

嫌気培養装置を用いた昆布の腸内細菌による発酵特性の検討

Fermentation Characteristics by Human Intestinal Microbiota using Anaerobic Fermenter

青江 誠一郎¹, 山中 千恵美², 鈴木 祥菜³Seiichiro Aoe¹, Chiemi Yamanaka², and Sachina Suzuki³¹大妻女子大学家政学部, ²つくば国際大学医療保健学部, ³東京医療保健大学医療保健学部

キーワード: 昆布, 嫌気培養装置, 発酵, 腸内細菌

Key words: Kombu, Anaerobic Fermenter, Fermentation, Intestinal microbiota

1. 研究目的

近年になって, 心筋梗塞, 脳卒中, 循環器疾患, 2 型糖尿病, 乳癌, 胃癌, 大腸癌の疾患の原因または増悪因子として, 腸内細菌叢の乱れが関係しているという報告が増えてきた. ヒトの腸には約 1000 種類の細菌が共生しており, 全体として腸内細菌叢を形成している. 次世代シーケンサーというゲノムを一斉解析する装置を用いて腸内細菌叢の解析が行われた結果, 炎症性腸疾患, 肥満, 糖尿病, がん, 動脈硬化, 自閉症など, さまざまな疾患と腸内フローラの異常とが関係していることが報告された. この腸内細菌叢の乱れはディスバイオーシス (dysbiosis) とよばれており, 細菌の種類減少 (多様性の低下) や, 本来あまり多くない細菌種の異常な増加, あるいは, 有用菌と言われている細菌種の減少などが起こる. すなわち, ディスバイオーシスとは腸内細菌叢の乱れにより, 腸内全体として機能的に劣った細菌群の構成と言える. 難治性の潰瘍性大腸炎などいくつかの疾患に対しディスバイオーシスの改善が重要な治療法となること, 便の移植の治験などから注目されている. 食生活を中心とした生活習慣と腸内細菌叢の関係は, 高脂肪, 低食物繊維食により, 腸内細菌叢の多様性が低下し, 構成菌種が変化すると報告されている. このように, ヒトの健康に大きく関与している腸内細菌叢を健康な状態に維持するために, どのような食物繊維を摂取したらよいか注目が集まっている.

日本人の食物繊維摂取源として重要な食品に, 穀類, 豆類, 根菜類, 海藻類が挙げられる. 昆布には, 他の食品素材よりも多くの食物繊維が含まれており, 特に水溶性食物繊維のアルギン酸ナトリ

ウムは, 血中コレステロールの低下作用, 血糖値上昇抑制作用など多くの健康維持に関する機能性があることが報告されている[1,2].

昆布には, アルギン酸ナトリウム以外の水溶性食物繊維としてラミナラン, フコイダンも含まれているが, ヒトを対象とした腸内細菌叢への影響は, これまでに報告はない. 我々は, 脱ヨウ素加工した昆布粉末の摂取が健康成人の腸内細菌叢に及ぼす影響を調べた結果, *Bacteroides* 属の増加を見出したが, 糞便中の短鎖脂肪酸濃度の増加が観察されなかった. それ以外に, 日本人を対象として, 昆布摂取による腸内細菌叢に及ぼす影響を検討した報告は見あたらない. 大腸内で産生された短鎖脂肪酸は速やかに 95% 以上が吸収されることが報告されている[3]. したがって, 糞便中の短鎖脂肪酸は, 吸収されなかった 5% 未満の量を測定していることになる. そこで本研究では, 嫌気培養装置を用いて, 糞便培養を行い, ヒト介入試験で使用した脱ヨウ素昆布を人工消化して培養装置に添加して, 経時的に短鎖脂肪酸の産生糖と腸内細菌叢の変動を調べることにした.

2. 研究実施内容

ヒト糞便を用いた *in vitro* 腸内発酵試験を行った. 研究計画書は, 大妻女子大学倫理委員会にて承認を得た (承認番号: No.04-013). 糞便ドナー 3 名に対しては, 試験内容を説明し, 試験参加への同意書を書面にて取得した. また, ヒトを対象とする医学系研究に関する倫理指針およびヘルシンキ宣言に則り, 医学倫理に配慮して実施した. 糞便ドナーは 30 歳以上 70 歳以下の日本人女性 1 名と男性 2 名の計 3 名で行った.

昆布は、60 分間煮沸してヨウ素を低減化した乾燥昆布を用いた。乾燥昆布中の、プロスキー法で求めた総食物繊維量は 59.6%であった。また、アルギン酸量は、50.8%であった。ヨウ素は、7.1mg/100g であった。

嫌気培養装置に添加するにあたり、ヒトの体内での消化を想定し、AOAC Method 991.43 (プロスキー変法) に準じて、前処理を行った。

前処理は、はじめに MES-TRIS 緩衝液 (MES : 2- (N-Morpholino) ethane sulfonic acid, TRIS : Tris (hydroxymethyl) aminomethane) に乾燥昆布を懸濁し、熱安定 α -アミラーゼによって、残存するでんぷんを分解した。次に、プロテアーゼによって、たんぱく質のペプチド結合を分解し、最後にアミログルコシダーゼによって、熱安定 α -アミラーゼによって分解された糖鎖をブドウ糖にまで分解し、その後エタノールを加えて沈殿を生成させた後、吸引ろ過で沈殿を回収した。得られた沈殿をエタノール及びアセトンで洗浄することで、酵素分解されなかった沈殿物中の脂質を洗い流し、その後、沈殿物を 50°C で 16 時間乾燥した。

in vitro 腸内発酵試験は、福島ら[4,5]の方法を参考にして、新鮮なヒト糞便を用いて行った。

BME-25NC-M 型培養装置 ((株) バイオット, 東京) に蒸留水を加え、オートクレーブ滅菌を行った。生理食塩水で調製した糞便懸濁液を滅菌した培養装置に加えた後、窒素ガスを常時送入したバブリングを行い嫌気状態とし、温度 37°C, 下限 pH を 5.5 に設定し、採取した便由来の基質の影響が出ないように、培養前に 12 時間の空培養を行った。その後、各種試料およびニュートリエントブロス (NB) (Difco, Sparks, MD, USA) を添加し、48 時間の培養試験を開始した。ヒト糞便は、培養液の 2% となるように添加した。培養液中の乾燥昆布およびポジティブコントロールのイヌリン (フジ FF, フジ製糖(株)) は、3% となるように添加した。NB の添加量は、培養液の 0.8% となるように調製した。

培養液のサンプル採取は培養開始から 0, 1, 12, 24, 36, 48 時間後にそれぞれ行い、それらを短鎖脂肪酸量の分析に用いた。また、0, 12, 48 時間目においては、併せて次世代シーケンサーによる 16S rRNA 解析にて腸内細菌叢の分析も実施した。

各サンプルの短鎖脂肪酸濃度の測定は培養液上澄よりエーテルで抽出し、誘導体化して GC/MS にて測定した。

新鮮便は、嫌気状態で新鮮な状態を保つため、すぐに持参できない場合はアネロパック嫌気培養用アネロパウチ®・ケンキ (三菱ガス化学 (株)) を使用して、嫌気状態にして 48 時間以内に保冷剤入りの袋に入れて持参してもらう形式をとった。新鮮便を滅菌済み生理食塩水にて懸濁後、滅菌した牛乳濾紙 (ミルパップ, 安曇濾紙 (株)) でろ過して糞便懸濁液とした。

また、腸内細菌叢は、サンプリングした糞便液を 12000rpm, 10 分間遠心分離して回収したペレットを次世代シーケンサーによる 16S rRNA 解析にて腸内細菌叢の分析を行った。検体は、(株) 生物技研に委託して次世代シーケンサーによる 16S rRNA 解析にて腸内細菌叢の分析を行った。

短鎖脂肪酸の分析は、培養上澄 200 μ L に①100 μ M クロトン酸 100 μ L (内部標準), ②濃塩酸 50 μ L, ③ジエチルエーテル 300 μ L を加え、攪拌した後、遠心した (5000rpm, 10min, 室温)。上層 80 μ L を誘導体化試薬 N-Methyl-N-tert-

Butyldimethylsilyltrifluoroacetamide (MTBSTFA; Sigma-Aldrich) 16 μ L の入ったガラスバイアルに移し、恒温槽でインキュベートした後 (80°C, 20min), 48 時間室温に安置し、GC/MS (アジレント社) で分析した。

3. 研究結果

糞便培養液中の 3 ドナーの平均短鎖脂肪酸濃度を図 1 に示す。ポジティブコントロールとして用いたイヌリンは、12 時間目で発酵が促進し、以後は漸増した。主要な短鎖脂肪酸は、酢酸と酪酸であった。48 時間目の総短鎖脂肪酸濃度は、35.9 μ mol/ml であった。一方、脱ヨウ素昆布は 24 時間目より顕著に発酵が促進し、48 時間目まで増加した。したがって、イヌリンよりも発酵速度が遅いと考えられる。また、主要な短鎖脂肪酸は、酢酸、プロピオン酸、酪酸、吉草酸と種類が多かった。48 時間目の総短鎖脂肪酸濃度は、36.1 μ mol/ml であった。したがって、イヌリンよりも様々な腸内細菌によって異なる短鎖脂肪酸が産生し、総短鎖脂肪酸濃度は易発酵性のイヌリンと同程度の高発酵性であることが明かとなった。

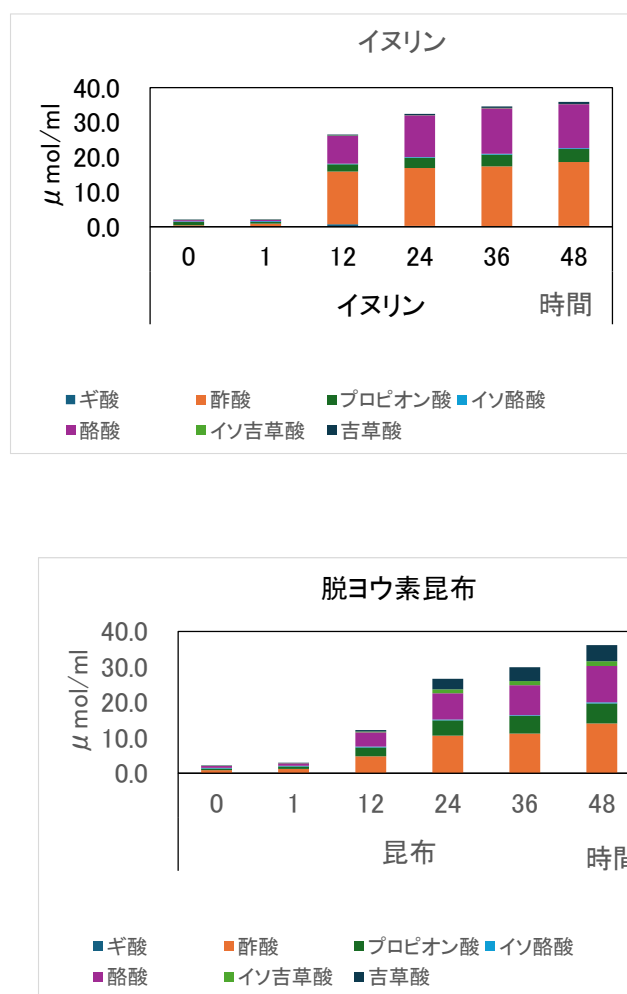


図 1. 糞便培養液中の平均短鎖脂肪酸濃度

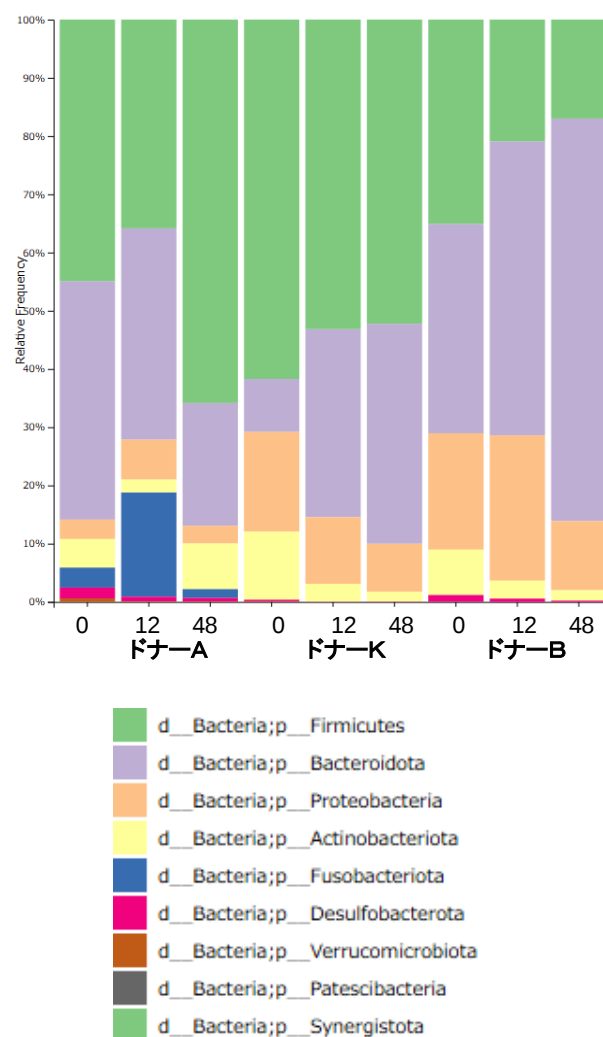


図 2. 糞便培養液中の腸内細菌叢(門レベル)

3 ドナーの門レベルの腸内細菌叢の変化を図 2 に示す. 3 ドナーともに昆布摂取で大きな変動が見られたが, 各ドナーのエンテロタイプが異なっていたため, 個別に表示した. ドナー A は, Firmicutes 門と Bacteroidota 門の比がほぼ等しかったが, 昆布添加により Firmicutes 門の比率が優性となった. ドナー K は, Firmicutes 門優勢の菌叢であったが, 昆布添加により Bacteroidota 門の比が増加し, Proteobacteria 門の比率も減少した. ドナー B は, ドナー A に類似して Firmicutes 門と Bacteroidota 門の比がほぼ等しかったが, 昆布添加により, Bacteroidota 門の比率が増加し, Firmicutes 門, Proteobacteria 門の比率も減少した. 以上のように個人差があるが, 昆布添加により腸内細菌叢のバランスが変化することが示された.

3 ドナーの属レベルの腸内細菌叢の変化を図 3 に示す. 属レベルは, 検出菌属が多いため, 占有率の多い 10 菌属のみ凡例を示した. ドナー A は, 門レベルでは Firmicutes 門の比率が増加したが, 属レベルでは各菌属が等しく増加し, 多様性が増した菌叢となることが明らかになった. その中でも, *Bacteroides* 属, *Lachnoclostridium* 属, *Faecalibacterium* 属, *Bifidobacterium* 属等の有用菌属の比率が高かった. ドナー K は, Bacteroidota 門の比が増加したが, *Bacteroides* 属が顕著に増加し, Bacteroidota 門の増加の原因であることが明らかとなった. また, 酪酸産生菌である *Faecalibacterium* 属の占有率も顕著に増加し, これら有用菌の 2 菌属が優勢となることが示された. 単離したアルギン酸ナトリウムを糞便培養した既

報によると、アルギン酸ナトリウムは、はじめに *Bacteroides* 属に利用され、分解したアルギン酸ナトリウムが、*Faecalibacterium* 属に利用される cross feeding によって発酵を受けることが報告されている[6]。ドナーKの結果はこの報告と一致した結果であった。ドナーBは、昆布添加により、*Bacteroidota* 門の比が増加したが、その増えた金属は *Bacteroides* 属であることが示された。昆布中のアルギン酸は *Bacteroides* 属によりよく発酵を受けることが示された。*Bacteroides* 属はプロピオン酸も産生することから短鎖脂肪酸の結果において、イヌリンよりもプロピオン酸濃度が高かった理由は *Bacteroides* 属の増加による可能性が考えられた。

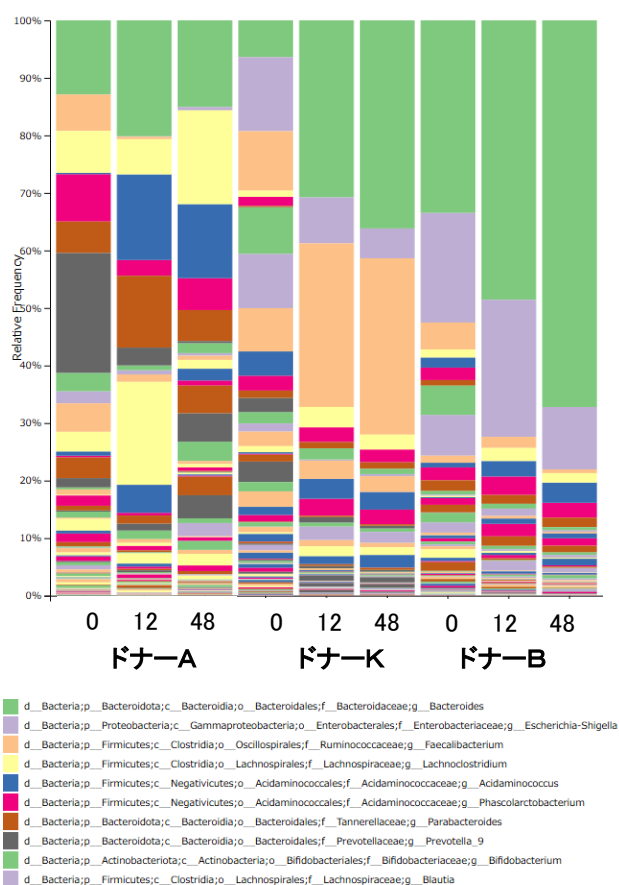


図3. 糞便培養液中の腸内細菌叢(属レベル)

4. まとめと今後の課題

昨年度の脱ヨウ素昆布を配合したクッキーを摂取するヒト介入試験の結果、腸内細菌叢が変化した。糞便中の短鎖脂肪酸濃度に変化が見られなかった。そこで、*in vitro* の糞便嫌気培養試験により脱ヨウ素昆布の腸内細菌による発酵特性を調べた。その結果、脱ヨウ素化した昆布は、ポジティブ

コントロールのイヌリンと同等の発酵を受けることがはじめて明かとなった。また、イヌリンに比べて短鎖脂肪酸の種類が多く検出され、多様な腸内細菌に利用されることが認められた。昆布中のアルギン酸は、*Bacteroides* 属によく利用されることが示された。さらにエンテロタイプによっては *Faecalibacterium* 属に更に発酵を受けることも示された。

今後、ドナー数を増やしてデータを蓄積する予定である。

5. 引用文献

- [1] 浅岡力, 岩塚英文, 箕輪久子: 健常男性の血清総コレステロール値に対する低分子化アルギン酸ナトリウム配合飲料『コレカット』の効果, 栄養・評価と治療, 13, 460-464, 1996年.
- [2] Torsdottir I, Alpsten M, Holm G, Sandberg AS, Tölli J.: A small dose of soluble alginate-fiber affects postprandial glycemia and gastric emptying in humans with diabetes. J Nutr. ,121:795-9,1991.
- [3] Von Engelhardt W, Rönna K, Rechkemmer G, Sakata T.: Absorption of short-chain fatty acids and their role in the hindgut of monogastric animals. Anim Feed Sci., 23: 43-53, 1989.
- [4] 韓 圭鎬, 永田 龍次, 福島 道広. ポリフェノールの機能作用についての最近のアプローチなぜ腸内細菌に注目すべきなのか. 化学と生物 60:162-163, 2022.
- [5] 佐藤 駿, 永田 龍次, 福岡 直希, 島田 謙一郎, 田宮 大雅, 中山 保典, 韓 圭鎬, 福島 道広. BARLEYmax 由来難消化性炭水化物の構成およびその定量的な優位性が *in vitro* における腸内発酵特性に与える影響. 日本栄養・食糧学会誌, 73:81-91, 2020.
- [6] Murakami R, Hashikura N, Yoshida K, Xiao JZ, Odamaki T., Growth-promoting effect of alginate on *Faecalibacterium prausnitzii* through cross-feeding with *Bacteroides*. Food Res Int 144: 110326, 2021.

付記

本研究は大妻女子大学人間生活文化研究所の研究助成 (K2401)「嫌気培養装置を用いた昆布の腸内細菌による発酵特性の検討」を受けたものです。