

【表 3・(3)】研究成果(1)

サブテーマ名：プロバイオティック、プレバイオティック食素材の開発及び評価 小テーマ名：嫌気培養系を用いた腸内細菌の機能解明															
サブテーマリーダー 北大院農 教授 浅野行蔵 研究従事者 雇用研究員 上條万二郎															
<p>研究の概要、新規性及び目標</p> <p>研究の概要 嫌気性多段連続培養装置を用い、腸内細菌混合系における腸内細菌の動態を解析する。</p> <p>研究の独自性・新規性 多段式であるため、大腸上部から下部に至る経路のpHを設定して細菌叢の変化が確認できる。</p> <p>研究の目標 腸内細菌叢のモデル系を確立するために、乳酸菌、ビフィズス菌、ウェルシュ菌、大腸菌をとりあげて培養条件を検討した(フェーズ)</p> <p>フェーズ で確立した混合培養系を利用して、各種のオリゴ糖の存在での混合菌の動態解析のための基盤を設定した(フェーズ)</p> <p style="text-align: right;">達成率90%</p>															
<p>研究の進め方及び進捗状況</p> <p>フェーズ での培養条件(ガス組成、温度、pHなど)の確立に基づき、乳酸菌、ビフィズス菌、ウェルシュ菌、大腸菌などとオリゴ糖ラフィノースの関係を明らかにするため、各種菌の増殖能、短鎖脂肪酸等を解析してプロバイオティック機能を明らかにしたほか、16SrDNAを用いたプローブにより菌種の識別を行った。</p>															
<p>主な成果</p> <p>具体的な成果内容： ビフィズス菌(善玉菌)とウェルシュ菌(悪玉菌)の混合系にラフィノースを投与すると盲腸に相当するpH5.5付近ではビフィズス菌の増殖と酢酸の生成がみられるが結腸下部に相当するpH6.5付近ではクロストリジウム菌の増殖と酪酸の生成がみられ、このことは<i>in vivo</i>試験の結果と一致した。</p> <p>特許件数：0 論文数：2 口頭発表件数：9</p>															
<p>研究成果に関する評価</p> <p>1 国内外における水準との対比 嫌気培養装置の報告はあるが、pHを調節できる多段型の例は海外でみられる。</p> <p>2 実用化に向けた波及効果 嫌気性多段連続培養装置による大腸発酵モデルは、大腸内フローラの動態を解析でき、これを利用してプロバイオティック、プレバイオティック食素材の開発及び評価の簡略化が図れる。</p>															
<p>残された課題と対応方針について 混合培養系における、抗酸化成分の影響などを解析する手法の確立</p>															
	J S T負担分(千円)							地域負担分(千円)							合計
	H10	H11	H12	H13	H14	H15	小計	H10	H11	H12	H13	H14	H15	小計	
人件費	979	7,423	8,356	7,731	7,859	3,462	35,810	5,630	11,000	3,825	7,230	7,230	1,807	36,722	72,532
設備費	10,863	2,783	12,101	5,721	261	0	31,729	2,670	3,960	7,660	0	8,290	2,500	25,080	56,809
研究費	3,221	4,590	4,473	4,596	4,089	4,542	25,511	4,810	5,880	4,562	9,980	1,690	6,872	33,794	59,305
旅費		164	413	268	482	48	1,440	0	0	0	0	0	0	0	1,440
その他	0	551	7,781	7,466	7,187	255	23,240	370	300	600	150	150	75	1,645	24,885
小計	15,128	15,511	33,124	25,782	19,878	8,307	117,730	13,480	21,140	16,647	17,360	17,360	11,254	97,241	214,971
<p>代表的な設備名と仕様 [既存(事業開始前)の設備含む]</p> <p>J S T負担による設備：多段嫌気連続培養システム、シーケンサー</p> <p>地域負担による設備：H P L C</p>															

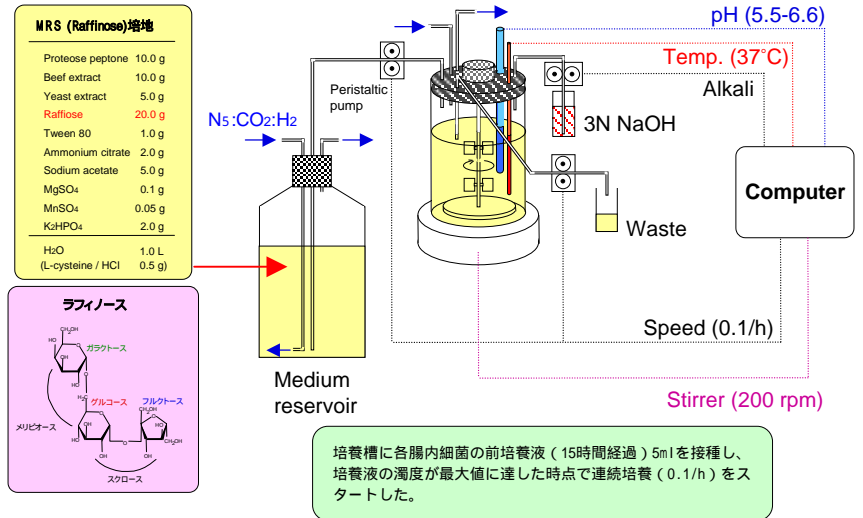
要旨

【研究目的】
ヒト腸内フローラの代表的な菌株を糖ラフィノースで多段連続混合培養し、*in vitro*で大腸内の状態を再現する。これを利用してプロバイオティックもしくはプレバイオティック食材の開発及び評価を簡便に行えるようにする。

【実験方法】
腸管に到達しうる糖ラフィノース（腸管細胞の免疫性を向上させる）を基質として、*Bifidobacterium breve*+*Clostridium perfringens*の連続混合培養を行い、有機酸生成量や菌数比率の変化を調べた。またその過程で、大腸を模した多段連続培養系の構築を検討した。

【結果】
一段の連続培養では腸管上流のpHで制御すると*Bif. breve*が圧倒的に優勢となったが、結腸付近のpHでは*C. perfringens*が一方向的に増殖した。しかし多段連続培養ではどの層もやがて*Bif. breve*が優勢となり*in vivo*と同様にラフィノースのプレバイオティック効果が示された。

嫌気性連続培養 (大腸と同じpH 温度)



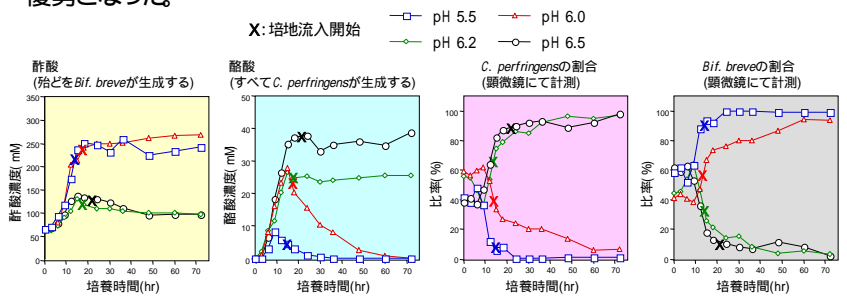
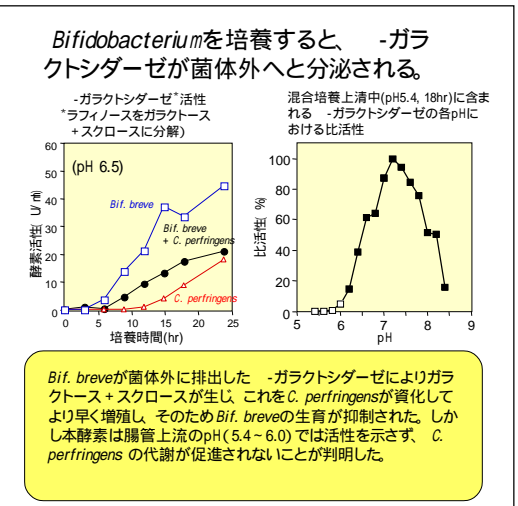
培養槽に各腸内細菌の前培養液（15時間経過）5mlを接種し、培養液の濁度が最大値に達した時点で連続培養（0.1/h）をスタートした。

代表的な腸内細菌

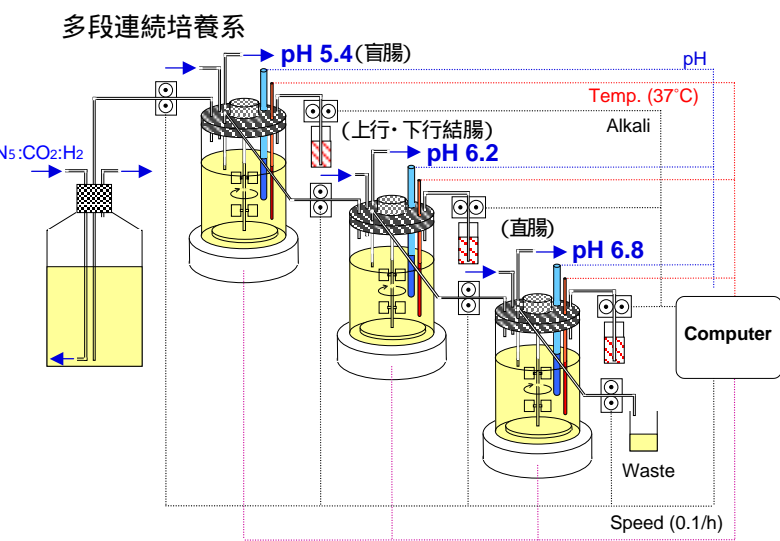
Bifidobacterium		Bacteroides		Escherichia		Clostridium	
<i>Bif. breve</i>	<i>Bif. adolescentis</i>	<i>Bac. vulgatus</i>		<i>E. coli</i>		<i>Cl. perfringens</i>	
<i>Bif. bifidum</i>	<i>Bif. gallium</i>	<i>Bac. ovatus</i>		<i>E. coli</i>		<i>Cl. butyricum</i>	
<i>Bif. longum</i>	<i>Bif. catenulatum</i>	<i>Bac. distasonis</i>		<i>E. coli</i>		<i>Cl. clostridioforme</i>	
<i>Bif. infantis</i>	<i>Bif. pseudocatenulatum</i>	<i>Bac. thetaiotaomicron</i>		<i>E. coli</i>		<i>Cl. coccooides</i>	
<i>Lb. salivarius</i>		<i>Bac. caccae</i>		<i>E. coli</i>		<i>Cl. spiriforme</i>	
<i>Lb. bulgaricus</i>				<i>E. coli</i>		<i>Cl. scindens</i>	
<i>Lb. lactis</i>							
<i>Lb. helveticus</i>							
<i>Lb. acidophilus</i>							

使用菌株
腸内フローラでの割合などを考慮した上で、各属ごとの代表菌株として用いた。

ラフィノースを唯一炭素源として*Bif. breve*と*C. perfringens*を連続混合培養すると、pH6.5では*C. perfringens*、pH5.5では*Bif. breve*が優勢となった。

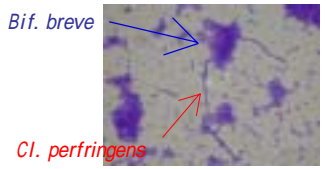
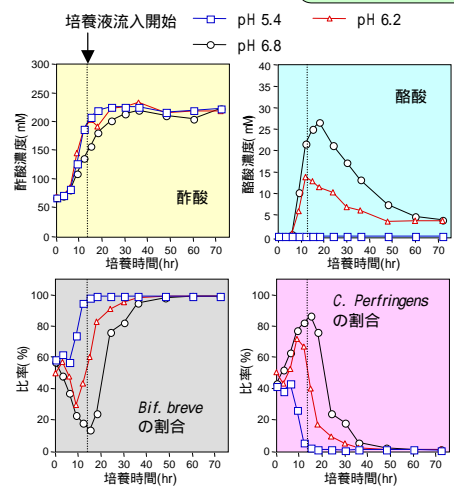


pH5.5~6.0（腸管上流に相当）では*Bif. breve*が優勢となり酢酸も多量に生成された。pH 6.2~6.5（結腸付近に相当）では*C. perfringens*が一方向的に増殖して*Bif. breve*の生育を抑制した。他の*Bifidobacterium*属+*Clostridium*属でも同様の結果となり、結腸付近のpHで制御した連続培養では*in vivo*でのラフィノースのプレバイオティック効果が現れず、一段の連続培養では腸管を反映していないことが分かった。



多段連続混合培養では、*Bif. breve*が優勢になった。

初めは各段階でそれぞれ混合培養を行い、pH5.4の培養槽の濁度が最大値に達した時点で次段階への培養液流入を開始した。



pH 6.8, 72 hr (X1,000)