

博士論文

ビフィズス菌の棲息環境による特性の違いおよび
個別の菌株の生理作用に関する研究

令和2年6月

南 淳一

目次

略記.....	1
第1章 序論	3
1.1. 腸内細菌叢と健康.....	3
1.2. ビフィズス菌の種類と棲息環境.....	3
1.3. 腸内細菌と肥満.....	4
1.4. 本研究の目的.....	6
第2章 母乳中のビフィズス菌選択因子に関する研究.....	9
2.1. はじめに.....	9
2.2. 方法.....	10
2.2.1. 微生物菌株.....	10
2.2.2. 母乳中におけるビフィズス菌の生育の評価	11
2.2.3. リゾチームに対する耐性の評価.....	11
2.3. 結果.....	12
2.3.1. 母乳中におけるビフィズス菌の生育	12
2.3.2. 栄養素を添加した母乳中におけるビフィズス菌の生育	12
2.3.3. リゾチーム耐性	13
2.4. 考察.....	14
第3章 ビフィズス菌 B-3 の摂取が肥満気味の成人で代謝機能に及ぼす影響に 関する臨床研究.....	18
3.1. はじめに.....	18
3.2. 方法.....	19

3.2.1.	試験デザイン	19
3.2.2.	参加者	19
3.2.3.	試験手順	19
3.2.4.	試験食品	20
3.2.5.	評価項目	20
3.2.6.	統計解析	20
3.3.	結果	21
3.3.1.	参加者のベースライン特性	21
3.3.2.	体組成への影響	21
3.3.3.	血液組成に対する <i>B. breve</i> B-3 の影響	22
3.3.4.	体脂肪量の変化と血液組成の相関	22
3.4.	考察	22
第4章 BMIが高めの健常成人を対象としたビフィズス菌 B-3 の体脂肪低減作用に関する臨床研究		32
4.1.	はじめに	32
4.2.	方法	32
4.2.1.	参加者	32
4.2.2.	試験方法	33
4.3.3.	試験食品	34
4.3.4.	体組成測定	34
4.3.5.	血液検査・尿検査	34
4.3.6.	食事調査	35
4.3.7.	統計解析	35
4.3.	結果	35

4.3.1. 参加者の背景特性と食事調査結果.....	35
4.3.2. 体組成.....	36
4.3.3. 有効性に関する血液パラメータ.....	36
4.3.4. 安全性評価に関する血液・尿検査.....	37
4.4. 考察.....	37
第5章 本研究の総括.....	48
5.1. ヒト常在性ビフィズス菌の母乳親和性について.....	48
5.2. HRB のリゾチーム耐性機序について.....	48
5.3. ビフィズス菌 B-3 の体脂肪低減作用機序について.....	49
5.4. 今後の課題.....	51
参考文献.....	52
謝辞.....	65

略記

ALT; alanine transaminase

ALP; alkaline phosphatase

ANCOVA; analysis of co-variance

AST; aspartate transaminase

ATCC; American Type Culture Collection

B.; *Bifidobacterium*

BIA; Bioelectrical Impedance Analysis

BMI; Body Mass Index

CFU; colony forming unit

DSMZ; German Collection of Microorganisms (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen)

FGF; fibroblast growth factors

FXR; farnesoid X receptor

GLNBP; 1,3- β -galactosyl-N-acetylhexosamine phosphorylase

γ -GTP; gamma-glutamyl transpeptidase

HbA1c; Hemoglobin A1c

hCRP; high-sensitivity C-reactive protein

HMOs; Human Milk Oligosaccharides

HRB; Human-Residential Bifidobacteria

JCM; Japan Collection of Microorganisms

L.; *Lactobacillus*

LBP; LPS-binding protein

LNB; Lact-N-biose

LPS; Lipopolysaccharide

MCC; Morinaga Culture Collection

MRS; de Man, Rogosa, and Sharpe Agar

TPY; Trypticase phytone yeast extract

第1章 序論

1.1. 腸内細菌叢と健康

ヒトの腸内には数百種類、百兆個以上の細菌が棲息しており、腸内細菌叢としてヒトの健康と密接に関わっていることが明らかになってきている。近年の多くの研究から、腸内細菌は、大腸がんや炎症性腸疾患などの消化管疾患だけでなく、非アルコール性脂肪性肝炎や2型糖尿病、肥満などの全身性の代謝疾患、さらには認知症や自閉症などの精神疾患とも関連があることが明らかになってきている¹⁾。

腸内細菌の中でビフィズス菌は乳児および成人において最優勢菌種のひとつである²⁾。特に離乳前の乳児腸管内にはビフィズス菌が非常に高い割合で棲息しており、未熟な乳幼児を守るべく腸内の環境維持に貢献していると考えられている³⁾。ビフィズス菌のヒトへの生理作用については、整腸作用をはじめとして免疫調節作用や、アレルギー抑制作用、感染防御作用、抗肥満作用など数多くの報告があり⁴⁾ (Fig. 1-1)、プロバイオティクスの代表として発酵乳製品やサプリメント、育児粉乳などに幅広く利用されている。

1.2. ビフィズス菌の種類と棲息環境

ビフィズス菌とは、Actinobacteria 門 *Bifidobacterium* 属に属する細菌を指し、2020年1月現在 69 種、10 亜種を含む 79 の種類が同定されている⁵⁾。自然界においてビフィズス菌の棲息場所は、ヒトやその他哺乳類、鳥類、昆虫の腸管などが挙げられ、種・亜種によって棲息場所は異なる。主にヒト腸管から検出されるビフィズス菌は 10 菌種程度であり⁶⁻⁸⁾、これらはヒト常在性ビフィズス菌 (Human-Residential Bifidobacteria; HRB) と呼ばれ^{9,10)}、ヒト以外から検出されるビフィズス菌 (Non-HRB) の菌種と明確に区別することができる。さらに、乳児と成人でも棲息する菌種が異なっており、乳児の腸管には *Bifidobacterium longum* (subsp. *longum* および *infantis*)、*B. breve*、*B. bifidum* といった菌種・亜種 (乳児型 HRB) が優勢に定着しており^{11,12)}、成人の腸管には *B. longum* subsp. *longum*

の他、*B. adolescentis*、*B. pseudocatenulatum* といった菌種（成人型 HRB）が棲んでいる¹³⁾。興味深いことに、唯一 *B. longum* subsp. *longum* は乳児から成人まで幅広い年齢層で検出される^{2,14)} (Fig. 1-2)。

腸内細菌研究において「なぜヒトには特定のビフィズス菌菌種が棲息しているのか」という命題があり、その解明に向けて、HRB と Non-HRB に着目した研究が報告されている。プロバイオティクスとして幅広く利用されている 3 菌種、すなわち乳児型 HRB である *B. longum* (subsp. *longum* および *infantis*) と *B. breve*、および Non-HRB である *B. animalis* (subsp. *animalis* および *lactis*) から計 49 菌株を対象に比較ゲノム解析を行った研究では、乳児型 HRB と Non-HRB との間には保有する炭水化物代謝関連遺伝子に大きな違いがあること、前者には母乳に含まれるヒトミルクオリゴ糖（Human Milk Oligosaccharides, HMOs）の代謝関連遺伝子が多く分布していることが示されている⁹⁾。また 0 才から 98 歳の健康な日本人などから単離した 145 株の *B. longum* subsp. *longum* について保有している遺伝子情報の多様性と分布を調べた結果、*B. longum* subsp. *longum* は、乳児腸管での生育に有利なシアル酸代謝に関わる遺伝子に加え、米や小麦などの穀物に含まれる繊維質や糖タンパクを利用するための遺伝子を保有している菌株も存在していることから、この種だけが成人や高齢者まで幅広い年代で腸管に棲息している理由の一端が示されている^{15,16)}。このように、ビフィズス菌は棲息する環境に合わせて各菌種に適応進化したと考えられるが、なぜヒトには特定のビフィズス菌菌種が棲息しているのか、そのメカニズムには未だ未解明な点が多く残されている。

1.3. 腸内細菌と肥満

肥満は異常または過剰な脂肪蓄積として定義され、高血圧、脂質異常症、糖尿病など、生活習慣に関連した代謝障害を引き起こす¹⁷⁾。肥満の主要因は、糖質や脂質の多い食事や運動不足による摂取エネルギーと消費エネルギーのアンバランスであるが、近年の

研究は、腸内細菌叢が脂肪細胞のエネルギー恒常性と脂肪蓄積、ホルモン分泌、免疫系に影響し、肥満と密接に関連している外的要因のひとつであることを示している¹⁸⁻²¹⁾。

肥満や糖尿病を発症する主な原因の1つとして、全身のインスリンの効きが悪くなる「インスリン抵抗性」という考え方が知られている。腸内細菌の中でグラム陰性桿菌の外膜成分であるリポポリサッカライド (Lipopolysaccharide, LPS) には、強力な炎症誘因作用があり、体内に入ると慢性炎症 (代謝性内毒素血症) やインスリン抵抗性を惹起し、肥満および糖尿病の早期発症を招くことが報告されている^{22,23)}。栄養成分は腸管上皮によって選択的に吸収され、通常、腸管内の異物が腸管バリアを通過することはないが、動物およびヒトにおいて、高脂肪食や西洋食の摂取が腸管バリア機能障害と関連しており、LPS の血中への侵入の増加につながることを示唆されている²⁴⁻²⁶⁾。一方、動物の高脂肪食肥満誘導モデルにおいて、ビフィズス菌の経口投与は代謝性内毒素血症を回復させ、腸管バリア機能および代謝機能を改善することが示されている^{22,27)}。したがって、ビフィズス菌の投与は、代謝性内毒素血症の予防および肥満や糖尿病などの代謝性疾患の治療において医薬品や運動・食事療法以外の新たなアプローチとなり得ると考えられる。

腸内細菌叢の構成と肥満の関係を調べた研究では、痩せた者と比べて肥満者では、腸内細菌の大きな分類であるバクテロイデス門に対するファーミキューテス門の比率 (F/B 比) が高いことが報告され²⁸⁾、腸内細菌と肥満の関係という分野が注目されるきっかけとなった。肥満者の菌叢は高 F/B 比であるというこの仮説は、肥満児童を対象とした研究などで同一見解を示す研究結果もある²⁹⁾が、相反する報告もあり³⁰⁾、メタアナリシスでは一貫性はないという結論が出ている³¹⁾。肥満者に特徴的な腸内細菌の候補は他にも複数あり、そのうちのひとつとして、ビフィズス菌の量は肥満者で有意に低いことが報告されている³²⁻³⁴⁾。前述のメタアナリシスでは、肥満者の腸内細菌叢では一貫してビフィズス菌が枯渇していることを示された³¹⁾。肥満者に特徴的な腸内細菌叢構成の観点からも、肥満者で減少してしまったビフィズス菌をプロバイオティクスとして補うアプローチは、腸

内細菌叢を介した肥満の予防、改善において有力な戦略の一つであることが示唆されている³¹⁾。

これらの知見から、肥満の治療予防における新たな方法として腸内細菌叢へのアプローチが考えられるが、プロバイオティクスの効果は、菌種あるいは株特異的であることが知られている³⁰⁾。また糖尿病患者や肥満気味の健常成人など対象の状態によってもその影響は異なると考えられる。したがって、プロバイオティクスによる抗肥満作用を研究するにあたって、抗肥満作用が期待される特定の有望株を用いて、対象とする被験者を明確にしたうえで臨床試験によって効果を検証する必要がある。

1.4. 本研究の目的

本研究では、まず「なぜヒトには特定のビフィズス菌菌種が棲息しているのか」という命題について、ビフィズス菌優勢な腸内環境を持つ乳児において主要な栄養源である母乳成分に着目し、ビフィズス菌の生育に関わる選択因子について研究を行った。また腸内細菌と健康に関する近年の研究において、肥満者ではビフィズス菌の占有率が減少しており、腸内細菌叢を介した肥満の予防・改善戦略の一つとしてビフィズス菌が有力候補であることが示唆されている。そこで高脂肪食肥満誘導モデルにおいて、体重の増加を抑制や血中コレステロールの改善作用を示し、抗メタボ作用が期待されるビフィズス菌 *B. breve* B-3 株の含有食品を用いて糖尿病患者を含む集団、および BMI が高めの健常成人を対象としたプラセボ対照二重盲検ランダム化試験を行い、ビフィズス菌の摂取が肥満気味の方の体組成や代謝機能に及ぼす影響について研究を行った。

腸内のビフィズス菌との関連性が示唆されている健康状態

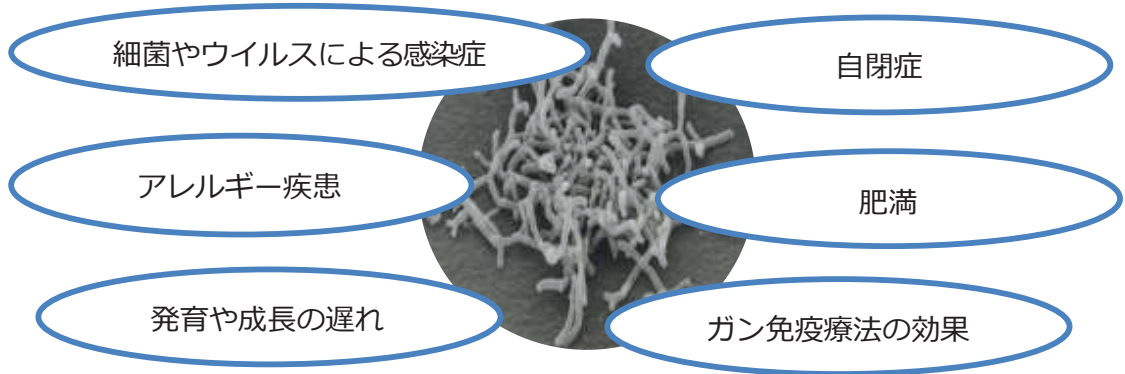
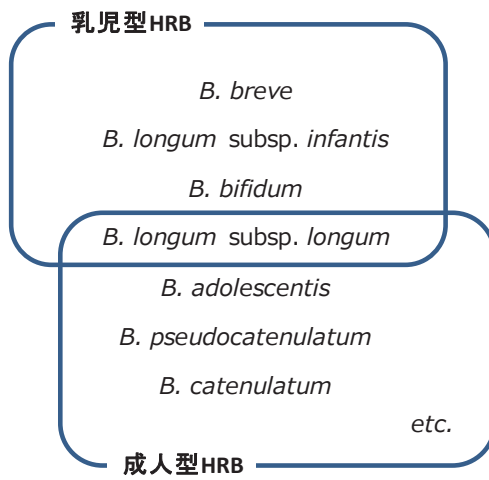


Fig. 1-1. Health conditions associated with intestinal bifidobacteria

ヒト常在性ビフィズス菌
(Human-Residential Bifidobacteria, **HRB**)



ヒト以外から検出されるビフィズス菌

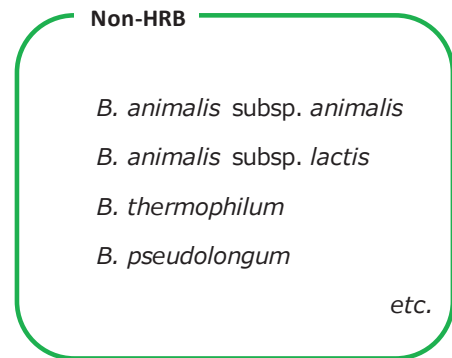


Fig 1-2. Human-Residential Bifidobacteria (HRB) and their representative species

第2章 母乳中のビフィズス菌選択因子に関する研究

2.1. はじめに

序論で述べた通り、ビフィズス菌は乳児および成人において最優勢の腸内細菌の一つであり、特に離乳前の乳児の腸管において非常に高い占有率を示す^{2,35)}。乳児の食事様式はビフィズス菌優勢な腸内細菌叢と関係しており、母乳栄養児と比べて人工栄養などの代替食を摂取している乳児では概してビフィズス菌の占有率が低く、腸内細菌叢が成人の構成に近くなっていた^{7,11)}。母乳に含まれる様々な生理活性成分のうち、ヒトミルクオリゴ糖 (HMOs) は、乳児型ビフィズス菌が乳児腸管で棲息するための重要な要因であると考えられている³⁶⁾。

HMOs は、人乳中でラクトースおよび脂質に次いで3番目に多く含まれる固形成分であり、母乳中に 10-20 g/L 程度の濃度で存在する³⁷⁾。しかし、乳中のラクトースや脂質が乳児の栄養になるのに対し、HMOs は乳児の消化酵素には分解されないため栄養とはならない³⁸⁾。また HMOs には 130 種類以上の構造が同定されているが、人乳はラクト-N-ビオース 1 (LNB) を基本骨格に持つ 1 型糖鎖構造を有するオリゴ糖を多量に含む^{39,40)}。これはヒト固有の特徴であり、他の哺乳動物乳の乳オリゴ糖では 2 型糖鎖構造の割合が高く、1 型糖鎖構造は検出されないか、あったとしても微量であることが知られている³⁹⁾。北岡らおよび清水らは以前、乳児型 HRB (*B. longum* subsp. *longum*、*B. longum* subsp. *infantis*、*B. breve*、*B. bifidum*) のすべての菌株が、1,3-β-ガラクトシル-N-アセチルヘキソサミンホスホリラーゼ (GLNBP) 遺伝子を保有しており、1 型糖鎖構造を持つ HMOs の基本骨格である LNB^{41,42)}の資化能を持っていたのに対して、成人型ビフィズス菌の菌株は GLNBP 遺伝子が見つからなかったことを報告している⁴³⁾。すなわち、母乳中に含まれる HMOs は、分解されずに腸まで届き、乳児型 HRB のみが特異的に栄養源として利用できることから、乳児腸管における乳児型 HRB の選択的な生育に寄与していると考えられる。

一方で、近年、栄養源とは反対に、抗菌活性を有し、涙、唾液、母乳などの体液に存在するタンパク質であるリゾチーム^{44,45)}に対する感受性がビフィズス菌の菌株によって異なることがいくつかの研究で報告された^{46,47)}。Radaらは、様々な分離源に由来するビフィズス菌サンプルについて、400 µg/mLのリゾチームに対する耐性または感受性を試験し、ヒト由来の菌株が動物由来の菌株よりもリゾチームに耐性があることを示した⁴⁷⁾。しかし、これらの研究では試験した菌株数は限定的であり、*in vitro*の評価ではヒトリゾチームではなく卵白リゾチームを用いるなど、ビフィズス菌菌種間のリゾチーム感受性の違いと母乳中におけるビフィズス菌の生存率との関係が十分に評価されていなかった。

そこで本研究では、ビフィズス菌の異なる棲息特性のメカニズムを理解するために、乳児型 HRB、成人型 HRB および非 HRB を含む、10 菌種 3 亜種 37 菌株のビフィズス菌について、各菌株の卵白由来およびヒトリゾチームに対する耐性を調べるとともに、各菌株の母乳中での生育を調査した。

2.2. 方法

2.2.1. 微生物菌株

本章の実験で用いたビフィズス菌菌株は、Morinaga Culture Collection (MCC ; 森永乳業、座間)、American Type Culture Collection (ATCC ; USA)、Japan Collection of Microorganisms (JCM ; 和光)、および German Collection of Microorganisms (DSMZ ; ドイツ)のいずれかより入手した。使用した菌株は全て *Bifidobacterium* 属であり、ヒトの特に乳児でよく検出される乳児型 HRB として 4 種 (3 菌種 1 亜種) 12 株、成人でよく検出される成人型 HRB として 4 種 12 株、ヒト以外の動物から検出されることの多い Non-HRB として 5 種 (3 菌種 2 亜種) 13 株の計 37 株を用いた。各ビフィズス菌菌株の菌種名、菌株番号および分離源を Table 2 - 1 に示す。各菌株は 0.05%L-システインを添加した MRS 液体培地 (Becton Dickinson 社製、USA) で培養した。菌株を遠心分離により集菌し、滅菌生

理食塩水で1回洗浄した後に10倍量の滅菌生理食塩水に再懸濁したものを培養実験の接種菌液として使用した。

2.2.2. 母乳中におけるビフィズス菌の生育の評価

実験で用いた母乳試料は母乳育児中の健康な母親から提供された。母乳試料の提供および使用目的等に関する試験プロトコルは医療法人健昌会（大阪）の倫理委員会によって承認され、試験プロトコルについて全てのサンプル提供者から事前に書面による同意書を取得した。母乳試料は4℃、1200 × gで10分間遠心して上部脂肪層を除去することで脱脂した後、実験に使用するまで-20℃にて保存した。母乳試料に含まれるリゾチーム濃度はLysozyme Human ELISAキット（Abcam社製、UK）を用いて測定した。試験菌株の生育を評価するために、脱脂母乳試料を脱気し、各々、母乳試料100 μLあたりに10 μLのビフィズス菌菌液を接種し、37℃で嫌氣的条件下24時間インキュベーションした。接種菌液および培養後の試料中の生菌数を菌数測定した。菌数測定のため、各試料を滅菌生理食塩水で段階希釈し、それらを37℃嫌気性条件下にて72時間TOS寒天培地（ヤクルト製薬工業製、東京）で培養した。実験は繰り返し3回行った。栄養素の不足が母乳中のビフィズス菌の不十分な生育の要因かどうかを調べる実験では、母乳試料にそれぞれ2%の濃度の酵母エキスとグルコースを補充した。統計解析には対応のあるt検定を用いて、各菌株の生育が接種菌数と比べて有意に異なるかを判定した。

2.2.3. リゾチームに対する耐性の評価

Trypticase phytone yeast extract (TPY) 液体培地は、次の組成を混合溶解し、pHを6.5に調整し、121℃で15分間オートクレーブして調製した。TPY 液体培地組成；Trypticase (10 g/L)、phytone (5 g/L)、グルコース (5 g/L)、酵母エキス (2.5 g/L)、L-システイン (0.5 g/L)、Tween-80 (1 g/L)、K₂HPO₄ (2 g/L)、MgCl₂ (2 g/L)、ZnSO₄ (0.25 g/L)、

CaCl₂ (0.15 g/L)、FeCl₂ (0.15 g/L)。TPY 液体培地にフィルター滅菌した鶏卵白リゾチーム (Sigma-Aldrich 社製、USA) またはヒトリゾチーム (Sigma-Aldrich 社製) のいずれかを種々の濃度 (1、10、50、100、1000 µg/mL) で無菌的に添加し、そこへ生理食塩水で洗浄したビフィズス菌菌液を 3% の濃度で接種した。各ビフィズス菌菌株の生育は、37°C で嫌気条件下 16 時間培養した後に、OD600 の吸光度測定によって確認した。実験は繰り返し 2 回行い、平均値で吸光度 0.2 以上まで増殖したものを生育とみなした。

2.3. 結果

2.3.1. 母乳中におけるビフィズス菌の生育

3 名の健康な母親から得られた母乳試料 (サンプル A、B、C) 中における各ビフィズス菌菌株の生育の割合を Table 2-1 に示す。*B. longum* subsp. *infantis* 種および *B. breve* 種のほとんどの菌株は母乳試料中で良好に生育した。*B. longum* subsp. *longum* 種と *B. bifidum* 種では、母乳中で生育する能力は菌株依存的であり、一部の菌株は菌数が増加または接種菌数を保持したが、一部の菌株は生育しなかった。母乳試料間のインキュベーション後の菌数を比較すると、母乳試料のサンプル A、B に比べてサンプル C で高かった。乳児型 HRB 株でみられたこれらの結果に対して、実験に用いた成人型 HRB あるいは Non-HRB 菌株の中では、*B. dentium* ATCC27678、*B. thermophilum* MCC1461 を除いて、ほとんどの株が母乳中で生育しなかった。それどころかインキュベーション後の生菌数は接種菌数と比べて減少していた。

2.3.2. 栄養素を添加した母乳中におけるビフィズス菌の生育

母乳中において成人型 HRB および Non-HRB の生育が抑制されたのは、栄養不足が原因であったかどうかを判断するために、2% の酵母エキスと 2% グルコースを添加した母乳サンプル A 中における各菌株の生育を調べた (Table 2-2)。本実験には、成人型 HRB

および Non-HRB に各菌種の基準株 (type-strain) 9 株を用いた。実験の結果、成人型 HRB および Non-HRB に属するこれらの菌株は、2%酵母エキスと 2%グルコースを添加した母乳サンプルにおいて、*B. pseudocatenulatum* ATCC27919^T の 1 株を除いて、ほとんどの菌株は増殖することができなかつたことから、母乳試料中でビフィズス菌の生育が抑制されたのは、菌にとっての栄養不足が原因ではないと考えられた。

2.3.3. リゾチーム耐性

卵白リゾチームまたはヒトリゾチームを用いて、リゾチームの殺菌作用に対する各ビフィズス菌菌株の耐性を評価した。すなわち、0, 1, 10, 50, 100, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で卵白リゾチームまたはヒトリゾチームを含む TPY 液体培地にて各ビフィズス菌菌株を培養し、吸光度 0.2 以上まで増殖したものを生育とみなし、生育可能な最大リゾチーム濃度を比較することで、各ビフィズス菌菌株のリゾチームに対する許容度 (耐性) を評価した (Table 2-3)。乳児型 HRB のうち、*B. longum* subsp. *infantis* 種および *B. breve* 種に属する全ての菌株は、実験に用いた最高濃度である 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の卵白リゾチーム存在下で増殖することができ、リゾチームに対して高い耐性を持つことが示された。乳児型 HRB の *B. longum* subsp. *longum* 種と *B. bifidum* 種ではリゾチームに対する耐性は菌株依存的であり、生育可能なリゾチーム濃度は 50-1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。成人型 HRB が生育可能なリゾチーム濃度は 50-1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲であり、12 株中 10 株の生育可能リゾチーム濃度は 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下であった。Non-HRB が生育可能なリゾチーム濃度は 1-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲であり、13 株中 10 株の生育可能リゾチーム濃度は 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下であった。ヒトリゾチームと卵白リゾチームの結果を比較すると、いくつかの菌株で生育可能な上限濃度が若干変わっていたが、乳児型 HRB、成人型 HRB、Non-HRB のリゾチーム耐性には同様の傾向がみられた (Table 2-3)。

2.4. 考察

ビフィズス菌は、ヒトとそれ以外では主に棲息している菌種が異なることや乳児と成人では頻繁に検出される菌種が異なることが知られていたが、そういった棲息環境ごとの菌種間での特性の違いに関する研究はこれまで少なかった。本章の研究では、ビフィズス菌を主な棲息場所に基づいて、乳児型 HRB、成人型 HRB および Non-HRB に分けたときに、母乳中での生育やリゾチーム耐性において異なる特性を持つことを示した。乳児型 HRB のほとんどの株は、母乳中で増殖するか少なくとも生菌数を維持することができたのに対して、成人型 HRB と Non-HRB は、ほとんどの株が母乳中で増殖できず、インキュベーション後に生菌数が減少した。さらに乳児型 HRB は、高濃度のリゾチームに耐性を持っていたのに対して、Non-HRB はリゾチームに対する耐性が低く、わずかな濃度でも生育できなくなり、成人型 HRB は、乳児型 HRB と Non-HRB の中間程度のリゾチーム耐性能を持っていた。

我々は *in vitro* にて母乳試料中でのビフィズス菌の生育を評価するにあたって、実験に使用した 3 つの母乳サンプルがいずれもビフィズス菌が資化できる炭水化物源として十分な濃度のラクトース (約 7.0 mg/mL) を含んでいたことを確認した (データ非掲載)。さらに、母乳で生育することができなかったほとんどの株は、酵母エキスとグルコースを添加しても生育しないことを確認した。これらの結果は、栄養素の欠乏が生育を阻害した原因ではないこと、それから成人型 HRB と Non-HRB の生育を抑制し、菌数を減少させた何らかの阻害因子が母乳中に存在することを示唆した。

リゾチームは、母乳、涙、唾液、粘液などの体液として体中に存在することが知られている自然の抗菌酵素である^{44,45,48}。本研究では、乳児型 HRB が高濃度リゾチームに耐性を示したことと、母乳中で良好に生育したことはよく関連していた。母乳に含まれる天然のリゾチーム濃度は、ELISA での測定で 17–184 µg/mL の範囲であったことが報告されている⁴⁹。本章の研究で使用した母乳試料中のリゾチーム濃度は、サンプル A、B、

Cでそれぞれ 60、153、47 $\mu\text{g/mL}$ であり、生育可能なリゾチーム濃度がほとんどの株で 10 $\mu\text{g/mL}$ 以下であった Non-HRB には許容できない濃度であった。人乳に含まれるリゾチーム含有量は、他の哺乳類の乳と比較して数千倍高いことが報告されている⁵⁰⁾。母乳中のリゾチームが耐性を持つ乳児型 HRB 以外を死滅させてしまうのは、ヒト固有の現象と考えられる。これまでにヒト由来のビフィズス菌株は動物由来の菌株と比較してリゾチームに対してより耐性があったことが報告されていた^{47,49,51)}が、それらは鶏卵白由来リゾチームを用いていた。卵白のリゾチームは、アミノ酸配列の一次構造レベルにおいて、ヒトのリゾチームとわずか 60%しか相同性がないことが報告されており⁴⁹⁾、リゾチームの由来が異なれば異なる抗菌活性を示す可能性が考えられる。本研究は、ビフィズス菌のヒトリゾチームに対する耐性を研究し、乳児型 HRB、成人型 HRB、Non-HRB がヒトリゾチームに対しても卵白リゾチームと同様の許容レベルを持つことを示したはじめての報告である。これらの知見から、母乳中に存在しているリゾチームは、耐性を持つ乳児型 HRB の母乳栄養児の腸内への選択的定着を促し、耐性を持たない Non-HRB の定着を拒んでいる可能性が考えられる。

成人型 HRB は、乳児型 HRB と Non-HRB の中間程度のリゾチーム耐性を有していたにもかかわらず、大多数の株は母乳中で生育することができなかった。この結果から、母乳中に含まれるその他の阻害因子が成人型 HRB の生育を抑制した可能性が考えられる。ヒトの母乳には、免疫グロブリン、ラクトフェリン、リゾチーム、 κ -カゼイン、ラクトペルオキシダーゼ、ハプトコリン、 α -ラクトアルブミンなど、細菌への阻害活性を持つものを含め、多くのたんぱく質が含まれている^{44,52)}。例えば、ラクトフェリンは、グラム陰性菌に対する有名な抗菌たんぱく質だが、一方でビフィズス菌の生育を促進することも報告されている⁵³⁾。我々は、ラクトフェリンについても検討したが、HRB または Non-HRB のいずれかの生育に対するラクトフェリンの選択的効果は見られなかった(データ非掲載)。成人型 HRB の選択因子を明らかにするには、さらなる研究が必要である。

ビフィズス菌がどのようにしてリゾチームに対する耐性を示し、なぜ菌種や菌株によってその許容度が異なるのか、そのメカニズムに関する情報は十分ではない。Mattarelliらは、リゾチームの溶菌・殺菌活性およびカチオン性ポリペプチドに対する感受性は、*B. globosum* ではプラスミド依存性の高分子量膜たんぱく質の有無と関連したことを報告している⁵⁴⁾。しかし、ビフィズス菌は滅多にプラスミドを保有しないことから、このようなプラスミド依存的な機序は一部のビフィズス菌株にのみ適用され、乳児型 HRB 全般のリゾチーム耐性のメカニズムではなさそうである。別の報告では、*B. bifidum* において細胞壁に存在するリポテイコ酸が、リゾチーム処理の後でも不溶性のまま残ったことが示されている⁵⁵⁾。別の細菌群だが、黄色ブドウ球菌では細胞壁ペプチドグリカンの O-アセチル化がリゾチーム耐性に関連しており、O-アセチル化の程度は菌株と増殖の状態によって 35%から 90%まで多岐にわたることが報告されている⁴⁵⁾。また Dupont と Clarke らは、ムラミダーゼ耐性の程度は O-アセチル化の程度に依存することを報告している⁵⁶⁾。これらの知見から、ビフィズス菌において細胞壁中のリポテイコ酸含有量あるいは O-アセチル化の程度が異なっていれば、リゾチーム耐性メカニズムを説明できる可能性があり、今後詳細に研究する必要があると考えられる。

本章の研究から、HMOs の代謝能に加えてリゾチーム耐性機構を獲得した乳児型 HRB は、母乳との親和性を高めることで乳児腸管という特殊な環境に高度に適応してきたと考えられた。関連する臨床研究として、乳児の腸内細菌叢の構成を 2 歳頃まで詳細に追跡した研究では、離乳を境に乳児の腸内菌叢の多様性が変化し、徐々に成人の構成近づいていくことが示されている^{8,57)}。また早産児に 2 種類のプロバイオティクスを 2 週間ずつ摂取させたクロスオーバー臨床研究では、食事が母乳栄養だったか人工栄養だったかに関わらず、*B. longum* subsp. *infantis* (Binf) を摂取させたときに、*B. animalis* subsp. *lactis* (Blac) 摂取時よりも腸内菌叢のビフィズス菌占有率が高かったことが報告されている⁵⁸⁾。それゆえ、その著者らは、Binfの方がBlacよりも腸内細菌叢への定着に効果的であると結論

付けた⁵⁸⁾。これらの報告は、乳児型 HRB が乳児の腸内環境に適していることを裏付ける臨床研究だと考えられる。

本章の研究では、乳児型 HRB が母乳と高い親和性を示すことが明らかとなり、「何故ヒトには HRB が棲息しているのか」についてその一端ではあるが重要な知見を得ることができた。一方で、ビフィズス菌が菌種や菌株によって異なるリゾチーム耐性を示すメカニズムや成人型 HRB の選択に関わる因子については、いくつかの研究課題が残された。このような自然界におけるビフィズス菌の特性を明らかにすることは、有望なプロバイオティクスの選抜や生理作用の研究に寄与すると考えられる。

Table 2-1. Difference in growth of bifidobacterial strains in human breast milk

Species	Strain	Origin	Initial cell number in breast milk	Cell number after incubation (Mean \pm SD)		
				Breast Milk A (60)	Breast Milk B (153)	Breast Milk C (47)
Infant-type human-residential bifidobacteria (HRB)						
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>						
	ATCC15707 ^T	Faeces of adult	6.9	7.4 \pm 0.06 *	7.3 \pm 0.11 *	7.0 \pm 0.21
	ATCC51870	Human faeces	6.9	ND	ND	ND
	BB536	Faeces of infant	7.2	ND	ND	7.9 \pm 0.02 *
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i>						
	ATCC15697 ^T	Faeces of infant	7.2	8.0 \pm 0.02 *	7.6 \pm 0.08 *	8.6 \pm 0.04 *
	M63	Faeces of infant	7.3	8.3 \pm 0.03 *	6.7 \pm 0.37	8.9 \pm 0.02 *
	MCC1447	Faeces of infant	7.3	ND	8.0 \pm 0.16 *	8.2 \pm 0.09 *
<i>B. breve</i>						
	ATCC15700 ^T	Faeces of infant	7.1	7.2 \pm 0.24	7.3 \pm 0.22	7.8 \pm 0.12 *
	B-3	Faeces of infant	7.6	6.6 \pm 0.03	7.4 \pm 0.10	8.1 \pm 0.04 *
	M-16V	Faeces of infant	7.6	7.1 \pm 0.16	7.4 \pm 0.08	7.9 \pm 0.04 *
<i>B. bifidum</i>						
	ATCC29521 ^T	Faeces of infant	7.1	ND	ND	ND
	ATCC15696	Intestine of infant	6.9	ND	ND	7.6 \pm 0.12 *
	MCC1628	Faeces of infant	6.8	ND	ND	7.4 \pm 0.07 *
Adult-type human-residential bifidobacteria (HRB)						
<i>B. adolescentis</i>						
	ATCC15703 ^T	Intestine of adult	7.1	ND	ND	ND
	ATCC15706	Intestine of adult	6.5	ND	ND	ND
	ATCC15704	Intestine of adult	6.6	ND	ND	ND
<i>B. angulatum</i>						
	ATCC27535 ^T	Human faeces	6.6	ND	ND	ND
	ATCC27669	Sewage	6.6	ND	ND	ND
	ATCC27671	Sewage	6.6	ND	ND	ND
<i>B. dentium</i>						
	DSM20436 ^T	Human dental caries	7.1	ND	ND	ND
	ATCC27678	Human faeces	7.0	ND	ND	7.0 \pm 0.10
	ATCC27679	Human vagina	6.2	ND	ND	ND
<i>B. pseudocatenumulatum</i>						
	ATCC27919 ^T	Human faeces	6.7	ND	ND	ND
	ATCC27676	Sewage	7.0	ND	ND	ND
	ATCC27677	Sewage	7.0	ND	ND	ND

(Table 2-1 続き)

Non human-residential bifidobacteria (non-HIRB)

<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	DSM10140 ^T	Yogurt	7.3	ND	ND	ND
	ATCC27536	Chicken faeces	7.1	ND	ND	ND
<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	ATCC25527 ^T	Rat faeces	7.1	ND	ND	ND
	MCC0499	Rat faeces	6.9	ND	ND	ND
	MCC1489	Guinea pig faeces	6.8	ND	ND	ND
<i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>globosum</i>	JCM5820 ^T	Cattle rumen	6.4	ND	ND	ND
	MCC0101	Cattle rumen	7.1	ND	ND	ND
	MCC0103	Cattle faeces	7.0	ND	ND	ND
<i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>pseudolongum</i>	ATCC25526 ^T	Swine faeces	7.1	ND	ND	ND
	MCC1508	Mouse faeces	6.7	ND	ND	ND
<i>B. thermophilum</i>	ATCC 25525 ^T	Swine faeces	7.4	ND	ND	ND
	MCC1461	Chicken intestine	7.5	ND	ND	7.1 ± 0.29
	JCM7031	Swine faeces	7.4	ND	ND	ND

The lysozyme concentration of each breast milk sample is given in parentheses (mg/mL).

Each strain was cultivated at 37°C for 24 h under anaerobic conditions in triplicate.

Viable cell numbers are shown as log values. ND: not detected on TOS agar plates (detection limit was 3.0×10^6 CFU/mL).

* Significant difference in cell number ($P < 0.05$).

Table 2-2. Growth of bifidobacteria cultivated in breast milk with nutrient supplementation

Species	Strain	Initial counts	After incubation
<i>B. adolescentis</i>	ATCC15703 ^T	6.9	ND
<i>B. angulatum</i>	ATCC27535 ^T	6.6	ND
<i>B. dentium</i>	DSM20436 ^T	7.1	ND
<i>B. pseudocatenulatum</i>	ATCC27919 ^T	7.0	7.4 ± 0.14 *
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	DSM10140 ^T	7.0	ND
<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	ATCC25527 ^T	7.1	ND
<i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>globosum</i>	JCM5820 ^T	6.7	ND
<i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>pseudolongum</i>	ATCC25526 ^T	6.9	ND
<i>B. thermophilum</i>	ATCC 25525 ^T	7.5	ND

Breast milk was supplemented with 2% yeast extract and 2% glucose.

Each strain was cultivated at 37°C for 24 h under anaerobic conditions in triplicates.

Viable cell numbers in log were shown. ND: not detected at by TOS agar plates (detection limit was 3.0×10^6 CFU/mL).

* Significant difference in cell number (P<0.05).

Table 2-3. Tolerance of bifidobacteria to egg white lysozyme or human lysozyme

Species	Strain	Egg white lysozyme	Human lysozyme
Infant-type human-residential bifidobacteria (HRB)			
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>	ATCC15707 ^T	1000	1000
	ATCC51870	50	50
	BB536	100	1000
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i>	ATCC15697 ^T	1000	1000
	M63	1000	1000
	MCC1447	1000	1000
<i>B. breve</i>	ATCC15700 ^T	1000	1000
	B-3	1000	1000
	M-16V	1000	1000
<i>B. bifidum</i>	ATCC29521 ^T	1000	-
	ATCC15696	100	100
	MCC1628	100	100
Adult-type human-residential bifidobacteria (HRB)			
<i>B. adolescentis</i>	ATCC15703 ^T	100	1000
	ATCC15706	100	100
	ATCC15704	100	100
<i>B. angulatum</i>	ATCC27535 ^T	100	100
	ATCC27669	1000	100
	ATCC27671	100	100
<i>B. dentium</i>	DSM20436 ^T	100	100
	ATCC27678	100	100
	ATCC27679	50	1000
<i>B. pseudocatenulatum</i>	ATCC27919 ^T	100	1000
	ATCC27676	100	100
	ATCC27677	1000	100
Non human-residential bifidobacteria (non-HRB)			
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	DSM10140 ^T	10	10
	ATCC27536	10	10
<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	ATCC25527 ^T	10	50
	MCC0499	50	100
	MCC1489	10	100
<i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>globosum</i>	JCM5820 ^T	1	10
	MCC0101	1	1
	MCC0103	10	10
<i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>pseudolongum</i>	ATCC25526 ^T	10	10
	MCC1508	1	1
<i>B. thermophilum</i>	ATCC 25525 ^T	10	50
	MCC1461	50	100
	JCM7031	50	50

Each bifidobacterial strain was incubated in TPY broth supplemented with lysozyme from egg white or human lysozyme in concentration range from 0 to 1000 mg/mL. The growth of each strain was measured by OD600 after incubation and the maximum concentration of lysozyme for each strain to be viable (OD above 0.2) was indicated.

“-”: no growth after incubation

第3章 ビフィズス菌 B-3 の摂取が肥満気味の成人で代謝機能に及ぼす影響に関する臨床研究

3.1. はじめに

序章で述べた通り、肥満者ではビフィズス菌が枯渇し、痩身者と異なる腸内細菌構成をしていること、それが肥満および糖尿病の発症と関連していたこと^{33,59,60}から、医薬品や食事、運動介入以外の手法として、プロバイオティクスにより肥満を予防、改善する試みがなされている。

Ilmonen らおよび Luoto らは、妊娠中および妊娠後の肥満の予防を目的として *Lactobacillus rhamnosus* および *B. lactis* Bb12 を妊婦に投与することで腹囲により評価される肥満症のリスクや妊娠中の体重増加が抑制されたことを報告している^{61,62}。Mikirova らは、*L. acidophilus* と *B. bifidum* を組合わせたプロバイオティクスの投与により 53 人の肥満者の体重が減少することを見出した⁶³。門岡らが実施した二重盲検ランダム化比較試験では、*L. gasseri* SBT2055 の投与により、体脂肪と体重が減少したことが実証された。著者らは低用量の *L. gasseri* SBT2055 を含む発酵乳を使用した試験によって SBT2055 に内臓脂肪量、BMI、ウエストおよびヒップ周囲を低下させる再現性のある効果を実証した⁶⁴。

プロバイオティクスが肥満を改善する作用機序として、食欲調節、宿主の代謝改善、脂質吸収の阻害、腸の恒常性と完全性の維持および軽度炎症といった様々な作用機序が考察されている⁶⁴⁻⁶⁸。しかし、プロバイオティクスの生理作用は株に依存すると考えられており、肥満改善作用のメカニズムは不明瞭な点も多く残されている。プロバイオティクスの投与による肥満の改善作用を明らかにするには、各菌株について臨床研究による検証が必要である。

ビフィズス菌 B-3 (*B. breve* B-3) は、森永乳業が保有する微生物菌株ライブラリー MCC から肥満の改善作用が期待される菌株として選抜された。ビフィズス菌 B-3 は、乳児から単離された菌株であり、*B. breve* 種に属するヒト常在性ビフィズス菌 HRB である。近藤らは食餌誘導性肥満マウスモデルにおいて *B. breve* B-3 の投与が用量依存的に体重増加と内臓脂肪蓄積を抑え、血清中の総コレステロール、血糖およびインスリンのレベルが改善したことを報告している⁶⁹。プロバイオティクスの生理作用は菌株依存的とされており、候補株選抜の過程では同じ菌種であっても体重増加の抑制作用を示さない株も存在した。

また *B. breve* B-3 に関して加熱殺菌死菌体では食餌誘導性肥満マウスモデルにおける体重増加の抑制作用が観察されなかった (unpublished observation)。したがって、ビフィズス菌 *B. breve* B-3 株は肥満改善作用が期待されるプロバイオティクス株であるが、これまでにこの株を用いてヒトにおける効果を検証した臨床試験はなかった。そこで *B. breve* B-3 生菌を含むカプセルの摂取が肥満ぎみの成人の体組成と血液組成にどのような影響を与えるかを調べるために、無作為化二重盲検並行群間比較試験を実施した。

3.2. 方法

3.2.1. 試験デザイン

臨床試験デザインは無作為化二重盲検並行群間比較研究とした。試験プロトコルはヘルシンキ宣言に準拠した。全ての参加者から書面によるインフォームド・コンセントを取得した。全ての試験プロトコルは、東京医療保健大学の倫理委員会（東京）によって承認された。臨床試験は 2012 年 1 月から 2012 年 6 月にかけて神奈川県の中島内科クリニックで実施された。

3.2.2. 参加者

中島内科クリニックにて、BMI 24 kg/m^2 以上 30 kg/m^2 未満かつ年齢 40 歳以上 69 歳以下という適格基準を満たす計 52 名の成人ボランティアを募集した。参加者は、中島内科クリニックへ通院している者であったため、ほとんどの者が栄養指導や薬物療法を含む糖尿病の臨床診療を受けていた。除外基準には、体脂肪やコレステロールの低下を目的としたダイエット食品やサプリメントの定期的な摂取（週に 2 回以上）、腸内細菌叢に影響を与える可能性のあるプロバイオティクス製品の摂取、肝臓、腎臓、心臓、肺、消化器官、血液、内分泌系、代謝経路の重篤な既往歴、食物アレルギーまたは薬物アレルギーが含まれていた。参加者のフローチャートを Fig. 3-1 に示す。

3.2.3. 試験手順

試験期間は前観察期間 4 週間、摂取期間 12 週間の計 16 週間であった。同意取得後に参加者の身体測定を行い、調査表にて生活習慣（ヨーグルトの摂取、喫煙、飲酒）、疾病歴、アレルギーの有無、および定期的な薬物療法に関して背景調査を行った。前観察期間の後、参加者は性別と BMI (27 kg/m^2 以上または 27 kg/m^2 未満) によって層別化され、

東京医療保健大学でコンピューター生成した置換ブロックランダム化に従って2つのグループにランダムに割付された。参加者はプラセボカプセルまたは B-3 カプセルのいずれかを1日3カプセル、12週間毎日摂取した。評価項目である体組成測定と血液検査について、ベースライン測定は前観察期間の終了時に行い、これを0週目の値とした。その後、参加者は B-3 カプセルまたはプラセボカプセルの摂取を開始し、4週間ごと（4、8、12週時）に来院して身体測定、採血および医師の診察を受けた。参加者は試験開始後に食事、運動、定期的な薬物療法など、通常的生活習慣を変えないように指導された。また試験期間中、参加者はアルコール飲酒、運動量、服薬、排便の有無、および体調を毎日生活日誌に記録した。

3.2.4. 試験食品

被験食品である B-3 カプセルには、乳児由来のビフィズス菌菌株 *B. breve* B-3 の凍結乾燥粉末が含まれており、酸耐性ゼラチンカプセルに充填されていた。対照食品であるプラセボカプセルには、菌末の代わりに賦形剤として主にコーンスターチが含まれていた。臨床試験の開始前に、強化クロストリジウム寒天培地（Oxoid 社製）を用いた微生物コロニーカウント法によって、1日摂取量である B-3 カプセル3粒中に、約 5×10^{10} コロニー形成単位（colony forming unit, CFU）のビフィズス菌生菌が含まれることを確認した。B-3 カプセルとプラセボカプセルは、外観も味も全く同じであった。

3.2.5. 評価項目

主要評価項目は、12週での体組成（体重、BMI、筋肉量、脂肪量、脂肪率、ウエストヒップ比）の変化、副次評価項目は12週での血液組成（血中脂質、血糖、肝機能、炎症指標）の変化とした。体重、筋肉量、および体脂肪（量および率）は、医療グレードの体組成測定機器 InBody 3.0（インボディ・ジャパン社製）を用いて生体電気インピーダンス法で測定した。BMIは、体重（kg）/身長（m）²として計算した。ウエストヒップ比は、ウエスト周囲長とヒップ周囲長に基づいて計算した。血液検査は株式会社保健科学研究所（東京）で実施した。

3.2.6. 統計解析

統計解析には SAS ソフトウェアバージョン 9.3（SAS Institute 社製）を使用した。

正規分布に従わなかった変数は、自然対数変換後に解析した。ただし、表中の数値については、分かりにくさを避けるため元のスケールで表示する。2群間の参加者の特性は、カテゴリ変数についてはフィッシャーの正確検定、連続変数については2標本 t 検定で比較した。主要評価および副次評価の結果については、ベースライン値(0週値)で調整した共分散分析(analysis of co-variance, ANCOVA)を用いて12週での群間比較を行った。ベースラインから各検査時点(4週、8週、および12週)の群内の変化は、1標本 t 検定を用いて解析した。0週から12週で起きた体脂肪量の変化とその他の測定値の変化の相関については、各変数を標準化した後に、ピアソンの相関係数を用いて解析した。 P 値は0.05未満を統計的に有意であるとみなした。

3.3. 結果

3.3.1. 参加者のベースライン特性

参加者のうち、B-3群4名とプラセボ群2名が個人的な理由により試験を中止した。また各群から1名ずつが試験期間中に生活習慣の重大な変化(食事制限によるダイエットの開始)を報告したため、これらの参加者は解析から除外した。したがって、本試験の最終的な解析対象者は、B-3群19名、プラセボ群25名であった(Fig. 3-1)。参加者の背景情報、身体的特徴、処方薬の使用量(糖尿病、高脂血症、高血圧症)、および代謝マーカー(中性脂肪、空腹時血糖、HDL コレステロール)のベースライン値について、B-3群とプラセボ群の間で有意な差は見られなかった(Table 3-1)。試験食品の摂取に関する参加者のコンプライアンスは高く、摂取率は、それぞれB-3群で98.4%(標準誤差 2.6)、プラセボ群では102.5%(標準誤差 2.2)であった。

3.3.2. 体組成への影響

介入期間中の各体組成の推移をTable 3-2に示す。主要評価項目である12週での体組成の変化をANCOVAで解析した結果、プラセボ群と比較して、B-3群における体脂肪量の有意な低下が観察された。体脂肪率についても群間比較にてB-3群における低下傾向が観察された。その他の評価項目については、群間有意差はみられなかった。介入期間中のベースライン値(0週)からの各体組成の変化量をTable 3-3に示す。なお変化量については、欠損値のある参加者は除き、0、4、8、12週データの完全なものについて集計、解析した結果、ベースラインからの群内比較において有意な減少が以下の項目(有意差のあっ

た週)で観察された;体重(B-3群:4週と12週、プラセボ群:4週)、BMI(両群:4週)、体脂肪量(B-3群:4週と12週)、体脂肪率(B-3群:12週目)、ウエストヒップ比(両群:8週と12週)。

3.3.3. 血液組成に対する *B. breve* B-3 の影響

介入期間中の血液組成の推移を Table 3-3 に示す。 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ(γ -GTP) ($P=0.011$)と高感度C反応性タンパク質(hCRP) ($P=0.039$)に関して12週における有意な群間差が観察された。血中脂質(総コレステロール、LDLコレステロールおよびHDLコレステロール、中性脂肪)については、12週で有意な差はみられなかった(データ非掲載)。介入期間中、次の項目(群:時期)についてベースライン値から有意な増加が観察された;HbA1c(両群:4週と8週、プラセボ群:12週目)、 γ -GTP(プラセボ群:12週目)、総ビリルビン(プラセボ群:4週と8週)。また、インスリン(プラセボ群:4週と8週)、アルカリホスファターゼ(ALP)(B-3群:8週)、hCRP(B-3群:12週)については、ベースライン値と比べて有意な減少が観察された。

3.3.4. 体脂肪量の変化と血液組成の相関

群間比較で有意な変化がみられた体脂肪量と関連する血液組成があるかピアソンの相関係数で解析した。その結果、B-3群ではアラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)および γ -GTPの値との間には有意な正の相関がみられ、1,5-アンヒドログルシトールの値との間には有意な負の相関がみられたが、プラセボ群ではみられなかった(Fig.3-2)。その他の血液組成については、体脂肪量の変化量との有意な相関はみられなかった。

3.4. 考察

本章の研究では、ビフィズス菌 *B. breve* B-3 生菌含有カプセルの摂取が肥満気味の成人にどのような影響を及ぼすかを調べるために臨床試験を実施した。本臨床試験では、体重は両群とも減少し群間で有意な差はみられなかったが、12週間の摂取終了時点で、*B. breve* B-3 含有カプセル摂取群ではプラセボ群と比較して有意な体脂肪量の減少が観察された。B-3群の被験者が12週間で減少した体脂肪量は平均0.7kgであった。門岡らは、本試験と同様にプロバイオティクスによる体組成への影響を評価する臨床研究を実施しており、その研究では乳酸菌 *L. gasseri* SBT2055 を12週間摂取することで体脂肪量が平均0.6kg減

少したことが報告されている⁶⁴⁾。一般的に、減量プログラムとして厳格な食事制限をすることで体脂肪量にめざましい変化をもたらすケースがあるが、そういった重大な食事介入プログラムは、筋肉量の減少や基礎代謝の低下によるリバウンドのリスクを伴うことがある。またそういった食事制限には継続性の難しさが懸念される。内臓脂肪肥満がメタボリックシンドローム発症の重要な病因であることや、内臓脂肪の過剰な蓄積が代謝疾患と重大な関連性を示すことは、多くの研究によって実証されている^{70,71)}。本研究の結果は、肥満によって引き起こされる慢性疾患の予防に *B. breve* B-3 摂取が持続可能な方法として効果を発揮する可能性を示している。

本試験は内科クリニックで参加者を募集したため、多くの参加者は糖尿病の診療を受けていた。参加者の特性 (Table 3-1) で示したように、糖尿病薬の使用率に 2 群間で有意差はなかった。また介入前から受けている定期的な投薬について介入中に変更はなかった。一部の参加者は、体重に影響を及ぼすことが示唆されている⁷²⁾糖尿病薬であるスルホニルウレア (プラセボ群で 56%、B-3 群で 53%) とチアゾリジン (プラセボ群で 24%、B-3 群で 16%) を処方されていたが、その使用率に 2 群間で有意差はなかった。参加者の多くが栄養指導や薬物療法などの糖尿病の診療を受けており、空腹時血糖、HbA1c、グリコアルブミン、インスリン値など糖尿病に関連する臨床検査値は、ベースラインにおいて正常レベルよりも高い傾向にあった (Table 3-1、Table 3-3)。介入期間中、プラセボ群と比較して、B-3 摂取によるこれら血糖関連パラメーターの群間有意差な改善は見られなかったが、B-3 群では、ベースラインとの前後比較で、過去 2 週間程度の血糖状態を反映するグリコアルブミンの値に改善傾向がみられた (12 週目、 $P = 0.081$) (Table 3-3)。さらに、プラセボ群では、過去 2~3 ヶ月の血糖レベルを反映する HbA1c 値が有意に上昇したのに対して、B-3 群ではそのような変化はみられなかった (Table 3-3)。また興味深いことに、B-3 群では、過去 7 日以内の血糖コントロールと密接に関わる 1,5-アンヒドログリセロールと体脂肪量の変化量の間に関連がみられたのに対して、プラセボ群では負の相関がみられなかった (Fig. 3-2)。これらの結果は、糖尿病の改善における B-3 の潜在的な可能性を示唆しているが、12 週間介入した本試験での効果は小さかったため、長期摂取によりさらなる検証が必要と考えられる。

本試験では、 γ -GTP に有意な改善が観察され、摂取期間中の γ -GTP の変化は体脂肪量の変化と正の相関がみられた。韓国および日本で行われた大規模コホート調査において、血清 γ -GTP レベルはメタボリックシンドロームのリスクと関連することが報告されている

^{73,74)}。臨床的には、血清 γ -GTP レベルは、広く肝障害の程度を評価するマーカー^{75,76)}や、肝胆道機能および過剰なアルコール摂取のマーカー⁷⁷⁻⁷⁹⁾として使用されるが、ある研究では、血清 γ -GTP レベルとメタボリックシンドロームのリスクファクターの相関関係は、全被験者での解析よりも、非飲酒者のサブグループ解析でより強かったことが観察された⁸⁰⁾。肝機能に関連したプロバイオティクスの介入試験として、Allerらは5億個の*L. bulgaricus*と*Streptococcus thermophilus*を含む錠剤の投与によって、非アルコール性脂肪肝疾患の患者の肝臓アミノトランスフェラーゼレベルが改善したことを報告している⁸¹⁾。別のパイロット研究では、*B. bifidum*と*L. bulgaricus* 8PA3含有サプリメントを短期間経口摂取することで、アルコール性肝障害が通常の治療単独よりも改善した⁸²⁾。しかしながら、プロバイオティクスの効果として、 γ -GTPが改善することは過去には評価されていなかった。肝機能の改善に関するプロバイオティクスの作用メカニズムはまだ十分に評価されていないが、本試験の結果は、食餌誘導性肥満モデルマウスに*B. breve* B-3を投与することで肝臓において脂質代謝に関与する遺伝子発現が亢進していたという過去の実験結果と一致している⁸³⁾。

これまでの研究から、肥満者は軽度慢性炎症状態にあることが報告されており、肥満の進展に伴うインスリン抵抗性の悪化には、炎症が関係していると考えられる⁸⁴⁻⁸⁷⁾。肥満の初期段階では、脂肪細胞は過剰栄養に応じて肥大する。脂肪蓄積の増加に伴い、脂肪組織はMCP-1などのシグナルを放出し、単球の流入を増加させる⁸⁸⁾。肥満の進行した段階では、マクロファージなど種々の免疫細胞が肥満脂肪組織に浸潤し、脂肪組織から放出される遊離脂肪酸と相互作用することで、炎症状態がさらに高まる悪循環に陥っている^{89,90)}。また高脂肪の摂取によるメタボリックシンドロームの発症には、強い炎症促進作用を持つLPSが関与することが示唆されており、複数の報告において2~4週間高脂肪食を与えたマウスの血漿LPSが有意に増加したことが示されている^{22,91,92)}。高脂肪食によって誘発されるこの血漿LPSの増加は代謝性内毒素血症と呼ばれ、LPSおよび脂肪酸がCD14/TLR4受容体複合体を活性化することが、肥満、炎症、インスリン抵抗性、2型糖尿病、およびアテローム性動脈硬化の発症の引き金となることが示唆されている。しかしながら、その研究の中で、オリゴフルクトースの摂取がビフィズス菌の増殖を促進し、腸管からのLPSの取り込みを低下させたこと、および、その効果が耐糖能およびインスリン感受性の改善と関連していたことが示されている²²⁾。Hoarauらは、ヒト樹状細胞を用いて、*B. breve* C50の培養上清がLPS暴露による樹状細胞の細胞死を抑制し、樹状細胞の成熟や高IL-10産生といったLPSによる影響と反対の作用を示した⁹³⁾。*B. breve*の培養上清分画は、そ

れ単独でのサイトカイン誘導能は低いが、免疫調節特性を有することが示唆されている⁹⁴⁾。Jeonらは、大腸でIL-10産生によりTr1細胞の発達を誘導する作用が*L. casei*にはなく、*B. breve*にはあることを見つけ、*B. breve*が腸の炎症を抑制することを示した⁹⁵⁾。本研究では、*B. breve* B-3を12週間摂取した結果、プラセボ群と比べて、hCRPレベルが有意に減少した(Table 3-3)。近藤らの研究では、*B. breve* B-3を食餌誘導性肥満マウスに投与したときに、体重増加抑制と脂肪蓄積抑制とともに、*Saa*や*Orm*などの急性期タンパク質の発現の下方抑制を観察した⁸³⁾。これらの結果は、*B. breve* B-3は肥満に関連する炎症促進性の反応に抑制的に作用することを示唆している。

本章の研究では、ビフィズス菌*B. breve* B-3を12週間摂取することで、肥満ぎみの成人被験者において体脂肪量が減少した。また*B. breve* B-3の摂取によって、肝機能および全身性炎症反応が改善する可能性が示された。本試験では医師による問診や血液検査において、重大な有害事象は観察されなかった。*B. breve* B-3は、生理活性成分として酢酸や乳酸などの短鎖脂肪酸、および共役リノール酸などの脂肪酸代謝物を産生することが可能であり、それらが抗メタボリックシンドローム効果に関わっている可能性が考えられる。*B. breve* B-3代謝機能改善における臨床効果を確認するには、より大きな規模でさらなるランダム化対照比較試験を実施することが必要である。

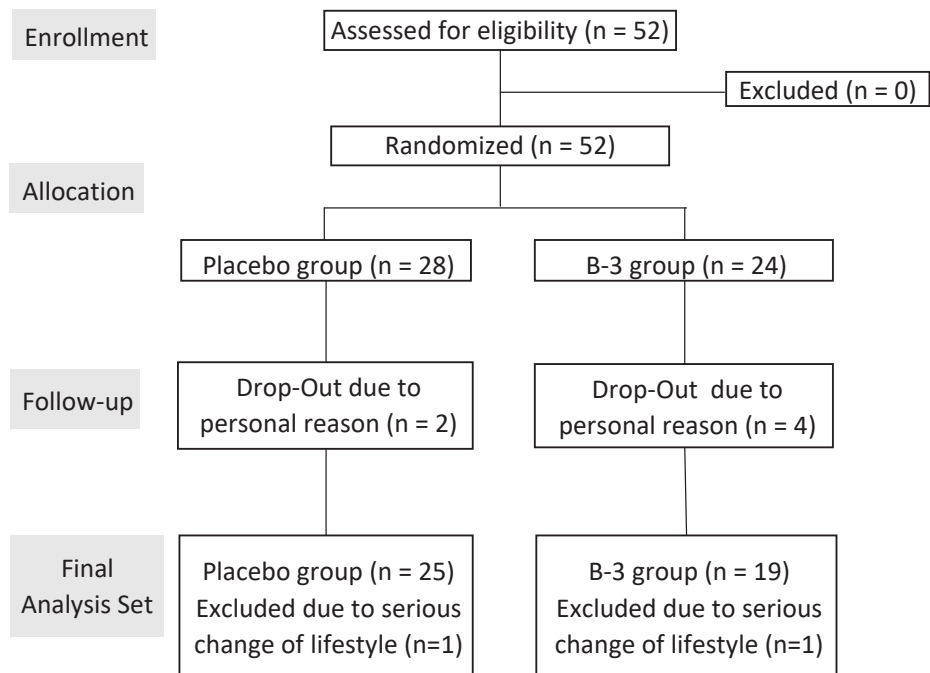


Fig. 3-1. Participant flowchart

Table 3-1. Baseline characteristics of the subjects

	Placebo	B-3	P-value ^a
Sex n	25	19	0.535
Male	11	6	
Female	14	13	
Body component, mean (SEM)			
Age (years)	61.9 (1.9)	58.9 (2.0)	0.302
Body weight (kg)	71.2 (2.3)	68.9 (2.7)	0.506
BMI (kg/m ²)	27.7 (0.5)	27.1 (0.6)	0.461
Muscle Mass (kg)	45.1 (2.0)	44.8 (2.1)	0.908
Fat mass (kg)	23.5 (1.0)	21.5 (1.0)	0.187
Fat percentage (%)	33.3 (1.3)	31.3 (1.0)	0.276
Prescribed drug usage (%)			
for diabetes mellitus	72	79	0.734
for hyperlipidemia	52	68	0.358
for hypertensive	36	42	0.760
Metabolic markers (%)			
TG \geq 150 mg/dL ^b	60	42	0.361
FBS \geq 110 ^b	84	79	0.709
HDL-C $<$ 40 ^b	4	5	1.000

^a P-value of Fisher's exact test for categorical data and P-value of two-sample T-test for continuous data were shown.

^b The proportion of participants with a baseline level higher than the borderline for domestic criteria of metabolic syndrome in Japan.

Table 3-2. Changes of physical examination values

	B-3						P-value		
	Placebo	Week 0	Week 4	Week 8	Week 12	Week 0		Week 4	Week 8
Body Weight (kg)	71.2 (2.3)	70.4 (2.3)	71.0 (2.3)	70.8 (2.3)	68.9 (2.7)	68.4 (2.6)	68.6 (2.6)	69.1 (2.6)	0.493
BMI (kg/m ²)	27.7 (0.5)	27.5 (0.6)	27.6 (0.5)	27.8 (0.5)	27.1 (0.6)	26.9 (0.6)	27.0 (0.6)	27.2 (0.6)	0.403
Muscle Mass (kg)	45.1 (2.0)	44.5 (1.9)	44.9 (1.9)	44.8 (1.9)	44.8 (2.1)	44.8 (2.1)	44.9 (2.1)	45.7 (2.1)	0.376
Fat mass (kg)	23.5 (1.0)	23.3 (1.1)	23.3 (1.1)	23.4 (1.0)	21.5 (1.0)	21.0 (1.0)	21.0 (0.9)	20.8 (0.9)	0.046*
Fat percentage (%)	33.3 (1.3)	33.3 (1.3)	33.2 (1.3)	33.3 (1.2)	31.3 (1.0)	30.8 (1.1)	30.8 (1.0)	30.3 (1.0)	0.066
Waist-Hip Ratio	0.964 (0.0084)	0.960 (0.0086)	0.958 (0.0085)	0.963 (0.0076)	0.935 (0.0091)	0.932 (0.0084)	0.928 (0.0081)	0.931 (0.0071)	0.174

Physical examination values are shown as Mean (SEM).

* Significant difference between placebo and B-3 group at week 12 was analyzed by ANCOVA adjusted for the baseline (P<0.05).

Table 3-3. Differences from baselines of physical measurements

Group	Week 4	Week 8	Week 12
Body Weight (kg)			
B-3	-0.5 (0.21) *	-0.3 (0.25)	-0.6 (0.29) *
Placebo	-0.4 (0.19) *	-0.2 (0.25)	-0.4 (0.23)
BMI (kg/m²)			
B-3	-0.2 (0.08) *	-0.1 (0.10)	-0.3 (0.12)
Placebo	-0.2 (0.07) *	-0.1 (0.10)	-0.1 (0.10)
Muscle Mass (kg)			
B-3	0.0 (0.24)	0.2 (0.19)	0.4 (0.27)
Placebo	-0.1 (0.15)	0.0 (0.16)	0.1 (0.16)
Fat mass (kg)			
B-3	-0.5 (0.22) *	-0.5 (0.24)	-1.1 (0.23) *
Placebo	-0.3 (0.18)	-0.2 (0.21)	-0.5 (0.23)
Fat percentage (%)			
B-3	-0.6 (0.29)	-0.5 (0.26)	-1.2 (0.30) *
Placebo	-0.2 (0.18)	-0.3 (0.23)	-0.5 (0.26)
Waist-Hip Ratio			
B-3	-0.004 (0.002)	-0.007 (0.003)	-0.009 (0.003) *
Placebo	-0.004 (0.002)	-0.005 (0.002)	-0.008 (0.003)

The amount of changed physical examination values from baseline for participants with no missing values are shown as Mean (SEM).

* Significant within-group difference from the baseline analyzed by a one-sample t-test (P<0.05).

Table 3-4. Changes of blood parameters

Parameters	Placebo				B-3				P-value
	Week 0	Week 4	Week 8	Week 12	Week 0	Week 4	Week 8	Week 12	
Fasting blood glucose (mg/dL)	155.5 (13.0)	162.7 (18.1)	153.4 (15.9)	155.0 (13.4)	178.1 (16.3)	183.1 (15.0)	169.1 (11.9)	177.2 (12.8)	0.541
HbA1c (%)	7.01 (0.27)	7.16 (0.27) [†]	7.24 (0.27) [†]	7.30 (0.26) [†]	7.54 (0.30)	7.77 (0.27) [†]	7.84 (0.28) [†]	7.67 (0.24)	0.249
Glyco albumin (%)	18.9 (0.7)	18.8 (0.8)	18.8 (0.7)	19.0 (0.8)	21.0 (1.0)	20.6 (0.8)	20.2 (0.7)	20.3 (3.1)	0.213
1,5-Anhydroglucitol (µg/mL)	9.8 (1.3)	10.3 (1.4)	10.5 (1.4)	10.6 (1.4)	6.0 (0.8)	5.7 (0.8)	5.7 (0.8)	6.6 (0.8)	0.725
Insulin (µU/mL)	39.9 (10.3)	31.8 (8.9) [†]	29.1 (8.6) [†]	39.4 (12.7)	32.0 (6.1)	25.5 (4.3)	25.9 (5.4)	37.7 (8.0)	0.096
AST (IU/L)	26.4 (3.0)	26.6 (2.5)	26.8 (2.6)	27.2 (3.3)	29.7 (5.4)	28.9 (4.5)	27.9 (4.7)	29.5 (5.9)	0.624
ALT (U/L)	28.6 (2.6)	29.7 (3.1)	30.2 (3.2)	30.6 (3.1)	34.0 (5.3)	35.1 (5.7)	34.2 (5.7)	32.2 (4.9)	0.156
ALP (IU/L)	209.5 (12.3)	211.9 (13.9)	203.5 (12.5)	207.2 (12.0)	242.7 (20.0)	241.7 (20.1)	230.2 (18.0) [†]	234.3 (18.4)	0.704
LDH (IU/L)	199.0 (7.9)	197.1 (7.2)	197.8 (7.8)	199.4 (8.5)	197.4 (6.6)	197.6 (8.3)	196.2 (8.6)	197.2 (8.2)	0.936
γ-GTP (IU/L)	39.0 (6.1)	39.6 (7.0)	42.4 (8.1)	44.0 (8.4) [†]	37.0 (7.1)	41.7 (8.1)	39.6 (8.2)	37.8 (7.2)	0.011 *
Total bilirubin (mg/dL)	0.52 (0.03)	0.65 (0.04) [†]	0.62 (0.04) [†]	0.59 (0.04)	0.61 (0.05)	0.63 (0.05)	0.59 (0.05)	0.61 (0.05)	0.233
hCRP (mg/dL)	0.088 (0.014)	0.090 (0.019)	0.093 (0.018)	0.110 (0.018)	0.098 (0.025)	0.127 (0.032)	0.105 (0.023)	0.090 (0.027) [†]	0.039 *

Blood parameter values are shown as Mean (SEM).

Statistical analysis was performed after logarithmic transformation of the values for fasting blood glucose, insulin, AST, ALT, ALP, γ-GTP, total bilirubin and hCRP.

* Significant difference between placebo and B-3 group at week 12 was analyzed by ANCOVA adjusted for the baseline (P<0.05).

† Significant within-group change from the baseline was analyzed using a one-sample t-test (P<0.05).

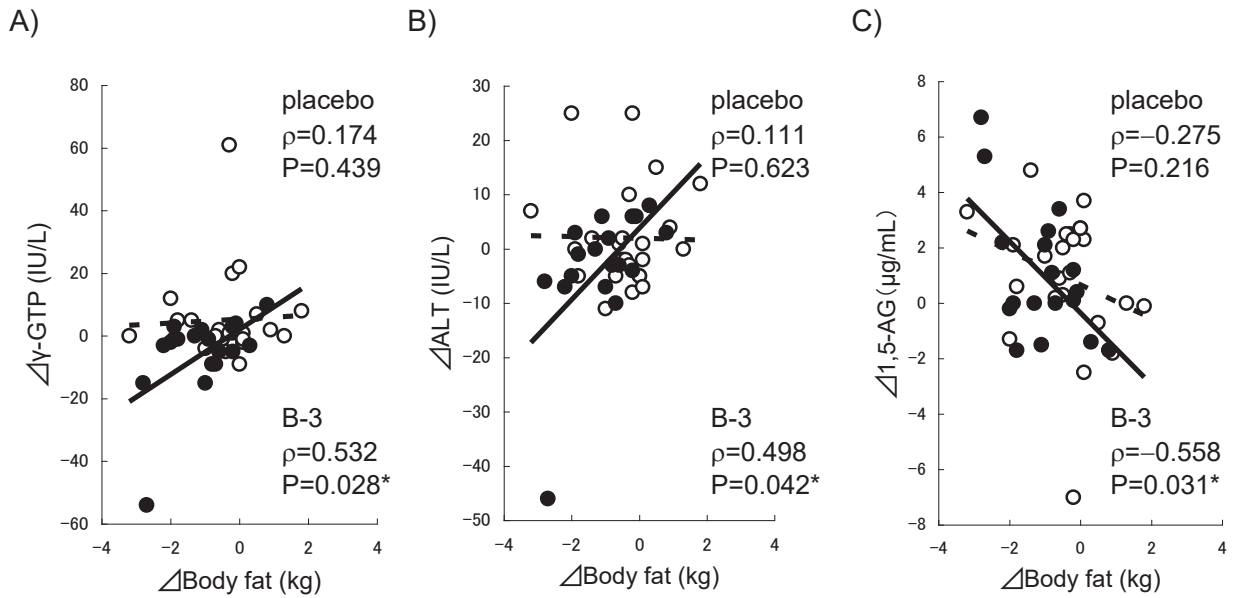


Fig. 3-2. Correlative relationship between body fat mass and blood parameters.

Correlation analysis between changed values at week 12 from week 0 of body fat mass and blood parameters (A, γ -GTP; B, ALT; C, 1,5-AG) by Pearson's correlation test. Data shown were correlation coefficients (ρ) with P values, * $P<0.05$. As for ALT and γ -GTP, correlation analysis was performed using the data after logarithmic transformation and standardization. Solid lines and filled circles indicate B-3 group, dotted lines and unfilled circles indicate placebo group.

第4章 BMIが高めの健常成人を対象としたビフィズス菌 B-3 の体脂肪低減作用に関する臨床研究

4.1. はじめに

ビフィズス菌 *B. breve* B-3 はヒトにおいて抗肥満作用が期待されるプロバイオティクスである。近藤らは、このビフィズス菌株の投与が食餌誘導性肥満マウスにおいて、用量依存的に体重増加と内臓脂肪沈着を抑制し、血中総コレステロール、グルコース、インスリンレベルを改善したことを報告している⁶⁹⁾。また第3章の研究で示した通り、臨床試験では、1日500億CFUの用量で *B. breve* B-3 の凍結乾燥粉末を含むカプセルを12週間摂取することで体脂肪量の有意な減少がみられた⁹⁶⁾。しかしながら、前述の臨床試験では、被験者に糖尿病などの疾病罹患者も含まれており、その試験結果を健常成人に外挿することはできないと考えられた。

そこで本研究では、糖尿病、高血圧、高脂血症、その他のいかなる疾患も伴わない肥満1度の健常成人を対象として、*B. breve* B-3 生菌粉末を含むカプセルの摂取が体組成に影響を及ぼすかを調査する目的で、無作為化二重盲検プラセボ対照試験を実施した。また代謝機能に対する *B. breve* B-3 の影響を評価し、その安全性を評価するために、肥満に関連する血液脂質、血糖、肝機能、炎症マーカー等の血液パラメータを評価した。

4.2. 方法

4.2.1. 参加者

この無作為化二重盲検プラセボ対照試験は、受託臨床試験機関の株式会社ケイ・エス・オー（東京）に実施委託して、2016年9月から2016年12月にかけて東京の品川シーズンテラス健診クリニックで行われた。参加者はインターネットを介して募集した。体組成測定、血液検査、尿検査、および背景調査によるスクリーニングを行い、以下の適格基準を満たす肥満1度の健常成人80名を本試験に組入れた。選択基準は年齢が20～64歳で、かつ肥満度指数 (BMI) が25以上30 kg/m²未満 ($25 \leq \text{BMI} < 30 \text{ kg/m}^2$) の者とした。このBMI範囲はWHOの基準で pre-obese (肥満1度) と見なされている⁹⁷⁾。除外基準は以下の通りであった：アウトカム指標に影響を及ぼす可能性のある消化

器疾患、糖尿病、高血圧または脂質異常症の治療薬の服用歴、重篤な疾患（心血管疾患、肝疾患、消化器疾患、内分泌代謝疾患、睡眠時無呼吸症候群など）の治療歴、医薬品および食物に対する重篤なアレルギー、妊娠または授乳、多量喫煙、多量飲酒、不規則な生活習慣、病気などの所見から試験責任医師が本試験に不適切と判断した者。参加者は試験開始前に書面によるインフォームド・コンセントを提出した。

4.2.2. 試験方法

適格性の評価後、参加者を B-3 カプセル投与群またはプラセボカプセル投与群に無作為に割り付けた。性別、年齢、BMI、腹部脂肪面積で層別化し、1ブロック4名のランダム置換ブロックを利用するコンピュータ生成ランダム化スキームを使用して、参加者を各群へ割り付けた。無作為化は、秘匿化された試験コーディネーターが行った。試験食品に識別番号のみを表示することで、参加者も試験担当者も試験群の割り付けについて盲検化された二重盲検化を行った。識別番号と試験群を関連付ける盲検化コードは、秘匿化された試験コーディネーターが保管し、試験終了後に開封した。試験期間は、2週間の前観察期間とその後の12週間の摂取期間とした。参加者は、介入開始から0、4、8、および12週間後に身体測定および医師による問診を受けた。0週目および12週目に血液検査および尿検査を実施した。参加者は、試験食品の摂取、食事内容、服薬、飲酒、生活習慣の変化、運動について日記に記録し、この日記は4週間ごとの来院時に栄養士が確認した。参加者には、通常的生活習慣、食事、運動を変えないように指導し、体脂肪、血糖、コレステロールを低下させる食品、飲料、サプリメント、および体組成に影響を及ぼす可能性がある発酵食品、プロバイオティクス微生物を含むサプリメントの摂取を禁止した。

主要評価項目は、12週目の腹部内臓脂肪面積の変化とした。副次的評価項目は、体組成（体重、体脂肪量、体脂肪率、BMI、皮下脂肪面積）、ウエスト周囲径、血液パラメータ（血中脂質、血糖、肝機能、炎症性パラメータ）、腸内細菌叢の組成の変化とした。被験食品摂取の安全性は、血液検査、尿検査、および医師による問診により評価した。

サンプルサイズ計算から、12週目に有意水準5%、検出力80%で、群間の内臓脂肪面積の $10 \pm 15 \text{ cm}^2$ （平均 \pm SD）の変化を検出するのに必要な最小被験者数を80例と算出した。脱落率は10%と予測した。

本試験実施計画書は、日本橋循環器科クリニック試験審査委員会（東京）の倫理委員会によって審査され、承認された。プロトコルはヘルシンキ宣言に準拠した。この臨床試験は、2016年9月2日に UMIN Clinical Trials Registry に事前登録された (UMIN 000023919)。

4.3.3. 試験食品

被験食品は、*B. breve* B-3 生菌の凍結乾燥粉末（100 億 CFU/カプセル）を含むカプセルとした。対照食品には、主にコーンスターチを含みビフィズス菌を含まないプラセボカプセルを用いた。参加者には、12 週間毎日、食後 30 分以内に 2 カプセル（B-3 群は 200 億 CFU/日）を摂取するように指示した。B-3 カプセルが介入期間中に必要な生菌数を含んでいたこと、プラセボカプセルと外観、匂い、重量が同一であったことを確認した。0、4、8 週目の各来院時に 60 粒の B-3 カプセルまたはプラセボカプセルを配布し、残ったカプセルをその次の来院時に参加者から回収した。

4.3.4. 体組成測定

腹部内臓脂肪面積および皮下脂肪面積は、DUALSCAN HDS-2000 二重生体電気インピーダンス分析 (BIA) 装置（オムロンヘルスケア、京都）を用いて測定した。デュアル BIA 装置を用いて得られた腹部内臓脂肪面積測定の方法については、以前に詳細に記載されている^{98,99)}。水分補給状態によって引き起こされる測定結果への影響を回避するために、朝食なし、最小限の飲水の状態での測定を行った。測定は 3 回行い、平均値を解析に用いた。体重、体脂肪量、および体脂肪率は、医療グレードの体組成計 InBody 770（インボディ・ジャパン、東京）を用いて生体電気インピーダンス法により測定した。BMI は、身長の手動測定値を使用して InBody 770 によって自動的に算出された。ウエスト周囲径は、肋骨の下縁と腸骨稜の頂部との間の中点で測定した。

4.3.5. 血液検査・尿検査

血液検査および尿検査は 0 週目および 12 週目に実施した。以下の血液パラメータを株式会社 LSI メディエンス（東京）において分析した：総コレステロール、LDL-コレステロール、HDL-コレステロール、中性脂肪、グリコアルブミン、空腹時血糖、HbA1c、インスリン、アスパラギン酸トランスアミナーゼ (AST)、ALT、ALP、 γ -GTP、

hCRP、LPS-binding protein (LBP)、白血球数 (WBC)、赤血球数 (RBC)、ヘモグロビン、ヘマトクリット、血小板、総たんぱく、アルブミン、乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH)、ビリルビン、クレアチンキナーゼ (CK)、尿素窒素、クレアチニン、尿酸、ナトリウム、塩化物、カリウム、カルシウム、無機リン、マグネシウム、および 血清鉄。HOMA-IR は、インスリン ($\mu\text{U/ml}$) \times 空腹時血糖 (mg/dl) /405 として算出した。また、以下の尿パラメータも株式会社 LSI メディエンスにおいて分析した：尿タンパク質、糖、ウロビリノーゲン、ビリルビン、ケトン体、潜血。

4.3.6. 食事調査

参加者は、0、4、8、12 週の各来院前の 3 日間について詳細な食事内容を日誌に記録した。栄養士はエクセル栄養君 ver.8.0 (株式会社 建帛社、東京)を用いて総エネルギー、たんぱく質、脂肪、炭水化物、食物繊維の摂取量を評価した。

4.3.7. 統計解析

SAS ソフトウェアバージョン 9.3 (SAS Institute、USA) を用いて、体組成および血液パラメータの統計解析を行った。正規分布に従わない変数は、自然対数変換後に解析した。分かりやすくするために、表中の値は元のスケールで示している。背景特性は、カテゴリー変数についてはフィッシャーの正確確率検定、連続変数については 2 標本 t 検定で比較した。主要評価項目および副次評価項目については、ベースライン (0 週目) で調整した ANCOVA を用いて、試験群間の比較を行った。ベースラインからの各検査 (4 週目、8 週目、12 週目) 時点における群内変化を、1 標本 t 検定を用いて解析した。 P 値 < 0.05 を有意とした。効果量の大きさを計算し、 $\eta^2 = \text{SS 効果} / \text{SS 合計}$ として表し、効果量の大きさは小 ($\eta^2=0.01$)、中 ($\eta^2=0.06$)、大 ($\eta^2=0.14$) とした¹⁰⁰⁾。

4.3. 結果

4.3.1. 参加者の背景特性と食事調査結果

参加者のフローチャート (Fig. 4-1) に示すように、試験参加を希望した 149 人の適格性を検討した後、肥満 1 度の健常成人 80 名をプラセボ群と B-3 群の 2 群に割り付けた。試験開始後に脱落した参加者はおらず、全員が試験を完遂した。体重、BMI、腹部脂肪面積、体脂肪、筋肉量などの参加者の背景は、ベースライン時にプラセボ群と

B-3 群との間で有意差はなかった (Table 4-1)。食事調査では、食事内容から栄養計算した総エネルギー、たんぱく質、脂肪、炭水化物、食物繊維のいずれも群間差は認められず、ベースラインから 0、4、8、12 週目でも有意な変化は認められなかった (Table 4-2)。試験食品の摂取率はプラセボ群 99.9%、B-3 群 99.8%であった。コンプライアンスに関する違反はなかった。

4.3.2. 体組成

体脂肪率は、プラセボ群では 4 週目から 12 週目にかけて有意にベースラインから増加した (Fig. 4-2A)。B-3 群の体脂肪率は、プラセボ群よりも 8 週目および 12 週目で有意に低く、その効果量の大きさは中であった (8 週目は $P=0.02$ 、 $\eta^2=0.074$ 、12 週目は $P=0.02$ 、 $\eta^2=0.068$) (Fig. 4-2A)。B-3 群の体脂肪量は、プラセボ群よりも 8 週目および 12 週目で有意に低く、その効果量の大きさは小から中であった (8 週目は $P=0.04$ 、 $\eta^2=0.053$ 、12 週目は $P=0.03$ 、 $\eta^2=0.060$) (Fig. 4-2B)。介入期間中、プラセボ群の筋肉量はわずかに減少したが、B-3 群の筋肉量は 8 週目以降増加し始めた。筋肉量は、8 週目に有意な群間差を示し、効果量は中であった ($P=0.03$ 、 $\eta^2=0.062$) (Fig. 4-3C)。B-3 群のウエスト周囲径は、12 週目でベースラインから有意に低下した ($P<0.01$) (Fig. 4-2E)。BMI に有意な変化は認められなかった (Fig. 4-2D)。

腹部脂肪面積の変化を Fig. 4-3 に示す。総脂肪面積は、4 週目に両群でベースラインから有意に増加した (Fig. 4-3A)。プラセボ群の内臓脂肪面積は、4 週目および 8 週目にベースラインから有意に増加した (それぞれ $P=0.02$ および $P=0.045$) (Fig. 4-3B)。B-3 群の内臓脂肪面積および両群の皮下脂肪面積に有意な変化は認められなかった (Fig. 4-3B、C)。

内臓脂肪面積が 100 cm^2 未満だった軽度肥満者の参加者 (プラセボ群 15 名; B-3 群 19 名) を対象とした層別解析では、12 週目において体脂肪率はプラセボ群と比べて B-3 群で低い傾向 (-0.65% 、 $P=0.08$) を示し、ウエスト周囲径はプラセボ群と比べて B-3 群で有意に低かった (-3.3 cm 、 $P=0.01$)。

4.3.3. 有効性に関する血液パラメータ

0 週から 12 週までの血液パラメータの推移を Table 4-3 に要約する。両群間で血液パラメータに有意差は観察されなかった。プラセボ群ではグリコアルブミンがベー

スラインから増加 (12.7%から 12.9%、 $P<0.01$) し、B-3 群では AST (24.8 U/L から 25.5 U/L、 $P=0.049$) および ALT (34.3 U/L から 36.4 U/L、 $P=0.03$) がベースラインから有意に増加した。B-3 群では HDL-コレステロールがベースラインから増加傾向を示し (46.4 mg/dL から 48.2 mg/dL、 $P=0.058$)、中性脂肪は減少傾向を示した (176.8 mg/dL から 150.4 mg/dL、 $P=0.053$)。炎症マーカーである hCRP と LBP に有意な変化は認められなかった。

4.3.4. 安全性評価に関する血液・尿検査

本試験の試験期間中、参加者に重篤な有害事象は観察されなかった。感冒、頭痛、筋肉痛などの軽度の有害事象 8 件のうち、プラセボ群で 6 件、B-3 群で 2 件の感冒が認められた。B-3 群で観察された症状は、医師によって被験食品の摂取とは無関係であると判断された。

血液検査、生化学検査、尿検査の結果を Table 4-4 に示す。白血球数、赤血球数、ヘモグロビン、血小板などの血液パラメータに有意な変化は認められなかった。B-3 群では、アルブミン、尿酸、およびカルシウムはベースラインから有意に減少したが、クレアチニンおよび塩化物はベースラインから有意に増加した。対照的に、プラセボ群では、クレアチニンと尿酸は有意に減少したのに対し、塩化物は有意に増加した。しかし、これらの血液パラメータの変化は正常範囲内にあった。

4.4. 考察

腸内細菌叢の構成は、やせた被験者と肥満被験者の間で異なり、肥満の治療標的として認識されている。過体重 (BMI 25~29.9 kg/m²) および肥満 (BMI ≥ 30 kg/m²) の被験者でプロバイオティクス摂取の効果を調べたランダム化対照比較試験をメタアナリシス解析した研究報告では、5 つの研究が体脂肪率の変化を報告しており、プロバイオティクス介入群は対照群よりも体脂肪率が統合推定値で -0.60% と有意に低く、研究間の異質性は低いものであった¹⁰¹⁾。これら 5 つの研究には、*B. breve* B-3 を 500 億 CFU/日の用量で 12 週間摂取することにより、0.7 kg の脂肪量の減少を示した我々の以前の研究 (第 3 章の研究) が含まれていた⁹⁶⁾。本試験では、*B. breve* B-3 を 200 億 CFU/日の用量で 12 週間摂取することで、肥満 1 度の参加者の体脂肪率および体脂肪量が有意に低下した。体脂肪率および体脂肪量の群間差は、それぞれ 0.7% および 0.6 kg であり (Fig. 4-2A, B)、これは上述のメタアナリシス¹⁰¹⁾ および我々の以前の研究の所見と

一致している。過剰な食物摂取は肥満につながる主要因子であるため、本試験では食事調査を行い試験期間中に栄養摂取量は群間で有意差がないことを確認した。これらの結果は、*B. breve* B-3 が肥満1度の健常成人における体脂肪減少のための有望なプロバイオティック株であることを示唆する。我々の知る限り、*B. breve* B-3 は、カロリー制限などのライフスタイル変更や他のプレ/プロバイオティクスを併用することなく、ランダム化対照比較試験において体脂肪の有意な減少を誘導した唯一のビフィズス菌株である。

腹部の体脂肪に関して、内臓脂肪組織は、解剖学的にも、生理学的にも、予後的にも皮下脂肪組織とは異なる¹⁰²⁾。過剰な内臓脂肪は過剰な皮下脂肪よりも代謝疾患と強い相関を示すので、我々は主要評価項目として内臓脂肪面積の変化を調べた。しかし、体脂肪の有意な減少にもかかわらず、本研究では群間で内臓脂肪面積の有意差は観察されなかった。いくつかの臨床試験で、内臓脂肪の減少に対するプロバイオティクス株の陽性の効果が報告されている。*L. gasseri* SBT2055 を含む発酵乳を12週間摂取すると、内臓脂肪蓄積のある(81.2~178.5 cm²)成人において内臓脂肪面積が有意に減少した⁶⁶⁾。さらに、*B. animalis* ssp. *lactis* GCL2505 を含む発酵乳を12週間摂取すると、BMIが23~30の健常被験者の内臓脂肪面積が有意に減少することが報告された¹⁰³⁾。本試験参加者の内臓脂肪蓄積(Table 4-1)は、以前の研究(門岡らの試験における SBT2055 群の 127.3 ± 24.6 cm²、高橋らの試験における GCL2505 群の 133.4 ± 29.6 cm²)よりも少なかった^{66,103)}。本試験では、内臓脂肪蓄積量が少ないことが、内臓脂肪面積の変化が検出できない1つの理由である可能性がある。

本試験では、B-3 群で中性脂肪レベルが減少傾向を示し、HDL-コレステロールはベースラインから改善傾向を示した(Table 4-3)。いくつかのプロバイオティクスは、ヒトの血清脂質レベルに影響を及ぼすことが報告されている¹⁰⁴⁾。食餌誘発性肥満マウスでは、*B. breve* B-3 を摂取すると血清総コレステロール値が改善した⁶⁹⁾。また、DNAマイクロアレイ解析により、*B. breve* B-3 の投与は、食餌誘発性肥満モデルマウスの肝臓における *Cyp4a* ファミリーおよび *Cyp7A1a* を含む脂質代謝に関与する経路の遺伝子発現を上方制御することが明らかになった⁸³⁾。*Cyp4a* ファミリーメンバーは、肝臓における脂肪酸酸化またはエネルギー消費の誘導に関する役割を果たし¹⁰⁵⁾、そして *Cyp7A1a* はコレステロールからの胆汁酸塩の合成における律速酵素である¹⁰⁶⁾。肝臓で *Cyp7a1* を過剰発現するトランスジェニックマウスは、高脂肪による肥満、脂肪肝、イ

ンスリン抵抗性に抵抗性を示すことが明らかになった¹⁰⁷⁾。肝臓の Cyp7A1 は、線維芽細胞増殖因子 15 (FGF15) と併用して腸管ファルネソイド X 受容体 (FXR) によって調節されることが示された^{108,109)}。Sayin らは、無菌 FXR 欠損マウスを用いた再誘導試験において、腸内細菌叢が FXR 依存性機序を介して回腸における FGF15 および肝臓における Cyp7A1 の発現を調節し、総胆汁酸プールのサイズおよび組成を変化させることを実証した¹¹⁰⁾。プロバイオティック投与の効果を調べたところ、マウスにおいて FXR-FGF15 軸の下方制御を介して肝胆汁酸合成を誘導することが分かった¹¹¹⁾。これらの知見から、肝臓における Cyp7A1 発現増加を介して脂肪酸酸化、エネルギー消費、および胆汁酸合成を誘導することによって、*B. breve* B-3 の摂取は脂質代謝の改善や体脂肪の減少を引き起こした可能性が考えられる。

本試験では、*B. breve* B-3 の摂取による血液炎症マーカーへの影響は見られなかった。本試験では B-3 群の血液炎症マーカーの平均値は、hCRP : 0.13 mg/L、LBP : 7.5 µg/mL であり、過去の研究と比べるとベースラインの時点で低かった。Sun らの研究では、血中 hCRP の値は肥満状態によって異なること、LBP の血中レベルはメタボリックシンドローム、2 型糖尿病、およびインスリン抵抗性のオッズ比と関連することが論証されている（同研究における hCRP の平均値は 1.38 mg/L、LBP の平均値は 27.6 µg/ml）¹¹²⁾。第 3 章の研究では、500 億 CFU /日の用量で *B. breve* B-3 を摂取することで hCRP の有意な減少が観察されたが、参加者に糖尿病などの病者が含まれており、ベースラインでの参加者の hCRP の平均値は本試験の 7 倍高い値を示していた (0.98 µg/mL)⁹⁶⁾。これらの所見から、代謝性エンドトキシン血症に関連する炎症状態は、本試験に参加した健常者の集団では軽度であったことが示唆される。BMI は体重による肥満度の指標ではあるが、脂肪蓄積の種類、機能、代謝の意味合いを区別することはできない¹¹³⁾。肥満に伴うエンドトキシン血症と慢性炎症に対するプロバイオティクスの影響を評価するためには、血中エンドトキシンレベルを選択基準に追加し、代謝性エンドトキシン血症とみられる参加者を組入れる必要がある。

8 週目には、筋肉量に有意な群間差が認められた (Fig. 4-2C)。近年の研究では「腸筋軸」の存在が示唆されており、腸内細菌叢が筋細胞に対する栄養効果のメディエーターとして作用する可能性がある^{114,115)}が、臨床的証拠についてはほとんど知られていない^{114,116)}。本試験では、参加者に定期的なライフスタイルまたは運動を変更しないように指示した。しかし、参加者の身体活動に関する測定可能なパラメータは評価しな

かった。身体活動および運動は筋肉量の増加および減少の重要な因子であるため、身体活動の厳格な評価を通して筋肉量に対する *B. breve* B-3 の効果を調べるためにはさらなる研究が必要である。

本研究では、*B. breve* B-3 摂取の安全性および体組成に対するその有効性を検討した。プロバイオティック微生物は一般に *Lactobacillus* 属および *Bifidobacterium* 属に由来し、ほとんどの場合、安全であると考えられている¹¹⁷⁾。本試験では、*B. breve* B-3 の投与に起因する有害作用は観察されず、認められた変化（血液および尿のパラメータを参照）は正常範囲内にあった。従って、本研究は *B. breve* B-3 の摂取に関して安全性への懸念がないことを示唆している。

本研究にはいくつかの限界があった。各参加者の身体活動の変動は、エネルギー消費量と体組成に影響を及ぼした可能性がある。参加者には通常のライフスタイルや運動を変えないように指示し、ライフスタイルの変化および運動を日記に記録するように彼らに依頼した。しかし、歩数計で測定された歩数などの測定可能なパラメータを用いて身体活動の変化を調査しなかった。従って、各参加者の身体活動の変動は、本研究の結果に影響を与えた可能性を否定することはできない。さらに、本研究の結果は、参加者が健康な肥満 1 度の成人であったため、重度の肥満症 (BMI>30)、糖尿病、高脂血症、および小児肥満の患者などには外挿することはできない。それと、過去に発酵乳中のプロバイオティクスの抗肥満効果を評価した別の研究グループの試験では、摂取終了から 4 週間後の追跡調査では体組成がベースライン値付近まで戻っていた⁶⁴⁾。本試験では追跡分析を実施していないため、有効性の持続性を評価するためにはフォローアップ分析をする必要がある。

本章の研究では、200 億 CFU/日の用量で 12 週間 *B. breve* B-3 を毎日摂取すると、健康な肥満 1 度の成人において、有害事象を伴わずに、有意な体脂肪減少効果を発揮することを示した。従って、*B. breve* B-3 株は肥満 1 度の健康成人において、摂取による安全性に問題がないこと、体脂肪蓄積や脂肪蓄積に関連する代謝障害の予防に有用であることが示された。

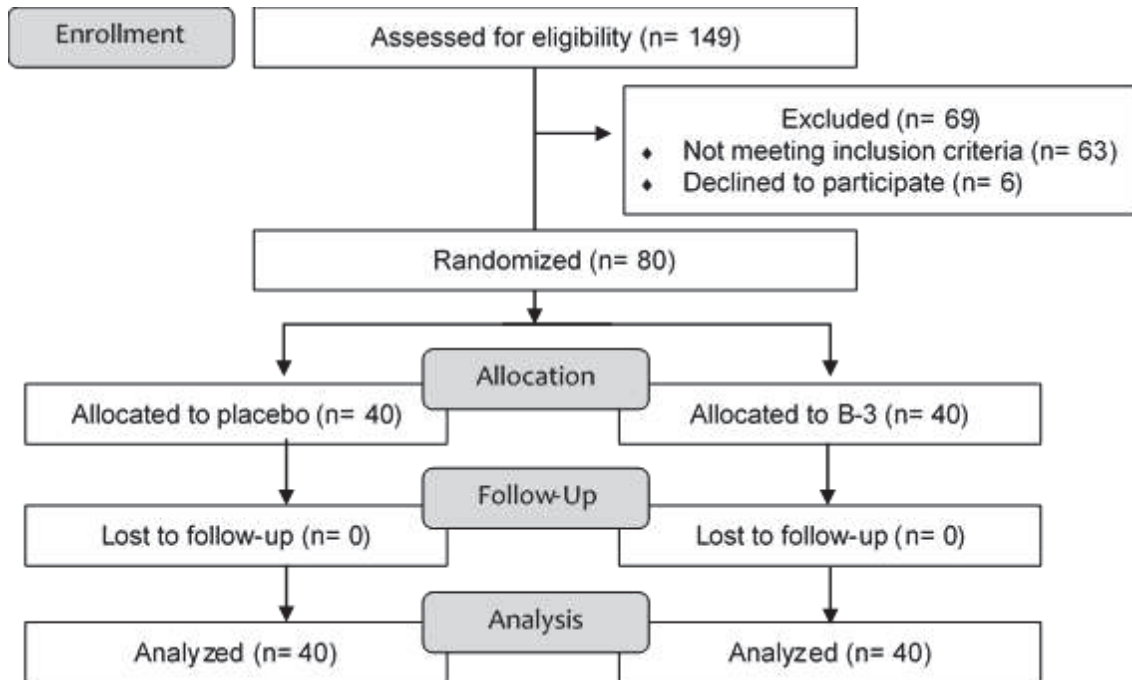


Fig. 4-1. Participant flow diagram

Table 4-1. Baseline information of participants

	Placebo (N=40)	B-3 (N=40)
Sex (male, female)	37, 3	37, 3
Age	45.6 ± 8.5	45.4 ± 9.8
Anthropometric measures		
Height (cm)	170.4 ± 7.0	170.5 ± 5.9
Body weight (kg)	80.3 ± 7.1	80.6 ± 6.8
BMI (kg/m ²)	27.6 ± 1.2	27.7 ± 1.2
Waist circumference (cm)	96.2 ± 5.6	96.6 ± 4.9
Abdominal fat areas		
Visceral fat area (cm ²)	106.1 ± 20.7	106.3 ± 20.3
Subcutaneous fat area (cm ²)	233.4 ± 40.9	233.2 ± 36.2
Whole body fat area (cm ²)	339.6 ± 54.2	339.6 ± 47.1
Body composition		
Body fat mass (kg)	23.6 ± 4.2	22.9 ± 3.1
Body fat (%)	29.5 ± 5.4	28.5 ± 3.9
Muscle mass (kg)	53.6 ± 6.8	54.5 ± 6.2

Continuous variables are shown as means ± SD.

Table 4-2. Daily nutrition intake in the B-3-supplemented and placebo groups during the intervention

		0 weeks		4 weeks		8 weeks		12 weeks	
		Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Energy (kcal/day)	Placebo	2028	450	2009	564	1959	580	1922	518
	B-3	1940	404	1959	427	1966	466	1885	492
Protein (g/day)	Placebo	76.3	20.6	74.3	23.2	72.8	22.4	73.7	22.0
	B-3	70.0	15.4	70.8	16.2	73.1	15.4	68.3	14.8
Fat (g/day)	Placebo	68.5	18.7	68.1	23.7	66.0	24.3	65.2	21.9
	B-3	65.0	19.7	69.8	21.9	68.0	26.1	62.1	21.2
Carbohydrates (g/day)	Placebo	260.7	68.6	258.7	70.9	253.2	76.6	243.7	69.2
	B-3	255.4	54.5	248.0	52.2	251.0	55.5	250.8	66.0
Fiber (g/day)	Placebo	10.6	3.6	10.5	3.7	10.7	3.5	10.5	3.7
	B-3	10.5	2.6	10.7	3.3	10.4	3.4	11.1	4.4

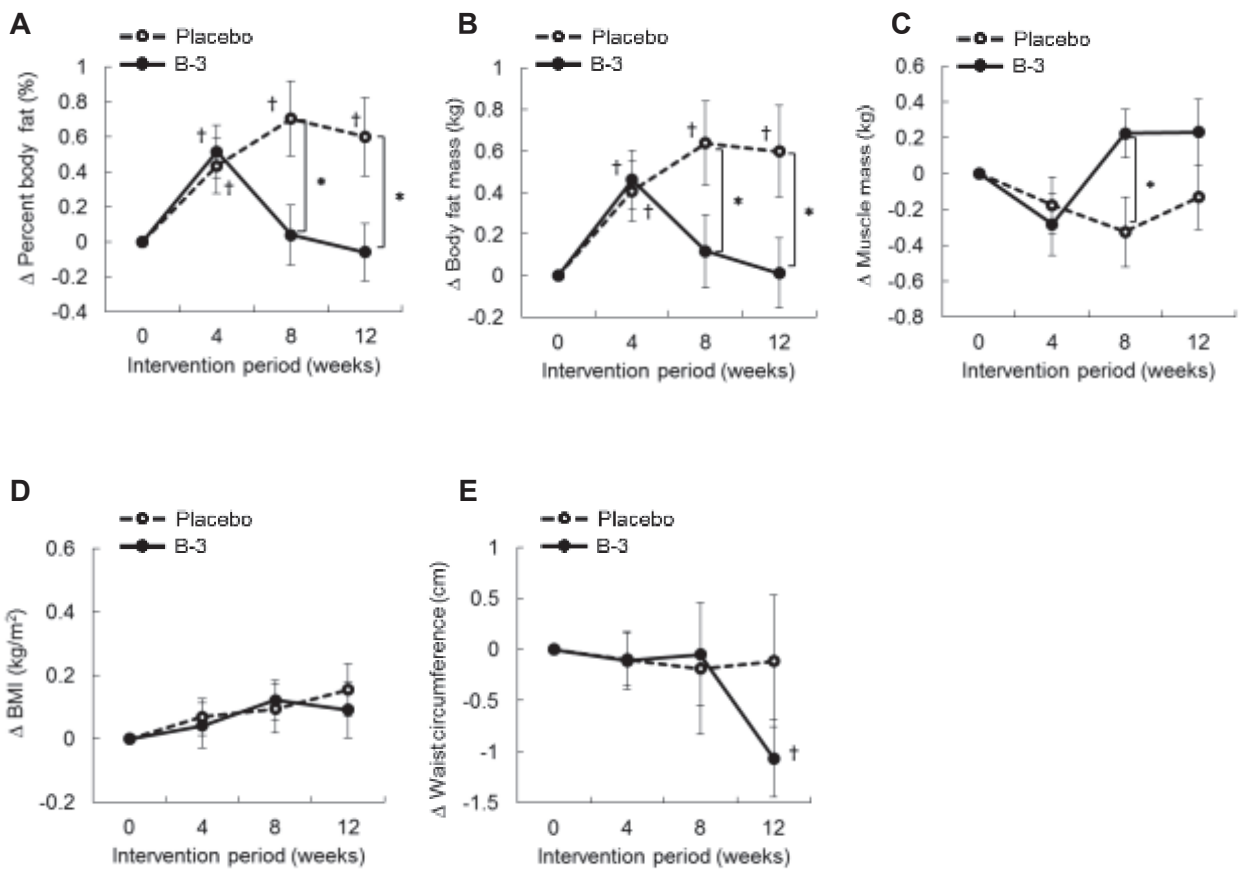


Fig. 4-2. Transition of changes in (A) percent body fat, (B) body fat mass, (C) muscle mass, (D) BMI, and (E) waist circumference during the intervention period.

The data are presented as means \pm SE.

*Significant difference between the placebo and B-3 groups analyzed by ANCOVA adjusted for the baseline ($P < 0.05$).

†Significant within-group difference from the baseline analyzed by a one-sample *T*-test ($P < 0.05$).

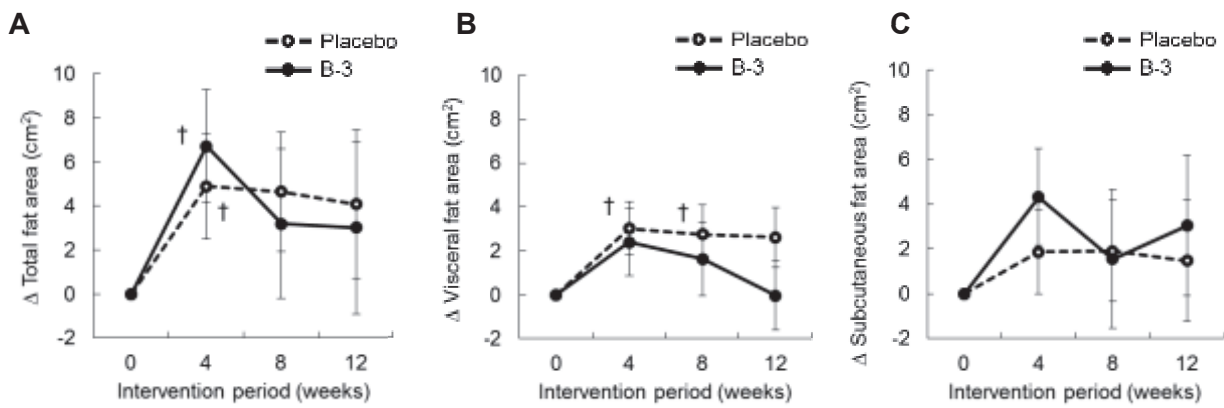


Fig. 4-3. Transition of changes in (A) total fat area, (B) visceral fat area, and (C) subcutaneous fat area during the intervention period.

The data are presented as means \pm SE.

*Significant difference between the placebo and B-3 groups analyzed by ANCOVA adjusted for the baseline ($P < 0.05$).

†Significant within-group difference from the baseline analyzed by a one-sample *T*-test ($P < 0.05$).

Table 4-3. Changed values of blood parameter from the baseline

	Placebo	B-3
Blood lipids		
Δ Total cholesterol (mg/dl)	-2.1 ± 18.7	3.0 ± 15.4
Δ LDL-cholesterol (mg/dl)	-2.1 ± 16.1	3.5 ± 16.6
Δ HDL-cholesterol (mg/dl)	1.8 ± 6.7	1.8 ± 5.7 †
Δ Triglyceride (mg/dl)‡	-0.8 ± 63.4	-26.3 ± 83.5 †
Blood sugar		
Δ Glycoalbumin (%)	0.2 ± 0.3 *	0.1 ± 0.4
Δ Fasting blood glucose (mg/dl)	0.9 ± 5.9	0.5 ± 7.8
Δ HbA1c (%)	-0.02 ± 0.15	-0.03 ± 0.16
Δ HOMA-IR	-0.22 ± 2.34	-0.18 ± 1.58
Liver function		
Δ AST (U/l)‡	-1.0 ± 11.7	0.6 ± 7.8 *
Δ ALT (U/l)‡	0.0 ± 14.2	2.0 ± 15.3 *
Δ ALP (U/l)	5.0 ± 20.2	-2.2 ± 16.7
Δ γ-GTP (U/l)‡	-0.9 ± 19.2	-1.2 ± 11.5
Inflammation markers		
Δ hCRP (mg/dl)‡	0.076 ± 0.361	-0.012 ± 0.186
Δ LBP (μg/ml)‡	0.21 ± 3.79	-0.33 ± 1.67

Values are means ± SD.

Within-group comparisons: *P < 0.05; †P < 0.1

‡ Analysis was performed after logarithmic transformation of the values.

Table 4-4. Changed values of hematology, biochemical, and urine parameters from the baseline

	Placebo	B-3
Δ WBC (/ml)	-128 ± 694	-5 ± 1158
Δ RBC (×10 ⁴ /ml)	2.9 ± 15.8	4.0 ± 15.4
Δ Hemoglobin (g/dl)	0.0 ± 0.6	0.0 ± 0.4
Δ Hematocrit (%)	-0.4 ± 2.4	-0.5 ± 2.3
Δ Platelets (×10 ⁴ /ml)	0.3 ± 2.0	0.4 ± 1.6
Δ LDH (U/l)	-2.4 ± 17.8	-0.6 ± 13.2
Δ Bilirubin (mg/dl) [‡]	0.0 ± 0.24	0.1 ± 0.30
Δ CK (U/l) [‡]	-4.3 ± 53.6	-56.0 ± 325.6
Δ Total protein (g/dl)	0.0 ± 0.23	0.0 ± 0.24
Δ Albumin (g/dl)	-0.1 ± 0.18	-0.1 ± 0.16 *
Δ Urea nitrogen (mg/dl)	0.2 ± 2.19	0.1 ± 2.79
Δ Creatinine (mg/dl)	-0.03 ± 0.07 *	-0.02 ± 0.07
Δ Uric acid (mg/dl)	-0.4 ± 0.72 *	-0.3 ± 0.55 *
Δ Sodium (eEq/l)	0.2 ± 1.6	0.4 ± 1.5
Δ Chloride (mEq/l)	-0.2 ± 2.2	0.8 ± 1.8 *
Δ Potassium (mEq/l)	0.1 ± 0.32 *	0.0 ± 0.29
Δ Calcium (mg/dl)	0.1 ± 0.29	-0.1 ± 0.25 *
Δ Phosphorus (mg/dl)	0.0 ± 0.39	-0.1 ± 0.35
Δ Magnesium (mg/dl)	0.1 ± 0.12 *	0.0 ± 0.12
Δ Serum Iron (mg/dl)	-5.8 ± 35.0	9.3 ± 35.9
Δ Urine pH [‡]	-0.1 ± 0.61	-0.1 ± 0.68
Δ Urine specific gravity	-0.001 ± 0.008	0.000 ± 0.009

Values are means ± SD.

Within-group comparisons: *P < 0.05

‡ Analysis was performed after logarithmic transformation of the values.

第5章 本研究の総括

5.1. ヒト常在性ビフィズス菌の母乳親和性について

本研究では11菌種3亜種から成る37種類のビフィズス菌菌株について母乳との親和性を評価した結果、主にヒト乳児腸管から検出される乳児型 HRB に属するビフィズス菌菌株のうち、*B. breve* と *B. longum* subsp. *infantis* ではほとんどの菌株が母乳中で生育し、*B. longum* subsp. *longum* と *B. bifidum* でも菌株特異的に生育したのに対し、成人型 HRB および Non-HRB に属するビフィズス菌菌株のほとんどが母乳中では生育しないことが明らかとなった（第2章の研究）。さらに、母乳中にはビフィズス菌の生育に必要な炭水化物源として充分量（およそ 7.0 mg/mL）のラクトースが含まれているため、母乳中でのビフィズス菌の生育阻害の原因は栄養素の枯渇ではなく、菌数を減少させる生育阻害因子の関与が考えられた。そこで、生育阻害作用に着目して実験した結果、母乳中に含まれる抗菌成分の一つであるリゾチームに対する耐性能は、菌種および乳児型 HRB、成人型 HRB、Non-HRB の棲息区分によって大きく異なることを見出した（第2章の研究）。ヒト母乳中に含まれるリゾチーム濃度は最大 400 µg/mL に達し、他の哺乳動物のそれよりも高く、ウシ乳と比べて約 3000 倍の濃度に相当することが報告されている⁵⁰⁾。また Brundige らは、低温殺菌されたヒトリゾチーム含有ヤギのミルクを投与することで、若齢ブタおよびヤギの腸内微生物叢の組成が明確に変化したことを報告している¹¹⁸⁾。したがって、他の哺乳類と比べて高濃度に存在するヒト母乳中のリゾチームは、耐性を持たない細菌に対する選択因子として機能し、乳児の腸管における乳児型 HRB の優勢な定着に寄与していると考えられる。一方、乳児型 HRB は、そのような特殊な環境である乳児の腸内環境に適応し、HMOs の資化能やリゾチーム耐性といった母乳親和性を獲得してきたと考えられる。

5.2. HRB のリゾチーム耐性機序について

乳児型 HRB はどのようにしてリゾチームに耐性を示しているのでしょうか。*L. plantarum* や *L. lactis* を含むいくつかのグラム陽性細菌は、ペプチドグリカンに O-アセチル化といった化学修飾を獲得することによって、自己分解活性を調節し、リゾチーム耐性を得ている¹¹⁹⁻¹²¹⁾。ペプチドグリカンの C6 基の O-アセチル化修飾は、リゾチー

ムの結合親和性を著しく低下させる立体障害を引き起こす¹²²⁾。HRB に属するビフィズス菌が、リゾチームによる加水分解を回避するために、進化的戦略としてそのような特徴を持っていてもおかしくはない。桜井らは HRB および Non-HRB を含むビフィズス菌菌株からペプチドグリカン抽出し、O-アセチル化の割合を調べたところ、菌種間で O-アセチル化の割合は異なっていたが、抽出したペプチドグリカンは O-アセチル化の割合とは関係なく、いずれもリゾチームに耐性を示したことを報告している¹²³⁾。さらに、リゾチームの酵素非依存的な殺菌活性を評価するために、加熱変性リゾチームを用いて処理したところ、HRB と Non-HRB のビフィズス菌菌株 (30 株) は、加熱変性リゾチームに対して、元の完全なリゾチームと同様の感受性パターンを示したことから、HRB と Non-HRB のリゾチーム耐性の違いは、リゾチームの酵素非依存的なカチオン性殺菌活性に対する耐性によってもたらされることが示唆された¹²³⁾。また、その他の推定しうるメカニズムとして、ある種の細菌では特異的なタンパク性のリゾチーム阻害物質を生産し、リゾチームの攻撃から細胞壁を効果的に保護することで、宿主への定着を可能とすることが報告されている¹²⁴⁾。これらはビフィズス菌のリゾチーム耐性機構を理解する重要な知見であるが、HRB がリゾチームのカチオン性殺菌活性に耐性を持つ機構の理解や菌種による許容濃度の違いを明確に説明するにはより詳細な研究が必要である。

5.3. ビフィズス菌 B-3 の体脂肪低減作用機序について

第 3 章では BMI 24 以上 30 未満、年齢 40~69 歳で糖尿病患者を含む参加者 52 名を対象として、第 4 章では、BMI 25 以上 30 未満、年齢 20~69 歳の健常成人を対象として、*B. breve* B-3 を 12 週間摂取する介入試験を行った結果、どちらの研究でも一貫して *B. breve* B-3 を摂取することで、対照群と比べて有意な体脂肪量の減少が観察された。これまでの研究結果から、*B. breve* B-3 の抗肥満作用は菌体やその代謝物が直接的あるいは腸内細菌叢の変化を介して間接的に宿主のエネルギーバランスに影響を与えていると考えられる。本研究を含め、これまでの臨床試験および動物試験の研究結果から、*B. breve* B-3 の抗肥満作用機序には、肝臓における脂肪酸代謝の促進、腸管バリア機能改善による慢性炎症抑制¹²⁵⁾などが推察されている。

これまでに高脂肪食を給餌した肥満モデル C57BL/6 マウスにおいて、高脂肪食と共に *B. breve* B-3 を投与すると、対照群と比べて、体重増加が抑制され、精巣上体脂

肪組織重量が低下し、血中総コレステロール値が低下したことが報告されている⁶⁹⁾。さらに上記の実験系において、ビフィズス菌 B-3 投与群および対照群のマウス肝臓を用いて DNA マイクロアレイ解析を実施したところ、B-3 投与群ではシトクロム P450 ファミリー遺伝子である *Cyp4a12a* やレプチンレセプター遺伝子 *Lepr* などの脂質代謝にかかわる遺伝子群やケトン体代謝、アルコール代謝にかかわる遺伝子群の発現上昇が認められた一方で、ステロール代謝やストレス、炎症にかかわる遺伝子群の発現低下がみられた⁸³⁾。定量 PCR においてもエネルギー消費にかかわる *Cyp4a* ファミリー遺伝子の発現上昇が確認されたことから、*B. breve* B-3 の摂取が肝臓の脂肪酸 β 酸化を誘導し、宿主のエネルギーバランスに影響した可能性が示された。これらの報告から、*B. breve* B-3 の投与は、生体内において β 酸化を亢進し、脂肪の代謝を高めることにより、体脂肪を減少させる働きをすることが考えられる。

一方、高脂肪食摂取後にみられるグラム陰性細菌由来の LPS の血中濃度上昇（内毒素血症）は、肥満やインスリン抵抗性を引き起こす要因のひとつと考えられており²³⁾、肥満者や 2 型糖尿病患者では血中内毒素レベルが増悪していることが報告されている¹²⁶⁾。これは高脂肪食負荷などによる腸管上皮細胞のバリア機能低下が招く状況であると考えられており、炎症の誘発要因であることが示唆されている^{26,92)}。黒瀬らは、ヒト腸管上皮細胞株 Caco-2 を用いた腸管バリア機能の評価実験において、*B. breve* B-3 の培養上清が上皮細胞間の結合に重要なタイトジャンクションを構成するタンパク質 claudin-4 の発現を上昇させ、腸管上皮のバリア機能を高める作用を示すことを報告している¹²⁷⁾。第 3 章の研究では、BMI 24 以上 30 未満の成人男女 44 名を対象にした臨床試験において、B-3 摂取群で炎症のマーカーである血中 hCRP の値が改善した (Table 3-3)。第 4 章の考察で述べた通り、肥満者で観察される軽度慢性炎症状態は、肥満の進行度や糖尿病などの肥満関連疾患の発症の有無によっても異なると考えられ、BMI および体脂肪が高めの健常成人においては、必ずしも軽度慢性炎症をとまなわれないことが推察される。少なくとも、第 3 章で対象とした肥満および血液指標で確認される炎症状態を併せ持つ参加者を対象とした場合において、*B. breve* B-3 は腸管のバリア機能を高め、慢性炎症を改善することで間接的に肥満の抑制作用を示すことが推察される。

肥満の進行度や軽度慢性炎症の状態に加えて、近年、個人個人の腸内細菌叢の違いが肥満改善を目的とした介入試験の結果を大きく左右することが示唆されており、介入効果を予測する腸内細菌の特徴（マーカー）の探索やレスポonderとノンレスポonder

ダーの機序解明に向けた研究が行われている¹²⁸⁻¹³⁰⁾。今後も臨床研究と基礎研究を組合わせて、腸内細菌と肥満の関係が明らかになることでより効果の高い腸内環境への介入方法が見つかることが期待される。

5.4. 今後の課題

本研究では、ビフィズス菌の基礎的な研究を通じて乳児型 HRB が乳児腸管における選択的定着を可能にしている作用機序の一端を明らかにし、さらに個別の菌株を用いた臨床研究を通じてビフィズス菌の摂取が BMI の高めの成人において体脂肪低減作用を発揮する可能性を示した。ビフィズス菌の菌種間のリゾチーム許容度の違いについては、その後の研究により、酵素非依存的なカチオン性殺菌活性に対する耐性によることが報告されている。さらに HRB の特徴に関しては、ビフィズス菌がヒト腸管に選択的定着するために必要な特性だけでなく、ヒトに有益なビタミンやインドール-3-乳酸の産生能が高いこと^{131,132)}、および消化管における炎症やセリアック病との関連が示唆されている食品由来オピオイドペプチドの分解能が高いこと¹³³⁾など、HRB と宿主との有益な相互作用を示唆する結果が報告されている¹⁰⁾。今後もビフィズス菌の特性に関して、基礎研究および個別の菌株の生理作用の臨床的検証の両面からのアプローチを継続することで、目的とする健康効果に適した菌株のスクリーニングや作用機序の解明が進展することが期待される。

参考文献

1. 清水(肖) 金忠. ヒトに棲息するビフィズス菌の特徴とヨーグルトに応用する技術の開発. *Milk Sci.* **66**, 45–51 (2017).
2. Odamaki, T. *et al.* Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: a cross-sectional study. *BMC Microbiol.* **16**, 90 (2016).
3. 光岡知足(編著). 「ビフィズス菌の研究」. 日本ビフィズス菌センター (1994).
4. 日本乳酸菌学会(編). 「乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス」. 京都大学学術出版会 (2010).
5. Parte, A. C. LPSN - List of prokaryotic names with standing in nomenclature (Bacterio.net), 20 years on. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **68**, 1825–1829 (2018).
6. Boesten, R. *et al.* *Bifidobacterium* population analysis in the infant gut by direct mapping of genomic hybridization patterns: potential for monitoring temporal development and effects of dietary regimens. *Microb. Biotechnol.* **4**, 417–427 (2011).
7. Harmsen, H. J. *et al.* Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **30**, 61–67 (2000).
8. Roger, L. C., Costabile, A., Holland, D. T., Hoyles, L. & McCartney, A. L. Examination of faecal *Bifidobacterium* populations in breast- and formula-fed infants during the first 18 months of life. *Microbiology* **156**, 3329–3341 (2010).
9. Odamaki, T. *et al.* Comparative Genomics Revealed Genetic Diversity and Species/Strain-Level Differences in Carbohydrate Metabolism of Three Probiotic Bifidobacterial Species. *Int. J. Genomics* **2015**, 567809 (2015).
10. Wong, C. B., Sugahara, H., Odamaki, T. & Xiao, J. Z. Different physiological properties of human-residential and non-human-residential bifidobacteria in

- human health. *Benef. Microbes* **9**, 111–122 (2018).
11. Mitsuoka, T. & Kaneuchi, C. Ecology of the bifidobacteria. *Am. J. Clin. Nutr.* **30**, 1799–1810 (1977).
 12. Sakata, S. *et al.* Culture-independent analysis of fecal microbiota in infants, with special reference to *Bifidobacterium* species. *FEMS Microbiol. Lett.* **243**, 417–423 (2005).
 13. Matsuki, T. & Watanabe, K. Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 4506–4512 (1999).
 14. Kato, K. *et al.* Age-Related Changes in the Composition of Gut *Bifidobacterium* Species. *Curr. Microbiol.* **74**, 987–995 (2017).
 15. Odamaki, T. *et al.* Genomic diversity and distribution of *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* across the human lifespan. *Sci. Rep.* **8**, 1–12 (2018).
 16. Komeno, M., Hayamizu, H., Fujita, K. & Ashida, H. Two novel α -l-arabinofuranosidases from *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* belonging to glycoside hydrolase family 43 cooperatively degrade arabinan. *Appl. Environ. Microbiol.* **85**, e02582-18 (2019).
 17. Guilherme, A., Virbasius, J. V., Puri, V. & Czech, M. P. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 367–377 (2008).
 18. Rosenbaum, M., Knight, R. & Leibel, R. L. The gut microbiota in human energy homeostasis and obesity. *Trends Endocrinol. Metab.* **26**, 493–501 (2015).
 19. Bäckhed, F. *et al.* The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 15718–15723 (2004).
 20. Tremaroli, V. & Bäckhed, F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature* **489**, 242–249 (2012).
 21. Esteve, E., Ricart, W. & Fernández-Real, J.-M. Gut microbiota interactions with

- obesity, insulin resistance and type 2 diabetes: did gut microbiote co-evolve with insulin resistance? *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **14**, 483–490 (2011).
22. Cani, P. D. *et al.* Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia* **50**, 2374–2383 (2007).
 23. Cani, P. D. *et al.* Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* **56**, 1761–72 (2007).
 24. Trial, C. *et al.* Probiotic with or without fiber controls body fat mass, associated with serum zonulin, in overweight and obese adults—randomized controlled trial. *EBioMedicine* **13**, 190–200 (2016).
 25. Kallio, K. A. E. *et al.* Endotoxemia, nutrition, and cardiometabolic disorders. *Acta Diabetol.* **52**, 395–404 (2015).
 26. Bischoff, S. C. *et al.* Intestinal permeability – a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterol.* **14**, 189 (2014).
 27. Wang, Z. *et al.* The role of bifidobacteria in gut barrier function after thermal injury in rats. *J. Trauma* **61**, 650–657 (2006).
 28. Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S. & Gordon, J. I. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* **444**, 1022–1023 (2006).
 29. Riva, A. *et al.* Pediatric obesity is associated with an altered gut microbiota and discordant shifts in *Firmicutes* populations. *Environ. Microbiol.* **19**, 95–105 (2017).
 30. Woting, A. & Blaut, M. The intestinal microbiota in metabolic disease. *Nutrients* **8**, 202 (2016).
 31. Angelakis, E., Armougom, F., Million, M. & Raoult, D. The relationship between gut microbiota and weight gain in humans. *Future Microbiol.* **7**, 91–109 (2012).
 32. Schwartz, A. *et al.* Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity* **18**, 190–195 (2010).

33. Kalliomäki, M., Collado, M. C., Salminen, S. & Isolauri, E. Early differences in fecal microbiota composition in children may predict overweight. *Am. J. Clin. Nutr.* **87**, 534–538 (2008).
34. Santacruz, A. *et al.* Gut microbiota composition is associated with body weight, weight gain and biochemical parameters in pregnant women. *Br. J. Nutr.* **104**, 83–92 (2010).
35. Matsuki, T. *et al.* Quantitative PCR with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers for analysis of human intestinal bifidobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 167–173 (2004).
36. Sela, D. A. & Mills, D. A. Nursing our microbiota: Molecular linkages between bifidobacteria and milk oligosaccharides. *Trends Microbiol.* **18** 298–307 (2010).
37. Kunz, C., Rudloff, S., Baier, W., Klein, N. & Strobel, S. Oligosaccharides in human milk: structural, functional, and metabolic aspects. *Annu. Rev. Nutr.* **20**, 699–722 (2000).
38. Brand-Miller, J. C., McVeagh, P., McNeil, Y. & Messer, M. Digestion of human milk oligosaccharides by healthy-infants evaluated by the lactulose hydrogen breath test. *J. Pediatr.* **133**, 95–98 (1998).
39. Urashima, T. *et al.* The predominance of type I oligosaccharides is a feature specific to human breast milk. *Adv Nutr.* **3**, 473S–482S (2012).
40. 片山高嶺. ビフィズス菌とヒトミルクオリゴ糖. *応用糖質科学* **4**, 287–294 (2014).
41. Kitaoka, M. Bifidobacterial enzymes involved in the metabolism of human milk oligosaccharides. *Adv. Nutr.* **3**, 422S–429S (2012).
42. Kitaoka, M., Tian, J. & Nishimoto, M. Novel putative galactose operon involving lacto-N-biose phosphorylase in *Bifidobacterium longum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 3158–3162 (2005).
43. Xiao, J. *et al.* Distribution of in vitro fermentation ability of lacto-N-biose I, a

- major building block of human milk oligosaccharides, in bifidobacterial strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 54–59 (2010).
44. Lönnerdal, B. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *Am. J. Clin. Nutr.* **77**, 1537S-1543S (2003).
 45. Masschalck, B. & Michiels, C. W. Antimicrobial properties of lysozyme in relation to foodborne vegetative bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* **29**, 191–214 (2003).
 46. Gagnon, M., Kheadr, E. E., Le Blay, G. & Fliss, I. In vitro inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 by bifidobacterial strains of human origin. *Int. J. Food Microbiol.* **92**, 69–78 (2004).
 47. Rada, V., Splichal, I., Rockova, S., Grmanova, M. & Vlkova, E. Susceptibility of bifidobacteria to lysozyme as a possible selection criterion for probiotic bifidobacterial strains. *Biotechnol. Lett.* **32**, 451–455 (2010).
 48. Koh, D. *et al.* Salivary immunoglobulin A and lysozyme in patients with psoriasis. *Ann. Acad. Med. Singapore* **33**, 307–310 (2004).
 49. Ročková, Š. *et al.* Growth of bifidobacteria in mammalian milk. *Czech J Animal Sci.* **58**, 99–105 (2013).
 50. Clare, D. A., Catignani, G. L. & Swaisgood, H. E. Biodefense properties of milk: the role of antimicrobial proteins and peptides. *Curr. Pharm. Des.* **9**, 1239–1255 (2003).
 51. Rockova, S. *et al.* Factors affecting the growth of bifidobacteria in human milk. *Int. Dairy J.* **21**, 504–508 (2011).
 52. Field, C. J. The immunological components of human milk and their effect on immune development in infants. *J. Nutr.* **135**, 1–4 (2005).
 53. Oda, H., Wakabayashi, H., Yamauchi, K. & Abe, F. Lactoferrin and bifidobacteria. *Biometals* **27**, 915–922 (2014).
 54. Mattarelli, P., F. C. and B. B. Bactericidal activity of poly-D-lysine and lysozyme

- in *Bifidobacterium globosum* strains. *Ann. Microbiol. Enzym.* **47**, 185–191 (1997).
55. Op den Camp, H. J., Veerkamp, J. H., Oosterhof, A. & Van Halbeek, H. Structure of the lipoteichoic acids from *Bifidobacterium bifidum* spp. *pennsylvanicum*. *Biochim. Biophys. Acta* **795**, 301–313 (1984).
 56. Dupont, C. & Clarke, A. J. Dependence of lysozyme-catalysed solubilization of *Proteus mirabilis* peptidoglycan on the extent of O-acetylation. *Eur. J. Biochem.* **195**, 763–769 (1991).
 57. Roger, L. C. & McCartney, A. L. Longitudinal investigation of the faecal microbiota of healthy full-term infants using fluorescence in situ hybridization and denaturing gradient gel electrophoresis. *Microbiology* **156**, 3317–3328 (2010).
 58. Underwood, M. A. *et al.* A Comparison of Two Probiotic Strains of Bifidobacteria in Premature Infants. *J. Pediatr.* **163**, 1585–1591 (2013)
 59. Collado, M. C., Isolauri, E., Laitinen, K. & Salminen, S. Distinct composition of gut microbiota during pregnancy in overweight and normal-weight women. *Am. J. Clin. Nutr.* **88**, 894–899 (2008).
 60. Wu, X. *et al.* Molecular characterisation of the faecal microbiota in patients with type II diabetes. *Curr. Microbiol.* **61**, 69–78 (2010).
 61. Ilmonen, J., Isolauri, E., Poussa, T. & Laitinen, K. Impact of dietary counselling and probiotic intervention on maternal anthropometric measurements during and after pregnancy: a randomized placebo-controlled trial. *Clin. Nutr.* **30**, 156–164 (2011).
 62. Luoto, R., Laitinen, K., Nermes, M. & Isolauri, E. Impact of maternal probiotic-supplemented dietary counseling during pregnancy on colostrum adiponectin concentration: A prospective, randomized, placebo-controlled study. *Early Hum. Dev.* **88**, 339–344 (2012).
 63. Mikirova, N. A., Casciari, J. J., Hunninghake, R. E. & Beezley, M. M. Effect of

- weight reduction on cardiovascular risk factors and CD34-positive cells in circulation. *Int. J. Med. Sci.* **8**, 445–452 (2011).
64. Kadooka, Y. *et al.* Effect of *Lactobacillus gasseri* SBT2055 in fermented milk on abdominal adiposity in adults in a randomised controlled trial. *Br. J. Nutr.* **110**, 1696–1703 (2013)
 65. Sanz, Y., Santacruz, A. & Gauffin, P. Gut microbiota in obesity and metabolic disorders. *Proc. Nutr. Soc.* **69**, 434–441 (2010).
 66. Kadooka, Y. *et al.* Regulation of abdominal adiposity by probiotics (*Lactobacillus gasseri* SBT2055) in adults with obese tendencies in a randomized controlled trial. *Eur J. Clin Nutr.* **64**, 636–643 (2010).
 67. Delzenne, N. M., Neyrinck, A. M. & Cani, P. D. Gut microbiota and metabolic disorders: how prebiotic can work? *Br. J. Nutr.* **109**, S81-S85 (2013).
 68. Yin, Y.-N., Yu, Q.-F., Fu, N., Liu, X.-W. & Lu, F.-G. Effects of four Bifidobacteria on obesity in high-fat diet induced rats. *World J. Gastroenterol.* **16**, 3394–3401 (2010).
 69. Kondo, S. *et al.* Antiobesity effects of *Bifidobacterium breve* strain B-3 supplementation in a mouse model with high-fat diet-induced obesity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **74**, 1656–1661 (2010).
 70. Montague, C. T. & O’Rahilly, S. The perils of portliness: causes and consequences of visceral adiposity. *Diabetes* **49**, 883–888 (2000).
 71. Fox, C. S. *et al.* Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation* **116**, 39–48 (2007).
 72. Bennett, W. L. *et al.* Comparative effectiveness and safety of medications for type 2 diabetes: An update including new drugs and 2-drug combinations. *Ann Intern Med.* **154**, 602–613 (2011).
 73. Nakanishi, N., Suzuki, K. & Tatara, K. Serum gamma-glutamyltransferase and

- risk of metabolic syndrome and type 2 diabetes in middle-aged Japanese men. *Diabetes Care*. **27**, 1427–1432 (2004).
74. Lee, J. H., Um, M. H. & Park, Y. K. The Association of Metabolic Syndrome and Serum γ -Glutamyl Transpeptidase: A 4-Year Cohort Study of 3,698 Korean Male Workers. *Clin. Nutr. Res.* **2**, 67–75 (2013).
75. Lieber, C. S. Alcohol and the Liver: 1984 Update. *Hepatology* **4**, 1243–1260 (1984).
76. Sato, K. K. *et al.* Liver enzymes compared with alcohol consumption in predicting the risk of type 2 diabetes. *Diabetes Care* **31**, 1230–1236 (2008).
77. Miller, P. M., Anton, R. F., Egan, B. M., Basile, J. & Nguyen, S. A. Excessive alcohol consumption and hypertension: clinical implications of current research. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. **7**, 346–351 (2005).
78. Lee, D. H. *et al.* Gamma-glutamyltransferase and diabetes - A 4 year follow-up study. *Diabetologia* **46**, 359–364 (2003).
79. Duk, H. L., Silventoinen, K., Jacobs, D. R., Jousilahti, P. & Tuomilehto, J. γ -glutamyltransferase, obesity, and the risk of type 2 diabetes: Observational cohort study among 20,158 middle-aged men and women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **89**, 5410–5414 (2004).
80. Fraser, A. *et al.* Gamma-glutamyltransferase is associated with incident vascular events independently of alcohol intake: Analysis of the British Women's Heart and Health study and meta-analysis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**, 2729–2735 (2007).
81. Aller, R. *et al.* Effect of a probiotic on liver aminotransferases in nonalcoholic fatty liver disease patients: A double blind randomized clinical trial. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **15**, 1090–1095 (2011).
82. Kirpich, I. A. *et al.* Probiotics restore bowel flora and improve liver enzymes in human alcohol-induced liver injury: a pilot study. *Alcohol* **42**, 675–682 (2008).

83. Kondo, S., Kamei, A., Xiao, J. Z., Iwatsuki, K. & Abe, K. *Bifidobacterium breve* B-3 exerts metabolic syndrome-suppressing effects in the liver of diet-induced obese mice: a DNA microarray analysis. *Benef. Microbes* **4**, 247–251 (2013).
84. Baker, R. G., Hayden, M. S. & Ghosh, S. NF- κ B, inflammation, and metabolic disease. *Cell Metab.* **13**, 11–22 (2011).
85. Schenk, S., Saberi, M. & Olefsky, J. M. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J. Clin. Invest.* **118**, 2992–3002 (2008).
86. Hotamisligil, G. S. & Erbay, E. Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 923–934 (2008).
87. Rocha, V. Z. & Folco, E. J. Inflammatory concepts of obesity. *Int. J. Inflam.* **2011**, 529061 (2011).
88. Weisberg, S. P. *et al.* Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* **112**, 1796–1808 (2003).
89. Suganami, T. & Ogawa, Y. Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. *J. Leukoc. Biol.* **88**, 33–39 (2010).
90. Suganami, T., Nishida, J. & Ogawa, Y. A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 2062–2068 (2005).
91. Cani, P. D. *et al.* Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* **57**, 1470–1481 (2008).
92. Cani, P. D. *et al.* Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut* **58**, 1091–1103 (2009).
93. Hoarau, C., Lagaraine, C., Martin, L., Velge-Roussel, F. & Lebranchu, Y. Supernatant of *Bifidobacterium breve* induces dendritic cell maturation, activation, and survival through a Toll-like receptor 2 pathway. *J. Allergy Clin.*

- Immunol.* **117**, 696–702 (2006).
94. Bermudez-Brito, M. *et al.* Cell-Free Culture Supernatant of *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 Decreases Pro-Inflammatory Cytokines in Human Dendritic Cells Challenged with *Salmonella typhi* through TLR Activation. *PLoS One* **8**, e59370 (2013).
 95. Jeon, S. G. *et al.* Probiotic *Bifidobacterium breve* induces IL-10-producing Tr1 cells in the colon. *PLoS Pathog.* **8**, e1002714 (2012).
 96. Minami, J.-I. *et al.* Oral administration of *Bifidobacterium breve* B-3 modifies metabolic functions in adults with obese tendencies in a randomised controlled trial. *J. Nutr. Sci.* **4**, e17 (2015).
 97. WHO Expert Consultation. Appropriate body-mass index for Asian populations and its implications for policy and intervention strategies. *Lancet* **363**, 157–163 (2004).
 98. Ida, M. *et al.* Early changes of abdominal adiposity detected with weekly dual bioelectrical impedance analysis during calorie restriction. *Obesity (Silver Spring)* **21**, E350-E353 (2013).
 99. Takeoka, A. *et al.* Intra-abdominal fat accumulation is a hypertension risk factor in young adulthood: A cross-sectional study. *Medicine (Baltimore)* **95**, e5361 (2016).
 100. Cohen, J. "*Statistical power analysis for the behavioral sciences*", Academic Press (1977).
 101. Borgeraas, H., Johnson, L. K., Skattebu, J., Hertel, J. K. & Hjelmessaeth, J. Effects of probiotics on body weight, body mass index, fat mass and fat percentage in subjects with overweight or obesity: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Obes. Rev.* **19**, 219-232. (2017).
 102. Ibrahim, M. M. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obes. Rev.* **11**, 11–18 (2010).

103. Takahashi, S. *et al.* Effect of *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* GCL2505 on visceral fat accumulation in healthy Japanese adults: a randomized controlled trial. *Biosci. Microbiota, Food Health* **35**, 163–171 (2016).
104. Pereira, D. I. A. & Gibson, G. R. Effects of Consumption of Probiotics and Prebiotics on Serum Lipid Levels in Humans. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **37**, 259–281 (2002).
105. Hardwick, J. P. Cytochrome P450 omega hydroxylase (CYP4) function in fatty acid metabolism and metabolic diseases. *Biochem. Pharmacol.* **75**, 2263–2275 (2008).
106. Goodwin, B. *et al.* A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis. *Mol. Cell* **6**, 517–526 (2000).
107. Li, T. *et al.* Transgenic expression of cholesterol 7 α -hydroxylase in the liver prevents high-fat diet-induced obesity and insulin resistance in mice. *Hepatology* **52**, 678–690 (2010).
108. Inagaki, T. *et al.* Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *Cell Metab.* **2**, 217–225 (2005).
109. Kim, I. *et al.* Differential regulation of bile acid homeostasis by the farnesoid X receptor in liver and intestine. *J. Lipid Res.* **48**, 2664–2672 (2007).
110. Sayin, S. I. *et al.* Gut microbiota regulates bile acid metabolism by reducing the levels of tauro-beta-muricholic acid, a naturally occurring FXR antagonist. *Cell Metab.* **17**, 225–235 (2013).
111. Degirolamo, C., Rainaldi, S., Bovenga, F., Murzilli, S. & Moschetta, A. Microbiota modification with probiotics induces hepatic bile acid synthesis via downregulation of the Fxr-Fgf15 axis in mice. *Cell Rep.* **7**, 12–18 (2014).
112. Sun, L. *et al.* A marker of endotoxemia is associated with obesity and related metabolic. *Diabetes Care* **33**, 1925–1932 (2010).
113. Goyal, A., Nimmakayala, K. R. & Zonszein, J. Is There a Paradox in Obesity?

- Cardiol. Rev.* **22**, 163–170 (2014).
114. Ticinesi, A. *et al.* Aging gut microbiota at the cross-road between nutrition, physical frailty, and sarcopenia: Is there a gut–muscle axis? *Nutrients* **9**, 1303 (2017).
 115. Grosicki, G. J., Fielding, R. A. & Lustgarten, M. S. Gut microbiota contribute to age-related changes in skeletal muscle size, composition, and function: biological basis for a gut-muscle axis. *Calcif. Tissue Int.* **102**, 433–442 (2018).
 116. Coqueiro, A. Y. *et al.* Probiotic supplementation in sports and physical exercise: Does it present any ergogenic effect? *Nutr. Health* **23**, 239–249 (2017).
 117. Donohue, D. C. Safety of probiotics. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* **15**, 563–569 (2006).
 118. Brundige, D. R., Maga, E. A., Klasing, K. C. & Murray, J. D. Consumption of pasteurized human lysozyme transgenic goats' milk alters serum metabolite profile in young pigs. *Transgenic Res.* **19**, 563–574 (2010).
 119. Bernard, E. *et al.* Characterization of O-acetylation of N-acetylglucosamine: a novel structural variation of bacterial peptidoglycan. *J. Biol. Chem.* **286**, 23950–23958 (2011).
 120. Veiga, P. *et al.* SpxB regulates O-acetylation-dependent resistance of *Lactococcus lactis* peptidoglycan to hydrolysis. *J. Biol. Chem.* **282**, 19342–19354 (2007).
 121. Moynihan, P. J. & Clarke, A. J. O-Acetylated peptidoglycan: Controlling the activity of bacterial autolysins and lytic enzymes of innate immune systems. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **43**, 1655–1659 (2011).
 122. Clarke, A. J., Strating, H. & Blackburn, N. T. Pathways for the O-Acetylation of Bacterial Cell Wall Polysaccharides. in *Glycomicrobiology* 187–223 (2002).
 123. Sakurai, T. *et al.* Tolerance mechanisms of human-residential bifidobacteria against lysozyme. *Anaerobe* **47**, 104–110 (2017).
 124. Callewaert, L. *et al.* Guards of the great wall: bacterial lysozyme inhibitors.

- Trends Microbiol.* **20**, 501–510 (2012).
125. 堀米綾子、新井聡、小田巻俊孝. プロバイオティクスによる生活習慣病予防作用と将来に向けたビフィズス菌の基礎研究. *月間糖尿病* **9**, 77–89 (2017).
 126. Al-Disi, D. A. *et al.* Postprandial effect of a high-fat meal on endotoxemia in arab women with and without insulin-resistance-related diseases. *Nutrients* **7**, 6375–6389 (2015).
 127. Kurose, Y. *et al.* Bioactive factors secreted by *Bifidobacterium breve* B-3 enhance barrier function in human intestinal Caco-2 cells. *Benef. Microbes* **10**, 89–100 (2019).
 128. Kovatcheva-Datchary, P. *et al.* Dietary fiber-induced improvement in glucose metabolism is associated with increased abundance of *Prevotella*. *Cell Metab.* **22**, 971–982 (2015).
 129. Hjorth, M. F. *et al.* Pre-treatment microbial *Prevotella*-to-*Bacteroides* ratio, determines body fat loss success during a 6-month randomized controlled diet intervention. *Int. J. Obes.* **42**, 580–583 (2017).
 130. Korpela, K. *et al.* Gut microbiota signatures predict host and microbiota responses to dietary interventions in obese individuals. *PLoS One* **9**, e90702 (2014).
 131. Sugahara, H., Odamaki, T., Hashikura, N., Abe, F. & Xiao, J. Differences in folate production by bifidobacteria of different origins. *Biosci. Microbiota, Food Health* **34**, 87–93 (2015).
 132. Sakurai, T., Odamaki, T. & Xiao, J. Production of indole-3-lactic acid by *Bifidobacterium* strains isolated from human infants. *Microorganisms* **7**, 340 (2019).
 133. Sakurai, T., Yamada, A., Hashikura, N., Odamaki, T. & Xiao, J. Z. Degradation of food-derived opioid peptides by Bifidobacteria. *Benef. Microbes* **9**, 675–682 (2018).

謝辞

本学位論文の作成において、丁寧にご助言やご指導を頂きました広島大学大学院
統合生命科学研究科の鈴木卓弥教授に心より厚く御礼申し上げます。

本研究を実施するにあたり、多くのご指導とご協力を賜りました京都医療センター
臨床研究センター予防医学研究室の坂根直樹室長、奈良女子大学生生活環境学部の下田
妙子特任教授、順天堂大学革新的医療技術開発研究センターの柳澤尚武准教授、中島
内科クリニックの中島茂院長と浜本幸江様に心より御礼申し上げます。

また、本研究においてご便宜を賜り、数々のご指導を頂きました森永乳業株式会社
基礎研究所の清水金忠所長、小田巻俊孝グループ長、素材応用研究所の阿部文明所
長、岩淵紀介グループ長、EC 事業部の近藤しずきグループ長をはじめ、森永乳業株式
会社の関連部署の皆様に深く感謝の意を表します。

最後に、今日に至るまで私をあたたく応援していただき、様々な面から支えてく
れた妻と父母に心から感謝の意を表します。