

令和元年6月9日現在

機関番号：32517

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00919

研究課題名(和文) 乳酸菌の摂取が妊娠・授乳期の母親と乳児の健康に及ぼす影響

研究課題名(英文) Effect of lactic acid bacteria intake on the health of dam and infant during pregnancy and lactation

研究代表者

小松崎 典子 (Komatsuzaki, Noriko)

聖徳大学・人間栄養学部・准教授

研究者番号：20536312

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：マウスを用いて妊娠・授乳期の高脂肪食と*Lactobacillus paracasei* NFR1 7415の摂取が母親と乳児の健康にどのような影響を及ぼすかを検討した。乳酸菌を摂取した母マウスの腸内細菌叢に影響を及ぼし、高脂肪食の子マウスの肝臓の総コレステロール濃度を下げることが明らかとなった。*Lb. paracasei*のプロバイオティクス効果を調べた。対照として*Lactobacillus casei*を用いた。コレステロール吸着率と胆汁酸吸着率は、*Lb. paracasei*が*L. casei*に比べて高値を示した。これらの結果から、ふなずし由来乳酸菌のプロバイオティクス素材としての可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Lactobacillus paracasei NFR1 7415は、生きたまま腸に到達し、腸内細菌叢の改善に役立つと同時に、乳酸菌のコレステロール低下作用が脂質代謝や腸管免疫に影響を与えていることが示唆された。本研究の成果は、妊娠・授乳期の母親と乳児の生活習慣病予防と健康増進に寄与する新規なプロバイオティクス効果を有する食品素材となり得ると考える。

研究成果の概要(英文)：We examined the effects of *Lactobacillus paracasei* during pregnancy and lactation on mice fed a high-fat diet. *Lb. paracasei* reduces the content of liver lipids in pups of high-fat diets. It is thought that ingesting *Lb. paracasei* affects the formation of bacterial flora in dams.

The probiotic of *Lb. paracasei* was examined. *Lactobacillus casei* was used as a control. *Lb. paracasei* showed high tolerance for the gastric juice although the tolerance for bile acid was low. Cholesterol and bile acid binding abilities of *Lb. paracasei* was higher than *L. casei*. Therefore, it was suggested that *Lb. paracasei* may be effectively applied as probiotics *Lactobacillus*.

研究分野：食品微生物学

キーワード：乳酸菌 プロバイオティクス 妊娠・授乳期 コレステロール低下作用

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、わが国における食生活は欧米化傾向にあり、若年世代の動物性脂肪摂取量が増加している。平成 25 年の「人口動態統計月報年計の概況」によれば、心疾患および脳血管疾患の死亡数は総死亡数の 25% を占めている¹⁾。動脈硬化や心臓病の発症には、肥満や糖尿病が引き金となることから、食生活の改善による生活習慣病の予防が重要となる。また、平成 25 年の国民・栄養調査の結果、18~29 歳女性のカルシウム摂取量は 405 mg/日、推定平均必要量 550mg/日(日本人の食事摂取基準 2015 年版)をかなり下回っている。妊娠・授乳期ラットにラードと魚油を摂取させたところ、ラードを摂取したラットの仔ラットの血液中の中性脂肪、総コレステロール濃度は、魚油摂取ラットに比べて高値を示した²⁾。また、妊娠・授乳期のカルシウム不足は、子どもの免疫細胞の機能低下を引き起こすことが報告されている³⁾。若い世代の高脂肪食の過剰摂取およびカルシウム不足は、その後の生活習慣病の要因となり、妊娠・授乳期の肥満やカルシウム不足が子の肥満や免疫機能低下といった健康への影響が懸念される。

(2) *Lactobacillus paracasei* NFRI 7415 は、ふなずしから分離された乳酸菌で、 γ -アミノ酪酸(GABA)を大量に生産する能力を有している^{4,5)}。GABA には血圧上昇抑制作用の他に、中性脂肪の上昇を抑える働きについての報告もあり、血中アミノ酸組成と肥満、糖尿病には関連があることが示唆された⁶⁾。*Lb. paracasei* NFRI 7415 が、長期間アルコールを摂取したラットの肝臓中のコレステロール濃度の上昇を抑制する働きがあることをみだした⁷⁾。

2. 研究の目的

(1) 妊娠・授乳期の高脂肪食および乳酸菌摂取が、出生後の仔マウスに及ぼす影響

食生活の欧米化により、若い世代の肥満はその後の生活習慣病の要因となり、妊娠・授乳期の肥満は子の成長への影響が懸念される。乳酸菌の摂取は、腸内細菌叢を改善し、プロバイオティクス効果や免疫疾患予防が期待できる。本研究は、マウスを用いて妊娠・授乳期の高脂肪食と乳酸菌摂取が母親と乳児の健康にどのような影響を及ぼすかを検討した。

(2) 妊娠・授乳期のカルシウム不足および乳酸菌摂取が、出生後の仔マウスに及ぼす影響

妊娠・授乳期にカルシウムが不足することは、出生後の乳児の成長に影響を及ぼす可能性がある。乳酸菌の摂取は体内でカルシウムの吸収を促進させる働きがあることが報告されている。本研究は、ふなずしから分離した *Lb. paracasei* NFRI 7415 の摂取とカルシウム摂取不足が妊娠・授乳期の母親と乳児の健康にどのような影響を及ぼすかを検討した。

(3) *Lb. paracasei* NFRI 7415 のプロバイオティクス効果の検討

妊娠・授乳期の母親と乳児の健康に、乳酸菌はどのような効果があるのか。*Lb. paracasei* NFRI7415 が生体内でどのような効果を発揮するのか、in vitro による試験で検証する。人工胃液耐性、胆汁酸耐性試験、コレステロールおよび胆汁酸吸着作用について、乳酸菌のプロバイオティクス効果を明らかにした。

3. 研究の方法

(1) 妊娠・授乳期の高脂肪食および乳酸菌摂取が、出生後の仔マウスに及ぼす影響

ICR 妊娠マウス(妊娠確認 3 日目)を 16 匹購入し、標準食(CD)群(5 匹)、高脂肪食(HD)群(5 匹)、高脂肪食+乳酸菌(*Lb. paracasei* NFRI 7415)(HDL)群(6 匹)の 3 群に分けて飼育した。標準食には 7% の大豆油、高脂肪食には 7% 大豆油に 14% のラードを添加した。乳酸菌は培養後菌体を回収し、滅菌水で洗浄した後、飲料水の中に 10^7 cfu/mL になるよう調製した。仔マウスは出生後 24 時間以内に 1 匹の母マウスに対し 10 匹ずつに調整し授乳させた。生後 21 日目に母マウスと仔マウスを 2 匹ずつ解剖し、血漿と肝臓を採取した。仔マウスは生後 31 日目、40 日目、50 日目に解剖し、血漿と肝臓を採取した。母マウスの解剖前日に、24 時間以内の糞を採取し、腸内細菌を調べた。

(2) 妊娠・授乳期のカルシウム不足および乳酸菌摂取が、出生後の仔マウスに及ぼす影響

妊娠マウスを標準食(C)群、低カルシウム食(-Ca)群、標準食+乳酸菌投与(CL)群および低カルシウム食+乳酸菌投与(-CaL)群の 4 群に分けて飼育し、出産後、仔マウスは 1 匹の母親に 10 匹となるよう調整し 3 週間飼育した。標準食と低カルシウム食の飼料中のカルシウム濃度は、それぞれ 6.93 mg/g と 0.24 mg/g であった。乳酸菌は培養後、洗浄し、 10^7 cfu/mL になるよう飲料水を調製し、自由に摂取させた。離乳直後、母マウスと 3 週齢の仔マウス(2 匹ずつ)を解剖し、肝臓、後腹壁脂肪組織、血液および右大腿骨を採取した。残りの仔マウスは雌雄に分け、C 群を標準食-標準食(CC)群と標準食-低カルシウム食(C-Ca)群に、CL 群を標準食+乳酸菌-標準食(CLC)群と標準食+乳酸菌-低カルシウム食(CL-Ca)群とした。-Ca 群は低カルシウム食-標準食(-CaC)群に、-CaL 群は低カルシウム食+乳酸菌-標準食(-CaLC)群の 6 群とした。5 週齢、6 週齢、7 週齢、9 週齢でそれぞれ 2 匹ずつ解剖をおこなった。解剖時に、血漿、肝臓、後腹壁脂肪組織、右大腿骨を採取し、重量を測定した。右大腿骨中のカルシウムとリン、血漿中のカルシウム量を調べた。

(3) *Lb. paracasei* NFRI 7415 のプロバイオティクス効果の検討

Lb. paracasei NFRI 7415 と比較対照として *Lactobacillus casei* を培養し、生菌を凍結乾燥後粉末化した。人工胃液耐性試験は、人工胃液(pH2~3)の中に乳酸菌を接種し、4時間以内の生存率を調べた。胆汁酸耐性試験は、0~0.3%濃度の胆汁酸の中に乳酸菌を接種し、37°Cで16時間後の乳酸菌の生存率を調べた。コレステロール吸着試験は、コレステロール溶液中に、胆汁酸吸着試験は0~0.3%の胆汁酸濃度の溶液中にそれぞれ粉末化した乳酸菌を懸濁し、コレステロールと胆汁酸の吸着率を調べた。

4. 研究成果

(1) 妊娠・授乳期の高脂肪食および乳酸菌摂取が、出生後の仔マウスに及ぼす影響

母マウスの体重、肝臓重量、後腹壁脂肪組織重量、肝臓および血漿脂質濃度に3群間で有意差はみられなかった。妊娠・授乳期をとおして総摂取エネルギー量は、HD群とHDL群はCD群に比べて高値を示した($p<0.05$)。母マウスの糞中の細菌を調べたところ、好気性菌数と嫌気性菌数の3群間で有意な差はみられなかった。HDL群の糞中にはビフィズス菌が検出されたが、HD群には検出されなかった。また、HDL群のクロストリジウム属の菌数がCD群とHD群に比較して少ないことから、乳酸菌の摂取が母マウスの腸内細菌叢に影響を及ぼしていることが示唆された(表1)。飼育期間をとおして、仔マウスの体重は3群間で有意な差はみられなかったが、CD群の総摂取エネルギー量は他の2群に比べて低かった($p<0.05$)。授乳期間中の血漿トリアシルグリセロール濃度は3群間とも高く、その後低下したが、血漿中のレプチン濃度は成長とともに上昇した。肝臓の総コレステロール(T-Cho)濃度は、生後40日目までは3群間で有意差はなかったが、生後50日目のCD群とHDL群はHD群に比べて有意に定値を示した($p<0.05$)。妊娠・授乳期の乳酸菌の摂取は、マウスの腸内細菌叢に影響を及ぼし、高脂肪食を摂取した仔マウスの肝臓のT-Cho濃度を下げる働きを有することが明らかとなった。

表1 母マウスの糞中細菌数

	ビフィズス菌	MRS	Clostridium	嫌気性菌	Enterococcus	Staphylococcus	好気性菌
CD	7.05 ± 0.07 ^a	ND ^b	9.15 ± 0.21 ^a	6.24 ± 1.81	3.60 ± 0.56 ^b	3.37 ± 0.80 ^b	4.73 ± 0.55
HD	ND ^b	5.5 ± 0.47 ^a	8.01 ± 0.07 ^{ab}	6.63 ± 2.06	4.34 ± 0.17 ^a	4.28 ± 0.16 ^a	5.43 ± 1.31
HDL	8.07 ± 1.39 ^a	5.7 ± 0.81 ^a	6.33 ± 0.58 ^b	6.67 ± 1.17	4.31 ± 0.30 ^a	4.02 ± 0.04 ^a	5.78 ± 1.28

(2) 妊娠・授乳期のカルシウム不足および乳酸菌摂取が、出生後の仔マウスに及ぼす影響
離乳直後の母マウスの体重、授乳期の飼料摂取量、血漿カルシウム濃度は、C群とCL群が-Ca群と-CaL群より有意に高かった($p<0.05$)。授乳期間中の母マウスの体重をみると、-CaL群は-Ca群を上回っていた(表2)。CL群の母マウスの骨量が他の群と比較して増加したことから、妊娠・授乳期にカルシウムを十分摂取することによって、*Lb. paracasei* NFRI 7415 によるカルシウムの吸収が高まるのではないかと推測された。離乳直後、低カルシウム食群の仔マウスは成長が遅く、標準食群との体重差が大きくなった。妊娠・授乳期の低カルシウム食は、子どもの成長を遅らせ骨の形成に大きな影響を及ぼすが、その後カルシウムを十分に摂取することで、骨の成長を取り戻すことができると考えられた。

表2 母マウスの飼料総摂取量、体重、肝臓重量、後腹壁脂肪組織重量、右大腿骨重量および血漿カルシウム濃度

Group	C (n=5)	CL (n=4)	-Ca (n=3)	-CaL (n=3)
Food intake (pregnancy) (g)	66.4 ± 3.21 ^{ab}	63.6 ± 2.99 ^{ab}	59.6 ± 4.02 ^b	70.4 ± 5.98 ^a
Food intake (lactation) (g)	273.4 ± 16.8 ^a	296.4 ± 9.42 ^a	135.3 ± 21.5 ^b	140.5 ± 23.9 ^b
Body weight (g)	40.2 ± 2.20 ^a	40.4 ± 1.94 ^a	32.1 ± 2.72 ^b	33.8 ± 4.27 ^b
Liver weight (g/100 g wt)	6.13 ± 1.23	5.40 ± 0.44	5.24 ± 0.29	5.18 ± 0.41
Perirenal fat tissue weight (g/100g wt)	0.224 ± 0.08	0.217 ± 0.11	0.063 ± 0.02	0.057 ± 0.04
Right femur (dry) (mg)	46.8 ± 14.3 ^{ab}	66.3 ± 8.0 ^a	35.0 ± 3.3 ^b	33.7 ± 7.4 ^b
Right femur (defatted) (mg)	44.5 ± 14.3 ^{ab}	63.9 ± 7.9 ^a	33.6 ± 3.6 ^b	31.7 ± 7.2 ^b
Calcium in right femur (mg/g)	103.5 ± 13.7 ^a	79.4 ± 2.	75.7 ± 6.0	78.5 ± 9.7
Plasma calcium (mg/dl)	8.39 ± 1.76 ^a	7.58 ± 0.87 ^a	4.02 ± 0.47 ^b	4.01 ± 1.46 ^b

C; Control diet, CL; Control diet + *Lb. paracasei*, -Ca; Calcium deficient diet, -CaL; Calcium deficient diet + *Lb. paracasei*.

Values represent means ± SD. Within a row values not sharing a common superscript letter are significantly different at p<0.05.

(3) *Lb. paracasei* NFRI 7415 のプロバイオティクス効果の検討

人工胃液耐性試験において、*Lb. paracasei* は胃液に対する高い耐性を示した(表 3)が、胆汁に対する耐性は、*L. casei* に比べて低かった。コレステロール吸着率は、*Lb. paracasei* が 50.9%、*L. casei* が 39.4%であり、胆汁吸着率は *Lb. paracasei* が 40.9%、*L. casei* が 33.8%であった。*Lb. paracasei* が他の乳酸菌に比べてコレステロール吸着作用が高いこと、胃の中での生存率が高いことから、妊娠・授乳期の母親と乳児の健康に寄与するプロバイオティクス効果が期待できた。

表 3 人工胃液耐性試験

	生菌数(log cfu/mL)		
	pH3	pH2.5	pH2
<i>L. casei</i>	4.0	-	-
<i>Lb. paracasei</i>	5.0	5.0	-

<引用文献>

- 1) Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan, The National Livelihood Survey in Japan 24-26, 2014
- 2) Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan, The National Health and Nutrition Survey in Japan, Daiichi Press, Tokyo, Japan, 2014
- 3) Komatsuzaki N, Usui T, Toriumi E, Yamada Y, Nakashima Y. Effect of dietary lard and fish-oil intake by rats during pregnancy and lactation on the composition of stomach contents and plasma lipid concentration in pups. *Jpn Soc Nutr Food Sci*, 63, 107-114, 2010
- 4) Hall JA, Bobe G, Vorachek WR, Kasper K, Traber MG, Mosher WD, Pirelli GJ, Gamroyh M. Effect of supranutritional organic selenium supplementation on postpartum blood micronutrients, antioxidants, metabolites, and inflammation biomarkers in selenium-replete dairy cows. *Biol Trace Elem Res*, 161, 272-287, 2014
- 5) Komatsuzaki N, Shima J, Kawamoto S, Momose H, Kimura T. Production of γ -aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus paracasei* isolated from traditional fermented foods. *Food Microbiology* 22, 497-504, 2005
- 6) Zhou Y, Qiu L, Xiao O, Wang Y, Meng X, Xu R, Wang S, Na R. Obesity and diabetes related plasma amino acid alterations. *Clin Biochem*, 46, 1447-1452, 2013
- 7) Komatsuzaki N, Shima J. Effects of live *Lactobacillus paracasei* on plasma lipid concentration in rats fed an ethanol-containing diet. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76, 232-237, 2012

5 . 主な発表論文等

[学会発表](計2件)

Abe A, Fujihara S, Komatsuzaki N. Effect of lactic acid bacteria intake on the health of dam and infant mice. 12th International Conference on Childhood Obesity and Nutrition (2019)

Abe A, Mizuho Endo, Komatsuzaki N. Effect of Lactic acid bacteria during pregnancy and lactation in mice fed a high-fat diet. 10th EFAD (European Federation of the Associations of Dietitians) (2017)

6 . 研究組織

(1)研究分担者氏名：藤原しのぶ

ローマ字氏名：Fujihara, Shinobu

所属研究機関名：聖徳大学

部局名：人間栄養学部

職名：准教授

研究者番号(8桁): 10279672

研究分担者氏名：佐藤明恵

ローマ字氏名：Sato, Akie

所属研究機関名：聖徳大学

部局名：人間栄養学部

職名：助手

研究者番号(8桁): 20774003

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。