

学 位 論 文 題 名

オリゴ糖 Difructose anhydride III (DFA III) 摂取に おける腸内菌叢動態に関する研究

学位論文内容の要旨

近年、プロバイオティクス、プレバイオティクスを含む機能性食品の研究開発が盛んである。すでに、応用菌学教室ではチコリのイヌリンを *Arthrobacter* 属のイヌラーゼ II の酵素を使って、DFA III の大量生産の開発が進んでいた。DFA III は小腸での直接作用と大腸での間接的作用の二つの機構でカルシウム吸収を促進する難消化性のオリゴ糖である。オリゴ糖ゆえに、*bifidobacteria* を増やす効果があると期待されて動物試験が行われたが、従来からの培養法では、*bifidobacteria* を増やす効果は見られず、レシチナーゼ陰性の *clostridia* が増加したことが示されたが、詳しいことは不明であった。その後、分子生物学的手法によって、培養法では腸内菌叢の 8 割近くが培養できないことが明らかになった。そこで、培養可能と培養困難な細菌を含めた腸内菌叢全体を調べることが可能な分子生物学的ツールを開発・改良する必要があった。腸内細菌には未知の細菌も多いため、既知のみならず未知の細菌のデータも得られることから変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法 (DGGE 法) を選択し、主要な腸内細菌がバンドとして検出されるように改良を行った。

また、DFA III をラットに摂取させると、大腸発酵が起こり、有機酸の増加と盲腸内 pH 低下が観察されていた。腸内の酸性化は有害な細菌の増殖を抑えるほかに、宿主に悪影響を与える微生物由来の酵素活性を阻害することによって、宿主に健康をもたらす。この悪影響を与える反応の中で、食の欧米化に伴い大腸癌の発症率が増加していることから、7 α -脱水酸化反応に注目した。これは腸内で一次胆汁酸を、二次胆汁酸に変換する反応で、この二次胆汁酸は大腸癌の誘導物質として疫学的調査・動物実験により研究されている。7 α -脱水酸化活性の最適 pH は 7-8 で、*in vitro* では pH 6.5 以下で活性が下がることが示されている。そこで、DFA III 摂取によって、盲腸内 pH が 6.5 以下になることにより、7 α -脱水酸化反応が阻害され、二次胆汁酸生成が抑えられるのかどうかをラットやヒトで調べた。

上記のような DFA III のプレバイオティクス効果を調べるほかに、*in vitro* では発見することができなかった DFA III 資化性細菌の単離を DGGE 法で得られた菌の情報を元に試みた。さらに、ラットやヒトで初めて見つけた DFA III 資化性細菌と DFA III を同時に投与するシンバイオティクスによる新たな効果についても調査した。

1. DGGE 法を改良した結果、ヒトを含めた動物の主要な腸内細菌といわれているグループは検出できていた。
2. DGGE プロフィールによると、3%DFA III 添加食群のラット盲腸内で *Clostridium lituseburens* グループに含まれる細菌と *Bacteroides acidofaciens* と相溶性が高い細菌は減少して、*B.*

vulgatus, *B. uniformis*, *Ruminococcus productus* と相同性が高い細菌は増加していた。ヒトでは (9 g/日, 4 週間, 3 g/日, 2-12 ヶ月摂取)、腸内菌叢の個人差が大きく、被験者全員で共通した細菌の増減はなかった。便秘傾向の被験者では *Bacteroides* 属のバンドが増えていた。

3. 3%DFA III 添加食群のラット盲腸内容物から DFA III 資化性細菌 *R. productus* M-2 を単離した。この株は *R. productus* ATCC 27340^T と 16S rDNA 全長で 98% の相同性をもち、主に酢酸を生成した。リアルタイム PCR の定量によって、*R. productus* M-2 は DFA III 摂取 1 週間以内に 10^6 cells/g 乾燥糞 から 10^8 - 10^9 cells/g 乾燥糞 の定常に達したことが示された。また 12 ヶ月間 DFA III を摂取したヒトからも、DFA III 資化性細菌 *Ruminococcus* sp. を数株単離した。これらの株は *Ruminococcus obeum* ATCC 29174^T と 16S rDNA 全長で 95% の相同性があり、主に酢酸を生成していた。これらの株を単離した被験者の DGGE プロフィールでは資化性細菌に相当するバンドが増加していた。
4. 3%DFA III 添加食群のラット盲腸内容物では pH が低下して、短鎖脂肪酸量、特に酢酸が増加していた。ヒト試験でも糞便 pH は減少傾向があり、糞便中の有機酸は増加傾向があった。
5. 3%DFA III 摂取によって、ラット糞中の二次胆汁酸の割合は減少して、糞中の胆汁酸の組成が変化した。盲腸内 pH と二次胆汁酸の割合は相関があり、pH が下がると、二次胆汁酸の割合も減少していた。ヒトでも糞便中の二次胆汁酸の割合は減少傾向があり、糞便 pH と二次胆汁酸の割合は相関があった。盲腸内容物と糞便を使った *in vitro* の試験でも、低 pH によって二次胆汁酸生成が阻害されていた。このことから DFA III を摂取することによって、腸内 pH が低下した結果、7 α -脱水酸化活性が阻害されて、二次胆汁酸生成が減少することが示された。しかし、ヒト試験の場合では、腸内 pH 低下による 7 α -脱水酸化活性阻害だけではなく、二次胆汁酸生産菌の減少による可能性も示唆された。
6. ラットに、ヒトから単離した DFA III 資化性細菌 *R. productus* AHU1760 を、一日当たり、*R. productus* 添加食群で、 4.9×10^7 CFU、*R. productus* + 3% DFA III 添加食群で 4.7×10^7 CFU、それぞれ与えたところ、盲腸内に生存していることをランダム増幅多型法で確認した。このことにより、*R. productus* AHU1760 は酸と酸素に弱い、工夫次第によってはプロバイオティクスまたはシンバイオティクスも可能なことが示された。
7. DFA III を投与することによる腸内の酸性化は DFA III 資化性細菌である *Ruminococcus* 属が DFA III から生成する酢酸が主な要因であった。このことにより、今まで注目されていなかった *Ruminococcus* 属は有用菌である可能性が示唆された。また、DFA III の働きは DFA III 資化性細菌 *R. productus* AHU1760 と一緒に摂取することで、腸内の有益な細菌である lactobacilli と bifidobacteria の生菌数を増やす効果もあった。

プレバイオティクスは、大腸にいる宿主の健康を改善する限られた細菌の増殖や活性を選択的に刺激することによって、宿主に有益な影響を与える難消化性のものと定義されている。DFA III は難消化性であり、腸内の常在菌である *Ruminococcus* 属のみが資化することが示された。

Ruminococcus 属は DFA III を資化して、酢酸を生成し、腸内 pH を低下させ、腸内環境をより健康な菌叢にかえた。さらに、腸内 pH の低下により、二次胆汁酸形成を阻害し、大腸癌の誘導物質である二次胆汁酸の割合を減らした。以上のことより、DFA III はミネラル吸収促進効果があり、大腸癌発生を抑制する可能性のある新しいプレバイオティクス素材と考えられる。

さらに、DFA III 資化性細菌 *R. productus* AHU1760 と DFA III の同時摂取は、ヒトに有益な細菌である bifidobacteria と lactobacilli の生菌数が増加するなど腸内菌叢の改善につながることも示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 野 行 蔵

副 査 教 授 横 田 篤

副 査 教 授 原 博

副 査 名誉教授 富 田 房 男 (放送大学

北海道学習センター)

学 位 論 文 題 名

オリゴ糖 Difructose anhydride III (DFA III) 摂取に おける腸内菌叢動態に関する研究

本論文は、7章からなり、図 39、表 11、文献 128 を含む総頁数 139 の日本語論文である。別に参考論文 1 編が付されている。

DFA III は腸管でミネラル吸収を促進する難消化性のオリゴ糖である。従来からの培養法では、摂取時の詳しい腸内菌叢動態は不明であった。そこで、培養可能と培養困難な細菌を含めた腸内菌叢全体を調べることができる変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法 (DGGE 法) を改良した。

また、DFA III をラットに摂取させると、大腸発酵が起こり、有機酸の増加と盲腸内 pH 低下が観察されていた。腸管の酸性化は有害な細菌の増殖を抑えるほかに、宿主に悪影響を与える微生物由来の酵素活性を阻害することによって、宿主に健康をもたらす。この悪影響を与える酵素の中で、7 α -脱水酸化反応に注目した。これは腸内で一次胆汁酸を、二次胆汁酸に変換する反応で、この二次胆汁酸は大腸癌の誘導物質として疫学的調査・動物実験により研究されている。7 α -脱水酸化活性の最適 pH は 7-8 で、*in vitro* では pH 6.5 以下で活性が下がることが示されている。そこで、DFA III 摂取によって、盲腸内 pH が 6.5 以下になることにより、7 α -脱水酸化活性が阻害され、二次胆汁酸生成が抑えられるのかどうかをラットやヒトで調べた。さらに、*in vitro* では発見することができなかった DFA III 資化性細菌の単離を DGGE 法で得られた菌の情報を元に試みた。また、ラットやヒトで初めて見つけた DFA III 資化性細菌と DFA III を同時に投与する効果についても調べた。

1. DGGE 法を改良した結果、ヒトを含めた動物の主要な腸内細菌といわれているグループは検出できていた。

2. DGGE プロフィールによると、3%DFA III 添加食群のラット盲腸内で *Clostridium*

lituseburens グループに含まれる細菌と *Bacteroides acidofaciens* と相同性が高い細菌は減少して、*B. vulgatus*、*B. uniformis*、*Ruminococcus productus* と相同性が高い細菌は増加していた。ヒトでは (9 g/日, 4 週間、3 g/日, 2-12 ヶ月摂取)、腸内菌叢の個人差が大きく、被験者全員で共通した細菌の増減はなかった。便秘傾向の被験者では *Bacteroides* 属のバンドが増えていた。

3. 3%DFA III 添加食群のラット盲腸内容物から DFA III 資化性細菌 *R. productus* M-2 を単離した。この株は主に酢酸を生成した。リアルタイム PCR の定量によって、*R. productus* M-2 は DFA III 摂取 1 週間以内に 10^6 から 10^8 - 10^9 cells/g 乾燥糞 の定常に達したことが示された。また 12 ヶ月間 DFA III を摂取したヒトからも、DFA III 資化性細菌 *Ruminococcus* sp. を数株単離した。これらの株も主に酢酸を生成していた。
4. 3%DFA III 添加食群のラット盲腸内容物では pH が低下して、短鎖脂肪酸量、特に酢酸が増加していた。ヒト試験でも糞便 pH は減少傾向があり、糞便中の有機酸は増加傾向があった。
5. 3%DFA III 摂取によって、ラット糞中の二次胆汁酸の割合は減少して、一次胆汁酸が増加していた。盲腸内 pH と二次胆汁酸の割合は相関があり、pH が下がると、二次胆汁酸の割合は減少していた。ヒトでも糞便中の二次胆汁酸の割合は減少傾向があり、糞便 pH と二次胆汁酸の割合は相関があった。盲腸内容物と糞便を使った *in vitro* の試験でも低 pH によって二次胆汁酸生成が阻害されていた。このことから DFA III を摂取することによって、腸内 pH が低下した結果、7 α -脱水酸化活性が阻害されて、二次胆汁酸生成が減少することが示された。しかし、ヒト試験の場合では、腸内 pH 低下による酵素活性阻害だけではなく、二次胆汁酸生産菌の減少による可能性も示唆された。
6. ラットに、ヒトから単離した DFA III 資化性細菌 *R. productus* AHU1760 を、一日当たり、*R. productus* 添加食群で、 4.9×10^7 CFU、*R. productus* + 3% DFAIII 添加食群で 4.7×10^7 CFU、それぞれ与えたところ、盲腸内に生存していることをランダム増幅多型法で確認した。このことにより、*R. productus* AHU1760 はプロバイオティクスまたはシンバイオティクスが可能なことが示された。また、DFA III と DFA III 資化性細菌 *R. productus* AHU1760 を同時摂取することで、*lactobacilli* と *bifidobacteria* の生菌数を増加させる効果もあった。

以上のことより、DFA III はミネラル吸収促進効果があり、大腸癌発生を抑制する可能性のある新しいプレバイオティクス素材と考えられる。さらに、DFA III 資化性細菌 *R. productus* AHU1760 と DFAIII の同時摂取は、ヒトに有益な細菌である *bifidobacteria* と *lactobacilli* の生菌数が増加するなど腸内菌叢の改善につながることも示唆された。

本研究では、DFA III 摂取における腸内菌叢動態を調べるために DGGE 法を改良し、培養法では不明だった摂取時の腸内菌叢の変化について、ラットとヒトで明らかにした。また、DFA III 資化性細菌 *Ruminococcus* 属を世界で初めて単離し、摂取時における二次胆汁酸減少等の有益な効果、DFA III と DFA III 資化性細菌の同時投与による効果等も明らかにした。こ

のような多くの新知見を得ており、学術的並びに実用的に高く評価される。よって審査員一同は、南田公子が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。