

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 15 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22500773

研究課題名(和文) プロバイオティクスを用いた小児肥満対策の検討

研究課題名(英文) Beneficial effects of probiotics for obesity in children

研究代表者

永田 智 (Nagata, Satoru)

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号：70266055

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：肥満群の便では健常児と比較してビフィズス菌の有意な減少と便中酢酸濃度の明らかな低下が認められた。肥満群は、観察期間の前半6ヶ月を食事・運動療法のみ、後半6ヶ月は乳酸菌シロタ株含有飲料を飲用させたところ、飲用1ヶ月後に有意な体重減少が得られた。また、飲用3カ月後に中性脂肪値の有意な低下、1カ月後にHDLコレステロール値の上昇傾向、飲用3カ月後に便中ビフィズス菌の有意な増加と酢酸濃度の有意な上昇が認められた。以上より、シロタ株には肥満抑制効果があることが示唆され、その効果は、シロタ株が腸内のビフィズス菌の増殖を促進して、その代謝産物である酢酸などが脂質代謝に影響している可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：We performed this open study to clarify the usefulness of *Lactobacillus casei* strain Shirota (LcS) fermented milk in the reduction of body weight and prevention of metabolic syndrome in obese children. A significant reduction of the fecal bifidobacteria and acetic acid concentration were noted in the obese children compared with the controls prior to treatment. Continuous intake of LcS fermented milk for six months contributed to a reduction of body weight and decreased serum triglyceride levels, accompanied by a significant increase in the number of fecal bifidobacteria and an increased fecal acetic acid level in the obese group in comparison with those treated with kinesitherapy and dietetic treatment during the same period. LcS may help increase the proliferation of intestinal bifidobacteria, resulting in beneficial effects on the lipid metabolism, as evidenced by the increased fecal acetic acid, one of the main products of these bacteria, in obese children.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：小児肥満 プロバイオティクス 腸内細菌叢 便中有機酸 *Lactobacillus casei* シロタ株 *Bifidobacterium* 減量効果 脂質代謝

### 1. 研究開始当初の背景

肥満は、高血圧、糖尿病、高脂血症、痛風、脳血管障害、動脈硬化症、虚血性心疾患など生活習慣病を引き起こす元凶であり、肥満をコントロールすることが、現代の日本人の健康を維持する上での急務といえる。近年の動物実験では、遺伝的に肥満のマウスでの腸内細菌叢では、*Bacteroidetes*が痩せたマウスより50%少なく、代わりに*Firmicutes*の割合が増加していることが指摘されている (Ley, R.E. et al. Proc. Natl Acad. Sci. USA 2005;102:11070-5)。ヒトにおいても、炭水化物制限食ならびに脂肪制限食で治療中の肥満成人の腸内細菌を検索したところ、*Firmicutes*の割合が低下し、*Bacteroidetes*の増加が見られたとの報告がある (Ley, R.E. et al. Nature 2006;444:1022-3)。しかし、肥満と腸内細菌叢の関係に関するこれら数少ない検討は、成人を対象としたもので、小児のデータはない。申請者は、*Bifidobacterium*がエンドトキシン血症を抑制して1型糖尿病を予防したり (Cani PD et al. Diabetologia, 2007;50:2374-83)、イソフラボンなどの産生を介して高コレステロール血症を改善させる効果がある (Choi I et al. Biofactors, 2007;29:105-12)とする動物実験の報告があることより、腸内の*Bifidobacterium*を増殖させることにより、肥満やその合併症を改善させる効果があるか否かを証明したいと考えるに至った。

### 2. 研究の目的

申請者は、上記の仮説を証明するために、まず、肥満児と健常児の腸内フローラを比較して、肥満児では、*Bifidobacterium*が健常児に比較して減少していることを示し、腸内の*Bifidobacterium*を増殖させる効果が示唆されている*Lactobacillus casei* シロタ株 (以下、シロタ株と略) 含有飲料を肥満児に飲用させ、体重減量効果や高脂血症、血糖低下作用があるか否かを明らかにしたいと考えた。

### 3. 研究の方法

- (1) 検討：以下の2検討を前方視的に行った。  
肥満児と健常小児の腸内細菌叢の比較研究  
肥満児における*Lactobacillus casei* シロタ株含有飲料飲用による肥満、高脂血症、および耐糖能の改善効果
- (2) 研究予定期間  
平成23年4月1日～26年3月31日
- (3) 試験品：市販品のヤクルト400®(1本中シロタ株400億個含有)
- (4) 被験者および試験群  
申請者らの小児科外来を受診した小児のうち、当該検討参加の意思を文書で確認した肥満度20%以上の肥満児と肥満のない健常児。

- (5) 被験者の人権および安全性・不利益に対する配慮

人権への配慮 (プライバシーの保護)

試験実施に係る素データ類および同意書等を取扱う際は、被験者の秘密保護に十分配慮した。病院外に症例報告書等を提出する必要性が生じた場合は、被験者識別コード等を用いた。試験結果を公表する際は、被験者を特定できる情報を含まないようにした。試験の目的以外に、試験で得られた被験者のデータを使用していないよう徹底した。被験者の検体等を病院外に出して測定を行う必要性が生じた場合は、匿名とした。検体は順天堂大学医学部附属静岡病院 小児科所有の冷凍庫にて冷凍保存し、試験終了後は研究代表者の指示の下に速やかに廃棄した。被験者に関するデータの閲覧は、研究代表者および共同研究者に限るものとした。

GCP及びヘルシンキ宣言への対応

本試験はGCPを準用するものとした。また、ヘルシンキ宣言(2000年改訂)を遵守して実施した。

### (6) 試験デザイン

検討：肥満群、健常群の初診時の腸内細菌叢および便中脂肪酸濃度を、次項に示す方法により測定し、2群間で比較検討した。

検討：肥満群は、観察期間の前半6カ月を食事・運動療法のみ、後半6カ月はシロタ株含有飲料を1日1本飲用させ、飲用前、1カ月後、3カ月後、6カ月後の体重、末梢血・血清中性脂肪値、HDLコレステロール値、空腹時血糖値および、飲用前、3カ月後、6カ月後の腸内細菌叢および便中脂肪酸濃度を解析した。

### (7) 食事療法

目標総エネルギー量は(年齢×100)+1,000Kcalの簡易式で計算し、男児2,700kcal、女児2,250kcalをそれぞれ上限とし、カロリー比は炭水化物：タンパク質：脂質=50～55：15～20：30(%)とした。

### (8) 運動療法

摂取総カロリーの10%程度を消費する運動を最低1日おきに行うよう指導した。

### (9) 腸内細菌叢解析

糞便採取済みのチューブを秤量後、9倍量のRNAlater (Ambion)を添加して糞便懸濁液を調製後、糞便懸濁液(200 μl)に1 mlのリン酸緩衝液(PBS)を添加して、5,000×gにて10分間遠心分離した。上清を除去して得られた沈査より抽出された核酸を1 mlのnuclease-free water (Ambion)に溶解した。糞便より抽出されたRNA、および標準菌株RNAを鋳型として、各菌群に特異的なプライマーにより定量的RT-PCRを行った。4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)カウントして菌数調整した標準菌株由来のRNAを用いて作成した標準曲線をもとに、得られ

たCT値から糞便 1g当りの菌数を算出した。

(10)便中有機酸解析

pH：IQ 150 pH/Thermometer (IQ Scientific Instrument)を用いて糞便内に直接挿入することによって糞便中の pH を測定した。糞便採取用チューブ(有機酸分析用)内の糞便を秤量後、4倍量の 0.15 M Perchloric acid を添加して 4、12時間静置後、4、15,000回転、10分間遠心分離して分取した上清を、0.45 μm メンブレンフィルターで濾過滅菌した。この試料の有機酸濃度を、Waters HPLC システム (Waters 432 Conductive Detector; Waters, USA)で Shodex Rspack KC-811 カラム (昭和電工)を用いて測定した。なお 1~20 mM のコハク酸、乳酸、蟻酸、酢酸、プロピオン酸、酪酸、イソ-吉草酸、吉草酸の標準混合液を作製し、得られた標準曲線をもとに有機酸濃度を算出した。

(11) 統計解析

2群間の解析結果の比較には、ノンパラメトリック検定の Student t 検定(体重、血清中性脂肪値、HDL コレステロール値、血糖値および糞便 pH)およびノンパラメトリック検定のウィルコクソンの符号付順位和検定(糞便中の細菌叢および有機酸濃度)を用いた。飲用前後の比較には、パラメトリック検定の paired t 検定(体重、血清中性脂肪値、HDL コレステロール値、血糖値および糞便 pH)およびノンパラメトリック検定のウィルコクソンの符号順位検定 signed-rank test (糞便中の細菌叢および有機酸濃度)を用いた。統計ソフトには SPSS Ver. 11 (SPSS)を使用し、いずれの検定においても有意水準は両側検定で 5%とした。

4. 研究成果

研究代表者の所属施設の小児科外来において、肥満小児 (n=9; 平均年齢10歳9ヶ月; 男:女=8:1; 平均肥満度28.1%)と肥満のない健常児 (n=22; 平均年齢8歳6ヶ月; 男:女=13:9; 平均肥満度-3.6%)が試験登録された。対象群の初診時の腸内細菌叢の分析では、肥満群の便では *Bifidobacterium* の有意な減少 (肥満群  $7.5 \pm 0.5$  Vs 健常群  $9.8 \pm 0.5$  Log<sub>10</sub>cells/g; p<0.01) が認められると共に、*Bacteroides fragilis* group、*Atopobium cluster*、*L. gasseri* subgroup のそれぞれ有意な減少が認められた (表 1)。便中有機酸分析においては、肥満群で酢酸濃度の明らかな低下 (肥満群  $45.1 \pm 16.9$  vs 健常群  $57.9 \pm 17.6$  μmol/g; p<0.05) と共に、総有機酸、プロピオン酸、酪酸濃度の有意な低下が認められた (表1)。

表1. 肥満群、対照群のベースデータ (初診時)

	肥満群	対照群	P value
n (人)	9	22	
男女比	8:1	13:9	
年齢(歳)	10歳9カ月 (4歳5カ 月) <sup>a</sup>	8歳6カ月 (2歳11カ 月)	ns
肥満度(%)	28.2 (15.4)	-3.6 (6.8)	p<0.01
腸内細菌叢解析 <sup>b</sup>			
<i>Bacteroides fragilis</i> group	8.1 (1.5)	9.8 (0.4)	p<0.05
<i>Bifidobacterium</i>	7.5 (1.7)	9.8 (0.5)	p<0.01
<i>Atopobium cluster</i>	7.1 (1.3)	9.0 (0.7)	p<0.05
<i>L. gasseri</i> subgroup	4.4 (1.8)	5.0 (1.4)	p<0.05
便中有機酸解析 <sup>c</sup>			
総有機酸	66.5 (29.8)	85.5 (23.3)	ns
乳酸	2.0 (4.3)	2.4 (1.4)	ns
酢酸	45.1 (16.9)	57.9 (17.6)	p<0.05
プロピオン酸	9.7 (5.1)	14.4 (4.1)	ns
酪酸	5.7 (4.5)	8.4 (2.7)	ns
pH	6.8 (0.5)	6.6 (0.6)	ns

a: ()の数字は標準偏差; b:単位 Log<sub>10</sub> cells/g; c: 単位 μmol/g

肥満群は、観察期間の前半6ヶ月を食事・運動療法のみ、後半6ヶ月はシロタ株含有飲料 (1本中シロタ株400億個含有) を1日1本飲用させ、体重、末梢血・血清中性脂肪値、HDLコレステロール値、空腹時血糖値をモニタリングしたところ、シロタ株含有飲料飲用1ヶ月後に食事・運動療法のみ1ヶ月後のものに比較して有意な体重減少が得られた (図1: 食事・運動療法のみ  $-0.25 \pm 1.8\%$  vs シロタ株含有飲料飲用  $-3.2 \pm 1.6\%$ ; p<0.05%)

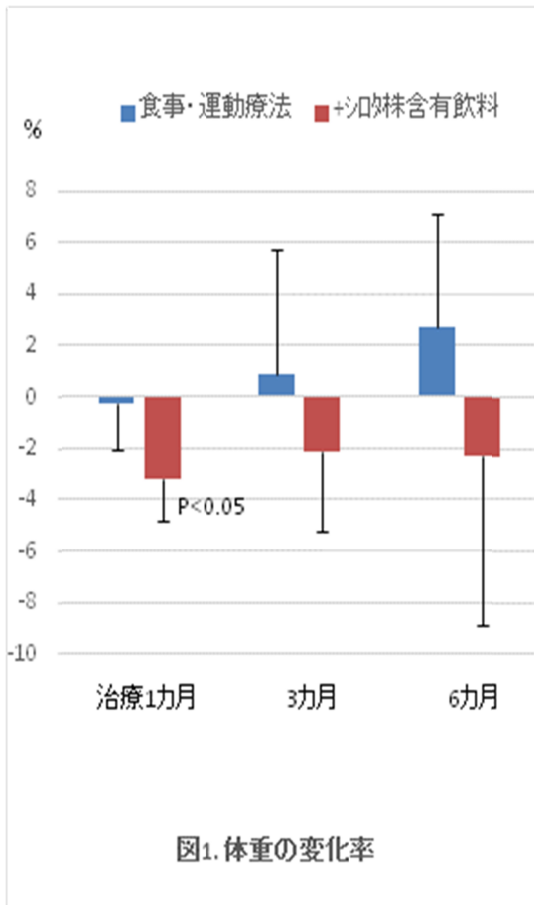


図1. 体重の変化率

また、同飲用3ヶ月後に中性脂肪値は食事・運動療法3ヶ月後のものに比して有意な低下 (図2: 食事・運動療法+22.5 ± 27.1% vs シロタ株含有飲料飲用-59.6 ± 4.4%; p<0.01%) を認めた。

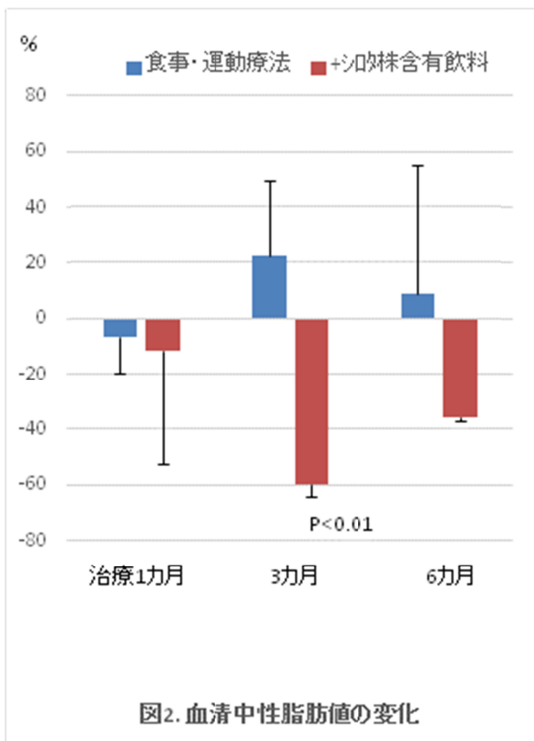


図2. 血清中性脂肪値の変化

さらにHDLコレステロール値は、同飲用1ヶ月後に食事・運動療法1ヶ月後に比較して上昇傾向 (図3: 食事・運動療法+0.55 ± 1.1% vs シロタ株含有飲料飲用13.2 ± 17.5%; p<0.1%) であった。

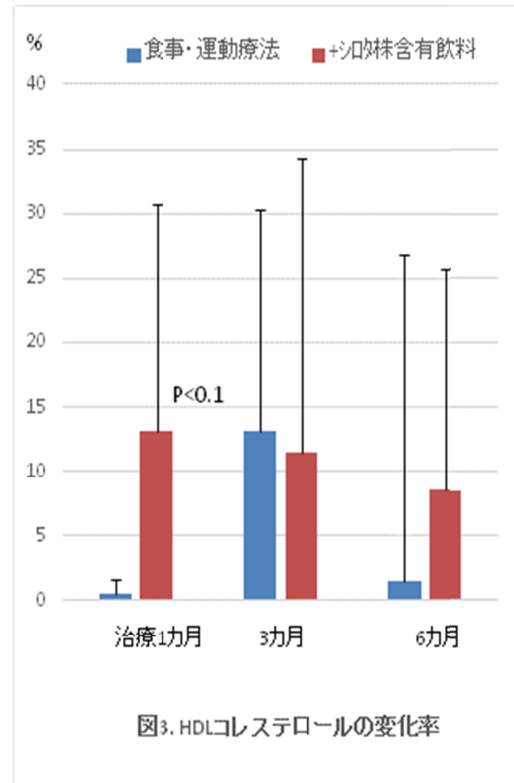


図3. HDLコレステロールの変化率

空腹時血糖は、シロタ株含有飲料飲用と食事・運動療法同期間との比較において有意差は認められなかった (図4)

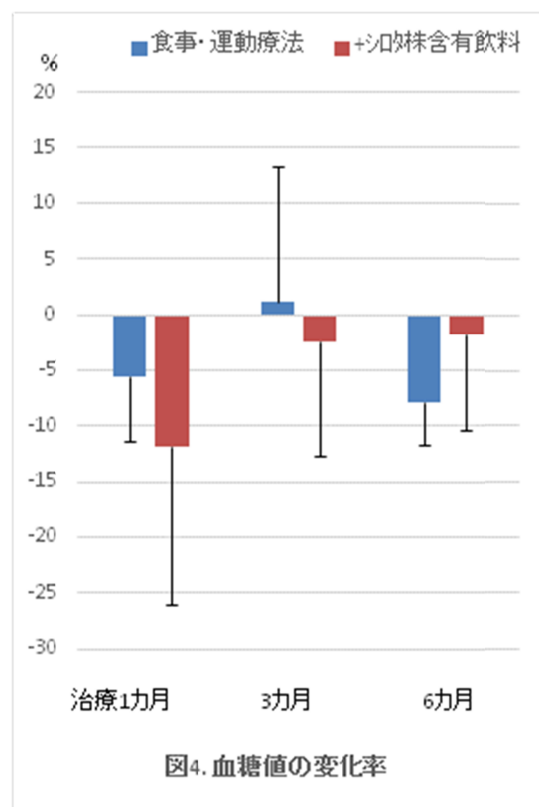


図4. 血糖値の変化率

腸内細菌叢分析においては、シロタ株含有飲料飲用3カ月後に飲用前に比較して

*Bifidobacterium*の有意な増加が認められた(表2: シロタ株含有飲料飲用前 $7.5 \pm 0.5$  vs 飲用後  $9.0 \pm 1.1$  Log<sub>10</sub>cells/g;  $p < 0.05$ )。便中 *Bacteroides fragilis* group、*Atopobium cluster*、*L. gasseri* subgroup、*L. casei* subgroup の菌数については、シロタ株含有飲料飲用前後で有意な変化は認められなかった。便中有機酸分析では、酢酸濃度の明らかな上昇(表2: 飲用前  $45.1 \pm 16.9$  vs 飲用後  $66.8 \pm 5.0$   $\mu$  mol/g;  $p < 0.05$ )が認められた。また同飲用により便pHの低下傾向も伴っていた。

表2. 肥満群の*Lactobacillus casei* シロタ株含有飲料飲用後の腸内細菌叢・便中有機酸分析結果の推移

	飲用前	飲用3カ 月	飲用6 カ月
腸内細菌叢解析 <sup>b</sup>			
<i>Bacteroides fragilis</i> group	8. 1(1.5) <sup>a</sup>	8.7 (1.2)	6.9 (0.9)
<i>Bifidobacterium</i>	7.5 (1.7)	9.0 (1.1) <sup>d</sup>	7.0 (.04)
<i>Atopobium cluster</i>	7.1 (1.3)	7.7 (1.1)	7.1 (1.0)
<i>L. gasseri</i> subgroup	4.4 (1.8)	4.1 (1.6)	3.8 (0.9)
<i>L. casei</i> subgroup	4.0 (1.2)	4.3 (1.3)	3.9 (0.9)
便中有機酸解析 <sup>c</sup>			
総有機酸	66.5 (29.8)	92.9 (13.6)	77.0 (38.5)
乳酸	2.0 (4.3)	0.24 (0.06)	3.6 (4.8)
酢酸	45.1 (16.9)	66.8 (4.96) <sup>d</sup>	46.7 (26.4)
プロピオン酸	9.7 (5.1)	14.1(8.0)	13.5 (13.1)
酪酸	5.7 (4.5)	9.2 (2.5)	12.1 (7.6)
pH	6.8 (0.5)	6.4 (0.2)	6.5 (6.9)

a: 0の数字は標準偏差; b:単位 Log<sub>10</sub> cells/g ; c:  $\mu$  mol/g ; d:  $p < 0.05$

以上より、プロバイオティクスは肥満抑制に有効であることが示唆され、その機序は、外来性に投与されたシロタ株の直接効果というより、腸内の*Bifidobacterium*を増殖させ、その代謝産物である酢酸などの有機酸の産生を促進することによる宿主の脂質代謝などに及ぼす影響が関与している可能性が考えられた。

肥満の治療においては、食事・運動療法により肥満が解消されても、その後にリバウンドがあり一時的な効果で終わることが最大の問題である。シロタ株の習慣的な使用により、*Bifidobacterium*主体の腸内細菌叢が維持され、腸内環境が適正に安定されれば、ストレスフルな運動・治療食後も肥満への逆戻りに歯止めがかかり、さらに将来的な生活習慣病への移行をも阻止できる可能性も期待できることから、意義深いものと思われる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計11件)

千葉幸英、永田 智：小児とプロバイオティクス 小児科 査読無 55 巻 2014, 183-194

Tsuji H, Oozeer R, Matsuda K, Matsuki T, Ohta T, Nomoto K, Tanaka R, Kawashima M, Kawashima K, Nagata S, Yamashiro Y. Molecular monitoring of the development of intestinal microbiota in Japanese infants. Beneficial Microbes 査読有 3:2012, 113-25  
Matsuda K, Tsuji H, Asahara T, Takahashi T, Kubota H, Nagata S, Yamashiro Y, Nomoto K. Sensitive quantification of *Clostridium difficile* cells by reverse transcription-quantitative PCR targeting rRNA molecules. Appl Environ Microb 査読有 78:2012, 5111-8

Rahman MS, Nagata S, Matsuda K, Tsuji H, Ogata K, Ozaki S, Kawashima K, Nomoto K, Yamashiro Y. Molecular biological studies of the origin of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* in neonatal feces. International Journal of Probiotics & Prebiotics 査読有 7: 2012, 91-98

永田 智：食品(サプリメント)の効用と有害事象 プロバイオティクスと QOL 順天堂医学 査読無 57 巻 2011, 115-124

Shida K, Nanno M, Nagata S. Flexible cytokine production by macrophages and T cells in response to probiotic bacteria: a possible mechanism by which probiotics exert multifunctional immune regulatory activities. Gut Microbes. 査読有 2: 2011,

109-14

Bian L, Nagata S, Asahara T, Rahman MS, Ohta T, Yuki N, Wang C, Takano K, Daibo M, Yamashiro Y, Nomoto K. Effects of continuous intake of Lactobacillus casei strain Shirota-fermented milk containing on risk management of long-term inpatients at health service facilities for the elderly. International Journal of Probiotics & Prebiotics 査読有 6: 2011, 123-132

Nagata S, Asahara T, Ohta T, Yamada T, Kondo S, Bian L, Wang C, Yamashiro Y, Nomoto K. Effect of the continuous intake of probiotic fermented milk containing Lactobacillus casei strain Shirota on fever in a mass outbreak of norovirus gastroenteritis and the fecal microflora in a health service facility for the aged. Brit J Nutr 査読有 106:2011. 549-56

Chiba Y, Shida K, Nagata S, Wada M, Bian L, Wang C, Shimizu T, Yamashiro Y, Kiyoshima-Shibata J, Nanno M, Nomoto K. Well-controlled proinflammatory cytokine responses of Peyer's patch cells to probiotic Lactobacillus casei. Immunology 査読有 130:2010, 352-62

Lkhagvadorj E, Wada M, Bian L, Wang C, Chiba Y, Nagata S, Shimizu T, Yamashiro Y, Takahashi A, Asahara T, Nomoto K. Anti-infectious activity of synbiotics in a novel mouse model of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus infection. Microbiol Immunol 査読有 54:2010, 265-75  
Yamashiro Y, Nagata S. Beneficial microbes for premature infants, and children with malignancy undergoing chemotherapy. Beneficial Microbes 査読有 1:2010, 357-365

〔学会発表〕(計 4 件)

Nagata S: Effects of continuous intake of Lactobacillus casei Shirota for controlling infections and fetal microbiota in facilities for the elderly. Probiotics Microbiome and the Gut Function. New Delhi, India, 2014 (招待)

Nagata S: Probiotics-The true lies and the incredible truth? 2013 Joint Meeting of the 13<sup>th</sup> Asian Pan Pacific Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition and 40<sup>th</sup> Japanese Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition, Tokyo, 2013(招待)

永田 智: 高齢者施設入所者に対するプロバイオティクスの感染予防およびQOL 向上 第 60 回日本栄養改善学会神戸, 2013(招待)

永田 智, 朝原崇, 王崇新: 高齢者施設における感染症への乳酸菌飲料の有効性検討試験 第 68 回日本感染症学会 長崎, 2012

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

プロバイオティクスを用いた小児肥満対策の検討

<https://upload.umin.ac.jp/cgi-open-bin/ctr/ctr.cgi?function=brows&action=brows&type=summary&recptno=R000008198&language=J>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

永田 智 (NAGATA Satoru)

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号: 70266055

(2)研究分担者

清水 俊明 (SHIMIZU Toshiaki)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号: 30260889

大塚 宜一 (OHTSUKA Yoshikazu)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号: 90338335