

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07450

研究課題名(和文) フィトエストロゲン代謝菌の機能性に及ぼす植物性乳酸菌の影響の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the effects of lactic acid bacteria derived from plant on functionality of phytoestrogen-metabolizing bacteria

研究代表者

田村 基 (TAMURA, Motoi)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品研究部門・主席研究員

研究者番号：70353943

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)：植物由来乳酸菌が、エコーン産生菌のエコーン産生に及ぼす影響を *in vitro* で検討した結果、程度の差があるものの、植物由来乳酸菌にエコーン産生促進効果が有ることを見出した。マウスに、イソフラボン添加食を給餌し、乳酸菌 JCM1149 もしくは乳酸菌 JCM1149+エコーン産生菌 TM-30 を経口投与して、生理食塩水経口投与群(対照群)とで尿中イソフラボン類濃度を比較検討したところ、尿中エコーン濃度は、対照群や乳酸菌+エコーン産生菌投与群よりも乳酸菌投与群で高い結果となった。本 *in vitro* のエコーン産生性評価試験は、エコーン産生向上成分を評価する際のツールの一つとして利用し得ると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We estimated the effects of lactic acid bacteria derived from plant on equol production by equol-producing bacteria *in vitro*. We found lactic acid bacteria including *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* JCM1149 had promoting effects of equol production by equol-producing bacteria. The mice fed the isoflavone-containing diet and orally administrated physiological saline, strain JCM1149 or strain JCM1149+equol-producing bacteria. Urinary equol concentration was the highest in the mice administrated strain JCM1149. Our results suggested that our method of *in vitro* anaerobic incubation of lactic acid bacteria with equol-producing bacteria would be one way to predict *in vivo* promoting effects of equol production by equol-producing bacteria regarding lactic acid bacteria resistant to digestive juices.

研究分野：腸内細菌学

キーワード：植物由来乳酸菌 エコーン エコーン産生菌 ダイゼイン マウス 脂質代謝

1. 研究開始当初の背景

フィトエストロゲンとは、女性ホルモンのように機能する外因性エストロゲンのことであり、植物エストロゲンとも呼ばれる。代表的なフィトエストロゲンには、大豆イソフラボンがある。エコールは、消化管内で腸内菌叢の作用により、大豆イソフラボンの一つダイゼインから、ジヒドロダイゼインを経由し産生される機能性成分であるが、エコール産生能には、個人差が大きい。

植物由来乳酸菌は、消化管内で生存可能な菌も存在し、その経口摂取は、腸内菌叢に影響を及ぼすものも存在すると考えられる。しかし、植物由来乳酸菌のエコール産生菌に及ぼす影響は解明されていない。フィトエストロゲン代謝菌の機能性に及ぼす植物由来乳酸菌の影響を解明することは意義深いと考えられる。

2. 研究の目的

1. 研究開始当初の背景を踏まえ次の課題に取り組むこととした。

- (1) 植物由来乳酸菌の新規単離、*in vitro*でのエコール産生菌のエコール産生活性に及ぼす植物由来乳酸菌の影響の解明
- (2) 植物由来乳酸菌が、マウスのイソフラボン代謝性、糞便排泄量、糞便脂質排泄量、脂質代謝、糞便乳酸菌数に及ぼす影響の解明
- (3) エコール産生菌と植物由来乳酸菌の混合投与が、マウスのイソフラボン代謝性、糞便排泄量、糞便脂質排泄量、脂質代謝に及ぼす影響の解明

3. 研究の方法

ぬか漬からの植物由来乳酸菌の分離方法は、ぬか漬けにつけたキュウリ、生姜、昆布を細かくカットし、滅菌生理食塩水に懸濁し、この懸濁液を滅菌生理食塩水で段階希釈し、2%NaCl-1%CaCO₃-MRS寒天培地に希釈液を接種し、30℃でアネロパックによる嫌気培養を行った。培地に生育したコロニーをそれぞれ2%NaCl-1%CaCO₃-MRS寒天培地に再度接種し、酸産生によるCaCO₃の可溶化を目安にして植物由来乳酸菌の分離を行った。このMRS培地においてCaCO₃が可溶化した菌を分離し、菌のDNAを抽出し、microseq500を用いて菌の16S rRNA遺伝子を解析し、分離菌の簡易同定を行った。

エコール菌 TM-30 のエコール産生に及ぼす植物由来乳酸菌の影響の *in vitro* での測定方法は、エコール菌 TM-30 と植物由来乳酸菌とを嫌気性培養液に接種し、ダイゼインを添加し、Anaeropak®(三菱ガス化学)で37℃で培養し、培養液の抽出物をフォトダイオードアレイ検出器で測定した。動物試験では、ICRマウス(メス)を用い、試験食は、イソフラボン抽出物(ソヤフラボン HG)0.03%もしくはは

0.05%添加した AIN-93G をベースとした試験食を用いた。マウス尿中のイソフラボン類測定方法は、解剖一週間前にマウスを代謝ケージ(テクニプラスト)で個別飼育し、尿を採取した。尿は β -glucuronidase/sulfatase で脱結合処理し、抽出後にフォトダイオードアレイや LC/MS/MS による分析を行った。マウスの血漿総コレステロール濃度、血漿トリグリセリド濃度、血漿 HDL コレステロール濃度は、和光純薬のキットを用いて測定した。糞便重量は、糞便を全て採取し、凍結乾燥して重量を測定した。凍結乾燥した糞便をフードミルで粉碎し、Bligh and Dyer 法で糞便中の脂質重量を測定した。マウスの肝脂質は、Bligh and Dyer 法で肝臓から脂質を抽出するとともに、抽出した肝脂質は 10%トリトン X100 含有イソプロパノールに溶解し、この溶解した肝脂質のコレステロールとトリグリセリドを和光純薬のキットを用いて測定した。

4. 研究成果

- (1) 植物由来乳酸菌の新規単離、*in vitro*でのエコール産生菌のエコール産生活性に及ぼす植物由来乳酸菌の影響の解明

ぬか漬から植物由来乳酸菌を分離した。ぬか漬けから分離した乳酸菌の 16S rRNA 遺伝子を解析し、分離菌の簡易同定を行ったところ、ぬか漬けから分離した菌の多くは乳酸菌に属していた。これらの乳酸菌と以前に研究室で分離した植物由来乳酸菌(表 1)を、MRS 寒天培地で前培養し、前培養した菌を MRS 寒天培地に接種し、アネロパックにて37℃、24時間程度培養したものの一白金耳を試験用に用いた。それぞれをエコール産生菌 TM-30 株と混合嫌気培養し、ダイゼインからのエコール産生性を比較したところ、TM-30 のエコール産生性は、共存する乳酸菌の種類によってかなりの違いが認められた(図 1)。

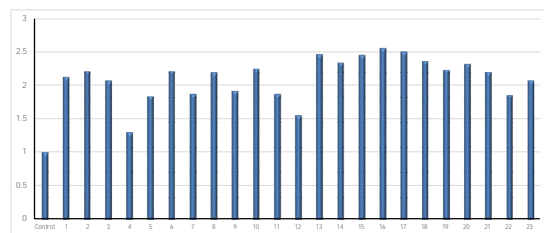


図 1. 乳酸菌とエコール産生菌の培養におけるダイゼインからのエコール産生量の比較。乳酸菌非添加区のエコール濃度を1として相対量で表示

エコール産生菌 TM-30 の培養液中濃度(6 × 10⁷/mL)

今回の培養試験から、同じ菌種に属すると推定される菌株の間でもかなりエコール産生菌のエコール産生促進作用に違いがあったことから、乳酸菌のエコール産生促進作用は、菌種共通の特徴というよりも、菌固有の性質による違いによるものと推察された。今回試

表 1. 嫌気培養試験に用いた乳酸菌

サンプル番号	サンプル名	菌名称
1	B7-2	<i>Pedococcus</i> sp. B7-2
2	N24.1	<i>Lactobacillus</i> sp. N24.1
3	N14	<i>Pedococcus</i> sp. N14
4	N22	<i>Pedococcus</i> sp. N22
5	T6	<i>Lactobacillus</i> sp. T6
6	T15	<i>Lactobacillus</i> sp. T15
7	U15	<i>Pedococcus</i> sp. U15
8	Syouga2	<i>Pedococcus</i> sp. Syouga2
9	Syouga18	<i>Pedococcus</i> sp. Syouga18
10	Syouga23	<i>Lactobacillus</i> sp. Syouga23
11	Kyuri39	<i>Lactobacillus</i> sp. Kyuri39
12	Kyuri42	<i>Pedococcus</i> sp. Kyuri42
13	Komb-11	<i>Lactobacillus</i> sp. Kombu11
14	Komb-12	<i>Pedococcus</i> sp. Kombu12
15	Komb-18	<i>Lactobacillus</i> sp. Kom18
16	Komb-19	<i>Lactobacillus</i> sp. Kombu19
17	Komb-20	<i>Lactobacillus</i> sp. Kombu20
18	Komb-25	<i>Lactobacillus</i> sp. Kombu25
19	Komb-26	<i>Lactobacillus</i> sp. Kombu26
20	Komb-28	<i>Lactobacillus</i> sp. Kombu28
21	Komb-30	<i>Lactobacillus</i> sp. Kombu30
22	Komb-34	<i>Pedococcus</i> sp. Kombu34
23	Komb-36	<i>Pedococcus</i> sp. Kombu36

験した乳酸菌には程度の差があるが、いずれの菌もエコール産生菌に対するエコール産生促進効果を有していた。サンプル番号 16 番 Komb-19 は、他の乳酸菌よりもエコール産生菌に対する *in vitro* でのエコール産生促進作用が高い傾向が認められた。次に、これまでに研究担当者が漬物から分離し、保存していた植物由来乳酸菌や微生物保存機関(理化学研究所)から入手した植物由来乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* JCM1149^T (表 2.)についても、エコール産生菌 TM-30 とこれらの乳酸菌とを混合嫌気培養し、ダイゼインからのエコール産生性を比較したところ、JCM1149^T は他の 3 株に比較してエコール産生菌のエコール産生促進効果が強い結果となった(図 2)。T-14 は、*Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* とホモロジーが高い菌であるにも関わらず、JCM1149^T に比べてエコール産生菌のエコール産生促進効果が 52%程度であり、JCM1149^T は、*in vitro* でのエコール産生促進作用が高い可能性が示唆された。

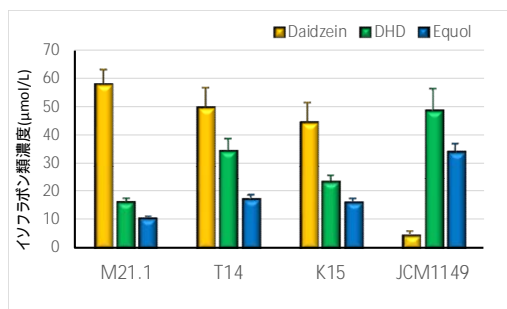


図 2 乳酸菌とエコール産生菌の培養におけるダイゼインからのエコール産生量の比較

表 2. 嫌気培養試験に用いた乳酸菌

サンプル名称	菌名称
T14	<i>Lactobacillus</i> sp. T14
M21.1	<i>Lactobacillus</i> sp. M21.1
K15	<i>Lactobacillus</i> sp. K15
JCM1149	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> JCM1149 ^T

(2) 植物由来乳酸菌が、マウスのイソフラボン代謝性、糞便排泄量、糞便脂質排泄量、脂質代謝、糞便乳酸菌数に及ぼす影響の解明

漬物由来乳酸菌 Komb-19 は、他の乳酸菌よりも *in vitro* でのエコール産生菌のエコール産生を高めたので、イソフラボンを与えたマウスにこの乳酸菌を投与して、生理食塩水投与群と尿中イソフラボン類濃度を比較検討した。

6 週齢 ICR メスマウスを一週間予備飼育後、マウスを 7 匹ずつ二群に分け、イソフラボン(ソヤフラボン HG)0.03%を含む試験食をマウスに給餌した。試験食は、解剖日まで 28 日間給餌した。漬物由来乳酸菌投与群には、あらかじめ 24 時間培養した乳酸菌 Komb-19 を一日一回生理食塩水に懸濁し、マウス一匹あたり 0.2mL を経口投与した。対照群には、マウス一匹あたり 0.2mL の生理食塩水を経口投与した。経口投与は、解剖前日まで 11 日間連続で行った。解剖一週間前には全てのマウスを代謝ケージに移し、飼育試験を継続した。解剖前日から採尿を行った。解剖 4 日前の新鮮糞便を採取し、糞便を滅菌生理食塩水でホモジナイズ後希釈し、LBS 培地に接種し、37 で 2 日間アネロパックで培養した後に乳酸桿菌の菌数を測定した。尿中イソフラボン類濃度を測定したところ、乳酸菌投与群でゲニステイン濃度が有意に低値を示した。エコール濃度も低い傾向があったが、有意な差は認められなかった。乳酸菌 Komb-19 株の投与がゲニステインのバイオアベイラビリティを低下させる可能性が示唆された。

糞便グラム当たりの乳酸菌数は、漬物乳酸菌投与群で高い傾向が認められた(P=0.083)。乳酸菌 Komb-19 投与は、マウス糞便の乳酸菌数を増加する可能性が示唆された。二群における糞便排泄量については、有意な差が認められなかった。また、糞便脂質排泄量は、二群の間で有意な差は認められなかった。肝脂質については、二群間で有意な差は認められなかったが、肝臓トリグリセリドとコレステロールは、乳酸菌投与群で高い傾向が認められた。血漿コレステロール濃度、HDL-コレステロール濃度は、乳酸菌投与群で高い傾向が認められた。血漿トリグリセリド濃度は、乳酸菌 Komb-19 投与群で有意に高値を示した(表 3)。

表 3. 血漿コレステロール、トリグリセリド、HDL-コレステロール値、*P<0.05

	Chloesterol (mg/dL)	Triglyceride (mg/dL)	HDL-Cholesterol (mg/dL)
対照群	102.8 ± 8.0	85.0 ± 5.2	66.3 ± 4.8
乳酸菌投与群	123.5 ± 10.3	131.2 ± 12.2*	77.8 ± 5.1

乳酸菌 Komb-19 投与群は、イソフラボン添加飼料を給餌した場合、対照群よりも血漿脂質が高い傾向を示した。植物由来乳酸菌 Komb-19 のマウスへの投与は、対照群に比し

て、血漿トリグリセリドが高くなったが、尿中エコール濃度は高めることはなかった。しかし、糞便の乳酸桿菌数は、対照群に比べて高い傾向を有して、乳酸桿菌の菌数を高める可能性が示唆された。糞便中の乳酸菌の菌数が増加傾向にあったにもかかわらず、尿中のエコール濃度が低い傾向があったことから、Komb-19 の投与は、マウスの腸内菌叢のエコール産生菌のエコール産生には適さない腸内環境を形成した可能性がある。

(3) エコール産生菌と植物由来乳酸菌の混合投与が、マウスのイソフラボン代謝性、糞便排泄量、糞便脂質排泄量、脂質代謝に及ぼす影響の解明

植物由来乳酸菌をエコール産生菌 TM-30 と混合嫌気培養し、ダイゼインからのエコール産生性を測定した際に、*Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* JCM1149^T が他の乳酸菌よりもエコール産生菌のエコール産生を高めため、イソフラボンを与えたマウスに JCM1149^T もしくは JCM1149^T+エコール産生菌 TM-30 を経口投与して、生理食塩水投与群とで尿中イソフラボン類濃度を比較検討した。6 週齢 ICR メスマウス 18 匹を一週間予備飼育後、マウスを 6 匹ずつ三群に分け、イソフラボン(ソヤフラボン HG)0.05%を含む試験食を給餌した。試験食は解剖日まで、28 日間給餌した。JCM1149^T 投与群には、MRS 培地で 24 時間培養した JCM1149^T を一日一回生理食塩水に懸濁し、マウス一匹あたり 0.2mL を経口投与した。JCM1149^T+エコール産生菌 TM-30 投与群には、あらかじめ嫌気培養した JCM1149^T とエコール産生菌 TM-30 とを滅菌生理食塩水に懸濁し、マウス一匹あたり 0.2mL を一日一回経口投与した。対照群には、マウス一匹あたり 0.2mL の生理食塩水を一日一回経口投与した。経口投与は、解剖前日まで 11 日間連続で行った。解剖一週間前には全てのマウスを代謝ケージに移し、飼育試験を継続した。解剖前日から採尿を行った。尿中イソフラボン類濃度は、三群の間で違いが認められた(図 3)。尿中エコール濃度は、対照群や乳酸菌+エコール産生菌投与群よりも乳酸菌 JCM1149^T 投与群が高い結果となった。

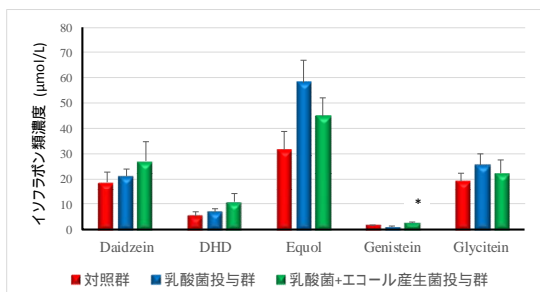


図 3. 対照群、乳酸菌 JCM1149^T 投与群、JCM1149^T+エコール産生菌 TM-30 投与群の尿中イソフラボン類濃度測定結果 *P<0.05

エコール産生菌と乳酸菌の同時投与は、尿

中エコール濃度を顕著に高めることはなかった。しかし、尿中ゲニステイン濃度は、乳酸菌+エコール産生菌投与群が、乳酸菌単独投与群よりも有意に高値を示し、ゲニステインのバイオアベイラビリティをエコール産生菌の経口投与が改善する可能性が示唆された。

三群における糞便排泄量については、有意な差が認められなかった。また、糞便脂質排泄量についても、三群の間で有意な差は認められなかった。肝脂質については、乳酸菌 JCM1149^T 投与群(0.141±0.012g)は、対照群(0.092±0.003g)や JCM1149^T+エコール産生菌 TM-30 投与群(0.107±0.006g)よりも有意に高値(P<0.05)を示し、JCM1149^T 投与群は肝脂質を高める傾向が認められた。しかし、肝臓中のトリグリセリドやコレステロールについては有意な差は認められなかった。血漿コレステロール濃度、血漿トリグリセリド濃度、血漿 HDL-コレステロール濃度は、三群の間で有意な差は認められなかった。

結語

本研究で、漬物等から分離した植物由来乳酸菌が、エコール産生菌のダイゼインからエコール産生に及ぼす影響を、*in vitro* で検討した結果、乳酸菌には程度の差があるが、エコール産生菌に対するエコール産生促進効果があることを見出した。

マウスにイソフラボン添加食を給餌し、乳酸菌 Komb-19 を経口投与した場合、対照の生理食塩水投与群に比して、尿中ゲニステイン濃度が有意に低値を示し、エコール濃度は、有意差はなかったものの、低下傾向を示した。

マウスにイソフラボン添加食を給餌し、乳酸菌 JCM1149^T 投与群、JCM1149^T+エコール産生菌 TM-30 投与群、生理食塩水投与群とで尿中イソフラボン類濃度を比較検討したところ、尿中エコール濃度は、生理食塩水投与群や乳酸菌+エコール産生菌投与群よりも乳酸菌 JCM1149^T 投与群が高い結果となった。エコール産生菌と乳酸菌の同時投与は、尿中エコール濃度を顕著に高めることはなかった。JCM1149^T は、予備試験では、pH2.5 の人工胃液耐性能や人工腸液耐性能を有しており、消化液耐性能を有した乳酸菌であることから、本試験でマウスへ投与した JCM1149^T は、生きて腸内に到達し、マウスのエコール産生菌のエコール産生に寄与した可能性がある。しかし、JCM1149^T+エコール産生菌 TM-30 投与マウスでは、JCM1149^T 投与マウスよりも尿中エコール濃度が高まっておらず、乳酸菌 JCM1149^T の存在下では、エコール産生菌 TM-30 とマウスのエコール産生菌との間でエコール産生に対する何らかの相互作用が生じたのかもしれない。また、脂質代謝に関しては、植物由来乳酸菌 Komb-19 と JCM1149^T とでは、肝脂質や血漿トリグリセリドに及ぼす影響が異なっていた。

本研究の結果、*in vitro* でのエコール産生

菌と植物由来乳酸菌との培養におけるエコール産生性の評価は、消化液耐性の強い乳酸菌に関しては、*in vivo*でも*in vitro*の評価を反映する結果を得る可能性が示唆された。

本 *in vitro* のエコール産生評価試験は、エコール産生向上成分を評価する際のツールの一つとして利用し得るであろう。また、植物由来乳酸菌は、イソフラボンを含む食餌を投与したマウスの脂質代謝に対して種々の影響を有することも見出した。これらの現象は、今後の植物由来乳酸菌の機能性を考慮する上で重要な知見の一つになると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Tamura M, Hori S, Nakagawa H, Yamauchi S, Sugahara T. Effects of an equol-producing bacterium isolated from human faeces on isoflavone and lignan metabolism in mice. *J Sci Food Agric*. 査読有 96(9):3126-3132. (2016)
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jsfa.7490>

〔学会発表〕(計 1 件)

田村基, 星千草, 堀幸子, 中川博之, 山内聡, 菅原卓也, ヒトの糞便から分離した equol 産生菌がマウスのイソフラボンや植物リグナン代謝に及ぼす影響
日本食品科学工学会 第62回大会 2015年8月29日

〔図書〕(計 1 件)

田村 基 第3章 腸内細菌 シーエムシー出版 食品機能性成分の吸収・代謝機構
2018 316 ページ

6. 研究組織

(1)研究代表者

田村 基 (TAMURA Motoi)
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品研究部門・主席研究員
研究者番号: 70353943

(2)研究分担者

中川 博之 (NAKAGAWA Hiroyuki)
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品研究部門・上級研究員
研究者番号: 30308192

(3)連携研究者
なし