

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成26年3月31日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：平成23年度～平成25年度

課題番号：23580097

研究課題名（和文）

ビフィズス菌 対 ルミノコッカス属菌腸内細菌の機能性比較

研究課題名（英文）

Comparison of functions on intestinal microbes between strains of *Bifidobacterium* and *Ruminococcus*.

研究代表者 浅野 行藏 (ASANO, kozo)

北海道大学大学院農学研究院・教授

研究者番号：50312393

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）4,000,000円、（間接経費）1,200,000円

研究成果の概要（和文）：我々は、これまでにプレバイオティクスの候補として難消化性オリゴ糖 DFAIIIを開発し、その資化性腸内細菌として *Ruminococcus productus* AHU1760 をヒトから単離した。本研究では、既知のシンバイオティクスであるフラクトオリゴ糖(FOS)と *Bifidobacterium breve* JCM1192T と腸内挙動を比較することで、DFAIIIと *Ruminococcus productus* AHU1760 が、新たなシンバイオティクス（善玉菌と難消化オリゴ糖の組み合わせ）となる可能性を検証し評価した。試験は、5週齢のSD系雄ラットを用いた。標準食を対照群とし、加えてDFAIIIと *R. productus* AHU1760 の投与群、さらにFOSと *B. breve* JCM1192T の投与群を用いてシンバイオティクスの評価を行った。また試薬のFOSにかえて自然素材のヤーコンも比較試験した。油脂を添加した高脂肪餌条件でもラットを飼育した。30日間の試験飼育を行い、その間のラットの健康状態、解剖後の消化管内容物の多岐にわたる項目を試験した。

いずれのシンバイオティクスでも糞便、盲腸内容物のpH低下、有機酸量の増加がみられ旺盛な腸内発酵を裏付けた。微生物は盛んに生育して腸内環境を健康な状態へと変化・維持させていた。DFAIIIと *R. productus* AHU1760 の組み合わせの方が腸内発酵性は優秀で、特に高脂肪食のストレスの高い腸内環境でも優れた腸内発酵を示した。血清コレステロールの減少傾向も観察された。試薬FOSと比較して等量のFOSを含有するヤーコンパウダーの摂取は、より速い菌叢変化を起し、ヤーコン含有物の複合効果が示された。

研究成果の概要（英文）：

In-digestible saccharides are important to control microbiota in colon. Fructo-oligosaccharide (FOS) is a typical in-digestible oligosaccharide, and it increase cells of *Bifidobacterium* species. We made process to make different in-digestible oligosaccharide which is DFAIII (di-fructose anhydride III) with using microbial enzyme effectively. DFAIII enhanced growth of *Ruminococcus productus* AHU1760 which was isolated from human feces, but not growth of *Bifidobacterium* strains because *Bifidobacterium* strains can't degrade DFAIII. In this study we compared health effect of DFAIII + *Ruminococcus productus* AHU1760 vs. FOS + *Bifidobacterium breve* JCM1192T. Both combination were symbiotic. Yacon which is FOS rich natural vegetable were used as comparison with reagent FOS. Rat used were SD male 5 weeks with normal feed and high fat feed were used. Rats were kept for 30 days and analyzed pH, organic acid compositions, microbiota in cecum with using HPLC, DNA PCR-DGGE.

Both symbiotic showed clear pH decrease in cecal contents and feces which indicated abundant intestinal fermentation by abundant growth of microbes. Differences were observed in high fat conditions. Symbiotic by DFAIII and *Ruminococcus productus* AHU1760 continued abundant intestinal fermentations and kept intestinal pH in lower condition but not symbiotic by FOS and *Bifidobacterium breve* JCM1192T. Those results were supported DNA PCR-DGGE analysis. *Ruminococcus productus* AHU1760 showed better health effect than *Bifidobacterium breve* JCM1192T. Yacon diet gave faster change of intestinal microbiota and pH which showing better health effect than reagent FOS.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：High Fat, Health Effect, Intestinal Bacteria, *Ruminococcus*, *Bifidobacterium*, DFAIII, FOS, Yacon

## 1. 研究開始当初の背景

腸内細菌の総量は、ヒトでは 1.5Kg、100 兆個と膨大なバイオマスであり、健康への影響も大きい。影響は、菌体そのものが腸管細胞へ、菌の代謝物、そして大腸に存在する物質の菌による変換機能と種々影響を与えている。フラクトオリゴ糖は、最もよく使用されている難消化オリゴ糖であり、ビフィズス菌を増加させて健康効果を得ていることはよく知られている。健康効果として、整腸作用、有害菌増殖阻止、ミネラル吸収増加、免疫能増加、炎症性反応の低下など広範囲に報告がある。一方、申請者らは、新たな難消化オリゴ糖（希少オリゴ糖）の効率的生産方法を発明した。放線菌 *Nonomurae* あるいは *Arthrobacter* の菌体外酵素を用いて、果糖 2 分子が 2 つのグリコシド結合で結合した Difructose anhydride (DFA) III である（国際特許 W02004/078989）。加えて、別の結合形式を持つ DFAIV も枯草菌を用いてショ糖からの効率的生産に成功した。DFAIII および IV の機能性は、ミネラル吸収を著しく促進した。カルシウム、亜鉛など現代人に不足がちなミネラルに有効であった。吸収機構の解明も進み、腸管細胞のタイトジャンクションを開けて吸収していた。鉄の吸収促進は、この機構ではなく大腸発酵を増加によるものであった。量産化に成功した DFAIII について研究は、より進んでいる。腸内細菌に対して DFA III は、ユニークな位置にある。DFAIII は、ビフィズス菌類では資化できないという重要な特徴を持っている。替わってルミノコッカス属のある種の菌が、DFAIII を資化して、大腸内で主流の菌となることが判った。またラフィノースは、ビフィズス菌の増加が主であり顕著な特徴はない。この現象は、フラクトオリゴ糖と DFAIII を使い分けることによって、異なった菌を大腸内で主流とした腸内細菌叢を構築できる技術を意味している。明確な違いのある 2 種の異なった腸内細菌叢を用いることによって、それぞれの微生物の健康への影響をより明確にすることができると考え、本申請に至った。申請者らが、すでに明らかにしたことは、DFAIII をラットに摂取させると、フラクトオリゴ糖の場合よりも、より多くのカルシウムを吸収することができる、鉄吸収もより多い、腸内 pH はより低くなる、さらに胆汁酸が二次化して毒性の高まる 7 $\alpha$ -脱水酸化反応に対する阻害能力がより高い事などであり、DFAIII の摂取の有用性が示唆されている。本事業の目的は、種々の異なった餌組成を与えた時に、どこまで一般化した性質が得られるのかを両菌株において明確にして、両者の健康機能性を比較することにある。

## 2. 研究の目的

2 つの異なった腸内細菌叢を作り出し、微

生物の違いが健康度に与える影響を対比して調べる。大腸内微生物は、小腸で消化されなかった難消化物をエネルギー源として生きている。特定の難消化物を与えると特定の菌が主流となった腸内細菌叢を作ることができる。ルミノコッカス属菌、あるいはビフィズス菌を主流とした 2 つの異なった腸内細菌叢を作る。両条件での大腸発酵の特徴を解析するとともに健康度を調べる。健康度は、胆汁酸類の毒性化への影響、慢性炎症への影響、酸化物質やアミンや発ガン性物質の影響などを 2 つの腸内細菌で対比して、微生物の果たす役割を解明する。

## 3. 研究の方法

主にラットを用いて、2 つ明確な違いのある腸内細菌叢を構築して、健康度に与える影響を下記の要素を分析することによって判定する。実験系である腸内細菌叢の確認のために、リアルタイム PCR、PCR-DGGE、および特定資化菌の単離によって系の確かさと安定性をモニターする。これらの状態において、通常の餌および高脂肪食、高コレステロール食、炎症惹起成分食、高ポリフェノール食、など種々の負荷や促進を与えて、2 つの腸内細菌叢の変化と、代謝物の変化を追跡して、腸内細菌の特徴を明確にすることを狙う。測定は、腸内細菌の産物である有機酸組成、そして胆汁酸組成、炎症反応の程度、腸管細胞への影響、および与えた物質の変換の程度などを定量する。また新たな腸内細菌として新たな DFAIII 資化性菌の分離を行う。

## 4. 研究成果

我々は、これまでにプレバイオティクスの候補として難消化性オリゴ糖 DFAIII を開発し、その資化性腸内細菌として *Ruminococcus productus* AHU1760 をヒトから単離している。本研究では、既知のシンバイオティクスであるフラクトオリゴ糖 (FOS) と *Bifidobacterium breve* JCM1192T と健康比較することで、DFAIII と *Ruminococcus productus* AHU1760 が、新たなシンバイオティクス（善玉菌と難消化オリゴ糖の組み合わせ）となる可能性検証し、さらに両シンバイオティクスのどちらが優れているのか評価した。試験は、5 週齢の SD 系雄ラット用いた。標準食を対照群とし、加えて DFAIII と *R. productus* AHU1760 の投与群、さらに FOS と *B. breve* JCM 1192T の投与群を用いてシンバイオティクスの評価を行った。標準食の他、種々の試験食を与えた。試験の FOS にかえて自然素材のヤーコンも試験した。また油脂を添加した脂肪食条件でもラットを飼育した。30 日間の試験飼育を行い、その間のラットの健康状態、解剖後の消化管の試験など多岐にわたる項目を試験した。解剖によって摘出した盲腸内容物は、有機酸のほか、腸内

細菌の分析を抽出 DNA・PCR-DGGE 法に供した。糞便の胆汁酸を分析し、血清コレステロール濃度も測定した。

どのシンバイオティクスでも糞便、盲腸内容物の pH 低下、有機酸量の増加がみられ腸内発酵は盛んになった。プロバイオティクスの微生物もよく生育して腸内環境を健康な状態へと変化維持させていた。シンバイオティクス比較は、DFAIII と *R. productus* AHU1760 のシンバイオティクスの方が優秀で、特に高脂肪食のストレスの高い腸内環境でも優れた腸内発酵を示した。血清コレステロールの減少傾向も判明した。2 種類のシンバイオティクスを比較した。即ち、難消化性オリゴ糖 DFAIII とヒト由来資化性菌 *Ruminococcus productus* AHU1760 と、既知のシンバイオティクスであるフラクトオリゴ糖と

*Bifidobacterium breve* JCM1192T と健康機能性を比較した。さらにフラクトオリゴ糖を主な炭水化物とする天然食品としてヤーコンも試験に加えた。通常食を基準とした試験では、両方のシンバイオティクスともに盛んな大腸発酵を起こして、各成分ともに優れた健康効果を示す値となった。種々の条件を試験した中で、餌中の脂肪濃度を変えた試験において両者の違いが明らかになってきた。高脂肪食とすると腸内環境においては、より多くの胆汁酸が分泌され、胆汁酸の抗菌作用のために腸内細菌にとっては厳しい環境となる。このようなストレス環境においても DFAIII と *Ruminococcus productus* AHU1760 のシンバイオティクスでは、通常食の低度ストレス環境化においてと同様に盛んに生育して安定な腸内細菌叢を維持した。他方、フラクトオリゴ糖と *Bifidobacterium breve* JCM1192 のシンバイオティクスでは、腸内細菌叢は、大きく乱れて定常性を確保することが難しかった。これらの明瞭な結果から両シンバイオティクスの勝負は、DFAIII と *Ruminococcus productus* AHU1760 のシンバイオティクスに軍配が挙げられた。また、試葉のフラクトオリゴ糖とフラクトオリゴ糖を主な成分として含有するヤーコンの根の乾燥物をフラクトオリゴ糖として等量与える飼育を行ったところヤーコンの方が、より速い腸内発酵そして菌叢変化を示し、ヤーコンの健康作用も示した。

#### 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] (査読有り) (計 1 件)

Utami, N. W. A., Sone, T., Tanaka, M., Nakatsu, C. H., Saito, A. and Asano, K.: Comparison of yacon (*Smallanthus*

*sonchifolius*) tuber to commercialized fructo-oligosaccharides (FOS) in terms of physiology, fermentation products, and intestinal microbial communities in rats. *Biosci. Microbiota, Food and Health*, 32, 167-178 (2013).

[学会発表] (計 8 件)

1. Nanami Takanol, Sri Pudjirahatri, Midori Ohtanil, Keisuke Sugimoto, Teruo Sone, Michiko Tanaka, Kozo Asano, Oligosaccharide (DFAIII) production from dahlia tuber with actinomycete *Nonomurea* sp. Yang scientists seminar. Osaka 2013 Aug. 7.
2. 藤井早苗、ヴェロニカ・パウア、川並かおる、曾根輝夫、田中みち子、浅野行蔵、オリゴ糖 DFAIII と *Ruminococcus productus* AHU1760 のシンバイオティクス効果について、日本農芸化学会大会、仙台市、2013 年 3 月 27 日
3. バルア・ヴェロニカ・ラファエル、藤井早苗、川並かおる、曾根輝夫、田中みち子、浅野行蔵、異なったオリゴ糖摂取による腸内環境の相違、日本栄養改善学会北海道支部会、札幌市、2012 年 12 月 5 日
4. Ni Wayan Arya Utami, Michiko Tanaka, Teruo Sone, Cindy Nakatsu, Kozo Asano. Feeding Yacon Tuber-containing Oligofructose Increases Intestinal Fermentation and Alters Microbial Community Structure in Rats. The 4th International Conference for Biosciences and Biotechnology (ICBB). インドネシア国バリ島、2012 年 9 月 20 日
5. 藤井早苗、田中みち子、曾根輝夫、中津シンディ、浅野行蔵、DFAIII と *Ruminococcus productus* AHU1760 の投与による腸内環境への影響、食品科学工学会大会第 59 回大会、札幌市、2012 年 8 月 30 日
6. Utami Ni Wayan Arya, Tanaka Michiko, Sone Teruo, Nakatsu Cindy H, Asano Kozo. Effects of yacon tuber-containing oligofructose on

intestinal short chain fatty acids  
and microbial ecology in rats. 日本  
食品科学工学会第 59 回大会、札幌市  
2012 年 8 月 30 日

7. Utami, N.A., Tanaka, M., Sone, T.,  
Nakatsu, C.H., Asano, K. Feeding  
yacon tuber increases intestinal  
fermentation and alters microbial  
community structure in rats. 14th  
International Society of Microbial  
Ecology. デンマーク国コペンハーゲン  
市、2012 年 8 月 22 日
8. Utami NA, Tanaka, M., Sone, T.,  
Nakatsu, C.H., Asano, K., Yacon  
increased intestinal fermentation  
and changed microbial communities in  
rats. 日本腸内細菌学会第 16 回大会、  
神戸市、2012 年 6 月 13 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

浅野 行藏 (ASANO, Kozo)

北海道大学大学院農学研究院・教授

研究者番号：5 0 3 1 2 3 9 3