

明 細 書

発明の名称：Ｌ－エルゴチオネイン含有組成物

技術分野

[0001] 本発明は、Ｌ－エルゴチオネイン（ＥＧＴ）を含有する組成物に関する。
より詳細には、Ｎ，Ｎ－ジメチル－Ｌ－２－チオヒスチジン（ＤＴＨ）の存在下において、Ｌ－エルゴチオネイン（ＥＧＴ）の安定性を高めた組成物、及び、その製造方法に関する。

背景技術

[0002] Ｌ－エルゴチオネイン（本明細書では「ＥＧＴ」と表記する場合がある）は含硫アミノ酸の一種であり、抗酸化能をはじめとする多様な生理活性を有することが知られている。

[0003] 例えば非特許文献１では、ＥＧＴが、腫瘍関連抗原（ＴＡＡ）とアジュバントとからなるガンワクチンによる免疫治療の効果を向上させる作用を有することが記載されている。特許文献１では、ＥＧＴが細菌による感染症を治療する作用を有することが記載されている。特許文献１の実験１では、５ｍＭ及び５０ｍＭのＥＧＴが大腸菌の増殖を抑制することが確認されていることから、特許文献１に記載の細菌の感染症抑制は、ＥＧＴが細菌の増殖を直接に抑制することによるものと理解できる。

[0004] 非特許文献２では、トールライク受容体リガンドによる刺激条件下でのマウス骨髄由来マクロファージによるサイトカイン（ＩＬ－６、ＩＬ－１２ｐ４０、ＩＬ－１β、ＩＬ－１０）の生産が、１０ｍＭのＥＧＴにより促進され、１ｍＭのＥＧＴでは促進されないこと、及び、Ｆ４／８０マクロファージとＯＴ－１１ ＣＤ４＋Ｔ細胞との共培養において、ＯＴ－１１ ＣＤ４＋Ｔ細胞のＴｈ１７極性化が３０ｍＭのＥＧＴにより促進されることが記載されている。このように非特許文献２では、１０ｍＭ以上の高濃度のＥＧＴがマクロファージを活性化させることが記載されている。

[0005] 非特許文献３は、ＥＧＴの生理活性についての総説である。非特許文献３

ではEGTは動物及び植物の体内に吸収・蓄積されることが記載されている。
。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：WO2019/089878

非特許文献

[0007] 非特許文献1：S. Yoshida et al., Front. Immunol. 10:671 (2019)

非特許文献2：PLOS ONE 12(1):e0169360

非特許文献3：玉川大学農学部研究教育紀要第1号：17-41 (2016)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] しかしながら、EGTを含有する組成物における製剤安定性については、未だに十分に検討されていない状況である。特に、EGTを含有する組成物における、共存する他の成分による影響については、詳細な報告がなされていない。

課題を解決するための手段

[0009] 前記課題に鑑み、鋭意検討を行った結果、EGTを含有する組成物において、N, N-ジメチル-L-2-チオヒスチジン(DTH)が共存する場合には、EGTが不安定化し、それに伴い、EGTを含有する組成物の着色が生じるという、これまでに報告の無い新規な課題が見出された。

[0010] この新規な課題に対して、EGT及びDTHを含有する組成物において、DTHの含有量を低減させることにより、EGTの安定性を高め、組成物の着色を抑制できることを見出し、本発明を完成させるに至った。

[0011] すなわち、本発明は、下記に掲げる組成物を提供する。

[0012] [1]

L-エルゴチオネイン、及び、N, N-ジメチル-L-2-チオヒスチジ

ンを含有する組成物であって、

該N，N－ジメチル－L－2－チオヒスチジンの含有量が、低減されてなる、組成物。

[0013] [2]

前記N，N－ジメチル－L－2－チオヒスチジンの含有量が低減されることにより、前記組成物の着色が抑制されてなる、[1]に記載の組成物。

[0014] [3]

前記L－エルゴチオネイン100質量部に対して、前記N，N－ジメチル－L－2－チオヒスチジンの含有量が、50質量部以下である、[1]又は[2]に記載の組成物。

[0015] [4]

前記L－エルゴチオネイン100質量部に対して、前記N，N－ジメチル－L－2－チオヒスチジンの含有量が、0.0001質量部以上である、[1]～[3]のいずれか1に記載の組成物。

[0016] [5]

前記L－エルゴチオネイン100質量部に対して、前記N，N－ジメチル－L－2－チオヒスチジンの含有量が、0.05質量部以上である、[1]～[4]のいずれか1に記載の組成物。

[0017] [6]

L－エルゴチオネイン、及び、N，N－ジメチル－L－2－チオヒスチジンを含有する組成物であって、

該L－エルゴチオネイン100質量部に対して、該N，N－ジメチル－L－2－チオヒスチジンの含有量が、50質量部以下である、

前記組成物の着色を抑制するための組成物。

[0018] また、本発明は、下記に掲げる製造方法に関する。

[0019] [7]

L－エルゴチオネイン、及び、N，N－ジメチル－L－2－チオヒスチジンを含有し、着色が抑制された組成物の製造方法であって、

該N，N－ジメチル－L－2－チオヒスチジンの含有量を低減させる工程を含む方法。

[0020] また、本発明は、下記に掲げる方法に関する。

[0021] [8]

L－エルゴチオネイン、及び、N，N－ジメチル－L－2－チオヒスチジンを含有する組成物であって、

該L－エルゴチオネイン100質量部に対して、該N，N－ジメチル－L－2－チオヒスチジンの含有量が、50質量部以下とすることによる、
前記組成物に対して着色抑制効果を付与する方法。

発明の効果

[0022] EGTの安定性に影響を与える成分として、DTHが見出されたことにより、EGTとDTHとが共存する組成物において、DTHの含有量を低減することにより、製剤安定性を高め、組成物の着色を抑制することが可能となる。

図面の簡単な説明

[0023] [図1]図1は、試験例1における、EGT及びDTHを含有する組成物の安定性評価結果を示すグラフである。

[図2]図2は、試験例2における、EGT及びDTHを含有する組成物の着色抑制試験の結果を示すグラフである。

[図3]図3は、試験例2における、EGT及びDTHを含有する組成物の着色抑制試験の結果を示すグラフである。

[図4]図4は、試験例3における、EGT発酵法におけるDTHの低減試験を行った結果を示すグラフである。

[図5]図5は、試験例3における、EGT発酵法におけるDTHの低減試験を行った結果を示すグラフである。

発明を実施するための形態

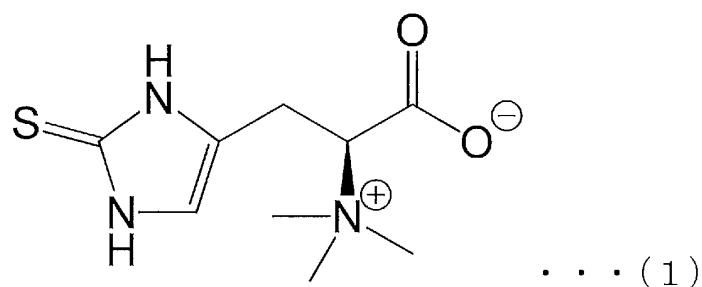
[0024] 本発明の組成物は、L－エルゴチオネイン（EGT）、及び、N，N－ジメチル－L－2－チオヒスチジン（DTH）を含有するものであって、D T

Hの含有量が低減されてなる。

[0025] [L-エルゴチオネイン (EGT)]

EGTは、ヒスチジン誘導体 (N, N, N-トリメチル-L-2-チオヒスチジン) であり、その構造は次式 (1) で表される。

[0026] [化1]



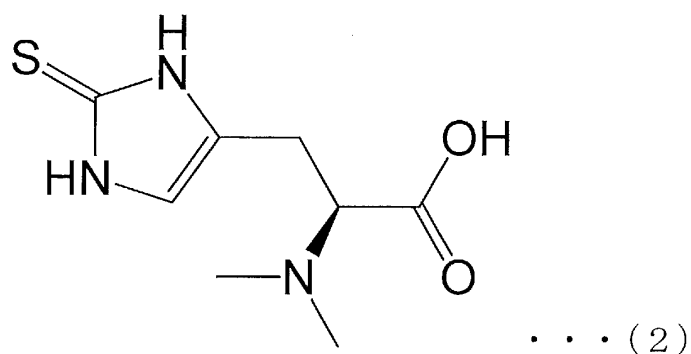
[0027] EGTは、合成法、抽出法、発酵法等の公知の方法により得ることも可能であり、市販品を入手して用いることも可能である。

[0028] EGTの市販品としては、L-エルゴチオネイン (テトラエドロロン社製) 等が挙げられる。

[0029] [N, N-ジメチル-L-2-チオヒスチジン (DTH)]

DTHは、EGTの類縁体であり、その構造は次式 (2) で表される。

[0030] [化2]



[0031] DTHは、合成法、抽出法、発酵法等の公知の方法により得ることも可能であり、市販品を入手して用いることも可能である。

[0032] DTHの市販品としては、N, N-ジメチル-L-2-チオヒスチジン (

テトラエドロン社製)等が挙げられる。

[0033] EGT及び／又はDTHは、遊離体の形態であってもよく、塩の形態であってもよい。EGT及び／又はDTHの塩は、これらの構造におけるカルボキシル基で形成された塩であってもよいし、トリメチルアミノ基又はジメチルアミノ基で形成された塩であってもよい。また、L-エルゴチオネイン又はL-エルゴチオネイン類縁体は水和物等の溶媒和物であってもよい。

[0034] EGT及び／又はDTHの塩としては、薬理的に又は生理学的に許容される塩であれば、特に制限されないが、具体的には、有機酸塩、無機酸塩、有機塩基との塩、又は無機塩基との塩が挙げられる。有機酸塩としては、例えば、酢酸塩、トリフルオロ酢酸塩、酪酸塩、パルミチン酸塩、ステアリン酸塩等のモノカルボン酸塩；フマル酸塩、マレイン酸塩、コハク酸塩、マロン酸塩等の多価カルボン酸塩；乳酸塩、酒石酸塩、クエン酸塩等のオキシカルボン酸塩；メタンスルホン酸塩、トルエンスルホン酸塩、トシル酸塩等の有機スルホン酸塩が例示される。無機酸塩としては、例えば、塩酸塩、硫酸塩、硝酸塩、臭化水素酸塩、リン酸塩が例示される。有機塩基との塩としては、例えば、メチルアミン、トリエチルアミン、トリエタノールアミン、ジエタノールアミン、モルホリン、ピペラジン、ピロリジン、エチレンジアミン等の有機アミンとの塩が挙げられる。無機塩基との塩としては、例えば、ナトリウム又はカリウム等のアルカリ金属、カルシウム又はマグネシウム等のアルカリ土類金属、アルミニウム等の金属との塩等の各種の塩が挙げられる。これらのEGT及び／又はDTHの塩は、1種単独で使用してもよく、また2種以上を任意に組み合わせて使用してもよい。「薬学的に又は生理学的に許容される塩」には、塩の溶媒和物又は水和物を含んでいてもよい。

[0035] 下記の実施例において、本発明者らは、EGTを含有する組成物において、DTHが共存する場合に、EGTが不安定化し、それに伴い、EGTを含有する組成物の着色が生じるという、これまでに報告の無い新規な課題を見出している。さらに、本発明者らは、EGT及びDTHを含有する組成物において、DTHの含有量を低減させることにより、EGTの安定性を高め、

組成物の着色を抑制できることを見出している。EGTを含有する組成物にDTHが共存する態様は特に限定されず、例えば、EGTを含有する組成物に対してDTHが添加されていてもよく、抽出法における夾雑物、合成法、発酵法等における副生成物等により内在的に含有していてもよい。

[0036] 本発明の組成物において、着色が抑制されているとは、EGT及びDTHを等量で含有する組成物に対して、同じpH条件で、DTHの含有量を低減させることにより、400nmの吸光度が低減することを言う。400nmの吸光度の低減は、公知の分光光度計を用いて求めることが可能である。400nmの吸光度の低減は、例えば、EGT及びDTHを等量で含有する組成物に対して、少なくとも5%の低減率であることが好ましく、少なくとも10%の低減率であることがより好ましい。

[0037] 本発明の組成物において、EGT及びDTHの含有比率は、組成物の着色抑制の観点、及び、EGTの安定性の観点から、EGT100質量部に対して、DTHの含有量が、50質量部以下であることが好ましく、40質量部以下であることがより好ましく、30質量部以下であることが更に好ましく、20質量部以下であることが特に好ましく、10質量部以下であることが最も好ましい。

[0038] また、本発明の組成物において、EGT及びDTHの含有比率は、組成物の生産効率等の観点から、EGT100質量部に対して、DTHの含有量が、0.0001質量部以上であることが好ましく、0.001質量部以上であることがより好ましく、0.005質量部以上であることが更に好ましく、0.01質量部以上であることが特に好ましく、0.05質量部以上であることが最も好ましい。

[0039] また、本発明の組成物において、EGT及びDTHの含有比率は、組成物の着色抑制の観点、EGTの安定性の観点、及び、組成物の生産効率等の観点から、EGT100質量部に対して、DTHの含有量が、0.0001～50質量部であることが好ましく、0.001～40質量部であることがより好ましく、0.005～30質量部であることが更に好ましく、0.01

～20質量部であることが特に好ましく、0.05～10質量部であることが最も好ましい。

[0040] また、本発明の組成物において、EGTの含有量は、製剤の形態や、用途、他の成分の種類や含有量等により適宜調整され、限定はされないが、例えば、組成物全量に対して、0.000001質量%以上とすることができ、0.000005質量%以上、0.00001質量%以上、0.00005質量%以上、0.0001質量%以上、0.0005質量%以上、0.001質量%以上等が挙げられる。また、EGTの含有量は、例えば、組成物全量に対して、99.999質量%以下とすることができ、99.9質量%以下、99.5質量%以下、99質量%以下、98.5質量%以下、98質量%以下等が挙げられる。別の実施態様において、液状製剤として調製される場合、限定はされないが、EGTの含有量は、例えば、組成物全量に対して、80質量%以下とすることができ、70質量%以下、60質量%以下、50質量%以下、40質量%以下、30質量%以下、20質量%以下、10質量%以下、5質量%以下、1質量%以下等が挙げられる。

[0041] [用途]

EGT及びDTHを含有する組成物において、DTHの含有量を低減させることにより、EGTの安定性を高めることができるため、本発明は、上記組成物の着色を抑制するために用いることが可能である。

[0042] また、上記の通り、EGTは、抗酸化能をはじめとする多様な生理活性を有することが知られている。EGT及びDTHを含有する組成物においても、本発明を用いることにより、EGTの安定性を高め、その分解を抑制することができるため、EGTが本来有する生理活性を損なうことなく発揮することが可能となる。

[0043] EGT及びDTHを含有する組成物においても、本発明を用いることにより、EGTが本来有する生理活性である、抗酸化用、脳機能改善用、抗老化用、眼疾患用、美白用、紫外線吸収用、メラニン産生抑制用、活性酸素種の消去用、エラスターゼ活性阻害用、シワ形成抑制用、肌のたるみ抑制用、肌

のシミの形成抑制用、眼周囲のクマ抑制用、紫外線による肌ダメージ軽減（光老化の抑制）用、乾燥肌用、敏感肌用、毛髪改善用、オートファジー促進用等に好適に用いることが可能となる。

[0044] 本発明の組成物は、更に飲食品、機能性表示食品、特定保健用食品、医薬部外品、医薬品、化粧品、日用品、飼料等に使用可能な有効成分や添加剤を適宜配合することができ、また、当該品目で使用される公知の製剤化方法により、適宜製剤化することができる。

[0045] 化粧品や日用品としては、例えば、化粧水、乳液、ジェル、美容液、クリーム、日焼け止めクリーム、パック、マスク、ファンデーション、おしろい、浴用剤、ボディローション、シャンプー、リンス、ヘアトリートメント、ヘアコンディショナー、整髪料、ヘアトニック、歯磨き粉、マウスウォッシュ等に製剤化することが可能である。

[0046] [製剤]

本発明の組成物は、例えば、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤などの固形製剤；または液剤、シロップ剤、注射剤、クリーム、ローション、ペースト、軟膏、エマルジョン（水中油型エマルジョン、油中水型エマルジョン、多重エマルジョン、ミクロエマルジョン、PET-エマルジョン、ピッカリング・エマルジョン）、ゲル（ヒドロゲル、アルコールゲル）、懸濁液などの液状製剤として経口または非経口的（外用を含む）に投与することもできる。固形製剤には、賦形剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤；液状製剤には、溶剤、溶解補助剤、乳化剤、乳化安定剤、増粘剤、保湿剤、懸濁化剤、等張化剤、緩衝剤、無痛化剤などを用いることができる。また必要に応じて、防腐剤、抗酸化剤、着色剤、甘味剤、香料などの添加物を用いることもできる。

[0047] 賦形剤としては、例えば、ソルビトール、マンニトール、キシリトールなどの糖アルコール、ブドウ糖、白糖、乳糖、果糖などの糖類、結晶セルロース、カルメロースナトリウム、クロスカルメロースナトリウム、リン酸水素カルシウム、コムギデンプン、コメデンプン、トウモロコシデンプン、バレイショデンプン、デキストリン、 β -シクロデキストリン、軽質無水ケイ酸

、酸化チタン、メタケイ酸アルミン酸マグネシウム、タルク、カオリン、オリーブ油などが挙げられる。

[0048] 結合剤としては、例えば、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースなどのセルロース誘導体、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、アクリル酸系高分子、ゼラチン、アラビアゴム、プルラン、アルファー化デンプン、カンテン、トラガント、アルギン酸ナトリウム、アルギン酸プロピレングリコールエステルなどが挙げられる。

[0049] 崩壊剤としては、例えば、デンプン、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム、クロスカルメロースナトリウム、ヒドロキシプロピルスターチ、部分アルファー化デンプンなどが挙げられる。

[0050] 溶剤としては、例えば、水、アルコール、プロピレングリコール、マクロゴール、ゴマ油、トウモロコシ油などが挙げられる。

[0051] 滑沢剤としては、例えば、ステアリン酸、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸ポリオキシル、セタノール、タルク、硬化油、ショ糖脂肪酸エステル、ジメチルポリシロキサン、ミツロウ、サラシミツロウなどが挙げられる。

[0052] 溶解補助剤としては、例えば、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、マンニトール、安息香酸ベンジル、エタノール、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン、コレステロール、トリエタノールアミン、炭酸ナトリウム、クエン酸ナトリウムなどが挙げられる。

[0053] 懸濁化剤・乳化剤としては、例えば、ステアリルアミン、トリエタノールアミン、ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリルアミノプロピオン酸、レシチン、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、モノステアリン酸グリセリンなどの界面活性剤；例えばポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセル

ロースなどの親水性高分子；例えばシェラックロウ、ミツロウ、カルナバロウ、鯨ロウ、ラノリン、液状ラノリン、還元ラノリン、硬質ラノリン、環状ラノリン、ラノリンワックス、キャンデリラロウ、モクロウ、モンタンロウ、ライスワックスなどワックス類などが挙げられる。

[0054] 等張化剤としては、例えば、塩化ナトリウム、グリセリン、D-マンニトールなどが挙げられる。

[0055] 緩衝剤としては、例えばリン酸塩、酢酸塩、炭酸塩、クエン酸塩などの緩衝液などが挙げられる。

[0056] 防腐剤としては、例えば、パラオキシ安息香酸エステル類、クロロブタノール、ベンジルアルコール、フェネチルアルコール、デヒドロ酢酸、ソルビン酸などが挙げられる。

[0057] 抗酸化剤としては、例えば、亜硫酸塩、アスコルビン酸などが挙げられる。

[0058] 本発明の組成物を固形製剤とする場合、当該分野で公知の製造方法を用いることができる。例えば、組成物を練合し、スクリーンを通過させることで成型する押出造粒物を、粉碎し、整粒する方法、前記組成物に練合水を加え、バーチカルグラニュレーターによって成型する攪拌造粒の後に、コーミルを用いて粉碎・篩過する方法が挙げられる。また、前記製剤組成物をローラーコンパクターで圧縮した後、ロールグラニュレーターで粉碎し篩過する方法が挙げられる。また、攪拌造粒の後に、流動層乾燥する方法が挙げられる。また、例えば、直打により製造する場合には、組成物を混合した後、直接、打錠機に投入して打錠すればよい。

[0059] [飲食品]

本発明の組成物は、飲食品組成物としても使用することができ、食品または機能性食品に含有させて提供され得る。このような食品または機能性食品としては、米飯；そば、うどん、はるさめ、中華麺、即席麺、カップ麺を含む各種の麺類；清涼飲料、炭酸飲料、栄養飲料、果実飲料、乳酸飲料、スポーツ飲料等の飲料；カレールー、シチュー、各種スープ類；アイスクリーム

、アイスシャーベット、かき氷等の冷菓；飴、クッキー、キャンディー、ガム、チョコレート、錠菓、スナック菓子、ビスケット、ゼリー、ジャム、クリーム、その他の焼き菓子等の菓子類；かまぼこ、はんぺん、ハム、ソーセージ等の水産・畜産加工食品；加工乳、発酵乳等の乳製品；サラダ油、てんぷら油、マーガリン、マヨネーズ、ショートニング、ホイップクリーム、ドレッシング等の油脂及び油脂加工食品；ソース、ドレッシング、味噌、醤油、たれ等の調味料；スープ、シチュー、サラダ、惣菜、ふりかけ、漬物；その他種々の形態の健康・栄養補助食品・機能性表示食品・特定保健用食品などが例示される。

[0060] また、本発明の組成物を含有するサプリメント（散剤、顆粒剤、ソフトカプセル、ハードカプセル、錠剤、チュアブル錠、速崩錠、シロップ、液剤等）を調製してもよい。

[0061] また、ペットなどの動物用の餌に対して本発明の組成物を含有させることもできる。

[0062] 飲食品には、必要に応じて、添加物が加えられる。このような添加物としては、例えばブドウ糖、果糖、ショ糖、マルトース、ソルビトール、トレハロース、ステビオサイド、ルブソサイド、コーンシロップ、乳糖、マンニトール、デキストリン、クエン酸、クエン酸ナトリウム、酒石酸、リンゴ酸、コハク酸、乳酸、L-アスコルビン酸、トコフェロール、エリスリジン、ポリグリセリン脂肪酸エステル、ショ糖脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステル、アラビアガム、カラギーナン、カゼイン、ゼラチン、ペクチン、寒天、ビタミンB類、ニコチン酸アミド、パントテン酸カルシウム、アミノ酸類、カルシウム塩類、界面活性剤、色素、香料、保存剤などが挙げられる。

[0063] 本発明の組成物は、各種症状や状態の改善・予防・向上等の表示が許可されている飲食品ために用いることができる。ここで、本発明において、症状や状態の改善・予防・向上等の表示が許可されている飲食品とは、国や公共

団体が許可・指定している効能を有する飲食品であり、例えば、機能性表示食品、特定保健用食品等の保健機能食品、特別用途食品等である。なお、状況や時代、各国の制度により名称や規程が変化するが、本質的に同じであるものは本発明に含まれる。

[0064] 本発明において、本発明の組成物の配合量は、特に制限されず、適用の目的（対象疾患や症状の種類等）、適用対象部位、適用者の性別や年齢、飲食品、機能性表示食品、特定保健用食品、医薬部外品、医薬品、化粧品、日用品又は飼料等の製品形態、これらの投与又は摂取方法や回数、嗜好等に応じて適宜設定される。

[0065] 本発明の組成物を使用する場合には、EGTが本来有する生理活性を発揮できる有効量を1日当たりの摂取量（適用量）とすることが可能である。例えば、健常の成人が摂取（適用）する場合、EGTの1日当たりの摂取量（適用量）は、例えば、0.005～4,000mg、好ましくは0.1～3,000mg、より好ましくは0.5～2,000mg、更に好ましくは1～1,000mg、特に好ましくは2～500mg、最も好ましくは3～300mgで使用することができる。

[0066] また本発明の組成物を飲食品として用いる場合は、限定はされないが、EGTが本来有する生理活性を表示できる観点からは、機能性食品とすることが好ましく、機能性食品のなかでも機能性表示食品、栄養機能食品、栄養補助食品、特定保健用食品が挙げられるが、用途を明確に表示できる点で機能性表示食品が好ましい。

[0067] [適用対象者]

本発明の組成物が適用される対象者は、EGTが本来有する生理活性を必要とする年代であれば、特に制限されないが、仕事等の生活環境からストレスを受けやすい年代である30歳頃以上であってもよく、ホルモンバランスの変化や生活環境の変化等により身体の変化を感じやすい年代である中年齢者（45歳頃以上55歳未満）であってもよく、高齢者（55歳以上）であってもよい。

[0068] [pH]

本発明の組成物のpHは、他の配合成分の種類及び含有量、製剤形態、使用方法等に応じて適宜設定され、薬学的又は生理学的に許容できる範囲であれば制限されないが、例えば、pH2～10とすることができる。本発明の効果を安定的に発揮する観点から、本発明の組成物のpHは、例えば、pH2～10、pH2～9、pH2～8、pH2～7、pH3～10、pH3～9、pH3～8、pH3～7、pH4～10、pH4～9、pH4～8、pH4～7、pH5～10、pH5～9、pH5～8、pH5～7、pH6～10、pH6～9、pH6～8、pH6～7等とすることが可能である。

[0069] [EGT及びDTHを含有し、着色が抑制された組成物の製造方法]

本発明において、EGT及びDTHを含有し、着色が抑制された組成物の製造方法は、DTHの含有量を低減させる工程を含む。

[0070] DTHの含有量を低減させる工程は、DTH含有量が低減される限り、公知のどのような手段であっても利用することができる。例えば、EGTとDTHとを混合し、組成物を調製する場合は、EGTに対するDTHの含有比率を低減させる工程を採用することができる。また、上述の通り、EGTを含有する組成物にDTHが共存する態様は特に限定されず、例えば、EGTの抽出法における夾雑物においてDTHが存在する態様、合成法又は発酵法等における副生成物として存在する態様であってもよい。

[0071] EGTのキノコや植物等からの抽出法における夾雑物においてDTHを低減させる場合は、例えば、溶媒抽出、溶解度差による分離、シリカゲル、アルミナなど吸着剤を用いたクロマトグラフィー、カチオン交換クロマトグラフィー、アニオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲル濾過、チオプロピルセファロース6B、逆相クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィー、結晶化、活性炭処理、膜処理などの方法、およびこれらを組み合わせた方法が挙げられる。

[0072] EGTを発酵法により生産する方法は、国際公開第2019/163767号等により大腸菌等を用いた方法が公知である。EGTの発酵法における

夾雑物においてDTHを低減させる場合は、例えば、後述の実施例にて記載された方法等が挙げられる。具体的には、EGTの発酵法において、EGT生産能を有する腸内細菌科に属する細菌のmetJ遺伝子を欠失させる工程を採用することにより、培養液中のDTHを低減させ、且つ、EGTを効率的に生産させることが可能となる。

[0073] metJ遺伝子を欠失させる工程は、公知の方法を用いることができ、例えば、相同組換え、変異処理、ゲノム編集などによりmetJ遺伝子をノックアウトまたはノックダウンする方法等が挙げられる。

EGT生産能を有する腸内細菌科に属する細菌としては、エシェリヒア (*Escherichia*) 属、エンテロバクター (*Enterobacter*) 属、パントエア (*Pantoea*) 属、クレブシエラ (*Klebsiella*) 属、及びサルモネラ (*Salmonella*) 属の細菌が例示されるが、これらに限定されない。特に好ましい腸内細菌としては、大腸菌 (*Escherichia coli*) 等のエシェリヒア属、パントエア・アナナティス (*Pantoea ananatis*) 等のパントエア属などの腸内細菌が挙げられる。

[0074] 腸内細菌科に属する細菌の培養は、通常の方法にて行うことができる。具体的には、LB培地、2×YT培地、NZY培地、M9培地、SOC培地、またはYPD培地などを用いることができる。上記の培地を用いて、EGT及びDTHを生産させることができるが、用いる培地はこれらに限定されない。また、生産させたEGT及びDTHは菌体内に蓄積してもよいし、菌体外（培養液中）に分泌・蓄積してもよい。

[0075] 菌体内、または菌体から遊離されたEGT及びDTHの回収は公知の方法によって行うことができる。例えば、培養物を遠心分離あるいは濾過等の固液分離に供して、菌体内からは溶媒抽出、熱水抽出、破碎処理等によりEGT及びDTHの抽出液を取得できる。EGT及びDTHの抽出液、または培養上清からは、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー等の公知のクロマトグラフィーに供してEGTを得ることができる。

[0076] 各種のDTHの含有量を低減させる手段において、EGT及びDTHの好ましい含有比率については、上記に準じる。

[0077] 上記製造方法は、更に、pHを調整する工程を含むことが可能である。至適なpHの数値範囲については、上記に準じる。

[0078] [EGT及びDTHを含有する組成物に対して着色抑制効果を付与する方法]

本発明において、EGT、及び、DTHを含有する組成物であって、

該EGT100質量部に対して、該DTHの含有量が、50質量部以下とすることによる、前記組成物に対して着色抑制効果を付与する方法を提供することも可能である。EGT及びDTHの好ましい含有比率については、上記に準じる。

実施例

[0079] 次に、実施例や試験例により本発明を具体的に説明するが、本発明は以下の実施例や試験例に限定されるものではない。なお、特に説明がない場合には、分子生物学、応用微生物学に関する標準的なプロトコール集に記載の方法、あるいはそれを修飾、改変した方法を用いて実験を実施した。また、%は、特に明記しない限りw/v%を表す。

[0080] (試験例1. EGT及びDTHを含有する組成物における安定性評価1)

L-エルゴチオネイン(EGT)及びN,N-ジメチル-L-2-チオヒスチジン(DTH)を含む組成物について、種々のpH条件下における保存安定性を下記の通り調べた。

[0081] EGT、DTHの終濃度、及びpHが表1の通りになるよう、EGT(テトラエドロン社製)及びDTH(テトラエドロン社製)をpH3、4、5、6、7、8、9、又は、10のBritton-Robinson Buffer(終濃度30mM)に溶解し、pH及び濃度の異なるDTHとEGTの混合溶液を3.0ml調製した。

[0082] pHの調整に用いた広域緩衝液であるBritton-Robinson Bufferは、次の要領で調製した。ホウ酸+リン酸+酢酸混合溶液(

終濃度各200mM)を20ml分取し、1N NaOHでpH3、4、5、6、7、8、9、又は、10にそれぞれ調整後、水を用いて40mlにメスアップすることで、pH3~10の300mM(各100mM) Britton-Robinson Bufferとした。さらに、Britton-Robinson Bufferの終濃度が30mMとなるように、各pHの300mM Britton-Robinson bufferと水を用いてEGTとDTHを溶解させることで、表1のEGT及びDTH混合溶液を調製した。

[0083] 表1記載のEGT及びDTH混合溶液をサンプル番号一つにつき、1.0mlずつ2本のチューブに移し、それぞれ30℃、または70℃で21日間静置した。開始直後(0日目)、8日目、14日目、及び、21日目にチューブの写真を撮影することで溶液の色の変化を記録し、さらに100μlずつサンプリングを行い、表2記載の条件で高速液体クロマトグラフィー(島津製作所社製)を用いたEGTとDTHの定量に供した。図1は、14日目に撮影した溶液の写真である。

[0084] 図1に示される通り、70℃で14日間保存したサンプルのうち、EGT 100mg/L+DTH 20mg/L、EGT 100mg/L+DTH 50mg/L、EGT 100mg/L+DTH 100mg/Lの試験区のサンプルにおいて、無色透明から茶褐色への溶液の着色が確認された。また、DTH濃度の増加に伴い着色の度合いは強くなった。また、DTH保存期間の増加に伴い着色の度合いは強くなった。以上より、本試験例により、EGT及びDTHの混合溶液が着色するという課題が初めて確認された。

[0085]

[表1]

No.	EGT (mg/L)	DTH (mg/L)	pH	No.	EGT (mg/L)	DTH (mg/L)	pH
1	100	0	3	17	100	50	3
2			4	18			4
3			5	19			5
4			6	20			6
5			7	21			7
6			8	22			8
7			9	23			9
8			10	24			10
9	100	20	3	25	100	100	3
10			4	26			4
11			5	27			5
12			6	28			6
13			7	29			7
14			8	30			8
15			9	31			9
16			10	32			10

[0086] [表2]

使用機器	島津製作所社製 HPLC Prominence
カラム	YMC-Pack ODS-AQ (4.6 × 250 mm, 粒子径 5 μm) YMC 社製
溶媒	0.1%ギ酸
グラジエント条件	アイソクラティック
検出波長	263 nm
流量	0.8 mL/分
カラム温度	30°C
注入量	5 μl
溶出時間	DTH: 5.1 min 付近, EGT: 6.0 min 付近

[0087] (試験例2. EGT及びDTHを含有する組成物における着色抑制評価1)

試験例1の結果、EGT及びDTHの混合溶液が着色するという新規な課題が見出されたため、この変色の程度を吸光度測定により数値化すると同時

に、EGTとDTHの濃度を様々に検討することで、着色の抑制方法を探索した。

[0088] 試験例1と同様に、EGT（テトラエドロン社製）及びDTH（テトラエドロン社製）の終濃度が表3及び表4に示す濃度かつpHになるようにBritton-Robinson Buffer（終濃度30mM）に溶解し、2.0mLのEGT及びDTH混合溶液を調製した。

[0089] 表3及び表4に記載のEGT及びDTH混合溶液各1.5mLを2.0mLチューブに移し、溶液の蒸散防止としてミネラルオイルを200 μ Lずつ液面に重層した。調製したサンプルを70℃で28日間静置し、開始直後（0日目）、4日目、7日目、14日目、21日目、28日目に200 μ Lずつ96wellマイクロプレートに採取し、MULTISKAN GO（Thermo SCIENTIFIC社製）を用いて250～800nmの吸光度測定を行った。図2は、表3のサンプルを対象とした吸光度測定により得られたデータのうち、400nmの吸光度データを用いて作成した。さらに、吸光度測定後のサンプル100 μ Lを使用して、表2記載の条件で高速液体クロマトグラフィー（島津製作所社製）を用いたEGTとDTHの定量も行った。

[0090]

[表3]

No.	EGT (mg/L)	DTH (mg/L)	pH	No.	EGT (mg/L)	DTH (mg/L)	pH
1	100	50	3	37	100	50	7
2		20		38		20	
3		10		39		10	
4		5		40		5	
5		2.5		41		2.5	
6		1		42		1	
7		0.1		43		0.1	
8		0.01		44		0.01	
9		0.001		45		0.001	
10	100	50	4	46	100	50	8
11		20		47		20	
12		10		48		10	
13		5		49		5	
14		2.5		50		2.5	
15		1		51		1	
16		0.1		52		0.1	
17		0.01		53		0.01	
18		0.001		54		0.001	
19	100	50	5	55	100	50	9
20		20		56		20	
21		10		57		10	
22		5		58		5	
23		2.5		59		2.5	
24		1		60		1	
25		0.1		61		0.1	
26		0.01		62		0.01	
27		0.001		63		0.001	
28	100	50	6	64	100	50	10
29		20		65		20	
30		10		66		10	
31		5		67		5	
32		2.5		68		2.5	
33		1		69		1	
34		0.1		70		0.1	
35		0.01		71		0.01	
36		0.001		72		0.001	

[0091]

[表4]

No.	EGT (mg/L)	DTH (mg/L)	pH	No.	EGT (mg/L)	DTH (mg/L)	pH
1	1000	500	3	37	1000	500	7
2		200		38		200	
3		100		39		100	
4		50		40		50	
5		25		41		25	
6		10		42		10	
7		1		43		1	
8		0.1		44		0.1	
9		0.01		45		0.01	
10	1000	500	4	46	1000	500	8
11		200		47		200	
12		100		48		100	
13		50		49		50	
14		25		50		25	
15		10		51		10	
16		1		52		1	
17		0.1		53		0.1	
18		0.01		54		0.01	
19	1000	500	5	55	1000	500	9
20		200		56		200	
21		100		57		100	
22		50		58		50	
23		25		59		25	
24		10		60		10	
25		1		61		1	
26		0.1		62		0.1	
27		0.01		63		0.01	
28	1000	500	6	64	1000	500	10
29		200		65		200	
30		100		66		100	
31		50		67		50	
32		25		68		25	
33		10		69		10	
34		1		70		1	
35		0.1		71		0.1	
36		0.01		72		0.01	

[0092] 表3のサンプルを用いた着色抑制評価試験の結果が図2である。図2に示される通り、EGT 100 mg/L + DTH 50 mg/Lのサンプルでは全てのpH区で、時間経過とともに着色度合いを示す400 nmの吸光度（A

400値)が増加し、実施例1で確認されたEGT及びDTH混合溶液の着色を吸光度からも確認できた。さらに、様々なDTH濃度を検討した結果、全てのpH区でDTH濃度を低下させることでA400値が低下することが確認できた。限定はされないが、特に、EGT100質量部に対しDTHを20質量部以下の含有比率にすることで経時的な着色が顕著に抑制されることを見出した。各サンプルのEGTの定量結果から、着色と同様に、DTH濃度を低下させることでEGTの分解を抑制できることも示された。

[0093] また、表4に示すEGT及びDTH混合溶液を用いた着色抑制評価試験においても、表3のサンプルと同傾向の結果が得られた。結果を図3に示す。具体的には、全てのpH区でDTH濃度を低下させることでA400値が低下することが確認でき、特に、EGT100質量部に対しDTHを20質量部以下の含有比率にすることで経時的な着色が顕著に抑制できることが確認された。

[0094] (試験例3. EGT発酵法におけるDTHの低減試験)

EGT合成遺伝子を発現させた大腸菌を用いた、EGTの微生物生産を試みた(先行技術:国際公開第2019/163767号)。鋭意検討を進めた結果、偶然にもmetJ遺伝子を破壊した株を用いることで培養液中のDTH含量が有意に低下することを見出した。下記に、その実施例を記載する。

[0095] 奈良先端科学技術大学院大学より、Mol. Syst. Biol., 2006; 2: 2006.0008 (Baba, T.ら、Construction of Escherichia coli K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection) 記載の方法に準じて大腸菌BW25113 (NBRC103404) 株から調製された、metJをコードする遺伝子の欠損した大腸菌ΔmetJ株を入手した。

[0096] なお、大腸菌ΔmetJ株は例えば以下の方法に準じて調製することもできる。metJ遺伝子上流配列と下流配列を含むカウンターセクションベクター(sacB遺伝子、薬剤耐性遺伝子を含む)を用いた相同組み換え法により、大腸菌BW25113株の各遺伝子領域を欠失させる従来公知の

方法で構築した。上記の破壊株構築は、M. S. Donnenberg and J. S. Kaper, Infect. Immun., 1991, 4310-4317や、H. Mizoguchi et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 2007, 71 (12), 2905-2911などを参照できる。

[0097] EGT生産ベクターはpACG-EGT（先行技術：国際公開第2019/163767号）を使用した。BW25113株及び $\Delta metJ$ 株を使用し、pACG-EGTを用いて形質転換を行い、EGT生産株（BW25113/pACG-EGT、 $\Delta metJ$ /pACG-EGT）を得た。

[0098] 上記で構築したEGT生産株 $\Delta metJ$ /pACG-EGTを用いて、EGTの発酵生産試験を行った。BW25113株にpACG-EGTを導入したBW25113/pACG-EGTをコントロール株とした。BW25113/pACG-EGT、 $\Delta metJ$ /pACG-EGT、それぞれのグリセロールストックを3mLのLB培地（polypeptone 10g、yeast extract 5g、NaCl 10g/培地1L）にテトラサイクリン（終濃度10 μ g/mL）を含む試験管に添加し、30℃、200rpmで15-18時間、定常期に達するまで振盪培養し前培養液を得た。さらに、 Φ 24mm試験管中の5mLの2 $\times$ YT培地（polypeptone 16g、yeast extract 10g、NaCl 5g、Glucose 5%、L-Histidine 5mM、L-Cystine 2.5mM、L-Methionine 5mM、tetracycline 10 μ g/mL/培地1L）に、OD=0.5となるよう前培養液を添加し、30℃300rpmで96時間振盪することで本培養を行った。

[0099] EGT及びDTHの定量は下記の通り行った。本培養の間、培養開始後24、48、72、96時間に培養液1mLを採取し培養サンプルを評価した。採取した培養液の菌体濁度（OD600）を測定後、14000rpmで10分間、遠心分離して、菌体外培養液と沈殿物（菌体）とに分離した。分離した菌体外培養液（菌体外サンプル）中のEGT含量を、HPLCにより測定した。HPLC測定条件は以下の表5の通りで、保持時間10分付近に

生じるEGTのピーク、保持時間8分付近に生じるDTHのピークをもとに、定量を行った。

[0100] [表5]

カラム	Inertsil HILIC (5 μ M ; 4.6 ϕ mm $\times$ 250mm) ジーエルサイエンス社製
溶媒	100mM 酢酸アンモニウム/アセトニトリル/ イソプロパノール/水 (2:82:6:10)
グラジエント条件	アイソクラティック
検出波長	265nm
流量	1mL/分
カラム温度	40 $^{\circ}$ C

[0101] WT／pACG-EGT、 $\Delta met J$ ／pACG-EGTを培養しEGT、DTHの生産量を調べた結果、図4、図5に示す通り、96時間目の培養液中のDTH量が $\Delta met J$ 株を用いた場合、WTと比較して、約1／7と顕著に低下することを見出した。