

学 位 論 文 題 名

Molecular Ecological Analyses of Alteration of
Bifidobacterial Population by Administration of
Raffinose in Rat Cecum and Human Intestine

(ラフィノース投与によるラット盲腸およびヒト腸管内での
ビフィズス菌動態の分子生態学的解析)

学位論文内容の要旨

ヒト腸管内には多種の細菌が常在しており、宿主の健康に対して様々な影響を与えている。中でもビフィズス菌は宿主に対して種々の有益な効果を持つことが明らかになっている。ビフィズス菌がこの効果を発揮するためには、プロバイオティクス、プレバイオティクスおよびシンバイオティクスを宿主に投与し、腸管内のビフィズス菌を増殖させることが必要である。プレバイオティクスは「大腸内に存在する有用菌を選択的に増殖・活性化することで、生体の健康を改善する難消化性食品成分」として定義され、多くのオリゴ糖がプレバイオティクス効果を持つことが報告され、製品として市場に流通している。

ラフィノースは、甜菜からの砂糖精製の副産物として得られる北海道の産業上重要なオリゴ糖である。ラフィノースはヒト腸管上部での難消化性およびビフィズス菌の増殖促進効果という特徴からプレバイオティクスの一つであるが、そのプレバイオティクス機能を詳細に解析するため、ラフィノース投与によるビフィズス菌の動態を *in vitro* と *in vivo* で解析することは重要である。腸内細菌の動態解析にはこれまで平板培養による菌数計測が主に用いられてきたが、多大な労力と時間がかかる点、難培養性の菌を計測できないという欠点がある。この欠点を改善するために、近年培養を伴わない種々の分子生態学的手法が開発され、腸管内容物や糞便という複雑なサンプルの菌叢を正確に解析することが可能になってきている。そこで本研究では、分子生態学的手法として最も精度の高い Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) 法を用いて、ラフィノース投与によるラット盲腸内のビフィズス菌の動態を解析した。次いでフローサイトメトリー (FCM) を組み合わせて FISH 法をハイスループット化し (以下 FISH-FCM 法とする)、これを用いてラフィノース投与によるヒト腸管内のビフィズス菌の動態を種レベルで解析した。

1) シンバイオティクス投与ラット盲腸内のビフィズス菌の動態解析

ラフィノース投与による腸内ビフィズス菌の動態の前臨床的解析として、雌 WKAH/Hkm 系ラットに4種の異なる試験食を3週間に亘って投与し、盲腸内ビフィズス菌の動態を解析した。FISH-顕微鏡解析の結果、基本食群および基本食 + *Bifidobacterium breve* JCM1192^T (プロバイオティクス群) の盲腸内全細菌に対するビフィズス菌の割合はそれぞれ 0.4% および 0.3% と低か

った。それに対して、基本食+ラフィノース（プレバイオティクス群）および基本食+ *B. breve* JCM1192^T+ラフィノース（シンバイオティクス群）を投与した群では、盲腸内ビフィズス菌の増殖促進が見られた（それぞれ全細菌の 19.5%および 25.4%）。後者の両群で増殖したビフィズス菌を FISH-顕微鏡解析および Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) 解析に供したところ、盲腸内ではラット内在性の *B. animalis* が有意に増殖していることが明らかになった。また、非内在性である *B. breve* はシンバイオティクス群のみで全細菌の 6.3%まで増殖したことが観察された。これらの結果はシンバイオティクスとして投与した細菌種を内在性の同属細菌と区別して明確に検出し、シンバイオティクス効果を明示した初めてのものである。また、ラフィノースはラット盲腸において、内在性だけでなく非内在性のビフィズス菌の増殖をも促進するビフィズス因子としての機能を持つことが示された。

2) *in vitro* ヒト糞便培養による各種オリゴ糖のビフィズス菌増殖促進試験

ヒトにおけるラフィノースのビフィズス因子としての機能を評価するために、まずヒト糞便中に存在するビフィズス菌のラフィノースによる増殖促進効果を静置培養試験により調べた。糞便サンプルを接種した培養液に炭素源として種々の糖を添加し、培養 24 時間後のビフィズス菌の増殖を FISH 法により解析した。その結果、ラフィノース添加によりビフィズス菌は全細菌の 12.9%にまで到達していたのに対し、他の糖を加えた場合は、それぞれ 6.1% (1-kestose), 3.6% (nystose) および 2.4% (glucose) となり、ラフィノースがビフィズス因子として優れていることが *in vitro* で確認された。

3) FCM の適用による FISH 法のハイスループット化

FISH 法は蛍光顕微鏡下でターゲット細菌細胞を検出して手動計数するため、手間と時間がかかる。そこでビフィズス菌の動態解析をより迅速に行うために、FISH 法に迅速計数法としての FCM を組み合わせ、本法のハイスループット化を試みた。2 種類の蛍光色素 (FITC と Cy5) を用いた FISH を行い、FCM 解析を行ったところ、筆者らの解析に供与頂いた糞便サンプルでは、FITC 検出チャンネルにおいて強い自家蛍光が検出された。このため、種々の解析条件を検討し、単一の色素である Cy5 を用いて、自家蛍光物質を含む糞便サンプル中の種レベルのビフィズス菌の動態解析が可能な方法を確立した。

4) ラフィノース摂取によるヒト糞便中ビフィズス菌動態の FISH-FCM 法を適用した解析

In vivo でのラフィノースのビフィズス因子としての効果を明らかにするために、ヒトラフィノース摂取試験を実施した。13 名のボランティアの方々に 2 g のラフィノースを一日 2 回、4 週間に亘って摂取して頂き、摂取前 (0 週)、摂取中 (2 週および 4 週)、摂取後 (摂取終了後 4 週間後、8 週) の 4 回、糞便サンプルを供与頂いた。3) で確立した方法を用いて糞便中のビフィズス菌の動態を解析した。その結果、属レベルでは、ビフィズス菌はラフィノース摂取前平均で全菌数の 12.5%存在しており、ラフィノース摂取により 28.7% (2 週) および 37.2% (4 週) まで増加した。種レベルでは、*B. adolescentis*, *B. catenulatum* group, *B. longum* の 3 種が優勢であった。優勢 3 菌種はラフィノース摂取により 2 週目、4 週目と漸次的に増加したが、摂取終了と共に 0 週と同程度の割合まで低下した。ラフィノース投与期間中は、成人においてマイナーな菌種である *B. breve*, *B. bifidum*, *B. dentium*, *B. angulatum* についても増殖促進が見られたが、これらの割合は不安定であった。これらのことから優勢菌種とマイナーな菌種間で、ラフィノースによる増殖促進効果に異なる傾向があることが明らかになった。本研究はラフィノ

ース投与によるヒト内在性ビフィズス菌の動態を種レベルで詳細に解析した最初の報告である。

以上、本研究ではラフィノースのビフィズス菌増殖促進作用をラットおよびヒトにおいて種レベルで初めて明らかにし、本オリゴ糖の腸内菌叢改善機能に科学的な基盤を与えた。また FISH-FCM 法をハイスループットな汎用性の高い分子生態学的解析手法として確立できた。以上の成果は、プレバイオティクスの開発研究ならびに腸内細菌叢解析に大きく寄与するものである。

学位論文審査の要旨

主査	教授	横田	篤
副査	教授	浅野	行蔵
副査	教授	小林	泰男
副査	助教授	石塚	敏

学位論文題名

Molecular Ecological Analyses of Alteration of Bifidobacterial Population by Administration of Raffinose in Rat Cecum and Human Intestine

(ラフィノース投与によるラット盲腸およびヒト腸管内での
ビフィズス菌動態の分子生態学的解析)

本論文は英文 130 頁，図 30，表 15，6 章からなり，参考論文 1 編が付されている。

ビフィズス菌は宿主の健康に対して種々の有益な効果を示すプロバイオティクスである。一方，ラフィノースはビフィズス菌増殖効果が明らかにされているプレバイオティクオリゴ糖の一つであり，甜菜から砂糖精製の副産物として得られるため，北海道の食品産業上重要である。本研究はこのラフィノースに焦点を当て，そのビフィズス菌増殖効果の詳細をラットとヒトにおいて解析したものである。腸管内には多くの難培養性細菌が存在することから，腸内細菌の動態解析には従来の培養による菌数計測に代わり，培養を伴わない種々の分子生態学的手法が開発されている。そこで本研究では Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) 法を用いて種レベルでの詳細解析を行った。また，計数に多大な労力を有する FISH 法をフローサイトメトリー (FCM) と組み合わせて効率化し (FISH-FCM 法)，ヒト腸管内のビフィズス菌の動態解析に適用してその有効性を検討した。

1) シンバイオティクス投与ラット盲腸内のビフィズス菌の動態解析

ラフィノース投与によるヒト腸管内ビフィズス菌の動態解析の前段階として，雌 WKAH/Hkm 系ラットに基本食，基本食+*Bifidobacterium breve* JCM1192^T (プロバイオティクス群)，基本食+ラフィノース (プレバイオティクス群)，基本食+B. *breve*+ラフィノース (シンバイオティクス群) の 4 種の異なる試験食を 3 週間に亘って投与し，盲腸内ビフィズス菌の動態を FISH-顕微鏡法により解析した。その結果，基

本食群およびプロバイオティクス群ラットの盲腸内全細菌に対するビフィズス菌の割合はそれぞれ 0.4%および 0.3%と低かったが、プレバイオティクス群およびシンバイオティクス群ラットでは、それぞれ全細菌の 19.5%および 25.4%を占めるまで増殖した。後者の両群で増殖したビフィズス菌はラット内在性の *B. animalis* であり、非内在性である *B. breve* はシンバイオティクス群のみで全細菌の 6.3%まで増殖したことが観察された。これらの結果から、ラフィノースはラット盲腸において、内在性だけでなく外来のビフィズス菌の増殖をも促進するビフィズス因子としての機能を持つことが示された。

2) FCM の適用による FISH 法のハイスループット化

FISH 法は蛍光顕微鏡下でターゲット細菌細胞を検出して手動計数するため、手間と時間がかかる。そこで FISH 法に迅速計数法としての FCM を組合せ、本法のハイスループット化を試みた。糞便サンプルに対し常法として 2 種類の蛍光色素 (FITC と Cy5) を用いた FISH を行い、FCM 解析を行ったところ、FITC 検出チャンネルにおいて強いバックグラウンドの自家蛍光が検出され、計測を妨害した。このため、種々の解析条件を検討し、Cy5 のみを用いることで、自家蛍光物質を含む糞便サンプルでも計測可能な汎用 FISH-FCM 法を確立することに成功した。

3) ラフィノース摂取によるヒト糞便中ビフィズス菌動態の FISH-FCM 法を適用した解析

ヒト腸管内でのラフィノースのビフィズス因子としての効果を種レベルで明らかにするために、ラフィノース摂取試験を実施した。2 g のラフィノースを一日 2 回、4 週間に亘って摂取した 13 名のボランティアから、摂取前 (0 週)、摂取中 (2 週および 4 週)、摂取後 (摂取終了後 4 週間後、8 週) の 4 回、糞便を提供いただき、FISH-FCM 法を用いて糞便中のビフィズス菌の動態を解析した。その結果、属レベルのビフィズス菌は 0 週には平均で全菌数の 12.5%存在しており、ラフィノース摂取により 28.7% (2 週) および 37.2% (4 週) まで増加した。種レベルでは、*B. adolescentis*, *B. catenulatum* group, *B. longum* の 3 種が優勢であり、これらはラフィノース摂取により 2 週目、4 週目と漸次的に増加したが、摂取終了と共に 0 週と同程度の割合まで低下した。ラフィノース投与期間中は、成人においてマイナーな菌種である *B. breve*, *B. bifidum*, *B. dentium*, *B. angulatum* についても増殖促進が見られたが、これらの割合は不安定であった。これらのことから優勢菌種とマイナーな菌種間で、ラフィノースによる増殖促進効果に違った傾向があることが明らかになった。本研究はラフィノース投与によるヒト内在性ビフィズス菌の動態を種レベルで詳細に解析した最初の報告である。

以上、本研究では FISH 法を適用することにより、ラフィノースのビフィズス菌増殖促進作用をラットやヒトにおいて種レベルで初めて明らかにした。また FCM を組合せることにより FISH 法のハイスループット化を達成するとともに、自家蛍

光物質を多量に含む糞便サンプルにも適用可能な汎用性の高い FISH-FCM 法を確立した。特にこれを用いて解析したヒト糞便中のビフィズス菌の種レベルでの動態は、きわめて興味深い新知見を含んでいる。以上の成果は、プレバイオティクスの科学的理解に役立つだけでなく、腸内細菌叢の解析、特にヒト腸管内でのビフィズス菌の生態学的理解に大きく寄与するものである。

よって審査員一同は、アハマド・ディノトが博士（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。