

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：32669

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12361

研究課題名(和文) ビフィズス菌の難消化性糖利用能を標的としたカスタムメイドプレバイオティクス研究

研究課題名(英文) Prebiotic research targeting oligosaccharides utilization by Bifidobacterium spp.

研究代表者

吉川 悠子 (YOSHIKAWA, YUKO)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・助教

研究者番号：00580523

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ビフィズス菌がもたらす健康増進効果を宿主が受益するうえで、宿主の腸内細菌叢を構成している固有のビフィズス菌株を利用する方が安全性が高いと考えられる。そこで本研究では、宿主固有のビフィズス菌株の増殖を効率よく促進するプレバイオティクスの探索を最終目標とし、ビフィズス菌を含めたヒトの消化管内細菌叢を構成する菌種の基準株やヒト糞便由来のビフィズス菌株を用いて、特異的に菌の増殖を促進するオリゴ糖などの難消化性糖質の種類や配合を評価可能な培養条件を確立した。このスクリーニング試験系を通して、ビフィズス菌および消化管内常在菌のオリゴ糖資化能に関する基礎的な知見を収集することができた。

研究成果の概要(英文)：The unique Bifidobacterium strain constituting the intestinal microbiota is desirable for improving the intestinal environment because it has a symbiotic relationship with host for a long time. In this study, we aimed to search for the type of oligosaccharide that specifically promotes the proliferation of the host-specific Bifidobacterium strain. Firstly, we tried to establish the culture conditions for screening of oligosaccharide assimilation by bacteria. Then, we evaluated the bacterial proliferation using seven isolates belonging to four Bifidobacterium species derived from human feces, in addition to type strains of eight Bifidobacterium species and nine representative species that reside in the human gastrointestinal tract (including oral cavity). As a result of our screening system, we obtained fundamental data of Bifidobacterium strains in the utilization of oligosaccharides.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ビフィズス菌 オリゴ糖 プレバイオティクス ラクトバチルス菌 RFLP

1. 研究開始当初の背景

出生後、速やかに形成された腸内細菌叢は離乳期以降、各個人特有の性質を備えるようになり、その恒常性が維持される。しかし、食習慣や慢性的なストレス、加齢などにより、腸内細菌叢の構成細菌はその割合とともに多様性が変化する。腸内細菌叢は宿主に対し、菌の代謝を介した消化吸収の補助やビタミンの供給だけではなく、腸管感染症予防など生体防御システムの一部としての機能を担っている。よって、腸内細菌叢の変化の影響は腸管だけにとどまらず、肥満や心血管疾患、さらには精神面にも影響すると考えられている。そのため、近年、プロバイオティクスによる健康増進・疾病予防が注目されている。プロバイオティクスとして、*Bifidobacterium* 属菌（ビフィズス菌）や *Lactobacillus* 属菌が汎用されているが、これらによる保健効果は、プロバイオティクス菌株と宿主の腸内細菌叢と宿主自体の三者間相互作用の結果であり、同一の菌株を摂取しても、宿主により効果に差が生じることは以前から指摘されてきた。

一方、プレバイオティクスとして、特定の有益な腸内細菌以外には利用困難な難吸収性オリゴ糖や糖アルコールなどが利用されており、これらは摂取後、そのままの形で大腸へ到達する。プレバイオティクスもまた、広く世間に流通しており、拡大する市場規模から消費者の関心の高さを容易に量ることができる。プレバイオティクスによる腸内環境正常化は、ビフィズス菌など大腸に棲息する腸内細菌の増殖・糖代謝活性に依存している。ヒトの大腸内において、ビフィズス菌の占める割合は *Lactobacillus* 属菌のそれよりもはるかに大きい。ビフィズス菌は同じ菌種でも菌株によりゲノムサイズに多様性があり、遺伝子数も大きく異なる (J. Sci. Food Agric., 94, 2014)。これに伴い、糖利用能にも違いがみられることが知られている (J. Appl. Microbiol., 114, 2012)。そのため、画一的なプレバイオティクスの摂取では、個人によって大腸に定着しているビフィズス菌の有用性が十分に発揮されない可能性がある。また、優れたプロバイオティクス菌株とその菌株の増殖を促すプレバイオティクスを組み合わせたシンバイオティクスであっても、プロバイオティクス菌株が腸管に定着しない限り、腸内細菌叢の違いから生じる保健効果の個人差という問題を克服することは困難である。

2. 研究の目的

ビフィズス菌や *Lactobacillus* 属菌などのプロバイオティクスは腸内環境を整えることで、宿主に健康増進機能を付与するため、予防医学の観点から注目を浴びている。しかし、「生きたまま腸に届く」プロバイオティクス

を継続的に摂取していても、腸内細菌として定着せず、摂取をやめれば速やかに排除されてしまう。よって、最終的に腸内から排除されてしまうビフィズス菌を毎日大量に摂取するよりも、既に個人の大腸に定着し、長期間にわたって共生関係を築いている固有のビフィズス菌を利用する方が、得られる保健効果の持続性および宿主や他の腸内細菌叢の構成細菌との適合性の点で効率が良く、安全性が高いといえる。

一方、難消化性糖質であるオリゴ糖は大腸においてビフィズス菌の増殖を促すプレバイオティクスとしての機能性が既に認められている。しかし、ビフィズス菌は菌株ごとにそれぞれ糖の利用能が異なることから、個々の大腸のビフィズス菌のうち、腸内細菌叢に最も占める割合の大きい菌株に対してビフィズス菌専用の「エサ」となるオリゴ糖などの難消化性糖質を最適化することで、大腸内でのさらなる増殖を促し、腸内環境の改善がなされ、宿主にとって最大限の健康増進効果・疾病予防効果が得られると予想される。

そこで本研究では、個人の大腸に定着しているビフィズス菌を分離し、その菌株が最も効率よく利用できるオリゴ糖などの難消化性糖質の種類や配合を探索・評価することで、カスタムメイドなプレバイオティクスへの展開を目指す。

3. 研究の方法

(1) ビフィズス菌基準株を用いた難消化性糖利用能試験系の確立

本研究では、ヒト試料由来のビフィズス菌 7 種/亜種およびはっ酵乳製品に利用されている *B. animalis* subsp. *lactis* (B3) からなる計 8 種のビフィズス菌基準株、口腔を含めた消化管内常在菌基準株 9 種 (表 1) および市販のオリゴ糖 8 種 (A~H) を使用した。ビフィズス菌は偏性嫌気性細菌のため、全ての操作は空気を CO₂ ガスで置換した嫌気ボックス内で行い、液体培地はビフィズス菌専用に調製された TOS プロピオン酸培地 (基本培地) を用

表1. 使用した基準株

Type strain	Species	JCM No.
B1	<i>B. adolescentis</i>	1275
B2	<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	1190
B3	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	10602
B4	<i>B. bifidum</i>	1255
B5	<i>B. breve</i>	1192
B6	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>	1217
B7	<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i>	1222
B8	<i>B. pseudocatenulatum</i>	1200
C1	<i>Escherichia coli</i>	1649
C2	<i>Staphylococcus aureus</i>	20624
C3	<i>Streptococcus salivarius</i>	5707
C4	<i>Streptococcus mutans</i>	5705
C5	<i>Clostridium perfringens</i>	1290
C6	<i>Clostridium butylicum</i>	1391
C7	<i>Clostridium difficile</i>	1296
C8	<i>Bacteroides fragilis</i>	11019
C9	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	12257



図1. 濁度法による難消化性糖質に対する利用能スクリーニング

いた。基本培地には転移ガラクトオリゴ糖 (TOS) が 1%含まれているため、糖資化試験において、この TOS の組成を各種糖質試料と入れかえた。また、嫌気性菌の炭水化物資化試験に用いられる peptone yeast extract (PY) 培地でも同様に試験し、基本培地を用いた際の結果と比較した。オリゴ糖を添加していない培地および植菌していない糖質試料添加培地をネガティブコントロールとして用い、ポジティブコントロールには嫌気性細菌の培養に適した Reinforced Clostridium Medium (RCM) 培地を用いた。試験菌株は 96 穴プレート 1 ウェルにつき $OD_{600}=0.050$ となるように調整し、一定時間培養後の OD_{600} の濁度を指標としてビフィズス菌の増殖を最も促進させる難消化性糖質の種類や配合のスクリーニングを行った (図 1)。

(2) マウス糞便を用いたスクリーニング菌株の選抜条件検討

ヒト糞便試料を扱う前に、マウス糞便から基本培地を用いてビフィズス菌分離、菌種同定、(1)で確立した糖資化試験を行った。一般的な細菌の菌種同定には 16S rRNA 遺伝子の配列解析が広く用いられているが、ビフィズス菌の菌種間では高い相同性を示すため、区別することが難しい。そのため、菌種同定は PCR にて増幅した *hsp60* の部分断片を用いた *Hae* III での制限酵素断片長多型 (PCR-RFLP) 解析法 (BMC Microbiol., 13, 2013) にて行った。

(3) ヒト糞便から分離した個人固有のビフィズス菌株の菌種同定および難消化性糖質の利用能試験

静岡県立大学研究倫理審査委員会の承認を受け、被験者 12 名から糞便を提供していただいた。(2)と同様にビフィズス菌を分離・同定し、糖資化試験を行った。

4. 研究成果

(1) ビフィズス菌基準株を用いた難消化性糖質利用能試験系の確立

ビフィズス菌基準株は基本培地でも、PY 培地でも結果は同じ傾向を示したことから、以

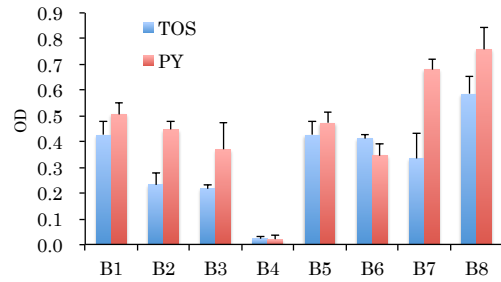


図2. オリゴ糖B添加時におけるビフィズス菌基準株の増殖度

表2. 基準株の糖資化試験

Strain	Oligosaccharide								OD	
	A	B	C	D	E	F	G	H		
B1	Red	Green	Green	Green	Green	Red	Green	Green	Green	0.8 <
B2	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	0.6-0.8
B3	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	0.4-0.6
B4	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	0.2-0.4
B5	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	> 0.2
B6	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	> 0.2
B7	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	> 0.2
B8	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	> 0.2
C1	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	> 0.2
C2	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	> 0.2
C3	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	> 0.2
C4	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	> 0.2
C5	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	> 0.2
C6	Red	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Red	0.8 <
C7	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	> 0.2
C8	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	> 0.2
C9	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	> 0.2

降は基本培地に各糖試料を最終濃度 0.5% で添加した培地にて、37°C で 24 時間嫌気培養後の増殖を比較することとした (図 2)。

ビフィズス菌基準株において、使用した 8 種類のオリゴ糖のうち、A と F 添加時の生育はいずれの菌種でも比較的良好であり、E では菌の増殖度は大きく 2 つに分かれた (表 2)。また、B1、B5 および B8 は比較的増殖度が高く、複数のオリゴ糖を資化できる能力を持っていることが分かった。

一方、*Porphyromonas gingivalis* などの口腔内常在菌や大腸菌 (*Escherichia coli*) および *Clostridium* 属菌などの腸管内の常在菌、計 9 菌種の基準株を用いて、難消化性オリゴ糖に関するビフィズス菌との競合性の有無を確認した。その結果、現在プレバイオティクスとして多用されているオリゴ糖 A は C1 (*E. coli* JCM 1649 株) および C6 (*C. butylicum* JCM 1391 株)、オリゴ糖 B は C5 (*C. perfringens* JCM 1290 株) および C6 の増殖を促進することが分かり (表 2)、ビフィズス菌の増殖を狙う糖の摂取がかえってこれらの細菌を増殖させる可能性を孕んでいることが推察された。また、腸内細菌叢の構成細菌に個人差があることや菌株により表現型に差が存在する可能性があり、これらの細菌についても個人が保有する細菌における糖資化能を調べなければ、ビフィズス菌の増殖を促進する糖を正確に判定できないと考えられる。

表3. ヒト糞便由来ビフィズス菌株

Species	Strain
<i>B. adolescentis</i>	A-2-a
	B-1-b
<i>B. bifidum</i>	A-6-b
	B-4-a
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>	B-5-a
	B-6-a
	B-4-b
<i>B. pseudocatenulatum</i>	B-4-b

また、ビフィズス菌の生育が促進されたオリゴ糖のうち、E は消化管内常在菌の生育が比較的低かったことから、本研究において使用した基準株 8 種の糖の中では E が最もビフィズス菌基準株の生育促進に適していると考えられた。

(2) マウス糞便を用いたスクリーニング菌株の選抜条件検討

ヒト糞便試料を扱う前段階としてマウス糞便からビフィズス菌分離を試みた。ビフィズス菌は 35 週齢のマウスからは全く分離されず、2 週齢のほ乳期のマウス糞便からのみ 10 株分離することができた。*hsp60* の部分配列を標的とした RFLP の結果、分離株はすべて同一のパターンを示し、これらの菌種は *B. pseudolongum* subsp. *pseudolongum* であると推測された。

また、同一試料を用いて糞便中の *Lactobacillus* 属菌についても検索したところ、ビフィズス菌を全く分離できなかった 35 週齢のマウスからも、45 株の *Lactobacillus* 属菌を得ることができた。*Lactobacillus* 属菌の phenylalanyl-tRNA synthase alpha subunit (*pheS*) 遺伝子の 4 種類 (*HhaI*、*RhaI*、*Sau3AI* および *Sau96I*) の制限酵素を用いた RFLP による *Lactobacillus* 属菌の簡易的菌種同定法で、マウス糞便から得られた 45 株の *Lactobacillus* 属菌は 9 菌種に分けられ、*L. reuteri* (18/45)、*L. kalixensis* (10/45) が優占種となっていた。以上の結果から、*Lactobacillus* 属菌と比べると、マウス腸内細菌叢におけるビフィズス菌の多様性は非常に小さいことが分かった。よって、マウスを用いた解析は腸管に常在菌として定着しているビフィズス菌の検索には有効ではないと考えられた。

(3) ヒト糞便から分離した個人固有のビフィズス菌株の菌種同定および難消化性糖質の利用能試験

被験者 12 名に協力していただき、ヒト糞便から分離した個人固有のビフィズス菌株の菌種同定および難消化性オリゴ糖の利用能試験を行った。ヒト分離ビフィズス菌株の菌種は個人によって大きく異なっていた。*B. longum* subsp. *longum* 3 株、*B. adolescentis*

表4. 分離株の糖資化試験

Strain	Oligosaccharide							
	A	B	C	D	E	F	G	H
A-2-a	Red	Green	Yellow	Green	Yellow	Red	Blue	Blue
B-1-b	Green	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Blue	Blue
A-6-b	Green	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
B-4-a	Red	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
B-5-a	Green	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Blue	Blue
B-6-a	Green	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Red	Blue	Blue
B-4-b	Green	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Blue	Blue

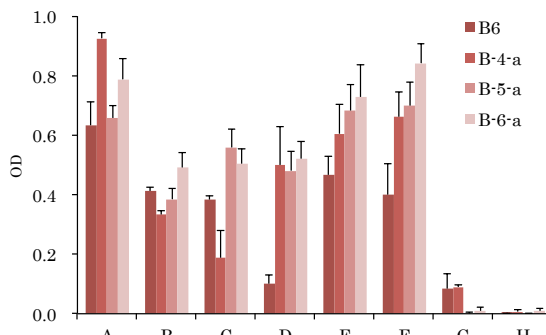
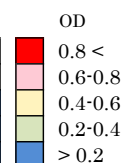


図3. *B. longum* subsp. *longum*における各オリゴ糖添加時の増殖度

2 株、*B. bifidum* と *B. pseudocatenulatum* が 1 株ずつ分離・同定できた (表 3)。

これら計 7 分離株の糖資化能を確認したところ、全体の傾向としては、基準株と同様であり、A、E および F に対する資化性が高いことが分かった (表 4)。最も分離株数の多かった *B. longum* subsp. *longum* において、基準株と分離株を比較すると、分離株の方が糖資化能は高かった (図 3)。

また、オリゴ糖 C は試験したビフィズス菌の中で唯一 *B. adolescentis* A-2-a 株の 0.6 以上の OD₆₀₀ 値を示した。よって、この菌株を腸内細菌として所有する宿主はオリゴ糖 C の摂取により、固有のビフィズス菌を効率よく増殖させることができると考えられる。

5. 主な発表論文

〔雑誌論文〕(計 2 件)

① Yuko YOSHIKAWA, Yoshitsugu OCHIAI, Mariko MOCHIZUKI, Osamu FUJITA, Takashi TAKANO, Ryo HONDO, Fukiko UEDA.

Genetic subtyping of *Listeria monocytogenes* via multiple-locus sequence typing using *iap*, *sigB*, and *actA*.

The Journal of veterinary medical science. Vol. 78, No. 12, pp. 1831-1839, 2016, 査読有

<http://doi.org/10.1292/jvms.16-0367>

② Dongxing WU, WURITU, Yuko YOSHIKAWA, GAOWA, Fumihiko KAWAMORI, Asaka IKEGAYA, Masayoshi OHTAKE, MASataka OHASHI, Masahiko SHIMADA, Ayumi TAKADA,

Katsuki IWAI, Norio OHASHI.
A molecular and serological survey of
Rickettsiales bacteria in wild sika deer
(*Cervus nippon nippon*) in Shizuoka
prefecture, Japan: High prevalence of
Anaplasma species.
Japanese journal of infectious diseases. Vol.
68, No. 5, pp. 1434–1437, 2015, 査読有
<http://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2015.003>

〔学会発表〕（計5件）

- ① 落合由嗣、山田文也、吉川悠子、高野貴士、望月真理子、本藤良、植田富貴子
Listeria monocytogenes の過酸化水素暴露に対する生残、発育およびストレス関連因子発現の解析
第89回日本細菌学会総会
大阪国際交流センター（大阪府大阪市）
平成27年3月23日
- ② 吉川悠子、杉本溪、古川英嗣、大橋典男
Anaplasma phagocytophilum promotes endoplasmic reticulum stress response.
第89回日本細菌学会総会
大阪国際交流センター（大阪府大阪市）
平成27年3月24日
- ③ 岩井克機、吉川悠子、三好規之、大橋典男、福富竜太、浅田憲一
小麦ふすまの短期摂取による腸内環境の変化に関する機能性解析
日本農芸化学会2016年度大会
札幌コンベンションセンター（北海道札幌市）
平成27年3月28日
- ④ 吉川悠子、田中実穂、大橋典男
RFLPを用いた簡易的 *Lactobacillus* 属菌種同定法の確立とその応用
日本農芸化学会2016年度大会
札幌コンベンションセンター（北海道札幌市）
平成27年3月29日
- ⑤ 落合由嗣、山田文也、吉川悠子、高野貴士、望月真理子、本藤良、植田富貴子
鉄・鉄キレート剤が *Listeria monocytogenes* の過酸化水素抵抗性に及ぼす影響の解析
第159回日本獣医学会学術集会、
日本大学湘南キャンパス（神奈川県藤沢市）
平成27年9月7日

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉川 悠子 (YOSHIKAWA, Yuko)
日本獣医生命科学大学・獣医学部・助教
研究者番号：00580523

(2)研究分担者

大橋 典男 (OHASHI, Norio)
静岡県立大学・食品栄養科学部・教授
研究者番号：10169039