

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：25301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K20120

研究課題名（和文）ヒトへの応用に向けた新規ビフィズス菌の肥満抑制効果とその作用機序の解明

研究課題名（英文）Function of novel bifidobacteria on anti-obesity

研究代表者

丸田 ひとみ (Maruta, Hitomi)

岡山県立大学・保健福祉学部・助教

研究者番号：30823231

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：肥満及び糖尿病は世界的に広がっている疾患で、解決すべき重要な課題である。近年、腸内細菌が肥満に大きく関わるとの報告がされており、腸内細菌の一つであるビフィズス菌は最終産物として酢酸を生成することが特徴である。外因的な酢酸摂取は肥満及び2型糖尿病予防効果があることが明らかとなっている。そこで本研究はビフィズス菌が産生する酢酸に着目して、新たに単離したビフィズス菌株の肥満抑制効果とその作用機序について明らかにすることを目的とした。その結果、新規ビフィズス菌を摂取させたラットでは体重増加抑制効果などを示し抗肥満効果があることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新たに単離したヒト成人の腸内にも生息するビフィズス菌種である新規ビフィズス菌株を摂取することにより、体重増加抑制や脂肪肝抑制などの肥満抑制効果があることを見出した。また、この作用機序は酢酸を摂取した際と類似しており、内因性の酢酸の効果であることが示唆された。糖尿病患者が増えている成人において、より適した新たなビフィズス菌の科学的な基礎知見となり、抗肥満効果という点で国民の健康増進に貢献できるものである。

研究成果の概要（英文）：Obesity and type 2 diabetes are one of the most serious health problem worldwide. In recent years, it has been suggested that gut microflora is a contributing factor for the leading of obesity. Bifidobacterium, one of the gut microflora, produces acetic acid as a final metabolite. It has been indicated that supplementation of acetic acid has function of anti-obesity and antidiabetic. Therefore, in this study, we investigated novel function of Bifidobacterium, isolated from infant feces, which improve energy metabolism and prevent obesity. As a result, it was suggested novel Bifidobacterium was the strain having the potential to inhibit obesity and diabetes.

研究分野：栄養学

キーワード：ビフィズス菌 抗肥満 酢酸

1. 研究開始当初の背景

IDF 糖尿病アトラス第 8 版によると成人の 11 人に 1 人が糖尿病であるとされており、肥満及び糖尿病は全世界で蔓延している病気のひとつである。近年、肥満の原因の一つに腸内細菌の関与が示唆されているが、「腸内細菌のバランスを改善することにより、宿主に有益な作用をもたらす生きた微生物」として定義されるプロバイオティクスを使った肥満予防に注目が集まっている。プロバイオティクスの代表的なものとして、乳酸菌やビフィズス菌がある。ビフィズス菌は昔からヨーグルトの製造に用いられており、ヒトへの生理作用として、腸内環境改善、アレルギー症状改善、脂質代謝の改善、感染防御作用などがあり、ヒトの健康に寄与する機能性食品素材として注目されている。ビフィズス菌はヒトを含めた動物の消化管に生息し、解糖系だけでブドウ糖を分解してエネルギーを生成する偏性嫌気性細菌のひとつであるが、ビフィズス菌が特異的に持っている乳酸発酵の代謝経路に「ビフィズム経路」がある。これは代謝過程の最終産物に乳酸の他に酢酸を生成することが特徴である。食酢の主成分である酢酸はこれまで抗肥満、抗糖尿病効果が報告されている。2 型糖尿病モデル動物に継続的に酢酸を摂取させると肥満抑制や耐糖能改善効果を示し、肝臓における脂肪合成抑制や骨格筋における脂質代謝促進効果が報告されている。さらに、食酢を BMI25-30 の男女が 12 週間継続的に食酢を摂取したところ体重、内臓脂肪、血中中性脂肪の値の減少がみられたとの報告があり、外因性の酢酸摂取が肥満抑制に効果的であることが強く示唆されている。

一方、ビフィズス菌によって腸内で生成される内因性の酢酸が O157 感染を抑止するとの報告がある。しかし、ビフィズス菌により生成された酢酸による肥満抑制効果についての報告はほとんどない。そこで、経口的にビフィズス菌を摂取することによって、体内で生成した酢酸によっても同等の抗肥満効果がみられ、その作用機序が明らかとなれば、ビフィズス菌の機能性食品素材としての新しい知見となり、さらに世界中で問題となっている肥満予防への一助となる可能性がある。

2. 研究の目的

現在、市販されているビフィズス菌ヨーグルトに使われているビフィズス菌種は乳児にのみ棲息する菌種やヒト以外の動物の腸内に棲息するビフィズス菌が用いられているものが多い。そこで、本研究ではヒト糞便より新たに単離した成人の腸内にも棲息するビフィズス菌種を使用する。さらに、そのビフィズス菌の中でも乳中での生育性と生残性に優れ、酢酸の生成能の高い菌を使用することで、生きて腸にまで届き、定着することにより肥満抑制効果が期待できるのではないかと考えた。本研究では、その新規ビフィズス菌株をもちいて、肥満抑制効果とその作用機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 新規ビフィズス菌のスクリーニング

ヒト糞便より単離した新規ビフィズス菌株の中から酢酸の生成能と乳中での生育性と生残性に優れ、成人の腸内でも棲息しているビフィズス菌種を 3 種類選抜し、それらのビフィズス菌株を用いてヨーグルトを作成し、2 型糖尿病モデル動物である OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty) ラットに投与して体重増加量を比較した。OLETF ラットは 20 週齢頃より糖尿病となる個体が見られ、25 週齢でほとんどの個体で糖尿病と診断される。

(2) ビフィズス菌調整方法及び菌数の検討

(1) では脱脂粉乳中で生育、発酵させたビフィズス菌ヨーグルトを用いたが、生存率などの問題があり、より扱いやすい方法と菌数の検討を行う。市販されているビフィズス菌ヨーグルトはヨーグルト中に粉末濃縮した種菌を加えている場合が多いため、脱脂粉乳中に種菌を加えた方法を検討した。その試料を OLETF ラットに投与した。菌数はスクリーニングで用いた投与時の生菌数の約 5 倍とさらに 5 倍量の菌数のもので検討を行った。

(3) AMPK の活性化ならびに遺伝子の発現動態解析

酢酸の抗肥満効果の作用機序として、代謝のマスタースイッチである AMPK (AMP-activated protein kinase) がリン酸化され活性化がされることにより、肝臓での脂肪合成系遺伝子の抑制や筋肉での代謝促進が引き起こされることが報告されている。そこで、(2) の結果より血中酢酸濃度が上昇していることから酢酸と同様の効果が起こっているか、ウエスタンブロット法及びリアルタイム PCR 法を用いて解析を行った。

(4) 組織学的変化の解析

脂肪を赤く染めるオイルレッド染色により肝臓での脂肪蓄積抑制レベルを観察した。また、白色脂肪細胞をヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色により脂肪滴のサイズの観察を行った。

4. 研究成果

(1) 新規ビフィズス菌摂取による体重増加抑制効果

水投与群 (Water) と比較して体重増加抑制効果がみられたビフィズス菌投与群が 1 群確認された (図 1)。以後の実験では、体重増加抑制効果のあったビフィズス菌株 (Bif-A) を用いた。

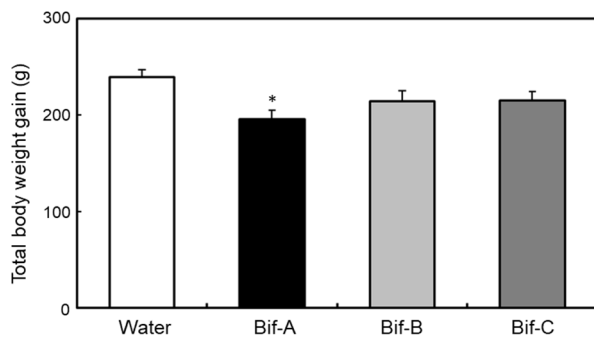


図 1. ビフィズス菌ヨーグルト投与による体重増加量の変化

(2) 新たな調整方法による体重増加抑制効果と血中酢酸濃度の解析

脱脂粉乳中に種菌を加えた方法では凍結融解による菌の死滅がほとんど見られなかった。加えて、調整の簡便さなどの理由により、この調整方法を採用した。また、その方法で調整した試料を OLETF ラットに投与したところ体重増加が水投与群と比較して、ビフィズス菌投与群で有意に抑制されていた。菌数は発酵させて調整した際に使用した試料の投与時（凍結融解後）の菌数の約 5 倍程度の群でも体重増加抑制効果が見られた。また、血中酢酸濃度もビフィズス菌投与群で有意に増加しており、発酵していない種菌のビフィズス菌を摂取した際にも内因性の酢酸が産生されていることが示唆された。

(3) AMPK の活性化ならびに脂肪合成系遺伝子の発現抑制効果

肝臓での AMPK のリン酸化レベルをウエスタンブロット法により確認したところ、水投与群と比較してビフィズス菌投与群で有意にリン酸化レベルが高くなっていた。また、肝臓での脂肪合成系遺伝子 (Fatty acid synthase (FAS)、L-type pyruvate kinase (L-PK)、acetyl-CoA carboxylase (ACC)) の発現を調べたところ水投与群と比較してビフィズス菌投与群で有意に発現が抑制されていた。AMPK はリン酸化されると活性化し、Carbohydrate-responsive element-binding protein (ChREBP) をリン酸化し不活性化する。ChREBP は FAS、L-PK、ACC などの転写因子であることから、肝臓での AMPK の活性化に伴い脂肪合成系遺伝子の発現が抑制されたことが示唆された。

(4) 肝臓での脂肪肝抑制効果と白色脂肪細胞のベージュ化

肝臓での脂肪合成系遺伝子の発現抑制が (3) の実験より確認されたため、実際にオイルレッド染色により組織学的に肝臓での脂肪蓄積抑制効果を観察した。その結果、水投与群と比較してビフィズス菌投与群では脂肪蓄積が抑制されていた。実際に ImageJ で定量的に解析したところ有意に脂肪蓄積が抑制していることが示された。また、白色脂肪細胞を HE 染色により観察したところ、ビフィズス菌投与群では脂肪滴サイズの肥大化が抑制されていた。ImageJ で脂肪滴のサイズを定量化し、解析したところ、水投与群と比較して有意に脂肪滴が小さかった。また、水群では全く観察されなかった褐色脂肪細胞がビフィズス菌投与群では所々観察され、ビフィズス菌摂取により白色脂肪細胞のベージュ化が起こることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Chiaki Isono, Hitomi Maruta, Yun Ma, Natsuki Ganeko, Tsuyoshi Miyake, Hiromi Yamashita	4. 巻 86
2. 論文標題 Seasonal variations in major components of <i>Crassostrea gigas</i> from Seto Inland Sea	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Fishery Science	6. 最初と最後の頁 1087-1099
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12562-020-01458-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hitomi Maruta and Hiromi Yamashita	4. 巻 15(9):e0239428
2. 論文標題 Acetic acid stimulates G-protein-coupled receptor GPR43 and induces intracellular calcium influx in L6 myotube cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PloS One	6. 最初と最後の頁 1-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0239428	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yun Ma, Hitomi Maruta, Baojun Sun, Chengduo Wang, Chiaki Isono, Hiromi Yamashita	4. 巻 53
2. 論文標題 Effects of long-term taurine supplementation on aging-related changes in Sprague-Dawley rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Amino acid	6. 最初と最後の頁 159-170
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00726-020-02934-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yun Ma, Hitomi Maruta, Baojun Sun, Hiromi Yamashita	4. 巻 27
2. 論文標題 Age-related changes in skeletal muscle of Sprague-Dawley rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 岡山県立大学紀要	6. 最初と最後の頁 83-92
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15009/00002367	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 丸田ひとみ、中村昇二、藤井祐介、豊川直樹、山下広美
2. 発表標題 新規ビフィズス菌株の特性と肥満抑制効果に関する研究
3. 学会等名 第74回 日本栄養・食糧学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ma Yun、Sun Baojun、丸田ひとみ、Wang Chen、山下広美
2. 発表標題 The effects of long-term taurine supplementation on SD ageing rats
3. 学会等名 第74回 日本栄養・食糧学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 丸田ひとみ、中村昇二、藤井祐介、豊川直樹、山下広美
2. 発表標題 肥満抑制効果を持つ新規ビフィズス菌株に関する研究
3. 学会等名 第53回日本栄養・食糧学会 四国・中国支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 丸田ひとみ、王承鐸、天満晴菜、馬芸、中村昇二、藤井祐介、豊川直樹、山下広美
2. 発表標題 ビフィズス菌発酵乳の抗肥満効果
3. 学会等名 第73回 日本栄養・食糧学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 丸田ひとみ
2. 発表標題 酢酸の骨格筋における生理機能
3. 学会等名 第77回岡山動物研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 丸田ひとみ、中村昇二、藤井祐介、豊川直樹、山下広美
2. 発表標題 新規ビフィズス菌株の肥満抑制効果
3. 学会等名 第52回 日本栄養食糧学会 中国四国支部
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hitomi Maruta, Chengduo Wang, Haruna Tenma, Yun Ma, Syoji Nakamura, Yusuke Fujii, Naoki Toyokawa and Hiromi Yamashita
2. 発表標題 Effect of Bifidobacterium fermented milk on anti-obesity
3. 学会等名 ICoFF2019/ISNFF2019/ICPH2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 丸田ひとみ、中村昇二、藤井祐介、豊川直樹、山下広美
2. 発表標題 新規ビフィズス菌株の肥満抑制効果
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------