

耐酸性シームレスカプセル化ビフィズス菌とその特性

浅田 雅宣

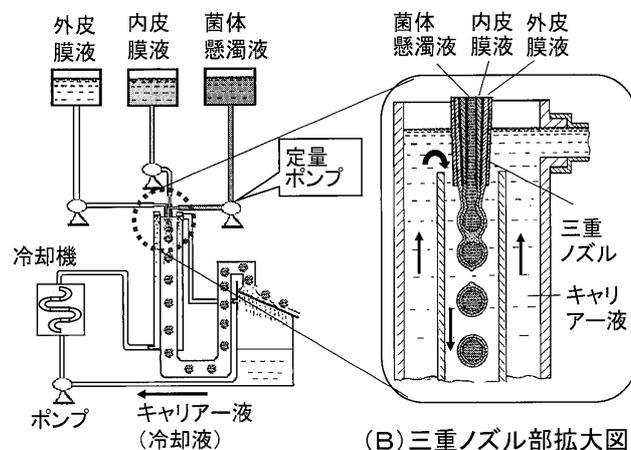
ポストゲノム時代においてプロバイオティクスと称される体に良い機能性乳酸菌やビフィズス菌を実際に摂取するには、効率よくそれらをその働く場である腸に生きたまま届けるということがきわめて重要となる。特に善玉菌の代表とされるビフィズス菌は偏性嫌気性菌であり、かつ著しく酸に弱く、そのまま摂取しても胃酸(pH1.2)により大部分が死滅する。森下仁丹は、独自のシームレスカプセル化技術を開発させ、3層カプセルを調製することを可能にした。これは外側の皮膜、内側の皮膜、さらに内容物となっており、この両皮膜に特徴を持たせることで、内容物を保護したり、選択的に放出させたりすることが可能となる。この3層カプセルを用いて胃酸からビフィズス菌を保護することを試み、低いpHでは溶解しない耐酸性の皮膜を開発し、胃ではカプセルが崩壊せずに腸で崩壊するように設計した。カプセルに包まれたビフィズス菌は、生きたまま腸まで届くようになり、これまでにない整腸作用を示した。

その耐酸性シームレスカプセルの製法、特性、カプセル化ビフィズス菌の性質、摂取したときの効果、さらに、ユニークなカプセル内生菌培養増殖技術を紹介する。

シームレスカプセルの製法

製造装置 シームレスカプセルは主に多重ノズルを用いた液中滴下法で調製されるが、その製造装置のフローは図1のようになっている。滴下式製法では、界面張力により充填物質を皮膜物質が溶液状態(ゾル)で包み込んでゲル化するため、球形で皮膜に継ぎ目のないシームレスカプセルが形成され、カプセルの直径や皮膜厚さは、ノズルから吐出する液量と硬化液の流下速度を適宜調節することで広範囲に設定できる。粒径は量産レベルで0.3~10 mmの範囲で自由に設定が可能である。

シームレスカプセルの機能と特性 多層シームレスカプセルの調製において、層間の境界面を明確に形成することが重要であり、そのためにはエマルジョン形成と同様に3層であればW/O/WまたはO/W/Oのように界面張力が交互に作用する組み合わせにすればよい。たとえば、外皮膜には水溶性のポリマーを、内皮膜には油性の成膜物質を用いれば水性の内容液のカプセルを形成できる。得られるカプセルの例を図2に示したが、O/W/O/W



(A)連続カプセル製造機模式図

図1. シームレスカプセル製造装置模式図

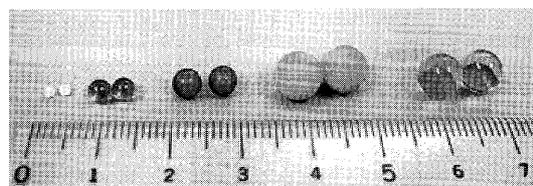


図2. シームレスカプセルの例. 右端のカプセルは4層のダブルカプセル。

にすることで、世界初の4層カプセル(カプセル in カプセル, 図2の右端)にも成功している。これは、外側の皮膜が口で溶け中間の成分を放出し、内部のカプセルの皮膜は胃で溶け内側の成分を放出するような、2成分を別々の場所で作用させることが可能となる機能を持ったカプセルである。

油性の内皮膜を用いて水溶液や水懸濁液などの親水性物質のカプセル化を可能にしたことは、新たな機能の広がりとして注目されている。それを発展させ、カプセル内に生細胞懸濁液を包括し、さらにその細胞をカプセル内で培養増殖させることも可能にし、いわゆるバイオカプセルの開発につながった。さらに、バイオカプセルは、安定な多孔性皮膜を用いることにより、固定化微生物としても使用可能なことから、新たに工業用途への展開も検討されている。

乾燥ビフィズス菌末のカプセル化 ビフィズス菌カ

著者紹介 森下仁丹(株) バイオフィーマ研究所(所長) E-mail:m-asada@jintan.co.jp

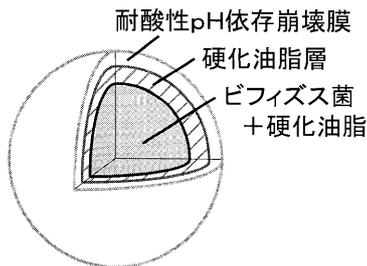
Bifidobacterium longum JBL-01菌数 1×10^{10} cfu/gカプセル

図3. ビフィズス菌の耐酸性カプセル模式図

カプセルは、三重ノズルを用いた液中滴下法で調製される。外皮膜素材としては、水溶液が加熱により溶液状態（ゾル状態）になり、冷却することにより固化（ゲル化）するゼラチンなどの水溶性高分子が用いられてきたが、現在はデンプンなどの植物性素材が用いられている。その内側のバリアー層となる内皮膜には融点 $40 \sim 42^\circ\text{C}$ の硬化油が用いられ、さらに、ビフィズス菌末を融点 $38 \sim 40^\circ\text{C}$ の硬化油に懸濁したものが内容液となっている。加温して熔融状態にある内容液および内外の皮膜液はそれぞれのタンクから定量ポンプで同心三重ノズルに送られる。キャリアー液体（凝固液）は $0 \sim 10^\circ\text{C}$ に冷却された液状油が用いられ矢印の方向に沿って循環している。図1(B)の拡大図に示すように三重ノズルの内ノズルから内容液、中間ノズルから内皮膜液、最外層から外皮膜液が三相ジェットとして同時にキャリアー流体中に噴出される。噴出された三相ジェットは界面張力により内容液を内包した球となり、形成管中を流下していく過程で各液が冷却され固化する。固化したカプセルは分離器でキャリアー液体と分離され、クーリング脱油乾燥後選別の工程を経て製品化される。得られる乾燥ビフィズス菌の3層カプセルの模式図を図3に示す。

プロバイオティクスへの応用

ビフィズス菌カプセル 近年、免疫や健康維持に腸内細菌の重要性が光岡^{1,2)}や上野川³⁾に指摘され、ビフィズス菌はプロバイオティクス (probiotics) としても注目されている⁴⁾。しかし、ビフィズス菌の乾燥菌末は、熱や水分により生菌数が減少するので、錠剤の場合はその打錠熱などにより高生菌数の製剤を作ることが難しく、さらに図4に示すように摂取してもビフィズス菌は酸に弱く、pH1.2の人工胃液による耐酸性試験において著しく生残率が低下する。

ビフィズス菌を生きたまま腸まで届けるために、前記

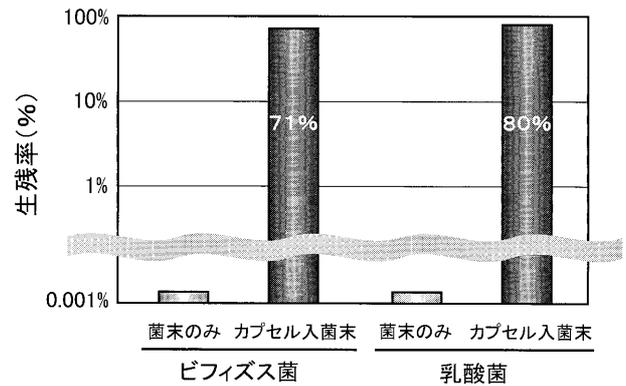


図4. ビフィズス菌カプセルと乳酸菌カプセルの耐酸性。初期菌数20億個のビフィズス菌または乳酸菌を 37°C の人工胃液 (pH1.2) の中に入れ、2時間後に生き残っている割合 (生残率)。

のように乾燥ビフィズス菌末のカプセル化を行った。外皮膜は耐酸性高分子（ペクチンなどの多糖類）を配合することにより、腸溶性カプセルとなり、内皮膜の硬化油脂層も酸に対するプロテクト層となるため、胃酸に対すすぐれた保護作用が示された（図4）。すなわち、胃を無事に通過したカプセルは、小腸で周辺のpHが中性付近に変化することにより、まず最外層が溶解し、次に中間層の硬化油脂層が、胆汁酸の界面活性作用、リパーゼによる消化作用、腸管運動による物理的な刺激などにより溶解あるいは崩壊して、最内層のビフィズス菌末が腸管内に放出される。放出された胃酸の虐待を受けていないビフィズス菌末は腸内の水分により復水し、活発に増殖、代謝を行い、腸内でより効果的に働くことが期待された。

ビフィズス菌カプセル摂取効果 実際に耐酸性皮膜でカプセル化したビフィズス菌を用いて各種ヒト試験を行った。生菌と死菌各々10億個を健康成人に毎日2週間摂取してもらい、大腸内でビフィズス菌が占める割合を糞便から測定すると、ビフィズス菌を摂取しなかった群 (9.1%) よりも死菌カプセルを与えた群 (15.9%) の方が占有率が高く、さらに、生菌カプセルを与えた群 (35.7%) ではより占有率が高くなり、耐酸性カプセルで生菌を腸内に届ける効果が認められた（図5）。同時に便秘状態も改善され、腸内腐敗産物であるアンモニアも便中濃度が低下することが認められた（図6）⁵⁾。

さらに、健康成人94名でビフィズス菌カプセルの2週間の摂取試験を行い、排便回数、便量、便の色、便の性状、排便後の爽快感などを調べた。その結果、排便回数が1週間に5回未満の被験者では、1日にビフィズス菌を20億個摂取することにより排便回数の増加が認められ、1週間に14回以上の下痢気味の被験者では排便回数の減少が認められた（図7）。この時、摂取菌数を変えた試

特集

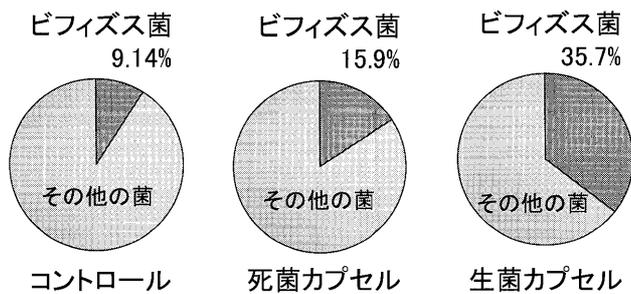


図5. ビフィズス菌カプセル摂取効果 (I). 毎日生菌10億個を2週間摂取後、腸内でビフィズス菌が占める割合.

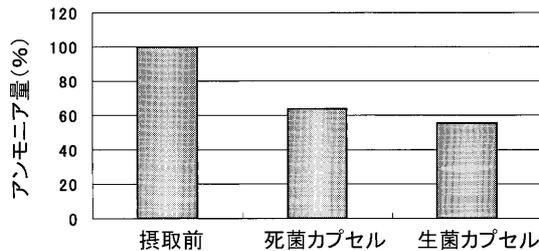


図6. ビフィズス菌カプセル摂取効果 (II). 毎日生菌10億個を2週間摂取後の糞便中のアンモニア量の減少.

験での排便感に関するアンケートでも、改善したヒトの割合が摂取菌数が20億個で46%、50億個で62%、100億個で82%に達し、著しい効果が認められた⁶⁾.

このような腸溶性皮膜の開発により、プロバイオティクスとして著しい効果が認められた乾燥ビフィズス菌を包括したカプセル製剤を食品と医薬品分野で商品化し、上市している (図8). さらに、ヨーグルトにこのようなビフィズス菌カプセルを添加した製品も市販されている⁷⁾.

近年、お腹の調子をくずすペットが多くなり、動物由来のビフィズス菌を上と同様な手法でカプセル化し、イヌ、ネコ用の製品を開発した. これは、エサにふりかけて与えることによって、下痢症状の改善と糞便の臭いが抑えられるというダブルの効果が認められている⁸⁾.

腎不全患者に対する効果 腎不全により人工透析を受けている患者は、水分を制限することが多く便秘になりやすいため、下剤を飲むことが多く、健全な腸内フローラバランスを崩すことになる. ビフィズス菌のカプセルは、前に記したように、便秘の改善に著しい効果が認められたことから、透析患者用にNa, K, Pなどを少なくした素材でビフィズス菌カプセルを調製した. このカプセルの摂取により、腸内細菌叢の改善が見られ、腐敗産物の産生抑制効果も認められた⁹⁾. さらに、便秘が改善されただけでなく、12週間の摂取により、1) 血中中性脂肪トリグリセリドの低減、2) 血中尿毒症物質インド

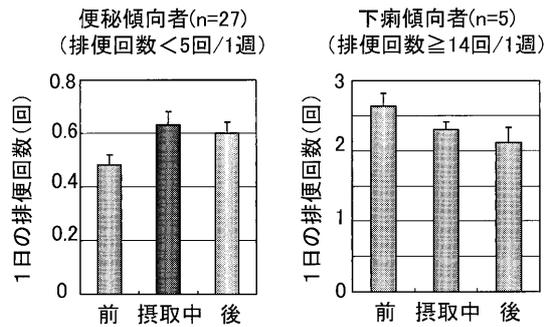


図7. ビフィズス菌カプセル摂取前、摂取中、摂取後、各2週間の平均排便回数の変化.



図8. ビフィズス菌カプセルの食品と医薬品の応用例

表1. ビフィズス菌カプセル摂取による血中腎不全合併症原因物質の変化

腎不全合併症原因物質	開始時	12週間後
1. 血中中性脂肪	124 mg/dl	→ 104 mg/dl
2. 尿毒症物質		
インドキシル硫酸	35 mg/dl	→ 32 mg/dl
フェノール	4.2 mg/dl	→ 3.8 mg/dl
3. 動脈硬化危険因子		
ホモシステイン	39 nmol/ml	→ 34 nmol/ml
4. 葉酸	27 nmol/ml	→ 32 nmol/ml
5. 血中アンモニア濃度	102 μg/dl	→ 78 μg/dl

キシル硫酸とフェノールの低減、3) 動脈硬化危険因子ホモシステインの低減、4) 葉酸の増加、5) 血中アンモニア濃度の低減、が認められた (表1)¹⁰⁾. このように、本カプセル化ビフィズス菌の摂取は、マイルドな作用で便秘を改善し、腸内フローラを整え、腎不全合併症の原因物質の低減につながるため、透析患者のQOL改善に寄与できると思われる.

保存期における慢性腎不全患者にビフィズス菌カプセルを投与したところ、下痢で長期間の継続使用が困難なラクツロース療法に比べて有意な副作用はなく、患者

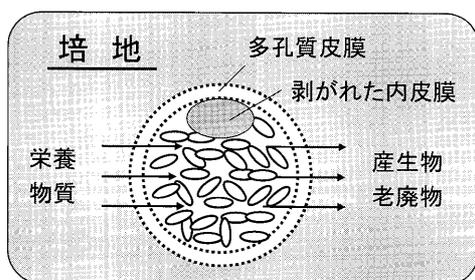


図9. ビフィズス菌のカプセル内培養増殖模式図

のコンプライアンスも良好で、慢性腎不全の保存的療法の一つとして有用と思われた。特に、投与開始時における血清クレアチニン (S-Cr) 値とリン (P) 値が各々 4.0 mg/dl 以上の患者では透析導入への期間が延長されるといふ有意な改善が認められた¹¹⁾。

生ビフィズス菌カプセル内培養

水系物質をカプセル化できる技術を発展させ、水中で安定なゲルを形成する寒天を外皮膜に用い、ビタミン E オイルを内皮膜とした 2 層皮膜で生のビフィズス菌培養懸濁液を包括した。これをバイオカプセルと呼んでいるが、皮膜の半透性を利用した一種の透析培養が可能であった (図9)。すなわち、カプセルを栄養培地に浸けることで外の培地中から栄養源をカプセル内に補給することができ、老廃物であり生育を阻害する乳酸や酢酸は外部に拡散希釈されるため、カプセル内でビフィズス菌を高密度に培養増殖させ得た。さらにカプセルをカラムに充填し、外部タンクから培地を循環させることによって培養するバイオリアクターシステムとすることで、培養後のカプセルはカラムから容易に回収することができ、操作性の良い培養方法となった (図10, 11)。培養後はカプセル 1 g あたり $10^{10} \sim 10^{11}$ 個の高菌数となり、菌体の回収はミリサイズのカプセルの回収で済み、高速遠心や菌体ろ過などの操作を必要とせず、きわめて容易という特徴を有している。

生ビフィズス菌バイオカプセルをヨーグルト、各種ドリンク、果汁やゼリーなどに添加することは、ドリンクやゼリーの味を変えず、新鮮な活きの良いビフィズス菌を数多く摂取できる従来なかった食品を可能とするものである。このように、特徴のあるシームレスカプセル化技術を利用することで、味においても機能においても新しい食品の分野を開くことが可能となった。

おわりに

遺伝子的にも機能的にもビフィズス菌や乳酸菌の働き

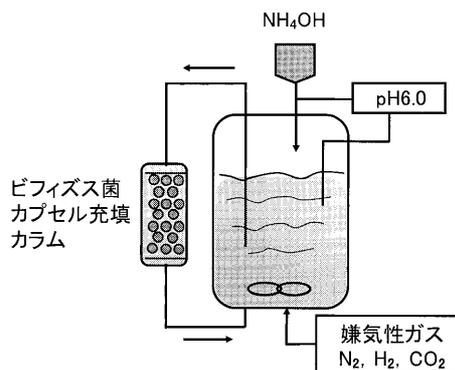


図10. カラム方式バイオリアクター模式図

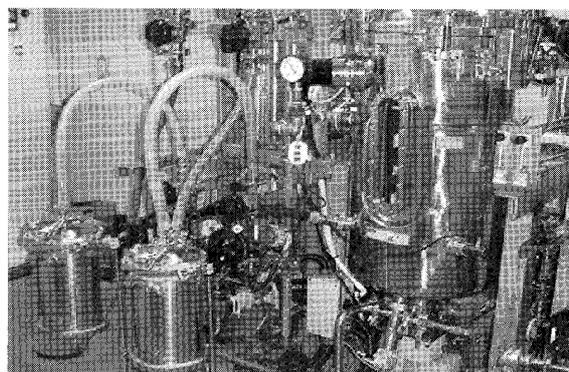


図11. カラム方式バイオリアクターのパイロットプラント

が解明されてきており、それらをプロバイオティクスとして摂取して有効に働かすために、独自の耐酸性シームレスカプセルが活かせることを紹介した。さらに、皮膜に特性を与え、小腸下部や大腸特異的に崩壊するカプセルを選択的に調製できるように研究を進めたい。また自社製品に限らず、カプセル化の受託により他社製品にも使われており、このシームレスカプセルが広く使われることを期待している。

文 献

- 1) 光岡知足：腸内細菌の話，p.115, 岩波書店 (1978)。
- 2) 光岡知足：*Food Style* 21, 5, 47 (2001)。
- 3) 上野川修一：免疫と腸内細菌，p.40, 平凡社 (2003)。
- 4) 田中隆一郎：ビフィズス菌の研究 (光岡知足編)，p.221, 日本ビフィズス菌センター (1994)。
- 5) 金沢暁太郎ら：第16回食品微生物学会学術総会講演要旨集，p.90 (1995)。
- 6) 河野麻実子ら：腸内細菌学雑誌，18, 87 (2004)。
- 7) 荒井 修ら：食品工業，39, 53 (1996)。
- 8) 深田恒夫ら：日獣会誌，55, 735 (2002)。
- 9) 南 浩二ら：透析会誌，32, 349 (1999)。
- 10) Taki, K. *et al.*: *J. Renal Nutr.*, 15, 77 (2005)。
- 11) 安藤康宏ら：日腎会誌，45, 759 (2003)。