

豆乳乳酸菌発酵物のヒト介入試験による腸内細菌叢の解析 ならびに代謝産物の測定（解析方法の検討報告）

Analysis of fecal microbiota and metabolites in human volunteers consumed soybean-milk fermented products of lactic acid bacteria.

伊藤 幸恵
Yukie Ito

大妻女子大学人間生活文化研究所
Institute of Human Culture Studies, Otsuma Women's University

キーワード：腸内細菌叢，短鎖脂肪酸，乳酸菌
Key words : Intestinal microbiome, Short-chain fatty acids, Lactic acid bacteria

1. 研究目的

近年，乳酸菌，ビフィズス菌等を用いた豆乳発酵物がヒトの健康の維持増進を目的に広く用いられており，腸内環境の改善，乳がんや大腸がんの抑制，血圧調整，糖尿病改善など多くの健康効果を有することが報告されている¹⁾．特に，腸内環境の改善に関しては腸内有用菌の増殖促進，有害菌の増殖抑制，また腸内代謝産物の有機酸濃度の上昇等が報告されている．しかし，これまでの解析法は属レベルの変動を調べたにすぎず，菌種レベルの変動については報告が少ない．腸内細菌を網羅的に解析し，腸内細菌の多様性とヒトの健康効果に関して示されたデータは少ないのが現状である．そこで，次世代シーケンサー（NGS）を用いて解析することにより，豆乳乳酸菌発酵物が腸内細菌叢の多様性に与える影響を解析すると同時に，ガスクロマトグラフィー・質量分析装置（GC-MS）を用いて腸内代謝産物を測定し，腸内細菌叢の変動との関連を詳細に検証することが最終目標である．

大腸で作られる食物繊維や難消化性オリゴ糖など腸内細菌が分解して作り出す短鎖脂肪酸は近年，エネルギー源としてだけでなく，健康を維持する多くの生理作用を有することが知られている．その働きは肥満抑制，血糖値調整，がん細胞の増殖抑制，アレルギー抑制など多岐にわたり，中でも短鎖脂肪酸の1つである酪酸は免疫調整をつかさどる Treg 細胞を増やすことから特に注目されている²⁾．現在酪酸をはじめとした短

鎖脂肪酸産生菌が数多く同定されつつある．そこで今回，男女ボランティア 16 名から提供された糞便を用いて，腸内細菌叢と短鎖脂肪酸の関係について検討した．

2. 研究実施内容

2.1 NGS による糞便中細菌叢解析

健康な 7 歳から 80 歳までのボランティア男女 16 名（平均年齢 55.5 歳，男女比 8 (46.1 歳) : 4 (62.9 歳)）を対象とし，ボランティアには食事やサプリメント飲用の制限は行わなかった．採取した糞便は，「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．NGS 解析は口腔常在微生物叢解析センター（香川県高松市）に依頼し，16S rDNA の V3-V4 領域を Miseq (イルミナ株式会社)にて解析した．

2.2 糞便中の有機酸の分析

糞便の一定重量を測りとり 100 μ M クロトン酸（内部標準物質）および濃塩酸，ジエチルエーテルを加え，TissueLyzerII (Quiagen 社)を用いてホモジナイズ後遠心分離（3000rpm，10min）し，エーテル層を有機酸抽出物とした．有機酸抽出物の誘導体化はメトキシアミン塩酸塩 40 mg/mL 10 μ L 添加，30 $^{\circ}$ C，90 分間反応にてオキシム化後，

N-メチル-N-tert-ブチルジメチルシリル トリフルオロアセトアミド (MTBSTFA, SIGMA 社) を 90 μ L 添加，37 $^{\circ}$ C，30 分間反応にて誘導体化を行った．GC-MS 装置は 7890 GC/5975C MSD with 7693

自動前処理機能付きオートサンブラ（アジレント・テクノロジー株式会社）を使用し、カラムは DB-5ms + Duragurd (10m) 30m, 0.25mm, 0.25 μ m を用いた。MS 分析部はインターフェース温度 290 $^{\circ}$ C, イオン源温度 250 $^{\circ}$ C, スキャン測定, 質量範囲 m/z 50-600 にて測定を行った。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 (和光純薬) を用い, 内部標準物質との比から糞便中濃度を算出した。

2.3 統計解析

統計処理は統計ソフト (StatMateIV) を用いて, ピアソンの相関係数の検定を行った。

3. 試験結果

3.1 糞便中細菌叢解析結果

図 1 に糞便中細菌叢の属レベルにおける菌種構成を示す。組成比率の高い属としてバクテロイデス, プレボテラ, ルミノコッカスの 3 属が観察された。腸内細菌叢は常在菌の分布の違いによる分類がなされており, その分布は性別や人種には左右されず食習慣が影響することが知られており, バクテロイデス, プレボテラ, ルミノコッカス属の 3 つのエンテロタイプに分けられるとの報告がある³⁾。今回の結果から 3 属の組成比を算出するとバクテロイデス属優勢タイプ, プレボテラ優勢タイプのおよそ 2 群に分けられ, ルミノコッカス属は検出例においても他より劣勢であった (図 2)。

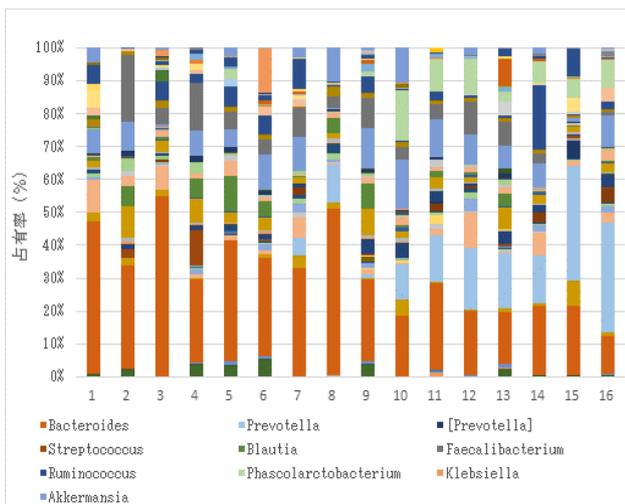


図 1 : 糞便中における属レベルの細菌構成

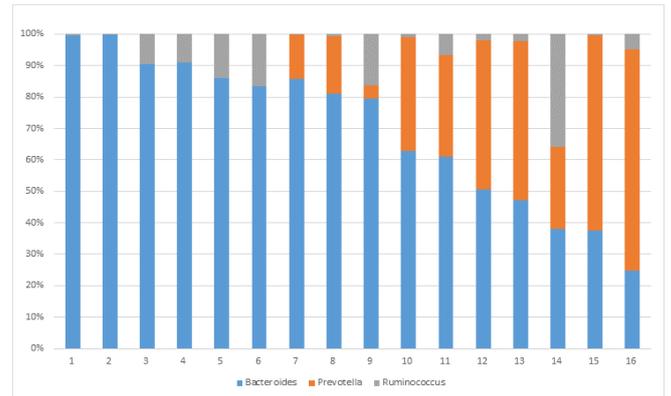


図 2 : バクテロイデス, プレボテラ, ルミノコッカス属の組成比 (3 属の合計に対する比率)

3.2 糞便中有機酸分析結果

糞便中の有機酸量を図 3 に示す。各例とも 9 割以上が酢酸, プロピオン酸, 酪酸で占められ, その比はおおよそ 2:1:1 であった。

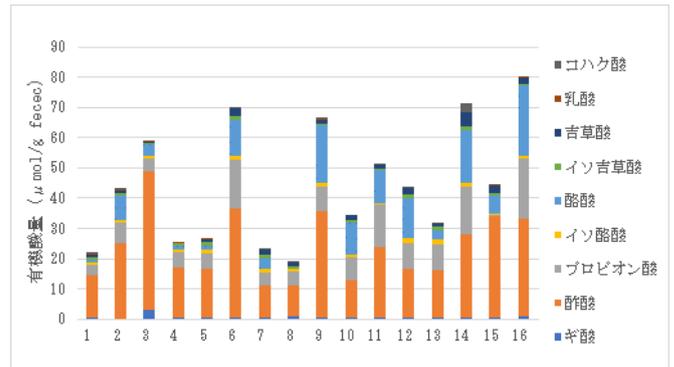


図 3 : 糞便中の有機酸量

3.3 糞便中の短鎖脂肪酸量と腸内細菌との相関

バクテロイデス, プレボテラ, ルミノコッカス属はいずれも短鎖脂肪酸産生菌を含むとされているが, 種まで同定がなされているものは少ない。そこで, 属レベルで短鎖脂肪酸量との相関性をみたところ, ルミノコッカス属の占有率と短鎖脂肪酸量に有意な相関 ($P < 0.05$) が認められた (図 4)。バクテロイデス, プレボテラ属では有意な相関は認められなかった。

一方, 短鎖脂肪酸産生菌として同定されている菌種として *Faecalibacterium prausnitzii*⁴⁾, *Prevotella copri*⁵⁾ の 2 菌種が報告されている。図 5 にこの 2 菌種の合計占有率と短鎖脂肪酸量の相関図を示すが, 相関の傾向は見られたが有意な差は認められなかった。

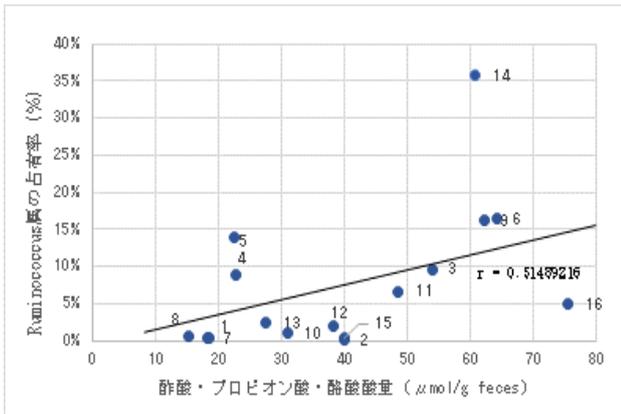


図 4：糞便中の短鎖脂肪酸量とルミノコッカス属の相関

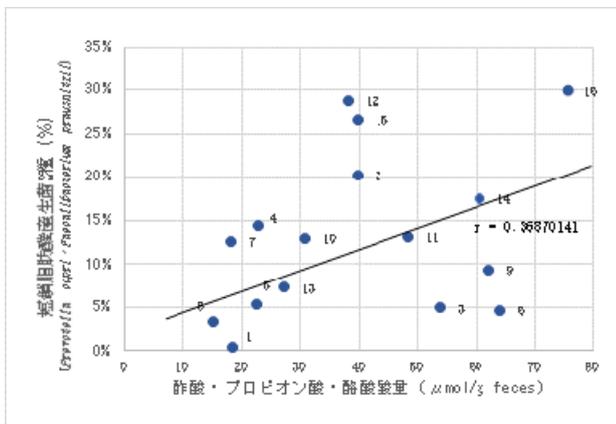


図 5：糞便中の短鎖脂肪酸量と *Prevotella copri*, *Faecalibacterium prausnitzii* 合計の相関

4. まとめと今後の課題

本試験により、腸内細菌叢は被験者によって大きく異なることが改めて示され、介入試験実施の際においては被験者数、エンテロタイプなど考慮すべき項目の概要が明らかとなった。特に今回実施しなかった食習慣や生活習慣のアンケートを通して腸内細菌叢に与える影響を調査しておくことは今後の介入試験に必要と考えられる。

糞便中短鎖脂肪酸濃度においても被験者数を増やすことにより有意な相関が得られることが予想された。また短鎖脂肪酸を生産する他の菌種との相関性についても今後検討が必要と考えられる。さらに短鎖脂肪酸以外の腸内代謝産物についても GC-MS を用いた網羅的解析法の検討を行う予定である。

5. 参考文献

- 1) 新 良一, 伊藤幸恵ら. 豆乳の乳酸菌発酵産物が腸内細菌および大腸がん発がんに及ぼす影響. 腸内細菌学雑誌 2014; 28: 15-24.
- 2) Furusawa Y, Obata Y et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. Nature 2013;19;504 (7480): 446-450.
- 3) Arumugam M, Raes J et al. Enterotypes of the human gut microbiome. Nature 2011; 12; 473 (7346) : 174-180.
- 4) Pituch A, Walkowiak J et al. Butyric acid in functional constipation. Prz Gastroenterol 2013; 8 (5) : 295-298.
- 5) Pedersen HK, Gudmundsdottir V et al. Human gut microbes impact host serum metabolome and insulin sensitivity. Nature 2016; 535: 376-381.