

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：33919

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K16291

研究課題名(和文)腸内細菌叢を介した精神疾患に対する栄養学的治療法の探索

研究課題名(英文)Exploration of nutritional prophylaxis against mental disorders mediated by the alteration of gut microbiota

研究代表者

長澤 麻央(Nagasawa, Mao)

名城大学・農学部・助教

研究者番号：80759564

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、精神疾患の予防に対する栄養学的アプローチの確立を目的とした。当研究室で保有する*Lactobacillus helveticus*を用いて作製した発酵乳を長期摂取させることで、抗不安様効果が確認された。発酵乳由来の水溶性画分ならびに非水溶性画分ではなく、生菌を摂取させた場合のみ抗不安様効果が確認された。また、生菌を摂取させた動物の海馬において、特異的なタンパク質スポットが検出された。以上より、本研究で用いた*Lactobacillus helveticus*にはプロバイオティクスとして働くことで抗不安様効果を発揮し、その効果は海馬のタンパク質発現動態の変化に起因する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the present study was to establish the nutritional prophylaxis against mental disorders. Chronic supplementation of fermented milk with *Lactobacillus helveticus*, which is retained in our laboratory, induced the anxiolytic-like effect in rodent model. Chronic administration of viable *Lactobacillus helveticus*, not soluble and non-soluble fractions derived from fermented milk, exerted the anxiolytic-like effect. In addition, characteristic protein spots were detected in the hippocampus of mice with supplementation of the viable *Lactobacillus helveticus*. In conclusion, *Lactobacillus Helveticus* as probiotics has anxiolytic-like effect mediated by the novel protein expression in the hippocampus.

研究分野：行動神経科学

キーワード：抗不安様効果 発酵乳 プロバイオティクス 海馬

1. 研究開始当初の背景

現代社会において、私達は日々ストレスに曝されており、これが原因となってうつ病や不安障害といった精神疾患に罹患する場合があります。これらの精神疾患の治療には薬剤が用いられるが、寛解後に投薬をやめた際の再発率が高く、根治が非常に難しい。そのため、ストレス誘導性の精神疾患に罹患しないことが重要である。つまり、ストレス誘導性の精神疾患の予防法を確立することが、私達の「生活の質」を維持あるいは向上させる上で非常に重要である。

2. 研究の目的

本研究では、精神疾患の予防に向けた栄養学的なアプローチを確立することを目的とした。近年、腸内環境とストレス感受性との関連に注目が集まっているため、プロバイオティクスの効果が期待できる発酵乳を対象とし、食品の長期摂取によって精神疾患の予防が可能であるかに焦点をあてた。

3. 研究の方法

(1) 発酵乳の摂取が情動行動へ及ぼす影響

ICR マウス(雄、4 週齢)に当研究室が保有する未同定商業用乳酸菌株を用いて作製した発酵乳を、胃ゾンデを用いて4週間に亘り強制経口摂取させた。摂取試験終了後、オープンフィールド試験を行い、発酵乳の摂取が不安様行動へ及ぼす影響を評価した。

オープンフィールド試験では縦 60 cm × 横 60 cm × 高さ 60 cm の四角い装置内における行動を観察することでげっ歯類の軽度の不安様行動を評価した(図1)。不安様行動の評価の指標には中央エリア移動距離の割合を用いた。装置底面を5マス×5マスに分け、中央の3マス×3マスを中央エリアとし、装置全体における移動距離に対する中央エリアの移動距離の割合を算出した。光のよくあたる中央エリアでは不安を感じ、壁際の光が当たりにくいエリアを好むというげっ歯類の習性を利用し、これを不安様行動の指標とした。

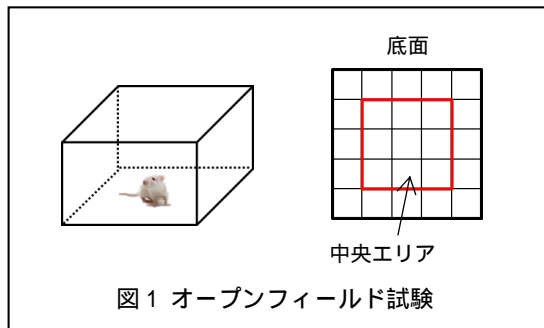


図1 オープンフィールド試験

(2) 抗不安様効果を有する発酵乳を作製する際に用いた乳酸菌の同定

(1)で摂取試験に使用した発酵乳由来の乳

酸菌をMRS培地で培養した後、適当な濃度に希釈して寒天培地に移し、そこに現れたコロニーから乳酸菌を単離した。単離した乳酸菌を再度MRS培地で培養し、得られた菌体からDNAを抽出した。得られたDNAを鋳型として、16SrRNA 遺伝子の V3 (Forward: HDA1、Reverse: HDA2) ならびに V6 から V8 領域 (Forward: F984_FW、Reverse: R1378_RV) をターゲットとしたプライマー(表1)を用いてPCR法による増幅を行った。その後、DNAシーケンサーにて塩基配列を特定し、NCBIのBLAST searchより乳酸菌の同定を行った。

表1 使用したプライマー

	5' 3'
HDA1	gactcctacgggaggcagcagt
HDA2	gtattaccgcggtgctggcac
F984_FW	aacgcgaagaaccttac
R1378_RV	cggtatgtacaaggccccggaacg

(3) 発酵乳が有する抗不安様効果に関わる機能性画分の評価

(1)で確認された抗不安様効果が、発酵乳の水溶性画分ならびに非水溶性画分のどちらに由来するものであるかを明らかにするために、水溶性画分(ホエー)あるいは非水溶性画分(カード)の摂取試験を行った。ICR マウス(雄、4 週齢)に蒸留水、脱脂乳、発酵乳由来水溶性画分あるいは発酵乳由来非水溶性画分を4週間に亘り、胃ゾンデを用いて強制経口摂取させた。摂取試験終了後、オープンフィールド試験を行い、不安様行動を観察した。摂取試験に用いた試料はあらかじめ凍結させたものを用いた。

(4) 生菌の摂取が不安様行動へ及ぼす影響

(1)で確認された抗不安様効果は、発酵乳中に含まれる生菌の摂取によるものである可能性があるため、生きた乳酸菌の摂取試験を行った。Wistar ラット(雄、4 週齢)に蒸留水あるいは生菌懸濁液(10⁸個/kg体重)を4週間に亘り、胃ゾンデを用いて経口摂取させた。摂取試験終了後、オープンフィールド試験を行い、不安様行動を観察した。ラットにおけるオープンフィールド試験では縦 90 cm × 横 90 cm × 高さ 60 cm の装置を用いた。

(5) 生菌の摂取が海馬におけるタンパク質発現動態へ及ぼす影響の検証

(4)で蒸留水あるいは生菌懸濁液を摂取させたWistar ラットの海馬を採取し、タンパク質を抽出した。得られたタンパク質画分を二次元電気泳動法にて分離し、銀染色を施すことでタンパク質を検出した。

4. 研究成果

(1) 発酵乳の摂取が情動行動へ及ぼす影響

4週間に亘り数種類の発酵乳を摂取させたところ、ある乳酸菌を用いて作製した発酵乳を摂取させた群において、オープンフィールド試験における不安様行動が緩和される結果が得られた(図2)。

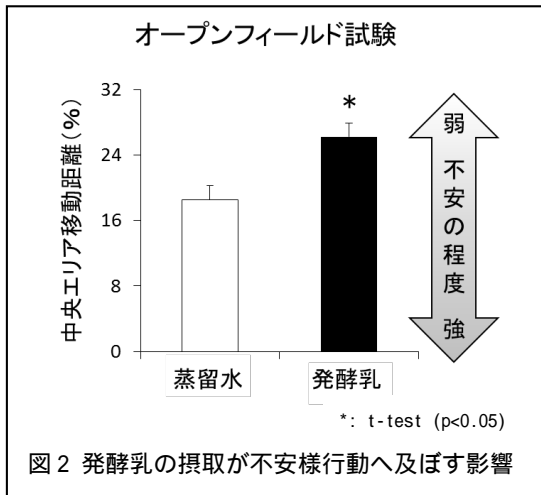


図2 発酵乳の摂取が不安様行動へ及ぼす影響

(2) 抗不安様効果を有する発酵乳を作製する際に用いた乳酸菌の同定

DNA シークエンス解析の結果から、V3 領域をターゲットとしたプライマーを用いることで、134 塩基、V6 から V8 領域をターゲットとしたプライマーを用いることで 350 塩基の配列を得た。これらの結果を用いて BLAST search を行ったところ、同定率が 99% となったため、抗不安様効果を有する発酵乳の作製に用いた未同定商業用乳酸菌株は *Lactobacillus helveticus* 種に属する株であると結論づけた。

(3) 発酵乳が有する抗不安様効果に関わる機能性画分の評価

4週間に亘り、蒸留水、脱脂乳、発酵乳由来水溶性画分あるいは発酵乳由来非水溶性画分を摂取させたが、不安様行動を緩和するような結果は得られなかった。摂取試験で使用する試料はあらかじめ -20 で凍結しものを用いた。凍結することで、発酵乳由来非水溶性画分に存在する *Lactobacillus helveticus* の生菌数を著しく減少させることができるためである。そのため、(1)で確認された抗不安様効果は、脱脂乳由来成分ならびに *Lactobacillus helveticus* が乳成分を資化する際に生成される発酵由来成分によるものではない可能性が示された。

(4) 生菌の摂取が不安様行動へ及ぼす影響

4週間に亘り、生きた *Lactobacillus helveticus* の懸濁液を摂取させた群において、オープンフィールド試験における不安様行動が緩和される結果が得られた(図3)。これまでの結果を考慮すると、*Lactobacillus helveticus* を用いて作製した発酵乳が有する抗不安様効果の発現には、生きた *Lactobacillus helveticus* を腸内へと取り込

むことが重要である可能性が示された。

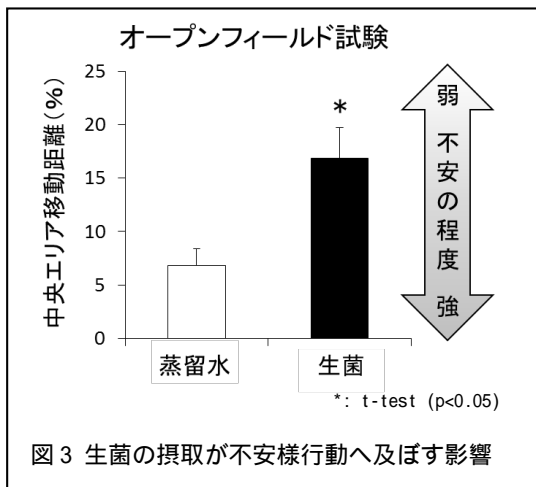


図3 生菌の摂取が不安様行動へ及ぼす影響

(5) 生菌の摂取が海馬におけるタンパク質発現動態へ及ぼす影響の検証

生きた *Lactobacillus helveticus* の懸濁液を摂取した際に誘導される抗不安様効果のメカニズムを明らかにするため、蒸留水あるいは生菌懸濁液を摂取した際の海馬におけるタンパク質発現動態の違いを比較した。生菌懸濁液を摂取させた群において、21.5 kDa の位置に発現量は少ないが多くのタンパク質の発現が確認された。また、25 kDa 付近に蒸留水投与群では確認できない特徴的なタンパク質スポットが確認された(図4中の矢印)。そのため、これらのタンパク質群が生菌懸濁液摂取による抗不安様効果の一端を担う可能性が考えられる。

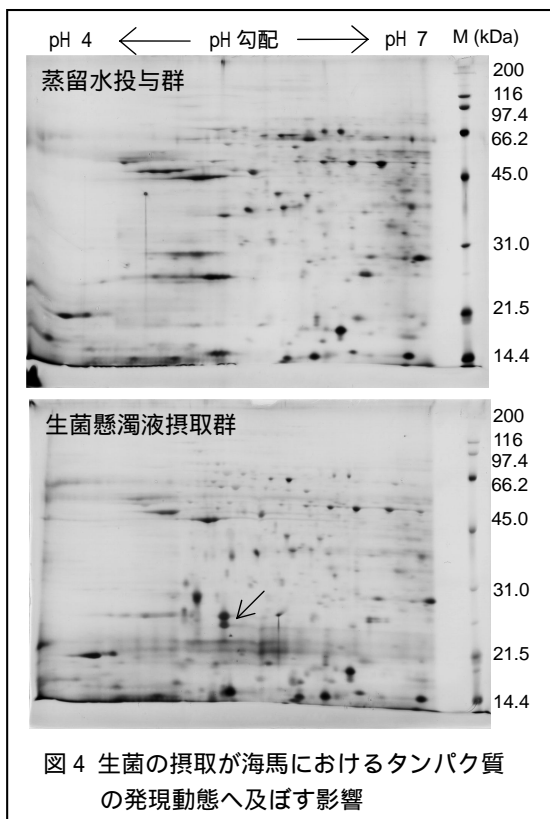


図4 生菌の摂取が海馬におけるタンパク質の発現動態へ及ぼす影響

(6) 結論

Lactobacillus helveticus を用いて作製した発酵乳を長期的に経口摂取することで、抗不安様効果が誘導される可能性が示された。この効果を得るためには生きた乳酸菌を摂取することが重要であり、それによって海馬におけるタンパク質発現動態が変化することが抗不安様効果を誘導する鍵である可能性も示された。以上より、発酵乳を摂取するといった栄養学的なアプローチから、「気持ち」の病気である不安障害を予防できる可能性が示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

丸井萌子、長澤麻央、林利哉 (2017) 乳製品を用いたストレス誘導性の脳機能障害の予防を目指して、日本畜産学会第 122 回大会、3 月 29 日、兵庫県、神戸大学(口頭発表、VII29-18)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長澤 麻央 (NAGASAWA Mao)
名城大学・農学部・助教
研究者番号：8 0 7 5 9 5 6 4

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

林 利哉 (HAYASHI Toshiya)
名城大学・農学部・教授
研究者番号：1 0 3 0 4 7 6 8

(4) 研究協力者

丸井 萌子 (MARUI Moeko)
足立 華織 (ADACHI Kaori)