

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：82108

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2013

課題番号：21300282

研究課題名(和文) ナノテクを利用した希少糖の新規機能性食品開発と食品安全性評価法の確立

研究課題名(英文) Formulation of the rare sugar delivery system for functional food and the safety assessment method

研究代表者

白井 暢子 (Shirai, Yoko)

独立行政法人物質・材料研究機構・生体機能材料ユニット・主幹エンジニア

研究者番号：10399404

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円、(間接経費) 4,380,000円

研究成果の概要(和文)：希少糖は、これまで多量の供給が困難なため高価であったが、安価で大量に合成する方法が確立され、血糖値の調節や体脂肪蓄積の抑制など様々な生理作用を持つことが報告されていた。一方で、一般的な単糖と比較して腸管から吸収後に大部分が速やかに排泄されるなど食品として利用し難い性質を持つことも指摘されていたため、本研究では、薬物送達システム(DDS)を応用し、体内での安定性や滞留時間の延長など、希少糖の生理的機能を効率よく発揮させることを試みた。さらに、口腔内評価など糖を利用した機能性食品の安全性評価について検討した。

研究成果の概要(英文)：Although it has been difficult to supply a large amount of rare sugars, an inexpensive synthetic method on a large scale was recently established, leading to the reports on various physiological functions including regulation of blood glucose level and suppression of body fat accumulation. Meanwhile, it has been pointed out that rare sugars are difficult to utilize as foodstuffs by reason that they are excreted after the gut absorption more rapidly than typical monosaccharide.

Therefore in present study, by applying drug delivery systems (DDS), we tried to bring the physiological functions of rare sugars into action efficiently by means of improving the stability in the body and prolonging the residence time. In addition, safety assessment methods for functional foods containing saccharides such as those exerted in the oral cavity were examined.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：希少糖 DDS 安全性評価

1. 研究開始当初の背景

“機能性食品”という概念は日本が提唱し、薬とは異なり生理系統に調節作用を持つ食品を日常の食生活に取り入れることにより病気の予防に寄与するとして、世界的にも注目されてきた。また、糖尿病、高血圧、高脂血症など生活習慣病の予防・治療には、インスリン投与が必要な場合を除き、食事制限による減量が効果的とされ、低カロリーの人工甘味料が用いられるが、現行品は従来考えられていたほど低カロリーでない、加熱すると苦みを生じる、多量に摂取すると下痢を引き起こすなど、患者のQOLを損なっている商品が少なくない。

希少糖は、自然界に微量しか存在しない単糖で、ほとんどのものは市販されておらず、また市販されていても大変高価であったため、研究に必要な量の供給が困難であった。近年、希少糖を自然界に多量に存在する単糖から安価で大量に合成する方法が確立され機能の解明が進んだ。これら単糖類がショ糖の70%の甘味を持ち、ノンカロリーである上に、小腸の α -グルコシダーゼ阻害、血糖上昇反応抑制、細胞からのインスリン分泌促進脂肪酸合成酵素阻害など、様々な生理作用を持ち、糖尿病等の治療食に利用できる可能性があることや抗酸化作用や癌細胞の増殖抑制作用を持つことを明らかにした。しかしD-グルコースなどの一般的な単糖類と比較すると血中の存在閾値が低いこと等、単体では食品として利用し難い性質を持つことが指摘されてきた。

2. 研究の目的

申請者は、これら希少糖の持つ問題点を解消するため、(独)物質・材料研究機構で開発された DDS 技術に着目した。すなわち希少糖-DDS キャリアの複合体を作成することで、希少糖の腸管での消化吸収率を改善させ、あるいは体内での徐放作用により許容1日摂取量(ADI)を増やすなど、希少糖本来の生理作用を失うことなく効率よく発揮させることを試みた。さらに、口腔内評価など糖を利用した機能性食品の安全性評価について検討した。

3. 研究の方法

(1)担体の設計

希少糖(D-プシコース、D-アロース)は、香川大学より提供された原料を用いて実施した。また、DDS作製の予備実験段階では、比較的入手が容易なD-グルコースを用いた。糖の物理的相互作用やカプセル化による担持法は、糖の化学特性が変化することはなく、希少糖の生理的特性を有効に反映させるDDS設計として適切であり、特にカプセルなどによる内包化は制作工程が

簡便である上に、あらゆる希少糖および希少糖誘導体に適用でき、評価技術としても規格化しやすい剤形として利用価値が高い。また包接錯体などは低分子量であり、大型の薬物形体と比べて吸収効率が高く、血中での糖の安定化に有効と考えられ、糖のもつ特定の機能に着目したDDS設計となる。本研究では主に物理的相互作用と内包化によるDDS手法や、さらに目的に応じて2つのDDS手法を組み合わせる手法により、希少糖の特性を活用した希少糖- DDS複合体を作製した。

(2)希少糖- DDS 複合体の安定性および機能性の評価

まず、低分子 DDS 担体と希少糖との複合体が形成されているか否かを NMR、IR にて確認した後、生理条件下において溶解性、凝集性などの安定性を確認した。さらに、構造が安定な高分子ミセルやマイクロゲルを用いたカプセル化を検討し、高 pH 領域で膨潤・分解する高分子を用いることで、腸領域で選択的に放出する DDS 設計を可能とした。希少糖のカプセル内担持率は、残留溶液の希少糖濃度測定や、アルカリ処理によってカプセルから放出された希少糖量から算定した。希少糖- DDS 複合体の機能性評価としてラットに長期投与し、希少糖のみ、あるいは既存の甘味料を投与した場合と比較して耐糖能の低下抑制など生理作用があることを確認した。

(3)希少糖- DDS 複合体の安全性評価

生体内評価：実験動物を用いた短期および長期投与性試験により、食餌摂取量、体重増加量、体脂肪率、血清生化学などを初め希少糖単独による先行研究との比較検討し、毒性および一日許容摂取量(ADI)について確認した。

口腔内評価：糖として利用するためカリエスの発生や口腔内環境への影響に関する生化学的な観点から確認し、食品としての安全性を検討した。

4. 研究成果

(1)薬物担体設計

D-プシコース、D-アロースおよびD-グルコースの様々な溶媒に対する溶解性を測定し、さらに、アミノ酸誘導体との共存下における単糖の溶解性への影響を確認した。これにより、単糖と強く相互作用する条件や組み合わせを分析した。これらの分析結果をもとに、適切な単糖認識化合物を設計し、合成法を検討した。D-プシコース、D-アロースおよびD-グルコースに対し、アミノ酸ないしアミノ酸誘導体をアミノカルボニル反応

にて導入する方法を確立した。

(2) 希少糖 - DDS 複合体の安定性、機能性の評価

希少糖にアミノ酸誘導体をアミノカルボニル反応にて導入した誘導体を用いて高分子多糖であるアルギン酸に脱水縮合反応によって担持させたDDSを作製した。得られたDDS中の担体と希少糖との相互作用をUV吸収、元素分析により合成効率の確認および基礎的な物性解析を行い、HPLCを用いてDDS中に含まれる希少糖の放出挙動を経時的に測定した。アルギン酸ゲルからの糖の放出スピードを検討したところ、酸性溶液中では生理食塩水よりも放出スピードがやや速く、架橋剤の存在下では放出スピードが1.5倍程度遅延することが認められた (Fig. 1)。

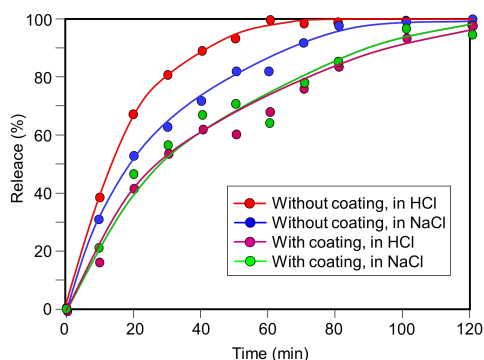


Fig. 1 Release behavior of psicose-lysine derivative from gel beads.

高分子多糖であるアルギン酸に脱水縮合反応によって希少糖を担持させた希少糖 - DDSを作製し、HPLCを用いてDDS中に含まれる希少糖の放出挙動を経時的に測定した。脱水縮合反応後に合成溶液中に残存する希少糖の利用効率を向上させることを目的として5~10回程度反応溶液を再利用して希少糖を担持させた場合でも、初回と同程度の放出挙動を示すことを確認した。DDS担体と希少糖との複合体を食品として用いる場合、その構造が様々な生理条件下において安定に存在する必要があるため、生理食塩水や酸性溶液中においても同様に希少糖の放出挙動を観察したところ、いずれの溶液中においても複合体の安定性が確認された。また、ラットの嗜好性向上を目的として反応溶液の温度やpH等、脱水縮合時の反応条件が希少糖 - DDSの粒子の形状に与える影響について検討し、上述の高い収率を保ちつつ嗜好性を兼ね備えた希少糖 - DDSを作製した。

(3) 安全性評価

最も嗜好性が高い条件で3%のD-プシコースを含む希少糖 - DDS複合体を作成し、ラ

ットに長期投与したところ、食餌摂取量、体重増加量、体脂肪率、血清生化学のいずれの指標においても対象群との違いは認められなかった。組織生化学評価においてもいずれの臓器にも異常は認められず、プシコース - DDSの安全性が示された。D-プシコース単独で長期投与を行った先行研究において報告されていた肝重量や腎重量の増加がプシコース-DDSの長期投与においては認められなかった。

D-アロースおよびD-プシコースが代表的齲蝕関連菌である *Streptococcus mutans* (*Sm*) および *Actinomyces naeslundii* (*An*) の増殖に与える影響について検討した。0.5%のD-アロースあるいはD-プシコースを唯一の炭素源(エネルギー源)として含む液体培地では *Sm* も *An* も増殖しなかった。一方、0.5% D-グルコース含有液体培地に0.5% D-アロースを添加すると *An* の増殖は抑制されたが、*Sm* の増殖は抑制されなかった。また、0.5% D-プシコースを添加しても *Sm* と *An* の増殖は抑制されなかった。以上の結果からD-アロースとD-プシコースともには齲蝕関連菌の炭素源(エネルギー源)とはならないこと、さらにアロースは *An* の増殖を阻害することが明らかになった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4件)

1. Ishii R, Matsuo T and Shirai Y, The 90-day oral toxicity study of D-psicose in male wistar rats. J Clin Biochem Nutri 50(2) 2012 158-161 査読有
2. Takahashi N and Nyvad B, The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. J Dent Res 90(3) 2011 294-303 査読有
3. Nakajo, K, Takahashi N et al, Resistance to acidic environments of caries-associated bacteria: *Bifidobacterium dentium* and *Bifidobacterium longum*. Caries Res. 44(5) 2010 431-437 査読有
4. Matsuo T, Shirai Y et al, Acute and sub-chronic toxicity of D-allose in rats. Biosci. Biotechnol. Biochem. 74(7) 2010 1476-1478 査読有

[学会発表](計 4件)

1. Shirai Y, Kamimura W, et al, Formulation of the rare sugar delivery system for functional food, Experimental Biology, Apr 20, 2013,

- Boston, USA
2. Shirai Y, Kamimura W, et al, Conjugate of rare sugar with amino acid through the maillard reaction. *Experimental Biology*, Apr 13, 2011, Washington DC, USA
 3. Nakajo K, Takahashi N et al, Acid-tolerance of oral bifidobacteria and its comparison with *Streptococcus mutans*. The 88th IADR, July 17, 2010 Barcelona, Spain
 4. Matsuo T, Shirai Y et al, Acute and chronic toxicity of D-allose in rats. *Experimental Biology*, Apr 24, 2010, Anaheim, USA

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白井 暢子 (SHIRAI, Yoko)
(独)物質・材料研究機構・生体機能材料
ユニット・主幹エンジニア
研究者番号：10399404

(2) 研究分担者

高橋 信博 (TAKAHASHI, Nobuhiro)
東北大学・歯学研究科・教授
研究者番号：60183852

上村 渉 (KAMIMURA, Wataru)
東京大学・医学部附属病院・研究員
研究者番号：80399394

金高 弘恭 (KANETAKA, Hiroyasu)

東北大学・歯学研究科・准教授
研究者番号：50292222

清水 良央 (SHIMIZU, Yoshinaka)
東北大学・歯学研究科・助教
研究者番号：30302152

(3) 連携研究者

松尾達博 (MATSUO, Tatsuhiko)
香川大学・農学部・教授
研究者番号：202700019