

学 位 論 文 題 名

Studies on synbiotic effect of fructo-oligosaccharides
on anti-obese probiotic bacterium

Lactobacillus plantarum strain No.14 in mice

(*Lactobacillus plantarum* No.14株の抗肥満作用に対する
フラクトオリゴ糖のシンバイオティック効果に関する研究)

学位論文内容の要旨

肥満はメタボリックシンドロームを惹起する基盤であり、近年ではその増加が社会問題となっている。最近の研究により、腸内細菌が肥満の発達に関与する重要な因子であることが示唆されてきた。プロバイオティクスは宿主の健康に有益に作用する生菌製剤である。したがって肥満の予防・改善に寄与するプロバイオティクスを開発できるかもしれない。食品由来乳酸菌株 *Lactobacillus plantarum* No.14 株 (LP14) の凍結乾燥菌体を健康な被験者に継続的に摂取させると、体脂肪率が低下することが報告されている。すなわち、LP14 は肥満予防のためのプロバイオティクスとなりうる。本研究は、食餌誘導性肥満マウスを用いて LP14 の抗肥満作用を明らかにすることを第一の目的とした。

プロバイオティクスの効果を十分に得るためには、消化管にその菌数を多く維持し続ける必要があると考えられる。そのためには、プロバイオティクスの生存や増殖に影響する胃酸や胆汁酸などのストレスを減少させる、あるいは定着を促すような状態を確立する必要がある。理論的には、腸内環境は食餌により制御できる。そこで、消化管における LP14 の増殖や定着に食餌が及ぼす影響を、動物実験と *in vitro* の培養実験で明らかにすることを、第二の目的とした。難消化性オリゴ糖は腸の常在性乳酸菌の増殖を刺激するため、外因性の乳酸菌も管腔内での増殖や定着が促されるかもしれない。そこで、マウス消化管における LP14 の増殖や接着にイヌリン型フラクタンが及ぼす影響を解析した。一方で、高脂肪食は胆汁酸の濃度を増加させることが報告されている。そこで、マウス消化管における LP14 の生存に高脂肪食が影響するか、さらにイヌリン型フラクタンがそれを改善するかを解析した。

食餌誘導性肥満マウスにおける LP14 の抗肥満作用の解析

4 週齢の雌性 C57BL/6 マウスに、通常食 (AIN-93G 配合精製飼料) あるいはこれにラードを添加した高脂肪食を摂取させると同時に、LP14 凍結乾燥菌体 (1×10^8 CFU/頭) あるいは同質量の担体 (デキストリン) を毎日経口投与して飼育した。通常食と比較して、高脂肪食は体重を有意に増加させた。LP14 は食餌摂取量および体重変化に影響しなかった。通常食と比較して、

高脂肪食は白色脂肪組織重量を増加させたが、LP14 はそれを抑制する傾向を示した。血清中の総コレステロールおよびレプチンの濃度は、いずれも白色脂肪組織重量と有意な正の相関を示した。通常食と比較して、高脂肪食は白色脂肪細胞を肥大させたが、LP14 はそれを抑制した。以上より、LP14 は脂肪細胞での脂質の蓄積を抑制して白色脂肪組織重量を減少させるため、肥満を予防しうるプロバイオティクスであると考えられた。

LP14 の作用は未解明であるが、既報のプロバイオティクスの抗肥満機構、すなわち共役リノール酸、食餌脂質の吸収抑制、白色脂肪組織での脂質分解、白色および褐色脂肪組織での脱共役タンパク質の発現亢進にはよらないことを示した。ただし、LP14 摂取群の白色脂肪組織では、脂質合成系酵素群の mRNA 発現が減少する傾向にあった。

マウス消化管における LP14 の増殖や接着にイヌリン型フラクタンが及ぼす影響の解析

平均重合度の異なるイヌリン型フラクタン (FOS : 平均重合度 3、INU : 平均重合度 16) を用意した。5 週齢の雌性 ddY マウスに通常食、5%FOS 添加食、あるいは 5%INU 添加食を与えて 2 日間飼育した。1×10⁸ CFU/頭で LP14 を経口投与し、後に排出される糞中の *L. plantarum* 生菌を選択培地で検出した。通常食群と比較して、フラクタン摂取群では *L. plantarum* の糞中排泄が増加しており、とりわけ INU 摂取群で顕著だった。糖質無添加の MRS 培地中では、FOS と INU はそれぞれ同程度に LP14 の増殖を刺激した。一方で、マウスの糞の水抽出物を培地として LP14 を培養したところ、フラクタン摂取群より調製した培地で LP14 はより増殖し、とりわけ INU 摂取群で顕著だった。ただし、イヌリン型フラクタンは糞中にはほとんど残存しないと報告されている。以上より、消化管においてイヌリン型フラクタンは LP14 を直接刺激して増殖を促すのみでなく、常在細菌によって重合度に依存した発酵を受け、その産物も LP14 の増殖促進に寄与すると考えた。

マウスの胃より常在性乳酸菌 *L. johnsonii* (LJ) を単離し、リファンピシン耐性を誘導した。LP14 とリファンピシン耐性 LJ (各々 1×10⁸ CFU/頭) をマウスに同時投与し、それぞれの糞中排泄を比較した。リファンピシン耐性菌は投与後 24 時間以降一定数検出され続けたのに対して、*L. plantarum* は投与後 48 時間で検出限界以下となった。また、組織観察により、投与した LJ は前胃粘膜表面に多く接着するものの、LP14 は胃、小腸、盲腸、結腸のいずれの粘膜表面にも接着せず、内容物に局在することが確認された。イヌリン型フラクタンは LP14 の接着に影響しなかった。以上より、LP14 はマウス消化管には接着せず、イヌリン型フラクタンはそれを促さないと考えられた。

高脂肪食およびイヌリン型フラクタンがマウスの消化管における LP14 の生存に及ぼす影響の解析

6 週齢の雌性 C57BL/6 マウスに通常食あるいは高脂肪食を摂取させた。飼育 2 日後に LP14、また 7 日後にリファンピシン耐性 LJ を、単独 (1×10⁸ CFU/頭) あるいは INU (10 mg/頭) と同時に経口投与し、選択培地を用いて各々の糞中排出を解析した。高脂肪食により *L. plantarum* の糞中排泄は著減したが、リファンピシン耐性菌は変化しなかった。INU は高脂肪食摂取時の両菌の糞中排泄を増加させた。LP14 あるいは LJ をコール酸あるいはデオキシコール酸添加

MRS 培地で培養したところ、各胆汁酸の濃度依存的に LP14 の生菌率は低下したが、LJ はほとんど変化しなかった。培地への INU の添加は、LP14 と LJ の生存に影響しなかった。INU あるいは溶媒のみを経口投与した後の小腸および盲腸内容物中の胆汁酸と有機酸を分析した。通常食群と比較して、高脂肪食群の小腸および盲腸の総胆汁酸濃度は有意に高く、また INU による影響はなかった。INU は高脂肪食群の盲腸中の有機酸濃度を増加させたが、一次および二次胆汁酸の濃度に影響しなかった。以上より、高脂肪食は胆汁酸濃度を増加させて LP14 の生存の低下させること、また INU は LP14 の生存を回復させるが、それは毒性の強い二次胆汁酸の発生が腸内 pH の低下により減少したためではないことが予想された。

以上より、イヌリン型フラクタンを摂取すること、また高脂肪食を避けることが消化管により多くの LP14 を維持し、ひいては抗肥満作用を発揮するために有効であると考えた。

学位論文審査の要旨

主 査	准教授	園 山	慶
副 査	教 授	有 賀	早 苗
副 査	教 授	内 藤	哲
副 査	教 授	横 田	篤 (農学院)

学 位 論 文 題 名

Studies on synbiotic effect of fructo-oligosaccharides on anti-obese probiotic bacterium *Lactobacillus plantarum* strain No.14 in mice

(*Lactobacillus plantarum* No.14株の抗肥満作用に対する
フラクトオリゴ糖のシンバイオティク効果に関する研究)

近年、肥満の増加が社会問題となっているが、最近の研究により、腸内細菌が肥満の発達に關与する重要な因子であることが示唆されてきた。プロバイオティクスは宿主の健康に有益に作用する生菌製剤であるので、肥満の予防・改善に寄与するかもしれない。

本論文は、乳酸菌株 *Lactobacillus plantarum* No.14 株 (LP14) の抗肥満作用を記載し、本菌株が抗肥満プロバイオティクスであることを示すとともに、食餌条件が消化管におけるプロバイオティクスの動態に及ぼす影響を明らかにすることを目的として、主として動物実験により解析したものである。

まず、雌性 C57BL/6 マウスに高脂肪食を摂取させることにより食餌誘導性肥満モデルを作成し、LP14 凍結乾燥菌体 (1×10^8 CFU/頭) あるいは担体 (デキストリン) を毎日経口投与した。LP14 は食餌摂取量および体重変化に影響しなかったが、高脂肪食による白色脂肪組織重量の増加を抑制する傾向を示した。また高脂肪食は白色脂肪細胞を肥大させたが、LP14 はそれを抑制した。さらに血清中の総コレステロールおよびレプチンの濃度は、いずれも白色脂肪組織重量と有意な正の相関を示した。これらの結果より、LP14 は白色脂肪細胞の肥大を抑制することにより肥満を予防するプロバイオティクスと成りうることが示唆された。

次に、腸内細菌叢を修飾する食品成分のひとつである難消化性オリゴ糖が LP14 の消化管内動態に及ぼす影響を解析した。マウスに基本飼料あるいはイヌリン型フラクタンを添加した飼料を与えて 2 日間飼育した後、LP14 (1×10^8 CFU/頭) を経口投与し、排出される糞中の LP14 生菌を選択培地で検出した。基本食群と比較して、フラクタン摂取群では LP14 の糞中排泄が増加していた。一方、マウスの胃より常在性乳酸菌 *Lactobacillus johnsonii* (LJ) を単離して LP14 と同時にマウスに投与し、それぞれの糞中排泄を比較した結果、LJ は投与後 24 時間以降一定数検出され続けたのに対して、LP14 は投与後 48 時間で検出限界以下となった。また、組織観察により、投与した LJ

は前胃粘膜表面に多く接着するものの、LP14 は胃、小腸、盲腸、結腸のいずれの粘膜表面にも接着せず、内容物に局在することが確認された。イヌリン型フラクタンは LP14 の接着に影響しなかった。以上より、イヌリン型フラクタンは管腔における LP14 の増殖を促進するが、消化管粘膜への接着を促進するわけではないことが示唆された。

さらに、胆汁酸はプロバイオティクスの生存・増殖に対するストレスになることが知られているので、胆汁酸分泌を刺激する高脂肪食が LP14 の消化管内動態に及ぼす影響を解析した。マウスに基本食あるいは高脂肪食を摂取させ、LP14 あるいは LJ を経口投与し、選択培地を用いて各々の糞中排出を解析した。高脂肪食により LP14 の糞中排泄は著減したが、LJ は変化しなかった。イヌリン型フラクタンは高脂肪食摂取時の両菌の糞中排泄を増加させた。LP14 および LJ を胆汁酸(コール酸およびデオキシコール酸)添加培地で培養したところ、各胆汁酸の濃度依存的に LP14 の生菌率は低下したが、LJ はほとんど変化しなかった。培地へのイヌリン型フラクタンの添加は、LP14 と LJ の生存に影響しなかった。小腸および盲腸内容物中の胆汁酸を分析した結果、基本食群と比較して高脂肪食群の小腸および盲腸の総胆汁酸濃度は有意に高く、イヌリン型フラクタンはこれに影響しなかった。イヌリン型フラクタンは高脂肪食群の盲腸内の一次および二次胆汁酸の濃度に影響しなかった。以上より、高脂肪食は胆汁酸濃度を増加させて LP14 の生存の低下させること、またイヌリン型フラクタンは LP14 の生存を回復させるが、それは毒性の強い二次胆汁酸の発生を抑制したためではないと推察した。

これを要するに、著者は、体脂肪蓄積を抑制するプロバイオティクスを見出し、その消化管内動態に対する食餌の影響に関する新知見を得たものであり、肥満予防のための新たな方策確立へ貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士(生命科学)の学位を授与される資格あるものと認める。