

酪酸を産生する腸内細菌とその利用に関する研究

2019年1月

佐藤 直

酪酸を産生する腸内細菌とその利用に関する研究

筑波大学大学院
生命環境科学研究科
生物機能科学専攻
博士（農学）学位論文

佐藤 直

目次

第1章 序論.....	1
第2章 乳酸を酪酸に変換する腸内細菌およびそれらのヒトにおける分布.....	4
2.1 緒言	4
2.2 材料と方法.....	5
2.3 結果	12
2.4 考察	15
第3章 乳酸を酪酸に変換する腸内細菌の <i>in vivo</i> における活性	31
3.1 緒言	31
3.2 材料と方法.....	31
3.3 結果	37
3.4 考察	38
第4章 酪酸の産生を促進する難消化性糖質の探索	48
4.1 緒言	48
4.2 材料と方法.....	49
4.3 結果	57
4.4 考察	60
第5章 総括.....	81
参考文献.....	86
主論文目録.....	99
謝辞	100

第1章 序論

ヒト大腸内には数百から 1,000 種類以上の細菌が棲息しており、その数は約 100 兆個にも達することが知られている[1]。腸内細菌群は主に食事に含まれる未消化の栄養成分を基質として様々な代謝産物を産生することにより、ヒトの健康に多大な影響を及ぼしている。食事で摂取した炭水化物のうち、約 85%が胃および小腸などの上部消化管において消化吸収され、残りが難消化性糖質として下部消化管に到達するとされている[2]。難消化性糖質は下部消化管内において、腸内細菌により発酵基質として利用され、酢酸、プロピオン酸、酪酸などのいわゆる短鎖脂肪酸が主要な代謝産物として産生される。これら短鎖脂肪酸は腸管から吸収された後、大部分は腸管粘膜上皮細胞のエネルギー源として消費され、残りは血中に移行して肝臓、筋肉などの末梢組織において利用される。短鎖脂肪酸は様々な生理作用を示すが、なかでも酪酸は極めて多彩な作用を有することが知られている。例えば、酪酸は大腸粘膜上皮細胞の主要なエネルギー源として利用される[3,4]だけでなく、ヒストン脱アセチル化酵素を阻害することにより[5,6]、大腸がん細胞の増殖を抑制して分化およびアポトーシスを誘導すること[7-11]、炎症およびアレルギー反応の抑制に中心的役割を果たす獲得免疫系細胞の成熟を促進すること[12,13]、自然免疫系細胞による炎症性サイトカインの産生を抑制すること[14]などが知られている。大腸がんについては、実際にモデル動物への酪酸の腸注により発症の抑制が認められている[15,16]。また、潰瘍性大腸炎患者の糞便中では酪酸濃度が低下していること[17]、患者への酪酸溶液の腸注により症状が改善することが報告されている[18,19]。したがって、腸内における酪酸の産生を制御することは、大腸機能の恒常性維持、大腸疾患の予防および改善に重要であると考えられる。酪酸は経口的に摂取すると上部消化管で吸収されてしまうため、主な作用点である下部消化管に到達させることができない。したがって、腸内で酪酸産生菌の代謝を活性化させることが、大腸粘膜組織に酪酸を効率的に供給する有効な方法の一つである。これまでに、いくつかの難消化性糖質の摂取により糞便中の酪酸濃度が上昇することが示されている[20]が、その産生量は

糖質の種類や個人の腸内菌叢構成の違い等に大きく影響される。したがって、腸内における酪酸の産生を制御する有用な方法は未だ確立されていないのが現状である。

ヒト腸内における酪酸産生菌は、16S rRNA 遺伝子配列を基にした分類体系[21]において、*Clostridium* クラスター I、IV、IX、XI、XIVa、XV および XVI、*Fusobacteriaceae* 科などの極めて幅広い範囲に分布していることが示されている[22]。なかでも特に、クラスター XIVa (*Cl. coccooides* グループ) および IV (*Cl. leptum* サブグループ) は、総菌数のそれぞれ約 29% および 15% を占める最優勢菌群であることが報告されており[23]、腸内における酪酸の産生に重要な役割を担っていると考えられている[24-27]。糞便中の細菌叢のメタゲノム解析により、炎症性腸疾患患者[28,29]に加え、2型糖尿病[1]、肥満[30]および動脈硬化症[31]の患者において、上記クラスターに属する酪酸産生菌の割合が低下していることが示されており、酪酸産生菌と生活習慣病との関連性が注目されている。上述の通り、酪酸産生菌は極めて幅広いクラスターに分布しており、腸内ではその代謝特性により種々の栄養素のニッチを占めることで他の腸内細菌と互いに影響を及ぼし合い、複雑な生態系を形成していると推測される。したがって、腸内の酪酸産生菌の生態およびその代謝特性を理解することは、大腸や全身性の疾患予防の観点からも極めて重要といえる。

このような背景から本研究では、ヒト腸管由来の酪酸産生菌に着目し、その代謝特性とそれを利用した酪酸産生の制御法に関する研究を行った。第 2 章では、腸内において難消化性糖質の発酵により生じる乳酸が酪酸産生の重要な前駆物質となっていると考え、乳酸を酪酸に変換する腸内細菌を探索した。さらに、当該活性を持つ菌のヒトにおける分布について分子生物学的手法を用いて調べた。第 3 章では、難消化性糖質から乳酸を産生するビフィズス菌と乳酸を酪酸に変換する菌を共培養し、2 菌の協働作用によって酪酸が産生されるか否かを検証した。さらに、乳酸を酪酸に変換するヒト腸内細菌株の腸内における活性を動物モデルにより検証した。第 4 章では、酪酸産生の基質に焦点を当て、ビフィズス菌による乳酸の産生を介さずに直接酪酸の産生を促進させる難消化性糖質の探索を行った。また、高

い活性を示した基質について、基質からの酪酸の産生に寄与する腸内細菌の解明を試みた。
さらに、各種腸内細菌による当該基質の資化性についても検討し、素材としての特性を評価した。

第2章 乳酸を酪酸に変換する腸内細菌およびそれらのヒトにおける分布

2.1 緒言

食事に含まれる難消化性糖質は、下部消化管内で腸内細菌により嫌気発酵の基質として利用される。これら難消化性糖質の中には、機能性を持った、いわゆる「プレバイオティクス」が含まれる。「プレバイオティクス」とは、Gibson および Roberfroid によって提唱された概念であり、「大腸内における特定の細菌の増殖および活性を選択的に変化させ、宿主の健康に寄与する難消化性の食品成分」と定義されている[32]。オリゴ糖は一般的に良く知られたプレバイオティクスであり、腸内におけるビフィズス菌 (*Bifidobacterium* 属細菌) の増殖を選択的に促進し、整腸作用などを発揮する。オリゴ糖を含む各種難消化性糖質のヒトへの投与試験に関するメタアナリシスでは、難消化性糖質の摂取は、腸内での *Bifidobacterium* 属細菌および乳酸桿菌 (*Lactobacillus* 属細菌) の割合を増加させると同時に、糞便中の短鎖脂肪酸のうち酪酸の濃度を高めることが示されている[20]。しかしながら、*Bifidobacterium* 属細菌および *Lactobacillus* 属細菌は糖質から主として乳酸および酢酸を産生するが、酪酸を産生する能力を持たない。*Bifidobacterium* 属細菌は、日本人では腸内における総細菌の約 6%を占める優勢菌群の一つであり[23]、腸内での乳酸および酢酸の産生に大きく寄与していると考えられる。ところが、健常なヒト糞便中では、乳酸はほとんど検出されない[17]。少数の欧米人を対象とした試験において、糞便の希釈液に乳酸を加えると主に酪酸が生成することが報告されており[33]、腸内には乳酸を酪酸に変換する菌が存在すると考えられている。実際に、ヒト腸内優勢菌群である *Clostridium* クラスタ XIVa に属するいくつかのヒト腸内細菌種が乳酸を酪酸に変換する活性を示すことが報告されている[34]。したがって、腸内では *Bifidobacterium* 属細菌による難消化性糖質の発酵によって生じた乳酸は、その一部が他の腸内細菌によって酪酸産生の前駆物質として利用さ

れていると推察される。

そこで、まず日本人を対象とした試験により、糞便に乳酸を添加してその消長と酪酸濃度の推移を調べた。さらに、乳酸を酪酸に変換する活性を示す菌をヒト糞便からスクリーニングした。併せて、ヒト消化管から見出される既知の細菌種およびその近縁種を対象に、当該活性を示す菌を探索した。また、活性を示した菌種のヒトにおける分布を分子生物学的手法により解析し、腸内における主要な菌群の特定を試みた。

2.2 材料と方法

2.2.1. ヒト糞便への乳酸添加試験

・糞便の処理および培養

健康成人男性 5 名 (A-1~A-5: 年齢 27~41 歳、平均 34.4 ± 5.0 歳) から糞便を採取し、アネロパックケンキ (三菱ガス化学) により嫌気状態を維持したまま、試験実施まで保冷剤にて冷蔵で保持した。嫌気チャンバー (Coy Laboratory Products) 内に糞便を搬入し、手で十分に均質化した後、糞便約 5 g を測り取り、予め嫌気置換しておいた PBS を糞便重量の 4 倍量を添加した。滅菌ガラスビーズ (2 mm 径、トミー精工) 2 g を加えて手で激しく振盪した。懸濁液を滅菌ガーゼでろ過して残渣を除去し、ろ液 10 ml を回収して糞便 5 倍希釈液を作製した。嫌気置換済みの 1 M DL-乳酸ナトリウム溶液 (pH 6.0) を 500 μ l 添加し (最終乳酸濃度 約 48 mM)、37°C で嫌氣的にインキュベートした。気相中の嫌気ガスの組成は、N₂ 80%、CO₂ 15%、H₂ 5% に維持した。培養液を経時的に 450 μ l サンプリングし、10% 過塩素酸溶液を 50 μ l 加えて混合した後、4°C で一晩静置した。4°C のもと 15,000 rpm で 5 分間遠心し、上清を 0.45 μ m のフィルターでろ過して有機酸分析に供した。

・イオン排除 HPLC による有機酸分析

糞便希釈液および培養液上清中の有機酸濃度は、既報[35]に従い 2 点絶対検量線法により測定した。標準物質には酢酸、酪酸、イソ酪酸、ギ酸、プロピオン酸、吉草酸およびイソ吉草酸のナトリウム塩、コハク酸および乳酸リチウムの計 9 種類（全て関東化学）を用いた。サンプルおよび 10% 過塩素酸溶液を 9:1 の割合で混合した後、4°C で一晚静置した。4°C のもと 15,000 rpm で 5 分間遠心し、上清を 0.45 μm のフィルターでろ過して有機酸分析に供した。分離カラムには有機酸分析用カラム RSpak KC-811 $\times 2$ （昭和電工）を用い、カラム温度を 42°C に設定した。注入試料量は 10 μl とし、分析時間 35 min とした。溶離液は 15 mM 過塩素酸-7% アセトニトリル溶液（流速 1.0 ml/min）を用い、カラム溶出後に pH 調整剤である 15 mM 過塩素酸-60 mM トリスヒドロキシメチルアミノメタン-7% アセトニトリル（流速 1.0 ml/min）と混合させ、セル温度 45°C に設定した 432 電気伝導度検出器（Waters）により検出した。

2.2.2 乳酸を酪酸に変換する腸内細菌のヒト糞便からのスクリーニング

・スクリーニング方法

健常成人男性 10 名（HD-1~HD-10: 年齢 26~44 歳、平均 35.6 \pm 5.8 歳）から糞便を採取し、アネロパックケンキにより嫌気状態を維持したまま、試験実施まで保冷剤にて冷蔵で保持した。嫌気チャンバー内に糞便を搬入し、手で十分に均質化した後、糞便 3 g を遠心管に測り取り、予め嫌気置換しておいた PBS 溶液 27 ml を加えた。滅菌ガラスビーズ（2 mm 径、トミー精工）2 g を加えて手で激しく振盪し、糞便懸濁液を作製した。懸濁液を滅菌ガーゼでろ過し、糞便 10 倍希釈液を作製した。糞便 10 倍希釈液を嫌気希釈液にて 10⁸ 倍まで 10 倍ずつ段階希釈した。嫌気希釈液の組成は、1 L あたり Trypticase soy broth without dextrose（Becton Dickinson）16 g、炭酸ナトリウム 0.8 g、L-システイン 1 水和物 0.5 g、Bacto agar（Becton Dickinson）0.5 g とした。糞便の 10³ から 10⁸ 倍

希釈液の 0.1 ml を分離用平板培地に播種し、37°C で 72 時間嫌気培養した。分離用平板培地の組成は、1 L あたり Trypticase peptone (Becton Dickinson) 2.0 g、酵母エキス 0.5 g、L-システイン 1 水和物 0.5 g、炭酸ナトリウム 0.6 g、Bacto agar (Becton Dickinson) 16 g、0.05% ヘミン溶液 20 ml、0.1% レサズリン溶液 1.0 ml、92% DL-乳酸 3.25 ml (最終濃度 40 mM)、リン酸二水素カリウム 0.11 g、リン酸水素二カリウム 0.11 g、塩化ナトリウム 0.23 g、硫酸アンモニウム 11 g、塩化カルシウム 11 mg、硫酸マグネシウム 7 水和物 24 mg とし、pH 6.8 に調整して使用した。培養後、288 コロニーを拾い、分離用培地と同じ組成の液体培地に接種して 37°C で 24 時間嫌気培養した。培地中の有機酸濃度は 2.2.1 に示した方法に従い、イオン排除 HPLC により測定した。液体培養したコロニーのうち、5 mM 以上の乳酸消費量および 5 mM 以上の酪酸産生量を示したコロニーを選抜し、分離用平板培地にて繰り返し画線培養することで菌株を純粋分離した。分離培養操作は全て嫌気チャンバー内で行い、気相の嫌気ガス組成は、N₂ 80%、CO₂ 15%、H₂ 5% に維持した。

分離株を 1.0% グルコース添加 変法 GAM 液体培地 (日水製薬) により 37°C で 24 時間嫌気培養した後、培養液 0.04 ml を 40 mM の DL-乳酸および 33 mM の酢酸ナトリウムを加えたペプトン-酵母エキス (PYLA) 培地もしくは酢酸ナトリウムのみ加えた培地 (PYA) 4 ml に接種した。酸素を除去した炭酸ガスを気相とし、37°C で 24 時間嫌気培養した。ペプトン-酵母エキス (PY) 培地の組成は、1 L あたり Bacto Peptone (Becton Dickinson) 5.0 g、Trypticase peptone (Becton Dickinson) 5.0 g、酵母エキス 10.0 g、L-システイン 1 水和物 0.5 g、炭酸ナトリウム 0.4 g、0.05% ヘミン溶液 10 ml、0.1% レサズリン溶液 1.0 ml、リン酸水素二カリウム 0.4 g、リン酸二水素カリウム 0.04 g、炭酸水素ナトリウム 0.08 g、塩化ナトリウム 0.04 g、塩化カルシウム 8 mg、硫酸マグネシウム 7 水和物 1.9 mg、ビタミン K₁ 1.0 mg とし、pH 6.8 に調整して使用した。培養液中の有機酸濃度は 2.2.1 に記載した方法に従い、イオン排除 HPLC により測定した。PYLA および PYA 液体培地

中での分離株の増殖は、培養後の濁度 OD_{650nm} を測定することにより評価した。

2.2.3 分離株の同定

・菌体からの DNA の抽出

分離株を 1.0% グルコース添加 変法 GAM 液体培地により 37°C で 24 時間培養した。培養菌体からの DNA 抽出は、Zhu ら[36]の方法に従って実施した。培養後の菌体を 250 μ l の 100 mM Tris-HCl/40 mM EDTA 溶液 (pH 9.0) に懸濁した。そこに 0.7 g の滅菌ガラスビーズ (直径 0.1 mm、トミー精工) と 400 μ l のベンジルクロライドを添加し、Fast Prep FP120 (MP Biomedicals) によりレベル 6.5 で 30 秒間振とうして菌体を破碎した。10% SDS 溶液を 50 μ l 加え、50°C で 20 分間激しく振とうした。3 M の酢酸ナトリウムを 150 μ l 添加し、氷中に 15 分間静置した。4°C のもと 15,000 rpm で 10 分間遠心した後、上清を回収し、等量のイソプロパノールを加えた。4°C のもと 15,000 rpm で 10 分間遠心し、上清を除去した後、沈殿を 70% エタノールで洗浄した。減圧乾燥した後、沈殿を 30 μ l の TE バッファーに溶解した。

・ Random amplified polymorphic DNA (RAPD) 法を用いた分離株の菌株識別

分離株から抽出した DNA を鋳型とし、既報[37]に従って A : 5'-CCGCAGCCAA-3'、B : 5'-AACGCGCAAC-3' および C : 5'-GCGGAAATAG-3' の 3 種類をランダムプライマーとして使用し、PCR を行った。PCR は Gene Taq FP (ニッポンジーン) を使用した。増幅産物を 1.5% アガロースゲルにより電気泳動した後、エチジウムブロマイドを用いて染色し、菌株ごとの泳動パターンを比較した。

・ 16S rRNA 遺伝子の配列の決定と系統解析

分離株の菌体から抽出した DNA を鋳型とし、細菌の 16S rRNA 遺伝子の共通配列を標

的とした 8F : 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'、15R : 5'-AAGGAGGTGATCCARCCGCA-3'の2種類のプライマーを用いて、既報[38]に従い分離株の16S rRNA 遺伝子の全長をPCRにより増幅した。PCRはGene Taq FP (ニッポンジーン)を用いて行った。増幅したDNAの塩基配列はBig Dye Terminator Ver. 3.1 Cycle Sequencing Kit (ThermoFisher Scientific)およびABI PRISM 3100 (Applied Biosystems)を使用して決定した。配列決定には、8F, r1L (5'-GTATTACCGCGGCTGCTGG-3')、f2L (5'-CCAGCAGCCGCGGTAATAG-3')、r2L (5'-GACTACCAGGGTATCTAATC-3')、926f (5'-AAACTCAAAGGAATTGACGG-3')、r3L (5'-TTGCGCTCGTTGCGGGACT-3')、f3L (5'-GTCCCGCAACGAGCGCAAC-3')および15R[38,39]をプライマーとして使用した。分離株より得られた16S rRNA 遺伝子の配列は、DNA Data Bank of Japan (DDBJ)のBLASTプログラムに供し、近縁種のデータベース検索を行った。分離株ならびにこれらの近縁種を中心とする各種腸内細菌の16S rRNA 遺伝子の塩基配列をGenBank、EMBLおよびDDBJから取得した。各配列をClustal X (ver. 2.0.12) [40]によりアライメントし、近隣接合法 [41]を用いて系統樹を作成した。作成した系統樹はTree-Viewプログラム (ver. 1.6.6) [42]を用いて表示した。

2.2.4 既知菌種の菌株ライブラリーからのスクリーニング

・使用菌株および培養条件

ヒト消化管から分離される菌およびその近縁種である20菌属65菌種65株を試験に用いた (Table 2-3)。各菌株は、1.0%グルコースを添加した変法GAM液体培地 (日水製薬) もしくはPY培地により37°Cで24時間嫌気培養した後、培養液0.04 mlをPYLA培地4 mlに接種し、酸素を除去した炭酸ガスを気相として37°Cで24時間嫌気培養した。培養前後の培養液をサンプリングし、培養液中の有機酸濃度を上記2.2.1に記載した方法に従ってイオン排除HPLCにより測定した。

- ・各菌株の活性評価方法

各菌種の有機酸産生量および DL-乳酸消費量は以下の式に従い算出した。

- ・ (有機酸産生量) = (培養 24 時間後の有機酸量) - (培養開始時の有機酸量)
- ・ (DL-乳酸消費量) = (培養開始時の DL-乳酸量) - (培養 24 時間後の DL-乳酸量)

対象菌株のうち、5 mM 以上の乳酸消費量および 5 mM 以上の酪酸産生量を示した菌株を活性保有株として選定した。

2.2.5 乳酸を酪酸に変換する菌のヒトにおける分布

- ・菌種特異的プライマーの設計

乳酸を酪酸に変換する活性を示した菌種とその近縁種の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を Clustal X (ver. 2.0.12) [40]によりアライメントして比較し、標的菌種に特異的な配列を基にプライマーを設計した (Table 2-4)。Ribosomal Database Project [43]の Probe Match プログラムを用いて、見出した配列をデータベース上に登録されている種々の菌の 16S rRNA 遺伝子配列と比較し、目的とする菌種以外に同一の配列を有する菌種が存在しないことを確認した。

- ・糞便および菌体からの DNA の抽出

健康成人男性 25 名 (HA-1~HA-25: 年齢 26~44 歳、平均 35.0±5.6 歳) から糞便を採取し、PBS で 10 倍希釈した。糞便および純培養菌体からの DNA の抽出にはビーズフェノール法[23]を用いた。糞便 10 倍希釈液あるいは純培養菌体 (10¹⁰ cells/ml) 200 μl に 0.3 g のガラスビーズ (直径 0.1 mm、トミー精工) と 300 μl の Tris-SDS 溶液 (250 ml の 200 mM Tris-HCl 80 mM EDTA pH 9.0 と 50 ml の 10% SDS を混合した溶液) および 500 μl の TE 飽和フェノール (ニッポンジーン) を加えて FastPrep FP120 によりパワーレベル 5.0 で 30 秒間激しく振とうした。溶液を 15,000 rpm で 5 分間遠心した後、400

μl の上清にフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25 : 24 : 1) 溶液 400 μl を加え、FastPrep FP120 によりパワーレベル 4.0 で 45 秒間振とうした。溶液を 15,000 rpm で 5 分間遠心した後、上清 250 μl に 25 μl の 3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.4) および 250 μl のイソプロパノールを加えて混合した。15,000 rpm で 5 分間遠心して上清を除き、500 μl の 70%エタノールを加えて再度 15,000 rpm で 5 分間遠心した。上清を除いてペレットを乾燥させ、1.0 ml の TE バッファーに溶解した。

・設計したプライマーの特異性の確認

設計した各種プライマーの特異性は、ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems) を用いて PCR による増幅産物の生成により確認した。0.5 μM の各プライマーを含む SYBR Premix Ex Taq (Takara Bio) に各種菌体から抽出した鋳型 DNA 溶液を加え、総量を 10 μl として既報[23]に従い PCR 反応を行った。まず鋳型 DNA の二本鎖を解離させるため 94°C で 5 分間加熱した後、94°C で 20 秒間、55°C で 20 秒間、72°C で 50 秒間の反応を 1 サイクルとして、これを 40 サイクル繰り返し、72°C で 3 分間反応させた。さらに、これに引き続き T_m 値解析[44]のため、60°C で 2 分間反応させた後、0.2°C/秒の温度勾配で 95°C まで温度を上昇させ、このときの SYBR Green I の蛍光を測定して増幅産物の 2 本鎖が解離するときの温度 (T_m) を測定した。

・各種酪酸産生菌の定量

糞便中の酪酸産生菌は、糞便から抽出した DNA を鋳型とし、Matsuki らの方法[23]に従い菌種特異的プライマーを用いた定量的 PCR 法により定量した。検量線の作製には各菌種の基準株から抽出した DNA を用いた。各菌株の菌体を 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Vector Laboratories) により染色し[45]、蛍光顕微鏡を用いてその菌数を決定した。この菌液から抽出した DNA を 10 倍段階希釈して PCR を行い、一定

の蛍光値に達する PCR サイクル数 (Ct 値) と菌数の対数値を基に検量線を作成した。同時に、糞便から抽出した DNA を 10 倍ずつ 3 段階希釈して反応させ、菌数の対数値との間に直線性が認められた Ct 値を検量線に代入し、3 点の平均値から菌数を算出した。

2.3 結果

2.3.1 ヒト糞便への乳酸添加試験

健常な日本人男性 5 名 (A-1~A-5) から採取した糞便の懸濁液に DL-乳酸溶液 (pH 6.0) を添加し、乳酸濃度および酪酸濃度の経時的变化を測定した。その結果、添加した乳酸は、全ての糞便で添加後 4 時間から 8 時間の間で完全に消失し、酪酸濃度は時間とともに上昇した (Fig. 2-1)。培養終了時における酪酸の到達濃度は 5~23 mM であり、その値には個人差が認められた。プロピオン酸濃度も乳酸濃度の減少に応じて 17~42 mM まで上昇した (Fig. 2-1)。その際、酪酸の到達濃度が高いヒトほど、プロピオン酸の到達濃度が低い傾向が認められた。

2.3.2 乳酸を酪酸に変換する菌のヒト糞便からのスクリーニング

健常人 10 名 (HD-1~HD-10) から採取した糞便の 10^4 ~ 10^8 倍希釈液を、DL-乳酸を唯一の炭素源とする平板培地に播種し、生育した 288 コロニーを分離した。そのうち、36 コロニーが 5 mM 以上の乳酸を消費し、5 mM 以上の酪酸を産生した。これらのコロニーは分離用寒天培地上に繰り返し画線することにより純化培養した。続いて、RAPD 法による電気泳動パターンをもとに分離株の識別を行い、最終的に 7 菌株 (No.1~7) を取得した。糞便提供者 HD-1、HD-2 および HD-3 からそれぞれ分離株 No.1、No.2 および No.3 を、糞便提供者 HD-4 から分離株 No.4 および No.5 を、提供者 HD-5 から分離株 No.6 および No.7

を分離した。分離株 No.1~3 はいずれもグラム陰性の球菌であり、No.4~7 はいずれもグラム陽性の桿菌であった。これら 7 菌株は乳酸を消費して酪酸を産生する活性を示した (Fig. 2-2)。

これら 7 菌株について、乳酸および酢酸添加培地中での増殖性および代謝産物のプロファイルを調べた (Table 2-1)。被験者 3 名 (HD-1~HD-3) から分離された分離株 No.1~3 は、乳酸および酢酸を消費し、酪酸、プロピオン酸、ギ酸、イソ酪酸、イソ吉草酸および吉草酸を産生した。これらの 3 菌株は、PYA 液体培地中でも酪酸の産生活性を示したが、乳酸の添加は明らかに酪酸、プロピオン酸、ギ酸および吉草酸の産生を促進した。被験者 HD-4 から分離された No.4 および No.5 は、乳酸を消費して酪酸および酢酸を産生した。被験者 HD-5 から分離された分離株 No.6 および No.7 は、乳酸および酢酸を消費し、主に酪酸を産生した。また、全ての菌株で乳酸添加に依存した OD_{650nm} の増加を認めた。

分離株の 16S rRNA 遺伝子の配列を基に系統解析を行った結果、分離株 No.1~3 は *Clostridium* クラスタ IX 中の *Megasphaera elsdenii* ATCC 25940^T と同じサブクラスターに、No.4 および No.5 はクラスタ XV 中の *Eubacterium limosum* ATCC 8486^T と同じサブクラスターに入った (Fig. 2-3)。また、No.6 および No.7 はクラスタ XIVa 中の *Anaerostipes caccae* DSM 14662^T と同じサブクラスターに属した。さらに、いずれの分離株も BLAST 検索でヒットした最も近縁な菌種の配列と 98%以上の相同性を示した (Table 2-2)。以上の結果から、分離株 No.1~3 は *M. elsdenii* と、No.4 および No.5 は *E. limosum* と、No.6 および No.7 は *A. caccae* と同定した。

2.3.3 既知菌種の菌株ライブラリーからのスクリーニング

ヒトの消化管から分離される細菌およびその近縁種である 20 属 65 菌種 65 菌株 (Table 2-3) を対象に、乳酸を酪酸に変換する菌をスクリーニングした。同時に、乳酸からプロピオン酸を産生する菌についても調べた。その結果、#2 *Anaerostipes caccae* YIT 10168^T

(=DSM 14462^T)、#20 *Clostridium butyricum* YIT 10073^T (JCM 1391^T)、#36 *Coprococcus catus* YIT 11484^T (=ATCC 27761^T)、#38 *Eubacterium aggregans* YIT 11486^T (=DSM 12183^T)、#39 *E. barkeri* YIT 11485^T (=JCM 1398^T)、#44 *E. hallii* YIT 10064^T (=DSM 3353^T)、#45 *E. limosum* YIT 6067^T (=JCM 6421^T) および#51 *Megasphaera elsdenii* YIT 6063^T (=JCM 1772^T) の 5 属 8 菌種が 10 mM 以上の乳酸を消費し、5 mM 以上の酪酸を産生した (Fig. 2-5)。

一方、#36 *Co. catus* YIT 11484^T (=ATCC 27761^T)、#51 *M. elsdenii* YIT 6063^T (=JCM 1772^T)、#61 *Selenomonas ruminantium* subsp. *lactylitica* YIT 10173^T (=DSM 2872^T)、#62 *Veillonella atypica* YIT 6081^T (=ATCC 17744^T)、#63 *V. dispar* YIT 6080^T (=ATCC 17748^T)、#64 *V. parvula* YIT 6072^T (=GIFU 7884^T) および#65 *V. ratti* YIT 10065^T (=DSM 20736^T) が 10 mM 以上の乳酸を消費し、5 mM 以上のプロピオン酸を産生した (Fig. 2-6)。

2.3.4 乳酸を酪酸に変換する菌のヒトにおける分布

乳酸を酪酸に変換する活性を示した *A. caccae*、*Cl. butyricum*、*Co. catus*、*E. aggregans*、*E. barkeri*、*E. hallii*、*E. limosum* および *M. elsdenii* の 5 属 8 菌種について、16S rRNA 遺伝子配列を基に菌種特異的プライマーを作製した (Table 2-4)。設計したプライマーの特異性を PCR により調べた結果、それぞれのプライマーペアは標的菌種の DNA を鋳型にしたときのみ目的とする増幅産物を与えた (Table 2-5)。

作製した菌種特異的プライマーを用い、健康成人 25 名 (HA-1~HA-25) の糞便から抽出した DNA を鋳型に、乳酸を酪酸に変換する菌の菌数を定量的 PCR により測定した。その結果、*A. caccae* は 60% の便提供者から糞便 1 g あたり平均 $10^{7.2}$ 個で検出された (Table 2-6)。*E. hallii* は検出率が 64% と調べた菌種のうちで最も高く、平均菌数も $10^{8.7}$ 個/g 糞便と高かった。*E. limosum* は 25 名中約半数の提供者で平均 $10^{6.6}$ 個/g 糞便で検出された。*M. elsdenii* および *Co. catus* は、検出率がそれぞれ 12% および 16% と低かったが、平均菌数は

それぞれ $10^{8.1}$ および $10^{8.3}/g$ 糞便であり、*E. hallii* に次いで高かった。一方、*E. aggregans*、*E. barkeri* および *Cl. butyricum* はいずれの提供者においても定量下限値 ($10^{6.0}$ 個/g 糞便) 未満であった。

2.4 考察

健康な日本人から採取した糞便に DL-乳酸を添加して嫌気条件下でインキュベートした結果、いずれの提供者においても乳酸は完全に消費され、酪酸が生成することがわかった (Fig. 2-1)。したがって、日本人の腸内においても乳酸を酪酸に変換する活性を持つ菌は広く存在していると考えられた。提供者 A-4 および A-5 のように、酪酸の到達濃度が低い提供者はプロピオン酸濃度が高い傾向が認められたことから、乳酸からいずれの酸に変換されるかは、個人の腸内細菌叢の構成に依存していると推察された。

次に、DL-乳酸を唯一の炭素源とする培地を用いて、乳酸を酪酸に変換する腸内細菌をヒト糞便からスクリーニングした。その結果、5名の被験者から乳酸を酪酸に変換する活性を示す菌を7株分離することができた (Fig. 2-2)。活性評価にもラセミ体の乳酸を用いたが、いずれの分離株も初発量の70%以上の乳酸利用率を示した (Table 2-1)。この結果は、いずれの分離株も D-乳酸および L-乳酸の両方を酪酸産生の基質として利用できる能力を持つことを示している。ヒト糞便由来の *A. caccae* ならびに *E. hallii* に近縁な菌株が、乳酸を酪酸に変換する能力を持つことが報告されている [34]。また、*E. limosum* [46] および *M. elsdenii* [47] も乳酸を酪酸へと代謝することが報告されており、我々の結果は既報の結果と一致した。

M. elsdenii と同定された分離株 No.1~3 および *A. caccae* と同定された No.6 および No.7 は、乳酸だけでなく、酢酸も消費する活性を示した (Table 2-1)。Louis ら [26] はヒト

腸内から見出される酪酸産生菌の多くが、酪酸産生の際に酢酸を基質として消費することを報告している。これらの菌は、酪酸産生の最終ステップを触媒する Butyryl coenzyme A (CoA):acetate CoA transferase を保有しており、本酵素の働きにより外部環境から取り込んだ酢酸に CoA を転移することで、最終的に ATP を獲得する (Fig. 2-4)。我々が分離した菌株も酢酸を消費したことから、本酵素を保有していると考えられた (Fig. 2-4)。

既知菌種のライブラリーを対象としたスクリーニングで活性を示した菌種には、糞便から分離した *A. caccae*、*E. limosum* および *M. elsdenii* が含まれていた (Fig. 2-5)。したがって、これらの菌は菌種レベルで活性を示すと推察された。ライブラリーからのスクリーニングで得られた菌種のうち、*E. aggregans* は乳酸を基質として酪酸を産生することが既に報告されている [48]。したがって、糞便からのスクリーニング結果と合わせると、本研究により、*Cl. butyricum*、*Co. catus* および *E. barkeri* が活性を持つことが初めて明らかとなった。腸内には培養困難な細菌種も多く含まれているため、これら以外にも活性を持つ菌種は存在する可能性はあるが、糞便および既知菌種からの探索という 2 通りの方法によって、目的の活性を持つ培養可能な菌の大部分を把握できたと考えられる。

Hold ら[49]は、菌体内の 16S rRNA 分子を標的とする蛍光標識オリゴヌクレオチドプローブを用いた fluorescent *in situ* hybridization (FISH 法) により、糞便中における各種酪酸産生菌の定量を行い、10 名中 9 名で *E. hallii* が糞便乾燥重量 1 g あたり $10^{8.3} \sim 10^{10.4}$ 個で存在すること、一方で *A. caccae* は検出されないことを示した。また、Kurakawa らは、菌体内の rRNA 分子を標的とした定量的 RT-PCR (reverse transcription-qPCR) 法により、日本人の糞便中における *E. hallii* および *A. caccae* の菌数を定量している[50]。その結果、本研究の対象者 (平均 35 歳, n=25) と比較的近い年齢層 (平均 39 歳, n=32) の集団では、*E. hallii* が検出率 88%かつ平均菌数 $10^{8.1}$ 個/g 糞便、*A. caccae* が検出率 59%かつ平均菌数 $10^{6.8}$ 個/g 糞便であり、本研究での値 (Table 2-6) とほぼ同等であった。

上記の Hold ら[49]に加え、Schwiertz ら[51]も FISH 法により糞便中の *E. limosum* の

定量を試みているが、やはりいずれの対象者からも検出されていない。一方、本研究では、*E. limosum* は 52%のヒトから $10^{6.6}$ 個/g 糞便で検出された。*E. limosum* の検出率と既報 [49,50] のそれとの違いには、用いた定量法の検出感度が影響していると考えられる。すなわち、FISH 法による検出下限値は糞便乾燥重量 1 g あたり 10^7 個程度であるのに対し、本研究で使用した定量的 PCR 法は定量下限値が糞便湿重量 1 g あたり $10^{6.0}$ 個と FISH 法と比べて 10 倍以上高感度である。また、既報のデータは欧州での試験結果であることから、人種による腸内細菌叢の構成にも相違がある可能性も考えられた。以上の結果より、本研究で用いた定量的 PCR 法により、*E. limosum* のヒトにおける分布を初めて明らかにすることができた。

Co. catus については、次世代シーケンサーを用いた網羅的解析により、糞便中での存在比率が報告されている [52]。また、*M. elsdenii* は家畜からは比較的高頻度で分離されているが [53-55]、ヒトからの分離例は少なく [56]、その菌数についても明らかではなかった。本研究により、*Co. catus* および *M. elsdenii* は約 1~2 割のヒトで検出され、検出率は *A. caccae* や *E. limosum* と比べて低いものの、平均菌数は糞便 1 g あたり 10^8 個程度と比較的高いことが明らかとなった (Table 2-6)。*Co. catus* および *M. elsdenii* は、乳酸からプロピオン酸を産生する能力も持つこと (Fig. 2-5) から、腸内では乳酸からの酪酸の産生だけでなく、プロピオン酸の産生にも関与していると推測された。

以上の結果から、培養可能な腸内細菌群の中で、*A. caccae*、*Co. catus*、*E. hallii*、*E. limosum* および *M. elsdenii* が、乳酸を酪酸に変換する主要な菌としてヒト腸内に存在すると考えられた。

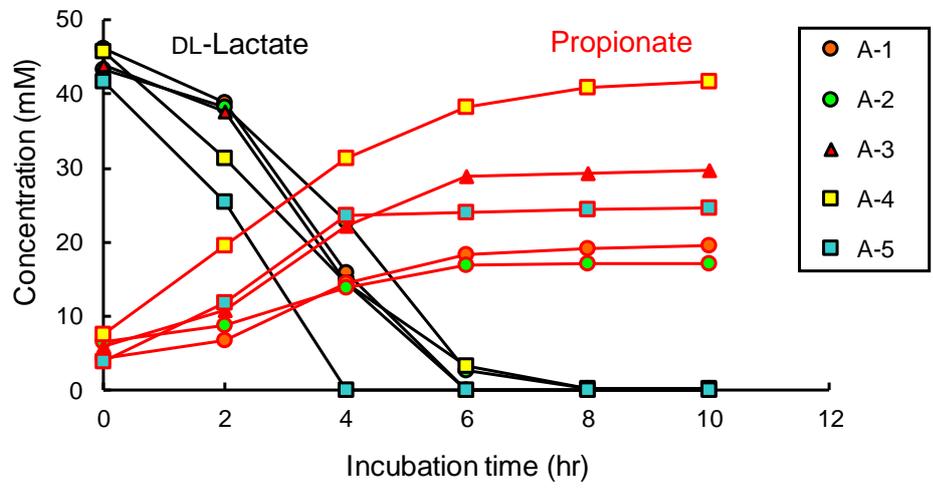
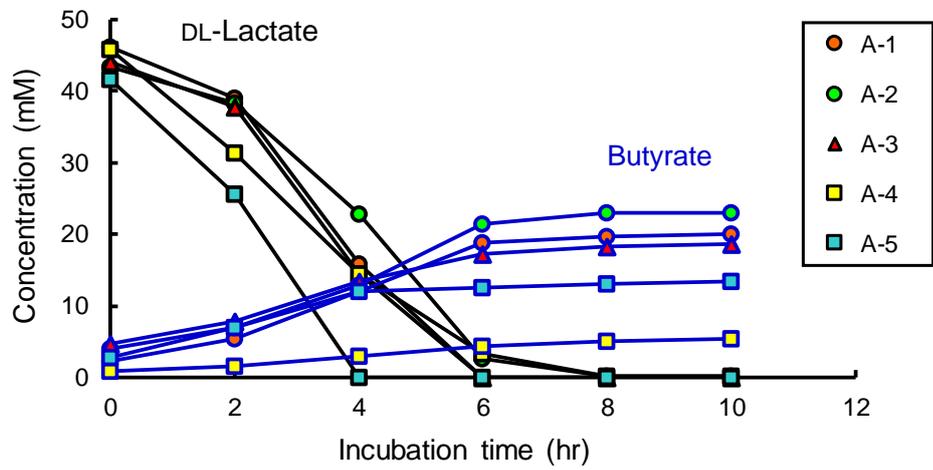


Fig. 2-1. Changes in lactate and butyrate concentration in fecal slurries from five healthy donors (A1-A5) supplemented with DL-lactate.

DL-Lactate, butyrate, and propionate are indicated by black, blue, and red line, respectively.

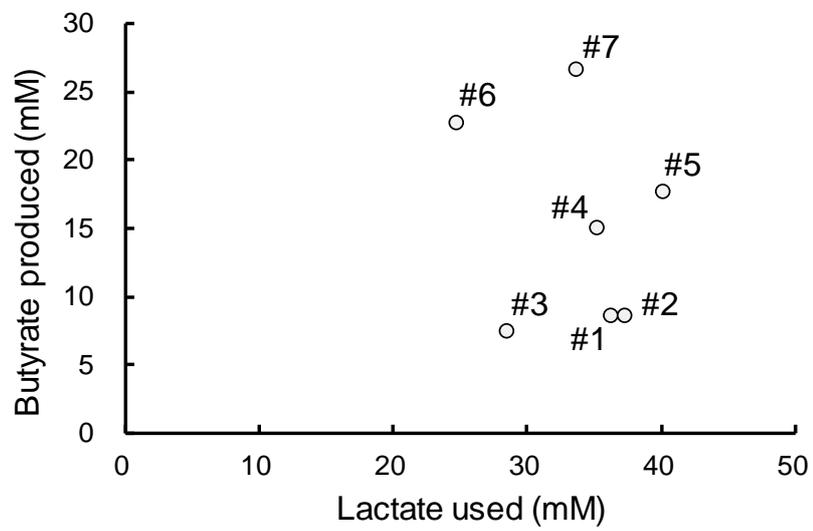


Fig. 2-2. Lactate-utilizing, butyrate-producing activities of human fecal isolates.

Table 2-1. Fermentation products of human fecal isolates in test medium

Isolate no.	Donor	Medium ²	OD ₆₅₀	Concentration ¹ (mM)							
				Lactate	Acetate	Butyrate	Propionate	Formate	<i>iso</i> -Butyrate	<i>iso</i> -Valerate	Valerate
1	HD-1	PYLA	0.829	-36.4 ± 0.7	-16.4 ± 2.1	18.7 ± 1.3	8.1 ± 0.5	9.8 ± 0.9	4.0 ± 0.5	7.8 ± 0.6	7.2 ± 0.6
		PYA	0.445	-1.1 ± 0.1	-20.4 ± 0.5	10.1 ± 0.3	1.3 ± 0.3	3.4 ± 0.3	2.6 ± 0.2	5.8 ± 0.1	0.6 ± 0.2
2	HD-2	PYLA	1.263	-37.4 ± 0.1	-5.1 ± 0.9	15.2 ± 0.3	15.1 ± 0.2	12.9 ± 0.1	4.3 ± 0.0	8.6 ± 0.2	5.4 ± 0.6
		PYA	0.160	-1.2 ± 0.1	-8.9 ± 0.6	6.7 ± 0.4	0.6 ± 0.3	3.5 ± 0.3	1.4 ± 0.4	5.2 ± 0.3	ND ³
3	HD-3	PYLA	0.798	-28.6 ± 0.9	-16.1 ± 1.4	20.0 ± 0.9	1.5 ± 0.2	15.0 ± 2.1	1.0 ± 0.2	4.0 ± 0.5	1.2 ± 0.0
		PYA	0.356	-1.4 ± 0.0	-20.2 ± 3.8	12.6 ± 1.3	1.3 ± 0.6	5.8 ± 0.4	3.6 ± 0.6	8.2 ± 0.3	ND
4	HD-4	PYLA	0.707	-35.3 ± 3.4	24.8 ± 2.6	15.4 ± 0.5	ND	ND	ND	ND	ND
		PYA	0.236	-1.2 ± 0.0	4.9 ± 0.5	0.8 ± 0.0	ND	ND	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.0	ND
5	HD-4	PYLA	1.143	-40.2 ± 0.7	28.0 ± 4.9	18.5 ± 0.3	ND	ND	2.6 ± 0.2	1.9 ± 0.3	ND
		PYA	0.384	-1.2 ± 0.0	6.6 ± 0.6	0.9 ± 0.1	0.5 ± 0.1	ND	3.7 ± 0.1	3.3 ± 0.2	ND
6	HD-5	PYLA	0.506	-24.9 ± 0.4	-22.9 ± 0.4	27.0 ± 1.0	ND	0.3 ± 0.0	ND	ND	ND
		PYA	0.193	-0.8 ± 0.3	-3.8 ± 1.5	4.3 ± 0.3	ND	0.1 ± 0.0	ND	ND	ND
7	HD-5	PYLA	0.832	-33.8 ± 2.7	-27.6 ± 2.1	31.5 ± 2.1	0.3 ± 0.2	0.2 ± 0.0	ND	ND	ND
		PYA	0.236	-1.6 ± 0.1	4.0 ± 6.1	5.0 ± 0.2	1.3 ± 1.2	0.2 ± 0.0	ND	ND	ND

¹ Values are mean ± SD, n = 3. Experimental values are calculated by subtracting the values of the 0 h culture from those of the 24 h culture.

² PY, peptone yeast extract broth; PYLA, PY broth supplemented with 40 mM DL-lactate and 33 mM sodium acetate; PYA, PY broth supplemented with 33 mM sodium acetate.

³ ND, not detected.

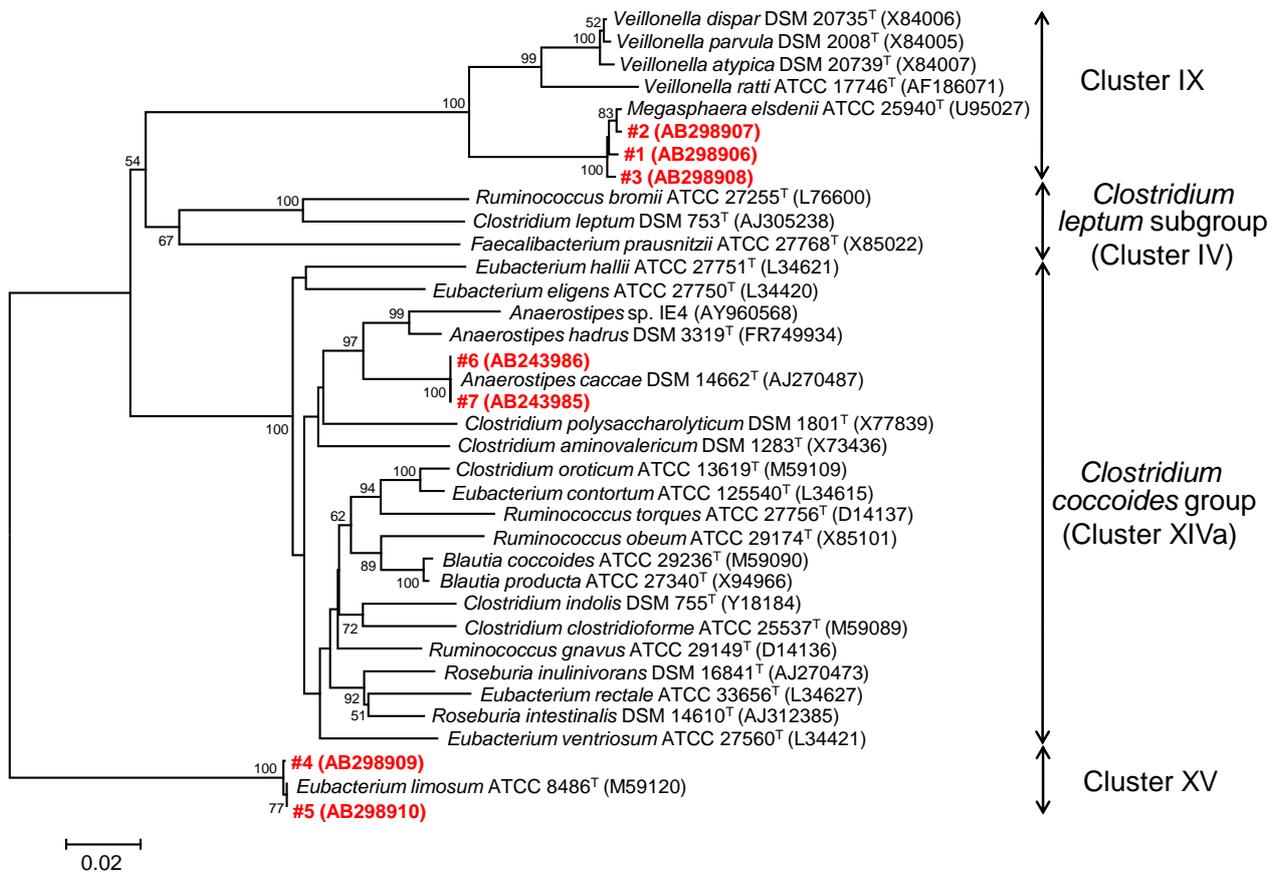


Fig. 2-3. Phylogenetic tree showing the relationship between seven fecal isolates (red and bold) and their related bacterial species.

The tree was constructed by using the neighbor-joining method based on 16S rRNA gene sequences. Bootstrap values (1,000 replicates) above 50% are shown at branching nodes. Scale bar indicates 2% sequence divergence.

Table 2-2. Identification of fecal isolate based on the sequences of the 16S rRNA gene

Isolate no.	Species identified (% identity)	Length (bp)	Accession no.
1	<i>Megasphaera elsdenii</i> (99.3)	1126	AB298906
2	<i>Megasphaera elsdenii</i> (99.3)	1106	AB298907
3	<i>Megasphaera elsdenii</i> (98.1)	958	AB298908
4	<i>Eubacterium limosum</i> (99.5)	1467	AB298909
5	<i>Eubacterium limosum</i> (99.7)	1474	AB298910
6	<i>Anaerostipes caccae</i> (99.1)	1399	AB243986
7	<i>Anaerostipes caccae</i> (99.7)	1492	AB243985

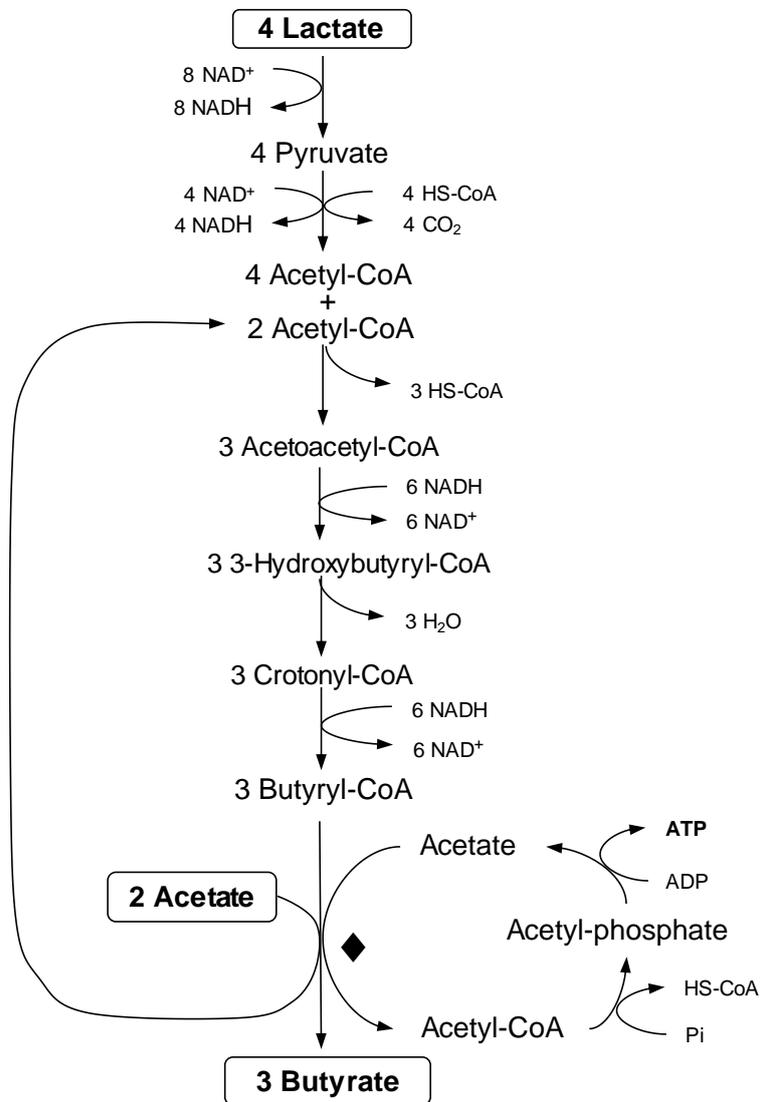


Fig. 2-4. Pathways of butyrate formation from lactate and exogenous acetate (Figure modified from Duncan *et al.* [34]).

◆ Butyryl coenzyme A (CoA):acetate CoA transferase

Table 2-3. Bacterial strains used in this study

No.	Bacterial species	Registration No.	
1	<i>Acidaminococcus fermentans</i>	YIT 6071 ^T	ATCC 25085 ^T
2	<i>Anaerostipes caccae</i>	YIT 10168 ^T	DSM 14662 ^T
3	<i>Atopobium minutum</i>	YIT 0194	VPI 9953
4	<i>Bacteroides caccae</i>	YIT 10226 ^T	JCM 9498 ^T
5	<i>Bacteroides eggerthii</i>	YIT 10227 ^T	DSM 20697 ^T
6	<i>Bacteroides fragilis</i>	YIT 6158 ^T	ATCC 25285 ^T
7	<i>Bacteroides ovatus</i>	YIT 6161 ^T	ATCC 8483 ^T
8	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	YIT 6163 ^T	JCM 5827 ^T
9	<i>Bacteroides uniformis</i>	YIT 6164 ^T	JCM 5828 ^T
10	<i>Bacteroides vulgatus</i>	YIT 6159 ^T	ATCC 8482 ^T
11	<i>Blautia coccoides</i>	YIT 6035 ^T	JCM 1395 ^T
12	<i>Blautia hydrogenotrophica</i>	YIT 10080 ^T	DSM 10507 ^T
13	<i>Blautia producta</i>	YIT 6141 ^T	JCM 1471 ^T
14	<i>Butyrivibrio crossotus</i>	YIT 10152 ^T	DSM 2876 ^T
15	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	YIT 10169 ^T	DSM 3071 ^T
16	<i>Clostridium acetobutyricum</i>	YIT 10170 ^T	DSM 792 ^T
17	<i>Clostridium aminovalericum</i>	YIT 10174 ^T	JCM 11016 ^T
18	<i>Clostridium baratii</i>	YIT 6052 ^T	JCM 1385 ^T
19	<i>Clostridium bifermentans</i>	YIT 6053 ^T	JCM 1386 ^T
20	<i>Clostridium butyricum</i>	YIT 10073 ^T	JCM 1391 ^T
21	<i>Clostridium celatum</i>	YIT 6056 ^T	JCM 1394 ^T
22	<i>Clostridium glycolicum</i>	YIT 6058 ^T	JCM 1401 ^T
23	<i>Clostridium indolis</i>	YIT 10077 ^T	JCM 1380 ^T
24	<i>Clostridium innocuum</i>	YIT 10151 ^T	DSM 1286 ^T
25	<i>Clostridium leptum</i>	YIT 6169 ^T	DSM 753 ^T
26	<i>Clostridium limosum</i>	YIT 6061 ^T	JCM 1427 ^T
27	<i>Clostridium orbiscindens</i>	YIT 10060 ^T	DSM 6740 ^T
28	<i>Clostridium oroticum</i>	YIT 6037 ^T	JCM 1429 ^T
29	<i>Clostridium paraputrificum</i>	YIT 10074 ^T	JCM 1293 ^T
30	<i>Clostridium perfringens</i>	YIT 6050 ^T	JCM 1290 ^T
31	<i>Clostridium sordellii</i>	YIT 6065 ^T	JCM 3814 ^T
32	<i>Clostridium sphenoides</i>	YIT 6059 ^T	JCM 1415 ^T
33	<i>Clostridium spiroforme</i>	YIT 10342 ^T	JCM 1432 ^T
34	<i>Clostridium sporogenes</i>	YIT 6060 ^T	JCM 1416 ^T
35	<i>Clostridium tertium</i>	YIT 6066 ^T	JCM 6289 ^T
36	<i>Coprococcus catus</i>	YIT 11484 ^T	ATCC 27761 ^T
37	<i>Coprococcus eutactus</i>	YIT 10160 ^T	ATCC 27759 ^T
38	<i>Eubacterium aggregans</i>	YIT 11486 ^T	DSM 12183 ^T
39	<i>Eubacterium barkeri</i>	YIT 11485 ^T	ATCC 25849 ^T
40	<i>Eubacterium bifforme</i>	YIT 6076 ^T	ATCC 27806 ^T

Table 2-3. Continued

No.	Bacterial species	Registration No.	
41	<i>Eubacterium cylindroides</i>	YIT 10236 ^T	DSM 3983 ^T
42	<i>Eubacterium dolichum</i>	YIT 10081 ^T	DSM 3991 ^T
43	<i>Eubacterium eligens</i>	YIT 10078 ^T	DSM 3376 ^T
44	<i>Eubacterium hallii</i>	YIT 10064 ^T	DSM 3353 ^T
45	<i>Eubacterium limosum</i>	YIT 6067 ^T	JCM 6421 ^T
46	<i>Eubacterium rectale</i>	YIT 6082 ^T	ATCC 33656 ^T
47	<i>Eubacterium siraeum</i>	YIT 10049 ^T	DSM 3996 ^T
48	<i>Eubacterium ventriosum</i>	YIT 10066 ^T	ATCC 27560 ^T
49	<i>Feacalibacterium prausnitzii</i>	YIT 10067 ^T	ATCC 27768 ^T
50	<i>Fingoldia magna</i>	YIT 6073 ^T	ATCC 15794 ^T
51	<i>Megasphaera elsdenii</i>	YIT 6063 ^T	JCM 1772 ^T
52	<i>Mitsuokella multacida</i>	YIT 6027	VI-99
53	<i>Parabacteroides distasonis</i>	YIT 6162 ^T	JCM 5825 ^T
54	<i>Prevotella corporis</i>	YIT 6132 ^T	JCM 8529 ^T
55	<i>Prevotella intermedia</i>	YIT 6130 ^T	JCM 11150 ^T
56	<i>Romboutsia lituseburensis</i>	YIT 10059 ^T	JCM 1404 ^T
57	<i>Roseburia intestinalis</i>	YIT 10172 ^T	DSM 14610 ^T
58	<i>Ruminococcus gnavus</i>	YIT 6176 ^T	ATCC 29149 ^T
59	<i>Ruminococcus obeum</i>	YIT 6085 ^T	ATCC 29174 ^T
60	<i>Ruminococcus torques</i>	YIT 10159 ^T	ATCC 27756 ^T
61	<i>Selenomonas ruminantium</i> subsp. <i>lactylitica</i>	YIT 10173 ^T	DSM 2872 ^T
62	<i>Veillonella atypica</i>	YIT 6081 ^T	ATCC 17744 ^T
63	<i>Veillonella dispar</i>	YIT 6080 ^T	ATCC 17748 ^T
64	<i>Veillonella parvula</i>	YIT 6072 ^T	GIFU 7884 ^T
65	<i>Veillonella ratti</i>	YIT 10065 ^T	DSM 20736 ^T

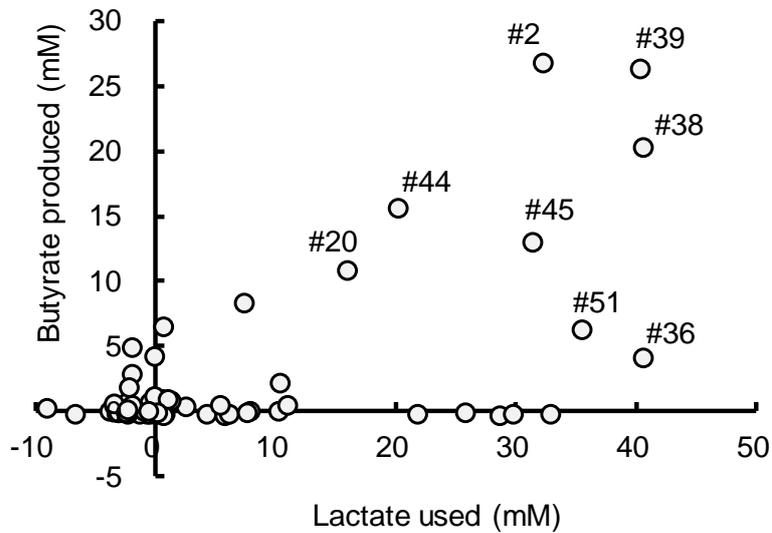


Fig. 2-5. Lactate-utilizing, butyrate-producing activities in 65 screened strains. Bacterial numbers in Table 2-3 are shown near the circle dots.

#2, *Anaerostipes caccae* YIT 10168^T (=DSM 14662^T); #20, *Clostridium butyricum* YIT 10073^T (JCM 1391^T); #36, *Coprococcus catus* YIT 11484^T (=ATCC 27761^T); #38, *Eubacterium aggregans* YIT 11486^T (=DSM 12183^T); #39, *Eubacterium barkeri* YIT 11485^T (=JCM 1398^T); #44, *Eubacterium hallii* YIT 10064^T (=DSM 3353^T); #45, *Eubacterium limosum* YIT 6067^T (=JCM 6421^T); and #51, *Megasphaera elsdenii* YIT 6063^T (=JCM 1772^T).

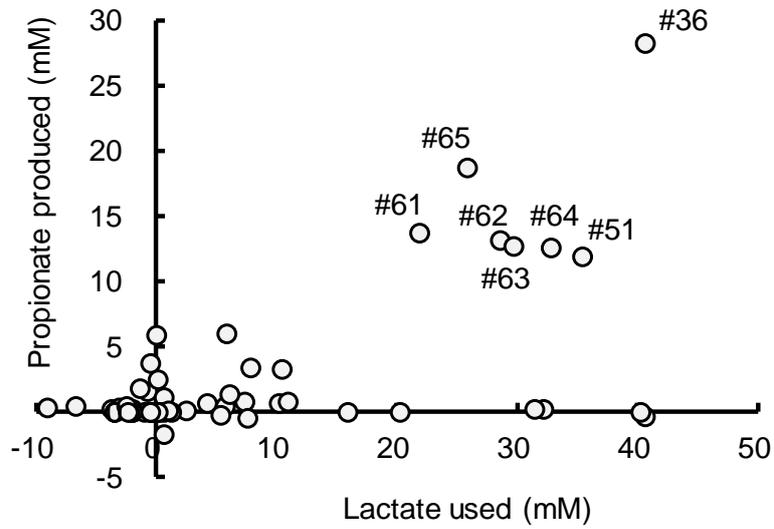


Fig. 2-6. Lactate-utilizing, propionate-producing activities in 65 screened strains. Bacterial numbers in Table 2-3 are shown near the circle dots.

#36, *Coprococcus catus* YIT 11484^T (=ATCC 27761^T); #51, *Megasphaera elsdenii* YIT 6063^T (=JCM 1772^T); #61, *Selenomonas ruminantium* subsp. *lactylitica* YIT 10173^T (=DSM 2872^T); #62, *Veillonella atypica* YIT 6081^T (=ATCC 17744^T); #63, *Veillonella dispar* YIT 6080^T (=ATCC 17748^T); #64 *Veillonella parvula* YIT 6072^T (=GIFU 7884^T); and #65, *Veillonella ratti* YIT 10065^T (=DSM 20736^T).

Table 2-4. 16S rRNA gene-targeted species-specific primers for lactate-utilizing, butyrate-producing bacteria

Target bacteria	Primer	Sequence (5' to 3')	Product size (bp)	Reference
<i>A. caccae</i>	s-Acac-F s-Acac-R	GTCGAACGAAGCATTTAGGATT ACCATCCTATACTGCCAGG	188	This study
<i>Cl. butyricum</i>	CIBUT-F CIBUT-R	CTCTGTAATGGAGGAAGCCA TTGCTCACTCTCGCGAGG	270	Matsuki <i>et al.</i> [57]
<i>Co. catus</i>	s-Ccat-F s-Ccat-R	CTGCCCTGCTTGATTTTC GTGCTCCGTAGAGAAGAC	397	This study
<i>E. aggregans</i>	s-Eagg-F s-Eagg-R	TGATCCTTCGGGTGAACTAAGAA CGAATTGCCATGCGACAAC	137	This study
<i>E. barkeri</i>	s-Ebar-F s-Ebar-R	TCGAACGAGAAGCTTTTTATGGAT CATTAAAACACCATGCGATGTCTT	159	This study
<i>E. hallii</i>	s-Ehal-F s-Ehal-R	GAGGAGACATCTCCTTGTG TTGCACTGCCACCTACGC	385	This study
<i>E. limosum</i>	s-Elim-F s-Elim-F	CTTCGGGTGAMATTAGAACTGG GATCTYGCCATGCGACAAAAC	132	This study
<i>M. elsdenii</i>	s-Mels-F s-Mels-R	GAGGCTCTTCGGAGCTTT TAACGGGTATTGACCGCTAC	194	This study

DNAs extracted from *Anaerostipes caccae* DSM 14662^T, *Clostridium butyricum* JCM 1391^T, *Coprococcus catus* ATCC 27761^T, *Eubacterium aggregans* DSM 12183^T, *Eubacterium barkeri* JCM 1389^T, *Eubacterium hallii* DSM 3353^T, *Eubacterium limosum* JCM 6421^T, and *Megasphaera elsdenii* JCM 1772^T were used as real-time PCR controls.

Table 2-5. Specificity test of designed primers for lactate-utilizing, butyrate-producing bacteria.

Species	Registration No.	PCR results ¹						
		s-Acac	s-Ehal	s-Elim	s-Mels	s-Ccat	s-Eagg	s-Ebar
<i>Anaerostipes caccae</i>	YIT 10168 ^T = DSM 14662 ^T	+	-	-	-	-	-	-
<i>Eubacterium hallii</i>	YIT 10064 ^T = DSM 3353 ^T	-	+	-	-	-	-	-
<i>Eubacterium limosum</i>	YIT 6067 ^T = JCM 6421 ^T	-	-	+	-	-	-	-
<i>Megasphaera elsdenii</i>	YIT 6063 ^T = JCM 1772 ^T	-	-	-	+	-	-	-
<i>Coprococcus catus</i>	YIT 11484 ^T = ATCC 27761 ^T	-	-	-	-	+	-	-
<i>Eubacterium aggregans</i>	YIT 11486 ^T = DSM 12183 ^T	-	-	-	-	-	+	-
<i>Eubacterium barkeri</i>	YIT 11485 ^T = ATCC 25849 ^T	-	-	-	-	-	-	+
<i>Acidaminococcus fermentans</i>	YIT 6071 ^T = ATCC 25085 ^T	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	YIT 6158 ^T = ATCC 25285 ^T	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacteroides ovatus</i>	YIT 6161 ^T = ATCC 8483 ^T	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacteroides uniformis</i>	YIT 6164 ^T = JCM 5828 ^T	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacteroides vulgatus</i>	YIT 6159 ^T = ATCC 8482 ^T	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	YIT 4011 ^T = ATCC 15703 ^T	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	YIT 4016 ^T = ATCC 27539 ^T	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>	YIT 4021 ^T = ATCC 15707 ^T	-	-	-	-	-	-	-
<i>Blautia coccoides</i>	YIT 6035 ^T = JCM 1395 ^T	-	-	-	-	-	-	-
<i>Blautia producta</i>	YIT 6141 ^T = JCM 1471 ^T	-	-	-	-	-	-	-
<i>Clostridium clostridioforme</i>	YIT 6051 ^T = JCM 1291 ^T	-	-	-	-	-	-	-
<i>Clostridium cocleatum</i>	YIT 6036 ^T = JCM 1397 ^T	-	-	-	-	-	-	-
<i>Clostridium leptum</i>	YIT 6169 ^T = DSM 753 ^T	-	-	-	-	-	-	-
<i>Clostridium nexile</i>	YIT 6170 ^T = ATCC 27757 ^T	-	-	-	-	-	-	-
<i>Clostridium orbiscindens</i>	YIT 10060 ^T = DSM 6740 ^T	-	-	-	-	-	-	-
<i>Clostridium oroticum</i>	YIT 6037 ^T = JCM 1429 ^T	-	-	-	-	-	-	-
<i>Clostridium ramosum</i>	YIT 10062 ^T = JCM 1298 ^T	-	-	-	-	-	-	-
<i>Clostridium sphenoides</i>	YIT 6059 ^T = JCM 1415 ^T	-	-	-	-	-	-	-
<i>Clostridium spiroforme</i>	YIT 10324 ^T = JCM 1432 ^T	-	-	-	-	-	-	-
<i>Clostridium viride</i>	YIT 10050 ^T = DSM 6836 ^T	-	-	-	-	-	-	-
<i>Collinsella aerofaciens</i>	YIT 10235 ^T = DSM 3979 ^T	-	-	-	-	-	-	-
<i>Eggerthella lenta</i>	YIT 6077 ^T = ATCC 25559 ^T	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	YIT 6044 ^T = JCM 1649 ^T	-	-	-	-	-	-	-
<i>Eubacterium rectale</i>	YIT 6082 ^T = ATCC 33656 ^T	-	-	-	-	-	-	-
<i>Eubacterium siraeum</i>	YIT 10049 ^T = DSM 3996 ^T	-	-	-	-	-	-	-
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	YIT 10067 ^T = ATCC 27768 ^T	-	-	-	-	-	-	-
<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i>	YIT 6069 ^T = JCM 8532 ^T	-	-	-	-	-	-	-
<i>Parabacteroides distasonis</i>	YIT 6162 ^T = JCM 5825 ^T	-	-	-	-	-	-	-
<i>Prevotella intermedia</i>	YIT 6130 ^T = JCM 11150 ^T	-	-	-	-	-	-	-
<i>Prevotella melaninogenica</i>	YIT 6039 ^T = ATCC 25845 ^T	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ruminococcus bromii</i>	YIT 6078 ^T = ATCC 27255 ^T	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ruminococcus gnavus</i>	YIT 6176 ^T = ATCC 29149 ^T	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ruminococcus lactaris</i>	YIT 10225 ^T = ATCC 29176 ^T	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ruminococcus obeum</i>	YIT 6085 ^T = ATCC 29174 ^T	-	-	-	-	-	-	-
<i>Veillonella parvula</i>	YIT 6072 ^T = GIFU 7884 ^T	-	-	-	-	-	-	-

¹ +, positive; -, negative.

Table 2-6. Bacterial counts of lactate-utilizing, butyrate-producing bacteria in fecal samples as determined by real-time PCR

Species	Log ₁₀ cells/g feces (wet wt) ¹	% Persons testing positive (n = 25)
<i>A. caccae</i>	7.2 ± 0.3	60
<i>E. hallii</i>	8.7 ± 0.6	64
<i>E. limosum</i>	6.6 ± 0.4	52
<i>M. elsdenii</i>	8.1 ± 0.1	12
<i>Co. catus</i>	8.3 ± 0.8	16
<i>E. aggregans</i>	ND ²	0
<i>E. barkeri</i>	ND	0
<i>Cl. butyricum</i>	ND	0

¹ Values are shown as mean ± SD (n = 25).

² ND, not detected (< log₁₀ 6.0 cells/g feces).

第3章 乳酸を酪酸に変換する腸内細菌の *in vivo* における活性

3.1 緒言

前章において、乳酸から酪酸を産生する主要なヒト腸内細菌種およびその分布を明らかにした。しかしながら、これらヒト由来の菌が実際の腸内において、乳酸から酪酸を産生する活性を示すか否かは明確でない。難消化性糖質であるガラクトオリゴ糖 (GOS: β 結合型) は、*Bifidobacterium* 属細菌の選択的な増殖因子として作用する、いわゆる代表的なプレバイオティクスとして一般的に知られている [58]。腸内においてプレバイオティクスから *Bifidobacterium* 属細菌によって産生された乳酸および酢酸は、共存する乳酸利用性細菌によって酪酸産生の基質として利用されると考えられる。そこで、まず GOS の存在下で *Bifidobacterium* 属細菌と乳酸を酪酸に変換する菌を共培養することにより、2 菌の協働作用によって実際に酪酸が産生されるか否かを検証した。また、GOS を投与して腸内での乳酸の産生を促進させたラットに、ヒト糞便分離株である *A. caccae* YIT 12353 株を投与し、腸内における酪酸の産生を調べることで当該菌株の *in vivo* における活性を評価した。

3.2 材料と方法

3.2.1 ビフィズス菌および各種酪酸産生菌の共培養

・使用菌株および培養方法

Bifidobacterium breve は、幼児および成人の糞便から検出される代表的なビフィズス菌種として知られている [59]。そこで本研究では、ビフィズス菌として *Bifidobacterium breve* YIT 10001 を用いた。乳酸を酪酸に変換する菌として、*Anaerostipes caccae* YIT 10168^T (=DSM 14662^T)、*Eubacterium hallii* YIT 10064^T

(=ATCC 27751^T)、*Eubacterium limosum* YIT 6067^T (=ATCC 8486^T)、*Megasphaera elsdenii* YIT 6063^T (=JCM 1772^T) および *Coprococcus catus* YIT 11484^T (=ATCC 27761^T) を使用した。1%グルコース添加変法 GAM 培地 (日水製薬) により、窒素ガス気相下で 37°C、24 時間嫌気培養した。

・ GOS の調製

本研究で使用した GOS (β結合型) は、市販のガラクトオリゴ糖液糖「オリゴメイト 55N」(ヤクルト薬品工業) から易消化性のグルコース、ガラクトースおよびラクトース成分を除去した糖液を使用した。当該糖液は以下の手順で調製した。ラクトース 100 g を精製水 100 ml に溶解し、5%炭酸ナトリウム溶液にて pH を 6.3 に調整した。*Sporobolomyces singularis* YIT 10047[60] の菌体懸濁液をβ-ガラクトシダーゼの酵素液として加えた後、5%炭酸ナトリウム溶液にて pH を 5.9 に調整した。60°C で 24 時間酵素反応させた後、100°C で 10 分間加熱して反応を止め、精製水で 5 倍希釈した GODO-YNL ラクターゼ (合同酒精) を 1.2 ml 添加し、386 mg の塩化カリウムを加えてラクトースの酵素消化を行った。溶液を 45°C で 2.5 時間反応させた後、100°C で 10 分間加熱して反応を止め、遠心して上清を回収した。上清を珪藻土ろ過した後、ろ液 38 ml を精製水にて 100 ml にメスアップし、酸洗浄した活性炭を詰めた Econo-column (Bio-Rad Laboratories) に供した。カラムを 2%エタノール溶液で一晩洗浄して単糖を除去した後、活性炭への吸着画分を 50%エタノールで溶出し、溶出液を減圧濃縮することで 38%GOS 糖液を得た。GOS 糖液の組成は、既報[61]に従い、RI-98 示差屈折率検出器 (Labo System) を用いた HPLC システム (Waters) により調べた。カラムは SUGAR KS-802 (昭和電工) を 80°C に保持し、溶離液として精製水を使用して流速は 0.5 ml/min とした。GOS 糖液の組成は、単糖 0.8%、2 糖 21.9% (ラクトース 2.7% 含む)、3 糖 66.3% および 4 糖以上が 11.0% であった。

・ビフィズス菌および酪酸産生菌の共培養

培養には上記で調製した GOS を唯一の炭素源として 1%添加したペプトン-酵母エキス (PY) 培地を用いた。本培地に上記で調製した各菌株の前培養液を単独あるいは *B. breve* YIT 10001 と酪酸産生菌の 2 菌株を組み合わせそれぞれ 1%接種した。炭酸ガス気相下で 37°C、24 時間嫌気培養し、培養後の培養液中の有機酸濃度を 2.2.1 に記載の方法に従い、イオン排除 HPLC により測定した。

3.2.2 乳酸を酪酸に変換するヒト糞便分離株の腸内における活性評価

・使用菌株の選定および培養条件

乳酸を酪酸に変換する活性を示す各種菌株のうち、変換活性、菌体の増殖性および保存性等を考慮し、本研究ではヒト糞便から分離した *A. caccae* YIT 12352 (Table 2-1、分離株 No.6) および *A. caccae* YIT 12353 (Table 2-1、分離株 No.7) を使用した。両菌株を、40 mM 乳酸および 33 mM 酢酸ナトリウムを添加したペプトン-酵母エキス (PYLA) 培地により、炭酸ガス気相下で 37°C、24 時間嫌気培養した。両菌株の PYLA 培地中での比増殖速度 (h^{-1}) を比較し、より高い増殖性を示す菌株を以後の試験に使用する菌株として選択した。比増殖速度は、PYLA 培地中での対数増殖期における OD_{650nm} を測定することにより算出した。

A. caccae YIT 12353 による GOS の資化性を調べる目的で、市販のオリゴメイト 55N (ヤクルト薬品工業) を唯一の炭素源として 1%添加したペプトン-酵母エキス (PY-GOS) 培地に *A. caccae* YIT 12353 を 1%接種した。炭酸ガス気相下で 37°C、24 時間嫌気培養し、培養前後の培養液中に含まれる GOS の鎖長ごとの組成を上記 3.2.1 に従い HPLC システム (Waters) により調べた。

・投与菌体の調製

A. caccae YIT 12353 は、炭酸ガス気相下、PYLA 培地 10 ml で 37°C、24 時間嫌気培養し、同じ組成の培地 1 L に全量接種した。37°C で 20 時間嫌気培養した後、4,500×g で 10 分間遠心して集菌した。N₂ ガス噴射下で、嫌気置換済の氷冷生理食塩水約 40 ml で菌体を洗浄した。得られた菌体を氷冷生理食塩水 15 ml に再度懸濁し、投与菌液とした（菌数 7.8 × 10¹⁰ cells/ml）。なお、投与までの間はできる限り氷上で調製し、嫌気状態を保ちながら氷上に保持した。菌体は毎日投与直前に調製した。菌体懸濁液は 4%パラホルムアルデヒド-PBS 溶液と混合して 4°C で固定した後、スライドグラスに塗抹した。4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Vector Laboratories) により染色し[45]、蛍光顕微鏡によるダイレクトカウント法により菌数を計数した。

・試験動物および試験設定

6 週齢の Sprague-Dawley (SD) 雄ラットは日本クレア(株)より購入した。飼育環境は、明暗 12 時間サイクル、室温 25°C、湿度 55 %とした。入荷後 5 日間は MF 飼料（フナバシファーム）で、その後 7 日間は AIN-76 組成の精製飼料（Table 3-1）で馴化飼育した。飲料水と飼料は自由摂取させた。馴化飼育終了後、体重を基準にして 6 匹ずつ、対照 (Saline) 群、GOS 単独投与 (GOS/Saline) 群、GOS および *A. caccae* の共投与 (GOS/Ac) 群の 3 群に分けた。馴化飼育後 5 日間を試験期間とし、試験期間中、対照群には通常の飲料水を、GOS 群および GOS/Ac 群には飲料水の代わりに 5% (w/v) 「オリゴメイト 55N」(ヤクルト薬品工業) 水溶液を自由摂取させた。試験期間中、3 群とも AIN-76 組成の飼料を自由摂取させた。GOS/Ac 群のラットには、上記で調製した菌体懸濁液 (3.9 × 10¹⁰ cells/rat) 0.5 ml を 1 日 1 回、5 日間連日、経口ゾンデ投与した。Saline 群および GOS/Ac 群には菌液の代わりに生理食塩水 0.5 ml を投与した。

試験開始 4 日目にラットの新鮮便を滅菌サンプルチューブに採取した。試験開始 5 日目

にネンブタール麻酔下でラットを解剖して盲腸を採取し、内容物を滅菌シャーレに回収した。

・糞便および盲腸内容物の前処理

採取した糞便あるいは盲腸内容物を乳鉢に 0.3~0.4 g 量り取り、重量の 9 倍量の滅菌 PBS を添加し、乳棒でホモジナイズした。懸濁液 200 μ l をサンプルチューブに移し、600 μ l の 4%パラホルムアルデヒド・PBS 溶液を添加して 4°Cで一晩固定し fluorescent *in situ* hybridization (FISH 法) による菌数測定に用いた。また、懸濁液のうち 450 μ l を別のサンプルチューブに移し、50 μ l の 10%過塩素酸溶液を添加した。4°Cで一晩静置した後、その遠心上清を 2.2.1 に記載の方法に従って有機酸分析に供した。

・糞便および盲腸内容物中の *A. caccae*、*Bifidobacterium* 属細菌数および総菌数の測定

糞便および盲腸内容物中の *A. caccae* および *Bifidobacterium* 属細菌の菌数は、蛍光標識オリゴヌクレオチドプローブを用いた FISH 法により測定した。*A. caccae* に特異的なオリゴヌクレオチドプローブは Tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC) 標識した Acac194 (5'-CTATACTGCCAGGGCTTT-3') [49]を、*Bifidobacterium* 属細菌に特異的なプローブは Fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識した Bp153 (5'-ACCACCCGTTTCCAGGAG-3') [62]を用いた。

FISH 法による菌数測定は既報[62]の方法に従って実施した。MAS コートスライドガラス (松浪硝子工業) 上の 1 cm 四方の枠に固定した盲腸内容物および糞便を 10 μ l ずつ塗抹し、室温で乾燥させた。スライドガラスを 96%エタノールに 3 分間浸し、風乾させた後、キシレンに 3 分間浸して固定した。そこに、オリゴヌクレオチドプローブ 500 ng を含む 100 μ l のハイブリダイゼーション溶液 (750 mM NaCl、100 mM Tris-HCl、5 mM EDTA、0.01 % BSA、0.2 % Poly A、10 % Dextran sulfate) をスライドガラス上に塗布

しカバーグラスをかけた。このスライドグラスを SET 溶液 (750 mM NaCl、100 mM Tris-HCl、5 mM EDTA) で湿潤化した 42 °C の暗箱中に一晩静置し、ハイブリダイゼーションさせた。その後、スライドグラスを 47 °C の Wash 溶液 (50 mM NaCl、4 mM Tris-HCl、0.02 mM EDTA) 中に 20 分間静置した後、ミリ Q で 1 回洗浄した。風乾後、DAPI 染色剤が入った退色防止液 (VECTASHIELD® [Vector Laboratories]) を塗布しカバーグラスをかけて封入した。

蛍光顕微鏡画像の取得には、Leica Q550FW システム (Leica Microsystems) を用いた。スライドグラス上の 1 cm 四方の柵目につき無作為に 10 視野を決定し、1 視野毎に 3 画像 (DAPI、TRITC、FITC) を取得した。糞便および盲腸内容物中の *A. caccae* および *Bifidobacterium* 属細菌の菌数は、10 視野中でそれぞれ TRITC および FITC により染色された菌体をカウントし、1 cm 四方の柵目中の総視野数と希釈倍率を乗じて算出した。総菌数は DAPI 染色で得られた画像を画像解析ソフト Image-Pro Plus ver.4.0 (Media-Cybernetics) により処理してカウントし、1 cm 四方の柵目中の総視野数と希釈倍率を乗じて算出した。

・盲腸内容物からの *A. caccae* YIT 12353 の回収性

嫌気チャンバー内において、*A. caccae* を投与したラットの盲腸内容物を予め嫌気置換した PBS で 10⁷ 倍まで段階希釈し、乳酸を唯一の炭素源とする分離用平板培地に播種した。37°C で 48 時間嫌気培養した後、コロニー形状を指標に 32 コロニーを分離した。上記 2.2.3 に示した方法に従い、RAPD 法により *A. caccae* YIT 12352、YIT 12353 および YIT 10168^T (=DSM 14662^T) との間で菌株識別を行った。

・統計解析

動物試験で得られた全てのデータは Tukey 型多重比較により群間の差を検定し、有意水

準は 5%とした。

3.3 結果

3.3.1 *Bifidobacterium* 属細菌および乳酸を酪酸に変換する腸内細菌との共培養

GOS を唯一の炭素源とする培地により、*Bifidobacterium* 属細菌と乳酸を酪酸に変換する菌の共培養を行った。*B. breve* YIT 10001 は、単独培養で培地中の GOS から乳酸および酢酸を産生した (Fig. 3-1)。*A. caccae* YIT 10168^T、*E. hallii* YIT 10064^T、*E. limosum* YIT 6067^T、*M. elsdenii* YIT 6063^T および *Co. catus* YIT 11484^T は、単独培養では GOS からの有機酸産生量は低かった。ところが、各種酪酸産生菌と *B. breve* YIT 10001 と共培養した場合には、それぞれ単独培養したときと比べて酪酸濃度が高まった。また、2 菌を共培養した培地中における乳酸および酢酸濃度は、*B. breve* YIT 10001 の単独培養と比べて低かった。*Co. catus* YIT 11484^T は、*B. breve* YIT 10001 と共培養した場合、酪酸だけでなくプロピオン酸も産生した。

3.3.2 乳酸を酪酸に変換する腸内細菌の *in vivo* における活性評価

本研究でヒト糞便から分離した株のうち、*A. caccae* YIT 12353 は最も高い酪酸産生活性を示したこと (Table 2-1)、同時に分離した *A. caccae* YIT 12352 と比べて高い比増殖速度を示したこと ($\mu=0.22 \text{ h}^{-1}$ vs $\mu=0.14 \text{ h}^{-1}$) から、*A. caccae* YIT 12353 を動物試験に使用する菌株として選択した。*A. caccae* YIT 12353 は、GOS の構成糖のうち、易消化性の単糖であるグルコースおよびガラクトースのみを利用したが、2 糖以上の鎖長の難消化性画分は利用能を示さなかった (Fig. 3-2)。

GOS は GOS/Saline 群および GOS/Ac 群に飲水投与し、GOS/Ac 群にはヒト糞便分離株である *A. caccae* YIT 12353 の懸濁液を 5 日間連日、経口投与した。飼料摂取量、飲水量お

よび GOS 摂取量には 3 群間で差は認められなかった (Table 3-2)。また、試験最終日における体重にも群間で有意な差は見られなかった。

盲腸内容物および糞便中における *A. caccae* の菌数を FISH 法により測定した結果、GOS/Ac 群で盲腸内容物および糞便の両方から *A. caccae* が検出された (Table 3-3)。一方、Saline 群および GOS/Saline 群では *A. caccae* は検出されなかった。*A. caccae* 投与群の糞便から乳酸を炭素源とする培地で分離した複数の菌株のうち、コロニー No.3 の RAPD プロファイルが投与株と一致した (Fig. 3-3)。盲腸内容物および糞便中の *Bifidobacterium* 属細菌は GOS の投与により顕著に増加したが、GOS/Saline 群および GOS/Ac 群の間ではその菌数に差は認められなかった。GOS/Saline 群および GOS/Ac 群の盲腸内容物中における総菌数は、Saline 群と比較して有意に高く ($p<0.01$)、また GOS/Ac 群の総菌数は GOS/Saline 群と比べても有意に高かった ($p<0.01$)。

GOS/Saline 群の盲腸内容物中における乳酸および酪酸は Saline 群と比べて有意に高かった (Fig. 3-4, $p<0.05$)。GOS/Ac 群の盲腸内の乳酸濃度の平均値は GOS/Saline 群のそれと比べて低値を示したが、有意差は認められなかった ($p=0.32$)。GOS/Ac 群の盲腸内容物および糞便中における酪酸濃度は Saline 群と比較して有意に高かった (それぞれ $p<0.01$, $p<0.05$)。さらに、GOS/Ac 群の盲腸内の酪酸濃度は GOS/Saline 群のそれと比べて高値傾向を認めた ($p=0.06$)。また、GOS/Ac 群の盲腸内の酢酸および総有機酸濃度は、他の 2 群よりも高く、それぞれ群間で有意差が認められた。GOS/Ac 群の糞便中の酢酸および総有機酸濃度も Saline 群と比較して有意に高かった ($p<0.05$)。

3.4 考察

乳酸を酪酸に変換する活性を示す 5 菌株について、GOS を唯一の糖源とした培地でビフィズス菌と共培養した。その結果、5 菌株全てにおいて、ビフィズス菌との共培養により乳

酸および酢酸の減少と酪酸の産生が確認された (Fig. 3-1)。したがって、これら 5 菌株はいずれもビフィズス菌が GOS から産生した乳酸および酢酸を酪酸に変換したと考えられた。したがって、乳酸を酪酸に変換する菌とビフィズス菌との 2 菌の協働作用によって、*in vitro* で GOS から酪酸が生成することが示された。

次に、実際の腸内においてこの協働代謝が行われるか否かについて、ヒト糞便分離株である *A. caccae* YIT 12353 を対象に、ラットを用いた動物モデルにより検証した。GOS 単独投与は盲腸内の酪酸濃度を増加させたが、GOS と *A. caccae* YIT 12353 を共投与した結果、GOS 単独での酪酸産生がさらに増強される傾向が示された (Fig. 3-4)。*A. caccae* YIT 12353 は GOS の難消化性画分を基質として利用できない (Fig. 3-2) ことから、腸内の酪酸は本菌が GOS を直接発酵して産生したものではないといえる。一方、GOS 投与により盲腸内容物および糞便中の乳酸濃度が上昇したが、*A. caccae* YIT 12353 の投与により有意ではないものの平均値が低下した。腸内における *Bifidobacterium* 属細菌の菌数を調べた結果、当該菌群は GOS の投与に依存して乳酸の産生を伴って顕著に増加しており、GOS がプレバイオティクスとしての作用を発揮したことを確認した。*Bifidobacterium* 属細菌による糖質からのエネルギー代謝では主に乳酸および酢酸が終末産物として生成する [63]。したがって、GOS/Saline 群および GOS/Ac 群の腸内における乳酸の一部は、内在性の *Bifidobacterium* 属細菌によって GOS から産生されたものであると推測された。

盲腸内容物および糞便中で *A. caccae* YIT 12353 が FISH 法により検出された。本研究で使用した FISH 法は菌体内の rRNA を標的とした手法であり、得られた定量値は、安定な DNA を標的とした定量的 PCR 法と比べてより生菌の状態を反映している可能性が高いといえる [64]。実際、*A. caccae* YIT 12353 を投与したラットから、投与株と同じ RAPD パターンを示す株を分離できていることから、本菌は生きたまま下部消化管へと到達したと考えられた。以上の結果から、腸内で GOS から *Bifidobacterium* 属細菌によって産生された乳酸を、*A. caccae* YIT 12353 が酪酸に変換した可能性が示された。反芻胃動物であるヒツ

ジ由来の *M. elsdenii* JCM 1772^T が同様にフラクトオリゴ糖を負荷したラットの腸内で乳酸を酪酸に変換する活性を発現することが示唆されているが[65]、ヒト由来の主要な酪酸産生菌を用いてその可能性を示したのは本研究が初めてである。ヒトへの適用を考慮した場合、*A. caccae* YIT 12353 の投与は、特に腸内で乳酸がプロピオン酸へと変換される傾向にあるヒトに対して、酪酸の産生を促進する有効な手段になることが期待される。

ところで、*A. caccae* YIT 12353 は酢酸を消費するにもかかわらず、その投与に依存して酢酸が増加した。*A. caccae* YIT 12353 の投与は、腸内における *Bifidobacterium* 属細菌の菌数に影響を与えなかったことから、*Bifidobacterium* 属細菌以外の酢酸産生菌の増殖を促進した可能性が考えられた。実際、*A. caccae* YIT 12353 の投与に依存して腸内の総菌数が増加したことから、*A. caccae* YIT 12353 は腸内の菌叢構成に影響を与え、有機酸代謝を変化させると考えられた。

本研究では、*A. caccae* YIT 12353 の乳酸を酪酸に変換する代謝特性を利用し、*A. caccae* YIT 12353 と GOS を組み合わせることで、腸内のビフィズス菌を増やしつつ、酪酸の産生を促進できることを示した。この結果より、*A. caccae* YIT 12353 と GOS の組み合わせが、プロバイオティクスとプレバイオティクスを併用した、新たな「シンバイオティクス」として酪酸の産生制御に利用できる可能性を提示できた。

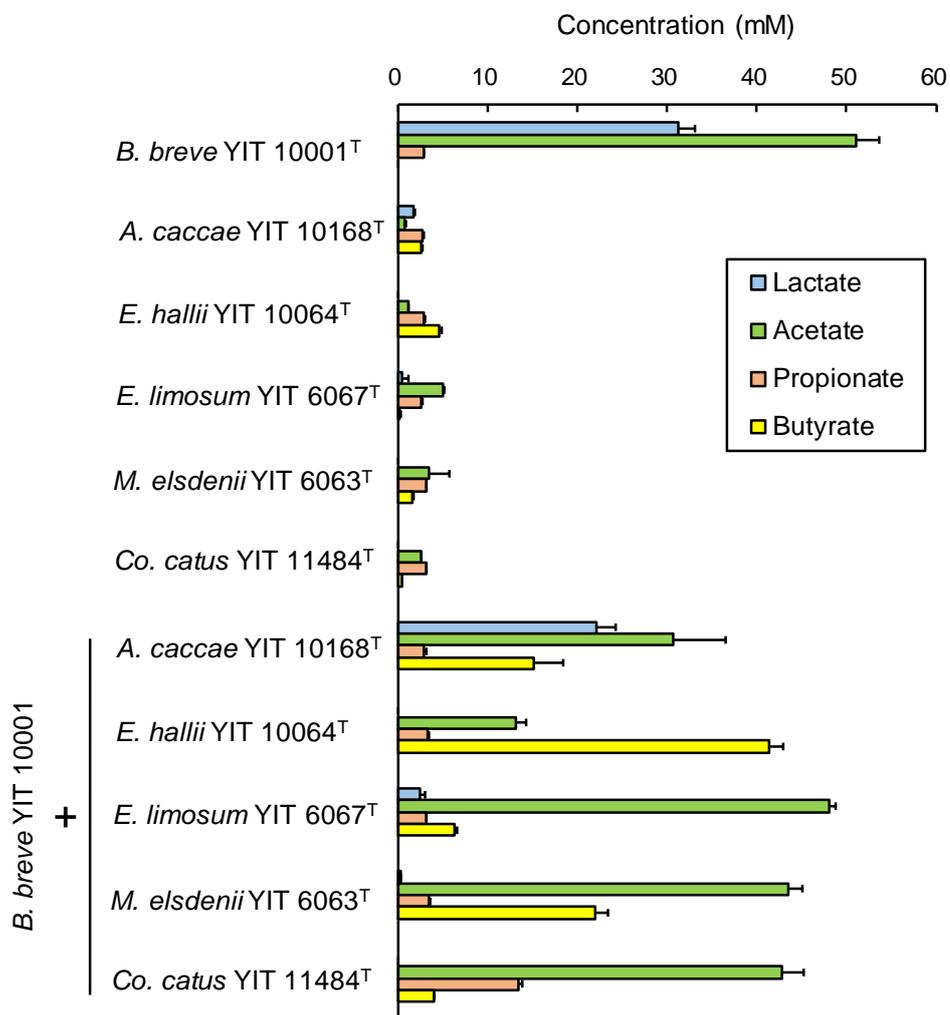
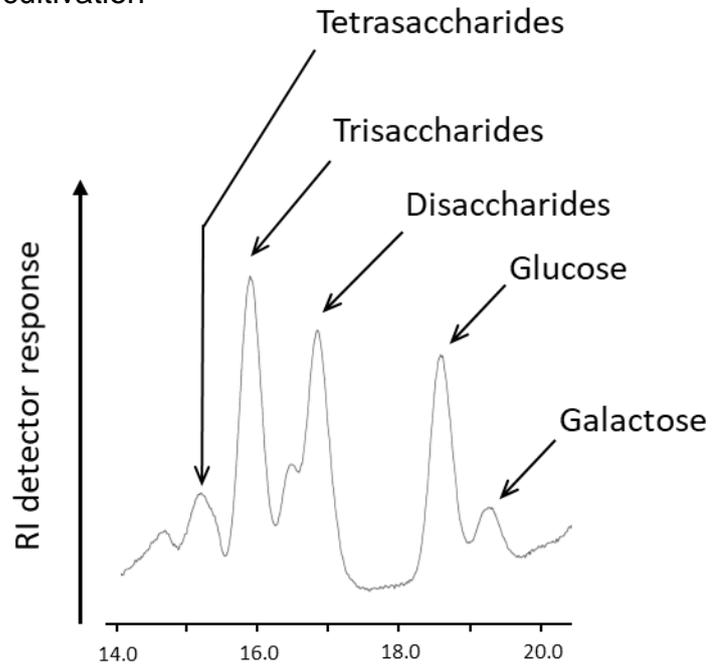


Fig. 3-1. Coculture between bifidobacteria and lactate-utilizing, butyrate-producing bacteria. Values are expressed as means \pm SD based on results from triplicate cultures.

a) Before cultivation



b) After cultivation

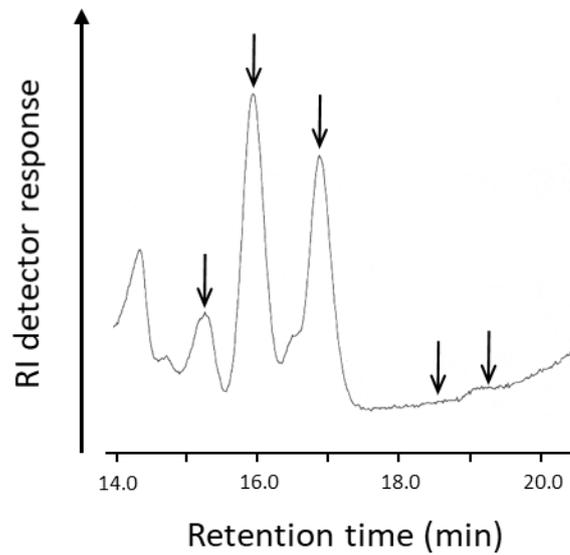


Fig. 3-2. The HPLC chromatograms of culture supernatant of *A. caccae* YIT 12353.

A. caccae YIT 12353 was cultured anaerobically for 24 h in peptone-yeast extract (PY) broth supplemented with 1% Oligomate 55N.

Table 3-1. Composition of the diet for animal experiment¹

Ingredient	g/100 g dry matter
Sucrose	50.0
Casein	20.0
α -Cornstarch	15.0
Cellulose	5.0
Corn oil	5.0
AIN-76 mineral mix	3.5
AIN-76 vitamin mix	1.0
DL-Methionine	0.3
Choline hydrogen tartrate	0.2

¹ AIN-76 diet.

Table 3-2. Body weights and intakes of water, GOS, and food¹

Item	Saline group	GOS/Saline group	GOS/Ac group
Water intake (g/day)	37.1 ± 10.6	33.5 ± 6.3	36.6 ± 12.2
GOS intake (g/day)	—	0.9 ± 0.2	1.0 ± 0.4
Food intake (g/day)	24.8 ± 2.4	21.6 ± 1.5	23.2 ± 3.7
Body weight (g)	282.2 ± 10.5	279.6 ± 9.9	273.4 ± 12.2

¹ Values are shown as mean ± SD. Intakes of water, GOS, and food were mean values per day for the five day study period. Body weights were mean values on the last day of the study period.

Table 3-3. Bacterial counts, as determined by DAPI or FISH in cecal contents and feces¹

Item	Saline group	GOS/Saline group	GOS/Ac group
Cecal contents			
<i>A. caccae</i>	ND ³	ND	8.0 ± 0.3
Bifidobacteria	ND	9.5 ± 0.3	9.5 ± 0.4
Total bacteria ²	10.2 ± 0.2 ^a	10.6 ± 0.1 ^b	10.9 ± 0.1 ^c
Feces			
<i>A. caccae</i>	ND	ND	8.7 ± 0.3
Bifidobacteria	ND	9.7 ± 0.4	9.5 ± 0.4
Total bacteria	10.9 ± 0.1	10.9 ± 0.1	11.1 ± 0.2

¹ Counts of bacteria are expressed as numbers of cells log₁₀ per gram of cecal contents or feces (wet weight). Values are shown as mean ± SD (n = 6).

² Total bacterial numbers were determined by staining with 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI).

³ ND; not detected (< 6.59 log₁₀ cells/g contents or feces).

Values with different alphabets are significantly different ($p < 0.01$).

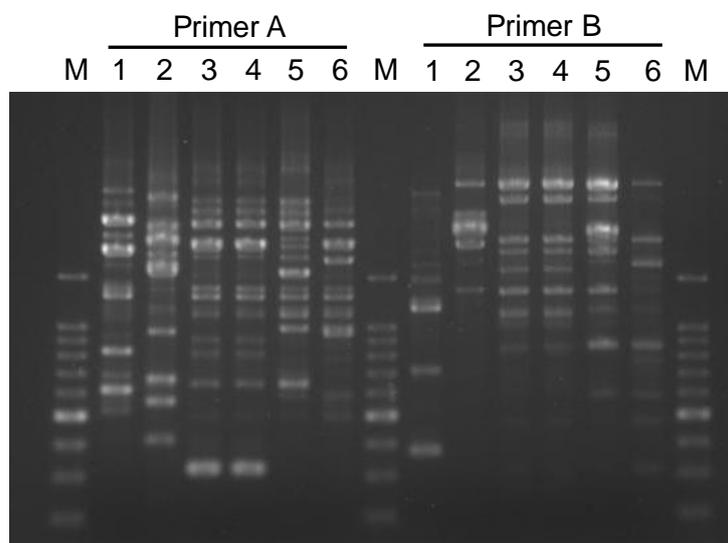


Fig. 3-3. RAPD profiles from DNA of cecal isolates.

Lane 1, colony no. 1; lane 2, colony no. 2; lane 3, colony no. 3; lane 4, *A. caccae* YIT 12353; lane 5, *A. caccae* YIT 12352; lane 6, *A. caccae* YIT 10168^T (=DSM 14662^T); lane M, 100-bp DNA ladder.

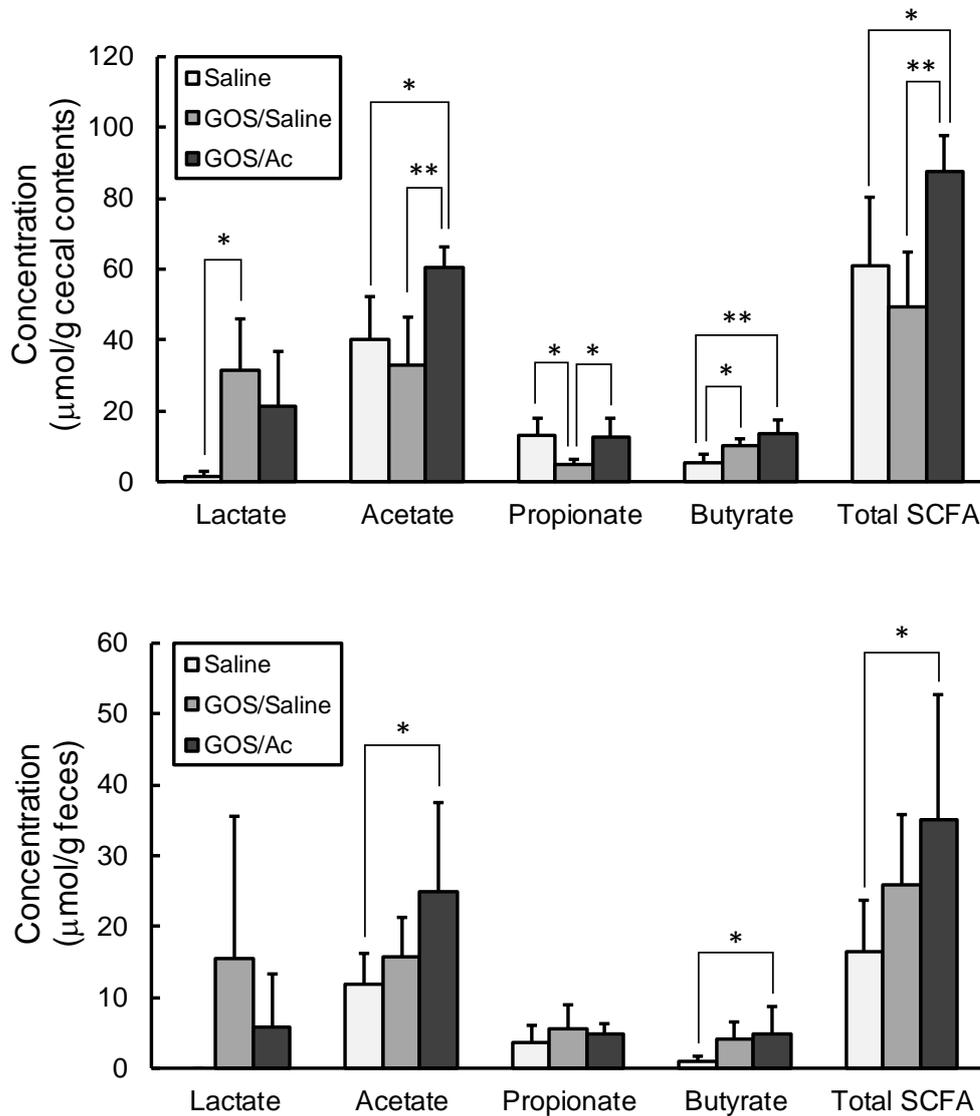


Fig. 3-4. Concentrations of cecal (A) and fecal (B) SCFA, succinate, and lactate in the Saline group (white bars), GOS/Saline group (solid gray bars), and GOS/Ac group (black bars).

Values are means with their standard deviation represented by vertical bars. Total SCFA are sum of formate, acetate, propionate, and butyrate. Values with asterisks are significantly different from each other (* $p < 0.01$ and ** $p < 0.001$).

第4章 酪酸の産生を促進する難消化性糖質の探索

4.1 緒言

腸内における主要な短鎖脂肪酸の一つである酪酸は、難消化性糖質の腸内細菌による嫌氣的発酵により産生される。難消化性のオリゴ糖に代表されるプレバイオティクスは、腸内において *Bifidobacterium* 属細菌および *Lactobacillus* 属細菌の増殖を促進し、乳酸および酢酸の産生を亢進する。乳酸はさらに他の腸内細菌によって利用されて酪酸もしくはプロピオン酸などが産生される。すなわち、オリゴ糖から乳酸を介して生じる酪酸量は個人の腸内細菌叢の構成によって規定されると推察される。したがって、腸内において乳酸を介さず直接酪酸産生菌によって利用される糖質は、従来のプレバイオティクスと比べてより効率的に酪酸の産生を促進する新規なプレバイオティクス素材として期待される。

これまでに、*in vitro* および動物を用いた試験により、オリゴフラクトース[66]、イヌリン[67]、グアガム加水分解物[68]、グルコン酸[69]、糖アルコール[70]、酪酸化でんぷん[71]などの難消化性糖質が、酪酸を始めとする短鎖脂肪酸の産生を促進することが報告されているが、特にヒト腸内において酪酸を特異的に増加させる素材の報告は極めて少ないのが現状である。糖アルコールの一種であるキシリトールは、ヒト腸内環境を模倣した *in vitro* 半連続培養系において酪酸の産生を特異的に亢進することが報告されているが[70]、どのような細菌が酪酸の産生に寄与しているかなど、その発酵特性については明らかでない。

そこで本研究では、キシリトールを含む難消化性糖質を対象に、ヒト糞便培養系を用いて酪酸の産生を特異的に促進する素材をスクリーニングした。また、活性を示した素材からの酪酸の産生に関わる腸内細菌を明らかにするため、糞便培養液中の菌叢変化を解析するとともに、糖質からの酪酸の産生に関わる菌の分離を試みた。さらに、各種腸内細菌による発酵特性を調べることにより、糖質のプレバイオティクスとしての特性を評価した。

4.2 材料と方法

4.2.1 酪酸の産生を亢進する難消化性糖質の1次スクリーニング

・対象素材

水溶性の難消化性糖質である α -シクロデキストリン、 β -シクロデキストリン、フラクトオリゴ糖 (FOS)、ガラクトオリゴ糖 (GOS)、ゲンチオオリゴ糖、イソマルチトール、イソマルトオリゴ糖、イソマルチュロース、ラクチトール、ラクトスクロース、ラクチュロース、マルチトール、D-マンニトール、D-メレジトース、パラチニット、ラフィノース、L-ラムノース、グルコン酸ナトリウム、D-ソルビトール、L-ソルボース、キシリトールおよびキシロオリゴ糖の計 22 素材を 1 次スクリーニングの対象とした。各素材 20 mg をスクリーバイアルに量り取り、嫌気チャンバー内に搬入して嫌気置換した。なお、GOS は 3.2.1 に記載した方法で調製した。

・糞便培養

健常成人男性 2 名 (A ; 年齢 31 歳、B ; 28 歳) から新鮮排泄便を提供してもらい、試験に使用した。糞便を採取後、直ちにアネロパックケンキにより嫌気状態に維持し、試験実施まで保冷剤にて冷蔵で保持した。糞便を嫌気チャンバー内に搬入し、手で十分に均質化した後、約 20 g をフィルター付きホモジナイズバッグ PYXON-30 (エルメックス) に移した。そこに糞便の 9 倍量の嫌気置換液 0.1 M リン酸 Na バッファー (pH 6.8) を加えてホモジナイズし、残渣を除いた。ろ液 10 ml を各種素材 20 mg が入ったスクリーバイアルに移し、37°C で 24 時間、振とう培養した。各素材の最終濃度は 0.2%(w/v) とし、糖質を加えずに培養したものを陰性対照とし、代表的なプレバイオティクスである GOS を加えた培養液を陽性対照とした。糞便の 1 次処理および培養操作は全て嫌気チャンバー内で実施し、気相中の嫌気ガスの組成は、N₂ 80%、CO₂ 15%、H₂ 5% に維持した。

- ・有機酸産生量の測定および選抜基準

培養終了後、培養液中の有機酸濃度は 2.2.1 に示した方法により、イオン排除 HPLC にて測定した。各種素材を添加した際の酪酸濃度が、提供者 B もしくは E のいずれかで GOS を添加した際の酪酸濃度である 8.7 mM より高い素材を選抜した。

4.2.2 難消化性糖質の 2 次スクリーニング

- ・対象素材

1 次スクリーニングにおいて高い酪酸産生活性を示した D-マンニトール、D-ソルビトール、L-ソルボースおよびキシリトールの 4 素材をスクリーニング対象とした。またその際、代表的なプレバイオティクスであるフラクトオリゴ糖 (FOS) および GOS についても評価対象に加えた。各素材 50 mg をスクリーバイアルに量り取り、嫌気グローブボックス内に搬入して嫌気置換した。

- ・糞便培養

健康成人男性 5 名 (A~E: 年齢 27~40 歳、平均年齢 33.2±5.9 歳) から新鮮排泄便を提供してもらい、試験に使用した。糞便を採取後、直ちにアネロパックケンキにより嫌気状態に維持し、試験実施まで保冷剤にて冷蔵で保持した。糞便を嫌気グローブボックス内に搬入し、手で十分に均質化した後、20 g をフィルター付きホモジナイズバッグ PYXON-30 (エルメックス) に移した。そこに糞便の 180 ml の嫌気置換液 0.1 M リン酸 Na バッファー (pH 6.8) を加えてホモジナイズし、残渣を除いた。ろ液 10 ml を素材が入ったスクリーバイアルに移し、嫌気条件下 37°C で 24 時間、振とう培養した。各素材の最終濃度は 0.5%(w/v) とし、糖質を加えずに培養したものを陰性対照とした。糞便の 1 次処理および培養操作は全て嫌気グローブボックス内で実施し、気相中の嫌気ガスの組成は、N₂ 80%、CO₂ 15%、H₂ 5% に維持した。培養終了後、培養液中の有機酸濃度を 2.2.1

に示した方法に従い、イオン排除 HPLC にて測定した。

4.2.3 PCR-DGGE 法を用いた糞便培養液中の菌叢解析

糞便培養液中の細菌 DNA は、既報[23]に従いビーズフェノール法にて抽出した。細菌叢の解析には、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法 (Denaturing gradient gel electrophoresis: DGGE 法) を用い、既報[72]に記載の方法を一部改良して実施した。抽出した DNA を鋳型にして、GC クランプを付与した forward プライマー GC-341-F (5'-CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCGCCCG-CCTACGGGAGGCAGCAG-3' [72] および reverse プライマー 800R (5'-GGACTACCAGGGTATCTAAT-3') により細菌の 16S rRNA 遺伝子 (V3-V4 領域) を、既報[73]に従ってタッチダウン PCR 法により増幅した。反応液 50 μ l 中に 5 μ l の 10 \times PCR buffer、5 μ l の 2.5 mM dNTP、1 μ l の 25 pmol/ μ l プライマー溶液、1.25 units の Ex Taq polymerase HS (Takara Bio)、10 ng の鋳型 DNA で行った。温度条件は 94 $^{\circ}$ C 3 分、(94 $^{\circ}$ C 30 秒、65 $^{\circ}$ C (1 cycle ごとに 1 $^{\circ}$ C ずつ 55 $^{\circ}$ C まで下げる) 30 秒、72 $^{\circ}$ C 30 秒) \times 10 サイクル、(94 $^{\circ}$ C 30 秒、55 $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 30 秒) \times 20 サイクル、72 $^{\circ}$ C 5 分で行った。増幅産物 15 μ l を DCode Universal Mutation Detection System の Model 475 Gradient Delivery System (Bio-Rad Laboratories) で 30-50%の変性剤の濃度勾配(ここでは 100%変性剤とは 7 M の urea と 40%formamide の混合物)をつけた 8%アクリルアミドゲル (8% Acrylamide/Bis (37:5:1)、1 \times TAE (pH 8.0)、0.1% TEMED、0.1% Ammonium persulfate) を用いて 60 $^{\circ}$ C、130V で 5~7 時間泳動した。泳動後、エチジウムブロマイドで染色し、UV ランプ下でバンドを確認した。対照と比べて素材の添加により強度が増加したバンドを切り出し、TE バッファー中で凍結融解を繰り返すことでゲルから DNA を抽出した。抽出した DNA を鋳型にし、GC クランプを付与していないプライマー-341F および 800R を使用して PCR により V3-V4 領域を再度増幅した。得られた約 400 bp の増

幅産物の塩基配列は Big Dye Terminator Ver.3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies) および ABI PRISM 3130 (Life Technologies) を使用して決定した。塩基配列を DNA Data Bank of Japan (DDBJ) の BLAST プログラムに供し、データベース上に登録されている既知の菌種との相同性を検索した。

4.2.4 L-ソルボースあるいはキシリトールから酪酸を産生する菌のヒト糞便からの分離

・分離方法

健康成人男性 2 名 (C : 30 歳, E : 29 歳) から糞便を採取し、直ちにアネロパックケンキにより嫌気状態に維持し、試験実施まで保冷剤にて冷蔵で保持した。糞便をグローブボックス内に搬入し、糞便を十分に均質化した後、約 1 g をフィルター付きホモジナイズバッグ PYXON-30 (エルメックス) に移した。そこに糞便の 9 ml の嫌気置換済 0.1 M リン酸 Na バッファー (pH 6.8) を加えてホモジナイズし、残渣を除いた。糞便希釈液の一部をペプトン-酵母エキス (PY) 培地、0.5% L-ソルボース添加 PY (PYS) 培地、および 0.5% キシリトール添加 PY (PYX) 培地に 0.5% 接種し、炭酸ガス気相下で 37°C のもと 24 時間嫌気培養した。PY 培地の組成は、1 L あたり Bacto Peptone (Becton Dickinson) 5.0 g、Trypticase peptone (Becton Dickinson) 5.0 g、酵母エキス 10.0 g、L-システイン 1 水和物 0.5 g、炭酸ナトリウム 0.4 g、0.05% ヘミン溶液 10 ml、0.1% レサズリン溶液 1.0 ml、リン酸水素二カリウム 0.4 g、リン酸二水素カリウム 0.04 g、炭酸水素ナトリウム 0.08 g、塩化ナトリウム 0.04 g、塩化カルシウム 8 mg、硫酸マグネシウム 7 水和物 1.9 mg、ビタミン K₁ 1.0 mg とし、pH 6.8 に調整して使用した。培養後、培養液を嫌気置換した PBS で 10⁷ 倍希釈し、PY、PYS、および PYX 平板培地に播種し、37°C で 48 時間嫌気培養した。PYS および PYX 平板培地に生育したコロニーのうち、PY 平板培地上のそれと比較して形態が異なるコロニーを釣菌し、33 mM の酢酸ナトリウムを加えた PYS および PYX 液体培地 (PYAS および PYAX) に接種して炭酸ガス気相下、37°C で 24

時間嫌気培養した。これらの分離株のうち、培養液中に酪酸を産生した株を選抜した。

・分離株の同定

分離株の菌体から上記のビーズフェノール法にて DNA を抽出し、プライマーA (5'-CCGCAGCCAA-3')、プライマーB (5'-AACGCGCAAC-3') およびプライマーC (5'-GCGGAAATAG-3') の 3 種類をランダムプライマーとする RAPD 法[37]により菌株識別を行った。増幅産物を 1.5%アガロースゲルにより電気泳動した後、エチジウムブロマイドを用いて染色し、菌株ごとの泳動パターンを比較することで菌株識別した。互いに異なる RAPD プロファイルを示した菌株について、細菌の 16S rRNA 遺伝子の共通配列部分を標的とするプライマー27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') および 1524R (5'-AAGGAGGTGATCCARCCGCA-3') [74 を一部改変]により 16S rRNA 遺伝子を PCR により増幅した。増幅した DNA の塩基配列は Big Dye Terminator Ver.3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies) および ABI PRISM 3130 (Life Technologies) を使用して決定した。配列決定用プライマーとして、27F, r1L (5'-GTATTACCGCGGCTGCTGG-3')、f2L (5'-CCAGCAGCCGCGGTAATAG-3')、r2L (5'-GACTACCAGGGTATCTAATC-3')、926f (5'-AAACTCAAAGGAATTGACGG-3')、r3L (5'-TTGCGCTCGTTGCGGGACT-3')、f3L (5'-GTCCCGCAACGAGCGCAAC-3') および 1524R[38,39]を使用した。分離株より得られた 16S rRNA 遺伝子の配列は、DDBJ の BLAST プログラムに供し、近縁種のデータベース検索を行った。

・分離株の系統解析

分離株ならびにこれらの近縁種を中心とする各種腸内細菌の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を GenBank、EMBL および DDBJ から取得した。各配列を Clustal X (ver. 2.0.12) [40]によりアライメントし、近隣接合法 [41]を用いて系統樹を作成した。作成した系統樹

は Tree-View プログラム (ver. 1.6.6) [42]を用いて表示した。

・分離株の表現型および生化学検査

糞便分離株 2 株ならびに 16S rRNA 遺伝子配列が分離株に最も近縁であった *A. hadrus* DSM 3319^T について表現型および生化学検査を行った。グルコースから産生される有機酸のプロファイルは、各菌株を 0.5%グルコース添加-PY (PYG) 培地にて 37°Cで 24 時間培養した後、培養上清中の有機酸濃度を 2.2.1 に記載した方法に従ってイオン排除 HPLC にて分析した。乳酸利用性は、PYA 培地に 40 mM の DL-乳酸もしくは L-乳酸を加えた培地にて 37°Cで 24 時間培養し、上記と同様に有機酸濃度を測定した。3 菌株について、菌の形態、グラム染色性、運動性、ならびに芽胞形成性を調べた。菌の大きさは、グラム染色画像をもとに画像解析ソフト DP2-BSW (オリンパス) により測定した。芽胞形成性は PYG 寒天培地上で 37°Cのもと 48 時間嫌気培養した菌体を Schaeffer and Fulton Spore Stain Kit (Sigma Aldrich) により染色した後、光学顕微鏡を用いて判定した。運動性は、各菌株を半流動 GAM 培地 (日水製薬) に白金耳で穿刺して 37°Cで 24 時間培養した後、培地中への菌体の拡散の有無を指標に評価した。

生化学性状検査 (糖資化性、酵素活性、インドール産生能) には、アピケンキ 20A、ラピッド ID 32A アピおよびアピ ZYM (Sysmex BioMérieux) を用い、製品マニュアルに従って試験した。菌株 DNA の GC 含量は、既報[75]に従って、DNA を酵素的に分解させて生成したヌクレオシドを HPLC にて定量することにより決定した。

4.2.5 定量的 PCR による糞便培養液中の細菌群構成の解析

A. hadrus およびその近縁種の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を Clustal X (ver. 2.0.12) [40]によりアライメントして比較し、*A. hadrus* に特異的な配列を基にプライマーを設計した (Table 4-3)。Ribosomal Database Project (RDP-II) (<http://rdp.cme.msu.edu/>)

[43]の Probe Match プログラムおよび DNA Data Bank of Japan の BLAST プログラムを用いて、見出した配列をデータベース上に登録されている種々の菌の 16S rRNA 遺伝子配列と比較し、目的とする菌種以外に同一の配列を有する菌種が存在しないことを確認した。

設計した各種プライマーの特異性の確認および糞便中における各種腸内細菌の定量は、ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems) を用いた PCR により行った。1.0 μ M の各プライマーを含む SYBR Premix Ex Taq II (Takara Bio) に各種菌体から抽出した鋳型 DNA 溶液を加え、総量を 10 μ l として既報[23]に従い PCR 反応を行った。まず鋳型 DNA の二本鎖を解離させるため 94°C で 5 分間加熱した後、94°C で 20 秒間、50°C もしくは 55°C で 20 秒間、72°C で 50 秒間の反応を 1 サイクルとしてこれを 40 サイクル繰り返し、94°C で 15 秒間反応させた。さらに、これに引き続き T_m 値解析[44]のため、60°C で 2 分間反応させた後、0.2°C/秒の温度勾配で 95°C まで温度を上昇させ、このときの SYBR Green I の蛍光を測定して増幅産物の 2 本鎖が解離するときの温度 (T_m) を測定した。定量的 PCR の標準曲線は、*A. caccae* YIT 10168^T (=DSM 14662^T)、*A. hadrus* YIT 12355、*Bacteroides vulgatus* YIT 6159^T (=ATCC 8482^T)、*Bifidobacterium longum* subsp. *suis* YIT 4082^T (=JCM 1269^T)、*Blautia producta* YIT 6141^T (=JCM 1471^T)、*Faecalibacterium prausnitzii* YIT 6174 (=ATCC 27766) および *Lactobacillus gasseri* YIT 0192^T (=DSM 20243^T) から抽出した DNA を用いた。検量線の作製には各菌種の基準株から抽出した DNA を用いた。各菌株の菌体を 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Vector Laboratories) により染色し[45]、蛍光顕微鏡を用いてその菌数を決定した。この菌液から抽出した DNA を 10 倍段階希釈して PCR を行い、一定の蛍光値に達する PCR サイクル数 (C_t 値) と菌数の対数値を基に検量線を作成した。同時に、糞便から抽出した DNA を 10 倍ずつ 3 段階希釈して反応させ、菌数の対数値との間に直線性が認められた C_t 値を検量線に代入し、3 点の平均値から菌数を算出した。

4.2.6 *Anaerostipes* 属細菌における L-ソルボースおよびキシリトールの代謝経路の解析

A. caccae DSM 14662^T および *A. hadrus* DSM 3319^T のドラフトゲノム配列から予測される ORF のアミノ酸配列の multi-FASTA ファイルを NIH Human Microbiome Project [76] (<http://hmpdacc.org/>) から取得した。これらの配列を KAAS (KEGG Automatic Annotation Server, <http://www.genome.jp/kegg/kaas/>) プログラム[77]を用いて KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) [78]パスウェイマップに割り当てた。KAAS プログラムによるアノテーションの際、原核生物としての初期設定の対照菌株に加えて、*Akkermansia muciniphila*、*Bacteroides fragilis* NCTC 9343、*Bifidobacterium adolescentis* ATCC 15703、*Bifidobacterium longum* NCC 2705、*Eggerthella lenta*、*Eubacterium eligens*、*E. rectale* ATCC 33656、*Fusobacterium nucleatum* susp. *nucleatum* ATCC 25586、*Lactobacillus casei* BL23、*Roseburia hominis* および *Ruminococcus albus* を対照菌株として追加した。また、オーソログの割り当てには、bi-directional best hit 法を使用した。

4.2.7 各種腸内細菌の L-ソルボースおよびキシリトールの資化性

ヒト消化管から見出される細菌 24 属 67 菌種 73 株を対象に L-ソルボースおよびキシリトールの資化性を調べた (Table 4-6)。素材の資化性は、L-ソルボースおよびキシリトールを炭素源として培養した際の糖質からの有機酸産生量を基に評価した。各種菌株を 1% グルコース添加-変法 GAM 培地により窒素ガス飽和下で 37°C、24 時間から 48 時間培養した。培養後、培養液の一部を PYA 培地、0.5% L-ソルボースもしくはキシリトールを添加した PYA 培地 (PYAS および PYAX) 培地 4 ml にそれぞれ 1%接種し、炭酸ガス飽和下で 37°C、24 時間嫌気培養した。培養後の培養液中の有機酸濃度を 2.2.1 に示した方法に従い、イオン排除 HPLC により測定した。各菌株による L-ソルボースおよびキシリトールからの有機酸産生量は以下に従って算出した。

- ・ (有機酸産生量) = (PYAS もしくは PYAX 培地での培養後の有機酸量)
 - － (PYA 培地での培養後の有機酸量)

4.3 結果

4.3.1 酪酸の産生を亢進する難消化性糖質のスクリーニング

最初に 1 次スクリーニングとして、2 名の健常成人 B および E から採取した糞便を用いた *in vitro* 糞便培養系により、22 種類の水溶性難消化性糖質について酪酸産生量を評価した。その結果、D-マンニトール、D-ソルビトール、L-ソルボースおよびキシリトールが、5 種類の一般的なプレバイオティクス (FOS、GOS、ゲンチオオリゴ糖、イソマルトオリゴ糖およびキシロオリゴ糖) の中で最も高い酪酸産生量を示した GOS (8.7 mM) よりも高い値を示した (Fig. 4-1)。続いて、糞便提供者を 5 名 (A~E) に増やした 2 次スクリーニングにおいて、上記 4 種類の糖質ならびに代表的なプレバイオティクスである FOS および GOS からの酪酸産生量を評価した。FOS および GOS は全ての糞便培地で、糖質を加えない対照と比較して短鎖脂肪酸全般、特に酢酸の産生を促進した (Fig. 4-2)。L-ソルボースは、全ての培地において酪酸濃度を 20 mM 以上まで到達させた。キシリトールの添加でも酪酸濃度は 20 mM 以上に達したが、糞便提供者 A の場合にはプロピオン酸が主要な代謝産物であった。D-マンニトールおよび D-ソルビトールも全ての培地で酪酸の産生を促進したが、その濃度は L-ソルボースおよびキシリトールと比べて低かった。L-ソルボースおよびキシリトールを基質とした際の酪酸が総短鎖脂肪酸 (酢酸、プロピオン酸および酪酸の総和) に占める割合の平均はそれぞれ 49% および 54% であったが、他の糖質は 15~35% と低い値を示した。以上の結果から、L-ソルボースおよびキシリトールを素材として選定した。

4.3.2 L-ソルボースおよびキシリトールを添加した糞便培地中の菌叢変化

L-ソルボースおよびキシリトールを加えた際に、酪酸濃度の上昇に伴ってどのような細菌群が増加するかを、PCR-DGGE 法により解析した。L-ソルボースを添加した場合、バンド S1 から S7 までのバンド強度が増加した (Fig. 4-3)。これらのバンドを切り出し、塩基配列を調べて BLAST 検索を行った結果、バンド S1、S5、S6 および S7 は、*Anaerostipes hadrus* DSM 3319^T と、バンド S3 は *A. caccae* DSM 14662^T と 99%以上の相同性を示した。糞便提供者 A および B の培地におけるバンド S2 および S4 は、*Ruminococcus obeum* と 98%以上の相同性を示した。

キシリトールの添加では、L-ソルボースと同様にバンド X3、X4 および X6 が *A. hadrus* DSM 3319^T と、バンド X2 は *A. caccae* DSM 14662^T と 98%以上の相同性を示した (Fig. 4-3)。キシリトールは、*Bacteroides plebeius* M14 および *Eubacterium contortum* とそれぞれ 100%および 99%の相同性を示す菌に由来するバンドである X1 および X5 の強度を増加させた。

4.3.3 L-ソルボースおよびキシリトールから酪酸を産生する腸内細菌の分離および同定

提供者 C および E から採取した糞便希釈液を、L-ソルボースもしくはキシリトールを唯一の炭素源として添加した PY 液体培地に接種し、各基質を資化して増殖する菌を集積培養した。培養液をそれぞれ同じ組成の平板培地に播種し、培養後に平板上に生育したコロニーを分離した。L-ソルボースを添加した PYS 平板培地により、提供者 C から 3 個のコロニーを、提供者 E から 6 個のコロニーを分離した。また、キシリトールを添加した PYX 平板培地により、提供者 C から 7 個のコロニーを、提供者 E から 4 個のコロニーを分離した。これらのコロニーのうち、提供者 C の PYS 平板培地から 1 株が、提供者 E 由来の PYS および PYX 平板培地から同一の 1 株が、PYS および PYX 液体培地中で酪酸産生活性を示した。これら分離株をそれぞれ YIT 12354 (提供者 C 由来) および YIT 12355 (提供者 E 由来)

と命名した。これらの菌株は、酢酸を含む PY 基礎培地 (PYA) 中で L-ソルボースおよびキシリトールから著量の酪酸を産生するとともに、酢酸を消費した (Table 4-1)。また、L-ソルボースもしくはキシリトールを基質とした場合、グルコースを基質としたときと比べて、酢酸の消費量とギ酸の産生量が高かった。16S rRNA 遺伝子の配列を基に系統解析を行った結果、両菌株はいずれも *Clostridium* クラスター XIVa 中の *A. hadrus* DSM 3319^T と同じサブクラスターに入り、これら 3 菌株は互いに 99.8%以上の相同性を示した (Fig. 4-4)。分離株 2 株と *A. hadrus* DSM 3319^T について、表現型および生化学的性状を比較した。これら 3 菌株は全てグラム陽性の桿菌であり、DNA の GC 含量は約 37%、D-乳酸の利用性が陽性であった (Table 4-2)。さらに、各種酵素活性および糖発酵性が 3 株の間で類似していたことから、YIT 12354 および YIT 12355 を *A. hadrus* と同定した。

4.3.4 糞便培養液中における腸内細菌叢の定量解析

糞便培養液中の *A. hadrus* の菌数を定量するため、新たに本菌に対する菌種特異的プライマーを設計した (Table 4-3)。各種腸内細菌から抽出した DNA を鋳型に、PCR によりプライマーの特異性を調べた結果、標的とする *A. hadrus* 3 菌株の DNA を鋳型にしたときのみ増幅産物が得られた (Table 4-4)。L-ソルボースおよびキシリトールを添加した糞便培養液中の細菌叢について、菌群および菌種特異的プライマー (Table 4-3) を用いた定量的 PCR 法により解析した。その結果、全ての提供者において、L-ソルボースおよびキシリトールの添加により、対照と比較して *A. hadrus* および *A. caccae* の菌数が有意に増加した (Table 4-5, $p<0.01$)。糞便培養 A では、キシリトールの添加により *Bacteroides fragilis* グループが有意に増加した ($p<0.01$)。一方、*Bifidobacterium* 属および *Lactobacillus* 属細菌の菌数に変化は認められなかった。

4.3.5 各種腸内細菌による L-ソルボースおよびキシリトールの資化性

本研究で分離した細菌株、*A. caccae* YIT 12352 および YIT 12353、*A. hadrus* YIT 12354 および YIT 12355 の 4 株を含む、ヒト消化管から見出される細菌 24 属 67 菌種 73 株について、L-ソルボースおよびキシリトールの資化性を調べた。L-ソルボースおよびキシリトールを炭素源とする酢酸添加 PY 培地により各種菌株を培養し、両基質からの有機酸産生量をもとに資化性を評価した。その結果、L-ソルボースから *Blautia coccooides* YIT 6035^T および *Lactobacillus rhamnosus* YIT 0105^T がそれぞれ酢酸および乳酸を産生する活性を示したが、酪酸は *Anaerostipes* 属細菌によって産生された (Fig. 4-5)。また、その際、酢酸の消費を伴った。一方、キシリトールについては、*A. hadrus* DSM 3319^T を除く全ての *Anaerostipes* 属細菌により特異的に資化され、酢酸の消費を伴って酪酸が産生された (Fig. 4-6)。

4.4 考察

D-フルクトースの 5 位のエピマーである L-ソルボースは、パッションフルーツ (*Passiflora edulis*) 果皮のペクチンの酵素分解物中に含まれていること [79]、またアップルサイダービネガー中に存在することが知られている [80]。本研究により、L-ソルボースは糞便培養系において酪酸産生の優れた基質となることがわかった (Fig.4-2)。L-ソルボースのヒト消化管内における吸収性および消化性については明らかではないが、L-ソルボース 20 g を 1 日 2 回、10 日間継続摂取すると下痢や腸内でのガス産生による腹部症状が生じることが報告されている [81]。このことから、L-ソルボースのヒト上部消化管からの吸収性は低く、一部は下部消化管に到達すると推察される。したがって、L-ソルボースは酪酸の産生を促進するプレバイオティクスとしての特性を示すと考えられる。L-ソルボースが酪酸の産生を促進する

報告はこれまでになく、新規の知見であると考えられる。

キシリトールは、5 単糖の糖アルコールであり、カリフラワーやイチゴなど野菜や果物に広く存在している[82,83]。キシリトールは口腔内細菌による基質利用性が低く[84]、う蝕の原因になりにくいいため、食品産業分野においては甘味料として汎用されている。摂取したキシリトールのうち、約半分は小腸からの消化吸収を免れて下部消化管まで到達するとされている[85]。本研究において、キシリトールは代表的なプレバイオティクスである FOS および GOS と比べて高い酪酸産生活性を示した (Fig. 4-2)。ヒトがキシリトールを 30 g 単回摂取すると、糞便中で総菌数に占めるグラム陽性細菌の割合が増加することが報告[86]されていることから、キシリトールはその一部が下部消化管に到達して腸内細菌叢の構成と代謝活性に影響を与えると推測される。

これまでに、ヒト大腸内の環境を模した *in vitro* 嫌気培養システムにより、キシリトールが酪酸の産生を促進することが報告されているが[70]、どのような菌がその産生に関与しているかは明らかにされていない。本研究では、*A. hadrus* 2 株をヒト糞便から分離し、これらの株がキシリトールだけでなく L-ソルボースも資化し、酪酸を主要な代謝産物として産生することを明らかにした (Table 4-1)。その際、両菌株は酢酸を消費したことから、Butyryl coenzyme A (CoA):acetate CoA transferase (Fig. 2-4) を有していると考えられた。ヒト消化管から見い出される各種腸内細菌を対象に、L-ソルボースおよびキシリトールの資化性を調べた結果、両者とも *Anaerostipes* 属細菌によって酪酸産生の基質として利用されることがわかった。DGGE による解析では、*B. plebeius*、*E. contortum* および *R. obeum* に近縁な細菌種によっても基質として利用されることが示唆されたが、これらの菌種はいずれも分類学的に酪酸産生能を持たない[22,87]。したがって、これらの細菌が糞便培養液中で酪酸の産生に寄与している可能性は低い。*B. plebeius* に近縁な菌の顕著な増加が認められた提供者 A の糞便培養液では、キシリトール添加によりプロピオン酸が主要な代謝産物として産生されたことから (Fig. 4-2)、当該菌はむしろプロピオン酸の産生に関与したと考えら

れた。一方で、提供者 A の糞便培養液においてはキシリトール添加で *Anaerostipes* 属細菌も増加しており (Table 4-5)、*B. plebeius* との間で基質の競合が起こっていたと推測された。以上の結果は、キシリトールから酪酸もしくはプロピオン酸のいずれが産生されるかは、個人の腸内菌叢構成の違いならびに構成菌の基質との親和性が影響すると考えられた。一方で、提供者 A の糞便培養液でも L-ソルボースからのプロピオン酸産生量は低かったことから (Fig. 4-2)、L-ソルボースの酪酸産生菌に対する特異性はキシリトールよりも高いことがわかった。また、L-ソルボースおよびキシリトールはともに *Bifidobacterium* 属および *Lactobacillus* 属細菌の菌数には影響を及ぼさなかったことから (Table 4-5)、これらの菌群の増殖を促進する従来のプレバイオティクスとは全く異なる発酵特性を示すことがわかった。以上の結果から、L-ソルボースおよびキシリトールからの酪酸の産生には、*Anaerostipes* 属細菌という極めて限定した菌群が寄与していることが明らかとなった。

A. caccae DSM 14662^T および *A. hadrus* DSM 3319^T のドラフトゲノム配列から予測される遺伝子のアミノ酸配列を用いて、L-ソルボースおよびキシリトールの代謝経路を推測した。その結果、*A. caccae* DSM 14662^T は、キシリトールを L-iditol (sorbitol) 2-dehydrogenase (SorD) によりキシロースに酸化し、続いてペントースリン酸経路を介して解糖系へと代謝していると考えられた (Fig. 4-7)。一方、*A. hadrus* DSM 3319^T からは SorD が見出されず、キシリトールの資化能を示さない表現型と矛盾のない結果であった。

L-ソルボースは、*A. caccae* DSM 14662^T において、1) 細胞膜上の輸送体である phosphoenolpyruvate-dependent L-sorbose-specific phosphotransferase system (PTS) [88-90]によって取り込まれると同時にソルビトールへの酸化とリン酸化を受けて解糖系に入る、もしくは、2) ソルビトール脱水素酵素および SorD により L-ソルボースから D-ソルビトールを介して D-フルクトースまで変換されて解糖系に入ると推測された。一方、*A. hadrus* DSM 3319^T のゲノム上からは PTS およびソルビトール脱水素酵素は見出されず、

L-ソルボースの利用性を示した表現型とは一致しなかった。したがって、*A. hadrus*によるL-ソルボースの代謝経路を明らかにするためには、当該菌種ならびに近縁種のさらなるゲノム情報の蓄積と生化学的解析が必要であると考えられる。

ヨーロッパ人を対象とした腸内細菌叢のメタゲノム解析では、9割以上のヒトで *A. hadrus* が菌叢全体のゲノムの10%以上をカバーしていることが知られており、本菌が腸内における優勢菌種の一つであることが明らかとなっている[1]。細菌の16S rRNA 遺伝子を標的とした FISH 法による解析では、*A. hadrus* は10名中8名(80%)の糞便から菌数にして糞便乾燥重量1gあたり $10^{8.5} \sim 10^{9.5}$ 個検出されている[49]。本研究においても、5名中4名(80%)の糞便培養液から検出され、糞便1g換算では $10^{9.2} \sim 10^{9.8}$ 個であった(Table 4-5)。一方、*A. caccae* は60%の日本人から糞便1gあたり $10^{7.2}$ 個で検出されている(Table 2-6)。FISH法を用いたヨーロッパ人の腸内細菌叢の解析では *A. caccae* は検出されていないが、基準株である *A. caccae* DSM 14662^T はヨーロッパにおいて分離、登録されている。これらの結果は、*A. hadrus* および *A. caccae* が食習慣や遺伝的背景の異なるヒトでも広く分布していることを意味している。特に *A. hadrus* は極めて高い頻度で分布することから、L-ソルボースもしくはキシリトール(特異性の観点から好ましくはL-ソルボース)を摂取することで、個人の腸内細菌叢構成の違いによる影響をほとんど受けずに、腸内で安定した酪酸の産生を維持できることが期待される。

以上の結果、L-ソルボースおよびキシリトールは、複雑な腸内細菌叢の中で *Anaerostipes* 属細菌の増殖および代謝活性を亢進させ、酪酸の産生を特異的に促進する特性を持つと考えられた。したがって、両糖質は、腸管の恒常性維持や大腸疾患の予防・改善に役立つ新しい概念のプレバイオティクスとして利用できる可能性が示された。

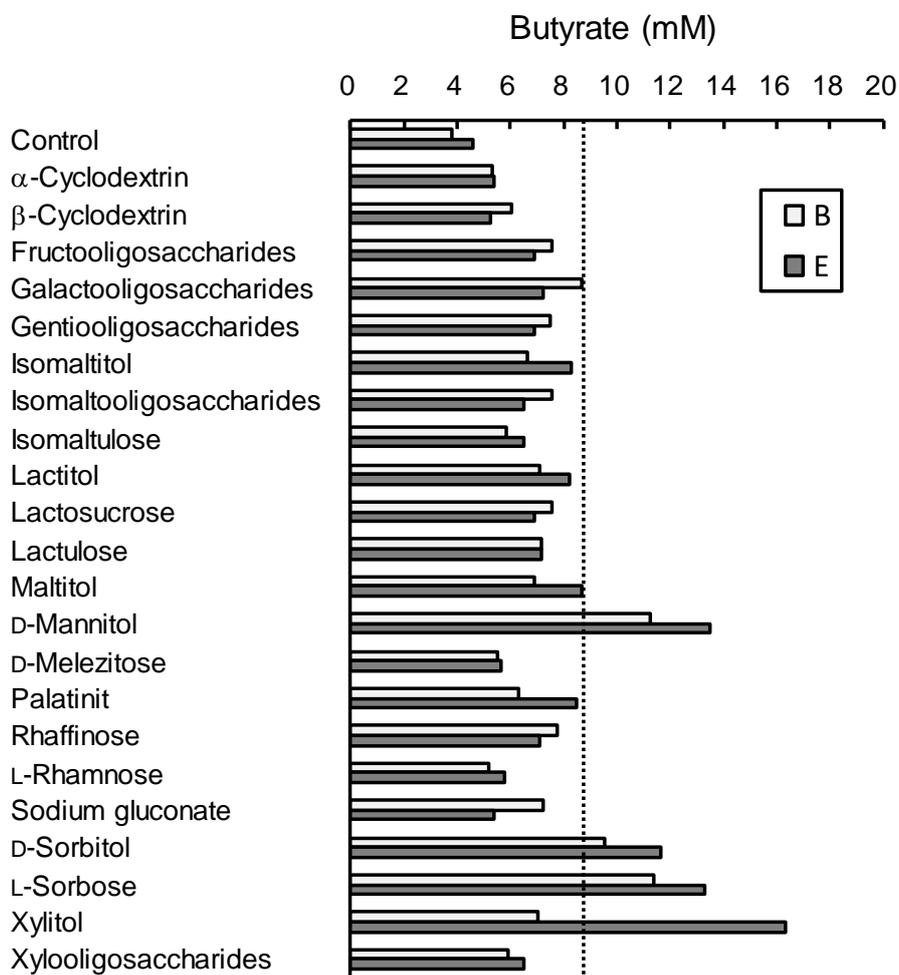


Fig. 4-1. Pre-screening of 22 LDCs that promoted butyrate formation in *in vitro* fecal culture.

Butyrate concentration after 24 h fermentation in *in vitro* fecal culture with 0.2% (w/v) of each LDC. Cultures were prepared from fecal samples collected from two healthy males (donors B and E). The dashed line indicates butyrate concentration (8.7 mM) in the culture supplemented with GOS that gave the highest value among representative prebiotics (five types of oligosaccharide: FOS, GOS, gentiooligosaccharides, isomaltoligosaccharides, and xylooligosaccharides).

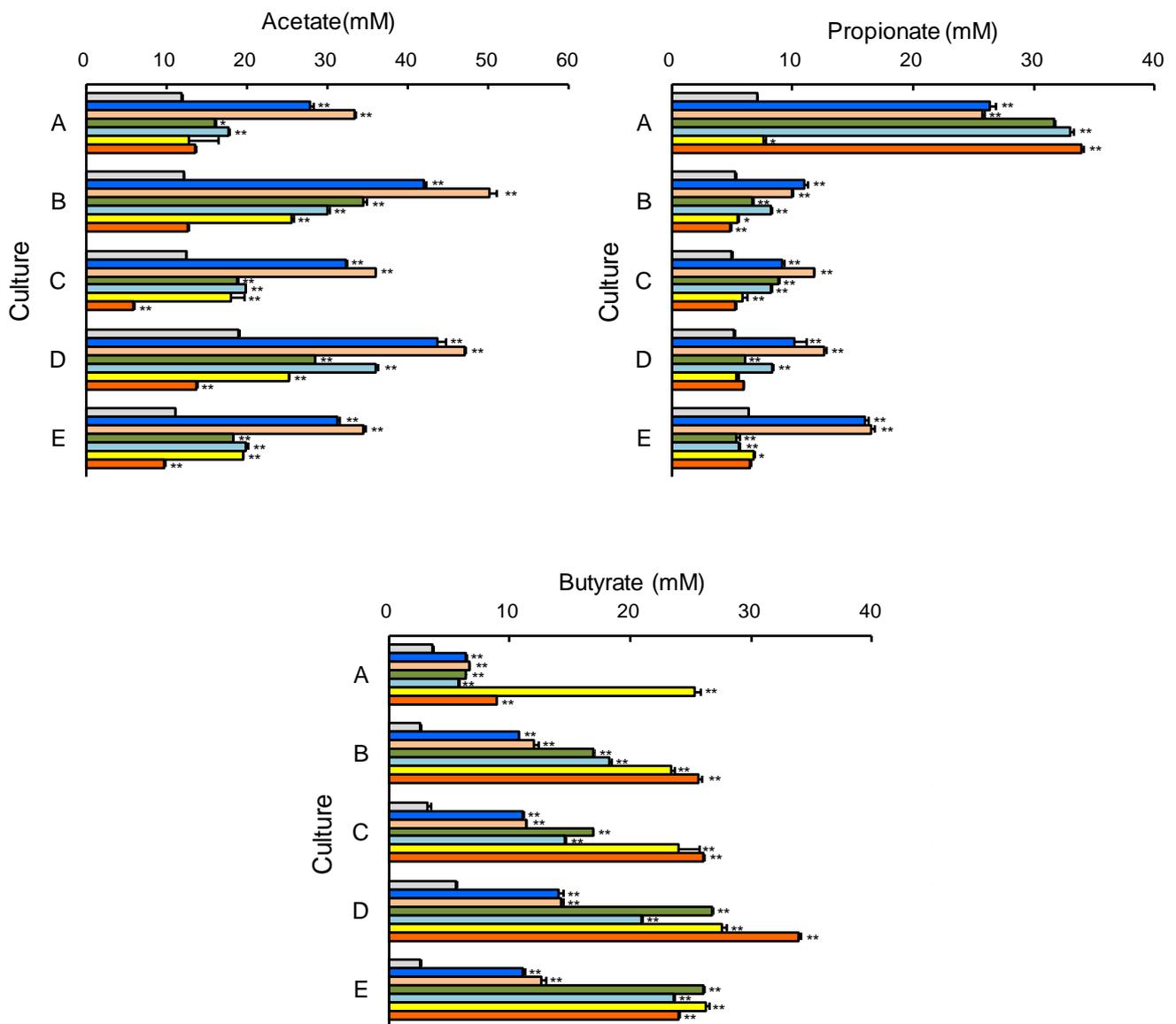


Fig. 4-2. Concentrations of short-chain fatty acids (SCFA) after 24 h of fermentation of six low-digestible carbohydrates (LDCs) in *in vitro* fecal culture.

Fecal suspensions from five healthy donors (A to E) were anaerobically incubated with 0.5% of LDCs. The vertical axis indicates fecal cultures prepared from five donors. Horizontal bars and error bars indicate means and standard deviations, respectively, from triplicate cultures. Succinate and lactate were not detected in any of the cultures. Formate is not shown because it was either not detected or was detected only in trace amounts. Asterisks indicate significant differences from the control ($*p < 0.05$ and $**p < 0.01$) by Dunnett's multiple range test.

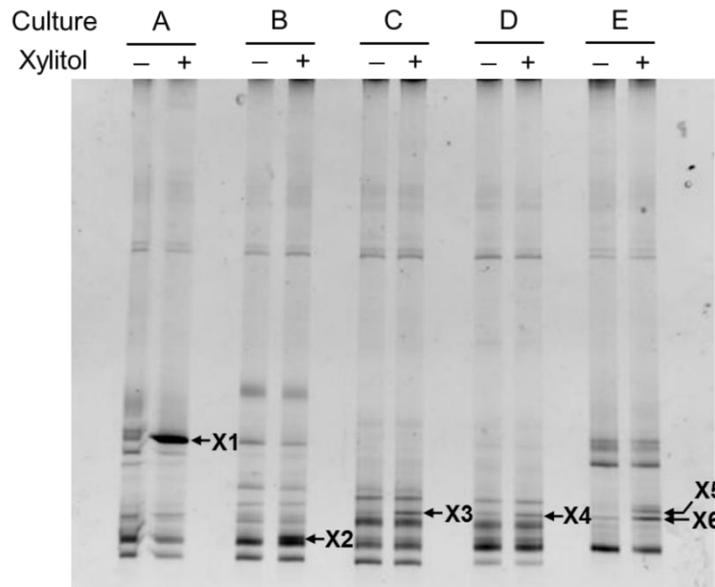
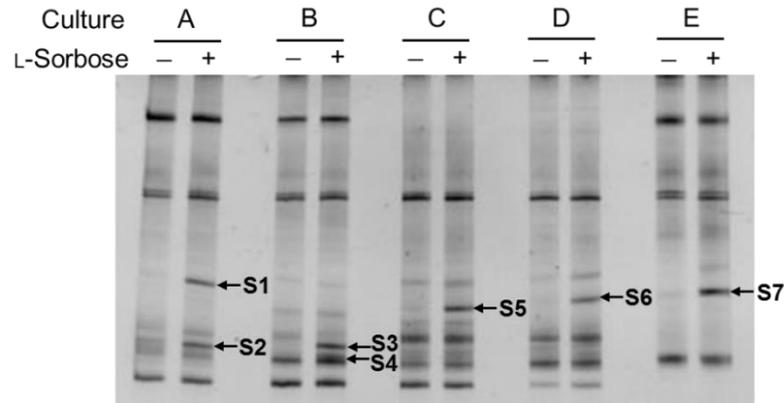


Fig. 4-3. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) profiles of PCR amplicons of bacterial 16S rRNA partial gene fragments in fecal cultures supplemented with L-sorbose or xylitol. +, culture supplemented with L-sorbose or xylitol; -, culture without substrate.

Arrows indicate bands intensified by substrate supplementation; bands are labeled S1 to S7 for L-sorbose and X1 to X6 for xylitol. The best BLAST hit species for bands S1 (100% identity, accession no. LC146676), S5 (99%, LC146680), S6 (100%, LC146681), S7 (99%, LC146682), X3 (99%, LC146685), X4 (98%, LC146686), and X6 (99%, LC146688) was *Anaerostipes hadrus* DSM 3319^T (FR749934). Bands S3 (LC146678) and X2 (LC146684) were associated (99% and 98% identity, respectively) with *A. caccae* DSM 14662^T (AJ270487); bands S2 (LC146677) and S4 (LC146679) with *Ruminococcus obeum* (X85101) (99% and 98% identity, respectively); band X1 with *Bacteroides plebeius* M14 (AB200218) (100% identity, accession no. LC146683); and band X5 with *Eubacterium contortum* (L34615) (99%, LC146687).

Table 4-1. Organic acid production from L-sorbose or xylitol by fecal isolates.

Bacterial strain	Medium	Lactate	Formate	Acetate	Butyrate
Strain YIT 12354	PYA	-0.60 ± 0.01	0.28 ± 0.01	-2.69 ± 0.22	3.69 ± 0.22
	PYAG	3.84 ± 0.13 ^a	21.70 ± 0.50 ^a	-11.96 ± 0.32 ^a	26.99 ± 0.23 ^a
	PYAS	3.67 ± 0.04 ^a	13.36 ± 0.24 ^b	-17.19 ± 0.31 ^b	26.72 ± 0.02 ^a
	PYAX	2.22 ± 0.12 ^b	18.58 ± 0.90 ^c	-30.73 ± 0.10 ^c	31.30 ± 0.26 ^b
Strain YIT 12355	PYA	-0.63 ± 0.01	0.36 ± 0.06	-2.13 ± 0.62	3.77 ± 0.15
	PYAG	0.01 ± 0.13 ^a	18.41 ± 0.92 ^a	-17.22 ± 0.54 ^a	32.99 ± 0.59 ^a
	PYAS	-0.03 ± 0.04 ^a	9.98 ± 0.69 ^b	-22.24 ± 0.81 ^b	31.76 ± 0.55 ^a
	PYAX	0.61 ± 0.12 ^b	13.39 ± 2.20 ^b	-30.22 ± 0.78 ^c	30.97 ± 1.18 ^a

Values are expressed as means ± SD obtained from triplicate cultures. Succinate and propionate are not shown because they were detected only in trace amounts. Values were calculated by subtracting the values for uninoculated broth from those for inoculated broth after 24 h of incubation. PYA, PY broth supplemented with 33 mM sodium acetate; PYAG, PYA broth supplemented with 0.5% of glucose, PYAS, PYA broth supplemented with 0.5% of L-sorbose; PYAX, PYA broth supplemented with 0.5% of xylitol. One-way analysis of variance followed by Tukey's multiple comparison test was used to identify significant differences between substrates. Values with different alphabets were significantly different between substrates ($p < 0.05$).

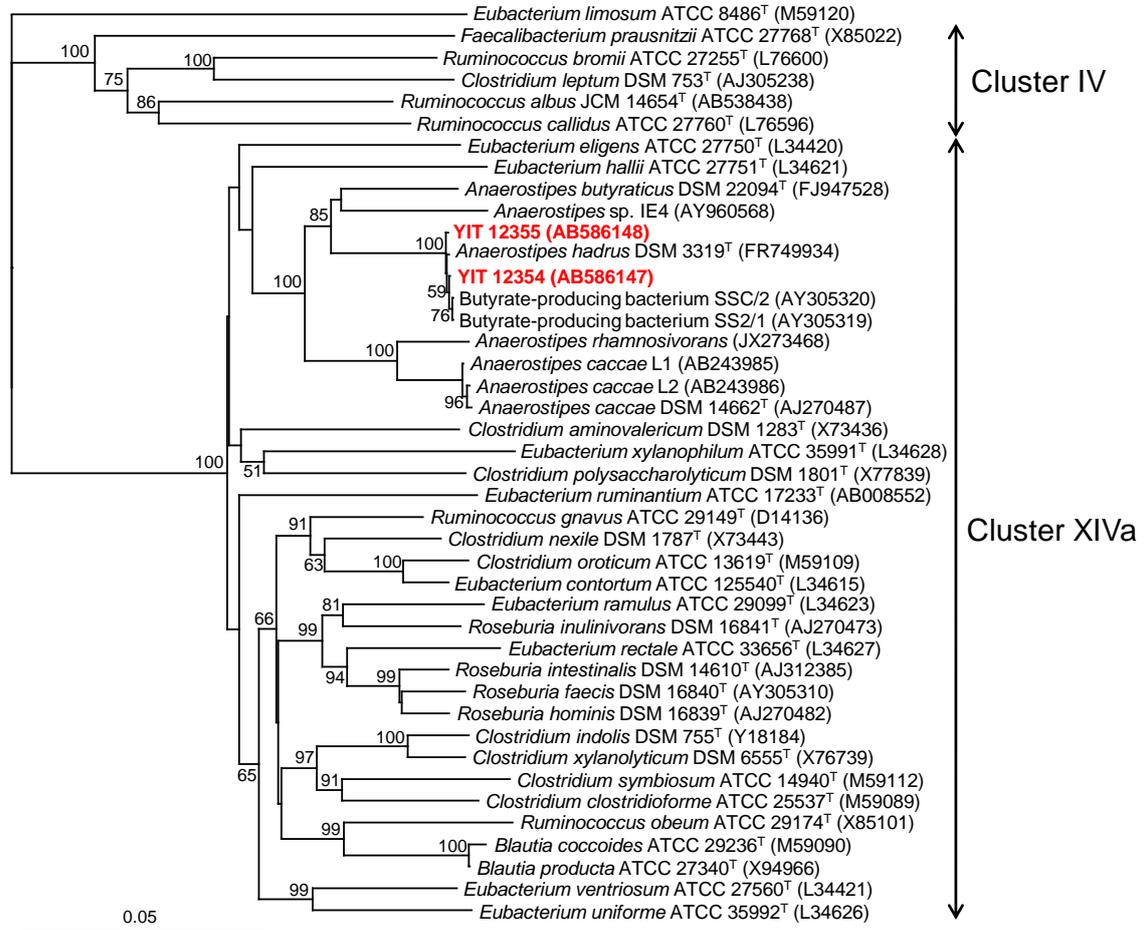


Fig. 4-4. Phylogenetic tree showing the relationship between fecal isolates (red and bold, YIT 12354 and YIT 12355) and their related bacterial species.

The tree was constructed by using the neighbor-joining method based on 16S rRNA gene sequences (about 1,340 bp). Bootstrap values (1,000 replicates) above 50% are shown at branching nodes. Scale bar indicates 5% sequence divergence.

Table 4-2. Phenotypic and biochemical characteristics of strains YIT 12354 and YIT 12354 and *Anaerostipes hadrus* DSM 3319^T

Characteristic	YIT 12354	YIT 12355	<i>A. hadrus</i> DSM 3319 ^T
Acetate utilization	+	+	+
D,L-Lactate utilization	+ (D)	+ (D)	+ (D)
Major products from glucose	B, L, A, F	B, L, A, F	B, L, F, A
DNA G+C content (mol%)	37.4	37.0	37.2 ^a
Enzyme activity			
Acid phosphatase	+	+	+
Alkaline phosphatase	+	+	-
Esterase (C4)	-	+	+
Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	+	+	+
β-Galactosidase	+	+	+
β-Galactosidase-6-phosphate	-	-	+
α-Glucosidase	w	w	-
Indole production	+	+	+
Arginine arylamidase	w	w	w
Leucylglycine arylamidase	-	-	w
Phenylalanine arylamidase	-	-	w
Histidine arylamidase	+	+	+
Serine arylamidase	w	w	w
Substrate utilization			
D-Mannitol	+	+	+
Lactose	+	+	+
Sucrose	+	+	+
Maltose	w	+	w
Salicin	-	+	+
D-Xylose	+	+	+
L-Arabinose	+	+	+
Aesculin	-	+	-
Glycerol	-	w	-
D-Cellobiose	-	w	-
D-Mannose	+	+	+
D-Raffinose	w	-	-
D-Sorbitol	+	+	+
L-Rhamnose	-	+	-

+, positive; -, negative; w, weak. Data were based on the duplicate test. A; acetate, B; butyrate, F; formate, L; lactate.

^a Data were taken from Allen-Vercoe *et al.*, 2012 [91]. All strains gave negative results for: esterase lipase (C₈), lipase (C₁₄), α-chymotrypsin, trypsin, α-galactosidase, β-glucuronidase, β-glucosidase, N-acetyl-β-glucosaminidase, α-mannosidase, α-fucosidase, urease, arginine dihydrolase, α-arabinosidase, mannose fermentation, raffinose fermentation, glutamic acid

decarboxylase, nitrate reductase, cysteine arylamidase, proline arylamidase, leucine arylamidase, pyroglutamic acid arylamidase, tyrosine arylamidase, alanine arylamidase, glycine arylamidase, glutamylglutamic acid arylamidase, valine arylamidase, and catalase. Acid was not produced from gelatin, D-melezitose, and D-trehalose.

Table 4-3. Oligonucleotide primers used in this study

Target species or group	Primer name	Sequence (5' to 3')	Annealing temperature (°C)	Product size (bp)	Reference
<i>Anaerostipes caccae</i>	s-Acac-F s-Acac-R	GTCGAACGAAGCATTAGGATT ACCATCCTATACTGCCAGG	55	188	This study
<i>A. hadrus</i>	s-Ahad-F s-Ahad-R	AGGGCTTAACTCTGGGAC GGTAAAGGACCGGTCAGAA	55	405	This study
<i>Bacteroides fragilis</i> group	g-Bfra-F g-Bfra-R	ATAGCCTTTCGAAAGRAAGAT CCAGTATCAACTGCAATTTTA	50	501	Matsuki <i>et al.</i> , 2004 [23]
<i>Bifidobacterium</i>	g-Bifid-F g-Bifid-R	CTCCTGGAAACGGGTGG GGTGTCTTCCCGATATCTACA	55	549-563	Matsuki <i>et al.</i> , 2004 [23]
<i>Clostridium coccooides</i> group	g-Ccoc-F g-Ccoc-R	AAATGACGGTACCTGACTAA CTTTGAGTTTCATTCTTGCGAA	50	438-441	Matsuki <i>et al.</i> , 2004 [23]
<i>Cl. leptum</i> subgroup	sg-Clep-F sg-Clep-R3	GCACAAGCAGTGGAGT CTTCCTCCGTTTTGTCAA	50	239	Matsuki <i>et al.</i> , 2004 [23]
<i>Lactobacillus</i>	R16-1 LbLMA1-rev	CTTGTACACACCGCCCGTCA CTCAAAACTAAACAAAGTTTC	55	194	Dubernet <i>et al.</i> , 2002 [92]

DNAs extracted from *Anaerostipes caccae* YIT 10168^T (=DSM 14662^T), *A. hadrus* YIT 12355, *Bacteroides vulgatus* YIT 6159^T (=ATCC 8482^T), *Bifidobacterium longum* subsp. *suis* YIT 4082^T (=JCM 1269^T), *Blautia producta* YIT 6141^T (=JCM 1471^T), *Faecalibacterium prausnitzii* YIT 6174 (=ATCC 27766), and *Lactobacillus gasseri* YIT 0192^T (=DSM 20243^T) were used as standards for qPCR.

Table 4-4. Specificity test of designed primers for *Anaerostipes hadrus*

Species ¹	Strain	PCR results ²
		s-Ahad
<i>Anaerostipes hadrus</i>	YIT 10092 ^T (=DSM 3319 ^T)	+
	YIT 12354	+
	YIT 12355	+
<i>Anaerostipes caccae</i>	YIT 10168 ^T (=DSM 14662 ^T)	-
	YIT 12352 (=strain L1)	-
	YIT 12353 (=strain L2)	-
<i>Atopobium minutum</i>	YIT 0194 ^T (=VIP 9953 ^T)	-
<i>Bacteroides uniformis</i>	YIT 6164 ^T (=JCM 5828 ^T)	-
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	YIT 4011 ^T (=ATCC 15703 ^T)	-
<i>Clostridium clostridiiforme</i>	YIT 6051 ^T (=JCM 1291 ^T)	-
<i>Clostridium orbiscindens</i>	YIT 10060 ^T (=DSM 6740 ^T)	-
<i>Collinsella aerofaciens</i>	YIT 10235 ^T (=ATCC 25986 ^T)	-
<i>Coprococcus catus</i>	YIT 11484 ^T (=ATCC 27761 ^T)	-
<i>Eubacterium hallii</i>	YIT 10064 ^T (=ATCC 27751 ^T)	-
<i>Eubacterium limosum</i>	YIT 6067 ^T (=ATCC 8486 ^T)	-
<i>Eubacterium rectale</i>	YIT 6082 ^T (=ATCC 33656 ^T)	-
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	YIT 10067 ^T (=ATCC 27768 ^T)	-
<i>Megasphaera elsdenii</i>	YIT 6063 ^T (=JCM 1772 ^T)	-
<i>Roseburia faecis</i>	YIT 11921 ^T (=DSM 16840 ^T)	-
<i>Roseburia hominis</i>	YIT 11920 ^T (=DSM 16839 ^T),	-
<i>Roseburia intestinalis</i>	YIT 10172 ^T (=DSM 14610 ^T)	-
<i>Roseburia inulinivorans</i>	YIT 11922 ^T (=DSM 16841 ^T)	-

¹ In addition, negative PCR results were obtained for the following bacterial species: *Acidaminococcus fermentans* YIT 6071^T (=GIFU 7844^T), *Bacteroides caccae* YIT 10226^T (=JCM 9498^T), *Bacteroides fragilis* YIT 6158^T (=DSM 2151^T), *Bacteroides ovatus* YIT 6161^T (=JCM 5824^T), *Bacteroides thetaiotaomicron* YIT 6163^T (=JCM 5827^T), *Bifidobacterium catenulatum* YIT 4016^T (=ATCC 27539^T), *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* YIT 4021^T (=ATCC 15707^T), *Blautia coccoides* YIT 6035^T (=JCM 1395^T), *Blautia producta* YIT 6141^T (=ATCC 27340^T), *Clostridium aminophilum* YIT 6167^T (=DSM 10710^T), *Clostridium cocleatum* YIT 6036^T (=JCM 1397^T), *Clostridium indolis* YIT 10077^T (=DSM 755^T), *Clostridium innocuum* YIT 10151^T (=ATCC 14501^T), *Clostridium leptum* YIT 6169^T (=DSM 753^T), *Clostridium perfringens* YIT 6050^T (=JCM 1290^T), *Clostridium ramosum* YIT 10062^T (=JCM 1298^T), *Clostridium symbiosum* YIT 11480^T (=ATCC 14940^T), *Collinsella intestinalis* YIT 10051^T (=JCM 10643^T), *Collinsella stercoris* YIT 10052^T (=JCM 10641^T), *Desulfovibrio vulgaris* YIT 11487^T (=DSM 644^T), *Eggerthella lenta* YIT 6077^T (=ATCC

25559^T), *Enterococcus faecalis* YIT 2031^T (=ATCC 19433^T), *Enterococcus faecium* YIT 2032^T (=ATCC 19434^T), *Enterobacter intermedius* YIT 6038^T (=ATCC 33110^T), *Escherichia coli* YIT 6044^T (=JCM 1649^T), *Eubacterium bifforme* YIT 6076^T (=ATCC 27806^T), *Eubacterium cylindroides* YIT 10236^T (=DSM 3983^T), *Eubacterium dolichum* YIT 10081^T (=DSM 3991^T), *Eubacterium siraeum* YIT 10049^T (=DSM 3996^T), *Eubacterium tortosum* YIT 10348^T (=DSM 3987^T), *Eubacterium ventriosum* YIT 10066^T (=ATCC 27560^T), *Fusobacterium varium* YIT 11855^T (=DSM 19868^T), *Lactobacillus acidophilus* YIT 0070^T (=ATCC 4356^T), *Lactobacillus gasseri* YIT 0192^T (=DSM 20243^T), *Peptostreptococcus anaerobius* YIT 10025^T (=GIFU 7882^T), *Prevotella malaninogenica* YIT 6039^T (=ATCC 25845^T), *Proteus mirabilis* YIT 6047^T (=ATCC 29906^T), *Romboutsia lituseburensis* YIT 10059^T (=JCM 1404^T), *Ruminococcus albus* YIT 6083^T (=JCM 14654^T), *Ruminococcus gnavus* YIT 6176^T (=ATCC 29149^T), *Ruminococcus lactaris* YIT 10225^T (=ATCC 29176^T), *Veillonella ratii* YIT 10065^T (=DSM 20736^T), *Veillonella parvula* YIT 6072^T (=ATCC 10790^T)

² +, positive; -, negative.

Table 4-5. Bacterial counts, as determined by DAPI or qPCR, in fecal cultures

Donor	Substrate	Bacterial cell number (log ₁₀ cells/ml culture) ¹							
		Total bacteria ²	<i>A. caccae</i>	<i>A. hadrus</i>	<i>B. fragilis</i> group	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Cl. coccooides</i> group	<i>Cl. leptum</i> subgroup	<i>Lactobacillus</i>
A	Control	9.79	6.87	8.16	8.59	9.32	9.52	8.25	6.92
	L-Sorbose	9.84	8.72 **	9.26 **	8.61	9.35	9.91 **	8.04 **	6.90
	Xylitol	10.01 **	7.03 **	8.59 **	9.16 **	9.35	9.66 **	8.20	6.95
B	Control	9.70	7.26	< 5.0	8.80	9.49	9.74	8.58	6.29
	L-Sorbose	9.81	9.09 **	< 5.0	8.71	9.42	9.93 **	8.32 **	6.34
	Xylitol	9.96	9.07 **	< 5.0	8.77	9.49	10.07 **	8.51	6.33
C	Control	10.39	< 5.0	8.63	7.74	9.62	9.89	8.96	6.62
	L-Sorbose	10.36	< 5.0	9.44 **	7.62	9.47	9.98	8.82	6.56
	Xylitol	10.37	< 5.0	9.19 **	7.63	9.53	9.97	8.90	6.59
D	Control	10.26	< 5.0	8.75	7.49	9.05	10.03	9.05	7.14
	L-Sorbose	10.30	< 5.0	9.54 **	7.21 *	8.93	10.05	8.98	6.99
	Xylitol	10.37	< 5.0	9.08 **	7.32	9.00	10.06	9.08	7.14
E	Control	10.00	< 5.0	8.43	8.85	6.39	9.75	8.07	< 5.0
	L-Sorbose	10.02	< 5.0	9.67 **	8.94	6.47	10.14 **	7.98 **	< 5.0
	Xylitol	10.01	< 5.0	9.32 **	8.89	6.37	10.01 **	8.13 **	< 5.0

¹ Values are expressed as means obtained from triplicate cultures.

² Total bacteria were determined by DAPI count. Bacterial species and groups were enumerated by qPCR. The detection limit by qPCR was 5.0 log₁₀ cells/ml culture. Asterisks indicate significant difference from control (***p* < 0.01) by Dunnett's multiple range test.

Table 4-6. Bacterial strains used in this study

No.	Bacterial species	Registration No.	
1	<i>Acidaminococcus fermentans</i>	YIT 6071 ^T	ATCC 25085 ^T
2	<i>Anaerostipes caccae</i>	YIT 10168 ^T	DSM 14662 ^T
3	<i>Anaerostipes caccae</i>	YIT 12352	-
4	<i>Anaerostipes caccae</i>	YIT 12353	-
5	<i>Anaerostipes hadrus</i>	YIT 10092 ^T	DSM 3319 ^T
6	<i>Anaerostipes hadrus</i>	YIT 12354	-
7	<i>Anaerostipes hadrus</i>	YIT 12355	-
8	<i>Atopobium minutum</i>	YIT 0194	VPI 9953
9	<i>Bacteroides fragilis</i>	YIT 6158 ^T	ATCC 25285 ^T
10	<i>Bacteroides ovatus</i>	YIT 6161 ^T	ATCC 8483 ^T
11	<i>Bacteroides uniformis</i>	YIT 6164 ^T	JCM 5828 ^T
12	<i>Bacteroides vulgatus</i>	YIT 6159 ^T	ATCC 8482 ^T
13	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	YIT 4011 ^T	ATCC 15703 ^T
14	<i>Bifidobacterium angulatum</i>	YIT 4012 ^T	ATCC 27535 ^T
15	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	YIT 4039 ^T	DSM 20456 ^T
16	<i>Bifidobacterium breve</i>	YIT 4014 ^T	ATCC 15700 ^T
17	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	YIT 4016 ^T	ATCC 27539 ^T
18	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i>	YIT 4018 ^T	ATCC 15697 ^T
19	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>	YIT 4021 ^T	ATCC 15707 ^T
20	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	YIT 4072 ^T	JCM 1200T
21	<i>Blautia coccooides</i>	YIT 6035 ^T	JCM 1395 ^T
22	<i>Blautia producta</i>	YIT 6141 ^T	JCM 1471 ^T
23	<i>Clostridium clostridioforme</i>	YIT 6051 ^T	JCM 1291 ^T
24	<i>Clostridium leptum</i>	YIT 6169 ^T	DSM 753 ^T
25	<i>Clostridium orbiscindens</i>	YIT 10060 ^T	DSM 6740 ^T
26	<i>Collinsella aerofaciens</i>	YIT 10235 ^T	DSM 3979 ^T
27	<i>Coprococcus catus</i>	YIT 11484 ^T	ATCC 27761 ^T
28	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	YIT 11232 ^T	DSM 642 ^T
29	<i>Eggerthella lenta</i>	YIT 6077 ^T	ATCC 25559 ^T
30	<i>Enterococcus faecalis</i>	YIT 2031 ^T	ATCC 19433 ^T
31	<i>Enterococcus faecium</i>	YIT 2032 ^T	ATCC 19434 ^T
32	<i>Escherichia coli</i>	YIT 6044 ^T	JCM 1649 ^T

Table 4-6 Continued

No.	Bacterial species	Registration No.	
33	<i>Eubacterium cylindroides</i>	YIT 10236 ^T	DSM 3983 ^T
34	<i>Eubacterium dolichum</i>	YIT 10081 ^T	DSM 3991 ^T
35	<i>Eubacterium hallii</i>	YIT 10064 ^T	DSM 3353 ^T
36	<i>Eubacterium limosum</i>	YIT 6067 ^T	JCM 6421 ^T
37	<i>Eubacterium rectale</i>	YIT 6082 ^T	ATCC 33656 ^T
38	<i>Eubacterium ventriosum</i>	YIT 10066 ^T	ATCC 27560 ^T
39	<i>Feacalibacterium prausnitzii</i>	YIT 6174	ATCC 27766
40	<i>Fusobacterium gonidiaformans</i>	YIT 6079 ^T	ATCC 25563 ^T
41	<i>Fusobacterium necrophorum</i> subsp. <i>necrophorum</i>	YIT 10343 ^T	JCM 3718 ^T
42	<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i>	YIT 6069 ^T	JCM 8532 ^T
43	<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>polymorphum</i>	YIT 10351 ^T	DSM 20482 ^T
44	<i>Fusobacterium varium</i>	YIT 11855 ^T	JCM 3722 ^T
45	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	YIT 0070 ^T	ATCC 4356 ^T
46	<i>Lactobacillus casei</i>	YIT 0180 ^T	ATCC 334 ^T
47	<i>Lactobacillus fermentum</i>	YIT 0081 ^T	ATCC 14931 ^T
48	<i>Lactobacillus gasseri</i>	YIT 0192 ^T	DSM 20243 ^T
49	<i>Lactobacillus helveticus</i>	YIT 0083 ^T	ATCC 15009 ^T
50	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	YIT 0219 ^T	JCM 2012 ^T
51	<i>Lactobacillus plantarum</i>	YIT 0102 ^T	ATCC 14917 ^T
52	<i>Lactobacillus reuteri</i>	YIT 0197 ^T	JCM 1112 ^T
53	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	YIT 0185	-
54	<i>Lactobacillus salivarius</i>	YIT 0104 ^T	ATCC 11741 ^T
55	<i>Lactobacillus zeae</i>	YIT 0078	ATCC 393 ^T
56	<i>Megasphaera elsdenii</i>	YIT 6063 ^T	JCM 1772 ^T
57	<i>Parabacteroides distasonis</i>	YIT 6162 ^T	JCM 5825 ^T
58	<i>Prevotella intermedia</i>	YIT 6130 ^T	JCM 11150 ^T
59	<i>Prevotella melaninogenica</i>	YIT 6039 ^T	ATCC 25845 ^T
60	<i>Roseburia faecis</i>	YIT 11921 ^T	DSM 16840 ^T
61	<i>Roseburia hominis</i>	YIT 11920 ^T	DSM 16839 ^T
62	<i>Roseburia intestinalis</i>	YIT 10172 ^T	DSM 14610 ^T
63	<i>Roseburia iulinivorans</i>	YIT 11922	DSM 16841 ^T
64	<i>Ruminococcus bromii</i>	YIT 6078 ^T	ATCC 27255 ^T
65	<i>Ruminococcus gnavus</i>	YIT 6176 ^T	ATCC 29149 ^T
66	<i>Ruminococcus lactaris</i>	YIT 10225 ^T	ATCC 29176 ^T

Table 4-6 Continued

No.	Bacterial species	Registration No.	
67	<i>Streptococcus mitis</i>	YIT 2069 ^T	GIFU 12458 ^T
68	<i>Streptococcus salivarius</i>	YIT 10260 ^T	JCM 5707 ^T
69	<i>Streptococcus sobrinus</i>	YIT 2064 ^T	ATCC 33478 ^T
70	<i>Veillonella atypica</i>	YIT 6081 ^T	ATCC 17744 ^T
71	<i>Veillonella dispar</i>	YIT 6080 ^T	ATCC 17748 ^T
72	<i>Veillonella parvula</i>	YIT 6072 ^T	GIFU 7884 ^T
73	<i>Veillonella ratti</i>	YIT 10065 ^T	DSM 20736 ^T



Fig. 4-5. Heatmap of organic acid produced in culture of 73 bacterial strains in PYA broth containing L-sorbose.

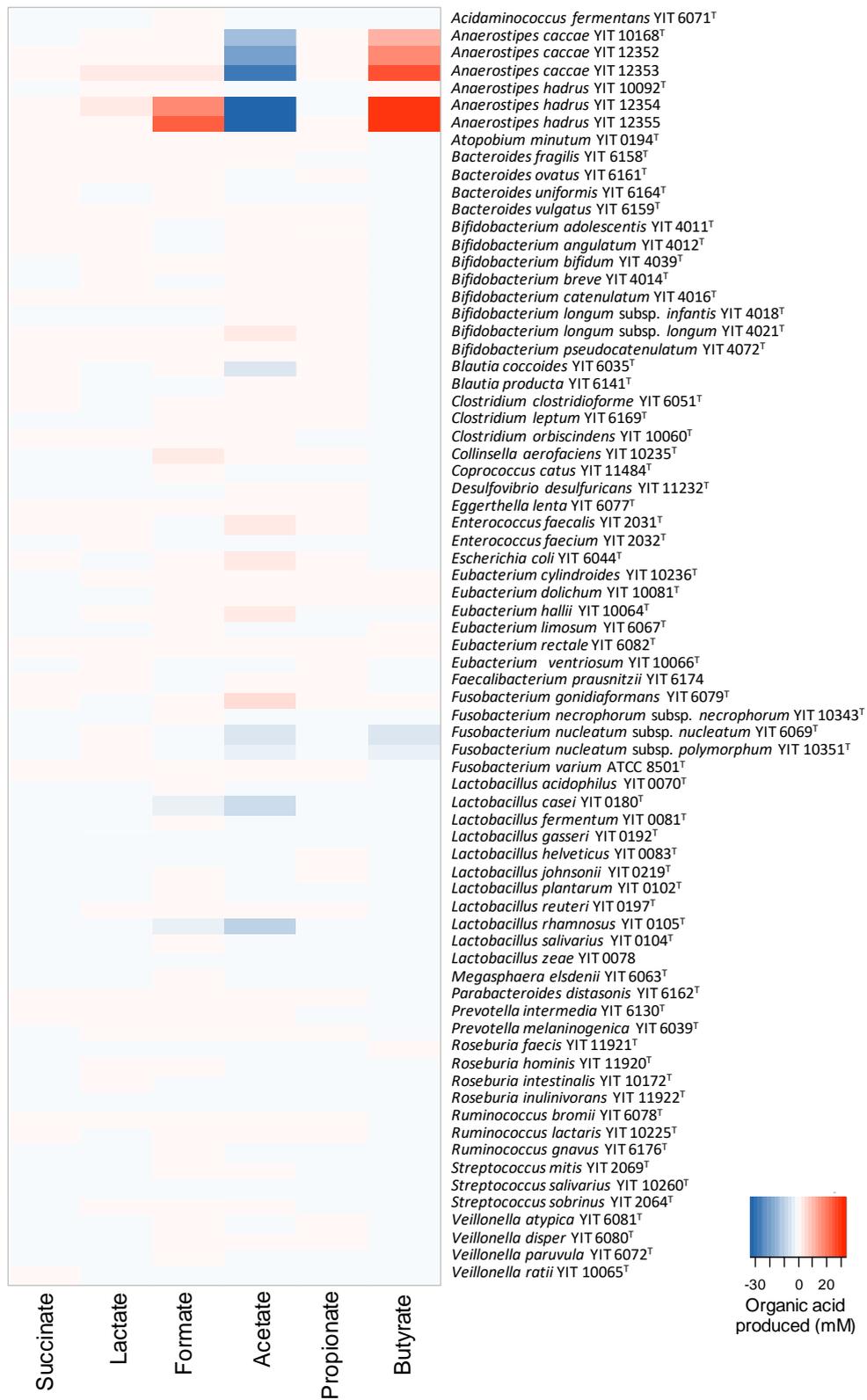


Fig. 4-6. Heatmap of organic acids produced in culture of 73 bacterial strains in PYA broth containing xylitol.

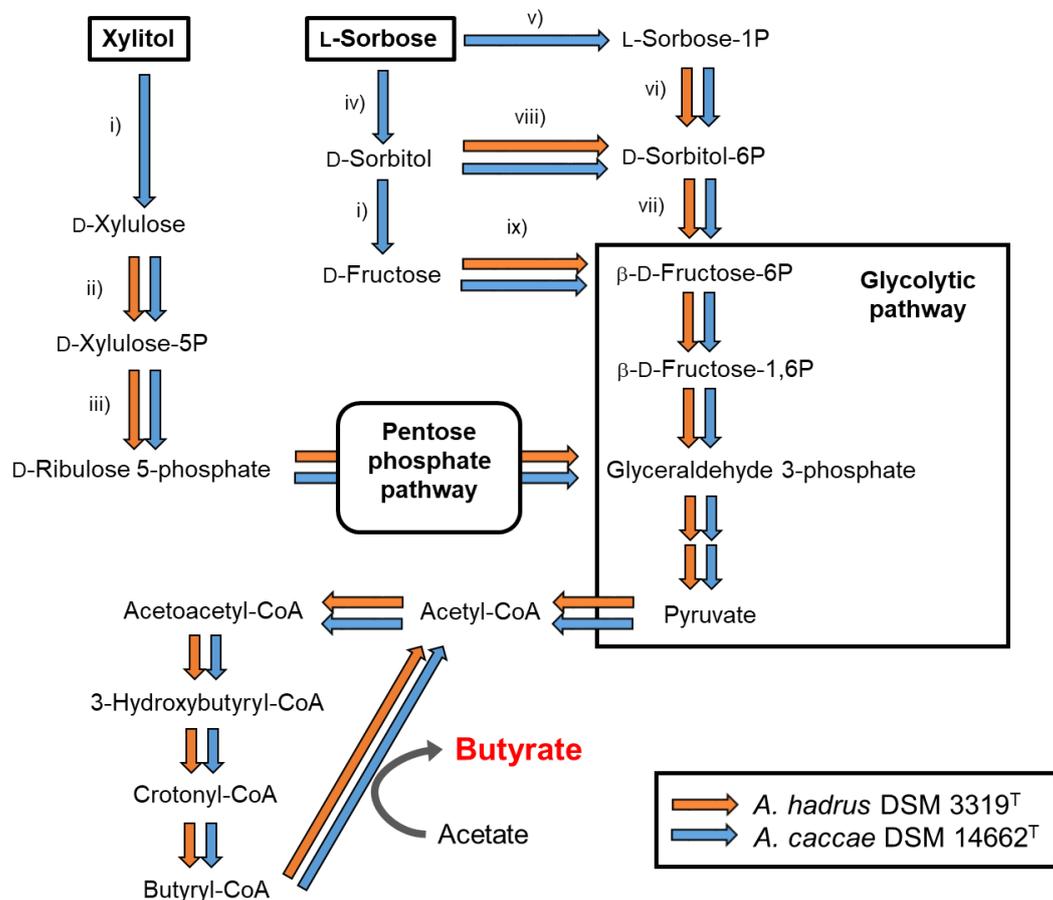


Fig. 4-7. Predicted pathways of L-sorbose and xylitol metabolism in *Anaerostipes* spp.

Enzymes found in *A. hadrus* DSM 3319^T or *A. caccae* DSM 14662^T, are indicated by red or blue arrows, respectively. i) L-idoitol (sorbitol) 2-dehydrogenase, ii) xylulokinase, iii) D-ribulose 5-phosphate epimerase, iv) D-sorbitol dehydrogenase, v) L-sorbose PTS permease, vi) L-sorbose 1-phosphate reductase, vii) sorbitol-6-phosphate 2-dehydrogenase, viii) D-sorbitol PTS permease, ix) fructokinase.

第 5 章 総括

ヒト腸内には膨大な数の細菌が棲息しており、これらは腸内で様々な代謝産物を産生することで、宿主の健康に大きな影響を与えている。食事に含まれる炭水化物は、一部が難消化性糖質として下部消化管に到達し、腸内細菌によって発酵基質として利用される。その結果、主要な発酵産物として酢酸、プロピオン酸、酪酸といった短鎖脂肪酸が生成する。このうち酪酸は大腸において極めて多くの有益な作用を示すことから、腸内における酪酸の産生を制御することは大腸機能の恒常性維持、大腸疾患の予防につながると考えられる。そこで本研究では、ヒト由来の酪酸産生菌に注目し、その代謝特性を利用した酪酸産生の制御法について検討した。

第 2 章では、乳酸を酪酸へと代謝する特性を持つ腸内細菌について調べた。オリゴ糖に代表されるビフィズス菌の増殖因子である「プレバイオティクス」は、腸内におけるビフィズス菌の増殖だけでなく、便中の酪酸濃度を増加させることが知られている。ビフィズス菌は糖質から主に乳酸および酢酸を産生するが酪酸産生能は持たないことから、腸内でオリゴ糖からビフィズス菌が産生した乳酸は、その一部が他の腸内細菌によって酪酸産生の基質として利用されていると考えられる。そこで、乳酸を酪酸に変換する細菌をヒト糞便ならびに既知の腸内細菌ライブラリーからスクリーニングした。その結果、*Anaerostipes caccae*、*Eubacterium aggregans*、*E. barkeri*、*E. hallii*、*E. limosum*、*Clostridium butyricum*、*Megasphaera elsdenii* および *Coprococcus catus* の 8 菌種が当該活性を示した。これらのうち、*A. caccae*、*E. hallii*、*E. aggregans*、*E. limosum* および *M. elsdenii* が活性を示すことは既に報告されているが[36, 46-48]、*E. barkeri*、*Cl. butyricum* および *Co. catus* の活性については本研究によって初めて明らかとなった。さらに、16S rRNA 遺伝子を標的とする菌種特異的プライマーを用いた定量的 PCR 法により、これらの菌群のヒトにおける分布を調べた。その結果、*A. caccae*、*E. hallii*、*E. limosum*、*M. elsdenii* および *Co. catus* の 5

菌種が乳酸を酪酸に変換する主要な菌としてヒト腸内に存在することがわかった。これらのうち、*E. limosum*、*M. elsdenii* および *Co. catus* のヒトにおける分布および菌数を明らかにしたのは本報が初めてである。

第 3 章では、代表的なプレバイオティクスであるガラクトオリゴ糖 (GOS) の存在下で、乳酸を酪酸に変換する活性を示した上記 5 菌種と代表的なビフィズス菌である *Bifidobacterium breve* YIT 10001 を共培養した。その結果、2 菌の協働作用によって GOS から乳酸を介して酪酸が生成した。さらに、ヒト糞便から分離した *A. caccae* YIT 12353 と GOS をラットに共投与した結果、内在性のビフィズス菌が増加するとともに酪酸の産生が亢進したことから、腸内でビフィズス菌と *A. caccae* との代謝協働により GOS から酪酸が産生されたと考えられた。これまでに、反芻胃動物由来の *M. elsdenii* が、ラットの腸内で乳酸を酪酸に変換する活性を持つことが示唆されているが[65]、ヒト由来の主要な腸内細菌の活性を示したのは本研究が初めてである。近年、ヒト由来の酪酸産生菌である *Faecalibacterium prausnitzii* [93,94] や *Roseburia intestinalis* [95] などを炎症性腸疾患に対する次世代のプロバイオティクス[96]として利用する研究が注目されてきているが[97]、これらの細菌では腸内での酪酸の産生を制御するには至っていない。一方、*Anaerostipes* 属細菌をプロバイオティクスとして応用する研究はほとんど進められていない。したがって、*A. caccae* とオリゴ糖の組み合わせは、*A. caccae* の代謝特性を利用した、新たな酪酸産生の制御法として提案できると考えられた。

第 4 章では、酪酸産生の基質に着目し、乳酸を介さずに直接酪酸の産生を促進する難消化性糖質をヒト糞便培養系により探索した。GOS を含む水溶性の各種難消化性糖質のうち、L-ソルボースおよびキシリトールが顕著に酪酸の産生を促進した。これまでヒト大腸発酵モデルを用いた *in vitro* 試験により、キシリトールが酪酸の産生を促進することが報告されていたが[69]、L-ソルボースの活性については本研究で初めて明らかとなった。変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法を用いて培養液中の細菌叢を解析した結果、両基質からの酪酸の産生に

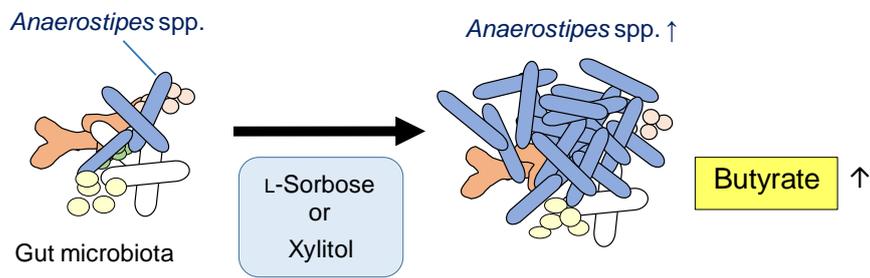
伴って *Anaerostipes hadrus* および *A. caccae* に近縁な菌が増加することがわかった。また実際に、L-ソルボースおよびキシリトールを含む培地を用い、両基質から酪酸を産生する菌として *A. hadrus* 2 株をヒト糞便から分離した。さらに、これらの分離株を含む各種腸内細菌株を対象に、L-ソルボースおよびキシリトールの資化性を調べた結果、両基質は *Anaerostipes* 属細菌 (*A. hadrus* および *A. caccae*) によって特異的に酪酸産生の基質として利用されることが明らかとなった。酪酸の産生を促進することが知られている各種難消化性糖質のうち、その産生に寄与する菌を特定した例は極めて稀である。すなわち、L-ソルボースは勿論のこと、既に活性が報告されているキシリトールについても、その活性発現に寄与する細菌が本報によって初めて解明された。以上の結果により、L-ソルボースおよびキシリトールが複雑な腸内細菌叢の中で、*Anaerostipes* 属細菌という極めて限定された菌群の増殖および活性を促進する特性を有することが明らかとなった。

本研究により、L-ソルボースおよびキシリトールが、腸内の *Anaerostipes* 属細菌 (*A. hadrus* および *A. caccae*) の代謝活性を亢進させて酪酸の産生を制御する、新規なプレバイオティクスとして有用である可能性が示された (Fig. 5-1-a)。また、*A. caccae* はビフィズス菌がオリゴ糖から産生する乳酸を酪酸に変換する活性も有している。したがって、*A. caccae* とオリゴ糖との組み合わせは、腸内における酪酸の産生を促進させる新たなシンバイオティクスとして提示できる (Fig. 5-1-b)。しかしながら、このシンバイオティクスによる酪酸の産生はオリゴ糖からの乳酸の産生量に依存するうえに、乳酸の一部はプロピオン酸にも変換されるため (Fig. 2-1 および Fig. 2-6)、L-ソルボースおよびキシリトールといった基質を用いて直接酪酸を生成させる方法がより効率的である。したがって、このシンバイオティクスの概念は、何らかの疾患等による腸内細菌叢の破綻、いわゆる「dysbiosis」などにより、特に腸内の *Anaerostipes* 属細菌の菌数レベルが極めて低いヒトに有効な方法として利用できる可能性がある。また、オリゴ糖により腸内のビフィズス菌を増加させることができるため、酪酸の産生促進だけでなく、ビフィズス菌による整腸作用など副次的効果を得

られるというメリットもある。腸内の酪酸の産生を制御するためにどちらの手法を選択するかは、個人の腸内細菌叢の構成ならびに腸内の代謝特性に応じて選択できるのではないかと考えられる。

以上、本研究で得られた成果は、腸内細菌の代謝特性を利用した新たな大腸疾患の予防法ならびに治療法の開発へと貢献できることが期待される。

a)



b)

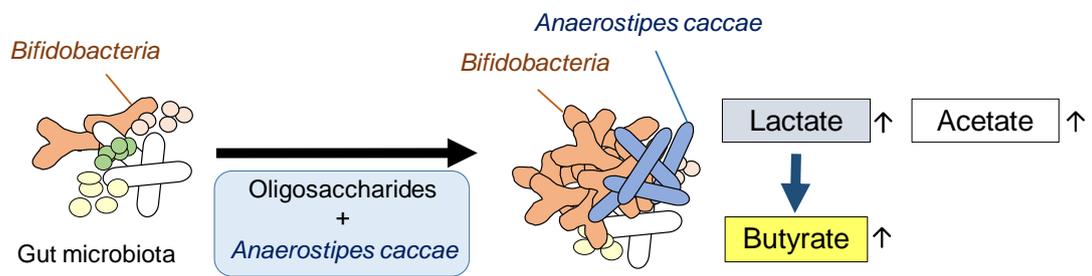


Fig. 5-1. Prebiotic (a) or synbiotic (b) strategy for promoting butyrate formation in the human colon.

参考文献

1. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li J, Xu J, Li S, Li D, Cao J, Wang B, Liang H, Zheng H, Xie Y, Tap J, Lepage P, Bertalan M, Batto J-M, Hansen T, Le Paslier D, Linneberg A, Nielsen HB, Pelletier E, Renault P, Sicheritz-Ponten T, Turner K, Zhu H, Yu C, Li S, Jian M, Zhou Y, Li Y, Zhang X, Li S, Qin N, Yang H, Wang J, Brunak S, Doré J, Guarner F, Kristiansen K, Pedersen O, Parkhill J, Weissenbach J, Bork P, Ehrlich SD, Wang J. 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464(7285): 59–65.
2. Chacko A, Cummings JH. 1988. Nitrogen losses from the human small bowel: obligatory losses and the effect of physical form of food. *Gut* 29:809–815.
3. Hague A, Singh B, Paraskeva C. 1997. Butyrate acts as a survival factor for colonic epithelial cells: further fuel for the *in vivo* versus *in vitro* debate. *Gastroenterology* 112: 1036-1040.
4. Roediger WEW. 1980. Role of anaerobic bacteria in the metabolic welfare of the colonic mucosa in man. *Gut* 21: 793-798.
5. Waldecker M, Kautenburger T, Daumann H, Busch C, Schrenk D. 2008. Inhibition of histone-deacetylase activity by short-chain fatty acids and some polyphenol metabolites formed in the colon. *J Nutr Biochem* 19:587-593.
6. Davie JR. 2003. Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. *J Nutr* 133 (7 Suppl): 2485S-2493S.
7. Hamer HM, Jonkers D, Venema K, Vanhoutvin S, Troost FJ, and Brummer RJ. 2008. Review article: the role of butyrate on colonic function. *Aliment Pharmacol Ther* 27:

- 104-119.
8. Scheppach W, and Weiler F. 2004. The butyrate story: old wine in new bottles? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 7: 563–567.
 9. Archer SY, Meng S, Shei A, and Hodin, RA. 1998. p21^{WAF1} is required for butyrate-mediated growth inhibition of human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 6791–6796.
 10. Chopin V, Toillon RA, Jouy N, and Le Bourhis X. 2002. Sodium butyrate induces P53-independent, Fas-mediated apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. *Br J Pharmacol* 135: 79–86.
 11. Velcich A, Palumbo L, Jarry A, Laboisse C, Racevskis J, Augenlicht L. 1995. Patterns of expression of lineage-specific markers during the in vitro-induced differentiation of HT29 colon carcinoma cells. *Cell Growth Differ* 6: 749-757.
 12. Arpaia N, Campbell C, Fan X, Dikiy S, van der Veecken J, deRoos P, Liu H, Cross JR, Pfeffer K, Coffey PJ, Rudensky AY. 2013. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature* 504: 451-455.
 13. Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, Endo TA, Nakato G, Takahashi D, Nakanishi Y, Uetake C, Kato K, Kato T, Takahashi M, Fukuda NN, Murakami S, Miyauchi E, Hino S, Atarashi K, Onawa S, Fujimura Y, Lockett T, Clarke JM, Topping DL, Tomita M, Hori S, Ohara O, Morita T, Koseki H, Kikuchi J, Honda K, Hase K, Ohno H. 2013. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* 504: 446-450.
 14. Chang PV, Hao L, Offermanns S, Medzhitov R. 2014. The microbial metabolite butyrate regulates intestinal macrophage function via histone deacetylase inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA* 111: 2247-2252.

15. G D'Argenio, V Cosenza, M Delle Cave, P Iovino, N Delle Valle, G Lombardi, G Mazzacca 1996. Butyrate enemas in experimental colitis and protection against large bowel cancer in a rat model. *Gastroenterology* 110: 1727–1734.
16. Medina V, Afonso JJ, Alvarez-Arguelles H, Hernández C, González F. 1998. Sodium butyrate inhibits carcinoma development in a 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon cancer. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 22: 14-17.
17. Vernia P, Caprilli R, Latella G, Barbetti F, Magliocca FM, Cittadini M. 1988. Fecal lactate and ulcerative colitis. *Gastroenterology* 95: 1564-1568.
18. Scheppach W, Sommer H, Kirchner T, Paganelli GM, Bartram P, Christl S, Richter F, Dusel G, Kasper H. 1992. Effect of butyrate enemas on the colonic mucosa in distal ulcerative colitis. *Gastroenterology* 103: 51–56.
19. Vernia P, Annese V, Bresci G, d'Albasio G, D'Inca R, Giaccari S, Ingrosso M, Mansi C, Riegler G, Valpiani D, Caprilli R. 2003. Topical butyrate improves efficacy of 5-ASA in refractory distal ulcerative colitis: results of a multicentre trial. *Eur J Clin Invest* 33: 244-248.
20. So D, Whelan K, Rossi M, Morrison M, Holtmann G, Kelly JT, Shanahan ER, Staudacher HM, Campbell KL. 2018. Dietary fiber intervention on gut microbiota composition in healthy adults: a systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 107: 965-983.
21. Collins MD, Lawson PA, Willems A, Cordoba JJ, Fernandez-Garayzabal J, Garcia P, Cai J, Hippe H, Farrow JA. 1994. The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *Int J Syst Bacteriol* 44: 812-826.
22. Pryde SE, Duncan SH, Hold GL, Stewart CS, Flint HJ. 2002. The microbiology of

- butyrate formation in the human colon. *FEMS Microbiol Lett* 217:133–139.
23. Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, Takada T, Tanaka R. 2004. Use of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in human feces. *Appl Environ Microbiol* 70: 7220-7228.
 24. Barcenilla A, Pryde SE, Martin JC, Duncan SH, Stewart CS, Henderson C, Flint HJ. 2000. Phylogenetic relationships of butyrate-producing bacteria from the human gut. *Appl Environ Microbiol* 66: 1654–1661.
 25. Duncan SH, Louis P, Flint HJ. 2007. Cultivable bacterial diversity from the human colon. *Lett Appl Microbiol* 44: 343–350.
 26. Louis P, Duncan SH, McCrae SI, Millar J, Jackson MS, Flint HJ. 2004. Restricted distribution of the butyrate kinase pathway among butyrate-producing bacteria from the human colon. *J Bacteriol* 186: 2099-2106.
 27. Louis P, Flint HJ. 2009. Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *FEMS Microbiol Lett* 294: 1-8.
 28. Machiels K, Joossens M, Sabino J, De Preter V, Arijs I, Eeckhaut V, Ballet V, Claes K, Van Immerseel F, Verbeke K, Ferrante M, Verhaegen J, Rutgeerts P, Vermeire S. 2014. A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. *Gut* 63: 1275-1283.
 29. Takahashi K, Nishida A, Fujimoto T, Fujii M, Shioya M, Imaeda H, Inatomi O, Bamba S, Sugimoto M, Andoh A. 2016. Reduced abundance of butyrate-producing bacteria species in the fecal microbial community in Crohn's disease. *Digestion* 93: 59-65.
 30. Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, Prifti E, Hildebrand F, Falony G, Almeida M,

- Arumugam M, Batto JM, Kennedy S, Leonard P, Li J, Burgdorf K, Grarup N, Jørgensen T, Brandslund I, Nielsen HB, Juncker AS, Bertalan M, Levenez F, Pons N, Rasmussen S, Sunagawa S, Tap J, Tims S, Zoetendal EG, Brunak S, Clément K, Doré J, Kleerebezem M, Kristiansen K, Renault P, Sicheritz-Ponten T, de Vos WM, Zucker JD, Raes J, Hansen T; MetaHIT consortium, Bork P, Wang J, Ehrlich SD, Pedersen O. 2013. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* 500(7464): 541–546.
31. Karlsson FH, Fåk F, Nookaew I, Tremaroli V, Fagerberg B, Petranovic D, Bäckhed F, Nielsen J. 2012. Symptomatic atherosclerosis is associated with an altered gut metagenome. *Nat Commun* 3: 1245.
32. Gibson GR, Roberfroid MB. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 125: 1401-1412.
33. Bourriaud C, Robins RJ, Martin L, Kozlowski F, Tenailleau E, Cherbut C, Michel C. 2005. Lactate is mainly fermented to butyrate by human intestinal microfloras but inter-individual variation is evident. *J Appl Microbiol* 99: 201-212.
34. Duncan SH, Louis P, Flint HJ. 2004. Lactate-utilizing bacteria, isolated from human feces, that produce butyrate as a major fermentation product. *Appl Environ Microbiol* 70: 5810-5817.
35. Kikuchi H, Yajima T. 1992. Correlation between water-holding capacity of different types of cellulose *in vitro* and gastrointestinal retention time *in vivo* of rats. *J Sci Food Agric* 60: 139-146.
36. Zhu, H., F. Qu, and L. H. Zhu. 1993. Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride. *Nucleic Acids Res* 21: 5279-5280.
37. Akopyanz N, Bukanov NO, Westblom TU, Kresovich S, Berg DE. 1992. DNA

- diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 20: 5137-5142.
38. Hiraishi A, Shin YK, Ueda Y, Sugiyama J. 1994. Automated sequencing of PCR-amplified 16S rDNA on “HydroLink” gels. *J Microbiol Methods* 19: 145-154.
39. Hiraishi A. 1992. Direct automated sequencing of 16S rDNA amplified by polymerase chain reaction from bacterial cultures without DNA purification. *Lett Appl Microbiol* 15: 210-213.
40. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. 1997. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25: 4876-4882.
41. Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-425.
42. Page RD. 1996. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci* 12:357-358.
43. Cole JR, Chai B, Marsh TL, Farris RJ, Wang Q, Kulam SA, Chandra S, McGarrell DM, Schmidt TM, Garrity GM, Tiedje JM. 2003. Ribosomal Database Project. The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Res* 31: 442-443.
44. Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. 1997. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 245: 154-160.
45. Jansen GJ, Wildeboer-Veloo AC, Tonk RH, Franks AH, Welling GW. 1999. Development and validation of an automated, microscopy-based method for enumeration of groups of intestinal bacteria. *J Microbiol Methods* 37: 215-221.

46. Kanauchi O, Fujiyama Y, Mitsuyama K, Araki Y, Ishii T, Nakamura T, Hitomi Y, Agata K, Saiki T, Andoh A, Toyonaga A, Bamba T. 1999. *Bifidobacterium* and *Eubacterium* by germinated barley foodstuff, accompanied by enhanced butyrate production in healthy volunteers. *Int J Mol Med* 3: 175-179.
47. Marounek M, Fliegrova K, Bartos S. 1989. Metabolism and some characteristics of ruminal strains of *Megasphaera elsdenii*. *Appl Environ Microbiol* 55: 1570-1573.
48. Mechichi T, Labat M, Woo TH, Thomas P, Garcia JL, Patel BK. 1998. *Eubacterium aggregans* sp. nov., a new homoacetogenic bacterium from olive mill wastewater treatment digester. *Anaerobe* 4:283-291.
49. Hold GL, Schwartz A, Aminov RI, Blaut M, Flint HJ. 2003. Oligonucleotide probes that detect quantitatively significant groups of butyrate-producing bacteria in human feces. *Appl Environ Microbiol* 69: 4320-4324.
50. Kurakawa T, Ogata K, Matsuda K, Tsuji H, Kubota H, Takada T, Kado Y, Asahara T, Takahashi T, Nomoto K. 2015. Diversity of intestinal *Clostridium coccooides* group in the Japanese population, as demonstrated by reverse transcription-quantitative PCR. *PLoS One* 10: e0126226.
51. Schwartz A, Le Blay G, Blaut M. 2000. Quantification of different *Eubacterium* spp. in human fecal samples with species-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol* 66: 375-382.
52. Kasai C, Sugimoto K, Moritani I, Tanaka J, Oya Y, Inoue H, Tameda M, Shiraki K, Ito M, Takei Y, Takase K. 2015. Comparison of the gut microbiota composition between obese and non-obese individuals in a Japanese population, as analyzed by terminal restriction fragment length polymorphism and next-generation sequencing. *BMC Gastroenterol* 15: 100.

53. Counotte GH, Prins RA, Janssen RH, Debie MJ. 1981. Role of *Megasphaera elsdenii* in the fermentation of DL-[2-¹³C]lactate in the rumen of dairy cattle. *Appl Environ Microbiol* 42:649–655.
54. Hino T, Kuroda S. 1993. Presence of lactate dehydrogenase and lactate racemase in *Megasphaera elsdenii* grown on glucose or lactate. *Appl Environ Microbiol* 59: 255-259.
55. Tsukahara T, Koyama H, Okada M, Ushida K. 2002. Stimulation of butyrate production by gluconic acid in batch culture of pig cecal digesta and identification of butyrate-producing bacteria. *J Nutr* 132: 2229–2234.
56. Sugihara PT, Sutter VL, Attebery HR, Bricknell KS, Finegold SM. 1974. Isolation of *Acidaminococcus fermentans* and *Megasphaera elsdenii* from normal human feces. *Appl Microbiol* 27: 274-275.
57. Matsuki T, Fujimoto J, Watanabe K. 2007. Group-specific PCR primers for the detection of human intestinal bacteria. *Japanese patent* 2007-20423.
58. Ito M, Kimura M, Deguchi Y, Miyamori-Watabe A, Yajima T, Kan T. 1999. Effects of transgalactosylated disaccharides on the human intestinal microflora and their metabolism. *J Nutr Sci Vitaminol* (Tokyo) 39: 279-288.
59. Matsuki T, Watanabe K, Tanaka R, Fukuda M, Oyaizu H. 1999. Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers. *Appl Environ Microbiol* 65: 4506-4512.
60. Ishikawa E, Sakai T, Ikemura H, Matsumoto K, Abe H. 2005. Identification, cloning, and characterization of a *Sporobolomyces singularis* β-galactosidase-like enzyme involved in galacto-oligosaccharide production. *J Biosci Bioeng* 99: 331-339.
61. Sakai T, Tsuji H, Shibata S, Hayakawa K, Matsumoto K. 2008. Repeated-batch

- production of galactooligosaccharides from lactose at high concentration by using alginate-immobilized cells of *Sporobolomyces singularis* YIT 10047. *J Gen Appl Microbiol* 54: 285-293.
62. Takada T, Matsumoto K, Nomoto K. 2004. Development of multi-color FISH method for analysis of seven *Bifidobacterium* species in human feces. *J Microbiol Methods* 58: 413-421.
63. Scardovi Y. 1986. Genus *Bifidobacterium*: in *Bergey's manual of systematic bacteriology*, (Peter H, Sneatheds A, eds.) Williams and Wilkins Co, Baltimore. pp1418-1434.
64. Matsuda K, Tsuji H, Asahara T, Kado Y, Nomoto K. 2007. Sensitive quantitative detection of commensal bacteria by rRNA-targeted reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol* 73: 32-39.
65. Hashizume K, Tsukahara T, Yamada K, Koyama H, Ushida K. 2003. *Megasphaera elsdenii* JCM 1772^T normalizes hyperlactate production in the large intestine of fructooligosaccharide-fed rats by stimulating butyrate production. *J Nutr* 133: 3187-3190.
66. Morrison DJ, Mackay WG, Edwards CA, Preston T, Dodson B, Weaver LT. 2006. Butyrate production from oligofructose fermentation by the human faecal flora: what is the contribution of extracellular acetate and lactate? *Br J Nutr* 96: 570-577.
67. van de Wiele T, Boon N, Possemiers S, Jacobs H, Verstraete W. 2007. Inulin-type fructans of longer degree of polymerization exert more pronounced *in vitro* prebiotic effects. *J Appl Microbiol* 102: 452-460.
68. Stewart ML, Slavin JL. 2006. Molecular weight of guar gum affects short-chain fatty acid profile in model intestinal fermentation. *Mol Nutr Food Res* 50: 971-976.

69. Kameue C, Tsukahara T, Ushida K. 2006. Alteration of gene expression in the colon of colorectal cancer model rat by dietary sodium gluconate. *Biosci Biotechnol Biochem* 70: 606-614.
70. Mäkeläinen HS, Mäkivuokko HA, Salminen SJ, Rautonen NE, Ouwehand AC. 2007. The effects of polydextrose and xylitol on microbial community and activity in a 4-stage colon simulator. *J Food Sci* 72: M153-159.
71. Bajka BH, Topping DL, Cobiac L, Clarke JM. 2006. Butyrylated starch is less susceptible to enzymic hydrolysis and increases large-bowel butyrate more than high-amylose maize starch in the rat. *Br J Nutr* 96: 276-282.
72. Muyzer G, De Waal EC, Uitterlinden AG. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 59: 695-700.
73. Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS. 1991. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res* 19: 4008.
74. Miyake T, Watanabe K, Watanabe T, Oyaizu H. 1998. Phylogenetic analysis of the genus *Bifidobacterium* and related genera based on 16S rDNA sequences. *Microbiol Immunol* 42: 661-667.
75. Ezaki T, Saidi SM, Liu SL, Hashimoto Y, Yamamoto H, Yabuuchi E. 1990. Rapid procedure to determine the DNA base composition from small amounts of gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 55: 127-30.
76. Human Microbiome Project C Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. 2012. *Nature* 486: 207-214.
77. Moriya Y, Itoh M, Okuda S, Yoshizawa AC, Minoru Kanehisa. 2007. KAAS: An automatic genome annotation and pathway reconstruction server. *Nucleic Acids Res*

- 35: 182-185.
78. Kanehisa M, Sato Y, Kawashima M, Furumichi M, Tanabe M. 2016. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Res* 44: D457-462.
79. Martin CM, Reuter FH. 1949. Isolation of pectic substance from passion fruit (*Passiflora edulis*). *Nature* 166: 407.
80. McComb E. 1975. Occurrence of L-sorbose in apple-cider vinegar. *Carbohydrate Res* 42: 200-202.
81. Würsch, P., Welsch C, Arnaud MJ. 1979. Metabolism of L-sorbose in the rat and the effect of the intestinal microflora on its utilization both in the rat and in the human. *Ann Nutr Metab* 23: 145-155.
82. Hounsome N, Hounsome B, Tomos D, Edwards-Jone G. 2008. Plant metabolites and nutritional quality of vegetables. *J Food Sci* 73: 48-65.
83. Sreenath K, Venkatesh YP. 2010. Quantification of xylitol in foods by an indirect competitive immunoassay. *J Agric Food Chem* 58: 1240-1246.
84. Mäkinen KK. 2010. Sugar alcohols, caries incidence, and remineralization of caries lesions: a literature review. *Int J Dent* doi: 10.1155/2010/981072.
85. Livesey G. 2003. Health potential of polyols as sugar replacers, with emphasis on low glycemic properties. *Nutr Res Rev* 16: 163-191.
86. Salminen S, Salminen E, Koivistoinen P, Bridges J, Marks V. 1985. Gut microflora interactions with xylitol in the mouse, rat and man. *Food Chem Toxicol* 23: 985-990.
87. Ramakrishna BS. 2013. Role of the gut microbiota in human nutrition and metabolism. *J Gastroenterol Hepatol* 28 Suppl 4: 9-17.
88. Sprenger GA, Lengeler JW. 1984. L-Sorbose metabolism in *Klebsiella pneumoniae* and Sor⁺ derivatives of *Escherichia coli* K-12 and chemotaxis toward sorbose. *J*

- Bacteriol* 157: 39-45.
89. Wehmeier UF, Nobelmann B, Lengeler JW. 1992. Cloning of the *Escherichia coli* *sor* genes for L-sorbose transport and metabolism and physical mapping of the genes near *metH* and *iclR*. *J Bacteriol* 174: 7784-7790.
90. Yebra MJ, Veyrat A, Santos MA, Pérez-Martínez G. 2000. Genetics of L-sorbose transport and metabolism in *Lactobacillus casei*. *J Bacteriol* 182: 155-163.
91. Allen-Vercoe E, Daigneault M, White A, Panaccione R, Duncan SH, Flint HJ, O'Neal L, Lawson PA. 2012. *Anaerostipes hadrus* comb. nov., a dominant species within the human colonic microbiota; reclassification of *Eubacterium hadrum* Moore *et al.* 1976. *Anaerobe* 18: 523-529.
92. Dubernet S, Desmasures N, Guéguen M. 2002. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS Microbiol Lett* 214: 271-275.
93. Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermúdez-Humarán LG, Gratadoux JJ, Blugeon S, Bridonneau C, Furet JP, Corthier G, Grangette C, Vasquez N, Pochart P, Trugnan G, Thomas G, Blottière HM, Doré J, Marteau P, Seksik P, Langella P. 2015. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 16731-16736.
94. Martín R, Miquel S, Chain F, Natividad JM, Jury J, Lu J, Sokol H, Theodorou V, Bercik P, Verdu EF, Langella P, Bermúdez-Humarán LG. 2015. *Faecalibacterium prausnitzii* prevents physiological damages in a chronic low-grade inflammation murine model. *BMC Microbiol* 21;15: 67.
95. Zhu C, Song K, Shen Z, Quan Y, Tan B, Luo W, Wu S, Tang K, Yang Z, Wang X. 2018. *Roseburia intestinalis* inhibits interleukin-17 excretion and promotes regulatory T

cells differentiation in colitis. *Mol Med Rep* 17: 7567-7574.

96. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, Morelli L, Canani RB, Flint HJ, Salminen S, Calder PC, Sanders ME. 2014. Expert consensus document. The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 11: 506-514.
97. Hiippala K, Jouhten H, Ronkainen A, Hartikainen A, Kainulainen V, Jalanka J, Satokari R. 2018. The potential of gut commensals in reinforcing intestinal barrier function and alleviating inflammation. *Nutrients* 10. pii: E988.

主論文目録

本学位論文は下記の発表論文による。

第2章および第3章

Sato T, Matsumoto K, Okumura T, Yokoi W, Naito E, Yoshida Y, Nomoto K, Ito M, Sawada H. 2008. Isolation of lactate-utilizing butyrate-producing bacteria from human feces and *in vivo* administration of *Anaerostipes caccae* strain L2 and galacto-oligosaccharides in a rat model. *FEMS Microbiol Ecol* 66: 528-536.

第4章

Sato T, Kusuhara S, Yokoi W, Ito M, Miyazaki K. 2017. Prebiotic potential of L-sorbose and xylitol in promoting the growth and metabolic activity of specific butyrate-producing bacteria in human fecal culture. *FEMS Microbiol Ecol* 93 pii: fiw227.

謝辞

本論文を作成するにあたり、多くのご指導、ご鞭撻を賜りました筑波大学大学院 生命環境科学研究科 生物機能科学専攻 小林 達彦 教授に厚く御礼申し上げます。

本研究の機会を与えて下さいました、株式会社ヤクルト本社中央研究所 石川 文保 所長、南野 昌信 副所長に深く感謝申し上げます。

本研究を進めるにあたり、多くのご指導ならびにご支援をいただきました、公益財団法人ヤクルト・バイオサイエンス研究財団理事長・ヤクルト本社中央研究所顧問 澤田 治司 博士、株式会社ヤクルト本社中央研究所 宮崎 幸司 博士、松本 敏 博士、伊藤 雅彦 博士、辻 浩和 博士、松本 一政 氏、奥村 剛一 博士、吉田 康人 氏、松木 隆広 博士、世良田 雅紀 博士、内藤 栄一郎 氏、楠原 史朗 氏、横井 稚恵 氏、中村 祐子 氏ならびに東京農業大学 生命科学部 分子微生物学科 野本 康二 教授に厚く御礼申し上げます。

最後に、研究に深い理解を示し、心身ともに支えてくれた家族に心より感謝いたします。

以上