時点で成分検査、官能検査、微生物検査での以上は確認されなかった。

試作したセラミド配合甘酒



麹菌	タイプ	特徴
白麹菌 黒麹菌	レギュラー	白麹と黒麹を用い、香味(クエン酸由来の酸味)と色調(黒麹の黒色胞子)の違いをアピール
黄麹菌(プレーン) 白麹菌 黒麹菌	フレッシュ	麹菌の違いに加え、殺菌温度を下げビタミン類などの栄養素を残存させた試作品。 [殺菌温度100℃(従来)⇒90℃(試作品), 冷蔵]
黄麹菌(プレーン) 白麹菌 黒麹菌	フリーズ	麹菌の違いに加え、製品を冷凍しビタミン類などの栄養素を多く残存させた試作品。 [無殺菌, 冷凍]

## 【平成29年度研究開発成果】

### ○天然ヒト型マルチセラミド精製方法の検討

福岡県醤油醸造協同組合で前年度確認したストレス環境下に置き自己消化させた麹菌を乾燥粉碎した物を、ジェヌイン R&D においてセラミド画分の抽出および溶媒分画法による精製でセラミド以外の成分を除去し、高純度のセラミド粉末を作成した。高純度化の際に、極性の低い不純物が多く含まれたが、洗浄工程を加えることによりその問題を解決することができた（図2-4）。

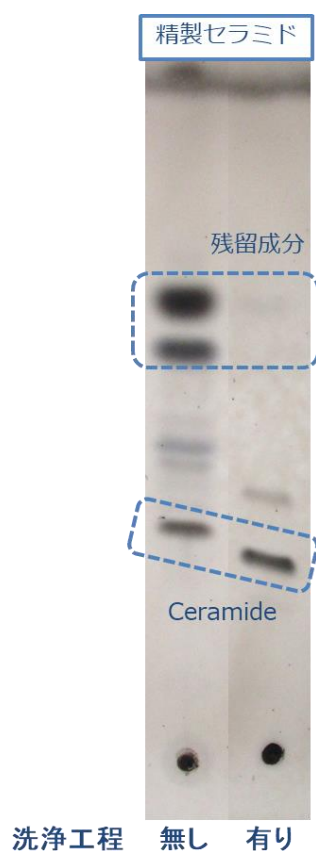


図2-4. 洗浄工程の残留物除去効果

### ○天然ヒト型マルチセラミド素材の製剤化に関する検討

機能性表示食品の申請に向け、第三者機関での添加回収試験方法の検討を行った。一般的な脂質成分の抽出方法で、セラミド配合サプリメントおよび甘酒中の脂質を抽出し、HPLCによってセラミド成分の定性および定量分析を行った。サプリメントにおいては、100%に近い回収率であったが、甘酒はもともと甘酒が持つセラミドや夾雑物の影響を受け、回収率が70%弱であった（図2-5、図2-6）。甘酒のような一般食品にセラミド配合した場

合、前述の通り夾雑物による分析結果への影響が懸念されるため、この影響については今後検討していく。

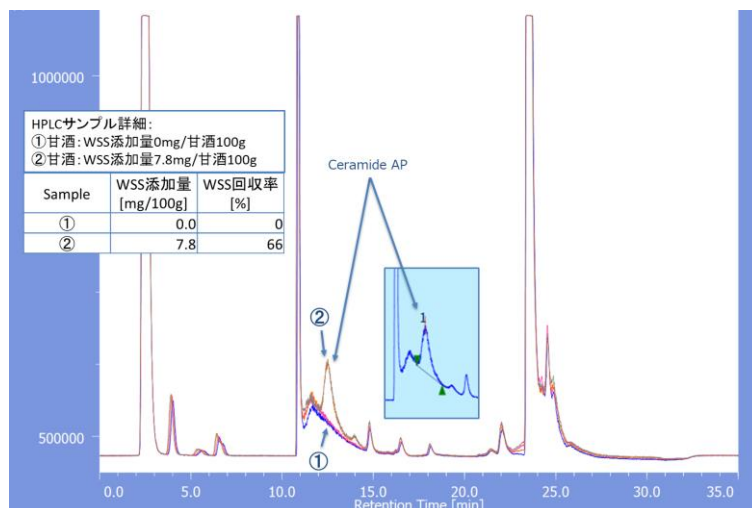


図 2-5. 甘酒のセラミド添加回収試験

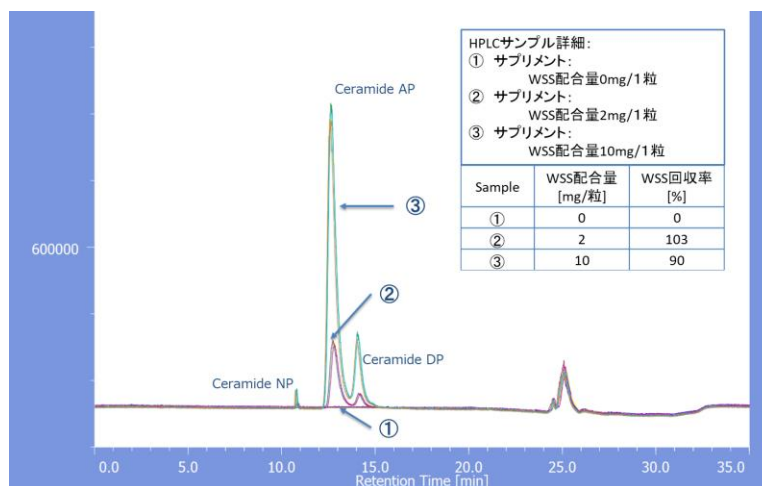


図 2-6. サプリメントのセラミド添加回収試験

### ○配合モデル商品の試作

異種麹菌等を用いてセラミド配合した甘酒を試作した。これらの試作品の消費者アンケート調査の評価は、総合評価の良好が80%以上であった。製品化の評価基準は良好70%以上でありいずれも適合した（図2-7）。今後、商品化について検討して行く。また、甘酒製造における主要原料である米麴の最適酵素力価を検討し、3酵素（ $\alpha$ -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、酸性カルボキシペプチダーゼ）の最適酵素力価（目標値）を決定した。

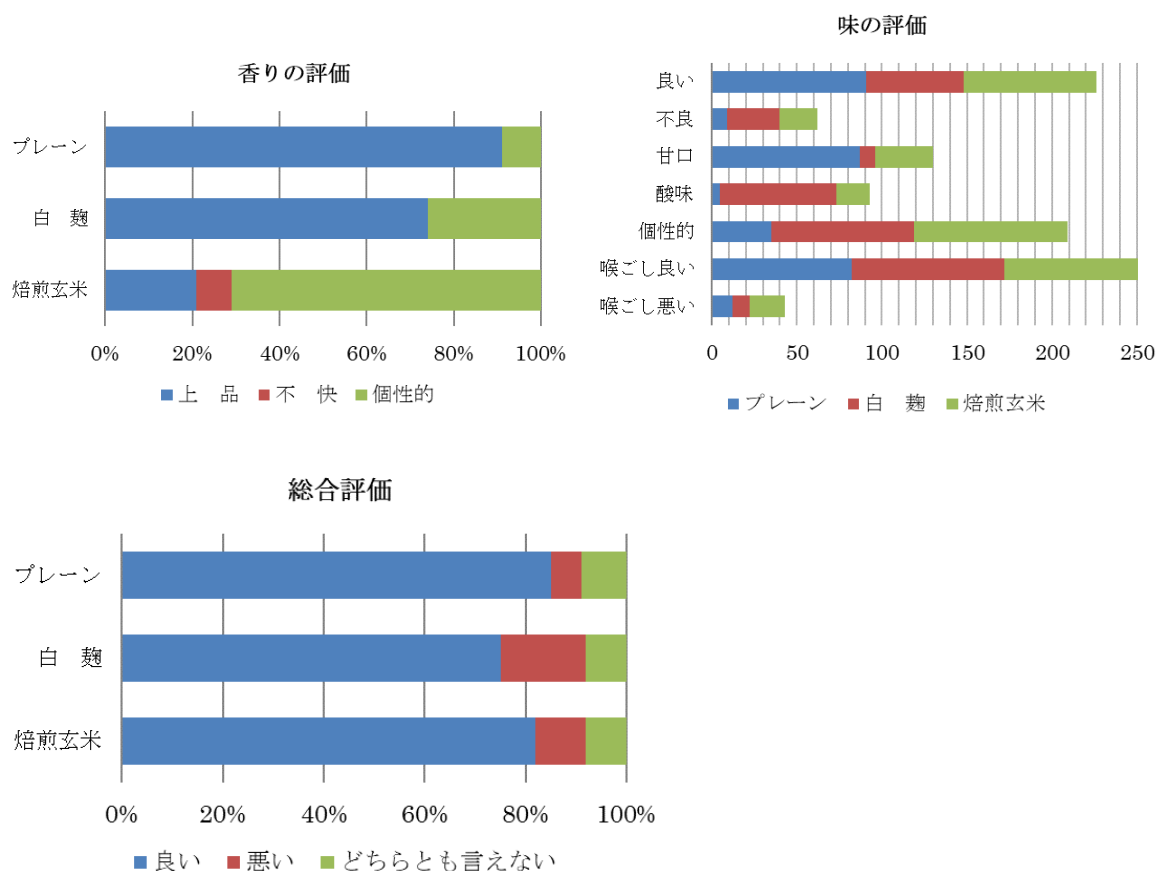


図 2-7. 試作品の消費者アンケート調査結果

## 2-4 安全性・機能性の評価

### 【目的及び目標値】

○安全性・機能性の評価【京都大学, ジェヌイン R&D, 福岡県醤油醸造協同組合】

内外美容素材としての観点から、食品と化粧品の両面について安全性評価と機能性評価を実施し科学的なエビデンスを蓄積する。安全性評価について、食品素材としては平成27年4月1日より開始された新しい食品機能性表示の届出のガイドラインを参考に実施項目、化粧品素材としては川下企業から要求される項目を実施した。機能性評価について、食品素材としては食品機能性表示の届出のガイドラインに準拠しヒト臨床試験を実施した。化粧品素材としては川下企業の意見を参考に計画を立案し実施した。また、Caco-2 細胞や実験動物を用いて、腸管吸収性や血液動態、経口投与による肌質改善評価を行った（表 2-7）。

表2-7. 本研究で行った安全性試験及び機能性試験の項目と実施年度

		平成27年度	平成28年度	平成29年度
安全性評価 【福岡県醤油醸造 協同組合】	食品	・評価試料の仕様検討	・亜急性毒性 ・変異原性	・急性毒性
	化粧品	・評価試料の仕様検討	・感作性 ・皮膚刺激性 ・眼刺激性代替法	
機能性評価 【京都大学, ジェ ヌイン R&D, 福 岡県醤油醸造協同 組合】	食品	・評価試料の仕様検討 ・腸管吸収 (Caco-2)	・血液動態 (動物) ・ヒト臨床テスト (予備試験)	・ヒト臨床テスト
	化粧品	・評価試料の仕様検討	・ヒト肌質改善試験	

【平成27年度研究開発成果】

○安全性の評価

安全性評価用の化粧品用サンプルとしては、純度 90%以上の粉体を用いる。麹菌の種類、培養条件の違いによるセラミドの構造解析を行い、最終的な素材仕様を決定した。

○機能性の評価

醤油粕から精製した高純度セラミドを用いてファイトスフィンゴシンを製造し、吸収性試験用サンプルとした。Caco-2 細胞によるスフィンゴイド塩基の吸収性試験を行った結果、セラミド AP に特徴的な t20:0 では細胞からの回収率が特に高かった。醤油粕由来セラミドの吸収性が細胞レベルで確認された (図2-8)。

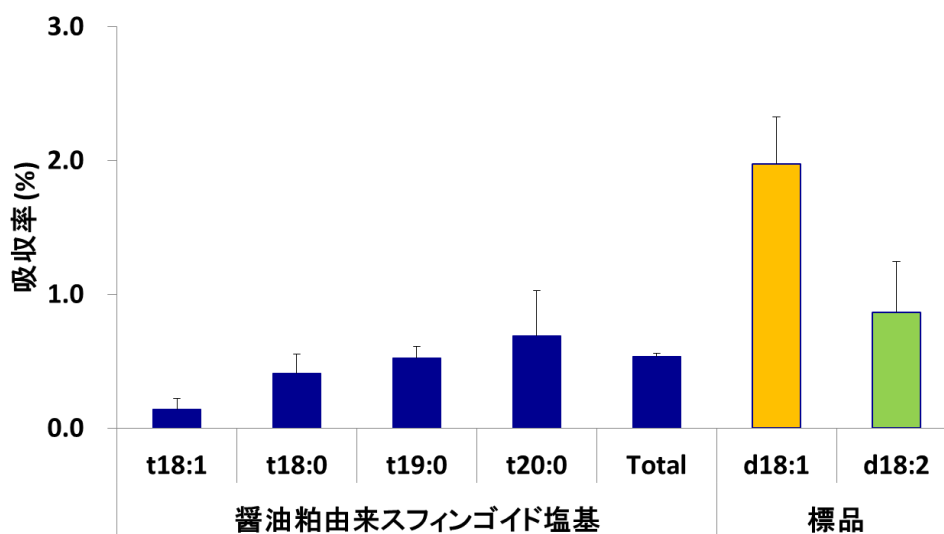


図2-8. 醤油粕セラミドスフィンゴイド塩基の細胞からの回収率



【平成28年度研究開発成果】

○安全性の評価

植物由来セラミド（グルコシルセラミド）が機能性関与成分である機能性表示食品の届出書を調査し外部機関に委託する試験の項目を再検討した。その結果、変異原性（Ames法）、亜急性毒性、食経験及び文献調査を行うこととした。これらの試験・調査において、毒性及び危害情報は認められなかった。

○機能性の評価

京都大学にて前年度に引き続き動物実験により血中動態を検討した。その結果、ICRマウスを用いた単回投与後に血漿中の天然ヒト型セラミド（醤油粕）に主要なスフィンゴイド塩基（t18:0）が増加することを確認した（図2-9）。また、ヘアレスマウスを用いた飼育試験では、天然ヒト型セラミド（醤油粕）の皮膚バリア機能向上作用は、植物グルコシルセラミドと同等以上であることが確認された。

さらに、次年度行うヒト臨床試験のプレテストとして、2mg 天然ヒト型セラミド摂取区 15名、10mg 天然ヒト型セラミド摂取区 15名、プラセボ区 15名の3群構成の試験を実施した。その結果、肌質改善等に有効な傾向が認められた。

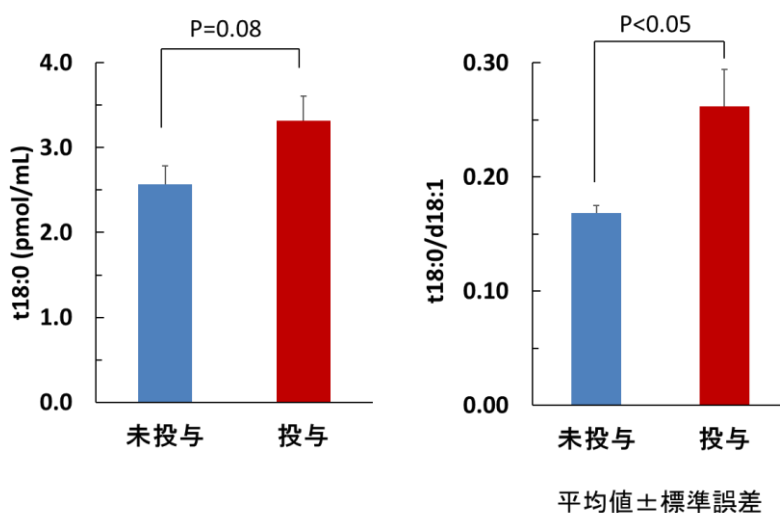


図2-9. マウス血漿のスフィンゴイド塩基量



## 【平成29年度研究開発成果】

### ○安全性の評価

食品としての安全性試験として、急性毒性試験を行い毒性はないことを確認した。また、健常成人における長期摂取安全性試験として12週間プラセボ対象二重盲検ランダム化並行群間比較試験と過剰摂取安全性試験として4週間プラセボ対象二重盲検ランダム化並行群間比較試験を行った。これらの試験において、セラミド含有サプリメントの摂取により健康に及ぼす影響はなかった。

### ○機能性の評価

動物実験による血中動態について、LC-MSを用いてさらに詳細に検討した。その結果、単回投与後のICRマウスの血漿から、投与した天然ヒト型セラミド（醤油粕）に含まれるセラミド分子種がほぼ同様の組成で検出されることが見出された。また、ヘアレスマウスを用いた飼育試験の皮膚における遺伝子発現変動を調べたところ、セラミド合成酵素やインボルクリンなどの発現は減少する傾向を示した。

食品としての機能性試験として、前項で行った健常成人における長期摂取安全性試験と過剰摂取安全性試験に合わせて、「不定愁訴アンケート（日本語版 CFS）」、「気分尺度アンケート（日本語版 POMS）」、「ピッツバーグ睡眠質問票日本語版」および「肌質検査」を行った。

## 最終章 全体総括

### 3-1 研究開発成果の総括

「ヒト型セラミド」はアンチエイジング素材として食品及び化粧品市場からのニーズが高い。しかし、このヒト型セラミドは、市販の植物由来の天然セラミド（グルコシルセラミドなど）には存在しない。ヒト型としては化学合成されたセラミドしかないのが現状であり、化学合成品は食品として用いられていない。本研究は、天然ヒト型セラミドは食品・化粧品の両用途に使用可能な天然ヒト型マルチセラミドの開発に取り組んだ。

サブテーマ1と2では、発酵法によるセラミド生産を検討した。セラミドは生産する微生物は、素材としての安全性や消費者の安心の観点から食経験のある麹菌から選択することとし、清酒、醤油や味噌などに用いられる醸造用種麹菌25種から1菌株を選びセラミド発酵に用いた。セラミド発酵条件およびセラミド蓄積条件を検討し、セラミド生産に関連する2つの制御要因を見出すとともに、セラミド発酵とセラミド蓄積の2工程を1つの装置の中で行った。さらに、麹菌体からのセラミド抽出について、基本的な工程フローを作成した。

サブテーマ3では、発酵法で生産したセラミドと仕様湯粕中のセラミドの化学構造を明らかにし、いずれもヒト型のファイトセラミドであることを証明した。また、水系では目標値の3倍である3%、油系ではセラミド1%まで乳化したヒト型セラミド製剤を完成させた。さらに、ヒト型セラミド配合甘酒及びフルーツドレッシングを開発した。ヒト型セラミド配合甘酒については試作品の消費者アンケートを実施し、良好な結果が得られたので商品化に向けて検討を続けているところである。

サブテーマ4では、化粧品および食品素材の安全性と機能性について評価した。食品安全性について、セラミドを含有している食品の食経験は有るが食品から抽出されたヒト型セラミドの食経験は無く新規物質扱いとなると想定された。そこで、機能性表示食品ガイドラインの安全性手順を参考にデータベースの検索から変異原性試験、急性毒性試験、亜急性毒性試験、ヒト長期摂取試験、ヒト過剰摂取試験を実施し安全であることを確認した。化粧品安全性についても、感作性、皮膚刺激性、眼刺激性を実施し安全であることを確認した。また、化粧品機能性として、経費水分蒸散量の上昇抑制が確認された。食品機能性としても、当初予定していなかった中枢性疲労の軽減効果を新たに見出し、特許を出願するに至った。

以上の3年間の開発を通し、関連メーカー、研究機関が一体となったチームを作り上げることができた。それぞれの強みを生かし目標に向かったプロセスを踏んでいくといった開発の進め方を身につけることができた。

### 3-2 研究開発後の課題と事業化展開

- ①目標達成に向けた課題が判明次第解決を図り、改善していく。
- ②新規物質である「ヒト型セラミド」の機能性表示食品の届出を達成し、甘酒、ドレッシング、サプリメントと関連商品を増やしていく。