

【公開版】

令和4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

「メタボ予防成分モグロールを生成する新酵素反応技術の高度化と
スケールアップ技術の確立」

研究開発成果等報告書

令和5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・研究目的及び目標	…	1
1-2	研究体制	…	2
1-3	成果概要	…	3
1-4	当該研究開発の連絡窓口	…	3

第2章 本論

2-1	研究開発実施内容		
	【1】新酵素反応技術の高度化	…	4
	【2】モグロールの安全性・機能性評価	…	8
	【3】用途別精製技術の確立	…	11
	【4】商品化に向けた加工技術の確立	…	14
	【5】スケールアップ技術の確立	…	15

第3章 全体総括

3-1	研究開発成果	…	16
3-2	研究開発後の課題・事業化展開	…	17

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

近年、メタボ予防として植物中の希少な機能成分(トリテルペノイド)の1種である**モグロール**の生理機能に注目が集まっている。

海外の研究グループは、モグロールの生理機能解明に取り組んでおり、抗炎症、抗酸化作用などの研究結果*1を報告している。

また、**モグロール研究のパイオニア**である**サラヤと大阪公立大学の研究チーム**は、抗腫瘍、抗アレルギー、抗動脈硬化などに効果があることを解明してきた*2(他18件)。なかでも最大の成果が**脂質蓄積と血糖上昇の抑制によるメタボ予防効果の発見**である(図1-1)。

脂質蓄積抑制は、モグロールが脂肪細胞に特異的なタンパク質(CCAAT/エンハンサー結合タンパク質β:c/EBPβ)の転写活性を減少させ、脂質形成を抑制するメカニズムであり、世界初の発見で論文*3および特許権利化*4した。

血糖上昇抑制は、モグロールが膵臓β細胞に対して**インスリン**の分泌を増加させて血糖値を下げられると考えられる。詳細なメカニズムについては現在、調査研究中である。

- *1. 論文: X Chen *et al.*, Bioorg. Medicinal Chemistry, 19, (2011), 5776-5781
- *2. 論文: Y Murata *et al.*, Biosci. Biotechnol. Biochem., 74, (2010), 673-676...(サラヤ)
- *3. 論文: N Harada *et al.*, PLoS One, 11 (2016), e0162252...(大阪公立大学 サラヤ共同)
- *4. 特許: 第5864003号 脂質蓄積抑制効果を有する新規羅漢果抽出物組成物...(共同)

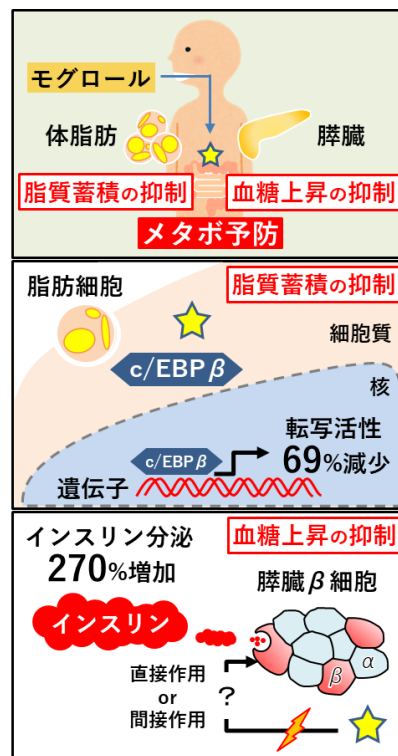


図 1-1. モグロールのメカニズム (ヒトでの予想)

表 1-1. モグロールと既存の機能成分との比較

そこで、2種類のメタボ予防効果があるモグロールと既存の機能成分(緑茶、大豆、玉ネギ、マメ科、サラシア、トウモロコシ)と比較した結果、モグロールは**最も低濃度・低用量で効果がある**(表1-1)。さらに、新技術の「**新酵素反応技術**」の高度化による**低コスト化**で、川下製造業者のニーズに応えることができる。

由来植物	機能成分	キロ単価 (製造コスト含)	脂質蓄積を50%に抑制			血糖上昇を80%に抑制		
			有効濃度 [μM]	コスト比* (単価×濃度)	判定	有効量 [mg]	コスト比† (単価×量)	判定
ラカンカ	新技術 モグロール	50万円	8	14	◎	5	50	◎
ラカンカ	従来技術 モグロール	6500万円	8	1867	△	5	6500	△
緑茶	カテキン	10万円	220	79	○	80	160	○
大豆	ダイゼイン	22万円	500	395	△	—	—	×
玉ネギ	ケルセチン	48万円	58	100	○	—	—	×
マメ科	ピニトール	5万円	—	—	×	590	590	△
サラシア	サラシノール	30万円	—	—	×	17	102	○
トウモロコシ	難消化性デキストリン	1000円	—	—	×	5000	100	○

*玉ネギ成分を100としたときの相対比較、†トウモロコシ成分を100としたときの相対比較

(2) 研究目的及び目標

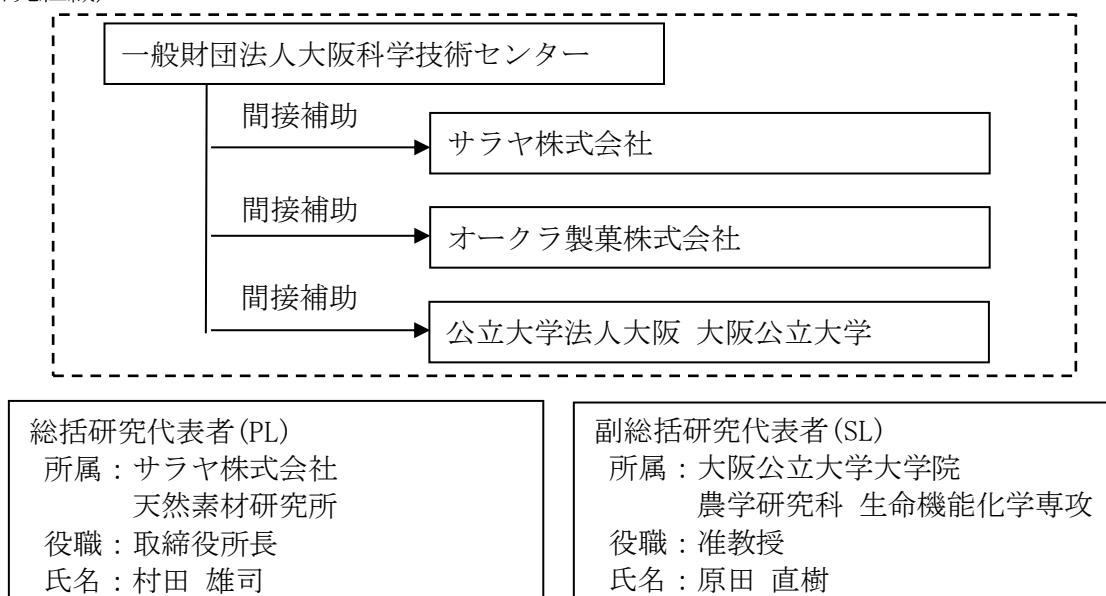
従来技術の課題(製造コスト高、生産量少、環境負荷大)を解決するため、生産性の向上を目的に「モグロール生成酵素の遺伝子組換え技術による改良」と「固定化酵素カラム技術を利用した連続的な酵素反応」および「スケールアップ」、製品の安全性の確保を目的とした「安全性・機能性試験」を実施する。技術的目標値は以下とした。

【1. 新酵素反応技術の高度化】	目標値と内容
【1-1】 モグロール生成酵素の同定	・麴カビが生産するタンパク質中から酵素を10種類以上単離 ・モグロール生成酵素のアミノ酸配列を同定
【1-2】 変異導入による酵素改良	・同定した酵素に対して変異導入した酵素を10種以上作製

	<ul style="list-style-type: none"> ・変異導入酵素の活性を5倍以上向上
【1-3】 固定化酵素カラムによる連続生産	<ul style="list-style-type: none"> ・固定化担体と酵素の組合せを10種類以上検討 ・連続生産条件の確立(酵素10回再利用時で酵素活性>80%)
【2. モグロールの安全性・機能性評価】 目標値と内容	
【2-1】 モグロールの安全性評価	<ul style="list-style-type: none"> ・微生物での変異原性試験において陰性 ・培養細胞での染色体異常試験において既存物質と同等以下 ・実験動物での単回・反復投与試験において有害作用なし ・ヒトでの有害事象(アレルギー、嘔吐、腹痛)なし ・ヒトでの血液検査(肝臓代謝マーカーなど)に異常なし
【2-2】 モグロールの機能性評価	<ul style="list-style-type: none"> ・培養細胞でのモグロールとTGR5の結合部位を1ヶ所同定 ・実験動物での脂質食試験で脂肪蓄積20%抑制する用量の決定 ・実験動物での糖負荷試験で血糖上昇20%抑制する用量の決定 ・ヒトでの脂質蓄積抑制効果(体脂肪面積20%抑制)の証明 ・ヒトでの血糖上昇抑制効果(血糖値20%抑制)の証明
【3. 用途別精製技術の確立】 目標値と内容	
【3-1】 噴霧乾燥を利用した連続精製	<ul style="list-style-type: none"> ・食品用途(純度10~20%)、乾燥時の熱変性率1%未満
【3-2】 結晶化を利用した高純度精製	<ul style="list-style-type: none"> ・化粧品・医薬品原料用途(純度>95%)、結晶時の損失率5%未満 ・結晶物のサイズ1mm以上、単回取得量100g以上
【4. 商品化に向けた加工技術の確立】 目標値と内容	
【4-1】 モグロールの加工適性検証	<ul style="list-style-type: none"> ・モグロールを配合した打錠製品の安定製造条件の決定 ・製品加工時の熱変性および長期保管時の分解率1%未満
【5. スケールアップ技術の確立】 目標値と内容	
【5-1】 量産スケールアップ検証	<ul style="list-style-type: none"> ・月産10kg、年間生産量120kg(4万人の供給量に相当) ・価格を50万円/kg以下(純度95%のとき)

1-2 研究体制

(研究組織)



1-3 成果概要

【1】新酵素反応技術の高度化

- ・カビの培養上清中にモグロシドからモグロールを生成する単一酵素の同定に成功した。
- ・担体に酵素を固定し、酵素反応の度に基質溶液を交換することで、酵素の繰り返し利用が可能であることを明らかにした。

【2】モグロールの安全性・機能性評価

- ・モグロールを用いた安全性試験（培養細胞、実験動物、ヒト）と機能性試験（ヒト）を外部機関で実施し、有効性を確認した。
- ・高脂肪食を摂取させた肥満・糖尿病モデル（KKAy）マウスにおいて、モグロール摂取によって、糖負荷試験で 15.4%の血糖値抑制作用を認めた。TGR5 を介したインスリン分泌促進作用が関係することを見出した。

【3】用途別精製技術の確立

- ・結晶化を利用することで、純度 95%以上のモグロールが得ることを確認した。

【4】商品化に向けた加工技術の確立

- ・モグロール入りタブレット試作品の安定性試験（室温、1 年保管）を実施し、各種物性とモグロール含量について賞味期限 1 年を担保できることを確認した。

【5】スケールアップ技術の確立

- ・既存の設備を利用して、年間 120kg の生産が可能であることを確認した。

1-4 当該研究開発の連絡窓口

〒582-0028 大阪府柏原市玉手町2-4-12

サラヤ株式会社

天然素材研究所 課長補佐 伊藤雄太

Email : ito-yut@saraya.com TEL : 072-977-1212

第2章 本論

2-1 研究開発実施内容

【1】新酵素反応技術の高度化

【1-1】モグロール生成酵素の同定

(i) タンパク質の単離

【研究方法と結果】

カビの培養上清を 10mM リン酸緩衝液 (pH7.0) に溶解した。陰イオン交換樹脂 (DEAE SepharoseFF®) をリン酸緩衝液で平衡化し、ガラスオープンカラム (15mm I.D. × 300mm) に充填後、培養上清液 20mL を注入した。非吸着成分を洗浄するために 3CV のリン酸緩衝液を注入した。次に陰イオン交換樹脂に吸着したタンパク質を塩濃度の異なる緩衝液 (50, 100, 150, 200, 225, 250, 300, 1000mM NaCl) で溶出して分画した。分画したタンパク質の一部は、モグロシドと酵素反応させて、モグロールの生成量を測定した。さらに分画したタンパク質の一部は SDS-PAGE によって分子量で分離し、銀染色で可視化した。これより、モグロールを生成する活性の高い画分と活性の低い画分を比較すると、銀染色したタンパク質の中から 20.1~29.0kDa 付近に特異的なバンドを確認することができた。

さらにカビのタンパク質を陰イオン交換樹脂のみでは十分に精製できていないと考え、硫酸アンモニウムによるタンパク質沈殿を組み合わせることで再度上記の手法で検討した結果、分画したタンパク質を SDS-PAGE 後に銀染色すると、モグロールを生成する酵素活性が認められた画分で、66.4~116kDa 付近に特異的なバンドを確認することができた (図 2-1-1)。

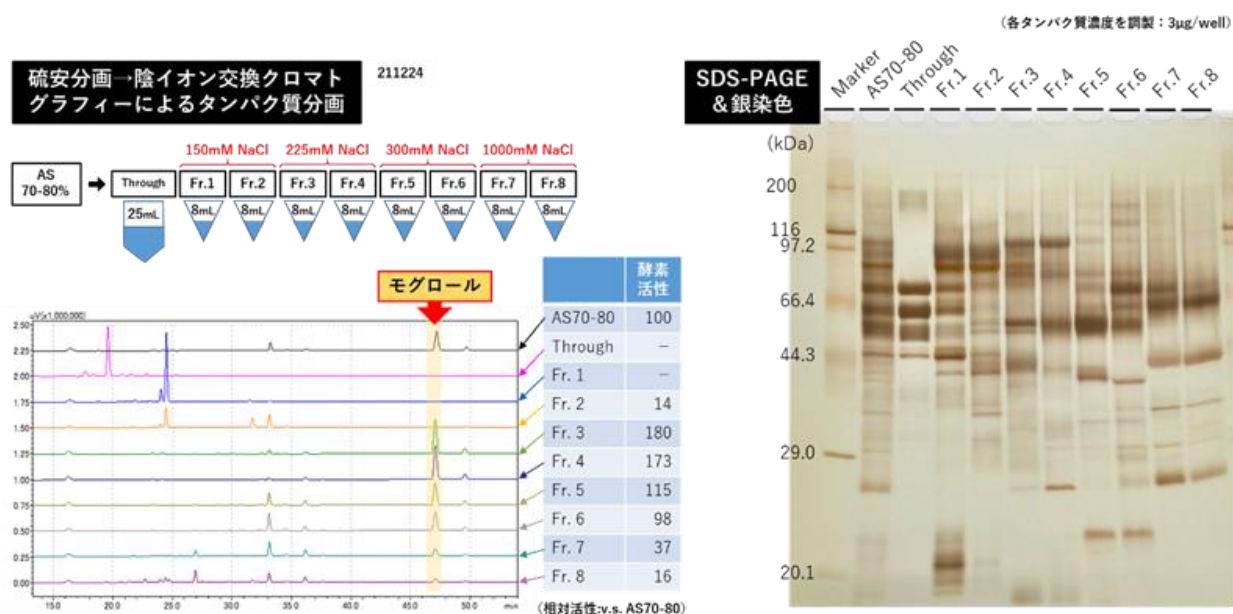


図 2-1-1. 硫酸沈殿と陰イオン交換クロマトグラフィーを組み合わせた分画精製

(ii) タンパク質情報の取得

【研究方法と結果】

カビの培養上清中のタンパク質を硫酸沈殿と陰イオン交換樹脂を組み合わせることで分画し、SDS-PAGE と銀染色で可視化し、酵素活性測定から得られたモグロール生成酵素と予想されるタンパ

ク質をポリアクリルアミドゲルから切り出し、nano LC-MS/MS 分析を行った。Mascot Score から判断し、有意な同定の指標とされる Score「30」以上のタンパク質を選択した。13 検体を分析した結果、105 種類のタンパク質が同定された（以下、酵素情報は機密情報のため非開示）。これらの中から酵素活性が報告されているタンパク質を選別した。最もカバー率（＝タンパク質のアミノ酸配列と相当するペプチドの相同率）が高かったのは、酵素タンパク質 A（カバー率 30%）であった。次点で、酵素タンパク質 B（カバー率 27%）であり、さらに、酵素タンパク質 C（カバー率 12%）であった。いずれも 2 糖以上の化合物を基質として加水分解する酵素タンパク質であった。

(iii) モグロシドを基質としたモグロール生成酵素の酵素活性測定

【研究方法と結果】

最もカバー率の高かった酵素タンパク質 A の遺伝子情報を取得して、カビで発現させて、単一酵素まで精製した。モグロシドを基質して酵素反応を測定した。すなわち、ラカンカの果実から単離精製したモグロシドに対して、カビから単離精製した酵素タンパク質 A を反応させた。

以上の結果から酵素タンパク質 A は、基質であるモグロシドの特定の構造を認識して酵素活性を示すことが分かった。一部の条件下ではモグロールが生成しなかったことから酵素タンパク質 A 以外の別の酵素の存在も示唆され、複合的な作用が考えられた。

【1-2】変異導入による酵素改良

【研究方法と結果】

事業では本菌株であるカビの食品利用について文献調査を行った。

調査 1：カビの病原性の有無について

本菌株は、国立感染症研究所病原体等安全管理規定別冊 1「病原体等の BSL 分類等」におけるバイオセーフティーレベル (BSL) 1、米国 NIH の“Guidelines for Research Involving Recombinant DNA Molecules”の定義における Risk Group1 に分類され、非病原性の微生物とみなされていた。以上の調査結果より、本菌株自体の病原性はないと考えられる。

調査 2：カビの生産する酵素の食品製造利用への可否について

厚生労働省の「食品衛生法に基づく添加物の表示等について」においては、カビを基原とする添加物とする添加物が我が国において使用実績があるということが分かった。以上の調査結果より、本菌株の生産する酵素は食品製造へ利用できると考えられる。

調査 3：遺伝子組換え酵素の許認可について

一般的に酵素の活性部位にアミノ酸変異を導入することで酵素活性が増加することが知られている。モグロールの生産効率向上を目的に調査の結果、厚生労働省の食品安全委員会による安全性審査が必要であることが分かった。

厚生労働省に収蔵されている国内市場の酵素添加物は「既存添加物」として収蔵されているのが、68 品目であるが、厚生労働大臣の指定を受けた「指定添加物」は、アスパルギナーゼとプシコースエピメラーゼの 2 品目のみである。また、安全性審査の手続きを経た旨の公表がなされている「遺伝子組換え酵素」は、7 品目・15 製品である。これらの内、海外メーカーの認可数は 5 品目・13 製品であり、国内メーカーは 2 品目・2 製品であることが分かった。

以上の結果より、「遺伝子組換え酵素」は安全性審査には想定以上の期間と経費が必要であると

予想されるため、変異導入による酵素改良は未実施とした。

そこで当初の目的に立ち返り、酵素活性を高める別の新たな取り組みとして、カビの培養条件や培養上清の精製法について検討を行った。精製方法（賦形剤の種類や配合割合）などを変更することで初期酵素と比較して改良酵素で酵素活性を約4倍に増加させることに成功した（図2-1-2）。

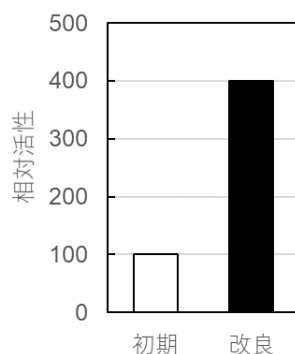


図2-1-2. 初期酵素と改良酵素の酵素活性の違い

【1-3】固定化酵素カラムによる連続生産

(i) 固定化担体の選定

【研究方法と結果】

カビの培養上清中の酵素を固定化して再利用するために食品製造に利用可能な担体として以下のものを用いた。

表2-1-1. 固定化担体（外観：左から担体A、B、C、D、E、F）

材質	略称	名称	外観
セラミック	A	非公開	
	B		
	C		
	D		
スチレン	E		
	F		

(ii) 固定化酵素担体の評価

【研究方法と結果】

固定化前の担体の外観を表2-1-1に示す。担体へ酵素を固定化する際は、以下に示す方法で行った。培養上清を緩衝液に溶解させた酵素溶液を容器に入れて担体を加えて15時間攪拌（50rpm, 20-25℃）した。この時、固定化酵素担体だけでなく培養上清も回収し、酵素と担体の結合の指標とした。固定化酵素反応（バッチ法）では、容器に基質溶液と固定化酵素担体を加えて24時間攪拌（50rpm, 40℃）を1回の酵素反応として、連続で3回繰り返した結果、担体A、B、C、D、E、Fのうち、担体Fは目的とする酵素が結合せず、上清のみに酵素活性が確認された。他の固定化担体は、酵素活性を示したが、固定化しない酵素活性（陽性対照：以下、ポジ）と比べて半分以下の活性しか示さなかった。このなかで唯一、担体Bは、1回目の酵素反応は弱かったが、2回目と3回目の酵素反応では、ポジと比較して80%以上の酵素活性を示した（図2-1-3）。

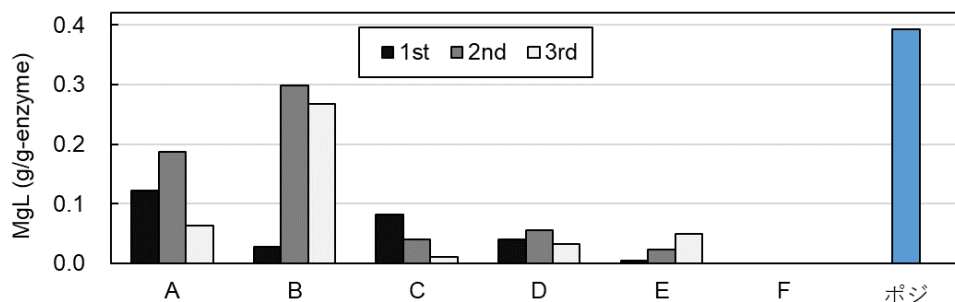


図 2-1-3. 固定化酵素担体の違いによる酵素活性 (バッチ法)

(iii) 固定化酵素担体を用いた連続生産 (バッチ法)

【研究方法と結果】

酵素を固定化した担体Bを用いて連続酵素反応を行った。すなわち、固定化酵素担体Bに基質溶液を添加→24時間の酵素反応→酵素反応溶液の回収と新たな基質溶液の添加 (固定化酵素担体Bはそのまま) →24時間の酵素反応→ … といったサイクルで行った。

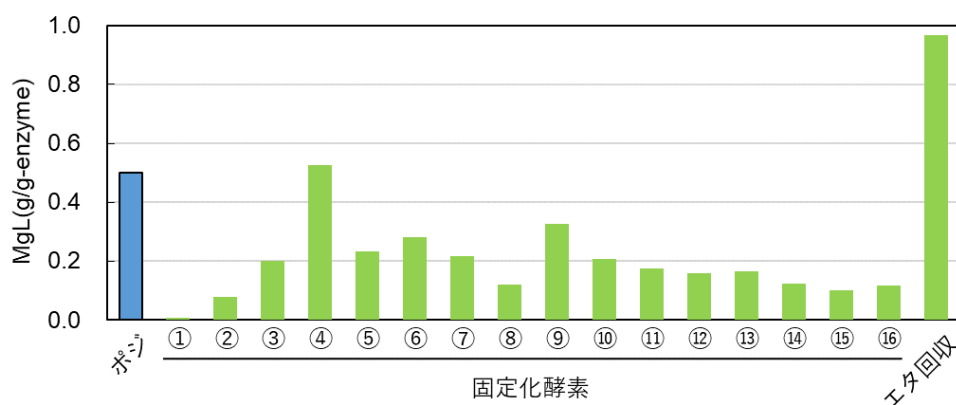


図 2-1-4. 担体Bの連続使用による酵素活性 (バッチ法)

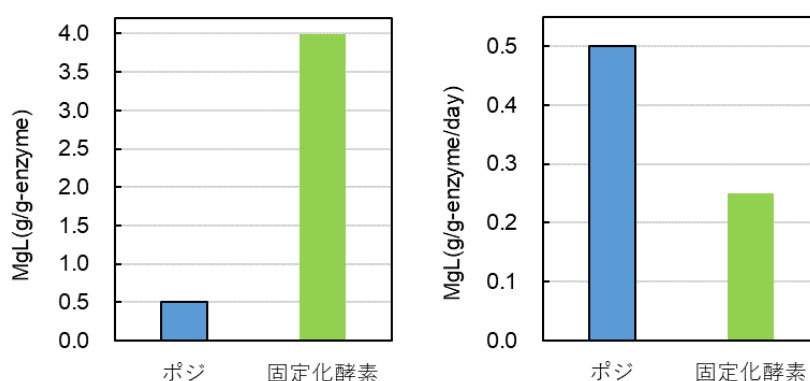


図 2-1-5. 担体Bを用いたモグロールの生産能力 (生産量、製造時間あたりの生産量)

酵素を固定化した担体Bで連続16回の酵素反応を行った結果、モグロール生産能力には、ブレがあり、徐々に低下するが、酵素の繰り返し利用が可能であることを明らかにした (図 2-1-4)。

また、ポジと担体Bに酵素を固定化した固定化酵素とのモグロール生産能力を比較した結果、使用した酵素あたりのモグロール生産量は、固定化酵素の方が約8倍高かったが、一方で製造時間あ

たりでは、固定化酵素の方が 0.5 倍低かった（図 2-1-5）。

【2】モグロールの安全性・機能性評価

【2-1】モグロールの安全性評価

【研究方法と結果】

遺伝毒性試験と一般毒性試験では、モグロシドとカビの培養上清を緩衝液に溶解させ、40℃の湯浴で酵素反応させた反応液を分取精製クロマトグラフでモグロールと不純物を分離し、減圧濃縮により溶媒を除去して、モグロールを高純度で含む組成物を得て、これを試験に用いた。

ヒト試験では、酵素反応液を噴霧乾燥してモグロールを含む組成物を得た。これとさらに賦形剤（デキストリン）を3号カプセルに規定量を充填したものをヒト試験の被験食品とした。

外部機関において、国際機関である OECD のテストガイドラインの中から化学物質の毒性試験ガイドラインに準拠した遺伝毒性試験と一般毒性試験、厚生労働省の「特定保健用食品の安全性評価に関する基本的考え方」に準拠したヒト安全性試験を行った（表 2-2-1）。

表 2-2-1. 外部機関で実施したモグロールの安全性試験

試験内容		試験条件概要	結果
遺伝毒性	Ames試験 (変異原性試験)	菌株：ネズミチフス菌（5種）大腸菌（1種）	陰性
	染色体異常試験	細胞：CHO/IU	陰性
一般毒性	単回経口投与試験	動物：ラット雌雄 各5匹×4群 用量：0, 50, 300, 2000 mg/kgBW 項目：一般状態観察、体重測定、肉眼的病理検査	LD ₅₀ > 2000 mg/kg
	91日間反復経口投与試験	動物：ラット雌雄 各10匹×4群 用量：0, 500, 1000, 2000 mg/kgBW 項目：一般状態観察、体重・摂餌測定、尿検査、血液学的 ・血液生化学検査、組織重量測定、肉眼的病理検査、病理組織学的検査	NOAEL 2000 mg/kg BW/day
ヒト安全性	過剰摂取試験 長期摂取試験	対象：健康成人（各試験11名ずつ） 摂取：1日摂取目安量の5倍量を4週間連続摂取 1日摂取目安量の1倍量を12週間連続摂取 評価：有害事象、身体計測、臨床検査	医学的に問題なし

モグロールを用いた各種試験において、死亡例はなく、異常所見も観察されなかったため、ヒトにおけるモグロールの一日摂取許容量(ADI)について算出した。一般的にヒトでの ADI を算出するには、無毒性量（NOAEL）に対して、安全係数で除すことで求められる。安全係数は、100 とした（実験動物とヒトの種差を考慮して 10 倍、さらにヒトの体格差などの個人差を考慮して 10 倍、なので 100 倍）。今回、実験動物におけるモグロールの NOAEL が 2000 mg/kg bw/day であるため、安全係数 100 で除すと、ヒトの ADI は、20 mg/kg bw/day、すなわち体重 60kg の場合、1 日当たり 1200 mg のモグロールを摂取しても健康に悪影響はなく安全であると推定された。

そこで各種安全性試験の結果より、20 歳以上の健康男女 11 名を対象に過剰摂取試験を実施した。ヒト試験の実施に際して、モグロールの 1 日あたりの目安摂取量を設定した。過剰摂取試験は、これに対する 5 倍量を 4 週間毎日摂取させた結果、有害事象が 1 件発生したが、被験食品の摂取が原因ではないと担当医師により判断された。同様に 20 歳以上の健康男女 11 名を対象に長期摂取試験を実施した。長期摂取試験では、1 日あたりの目安摂取量に対する 1 倍量を 12 週間毎日摂取させた結果、有害事象が 2 件発生したが、被験食品の摂取が原因ではないと担当医師により判断された。

以上より、2種類のヒト試験において医学的に問題のある変化は確認されなかったため、ヒトにおけるモグロールの摂取における安全性が医師により確認された。

【2-2】モグロールの機能性評価

【研究方法と結果】

(i) 動物実験での高血糖予防効果の検証

肥満・糖尿病マウスに高脂肪食を摂取させるモデルを用いてモグロールの生理作用について検討した。図2-2-1 (Fig. A) に示すように5週齢時から KKAY マウスに高脂肪食を摂取させ、モグロールは0.01%または0.05%混餌投与した。Non-diabetic control として C57BL/6J マウスに標準食を摂取させる群 (C57BL) を設けた。モグロールによる体重への影響はなく (Fig. B)、鼠径部皮下脂肪重量や腸間膜脂肪重量への影響はなかった。7-8週齢時に行った6時間絶食後の腹腔内糖負荷および経口糖負荷試験においてモグロールは投与量依存的に耐糖能を改善することが明らかになった (Figs. C-F)。インスリン負荷試験ではモグロール摂取による影響はなかったが (Fig. G)、モグロールは血中インスリンを増加させたため (Fig. H)、膵臓β細胞機能に影響して耐糖能を改善させることが示唆された。

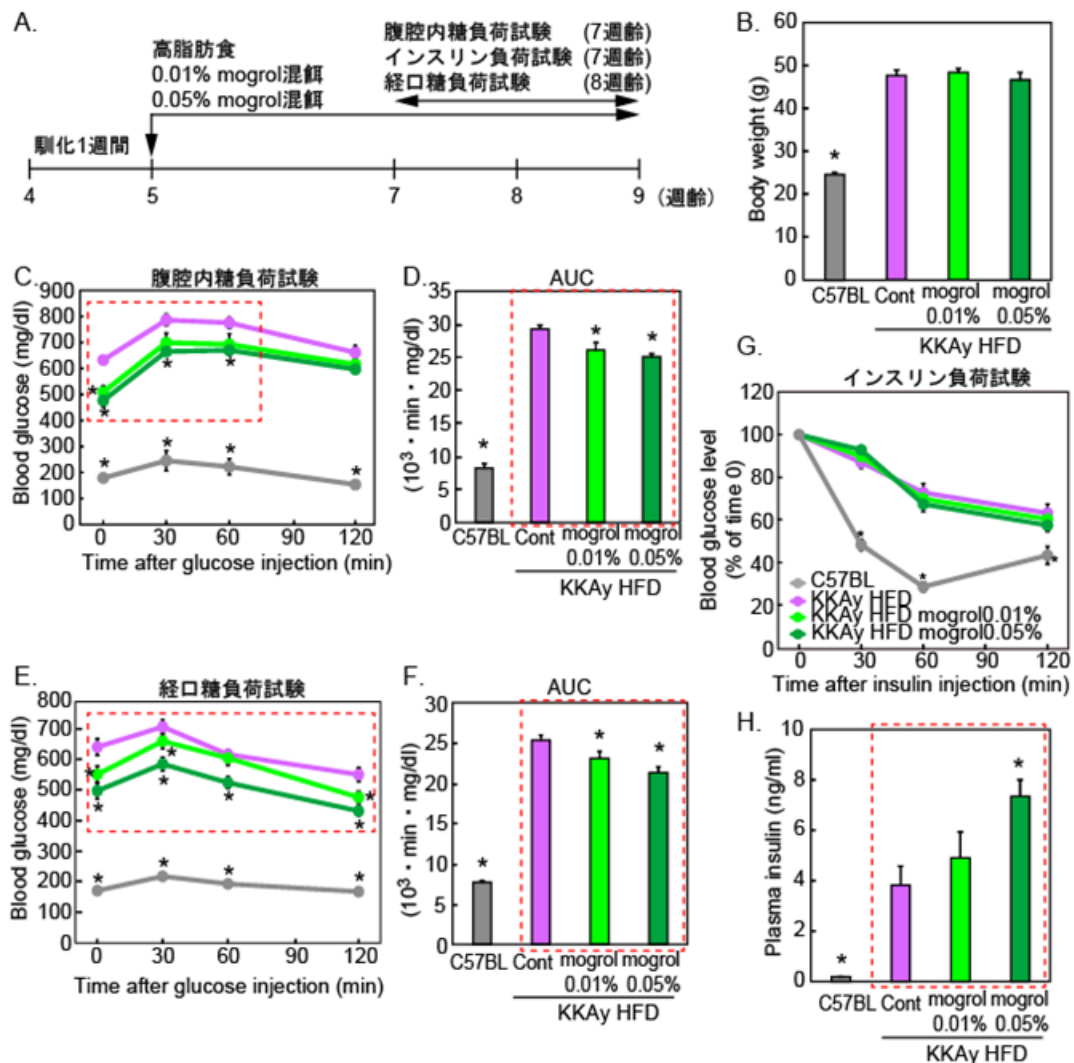


図 2-2-1 (A-H) . 高脂肪食摂取 KKAY マウスのモグロール混餌摂取による耐糖能への影響

肝臓中トリグリセリド量には影響がなかったが、血漿中のトリグリセリド量を減少させる傾向があり、図 2-2-2 (Fig. A)、高脂血症予防作用が示唆された。血漿中のコレステロールや遊離脂肪酸量には影響がなかった (Figs. B, C)。

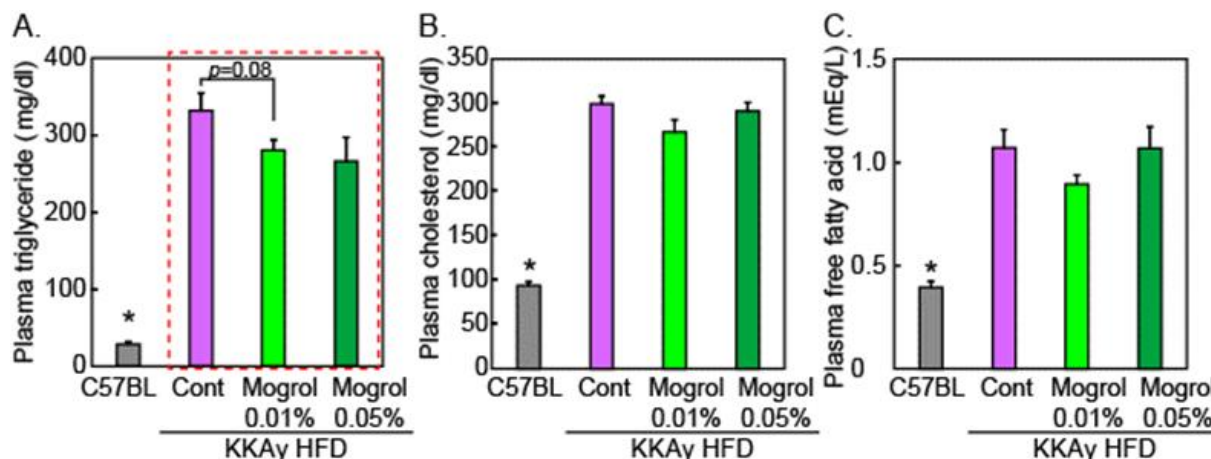


図 2-2-2 (A-C) . 高脂肪食摂取 KKAY マウスのモグロール混餌摂取による耐糖能への影響

モグロールによる耐糖能への影響が、モグロール単回投与でも効果があるか否かを検証するために、KKAY マウスに高脂肪食を摂取させて飼育し、図 2-2-3 (Fig. A)、7 と 12 週齢時に腹腔内糖負荷試験を、さらに 7 週齢時にはインスリン負荷試験も行った。モグロールはグルコースまたはインスリン投与 30 分前に 50 mg/kg で強制経口投与を行った。その結果、モグロールはグルコース負荷 120 分後の血糖値を改善させた (Fig. B、7 週齢時)。12 週齢時でも耐糖能改善作用が認められた。一方で、インスリン感受性には影響がなかった (Fig. C)。

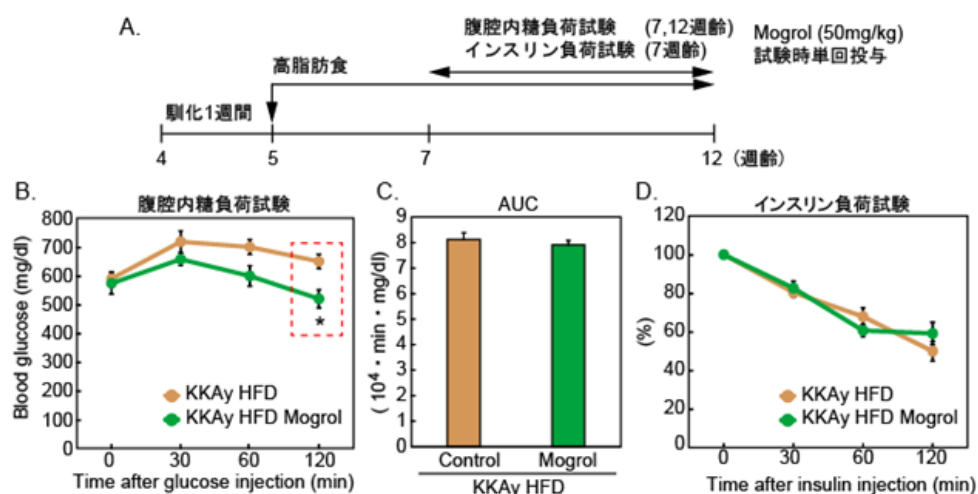


図 2-2-3 (A-D) . 高脂肪食摂取 KKAY マウスのモグロール単回投与による耐糖能への影響

(ii) 培養細胞で高血糖予防メカニズムの評価

モグロールのインスリン分泌への影響を INS-1β 細胞を用いて評価した。その結果、モグロールはインスリン分泌を促進し、その作用は TGR5 阻害剤である SBI-115 存在下で消失した (Fig. 2-2-4 (Fig. A))。一方で、インスリン分泌促進作用をもつ GLP-1 分泌への影響を GLUTag L 細胞を用いて評価した

が、モグロールによる作用は認められなかった (Fig. B)。尚、いずれの実験系でもポジティブコントロールとして KCl を用いた。つまり、動物実験で認められたモグロールのインスリン量増加による耐糖能改善作用は、膵臓β細胞の TGR5 を活性化させることで発揮されることが示唆された。

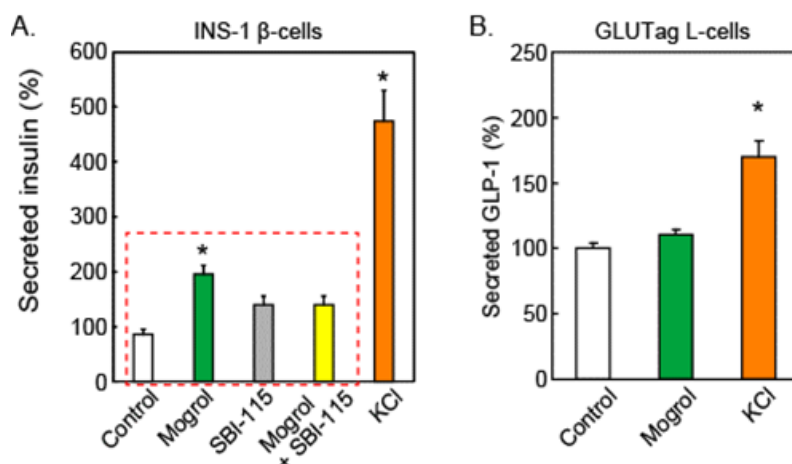


図 2-2-4 (A, B) . 培養細胞を用いたインスリン分泌と GLP-1 分泌への影響

(iii) ヒトでの機能性の検証

モグロール摂取による機能性を検討するため、ランダム化比較試験を実施した。すなわち本試験は、健常な 20 歳以上の日本人男女をランダムに群分けして被験食品を摂取させた場合とプラセボ食品を摂取させた場合についての影響を比較評価した。身体測定、理学検査、尿検査、末梢血測定、問診などを行い、肥満や高血糖に関する項目について解析した結果、プラセボと比べて被験食品の摂取によって有意な値を示す項目を明らかにした。

【3】用途別精製技術の確立

【3-1】噴霧乾燥を利用した連続精製

(i) 賦形剤の候補選定

【研究方法と結果】

モグロールは、賦形剤を配合しなければ噴霧乾燥できずに装置の壁面に付着するため、サラヤで保有する食品の賦形剤 (=乾燥補助剤) 中から賦形剤の Dextrose Equivalent (DE) 値という指標を元にアドバイザーからの意見を参考に試験を実施した (表 2-3-1)。

表 2-3-1. 噴霧乾燥で検証する賦形剤

一般名称	製品名	DE 値
デキストリン	パインデックス#100	4
マルトデキストリン	パインデックス#2	11
	TK-16	18
マルトオリゴ糖	パインオリゴ 20	22
粉あめ	パインデックス#3	25

(ii) 噴霧乾燥の条件検討

【研究方法と結果】

表 2-3-2 に示す噴霧乾燥条件でモグロールを含む酵素反応液と賦形剤を混合することで噴霧乾燥できることを確認した。そこで適正な賦形剤の添加量について検討するために、パインデックス #100 (DE4) を用いて検討した。酵素反応液を約 90mL ビーカーに取り、パインデックス#100 を加えて溶解させ、100mL にメスアップし、100mL 分噴霧乾燥したときにサイクロン部に回収できた粉体の量を測定した。次に適正な賦形剤の DE 値について検討するために、賦形剤の添加量を 10% に固定して、先程と同様の条件で検討した。

表 2-3-2. 噴霧乾燥の設定条件

	設定値
入口温度	120, 140, 160, 200°C
吸気エア	除湿空気
噴霧方式	2 流体ノズル

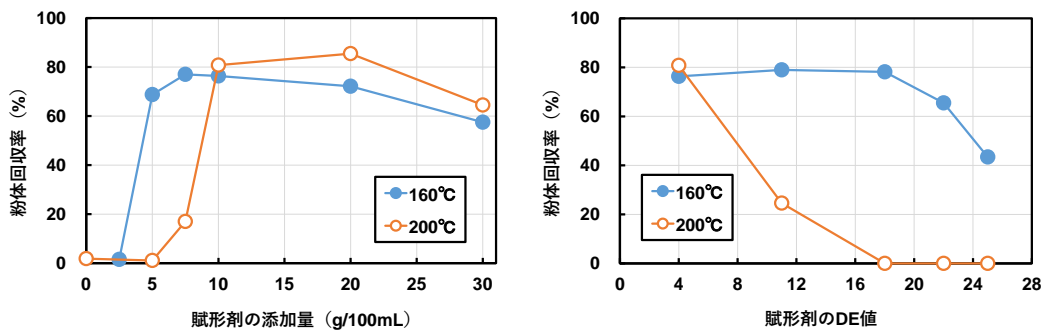


図 2-3-1. 賦形剤の添加量と DE 値による噴霧乾燥物の粉体回収率

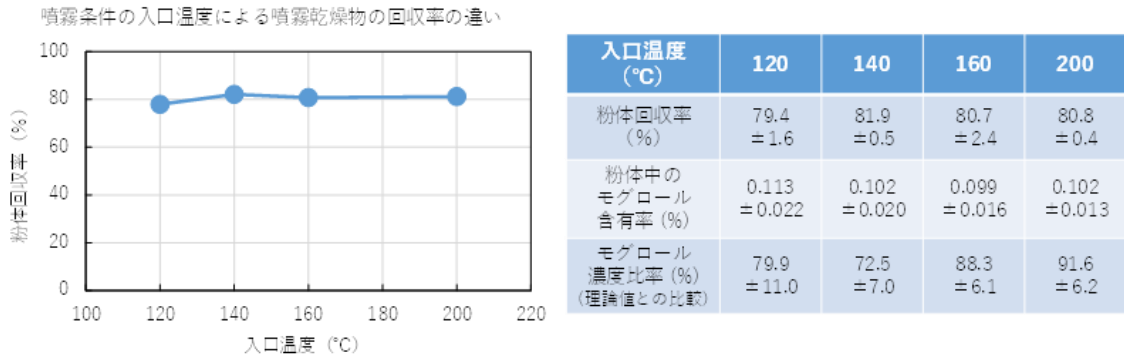


図 2-3-2. 入口温度による噴霧乾燥物の粉体回収率

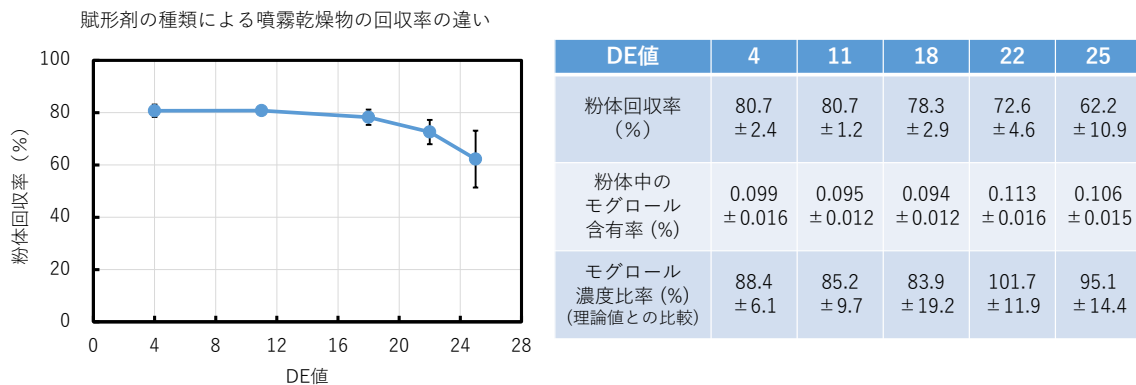


図 2-3-3. 賦形剤の種類による噴霧乾燥物の粉体回収率の違い

図 2-3-1 より、噴霧乾燥温度 160℃ と 200℃ の時の賦形剤添加量および賦形剤の DE 値における粉体の回収量について検討した。賦形剤の添加量では 10% 未満のときは、160℃ の方が粉体の回収率は良かったが、10% 以上となると 200℃ の方が粉体回収率は良い傾向にあった。ただし、添加量が 10% を超えると粉体回収率が低下する傾向が認められた。次に賦形剤の DE 値の差では、噴霧乾燥温度に係らず、DE 値が大きくなると粉体回収率は低下した。この傾向は、噴霧乾燥温度が 200℃ の時に顕著であり、特に賦形剤「TK-16 (DE18)」を使用した場合、160℃ では粉体回収率 80% 付近であるのに対して、200℃ では粉体はほぼ回収できなかった。

さらに図 2-3-2 では、噴霧乾燥温度による違いが粉体回収率に及ぼす影響について確認するために、賦形剤「パインデックス#100 (DE4)」を 10% 添加で固定して 120℃、140℃、160℃、200℃ で噴霧乾燥した結果、粉体回収率は噴霧乾燥温度に関わらず同等であったが、モグロール含量では 200℃ が最も回収率が安定しており、温度が低下するとモグロール回収量も低下した (n=3)。

また、図 2-3-3 では賦形剤の種類が粉体回収率に及ぼす影響について確認するために噴霧乾燥温度 160℃、賦形剤を 10% 添加で固定して DE 値 : 4, 11, 18, 22, 25 の賦形剤で噴霧乾燥した結果、粉体回収率は賦形剤の DE 値が増加するにつれて低下した (n=3)。これらのことから、モグロールを含む酵素反応液を噴霧乾燥する際には、賦形剤「パインデックス#100 (DE4)」を 10% 配合したとき、粉体回収率、モグロール回収量が最も安定することが分かった。

【3-2】結晶化を利用した高純度精製

【研究方法と結果】

インライン顕微鏡を用いて酵素反応におけるモグロールの生成過程におけるモグロールの核化と核成長を画像と濁度を指標にモニタリングした。

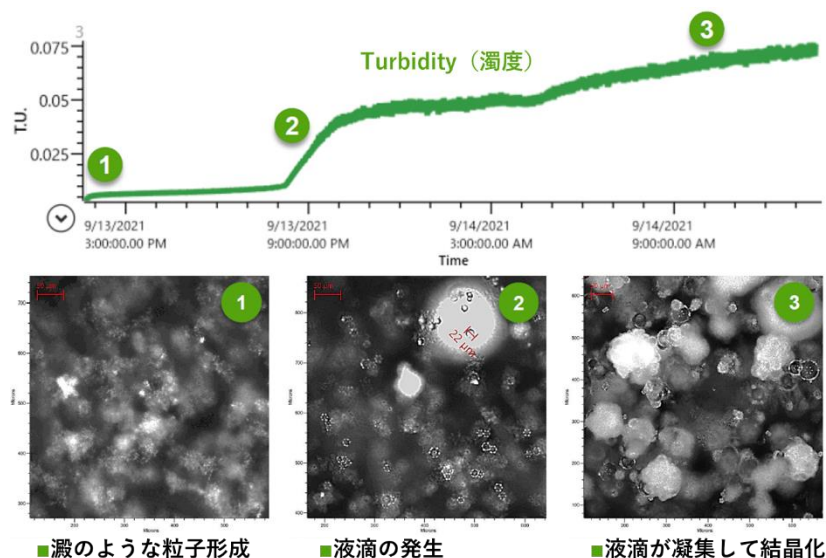


図 2-3-4. モグロールの生成～結晶化のモニタリング

図 2-3-4 において 1L スケールの酵素反応でモグロール生成時の様子のインライン顕微鏡観察を行った結果、反応開始から約 24 時間で結晶化が認められた。この結晶化物を含む粗生成物の純度を確認した結果、純度 60% 以上であったため、再溶解して C18 カラム精製を実施した結果、ステップワイズ溶出法の 50~60% エタノール溶出液中で再度結晶化が発生した。この結晶物の純度を確認した結果、純度 95% 以上であった。

【4】商品化に向けた加工技術の確立

【4-1】モグロールの加工適性検証

【研究方法と結果】

オークラ製菓が保有する高速回転式打錠機で5kg分のタブレットを実機試作した。モグロール以外に必要な原材料として、ソルビトール（賦形剤）、シュガーエステル（滑沢剤）などを配合した。実機試作において1分間に1000錠以上が製造可能であることを確認した（図2-4-1）。

この実機試作したモグロール入りタブレットについて最終製品としての賞味期限を設定するためアルミ包材に充填して40℃の加温条件下での安定性試験を実施した。タブレットの物性：「重量」「直径」「厚み」「硬度」「摩損度」「外観および色調」、成分：「モグロール含量」、味質：「味質（甘味、刺激、風味）」について評価した結果、「硬度」は、製造初期値と比べて、保管1ヶ月、2ヶ月で有意な上昇が認められた。この上昇したモグロール入りタブレットの硬度と他社のタブレット製品の硬度と比べた際、他社品の硬度の方が高いことから、今回の硬度上昇による変化は著しい劣化ではないと判断した。また、色調の変化として、黄色味を帯びていたが、変化の度合いは小さいと判断した。その他の物性については顕著な変化は認められなかった（図2-4-2）。

一方で、アルミ包材に充填して室温条件下で1年保管する安定性試験を実施した。タブレットの各項目を評価した結果、すべての項目において、有意な差は認められなかった（図2-4-3）。



図2-4-1. 製造実機における試作品タブレットと安定性試験サンプル

	重量 (mg)	直径 (mm)	厚み (mm)	硬度 (kN)	摩損度 (%)
初期値	147 ± 2	7.0 ± 0.0	3.4 ± 0.0	72.5 ± 10.0	0.14
1ヶ月後	147 ± 1	7.0 ± 0.0	3.4 ± 0.0	101.5 ± 9.2 *	0.11
2ヶ月後	145 ± 1	7.0 ± 0.0	3.4 ± 0.0	107.9 ± 11.5 *	0.17

摩損度以外は、n=10 (Mean ± SD) *p<0.05, versus 初期値：スチューデントのt検定
摩損度は、錠剤の摩損度試験法（日本薬局方）に準じ、6.5gを超える最小錠数で実施

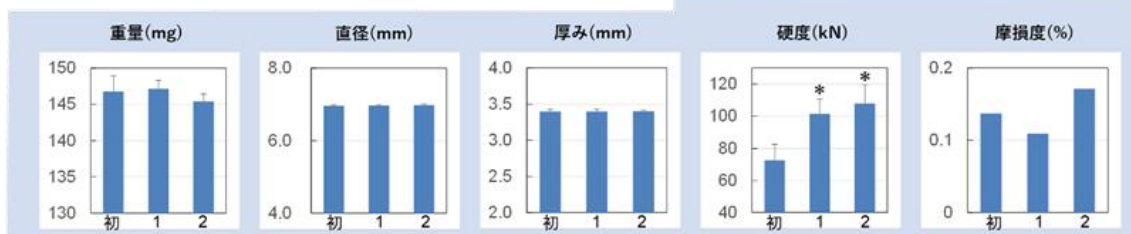


図2-4-2. 安定性試験（40℃、1～2ヶ月）の結果

実機試作品（室温1年保管品）を用いた安定性試験（物性）

	重量 (mg)	直径 (mm)	厚み (mm)	硬度 (kN)	摩損度 (%)
初期値	147 ± 2	7.0 ± 0.0	3.4 ± 0.0	72.5 ± 10.0	0.14
室温1年	146 ± 2	7.0 ± 0.0	3.4 ± 0.0	78.2 ± 12.3	0.11

摩損度以外は、n=10 (Mean ± SD) *p<0.05, versus 初期値：スチューデントのt検定
摩損度は、錠剤の摩損度試験法（日本薬局方）に準じ、6.5gを超える最小錠数で実施

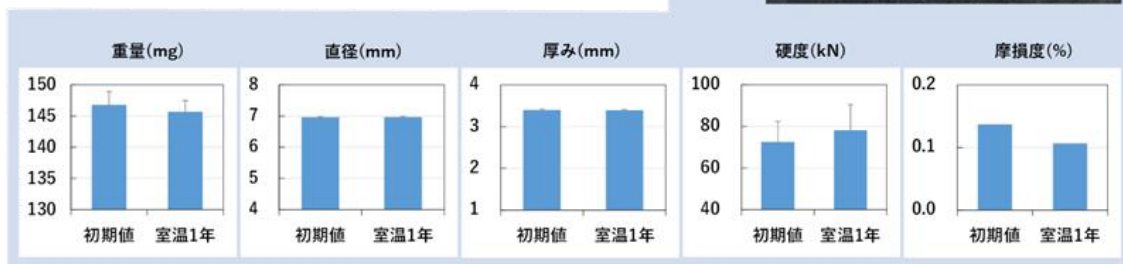


図 2-4-3. 安定性試験（室温、1年）の結果

モグロール入りタブレット中に含まれるモグロールの定量法については、公定法などで示されていないため、サラヤで仮作成中のモグロール定量法を使用した。室温で2ヶ月間保管したサンプルと40°Cで2ヶ月間保管したサンプルや室温で1年間保管したサンプルのモグロール含量についてHPLCを用いて測定した結果、規格値と同程度か上回っており、下回ることにはなかった。

モグロール入りタブレットの味質について評価した結果、熟練パネリストの官能評価において違いは認められなかった。

【5】スケールアップ技術の確立

【5-1】スケールアップ技術の確立

【研究方法と結果】

サラヤが保有する120L反応釜で実機試作を行った。試作量は100Lとし、酵素反応の原材料としては、基質、酵素、緩衝液、溶媒を準備した。量産試作では、これら原材料が計量可能であること、均一に攪拌できること、過剰な泡立ちなく攪拌できること、液温が自動調節可能であることなど総合的に各種生産設備について確認した(図2-5-1)。酵素反応完了後にモグロールが生成した溶液を遠心分離、噴霧乾燥、結晶精製などで水分を除去した生成物を得た。100Lの試作量で生成物である食品グレードのモグロールを約2400g(乾燥重量)得られることを確認した。原材料の準備から生成物の袋詰まで約7日間を要した(表2-5-1)。



図 2-5-1. 量産試作の製造設備と食品グレードのモグロール（量産試作品）

表 2-5-1. 食品グレードのモグロールの生産条件

製造単位	2400g dw/100L Batch
製造リードタイム	7 days
製造設備	<ul style="list-style-type: none"> ・ 120L 反応釜+温調ユニット ・ 遠心分離機 ・ 送風乾燥機
製造場所	サラヤ株式会社 関東工場 (茨城県)

第3章 全体総括

3-1 研究開発成果

【1】新酵素反応技術の高度化

【1-1】モグロール生成酵素の同定

カビの培養上清中のタンパク質を同定するために、各種精製法を用いて検討した結果、酵素活性の有無による違いを SDS-PAGE と銀染色により可視化することで、特定のバンドパターンを明らかにした。ここから nano LC-MS/MS 分析を実施したところ、カビ由来のタンパク質を 105 種類明らかにした。モグロール生成酵素の候補の中から最もカバー率の高い酵素タンパク質 A について、モグロシドとの酵素反応特性を明らかにした。

【1-2】変異導入による酵素改良

モグロール生成酵素について各種調査を行い、法規制、安全性などについて明らかにした。酵素改良として酵素活性を高めるために、カビの培養条件や培養上清の精製法について再検討した結果、精製方法（賦形剤の種類や配合割合）などを変更することで初期酵素と比較して改良酵素で酵素活性を約 4 倍に向上できることを明らかにした。

【1-3】固定化酵素カラムによる連続生産

通常は使い捨てとなる酵素を繰り返し利用するため、酵素の固定化技術について検討した。担体 B を用いることで少なくとも 16 回連続して酵素反応に使用可能であることを明らかにした。

【2】モグロールの安全性・機能性評価

【2-1】モグロールの安全性評価

モグロールの食経験は、従来の摂取量から増加が予想されるため、不十分な状態であった。そこで各種試験（培養細胞、実験動物、ヒト）を行い、モグロールの安全性を明らかにした。

【2-2】モグロールの機能性評価

(i) モグロールにより培養細胞で肥満予防および高血糖予防メカニズムの評価

モグロールが機能性を発揮するメカニズムとして胆汁酸受容体 TGR5 の活性化を明らかにし、活性化に重要な TGR5 のアミノ酸残基を同定した。一方で、TGR5 以外の胆汁酸受容体 (FXR、ビタミン D 受容体、CHRM3) の活性化は認められず、TGR5 に選択的に機能することが判明した。モグロールは TGR5 を介して膵臓 β 細胞でインスリン分泌を促進する作用をもつことを見出した。

(ii) 動物実験での肥満および高血糖予防効果の検証

アルコール摂取モデルでは、10 mg/kg 体重/day での投与に加え、これと同等量を摂取する形となる 0.02%混餌アルコール食、および 5 倍量の 0.1%混餌アルコール食でも体温の低下を抑制する作用が認められた。さらに、アルコールによる肝障害マーカーの ALT、AST、CRP の上昇を抑制する作用を持つことが明らかとなった。肥満・糖尿病モデルマウスに対する効果として、インスリン分泌を促進して血糖値の上昇を抑制する作用を有することが判明した。加えて、血中の高トリグリセリド血症を抑制する傾向が認められた。

(iii) ヒトでの肥満および高血糖予防効果の検証

モグロールの経口摂取によるランダム化比較試験の結果、健常男女において被験食品はプラセボ食品と比較して、肥満または高血糖の予防に関係する一部の評価項目において有意な値を示し、有効性が認められた。

【3】用途別精製技術の確立

【3-1】噴霧乾燥を利用した連続精製

食品グレードのモグロールを製造するために、噴霧乾燥による連続精製においては、乾燥温度、賦形剤の種類、賦形剤の配合量が安定化に重要であることを明らかにした。

【3-2】結晶化を利用した高純度精製

最終製品の用途によっては、不純物を取り除く必要があり、モグロールに特有の結晶化メカニズムを明らかにするため、モグロールの生成過程を画像としてインライン顕微鏡でモニタリングすることで結晶（純度 95%以上）の形成過程を明らかにした。

【4】商品化に向けた加工技術の確立

【4-1】モグロールの加工適性検証

食品グレードのモグロールを用いた製品試作を行い、粉原料混合時におけるハンドリングの問題や圧縮成形時における熱耐性などの加工適性を検討した。オークラ製菓の製造設備を用いて 1 分間に 1000 錠以上の製造条件で 5 kg の実機試作に成功した。さらに実機試作品を用いた安定性試験を実施した結果、物性、成分、味質に顕著な変化は認められず、1 年間の賞味期限を担保できることを明らかにした。

【5】スケールアップ技術の確立

【5-1】量産スケールアップ検証

食品グレードのモグロールの量産化に向けたスケールアップにおける課題を確認した。ラボ検証時よりも工程の追加が必要であったが、サラヤの製造設備を用いて 100L での量産試作に成功し、年間 120kg 相当量の食品グレードのモグロールを製造可能であることを確認した。

3-2 研究開発後の課題・事業化展開

(1) 研究開発後の課題

ターゲット商品である「モグロール入りタブレット」等について、ヒト試験において効果が認

められた項目を訴求する機能性表示とする。機能性表示食品は、安全性と機能性に関する科学的根拠が必要とされるため、補助事業で実施したヒト試験結果について論文を作成後、消費者庁に機能性表示食品の手続きに必要な書類が受理される必要がある。

(2) 事業化展開

「モグロール入りタブレット」等のモグロールを配合した機能性表示食品について、発売初期は、サラヤの公式通販限定で販売し、SNS を通じてたプロモーション、マーケティングを行い、ユーザーからの意見などを製品へフィードバックする。その後は、ドラッグストアなどを中心に国内で取引のある企業を通じた販売を行い、海外はサラヤの既存販路を通じた販売を行い、本事業を拡大展開する。