

学 位 論 文 題 名

STUDIES ON DNA-BASED GELS FOR ORAL DELIVERY OF PROBIOTIC BACTERIA

（プロバイオティックバクテリアの経口投与に用いる

DNA含有複合ゲルに関する研究）

学位論文内容の要旨

日本は四方を海に囲まれている海洋国家であるため、魚類は日本人にとって古くから主要な食品であり、重要な蛋白質源であった。日本で食される大型魚の代表である鮭の多くは、北日本で捕獲される。その肉や卵は一般的な食材であるが、精子を含む白子はほとんど食される事はない。そのため、鮭の捕獲量が増大（農林水産省報告書、2002 年）する中、毎年莫大な量の白子が産業廃棄物として捨てられてきた。しかし、水産物を加工する過程で食品として利用されない部分より生ずる廃棄物については長い間あまり顧みられる事がなく、環境にも悪影響を与えてきた。この白子を有効利用する事ができれば、環境問題軽減に役立つであろうし、さらに、この白子を利用して人類や地球に優しい製品を生産できれば画期的な成果といえる。DNA は白子中の主要な成分の一つである。サケ白子より抽出された DNA はこれまで、例えば、健康食品、伝承医学に基づく医薬品、化粧品、遺伝子産業用薬品の原料等に使われてきた。ところで、この天然バイオ素材である DNA のより高度な利用法として地球環境改善や人類の健康向上に役立てる事はできないだろうか。

DNA の化学構造の特徴の一つは、その骨格に多くのリン酸基によるマイナス電荷を持ち、そのため、分子全体としてはポリアニオンの性質を持つ。そのため、DNA は他のポリカチオン性の生体高分子とイオン性架橋構造体を形成する。このようなポリイオンコンプレックスで機能性物質を包み込めば、この物質を厳しい破壊的な環境から保護できるかもしれない。本研究ではプロバイオテックバクテリアを経口投与するための DNA 含有ゲルの調製を行った。プロバイオテックバクテリアは宿主の健康にとって良い効果を与える生きているバクテリアと定義される。たとえば、免疫系の刺激、体外より侵入するバクテリアやウイルスよりの保護、食物消化の促進等である。これらは通常、人間や動物の腸内に存在する微生物群である。酪農業において最も広く用いられているプロバイオテックバクテリアは乳酸菌 (LAB) のグループである。その他、ビフィドバクテリアや酵母も用いられている。これらは伝承的に発酵食品や乳製品として、子供や大人の胃腸障害改善に用いられている。しかし、胃液が酸性であるために、生菌数が減少してしまう問題がある。プロバイオテックバクテリアを DNA 含有ゲルで保護する事により腸に到達する生菌数を増やす事ができるようになるかもしれない。それは、

DNA が胃ではほとんど分解されず、腸に届いてはじめて膵臓から分泌される DNA 分解酵素で分解されるからである。結果として、バクテリアは胃酸より保護され腸内で酵素により DNA 含有ゲルより放出され腸管や結腸中でコロニーを形成する事になる。

この論文は 5 章よりなる。第 1 章は鮭白子 DNA とその応用について、プロバイオテックバクテリアとその応用について、及びこの研究の目的について述べた。DNA が生物の遺伝因子であるばかりでなく生体関連機能性素材であるとの認識に基づく研究は生物や地球環境に優しい革新的な物質の開発を可能にするであろう。

続く 3 つの章は、実験で得られた結果につき述べた。第 2 章は、DNA、ゼラチン、カラギナンよりなる複合体形成につき述べた。この複合体は酸性条件下で機能性物質を保持できる。“ハイドロゲル”と“コンプレックスゲル”と呼んでいる 2 種類のゲルを調製した。ハイドロゲルは、DNA、ゼラチン及びカラギナンの温かい混合溶液を冷却する事により容易に調製できる。この実験ではバクテリア源として乳酸菌を含む市販ヨーグルトを用いた。温かい混合溶液をある程度冷却したところに乳酸菌を含むヨーグルトを直接的に混合した。一方、コンプレックスゲルの場合は DNA、ゼラチン、カラギナンよりなるゲル溶液中にヨーグルトとカカオオイルよりなる乳濁液を加える事により調製した。固化させた乳濁液を混合する事により調製したコンプレックス中では乳酸菌はオイル粒子中に存在している。このコンプレックスゲルの利用につき詳しく研究した。それは、このコンプレックスゲルが人工胃液中で効率よく乳酸菌を保護したからである。一方、ハイドロゲル中の乳酸菌は保護なしの乳酸菌と同様人工胃液処理後は全く検出されなかった。ゲルの形態は走査型電子顕微鏡で観察した。酸性条件下におけるコンプレックスゲルの生きた乳酸菌に対する保護能力を高めるためにゲル調製の最適条件を調べた。乳酸菌含量が $2.58 \times 10^7 \text{CFU/g}$ の最適化ゲルを人工胃液中で 2 時間処理すると乳酸菌含量は $1.50 \times 10^6 \text{CFU/g}$ になり、さらにこれを人工腸液中で 6 時間処理すると $2.53 \times 10^7 \text{CFU/g}$ になるという好結果が得られた。

第 3 章では、ヨーグルトではなく、いくつかのプロバイオテック種についての研究を行った結果につき述べた。この研究では、応用面からみてより重要な結果が得られた。この系ではコンプレックスゲルは、ハイドロゲルに比べ桁高い保護効果があったが、ヨーグルト中の乳酸菌と異なりハイドロゲルでも充分高い保護作用を示した。さらに、4℃で冷却保存した場合、ハイドロゲル中のプロバイオテックの方が、コンプレックスゲル中よりも安定であった。ハイドロゲル中の *Lactobacillus* と *Lactococcus* は、*Bifidobacterium* よりも酸に対して安定であった。さらに、健康食品として実際に使用するために食品用の DNA、ゼラチン、カラギナンを用いて、上記と同様の方法でゲル調製の最適化を行った。

第 4 章では、*Lactobacillus helveticus* を含む DNA ゲルを人間に経口投与した結果につき述べた。ゲルを投与する前、投与中、投与後における便中の生菌の有無を Real-Time PCR、Nested RT-PCR 等の分子生物学的手法により調べた。

最後の第 5 章では、結論として DNA 含有ゲルのプロバイオテックバクテリア保護能力や、サケ白子 DNA を用いる革新的な健康食品を生み出す可能性につき述べた。

本研究により、乳酸菌、ビフィドバクテリア等のプロバイオテックバクテリアのみならず、胃の酸性に弱い薬効物質を、DNA 含有ゲルで保護する事により活性を保ったまま腸に到達させる方法が確立された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 坂 入 信 夫

副 査 教 授 荒 木 義 雄

副 査 教 授 森 川 正 章

副 査 教 授 西 則 雄 (北海道大学工学研究科)

学 位 論 文 題 名

STUDIES ON DNA-BASED GELS FOR ORAL DELIVERY OF PROBIOTIC BACTERIA

(プロバイオティックバクテリアの経口投与に用いる

DNA含有複合ゲルに関する研究)

日本は四方を海に囲まれている海洋国家であるため、魚類は日本人にとって古くから主要な食品であり、重要な蛋白質源であった。日本で食される大型魚の代表である鮭の多くは、北日本で捕獲される。その肉や卵は一般的な食材であるが、精子を含む白子はほとんど食される事はなく、毎年莫大な量の白子が産業廃棄物とされてきた。しかし、水産物を加工する過程で食品として利用されない部分より生ずる廃棄物については長い間あまり顧みられる事がなく、環境にも悪影響を与えてきた。この白子を有効利用する事ができれば、環境問題軽減に役立つであろうし、さらに、この白子を利用して人類や地球に優しい製品を生産できれば画期的な成果となりうる。

DNAはサケ白子中の主要な成分の一つであり、そこから抽出されたDNAはこれまで、例えば、健康食品、伝承医学に基づく医薬品、化粧品、遺伝子産業用薬品の原料等ごく限られた分野で使われてきた。本研究は、この天然バイオ素材であるサケ白子DNAのより高度な利用法を開発して、地球環境改善や人類の健康向上に貢献する事を最終的な目的として行われた。

DNA化学構造上の注目すべき特徴は、その骨格に多くのリン酸基によるマイナス電荷を持ち、そのため、分子全体としてはポリアニオンの性質を持つ。そのため、DNAは他のポリカチオン性生体高分子とイオン性架橋構造体を形成する。このようなポリイオンコンプレックスで機能性物質を包み込めば、この物質を厳しい破壊的な環境から保護できることが期待される。本研究ではプロバイオテックバクテリアの経口投与を可能としうる、DNA含有ゲルの調製を詳細に調べた。

プロバイオテックバクテリアは、たとえば、免疫系の刺激、体外より浸入するバクテリアやウイルスよりの保護、食物消化の促進等、宿主の人や動物の健康に良い影響を与えるバクテリアと定義される。これらは通常、人間や動物の腸内に存在する微生物群である。酪農業において最も広く用いられているプロバイオテックバクテリアは乳酸菌 (LAB) のグループである。そのほかにビフィドバクテリアや酵母も有用微生物である。これらは、伝承的に、発酵食品や

乳製品として子供や大人の胃腸障害改善に用いられている。しかし、胃液が酸性であるために、食物として摂取した場合、生菌数が大幅に減少してしまう問題がある。そこで、本研究では、プロバイオテックバクテリアを保護し腸に到達する生菌数を増加させるために、菌体を保護する DNA 含有ゲルの開発を目指して検討した。それは、DNA が胃ではほとんど分解されず、腸に届いてはじめて膵臓から分泌される DNA 分解酵素で分解されるからである。結果として、バクテリアは胃酸より保護され腸内で酵素により DNA 含有ゲルより放出され腸管や結腸中でコロニーを形成する事になる。

本研究では、まず、DNA、ゼラチン、カラギナンよりなる“ハイドロゲル”と“コンプレックスゲル”と呼んでいる 2 種類のゲルを調製し、この複合体は酸性条件下で機能性物質の保持能力を調べた。ハイドロゲルは、DNA、ゼラチン及びカラギナンを含む温かい混合溶液を冷却する事により容易に調製できる。この実験ではバクテリア源として乳酸菌を含む市販ヨーグルトを用いた。温かい混合溶液をある程度冷却したところに乳酸菌を含むヨーグルトを直接的に混合し、ハイドロゲルを調製した。しかし、ゲルを人工胃液で処理するとハイドロゲル中の乳酸菌は、保護なしの乳酸菌と同様に全く検出されなかった。一方、コンプレックスゲルの場合は DNA、ゼラチン、カラギナンよりなるゲル溶液中にヨーグルトとカカオオイルよりなる乳濁液を加える事により調製した。固化させた乳濁液を混合する事により調製したコンプレックス中では乳酸菌はオイル粒子中に存在していることが判明した。このコンプレックスゲルの利用につき詳しく研究した。それは、このコンプレックスゲルが人工胃液中で効率よく乳酸菌を保護したからである。さらに、ゲルの形態を走査型電子顕微鏡で観察し、酸性条件下におけるコンプレックスゲルの生きた乳酸菌に対する保護能力を高めるためにゲル調製の最適条件を調べた。その結果、乳酸菌含量が $2.58 \times 10^7 \text{CFU/g}$ の最適化ゲルを人工胃液中で 2 時間処理すると乳酸菌含量は $1.50 \times 10^6 \text{CFU/g}$ になり、さらにこれを人工腸液中で 6 時間処理すると $2.53 \times 10^7 \text{CFU/g}$ になるという好結果が得られた。

ついで、ヨーグルトではなく、いくつかのプロバイオテック種についての研究を行った結果について述べた。この系ではコンプレックスゲルは、ハイドロゲルに比べ桁高い保護効果があったが、ヨーグルト中の乳酸菌と異なりハイドロゲルでも充分高い保護作用を示した。さらに、4℃で冷却保存した場合、ハイドロゲル中のプロバイオテックの方が、コンプレックスゲル中よりも安定であった。ハイドロゲル中の *Lactobacillus* と *Lactococcus* は、*Bifidobacterium* よりも酸に対して安定であった。さらに、健康食品として実際に使用するために食品用の DNA、ゼラチン、カラギナンを用いて、上記と同様の方法でゲル調製の最適化を行った。この研究では、応用面からみてより重要な知見が得られた。

さらに、*Lactobacillus helveticus* を含む DNA ゲルを人間に経口投与した結果について調べた。ゲルを投与する前、投与中、投与後における便中の生菌の有無を Real-Time PCR、Nested RT-PCR 等の分子生物学的手法で検討し、バクテリアの腸管への輸送が可能であることを確認した。

以上の研究によって、DNA 複合材料がバクテリアを固定化し安定に利用できることが明らかとなり、DNA が生物の遺伝因子であるばかりでなく生体関連機能性素材であるとの認識に基づく研究は生物や地球環境に優しい革新的な物質の開発を可能にすることが示唆された。

審査員一同は、これらの結果を高く評価した研究者として誠実かつ熱心であり、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士（地球環境科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判断する。