

平成29年度 新産業創出研究会「研究成果報告書」  
「保健機能性植物乳酸菌の活用によるペット用サプリメントの実用化開発」  
[広島大学 大学院医歯薬保健学研究科 教授・名誉教授] [杉山 政則]

## 1. はじめに

一般社団法人 ペットフード協会が調査した「平成29年の全国犬猫飼育実態」によると、国内のイヌ・ネコの飼育頭数は、18,446,000匹（イヌ：8,920,000匹、ネコ：9,526,000匹）である。近年、動物病院数は年々増加傾向にあり、平成26年時点での全国病院数は11,259となっている。動物のための医療技術が進み、ペットの平均寿命も確実に延伸している。

現在、ペット市場がにぎわっている理由として、「ペットも家族の一員」との意識が強くなったことが挙げられる。すなわち、わが国では子供が少なくなったことも要因となり、イヌやネコは飼い主にとって家族同然の、いわゆる「コンパニオンアニマル（伴侶動物）」となっている。このような考え方が浸透するにつれ、飼い主はペットの健康にお金や手間を十分にかけるようになった。

現在のペットビジネスのキーワードの1つは、「Aging」である。ペットフード協会によると、2013年度のペットの平均寿命は犬が14歳、猫が15歳である。それぞれ人間の年齢に換算すると、小型犬は72歳、大型犬は93歳、猫は76歳にあたる。飼い主は高齢化したペットの食事などに気を使い、健康管理について正しい知識を持とうと行動している。

未病・予防医学共同研究講座（杉山教授担当）が総括する植物乳酸菌研究プロジェクトにおいて、これ迄に「脂肪肝の改善および内臓脂肪の蓄積抑制に有効な植物乳酸菌 LP28 株」や「 $\gamma$ -GTP を有意に低下させるのに有効な SN13T 株」を見出しているほか、「GABA を大量に産生する人参の葉由来の乳酸菌 G-15 株」も取得している。それに加え、現在推進中の旭興産（株）グループとの共同研究を通じて、「遅延型アレルギーに対してきわめて有効な乳酸菌 *Lactobacillus paracasei* IJH-SONE68」をイチジクの葉から取得することに成功した。

本研究では、上記のような保健機能を示す植物乳酸菌を、ペットやヒトに対して有効な「健康サプリメント」、医薬品、機能性食品等の創出に活用するため、幾つかの植物乳酸菌株について、実用的かつ最適な培養法を開発すると共に、それら菌体や発酵液をマウスやイヌに経口摂取させることで、腸内細菌叢（腸内フローラ）がどのように変動するのか評価した。

## 2. 研究成果と今後の課題

### (1) LP28 株による脂肪肝の改善と体内脂肪の蓄積抑制に関する研究

#### a. LP28 株の可食培地を用いた培養法の開発と菌体粉末化の最適化

果物の一種として知られる「龍眼（ロンガン）」から単離した *Pediococcus pentosaceus* LP28 菌体を肥満マウスに高脂肪食とともに摂取させると、内臓脂肪の蓄積が抑制されることを以前見出し、ヒト臨床試験にてもその効果を実証した。今回の研究で、果汁などを培養培地として用い、その発酵液をそのまま摂取できる、有用性の高い培養法の確立に成功した。

#### b. LP28 株の抗肥満作用の用量依存性

高脂肪食を摂取させることにより作出した「高肥満モデルマウス」を用い、上記保健機能効果を得るための用量依存性について調査した：具体的には、7週齢の C57BL/6JJcl (SPF) 雄性マウス 25 匹を用い、1週間の馴化飼育のあと、5匹ずつを5群（A群～E群）に分け、高脂肪食（リサーチダイエット社、#D12492）を6週間摂取させ、肥満を誘導した。6週間ののち、各群のマウスの食餌内容を下記のように変更し、飼育を継続した。

A 群： 引き続き高脂肪食のみの群 (コントロール群)

B-E 群： LP28 死菌体を含む発酵酒粕粉末摂取群

(B:  $1 \times 10^{11}$ , C:  $2 \times 10^{10}$ , D:  $1 \times 10^{10}$ , および E:  $2 \times 10^9$  cfu/day となるよう摂取させる)

食餌内容を変更してから、さらに 9 週間飼育を継続した。飼育期間終了後、血液および各臓器を採取し、c. の解析実験にも供した。

LP28 株摂取開始時の体重を 1 とした場合の各群のマウスの平均体重の推移を週ごとに調べた結果、LP28 株摂取群と非摂取群間の体重上昇には明らかな違いが認められ、そのなかでも D 群で顕著に減少した。また、各群のマウスから採取した肝臓および内臓脂肪量を調べた結果、肝重量は LP28 株摂取群で減少したが、内臓脂肪量については LP28 株摂取による効果はあまり認められなかった。さらに、各群のマウスから採取した肝臓中に含まれる中性脂肪 (TG) の量を調査した結果、最も体重上昇が抑制された D 群で顕著に減少した。

#### c. LP28 株摂取による腸内細菌叢の変化

LP28 株摂取群と非摂取群でのマウス腸内細菌叢の変動を、「盲腸」と「大腸」に特化して調査した。その結果、LP28 株摂取群において、盲腸における細菌叢の変化が観察された。ちなみに、盲腸で減少した「RF32 目」に属する細菌の存在が、*Akkermansia muciniphila* と同様、結腸の炎症に関与しているとの報告がある。それに加え、他の研究グループが行ったマウスを用いた実験により、血漿中の trimethylamine N-oxide (TMAO) の増加とともに糞便中に RF32 目細菌の存在が確認されることがわかっている。なお、腸内細菌によってコリンやベタインから代謝産生された trimethylamine (TMA) が肝臓で酸化されて生じる物質が TMAO である。TMAO は動脈硬化などの心疾患に関わっている。

現在、コリンの欠乏は脂肪肝につながると考えられており、コリン欠乏食の食餌によって、マウス脂肪肝モデルを作出することができる。すなわち、摂取したコリンが生体に吸収される前に特定の腸内細菌によって TMAO に代謝される結果、コリンが欠乏するものと考えられる。今回の結果は、LP28 株の摂取によって肝臓脂肪量の抑制が観察されたことが、RF32 目細菌群の減少と関係する可能性を示唆するものである。

他方、同じく盲腸で減少した Clostridiaceae 科のカテゴリーに分類される SMB53 属細菌は、糞便中の存在量と、血清中の LDL, TG, 並びにコレステロール量との間に正の相関性を示すとの報告がある。今回の研究を通じて、LP28 株を摂取させると、Clostridiaceae 科 *Clostridium* 属細菌がマウスの盲腸で増えることが観察された。近年の腸内細菌叢の解析研究から、*Clostridium* 属は宿主の免疫応答に重要な働きを担っているとの報告があることから、*Clostridium* 属細菌の腸管内の変動を調査することは大変興味深いものと言えよう。

さらに興味深いことに、*Pediococcus pentosaceus* LP28 を連日摂取させても、大腸・盲腸のいずれにおいても、*Pediococcus* 属の比率は増加しなかった。すなわち、LP28 株は腸管内に定着しないが、細菌叢に働きかけるものと推測される。

## (2) IJH-SONE68 株の産生する細胞外多糖体 (exopolysaccharide, EPS) と抗アレルギー活性に関する研究

### a. 可食培地での増殖性

イチジクの葉から分離した *Lactobacillus paracasei* IJH-SONE68 は、培養液上清中に EPS を分泌する。この物質は「ヒアルロニダーゼ」を阻害する機能もつ。本研究では、可食培地を用いた IJH-SONE68 株の効率的な培養条件を確立することを目的とした。植物乳酸菌に対する増殖促進剤として基本特許取得済みである「パイナップル果汁」ならびに「酒粕」

を用いた実験の結果、両材料を特定濃度で組み合わせて培養を行った場合、菌数が一般的に用いられる「MRS 培地」と同等以上となることが判明した。

#### b. IJH-SONE68 株の抗アレルギー活性

ヒアルロニダーゼ阻害活性と、アレルギー反応を引き起こす「ヒスタミン」の遊離抑制との間には正の相関がある。本研究では、ヒアルロニダーゼ阻害活性を示す EPS を産生する IJH-SONE68 株が、抗アレルギー活性を示すか否かについて、BALB/cA マウス (7 週齢, オス) を被験動物とした「アレルギーモデルマウス」を用いて評価した。実験の結果、本株の産生する EPS の摂取が、花粉症などの即時型アレルギー反応に対して有効であるとともに、接触性皮膚炎などの遅延型アレルギーに対しても有効であることが判明した。

#### (3) GABA 高産生性を示す *Enterococcus avium* G-15

可食培地での培養および粉末化最適条件を決定した (具体的な記載は省略)。

#### (4) *Lactobacillus plantarum* SN13T に関する基礎研究と実用化研究

中国醸造 (株) との共同研究として、アルコール性肝傷害を惹起させたモデルマウスにおいて、SN13T 株の生菌を摂取させた場合に限り、アルコール中毒に対する症状が回避されることを発見した。この際、糞便中の腸内細菌叢の解析結果から、SN13T 株生菌を摂取することによって、アルコール摂取によって変動した腸内細菌叢が、アルコールを摂取しなかった場合 (SN13T 株非摂取) の状態に近づくことが見出された。そこで、ペットとして飼われているイヌに SN13T 株の生菌体を摂取させた場合の腸内細菌叢の変動についても調べた。

解析には、一般家庭で飼育されているイヌ 7 匹の糞便を解析用サンプルとした。試験期間中、各イヌに商品名「植物乳酸菌 SN13T」サプリメント (株式会社エルシーコーポレーション製品) を 1 日 1 粒ずつ摂取させ、糞便サンプルは、「植物乳酸菌 SN13T」摂取前 (W0)、摂取開始 2 週間後 (W2)、および 4 週間後 (W4) の 3 点で回収した。糞便サンプル中の細菌叢の構成菌種を、16S rDNA の部分配列 (V3-V4 領域) に基づいて比較した。

その結果、摂取前から 2 週間後までの間、*Faecalibacterium* 属細菌が増加傾向にあった。ちなみに、腸管内に *Faecalibacterium prausnitzii* 細菌が多い場合、クローン病や潰瘍性大腸炎の予防効果があるとの報告がある。さらに、本研究において、摂取前から 4 週間後までの間で減少することが観察された「嫌気性らせん桿菌 *Anaerobiospirillum* 属細菌」に関して、他の研究グループが、*Anaerobiospirillum succiniciproducens* は敗血症を誘発することがあると発表している。このことから考えると SN13T 株を摂取させることにより、ペットの敗血症を予防することができるかも知れない。ちなみに、この細菌はヒト腸管内には常在せず、イヌやネコの腸管内に生育している。

以上、*Lactobacillus plantarum* SN13T の経口摂取により、イヌの腸内細菌叢を変化させることが示されたことから、SN13T 株の長期摂取は、ペットに対する未病・予防医療に有用であることが十分期待できる。

### 3. おわりに

本研究では、4 種類の植物乳酸菌株 (LP28, IJH-SONE68, G-15, SN13T) を用いた、ヒトやペットのための機能性食品、サプリメント、医薬品の実用化を目指し、可食培地での乳酸菌数数の向上、動物実験による保健機能性の実証を進めると共に、これらの乳酸菌を摂取することによる腸内細

菌叢 (腸内フローラ) の改善効果を示すことができた。

#### 4. 本研究の今後の計画

LP28 および IJH-SONE68 の両株については、既に全ゲノム解析が終了しており、今後は G-15 株 および SN13T 株の全ゲノムを解析する。また、動物実験により抗アレルギー効果を示すことが判明した IJH-SONE68 株については被験食を作製し、ヒト臨床試験による科学的エビデンスを得ると共に、その研究成果を国際学術誌に発表する。なお、この新産業創出研究会杉山プロジェクトの参加企業である「(株) みなり」は LP28 株を配合した「機能性ふりかけ」の開発に成功し、製造販売に向けて検討しているところである。また、国内大手食品企業が LP28 株を含有した菓子類の発売を検討している。現在、(株) エルシーコーポレーションでは、既に SN13T 株の健康サプリメントを販売しているが、更なる研究課題として、生菌の室温での長期保存技術の確立を急ぐ必要がある。また、(株) ギンレイサービスは G-15 株を用いた「機能性おにぎり」の試験販売を行っている。

#### 5. その他

- (1) 出願特許 (タイトル・出願番号・発明者・特許権者など)

平成29年4月から平成30年3月の期間中に申請した特許は無し。

- (2) 投稿論文 (タイトル・学会名等)

Noda M, Shiraga M, Kumagai T, Danshiitsoodol N, Sugiyama M. 2017. Characterization of the SN35N strain-specific exopolysaccharide encoded in the whole circular genome of a plant-derived *Lactobacillus plantarum*. Biol Pharm Bull. in press, 2018

Noda M, Miyauchi R, Danshiitsoodol N, Matoba Y, Kumagai T, Sugiyama M. 2018. The expression of bacteriocin production and self-resistance in *Lactobacillus brevis* 174A is mediated by two regulatory proteins. Appl Environ Microbiol. in press, 2018

- (3) 本研究会の参加企業・団体名

旭興産 (株) グループ, 野村乳業 (株), 中国醸造 (株), (株) ギンレイサービス, (株) エルシーコーポレーション, メディカルクラフトン (株), 三井物産 (株), 広島大学大学院 医歯薬保健学研究科 未病・予防医学共同研究講座, 広島大学産学・地域連携センター霞分室



競輪の補助事業

この事業は、競輪の補助を受けて実施しました。

<http://hojo.keirin-autorace.or.jp/>