

博士論文審査報告書

論文題目

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

申請者

佐々木	裕之
Hiroyuki	SASAKI

電気・情報生命専攻 薬理学研究

2020 年 7 月

本論文は、全 4 章の構成となっている。1 章では本論文の研究背景について述べている。まず研究対象である腸内細菌叢のことについて記述している。哺乳類の腸内には約 40 兆個の腸内細菌が集団で生息しており、この細菌集団を腸内細菌叢と呼ぶ。腸内細菌叢は宿主の生理機能と深くかかわっており、腸内細菌叢の全種の構成が乱れた状態は不健康であると考えられる。例えば肥満や大腸がんなどの身体的疾患のみならず、うつ病や不安など精神疾患も含めた様々な疾患は腸内細菌叢の全種の構成変化も一因である。

水溶性食物繊維を豊富に含む食事を摂取すると、これを発酵・分解する腸内細菌が活発になり、酢酸、プロピオン酸、酪酸など短鎖脂肪酸（Short-chain fatty acid：SCFA）や乳酸を産生することが分かってきた。この SCFA は腸管免疫や肝臓のエネルギー代謝等に利用され、また SCFA はそれ自体が弱酸性であることから、腸管内の pH を低下させ、有害な菌の増殖を抑える。食事や運動、喫煙、飲酒など様々な生活要因が腸内細菌に影響を及ぼす。また、体内時計により制御された摂食リズムは、腸内細菌叢の構成に日内変動をもたらすことが報告されている。このように腸内細菌叢に日内変動があることから、腸内細菌に影響を及ぼす食品成分も、その摂食タイミングによっては効果が異なる可能性がある。この“いつ”食するかという「時間栄養学」を視点とした考え方は、肥満やエネルギー代謝について多く報告されているが、腸内細菌叢に関する研究は非常に少ない。

以上から、本論文ではマウスを用いて、腸内細菌に影響を与えることが知られている食品成分を、朝食あるいは夕食（活動期の前半または後半）に摂取すると、腸内細菌叢に対してどのように影響を及ぼすかについて研究を行った。2 章では水溶性食物繊維の一種であり、キクイモやゴボウに豊富に含まれるイヌリンを用いた 3 章ではレジスタントプロテイン（難消化性タンパク質）を多く含む大豆タンパク質を用いた。公聴会において、イヌリンの食物繊維の分類等における位置づけやレジスタントプロテインの内容に関する質問があったが、申請者は図表等を使用し適切に回答していた。

第 2 章について述べる。ICR 雄マウス 9 週齢を用い、マウスの活動期はじめに摂食させる餌を「朝食」、活動期終わりに摂食させる餌を「夕食」と定義し、この 1 日 2 食の制限給餌条件下で 14 日間飼育した。腸内細菌叢に異常をもたらすことが知られている高脂肪食に、イヌリンを添加した餌（イヌリン餌）と、対照として高脂肪食に不溶性食物繊維であるセルロースを添加した餌（セルロース餌）を用意した。セルロースは、腸内細菌による発酵を受けず、短鎖脂肪酸の生成は起さない。マウスを以下の 3 群に分けて実験した。朝食、夕食共にセルロース餌を給餌する「セルロース群」、朝食にイヌリン餌、夕食にセルロース餌を与える「朝食イヌリン群」、朝食にセルロース餌、夕食にイヌリン餌を与える「夕食イヌリン群」を設定した。盲腸内 pH は朝食イヌリン群でセルロース群と比較し有意に低

下し、盲腸内の乳酸・酪酸の濃度が朝食イヌリン群でセルロース群と比較して有意に増加した。マウス糞便中の腸内細菌叢の構成、相対存在量を次世代シーケンサーによる 16S rRNA 解析により調べた。腸内細菌の相対存在量は門レベルでは有意な変化を示さなかったが、属レベルにおいて *Butyricimonas*, *Lactococcus*, *Oscillospira*, *Desulfovibrio*, *Staphylococcus* が朝食イヌリン群でセルロース群と比較して有意に変化した。さらに主座標分析を行い、腸内細菌叢の全種の構成を比較すると、セルロース群と朝食イヌリン群間で有意差が見られ、セルロース群と夕食イヌリン間では見られなかった。腸内細菌の全種の相対存在量および構成比較の結果より、朝のイヌリン摂食は夕に比較して腸内細菌叢を大きく変動させた。

夕食に比較して朝食のイヌリン摂食が腸内細菌叢に大きく影響したのは、絶食の長さに起因すると考えた。実際、マウスは 12 時間絶食後に朝食を、4 時間絶食後に夕食を摂っていた。そこで絶食時間の長さを 20 時間に統一した 1 日 1 食の摂食スケジュールを 14 日間施行した。以下の 4 群で実験した。「朝食セルロース群」は朝食の時刻（ZT12）にセルロース餌、「朝食イヌリン群」は朝食にイヌリン餌をそれぞれ与えた。「夕食セルロース群」は夕食の時刻（ZT20）にセルロース餌、「夕食イヌリン群」は夕食にイヌリン餌を与えた。イヌリン摂食により盲腸内 pH の低下、盲腸内 SCFA 量の増加が確認されたが、朝食と夕食群間に有意差は見られなかった。さらに腸内細菌叢の構成を比較すると、イヌリン群はセルロース群とは異なるが、イヌリンの朝摂取と夕摂取群間に有意差は認められなかった。絶食時間を等しくすると朝摂食と夕摂食に差が見られなくなったので、先の 1 日 2 食の実験で、朝食イヌリン摂取が効果的だったのは、イヌリン摂食までの絶食時間が長かったことに起因すると考えた。公聴会において、朝の蠕動運動の活発化以外の可能性について質問されたが、腸内容物の排泄速度、消化管ホルモンの関与や高脂肪食に含まれるセルロースとの相加・相乗作用が活発化される可能性などについて言及していた。また、1 日 1 食の場合は、末梢体内時計の位相がそれぞれの食事に固定され、朝食イヌリンと夕食イヌリンの効果に差を生じさせなかった可能性について質問があった。申請者はその可能性は否定できない事を認めつつも、絶食時間を等しくした 1 日 2 食の摂餌プロトコルで解決できることを示し、機会があれば追加研究したいと述べていた。

第 3 章について述べる。朝のイヌリン摂取が腸内細菌叢に効果的であったので、他の食品成分でも同様な効果が見られるか否かを、難消化性タンパク質を用いて実験した。本実験では、難消化性タンパク質を多く含み、日本人にとって馴染み深い、大豆タンパク質を用いた。脱脂大豆を加工・調整し、タンパク質含量が高く（90%）、その中の 30% 程度が難消化性タンパク質を含む加工大豆タンパク質を入手・使用した。高脂肪食に含まれるタンパク質部分を全てカゼインタンパク質に置換したカゼイン餌と、大豆タンパク質に置換した大豆餌の 2 種を用意

した。第2章と同様の摂食スケジュールで、以下の3群で実験した。「カゼイン群」は朝食と夕食ともにカゼイン餌を給餌、「朝食大豆群」は朝食に大豆餌、夕食にカゼイン餌を給餌、「夕食大豆群」は朝食にカゼイン餌、夕食に大豆餌を給餌した。サンプリング時刻は、それぞれ朝食や夕食開始4時間後だけではなく、摂食前にも設定し、8時おき計3回のサンプリングで、1日を通した変化も調べた。各条件で14日間飼育後、第2章と同項目の測定を行った。盲腸内 pH 低下と盲腸内容物中の乳酸と酪酸の増加は、朝食大豆群で摂取後に顕著に現れ、かつこの効果は1日の平均値でも観察できた。腸内細菌叢の構成はカゼイン群と比較して朝大豆群でのみ有意に変化した。盲腸内 pH、SCFA、腸内細菌叢の構成比較の結果から、大豆タンパク質においても朝食に摂食することが夕食に比べ腸内細菌叢に大きく影響する可能性が示唆された。公聴会では、使用した大豆タンパク質が難消化性タンパク質のみを用いたわけではなく、分離精製しても10%程度の他の成分が混入しており、それが作用した可能性もあるのでは、といった議論があった。

第4章では総括と今後の研究展開について述べられた。表を用いてイヌリンと大豆タンパク質の摂食タイミングに関する検証を行い、どちらの食品成分においても、夕食の摂食よりも朝食に摂食することが腸内細菌叢に強く影響することを結論とした。過去の文献等から、絶食時間の長さが、食後の腸内細菌叢によるSCFA産生増加に関与することを示し、本研究で特に朝食で効果が強かった理由として絶食時間の長さを挙げた。一方で、予備研究において、水溶性食物繊維と不溶性食物繊維のSCFA産生に対する相乗効果を見出していることを紹介し、今後は食の組み合わせや運動との併用など実社会に根差した研究したいと述べていた。

以上、申請者は、腸内細菌叢に対する食物繊維や難消化性タンパク質の摂取タイミングの効果を時間栄養学の視点で研究し、1日の中でも朝食でより摂取することが効果的であることを、世界で初めて示した。今回用いた食品成分は安全性が担保されているので、この成果は人の社会に直ちに応用でき、社会実装が大いに期待できる。以上より、本研究の時間栄養学への貢献は大きいと考えられ、本論文は博士(理学)の学位論文として、十分価値のあるものであると判断できる。

2020年6月

審査員

主査	早稲田大学教授	薬学博士 九州大学	柴田重信
		年 月 日	
	早稲田大学教授	博士(理学) 京都大学	岡野俊行
		年 月 日	
	早稲田大学准教授	博士(理学) 早稲田大学	田原 優
		年 月 日	