

一般演題 A-19

腸内有用菌の生存維持におけるエラジタンニンの効果

Effect of Ellagitannins on Sustainable Survival of
Beneficial Intestinal Bacteria

○小河原恵里香¹, 小崎敏雄², 西田典永², 長友暁史², 吉野智恵², 波多野力¹, 伊東秀之¹
¹岡山大学大学院医歯薬学総合研究科, ²森下仁丹株式会社

【目的】腸内フローラのバランスの乱れは様々な疾病発現などに関連し、フローラの正常化はヒトの健康に有益な効果をもたらすとされている。腸内環境を改善するものとして、難消化性食品成分のプレバイオティクスが知られているが、プレバイオティクスの評価は、通常有用菌の増殖を目標としている。そこで本研究では、腸内有用菌の減衰期に注目し、整腸薬として用いられているゲンノショウコやザクロ果皮などのエラジタンニン高含有素材や構成エラジタンニンについて、腸内有用菌のひとつである *Bifidobacterium longum* の減衰期における生存維持作用の評価を行ったので、それらの結果について報告する。

【方法】腸内有用菌として *B. longum* JBL01 株を MRS 培地で前培養し、菌数を調整後、被験サンプルを添加した GAM 培地に移植した。これを 37℃、嫌気的条件下で培養し、12 時間後及び 24 時間後に培養液を採取して菌数を測定した。菌数測定には BL 寒天培地を用い、37℃、嫌気的条件下で 48 時間培養し、コロニー数をカウントした。サンプル無添加をコントロールとし、菌数の減少度を比較検討することにより、被験サンプルによる菌の生存維持作用を評価した。

【結果】ゲンノショウコの短時間および長時間煎液について、*B. longum* の生存維持作用を比較した結果、長時間煎液の方が強い作用を示した。また、ザクロ果皮エキスにも生存維持作用が認められた。ゲンノショウコ長時間煎液中には、corilagin が多く含まれていることを確認し、さらに corilagin がゲンノショウコ成分の中でも最も強い生存維持作用を有することを見出し、corilagin をはじめとするエラジタンニンがゲンノショウコの整腸作用に大きく関与している可能性が示唆された。さらに、ザクロやサンシュユなどに含まれるエラジタンニンも顕著な生存維持作用を有することが示された。

【考察】各種民間薬の整腸作用機序は、腸の蠕動運動の制御や、タンニン成分などが腸粘膜のタンパク質と結合することによって生ずる腸粘膜の保護、抗炎症によるものと推察されているが、整腸作用への寄与が考えられる腸内細菌に対する影響については、ほとんど報告が見当たらない。本研究の結果から、ゲンノショウコやザクロなどに含まれるエラジタンニンが、腸内有用菌の減衰期における生存維持作用を介して、素材の整腸作用に寄与している可能性が示唆された。

一般演題 A-20

加熱殺菌乳酸菌含有飲料の摂取が便秘気味なヒトの腸内細菌叢
および便通に及ぼす影響Effects of the Intake of Beverage Containing Heat-killed
Enterococcus faecalis EC-12 on Microflora and Defecation
in Humans Tended to be Constipated○小林 誠¹, 金原紀章¹, 高橋綾子¹, 沢村信一¹, 提坂裕子¹,山下慎一郎², 鈴木直子², 山本和雄², 高良 毅³¹株式会社伊藤園 中央研究所²株式会社オルトメディコ 研究開発部³医療法人社団盛心会 タカラクリニック

【目的】 加熱殺菌乳酸菌 *Enterococcus faecalis* EC-12 は腸内でバイオジェニックス, オリゴ糖は腸内でプレバイオティクスとして機能し, とともに腸内環境を改善することが知られている. これらをともに摂取することで, 期待される効果がより顕著になるかどうかを検討する.

【方法】 20~39歳の日頃から便秘気味な日本人男女における腸内細菌叢および便性・排便状況に関する改善効果を検証するために二重盲検試験を実施した. 試験飲料は *Enterococcus faecalis* EC-12 を 1×10^{11} あるいは 1×10^{12} 個および乳果オリゴ糖を含む飲料 (280 ml) をそれぞれ低用量および高用量として用いた. プラセボとして *Enterococcus faecalis* EC-12 および乳果オリゴ糖を含まない飲料 (280 ml) を用いた. 24名の被験者を摂取前検査時に T-RFLP 解析から *Bifidobacterium* の占有割合が均等になるよう各群8名に割り付けた. 2週間の試験飲料摂取の前後に T-RFLP 解析による腸内フローラ検査, CAST-MT および便形スケールを用いた排便評価などを行った.

【結果】 低用量群および高用量群にて善玉菌である *Bifidobacterium* の占有割合が摂取前と比較して摂取後, 有意に増加した. 善玉菌である *Bifidobacterium* の変化量は, 高用量群でのみプラセボ群と比較して有意に増加した. 排便日数および CAST-MT は3群とも, 摂取前と比較して摂取後, 有意に改善した. 便形スケールは低用量群および高用量群にて摂取前と比較して摂取後, 有意に改善した.

【考察】 以上の結果より, 加熱殺菌乳酸菌 *Enterococcus faecalis* EC-12 および乳果オリゴ糖をともに摂取した際, 腸内環境が改善した. また, 加熱殺菌乳酸菌 *Enterococcus faecalis* EC-12 の摂取量を増加させると, この効果はより顕著になった. 今後は, それぞれを単独で摂取した場合と同時摂取した際の比較試験を実施する.

一般演題 A-21

Yacon Increased Intestinal Fermentation and Changed Microbial Communities in Rats

○Utami NA, Tanaka M, Sone T, Nakatsu C, Asano K
Hokkaido University, Graduate School of Agriculture

【Background and objectives】 Non-digestible but fermentable oligosaccharides influence the composition and the activity of intestinal bacteria and promote the health of the host. *Smallanthus sonchifolius* (yacon) contains high amount of fructo-oligosaccharides (FOS) as the main carbohydrate sources instead of starch in other root crops. Yacon tubers are widely consumed in South American countries like fruits. They are not metabolized in the small intestine and thus the consumption of yacon tuber does not increase the level of glucose in the blood. However, there is a little information on the physiological and microbiological effects of yacon tuber in rats. The objective of this study was to determine the increases in the intestinal fermentation; pH, cecal weight, short chain fatty acids (SCFA) and lactate, as well as the changes of intestinal microbial community profiles after ingestion of dietary yacon powder.

【Methods】 Thirty of four-weeks-old male Sprague Dawley (SD) rats were randomly divided into one of three dietary treatment groups (n = 6/group) in which they were fed a control diet (AIN 93G modified + 8% cellulose), FOS diet (AIN 93G modified + 5% FOS), or yacon powder diet (AIN 93G modified + yacon powder equivalent to 5% FOS) for 28 d. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of PCR-amplified 16S rRNA gene was performed to characterize changes in intestinal microbial populations. Comparisons of DGGE fingerprint profiles were performed using Dice Similarity coefficient, the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) cluster analysis and multidimensional scaling (MDS) based on numbers and positions of the bands. We also investigated short chain fatty acids (SCFA) and lactate concentration using HPLC.

【Results】 Administration of yacon powder and FOS significantly decreased pH in cecum and feces and increased cecal content weight compared with control. Cluster analysis of PCR-DGGE fingerprint patterns of 16S rRNA from cecal and colon content as well as fecal DNA indicated that microbial community structures in rats fed yacon powder were more similar to rats on the FOS diet versus the control diet. Microbial communities in feces of rats fed yacon powder change after 3 weeks of administration while rats fed FOS, alteration showed after 4 weeks of administration. Yacon powder and FOS significantly increased total SCFA and lactate compared with control. Yacon powder was fermented into acetate as shown by the highest acetate concentration in cecum and feces, while FOS was fermented into lactate as shown by the highest lactate concentration in cecum but not in feces.

【Discussion】 To conclude, our results demonstrated that PCR-DGGE can be performed as a useful technique for demonstrating changes in intestinal microbiota. We also show that the powder from yacon tuber increases intestinal fermentation, pH, cecal weight, SCFA, and lactate, in a manner different to the addition of FOS to the diet which has been shown by many number of studies to be related to the gastrointestinal health's improvement. We suggest that yacon powder can be used as an alternative source of FOS and as the ingredients of the nutritional formula, it could benefit the health of gastrointestinal and other components on it will also enhance their beneficial effects.

一般演題 A-22

高齢者における腸内のビフィズス菌種構成

Bifidobacterium Composition in the Fecal Microbiota of Elderly

○高橋幸子¹, 小田巻俊孝¹, 清水(肖)金忠¹, 岩附慧二¹, 赤津裕康², 近藤順子³, 大澤 朗⁴
¹森永乳業株式会社食品基盤研究所, ²福祉村病院内科, ³特定医療法人北九州病院, ⁴神戸大学農学研究科

【目的】 健常成人における腸内のビフィズス菌数は安定しているが, 加齢と共に徐々に低下すると報告されている。本研究では健常高齢者と寝たきりの経腸栄養患者, 及び健常成人のビフィズス菌種を解析することで, 健康状態との関わりについて考察した。

【方法】 健常高齢者 (79歳~104歳, n=68), 経腸栄養患者 (57歳~102歳, n=127), 健常成人 (21歳~65歳, n=91) の被験者より糞便を回収し, フェノール・ガラスビーズ法を用いてDNAを抽出した。総ビフィズス菌数, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium adolescentis* group, *Bifidobacterium pseudocatenulatum* subgroup 菌数をリアルタイムPCRにて測定した。

【結果】 健常成人の総ビフィズス菌数が 10.2 ± 0.8 (log/g wet feces) で全ての被験者から検出されたのに対し, 健常高齢者では菌数が 9.0 ± 1.0 (log/g wet feces), 検出率が97.1%, 経腸栄養患者では菌数が 8.5 ± 1.2 (log/g wet feces), 検出率が49.6%と3群で有意差が認められた。*Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis* group, *Bifidobacterium pseudocatenulatum* subgroupの3菌種についても同様の有意差が認められ, 健常高齢者では*Bifidobacterium breve*, 経腸栄養患者では*Bifidobacterium bifidum*の検出率が有意に低かった。一人当たりの検出菌種数を比較したところ, 健常成人では 3.0 ± 1.2 菌種, 健常高齢者では 2.1 ± 1.4 菌種, 経腸栄養患者では 1.2 ± 1.3 菌種と有意差が認められた。

【考察】 健常成人における優勢3菌種の菌数や, 被験者ごとの保有菌種数が「健常成人>健常高齢者>経腸栄養患者」の順であったことから, 加齢や健康状態, 食事の違い等によりビフィズス菌叢が影響を受けていると推測された。

一般演題 A-23

キトサンコーティングカプセルの腸内崩壊部位に関する研究

Study of Chitosan-coating Capsules on their Disintegration Area
in the Intestinal Tract

○竹本有貴, 峯村剛, 抜井一貴

日清ファルマ株式会社 健康科学研究所

【目的】 ビフィズス菌は胃酸や胆汁酸に弱いという性質があり, そのまま摂取しても胃や小腸で死滅するため, 本来棲息する大腸付近に生きてそのまま届けることがビフィズス菌製剤の重要な課題となる. ビフィズス菌製剤としてのキトサンコーティングカプセルの使用は, 大腸におけるカプセルの選択的崩壊を起こさせ, ビフィズス菌を大腸にそのまま届けることが期待される. そこで新たに開発したキトサンコーティングカプセルの腸内崩壊部位に関する検討を行った.

【方法】 カプセルの溶出試験として, 吸光度で評価できるようにカプセル内容物をビフィズス菌末から水溶性 β -カロチン粉末に置き換えた. そしてキトサンコーティング及び耐酸性コーティングを施したカプセルを用い, 第十六改正日本薬局方解説書(局方)の崩壊試験法に従い溶出試験を実施した. 試験液900 mlとし被検体カプセルを崩壊試験器に入れ, 約30分ごとにサンプリングして吸光度(280 nm)を測定した. 局方の規定に従い胃内環境を模したI液(pH1.2)は60分間, 続いて小腸内環境を模したII液(pH6.8)は120分間, 計180分間まで確認した. ヒトでのX線撮影による崩壊部位確認試験は, 硫酸バリウム(局方品, (株)カイゲン, 「バリコンクMX」)を1カプセルあたり400 mg充填後, コーティングを施し健康成人男性6名(平均年齢 \pm S.D.: 46.5 \pm 10.9)を被験者としカプセルを摂取後, 経時的に腹部X線撮影を行った.

【結果】 溶出試験の結果, 胃液を模したI液では60分以降で若干の溶出が確認され, 続く小腸での環境を模したII液で120分間行くと約3%溶出した. その後, キトサン膜の溶解性に変化が無いことをpH3.5で確認したところ, 60分以内に約100%の溶出を示した. ヒトにおける消化管での崩壊部位確認試験は, 1例はカプセルが十二指腸に留まり観察時間内での崩壊は認められなかった. これは何らかの原因で胃及び十二指腸内部に長時間停滞したためと考えられた. 残り5例に関しては大腸または小腸で崩壊し, 全てでカプセルの崩壊が始まる時間は摂取後4.0~7.5時間と判断された. そして全体が壊れたと見なされる崩壊時間は5.0~8.5時間と判断された.

【考察】 本コーティングを施したカプセルは耐酸性を有し, 大腸内で崩壊する可能性が示唆され, ビフィズス菌製剤としての用途が期待される. 今後, 腸内フローラの変動や有用性等について更に検討する予定である.

一般演題 A-24

ヒト腸内細菌叢の解析に適した Terminal Restriction Fragment Profiles (T-RFLP) 法の検討

Exploration of Suitable Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of 16S rRNA Genes from Human Fecal Microbiota

○菅原宏祐, 小田巻俊孝, 高橋幸子, 堀米綾子, 清水(肖)金忠, 岩附慧二
森永乳業株式会社 食品基盤研究所

【目的】次世代シーケンサーによる腸内細菌叢解析が主流になる一方で、コスト、労力の点から予備的な検討には簡便なフィンガープリント法が適していると考えられる。Terminal Restriction Fragment Profiles (T-RFLP) 法は、比較的容易に微生物の相互関係や腸内細菌叢を解析できるハイスループットな半定量的DNAフィンガープリント法である。これまで各種プライマーや制限酵素を用いた手法が報告されているが、ヒト腸内細菌叢を評価するために適したプライマーや制限酵素については検討の余地がある。そこで本研究は、ヒト腸内細菌叢の個人差を表すために適したプライマーと制限酵素の組み合わせについて検討と評価を行った。

【方法】Qinらの報告(nature, 2010)でヒト腸内細菌叢の優勢菌種とされている75種のうち、その後同定され菌種が重複した*Bacteroides* sp. 7株を除く計68種の16S-rRNA遺伝子を比較し、プライマーの再設計を行った(FAM-27mF, VIC-806mR)。次に、これらプライマーで増幅したPCR産物について上記68菌種中50菌種以上を理論上識別できる制限酵素を、認識部位の異なる169種類の中から15種類選抜した。実際に、健康成人32名の糞便から抽出したDNAを用いてT-RFLPを行い、クラスター解析から得られた各被験者の非類似度を基に評価を実施した。

【結果】各制限酵素で処理したデータから得られた各被験者の非類似度を比較した結果、*Alu* I処理は他のいずれの制限酵素よりも有意に高い非類似度を示したことから、被験者ごとの分離能が高いことが示唆された。一方で*Mlu*C I処理は他のいずれの制限酵素よりも有意に低い非類似度を示したことから、その後の解析から除外した。次に、各制限酵素処理で得られた被験者のクラスタリングパターンを比較するために、各被験者の非類似度に基づきクラスター解析を実施した。異なるクラスターに属した制限酵素を組み合わせた場合、同一クラスター内の酵素を組み合わせた場合よりも被験者ごとの非類似度が高くなることから、被験者のクラスタリングパターンが異なる制限酵素を組み合わせたほうがサンプル毎の違いを示すためには適していることが示された。

【考察】本研究で得られた知見から、より効率的にヒト腸内細菌叢の違いを検出することが可能となった。