

耐塩性酵母（蔵華酵母）のラットにおけるストレス性下痢 改善効果

菅野友美¹⁾・浅井紀之²⁾・小竹久仁彦²⁾・山田禎賀¹⁾・西村篤寿²⁾

Effect of salt-tolerant yeast (Kurahana) on corticotropin releasing factor-induced diarrhea in rats

Tomomi KANNO, Noriyuki ASAI, Kunihiro KOTAKE, Sadaka
YAMADA and Atsuhisa NISHIMURA

乳酸菌や酵母は、整腸作用、コレステロール低減作用、睡眠改善作用などの様々な機能があることが確認されている。蔵華酵母は味噌由来の耐塩性酵母である。本研究ではストレス負荷時における下痢改善効果を確認することを目的とし、副腎皮質刺激ホルモン放出因子（CRF）を用いてストレス性下痢症状のラットにおける蔵華酵母の影響を調べた。その結果ラットモデルにおける CRF 誘発性下痢を有意に改善した。この効果は今回確認した他の耐塩性酵母や市販の酵母および酵母に含まれる B グルカンでは同様の効果が認められなかった。このことから蔵華酵母は胃腸の生理機能において重要な役割を果たしていることが示唆された。

Keywords : 耐塩性酵母, 蔵華, 下痢, 副腎皮質刺激ホルモン放出因子, ラット

Salt-tolerant yeast, KURAHANA, Diarrhea, Corticotropin releasing factor, Rats

1. 緒言

酵母は単細胞の真核微生物であり、古くから人類は発酵食品であるワイン、ビール、日本酒等の酒類、パン、ヨーグルト等の発酵乳、味噌や醤油等の製造に利用されてきた。また、酵母は生体の腸管内で定着または通過し、吸収または排泄されるが、その過程で身体に様々な作用を及ぼしていると考えられる。そのため近年、酵母の保健機能についても多くの研究が行われており、これまで抗腫瘍活性（Mifuchi, *et al.*, 1969）やコレステロール低下活性（Yoshida, *et al.*, 2004）、免疫調節作用（三枝ら., 2005）、整腸作用（Nakamura, *et al.*, 2001）等について研究されている。特に下痢・軟便の予防・軽減に関与する酵母として、*Saccharomyces boulardii*（Ragavan, *et al.*, 2020）、*Saccharomyces cerevisiae* CNCM I - 3856（Gayathri, *et al.*, 2020）の報告があるが、生菌の効果であることや、酵母単体では効果がないことが報告されている。下痢モデル動物は複数種あるが、中でも飼育後副腎皮質刺激ホルモン放出因子（Corticotropin Releasing Factor; CRF）を末梢注射することで下痢症状を模倣したモデルはストレス性下痢の動物モデルとして使用されている（Yuan, *et al.*, 2007）。

蔵華酵母 *Zygosaccharomyces rouxii*（Y1 株）はイチビキ株式会社が発見した味噌由来の酵母である。耐塩性菌であるため塩分が高くても増殖可能である。そのため、食中毒菌や汚染菌などが生育し難い塩濃度が高い条件で培養することで、選択的に培養することができ、更に簡易な培養設備で低コストに製造が可能である。

1) 愛知淑徳大学 健康医療科学部 健康栄養学科

2) イチビキ株式会社 研究開発部

本研究では下痢モデルラットを用いて蔵華酵母の摂取による下痢症状の改善効果を検討するとともにストレス性下痢の改善効果のある素材の探究を行った。

2. 実験方法

2.1. 実験動物

実験動物は生後4週齢の Sprague Dawley 系雄性ラット(日本エスエルシー株式会社より購入)を用い、飼育後 CRF (Anaspec 社) で下痢誘導した下痢モデルラットを使用した。

2.2. 飼料

ラット供試飼料は、通常食として市販飼料 F-2 固形飼料(株式会社フナバシファーム)を用いた。試験試料として蔵華酵母 Y1 株(イチビキ株式会社)を用い、市販飼料に 0.20%の割合で混合した飼料を調製した(実験 I)。

比較として酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* Y3 株(イチビキ株式会社)、酵母 *Candida famata* Y6 株(イチビキ株式会社)、酵母 *Pichia anomala* Y4 株(イチビキ株式会社)、市販のビール酵母 *Saccharomyces cerevisiae* (EBIOS 天然素材ビール酵母粉末, アサヒグループ食品株式会社)、酵母エキス *Candida utilis* (トルラ酵母 YE-KM, 味の素株式会社)を市販飼料にそれぞれ 0.20%になるよう混餌調製した。また酵母中の成分として食物繊維の β グルカン(パン酵母 β グルカン 85, 株式会社大地堂/ β グルカン 80%以上含有)を 0.02%の割合で混合した飼料も使用した(実験 II)。 β グルカンは Y1 株中に 7.5%含有するため、酵母 Y1 株を 0.20%の割合で混合した飼料には 0.015%含有することになる。そこで、酵母 Y1 株 0.20%含有飼料中 β グルカン量より多い 0.02%を配合してした餌を摂取した。なお、Y1、Y3、Y6、Y4 は加熱殺菌粉末として調整してから各実験に使用した。

2.3. 動物実験

実験 I : 4 週齢のラットを 4 群(対照群, 酵母 Y1 群, CRF 群, CRF+酵母 Y1 群)に分け、7 週齢まで 3 週間、愛知淑徳大学実験動物管理室にて飼育した。その間対照群 (n=11) および CRF 群 (n=9) には通常食を、酵母 Y1 群 (n=4) および CRF+酵母 Y1 群 (n=10) には Y1 株の酵母 0.20%の飼料を自由に摂食させた。飼育室は 12 時間の明暗サイクル (8:00 a.m.から 8:00 p.m.まで点灯)とした。水は自由に摂食させた。それぞれの飼料を 3 週間投与した後、体重測定し、CRF 群および CRF+酵母 Y1 群には 25 μ g/mL CRF を含む PBS (富士フィルム和光純薬株式会社) 溶液を 12.5 μ g/kg 体重となるよう腹腔内投与し、下痢誘導を行った。下痢誘導させない対照群と酵母 Y1 群は、同様に PBS を腹腔内投与した。

実験 II : 実験 I と同様に 4 週齢のラットを 8 群(対照群, CRF+酵母 Y1 群, CRF+酵母 Y3 群, CRF+酵母 Y4 群, CRF+酵母 Y6 群, CRF+市販のビール酵母群, CRF+酵母エキス群, CRF+ β グルカン群)に分け、実験 I と同様に飼育した。その間対照群 (n=4) には通常食を、CRF+酵母 Y1 群 (n=7) には酵母 Y1 株 0.20%の飼料を、CRF+酵母 Y3 群 (n=7) には酵母 Y3 株 0.20%の飼料を、CRF+酵母 Y4 群 (n=8) には酵母 Y4 株 0.20%の飼料を、CRF+酵母 Y6 群 (n=7) には酵母 Y6 株 0.20%の飼料を、CRF+市販のビール酵母群 (n=8) には市販のビール酵母 0.20%の飼料を、CRF+酵母エキス群 (n=7) には酵母エキス 0.20%の飼料を、CRF+ β グルカン群 (n=8) には β グルカン 0.02%の飼料を自由に摂食させた。それぞれの飼料を 3 週間投与した後、対照群は、PBS を腹腔内投与した。対照群以外の群は CRF を腹腔内投与し、下痢誘導を行った。

実験 I と実験 II で CRF または PBS 投与後、20 分間隔で 100 分間 (5 区分) の糞便を採取し、糞便重量を測定および便の色、形、硬さなど形態的特徴(便性状スコア)を記録した。便性状スコアは、Bristol stool scale (Lewis, *et al.*, 1997) を修正したものをを用いて評価した。すなわち便の形態は、普通便 (1 点: 水分をやや含み、黒色で表面に亀裂のある正常な固形便)、やや柔らかい便 (2 点: 水分を含み、茶色で滑ら

かで柔らかい形態の軽度の下痢)、泥状便 (3点: 水分を多くふくみ、茶色で柔らかい塊を伴う下痢)、水様便 (4点: 水分を非常に多く含み、茶色と粘り気のあり形がくずれていて水分が分離している重度の下痢) の点数で示した。これを用いて CRF 投与後、20 分ごとの下痢スコア、総下痢スコアを以下の式で算出した。また、実験Ⅱについては総下痢スコアが 4.0 以上の個体数から以下の式で下痢率を算出した。

下痢スコア = 20 分間の便重量 × 便性状スコア

総下痢スコア = 20 分ごと (5 区分) の下痢スコアの合計

下痢率 (%) = 総下痢スコア 4.0 以上の個体数 / 総個体数 × 100

実験Ⅰで便を採取し終えた後、対照群、CRF 群および CRF+酵母 Y1 群のラットに吸入麻酔をかけた上で心採血し、血清中のコルチコステロン量 (ng/mL) を ELISA kit (Corticosterone ELISA Kit, cayman 社 #501320) を使用して測定した。また、腸管内の環状アデノシン 3',5'-リン酸 (cAMP) 値 (pmol/mL) を ELISA kit (Cyclic AMP Select ELISA Kit, cayman 社 #501040) を用いて測定した。

これらの実験は、愛知淑徳大学の実験動物の飼養および使用に関する倫理指針に準拠して実施し、愛知淑徳大学動物使用倫理委員会の承認を得た (承認番号第 8 号)。

2.4. 統計処理

試料群間の有意差は多重比較検定の Tukey-Kramer 法を用いた。また、すべての研究において危険率 5% を有意水準とした。統計解析は統計解析ソフト「Excel 統計 2010」を用いた。

3. 結果および考察

3.1. CRF 誘発性下痢に対する蔵華酵母 Y1 株の影響

ラットの CRF 誘発性下痢に対する蔵華酵母 Y1 株の影響を総下痢スコアで評価し、その結果を図 1 に示した。対照群の総下痢スコア (0.95) と酵母 Y1 群の総下痢スコア (1.25) では有意差はみられなかったが、対照群と CRF 群の総下痢スコア (10.38) では対照群の総下痢スコアが CRF 群よりも有意に高い値であった。このことから、CRF 投与により、ストレス性下痢を誘発したことが確認できた。さらに CRF+酵母 Y1 群の総下痢スコア (4.94) は CRF 群よりも有意に低値を示した。

ラットに CRF 投与後、20 分毎に測定された CRF 誘導性下痢の時間依存的変化に対する酵母の影響を図 2 に示した。その結果、いずれの時間においても CRF+酵母 Y1 群の下痢スコアは CRF 群の下痢スコアよりも低い値を示した。特に、CRF 投与後 80 分で CRF+酵母 Y1 群の下痢スコア (0.05) は酵母 Y1 群の下痢スコア (0.06) と同様の下痢スコアまで低下した。

これらの結果から、蔵華酵母 Y1 株を 3 週間摂取することで、ストレス性下痢症状および時間依存的変化の両方が有意に改善されることが明らかになった。このことは、蔵華酵母 Y1 株の摂取がストレス性下痢症を改善するのに有効であることを示唆している。

CRF は、ストレスに対する運動および分泌反応を媒介に関与し、ラット結腸に投与されると、CRF1 受容体が活性化され、ストレス誘発性の結腸の運動および分泌反応を変化させる (Liu, *et al.*, 2016)。その結果、糞便排出量、イオン分泌などが増加し、下痢状態となる。従って、ラットに酵母を 3 週間摂取したことによる CRF 誘発性下痢症状の改善は、ストレスに対する結腸の反応や CRF によって誘導される管腔への水分排出を抑制していると推察される。

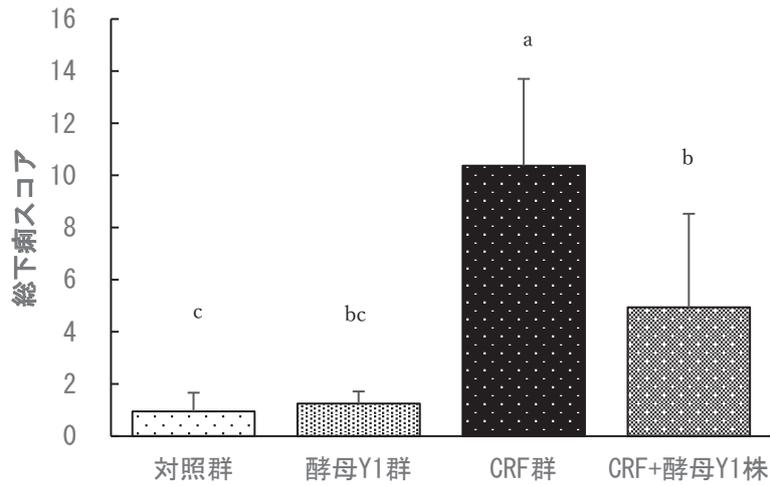


図1 CRF誘導性下痢に対する酵母の影響

アルファベットが異なる試料間で有意差有り ($p < 0.05$)

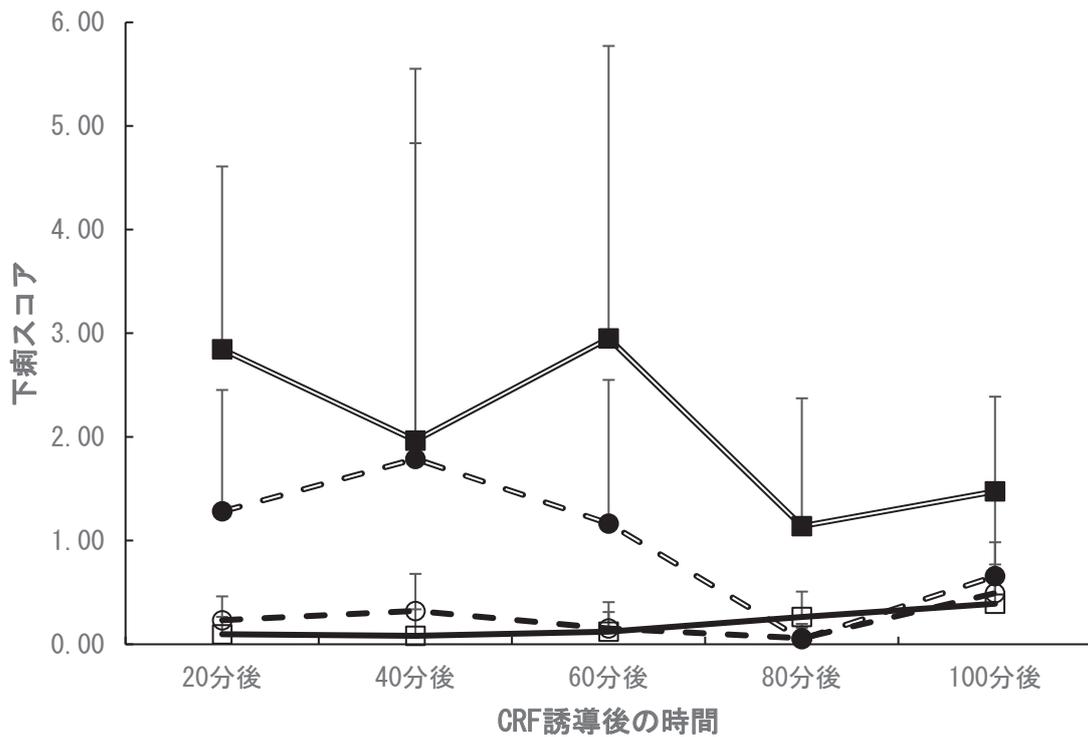


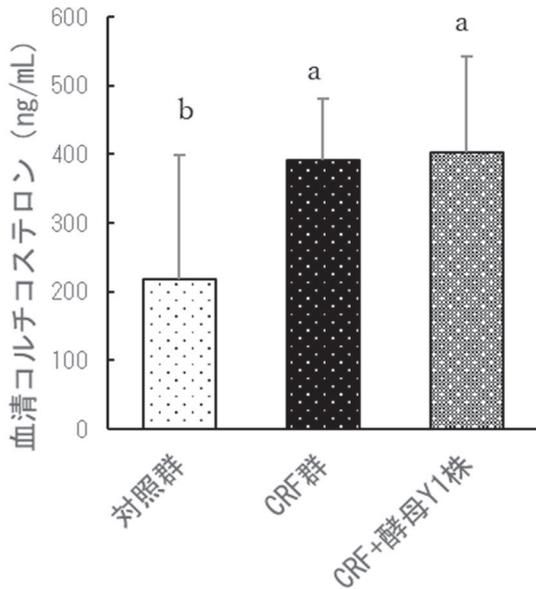
図2 CRF誘導性下痢の時間依存的変化に対する酵母の影響

□ ; 対照群, ○ ; 酵母 Y1 群, ■ ; CRF 群, ● ; CRF+酵母 Y1 群

3.2. CRF誘導性下痢に及ぼす蔵華酵母 Y1 株の作用機序の解明

酵母 Y1 株の摂取による CRF 誘導性下痢症状の改善が確認されたため、その作用機序を解明することが必要である。そこで、実験 I の対照群、CRF 群および CRF+酵母 Y1 群のラットの血清中のコルチコステロン量と腸管の cAMP 値を測定した (図 3)。

(A) 血清コルチコステロン



(B) 腸管 cAMP

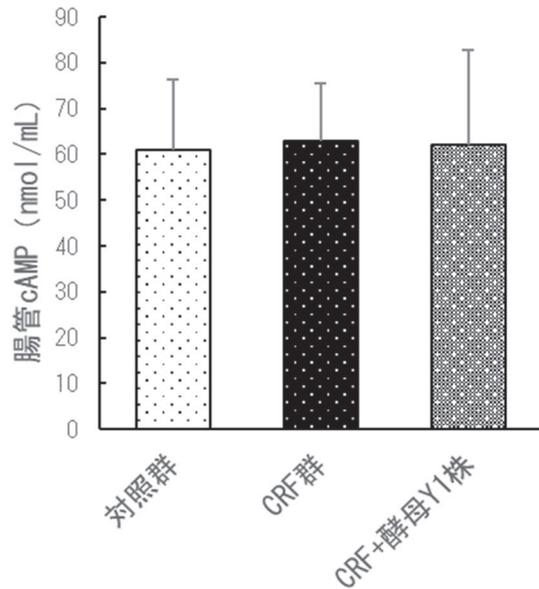


図3 CRF 誘導性下痢に対する酵母の血清コルチコステロン量および腸管 cAMP 値への影響

アルファベットが異なる試料間で有意差有り ($p < 0.05$)

ラットはストレス負荷により血中のコルチコステロン濃度が上昇することが知られており (Nemoto, *et al.*, 2013)、ストレスの指標となる。そこで CRF 投与によるストレス増加を酵母が抑制することで、下痢症状を緩和しているのではないかと考え、血清コルチコステロン量を測定した。その結果、CRF 群は対照群に比べて血清コルチコステロン量が有意に増加した (図 3 (A))。しかし CRF+酵母 Y1 群の血清コルチコステロン量は CRF 群より有意な減少が認められなかったことから、酵母の摂取が CRF 投与によるストレス増加抑制に関与していないことが示唆された。その作用機序については今後検討する必要がある。

下痢の発生機序には腸管運動亢進、浸透圧の亢進、そして腸液分泌亢進などがあげられる。そのうち分泌亢進による下痢は、腸管分泌刺激物質により引き起こされる cAMP あるいはカルシウムイオン依存性の塩素イオン分泌亢進により下痢が悪化する (杉ら, 2001)。そのため、下痢の発生機序が腸液分泌亢進によるものかどうか cAMP を測定した。その結果、図 3 (B) に示すようにいずれの群も有意な差が認められなかったことから、本実験は分泌亢進による下痢症状と関連性が薄いことが示唆された。Sugawara らは CP2305 株を用いて CRF 誘導下痢に対する乳酸菌の作用機序を検討し、CRF あるいはヒスタミンのシグナル伝達経路と関連する可能性を示唆している (Sugawara, *et al.*, 2019) ことから、作用機序の解明にはさらなる研究が必要である。

3.3. 異なる酵母の CRF 誘導性下痢に及ぼす影響

実験 I で明らかとなったラットの蔵酵母 Y1 株摂取による CRF 誘導性下痢の改善効果について、他の酵母についても検討した。即ち、ラットに酵母 Y1 株の他、5 種類の異なる酵母をそれぞれ 0.20% 摂取させて CRF で下痢誘導を行い、下痢スコアから下痢率を測定した。その結果、Y1 株を摂取したラットの下痢率が 29% で最も低値を示した (図 4)。

Saccharomyces cerevisiae について、過敏性腸症患者の便の硬さが改善された報告がある (Gayathri, *et al.*, 2020) が、本研究において加熱死菌である市販のビール酵母の下痢率が 63% であったことから、ビール酵母 (加熱死菌) は CRF 誘導のようなストレス性下痢に対しては改善効果が期待できないと思われ、蔵華酵母のような *Zygosaccharomyces rouxii* 特有の効果である可能性が示唆された。

耐塩性酵母の中でも酵母 Y3 株、Y4 株、Y6 株の下痢率はそれぞれ 71%、50%、86%でいずれも 50% 以上の下痢率であったことから CRF 誘導性下痢症状の改善は期待できないと思われる。酵母 Y1 株を摂取したラットは CRF で下痢誘導しているにもかかわらず、正常率が高いことから、酵母 Y1 株の摂取は CRF 誘導性下痢症状の改善に有効であると示唆された。

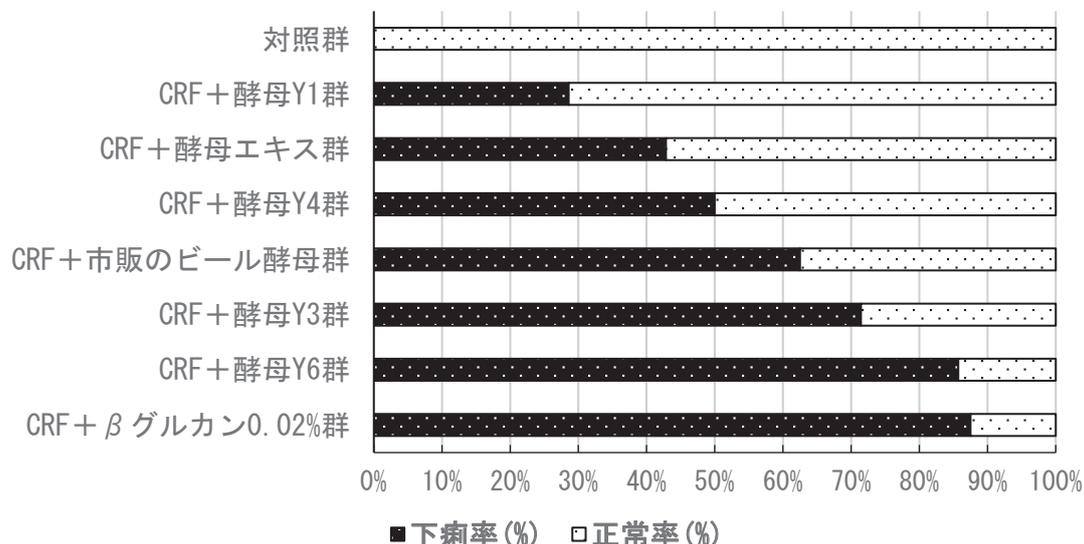


図4 CRF 誘導性下痢に対する異なる酵母および成分の下痢率

臨床において下痢症の患者に食物繊維が投与されている（堀内ら, 2014）。なかでも β グルカンはパン酵母においてラットの整腸作用が確認されており（福田ら, 2009）、黒酵母の β グルカンにおいても整腸作用やストレス改善作用が報告されている（鈴木ら, 2012）。本実験の蔵華酵母の効果も酵母内の β グルカンによる可能性がある。Y1 株中には β グルカンを 7.5%含有しているため、酵母 Y1 株中の β グルカン量より多い 0.02%を配合してした餌を摂取した結果、図4のように下痢率は 88%であり、下痢の改善効果は認められなかった。このことから、蔵華酵母 Y1 株の CRF 誘導性下痢症状の改善効果は β グルカン以外の原因物質が関与すると示唆された。今後は CRF 誘導性下痢の改善の作用機序を探索すると共に、酵母の性質と下痢の改善効果の原因物質の関連についても検討する必要がある。

4. 結論

酵母はミネラルや食物繊維の含有量が高いことや様々な生理活性機能があることから、機能的食品やサプリメントの素材として用いられている。蔵華酵母（Y1 株）はイチビキ株式会社が発見した味噌由来の耐塩性酵母で、塩分が高く雑菌汚染されにくい培地で製造可能なため、低コストで、利点大きい。本研究では酵母のストレス負荷による下痢の改善効果を検証するため、CRF 誘導性下痢ラットにおける蔵華酵母（Y1 株）摂取の影響を検証した。その結果、蔵華酵母（Y1 株）を 0.20%配合した飼料を 3 週間摂取することにより、ラットの CRF 誘導性下痢を有意に改善した。この効果は今回確認した他の酵母には認められなかった。また、この効果は β グルカンによるものではないことが判明した。これらの結果から、蔵華酵母（Y1 株）はストレス性症状を改善する機能的素材として新たな可能性を提示するものと期待している。

利益相反

本研究はイチビキ株式会社との共同研究の助成を受け、実施されたものである。

引用文献

- 福田伊津子・小土井理恵・久保麻友子・藤嶽暢英・藤田剛・芦田均（2009）パン酵母βグルカン摂取によるラットの盲腸内容物および糞便排泄に及ぼす影響，*生物工学会誌*, 87, 170-174.
- Gayathri, R., Aruna, T., Malar, S., Shilpa, B. & Dhanasekar, K. R. (2020). Efficacy of *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3856 as an add-on therapy for irritable bowel syndrome. *International Journal of Colorectal Disease*, 35, 139-145.
- 堀内景子・野澤奈々瀬・田辺真未・鈴木佑理・高橋尚保子・堤千晴・六ッ見しのぶ・藤谷順子（2014）急性期経鼻経管栄養法における栄養剤半固形化の下痢改善効，*静脈経腸栄養*, 29, 1225-1229.
- Lewis, S. J. & Heaton, K. W. (1997). Stool form scale as a use-ful guide to intestinal transit time. *Scand J Gastroenterol*, 32, 920-924.
- Liu, S., Chang, J., Long, N., Beckwith, K., Talhouarne, G., Brooks, J.J., Qu, M., Ren, W., Wood, J.D., Cooper, S. & Bhargava, A. (2016). Endogenous CRF in rat large intestine mediates motor and secretory responses to stress. *Neurogastroenterol Motil*, 28, 281-291.
- Mifuchi, I., Hosoi, M., & Yokokura, T. (1969). Promotion of resistance to Ehrlich ascites carcinoma cells by injection of tumor cells mixed with yeast cell wall. *Gann*, 60, 655-656.
- Nakamura, T., Agata, K., Mizutani, M., & Iino, H. (2001). Effects of brewer's yeast cell wall on constipation and defecation in experimentally constipated rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65, 774-780.
- Nemoto, T., Mano, A., Shibasaki, T. (2013). miR-449a contributes to glucocorticoid-induced CRF-R1 downregulation in the pituitary during stress. *Mol. Endocrinol.* 27, 1593-1602.
- Ragavan P. S. K., Kaur, A., Kumar, M., Singhal, V., Patel, A. M., Khunt, A., Shah, R., Wazeer, S., Rathod, R., Mane, A., Mehta, S. & Veligandla, K. C. (2020). Retrospective analysis of EMR database to assess the effectiveness of *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 in children with acute diarrhea during routine clinical practice. *New Microbes New Infect.*, 38, 100766.
- 三枝静江・細井知弘（2005）酵母が腸管上皮細胞の免疫応答に及ぼす作用，*醸協*, 100, 530-537.
- Sugawara, T., Sawada, D., Kaji, I., Karaki, S. & Kuwahara, A. (2019). The effects of viable and non-viable *Lactobacillus gasseri* CP2305 cells on colonic ion transport and corticotropin releasing factor-induced diarrhea. *Biomedical Research*, 40, 225-233.
- 杉和憲・齊藤治（2001）腸粘膜局所のOxidantによるCa⁺⁺及びcAMP依存性のCl⁻分泌亢進による下痢悪化のメカニズム，*消化と吸収*, 23, 21-24.
- 鈴木利雄・西川孝治・中村誠司・鈴木隆浩（2012）機能性食品素材に向けた黒酵母由来高純度β-1,3-1,6-グルカンの開発，*日本応用糖質科学会誌*, 2, 51-60.
- Yoshida, Y., Yokoi, W., Wada, Y., Ohishi, K., Ito M. & Sawada H. (2004). Potent hypocholesterolemic activity of the yeast *Kluyveromyces marxianus* YIT 8292 in rats fed a high cholesterol diet. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68, 1185-1192.
- Yuan, P. Q., Million, M., Wu, S. V., Rivier, J. & Tache, Y. (2007). Peripheral corticotropin releasing factor (CRF) and a novel CRF1 receptor agonist, stressin1-A activate CRF1 receptor expressing cholinergic and nitrgic myenteric neurons selec-tively in the colon of conscious rats. *Neurogastroenterol. Motil.* 19, 923-936.

（2023年 2月7日 受付）
（2023年 2月13日 受理）