

学 位 論 文 題 名

生菌製剤投与によるラットの脂質代謝に関する研究

学位論文内容の要旨

生菌製剤は抗生物質に代わるものとして関心が高く、微生物学および栄養学的研究においてもその効果が注目されはじめ、数多くの生菌剤が開発・生産されている。しかし、これらの生菌製剤は単一微生物もしくは2～3種類の微生物で構成されているものがほとんどである。そのため、100兆個近く分布するといわれている腸内細菌叢へ影響を及ぼしている可能性は少ない。また、コレステロール低下作用についてもその効果に統一性がなく、その作用機構についても不明な点が多い。

本研究は、腐植土壌から分離した複数の *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Saccharomyces*, *Candida* で構成された複合系の生菌製剤を用いて、腸内細菌叢に与える影響および栄養生理作用、とくに脂質代謝に与える影響に対する生菌製剤の位置づけと、生菌製剤の効果発現の機構を解明する目的で開始した。なお、本研究は、ラットを用いた生菌製剤の栄養学に関する基礎的研究に属するものである。研究の進め方は、予備試験として乳牛および豚に生菌製剤を投与することにより乳および肉中のコレステロールの動態を検討し、次いでラットに全栄養素を十分含む精製基本飼料、パーム油およびコレステロールを添加した高脂肪・高コレステロール飼料と、これらに複合系の生菌製剤および単一生菌製剤として *L. acidophilus*, *S. faecalis* をそれぞれ添加した飼料を給与し、このときの成長応答をはじめとする生理的応答を比較する方法で研究を進めた。

1. 生菌製剤の微生物組成

生菌製剤の構成微生物は *Bacillus subtilis*, *B. natto*, *B. megaterium*, *B. thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. casei*, *Streptococcus faecalis*, *S. lactis*, *S. thermophilus*, *Clostridium butyricum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis* である。これら複数の微生物を米ヌカ

にそれぞれ 10^{7-8} cfu/gになるように発酵させて調製した。また、比較実験のために、*C. butyricum*および*B. thermophilus*を除いた12種類の微生物を米ヌカ上で調製した発酵系生菌製剤は、微生物を米ヌカに吸着させたのみの非発酵系生菌製剤、殺菌した発酵系生菌製剤、*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus plantarum*, *L. acidophilus*の3種類で構成された発酵系生菌製剤と比較し、*C. butyricum*および*B. thermophilus*を加えて14種類で構成された発酵系生菌製剤は、*L. acidophilus*および*S. faecalis*をそれぞれ米ヌカ上で発酵させた単一の発酵系生菌製剤と比較して行った。

2. 生菌製剤の腸内細菌叢正常化作用

生菌製剤の腸内細菌叢に与える影響を乳牛およびラット糞便性微生物叢を用いて検討した。乳牛においては、発酵系生菌製剤を投与することにより対照区および非発酵系生菌製剤と比較して、有意に*E. coli*の菌数を減少させ、*Streptococcus*, *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*を有意に増加させていた。また、非発酵系生菌製剤でも対照区と比較して、*Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*の有意な増加がみられた。*Closteridium*については発酵系生菌製剤で非発酵系生菌製剤より有意な減少を示した。ラットにおいては、基本飼料群および高脂肪・高コレステロール飼料群ともに発酵系生菌製剤が*E. coli*を減少させ、*Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*を有意に増加させることを確認した。とくに、高脂肪・高コレステロール飼料群においてその効果は顕著であった。また、高脂肪・高コレステロール飼料群の生菌製剤投与区で、*Clostridium*, *Bacteroidaceae*, *Megashaera*の有意な減少を明らかにした。高脂肪・高コレステロール負荷は、腸内細菌叢を悪化させるのに対して、生菌製剤を投与することにより有用菌の増加、有害菌の減少がみられ、腸内細菌叢全体のバランスが改善されていることが示唆された。生菌製剤中に存在しない*Bifidobacterium*, *Eubacterium*が腸内において顕著に増加していることを解明することは、腸内細菌叢の相互作用が、生菌製剤を介してどのような機構で作用しているかを解き明かす端緒となり、今後の重要な研究テーマとなろう。

3. 生菌製剤の脂質代謝改善作用

生菌製剤として今回開発した複合系の発酵系生菌製剤と米ヌカに吸着させた非発酵系生菌製剤を用い、乳牛および豚に投与することにより、それぞれ乳およびロイ

ン部位の肉中のコレステロールへの影響について検討した。乳においては発酵系生菌製剤を投与することにより、コレステロールは対照区より有意に減少することが確認されたが、非発酵系生菌製剤と比較して有意な差は得られなかった。また、非発酵系生菌製剤は対照区よりわずかに低下している程度であった。豚肉中のコレステロールを比較すると、発酵系生菌製剤を投与することにより、対照区および非発酵系生菌製剤投与区より有意に低下していることが確認された。ラットを用いた試験では、給与飼料はコレステロールを負荷した飼料および負荷しない飼料の二つの実験系で行った。発酵系生菌製剤は、コレステロールを負荷したときに、血清脂質（総コレステロール、VLDL+IDL+LDL-コレステロール、中性脂肪、遊離脂肪酸）の低下作用、とくに総コレステロールについては3種類で構成された発酵系生菌製剤および殺菌された生菌製剤より有意に低下、肝臓へのコレステロール蓄積抑制作用および糞便中への中性ステロール、胆汁酸の排泄促進作用を有することを示した。しかし、本実験条件下ではこれまでコレステロール低下作用があるといわれている *L. acidophilus*, *S. faecalis* に顕著な効果はみられなかった。また、発酵系生菌製剤（以下生菌製剤）のその効果発現は、肝臓においてコレステロール合成の律速酵素である HMG-CoA reductase 活性の低下と、Cholesterol 7 α -hydroxylase 活性には変化がみられないことおよび *in vitro* の実験でコレステロール、胆汁酸が生菌製剤菌体との吸着作用によりミセル形成を阻害していることから、コレステロール合成阻害および排泄促進が密接に関与していると示唆された。このことは血清コレステロール濃度と肝臓コレステロール濃度間の正の相関、血清コレステロール濃度と糞便性コレステロール濃度間および肝臓コレステロール濃度と糞便性コレステロール濃度間の負の相関関係からも支持された。また、血清中の VLDL+IDL+LDL-コレステロール濃度の低下は、アポリポプロテイン B-100 の合成阻害、HDL から VLDL へのコレステロールエステルの転換の抑制および LDL レセプターが増加している可能性が考えられる。肝臓中の主なリン脂質であるホスファチジルコリンの脂肪酸組成で、生菌製剤がリノール酸の減少、アラキドン酸の増加を促していることから、リノール酸からの不飽和化酵素である $\Delta 6$ -desaturase 活性についてもその活性を上昇させている可能性が示唆された。

以上の結果から、生菌製剤の脂質代謝改善作用が確認された。12種類の微生物を混合させた生菌製剤と14種類の微生物を混合させた生菌製剤とでは同様に血清中のコレステロールを低下させる作用が認められ、その発現機構も肝臓におけるコレス

テロール合成抑制および腸管からのステロールの排泄促進と類似しており、基本的に同様の効果を持つ生菌製剤であると考えられる。また、複数の微生物を米ヌカ等有機資材上で発酵させて用いた方が単一微生物を用いるよりもラット生体内において、より高いコレステロール低下作用を有することが明らかとなった。しかし、肝臓におけるコレステロール合成酵素の阻害が生菌製剤によるものかもしくはバランスが改善された腸内細菌叢によるものか、また、不飽和化酵素の活性化についてその発現機構を探求することは、今後の重要な課題である。

以上のように、今回開発した複合系生菌製剤は、各種の生理的効果を有する生菌製剤であることが示された。乳酸菌、枯草菌、納豆菌、酪酸菌、酵母等の混合物である複合系生菌製剤は、高コレステロール負荷条件下において従来からの乳酸菌を中心とした生菌製剤と比べると、飼料効率の増加が認められ、腸内細菌叢全体のバランスを改善していることが明らかとなった。また、生菌製剤の脂質代謝改善作用をみると、コレステロールの低下作用および脂肪酸の不飽和化作用が確認された。その効果発現は、生菌製剤および活性化された腸内細菌叢の両方かまたはどちらか一方によって、コレステロール合成阻害および排泄促進の可能性が示唆された。しかし、腸内細菌叢は複雑な系をしており、今後、活性化された腸内細菌叢と脂質代謝との関係を解明することは、重要な課題である。

学位論文審査の要旨

主査	教授	葛西隆則
副査	教授	本間守
副査	教授	富田房男
副査	助教授	原博

学位論文題名

生菌製剤投与によるラットの脂質代謝に関する研究

本論文は、総頁数121ページの和文論文で、表33、図13、模式図1、引用文献193を含み、12章で構成されている。別に参考論文16編が添えられている。

生菌製剤は抗生物質に代わるものとして関心が高まっており、数多くの生菌剤が開発・生産されている。

本研究は、腐植土壌から分離した複数の *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Saccharomyces*, *Candida* で構成された複合系の生菌製剤について乳牛、豚、ラットを用いた実験系で、生菌製剤としての栄養生理的效果を確認することを目的としたものである。また、様々な角度から生菌製剤の効果発現の解明を試みている。

本研究で得られた成果を要約すると以下の通りである。

1. 生菌製剤の微生物組成

生菌製剤の構成微生物は *Bacillus subtilis*, *B. natto*, *B. megaterium*, *B. thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. casei*, *Streptococcus faecalis*, *S. lactis*, *S. thermophilus*, *Clostridium butyricum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis* である。これら複数の微生物を米ヌカにそれぞれ 10^{7-8} cfu/g になるように発酵して調製した。また、比較実験のために、*C. butyricum* および *B. thermophilus* を除いた12種類の微生物を米ヌカ上で調製した発酵系生菌製剤は、微生物を米ヌカに吸着させたのみの非発酵系生菌製剤、殺菌した発酵系生菌製剤、*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus plantarum*, *L. acidophilus*

の3種類で構成された発酵系生菌製剤と比較し、*C. butyricum*および*B. thermophilus*を加えて14種類で構成された発酵系生菌製剤は、*L. acidophilus*および*S. faecalis*をそれぞれ米ヌカ上で発酵させた単一の発酵系生菌製剤と比較して行った。

2. 生菌製剤の腸内細菌叢正常化作用

生菌製剤の腸内細菌叢に与える影響を乳牛およびラット糞便性微生物叢を用いて検討した。乳牛においては、発酵系生菌製剤を投与することにより対照区および非発酵系生菌製剤と比較して、有意に*E. coli*の菌数を減少させ、*Streptococcus*, *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*を有意に増加させていた。また、非発酵系生菌製剤でも対照区と比較して、*Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*の有意な増加がみられた。*Clostridium*については発酵系生菌製剤で非発酵系生菌製剤より有意な減少を示した。ラットにおいては、基本飼料群および高脂肪・高コレステロール飼料群ともに発酵系生菌製剤が*E. coli*を減少させ、*Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*を有意に増加させることを確認した。とくに、高脂肪・高コレステロール飼料群においてその効果は顕著であった。また、高脂肪・高コレステロール飼料群の生菌製剤投与区で、*Clostridium*, *Bacteroidaceae*, *Megashaera*の有意な減少を明らかにした。高脂肪・高コレステロール負荷は、腸内細菌叢を悪化させるのに対して、生菌製剤を投与することにより有用菌の増加、有害菌の減少がみられ、腸内細菌叢全体のバランスが正常化されていることが示唆された。

3. 生菌製剤の脂質代謝改善作用

生菌製剤として今回開発した複合系の発酵系生菌製剤と米ヌカに吸着させた非発酵系生菌製剤を用い、乳牛および豚に投与することにより、それぞれ乳およびロイン部位の肉中のコレステロールへの影響について検討した。乳においては発酵系生菌製剤を投与することにより、コレステロールは対照区より有意に減少することが確認されたが、非発酵系生菌製剤と比較して有意な差は得られなかった。また、非発酵系生菌製剤は対照区よりわずかに低下している程度であった。豚肉中のコレステロールを比較すると、発酵系生菌製剤を投与することにより、対照区および非発酵系生菌製剤投与区より有意に低下していることが確認された。ラットを用いた試験では、給与飼料にコレステロールを負荷した飼料および負荷しない飼料の二つの

実験系で行った。発酵系生菌製剤は、コレステロールを負荷したときに、血清脂質（総コレステロール，VLDL+IDL+LDL-コレステロール，中性脂肪，遊離脂肪酸）の低下作用，とくに総コレステロールについては3種類で構成された発酵系生菌製剤および殺菌された生菌製剤より有意に低下，肝臓へのコレステロール蓄積抑制作用および糞便中への中性ステロール，胆汁酸の排泄促進作用を有することを示した。しかし，本実験条件下では，これまでコレステロール低下作用があるといわれている *L. acidophilus*, *S. faecalis* に顕著な効果はみられなかった。また，発酵系生菌製剤（以下生菌製剤）のその効果発現は，肝臓においてコレステロール合成の律速酵素である HMG-CoA reductase 活性の低下と，Cholesterol 7 α -hydroxylase 活性には変化がみられないことおよび *in vitro* の実験でコレステロール，胆汁酸が生菌製剤菌体との吸着作用を有することから，コレステロール合成阻害および糞便中への排泄促進が密接に関与していることが示唆された。このことは血清コレステロール濃度と肝臓コレステロール濃度間の正の相関，血清コレステロール濃度と糞便性コレステロール濃度間および肝臓コレステロール濃度と糞便性コレステロール濃度間の負の相関関係からも支持された。肝臓中の主要なリン脂質であるホスファチジルコリンの脂肪酸組成において，生菌製剤がリノール酸の減少，アラキドン酸の増加を促していることから，リノール酸からの不飽和化酵素である $\Delta 6$ -desaturase 活性についても上昇させている可能性が示唆された。

以上の結果から，生菌製剤の脂質代謝改善作用が確認された。12種類の微生物を混合させた生菌製剤と14種類の微生物を混合させた生菌製剤とでは同様に血清中のコレステロールを低下させる作用が認められ，その発現機構も肝臓におけるコレステロール合成抑制および腸管からのステロールの排泄促進と類似しており，基本的に同様の効果を持つ生菌製剤であると考えられる。また，複数の微生物を米ヌカ等有機資材上で発酵させて用いた方が単一微生物を用いるよりもラット生体内において，より高いコレステロール低下作用を有することが明らかとなった。

以上，今回開発した複合系の生菌製剤を用いたラット試験で，生菌製剤の新しい現象を数多く見だし，それらの効果発現の解明を進めたことは高く評価される。よって，審査員一同は，別に行った学力確認試験の結果と合わせて，本論文の提出者，福島道広は博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格があるものと認定した。