

様式第5号（第8条関係）

一部改正〔平成27年規程第69号、第79号〕

研究実施状況報告書

平成 31 年 4 月 2 日

長崎県立大学長 様

研究責任者 所 属 看護栄養学部

職 名 教授

氏 名 田中一成



受付番号 350	承認番号 338
I 課 題 乳酸菌飲料長期摂取が内臓脂肪面積に及ぼす影響に関する研究	
II 研究期間及び調査期間 研究期間 30 年 6 月 17 日 ～ 30 年 9 月 30 日 調査期間 年 月 日 ～ 年 月 日	
III 研究の実施状況（該当項目にチェックしてください） <input checked="" type="checkbox"/> 研究計画書どおり研究が終了した（公表方法：学会発表、学術論文） <input type="checkbox"/> 研究計画書どおり研究を実施した <input type="checkbox"/> 研究計画を変更して研究を実施した 変更審査申請書提出（ 済 ・ 未 ） 変更内容： 変更理由：	
IV 今後の研究の概要（研究が継続の場合）	
V 研究結果の概要（研究が終了の場合） 本試験で用いた乳酸菌飲料摂取は、内臓脂肪面積を効果的に低下させることが明らかになった。	
VI その他報告すべき事項	

※V研究結果の概要については別紙での提出も可

# 共同研究報告書

「乳酸菌飲料の人用としての安全性の確認」

長崎県立大学

看護栄養学部栄養健康学科

田中一成

## 第1章 乳酸菌飲料長期摂取が内臓脂肪面積に及ぼす影響

### 1-1.緒言

近年、乳酸菌の健康効果について多くの報告がされている。乳酸菌のうち *Lactobacillus acidophilus* は整腸作用[1]、*Lactobacillus helveticus* は血圧降下作用[2]を有することが示されている。また、脂質代謝改善作用を示すことが報告されており、Kadookaらは軽度肥満の被検者に *Lactobacillus gasseri* SBT2055株を含む発酵乳1日200gを12週間摂取させたところ、内臓脂肪面積、皮下脂肪面積および腹部周囲が減少することを観察した[3]。田中らはふなずし由来乳酸菌 *Lactobacillus* NLB163 加熱死菌を100mg含むカプセル1日3回を6週間摂取させたところ、境界域および軽度高コレステロール血症者において血清コレステロール濃度が低下することを報告した[4]。また、前川らは内臓脂肪型肥満の被験者に *Lactobacillus pentosus* strain S-PT84株400億個にデキストリンを混合させた粉末を1日1回8週間摂取させたところ内臓脂肪面積が低下することを示した[5]。

(株)安藤通商はカラコ土壤より単離した乳酸菌 *Lactobacillus buchneri*、*Pediococcus ethanolidurans*、*Lactobacillus diolivorans* と酵母 *Pichia deserticola* を米ぬかおよび乳糖を含む培地で発酵させた乳酸菌発酵液を開発した。これまでに土壤改良剤や家畜の整腸剤として幅広い用途で販売してきた。また、ヨーグルト、漬物、乳酸菌飲料など食品としても販売している。

これまでの研究により、この10%乳酸菌発酵液を含む食餌を Sprague Dawley (SD) ラットに4週間与えることにより肝臓トリグリセリド濃度が低下することが観察され、本乳酸菌発酵液が脂質濃度減少効果を発揮する可能性が示唆された[6]。乳酸菌の健康効果には内臓脂肪蓄積抑制効果やコレステロール低下作用などの脂質代謝改善作用が報告されているが、本乳酸菌発酵液のヒトの体脂肪に及ぼす影響については不明である。そこで本研究では乳酸菌発酵液のヒトに対する効果を明らかにするために、健常若年者を対象に乳酸菌発酵液を長期摂取させることで、ヒトの体脂肪および内臓脂肪面積に及ぼす影響を検討した。

## 1-2.試験方法

### <実験1>

#### 試験飲料

試験飲料は、(株)安藤通商が販売している乳酸菌発酵液である。

#### 本乳酸菌発酵液の製造方法

- ① 土(カラコ土壤)から乳酸菌3種(*Lactobacillus buchneri*、*Pediococcus ethanolidurans*、*Lactobacillus diolivorans*)と酵母(*Pichia deserticola*)を抽出した。
- ② 抽出した菌をクリーベンチで培地に植菌し、恒温機に入れ37°Cで3日間培養した。
- ③ 培養した菌を遠心分離し、菌を回収した。
- ④ オートクレーブにかけたコメ発酵液と乳糖に菌を混ぜた。
- ⑤ 菌を混ぜ込んだ液とアルギン酸ナトリウムをミキサーで混合し、ゲル化させた。
- ⑥ ゲル化した液を塩化カルシウム水溶液に滴下し、直径5mm程度の多孔質のアルギンビーズを製造した。
- ⑦ アルギンビーズを塩化カルシウム水溶液から取り出し、ビーズのみを種菌の菌床として、容量1000Lの製品タンクに入れた。
- ⑧ コメ発酵液と乳糖をオートクレーブにかけて滅菌した。
- ⑨ 滅菌した液を35°C以下に冷却して、アルギンビーズの入った製品タンクに入れた。
- ⑩ 10日間程製品タンクで培養し、液のみを布濾し、その後濾過器でさらに濾した。
- ⑪ 濾した液をボトルに充填した。

乳酸菌発酵液に大腸菌等の異物混入がないことを確認した。プラセボ飲料は乳酸菌を含まない飲料であり、これを外観から区別できないよう試験飲料と同様の容器に充填した。

#### 試験対象者

被験者は本学栄養健康学科3年生、4年生および大学院生の女性で、学内での掲示により募集した。対象者に対して目的および方法を十分に説明し、試験参加の同意を文書で得たうえで試験を実施した。応募者のうち、選択基準に該当し、

かつ除外基準に該当しない女性 37 名を被験者とした。

選択基準は、①20 歳以上の女性 ②試験期間中の暴飲暴食を控えることが可能な者 ③試験の目的・内容について十分な説明を受け、同意能力があり、よく理解した上で自発的に参加を志願し、書面で試験参加に同意した者である。除外基準は、①脂質代謝に影響を及ぼす可能性のある医薬品を使用している者 ②試験期間中に脂質代謝に影響を及ぼす可能性があるサプリメント・健康食品摂取を止めることができない者 ③重篤な糖尿病、腎・肝疾患に罹患している者、治療中の者 ④家族性高脂血症と診断されたことがある者 ⑤慢性疾患を有し、薬剤を常用している者 ⑥試験期間中に被験食品以外の乳酸菌飲料の多量摂取を止めることができない者 ⑦妊娠している者、試験期間中妊娠の意思がある者、授乳中の者 ⑧他の食品の摂取や薬剤を使用する試験、化粧品および薬剤などを塗布する試験に参加中の者、参加の意思がある者 ⑨その他、試験担当医師が被験者として不適当と判断した者である。

試験開始前に身体測定を実施し、体脂肪率の平均値がほぼ同じになるよう 2 群に分けた。1 群の 19 名に乳酸菌発酵液を、もう 1 群の 18 名にはプラセボ飲料として試験食品と外観の形状が同じである乳酸菌を含まない飲料を同じ条件で摂取させた。被験者の背景を表 1-1 に示す。

表1-1.被験者の背景

項目	全体	プラセボ飲料	乳酸菌飲料
人数 (人)	37	18	19
年齢 (歳)	20.8 ± 0.1	20.9 ± 0.2	20.7 ± 0.2
身長 (cm)	157.6 ± 0.8	157.2 ± 1.3	158.1 ± 1.1
体重(kg)	52.4 ± 1.1	51.3 ± 1.6	53.5 ± 1.5
内臓脂肪面積(cm <sup>2</sup> )	43.2 ± 2.6	42.0 ± 4.2	44.3 ± 3.2
体脂肪率 (%)	29.2 ± 0.8	27.7 ± 1.1	30.7 ± 0.9
ウエスト周囲径 (cm)	66.8 ± 2.0	67.5 ± 1.1	66.2 ± 3.8
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	21.1 ± 0.4	20.7 ± 0.5	21.4 ± 0.5

平均値±標準誤差

### 試験スケジュール

本試験は 2018 年 6 月～7 月に、被験者と試験担当者双方が摂取する飲料の種類を識別できないランダム化二重盲検プラセボ対照並行群間比較法で実施した。試験飲料あるいはプラセボ飲料 20 mL を夕食時に 8 週間摂取させた。摂取開始 2 週間前 (前観察期間)、摂取直前、摂取 4 週間後、8 週間後の午後に、体重、体脂肪率、内臓脂肪面積、体脂肪率、ウエスト周囲径を測定した。初回の測定時のみ身長の測定を行った。試験は 6 月上旬から 8 週間食品を摂取した。

試験期間中毎日、体調の変化の有無 (特に胃腸症状)、生活状況の変化の有無、

健康食品類(栄養ドリンク剤・サプリメント・その他の健康食品)の摂取の有無、医薬品(栄養ドリンク剤を除く医薬品・新指定医薬品部外品・新範囲医薬部外品)使用の有無、睡眠状況を被験者日誌に記入させた。なお、被験者に暴飲、暴食、過剰のアルコール摂取を避けるように指導した以外は、食事の内容や生活様式についての規制は特に行わなかった。なお、本試験は長崎県立大学一般研究倫理委員会の審査・承認(承認番号338)を受けたうえで、ヘルシンキ宣言を遵守し、ヒト試験実施にあたっては、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」(文部科学省・厚生労働省告示：平成26年12月22日)に従った。

### 検査項目

体重、体脂肪率、内臓脂肪面積、体脂肪率、ウエスト周囲径の測定を行った。デュアル周波数体組成計 DC-430A セパレートタイプを用い、体重、体脂肪率、BMI を測定した。内臓脂肪面積の測定には、内臓脂肪測定装置 HDS-2000 DUALSCAN を使用し、インピーダンス法で行った。

### 統計解析

測定値は平均値±標準誤差で示した。Student's *t*-test により試験飲料摂取群とプラセボ飲料摂取群間の対応のない比較および摂取開始時との対応のある比較を行い、危険率5%未満を有意差ありとした。

所定の試験スケジュールおよび試験内容をすべて終了した被験者のうち、除外基準に該当していたことや、試験期間中の食事制限およびその他の制限を遵守できなかったことが明らかになったプラセボ飲料群の2名と乳酸菌飲料群の2名を除外した計33名を解析対象者とした。

## <実験 2>

### 実験動物

動物は6週齢のSD系雄ラット（日本クレア・大阪）を用いた。ラットを温度  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度  $55 \pm 5\%$ 、12時間明暗サイクル（明期：8～20時）に設定した長崎県立大学動物実験室内で飼育し、MF固形飼料（オリエンタル酵母工業、東京）と蒸留水を自由摂取させた。20～21日間MF固形試料と蒸留水を自由摂食させたのち、12時間絶食後、乳酸菌原液群には乳酸菌発酵液をそれぞれ体重1kgあたり5ml投与した。2倍希釈乳酸菌群は乳酸菌発酵液を2倍希釈したものをそれぞれ体重1kgあたり5ml投与した。コントロール群には蒸留水を体重1kgあたり5ml投与した。5分後、市販の大豆油を10%含むエマルジョン（イントラリピッド輸液10%、テルモ（株）、東京）を体重1kgあたり15ml投与した。

### 採血、血清トリグリセリド濃度の測定

投与開始前、投与60、120、180、240、300および360分後にラットの尾静脈から採血した。採血した血液を遠心分離し、血清トリグリセリド濃度の測定を行った。血清トリグリセリド濃度は、glycerol 3-phosphate oxidase・DAOS法によるトリグリセリドE-テストワコー（和光純薬工業、大阪）を用いて測定した。なお、本研究は「長崎県立大学動物実験指針」ならびに「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」（平成25年環境省告示第84号）に則って、本実験動物は長崎県立大学動物実験委員会の承認を得て実施した（承認番号29-33）。

### 統計処理

各群のデータは平均値  $\pm$  標準誤差で示した。有意差検定はTukey Kramer法により多重比較を行い、危険率5%未満で有意差ありとした。

### 1-3.試験結果

#### <実験1>

#### 体重、体脂肪率、ウエスト周囲径およびBMI

体重、体脂肪率、ウエスト周囲径およびBMIの推移を表2-2に示す。体重および体脂肪率はプラセボ飲料群および乳酸菌飲料群ともに試験期間中経時的に低下したが有意な変動は観察されなかった。ウエスト周囲径はプラセボ食品摂取群では8週間後にやや低下したが有意な変動はなかった。乳酸菌飲料群は経時的に低下した。BMIは摂取開始時とほぼ同じレベルで推移した。体重、体脂肪率、ウエスト周囲径およびBMIにおいて、各測定時に両群の間に違いは認められなかった。

表1-2.体重、体脂肪率、ウエスト周囲径およびBMI

項目	群	n	0週	4週	8週
体重(kg)	プラセボ飲料	16	52.1 ± 1.7	51.7 ± 1.8	51.4 ± 1.7
	乳酸菌飲料	17	53.6 ± 1.7	53.2 ± 1.7	52.6 ± 1.7
体脂肪率 (%)	プラセボ飲料	16	28.6 ± 1.0	28.1 ± 1.1	27.5 ± 1.2
	乳酸菌飲料	17	30.7 ± 1.0	30.0 ± 1.1	29.5 ± 1.2
ウエスト周囲径 (cm)	プラセボ飲料	16	68.1 ± 1.2	68.3 ± 1.4	66.3 ± 1.2
	乳酸菌飲料	17	71.5 ± 1.3	71.1 ± 1.8	68.0 ± 1.3
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	プラセボ飲料	16	21.1 ± 0.5	20.9 ± 0.5	20.8 ± 0.5
	乳酸菌飲料	17	21.4 ± 0.6	21.2 ± 0.6	21.0 ± 0.6

平均値±標準誤差



試験期間中の全被験者の内臓脂肪面積の推移を図 2-1 に示す。内臓脂肪面積はプラセボ食品摂取で摂取開始 4 週間後ほとんど変化しなかったが、摂取開始 8 週間後の値は摂取開始時よりやや高かった。乳酸菌飲料摂取では摂取開始から 8 週間後まで経時的に低下した。また、摂取開始 4 週間後に両群の間で有意な差は観察されなかったが、摂取開始 8 週間後において乳酸菌飲料摂取の被験者でプラセボ飲料摂取の被験者に対して有意に低値を示した。

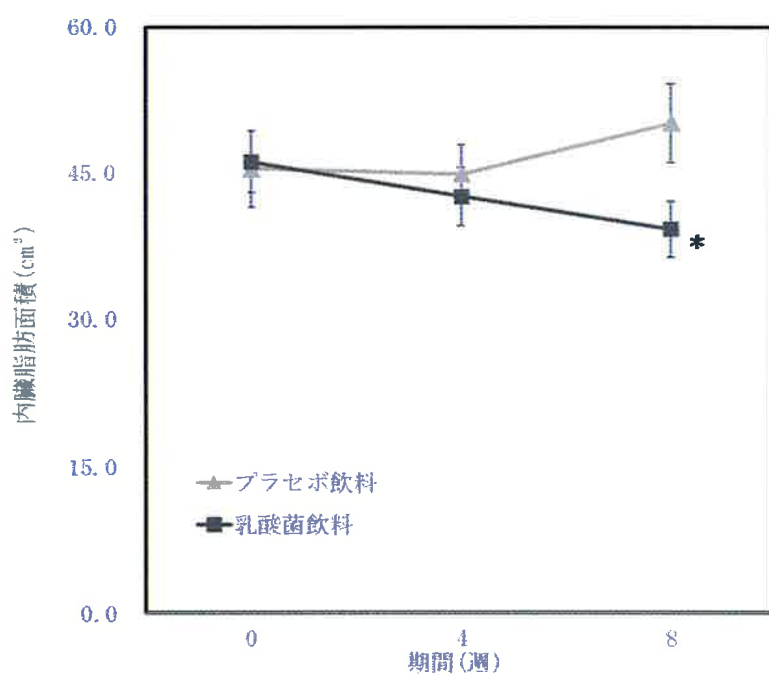


図 1-1.内臓脂肪面積の推移

\*, プラセボ飲料摂取群に対して有意差あり ( $p < 0.05$ )

試験期間中の全被験者の内臓脂肪面積の変化量の推移を図 2-2 に示す。内臓脂肪面積は 4 週間後で両群ともに減少したが、プラセボ飲料摂取よりも乳酸菌飲料で大きく減少した。摂取開始 8 週後でプラセボ飲料摂取の値が上昇したが、乳酸菌飲料摂取の値は減少したことから、摂取開始 8 週間後に乳酸菌飲料摂取はプラセボ飲料摂取に対して有意に低値を示した。

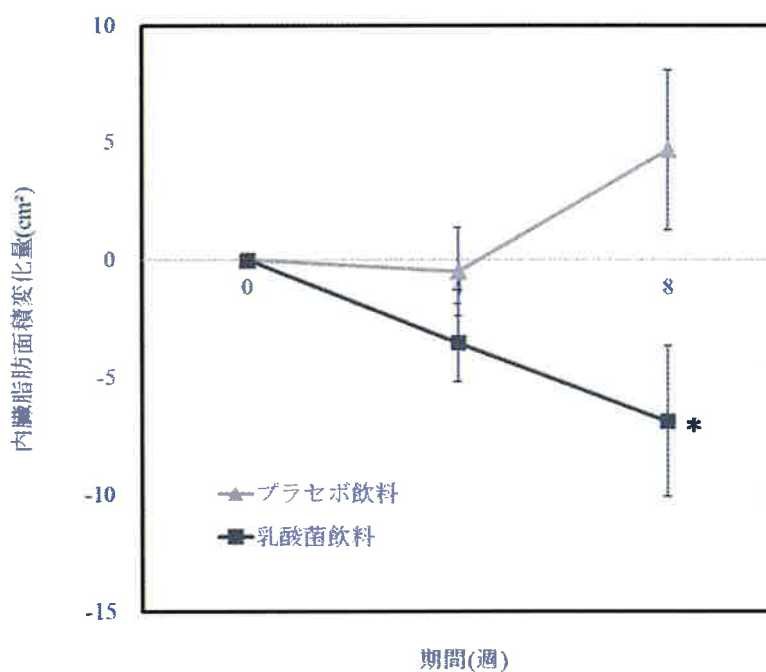


図 1-2.内臓脂肪面積変化量の推移

\*, プラセボ飲料摂取群に対して有意差あり ( $p < 0.05$ )

## <実験 2>

### 乳酸菌飲料投与後の血清トリグリセリド濃度

血清トリグリセリド濃度を図 4-1 に示す。投与開始前では血清トリグリセリド濃度はコントロール群で最も高く、乳酸菌原液群で最も低く、2 倍希釈乳酸菌群の値はその間であった。乳酸菌原液群は投与開始前コントロール群に対して有意に低値を示した。コントロール群において血清トリグリセリド濃度は投与 180 分後まで上昇しピークに達した。その後経時的に減少し、投与 360 分後には投与開始前よりやや高い値であった。乳酸菌原液群および 2 倍希釈乳酸菌群も同様に投与 180 分後まで上昇し、その後経時的に減少した。両群ともに投与 360 分後の値は投与開始前よりやや高かった。乳酸菌原液群は投与 300 分後コントロール群に対して有意に低値を示した。

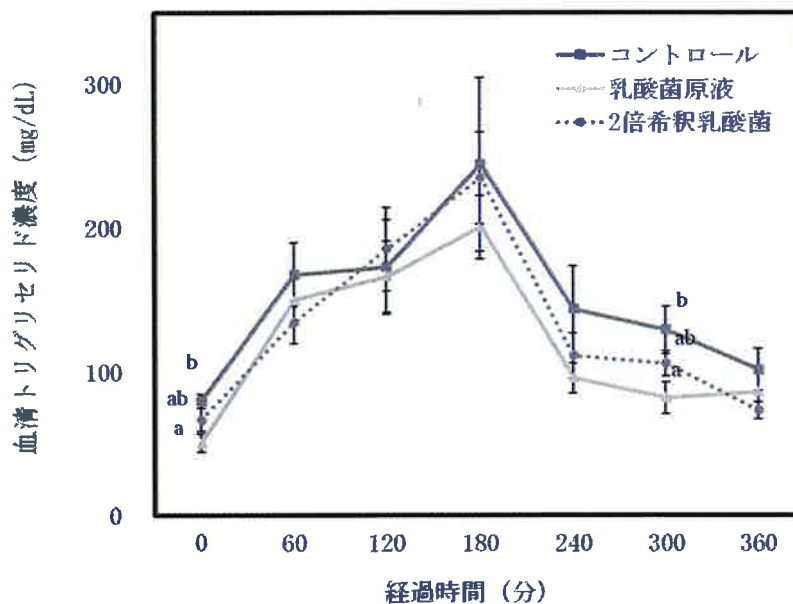


図 1-3.血清トリグリセリド濃度

a,b:異なる文字間で有意差あり ( $p < 0.05$ )

平均値±標準誤差 (n=8)

### 乳酸菌飲料投与後の血清トリグリセリド濃度変化量

血清トリグリセリド濃度の変化量を図4-2に示す。コントロール群において投与60分後の血清トリグリセリド濃度の変化量は乳酸菌原液群と同程度であった。投与180分後にはコントロール群で2倍希釈乳酸菌群とほぼ同じ値であった。乳酸菌原液群は投与120分後および240分後において2倍希釈乳酸菌群と同じ値であった。投与360分後の値はコントロール群に対しやや高かった。2倍希釈乳酸菌群において投与360分後コントロール群に対しやや低い値であった。乳酸菌原液群は投与300分後から360分後にかけて低下しなかった。その結果として投与360分後において乳酸菌原液群が最も高い値となった。血清トリグリセリド濃度の変化量にすべての時間において3群間で差は観察されなかった。

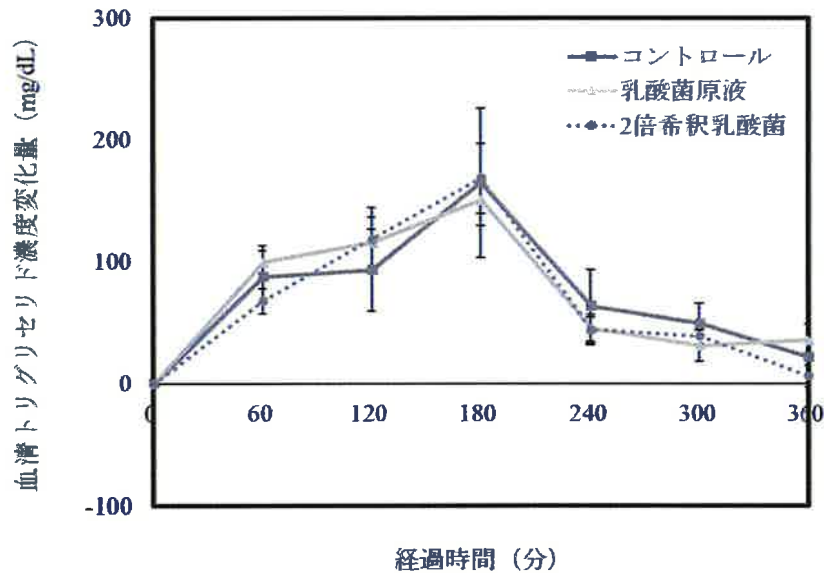


図1-4.血清トリグリセリド濃度変化量

平均値±標準誤差 (n=8)

## 1-4. 考察

乳酸菌はヒトにおいて内臓脂肪蓄積抑制効果[3,5]やコレステロール濃度低下作用[4]などの脂質代謝改善作用を有することが報告されている。本研究では長崎県のカラコ土壤より単離した乳酸菌 *Lactobacillus buchneri*、*Pediococcus ethanolidurans*、*Lactobacillus diolivorans* と酵母 *Pichia deserticola* を米ぬかおよび乳糖を含む培地で発酵させて製造した乳酸菌発酵液が体脂肪に及ぼす効果について検討した。本乳酸菌飲料をSDラットに4週間与えると肝臓トリグリセリド濃度が低下することが観察され脂質代謝に影響する可能性が報告されているが[4]、乳酸菌飲料のヒトの体脂肪に及ぼす効果については不明である。そこで本研究では、健常若年者を対象に本乳酸菌飲料を8週間摂取させた。

本乳酸菌飲料の長期摂取は体重、体脂肪、ウエスト周囲径およびBMIに影響しなかったが、内臓脂肪面積を低下させたことから、本乳酸菌飲料が内臓脂肪を減少させる効果を有する可能性が示唆された。内臓脂肪の蓄積に影響する原因として、体内での脂肪の合成および分解のバランス、小腸からの食事脂肪の吸収などが挙げられる。本乳酸菌飲料と油脂をラットに経口摂取させると、投与後血中トリグリセリド濃度の上昇が抑制されなかったことから、内臓脂肪の低下は小腸の吸収阻害以外のメカニズムが関与していると考えられる。以上の結果から本乳酸菌飲料が肥満や脂質異常症、メタボリックシンドロームなどの生活習慣病の予防に効果を発揮することが期待される。

## 参考文献

- 1) 瀧口隆一, 宮本真理, 望月英輔, 鈴木豊, 景山良治, 飯野久和: 発酵乳の摂取が健常成人の排便回数、排便量、便性および糞便内菌叢に及ぼす影響. *Journal of Intestinal Microbiology*, 2: 117-122 (1998)
- 2) 梶本修身, 中村康則, 屋田裕二, 森口盛雄, 平田洋, 高橋丈生: 酸乳の軽症および中等症高血圧者に対する降圧効果. *日本栄養・食糧学会誌*, 54: 347-354 (2001)
- 3) Kadooka Y, Sato M, Imaizumi K, Ogawa A, Ikuyama K, Akai Y, Okano M, Kagoshima M, Tsuchida T: Regulation of abdominal adiposity by probiotics (*Lactobacillus gasseri* SBT2055) in adults with obese tendencies in a randomized controlled trial. *European Journal of Clinical Nutrition*, 64: 636-643 (2010)
- 4) 田中(東)幸雄, 松村敦, 増田康, 齋藤正実, 小池田崇史, 山田敏広: ふなずし由来乳酸菌 NLB163 のヒトに対するコレステロール低下作用. *日本食品科学工学会誌*, 56: 184-190 (2009)
- 5) 前川敏広, 出雲貴幸, 井田正幸, 北川義徳, 柴田浩志, 福原育夫: *Lactobacillus pentosus* strain S-PT84 株の継続摂取による腹部内臓脂肪低減効果に関する探索的研究とその安全性—ランダム化二重盲検プラセボ対照並行群間比較試験—. *薬理と治療*, 46: 97-109 (2018)
- 6) 本田俊希: 卒業論文 崇城大学 (2017)
- 7) 厚生労働省 健康日本 21 (第二次) の推進に関する参考資料
- 8) 厚生労働省 平成 28 年国民健康・栄養調査
- 9) 農林水産省 平成 29 年産みかんの結果樹面積、収穫量及び出荷量
- 10) 農林水産省 平成 29 年度食料需給表
- 11) 農林水産省 果樹をめぐる情勢 (平成 30 年 9 月)
- 12) 農林水産省 平成 29 年産果樹生産出荷統計
- 13) Sugiura M, Nakamura M, Ikoma Y, Yano M, Ogawa K, Matsumoto H, Kato M, Ohshima M, Nagao A: High serum carotenoids are inversely associated with serum gamma-glutamyltransferase in alcohol drinkers within normal liver function. *Journal of Epidemiology*, 15: 180-186 (2005)

- 14) Nakamura M, Sugiura M, Aoki N: High beta-carotene and beta-cryptoxanthin are associated with low pulse wave velocity. *Atherosclerosis*, 184: 363-369 (2006)
- 15) Sugiura M, Nakamura M, Ikoma Y, Yano M, Ogawa K, Matsumoto H, Kato M, Ohshima M, Nagao A: The homeostasis model assessment-insulin resistance index is inversely associated with serum carotenoids in non-diabetic subjects. *Journal of Epidemiology*, 16: 71-78 (2006)
- 16) Sugiura M, Nakamura M, Ogawa K, Ikoma Y, Yano M: High serum carotenoids associated with lower risk for bone loss and osteoporosis in post-menopausal Japanese female subjects: prospective cohort study. *PLOS ONE*, 7: 1-9 (2012)
- 17) Sugiura M, Nakamura M, Ogawa K, Ikoma Y, Matsumoto H, Ando F, Shimokata H, Yano M: Associations of serum carotenoid concentrations with the metabolic syndrome: interaction with smoking. *British Journal of Nutrition*, 100: 1297-1306 (2008)
- 18) Sugiura M, Nakamura M, Ogawa K, Ikoma Y, Yano M: High serum associated with lower risk for the metabolic syndrome and components among Japanese subjects: Mikkabi cohort study. *British Journal of Nutrition*, 114: 1674-1682 (2015)
- 19) Takayanagi K: Prevention of adiposity by the oral administration of  $\beta$ -cryptoxanthin. *Frontiers in Neurology*, 2: 1-6 (2011)
- 20) 土田隆, 向井克之, 水野康司, 益子研士, 皆川佳奈枝: 温州みかん由来  $\beta$ -クリプトキサンチン含有飲料摂取による体脂肪低減効果の有用性の検討. *薬理と治療*, 36: 247-253 (2008)
- 21) 日本食品標準成分表 2015 年版 (七訂)
- 22) 農研機構, 金沢大学医薬保健学域, 愛媛大学, 京都大学, 浜松医科大学, 株式会社えひめ飲料:  $\beta$ -クリプトキサンチンの抗メタボ効果等に着目したカンキツ及びその加工食品の開発.