

培養系ヒト腸内細菌叢モデル KUHIMM を 利用した食物繊維の影響評価

生田 直子 (IKUTA Naoko)¹ 篠原 涼平 (SHINOHARA Ryouhei)¹
佐々木 大介 (SASAKI Daisuke)² 佐々木 建吾 (SASAKI Kengo)²

¹ 神戸大学大学院医学研究科, ² 神戸大学科学技術イノベーション研究科

Key Words : 食物繊維 腸内細菌 ヒト腸内細菌叢モデル

1. 背景

腸内細菌叢は宿主への栄養分を提供して健康状態を保ち、腸管内の恒常性や宿主の免疫反応における重要な役割を担っている¹⁾。また、腸内細菌叢のバランスの乱れと肥満や2型糖尿病、大腸炎などの疾病を関連付けた研究が多く報告されており²⁻⁵⁾、腸内細菌叢のバランスを保つことが健康の維持・増進に重要であることが広く知られるようになった。食物繊維は、「ヒトの小腸内で消化・吸収されにくく、消化管を介して健康の維持に役立つ生理作用を発現する食物成分」と定義されており⁶⁾、それ自体が栄養素ではないにも関わらず、健康の維持・増進に重要な機能を有するので、第6の栄養素とも呼ばれている。近年、食物繊維は大腸まで届き腸内細菌叢に様々な影響を及ぼすことが様々な研究から明らかになってきており、生活習慣病の予防や健康増進のためにサプリメントとして食物繊維を利用する人が増えてきている。食物繊維の種類については、水への溶解度や粘性などの物性によって、水溶性と不溶性の2種類に分類されており、その物性の違いが機能性にも影響することが多くの研究によって明らかにされている⁶⁾。難消化性デキストリン (DEX) は特定保健用食品 (トクホ) 素材として認定され

ている水溶性食物繊維で、トウモロコシでん粉を熱処理し加水分解を行った後、精製を行い、食物繊維画分を分取して得られたものであり、食物繊維を85~95%含有する。難消化性デキストリンは機能性食品表示制度においても、整腸作用、食後血糖上昇抑制作用、食後中性脂肪上昇抑制作用について研究レビューを利用した機能性表示の届出が受理されている。さらに、難消化性デキストリンは米国食品医薬品局 (FDA) より、マルトデキストリンに合致するとされ、GRAS 認証 (Generally Recognized As Safe) を1990年に得ている。小腸で一部が分解されるが、摂取したうちの半分が大腸で腸内細菌に資化されると言われている。一方、水溶性食物繊維である α -シクロデキストリン (α CD) はグルコース6個が α -1,4 グルコシド結合により連なった環状オリゴ糖で、天然に存在する無味の糖質である。工業的にはトウモロコシなどから取り出されたでん粉にCD生成酵素を作用させて製造されている。 α CDは低粘性の水溶性食物繊維であり、摂取時にヒトの生体内の消化酵素では分解されないが、大腸にて腸内細菌に分解される性質を持つ⁷⁾。近年、アメリカ国立衛生研究所 (NIH) にて α CDの血中コレステロール低下作用に関する臨床研究

が開始される⁸⁾など、 α CDの機能性について、特に抗メタボリックシンドローム素材として大きく注目されている。 α CDは中性脂肪低減効果や血糖値上昇抑制効果などの健康効果⁹⁻¹¹⁾や乳化作用などの物性改善効果を有していることから、現在広く食品に配合されている。

我々の研究では、それらを含めたいくつかのオリゴ糖に着目し、神戸大学で開発された培養系ヒト腸内細菌叢モデルを利用して、食物繊維が腸内細菌叢に及ぼす影響について評価を行った。

腸管モデルについての研究は1990年代から活発になり、2010年以降になると腸内細菌叢の網羅的な解析技術が飛躍的に向上した背景により腸管モデルや腸内細菌関連の論文数が増加している。近年、腸内細菌叢は健康と関連付けて注目されるようになり、腸内細菌叢を改善する食品素材としての食物繊維は、前述の通り、健康面から注目される第6の栄養素とされている。2016年にOsawa¹²⁾によってまとめられた腸管モデルに関する総説では、食品成分の腸内動態、腸管モデルの構築と使用例について1979年の光岡らの書籍から2016年までの文献を元にまとめられている。本稿では神戸大学で開発された培養系ヒト腸内細菌叢モデル(KUHIMM: Kobe University Human Intestinal Microbiota Model)とそれを利用した*in vitro*試験と臨床との関連及び腸内細菌叢に及ぼす種々の食物繊維の影響について、我々の研究例を中心にまとめ、さらに食品開発への応用技術などについて紹介する。

2. 培養系ヒト腸内細菌叢モデル KUHIMM の特性

日本に先駆けて30年以上前から欧米諸国の研究グループは*in vitro*培養系でヒトの腸管や腸管内の細菌叢を模した腸管モデルの開発に取り組み、この技術を用いた食品の安全性や機能性の評価が行われてきた。例えば、ベルギー・ゲント大学のSHIME (Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem)、オランダ・TNO

社のTIM (TNO Intestinal Model)、といった培養系ヒト腸管モデルが開発されてきた。しかしながら、いずれも外観や物理的な機構面でヒトの消化管を模擬しているシステムであり、長時間培養すると培養液中の細菌叢によって産生された短鎖脂肪酸(SCFAs)やアンモニア等の代謝物量や構成比が実際のヒト腸内の値とギャップが生じ、実際のヒト腸管内の菌数を再現するに至っていない。体内で起こる消化された栄養素の動態を再現することは難しいのが現状である。これらのシステムの問題点を解決すべく神戸大学で開発したKUHIMM(図1)は一槽式で構成がシンプル、短時間で評価が可能、動的な解析が可能、という特徴を有し、他のヒト培養系腸管モデルと比較して次の点でより正確にヒトの腸内を模している。①培養24~30時間後において、ヒト大腸内の全菌種(500-1,500種)や菌多様性を保持し、個人ごとの菌叢を維持している¹³⁾。②偏性嫌気性細菌(門レベルでFirmicutesとBacteroidetes)が優勢である。③難培養の細菌種も増殖している。④代謝プロファイルを維持している。短鎖脂肪酸の構成比が実際のヒト大腸内を模している。(酢酸:プロピオン酸:酪酸=3:1:1)

本モデルは前述の通り、小容量の培養槽を複数備えた嫌気性の培養装置で、ヒト糞便をスターターとし、複数のサンプルを同時にかつ比較的短時間に培養することができる。また、経時的にpHやアンモニア濃度をモニタリングす



図1 培養系ヒト腸内細菌叢モデル KUHIMM

表 1 KUHIMM での評価に用いた食物繊維の種類とグルコースの結合様式および分子量

食物繊維	結合様式	分子量
難消化性デキストリン (DEX)	α -1,4*, α -1,6, α -1,2, α -1,3	1,800-2,000
α -シクロデキストリン (α CD)	α -1,4*	972
デキストラン (DXR)	α -1,6*, α -1,4	32,000-45,000

* : 主要な結合様式

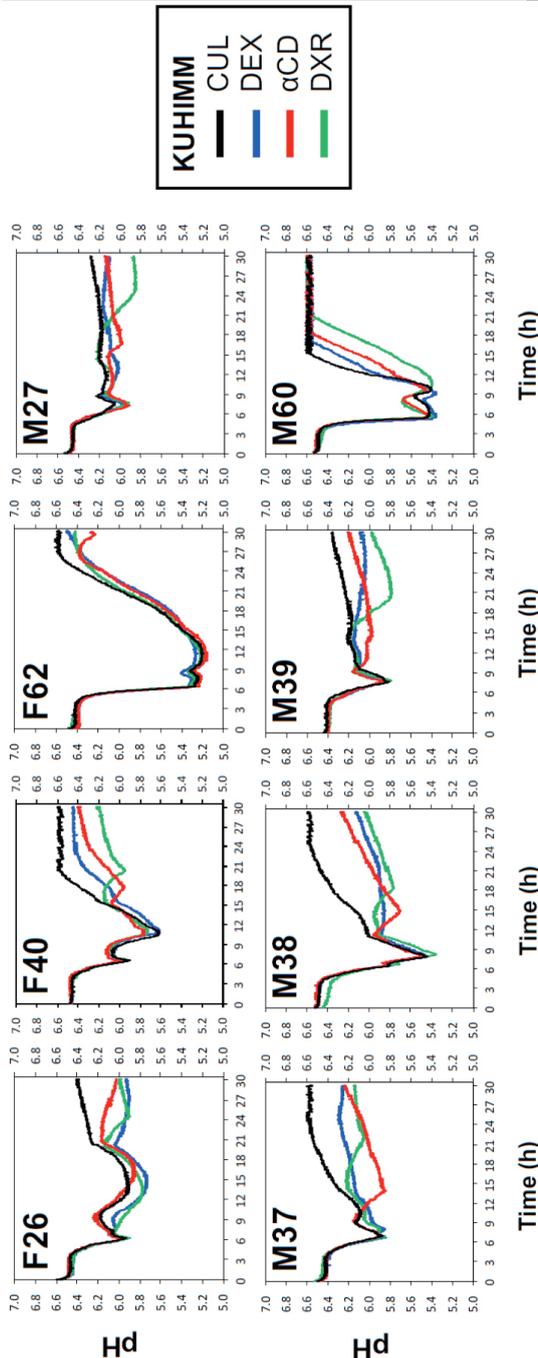


図 2 8名の健康人から提供された検体を KUHIMM にて 30 時間培養中の pH の経時変化
 CUL: 無添加での培養, DEX: 難消化性デキストリン添加での培養, α CD: α -シクロデキストリン添加での培養, DXR: デキストラン添加での培養

ることが可能で、サンプリングした培養液中の短鎖脂肪酸濃度やその他の代謝物の分析結果を菌叢と関連付けて考察することができる。

3. KUHIMM を利用した食物繊維の評価 - 臨床試験との比較

前述の難消化性デキストリンは、摂取量の 90 パーセントが大腸まで届き、40 パーセントは排泄されるのでおよそ 50 パーセントが大腸で腸内細菌に資化される。一方、 α CD を経口摂取すると消化酵素では分解されず、摂取量の 99 パーセントが腸に達する¹⁴⁾。 α CD は CDase を産生する *Bacteroides ovatus* などの腸内細菌によって資化されることが報告されている¹⁵⁾。同じ量を摂取した場合に大腸まで届く量が若干異なり、また、構造が違うことから、それぞれを資化する腸内細菌が異なる可能性がある。我々は食物繊維の資化性を詳細に検討することを目的として KUHIMM を使った評価を行った。

健康人 8 名から提供を受けた糞便をスターターとし、構造の異なる食物繊維（難消化性デキストリン、 α -シクロデキストリン、デキストラン；各 0.2g/100mL、表 1）を添加し 30 時間培養を行った¹⁶⁾。経時的な (0, 6, 9, 12, 24, 30 h) 培養のモニタリングとサンプリングを実施し、次世代シーケンサーを用いたメタ 16S による菌叢解析と代謝物解析を行い、非添加培養時の結果と比較し、種々の食物繊維のヒト

大腸内の細菌群集への影響について評価した。

実験の結果、非添加培養時の pH の変遷は個人ごとに異なり、ヒト個人の特徴を示している (図 2)。食物繊維の添加によって、発酵過程後期に特異的な pH の低下が観察された点が非常に興味深い。この pH の低下は難消化性の食物繊維が分解されたことを示唆している。短鎖脂肪酸 (主に酢酸, プロピオン酸, 酪酸) については、食物繊維の添加により酢酸・プロピオン酸の増加が観察された (図 3)。次に、難消化性デキストリン, α -シクロデキストリンおよびデキストラン添加時と無添加時について 30 時間培養後の細菌群集の構造を次世代シーケンサーにより解析した。その結果、全ての培養液

中より *Bacteroidetes* 門に属する細菌群の優占が観察された (図 4)。食物繊維の摂取によって *Bacteroidetes* 門に属する細菌群の割合が増加するとの報告例¹⁵⁾とは異なる結果であったが、この理由については、我々の実験での添加濃度が 0.2g/100mL と低いことに起因すると考えられる。しかしながら、本濃度はヒトが 1 日に摂食する食物繊維量を反映しており、現実的な濃度条件で KUHIMM が *Bacteroidetes* 門の代謝活性 (酢酸・プロピオン酸生成) の増加を検出できた点は興味深い。

次に、顕著な結果が得られた検体提供者 4 名を対象としたヒト介入試験を計画し、神戸大学医学倫理委員会にて承認後、KUHIMM の結果と比較することを目的として実施した。試験デザインは 2 期前後比較試験で、4 名の健常人から同意を得たのち、2 週間のウォッシュアウトの後に 1 回目の採便、 α CD を 1 日 6g、1 週間食べた後に 2 回目の採便、その後 2 週間のウォッシュアウトの後に 3 回目の採便、難消化性デキストリンを 1 日 6g、1 週間食べた後に 4 回目の採便を行った (図 5)。食物繊維の摂取量は先に実施した培養系ヒト腸内細菌叢モデル KUHIMM での添加量 (0.2g/100mL 培養液) を参考に、ヒトの消化管内を 1 日に通過する液体量を 3L として、1 日 6g と算出した。

その結果、検出された種数による β -diversity の比較では、糞便由来のプロットは菌叢の変化が少なく、摂取の有無に関わらず個人ごとの菌叢を維持していた。4 名の健常人を対象としたヒト介入試験では、ダイナミックな菌叢変化は観察されず、KUHIMM の結果と一致していた (図 5)。しかしながら、KUHIMM の結果も併せると、食物繊維の摂取が菌叢の代謝プロファイルに影響を及ぼすことは確からしいと考えられる。これらの結果から、KUHIMM を用いた解析により、*in vivo* 解析では難しい代謝プロファイル (pH, 短鎖脂肪酸) の変化を予測できる可能性が示された。

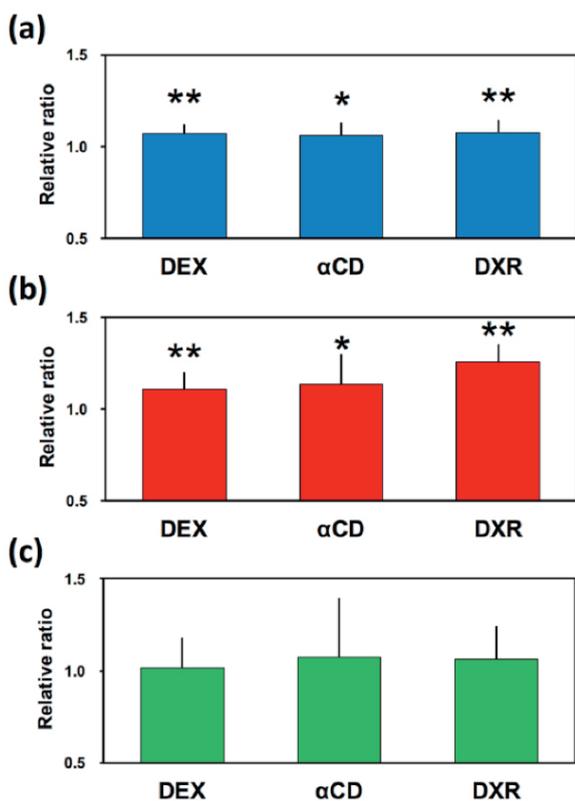


図 3 KUHIMM に食物繊維を添加し 30 時間培養後の短鎖脂肪酸の相対濃度 (無添加時を 1.0 とした)

(a) 酢酸, (b) プロピオン酸, (c) 酪酸

DEX: 難消化性デキストリン添加での培養, α CD: α -シクロデキストリン添加での培養, DXR: デキストラン添加での培養

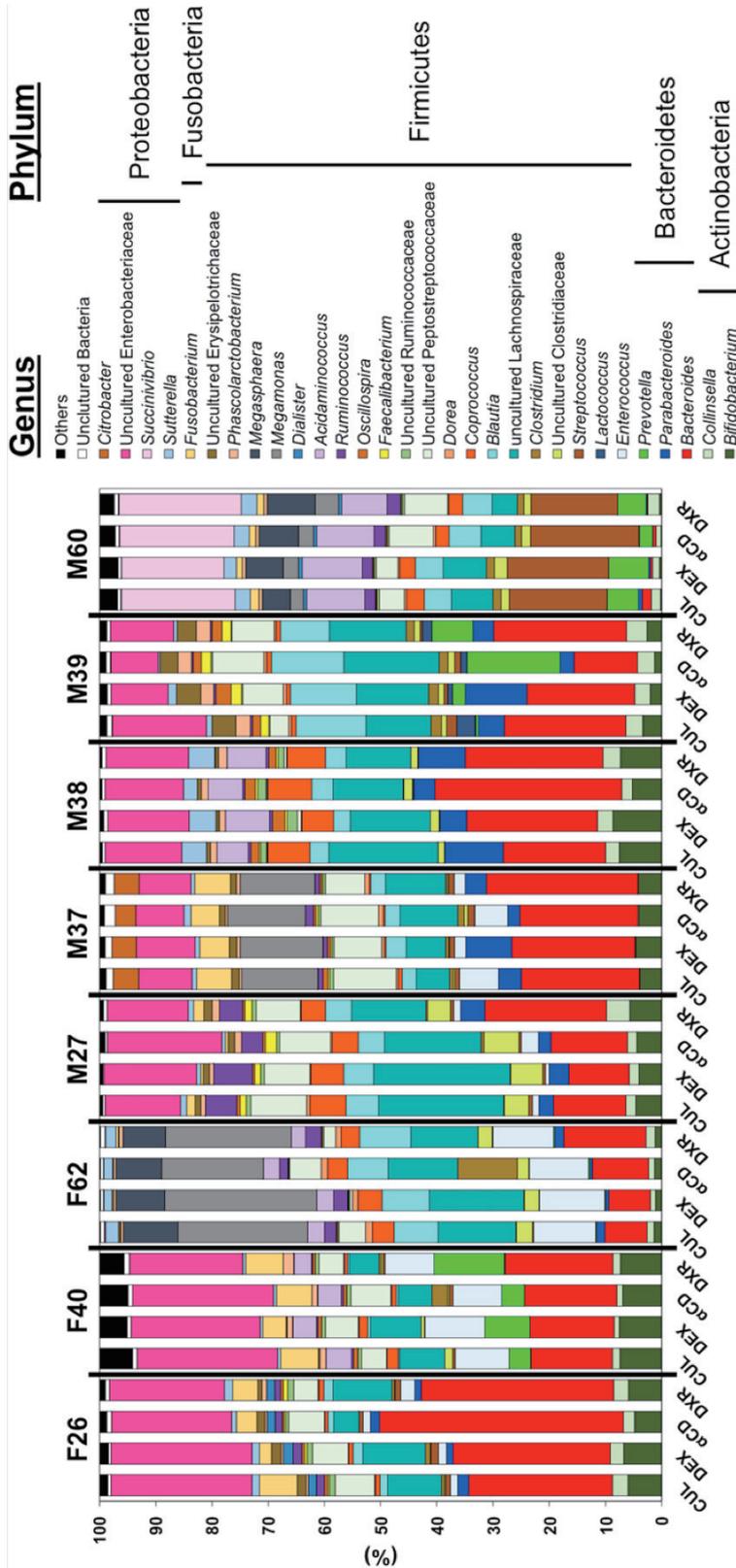


図4 KUHIMM に食物繊維を無添加あるいは添加し 30 時間培養した後の細菌群集構造

CUL : 食物繊維無添加での培養, DEX : 難消化性デキストリン添加での培養, αCD : α- シクロデキストリン添加での培養, DXR : デキストラン添加での培養

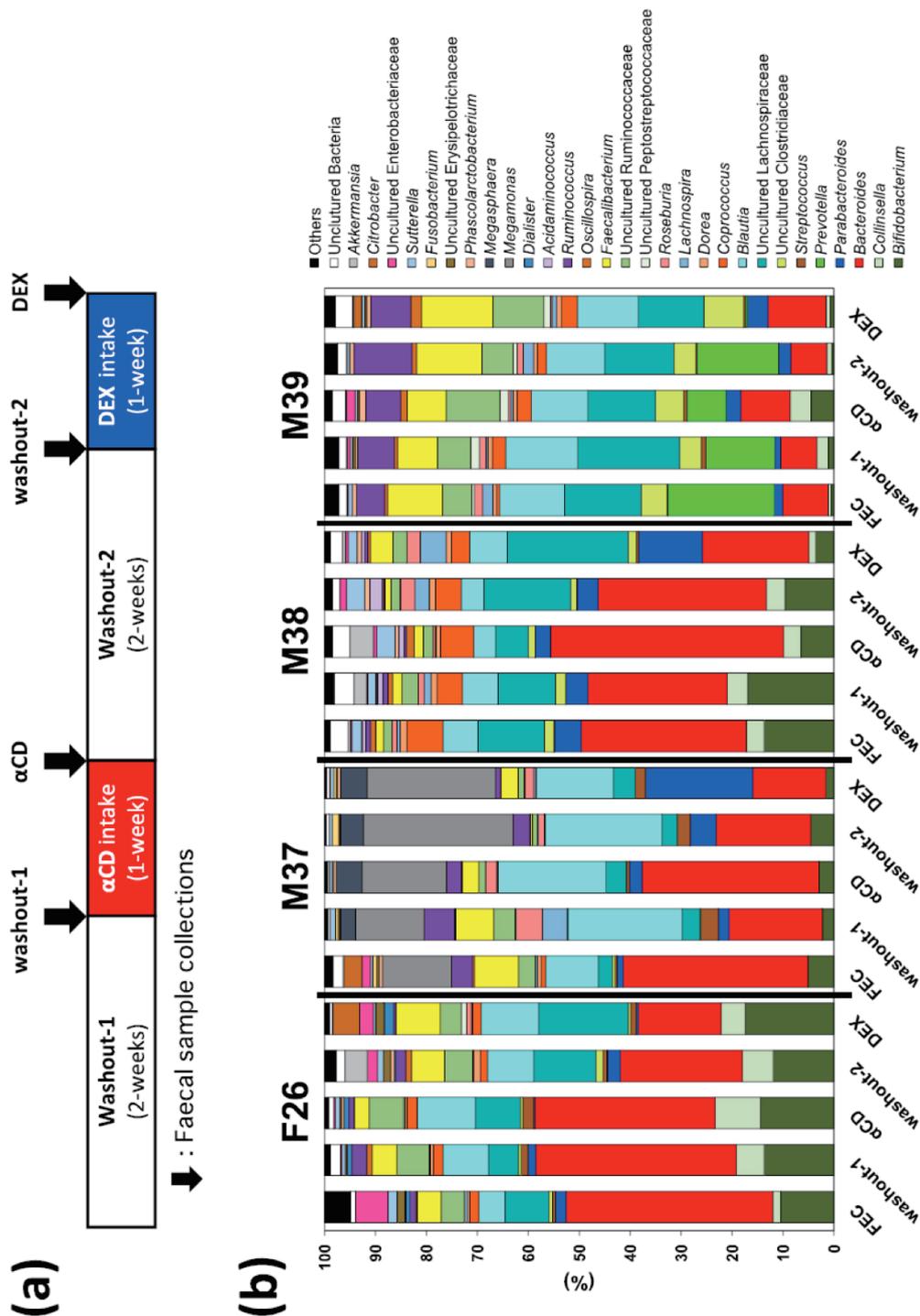


図5 ヒト介入試験のプロトコル (a) と各被験者の糞便中の腸内細菌叢集構造 (b)
 DEX: 難消化性デキストリン摂取後のサンプル, αCD: α-シクロデキストリン摂取後のサンプル, washout: 休薬期間後のサンプル

おわりに

本稿では、腸管モデルの歴史を簡単に振り返り、神戸大学にて開発された培養系ヒト腸内細菌叢モデル KUHIMM の特徴について概説した。我々はヒト介入試験も実施し、KUHIMM への食物繊維添加により、個人ごとに異なる代謝プロファイル (pH, 短鎖脂肪酸) およびその変化に対応した細菌群の変遷を予測できる可能性を示した。

近年、食物繊維は生活習慣病や腸内細菌が関わる様々な疾病の予防あるいは改善に期待され

ていることがよくわかる。しかしながら、ヒト介入試験は倫理的にハードルが高く、膨大な時間やコストが必要になるため、とりわけ食品開発において実施するのは極めて困難である。大腸内での現象を模した培養系ヒト腸内細菌叢モデル KUHIMM が、食物繊維や大腸まで届く可能性のある食品成分の開発において、スクリーニングや安全性評価に利用されることを我々は大いに期待する。KUHIMM への関心が高まり、食品開発への応用技術が進歩することには大きな意義があると筆者らは考えている。

参考文献

1. Robles Alonso V., Guarner F.: Linking the gut microbiota to human health. *Br J Nutr.* **109**(52): S21–S26, 2013. doi: 10.1017/S0007114512005235.
2. Cani, P.D., Bibiloni, R., Knausf, C., Waget, A., Neyrinck, A. M., Delzenne, N. M., *et al.*: Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes.* **57**(6): 1470–1481, 2008. doi: 10.2337/db07-1403.
3. Qin, J., Li, Y., Cai, Z., Li, S., Zhu, J., Zhang, F., *et al.*: A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature.* **490**(7418): 55–60, 2012. doi:10.1038/nature11450.
4. Serino, M., Fernández-Real, J. M., García-Fuentes, E., Queipo-Ortuño, M., Moreno-Navarrete, J. M., Sánchez, A., *et al.*: The gut microbiota profile is associated with insulin action in humans. *Acta Diabetol.* **50**(5): 753–761, 2013. doi: 10.1007/s00592-012-0410-5.
5. Uronis, J. M., Mühlbauer, M., Herfarth, H. H., Rubinas, T. C., Jones, G. S., Jobin, C.: Modulation of the intestinal microbiota alters colitis-associated colorectal cancer susceptibility. *PLoS One.* **4**(6): e6026, 2009. doi:10.1371/journal.pone.0006026.
6. 海老原 清, 早川 享志, 奥 恒行 編集: ルミナコイド研究のフロンティア. 建帛社, 2010 年.
7. Kaewprasert, S., Okada, M., Aoyama, Y.: Nutritional effects of cyclodextrins on liver and serum lipids and cecal organic acids in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **47**: 335, 2001.
8. <http://clinicaltrials.gov/show/NCT01131299>
9. Grunberger, G., Jen, K. L., Artiss, J. D.: The benefits of early intervention in obese diabetic patients with FBCx: a new dietary fibre. *Diabets Metab Rse Rev.* **23**(1): 56–62, 2007. doi: 10.1002/dmrr.687.
10. Comerford, K. B., Artiss, J. D., Jen, K. L., Karakas, S. E.: The beneficial effects α -cyclodextrin on blood lipids and weight loss in healthy humans. *Obesity.* **19**(6): 1200–1204, 2011. doi: 10.1038/oby.2010.280.
11. Amar, M. J., Kaler, M., Courville, A. B., Shamburek, R., Sampson, M., Remaley, A. T.: Randomized double blind clinical trial on the effect of oral α -cyclodextrin on serum lipids. *Lipids Health Dis.* **15**: 115, 2016. doi: 10.1186/s12944-016-0284-6.
12. Osawa, R.: Evaluation of functionality and safety of Food components by human intestinal models: Kobe University's approach. *Japanese Journal of Lactic Acid Bacteria.* **27**(2): 93-100, 2016.
13. Takagi, R., Sasaki, K., Sasaki, D., Fukuda, I., Tanaka, K., Yoshida, K., Kondo, A., Osawa, R.: A single-batch fermentation system to simulate human colonic microbiota for high-throughput evaluation of prebiotics. *Plos One.* **11**: e0160533, 2016. doi: 10.1371/journal.pone.0160533.
14. Van Ommen, B., De Bie, A. T., Bär, A.: Disposition of ^{14}C - α -cyclodextrin in germ-free and conventional rats. *Regul Toxicol Pharmacol.* **39**: S57-S66, 2004. doi: 10.1016/j.yrtph.2004.05.011.
15. Robert, N. A., James, K. P.: Enzymatic Degradation of α - and β -Cyclodextrins by Bacteroides of the Human Colon. *J Agric Food Chem.* **32**: 1321-1325, 1984. doi: 10.1021/jf00126a025.
16. Sasaki, D., Sasaki, K., Ikuta, N., Yasuda, T., Fukuda, I., Kondo, A., Osawa, R.: Low amounts of dietary fibre increase *in vitro* production of short-chain fatty acids without changing human colonic microbiota structure. *Sci Rep.* **8**: 435, 2018. doi: 10.1038/s41598-017-18877-8.