

報 文 2

飼料用ゼアキサンチンの開発

中央技術研究所 化学研究所 先端材料グループ ながい ひでただ
永井 秀忠



1. はじめに

ゼアキサンチンはアスタキサンチンなどで代表されるカロテノイド類の一種である。ゼアキサンチンは、パプリカ、柿、とうもろこし、温州みかん、ケール、ほうれん草、パセリなどの食品類に含まれている。また、ゼアキサンチンは天然の黄色色素として飼料に添加され、ニワトリ等の家禽類の卵黄、肉、表皮の色調を改善する用途が知られている。

一方で、ゼアキサンチンは人間の目の健康において重要な役割を果たしていることが分かってきている。図1に示した通り、ゼアキサンチンは同じくカロテノイド類の一種であるルテインとともに目の網膜の中心部（黄斑部）に多く存在していることが知られている。この目の網膜の病気として知られているものに、加齢性黄斑変性（Age-related Macular Degeneration : AMD）がある。図2はAMD患者の視野イメージを表現した図である。日本のある町の住民を対象にして、1998年に行われた研究¹⁾では、少なくとも1眼に加齢黄斑変性がみられる人は50歳以上の人口の0.87%を占めていた。これを日本人の総人口に直すと約37万人になる。9年後の2007年に行われた再調査では加齢黄斑変性は1.3%と2倍に増加していた。日本の総人口に換算すると、加齢黄斑変性の推定患者数は69万人となる。加齢黄斑変性は現在、日本人の視覚障害の原因の第4位とされている。

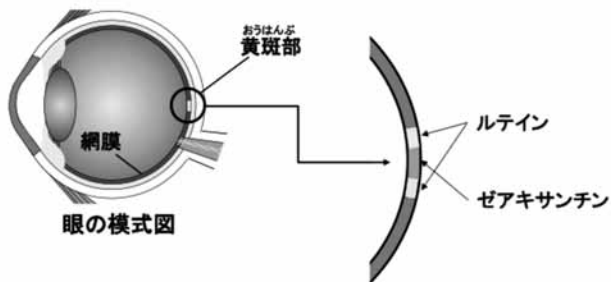


図1 ヒト眼球の構造とルテイン、ゼアキサンチンの存在箇所



図2 加齢黄斑変性症患者の視野イメージ

ゼアキサンチンは、ヒトの食事に使用されている素材からゼアキサンチンを経口摂取し、腸管から体内に取り込まれると言われている。体内に取り込まれたゼアキサンチンのヒト体内の移動には血液が介在する。通常の食事を摂取しているヒトの血中には、既にゼアキサンチンが取り込まれていることがわかっている。

ヒト血中ゼアキサンチン濃度を高める試みは現在までに数多く報告されている。ゼアキサンチン源としては、ほうれん草、とうもろこし等の野菜類やみかん等の柑橘類の植物系ゼアキサンチン源、鶏卵の黄身等の動物系ゼアキサンチン源、又はゼアキサンチンを含むサプリメント等が考えられる。このうち植物系のゼアキサンチン源については、遺伝子組み替え技術を応用する必要があるなど、そのゼアキサンチン濃度を人為的に高めることは困難であると考えられる。以上の理由により、ヒト血中濃度を高めるには、大きく分けて鶏飼料にゼアキサンチン源を配合して鶏卵中のゼアキサンチン濃度を高めてヒトに摂取させるか、ゼアキサンチンを含むスピルリナなどからなるサプリメントを使用してヒト血中濃度を高める方法が存在する。

本検討では、前者の鶏飼料用に当社製品であるゼアキサンチン含有乾燥菌体（商品名：Panaferd-ZX）を養鶏業者に販売、養鶏業者がゼアキサンチン強化卵を製造して高付加価値鶏卵として販売するというビジネスモデルの実現のため開発を行ってきた経過を報告する。

2. ゼアキサンチン含有乾燥菌体(Panaferd-ZX) 製法の開発

2.1 ゼアキサンチン生産菌株の取得

当社は、カロテノイドの一種であるアスタキサンチンを主に鮭養殖のための飼料用途で販売している。製法開発に先立って当社ではアスタキサンチンを生産する菌株を見出し、発酵法をベースとした製造方法を開発した。このアスタキサンチン生産株 (E-396 株) の分類学名は、*Paracoccus carotinifaciens* である²⁾ (図 3)。このアスタキサンチン生産株の変異処理によってゼアキサンチン生産菌を取得した。具体的には、濃度 200mg/L の NTG (N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン) 中で、温度 28℃、30 分間静置して菌体の変異処理を行った。その後、黄色～橙色を呈する変異株コロニー 200 株を選抜し、酵母エキス、ペプトン、ショ糖、リン酸塩などのミネラル分を含んだ培地 6ml を内径 18mm の試験管に入れ、それぞれ試験管培地に 1 白金耳植菌、28℃ で 4 日間、振とう培養を行った。次にこの培養物を遠心分離し、得られた菌体のカロテノイド化合物の分析を高速液体クロマトグラフィーにより行ったところ、総カロテノイド生産量に対するゼアキサンチンの比率が 50% 以上の菌株 1 株を得た³⁾。



図 3 *Paracoccus carotinifaciens* の顕微鏡写真

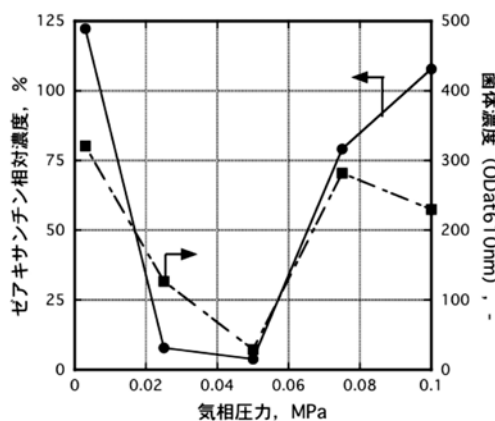


図 4 加圧下におけるゼアキサンチン生産菌株のラボ 5L ジャー培養結果 (●: ゼアキサンチン相対濃度、■: 光学菌体濃度)

2.2 ゼアキサンチン生産菌株を使用した製造方法の開発

取得した菌株を用いて培養プロセスを構築し、kL スケールのパイロットプラント培養を行う段階で、本菌株は容易に培養できないことが判明した。特に、本菌株は圧力の影響を強く受けることがわかった。図 4 に示したように、加圧できるジャーファメンターの気相圧力を調節して、0.1MPa までの圧力下で培養をすると、常圧ではほぼ生育するものの 0.05MPa 付近まで菌体生育が悪化し、極小値を示した後、0.1MPa まで復活する傾向を見せた。kL スケールのパイロットプラント培養槽では、液深分 0.01MPa + 気相圧力 0.02MPa ~ 0.04MPa の 0.03MPa ~ 0.05MPa 付近の総圧力となり、まさに菌体生育の難しい条件下で培養を成立させなければならない状況であった。

この原因について考えられることは、圧力によって溶液中の炭酸イオン濃度は変化する可能性がある点である。本培養では種々ミネラル分を添加しているため、ある程度の無機沈殿物が存在する。炭酸イオン濃度の変化によって無機沈殿物の量が変化し、場合によっては対イオンである陽イオンの濃度に変化が生じる可能性があると考えた。

また、文献⁴⁾によれば、*Paracoccus* 菌のアスタキサンチン生成酵素には 2 種類あり、一つの酵素には鉄イオンの介在が必要であると記載がある。本培養において、鉄イオンの存在を確かめるために、培地上清の鉄イオン濃度を測定したところ未検出であった。しかし、イオンをキレート効果で溶存させることは可能と考え、クエン酸を添加して上清濃度を測定した結果を図 5 に示した。予想通り鉄濃度を高めることに成功したため、加圧下で培養試験を行った。結果を図 6 に示した。結果、クエン酸未添加の時には見られた 0.05MPa 付近の菌体生育悪化は認められなかった。この方法で 5kL のパイロットスケールで培養テストを実施したところ、光学菌体濃度 350 程度、ゼアキサンチン相対濃度約 100% (対未加圧条件ラボジャー結果) の結果が得られた。これにより商業ベースでのサンプル供給が可能となった。発酵した菌体は、膜などの菌体分離機にかけられ、培地成分を洗い流した後、スプレードライなどの乾燥機にかけられ、ゼアキサンチン高濃度含有の乾燥菌体として製造される。

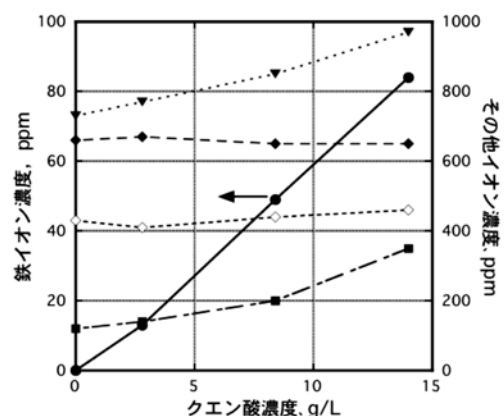


図 5 クエン酸添加時の培地上清中無機元素濃度の変化 (●: 鉄濃度、▼: リン濃度、◆: カリウム濃度、◇: マグネシウム濃度、■: カルシウム濃度、)

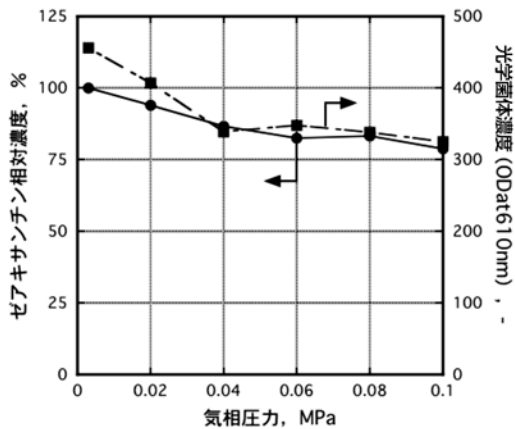


図6 クエン酸添加系での加圧下ゼアキサンチン生産菌株のラボ 5L ジャー培養結果 (●:ゼアキサンチン相対濃度、■:光学菌体濃度)

この様に取得したゼアキサンチン高濃度含有乾燥菌体 Panaferd-ZX の外観図を図7に示した。また、この乾燥菌体の含有するカロテノイド類の分析結果を表1に示した。結果として6.6%が β -カロテンであり、1.6%が β -クリプトキサンチン、90.7%がゼアキサンチンである。カロテノイド分子において、トランス体とは炭素鎖が直線状の分子の状態、シス体とは炭素鎖が途中で折れ曲がっている状態を言うが、本製品においてはゼアキサンチンの内、トランス体が大半を占め、シス体が少量含まれていることがわかる。文献からクコの実のゼアキサンチン含量は1.1mg/100g、スピルリナのゼアキサンチン含量は約1mg/gとの報告があることから、Panaferd-ZXのゼアキサンチン濃度9.3mg/gは非常に高濃度であることがわかる。



図7 当社ゼアキサンチン含有乾燥菌体 Panaferd-ZX

表1 Panaferd-ZXのカロテノイド組成の一例

含有カロテノイド名	含有量(mg/g)	組成比(%)
β -カロテン	0.7	6.6
β -クリプトキサンチン	0.2	1.6
トランス-ゼアキサンチン	9.3	84.3
9-シス-ゼアキサンチン	0.3	2.9
13-シス-ゼアキサンチン	0.4	3.5
その他	0.1	1.1
計	11	100

3. Panaferd-ZXを用いた鶏卵黄への移行試験

3.1 飼料に添加したゼアキサンチンが卵黄に移行するのに要する時間の検討

ゼアキサンチンを高濃度に含む乾燥菌体を鶏飼料に添加すると、従来のクコの実やスピルリナより濃度が10倍近いいため、飼料中のゼアキサンチンを効果的に高める事が可能となる。そこで、実際に鶏飼料に添加してゼアキサンチン濃度を強化した鶏卵の製造を試みた⁵⁾。

試験期間は2010年4月15日～5月21日(5週間)で、無添加、ゼアキサンチン10ppm添加、ゼアキサンチン30ppm添加の鶏5羽のグループを用意して、産卵した卵を当社研究所において重量、卵黄中のカロテノイドを分析した。

卵黄中カロテノイド分析方法は、卵の黄身を分離し、冷凍後自然解凍させる。各サンプルを1g、50mLチューブに採取し、THF:MeOH=20:1の溶媒15mLで抽出する。Hex 30mLを加え遠心分離後、上清をHPLCによって分析した。

また、飼料中カロテノイド分析方法は、飼料をミルで粉砕した後、サンプルを1gずつ50mLチューブに採取し、蒸留水2.5mLを加え、THF:MeOH=20:1の溶媒5mLで抽出する。Hex 10mLを加え遠心分離後、上清を50mLメスフラスコにとり、この抽出工程を3回繰り返す。展開溶媒で50mLにメスアップ後HPLCによって分析した。HPLC分析条件は以下の通りである。

カラム: Inertsil 4.2 mm x250mm 2連続、移動層:ヘキサン:THF:MeOH=40:20:1, v/v、流量:1 mL/min、検出波長:480nm、インジェクション量:20 μ L、分析時間:30min。

結果を図8に示した。図から鶏卵卵黄中のゼアキサンチン濃度は経過時間に伴って増加して約2週間で一定の濃度になることがわかる。また、到達濃度は飼料中の添加ゼアキサンチン濃度に依存していることがわかった。次に、飼料中の添加ゼアキサンチン濃度と鶏卵卵黄中のゼアキサンチン濃度の関係を2週間で比較してみることにした。

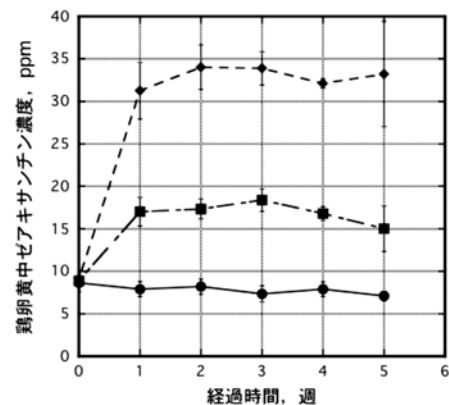


図8 各種ゼアキサンチン濃度の飼料を給餌した際の鶏卵卵黄中ゼアキサンチン濃度の経時変化

(●:ゼアキサンチン無添加、■:ゼアキサンチン10ppm添加、◆:ゼアキサンチン30ppm添加)

3. 2 卵黄中の最大ゼアキサンチン移行量の把握

試験期間は先のデータから投与期間 14 日間とし、2010 年 11 月 5 日～11 月 19 日で試験した。試験区は、ゼアキサンチン無添加、10ppm 添加、30ppm 添加、50ppm 添加、100ppm 添加、200ppm 添加の計 6 区 (各 3 羽) 用意した。これら飼料を朝、夕 50g ずつ給餌し、0～2 週目の卵および飼料を当社中央技術研究所においてカロテノイド分析に供した。

結果を図 9 に示した。図からわかるように、飼料中ゼアキサンチン添加濃度に比べて卵黄中のゼアキサンチンは直線的な関係にはなく、飼料中ゼアキサンチン高濃度領域において卵黄中最大濃度 (90ppm) に近づいて増加して行く傾向を示した。これは鶏卵卵黄中にゼアキサンチンと結合するタンパク質が存在してその存在量に限界があるため、このような挙動を示すものと思われる。ゼアキサンチンの飼料から鶏卵卵黄中への移行の効率を考えると、卵黄中ゼアキサンチン含量が 60ppm 程度まで (飼料添加濃度として 30ppm) は効率が良いと考えられる。また、他の天然系ゼアキサンチン源を使用した場合はその濃度が薄いことから添加可能最大量を勘案すると添加濃度が 10ppm 程度に限られるため、卵黄中ゼアキサンチン含量 30ppm から 60ppm は、天然系ゼアキサンチン源の中でも当社製品を使用しなければ実現できない鶏卵中のゼアキサンチン濃度である。

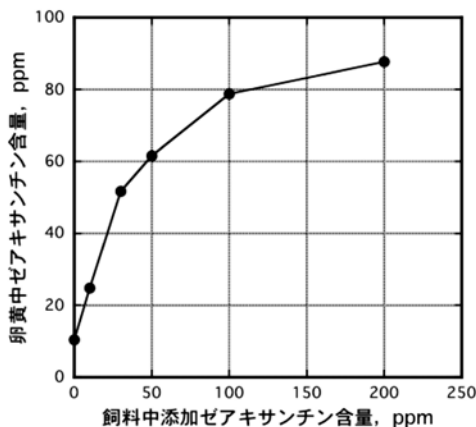


図 9 飼料給餌開始 2 週間後の各試験区の卵黄中ゼアキサンチン含量

4. ゼアキサンチン強化卵を用いたヒト血中移行試験

4. 1 単回投与試験結果

ゼアキサンチン強化卵を単回的に投与し、ヒト血清中ゼアキサンチン濃度がサプリメントに比べ有意に増加するかを調べた。試験方法は、ゼアキサンチン強化卵投与群 (1 名) およびゼアキサンチンサプリメント (スピルリナ) 投与群 (1 名) について、それぞれ半熟のゼアキサンチン強化卵 5 個 (ゼアキサンチン 2.7mg 含有)、およびサプリメント 15 錠 (ゼアキサンチン量 2.5mg 含有) を経口摂取させた。結果を

図 10 に示した。血清中のゼアキサンチン濃度は摂取時にはほぼ同等であったが、ゼアキサンチン強化卵の方が血清中濃度を早く高める効果があることがわかった。各 1 名の試験であり、ヒトの個体差の問題はあるものの、ゼアキサンチン強化卵の方が吸収速度は高いと考え、さらに連続投与試験を行うこととした。

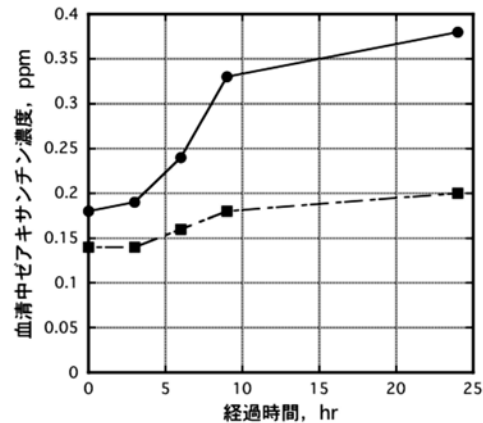


図 10 ゼアキサンチン強化卵を用いた単回投与試験結果 (●: ゼアキサンチン強化卵投与群、■: ゼアキサンチンサプリメント (スピルリナ) 投与群)

4. 2 連続投与試験結果

まず、試験用のゼアキサンチン (ゼアキ) 強化卵は、市販されている白卵用のベース飼料に Panaferd-ZX をゼアキサンチン添加量 30ppm となるように加え、鶏に給餌して製造した。ベース飼料、ゼアキ混合飼料、一般卵、ゼアキ強化卵中のカロテノイドは当社中央技術研究所において測定した。卵黄中カロテノイド分析および飼料中カロテノイド分析は、3.2 に記載の方法と同様の方法で行った。

試験方法の要領は下記の通り。

試験実施支援機関: サイトサポート・インスティテュート(株)

試験実施場所: 医療法人 冠心会 大崎病院

東京ハートセンター

血清分析機関: 京都微生物研究所

試験期間: 2010 年 7 月 16 日～8 月 31 日 投与期間 28 日

試験食品: I 群: 一般市販卵投与群、

II 群: ゼアキサンチン強化卵投与群、

III 群: サプリメント投与群

試験症例数: 21 症例 (7 症例×3 群)

投与条件: 一般市販卵、ゼアキ強化卵については、朝食後 1 個、夕食後 1 個の 1 日 2 個ずつ投与 (ゆで卵)。サプリメント (スピルリナ) は、朝食後 3 錠、夕食後 3 錠の一日計 6 錠ずつ投与。原則として朝食を 6:30-7:30、昼食を 11:30-13:30 にとることを依頼。さらに、被験者には試験食品摂取 2 週間前からパプリカ、とうもろこし、ほうれん草、桃、柑橘類、かぼちゃ、卵などゼアキサンチンを含む食べ物の摂取を控えてもら

うようにした。なお、本試験は倫理委員会で承認を得た後、実施した。

本試験においては、結果としてゼアキサンチンの投与量が、ゼアキ強化卵 1.8mg/日、一般卵 0.5mg/日、ゼアキサンチンサプリメント 1.0mg/日となっており、ゼアキサンチン強化卵のゼアキサンチン摂取量が多くなった。これは鶏卵卵黄へのゼアキサンチンの移行率が想定よりも良かったことと、ベース飼料中のゼアキサンチン含有量が想定よりも高かったことによる。よって、血中におけるゼアキサンチン濃度を比較する際は、この分を考慮する必要がある。試験結果を図 11 に示した。試験結果において到達する絶対濃度を比較することは難しいが、最高濃度に到達する時間はゼアキサンチン強化卵の方がゼアキサンチンサプリメントよりも早く、強化卵の方が血清への移行速度が速いことがわかった。

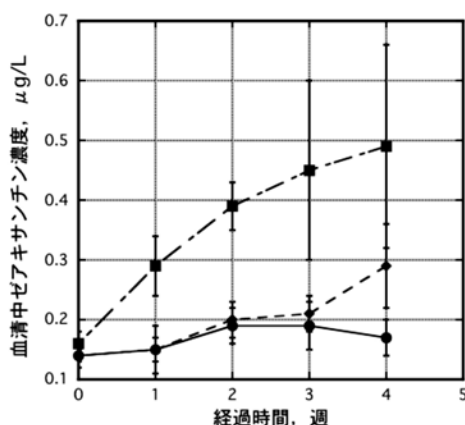


図 11 ゼアキサンチン強化卵、普通卵およびゼアキサンチンサプリメントを接触した際のヒト血清中ゼアキサンチン濃度の変化 (■:ゼアキサンチン強化卵、◆:サプリメント(スピルリナ)、●:普通卵)

5. まとめ

以上述べたように、①アスタキサンチン生産菌より突然変異によって取得したゼアキサンチン生産菌を用いて、数kLスケールのパイロットまでの製造方法を開発した。取得したゼアキサンチンの濃度は、クコの実やスピルリナなどの天然ゼアキサンチン源に比べて10倍程度の高濃度を含んでいる。また、②鶏飼料に添加したゼアキサンチン量を増加させた場合、鶏卵卵黄中の濃度は最大90ppmと高濃度になることが判明した。この濃度域は従来の天然系ゼアキサンチン源では達成できない領域である。さらに、③このゼアキサンチン強化卵をヒト試験に供して、血清中のゼアキサンチンの増加を観察したところ、最高濃度に到達する時間はゼアキサンチン強化卵の方がゼアキサンチンサプリメントよりも早く、強化卵の方が血清への移行速度が速いことがわかった。

これらの事実は、当社の「鶏飼料用に当社製品であるゼアキサンチン含有乾燥菌体(商品名:Panaferd-ZX)を

養鶏業者に販売、養鶏業者がゼアキサンチン強化卵を製造して高付加価値鶏卵として販売するというビジネスモデル]を強く支持するものである。

今後は、このビジネスを大きくしていくため、さらにコスト効果性を追求し、例えば鶏飼料中から鶏卵卵黄へのゼアキサンチン移行について詳細にメカニズムを検討して移行性を改良することにより、原料中に占めるゼアキサンチン源コストを省略することが可能と考える。また、当然のことながらゼアキサンチン生産菌株の改良、培養方法の改良などの製法改良によってもコスト削減を追求していく必要がある。

－ 引用文献 －

- 1) Oshima, Y; Ishibashi, T; Murata, T; Tahara, Y; Kiyohara, Y; Kubota, T; Prevalence of age related maculopathy in a representative Japanese population; the Hisayama study. Br J Ophthalmol, 85, 1153-7 (2001).
- 2) Tsubokura, A; Int. J. Syst. Bacteriol., 49, 277 (1999).
- 3) 坪倉章; 米田久; 平澤和明; ゼアキサンチンの製造方法, 特願 2003-325104
- 4) Fraser, P.D; Miura, Y; Misawa, N; In Vitro Characterization of Astaxanthin Biosynthetic Enzymes, J. Biol. Chem., 272, 6128-6135 (1997).
- 5) 川嶋祐貴; 永井秀忠; 五十嵐道久; ゼアキサンチン強化家禽卵, 特開 2012-170425