

# Haematococcus 属緑藻によるアスタキサンチンの商業生産

北村 晃利\*・平井 克幸・山下 栄次

## はじめに

もともとアスタキサンチンは海洋生物によく見られる赤色系のカロテノイドということで、養殖魚の色揚げの用途に化学合成品が用いられてきた。80年代にその高い抗酸化活性が見いだされたこと<sup>1,2)</sup>をきっかけに機能性研究に弾みがつき、その需要が元来の養殖魚の色揚げから、サプリメントやコスメティクスといった、ヒト向け用途に向かうようになる。ヒト向けの市場が開かれると同時に90年代初頭には天然資源からの商業生産が試みられるようになった。商業生産が可能になると、さらに機能性研究が加速的に増え、近年では網膜保護作用<sup>3)</sup>や眼精疲労改善<sup>4)</sup>のほか、ミトコンドリア機能改善<sup>5)</sup>、エネルギー源として脂質利用促進効果<sup>6)</sup>、持久力や運動機能向上<sup>7-9)</sup>、あるいは美肌効果<sup>10)</sup>、などの機能性が多数報告されるようになり、今ではサプリメントやコスメティクスにとどまらず、飲料や食品など、ますます広く利用されるようになった。その研究のほとんどは、ヘマトコッカス (*Haematococcus pluvialis*) という単細胞の淡水生微細藻類に由来するアスタキサンチンに対して行われているものである。

さらに最近では、動脈硬化抑制<sup>11)</sup>、血圧上昇抑制<sup>12)</sup>、ヒト認知機能改善<sup>13)</sup>のほか、糖尿病や認知症あるいはサルコペニアなどの重要な発症要因の一つであるといわれるインシュリン抵抗性改善<sup>14)</sup>など、予防医療の分野での利用が期待されるようになってきている。多くのサプリメント素材が、実のところその臨床報告の信頼性について厳しい評価を受ける中<sup>15)</sup>、ヘマトコッカス由来のアスタキサンチンは、専門家によって実施されたレビュー<sup>16)</sup>によっても、その臨床データの内容(数と質)に対して高い評価を受けている。今や、カロテノイドのみならず、数多の健康食品素材の中でももっとも科学的な裏づけのある素材の一つであると言える。

そうした中、天然由来のアスタキサンチンの需要は増え続け、今や米国市場をはじめ、全世界で流通しているヘマトコッカス由来のアスタキサンチンは純品換算で年間10tを超えると推定されている。そのほとんどはサプリメントとして利用されており、多くの臨床試験で有効性が確認されている一日量(たとえば眼精疲労などは有

効量6 mg<sup>4)</sup>)から換算すると、年間10億食分以上が消費されていることになる。

本稿では、このヘマトコッカスを用いた天然アスタキサンチンの特徴とその生産様式について述べる。

## さまざまなアスタキサンチン商業生産

最初の商業生産は、化学合成によるものであった。アスタキサンチンの化学合成法は古くは60年代に確立され、今日に至るまで養殖魚の色揚げの用途に長く使われてきているが、現在、ヒト用としては正式な安全性評価がなされていない。また、合成品は結晶性であるため、製剤的な加工を施さないと著しく吸収性に劣る。

先に述べたとおり、80年代にアスタキサンチンの機能性が認められるようになると同時に、天然由来アスタキサンチンの商業的な生産が求められるようになった。当初は、オキアミ由来のアスタキサンチンを商業化するための技術開発が主流であったが、基原原料であるオキアミに含まれるアスタキサンチン量が微量であること(オキアミ油中に含まれるアスタキサンチン量は0.01%~0.02%程度)などの理由から、やがて微細藻類の大量培養による生産に置き換わる。オキアミ由来の脂質は、EPAなどの高度不飽和脂肪酸やリン脂質などを多量に含むため、今ではアスタキサンチン源としてではなく、オキアミオイル(クリルオイル)として大きな市場を築いている。オキアミ由来のアスタキサンチンは、両端の水酸基が両方とも脂肪酸と結合したジエステル体であることが特徴である。

もう一つ、天然アスタキサンチンの有力な基原原料として、ファフィア(現在の学名は*Xanthophyllomyces dendrorhous*)と呼ばれるある種の酵母があげられる。合成品のアスタキサンチンと同じく、主として海洋養殖魚の色揚げの用途に使われてきた。光学的には純粋な3R,3'R-体のみを生産するのが特徴であり、また脂肪酸の付加されていないフリー体を細胞内に蓄積する。ファフィア由来のアスタキサンチンは、フリー体であるがゆえに、結晶化傾向が強く、ヒトでの吸収性に劣るという報告がある<sup>17)</sup>。また、ファフィアはアスタキサンチン以外にも多種多様なカロテノイドを産生し、株にもよるが、産生するカロテノイドに占めるアスタキサンチンの割合

\*著者紹介 アスタリール株式会社(開発部長) E-mail: kitamura@fujichemical.co.jp

は50%程度であり、未同定のものや、その生理作用、安全性が十分に解明されていないカロテノイドを含む<sup>18)</sup>。

パラコッカスはカロテノイドを生合成するという珍しい特性を持った土壌性のバクテリアで、乾燥菌体当たりのアスタキサンチンの含有量が2% w/w以上とファフィア酵母（現在、市販されているものはアスタキサンチン含量が1% w/w前後）よりさらに生産性が高い。ファフィアと同様、アスタキサンチン以外のさまざまなカロテノイドも同時に産生し、やはり主に養殖サケの色揚げの用途に使われてきている。パラコッカスについては、本号に特集されているので、本稿での詳述は省略する。

ヘマトコッカスはクラミドモナス目、ヘマトコッカス科の淡水生の単細胞藻類で、飢餓（栄養塩類の欠乏）や高温、低温、乾燥による塩濃度の上昇あるいは高照度下など、生育に不適な環境条件下で、これらに対するストレス応答として、休眠細胞（シスト）化して、細胞内にアスタキサンチンを貯め込むことで知られている。ヨーロッパ、アジア、アフリカ、北アメリカなど世界中のいたるところで、普遍的に分布しており、しばしば一過性の水たまりなどからも見つかる。なかでも、*Haematococcus pluvialis*がアスタキサンチン高産生種として有名であり、より生産性の高い株がスクリーニングされて、商業生産に用いられている。そのカロテノイド合成の代謝経路はすでに解明されており<sup>18)</sup>、既出のファフィア酵母やパラコッカスとは異なり、ほぼアスタキサンチンだけを最終産物として生産し、わずかにその中間体であるクリプトキサンチンやアドニルピンなどが含まれる以外は、含有されるカロテノイドの構成はそのほとんどがアスタキサンチンで占められているのが特徴である。また、ヘマトコッカスによって生合成されたアスタキサンチンは、光学的には純粋な3*S*,3'*S*-体のみであり、末端のイオノン環の3位、もしくは3'位の水酸基の一方、もしくは両方が脂肪酸でエステル化された状態で蓄積される。通常、一方の水酸基のみが脂肪酸エステル化されたモノエステル体が多くなり、70~80%程度を占めている。次いで、ジエステル体（15~20%程度）、残りがフリー体（5~10%程度）として存在する。ヘマトコッカスのアスタキサンチン含有量は既出の天然ソースに比べて一段高く、生産条件（培養条件）にもよるが、商業ベースの生産でも、乾燥藻体当たりのアスタキサンチンの含量は、フリー体換算で5%（w/w）以上に及ぶ。ヘマトコッカス由来のアスタキサンチンは、日本では1995年に既存添加物として収載されており、また米国ではGRAS（generally recognized as safe）物資として、安全性が認められている。安全性を示す研究報告も豊富

である<sup>20)</sup>。早くから商業生産が確立されてきたことに加えて、その高い安全性と使用実績から、現在、サプリメントやコスメティクスといった、ヒト用に用いられる天然由来のアスタキサンチンは、ほとんどがこのヘマトコッカスに由来するものであると言って過言ではない。

### ヘマトコッカスの生活史

ヘマトコッカスは非常に興味深い生活サイクルを持つ。冷涼で、弱光、栄養塩類の豊富な好適環境下では、2本の鞭毛を持った変形能のある遊泳型細胞の形態をとる。この遊走子状の細胞は、培養初期の活発な生育期にある培養液に多く見られ、株にもよるが、通常20~30 μm程度の大きさで、泳ぎ回りながら、分裂を行い、栄養増殖を行う。やがて栄養塩類のバランスが崩れるか、あるいは強い光にさらされると、鞭毛を失い、かたい細胞壁を持つバルメロイド（Palmeloid）と呼ばれる不動性の球状細胞へと変形する（図1）。バルメロイドの状態でも、依然として分裂能を有しており、細胞増殖を行うが、遊走細胞とは異なり、そのままでは沈降し、培養液中で偏りを生じてしまうため、生産性が劣ることになる。より高い生産性を達成するためには、遊走型の細胞をいかに維持するかが一つの鍵になる。遊走型細胞とバルメロイドの間の形態変化は比較的容易に起こり、一旦、バルメロイド化してしまった培養液も、好適な環境下に戻すことで、数時間のうちに分裂が活性化し、大量の遊走子型の細胞を放出する現象がみられる。

バルメロイドがさらに強いストレスを受けるといよいよシスト（cyst）と呼ばれる休眠細胞となり、この細胞を継続したストレス状態におくことにより、細胞内のアスタキサンチンの蓄積が一層進むようになる。アスタキサンチンの含量の高まりに反するように、クロロフィルは減少し、細胞の中心から赤みが強くなる。また、シストの成熟が進むにつれ、アスタキサンチンを貯め込むと同時に、中性脂質（主としてトリグリセリド）の含有量も多くなり、成熟したヘマトコッカスのシスト細胞の脂質含量は乾燥重量の45%を超えるようになる。細胞自体も肥大化し、100 μmにも及ぶものもある。細胞を取り囲む細胞壁も厚みを増し、より強固になる（図2）。細胞全体が真っ赤になり、培養液も鮮やかなワインレッドを呈し、にわかには緑藻とは思えないほどである（図3）。

### アスタキサンチン生産のための大量培養

商業生産では、上述のヘマトコッカスの特性を利用して、2段階培養によって、アスタキサンチンの生産を行う。つまり、緑色の細胞を活発に分裂増殖させて細胞数

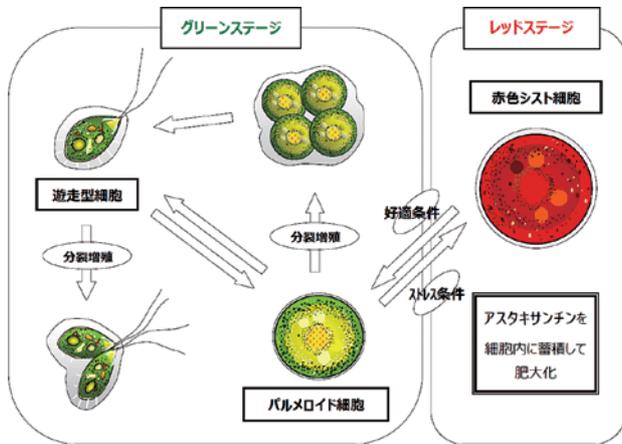


図1. 微細藻類ヘマトコッカスのライフサイクル

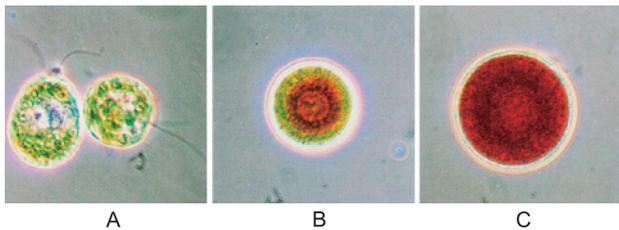


図2. さまざまな形態に変化するヘマトコッカスの細胞. A: 遊走細胞, B: バルメロイド細胞 (未成熟シスト), C: シスト細胞 (休眠細胞).

を増やすグリーンステージと、ストレス応答により細胞内にアスタキサンチンを蓄積させるレッドステージからなる。アスタキサンチン合成の誘導には、強光ストレスと栄養塩類 (特に窒素源) の欠乏の組合せが一般的だが、これに高塩濃度や高温ストレスなどを組み合わせることもある。

しかしながら、これまで大量培養に成功している他の微細藻類に比べて、ヘマトコッカスの大量培養は格段に難しい。もともと、低温や弱光条件下を好むため、屋外培養では好適な培養環境の維持が難しい。クロレラほどの増殖速度はなく、加えて、ごく平凡な中性の淡水条件で増殖するため、スピルリナやドナリエラのように極端な高pHや高塩濃度といった選択的な条件での培養ができず、バクテリアや他の藻類といった異種生物のコンタミに対して非常に脆弱である。そのため、より繊細な管理を要するグリーンステージはもっぱら屋内もしくはグリーンハウスのような半屋内の設備内で、密閉式の培養設備で培養されることが多い。

一方のレッドステージの培養様式は、コンベンショナルなオープンポンド方式から、チューブラー方式、ドーム型、フラットパネル方式、タワー型、プラスチック



図3. グリーンステージ (A) とレッドステージ (B) それぞれのヘマトコッカスの培養液外観



図4. チューブラー型のヘマトコッカス培養設備

バッグ方式などの各社さまざまな様式が採用されている。

オープンポンド方式は設備が単純なため、維持管理のためのコストが低いのが特徴であるが、培養液が完全に解放されているため、他の微生物による汚染が進みやすく、長期間の培養維持ができない。そのため、アスタキサンチン含量が上がりきる前の未熟な状態で収穫されることが多いため、単位培養液当たりの生産性が低い。未熟な細胞には多くのクロロフィルが残留しており、これが後々の製品の品質にも影響することにもなる。この欠点を改善するためにさまざまな密閉型のバイオリアクターが開発されているが、なかでも商業ベースのヘマトコッカス培養で、現在、もっとも多く採用されているは、多段式のチューブラー方式である (図4)。直径5 cm ~ 10 cm 程度の透明なガラス管を片道数十mあるいはそれ以上の長さに継いで、さらに何層にも並べて屋外に設置する。そのガラス配管中に、ヘマトコッカスの培養液をポンプで送液することで、太陽光に暴露させ、アスタキサンチンの蓄積を行わせる。大規模なものでは、1施設で使用されるガラス管の総延長距離は数百kmにも及ぶ。もともとはイスラエルの Algatechnologies 社がヘマトコッカスの培養のために開発し実用化したのが始まりであるが、近年、この方式を用いてヘマトコッカスの商業培養を行う会社が増えている。通常、オープンポンドで培養されたヘマトコッカスのアスタキサンチン含量が乾燥藻体重量当たりで2%台 (フリー体換算) に留まるのに対して、チューブラー方式では4%を超えて生産されることもある。チューブラー方式は単位培養液当たりの生産性が高い一方で、構造が複雑なため、設備の洗浄や



図5. 屋内密閉タンクによるヘマトコッカスの培養 (Asta Real AB社 (スウェーデン))

維持に手間がかかる。また、天然光を用いる屋外培養の性質上、培養の成否は日照時間や気温といった気象の影響を直接受け、安定な生産を維持するのは容易ではない。培養に関する生産技術的な要素の他、培養設備が設置された環境(気候)条件も、生産性を決める大きな要因となる。

これらの外部環境要因の影響を一切排除したのが、屋内で人工光を用いる方式であるが、大量のエネルギーを要するため、通常、藻類の商業的培養には用いられない。現在、屋内培養で商業生産を行っているのは、筆者の所属するアスタリアル社(富士化学工業株式会社グループ)の2つのヘマトコッカス培養工場(AstaReal AB社/スウェーデンおよびAstaReal Technologies, Inc./米国)のみである。同社では、グリーンステージ、レッドステージ両方の培養を、衛生的に管理された工場内に設置したステンレス製の密閉型培養タンクを用いて、アスタキサンチンの生産を行っている(図5)。屋外培養でしばしば発生する異種藻類や雑菌のコンタミネーションリスクがない上、培養ステージに合わせて、必要な栄養塩類、エアレーションによる攪拌、光量の調整がほぼ完全に管理できるため、常に最適な培養環境を維持することができる。屋外の培養式に比べて、より高濃度での培養が可能で、さらに24時間連続して強光条件を維持できるため、アスタキサンチンの蓄積も早く、より完熟した状態で収穫することができる。年間を通じて常に一定の高い生産安定性に加えて、衛生面でも優れており、生産されるアスタキサンチンの品質の高さは、食品用途で用いられる機能素材にとって、何物にもかえがたい。人工の光源を用いるため、コスト高になると考えられがちだが、実際には、高度な最適化によって得られる高い生産性が、エネルギーコストを十分にカバーしている。近年のLED



図6. アスタキサンチンを高濃度に含有するヘマトコッカス抽出物

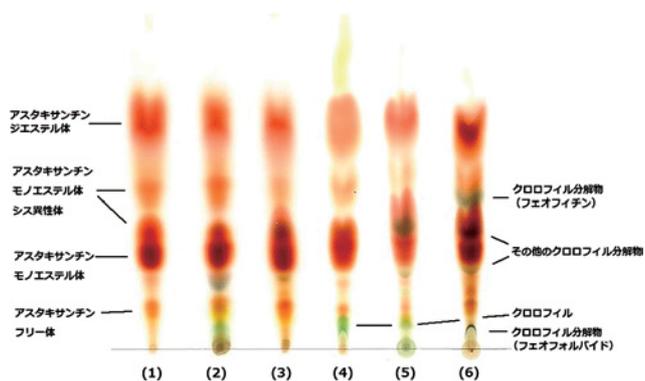


図7. さまざまなサプライヤーのヘマトコッカス抽出物の比較(TLC). 赤く見えるのがアスタキサンチンのスポット。(1) AstaReal社(富士化学グループ)のヘマトコッカス藻抽出物、(2)～(6) 他社のヘマトコッカス抽出物。

技術の進歩は、今後さらに屋内培養に必要な人工光源のエネルギーコストを押し下げる要因となりうる。

### アスタキサンチンの抽出

レッドステージを経てアスタキサンチンを溜め込んだヘマトコッカス藻は、遠心分離や沈殿濃縮などの方法によって、培養液より収穫される。シスト化して細胞内にアスタキサンチンを溜め込んだヘマトコッカス藻は、厚い細胞壁を持つため、生体利用可能な状態にするためには、この細胞壁を破碎する必要がある。ときおり、細胞壁がほとんど破碎されないまま乾燥されたヘマトコッカス藻体粉末が、アスタキサンチンの原料バルクとして市場に流通しているのを見かけるが、このようなものは摂取してもほとんど吸収されない。細胞壁を破碎されたヘマトコッカス藻は、スプレードライやドラムドライなど

の乾燥工程を経て乾燥粉末となる。乾燥藻体末がそのままアスタキサンチン原料として利用されることもあるが、通常、さらに溶媒や超臨界CO<sub>2</sub>などによる抽出工程を経て、オイル状の抽出エキスとなる。レッドステージでのヘマトコッカスの成熟度にもよるが、良く成熟したシスト細胞から得られる抽出エキス中のアスタキサンチン濃度は10%（フリー体換算）以上になる（図6）。抽出されたエキスは、さらに精製、安定化成分の配合、濃度調整などの工程を経て、販売、流通されるが、それらの品質は培養工程から、その後の破碎、乾燥、抽出などの加工工程での管理方法によって大きく影響を受ける。未熟な細胞にはクロロフィルが多く残留しており、そのような原料から抽出されたアスタキサンチンエキスには、クロロフィルの分解物をはじめとする不純物が多くみられることがある（図7）。また、アスタキサンチンを含めてエキス成分は脂溶性で、酸化による劣化を生じやすい成分であるため、収穫後の工程管理によっても、その製品品質が大きく左右される。収穫から抽出までは、大気との接触による酸化が極力抑えられるように綿密に設計された工程で加工を行う必要がある。粗雑な管理下で加工、抽出されると、工程中で酸化による変敗が進み、過酸化物質などの多い抽出物が得られてしまう。より良い品質のアスタキサンチンを市場に提供するためには、培養から破碎、乾燥、抽出、充填包装までの一連の工程、さらには保管管理、販売、流通までに至る一連のサプライチェーンを一貫通貫で管理できる体制が望ましい。

#### ヘマトコッカス由来アスタキサンチンの展望

アスタキサンチンは、これまでに多くの有用性が報告されてきている。研究対象は、これまでの主体であったサプリメント用途の美容やアンチエイジングの分野にとどまらず、今後は、メタボ・糖尿病などの生活習慣病、あるいは加齢による骨格筋力の衰えなどに起因するフレイル（高齢者の機能障害、サルコペニア症候群など）へ移行しつつある。高齢化社会が抱える問題に本質的に寄与できる可能性があることが明らかになりつつあり、大きな期待が寄せられている。これらの機能性研究のほとんどは、使用実績（食経験）を含めて安全性評価の確立されているヘマトコッカス由来のアスタキサンチンを中心としたものであり、今では食品や医薬品並みの厳しい衛生管理と品質管理が求められる。もはや飼料として利用されていた時代の製造方式や品質では要求を満たさな

くなってきていると言える。

ヘマトコッカスは、他の微細藻類に比べて生育が遅く、商業規模での培養生産は容易ではない。加えて、アスタキサンチンはきわめて優れた抗酸化活性を持つ反面、非常に酸化に弱く、繊細な素材であり、工程や品質の管理には細心の注意と経験を要する。生産様式は屋外の解放培養から、屋外密閉培養方式へ、さらには主要な培養パラメーター完全管理を可能とした屋内培養システムへと進化し、生産効率も飛躍的に改善されてきた。高度な自動化によって、省力化された培養設備は、人工の光エネルギーを使うというデメリットを十分に補うだけの生産性を達成しつつあり、品質面の優位性は言うまでもない。今後は、LEDの活用などによりさらに省電力化が進むことが期待されている。素子の性能向上などを含めたLED技術の進歩著しいおり、実用化までにはさほど時間を要しない見通しである。

#### 文 献

- 1) 幹 渉ら：日本水産学会春季大会要旨集, p. 211 (1982).
- 2) Miki, W.: *Pure Appl. Chem.*, **64**, 141 (1991).
- 3) Nakajima, Y. *et al.*: *J. Pharm. Pharmacol.*, **60**, 1365 (2008).
- 4) 長木康典ら：眼科臨床紀要, **3**, 461 (2010).
- 5) Manabe, E. *et al.*: *J. Cell. Biochem.*, **103**, 1925 (2008).
- 6) Aoi, W. *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **366**, 892 (2008).
- 7) Lignell, A.: WO 99/11251 (1998).
- 8) Aoi, W. *et al.*: *Antioxid. Redox Signal.*, **5**, 139 (2003).
- 9) 内藤裕二ら, 第1回アスタキサンチン研究会要旨集, p. 12 (2005).
- 10) Tominaga, K. *et al.*: *Acta Biochim. Pol.*, **59**, 43 (2012).
- 11) Kishimoto, Y. *et al.*: *Eur. J. Nutr.*, **49**, 119 (2010).
- 12) Hussein, G. *et al.*: *Life Sci.*, **80**, 522 (2007).
- 13) Katagiri, M. *et al.*: *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **51**, 102 (2012).
- 14) Ishiki, M. *et al.*: *Endocrinology*, **154**, 2600 (2013).
- 15) 平成23年度の消費者庁委託事業「食品の機能性評価モデル事業」における11成分の評価（食品成分の機能性評価に係る評価基準等の検討）<http://www.caa.go.jp/foods/index17.html#m01>
- 16) 日本健康・栄養食品協会による平成26年度機能性評価事業。
- 17) Depeint, F. *et al.*: *Vitafoods Europe* (2014).
- 18) Schmidt, I. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **89**, 555 (2011).
- 19) Misawa, N. and Shimada, H.: *J. Biotechnol.*, **59**, 169 (1997).
- 20) 高橋二郎ら：日本補完代替医療学会誌, **12**, 9 (2015).