

生化学試薬製造のための海洋生物利用技術の開発

市場俊雄、照屋正映

沖縄近海の高付無脊椎生物（海藻類、海綿類、サンゴ類、ホヤ類など）には抗ガン活性、抗ウイルス活性等を有する有用成分が含まれることが知られており、世界中の研究者が積極的に研究している。この事業では、有用成分を含む高付無脊椎生物の探索・選定にエキスポファイルを用いる技術を開発し、エキスのプロフィールデータベースを構築した。さらにこの方法で選定した生物から、高付加価値な成分の抽出・精製を行い、それを生化学、検査、分析用標準試薬として製品化するとともに、その品質管理を行う総合製造技術の開発を行った。

1 はじめに

沖縄は、伝承的に海人草（かいじんそう：マクリ）を回虫の駆除に用いてきたという事実がある。この海人草の成分カイニン酸の薬効は最近になってその科学研究から興味深い生理活性が発見され、伝承薬に新たな可能性を持たせるものとして注目された。それ以来、高付無脊椎生物の成分は、大手製薬企業やベンチャー企業によって抗がん剤、抗菌剤、海洋防汚物質等として積極的に開発研究が行われてきている。

本開発事業では高付加価値な成分の抽出・精製を行い、それを生化学、化学、検査用標準試薬として製品化することを目的に、これまでの大学などでの研究成果を基に、今後有望と思われる高付無脊椎生物由来の成分を選び出した。そしてその粗精製物および精製物の一次製品化を目標に、原料確保のための生物探索・選定技術および有用成分の抽出・精製技術の開発を行った。

また、一部の県内薬草関連企業で一次製品としての植物エキスの製品化が始まっているが、それらはいずれも本土企業主体の下請け的な製造であるため、新たな資源の製品化や、独自の研究成果を生かした機能を付加した製品の商品化は困難である。本開発事業では、このような不利な立場での原料生産から抜け出し、本土大手試薬メーカーや製薬会社等をターゲットに県内企業主体の積極的な一次製品開発と商品化を可能にすることを第二の目標として、汎用性の高い柔軟なシステムの開発を行った。

さらに第一目標の探索技術確立の中で普遍的なエキスポファイリング技術とプロフィールのデータベース化は、本開発事業の対象である高付無脊椎生物だけではなく陸上生物にも広く適用できる技術であり、将来的に県内での生化学試薬産業の基盤をなす部分であるため、プロフィールのライブラリ化を行える技術を県内企業に導入することも重要な目標とした。

2 方法の概要

2-1 原料生物探索・選定技術の開発

生物の選定を行うことは、生物を工業原料として利用する上で必要不可欠である。しかしながら陸上生物と比べて高付無脊椎生物では、種の同定が困難なものが多く、このことは高付無脊椎生物中の有効成分を製品原料として利用する場合に個体差、地域差、季節差等が評価しにくく、原料の安定供給と製品の品質管理に大きな支障となる。そこで標的成分を生産する高付無脊椎生物の同定をその抽出エキスをを用いて簡便で確実にを行う方法を確立する必要があった。

本サブテーマの目標として、まず前処理、抽出、分析、プロフィールングに関する各種パラメーターを検討し、エキスポファイルによる生物の選定のための標準的な手順の確立を行った。

次にここで確立した標準手法により、採集した高付無脊椎生物のエキスポファイルを作成し、情報のデータベース化を行い確立した手法の適性を検証した。

2-2 一次製品製造（抽出・精製）技術の開発

食品として利用する場合と異なり、試薬や試薬原料となる一次製品を目標とする場合、最も重要な要素は製品の純度である。通常試薬として市販されているものは98%以上の純度があり、その精製には特別な技術を要する。本サブテーマでは、この精製技術の開発を主要な目標に研究を行い、この技術を用いて製品の試作を行うことでこの開発結果の検証を行った。

まず抽出に関してはイオン性物質から低極性のものまで幅広く抽出できる条件の検討を行った。一方精製では、HPLCの分離条件（メソッド）開発が純度を決める最も大きな要因となることから、分子量をトリガーとした有効成分精製法を検討し、生産の効率化と製品の高品質化を同時に達成するシステムの開発を試みた。

2-3 一次製品管理・評価技術の開発

生化学試薬では、純度は製品の品質そのものであることから、高純度を確保できる生産技術の確立は最重要課題である。本開発事業で目標とする一次製品に関する品質としては「有効成分の純度」と「不純物の量と種類」を市場のニーズに対応することが要求される。この消費者ニーズに合う品質評価法の確立をこのサブテーマの目標として研究を行った。

このため、大手試薬メーカーや医薬品メーカーなど特に製品の品質に厳しい基準を持つ顧客のニーズを把握すると共に、有効成分の純度に関してはHPLC-マスによる定量・定性法を、また不純物の量と種類に関しては、HPLCによる定性法を検討し、二次製品の性質によりユーザー（市場）の要求に臨機応変に対応できる管理・評価のマニュアル作りを行った。

3 結果の概要

3-1 原料生物探索技術の開発

本研究において、化学・生化学試薬として開発可能な有用物質を生産する生物の選定を、その抽出エキスを用いて簡便で確実にを行う方法を確立することができた。すなわち、沖縄沿岸でSCUBAなどにより採集した海産無脊椎生物が、有用物質を生産していることを確認するための試料前処理法を確立し、それを抽出し分析するための標準的な方法を確立することができた。試料の前処理では、分析段階で修正または無視できる要素の検討や操作に必要な以上手間をかけることを避けると共に、特殊な方法の導入も極力避け個々の条件を最適化することにより、採集→凍結乾燥→溶媒抽出→分析というシンプルな方法を確立した。

プロファイリングでは、この確立した条件を用い、採集した生物のエキスプロファイルを作成しライブラリ化した。

同様に標準物質もプロファイルを作成しライブラリ化した。標準物質となるスウィンホリドA、ミサキノリドA、ラトランクリンA、スコボレチンは購入または他の研究機関より譲り受けたものを使用し、マンザミンA、オンナミドAは単離後、MS、NMRを文献値と比較することにより同定した。

この標準物質プロファイルと、調製したエキスプロファイル Millenniumソフト上でライブラリ検索により照合することで、目的物質を素早く確実に検索することができるシステムの確立に成功した。これにより、スウィンホリドA、ラトランクリンA、マンザミンA、オンナミドAを含むエキスを選定することに成功した。

一方、標品が入手できなかったモノアリドは、

LC/MSにより全エキスの分析を行い、分子量を手がかりにモノアリド含有エキスのスクリーニングをまず行なった。この絞り込まれたエキスとそのクロマトグラム上のピークを、3次元UV検出器（PDA）により紫外吸収スペクトルを抽出し、文献値と照合した結果4種のエキスにモノアリドが含まれることが推定された。この4種のエキス中のモノアリドと思われるピークに関しては、さらにMSの開裂パターンを予想し、LC/MS/MS分析を行ったところ、予想どおりのスペクトルパターンが観測されたことより、これらのエキスがモノアリド生産海綿のエキスであるとほぼ断定できた。

3-2 一次製品製造技術の開発

試薬やその原料となる一次製品を目標として純度95%以上を目標に精製法の検討を行った。

その結果マンザミンA、オンナミドAでは、凍結乾燥試料を2mm以下に粉碎し、エタノールまたはメタノールを用いて抽出し、抽出物を液液分配後、LCによる分離または再結晶化させることで精製できることが分かった。一方含有量の少ないスウィンホリドAは、LC分離後HPLCでさらに精製することで目標の純度を達成できた。

今回の方法は量産を考慮し、スケールアップが容易な方法の組み合わせで構成するよう工夫してある。すなわち、粉碎をはじめとする全ての処理工程は、①同じ操作を繰り返すだけで再現良く精製が進められ、②装置を大型化しても同じ結果が得やすく、③スケールアップの際の量的な相関が計算し安い。したがってこれらの方法は、大量生産への移行が容易で、将来的な量産方法としても優れていると思われる。

ここでLCによる精製では、分子量をトリガーとした有効成分精製法を確立し、生産の効率化と製品の高品質化を同時に達成するシステムの開発に成功した。

3-3 一次製品管理・評価技術の開発

有効成分の純度検定では、特に製品の品質に厳しい大手試薬メーカーや医薬品メーカーなどの基準を満たすため市場の動向を調査し、ELSD（蒸発光散乱検出法）を用い純度の検定を行なうことにした。

蒸発光散乱検出は、移動相を蒸発させることにより目的化合物を微粒子化し、その散乱光を測定する方法で、低沸点化合物を除き 原理的にほとんど全ての化合物を検出することができ、検出感度は化合物によらず概ね絶対量に基づくので、不純物の含有量を調べる上で有効であり、創薬研究などで近年威力を発揮している。

さらに有効成分の定量では、選択性と感度の高いLC/MS/MSを用い、ppbオーダーでの定量を可能にする方法を開発・確立した。

4 考察

4-1 原料生物探索技術の開発

このシステムにより生物の科学的種の同定を行うことなく、今回採集した200あまりの試料から、スウィンホリドA、マンザミンA、オンナミドA、ラトランクリンAを生産する海綿の特定が可能であった。

また、モノアリドを生産する海綿も、LC/MSからの分子量情報、LC/UVからの紫外吸収スペクトル情報、LC/MS/MSからの開裂パターン情報からほぼ特定できた。このことは標品が入手困難な成分でもLCとUV、MSを組み合わせることで、かなりの確率で原料となる生物を推定でき、単離する効率を飛躍的に向上させることができることが確認できた。

一方、ミサキノリドAの検出がLC/MS/MSを使用することによりppbオーダーで可能であるにもかかわらず、ミサキノリドAを生産する海綿を特定することはできなかったことから、今回採集した試料中にはミサキノリドAを生産する種が含まれていなかったものと思われる。

以上のことから、LCによるエキスプロファイルを用いることで種の同定なしに原料となる生物を特定し、その有効成分の精製の効率化を図れるシステムを構築するという当初の目的は十分に達成できたものと考えられる。

4-2 一次製品製造技術の開発

スウィンホリドAとオンナミドAは分子量をトリガーとした成分精製法を確立し、生産の効率化と製品の高品質化を同時に達成するシステムの開発に成功した。一方マンザミンA、では、最終的に再結晶化させることで精製を行なうことができた。

また、今回の生物選定および精製技術の陸上生物成分への適用の可能性を検証する意味で近年注目されている、ヤエヤマアオキ果実ノニの有用成分スコポレチンの精製と製品化を行ない、その有用成分の製品化を行なった。

目標とした海産生物からの4試薬の精製はできなかったが、今回の方法論が海産生物のみならず、陸上の生物にも適用できることが証明でき、陸上生物由来の成分も含めて4成分の製品化に成功したことから、当サブテーマの目標は十分に達成できたものと思われる。

4-3 一次製品管理・評価技術の開発

市場調査の結果、化学試薬・生化学試薬の品質保証がどのようになされているかが分かった。それに基づき、当初二次的なものと考えていたELSDを用いた純度検定法を導入することとなり検討事項が増え研究内容を一部修正することとなった。しかしこれにより市場のニーズにより近い方法での純度検定が実施されることとなり、結果的に今回の製品の品質をより高いものにすることができた。

さらに、製品の品質管理の面からLC/MS/MSによる定量技術の導入と、個々の成分に最適な分析条件の確立が達成されたことから、今後製品の安定性試験などがより効果的に行なえるものと思われる。

以上のことから、今回生産する試薬類の品質保証・品質評価技術の開発という当初の目標はほぼ達成できたものと思われる。

5 まとめ

今回の研究開発事業で、当初目的とした技術開発はほぼ完了することができたが、ミサキノリドAやラトランクリンAのように、目的成分を含有（生産）する原料の確保に課題があることが明らかとなった。200種余りの生物を採集したにもかかわらずミサキノリドAを含有すると思われる原料は発見できず、またラトランクリンAを含有する原料もごくわずかし入手できなかった。このことから、エキス段階での探索技術よりむしろ今後目的とする物質を含有する生物の入手法に課題を残した。この課題を解決するには、今後原料となる生物の栽培（培養）技術を確立する必要があると思われる。この場合、沖縄は周りを海に囲まれており研究環境としては恵まれている。さらに琉球大学や水産試験場、深層水研究所など栽培技術の蓄積のある研究機関が充実していることもあり、共同研究により栽培（培養）技術の確立は可能だと考えられる。

また今回確立した技術を利用し、陸上生物を原料とした試薬の開発を行うことができれば試薬の多様性も広がり原料の栽培技術も海洋生物に比べると短期間に確立できるものと思われる。

市場調査の結果、試薬業界では中小企業は限られた数（1-2種）の特定の試薬または試薬原料の供給を請け負っており、ライブラリの販売は行っていないことがわかった。これは、一中小企業が数百から数千の物質を常に在庫として持つことの困難さと、消費者ニーズの予想以上の多様性によるものと分析できる。したがって、当初目標としていた数百種の生成物から成るハイスルーブットスクリーニング用ライブラリの製品化は困難であると考えられる。この課題では、今後さらに市場調査を行い、エキスライブラリまたはフラクションライブラリの商品化を検討し、その技術開発に取り組むことで解決が図れるものと思われる。

謝辞

この研究は、平成14年度補正沖縄産学官共同研究推進事業に採択された『生化学試薬製造のための海洋生物利用技術の開発』として行われました。本共同研究事業に

参加できる機会を与えていただいたプロジェクトサブリーダーの國永秀樹氏（株式会社仲善専務取締役）をはじめ以下の共同研究者の方々、および研究管理・コーディネートを行っていただいた財団法人南西地域産業活性化センターに感謝致します。

西里さおり 株式会社仲善 研究員

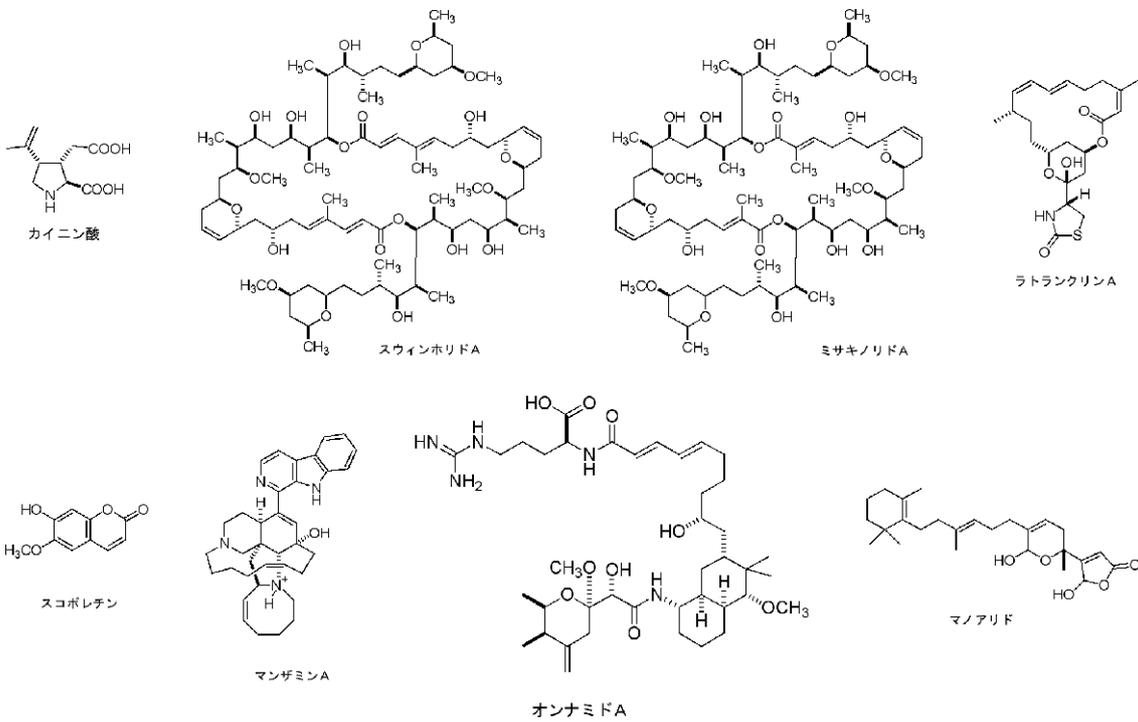
石川桂一 株式会社仲善 研究員

緑川義行 財団法人南西地域産業活性化センター
調査第1部 部長

中村大助 財団法人南西地域産業活性化センター
調査第1部 研究員

富田安弘 財団法人南西地域産業活性化センター
調査第1部 研究員

又吉桃子 財団法人南西地域産業活性化センター
調査第1部 研究員



構造式一覧

編 集 沖縄県工業技術センター

発 行 沖縄県工業技術センター

〒904-2234 沖縄県うるま市字州崎 12 番 2

T E L (098)929-0111

F A X (098)929-0115

U R L <https://www.pref.okinawa.lg.jp/site/shoko/kogyo/>

著作物の一部および全部を転載・翻訳される場合は、当センターに

ご連絡ください。