

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292143

研究課題名(和文)血液型乳酸菌を用いた炎症性腸疾患を防止する新機能性ヨーグルトの構築と応用

研究課題名(英文) Construction of new functional yogurt with prevention to IBD(inflammatory bowel disease) by blood type lactic acid bacteria.

研究代表者

齋藤 忠夫 (SAITO, TADAO)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：00118358

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：我が国では、近年潰瘍性大腸炎やクローン病などの炎症性腸疾患が若年層に急増しており、その原因は不明であり大きな問題となっている。我々は、これまで免疫刺激性のある乳酸菌、抗菌性ペプチドで有害菌を排除する乳酸菌を用いたヨーグルトを研究した。ヒト腸管付着性をバイオセンサー：Biacoreという機器で選抜する新しい手法を開発し、世界で初めて「血液型乳酸菌」をヒト腸管から発見した。本研究では、この高いヒト腸管付着性を示す血液型乳酸菌を用いて、潰瘍性大腸炎の原因菌とされる各種有害菌を、血液型別の競合阻害により排除することで予防や緩解を可能とする新機能性ヨーグルトを構築し、疾病を予防する可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Inflammatory bowel diseases such as ulcerative colitis or Crohn disease increase rapidly in the young Japanese recently. The cause is still unknown and becomes the big problem in the world. We studied the yogurt using the lactic acid bacteria (LAB) which remove harmful bacteria by production of antibacterial peptides or stimulate immunity until now. We studied the adhesion of bacteria to human intestine by a biosensor Biacore and discovered "a blood type lactic acid bacterium" in human intestinal tract for the first time in the world. Using a blood type lactic acid bacterium indicating this high human intestinal tract adhesion, we could developed the new feature-related yogurt which enabled the prevention and remission by removing a pathogen and various harm bacteria of the ulcerative colitis by the competitive inhibition according to the blood type and, in this study, showed possibility to prevent illness.

研究分野：応用微生物学

キーワード：ビフィズス菌 乳酸菌 潰瘍性大腸炎 炎症性腸疾患 血液型乳酸菌 機能性ヨーグルト

1. 研究開始当初の背景

病原性細菌のヒト腸管や標的器官への認識・結合性は良く研究されているが、乳酸菌やビフィズス菌などの有用菌(善玉菌)に対する消化管付着機構研究は極めて遅れている。近年、「プロバイオティクス」という胃酸・胆汁酸耐性があり、高いヒト腸管付着性により増殖して宿主に有益な保健効果をもたらす乳酸菌やビフィズス菌が注目され、わが国でもトクホ(特定保健用食品)のヨーグルトに利用され始めている。

2004年 Science 誌に、*Helicobacter pylori*(ピロリ菌)は胃ムチンのヒト血液型 ABO 抗原を認識して結合するという、衝撃的な報告がなされた。一方、原因不明で政府指定の難病である潰瘍性大腸炎(UC)は、国内でも 17 万人もの患者が増加傾向にあり、腸内有害菌であるバクテロイデスなどにより炎症や潰瘍化が起こることが推定されている。しかし、その詳細は不明であり予防や治療の目処が立っていない。潰瘍性大腸炎の原因細菌のヒト腸管結合性機構に関する研究は、腸管の疾病を予防できる新しい戦略的研究分野として注目されていた。

国内外での研究では、有害菌の標的器官へのアドヘシンや付着機構の解明が進んでいるが、乳酸菌やビフィズス菌などの有用菌に対する同分野研究は進んでいない。また、乳酸菌の機能性の追求では、乳酸菌体や代謝物の示す機能性などの研究が先行する傾向が強く、腸管付着性の検討と機構解明が軽視されている。Caco 2 細胞などによる菌体付着性試験も多数報告があるが、付着性の客観的な評価法が確立されていないことより、信頼性の高いヒト腸管付着性乳酸菌の選抜評価に直結するマスマスクリーニング法の構築が国内外ともに強く求められていた。

2. 研究の目的

我が国では、近年大腸がんに加えて潰瘍性大腸炎やクローン病などの炎症性腸疾患の患者は、とくに若年層に急増しており、その原因は不明であり大きな問題となっている。我々は、これまで乳糖不耐症を予防する乳酸菌、免疫刺激性のある乳酸菌、抗菌性ペプチドで有害菌を排除する乳酸菌などを用いたヨーグルトを研究して来た。その過程で、ヒト腸管付着性をバイオセンサー: Biacore という機器で選抜する新しい手法を開発し、世界で初めて ABO 式血液型を認識する「血液型乳酸菌」をヒト腸管から発見した。本研究は、この高いヒト腸管付着性を示す血液型乳酸菌を用いて、潰瘍性大腸炎の原因菌とされる各種有害菌を、血液型別の競合阻害により排除することで予防や緩解を可能とする新機能性ヨーグルトを構築し、疾病を予防することを最終的な目的とした。

3. 研究の方法

(1) 潰瘍性大腸炎(UC)の炎症部位より単離した *Fusobacterium varium*(バリウム菌)の Biacore 法によるヒト大腸ムチンへの結合性の詳細解析

ヒトの大腸組織および粘液標本は、東北大学病院より大腸がん患者のがん切除手術時に得られる腸管正常部位より ABO 式血液型別に入手し、それよりヒト大腸ムチンを単離精製する。ヒト大腸ムチンはプロテイナーゼ K 処理で可溶化し、陰イオン交換クロマトグラフィーで精製してから血液型別に Biacore 1000 のセンサーチップ上に固定した。表面プラズモン共鳴を用いてムチン糖鎖(リガンド)と菌体(アアナライト)との相互作用を非標識下で定量解析する。バリウム菌がどの程度、血液型抗原糖鎖(A 型: GalNAc, B 型: Gal, O 型: Fuc) 硫酸基、シアル酸(NeuAc)などの糖鎖上のエピソード部位を認識するか否かを定量的に解析

する。とくに、血液型抗原の糖鎖部位と硫酸基などの酸性基との認識結合性の差異を確認する。

(2) 潰瘍性大腸炎の炎症部位より単離したバリウム菌のヒト大腸ムチンへの結合性を強く 阻害する血液型乳酸菌の探索と選抜

当研究室で構築した血液型乳酸菌や血液型ビフィズス菌のプロバイオティクスライブラリーより、バリウム菌のヒト大腸ムチンに対して全く同様の結合認識性パターンを示す乳酸菌体を選抜する。さらに、Biacore のセンサーチップ上のヒト大腸ムチンに対して認識部位(残基)への付着性に競合阻害が起こるかどうかを検証することにより、結合部位を巡って高度に競合する乳酸菌体を選抜する。

(3) 潰瘍性大腸炎の原因菌と推定されるバリウム菌および競合阻害菌候補として選抜された血液型乳酸菌のヒト大腸ムチン糖鎖の結合部位の解明

バリウム菌の臨床株は複数あり、それらのヒト大腸ムチンの結合糖鎖における認識部位を Biacore 法により詳細に検討する。とくに、ABO 式血液型別の抗原の糖鎖構造、とくに潰瘍性大腸炎の初期の炎症部位では、ムチン結合性の硫酸(硫酸化ムチン)の減少と、シアル酸(シアロムチン)の増加が知られている。そこで、バリウム菌のとくに硫酸基への反応性について解析を進める。

(4) 潰瘍性大腸炎(UC)の炎症部位より単離した *Fusobacterium varium*(バリウム菌)の細胞表層付着因子であるアドヘシンの単離同定とクローニング解析

バリウム菌のヒト大腸ムチンへの付着性とそのエピトープ部位が推定されたら、細胞表層に存在することが推定される付着性因子としてのアドヘシンの単離精製を行う。ほぼ確定している塩酸グアニジン抽出、SDS-PAGE およびオーバーレイ解析を組み合わ

せた方法で、アドヘシンを単離精製し、タンパク質化学的な同定を行う。

(5) 潰瘍性大腸炎の炎症部位より単離したバリウム菌に対して高いヒト腸管付着阻害性が予想される血液型乳酸菌およびビフィズス菌の腸溶性カプセル化の検討とカプセル添加ヨーグルトの構築

血液型乳酸菌ライブラリーより選抜された血液型乳酸菌およびビフィズス菌の、胃酸耐性および胆汁酸耐性を検討する。一般的に、ヒト腸管から単離されたプロバイオティクスは意外と胃酸耐性や胆汁酸耐性の弱い菌が多く、そのままの摂取では生きてまま腸管に届く菌数が激減する可能性が高い。この乳酸菌を充填した腸溶性カプセルを添加したヨーグルトを試作する。

(6) 選抜乳酸菌を充填した腸溶性カプセル添加ヨーグルトの安全性確認と潰瘍性大腸炎患者への摂取試験

選抜された乳酸菌株については、動物実験などによりその安全性を確認する。また、ヨーグルトの形態(固形、液体、果肉添加)、ヨーグルト菌の種類、容量、摂取時間などを検討しながら、潰瘍性大腸炎の患者さんに腸溶性カプセル添加した本ヨーグルトを摂取して頂き、問診や臨床検査により、症状の緩和や軽減、しいては緩解などに導くことが出来るかどうかを検討する。

4. 研究成果

(1) 臨床検体からの *Bacteroides* の単離と同定

東北大学病院提供の直腸がん患者(88歳男性、A型Rh(-))の新鮮な腸粘液サンプルを GAM プロスにて培養後、BBE 寒天培地に画線塗抹し、37°C、24h、嫌気条件下で培養した。BBE 寒天培地において発育が認められ、エスクリン加水分解が認められたコロニーを単離し、計113菌株を得た。ランダム選んだ55菌株をスルファターゼ産

生誘導培地であるコンドロイチン硫酸添加 MM 培地 (MM-C) にて 37 °C、24 h、嫌気条件下で培養し、高い発育性を示す菌を選抜した。*Bacteroides* spp. 10 菌株の MM-C 100 ml 培養超音波破碎菌体を用いて、スルファターゼ活性を測定した。また、MM-C において低い発育性を示す *Bacteroides* spp. 2 菌株も比較対照として同様にスルファターゼ活性を測定した。MM-C における高発育性を示す 10 菌株は低発育性を示す 2 菌株よりも比較的高いスルファターゼ活性が認められた。

(2) 単離 *Bacteroides* spp. のヒト大腸ムチンへの付着性試験

スルファターゼ活性測定に用いた高発育性 10 菌株および低発育性 2 菌株について sHCM-A に対する付着性試験を行った。高発育性 *Bacteroides* spp. において、sHCM-A への付着量は異なっており、この中でも、4H と 3C に高い sHCM-A 付着性が認められた。また、低発育性 *Bacteroides* spp. 2 菌株は低い付着性を示した。以上より、4H をスルファターゼ高産生 sHCM-A 高付着性 *Bacteroides* spp. として、7C をスルファターゼ低産生 sHCM-A 低付着性 *Bacteroides* spp. として選抜した。

(3) 単離 *Bacteroides* spp. の酸性基認識性の評価試験

単離 *Bacteroides* spp. の 4H と 7C、および硫酸基高認識付着性乳酸菌の *Lactobacillus gasseri* OLL28772 の硫酸基除去処理 (塩化バリウム処理・スルファターゼ処理) sHCM-A に対する付着性試験を行った。OLL2877 において、sHCM-A を塩化バリウム処理することによる付着量の有意な減少が認められた。また、スルファターゼ高産生 sHCM-A 高付着性 *Bacteroides* spp. である 4H においても、有意な減少が認められた。さらに、スルファターゼ除去処理 sHCM-A に対しても、OLL2877 および 4H の両

菌株で除去処理による付着量の有意な減少が認められた。

単離 *Bacteroides* spp. の 4H と 7C、および硫酸基高認識付着性乳酸菌の *Lactobacillus gasseri* OLL28772 のシアル酸除去処理 (シアリダーゼ処理) sHCM-A に対する付着性試験を行った。OLL2877 において、sHCM-A をシアリダーゼ処理することによる付着量の有意な減少が認められた。また、スルファターゼ高産生 sHCM-A 高付着性 *Bacteroides* spp. である 4H においても、有意な減少が認められた。

単離 *Bacteroides* spp. の 4H と 7C、および硫酸基高認識付着性乳酸菌の *Lactobacillus gasseri* OLL2877 の、硫酸基プローブ (GlcNAc-6-S・Gal-3-S) および硫酸基プローブから硫酸基のみを除去した糖鎖プローブ (GlcNAc・Gal) に対する付着性試験を行った。OLL2877 において、GlcNAc と比較した際の GlcNAc-6-S に対する高い付着性が認められた。また、スルファターゼ高産生 sHCM-A 高付着性 *Bacteroides* spp. である 4H においても、GlcNAc-6-S に対する比較的高い付着性が認められた。さらに、Gal と比較した際の Gal-3-S に対しても、OLL2877 および 4H の両菌株で高い付着性が認められた。

単離 *Bacteroides* spp. の 4H と 7C、および硫酸基高認識付着性乳酸菌 *Lactobacillus gasseri* OLL2877 の、シアル酸プローブ (Neu5Ac) に対する付着性試験を行った。3 菌株の中では OLL2877 が Neu5Ac に対する比較的高い付着性を示した。

(4) ビフィズス菌 9 菌株のヒト腸管ムチンに対する付着性試験

ビフィズス菌 9 菌株 (*Bifi. bifidum* MCC1092, *Bifi. longum* MCC180, *Bifi. pseudocatenulatum* MCC201, *Bifi. adolescentis* MCC75, *Bifi. breve* MCC167,

Bifi. breve MCC1095, *Bifi. breve* MCC1093, *Bifi. infantis* ATCC15697, *Bifi. adolescentis* ATCC15703^T)について sHCM-A に対する付着性試験を行った。発育性は様々であったが、その中でも *Bifi. longum* MCC180 や *Bifi. breve* MCC167 が比較的高い付着性を示した。

(5) *Bifidobacterium breve* MCC167 の血液型抗原認識性の評価

Bifi. breve MCC167 の血液型抗原 (BP-A, BP-B, BP-H) に対する付着性と、血液型ごとに精製した 3 種の sHCM (sHCM-A, sHCM-B, sHCM-H) に対する付着性を検討した。*Bifi. breve* MCC167 は 3 種すべての血液型プローブに対して高い付着性を示した。また、3 種の血液型の sHCM に対しても平均して高い付着性を示したが、その中でも sHCM-B に対して比較的高い付着性を示し、sHCM-H に対して比較的低い付着性を示した。

(6) *Bifidobacterium breve* MCC167 により単離 *Bacteroides* spp. 4H に対する付着阻害性試験

Bifi. breve MCC167 によるスルファターゼ高産生高付着性 *Bacteroides* spp. (4H) の付着阻害試験を実施した。*Bifi. breve* MCC167 はスルファターゼ高産生高付着性 *Bacteroides* spp. (4H) の sHCM-A 付着を有意に阻害し、3 方法別 (排除・置換・競合) に見ると、排除と置換による阻害能で比較的高い傾向が認められた。

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] (計 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

Tadao SAITO

Recent strategy of development of

functional yogurts using probiotics and prebiotics in Japan.

The 5th AFSLAB (Asian Federation of Society for Lactic Acid Bacteria) International Symposium.

Invited presentation.

(November 28, 2016, Howard International House, Taipei, Taiwan)

Tadao SAITO

Recent strategy of development of functional yogurts using probiotics in Japan.

The 4th International Scientific Symposium on Probiotics and Prebiotics.

Invited presentation.

(November 3, 2016, Sari Pan Pacific Hotel, Jakarta, Indonesia).

Tadao SAITO

Development of new functional yogurts using probiotic lactic acid bacteria (LAB) and/or Bifidobacteria and the future strategy in Japan.

Invited presentation.

International Scientific Conference 2016 Probiotics and Prebiotics (IPC2016).

Invited presentation

(July 21, Budapest Marriot Hotel, Budapest, Hungary).

[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0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
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

齋藤 忠夫 (SAITO Tadao)
東北大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：00118358

(2) 研究分担者

北澤 春樹 (Kitazawa Haruki)
東北大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号：10204885

(3) 連携研究者

()

研究者番号：