

氏名	AJEETA ANAND		
学位の種類	博士（農学）		
学位記番号	博 甲 第 8866 号		
学位授与年月日	平成 30年 11月 30日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Development of Synbiotic Formulation using Phosphate Accumulating Probiotic for the Prevention of Hyperphosphatemia (高リン酸血症予防のためのリン蓄積プロバイオティクスを用いた製剤開発)		
主査	筑波大学教授	博士（農学）	青柳 秀紀
副査	筑波大学教授	博士（工学）	市川 創作
副査	筑波大学教授	博士（農学）	北村 豊
副査	筑波大学准教授	博士（農学）	野村 名可男

## 論 文 の 要 旨

国内外で慢性腎臓病（Chronic Kidney Disease [CKD]）は大きな問題となっている。CKDにより腎臓の機能が低下するとリンの体外への排泄量が減少し、血液中のリン濃度が増加し、高リン酸血症となり、ビタミンDの不活性化やCa濃度の上昇による骨線維症、血管の石灰化、などの深刻な心血管疾患を引き起こす。臨床的な治療としてリン吸着剤（高リン酸血症治療剤）を経口投与し、腸内のリン酸イオンを吸着することで、リン酸イオンの血液への吸収を阻止し、糞便として体外に排泄させる方法がなされている。しかしながら、リン吸着剤は便秘や副作用、長期投与の安全性に問題がある。CKDが進行し重度の高リン酸血症になると透析治療が適用される。この現状を踏まえ、著者は、“食”という側面からこの問題の解決に貢献できないかと考え、従来のリン吸着剤の問題点を排除した、リンの除去法として、腸内有用微生物の活用を提案している。はじめに著者は、メイラード反応により生成する物質がCKDの主要な原因物質となる既報の知見に着目し、1%[w/v]のグルコースと硫酸アンモニウムで構成されるモデル溶液を対象に種々の塩類を添加しメイラード反応を生じさせたところ、 $\text{HPO}_4^{2-}$ の濃度が高いとメイラード反応が促進されるが、適切な濃度の範囲（0.1～50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）ではメイラード反応の阻害が生じることを新たに見出している。次に著者は、実際に腸内有用細菌によるリン除去の可能性を検証するために、複数種の乳酸菌やビフィズス菌の培養株を対象に、培養液中からのリン除去能力や菌体内のリン蓄積量の評価を試みている。その結果、リン酸イオン除去能は菌株により大きく異なり、今回検討した培養株の中では、単位菌体あたりのリン酸イオン除去量は*Lactobacillus casei* JCM 1134株と*Bifidobacterium adolescentis* JCM 1275株が高い値を有することを示している。また著者は、2-(4-amidinophenyl)-1H-indole-6-carboxamide [DAPI]を用いて両菌株を蛍光染色した結果、菌体内にポリリン酸が顆粒となって蓄積することを明らかにしている。

さらに、著者は、*L. casei* JCM 1134と*B. adolescentis* JCM 1275を対象に、その集団の中から高いリン蓄積能を

有する単一優良菌を取得する方法を提案している。具体的には、開発した培地を用いて培養し、菌体内にリンを蓄積させた後、リン酸を含まない酸性培地で培養することでリン蓄積能の低い菌を排除し、続いて、Percoll密度勾配遠心分離により菌体内にリンを蓄積している比重が大きい菌体のみを選択的に取得し、さらに、リン酸と複合体を形成するToluidine Blue O (TBO) を添加した寒天平板培地を用いて、著者が考案した半定量法に基づき、高いリン蓄積能を有する単一菌を取得する)。著者は、本法により高いリン蓄積能を有する*L. casei* JCM 1134と*B. adolescentis* JCM 1275の単一優良菌の取得に成功している。

また、著者は微生物のリン酸蓄積能の推定に優れた方法として使用されているTBOを用いた測定法が、結果の再現性、感度、精度などの点で問題があることを明らかにしている。著者は、TBOと測定用試料を混合した後にオートクレーブ処理をおこなうと測定感度、精度および結果の安定性が著しく向上することを見出すとともに、菌体内のリン蓄積量を測定する際に、適切なブランクを用意することで、従来のTBOを用いた測定法の問題点を排除できることを明らかにしている。著者は、これらの知見を活用することで、培養中の微生物のリン酸蓄積能の経時的な変化を正確かつ簡便に評価している。

以上、得られた知見を統合し、著者は、リン蓄積能の高い*L. casei* JCM 1134とAloe Veraを組み合わせたSynbiotic素材 (Sd) を作成し、リン酸イオンが豊富に含まれる市販のミルクや飲料などを対象にリン吸着能を、医薬品で使用されている炭酸カルシウム、水酸化アルミニウム、炭酸ランタンと比較した結果、Sdは同等以上の高いリン吸着能を有することを明らかにしている。著者は、SdはCKDを予防する食品素材として有用性が高いと結論づけている。

## 審 査 の 要 旨

本論文で著者は、国内外で問題となっている慢性腎臓病 (Chronic Kidney Disease [CKD]) の治療の際に使用されているリン吸着剤の問題点を排除した、新たなリン吸着用食品素材の作成にあたり、食用の腸内有用細菌の活用を提案し、高いリン蓄積能を有する乳酸菌とビフィズス菌の取得とその関連技術の開発について検討をおこなっている。これまでビフィズス菌や乳酸菌はプロバイオティクスに広く用いられてきたが、リン除去に着目した研究は国内外を通じて皆無であり、研究の新規性、独創性は評価できる。また、著者が開発した高いリン蓄積能を有する単一優良菌の取得法を用いて得られた*L. casei* JCM 1134と*B. adolescentis* JCM 1275の単一優良菌のリン蓄積能は、腸内細菌のみならず既報のリン蓄積微生物と比較しても高い値であり、本法の有用性は高いと評価できる。さらに、著者が開発した微生物のリン蓄積能の評価法により、従来は適切に評価できていなかった培養系における微生物のリン蓄積能が評価可能となっており、今後、様々なリン蓄積微生物の特性評価に使用されることも期待できる。著者が作製した*L. casei* JCM 1134とAloe Veraを組み合わせたSynbiotic素材 (Sd) は*in vitro*の系ではあるが、市販のミルクや飲料などから従来のリン吸着剤と匹敵するリン除去能を示しており、今後、*in vivo*での研究が進む事により、実用的な利用も期待できる。特に、著者が提案している方法は、リン吸着剤のように医薬品ではなく、食品として使用可能であり、CKDの予防にも有用な可能性があり特許性も極めて高い。

平成30年10月15日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士(農学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。