

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：12614

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450300

研究課題名(和文)水産食品の腸内環境に及ぼす影響 - FLX-pyrosequence法を用いた解析

研究課題名(英文)Effect of marine foods on intestinal environment -Analysis with FLX-pyrosequence method

研究代表者

久田 孝 (Takashi, Kuda)

東京海洋大学・その他部局等・准教授

研究者番号：00290081

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：H25年度は日本で多く食されてきた褐藻類の水溶性多糖類のアルギン酸およびラミナランのラット盲腸内フローラへ与える影響について検討した結果、腸内フローラの変動とともに、腸内発酵の促進、腐敗産物の低減が認められた。H26年度はタンパク源(ミルクカゼイン、大豆タンパク、魚粉)の違いによる影響を検討し、大豆タンパクおよび魚粉を与えたラットでは盲腸内のインドールおよび硫化水素などの腐敗産物の増加が確認された。この腐敗産物の増加は海藻の摂取によって改善された。H27年度は腸内環境改善能を示したアルギン酸およびラミナランのラットにおけるサルモネラ侵入抑制について検討し、アルギン酸の感染抑制能が確認した。

研究成果の概要(英文)：Effect of water soluble polysaccharide in brown algae, alginate and laminaran, on cecal environment in rats were examined. These polysaccharides fermented by the cecal microbiota and suppressed putrefactive compounds.

Differences of the effects of milk casein, soyprotein and fish-meal on the cecal environment were examined. Compared with milk casein, putrefactive compounds were increased by soyprotein and fish-meal. However, feeding of algae improved the cecal environment in the rats fed soyprotein and fish meal.

Furthermore, alginate in diet suppressed infection of Salmonella in rats.

研究分野：食品科学

キーワード：腸内フローラ 海藻 アルギン酸 ラミナラン サルモネラ

1. 研究開始当初の背景

成人の大腸内には少なくとも500種類の細菌類が10¹³~10¹⁴個も存在し、腸内フローラを形成しており、現在では9門の細菌類が腸内菌を構成するものとして報告されている。その90%以上はFirmicutes (Gram陽性の多くの科を含む)とBacteroidetes (Gram陰性嫌気性桿菌)である。腸内フローラの菌体自体や代謝産物が宿主に影響を及ぼすことはよく知られており、例えば、有用な点では免疫賦活化、病原菌の防除などが(下記研究業績、一方、有害な面からはアンモニア、フェノール、クレゾール類などいわゆる腐敗産物の生成があげられ、これら腸内腐敗産物は腫瘍リスクの一部とも考えられている。そのため、腸内フローラとその代謝産物のバランスは宿主の健康にとって非常に重要であると考えられている。一方、そのバランスは老化、疾病、感染、薬物によって大きく変動するものではあるが、通常の生活においては食餌性成分も大きな影響を及ぼすと因子と考えられる。De Filippo et al. (2010, PNAS)はヨーロッパの都市部とアフリカのブルキナ・ファソの乳幼児の糞便フローラを調べた結果、母乳のみを摂取している乳児間では差がないものの、離乳を境にヨーロッパの幼児ではFirmicutesが、ブルキナ・ファソではBacteroidetesが増加していることを報告した。

韓国や日本をはじめとする東アジアでは、漁村地域に限らず様々な種類の魚介とともに海藻類が多く摂取されている。最近の報告で、ノリ(紅藻類)由来の細菌類の炭水化物分解酵素の遺伝子が、長年の食餌により、日本人の腸内菌の一部に導入されていることが示された。この報告は生物学的にも栄養学的にも非常に興味深いもので注目されているが、日本においてはコンブ、ワカメ、ヒジキなどの褐藻類の生産量が高く、消費重量も高いと考えられる。褐藻類にはアルギン酸、フコイダン、ラミナランなど水溶性多糖類が多く含まれ、その中でアルギン酸とラミナランはヒト糞便フローラにより発酵される。以前、申請者らの行った実験で、ラットやマウスにアルギン酸やラミナランを投与した際も腸内発酵が示され、腸内腐敗産物の産生を抑制した。この際の腸内フローラについては培養法により検討したが、現在の遺伝子検出による解析法では行っていないため、培養の難しい多くの菌群について、正しい情報は得られていなかったと推測される。

今世紀に入って、遺伝子解析技術の発展にともない、例えばdenaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)法、terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP)法などによる腸内フローラの検索が多く報告されている。最近ではエマルジョンPCR、次世代シーケンサーを用いて膨

大な数の遺伝子を読み取り解析するpyrosequence法による微生物フローラの解析が行われるようになってきた。例えば、従来から細菌同定に用いられる16S rDNAの一部300bp程度であれば、一度の解析で数万リード読み取ることが可能である。DGGE法で分離解析できるバンドが上位十数種であるのに対して、pyrosequenceでは占有率0.01%の菌でも検出できるため、より精度の高い検索が可能である。一方、pyrosequence法ではこれまで分離、同定されていない多くの細菌類が優勢菌として存在することが報告されており、かつて培養法で行われてきた食餌成分の腸内フローラへの影響について、再検討の必要がある。

2. 研究の目的

本研究においては、水産食品の摂取が腸内環境、および腸内環境を介して宿主へどのような影響を及ぼすか検討するため、西洋食、日本食および漁村食モデル食餌を投与したラット、低食物繊維食に海藻多糖類成分を加え投与したラット、ミルクタンパク、大豆タンパク、あるいは魚肉タンパクを投与したラットについて、腸内環境(発酵産物、腐敗産物、粘膜と付着細菌の状態など)とともにDGGE法を用いて腸内フローラへの影響を検討する。腸内環境の指標あるいはDGGE法で変動の認められた場合に、pyrosequence法を用いて、各成分の腸内フローラに及ぼす影響を詳細に検討する。また、各食餌群で優勢となる菌種の分離と詳細な性状試験を行いたい。本研究で得られる結果は、学術的に未解決の部分もある長寿と日本食、あるいは漁村食の関連の解明につながるものと考えている。また、その成果は水産物にかかわる産業の活性化にもつながるものと考えた。

3. 研究の方法

本研究においては、水産食品を多く摂取することが腸内環境、および腸内環境を介して宿主へどのような影響を及ぼすか検討するため、ラットを用いて以下の食餌群の投与実験を行い、下の項目について検討した。

低食物繊維食に海藻多糖類成分を加えた場合の影響
ミルクタンパク、大豆タンパク、あるいは魚肉タンパクの比較
西洋食、極東アジア(日本)食および漁村食モデル食餌の比較
海藻多糖類を多く含む食餌のサルモネラ感染抑制能

(1) 投与後の腸内環境について、発酵の指標として盲腸内容物のpH、有機酸量を検

討した。有機酸は HPLC 法で分析した。腐敗産物であるアンモニア、インドール、フェノールは比色法で定量した。

- (2) 盲腸内フローラは DGGE 法および pyro-sequence 法で解析した。
- (3) サルモネラ感染に及ぼす影響を検討するため、あらかじめ試験食を与えた BALB/C にサルモネラを経口接種し、7 日後の糞、肝臓、脾臓中の菌数を測定した

4. 研究成果

(1) アルギン酸およびラミナランのラット盲腸内環境に及ぼす影響

Table 1 に示す試験食をラットに 2 週間与え、盲腸内の有機酸および腐敗産物を検討した結果、ラミナランが強く発酵され、いずれの多糖類も腐敗産物を抑制することが示された (Fig. 1, 2)。

Table 1 Composition of test diets

Diet type	Composition (grams/100 g) of test diet		
	Control	Alginate	Laminaran
Sucrose	50.0	50.0	50.0
Casein	20.0	20.0	20.0
Corn starch	20.0	18.0	18.0
Sodium alginate		2.0	
Laminaran			2.0
Corn oil	5.0	5.0	5.0
AIN-76 mixed minerals	3.5	3.5	3.5
AIN-76 mixed vitamins	1.0	1.0	1.0
DL-Methionine	0.3	0.3	0.3
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2

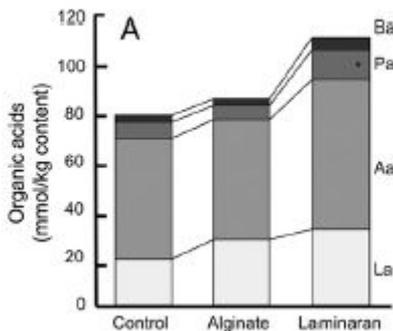


Fig. 1. Organic acids in rats fed test diet.

Ba: butyric acid, Pa: propionic acid, Aa: acetic acid, La: lactic acid.

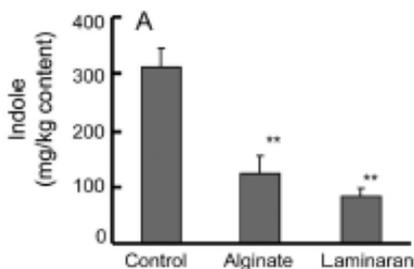


Fig. 2. Cecal indole in rats fed test diets.

腸内フローラを DGGE 法、pyrosequence 法で検討した結果、それぞれの群でいくつかの菌群、菌種が増加しているのが確認された、しかし、腐敗産物とのかかわりについてはこれからの課題である。

(2) タンパク質の違いによる影響

Table 2 に示すように AIN-76 のミルクカゼインを大豆タンパク、魚粉に置き換えた試験食をラットに 2 週間投与し、腸内環境について検討した。その結果、盲腸内の腐敗産物特にインドールが大豆タンパクおよび魚粉によって高い値であった。

Table 2 Composition of test diets

	Milk casein	Soy protein	Fish meal
Sucrose	50.0	50.0	50.0
Milk casein	20.0		
Soy protein		20.0	
Fish meal powder			20.0
Corn starch	20.0	20.0	20.0
Corn oil	5.0	5.0	5.0
Mixed minerals (AIN-76)	3.5	3.5	3.5
Mixed vitamins (AIN-76)	1.0	1.0	1.0
DL-Methionine	0.3	0.3	0.3
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2
Cellulose	2.0	2.0	2.0

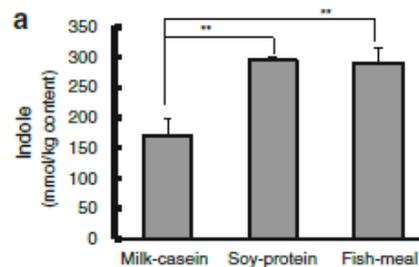


Fig. 3. Cecal indole in rats fed test diets.

(3) 西洋食、極東アジア (日本) 食および漁村食モデル食餌の比較

Table 3 に示す西洋食 (SCB)、極東アジア (FEA) および漁村食 (FEAM) モデル食餌をラットに 2 週間投与し、盲腸内環境について比較した。その結果、大豆を多く含む FEA では腐敗産物が多くなったが、FEAM 食では大豆、魚粉を含むものの、腐敗産物の値は高くなかった (Fig. 4)。FEAM に多く加えた褐藻類ワカメの効果と考えられる。

(4) アルギン酸およびラミナランのサルモネラ感染に及ぼす影響

2% (w/v) のアルギン酸あるいはラミナランを含む食餌を BALB/c マウスに 1 週間投与し、*Salmonella Typhimurium* を経口接種後、さらに同じ食餌で 1 週間飼育した。糞、肝臓、および脾臓中のサルモネラ菌数を測定した結

果、アルギン酸によって感染の抑制が示された。一方、ラミナランによる改善効果は認められず、症状の改善も認められなかった(Fig. 5)。

以上の結果より、伝統的な和食の材料でもある褐藻類の多糖類の一部は腸内フローラによって発酵され、排泄促進作用も加わり、腐敗産物を抑制するなどの腸内環境改善効果が確認された。さらに病原菌感染にも影響が示されたが、発酵性の強いラミナランについては、感染時の摂取にはさらに検討が必要と考えられる。

Table 3 Composition of test diets

		AIN-76	Test diets		
			SCB	FEA	FEAM
Carbohydrates	Sucrose	50.0	36.0	5.0	2.9
	Corn starch	15.0			
	Wheat starch		30.0		
	Rice starch			60.3	57.7
	Cellulose	5.0	2.0	6.9	
	<i>Undaria pinatifida</i> ^a				4.9
Protein	Milk casein	20.0	20.0		
	Soy protein			7.9	3.9
	Fish meal			7.9	11.8
Lipid	Corn oil	5.0			
	Beef tallow		7.0		
	Soy oil			5.0	2.0
	Fish oil			2.0	4.9
Micronutrients	Mixed minerals (AIN-76)	1.0	1.0	1.0	1.0
	Mixed vitamins (AIN-76)	3.5	3.5	3.5	3.5
	DL-methionine	0.3	0.3	0.3	0.3
	Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2	0.2

^a Wakame: rich in insoluble and soluble dietary fibers

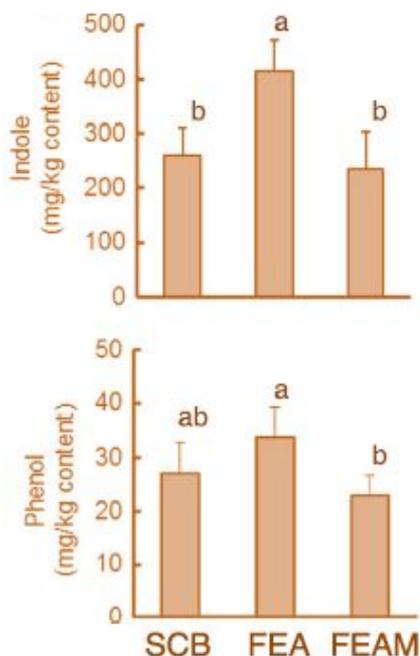


Fig. 4. Cecal indole and phenol in rats fed test diets.

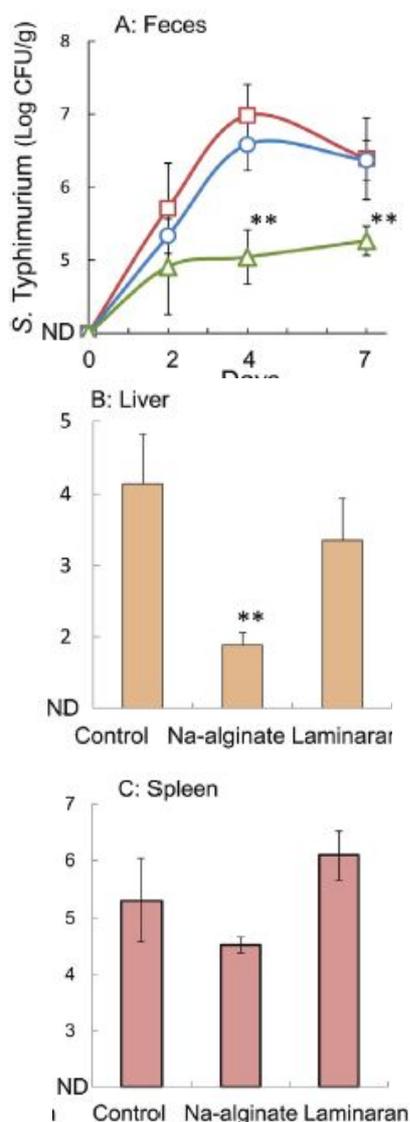


Fig. 5. Effect of alginate and laminaran on *Salmonella* infection in BALB/c mice.

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5件)

Kuda, T., Kosaka, M., Hirano, S., Kawahara, M., Sato, M., Kaneshima, T., Nishizawa, M., Takahashi, H., Kimura, B. 2015. Effect of sodium-alginate and laminaran on *Salmonella* Typhimurium infection in human enterocyte-like HT-29-Luc cells and BALB/c mice. *Carbohydr. Polymers* 125, 113-119.

Choa, A., Kuda, T., Yazaki, T., Takahashi, H., Kimura, B. 2014. Caecal fermentation, putrefaction and microbiotas in rats fed milk casein, soy protein or fish meal. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 2779-2787.

Choa, A., Kuda, T., Yazaki, T., Takahashi, H., Kimura, B. 2014. Caecal environment of rats fed far East Asian-modelled diets. Appl. Microbiol. Biotechnol. 98, 4701-4709.

Choa, A., Kuda, T., Yazaki, T., Takahashi, H., Kimura, B. 2013. FLX Pyrosequencing analysis of the effects of the brown-algal fermentable polysaccharides alginate and laminaran on rat cecal microbiotas. Appl. Environ. Microbiol. 79, 860-866.

Choa, A., Yazaki, T., Takahashi, H., Kuda, T., Kimura, B. 2013. Diet-induced changes in alginate- and laminaran-fermenting bacterial levels in the caecal contents of rats. J. Funct. Foods 5, 389-394.

〔学会発表〕(計 2 件)

中田徹・安チョア・高橋肇・木村凡・久田孝・大豆たん白質食ラットの腸内腐敗産物に及ぼすラミナランおよびアルギン酸の影響．日本食物繊維学会．2014年11月30日．東京（大妻女子大学）

中田徹・高橋肇・木村凡・久田孝・高大豆たん白質食ラットの盲腸内フローラに及ぼす褐藻類多糖類の影響 2015年9月24日．仙台市（東北大学）

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

久田 孝 (KUDA, Takashi)

東京海洋大学・学術研究院・准教授

研究者番号：00290081

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：