

令和元年6月25日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08294

研究課題名(和文) アルコール中毒症の改善作用を有する植物乳酸菌の分子機構解明

研究課題名(英文) Intake of living *Lactobacillus plantarum* SN13T prevents mice from lethal alcohol poisoning by alternating the gut microflora

研究代表者

野田 正文 (Masafumi, Noda)

広島大学・医歯薬保健学研究所(薬)・特任准教授

研究者番号：40457289

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、SN13T株生菌体の摂取によってもたらされる、アルコール中毒症の改善機構について、腸内の細菌叢解析とメタボローム解析を用いた動物実験を通じ、その特異的機能性分子と共に明らかにすることを目的とした。

研究の結果、エタノール摂取群では特定の細菌の存在比率が増減したが、SN13T株の摂取によりその比率が回復することが観察された。また、腸内では動物の体組織が腐敗する際に生成される物質がエタノール摂取群で上昇し、SN13T株摂取で回復することがわかった。すなわち、SN13T株の生菌体の摂取は、過剰なエタノール摂取によって生じる腸内細菌叢変化と腐敗物質の産生を抑制することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

国民の健康意識の向上に伴い、近年数多くの保健機能性食品が販売されているが、その多くが特定の機能性分子(セサミン、ラクトフェリンなど)の作用によるものであり、腸内細菌叢への影響が考慮されているものはまだまだ少ない。近年、腸内細菌叢と生活習慣病や精神疾患との関連性を裏付ける研究報告が増えて来ており、ヒトの健康を考える上では、腸内細菌叢も身体の重要な構成要素の一部であると言える。本研究結果によって、健康寿命を延ばすべく、乳酸菌などのプロバイオティクスを利用し、宿主であるヒトと共生関係にある腸内細菌叢を健康維持のポジティブファクターとして利用する創薬の可能性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we successfully found that the lethal effect caused by intake of ethanol in mice was completely avoided by oral administration of the SN13T strain living cells. Further analysis showed that the disordered gut microflora observed in ethanol-fed mice was partially restored by intake of the SN13T strain living cells. Additionally, comparative metabolomic analysis of cecum revealed that increment of non-volatile putrefactive amines observed in ethanol administration group was repressed by SN13T living cells feeding.

Judging from our results, the living SN13T cells reached to the gut may contribute to adjust the gut bacterial diversity and to protect against the alcoholic damages. The present study supports that the gut microflora balance is not negligible factor of human body for the health maintenance, and the probiotics can actually prevent the undesirable side-effect of alcohol drinking.

研究分野：分子微生物学

キーワード：プロバイオティクス 腸内細菌叢 アルコール 乳酸菌

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

「節度のある適度な飲酒」が健康に寄与する一方で、多量・常用飲酒は肝細胞障害の引き金となる。アルコール性肝障害に由来する肝硬変症は、わが国全体の肝硬変症の10-15%を占めており、更には一度進行した肝硬変症は飲酒を止めても元に戻ることはなく、ウイルス性肝炎を除けば肝臓がんの最も高いリスク因子となっている。

申請者は、文部科学省・都市エリア産学官連携促進事業(発展型)のプロジェクト研究(期間:平成20-22年度)に参加し、生活習慣病の予防改善に有効な植物乳酸菌の探索研究に携わってきた。既に600株を超える植物乳酸菌から成るライブラリーを樹立しており、その保存乳酸菌株の保健機能性を調査した結果、アルコール性肝障害に特徴的な γ -GTP(γ -glutamyl transpeptidase)の高値を少なくとも25%低減化させる乳酸菌SN13T株を、ヒト臨床試験により見出した[1]。

*Lactobacillus plantarum*と同定されたSN13T株の予備実験を通じて、アルコール性肝障害モデルマウスにSN13T株の生菌体を経口摂取させると、致死的なアルコール中毒作用が回避されることを発見した。しかしながら、SN13T株のこの作用は、加熱処理した死菌体の摂取や超音波破砕した菌体成分抽出液の摂取ではほとんど認められなかった。

多量のアルコールの摂取は、腸管粘膜バリアの破壊を惹起し、体内へのエンドトキシンなどの有害物質を流入しやすくさせる結果、肝障害を誘発する。これまでに、乳酸菌の細胞壁成分や菌体が培養液中に産生する物質による腸管粘膜バリアの修復機能に関する報告はあるものの[2]、本研究で対象としているSN13T株のように、生菌体の摂取でのみ著しい効果が認められるとの例は全く存在しなかった。

2. 研究の目的

アルコール摂取による肝障害モデルマウスにSN13T株を経口摂取させた際の「腸内細菌叢」の変化を、糞便から回収した16S rDNAの部分配列に対する多型解析(T-RFLP法)にて調査した結果、生菌体摂取群では、Lactobacillalesに属する細菌が増加する代わりに、*Bacteroides*属細菌が顕著に減少した。一方、菌体摂取なしの群では、その観察結果は完全に逆転しており、かつ、未同定の細菌群が顕著に増加していた。このことから、SN13T株の摂取でみられた効果は、生菌として腸管内に到達した本株が、自身あるいは共存する腸内細菌叢を介して産生する「特異的機能性分子」の存在が関わっている可能性が考えられた。

そこで本研究では、SN13T株生菌体の摂取によってもたらされる、アルコール中毒症の改善機能について、その特異的機能性分子ならびにその分子の生合成経路を明らかにするとともに、それらの作用機序を分子生物学的に解明することを目的として、実験を行った。

3. 研究の方法

(1) エタノール含有飼料の調製

エタノールを含む液体飼料としてResearch Diet社のL10016を、一方、エタノールを含まない液体飼料として同社のL10015を、それぞれ用いた。なお、L10015には、L10016に含まれるエタノールと同カロリーに相当するマルトデキストリンを添加して動物実験に供した。なお、予備飼育の時を除いて飲用水は与えず、水分の補給もこれら液体飼料によって行うこととした。

(2) 動物実験

エタノール嗜好性を有するC57BL/6J雄性マウス(7週齢)をマウス基礎飼料(MF、オリエンタル酵母)で1週間予備飼育した後、A群(L10015のみ)、B群(L10016のみ)、C群(L10015+SN13T株生菌体)、およびD群(L10016+SN13T株生菌体)の計4群に分けて実験を開始した。エタノール含有飼料の摂取開始前に、各群のマウスには予めL10015を1週間摂取させる期間を設けた。その際、C群およびD群には予め飼料にSN13T株生菌体を与えておくこととし、その菌体数は $1-2 \times 10^9$ cfu/mLとした。エタノール摂取開始2週間後、イソフルラン吸入による深麻酔によって安楽殺し、血液に加え、消化管を小腸、盲腸、および大腸に分けて、それぞれ回収した。

なお、他の乳酸菌株を用いて実験を行う場合も、飼料に含有させる菌体数は同数とした。

(3) 血液検査

マウスより回収した血清に対して、AST、ALT、アルカリホスファターゼ、LDH、アミラーゼ、 γ -GTP、リパーゼ、中性脂肪、LDL-コレステロール、HDL-コレステロール、総ビリルビン、および血糖の各値について、各検査項目測定用キットを用いて測定を行った。

(4) 腸内細菌叢解析

マウスより回収した各腸内容物よりDNAを抽出し、イルミナ社製MiSeqを用いて16S rDNAのV3-V4領域に基づいた細菌叢解析を行った。

(5) メタボローム解析

メタボローム解析はヒューマン・メタボローム・テクノロジー株式会社への委託解析として実施した。マウスより回収した盲腸内容物をサンプルとして、そこに含まれる約900種類のイオン性代謝物と約300種類の脂質代謝物質化合物について、LC-TOF/MSおよびCE-TOF/MSによ

って網羅的に測定した。

4. 研究成果

(1) エタノール摂取マウスにおける SN13T 株の影響

これまでの研究結果から、C57BL/6J マウスをエタノール含有飼料で飼育すると、その中毒症状により少なくとも数週間以内に死亡することが確認されている。本研究ではまず、飼料に含まれるエタノールの濃度を変えた場合に（最大で 10.0 v/v % まで）、マウスがどの程度生存するかについて検討を行った。その結果、6.0 v/v % 程度までであれば SN13T 株の摂取に関係無く 8 週間以上生存するが、それ以上の濃度では中毒症状の影響が強くなって行き、10.0 v/v % では摂取開始 1 週間前後で、SN13T 株の摂取・非摂取に関わらず死に至った。これはあまりにも高濃度のエタノールを摂取したことによる急性中毒によるものと考えられ、細菌叢や代謝物の毒性によるものではなく、血液中エタノール濃度の上昇による昏睡であると考えられた。

エタノール濃度を 7.5 v/v % とした際には、摂取開始 2-3 週間ではほぼ全てのマウスの死亡が認められ、SN13T 株の摂取によってその死亡が抑制されることが確認された。よって、SN13T 株による中毒症状の回避作用に関する研究にはこのエタノール濃度を用いて実験を進めることとした。

なお、過去の研究でラットを用いた急性経口毒性試験での安全性が確認されている乳酸菌株についても調査を行ったが、SN13T 株にみられたような中毒症状の回避作用は認められなかった。この結果から、この特性は SN13T 株に特異的なものであると考えられた。

(2) エタノール摂取が腸内細菌叢に及ぼす影響と SN13T 株による回復効果

研究の方法「(2) 動物実験」に記載した方法に従ってマウスを飼育し、血液サンプルならびに各消化管サンプルを回収した。血液検査の結果から、2 週間のエタノール摂取によってマウスの血液中 AST および ALT の値が有意に上昇すること、そしてその上昇が SN13T 株の摂取により抑制されることが確認された (図 1)。また、エタノールを摂取させずに SN13T 株を摂取させた群では、顕著な増減は認められなかった。

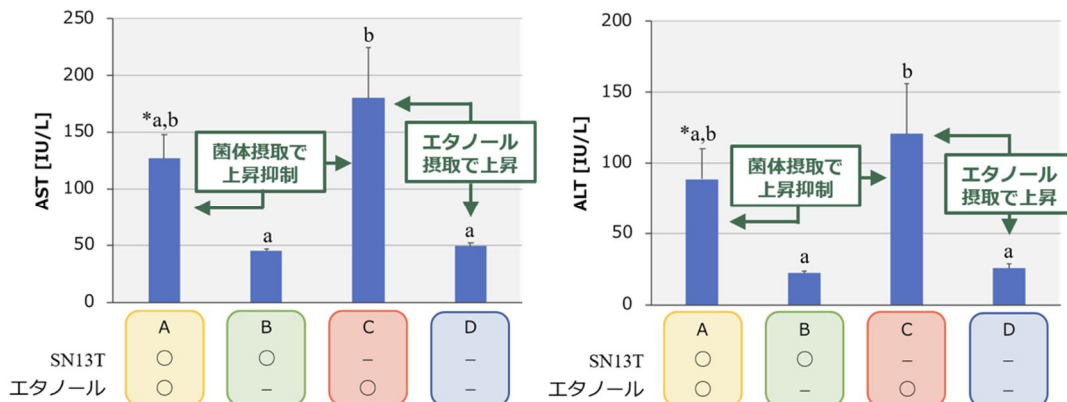


図 1. エタノールおよび SN13T 株生菌体を摂取させた場合のマウス血中 AST および ALT の変化。

*図中のアルファベットは Tukey-Kramer 法による検定結果 (mean ± S.E.). * $P < 0.05$

回収した各消化管の部位ごとに細菌叢解析を行ったところ、エタノール摂取の有無によって細菌叢が異なってくるという結果が得られた (図 2)。盲腸に加え、とりわけ小腸においては、Enterococcaceae 科の割合がエタノール摂取により劇的に増加していた (図 2A, B)。また、盲腸および大腸において、Paraprevotellaceae 科の割合がエタノール摂取によって減少する様子が確認された (図 2B, C)。盲腸と大腸においては、RF32 目と呼ばれる未同定分類群の割合が、エタノール摂取によって増加している様子も合わせて観察された。3 つの部位に共通して見られた変化としては、エタノール摂取群における *Allobaculum* 属および *Akkermansia* 属の割合の減少があった (図 2A-C)。面白いことに、ここまで述べた変化は全て SN13T 株を同時に摂取させることで解消されていた。

変化のあった群のうち、エタノール摂取群において減少のみられた *Akkermansia* 属は、*Akkermansia* (*A.*) *muciniphila* と *A.* *glycaniphila* の 2 菌種より構成される。後者の細菌は健康人の糞便中に 1-4% 存在し、腸管バリア形成に寄与しているとされ、炎症性腸疾患の患者においてはその比率が少ないことが報告されている [3-7]。更に、アルコール性肝炎の患者では健康人と比べて糞便中の数が減少していること、そして、エタノールを摂取させたマウスにおいても糞便中のその数が減少していることが報告されている [8]。

エタノール摂取群において上昇する様子が観察された RF32 目に属する細菌群は、その存在比率が結腸の炎症や血液中の TMAO (trimethylamine *N*-oxide) と正の相関を示すことが報告されている [9]。この TMAO は、腸内細菌によってコリンから変換された TMA (trimethylamine) が肝臓で代謝されることによって生成されるもので、血栓や動脈硬化、心疾患に関与するとされている。また、コリンの欠乏は脂肪肝や肝炎の原因となる。

以上の結果から、SN13T 株の摂取は、エタノール摂取により引き起こされる腸内細菌叢の変化を予防・改善することで、その乱れに続く腸や肝臓の炎症を予防・改善している可能性が示唆された。

(3) メタボローム解析によって明らかとなったエタノール摂取マウス体内で起こっている変化

メタボローム解析の対象組織として、善玉菌の成長を促すとともにそれをプールしておくことで、腸内細菌叢のバランス維持と腸管免疫の調節に寄与すると考えられている盲腸を選択した。解析の結果、エタノール摂取群で特異的に増減しているが、SN13T 株を合わせて摂取することによって改善している化合物の存在が明らかになった (図 3)。エタノール摂取時に著しく上昇した化合物の中には、体組織の腐敗時に生成されるカダベリンやチラミンの他、分岐鎖アミノ酸を含むタンパク質の分解によって腸内細菌が生成するイソ酪酸が認められた (図 3A)。このことから、SN13T 株の摂取は、腸内における腐敗関連物質の産生予防・改善に寄与している可能性が考えられた。一方、エタノール摂取時に減少した化合物には、解糖系や TCA サイクルに関する分子、ヌクレオチド、コレステロールや胆汁酸に関するもの、そして一部のアミノ酸の減少が認められた (図 3B)。これらの化合物とエタノール中毒症状との直接的な関連性については未だ不明であるが、今後の研究の進展によって明らかにしていきたい。今回の研究結果を基に、エタノール摂取時における腸内腐敗と炎症の惹起メカニズムについての仮説モデルを考えた (図 4)。過剰なエタノール摂取による腸内細菌叢の変化により、炎症・腐敗関連物質の産生が進むとともに、腸管バリアの保護等に働く細菌群の減少が引き起こされるものと推測される。このモデルにおいて、SN13T 株生菌体の摂取は、直接的に、若しくは腸内で協奏的に成育する細菌群とともに、これらの腸内細菌叢の変化を抑制し、効果を発揮しているものと考えている。本研究結果を基に、宿主である人間と共生関係にある腸内細菌叢を健康維持のポジティブファクターのひとつとして捉える創薬研究に対して、引き続き取り組んで行くつもりである。

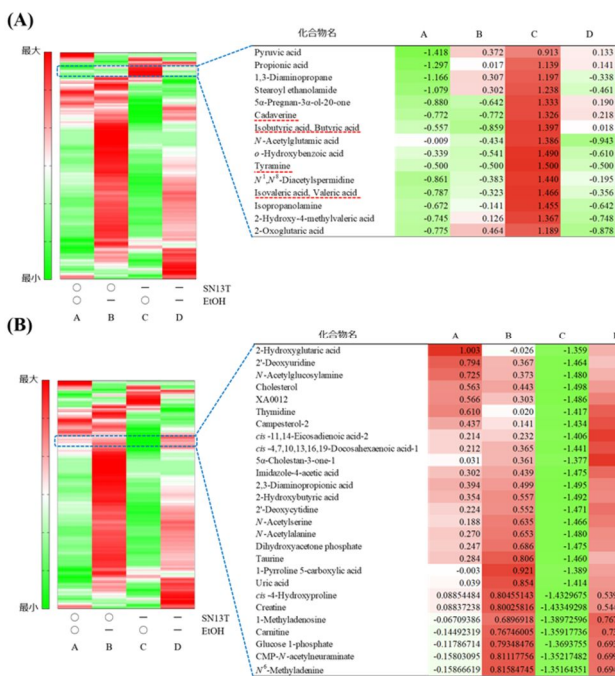


図 3. エタノールおよび SN13T 株を摂取させた場合の盲腸内内容物における変化。エタノール摂取時に減少した化合物群 (A) とエタノール摂取時に増加した化合物群 (B) についてそれぞれ示す。

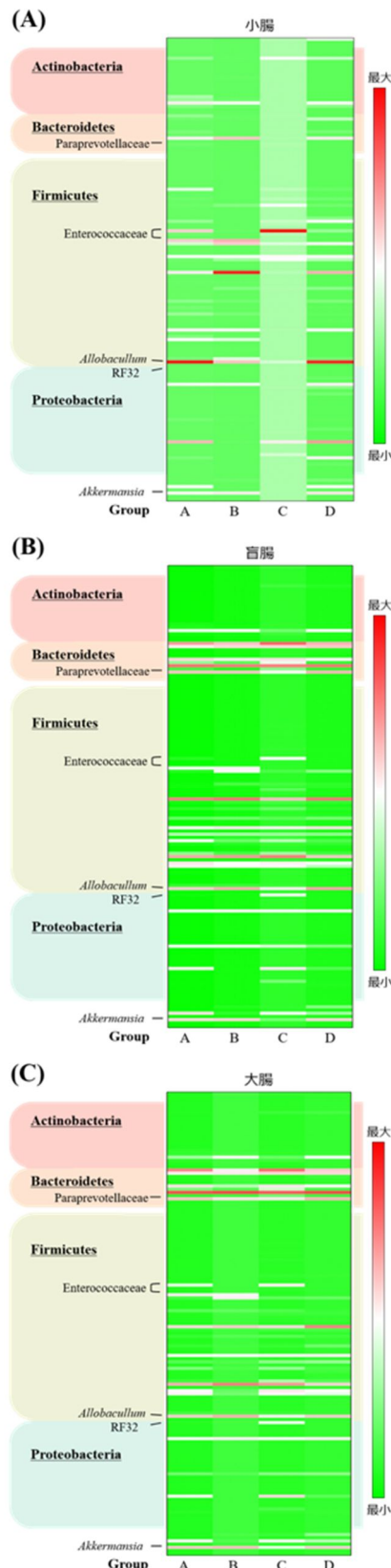


図 2. エタノールおよび SN13T 株を摂取させた場合の各消化管内における腸内細菌叢の変化。小腸 (A), 盲腸 (B), および大腸 (C) をそれぞれサンプルとした場合の結果。

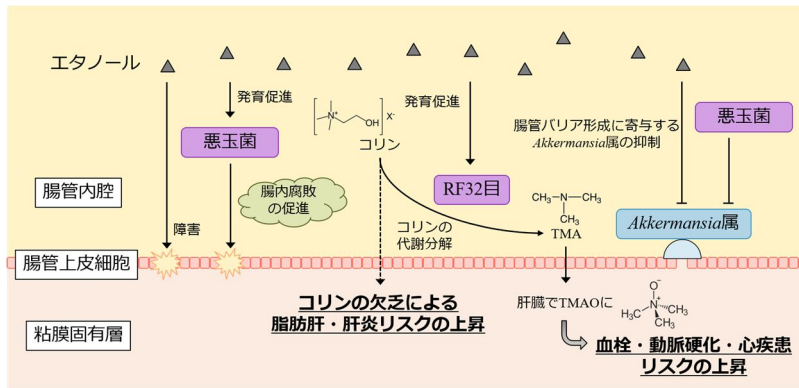


図 4. 腸管内において予測されるエタノール摂取時における腸内腐敗と炎症に起因する中毒症状の惹起メカニズムの仮説モデル。SN13T 株生菌体の摂取は中毒症状が引き起こされる方向への腸内細菌叢の変化を抑制することで効果を発揮しているものと考えられる。

< 引用文献 >

- Higashikawa F. *et al.*, (2010) *Nutrition*. **26**:367–374.
 Miyauchi E. *et al.*, (2009) *J. Dairy Sci.* **92**:2400–2408.
 Collado M.C. *et al.*, (2007) *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:7767–7770.
 Derrien M. *et al.*, (2008) *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:1646–1648.
 Everard A. *et al.*, (2013) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**:9066–9071.
 Li J. *et al.*, (2016) *Circulation*. **133**:2434–2446.
 van Passel M.W. *et al.*, (2011) *PLoS One*. **6**:e16876.
 Grander C. *et al.*, (2018) *Gut*. **67**:891–901.
 Castro-Mejía J. *et al.*, (2016) *Gastroenterol. Res. Pract.* **2016**:4953120.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- Noda M, Miyauchi R, Danshiitsoodol N, Matoba Y, Kumagai T, Sugiyama M. Expression of genes involved in bacteriocin production and self-resistance in *Lactobacillus brevis* 174A is mediated by two regulatory proteins. (2018) *Appl. Environ. Microbiol.* **84**:e02707-17.
 Noda M, Shiraga M, Kumagai T, Danshiitsoodol N, Sugiyama M. Characterization of the SN35N strain-specific exopolysaccharide encoded in the whole circular genome of a plant-derived *Lactobacillus plantarum*. (2018) *Biol. Pharm. Bull.* **41**:536–545.
 Noda M, Sugimoto S, Hayashi I, Danshiitsoodol N, Fukamachi M, Sugiyama M. A novel structure of exopolysaccharide produced by a plant-derived lactic acid bacterium *Lactobacillus paracasei* IJH-SONE68. *J. Biochem.* (2018) **164**:87–92.
 Panthavee W, Noda M, Danshiitsoodol N, Kumagai T, Sugiyama M. Characterization of exopolysaccharides produced by thermophilic lactic acid bacteria isolated from tropical fruits of Thailand. (2017) *Biol. Pharm. Bull.* **40**:621–629.

[学会発表] (計 1 9 件)

- 野田正文, 野口詩乃, Narandalai Danshiitsoodol, 東川史子, 杉山政則: 病原性細菌の毒素産生能を阻害する物質をつくる植物由来乳酸菌の探索研究, 日本食品衛生学会第 114 回 学術講演会, 広島, 2018 年 11 月 15 日~16 日
 Noda M, Sugiyama M. : Contribution to medicinal science and preventive medicine by the plant-derived lactic acid bacteria. Healthcare & Nutraceuticals seminar. Biopolis (one-north), Singapore, November 11, 2018
 野田正文, 丸山昌史, Narandalai Danshiitsoodol, 東川史子, 杉山政則: 植物乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* SN13T の摂取によるマウスのアルコール中毒症状の改善 腸内細菌叢との関連性, 第 57 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会, 米子, 2018 年 11 月 9 日~11 月 10 日
 Md Rakhimuzzaman, 野田正文, Narandalai Danshiitsoodol, 東川史子, 杉山政則: *Weissella confusa* K-28 isolated from *Senna obtusifolia* produces both ornithine and exopolysaccharide, 日本乳酸菌学会 2018 年度大会, 東京, 2018 年 7 月 13 日~14 日
 岡本知子, 野田正文, Narandalai Danshiitsoodol, 飯塚徳男, 杉山政則: 乳酸菌と生薬のコラボレーションによる新規医薬品の創生, 日本乳酸菌学会 2018 年度大会, 東京, 2018 年 7 月 13 日~14 日
 Narandalai Danshiitsoodol, 野田正文, 山野幸子, 東川史子, 杉山政則: 植物由来乳酸菌 *Lactobacillus reuteri* BM53-1 の産生する緑膿菌増殖阻害物質に関する研究, 日本乳酸菌学会 2018 年度大会, 東京, 2018 年 7 月 13 日~14 日
 野田正文, Narandalai Danshiitsoodol, 山野幸子, 東川史子, 林幾江, 深町光宏, 杉山政則: *Lactobacillus paracasei* IJH-SONE68 の産生する菌体外多糖体の炎症とアレルギーに対する機能性解析, 日本乳酸菌学会 2018 年度大会, 東京, 2018 年 7 月 13 日~14 日

野田正文, 丸山昌史, Narandalai Danshiitsoodol, 東川史子, 杉山政則: アルコールに対する植物乳酸菌 SN13T 株の保健機能性 アルコールによる肝機能傷害と腸内細菌叢の改善, 日本薬学会第 138 年会, 金沢, 2018 年 3 月 25 日~3 月 28 日

杉原奈穂, 野田正文, Narandalai Danshiitsoodol, 野口詩乃, 東川史子, 林幾江, 杉山政則: 植物乳酸菌 *Lactobacillus reuteri* BM53-1 の産生するバイオフィルム形成阻害物質の作用機構, 第 56 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会, 徳島, 2017 年 10 月 21 日~10 月 22 日

野口詩乃, 野田正文, Narandalai Danshiitsoodol, 杉原奈穂, 東川史子, 杉山政則: Quorum sensing 機構を阻害する物質のスクリーニングシステムの構築とその応用, 第 56 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会, 徳島, 2017 年 10 月 21 日~10 月 22 日

野田正文, 丸山昌史, Narandalai Danshiitsoodol, 東川史子, 杉山政則: 肝機能傷害を改善する植物乳酸菌 SN13T 株の機能解析-アルコール中毒症状と腸内細菌叢の改善-, 第 56 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会, 徳島, 2017 年 10 月 21 日~10 月 22 日

野田正文, Narandalai Danshiitsoodol, 山野幸子, 東川史子, 林幾江, 深町光宏, 杉山政則: 果実より新しく分離した植物由来乳酸菌 *Lactobacillus paracasei* の特性, 日本乳酸菌学会 2017 年度大会, 福岡, 2017 年 7 月 10 日~11 日

Narandalai Danshiitsoodol, 野田正文, 東川史子, 杉山政則: 病原細菌の毒素産生能を阻害する *Lactobacillus reuteri* BM53-1 由来物質の特性, 日本乳酸菌学会 2017 年度大会, 福岡, 2017 年 7 月 10 日~11 日

丸山昌史, 野田正文, Narandalai Danshiitsoodol, 東川史子, 杉山政則: 飲酒に及ぼす植物乳酸菌の保健機能性, 日本乳酸菌学会 2017 年度大会, 福岡, 2017 年 7 月 10 日~11 日

Md Rakhimuzzaman, 野田正文, Narandalai Danshiitsoodol, 東川史子, 杉山政則: Isolation and characterization of the lactic acid bacteria from natural sources to screen high ornithine-producing strains, 日本乳酸菌学会 2017 年度大会, 福岡, 2017 年 7 月 10 日~11 日

熊谷孝則, 安武哲也, 野田正文, 杉山政則: *Pediococcus pentosaceus* LP28 のゲノム配列特異性と菌体外多糖の特徴, 日本乳酸菌学会 2017 年度大会, 福岡, 2017 年 7 月 10 日~11 日

野田正文, 杉原奈穂, Narandalai Danshiitsoodol, 東川史子, 杉山政則: 植物乳酸菌 *Lactobacillus reuteri* BM53-1 による齧蝕原性細菌のバイオフィルム形成阻害の機構解明, 第 55 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会, 岡山, 2016 年 11 月 5 日~11 月 6 日

杉原奈穂, 野田正文, Narandalai Danshiitsoodol, 東川史子, 杉山政則: 齧蝕原性細菌のバイオフィルム形成を阻害する植物乳酸菌の作用機構とその活性物質の解明, 日本乳酸菌学会 2016 年度大会, 東京, 2016 年 7 月 9 日~10 日

水口真利江, 東川史子, 河村勇介, 野田正文, Narandalai Danshiitsoodol, 熊谷孝則, 杉山政則: 植物乳酸菌 *Pediococcus pentosaceus* LP28 の抗肥満作用, 日本乳酸菌学会 2016 年度大会, 東京, 2016 年 7 月 9 日~10 日

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 杉山 政則

ローマ字氏名: (SUGIYAMA, masanori)

所属研究機関名: 広島大学

部局名: 医歯薬保健学研究科 (薬)

職名: 共同研究講座教授

研究者番号 (8 桁): 3 0 1 0 6 8 0 1

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。