

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23617013

研究課題名(和文)植物乳酸球菌LP28による体内脂肪蓄積抑制の分子機構解明とヒト臨床試験による検証

研究課題名(英文)Anti-obesity mechanism of *Pediococcus pentosaceus* LP28 and its effect in overweight subjects

研究代表者

東川 史子 (Higashikawa, Fumiko)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院(薬)・特任准教授

研究者番号：70346534

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：龍眼(果物の一種)から分離した乳酸菌 *Pediococcus pentosaceus* LP28 (LP28) をマウスに摂食させる実験でLP28の肥満抑制作用を見出した。本研究では、主にLP28がヒトに対し抗肥満作用を示すのかを検証した。BMI値25～30の男女(20～70歳)を対象とした無作為化対照比較試験を行った結果、LP28の死菌を12週間摂取したグループは、プラセボ摂取グループよりも、BMI、体脂肪率、腹囲の他、LDLコレステロールとLDL/HDL比が有意に低下した。このように、ヒトでも抗肥満効果が確認されたことから、LP28はメタボリック症候群の予防改善に有効と結論づけた。

研究成果の概要(英文)： *Pediococcus pentosaceus* LP28 (LP28), which has been isolated from a fruit "longan", has an anti-obesity effect in high fat diet-induced obese mice. The main aim of this study was to investigate whether LP28 is also effective in human. In a double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial, the overweight subjects aged 20-70 years whose BMI was between 25 and 30, were assigned one of the following three groups: placebo; live LP28; or heat-killed LP28. The intake of heat-killed LP28 for 12 weeks reduced BMI, body fat percentage, waist circumference, serum LDL cholesterol level, and LDL/HDL ratio compared with the placebo. Thus, LP28 is effective to improve obesity in human as well as mouse, demonstrating that LP28 will be a very useful tool to reduce the risk of or prevent metabolic syndrome.

研究分野：予防医学・分子生物学

科研費の分科・細目：統合栄養科学

キーワード：抗肥満効果 植物乳酸菌 臨床試験 生活習慣病 メタボリック症候群

## 1. 研究開始当初の背景

WHOによると、世界の肥満人口は著しく増加しており、1980年～2008年までの間に約2倍となった。日本では米国や英国と比較すると少ない傾向にあるものの、成人男性の29.1%、成人女性の19.4%は肥満である(厚生労働省平成24年国民健康・栄養調査結果より)。糖尿病や脂質異常症、高血圧などの生活習慣病の中心に肥満があると言われ、肥満を解消することは、同時に生活習慣病を予防・改善することにつながると期待される。肥満を解消するためには、適切な食生活や運動習慣が大切であるが、多くの肥満者にとって、運動習慣と食生活の改善は容易ではない。

我々は、果物の龍眼(ロンガン)から新規に分離した乳酸菌 *Pediococcus pentosaceus* LP28 (以下 LP28 と略す) を、肥満を誘発させたマウス(C57BL/6J)に経口投与したところ、2ヶ月間で体重増加を13%抑制することを見出した。なお、別の植物乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* SN13T の投与では、肥満抑制効果は認められなかったことから、LP28 に特異的な作用であることが示唆された。高脂肪食を摂取させたマウスでは、体重増加の他に、白色脂肪(内臓脂肪)量増加、肝肥大、肝臓中の脂質増加(脂肪滴の生成)などが観察された。しかしながら、LP28 を8週間継続摂取させた結果、これらすべてにおいて改善が認められた。特に、白色脂肪細胞のサイズが LP28 摂取によって減少し、脂肪量は約1/2となった。また、脂肪肝が著しく改善し、肝臓中の中性脂肪およびコレステロール量の有意な低下、さらに、肝臓中の脂肪滴の消失を認めた。普通食を摂取させた正常体重のマウスでは、LP28 摂取による異常な体重減少は観察されず、LP28 の効果は、栄養過多時に限定されることが示唆された。このように、LP28 は内臓脂肪を減少させることから、先進国における重大な問題である肥満および生活習慣病(メタボリック症候群)の予防に貢献できるとともに、ひいては国民医療費の削減にもつながることが期待できると考えた。

## 2. 研究の目的

(1) 高脂肪食負荷のマウスにおいて肥満抑制作用が認められた LP28 を、実際に人々の健康維持に活用するために、その作用機序を明らかにすることを目的とした。以前の研究で DNA マイクロアレイ解析を実施し、LP28 投与後のマウス肝において多くの脂質代謝関連遺伝子の発現変動を検出した。そこで本研究では、これらの遺伝子を中心に、肝の遺伝子発現についてさらに解析を進めること、白色・褐色脂肪組織などでの LP28 の作用を遺伝子レベルで明らかにすることを目的とした。また、LP28 の抗肥満作用本体を明らかにするために、より簡便に評価が可能な、*in vitro* 評価系の確立を目指した。

(2) LP28 を新しい健康補助食品として活用するためには、動物だけではなくヒトにおいて効果がなくては意味がない。そこで、ヒトで臨床試験を実施し、その実用性について検証することを目標とした。そのヒト試験で使用する試験食の準備のため、LP28 の高密度培養法および安定した LP28 生菌を製造する技術を確立させることも併せて目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) Hepa1-6 細胞を用いた *in vitro* 実験

マウス肝由来細胞株である Hepa1-6 にオレイン酸を添加し培養することで細胞内に脂肪が蓄積することを利用し、その培養中に LP28 を添加することで生じる変化(脂肪蓄積・遺伝子発現)を解析した。

### (2) 動物実験

7~8 週齢の雄性マウス(C57BL/6J)を、普通食のみ14週間与えたコントロール(RD群)、高脂肪食のみ14週間与えた高脂肪食コントロール(HFD群)および、最初の6週は高脂肪食を与え、続く8週間は高脂肪食に LP28 生菌を混ぜて与えたグループ(HFD-LP28群)の3群に分けた。マウスは各群5匹ずつとした。14週目に肝、白色脂肪、腸などを摘出し、遺伝子発現変動などについて解析を行った。

### (3) LP28 摂取の食品臨床試験

被験者条件を、20~70歳までの健康な男女で BMI が  $25 \text{ kg/m}^2$  以上  $30 \text{ kg/m}^2$  未満とし、一般から参加者を広く募集したところ、151人の応募があった。そこでスクリーニング検査を実施し、条件に適合した62人(男性23人、女性39人)の参加で試験を開始した。臨床試験は二重盲検法による無作為化対照比較試験として実施し、被験者は3グループ(LP28生菌、LP28死菌、あるいはプラセボ)のいずれかにランダムに割り付けられた。試験食として菌体粉末(生菌、死菌ともに  $10^9 \text{ cfu}$  相当量/日)を、あるいは、対照食のデキストリン(プラセボ)を、飲料に懸濁して1日1回飲んでもらった。計画当初は、LP28 入りの野菜ジュースを試験食とすることを想定していたが、十分量の乳酸菌を摂取するために、LP28 菌体粉末を用いることとした。なお、製造した LP28 生菌粉末が、冷凍状態で長期間、生菌として保存可能であることを確認した上で実施した。12週間の摂取期間中、被験者は毎日自宅で朝食前に脱衣の上で体重を測定した他、定期的に身体測定、血液検査、および尿検査を受けた。結果は、各評価項目の摂取前後の変化量を、Dunnett 法によって多重比較し評価した。

## 4. 研究成果

### (1) Hepa1-6 細胞を用いた *in vitro* 実験

LP28 の生菌存在下で Hepa 1-6 細胞株にオレイン酸を添加培養すると、コントロールよりも細胞内の脂肪蓄積量が有意に低下した。

なお、LP28 を過剰に添加すると細胞死を生じたため、上記評価時には、Hepa1-6 細胞の生存率が低下していないことを確認した上で、比較した。Hepa 1-6 細胞を用いたウエスタンブロット解析を行い、LP28 添加の有無による変動を比較したところ、不飽和脂肪酸の合成に關与する Stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1) の発現が、添加した LP28 の濃度依存的に抑制されていた。また、LP28 の培養上清のみを添加した場合においても脂肪蓄積抑制の傾向が認められたことから、LP28 菌体そのものではなく、LP28 生菌が産生・分泌する成分が脂肪蓄積抑制作用を持つことが考えられる。しかしながら、後述するヒト試験では、LP28 死菌で高い肥満改善作用が認められたため、LP28 の作用本体は単一ではなく、複雑な機序を持つ可能性が示唆された。

LP28 添加により、Hepa1-6 細胞内への脂肪蓄積が抑制されたこと、および、LP28 添加時の培養細胞における SCD1 の発現低下は、動物実験の肝の遺伝子発現変動の結果と一致したことから、この *in vitro* 評価系は、LP28 の作用機序解明や關与成分の特定のための簡易評価系として利用できると考えられた。

## (2) 動物実験

マウス実験では、以前の結果と同様に、高脂肪食負荷による体重増加が LP28 経口摂取によって有意に抑制され、抗肥満効果の再現性が確認できた。同様に、肝における *scd1* の発現量が高脂肪食負荷で増加し、LP28 投与で低下するという現象を再確認した。摘出した白色脂肪組織における各種遺伝子発現変動を解析した結果、*acc1* (acetyl-CoA carboxylase) の発現量が、HFD 群と比較して HFD-LP28 群で有意に低下していた。ACC1 は脂肪酸の合成や伸長に關与していることから、LP28 投与により脂肪酸の合成が抑制された可能性がある。一方、toll like receptor の一種である TLR5 のノックアウトマウスは肥満化することや、高脂肪食負荷の肥満マウスにおいて腸管における *tlr5* の遺伝子発現が低下したという報告があることから、LP28 の経口投与が *tlr5* に影響を及ぼしているか、マウスより腸粘膜組織を摘出し、mRNA の発現量を比較した。その結果、HFD 群は RD 群よりも *tlr5* の mRNA 量が低下していたが、HFD-LP28 群でも同様に低下しており、HFD 群と HFD-LP28 群に差はなかった。よって、LP28 の抗肥満作用過程に、TLR5 は關与していない可能性が示唆された。

## (3) LP28 摂取の食品臨床試験

本研究の最終目標であったヒト試験を平成 24 年度後半～25 年度に実施した。62 人の被験者のうち 4 人が試験途中で脱落したが 2 人が LP28 生菌群で、理由はそれぞれ便秘と被験者都合、他の 2 人が LP28 死菌群でじん

ましんと被験者都合) 残り 58 人は試験を完遂した。脱落による欠損値は多重代入法で補い、すべてのデータを解析に用いた。

その結果、LP28 死菌摂取群において BMI、体脂肪率、腹囲、LDL コレステロール、および LDL/HDL 比が、以下のような改善を示した。まず BMI は、LP28 死菌群 (n=21) でわずかに低下したに過ぎなかったものの、プラセボ群 (n=20) ではむしろ増加していたため、12 週間の変化量をプラセボ群と比較すると、LP28 死菌群で有意に低下していた。次に体脂肪率は、LP28 死菌摂取によって、顕著な経時的低下が認められた (図 1)。これを体脂肪量として比較すると、プラセボ群では約 400 g 増加、LP28 死菌群では約 770 g 減少だった (図 2)。つまり、被験者は食生活や運動習慣を変化させることなく、12 週間の LP28 死菌の摂取の有無だけで、約 1.2 kg の体内脂肪量の変動の差が生じたことになる。

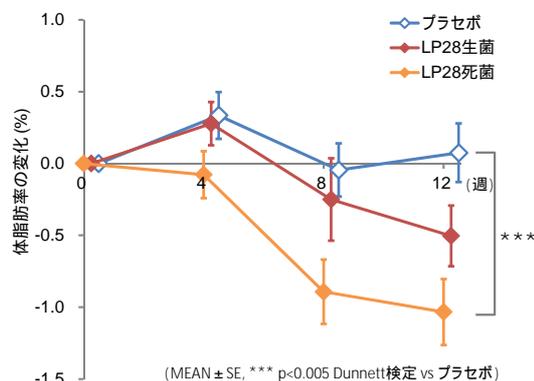


図 1 体脂肪率の経時的変化

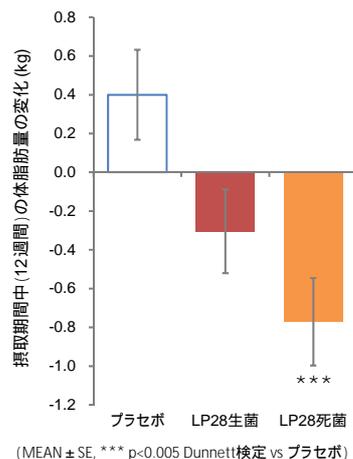


図 2 体脂肪量の変化

同様に腹囲についても、プラセボ群では摂取期間中に約 1.0 cm 増加したが、LP28 死菌群では約 1.8 cm 減少したため LP28 死菌摂取の有無による差は約 2.8 cm となった。(図 3)。一方、LP28 生菌群 (n=21) においても、体脂肪や腹囲に一定の効果が認められたが、多重比較によってプラセボ群との有意差は検出されなかった。

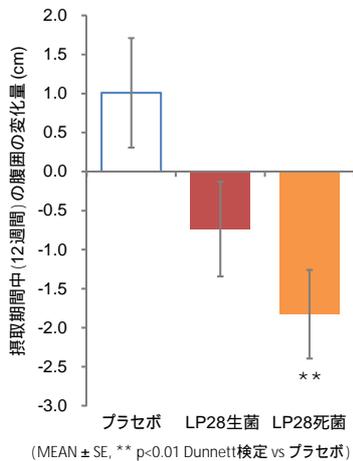


図3 腹囲の変化量

さらに、血液生化学データの中では、LDL コレステロールと LDL/HDL 比が、LP28 死菌群において有意に低下していた。LDL/HDL 比は動脈硬化指数と呼ばれ、動脈硬化の進展の指標とされる検査値であり、LP28 摂取により LDL/HDL 比を低下させたことは、生活習慣病予防に寄与できることを証明するものである。一方、空腹時血糖値、HbA1c、空腹時インスリン、HOMA-R、中性脂肪、アディポネクチン、レプチン、およびレジスチンの変化量に群間有意差は認められなかった。

また、尿検査や安全性評価項目について、プラセボ摂取群と比較して、LP28 生菌・死菌摂取群に統計学的に差が認められるような異常変動はなかった。

以上のように、ヒト試験において LP28 死菌による抗肥満効果が認められた一方、LP28 生菌摂取群では肥満抑制傾向が見られたものの、LP28 死菌群には及ばなかった。本試験では、LP28 の菌体を飲料に懸濁して飲んでもらったが、実際は飲料と混ざりにくく、菌体粉末が容器に付着しやすい等の難点があった。さらに死菌は加熱殺菌した過程で風味がかなり変化しており、飲みやすさの点で生菌と死菌に差があった可能性がある。試験食の摂取率は、いずれのグループも 95% を超えており、全摂取期間を通じて大きな変動もなく良好であったが、日々の摂取量としては、上記の点から想定した量を完全に摂取できなかった可能性がある。よって、LP28 死菌に抗肥満作用があることは疑う余地がないものの、LP28 死菌の方が LP28 生菌より効果が高いか否かについては、ほかの形状の試験食を用意し、追試する必要があると考えられる。

#### (4) 総括

本研究の結果、LP28 の抗肥満作用機序が部分的に解明され、さらにヒトにおける抗肥満効果が実証された。今後、LP28 の健康補助食品を創出することで、生活習慣病メタボリック症候群の予防に大いに貢献できると考えられる。

## 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. 杉山 政則, Narandalai Danshiitsoodol 植物乳酸菌を利用した保健機能性製品の開発, 食品と開発 48(5), 81-83, 2013 査読なし

2. Zhao X, Higashikawa F, Noda M, Kawamura Y, Matoba Y, Kumagai T, Sugiyama M. The obesity and fatty liver are reduced by plant-derived *Pediococcus pentosaceus* LP28 in high fat diet-induced obese mice. PLoS One. 2012;7(2):e30696.

doi:10.1371/journal.pone.0030696

査読あり

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 1 件)

杉山 政則

広島大学出版会

植物乳酸菌の挑戦 - 未病および生活習慣病から化粧品まで

2012 年

149 ページ

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

東川 史子 (HIGASHIKAWA Fumiko)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院

(薬)・特任准教授

研究者番号: 70346534

### (2) 研究分担者

杉山 政則 (SUGIYAMA Masanori)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院

(薬)・教授

研究者番号: 30106801

野田 正文 (NODA Masafumi)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院

(薬)・特任講師

研究者番号: 40457289