

ふりがな	くまがい たけひさ
氏名	熊谷 武久
学位	博士(農学)
学位記番号	新大博(農)第19号
学位授与の日付	平成16年9月30日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
博士論文名	植物性有用乳酸菌の選抜及びその発酵乳摂取のヒトへの生理効果に関する研究

論文審査委員	主査 教授	星野 力
	副査 教授	谷口正之
	副査 教授	渡邊剛志
	副査 教授	門脇基二
	副査 助教授	城 斗志夫

#### 博士論文の要旨

本論文は、植物性乳酸菌の機能性を研究した例が極めて少ない点に注目して、植物起源の乳酸菌を新たに分離して、その機能性を様々な角度から追求することにより、ヒトに対する有益効果を見いだした一連の研究成果をまとめたものである。

本論文は計7章からなっているが、研究内容は大きく分けて2つに分類される。

#### 1. 植物起源からの乳酸菌の分離および選抜

米、米加工品及び酒粕などから乳酸菌を計300株分離し、それぞれの分離株の同定を行った。米粉を添加した牛乳の発酵性、抗変異原性、食品発酵性の観点から有用株として80株を選抜した。更に 4-nitroquinolone-1-oxide, Trp-1, Trp-2, 2-aminoanthracene 及び N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG)に対する抗変異原性試験を行い、9株を選抜した。その中で、*Lactobacillus casei* subsp. *casei* 6株のみが MNNG に対して抗変異原性を示した。また、人工胃液、人工腸液の耐性試験を通して腸内での生残性を調べたところ、良好な結果を得た。

米粉を添加した発酵乳の食味の良さ、発酵速度、広くかつ高い抗変異原性、人工消化液の耐性度などの観点から *Lactobacillus casei* subsp. *casei*327 を最良株として選抜した。

#### 2. 発酵乳摂取によるヒトに対する有益効果

上記の選抜した *Lactobacillus casei* subsp. *casei*327 を用いた発酵乳摂取によるヒトに対する有益効果を検証した。本菌の腸内生残性を調べるために、毎日排便のある被験者7名に本菌を用いた100gの発酵乳を1週間摂取させ、糞便乳酸桿菌を測定した。糞便乳酸桿菌数は  $10^7 \sim 10^8$  cfu/g になり有意な増加を示し、当該乳酸菌の腸内到達性が示唆された。腸内 *Bifidobacterium* の増殖効果を調べるために、腸内 *Bifidobacterium* 数が  $10^{10}$  cfu/g 以下の被験者7人に対して100gの発酵乳を2週間摂取させ、糞便中の総嫌気性菌数、*Bifidobacterium* 数を測定した。摂取前の *Bifidobacterium* 数  $9.8 \pm 0.2 \log \text{cfu/g}$  が発酵乳の摂取により  $10.2 \pm 0.4 \log \text{cfu/g}$  になり有意な増加を示した。排便回数が4回/週以下の便秘傾向者14名に対して発酵乳を100g、2週間摂取させ、アンケート方式により排便日数、排便量及び便性(量, 形状,

色、におい、爽快感、かたさ)を調査した。摂取により排便日数の有意な増加、形状、色及びかたさの有意な改善が認められた。

さらに *in vitro* 試験で確認された抗変異原性がヒト腸内で発現する可能性を調べるために、焦げ肉を摂取させ、尿及び糞便中の変異原性を測定した。焦げ肉の変異原物質はブルーレーヨンを用いて吸着・溶出した。生肉をホットプレートで 170℃、15 分炒めることで変異原性は約 8 倍上昇した。被験者 8 人に焦げ肉(40g)と発酵乳(100g)、対照食として牛乳(100mL)を飲用させた。焦げ肉は 1 回、発酵乳又は牛乳を 1 週間摂取させ、尿及び便は全量採取した。焦げ肉摂取により変異原性は上昇し、尿では 6 時間で、便では約 4 日間で変異原物質が排泄された。尿及び便中の変異原性は焦げ肉と発酵乳を摂取することで、焦げ肉だけの摂取に対して有意に低下した。牛乳摂取だけでは明確な変異原性の低下は見られなかった。

以上、本研究を通して、植物質より新たな乳酸菌を分離して、*in vitro* 試験により優良株を選抜し、この選抜乳酸菌を用いた発酵乳はヒト腸内においても抗変異原性を示し、かつ便通・便性の改善が認められ、大腸癌予防に優れたプロバイオティクスになりうることを実証した。

#### 審査結果の要旨

申請者は、植物起源の乳酸菌の機能性を追求した研究例が極めて少ないことに着眼して本研究を行った。即ち植物起源乳酸菌による発酵乳の機能性を追求することを目的として行われた。

300 種類の乳酸菌の分離に成功し、その分離株を同定し、*in vitro* の系での抗変異原性を指標に優良株の選抜に成功している。*in vitro* 試験での有用性ばかりではなく、ヒトに対する効果まで追求して

その有用性を実証した。近年、プロバイオティクスという言葉が繁用されている。「宿主の腸内細菌叢のバランスを改善することにより、宿主に有益な作用をもたらすような経口摂取する生きた微生物」

と定義されている。その効果として、腸内 *Bifidobacterium* 数の増加による便通・便性状の改善、ピロリ菌の減少、抗変異原性、免疫賦活作用等があげられる。それらの効果を得るためには、乳酸菌種や乳酸菌量だけではなく、腸内への到達性、腸内での生残性、腸内での生育可能性が大きく関与する。

これらの観点を重視して、本研究が行われている。申請者が選抜した *Lactobacillus casei* subsp. *casei* 327 を添加した発酵乳はプロバイオティクスとしての機能を有しており、上記した条件を十分に満たした乳酸発酵乳の製造開発への道を開いた点で高く評価される。

以上のことから、本申請論文は博士(農学)の学位論文として十分な内容をもつものと判定した。