

令和 2 年 12 月 17 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K12897

研究課題名(和文) 機能性食品の有効性をテララーメイドに事前評価する技術基盤の創出

研究課題名(英文) Evaluation of effects of probiotics on intestinal microbiota in vitro

研究代表者

佐々木 大介 (SASAKI, Daisuke)

神戸大学・科学技術イノベーション研究科・特命助教

研究者番号：00650615

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、食物繊維がヒト腸内細菌の生態および最終代謝産物に及ぼす影響について、in vitroバッチ発酵システムを使用することで調査が行われた。ヒト大腸内を模倣するためにヒト糞便を接種した大腸細菌叢モデルを構築し、菌叢構造をボランティアから収集した糞便サンプルと比較した。またin vitroモデルとボランティアの両方に食物繊維の投与・介入試験を行った。次世代シーケンスにより、食物繊維の摂取はヒト腸内細菌叢の組成に大きな影響を与えないことが明らかになった。しかし、菌叢は大きく変遷しないものの、微生物代謝が活性化して短鎖脂肪酸の産生が促進され、健康増進効果を発揮することが予測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神戸大学が開発した大腸内の腸内細菌を人工的に模擬培養する技術を使用することで、プレバイオティクスに代表される様々な機能性食品をヒトが実際に摂取することなく、それらの健康効果を予測できることが本研究によって示された。個人ごとに腸内細菌叢は異なっても、本システムを用いることでテララーメイドに効果のある機能性食品を選択することができると考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study was investigated the various impacts of dietary fibers as prebiotics on human colonic microbial ecology and metabolic end-products using an in vitro batch fermentation system (KUHIMM; Kobe University Human Intestinal Microbiota Model). Dietary prebiotics enter the colon, where they are fermented by the gut microflora. Here, I used an in vitro colonic microbiota models inoculated with human faecal matter to mimic the human digestive tract environment and compared the compositions to faecal samples collected from human volunteers. Further, both the in vitro models and the volunteers were fed prebiotics. Next-generation sequencing revealed that a dosage of prebiotics did not significantly affect colonic microbiota composition. It did however promote the generation of acetate and propionate, suggesting an increase in microbial metabolic activity. The positive effect of prebiotics seen in vitro would be achieved in vivo in human subjects upon administration of prebiotics.

研究分野：応用微生物学

キーワード：腸内細菌 機能性食品 プレバイオティクス 腸内細菌叢 腸内フローラ 短鎖脂肪酸 食物繊維 in vitro培養

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、健康志向が急速に広がり、特に「腸内フローラ(腸内細菌群)」を介した食品と人の健康に対する関心が高くなっている。これは、腸内細菌が人の生体調節に大きく寄与していることが広く知られたため、より良い菌叢に制御するための「機能性食品」、疾患治療法等の開発が期待されている。機能性食品としては「特定保健用食品」がその代表であったが、2015年4月から「機能性表示食品」の販売も開始され、現在1000以上の商品が認可を受けている。それらの多くが「プレバイオティクス」であり、消化管上部で分解されずに大腸まで届き、腸内細菌に影響することで人の健康増進・維持に役立つ食品成分として分類されている。具体的には、「難消化性食物繊維」や「オリゴ糖」が該当し、現在、それぞれで登録件数として最も多いのが難消化性食物繊維である。各種プレバイオティクスには、糖鎖の長さや分子結合様式が異なるいくつかの種類が存在し、商品に表示されている人への健康効果も成分によって異なる。

プレバイオティクスは大腸の細菌群に分解され、それらの発酵代謝産物(短鎖脂肪酸)を介した二次的効果として、乳酸菌・ビフィズス菌などの増殖促進作用、整腸作用、各種免疫システムの活性化、自己免疫性疾患の抑制作用など多く報告されている。しかし、大腸内の細菌群を構成する菌の種類・構造が個人ごとに異なることが既に知られており、異なる分子構造・機能性を持つプレバイオティクスが、すべての人にとって一様に期待される健康効果を発揮できるとは限らない。すなわち、個人ごとの腸内細菌と健康効果をもたらす機能性成分の組み合わせがあり、テラーメイドな機能性食品が存在すると予測される。

一方で、大腸環境の改善を目的とした機能性食品・生菌製剤等の従来の開発・有効性評価には、いくつかの問題がある。「ヒト介入試験」では、倫理的要因により糞便の解析に限られる上、評価期間が長いために費用が高むことが多く、「動物実験」では、一様の結果のみが得られることや人の腸内環境との違いによる結果の齟齬があり、実環境の腸内細菌に対する機能性食品の作用機序は不明であった。申請者らは、これらの問題点を解決し、実環境に近い条件で時系列/反復実験を行うために、ヒト糞便を摂取源とし、個人ごとの菌叢や代謝状態を再現する「培養系ヒト腸管モデル」を開発してきた。本モデルは、1)腸内細菌の99%以上を占める Firmicutes, Bacteroidetes, Acitnobacteria, Proteobacteria の4門の保持、難培養性細菌を含む全菌種の保持(1000種前後)、個人の菌叢の多様性を維持し、2)短鎖脂肪酸の構成比(酢酸/プロピオン酸/酪酸)を再現でき、3)既存のプレバイオティクス投与により、予測される応答を再現できる。

これらの背景を元に本研究は、個人で異なる腸内細菌群に対するプレバイオティクス(難消化性食物繊維)の効果について、モデル培養によってその代謝状態・菌叢の動態を解明すると同時に、ヒト介入試験によって実際の影響を評価し、二つの結果の比較を行う。培養系ヒト腸管モデルと介入試験の相関を明らかにすることで、個人ごとに有効性の有無が異なると考えられる機能性食品について、時間とお金をかけてヒト介入試験を実施しなくても健康効果を事前に確認できる画期的なテラーメイド評価システムの構築を目的としている。さらに本研究は、広く一般的に健康効果のある機能性食品を特定するための技術基盤となる。

### 2. 研究の目的

本研究は【機能性食品の有効性をテラーメイドに事前評価する技術基盤を創出】つまりは、健康効果を事前に確認できる評価システムの構築を目的とし、以下の2つの実験によって展開される。

(1)「培養系ヒト腸管モデル」を用いたヒト糞便の培養により、腸内細菌群に影響を与える種々の機能性食品について、個人ごとの有効性を短鎖脂肪酸・菌叢変化から見積もる。

(2)「ヒト介入試験」により、有効性が予測された機能性成分の摂取前/後における健康効果の所見と糞便の菌叢変化を個人ごとにモデルと比較し、事前評価技術を確立する。

### 3. 研究の方法

培養系ヒト腸管モデルの運転は、GAM培地を主成分とする合成培地100 mLを8連培養システム(Bio Jr.8; 図1)に満たして密閉・滅菌し、N<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>(80:20)の混合ガスを通気することで嫌気状態を維持しながら37°Cで培養を行う。

ここに、健康人ボランティアから提供を受けたスワブ(BBLカルチャースワブプラス)に封入された糞便を還元剤の入ったPBS溶液に懸濁し、100 µLを無菌的に接種して30時間の培養を行う。機能性成分を0.2%の濃度で別々に添加し、対照区には添加せずに培養を行う。

培養系ヒト腸管モデル



図1 培養系ヒト腸管モデル、培養装置の写真

腸内細菌群の解析として重要である核酸、短鎖脂肪酸(特に酢酸、プロピオン酸、酪酸)、細胞内代謝産物を分析する。具体的には、核酸解析はNGS(Miseq)を用いた 16S rRNA 遺伝子の Deep シーケンスによる菌叢の構造変化を解析する。また、短鎖脂肪酸の解析は高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による培養液の分析によって、細胞内代謝解析は質量分析計(LC-QqQ-MS, GC-MS)にて菌体から代謝産物を網羅的に抽出して行う。これらの解析は経時的な実施が可能であるため、培養時の腸内細菌の代謝状態をモニタリングすることが可能である。機能性成分の添加あり/なしを比較し、添加時の生態・生理の動的変化から、糞便提供者が摂取した場合に有益な影響を及ぼす成分の種類を検出する。指標としては、摂取効果として排便回数の増加や免疫賦活作用の報告のある短鎖脂肪酸の増加、それに呼応する既報の有用菌などの増加を検出することで、それらの有効性を予測する。

#### 4. 研究成果

神戸大学では、*in vitro* ヒト腸内細菌叢モデル(Kobe University Human Intestinal Microbiota Model [KUHIMM])を構築し、成果を報告している。KUHIMM はヒト便検体の培養により、個人ごとに異なる大腸内細菌群の菌数・菌種の保持および短鎖脂肪酸(ヒトの健康に様々な影響を与える物質)濃度のバランスを再現できる。

初年度(1年目)は、機能性食品・プレバイオティクスとして種々の食物繊維素材を用い、ヒト腸内細菌叢および代謝プロファイルに対するこれらの影響を KUHIMM で試験し、さらにはヒト介入試験を実施して比較することで KUHIMM の有効性を比較評価した。次年度(2年目)は、1年目の結果から「腸内細菌叢と短鎖脂肪酸産生に影響を与える食物繊維の種類が個人ごとに異なる」という知見を詳しく掘り下げる研究を実施した。KUHIMM 培養液中の短鎖脂肪酸濃度や腸内細菌の構造だけでなくその他のパラメーターの挙動を測定し、食物繊維素材の構造等との相関関係を解析した。最終年度である3年目は、2年目の解析を続けて行い、検体数とその結果を集積した。

本研究の具体的な成果は、KUHIMM 培養は健康人の便検体を接種源とし、構造様式の異なる食物繊維を培養のある時間に添加し、そこから24時間の培養を行うことで得た。経時的に培養液を採取して短鎖脂肪酸濃度を測定するとともに、次世代シーケンサーによる 16S rRNA 遺伝子の網羅的な解析を行った。その結果 KUHIMM およびヒト介入試験では、食物繊維を摂取しても個人ごとに異なる腸内細菌叢を劇的に変化させないことが明らかになった(図2)。しかしながら、短鎖脂肪酸の産生には変化が観察され(図3)、菌叢の変化なしに代謝物産物の産生が促進されることが示唆された。つまり、KUHIMM は実際にヒトが摂取する必要なしに、その機能性を予測できる可能性を示すことに成功した。これらの成果は学術論文や学会発表を通じて発信した。また、最終年度にまとめた解析結果については、特許化および海外学術誌に提出済みである。

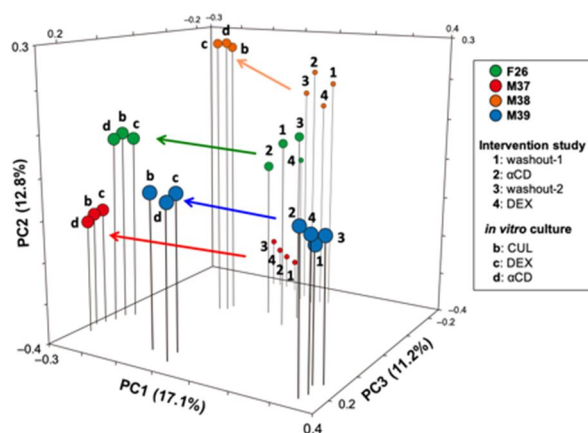


図2 主座標分析による菌叢構造の比較  
プロット 1-4 はヒト介入試験時、b-d は KUHIMM 培養の菌叢構造。(プロットがまとまる=構造が似ている)

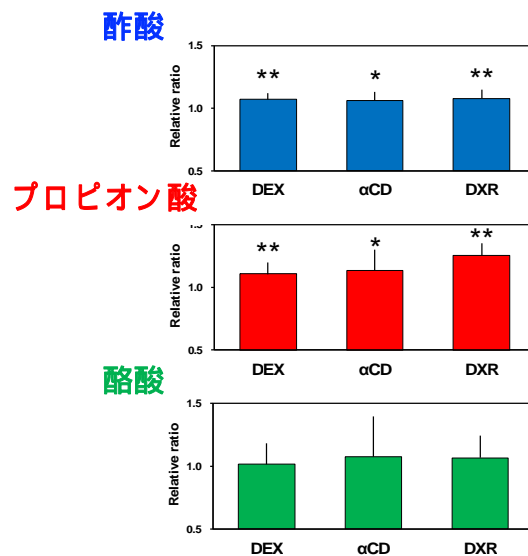


図3 短鎖脂肪酸濃度の相対比の比較  
非添加培養時の濃度を 1.0 とした場合の 3 種食物繊維添加培養時の濃度。酢酸およびプロピオン酸がどの食物繊維添加時でも有意差を持って増加

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sasaki Daisuke, Sasaki Kengo, Ikuta Naoko, Yasuda Takahiro, Fukuda Itsuko, Kondo Akihiko, Osawa Ro	4. 巻 8
2. 論文標題 Low amounts of dietary fibre increase in vitro production of short-chain fatty acids without changing human colonic microbiota structure	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 453
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-017-18877-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sasaki Daisuke, Sasaki Kengo, Kadowaki Yasushi, Aotsuka Yasuyuki, Kondo Akihiko	4. 巻 9
2. 論文標題 Bifidogenic and butyrogenic effects of young barely leaf extract in an in vitro human colonic microbiota model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 AMB Express	6. 最初と最後の頁 182
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1186/s13568-019-0911-5">https://doi.org/10.1186/s13568-019-0911-5</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐々木大介、佐々木建吾、生田直子、近藤昭彦、大澤朗
2. 発表標題 培養系ヒト腸管モデルを用いた難消化性食物繊維の腸内細菌群への影響
3. 学会等名 腸内細菌学会
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 佐々木大介、佐々木建吾、生田直子、福田伊津子、近藤昭彦、大澤朗
2. 発表標題 in vitro培養系ヒト腸内細菌叢モデル（KUHIMM）を用いた難消化性食物繊維の影響評価
3. 学会等名 日本生物工学会
4. 発表年 2018年～2019年

## 〔図書〕 計4件

1. 著者名 佐々木大介, 佐々木建吾, 近藤昭彦, 大澤朗	4. 発行年 2018年
2. 出版社 日本食物繊維学会	5. 総ページ数 11
3. 書名 日本食物繊維学会会誌	

1. 著者名 佐々木大介, 佐々木建吾	4. 発行年 2019年
2. 出版社 ニュー・サイエンス社、北隆館	5. 総ページ数 6
3. 書名 アグリバイオ	

## 〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 食物繊維の哺乳動物腸内での分解性能または有機酸生産能を評価する方法	発明者 佐々木大介、佐々木建吾、近藤昭彦	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-56736	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

## 〔取得〕 計0件

## 〔その他〕

-

## 6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----