

一般演題 B-7**高齢者の腸内菌叢やケルセチン代謝の解析****Analysis of the microbiota and quercetin metabolism from the elderly**

○田村 基¹, 堀 幸子¹, 星 千草¹, 小堀真珠子¹, 高橋俊輔², 富田順子², 西村三恵³, 西平 順³

¹ 国立研究開発法人農研機構食品研究部門, ² 株式会社テクノスルガ・ラボ,

³ 北海道情報大学医療情報学科

【目的】 タマネギの主要な機能成分の1つにケルセチンがある。疫学調査において、ケルセチンの摂取量とLDL コレステロールが逆相関していたという報告や、ケルセチンの摂取量が多いほど、虚血性心不全による死亡率が低く、2型糖尿病のリスクも低い傾向にあったという報告がなされている。腸内菌叢には個人差があることが知られているが、腸内菌叢によるケルセチン代謝についての報告は少ない。そこで、65歳以上の高齢者について、糞便菌叢の構成、糞便菌叢のケルセチン代謝性や食事との関連性について検討した。

【方法】 北海道在住の高齢者56人から新鮮糞便の提供を受けた。新鮮糞便は、嫌気度を保ちつつ輸送を行い、嫌気培養液で希釈した。この新鮮糞便の希釈液200 μ Lに20 mg/mL濃度のケルセチンを2 μ L添加し、嫌気培養を行った。培養終了後、培養液を抽出し、培養物のケルセチン濃度を測定した。糞便のDNAを抽出し、Pro341f/Pro806rプライマーを用いてPCRを行い、次世代シーケンス解析・アンプリコン解析によって糞便検体に含まれる微生物群集解析を行った。また、糞便提供者の採便直前一週間の食事情報を食物摂取頻度調査FFQg ver4.0 (Food Frequency Questionnaire Based on Food Groups)によって調査した。

【結果】 食事調査の結果では、ボランティアの一日当たりのエネルギー摂取量の平均は、1,895.5 Kcal、炭水化物摂取量の平均は254.2 g、タンパク質摂取量の平均は66.7 g、脂質摂取量の平均は59.8 gであり、タンパク質の摂取量が脂質の摂取量を上回る結果となった。糞便培養で代謝・分解を免れたケルセチン濃度と食事との関連性を解析すると、ケルセチン濃度とビタミンD、ナイアシン、ビタミンB6、動物タンパク質比率との間には負の相関が認められた。次世代シーケンス・アンプリコン解析におけるFamily菌叢解析の結果、調査したボランティア56人の占有率の平均値は、高い順に*Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Bifidobacteriaceae*, *Streptococcaceae*, *Bacteroidaceae*, *Eubacteriaceae*, *Coriobacteriaceae*であった。ケルセチン濃度と腸内菌叢の解析から、ケルセチン濃度と正の相関が認められる腸内細菌や負の相関が認められる腸内細菌が存在した。

【考察】 腸内菌叢の中に、ケルセチン濃度と正の相関が認められる腸内細菌や負の相関が認められる腸内細菌が存在していたことから、腸内菌叢の構成が腸内菌叢のケルセチンの代謝性に関連している可能性が考えられた。

一般演題 B-8

種々の因子（母親由来・環境由来）が乳児期の腸内フローラ形成に及ぼす影響について

Various factors impacting the gut colonization during infancy

○牧野 博¹, Rocio Martin², Kaouther Ben Amor², Mieke Roelofs², 石川英司¹, 久保田博之¹,
Sophie Swinkels², Aysun Yavuz², 酒井隆史¹, 大石憲司¹, 久代 明¹, Jan Knol^{2,3}
¹(株)ヤクルト本社中央研究所, ²Danone Nutricia Research, ³Wageningen 大学

【目的】腸内フローラはヒトの健康維持において重要な役割を果たしている。特に乳児期の腸内フローラ形成は、生涯の健康状態に影響する可能性が示唆されている。本研究は、乳児期の腸内フローラ形成に影響を及ぼす因子の検索を目的とした。

【方法】本試験では、食事療法を受けていない 108 名の子供とその母親を対象とした。母親からは妊娠中の糞便を 2 回、子供からは出生後最初の糞便（胎便）、出生 2 日後、7 日後、30 日後、90 日後および固形食を食べ始めて 1 週間後の糞便を採取し、qPCR 法を用いた菌叢解析および有機酸分析を行った。また母親からは妊娠前のボディマス指数（BMI）、健康状態、食事情報等を、乳児からは性別、出産形態、授乳形態、健康状態、服薬の有無などの背景情報を記録した。糞便フローラ等の測定データと背景情報を基に統計解析を実施した。

【結果】ビフィズス菌の菌数が高い母親から生まれた子供は、高い菌数のビフィズス菌を保持していた。大腸菌群の菌数についても同様に、母と子で正の相関関係が認められた。一方、大腸菌群の菌数が高い母親から生まれた子供は、ビフィズス菌の菌数が低かった。過体重（BMI>25）の母親から生まれた子供は、*Clostridium coccoides*, *C. perfringens* および *Bacteroides* の菌数が高く、妊娠中の母親の BMI も腸内フローラ形成に大きな影響を及ぼす因子の 1 つであることが示唆された。自然分娩で生まれた乳児は、帝王切開出生児に比べて、乳酸菌、ビフィズス菌、*Bacteroides* に属する菌種の検出率が高かった。また、酢酸、乳酸、コハク酸の検出量も高かった。母乳のみで育った乳児は人工乳もしくは混合乳で育った乳児に比べて、初期における腸内フローラの構成がシンプルであり、徐々に複雑な菌叢となることが認められた。また、女兒は男児に比べて複数菌種の乳酸菌の検出率が高いこと、年上の兄弟姉妹がいる乳児はいない乳児に比べて一部の乳酸菌やビフィズス菌の検出率が低いことも確認された。

【考察】本研究では、出産形態や授乳形態などの環境因子だけでなく、母親由来の因子（BMI 等）も乳児期の腸内フローラ形成に影響を及ぼしていることが認められた。食事療法等により妊娠中の母親の腸内フローラを整えることで、生まれ来る子供の腸内フローラ形成により影響を与え得る可能性が考えられた。

一般演題 B-9

高カカオチョコレート摂取は腸内細菌叢中の
Faecalibacterium 属菌占有率を増大させるDark chocolate intake increases *Faecalibacterium* in fecal microbiota○下仲 敦¹, 大柴幸男¹, 夏目みどり¹, 古賀仁一郎²¹株式会社明治, ²帝京大学理工学部バイオサイエンス学科

【目的】便秘を自覚する女性を被験者としてルミナコイド（食物繊維+レジスタントプロテイン）を多く含む高カカオチョコレートを摂取させる試験を行い、①便通の改善について検討した。併せて便通改善効果の作用機作解明のため、②腸内細菌叢について検討した。

【方法】被験者（20～50歳の週平均排便回数4回以下である便秘を自覚する健常女性）を、高カカオチョコレート（カカオ分を72%含む）を摂取する群、ホワイトチョコレート（ルミナコイドを含まない）摂取群の2群に分け、それぞれ1日当たり約25gの試験食品を2週間連続摂取させた。便通に関して排便回数や便性（便色、形状、臭気等）を評価した。また腸内細菌叢の検討のため試験食品摂取前後の便サンプルを用いた16S rRNAメタゲノム解析を行った。

【結果】①試験食品摂取後に便通の改善が見られた。両群ともに摂取後の週間平均排便回数に有意な増加が見られた。群間を比較するとホワイトチョコレート摂取群に対し、高カカオチョコレート摂取群において有意な排便回数の増加が見られた。また便性のうち便色について、高カカオチョコレート摂取群において有意な改善が見られた。②両群ともに摂取前後で腸内細菌叢の変動が見られた。特に高カカオチョコレート摂取群において、善玉菌として知られる *Faecalibacterium* 属の全真正細菌数に対する平均占有率の有意な増大が群間比較、前後比較ともに検出された。一方、ホワイトチョコレート摂取群の *Faecalibacterium* 属平均占有率には有意な変動は見られなかった。

【考察】ホワイトチョコレートには含まれない高カカオチョコレート特有の成分が便通の改善と腸内細菌叢中の *Faecalibacterium* 属の占有率増加に寄与したものと考えられた。高カカオチョコレート摂取による便通改善には、便の嵩増し効果による排便量の増加に加え、*Faecalibacterium* 属が産生する酪酸の作用が関与している可能性が示された。*Faecalibacterium* 属占有率の増加により、種々の酪酸の機能（大腸上皮細胞の賦活、大腸がんの抑制、抗炎症、炎症性腸疾患の症状軽減、Treg分化誘導など）についても作用向上が期待される。

一般演題 B-10

Bifidobacterium animalis ssp. *lactis* 420 with or without polydextrose controls body fat mass and waist circumference in overweight and obese subjects

○ Olli K¹, Stenman LK¹, Lehtinen MJ¹, Meland N², Kloster Smerud H²,

Lähdeaho M-L³, Linros J⁴, Apter D⁵, Scheinin M⁶, Rissanen A⁷, Lahtinen S¹

¹DuPont Nutrition & Health, Finland, ²Smerud Medical Research, Norway, ³FinnMedi, Finland,

⁴Kerava Health Centre, Finland, ⁵VL-Medi, Finland, ⁶CRST, University of Turku, Finland,

⁷Obesity Research Unit, Biomedicum, University of Helsinki, Finland

Introduction: The gut microbiota is interlinked with energy balance and obesity, but direct evidence of its capacity to modulate body fat mass is still limited. We investigated the effects of *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* 420 (B420) and a dietary fiber, polydextrose (PDX), on body fat mass and other obesity-related parameters in a randomized, double-blind, and multicentered clinical trial following Good Clinical Practices (ICH-GCP).

Methods: In total, 225 healthy volunteers (BMI 28-34.9) were randomized into four groups for 6 months of treatment in parallel design: 1) Placebo; 2) Litesse[®]Ultra PDX, 12 g/d; 3) B420, 10¹⁰ CFU/d; 4) PDX+B420, 12 g+10¹⁰ CFU/d. As primary outcome, body composition was monitored with dual-energy X-ray absorptiometry (DXA). Body composition and anthropometric measurements were taken at 0, 2, 4 and 6 months timepoints, and one month after the intervention period. Data from 5-day food diaries was collected pre- and post-intervention. Participants maintained their habitual diet and exercise routines throughout the study.

Results: There were marked differences in the results of the Intention-To-Treat (ITT; n=209) and Per Protocol (PP; n=134) study populations. The PP analysis included only those participants who completed the intervention without major protocol violations, i.e. with >80% product compliance and without any antibiotic use. There were no significant differences between different treatment groups in total body fat mass in the ITT population. However, PDX+B420 and B420 seemed to improve weight management in the PP population. For change in total body fat mass, PDX+B420 group showed a -4.5% (-1.4 kg) difference to the Placebo group (P=0.02), whereas PDX alone had no effect (overall ANCOVA P=0.095). The factorial ANOVA analysis for total fat mass was significant for B420 (-4% (-1.4 kg), P=0.002 vs. groups without B420). Changes in fat mass were most pronounced in the abdominal region, and were reflected by a similar reduction in waist circumference in PDX+B420 group (-2.7% (-2.6 cm), P=0.047 vs. Placebo; overall ANCOVA P=0.10). The lean body mass was significantly increased in PDX+B420 group (+0.95 kg (+2.0%), P=0.012 vs. Placebo). The factorial ANOVA analysis for total body weight was significant for B420 (-1.0 kg (-1.2%), P=0.03 vs. groups without B420). B420 and PDX+B420 significantly reduced energy intake compared to Placebo (change from baseline -320±300 (SD) kcal/day in B420, -230±640 kcal/day in PDX+B420, and -23±600 kcal/day in Placebo, P<0.05 for both vs. Placebo, overall ANCOVA P= 0.005).

Discussion: This study demonstrates that *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* 420, alone or together with polydextrose, controls body fat mass. This effect concentrated to the trunk area, and no effect was observed in other regions. In addition, B420 and PDX+B420 reduced waist circumference and food intake, whereas PDX alone had no significant effects. To conclude, probiotic strain B420 alone or together with polydextrose showed significant benefits for weight management and improved body composition.

Disclosure: The study was sponsored by DuPont, and registered at Clinicaltrials.gov (NCT01978691).

一般演題 B-11

小児特発性ネフローゼ症候群の病因研究としての便中有機酸の解析 Analysis of fecal organic acids in children with idiopathic nephrotic syndrome to elucidate the pathogenesis

○辻 章志, 木全貴久, 山内壮作, 北尾哲也, 神田枝理子, 木野仁郎, 駿田竹紫, 金子一成
関西医科大学小児科学講座

【背景および目的】 小児特発性ネフローゼ症候群 (INS) の病因の 1 つとして制御性 T 細胞 (Treg) の異常が示唆されている。演者らはすでに INS 患児の Treg 数が初発時に低下していることを報告した (辻章志他. 日小児腎臓病会誌 2016; 29: 214)。一方, 近年, Clostridium 目に属する腸内細菌が産生する酪酸に Treg を分化・誘導する作用があることが報告された (Furusawa Y, *et al.* Nature. 2013; 504: 446)。そこで演者らは「腸内細菌叢の異常による酪酸量の低下が, 腸管での Treg の分化・誘導の異常を引き起こし, INS の発症に到る」という仮説を立て, その検証を行うために検討を行った。

【対象と方法】 INS 患児 10 名 (A 群: 年齢中央値 4.5 歳, 男児 4 名) と, 患児に年齢を合わせた健康小児 7 名を対照とし便中有機酸を測定した (B 群: 年齢中央値 5.9 歳, 男児 4 名)。A 群では初発時の治療開始前の便を, B 群では服薬をしていない状態の便を採取した。高速液体クロマトグラフィー法で各種便中有機酸 (乳酸, ギ酸, 酢酸, プロピオン酸, 酪酸, 吉草酸) を測定し, 糞便 1 g あたりの有機酸量を両群間で比較した。統計学的検討には Mann-Whitney U test を用いた。

【結果】 測定した有機酸全てにおいて両群間に有意差を認めなかったが, 酪酸は A 群が B 群に比して低い傾向が認められた (A 群: B 群 = 0.5 : 0.9 ; 単位 mg/g, 数値は中央値, $p=0.19$)。

【考察と結語】 検討数が少ないため統計学的有意差は認めなかったが, 便中酪酸は INS 患児で低い傾向を示した。したがって INS における Treg の異常の一因として腸内細菌の産生する便中酪酸量の低下が関与している可能性があると思われた。

一般演題 B-12

クローン病における小腸と大腸の腸内菌叢の違いについて

Analysis of microbiota communities in the small and large bowel of Crohn's disease

○田中良紀¹, 福田能啓², 嶋川真木¹, 大野裕史¹, 藤本美樹², 福田修久²,
清田清史², 西原当裕³, 細見基信⁴, 田村和民⁵, 大野忠嗣², 奥田真珠美⁶

¹ ビオフェルミン製薬株式会社 R&D センター, ² 医療法人協和会第二協立病院,

³ 医療法人協和会協立病院, ⁴ 細見医院, ⁵ 田村消化器内科クリニック,

⁶ 兵庫医科大学地域総合医療学

【目的】IBD の 1 つであるクローン病 (CD) は, 消化管全体において慢性炎症と潰瘍をともなう難病であり, 寛解期をいかに維持するかが治療の焦点となっている. 本疾患の症状が抗菌薬の投与で改善すること, *Firmicutes* の減少や, 大腸菌などの *Proteobacteria* の増加など, 本疾患への腸内細菌の関与を示唆する研究が報告されている. また, 難治例においてのストマの造設が全身症状の改善と状態の維持に有効である例が認められることから, 腸内菌叢の CD への関与は, 腸管の部位によって異なる可能性が考えられる. そこで CD の病態解明への一助とすることを目的に, CD における小腸と大腸の腸内菌叢の違いについて検討した.

【方法】症状の状態が寛解期で 5-ASA (ペンタサ) や成分栄養剤 (エレンタール) が治療に用いられている CD 患者を対象に, 小腸内菌叢の解析には回腸ストマ増設 CD 患者のストマ内容物を, 大腸内菌叢の解析には非ストマ CD 患者の糞便を用いた. これらの検体に加え健康成人から採取した糞便について, Miseq を用いた 16S rRNA 遺伝子配列 V3-V4 領域の網羅的解析を行った.

【結果】PCoA 解析の結果, CD と健康成人では腸内細菌叢プロファイルが明確に異なることが確認された. 一方で, CD の中でも, ストマ内容物と糞便との菌叢プロファイルが異なる傾向は認められたが, 明確に分かれることはなかった. また, CD 患者の糞便における菌叢の多様性が健康成人よりも大きく低下していたが, ストマ内容物では多様性の低下はわずかであった. 菌属レベルの比較から CD においてはストマ内菌叢のみならず大腸内菌叢においても通性嫌気性菌の増加が認められ, CD の大腸内では大腸菌群が, ストマでは *Streptococcus* が優占していることが明らかとなった. さらに, 16S rRNA 配列データに基づいた機能遺伝子予測を行ったところ, 好気呼吸に関与する遺伝子群の割合が CD のストマと大腸のいずれにおいても有意に増加していることが明らかとなった.

【結論】寛解維持療法中の CD 患者では, 大腸内が好气的環境にシフトしており, 病勢の悪化を是正している可能性が考えられた.