

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05921

研究課題名(和文) 熱殺菌した乳酸菌による排便促進効果の検証と腸管セロトニン産生亢進機序の解明

研究課題名(英文) The mechanisms whereby heat-killed lactic acid bacteria up-regulates gut-derived serotonin synthesis and promotes defecation

研究代表者

原 崇 (Hara, Takashi)

新潟大学・自然科学系・准教授

研究者番号：20323959

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：熱殺菌乳酸菌の便秘改善効果において、腸管のセロトニン(5-HT)が寄与することを実証した。p-chlorophenylalanineにより腸管5-HT産生を遮断したマウスでは腸管における5-HT陽性細胞が減少し、腸管通過時間が顕著に延長した。これらは熱殺菌した*Lactobacillus casei* subsp. *casei* 327 (Lc327)の摂取により回復した。また、熱殺菌Lc327は便秘モデルマウスの便秘を改善し、5-HT陽性細胞増加、TPH1発現増大、亢進したSERTおよびiNOSの低減、減少した酪酸レベルおよびカハール介在細胞の回復がみられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳酸菌は便秘改善効果を示すことがよく知られているが、その作用機構はよくわかっていない。本研究において、乳酸菌死菌体の便秘改善効果に腸管5-HTが関与することを腸管5-HT産生を遮断したマウスで実証した。乳酸菌死菌体は便秘モデルマウスに対しても便秘改善作用を示し、大腸における5-HT陽性細胞の増加、5-HT再取り込みトランスポーターの抑制など、5-HTの働きが関わる証拠が得られると同時に腸管グリア細胞やカハール介在細胞など、腸運動の制御に重要な役割を果たす細胞に影響を及ぼす可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated the contribution of intestinal serotonin (5-HT) in improving bowel movement by ingesting heat-killed lactic acid bacteria. Mice received p-chlorophenylalanine to block intestinal 5-HT production showed reduced 5-HT positive cells in the intestinal tract and prolonged intestinal transit time, these changes were restored by ingestion of heat-killed *Lactobacillus casei* subsp. *casei* 327 (Lc327). Heat-killed Lc327 also improved bowel movements in a mouse model of constipation, with increased 5-HT positive cells, increased TPH1 expression, reduced SERT and iNOS expression, increased butyrate levels and an increase in the number of interstitial cells of Cajal in the intestinal tract.

研究分野：食品機能学

キーワード：乳酸菌 排便促進 セロトニン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

乳酸菌は便秘改善効果を示すことがよく知られているが、その作用機構は未解明である。従来より、乳酸菌の働きはその生菌に重点が置かれてきたが、摂取した乳酸菌が腸管に定着して十分に機能する確証は得られていない。一方、乳酸菌は死菌であっても便秘改善効果を示す報告が散見される。研究代表者は、ヒトに対する排便促進効果が認められた乳酸菌 *Lactobacillus casei* subsp. *casei* 327 (Lc327) の死菌体を経口投与したマウスにおいて排便量が増大し、腸管通過時間が短縮される現象を確認した。さらに、熱殺菌 Lc327 を経口投与したマウスでは便水分量や排便量の増加が観察され、大腸組織におけるセロトニン(5-HT)の存在量が増大していた(J. Funct. Foods, 47, 585-589, 2018)。腸管において5-HTは腸管上皮の腸クロム親和性細胞(EC細胞)により産生され、分泌された5-HTは腸管神経細胞の5-HT受容体に作用して腸の蠕動運動を促す。過剰な5-HTの作用は、下痢や腹痛を伴う過敏性腸症候群につながる。また、5-HT受容体の作動薬や阻害薬は、便秘薬や下痢止め剤となっている。一方、乳酸菌の便秘改善効果における腸管5-HTの関与について、未だ検討例が少なく、不明確である。

2. 研究の目的

死菌の乳酸菌が腸運動を促し便秘症状を改善することを実証し、腸管における5-HTの働きに重点を置きつつ、その作用機序の解明に取り組む。この目的で、ヒトに対する便秘改善効果を示すと同時にマウス大腸における5-HTの産生を亢進させることが確認されている乳酸菌 Lc327を活用し、腸管5-HT産生を遮断したマウスと便秘モデルマウスに対する便秘改善作用について検討した。

3. 研究の方法

熱殺菌 Lc327 が便秘に及ぼす影響について、腸管5-HT産生を遮断したマウスと便秘モデルマウスを用いて検討した。Lc327は、熱殺菌乾燥粉末(1×10¹² CFU/g相当)を0.2%含む市販飼料(MF, オリエンタル酵母(株))を自由摂取させることによりBALB/cマウス(、8週齢)に混餌投与した。腸管5-HT産生の遮断は、熱殺菌 Lc327 を14日間自由摂取させると同時に、セロトニン合成阻害剤 p-chlorophenylalanine (PCPA)(100 mg/kg)をゾンデを用いて毎日1回胃内投与することにより実施した。便秘モデルマウスは、熱殺菌 Lc327 を14日間自由摂取後、飼育15~17日目の期間(3日間)にロペラミド(0.3 mg/kg)をゾンデを用いて毎日1回胃内投与し、便秘を誘発させた。定期的に排便量、糞便のペレットサイズと水分含量を測定し、カルミン(赤色色素)を胃内投与して消化管通過時間を評価した。エンドポイントにおいて腸管組織を採取し、免疫組織染色法、ウエスタンブロット法、ELISA法による解析を実施した。また、腸管内容物中の短鎖脂肪酸をガスクロマトグラフィー分析により調べた。

4. 研究成果

(1) PCPA投与マウスの便秘に及ぼす熱殺菌 Lc327の影響

PCPAを14日間経口投与すると、糞便ペレットのサイズ、糞便重量および便水分量が減少する傾向がみられ、糞便の腸管通過時間が顕著に延長した。腸管組織のパラフィン切片を作製し、抗5-HT抗体を用いた免疫組織染色を実施した結果、空腸、回腸および大腸における5-HT陽性細胞の有意な減少が確認された。経口投与したPCPAは腸管における5-HT産生を阻害し、腸管5-HTレベル低下が腸運動の減弱につながったと推察される。ウエスタンブロット解析の結果、空腸、回腸および大腸における5-HT合成酵素 Tryptophan hydroxylase 1 (TPH1)の発現量はPCPA投与群と対照群との間に差はみられなかった。一方、熱殺菌 Lc327 摂取により、PCPAによる腸管通過時間延長は有意に短縮された。また、空腸、回腸および大腸におけるPCPAによる5-HT陽性細胞の減少は、熱殺菌 Lc327 摂取により顕著に回復し、対照群マウスと同レベルを示した。熱殺菌 Lc327 を摂取したマウスでは、PCPA投与の有無に関係なく、空腸、回腸および大腸におけるTPH1発現量の増大が確認された。腸管5-HTの主な産生源は、TPH1を発現するEC細胞である。これらの結果から、熱殺菌 Lc327 の便秘改善効果は、EC細胞の5-HT産生促進を介してもたらされることが推察される。マウス盲腸内容物に存在する短鎖脂肪酸を定量した結果、酪酸がPCPA投与により顕著に減少していた。この結果は、5-HTレベル低下が腸内細菌叢からの酪酸産生の減少につながる可能性を示唆する。一方、PCPA投与と同時に熱殺菌 Lc327 を摂取すると、盲腸内容物中の酪酸は対照群マウスと同等のレベルに回復していた。腸内細菌叢から生じる酪酸はEC細胞の5-HT産生を促す働きが注目されているが、本研究結果から、熱殺菌 Lc327 により産生誘導された5-HTが腸内細菌叢の酪酸の産生を促した可能性も否定できない。

(2) ロペラミド誘発便秘モデルマウスの便秘に及ぼす熱殺菌 Lc327の影響

止瀉作用を示すロペラミドを投与したマウスでは、糞便重量の減少や糞便ペレットの小型化や腸管通過時間の延長など、便秘の兆候が確認された。このロペラミド誘発便秘モデルマウスに

対し、熱殺菌 Lc327 が便通に及ぼす影響について検討した。ロペラミドによる糞便重量減少、糞便ペレット小型化および腸管通過時間延長は、熱殺菌 Lc327 の摂取により対照群マウスのそれらと同等のレベルにまで回復した。アルシアンブルー染色の結果、ロペラミド誘発便秘モデルマウスでは大腸上皮組織におけるムチンの減少がみられ、この減少は熱殺菌 Lc327 の摂取により有意に回復していた。大腸における 5-HT 陽性細胞は、ロペラミド投与による有意な増減は認められなかったが、熱殺菌 Lc327 摂取により有意な増加が確認された。同様に、大腸における THP1 の発現量は、ロペラミド投与による有意な増減は認められなかったが、熱殺菌 Lc327 摂取により有意な増加が確認された。熱殺菌 Lc327 は実際に便秘モデルマウスの便秘症状を改善し、この効果には腸管に存在する EC 細胞の 5-HT 産生亢進が寄与することが推察される。腸管では TPH1 を発現する EC 細胞が 5-HT の主な産生源であるが、腸管壁内の神経細胞も 5-HT を産生し、神経細胞では TPH2 が 5-HT 合成律速酵素となっている。本研究において、ロペラミド投与や熱殺菌 Lc327 摂取による TPH2 発現量の有意な変化は認められなかった。一方、盲腸内容物中における短鎖脂肪酸を調べた結果、ロペラミド誘発便秘モデルマウスでは酪酸の存在量が対照群マウスのその半以下に減少していることが確認された。酪酸は EC 細胞の 5-HT 産生を促すことを考慮すると、腸管内の酪酸の減少が 5-HT レベル低下、延いては腸運動低下の一因となっている可能性が窺える。このロペラミドによる酪酸の減少は、熱殺菌 Lc327 を摂取すると有意に回復していた。熱殺菌 Lc327 による腸管 5-HT レベルの亢進は、腸内細菌叢の酪酸産生促進との関連性が窺える。

分泌された 5-HT は 5-HT 再取り込みトランスポーター (SERT) により回収され、5-HT の働きが終息することが知られている。また、SERT 発現が亢進した腸管局所では 5-HT 濃度が低下し、腸管蠕動運動の低下、便秘につながることを報告されている。本研究において、ロペラミド誘発便秘モデルマウスの大腸組織では SERT の発現量の顕著な増大が確認され、便秘状態と 5-HT の働きが減弱する状況との関連性が浮かび上がってきた。このロペラミドによる SERT 発現量増大は、熱殺菌 Lc327 摂取により有意に抑制されることが確認された。熱殺菌 Lc327 は、EC 細胞の 5-HT 産生を促進することに加え、SERT 発現の亢進を抑制することも、便通改善効果の作用機序の一つとなっていることが推察される。さらに、本研究において、5-HT の働きとは直接関連しないが、熱殺菌 Lc327 の便通改善効果につながる次の ~ の作用機序が見出された。

NO 産生抑制 (iNOS 発現抑制)

一酸化窒素 (NO) は平滑筋弛緩作用を有し、弛緩性便秘を引き起こす働きが疑われている。ロペラミド誘発便秘モデルマウスでは、大腸において誘導性 NO 合成酵素 (iNOS) の発現量が増大していた。ロペラミドにより iNOS が誘導され、発生した NO が便秘症状の一因となっていることが予想される。また、ロペラミド誘発便秘モデルマウスでは、大腸においてグリア細胞繊維性酸性タンパク質 (GFAP) の発現量が増大していた。GFAP はグリア細胞のマーカーであることから、ロペラミド誘発便秘モデルマウスでは腸管グリア細胞が増加または活性化しているようであり、腸管グリア細胞の iNOS により NO 産生が亢進している可能性がある。このロペラミドによる iNOS および GFAP の発現増大は、熱殺菌 Lc327 を摂取により有意に抑制されていた。熱殺菌 Lc327 は、腸管グリア細胞が iNOS を誘導して NO を産生することによる腸運動の低下を抑制する可能性がある。

カハール介在細胞の増加

腸運動の制御に重要な役割を果たす細胞として、腸管の筋層に存在するカハール介在細胞 (ICC) が知られている。ICC は腸管のペースメーカー細胞として働き、規則的な緩徐波を発生することにより平滑筋細胞の律動的な自動収縮が起こる。便秘状態では ICC が減少し、腸運動の低下につながることを報告されている。ICC のマーカーである c-kit に着目して組織免疫染色を実施した結果、ロペラミド誘発便秘モデルマウスでは、大腸の筋層周辺における ICC の減少が確認された。このロペラミドによる ICC の減少は、熱殺菌 Lc327 を摂取すると、対照群マウスの ICC 数と同等のレベルにまで有意に回復していた。熱殺菌 Lc327 による便秘症状の改善には、減少した ICC の回復が寄与する可能性がある。

炎症性サイトカインの抑制

腸運動の抑制、便秘症状に TNF- α や IL-1 β などの炎症性サイトカインの関与が指摘されている。ロペラミド誘発便秘モデルマウスでは大腸において TNF- α および IL-1 β レベルの増大が確認され、これらは熱殺菌 Lc327 を摂取により低減されていた。本研究では、ロペラミド誘発便秘モデルマウスでは大腸において IL-17 レベルの増大が見出された。さらに、この IL-17 レベル増大は、熱殺菌 Lc327 の摂取により有意に抑制され、対照群マウスのそれと同等のレベルを示した。IL-17 が腸運動に及ぼす影響は未解明であるが、IL-17 が消化管マクロファージの iNOS

を誘導して NO 産生を促すことにより平滑筋収縮を促すことが報告されている。熱殺菌 Lc327 による便秘症状の改善には、腸運動低下につながる TNF- α 、IL-1 β や IL-17 などのサイトカインの産生抑制が関わる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 河内 万奈, 原 崇, 城 斗志夫
2. 発表標題 セロトニン合成阻害剤p-chlorphenylalanineを投与したマウスの便通に及ぼす加熱殺菌乳酸菌の影響
3. 学会等名 日本食品科学工学会
4. 発表年 2022年～2023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
---------	---------