

令和元年9月26日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09066

研究課題名(和文) 梅摂取習慣が腸内細菌叢と免疫能・消化器疾患に及ぼす影響の検討

研究課題名(英文) Improvement effect of Japanese apricot (*Prunus mume* Siebold et Zucc; Ume) on lower intestinal microflora.

研究代表者

前北 隆雄 (MAEKITA, TAKAO)

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10326358

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ヘリコ陰性/胃粘膜萎縮なし(A)と胃酸分泌が低下したヘリコ陰性/強度萎縮(D)に、梅エキスを投与した。年齢・性マッチしたA・D21例ずつで、エキス前A vs D(検討1)、全例エキス前vs後(検討2)、Aエキス前vs後(検討3)、Dエキス前vs後(検討4)で腸内細菌叢を評価した。多様性に違いは無かったが構造の違いを認めた。検討1では綱レベルでc\_Clostridialに、目レベルでo\_Clostridialesに、検討4では門レベルでBacteroidetesに、それぞれ有意差を認めた。胃酸分泌が腸内細菌の構造と関連し、酸分泌低下状態では梅エキスが腸内細菌の構造を変化させうることを示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

梅エキス投与による腸内細菌叢改善が証明されれば、病変の発生を予防する広大な戦略構築に貢献する一助となることが予測され、健康増進に大きな福音となることが考えられる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the relation between gut microbiota and gastric acid secretion, and the effect of Japanese apricot (JA) on the microbiota. Healthy Japanese subjects with *H.pylori*-/atrophic gastritis- (Group A) and *H.pylori*-/atrophic gastritis+ in which gastric acid secretion has markedly reduced (Group D) were enrolled. This trial composed of 4 parts (Part 1: Group A vs Group D before JA, Part 2: all cases before vs after JA, Part 3: before vs after JA in Group A, Part 4: before vs after JA in Group D). Significant differences were observed in not the diversity but the structure of the gut microbiota in some parts of the trial. In Part 1, c\_Clostridia at the class level and o\_Clostridiales at the order level were significantly different. In Part 4, Bacteroidetes at phylum level was significantly different. These results show that gastric acid might be related to the structure of the gut microbiota, and JA might alter the structure in the reduced gastric acid condition.

研究分野：消化器内科

キーワード：梅 腸内細菌叢

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

胃のヘリコバクターピロリ(Hp)の発見から、胃疾患の発病メカニズムは飛躍的に解明されてきている。ただし、大腸疾患の発病メカニズムは依然不明点が多い。腸内細菌叢は胃酸分泌により制御されているという知見、そしてヒトの腸内微生物叢は宿主の健康と病気の発生に関わっており大腸癌の発生に腸内細菌が関与するという報告がある。近年の大腸腫瘍性病変の増加の主要因として、高脂肪食・低繊維食など食習慣の変化が挙げられているが、食習慣の変化と腸内細菌叢がどのような関係があるかは解明されていない。

梅は、2000年前に書かれた中国最古の薬物学書『神農本草経』に「肺の組織を引き締め、腸の動きを活発にし、胃を元気づけ、体の中の虫を殺す」効用があると記され、古来より「体によい」といわれている。また近年、Hpが丸く変形して動けなくなり、凝集して働きを失う効果が確認され科学的に効果が解明されてきている。

## 2. 研究の目的

これらの点をふまえ、本研究では、腸管内腔環境を構成する主要因子である腸内細菌叢に着目し、胃酸分泌動態と腸内細菌叢の関係を把握し、梅エキス投与による腸内細菌叢に与える影響について検討する。梅エキス投与による腸内細菌叢の改善が証明されれば、病変の発生を予防する広大な戦略構築に貢献する一助となることが予測され、健康増進に大きな福音となることが考えられる。また、梅エキス投与による総コレステロール値とトリグリセリド値に与える影響について検討した。

## 3. 研究の方法

### 倫理ステートメント

この研究は、ヘルシンキ宣言に記載されている倫理規定に準拠しています。この研究は、和歌山県立医科大学倫理委員会が研究プロトコル(許可番号 1211)を承認し、大学病院医療情報ネットワークセンター(UMIN000024878)に登録。参加者全員から書面によるインフォームドコンセントを得た。

### 母集団とデータ収集

酸分泌に直接影響する胃粘膜萎縮を評価するため Hp 感染の有無を血清抗 Hp IgG 抗体、萎縮の程度を血清ペシノゲン法(PG 法)により 4 群に分類した。A 群は血清抗 HpIgG 抗体(-)かつ PG 法(-)で健常胃群、B 群は血清抗 HpIgG 抗体(+ )かつ PG 法(-)で酸分泌の亢進する潰瘍発生(危険)群、C 群は血清抗 HpIgG 抗体(+ )かつ PG 法(+ )で萎縮性胃炎群、D 群は血清抗 HpIgG 抗体(-)かつ PG 法(+ )で Hp が棲息できなくなった腸上皮化生群とする。D 群では腸上皮化生のため、胃酸分泌が低下し pH5 ~ 7 前後まで上昇していることが知られている。

本研究では、以前の健康診断時に A 群および D 群と判明している 42 歳以上 80 歳以下の健常者から計 65 名が選択され、58 名(男性 35 名 女性 23 名)から研究参加の同意が得られた。同意取得後、エキス・プラセボ投与までに 1 名他疾患で入院となり 57 名(A 群 36 名 D 群 21 名・男性 34 名 女性 23 名)で検討をおこなった。除外基準は、梅アレルギーの者、胃術後、Hp 除菌歴がある者、酸抑制剤(プロトンポンプ阻害剤(PPI)や H2 受容体拮抗薬(H2RA))内服中である者、桃アレルギーの者、腎機能異常のある者、抗生物質を内服している者とした。

A 群と D 群、健常者 63 名を外部委託にて乱数表を用いてランダム化して 2 群とし、各被験者に梅エキス(UME AQUA 6mL/回 1 日 2 回 朝・夕)とプラセボ(UME AQUA より梅エキス抜いたジュース成分 6mL/回 1 日 2 回 朝・夕)を、時期を互いにずらして投与し評価した(クロスオーバー比較試験)。評価項目は、評価項目は、腸内細菌叢、有害事象(下痢・

アレルギー・胃部不快感など)、排便回数、血中トリグリセリド値、血中コレステロール値とした。

	検査前	2週間	1次評価	2週間	2週間	2次評価
健常胃	問診・採血・採便	梅エキス服用	採血・採便	体外排出期間	プラセボ服用	採血・採便
36名	問診・採血・採便	プラセボ服用	採血・採便	体外排出期間	梅エキス服用	採血・採便

	検査前	2週間	1次評価	2週間	2週間	2次評価
高度萎縮胃	問診・採血・採便	梅エキス服用	採血・採便	体外排出期間	プラセボ服用	採血・採便
21名	問診・採血・採便	プラセボ服用	採血・採便	体外排出期間	梅エキス服用	採血・採便

#### サンプル採取とDNA抽出

これら A 群および D 群に振り分けられた成人の糞便を採取後-80 で冷凍保存し、ゲノム DNA は「NucleoSpin® Microbial DNA キット」(MACHERY – NAGEL、Düren、ドイツ)を用いて単離した。約 500 µL の保存された糞便サンプルを、100 µL の溶出バッファー (BE) を含むマイクロ遠心チューブに入れた。次いで、混合物をプロテナーゼ K を含むヌクレオスピンプーズチューブに入れ、TissueLyser (LT) 中で 30Hz・12 分間メカニカルピーズを用い細かく破碎した。その後の抽出手順は NucleoSpin® Microbial DNA キットの指示に従って行った。抽出した DNA サンプルを、Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter、Brea、CA) を用いて精製した。

#### 16S rRNA 遺伝子の塩基配列

精製 DNA サンプルについて 2 段階ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行い、シーケンスライブラリーを得た。得られた 16S rRNA PCR サンプルのシーケンス解析を行った。

16S rRNA の V3-V4 領域に対応する、プライマー対 341F (5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-')と 806R (5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGGA CTACHVGGGTWCTAAT-3')を使用する、NGS 用 16S (V3-V4) メタゲノムライブラリー構築キット (Takara Bio Inc、草津、日本) で最初の PCR を行った。Nextera XT Index Kit (Illumina、San Diego、CA) を使用したバーコードシーケンスで、Illumina シーケンサー用のインデックスシーケンスを付加するために、2 回目の PCR を行った。調製したライブラリーを、Takara Bio の Biomedical Center において、MiSeq Reagent v3 kit と MiSeq (Illumina) を用いて 250 対の末端塩基のシーケンスを行った。

#### マイクロバイオーム解析

キメラチェック、オペレーショナルタクソノミックユニット (OTU) の定義、およびタクソノミーアサインメントを含むシーケンスデータの処理は、井上らのやり方に従って、QIIME バージョン 1.9 [1]、USEARCH バージョン 8.0 [2]、および UCHIME バージョン 4.2.40 [3]を用いて実行した。

CD-HIT-OTU 及び 16S rRNA 解析の統合パイプライン QIIME (Quantitative

Insights Into Microbial Ecology) を用いて解析を行った。α 多様性指標として、Chao 1 Index (OTU の豊富さの推定) および Shannon Index (OTU の均等性の推定) を用いて腸微生物叢の多様性を評価した。

β-diversity は、UniFrac metric を用いてサンプル間の距離を計算し、principal coordinate analysis (PCoA) によって可視化した。また、統計的に permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) を用いて調べた。

#### 4. 研究成果

##### 梅エキスと腸内細菌叢

梅エキス投与前後の便が採取できたのは A 群 35 名、D 群 21 名で、年齢性マッチした A 群 21 例と D 群 21 例で腸内細菌叢の検討を行った。A 群 21 例の梅エキス投与前と D 群 21 例の梅エキス投与前の検討 (検討 1) A 群と D 群を合わせた 42 症例での梅エキス投与前と投与後の検討 (検討 2) A 群 21 例の梅エキス投与前と梅エキス投与後の検討 (検討 3) D 群 21 例の梅エキス投与前と梅エキス投与後の検討 (検討 4) で比較検討を行った。

α 多様性指数は、すべての検討で Chao 1 Index および Shannon Index とも統計的に有意な差を示さなかった。(Fig.1, 2)

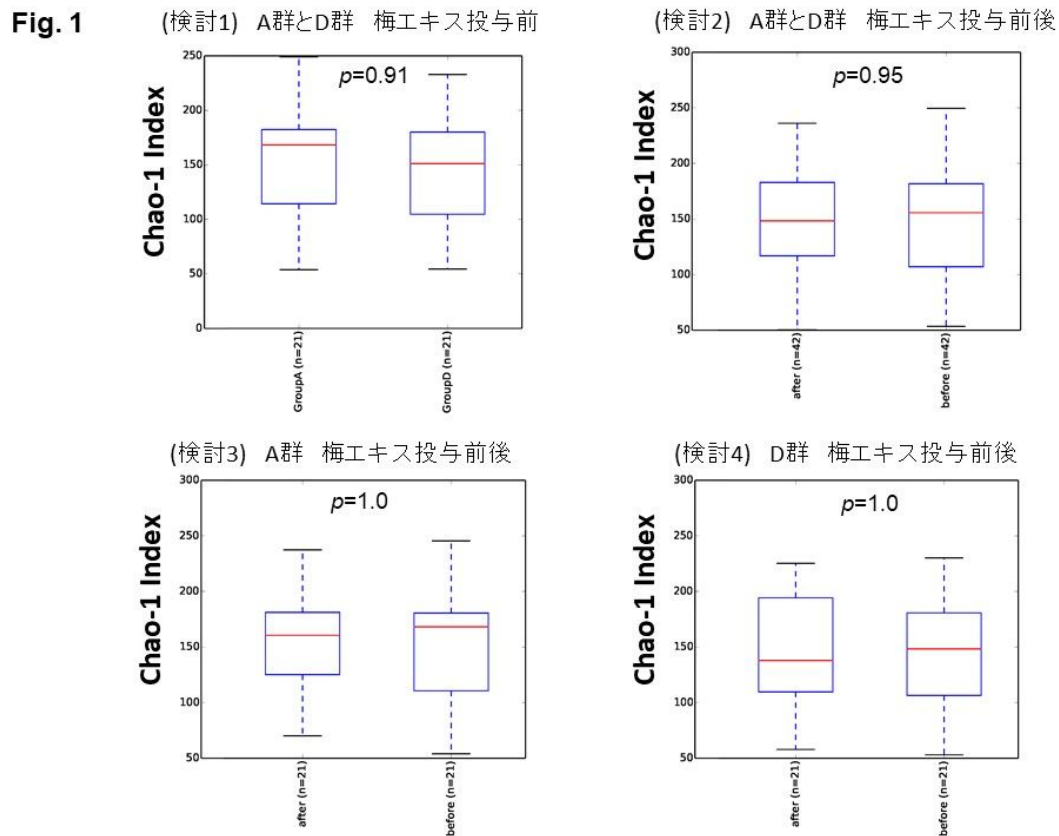
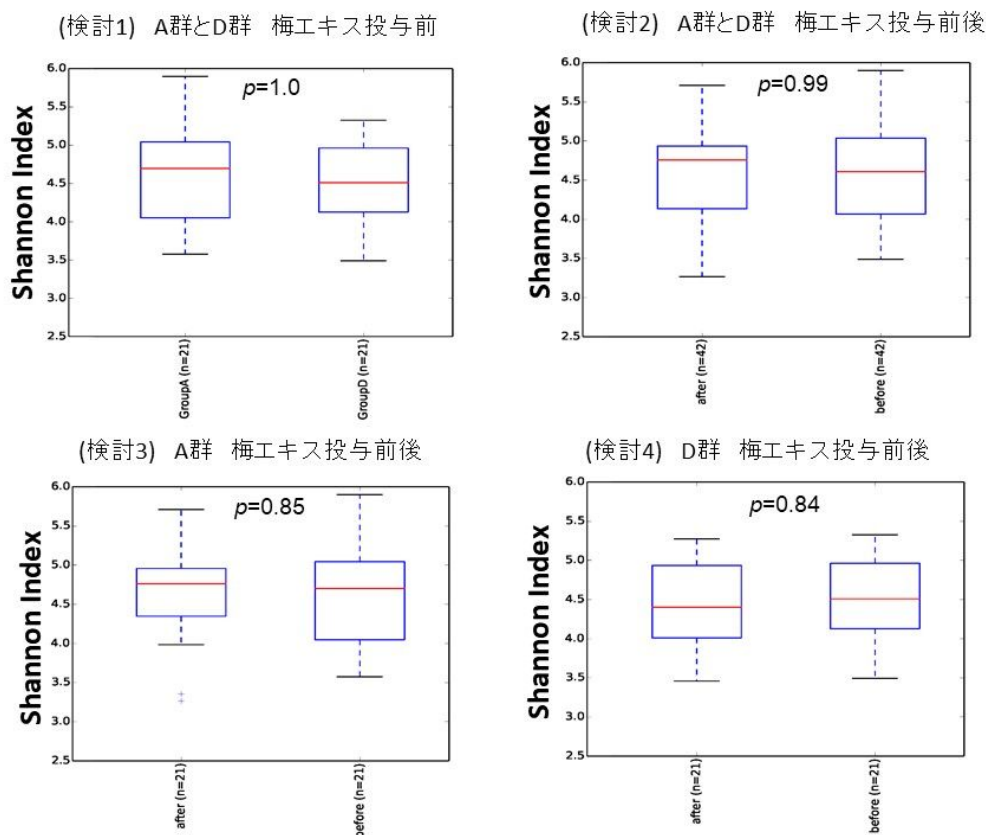


Fig. 2



腸内細菌叢の構造の違いを門レベルで分類学的に評価した。以前の結果と一致して、微生物叢組成物は 4 つの優勢な系統 (Firmicutes、Bacteroidetes、Actinobacteria、Proteobacteria) を含んでいた。A 群と D 群の梅エキス投与前の比較検討、A 群と D 群を合わせた症例での梅エキス投与前と投与後の比較検討、A 群の梅エキス投与前と梅エキス投与後の比較検討では、腸内細菌叢の構造に著しい違いは観察されなかった。D 群の梅エキス投与前と梅エキス投与後の比較検討では、Bacteroidetes ( $p=0.04$ ) に有意な違いが観察された。

A 群と D 群の梅エキス投与前の比較検討では、網レベルで *c\_Clostridia* ( $p=0.02$ )、目レベルで *o\_Clostridiales* ( $p=0.02$ ) に有意な違いが観察されたが、科レベルや属レベルでは著しい違いは観察されなかった。A 群と D 群を合わせた症例での梅エキス投与前と投与後の比較検討および A 群の梅エキス投与前と梅エキス投与後の比較検討、D 群の梅エキス投与前と梅エキス投与後の比較検討では、網レベル・目レベル・科レベル、属レベルでは著しい違いが観察されなかった。

#### 梅エキスと排便回数

A 群と D 群 42 症例のうち、梅エキス投与中 2 週間とプラセボ投与中 2 週間の排便回数が日誌で確認できた 40 症例において、エキス投与中とプラセボ投与中では排便回数に有意な差は認めなかった ( $p=0.935$ )

#### 梅エキスとトリグリセリド・総コレステロール値

同意取得できた 57 名のうち高脂血症治療薬内服がない 40 例で、エキス投与前と後の血液検査では、それぞれ TC (222.9 219.9  $p=0.19$ ) TG (166.8 128.9  $p=0.27$ ) と有意差はなかった。

#### 結論

この研究は、腸内微生物叢におけるいくつかの組成変化が胃酸分泌環境に関連していることを示した。また、胃粘膜が強度萎縮し胃酸分泌が低下している状態においては、梅エキス投与により、門レベルで Bacteroidetes が優位に変化することを示した。

## 参考文献

1. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. Nat Methods. 2010;7:335–6.
2. Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. Bioinformatics (Oxford, England). 2010;26:2460–1.
3. Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, et al. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. Bioinformatics (Oxford, England). 2011;27:2194–200.

4.

### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等 なし

### 6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：一瀬 雅夫

ローマ字氏名：MASAO ICHINOSE

所属研究機関名：帝京大学

部局名：医学部

職名：副院長

研究者番号(8桁): 50143425

研究分担者

研究分担者氏名：宇都宮 洋才

ローマ字氏名：HIROTOSHI UTSUNOMIYA

所属研究機関名：和歌山県立医科大学

部局名：共同利用施設

職名：准教授

研究者番号(8桁): 60264876

(2)研究協力者

研究協力者氏名：吉田 岳市

ローマ字氏名：TAKEICHI YOSHIDA