

令和元年6月12日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19883

研究課題名(和文)複合的に炎症性腸疾患を予防する新機能性ヨーグルトの開発

研究課題名(英文)Development of probiotics for the control of inflammatory bowel disease

研究代表者

大坪 和香子(Ohtsubo, Wakako)

東北大学・農学研究科・助教

研究者番号：00598203

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究においてヒト腸管試料から見出された高い酪酸酸性能を有するLachnospiraceae科酪酸産生細菌は、海藻多糖を基質として生育することが可能であった。そこで、海藻多糖分解産物であるフコースを資化するビフィズス菌を乳児腸管由来菌株ライブラリから選抜し、フコースを提供する酪酸産生菌と、酢酸を提供するビフィズス菌のクロスフィーディングによる共培養系の条件を検討した。さらに、ヒト腸管ムチンを固定化したマイクロプレートを用いた競合付着阻害試験では、炎症性腸疾患発症に関与することが知られるDesulfovibrio属硫酸還元細菌に対する高い置換・競合能を有するビフィズス菌が見出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、炎症性腸疾患の予防や発症に関与すると考えられている酪酸産生細菌や硫酸還元細菌と、クロスフィーディングや付着競合を通して直接的に相互作用するビフィズス菌株を単離・選抜した。これまでに開発されたプロバイオティックビフィズス菌の多くが、ビフィズス菌単独の機能性に着目したものであったが、本研究において選抜されたビフィズス菌株は、ヒト腸管に常在する腸内フローラ細菌との相互作用に着目した新規性の高いプロバイオティクス候補であり、腸管の炎症抑制に関与する酪酸産生細菌の増殖促進と腸管炎症の悪化に関与する硫酸還元細菌の阻害という複合的な作用により、炎症性腸疾患の予防への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Culture enrichments of human gut microbiota using various polysaccharides as a substrate were performed and bacterial strains affiliated with Lachnospiraceae, which produce butyrate and simultaneously degrade algae polysaccharides, were found. We screened probiotic bifidobacterial strains with an ability to utilize fucose to establish a co-culture of butyrate-producing Lachnospiraceae and probiotics. We also identified bifidobacterial strains with an ability of competitive adhesion to purified human mucosal polysaccharides against sulfate-reducing bacteria, which occurrence has been known to be correlated with inflammatory bowel disease. Our findings offer a new aspect of probiotics for preventing inflammatory bowel disease by promoting butyrate-producing bacteria or by preventing sulfate-reducing bacteria in human intestine.

研究分野：応用微生物学

キーワード：腸内細菌 酪酸 ヨーグルト プロバイオティクス 炎症性腸疾患

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年若年層を中心に急増している炎症性腸疾患 (Inflammatory Bowel Disease, IBD) は、腸管内が慢性的な炎症を起こしている状態であり、その多くが難治である。IBD の発症には、腸管内の細菌叢 (腸内フローラ) の異常 (dysbiosis) が深く関与しており、患者の腸内では、健全な腸内フローラで優勢化する酪酸生成細菌が顕著に減少していることが報告されている。一方、健康者の腸内にはあまり見られない硫酸還元細菌やフソバクテリウム属細菌が高頻度で検出され、これらによる硫化水素 H<sub>2</sub>S や毒素産生、過剰な脂肪酸生成は、炎症性腸疾患を悪化させる原因になると考えられている。酪酸 (butyrate) は、腸内フローラが行う嫌気発酵により生成する主な短鎖脂肪酸の一つであるが、宿主の栄養として吸収されるだけでなく、大腸粘膜の制御性 T 細胞を誘導し、大腸炎を緩和することが報告されており、腸管免疫の恒常性や炎症抑制に重要なはたらきを持っていると考えられている。そのため、酪酸を利用した腸疾患の予防や治療方法の開発・投与試験、食品への添加が広く実施されているが、酪酸が下部消化管まで到達しにくいヒトや大型動物に対する酪酸塩の経口摂取の効果は低く、腸管内における酪酸生成を促進する新しい手法が求められている。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒト腸管内における酪酸生成細菌の増殖や酪酸生成を補助すると同時に、硫酸還元細菌等の炎症性腸疾患発症に関与すると言われている要因菌を阻害する機能を有する機能性ビフィズス菌株を選抜し、その特性を生かした機能性ヨーグルトを開発することである。これまでに開発されている機能性ビフィズス菌を用いたプロバイオティクスの多くは、ビフィズス菌自体の機能に着目したものが多く、本研究では、本来腸内フローラに存在する酪酸産生菌や硫酸還元細菌に対するビフィズス菌の相互作用に着目した。また、過去の炎症性腸疾患と腸内フローラの関連性の研究では、腸管由来酪酸生成細菌や硫酸還元細菌は 16S rRNA 遺伝子レベルで検出されてきたが、本研究ではこれらの細菌をヒト腸管試料から集積培養・単離し、ビフィズス菌との共培養や付着競合阻害試験に用いることにより、プロバイオティックビフィズス菌の各菌株が特異的に示す細菌間相互作用に関する知見を獲得し、炎症性腸疾患予防プロバイオティクス開発へ応用可能な機能性を有する菌株を選抜することを目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) ヒト腸内フローラ細菌の集積培養と酪酸量測定

本研究において実施した集積培養で用いた合成培地は、Plugge (2005) による手法および培地組成を用いて、以下のように調製した。基本培地を作製し、沸騰、冷却後バイアル瓶に分注し、ヘッドスペースを N<sub>2</sub> ガスと CO<sub>2</sub> ガス (4:1) で置換し、プチルゴム栓とアルミシールで密閉した。121、20 分間のオートクレーブ後、塩化カルシウム溶液、ビタミン類混合溶液、炭酸水素ナトリウム、Na<sub>2</sub>S およびシステイン塩酸塩を含む還元溶液を添加した。調製した各培地に多糖 (セルロース、海藻多糖、 $\alpha$ -グルカン) およびヒト腸管試料を添加し、37 において培養した。濁度が上昇した培養液について、イオン排除高速液体クロマトグラフィーによる短鎖脂肪酸量の測定を行い (栄養・病理学研究所による受託解析) 酪酸量を比較した。特に酪酸産生比率の高い培養液を新鮮な培地に植え継ぎ、同条件で継代培養を行った。

#### (2) 酪酸産生細菌の同定

酪酸産生比率が高い培養液から DNeasy キット (QIAGEN) を用いて DNA を抽出し、濃度および純度について NanoDrop1000 を用いて測定後、20 ng/ $\mu$ L となるように希釈調製し、16S rRNA 遺伝子の配列のシーケンス解析 (illumina MiSeq、受託解析) を行った。得られたシーケンス配列は CLC Microbial Genomics Module (QIAGEN Bioinformatics) を用いてアセンブリ、トリミング、フィルタリングおよび OTU クラスタリングを行い、酪酸産生菌と考えられる細菌種の存在を調べた。単離した菌株については、同様に抽出した DNA を鋳型として得られた 16S rRNA 遺伝子の PCR 産物を鋳型とし、BigDye terminator によるサイクルシーケンス反応を行い、ジェネティックアナライザ ABI3500 により塩基配列の決定を行った。

#### (3) ヒト腸管由来酪酸産生細菌とビフィズス菌の共培養条件の検討

多糖を資化する酪酸産生細菌と単糖からオリゴ糖までを資化するビフィズス菌との共培養条件を調べるため、合成培地を調製し、多糖 (セルロース、海藻多糖、 $\alpha$ -グルカン) を栄養基質として添加し、ヘッドスペースを CO<sub>2</sub> ガスで置換した。GAM 培地で培養したビフィズス菌および BL 培地で培養した酪酸産生細菌を同時に植菌し、30 において培養を行った。計時的に採取した培養液を GAM 寒天培地および BL 寒天培地に塗布し、30 においてアネロパックおよび専用培養ジャーを用いて培養後、出現したコロニー数を計測した。

#### (4) ビフィズス菌と硫酸還元細菌の付着競合阻害試験

ヒトの大腸粘液 (腸管正常部位由来) よりゲル濾過クロマトグラフィーにより溶出・精製した可溶性ヒト大腸ムチン (HCM) をマイクロプレート (Thermo Scientific<sup>TM</sup> Pierce<sup>TM</sup> Maleic Anhydride Plates) に固定化し、ビフィズス菌および CFDA 染色した硫酸還元細菌を添加した。ビフィズス菌を先に添加した後に硫酸還元細菌を添加して硫酸還元細菌の付着量を検討する

「排除」、ビフィズス菌を後に添加し硫酸還元細菌の残存付着量を検討する「置換」、同時添加による付着量を検討する「競合」について、マイクロプレートリーダーによる蛍光強度測定により検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) ヒト腸内フローラ由来酪酸産生細菌の集積培養と同定

ヒト腸管試料を添加した集積培養の 16S rRNA 遺伝子解析の結果、本研究において検討した各条件において、培養初期では Enterobacteriaceae 科などの通性嫌気性細菌が優勢であり、短鎖脂肪酸の中でも酪酸の生成量は少なく、ギ酸の生成が多く見られた。継代培養を行うと、通性嫌気性細菌は減少し、代わりに酪酸の生成量が増加し、ギ酸は検出限界以下となった。各培養条件の中でも、酢酸やプロピオン酸に比べて酪酸の生成比が高かった培養液の条件では、Lachnospiraceae 科および *Phascolarctobacterium* 属細菌が優勢的であった。そこで、これらの培養液を段階希釈し、アガーシェイク法により得られたコロニーを取得し、単離培養を行った。

##### (2) ヒト腸管由来酪酸産生細菌とビフィズス菌の共培養系の確立

研究計画時に予定していた酪酸生成細菌 *Eubacterium limosum* RA27 株とプロバイオティックビフィズス菌共培養を試みたところ、両菌株が同時に増殖可能な条件の特定には至らなかった。この理由として、RA27 株がビフィズス菌の生成する酢酸を利用して増殖可能である一方で、ビフィズス菌の生育に必要なラクトースなどの糖を培地に添加すると、ビフィズス菌の急速な増殖により生じる乳酸の増加とそれに伴う pH の低下が、RA27 株の増殖を阻害するためであることが考えられた。そこで、多糖を資化して酪酸を生成し、さらにはビフィズス菌が資化可能な単糖やオリゴ糖を多糖の分解産物として生成するヒト腸管由来細菌の探索を試みた。その結果、海藻多糖を唯一の炭素源として添加した合成培地において、酪酸産生細菌として知られる Lachnospiraceae 科の細菌が増殖し、これらがビフィズス菌の栄養基質と成り得る L-フコースを生成する可能性が示唆された。そこで、ヒト腸管試料および乳児糞便試料を用いてヒト腸管由来ビフィズス菌株ライブラリを作製し、L-フコースの資化能を有するプロバイオティックビフィズス菌のスクリーニングを行った。その結果、乳児腸管由来の複数菌株に、フコース資化性が認められた。現在、これらのフコース資化能を有するプロバイオティックビフィズス菌と本研究において見出された Lachnospiraceae 科酪酸産生菌が同時に増殖する共培養条件の検討を行っている。

##### (3) 硫酸還元細菌に対する腸ムチン付着競合性を有するプロバイオティックビフィズス菌の選抜

先行研究において単離培養した新規の硫酸還元細菌は、純粋培養系では本試験に必要な細胞数が得られなかった。そこで、JCM 分譲株である *Desulfovibrio* 属 2 菌株を用いて、プロバイオティックビフィズス菌による硫酸還元細菌の競合付着性の評価を行った。バイオセンサー Biacore による腸管付着性評価法において、ヒト腸ムチン sHCM-A に対する高い付着性を示したプロバイオティックビフィズス菌 5 菌株について、硫酸還元細菌に対する付着阻害試験を行ったところ、*Bifidobacterium bifidum* MCC1092 株に、特に高い置換・競合能が認められた。本菌株は、先行研究において硫酸基を認識して付着する *Bacteroides* 属細菌に対しては付着競合性が見られなかったことから、硫酸還元細菌とプロバイオティックビフィズス菌間の付着競合性には異なる付着メカニズムが関与すると考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計7件)

1. Igata M, Islam MA, Tada A, Takagi M, Kober AKMH, Albarracin L, Aso H, Ikeda-Ohtsubo W, Miyazawa K, Yoda K, He F, Takahashi H, Villena J and Kitazawa H (2019) Transcriptome modifications in porcine adipocytes via toll-like receptors activation. *Frontiers in Immunology*, 査読有、10、2019、Article1180  
doi: 10.3389/fimmu.2019.01

2. Ikeda-Ohtsubo W, Brugman S, Warden CH, Rebel JMJ, Folkerts G and Pieterse CMJ (2018) How can we define “optimal microbiota?”: A comparative review of structure and functions of microbiota of animals, fish, and plants in agriculture. *Frontiers in nutrition*, 査読有、5、Article 90  
doi: 10.3389/fnut.2018.00090

3. Kanmani P, Albarracin L, Kobayashi H, Hebert EM, Saavedra L, Komatsu R, Gatica B, Miyazaki A, Ikeda-Ohtsubo W, Suda Y, Aso H, Egusa S, Mishima T, Salas-Burgos A, Takahashi H, Villena J and Kitazawa H, Genomic characterization of *Lactobacillus delbrueckii* tua44081 and evaluation of the antiviral activities of its extracellular polysaccharides in porcine intestinal epithelial cells. *Frontiers in Immunology*, 査読有、9、2018、Article2178

doi: 10.3389/fimmu.2018.02178

4. Brugman S, Ikeda-Ohtsubo W, Braber S, Folkerts G, Pieterse CMJ, Bakker PAHM, A comparative review on microbiota manipulation: lessons from fish, plants, livestock, and human research, *Frontiers in nutrition*, 査読有、5、2018、Article 80

doi: 10.3389/fnut.2018.00080

5. Kanmani PL, Albarracin L, Kobayashi H, Iida H, Komatsu R, Humayun Kober AKM, Ikeda-Ohtsubo W, Suda Y, Aso H, Makino S, Kano H, Saito T, Villena J, Kitazawa H, Exopolysaccharides from *Lactobacillus delbrueckii* OLL1073R-1 modulate innate antiviral immune response in porcine intestinal epithelial cells, *Molecular Immunology*, 査読有、93 2018、253-265

<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.07.009>

6. 大坪和香子、齋藤忠夫、ピフィズス菌のクロスフィーディングを利用した炎症性腸疾患を予防するプロバイオティクスの開発、*メディカル・サイエンス・ダイジェスト*、査読有、43、2017、708-710

[jglobal.jst.go.jp/public/201702264065460590](http://jglobal.jst.go.jp/public/201702264065460590)

7. 大坪和香子、硫酸還元細菌の腸管における生態とその研究アプローチ、*無菌生物*、査読有、47、2017、30-38

<https://ci.nii.ac.jp/naid/40021341247>

〔学会発表〕(計 10 件)

1. 有川優希、大坪和香子、木村一雅、伊波匡彦、嘉手納 築、齋藤忠夫、北澤春樹、海藻多糖のプレバイオティクス機能の探索、*酪農科学シンポジウム 2018*、2018 年 9 月 14 日、和洋女子大学(千葉県市川市)

2. Binghui Zhou, Noriyuki Iwabuchi, Ohtsubo (Ikeda) Wakako, Jin-zhong Xiao, Tadao Saito, Haruki Kitazawa, *酪農科学シンポジウム 2018*、2018 年 9 月 14 日、和洋女子大学(千葉県市川市)

3. Zhou Binghui, Ikeda-Ohtsubo Wakako, Kitazawa Haruki, Saito Tadao, 日本畜産学会第 124 回大会、2018 年 3 月 28 日、東京大学農学部(東京都文京区)

4. Sato Nana, Kober Humayun, Albarracin Leonardo, Indoh Yuhki, Ohtsubo Wakako, Aso Hisashi, Saito Tadao, Villena Julio, Haruki Kitazawa, 日本畜産学会第 124 回大会、2018 年 3 月 28 日、東京大学農学部(東京都文京区)

5. 山田 滉介、大坪 和香子、北澤 春樹、齋藤 忠夫、*Lactobacillus bulgaricus* のラクトース取込みの対向輸送解析と低ガラクトースヨーグルトの開発、*日本畜産学会第 124 回大会*、2018 年 3 月 28 日、東京大学農学部(東京都文京区)

6. Igata Manami, AKM Humayun Kober, Tada Asuka, Albarracin Leonardo, Ikeda-Ohtsubo Wakako, Aso Hisashi, Yoda Kazutoyo, Miyazawa Kenji, He Fang, Saito Tadao, Villena Julio, Kitazawa Haruki, TLR2 and 4 ligands stimulate inflammation/adipogenesis in porcine adipocytes、*日本畜産学会第 124 回大会*、2018 年 3 月 28 日、東京大学農学部(東京都文京区)

7. 大坪 和香子、澤田 侑希、北澤 春樹、齋藤 忠夫、ハチミツに含まれるオリゴ糖のピフィズス菌による資化性、*日本農芸化学会 2018 年度大会*、2018 年 3 月 16 日、名城大学天白キャンパス(愛知県名古屋市天白区)

8. 日下 練介、大坪和香子、ヒト腸管粘膜中に常在する硫酸還元細菌の検出と同定、第 51 回日本無菌生物ノートバイオロジー学会、2018 年 1 月 26 日、大阪ガーデンパレス(大阪市淀川区)

9. 澤田侑希、大坪和香子、ハチミツに含まれるオリゴ糖の特徴とプレバイオティクス効果、第 51 回日本無菌生物ノートバイオロジー学会、2018 年 1 月 26 日、大阪ガーデンパレス(大阪市淀川区)

10. W. Ikeda-Ohtsubo, Exploration of sulfate-reducing bacteria colonizing the intestinal tracts, *Microbiology Centennial Symposium*、2017 年 10 月 19 日、Wageningen 大学(オランダ)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：齋藤 忠夫  
ローマ字氏名：Tadao Saito  
所属研究機関名：東北大学  
部局名：大学院農学研究科  
職名：名誉教授  
研究者番号（8桁）：00118358

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：北澤 春樹  
ローマ字氏名：Haruki Kitazawa

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。