

一般演題 A-8

Lactobacillus fermentum によって産生された
Porphyromonas gingivalis に対する抗菌物質The antibacterial substances produced by *Lactobacillus fermentum*
against *Porphyromonas gingivalis*

○河井智美¹, 大島朋子¹, 新 良一², 井川 聡³, 谷 篤史⁴,
稲角直也⁵, 水谷武夫², 三浦竜介², 五味一博⁶, 前田伸子¹

¹ 鶴見大学歯学部口腔微生物学講座, ² 株式会社エイ・エル・エイ中央研究所,

³ 地方独立行政法人大阪府立産業技術総合研究所化学環境科,

⁴ 大阪大学大学院理学研究科宇宙地球科学専攻,

⁵ 大阪大学大学院理学研究科化学専攻, ⁶ 鶴見大学歯学部歯周病学講座

【目的】 歯周病は、プラーク中の *Porphyromonas gingivalis* などの歯周病原菌が原因となって発症する。急性症状を示す場合、抗菌薬が投与されるが、薬剤耐性菌の出現やアレルギーなどの問題がある。そこで代替療法として、近年、プロバイオティクスの効果に関する研究が行われている。しかし、歯周病に対するプロバイオティクス菌の抑制効果の基礎的なメカニズムについては明確に解明されていない。歯周病原菌に対するプロバイオティクス菌の抗菌メカニズムを解明するために、私たちは、スクリーニングした乳酸菌 50 株中 *P. gingivalis* に対する最も強い抗菌活性のある *Lactobacillus fermentum* ALAL020 によって産生された抗菌物質の同定を行った。

【方法】 MRS 液体培養上清は、中和後、ゲル濾過カラムクロマトグラフィーと逆相 HPLC によって精製した。精製物質の分子量と構造は、LC/MS/MS, FT-IR, NMR にて分析した。

【結果】 *L. fermentum* ALAL020 によって産生された培養上清中の主な抗菌物質は単一ピーク分画として精製され、その分子量 (m/z) は、226.131 であった。この低分子化合物を LC-MS 分析したところ、組成式は $C_{11}H_{18}O_3N_2$ であると明らかになった。この化合物の IR スペクトルから、アミノ基とカルボキシル基を含まないことが示された。また、Photodiode Array Detector による UV-VIS 吸収スペクトルから、240 nm 以上の領域に吸収がなかったため、ベンゼン環のような共役系を持たないと考えられた。そこで、NMR での構造解析を行ったところ、環状ジペプチドの hexahydro-7-hydroxy-3-(2-methylpropyl) pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione であることが明らかとなった。

【考察】 私たちは *L. fermentum* ALAL020 によって産生された *P. gingivalis* に対する主要な抗菌物質を精製し、同定した。この物質は、今までにプロバイオティクス菌が産生しているという報告は見当たらない。今回の分析結果は、今後の抗菌メカニズムの解明につながると考えられ、また歯周病予防のために応用できる可能性が期待できる。

一般演題 A-9

タイ発酵食品由来 *Lactobacillus pentosus* TJ515 株の機能性評価
A functionality assessment of *Lactobacillus pentosus* TJ515 isolated
from fermented food in Thailand

○岡田圭祐, 木村 基, 平野 貢, 伊藤雅起, 野口敬康, 内藤 聡
わかもと製薬株式会社相模研究所

【目的】近年, ヒトに対して有用な作用を示す乳酸菌の研究が盛んに行われ, 商品化も進められている。中でも, 免疫系に対して作用し, 抗アレルギーや自然免疫賦活などの調節能を示す乳酸菌が注目されている。我々は, 新規に免疫調節能を示す乳酸菌を見出す目的で, 食品由来の乳酸菌のスクリーニングを行った。また, 単離された菌株に対して, その有効成分の同定や作用機序を解明し, 機能性を評価することを目的とし, 解析を行った。

【方法】タイの発酵食品 864 種よりラクトバチルス属細菌 863 株を単離し, 酸および胆汁に対する耐性の有無, マウスパイエル板細胞に対する IL-10 産生誘導能などによりスクリーニングを行った。最も IL-10 産生誘導能の高い菌株に対し, その機能を, *in vitro* および *in vivo* の試験により解析した。*in vitro* の試験では, マウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 に菌体を作用させ, 培養上清中のサイトカイン量を測定した。*in vivo* の試験では, ヒスタミン遊離抑制試験, PCA 反応抑制試験を行い, 抗アレルギー能を示すかどうかを検証した。

【結果】我々は今回のスクリーニングにより, 酸および胆汁に耐性を示し, RAW264.7 細胞やマウスパイエル板細胞に対し高い IL-10 産生誘導能を示す乳酸菌, *Lactobacillus pentosus* TJ515 株 (以下 TJ515) を見出した。TJ515 を 2 週間以上投与した SPF ラットに対し, ヒスタミン遊離抑制試験, PCA 反応抑制試験を行ったところ, コントロール群と比較して抑制効果がみられた。

【考察】我々は, IL-10 産生誘導能を有し, 動物に対して抗 I 型アレルギー能を示す乳酸菌 TJ515 を見出した。今後は, 他のアレルギーに対する効果や自然免疫賦活能の有無などを調べ, 本菌がどのような免疫調節能を示すのか, また菌体のどの成分がどのようなメカニズムで細胞に対して作用しているのかについてより詳細に調べていく予定である。

一般演題 A-10*Lactobacillus gasseri* SBT2055 の抗酸化ストレス効果と作用機構の解明

Effects and action mechanisms of anti-oxidative stress by

Lactobacillus gasseri SBT2055○小島英史¹, 中川久子², 江口 慧¹, 山下舞亜¹, 浮辺 健¹,
馬場一信², 猪村 帝², 松原由美², 宮崎忠昭²¹雪印メグミルク株式会社ミルクサイエンス研究所, ²北海道大学遺伝子病制御研究所

【目的】 *Lactobacillus gasseri* SBT2055 (LG2055) はプロバイオティクスとして使用されており, 整腸作用, 内臓脂肪低減作用 (1), インフルエンザウイルス感染後の重症化抑制作用 (2) などを示すことが報告されている. これまでに我々は, LG2055 が線虫 *Caenorhabditis elegans* に対して寿命延長作用を示すことを明らかにした (3). また, LG2055 を摂取した線虫では, 腸において SKN-1 (酸化ストレス応答に関わる転写因子 Nrf2 のオルソログ) の遺伝子発現および核内移行が亢進し, 酸化ストレス抵抗性の向上が認められた. 本研究ではマウス培養細胞を用いて LG2055 による抗酸化ストレス効果を評価し, その作用機構を解析した.

【方法】 NIH-3T3 (マウス胎仔線維芽細胞株) に酸化ストレス源としてパラコートを単独, もしくは LG2055 と同時に添加し, 24 時間培養した後に細胞生存率および活性酸素種 (ROS) 蓄積を評価した. また, C57BL/6N マウスより調製した MEF (マウス胎仔線維芽細胞) に対して LG2055 を添加し, Nrf2 タンパクおよび Nrf2 標的遺伝子の発現変化を解析した.

【結果】 細胞にパラコートを添加すると生存率の低下, ROS 蓄積が認められたが, LG2055 同時添加によってこれらの変化の程度が抑制された. この結果より, LG2055 は培養細胞においても抗酸化ストレス作用を示すことが明らかとなった.

また, LG2055 添加によって Nrf2 発現および核内移行が増加し, Nrf2 標的遺伝子である *HO-1*, *Nqo1*, *Gclc* の mRNA 発現量が上昇した. 一方, LG2055 を添加した細胞では JNK シグナル伝達経路が活性化しており, JNK 阻害剤の処理により Nrf2 タンパクおよび Nrf2 標的遺伝子の発現上昇が抑制された.

【考察】 線虫を用いた試験によって示された LG2055 の抗酸化ストレス作用は, マウス培養細胞においても同様に認められた. LG2055 を添加したマウス培養細胞では転写因子 Nrf2 による酸化ストレス応答が亢進しており, LG2055 は JNK シグナル伝達経路を介して Nrf2 による酸化ストレス応答系を活性化している可能性が示された.

(1) Miyoshi *et al. Eur J Nutr.* 2014.(2) Nakayama *et al. Sci Rep.* 2014.(3) Nakagawa *et al. Aging Cell.* 2015.

一般演題 A-11

乳酸菌 (*Enterococcus faecium* WB2000 株) の
マウスドライアイモデルにおける涙液分泌, 維持作用Tear secretion and maintaining effects of lactic acid bacteria
(*Enterococcus faecium* WB2000)
in mouse dry eye model.○泉田祐輔, 中村 滋, 川島素子, 坪田一男
慶應義塾大学医学部眼科学教室

【目的】 乳酸菌をはじめとするプロバイオティクスには感染症, 花粉症, アレルギー, 癌, 生活習慣病や肥満の予防等, 健康維持機能に関わる科学的根拠が集積されつつあるが, 眼科領域における知見は少ない。ドライアイは涙の減少・変化によって, 目の表面, 視力の障害が惹起される前眼部疾患である。コンピュータモニター, 携帯電話, ポータブルゲームをはじめとする視覚情報端末を注視する作業において, 発症リスクが高まることが知られているが, 点眼液を中心とした対症療法が主流である。今回, マウスストレス性ドライアイモデルを用い, 乳酸菌 *Enterococcus faecium* WB2000 株 (WB2000) の涙液分泌能への影響を生菌及び死菌を用いて検討し, ドライアイの予防/治療因子としての可能性を検証した。

【方法】 C57BL/6系マウス (♀, 7週齢) を, 1日4時間, 呼吸/排泄可能な処置を施したポリプロピレン製遠沈管 (容量約 60 ml) 内に拘束した。拘束中はマウス顔面に送風 (風速 0.5-1.0 m/s) を行った。拘束処置時間以外はケージ内で餌と飲料は自由摂取とした。WB2000 (生菌及び加熱滅菌処理した死菌) は蒸留水に懸濁し, 0.85, 1.7, 17, 170 mg/kg の用量で, 処置の前日及び直前に投与した。溶媒投与群を対照とした。マウス涙液分泌量の測定は処置の翌日に行った。外眼角に綿糸を 15 秒間挿入し, 綿糸に浸透した涙液の長さを計測後, 左右眼の平均を個体の涙液分泌量とした。

【結果】 処置後, 溶媒投与群では涙液量が投与前値に対し半分以下に減少した ($46.19\% \pm 18.53$)。生菌投与群では WB2000 の用量依存的に涙液減少が抑制され, 17 mg/kg, 170 mg/kg においてはそれぞれ $93.33\% \pm 38.37$, $91.33\% \pm 21.26$ とドライアイ処置前値とほぼ同値を示し, 溶媒投与群に対し有意な ($p=0.008$, $p=0.01$) 涙液分泌能低下抑制効果が認められた。死菌投与群は 17 mg/kg, 170mg/kg の用量で単回処置にて効果を検討したが, いずれの濃度においても $59.85\% \pm 25.57$, $80.48\% \pm 14.36$ と溶媒投与群に対し有意な ($p=0.77$, $p=0.19$) 減少抑制効果は認められなかった。

【考察】 本モデルにおいて WB2000 生菌が涙液分泌能の低下を抑制したことから, プロバイオティクスの摂取はドライアイ症状の予防/改善に有用である可能性が示唆された。

一般演題 A-12**フラクトオリゴ糖または 1-ケストースの摂取は泌乳期マウスの乳中 IgA レベルを上昇させる****Fructooligosaccharides or 1-kestose consumption increases the levels of IgA in the milk of lactating mice**

○神野慎治, 中村吉孝, 長田昌士, 高橋 毅

株式会社明治研究本部食機能科学研究所

【目的】 フラクトオリゴ糖の摂取による腸内細菌叢の活性化が, 遠隔の粘膜組織である乳腺での IgA 分泌を促進するかどうかを評価する.

【背景】 フラクトオリゴ糖摂取の効果の 1 つとして腸管 IgA の産生促進がこれまでに知られている. 一方で, パイエル板で分化した B 細胞は末梢の粘膜組織に移行することが仮説として提唱されている.

【方法】 フラクトオリゴ糖の構成成分の一つである 1-ケストースを 5% 含む飼料または対照飼料で妊娠～泌乳期の Balb/c マウスを飼育した. 母乳中の総 IgA 濃度および抗原特異的 IgA 抗体価を泌乳 7 日目と泌乳 14 日目に測定した. 泌乳 17 日目の母獣の糞便中 *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp. ならびに *Bacteroides* spp. の菌数を特異プライマーを用いた Real-time PCR 法により測定した. また, フラクトオリゴ糖を用いた試験を同様に実施し, 乳中の総 IgA 濃度および抗原特異的 IgA 抗体価を測定した.

【結果】 マウス母乳中の総 IgA 濃度ならびに抗 *Bacteroides* IgA 抗体価は, 1-ケストース摂取群で有意に高かった (二元配置分散分析 飼料×泌乳期, 飼料の効果: $p < 0.05$, 泌乳期の効果: $p < 0.05$, 交互作用無) (1). さらに泌乳 14 日目の母乳中総 IgA 濃度は, 泌乳 17 日目の母獣の糞便中 *Bacteroides* spp. 数と有意に相関していた ($p < 0.05$) (1). また, フラクトオリゴ糖摂取群においても, 乳中の総 IgA 濃度および抗原特異的 IgA 抗体価が上昇することが確認された.

【考察】 本研究では, フラクトオリゴ糖または 1-ケストースの摂取が母乳 IgA の分泌に影響を及ぼすことが初めて示された. このメカニズムとしてパイエル板に由来する B 細胞の遠隔組織への移行等の関与が示唆された.

(1) *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2014. 78: 861-866.

一般演題 A-13

プロバイオティックビフィズス菌の
抗メタボリックシンドローム作用メカニズムAnti-metabolic syndrome effect of probiotic bifidobacteria
in high-fat diet-induced obesity

○青木 亮^{1, 2}, 上門弘平¹, 須田 互^{2, 3}, 菅沼名津季¹, 滝井 寛¹, 古賀泰裕⁴, 服部正平^{2, 5}

¹江崎グリコ(株)健康科学研究所, ²東京大学大学院新領域創成科学研究科,

³慶應義塾大学医学部, ⁴東海大学医学部, ⁵早稲田大学理工学術院

【目的】内臓脂肪蓄積に起因する糖尿病などのメタボリックシンドロームの増加は、世界的に大きな問題となっている。近年、メタボリックシンドロームと腸内細菌叢の関連性が明らかになってきており、ビフィズス菌に代表されるプロバイオティクス摂取によるメタボリックシンドロームの予防・改善が期待されている。一方、菌種・菌株ごとの効果の有無や作用機序については不明な点が多い。本研究では、異なる2種のビフィズス菌の抗メタボリックシンドローム効果を検証し、その作用機序の解明を目的とした。

【方法】試験に用いるビフィズス菌として、プロバイオティクスとして汎用されている菌種であり、腸内での酢酸生産能に優れていると報告のある *Bifidobacterium longum* の基準株 JCM1217^T 株 (1) と、腸管増殖性を有する *B. animalis* ssp. *lactis* GCL2505 株 (2) を用いた。

雄性5週齢 C57BL/6J マウスに高脂肪食を負荷して肥満を誘導し、*B. longum* JCM1217^T (*B. longum* 群) または *B. animalis* ssp. *lactis* GCL2505 (*B. lactis* 群) の生菌を7週間連続経口投与した (10⁹ cfu/day)。対照群には生理食塩水を投与した。

【結果】*B. lactis* 群は対照群と比較して内臓脂肪蓄積改善・耐糖能改善などの抗メタボリックシンドローム効果を示したが、*B. longum* 群は効果を示さなかった。腸内の16S rRNA 遺伝子の pyrosequencing を行い、UniFrac を用いた菌叢全体の変動について解析を行ったところ、*B. lactis* 群の方が *B. longum* 群よりも対照群に対する変化が大きいことが明らかとなった。特に、*B. lactis* 群では対照群および *B. longum* 群に比べ、腸内の *Bifidobacterium* 等の有意な増加が見られた。さらに *B. lactis* 群では腸管内・血中において、酢酸濃度および消化管ホルモンの1種である GLP-1 の有意な上昇が見られたが、*B. longum* 群では変動が見られなかった。

【考察】以上の結果から、*B. animalis* ssp. *lactis* GCL2505 は腸管内で増殖し、腸内細菌叢の変化や酢酸の上昇を引き起こすことで、結腸 GLP-1 の上昇や内臓脂肪蓄積抑制をもたらし、糖代謝を改善したと考えられた。すなわち、プロバイオティクスが抗メタボリックシンドローム効果を発揮するには、高い腸管到達性・増殖性をもち、腸内細菌叢や腸内短鎖脂肪酸を変動させることが重要であると考えられた。

(1) Nature. 2011, 469 (7331): 543-7.

(2) J Biosci Bioeng. 2012, 113 (5): 587-91.

一般演題 A-14**医学部生の学術試験ストレスに伴う腹部症状および腸内細菌叢変化に対する乳酸菌 *Lactobacillus casei* シロタ株の影響****Effects of *Lactobacillus casei* strain Shirota on academic stress-induced abdominal symptoms and gut microbiota change**

○高田麻衣¹, 加藤豪人¹, 西田憲生², 桑野由紀², 河合光久¹,
権藤祐輔¹, 清水健介¹, 松木隆広¹, 久代 明¹, 宮崎幸司¹, 六反一仁²
¹株式会社ヤクルト本社中央研究所, ²徳島大学大学院医歯薬学研究所

【目的】 学術試験ストレスに伴う腹部症状に対する乳酸菌 *L. casei* シロタ株 (LcS) の影響を調べるため, 進級のための全国共通試験 (CBT) を受ける健康な医学部生を対象に二重盲検プラセボ対照試験 (UMIN000011926) を実施した.

【方法】 CBT を受験する医学部 4 年生 49 名を均等に 2 群に分けた後, CBT の 8 週前から LcS 発酵乳飲料もしくはプラセボ飲料を 8 週間飲用させ, 飲用期間と前後 2 週間の観察期間における腹部症状, 心身の状態, 唾液ストレスマーカーを評価した. さらに, 解析対象者 45 名 (プラセボ群 23 名, LcS 群 22 名) の飲用前観察期と CBT 前日の便について, 16S rRNA 遺伝子の V1-V2 を対象に次世代シーケンサーによる腸内細菌叢の解析を行い, α 多様性と菌叢構成を評価した.

【結果】 LcS 群では, プラセボ群と比べて, 学術試験ストレスに伴う主観的ストレス感の上昇や腹部症状の増加が有意に抑制された. また, プラセボ群で認められた CBT 前日の唾液ストレスマーカーの有意な上昇は LcS 群ではみられなかった. 一方, 腸内細菌叢の α 多様性は, 飲用前から CBT 前日にかけてプラセボ群では低下傾向を示したのに対し, LcS 群では増加傾向がみられ, CBT 前日では LcS 群の α 多様性がプラセボ群と比べて有意に高値を示した. さらに, 飲用前に腹部症状がなかった被験者と症状があった被験者に分けて層別解析を行った結果, 飲用前に腹部症状がなかったサブグループの方が α 多様性の差が顕著であった. 腸内細菌叢の構成については, 門レベルでは学術試験ストレスによりプラセボ群で Bacteroidetes の割合が軽度増加し, 科レベルでは Bacteroidaceae の割合が高値を示したが, LcS 群ではいずれも変化しなかった.

【考察】 以上より, LcS 発酵乳飲料の継続飲用は, 学術試験ストレス下で低下傾向を示す腸内細菌叢の α 多様性を増加させることが明らかになった. さらに, 今回の腸内細菌叢の多様性や構成の変化と腹部症状の関係は明確ではないが, LcS の摂取が腸内細菌叢の多様性や構成のバランスを維持した結果, ストレス状況下の健常者において腹部症状などのストレス性応答を軽減する可能性が示された.

一般演題 A-15

Bifidobacterium bifidum YIT 10347 発酵乳の継続飲用は
H. pylori 除菌治療時の腸内フローラの乱れを緩和し
抗生剤関連下痢の重症化を抑制する

Bifidobacterium bifidum YIT 10347 suppresses gut microbiota dysbiosis
and alleviates severe diarrhea in *Helicobacter pylori* eradication therapy

○五味 淳¹, 松本星隆¹, 田島沙耶¹, 矢矧加奈¹, 松木隆広¹,
野中千秋², 宮崎幸司¹, 神谷 茂³, 大草敏史⁴
¹(株)ヤクルト本社中央研究所, ²(株)ヤクルト本社開発部,
³杏林大学医学部, ⁴東京慈恵会医科大学附属柏病院

【目的】 *H. pylori* (以下 Hp) の除菌治療はプロトンポンプ阻害剤と2種の抗生剤を1週間服用するため、患者の10～30%は下痢や軟便等の副作用に悩まされ、重症化すると治療を中止するケースもある。抗生剤関連下痢は腸内菌叢の乱れが主な原因と考えられるが、Hp除菌治療に伴う下痢と腸内菌叢の関係について詳細に調べた報告は少ない。

Bifidobacterium bifidum YIT 10347 はこれまでに胃傷害抑制効果、Hp活性抑制効果等が認められており、胃に対する効果が期待されるプロバイオティクスである。本報告では、Hp除菌治療時における*B. bifidum* YIT 10347 発酵乳の継続飲用が下痢や腸内菌叢に及ぼす影響をプラセボ対照二重盲検平行群間試験で評価した。

【方法】 Hp陽性者228名を無作為に2群に分け、除菌治療の8週間前からYIT 10347発酵乳(アクティブ群)またはプラセボを1日1本(100 ml)飲用させ、ランサップ400(ランソプラゾール, アモキシシリン, クラリスロマイシン)で除菌治療を行った。除菌治療8週間後までサンプルの飲用を継続し、除菌率や副作用の発症を評価した。また、無作為に選抜した105名(アクティブ群46名, プラセボ群59名)を対象に除菌治療直前、除菌治療直後および除菌治療8週間後の3ポイントでメタ16S rDNA配列解読による腸内菌叢解析を行った。

【結果】 両群間で除菌に伴う副作用の発症率に差は認められなかったが、下痢を発症した被験者のうち重症化(期間中4日以上)した割合はアクティブ群で有意に低かった。また、腸内菌叢の乱れの指標であるUniFrac距離は除菌治療8週間後にアクティブ群で有意に低値を示した。下痢発症者を対象に層別解析を行ったところ、プラセボ群では除菌治療直後のUniFrac距離が下痢発症被験者で有意に高値を示したのに対し、アクティブ群では有意な変化は認められなかった。さらに、除菌治療直後のBifidobacteriaceae占有率がアクティブ群でプラセボ群と比較し有意に高値を示した。

【考察】 Hp除菌治療に伴い下痢を発症した被験者は非発症被験者と比べ腸内菌叢の変化が大きかった。*B. bifidum* YIT 10347の継続飲用は腸内のBifidobacteriaceaeを介して腸内菌叢の変化を抑制し抗生剤関連下痢の重症化を抑制したものと考えられた。