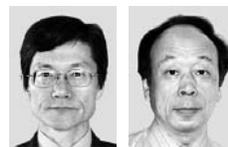


平成20年度 生物工学技術賞 受賞

生菌入りシームレスカプセルの研究開発

浅田 雅宣*・釜口 良誠
大野 徹・小崎 敏雄・杉本 敬之



Seamless Capsule Entrapped Living Microorganisms

Masanori Asada, Ryousei Kamaguchi, Tohru Ohno, Toshio Kozaki,
and Takayuki Sugimoto (Research and Development Department, Morishita Jintan Co., Ltd.,
2-11-1 Tsudayamate, Hirakata, Osaka 573-0128) *Seibutsu-kogaku* **87**: 123-128, 2009.

はじめに

森下仁丹(株)は、104年の歴史を有する医薬部外品“銀粒仁丹”の液体版「液体仁丹」を創るようという社長指示の下、1970年代から独自の同心二重ノズルを用いた滴下法による二層シームレスカプセル化技術の開発を始めた。1980年代に液体仁丹の実用化に目処が立ち、さらに、各種香料精油のカプセルを口中清涼剤、菓子やチューインガムへと展開して行った。また、食品素材による耐酸性カプセル皮膜開発にも着手した。同時に、その技術を利用する有意性のある内容物を検討し、当時、認知度は低かったが、ビフィズス菌のお腹における有用性と酸に弱いという菌の性質に着目した。ビフィズス菌を生きのまま腸まで届けることができると人々の健康に寄与できる、という光岡知足先生のご教示もあり、製剤研究開発を推進した。その研究により、同心三重ノズルを用いて外側の皮膜、内側の皮膜、さらに内容物という構造の三層カプセルを開発した。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り、シームレスカプセルの新たな応用分野が広がった。その一つが胃酸のような低いpHでは溶けないように皮膜に耐酸性を持たせたことであった。この耐酸性のシームレスカプセルに生きたビフィズス菌を包むことにより、胃酸からビフィズス菌を保護し、生きのまま腸まで届けることが可能になった。このビフィズス菌製剤は、これまでにない整腸作用を示し、機能性食品や医薬品として用いられている。

その生きた菌を包む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、カプセル内生菌培養増殖技術を紹介する。また、ポーラスな合成樹脂を皮膜として本滴下法でシームレスカプセルを調製することに成功し、生きた微生物を包むことでバイオリクターとして用いられる高効率固定化微生物としての可能性を見いだしたことも紹介する。

シームレスカプセルの製造方法

シームレスカプセル製造装置 シームレスカプセルはソフトカプセルの一種に分類される。もう一つのソフトカプセルとしてはロータリーダイにより打ち抜き製造される継目のあるラグビーボール型(最近では多様な形のものがある)のカプセルがある。シームレスカプセルの大きな特徴は文字通り継目がないことであり、「液中滴下法」と呼ばれる方法で製造される。原理的には界面張力により充填物質を溶液状態(ゾル)の皮膜物質が包み込んで固化(ゲル化)するため、球形で皮膜に継目のない均一な粒径のシームレスカプセルが形成される。図1のAにカプセル製造機の模式図を、Bに三重ノズル部の断面拡大図を示す。流下するキャリアー液(冷却液)に同心多重ノズルを挿入し、この、多重ノズルの内ノズルから充填内容物、外側ノズルから皮膜物質をそれぞれ流動状態で同時に吐出し、界面張力を利用し球形のカプセルを形成する。この液中滴下方式では、ノズルを二重から三重にすることによりカプセル中心部の充填物質と最

*著者紹介(代表) 森下仁丹株式会社バイオファーマ研究所(所長) E-mail: m-asada@jintan.co.jp
写真 上段左より浅田, 釜口; 下段左より大野, 小崎, 杉本。

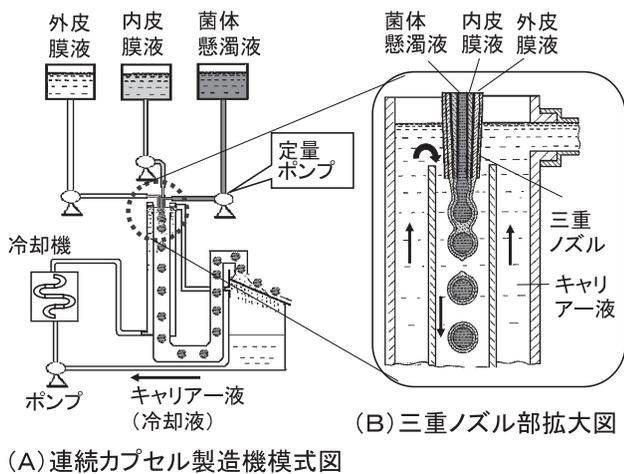


図1. シームレスカプセル製造フロー

外層の皮膜との間に新たな物質層を介在させることが可能となり、三層構造のシームレスカプセルを量産することが容易である。カプセルの粒径は0.3～10 mmの範囲で自由に設定が可能である。また、皮膜の厚さも自由に設定でき、粒径3 mmでは皮膜を30 μmまで薄くしたカプセルを調製している。また、充填物質や皮膜の重量の均一性にも優れている。このように、シームレスカプセルの液中滴下法は従来のソフトカプセルの製法であるロータリー法に比べて製剤設計の自由度が高く、皮膜に特性を付与することもできる生産性に優れた製法であると言える。

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二層であればO/W、三層であれば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にすることで、世界初の四層カプセル（カプセル in カプセル、図2の右端）の調製にも成功している。これは、外側の皮膜が口で溶け外の成分を放出し、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、二成分を別々の場所で作用させる機能を持ったカプセルである。

これら多層構造カプセルの機能発現要素には、皮膜層素材と層厚があり、これらの組み合わせにより充填成分の隔離保護あるいは放出の幅広いコントロールが可能である。特に、耐酸性を持たせた親水性の外皮膜と油性の内皮膜を用いて胃酸の侵入をブロックするカプセルは、お腹に重要なビフィズス菌を生きのまま腸に届ける用途

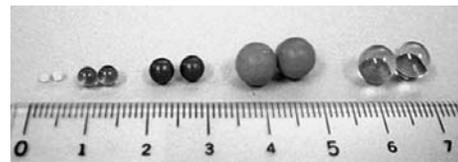


図2. シームレスカプセルの例。右端のカプセルは4層のダブルカプセル

のカプセルとして用いられている。

生きた乾燥ビフィズス菌末のカプセル化 生きたビフィズス菌カプセルは、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になり、冷却することにより固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。その内側のバリア層となる内皮膜には融点の高い硬化油が用いられ、さらに、凍結乾燥ビフィズス菌末を融点の低い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（冷却液）は0～10°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ビフィズス菌を懸濁した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と分離され、クーリング、脱油、乾燥、選別の各工程を経て製品化される。得られる乾燥ビフィズス菌の三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 腸内細菌、特にビフィズス菌が人の健康維持に重要な役割を果たしていることが光

Bifidobacterium longum JBL-01

菌数 1×10^{10} cfu/gカプセル

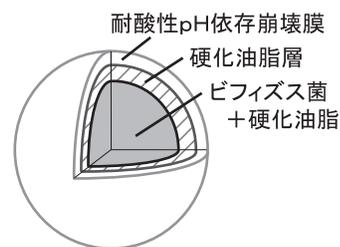


図3. ビフィズス菌の耐酸性カプセル模式図

岡らにより指摘され¹⁾、さらに、免疫にも腸内細菌が重要であることが上野川ら^{2,3)}によって明らかにされ、ビフィズス菌の摂取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、経口摂取してもビフィズス菌は酸に弱く腸まで生きてそのまま届けることは困難であった。森下仁丹では、1980年代からビフィズス菌の有用性に着目し、カプセル化研究を開始していたが、カプセル化するために凍結乾燥した *Bifidobacterium longum* JBL-01 の菌末は、pH 1.2の人工胃液による耐酸性試験において、図4に示すように著しく生残率が低下した。また、保存安定性にも欠け、初期のカプセル化ビフィズス菌では当初設定した1年間の賞味期限内での表示生菌数を維持することは困難であった。このようなビフィズス菌カプセルを商品とするために必要な長期間の保存安定性の確保と胃酸による影響を抑制する製剤開発に約10年費やした。

すなわち、ビフィズス菌を生きて腸まで届けるために、前記のように乾燥ビフィズス菌末のカプセル化を検討し、技術開発を行った。外皮膜は耐酸性高分子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、胃酸に対し優れた保護作用が示された (図4)。こうした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示された。

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

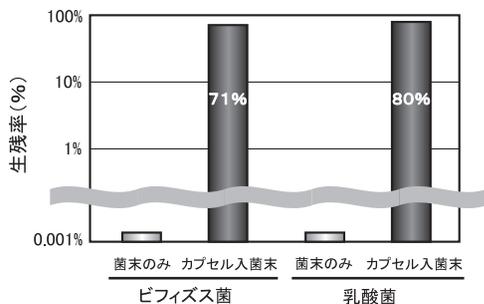


図4. ビフィズス菌カプセルと乳酸菌カプセルの耐酸性. 初期菌数20億個のビフィズス菌または乳酸菌を37°Cの人工胃液 (pH1.2) 中に入れ、2時間後に生き残っている割合 (生残率)。

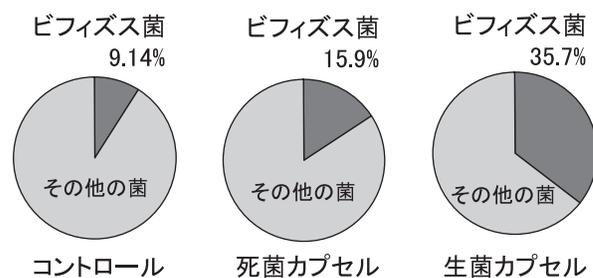


図5. ビフィズス菌カプセル摂取効果 (I). 10億個を毎日2週間摂取後、腸内でビフィズス菌が占める割合。

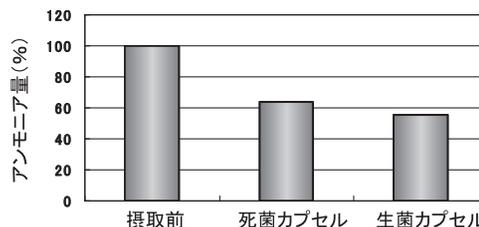


図6. ビフィズス菌カプセル摂取効果 (II). 生菌10億個を毎日2週間摂取後の糞便中のアンモニア量の減少。

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%) の方の占有率が高く、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)。同時に便通状態も改善され、腸内腐敗産物であるアンモニアの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、排便回数が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、菌数の増加に応じて著しい効果が認められた⁶⁾。

このように生きて乾燥ビフィズス菌を腸溶性皮膜で包括したカプセル製剤は、プロバイオティクスとして著しい効果が認められたため、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⁾。

また、近年、屋内で飼われたり、運動不足であったり、高齢化したりしてお腹の調子をくずすペットが多くなっ

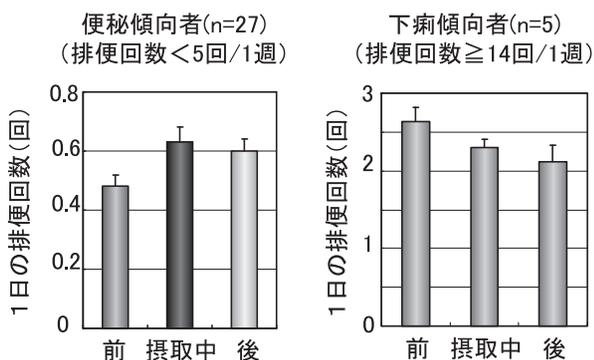


図7. ビフィズス菌カプセル摂取効果(Ⅲ). ビフィズス菌カプセル摂取前, 摂取中, 摂取後の排便回数の変化(各2週間の平均排便回数).

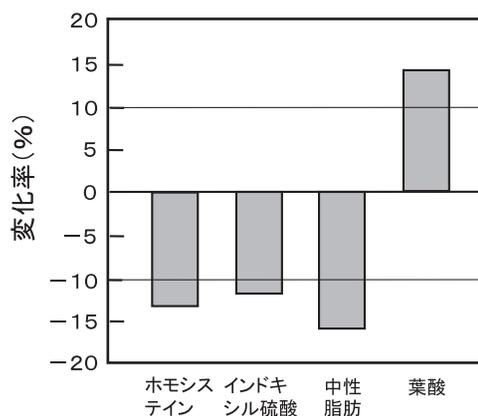


図9. ビフィズス菌カプセル摂取による血液透析患者のホモシステイン, インドキシル硫酸, 中性脂肪, 葉酸の血清中濃度の変化. 摂取前の値に対する%変化で表す(文献12の図を改変).



図8. ビフィズス菌カプセルを使用した食品と医薬品の応用例

ている. そのため, 上述したように人に良いビフィズス菌が動物に悪いはずがないということで, 動物由来の生きたビフィズス菌を上と同様な手法でカプセル化し, イヌやネコ用の製品を開発した. これは, イヌやネコの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認められ⁸⁾, 特に屋内で飼っている人にとっても喜ばれている.

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数は毎年増加しており, 国内でも30万人になろうとしている. 透析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. 耐酸性カプセルに包括したビフィズス菌は, 前述のように, 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生きたビフィズス菌を同様に耐酸性カプセル化した. このカプセルの摂取により, 腸内細菌叢の改善がみられ, 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週間の摂取により血清中の①尿毒症物質インドキシル硫酸の濃度低減, ②動脈硬化危険因子ホモシステインの濃度低減, ③中性脂肪の低減, ④葉酸濃度の増

加が認められた(図9)¹⁰⁾. また, 透析患者では, 血中のリン値が高くなり, 動脈硬化や多臓器不全の要因となるが, この生きたビフィズス菌カプセルの摂取により血清中のリン値の低下が認められた¹¹⁾. これらの作用は死菌体では認められず, 本耐酸性カプセルによって生きたビフィズス菌が腸まで届けられて初めて認められた知見である. 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, 透析患者における活用が見込まれている.

また, 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う有意な改善が認められた¹²⁾. このように健常人だけでなく, 病者においても生きたビフィズス菌のカプセルはQOLの改善に寄与できるものである.

カプセル内でのビフィズス菌の培養増殖と応用

水系物質のカプセル化 従来, カプセルはゼラチンなどの親水性物質を皮膜とするため, 肝油やビタミンEなどの油性物質を包んでおり, 皮膜を溶かすような水系物質, 極端に言えば水のカプセル化は不可能であった. しかし, 前述したように, 三重ノズルを用いてW/O/Wの三層構造とすることで, 中間の油の層が皮膜と内容物の水が接触することをブロックするのではと考え, カプセル化を試みた. その結果, 中間層に温度が室温より高め

内皮膜とすることで、水溶性のゼラチンを外皮膜に用いても内容物の水は硬化油で遮られるため、外皮膜のゼラチンを溶解することなく、カプセルを形成させることが可能となった。この基本技術を基にして、従来のゼラチンカプセルでは困難であったハーブや生薬の水溶性抽出エキスをカプセル化し、機能的食品に応用展開した。

カプセル内でのビフィズス菌の培養増殖 ここでは、本技術の発展形の一つである生の微生物のカプセル、文字通り生体活動を行っている生きた菌を包含したカプセル、およびそれを応用した飲料製品について紹介する。

前述した従来のビフィズス菌のカプセルは、硬化油に懸濁した乾燥菌体を包括しているため、カプセル製造工程中でビフィズス菌が増殖することはなく、したがって、カプセル中の含有生菌数は、カプセル形成時の配合菌数を上回することはなかった。それに対し、生の菌をカプセル化し培養増殖できれば、カプセル内の菌数をカプセル調製時よりも多くすることが可能となる。すなわちカプセルを増殖培地に浸けることで、培地中の栄養素などがカプセル内に浸透拡散し、菌は増殖し、増殖を阻害する菌の産生物や老廃物は外部に拡散希釈される。そのため、理論的には配合菌数に関わらず、菌をカプセル内部空間に充満するまで増殖させることが可能である。

実際にこれは、前述した同心三重ノズルを用いた水系物質をカプセル化できる技術を発展させ、水中で安定な半透性を有する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二層皮膜で生のビフィズス菌培養懸濁液を包括することで可能になった。このような生の菌を包括した微小培養槽ともいべきカプセルを「バイオカプセル」と称しているが、菌のカプセル内培養増殖は皮膜の半透性を利用した一種の透析培養である(図10)。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糖やアミノ酸、ミネラルといった栄養素をカプセル内に供給することができ、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。菌の大きさを $1\mu\text{m}$ と仮定した場合、計算上はお

よそ 10^{12} 個/mlの菌体密度とすることが可能である。実際に $10^7\sim 10^8$ 個/mlのビフィズス菌懸濁液をカプセル調製時に配合し、カプセル内で増殖させたところ、 10^{12} 個/mlオーダーまで増えることを確認している。また、外観上でも当初はほぼ透明であったカプセル内部が、菌体による白濁層が徐々に増し、培養最終段階では内部が完全に白濁することが観察され、カプセルもわずかに膨らんでいた。

さらに、より操作性の良い培養方法として、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を構築した。カラムは、上下を簡単に分離することができ、カラム内部を観察する窓も設けられている。このシステムとすることで、培養後のカプセルは培養タンクからの回収ではなく、カラムの蓋部分を開け、カラムから容易に回収することができる(図11, 12)。さらに、菌体の回収はミリサイズのカプセルの回収で済み、高速遠心や菌体濾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。このシステムは、生きた菌を包括したカプセルを固定化微生物とみなす時には、連続反応器としても用いることができるものである。

バイオカプセルの応用 上記のようにして培養した生ビフィズス菌のバイオカプセルを乳酸菌飲料へ応用し

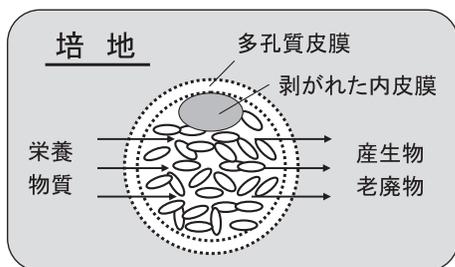


図10. バイオカプセルのカプセル内培養増殖模式図

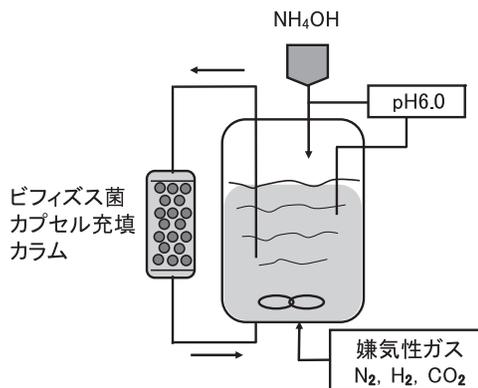


図11. カラム方式バイオリアクター模式図

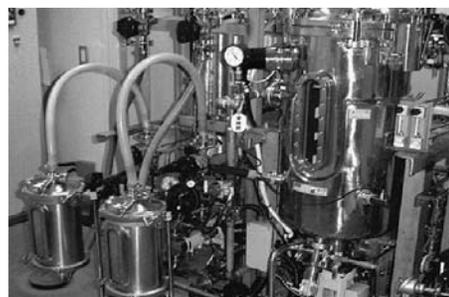


図12. カプセル充填カラム方式バイオリアクター



図13. 生ビフィズス菌カプセル入り乳酸菌飲料「ビフィーナバイオ」

た。有用菌の主力であるビフィズス菌の欠点は、乳酸菌飲料などに利用した際、ビフィズス菌が産生する酢酸により風味が劣化することである。これにより、生のビフィズス菌を配合した製品は、一般に乳酸菌のみを使用した製品より風味の自由度が制約される。しかし、本カプセルを利用することにより、培養した高菌数のビフィズス菌の菌体のみを容易に得ることが可能となり、このカプセルを別に調製した風味重視の乳酸菌飲料ベースに配合することにより、カプセルの添加量に応じて自由に菌数を調節でき、望む高菌数のビフィズス菌を含有した美味しい乳酸菌飲料を提供できるようになった。こうした生のビフィズス菌カプセルを添加した乳酸菌飲料を「ビフィーナバイオ」という商品名で上市した(図13)。

このように、バイオカプセルを乳酸菌飲料、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の提供を可能とするものである。

非食品分野への応用

シームレスカプセルは食品や医薬品などの口に入る用途で使用されてきたが、合成樹脂を皮膜素材として本滴下法でシームレスカプセルが調製できれば、物理的に強固で長期間安定なカプセルを得ることが可能となる。さらに、その合成樹脂皮膜のマトリックスが中低分子を透過するくらい大きければ、皮膜は半透性を持ち、非食品用のバイオカプセルとしての応用が考えられる。すなわち、各種微生物を包括することで、カプセル内には従来の固定化微生物の包括法におけるゲルのような立体障害がなく、カプセル内で増殖させることで菌密度も1桁以上高くなり、効率よく反応できる固定化微生物となり得る。安定な樹脂の皮膜であれば食品用の寒天ゲルよりも物理的強度は高く、何度も繰り返し使用したり、年オーダーの長期間連続反応を行ったりすることができるため、医薬品の中間体の微生物変換、バイオエタノールや

乳酸などの生産コストの低減に寄与できる可能性もある。

現在、本滴下法に適用できる光架橋性樹脂を見だし、安定なカプセルの調製が可能であることを確認した。さらに、本樹脂で酵母や乳酸菌を包括したカプセルを用いてカプセル内培養と長期間のパフォーマンスを検証するために繰り返し反応を行い、バイオリクターに用いられる可能性を見いだしている。

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。広範な応用展開が可能なシームレスカプセルの特徴を生かして、食品だけでなく、非食品分野への展開も検討中であり、バイオリクター分野への応用にも可能性を見いだしている。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の広範な応用展開を図っていきたい。

ここで紹介した技術と商品と知見は、森下仁丹株式会社において30年以上に渡って研究開発されてきた成果である。また、研究部門だけでなく、営業部門のメンバーにも商品の情宣に努め、市場の要望を吸い上げるなど、技術の展開に大きく尽力頂いた。この度の生物工学技術賞の受賞を全社での受賞と受け止める所以である。

本技術に関する研究開発は、大学および社外の多くの方々にご指導・ご協力いただいた結果であり、厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 光岡知足：腸内細菌の話，p.115, 岩波書店(1978).
- 2) 上野川修一：プロバイオティクス・プレバイオティクス・バイオジェニクス(光岡知足編)，p.31, 日本ビフィズス菌センター(2006).
- 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) 丹羽利充：プロバイオティクス・プレバイオティクス・バイオジェニクス(光岡知足編)，p.226, 日本ビフィズス菌センター(2006).
- 11) 島田美樹子ら：第53回日本透析医学会学術集会抄録集，講演番号0-0316(2008).
- 12) 安藤康宏ら：日腎会誌，45, 759(2003).