

# 各種食物繊維源を摂取したマウスの腸内細菌代謝産物に関する研究

Study of metabolites by microbiota in mice fed several dietary fiber sources.

青江 誠一郎<sup>1,2</sup>, 不破 未貴<sup>2</sup>, 山岸 あづみ<sup>3</sup>, 瀬藤 琴音<sup>2</sup>  
Seiichiro Aoe<sup>1</sup>, Miki Fuwa<sup>2</sup>, Azumi Yamagishi<sup>3</sup>, and Kotone Koketsu<sup>2</sup>

<sup>1</sup>大妻女子大学, <sup>2</sup>大妻女子大学大学院人間文化研究科, <sup>3</sup>大妻女子大学人間生活文化研究所

キーワード : 腸内細菌, 食物繊維, 代謝産物

Key words : Microbiota, Dietary fiber, Metabolite

## 1. 研究目的

ヒトの腸管には約 1,000 種類, 100 兆個以上の腸内細菌が生息している。腸内では, 腸内細菌叢を形成し, 食物繊維などを発酵基質とすることで, 短鎖脂肪酸などの代謝産物を産生する。この短鎖脂肪酸は, 腸上皮細胞のエネルギー源となることや, 全身に発現する GPR41 や GPR43 受容体を介して食欲, 糖代謝, 脂質代謝に影響を及ぼす事が報告された。一方, 高脂肪食により増殖する LPS 産生菌やアミン, フェノール産生菌は, 腸のバリアシステムを脆弱化し, 生体内に毒素が吸収され, 様々な代謝疾患の引き金となることが知られている。そのような背景の中, 腸内細菌の解析が劇的に進歩した。次世代シーケンサーを用いて, ヒトや動物の腸内細菌叢を網羅的に解析し, 疾病との関係を見いだそうとする流れである。しかし, 腸内細菌叢が明らかとなっても, その菌叢がどのように疾病と関わるのかという因果関係を証明することはできない。そこで, 腸内細菌の代謝産物を解析し, どのような代謝産物が健康維持や疾病リスクと関わるのかを調べようとする試みとしてメタボロミクス解析が脚光を浴びている。

本プロジェクト研究では, 主要腸内細菌数と腸内代謝産物を解析し, 各種食物繊維源による代謝産物の違いを相互に比較することを目的とした。本年度では, 入手できた以下の 3 種の素材の評価を行った。

1) 大麦中の  $\beta$ -グルカンの効果 : 高  $\beta$ -グルカン大麦と  $\beta$ -グルカンを含まない大麦がマウスの腸内細菌叢と内臓脂肪蓄積に及ぼす影響を比較した。

2) 昆布中のアルギン酸の効果 : 水溶性食物繊維であるアルギン酸を含む昆布の摂取による腸内細菌叢と腸内代謝産物との関係を調べた。

3) 全粒小麦中のアラビノキシランの効果 : アラビノキシランを含む全粒小麦の摂取による腸内細菌叢変化と腸内代謝産物との関係を調べた。共通評価項目として, 腸内細菌叢の変化を属レベルで評価することを主目的とした。

## 2. 研究実施内容

1) 実験 1 : 大麦中の  $\beta$ -グルカンの効果

4 週齢の雄性 C57BL/6J マウス (n=16) を 1 週間予備飼育後, 1 群 8 匹の 2 群に無作為に群分けした。試験群は, ビューファイバー(以下 BF)の全粒粉群ならびに  $\beta$ -グルカンを含まない大麦(四国裸 84(bgl);以下 bgl)の全粒粉群とした。飼料は, 脂肪エネルギー比 50%となるようにラードを 20%配合した AIN-93G 飼料に, 総食物繊維量が 5%となるように BF 全粒粉を配合した。bgl 群も同量配合し, 総食物繊維量が 5%となるようにセルロースで調整した。その他, たんぱく質量, 脂質量も等しくなるように調整した。なお, 飼料中の  $\beta$ -グルカン含量は, BF 全粒群 2.2%, bgl 全粒群 0.0%であった。飼料組成を表 1 に示す。飼料および水は 12 週間自由摂取させた。解剖時には, 6 時間の絶食後, イソフルラン麻酔下で二酸化炭素により安楽死させ, 開腹して心臓より採血した。肝臓, 腹腔内脂肪組織及び盲腸を摘出し, 重量を測定した。試験最終週に採取した新鮮便を用いて T-RFLP 法

(Nagashima 法)により主要な腸内細菌叢を検索した。

T-RFLP(Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism)法は, 末端蛍光標識したプライマーセットで鋳型 DNA を PCR 増幅し, 制限酵素による切断後, フラグメント解析を行う方法である。フラグメント解析は, 塩基配列の違いにより制限

酵素の切断部位が異なることを利用し、検出ピークの強度、位置、数により評価・比較する断片多型性解析である。Nagashima 法は、ほぼ同じサイズのフラグメント長のものを"OTU(Operational Taxonomic Unit)"とし、これが腸内細菌の系統分類群毎に相対比を表すことができるため、手軽に腸内細菌叢を推定し、その変化を視覚化・数値化することが可能であるため使用されている。

統計処理は、対応のない t 検定または Welch の検定にて行った。

表 1. 実験飼料組成

	(g/kg)	
	β-グルカンなし大麦	高β-グルカン大麦
カゼイン	168.6	173.2
レーシチン	3	3
コーンスターチ	154.009	183.416
ショ糖	100	100
大豆油	70	70
ラード	191.3	187
セルロース	29.7	0.0
β-グルカンなし大麦	235.8	—
高β-グルカン大麦	—	235.8
AIN-93Gミネラル混合	35	35
AIN-93ビタミン混合	10	10
重酒石酸コリン	2.5	2.5
t-ブチルヒドロキノン	0.014	0.014

T-RFLP 法により検出された主要な腸内細菌の解析結果を以下に示す。

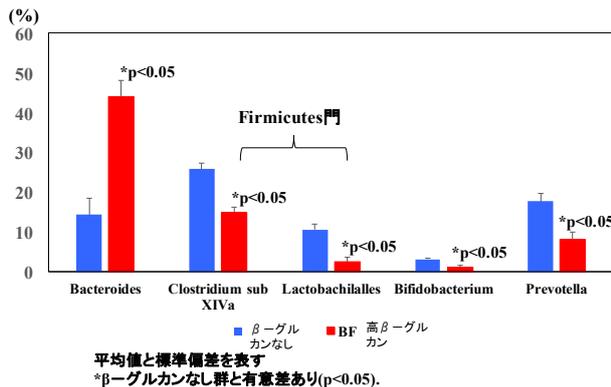


図 1. 高 β-グルカン大麦を摂取したマウスの腸内細菌叢

本結果より、高 β-グルカン大麦摂取により *Bacteroides* 属の比率が有意に上昇することが認められた。一方、Firmicutes 門に属する *Clostridium*

サブクラスター XIVa と *Lactobacillus* 属が有意に減少した。したがって、肥満度の指標と言われる Firmicutes 門/Bacteroidetes 門 (F/B) 比が減少することが認められた。本結果と一致して、内臓脂肪重量が高 β-グルカン大麦群で有意に低値を示した (図 2)。

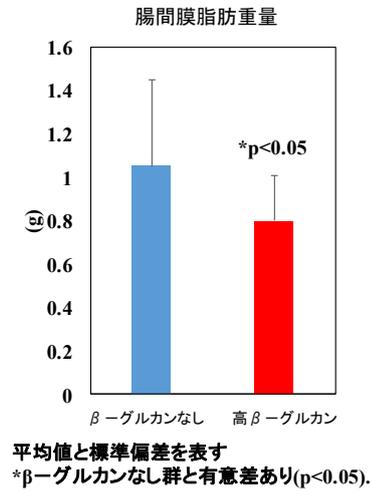


図 2. 高 β-グルカン大麦を摂取したマウスの内臓脂肪重量

## 2) 実験 2 : 昆布中のアルギン酸の効果

4 週齢の雄性 C57BL/6J マウス (n=16) を 1 週間予備飼育後、1 群 8 匹の 2 群に無作為に群分けした。試験群は、セルロースを食物繊維源とした対照群ならびに真昆布の乾燥粉末を配合した昆布配合群とした。飼料は、脂肪エネルギー比 50%となるようにラードを 20%配合した AIN-93G 飼料に、11%の昆布乾燥粉末を配合し、総食物繊維量が 5%となるようにセルロースで調整した。その他、たんぱく質量、脂質量も等しくなるように調整した。なお、飼料中のアルギン酸量は、3.4%であった。飼料組成を表 2 に示す。飼料および水は 12 週間自由摂取させた。解剖時には、6 時間の絶食後、イソフルラン麻酔下で二酸化炭素により安楽死させ、開腹して心臓より採血した。肝臓、腹腔内脂肪組織及び盲腸を摘出し、重量を測定した。摘出した盲腸内の腸内細菌叢ならびに短鎖脂肪酸濃度を測定した。

盲腸内容物から、「QIAamp DNA Stool kit」(QIAGEN 社)を用いてプロトコールに従い、DNA を抽出した。DNA 量を吸光度で測定し、260nm での吸光度が 0.1-1.0 であることを確認した。

腸内細菌数は、Applies Biosystems 7300 Real-Time

PCR System を用いた SYBER Green 法で測定した. DNA 溶液 (2  $\mu$ l) に *Bacteroides* 属, *Lactobacillus* 属, *Bifidobacterium* 属, *Prevotella* 属, *Atopobium cluster*, *Clostridium coccoides* グループ及び *Clostridium leptum* サブグループのそれぞれのプライマーを添加した SYBER Green 溶液 (10.5  $\mu$ l) を加えて増幅させた. 求められた Ct 値から, 検量線を用いてそれぞれの菌数を算出した. なお, 検量線は標準菌株から抽出した DNA 溶液を段階希釈して測定した Ct 値を用いて作成した.

表 2. 実験飼料組成

	g/kg diet	
	対照	昆布
アルファ化コーンスターチ	329.486	259.130
ミルクカゼイン	200.0	196.6
グラニュー糖 (ショ糖)	100.0	100.0
大豆油	70.0	70.0
ラード	200.0	197.1
セルロースパウダー	50.0	16.0
真昆布	-	110.6
ミネラルミックス	35.0	35.0
ビタミンミックス	10.0	10.0
L-シスチン	3.0	3.0
重酒石酸コリン	2.5	2.5
tブチルヒドロキノン	0.014	0.014

盲腸内要物の誘導体化は, 盲腸内容物を 10mg 測りとり, 100 $\mu$ M クロトン酸および濃塩酸, ジエチルエーテル加え TissueLyzerII (Quiagen 社)を用いてホモジナイズして有機酸を抽出した. 遠心分離 (3000rpm, 10min) 後, 上層 (エーテル層) を採取し, オキシム化, 誘導体化した. オキシム化, 誘導体化条件は以下の通りである.

オキシム化: メトキシアミン塩酸塩 40 mg/mL 10 $\mu$ L 添加, 30°C90 分間反応

誘導体化: MTBSTFA(SIGMA 社)を 90 $\mu$ L 添加, 37°C30 分間反応

装置: 7890 GC/5975C MSD with 7693 自動前処理機能付きオートサンブラ

カラム: DB-5ms + Duragurd (10m) 30m, 0.25mm, 0.25 $\mu$ m

注入量: 1 $\mu$ L

注入法: スプリット, 10:1

注入口温度: 250°C

オープン : 60°C(7min)-10°C/min-325°C(10min)

カラム流量: 1.1 ml/min (定流量モード)

インターフェース温度 : 290°C

イオン源温度: 250°C

測定モード: SIM モード測定

以下の標準物質を用いて, 10 種類の有機酸を同定し, 内部標準物質との比から濃度を算出した. 標準物質は, ギ酸, 酢酸, プロピオン酸, イソ酪酸, 酪酸, イソ吉草酸, 吉草酸, 乳酸, コハク酸を用いた (いずれも和光純薬 (株) 製). 統計処理は, 対応のない t 検定または Welch の検定にて行った.

図 3 に変化の見られた腸内細菌を示す. また, 表 3 に短鎖脂肪酸量を示す.

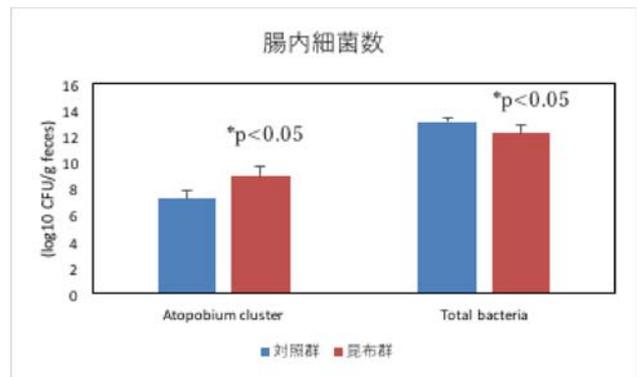


図 3. 昆布を摂取したマウスの盲腸内総菌数と *Atopobium cluster* 菌数

平均値と標準偏差を表す.

\*対照群と有意差あり (p<0.05)

表 3. 昆布を摂取したマウスの盲腸内短鎖脂肪酸量

	対照	昆布
酢酸 ( $\mu$ mol/g cecum)	10.0 $\pm$ 1.3	11.9 $\pm$ 0.90
プロピオン酸 ( $\mu$ mol/g cecum)	1.3 $\pm$ 0.1	1.7 $\pm$ 0.1
イソ酪酸 ( $\mu$ mol/g cecum)	0.4 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.1
酪酸 ( $\mu$ mol/g cecum)	3.3 $\pm$ 0.3	1.9 $\pm$ 0.2
イソ吉草酸 ( $\mu$ mol/g cecum)	0.4 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.1
吉草酸 ( $\mu$ mol/g cecum)	0.7 $\pm$ 0.0	0.4 $\pm$ 0.0
乳酸 ( $\mu$ mol/g cecum)	0.7 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.1*
総短鎖脂肪酸 ( $\mu$ mol/g cecum)	16.1 $\pm$ 0.9	16.5 $\pm$ 0.8

数値は平均 $\pm$ 標準偏差を示す.

\*p < 0.05 で有意差がある.

本結果より, 昆布摂取により総腸内細菌数が増えることはなく, 有意に減少した. 一方, *Actinobacteria* 門に属する *Atopobium cluster* の菌数のみが有意に増加した. アルギン酸を発酵できる菌の可能性がある. 総菌数の結果を受けて短鎖脂肪酸量に大きな差は認められなかった. 唯一, 有機酸である乳酸量が昆布群で有意に高かった.

3) 全粒小麦中のアラビノキシランの効果

4 週齢の雄性 C57BL/6J マウスを 1 週間予備飼育後、1 群 10 匹の 2 群に無作為に群分けした。試験群は、小麦粉群と全粒小麦粉群とした。全粒小麦飼料は、脂肪エネルギー比 50%となるようにラードを 20%配合した AIN-93G 飼料に、全粒小麦を粉碎して均一にした粉末を 60%配合し、総食物繊維量を 5%とした。小麦粉飼料は、同様の AIN-93G 飼料に、小麦粉を 60%配合し、セルロースを加えて総食物繊維量を 5%とした。その他、たんぱく質量、脂質量も等しくなるように調整した。飼料および水は 11 週間自由摂取させた。

解剖時には、8 時間の絶食後、イソフルラン麻酔下で二酸化炭素により安楽死させ、開腹して心臓より採血した。その後、肝臓、副睾丸周辺脂肪、後腹壁脂肪及び盲腸を摘出し、重量を測定した。盲腸内腸内細菌叢と短鎖脂肪酸量は 2) の実験と同一の方法で実施した。統計処理は、対応のない t 検定または Welch の検定にて行った。

以下に、差が検出された腸内細菌の菌数を示す。多糖類を分解する *Prevotella* 属が小麦粉群に比べて、全粒小麦粉群で菌数が有意に多かった。*Prevotella/Bacteroides* 属比が高いと耐糖能が良いことが報告されており、全粒小麦粉群での *Prevotella* 属の増加は糖代謝に影響した可能性がある。*Bifidobacterium* 属も、小麦粉群に比べて、全粒小麦粉群で菌数が有意に多かった。全粒小麦粉でビフィズス菌が増える作用はアラビノキシランを利用した可能性がある。

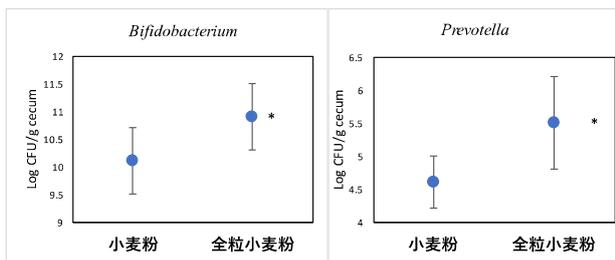


図 4. 全粒小麦を摂取したマウスの盲腸内 *Bifidobacterium*, *Prevotella* 属の菌数  
平均値と標準偏差を表す。  
\*小麦粉と有意差あり (p<0.05)

図 5 に酢酸、総短鎖脂肪酸量を示す。短鎖脂肪酸のうち、酢酸が最も多かったが、その差はわずかであった。小麦粉と全粒小麦粉で群間差が認め

られなかった。全粒小麦粉と小麦粉で水溶性食物繊維量に大きな差がなかったためか、明期になって 8 時間後に解剖時したため短鎖脂肪酸が吸収された後に測定したかいずれかの可能性が考えられる。

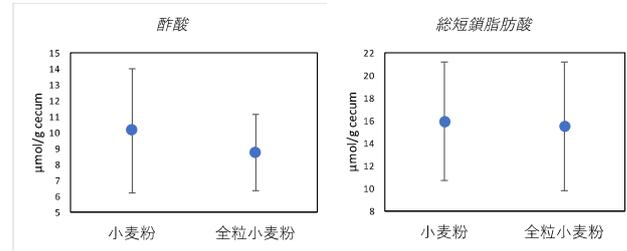


図 5. 全粒小麦を摂取したマウスの盲腸内酢酸、総短鎖脂肪酸濃度  
平均値と標準偏差を表す。

3. まとめと今後の課題

1) 大麦中の β-グルカンの効果：高 β-グルカン大麦と β-グルカンを含まない大麦がマウスの腸内細菌叢に及ぼす影響を比較した結果、糞便中の *Bacteroides* 属の増加が認められた。

*Firmicutes/Bacteroidetes* 比の低下により、内臓脂肪重量が低下したものと推定した。高 β-グルカン大麦と短鎖脂肪酸濃度の関係についての検討が今後の課題である。

2) 昆布中のアルギン酸の効果：水溶性食物繊維であるアルギン酸を含む昆布の摂取による腸内細菌叢と腸内代謝産物との関係を調べた。その結果、総菌数は有意に減少したが、一方で *Atopobium cluster* の菌数が増加した。短鎖脂肪酸の産生が変化しなかったが、乳酸の増加が認められた。昆布はマウスの腸内細菌に利用されにくいのか、高脂肪食などの影響で差は見られなかったのか、さらに追試が必要である。

3) 全粒小麦中のアラビノキシランの効果：アラビノキシランを含む全粒小麦の摂取による腸内細菌叢変化と腸内代謝産物との関係を調べた。その結果、*Prevotella* 属、*Bifidobacterium* 属の増加が認められた。全粒小麦のアラビノキシランは発酵性が高いことが認められた。しかし、短鎖脂肪酸酸性との関係が認められなかった。今後、腸内発酵と短鎖脂肪酸の結果の不一致の原因を調べる予定である。

今回は、共通評価項目として、腸内細菌叢の変化を属レベルで評価した結果、食物繊維の種類によって増加する腸内細菌が異なることが判明した。

このような食物繊維の種類比較はあまり報告がなく、重要な知見を得ることができた。

#### 4. この助成による発表論文等

##### 学会発表

- [1] 第 64 回日本食品科学工学会(日本大学)
- [2] 2018 年度日本農芸化学会総会 (名城大学)
- [3] 第 18 回日本抗加齢医学会総会(大阪国際会議場)