

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K11510

研究課題名(和文) 飲酒による腸内細菌叢の破綻と植物乳酸菌の生菌摂取による修復の機構

研究課題名(英文) Improvement of alcohol-poisoning symptoms in mice by the oral administration of live *Lactobacillus plantarum* SN13T cells

研究代表者

杉山 政則 (Sugiyama, Masanori)

広島大学・医系科学研究科(薬)・共同研究講座教授

研究者番号：30106801

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：以前、エタノールをマウスに投与すると、「盲腸」の細菌叢が非投与と比べ、腸内細菌叢が破綻することを見出した。今回、盲腸内の細菌に作用し、腸内細菌叢の破綻による炎症や疾患を改善できる植物乳酸菌株と薬用植物を調査した。その結果、植物乳酸菌で薬用植物エキスを発酵させると、抗炎症物質や抗酸化物質が新生したことから、腸内腐敗を抑える組み合わせを調査した。薬用植物(48種)-乳酸菌(10株)による発酵エキスを調べた結果、ライチ由来 LY45株によるステビアエキス発酵液が最高の抑制効果があった。更に、その発酵エキスを投与すると、アルコール中毒マウスの盲腸内細菌叢の破綻と中毒症状がともに改善した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エタノールの摂取によって増加し、発酵エキス投与でその変化が抑制されていたものとして、*Escherichia*属、*Enterococcus*属、SMB53属、そしてDorea属が確認された。一方で、エタノール摂取により減少し、発酵エキス投与でその変化が抑制されていた属はみられなかった。ちなみに、SMB53属は、マウスのdysbiosisモデルで存在比が著しく上昇することが確認されており、またII型糖尿病や肥満、肝臓がん等との関連性についても報告がなされている。本研究結果から、ステビア発酵エキスはエタノール中毒モデルマウスにおけるdysbiosisとその症状をともに改善することが示された。

研究成果の概要(英文)：It has been previously shown that continuous feeding of ethanol in diets caused mice dysbiosis, in which the cecal microbiota was altered compared with that in non-feeding control group, especially in some bacterial genus participated in gut inflammation and mucosal protection. The cecum is predicted to play a role in preservation of bacteria that contribute to keep a balance of gut microbiota. We aimed to improve and prevent the dysbiosis and following inflammation by controlling the cecal microbiota using P-LAB.

Medicinal herbal extract fermented with P-LAB are newly able to produce anti-inflammatory substances and antioxidants, we tried screening in the combination of medicinal herb and LAB strains to find effective ones for improve and prevent the dysbiosis. We have found that the stevia extract fermented with a strain LY45 possesses superior effect in the prevention. Further, LY45-fermented stevia extract were effective in the ethanol-poisoning model mice.

研究分野：微生物学、微生物薬品学、予防医学

キーワード：植物由来乳酸菌 プロバイオティクス 生薬 薬用植物 発酵

### 1. 研究開始当初の背景

腸内細菌叢は、難消化性多糖の分解、ビタミン産生、免疫システムの構築、そして病原細菌の増殖抑制といった役割を担っており、健康を維持するために不可欠な存在である。腸内細菌叢のバランスが崩れると、大腸癌や潰瘍性大腸炎、II型糖尿病、そして肥満等の発症にもつながる。腸内細菌叢のバランスの崩れは、抗生物質の乱用、偏った食事、加齢、ストレス等によって起きる。例えば、高タンパクや高脂肪食に偏ると、病原毒素をつくる腸内細菌が大腸で増加して、下痢症状や大腸癌を誘発する。この現象は、「有害菌の増殖による腸内細菌叢の破綻 (dysbiosis)」と捉えることができる。最近、これまで不要とされていた虫垂 (盲腸) が、IgA の産生場所であり、また腸内細菌叢の備蓄場所としても関わっていることが見出された [1]。すなわち、腸内細菌叢を理解するためには、大腸を反映する「糞便」中の腸内細菌叢以外に、虫垂の腸内細菌叢を解析した上で疾患との関わりを議論する必要がある。

申請者は、平成 15 年から、文部科学省と経済産業省の産学官連携プロジェクト研究に継続して採択されて以来、生活習慣病の予防改善に有効な植物由来の乳酸菌 (植物乳酸菌) の探索と機能性研究を推進してきた。例えば、バナナの葉から分離した *Lactobacillus (L.) plantarum* SN13T は、胃酸と胆汁酸に対する高度耐性を持つことから生きて腸管に届くことを明らかにした。さらに、SN13T 株を用いて製造したヨーグルトを、12 週間、被験者に摂取してもらう臨床研究を実施した結果、本乳酸菌株は、便通の改善以外に、AST、ALT、そして  $\gamma$ -GTP 値を有意に低下させる機能を持つことを見出した [2]。他方、マウスにアルコールを経口投与すると、マウスの虫垂 (盲腸) の腸内細菌叢中の RF32 目 (Order) に分類される腸内細菌が増加し、反対に *Akkermansia muciniphila* は肝機能改善に関わっていることが報告された [3]。

申請者は、アルコール投与時に SN13T 株の生菌を共存させると、両細菌の変動が抑制され、アルコール非摂取における腸内細菌叢に近づくことを観察した。更に、アルコール摂取マウスの腸管内で、腐敗臭と毒性に関与する「カダベリン」と「チラミン」の濃度が高まったが、生菌の経口投与で減少した。ちなみに、死菌ではこれらの物質は減少しなかった。

他方、循環器と脳の機能に必要な栄養素「コリン」から腸内細菌によってつくられる TMAO (trimethylamine N-oxide) の血中濃度が高いと、心血管疾患と脂肪性肝炎のリスクが高まることが指摘されている [4] (図 1)。更に、「腸内細菌叢を構成する *A. muciniphila* の比率が炎症性腸疾患患者と生活習慣病患者で減少している」ことも報告された [5]。

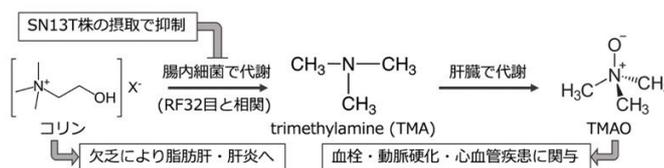


図 1. 生体内におけるコリンから TMAO への代謝経路とその場合に生じる生体への影響。

TMAO の産生により心血管疾患リスクが高まるとともに、基質であるコリンが減少することによる脂肪性肝炎リスクも合わせて上昇する。SN13T 株の摂取により、腸内細菌叢の改善を通じてこの代謝経路がブロックされる可能性が考えられた。

### 2. 研究の目的

今回、腸管の「虫垂 (盲腸)」にスポットを当て、飲酒が腸内細菌叢を破綻させることから、「アルコールによる腸内細菌叢の破綻と植物乳酸菌の摂取による回復」の研究を進めることに学術的新規性を見出したい。予備実験の結果、アルコール摂取による腸管の細菌叢の大きな変化は、「虫垂」で起きていることがわかった。これ返に、申請者のグループが保有する 7 種類の植物乳酸菌のいずれかをマウスに一定期間経口投与したところ、腸内細菌叢の変動は乳酸菌株ごとに異なっていた (図 2)。これまでの結果から判断すると、「腸内細菌叢のバランスを保つためには、虫垂に貯蔵されたある腸内細菌」が必要であり、アルコール中毒を発症したマウスは、虫垂の「腸内細菌叢のバランスを取るための調整能力」が失われることで、細菌叢が破綻するものと考えられ、乳酸菌の経口投与により、細菌叢破綻から回復できたものと推測する。

以前は、虫垂炎 (盲腸炎) の治療には虫垂の外科的切除が行われ、虫垂は不要な組織と認識されてきた。しかしながら、近年、虫垂を持つ動物と持たない動物を比較した研究 [6]、虫垂を切除したマウスの腸内細菌叢解析 [1]、そして虫垂切除と大腸癌の関係 [7] などの結果を総合すると、「虫垂とは、善玉菌を増やして保管するための器官」と言える。換言すれば、虫垂は腸内細菌叢をバランス良く保つために必要な器官であると解釈できる。

ある腸内細菌は、ときに腸管に炎症を引き起こす要

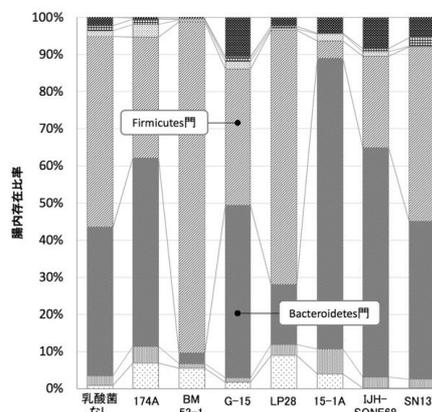


図 2. 各植物乳酸菌株を摂取させた際の健康マウスにおける腸内細菌叢の変化の様子。優勢菌叢を構成する Firmicutes 門および Bacteroidetes 門について図中に示す。

因となる一方、正常な免疫システムを維持し、過剰に攻撃的な免疫反応が起こらないように調節していると考えられる。換言すれば、免疫の過剰応答は腸内細菌叢の機能不全によって起きると捉えることができる。近年、代謝異常症、動脈硬化、癌の浸潤・転移、自己免疫疾患、神経変性疾患、そして炎症性腸疾患などに「炎症」が関わっていると考えられるようになってきた。わが国の炎症性腸疾患の罹患率は、欧米と比べると低いものの、2016年には潰瘍性大腸炎が約17万人、クローン病が約4万人にも達しており、これら疾患に対する治療や予防対策は急務である。換言すれば、腸管の炎症を抑えることができれば、上記の疾患の治療法や予防法となる。申請者は、今回、虫垂（盲腸）細菌叢を構成する細菌に対する植物乳酸菌の働きかけと、健康への優れた役割について、アルコール中毒改善のみでなく、炎症改善にも踏み込んで解明する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 生薬発酵エキスの調製

購入した生薬の細片を5% (w/v) となるよう蒸留水中に投入し、105℃、30分の条件で熱水抽出を行った。抽出したエキスから生薬細片残渣を遠心により取り除き、1N NaOH水溶液の添加によってエキスのpHを7に調整した後、121℃、20分の条件で滅菌処理を行った。その後、MRS液体培地で種培養した乳酸菌培養液を1% (v/v) となるよう各エキスに播種し、28℃あるいは37℃で1日間静置培養した。培養後、再び121℃、20分の条件で滅菌処理を行い、遠心によって乳酸菌菌体を取り除いたものを生薬発酵エキスサンプルとした。

この時、生薬または薬用植物として、胡麻仁（ゴマニン）、艾葉（ガイヨウ）、枇杷葉（ピヨヨウ）、益母草（ヤクモソウ）、百合（ビャクゴウ）、菊花（キクカ）、厚朴（コウボク）、蒼朮（ソウジュツ）、木通（モクツウ）、金銀花（キンギンカ）、枳実（キジツ）、紫根（シコン）、芍薬（シャクヤク）、杏仁（アンニン）、何首烏（カシュウ）、川芎（センキュウ）、ウラルカンゾウ、コガネバナ、ツボクサ、薄荷（ハッカ）、牡丹皮（ボタンピ）、淫羊藿（インヨウカク）、桂皮（ケイヒ）、半夏（ハンゲ）、紅花（コウカ）、甘草（カンゾウ）、山梔子（サンシシ）、スペインカンゾウ、荊芥（ケイガイ）、当归（トウキ）、桔梗（キキョウ）、桃仁（トウニン）、酸棗仁（サンソウニン）、大棗（タイソウ）、紫蘇葉（シソヨウ）、三七人參（サンシチニンジン）、大黃（ダイオウ）、黄芩（オウゴン）、枸杞子（クコシ）、黃連（オウレン）、黃耆（オウギ）、白朮（ビャクジュツ）、生姜（ショウキョウ）、防風（ポウフウ）、茯苓（ブクリョウ）、陳皮（チンピ）、ステビア、および木香（モッコウ）を用いた。また、発酵に用いる植物乳酸菌として、*L. plantarum* SN13T、*L. plantarum* SN35N、*L. brevis* 174A、*L. amylovorus* PY45、*L. reuteri* BM53-1、*L. paracasei* IJH-SONE68、*Enterococcus (E.) avium* G-15、*E. mundtii* 15-1A、*Pediococcus (P.) pentosaceus* LP28、そして *P. pentosaceus* LY45 を選択した。

#### (2) エタノール中毒モデルマウスの構築

エタノール中毒モデルマウスの構築は、過去の報告に従って実施した [8]。具体的には、C57BL/6J 雄性マウス（7週齢）をマウス基礎飼料（MF、オリエンタル酵母）で1週間予備飼育した後、エタノールを含む液体飼料として Research Diet 社の L10016 を自由摂取させることで構築した。なお、予備飼育の時を除いて飲用水は与えず、水分の補給もこの液体飼料によって行うこととした。また、エタノールを含まない液体飼料として L10015 を用い、エタノール非摂取コントロールマウスとした。

#### (3) トリメチルアミン（TMA）産生抑制性を指標とした *in vitro* スクリーニング系の構築

エタノール中毒モデルマウスから回収した盲腸内容物をサンプルとして用い、その培養時に産生される TMA（コリンから腸内細菌叢によって産生され、身体に吸収された後に肝臓で代謝されることで血栓や動脈硬化、心血管疾患のリスクを高めると報告のある化合物）の量を腐敗抑制の指標とした。盲腸内容物を変法 GAM 培地で嫌気培養して調製した種培養液を、各生薬発酵エキスサンプルを添加した変法 GAM 培地に 20% (v/v) となるよう播種し、37℃で嫌気培養した。培養液から遠心によって菌体を取り除き、得られた上清中に含まれる TMA を、改良 Dyer 法 [9, 10] によって測定した。具体的には、まず各上清 1 mL に対し、1:3 中性ホルマリン溶液 0.2 mL、乾燥トルエン 2 mL、25% (w/v) KOH 水溶液 0.6 mL を順次加え、激しく1分間攪拌した。5分以上室温で静置し、分離したトルエン層を回収し、無水硫酸ナトリウムの添加により脱水処理を行った。0.02% (w/v) ピクリン酸水溶液 1 mL に対して等量の脱水済みのトルエン層を加えて反応させ、予め作成しておいた検量線に基づき、生じた黄色のピクレート濃度を 450 nm の吸光度で測定した。

#### (4) エタノール中毒モデルマウスにおける有効性の評価

エタノール中毒モデルマウスの構築と同様、過去の報告に従って実施した [8]。具体的には、1週間の予備飼育を行った C57BL/6J 雄性マウス（7週齢）を A 群（L10015 のみで飼育：陰性コントロール）、B 群（L10016 のみで飼育：陽性コントロール）、C 群（L10016 + 未発酵エキス）、D 群（L10016 + 発酵エキス）の計 4 群に分けて実験を開始した。エタノール含有飼料の摂取開始と同時に、C 群と D 群には 1 日あたり 100 μL のエキスをゾンデにより経口投与した。なお、A 群と B 群には、エキスの代わりに滅菌蒸留水を投与した。

エタノール飼料摂取開始から 2 週間後、イソフルラン吸入による深麻酔によって安楽殺し、血

液および盲腸をそれぞれ回収した。マウスより回収した血清に対して、AST、ALT、アルカリホスファターゼ (ALP)、乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH)、コリンエステラーゼ (ChE)、および総コレステロール (T-Cho) の各値について、オリエンタル酵母工業株式会社の受託サービスを利用して測定した。また、マウスより回収した盲腸内容物においては、株式会社生物技研の受託サービスを利用することとした。

#### 4. 研究の成果

##### (1) TMA 産生抑制活性を示す生薬発酵エキス

エタノール中毒モデルマウス由来の盲腸内容物を培養した際に NC 群と比べて有意に増加する TMA の産生を抑制する生薬・薬用植物 (48 種類)―乳酸菌 (10 菌株) 発酵エキスの各組み合わせについて検討した。まず、生薬単独で調査したところ、比較的良好な TMA 産生抑制が認められたのがソウジュツ、ハッカ、ハンゲ、トウキ、タイソウ、シソヨウ、サンシシ、そしてクコシであった。それらの中でも比較的強い抑制活性を示したサンシシおよびクコシを生薬サンプルに固定し、10 種類の植物乳酸菌株で発酵したサンプルにおけるそれぞれの TMA 産生抑制活性を評価した。その結果から、発酵後に阻害活性の向上した SN35N、G-15、LP28、LY45、そして IJH-SONE68 の 5 株について、引き続き研究に使用することとした。

これら 5 株に的を絞って、改めて生薬を発酵してサンプルを調製し、アッセイを行った。その結果、発酵により大きく TMA 産生抑制活性が向上した植物乳酸菌株としては LY45 株が、また生薬としては、ポウフウ、ステビア、カンゾウ、ダイオウ、トウニン、センキュウ、ビャクゴウ、そしてピロヨウが該当した。それらの中でも、ステビアの発酵エキスが最も高い抑制活性を示したことから、以降の実験ではステビアの LY45 株による発酵エキスをサンプルとして用いることとした。

##### (2) エタノール中毒モデルマウスにおける改善効果

続いて、*in vitro* のスクリーニング結果をもとに、ステビアの LY45 株発酵エキスを用い、エタノール中毒モデルマウスを用いて実際に症状に対する改善効果があるか否か、実験を行った (図 3)。本モデルマウスでは、肝機能数値である AST および ALT の値が陰性コントロール群と比べて有意に上昇しており、それがステビアの LY45 株による発酵エキス摂取群で有意に改善することが確認された (図 3A および B)。なお、LDH でも同様の改善が観察されたが、有意差は認められなかった (図 3D)。

加えてこの時、盲腸内容物を回収し、それを嫌気培養した際に産生される TMA 量を比較したところ、肝機能数値と同様に発酵エキスの摂取において有意に改善されることが確認された (図 3G)。

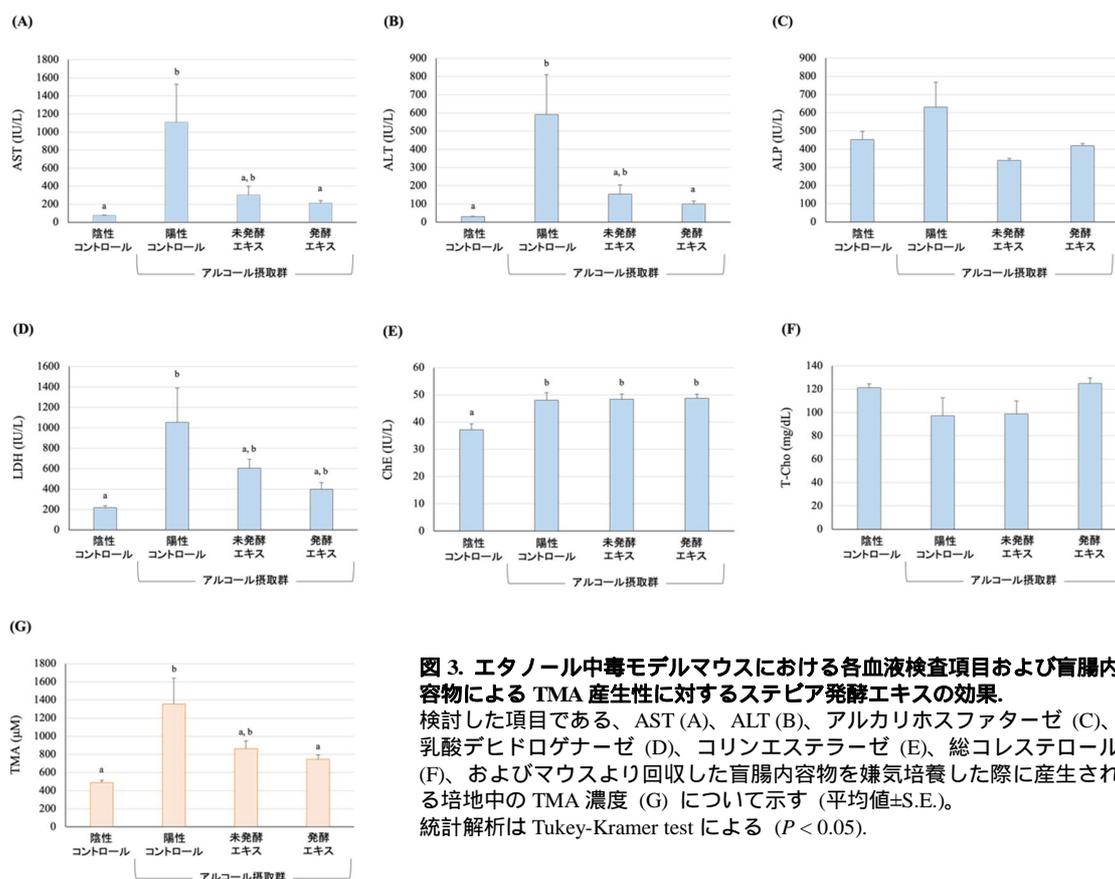


図 3. エタノール中毒モデルマウスにおける各血液検査項目および盲腸内容物による TMA 産生性に対するステビア発酵エキスの効果。

検討した項目である、AST (A)、ALT (B)、アルカリホスファターゼ (C)、乳酸デヒドロゲナーゼ (D)、コリンエステラーゼ (E)、総コレステロール (F)、およびマウスより回収した盲腸内容物を嫌気培養した際に産生される培地中の TMA 濃度 (G) について示す (平均値±S.E.)。

統計解析は Tukey-Kramer test による ( $P < 0.05$ )。

### (3) ステビア発酵エキスによる盲腸細菌叢への影響

次に、発酵エキスの摂取により、盲腸内容物についてどのような変化が生じているのか、16S rDNA 配列を基にした細菌叢解析を行った。この時、疾病や健康との関連性の報告がある程度揃っている属レベルでの変化を対象とし、エタノール摂取によって大きく変動し、かつ発酵エキスの投与によってその変化が回復・改善したものについて着目した。その結果、エタノールの摂取によって増加し、発酵エキス投与でその変化が抑制されていたものとして、*Escherichia* 属、*Enterococcus* 属、*SMB53* 属、そして *Dorea* 属が確認された。一方で、エタノール摂取により減少し、発酵エキス投与でその変化が抑制されていた属はみられなかった。これらのうち *SMB53* 属は、マウスの dysbiosis モデルで存在比が著しく上昇することが確認されており [11]、また II 型糖尿病や肥満、肝臓がん等との関連性についても報告がなされている [12–15]。すなわち、本研究結果から、ステビア発酵エキスはエタノール中毒モデルマウスにおける dysbiosis とその症状とともに改善することが示された。この発酵エキス中に生成された代謝物の構造解析を明らかにすべく、今後も継続して研究に取り組む予定である。

#### < 引用文献 >

- Masahata *et al.*, *Nat. Commun.*, **5**, 704 (2014)  
Higashikawa *et al.*, *Nutrition*, **26**, 367–374 (2010).  
Castro-Mejía *et al.*, *Gastroenterol. Res. Pract.*, **2016**, 4953120 (2016).  
Gregory *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **290**, 5647–5660 (2015).  
Derrien *et al.*, *Microb. Pathog.*, **106**, 171–181 (2017).  
Smith *et al.*, *C. R. Palevol.*, **16**, 39–57 (2017).  
Wu *et al.*, *PLoS One*. **10**, e0118411 (2015).  
Noda *et al.*, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 1896 (2020).  
橋本ら, *日本水産学会誌*, **23**, 269–272 (1957).  
Dyer WJ. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **6**, 351–358 (1945).  
Yang *et al.*, *Sci. Rep.*, **6**, 27427 (2016).  
Horie *et al.*, *Exp. Anim.*, **66**, 405–416 (2017).  
Chen *et al.*, *BMC Genom.*, **19** (Suppl 10), 904 (2018).  
Wang *et al.*, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, **12**, 836987 (2022).  
Liu *et al.*, *Microbiome*, **8**, 83 (2020).

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Okamoto T, Sugimoto S, Noda M, Yokooji T, Danshiitsoodol N, Higashikawa, F, Sugiyama M.	4. 巻 11
2. 論文標題 Interleukin-8 release inhibitors generated by fermentation of <i>Artemisia princeps</i> Pampanini herb extract with <i>Lactobacillus plantarum</i> SN13T.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Front Microbiol.	6. 最初と最後の頁 1159
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2020.01159	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Shakya S, Danshiitsoodol N, Noda M, Inoue U, Sugiyama M.	4. 巻 13
2. 論文標題 3-Phenyllactic acid generated in medicinal plant extracts fermented with plant-derived lactic acid bacteria inhibits the biofilm synthesis of <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> .	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Front Microbiol.	6. 最初と最後の頁 991144
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2022.991144	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Shakya S, Danshiitsoodol N, Sugimoto S, Noda M, Sugiyama M.	4. 巻 10
2. 論文標題 Anti-oxidant and anti-inflammatory substance generated newly in <i>Paeoniae Radix Alba</i> extract fermented with plant-derived <i>Lactobacillus brevis</i> 174A.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 1071
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/antiox10071071	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Shakya S, Danshiitsoodol N, Noda M, Sugiyama M.
2. 発表標題 In vitro anti-inflammatory effect of a probiotic candidate bacteria secreted protein fraction.
3. 学会等名 ISAPP-SFA Virtual Meeting 2020（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Qingmiao Ma, Masafumi Noda, Narandalai Danshiitsoodol, Masanori Sugiyama
2. 発表標題 Fermented stevia improved alcohol-poisoning symptoms in association with changes in the gut microbiota of mice
3. 学会等名 日本生物工学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shakya S, Danshiitsoodol N, Noda M, Sugiyama M.
2. 発表標題 Lactobacillus brevis 174A fermentation enhances anti-inflammatory activity of Paeoniae Radix in vitro.
3. 学会等名 13th International Symposium on Lactic Acid Bacteria-Online. (国際学会)
4. 発表年 2021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
研究分担者	NARANDALAI DANSHIITSOODOL (DANSHIITSOODOL NARANDARA I)  (00786072)	広島大学・医系科学研究科(薬)・共同研究講座准教授  (15401)	
研究分担者	野田 正文 (NODA MASAFUMI)  (40457289)	広島大学・医系科学研究科(薬)・特任准教授  (15401)	
研究分担者	杉本 幸子 (SUGIMOTO SACHIKO)  (60549012)	広島大学・医系科学研究科(薬)・准教授  (15401)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	東川 史子  (HIGASHIKAWA FUMIKO)  (70346534)	広島大学・病院（医）・主幹特任学術研究員    (15401)	

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