

氏 名（本 籍）	酒 井 隆 史（東京都）
学 位 の 種 類	博士(生命科学)
学 位 記 番 号	博 乙第7号
学位授与の日付	2020年9月15日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	多様な集団・環境におけるプロバイオティクス乳酸菌の機能性評価 に関する研究
論文審査委員	(主査) 熊澤 義之 教授 渡邊 一哉 教授 高橋 勇二 教授 浅野 謙一 准教授

論文内容の要旨

緒言

プロバイオティクスは、「十分量を摂取したときにヒトに有益な効果をもたらす生きた微生物」と定義され、主に乳酸菌やビフィズス菌が用いられている。ラクトバチルス・カゼイ・シロタ株 (*Lactobacillus casei* strain Shirota : LcS) は、80 年以上前に日本国内で代田稔博士により見出された乳酸桿菌であり、代表的なプロバイオティクス株の一つとして知られている。日本国内で実施された数多くの対人試験により、摂取した LcS が生きて腸まで到達し、腸内細菌叢や腸内環境を正常化する、便秘症状や便秘を改善するなどの整腸作用が確認されている。また、LcS の摂取により、外敵から身体を守る役割をもつ自然免疫細胞であるナチュラルキラー細胞 (NK 細胞) を活性化などの免疫調節作用を発揮する。LcS を利用した製品は日本のみならず世界各国に展開されている。その中で、日本国内とは異なる多様な集団、多様な環境にて LcS の機能性が発揮されることを科学的に証明していくことが求められる。一方、機能性評価の手法は日本国内での経験・知見に基づいて構築されており、日本以外の地域・環境で生活する人々にも適用可能な評価手法の導入が課題であった。

食習慣の違いをはじめ、日本と異なる多様な生活環境において LcS のもつ機能性を検証するためには、地域・環境の違いを踏まえ、目的に合致した評価手法を採用する必要がある。欧州地域は古くから酪農が盛んであり、チーズやヨーグルトといった発酵乳製品も豊富である。現地に居住する人々は日常的に発酵乳製品を摂取しており、腸内細菌叢もその食生活の影響を受けていると考えられる。LcS の消化管生残性を検

証するにあたり、LcS を摂取したヒトの糞便を選択培地で培養し、生育したコロニー数を測定する。しかし従来の選択培地を用いた場合、欧州地域にてヒトの糞便からの検出が報告されている *Lactobacillus rhamnosus* が LcS と類似のコロニーを形成するため、欧州地域の人々における LcS の消化管生残性評価の阻害要因となり得る。そこで第一の研究として、コロニー形態により LcS と *L. rhamnosus* を見分けられる選択培地として開発された M-RTLTV 寒天培地の性能評価を行うと共に、西欧の中心的位置にあるベルギーに居住する人々を対象として LcS の消化管生残性評価を行った。

上記のように対象地域に適した評価手法を必要とするケースがある一方、世界各国で共通の健康課題に対する LcS の機能性を評価するためには、地域を問わず普遍性の高い評価手法を適用することが望まれる。便秘は、世界の人々の 10～30% 程度が症状を感じており、その感じ方や捉え方が個々で異なる主観性の高い健康課題である。また、症状に関する表現も国や地域、言語によって異なる。そこで第二の研究として、便秘症状や便通に対する LcS の機能性評価に適した評価手法の導入・検証を行った。

また、一般の生活環境と著しく異なる特殊環境で生活する人々の健康課題対策にも LcS を活用することが期待される。国際宇宙ステーション (ISS) に滞在する宇宙飛行士は、微小重力、宇宙放射線、閉鎖隔離環境など地球には無い複合的なストレス環境下で生活する中、免疫機能が低下することが報告されている。その対応策の構築を目指し、免疫機能の維持・活性化に効果を発揮すると期待される LcS を ISS 船内で宇宙飛行士が摂取する宇宙実験に着手した。第三の研究として、宇宙空間での利用に適した試験サンプルとして開発された、凍結乾燥した LcS を含むカプセル品を ISS 船内で約 1 か月間保管し、免疫調節作用などの LcS 機能の安定性評価を行った。

1. 新規な乳酸菌鑑別用選択培地の性能評価および LcS の消化管生残性評価

プロバイオティクスは生きて腸まで届き、有機酸産生等の代謝活動を行うことにより、感染防御、腸内環境の改善、消化管蠕動運動の亢進、腸管バリア機能の増強等の機能を発揮することが示唆されている。LcS が「生きて腸に到達する」ことを検証するには、LcS を摂取したヒトの糞便を選択培地で培養し、生育したコロニー数を測定する評価方法が常法である。従来、日本国内の対人試験で使用されてきた選択培地 (LLV 寒天培地) では、LcS が含まれる *L. casei/Lactobacillus paracasei* との類縁種であり、欧州地域にてヒトの糞便からの検出が報告されている *L. rhamnosus* が類似のコロニーを形成するため、その形態で見分けることは困難であった。本研究では、まず *L. rhamnosus* との共存下でも LcS を鑑別できる新規な選択培地として開発された M-RTLTV 寒天培地の性能評価を行った。M-RTLTV 寒天培地は、*L. casei/L. paracasei* と *L. rhamnosus* によるラムノース資化性の違いに着目し、ラムノース資化の有無による酸産生の差と酸化還元指示薬である 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride の呈色変化を利用した選択培地として開発された。本寒天培地上にて *L. casei/L. paracasei* は赤色のコ

ロニーを形成するのに対し、*L. rhamnosus* は中央に赤い斑点のある白色のコロニーを形成した。*L. casei*/*L. paracasei* と *L. rhamnosus* の共存下で培養した結果、同一の培地プレート上でも目視で見分けることが可能であり、各々の菌数を測定することができた。そして、LcS 発酵乳を 1 週間継続飲用した被験者の糞便を M-RTLTM 寒天培地にて培養し、LcS 特異的モノクローナル抗体を用いた enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) と合わせて糞便中の LcS 菌数測定を行った。結果、摂取した LcS が生きたまま消化管を通過し、糞便と共に排出されて生菌として回収されることを確認した。

2. 便秘症状に関する精度の高い評価手法の導入および LcS の機能性評価

便秘の感じ方、捉え方は個々で異なり、その表現も国や地域、言語によって異なる。LcS は生きて腸まで届いて代謝活動を行うことにより、消化管の蠕動運動を促し、便秘関連症状の緩和に寄与すると期待される。便秘症状に対する LcS の有効性を適切に評価するためには、医学的根拠に基づく精度の高い評価手法の導入が必要である。まず、便秘関連の指標として客観性が高く、他の便秘症状との相関性も示されている硬めの便の排出頻度に着目した。便の形状を視覚的に評価可能であり、腸内通過時間との相関関係が証明されているブリストル便性状スケール (BSFS) を採用した。さらに、機能性消化管障害の世界的な診断基準であるローマ III の機能性便秘に関する診断基準に基づき、排便の 25% 以上で硬めの便 (BSFS スコア 1 または 2 に該当) が出る人の割合を基準とした解析手法を導入した。そして、硬めの健常成人を対象として、LcS 発酵乳の継続飲用による影響をランダム化非飲用対照オープン試験により調べた。結果、LcS 発酵乳群では、非飲用群に比べて排便の 25% 以上で硬めの便が出る人の割合が有意に低下し、平均 BSFS スコアも有意に改善した。また排便回数も増加しており、LcS 発酵乳の継続飲用が便秘症状の改善に有用であることが示された。

また、硬めの便の排出頻度以外にも、便秘症状や便秘に伴う生活の質 (quality of life: QoL) への影響を適切に評価することが求められる。そこで、便秘患者の症状との対応により有効性が検証されている質問票であり、便秘薬の有効性評価への使用実績もある Patient Assessment of Constipation Symptoms (PAC-SYM) および Patient Assessment of Constipation Quality of Life (PAC-QOL) を LcS の機能性評価に用いることを検討した。出産後の女性は育児ストレス、ホルモンバランスの変化、睡眠不足、授乳による水分不足等により便秘や痔になりやすく、特に産褥期 (出産後 6 週間頃までの時期) においてその割合が高い。便秘が更なるストレスとなり、QoL の低下を招くことが懸念される。そこで、出産直後の女性が LcS 発酵乳を 6 週間継続飲用することにより、便秘症状や QoL に影響を及ぼすかどうか PAC-SYM および PAC-QOL を用いて検証するランダム化プラセボ対照二重盲検試験を実施した。結果、LcS 発酵乳群ではプラセボ群に比べて PAC-SYM 総合スコアが有意に改善し、PAC-QOL による排便に対する満足感のスコアも LcS 発酵乳群の方が良好であった。

また、プラセボ群では飲用期間中に一定の割合で痔の出血のある被験者が認められたのに対し、LcS 発酵乳群では飲用 4 週目にその割合が減少し、飲用 5 週目以降はほぼ認められなくなった。以上のことから、LcS 発酵乳の継続飲用は出産後の便秘症状や痔の軽減にも有用であることが示された。

3. ISS 船内環境における LcS の機能性への影響評価

ISS に滞在する宇宙飛行士は、微小重力、宇宙放射線、閉鎖空間など地球には無い複合的なストレス環境で生活を営んでいる。このような環境下、宇宙飛行士の身体には骨格筋委縮、骨量・骨密度の低下など様々な変化が生じることが報告されており、近年の宇宙医学研究から免疫機能も低下することが確認されている。免疫機能低下により、ISS への滞在だけでなく、将来計画されている月や火星に向けた超長期宇宙滞在において感染症などの健康リスクが高まることが懸念され、健康管理上の対応策の構築が課題となっている。身体の免疫細胞の半数以上が存在する腸の環境を整え、NK 細胞の活性化など免疫機能の維持・活性化に効果を発揮する LcS は、その対応策の一つとして活用が期待される。そこで、ISS に滞在する宇宙飛行士を対象とし、LcS の継続摂取による免疫機能等への影響を評価する宇宙実験に着手した。ISS 船内での冷蔵保管スペースの制約や液漏れによる安全管理上の懸念があることから、地上で利用されている飲料の形態では使用できない。そこで、LcS を凍結乾燥してカプセルに封入した宇宙実験用の試験サンプルを新たに開発した。宇宙飛行士を対象とした宇宙実験に先立ち、本試験サンプルを ISS 船内で約 1 か月間保管し、免疫調節作用をはじめとする LcS の機能が宇宙空間でも安定的に維持されるか、基礎的な検証を行った。同じロットの試験サンプルを日本国内（ヤクルト中央研究所）および米国内（NASA ジョンソン宇宙センター）に同一期間保管し、地上対照品とした。ISS 船内に保管した試験サンプル中の LcS 生菌数、遺伝子解析、発酵性状解析および免疫指標解析を行った結果、いずれの評価項目でも地上対照品と同等であり、ISS 船内でも LcS が安定的に維持されることを確認した。宇宙空間でも LcS のプロバイオティクスとしての基本的性質が保たれ、本試験サンプルを用いることにより、ISS に滞在する宇宙飛行士に対する LcS の機能性評価が可能であることが示された。

結論

一連の研究により、多様な集団に対する LcS の機能性評価に適用可能な評価手法が構築され、これらの有用性および LcS の機能性が確認された。また、宇宙空間という特殊な環境にて LcS の機能性が維持されることを確認した。これらの知見に基づき、多様な地域・環境で生活する人々に対する LcS の機能性評価のエビデンスを積み重ね、世界の人々の健康管理に貢献していくことが期待される。本研究により得られた評価手法等に関する知見は、LcS 以外のプロバイオティクス研究、微生物研究や機能性食

品素材研究にも活用できると期待される。

【研究結果の掲載誌】

- (1) T. Sakai et al. M-RTL^V agar, a novel selective medium to distinguish *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus paracasei* from *Lactobacillus rhamnosus*. Int. J. Food Microbiol., 139, 154–60 (2010).
- (2) T. Sakai et al. Fermented milk containing *Lactobacillus casei* strain Shirota reduces incidence of hard or lumpy stools in healthy population. Int. J. Food Sci. Nutr., 62, 423–30 (2011).
- (3) T. Sakai et al. Effect of fermented milk containing *Lactobacillus casei* strain Shirota on constipation-related symptoms and haemorrhoids in women during puerperium. Benef. Microbes., 6, 253–62 (2015).
- (4) T. Sakai et al. Probiotics into outer space: feasibility assessments of encapsulated freeze-dried probiotics during 1 month's storage on the International Space Station. Sci. Rep., 8, 10687 (2018).

審査結果の要旨

プロバイオティクスによる人への健康価値に関する研究は、腸内細菌叢の正常化を含む整腸作用をはじめ、感染防御、免疫機能の賦活化、抗アレルギーやストレス緩和など多岐にわたり報告されている。これらの機能の効果や程度は菌株レベルで異なり、メカニズム解明や新たな機能性研究に向けては、多くの研究課題が残されている。

本学位論文は、国内で見出された代表的なプロバイオティクスの一つとして知られているラクトバチルス・カゼイ・シロタ株 (LcS) を研究対象として、その健康価値をより広く拡大させていくために欧州地域や宇宙空間など多様な集団、環境における機能性の評価、解析を新たな手法を開発しつつ行ったものである。その成果として、まず欧州地域居住人に多く見られる LcS 類縁菌と LcS との消化管生残性評価をコロニー形態で判別可能となるように開発された選択培地により可能となることを示した。また、世界共通の健康課題でありながら、多様な地域で適応可能な標準的評価が存在しない便秘に関して、ブリストル便性状スケール及び機能性消化管障害の診断基準であるローマ III 基準を取り入れた解析手法を構築し、欧州被験者における LcS の便通改善及び痔など便秘に伴う症状緩和を証明し、かつ標準解析手法としての有効性を示した。さらに、特殊環境として複合的ストレスによる健康リスクの高い宇宙空間においても、LcS の機能が安定的に維持されることを ISS 船内での保存試験サンプルの遺伝子解析、発酵性状及び免疫指標解析等により確認した。これらの研究成果は、LcS の有用性エビデンスの更なる蓄積と利用拡大への基礎知見として、人々の健康実現への貢献に繋がるものである。

以上の研究成果、質疑応答及び本学課程外博士授与基準より、本審査委員会は、全員一致で博士（生命科学）の授与に値すると判断した。尚、前述のようにメカニズムにはまだ不明な点も多く、更なる研究が必要と考えられる。本研究の成果は、プロバイオティクスの利用拡大による健康貢献に繋がる重要な知見であると同時に、作用機序解明の一助と成るものでもある。学位論文の完成版では、この点明記することを申し伝えるものとする。

以上