

in vitro ヒト大腸細菌叢モデルによる構造の異なる食物繊維の発酵性評価法

佐々木 建吾, 佐々木 大介

1. はじめに

ヒト腸管内には 10^{14} 個以上の腸内細菌（マイクロバイオータ）が生息しており、宿主であるヒトと共生関係にあり、互いのホメオスタシス（生体恒常性）を維持している¹⁾。しかし、この恒常性が崩れ腸内細菌の構成が乱れた状態（dysbiosis）は腸管だけでなく全身の臓器の疾患に影響することが報告されている²⁾。そのため腸内細菌に介入して特定の細菌の増殖や活性を変化させるプレバイオティクスは、宿主の健康改善に有用であると期待されている。プレバイオティクスは1995年にGibsonとRoberfroidにより「宿主の健康に有利に作用する難消化性食品成分」と定義された³⁾。すなわちプレバイオティクスは、胃や小腸で分解・吸収されずに大腸まで届き、腸内細菌叢を整えて（腸内有用菌の増殖を促進し、腸内有害菌の増殖を抑制する）腸内環境を浄化することで、免疫賦活や疾病予防等の効果が期待されている（図1）。難消化性食品成分の代表である食物繊維には水溶性と不溶性とが存在し、どちらも野菜等の植物に多く含まれている。本稿で取り上げる水溶性食物繊維はプレバイオティクスとして働くことが報告されている、あるいは期待されている食品素材であり、いずれもグルコースを構成糖とするものである。難消化性デキストリンには製造方法が異なる複数の商品があり、国内外で販売されている。ポリデキストロースや難消化性グルカン、イソマルトデキストリンは、製造方法が大きく異なり、それぞれ特徴ある構造を有している。食物繊維がヒト腸内細菌によって利用されて作られる短鎖脂肪酸は生理活性物質として働くため、食物繊維の異なる構造（グリコシド結合）が腸内細菌による発酵に対して与える効果を評価するシステムの構築が求められていた。我々の研究グルー

プにおけるヒト大腸内の細菌叢構造および代謝産物の構成を模擬できる培養システム「*in vitro* ヒト大腸細菌叢モデル」を用いて⁴⁾、腸内細菌による食物繊維の発酵性を測定するための方法を紹介する。

2. グリコシド結合の比率が異なる食物繊維の比較

難消化性デキストリン、ポリデキストロース、難消化性グルカンは、デンプンやグルコースを原料として加熱処理ないしは酸等を触媒として加えて加熱処理して製造され⁵⁾、加水分解・グリコシル基転移・再重合の三つの反応が関与している。すなわちデンプン中の α -(1 \rightarrow 4)結合・ α -(1 \rightarrow 6)結合が加水分解され、加水分解された画分は α -(1 \rightarrow 4)結合・ α -(1 \rightarrow 6)結合以外のグリコシド結合により枝分かれ構造が形成される。また、イソマルトデキストリンはデンプンに酵素処理をして製造され、 α -(1 \rightarrow 6)結合が伸長した構造を有する。本研究では、構造の異なる6種類の水溶性食物繊維〔ポリデキストロース（PDX）、難消化性グルカン（RGN）、3種類の難消化性デキストリン（DEX-1, DEX-2, DEX-3）、イソマルトデキストリン（IMD）〕を収集し、構造について分析を行った（図1）。このように構造が異なる理由は、各種食物繊維の原料や製法が異なるからである。（1 \rightarrow 2）結合・（1 \rightarrow 3）結合の割合が低ければ、 α 結合に対する β 結合の割合は低い傾向が認められた。なお食物繊維中の糖残基の結合位置をメチル化分析で同定し、 α 結合/ β 結合は核磁気共鳴で分類した。

3. 食物繊維各種の分解特性の違いを明らかにする *in vitro* ヒト大腸細菌叢モデルの構築

1) 培養系ヒト腸管モデルの背景

機能性食品、医薬品等の機能性・安全性や、ヒトに与える影響評価は一般的にはヒト介入試験や動物試験によって行われているが、我々は*in vitro*系によるハイスループット評価系の構築を行ってきた。海外では、ベルギーのSimulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem（SHIME）が有名なヒト腸管モデルである⁶⁾。SHIMEの構造的な特徴は、胃から大腸までの各部位を模した培養槽が連続的に配置されている点であり、培養槽ごとに異なる滞

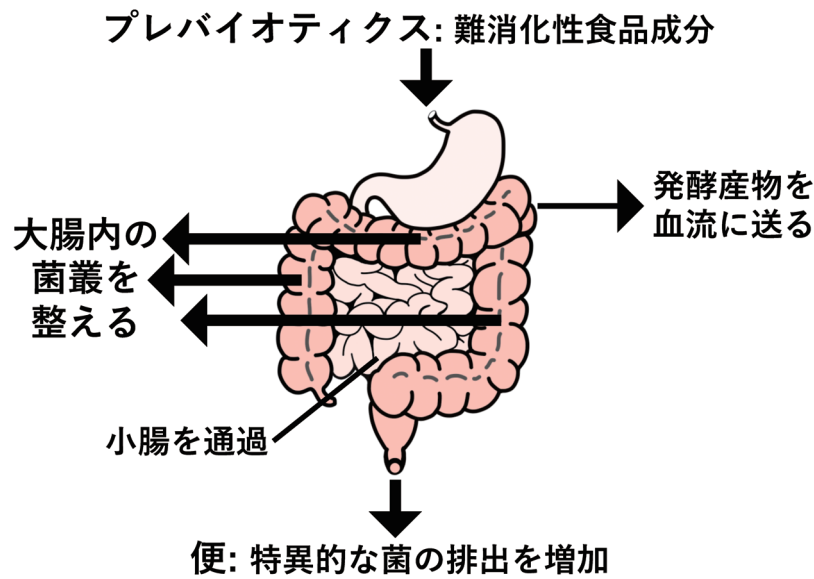
神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科（〒657-8501 兵庫県神戸市灘区六甲大町 1-1）

Evaluation of dietary fibers by *in vitro* human colonic microbiota model

Kengo Sasaki and Daisuke Sasaki (Graduate School of Science, Technology and Innovation, Kobe University, 1-1 Rokkodai-cho, Nada-ku, Kobe, Hyogo 657-8501, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2021.930167

© 2021 公益社団法人日本生化学会



【目的】複数の水溶性食物繊維について、それぞれの発酵性を*in vitro*ヒト大腸細菌叢モデルで解析し、各種食物繊維の物性（構造）との関連を明らかにする

食物繊維	構造：グリコシド結合 (%)					分子量	食物繊維含有量 (%)
	1→4	1→6	1→2	1→3	β結合 / α結合		
ポリデキストロース (PDX)	25.2	54.0	12.8	7.9	0.44	728	82.2
難消化性グルカン (RGN)	35.2	48.0	10.6	6.2	0.46	792	77.3
難消化性デキストリン (DEX-1)	53.4	34.3	5.7	6.7	0.39	2190	88.3
難消化性デキストリン (DEX-2)	38.3	47.5	8.2	6.0	0.42	1198	90.8
難消化性デキストリン (DEX-3)	51.5	36.8	5.1	6.6	0.31	1371	96.7
イソマルトデキストリン (IMD)	26.8	71.8	0.0	1.4	0.06	2176	87.0

図1 プレバイオティクスの概念とグリコシド結合の構造が異なる各種食物繊維の収集

留時間で試験食品および腸内細菌が一方向に送られる。しかしながら、報告されている多くのシステムの植菌源はヒト糞便であるものの、腸内細菌叢の系統学的な構成が元の状態から変化することが懸念される。したがって、特に上記システム下部の大腸部位において、食物繊維の摂取時のヒト腸内細菌叢に対する影響の再現性は限定的であると思われる。一方、我々の*in vitro*モデルではヒト大腸内の細菌叢を保持することに注力した（図2）。

2) 神戸大*in vitro*ヒト大腸細菌叢モデル

ヒト腸管内には300～500種以上の微生物種が存在しており⁷⁾、神戸大*in vitro*ヒト大腸細菌叢モデルではこれらの菌種を*in vitro*系内に保持することを目指した。100μLヒト臨床検体（糞便）懸濁液を、ガラスベッセル内のGAM（Gifu Anaerobic Medium）を主成分としてリン酸緩衝液を含む100mL培地に添加し、嫌気ガスをバブリングしながら攪拌して培養した。各培地には1人の臨床検体を添加し、計8人の健康人ボランティア検体を使用した。本研究の目的は、食物繊維各種の発酵性の特性を明らかにするこ

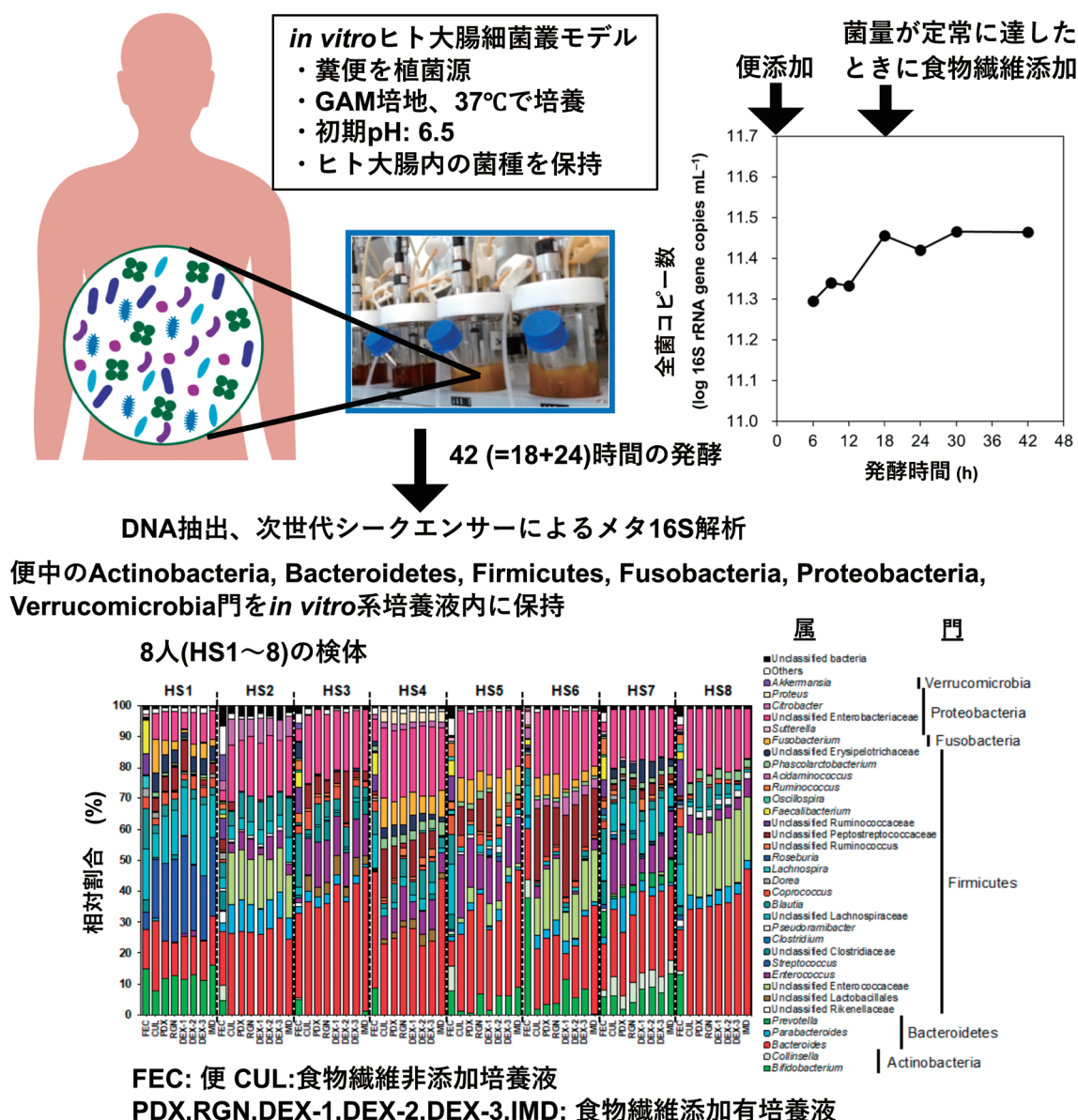


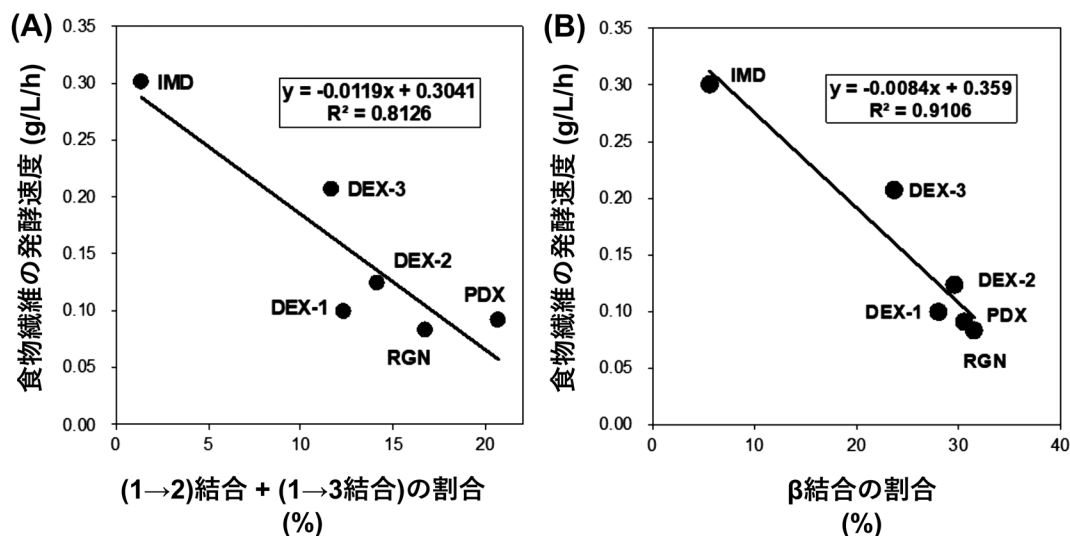
図2 食物繊維の発酵性を調べる *in vitro* ヒト大腸細菌叢モデルとメタ16S解析結果

とである。そのため糞便を18時間培養して菌量が定常に達したところで、1種類の食物繊維（終濃度：10g/L）それぞれをガラスベッセル内に添加した。それぞれの検体（糞便）について、食物繊維を添加しない系をControlとして食物繊維各種（PDX, RGN, DEX-1, DEX-2, DEX-3, IMD）をそれぞれ添加して計七つの *in vitro* ヒト大腸細菌叢モデルを構築した。食物繊維を添加してから24時間のさらなる培養を行い、トータル42（=18+24）時間の発酵を行った。

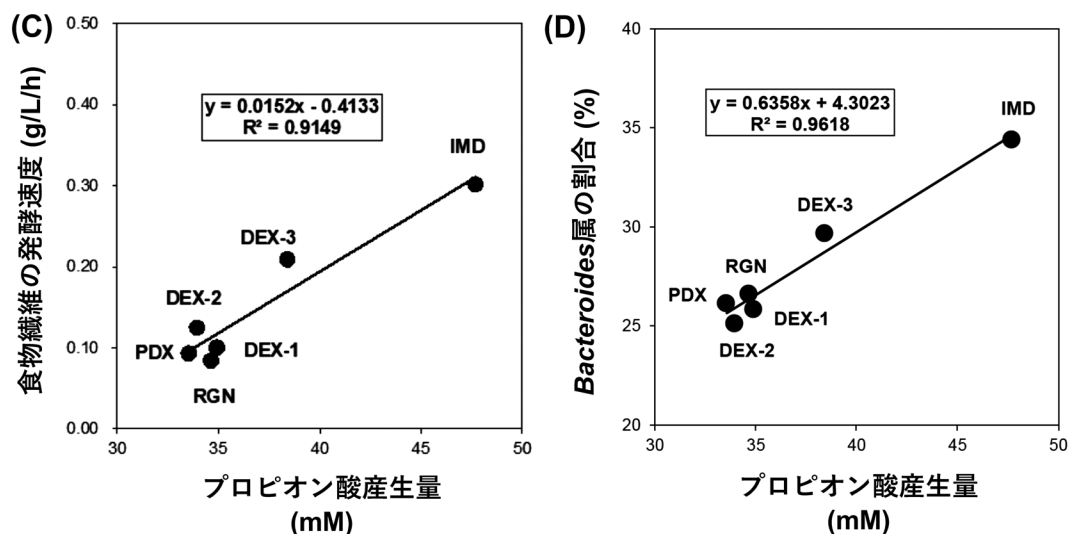
in vitro モデルの菌叢としての妥当性を評価した。42時間の発酵後に培養液および植菌源となる糞便よりDNAを抽出して、16S rRNA 遺伝子のV3~V4領域を対象とした特異的プライマーを使用して次世代シーケンサーによるメ

タ16S解析を行った⁸⁾。植菌源の糞便検体（FEC）、食物繊維非添加時の培養液（CUL）、各種食物繊維添加時（RGN, PDX, DEX-1, DEX-2, DEX-3, IMD）の順に並べてそれぞれの菌叢構造を比較した。相対割合が1%以下のOperational Taxonomic Unit（OTU；97%以上の相同性配列を持つ配列をグループ化したもの）は“Others”として、未同定のOTUは“Unclassified bacteria”としてまとめた（図2）。糞便中、培養液中のいずれでもOTU数は500以上であり、かつ糞便中のOTUがおおむね培養液中に保持されていることを確認した。門および属レベルで調べてみると一部の門・属の相対割合は糞便と培養液の間で乖離は認められるものの、糞便中の門・属は培養液中に検出されていることが確認できる（現在はこの乖離を少なくした培養法が確立しつつあ

(1→2)結合, (1→3)結合やβ結合は腸内細菌にとって難発酵性



- ・複雑な構造の食物繊維を代謝する酵素を持つ菌は主に *Bacteroides* 属
- ・ *Bacteroides* 属はプロピオン酸生成経路を持つ

*Bacteroides*属が発酵速度やプロピオン酸生成に影響している図3 *in vitro* ヒト大腸細菌叢モデルによる食物繊維の発酵性試験結果

る。また、食物繊維添加試験で主要なターゲットとなる腸内細菌や短鎖脂肪酸の挙動について、本モデルは評価可能である（後述、図3D）。

4. *in vitro* モデルによる食物繊維の発酵性評価

1) (1→2) 結合・(1→3) 結合やβ結合が難発酵性の決め手となる

in vitro ヒト大腸細菌叢モデルにおいて、糞便添加後の

18時間後に食物繊維を加えてから3時間ごとに培養液のサンプリングを行った。食物繊維に含まれるオリゴ糖を酵素分解して定量する酵素-HPLC法を用いて培養液中に残存する食物繊維量を解析した。細菌叢モデルによる食物繊維の発酵速度 ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$) を算出するために、食物繊維の利用が直線的に進む点を使用した。興味深いことに、健康人8名の臨床検体（糞便）から得られた食物繊維発酵速度の平均値は、食物繊維中の(1→2)結合・(1→3)結合の割合やβ結合の割合と反比例の関係を示した（図3A,

B). すなわち、食物繊維を製造する際に新たに形成される(1→2)結合・(1→3)結合や β 結合が微生物による難発酵性の指標となっていることを示している。

食物繊維は複雑なグリコシド結合を有しているために難発酵性である。これを最初に代謝する酵素を有する腸内細菌は主に *Bacteroides* 属に属する菌に限られ、主な代謝産物はプロピオン酸である^{9, 10)}。そのような菌として知られている *Bacteroides thetaiotaomicron* に対して α -(1→2)結合は α -(1→6)結合よりも抵抗性が高いことが示されており¹¹⁾、我々の結果と一致している。

2) 食物繊維発酵性と腸内細菌プロピオン酸産生の関連

腸内細菌による食物繊維の発酵産物である短鎖脂肪酸(主に酢酸、プロピオン酸、酪酸)は、宿主のエネルギー代謝にさまざまな益を与えることが知られている¹²⁾。興味深いことに、健康人8名の臨床検体(糞便)から得られた食物繊維発酵速度の平均値は、食物繊維の発酵で産生するプロピオン酸濃度の平均値と正の相関関係を示した(図3C)。 *Bacteroides* 属はコハク酸を経由してプロピオン酸を生成する代謝経路を有していることが知られており、腸から吸収されたプロピオン酸は糖新生を受けてグルコースに変換され、ヒトのエネルギー代謝の調節に深く関わっている¹⁰⁾。ヒト大腸細菌叢モデルに占める *Bacteroides* 属の割合とプロピオン酸産生量に正の相関関係があることを考え合わせると(図3D)、 *Bacteroides* 種が食物繊維の発酵性とプロピオン酸産生に大きく寄与していると考えられる。

5. おわりに

神戸大 *in vitro* ヒト大腸細菌叢モデルは食物繊維の発酵性を測定することに成功して、発酵産物の生産を予測することが可能であった。本モデルは、プレバイオティクスがヒト腸内細菌に与える効果を評価するためのシステムとして、動物実験やヒト介入試験のプレないしはポスト評価系として利用できると期待される。また我々は、*in vitro* 系内に潰瘍性大腸炎や冠動脈疾患のような疾患患者のヒト腸内細菌叢の特徴を再現することに成功している^{13, 14)}。プレバイオティクスだけでなく有用なプロバイオティクス(生菌添加物)を *in vitro* 系で探索してヒト腸内細菌叢を改善することで、疾患に対する既存の薬物の効果を高めることが期待される。

謝辞

本研究は、神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科・近藤昭彦教授のご支援で実施されたものであり、深く感謝いたします。

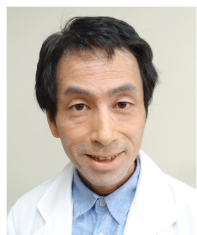
文 献

- 1) Thursby, E. & Juge, N. (2017) Introduction to the human gut microbiota. *Biochem. J.*, **474**, 1823–1836.
- 2) Carding, S., Verbeke, K., Vipond, D.T., Corfe, B.M., & Owen, L.J. (2015) Dysbiosis of the gut microbiota in disease. *Microb. Ecol. Health Dis.*, **26**, 26191.
- 3) Gibson, G.R. & Roberfroid, M.B. (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.*, **125**, 1401–1412.
- 4) Takagi, R., Sasaki, K., Sasaki, D., Fukuda, I., Tanaka, K., Yoshida, K., Kondo, A., & Osawa, R. (2016) A Single-Batch Fermentation System to Simulate Human Colonic Microbiota for High-Throughput Evaluation of Prebiotics. *PLoS One*, **11**, e0160533.
- 5) Wang, Y.J., Kozlowski, R., & Delgado, G.A. (2001) Enzyme resistant dextrans from high amylose corn mutant starches. *Starch*, **53**, 21–26.
- 6) Van den Abbeele, P., Grootaert, C., Marzorati, M., Possemiers, S., Verstraete, W., Gérard, P., Rabot, S., Bruneau, A., Aidy, S.E., Derrien, M., et al. (2010) Microbial community development in a dynamic gut model is reproducible, colon region specific, and selective for *Bacteroidetes* and *Clostridium* cluster IX. *Appl. Environ. Microbiol.*, **76**, 5237–5246.
- 7) Quigley, E.M.M. (2013) Gut bacteria in health and disease. *Gastroenterol. Hepatol.*, **9**, 560–569.
- 8) Sasaki, D., Sasaki, K., Ikuta, N., Yasuda, T., Fukuda, I., Kondo, A., & Osawa, R. (2018) Low amounts of dietary fibre increase *in vitro* production of short-chain fatty acids without changing human colonic microbiota structure. *Sci. Rep.*, **8**, 435.
- 9) Holscher, H.D. (2017) Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota. *Gut Microbes*, **8**, 172–184.
- 10) Hosseini, E., Grootaert, C., Verstraete, W., & Van de Wiele, T. (2011) Propionate as a health-promoting microbial metabolite in the human gut. *Nutr. Rev.*, **69**, 245–258.
- 11) Djouzi, Z., Andrieux, C., Pelenc, V., Somarriba, S., Popot, F., Pual, F., Monsan, P., & Szylit, O. (1995) Degradation and fermentation of alpha-glucosaccharides by bacterial strains from human colon: *in vitro* and *in vivo* studies in gnotobiotic rats. *J. Appl. Bacteriol.*, **79**, 117–127.
- 12) den Besten, G., van Eunen, K., Groen, A.K., Venema, K., Rijnsgoud, D.J., & Bakker, B.M. (2013) The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J. Lipid Res.*, **54**, 2325–2340.
- 13) Sasaki, K., Inoue, J., Sasaki, D., Hoshi, N., Shirai, T., Fukuda, I., Azuma, T., Kondo, A., & Osawa, R. (2019) Construction of a model culture system of human colonic microbiota to detect decreased Lachnospiraceae abundance and butyrogenesis in the feces of ulcerative colitis patients. *Biotechnol. J.*, **14**, e1800555.
- 14) Yoshida, N., Sasaki, K., Sasaki, D., Yamashita, T., Fukuda, I., Hayashi, T., Tabata, T., Osawa, R., Hirata, K., & Kondo, A. (2019) Effects of resistant starch on the gut microbiota and its metabolites in patients with coronary artery disease. *J. Atheroscler. Thromb.*, **26**, 705–719.

テクニカルノート

著者寸描

●佐々木 建吾 (ささき けんご)



神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科特命准教授。博士（農学）。

■略歴 1976年東京都に生まれる。2000年早稲田大学理工学部卒業。06年東京大学大学院農学生命科学研究科博士課程修了。電力中央研究所特別契約研究員、神戸大学特命助教を経て、16年より現職。

■研究テーマと抱負 ヒト腸内細菌叢や廃棄物処理に係る複雑微生物系の制御に

関する研究を進めています。健康社会・持続可能社会の構築を目指します。

■ウェブサイト http://www2.kobe-u.ac.jp/~akondo/sasaki_kengo.html

■趣味 ウォーキング

●佐々木 大介 (ささき だいすけ)



神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科特命助教。博士（農学）。

■略歴 1977年岩手県に生まれる。2003年帝京科学大学大学院理工学研究科博士前期課程修了。08年東京大学大学院農学生命科学研究科博士後期課程修了。東京大学特任研究員、電力中央研究所特別契約研究員、神戸大学特命助教を経て18年より現職。

■研究テーマと抱負 微生物による次世代医療への貢献、また有用腸内細菌・機能性食品素材の研究開発による健康社会の構築を目指しています。

■ウェブサイト http://www2.kobe-u.ac.jp/~akondo/sasaki_daisuke.html

■趣味 自動車整備、魚釣り。