

難消化性の食物成分の摂取タイミングが  
マウス腸内細菌叢に及ぼす影響

**The effects of feeding timing of indigestible dietary components on  
mouse intestinal microbiota**

2020年7月

佐々木 裕之

**Hiroyuki SASAKI**

難消化性の食物成分の摂取タイミングが  
マウス腸内細菌叢に及ぼす影響

**The effects of feeding timing of indigestible dietary components on  
mouse intestinal microbiota**

2020年7月

早稲田大学大学院 先進理工学研究科  
電気・情報生命専攻 薬理学研究

佐々木 裕之

**Hiroyuki SASAKI**

# —目次—

## 1 章. 序論 .....p.1

- 1.1 腸内細菌について
  - 1.1.1 *Bacteroidetes*, *Firmicutes*
  - 1.1.2 *Proteobacteria*
  - 1.1.3 *Odoribacter*
  - 1.1.4 *Butyricimonas*
  - 1.1.5 *Staphylococcus*
  - 1.1.6 *Lactococcus*
  - 1.1.7 *Oscillospira*
  - 1.1.8 *Desulfovibrio*
- 1.2 腸内細菌叢と生理機能
- 1.3 腸内細菌叢と生活要因
  - 1.3.1 食事
  - 1.3.2 運動
  - 1.3.3 喫煙と飲酒
  - 1.3.4 薬
- 1.4 腸内細菌叢と概日時計
- 1.5 時間栄養学
- 1.6 本研究の目的

## 2 章. イヌリンの摂取タイミングの違いがマウスの腸内細菌叢に及ぼす影響の検証

.....p.17

- 2.1 序論
- 2.2 実験手法
  - 2.2.1 使用動物
  - 2.2.2 摂食スケジュール
  - 2.2.3 サンプルング
  - 2.2.4 盲腸内 pH 測定
  - 2.2.5 短鎖脂肪酸 (SCFA) 測定
  - 2.2.6 糞便中の DNA 抽出
  - 2.2.7 16S rRNA 遺伝子解析
  - 2.2.8 菌叢解析
  - 2.2.9  $\alpha$  多様性解析 (Simpson Index)
  - 2.2.10  $\beta$  多様性解析
  - 2.2.11 統計
- 2.3 実験結果
  - 2.3.1 実験 1 : イヌリン摂食が腸内細菌叢の構成に与える影響
  - 2.3.2 実験 2 : 時間制限給餌条件下におけるイヌリンの摂食タイミングが腸内細菌叢の構成に与える影響
  - 2.3.3 実験 3 : 摂食量制限給餌条件下におけるイヌリンの摂食タイミングが腸内細菌叢の

構成に与える影響

2.3.4 実験4：絶食時間を等しくした条件におけるイヌリン摂食タイミングと腸内細菌叢の関係性

2.4 考察

2.5 小括

### 3章. 大豆タンパク質の摂取タイミングの違いがマウスの腸内細菌叢に及ぼす影響の検証 .....p.68

3.1 序論

3.2 実験手法

3.2.1 使用動物

3.2.2 実験スケジュール

3.2.3 血清コレステロールおよびトリグリセリド測定

3.2.4 リアルタイム RT-PCR

3.2.5 盲腸内 pH 測定

3.2.6 短鎖脂肪酸 (SCFA) 測定

3.2.7 糞便中の DNA 抽出

3.2.8 16S rRNA 遺伝子解析

3.2.9 菌叢解析

3.2.10  $\alpha$  多様性解析 (Simpson Index)

3.2.11  $\beta$  多様性解析

3.2.12 機能予測解析

3.2.13 統計

3.3 実験結果

3.3.1 実験1：大豆タンパク質の自由摂食が腸内細菌叢の構成に与える影響

3.3.2 実験2：1日2食の制限給餌条件下における大豆タンパク質の摂食タイミングが腸内細菌叢の構成に与える影響

3.4 考察

3.5 小括

### 4章. 総括 .....p.98

参考文献 .....p.107

謝辞 .....p.118

研究業績 .....p.119

## 1 章.序論

### 1.1 腸内細菌について

哺乳類の腸内には約 100 種類、40 兆個の腸内細菌が生息しており、その集団を腸内細菌叢と呼ぶ。この腸内細菌叢の多くは嫌気性細菌であるため、大気レベルの濃度の酸素に暴露されると死滅してしまう。そのため、腸内細菌叢の同定は難しいものであった。しかし、細菌がもっている 16S rRNA (リボソーム RNA) 遺伝子の塩基配列を解析するという遺伝子レベルでの解析が行われるようになったことで、腸内細菌の同定と分類が可能となった<sup>1</sup>。すると、腸内細菌叢を一種の生態系と捉えることが可能になり、腸内細菌叢が様々な要因(食事、年齢、運動、ストレス、喫煙、飲酒、薬物など)によって変動すること<sup>2</sup>、多くの宿主の生理機能の変化が腸内細菌叢の構成変化と相関していること<sup>3</sup>が明らかとなった。

生物は、ドメイン (Domain)、界 (Kingdom)、門 (Phylum)、綱 (Class)、目 (Order)、科 (Family)、属 (Genus)、種 (Species) の各階級で分類され、細菌 (Bacteria) ドメインは 33 の門に分けられる。しかし、ヒトの腸内細菌叢を主に構成しているのは *Firmicutes* 門、*Bacteroidetes* 門、*Actinobacteria* 門、*Proteobacteria* 門の 4 つの門に属する菌であり、この 4 門だけでヒト腸内細菌叢の全種のうち 95%以上を占める<sup>4</sup>。腸内細菌の分類の一例を Table 1.1 に示すが、本研究で有意な変化が見られ、特に注目した菌を赤字で示す (Table 1.1) (以下、「門」や「属」を略す)。また、赤字で示した菌の特徴について 1.1.1 の項以降で後述する。

Table.1.1 腸内細菌の分類の一例

門 Phylum	綱 Class	目 Order	科 Family	属 Genus	種 Species	
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Bacteroidaceae	Bacteroides	<i>fragilis</i>	
					<i>fluxus</i>	
					<i>clarus</i>	
			Odoribacteraceae	Odoribacter	<i>laneus</i>	
				Butyricimonas	<i>faecihominis</i>	
					<i>copri</i>	
			Prevotellaceae	Prevotella	<i>bryantii</i>	
					<i>aureus</i> (黄色ブドウ球菌)	
					<i>epidermidis</i>	
					<i>casei</i>	
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Staphylococcaceae	Staphylococcus	<i>aureus</i> (黄色ブドウ球菌)	
					<i>epidermidis</i>	
					<i>casei</i>	
			Lactobacillaceae	Lactobacillus (乳酸菌)	<i>acidophilus</i>	
					<i>equi</i>	
		Lactobacillales	Enterococcaceae	Enterococcus	<i>faecalis</i>	
					<i>thermophilus</i>	
			Streptococcaceae	Streptococcus (レンサ球菌)	<i>mutans</i>	
				Lactococcus	<i>lactis</i>	
					<i>difficile</i>	
	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae	Clostridium	<i>perfringens</i> (ウェルシュ菌)	
			Lachnospiraceae	Dorea	<i>longicatena</i>	
			Ruminococcaceae	Ruminococcus	<i>flavefaciens</i>	
				Oscillospira	<i>guilliermondii</i>	
	Erysipelotrichi	Erysipelotrichales	Erysipelotrichaceae	Allobaculum	<i>stercoricanis</i>	
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Desulfovibrionales	Desulfovibrionaceae	Desulfovibrio	<i>desulfuricans</i>
			Enterobacteriaceae	Escherichia	<i>coli</i> (大腸菌)	
Actinobacteria	Actinobacteridae	Bifidobacteriales	Bifidobacteriaceae	Bifidobacterium (ビフィズス菌)	<i>bifidum</i>	
					<i>breve</i>	
Fusobacteria	Fusobacteriia	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium	<i>nucleatum</i>	

多くの腸内細菌は代謝過程で短鎖脂肪酸 (short chain fatty acids: SCFA) と呼ばれる、酢酸、酪酸、プロピオン酸などを産生する<sup>5</sup>。乳酸は正式には SCFA には含まれないが、本論文では SCFA と呼ぶときは乳酸を含むことが多い。次に SCFA の産生過程について記述する<sup>5</sup>。食物繊維やレジスタントプロテインといった難消化性の食品成分が大腸にまで到達すると、腸内細菌

が持つ固有の酵素によって炭水化物はグルコースにまで、タンパク質はアミノ酸にまで分解される<sup>6</sup>。グルコースは腸内細菌の解糖系を経てピルビン酸へ、一部のアミノ酸はアミノ基転移酵素などの処理を経てピルビン酸へとなる<sup>6</sup>。基本的には、このピルビン酸を元に各腸内細菌が持つ SCFA 産生経路を経て、SCFA が産生される。*Bacteroides* や *Desulfovibrio* は酢酸を産生する菌であるが、酢酸はアセチル CoA 経路または酢酸発酵により産生される<sup>7</sup>。プロピオン酸の産生経路は主に、逆クエン酸回路によりコハク酸を生成し、コハク酸が酵素によりプロピオニル CoA へと変換され、プロピオニル CoA が加水分解されてプロピオン酸が産生されるコハク酸塩経路<sup>8</sup>。乳酸産生菌により産生された乳酸を利用してアクリル酸を生成し、アクリル酸が酵素によりプロピオニル CoA へと変換され、プロピオニル CoA が加水分解されてプロピオン酸が産生されるアクリル酸塩経路<sup>8</sup>。ピルビン酸とは無関係に、フコースやラムノースなどのデオキシ糖が酵素によりプロピオニル CoA へと変換され、プロピオニル CoA が加水分解されてプロピオン酸が産生されるプロパンジオール経路の3つが存在する<sup>8</sup>。また、酪酸は2分子のアセチル CoA の縮合反応とブチリル CoA への還元反応を経て、最終的に酪酸キナーゼによって酪酸が産生される経路<sup>9</sup>とアセチル CoA を利用して産生されたブチリル CoA が加水分解されて酪酸が産生される経路の2つが存在する<sup>10</sup>。乳酸の産生方法はホモ乳酸発酵とヘテロ乳酸発酵の2つが存在する。*Streptococcus*、*Lactococcus*、*Lactobacillus casei* はホモ乳酸発酵を行い、グルコースからピルビン酸を経て乳酸を産生する<sup>6</sup>。一方で、*Bifidobacterium*、*Lactobacillus fermentum* はヘテロ乳酸発酵を行い、グルコースから乳酸だけではなく二酸化炭素、エタノールを産生する<sup>6</sup>。

### 1.1.1 *Bacteroidetes*, *Firmicutes*

*Bacteroidetes* はヒト腸内細菌叢の全種のうち約 20%を占め、この門に属する菌の多くは多糖・タンパク質を代謝し、酢酸とプロピオン酸を産生する<sup>11</sup>。一方、*Firmicutes* はヒト腸内細菌叢の中でも最も多く存在し、全種のうち約 60%を占める<sup>11</sup>。*Firmicutes* に属する菌の種類は多様であり、一般的に善玉菌と呼ばれる乳酸菌 (*Lactobacillus*) が属している一方で、腸内腐敗のもととなるウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) も属している<sup>12</sup>。

近年、*Bacteroidetes* と *Firmicutes* の存在量は肥満と正常体重で異なることが知られており、*Bacteroidetes* は肥満によって減少し、*Firmicutes* は増加する<sup>13-15</sup>。Ley RE らは遺伝性の肥満マウス (*ob/ob* マウス) と正常マウスを用意し、腸内細菌叢を比較した。すると、肥満マウスの腸内細菌叢では正常マウスと比較して *Firmicutes* が増加し、*Bacteroidetes* が減少していることを見出した<sup>13</sup>。さらに、同研究グループは、無菌マウスにそれぞれの腸内細菌叢を移植する実験を行った。すると、両群で同様の餌を摂食しているにもかかわらず、肥満マウスの腸内細菌叢を移植されたマウスは、正常マウスの腸内細菌叢を移植されたマウスよりも体脂肪の増加率が高いことを示した<sup>14</sup>。以上の結果は、正常な腸内細菌叢よりも *Firmicutes* が増加し、*Bacteroidetes* が減少しているという腸内細菌叢の変化が原因となり肥満が引き起こされたことを示している。さらに、この結果は高脂肪食を摂食させた食餌誘導性の肥満マウスにおいても同様に見られたことから、腸内細菌叢の変化は食餌に依存することを示唆している<sup>15</sup>。

### 1.1.2 *Proteobacteria*

*Proteobacteria* はヒト腸内細菌叢のわずか数%のみしか占めておらず<sup>11</sup>、大腸菌、サルモネラ、ビブリオ、ヘリコバクターなど病原菌と呼ばれる菌が多く属している<sup>11</sup>。この、2 つの特徴を踏まえると、*Proteobacteria* が増加することは、腸内環境が悪化していると捉えることができ、実際に、炎症性腸疾患患者の腸内細菌叢では、健常者と比較して *Proteobacteria* が増加してい

る<sup>16</sup>。

### 1.1.3 *Odoribacter*

*Odoribacter* は酪酸キナーゼを持つため、炭水化物を発酵する過程で、酪酸を産生することが知られている<sup>17</sup>。この酪酸は、血管に発現している SCFA 受容体の GPR41 と結合することにより、血圧低下作用を果たす<sup>18</sup>。肥満女性の腸内細菌叢を調べた研究では、*Odoribacter* と収縮期血圧に負の相関が見られる<sup>17</sup>。以上の研究を踏まえると、高血圧の予防には *Odoribacter* の存在が重要であることを示唆している。

### 1.1.4 *Butyricimonas*

*Butyricimonas* はグルコースから酪酸を産生する酪酸産生菌の一つである<sup>19</sup>。また、遺伝性の 2 型糖尿病モデルマウス (*db/db* マウス) の腸内細菌叢と正常マウスの腸内細菌叢を比較すると、*Butyricimonas* が減少しており、盲腸内の酪酸量も減少していた<sup>20</sup>。さらに、この *db/db* マウスに 2 型糖尿病治療薬であるメトフォルミンを経口投与すると、*db/db* マウスの腸内細菌叢の構成が大きく変化し、*Butyricimonas* が増加したことが報告されている<sup>20</sup>。

### 1.1.5 *Staphylococcus*

*Staphylococcus* は大部分が非病原性であるが、一部の種に病原性を持つものが存在する<sup>21</sup>。*Staphylococcus* は増殖の際にエンテロトキシンと呼ばれる毒素を産生し、毒素性ショック症候群、敗血症などの疾患を引き起こすことが知られている<sup>21</sup>。また、*Staphylococcus* は肥満患者において、健常者よりも増加しており、*Staphylococcus* の存在量はエネルギー摂取量と正の相関を持つことが報告されている<sup>22,23</sup>。

### 1.1.6 *Lactococcus*

*Lactococcus* は pH の変化や塩濃度の変化に耐性を持つことが多く、幅広い環境に適応することができ、糖から乳酸を産生することが知られている<sup>24</sup>。*Lactococcus* は発酵食品の製造に用い

られることが多く、ヨーグルトやチーズ、バターなどの乳酸発酵食品に多く含まれている<sup>25</sup>。

### 1.1.7 *Oscillospira*

*Oscillospira* は酪酸産生菌の一つである<sup>26</sup>。ヒトの調査研究において、*Oscillospira* と肥満指数 Body mass index (BMI) に負の相関があることが示されており、このことから、肥満者の腸内細菌叢では *Oscillospira* が減少していると考えられる<sup>27</sup>。一方で、*Oscillospira* は便秘女性の腸内細菌叢において健常女性よりも多く存在している<sup>28</sup>。これは、*Oscillospira* が他の腸内細菌と比較して成長速度が遅い菌であるためと考えられている<sup>29</sup>。一般的に、腸管の蠕動運動が活発で腸管内容物の通過時間が短いと、腸内細菌の増殖が促されるが、便秘等により腸管の蠕動運動が悪くなり、腸管内容物の通過時間が長くなると、アンモニアやインドールなどの腸内腐敗産物が産生され、腸内環境が悪化する<sup>30</sup>。しかし、*Oscillospira* は腸管内容物が長い間腸管に留まっていることで、成長に必要な栄養素を腸管内で取り入れることができ、ゆっくりと成長するため、便秘女性の腸内細菌叢で *Oscillospira* が増加していると考えられている<sup>29</sup>。

### 1.1.8 *Desulfovibrio*

*Desulfovibrio* は有機物を代謝し酢酸や硫化水素を産生する<sup>31</sup>。この産生された硫化水素は腸管に対して毒性を示すことが報告されている<sup>32</sup>。また、*Desulfovibrio* の存在量は炎症性腸疾患患者において増加していることも知られている<sup>33</sup>。

## 1.2 腸内細菌叢と生理機能

腸内細菌叢のバランスが乱れた状態は“Dysbiosis”と呼ばれ、様々な疾患と関連することが報告されている<sup>34</sup>。先述にも数例を挙げているが、肥満患者の腸内細菌叢は、健常者の腸内細菌叢よりも *Firmicutes* が増加し、*Bacteroidetes* が減少している<sup>35</sup>。また、大腸がん患者の腸内細菌叢は健常者と比較して、*Fusobacterium* や *Fusobacterium nucleatum* が増加している<sup>36</sup>。さらに、身体的疾患のみならず、精神疾患にも腸内細菌叢との関連が報告されており、例えば、うつ病

患者の腸内細菌叢においては、*Bacteroidetes*、*Proteobacteria*、*Actinobacteria* が増加している<sup>37</sup>。

一方で、この腸内細菌叢と宿主の生理機能の関係性は、腸内細菌叢が産生する SCFA が宿主の生理機能を調節していると考えられている<sup>5,38,39</sup>。腸内細菌叢が難消化性の食品成分を発酵・分解することで SCFA が産生されるが<sup>6</sup>、産生された酢酸は肝臓においてエネルギー基質として利用されたり、酪酸は大腸において制御性 T 細胞を誘導し免疫反応を促進させたりと、宿主の生理機能に影響を及ぼすことが報告されている<sup>38,39</sup> (Fig.1.1)。

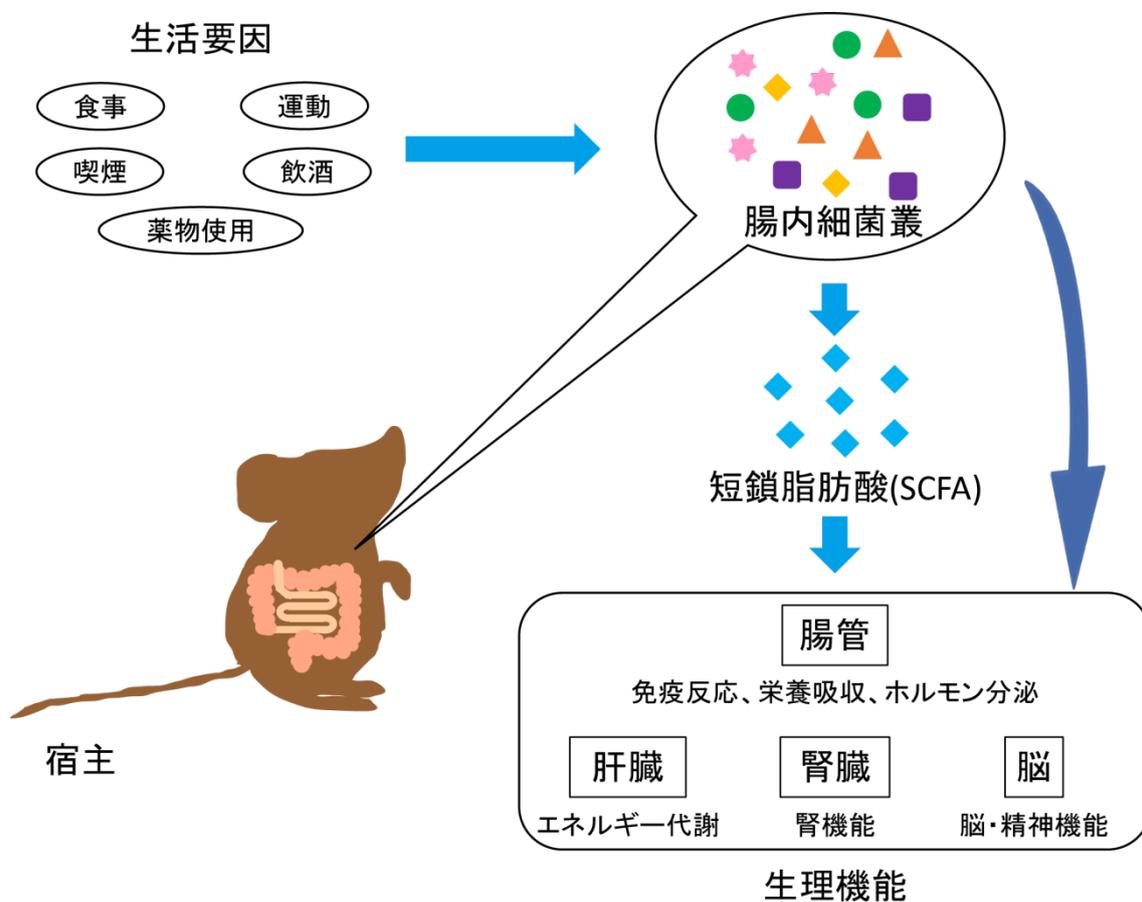


Fig.1.1 腸内細菌叢と宿主の関係性

また、SCFA はそれ自身が弱酸性であるため、SCFA の増加は腸管の pH を低下させて腸管内を弱酸性(pH: 5.0~7.0)に保つことができる<sup>5</sup>。大腸菌やウェルシュ菌などの有害な菌の増殖に最適な pH が 7.0~7.5 であることから、腸管 pH の低下は有害菌の増殖を抑えることができる<sup>40</sup>。すると、SCFA 産生菌の相対存在量が増え、腸内環境を良好に保つことができる<sup>5</sup> (Fig.1.2)。

## 難消化性の食品成分

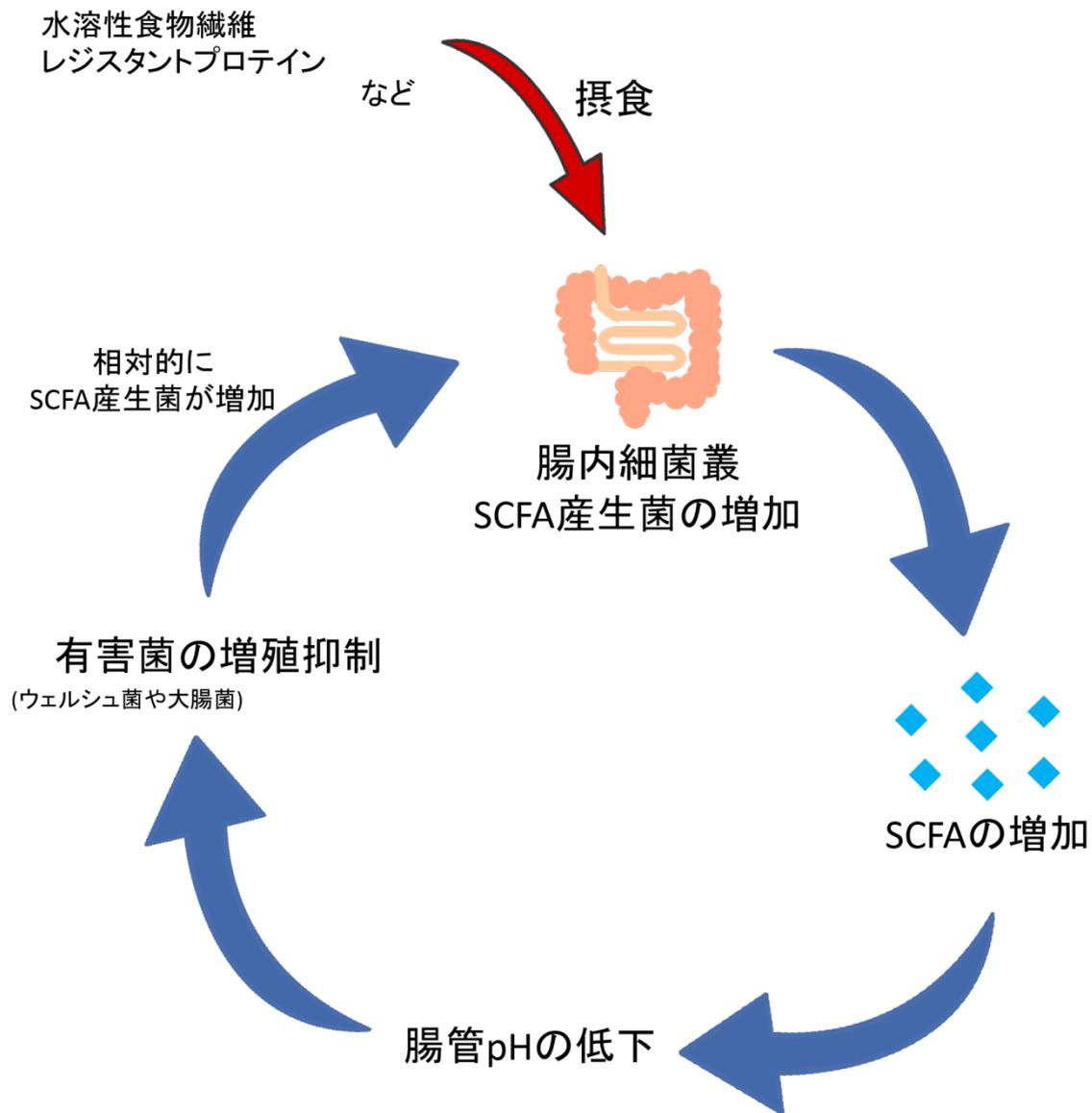


Fig.1.2 SCFA と腸内細菌叢との関係性

### 1.3 腸内細菌叢と生活要因

#### 1.3.1 食事

腸内細菌は主に宿主が小腸で消化・吸収しきれなかった食物や、老化して剥がれた腸管上皮細胞そのものや腸管で分泌される粘液成分であるムチンを栄養源として増殖している。食事を

大腸まで届かせて、腸内細菌叢に積極的に働きかけようとする考えが「プロバイオティクス」「プレバイオティクス」である。プロバイオティクスは1989年に Fuller によって「腸内細菌叢のバランスを改善することにより宿主に有益な作用をもたらす生きた微生物」と定義され<sup>41</sup>、*Bifidobacterium* などが挙げられる。先行研究で、成人女性に *Streptococcus thermophilus* と *Lactobacillus delbrueckii* のみを種菌として作成したヨーグルトと、上記に *Bifidobacterium longum* を種菌に追加して作成したヨーグルトを摂食させたところ、*Bifidobacterium longum* を追加したヨーグルトを摂食したほうが高い整腸作用を示した<sup>42</sup>。

一方、プレバイオティクスとは1995年に Gibson らによって「消化管上部で分解・吸収されず、腸内細菌の選択的な栄養源となり、それらの助長や活動を刺激することで腸内細菌叢を健康的に改善・維持し、宿主の健康を増進する食品成分」と定義され<sup>43</sup>、オリゴ糖や水溶性食物繊維が挙げられる。なお、オリゴ糖や水溶性食物繊維はいずれも炭水化物に分類されるが、プレバイオティクスには一部のタンパク質や脂質なども含まれる<sup>44,45</sup>。Fig.1.3 には、腸内細菌叢に影響を及ぼす可能性があり、プレバイオティクスとして働く難消化性の食品成分を記述した (Fig.1.3)。腸内細菌叢に影響するタンパク質として大豆タンパク質<sup>44</sup>、脂質として $\omega$ -3 脂肪酸であるエイコサペンタエン酸 (EPA) やドコサヘキサエン酸 (DHA) が挙げられる<sup>45</sup>。

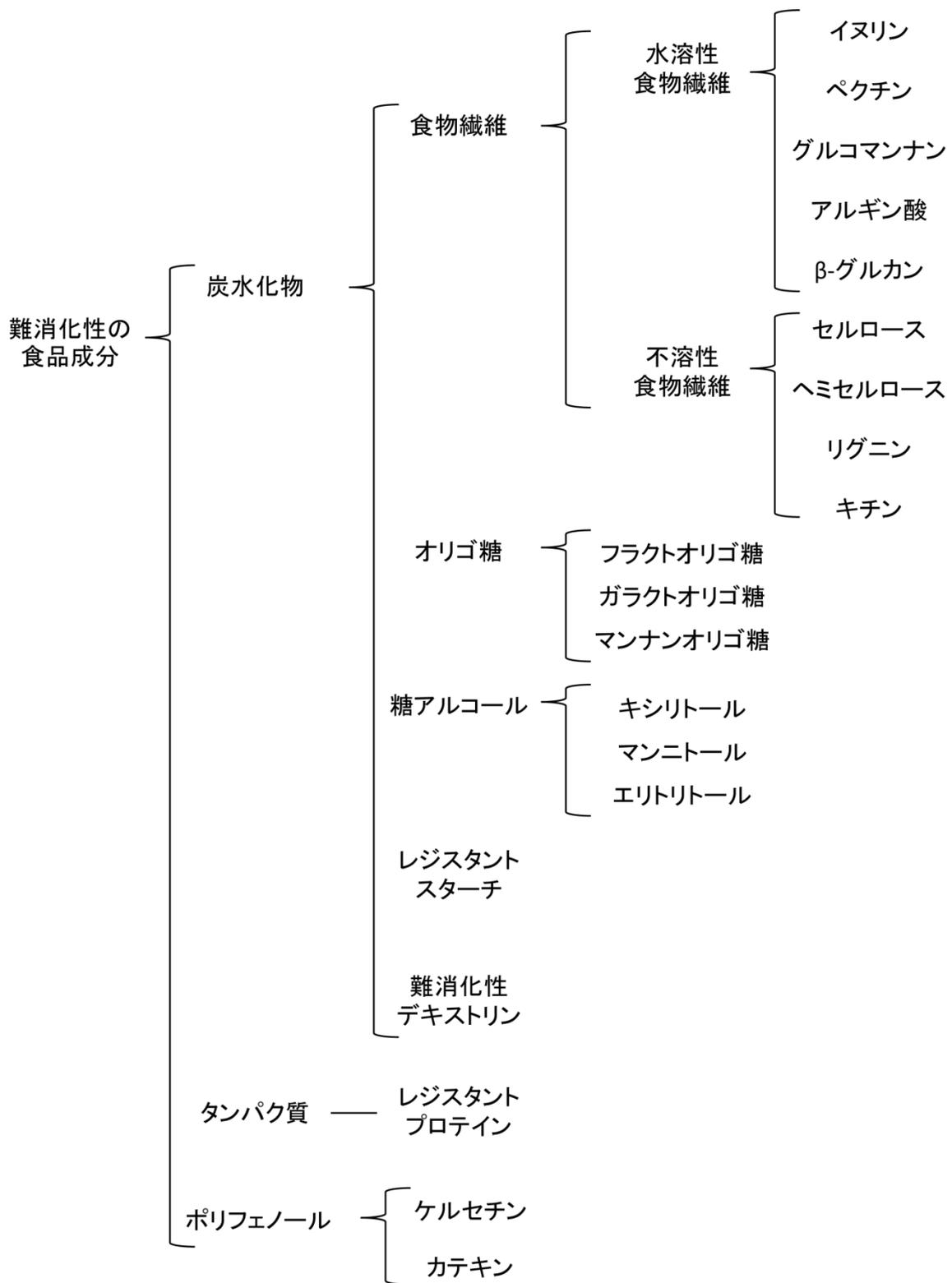


Fig.1.3 難消化性の食品成分の一例

本研究では、この我々の生活でなくてはならない「食事」に着目し、栄養素が腸内細菌叢に与える影響に着目した。特に、三大栄養素のなかでも、プレバイオティクスとしての機能を果たす物質が多く知られている炭水化物とタンパク質に着目した。さらに、炭水化物のなかでも水溶性食物繊維のイヌリンを用い、タンパク質のなかでも大豆タンパク質を用いた。

水溶性食物繊維の摂取は腸内細菌叢の構成に影響を与えるが<sup>46,47</sup>、現代日本において、食物繊維の摂取量が不足している<sup>48</sup>。平成29年度の国民健康・栄養調査では、1日の食物繊維の食事摂取基準量は成人男性で21g以上、成人女性で18g以上となっているが、実際の食物繊維摂取平均量は20代男性で12.8g、20代女性で11.8gと不足している<sup>48</sup>。そして、その他の年代においても実際の食物繊維摂取平均量は、推奨されている摂取基準量を満たしていない<sup>48</sup>。また、食物繊維摂取量の内訳では、水溶性食物繊維の摂取量は不溶性食物繊維の摂取量よりも少なくなっている<sup>48</sup>。したがって、この水溶性食物繊維摂取量の増加を促すことが重要であると考え、水溶性食物繊維を研究対象とした。さらに、水溶性食物繊維のなかでも、イヌリンは我々が日常的によく食べるゴボウや菊芋、玉ねぎなどの野菜に高濃度で含まれているため<sup>49</sup>、選定に至った。

タンパク質の摂取も腸内細菌叢の構成を大きく変化させることがいくつかの研究で報告されている<sup>44,50</sup>。通常、多くのタンパク質は小腸で吸収されるが、一部のタンパク質は小腸を通過して大腸に到達する<sup>51</sup>。このような性質を持つタンパク質をレジスタントプロテインと呼ぶ<sup>52</sup>。レジスタントプロテインが含まれている食材に、そば<sup>53</sup>、酒粕<sup>54</sup>、絹<sup>55</sup>、大豆<sup>56</sup>、卵黄<sup>57</sup>が挙げられる。この中でも大豆のタンパク質は腸内細菌叢の構成を変化させ、腸内環境を良好にすることが報告されている<sup>44,50</sup>。また、大豆は我々日本人にとって馴染み深い食材であり、豆腐や味噌、納豆などに加工され、加工後の高野豆腐<sup>58</sup>、納豆<sup>59</sup>もレジスタントプロテインが多く含まれていることから、大豆タンパク質を研究対象とした。

### 1.3.2 運動

運動習慣も腸内細菌叢に影響を与える要因の一つである。マウスやラットに輪回し運動を行わせると SCFA を産生する腸内細菌が増加し、SCFA 量（特に酪酸）も増加する<sup>60-62</sup>。またヒトにおいても、トップクラスのラグビー選手と一般人男性の腸内細菌叢を比較すると、ラグビー選手の方が腸内細菌叢の多様性が高く、炎症性関連物質が少ない<sup>63</sup>。さらに、Sheiman らによる、マラソン大会に参加した選手の腸内細菌叢を調べた研究では、大会前後で選手の腸内細菌叢の構成が異なり、特に大会後には *Veillonella* が増加していた<sup>64</sup>。そしてこの *Veillonella* をマウスに経口投与すると、マウスの運動量が増加することが示されている<sup>64</sup>。筆者らはマウスの運動量が増加したことについて、*Veillonella* の持つ乳酸代謝機能が重要であると述べている<sup>64</sup>。つまり、運動時に蓄積する乳酸を *Veillonella* が代謝することで運動パフォーマンスの低下を防いでいると考えられている<sup>64</sup>。一方、同じ運動でも高強度の運動は、腸壁を損傷させ、運動誘発性胃腸症候群を引き起こす可能性がある<sup>65</sup>。

### 1.3.3 喫煙と飲酒

喫煙習慣によっても腸内細菌叢は影響を受け、喫煙者と非喫煙者の腸内細菌叢を比較すると、喫煙者の方が非喫煙者よりも *Bacteroidetes* が少ない<sup>66</sup>。さらに、喫煙者が禁煙をすると *Actinobacteria* や *Firmicutes* が増加し、腸内細菌叢の多様性も増加する<sup>66</sup>。

過度の飲酒によっても腸内細菌叢は変動し、アルコール依存の度合いが高ければ高いほど酪酸産生菌が減少する<sup>67</sup>。さらにアルコール性肝疾患の一つである肝硬変患者では *Bacteroidales* が増加する<sup>67</sup>。

### 1.3.4 薬

腸内細菌叢に大きな影響を及ぼす要因は抗生物質や抗菌剤といった薬物であると考えられている<sup>68</sup>。実際に、病原体を減少させるために使用される抗生物質は副作用的に長期間に渡っ

て腸内細菌叢の構成に影響を与える<sup>68</sup>。さらに抗生物質以外の薬でも腸内細菌叢の構成に影響を与える<sup>69-73</sup>。例えば、2型糖尿病治療薬のメトホルミン<sup>71</sup>、プロトンポンプ阻害薬に属する胃酸抑制薬のオメプラゾール<sup>72</sup>、非ステロイド性抗炎症薬のインドメタシン<sup>73</sup>が挙げられる。

一方、腸内細菌叢の変化が薬効に影響することも知られている<sup>74-76</sup>。がん免疫療法に用いられる免疫チェックポイント阻害剤である抗 PD-1 抗体や抗 CTLA-4 抗体は、*Bacteroides*、*Bifidobacterium* や *Akkermansia* などの腸内細菌を多く持つ患者において効果が得られやすくなる<sup>74-76</sup>。

#### 1.4 腸内細菌叢と概日時計

概日時計は約 24 時間の周期を持った生理機構である。*Clock*、*Bmal1*、*Per*、*Cry* といった時計遺伝子が転写・翻訳のネガティブフィードバックループによってリズムが刻まれており、睡眠-覚醒リズム、ホルモン分泌、交感神経系などの様々な生体リズムの中心を担っている<sup>77,78</sup>。概日時計は脳や心臓、肝臓、筋肉、腸管など全身に幅広く存在しており、各組織の生理機能の概日リズムを調節している。これらの概日時計の中樞は、脳の視交叉上核（*Suprachiasmatic nucleus* : SCN）に存在し、神経伝達やホルモン分泌等を通して日内リズムを制御し、SCN 以外の脳や末梢臓器の時刻統制がされ、多くの生理現象の日内リズムを調節している<sup>79,80</sup>。中樞の概日時計は主に目から入る光情報を元に調節される。また、末梢臓器の概日リズムは、中樞からの制御のみならず、食事、体温、運動などの外部刺激によって調節される<sup>81-83</sup>。

概日リズムは腸内細菌叢の構成にも存在し、食事によって制御される<sup>84</sup>。*Per1/Per2* 欠損マウスの腸内細菌叢を調べると、腸内細菌叢の構成の日内変動が消失するが、*Per1/Per2* 欠損マウスに活動期のみの制限給餌または非活動期のみの制限給餌を行うと、腸内細菌叢の構成の日内変動が復活し、さらにその動態は活動期制限給餌と非活動期制限給餌で真反対のリズムを示した<sup>84</sup>。つまり、腸内細菌叢の構成の日内変動は摂食リズムによって制御されていることが示され

た。

光環境を3日おきに8時間ずらしたような時差ボケモデルマウスでは、摂食量の昼夜差がなくなり、腸内細菌叢の構成の日内変動も消失した<sup>84</sup>。この時差ボケモデルマウスに高脂肪食を与えると、通常マウスと比較して体重が増加しやすくなり、血糖値も増加した<sup>84</sup>。さらに、ヒトにおける時差ボケについても報告がされている<sup>84</sup>。8時間以上のフライトをした2人から、フライト1日前、フライト1日後、フライト2週間後の3回糞便を採取した。すると、フライト1日前と比較して、フライト1日後では *Firmicutes* が増加していた<sup>84</sup>。しかし、フライト2週間後には増加した *Firmicutes* はフライト1日前のレベルまで戻っていた<sup>84</sup>。また、このヒト糞便を無菌マウスに移植させると、フライト1日前の糞便移植マウス、フライト2週間後の糞便移植マウスと比較して、フライト1日後の糞便移植マウスの体重が増加した<sup>84</sup>。つまり、時差ボケによって日内変動が乱れた腸内細菌叢の構成はメタボリックシンドロームを引き起こす原因となることが示された。

近年、腸内細菌叢自体が宿主の概日リズムに影響を与える可能性が報告されつつある<sup>85,86</sup>。通常マウスに見られる各臓器の時計遺伝子発現の概日リズムが、無菌マウスにおいては減弱していた<sup>85</sup>。さらに腸内細菌叢が肝臓などの概日リズムに影響を与えるメカニズムとして SCFA が重要である可能性も報告された<sup>86</sup>。抗生物質を含む水を飲水させ、擬似的な無菌状態にさせたマウスに SCFA を非活動期に経口投与すると、肝臓・腎臓・顎下腺の PER2 の位相が前進した<sup>86</sup>。これは、マウスに食物繊維を再給餌させた場合も同様の結果だった<sup>86</sup>。このように SCFA が末梢時計を同調させたことから、プレバイオティクスの摂食による腸内細菌叢の調整が、体内時計を整えることにも効果的であることを示している。

## 1.5 時間栄養学

先に述べた時計遺伝子は脂質代謝や糖代謝に関わる酵素の発現を制御している<sup>77,78</sup>。脂質代

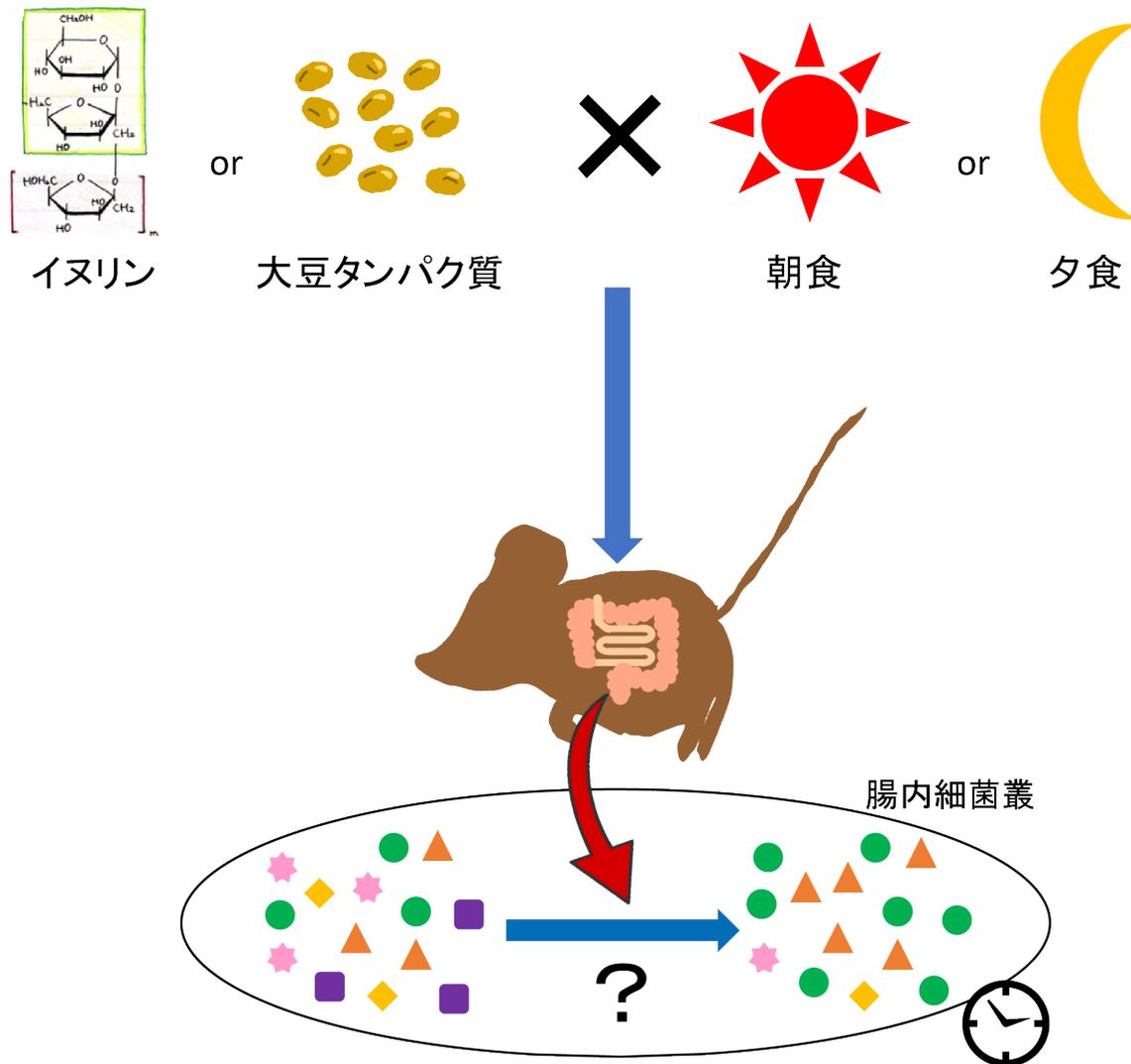
謝や糖代謝は概日リズムを示し、*Clock mutant* マウスや脂肪組織特異的に *Bmal1* をノックアウトさせたマウスでは肥満が引き起こされ、肝臓特異的および骨格筋特異的 *Bmal1* ノックアウトマウスでは糖代謝異常を引き起こす<sup>87-90</sup>。このことから体内時計によって作られるリズムに合わせて、食事の時刻やタイミングを考慮することは生活習慣病予防等にも重要であると考えられる。このように、体内時計によって作られる様々な概日リズムを利用し、食のタイミングに伴う影響を考慮する学問を「時間栄養学」と呼ぶ<sup>91</sup>。例えば、マウスに高脂肪食を与えると、通常、摂食行動を行わない非活動期である明期にも摂食し、摂食リズムや体内時計の乱れが見られる<sup>92</sup>。そして、高脂肪食の摂食可能な時間帯を活動期に制限すると、体内時計の乱れを抑える<sup>93,94</sup>。さらに、高脂肪食摂食による体重増加も、摂食可能な時間を活動期に制限すると、自由摂食と摂取カロリー量に差がないにもかかわらず、体重増加を抑え、脂質代謝異常を改善する<sup>93,94</sup>。また、マウスに高脂肪食を与えると腸内細菌叢の構成の日内変動が消失するが、活動期に時間制限給餌をすると、日内変動の一部が復活する<sup>95</sup>。また、活動期の前半と後半の1日2回の摂食条件において、活動期前半に高脂肪食、後半に通常食を摂食させたマウスは、前半に通常食、後半に高脂肪食を摂食させたマウスよりも体重増加が抑えられる<sup>96</sup>。さらにヒトにおいても、肥満のリスクが夕方20時以降の夕食摂食で大きく増加する<sup>97</sup>。

近年、食品成分の摂取時刻によって脂質代謝や糖代謝に与える影響が異なることが示唆されている<sup>98,99</sup>。例えば、高果糖食を与えられたマウスにおいて、魚油（DHA、EPA）を活動期の前半に与えると、活動期の後半に与えるよりも、より効果的に脂質代謝を改善する<sup>98</sup>。また、カテキンを含む緑茶の食後血糖値上昇の抑制効果は朝食よりも夕食において大きく見られる<sup>99</sup>。

## 1.6 本研究の目的

以上より、有効成分の摂取タイミングがエネルギー代謝に与える影響に関する報告はいくつか挙げられるが<sup>98,99</sup>、腸内細菌叢の構成に与える影響について報告された研究はほとんどない。

また、腸内細菌叢に影響を与えるプレバイオティクスは多く知られているが<sup>42-45</sup>、そのタイミングを考慮した報告も皆無である。そこで、本研究では、マウスに朝食と夕食の1日2食の摂食条件下で、朝食でのプレバイオティクス摂取と夕食でのプレバイオティクス摂取で腸内環境が異なるかどうかを調べることを目的とした (Fig.1.4)。



腸内環境に影響を与える摂食タイミングは？

Fig.1.4 研究目的

## 2章. イヌリンの摂取タイミングの違いがマウスの腸内細菌叢に及ぼす影響の検証

### 2.1 序論

本章はMDPI (Nutrients) により発行された“Mice Microbiota Composition Changes by Inulin Feeding with a Long Fasting Period under a Two-Meals-Per-Day Schedule”を元に再構成されたものである。

食物繊維は水溶性食物繊維と不溶性食物繊維に大別される<sup>100</sup>。水溶性食物繊維の例としてイヌリン、ペクチンが挙げられ、不溶性食物繊維の例としてセルロース、リグニンが挙げられる<sup>100</sup> (Fig.1.3)。水溶性食物繊維も不溶性食物繊維も大腸にまで届き、腸内細菌によって発酵・分解されるが、その発酵性は水溶性食物繊維の方が高い<sup>100</sup>。また、水溶性食物繊維は大腸に届いて腸内細菌叢のエサとなる以外にも、小腸において粘性の高いマトリックスを形成し、小腸の粘度を高め、栄養素の吸収を物理的に抑制し、血糖値上昇抑制の一助となる<sup>100</sup>。一方で、不溶性食物繊維は胃や小腸で水分を吸収して膨らみ、腸管を刺激して、蠕動運動を促進させたり排便量を増加させたりする<sup>100</sup>。また、腸内細菌によって産生された二次胆汁酸は発がん性を有するが<sup>101</sup>、不溶性食物繊維はこの胆汁酸を吸着し、体外へと排出する<sup>102</sup>。

イヌリンはゴボウやキクイモ、玉ねぎに多く含まれている水溶性食物繊維で、キクイモの根にはイヌリンが生体重あたり 15~20%、ゴボウの根には 3.5~4.0%含有している<sup>49</sup>。イヌリンはグルコースにフルクトースが  $\beta$ -2,1 結合で重合した構造をしている<sup>103,104</sup>。キクイモの根やゴボウの根など自然界において、結合しているフルクトース数は様々で、2~60 個のフルクトースが結合しており、その平均の結合数は 32~34 個である<sup>104</sup>。なお、本研究で用いたイヌリンは、自然から抽出したものではなく、スクロースから人工的にイヌリンを合成したものであり、フルクトースの結合数は 16 個である<sup>104</sup>。

先行研究より、マウスにおいてもヒトにおいても、イヌリンの摂取により乳酸産生菌（特に *Bifidobacterium* または *Lactobacillus*）が増加した<sup>46,105</sup>。また、ラットに3ヶ月間高脂肪食にイヌリンを添加した餌を与え続けると、高脂肪食のみを与えた場合と比較して酢酸・プロピオン酸・酪酸・乳酸が増加した<sup>106</sup>。さらに、カルシウムイオンやマグネシウムイオンなどのミネラル吸収を促進し、骨中のミネラル含有量が上昇した<sup>106</sup>。また、同様にラットに3ヶ月間高脂肪食にイヌリンを添加した餌を与えると、血清および肝臓の中性脂肪が低減することも確認されている<sup>104</sup>。イヌリンが小腸において物理的に糖・脂質の吸収を抑制するという性質から、血糖値上昇を抑制することが考えられている<sup>104</sup>。実際に、葛粉に12gのイヌリンを添加した食事で一過性の血糖値上昇を調べたところ、イヌリンを添加しなかったときと比較して、血糖値上昇が約10%抑制された<sup>104</sup>。以上の先行研究をまとめると、イヌリンには腸内細菌叢改善効果、ミネラル吸収促進効果、脂質代謝改善効果、一過性の血糖値上昇抑制効果といった生理機能が認められている<sup>46,103-106</sup>。

著者はイヌリンのもつ腸内細菌叢改善効果に着目した。先述のようにイヌリンの摂取が腸内細菌叢の構成を変化させ、SCFAの産生を促すことが報告されているが<sup>46,105</sup>、イヌリンの摂取タイミングが腸内細菌叢に与える影響に関する報告はない。そこで、本実験では、マウスに1日2食の制限給餌を行わせ、朝食にイヌリンを与えた場合と夕食にイヌリンを与えた場合で、腸内細菌叢の構成変化が異なるのかどうかを調べた。

## 2.2 実験手法

### 2.2.1 使用動物

実験では9週齢のICR雄マウスを用いた（東京実験動物）。マウスは室温 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $60\pm 5\%$ 、明期:暗期=12h:12hの明暗環境で飼育した。明期を8:00から20:00とし、明期開始時刻をZeitgeber time 0 (ZT0)、暗期開始時刻をZT12と定義した。予備実験・実験1・実験2においてはマウスを1ケージあたり5匹で群飼いし、実験3・実験4においてはマウスを1匹ずつ個飼いした。マウスには全カロリー中のうち45%を脂肪が占める（脂肪45% kcal 含有の）高脂肪食（Research Diets社；D12451, アメリカ）にセルロース（オリエンタル酵母工業）またはイヌリン（Fuji FF；フジ日本精糖）<sup>103,104</sup>を添加した餌を2.2.2の項のように与え、水道水を自由に摂取できるようにした。なお本実験で使用された高脂肪食は、げっ歯類の肥満、糖尿病、脂肪肝のモデルとして使用される餌である<sup>107,108</sup>。本実験では、高脂肪食摂取によって腸内細菌叢が悪化した状態に対して、イヌリンがどれだけ改善するかどうかを確認するために高脂肪食を使用した。

### 2.2.2 摂食スケジュール

本実験ではType 1とType 2の2種類の摂食条件を用意した。Type 1（実験1と実験2）では摂食可能な時間のみを制御し、Type 2（実験3と実験4）では摂食開始時刻と摂食量を制御した。

Type 1では、タイマー制御により指定の時間帯のみマウスが摂食可能となるような装置を用いた。朝をZT12-20、夕方をZT20-4と定義し、朝食をZT12-16、夕食をZT20-0として4時間摂食可能にした。摂食量は、実験の開始時と終了時に装置内の餌の重量を測定することによって算出した。

Type 2では、タイマー制御により特定の時刻にペレット状の餌を与えることができる装置を用いた。マウスに与えた摂食量は、実験1で測定された1日の総摂食量の90%（3.6 g）を与えるように設定した。なお、1日の総摂食量の90%としたのは、マウスの食べ残しを防ぐためであ

る。実験3では、ZT12（朝食）とZT20（夕食）の1日2回の給餌を行い、1食に与えた餌の量は1.8 gとした。実験4では、ZT12（朝食）またはZT20（夕食）の1日1回のみ給餌を行い、1食に与えた餌の量は3.6 gとした。

また、インサリンの摂取量が実験間で等しくなるように、インサリンの添加量を調整した。

### 2.2.3 サンプルング

各実験の摂食条件下で10日間または14日間飼育後、サンプルングを行った。マウスを麻酔下で安楽死させた後、盲腸および直腸を摘出した。2.2.4の項に記述した方法で盲腸内pHを測定した後、盲腸から盲腸内容物を採取し、直腸からは糞便を採取した。なお、予備検討で、着色顔料により着色した餌を用いて、着色された糞便が排泄されるまでの時間を測定したところ、4時間後に着色された糞便が排泄されていた。このことから、4時間で摂食した餌が小腸・盲腸・大腸とすべての消化管を通過していると考えられた。そこで、摂食終了時刻から4時間後には摂食したインサリンが大腸に到達し、腸内細菌叢に何らかの影響を与えていると考え、サンプルングを行うタイミングは摂食終了時刻から4時間後とした。また、2.2.2の項のType 2のようなペレット状の餌を与える実験において、マウスはペレット状の餌を与えてから4時間以内に餌を食べ切れることを確認した。そこで、Type 2は、餌を食べ切るのに4時間程度かかると仮定し、さらにその4時間後にサンプルングを行った。つまり、摂食開始時刻から8時間後にサンプルングを行った。

### 2.2.4 盲腸内 pH 測定

盲腸内pH測定は、サンプルング時に行った。まず、マウスを麻酔下で安楽死させた後、開腹し、盲腸を摘出する。摘出した盲腸の一部を切開し、切開箇所pHメーター（pH Spear; Eutech Instruments, アメリカ）の電極を盲腸内に挿入することで測定した。

### 2.2.5 短鎖脂肪酸（SCFA）測定

SCFAの定量は先行研究<sup>109</sup>を元に以下の方法で行った。SCFA測定はガスクロマトグラフィー水素炎イオン化検出器（FID）（GC2010；島津製作所）を用いた。0.05 gの盲腸内容物を0.05 mLの1mol/L 硫酸（富士フイルム和光純薬株式会社）で酸性化し、0.4 mLのジエチルエーテル（富士フイルム和光純薬株式会社）と0.2 mLのエタノール（富士フイルム和光純薬株式会社）を加えて、振とうし、SCFAを抽出した。その後、室温で30秒間14,000 rpmで遠心分離し、1 $\mu$ Lの有機層をカラムに注入した（InertCap Pure WAX（30 m x 0.25 mm、df=0.5 $\mu$ m）；GLサイエンス）。初期温度を80°C、最終温度を200°Cに設定し、キャリアガスとしてヘリウムを使用した。サンプルの定量は、酢酸、乳酸、プロピオン酸、および酪酸を含んだ標準液を作成し、検量線を作成して行った。

#### 2.2.6 糞便中の DNA 抽出

糞便DNAは先行研究<sup>110</sup>を元に以下の方法で抽出した。約0.2 gの糞便サンプルを、20 mLのPBSで懸濁し、懸濁液を100 $\mu$ mメッシュのナイロンフィルター（Corning Inc.、アメリカ）でろ過した。ろ液を4°Cで20分間4,000 rpmで遠心分離した後、各沈殿物を1.5 mLのTE10バッファー（10 mM Tris-HCl（富士フイルム和光純薬株式会社）/10 mM EDTA（DOJINDO）、pH : 8.5）に懸濁した。懸濁液を2 mLチューブに移し、4°Cで5分間10,000 rpmで遠心分離した。その後、各沈殿物を0.8 mLのTE10バッファーで再懸濁した。1 mLのPCI（Invitrogen、アメリカ）、0.1 mLのリゾチーム（型番：122-02673、富士フイルム和光純薬株式会社）および0.02 mLのアクロモペプチダーゼ（型番：015-09951、富士フイルム和光純薬株式会社）を添加して、DNAを抽出し、エタノール沈殿を行った。試料をRNase（型番：313-01461、Promega Corp.、アメリカ）で処理して含まれるRNA分解し、DNAを20%PEG溶液（型番：169-09125、東京化成工業株式会社）で沈殿させた。最後に、沈殿を70%エタノールでリンスし、50 $\mu$ LのTEバッファーに溶解した。

#### 2.2.7 16S rRNA 遺伝子解析

PCRによる、細菌ゲノムDNAからの16S rRNA遺伝子の増幅は、イルミナが提供するサイクル条件を元に行った。16S rRNA遺伝子のV3～V4可変領域は、以下のプライマーを使用してPCRで増幅した。

フォワードプライマー =

5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3'

リバースプライマー =

5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3'

PCRは、2.5 $\mu$ LのDNAサンプル (5 ng/ $\mu$ L)、5 $\mu$ Lの各プライマー (1 $\mu$ mol/L)、および12.5 $\mu$ Lの2x KAPA HiFi HotStart Ready Mix (Kapa Biosystems Inc.、アメリカ) によって行った。また、PCRのサイクル条件は下記の通りである。

1. 95°C 3分
2. 95°C 30秒
3. 55°C 30秒
4. 72°C 30秒
5. 2～4の手順を24サイクル
6. 72°C 5分

PCR産物は、AMPure XPビーズ (Beckman Coulter, Inc.、アメリカ) を使用して精製した。その後、Nextera XT Index Kit v2 (Illumina Inc.、アメリカ) を使用してインデックスPCRを行い、サンプルをラベルした。インデックスPCRは、5.0 $\mu$ LのPCR産物、5.0 $\mu$ Lの各Nextera XTインデックスプライマー、25 $\mu$ Lの2x KAPA HiFi HotStart Ready Mix、10 $\mu$ LのPCR-Grade Waterを使用した。

また、インデックスPCRのサイクル条件は下記の通りである。

1. 95°C 3分
2. 95°C 30秒
3. 55°C 30秒
4. 72°C 30秒
5. 2~4の手順を7サイクル
6. 72°C 5分

インデックスPCR産物は、AMPure XPビーズによって精製した。精製後のクオリティチェックには、Agilent 2100 Bioanalyzer with DNA1000 Kit (Agilent Technologies Inc.、アメリカ) を使用した。最後に、インデックスPCR産物をRNAライブラリーとして最終濃度が4 nmol/Lになるように希釈した。

次に、イルミナの手順に従って、Illumina Miseq Reagent Kit v3 (Illumina Inc.) を使用してRNAライブラリーのシーケンスを行い、シーケンスデータを得た。

Miseqで得られた16S rRNAのシーケンスデータは、フリーソフトウェアのQIIME (バージョン1.9.1) を用いて解析した<sup>111</sup>。UCLUSTアルゴリズム<sup>112</sup>を用いて97%の相同性でoperational taxonomic unit (OTU)の作成を行った。16S rRNAのシーケンスデータの配列とGreengenesデータベース(August 2013 version)の細菌の遺伝子配列(参照配列)と比較することで、細菌種を同定した。2章を通して、91サンプルから合計6,680,549リードが読み取られ、平均して、1サンプルあたり73,412±4,606 (平均±標準誤差) リードを得た。さらにQIIMEを使用して、生物分類学的階級における門レベルから属レベルまでの細菌の相対存在量、Simpson多様性指数を用いた $\alpha$ 多様性、Weighted UniFrac距離を用いた主座標分析 (PCoA) による $\beta$ 多様性を解析した。

## 2.2.8 菌叢解析

得られたシーケンスデータより、門レベルと属レベルにおける細菌の相対存在量を解析した。腸内細菌叢に存在する細菌種を0から1の相対存在量として示す。本研究ではTaxonomy summaryとして、門レベルと属レベルに存在する菌の全体像を示し、その後、1章で述べている着目した菌の詳細結果を示す。

解析に使用した16S rRNA遺伝子は、細菌群で共通に存在する塩基配列でV1からV9までの9つの可変領域とその間に存在する定常領域で構成されている。可変領域を間に挟み、定常領域から始まるプライマーを用いて菌叢解析が可能になるが、本実験ではV3-V4の可変領域をターゲットとしてプライマーを設計した。V3-V4をターゲットとすることで、他の領域をターゲットとするよりも最も多く細菌種を同定することができ、門レベルではほぼ100%の同定率を得られ、属レベルでは約60%の同定率を得られることができる<sup>113</sup>。一方で種レベルになると同定率は10%まで低下する<sup>113</sup>。そのため、本実験では同定可能な一番上のレベルである門レベルと、約60%まで同定可能である属レベルの解析を行った。

## 2.2.9 $\alpha$ 多様性解析 (Simpson Index)

得られたシーケンスデータより、各個体の腸内細菌叢の種の多様性を解析する ( $\alpha$ 多様性解析)。種多様性は種の豊富さ (Species richness) と種の均等度 (Evenness) の2つの要素からなり、この2つを考慮して種の多様性を数値で示したものがSimpson Indexとなる<sup>114</sup>。Simpson Indexは0から1の値をとり、値が1に近づけば近づくほど、その個体の腸内細菌叢の多様性は高いとみなされる<sup>114</sup>。細菌の種数が多ければ、種が豊富であるとされSimpson Indexは1に近づく<sup>114</sup>。一方、特定の種の個体数が多く、他の種の個体数が少ない場合、種の均等度が低いとされSimpson Indexは0に近づく<sup>114</sup>。なお、腸内細菌叢の種の多様性が高く、様々な菌の種類がバランス良く存在することが、宿主にとってメリットとなると考えられており<sup>115</sup>、炎症性腸疾患、過敏性腸

症候群、メタボリックシンドローム、心血管疾患など様々な疾患により種の多様性が低下する<sup>115</sup>。

### 2.2.10 $\beta$ 多様性解析

各個体間の腸内細菌叢の構成を比較するために $\beta$ 多様性解析を行った。得られた各個体のシーケンスデータから、各個体の腸内細菌叢の違いを0から1までの距離として求めた (UniFrac距離)。2つの個体間のUniFrac距離が0の場合、2個体の腸内細菌叢の構成は100%一致しており、UniFrac距離が1に近づくほど、2個体の腸内細菌叢の構成は異なることを意味する<sup>116,117</sup>。また、UniFrac距離の算出には腸内細菌の存在比を加味して算出するWeighted UniFracと、腸内細菌の存在比を無視して算出するUnweighted UniFracがあり、Weighted UniFracでは腸内細菌叢の菌組成に基づいた類似性を反映し、Unweighted UniFracでは腸内細菌叢を構成する菌種メンバーのみに基づいた類似性を反映している<sup>116,117</sup>。本研究では、両方の算出方法で解析を行い、特に顕著に結果が見られたものについてのみ結果を示した。全個体間で得られたUniFrac距離を主座標分析 (Principal coordinate analysis : PCoA) することで、各個体間の腸内細菌叢の類似性を3次元で可視化した<sup>116</sup>。

### 2.2.11 統計

各データは平均 $\pm$ 標準誤差で表している。統計分析は、GraphPad Prism (バージョン6.03、GraphPad Software Inc.アメリカ) を使用した。

D'Agostino-Pearson test / Kolmogorov-Smirnov testを用いてデータの正規分布を調べ、F-value test / Bartlett's testを用いてデータの分散を調べた。正規分布かつ等分散であった場合、2群間比較であればStudent's *t*-testを行い、1要因3群以上の比較であればOne-way ANOVAを使用し、事後分析としてTukeyの多重比較検定を行った。また、2要因の比較であればTwo-way ANOVAを使用し、相互作用があれば事後分析としてTukeyの多重比較検定を行い、相互作用がなければ事後分析

としてSidakの多重比較検定を行った。データが非正規分布または不等分散であった場合、1要因の3群以上の比較であればKruskal-Wallis検定を使用し、事後分析としてDunnの多重比較検定を行った。また、2要因の比較であればMann-Whitney検定またはKruskal-Wallis検定を使用し、事後分析としてDunnの多重比較検定を行い、Benjamini, Krieger, and Yekutieli の two-stage linear step-up法によるFDR制御を行った。なお有意水準 $\alpha < 0.05$ を有意とみなした。腸内細菌叢の構成比較はPermutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA)を用いて統計量とp値を算出した。統計量は2.2.10の項で述べたUniFrac距離から算出しており、統計量が大きいほど腸内細菌叢がグループ間で異なることを意味する。なお、PERMANOVAはQIIMEによって行った。

## 2.3 実験結果

### 2.3.1 実験1：インスリン摂食が腸内細菌叢の構成に与える影響

本実験では、高脂肪食に含まれている食物繊維が不溶性食物繊維であるセルロースであるため、セルロースをインスリンのコントロールとして高脂肪食に添加した。予備実験において、セルロースを5%添加した高脂肪食とセルロースを添加していない高脂肪食を比較した (Fig.2.1a)。なお、本実験における最大の添加量が5%であるため、予備実験においても5%添加した群と添加していない群の比較を行った。その結果、マウスの体重 (Fig.2.1b)、盲腸内 pH (Fig.2.1d)、SCFA 産生量 (Fig.2.1e-i)、腸内細菌叢の多様性 (Fig.2.1j) や構成 (Fig.2.1k) に有意差はなかった。

したがって、セルロースを添加すること自体が腸内細菌叢の構成に与える影響はないか、もしくはあったとしても小さいことがわかった。

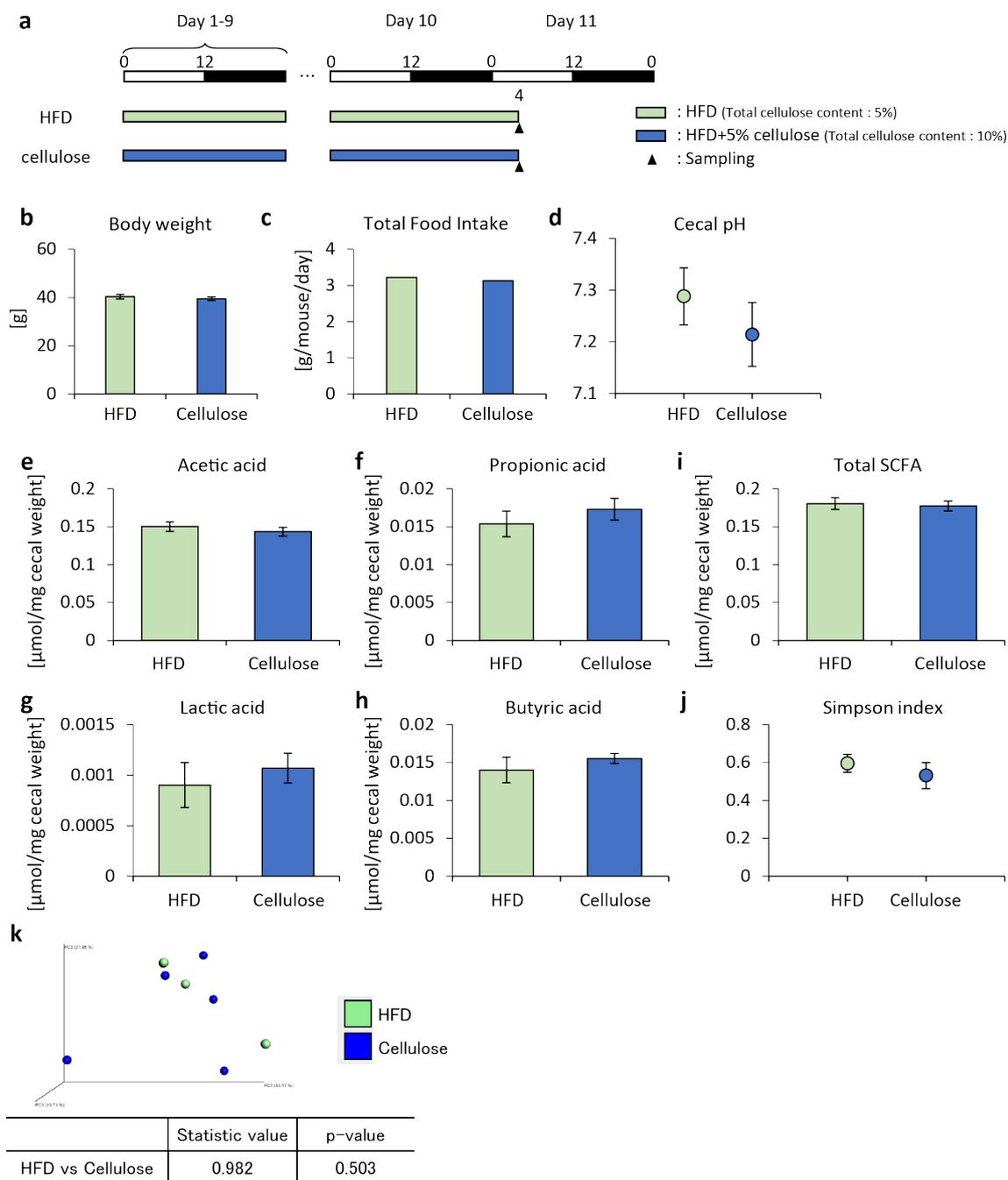


Fig.2.1 予備実験：セルロース添加の影響

(a) 予備実験のプロトコル、白と黒のバーは明期：暗期=12h：12hの明暗条件を表している。薄緑色のバーは高脂肪食（HFD）のみの餌を表し、青色のバーは高脂肪食に5%のCelluloseを添加した餌を表す。黒の矢尻はサンプリング時間を表す。(b) サンプリング前体重。(c) 1匹あたりの1日平均の摂食量。(d) 10日間飼育後の盲腸内pH。(e-i) 盲腸内のSCFA産生量。(e) 酢酸。(f) プロピオン酸。(g) 乳酸。(h) 酪酸。(i) 総SCFA量。(j) Simpson indexで示した腸内細菌叢の $\alpha$ 多様性。(k) Weighted UniFrac距離で示した腸内細菌叢の $\beta$ 多様性。データは平均値 $\pm$ 標準誤差で表す（(c)は群飼いのため標準誤差がついていない）。データのn数（(c)を除く）（HFD(n=4); Cellulose(n=5)）。高脂肪食群、高脂肪食+5%セルロースをそれぞれHFD、Celluloseと表す。

イヌリン摂取が腸内細菌叢の構成を変化させる可能性が示唆されている<sup>46,104,105,118-121</sup>。そこで、まずは本研究において、高脂肪食にイヌリンを添加した状態で腸内細菌叢にどのくらい影響するのかを調べた (Fig.2.2)。マウスは以下の2群に分けた。Cellulose 群：朝食と夕食の両方にセルロースを 2.5%添加した高脂肪食を摂食させた。Inulin 群：朝食と夕食の両方にイヌリンを 2.5%添加した高脂肪食を摂食させた。マウスを各条件下で 10 日間飼育し、その後 10~11 日目に ZT20 (朝食摂食から 4 時間後) または ZT4 (夕食摂食から 4 時間後) でサンプリングを行った (Fig.2.2)。

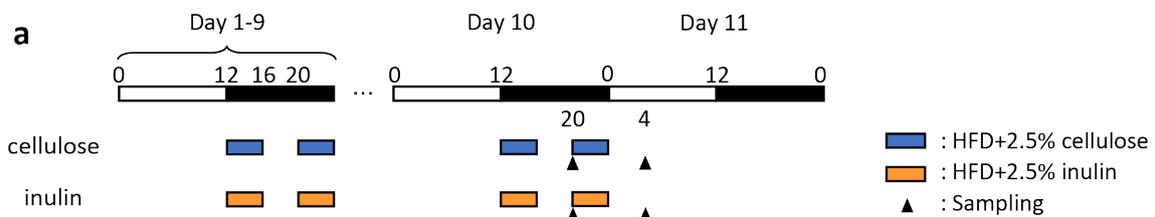


Fig.2.2 実験 1：実験スケジュール

白と黒のバーは明期：暗期=12h：12h の明暗条件を表している。青色のバーは高脂肪食に 5%の Cellulose を添加した餌を表し、オレンジ色のバーは高脂肪食に 5%の Inulin を添加した餌を表す。黒の矢尻はサンプリング時間を表す。

サンプリング前の体重は 2 群間で有意差はなく (Fig.2.3a)、摂食量にも 2 群間に大きな差はなかった (Fig.2.3b)。

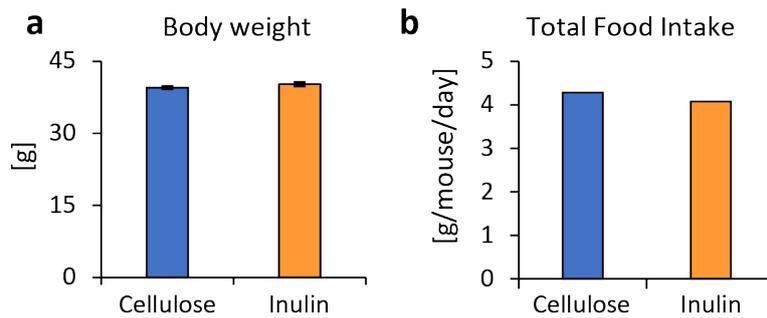


Fig.2.3 実験1：体重と摂食量

(a) サンプルング前の体重。(Cellulose 群 (n=10); Inulin 群 (n=10))。 (b) 1 匹あたりの 1 日平均の摂食量。データは平均値±標準誤差で表す (b)は群飼いのため標準誤差がついていない)。

盲腸内 pH は、ZT20 と ZT4 の両方で、Cellulose 群よりも Inulin 群において有意に低かった (Fig.2.4a)。プロピオン酸は ZT4 において Cellulose 群よりも Inulin 群で有意に増加し (Fig.2.4c)、乳酸は ZT20 において Cellulose 群よりも Inulin 群で有意に増加し、ZT4 においては Cellulose 群よりも Inulin 群で増加傾向が見られた (Fig.2.4d)。また、Cellulose 群においては ZT20 と ZT4 の間で乳酸量が有意に異なっていた (Fig.2.4d)。酢酸、酪酸、総 SCFA 量には有意差は見られなかった (Fig.2.4b, e, f)。

以上より、盲腸内 pH の低下、プロピオン酸と乳酸の増加が見られたことから、イヌリン摂食によって腸内環境が良好になったことが考えられた。

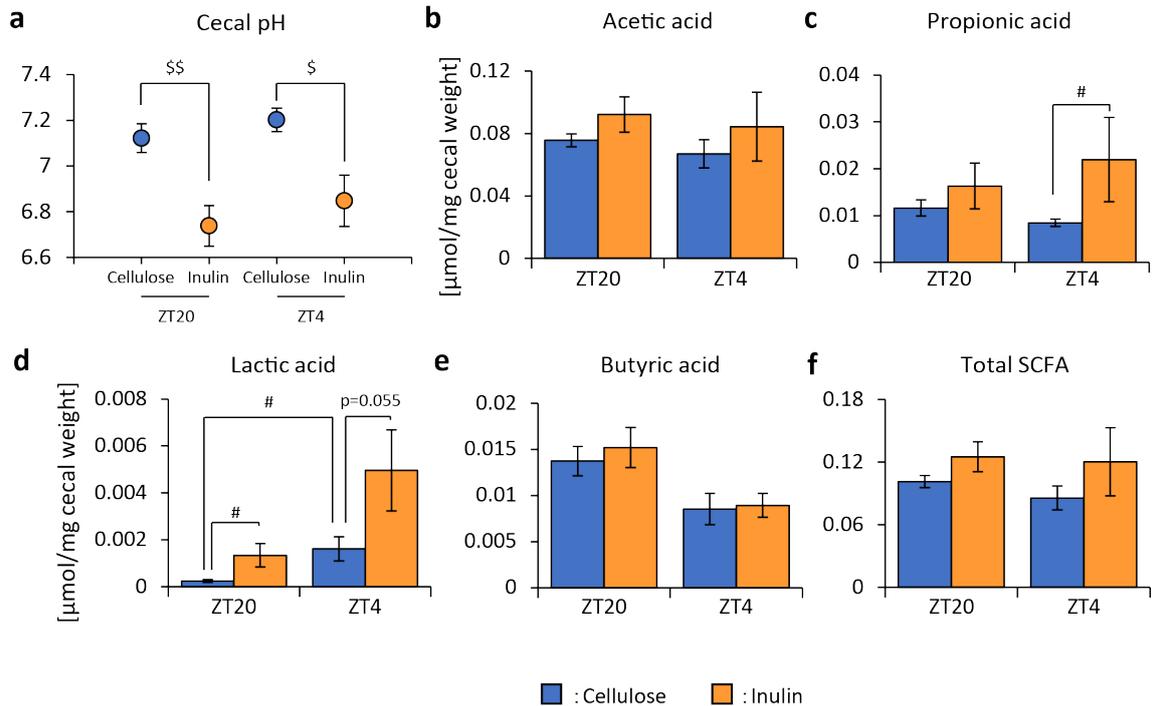


Fig.2.4 実験1：盲腸内 pH と SCFA

(a) 10日間飼育後の盲腸内 pH。(b-f) 盲腸内の SCFA 産生量。(b) 酢酸。(c) プロピオン酸。(d) 乳酸。(e) 酪酸。(f) 総 SCFA 量。データは平均値±標準誤差で表す。データの n 数 (Cellulose 群 ZT20 (n=5), ZT4 (n=5); Inulin 群 ZT20 (n=5), ZT4 (n=5))。\$\$  $p < 0.01$ , \$  $p < 0.05$ , Two-way ANOVA with Sidak's post-hoc test を使用。#  $p < 0.05$ , Mann-Whitney test with a two-stage linear step-up procedure of the Benjamini, Krieger, and Yekutieli test を使用。

プロピオン酸と乳酸が増加し、盲腸内 pH が低下していたので、イヌリン摂食によって腸内細菌叢の構成が変化した可能性が考えられた。そこで、マウスの糞便から 16S rRNA を抽出し、腸内細菌叢の多様性を分析した。Simpson Index は Cellulose 群において ZT20 よりも ZT4 で有意に高かった (Fig.2.5)。また、Simpson Index は ZT20 において Cellulose 群よりも Inulin 群で有意に高かったが、ZT4 において有意差は見られなかった (Fig.2.5)。

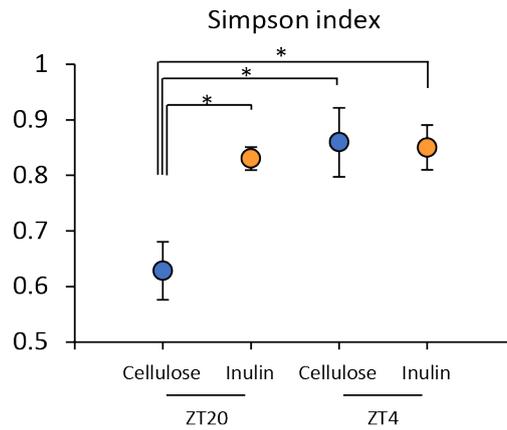


Fig.2.5 実験1：腸内細菌叢の $\alpha$ 多様性

Simpson index で示した腸内細菌叢の $\alpha$ 多様性。データは平均値 $\pm$ 標準誤差で表す。データのn数 (Cellulose 群 ZT20 (n=5), ZT4 (n=4); Inulin 群 ZT20 (n=5), ZT4 (n=5))。\* p<0.05, Two-way ANOVA with Tukey's post-hoc test を使用。

次に各群の腸内細菌叢の構成を比較するために、Weighted UniFrac 距離による PCoA 分析を行い、腸内細菌叢の構成の $\beta$ 多様性を測定した (Fig.2.6a)。本研究では、イヌリンが腸内細菌叢の構成に与える影響に着目するため、セルロースとイヌリンの比較を主に行った (Fig.2.6b, c)。腸内細菌叢の構成は ZT20 において Cellulose 群と Inulin 群の間で有意に異なっていたが (Fig.2.6b)、ZT4 では有意な差は見られなかった (Fig.2.6c)。

以上より、イヌリン摂食により腸内細菌叢の構成が変化するが、特に、朝食摂食4時間後において有意に構成が変化することが示唆された。

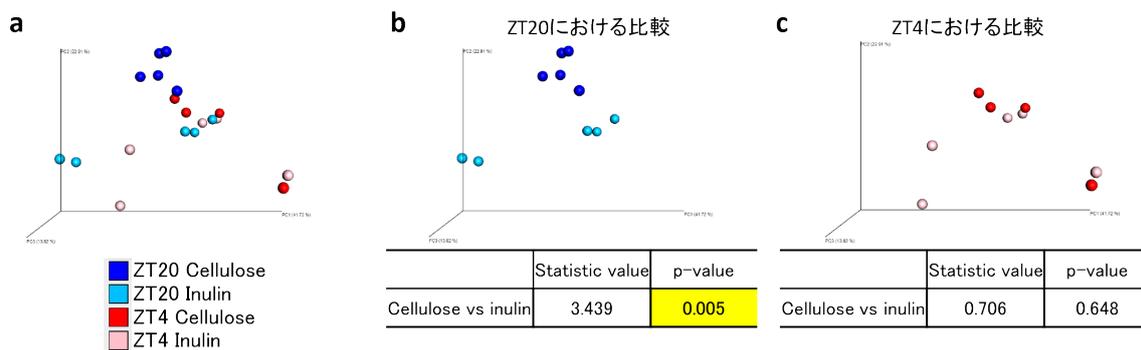


Fig.2.6 実験1：腸内細菌叢の $\beta$ 多様性

(a) 全サンプルの $\beta$ 多様性。(b) 朝食摂食4時間後(ZT20)におけるセルロースとイヌリンの構成比較。(c) 夕食摂食4時間後(ZT4)におけるセルロースとイヌリンの構成比較。データのn数(Cellulose群 ZT20(n=5), ZT4(n=4); Inulin群 ZT20(n=5), ZT4(n=5))。PERMANOVAの結果を図中の表に示す。

イヌリン摂食により腸内細菌叢の構成が変化し、特に、朝食摂食4時間後において有意な構成変化が見られた。そこで、具体的にどの細菌が変化しているのかを調べるために、Cellulose群とInulin群における腸内細菌の相対存在量を調べた。実験1で検出された各群の細菌叢の全体像を門レベル(Fig.2.7a)と属レベル(Fig.2.7b)についてそれぞれ積み上げグラフで示す。本実験で特に着目する細菌を赤枠で示し、その詳細結果をFig.2.8に示す。

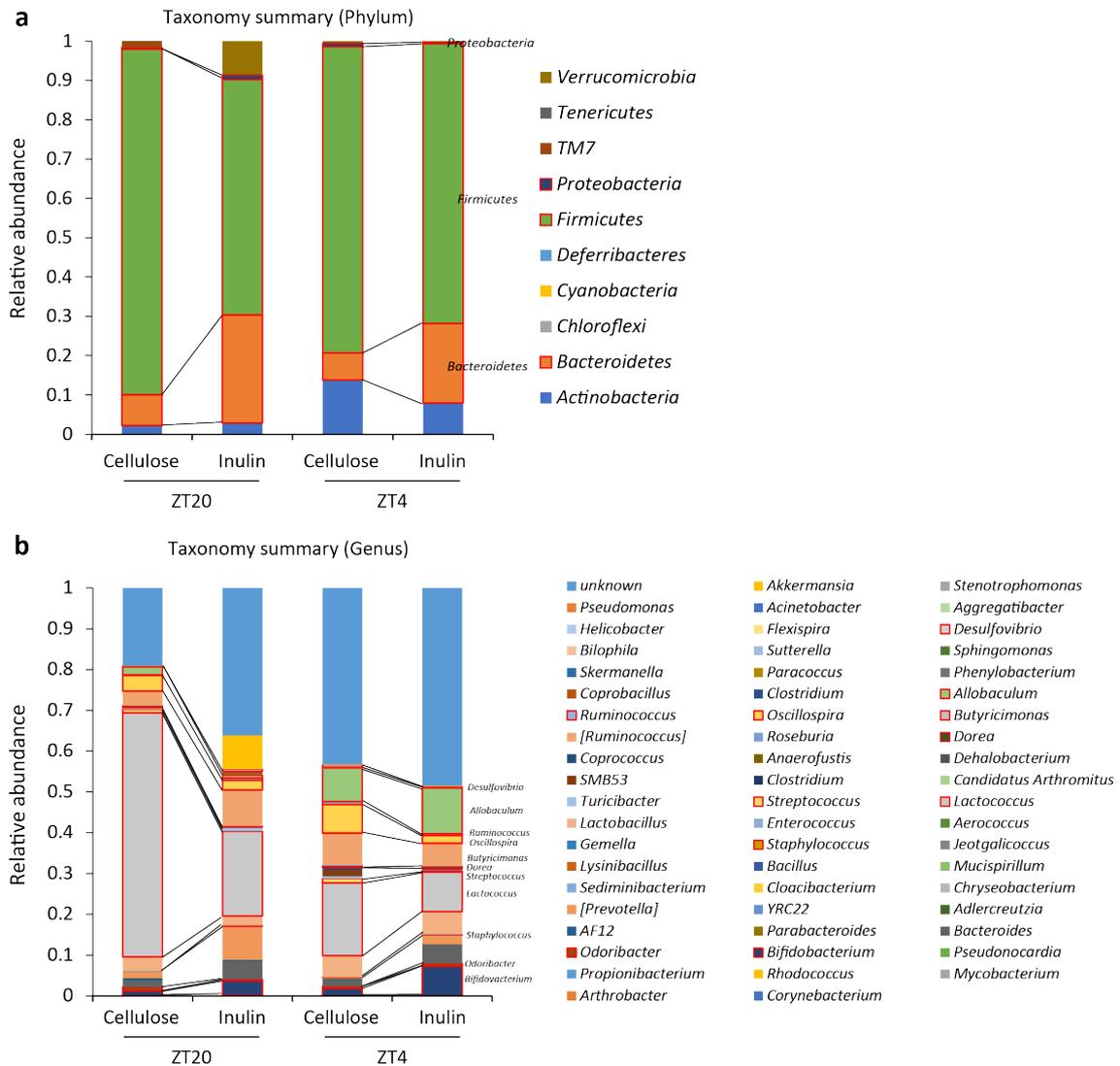


Fig.2.7 実験1：腸内細菌叢の相対存在量（全体像）

(a) 門レベル。(b) 属レベル。データは平均値で表す。データのn数 (Cellulose群 ZT20 (n=5), ZT4 (n=4); Inulin群 ZT20 (n=5), ZT4 (n=5))。

門レベルでは、*Firmicutes* の相対存在量が ZT20 において Cellulose 群よりも Inulin 群の方が有意に減少した (Fig.2.8c)。しかし、*Bacteroidetes* と *Proteobacteria* の相対存在量は Cellulose 群と Inulin 群の間に有意な差は見られなかった (Fig.2.8a, b)。属レベルでは、*Lactococcus* と *Streptococcus* の相対存在量が ZT20 において Inulin 群で有意に減少し (Fig.2.8g, k)、*Oscillospira* の相対存在量が ZT4 において Inulin 群で有意に減少した (Fig.2.8h)。

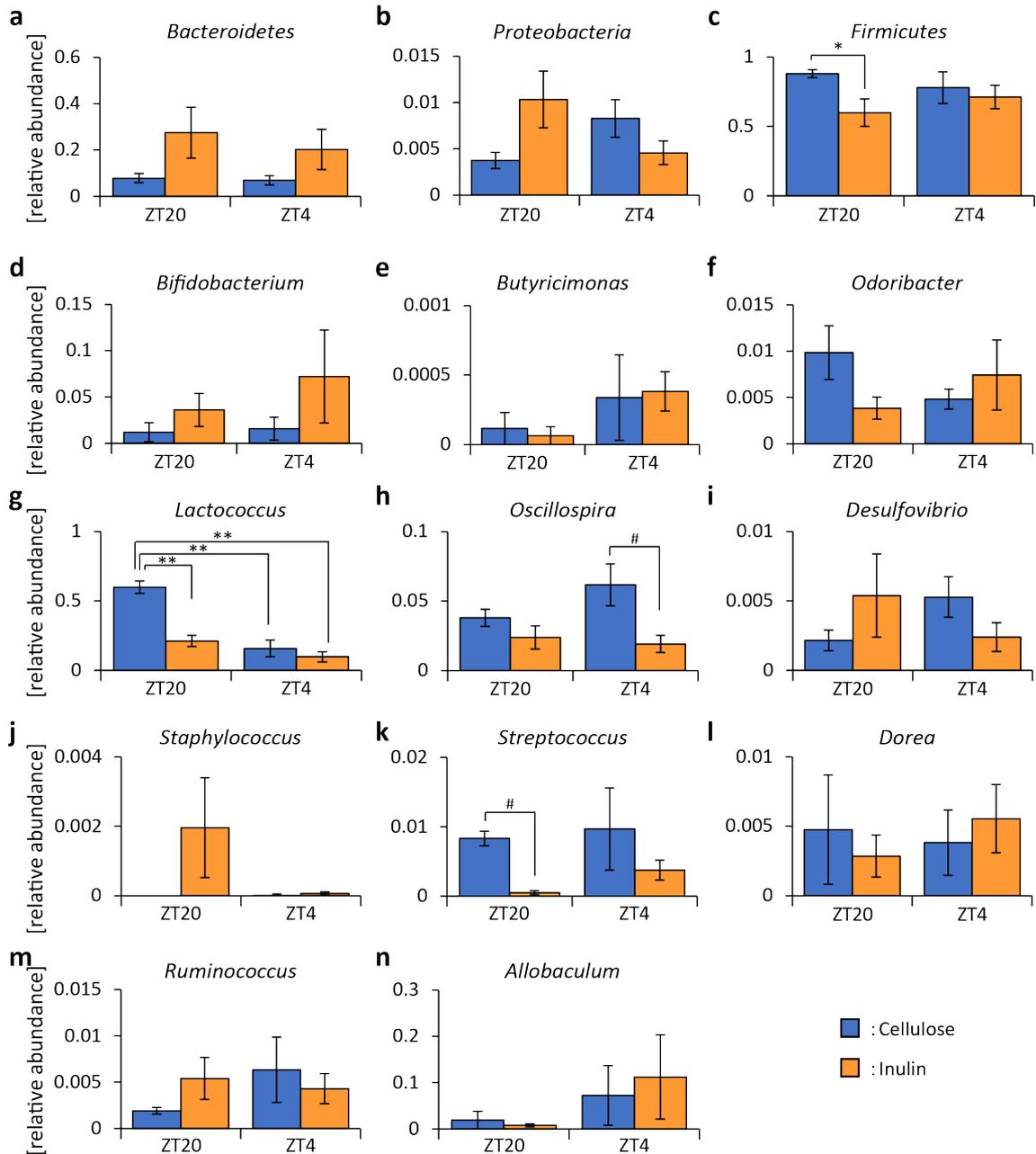


Fig.2.8 実験1：腸内細菌の相対存在量（詳細）

(a-c) 門レベルにおける相対存在量 ((a): *Bacteroidetes*, (b): *Proteobacteria*, (c): *Firmicutes*)。 (d-n) 属レベルにおける相対存在量 ((d): *Bifidobacterium*, (e): *Butyricimonas*, (f): *Odoribacter*; (g): *Lactococcus*, (h): *Oscillospira*, (i): *Desulfovibrio*, (j): *Staphylococcus*, (k): *Streptococcus*, (l): *Dorea*, (m): *Ruminococcus*, (n): *Allobaculum*)。データは平均値±標準誤差で表す。データのn数 (Cellulose 群 ZT20 (n=5), ZT4 (n=4); Inulin 群 ZT20 (n=5), ZT4 (n=5))。 \*\* p<0.01, \* p<0.05, Two-way ANOVA with Tukey's post-hoc test を使用。 # p<0.05, Mann-Whitney test with a two-stage linear step-up procedure of the Benjamini, Krieger, and Yekutieli test を使用。

これらの結果から、イヌリンを添加した高脂肪食を摂食すると腸内細菌叢の構成が変化すると考えられた。さらに、腸内細菌叢の変化は ZT4 (夕) よりも ZT20 (朝) で顕著であり、時間帯によってイヌリン摂食の影響が異なることから、イヌリンの摂食タイミングが腸内細菌叢に異なる影響を与える可能性が考えられた。

### 2.3.2 実験 2：時間制限給餌条件下におけるイヌリンの摂食タイミングが腸内細菌叢の構成に与える影響

実験 1 の結果より、イヌリンは摂食時間に応じて腸内細菌叢に異なる影響を与えた可能性が示唆された。特に、ZT20 (朝食摂食から 4 時間後) において、イヌリン摂食の効果が増加した可能性が考えられた。しかし、実験 1 では、摂食パターンの影響を考慮していなかったため、次の実験では、1 日 2 回の摂食条件下で、朝食または夕食のみのイヌリン摂食が腸内細菌叢にどのように影響するかを調べた。ここではマウスを以下の 3 群に分けた (Fig.2.9)。Cellulose 群：朝食と夕食の両方にセルロースを 5% 添加した高脂肪食を与えた。Morning inulin 群：朝食にイヌリンを 5% 添加した高脂肪食を与え、夕食にセルロースを 5% 添加した高脂肪食を与えた。Evening inulin 群：夕食にイヌリンを 5% 添加した高脂肪食を与え、朝食にセルロースを 5% 添加した高脂肪食を与えた。マウスを各条件下で 10 日間飼育し、その後 10~11 日目に朝食摂食 4 時間後の ZT20 および夕食摂食 4 時間後の ZT4 でサンプリングを行った (Fig.2.9)。

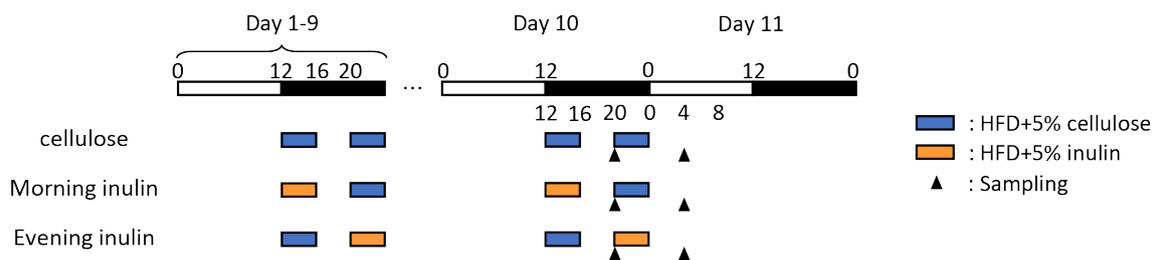


Fig.2.9 実験2：実験スケジュール

白と黒のバーは明期：暗期=12h：12hの明暗条件を表している。青色のバーは高脂肪食に5%のCelluloseを添加した餌を表し、オレンジ色のバーは高脂肪食に5%のイヌリンを添加した餌を表す。黒の矢尻はサンプリング時間を表す。

サンプリング前の体重は群間で統計的な有意差はなく (Fig.2.10a)、総摂食量にもグループ間にも大きな差はなかった。しかし、イヌリン摂取量については Morning inulin 群の方が Evening inulin 群よりもわずかに多かった (Fig.2.10b)。

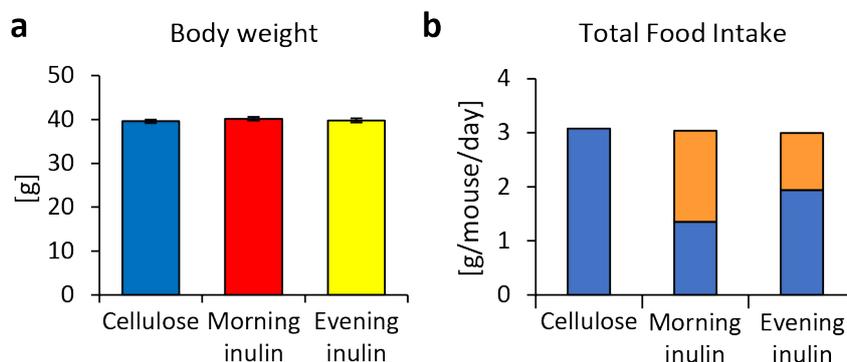


Fig.2.10 実験2：体重と摂食量

- (a) サンプリング前の体重。(Cellulose 群 (n=10); Morning Inulin 群 (n=10); Evening Inulin 群 (n=10)).  
 (b) 1匹あたりの1日平均の摂食量。青色のバーはセルロースの摂食量を表し、オレンジ色のバーはイヌリンの摂食量を表す。データは平均値±標準誤差で表す ((b)は群飼いのため標準誤差がついていない)。

盲腸内 pH は、ZT20 において Morning inulin 群が他の2群よりも有意に低く、ZT4 において Evening inulin 群が他の2群よりも有意に低かった (Fig.2.11a)。酢酸、プロピオン酸、乳酸、酪酸、および総 SCFA 量は、ZT20 において Morning inulin 群が Cellulose 群と Evening inulin 群よ

りも有意に増加していた (Fig.2.11b-f)。一方、ZT4 においては乳酸を除いて Evening inulin 群が Cellulose 群よりも有意に増加していた。(Fig.2.11b-f)。

以上より、Morning inulin 群および Evening inulin 群のいずれにおいても、イヌリン摂食 4 時間後に盲腸内 pH の低下、SCFA の増加が見られたことから、朝食でも夕食でもイヌリン摂食によって腸内環境が良好になったことが考えられた。特に乳酸産生量は Morning inulin 群のみで有意差がついたことから (Fig.2.11d)、朝食のイヌリン摂食が腸内環境をより良好にすることが考えられた。

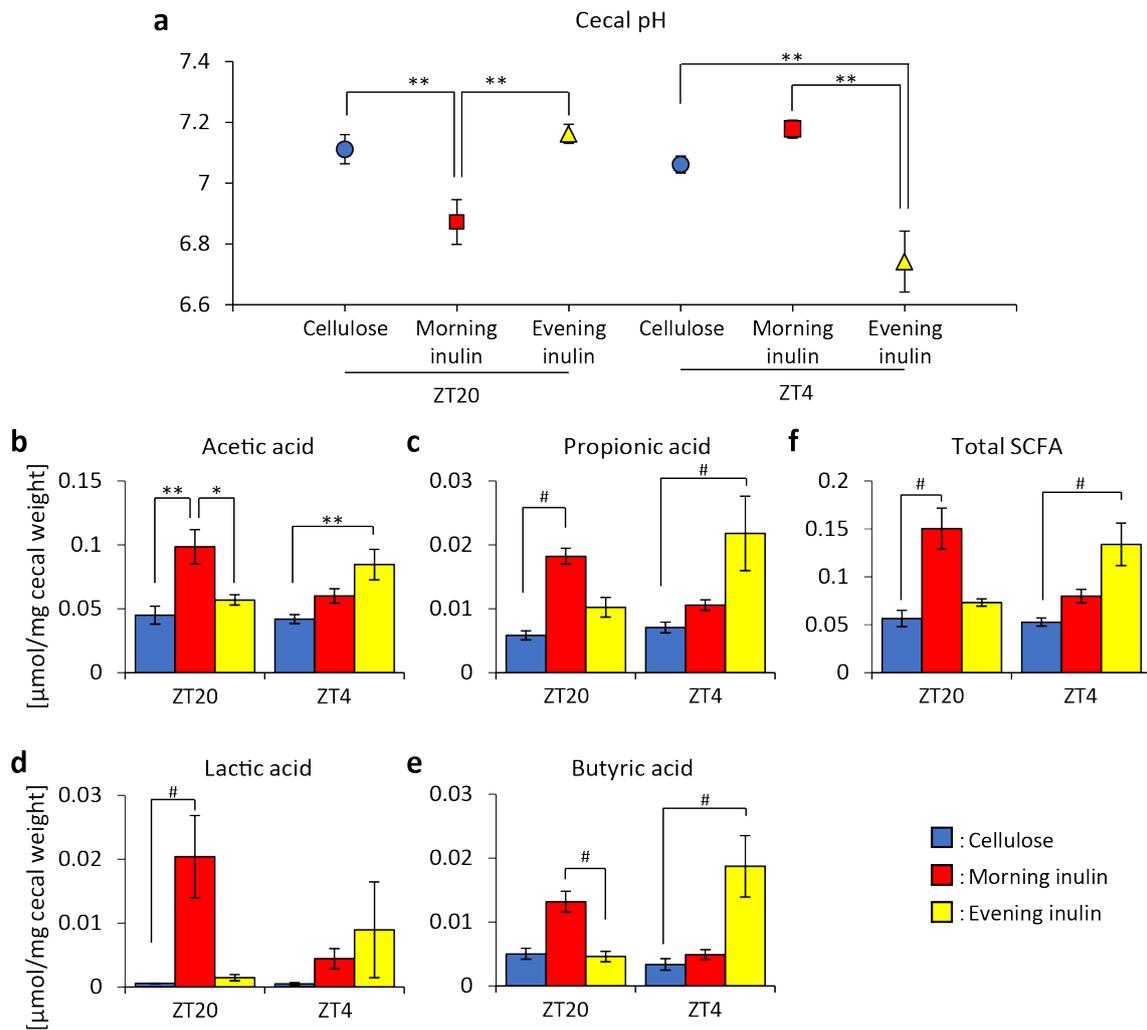


Fig.2.11 実験2：盲腸内 pH と SCFA

(a) 10 日間飼育後の盲腸 pH。(b-f) 盲腸内の SCFA 産生量。(b) 酢酸。(c) プロピオン酸。(d) 乳酸。(e) 酪酸。(f) 総 SCFA 量。データは平均値±標準誤差で表す。データの n 数 (Cellulose 群 ZT20 (n=5), ZT4 (n=5); Morning inulin 群 ZT20 (n=5), ZT4 (n=5); Evening inulin 群 ZT20 (n=5), ZT4 (n=5))。\*\* p<0.01, \* p<0.05, Two-way ANOVA with Tukey's post-hoc test を使用。# p<0.05, Kruskal-Wallis test with Dunn post hoc test with a two-stage linear step-up procedure of the Benjamini, Krieger, and Yekutieli test を使用。

次に、マウスの糞便から 16S rRNA を抽出し、腸内細菌叢の多様性を分析した。Simpson Index は、ZT20 と ZT4 の両方で、Morning inulin 群の方が Cellulose 群よりも有意に高かった (Fig.2.12)。

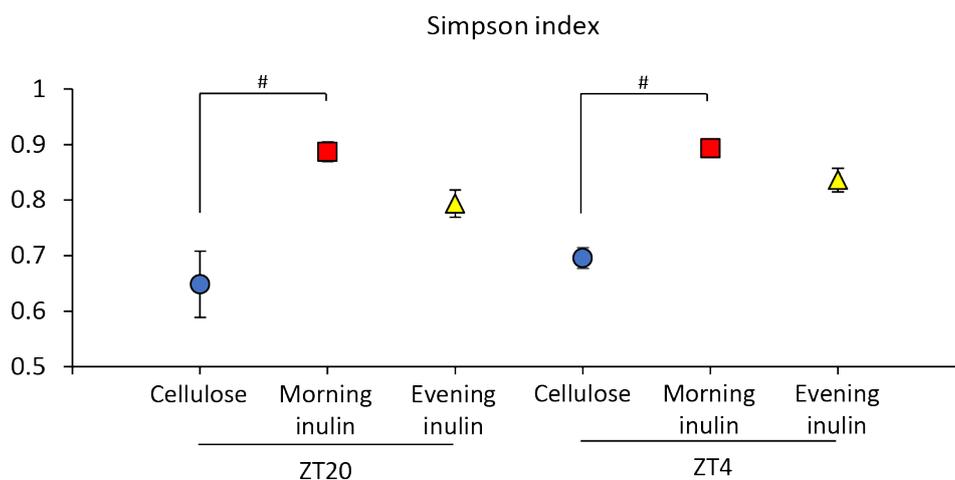


Fig.2.12 実験2：腸内細菌叢の $\alpha$ 多様性

Simpson index で示した腸内細菌叢の $\alpha$ 多様性。データは平均値 $\pm$ 標準誤差で表す。データのn数 (Cellulose 群 ZT20 (n=5), ZT4 (n=5); Morning inulin 群 ZT20 (n=5), ZT4 (n=5); Evening inulin 群 ZT20 (n=5), ZT4 (n=5))。# $p < 0.05$ , Kruskal-Wallis test with Dunn post hoc test with a two-stage linear step-up procedure of the Benjamini, Krieger, and Yekutieli test を使用。

次に各群の腸内細菌叢の構成を比較するために、Weighted UniFrac 距離による PCoA 分析を行い、腸内細菌叢の構成の $\beta$ 多様性を測定した (Fig.2.13a)。腸内細菌叢の構成は、朝食摂食4時間後の ZT20 において Cellulose 群と Morning inulin 群の間で有意に異なり (Fig.2.13b)、また、Morning inulin 群と Evening inulin 群の間で有意に異なっていた (Fig.2.13d)。一方、夕食摂食4時間後の ZT4 ではすべての群間で有意に異なっていた (Fig.2.13e-g)。

以上より、朝食摂食4時間後の ZT20 において、Morning inulin 群のみで有意な細菌叢の構成変化が見られたこと (Fig.2.13b)、夕食摂食4時間後の ZT4 において、Morning inulin 群は夕食にイヌリンを摂食していないにもかかわらず (Fig.2.9)、有意な細菌叢の構成変化が見られたことから (Fig.2.13e)、朝食のイヌリン摂食の方が夕食のイヌリン摂食よりも、腸内細菌叢の構成を大きく変化させることが示された。

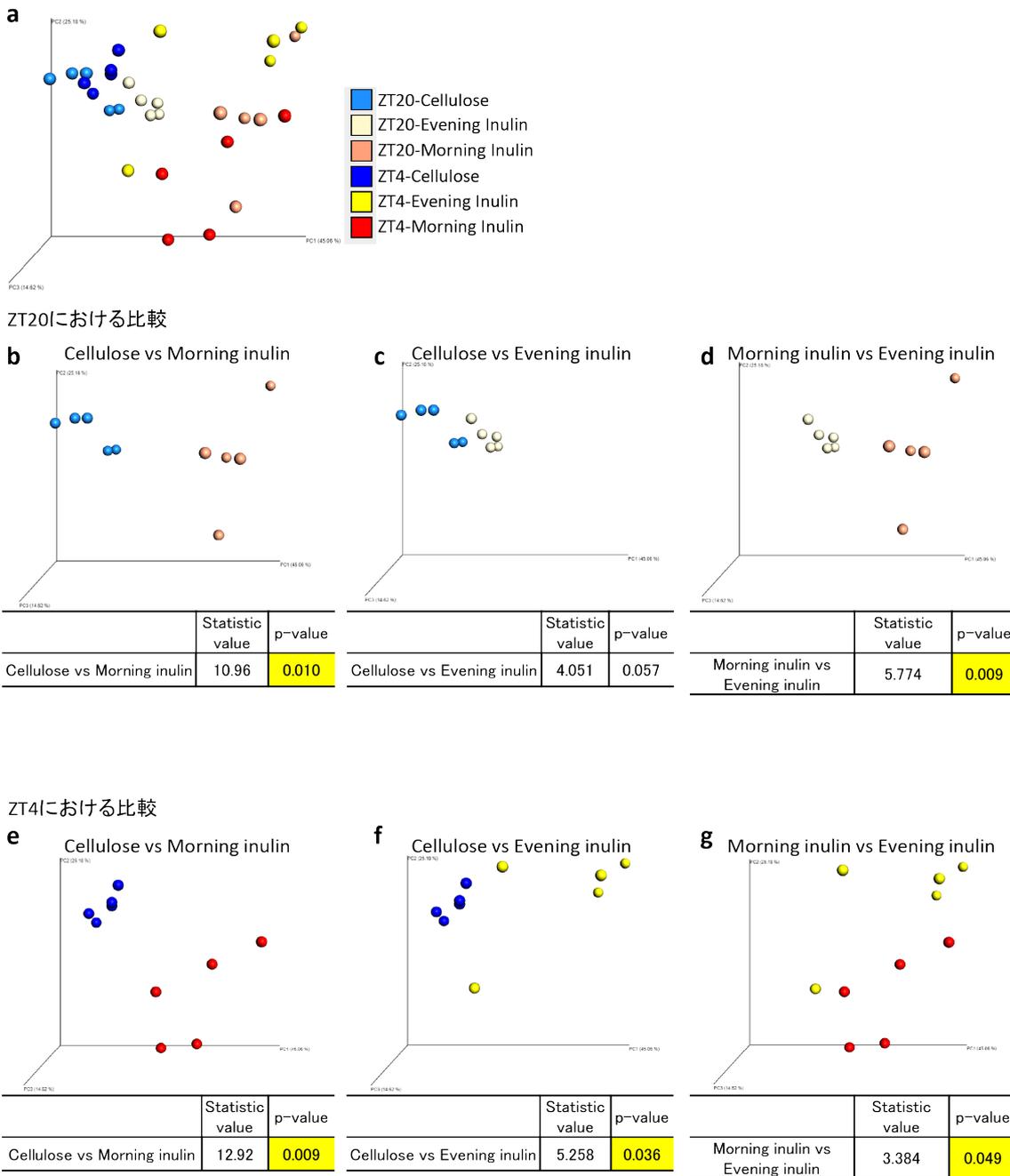


Fig.2.13 実験2：腸内細菌叢の $\beta$ 多様性

(a) 全サンプルの $\beta$ 多様性。(b-d) 朝食摂食4時間後 (ZT20) における各群間の構成比較。(e-g) 夕食摂食4時間後 (ZT4) における各群間の構成比較。データのn数 (Cellulose群 ZT20 (n=5), ZT4 (n=5); Morning inulin群 ZT20 (n=5), ZT4 (n=5); Evening inulin群 ZT20 (n=5), ZT4 (n=5))。

PERMANOVAの結果を図中の表に示す。

朝食のイヌリン摂食により腸内細菌叢の構成が大きく変化したことが考えられた。そこで、具体的にどの細菌が変化しているのかを調べるために、各群における腸内細菌の相対存在量を調べた。実験2で検出された各群の細菌叢の全体像を門レベル(Fig.2.14a)と属レベル(Fig.2.14b)についてそれぞれ積み上げグラフで示す。本実験で特に着目する細菌を赤枠で示し、その詳細結果を Fig.2.15 に示す。

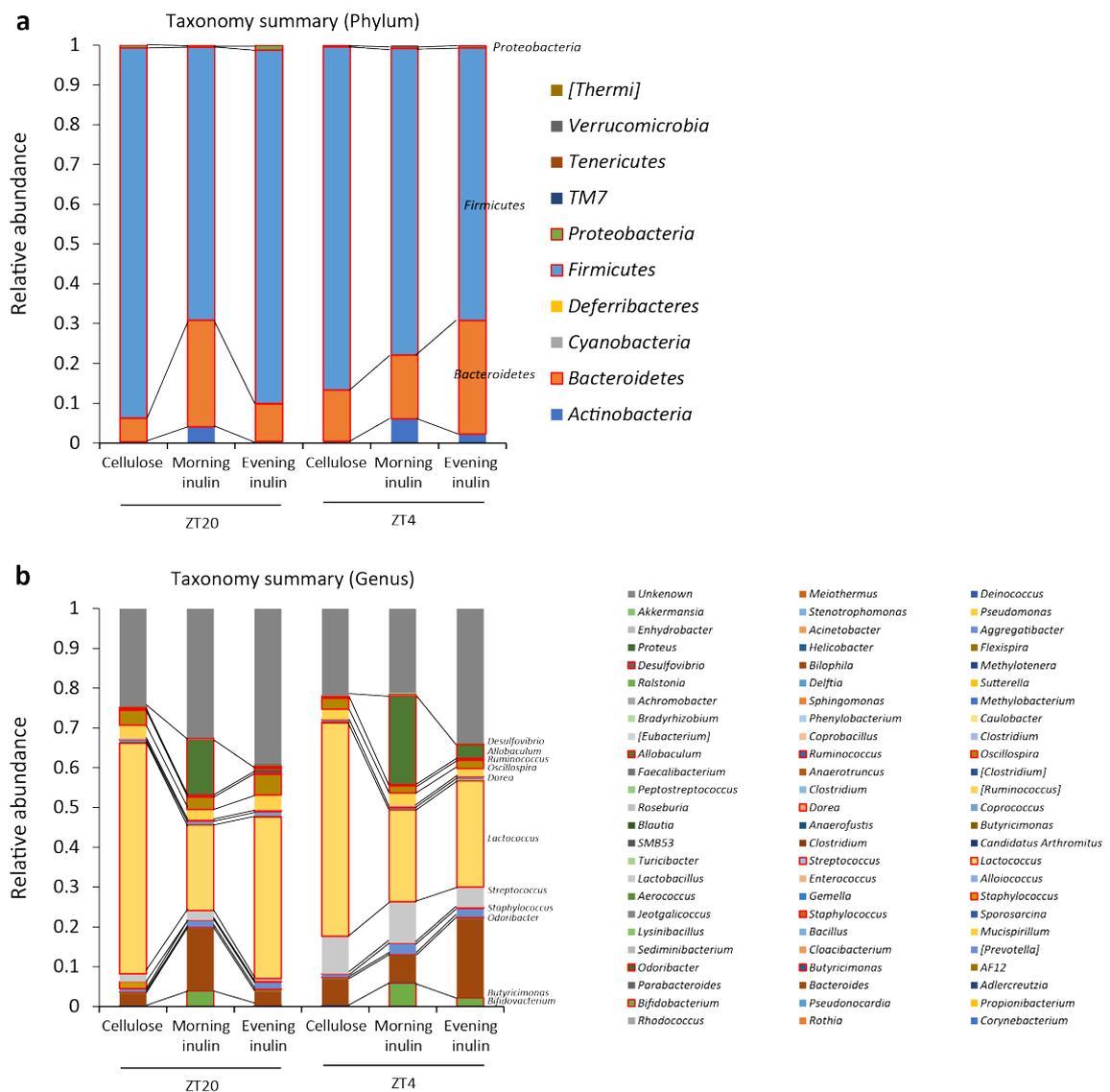


Fig.2.14 実験2：腸内細菌叢の相対存在量（全体像）

(a) 門レベル。(b) 属レベル。データは平均値で表す。データのn数 (Cellulose群 ZT20 (n=5), ZT4 (n=5); Morning inulin群 ZT20 (n=5), ZT4 (n=5); Evening inulin群 ZT20 (n=5), ZT4 (n=5))。

門レベルでは、*Bacteroidetes* の相対存在量が ZT20 において Morning inulin 群の方が Cellulose 群よりも有意に増加した (Fig.2.15a)。一方、*Firmicutes* の相対存在量が ZT20 において Morning inulin 群の方が Cellulose 群と Evening inulin 群よりも有意に減少し、ZT4 において Evening inulin 群の方が Cellulose 群よりも有意に減少した (Fig.2.15c)。属レベルでは、*Lactococcus* の相対存在量が、ZT20 と ZT4 の両方において Morning inulin 群で有意に減少し、ZT4 において Evening inulin 群で有意に減少した (Fig.2.15g)。また、*Staphylococcus* の相対存在量は Morning inulin 群において減少する傾向を示した (Fig.2.15j)。一方、*Dorea* と *Allobaculum* の相対存在量は Morning inulin 群において有意に増加した (Fig.2.15l, n)。

以上の相対存在量の結果をみると、Cellulose 群と比較して Morning inulin 群では多くの腸内細菌の相対存在量が有意に変化している (Fig.2.15a, c, g, j, l, n)。つまり、朝食のイヌリン摂食の方がより多くの腸内細菌の相対存在量を変化させ、腸内細菌叢の構成に大きく変化させると考えられる。

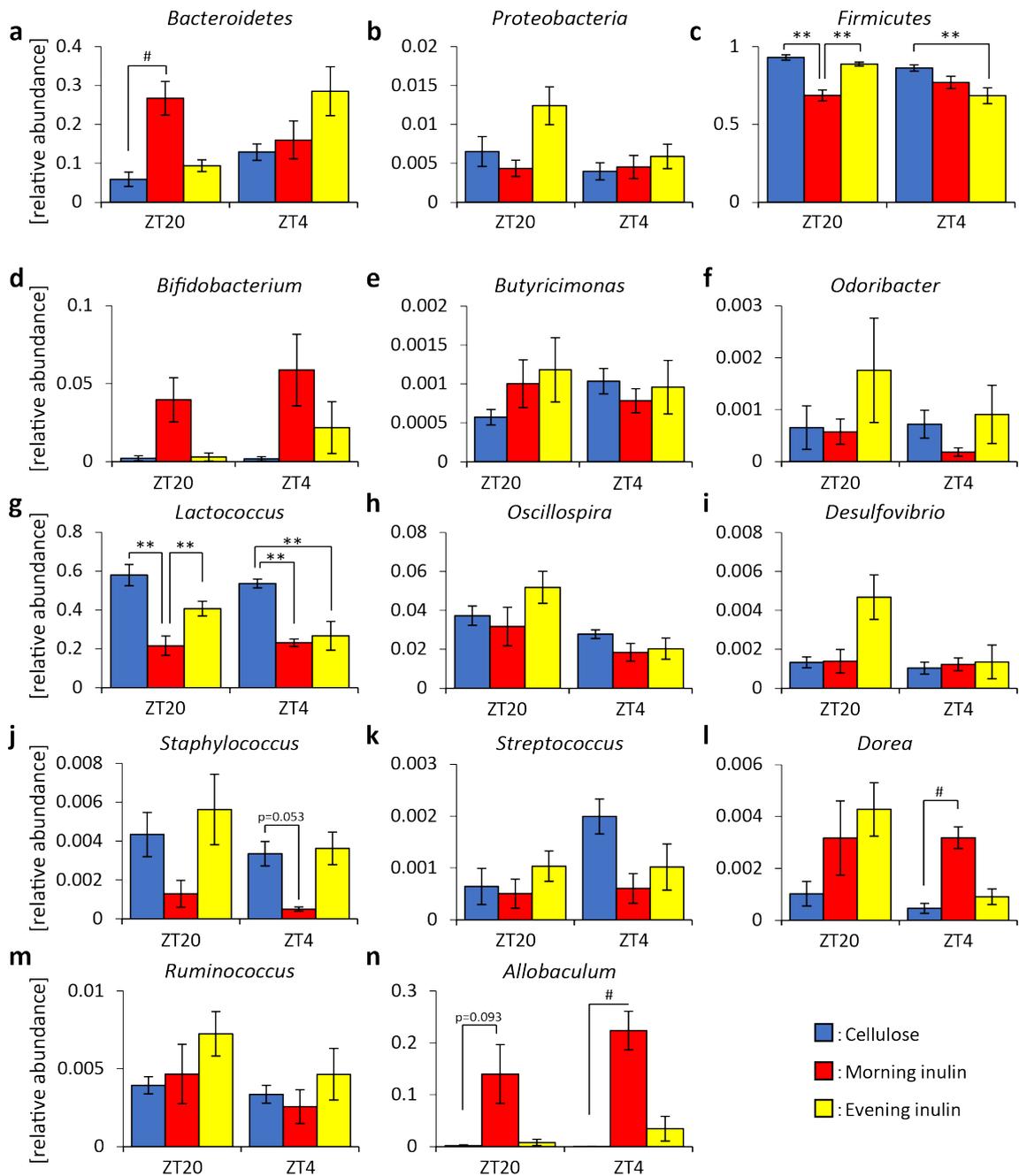


Fig.2.15 実験2：腸内細菌の相対存在量（詳細）

(a-c) 門レベルにおける相対存在量 ((a): *Bacteroidetes*, (b): *Proteobacteria*, (c): *Firmicutes*)。 (d-n) 属レベルにおける相対存在量 ((d): *Bifidobacterium*, (e): *Butyricimonas*, (f): *Odoribacter*; (g): *Lactococcus*, (h): *Oscillospira*, (i): *Desulfovibrio*, (j): *Staphylococcus*, (k): *Streptococcus*, (l): *Dorea*, (m): *Ruminococcus*, (n): *Allobaculum*)。データは平均値±標準誤差で表す。データの n 数 (Cellulose 群 ZT20 (n=5), ZT4 (n=5); Morning inulin 群 ZT20 (n=5), ZT4 (n=5); Evening inulin 群 ZT20 (n=5), ZT4 (n=5))。\*\* p<0.01, Two-way ANOVA with Tukey's post-hoc test を使用。# p<0.05, Kruskal-Wallis test with Dunn post hoc test with a two-stage linear step-up procedure of the Benjamini, Krieger, and Yekutieli test を使用。

これらの盲腸内 pH、SCFA、 $\beta$  多様性、腸内細菌の相対存在量の結果より (Fig.2.11, Fig.2.13, Fig.2.15)、イヌリンを夕食に摂食するよりも朝食に摂食したほうが腸内細菌叢に大きく影響したことが考えられた。しかしながら、イヌリンの摂食量を比較すると、朝食の摂食量がわずかに高かった (Fig.2.10b)。つまり、朝食にイヌリンを多く摂食したため、腸内細菌叢に大きく影響した可能性が考えられた。そこで、摂食量の違いによる影響を除くために、次の実験では 1 日 2 回等量を給餌する装置を用いて実験した。

### 2.3.3 実験 3 : 摂食量制限給餌条件下におけるイヌリンの摂食タイミングが腸内細菌叢の構成に与える影響

この実験では、1 日 2 回、ZT12 (朝食) と ZT20 (夕食) にそれぞれ 1.8 g の餌を与えることによる朝・夕の給餌量制限の実験を行った。マウスを以下の 3 群に分けた (Fig.2.16)。Cellulose 群 : 朝食と夕食にセルロースを 5% 添加した高脂肪食を 1.8 g 与えた。Morning inulin 群 : 朝食にイヌリンを 5% 添加した高脂肪食を 1.8 g 与え、夕食にセルロースを 5% 添加した高脂肪食を 1.8 g 与えた。Evening inulin 群 : 夕食にイヌリンを 5% 添加した高脂肪食を 1.8 g 与え、朝食にセルロースを 5% 添加した高脂肪食を 1.8 g 与えた。マウスを各摂食条件下で 14 日間飼育し、その後 14~15 日目の ZT20 および ZT4 にサンプリングを行った (Fig.2.16)。

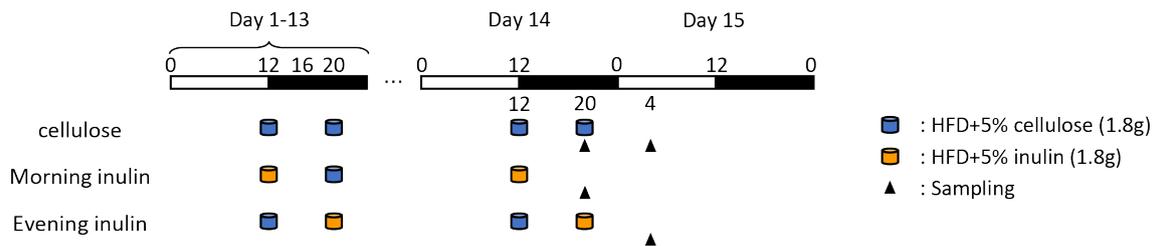


Fig.2.16 実験3：実験スケジュール

白と黒のバーは明期：暗期=12h：12hの明暗条件を表している。青色の円柱は高脂肪食に5%のCelluloseを添加した1.8gの餌を表し、オレンジ色の円柱は高脂肪食に5%のイヌリンを添加した1.8gの餌を表す。黒の矢尻はサンプリング時間を表す。

サンプリング前の体重について群間で有意な差はなかった (Fig.2.17)。

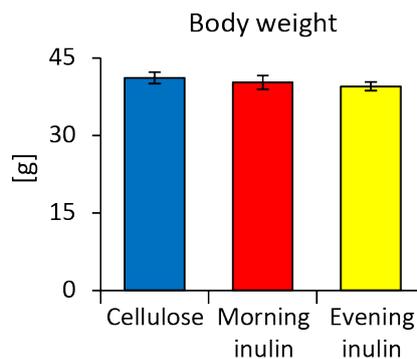


Fig.2.17 実験3：体重

サンプリング前の体重。データは平均値±標準誤差で表す。データのn数 (Cellulose群 (n=8); Morning inulin群 (n=5); Evening inulin群(n=5))。

盲腸内pHは、朝食後 (ZT20) と夕食後 (ZT4) のCellulose群よりもMorning inulin群およびEvening inulin群で有意に低く、さらに、Evening inulin群よりもMorning inulin群で有意に低かった (Fig.2.18a)。プロピオン酸、乳酸、酪酸、および総SCFA量は、ZT20のCellulose群よりもMorning inulin群で有意に増加した (Fig.2.18c-f)。一方、プロピオン酸のみZT4のCellulose群よりもEvening inulin群で有意に増加した (Fig.2.18c)。

以上より、Morning inulin群においてもEvening inulin群においても、Cellulose群と比較して

盲腸内 pH が低下するが、特に Morning inulin 群が Evening inulin 群よりも低下すること (Fig.2.18a)。乳酸、酪酸、総 SCFA 量が Morning inulin 群のみで有意な増加が見られたことから (Fig.2.18d-f)、等食条件下においても、朝食のイヌリン摂食の方が夕食のイヌリン摂食よりも、腸内環境を良好にすることが分かった。

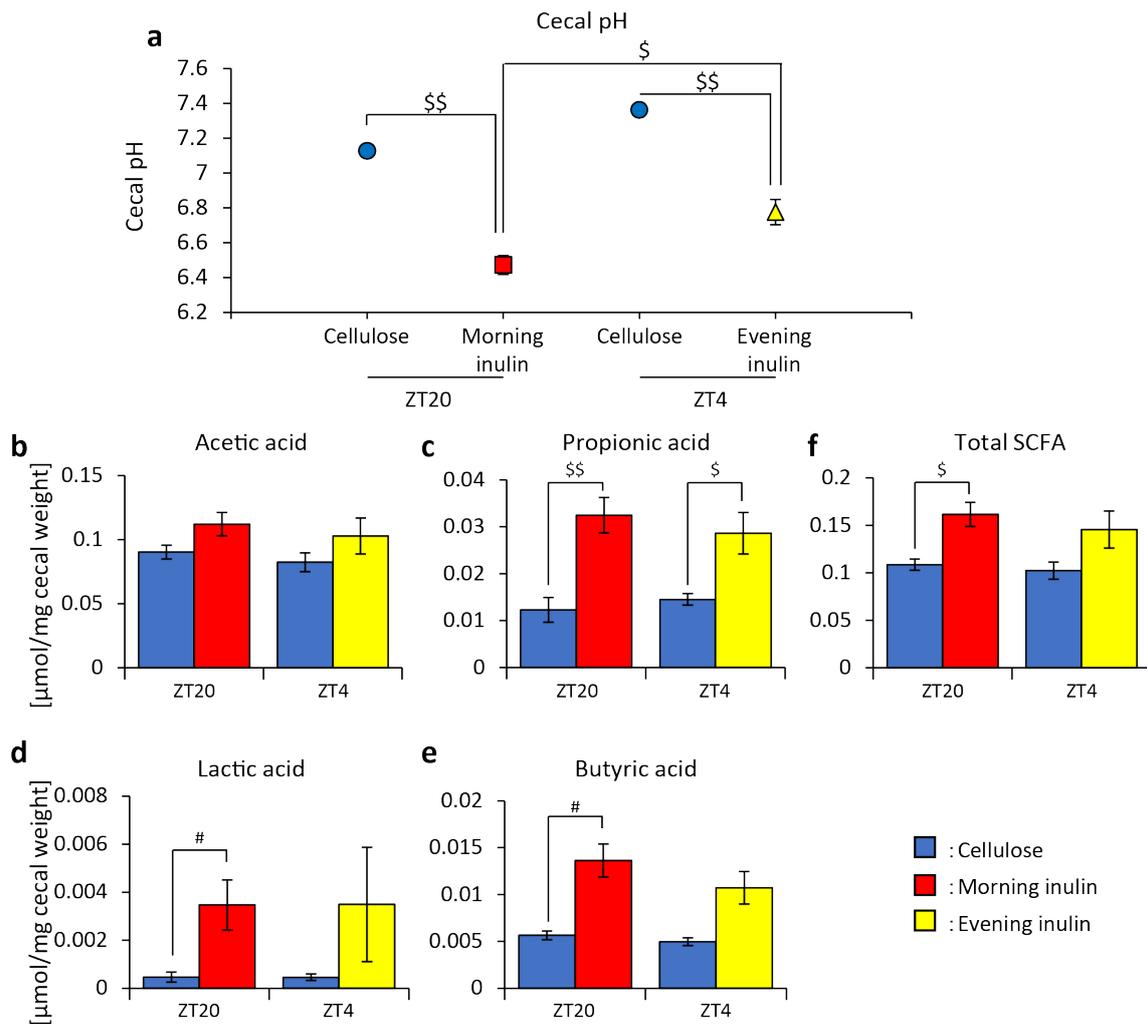


Fig.2.18 実験3：盲腸内 pH と SCFA

(a) 14 日間飼育後の盲腸 pH。(b-f) 盲腸内の SCFA 産生量。(b) 酢酸。(c) プロピオン酸。(d) 乳酸。(e) 酪酸。(f) 総 SCFA 量。データは平均値±標準誤差で表す。データの n 数 (Cellulose 群 ZT20 (n=4), ZT4 (n=4); Morning inulin 群 (n=5); Evening inulin 群 (n=5))。\$\$ p<0.01, \$ p<0.05, Two-way ANOVA with Sidak's post-hoc test を使用。# p<0.05, Mann-Whitney test with a two-stage linear step-up procedure of the Benjamini, Krieger, and Yekutieli test を使用。

次に、マウスの糞便から 16S rRNA を抽出し、腸内細菌叢の多様性を分析した。Simpson Index は、いずれの群間にも有意差はなかった (Fig.2.19)。

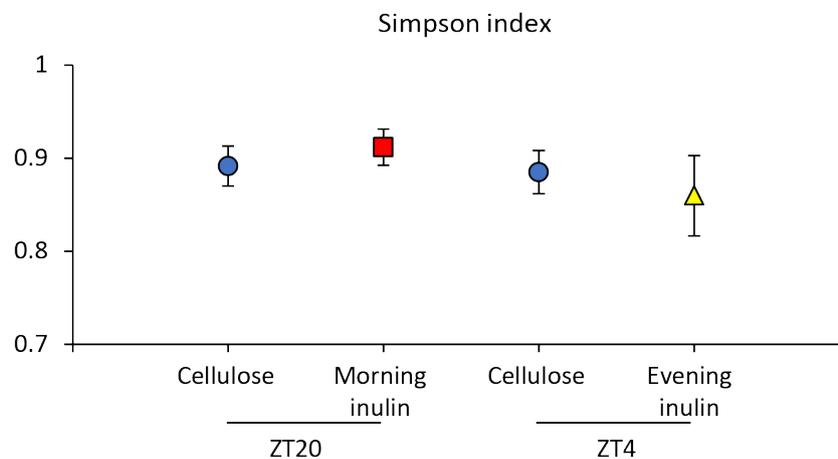


Fig.2.19 実験3：腸内細菌叢の $\alpha$ 多様性

Simpson index で示した腸内細菌叢の $\alpha$ 多様性。データは平均値 $\pm$ 標準誤差で表す。データのn数 (Cellulose 群 ZT20 (n=4), ZT4 (n=4); Morning inulin 群 (n=5); Evening inulin 群 (n=5))。

次に各群の腸内細菌叢の構成を比較するために $\beta$ 多様性を測定した (Fig.2.20a)。腸内細菌叢の構成は Cellulose 群と Morning inulin 群の間で有意に異なっていたが (Fig.2.20b)、Cellulose 群と Evening inulin 群の間には有意差は見られなかった (Fig.2.20c)。

以上より、Cellulose 群と Morning inulin 群のみで有意な細菌叢の構成変化が見られ、Cellulose 群と Evening inulin 群で有意な細菌叢の構成変化が見られなかったことから (Fig.2.20b, c)、等量の食条件下においても、朝食のイヌリン摂食の方が夕食のイヌリン摂食よりも、腸内細菌叢の構成を大きく変化させることが分かった。

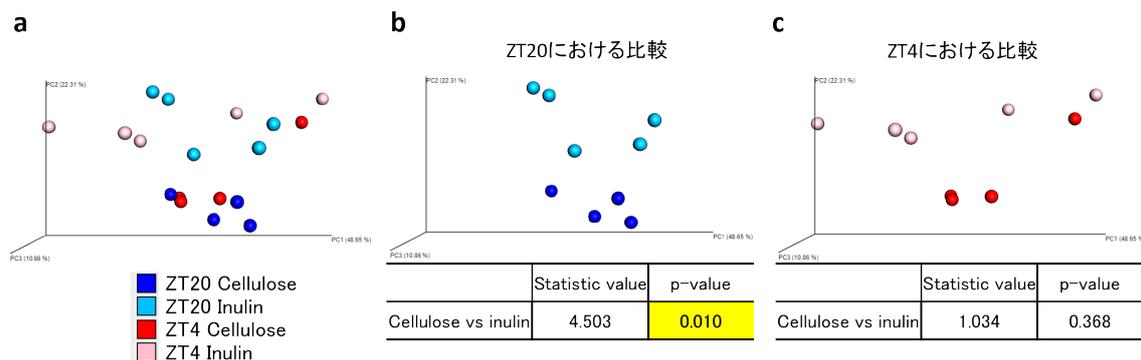


Fig.2.20 実験3：腸内細菌叢のβ多様性

(a) 全サンプルのβ多様性。(b) 朝食摂食開始8時間後(ZT20)におけるセルロースとイヌリンの構成比較。(c) 夕食摂食開始8時間後(ZT4)におけるセルロースとイヌリンの構成比較。データのn数 (Cellulose群 ZT20 (n=4), ZT4 (n=4); Morning inulin群 (n=5); Evening inulin群 (n=5))。

PERMANOVAの結果を図中の表に示す。

等量の食餌条件下においても、朝食のイヌリン摂食により腸内細菌叢の構成が大きく変化したことが分かった。次に、具体的にどの細菌が変化しているのかを調べるために、各群における腸内細菌の相対存在量を調べた。実験3で検出された各群の細菌叢の全体像を門レベル (Fig.2.21a) と属レベル (Fig.2.21b) についてそれぞれ積み上げグラフで示す。本実験で特に着目する細菌を赤枠で示し、その詳細結果を Fig.2.22 に示す。

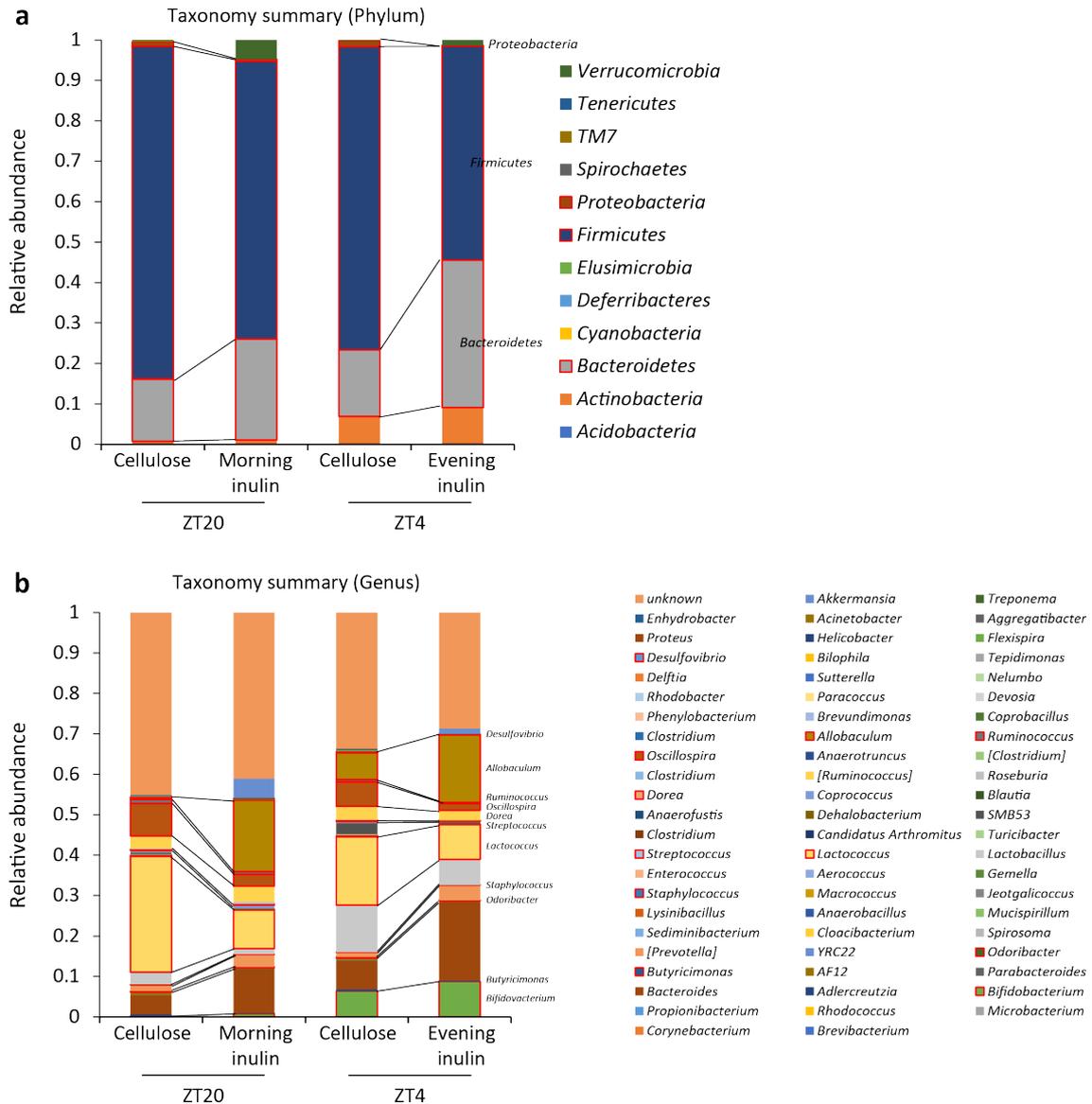


Fig.2.21 実験3：腸内細菌叢の相対存在量（全体像）

(a) 門レベル。(b) 属レベル。データは平均値で表す。データのn数 (Cellulose群 ZT20 (n=4), ZT4 (n=4); Morning inulin群 (n=5); Evening inulin群 (n=5))。

門レベルでは、*Proteobacteria* の相対存在量が ZT4 において Evening inulin 群で有意に減少した (Fig.2.22b)。一方、*Bacteroidetes*、*Firmicutes* の相対存在量は Morning inulin 群と Evening inulin 群で有意な変化は見られなかった (Fig.2.22a, c)。属レベルについては、*Butyrivibrio* の相対存在量は Morning inulin 群で有意に増加したが (Fig.2.22e)、*Lactococcus*、*Oscillospira*、*Desulfovibrio*、

*Staphylococcus* の相対存在量は Morning inulin 群で有意に減少した (Fig.2.22g, h, i, j)。一方、*Odoribacter*、*Oscillospira* の相対存在量は Evening inulin 群で有意に減少した (Fig.2.22f, h)。

以上の相対存在量の結果をみると、相対存在量に変化した細菌数は、Evening inulin 群よりも Morning inulin 群の方が多 (Morning inulin 群 : 5 種、Evening inulin 群 : 2 種)。つまり、朝食のイヌリン摂取の方がより腸内細菌叢の構成に影響することが分かった。

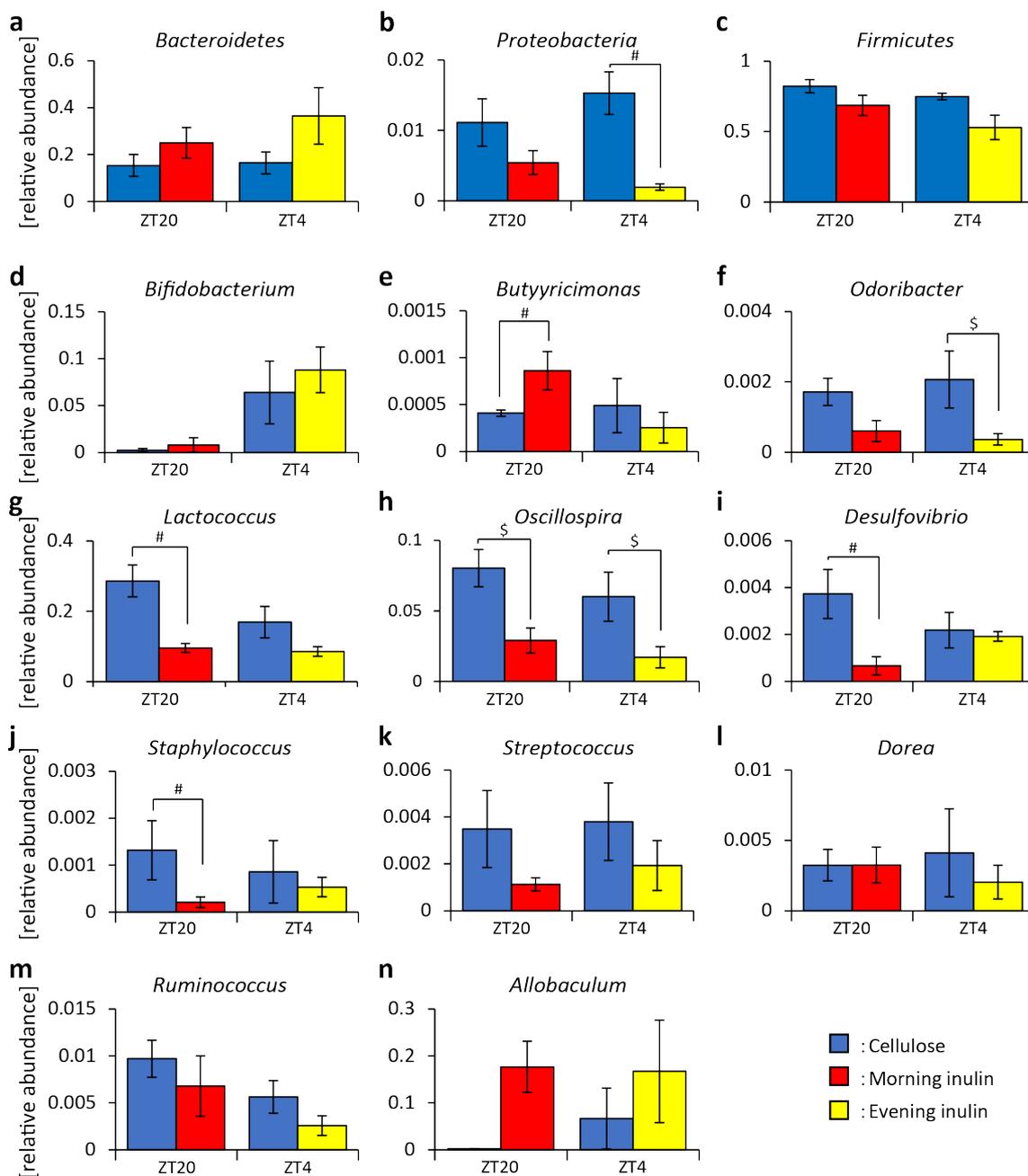


Fig.2.22 実験3：腸内細菌の相対存在量（詳細）

(a-c) 門レベルにおける相対存在量 ((a): *Bacteroidetes*, (b): *Proteobacteria*, (c): *Firmicutes*)。 (d-n) 属レベルにおける相対存在量 ((d): *Bifidobacterium*, (e): *Butyricimonas*, (f): *Odoribacter*, (g): *Lactococcus*, (h): *Oscillospira*, (i): *Desulfovibrio*, (j): *Staphylococcus*, (k): *Streptococcus*, (l): *Dorea*, (m): *Ruminococcus*, (n): *Allobaculum*)。データは平均値±標準誤差で表す。データのn数 (Cellulose 群 ZT20 (n=4), ZT4 (n=4); Morning inulin 群 (n=5); Evening inulin 群 (n=5))。\$ p<0.05, Two-way ANOVA with Sidak's post-hoc test を使用。# p<0.05, Mann-Whitney test with a two-stage linear step-up procedure of the Benjamini, Krieger, and Yekutieli test を使用。

これらの盲腸内 pH、SCFA、 $\beta$  多様性、腸内細菌の相対存在量の結果より (Fig.2.18, Fig.2.20, Fig.2.22)、朝食と夕食のイヌリンの摂食量が等しくても、朝食のイヌリン摂食の方が夕食のイヌリン摂食よりも腸内細菌叢に大きく影響することが考えられた。

#### 2.3.4 実験 4：絶食時間を等しくした条件におけるイヌリン摂食タイミングと腸内細菌叢の関係性

実験 3 では、朝食のイヌリン摂食が腸内細菌叢に大きく影響を与える可能性が示唆された。この時、朝食と夕食の影響の差は絶食時間の違いによるものと考えた。朝食のイヌリン摂食は前の夕食摂食から 16 時間絶食しており、夕食のイヌリン摂食は前の朝食摂食から 8 時間絶食している。つまり、夕食摂食までの絶食時間よりも朝食摂食までの絶食時間の方が長い。したがって、この絶食時間の長さの違いが腸内細菌叢への影響の差として現れた可能性が考えられた。この仮説を検証するために、ZT12 (朝食) または ZT20 (夕食) に 3.6 g の餌をマウスに与え、1 日 1 回の食事にして絶食時間が等しい条件で実験を行った。マウスは以下の 4 群に分けた (Fig.2.23)。Morning cellulose 群：朝食にセルロースを 2.5% 添加した高脂肪食を 3.6 g 与える。Morning inulin 群：朝食にイヌリンを 2.5% 添加した高脂肪食を 3.6 g 与える。Evening cellulose 群：夕食にセルロースを 2.5% 添加した高脂肪食を 3.6 g 与える。Evening inulin 群：夕食にセルロースを 2.5% 添加した高脂肪食を 3.6 g 与える。マウスを各条件下で 14 日間飼育し、その後 14~15 日目に ZT20 および ZT4 でサンプリングを行った (Fig.2.23)。

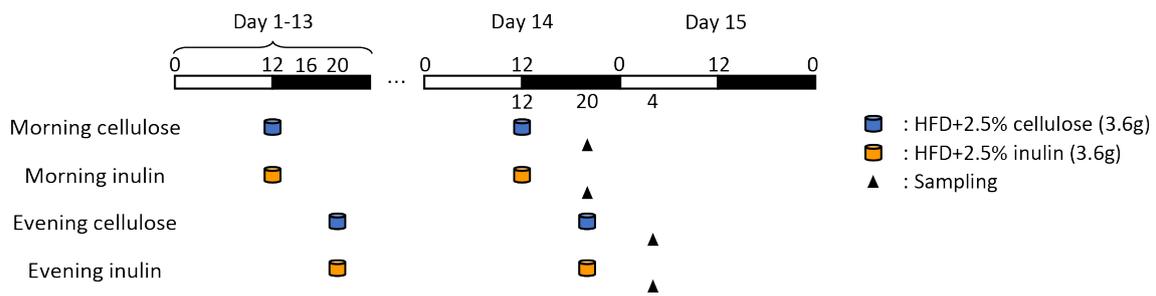


Fig.2.23 実験4：実験スケジュール

白と黒のバーは明期：暗期=12h：12hの明暗条件を表している。青色の円柱は高脂肪食に2.5%のCelluloseを添加した3.6gの餌を表し、オレンジ色の円柱は高脂肪食に2.5%のイヌリンを添加した3.6gの餌を表す。黒の矢尻はサンプリング時間を表す。

サンプリング前の体重は、Morning cellulose 群が Evening cellulose 群と比較して有意に減少し、Morning inulin 群が Evening inulin 群と比較して有意に減少した。(Fig.2.24)。

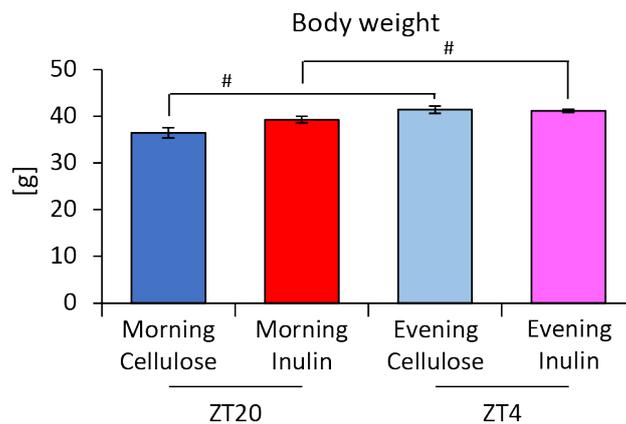


Fig.2.24 実験4：体重

サンプリング前の体重。データは平均値±標準誤差で表す。データのn数 (Morning Cellulose 群 (n=6); Morning inulin 群 (n=6); Evening cellulose 群 (n=6); Evening inulin 群(n=6))。#p<0.05, Mann-Whitney test with a two-stage linear step-up procedure of the Benjamini, Krieger, and Yekutieli test を使用。

盲腸内 pH は、Morning cellulose 群および Evening cellulose 群よりも Morning inulin 群および Evening inulin 群の方で有意に低かった (Fig.2.25a)。プロピオン酸は、Morning cellulose 群よりも Morning inulin 群で有意に増加し、Evening cellulose 群よりも Evening inulin 群で増加傾向であ

った (Fig.2.25c)。乳酸は、Morning cellulose 群よりも Morning inulin 群で有意に増加し、Evening cellulose 群よりも Evening inulin 群で有意に増加した (Fig.2.25d)。酪酸は、Morning cellulose 群よりも Morning inulin 群で増加傾向であり、Evening cellulose 群よりも Evening inulin 群で有意に増加した (Fig.2.25e)。総 SCFA 量には有意な変化が見られなかった (Fig.2.25f)。

以上の結果より、実験 3 で見られていた盲腸内 pH における、Morning inulin 群と Evening inulin 群との間の有意差 (Fig.2.18a) が、実験 4 では見られなくなった (Fig.2.25a)。実験 3 で見られていた乳酸と酪酸における、Morning inulin 群のみの有意な増加 (Fig.2.18d, e) が、実験 4 では Evening inulin 群でも有意に増加していた (Fig.2.25d, e)。以上から、絶食時間を統一した実験 4 では実験 3 で見られていた朝食イヌリン摂食と夕食イヌリン摂食の差が見られなくなった。つまり、朝食のイヌリン摂食が腸内環境を良好にするという結果は、朝食前の長い絶食時間が原因であると考えられる。

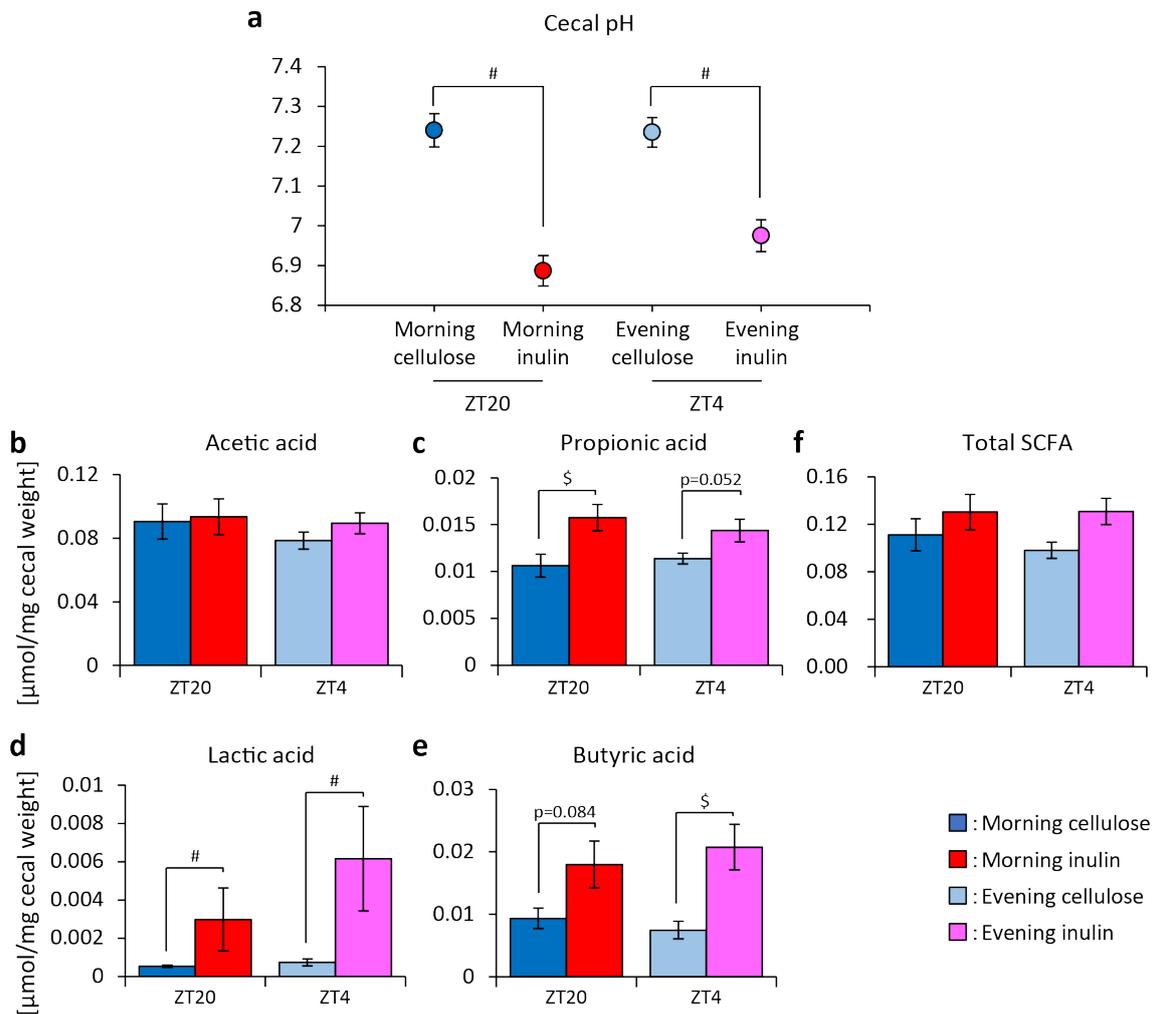


Fig.2.25 実験4：盲腸内 pH と SCFA

(a) 14 日間飼育後の盲腸 pH。(b-f) 盲腸内の SCFA 産生量。(b) 酢酸。(c) プロピオン酸。(d) 乳酸。(e) 酪酸。(f) 総 SCFA 量。データは平均値±標準誤差で表す。データの n 数 (Morning Cellulose 群 (n=6); Morning inulin 群 (n=6); Evening cellulose 群 (n=6); Evening inulin 群(n=6))。\$ p<0.05, Two-way ANOVA with Sidak's post-hoc test を使用。# p<0.05, Mann-Whitney test with a two-stage linear step-up procedure of the Benjamini, Krieger, and Yekutieli test を使用。

次に、マウスの糞便から 16S rRNA を抽出し、腸内細菌叢の多様性を分析した。Simpson Index は、Evening cellulose 群よりも Morning cellulose 群で有意に高かった (Fig.2.26)。

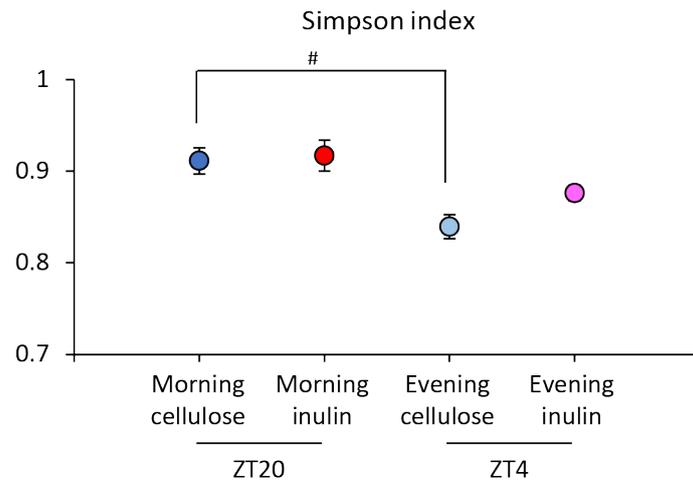


Fig.2.26 実験4：腸内細菌叢の $\alpha$ 多様性

Simpson index で示した腸内細菌叢の $\alpha$ 多様性。データは平均値 $\pm$ 標準誤差で表す。データのn数 (Morning Cellulose 群 (n=6); Morning inulin 群 (n=6); Evening cellulose 群 (n=6); Evening inulin 群 (n=6))。#  $p < 0.05$ , Mann-Whitney test with a two-stage linear step-up procedure of the Benjamini, Krieger, and Yekutieli test を使用。

次に各群の腸内細菌叢の構成を比較するために $\beta$ 多様性を測定した (Fig.2.27a)。腸内細菌叢の構成は、朝食摂食開始8時間後 (ZT20) においても夕食摂食開始8時間後 (ZT4) においてもセルロースとイヌリンの間に有意差はなかった (Fig.2.27b, c)。

実験3では朝食摂食開始8時間後のZT20においてのみ、セルロース摂食とイヌリン摂食で腸内細菌叢の構成に有意差が見られていたが (Fig.2.20b)、実験4では朝食摂食開始8時間後のZT20でも夕食摂食開始8時間後のZT4でも、セルロース摂食とイヌリン摂食の間に有意な差が見られなくなった (Fig.2.27b)。以上より、絶食時間の統一により実験3で見られていた朝食イヌリン摂食と夕食イヌリン摂食の差が見られなくなった。つまり、朝食のイヌリン摂食が腸内細菌叢の構成に大きく影響するという結果は、朝食前の絶食時間が長かったためであると考えられる。

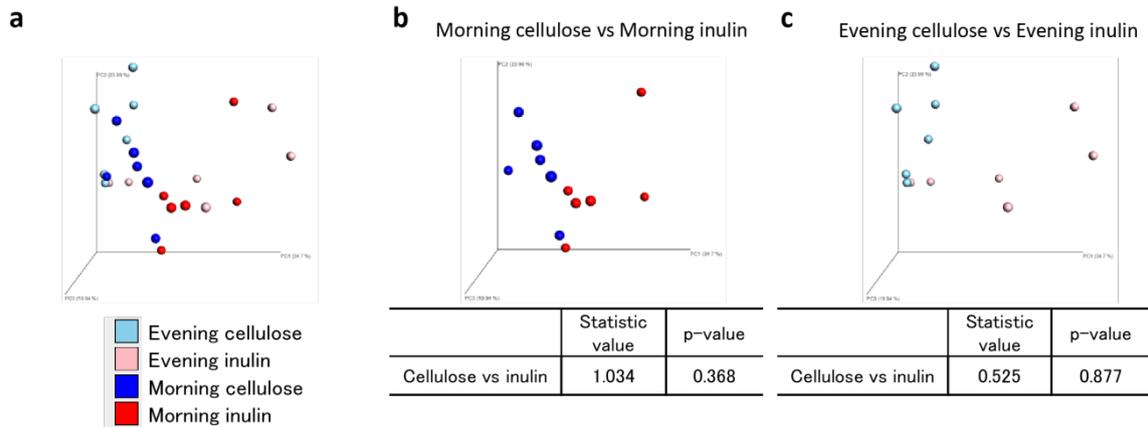


Fig.2.27 実験4：腸内細菌叢の $\beta$ 多様性

(a) 全サンプルの $\beta$ 多様性。(b) 朝食摂食開始8時間後(ZT20)におけるセルロースとイヌリンの構成比較。(c) 夕食摂食開始8時間後(ZT4)におけるセルロースとイヌリンの構成比較。データのn数 (Morning Cellulose 群 (n=6); Morning inulin 群 (n=6); Evening cellulose 群 (n=6); Evening inulin 群(n=6))。PERMANOVAの結果を図中の表に示す。

また、各群における腸内細菌叢の構成の詳細を調べるため、腸内細菌の相対存在量を測定した。実験4で検出された各群の細菌叢の全体像を門レベル (Fig.2.28a) と属レベル (Fig.2.28b) についてそれぞれ積み上げグラフで示す。本実験で特に着目する細菌を赤枠で示し、その詳細結果を Fig.2.29 に示す。

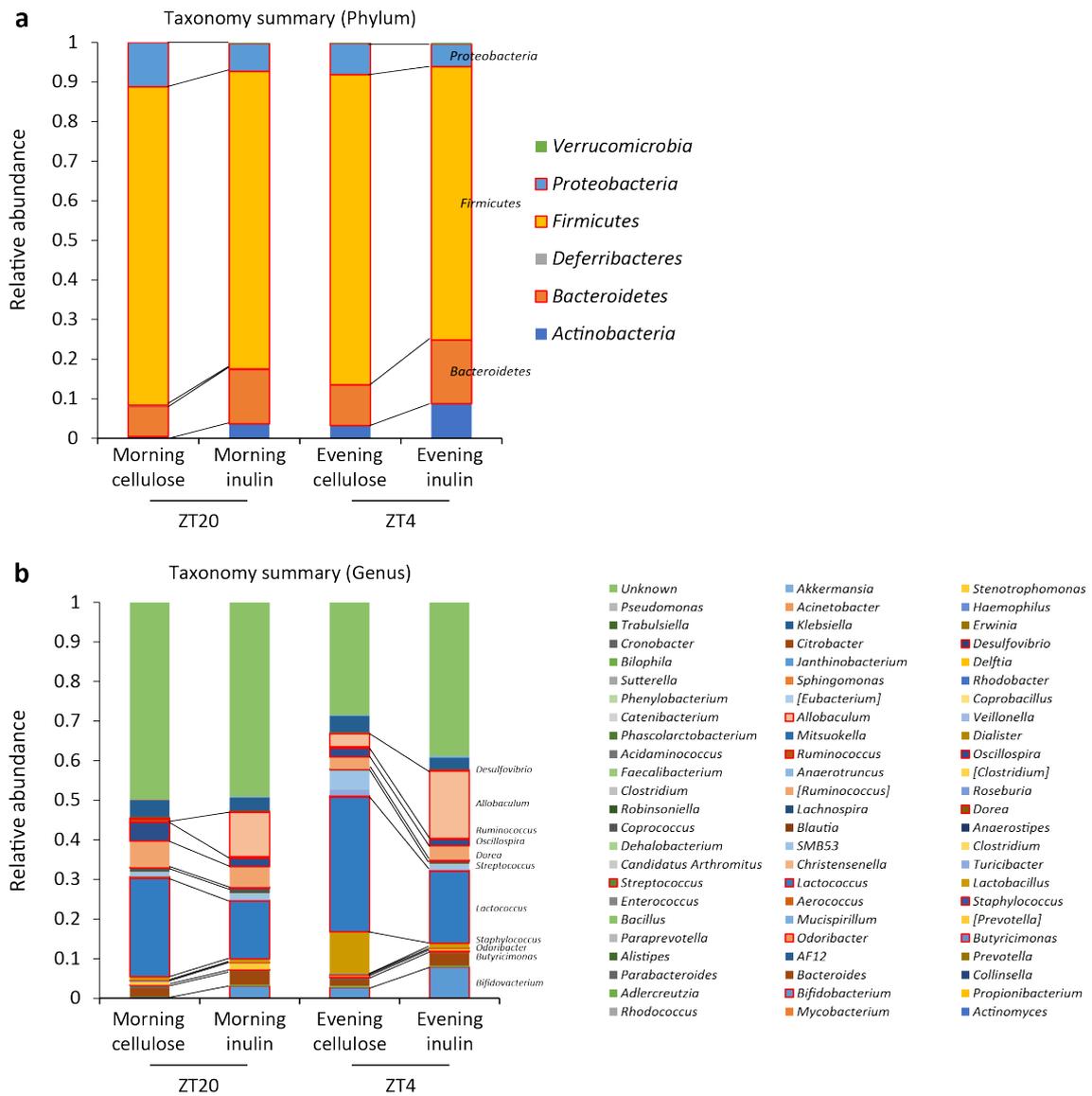


Fig.2.28 実験4：腸内細菌叢の相対存在量（全体像）

(a) 門レベル。(b) 属レベル。データは平均値で表す。データのn数 (Morning Cellulose 群 (n=6); Morning inulin 群 (n=6); Evening cellulose 群 (n=6); Evening inulin 群 (n=6))。

門レベルでは、*Bacteroidetes*、*Proteobacteria*、*Firmicutes* の相対存在量は Morning inulin 群と Evening inulin 群で有意な変化は見られなかった (Fig.2.29a-c)。属レベルでは、*Bifidobacterium* と *Allobaculum* の相対存在量は Morning inulin 群で有意に増加し (Fig.2.29d, n)、*Oscillospira*、

*Streptococcus*、*Ruminococcus* の相対存在量は Morning inulin 群で有意に減少した (Fig.2.29h, k, m)。一方、*Dorea* と *Allobaculum* の相対存在量は Evening inulin 群で有意に増加し (Fig.2.29l, n)、*Lactococcus* と *Staphylococcus* の相対存在量は Evening inulin 群で有意に減少した (Fig.2.29g, j)。

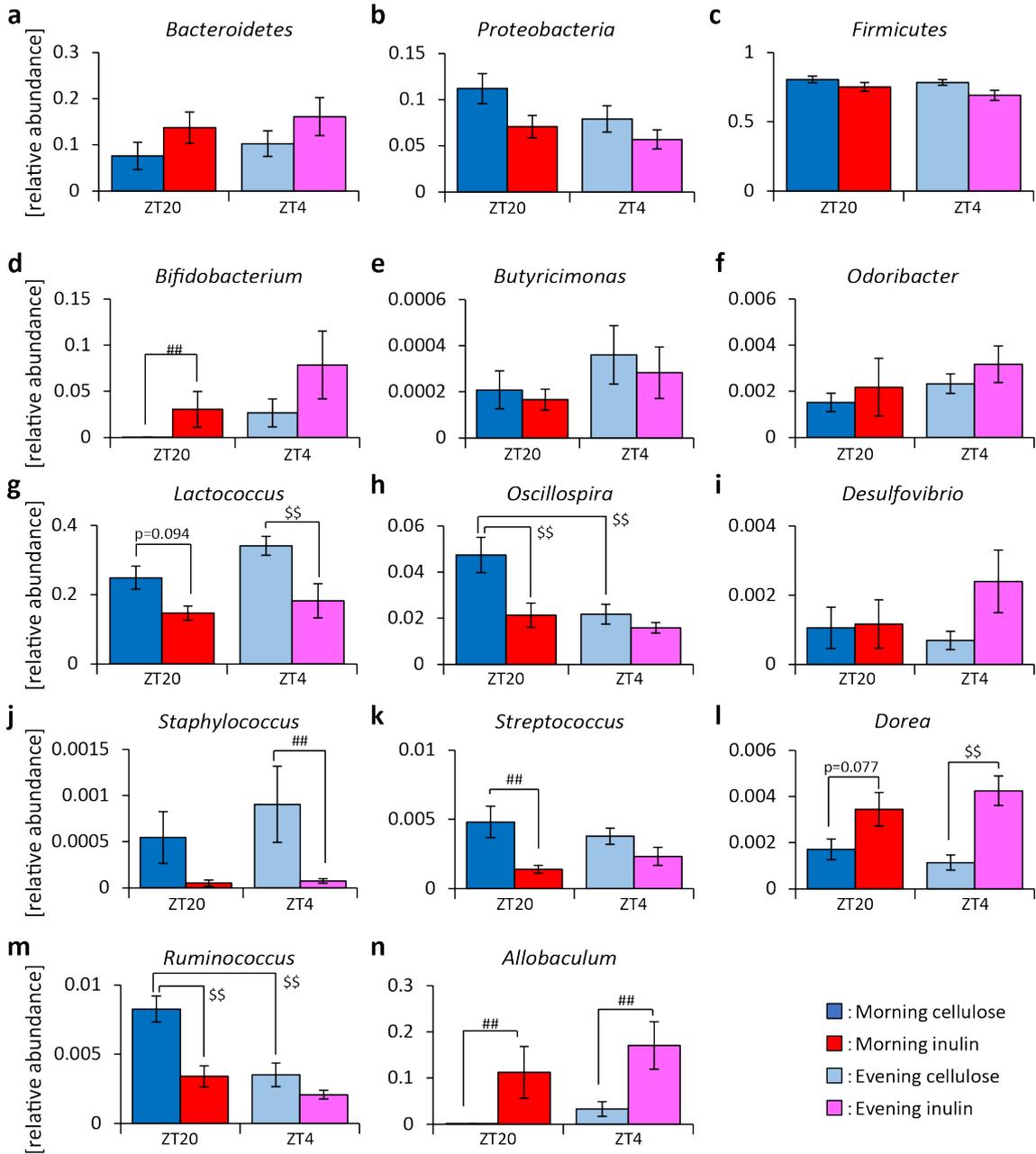


Fig.2.29 実験4：腸内細菌の相対存在量（詳細）

(a-c) 門レベルにおける相対存在量 ((a): *Bacteroidetes*, (b): *Proteobacteria*, (c): *Firmicutes*)。 (d-n) 属レベルにおける相対存在量 ((d): *Bifidobacterium*, (e): *Butyricimonas*, (f): *Odoribacter*, (g): *Lactococcus*, (h): *Oscillospira*, (i): *Desulfovibrio*, (j): *Staphylococcus*, (k): *Streptococcus*, (l): *Dorea*, (m): *Ruminococcus*,

(n): *Allobaculum*)。データは平均値±標準誤差で表す。データの n 数 (Morning Cellulose 群 (n=6); Morning inulin 群 (n=6); Evening cellulose 群 (n=6); Evening inulin 群(n=6))。\$\$ p<0.01, Two-way ANOVA with Sidak's post-hoc test を使用。## p<0.01, Mann-Whitney test with a two-stage linear step-up procedure of the Benjamini, Krieger, and Yekutieli test を使用。

これらの盲腸内 pH、SCFA、 $\beta$  多様性の結果より (Fig.2.25, Fig.2.27)、絶食時間の統一で Morning inulin 群と Evening inulin 群の差が見られなくなったことから、実験 3 で見られた、朝食インスリン摂食と夕食インスリン摂食の差は絶食時間の違いによるものと考えられた。

## 2.4.考察

本実験では、イヌリン摂食によって、盲腸内pHの低下 (Fig.2.4a, Fig.2.11a, Fig.2.18a)、SCFA産生量の増加 (Fig.2.4c-d, Fig.2.11b-f, Fig.2.18c-f)、腸内細菌叢の構成変化 (Fig.2.6b, Fig.2.13b, e, f, Fig.2.20b) が確認された。SCFAは肝臓や筋肉においてエネルギー代謝に利用されたり、大腸において免疫機能の改善に利用されたりするため、宿主の健康のために重要であると考えられる<sup>38,39,122</sup>。また、盲腸内pHの低下は大腸菌やウェルシュ菌などの有害菌の増殖を抑えることができ、腸内環境を良好に保つことができる<sup>5,40</sup>。さらに、イヌリン摂食が腸内細菌叢に与える影響は、イヌリン摂食のタイミングに依存している可能性が考えられた (Fig.2.6b)。朝食または夕食にイヌリンを与えたところ、朝食の方が夕食に比べて腸内細菌叢に与える影響が大きかった (Fig.2.18a, c-f, Fig.2.20b)。これは絶食時間が関係しており、朝食摂食までの絶食時間が長いことが原因だと考えられた。実際、実験4で絶食時間を等しくさせた場合においては、朝食と夕食のイヌリン摂食で盲腸内pHまたはSCFAの産生量に朝夕の差はなかった (Fig.2.25a, c, d, e)。

ここで絶食時間の長さや腸内細菌叢の関係性について考察する。先行研究より、食物が胃に入り、胃壁が刺激されると中枢を介して蠕動運動が発生する<sup>123</sup>。この時、絶食時間が長いほどこの反応は大きくなり、蠕動運動が促進される<sup>123</sup>。さらに、長い絶食 (36時間) 後の再給餌により大腸上皮細胞のターンオーバーが促進され乳酸産生菌が増加する<sup>39</sup>。一方で、モルヒネ投与によって消化管におけるコリン作動性神経活動を抑制し、蠕動運動を抑制させた便秘モデルのラットにおいては、腸内細菌叢の種の豊富さが低下し、ウェルシュ菌などの悪玉菌が増加する<sup>124</sup>。また、食物の腸管通過時間の長さやインドールやフェニル硫酸などの腸内腐敗産物の産生量に正の相関がある<sup>125</sup>。以上の報告から、長い絶食時間後の朝食摂食により蠕動運動が促進されたことが腸内細菌叢に良い影響を与え、その時にイヌリンを摂食したことで、イヌリンが有効に腸内細菌叢に影響し、腸内環境が改善したと考えられる。実際のヒトの生活を考えると、

一般的に3回の食事のうち夕食から朝食までの絶食時間が最も長い。したがって、本実験の結果は、ヒトでは朝食のイヌリン摂食が、腸内細菌叢の構成を大きく変化させるのに最も効果的であると期待できる。実験4において、1日1食の摂食スケジュールによる検証を行ったが、ヒトにおける先行研究では、食事前の絶食時間が特に長い朝食を欠食してしまうと、その後の昼食で反応する蠕動運動が抑えられ便秘傾向となる<sup>123</sup>。つまり、長すぎる絶食は腸内細菌叢に悪影響を与えることが考えられ、実験4でもその悪影響が生じていることも考えられる。そこで、本実験で用いた1日1食の摂食スケジュールの他にも、絶食時間が均等になるような摂食モデルを用いて検証する必要があるだろう。その摂食モデルの例として、ZT0とZT12に給餌する12時間絶食の1日2食モデル<sup>126</sup>、ZT0, ZT8, ZT16に給餌する8時間絶食の1日3食モデル<sup>127</sup>、ZT0から4時間おきに6食を給餌する4時間絶食の1日6食モデルが挙げられる<sup>128</sup>。これらの摂食モデルを使用することで、絶食時間と食の影響との関係を明確にすることができると考えられる。

蠕動運動は食物が胃に入った時に亢進されるが、その時以外にも、蠕動運動には日内リズムが存在し、覚醒時に亢進し睡眠前に低下する<sup>129</sup>。そのため、絶食時間の長さに関係なく摂食タイミングそのものが蠕動運動の亢進具合を変え、腸内細菌叢に与える影響も変化すると考えられる。実験4の詳細な腸内細菌の相対存在量の結果において (Fig.2.29)、絶食時間の等しいMorning cellulose群とEvening cellulose群で、*Oscillospira* (Fig.2.29h) や*Ruminococcus* (Fig.2.29m) など一部の細菌が異なる存在量になっているのは、この蠕動運動の日内リズムが影響しているのかもしれない。

先行研究において、ヒトとマウスの両方で、イヌリン摂食により*Bifidobacteria*や*Akkermancia muciniphila*が増加し、グラム陽性球菌が減少することが報告されている<sup>118-121</sup>。実験1~4を通して、グラム陽性球菌である*Streptococcus*と*Staphylococcus*は減少したが (Fig.2.8k, Fig.2.15j, Fig.2.22k, Fig.2.29j, k)、*Akkermancia*は実験1~4のいずれにおいても有意な増加は見られなかつ

た (Fig.2.7b, Fig.2.14b, Fig.2.21b, Fig.2.28b)。本実験結果では*Akkermancia*は有意に増加しておらず (Fig.2.7b, Fig.2.14b, Fig.2.21b, Fig.2.28b)、先行研究と結果の差異が生じているが、その理由として、イヌリンの重合度が考えられる。序論でも述べたが、イヌリンはフルクトースをモノマーとして、食材中では2~60個のフルクトース分子が $\beta$ -グリコシド結合によって結合した構造をしている<sup>103</sup>。本実験で使用したイヌリンは、人工的に合成され16個のフルクトースが結合したものであった (重合度: 16)<sup>103</sup>。食材中に含まれるイヌリンの平均重合度数が32~34であること<sup>103</sup>を考慮すると、本実験で使用したイヌリンの重合度は小さい。精製された平均重合度が10のイヌリンと平均重合度が4の短鎖イヌリンをマウスに与えた研究では<sup>119</sup>、短鎖イヌリンを与えた方が長鎖イヌリンを与えた時よりも*Bifidobacteriaceae*、*Lactobacillaceae*、*Akkermansia*の相対存在量が増加した<sup>119</sup>。また、短鎖イヌリンの方が細菌の相対存在量を増加させた理由として加水分解のされやすさが関係しており、小さい重合度の方が腸内細菌の持つ酵素によってより速くグルコースにまで分解されたためだと考えられている<sup>119</sup>。本実験と異なる結果となった先行研究<sup>118-121</sup>で使用されたイヌリンの重合度はわからないが、今回用いたイヌリンより重合度が小さいか、重合度の小さいイヌリンが多数含まれていた可能性が、差異が生じた理由の一つとして考えられるだろう。

次に本実験で有意な減少が見られたグラム陽性球菌 (*Streptococcus*と*Staphylococcus*) に着目する (Fig.2.8k, Fig.2.15j, Fig.2.22k, Fig.2.29j, k)。*Streptococcus*は乳酸を産生することが知られているが<sup>130,131</sup>、*Streptococcus mutans*は2型糖尿病患者で増加しており、高カロリー食によって増加する<sup>132</sup>。さらに、*Staphylococcus aureus*は肥満患者で増加しており、*Staphylococcus*の相対存在量はエネルギー摂取量と正の相関がある<sup>22,23</sup>。本実験での、16SrRNAのV3-V4領域をターゲットとしたシーケンスでは種レベルの同定率が約10%程度と低くなるという特性上<sup>113</sup>、種レベルの解析は行っていないが、*Streptococcus*と*Staphylococcus*の相対存在量の減少は2型糖尿病の予防や肥

満の予防と関連するかもしれない。

次に、イヌリン摂食によって産生されたSCFAに着目する (Fig.2.4c-d, Fig.2.11b-f, Fig.2.18c-f)。腸管内で産生されたSCFAが肥満を抑制する経路が報告されている<sup>122</sup> (Fig.2.30)。腸管で産生されたSCFAは腸管上皮細胞中のMonocarboxylate transporter 1 (MCT1) というトランスポーターによって血中へと輸送される<sup>133</sup>。短鎖脂肪酸受容体の1つであるGPR43は白色脂肪に多く発現しており、この脂肪細胞中のGPR43に短鎖脂肪酸 (特に酢酸とプロピオン酸) が結合すると、活性化したGPR43が脂肪細胞のインスリン受容体に働きかけ、インスリンの感受性を低下させる<sup>122</sup>。すると脂肪細胞への過剰なエネルギーの取り込みが抑制されて、脂肪の蓄積を抑制することができる<sup>122</sup>。また、腸管で産生されたSCFAは腸管内分泌細胞からのホルモン分泌にも影響する<sup>133</sup>。つまり、大腸L細胞に存在する短鎖脂肪酸受容体のGPR41とGPR43に結合することで、glucagon like peptide-1 (GLP-1) やpeptide YY (PYY) の血中への分泌を促進する<sup>133</sup>。GLP-1は膵臓のβ細胞に存在するGLP-1受容体に結合し、インスリン分泌を促進させ、血糖値上昇を抑制する<sup>134</sup>。また、PYYは脳の視床下部のY2受容体に作用し、食欲を抑制する<sup>135</sup>。以上の先行研究より<sup>22,23,122,130-133</sup>、イヌリン摂食による腸内細菌の変化およびSCFA産生が肥満予防と2型糖尿病予防に効果的であることが考えられる。また、実験3の結果から、夕食のイヌリン摂食よりも朝食のイヌリン摂食によって、*Staphylococcus*の有意な減少 (Fig.2.22j)、短鎖脂肪酸 (乳酸、酪酸、総SCFA量) の有意な増加 (Fig.2.18d-f) が見られた。つまり、夕食よりも朝食にイヌリンを摂食することで、肥満予防や2型糖尿病予防に効果的であることが考えられる。

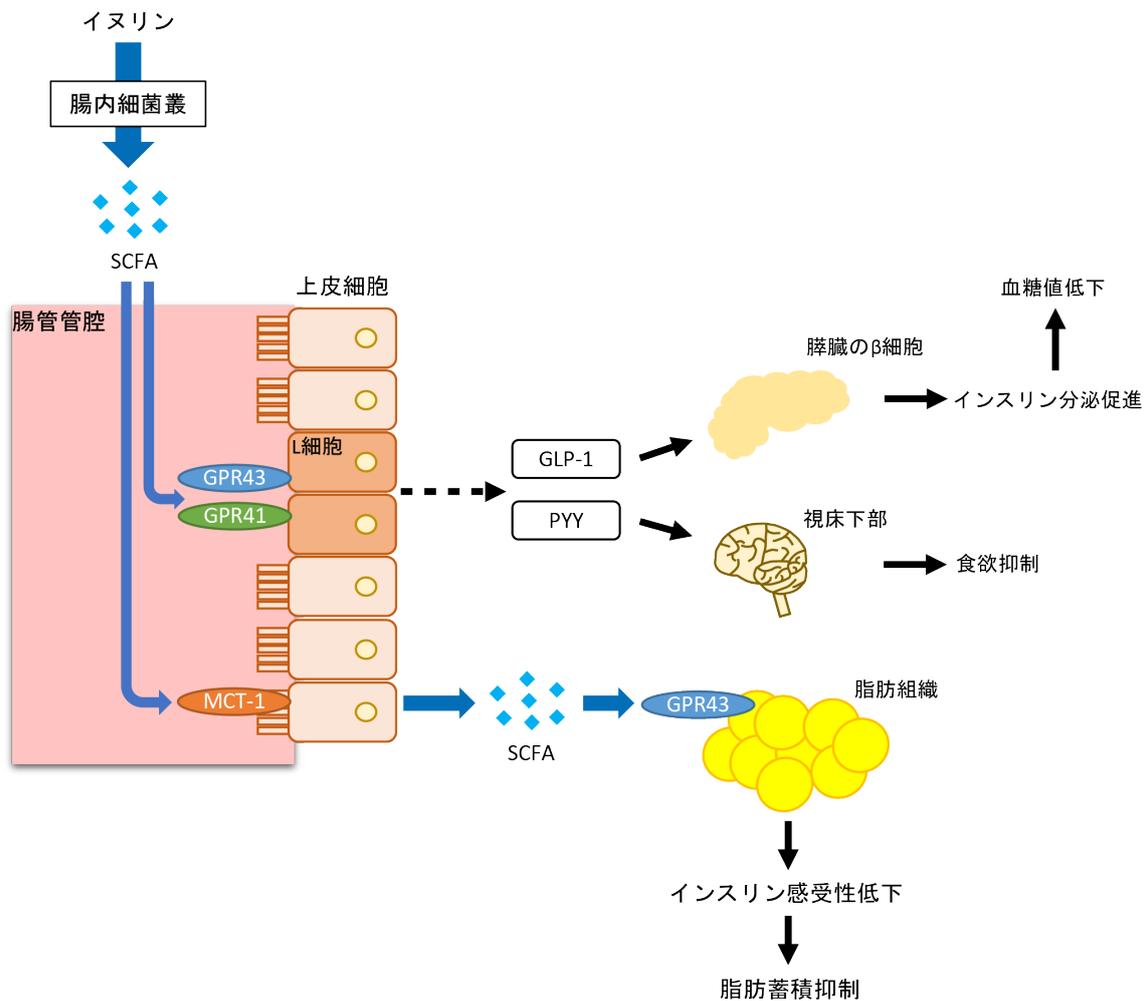


Fig.2.30 イヌリン摂食による SCFA 産生が肥満抑制に与える影響

実験1と実験2ではイヌリン摂食によりSimpson indexが増加したが (Fig.2.5, Fig.2.12)、実験3と実験4ではその効果が見られなかった (Fig.2.19、 Fig.2.26)。この理由として餌の摂食量が実験1・2と比較して実験3・4では少なかったためであると考ええる。先行研究では、マウスの1日の摂食量を自由摂食の70%に制限し寿命を迎えるまで与え続けると、*Lactobacillus*などの乳酸産生菌が増加し、乳酸産生菌の相対存在量と寿命が正に相関した<sup>136</sup>。この結果は、カロリー制限が良好な腸内細菌叢を誘導し、宿主の寿命を延ばすような効果を促進していることを示唆している<sup>136</sup>。実験1・2のCellulose群のSimpson indexの値は0.6~0.7付近だが (Fig.2.5, Fig.2.12)、実験3・

4のCellulose群の値は0.9付近となっている (Fig.2.19、 Fig.2.26)。つまり、実験3・4において摂食量を制限したこと自体が腸内細菌叢の多様性を増大させ、イヌリンによる腸内細菌叢の多様性増加が評価しにくくなったことが考えられる。

本実験では、サンプル数を $n=4-6$ で実験した。しかし、このサンプル数では十分な検出力は得られない。例えば、実験3において効果量=0.5、有意水準=0.05としてG\*power (バージョン3.1.9.6、Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf、ドイツ) を用いて検出力を算出すると0.35となる。慣例的に必要となる検出力が0.8であることを踏まえ<sup>137</sup>、必要となるサンプル数をG\*powerで算出すると、各群 $n=12$ が必要となる。また、 $\beta$ 多様性の統計手法であるPERMANOVAの計算方法を報告した論文において<sup>138</sup>、十分な検出力を得るためのサンプル数の記載はされていないが、PERMANOVAの計算例として総サンプル数を $N=30$ として説明しており、必要なサンプル数の一例となるだろう。今後、サンプル数を増やし、検出力を上げたうえで、同様の実験を行い、より本研究の検定結果の信頼性を上げる必要がある。

## 2.5 小括

朝食のイヌリン摂食は夕食の摂食よりも盲腸pHを低下させ、SCFA産生を促し、腸内微生物叢の構成を変化させた。そして、朝食のイヌリン摂食と夕食のイヌリン摂食の結果の違いは、摂食までの絶食時間の長さによるものだと考えられ、絶食時間と腸内細菌叢に影響を与える食事刺激との間に関係がある可能性があることを示唆している。

### 3章. 大豆タンパク質の摂取タイミングの違いがマウスの腸内細菌叢に及ぼす影響の検証

#### 3.1 序論

本章はMDPI (Nutrients) により発行された“The timing effects of soy protein intake on mice gut microbiota.”を元に再構成されたものである。

レジスタントプロテインとは、体内の消化酵素で分解されにくく、大腸にまで届くタンパク質である<sup>52</sup>。タンパク質は通常、小腸で吸収されるが、一部のタンパク質は小腸を通過して大腸に到達する<sup>51</sup>。大腸にまで届いたタンパク質は、アミノ酸に代謝されるだけでなく、さらにピルビン酸にまで代謝され、その結果、各細菌の持つSCFA産生経路が活性化され、SCFA産生量が増加する<sup>52</sup>。ピルビン酸へと代謝されるアミノ酸は20個のアミノ酸のうち、アラニン、グリシン、システイン、セリン、トレオニン、トリプトファンである<sup>52</sup>。またアスパラギン、アスパラギン酸はオキサロ酢酸に分解されるが、オキサロ酢酸の一部は脱炭酸化によりピルビン酸となる<sup>52</sup>。また、アルギニン、グルタミン、グルタミン酸、ヒスチジン、プロリンは $\alpha$ -オキソグルタル酸へと分解され、 $\alpha$ -オキソグルタル酸はアラニンとアミノ基転移酵素を介してピルビン酸を産生する<sup>52</sup>。このように、20個のアミノ酸のうち13個のアミノ酸がSCFA産生の起点となり得る。そして、タンパク質からアミノ酸までの代謝に関与する腸内細菌は主に*Bacteroides*、*Clostridium*、*Propionibacterium*、*Fusobacterium*、*Streptococcus*、*Lactobacillus*である<sup>139</sup>。

レジスタントプロテインが含まれている食材に、そば<sup>53</sup>、酒粕<sup>54</sup>、絹<sup>55</sup>、大豆<sup>56</sup>、卵黄<sup>57</sup>が挙げられるが、それぞれのレジスタントプロテインはタンパク質組成やアミノ酸組成が異なっている。例えば、そばに含まれるレジスタントプロテインにはリジンが多く含まれ<sup>53</sup>、絹のレジスタントプロテインはセリシンというタンパク質が主体成分であり、セリンが多く含まれている<sup>55</sup>。また、酒粕のレジスタントプロテインはプロラミンというタンパク質が主体成分であり、

グルタミン酸、プロリン、ロイシンを多く含んでいる<sup>54</sup>。

大豆は昔から日本人にとって馴染み深い食品であるが、大豆にはビタミンやミネラルなど豊富な栄養素が凝縮されている<sup>140</sup>。大豆にはタンパク質が約30%と多く含まれており、そのアミノ酸スコアは100である。つまり、必須アミノ酸（バリン、ロイシン、イソロイシン、ヒスチジン、リジン、スレオニン、メチオニン、トリプトファン、フェニルアラニン）がバランスよく含まれた良質なタンパク質源といえる<sup>140</sup>。本実験で用いた大豆タンパク質（フジプロF；不二製油株式会社）は、脱脂大豆に加水し、可溶化成分を抽出・分離した後、可溶化成分のpHを4.5に調整した際に生じた沈殿物を回収し、この沈殿物のpHを7.0に中和して乾燥させることで精製したものである<sup>141</sup>。大豆タンパク質のタンパク質組成は約70%がグリシニン（単純タンパク質の一種）とβ-コングリシニン（糖タンパク質の一種）で占められ、その比率は約2：1である<sup>141</sup>。大豆タンパク質中の約30%が脂質親和性タンパク質群であり、この脂質親和性タンパク質群がレジスタントプロテインの主体成分となるが<sup>141</sup>、詳細な成分は不明である。げっ歯類とヒトの両方で、大豆タンパク質の摂取が肝臓の脂質代謝改善、脂肪肝の予防、体脂肪の減少に効果的であるが<sup>56,142-145</sup>、その効果は大豆タンパク質中のβ-コングリシニンによるものである<sup>144,145</sup>。一方、大豆由来のレジスタントプロテインは、腸内細菌の代謝に関わる胆汁酸と高い結合能を示し、大腸がんを抑制する<sup>52</sup>。さらに、大豆由来のレジスタントプロテインの摂取により、腸内細菌叢の多様性とSCFAの産生量が増加する<sup>44,50</sup>。

以上のように、大豆タンパク質摂食により腸内細菌叢改善効果<sup>44,50</sup>と脂質代謝改善効果<sup>56,142-145</sup>が得られることが報告されているが、大豆タンパク質摂食の効果的なタイミングの報告は少ない。そこで、本実験では、朝食摂食や夕食摂食など時間栄養学の観点のもと、マウスの腸内微生物叢および脂質代謝改善に対する大豆タンパク質摂食タイミングの影響を調べた。

## 3.2 実験手法

### 3.2.1 使用動物

実験には2章と同様のICR雄マウスを使用および同様の飼育環境で飼育した。本実験においては各個体の摂食量を測定できるように、マウスを1匹ずつ個飼いした。マウスには脂肪45% kcal含有の高脂肪食（Research Diets社；D12451）の餌組成をベースに、その約20%分のタンパク質源をカゼインタンパク質（オリエンタル酵母工業）または大豆タンパク質（フジプロF；不二製油株式会社）にして作成した餌を与えた。詳細な餌組成をTable.3.1に示す。なお、粗タンパク量が等しくなるようにタンパク質量を調整している。また、水道水は自由に摂取できるようにした。

Table.3.1 各餌の100g中の餌組成 (g/100g)

	Casein diet	Soy diet
Casein	22.86	-
Soy protein	-	23.78
L-cysteine	0.18	0.18
βcorn starch	13.71	12.79
αcorn starch	15.5	15.5
Sucrose	10	10
Soybean oil	4	4
Lard	24	24
Cellulose	5	5
Mineral mixture	3.5	3.5
Vitamin mixture	1	1
Choline bitartrate	0.25	0.25
Total	100	100

### 3.2.2 実験スケジュール

実験1では、大豆タンパク質の自由摂食条件下における検証を行った。マウスにカゼインタンパク質餌 (Casein群) または大豆タンパク質餌 (Soy群) を10日間自由摂食させ、ZT12、ZT20、ZT4でサンプリングを行った。

実験2では、大豆タンパク質の摂食タイミングの効果を調べた。朝食と夕食の大豆タンパク質摂食効果を比較するために、マウスに朝（ZT12）と夕方（ZT20）に1.8gの餌を1日2回与えた。カゼインタンパク質餌のみを与える群（Casein群）、朝食に大豆タンパク質餌を与え、夕食にカゼインタンパク質餌を与える群（M-Soy群）、朝食にカゼインタンパク質餌を与え、夕食に大豆タンパク質餌を与える群（E-Soy群）の3群を用意した。各摂食条件で14日間飼育した後、ZT12、ZT20、ZT4でサンプリングを行った。

サンプリング方法は2章と同様に盲腸内pH測定、盲腸内容物採取、糞便採取を行い、3章においてはそれに加えて血液と肝臓を採取した。

### 3.2.3 血清コレステロールおよびトリグリセリド測定

血清コレステロールおよびトリグリセリド（TG）量は、コレステロール測定キットおよびトリグリセリド測定キット（富士フイルム和光純薬株式会社）を使用して測定した。なお、測定方法はキット中のプロトコルに基づいて行った。

### 3.2.4 リアルタイム RT-PCR

肝臓における脂質代謝関連遺伝子の相対的な mRNA 量を、リアルタイム RT-PCR によって測定した。RNA-Solv Reagent（Omega Bio-Tek Inc.、アメリカ）を使用して、肝臓の RNA を抽出した。各サンプルの RNA 濃度は、分光光度計（NanoVue plus：GEヘルスケアジャパン）を使用して測定した。RNA の逆転写および増幅は、One-Step SYBR RT-PCR キット（タカラバイオ）および Piko Real PCR システム（Thermo Fisher Scientific、アメリカ）を用いて行った。また、標的となる遺伝子のプライマーを Table.3.2 に、各遺伝子の機能を Table.3.3 に示す。標的遺伝子の相対的な発現量は GAPDH によって正規化した<sup>146</sup>。また、データは  $\Delta\Delta C_t$  法によって分析した。

Table.3.2 リアルタイム RT-PCR で使用したプライマー配列

Gene	Forward	Reverse
<i>Gapdh</i>	TGGTGAAGGTCGGTGTGAAC	AATGAAGGGGTCGTTGATGG
<i>Acc1</i>	GCACTCCCGATTCAATAATG	CCCAAATCAGAAAAGTGTATC
<i>Fasn</i>	TGGGTTCTAGCCAGCAGAGT	ACCACCAGAGACCGTTATGC
<i>Srebp1c</i>	CGCTACCGGTCTTCTATCAATG	CAAGAAGCGGATGTAG
<i>Hmgcr</i>	GATCATCCAGTTGGTCAATGC	GCAAGCTTTGTGGAGAGGAG
<i>Cyp7a1</i>	AGACCGCACATAAAGCCCGG	CTTTCATTGCTTCAGGGCTC

Table.3.3 リアルタイム RT-PCR で測定した遺伝子の機能

Gene	正式名称	機能	Reference
<i>Acc1</i>	Acetyl-CoA carboxylase1	脂肪酸合成の律速酵素	147
<i>Fasn</i>	Fatty acid synthase	脂肪酸合成酵素	148
<i>Srebp1c</i>	Sterol regulatory element-binding protein 1	脂肪酸合成に関わる酵素の転写調節因子	149
<i>Hmgcr</i>	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase	コレステロール合成の律速酵素	150
<i>Cyp7a1</i>	cytochrome P450 7A1	コレステロールから胆汁酸を合成する酵素	151

### 3.2.5 盲腸内 pH 測定

2章と同様に測定した。

### 3.2.6 短鎖脂肪酸 (SCFA) 測定

2章と同様に測定した。

### 3.2.7 糞便中の DNA 抽出

2章と同様に行った。

### 3.2.8 16S rRNA 遺伝子解析

2章と同様に行った。なお3章のリード数については、105サンプルから合計40,34,110リードが読み取られ、平均して、1サンプルあたり384,201±2,427 (平均値±標準誤差) リードを得た。

### 3.2.9 菌叢解析

2章と同様に行った。

### 3.2.10 $\alpha$ 多様性解析 (Simpson Index)

2章と同様に行った。

### 3.2.11 $\beta$ 多様性解析

2章と同様に行った。

### 3.2.12 機能予測解析

PICRUSt<sup>152</sup>を用いて腸内細菌叢機能の予測を行った。機能予測はMiseqによって得られたシーケンスデータを元に、KEGG pathwayデータベース中のKEGG orthologyの機能プロファイルと参照することで予測した。本実験においては、注目する機能として「エネルギー代謝関連」について解析した。

### 3.2.13 統計

実験データは平均±標準誤差として表した。すべての統計分析は、GraphPad Prism (バージョン6.03、GraphPad Software Inc., アメリカ)を使用した。また、本実験では摂食したタンパク質の違いに焦点をおいているため、時間要因の比較よりも餌要因の比較を中心に行った。D'Agostino-Pearson test/ Kolmogorov-Smirnov test および、Bartlett's testを使用して、データが正規分布か非正規分布か、および等分散か不等分散かを調べた。データが正規分布かつ等分散であった場合、2群間比較であればStudent's t-test、3群以上の比較であればOne-way ANOVAを使用し、事後分析としてTukeyの多重比較検定を行った。データが非正規分布または不等分散であれば、2群間比較であればMann-Whitner test、3群以上の比較であればKruskal-Wallis検定を使用し、事後分析としてDunnの多重比較検定を行った。なお有意水準 $\alpha < 0.05$ を有意とみなす。腸内細菌叢の構成比較はPERMANOVAを用いて有意検定を行った。なお、PERMANOVAはQIIMEによって分析した。

### 3.3 実験結果

#### 3.3.1 実験1：大豆タンパク質の自由摂食が腸内細菌叢の構成に与える影響

大豆タンパク質は血清コレステロールとトリグリセリドを減少させるだけでなく、腸内細菌叢の構成を変化させ、多様性を増加させることが報告されている<sup>44,56,142</sup>。そこで、まずは本研究で使用する大豆タンパク質餌によって以前の報告と同様の結果が得られるかどうかを確認するため、自由摂取条件下での影響を調べた。

また、実験1では、短期間での大豆タンパク質摂取の効果を調べることにした (Fig.3.1)。大豆タンパク質は抗肥満効果があることが知られており<sup>56,142-145</sup>、肥満と腸内細菌叢の構成 (*Firmicutes* の増加と *Bacteroidetes* の減少) にも相関がある<sup>13-15</sup> ことから、体重の違いによる影響を排除するため、10日間という短期間で大豆タンパク質を与え、体重が変化する前の状態で腸内細菌がどのように変化するのかを調べた。マウスにカゼインタンパク質餌 (Casein 群) または大豆タンパク質餌 (Soy 群) を10日間自由摂食させ、ZT12、ZT20、ZT4 でサンプリングを行った (Fig.3.1)。

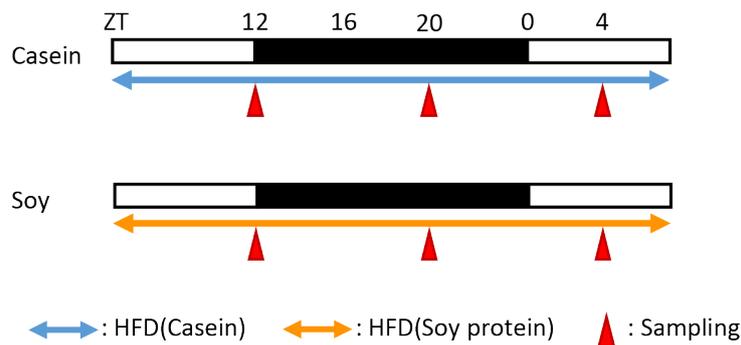


Fig.3.1 実験1：実験スケジュール

大豆タンパク質の自由摂食が腸内細菌叢の構成に与える影響の実験スケジュール。白と黒のバーは明期：暗期=12h：12hの明暗条件を表している。青色の矢印はカゼインタンパク質餌を表し、オレンジ色の矢印は大豆タンパク質餌を表す。赤の矢印はサンプリング時間を表す。

まず、大豆タンパク質が脂質代謝に及ぼす影響を調べた。摂食量およびサンプリング前の体重に群間で有意な差はなかった（摂食量（Casein 群：3.88±0.15 g/日、Soy 群：3.92±0.11 g/日）サンプリング前の体重（Casein 群：42.69±0.59 g、Soy 群：42.15±0.71 g））。各ポイント（ZT12, ZT20, ZT4）と3ポイントの平均値（AVE）を示す。血清コレステロールは、ZT20 および AVE において Soy 群の方が Casein 群より有意に低かった（Fig.3.2a）。血清トリグリセリドは、群間に有意差はなかった（Fig.3.2b）。また、肝臓における脂肪酸およびコレステロール代謝関連遺伝子の mRNA 発現量を測定した。脂肪酸合成関連遺伝子である *Acc1*（ZT12, ZT20, AVE）（Fig.3.2c）、*Fasn*（ZT12, ZT20, AVE）（Fig.3.2d）、および *Srebplc*（ZT12, ZT4, AVE）（Fig.3.2e）の発現量は、Soy 群の方が Casein 群より有意に低かった。一方、コレステロールを代謝する *Cyp7a1* の発現量は、ZT20 において Soy 群の方が Casein 群より高くなる傾向があった（Fig.3.2g）。

以上より、大豆タンパク質の摂取は肝臓における脂肪酸合成を抑制し、コレステロールも分解系を促進することが分かった。

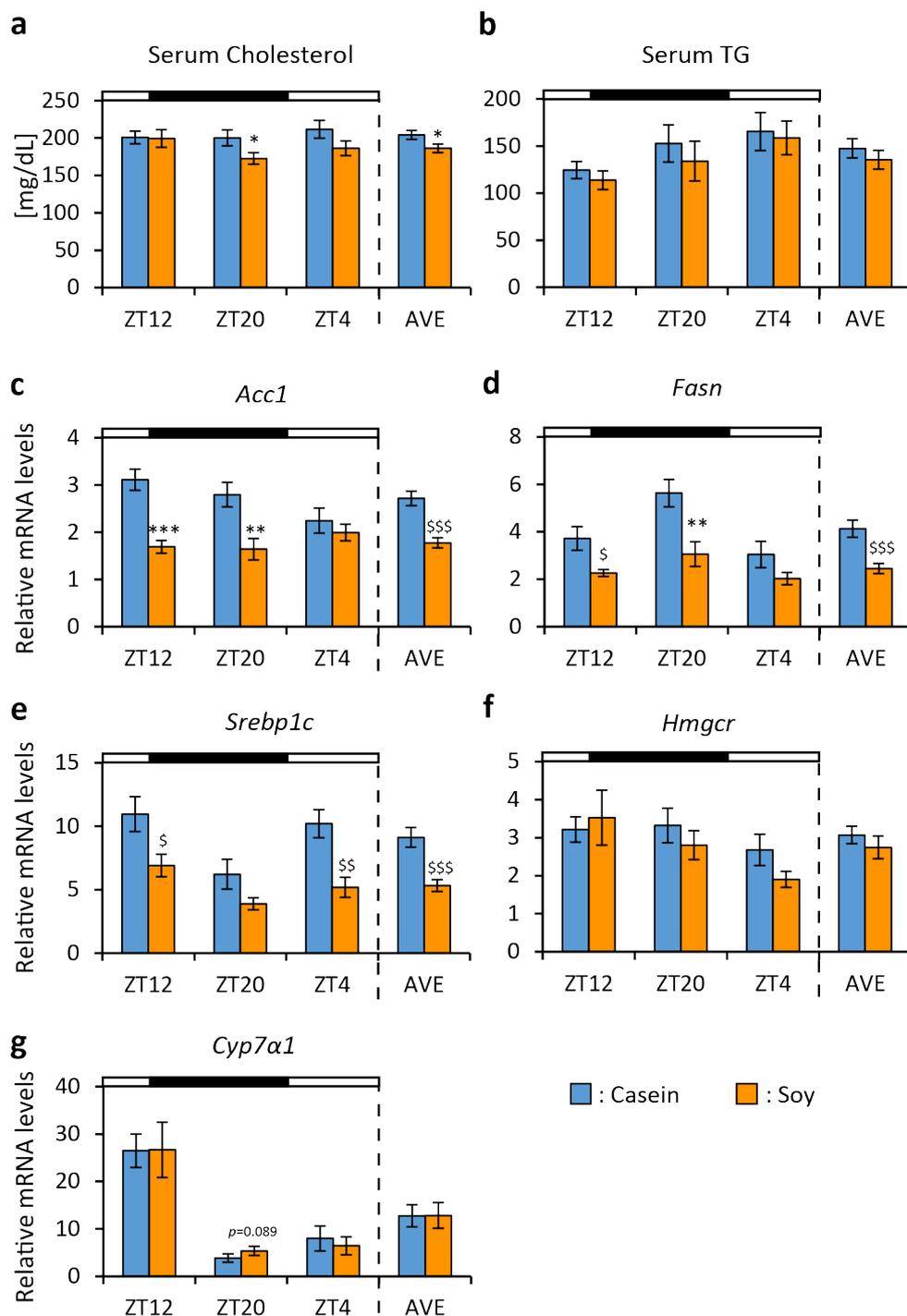


Fig.3.2 実験1：血清中の脂質と肝臓における脂質合成関連遺伝子

10日間摂食後のZT12,ZT20,ZT4および3ポイントの平均値における(a)血清コレステロール量、(b)血清トリグリセリド量および肝臓中の脂質代謝関連遺伝子のmRNAの相対発現量(c)*Acc1*、(d)*Fasn*、(e)*Srebp1c*、(f)*Hmgcr*、(g)*Cyp7a1*。データは平均値±標準誤差で表す。データのn数(各群各ポイントn=10)。\*p<0.05,\*\*p<0.01,\*\*\*p<0.001 vs. Casein, Student's *t*-testを使用。\$p<0.05,\$\$p<0.01,\$\$\$p<0.001, vs. Casein, Mann-Whitney testを使用。

次に大豆タンパク質が腸内細菌叢に与える影響を調べるために、盲腸内 pH と SCFA 産生量を測定した。盲腸内 pH は、いずれのポイントおよび平均値において Soy 群の方が Casein 群よりも有意に低かった (Fig.3.3a)。盲腸中の酢酸 (ZT12、ZT4、AVE) (Fig.3.3b)、プロピオン酸 (ZT12、ZT4) (Fig.3.3c)、乳酸 (Fig.3.3d)、酪酸 (Fig.3.3e) は、Soy 群の方が Casein 群よりも多かった。

以上より、盲腸内 pH の低下、プロピオン酸と乳酸、酪酸の増加が見られたことから、大豆タンパク質摂食によって腸内環境が良好になったことが分かった。

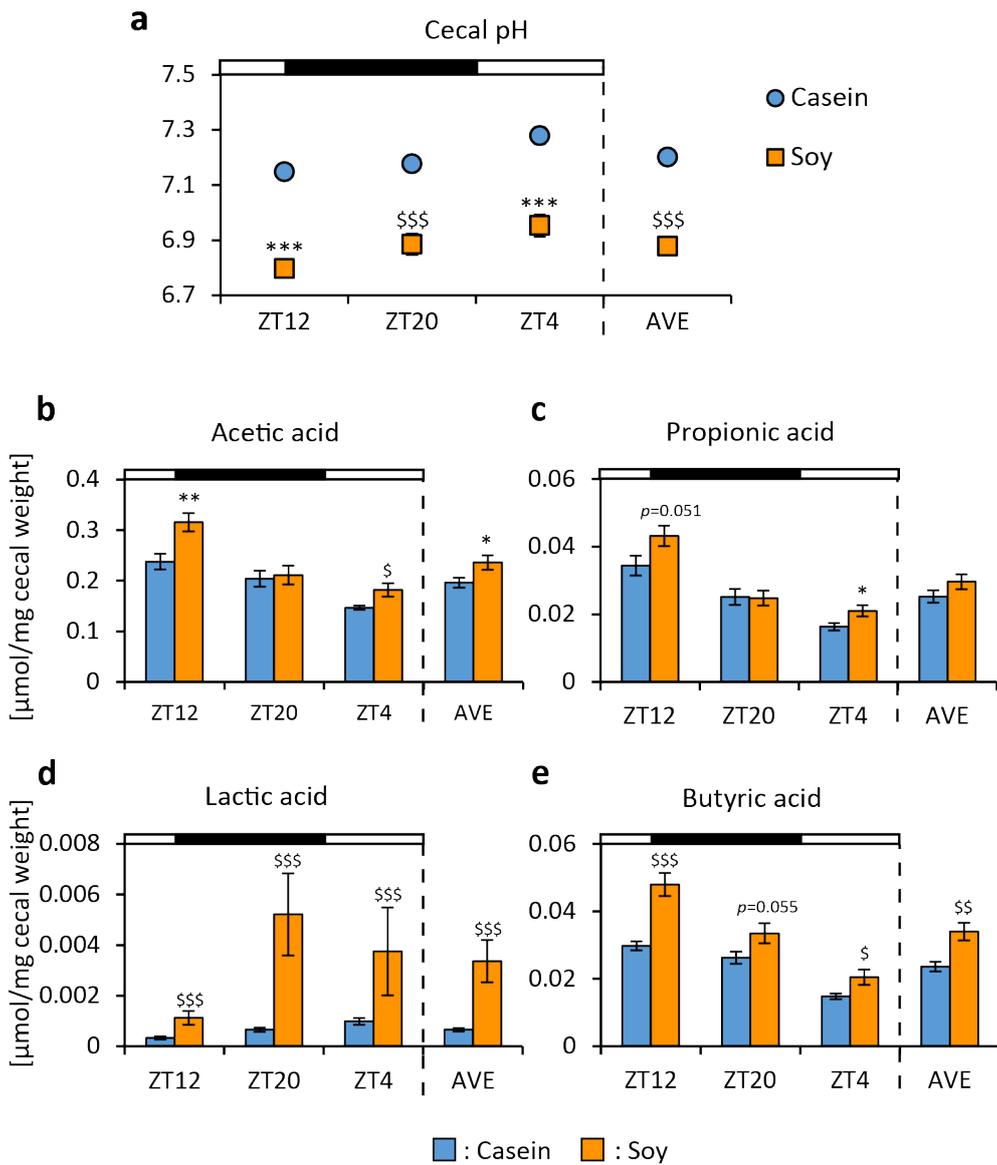


Fig.3.3 実験1：盲腸 pH と SCFA

10日間摂食後の ZT12, ZT20, ZT4 および3ポイントの平均値における(a)盲腸 pH, (b)酢酸, (c)プロピオン酸, (d)乳酸, (e)酪酸。データは平均値 $\pm$ 標準誤差で表す。データの n 数 (各群各ポイント n=10)。

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. Casein, Student's *t*-test を使用。\$  $p < 0.05$ , \$\$  $p < 0.01$ , \$\$\$  $p < 0.001$ , vs.

Casein, Mann-Whitney test を使用。

盲腸内 pH が低下し、SCFA 生産が増加したことから、大豆タンパク質の摂取により腸内細菌叢が変化した可能性が考えられた。そこで、糞便から 16S rRNA を抽出し、腸内細菌叢を分

析した。Simpson Index は、ZT20において Soy 群の方が Casein 群よりも有意に高かった (Fig.3.4)。

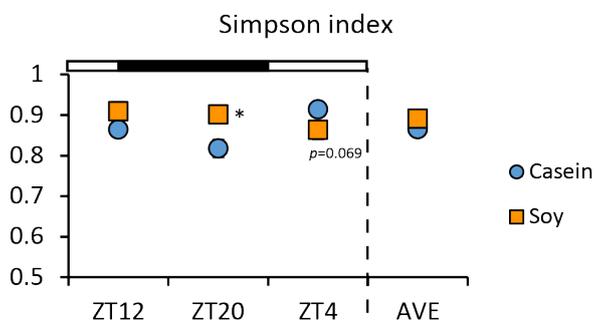


Fig.3.4 実験 1 : 腸内細菌叢の  $\alpha$  多様性

Simpson index で示した腸内細菌叢の  $\alpha$  多様性。データは平均値 $\pm$ 標準誤差で表す。データの n 数 (各群各ポイント n=10)。\* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001 vs. Casein, Student's t-test を使用。

次に各群の腸内細菌叢の構成を比較するために Unweighted UniFrac 距離による  $\beta$  多様性を解析したところ、腸内細菌叢の構成は Casein 群と Soy 群で有意に異なっていた (Fig.3.5)。

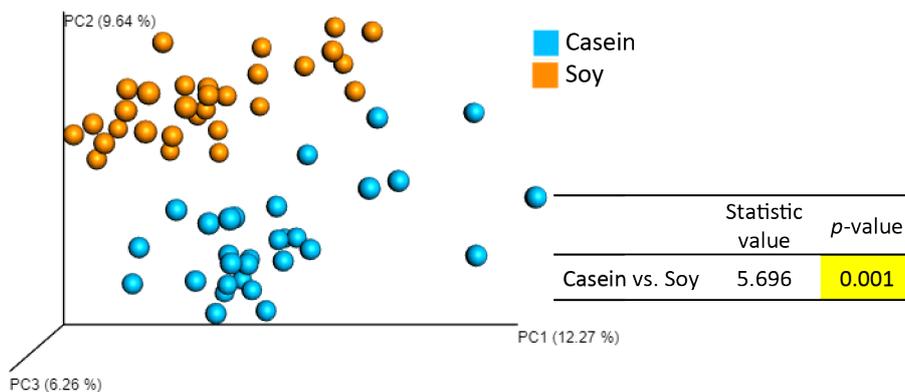


Fig.3.5 実験 1 : 腸内細菌叢の  $\beta$  多様性

全サンプルの  $\beta$  多様性 (Casein 群と Soy 群の比較)。データの n 数 (各群各ポイント n=10)。PERMANOVA の結果を図中の表に示す。

次に、具体的にどの細菌が変化しているのかを調べるために、Casein 群と Soy 群における腸内細菌の相対存在量を調べた。実験 1 で検出された各群の細菌叢の全体像を門レベル (Fig.3.6a) と属レベル (Fig.3.6b) についてそれぞれ積み上げグラフで示す。本実験で特に着目する細菌を赤枠で示し、その詳細結果を Fig.3.7 に示す。

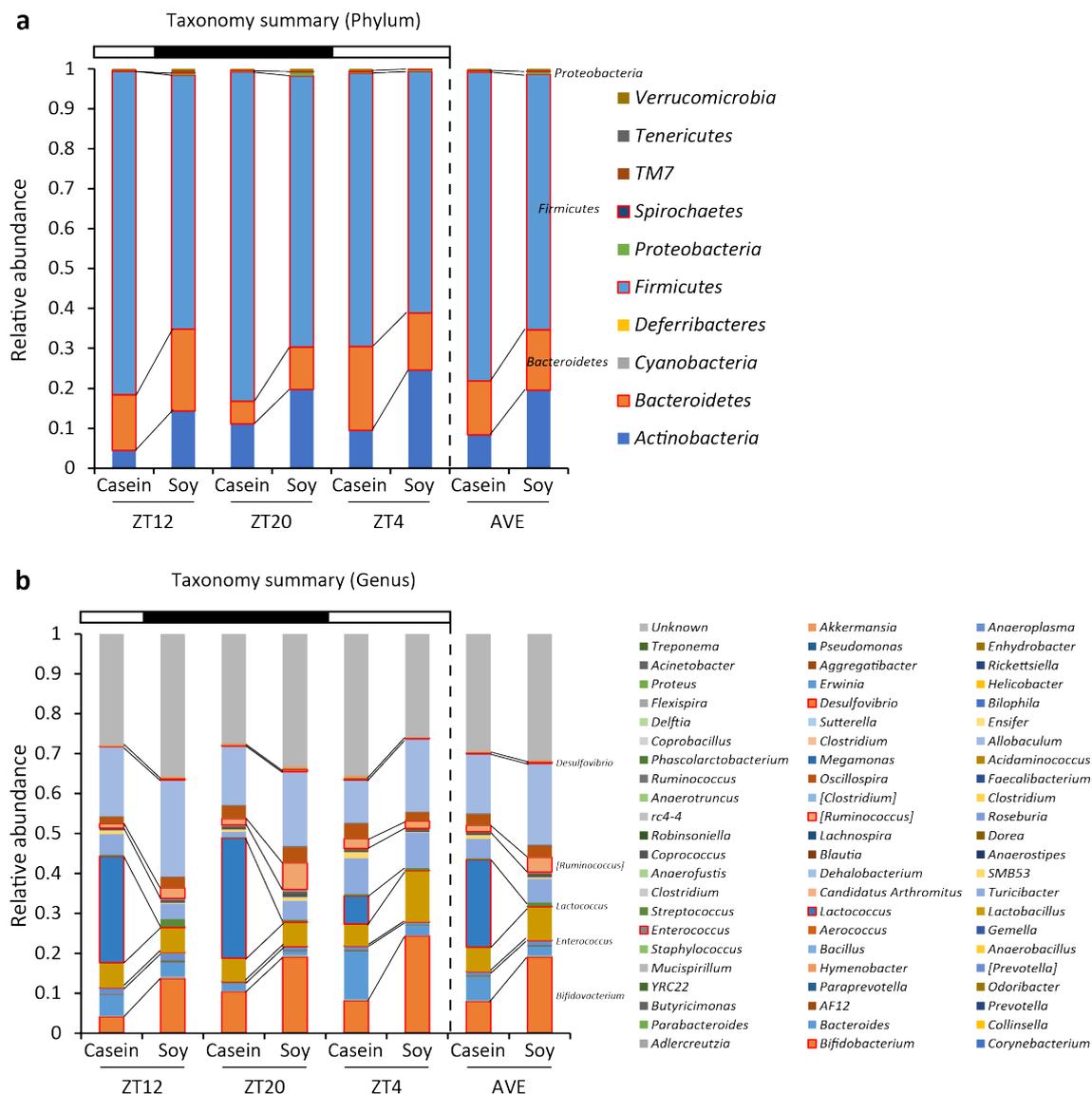


Fig.3.6 実験 1 : 腸内細菌の相対存在量 (全体像)

(a) 門レベル。(b) 属レベル。データは平均値で表す。データの n 数 (各群各ポイント n=10)。

門レベルでは、*Bacteroidetes* (ZT20) (Fig.3.7a) および *Proteobacteria* (ZT12, ZT20, AVE) (Fig.3.7b) は Soy 群の方が Casein 群よりも有意に増加し、*Firmicutes* (ZT12, ZT20, AVE) (Fig.3.7c) は有意に減少した (Fig.3.7)。属レベルについては、*Bifidobacterium* (ZT12, ZT4, AVE) (Fig.3.7d)、*Enterococcus* (ZT20, AVE) (Fig.3.7e)、*[Ruminococcus]* (ZT20, AVE) (Fig.3.7g)、*Desulfovibrio* (ZT20, AVE) (Fig.3.7h) は Soy 群の方が Casein 群よりも有意に増加し、*Lactococcus* は有意に減少した (Fig.3.4) (Fig.3.7f)。

以上、 $\beta$  多様性、腸内細菌の相対存在量の結果より (Fig.3.5, Fig.3.7)、大豆タンパク質の摂食により腸内細菌叢の構成が大きく変化することが分かった。

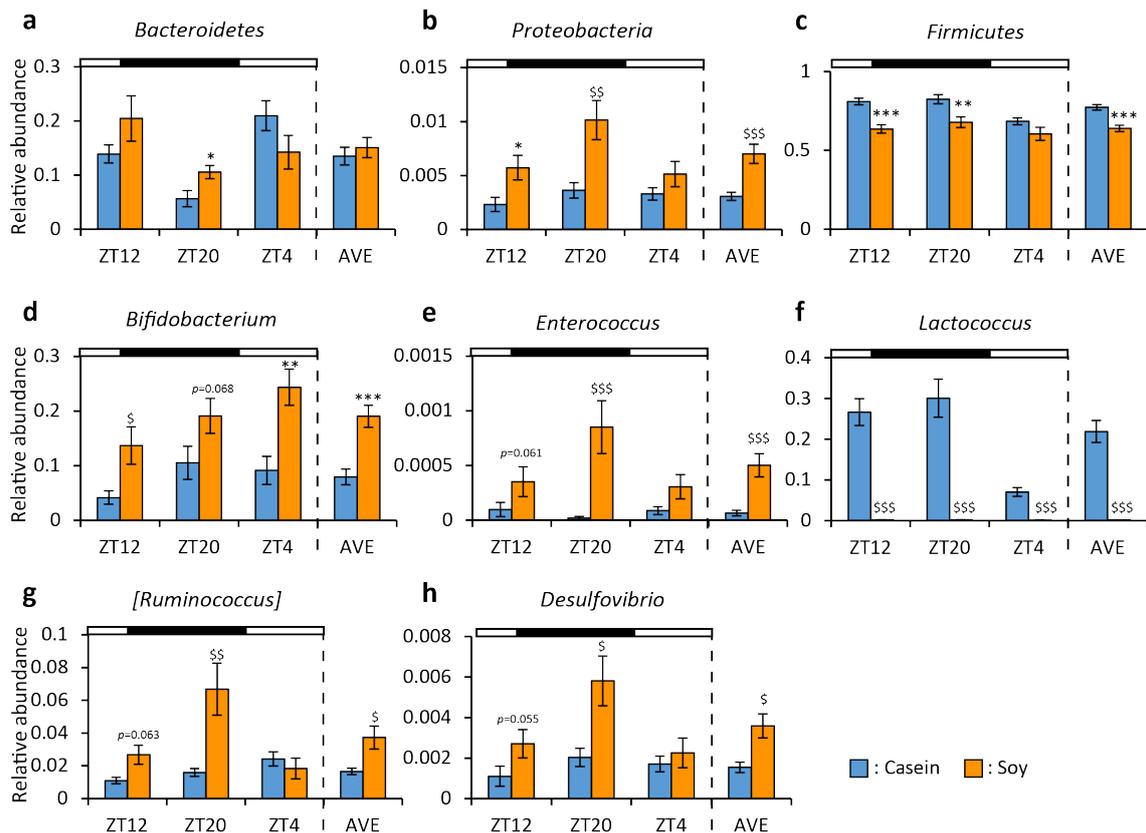


Fig.3.7 実験1：腸内細菌の相対存在量（詳細）

(a-c) 門レベルにおける相対存在量 ((a): *Bacteroidetes*, (b): *Proteobacteria*, (c): *Firmicutes*)。 (d-h) 属レベルにおける相対存在量 ((d): *Bifidobacterium*, (e): *Enterococcus*, (f): *Lactococcus*, (g): *[Ruminococcus]*, (h): *Desulfovibrio*)。データは平均値±標準誤差で表す。データのn数 (各群各ポイントn=10)。 \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001 vs.

Casein, Student's *t*-test を使用。 \$ p<0.05, \$\$ p<0.01, \$\$\$ p<0.001, vs. Casein, Mann-Whitney test を使用。

さらに、PICRUSt を使用してシーケンスデータから腸内細菌叢機能を予測した。その結果「エネルギー代謝」の「窒素代謝」(ZT12,ZT20,AVE) は Soy 群の方が Casein 群よりも有意に増加した (Fig.3.8)。

以上の結果、大豆タンパク質摂食により窒素代謝機能が増加していることは、大豆タンパク質のレジスタントプロテインが腸内細菌叢によって代謝されることを示唆している

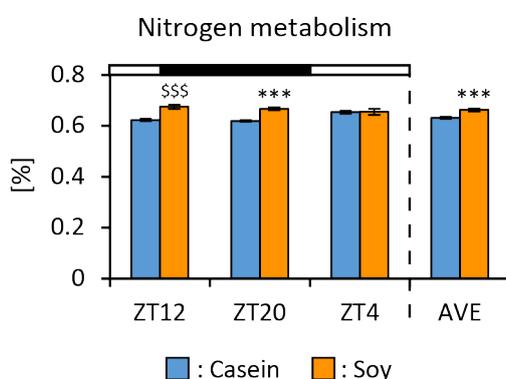


Fig.3.8 実験1：腸内細菌叢機能の解析

10日間摂食後のZT12,ZT20,ZT4および3ポイントの平均値における「窒素代謝」に関連する機能。データは平均値±標準誤差で表す。データのn数(各群各ポイントn=10)。\*\*\*p<0.001 vs. Casein, Student's *t*-test を使用。\$\$\$ p<0.001, vs. Casein, Mann-Whitney test を使用。

これらの盲腸内pH、SCFA、 $\alpha$ 多様性、 $\beta$ 多様性、腸内細菌の相対存在量の結果より (Fig.3.3, Fig.3.4, Fig.3.5, Fig.3.7)、大豆タンパク質の摂食により腸内細菌叢に大きく影響し、腸内環境が良好になったことが考えられた。つまり、大豆タンパク質は10日間という短期間で、体重が変化する前の段階で腸内細菌叢の構成を変化させることが示された。

### 3.3.2 実験2：1日2食の制限給餌条件下における大豆タンパク質の摂食タイミングが腸内細菌叢の構成に与える影響

本研究で用いた組成の大豆タンパク質餌の摂取により、腸内細菌叢の構成が変化したため、

次に、大豆タンパク質の摂取タイミングが及ぼす影響を調べた。

マウスに朝 (ZT12) と夕方 (ZT20) に1.8 g の餌を1日2回与えるスケジュールを設定した (Fig.3.9)。カゼインタンパク質餌のみを与える群 (Casein群)、朝食に大豆タンパク質餌を与え、夕食にカゼインタンパク質餌を与える群 (M-Soy群)、朝食にカゼインタンパク質餌を与え、夕食に大豆タンパク質餌を与える群 (E-Soy群) の3群を用意した。各摂食条件で14日間飼育した後、ZT12、ZT20、ZT4でサンプリングを行った (Fig.3.9)。

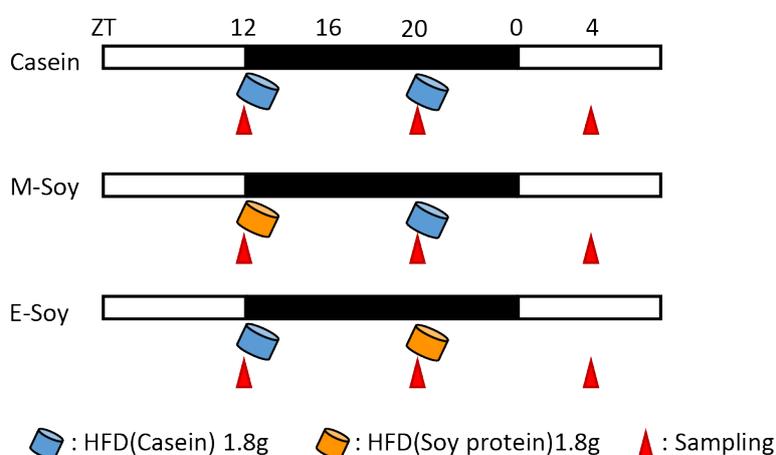


Fig.3.9 実験2：実験スケジュール

大豆タンパク質の摂食タイミングが腸内細菌叢の構成に与える影響の実験スケジュール。白と黒のバーは明期：暗期=12h：12hの明暗条件を表している。青色の円柱は1.8gのカゼインタンパク質餌を表し、オレンジ色の円柱は1.8gの大豆タンパク質餌を表す。赤の矢尻はサンプリング時間を表す。

最初に、大豆タンパク質の摂取タイミングが脂質代謝に及ぼす影響を調べた。サンプリング前の体重は群間で有意差はなかった (Casein 群 :  $43.57 \pm 0.76$  g、M-Soy 群 :  $43.86 \pm 0.51$  g、E-Soy 群 :  $42.50 \pm 0.77$  g)。各ポイント (ZT12, ZT20, ZT4) と3ポイントの平均値 (AVE) を示す。血清コレステロールは、ZT12においてM-Soy群はCasein群、E-Soy群と比較して有意に高かった (Fig.3.10a)。一方、血清トリグリセリドには有意差はなかった (Fig.3.10b)。また、肝臓における脂肪酸およびコレステロール代謝関連遺伝子の mRNA 発現量を測定した。脂肪酸合成関

連遺伝子である *Acc1* の発現量は、ZT12 および AVE において E-Soy 群の方が Casein 群よりも有意に低かった (Fig.3.10c)。同じく脂肪酸合成関連遺伝子の *Fasn* 発現量は、ZT12 において E-Soy 群の方が M-Soy 群よりも有意に低く、Casein 群よりも低い傾向があった (Fig.3.10d)。コレステロールを分解代謝する *Cyp7a1* 発現量は、ZT20 において M-Soy 群の方が Casein 群よりも有意に低く、ZT4 において M-Soy 群と E-Soy 群の方が Casein 群よりも有意に低かった (Fig.3.10g)。

以上、*Acc1*、*Fasn* の結果より夕方大豆タンパク質摂食が脂肪酸合成を抑制することが分かった。一方、血清コレステロールの結果より朝食大豆タンパク質摂食が血清コレステロールを増加させることから (Fig.3.10a)、実験 1 の大豆タンパク質の摂食により血清コレステロールが低下するという結果 (Fig.3.2.a) と反する結果となった。

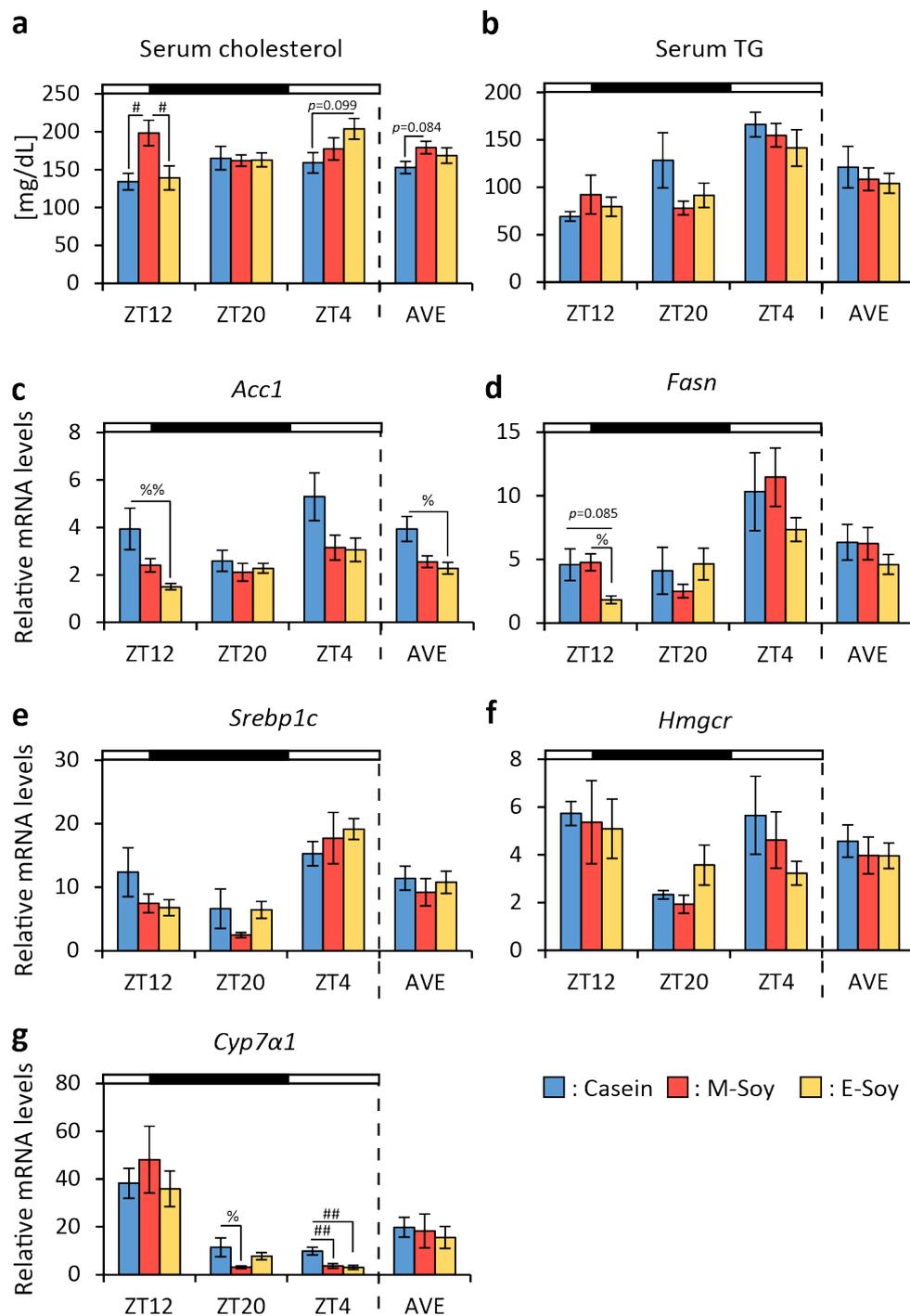


Fig.3.10 実験2：血清中の脂質と肝臓における脂質合成関連遺伝子

14日間摂食後のZT12,ZT20,ZT4および3ポイントの平均値における(a)血清コレステロール量、(b)血清トリグリセリド量および肝臓中の脂質代謝関連遺伝子のmRNAの相対発現量(c)*Acc1*、(d)*Fasn*、(e)*Srebp1c*、(f)*Hmgcr*、(g)*Cyp7a1*。データは平均値±標準誤差で表す。データのn数(各群各ポイントn=5)。# $p<0.05$ ,## $p<0.01$ ,one-way ANOVA with Tukey's post-hoc testを使用。% $p<0.05$ ,%% $p<0.01$ ,Kruskal-Wallis test with Dunn's post-hoc testを使用。

次に、大豆タンパク質の摂取タイミングが腸内細菌叢に及ぼす影響を調べるために、盲腸内 pH と SCFA 産生量を測定した。盲腸内 pH は、ZT12 において M-Soy 群が Casein 群よりも低下傾向で、ZT20 においては M-Soy 群が他群よりも有意に低かった (Fig.3.11a)。ZT4 においては E-Soy 群が他群よりも有意に低かった (Fig.3.11a)。AVE においては M-Soy 群および E-Soy 群が Casein 群よりも有意に低かった (Fig.3.11a)。乳酸は ZT20 において M-Soy 群が Casein 群よりも有意に増加し、E-Soy 群よりも増加傾向があった (Fig.3.11d)。ZT4 において E-Soy 群が Casein 群よりも有意に増加した (Fig.3.11d)。AVE においては M-Soy 群のみが Casein 群と比較して有意に増加した (Fig.3.11d)。酪酸は ZT20 において M-Soy 群が E-Soy 群よりも有意に増加し、Casein 群と比較して増加傾向があった (Fig.3.11e)。ZT4 においては E-Soy 群が他群よりも有意に増加した (Fig.3.11e)。AVE においては M-Soy 群が Casein 群よりも有意に増加した (Fig.3.11e)。

以上の結果から、大豆タンパク質は朝食と夕食のどちらで摂食しても、摂食開始 8 時間後の時刻において、盲腸内 pH が低下し、乳酸と酪酸が増加した (Fig.3.11a, d, e)。さらに、朝食に大豆タンパク質を摂食すると 1 日を通して盲腸内 pH の低下と乳酸・酪酸の増加が見られた (Fig.3.11a, d, e)。つまり、朝食摂食でも夕食摂食でも大豆タンパク質が腸内細菌叢を変化させるが、その影響は朝食摂食の方が大きいことが示された。

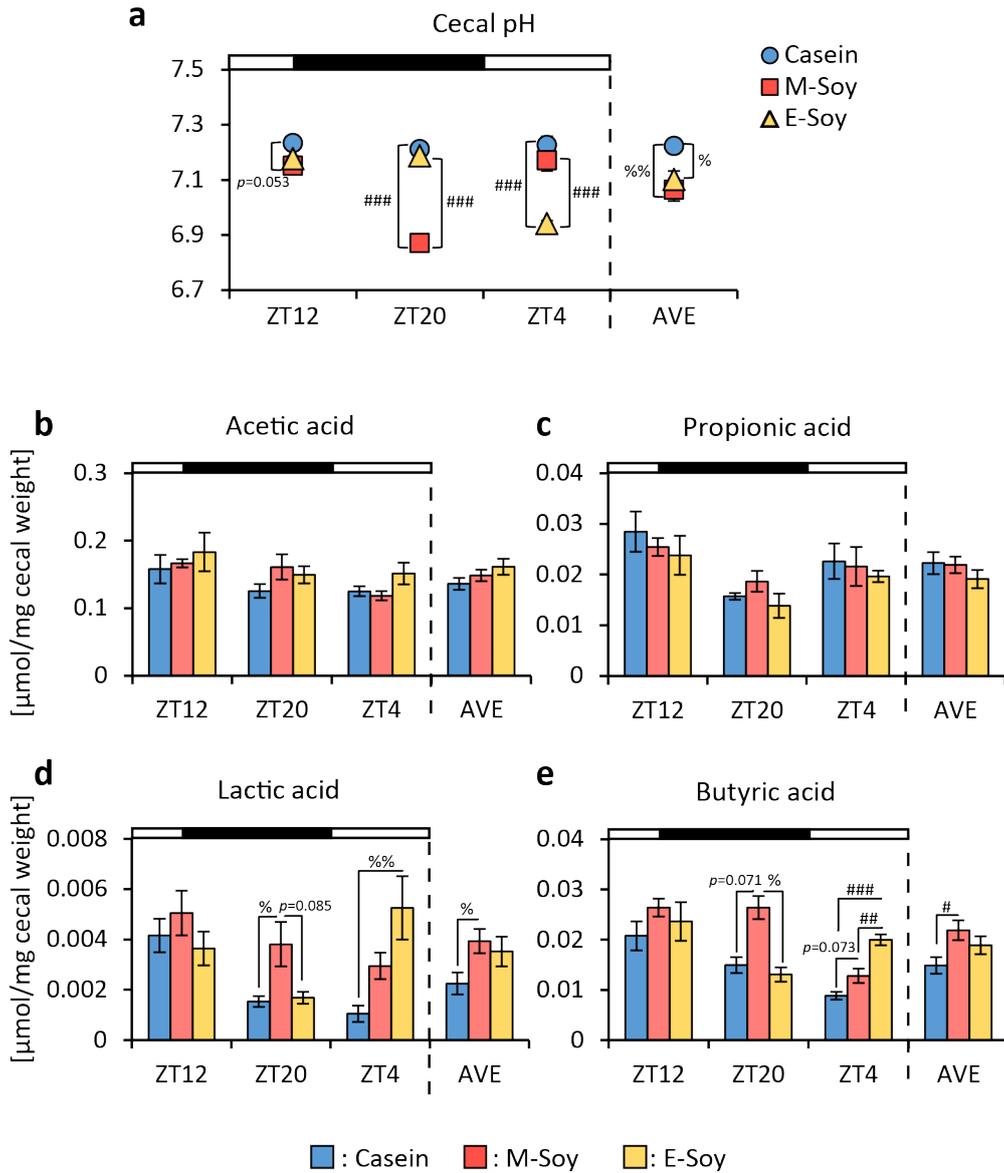


Fig.3.11 実験2：盲腸pHとSCFA

14日間摂食後のZT12, ZT20, ZT4および3ポイントの平均値における(a)盲腸pH (b)酢酸, (c)プロピオン酸, (d)乳酸, (e)酪酸。データは平均値±標準誤差で表す。データのn数 (各群各ポイントn=5)。# p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001, one-way ANOVA with Tukey's post-hoc testを使用。% p<0.05, %% p<0.01, Kruskal-Wallis test with Dunn's post-hoc testを使用。

盲腸内 pH が低下し、SCFA 生産量の増加が確認されたため、腸内細菌叢の構成が変化した可能性が考えられた。そこで、次に糞便から 16S rRNA を抽出し腸内細菌叢を分析した。その結果、Simpson Index は、AVE において M-Soy 群が他群よりも高い傾向があった (Fig.3.12)。

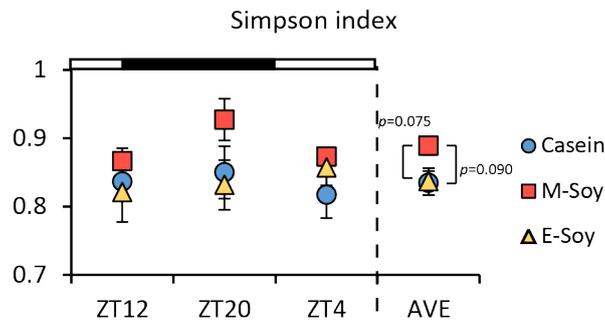


Fig.3.12 実験 2 : 腸内細菌叢の  $\alpha$  多様性

Simpson index で示した腸内細菌叢の  $\alpha$  多様性。データは平均値 $\pm$ 標準誤差で表す。データの n 数 (各群各ポイント n=5)。

次に各群の腸内細菌叢の構成を比較するために Unweighted UniFrac 距離による  $\beta$  多様性を測定した。その結果、大豆タンパク質摂食開始 8 時間後 (ZT20、ZT4) のポイントのみに着目した時の  $\beta$  多様性は、ZT20 において Casein 群と M-Soy 群が有意に異なっていた (Fig.3.13a)。一方、ZT4 においては Casein 群と E-Soy 群では有意な差はなかった (Fig.3.13b)。すべてのポイント (ZT12, ZT20, ZT4) を合わせた時の  $\beta$  多様性は、Casein 群と M-Soy 群で有意に異なり (統計値= 2.478、 $p = 0.002$ ) (Fig.3.13c)、Casein 群と E-Soy 群でも有意に異なっていた (統計値= 1.460、 $p = 0.048$ ) (Fig.3.13d)。

以上より、朝食に大豆タンパク質を摂食すると腸内細菌叢が有意に変化した一方、夕食ではその変化が見られなかったことから、夕食よりも朝食に大豆タンパク質を摂食した方が腸内細菌叢に大きく影響することが考えられた。

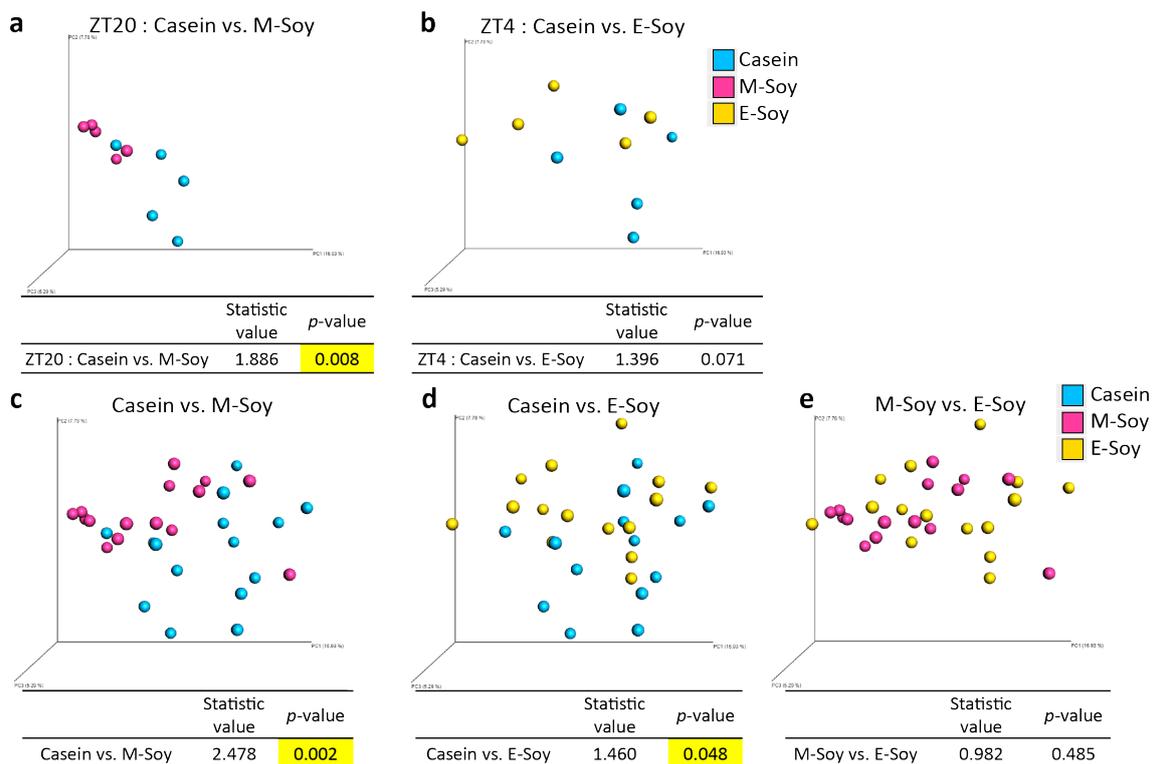


Fig.3.13 実験2：腸内細菌叢の $\beta$ 多様性

(a) 朝食摂食開始8時間後 (ZT20) におけるカゼイン摂食と大豆摂食の構成比較。(b) 夕食摂食開始8時間後 (ZT4) におけるカゼイン摂食と大豆摂食の構成比較。(c) 全ポイント (ZT12, ZT20, ZT4) における Casein 群と M-Soy 群の構成比較。(d) 全ポイント (ZT12, ZT20, ZT4) における Casein 群と E-Soy 群の構成比較。(e) 全ポイント (ZT12, ZT20, ZT4) における M-Soy 群と E-Soy 群の構成比較。データの n 数 (各群各ポイント n=5)。PERMANOVA の結果を図中の表に示す。

次に、具体的にどの細菌が変化しているのかを調べるために、各群における腸内細菌の相対存在量を調べた。実験1で検出された各群の細菌叢の全体像を門レベル (Fig.3.14a) と属レベル (Fig.3.14b) についてそれぞれ積み上げグラフで示す。本実験で特に着目する細菌を赤棒で示し、その詳細結果を Fig.3.15 に示す。

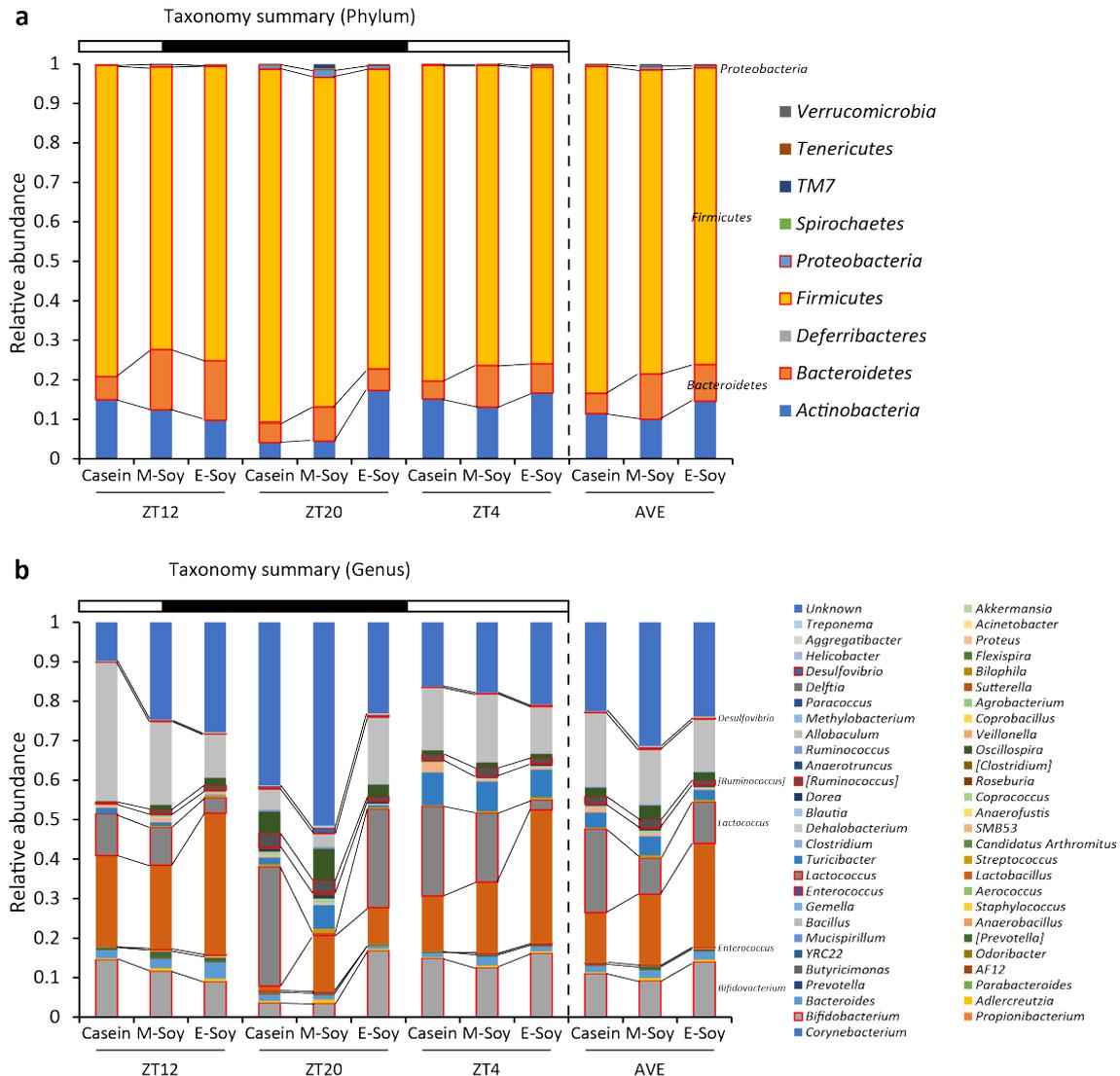


Fig.3.14 実験 2：腸内細菌の相対存在量（全体像）

(a) 門レベル。(b) 属レベル。データは平均値で表す。データの n 数 (各群各ポイント n=5)。

門レベルについては、*Bacteroidetes* (AVE) は M-Soy 群の方が Casein 群よりも有意に増加した (Fig.3.15a)。*Firmicutes* (ZT20, AVE) は E-Soy 群の方が Casein 群よりも有意に減少した (Fig.3.15c)。属レベルについては、*Lactococcus* は ZT20 において M-Soy 群が他群よりも有意に減少し、ZT4 において E-Soy 群が他群よりも有意に減少した (Fig.3.15f)。AVE において M-Soy 群は Casein 群よりも有意に減少したが、E-Soy 群は Casein 群よりも減少傾向を示したのみ

であった (Fig.3.15f)。[*Ruminococcus*] (ZT20) は E-soy 群が他群よりも有意に減少した (Fig.3.15g)。

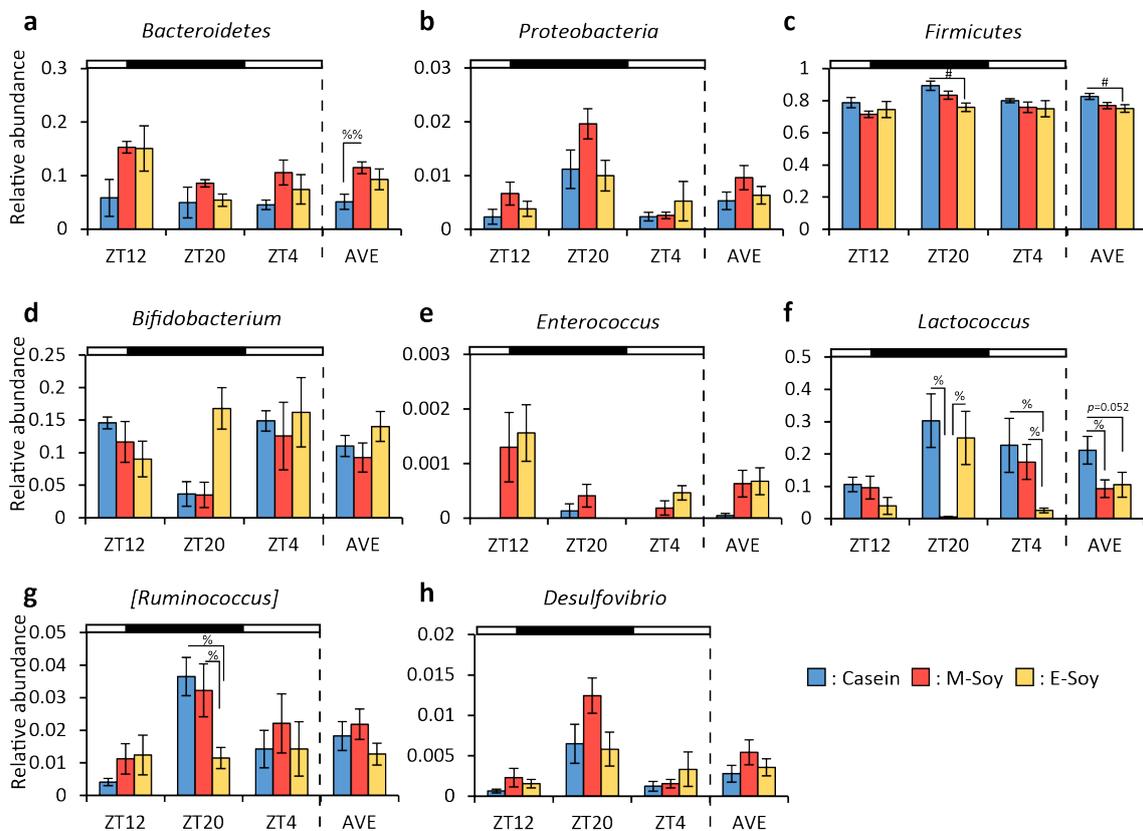


Fig.3.15 実験 2：腸内細菌の相対存在量（詳細）

(a-c) 門レベルにおける相対存在量 ((a): *Bacteroidetes*, (b): *Proteobacteria*, (c): *Firmicutes*)。 (d-h) 属レベルにおける相対存在量 ((d): *Bifidobacterium*, (e): *Enterococcus*, (f): *Lactococcus*, (g): [*Ruminococcus*], (h): *Desulfovibrio*)。データは平均値±標準誤差で表す。データの n 数 (各群各ポイント n=5)。# p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001, one-way ANOVA with Tukey's post-hoc test を使用。% p<0.05, %% p<0.01, Kruskal-Wallis test with Dunn's post-hoc test を使用。

さらに、PICRUST を使用してシーケンスデータから腸内細菌叢の機能を予測した。その結果「エネルギー代謝」の「窒素代謝」(AVE) は M-Soy 群が他群よりも増加する傾向を示した (Fig.3.16)。

以上より、朝食の大豆タンパク質摂食は、夕食の摂食よりも窒素代謝を活性化させ、大豆タ

ンパク質の代謝を促進していることが考えられる。

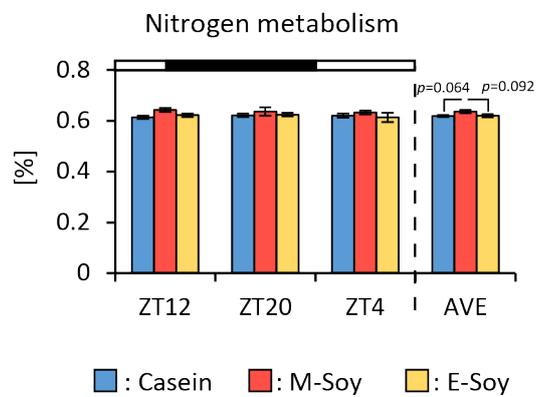


Fig.3.16 実験2：腸内細菌叢の機能解析

14日間摂食後のZT12,ZT20,ZT4および3ポイントの平均値における「窒素代謝」に関連する機能。データのn数(各群各ポイントn=5)。

### 3.4.考察

本実験では、10日間の大豆タンパク質摂食により、血清コレステロールと脂肪酸合成関連遺伝子の発現量が低下した (Fig.3.2a, c, d, e)。さらに、盲腸内pHが低下し (Fig.3.3a)、SCFA産生量が増加し (Fig.3.3b, c, d, e)、腸内細菌叢の構成が変化した (Fig.3.5)。朝食または夕食に大豆タンパク質を2週間摂食すると、大豆タンパク質摂食開始から8時間後において盲腸内pHの低下 (Fig.3.11a)、乳酸と酪酸の産生量増加が見られた (Fig.3.11d, e)。また、朝食の大豆タンパク質摂食は、夕食の大豆タンパク質摂取よりも、乳酸・酪酸産生および盲腸内pH低下に長期間で影響を与え (Fig.3.11a, d, e)、腸内細菌叢の構成を変化させ (Fig.3.13a, b)、腸内細菌叢の多様性を増加させた (Fig.3.12)。つまり、大豆タンパク質は、夕食よりも朝食に摂食することで、腸内細菌叢の構成を変化させ、腸内環境を改善することが考えられた。

実験1では、大豆タンパク質摂食によって、*Accl*、*Fasn*、*Srebp1c*などの脂肪酸合成関連遺伝子の発現量が低下し、血清コレステロールが減少した (Fig.3.2a, c, d, e)。大豆タンパク質が血清コレステロールやトリグリセリド、脂肪酸合成関連遺伝子の発現量を低下させることがすでに報告されている<sup>44,142</sup>。これらの先行研究<sup>44,142</sup>では、大豆タンパク質を長期間摂食した場合の影響について調べられていた。本実験では10日間のみ摂食であったが、血清コレステロールと脂肪酸合成関連遺伝子の発現量を低下させることができた (Fig.3.2a, c, d, e)。一方、腸内細菌叢によって生成されたSCFAは、MAPK経路の活性化を介してGLP-1の発現を増加させること、GLP-1が脂肪酸合成関連遺伝子のmRNA発現の低下を誘発することが知られている<sup>153-155</sup>。つまり、大豆タンパク質の摂取によるSCFA産生量増加は、脂肪酸合成関連遺伝子の発現量低下と相関している可能性が考えられる。

先行研究より、大豆タンパク質を摂食した時の腸内細菌叢の構成は、牛乳タンパク質を摂食した時の構成と全く異なり、腸内細菌叢の多様性は大豆タンパク質摂食のほうが増加する

44,56,142,143。しかしながら、これらの先行研究<sup>44,56,142,143</sup>では、大豆タンパク質を長期間摂食させたことで体重増加抑制も引き起こされている。つまり、先行研究<sup>44,56,142,143</sup>の結果は、大豆タンパク質による抗肥満効果の結果、腸内細菌叢の構成が変化した可能性が考えられた。しかし、本実験は10日間のみ大豆タンパク質を摂食させ、体重増加抑制効果が確認される前の段階で、腸内細菌叢の構成が変化することを示した (Fig.3.5)。つまり、大豆タンパク質摂食それ自体が腸内細菌叢を変化させ、その結果、抗肥満効果が得られることが考えられる。この結論を裏付けるためには、Casein群とSoy群の腸内細菌叢を無菌マウスに移植し、同組成の餌を摂食させて飼育し、体重の増加率がCasein群を移植させたマウスよりもSoy群を移植させたマウスの方が低ければ、腸内細菌叢の構成が原因で抗肥満効果が得られたといえるだろう。

また、大豆タンパク質の摂食によってさまざまな腸内細菌の相対存在量に変化した (Fig.3.6, Fig.3.7)。*Firmicutes*は肥満因子として知られており、肥満の人でその相対存在量が増加する<sup>35</sup>。そして、この*Firmicutes*が増えている肥満の人の腸内細菌叢を無菌マウスに移植すると、健常者の腸内細菌叢を移植したマウスと比較して、通常餌を摂食していても体脂肪が増加しやすくなる<sup>14</sup>。つまり、*Firmicutes*は肥満の原因因子であることを示している<sup>14,35</sup>。本実験では、*Firmicutes*が大豆タンパク質摂食により減少した (Fig.3.7c)。この結果は、大豆タンパク質が*Firmicutes*を減少させることで抗肥満効果をもたらす可能性があることを示唆している。*Bifidobacterium breve*を乳児に経口投与すると、消化器疾患を予防できることが報告されている<sup>156</sup>。本実験では*Bifidobacterium*が大豆タンパク質摂食により増加した (Fig.3.7d)。そのため、大豆タンパク質摂食は*Bifidobacterium*の相対存在量を増加させ、消化器疾患を予防する可能性が考えられる。*Lactococcus*は乳酸を産生することが知られているが<sup>25</sup>、本実験では大豆タンパク質摂食により*Lactococcus*が減少した (Fig.3.7f)。これは、*Lactococcus*が生乳、チーズ、および他の乳製品に一般的に見られる細菌であり<sup>25</sup>、乳タンパク質であるカゼインを摂取した方が増殖しやすかった

可能性が考えられる。本実験では、大豆タンパク質の摂取により *Proteobacteria* と *Desulfovibrio* が増加した (Fig.3.7b, h)。 *Desulfovibrio* は自身が産生した硫化水素により宿主の腸管バリア機能障害を引き起こす可能性が示唆されている<sup>157</sup>。本実験では、このような健康に負の作用をもたらす可能性のある細菌が増加している (Fig.3.7b, h)。この細菌が増加した理由や大豆タンパク質が腸内細菌叢に影響するメカニズムは不明である。将来的には、個々の細菌と大豆タンパク質の影響を調べることで明確になるかもしれない。

実験2では、大豆タンパク質の摂食タイミング (朝食または夕食) が腸内細菌叢に及ぼす影響を調べた。大豆タンパク質の摂取量は実験1よりも実験2の方が少なかったため、実験2における血清コレステロールや脂肪酸合成関連遺伝子の発現量に対する影響は、実験1よりも小さくなった (Fig.3.10a, c, d, e)。また、実験1と実験2の血清コレステロールの1日平均値を比べると、実験2の方が実験1よりも、全体的に血清コレステロールが低くなっている (Fig.3.2a, Fig.3.10a)。先行研究より、1日8時間の時間制限給餌条件下でマウスを飼育すると、マウスのエネルギー代謝が改善され、肥満を予防する<sup>94</sup>。本実験では、餌の量だけでなく摂食タイミングも制限した。そのため、給餌スケジュールそれ自体が、血清コレステロールや脂肪酸合成関連遺伝子の発現量を低下させた可能性があり、大豆タンパク質摂食によるこれらの低下効果が評価しにくくなった可能性がある。一方で、実験1では大豆タンパク質摂食により血清コレステロールが低下したが (Fig.3.2a)、実験2では朝食の大豆タンパク質摂食により血清コレステロールの増加傾向を示した (Fig.3.10a)。この詳細な理由はわからないが、摂食量を制限させた給餌スケジュールが影響したかもしれない。

腸内細菌叢への影響について、大豆タンパク質を摂食して8時間後の時刻においては、大豆タンパク質を朝食に摂食しても夕食に摂食しても、カゼイン摂取群と比較して、盲腸内pHの低下と乳酸・酪酸産生量の増加が見られた (Fig.3.11a, d, e)。しかし、ZT20におけるM-Soy群とZT4

におけるE-Soy群との間に大きな差はなく、大豆タンパク質の摂取時刻の違いによる差は見られなかった (Fig.3.11a, d, e)。この結果は、朝食摂食によっても夕食摂食によっても、大豆タンパク質がカゼインタンパク質と比較して、腸内細菌叢に有益な効果をもたらす可能性があることを示唆している。本実験では8時間ごとにサンプルを収集したため、3ポイントでの平均値を算出し、1日を通しての効果について議論を行う。朝食の大豆タンパク質摂食では、大豆タンパク質を摂食する前のポイント (ZT12) においても盲腸内pHが低下傾向にあり、1日平均では乳酸と酪酸の産生量が増加した (Fig.3.11a, d, e)。よって、全体として、朝食の大豆タンパク質摂食は、夕食の大豆タンパク質摂食よりも、SCFA生産と盲腸内pH低下に長期的な影響を与える可能性があることを示唆している。腸内細菌叢の構成を比較すると、大豆タンパク質を朝食に摂食した場合においてのみ、カゼイン摂食群と比較して有意な構成変化が見られた (Fig.3.13a)。また、1日平均での腸内細菌叢の多様性も増加傾向にあった (Fig.3.12)。これらの結果より、大豆タンパク質は朝食に摂食すると、夕食に摂食するよりも大きく腸内細菌叢に影響することが示唆された。

本実験では、朝食摂食と夕食摂食の差が生じたメカニズムについては検討していない。しかし、2章で述べたように、朝食摂食と夕食摂食の差は絶食時間の長さが影響している可能性が考えられる。つまり、長い絶食時間後の朝食摂食により蠕動運動が促進され、その時に大豆タンパク質を摂食したことで、腸内細菌叢に大きく影響したことが考えられる。本実験においても、絶食時間を等しくした摂食スケジュールでの検証を行うことで、朝食と夕食の差が生じるメカニズムを解明することができるかもしれない。

PICRUStを使用して、腸内細菌叢機能を予測したところ、大豆タンパク質摂食により窒素代謝に関連する機能が増加した (Fig.3.8, Fig.3.16)。大豆タンパク質摂食による窒素代謝機能の増加は、大豆タンパク質中のレジスタントプロテインが腸内細菌によって代謝されることを示唆

している。そして、これらの機能は朝食摂食で有意に増加していた (Fig.3.16)。つまり、朝食の大豆タンパク質摂食は夕食摂食よりも、これらの機能に強い影響を与え、大豆タンパク質の代謝を促進している可能性を示唆している。ただし、PICRUSTはあくまでも予測ツールであるため、大豆タンパク質摂食による機能変化を決定するためには、メタゲノム解析を実施する必要があるだろう。

### 3.5 小括

短期間の大豆タンパク質の摂食は、腸内細菌叢の構成を変化させ、SCFA産生と盲腸内pHの低下を引き起こし、脂質代謝の改善にも有効であった。また、大豆タンパク質の摂食タイミングについて検証すると、朝食の大豆タンパク質摂食は夕食の摂食よりも腸内細菌叢に強く影響する可能性が考えられた。

#### 4章. 総括

本研究では、2章ではイヌリン、3章では大豆タンパク質と、2つの章を通して腸内細菌叢と摂食タイミングに関する検証を行った。イヌリンも大豆タンパク質も腸内細菌叢の構成に影響を与え、短鎖脂肪酸を産生し、盲腸内pHを低下させた (Fig.2.4, Fig.2.6, Fig.3.3, Fig.3.5)。そして、摂食タイミングに関する検証を行ったところ、どちらの栄養素でも夕食よりも朝食に摂食することで腸内細菌叢に強く影響する可能性が示唆された (Fig.2.18, Fig.2.20, Fig.3.11, Fig.3.13)。そして、2章で検証を行ったが、この朝食と夕食の差は絶食時間の長さに関係していることを示した (Fig.2.25, Fig.2.27)。本研究のまとめとして、摂食スケジュールが同じである2章の実験3 (Fig.2.16) と3章の実験2 (Fig.3.9) の結果を Table.4.1 にまとめる。

Table.4.1 等食摂食条件下における本研究の結果のまとめ

## 等食摂食条件下において

	イヌリン (2.3.3 実験3)	大豆タンパク質 (3.3.2 実験2)		
盲腸内pH	朝:↓ 夕:↓ 朝 < 夕	朝:↓ 夕:↓ 朝 = 夕		
酢酸	朝:— 夕:—	朝:— 夕:—		
SCFA プロピオン酸	朝:↑ 夕:↑	朝:— 夕:—		
乳酸	朝:↑ 夕:—	朝:↑ 夕:—		
酪酸	朝:↑ 夕:—	朝:↑ 夕:—		
α多様性	朝:— 夕:—	朝:↑ 夕:—		
β多様性	Weighted UniFracによる解析 朝:有意に変化 夕:—	Unweighted UniFracによる解析 朝:有意に変化 夕:—		
有意に変化した細菌 (門レベル)	朝 —	夕 <i>Proteobacteria</i> : ↓	朝 <i>Bacteroidetes</i> : ↑	夕 <i>Firmicutes</i> : ↓
有意に変化した細菌 (属レベル)	朝 <i>Butyricimonas</i> : ↑ <i>Lactococcus</i> : ↓ <i>Oscillospira</i> : ↓ <i>Desulfovibrio</i> : ↓ <i>Staphylococcus</i> : ↓	夕 <i>Odoribacter</i> : ↓ <i>Oscillospira</i> : ↓	朝 <i>Lactococcus</i> : ↓	夕 —
属レベルにおける 有意に変化した細菌数 /検出された細菌数	5/67	2/67	1/54	0/54

等食の摂食条件下において、イヌリン摂食によっても大豆タンパク質摂食によっても、腸内細菌叢の構成を変化させた (Fig.2.20, Fig.3.13, Table.4.1)。しかし、有意に変化した腸内細菌には相違があり、2つの実験で共通しているのは、朝食摂食によって *Lactococcus* の相対存在量が減少するという点のみであった (Fig.2.22g, Fig.3.15f, Table.4.1)。各栄養素がなぜそれぞれ異なる細菌に作用したのかという詳細なメカニズムはわからないが、食物繊維とタンパク質の代謝経

路が異なることが関係しているかもしれない。炭水化物は解糖系を経てピルビン酸へ代謝され、タンパク質は各アミノ酸に対応する酵素によってピルビン酸へ代謝される<sup>6</sup>。なお、ピルビン酸から SCFA を産生する経路は共通の経路となる<sup>6</sup>。そして解糖系はほぼ全ての腸内細菌に備わっているが<sup>158</sup>、タンパク質からピルビン酸までの代謝に関与する腸内細菌は *Bacteroides*、*Clostridium*、*Propionibacterium*、*Fusobacterium*、*Streptococcus*、*Lactobacillus* と限られている<sup>139</sup>。つまり、各栄養素が大腸にまで到達した後、刺激され反応する腸内細菌が各栄養素によって異なっていることが関係しているかもしれない。また、 $\beta$  多様性の結果について、実験 2 では Weighted UniFrac 距離による解析で有意な構成変化が確認され、実験 3 では Unweighted UniFrac 距離による解析で有意な構成変化が確認された (Fig.2.20, Fig.3.13, Table.4.1)。Weighted UniFrac は腸内細菌の存在比を加味した算出法で、全ての個体に存在しているようなメジャーな腸内細菌の結果が反映されやすくなる。一方、Unweighted UniFrac は腸内細菌の存在比を無視した算出法で、個体によって存在したりしなかったりするような存在量の少ないマイナーな腸内細菌の結果が反映されやすくなる<sup>116,117</sup>。つまり、イヌリンはメジャーな細菌に影響を与えて腸内細菌叢の構成を変化させ、大豆タンパク質はマイナーな細菌に影響を与えて腸内細菌叢の構成を変化させていることを示している。この栄養素によって影響を与える細菌が異なっていることも、代謝経路の違いが関係しているかもしれない。いずれにしてもイヌリンと大豆タンパク質が補完し合いより良い腸内細菌叢を形成するのであれば、この両者を摂取した時の腸内細菌叢の解析が面白いかもしれない。

朝食摂食と夕食摂食に見られた差は絶食時間の長さに関係していることがわかった (Fig.2.25, Fig.2.27)。これは絶食時間が長くなることで蠕動運動の反応が大きくなることが関係していると考えられる。つまり、長い絶食時間後の朝食摂食により蠕動運動が促進され、さらにイヌリンや大豆タンパク質といった栄養素自体の効果で、腸内細菌叢の構成に大きく影響を与えたと

考えられる。この絶食時間の長さは一つの要因にすぎず、概日時計との関連は無視することはできないだろう。消化管にも *Per*、*Cry*、*Bmal1*、*Clock* などの時計遺伝子が発現し、特に大腸で多く発現している<sup>159</sup>。また、腸管の粘膜固有層よりも上皮層で多く発現しており、蠕動運動の日内リズムを制御すると考えられている<sup>159,160</sup>。そのため、例えば絶食時間の長さに関係なく摂食タイミングそのものが腸内細菌叢に影響することも考えられる。今回検証したイヌリン、大豆タンパク質以外にも難消化性デキストリン<sup>161</sup>、魚油<sup>45</sup>、クロロゲン酸<sup>162</sup>、EGCG<sup>163</sup>など腸内細菌叢に影響を及ぼす栄養素が知られている。これらの栄養素についても摂食タイミングを検討し、長い絶食時間後の朝食摂食で腸内細菌叢に強く影響することがわかれば、より絶食時間と腸内細菌叢の関係性が明確になるだろう。

朝食のイヌリンまたは大豆タンパク質摂食により短鎖脂肪酸の産生量が有意に増加したが、短鎖脂肪酸の中でも乳酸と酪酸において有意な増加が見られた (Fig.2.18d, e, Fig.3.11d, e, Table.4.1)。これはイヌリンと大豆タンパク質が乳酸産生菌と酪酸産生菌に影響し、乳酸産生と酪酸産生を促したためだと考えられる。先行研究より、イヌリンの摂食が *Bifidobacterium* (乳酸・酪酸産生) または *Lactobacillus* (乳酸産生) を増加させること<sup>46,105</sup>、大豆タンパク質の摂食が *Oscillibacter* (酪酸産生) と *Lactobacillus* (乳酸産生) を増加させることが知られている<sup>50</sup>。

しかし、実際に腸内細菌叢の構成を調べてみると、先行研究で知られている細菌の有意な増加は見られなかった (Fig.2.21b, Fig.2.22, Fig.3.14b, Fig.3.15, Table.4.1)。これは本実験条件においては、特定の数種類のみ乳酸・酪酸産生菌が増加したのではなく、複数の乳酸・酪酸産生菌が増加したためだと考えられる。腸内細菌が炭水化物・タンパク質を代謝して産生したピルビン酸は、各細菌の持つ SCFA 産生経路を経て、SCFA が産生される<sup>6</sup>。この時、各 SCFA を産生する腸内細菌は複数存在する<sup>69</sup>。例えば、*Bacteroides* や *Desulfovibrio* は酢酸を産生する菌で<sup>7</sup>、*Bacteroides*、*Lachnospiraceae*、*Ruminococcus* はプロピオン酸を産生する菌である<sup>8</sup>。さらに、

*Butyricinomonas*、*Coprococcus*、*Eubacterium*、*Bifidobacterium* は酪酸を産生し<sup>69</sup>、*Streptococcus*、*Lactococcus*、*Lactobacillus*、*Bifidobacterium* は乳酸を産生する<sup>6</sup>。また、ピルビン酸からどの細菌が何の短鎖脂肪酸を産生するかは、周囲のエネルギー源や細菌叢などの環境条件によって決まる<sup>158</sup>。例えば、*Bifidobacterium* は炭素源に限りのある条件で培養すると酢酸を産生するが、炭素源が多い条件では乳酸を産生する<sup>158</sup>。さらに、*Clostridium* は *Bifidobacterium* によって産生された乳酸を利用してプロピオン酸を産生する<sup>158</sup>。また、*Bacteroides* は炭素源が多い条件で培養すると酢酸を産生し、炭素源が少ない時はプロピオン酸を産生する<sup>158</sup>。以上を考慮すると、本実験では特定の乳酸・酪酸産生細菌の有意な増加は確認されなかったものの、複数の乳酸・酪酸産生菌が少しずつ増加し、それらの総和の結果として有意な乳酸・酪酸産生の増加が確認されたと考えられる。

イヌリンや大豆タンパク質などが盲腸内で発酵・分解を受けると、盲腸が肥大することが知られている<sup>164</sup>。そこで、2章と3章の全ての実験において、サンプリング時に測定しておいた盲腸内容物の全重量と、短鎖脂肪酸量の相関を調べた (Fig.4.1)。その結果、乳酸と盲腸内容物、酪酸と盲腸内容物に有意な正の相関が確認された (Fig.4.1c, d)。よって、先行研究<sup>164</sup>のとおり、イヌリンや大豆タンパク質が盲腸内で発酵・分解を受け、乳酸や酪酸が産生されると、盲腸内容物重量が増大し、盲腸が肥大することが確認された。したがって、濃度としての 1 mg の盲腸内容物重量あたりの乳酸・酪酸量の増加だけでなく、盲腸内に含まれている全量としての乳酸・酪酸量も増加していると考えられる。

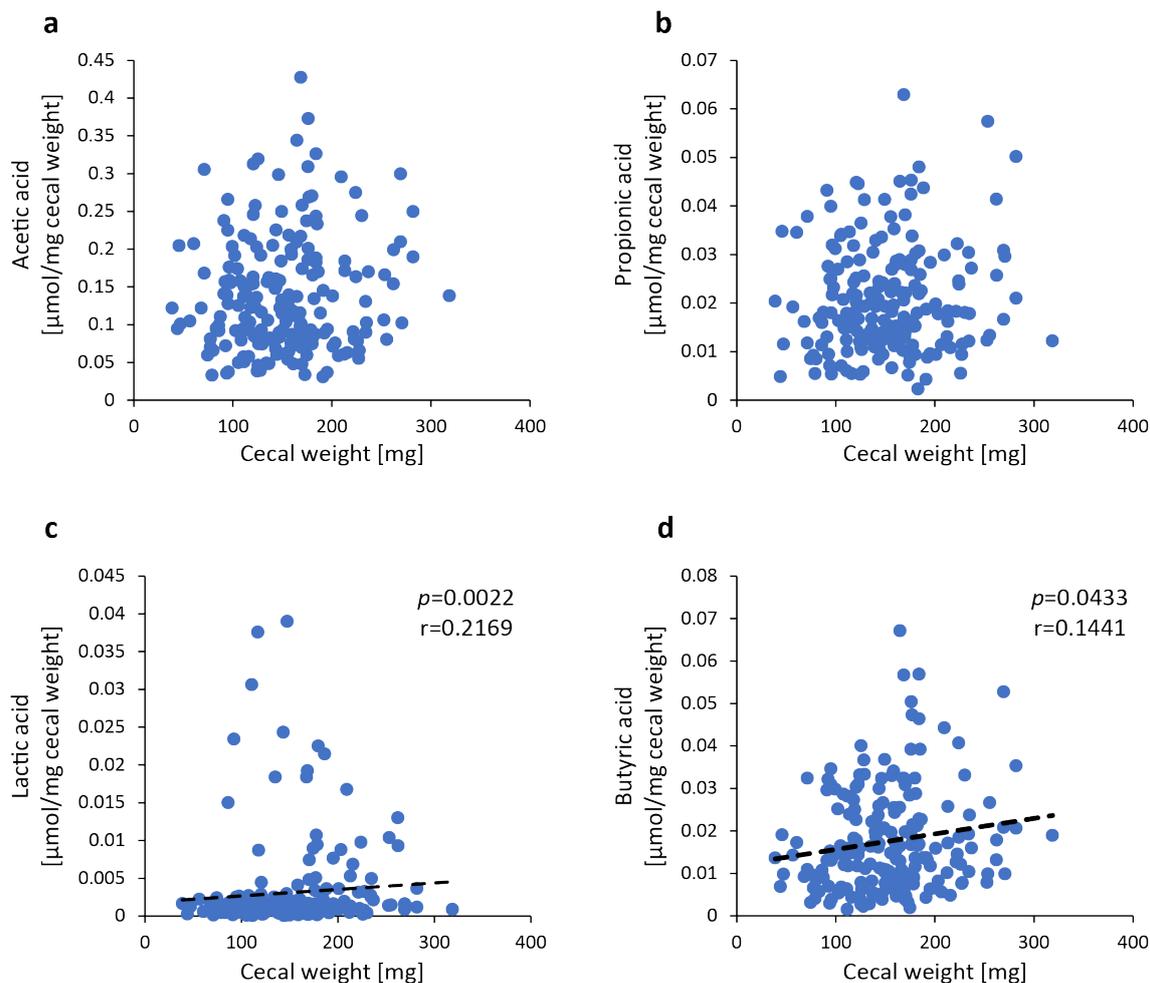


Fig.4.1 短鎖脂肪酸量と盲腸内容物重量の相関

(a) 酢酸と盲腸内容物重量の相関。(b) プロピオン酸と盲腸内容物重量の相関。(c) 乳酸と盲腸内容物重量の相関。(d) 酪酸と盲腸内容物重量の相関。r 値と p 値は Spearman の相関分析により計算。

有意な相関が見られたものには黒の破線を記載した。全データ数 n=197。

マウスでの先行研究より、通常餌を摂食した時と比較して、高脂肪食を摂食すると、腸内細菌叢の構成が大きく変化し、短鎖脂肪酸量が減少し、腸内細菌叢の多様性が低下する<sup>15,165</sup>。さらに腸管のバリア機構の低下と *TNF-α* や *IL-6* などの炎症性関連遺伝子の増加も確認され、腸内環境が悪化する<sup>166</sup>。本実験では、高脂肪食にイヌリンを添加し、摂食することで腸内細菌叢の構成変化と、短鎖脂肪酸量の増加が確認されたが (Fig.2.18, Fig.2.20)、通常餌との比較がされていないため、イヌリンにより短鎖脂肪酸の低下がどれだけ改善されたのか、腸内細菌叢の構

成がどのように変化したのかはわからない。通常餌、高脂肪食、高脂肪食+イヌリンの3種の餌を用いて、腸内細菌叢の構成を比較した研究では、通常餌と高脂肪食の腸内細菌叢の構成は全く異なるものになり、さらに、高脂肪食+イヌリンは高脂肪食とも通常餌とも全く異なる腸内細菌叢の構成を示した<sup>167</sup>。つまり、以上を考慮すると、本実験で使用したイヌリンは高脂肪食によって変化した腸内細菌叢の構成を、通常餌摂食時の構成へと改善するのではなく、全く異なる腸内細菌叢の構成へと変化させることで、短鎖脂肪酸量を増加させたと考えられる。

本研究で使用したイヌリンはフジ日本精糖により精製されたイヌリンであり、大豆タンパク質の実験においては餌中のタンパク質源をすべて大豆タンパク質にした。しかし、実際のヒトの食生活を踏まえると、精製されたイヌリンを食べることは少なく、菊芋やゴボウなどイヌリンが多く含まれているが、イヌリン以外の物質も含まれた野菜として食べることが多い。タンパク質に関しても、タンパク質は様々な食品に含まれており、大豆タンパク質だけを食べる食生活はほとんどないだろう。食物繊維に関する先行研究では、水溶性食物繊維だけではなく不溶性食物繊維も同時に摂食すると、水溶性食物繊維単独で食べたときと全く異なる腸内細菌叢の構成に変化することが報告されている<sup>168</sup>。また、当研究室の予備的なデータではあるが、水溶性食物繊維だけでなく、不溶性食物繊維と組み合わせて摂食することが腸内細菌叢により強く影響するというデータもある。これは、不溶性食物繊維の持つ蠕動運動促進効果が腸内細菌叢に良い影響を与えた可能性が考えられる。また、不溶性食物繊維が腸内細菌叢の代謝産物を吸着し、体外へ排出したことも、腸内細菌叢の構成に影響する可能性が考えられる。いずれにせよ、複数の食物繊維・食品成分による腸内細菌叢への影響は十分に考えられる。したがって、イヌリン単体のみや大豆タンパク質単体のみによる腸内細菌叢への影響だけでなく、複数の食品成分の組み合わせによる検証を行うと、よりヒトの実生活に近いモデルでの研究結果が得られるかもしれない。

本研究は摂食タイミングが腸内細菌叢に及ぼす影響について検証した。しかし、1章でも述べたように、腸内細菌叢に影響を及ぼす要因は、食以外にも運動や喫煙・飲酒、薬物使用など多岐にわたる。これらの要因についても、その実施タイミングが腸内細菌叢にどのような影響を与えるのかはまだ報告されていない。運動に関して、運動の実施タイミングがエネルギー代謝に及ぼす影響は複数の報告があるものの<sup>169,170</sup>、運動の実施タイミングによって腸内細菌叢の構成変化が異なるかどうかの報告はない。そのため今後は、運動の実施時刻、喫煙タイミング、薬物の使用時刻などが、腸内細菌叢へ与える影響を調べ、最適なタイミングを解明することで、腸内細菌叢改善を介した疾患予防のための生活サイクルの提案が可能になり、予防医療への社会貢献へと繋げることができるだろう。

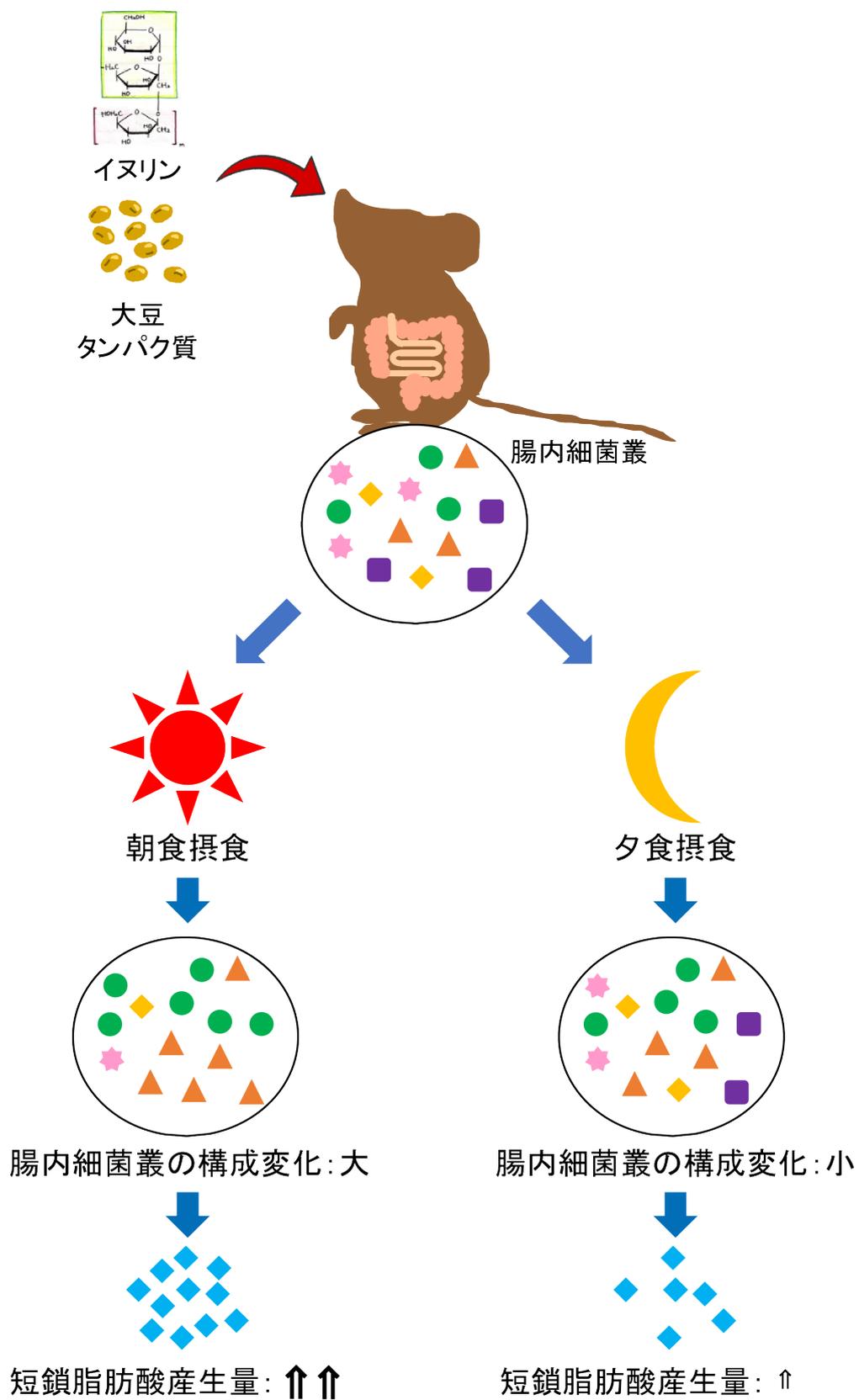


Fig.4.2 本研究のまとめ

## 参考文献

- 1 Mitsuoka, T. The progress of intestinal microbiota research. *Journal of Intestinal Microbiology* **25**, 113-124, doi:10.11209/jim.25.113 (2011).
- 2 Sekirov, I., Russell, S. L., Antunes, L. C. M. & Finlay, B. B. Gut microbiota in health and disease. *Physiological Reviews* **90**, 859-904, doi:10.1152/physrev.00045.2009 (2010).
- 3 Marchesi, J. R. *et al.* The gut microbiota and host health: A new clinical frontier. *Gut* **65**, 330-339, doi:10.1136/gutjnl-2015-309990 (2016).
- 4 Hattori, M. Advanced technologies for the human gut microbiome analysis. *Japanese Journal of Clinical Immunology* **37**, 412-422, doi:10.2177/jsci.37.412 (2014).
- 5 den Besten, G. *et al.* The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of lipid research* **54**, 2325-2340, doi:10.1194/jlr.R036012 (2013).
- 6 Koh, A., De Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P. & Backhed, F. From dietary fiber to host physiology: Short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. *Cell* **165**, 1332-1345, doi:10.1016/j.cell.2016.05.041 (2016).
- 7 Ragsdale, S. W. & Pierce, E. Acetogenesis and the wood-ljungdahl pathway of co(2) fixation. *Biochimica et biophysica acta* **1784**, 1873-1898, doi:10.1016/j.bbapap.2008.08.012 (2008).
- 8 Reichardt, N. *et al.* Phylogenetic distribution of three pathways for propionate production within the human gut microbiota. *The ISME journal* **8**, 1323-1335, doi:10.1038/ismej.2014.14 (2014).
- 9 Louis, P. *et al.* Restricted distribution of the butyrate kinase pathway among butyrate-producing bacteria from the human colon. *Journal of bacteriology* **186**, 2099-2106, doi:10.1128/jb.186.7.2099-2106.2004 (2004).
- 10 Riviere, A., Selak, M., Lantin, D., Leroy, F. & De Vuyst, L. Bifidobacteria and butyrate-producing colon bacteria: Importance and strategies for their stimulation in the human gut. *Front Microbiol* **7**, 979, doi:10.3389/fmicb.2016.00979 (2016).
- 11 Rajilic-Stojanovic, M. & de Vos, W. M. The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS microbiology reviews* **38**, 996-1047, doi:10.1111/1574-6976.12075 (2014).
- 12 安藤 朗. 新たな臓器としての腸内細菌叢. *日本消化器病学会雑誌* **112**, 1939-1946, doi:10.11405/misshoshi.112.1939 (2015).
- 13 Ley, R. E. *et al.* Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 11070-11075, doi:10.1073/pnas.0504978102 (2005).
- 14 Turnbaugh, P. J. *et al.* An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* **444**, 1027-1031, doi:10.1038/nature05414 (2006).
- 15 Hildebrandt, M. A. *et al.* High-fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity. *Gastroenterology* **137**, 1716-1724.e1711-1712, doi:10.1053/j.gastro.2009.08.042 (2009).
- 16 Shin, N. R., Whon, T. W. & Bae, J. W. Proteobacteria: Microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends Biotechnol* **33**, 496-503, doi:10.1016/j.tibtech.2015.06.011 (2015).
- 17 Gomez-Arango, L. F. *et al.* Increased systolic and diastolic blood pressure is associated with altered gut microbiota composition and butyrate production in early pregnancy. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* **68**, 974-981, doi:10.1161/hypertensionaha.116.07910 (2016).

- 18 Pluznick, J. L. Renal and cardiovascular sensory receptors and blood pressure regulation. *American journal of physiology: Renal physiology* **305**, F439-444, doi:10.1152/ajprenal.00252.2013 (2013).
- 19 Sakamoto, M. *et al.* Butyricimonas synergistica gen. Nov., sp. Nov. And butyricimonas virosa sp. Nov., butyric acid-producing bacteria in the family 'porphyromonadaceae' isolated from rat faeces. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **59**, 1748-1753, doi:10.1099/ijs.0.007674-0 (2009).
- 20 Zhang, W., Xu, J. H., Yu, T. & Chen, Q. K. Effects of berberine and metformin on intestinal inflammation and gut microbiome composition in db/db mice. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* **118**, 109131, doi:10.1016/j.biopha.2019.109131 (2019).
- 21 Hu, D.-L. & Okamura, M. Recent advances in staphylococcal enterotoxin studies: Focus on the molecular diversity and biological multifunctionality. *Japanese Journal of Food Microbiology* **32**, 87-94, doi:10.5803/jsfm.32.87 (2015).
- 22 Gomes, A. C., Hoffmann, C. & Mota, J. F. The human gut microbiota: Metabolism and perspective in obesity. *Gut microbes* **9**, 308-325, doi:10.1080/19490976.2018.1465157 (2018).
- 23 Bervoets, L. *et al.* Differences in gut microbiota composition between obese and lean children: A cross-sectional study. *Gut pathogens* **5**, 10, doi:10.1186/1757-4749-5-10 (2013).
- 24 Schleifer, K. H. *et al.* Transfer of streptococcus lactis and related streptococci to the genus lactococcus gen. Nov. *Systematic and Applied Microbiology* **6**, 183-195, doi:[https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(85\)80052-7](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(85)80052-7) (1985).
- 25 Casalta, E. & Montel, M.-C. Safety assessment of dairy microorganisms: The lactococcus genus. *International Journal of Food Microbiology* **126**, 271-273, doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.013> (2008).
- 26 Gophna, U., Konikoff, T. & Nielsen, H. B. Oscillospira and related bacteria - from metagenomic species to metabolic features. *Environ Microbiol* **19**, 835-841, doi:10.1111/1462-2920.13658 (2017).
- 27 Konikoff, T. & Gophna, U. Oscillospira: A central, enigmatic component of the human gut microbiota. *Trends in microbiology* **24**, 523-524, doi:10.1016/j.tim.2016.02.015 (2016).
- 28 Parthasarathy, G. *et al.* Relationship between microbiota of the colonic mucosa vs feces and symptoms, colonic transit, and methane production in female patients with chronic constipation. *Gastroenterology* **150**, 367-379.e361, doi:10.1053/j.gastro.2015.10.005 (2016).
- 29 Vieira-Silva, S. & Rocha, E. P. The systemic imprint of growth and its uses in ecological (meta)genomics. *PLoS genetics* **6**, e1000808, doi:10.1371/journal.pgen.1000808 (2010).
- 30 Vandeputte, D. *et al.* Stool consistency is strongly associated with gut microbiota richness and composition, enterotypes and bacterial growth rates. *Gut* **65**, 57-62, doi:10.1136/gutjnl-2015-309618 (2016).
- 31 Scanlan, P. D., Shanahan, F. & Marchesi, J. R. Culture-independent analysis of desulfovibrios in the human distal colon of healthy, colorectal cancer and polypectomized individuals. *FEMS microbiology ecology* **69**, 213-221, doi:10.1111/j.1574-6941.2009.00709.x (2009).
- 32 Huycke, M. M. & Gaskins, H. R. Commensal bacteria, redox stress, and colorectal cancer: Mechanisms and models. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)* **229**, 586-597, doi:10.1177/153537020422900702 (2004).
- 33 Gibson, G. R., Macfarlane, G. T. & Cummings, J. H. Sulphate reducing bacteria and hydrogen metabolism in the human large intestine. *Gut* **34**, 437-439, doi:10.1136/gut.34.4.437 (1993).

- 34 Hooks, K. B. & O'Malley, M. A. Dysbiosis and its discontents. *mBio* **8**, doi:10.1128/mBio.01492-17 (2017).
- 35 Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S. & Gordon, J. I. Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity. *Nature* **444**, 1022-1023, doi:10.1038/4441022a (2006).
- 36 Mai, V. & Morris, J. G., Jr. Need for prospective cohort studies to establish human gut microbiome contributions to disease risk. *Journal of the National Cancer Institute* **105**, 1850-1851, doi:10.1093/jnci/djt349 (2013).
- 37 Jiang, H. *et al.* Altered fecal microbiota composition in patients with major depressive disorder. *Brain, behavior, and immunity* **48**, 186-194, doi:10.1016/j.bbi.2015.03.016 (2015).
- 38 Cummings, J. H., Pomare, E. W., Branch, W. J., Naylor, C. P. & Macfarlane, G. T. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut* **28**, 1221-1227, doi:10.1136/gut.28.10.1221 (1987).
- 39 Okada, T. *et al.* Microbiota-derived lactate accelerates colon epithelial cell turnover in starvation-refed mice. *Nature communications* **4**, 1654, doi:10.1038/ncomms2668 (2013).
- 40 Duncan, S. H., Louis, P., Thomson, J. M. & Flint, H. J. The role of pH in determining the species composition of the human colonic microbiota. *Environmental Microbiology* **11**, 2112-2122, doi:10.1111/j.1462-2920.2009.01931.x (2009).
- 41 Fuller, R. Probiotics in man and animals. *The Journal of applied bacteriology* **66**, 365-378 (1989).
- 42 Yaeshima, T. *et al.* Effect of yogurt containing *Bifidobacterium longum* bb536 on the intestinal environment, fecal characteristics and defecation frequency  
a comparison with standard yogurt. *Bioscience and Microflora* **16**, 73-77, doi:10.12938/bifidus1996.16.73 (1997).
- 43 Gibson, G. R. & Roberfroid, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *The Journal of nutrition* **125**, 1401-1412, doi:10.1093/jn/125.6.1401 (1995).
- 44 Butteiger, D. N. *et al.* Soy protein compared with milk protein in a western diet increases gut microbial diversity and reduces serum lipids in golden syrian hamsters. *The Journal of nutrition* **146**, 697-705, doi:10.3945/jn.115.224196 (2016).
- 45 Caesar, R., Nygren, H., Oresic, M. & Backhed, F. Interaction between dietary lipids and gut microbiota regulates hepatic cholesterol metabolism. *Journal of lipid research* **57**, 474-481, doi:10.1194/jlr.M065847 (2016).
- 46 Valcheva, R. & Dieleman, L. A. Prebiotics: Definition and protective mechanisms. *Best practice & research. Clinical gastroenterology* **30**, 27-37, doi:10.1016/j.bpg.2016.02.008 (2016).
- 47 Carlson, J. L., Erickson, J. M., Lloyd, B. B. & Slavin, J. L. Health effects and sources of prebiotic dietary fiber. *Current developments in nutrition* **2**, nzy005, doi:10.1093/cdn/nzy005 (2018).
- 48 厚生労働省. 平成 29 年国民健康・栄養調査報告. 57-100 (2018).
- 49 van Loo, J., Coussement, P., de Leenheer, L., Hoebregs, H. & Smits, G. On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the western diet. *Critical reviews in food science and nutrition* **35**, 525-552, doi:10.1080/10408399509527714 (1995).
- 50 An, C., Kuda, T., Yazaki, T., Takahashi, H. & Kimura, B. Caecal fermentation, putrefaction and microbiotas in rats fed milk casein, soy protein or fish meal. *Applied Microbiology and Biotechnology* **98**, 2779-2787, doi:10.1007/s00253-013-5271-5 (2014).
- 51 Davila, A.-M. *et al.* Intestinal luminal nitrogen metabolism: Role of the gut microbiota and

- consequences for the host. *Pharmacological Research* **68**, 95-107, doi:<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.11.005> (2013).
- 52 Azuma, N., Kanaya, M., Kanamoto, R. & Iwami, K. Feeding soybean resistant protein to rats raises fecal bile acid excretion but counteracts a deoxycholate-caused decrease in colonic aberrant crypt foci. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* **45**, 183-192, doi:10.3177/jnsv.45.183 (1999).
- 53 Kayashita, J., Shimaoka, I. & Nakajoh, M. Hypocholesterolemic effect of buckwheat protein extract in rats fed cholesterol enriched diets. *Nutrition Research* **15**, 691-698, doi:[https://doi.org/10.1016/0271-5317\(95\)00036-I](https://doi.org/10.1016/0271-5317(95)00036-I) (1995).
- 54 渡辺 敏, 峰時 俊 & 友竹 浩. 二段発酵法で生まれたメタボリックシンドローム対応の新素材「酒粕難消化成分」(メタボリックシンドロームと特定健診). *Food style 21* **11**, 51-54 (2007).
- 55 Kato, N. *et al.* Silk protein, sericin, inhibits lipid peroxidation and tyrosinase activity. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **62**, 145-147, doi:10.1271/bbb.62.145 (1998).
- 56 Aoyama, T., Fukui, K., Takamatsu, K., Hashimoto, Y. & Yamamoto, T. Soy protein isolate and its hydrolysate reduce body fat of dietary obese rats and genetically obese mice (yellow kk). *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif)* **16**, 349-354, doi:10.1016/S0899-9007(00)00230-6 (2000).
- 57 Ishikawa, S. *et al.* Egg yolk proteins suppress azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation and cell proliferation in the colon of rats. *Nutrition research (New York, N.Y.)* **29**, 64-69, doi:10.1016/j.nutres.2008.12.003 (2009).
- 58 Ishiguro, T. & Murasawa, H. Kori-tofu making processes increase high-molecular-weight fraction (hmf). **44**, 613-616 (2016).
- 59 Terada, A., Yamamoto, M. & Yoshimura, E. Effect of the fermented soybean product “natto” on the composition and metabolic activity of the human fecal flora. *Japanese Journal of Food Microbiology* **16**, 221-230, doi:10.5803/jsfm.16.221 (1999).
- 60 Matsumoto, M. *et al.* Voluntary running exercise alters microbiota composition and increases n-butyrate concentration in the rat cecum. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **72**, 572-576, doi:10.1271/bbb.70474 (2008).
- 61 Hamasaki, H. Exercise and gut microbiota: Clinical implications for the feasibility of tai chi. *Journal of integrative medicine* **15**, 270-281, doi:10.1016/s2095-4964(17)60342-x (2017).
- 62 Queipo-Ortuno, M. I. *et al.* Gut microbiota composition in male rat models under different nutritional status and physical activity and its association with serum leptin and ghrelin levels. *PloS one* **8**, e65465, doi:10.1371/journal.pone.0065465 (2013).
- 63 Clarke, S. F. *et al.* Exercise and associated dietary extremes impact on gut microbial diversity. *Gut* **63**, 1913-1920, doi:10.1136/gutjnl-2013-306541 (2014).
- 64 Scheiman, J. *et al.* Meta-omics analysis of elite athletes identifies a performance-enhancing microbe that functions via lactate metabolism. *Nature medicine* **25**, 1104-1109, doi:10.1038/s41591-019-0485-4 (2019).
- 65 Costa, R. J. S., Snipe, R. M. J., Kitic, C. M. & Gibson, P. R. Systematic review: Exercise-induced gastrointestinal syndrome-implications for health and intestinal disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics* **46**, 246-265, doi:10.1111/apt.14157 (2017).
- 66 Biedermann, L. *et al.* Smoking cessation induces profound changes in the composition of the intestinal microbiota in humans. *PloS one* **8**, e59260, doi:10.1371/journal.pone.0059260 (2013).
- 67 Dubinkina, V. B. *et al.* Links of gut microbiota composition with alcohol dependence syndrome

- and alcoholic liver disease. *Microbiome* **5**, 141, doi:10.1186/s40168-017-0359-2 (2017).
- 68 Langdon, A., Crook, N. & Dantas, G. The effects of antibiotics on the microbiome throughout development and alternative approaches for therapeutic modulation. *Genome medicine* **8**, 39, doi:10.1186/s13073-016-0294-z (2016).
- 69 Maier, L. & Typas, A. Systematically investigating the impact of medication on the gut microbiome. *Current opinion in microbiology* **39**, 128-135, doi:10.1016/j.mib.2017.11.001 (2017).
- 70 Le Bastard, Q. *et al.* Systematic review: Human gut dysbiosis induced by non-antibiotic prescription medications. *Alimentary pharmacology & therapeutics* **47**, 332-345, doi:10.1111/apt.14451 (2018).
- 71 Forslund, K. *et al.* Disentangling type 2 diabetes and metformin treatment signatures in the human gut microbiota. *Nature* **528**, 262-266, doi:10.1038/nature15766 (2015).
- 72 Bajaj, J. S. *et al.* Systems biology analysis of omeprazole therapy in cirrhosis demonstrates significant shifts in gut microbiota composition and function. *American journal of physiology: Gastrointestinal and liver physiology* **307**, G951-957, doi:10.1152/ajpgi.00268.2014 (2014).
- 73 Liang, X. *et al.* Bidirectional interactions between indomethacin and the murine intestinal microbiota. *eLife* **4**, e08973, doi:10.7554/eLife.08973 (2015).
- 74 Matson, V. *et al.* The commensal microbiome is associated with anti-pd-1 efficacy in metastatic melanoma patients. *Science (New York, N.Y.)* **359**, 104-108, doi:10.1126/science.aao3290 (2018).
- 75 Routy, B. *et al.* Gut microbiome influences efficacy of pd-1-based immunotherapy against epithelial tumors. *Science (New York, N.Y.)* **359**, 91-97, doi:10.1126/science.aan3706 (2018).
- 76 Vetizou, M. *et al.* Anticancer immunotherapy by ctla-4 blockade relies on the gut microbiota. *Science (New York, N.Y.)* **350**, 1079-1084, doi:10.1126/science.aad1329 (2015).
- 77 Bass, J. & Takahashi, J. S. Circadian integration of metabolism and energetics. *Science (New York, N.Y.)* **330**, 1349-1354, doi:10.1126/science.1195027 (2010).
- 78 Shibata, S., Tahara, Y. & Hirao, A. The adjustment and manipulation of biological rhythms by light, nutrition, and abused drugs. *Advanced drug delivery reviews* **62**, 918-927, doi:10.1016/j.addr.2010.06.003 (2010).
- 79 Schibler, U., Ripperger, J. & Brown, S. A. Peripheral circadian oscillators in mammals: Time and food. *J Biol Rhythms* **18**, 250-260, doi:10.1177/0748730403018003007 (2003).
- 80 Shibata, S. Neural regulation of the hepatic circadian rhythm. *The anatomical record. Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology* **280**, 901-909, doi:10.1002/ar.a.20095 (2004).
- 81 Tahara, Y., Aoyama, S. & Shibata, S. The mammalian circadian clock and its entrainment by stress and exercise. *The journal of physiological sciences : JPS* **67**, 1-10, doi:10.1007/s12576-016-0450-7 (2017).
- 82 Tahara, Y. & Shibata, S. Entrainment of the mouse circadian clock: Effects of stress, exercise, and nutrition. *Free radical biology & medicine* **119**, 129-138, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2017.12.026 (2018).
- 83 Sasaki, H. *et al.* Forced rather than voluntary exercise entrains peripheral clocks via a corticosterone/noradrenaline increase in per2::Luc mice. *Scientific reports* **6**, 27607, doi:10.1038/srep27607 (2016).
- 84 Thaïss, C. A. *et al.* Transkingdom control of microbiota diurnal oscillations promotes metabolic homeostasis. *Cell* **159**, 514-529, doi:10.1016/j.cell.2014.09.048 (2014).

- 85 Leone, V. *et al.* Effects of diurnal variation of gut microbes and high-fat feeding on host circadian clock function and metabolism. *Cell host & microbe* **17**, 681-689, doi:10.1016/j.chom.2015.03.006 (2015).
- 86 Tahara, Y. *et al.* Gut microbiota-derived short chain fatty acids induce circadian clock entrainment in mouse peripheral tissue. *Scientific reports* **8**, 1395, doi:10.1038/s41598-018-19836-7 (2018).
- 87 Paschos, G. K. *et al.* Obesity in mice with adipocyte-specific deletion of clock component arntl. *Nature medicine* **18**, 1768-1777, doi:10.1038/nm.2979 (2012).
- 88 Turek, F. W. *et al.* Obesity and metabolic syndrome in circadian clock mutant mice. *Science (New York, N.Y.)* **308**, 1043-1045, doi:10.1126/science.1108750 (2005).
- 89 Dyar, K. A. *et al.* Erratum to "muscle insulin sensitivity and glucose metabolism are controlled by the intrinsic muscle clock" [mol metab 3 (2014) 29-41]. *Molecular metabolism* **3**, 857, doi:10.1016/j.molmet.2014.09.002 (2014).
- 90 Lamia, K. A., Storch, K. F. & Weitz, C. J. Physiological significance of a peripheral tissue circadian clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 15172-15177, doi:10.1073/pnas.0806717105 (2008).
- 91 Tahara, Y. & Shibata, S. Chrono-biology, chrono-pharmacology, and chrono-nutrition. *Journal of Pharmacological Sciences* **124**, 320-335, doi:10.1254/jphs.13R06CR (2014).
- 92 Kohsaka, A. *et al.* High-fat diet disrupts behavioral and molecular circadian rhythms in mice. *Cell metabolism* **6**, 414-421, doi:10.1016/j.cmet.2007.09.006 (2007).
- 93 Chaix, A., Zarrinpar, A., Miu, P. & Panda, S. Time-restricted feeding is a preventative and therapeutic intervention against diverse nutritional challenges. *Cell metabolism* **20**, 991-1005, doi:10.1016/j.cmet.2014.11.001 (2014).
- 94 Hatori, M. *et al.* Time-restricted feeding without reducing caloric intake prevents metabolic diseases in mice fed a high-fat diet. *Cell metabolism* **15**, 848-860, doi:10.1016/j.cmet.2012.04.019 (2012).
- 95 Zarrinpar, A., Chaix, A., Yooseph, S. & Panda, S. Diet and feeding pattern affect the diurnal dynamics of the gut microbiome. *Cell metabolism* **20**, 1006-1017, doi:10.1016/j.cmet.2014.11.008 (2014).
- 96 Bray, M. S. *et al.* Time-of-day-dependent dietary fat consumption influences multiple cardiometabolic syndrome parameters in mice. *International journal of obesity (2005)* **34**, 1589-1598, doi:10.1038/ijo.2010.63 (2010).
- 97 Baron, K. G., Reid, K. J., Kern, A. S. & Zee, P. C. Role of sleep timing in caloric intake and bmi. *Obesity (Silver Spring, Md.)* **19**, 1374-1381, doi:10.1038/oby.2011.100 (2011).
- 98 Oishi, K. *et al.* Dietary fish oil differentially ameliorates high-fructose diet-induced hepatic steatosis and hyperlipidemia in mice depending on time of feeding. *The Journal of nutritional biochemistry* **52**, 45-53, doi:10.1016/j.jnutbio.2017.09.024 (2018).
- 99 Takahashi, M. *et al.* Effects of timing of acute catechin-rich green tea ingestion on postprandial glucose metabolism in healthy men. *The Journal of nutritional biochemistry* **73**, 108221, doi:10.1016/j.jnutbio.2019.108221 (2019).
- 100 Soliman, G. A. Dietary fiber, atherosclerosis, and cardiovascular disease. *Nutrients* **11**, doi:10.3390/nu11051155 (2019).
- 101 Reddy, B. S., Watanabe, K., Weisburger, J. H. & Wynder, E. L. Promoting effect of bile acids in colon carcinogenesis in germ-free and conventional F344 rats. *Cancer research* **37**, 3238-3242 (1977).

- 102 Takahashi, Y. 繊維質と食物繊維. *日本食品科学工学会誌* **58**, 186-186,  
doi:10.3136/nskkk.58.186 (2011).
- 103 Wada, T., Ohguchi, M. & Iwai, Y. A novel enzyme of bacillus sp. 217c-11 that produces inulin  
from sucrose. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **67**, 1327-1334,  
doi:10.1271/bbb.67.1327 (2003).
- 104 Wada, T., Sugatani, J., Terada, E., Ohguchi, M. & Miwa, M. Physicochemical characterization  
and biological effects of inulin enzymatically synthesized from sucrose. *Journal of agricultural  
and food chemistry* **53**, 1246-1253, doi:10.1021/jf048711u (2005).
- 105 Hoving, L. R. *et al.* The prebiotic inulin modulates gut microbiota but does not ameliorate  
atherosclerosis in hypercholesterolemic apoe\*3-leiden.Cetp mice. *Scientific reports* **8**, 16515,  
doi:10.1038/s41598-018-34970-y (2018).
- 106 Demigne, C. *et al.* Comparison of native or reformulated chicory fructans, or non-purified  
chicory, on rat cecal fermentation and mineral metabolism. *European journal of nutrition* **47**,  
366-374, doi:10.1007/s00394-008-0736-5 (2008).
- 107 Kowalski, T. J., Farley, C., Cohen-Williams, M. E., Varty, G. & Spar, B. D. Melanin-  
concentrating hormone-1 receptor antagonism decreases feeding by reducing meal size.  
*European journal of pharmacology* **497**, 41-47, doi:10.1016/j.ejphar.2004.06.027 (2004).
- 108 Oh, J., Lee, S. R., Hwang, K. T. & Ji, G. E. The anti-obesity effects of the dietary combination  
of fermented red ginseng with levan in high fat diet mouse model. *Phytotherapy research :  
PTR* **28**, 617-622, doi:10.1002/ptr.5042 (2014).
- 109 Huazano, A. & López, M. G. Metabolism of short chain fatty acids in colon and faeces of mice  
after a supplementation of diets with agave fructans. *Lipid metabolism* **8**, 163-182,  
doi:10.5772/51248 (2013).
- 110 Nishijima, S. *et al.* The gut microbiome of healthy japanese and its microbial and functional  
uniqueness. *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes  
and genomes* **23**, 125-133, doi:10.1093/dnares/dsw002 (2016).
- 111 Caporaso, J. G. *et al.* Qiime allows analysis of high-throughput community sequencing data.  
*Nature methods* **7**, 335-336, doi:10.1038/nmeth.f.303 (2010).
- 112 Edgar, R. C. Search and clustering orders of magnitude faster than blast. *Bioinformatics  
(Oxford, England)* **26**, 2460-2461, doi:10.1093/bioinformatics/btq461 (2010).
- 113 Higashi, K. & Nakayama, J. Profiling of gut microbiota community by renewed next  
generation sequencer. *Journal of Intestinal Microbiology* **29**, 135-144, doi:10.11209/jim.29.135  
(2015).
- 114 Lande, R. Statistics and partitioning of species diversity, and similarity among multiple  
communities. *Oikos* **76**, 5-13, doi:10.2307/3545743 (1996).
- 115 Belizario, J. E. & Faintuch, J. Microbiome and gut dysbiosis. *Experientia supplementum  
(2012)* **109**, 459-476, doi:10.1007/978-3-319-74932-7\_13 (2018).
- 116 Doi, H. & Okamura, H. Similarity indices, ordination, and community analysis tests using  
the software r. *JAPANESE JOURNAL OF ECOLOGY* **61**, 3-20, doi:10.18960/seitai.61.1\_3  
(2011).
- 117 Lozupone, C. & Knight, R. Unifrac: A new phylogenetic method for comparing microbial  
communities. *Applied and environmental microbiology* **71**, 8228-8235,  
doi:10.1128/aem.71.12.8228-8235.2005 (2005).
- 118 Gibson, G. R., Beatty, E. R., Wang, X. & Cummings, J. H. Selective stimulation of  
bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology* **108**, 975-982,

- doi:10.1016/0016-5085(95)90192-2 (1995).
- 119 Zhu, L., Qin, S., Zhai, S., Gao, Y. & Li, L. Inulin with different degrees of polymerization modulates composition of intestinal microbiota in mice. *FEMS microbiology letters* **364**, doi:10.1093/femsle/fnx075 (2017).
- 120 Zhang, S. *et al.* Dietary pomegranate extract and inulin affect gut microbiome differentially in mice fed an obesogenic diet. *Anaerobe* **48**, 184-193, doi:10.1016/j.anaerobe.2017.08.017 (2017).
- 121 Brighenti, F., Casiraghi, M. C., Canzi, E. & Ferrari, A. Effect of consumption of a ready-to-eat breakfast cereal containing inulin on the intestinal milieu and blood lipids in healthy male volunteers. *European journal of clinical nutrition* **53**, 726-733 (1999).
- 122 Kimura, I. *et al.* The gut microbiota suppresses insulin-mediated fat accumulation via the short-chain fatty acid receptor gpr43. *Nature communications* **4**, 1829, doi:10.1038/ncomms2852 (2013).
- 123 Hosoda, S. Life style and discomfort on defecation. *Juntendo Medical Journal* **50**, 330-337, doi:10.14789/pjmj.50.330 (2004).
- 124 Nieuwenhuijs, V. B. *et al.* The effects of abt-229 and octreotide on interdigestive small bowel motility, bacterial overgrowth and bacterial translocation in rats. *European journal of clinical investigation* **29**, 33-40, doi:10.1046/j.1365-2362.1999.00364.x (1999).
- 125 Roager, H. M. *et al.* Colonic transit time is related to bacterial metabolism and mucosal turnover in the gut. *Nat Microbiol* **1**, 16093, doi:10.1038/nmicrobiol.2016.93 (2016).
- 126 Sasaki, H. *et al.* Phase shifts in circadian peripheral clocks caused by exercise are dependent on the feeding schedule in per2::Luc mice. *Chronobiology international* **33**, 849-862, doi:10.3109/07420528.2016.1171775 (2016).
- 127 Kuroda, H. *et al.* Meal frequency patterns determine the phase of mouse peripheral circadian clocks. *Scientific reports* **2**, 711, doi:10.1038/srep00711 (2012).
- 128 Ikeda, Y. *et al.* Feeding and adrenal entrainment stimuli are both necessary for normal circadian oscillation of peripheral clocks in mice housed under different photoperiods. *Chronobiology international* **32**, 195-210, doi:10.3109/07420528.2014.962655 (2015).
- 129 Rao, S. S., Sadeghi, P., Beaty, J., Kavlock, R. & Ackerson, K. Ambulatory 24-h colonic manometry in healthy humans. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* **280**, G629-639, doi:10.1152/ajpgi.2001.280.4.G629 (2001).
- 130 Kilic, A. O., Pavlova, S. I., Ma, W. G. & Tao, L. Analysis of lactobacillus phages and bacteriocins in american dairy products and characterization of a phage isolated from yogurt. *Applied and environmental microbiology* **62**, 2111-2116 (1996).
- 131 Gilliland, S. E. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *FEMS microbiology reviews* **7**, 175-188, doi:10.1111/j.1574-6968.1990.tb04887.x (1990).
- 132 Koh, A. *et al.* Microbially produced imidazole propionate impairs insulin signaling through mtorc1. *Cell* **175**, 947-961.e917, doi:10.1016/j.cell.2018.09.055 (2018).
- 133 Rasoamanana, R., Darcel, N., Fromentin, G. & Tome, D. Nutrient sensing and signalling by the gut. *The Proceedings of the Nutrition Society* **71**, 446-455, doi:10.1017/s0029665112000110 (2012).
- 134 Holst, J. J. The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiol Rev* **87**, 1409-1439, doi:10.1152/physrev.00034.2006 (2007).
- 135 Woods, S. C. & D'Alessio, D. A. Central control of body weight and appetite. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **93**, S37-50, doi:10.1210/jc.2008-1630 (2008).

- 136 Zhang, C. *et al.* Structural modulation of gut microbiota in life-long calorie-restricted mice. *Nature communications* **4**, 2163, doi:10.1038/ncomms3163 (2013).
- 137 Tomczak, M., Tomczak, E., Kleka, P. & Lew, R. Using power analysis to estimate appropriate sample size. *Trends in Sport Sciences* **21**, 195-206 (2014).
- 138 Anderson, M. J. in *Wiley StatsRef: Statistics Reference Online* 1-15 (2017).
- 139 Macfarlane, G. T. The colonic flora, fermentation and large bowel digestive function. *The Large Intestine : Physiology, Pathophysiology and Disease*, 51-92 (1991).
- 140 Mamabe, H. 大豆タンパク質の構造と食品物性. *Journal of Cookery Science of Japan* **38**, 204-208, doi:10.11402/cookeryscience1995.38.2\_204 (2005).
- 141 Samoto, M. *et al.* Abundant proteins associated with lecithin in soy protein isolate. *Food Chemistry* **102**, 317-322, doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.054> (2007).
- 142 Panasevich, M. R. *et al.* Soy compared with milk protein in a western diet changes fecal microbiota and decreases hepatic steatosis in obese oltf rats. *The Journal of nutritional biochemistry* **46**, 125-136, doi:10.1016/j.jnutbio.2017.05.004 (2017).
- 143 Watanabe, K. *et al.* Dietary soybean protein ameliorates high-fat diet-induced obesity by modifying the gut microbiota-dependent biotransformation of bile acids. *PLoS one* **13**, e0202083-e0202083, doi:10.1371/journal.pone.0202083 (2018).
- 144 Kohno, M., Hirotsuka, M., Kito, M. & Matsuzawa, Y. Decreases in serum triacylglycerol and visceral fat mediated by dietary soybean &beta;-conglycinin. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* **13**, 247-255, doi:10.5551/jat.13.247 (2006).
- 145 Yamazaki, T., Kishimoto, K., Miura, S. & Ezaki, O. Dietary β-conglycinin prevents fatty liver induced by a high-fat diet by a decrease in peroxisome proliferator-activated receptor γ2 protein. *The Journal of nutritional biochemistry* **23**, 123-132, doi:<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2010.11.006> (2012).
- 146 Ikeda, Y. *et al.* Glucagon and/or igf-1 production regulates resetting of the liver circadian clock in response to a protein or amino acid-only diet. *EBioMedicine* **28**, 210-224, doi:10.1016/j.ebiom.2018.01.012 (2018).
- 147 Endo, Y. *et al.* Acc1 determines memory potential of individual cd4+ t cells by regulating de novo fatty acid biosynthesis. *Nature Metabolism* **1**, 261-275, doi:10.1038/s42255-018-0025-4 (2019).
- 148 Jayakumar, A. *et al.* Isolation and chromosomal mapping of genomic clones encoding the human fatty acid synthase gene. *Genomics* **23**, 420-424, doi:10.1006/geno.1994.1518 (1994).
- 149 Ferre, P. & Foufelle, F. Hepatic steatosis: A role for de novo lipogenesis and the transcription factor srebp-1c. *Diabetes, obesity & metabolism* **12 Suppl 2**, 83-92, doi:10.1111/j.1463-1326.2010.01275.x (2010).
- 150 Tanos, R. *et al.* Aryl hydrocarbon receptor regulates the cholesterol biosynthetic pathway in a dioxin response element-independent manner. *Hepatology* **55**, 1994-2004, doi:10.1002/hep.25571 (2012).
- 151 Russell, D. W. & Setchell, K. D. Bile acid biosynthesis. *Biochemistry* **31**, 4737-4749, doi:10.1021/bi00135a001 (1992).
- 152 Langille, M. G. *et al.* Predictive functional profiling of microbial communities using 16s rrna marker gene sequences. *Nature biotechnology* **31**, 814-821, doi:10.1038/nbt.2676 (2013).
- 153 den Besten, G. *et al.* Protection against the metabolic syndrome by guar gum-derived short-chain fatty acids depends on peroxisome proliferator-activated receptor γ and glucagon-like peptide-1. *PLoS one* **10**, e0136364-e0136364, doi:10.1371/journal.pone.0136364 (2015).

- 154 Ding, X., Saxena, N. K., Lin, S., Gupta, N. A. & Anania, F. A. Exendin-4, a glucagon-like  
protein-1 (glp-1) receptor agonist, reverses hepatic steatosis in ob/ob mice. *Hepatology* **43**, 173-  
181, doi:10.1002/hep.21006 (2006).
- 155 ZHANG, J. *et al.* Scfas-induced glp-1 secretion links the regulation of gut microbiome on  
hepatic lipogenesis in chickens. *bioRxiv*, 549857, doi:10.1101/549857 (2019).
- 156 Wang, C. *et al.* Effects of oral administration of bifidobacterium breve on fecal lactic acid and  
short-chain fatty acids in low birth weight infants. *Journal of Pediatric Gastroenterology and  
Nutrition* **44**, 252-257, doi:10.1097/01.mpg.0000252184.89922.5f (2007).
- 157 Earley, H. *et al.* A preliminary study examining the binding capacity of akkermansia  
muciniphila and desulfovibrio spp., to colonic mucin in health and ulcerative colitis. *PLoS one*  
**10**, e0135280-e0135280, doi:10.1371/journal.pone.0135280 (2015).
- 158 Watabe, J. Carbohydrate fermentation in the colon. *Journal of Intestinal Microbiology* **19**,  
169-177, doi:10.11209/jim.19.169 (2005).
- 159 Pan, X. & Hussain, M. M. Clock is important for food and circadian regulation of  
macronutrient absorption in mice. *Journal of lipid research* **50**, 1800-1813,  
doi:10.1194/jlr.M900085-JLR200 (2009).
- 160 Rao, A. V. *et al.* A randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study of a probiotic in  
emotional symptoms of chronic fatigue syndrome. *Gut pathogens* **1**, 6, doi:10.1186/1757-4749-  
1-6 (2009).
- 161 Fastinger, N. D. *et al.* A novel resistant maltodextrin alters gastrointestinal tolerance factors,  
fecal characteristics, and fecal microbiota in healthy adult humans. *Journal of the American  
College of Nutrition* **27**, 356-366, doi:10.1080/07315724.2008.10719712 (2008).
- 162 Zhang, Z. *et al.* Chlorogenic acid ameliorates experimental colitis by promoting growth of  
akkermansia in mice. *Nutrients* **9**, doi:10.3390/nu9070677 (2017).
- 163 Remely, M. *et al.* Egg prevents high fat diet-induced changes in gut microbiota, decreases of  
DNA strand breaks, and changes in expression and DNA methylation of dnmt1 and mlh1 in  
c57bl/6j male mice. *Oxidative medicine and cellular longevity* **2017**, 3079148,  
doi:10.1155/2017/3079148 (2017).
- 164 Oku, T., Konishi, F. & Hosoya, N. Effect of various unavailable carbohydrates and  
administrating periods on several physiological functions of rat. *Eiyo To Shokuryo* **34**, 437-  
443, doi:10.4327/jsnfs1949.34.5\_437 (1981).
- 165 Tan, S. *et al.* Isoquercetin and inulin synergistically modulate the gut microbiome to prevent  
development of the metabolic syndrome in mice fed a high fat diet. *Scientific reports* **8**, 10100,  
doi:10.1038/s41598-018-28521-8 (2018).
- 166 Zhou, D. *et al.* Sodium butyrate attenuates high-fat diet-induced steatohepatitis in mice by  
improving gut microbiota and gastrointestinal barrier. *World journal of gastroenterology* **23**,  
60-75, doi:10.3748/wjg.v23.i1.60 (2017).
- 167 Hamilton, M. K. *et al.* Prebiotic milk oligosaccharides prevent development of obese  
phenotype, impairment of gut permeability, and microbial dysbiosis in high fat-fed mice.  
*American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* **312**, G474-g487,  
doi:10.1152/ajpgi.00427.2016 (2017).
- 168 Cheng, W. *et al.* Effect of functional oligosaccharides and ordinary dietary fiber on intestinal  
microbiota diversity. *Front Microbiol* **8**, 1750, doi:10.3389/fmicb.2017.01750 (2017).
- 169 Sasaki, H., Ohtsu, T., Ikeda, Y., Tsubosaka, M. & Shibata, S. Combination of meal and  
exercise timing with a high-fat diet influences energy expenditure and obesity in mice.

- Chronobiology international* **31**, 959-975, doi:10.3109/07420528.2014.935785 (2014).
- 170 Kim, H. K. *et al.* Effects of acute endurance exercise performed in the morning and evening on inflammatory cytokine and metabolic hormone responses. *PloS one* **10**, e0137567, doi:10.1371/journal.pone.0137567 (2015).

## 謝辞

本研究におきまして、幾重にも渡り助言を与えて頂き、寛大なご指導、ご助言を頂いた柴田重信教授に厚く御礼申し上げます。

また、本論文を手掛けるにあたり、実験に協力して頂きました宮川大輝君、渡邊文さん、中山由紀さん、呂怡錦君、濱香樹君、田村好さん、志賀一登君はじめ、早稲田大学先進理工学研究科、柴田研究室の皆さんにも心から感謝致します。

なお、本研究の一部は農研機構生物系特定産業技術研究支援センター、独立行政法人日本学術振興会、公益財団法人不二たん白質研究振興財団の助成を受けて実施されました。

実験の過程で多数のマウスの命を犠牲にしたことに対し深く哀悼の意を表すと共に、この命が無駄になることのないよう本研究のさらなる発展を誓い、謝辞とさせていただきます。

## 研究業績

### 【 主論文 】

- [1] Sasaki H, Miyakawa H, Watanabe A, Nakayama Y, Lyu Y, Hama K, Shibata S. Mice Microbiota Composition Changes by Inulin Feeding With a Long Fasting Period Under a Two-Meals-Per-Day Schedule. *Nutrients*, 2019, 11 (11), 2802.
- [2] Tamura K, Sasaki H, Shiga K, Miyakawa H, Shibata S. The Timing Effects of Soy Protein Intake on Mice Gut Microbiota. *Nutrients*, 2019, 12 (1), 87.

### 【 副論文 】

- [1] Moriya S, Tahara Y, Sasaki H, Hamaguchi Y, Kuriki D, Ishikawa R, Ishigooka J, Shibata S. Effect of quetiapine on Per1, Per2, and Bmal1 clock gene expression in the mouse amygdala and hippocampus. *J Pharmacol Sci*, 2014, 125 (3), 329-32.
- [2] Sasaki H, Ohtsu T, Ikeda Y, Tsubosaka M, Shibata S. Combination of meal and exercise timing with a high-fat diet influences energy expenditure and obesity in mice. *Chronobiol Int*, 2014, 31 (9), 959-75.
- [3] Ikeda Y, Sasaki H, Ohtsu T, Shiraishi T, Tahara Y, Shibata S. Feeding and adrenal entrainment stimuli are both necessary for normal circadian oscillation of peripheral clocks in mice housed under different photoperiods. *Chronobiol Int*, 2015, 32 (2), 195-210.
- [4] Moriya S, Tahara Y, Sasaki H, Ishigooka J, Shibata S. Housing under abnormal light-dark cycles attenuates day/night expression rhythms of the clock genes Per1, Per2, and Bmal1 in the amygdala and hippocampus of mice. *Neuroscience Research*, 2015, 99, 16-21.
- [5] Sasaki H, Hattori Y, Ikeda Y, Kamagata M, Shibata S. Eating meals before wheel-running exercise attenuate high fat diet-driven obesity in mice under two meals per day schedule. *Chronobiol Int*, 2015,

32 (5), 677-86.

- [6] Tahara Y, Shiraishi T, Kikuchi Y, Haraguchi A, Kuriki D, Sasaki H, Motohashi H, Sakai T, Shibata S. Entrainment of the mouse circadian clock by sub-acute physical and psychological stress. *Scientific Reports*, 2015, Article number:11417.
- [7] Moriya S, Tahara Y, Sasaki H, Ishigooka J, Shibata S. Phase-delay in the light-dark cycle impairs clock gene expression and levels of serotonin, norepinephrine, and their metabolites in the mouse hippocampus and amygdala. *Sleep Med*, 2015, 16 (11), 1352-9.
- [8] Sasaki H, Hattori Y, Ikeda Y, Kamagata M, Iwami S, Yasuda S, Shibata S. Phase shifts in circadian peripheral clocks caused by exercise are dependent on the feeding schedule in PER2::LUC mice. *Chronobiol Int*, 2016, 33 (7), 849-62.
- [9] Sasaki H, Hattori Y, Ikeda Y, Kamagata M, Iwami S, Yasuda S, Tahara Y, Shibata S. Forced rather than voluntary exercise entrains peripheral clocks via a corticosterone/noradrenaline increase in PER2::LUC mice. *Scientific Reports*, 2016, Article number: 27607.
- [10] Tahara Y, Takatsu Y, Shiraishi T, Kikuchi Y, Yamazaki M, Motohashi H, Muto A, Sasaki H, Haraguchi A, Kuriki D, Nakamura TJ, Shibata S. Age-related circadian disorganization caused by sympathetic dysfunction in peripheral clock regulation. *npj Aging and Mechanisms and Disease*, 2017, 3, 16030.
- [11] Kamagata M, Ikeda Y, Sasaki H, Hattori Y, Yasuda S, Iwami S, Tsubosaka M, Ishikawa R, Todoh A, Tamura K, Tahara Y, Shibata S. Potent Synchronization of Peripheral Circadian Clocks by Glucocorticoid Injections in PER2::LUC-Clock/Clock mice. *Chronobiol Int.*, 2017, 34 (8), 1067-82.
- [12] Wada M, Orihara K, Kamagata M, Hama K, Sasaki H, Haraguchi A, Miyakawa H, Nakao A, Shibata S. Circadian clock-dependent increase in salivary IgA secretion modulated by sympathetic receptor activation in mice. *Scientific Reports*, 2017, Article number: 8802.

- [13] Tahara Y, Yamazaki M, Sukigara H, Motohashi H, Sasaki H, Miyakawa H, Haraguchi A, Ikeda Y, Fukuda S, Shibata S. Gut Microbiota-Derived Short Chain Fatty Acids Induce Circadian Clock Entrainment in Mouse Peripheral Tissue. *Scientific Reports*, 2018, Article number: 1395.
- [14] Ikeda Y, Kamagata M, Hirao M, Yasuda S, Iwami S, Sasaki H, Tsubosaka M, Hattori Y, Todoh A, Tamura K, Shiga K, Ohtsu T, Shibata S. Glucagon and/or IGF-1 Production Regulates Resetting of the Liver Circadian Clock in Response to a Protein or Amino Acid-only Diet. *EBioMedicine*, 2018, 28, 210-24.
- [15] Akter S, Sasaki H, Ikeda Y, Miyakawa H, Shibata S.  $\gamma$ -oryzanol ameliorates the acute stress induced by behavioral anxiety testing in mice. *J Pharmacol Sci*, 2018, 138 (2), 155-9.
- [16] Takahashi M, Ozaki M, Kang MI, Sasaki H, Fukazawa M, Iwakami T, Lim PJ, Kim HK, Aoyama S, Shibata S. Effects of Meal Timing on Postprandial Glucose Metabolism and Blood Metabolites in Healthy Adults. *Nutrients*, 2018, 10 (11), 1763.
- [17] Akter S, Sasaki H, Uddin KR, Ikeda Y, Miyakawa H, Shibata S. Anxiolytic effects of  $\gamma$ -oryzanol in chronically- stressed mice are related to monoamine levels in the brain. *Life Sci*, 2019, 216, 119-28.
- [18] Yasuda S, Iwami S, Tamura K, Ikeda Y, Kamagata M, Sasaki H, Haraguchi A, Miyamatsu M, Hanashi S, Takato Y, Shibata S. Phase resetting of circadian peripheral clocks using human and rodent diets in mouse models of type 2 diabetes and chronic kidney disease. *Chronobiol Int*, 2019, 36 (6), 851-69.
- [19] Motohashi H, Tahara Y, Daniel S. Whittaker, Huei-Bin Wang, Yamaji T, Wakui H, Haraguchi A, Yamazaki M, Miyakawa H, Hama K, Sasaki H, Sakai T, Hirooka R, Takahashi K, Takizawa M, Makino S, Aoyama S, Christopher S. Colwell, and Shibata S. Circadian clock disruption in mice with adenine-induced tubulointerstitial nephropathy. *Kidney Int*, 2020, 97 (4), 728-40.
- [20] Watanabe A, Sasaki H, Miyakawa H, Nakayama Y, Lyu Y, Shibata S. Effect of Dose and Timing of

Burdock (*Arctium lappa*) Root Intake on Intestinal Microbiota of Mice. *Microorganisms*, 2020, 8 (2), 220.

[21] Takahashi M, Ozaki M, Tsubosaka M, Kim HK, Sasaki H, Matsui Y, Hibi M, Osaki N, Miyashita M, Shibata S. Effects of Timing of Acute and Consecutive Catechin Ingestion on Postprandial Glucose Metabolism in Mice and Humans. *Nutrients*, 2020, 12 (2), 565.

[22] Akter S, Uddin KR, Sasaki H, Shibata S. Gamma Oryzanol Alleviates High-Fat Diet-Induced Anxiety-Like Behaviors Through Downregulation of Dopamine and Inflammation in the Amygdala of Mice. *Front Pharmacol*, 2020, 11, 330.

#### 【 総説 】

[1] 柴田重信、池田祐子、佐々木裕之、「時間栄養学と時間運動学」、日本臨床71巻、2194-9、2013

[2] 佐々木裕之、柴田重信、「時間栄養学・時間運動学の視点を取り入れたヘルスフードの開発」、食品と科学 10月号、51-6、2017

[3] 佐々木裕之、「時間栄養学～新たな知見を読み解く～」腸内細菌の日内変動、食と医療 vol.12、2020

#### 【 書籍 】

[1] Tahara Y, Sasaki H, Shibata S. Chrono-nutrition and Chrono-exercise in Mice. アシヨフホンマ財団 『Circadian Clocks』、53-9、2015

[2] 青山晋也、佐々木裕之、「時間栄養学 時計遺伝子、体内時計、食生活をつなぐ」データ解析手法とデータリテラシー（共著）、柴田重信 編 化学同人、2020年6月発刊予定

- [3] 佐々木裕之、「時間栄養学 時計遺伝子、体内時計、食生活をつなぐ」腸内細菌と時間栄養  
(単著)、柴田重信 編 化学同人、2020年6月発刊予定