

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月28日現在

機関番号：20104

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500781

研究課題名（和文） 食事導入期のタンパク質栄養の制御による正常な大腸内環境の構築

研究課題名（英文） Formation of a healthy colonic environment under the control of protein nutrition during the weaning period

研究代表者

西村 直道（NISHIMURA NAOMICHI）

名寄市立大学・保健福祉学部・教授

研究者番号：10341679

研究成果の概要（和文）：

食事導入期に与えるタンパク質が大腸内環境形成に与える影響を明らかにするため、離乳ラットに異なるタンパク質を与えたときの腸内細菌叢および大腸内発酵の変動を調べた。その結果、食事導入期の大豆タンパク質摂取で獲得した腸内細菌叢は安定で、酪酸生成を亢進することが判明した。この現象は肥満マウスでもみられ、肥満抑制に関与している可能性が見出された。以上より、食事導入期の適切なタンパク質摂取で、健全な大腸内環境を構築できることがわかった。

研究成果の概要（英文）：

To determine whether protein affects formation of the colonic environment during the weaning period, we examined the change in colonic microbiota and fermentation in weaning rats fed different proteins. Colonic microbiota, colonized by soy protein isolate during the weaning period, were stable and produced high amounts of butyrate. The same phenomenon was also observed in obese mice, suggesting that unique colonic microbiota were formed by the administration of soy protein isolate during the weaning period. In addition, the administration of soy protein isolate may be involved in the suppression of fat accumulation due to the unique microbiota. Taken together, we found that the administration of appropriate protein during the weaning period established a healthy colonic environment.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：大腸内発酵、窒素供給、腸内細菌叢、食事導入期、離乳、酪酸、短鎖脂肪酸

1. 研究開始当初の背景

大腸疾病発症が腸内細菌叢の違いで変わ

る可能性が示唆されている。腸内細菌叢の変動は酪酸生成量に影響を与える。酪酸は正常

な大腸上皮細胞の増殖促進能を有し、ガン化細胞のアポトーシスを誘導するため、大腸内環境を正常化する因子である。また、腸内細菌そのものも大腸粘膜や肥満発症に影響を与える。幼児期に *Staphylococcus aureus* が大腸に定着することで低レベルの炎症を引き起こし、肥満発症に関与している可能性も報告されている。しかし、これまでに大腸内環境を変える目的に投与されるのは、糖質源である食物繊維、オリゴ糖などや腸内細菌そのものであった。細菌増殖に欠かせない窒素源の大腸内環境に与える影響や食事導入期におけるその必要性を調べた研究はほとんどない。

本研究者は、以前に大豆難消化性タンパク質をペクチンと同時に投与した場合、大腸内でプロピオン酸と酪酸の生成が増加し、特定の細菌種が活性化することを見出し、大腸への窒素供給の重要性を明らかにしている。食事導入期に確立された腸内細菌叢は長期間維持されるため、この時期に大腸に適切な窒素源を十分供給することは、大腸疾病や肥満の発症抑制につながることを期待できる。

2. 研究の目的

酪酸は大腸内の構造を健全に維持するため、正常な大腸内環境を保持する上で欠かせない。大腸内に適切な腸内細菌叢を食事導入期に構築できれば、長期に渡って正常な大腸内発酵を可能にし、大腸疾病や肥満の発症を抑えられる。本研究では、腸内細菌の増殖に欠かせない適切な窒素源を供給するために食事導入期に摂取するタンパク質（特に大豆タンパク質）を制御することによって、適切な腸内細菌の大腸への定着と発酵に及ぼす影響を検討した。

3. 研究の方法

(1) 食事導入期の異なるタンパク質摂取による腸内細菌定着の変動

① 食事導入期に与えるタンパク質の違いが腸内細菌叢に与える変動

カゼイン (Cas) 飼料を与えた妊娠ラットに出産、授乳させた仔ラットを強制離乳し、Cas および大豆タンパク質 (SPI) を窒素源とした飼料を 28 日間与えた。食事導入 0, 3, 7, 14, 21, 28 日後に麻酔下で解剖し、ただちに盲腸内容物を得た。盲腸内容物中の短鎖脂肪酸濃度変動を HPLC 法で、腸内細菌叢パターンを 16S

rDNA の特異的領域を増幅した後に、PCR-DGGE (変性グラジエントゲル電気泳動) 法で解析した。Bifidobacteria や Lactobacilli 数を定量的 PCR 法で解析した。

② 食事導入期の SPI 摂取により構築した腸内細菌叢の安定性

①と同様、Cas 飼料を与えた妊娠ラットに出産、授乳させた仔ラットを強制離乳し、Cas および SPI を窒素源とした飼料を 21 日間与えた。食事導入 21 日後、お互いの飼料を交換し、14 日間与えた。食事導入 0, 7, 14, 21, 28, 35 日後に麻酔下で解剖し、ただちに盲腸内容物を得た。盲腸内容物中の短鎖脂肪酸濃度、腸内細菌叢パターンを①と同様の方法と 16S rDNA クローンライブラリ法で解析した。

(2) 食事導入期の大腸内窒素供給による腸内細菌叢の構築に対する糖質同時供給の影響

妊娠ラットに出産、授乳させた仔ラットを強制離乳し、Cas および SPI を窒素源とした飼料およびそれらにペクチンを 5% 添加した飼料 (Cas-P および SPI-P) を 28 日間与えた。食事導入 0, 14, 28 日後に総 H₂ 排出量を測定した後、麻酔下で解剖し、ただちに門脈血と盲腸内容物を得た。盲腸内容物中の短鎖脂肪酸濃度、腸内細菌叢パターンを①と同様の方法で解析した。門脈血中の H₂ 濃度を GLC で測定した。

(3) 肥満マウス腸内細菌叢の定着に及ぼす食事導入期大腸内窒素供給の影響

肥満マウスのヘテロマウス (C57BL/6J ob/-) の交配により得られた仔ラット

(C57BL/6J ob/- および C57BL/6J ob/ob) を 21 日齢で強制離乳し、Cas および SPI を窒素源とした飼料を 14 日間与えた。食事導入 14 後に麻酔下で解剖し、ただちに盲腸内容物、腎周囲脂肪、肝臓を得た。定着した腸内細菌叢の違いを (1)-②と同様の方法で調べた。腎周囲脂肪の薄切標本をヘマトキシリン-エオジン染色した後、NIH イメージを用いて脂肪細胞サイズを測定した。

4. 研究成果

(1) 食事導入期の異なるタンパク質摂取による腸内細菌定着の変動

① 食事導入期に与えるタンパク質の違いが腸内細菌叢に与える変動

SPI 食群の腸内細菌叢パターンは Cas 食群と異なる新たなクラスターを食事導入 7 日後以降形成し、食事導入 21 日後にはその菌叢がほぼ安定した。Lactobacilli 数は食事導入 14 日後まで SPI 食群で有意に高かったが、21 日目以降同程度であった。食事導入 28 日後の Bifidobacteria 数は Cas 食群で SPI 食群より有意に高かった。SPI 投与ラットの盲腸内酪酸濃度は Cas 食群のそれに比べ有意に高く、食事導入 21 日後ではほぼ一定となった (図 1)。酢酸濃度、プロピオン酸濃度でも同様の傾向を示した。以上より、食事導入期の SPI

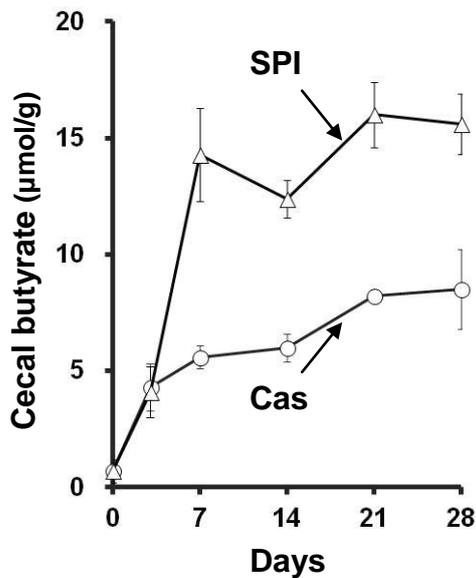


図1 食事導入期に異なるタンパク質を摂取した場合の盲腸内酪酸濃度変動

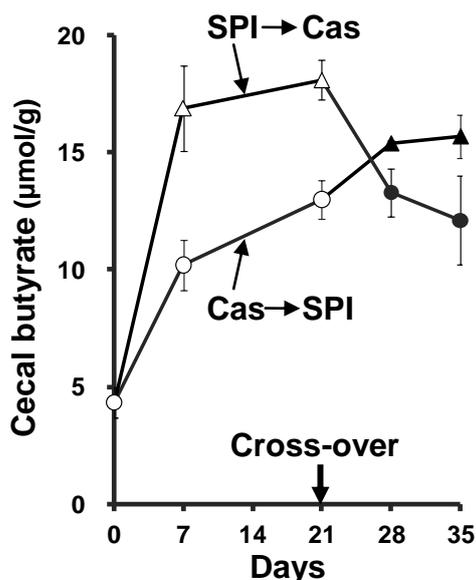


図2 食事導入期にタンパク質を交換した場合の盲腸内酪酸濃度変動

投与によって大腸内に流入した窒素源は特有の大腸内細菌叢の形成に寄与し、大腸上皮細胞のエネルギー源となる酪酸の生成を亢進させることがわかった。このように食事導入期に適切な窒素源を大腸内に供給することで、高酪酸生成細菌叢の形成を促すことができれば、長期にわたって大腸上皮細胞の主要なエネルギー源を十分提供できる。これは大腸組織を健全に保つ上でとても重要である。

②食事導入期の SPI 摂取により構築した腸内細菌叢の安定性

食事導入直後の SPI 投与による酪酸生成亢進作用は、Cas 食に切り換えることで消失したが (図 2)、腸内細菌叢は SPI から Cas に切り替えても SPI 摂取時の細菌叢と類似していた (図 3)。一方、Cas 食から SPI 食に切り替えたラットの腸内細菌叢パターンは有意に変動した。他の短鎖脂肪酸濃度も SPI に切り替えると有意に上昇したが、その上昇は食事導入直後に SPI を摂取したときに比べ小さかった。以上より、タンパク質源として食事導入期に SPI を与えることで獲得した腸内細菌叢パターンは安定しており、食事導入期の SPI 投与が高酪酸生成を可能にする腸内細菌叢の定着に寄与することを明らかにした。食事導入が完了してからは多様な食品を摂取することになるため、このような安定的な細菌叢の獲得は、大腸疾病を予防する上で必須とい

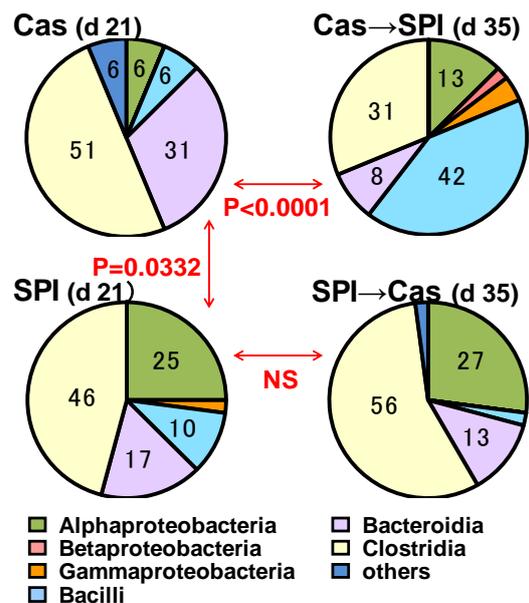


図3 食事導入期の SPI 摂取により形成された腸内細菌叢の安定性

える。

(2) 食事導入期の大腸内窒素供給による腸内細菌叢の構築に対する糖質供給の影響

SPI-P 食群の摂食量は他群より低下傾向を示し、体重増加量は他群より有意に低下した。食事導入 14 日後の腸内細菌叢パターンは群ごとに固有のパターンを形成する傾向を示したが、安定したものではなかった。一方、食事導入 28 日後の細菌叢パターンは各飼料摂取でそれぞれ固有のパターンを形成した。また、摂取タンパク質によらず、ペクチン投与群の細菌叢パターンは比較的類似した。食事導入 14 日後、SPI 食群の盲腸内酪酸濃度は他群より有意に高く、これまでの結果を再現した。しかし、いずれの食事導入期においても SPI-P 食群のそれは SPI 食群と同等もしくはそれ以下だった。一方、総 H₂ 排出量はペクチンの同時投与によって有意に増加した。以上より、食事導入期に SPI と同時にペクチンを与えても、大腸内酪酸生成を促進することはできないが、H₂ 生成を促進できることがわかった。

(3) 肥満 (ob/ob) マウス腸内細菌叢の定着に及ぼす食事導入期大腸内窒素供給の影響

食事導入 7 日後以降、いずれの遺伝子型でも SPI 食群で Cas 食群と比べ有意に体重は低値を示した。食事導入 14 日後、SPI 食群の腸内細菌叢パターンは Cas 食群と異なる傾向を示した (P = 0.0597)。ラット実験より腸内細菌叢の安定化まで 21 日間要する可能性が示唆されており、肥満マウスへの 14 日間の SPI

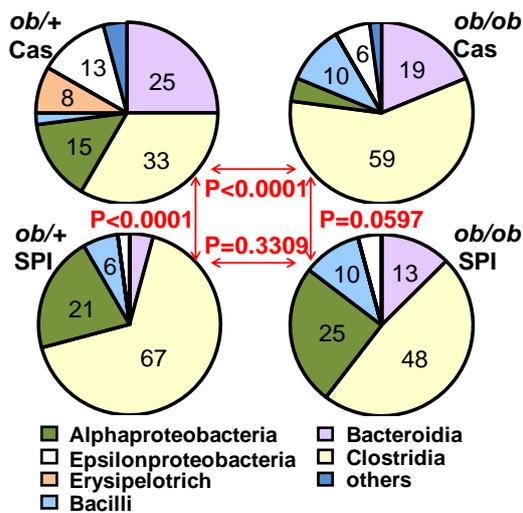


図 4 肥満マウスの食事導入期に SPI を投与したときの腸内細菌叢パターン変動

投与では細菌叢の変動が小さかったのかもしれない。一方、ヘテロ (ob/+) マウスでは食事導入期の SPI 投与で、Cas 投与と比べ細菌叢パターンが有意に異なった。また、Cas 投与のヘテロマウスと肥満マウスの間でも有意な腸内細菌叢パターンの違いが認められた。しかし、SPI 投与の両マウス間の腸内細菌叢には差が見られなかった。したがって、SPI によって遺伝子型の違いによる腸内細菌叢の違いが消失したものと考えられる。腎周囲脂肪組織の脂肪サイズは SPI 食群で Cas 食群より有意に小さかった。以上より、窒素源として食事導入期に SPI で窒素を供給すると、正常動物のみならず、肥満モデル動物でも大腸内の腸内細菌叢の定着に影響を与えられることが判明した。SPI 食群で脂肪細胞のサイズ減少も認められたが、腸内細菌叢の変動との関係についてはさらなる検証が必要である。肥満発症にはある種の腸内細菌が関与しているという報告が近年多数示されており、今後食事導入期の SPI 投与による腸内細菌叢パターンの変動が肥満発症に与える詳細な影響について解析を進めていくことが必要であろう。

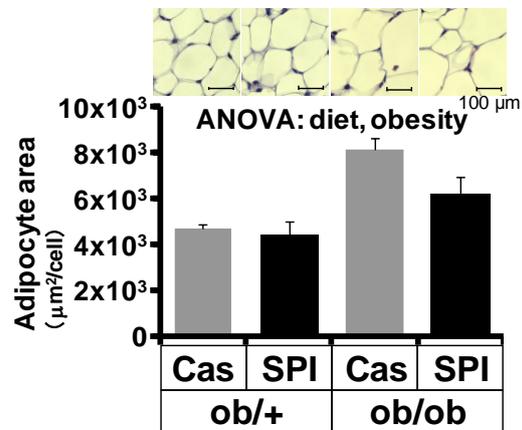


図 5 肥満マウスの食事導入期に SPI を投与したときの脂肪細胞サイズの変動

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Naomichi NISHIMURA, Hiroki TANABE, Yumi SASAKI, Yui MAKITA, Misako OHATA, Saori YOKOYAMA, Mami ASANO, Tatsuro YAMAMOTO, Shuhachi KIRIYAMA, Pectin and high-amylose maize starch increase

caecal hydrogen production and relieve hepatic-ischaemia reperfusion injury in rats. Br J Nutr, 107, 485-492, 2012. 査読有

- ② 西村直道, 濱田佳穂莉, 山本達朗, 大腸内フローラパタンの決定づけに及ぼす離乳後の大豆たん白質摂取の影響. 大豆たん白質研究, 12, 94-99, 2009. 査読無

[学会発表] (計 6 件)

- ① 西村直道, 食餌導入期の大豆タンパク質による高酪酸生成細菌叢の形成をペクチンは増強しない. 第 65 回日本栄養・食糧学会大会, 2011 年 5 月 14 日, 東京
- ② 田邊宏基, H₂ 産生能によるラットの選別で肝酸化障害抑制効果は上昇する. 第 65 回日本栄養・食糧学会大会, 2011 年 5 月 14 日, 東京
- ③ 佐々木由美, H₂ 高産生ラット群の採用で RS 摂取の肝障害抑制効果は増幅される. 日本食物繊維学会第 15 回学術集会, 2010 年 11 月 22 日, 札幌
- ④ 濱田佳穂莉, 食餌導入期の大豆タンパク質摂取による高酪酸生成細菌叢の形成. 第 64 回日本栄養・食糧学会大会, 2010 年 5 月 14 日, 徳島
- ⑤ 濱田佳穂莉, 食餌導入期の大豆タンパク質摂取が腸内細菌叢と大腸内発酵に及ぼす影響. 第 15 回 Hindgut Club Japan シンポジウム, 2009 年 12 月 5 日, 東京
- ⑥ 西村直道, ルミナコイド摂取によるラット門脈血中 H₂ 濃度上昇と虚血-再灌流肝の酸化障害抑制, 日本食物繊維学会第 14 回学術集会, 2009 年 10 月 24 日, 岐阜

[図書] (計 3 件)

- ① 西村直道, アニマル・メディア, 消化管の栄養・生理と腸内細菌 第 6 章大腸発酵と胆汁酸排泄の亢進によるコレステロール代謝調節, 2011, 289-301.
- ② 西村直道, 建帛社, ルミナコイド研究のフロンティアー食物繊維・オリゴ糖・レジスタントスターチの最新研究動向, 2010, 133-150.
- ③ 西村直道, サイエンスフォーラム, 大豆のすべて, 第 5 章第 1 節第 6 項 腸内フローラ(難消化性タンパク質と腸内フローラ), 2010, 173-176.

[その他]

<http://www11.ocn.ne.jp/~nutrbio/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西村 直道 (NISHIMURA NAOMICHI)
名寄市立大学・保健福祉学部・教授
研究者番号：10341679

(2) 研究分担者

山本 達朗 (YAMAMOTO TATSURO)
名寄市立大学・保健福祉学部・講師
研究者番号：90379389
(2010, 11 年度は連携研究者として参画)