

酸化マグネシウムとイヌリンの併用が
腸内細菌叢および盲腸内短鎖脂肪酸に及ぼす影響

Effects of Combined Use of Magnesium Oxide and Inulin
on Intestinal Microbiota and Cecal Short-Chain Fatty Acids

2021年9月

大森 加南子
Kanakano OMORI

酸化マグネシウムとイヌリンの併用が
腸内細菌叢および盲腸内短鎖脂肪酸に及ぼす影響

Effects of Combined Use of Magnesium Oxide and Inulin
on Intestinal Microbiota and Cecal Short-Chain Fatty Acids

2021年9月

早稲田大学大学院 先進理工学研究科および
東京農工大学大学院 生物システム応用科学府
共同先進健康科学専攻 薬物・栄養物効果解析学研究

大森 加南子
Kanakano OMORI

目次

略語一覧	7
第1章 緒言	8
1.1 便秘	8
1.2 便秘治療と MgO	8
1.3 MgO の動態	10
1.4 便秘治療における食物繊維の役割	12
1.5 ヒトの腸内細菌の分類と細菌叢の形成	15
1.6 腸内細菌叢の乱れと疾病	22
1.7 腸内細菌叢と薬剤による影響	23
1.8 腸内細菌叢の健康への寄与	24
1.8.1. プロバイオティクス	24
1.8.2. プレバイオティクス	24
1.8.3. シンバイオティクス	25
1.9 SCFA と生理機能の関連について	25
1.9.1. SCFA の生成	25
1.9.2. SCFA と便秘	26
1.9.3. SCFA と生理効果	27
1.10 腸管粘膜バリアと免疫グロブリン A	28
1.11 概日時計と時間薬理学について	31
1.12 研究目的	33
第2章 MgO が腸内環境に与える影響	35
2.1 普通食摂食時に MgO の単独投与が腸内環境に及ぼす影響	35
2.1.1 序論	35
2.1.2 実験材料および方法	35
2.1.3 結果	44
2.1.3.1 体重・摂食量	44

2.1.3.2	盲腸内容物の水分含有率	45
2.1.3.3	腸内細菌叢の多様性	45
2.1.3.4	腸内細菌の相対存在量	47
2.1.3.5	盲腸内 pH	47
2.1.3.6	盲腸内乳酸濃度および SCFA 濃度	47
2.1.3.7	糞便中の IgA 濃度	50
2.2	普通食摂食時に MgO と Inulin の併用が腸内環境に及ぼす影響	51
2.2.1	序論	51
2.2.2	実験材料および方法	51
2.2.3	結果	55
2.2.3.1	体重・摂食量	55
2.2.3.2	盲腸内容物の水分含有率	56
2.2.3.3	腸内細菌叢の多様性	57
2.2.3.4	腸内細菌の相対存在量	57
2.2.3.5	盲腸内 pH	60
2.2.3.6	盲腸内乳酸濃度および SCFA 濃度	60
2.2.3.7	糞便中の IgA 濃度	62
2.3	高脂肪食摂取時に MgO の単独投与が腸内環境に及ぼす影響	63
2.3.1	序論	63
2.3.2	実験材料および方法	63
2.3.3	結果	67
2.3.3.1	体重・摂食量	67
2.3.3.2	盲腸内容物の水分含有率	68
2.3.3.3	腸内細菌叢の多様性	69
2.3.3.4	腸内細菌の相対存在量	70
2.3.3.5	盲腸内 pH	70
2.3.3.6	盲腸内乳酸濃度および SCFA 濃度	70

2.4	高脂肪食摂取時に MgO と Inulin の併用が腸内環境に及ぼす影響	73
2.4.1	序論	73
2.4.2	実験材料および方法	73
2.4.3	結果	76
2.4.3.1	体重・摂食量	76
2.4.3.2	盲腸内容物の水分含有率	77
2.4.3.3	腸内細菌叢の多様性	78
2.4.3.4	腸内細菌の相対存在量	78
2.4.3.5	盲腸内 pH	81
2.4.3.6	盲腸内乳酸濃度および SCFA 濃度	81
2.5	考察	83
2.6	小括	98
第 3 章	MgO 以外の下剤・制酸剤が腸内環境に与える影響	100
3.1	マグネシウム塩が盲腸内乳酸濃度および酢酸濃度を与える影響	100
3.1.1	序論	100
3.1.2	実験材料および方法	101
3.1.3	結果	103
3.1.3.1	体重・摂食量	103
3.1.3.2	盲腸内容物の水分含有率	104
3.1.3.3	盲腸内乳酸濃度および酢酸濃度	105
3.2	水酸化アルミニウムが腸内環境に与える影響	106
3.2.1	序論	106
3.2.2	実験材料および方法	107

3.2.3	結果	110
3.2.3.1	体重・摂食量	110
3.2.3.2	盲腸内容物の水分含有率	110
3.2.3.3	盲腸内 pH	111
3.2.3.4	盲腸内乳酸濃度および SCFA 濃度	111
3.2.3.5	糞便中の IgA 濃度	111
3.3	塩化マグネシウム、塩化カルシウムが腸内環境に与える影響	114
3.3.1	序論	114
3.3.2	実験材料および方法	114
3.3.3	結果	117
3.3.3.1	体重・摂食量	117
3.3.3.2	盲腸内容物の水分含有率	118
3.3.3.3	盲腸内 pH	119
3.3.3.4	盲腸内乳酸濃度および SCFA 濃度	119
3.4	ダイオウが腸内環境に与える影響	121
3.4.1	序論	121
3.4.2	実験材料および方法	122
3.4.3	結果	124
3.4.3.1	体重	124
3.4.3.2	盲腸内容物の水分含有率	125
3.4.3.3	腸内細菌叢の多様性	125
3.4.3.4	腸内細菌の相対存在量	127
3.4.3.5	盲腸内 pH	127
3.4.3.6	盲腸内乳酸濃度および SCFA 濃度	127
3.5	考察	130
3.6	小括	134

第4章	MgOの適切な服用タイミングの検討	136
4.1	MgOの単独投与が腸内環境に与える影響と服用タイミングの関係	136
4.1.1	序論	136
4.1.2	実験材料および方法	137
4.1.3	結果	140
4.1.3.1	体重・摂食量	140
4.1.3.2	盲腸内容物の水分含有率	141
4.1.3.3	腸内細菌叢の多様性	141
4.1.3.4	腸内細菌の相対存在量	143
4.1.3.5	盲腸内 pH	146
4.1.3.6	盲腸内乳酸濃度および SCFA 濃度	146
4.2	MgO と Inulin の併用が腸内環境に与える影響と服用タイミングの関係	148
4.2.1	序論	148
4.2.2	実験材料および方法	148
4.2.3	結果	151
4.2.3.1	体重・摂食量	151
4.2.3.2	盲腸内容物の水分含有率	152
4.2.3.3	腸内細菌叢の多様性	153
4.2.3.4	腸内細菌の相対存在量	156
4.2.3.5	盲腸内 pH	159
4.2.3.6	盲腸内乳酸濃度および SCFA 濃度	159
4.3	考察	161
4.4	小括	163

第 5 章 本研究結果の臨床応用と総括	166
謝辞	172
参考文献	173
掲載ジャーナル	202
研究業績	203

【略語一覧】

ANOVA	Analysis of Variance	分散分析
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations	国際連合食糧農業機関
FID	Flame Ionization Detector	水素炎イオン化検出器
GC	Gas Chromatography	ガスクロマトグラフィー
IgA	Immunoglobulin A	免疫グロブリン A
IBD	Inflammatory Bowel Disease	炎症性腸疾患
MgO	Magnesium Oxide	酸化マグネシウム
MS	Mass Spectrometer	質量分析計
NSAID	Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug	非ステロイド性抗炎症薬
OTC	Over The Counter	(一般用医薬品を意味する)
OTU	Operational Taxonomic Unit	操作的分類単位
PBS	Phosphate Buffered Saline	リン酸緩衝食塩水
PCoA	Principal Coordinate Analysis	主座標分析
PCR	Polymerase Chain Reaction	ポリメラーゼ連鎖反応
PERMANOVA	Permutational Multivariate Analysis of Variance	順列多変量分散分析
pIgR	Polymeric Immunoglobulin Receptor	多量体免疫グロブリン受容体
PPI	Proton Pump Inhibitor	プロトンポンプ阻害薬
QIIME	Quantitative Insights Into Microbial Ecology	(微生物群衆解析ツール名)
SCFA	Short-Chain Fatty Acid	短鎖脂肪酸
SCN	Suprachiasmatic Nucleus	視交叉上核
Th17	T Helper 17 (cell)	T ヘルパー17 細胞
Treg	Regulatory T (cell)	制御性 T 細胞
WGO	World Gastroenterology Organization	国際消化器病学会
ZT	Zeitgeber Time	ツァイトゲバー時間

第1章 緒言

1.1 便秘

便秘は世界で多くの人にみられる状態である。その有訴者率は報告によって差がみられる (Roque *et al.*, 2015)。2014年に日本で行われたインターネット調査によれば、20歳～79歳の一般男女の28.4%が自身を便秘であると認識していた (Tamura *et al.*, 2016)。また、北米のシステマティックレビューでも、便秘は12%–19%の人に認められ、特に65歳以上で増加するとも報告されている (Higgins *et al.*, 2004)。

健康関連 QOL を測定する包括的尺度 SF-36 を用いた調査では、過去2年間で3ヶ月に1回以上便秘を経験した人と便秘でなかった健常者を対象にアンケートが実施された。その結果、全体的健康感、社会生活機能、心の健康の項目で便秘の人に有意な QOL の低下が認められた (Wald *et al.*, 2007)。

また、便秘は大腸がんのリスクを上昇させないという2007年の報告がある (Chan *et al.*, 2007) 一方で、2014年の報告では大腸がん罹患率は非便秘群に比べて慢性便秘群で高く、そのリスクは重症度に伴って上昇することが報告されている (Guérin *et al.*, 2014)。さらに、便秘だった人は、そうでなかった人よりも死亡率が高かったという報告がある (Koloski *et al.*, 2013)。

すなわち、便秘症は患者の QOL の低下を招くだけでなく、生命予後の憎悪につながるものである。そのみならず、便秘は経済的にも大きな負担となっている (Sun *et al.*, 2011)。2013年に発表されたシステマティックレビューでは、慢性便秘症で年間 US\$1,912～US\$7,522 のコストがかかっていると報告している (Nellesen *et al.*, 2013)。

1.2 便秘治療と MgO

便秘は全診療科横断的な疾患であり、あらゆる診療科の医師が診るべき疾患である。治療は一筋縄ではいかない。2017年に初の慢性便秘症診療ガイドラインが発表され、薬物治療の基本は非刺激性下剤であり、刺激性下剤はライフスタイルの指導や非刺激性下剤が十分でなかった場合に使用することが求められた (日本消化器病学会関連研究会 慢性便秘の診断・治療研究会, 2017)。現在日本で使用されている下剤を Table 1 に示した。刺激性下剤は腸管に刺激を与えて腸の蠕動運動を活発化することで排便を促す。一方、非刺激性下剤は便の水分量を増加させること

により、便を軟化させて排便を促す。また、便の水分量増加により便容積が増大し、間接的に腸管を刺激する効果もある。日本では、非刺激性下剤の中でも薬価の低い酸化マグネシウム (MgO) が慢性便秘症の第一選択薬として使われることが多い。マグネシウムの摂取量が少ないと機能性便秘が増えるという報告 (Murakami *et al.*, 2007) がある一方で、近年、MgO による高マグネシウム血症も問題視されている。MgO を服用している腎不全患者で高マグネシウム血症が報告されており (Wakai *et al.*, 2019)、2020 年に改定された便秘診療のガイドラインでは、腎不全、心臓病、電解質異常、利尿薬治療を受けている患者が MgO を服用する場合は電解質のモニタリングが必要であるとされている (水上, 2020)。また、MgO の長期服用も高マグネシウム血症のリスクファクターになるとされている (Wakai *et al.*, 2019)。MgO は耐性が生じにくく、エビデンスはないものの妊婦にも使用できるといった利点があるため、長期使用に繋がりやすい。Over The Counter (OTC) 薬として入手しやすいことも漫然とした使用の原因となる。

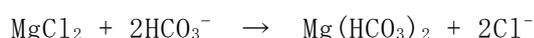
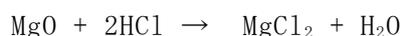
MgO は下剤 (通常成人 2 g/日、1 日 3 回または就寝前 1 回) としてだけでなく、制酸剤 (通常成人 0.5~1.0 g/日、分割投与) としても使用される。また、尿路尿酸カルシウム結石の予防薬 (通常成人 0.2~0.6 g/日) としても使用される。

また、がん性疼痛に使用される鎮痛剤オピオイドは、その副作用として便秘を引き起こすことがあるが、MgO は便秘の予防薬として使用される。MgO には併用に注意を要する薬剤がある。例えば、テトラサイクリン系抗菌薬、ニューキノロン系抗菌薬、ビスホスホネートはキレート形成により吸収が低下するため、MgO との併用は避けるか、MgO 服用の 2 時間以上前に服用することが求められている。また、活性型ビタミン D₃ 製剤との併用によって高マグネシウム血症が起りやすくなることや、大量の牛乳やカルシウム製剤との併用でミルク・アルカリ症候群のリスクがあることも指摘されている。

また、マグネシウムと疾病との関連を報告する研究も少なくない。マグネシウムの摂取が足りないと高血圧のリスクが高まることも知られており (Schutten *et al.*, 2018; Dominguez *et al.*, 2021)、マグネシウムの摂取により有意に血圧が下がったことを報告するメタアナリシスもある (Zhang *et al.*, 2016)。これは、血圧の主な要因である心拍出量と末梢抵抗にマグネシウムが作用することによると考えられている。

1.3 MgOの動態

MgOは、水への溶解度が0.62 mg/100gと極めて低い物質であり、そのままの状態
で吸収されることはほとんどない。MgOは、次のような反応によって生じた重炭酸
塩や炭酸塩が緩下作用を示すことから、浸透圧性下剤の中でも塩類下剤に分類され
る(Table 1)。MgOは胃の中で胃酸(HCl)と反応して塩化マグネシウム(MgCl₂)になり、
腸内に分泌された腓液(NaHCO₃)と反応して難吸収性の重炭酸塩(炭酸水素マグネシ
ウム: Mg(HCO₃)₂)や炭酸塩(炭酸マグネシウム: MgCO₃)となる(Figure 1)。



腸内の塩類濃度が高くなると、浸透圧の働きによって腸管壁と腸内の濃度を一定
にしようとして腸管壁から腸内に水分が移動する。それにより、腸内の水分が増え、
便が柔らかくなる。また、便の容積も増え腸管壁が刺激されることで排便が促進さ
れる。強酸性である胃酸と同程度のpH1.2溶液中でのMgOの溶出率は、15分で50%
程度に達し、60分で80%を超えるという報告(吉村ら, 2017)から、投与されたMgO
の多くは、胃酸で溶解して、上記の反応により緩下作用を示すと考えられる。

緩下剤としてのMgOの日本における用法・用量は、成人1日2gを食前または食
後の3回に分割経口投与するか、就寝前に1回投与となっている。MgOの体内
動態についての研究は少ないが、ラットで緩下作用が認められた400 mg/kgの経口
投与では投与3時間で血漿マグネシウム濃度がピークに達し、48時間後に平常値近
くまで低下することが報告されている(吉村ら, 2017)。この報告では、半減期が27.3
時間と長いことが示されている。このように血漿マグネシウム濃度が比較的長時間
維持されることが、高マグネシウム血症の理由になっている可能性がある。また、
経口投与されたMgOで、吸収され尿中に排泄されるのは15%程度であり、85%は吸収
されずに糞中に排泄されることもわかっている(吉村ら, 2017)。

Table 1 日本で使用される下剤の分類

分類		薬物名 (*生薬由来)	効果
刺激性下剤	小腸刺激性下剤	ヒマシ油*	小腸でリパーゼによってリシノール酸とグリセリンに加水分解される リシノール酸は腸管を刺激して蠕動運動を促進し、グリセリンはその粘滑作用で便を排泄しやすくする
	大腸刺激性下剤	センナ*	腸内細菌の分解によって生成されたレインアンスロンがアウエルパッハ神経叢に作用して大腸の蠕動運動を促進する
		センノシド*	
		アロエ*	
		ダイオウ*	
		ピサコジル	結腸・直腸粘膜に選択的に作用して蠕動運動を促進する
		ピコスルファートナトリウム	腸内細菌の分解によって活性型ジフェノール体となり大腸を刺激し蠕動運動を促進する
機能性下剤	膨張性下剤	カルメロースナトリウム	腸管内の水分を吸引して膨張することで腸管壁を刺激する
	塩類下剤	酸化マグネシウム	腸管内の浸透圧を上げ腸管内へ水分を引き込むことで便を軟化する
	浸潤性下剤	ジオクチルソジウムスルホサクシネート	界面活性作用により便に水分を浸透しやすくする
クロライドチャンネルアクチベーター	ルビプロストン	小腸上皮頂端膜の2型クロライドチャンネルを活性化することでCl ⁻ が腸管内に移動するとNa ⁺ 、水の腸管内腔への分泌が促進される	
胆汁酸トランスポーター阻害薬	エロピキシパット	終末回腸での胆汁酸再吸収を阻害することで大腸への胆汁酸の流入量を増加させ、胆汁酸のもつ大腸の水分分泌増加作用と大腸運動促進作用を発現させる	
グアニル酸シクラーゼC受容体アゴニスト	リナクロチド	腸管表面のGC-C受容体を活性化することで腸管分泌を促進し、さらに大腸痛覚過敏を抑制する	

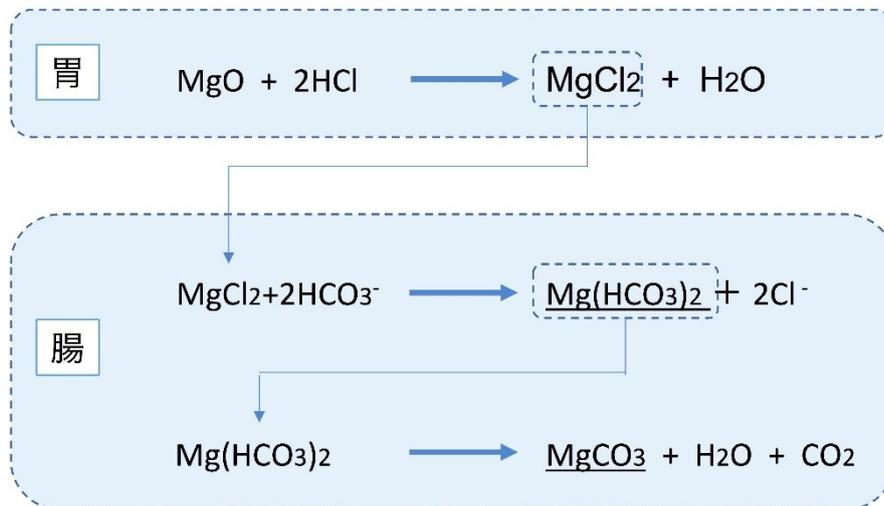


Figure 1 MgO の胃腸内における反応

1.4 便秘治療における食物繊維の役割

薬物による便秘治療がある一方、便秘の解消には、食生活をはじめとする生活習慣の改善が推奨されている。日本の慢性便秘症診療ガイドライン 2020 では、生活習慣の改善が治療の第一段階であるとしている。厚生労働省による食物繊維 1 日摂取量の目標値は男性成人で 20 g/日、成人女性で 18 g/日である(水上, 2020)が、国立健康・栄養研究所の報告によれば、2018 年における食物繊維摂取量の平均値は、男女ともに摂取目標に届いていない(国立健康・栄養研究所 https://www.nibiohn.go.jp/eiken/kenkounippon21/eiyouchousa/keinen_henka_eiyou.html)。World Gastroenterology Organization (WGO) のガイドライン(World Gastroenterology Organisation <https://www.worldgastroenterology.org/guidelines/global-guidelines/constipation>)においても、便秘治療の第一段階として挙げている項目の中に食物繊維の段階的増量が含まれている(Lindberg *et al.*, 2011)。WGO のガイドラインでは、便秘患者の治療に 1 日 25g の食物繊維の摂取を勧めている。しかし、過剰に摂取することはかえって便秘の増悪につながるという報告(Müller-Lissner *et al.*, 2005)や、食物繊維が便秘に有効であるのは摂取が足りていない時であるという報告(Leung *et al.*, 2011)もあることから、摂取量には注意を要する。

食物繊維は、食物成分の中でも、ヒトの消化酵素では消化されない難消化性成分と定義される。したがって、食物繊維は消化酵素によって消化されないまま大腸まで達することになる。食物繊維には不溶性と水溶性がある (Table 2)。不溶性の食物繊維は便容積の増加に繋がることで、大腸通過時間を短縮する。また水溶性食物繊維は、腸内細菌によって発酵され短鎖脂肪酸 (SCFA) となり、浸透圧を増加させ、大腸の通過を促進する。また、SCFA は腸管内 pH を低下させて腸内細菌叢を変化させ、大腸の通過を促進する。このような点が食物繊維の作用機序と推測されている (Bae *et al.*, 2014)。

食物繊維は、穀類、豆類、野菜類、果実類、きのこ類、藻類などに多く含まれている。食物繊維は便秘に作用するだけでなく、さまざまな効果が報告されている。心筋梗塞を発症した男女について、その後の死亡率と食物繊維摂取の関係を調べた研究では、発症前後に食物繊維をより多く摂取していた人の死亡率が有意に低かったことを報告している (Li *et al.*, 2014)。水溶性食物繊維オオバコを 2 型糖尿病患者に 8 週間にわたり昼食前と夕食前に与えたところ、空腹時血糖値、HbA1c、インスリン値、C ペプチド値、HOMA-IR (インスリン抵抗性) とともに有意に改善したという報告もある (Abutair *et al.*, 2016)。また有意ではないが HOMA- β (インスリン分泌能) も改善した。

本研究では、水溶性食物繊維の中でも Inulin を取り上げ使用した。Inulin は 1 つのグルコースにフルクトース 2~60 個が重合した直鎖状フルクタンである (Figure 2)。Inulin は、ゴボウ、ニンニク、チコリ、タマネギ、ニラといった身近でよく使用される食材に含まれているため、誰でもが、日常的に摂取すると思われることが、研究に使用した理由である。また、その生理作用から、Inulin を含む機能性表示食品が多数登録されるようになった。「おなかの調子を整える」「血糖値の上昇を抑える」「中性脂肪を抑える」という機能で、栄養補助食品、飲料、菓子、調味料、発酵乳、レトルト食品、米飯類に使用されている。食材のみならず機能性食品を積極的に利用する人にとって、Inulin は食物繊維を代表するキーワードのひとつとなっている。

Table 2 食物繊維の分類

分類	主な特徴	主な成分	主な食品
不溶性食物繊維	① 高い保水性 ↓ 消化管内で膨らむ ↓ 有害物質を吸着、便量の増加	セルロース ヘミセルロース キチン リグニン ペントザン	穀類、野菜類、果実類 穀類、野菜類、果実類 甲殻類 穀類、完熟野菜類、豆類、ココア ライ麦、植物の皮
	② 強い粘性・吸着性 ↓ 胃内滞留時間の遅延 ↓ 小腸における吸収速度が遅くなる ↓ 食後血糖値の上昇抑制 血中コレステロールの上昇抑制	難消化性デキストリン	とうもろこしでんぷん ↓ 扱いやすく食品に添加しやすい ↓ 健康食品や特定保健用食品
水溶性食物繊維	① 発酵性 ↓ 短鎖脂肪酸を産生 ↓ 善玉菌のエサとなり腸内細菌叢を改善	ペクチン ムチン グルカン グルコマンナン イヌリン ラミナラン	芋類、柑橘類、リンゴ ヤマイモ、オクラ、ウナギ きのこ類、海藻 コンニャクイモ キクイモ、ゴボウ、ニンニク、玉葱 きのこ類、藻
	② 強い粘性・吸着性 ↓ 胃内滞留時間の遅延 ↓ 小腸における吸収速度が遅くなる ↓ 食後血糖値の上昇抑制 血中コレステロールの上昇抑制	グアーガム フコダイン アルギン酸 ポルフィラン	グアーの種子 コンブ、ワカメ 海藻 海苔

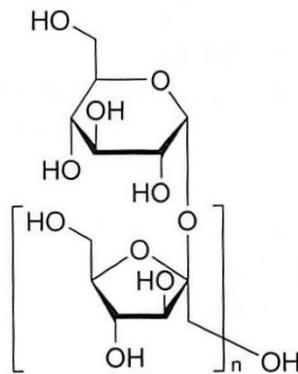


Figure 2 Inulin の構造式

1.5 ヒトの腸内細菌の分類と細菌叢の形成

ヒトの腸内には 100 兆個もの腸内細菌が存在し、腸内細菌叢を作っており (Rolhion *et al.*, 2016)、その重量は 2 kg にも及ぶ。腸内細菌の 1/3 はほとんどのヒトに共通に存在している (Bermon *et al.*, 2015)。腸内細菌の分類は、分類手法や嫌気性細菌分離培養技術の発展により変更が加えられてきた。それにより、2000 年には約 600 種とされていた菌種は、今日では 1,000 種以上が明らかになっている。しかしながら、分離培養が困難な菌もあることから、分類は未だ発展途上と言える。

生物は分類学上、上位からドメイン (Domain)、界 (Kingdom)、門 (Phylum)、綱 (Class)、目 (Order)、科 (Family)、属 (Genus)、種 (Species) の各階級に分類される。原核生物を分類学的な位置からみると、Archaea (古細菌) ドメインで 5 つの門、Bacteria (細菌) ドメインで 33 の門に分類される。しかし、その中でヒトの腸内から分離されるのは、Archaea で 1 つの門 (Euryarchaeota)、Bacteria で 11 の門 (Actinobacteria、Bacteroidetes、Deinococcus-Thermus、Firmicutes、Fusobacteria、Lentisphaerae、Proteobacteria、Spirochaetes、Synergistetes、Tenericutes、Verrucomicrobia) のみである (平山, 2016)。さらには、健常なヒトの腸内細菌叢の大部分は、Actinobacteria、Bacteroidetes、Firmicutes、Proteobacteria の 4 つの門で占められている (服部, 2014) (藤澤, 2017)。2020 年 8 月に開催された第 7 回日本時間栄養学会の服部による特別講演でも、Actinobacteria、Bacteroidetes、Firmicutes、Proteobacteria の 4 つの門による占有率について言及されており、それらが 99%以上を占めるとしている。また、ヒトの腸内細菌叢では Bacteroidetes と Firmicutes の 2 つの門が優勢である。Arumugam らがヨーロッパ 4 カ国、日本、アメリカのデータを対象に糞便中の存在比を推定したところ、Firmicutes 門は 38.8%、Bacteroidetes 門 27.8%、Actinobacteria 門 8.2%、Proteobacteria 門 2.1%、Verrucomicrobia 門 1.3%であった (Arumugam *et al.*, 2011)。ヒトの腸内細菌叢に関連する主な細菌 (属) を表にまとめた (Table 3)。

ヒトの腸内細菌叢は年齢によって変化する。Odamaki らの解析によれば、1~2 歳では Actinobacteria の割合がもっとも多くなっているが、3~60 歳では Firmicutes が 80% 程度を占めるほど優勢となり、70 歳以上では Bacteroidetes と Proteobacteria の割合が増えてくる (Odamaki *et al.*, 2016)。

また、世界レベルでヒトを対象とした解析により、個人の腸内細菌叢の特徴は 3

つのエンテロタイプ(腸内細菌のパターン)に分類できることが 2011 年に報告された。最も多いタイプは *Bacteroides* 属(Bacteroidetes 門)で、次に多いタイプが *Prevotella* 属(Bacteroidetes 門)であり、第 3 のタイプはさまざまな菌が雑多に含まれるが *Ruminococcus*(Firmicutes 門)が多いことから *Ruminococcus* 属とされたタイプである。エンテロタイプは人種、年齢、性別に依らないとされる(Arumugam *et al.*, 2011)。

ヒトの腸内細菌叢の解析は、分類手法や嫌気性細菌分離培養技術の発展のみならず、後述する腸内細菌と疾病との関係が盛んに報告されたことや、それに伴ってプロバイオティクスやプレバイオティクスが導入されたことにより加速することになった。プロバイオティクス、プレバイオティクスについては後述する。ヒト以外の動物を用いた腸内細菌叢の研究は多いが、ヒト以外の動物の腸内細菌叢の構成パターンに関する体系的な報告は少ない。動物種固有の腸内細菌叢の構成パターンがあることが報告されているが(伊藤, 1994; 光岡, 2002)、Bacteroidetes 門と Firmicutes 門が優勢であったとする報告(McKnite *et al.*, 2012)から、動物とヒトの腸内細菌叢には共通点があるとも言える。

本研究で MgO 単独または MgO と Inulin の併用が細菌の相対存在量に与える影響を検討するにあたり、観察対象とした細菌(Table 2 黄色マーカー)について、その特徴を以下に述べる。菌の選択にあたり、糞便中の存在比が高い Firmicutes 門、Bacteroidetes 門に属すること、プロバイオティクスとして利用されていること、疾病との関係が特に注目されていること、本研究で特徴的な変化が認められたことなどを考慮した。

<*Akkermansia* 属>

Akkermansia 属は、Verrucomicrobia 門に属するグラム陰性偏性嫌気性菌で、幅広い脊椎動物の消化管に分布している(Belzer *et al.*, 2012)。*Akkermansia muciniphila* はムチンを唯一の炭素源、窒素源としており(Derrien *et al.*, 2004)、ムチン分解の過程で酢酸とプロピオン酸を生成する。*Akkermansia* の発育温度と pH は 20-40°C、pH5, 5-8.0 で、至適発育温度は 37°C、pH は 6.5 とされる(Derrien *et al.*, 2004)。

Akkermansia については、さまざまな疾病との関連が報じられている。マウスに

高脂肪食を与えた研究では、*Akkermansia muciniphila* の存在量が高脂肪食の摂取やマウスの週齢と負の関係にあることが示された (Schneeberger *et al.*, 2015)。また、Wang らは、自閉症スペクトラム障害の小児で *Akkermansia muciniphila* の存在が減少していることを示した (Wang *et al.*, 2011)。一方で、近年は、消化性潰瘍の初期治療の第一選択薬であり、強力な胃酸分泌抑制作用を持つプロトンポンプ阻害薬 (PPI) により *dysbiosis* が起こり、*Akkermansia* が増えるという報告もあり (Yoshihara *et al.*, 2020)、*Akkermansia* の相対存在量の増減が生体に及ぼす影響についての評価が難しいことが窺える。

< *Bacteroides* 属 >

Bacteroidetes 門に属するグラム陰性偏性嫌気性菌で、口腔から腸内細菌叢まで大量に存在する優勢菌のひとつである (細野, 2013)。難消化性のフラクトオリゴ糖および単糖を代謝して栄養源としており、コハク酸、酢酸、プロピオン酸を産生する (Rajilic-Stojanovic *et al.*, 2014; 渡部, 2005)

Bacteroides はさまざまな分野の疾病との関連が報告されている。Zhou らによるメタアナリシスでは、クローン病、潰瘍性大腸炎、非定型的大腸炎といった炎症性腸疾患において、とりわけ活動期で *Bacteroides* の存在量が低くなっていることを示している (Zhou *et al.*, 2016)。また、免疫系疾患においても関連が報告されている。小児の食物感作と腸内細菌との関係について調べた研究では、食物アレルギーのある小児で、健常な小児に比べて *Bacteroides* 属を含む Bacteroidetes 門の存在量が低くなっていることがわかった (Chen *et al.*, 2016)。Scher らは、関節リウマチ患者で *Prevotella copri* が増加することに *Bacteroides* の減少が関連していることを示している (Scher *et al.*, 2013)。

< *Bifidobacterium* 属 >

Bifidobacterium 属は Actinobacteria 門に属するグラム陽性偏性嫌気性菌で、ビフィズス菌は、この *Bifidobacterium* 属に属する細菌の総称である。乳糖やオリゴ糖を分解して乳酸、酢酸を産生する。日本人の腸内には欧米人と中国人に比べてより多いビフィズス菌が存在していることがわかっている (Nishijima *et al.*, 2016)。このように日本人の腸内に多くのビフィズス菌が存在しているのは、乳糖分解酵素

発現が少ないタイプの遺伝子型を保有するため、小腸において乳糖分解酵素がさほど機能せず大腸まで乳糖が達し、その結果、大腸でビフィズス菌が増殖しやすいことによる(Kato *et al.*, 2018)。

ビフィズス菌と疾病との関連については、有用菌として疾患への影響を検討するヒト臨床試験が報告されている。中でも興味深いのは、加熱処理した *Bifidobacterium bifidum* が過敏性腸症候群の症状緩和に効果を示したという報告である(Andresen *et al.*, 2020)。また、ビフィズス菌は医薬品として服用されることもあるが、ビフィズス菌が酸に弱く胃酸で生菌数が減少してしまうため、食後に服用する。

< *Lactobacillus* 属 >

Lactobacillus 属は、Firmicutes 門に属するグラム陽性通性嫌気性または微好気性の桿菌である。狭義の乳酸桿菌をさす。糖を乳酸に代謝するが、乳酸のみを産生する種(ホモ乳酸発酵する種)と乳酸以外にも同時に産生する種(ヘテロ乳酸発酵する種)が存在する。酸素が存在する環境でも生存できるため、口腔や上部消化管に比較的多く存在する。また、低い pH の環境下でも増殖する。

Lactobacillus 属に属する種にはヨーグルトの製造に利用されているものが多く、プロバイオティクスとしての研究も盛んである。*Lactobacillus casei* に属する *Lactobacillus rhamnosus GG* が乳児の牛乳アレルギーの寛解を促進したという報告もある(Canani *et al.*, 2016)。また、腸内細菌が高塩分によって影響されることが Wilck らによって報告されたことも興味深い(Wilck *et al.*, 2017)。マウスに高塩分食を摂取させたところ、マウス特有の乳酸菌の一種である *Lactobacillus murinus* の減少が著しかった。*Lactobacillus murinus* を補充すると、炎症反応を亢進する T ヘルパー17(Th17)細胞の増殖が抑制され、その結果、自己免疫性脳脊髄炎や塩分依存性の高血圧が改善されることがわかった。ヒトを対象としたパイロットスタディでも高塩分食によって乳酸菌類の減少、Th17 細胞の増加、血圧の上昇が認められている(Wilck *et al.*, 2017)。これらの先行研究は、Th17 細胞の活性化を阻害する乳酸菌が塩分依存性の疾患の予防にも寄与する可能性を示している。

< *Lactococcus* 属 >

Lactococcus 属は、Firmicutes 門に属するグラム陽性通性嫌気性の球菌である。狭義の乳酸球菌をさす。ホモ乳酸発酵により糖を乳酸に代謝する。低い pH の環境下でも増殖ができる。チーズなどの乳製品の発酵に利用される。*Lactococcus* と疾病との関連について注目すべきは、ヒトの糞便から単離・同定されたエクオール産生菌 *Lactococcus garvieae* である(内山, 2007)。エクオールは大豆イソフラボンの一種であるダイゼインから腸内細菌によって生成される(Rafii *et al.*, 2015)。大豆に含まれるイソフラボンが、ホルモン依存性の癌に対して抗エストロゲン効果を示すことや(Herman *et al.*, 1995)、ホットフラッシュ(Messina *et al.*, 2003)など更年期障害症状を軽減すること、閉経後の骨代謝速度を遅くする可能性があること(Uesugi *et al.*, 2003)は知られている。エクオールの産生には個体差があり、産生できない人はエクオール産生菌をもたない可能性があると言われている。内山らが、安全性の高いエクオール産生菌として *Lactococcus garvieae* を単離・同定したことで、エクオールを産生できないヒトへのプロバイオティクスとしての利用が期待されている。

< *Odoribacter* 属 >

Odoribacter 属は、Bacteroidetes 門に属するグラム陰性偏性嫌気性の桿菌である。糖を分解する能力はなく、エネルギー源を炭水化物の発酵に依存している。ヒトの腸内で酪酸を産生する。妊娠 16 週の太り気味または肥満の妊婦を対象とした研究では、*Odoribacter* の存在量と収縮期血圧とは負の相関が認められた。また、プラスミノゲンアクチベータインヒビター1 と *Odoribacter* 存在量にも負の相関が認められた。*Odoribacter* は酪酸の生成を通じて、収縮期血圧を低く維持することに役立つことが報告されている(Gomez-Arango, *et al.*, 2016)。

Table 3 ヒトの腸内細菌叢に関連する主な細菌(属) (次ページに続く)

Bacteria Domain(ドメイン)	
Phylyum(門)	Genus(属)
Firmicutes * 最優勢の2門のひとつであり 菌数、菌種数が最も多い門	<i>Bacillus</i>
	<i>Listeria</i>
	<i>Staphylococcus</i>
	<i>Gemella</i>
	<i>Lactobacillus</i>
	<i>Lactococcus</i>
	<i>Streptococcus</i>
	<i>Granulicatella</i>
	<i>Enterococcus</i>
	<i>Leuconostoc</i>
	<i>Weissella</i>
	<i>Clostridium</i>
	<i>Anaerococcus</i>
	<i>Finegoldia</i>
	<i>Parvimonas</i>
	<i>Peptoniphilus</i>
	<i>Anaerofustis</i>
	<i>Eubacterium</i>
	<i>Anaerostipes</i>
	<i>Butyrivibrio</i>
	<i>Catonella</i>
	<i>Coprococcus</i>
	<i>Dorea</i>
	<i>Marvinbryantia</i>
	<i>Oribacterium</i>
	<i>Roseburia</i>
	<i>Peptostreptococcus</i>
	<i>Anaerotruncus</i>
	<i>Faecalibacterium</i>
	<i>Oscillibacter</i>
	<i>Ruminococcus</i>
	<i>Subdoligranulum</i>
<i>Blautia</i>	
<i>Pseudoflavonifractor</i>	
<i>Coprobacillus</i>	
<i>Holdemanella</i>	
<i>Holdemania</i>	
	<i>Solobacterium</i>
	<i>Turicibacter</i>
	<i>Acidaminococcus</i>
	<i>Phascolarctobacterium</i>
	<i>Centipeda</i>
	<i>Dialister</i>
	<i>Megasphaera</i>
	<i>Mitsuokella</i>
	<i>Selenomonas</i>
	<i>Veillonella</i>
Bacteroidetes * 最優勢の2門のひとつ	<i>Bacteroides</i>
	<i>Dysgonomonas</i>
	<i>Odoribacter</i>
	<i>Parabacteroides</i>
	<i>Porphyromonas</i>
	<i>Pararevotella</i>
	<i>Prevotella</i>
	<i>Alistipes</i>
<i>Capnocytophaga</i>	
Actinobacteria * 腸内細菌叢主要4門のひとつ	<i>Mobiluncus</i>
	<i>Corynebacterium</i>
	<i>Rothia</i>
	<i>Mycobacterium</i>
	<i>Propionibacterium</i>
	<i>Bifidobacterium</i>
	<i>Gardnerella</i>
	<i>Atopobium</i>
	<i>Collinsella</i>
	<i>Eggerthella</i>
	<i>Olsenella</i>
<i>Slackia</i>	
Proteobacteria * 腸内細菌叢主要4門のひとつ	<i>Bartonella</i>
	<i>Bradyrhizobium</i>
	<i>Nitrobacter</i>
	<i>Methylobacterium</i>
	<i>Achromobacter</i>
	<i>Burkholderia</i>

Bacteria Domain(ドメイン) (つづき)	
Phykyn(門)	Genus(属)
	<i>Lautropia</i>
	<i>Comamonas</i>
	<i>Oxalobacter</i>
	<i>Parasutterella</i>
	<i>Sutterella</i>
	<i>Eikenella</i>
	<i>Kingella</i>
	<i>Laribacter</i>
	<i>Neisseria</i>
	<i>Bilophila</i>
	<i>Desulfovibrio</i>
	<i>Arcobacter</i>
	<i>Campylobacter</i>
	<i>Helicobacter</i>
	<i>Citrobacter</i>
	<i>Cronobacter</i>
	<i>Edwardsiella</i>
	<i>Enterobacter</i>
	<i>Escherichia</i>
	<i>Klebsiella</i>
	<i>Proteus</i>
	<i>Providencia</i>
	<i>Salmonella</i>
	<i>Shigella</i>
	<i>Xenorhabdus</i>
	<i>Yersinia</i>
	<i>Aeromonas</i>
	<i>Succinatimonas</i>
	<i>Cardiobacterium</i>
	<i>Actinobacillus</i>
	<i>Aggregatibacter</i>
	<i>Basfia</i>
	<i>Haemophilus</i>
	<i>Histophilus</i>
	<i>Mannheimia</i>
	<i>Pasteurella</i>
	<i>Acinetobacter</i>
	<i>Enhydrobacter</i>
	<i>Moraxella</i>

	<i>Grimontia</i>
	<i>Vibrio</i>
Deinococcus-Thermus	<i>Deinococcus</i>
Fusobacteria	<i>Fusobacterium</i>
	<i>Leptotrichia</i>
Lentisphaerae	<i>Victivallis</i>
Spirochaetae	<i>Treponema</i>
Synergistetes	<i>Anaerobaculum</i>
	<i>Pyramidobacter</i>
Tenericutes	<i>Mycoplasma</i>
	<i>Ureaplasma</i>
Verrucomicrobia	<i>Akkermansia</i>
Archaea Domain(ドメイン)	
Phykyn(門)	Genus(属)
Euryarchaeota	<i>Methanobrevibacter</i>
	<i>Methanosphaera</i>

1.6 腸内細菌叢の乱れと疾病

腸内細菌の種類がバランスよく存在し、多様性が保たれることは宿主の健康に寄与する一方、病気になると多様性が低下する。

腸内細菌叢のバランスに影響を与える要因として、遺伝的背景、疾病、加齢が挙げられる他、食事、生活習慣、服薬といった要因も大きく関係する。脂肪やタンパク質を多く摂取すると *Bacteroides* 属が、炭水化物を多く摂取すると *Prevotella* 属が多くなることが報告されている (Wu *et al.*, 2011)。また、野菜・穀類を中心とした食事を摂取すると難消化性多糖を分解できる *Prevotella* 属や *Lachnospira* 属が多く、動物性食品を中心とした食事の場合は *Ruminococcus* 属が多くなる (De Filippis *et al.*, 2016)。運動や喫煙という生活習慣も影響する。マラソンランナーで *Veillonella* 属が増えたという報告があり (Scheiman *et al.*, 2019)、喫煙をしていると *Bacteroidetes* 属が低くなる (Biedermann *et al.*, 2013)。

加齢によっても腸内細菌叢に変化がある。70 歳以上で *Bacteroidetes* と *Proteobacteria* の割合が増えることは前にも述べたが、100 歳以上の高齢者で抗炎症効果をもつ *Faecalibacterium prausnitzii* が減少する一方、105 歳～109 歳では健康増進効果のある *Akkermansia* 属と *Bifidobacterium* 属が増えることも報告されている (Biagi *et al.*, 2016)。

疾病によっても腸内細菌叢は変化する。肥満で Firmicutes 門の増加と Bacteroidetes 門の減少が認められている (Ley *et al.*, 2005)。また、単一の菌種としては、体重超過の妊婦や糖尿病患者で *Akkermansia muciniphilia* (Verrucomicrobia 門) の割合が減っているという報告もある (Santacruz *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2013)。過敏性腸症候群では *Lactobacillus* 属、*Veillonella* 属が増え (Tana *et al.*, 2010)、大腸がんでは *Fusobacterium nucleatum* が炎症を引き起こすことがわかっている (Ito *et al.*, 2015)。大腸がん患者で *Fusobacterium nucleatum* ががん部以外の粘膜や便にも検出されることから、*Fusobacterium nucleatum* を発生のバイオマーカーとして利用できる可能性も論じられている。腸内細菌が神経伝達物質セロトニンの生合成を制御すること (Yano *et al.*, 2015) や、腸内細菌自体が神経伝達物質トリプタミンを合成すること (Williams *et al.*, 2014) など、腸内細菌と脳・神経系との関わりも明らかとなっている。

このように、腸内細菌叢の乱れは腸疾患のみならず、肥満や糖尿病などの疾患や、精神・神経系に関連していることが報告されている。したがって、腸内環境を整えることは全身の健康管理において非常に重要である。

1.7 腸内細菌叢と薬剤による影響

抗菌薬はその副作用として特定の細菌を減少または増加して腸内細菌叢に影響を及ぼすことが報告されている(Cho *et al.*, 2012)。抗菌薬による腸内細菌叢の乱れが耐性遺伝子の蔓延、ビタミン産生菌の低下、多様性やレジリエンスの低下、不適切な免疫応答に繋がる。

非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)は、消炎鎮痛目的で整形外科、歯科を始めとして、どの診療科でも処方される薬である。また OTC 薬としても頭痛、生理痛、腰痛・筋肉痛などを対象に多くの製品がある。また、NSAIDs の 1 つであるアスピリンは消炎鎮痛剤としてだけでなく、その抗血小板作用から低用量で血管イベント予防にも使用される。NSAIDs による胃・十二指腸の傷害は知られていたが、近年になり、小腸粘膜傷害も明らかになった。NSAIDs 常用者の約 70%になんらかの小腸粘膜傷害があったと Graham らは報告している(Graham *et al.*, 2005)。NSAIDs が小腸粘膜傷害を引き起こす原因は、その抗炎症作用によってプロスタグランジン濃度が低下することでプロスタグランジンが担っていた粘膜防御が弱くなり、粘膜攻撃因子である腸内細菌とのバランスが崩れることによる。

PPI も腸内細菌叢異常を引き起こすことが知られている(Freedberg *et al.*, 2015; Imhann *et al.*, 2016; Jackson *et al.*, 2016)。PPI が胃酸分泌を抑制することで、本来胃で殺菌されるべき口腔内や食物中の細菌が胃を通過して小腸に達することで腸内細菌叢の構成に異常をきたすことになる。また、Wallace らは PPI が NSAIDs による小腸粘膜傷害を増悪させることを報告している(Wallace *et al.*, 2011)。

1.8 腸内細菌叢の健康への寄与

腸内細菌叢の多様性の低下は病気の原因となる可能性があるため、いかにその多様性を保持するかが課題となる。

1.8.1 プロバイオティクス

1989年に Fuller が「腸内細菌叢のバランスを改善することで有益な作用をもたらす生きた微生物」をプロバイオティクスと定義し(小田巻ほか, 2019)、国際連合食糧農業機関(FAO)は「十分量を摂取したときに宿主に有益な効果をもたらす生きた微生物」と定義している。乳酸菌やビフィズス菌が有名だが、すべての株でその効果が科学的に認められたわけではない。

便秘においては、さまざまなプロバイオティクスを用いたランダム化二重盲検比較試験で有効性が報告されている。*Lactobacillus johnsonii La1*を含む発酵乳を用いて、24~67歳の健常な日本人男女57名を対象に試験を行ったところ、プロバイオティクスである発酵乳で軽度の便秘の改善が認められた(Fukushima *et al.*, 2004)。*Lactobacillus casei Shirota*を含む飲料を用いて慢性便秘症の患者70名を対象に行った試験でも便秘の改善が認められた(Koebnick *et al.*, 2003)。また、複数種を混合したプロバイオティクスの効果を報告した研究もある。18歳以上の慢性便秘患者120名を対象としてマレーシアで行われたランダム化二重盲検比較試験では、*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum* and *Bifidobacterium infantis*が混合された顆粒を摂取したところ、便の回数と硬さが改善したという報告もある(Jayasimhan *et al.*, 2013)。

1.8.2 プレバイオティクス

腸内細菌の餌になる食物繊維やオリゴ糖のような難消化性食品成分をプレバイオティクスという。1994年に提唱したGibsonとRoberfroidは「大腸内の特定の細菌の増殖および活性を選択的に刺激することにより、宿主に有益な影響を与え、宿主の健康を改善する難消化性食品成分」とし(Gibson *et al.*, 1995)、FAOは「腸内細菌叢の調節に関連して宿主に健康上の利益を与える生存不能な食品成分」と定義している。プレバイオティクスである食物繊維の摂取は冠動脈性心疾患、脳卒中、

糖尿病、肥満の相対リスクを有意に減少し、体重、血清 LDL-コレステロール値、血圧を減少する (Anderson *et al.*, 2009)。水溶性食物繊維 Inulin を肥満男性が摂取すると SCFA 産生が促進したという報告もある (van del Beek *et al.*, 2018)。また、米国で行われた横断研究では高食物繊維食で胃食道逆流症の症状リスクが減少したこと (El-Serog *et al.*, 2005)、MEDLINE を用いた検証では高食物繊維食が十二指腸潰瘍の罹患率を低下させること (Ryan-Harshman *et al.*, 2004) が報告されている。食物繊維の効果が多岐にわたることを考えると、多種類の食品から食物繊維を摂取する必要がある (Slavin *et al.*, 2013)。一方で、食物繊維のプレバイオティクスとしての効果に関する研究はいまだ十分とは言えない。

1.8.3 シンバイオティクス

シンバイオティクスは 1995 年に Gibson らにより提唱された概念で、プロバイオティクスとプレバイオティクスの組み合わせと定義される。シンバイオティクスの有効性に関する報告もある。敗血症と診断され ICU に入ってから人工呼吸器の管理下にある患者に対して、*Bifidobacterium breve*、*Lactobacillus casei* をプロバイオティクスとして、ガラクトオリゴ糖をプレバイオティクスとして入院後 3 日以内に開始したところ、腸炎や人工呼吸器関連肺炎の発生はシンバイオティクス群で有意に少なかった。また、糞便中の *Bifidobacterium* 数、*Lactobacillus* 数ともにシンバイオティクス群で多かったことから、シンバイオティクスが腸内環境を調節していることが示された (Shimizu *et al.*, 2018)。

1.9 SCFA と生理機能の関連について

1.9.1 SCFA の生成

腸内細菌は食物繊維を発酵して SCFA を産生する (Koh *et al.*, 2016)。SCFA には、酢酸、プロピオン酸、酪酸、iso 酪酸、吉草酸、iso 吉草酸、カプロン酸があるが、結腸における SCFA は酢酸、プロピオン酸、酪酸で 90~95% を占めている (Rios-Covián *et al.*, 2016)。その内訳は、酢酸 60~65%、プロピオン酸 20%、酪酸 15~20% と言われる (宇佐美ら, 2019)。

腸内細菌が SCFA を生成する経路において、乳酸はプロピオン酸に変換される。また、酪酸、酢酸、プロピオン酸に変換されるピルビン酸に変換される (渡部ほか,

2005; Koh *et al.*, 2016; Louis *et al.*, 2017) (Figure 3)。乳酸は SCFA とは定義されないが、SCFA の前駆物質であることから、本論文では SCFA の各有機酸に加えて乳酸も測定対象とした。

大腸で産生された SCFA は大腸粘膜から吸収される。SCFA の pKa(酸解離定数)は 4.6~4.9 である。大腸において非解離型で存在する SCFA は大腸上皮細胞から拡散により吸収され、解離型は重炭酸イオンと交換反応を行う担体によって上皮細胞膜を通過すると言われている (Mascolo *et al.*, 1991)。大腸上皮細胞を通過した SCFA のうち酢酸とプロピオン酸は門脈を経て、最初に肝臓に達し、その後筋肉でも代謝されエネルギー源となる。酢酸、プロピオン酸から得られるエネルギーは、ヒトの一日のエネルギー消費の 2~10%にも及ぶ(原, 2002)。一方、酪酸は大腸上皮細胞で代謝されるため、大腸上皮細胞の重要なエネルギー源となる(原, 2002)。

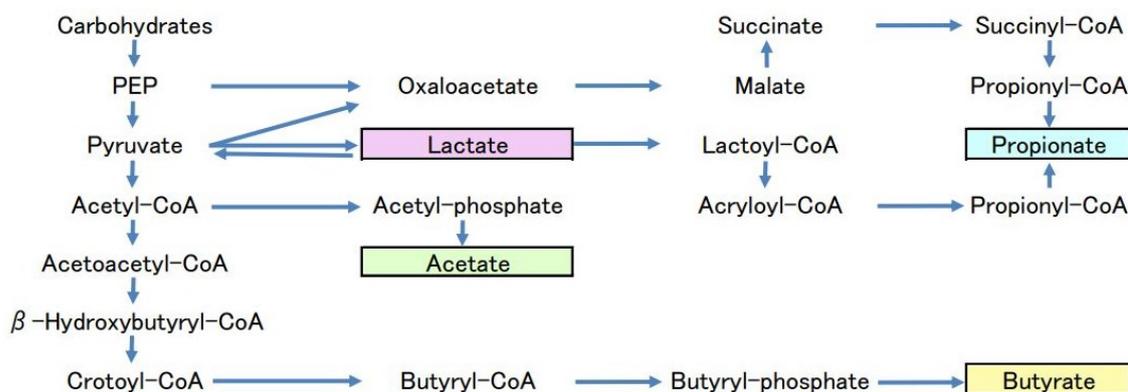


Figure 3 SCFA 産生経路の略図

(渡部, 2005; Koh *et al.*, 2017 を参考に作図)

1.9.2 SCFA と便秘

腸内 pH と SCFA 濃度は負の相関があることが報告されている (Cruz-Ortiz *et al.*, 2020)。SCFA が増えると腸内が酸性となり大腸粘膜を刺激することで腸の蠕動運動が活発化する。また、SCFA は腸管内への電解質の輸送を促し、アクアポリンからの水の放出を促すことで便の水分量を増やす。すなわち、食物繊維を摂取すること

で、腸内細菌により腸内の SCFA が増え、便秘の解消に繋がる。実際、水溶性食物繊維 Inulin は、マウスの盲腸内容物中、門脈血中の SCFA 濃度を増加させることが知られている (Mistry *et al.*, 2018; Matt *et al.*, 2018; Baxter *et al.*, 2019)。

1.9.3 SCFA と生理効果

SCFA は腸内の環境を整え便秘の解消に役立つだけでなく、さまざまな生体機能の調節にも重要な役割を担っている (Barrea *et al.*, 2019; Kimura *et al.*, 2013)。SCFA や乳酸が大腸内 pH を低下することで、有害菌の生育は抑制され、至適 pH が中性～弱アルカリである二次胆汁酸や腐敗化合物の生成も抑制されて、結果的に大腸内環境が改善される。酪酸やプロピオン酸は G タンパク質共役受容体 GPR43 を活性化することで筋肉や肝臓のインスリン感受性が高まりエネルギーバランスを調整する (Kimura *et al.*, 2013)。また、SCFA にはコレステロール生合成抑制作用があることが、ラットでもヒトでも確認されている (Nishina *et al.*, 1990; Wright *et al.*, 1990; Wolever *et al.*, 1991; Hara *et al.*, 1999; Alvaro *et al.*, 2008)。酪酸が大腸で制御性 T 細胞 (Treg) を分化誘導することも知られている (Furusawa *et al.*, 2013)。Treg は複数の機序で過剰な炎症反応など有害な免疫応答を抑制している。1 型糖尿病の発症が抑制された機序を SCFA 投与による Treg の増加であると考察する報告もある (Mariño *et al.*, 2017)。

SCFA と疾病との関係についても報告は多い。SCFA の抗炎症物質としても作用については、アルコール性肝疾患モデルマウスに Inulin を摂取させると SCFA を介して炎症が改善すること (Wang *et al.*, 2020)、炎症性関節炎を誘発する前または誘発中のマウスに酢酸を入れた飲料水を与えたところ、足の腫れが軽減したこと (Maslowski *et al.*, 2009)、プロピオン酸を与えたマウスでアレルギー性気道炎が抑えられたこと (Trompette *et al.*, 2014) などが報告されている。また、*L. johnsonii* の代表的産物である乳酸は NSAID 誘発性小腸損傷において保護的役割を果たす (Watanabe *et al.*, 2009)。さらに、大腸がん発症抑制効果 (Bishehsari *et al.*, 2018) や酪酸による高齢マウスの慢性神経炎症の軽減 (Matt *et al.*, 2018) なども報告されている。このように SCFA の生理効果はヒトに極めて有益である。

1.10 腸管粘膜バリアと免疫グロブリン A

消化管は、管という語で表現されるように、口から肛門まで繋がっている外部に開かれた器官である。そのため、病原微生物をはじめとする異物の侵入リスクに絶えず曝されている。外部からの攻撃を受ける一方で、全身の免疫細胞の約 60%が消化管に存在するとも言われており、細菌との共生により、エネルギーの獲得、免疫系の発達、恒常性維持といった恩恵も得ているのである。

MgO や Inulin と腸内細菌叢との関係について検討するには、腸管粘膜バリアや免疫細胞を知ることが不可欠である。ここでは、腸管粘膜バリアと免疫グロブリン A(IgA)について整理する (Figure 4)。

① 物理的バリアの構造

MgO や Inulin と腸内細菌叢との関係について検討するには、腸管粘膜バリアや免疫細胞を知ることが不可欠である。ここでは、腸管粘膜バリアと腸管粘膜免疫について整理する。

腸が免疫器官として重要であることが注目されたのは今世紀に入ってからとされているが、腸内細菌がどのように宿主の免疫を制御しているかが盛んに研究され、その中で、SCFA や IgA などとの関係も論じられてきた。

異物の攻撃から腸粘膜を守るため、腸管上皮細胞には物理的なバリアと化学的なバリアが備わっている。物理的バリアとは粘液層など物理的に異物侵入から防御するものであり、化学的バリアとは微生物に化学的変化をもたらすことで抗菌活性を示すものである。ここでは、本研究で特に関連があると考えられる大腸の粘膜バリアのうち物理的バリアについて触れる。

大腸の物理的バリアは、腸管上皮細胞間を密着ならびに接着結合する細胞間接着装置、その外側に位置する糖衣、さらにその外側を覆う粘液層からなる (竹田ほか, 2017)。

最外層にあたる粘液層は内粘液層と外粘液層に分かれているが、内粘液層には腸内細菌はほとんど存在しない。また、粘液層は腸管上皮細胞の一つである杯細胞によって産生されるムチンが主成分である。大腸では杯細胞が多いため、ムチンの産生も多く、その結果粘液層が分厚くなっている。ムチンは糖タンパク質であり、ムチン分子に付加されている糖鎖によって粘液は粘性をもつ。外部からくる病原微生物

物は上皮細胞表面の糖鎖に結合しようとするが、ムチンが競合的に拮抗することで上皮細胞への接着や侵入を阻む。内粘液層はムチンが密に重合した構造となっており、腸内細菌はほとんど存在しない。また、GP1 アンカー型タンパク質の Lypd8 が内粘液層に分泌され上皮細胞に細菌が接着することを阻止していることも報告されている (Okumura *et al.*, 2016)。一方、外粘液層には腸内細菌が存在し、腸内細菌由来のプロテアーゼやグリコシダーゼによってムチンは分解される。食物繊維を含まない餌を飼料としたマウスでは、常在菌によるムチンの過剰分解が起こり、その結果、内粘液層が薄くなり炎症が起こることが報告されている (Desai *et al.*, 2016)。しかし、ムチンを混餌投与した研究では、ムチンは内因性の発酵基質として資化され SCFA 濃度が増加し、Treg や IgA 産生形質細胞の割合が増加したという報告もある (Yamada *et al.*, 2019)。

次に、粘液層の下に位置する糖衣は、腸管上皮細胞表面に発現する膜タンパク質に付加されている糖鎖によって形成されており細菌の侵入を防御している。仮に細菌が粘液層や糖衣の防御を通過したとしても、最後に細胞間接着装置が細胞間を強固に結合することで侵入を防ぐことができる。

② IgA

腸が免疫器官として重要であることが注目されたのは今世紀に入ってからとされているが、腸内細菌がどのように宿主の免疫を制御しているかが盛んに研究され、その中で、免疫細胞や SCFA との関係についても論じられてきた。ここでは特に本研究で検討対象とした IgA について述べる。

IgA は主要な抗体アイソタイプの一つで、腸管において次のような機序で病原体の粘膜表面への接着を阻害して感染を防御している。粘膜固有層の IgA 産生形質細胞から産生された IgA は二量体を形成し、上皮細胞に発現する pIgR (polymeric immunoglobulin receptor) と結合した後、トランスサイトシスにより分泌型 IgA として腸管腔内に放出される (長谷ほか, 2006)。分泌型 IgA は細菌や抗原と結合することで粘膜表面への接着を阻害する。粘膜固有層に侵入した細菌や抗原に対しても二量体の IgA が結合して管腔内に排出する。このような機序によって、IgA は腸の恒常性維持と炎症からの保護に重要な役割を果たしている。また、IgA は有用菌には結合せずに、病原性の高い細菌にのみ結合して抑制することも報告されている

(Palm *et al.*, 2014)。

腸内細菌が食物繊維を発酵することで産生する SCFA の中でも、酪酸は粘膜固有層においてナイーブ B 細胞からの IgA 産生形質細胞への分化を促進させ、IgA の産生を促すことがわかっている (Isobe *et al.*, 2020)。また、ムチンは酪酸の産生を促すが、ムチンを投与したマウスでは IgA 産生形質細胞の割合が増加する (Yamada *et al.*, 2019)。

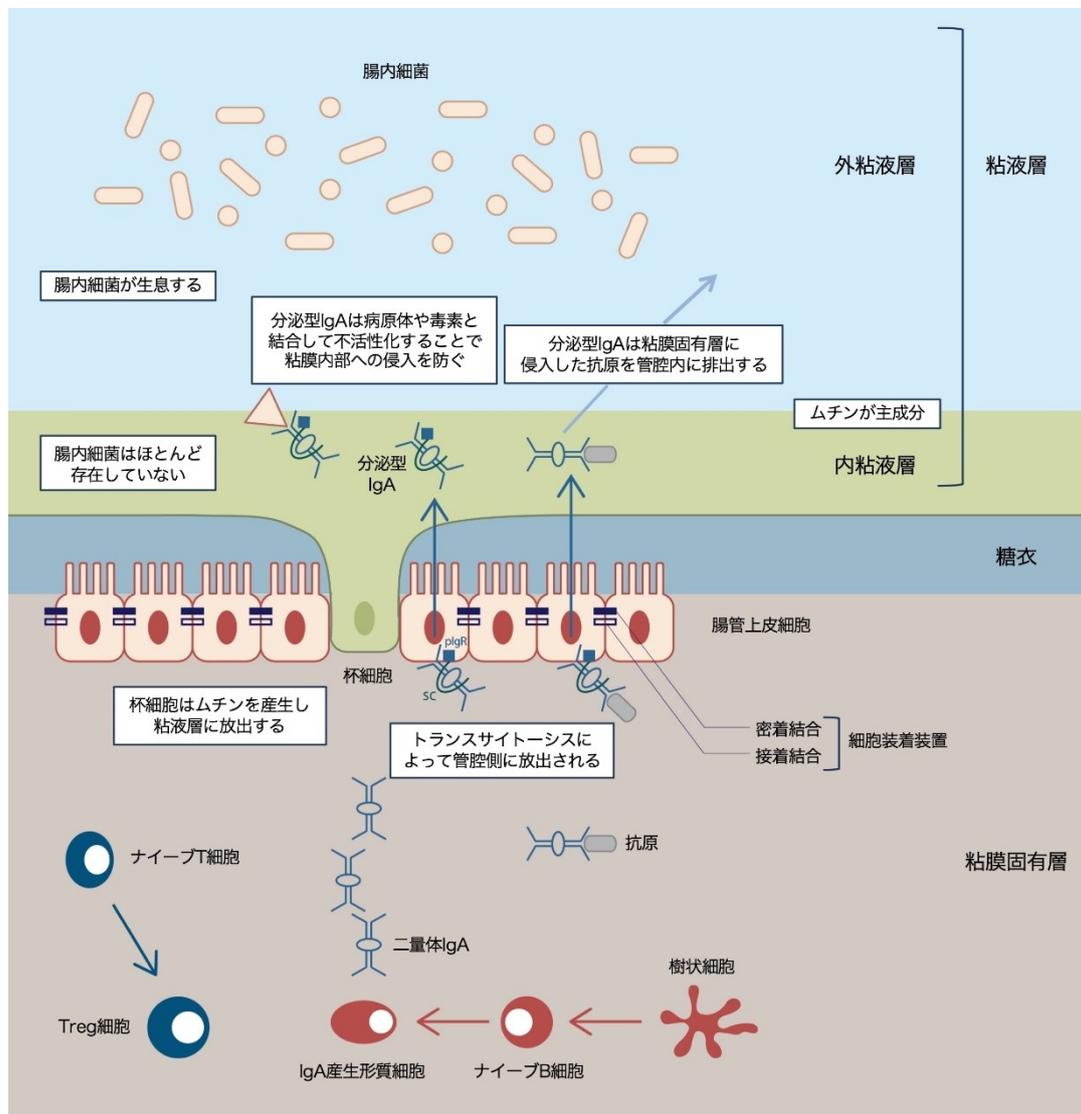


Figure 4 大腸の物理的バリアと IgA

(長谷ほか, 2006; 竹田ほか, 2017 を参考に作図)

1.11 概日時計と時間薬理学について

生物には時計遺伝子が存在し、自律的に 24.5 時間周期の概日リズムを作っている。しかし、地球の自転によってもたらされる 1 日 24 時間の明暗周期に同調させるため、ヒトのような昼行性生物では毎朝の光を浴びることで主時計遺伝子が位相を合わせて約 24 時間の日周リズムを獲得している。これにより、ヒトの睡眠・覚醒、血圧、体温、ホルモン分泌といった生命活動・機能が約 24 時間のリズムに調節されている。

哺乳類における概日時計の中樞は、視床下部の視交叉上核 (SCN) に存在し、中枢時計と呼ばれる (Figure 5)。中枢時計は網膜から入る光によって調節されており、大脳皮質や海馬にある脳時計を同調する。概日時計は脳のみならず、胃や腸などの臓器や様々な組織にも備わっている (岡村, 2005; Hoogerwerf *et al.*, 2007; 柴田, 2013)。各臓器や組織に備わる概日時計は末梢時計と呼ばれ (Richards *et al.*, 2012)、脳時計に同調される。末梢時計は、食事により位相の変化が起こることが知られているが、薬、ストレス、運動といった刺激によっても影響される (Tahara *et al.*, 2014; Narishige *et al.*, 2014; Tahara *et al.*, 2015; Furutani *et al.*, 2015; Tahara *et al.*, 2017)。胃腸の機能は概日リズムを持っており (Hoogerwerf, 2006; Malloy *et al.*, 2012)、腸内細菌叢にも概日リズムがあることが知られている (Thaiss *et al.*, 2014)。細胞内の Mg^{2+} 濃度にも概日リズムがあることが報告されている (Feeney *et al.*, 2016)。また、真正細菌の中でも光合成を行うシアノバクテリアに概日リズムがあることは知られていたが (Mitsui *et al.*, 1986; Cohen *et al.*, 2015)、最新の研究では、光合成を行わない真正細菌である枯草菌にも概日リズムがあることが明らかになっている (Eelderink-Chen *et al.*, 2021)。

疾病にも症状や重症度にリズムがある。例えば心筋梗塞、脳梗塞、血栓症といった血栓が原因の疾患の発症は午前中に多い。これは、線溶系の溶解活性に日内リズムがあるからだとされている (大蔵ら, 2012)。

概日時計の乱れは、脂肪肝や肝硬変、気分障害、肥満、糖尿病、がんなどの疾患につながる可能性がある (Tahara *et al.*, 2016; McGinnis *et al.*, 2016; Albrecht *et al.*, 2017)。腸内細菌や SCFA はや様々な疾病と関連があることが報告されているが、腸内細菌の律動性は概日時計によって調節されており (Liang *et al.*, 2015)、腸内細菌叢によって生成された SCFA はマウスの末梢時計位相を調節する (Tahara

et al., 2018)。

概日リズムを考慮しながら、効果的な投薬タイミングを理解する学問は時間薬理学、効果的な食や栄養の摂取タイミングを理解する学問は時間栄養学と言われ、多くの研究によりその重要性が示されてきた (Yoshioka et al., 2019; Watanabe et al., 2020; Tamura et al., 2020)。また、薬物が体内時計にどのように作用するかを調べる学問は、体内時計作用薬理学として研究されている。

時間薬理学の考えに基づき、最大の効果と最小の副作用を実現する投薬のタイミングを探ることは重要である。

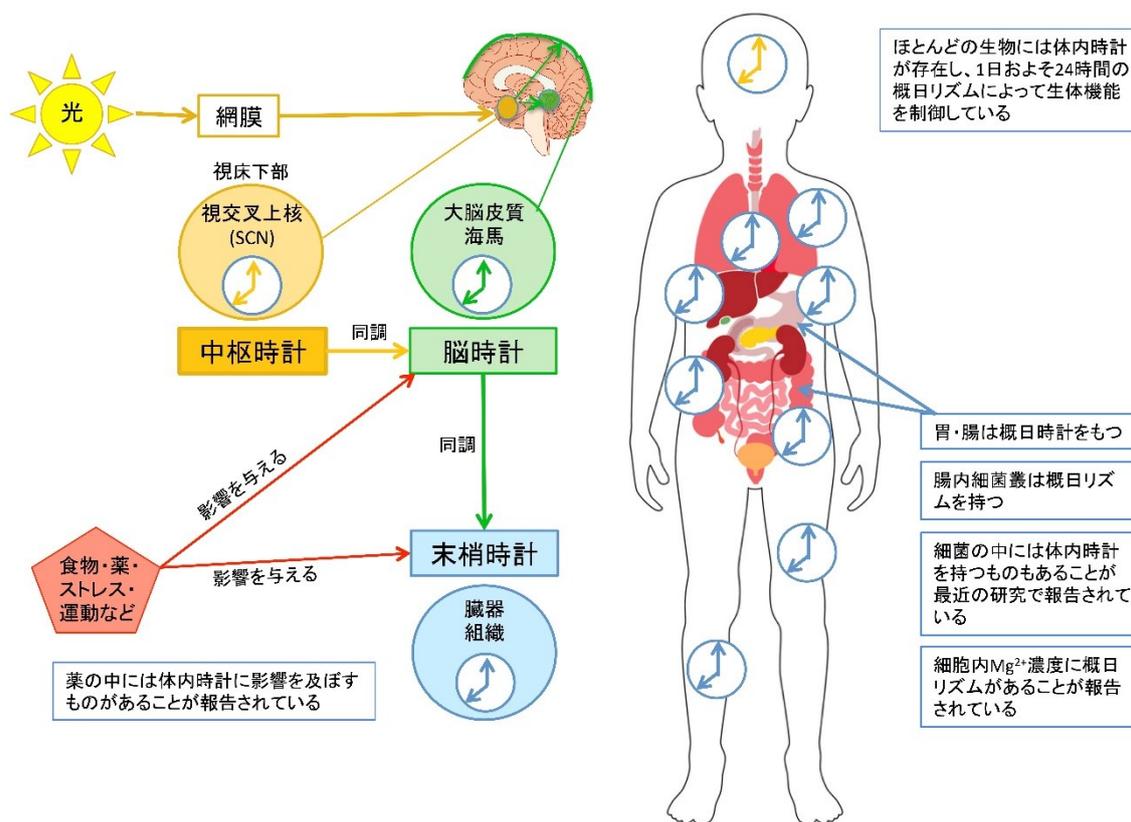


Figure 5 中枢時計と末梢時計

(柴田, 2013 を参考に作図)

1.12 研究目的

食物繊維をはじめとする食物成分が腸内細菌叢に与える影響を調べた研究は多く、プレバイオティクスやシンバイオティクス製品の開発につながっている。また、疾病と腸内細菌の関係を調べた研究も多い。さらに、PPI などの薬剤が腸内細菌叢を変化させることを調べた研究も少なくない (Freedberg *et al.*, 2015; Imhann *et al.*, 2016; Jackson *et al.*, 2016)。近年では単菌や菌株カクテルによる生菌製剤や特定の腸内細菌にのみ作用する低分子化合物の臨床開発も盛んになってきている。しかし、実生活で頻繁に起こりうる食と薬の組み合わせに注目した研究は少ない。私たちの日常では、食事と薬の服用が同時に起こる。また、ライフスタイルの変化から薬の服用が処方通りでなくなることもしばしば起こる。さらには、薬を服用しながら、食物繊維に代表されるように健康や症状の改善に良いとされる食物成分を摂取することもある。すなわち、食と薬は単独ではなく、併用でその効果をみる必要がある。本研究では、便秘症状改善のために摂取が推奨される食物繊維と便秘薬を併用するケースを想定した。食物繊維として、ゴボウやニンニクなどの身近な野菜に含まれている水溶性食物繊維である Inulin を用いた。便秘薬は、日本で広く使用されている便秘薬である MgO を使用した。マグネシウムが腸内細菌叢に与える影響について調べた研究は少ないものの、ラットを対象とした研究では、マグネシウム欠乏症でない場合に追加で食餌性のマグネシウムを与えると dysbiosis を引き起こすことが報告されている (García-Legorreta *et al.*, 2020)。しかし、医薬品としての MgO が腸内細菌叢や盲腸内 SCFA 濃度に与える影響を検証した文献はない。そして、食物繊維により変化した腸内細菌叢や、食物繊維により増加した盲腸内 SCFA 濃度に与える MgO の影響について調べた研究はこれまで存在しない。また、MgO に関して、盲腸内 SCFA 濃度への影響を考慮した効果的な投薬タイミングを検討した研究もみられない。そこで、本研究では、便秘の治療薬である MgO と水溶性食物繊維 Inulin との組み合わせが、腸内細菌叢、盲腸内 SCFA 濃度、盲腸内乳酸濃度および糞便中 IgA 濃度に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。さらに、MgO 摂取のタイミングが盲腸内 SCFA 濃度に及ぼす影響についても言及した。本研究は便秘の治療薬である MgO と、便秘の改善のため勧められる食物繊維 Inulin との組み合わせが腸内細菌叢に与える影響をみた初めての研究である。また、盲腸内 SCFA 濃度への影響を考慮した MgO の適切な服薬タイミングを探った研究としても初めての

ものである。本研究の背景と研究目的を Figure 6 にまとめた。

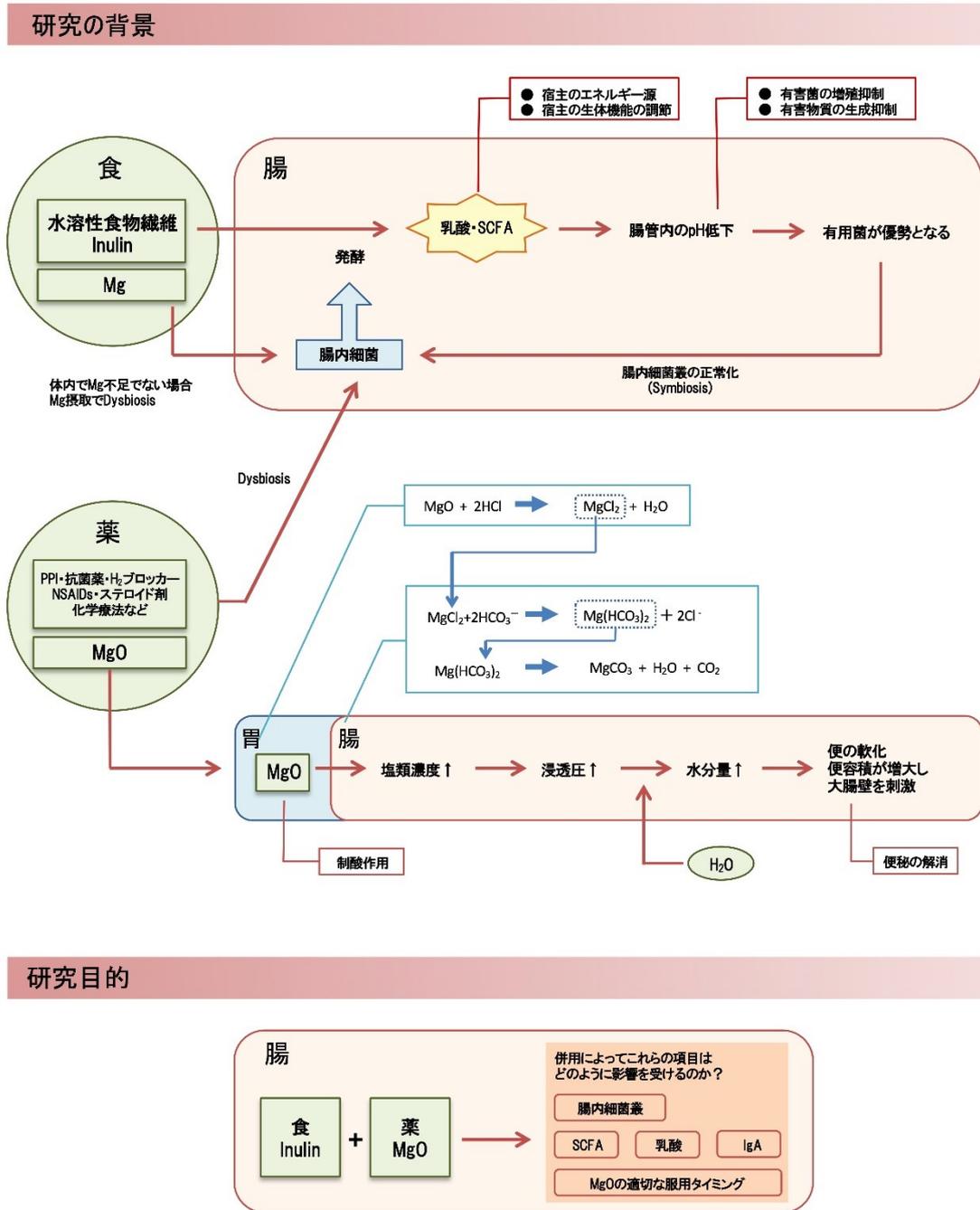


Figure 6 研究背景と研究目的

第 2 章 MgO が腸内環境に与える影響

2.1 普通食摂食時に MgO の単独投与が腸内環境に及ぼす影響

本章の一部は以下の投稿論文を基に作成されている。

Omori, K., Miyakawa, H., Watanabe, A., Nakayama, Y., Lyu, Y., Ichikawa, N., Sasaki, H., & Shibata, S. (2021). The combined effects of magnesium oxide and inulin on intestinal microbiota and cecal short-chain fatty acids. *Nutrients*, 13, 152.

2.1.1 序論

MgO は薬価が低く、副作用が少ない医薬品として古くから多くの患者に使用されてきた。一方で、近年、MgO の長期投与で高マグネシウム血症を引き起こすことが問題視されている。日本で多くの患者が使用している薬剤であるがゆえに、その副作用も含めて研究を進めることは非常に意義深い。腸内環境は全身の健康維持に寄与していることが知られているが、治療薬が腸内細菌叢に影響することもよく知られている。ここでは、正常な腸内環境において MgO の単独投与がどのような影響を及ぼすかを検証する。

2.1.2 実験材料および方法

(1) 動物

本節の実験では、9 週齢の ICR 雄性マウス(東京実験動物、東京、日本)を用いて実験を行った。マウスは温度 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $60 \pm 5\%$ 、光度 $100 \sim 150 \text{ lx}$ を維持した部屋で、自由摂食、自由飲水の条件下で飼育した。明暗条件は明期と暗期、12 時間ずつのサイクルとし、本実験では、明期の開始時刻である ZT0 を午前 8 時に設定した。尚、図表では Zeitgeber 時間 (ZT) で時刻を表記した。

(2) 実験デザイン

2.1 の実験では、普通食摂食時の正常な腸内環境において MgO の単独投与が腸内細菌叢、盲腸内 pH、乳酸濃度および SCFA 濃度に与える影響を検証した。餌はマウスの維持飼料である AIN-93M を使用し、MgO(富士フィルム和光純薬株式会社、大阪、

日本)は混餌投与した (Table 4~6)。マウスは対照群 (AIN-93M 群)、0.125% MgO 群、0.25% MgO 群の 3 群に分けた。MgO の混餌濃度の決定にあたり、MgO 製剤であるマグミット錠のインタビューフォーム (医薬品医療機器総合機構, 2017) を参考にした。インタビューフォームは、日本病院薬剤師会が製薬企業に依頼し、作成・配布をすすめる薬剤師向けの医薬品解説書の一つである。マグミット錠のインタビューフォームでは、マウスの緩下試験において 250 mg/kg の MgO を経口投与している。本研究では、0.25% MgO 群の MgO の一日投与量がインタビューフォームでの投与量と同等になるよう設定した。一般的に成熟マウスは一日 3~5 g 程度摂食することが知られていることや、申請者の実験におけるマウスの摂食量および体重を考慮し、マウスの体重は 40 g、摂食量は一日 4 g と仮定し、MgO の混餌濃度を算出した。

サンプリング時刻は、MgO が確実に腸管を通過している時刻が望ましい。所属研究室での予備実験により、マウスが摂食してから餌が便として排出されるまでの時間は約 4 時間であることが明らかになっている。このことから、本実験でのサンプリング時刻は、一日の中でマウスが餌を食べる最後の時刻と考えられる ZT0 (活動期の終わりの時刻) の 4 時間後となる ZT4 に決定した。実験開始から 11 日後の ZT4 に体重と盲腸内 pH の測定を行い、盲腸内容物および糞便を採取した (Figure 7)。

Table 4 2.1 で使用した生成飼料の配合組成

成分	Control群 AIN-93M (維持用)	0.125% MgO置換	0.25% MgO置換
コーンスターチ	46.57%	46.445%	46.32%
ミルクカゼイン	14.00%	14.00%	14.00%
アルファ化コーンスターチ	15.50%	15.50%	15.50%
ブラニュー糖	10.00%	10.00%	10.00%
精製大豆油	4.00%	4.00%	4.00%
セルロースパウダー	5.00%	5.00%	5.00%
ミネラルミックス (AIN-93M-MX)	3.50%	3.50%	3.50%
ビタミンミックス (AIN-93VX)	1.00%	1.00%	1.00%
L-シスチン	0.18%	0.18%	0.18%
重酒石酸コリン	0.25%	0.25%	0.25%
酸化マグネシウム (MgO)	—	0.125%	0.25%
合計	100.00%	100.00%	100.00%

Table 5 ミネラルミックス (AIN-93M-MX) の配合組成

成分	割合 (%)
CaCO_3	35.70%
KH_2PO_4	25.00%
$\text{K}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2.80%
NaCl	7.40%
K_2SO_4	4.66%
MgO	2.40%
$\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	0.606%
$2\text{ZnCO}_3 \cdot 3\text{Zn}(\text{OH})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.165%
$\text{MnCO}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	0.063%
$\text{CuCO}_3 \cdot \text{Cu}(\text{OH})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.03%
KIO_3	0.001%
Na_2SeO_4	0.001025%
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.000795%
$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	0.145%
$\text{CrK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	0.0275%
H_3BO_3	0.00815%
NaF	0.00635%
$\text{NiCO}_3 \cdot 2\text{Ni}(\text{OH})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.00318%
LiCl	0.00174%
NaVO_3	0.00069%
グラニュー糖	20.98057%
合計	100.00%

Table 6 ビタミンミックス (AIN-93VX) の配合組成

成分	割合 (%)
ニコチン酸	0.30%
パントテン酸Ca	0.16%
ビタミンB ₆	0.07%
ビタミンB ₁	0.06%
ビタミンB ₂	0.06%
葉酸	0.02%
D-ビオチン (2%)	0.10%
ビタミンB ₁₂ (0.1%)	0.25%
ビタミンE (50%)	1.50%
ビタミンA (100万IU/g)	0.04%
ビタミンD ₃ (50万IU/g)	0.02%
ビタミンK ₁ (phylloquinone)	0.0075%
グラニュー糖	97.4125%
合計	100.00%

会社，大阪，日本)を2:1の割合で混和したものを600 μ lずつ添加した。さらに硫酸50 μ lを加え、ボルテックスでよく攪拌した。室温、14000 rpmで30秒間遠心分離を行い、バイアル瓶にセットしたキャピラリーカラム [InertCap Pure-WAX (30 m \times 0.25 mm, df = 0.5 μ m); ジーエルサイエンス，東京，日本]に上清を注入した。これをサンプルとし、GC-FIDで分析した。GCは、初めは80°C、次に200°Cで測定し、ヘリウムガスをキャリアガスとして用いた。上清を取り除いた後の盲腸内容物は十分に乾燥させ、乾燥重量を計測した。盲腸内 SCFA 濃度は μ mol/mg dry cecal weight で算出した。

(5) 糞便中の DNA 抽出

まず初めに、50 ml ファルコンチューブにマウスの糞便 200 mg、phosphate buffered saline (PBS) 20 ml 加え、スパーテルとボルテックスで十分に懸濁した。懸濁後、100 μ m ナイロンメッシュ (Corning Inc., NY, USA) を用いて濾過した。50 ml ファルコンチューブに新たに 10 ml の PBS を添加し、チューブ内を十分洗浄した後、その溶液も濾過した。得られた濾液を 4°C、9000 \times g で 20 分間遠心分離し、上清を除去した。ペレットに 10 mM Tris-HCL (富士フィルム和光純薬株式会社，大阪，日本)/10 mM EDTA (DOJINDO，熊本，日本) を 1.5 mL 添加し、懸濁した。懸濁液を 2 ml チューブに移した後、4°C、10000 rpm で 5 分間遠心分離をし、上清を除去した。上清を除去したペレットに 10 mM Tris-HCL/10 mM EDTA を 800 μ l 添加し、懸濁した。10 mM Tris-HCL/10 mM EDTA を溶媒とした 150 mg/ml のリゾチーム (富士フィルム和光純薬株式会社，大阪，日本) 溶液を 100 μ l 添加し、転倒混和後、37°C で 1 時間保温した。アクロモペプチダーゼ (富士フィルム和光純薬株式会社，大阪，日本) 溶液 (100 unit/ μ L) を 20 μ L 添加し転倒混和後、37°C で 30 分間保温した。プロテイナーゼ K 溶液、20% SDS 溶液をそれぞれ 50 μ L 添加し転倒混和後、55°C で 1 時間保温した。等量の PCI (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, MA, USA) 溶液を添加し、白くなるまで十分に懸濁した。6000 \times g で 10 分間、室温で遠心し、上清を新しい 2 mL チューブに移した。上清に 3 M 酢酸ナトリウム溶液を 100 μ L、イソプロパノールを 900 μ L 添加、懸濁した。6000 \times g、10 min、20°C で遠心し、上清を除去した。冷 70% エタノールを 1 mL 添加し、15000 rpm で 5 分間遠心し、上清を除去した。冷 70% エタノールを 500 μ L 添加し、15000 rpm で 5 分間遠心し、上清を除

去した。ペレットが半透明になるまで風乾し、ペレットに TE buffer を 99 μ L、RNase(10 μ g/mL; Promega Corp., WI, USA)を 1 μ L 添加し、37°Cで一晩保温した。等量の 20% PEG(東京化成工業株式会社, 東京, 日本)溶液を添加、懸濁後、氷上で 10 分間静置した。10000 \times g、4°Cで 10 分間遠心し、上清を除去した。冷 70%エタノールを 500 μ L 添加し、15000 rpm で 5 分間遠心し、上清を除去した。タッピングでペレットをチューブから剥がした。冷 70%エタノールを 500 μ L 添加し、15000 rpm で 5 分間遠心し、上清を除去した。風乾し、TE buffer を 40 μ L 添加し、懸濁後、-20°Cで保存した。

(6) 16S rDNA シーケンス

腸内細菌の 16S rDNA は Illumina Miseq System のプロトコールである 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation に従って処理した。

以下に記載したプライマーを用いた polymerase chain reaction(PCR)により、16SrDNA 遺伝子の V3-V4 可変領域を増幅した。

Forward Primer =

5' -TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3'

Reverse Primer =

5' -GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3'

PCR は、2.5 μ L の microbial DNA(5 ng/ μ L)に 5 μ L の Forward Primer(1 μ mol/L)、5 μ L の Reverse Primer(1 μ mol/L)、12.5 μ L の 2 \times KAPA HiFi HotStart ReadyMix(Kapa Biosystems Inc., MA, USA)を添加して実施した。PCR の反応条件は、以下の通りである。

- ① 95°Cで 3 分間
- ② 95°Cで 30 秒間
- ③ 55°Cで 30 秒間
- ④ 72°Cで 30 秒間 (②~④を 25 サイクル繰り返す。)
- ⑤ 72°Cで 5 分間

PCR 後の産物は、AMPure XP beads(Beckman Coulter Inc., CA, USA)を使用して精製した。精製済みのアンプリコン PCR 産物 5 μ L に、Nextera XT Index Primer 1 (Illumina Inc., CA, USA)を 5 μ L、Nextera XT Index Primer 2 (Illumina Inc.,

CA, USA) を 5 μ L、2×KAPA HiFi HotStart ReadyMix (Kapa Biosystems Inc., MA, USA) を 25 μ L、PCR Grade water を 10 μ L 添加し、インデックス PCR を行った。インデックス PCR の反応条件は、以下の通りである。

- ① 95°C で 3 分間
- ② 95°C で 30 秒間
- ③ 55°C で 30 秒間
- ④ 72°C で 30 秒間 (②~④を 8 サイクル繰り返す。)
- ⑤ 72°C で 5 分間

インデックス PCR 産物は、AMPure XP beads (Beckman Coulter, Inc., CA, USA) を用いて精製した。精製後の DNA の品質は、DNA1000 キットを用いて、Agilent2100 バイオアナライザ (Agilent Technologies Inc., CA, USA) で確認した。最後に、DNA ライブラリの濃度を 4 nmol/L に調整し、DNA ライブラリは MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina Inc., CA, USA) を用いて、Illumina MiSeq 2×300bp platform でシーケンスを行った。このシーケンスは製造元の指示に従って実行した。

(7) 16SrDNA の遺伝子シーケンスの分析

糞便から抽出された 16SrDNA は quantitative insights into microbial ecology (QIIME) pipeline version 1.9.1 で解析した。クオリティチェック後のリードは、UCLUST により 97%類似度の operational taxonomic units (OTUs) に分類された。これらのリードは the Greengenes database (August 2013 version) のリファレンスシーケンスと比較した。QIIME を用いてこれらのリードを解析し、門レベルから種レベルまでの taxonomy summary と β 多様性を算出した。 β 多様性とは別々の環境間の種多様性の違いを表す。 β 多様性は主座標分析 (Principal Coordinate Analysis; PCoA) で結果を示した。PCoA は異なるサンプルの多様性の相違度を 2 点間の距離として表現する指標で、距離が大きくなるほど、2 つのサンプルの組成が異なることを示す。PCoA は unweighted UniFrac distances を用いて計算した。また、taxonomy summary より Simpson Index を算出し、 α 多様性の結果を示した。 α 多様性とは、ある 1 つの環境における種多様性を表す。すなわちサンプル固有の指標で、値が大きいほど種の多様性が高いことを示す。Simpson

Index はサンプル全体に対する種の割合に基づいて計算される多様度指数 (D) で、以下の計算式で算出される。最低値は 0 で、多様性が高いほど 1 に近づく。

$$D = 1 - \sum_{i=1}^S P_i^2 \quad 0 \leq D \leq 1$$

S : サンプルで観測された種数

p_i : サンプル全体に対する種 i の割合

(8) 糞便中 IgA 濃度の測定

糞便中 IgA 濃度は ELISA を用いて測定した。まず、マウスの糞便の重さを測り、糞便 20 mg あたり溶液が 1 ml になるよう、1×PBS、プロテアーゼインヒビターを添加した。糞便をホモジェナイズし、12000 rpm、4°C で 15 分間遠心分離をし、上清をサンプルとした。Coating Buffer を 11 倍希釈し、希釈した Coating Buffer を用いて Capture antibody (Purified anti mouse IgA) を 251 倍希釈した。96 ウェルプレートに Capture antibody を 1 ウェルあたり 100 μ l 添加し、4°C で一晩静置した。一晩静置後の 96 ウェルプレートを 2 回 Wash した。Wash は 1 ウェルあたり 196 μ l の 1×PBST (0.05% Tween-20 含有) を添加し、1 分間静置後、Buffer を除去した。Assay Buffer を 11 倍希釈したものを Blocking buffer とし、各ウェルに 250 μ l ずつ添加して室温で 2 時間静置した。2 時間静置後、2 回 Wash し、Assay Buffer を Standard 用、Blank 用のウェルに 100 μ l、サンプル用のウェルに 90 μ l 添加した。Standard は Standard 用ウェル内で調整し、サンプルは Assay Buffer で 5 倍希釈した後、サンプル用のウェルに 10 μ l ずつ添加した。2 時間室温で静置した後、4 回 Wash した。Substrate solution を 100 μ l 添加し、遮光して 15 分間室温でインキュベートした。Stop solution として、2NH₂SO₄ を 100 μ l 添加し、450 nm と 570 nm で吸光度測定を行った。

(9) 統計分析

β 多様性以外の全ての結果は平均 ± 標準誤差で示され、GraphPad Prism (version 8.4.3, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) により統計解析を行った。まず、正規性の有無を Kolmogorov-Smirnov test により判定した。次に、Bartlett's test により等分散か否かを判定した。これらの分析により正規

性があり、等分散と判定された場合、One way analysis of variance (ANOVA) test、Tukey post-hoc test を行った。正規性がない、もしくは不等分散であった場合には、Kruskal-Wallis test、Dunn's post-hoc test を行った。 β 多様性は A permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) により評価した。PERMANOVA による統計分析は QIIME を用いて行った。

2.1.3 結果

2.1.3.1 体重・摂食量

サンプリング時、全マウスの体重を計測し、群間で体重に差があるか検証した。対照群、0.125% MgO 群、0.25% MgO 群の 3 群間で体重に有意な差は認められなかった (Figure 8(a))。また、実験期間の摂食量をマウスごとに計測し、マウス一匹あたりの一日の摂食量の平均を算出した。群間でマウスの摂食量に差があるか検証したところ、摂食量に差は見られないことが示された (Figure 8(b))。これらの結果から、MgO はマウスの体重や摂食量に影響しないことが示唆された。

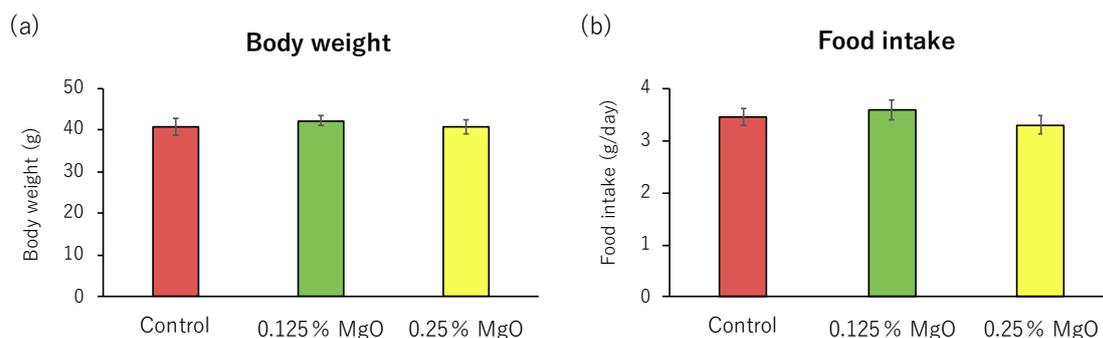


Figure 8 普通食 (AIN-93M) 摂食時、MgO が体重と摂食量に及ぼす影響

(a) サンプリング時の体重 (b) 一日あたりの摂食量 MgO は餌重量に対して 0.125% または 0.25% となるよう混餌した。データは平均 ± 標準誤差で表した (n = 5)。

2.1.3.2 盲腸内の水分含有率

MgO 投与により盲腸内容物の水分含有率が変化するか検証した。盲腸内容物の水分含有率は群間に差が見られなかった (Figure 9)。

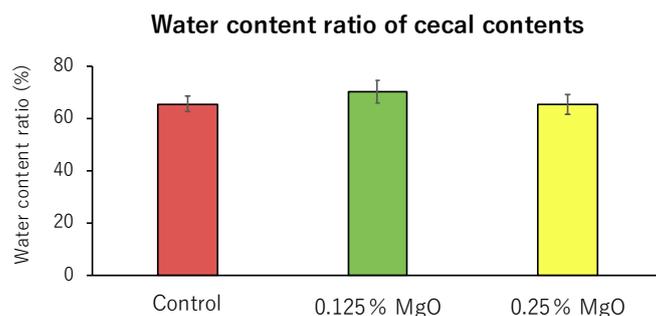


Figure 9 普通食 (AIN-93M) 摂食時、MgO が盲腸内容物の水分含有率に及ぼす影響

MgO は餌重量に対して 0.125% または 0.25% となるよう混餌した。データは平均 ± 標準誤差で表した (n = 5)。

2.1.3.3 腸内細菌叢の多様性

まず、MgO が腸内細菌叢の α 多様性に与える影響を検証するため、 α 多様性を表す指標の一つである Simpson Index を算出した。Simpson Index は全群間において有意な差が見られなかった (Figure 10(a))。これらの結果から、普通食摂食時、MgO は腸内細菌叢の α 多様性に影響を及ぼさないことが示された。

次に腸内細菌叢の β 多様性に対する影響をみた。対照群、0.125% MgO 群、0.25% MgO 群の β 多様性を比較したところ、有意に異なっていることが示された (Figure 10(b))。具体的にどの 2 群間に有意な差があるのか検証するため、2 群ずつの比較を行った。その結果、対照群と比較して、0.125% MgO 群、0.25% MgO 群では β 多様性が有意に変化していることが示された (Figure 10(c)(d))。一方、0.125% MgO 群と 0.25% MgO 群の間には有意な差は認められなかった (Figure 10(e))。これらの結果から、普通食摂食時、MgO は用量に関わらず腸内細菌叢の構成を変化させることが示唆された。

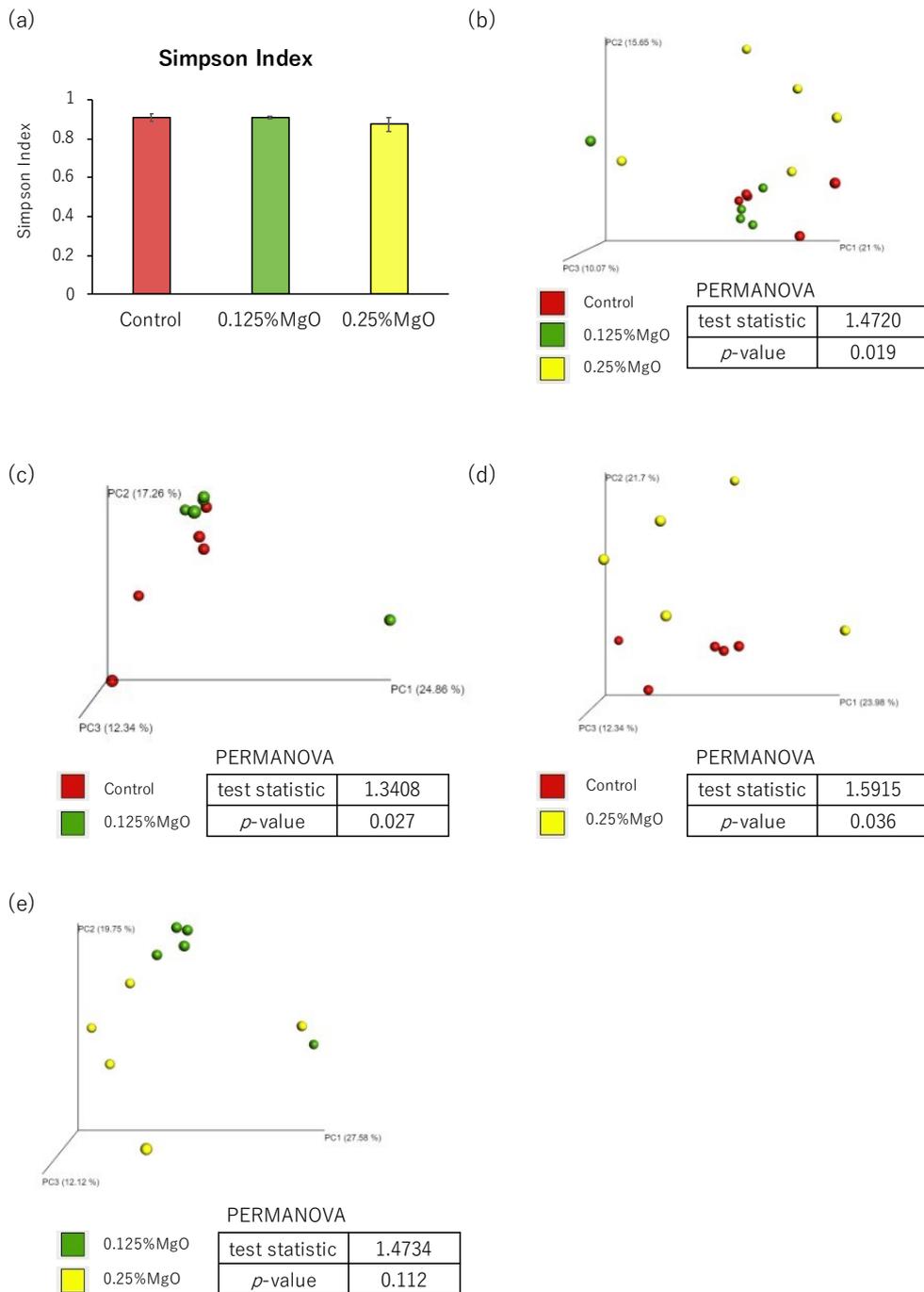


Figure 10 普通食(AIN-93M) 摂食時、MgO が腸内細菌叢の多様性に及ぼす影響

(a) α 多様性 (Simpson Index) (b) β 多様性 (対照群 vs. 0.125% MgO 群 vs. 0.25% MgO 群) (c) β 多様性 (対照群 vs. 0.125% MgO 群) (d) β 多様性 (対照群 vs. 0.25% MgO 群) (e) β 多様性 (0.125% MgO 群 vs. 0.25% MgO 群) MgO は餌重量に対して 0.125% または 0.25% となるよう混餌した。PCoA 3d plots は unweighted UniFrac distance で算出した。 α 多様性のデータは平均 \pm 標準誤差で表した ($n = 5$)。各データは下記の統計処理を行った。 α 多様性: The Kruskal-Wallis test with Dunn's post hoc test. β 多様性: A permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA).

2.1.3.4 腸内細菌の相対存在量

Figure 11 に各群の Taxonomy summary と各細菌の相対存在量の変化を示した。緒言述べたように、本研究では *Akkermansia*、*Bacteroides*、*Bifidobacterium*、*Lactobacillus*、*Lactococcus*、*Odoribacter* の 6 種類の属に着目した。これらは相対存在量が多いこと、プロバイオティクスとして利用されていること、疾病との関係が特に注目されていること、本研究で特徴的な変化が認められたことなどを考慮して選定した。*Akkermansia* の相対的存在量は、対照群と比較して 0.25% MgO 群で有意に増加し、有意ではないものの、0.125% MgO 群で微増した (Figure 11(b))。*Bacteroides*、*Bifidobacterium*、*Lactobacillus*、*Lactococcus*、*Odoribacter* の相対存在量は MgO の投与によりそれぞれ変動はあったものの、有意な差は認められなかった (Figure 11(c)~(g))。

2.1.3.5 盲腸内 pH

盲腸 pH は、対照群と比べて、0.125% MgO 群で上昇傾向が見られ、0.25% MgO 群で有意に上昇した (Figure 12(a))。有意な差は見られなかったものの、0.25% MgO 群の盲腸内 pH は 0.125% MgO 群よりも高値であった (Figure 12(a))。これらの結果から、MgO は用量依存的に盲腸内 pH を上昇させることが示唆された。

2.1.3.6 盲腸内乳酸濃度および SCFA 濃度

盲腸内乳酸濃度、酢酸濃度、プロピオン酸濃度、酪酸濃度は、いずれも有意な差は見られなかった (Figure 12(b)~(f))。これらの結果から、普通食摂食時、MgO は盲腸内乳酸濃度および SCFA 濃度に顕著な変化をもたらさないことが示唆された。

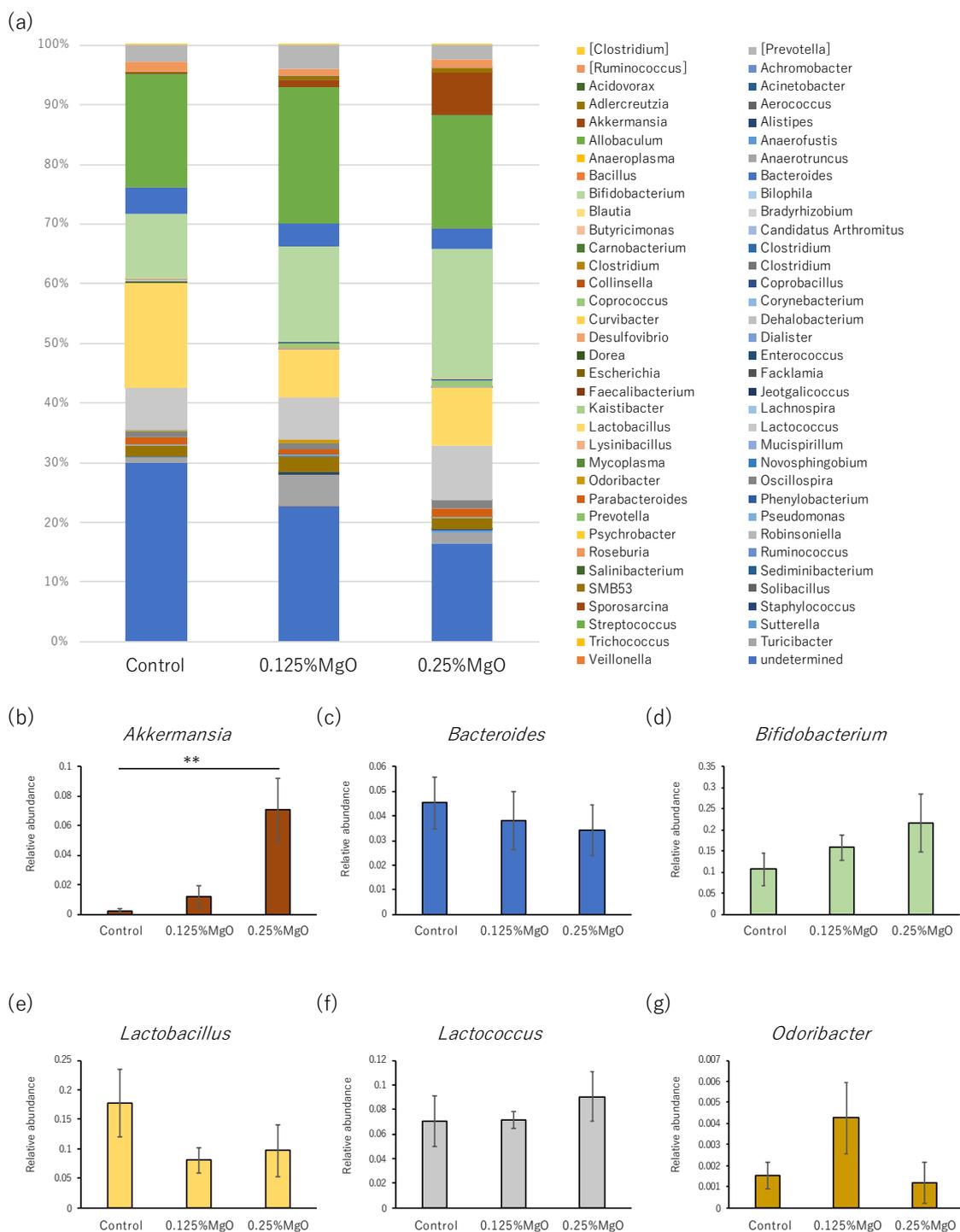


Figure 11 普通食(AIN-93M)摂食時、MgOが各細菌に及ぼす影響

(a)Taxonomy summary (b)*Akkermansia*の相対存在量 (c)*Bacteroides*の相対存在量 (d)*Bifidobacterium*の相対存在量 (e)*Lactobacillus*の相対存在量 (f)*Lactococcus*の相対存在量 (g)*Odoribacter*の相対存在量 MgOは餌重量に対して0.125%または0.25%となるよう混餌した。各細菌の相対存在量のデータは平均±標準誤差で表した(n = 5-6)。** $p < 0.01$, evaluated using the Kruskal-Wallis test with Dunn's post hoc test.

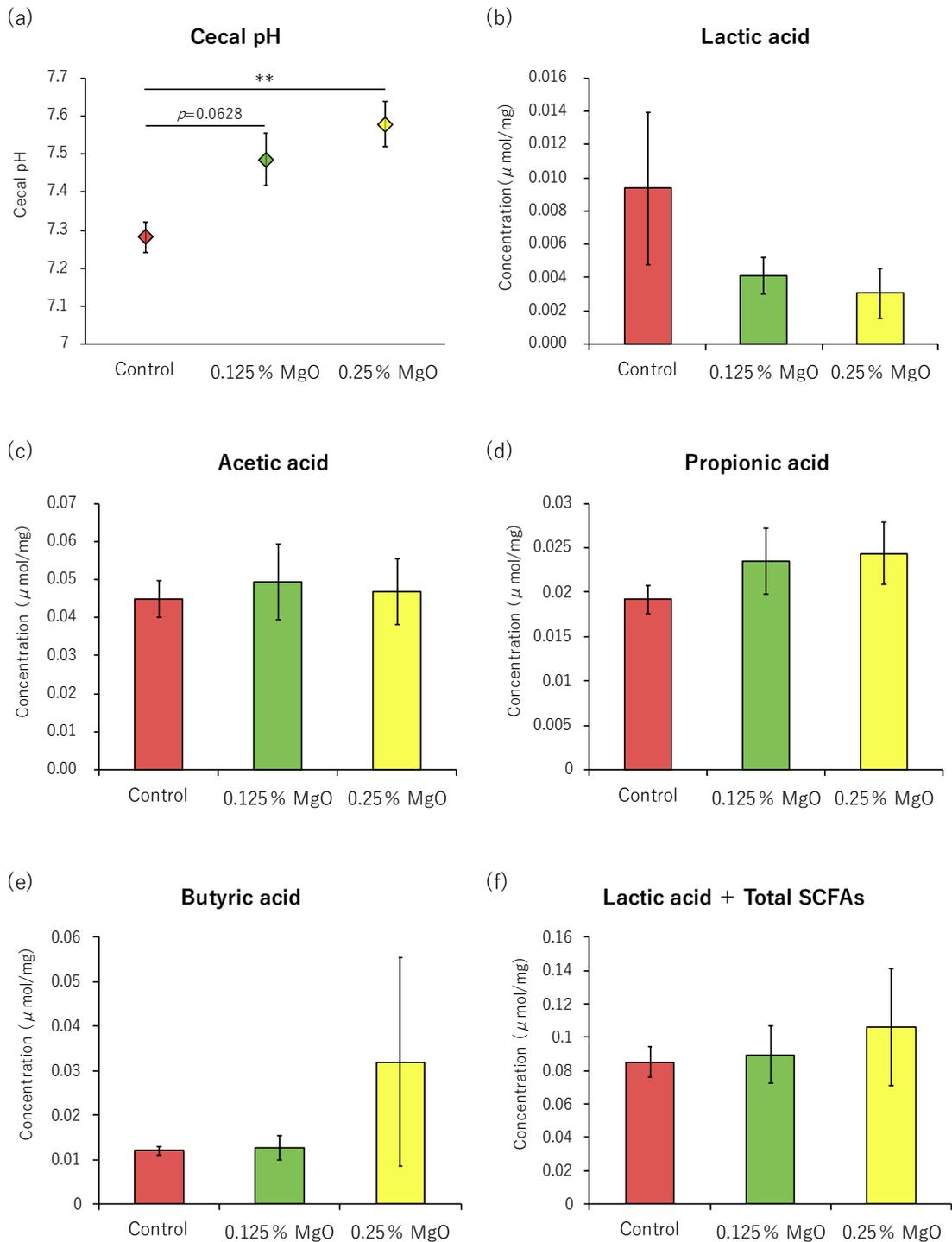


Figure 12 普通食 (AIN-93M) 摂食時、MgO の単独投与が盲腸内 pH、盲腸内乳酸濃度および SCFA 濃度に及ぼす影響 (a) 盲腸内 pH (b) 乳酸濃度 (c) 酢酸濃度 (d) プロピオン酸濃度 (e) 酪酸濃度 (f) 乳酸 + 総 SCFA 濃度 (総 SCFA 濃度は酢酸濃度、プロピオン酸濃度、酪酸濃度の総計) MgO は餌重量に対して 0.125% または 0.25% となるよう混餌した。乳酸および SCFA は盲腸内容物の乾燥重量あたりの濃度を算出した。データは平均 ± 標準誤差で表した (n = 5)。** $p < 0.01$, evaluated using the one-way ANOVA with Tukey's post hoc test.

2.1.3.7 糞便中の IgA 濃度

糞便中の IgA 濃度は全群間において有意な差が検出されなかったが、対照群と比較して、0.125% MgO 群、0.25% MgO 群の IgA 濃度は低値を示した (Figure 13)。

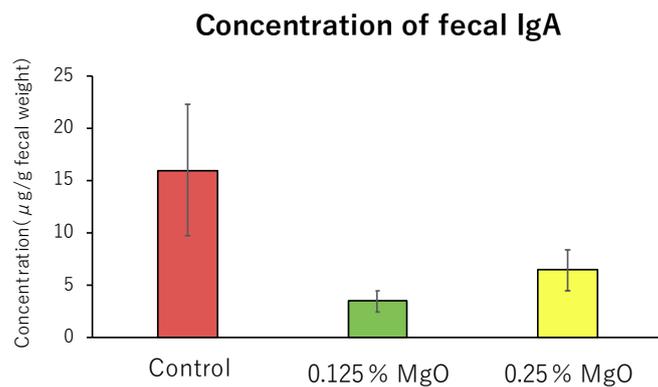


Figure 13 普通食 (AIN-93M) 摂食時、MgO が糞便中の IgA 濃度に及ぼす影響

MgO は餌重量に対して 0.125% または 0.25% となるよう混餌した。データは平均 ± 標準誤差で表した (n = 5)。

2.2 普通食摂食時に MgO と Inulin の併用が腸内環境に及ぼす影響

2.2.1 序論

Inulin はごぼうやニンニク、タマネギ等に含まれる水溶性食物繊維で、日本の食とも関係が深く、近年、Inulin を含む機能性表示食品が多く販売されている。腸内細菌叢や腸内細菌の代謝産物である SCFA は全身の健康維持に寄与していることが知られており、食物繊維が腸内細菌叢や SCFA に与える影響については多くの報告がある。一方で、食物繊維のような食物成分と薬の併用に焦点を当てた研究は少ない。慢性便秘症の治療は、薬物治療と食物繊維摂取等の生活改善の両輪で進められるにも関わらず、便秘薬と食物繊維の併用が腸内環境にどのような影響を与えるかについては焦点が当てられてこなかった。本研究は、日本における慢性便秘症の第一選択薬である MgO と Inulin の併用が腸内環境に与える影響に関する初めての研究であることから、ここではまず、MgO と Inulin が正常時の腸内環境に及ぼす影響を検証する。

2.2.2 実験材料および方法

(1) 動物

『2.1.2(1)動物』の項に記載の通りとした。

(2) 実験デザイン

2.2 では普通食摂食時に MgO と Inulin の併用が腸内細菌叢、盲腸内 pH、盲腸内乳酸濃度および SCFA 濃度を与える影響を検証した。餌はマウスの維持飼料である AIN-93M を使用し、MgO と Inulin (フジ日本精糖, 東京, 日本) は混餌投与した (Table 5~7)。マウスは対照群 (AIN-93M 群)、Inulin 群、Inulin + 0.125% MgO 群、Inulin + 0.25% MgO 群の 4 群に分けた。使用動物数を最小限に抑えるため、対照群は 2.1 の実験と共通の対照群とした。Inulin 群、Inulin + 0.125% MgO 群、Inulin + 0.25% MgO 群の餌は、AIN-93M に含有される cellulose を Inulin に置換し、餌の総重量あたり 2.5% の Inulin が含まれるよう調整した (Table 7)。11 日間の実験期間は自由摂食、自由飲水の条件下で飼育した。Day 11 の ZT4 に体重および盲腸内 pH の測定を行い、盲腸内容物と糞便を採取した (Figure 14)。

Table 7 2.2 で使用した生成飼料の配合組成

成分	コントロール群 AIN-93M (維持用)	2.5% イヌリン置換	2.5% イヌリン置換 0.125% MgO置換	2.5% イヌリン置換 0.25% MgO置換
コーンスターチ	46.57%	46.57%	46.445%	46.32%
ミルクカゼイン	14.00%	14.00%	14.00%	14.00%
アルファ化コーンスターチ	15.50%	15.50%	15.50%	15.50%
ブラニュー糖	10.00%	10.00%	10.00%	10.00%
精製大豆油	4.00%	4.00%	4.00%	4.00%
セルロースパウダー	5.00%	2.50%	2.50%	2.50%
ミネラルミックス (AIN-93M-MX)	3.50%	3.50%	3.50%	3.50%
ビタミンミックス (AIN-93VX)	1.00%	1.00%	1.00%	1.00%
L-シスチン	0.18%	0.18%	0.18%	0.18%
重酒石酸コリン	0.25%	0.25%	0.25%	0.25%
イヌリン	—	2.50%	2.50%	2.50%
酸化マグネシウム (MgO)	—	—	0.125%	0.25%
合計	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%

(3) 盲腸内 pH の測定

『2.1.2(3)盲腸内 pH の測定』の項に記載の通りとした。

(4) 盲腸内 SCFA 濃度および乳酸濃度の測定

『2.1.2(4)盲腸内乳酸濃度および SCFA 濃度の測定』の項に記載の通りとした。

(5) 糞便中の DNA 抽出

『2.1.2(5)糞便中の DNA 抽出』の項に記載の通りとした。

(6) 16S rDNA シークエンス

『2.1.2(6) 16S rDNA シークエンス』の項に記載の通りとした。

(7) 16SrDNA の遺伝子シーケンスの分析

『2.1.2(7) 16S rDNA の遺伝子シーケンスの分析』の項に記載の通りとした。

(8) 糞便中 IgA 濃度の測定

『2.1.2(8) 糞便中 IgA 濃度の測定』の項に記載の通りとした。

(9) 統計分析

『2.1.2(9) 統計分析』の項に記載の通りとした。

2.2.3 結果

2.2.3.1 体重・摂食量

サンプリング時、全マウスの体重を計測し、群間で体重に差があるか検証した。対照群、Inulin 群、Inulin + 0.125% MgO 群、Inulin + 0.25% MgO 群の 4 群間で体重に有意な差は認められなかった (Figure 15(a))。また、実験期間の摂食量をマウスごとに計測し、マウス一匹あたりの一日の摂食量の平均を算出した。群間でマウスの摂食量に差があるか検証したところ、摂食量に有意な変化は見られなかった (Figure 15(b))。これらの結果や 2.1.3.1 の結果 (MgO 単独投与時の体重と摂食量の結果) より、MgO は単独投与のみならず、Inulin 併用時にも、マウスの体重や摂食量に影響を及ぼさないことが示唆された。

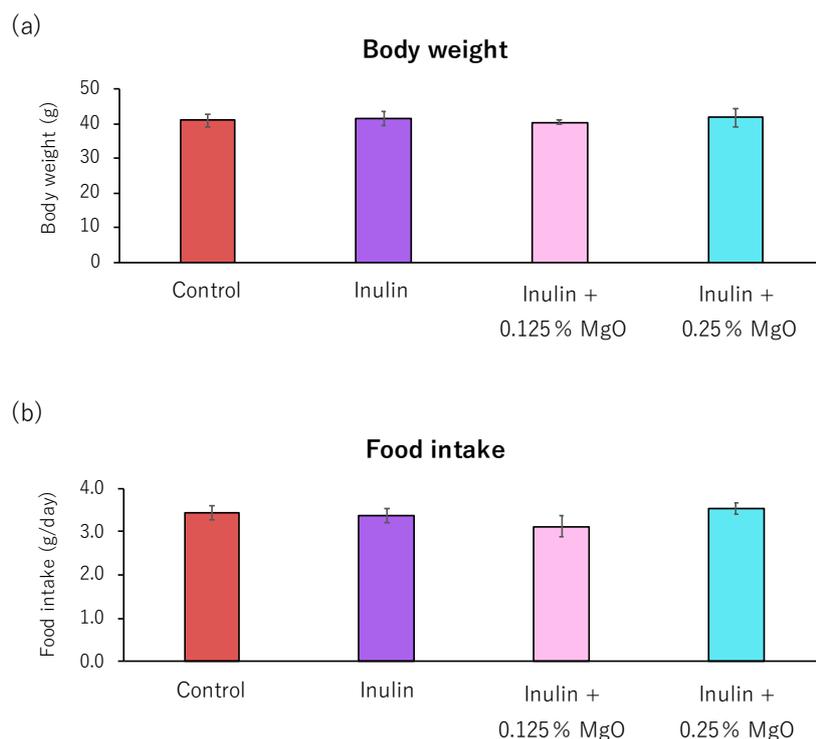


Figure 15 普通食 (AIN-93M) 摂食時、MgO と Inulin の併用が体重と摂食量に及ぼす影響

(a) サンプリング時の体重 (b) 一日あたりの摂食量 餌重量に対し、Inulin は 2.5%、MgO は 0.125% または 0.25% となるよう混餌した。データは平均 ± 標準誤差で表した (n = 5-6)。

2.2.3.2 盲腸内容物の水分含有率

Inulin 併用時、MgO 投与により盲腸内容物の水分含有率が変化するか検証した。対照群、Inulin 群、Inulin + 0.125% MgO 群、Inulin + 0.25% MgO 群の 4 群で盲腸内の水分含有率を比較したが、有意な差は見られなかった (Figure 16)。

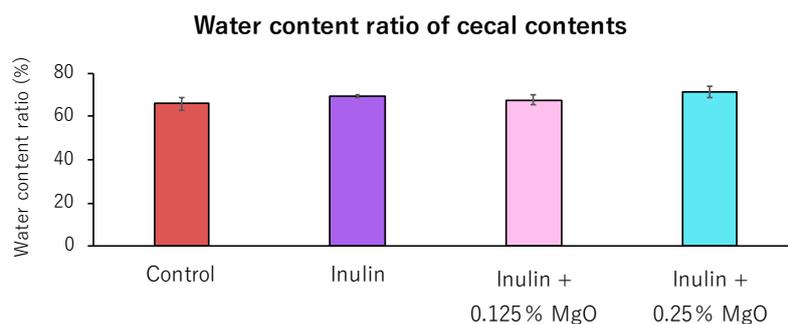


Figure16 普通食 (AIN-93M) 摂食時、MgO と Inulin の併用が盲腸内容物の水分含有率に及ぼす影響 餌重量に対し、Inulin は 2.5%、MgO は 0.125% または 0.25% となるよう混餌した。データは平均 ± 標準誤差で表した (n = 5-6)。

2.2.3.3 腸内細菌叢の多様性

α 多様性の指標である Simpson Index は対照群と比較して、Inulin + 0.25% MgO 群で有意に低下した (Figure 17(a))。対照群、Inulin 群、Inulin + 0.125% MgO 群、Inulin + 0.25% MgO 群の 4 群で β 多様性を比較したところ、群間で腸内細菌叢の構成が有意に異なっていることが示された (Figure 17(b))。具体的にどの群間に有意な差があるのかを検証するため、2 群ずつの解析を行った。まず、対照群と Inulin 群の β 多様性を比較したところ、 β 多様性が有意に異なっていることが示された (Figure 17(c))。これはすなわち、Inulin 摂取が、普通食摂食時の標準的な腸内細菌叢の構成を変化させることを示している。次に、Inulin 群と Inulin + 0.125% MgO 群との比較、Inulin 群と Inulin + 0.25% 群との比較を行った。どちらの組み合わせでも、群間の β 多様性は有意に異なっていた (Figure 17(d)(e))。これらの結果により、普通食摂食時、MgO は Inulin で変化した腸内細菌叢をさらに変化させることが示された。最後に Inulin + 0.125% MgO 群と Inulin + 0.25% MgO 群で β 多様性を比較した。Inulin + 0.125% MgO 群と Inulin + 0.25% MgO 群の β 多様性は有意に異なっており (Figure 17(f))、これにより、MgO が腸内細菌叢の β 多様性に与える影響は用量によって異なる可能性があることが示唆された。

2.2.3.4 腸内細菌の相対存在量

Figure 18(a)に各群の Taxonomy summary を示した (Figure 18(a))。緒言や前節で述べたように、本研究では *Akkermansia*、*Bacteroides*、*Bifidobacterium*、*Lactobacillus*、*Lactococcus*、*Odoribacter* の 6 種類の属に着目した。これらは相対存在量が多いこと、プロバイオティクスとして利用されていること、疾病との関係が特に注目されていること、本研究で特徴的な変化が認められたことなどを考慮して選定した。*Akkermansia* の相対存在量は対照群と比較して、Inulin 群で増加傾向が見られ、Inulin + 0.25% MgO 群で有意に増加した (Figure 18(b))。*Bacteroides*、*Odoribacter* の相対存在量は、対照群と比較して、Inulin + 0.25% MgO で有意に低下した (Figure 18(c)(g))。*Bifidobacterium*、*Lactobacillus*、*Lactococcus* の相対存在量は Inulin や MgO によりそれぞれ変動したが、いずれも有意な差は検出できなかった (Figure (d)(e)(f))。

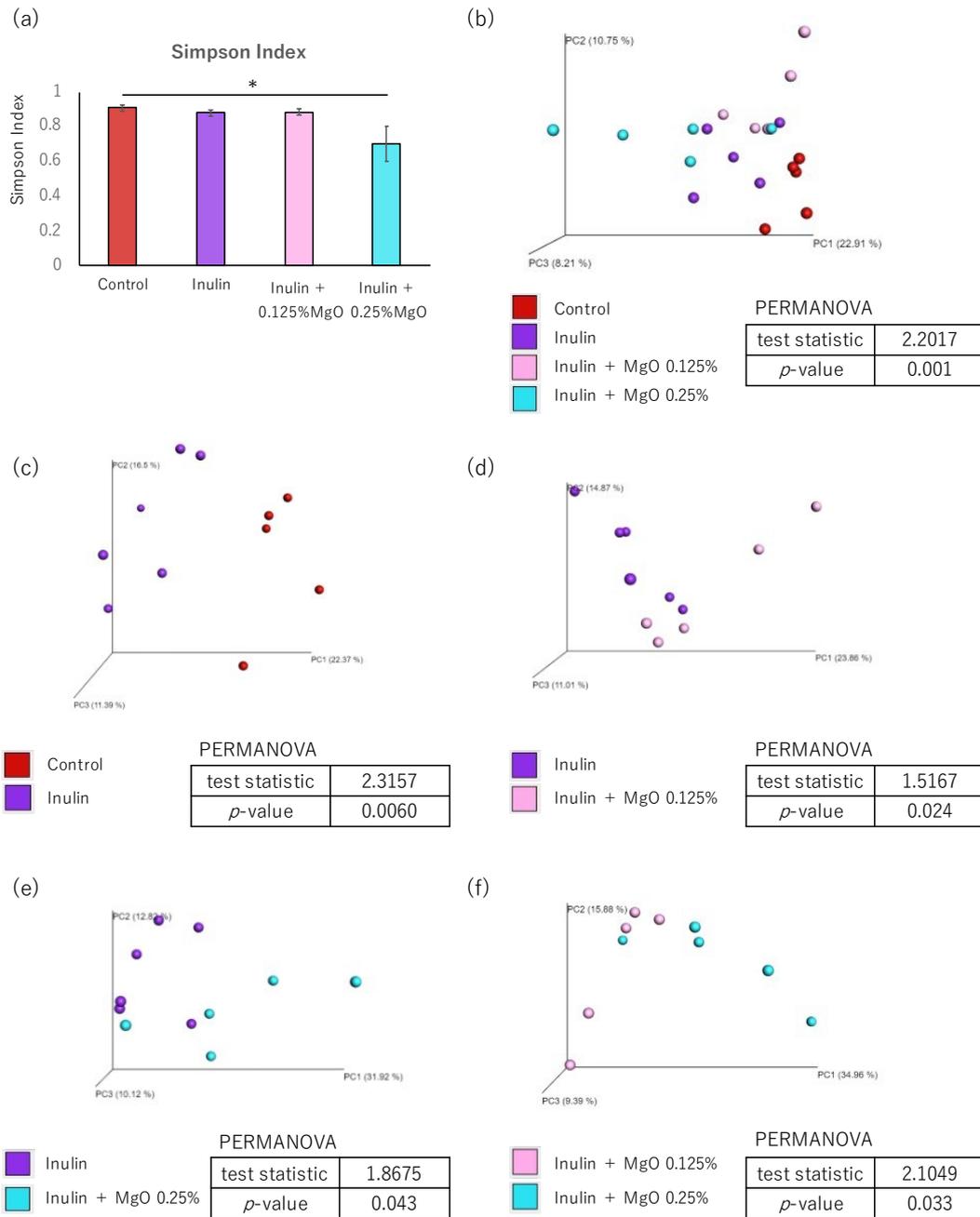


Figure 17 普通食(AIN-93M)摂食時、MgOとInulinの併用が腸内細菌叢の多様性に及ぼす影響
 (a) α 多様性(Simpson Index) (b) β 多様性(対照群 vs. Inulin群 vs. Inulin + 0.125%Mg群 vs. Inulin + 0.25 MgO群) (c) β 多様性(対照群 vs. Inulin群) (d) β 多様性(Inulin群 vs. Inulin + 0.125% MgO群) (e) β 多様性(Inulin群 vs. Inulin + 0.25% MgO群) (f) β 多様性(Inulin + 0.125% MgO群 vs. Inulin + 0.25% MgO群) 餌重量に対し、Inulinは2.5%、MgOは0.125%または0.25%となるよう混餌した。PCoA 3d plotsはunweighted UniFrac distanceで算出した。 α 多様性のデータは平均±標準誤差で表した(n = 5-6)。各データは下記の統計処理を行った。 α 多様性: * $p < 0.05$, evaluated using the Kruskal-Wallis test with Dunn's post hoc test. β 多様性: A permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA).

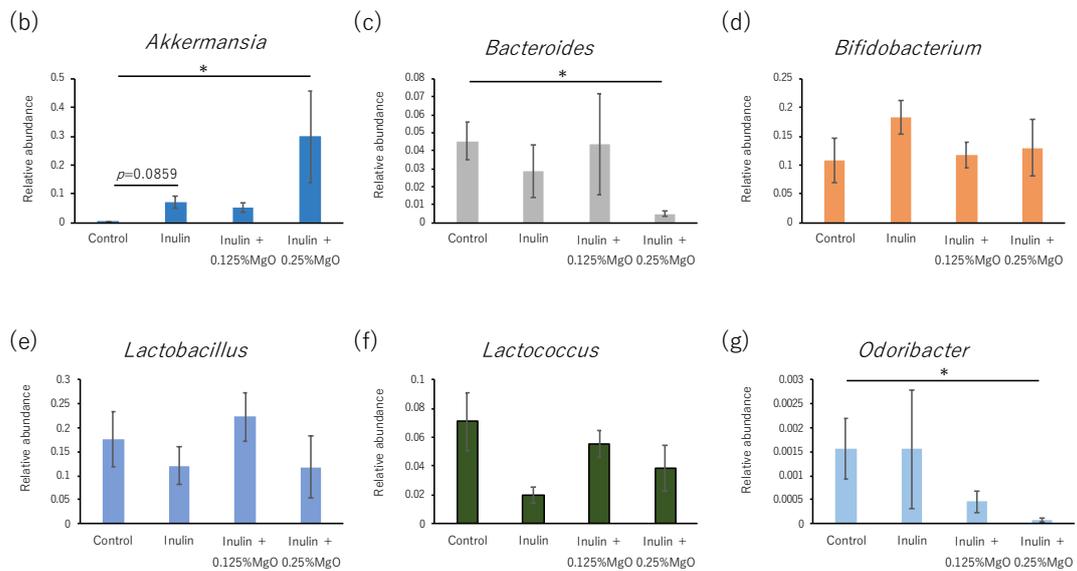
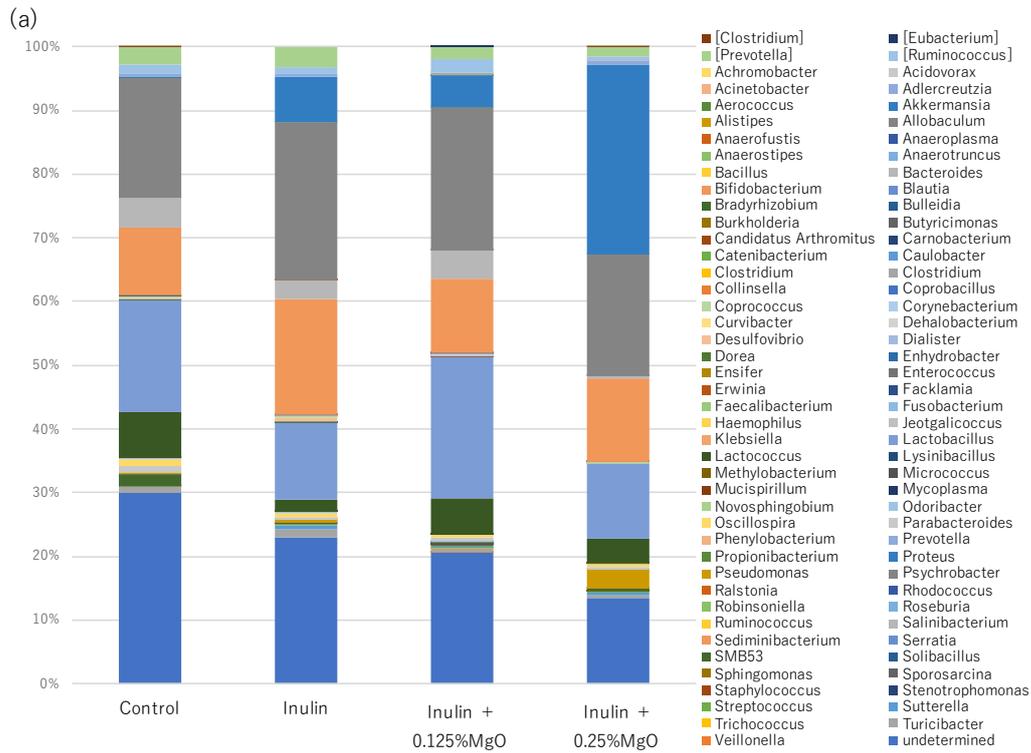


Figure 18 普通食(AIN-93M) 摂食時、MgO と Inulin の併用が各細菌に及ぼす影響

(a) Taxonomy summary (b) *Akkermansia* の腸内細菌の相対存在量 (c) *Bacteroides* の腸内細菌の相対存在量 (d) *Bifidobacterium* の腸内細菌の相対存在量 (e) *Lactobacillus* の腸内細菌の相対存在量 (f) *Lactococcus* の腸内細菌の相対存在量 (g) *Odoribacter* の腸内細菌の相対存在量 餌重量に対し、Inulin は 2.5%、MgO は 0.125% または 0.25% となるよう混餌した。細菌の相対存在量のデータは平均 ± 標準誤差で表した (n = 5-6)。* $p < 0.05$, evaluated using the Kruskal-Wallis test with Dunn's post hoc test.

2.2.3.5 盲腸内 pH

有意な差は認められなかったが、対照群と比較して、Inulin 群の盲腸内 pH は低値を示した (Figure 19(a))。一方、有意な差ではなかったものの、Inulin 群と比較して、Inulin + 0.125% MgO、Inulin + 0.25% MgO では、盲腸内 pH が上昇した (Figure 19(a))。

2.2.3.6 盲腸内乳酸濃度および SCFA 濃度

盲腸内乳酸濃度は Inulin 摂取によって有意に上昇した (Figure 19(b))。一方、Inulin + 0.125% MgO 群では乳酸濃度の低下傾向が見られ、Inulin + 0.25% MgO 群では有意な濃度低下が認められた (Figure 19(b))。Inulin + 0.25% MgO 群の乳酸濃度は Inulin + 0.125% MgO 群よりも低値であったが、有意な差は検出できなかった (Figure 19(b))。また、有意な差は検出出来なかったが、Inulin 摂食は酢酸濃度を上昇させた (Figure 19(c))。対照群と比較して、Inulin + 0.125% MgO 群で有意に酢酸濃度が高く、0.125% の MgO 混餌投与では顕著な酢酸濃度低下は認められないことが示唆された (Figure 19(c))。一方、Inulin + 0.25% MgO 群は、Inulin + 0.125% MgO 群と比較して、低い酢酸濃度を示す傾向があった (Figure 19(c))。このことから、Inulin 併用時、MgO は用量依存的に酢酸濃度を低下させる可能性が示唆された。プロピオン酸濃度は、対照群と比較して、Inulin 群、Inulin + 0.125% MgO 群、Inulin + 0.25% MgO 群の全てにおいて、有意に高かった (Figure 19(d))。酪酸濃度は、対照群と比較して、Inulin 群、Inulin + 0.125% MgO 群では有意に上昇した (Figure 19(e))。また、有意な差は検出されなかったが、Inulin + 0.125% MgO 群と比較して Inulin + 0.25% MgO 群では低い酪酸濃度を示した (Figure 19(e))。乳酸 + 総 SCFA 濃度は、対照群と比較して、Inulin 群、Inulin + 0.125% MgO 群で有意に高濃度を示した (Figure 19(f))。有意な差ではなかったものの、Inulin 群と比較して、Inulin + 0.125% MgO 群の総 SCFA 濃度は低く、Inulin + 0.25% MgO 群の総 SCFA 濃度はさらに低かった (Figure 19(f))。

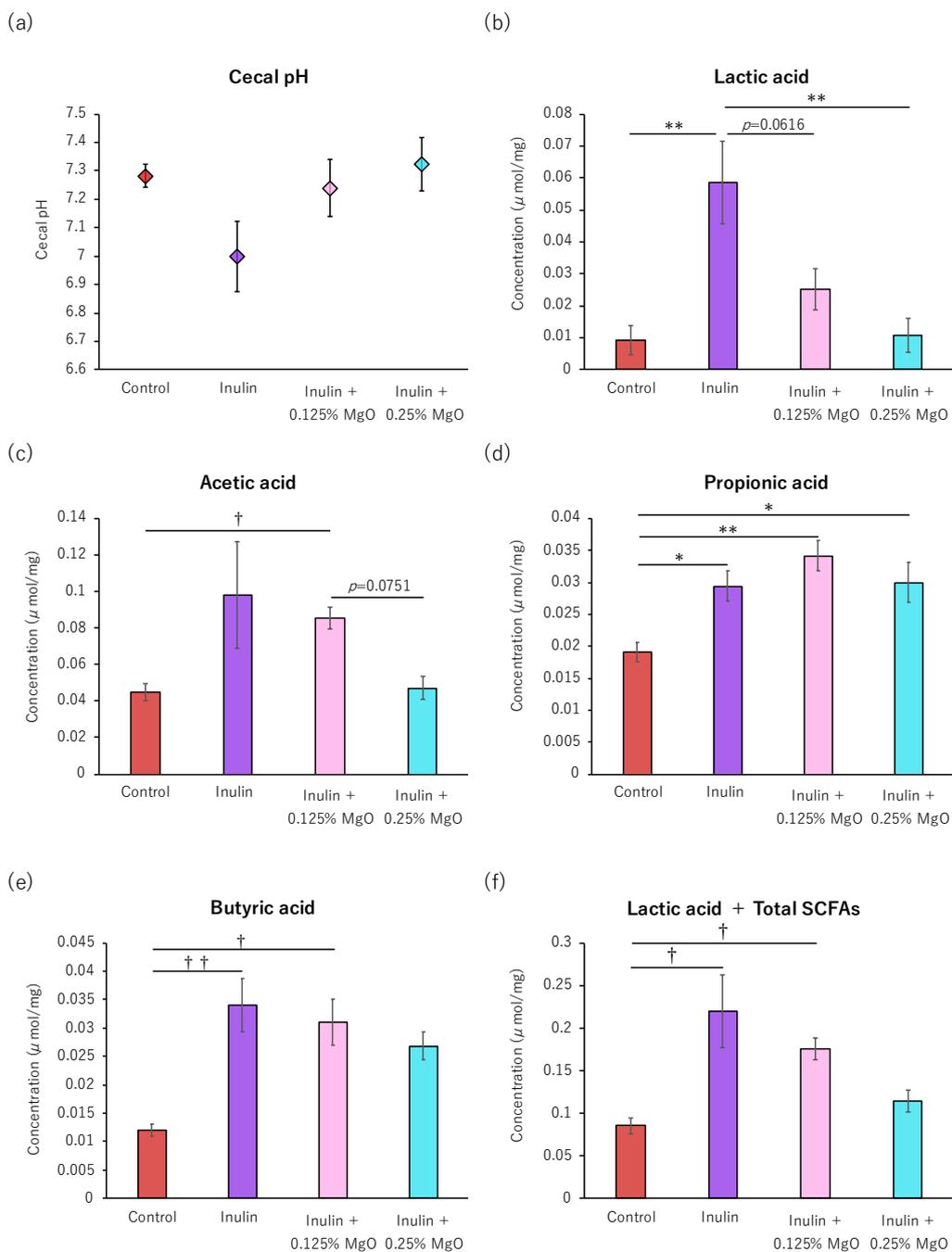


Figure 19 普通食(AIN-93M)摂食時、MgOとInulinの併用が盲腸内pH、盲腸内乳酸濃度およびSCFA濃度に及ぼす影響 (a)盲腸内pH (b)乳酸濃度 (c)酢酸濃度 (d)プロピオン酸濃 (e)酪酸濃度 (f)乳酸 + 総SCFA濃度(総SCFA濃度は酢酸濃度、プロピオン酸濃度、酪酸濃度の総計) 餌重量に対し、Inulinは2.5%、MgOは0.125%または0.25%となるよう混餌した。乳酸およびSCFAは盲腸内容物の乾燥重量あたりの濃度を算出した。データは平均±標準誤差で表した(n = 5-6)。* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, evaluated using the one-way ANOVA with Tukey's post hoc test. † $p < 0.05$ and †† $p < 0.01$, evaluated using the Kruskal-Wallis test with Dunn's post hoc test. (投稿論文(Omori *et al.*, 2021)の図を一部改変)

2.2.3.7 糞便中の IgA 濃度

糞便中の IgA 濃度は対照群と比較して、Inulin 群では高濃度を示したが有意な差は認められなかった。また、Inulin 群と比較して、Inulin + 0.125% MgO 群では IgA 濃度は低値を示し、Inulin + 0.25% MgO 群ではさらに低濃度を示したが、いずれも有意な差は認められなかった (Figure 20)。

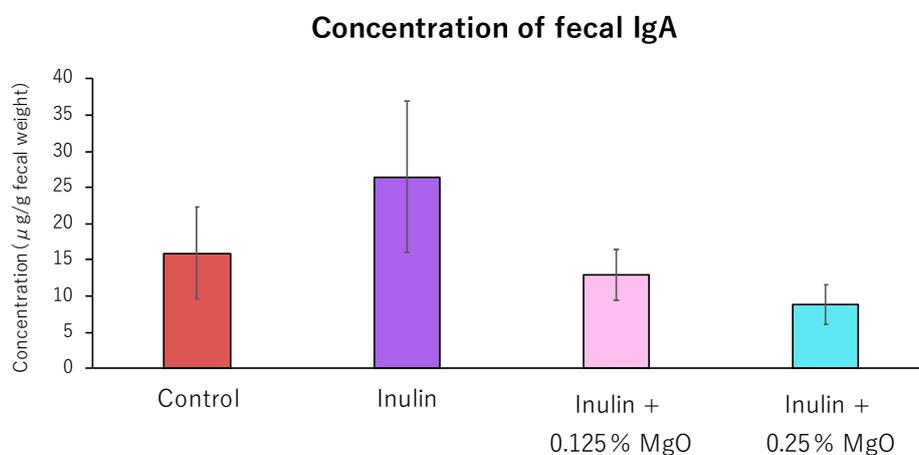


Figure 20 普通食(AIN-93M)摂食時、MgO と Inulin の併用が糞便中の IgA 濃度に及ぼす影響
餌重量に対し、Inulin は 2.5%、MgO は 0.125% または 0.25% となるよう混餌した。データは平均
±標準誤差で表した (n = 5-6)。

2.3 高脂肪食摂食時に MgO の単独投与が腸内環境に及ぼす影響

2.3.1 序論

便秘は、疾病、医薬品の服用、食物繊維の摂取量の不足などに起因して起こることが知られている。本研究では、水溶性食物繊維に分類される Inulin と便秘薬である MgO の併用した場合に、それらが腸内環境にどのような影響を与えるかを検証している。Inulin や MgO は便秘の解消を目的として併用される場合が多いと考えられ、様々な先行研究で、便秘時の腸内細菌叢は、正常時よりも腸内細菌叢が乱れていることが報告されている (Ohkusa *et al.*, 2019)。これらのことから、より現実に近い状態で Inulin と MgO の併用が腸内環境に及ぼす影響を検証するには、攪乱された腸内での検証が必要と考えた。高脂肪食はマウスの腸内環境を攪乱させることが知られている (He *et al.*, 2018) ことから、2.3 の実験では、高脂肪食を用いて Inulin と MgO を混餌投与し、腸内細菌叢攪乱時に Inulin と MgO が腸内細菌叢、SCFA、乳酸に与える影響を検証した。

2.3.2 実験材料および方法

(1) 動物

2.3 の実験では、8 週齢の ICR 雄性マウス (東京実験動物、東京、日本) を用いて実験を行った。マウスは温度 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $60 \pm 5\%$ 、光度 $100 \sim 150 \text{ lx}$ を維持した部屋で、自由摂食、自由飲水の条件下で飼育した。明暗条件は明期と暗期、12 時間ずつのサイクルとし、本実験では、明期の開始時刻である ZT0 を午前 8 時に設定した。尚、図表では Zeitgeber 時間 (ZT) で時刻を表記した。

(2) 実験デザイン

2.3 の実験では、高脂肪食摂食による腸内環境攪乱時に MgO と Inulin の併用が腸内細菌叢、盲腸内 pH、乳酸濃度および SCFA 濃度に与える影響を検証した。マウスは対照群と MgO 群の 2 群に分けた。餌は 45% kcal の脂肪を含有した高脂肪食 (HFD; Research Diets Inc., NJ, USA) を使用し (Table 8)、2.4 の実験と条件を揃えるため、両群に不溶性食物繊維である cellulose を 2.5% 混餌した。MgO 群の餌には、餌の総重量の 0.25% にあたる MgO を混餌した。11 日間の実験期間中、マウスは自由摂食、自由飲水の条件下で飼育した。最終日の ZT4 にサンプリングし、体重および盲

腸内 pH を測定し、盲腸内容物と糞便を採取した (Figure 21)。

Table 8 高脂肪食の配合組成

成分	gm%
カゼイン 30 Mesh	23.31%
L-シスチン	0.35%
コーンスターチ	8.48%
マルトデキストリン10	11.65%
スクロース	20.14%
セルロース BW200	5.83%
大豆油	2.91%
ラード	20.68%
ミネラルミックス S10026	1.17%
リン酸ニカルシウム	1.51%
炭酸カルシウム	0.64%
クエン酸カリウム 1H ₂ O	1.92%
ビタミンミックス V10001	1.17%
重酒石酸コリン	0.23%
FD&C Red Dye #40	0.01%
合計	100.00%
栄養素	kcal%
タンパク質	20%
炭水化物	35%
脂肪	45%
合計	100%

(3) 盲腸内 pH の測定

『2.1.2(3)盲腸内 pH の測定』の項に記載の通りとした。

(4) 盲腸内乳酸濃度および SCFA 濃度の測定

『2.1.2(4)盲腸内乳酸濃度および SCFA 濃度の測定』の項に記載の通りとした。

(5) 糞便中の DNA 抽出

『2.1.2(5)糞便中の DNA 抽出』の項に記載の通りとした。

(6) 16S rDNA シークエンス

『2.1.2(6) 16S rDNA シークエンス』の項に記載の通りとした。

(7) 16SrDNA の遺伝子シーケンスの分析

『2.1.2(7) 16S rDNA の遺伝子シーケンスの分析』の項に記載の通りとした。

(8) 統計分析

β 多様性以外の全ての結果の統計処理は GraphPad Prism(version8.4.3, GraphPad Software Inc., CA, USA)で行い、平均±標準誤差で示した。GraphPad Prismでの統計解析では、まず、正規性の有無を Kolmogorov-Smirnov test により判定した。正規分布でない場合には、Mann-Whitney' U test を行った。正規分布であった場合は、F test により等分散か否かを判定した。等分散でなかった場合は Welch' s t test を行った。正規性があり、等分散と判定された場合には、 t test を行った。 β 多様性は PERMANOVA により評価した。PERMANOVA は QIIME を用いて解析した。

2.3.3 結果

2.3.3.1 体重・摂食量

サンプリング時、全マウスの体重を計測し、群間で体重に差があるか検証した。HFD 群と MgO 群の間で体重に有意な差は見られなかった(Figure 22(a))。また、実験期間の摂食量をマウスごとに計測し、マウス一匹あたりの一日の摂食量の平均を算出した。群間でマウスの摂食量に差があるか検証したが、摂食量に差は見られなかった(Figure 22(b))。

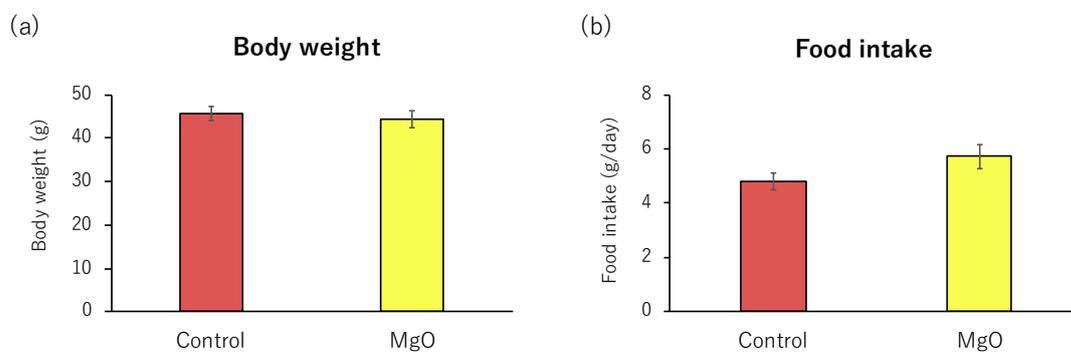


Figure 22 高脂肪食摂食時、MgO の単独投与が体重と摂食量に及ぼす影響

(a)サンプリング時の体重 (b)一日あたりの摂食量 MgO は餌重量の 0.25%になるよう混餌した。データは平均±標準誤差で表した(n = 5-6)。

2.3.3.2 盲腸内容物の水分含有率

対照群と MgO 群の間で盲腸内容物の水分含有率を比較したところ、有意な差は見られなかった (Figure 23)。

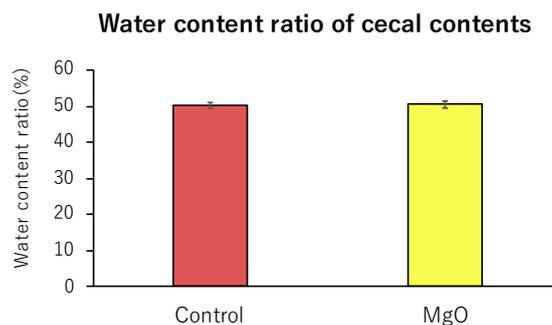


Figure 23 高脂肪食摂食時、MgO の単独投与が盲腸内容物の水分含有率に及ぼす影響
MgO は餌重量の 0.25% になるよう混餌した。データは平均±標準誤差で表した (n = 6)。

2.3.3.3 腸内細菌叢の多様性

対照群と MgO 群の Simpson Index に有意な差は検出できなかった (Figure 24(a))。すなわち、高脂肪食摂食時、MgO の単独・混餌投与は腸内細菌叢の α 多様性に影響を与えないことを示している。一方、群間での腸内細菌叢の構成の差を示す β 多様性を検証したところ、対照群と MgO 群で有意に異なることが示された (Figure 24(b))。

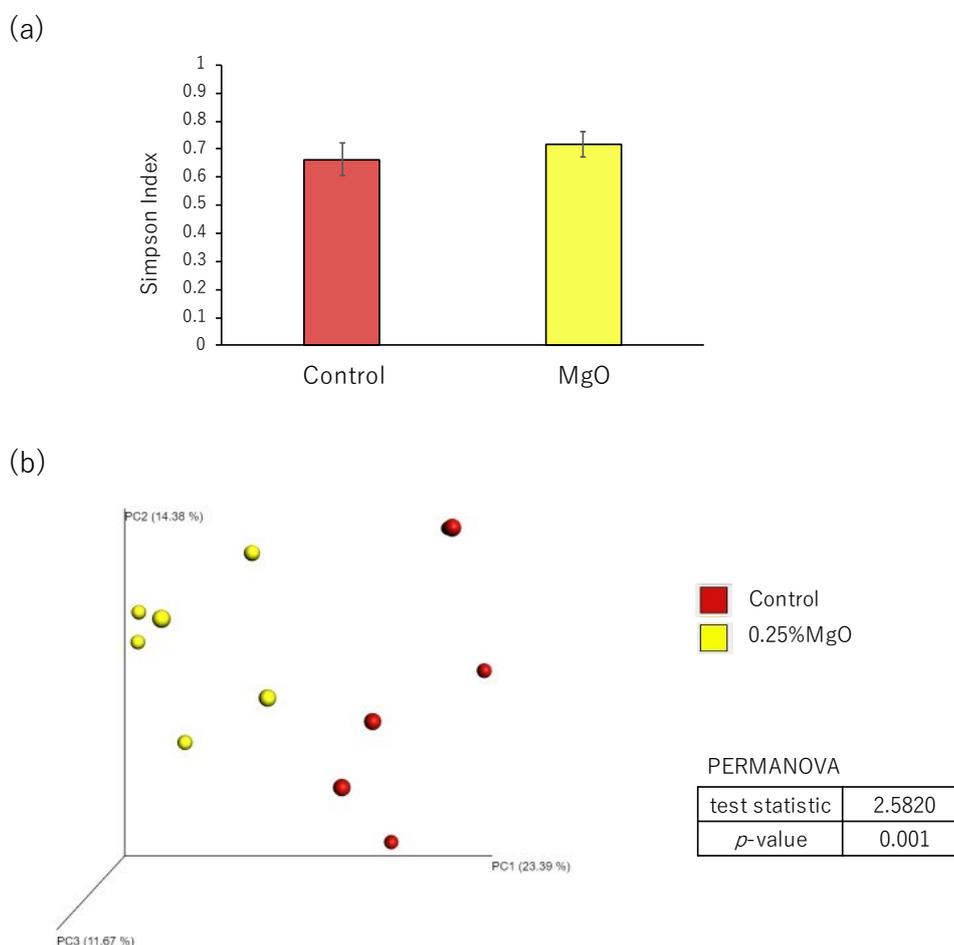


Figure 24 高脂肪食摂食時、MgO の単独投与が腸内細菌叢の多様性に及ぼす影響

(a) α 多様性 (Simpson Index) (b) β 多様性 (対照群 vs. MgO 群) MgO は餌重量の 0.25% になるよう混餌した。PCoA 3d plots は unweighted UniFrac distance で算出した。 α 多様性のデータは平均 \pm 標準誤差で表した ($n = 5-6$)。各データは下記の統計処理を行った。 α 多様性: Mann Whitney test. β 多様性: A permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA).

2.3.3.4 腸内細菌の相対存在量

Figure 25(a)に各群の taxonomy summary を示す。第1章や2.1、2.2で述べたように、本研究では *Akkermansia*、*Bacteroides*、*Bifidobacterium*、*Lactobacillus*、*Lactococcus*、*Odoribacter* の6種類の属に着目した。これらは相対存在量が多いこと、プロバイオティクスとして利用されていること、疾病との関係が特に注目されていること、本研究で特徴的な変化が認められたことなどを考慮して選定した。有意な差ではなかったものの、対照群と比較して、Mg0群では *Lactococcus*、*Lactobacillus*、*Odoribacter* の相対存在量が低下し、*Bifidobacterium* の相対存在量が増加した(Figure 25(d)(e)(f)(g))。 *Bacteroides*、*Akkermansia* の相対的存在量は、Mg0群で有意に増加した(Figure 25(b)(c))。

2.3.3.5 盲腸内 pH

対照群と比較して、Mg0群では盲腸内 pH が有意に上昇した(Figure 26(a))。この結果から、高脂肪食摂食による腸内環境攪乱時にも、Mg0は盲腸内の pH を上昇させることが示された。2.1の実験でも Mg0 の単独投与は盲腸内 pH を有意に上昇させていることから、Mg0による盲腸内 pH の上昇は、正常な腸内環境でも、攪乱された腸内環境でも引き起こされることが示唆された。

2.3.3.6 盲腸内乳酸濃度および SCFA 濃度

対照群と比較して、Mg0群で乳酸濃度が有意に低下した(Figure 26(b))。また、プロピオン酸濃度は Mg0群で有意に上昇した(Figure 26(d))。酢酸濃度、酪酸濃度、乳酸濃度と総 SCFA 濃度の総計は、対照群と比較して、Mg0群で高値を示したが、いずれも有意な差は検出できなかった(Figure 26(c)(e)(f))。

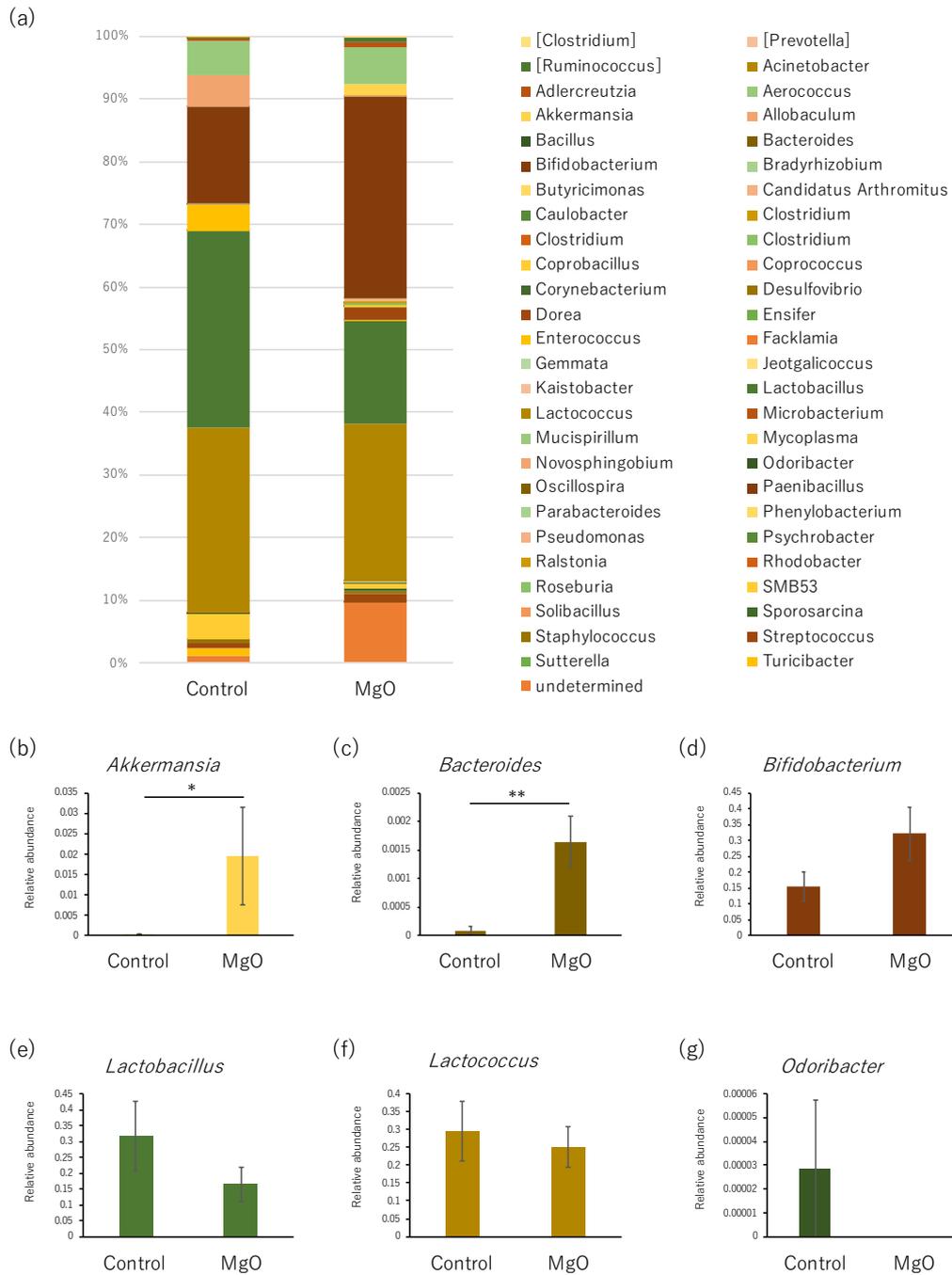


Figure 25 高脂肪食摂食時、MgO の単独投与が各細菌に及ぼす影響

(a) Taxonomy summary (b) *Akkermansia* の腸内細菌の相対存在量 (c) *Bacteroides* の腸内細菌の相対存在量 (d) *Bifidobacterium* の腸内細菌の相対存在量 (e) *Lactobacillus* の腸内細菌の相対存在量 (f) *Lactococcus* の腸内細菌の相対存在量 (g) *Odoribacter* の腸内細菌の相対存在量 MgO は HFD に 0.25% 混餌した。細菌の相対存在量のデータは平均±標準誤差で表した (n = 5-6)。* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, evaluated using Mann Whitney test.

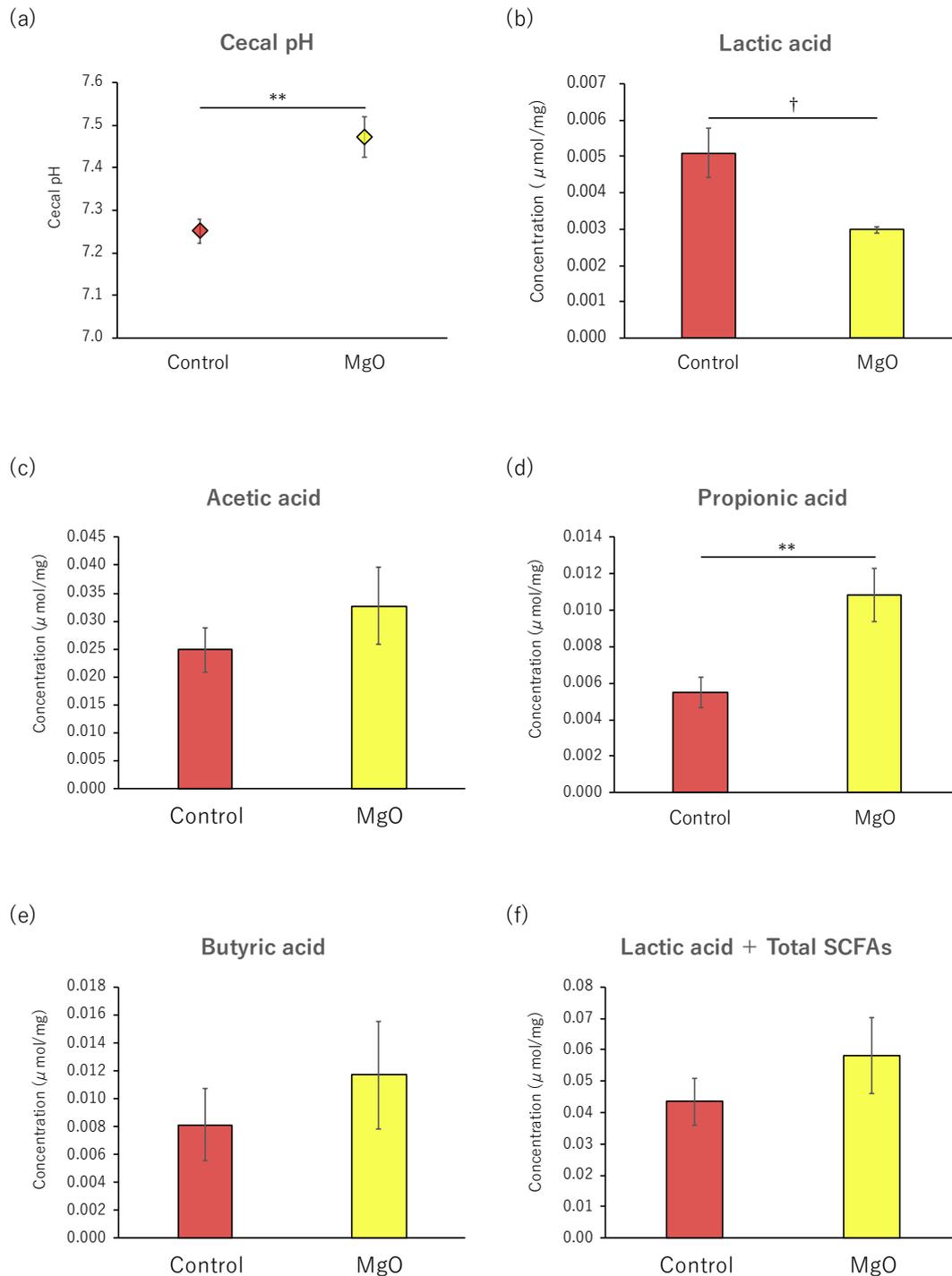


Figure 26 高脂肪食摂食時、MgO の単独投与が盲腸内 pH、盲腸内乳酸濃度および SCFA 濃度に及ぼす影響 (a)盲腸内 pH (b)乳酸濃度 (c)酢酸濃度 (d)プロピオン酸濃 (e)酪酸濃度 (f)乳酸 + 総 SCFA 濃度(総 SCFA 濃度は酢酸濃度、プロピオン酸濃度、酪酸濃度の総計) MgO は餌の総重量の 0.25%になるよう HFD に混餌した。乳酸および SCFA は盲腸内容物の乾燥重量あたりの濃度を算出した。データは平均±標準誤差で表した(n = 5-6)。** $p < 0.01$, evaluated using Unpaired t test with Welch' s correction. † $p < 0.05$, evaluated using Mann Whitney test.

2.4 高脂肪食摂食時に MgO と Inulin の併用が腸内環境に及ぼす影響

2.4.1 序論

2.1 ならびに 2.2 の実験では、MgO は単独投与時と Inulin との併用時で、盲腸内 SCFA および乳酸濃度に及ぼす影響が異なることが示された。これらの結果から、高脂肪食による腸内環境攪乱時にも、MgO は単独投与時と Inulin との併用時で腸内環境に及ぼす影響が異なる可能性が考えられた。2.3 の実験では、高脂肪食による腸内環境攪乱時に MgO の単独投与が腸内細菌叢の構成を有意に変化させ、盲腸内の乳酸濃度やプロピオン酸濃度に有意な変化をもたらすことが示された。2.4 では、高脂肪食摂食時、Inulin と MgO の併用が腸内細菌叢、盲腸内 pH、盲腸内 SCFA および盲腸内乳酸濃度に及ぼす影響を検証した。

2.4.2 実験材料および方法

(1) 動物

2.4 の実験では、9 週齢の ICR 雄性マウス(東京実験動物、東京、日本)を用いて実験を行った。マウスは温度 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $60 \pm 5\%$ 、光度 $100 \sim 150 \text{ lx}$ を維持した部屋で、自由摂食、自由飲水の条件下で飼育した。明暗条件は明期と暗期、12 時間ずつのサイクルとし、本実験では、明期の開始時刻である ZT0 を午前 8 時に設定した。尚、図表では Zeitgeber 時間 (ZT) で時刻を表記した。

(2) 実験デザイン

2.4 の実験では、高脂肪食摂食時に MgO と Inulin の併用が腸内細菌叢、盲腸内 pH、乳酸濃度および SCFA 濃度を与える影響を検証した。マウスは対照群、Inulin 群、Inulin + 0.25% MgO 群の 3 群に分けた。餌は 45% kcal の脂肪を含有した高脂肪食を使用し、餌の総重量に対して Inulin は 2.5%、MgO は 0.25% になるように混餌した。尚、総食物繊維重量を一致させるため、対照群には不溶性食物繊維である cellulose を 2.5% 混餌した。11 日間の実験期間中、マウスは自由摂食、自由飲水の条件下で飼育した。最終日の ZT4 にサンプリングをし、盲腸内 pH の測定および盲腸内容物、糞便の採取を行った (Figure 27)。

(3) 盲腸内 pH の測定

『2.1.2(3)盲腸内 pH の測定』の項に記載の通りとした。

(4) 盲腸内 SCFA 濃度および乳酸濃度の測定

『2.1.2(4)盲腸内 SCFA 濃度および乳酸濃度の測定』の項に記載の通りとした。

(5) 糞便中の DNA 抽出

『2.1.2(5)糞便中の DNA 抽出』の項に記載の通りとした。

(6) 16S rDNA シークエンス

『2.1.2(6) 16S rDNA シークエンス』の項に記載の通りとした。

(7) 16SrDNA の遺伝子シーケンスの分析

『2.1.2(7) 16S rDNA の遺伝子シーケンスの分析』の項に記載の通りとした。

(8) 統計分析

『2.1.2(9) 統計分析』の項に記載の通りとした。

2.4.3 結果

2.4.3.1 体重・摂食量

サンプリング時、全マウスの体重を計測し、群間で体重に差があるか検証した。対照群、Inulin 群、Inulin + MgO 群の 3 群間で体重に有意な差は認められなかった (Figure 28(a))。これにより、高脂肪食による腸内環境攪乱時にも、MgO はマウスの体重に影響を与えないことが示された。また、実験期間の摂食量をマウスごとに計測し、マウス一匹あたりの一日の摂食量の平均を算出した (Figure 28(b))。固めた餌を極端に崩して摂食したマウスがいたため、摂食量のデータは正確な摂食量を計測できたマウス (n = 3-4) のみで算出している。また、Inulin 群のマウスが実験途中に day 3 までに一匹死亡したため、Inulin 群のみ day 3~day 11 までの 8 日間の摂食量の平均を算出している。

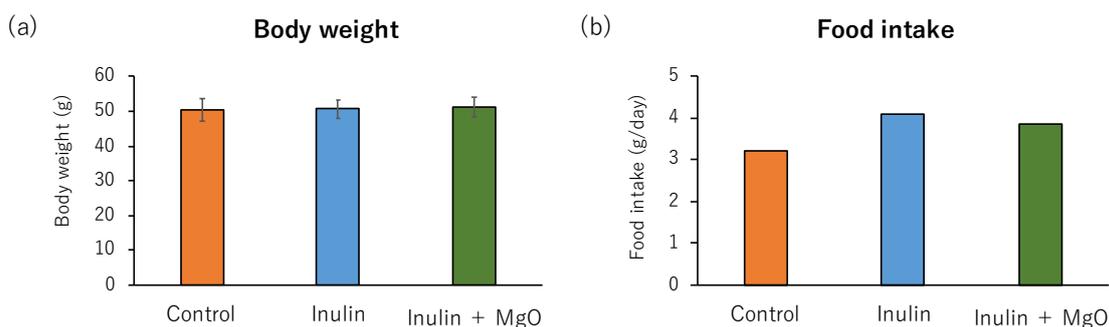


Figure 28 高脂肪食摂食時、MgO と Inulin の併用が体重と摂食量に及ぼす影響

(a)サンプリング時の体重 (b)一日あたりの摂食量(Control 群、Inulin + MgO 群は 11 日間の平均、Inulin 群は day 3~day 11 までの 8 日間の平均) 餌重量に対し、Inulin は 2.5%、MgO は 0.25%となるよう混餌した。体重のデータは平均±標準誤差で表した (n = 5-6)。マウスを群飼いで飼育したため、摂食量のグラフには誤差範囲を示していない。尚、摂食量のデータは n = 3-4 で算出しているが、これは、固めた餌を極端に崩して摂食したマウスがおり、正確な摂食量を計測できたマウスのみで摂食量を算出しているためである。

2.4.3.2 盲腸内容物の水分含有率

対照群、Inulin 群、Inulin + MgO 群の 3 群間で盲腸内容物の水分含有率に有意な差は見られなかった (Figure 29)。

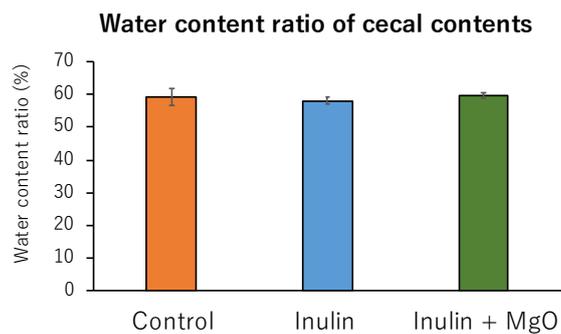


Figure 29 高脂肪食摂食時、MgO と Inulin の併用が盲腸内容物の水分含有率に及ぼす影響
餌重量に対し、Inulin は 2.5%、MgO は 0.25%となるよう混餌した。データは平均±標準誤差で表した (n = 5-6)。

2.4.3.3 腸内細菌叢の多様性

腸内細菌叢の α 多様性を Simpson Index で表した。対照群、Inulin 群、Inulin + MgO 群の 3 群間で Simpson Index に有意な差は見られなかった (Figure 30(a))。

腸内細菌叢の β 多様性の解析により、3 群間で腸内細菌叢の構成に有意な差が見られた (Figure 30(b))。具体的にどの群に有意な差が見られるのかを確かめるため、2 群ずつの比較を行った。まず、対照群と Inulin 群で比較すると、 β 多様性の有意な変化が認められ、高脂肪食による腸内環境攪乱時にも、Inulin 摂取により腸内細菌叢の構成が有意に変化することが示された (Figure 30(c))。さらに、Inulin 群と比較して、Inulin + MgO 群の β 多様性は有意に異なり、Inulin 併用時に MgO が腸内細菌叢を有意に変化させることが示された (Figure 30(d))。また、対照群と Inulin + MgO 群の β 多様性も有意に異なっており、Inulin 併用時、MgO によって変化した腸内細菌叢は、対照群の腸内細菌叢と異なることが示された (Figure 30(e))。

2.4.3.4 腸内細菌の相対存在量

第 1 章や 2.1、2.2、2.3 で述べたように、本研究では *Akkermansia*、*Bacteroides*、*Bifidobacterium*、*Lactobacillus*、*Lactococcus*、*Odoribacter* の 6 種類の属に着目した。これらは相対存在量が多いこと、プロバイオティクスとして利用されていること、疾病との関係が特に注目されていること、本研究で特徴的な変化が認められたことなどを考慮して選定した。対照群、Inulin 群と比較して、Inulin + MgO 群では *Akkermansia* の相対存在量が有意に上昇した (Figure 31(b))。 *Bacteroides*、*Bifidobacterium* の相対存在量には有意な差は検出できなかった (Figure 31(c) (d))。有意な差は検出できなかったものの、*Lactobacillus* の相対存在量は Inulin 摂取により増加し、MgO の併用により減少した (Figure 31(e))。 *Lactococcus* の相対存在量は、対照群と比較して、Inulin 群で有意に低下した (Figure 31(f))。 *Odoribacter* の相対存在量は対照群と比較して、Inulin + MgO 群で有意に低下した (Figure 31(g))。

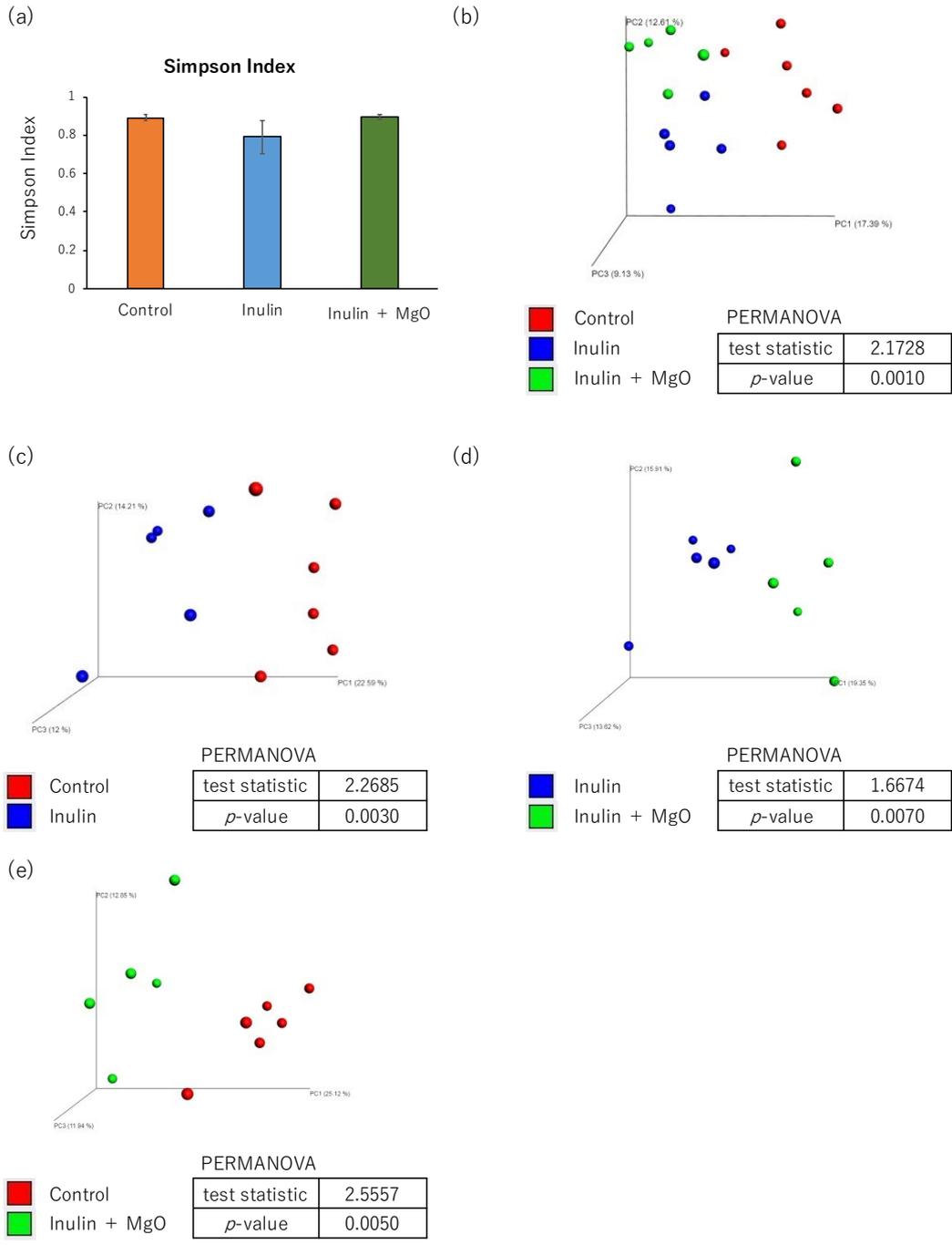


Figure 30 高脂肪食摂食時、MgO と Inulin の併用が腸内細菌叢の多様性に及ぼす影響
 (a) α 多様性 (Simpson Index) (b) β 多様性 (対照群 vs. Inulin 群 vs. Inulin + MgO 群) (c) β 多様性 (対照群 vs. Inulin 群) (d) β 多様性 (Inulin 群 vs. Inulin + MgO 群) (e) β 多様性 (対照群 vs. Inulin + MgO 群) MgO は餌の総重量に対して 0.25% になるように混餌した。PCoA 3d plots は unweighted UniFrac distance で算出した。 α 多様性のデータは平均±標準誤差で表した ($n = 5-6$)。各データは下記の統計処理を行った。 α 多様性: The Kruskal-Wallis test with Dunn's post hoc test. β 多様性: A permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA). [投稿論文 (Omori *et al.*, 2021) の図を一部改変]

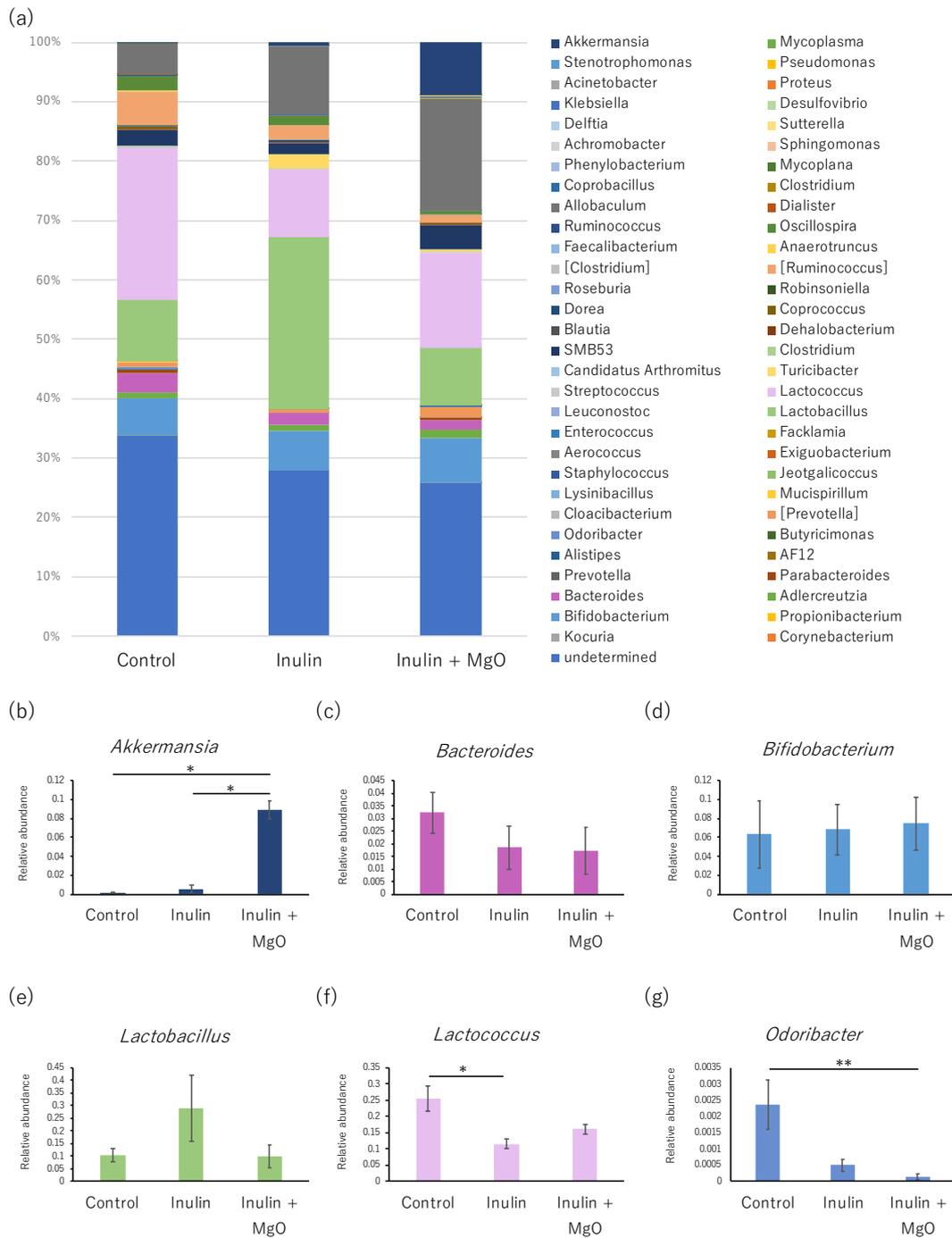


Figure 31 高脂肪食摂食時に MgO と Inulin の併用が各細菌に及ぼす影響

(a) Taxonomy summary (b) *Akkermansia* の腸内細菌の相対存在量 (c) *Bacteroides* の腸内細菌の相対存在量 (d) *Bifidobacterium* の腸内細菌の相対存在量 (e) *Lactobacillus* の腸内細菌の相対存在量 (f) *Lactococcus* の腸内細菌の相対存在量 (g) *Odoribacter* の腸内細菌の相対存在量 Inulin は餌の総重量の 2.5% となるように、MgO は 0.25% となるように HFD に混餌した。細菌の相対存在量のデータは平均 ± 標準誤差で表した (n = 5-6)。

* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, evaluated using the Kruskal-Wallis test with Dunn's post hoc test. [投稿論文 (Omori *et al.*, 2021) の図を一部改変]

2.4.3.5 盲腸内 pH

盲腸内 pH は、対照群と比較して、Inulin 群で有意に低下した (Figure 32(a))。一方、Inulin 群と比較して、Inulin + MgO 群では盲腸内 pH が有意に上昇した (Figure 32(a))。これらの結果から、MgO は Inulin 摂取で低下した盲腸内 pH を上昇させることが示唆された。

2.4.3.6 盲腸内乳酸濃度および SCFA 濃度

乳酸濃度は Inulin 摂取によって有意に上昇し、有意な差ではなかったものの、MgO を併用することによって低下した (Figure 32(b))。酢酸濃度は、対照群、Inulin 群と比較して、Inulin + MgO 群で有意に低下した (Figure 32(c))。プロピオン酸濃度は、Inulin の摂取で有意に上昇し、MgO の併用で有意に低下した (Figure 32(d))。酪酸濃度も Inulin 摂取によって上昇傾向が見られ、MgO の併用により有意に低下した (Figure 32(e))。乳酸と総 SCFA 濃度の総計を算出したところ、対照群と比較して、Inulin 群では有意に高く、対照群や Inulin 群と比較して、Inulin + MgO 群では有意に低かった (Figure 32(f))。これらの結果から、高脂肪食による腸内環境攪乱時、Inulin 摂取は乳酸、酢酸、プロピオン酸、酪酸濃度を上昇させる一方、MgO の併用により、それらの濃度が低下することが示された。

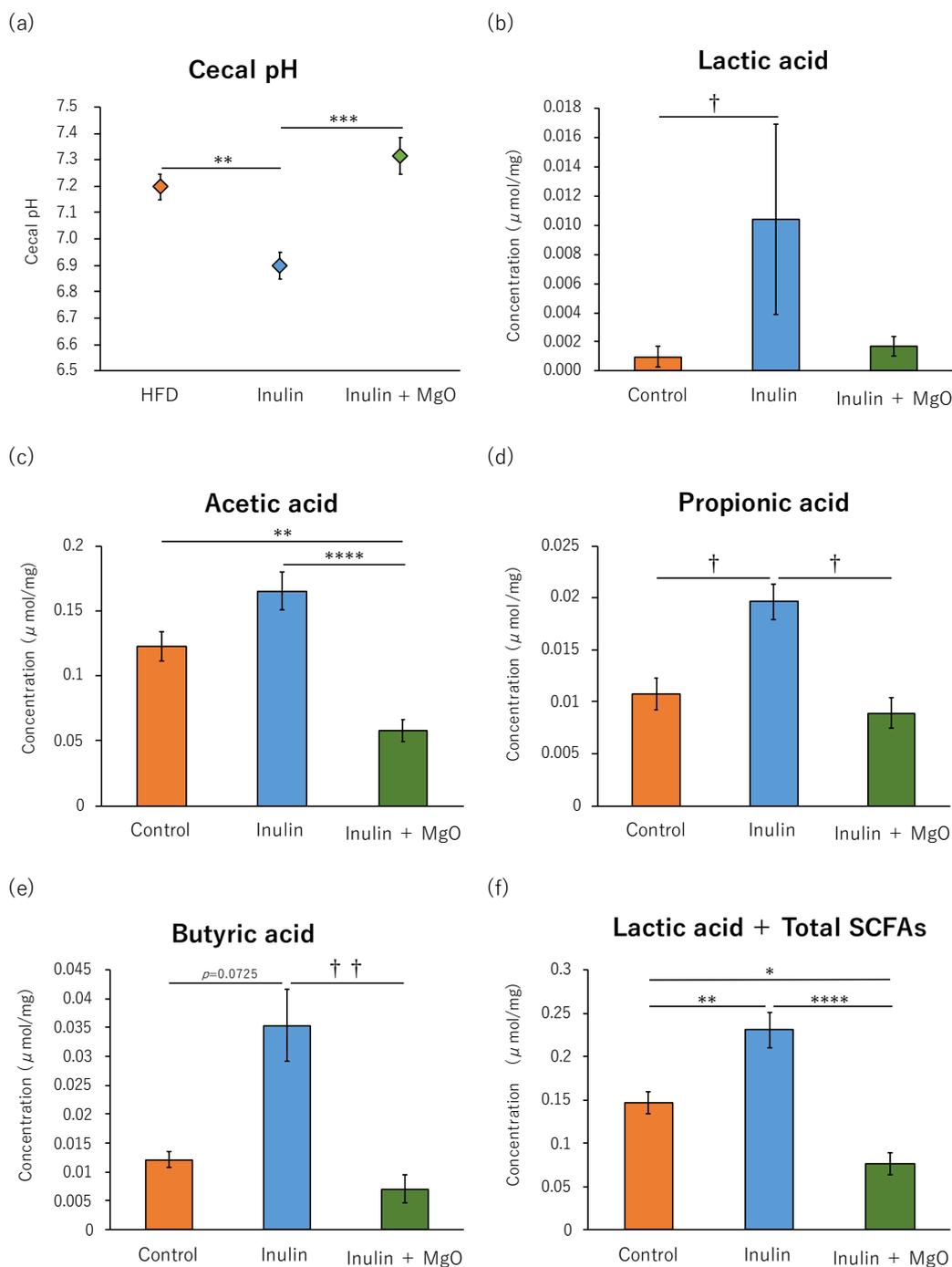


Figure 32 高脂肪食摂食時、MgO と Inulin の併用が盲腸内 pH、盲腸内乳酸濃度および SCFA 濃度に及ぼす影響 (a)盲腸内 pH (b)乳酸濃度 (c)酢酸濃度 (d)プロピオン酸濃 (e)酪酸濃度 (f)乳酸 + 総 SCFA 濃度(総 SCFA 濃度は酢酸濃度、プロピオン酸濃度、酪酸濃度の総計) Inulin は餌の総重量の 2.5%となるように混餌し、MgO は 0.25%混餌した。乳酸および SCFA は盲腸内容物の乾燥重量あたりの濃度を算出した。データは平均±標準誤差で表した(n = 5-6)。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$, evaluated using the one-way ANOVA with Tukey's post hoc test. † $p < 0.05$ and †† $p < 0.01$, evaluated using the Kruskal-Wallis test with Dunn's post hoc test. [投稿論文(Omori *et al.*, 2021)の図を一部改変]

2.5 考察

(1) 盲腸内容物の水分含有率について

MgO は腸内の浸透圧を増加させることで、便の水分量を増加させ、排便を促す。しかし、第 2 章では、餌の種類や Inulin 併用の有無に関わらず、MgO は盲腸内容物の水分含有率に影響を及ぼさなかった (Figure 9, 16, 23, 29)。MgO を摂取したにも関わらず、盲腸内容物の水分量が増加しなかった理由として、MgO が緩下作用を示すピークの時間帯とサンプリング時刻がずれていたことが考えられる。

MgO 製剤であるマグミット錠 (協和化学工業株式会社) のインタビューフォームに記載された緩下試験では、MgO (250 mg/kg・BW) を 10 匹のマウスに投与したところ、軟便あるいは下痢の症状を呈したマウスの匹数がピークを迎えたのは投与後 2~5 時間後だった (医薬品医療機器総合機構, 2017)。軟便・下痢の症状を呈するマウスの数は時間が経つにつれて減少し、MgO を経口投与してから 10~24 時間後には 0 匹となった (医薬品医療機器総合機構, 2017)。つまり、MgO は経口投与した場合、糞便の水分量に及ぼす影響は投与後 2~5 時間がピークであり、10~24 時間後には作用が完全に消失するということである。第 2 章の実験では、ZT4 で盲腸内容物を採取している (Figure 7, 14, 21, 27)。先行研究では、自由摂食の場合、マウスは暗期開始後 6 時間で摂食リズムのピークを迎えることが示されている (Gutman *et al.*, 2012)。したがって、サンプリング時刻 (ZT4) では摂食量がピークに達した時刻から 10 時間が経過しており、MgO による緩下作用が消失している可能性が考えられる。

上記の考察を裏付けるデータとして、第 4 章に示す結果を挙げる。Figure 54、Figure 61 でデータを示すが、第 4 章では、MgO を 250 mg/kg・BW で経口投与し、4 時間後に盲腸内容物を採取している。盲腸内容物の水分含有率は Inulin 併用の有無に関わらず、MgO により有意に上昇した (Figure 54, 61(b))。これは、MgO を投与してからサンプルを採取するまでの時間が短ければ盲腸内容物の水分含有率に顕著な差が見られることを示唆している。これらの結果は、MgO 投与後 2~5 時間後に軟便を排泄するマウス数がピークを迎えたというマグミット錠インタビューフォームのデータ (医薬品医療機器総合機構, 2017) とも矛盾していない。以上のことから、第 2 章で MgO を混餌投与したにも関わらず盲腸内容物の水分含有率が増加しなかった理由は、MgO が緩下作用を示すピークの時間帯とサンプリング時刻がずれていたためと考えた。

また、MgO を混餌投与したことで、インタビューフォームでの経口投与時の結果と異なった可能性が考えられる。マグミット錠のインタビューフォームでは投与用量 250 mg/kg・BW、投与液量 10 mL/kg・BW で MgO 溶液を経口投与しており(医薬品医療機器総合機構, 2017)、2.1 の実験の 0.25% MgO 群、2.2 の実験の Inulin + 0.25% MgO 群、2.3 の実験の MgO 群、2.4 の実験の Inulin + MgO 群では、一日の MgO 混餌投与量がインタビューフォームでの緩下試験での投与量と同等になるよう設定した。すなわち、インタビューフォームでの緩下試験では、250 mg/kg の MgO を一度で投与しているが、本研究では、餌と共に少量ずつ投与しているということである。一度に投与される MgO の量も緩下作用の強さに影響した可能性がある。

(2) 盲腸内 pH について

腸内の pH は重炭酸塩によってアルカリ性に傾く力と SCFA 産生によって酸性に傾く力のバランスにより決定されており、それが腸内細菌叢の構成を制御しているという説がある (Ilhan *et al.*, 2017)。たとえば、pH6.0 では乳酸を産生する *Streptococcus* が優勢となり、pH6.5 や pH6.9 では酢酸やプロピオン酸を産生する *Veillonella*、*Bacteroides*、*Escherichia* が優勢になるという報告がある (Ilhan *et al.*, 2017)。また、非肥満糖尿病マウスを対象とした研究でも、酸性水を与えられたマウスでは、中性水を与えられたマウスと腸内細菌叢の構成が異なっていたという報告もある (Wolf *et al.*, 2014)。また、*Lactobacillus* や *Lactococcus* は酸性条件下でも増殖できることが知られ、*Bifidobacterium* は酸に弱く、胃酸で生菌数が減少してしまうとされている。細菌の生存環境についても報告があり、肥満、糖尿病、自閉症等との関連が報告知られている *Akkermansia muciniphila* は 20-40°C、pH5.5~8.0 で生存し、至適発育環境は 37°C、pH6.5 とされている (Derrien *et al.*, 2004)。これらの報告からも分かるように、腸内細菌叢の構成変化と腸内の pH には密接な関係がある。

本研究では、餌の種類や Inulin 併用の有無に関わらず、全ての実験で共通していたことは、MgO を投与したことによる盲腸内 pH の上昇である。普通食を摂食させた 2.1 の実験では、0.125% MgO 群で盲腸内 pH の上昇傾向が見られ、0.25% MgO 群で盲腸内 pH が有意に上昇した (Figure 12)。HFD を摂食させた 2.3 の実験でも MgO 群で盲腸内 pH が有意に上昇した (Figure 26(a))。2.2 の実験では、有意な差ではなかつ

たものの、普通食摂食時、Inulinにより低下した盲腸内 pH が MgO の併用により上昇することが示された (Figure 19(a))。2.4 の実験では、HFD 摂食時、Inulin により有意に低下した盲腸内 pH が MgO の併用により有意に上昇した (Figure 32(a))。ここでは、MgO と盲腸内 pH の上昇との関連について考察する。

MgO は消化管内で胃酸や膵液と反応し、重炭酸マグネシウムや炭酸マグネシウムとなる。重炭酸マグネシウムは、重炭酸塩であるため、腸内 pH を上昇させる要因となり得る。また、炭酸マグネシウムの飽和水溶液はアルカリ性であるため (炭酸マグネシウム添付文書)、炭酸マグネシウムも腸内 pH を上昇させる要因となると考えられる。

別の可能性としては、MgO の胃での制酸作用により、胃内の pH が上昇し、それに伴って腸内 pH が上昇した可能性が考えられる。ラベプラゾールやボノプラザンは共にプロトンポンプに作用して胃酸の分泌を抑制することが知られているが、これらの作用機序は異なる。しかし、これらの薬剤は共に、マウスの小腸、結腸の細菌叢の構成を有意に変化させる (Nadatani *et al.*, 2019)。この結果は胃の酸性度が腸内の pH に影響することにより、腸内細菌叢の構成が変化することを示唆している。MgO は便秘薬として用いられる一方で、制酸薬としても用いられることから、投与により胃内 pH が上昇し、それに伴い腸内 pH が上昇した可能性が考えられる。

(3) 腸内細菌叢の β 多様性について

腸内細菌叢は消化管感染症の罹患、薬剤の使用、免疫機能の低下、脂肪が多く食物繊維が少ない欧米型の食事など様々な要因によってバランスが崩れ、腸内細菌の菌数増減や多様性低下が起こると言われている (水野ほか, 2018)。このような腸内細菌叢のバランス失調を *dysbiosis* と呼ぶ (水野ほか, 2018)。先行研究により、食餌性の高用量マグネシウムはラットの腸内細菌叢の β 多様性を有意に変化させ、*dysbiosis* を引き起こすことが報告されている (García-Legorreta *et al.*, 2020)。2.1 の実験では、対照群 (AIN93M 群) と比較して、0.125% MgO 群、0.25% MgO 群の両群ともに腸内細菌叢の β 多様性が有意に変化した (Figure 10(c)(d))。2.2 の実験では、Inulin 群と比較して、Inulin + 0.125% MgO 群、Inulin + 0.25% MgO 群ともに β 多様性が有意に変化した (Figure 17(d)(e))。また、2.3 の実験では、HFD 摂食による腸内環境攪乱時、MgO の投与が腸内細菌叢に及ぼす影響を検証したところ、対

照群と比較して、Mg0群では腸内細菌叢の β 多様性が有意に変化した (Figure 24(b))。2.4の実験では、Inulin群と比較して、Inulin + Mg0群では腸内細菌叢の β 多様性が有意に変化した (Figure 30(d))。これらの結果は、先に挙げた先行研究とも一致している。したがって、Mg0が dysbiosis を引き起こしている可能性が考えられる。Dysbiosis を引き起こす原因として、「腸内 pH の変化」や「腸内浸透圧の変化」が考えられる。

① 腸内 pH の変化

腸内細菌叢のバランス維持には腸内 pH が深く関与しており (Deehan *et al.*, 2017)、dysbiosis の状況下では、糞便 pH はアルカリ性に傾いている (水野ほか, 2018)。第2章の全ての実験において、Mg0の投与により盲腸内 pH が上昇した (Figure 12(a), 19(a), 26(a), 32(a))。これらのことから、Mg0投与による盲腸内 pH の上昇が腸内の dysbiosis を引き起こし、 β 多様性が変化した可能性が考えられる。

② 腸内浸透圧の変化

Mg0により腸内細菌叢の β 多様性が変化した原因として、腸内の浸透圧の変化が考えられる。Mg0は腸内で重炭酸塩となり、腸内の浸透圧を上げることで腸内腔に水分を引き寄せ、腸内容物を軟化させる (Figure 6)。浸透圧性下剤であるポリエチレングリコールは腸内細菌叢を長期的に変化させることが報告されている (Tropini *et al.*, 2018) ことから、腸内細菌叢の変化の一因として、腸内の浸透圧の変化が関与している可能性も考えられる。

(4) 腸内細菌叢の α 多様性について

α 多様性はある1つの環境における種の多様性を表し、 β 多様性は異なる環境間での種の多様性を表す。また、Simpson Index は α 多様性を示すいくつかの指標の中で、細菌の evenness (均一性) を示す値である。つまり、Simpson Index は細菌の種類数の低下だけでなく、それぞれの種の相対存在量が不均一であることで低下する値である。2.1や2.3の実験では、対照群と Mg0群で腸内細菌叢を構成する細菌の種類や割合が変化したものの、細菌叢を構成する細菌の種類数や均一性に大きな変化が起きなかったため、 α 多様性が変化しなかったと考えられる (Figure 10(a), 24(a))。

次に、2.3 と 2.4 の実験における α 多様性の結果を比較する。2.3 と 2.4 の実験はどちらも HFD を用いて実験をしているが、それぞれの実験の対照群の Simpson Index を比較すると、2.3 の実験の方が低値である (Figure 24(a), 30(a))。2 つの実験の対照群の Taxonomy summary を比較すると、2.4 の実験では、undetermined の細菌の相対存在量が全体の約 34%、*Lactococcus*、*Lactobacillus*、*Bifidobacterium* の 3 種類の属が約 42%であるのに対し、2.3 の実験では、undetermined の菌は全体のわずか 1%、*Lactococcus*、*Lactobacillus*、*Bifidobacterium* は全体の約 77%を占めている (Figure 25, 31)。先にも述べたように、Simpson Index は α 多様性を示すいくつかの指標の中で、細菌の evenness (均一性) を示す値であることから、細菌の種類が減少しただけでなく、相対存在量の均一性が失われたことが、Simpson Index の値が低下した要因と考えられる。

(5) 腸内細菌の相対存在量について

本論文で、腸内細菌の中でも相対存在量の変化を検討した属は、*Akkermansia*、*Bacteroides*、*Bifidobacterium*、*Lactobacillus*、*Lactococcus*、*Odoribacter* である。

以下のいくつかの観点から腸内細菌の相対存在量に関して考察をする。

① グラム陽性菌とグラム陰性菌の比較

これらの菌をグラム陽性菌と陰性菌で分類すると、グラム陽性菌は *Bifidobacterium*、*Lactobacillus*、*Lactococcus* であり、グラム陰性菌は *Akkermansia*、*Bacteroides*、*Odoribacter* である。グラム陽性菌は外膜がなく、厚いペプチドグリカン層からなる単純な構造の細胞壁をもつ。一方、グラム陰性菌はリポ多糖を含む外膜と薄いペプチドグリカン層の複雑な構造からなる細胞壁をもつ。外膜は薬物の浸透を抑えて菌を保護する機能があるため、グラム陰性菌はグラム陽性菌より抗菌薬に対して抵抗性が高いという特徴がある。MgO も医薬品であるため、腸内細菌に与える影響がグラム陽性菌とグラム陰性菌で異なる可能性があると考えたが、本研究で対象とした腸内細菌の相対存在量に関して、グラム陽性菌とグラム陰性菌の間で異なる特徴を見出すことができなかった。

② 通性嫌気性菌と偏性嫌気性菌の比較

細菌が増殖するためには栄養素が必要である。栄養素として、まずは炭素源が挙

げられる。炭素源としては、まず単糖特にグルコースが利用され、さらには二糖類、多糖類、脂肪酸、アルコールといった有機酸も利用される。次に窒素源であるが、アンモニウム塩、亜硝酸塩、硝酸塩といった無機化合物や、タンパク質、ペプトン、アミノ酸などが利用される。さらには、P、S、Mg、K、Na、Ca、Fe、Mn、Co、Zn、Cu、Moなどの無機塩類も必要である。また、細菌の増殖には栄養素以外にもいくつかの因子が関係している。水分、至適温度、至適 pHに加えて、酸素も重要な因子であり、その存在が増殖に影響するかどうかで、細菌は偏性好気性菌、偏性嫌気性菌、通性嫌気性菌の3種に分類される。本研究で解析した細菌を分類すると、通性嫌気性菌は *Lactobacillus*(または微好気性)と *Lactococcus* であり、偏性嫌気性菌は *Akkermansia*、*Bacteroides*、*Bifidobacterium*、*Odoribacter* である。通性嫌気性菌は、酸素の存在下では好氣的に呼吸してエネルギーを獲得するが、無酸素の状態では嫌氣的な発酵でエネルギーを得る細菌のことである。一方、偏性嫌気性菌は、酸素がない状況下でのみ増殖できる細菌で、嫌氣的な発酵によりエネルギーを獲得する。本研究で対象とした腸内細菌の相対存在量に、通性嫌気性菌間または偏性嫌気性菌間で共通した特徴は見られなかった。

③ *Akkermansia*

2.1 や 2.3 の実験では、MgO の投与により *Akkermansia* の相対存在量が増加することが示された (Figure 11, 25)。また、2.2 や 2.4 の実験では、Inulin 併用時にも MgO 投与により *Akkermansia* が顕著に増加することが示された (Figure 18, 31)。これらの結果から、MgO は Inulin 併用の有無に関わらず、*Akkermansia* の相対存在量を増加させることが示された。ここでは、MgO がなぜ *Akkermansia* の相対存在量に及ぼしたのかについて考察する。

いくつかの先行研究では、*Akkermansia muciniphila* と疾病との関連が報告されている。たとえば、2 型糖尿病患者では健常者に比べて腸内の *Akkermansia muciniphila* が少ないことが報告されている (Zhang *et al.*, 2013)。肥満との関連も知られており、肥満の妊婦や小児で *Akkermansia muciniphila* が減少し (Santacruz *et al.*, 2010; Karlsson *et al.*, 2012)、*Akkermansia muciniphila* の投与により肥満マウスの体重が減少した (Everard *et al.*, 2013)。便秘症や肥満症などに用いる漢方薬である防風通聖散は *Akkermansia muciniphila* の相対存在量を

増加させることにより腸内バリアを改善することが明らかになっている (Fujisaka *et al.*, 2020)。高脂肪食を摂食させた肥満マウスに *Akkermansia muciniphila* を経口投与すると結腸のムチン層が厚くなるとの報告がある (Everard *et al.*, 2013)。しかしながら、Yoshihara らは、PPI として知られるオメプラゾールが dysbiosis を引き起こし、それに伴って *Akkermansia muciniphila* が有意に増加し、腸管のムチン層を有意に薄くすることを報告しており (Yoshihara *et al.*, 2020)、ムチン層に関する研究結果は一致していない。本論文には掲載していないが、第 2 章に記載の実験とは別の実験で申請者も糞便中のムチン濃度を計測した。しかしながら、Inulin 併用時、MgO により糞便中ムチン濃度に有意な変化は見られなかった。先行研究ではムチン層の厚さを計測しているが、申請者の実験の場合は糞便中のムチン濃度を計測したため、変化が見られなかった可能性が考えられる。また、糞便中ムチン濃度を計測した実験では腸内細菌叢の解析を行っていないため、*Akkermansia* の相対存在量との関連も不明である。今後の実験では、*Akkermansia* とムチンの関連をみるために、腸内細菌叢解析のための糞便を採取した個体と同じ個体で、腸管のムチン層の計測を行うべきだと考える。

Akkermansia muciniphila が代謝改善に効果的であるとして注目されている一方、近年は *Akkermansia* の負の側面も報告されている。たとえば、ヒトの関節リウマチに似た症状を自然発症するモデルマウスである K/BxN モデルでは、*Akkermansia muciniphila* の相対存在量が足の腫れに相関しており、*Akkermansia muciniphila* の添加により足の腫れが悪化することが示された (Stoll *et al.*, 2019)。また、結腸直腸がんの患者では *Parvimonas micra*、*Fusobacterium nucleatum*、*Peptostreptococcus stomatis*、*Akkermansia muciniphila* が増加することが明らかになり、結腸直腸がんのバイオマーカーになることが期待されている (Osman *et al.*, 2021)。

以上のことから明らかなように、*Akkermansia* は生体に有益であるとの報告もあれば、疾病の症状増悪に関連しているとの報告もあり、*Akkermansia* の相対存在量の変化が持つ意味は研究ごとによく検討する必要がある。また、肥満女性を対象とした研究では、肥満外科手術であるルーワイ胃バイパス術の施術後、*Akkermansia muciniphila* の相対存在量が増加したが、代謝改善とは関連が見られなかったことが報告されている (Dao *et al.*, 2019)。これらの結果は、*Akkermansia* の増加が必

ずしも生体に有益な意味を持つとは限らないことを示唆している。本研究では Inulin 併用の有無に関わらず、Mg0 により *Akkermansia* の相対存在量が上昇したが、マウスの体重は減少しなかった (Figure 22(a), 28(a))。したがって、本研究での *Akkermansia* の上昇は生体の代謝に有益な作用をもたらすものではないと考えられる。In vitro の大腸モデルを用いた実験では、*Akkermansia muciniphila* は pH が高い場合に相対存在量が増加することが示されていることから (Van Herreweghen *et al.*, 2017)、本研究での *Akkermansia* の相対存在量の増加は、腸内 pH の上昇に伴う dysbiosis に起因するものである可能性が考えられる。

ここからは *Akkermansia* の相対存在量と酢酸濃度、プロピオン酸濃度の関係について考察する。*Akkermansia muciniphila* はムチン分解の過程で酢酸やプロピオン酸を生成することが知られている。実験 2.1~2.4 では *Akkermansia* が増加したため (Figure 11(b), 18(b), 25(b), 31(b))、*Akkermansia* の増加に伴い酢酸濃度やプロピオン酸濃度が増加している可能性があると考えた。

しかし、酢酸やプロピオン酸の増減の傾向は実験ごとに異なっており (Figure 12(c) (d), 19(c) (d), 26(c) (d), 32(c) (d))、酢酸濃度やプロピオン酸濃度と *Akkermansia* の相対存在量の増加の間に一定の傾向を見出すことはできなかった。これらの結果から、酢酸やプロピオン酸産生に対する *Akkermansia* の寄与度は大きくない可能性が示唆された。

④ *Bacteroides*

腸内細菌は食物繊維を発酵し、SCFA を生成する。SCFA は腸内の pH を低下させ (Walker *et al.*, 2005)、生体に有益な菌の増殖に寄与することが知られている。*Bacteroides* は難消化性のフラクトオリゴ糖および単糖を代謝してエネルギー源とし、コハク酸、酢酸、プロピオン酸を産生する (渡部, 2005; Rajilić-Stojanović *et al.*, 2014)。しかし、プレバイオティクスの摂取による SCFA の産生に起因した腸内 pH の低下は、*Bacteroides* の相対存在量を減少させることが報告されている (Davis *et al.*, 2011; Deehan *et al.*, 2017; Sawicki *et al.*, 2017)。また、Le Bastard らのレビューでも、Inulin 摂取により *Bacteroides* の相対存在量が減少したことが示されている (Le Bastard *et al.*, 2020)。これらの報告は、*Bacteroides* の相対存在量に対しては、細菌にとってのエネルギー源となるプレバイオティクスの摂取よ

りも、腸内 pH の低下が大きく影響することを示唆している。Inulin を用いた 2.2 の実験や 2.4 の実験でも、有意な差は認められなかったものの、Inulin 摂食により *Bacteroides* の相対存在量が低下し (Figure 18(c), 31(c))、先行研究と同傾向の結果が得られた。

また、高脂肪食の摂取は Bacteroidetes 門を減少させ、Firmicutes 門、Proteobacteria 門を増加するとの報告がある (Hildebrandt *et al.*, 2009)。本研究において高脂肪食が腸内細菌に与えた影響を検証するため、普通食摂食時に MgO が腸内細菌叢に与える影響を検証した 2.1 の実験と、高脂肪食摂食時に MgO が腸内細菌叢に与える影響を検証した 2.3 の実験のそれぞれの対照群を比較する。2.1 の実験に比べ、2.3 の実験では Bacteroidetes 門に属する *Bacteroides* や *Odoribacter* の相対存在量は低値を示した (Figure 11(c) (g), 25(c) (g))。一方、Firmicutes 門に属する *Lactobacillus* や *Lactococcus* の相対存在量は、2.1 の実験よりも 2.3 の実験の方が高い値を示した (Figure 11(e) (f), 25(e) (f))。これらの結果から、高脂肪食によって腸内細菌の相対存在量が変わることが示唆され、その結果は先行研究と矛盾しないことが示された。

⑤ *Bifidobacterium*

まず、Inulin と *Bifidobacterium* との関係について考察する。Inulin 摂取と糞便中の *Bifidobacterium* の関係については、乳幼児や高齢者でも報告があるが、成人のヒトを対象とした研究が最も多く、成人における Inulin の *Bifidobacterium* 増加効果が複数報告されている (Meyer *et al.*, 2009)。2.2 の実験では、有意な差ではなかったものの、Inulin 摂取により *Bifidobacterium* の相対存在量は増加した (Figure 18(d))。また、2.4 の実験でも、有意な差は認められなかったが、Inulin 摂取により *Bifidobacterium* が微増した (Figure 31(d))。本研究でのこれらの結果は先行研究と矛盾しない。

次に、*Bifidobacterium* をマグネシウムの関係を考察する。2.1 の実験、2.3 の実験では、有意な差は認められなかったものの、*Bifidobacterium* の相対存在量が増加した (Figure 11(d), 25(d))。また、実験 2.1 では、有意な差ではなかったものの、0.125% MgO 群と比較して 0.25% MgO 群で *Bifidobacterium* の相対存在量は高値であり (Figure 11(d))、MgO が用量依存的に *Bifidobacterium* の相対存在量を増加させ

る可能性が示された。Pachikian らは、Mg の欠乏が腸内の *Bifidobacteria* の濃度を調節していることを明らかにした (Pachikian *et al.*, 2009)。本研究ではマグネシウムが含まれる餌に追加で MgO を投与し、腸内細菌叢への影響を検証しており、先に述べた Pachikian らの研究では、マグネシウム欠乏時に *Bifidobacteria* にどのような影響を与えるかを検証しているため、直接の比較はできない。しかし、マグネシウムが腸内細菌に影響するという点において、本研究は Pachikian らの研究結果と矛盾がないと言える。また、ラットを対象とした研究では、マグネシウムが欠乏している場合とそうでない場合でマグネシウムが腸内細菌叢に与える影響は異なることが報告されていることから (García-Legorreta *et al.*, 2020)、医薬品としての MgO が腸内細菌に与える影響には、食餌の中のマグネシウムが不足しているか否かも関係する可能性があると考えられる。

⑥ *Lactobacillus*

Lactobacillus plantarum が検出されないマウスに、*Lactobacillus plantarum* No.14 を投与し、Inulin を加えた食餌を 2 日間または 28 日間与えた場合、両期間ともに、コントロール群に比べ糞便中の *Lactobacillus plantarum* 数が増加したことが報告されている (Takemura *et al.*, 2010)。この先行研究の結果は、2.4 の実験で Inulin 摂取により *Lactobacillus* の相対存在量が増加した本研究の結果と一致している (Figure 31(e))。

一方、高脂肪食で肥満を引き起こしたラットと正常ラットに、不溶性食物繊維である高大豆繊維食を与えた群と水溶性食物繊維である高フルクトオリゴ糖食を与えた群で 0 週目、4 週目、8 週目の OTU 存在量を比較している研究もある。肥満ラットでは高大豆線維食、高フルクトオリゴ糖食ともに *Lactobacillus* の OTU 存在量を 8 週目までに大きく減少させており (Li *et al.*, 2015)、先に述べた 2.4 の実験結果と異なっている。Takemura らの研究、Li らの研究、申請者の研究それぞれの研究結果を比較すると、それぞれ混餌濃度が異なっていることが分かった。厚生労働省による食物繊維の摂取基準 (2015 年) で 1 日あたりの目標量とされている量は、18~69 歳男性で 20g 以上、女性で 18g 以上である (厚生労働省 <https://www.e-healthnet.mhlw.go.jp/information/food/e-05-001.html>)。また、WGO ガイドラインでは便秘の場合は 1 日 25g 以上の摂取を推奨している (World Gastroenterology

Organisation <https://www.worldgastroenterology.org/guidelines/global-guidelines/constipation>)。厚生労働省による国民健康・栄養調査報告では日本人1日食事量(g)の平均値が成人で約1,700~2,100g程度であるとされている(厚生労働省 https://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kenkou_eiyouchousa.html)。本研究ではInulin濃度を決定するにあたり、これらのデータや、先行研究で用いられることの多いInulin濃度を考慮した。本研究の実験で使用したInulinの混餌濃度は2.5%~5.0%であり、Takemuraらの研究でも5% Inulinを使用しているが、Liらの研究では約14%のフルクトオリゴ糖が使用されている。食物繊維の上限摂取量は設定されていないが、過剰に摂取することはかえって便秘の増悪につながるという報告(Müller-Lissner *et al.*, 2005)もあることから、Liらが用いた約14%で8週間の結果を単純に比較することは難しい。

また、Inulin型フルクタン発酵特性は重合度によることが知られている(Kleessen *et al.*, 2001; Pompei *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2017)、本研究で使用したInulinの平均重合度は16で、Takemuraらの使用したInulinの平均重合度と同じであった。

さらに、*Lactobacillus*は種によってInulin型フルクタンを分解して菌体内へ取り込むメカニズムが異なることも示唆されている(Tsujikawa *et al.*, 2013; Takagi *et al.*, 2014)。*Lactobacillus paracasei*は細胞外で多重合分子を分解してから菌体内に取り込むが、*Lactobacillus delbrueckii*は多重合分子を直接菌体内に取り込んでから分解する。Inulinは*Lactobacillus paracasei*による細胞外分解より、*Lactobacillus delbrueckii*による細胞内分解を促進することが報告されている(Takagi *et al.*, 2014)。今後の研究では種レベルの変化にも焦点を当て、より詳細な腸内細菌叢解析を行うことで、*Lactobacillus*が種によってInulin分解に異なる特性を持つことを考慮した分析ができると考える。

⑦ *Lactococcus*

肥満マウスでは、Bacteroidetes門の相対存在量が低下するとFirmicutes門の相対存在量が増加することが知られている(Ley *et al.*, 2005)。本研究で注目した6種類の細菌では、*Bacteroides*がBacteroidetes門に属し、*Lactobacillus*や*Lactococcus*がFirmicutes門に属している。普通食を用いた2.1や2.2の実験での

対照群と比較して、高脂肪食を用いた 2.3 や 2.4 の実験での対象群では、*Bacteroidetes* に属す *Bacteroides* の相対存在量は低値を示し、Firmicutes 門に属す *Lactococcus* の相対存在量は高値を示した (Figure 11(c) (f), 18(c) (f), 25(c) (f), 31(c) (f))。これらの結果は先行研究と矛盾しない。

⑧ *Odoribacter*

高脂肪食を摂取したマウスにおいて、*Odoribacter* は sulfobacin B と呼ばれる sulfonolipids を産生する (Walker *et al.*, 2017)。Sulfobacin B はマウスを用いた実験で抗炎症作用を示すことが報告されている (Maeda *et al.*, 2010)。また、*in vitro* の実験では、*Odoribacter* が腸上皮の抗炎症作用を持つことが示されている (Hiippala *et al.*, 2020)。さらに、抗生物質により引き起こされた dysbiosis で、*Odoribacter* の相対存在量が減少するとされており (Yuan *et al.*, 2018)、*Odoribacter* は腸内細菌叢の恒常性維持や炎症抑制に役立っている可能性が示されている。本研究では、有意な差は見られなかったものの、MgO 投与により *Odoribacter* の相対存在量が低下することが示された (Figure 18(g), 25(g), 31(g))。ただし、2.1 の実験では、有意な差は見られなかったものの、0.125% MgO 群の *Odoribacter* の相対存在量は対照群よりも高値を示した。先行研究でもマグネシウムが腸内細菌叢に与える影響がマグネシウムの濃度によってことなることが示唆されていることから (Crowley *et al.*, 2018; García-Legorreta *et al.*, 2020)、本実験でも 0.125% MgO 群と 0.25% MgO 群の結果に差が生じたと考えられる。

ヒトを対象にした研究では、食物繊維を摂取している場合に *Odoribacter* の相対存在量が低下することが示されている (Lin *et al.*, 2018)。2.4 の実験では、対照群 (HFD 群) と比較して、Inulin 群では *Odoribacter* の相対存在量が低値を示しており、先行研究と一致している。*Odoribacter* の相対存在量が減少した理由として、Inulin 摂取により、*Akkermansia* や *Lactobacillus* など別の細菌が増加し、相対的に *Odoribacter* が減少した可能性が考えられる。

このように、先行研究や本研究により、食物繊維で抗炎症に関与する *Odoribacter* の相対存在量が低下することが示されている一方で、Inulin が腸内細菌叢を調節し、抗炎症作用をもたらすことが報告されている (Guo *et al.*, 2021)。これらの結果は、*Odoribacter* の相対存在量の増減に関わらず、Inulin が抗炎症効果を発揮すること

を示唆している。これらの結果から、*Odoribacter* が抗炎症作用を発揮するためには、ある一定以上の相対存在量が必要と推測される。それを確かめるためには、プロバイオティクスとして *Odoribacter* を投与し、炎症マーカーへの影響を検証する必要があると考えられる。*Bifidobacterium pseudocatenulatum* LI09 を前投与した急性肝障害ラットでは、MIP-1 α /MCP-1 と *Odoribacter* に負の相関が認められ、肝障害の予防もしくは補助的療法に用いるプロバイオティクスとして *Odoribacter* が有用である可能性が示された (Fang *et al.*, 2017)。このような先行研究から、*Odoribacter* は新たなプロバイオティクスとして、予防または治療補助の役割を担うことができる可能性があり、プロバイオティクスとして *Odoribacter* を投与する実験には臨床的にも意義深いと考えられる。

最後に、普通食と高脂肪食で *Odoribacter* の相対存在量に変化があるのかについて考察する。糖尿病でない日本人男性を対象とした研究では、欧米化した生活が腸内細菌叢を変化させ、インスリン抵抗性を誘発することが明らかになったが、その際、*Odoribacter* の相対存在量は有意に低下していた (Yamashita *et al.*, 2019)。実験 2.1 の対照群 (AIN93M 群) と実験 2.3 の対照群 (HFD 群) の *Odoribacter* の相対存在量を比較すると、実験 2.3 の対照群 (HFD 群) の方が低値を示しており、先行研究とも矛盾がないと考えられる。

(6) 盲腸内 SCFA

Inulin 併用時、MgO の投与により盲腸内 SCFA 濃度が低下した理由として、以下の 3 つの可能性を考察した。

● 仮説 1: Inulin に Mg²⁺ が吸着し、腸内細菌による Inulin 利用率が低下した

食物繊維は、胆汁酸などの有機化合物やミネラルを吸着する性質を持っている。海藻に含まれる食物繊維の一種であるアルギン酸を用いた研究では、アルギン酸塩がイオン交換樹脂のような役割を果たし、Na⁺ と K⁺ の交換や Na⁺ と Ca²⁺ の交換を行うことが示された (辻ほか, 1988)。そして、アルギン酸塩を摂取したラットの血圧が低下することも示された (辻ほか, 1988)。また、カリメート、アーガメイト、ケイキサレートといった高カリウム血症改善イオン交換樹脂製剤は MgO と併用すると、MgO の Mg²⁺ と高カリウム血症改善イオン交換樹脂製剤の陽イオンとが交換されてしまい、作用が減弱することが知られている。

これらのことから、水溶性食物繊維である Inulin が Mg^{2+} を吸着する可能性があるのではないかと考えた。 Mg^{2+} が吸着した Inulin は腸内細菌に利用されにくくなるとの仮説を立てると、 MgO 投与により腸内細菌が利用できる Inulin が減少し、それに伴って SCFA の生成も抑制される可能性が考えられる。しかし、先に述べた論文では、食物繊維の Na^+ 吸着能はカルボキシル基を持つ酸性多糖類で強いことが示され、Inulin はカルボキシル基を持たないことから、 Na^+ 吸着能が高い食物繊維とは言えない。また、金属イオンを吸着した後の食物繊維が腸内細菌により発酵されにくくなるかどうかを明らかにした文献がないことから、Inulin が Mg^{2+} イオンを吸着し、腸内細菌の SCFA 産生量を低下させているという仮説は現在の段階では考察の域を出ない。この仮説が正しいか否かを明らかにする方法の一つとして、盲腸内容物重量の計測が考えられる。先行研究では、対照群と比較して、抗生物質処理を行ったマウスの盲腸が肥大していることが示された (Tahara *et al.*, 2018)。これは、抗生物質処理により腸内細菌叢が除去されたことで、食物繊維が SCFA へと変換されずに盲腸内容物中に残存し、盲腸内容物の容積が増大させたことが原因と考えられる。第 2 章での実験条件では、Inulin 群と Inulin + MgO 群の間の盲腸内容物の水分含有率に有意な差が見られなかったことから、盲腸内容物の重量の差は、水分ではなく、残存食物繊維量の違いからくるものであると予測できる。

- 仮説 2: Mg^{2+} が SCFA 産生に関与する酵素を阻害し、SCFA 濃度が低下した

Akkermansia muciniphila 由来の β ガラクトシダーゼは、EDTA や Ca^{2+} や Cu^{2+} などの金属イオンでは活性阻害されないが、 Mg^{2+} により活性が抑制されることが報告されている (Guo *et al.*, 2018)。Inulin の分解酵素であるイヌリナーゼは、 Ca^{2+} 、 Fe^{3+} などによって活性化されるが、 Mg^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Ag^+ では活性が阻害されることが報告されている (Gong *et al.*, 2008; Sheng *et al.*, 2008)。これらの先行研究より、 MgO 由来の Mg^{2+} が SCFA 産生に関与する酵素を阻害し、盲腸内の SCFA 濃度を低下させている可能性があると考えた。

- 仮説 3: MgO 由来の dysbiosis に伴い、SCFA 産生が抑制された

先に述べたように、食餌性の高用量マグネシウムはラットの腸内細菌叢の β 多様性を有意に変化させ、dysbiosis を引き起こすことが報告されている (García-

Legorreta *et al.*, 2020)。また、腸内細菌叢のバランス維持には腸内 pH が深く関与しており (Deehan *et al.*, 2017)、dysbiosis の状況下では、糞便 pH はアルカリ性に傾いていることも知られている (水野ほか, 2018)。本研究でも MgO 投与により盲腸内 pH が上昇し、腸内細菌叢の β 多様性が有意に変化した (Figure 10, 12, 17, 19, 24, 26, 30, 32)。これらのことから、MgO の投与により腸内細菌叢の dysbiosis が起こった可能性が考えられ、dysbiosis に伴って SCFA 産生菌が減少し、盲腸内の SCFA 濃度が減少した可能性が考えられる。しかし、今回着目した 6 種類の腸内細菌に関しては、腸内細菌の相対存在量と SCFA 濃度の変動に繋がりは見いだせなかった。したがって、本論文で示した結果のみでは、MgO 由来の dysbiosis と SCFA 産生に関連性があるとは言えない。

(7) 糞便中の IgA 濃度について

2.1 の実験では、普通食 (AIN93M) 摂食時、有意な差は見られなかったものの、MgO は糞便中 IgA 濃度を低下させた (Figure 13)。2.2 の実験では有意な差は認められなかったものの、糞便中の IgA 濃度は Inulin 摂食により上昇した (Figure 20)。一方、有意な差ではなかったものの Inulin 群と比較して、Inulin + 0.125% MgO 群、Inulin + 0.25% MgO 群の IgA 濃度は低値を示した (Figure 20)。これらの結果は、Inulin 併用の有無に関わらず、MgO は糞便中 IgA 濃度を低下させる可能性があることを示唆している。

糞便中 IgA 濃度の低下と盲腸内 SCFA 濃度の関係について考察する。酪酸やプロピオン酸は IgA 濃度を増加させることが知られており、プロピオン酸を飲水投与されたマウスの血中 IgA 濃度が増加したことが報告されている (Kim *et al.*, 2016)。先に述べたように、2.1、2.2 の実験では、Inulin 併用の有無に関わらず MgO が糞便中の IgA 濃度を低下させる可能性が示唆された。しかし、2.1 の実験では、対照群と比較して、0.125% MgO 群、0.25% MgO 群のプロピオン酸濃度は低下しなかった (Figure 12(d))。さらに、2.2 の実験でも、Inulin 群と比較して MgO 添加群のプロピオン酸濃度に有意な差は認められなかった (Figure 19(d))。これらのことから、本研究では、糞便中の IgA 濃度と盲腸内プロピオン酸濃度の間に明らかな関連は見られなかった。

2.6 小括

- 餌混投与の場合、MgO は餌の種類や Inulin の併用の有無に関わらず、盲腸内容物の水分含有率に影響を与えなかった。
- MgO は Inulin の併用の有無に関わらず盲腸内 pH を上昇させた。その要因として、MgO が消化管内で重炭酸塩となることや、MgO の制酸作用による胃内 pH の上昇に伴って腸内にも pH の上昇をもたらしたことが考えられる。
- MgO により腸内 pH や腸内浸透圧が変化し、dysbiosis が引き起こされた可能性がある。
- 餌混投与の場合、MgO によって α 多様性が顕著に変化することはなかった。
- HFD によって腸内細菌の相対存在量に変化した。
- *Odoribacter* は新たなプロバイオティクスになる可能性があるが、MgO により *Odoribacter* の相対存在量は低下した。
- Inulin 併用の有無に関わらず、MgO により *Akkermansia* の相対存在量が増加した。
- MgO は Inulin で上昇した盲腸内 SCFA 濃度を有意に低下させた。その原因として、次のいくつかの仮説を立てた。
 - ① Mg^{2+} による酵素阻害
 - ② Mg^{2+} の Inulin への吸着
 - ③ Mg^{2+} 誘発性の dysbiosis
- Inulin 併用の有無に関わらず、MgO は糞便中の IgA 濃度を低下させる可能性がある。

本章の結果を Table 9 にまとめた。

Table 9 第2章の結果のまとめ

食餌	AIN93M	HFD	AIN93M	HFD	AIN93M	HFD
比較群	Control vs 0.25% MgO	Control vs 0.25% MgO	Control vs 2.5% Inulin	Control vs 2.5% Inulin	2.5% Inulin vs 2.5% Inulin + 0.25% MgO	2.5% Inulin vs 2.5% Inulin + 0.25% MgO
体重	NS	NS	NS	NS	NS	NS
摂食量	NS	NS	NS	NS	NS	NS
盲腸内容物水分含有量	NS	NS	NS	NS	NS	NS
α 多様性	NS	NS	NS	NS	NS	NS
β 多様性	p=0.036	p=0.001	p=0.006	p=0.003	p=0.043	p=0.007
<i>Akkermansia</i>	↑ (p<0.01)	↑ (p<0.05)	↑ (p=0.0859)	↑ (NS)	↑ (NS)	↑ (p<0.05)
<i>Bacteroides</i>	↓ (NS)	↑ (p<0.01)	↓ (NS)	↓ (NS)	↓ (NS)	NS
<i>Bifidobacterium</i>	↑ (NS)	↑ (NS)	↑ (NS)	↑ (NS)	↓ (NS)	↑ (NS)
<i>Lactobacillus</i>	↓ (NS)	↓ (NS)	↓ (NS)	↑ (NS)	NS	↓ (NS)
<i>Lactococcus</i>	↑ (NS)	↓ (NS)	↓ (NS)	↓ (p<0.05)	↑ (NS)	↑ (NS)
<i>Odoribacter</i>	↓ (NS)	↓ (NS)	NS	↓ (NS)	↓ (NS)	↓ (NS)
盲腸内pH	↑ (p<0.01)	↑ (p<0.01)	↓ (NS)	↓ (p<0.01)	↑ (NS)	↑ (p<0.001)
乳酸	↓ (NS)	↓ (p<0.05)	↑ (p<0.01)	↑ (p<0.05)	↓ (p<0.01)	↓ (NS)
酢酸	NS	↑ (NS)	↑ (NS)	↑ (NS)	↓ (p=0.0715)	↓ (p<0.0001)
プロピオン酸	↑ (NS)	↑ (p<0.01)	↑ (p<0.05)	↑ (p<0.05)	↓ (NS)	↓ (p<0.05)
酪酸	↑ (NS)	↑ (NS)	↑ (p<0.01)	↑ (p=0.0725)	↓ (NS)	↓ (p<0.01)
乳酸+総SCFA	↑ (NS)	↑ (NS)	↑ (p<0.05)	↑ (p<0.01)	↓ (NS)	↓ (p<0.0001)
糞便中IgA	↓ (NS)	—	↑ (NS)	—	↓ (NS)	—

NS: 有意差なし、↑, ↓: 有意差あり、AIN93M: 普通食、HFD: 高脂肪食

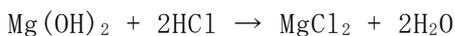
第3章 MgO 以外の下剤・制酸剤が腸内環境に与える影響

3.1 マグネシウム塩が盲腸内乳酸濃度および酢酸濃度に与える影響

3.1.1 序論

第2章では、Inulin 併用時、MgO が盲腸内の SCFA 濃度を低下させることが示された (Figure 19, 32)。得られた結果は MgO 特異的なものであるのか、MgO のどのような特徴が起因して SCFA 濃度低下作用を引き起こしたのかを検証するため、MgO 以外の下剤、制酸剤が腸内環境に及ぼす影響を検証した。

まず、3.1 では、Mg²⁺を含有する制酸剤、下剤が盲腸内の乳酸濃度、酢酸濃度に及ぼす影響を調べた。Mg²⁺を含有する制酸剤、下剤として、クエン酸マグネシウム、水酸化マグネシウム、炭酸マグネシウムなどが挙げられる。クエン酸マグネシウムは腸内容積を増大させ、大腸検査前処置における腸管内容物の排除や、腹部外科手術時における前処置用下剤として用いられる。水酸化マグネシウムは胃内で以下のように胃酸と反応し、塩化マグネシウムを生成する。



塩化マグネシウム生成後の体内での変化は、MgO と同様であり、作用も MgO と同じく制酸作用、緩下作用を持つ。炭酸マグネシウムも制酸薬、便秘薬としての機能を持ち、胃酸とは以下のように反応する。



しかし、炭酸マグネシウムは制酸薬、便秘薬としての機能が弱く、制酸薬としての効力は MgO の半分程である。また、胃酸を中和する際に炭酸ガスを発生する点も MgO と異なる点である。

本実験では、Mg²⁺を含有する制酸剤、下剤として、Mg₃(C₆H₅O₇)₂・9H₂O、Mg(OH)₂、MgCO₃を用いた。

3.1.2 実験材料および方法

(1) 動物

『2.1.2(1)動物』の項に記載の通りとした。

(2) 実験デザイン

3.1の実験では、これまでの実験で見られたMgOのSCFA濃度低下作用が物質特異的なものであるかを検証するため、Mg²⁺含有するMgO以外の制酸剤、下剤が盲腸内の乳酸濃度、酢酸濃度に及ぼす影響を調べた。

群は、対照群、Inulin群、Inulin + Magnesium citrate群、Inulin + Magnesium hydroxide群、Inulin + Magnesium carbonate群の5群とした。餌は高脂肪食を用い(Table 8)、総重量に対してInulinは5%になるように混餌した。Mg²⁺を含有する制酸薬・便秘薬は、それぞれの化合物のMg²⁺が、MgOを餌に0.25%混ぜた際のMg²⁺と同モル数になるよう混餌した。尚、対照群はTable 8の組成のHFDを用いた。実験期間中、マウスは自由摂食、自由飲水の条件下で飼育し、実験開始から11日目のZT4に体重の測定と盲腸内容物の採取を行った(Figure 33)。

(3) 盲腸内乳酸濃度および酢酸濃度の測定

『2.1.2(4)盲腸内SCFA濃度および乳酸濃度の測定』の項に記載の通りとした。

(4) 統計分析

全ての結果は平均±標準誤差で示され、GraphPad Prism(version8.4.3, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)により統計解析を行った。まず、正規性の有無をKolmogorov-Smirnov testにより判定した。次に、Bartlett's testにより等分散か否かを判定した。これらの分析により正規性があり、等分散と判定された場合、One way ANOVA test、Tukey post-hoc testを行った。正規性がない、もしくは不等分散であった場合には、Kruskal-Wallis test、Dunn's post-hoc testを行った。

3.1.3 結果

3.1.3.1 体重・摂食量

サンプリング時に全マウスの体重を計測し、群ごとの平均を算出した。また、マウスの摂食量を記録し、一日あたりの平均摂食量を算出した。尚、固めた餌を極端に崩して摂食したマウスがいたため、摂食量のデータは正確な摂食量を計測できたマウス (n = 4-6) のみで算出している。体重、摂食量ともに、群間で有意な差は認められなかった (Figure 34)。

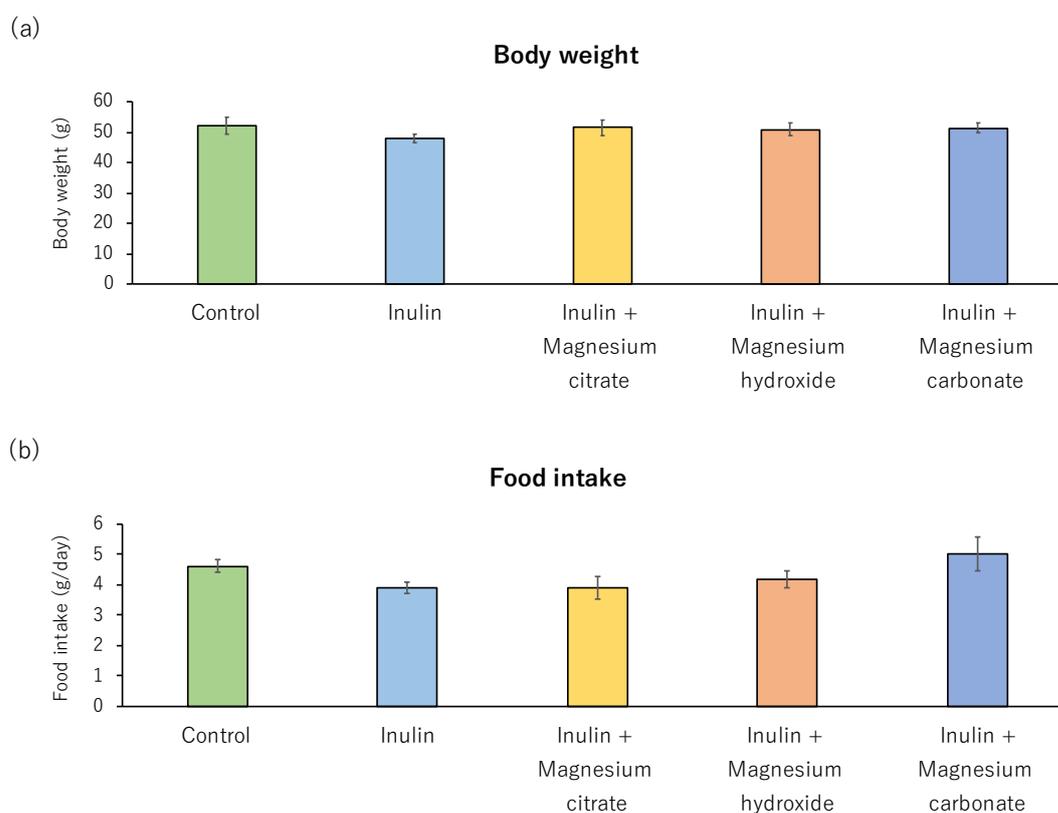


Figure 34 Mg²⁺含有する制酸薬・便秘薬が体重と摂食量に及ぼす影響

(a)サンプリング時の体重 (b)一日あたりの摂食量 Inulinは餌の総重量の5%となるように混餌した。Mg²⁺含有する制酸薬・便秘薬は、それぞれの化合物のMg²⁺が、MgOを餌に0.25%混ぜた際のMg²⁺と同モル数になるよう混餌した。データは平均±標準誤差で表した(n = 4-6)。

3.1.3.2 盲腸内容物の水分含有率

盲腸内容物の水分含有率は全ての群において有意な差が検出されなかった (Figure 35)。

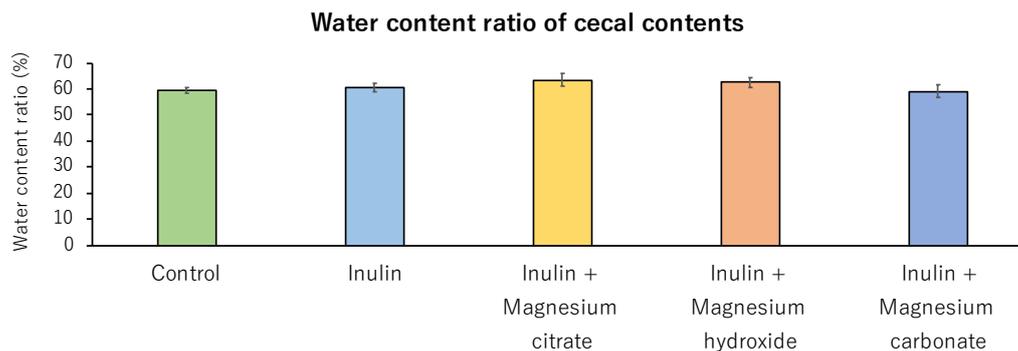


Figure 35 高脂肪食摂食時、 Mg^{2+} を含有する制酸薬・便秘薬が盲腸内容物の水分含有率に及ぼす影響 Inulinは餌の総重量の5%となるように混餌した。 Mg^{2+} を含有する制酸薬・便秘薬は、それぞれの化合物の Mg^{2+} が、 MgO を餌に0.25%混ぜた際の Mg^{2+} と同モル数になるよう混餌した。データは平均±標準誤差で表した(n = 5-6)。

3.1.3.3 盲腸内乳酸濃度および酢酸濃度

対照群と比較して、Inulin群では乳酸濃度の上昇傾向が見られた (Figure 36(a))。一方、Inulin群と比較して、Inulin + Magnesium hydroxide群、Inulin + Magnesium carbonate群では乳酸濃度が低下傾向だった (Figure 36(a))。酢酸濃度は、Inulin群と比較して、Inulin + Magnesium hydroxide群で有意に低下した (Figure 36(b))。

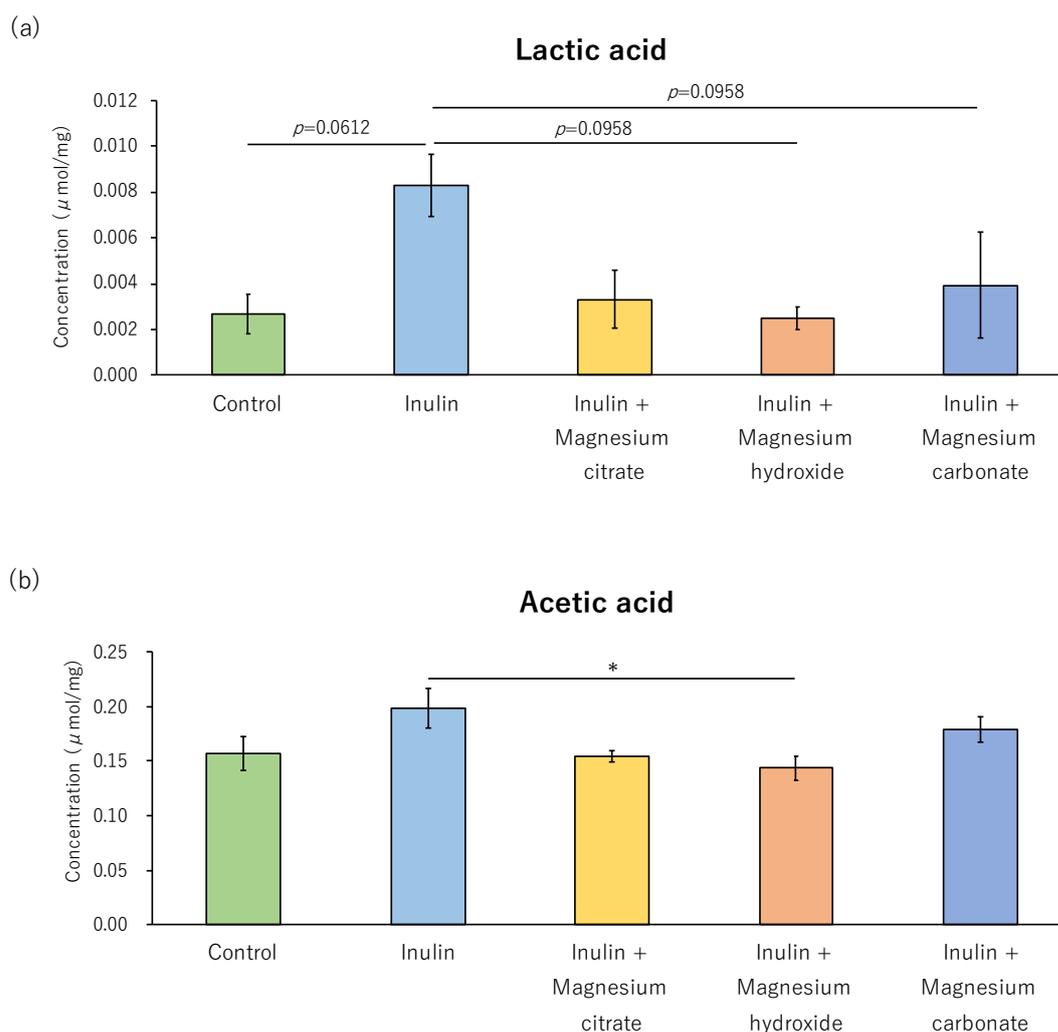
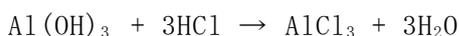


Figure 36 高脂肪食摂食時、 Mg^{2+} 含有する制酸薬・便秘薬が盲腸内乳酸濃度および酢酸濃度に及ぼす影響 (a)乳酸濃度 (b)酢酸濃度 Inulinは餌の総重量の5%となるように混餌した。 Mg^{2+} 含有する制酸薬・便秘薬は、それぞれの化合物の Mg^{2+} が、 MgO を餌に0.25%混ぜた際の Mg^{2+} と同モル数になるよう混餌した。乳酸および酢酸濃度は盲腸内容物の乾燥重量あたりの濃度を算出した。データは平均±標準誤差で表した($n = 5-6$)。* $p < 0.05$, evaluated using the one-way ANOVA with Sidak's multiple comparisons test. Data of lactic acid concentration is evaluated using the the Kruskal-Wallis test with Dunn's post hoc test.

3.2. 水酸化アルミニウムが腸内環境に与える影響

3.2.1 序論

MgO は便秘薬としてだけでなく、胃酸を中和する制酸薬としても用いられる。制酸薬は吸収性制酸薬と非吸収性制酸薬に分類される。炭酸水素ナトリウムのような吸収性制酸薬は胃酸を中和した後、体内に吸収される。一方、MgO、乾燥水酸化アルミニウムゲルなどは消化管から吸収されにくく、非吸収性制酸薬に分類される。乾燥水酸化アルミニウムゲルは以下のように胃酸を中和する。



また、乾燥水酸化アルミニウムゲルは胃壁に被膜を作り、保護作用を示すことも知られている。

先行研究では、胃のプロトンポンプを阻害するラベプラゾール、ボノプラザンが胃酸の抑制作用を介して腸内細菌叢の構成や細菌の相対存在量を変化させたことが報告されている (Nadatani *et al.*, 2019)。これは、胃内の pH の変化が腸内細菌叢に影響を及ぼすことを示唆している。また、本研究の 3.1 の実験では、Mg(OH)₂ 投与によって盲腸内酢酸濃度が低下し (Figure 36 (b))、酢酸濃度の低下は Mg(OH)₂ が持つ制酸作用に由来する可能性があると考えられた。そこで、胃内の pH の変化に伴う腸内細菌叢の変化は、腸内細菌の代謝産物である SCFA の産生に影響を及ぼすのではないかという仮説を立て、MgO と同じく非吸収性制酸薬である Al(OH)₃ が盲腸内の SCFA および乳酸に及ぼす影響について調べた。

また、第 2 章では、普通食摂食時、MgO 投与による盲腸内容物中酪酸濃度と糞便中の IgA 濃度に関連が見られるかを検証した。その結果、Inulin 併用時、MgO により盲腸内容物中の酪酸濃度が低下し、有意な差は認められなかったものの、糞便中 IgA 濃度も低下した。一方、MgO の単独投与時は酪酸濃度と糞便中 IgA 濃度に関連は見られなかった。HFD 摂食による腸内環境攪乱時、MgO の投与が糞便中 IgA 濃度を与える影響を調べたが、結果が安定しなかったため、本稿では割愛する。しかし、Inulin 併用時、Al(OH)₃ が糞便中の IgA 濃度に及ぼす影響については、有意な差は検出されなかったものの、一定の傾向を見出すことが出来たため、3.2.3 で結果を記載する。

3.2.2 実験材料および方法

(1) 動物

『2.3.2(1)動物』の項に記載の通りとした。

(2) 実験デザイン

3.2の実験では、MgOと同じく非吸収性制酸薬である $\text{Al}(\text{OH})_3$ が盲腸内SCFA濃度および乳酸濃度に及ぼす影響について調べた。マウスは、対照群、Inulin群、Inulin + $\text{Al}(\text{OH})_3$ 群の3群に分けた。餌は高脂肪食を用い(Table 8)、総重量に対してInulinは5%になるように混餌した。 $\text{Al}(\text{OH})_3$ の濃度に関しては、MgOを餌に0.25%混ぜた際の Mg^{2+} と $\text{Al}(\text{OH})_3$ の Al^{3+} が同モル数になるように計算し、混餌した。尚、対照群はTable 8の組成のHFDを用いた。実験期間中、マウスは自由摂食、自由飲水の条件下で飼育し、実験開始から11日目のZT4に体重および盲腸内pHの測定を行い、盲腸内容物を採取した(Figure 37)。

(3) 盲腸内 pH の測定

『2.1.2(3)盲腸内 pH の測定』の項に記載の通りとした。

(4) 盲腸内乳酸濃度および SCFA 濃度の測定

研究室で実験系が確立していたことから、本研究では、主に GC-FID を用いて盲腸内乳酸濃度および SCFA 濃度を測定している。しかし、国際情勢の変化で一時期、GC 分析のキャリアガスであるヘリウム供給量が減少したことから、3.2 の実験、3.3 の実験では、GC-FID よりも少量のヘリウムで分析可能なガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS) を用いて実験を行った。まず、1.5 ml チューブにマウスの盲腸内容物を 50 mg 測りとり、ジエチルエーテルとクロロホルムを 2:1 の割合で混和したものを 600 μ l ずつ添加した。さらに硫酸 50 μ l を加え、ボルテックスでよく攪拌した。室温、14000 rpm で 30 秒間遠心分離を行い、新たに用意した 1.5 ml チューブに上清 300 μ l を移した。誘導体化試薬として TMSI-H を 100 μ l 添加し、ボルテックスでよく攪拌した。ヒートブロックを用いて 30 分間、60°C で保温した後、10 分間氷上で静置した。室温、14000 rpm で 30 秒間遠心分離をし、上清をバイアル瓶にセットしたキャピラリーカラム [InertCap Pure-WAX (30 m \times 0.25 mm, df = 0.5 μ m); ジーエルサイエンス, 東京, 日本] に注入した。これをサンプルとし、GC-MS で分析した。上清を取り除いた後の盲腸内容物は十分に乾燥させ、乾燥重量を計測した。盲腸内 SCFA 濃度は μ mol/mg dry cecal weight で算出した。

(5) 統計分析

全ての結果は平均 \pm 標準誤差で示され、GraphPad Prism(version8.4.3, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)により統計解析を行った。まず、正規性の有無を Kolmogorov-Smirnov test により判定した。次に、Bartlett' s test により等分散か否かを判定した。これらの分析により正規性があり、等分散と判定された場合、One way ANOVA test、Tukey post-hoc test を行った。正規性がない、もしくは不等分散であった場合には、Kruskal-Wallis test、Dunn' s post-hoc test を行った。

3.2.3 結果

3.2.3.1 体重・摂食量

サンプリング時に全マウスの体重を計測し、群ごとの平均をグラフに示した。また、マウスの摂食量を測定し、一日あたりの平均摂食量を算出した。体重、摂食量ともに、群間で有意な差は認められなかった (Figure 38)。

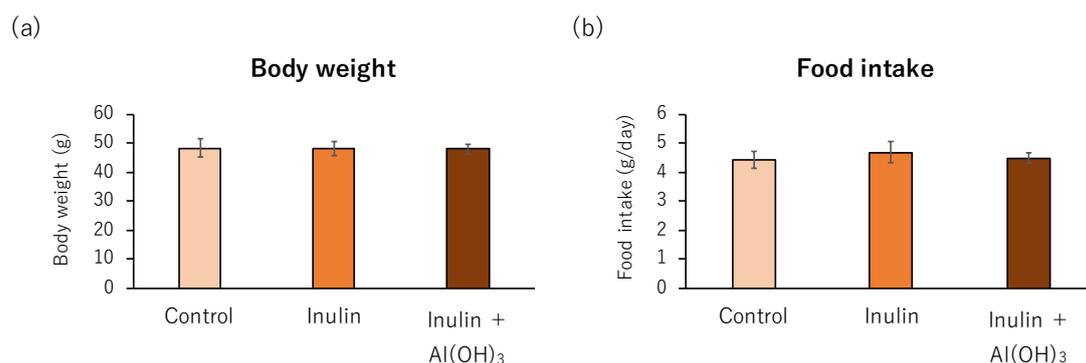


Figure 38 高脂肪食摂食時、Al(OH)₃とInulinの併用が体重と摂食量に及ぼす影響

(a) サンプリング時の体重 (b) 一日あたりの摂食量

Inulinは餌の総重量の5%となるように混餌した。Al(OH)₃は、Al³⁺がMgOを餌に0.25%混ぜた際のMg²⁺と同モル数になるよう混餌した。データは平均±標準誤差で表した(n = 5-6)。

3.2.3.2 盲腸内容物の水分含有率

対照群、Inulin群、Inulin + Al(OH)₃群の盲腸内容物水分含有率を比較したが、3群間に有意な差は見られなかった (Figure 39)。

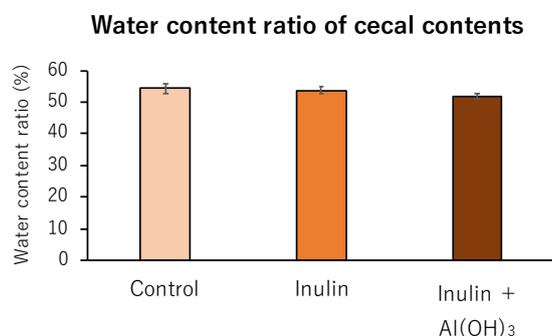


Figure 39 高脂肪食摂食時、Al(OH)₃とInulinの併用が盲腸内容物の水分含有率に及ぼす影響

Inulinは餌の総重量の5%となるように混餌した。Al(OH)₃は、Al³⁺がMgOを餌に0.25%混ぜた際のMg²⁺と同モル数になるよう混餌した。データは平均±標準誤差で表した(n = 5-6)。

3.2.3.3 盲腸内 pH

対照群と比較して、Inulin 群では盲腸内 pH が有意に低下した (Figure 40(a))。有意な差は検出されなかったものの、Inulin 群と比較して、Inulin + Al(OH)₃ 群では、盲腸内 pH が上昇した (Figure 40(a))。

3.3.3.4 盲腸内乳酸濃度および SCFA 濃度

乳酸濃度は群間で有意な差が認められなかった (Figure 40(b))。酢酸濃度、プロピオン酸濃度、酪酸濃度は Inulin 群と比較し、Inulin + Al(OH)₃ 群で有意に低下した (Figure 40(c)(d)(e))。乳酸濃度と総 SCFA 濃度の総計についても、Inulin 群と比較し、Inulin + Al(OH)₃ 群で有意に低下した (Figure 40(f))。これらの結果から、Al(OH)₃ は Inulin により上昇した SCFA 濃度を顕著に低下させることが示された。

3.3.3.5 糞便中の IgA 濃度

糞便中の IgA 濃度は対照群と比較して、Inulin 群で高濃度を示したが有意な差は認められなかった。Inulin + Al(OH)₃ 群の IgA 濃度は、対照群と比較して有意に高かった (Figure 41)。

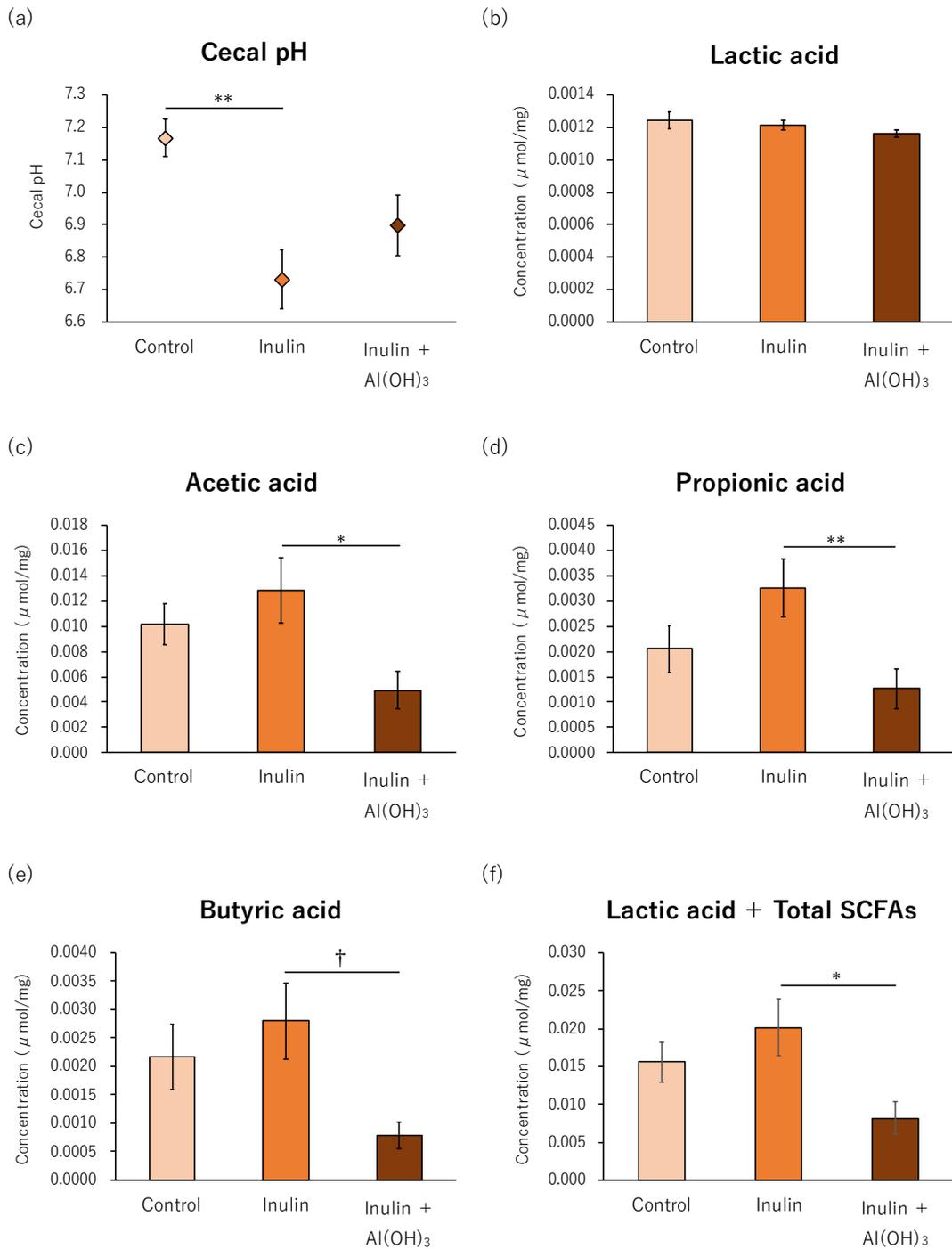


Figure 40 高脂肪食摂食時、Al(OH)₃とInulinの併用が盲腸内pH、盲腸内乳酸濃度およびSCFA濃度に及ぼす影響

(a)盲腸内pH (b)乳酸濃度 (c)酢酸濃度 (d)プロピオン酸濃 (e)酪酸濃度 (f)乳酸 + 総SCFA濃度(総SCFA濃度は酢酸濃度、プロピオン酸濃度、酪酸濃度の総計) Inulinは餌の総重量の5%となるように混餌し、Al(OH)₃は、Al³⁺がMgOを餌に0.25%混ぜた際のMg²⁺と同モル数になるよう混餌した。乳酸およびSCFAは盲腸内容物の乾燥重量あたりの濃度を算出した。データは平均±標準誤差で表した(n = 5-6)。**p* < 0.05 and ***p* < 0.01, evaluated using the one-way ANOVA with Tukey's post hoc test. †*p* < 0.05, evaluated using the Kruskal-Wallis test with Dunn's post hoc test.

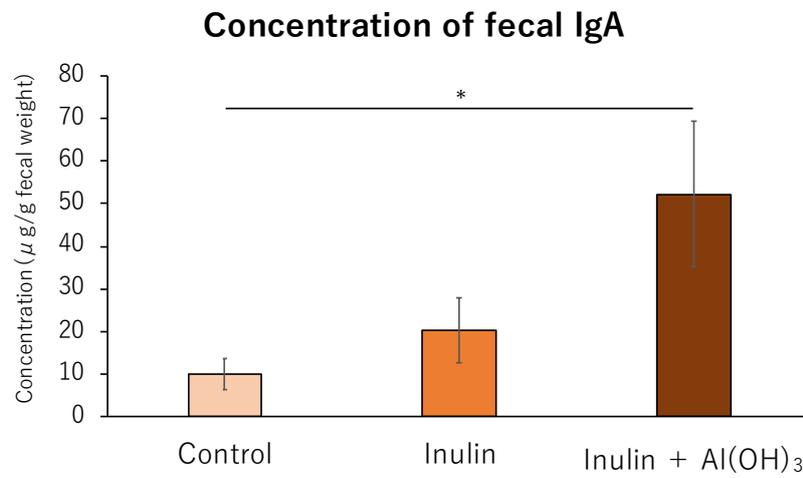


Figure 41 高脂肪食摂食時、Al(OH)₃とInulinの併用が糞便中のIgA濃度に及ぼす影響
 Inulinは餌の総重量の5%となるように混餌した。Al(OH)₃は、Al³⁺がMgOを餌に0.25%混ぜた際のMg²⁺と同モル数になるよう混餌した。データは平均±標準誤差で表した(n = 5-6)。
 **p* < 0.05, evaluated using the Kruskal-Wallis test with Dunn's post hoc test.

3.3 塩化マグネシウム、塩化カルシウムが腸内環境に与える影響

3.3.1 序論

ここまでの実験により、MgO と同じ非吸収性制酸薬である Al(OH)₃ は Inulin 摂食によって上昇した盲腸内酢酸濃度、プロピオン酸濃度、酪酸濃度を有意に低下させた (Figure 40(c)(d)(e))。これらの結果から MgO による SCFA 濃度低下作用は物質特異的なものではないことが示唆された。

MgO と Al(OH)₃ が持つ盲腸内 SCFA 濃度低下作用は、制酸作用に由来するものなのかを検証するため、ここでは、胃での制酸作用を持たない物質が盲腸内 SCFA 濃度に及ぼす影響を調べた。

緒言で述べたように MgO は胃内で以下のように変化する。



このことから、本節では、制酸作用を持たない物質として、MgCl₂、CaCl₂ を用いることとした。

3.3.2 実験材料および方法

(1) 動物

『2.3.2(1)動物』の項に記載の通りとした。

(2) 実験デザイン

本研究のこれまでの実験で MgO と Al(OH)₃ が盲腸内 SCFA 濃度を低下させることが示された (Figure 40)。この SCFA 濃度低下作用は、MgO と Al(OH)₃ の制酸作用に由来するものなのかを検証するため、3.3 の実験では、胃での制酸作用を持たない MgCl₂ や CaCl₂ が盲腸内 SCFA 濃度に及ぼす影響を調べた。

実験群は、対照群、Inulin 群、Inulin + MgCl₂ 群、Inulin + CaCl₂ 群の 4 群とした。餌は高脂肪食を用い (Table 8)、総重量に対して Inulin は 5% になるように混餌した。MgCl₂ や CaCl₂ は、それぞれの化合物の Mg²⁺ や Ca²⁺ が、MgO を餌に 0.25% 混ぜた際の Mg²⁺ と同モル数になるよう混餌した。尚、対照群は Table 8 の組成の HFD を用いた。また、使用動物数を最小限に抑えるため、対照群、Inulin 群は 3.2 の実験と共通の群を用いた。実験期間中、マウスは自由摂食、自由飲水の条件下で飼育し、実験開始から 11 日目の ZT4 に体重および盲腸内 pH の測定を行い、盲腸内容物を採

取した (Figure 42)。

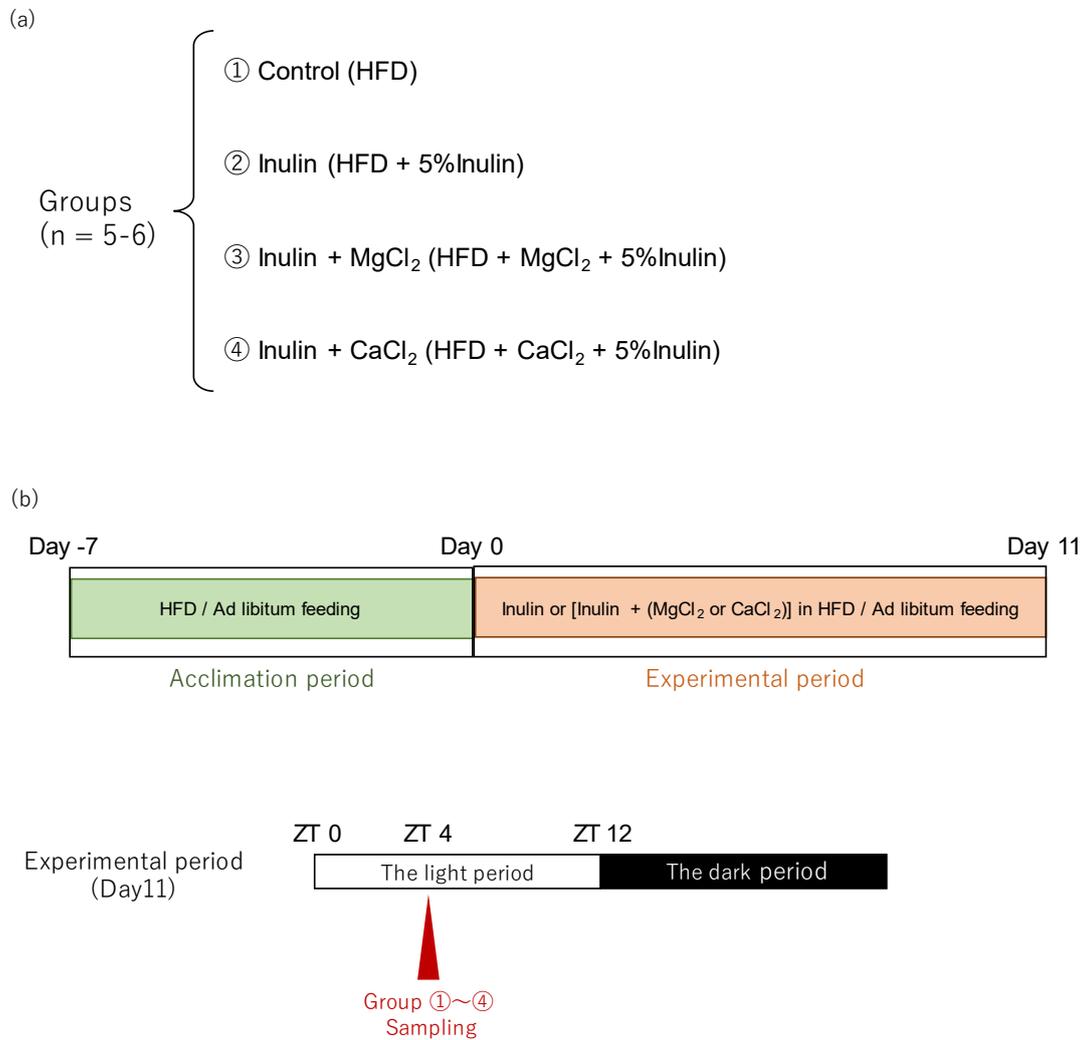


Figure 42 実験デザイン (3.3 塩化マグネシウム、塩化カルシウムが盲腸内乳酸濃度および SCFA 濃度に与える影響)

(a) 群分け (b) 実験スケジュール

(3) 盲腸内 pH の測定

『2.1.2(3)盲腸内 pH の測定』の項に記載の通りとした。

(4) GCMS による盲腸内乳酸濃度および SCFA 濃度の測定

『3.2.2(4)GCMS による盲腸内乳酸濃度および SCFA 濃度の測定』の項に記載の通りとした。

(5) 統計分析

全ての結果は平均±標準誤差で示され、GraphPad Prism(version8.4.3, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)により統計解析を行った。まず、正規性の有無を Kolmogorov-Smirnov test により判定した。次に、Bartlett' s test により等分散か否かを判定した。これらの分析により正規性があり、等分散と判定された場合、One way ANOVA test、Tukey post-hoc test を行った。正規性がない、もしくは不等分散であった場合には、Kruskal-Wallis test、Dunn' s post-hoc test を行った。

3.3.3 結果

3.3.3.1 体重・摂食量

サンプリング時に全マウスの体重を計測し、群ごとの平均を Figure 43 に示した。また、マウスの摂食量を記録し、一日あたりの平均摂食量を算出した。体重、摂食量ともに、群間で有意な差は認められなかった (Figure 43)。

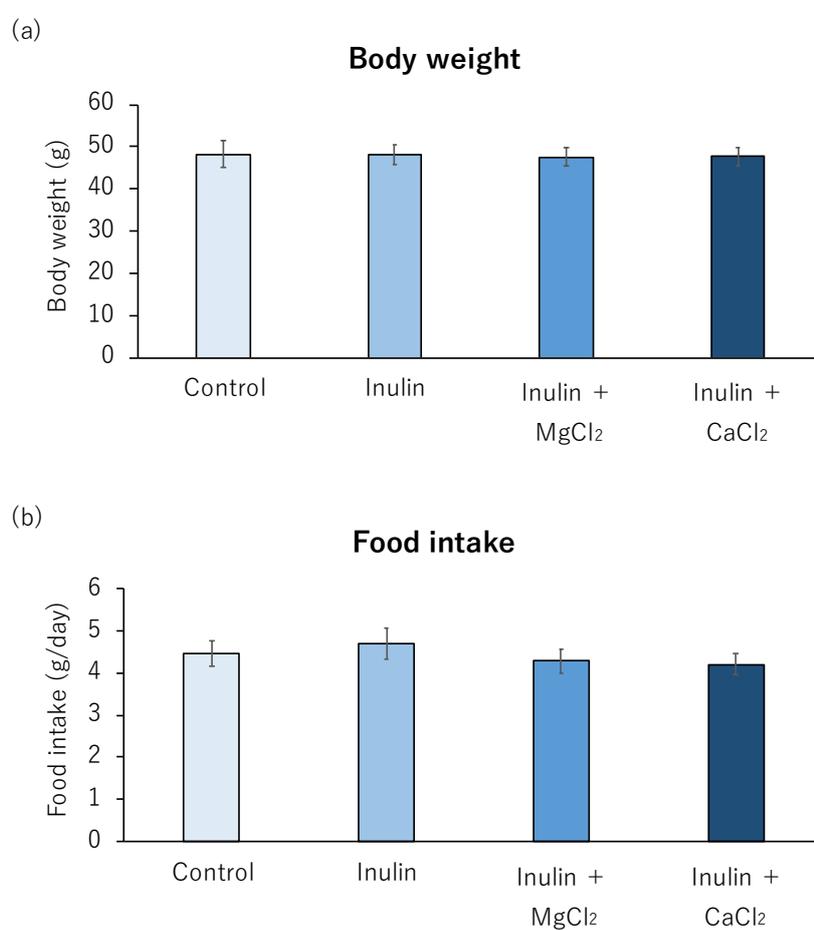


Figure 43 高脂肪食摂食時、MgCl₂またはCaCl₂とInulinの併用が体重と摂食量に及ぼす影響 (a)サンプリング時の体重 (b)一日あたりの摂食量 Inulinは餌の総重量の5%となるように混餌した。MgCl₂、CaCl₂は、それぞれの化合物のMg²⁺が、MgOを餌に0.25%混ぜた際のMg²⁺と同モル数になるよう混餌した。データは平均±標準誤差で表した(n = 5-6)。

3.3.3.2 盲腸内容物の水分含有率

対照群、Inulin 群、Inulin + MgCl₂ 群、Inulin + CaCl₂ 群の盲腸内容物の水分含有率を比較したが、どの群間においても有意な差は認められなかった (Figure 44)。

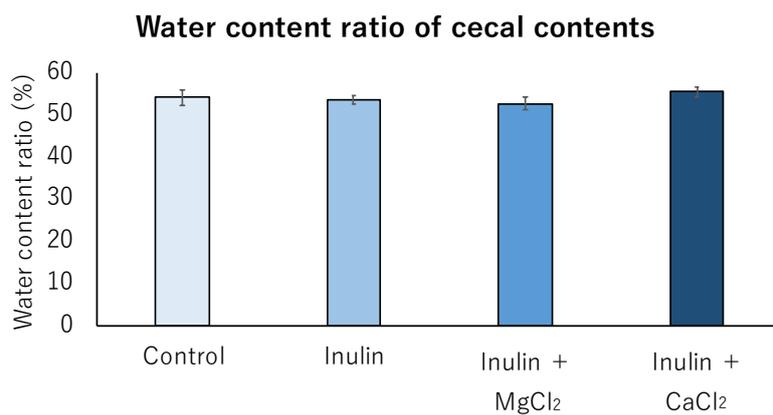


Figure 44 高脂肪食摂食時、MgCl₂またはCaCl₂とInulinの併用が盲腸内容物の水分含有率に及ぼす影響 Inulinは餌の総重量の5%となるように混餌した。MgCl₂、CaCl₂は、それぞれの化合物のMg²⁺が、MgOを餌に0.25%混ぜた際のMg²⁺と同モル数になるよう混餌した。データは平均±標準誤差で表した(n = 5-6)。

3.3.3.3 盲腸内 pH

対照群と比較して、Inulin 群では盲腸内 pH が有意に低下し、Inulin 群と比較して、Inulin + MgCl₂ 群では、盲腸内 pH が有意に上昇した (Figure 45(a))。一方、Inulin 群と Inulin + CaCl₂ 群の間には、盲腸内 pH の有意な差は認められなかった (Figure 45(a))。これらことから、MgCl₂ は CaCl₂ と比較して、Inulin 摂食により低下した盲腸内 pH をより顕著に上昇させることが示された。

3.3.3.4 盲腸内乳酸濃度および SCFA 濃度

乳酸濃度は群間で有意な差が認められなかった (Figure 45(b))。酢酸濃度、プロピオン酸濃度、酪酸濃度は Inulin 群と比較し、Inulin + MgCl₂ 群、Inulin + CaCl₂ 群で有意に低下した (Figure 45(c) (d) (e))。乳酸濃度と総 SCFA 濃度の総計についても、Inulin 群と比較し、Inulin + MgCl₂ 群、Inulin + CaCl₂ 群で有意に低下した (Figure 45(f))。これらの結果から、MgCl₂、CaCl₂ は共に、Inulin により上昇した SCFA 濃度を顕著に低下させることが示された。

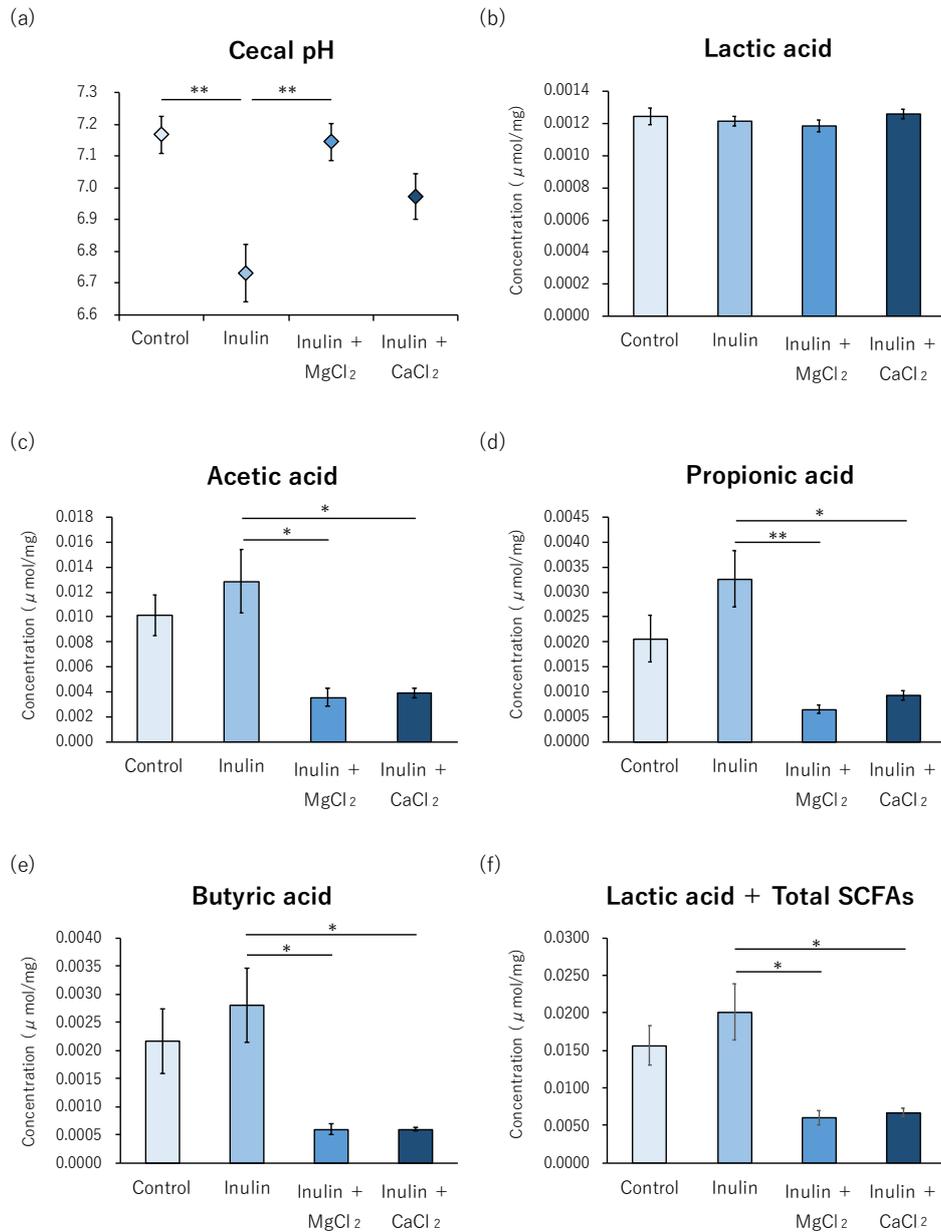


Figure 45 高脂肪食摂食時、MgCl₂またはCaCl₂とInulinの併用が盲腸内pH、盲腸内乳酸濃度およびSCFA濃度に及ぼす影響 (a)盲腸内pH (b)乳酸濃度 (c)酢酸濃度 (d)プロピオン酸濃度 (e)酪酸濃度 (f)乳酸 + 総SCFA濃度(総SCFA濃度は酢酸濃度、プロピオン酸濃度、酪酸濃度の総計) Inulinは餌の総重量の5%となるように混餌した。MgCl₂、CaCl₂は、それぞれの化合物のMg²⁺が、MgOを餌に0.25%混ぜた際のMg²⁺と同モル数になるよう混餌した。乳酸およびSCFAは盲腸内容物の乾燥重量あたりの濃度を算出した。データは平均±標準誤差で表した(n = 5-6)。**p* < 0.05 and ***p* < 0.01, evaluated using the Kruskal-Wallis test with Dunn's post hoc test.

Acetic acid: HFD vs. Inulin + MgCl₂ *p*=0.0773

Propionic acid: HFD vs. Inulin + MgCl₂ *p*=0.0830

Butyric acid: HFD vs. Inulin + MgCl₂ *p*=0.0541, HFD vs Inulin + CaCl₂ *p*=0.0626

Lactic acid + Total SCFAs: HFD vs. Inulin + MgCl₂ *p*=0.0830

3.4 ダイオウが腸内環境に与える影響

3.4.1 序論

これまでの実験により、制酸作用を持たない $MgCl_2$ と $CaCl_2$ が盲腸内の酢酸濃度、プロピオン酸濃度、酪酸濃度を低下させることが示された (Figure 45(c) (d) (e))。これらの結果から、盲腸内 SCFA の濃度低下作用は、胃内の制酸作用に由来するものではない可能性が示唆された。

MgO は腸管内の浸透圧を上げることで腸管壁から管腔内に水分を引っ張り、便を柔らかくする。先行研究では、浸透圧下剤であるポリエチレングリコールが腸内細菌叢に長期的な変化をもたらすことが報告されている (Tropini *et al.*, 2018)。 MgO による SCFA 濃度低下作用は、浸透圧の変化に伴う腸内細菌叢の構成変化に由来するという仮説を立て、 MgO とは作用機序の異なる下剤が腸内細菌叢、盲腸内 SCFA 濃度および乳酸濃度に及ぼす影響を検証した。

下剤は刺激性下剤と非刺激性下剤に分類され、緒言でも触れたように、ガイドラインでは、非刺激性下剤の効果が十分でなかった場合に刺激性下剤を使用することが求められている。刺激性下剤には、小腸刺激性下剤と大腸刺激性下剤があり、小腸刺激性下剤にはヒマシ油、大腸刺激性下剤にはダイオウ (図表中および群名では "Daiou" と表記する)、ピコスルファートナトリウムなどがある。刺激性下剤は腸管を刺激することにより便の排泄を促進する。一方、非刺激性下剤の MgO は、腸管内の浸透圧を上げることにより腸管壁から腸管腔内に水分を引き込み、便を軟化させることにより便秘を解消する。 MgO は非刺激性下剤の中でも塩類下剤に分類される。いずれも市販薬にも含有される馴染み深い医薬品である。

本実験では、 MgO と作用機序の異なる下剤として、刺激性下剤であるダイオウを用いた。ダイオウに含有されるセンノシドは胃や小腸で吸収されることなく大腸に到達し、腸内細菌に代謝され、レインアンスロンを生成する。ダイオウは、このレインアンスロンが腸のアウエルバッハ神経叢に作用して蠕動運動を促進し、かつ腸管からの水分吸収を抑制することで瀉下作用を示す。先行研究ではダイオウは7日間の投与でラットの腸内細菌の存在比を大きく変化させることが報告されている (Kon *et al.*, 2018)。第2章では、 MgO が腸内細菌の存在比を変化させることが示されたことから (Figure 11, 18, 25, 31)、同じく腸内細菌叢へ影響することが報告されているダイオウが、Inulin との併用時、腸内細菌叢、盲腸内乳酸濃度および SCFA

濃度に及ぼす影響について調べた。

3.4.2 実験材料および方法

(1) 動物

『2.1.2(1)動物』の項に記載の通りとした。

(2) 実験デザイン

MgO による SCFA 濃度低下作用は、浸透圧の変化に伴う腸内細菌叢の構成変化に由来するという仮説を立て、MgO とは作用機序の異なる下剤であるダイオウが腸内細菌叢、盲腸内 SCFA 濃度および乳酸濃度に及ぼす影響を検証した。

群は、対照群、Inulin 群、Inulin + Daiou 群の 3 群とした。餌は高脂肪食を用い (Table 8)、餌の総重量に対して Inulin は 2.5%、Daiou は 0.5%になるように混餌した。餌の総食物繊維量を合わせるため、対照群には、餌の総重量の 2.5%にあたる cellulose を混餌した。尚、使用動物数を最小限に抑えるため、対照群、Inulin 群は 2.4 の実験と共通の群を用いた。実験期間中、マウスは自由摂食、自由飲水の条件下で飼育し、実験開始から 11 日目の ZT4 に体重および盲腸内 pH の測定を行い、盲腸内容物と糞便を採取した (Figure 46)。

解析を行った。まず、正規性の有無を Kolmogorov-Smirnov test により判定した。次に、Bartlett' s test により等分散か否かを判定した。これらの分析により正規性があり、等分散と判定された場合、One way ANOVA test、Tukey post-hoc test を行った。正規性がない、もしくは不等分散であった場合には、Kruskal-Wallis test、Dunn' s post-hoc test を行った。 β 多様性は PERMANOVA により評価した。PERMANOVA は QIIME を用いて統計解析を行った。

3.4.3 結果

3.4.3.1 体重

サンプリング時に全マウスの体重を計測し、群ごとの平均をグラフに示した。群間で有意な体重の差は見られなかった (Figure 47)。マウスは群飼いし、HFD を固めた餌を与えていたが、餌を過剰に崩しながら摂食するマウスがおり、正確な摂食量を計測できなかつたため、グラフには示していない。

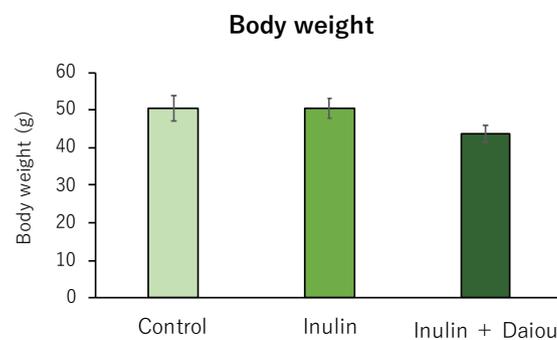


Figure 47 高脂肪食摂食時、Daiou と Inulin の併用が体重に及ぼす影響

餌の総重量に対し、Inulin は 2.5%、Daiou は 0.5%になるよう混餌した。データは平均±標準誤差で表した (n = 5-6)。

3.4.3.2 盲腸内容物の水分含有率

対照群、Inulin 群と比較して Inulin + Daiou 群では、盲腸内容物の水分含有率が有意に上昇した (Figure 48)。これらの結果から、Daiou の投与により腸内の水分量が増加することが示唆された。

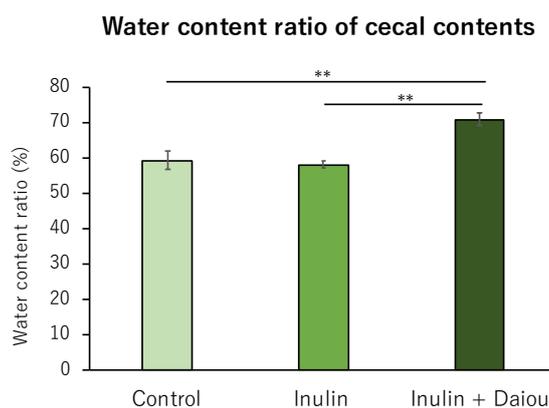


Figure 48 高脂肪食摂食時、Daiou と Inulin の併用が盲腸内容物の水分含有率に及ぼす影響
餌の総重量に対し、Inulin は 2.5%、Daiou は 0.5%になるよう混餌した。データは平均±標準誤差で表した (n = 5-6)。

3.4.3.3 腸内細菌叢の多様性

対照群、Inulin 群、Inulin + Daiou 群の Simpson Index を比較したが、有意な差は見られなかった (Figure 49(a))。一方、 β 多様性は 3 群間で有意に変化した (Figure 49(b))。具体的にどの群間に有意な差があるのかを検証するため、2 群ずつの解析を行った。尚、対照群、Inulin 群は、使用動物数を最小限に抑える目的で 2.4 の実験と共通の群を用いており、対照群と Inulin 群の β 多様性の結果は Figure 30(c) で既に示しているため、ここでは割愛する。対照群と Inulin + Daiou 群、Inulin 群と Inulin + Daiou 群の β 多様性をそれぞれ比較すると、いずれも有意に異なっていることが示された。これらの結果から、Inulin 併用時、ダイオウは腸内細菌叢を有意に変化させることが示された。

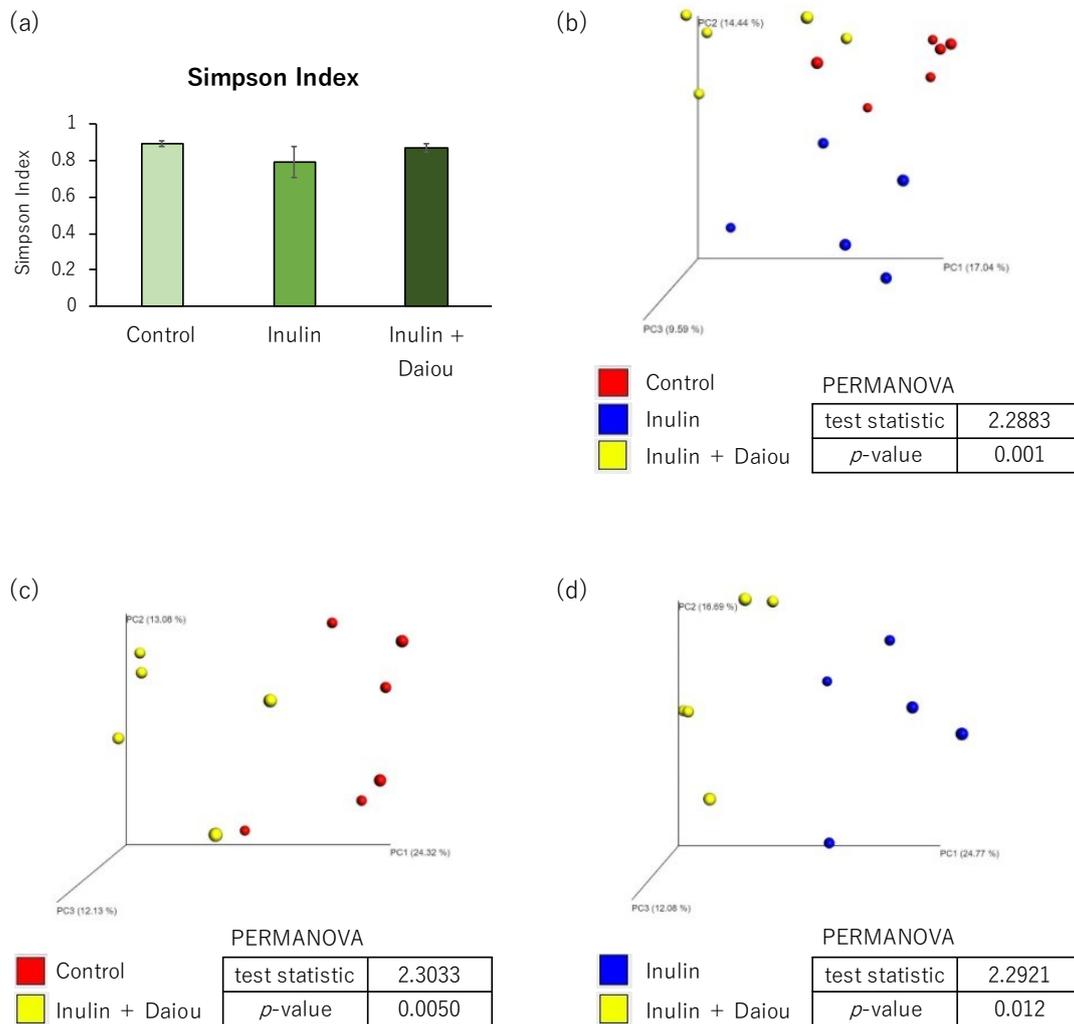


Figure 49 高脂肪食摂食時、DaiouとInulinの併用が腸内細菌叢の多様性に及ぼす影響

(a) α 多様性 (Simpson Index) (b) β 多様性 (対照群 vs. Inulin 群 vs. Inulin + Daiou 群) (c) β 多様性 (対照群 vs. Inulin + Daiou 群) (d) β 多様性 (Inulin 群 vs. Inulin + Daiou 群) 餌の総重量に対し、Inulinは2.5%、Daiouは0.5%になるよう混餌した。PCoA 3d plotsは unweighted UniFrac distanceで算出した。 α 多様性のデータは平均±標準誤差で表した (n = 5-6)。各データは下記の統計処理を行った。

α 多様性: The Kruskal-Wallis test with Dunn's post hoc test.

β 多様性: A permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA).

3.4.3.4 腸内細菌の相対存在量

第 1 章や第 2 章でも述べたように、本研究では *Akkermansia*、*Bacteroides*、*Bifidobacterium*、*Lactobacillus*、*Lactococcus*、*Odoribacter* の 6 種類の属に着目した。これらは相対存在量が多いこと、プロバイオティクスとして利用されていること、疾病との関係が特に注目されていること、本研究で特徴的な変化が認められたことなどを考慮して選定した。Figure 50(a)に各群の腸内細菌叢の Taxonomy summary を示した。対照群、Inulin 群と比較して、Inulin + Daiou 群では *Akkermansia* の相対存在量が有意に増加した (Figure 50(b))。対照群と比較して、Inulin + Daiou 群では *Lactococcus* の相対存在量が有意に減少した (Figure 50(f))。 *Odoribacter* の相対存在量は、対照群と比較して、Inulin 群で減少傾向が見られた (Figure 50(g))。 *Bacteroides*、*Bifidobacterium*、*Lactobacillus* の相対存在量は、群間に有意な差が見られなかった (Figure 50(c) (d) (e))。

3.4.3.5 盲腸内 pH

対照群と比較して、Inulin 群では盲腸内の pH が有意に低下した (Figure 51(a))。一方、Inulin + Daiou 群の盲腸内 pH は、Inulin 群と比較して上昇傾向だった (Figure 51(a))。これらの結果から、Inulin により低下した盲腸内 pH は Daiou の併用により上昇することが示唆された。

3.4.3.6 盲腸内乳酸濃度および SCFA 濃度

対照群と比較して、Inulin + Daiou 群では乳酸濃度の有意な上昇が見られた (Figure 51(b))。酢酸濃度、プロピオン酸濃度、酪酸濃度は Inulin により有意に上昇した (Figure 51(c) (d) (e))。酢酸濃度、プロピオン酸濃度、酪酸濃度いずれにおいても、Inulin 群と比較して、Inulin + Daiou 群で低値を示したが、有意な差は認められなかった (Figure 51(c) (d) (e))。乳酸濃度と総 SCFA 濃度の総計を算出したところ、対照群と比較して、Inulin 群では有意な上昇が認められ、Inulin + Daiou 群では上昇傾向が見られた (Figure 51(f))。これらの結果から、Daiou は、Inulin により上昇した SCFA 濃度を顕著に低下させることはなく、SCFA 濃度低下作用は MgO の方が強力であることが示唆された。

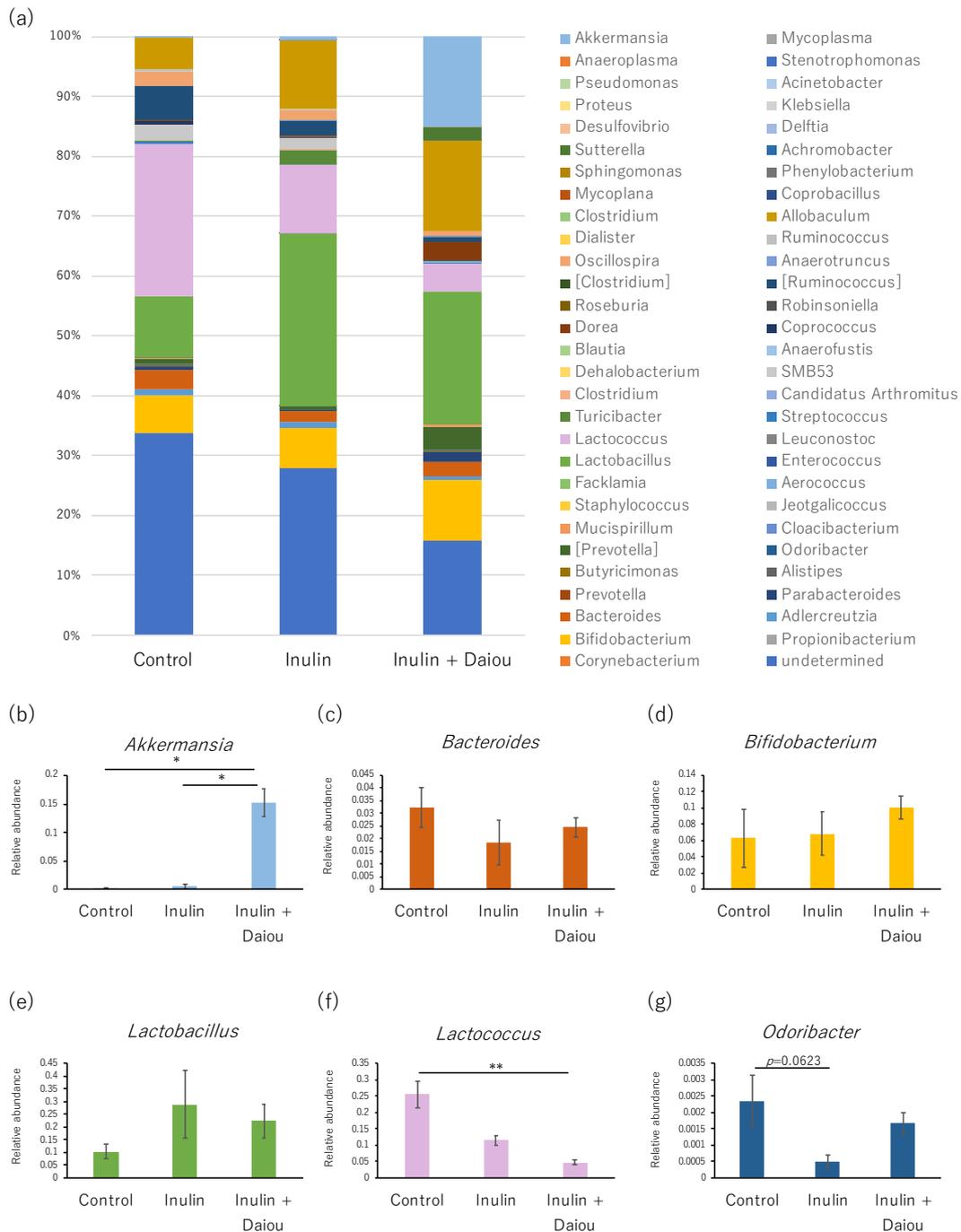


Figure 50 高脂肪食摂食時、Daiou と Inulin の併用が各細菌に及ぼす影響

(a) Taxonomy summary (b) *Akkermansia* の腸内細菌の相対存在量 (c) *Bacteroides* の腸内細菌の相対存在量 (d) *Bifidobacterium* の腸内細菌の相対存在量 (e) *Lactobacillus* の腸内細菌の相対存在量 (f) *Lactococcus* の腸内細菌の相対存在量 (g) *Odoribacter* の腸内細菌の相対存在量 餌の総重量に対し、Inulinは2.5%、Daiouは0.5%になるよう混餌した。細菌の相対存在量のデータは平均±標準誤差で表した(n = 5-6)。* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, evaluated using the Kruskal-Wallis test with Dunn's post hoc test.

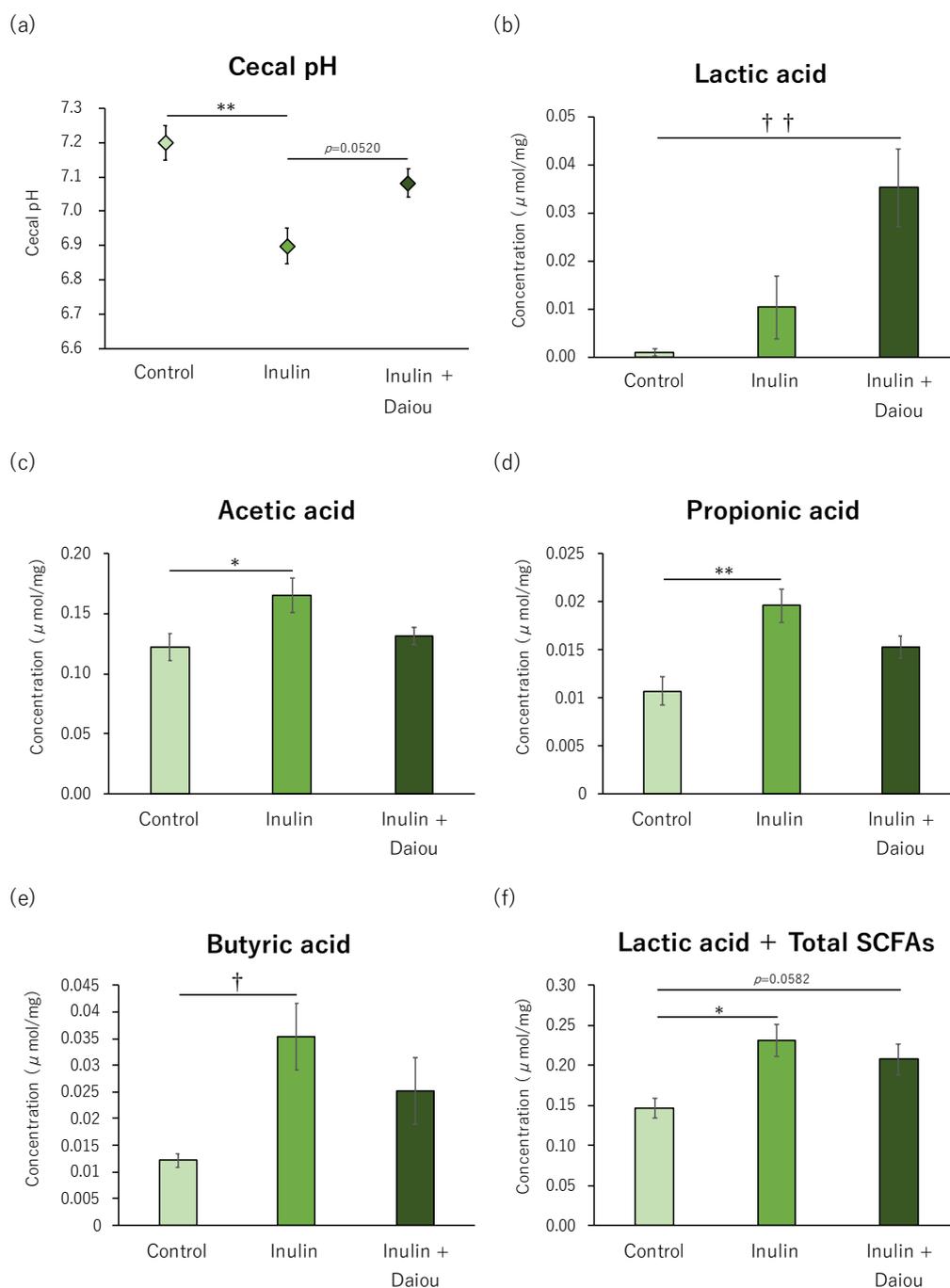


Figure 51 高脂肪食摂取時、Daiou と Inulin の併用が盲腸内 pH、盲腸内乳酸濃度および SCFA 濃度に及ぼす影響

(a)盲腸内 pH (b)乳酸濃度 (c)酢酸濃度 (d)プロピオン酸濃 (e)酪酸濃度 (f)乳酸 + 総 SCFA 濃度(総 SCFA 濃度は酢酸濃度、プロピオン酸濃度、酪酸濃度の総計) 餌の総重量に対し、Inulin は 2.5%、Daiou は 0.5%になるよう混餌した。乳酸および SCFA は盲腸内容物の乾燥重量あたりの濃度を算出した。データは平均±標準誤差で表した (n = 5-6)。

* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, evaluated using the one-way ANOVA with Tukey's post hoc test.
† $p < 0.05$ and †† $p < 0.01$, evaluated using the Kruskal-Wallis test with Dunn's post hoc test.

3.5 考察

(1) MgO 以外の下剤・制酸剤が盲腸内 SCFA 濃度について

① マグネシウム塩が盲腸内 SCFA に与える影響についての考察

本章では、MgO が腸内環境に及ぼす影響が物質特異的なものであるかを検証した。まず、3.1 では、 Mg^{2+} を含有する下剤、制酸薬が盲腸内乳酸濃度および酢酸濃度に及ぼす影響を検証した。その結果、 $Mg(OH)_2$ 、 $MgCO_3$ が Inulin で上昇した乳酸濃度を低下させる傾向が見られた (Figure 36(a))。一方、 $Mg_3(C_6H_5O_7)_2 \cdot 9H_2O$ では有意な変化は見られなかった (Figure 36(a))。また、 $Mg(OH)_2$ は酢酸濃度を有意に低下させたが、 $Mg_3(C_6H_5O_7)_2 \cdot 9H_2O$ 、 $MgCO_3$ では酢酸濃度の有意な低下が見られなかった (Figure 36(b))。これらの差は、それぞれの物質が持つ薬効の特徴に由来する可能性があると考えられる。クエン酸マグネシウムは制酸作用を持たない。 $MgCO_3$ は制酸作用を持つものの、作用は弱く、MgO の制酸作用の約半分と言われている。また、先行研究では、胃のプロトンポンプに作用し、胃酸の分泌を抑制する PPI はラットの腸内の酪酸濃度を有意に低下させることが報告されている (Lee *et al.*, 2019)。これらのことから、本研究での $Mg(OH)_2$ 投与による盲腸内酢酸濃度の低下は $Mg(OH)_2$ が持つ制酸作用に由来する可能性があると考えられる。

② $Al(OH)_3$ が盲腸内 SCFA に与える影響についての考察

3.2 の実験では、MgO と同じく制酸作用を持つ $Al(OH)_3$ が、Inulin 併用時、盲腸内 pH、盲腸内 SCFA 濃度、盲腸内乳酸濃度にどのような影響を及ぼすかを検証した。 $Al(OH)_3$ は、Inulin で低下した盲腸内 pH を有意に上昇させ、Inulin によって上昇した盲腸内 SCFA 濃度を有意に低下させた (Figure 40(a))。先行研究では、健康なヒトの便にアルミニウムを添加し、*in vitro* で発酵させたところ、対照群と比較して、腸内細菌叢の構成が有意に変化し、酢酸濃度、酪酸濃度、プロピオン酸濃度が有意に低下したことが示された (Yu *et al.*, 2020)。3.2 の実験では、 $Al(OH)_3$ が Inulin により上昇した SCFA 濃度を有意に低下させ (Figure 40(c) (d) (e))、先行研究とも矛盾のない結果が得られた。3.1 と 3.2 の実験結果により、Inulin 併用時、MgO によって盲腸内の SCFA 濃度が低下する現象は、MgO 特異的なものではなく、 Mg^{2+} に依存したものでもないことが示された (Figure 36, 40)。MgO や $Al(OH)_3$ の投与による盲腸内 SCFA 濃度の低下は $Al(OH)_3$ が持つ制酸作用により、腸内の pH が上昇し、腸

内細菌叢が変化したこと起因する可能性が考えられた。そこで、3.3の実験では、薬の持つ制酸作用が SCFA 濃度低下の原因となっているのかを確かめるため、制酸作用がない MgCl₂、CaCl₂ が SCFA 濃度に与える影響を検証した。

③ MgCl₂、CaCl₂ が盲腸内 SCFA に与える影響についての考察

本研究では、MgCl₂、CaCl₂ は共に Inulin で上昇した SCFA 濃度を有意に低下させることが示された (Figure 45 (c) (d) (e))。先行研究では、高脂肪食を摂食した肥満マウスにおいて、カルシウムが *Lactobacillus spp.*、*Bacteroides*、*Bifidobacterium* の糞便中 DNA 量を有意に減少させることが報告されている (Chaplin *et al.*, 2016)。また、ヒトを対象とした研究では、ミネラルを豊富に含む温泉水を飲水することで腸内細菌叢が変化し、血中糖化アルブミン値が有意に低下し、2 型糖尿病を予防または改善する可能性が示唆された (Murakami *et al.*, 2015)。これらの先行研究より、3.1、3.2、3.3 の実験で盲腸内 SCFA 濃度が低下した要因の一つとして、ミネラルによる腸内細菌叢の変化に由来する可能性が考えられる。

また、ミネラルが SCFA 産生に関与する酵素を阻害し、SCFA 濃度が低下した可能性も考えられる。第 2 章の考察で論じたように、Mg²⁺ は β ガラクトシダーゼを抑制し、イヌリナーゼの活性を阻害することが明らかになっており、これらの先行研究は、Mg²⁺ が SCFA 産生に関わる酵素を阻害しているという仮説を強化している (Gong *et al.*, 2008; Sheng *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2018)。本研究では、MgCl₂ のみならず、CaCl₂ も Inulin で上昇した SCFA 濃度を有意に低下させているが (Figure 45)、Ca²⁺ は前述の酵素の活性に関与しないか、活性増強に働くことが明らかになっている (Gong *et al.*, 2008; Sheng *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2018)。一方で、Ca²⁺ は高濃度になると腸のアルカリフォスファターゼの活性を阻害することも報告されている (Brun *et al.*, 2009)。また、高濃度の Cu²⁺ は腸内細菌叢を変化させる (Cheng *et al.*, 2020)。これらのことから、本研究でマウスに与えた Ca²⁺ が SCFA 産生酵素の活性化剤としてではなく、阻害剤として作用してしまった可能性が考えられる。この仮説を検証するためには、今回よりも低用量の CaCl₂ をマウスに投与し、低用量の CaCl₂ が SCFA 濃度に与える影響を確認する必要がある。

④ ダイオウが腸内細菌叢、盲腸内の SCFA・乳酸に与える影響についての考察

MgO による SCFA 濃度低下作用は、浸透圧の変化に伴う腸内細菌叢の構成変化に由来するという仮説を立て、Inulin 併用時、MgO とは作用機序の異なる下剤であるダイオウが腸内細菌叢、盲腸内 SCFA 濃度および乳酸濃度に及ぼす影響を検証した。

まず、ダイオウと SCFA 濃度の関係について考察する。3.4 の実験では、Inulin 群と比較して、Inulin + Daiou 群の盲腸内酢酸濃度、プロピオン酸濃度、酪酸濃度は低値を示したが、いずれも有意な変化ではなかった (Figure 51(c)(d)(e))。これらのことから、MgO やその他のマグネシウム塩、CaCl₂、Al(OH)₃ 投与による顕著な盲腸内 SCFA 濃度低下作用はミネラル特有のものである可能性が高いと考えられる。

有意な差は認められなかったものの、Inulin 群と比較して、Inulin + Daiou 群の SCFA 濃度は低値を示した理由として、ダイオウによる盲腸内容物の水分含有率増加が考えられる。Yue らは、止瀉薬としても用いられるオウレンやオウバクに含まれるベルベリンが dysbiosis を起こし、盲腸内の SCFA 濃度を有意に減少させることを明らかにしている (Yue *et al.*, 2019)。さらに、ベルベリン投与時の糞便中の水分量と盲腸内 SCFA 濃度には負の相関があることを報告している (Yue *et al.*, 2019)。本研究でも、ダイオウにより盲腸内容物の水分含有率が有意に上昇することが示されたことから (Figure 48)、ダイオウの投与による盲腸内 SCFA 濃度の低下は盲腸内容物の水分含有率の上昇に起因すると考えられる。

次に、乳酸濃度の結果について考察する。炎症性腸疾患 (IBD)、SCFA、乳酸の関連を調べたメタアナリシスでは、IBD 患者は酢酸、プロピオン酸、酪酸、吉草酸が減少しているが、乳酸が増加していることが明らかとなった (Zhuang *et al.*, 2019)。3.4 の実験では、ダイオウの投与により盲腸内乳酸濃度が有意に上昇し、有意ではなかったものの、盲腸内 SCFA 濃度が低下した (Figure 51(c)(d)(e))。これらの結果は、IBD 患者に見られる傾向と一致している。また、本研究ではダイオウの投与により盲腸内容物の水分含有率が有意に上昇した (Figure 48)。IBD でも下痢症状が現れることが知られているが、その主な原因は、上皮細胞のイオントランスポーター、イオンチャネルの機能や発現数が炎症によって変化し、腸内水分量が増加することだと言われている (Anbazhagan *et al.*, 2018)。これらのことから、乳酸濃度の増加と腸内の水分量の増加に関連がある可能性が考えられた。また、先行研究では、ダイオウの投与により腸内細菌の相対存在量に変化が見られ、TNF- α やシクロオキシ

ゲナーゼ-2 が有意に上昇したことが報告されていることから (Kon *et al.*, 2018)、盲腸内の乳酸濃度の上昇には腸の炎症も関与している可能性があると考えられた。

続いて、ダイオウで盲腸内 pH の上昇傾向がみられた理由について考察する。日本において、2018 年に器質的疾患を除く慢性便秘症への適応が追加となったリナクロチドは、腸管のグアニル酸シクラーゼ C 受容体に作用し、腸管分泌や腸管輸送能を促進することが知られている。Farmer らはリナクロチドが盲腸内の pH を有意に上昇させることを示した (Farmer *et al.*, 2019)。本研究では、ダイオウが盲腸内容物水分含有率を増加させる傾向にあったが、リナクロチドも腸管分泌により便の水分量を増加させることから、ダイオウによる盲腸内 pH の上昇傾向には、盲腸内容物の水分量の増加が関与している可能性が考えられた。

最後に、ダイオウと腸内細菌叢について考察をする。いくつかの研究で、カルシウム、マグネシウム、アルミニウムをはじめとするミネラルが腸内細菌叢に変化をもたらすことが示されており (Murakami *et al.*, 2015; Chaplin *et al.*, 2016; Crowley *et al.*, 2018; Garcia-Legorreta *et al.*, 2020)、本研究での MgO 投与時の腸内細菌叢の変化もミネラルに由来する可能性があるが、本研究ではダイオウでも腸内細菌叢の構成変化が認められたことから (Figure 49(b)(c)(d))、MgO による盲腸内 pH の上昇および腸内細菌叢の構成変化には、ミネラルとしての特徴のみならず、便秘薬としての側面が関係している可能性が考えられた。ダイオウは高脂肪・高フルクトース食摂食により誘発された体重増加等の代謝障害を改善し、その代謝改善には *Akkermansia muciniphila* の相対存在量の増加が関与している可能性があることが報告されている (Régnier *et al.*, 2020)。また、ダイオウの投与によりアルコール誘発性の肝臓の炎症が抑制された際、*Akkermansia* の相対存在量が増加したことも報告されている (Neyrinck *et al.*, 2016)。しかし、3.4 の実験では、Inulin 併用時、ダイオウにより *Akkermansia* の相対存在量が有意に増加したものの (Figure 50(b))、有意な体重減少は見られなかった (Figure 47)。また、Inulin 群と比較して、Inulin + Daiou 群では盲腸内 pH が上昇する傾向が見られた (Figure 51(a))。これらの結果は MgO の結果と同傾向である。これらのことから、Inulin 併用時のダイオウによる *Akkermansia* の相対存在量の増加は、体重減少等の代謝改善に寄与するものではなく、腸内細菌叢の dysbiosis に由来するものである可能性が考えられた。第 2 章の考察で述べたように、*Akkermansia* の相対存在量の増加は生体に有益

であるとの報告がある一方、代謝改善に関連しないとの報告もあり、*Akkermansia* の相対存在量の増加が生体にどのような意味を持つかは研究ごとに個別に考えていく必要があると考える。

3.6 小括

- $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 、 MgCO_3 は Inulin で上昇した乳酸濃度を低下させる傾向が見られた。
- $\text{Mg}(\text{OH})_2$ は Inulin で上昇した盲腸内酢酸濃度を有意に低下させた。
- $\text{Al}(\text{OH})_3$ 、 MgCl_2 、 CaCl_2 はいずれも盲腸内 pH を上昇させ、Inulin で上昇した盲腸内 SCFA 濃度を有意に低下させた。
- ダイオウは盲腸内 pH を上昇させ、乳酸濃度を増加させたが、SCFA 濃度に対する顕著な影響は見られなかった。
- 盲腸内 SCFA 濃度の低下には Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Al^{3+} などの金属イオンが関与していることが示唆された。
- ダイオウ投与時には、盲腸内 pH の上昇や *Akkermansia* の相対存在量の増加など、 MgO 投与時と同傾向の腸内の変化が認められた。
- $\text{Al}(\text{OH})_3$ は糞便中の IgA 濃度を上昇させる可能性がある。 MgO と $\text{Al}(\text{OH})_3$ はいずれも金属イオンを含む制酸剤であるが、糞便中 IgA 濃度に対する影響は異なる可能性がある。

第3章の結果を Table 10 にまとめる。

Table 10 第3章の結果のまとめ

本論文中の章・節	3.1				3.2		3.3				3.4	
	Control vs Inulin	5% Inulin vs 5% Inulin + Magnesium citrate	5% Inulin vs 5% Inulin + Mg(OH) ₂	5% Inulin vs 5% Inulin + MgCO ₃	Control vs Inulin	5% Inulin vs 5% Inulin + Al(OH) ₃	Control vs Inulin	5% Inulin vs 5% Inulin + Mg(Cl) ₂	5% Inulin vs 5% Inulin + Ca(Cl) ₂	Control vs Inulin	2.5% Inulin vs 2.5% Inulin + Daltou	
体重	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
摂食量	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	-	-	-	
盲腸内容物水分含有量	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	↓ (p<0.01)	
盲腸内pH	-	-	-	-	↓ (p<0.01)	↑ (NS)	↓ (p<0.01)	↑ (NS)	↑ (NS)	↓ (p<0.01)	↑ (p=0.0520)	
乳酸	↑ (p=0.0612)	↓ (NS)	↓ (p=0.0958)	↓ (p=0.0958)	↓ (NS)	↓ (NS)	↓ (NS)	↑ (NS)	↑ (NS)	↑ (NS)		
酢酸	↑ (NS)	↓ (NS)	↓ (p<0.05)	↓ (NS)	↑ (NS)	↓ (p<0.05)	↓ (p<0.05)	↓ (p<0.05)	↓ (p<0.05)	↓ (NS)		
プロピオン酸	-	-	-	-	↑ (NS)	↓ (p<0.01)	↑ (NS)	↓ (p<0.05)	↓ (p<0.05)	↓ (NS)		
酪酸	-	-	-	-	↑ (NS)	↓ (p<0.05)	↑ (NS)	↓ (p<0.05)	↓ (p<0.05)	↓ (NS)		

NS: 有意差なし、↑, ↓: 有意差あり

第4章 MgOの適切な服用タイミングの検討

4.1 MgOの単独投与が腸内環境に与える影響と服用タイミングの関係

本章の一部は以下の投稿論文を基に作成されている。

Omori, K., Miyakawa, H., Watanabe, A., Nakayama, Y., Lyu, Y., Ichikawa, N., Sasaki, H., & Shibata, S. (2021). The combined effects of magnesium oxide and inulin on intestinal microbiota and cecal short-chain fatty acids. *Nutrients*, 13, 152.

4.1.1 序論

生物には体内時計が存在し、1日およそ24時間の概日リズムによって生体機能を制御している。体内時計の乱れは生体の恒常性の乱れに繋がり、さまざまな疾病を引き起こす原因となる。一方、概日リズムを考慮して医薬品を使用することは、医薬品の有効性や安全性を高めることに繋がる。本章では、この時間治療学の観点から、MgOの至適服用タイミングを探ることを目的とし、マウスの活動開始時(ZT12)投与と活動終了時(ZT0)投与で、MgOが腸内細菌叢および盲腸内SCFAに及ぼす影響に違いがあるかどうかを検証した。

腸内細菌叢にも概日リズムがあることが知られている。マウスで *Clostridiales* 属、*Lactobacillales* 属、*Bacteroidales* 属に日内変動があることを確認した研究もある(Thaiss *et al.*, 2014)。また、腸内細菌叢が時計遺伝子NFIL3の概日リズムを介して脂質代謝を制御しているという報告(Wang *et al.*, 2017)や、無菌マウスを用いた研究で腸内細菌叢がヒストン脱アセチル化酵素3の小腸上皮での発現を介して概日代謝リズムを制御しているという報告もある(Kuang *et al.*, 2019)。

米国やアジアで承認済みの約1000種の薬の中から体内時計に影響を及ぼす薬があるかどうかを調べた研究も興味深い。概日周期を長くしたもの(46の薬)や短くしたもの(13の薬)が見つかり、薬の中にも体内時計に影響を及ぼすものがあることがわかっている(Tamai *et al.*, 2018)。マグネシウムについても、細胞内マグネシウムイオン濃度に概日リズムがあり、エネルギーバランスを制御することが報告されている(Feeney *et al.*, 2016)。またUetaniらは、概日リズム依存性のphosphatase of regenerating liver 2 (PRL2)発現が細胞内マグネシウムイオン濃度を変化させ、

エネルギー代謝を制御していることを報告している (Uetani *et al.*, 2017)。

4.1.2 実験材料および方法

(1) 動物

『2.3.2(1)動物』の項に記載の通りとした。

(2) 実験デザイン

4.1ではMgOの単独投与が腸内細菌叢および盲腸内SCFA濃度に与える影響とその投与時刻との関係を調べた。MgOの投与時刻はマウスの非活動期の開始時刻であるZT0と、マウスの活動期の開始時刻であるZT12のいずれかとした。MgOは水道水に懸濁し、ゾンデを用いて経口投与した(250 mg/kg・BW)。また、第2章と対照群の条件を合わせるため、対照群、MgO群は共に、餌の総重量の2.5%になるようcelluloseを混餌した。それぞれのMgO投与時刻の4時間後にサンプリングを行い、腸内細菌叢および盲腸内SCFAの各ポイントでの変動をみた。尚、腸内細菌叢にも概日リズムが存在することから、対照群は各サンプリングポイントに用意した。餌は、45%kcalの脂肪を含む高脂肪食を用い(Table 8)、11日間の実験期間中、マウスは自由摂食、自由飲水の条件下で飼育した。最終日のMgO投与時刻の4時間後にサンプリングをし、体重および盲腸内pHの測定を行い、盲腸内容物と糞便を採取した(Figure 52)。

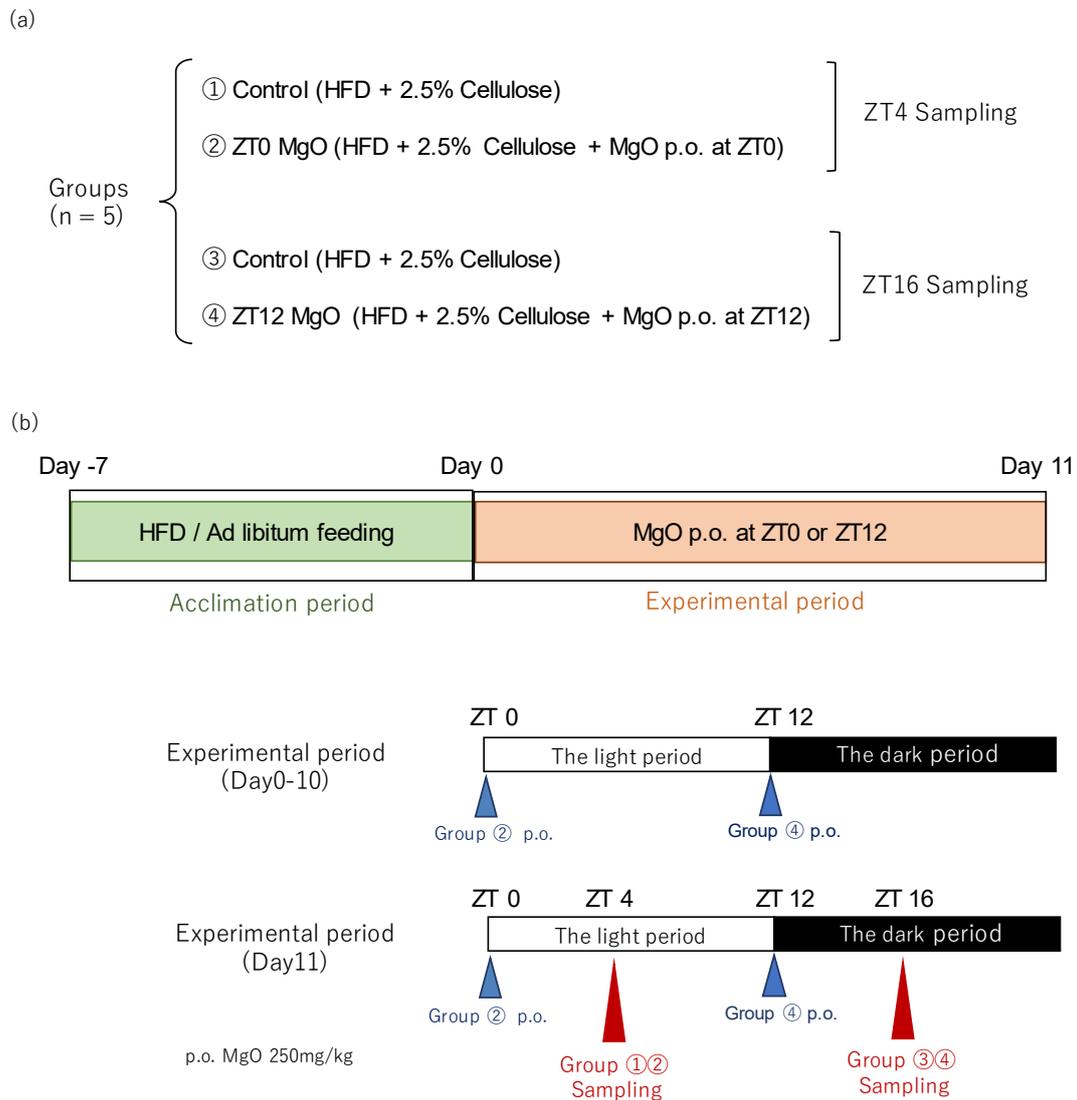


Figure 52 実験デザイン(4.1 MgO の単独投与が腸内環境に与える影響と服用タイミングの関係)

(a)群分け (b)実験スケジュール

(3) 盲腸内 pH の測定

『2.1.2(3)盲腸内 pH の測定』の項に記載の通りとした。

(4) 盲腸内 SCFA 濃度および乳酸濃度の測定

『2.1.2(4)盲腸内 SCFA 濃度および乳酸濃度の測定』の項に記載の通りとした。

(5) 糞便中の DNA 抽出

『2.1.2(5) 糞便中の DNA 抽出』の項に記載の通りとした。

(6) 16S rDNA シーケンス

『2.1.2(6) 16S rDNA シーケンス』の項に記載の通りとした。

(7) 16SrDNA の遺伝子シーケンスの分析

『2.1.2(7) 16S rDNA の遺伝子シーケンスの分析』の項に記載の通りとした。

(8) 統計分析

β 多様性以外の全ての結果の統計処理は GraphPad Prism(version8.4.3, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)で行い、平均±標準誤差で示した。GraphPad Prism での統計解析では、まず、正規性の有無を Kolmogorov-Smirnov test により判定した。正規分布でない場合には、Mann-Whitney' U test を行った。正規分布であった場合は、F test により等分散か否かを判定した。等分散でなかった場合は Welch' s t test を行った。正規性があり、等分散と判定された場合には、 t test を行った。 β 多様性は PERMANOVA により評価した。PERMANOVA は QIIME を用いて解析した。

4.1.3 結果

4.1.3.1 体重・摂食量

サンプリング時に全マウスの体重を計測し、群ごとの平均を Figure 53 に示した。ZT4 サンプリングの 2 群(対照群と ZT0 MgO 群)と ZT16 サンプリングの 2 群(対照群と ZT12 MgO 群)をそれぞれ解析し、別々のグラフで示した。ZT4 サンプリング、ZT16 サンプリングともに、体重に有意な差は見られなかった (Figure 53(a) (b))。

マウスは群飼いし、HFD を固めた餌を与えた。ZT16 サンプリングの 2 群の摂食量に関しては、群の中に餌を過剰に崩しながら摂食するマウスがおり、正確な摂食量を計測できなかったため、グラフを示していない。

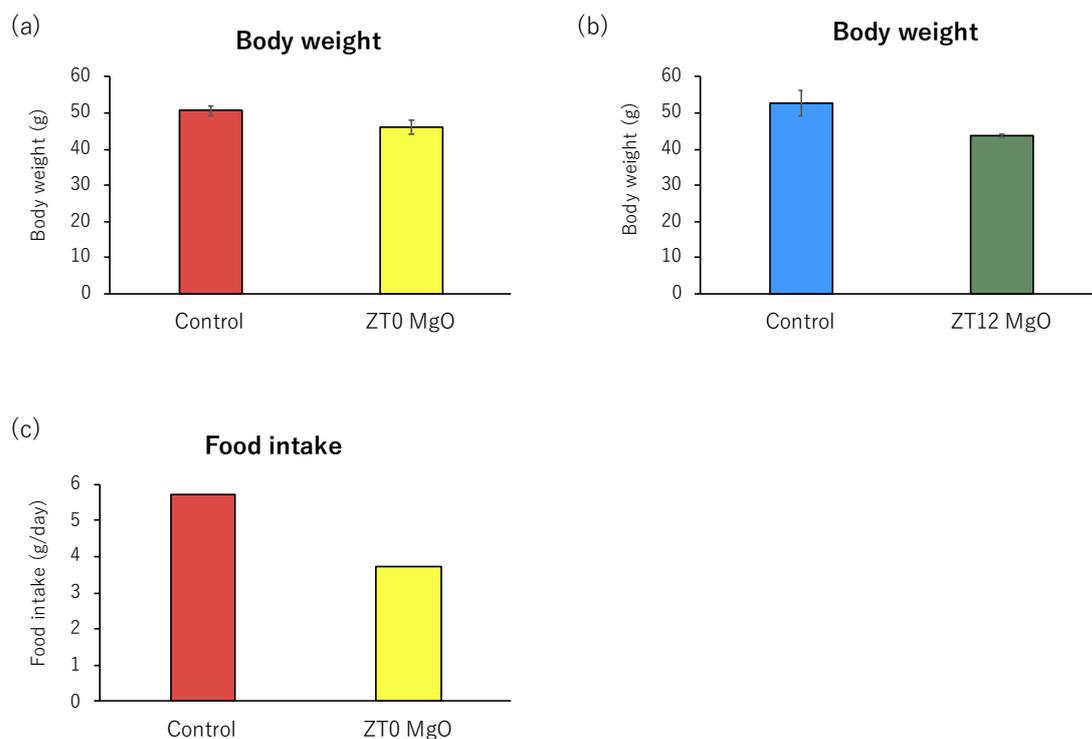


Figure 53 体重と摂食量

(a) サンプリング時 (ZT4) の体重 (b) サンプリング時 (ZT16) の体重 (c) ZT4 にサンプリングした 2 群の一日あたりの摂食量 MgO は ZT0 または ZT12 に 250 mg/kg・BW の用量でマウスに経口投与した。体重のデータは平均±標準誤差で表した (n = 5)。マウスを群飼いで飼育したため、摂食量のグラフには誤差範囲を示していない。尚、摂食量のデータは n = 2-5 で算出しているが、これは、固めた餌を極端に崩して摂食したマウスがおり、正確な摂食量を計測できたマウスのみで摂食量を算出しているためである。

4.1.3.2 盲腸内容物の水分含有率

ZT4 サンプルングの 2 群(対照群と ZT0 MgO 群)と ZT16 サンプルングの 2 群(対照群と ZT12 MgO 群)をそれぞれ解析をし、Figure 54 に示した。ZT4 サンプルング群、ZT16 サンプルング群いずれにおいても、対照群と比較して、MgO 投与群で盲腸内容物の水分含有率が有意に上昇した(Figure 54)。

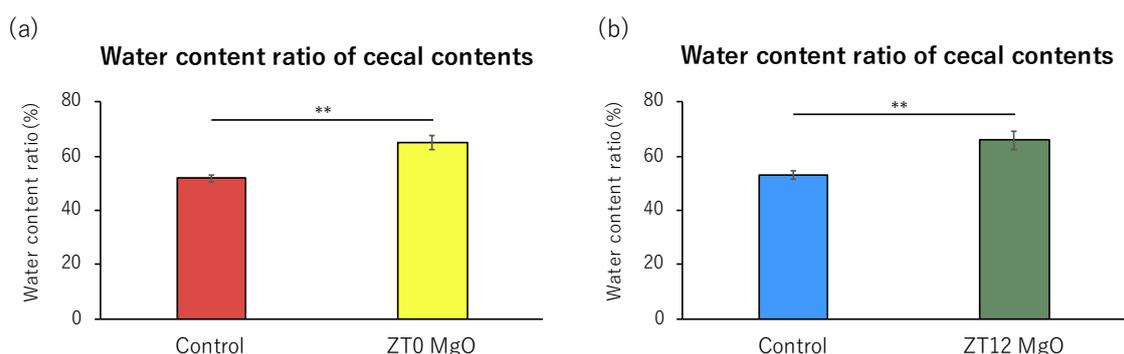


Figure 54 盲腸内容物の水分含有率

MgO は ZT0 または ZT12 に 250 mg/kg・BW の用量でマウスに経口投与した。データは平均±標準誤差で表した(n = 5)。** $p < 0.01$, evaluated using the unpaired t test.

4.1.3.3 腸内細菌叢の多様性

腸内細菌叢の α 多様性の指標である Simpson Index は、対照群と比較して、ZT0 MgO 群で有意に上昇した(Figure 55(a))。また、ZT12 MgO 群の Simpson Index も対照群と比較して有意に高い値を示した(Figure 55(c))。これらの結果は、MgO の経口投与は、投与時刻に関わらず、腸内細菌叢の α 多様性を増加させることを示唆している。

次に腸内細菌叢の β 多様性に与える影響について検証を行ったところ、ZT0 MgO 群、ZT12 MgO 群はどちらも腸内細菌叢の構成を有意に変化させた(Figure 55(b) (d))。これらの結果から、MgO の経口投与は時刻に関わらず、腸内細菌叢の β 多様性を変化させることが示唆された。

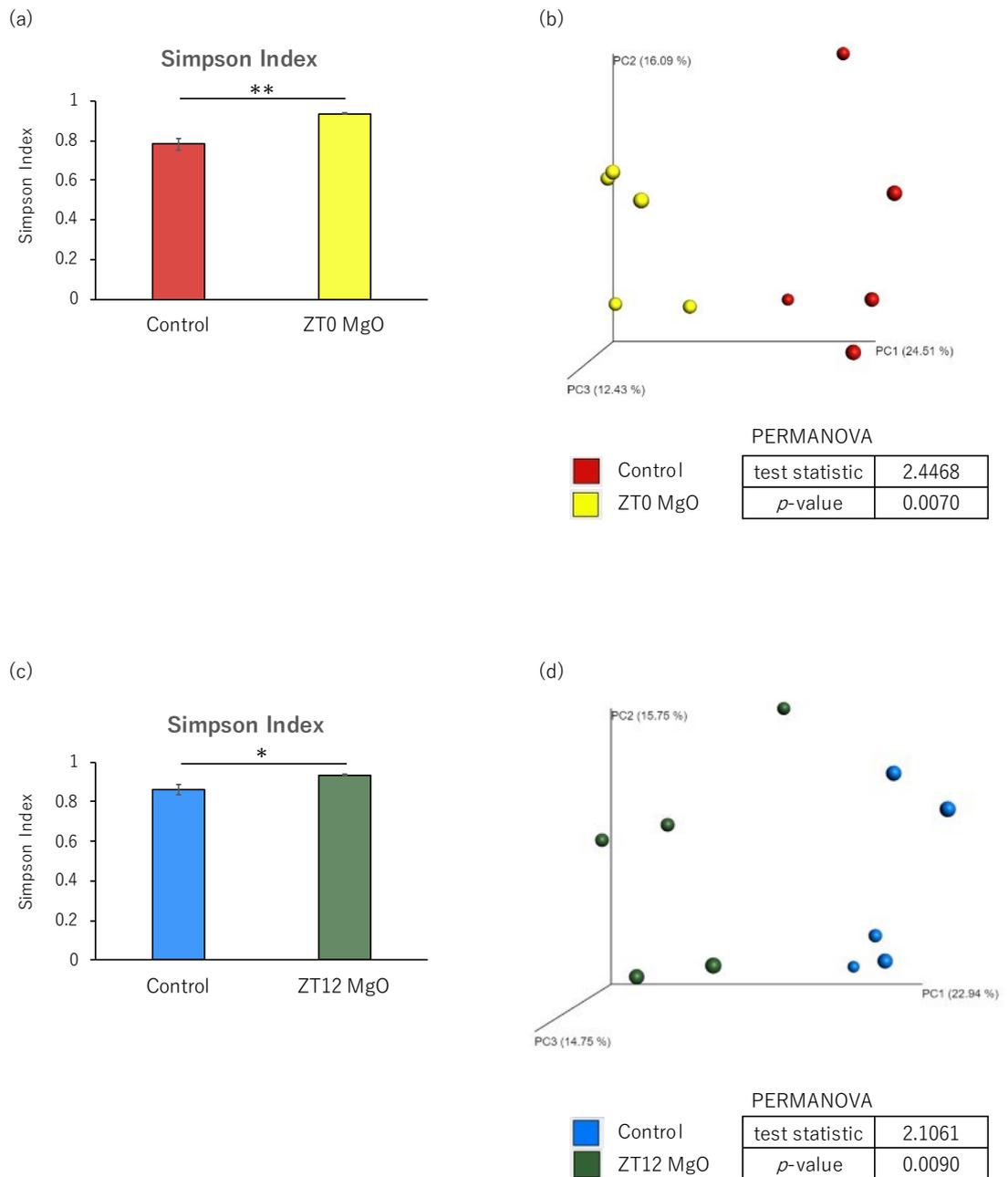


Figure 55 ZT0、ZT12 の MgO 投与が腸内細菌叢の多様性に及ぼす影響

(a) α 多様性 (Simpson Index, 対照群 vs. ZT0 MgO 群) (b) β 多様性 (対照群 vs. ZT0 MgO 群)
 (c) α 多様性 (Simpson Index, 対照群 vs. ZT12 MgO 群) (d) β 多様性 (Inulin 群 vs. ZT12 MgO 群)

MgOZT0 または ZT12 に 250 mg/kg·BW の用量でマウスに経口投与した。PCoA 3d plots は unweighted UniFrac distance で算出した。 α 多様性のデータは平均 ± 標準誤差で表した (n = 5)。各データは下記の統計処理を行った。 α 多様性: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, evaluated using Unpaired *t* test with Welch's correction. β 多様性: A permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA).

4.1.3.4 腸内細菌の相対存在量

第 1～3 章でも述べたように、本研究では *Akkermansia*、*Bacteroides*、*Bifidobacterium*、*Lactobacillus*、*Lactococcus*、*Odoribacter* の 6 種類の属に着目した。これらは相対存在量が多いこと、プロバイオティクスとして利用されていること、疾病との関係が特に注目されていること、本研究で特徴的な変化が認められたことなどを考慮して選定した。

ZT0 に MgO を投与したところ、*Lactobacillus*、*Odoribacter* の相対的存在量が有意に低下した (Figure 56(e)(g))。一方、*Akkermansia*、*Bacteroides* の相対的存在量は有意に上昇した (Figure 56(b)(c))。有意な差は検出されなかったが、対照群と比較して、ZT0 MgO 群の *Lactococcus* の相対的存在量は低値を示し、*Bifidobacterium* の相対存在量は微増した (Figure 56(d)(f))。

次に、ZT12 に MgO を投与した場合の結果について述べる。有意な差ではなかったものの、*Akkermansia* の相対的存在量は、対照群と比較して ZT12 MgO 群で高値を示した (Figure 57(b))。また、*Bacteroides* の相対存在量は有意に上昇した (Figure 57(c))。一方、*Lactococcus* の相対的存在量は有意に低下し、*Lactobacillus*、*Odoribacter* の相対的存在量には低下傾向が見られた (Figure 57(e)(f)(g))。また、有意な差では検出されなかったが、対照群と比較して、ZT12 MgO 群で *Bifidobacterium* の相対存在量が低下した (Figure 57(d))。

以上の結果から、MgO の投与時刻に関わらず、*Odoribacter*、*Lactococcus*、*Lactobacillus* の相対的存在量が減少し、*Akkermansia*、*Bacteroides* の相対的存在量が増加することが示された。一方で、*Bifidobacterium* の相対的存在量の変動は、ZT0 に MgO を投与する場合と、ZT12 に MgO を投与する場合で異なることが示唆された。

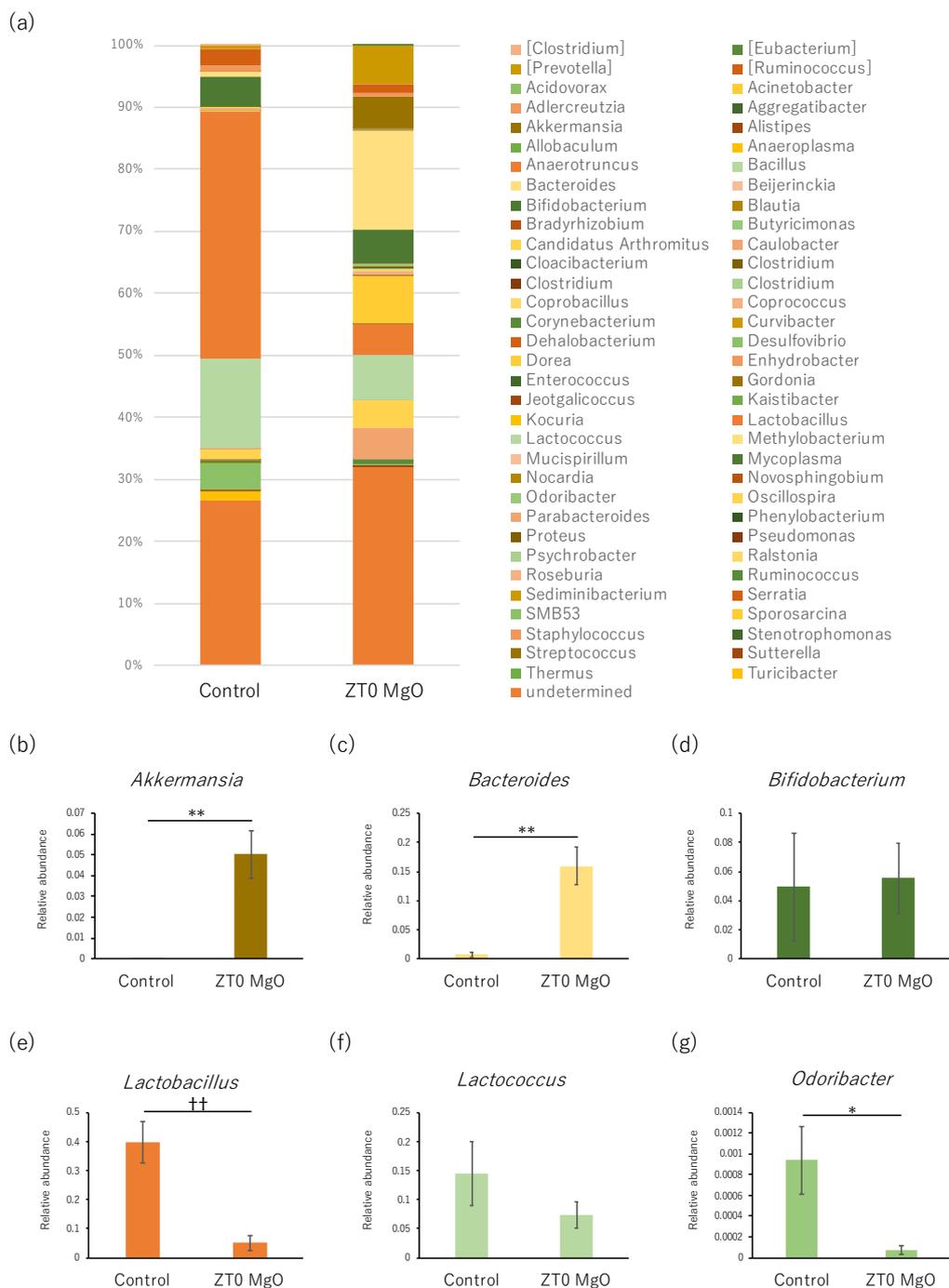


Figure 56 ZT0 の MgO 投与が各細菌に及ぼす影響

(a) Taxonomy summary (b) *Akkermansia* の腸内細菌の相対存在量 (c) *Bacteroides* の腸内細菌の相対存在量 (d) *Bifidobacterium* の腸内細菌の相対存在量 (e) *Lactobacillus* の腸内細菌の相対存在量 (f) *Lactococcus* の腸内細菌の相対存在量 (g) *Odoribacter* の腸内細菌の相対存在量 MgO は ZT0 に 250 mg/kg · BW の用量でマウスに経口投与した。細菌の相対存在量のデータは平均 ± 標準偏差で表した (n = 5)。* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, evaluated using Mann Whitney test. †† $p < 0.01$, evaluated using the Unpaired t test.

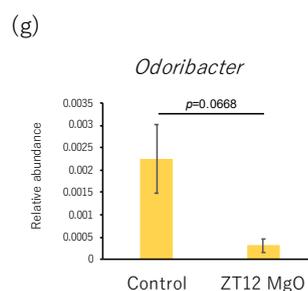
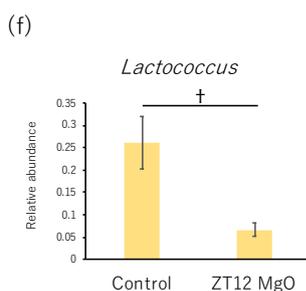
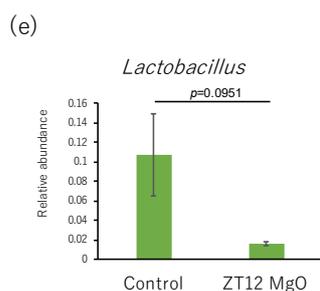
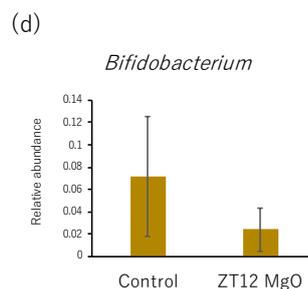
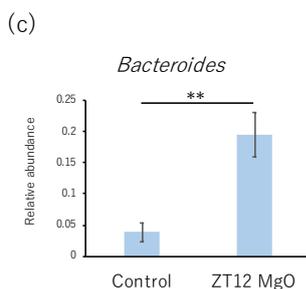
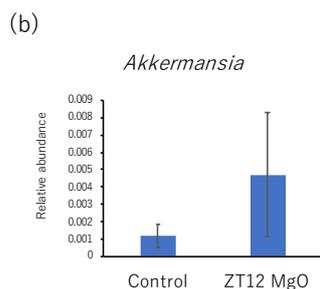
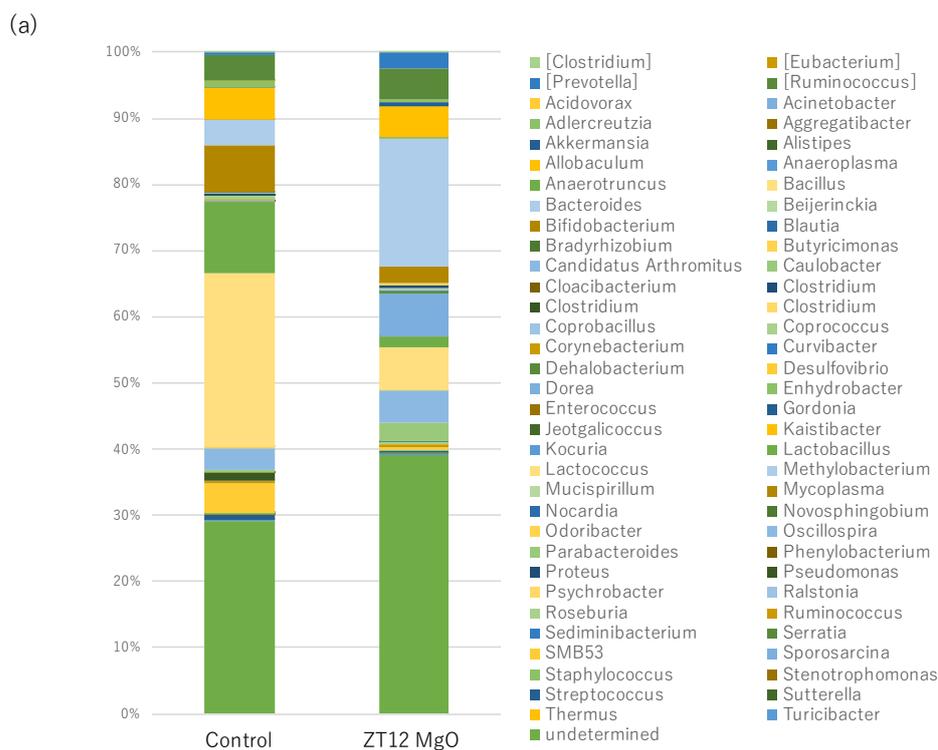


Figure 57 ZT12 の MgO 投与が各細菌に及ぼす影響

(a) Taxonomy summary (b) *Akkermansia* の腸内細菌の相対存在量 (c) *Bacteroides* の腸内細菌の相対存在量 (d) *Bifidobacterium* の腸内細菌の相対存在量 (e) *Lactobacillus* の腸内細菌の相対存在量 (f) *Lactococcus* の腸内細菌の相対存在量 (g) *Odoribacter* の腸内細菌の相対存在量 MgO は ZT12 に 250 mg/kg · BW の用量でマウスに経口投与した。細菌の相対存在量のデータは平均 ± 標準誤差で表した (n = 5)。** $p < 0.01$, evaluated using the Unpaired t test. † $p < 0.01$, evaluated using Unpaired t test with Welch's correction.

4.1.3.5 盲腸内 pH

ZT0 Mg0 群、ZT12 Mg0 群の盲腸内 pH は対照群と比較して有意に高かった (Figure 58(a))。これらの結果から、Mg0 は投与時刻に関わらず、盲腸内 pH を有意に上昇させることが示唆された。

4.1.3.6 盲腸内乳酸濃度および SCFA 濃度

盲腸内の乳酸濃度、プロピオン酸濃度は、ZT0 Mg0 群、ZT12 Mg0 群のいずれでも有意な差が見られなかった (Figure 58(b) (d))。一方、酪酸に関しては、ZT0 Mg0 群、ZT12 Mg0 群ともに、対照群と比較して有意な濃度低下が見られた (Figure 58(e))。酢酸濃度は ZT12 Mg0 群では有意な差が検出されなかったが、ZT0 Mg0 群で低下傾向が見られた (Figure 58(c))。乳酸濃度と総 SCFA 濃度の総計では、ZT0 Mg0 群は対照群と比較して有意な濃度低下がみられ、ZT12 Mg0 群は低下傾向が見られた (Figure 58(f))。

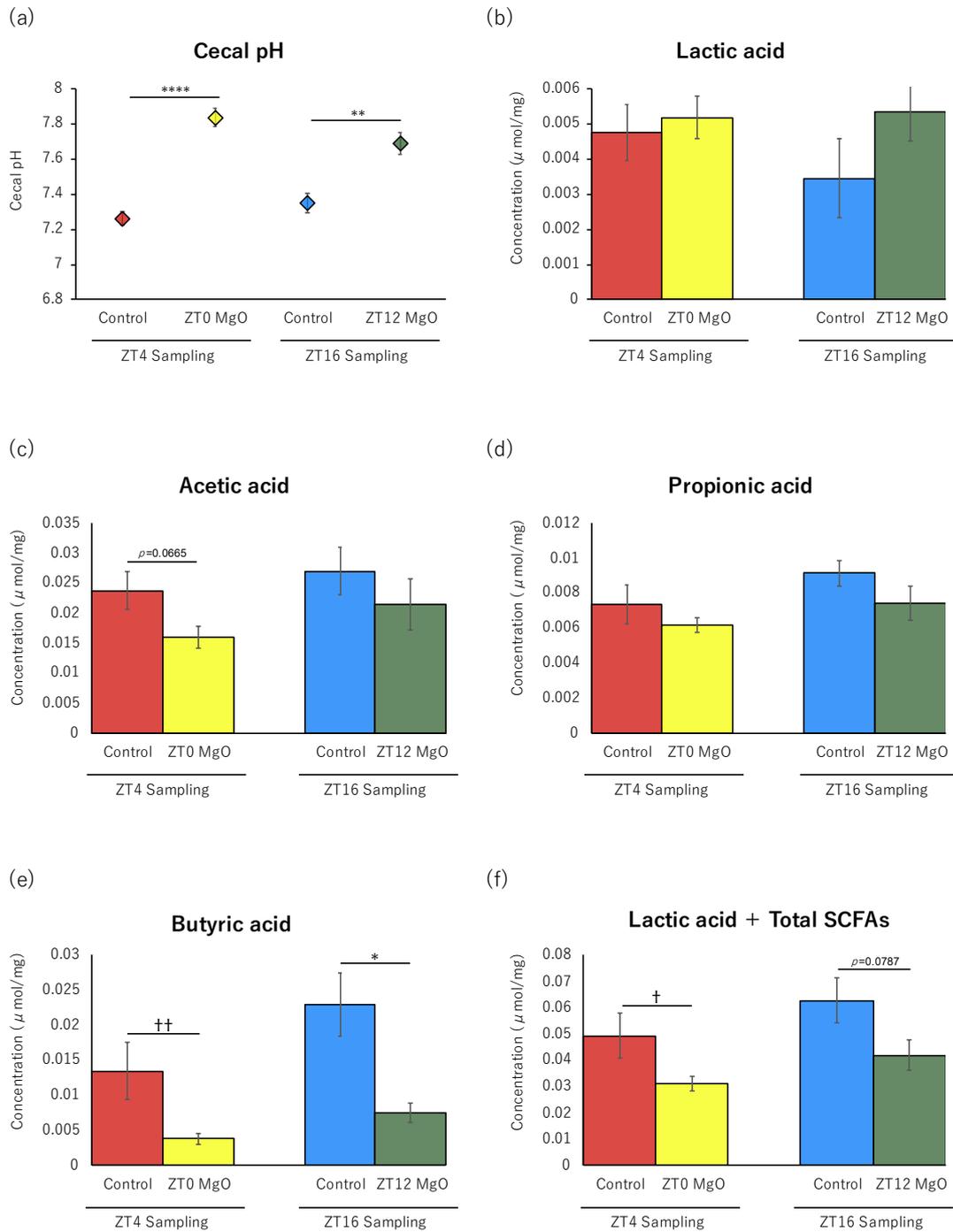


Figure 58 ZT0 または ZT12 投与の MgO が盲腸内 pH、盲腸内乳酸濃度および SCFA 濃度に及ぼす影響 (a) 盲腸内 pH (b) 乳酸濃度 (c) 酢酸濃度 (d) プロピオン酸濃 (e) 酪酸濃度 (f) 乳酸 + 総 SCFA 濃度 (総 SCFA 濃度は酢酸濃度、プロピオン酸濃度、酪酸濃度の総計) MgO は ZT0 または ZT12 に 250 mg/kg · BW の用量でマウスに経口投与した。乳酸および SCFA は盲腸内容物の乾燥重量あたりの濃度を算出した。データは平均±標準誤差で表した (n = 5)。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and **** $p < 0.0001$, evaluated using the Unpaired t test.

† $p < 0.05$ and †† $p < 0.01$, evaluated using Mann Whitney test.

4.2. MgO と Inulin の併用が腸内環境に与える影響と服用タイミングの関係

4.2.1 序論

4.1 では MgO の投与タイミングが腸内細菌叢や SCFA に与える影響について調べたが、ここでは、食物繊維を摂取しながら服薬するというヒトの日常で起こりうる併用が腸内細菌叢や SCFA に及ぼす影響について調べた。ヒトの場合、食物繊維は食事から摂取する可能性が高いため、4.2 の実験では、Inulin を自由摂食条件下で混餌投与した。一方、ヒトは一般的に、薬物がある決められた時刻に服用する。そのため、ここでは MgO を ZT0 (ヒトにおける就寝時) または ZT12 (ヒトにおける起床時) に投与した。水溶性食物繊維 Inulin と MgO の併用が腸内細菌叢や SCFA に及ぼす影響について調べ、MgO の至適投与タイミングを検討した研究は、本論文の基となった原著論文が初めてである。

4.2.2 実験材料および方法

(1) 動物

『2.3.2(1)動物』の項に記載の通りとした。

(2) 実験デザイン

4.2 では Inulin 併用時、MgO が腸内細菌叢および盲腸内 SCFA 濃度に与える影響とその投与時刻の関係を調べた。MgO の投与時刻はマウスの非活動期の開始時刻である ZT0 と、マウスの活動期の開始時刻である ZT12 のいずれかとした。MgO は水道水に懸濁し、ゾンデを用いて経口投与した (250 mg/kg・BW)。Inulin は餌の総重量の 2.5% になるよう混餌して与えた。また、4.1 の実験と同様に、対照群、MgO 群の餌には cellulose を 2.5% 混餌した。それぞれの MgO 投与時刻の 4 時間後にサンプリング (ZT0 投与は ZT4 に、ZT12 投与は ZT16 にサンプリング) を行い、腸内細菌叢および盲腸内 SCFA の各ポイントでの変動をみた。尚、腸内細菌叢にも概日リズムが存在することから、対照群、Inulin 群は各サンプリングポイントに用意した。使用動物を最小限に抑えるため、対照群、Inulin 群は 4.1 と共通の対照群とした。餌は、45% kcal の脂肪を含む高脂肪食を用いた (Table 8)。11 日間の実験期間中、マウスは自由摂食、自由飲水の条件下で飼育した。最終日の MgO 投与時刻の 4 時間後にサンプリングをし、盲腸内 pH の測定および盲腸内容物、糞便の採取を行った (Figure

59)。

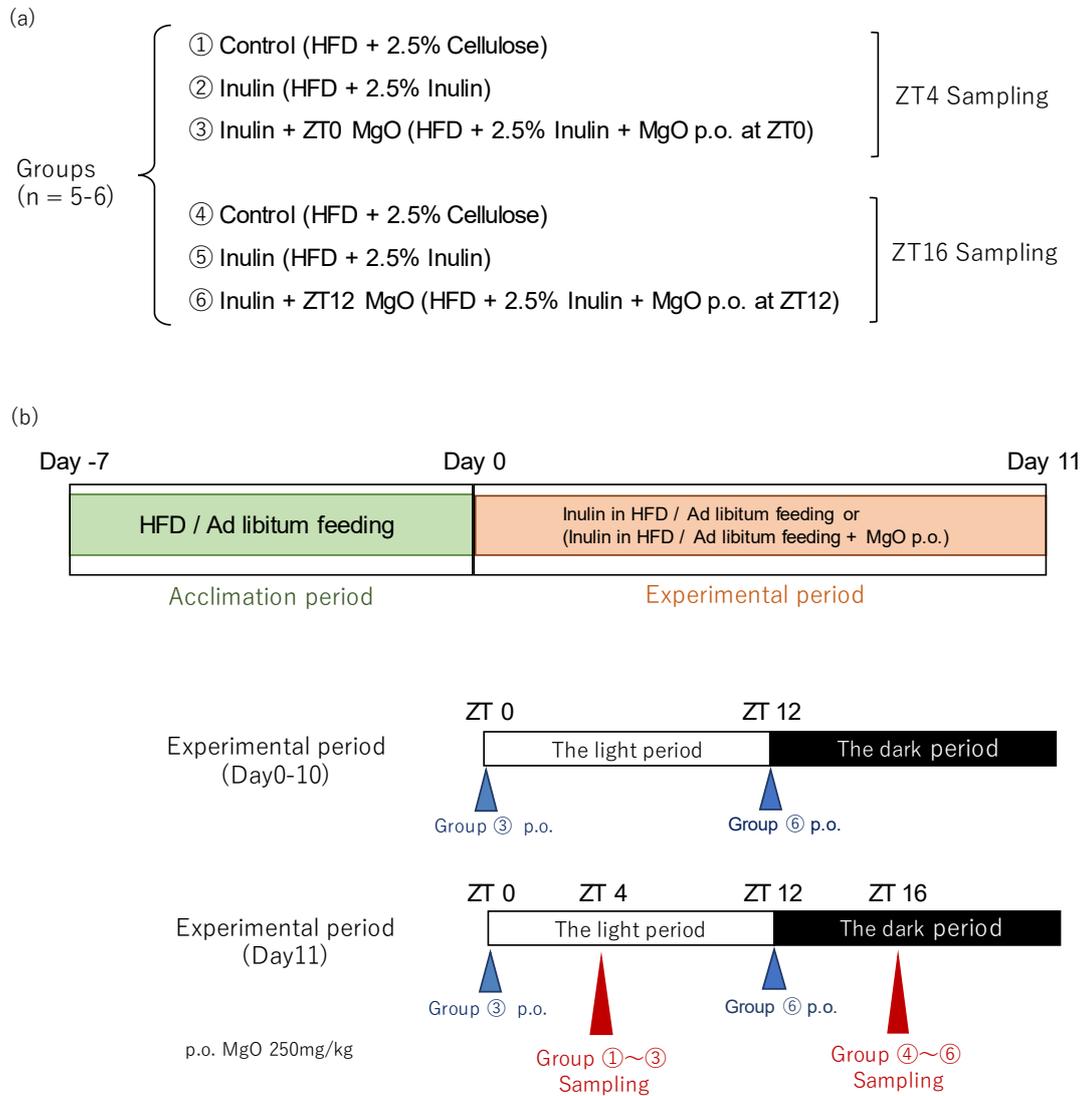


Figure 59 実験デザイン(4.2 MgO と Inulin の併用が腸内環境に与える影響と服用タイミングの関係)

(a) 群分け (b) 実験スケジュール

(3) 盲腸内 pH の測定

『2.1.2(3)盲腸内 pH の測定』の項に記載の通りとした。

(4) 盲腸内乳酸濃度および SCFA 濃度

『2.1.2(4)盲腸内 SCFA 濃度および乳酸濃度の測定』の項に記載の通りとした。

(5) 糞便中の DNA 抽出

『2.1.2(5)糞便中の DNA 抽出』の項に記載の通りとした。

(6) 16S rDNA シークエンス

『2.1.2(6)16S rDNA シークエンス』の項に記載の通りとした。

(7) 16SrDNA の遺伝子シークエンスの分析

『2.1.2(7) 16S rDNA の遺伝子シークエンスの分析』の項に記載の通りとした。

4.2.3 結果

4.2.3.1 体重・摂食量

全マウスの体重と一日あたりの摂食量の平均(day 4 から day 11 までの 7 日間の摂食量の平均)を Figure 60 に示した。体重は ZT4 サンプルングの 3 群(対照群、Inulin 群、Inulin + ZT0 MgO 群)と ZT16 サンプルングの 3 群(対照群、Inulin 群、Inulin + ZT12 MgO 群)でそれぞれ解析をし、別々のグラフで示した。尚、マウスは群飼いで飼育していたため、摂食量に関しては統計処理を行っていない。ZT4 サンプルングでは対照群と比較して、Inulin 群、Inulin+ZT0 MgO 群の平均体重は有意に低かった(Figure 60(a))。体重の低下は個体差による摂食量の低下に由来する可能性が考えられた。ZT16 サンプルングの 3 群では体重に有意な差は見られなかった(Figure 60(b))。

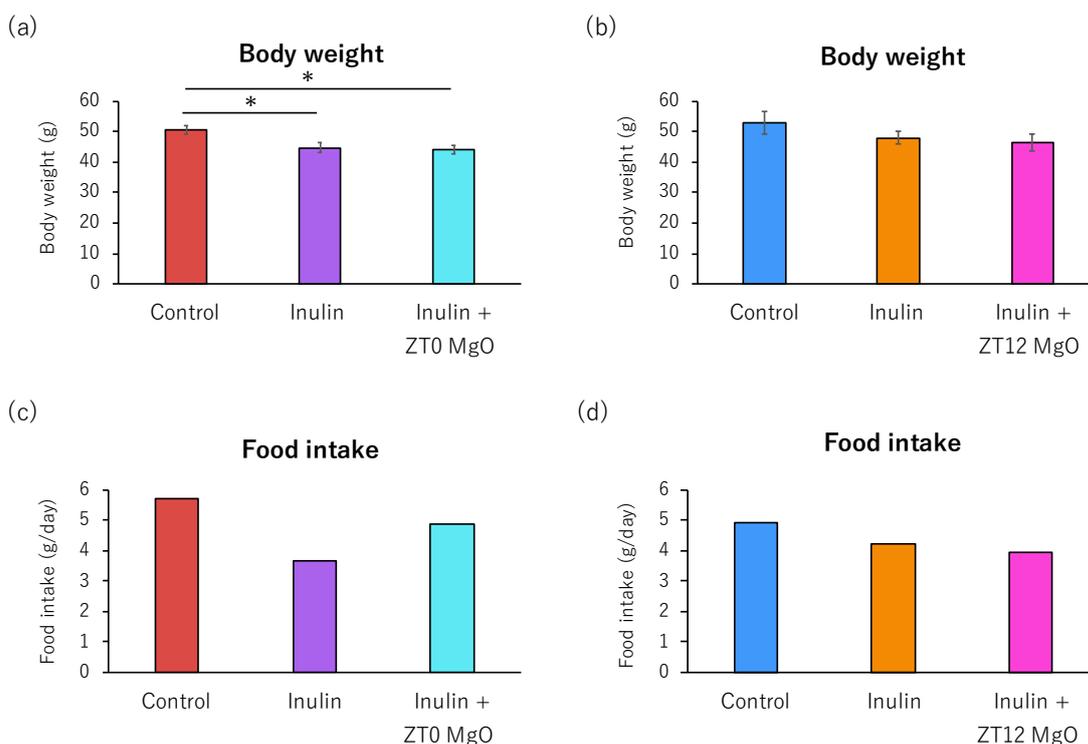


Figure 60 体重と摂食量

(a) サンプルング時(ZT4)の体重 (b) サンプルング時(ZT16)の体重 (c) ZT4にサンプルングした 3 群の一日あたりの摂食量(day 4 から day 11 までの 7 日間の摂食量の平均) (d) ZT16にサンプルングした 3 群の一日あたりの摂食量(day 4 から day 11 までの 7 日間の摂食量の平均) Inulin は餌の総重量の 2.5%となるように混餌した。MgO は ZT0 または ZT12 に 250 mg/kg・BW の用量でマウスに経口投与した。体重のデータは平均±標準誤差で表した(n = 5-6)。マウスを群飼いで飼育したため、摂食量のグラフには誤差範囲を示していない。尚、摂食量のデータは n = 2-5 で算出しているが、これは、固めた餌を極端に崩して摂食したマウスがおり、正確な摂食量を計測できたマウスのみで摂食量を算出しているためである。* $p < 0.05$, evaluated using the one-way ANOVA with Tukey's post hoc test.

4.2.3.2 盲腸内容物の水分含有率

ZT4 サンプルングの 3 群(対照群、Inulin 群、Inulin + ZT0 MgO 群)と ZT16 サンプルングの 3 群(対照群、Inulin 群、Inulin + ZT12 MgO 群)でそれぞれ解析をし、別々のグラフで示した。盲腸内の水分含有率は ZT4 サンプルング群、ZT16 サンプルング群いずれにおいても、対照群と比較して Inulin 群で増加傾向になり、Inulin + MgO 群で有意に増加した(Figure 61)。ZT16 サンプルングでは、Inulin 群と比較して、Inulin + ZT12 MgO 群で盲腸内水分含有率は有意に増加した(Figure 61(b))。

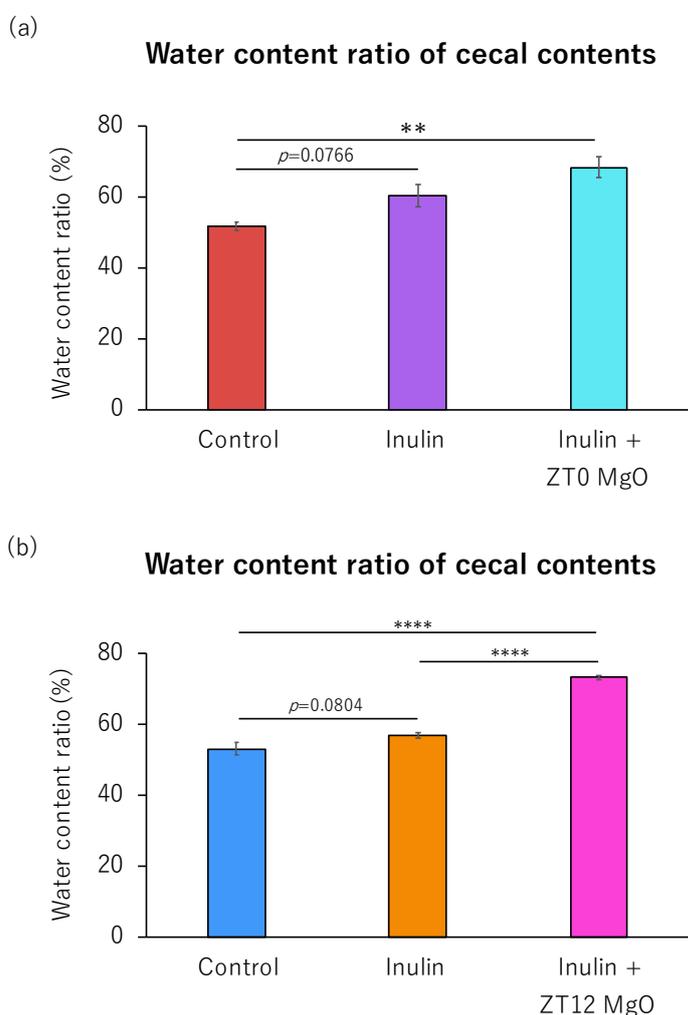


Figure 61 盲腸内容物の水分含有率

Inulin は餌の総重量の 2.5%となるように混餌した。MgO は ZT0 または ZT12 に 250 mg/kg・BW の用量でマウスに経口投与した。データは平均±標準誤差で表した(n = 5-6)。

** $p < 0.01$ and **** $p < 0.0001$, evaluated using the one-way ANOVA with Tukey's post hoc test.

4.2.3.3 腸内細菌叢の多様性

ZT4 サンプルングの 3 群と ZT16 サンプルングの 3 群をそれぞれ比較し、各ポイントでの腸内細菌叢への影響を検証した。

Inulin + ZT0 Mg0 群の Simpson Index は対照群と比較して、有意に高かった (Figure 62(a))。また、Inulin 群の Simpson Index は対照群と比較して上昇傾向であった (Figure 62(a))。ZT4 サンプルングの 3 群の β 多様性を比較したところ、腸内細菌叢の構成が有意に異なることが示された (Figure 62(b))。どの 2 群間に差があるのかを調べるため、対照群と Inulin 群、Inulin 群と Inulin + ZT0 Mg0 群、対照群と Inulin + ZT0 Mg0 群をそれぞれ比較した。その結果、全ての組み合わせにおいて有意な構成変化が見られることが示された (Figure 62(c) (d) (e))。

次に、ZT16 サンプルングの 3 群を比較した。Inulin + ZT12 Mg0 群の Simpson Index は Inulin 群と比較して、有意に高かった (Figure 63(a))。また、対照群と比較して、Inulin + ZT12 Mg0 群の Simpson Index は上昇傾向だった (Figure 63(a))。3 群間の β 多様性の変化を検証したところ、腸内細菌叢の構成が有意に異なることが示された (Figure 63(b))。対照群と Inulin 群、対照群と Inulin + ZT12 Mg0 群、Inulin 群と Inulin + ZT12 Mg0 群をそれぞれ比較したところ、いずれにおいても β 多様性に有意な変化が見られた (Figure 63(c) (d) (e))。

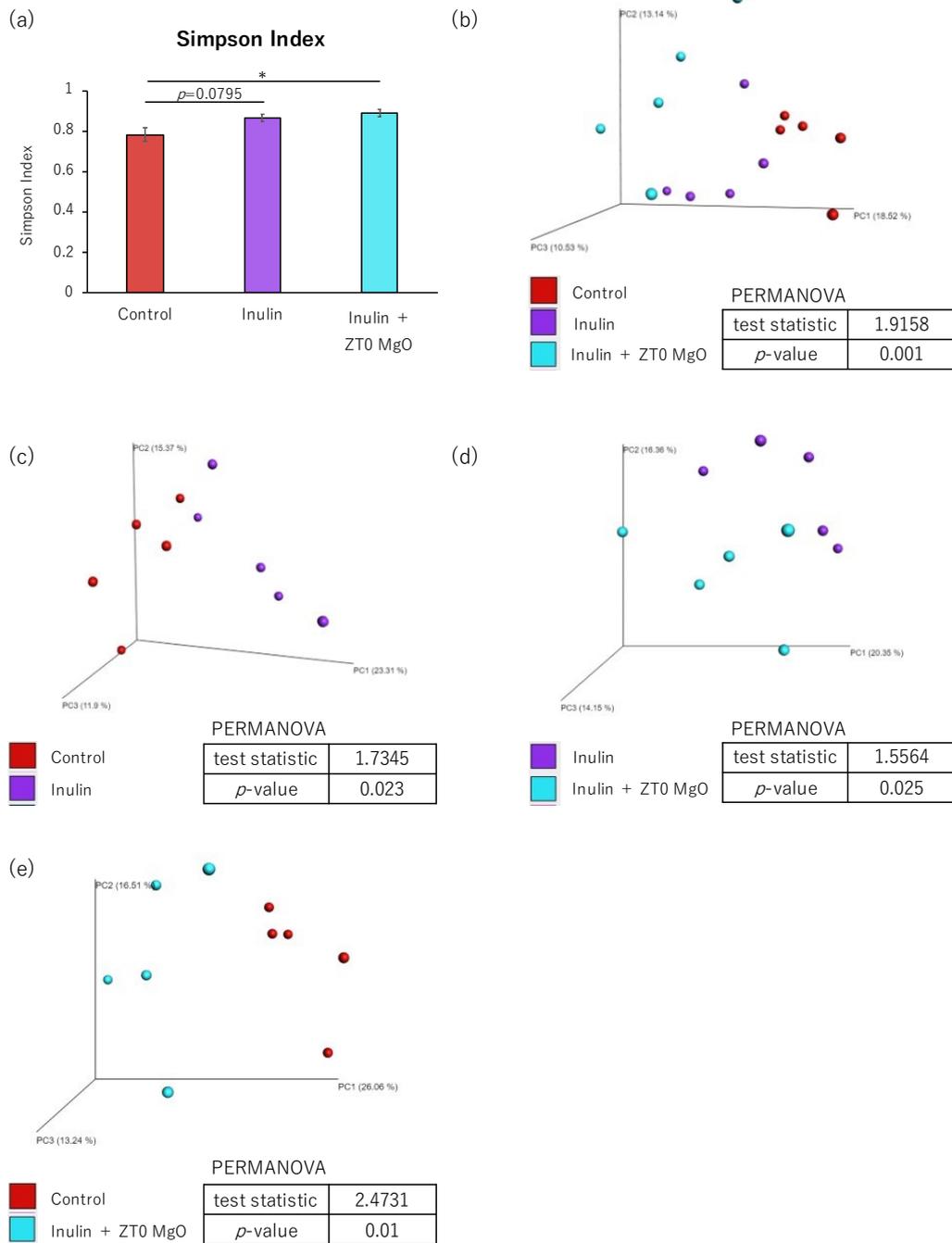


Figure 62 Inulin 併用時、ZT0 の MgO 投与が腸内細菌叢の多様性に及ぼす影響

(a) α 多様性 (Simpson Index, 対照群 vs. Inulin 群 vs. Inulin + ZT0 MgO 群) (b) β 多様性 (対照群 vs. Inulin 群 vs. Inulin + ZT0 MgO 群) (c) β 多様性 (対照群 vs. Inulin 群) (d) β 多様性 (Inulin 群 vs. Inulin + ZT0 MgO 群) (e) β 多様性 (対象群 vs. Inulin + ZT0 MgO 群) Inulin は餌の総重量の 2.5% となるように混餌し、MgO は ZT0 に 250 mg/kg · BW の用量でマウスに経口投与した。

PCoA 3d plots は unweighted UniFrac distance で算出した。 α 多様性のデータは平均 ± 標準誤差で表した (n = 5-6)。各データは下記の統計処理を行った。

α 多様性: * $p < 0.05$ evaluated using the one-way ANOVA with Tukey's post hoc test.

β 多様性: A permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA).

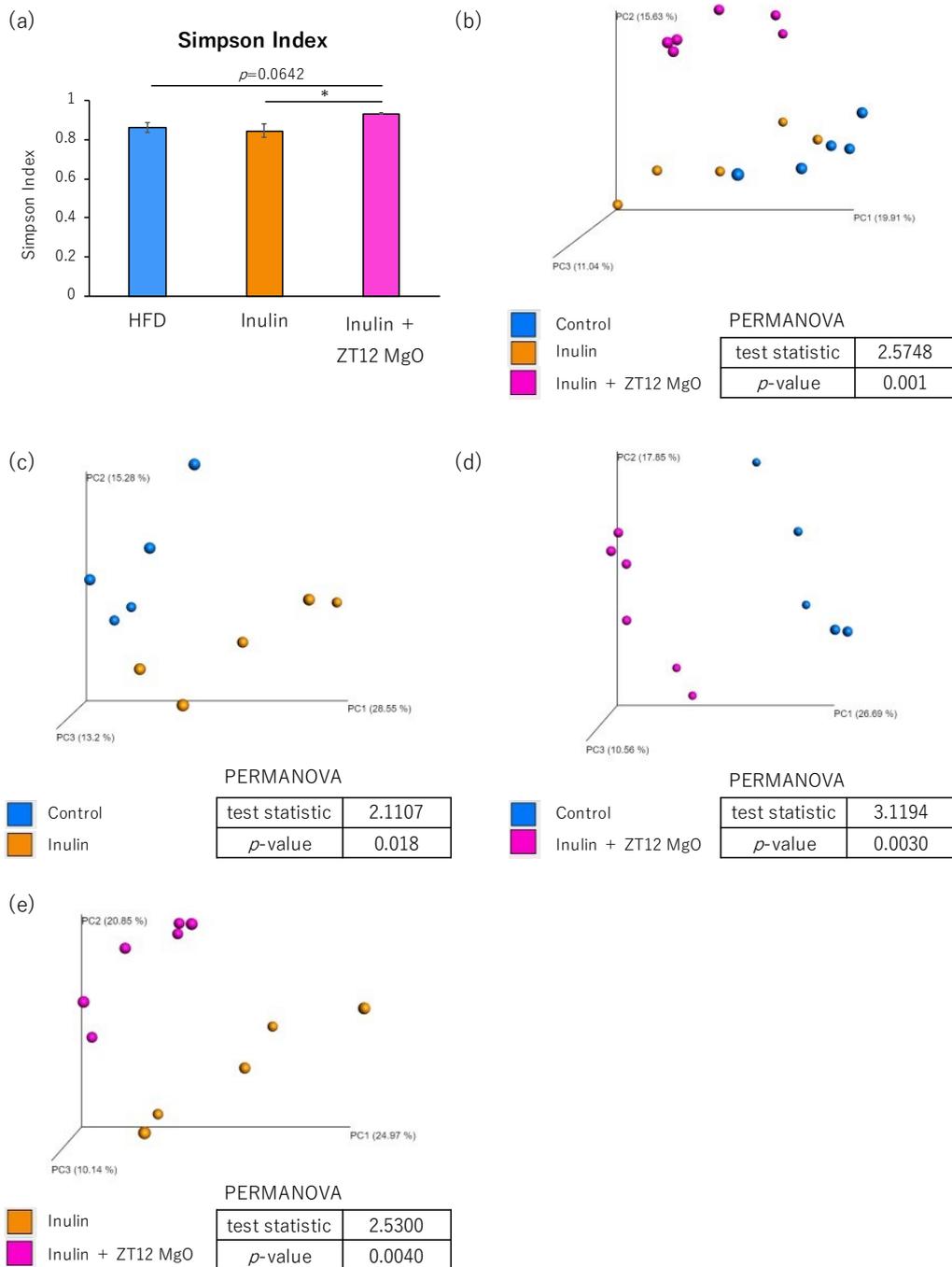


Figure 63 Inulin 併用時、ZT12 の MgO 投与が腸内細菌叢の多様性に及ぼす影響

(a) α 多様性 (Simpson Index, 対照群 vs. Inulin 群 vs. Inulin + ZT12 MgO 群) (b) β 多様性 (対照群 vs. Inulin 群 vs. Inulin + ZT12 MgO 群) (c) β 多様性 (対照群 vs. Inulin 群) (d) β 多様性 (対照群 vs. Inulin + ZT12 MgO 群) (e) β 多様性 (Inulin 群 vs. Inulin + ZT12 MgO 群) Inulin は餌の総重量の 2.5% となるように混餌し、MgO は ZT12 に 250 mg/kg \cdot BW の用量でマウスに経口投与した。PCoA 3d plots は unweighted UniFrac distance で算出した。 α 多様性のデータは平均 \pm 標準誤差で表した ($n = 5-6$)。各データは下記の統計処理を行った。
 α 多様性: * $p < 0.05$ evaluated using the Kruskal-Wallis test with Dunn's post hoc test.
 β 多様性: A permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA).

4.2.3.4 腸内細菌の相対存在量

ZT4 サンプルングの 3 群と ZT16 サンプルングの 3 群をそれぞれ比較し、各ポイントでの腸内細菌への影響を検証した。第 1~3 章や前節でも述べたように、本研究では *Akkermansia*、*Bacteroides*、*Bifidobacterium*、*Lactobacillus*、*Lactococcus*、*Odoribacter* の 6 種類の属に着目した。これらは相対存在量が多いこと、プロバイオティクスとして利用されていること、疾病との関係が特に注目されていること、本研究で特徴的な変化が認められたことなどを考慮して選定した。

ZT4 サンプルングの 3 群を比較したところ、対照群と比較して、Inulin + ZT0 Mg0 群では、*Akkermansia*、*Bacteroides* の相対存在量が有意に増加した (Figure 64(b)(c))。また、対照群と比較して、Inulin 群、Inulin + Mg0 群で *Lactobacillus* の相対存在量が有意に減少した (Figure 64(e))。有意な差は認められなかったが、*Bacteroides* の相対存在量は、Inulin 群と比較して、Inulin + ZT0 Mg0 群で高い値を示した (Figure 64(d))。有意ではなかったものの、*Lactococcus*、*Odoribacter* の相対存在量は Inulin 群と比較して、Inulin + ZT0 Mg0 群で低い値を示した (Figure 64(g))。

ZT12 サンプルングの 3 群を比較したところ、*Akkermansia* の相対存在量は、対照群と比較して、Inulin + ZT12 Mg0 群で有意に増加した (Figure 65(b))。*Bacteroides* の相対存在量は、対照群、Inulin 群と比較して、Inulin + ZT12 Mg0 群で有意に増加した (Figure 65(c))。有意な差は検出できなかったが、*Bifidobacterium* の相対存在量は Inulin 群と比較して、Inulin + ZT12 Mg0 群で低い値を示した (Figure 65(d))。*Lactobacillus*、*Lactococcus* の相対存在量は対照群と比較して、Inulin + ZT12 Mg0 群で有意に減少した (Figure 65(e)(f))。*Odoribacter* の相対存在量は、Inulin 群と比較して、Inulin + ZT12 Mg0 群で有意に減少した (Figure 65(g))。

ZT0 投与時と ZT12 投与時を比較すると、*Akkermansia*、*Bacteroides*、*Lactobacillus*、*Lactococcus* の挙動は同傾向であることが示された。一方、*Bacteroides* と *Odoribacter* の挙動は ZT0 投与と ZT12 投与で異なっていた。

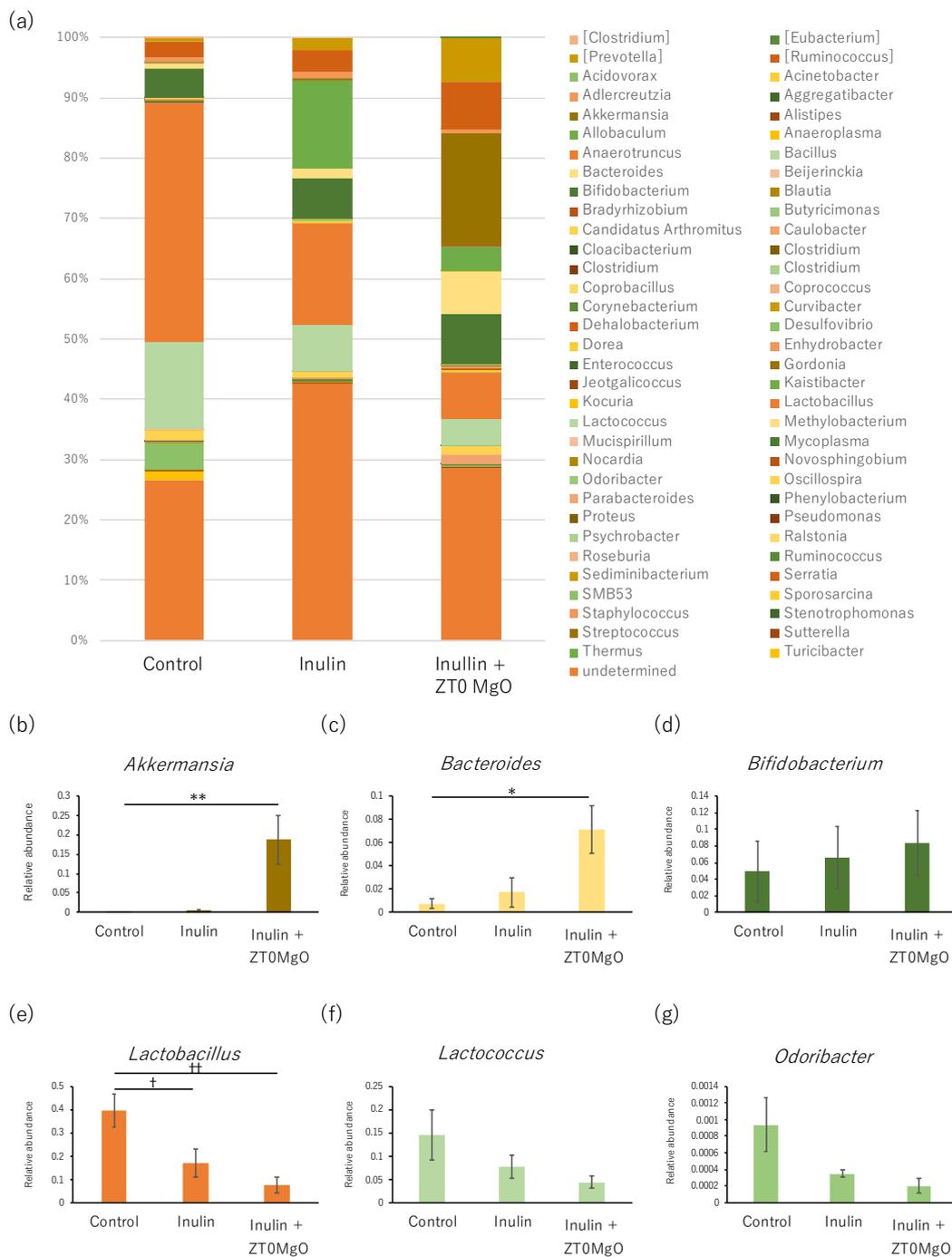


Figure 64 Inulin 併用時、ZT0 の MgO 投与が各細菌に及ぼす影響

(a) Taxonomy summary (b) *Akkermansia* の腸内細菌の相対存在量 (c) *Bacteroides* の腸内細菌の相対存在量 (d) *Bifidobacterium* の腸内細菌の相対存在量 (e) *Lactobacillus* の腸内細菌の相対存在量 (f) *Lactococcus* の腸内細菌の相対存在量 (g) *Odoribacter* の腸内細菌の相対存在量 Inulin は餌の総重量の 2.5% となるように混餌し、MgO は ZT0 に 250 mg/kg · BW の用量でマウスに経口投与した。細菌の相対存在量のデータは平均 ± 標準誤差で表した (n = 5-6)。

* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, evaluated using the Kruskal-Wallis test with Dunn's post hoc test. † $p < 0.05$ and †† $p < 0.01$, evaluated using the one-way ANOVA with Tukey's post hoc test.

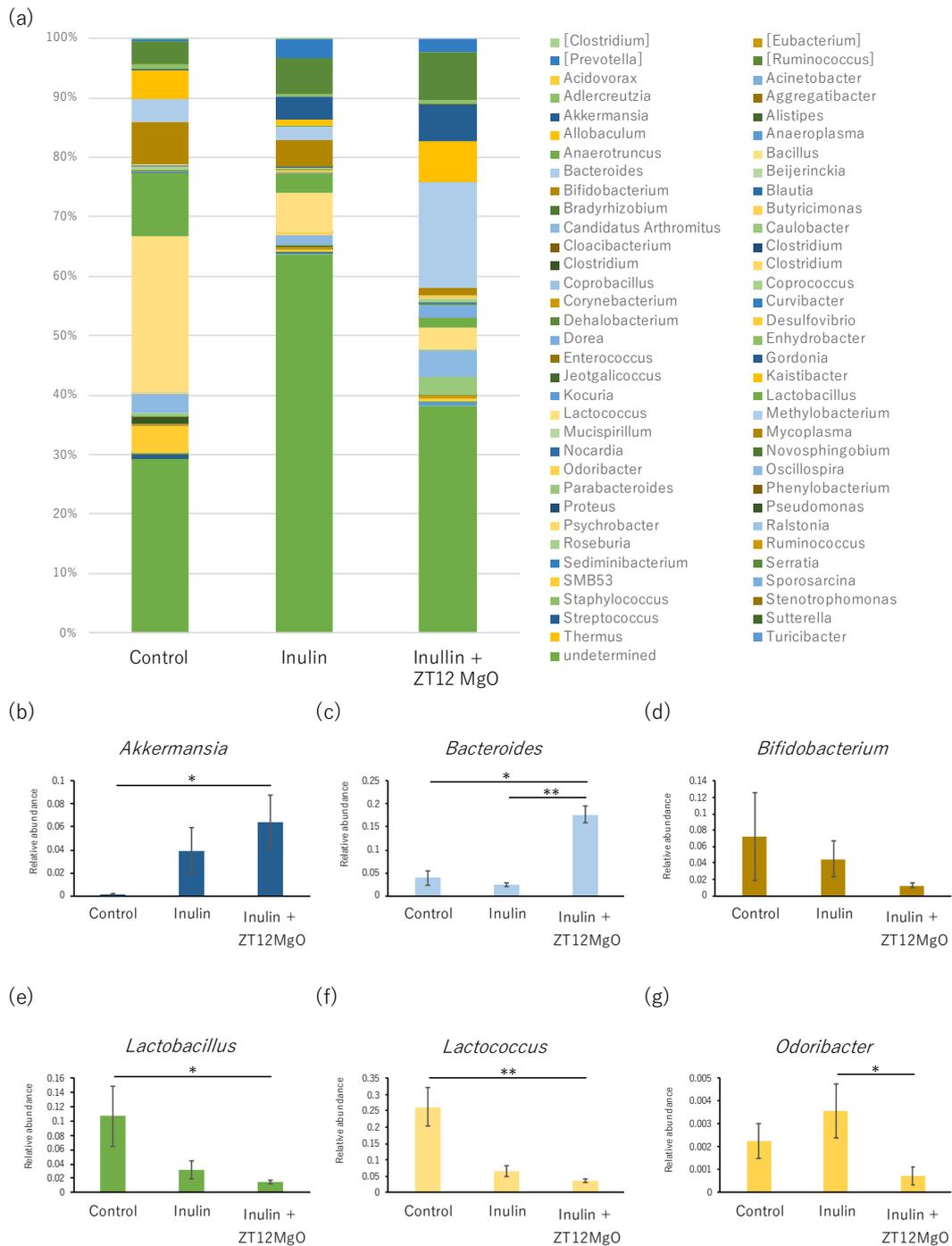


Figure 65 Inulin 併用時、ZT12 の MgO 投与が各細菌に及ぼす影響

(a) Taxonomy summary (b) *Akkermansia* の腸内細菌の相対存在量 (c) *Bacteroides* の腸内細菌の相対存在量 (d) *Bifidobacterium* の腸内細菌の相対存在量 (e) *Lactobacillus* の腸内細菌の相対存在量 (f) *Lactococcus* の腸内細菌の相対存在量 (g) *Odoribacter* の腸内細菌の相対存在量 Inulin は餌の総重量の 2.5% となるように混餌し、MgO は ZT12 に 250 mg/kg・BW の用量でマウスに経口投与した。細菌の相対存在量のデータは平均±標準誤差で表した (n = 5-6)。* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, evaluated using the Kruskal-Wallis test with Dunn's post hoc test.

4.2.3.5 盲腸内 pH

有意な差ではなかったものの、ZT4 サンプルングの Inulin 群の盲腸内 pH は、対照群と比較して低い値を示した (Figure 66(a))。一方、Inulin + ZT0 Mg0 群の盲腸内 pH は、ZT4 サンプルングの Inulin 群と比較して有意に上昇した (Figure 66(a))。ZT16 サンプルングの Inulin 群の盲腸内 pH は、対照群と比較して有意に低かった (Figure 66(a))。一方で、Inulin + ZT12 Mg0 群の盲腸内 pH は、ZT16 サンプルングの Inulin 群と比較して有意に上昇した (Figure 66(a))。また、Inulin + ZT12 Mg0 群の盲腸内 pH は対照群と比較して上昇傾向が見られた (Figure 66(a))。

4.2.3.6 盲腸内乳酸濃度および SCFA 濃度

乳酸濃度は、ZT4 にサンプルングをした 3 群間で有意な差は検出されなかったが、対照群と比較して Inulin 群で高い値を示し、Inulin 群と比較して Inulin + Mg0 群では低い値を示した (Figure 66(b))。ZT16 にサンプルングをした 3 群間では、対照群と比較して、Inulin + Mg0 群の乳酸濃度が上昇傾向だった (Figure 66(b))。酢酸濃度は、ZT4 にサンプルングした 3 群間を比較すると、有意な差ではなかったが、対照群と比較して Inulin 群で高値を示した (Figure 66(c))。Inulin 群と比較して、Inulin + Mg0 群では有意な濃度低下が見られた (Figure 66(c))。一方で、ZT16 サンプルング群でも Inulin による濃度上昇、Mg0 併用による濃度低下が見られたが、いずれも有意な差は検出されなかった (Figure 66(c))。プロピオン酸においては、ZT4 サンプルング、ZT16 サンプルングで共に Inulin による有意な濃度上昇が見られた (Figure 66(d))。有意な差は検出できなかったものの、いずれのサンプルングポイントでも Inulin 群と比較して、Inulin + Mg0 群の濃度は低値を示した (Figure 66(d))。酪酸濃度は、ZT4Z、ZT16 のいずれのサンプルング時刻においても、Inulin で上昇した濃度が Mg0 の併用により有意に低下した (Figure 66(e))。乳酸濃度と総 SCFA 濃度の総計についても、Inulin での濃度上昇と Mg0 の併用による濃度低下が見られた (Figure 66(f))。ZT4 サンプルングの群では、Inulin で上昇した濃度は Mg0 の併用により有意に低下し、ZT16 サンプルングの群では、Mg0 の併用による濃度の低下傾向が見られた (Figure 66(f))。また、ZT16 サンプルングの群では、対照群と比較して、Inulin 群で有意な濃度上昇が見られた (Figure 66(f))。

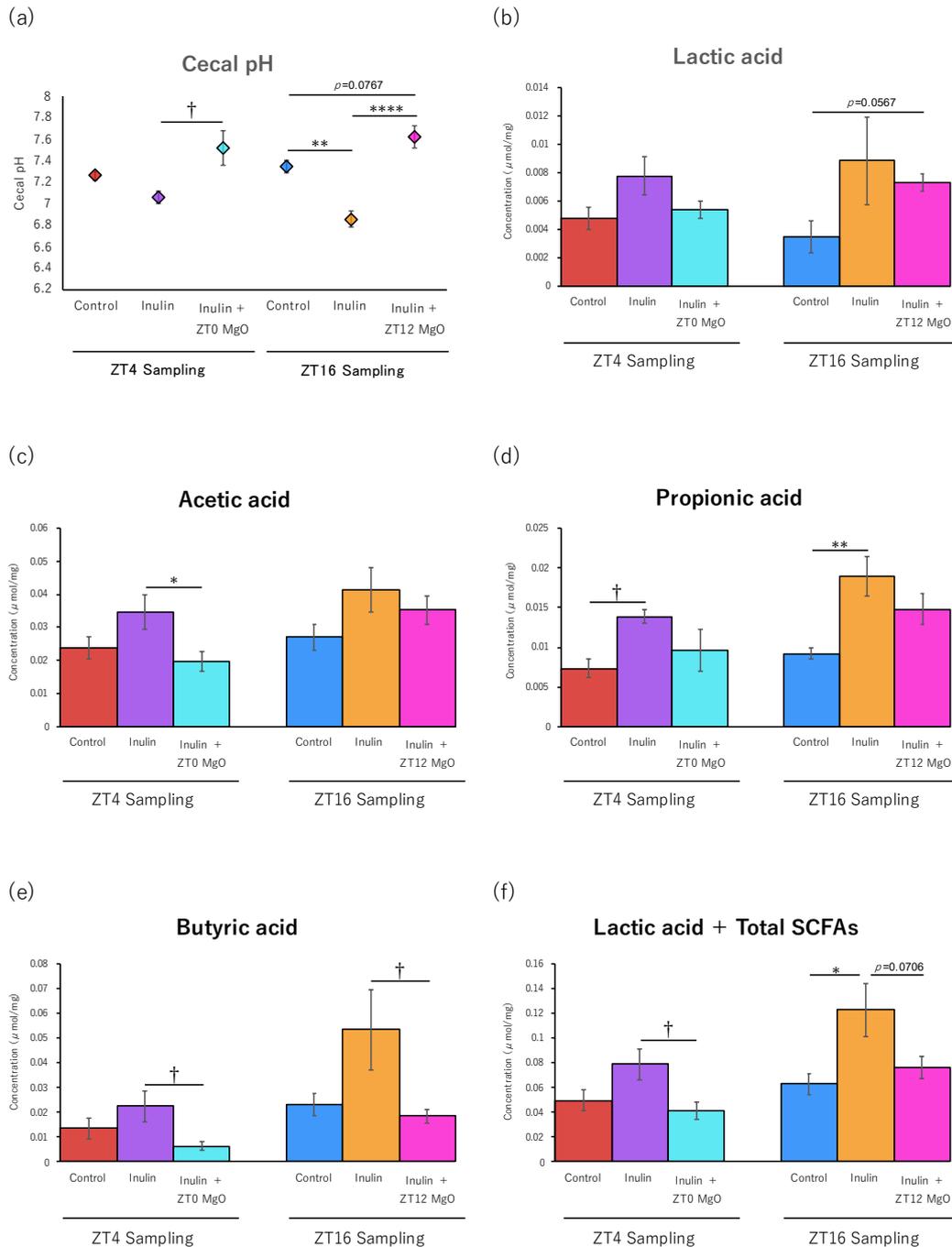


Figure 66 Inulin 併用時、ZT0 または ZT12 投与の MgO が盲腸内 pH、盲腸内乳酸濃度および SCFA 濃度に及ぼす影響 (a) 盲腸内 pH (b) 乳酸濃度 (c) 酢酸濃度 (d) プロピオン酸濃 (e) 酪酸濃度 (f) 乳酸 + 総 SCFA 濃度 (総 SCFA 濃度は酢酸濃度、プロピオン酸濃度、酪酸濃度の総計) Inulin は餌の総重量の 2.5% となるように混餌し、MgO は 250 mg/kg・BW の用量でマウスに経口投与した。乳酸および SCFA は盲腸内容物の乾燥重量あたりの濃度を算出した。データは平均 ± 標準誤差で表した (n = 5-6)。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and **** $p < 0.0001$, evaluated using the one-way ANOVA with Tukey's post hoc test. † $p < 0.05$, evaluated using the Kruskal-Wallis test with Dunn's post hoc test. [投稿論文 (Omori *et al.*, 2021) の図を一部改変]

4.3 考察

(1) MgO の投与タイミングと盲腸内容物の水分含有率

Inulin 群と比較して、Inulin + ZT12 MgO 群では盲腸内の水分含有率が有意に上昇した一方で、Inulin + ZT0 MgO 群では有意な差が見られなかった(Figure 61)。この結果から、Inulin 併用時、ZT0 に MgO を投与する場合に比べ、ZT12 に MgO を投与する場合の方が腸内の水分量が多くなり、便秘薬としての効果が高くなる可能性があると考えた。先行研究で細胞内 Mg^{2+} 概日リズムがあることが報告されていることから(Feeney *et al.*, 2016)、明期と比較して暗期では、細胞内への Mg^{2+} の取り込みが減弱するか、あるいは細胞外への Mg^{2+} の排泄が活発になるのではないかと考えた。その結果、明期と比較して暗期に腸管の管腔内の Mg^{2+} 濃度が高まり、それに伴って腸内の浸透圧が上昇し、MgO の作用が強くなったのではないかと考察した。先行研究でも、細胞内の Mg^{2+} は明期に上昇し、暗期に減少することが報告されており(Feeney *et al.*, 2016)、申請者の仮説と矛盾しない。

(2) MgO の投与タイミングと盲腸内 SCFA 濃度

医薬品の効果発現には概日時計が関連しており、適切な投薬タイミングを探ることは効果的な治療のために重要である。たとえば、選択的 SGLT2 阻害薬であるダパグリフフロジンは糖尿病治療薬として用いられており、通常 1 日 1 回投与される。先行研究では、ZT14 にダパグリフフロジンを投与しても、体重、精巣上体白色脂肪組織の重量、血中グルコース濃度、血中インスリン濃度、TNF- α 、MCP-1、F4/80 に有意な低下が認められなかった一方、ZT2 にダパグリフフロジンを投与するとそれらの数値が有意に低下したことが示された(Yoshioka H, 2019)。本研究において、2.2 の実験では、Inulin 摂取で盲腸内の SCFA 濃度および乳酸濃度が上昇したが、MgO の併用によりそれらの濃度が低下した。SCFA は免疫恒常性維持や代謝、概日時計の同調など全身の生理機能に重要な役割を果たしているが(Maslowski *et al.*, 2009; Kimura *et al.*, 2013; Furusawa *et al.*, 2013; Trompette *et al.*, 2014; Tahara *et al.*, 2018; Barrea *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2020)、本研究の結果は、Inulin 摂取によって増加した SCFA の有益な効果を MgO が打ち消してしまう可能性があることを示唆している。また、概日時計の乱れは、脂肪肝や肝硬変などの肝疾患、気分障害、肥満、糖尿病、癌につながる可能性があることが指摘されているが

(Tahara *et al.*, 2016; McGinnis *et al.*, 2016; Albrecht *et al.*, 2017)、SCFA は体内時計に作用することも知られており、その作用には時刻依存性があることが報告されている(Tahara *et al.*, 2018)。先行研究では、ZT5 の SCFA、L-乳酸の投与は、マウスの腎臓、肝臓、顎下腺の概日時計の位相を前進させるが、ZT0、ZT12、ZT17 に SCFA、L-乳酸を投与した場合には、位相に変化が見られなかったことが報告されている(Tahara *et al.*, 2018)。これらのことから、SCFA への影響を考慮した MgO の服薬タイミングを検討することは非常に意義深いと考える。また、日常では MgO と食物繊維を一緒に摂取するケースが想定されるため、水溶性食物繊維 Inulin と MgO の最適な併用タイミングを検討することが必要であると考え、4.2 の実験では Inulin 併用時の MgO の適切な服用タイミングを検討した。

本研究では MgO の投与時刻を ZT0(マウスの非活動期の開始時刻)と ZT12(マウスの活動期の開始時刻)の 2 つに分け、Inulin と MgO の併用が盲腸内 SCFA 濃度に与える影響に時刻依存性があるかを検証した。盲腸内の酢酸は、MgO を ZT0 に投与した場合には有意に濃度低下した一方、ZT12 に投与した場合には有意な濃度低下は見られなかった(Figure 66(c))。この結果から、MgO の盲腸内酢酸濃度への影響は、ZT12 と比較して、ZT0 投与の方が顕著であることが示された。これは ZT0 よりも ZT12 で MgO を投与した方が盲腸内 SCFA への影響が少ないことを示唆している。ZT12 はマウスの活動期の開始時刻であるため、ZT12 投与は、ヒトに置き換えると起床時の投与となる。日本における MgO の用法・用量は、成人が下剤として用いる場合、1 日 2 g を食前または食後の 3 回に分割経口投与するか、就寝前に 1 回投与するかであるが、腸内の SCFA への影響を考慮する場合、起床時投与の方が適している可能性がある。

ZT0 よりも ZT12 の方が盲腸内酢酸濃度への影響が少なかった理由として、ZT12 の方が Inulin による SCFA 濃度上昇作用が強力だった可能性が考えられる。本研究では自由摂食下でマウスを飼育していたが、マウスには摂食リズムがあり、活動期の前半でより多くの餌を摂食する(Hirao *et al.*, 2010)。したがって、ZT4 のサンプリング時よりも、ZT16 のサンプリング時の方が多くの Inulin を摂取したタイミングであり、Inulin がより効果的に働いていると考えられる。したがって、ZT16 にサンプリングをしている ZT12 MgO 群の方が Inulin による SCFA 濃度上昇作用が強く、MgO による SCFA 濃度低下作用が減弱した可能性が考えられる。

(3) MgO の投与タイミングと腸内細菌

第4章では MgO の腸内細菌への影響と投与時刻の関係を検証した。MgO 単独投与時、Inulin との併用時ともに、MgO が腸内細菌叢の α 多様性、 β 多様性に及ぼす影響に時刻依存性は見られなかった。このことから、MgO が腸内細菌叢の多様性に与える影響に時刻依存性はないことが示された。また、ZT0 投与時と ZT12 投与時を比較すると、*Akkermansia*、*Bacteroides*、*Lactobacillus*、*Lactococcus* の挙動は同傾向であることが示された。一方、*Bifidobacterium* の挙動は ZT0 投与と ZT12 投与で異なっていた。MgO の投与時刻によって腸内細菌の挙動が異なった理由として、腸内細菌叢に概日リズムがあることで (Thaiss *et al.*, 2014)、ZT4 の腸内細菌叢と ZT16 の腸内細菌叢の構成に違いが生まれたことが考えられる。実際に、Beli らは *Bifidobacterium* を含むいくつかの腸内細菌にリズム性があることを報告している (Beli *et al.*, 2019)。

4.4 小括

- Inulin 併用時、MgO は ZT0 に投与した場合に比べ、ZT12 に投与した場合の方が顕著に盲腸内水分含有率を上昇させる。したがって、MgO は ZT0 投与に比べ、ZT12 投与の方が便秘薬としての効き目が高い可能性がある。
- MgO は ZT12 に投与した時に比べ、ZT0 に投与した時に顕著に盲腸内酢酸濃度を低下させる。したがって、盲腸内 SCFA 濃度への影響を考慮すると、酢酸濃度低下作用が小さい ZT12 投与が適切であると考えられる。
- 医療現場における現在の MgO の用法は毎食後または就寝前であるが、盲腸内 SCFA 濃度への影響を配慮すると起床時服用が適切であることが示唆された。
- SCFA は免疫、代謝だけでなく、体内時計にも関与することが報告されており、全身の健康維持に重要な役割を担っている。したがって、SCFA 濃度に配慮した薬の服用タイミングを探ることは非常に意義深い。

第4章の結果を Table 11 と Table 12 にまとめる。

Table 11 4.1の結果のまとめ

Sampling Time	ZT4	ZT16
比較群	Control vs ZT0 Mg0	Control vs ZT12 Mg0
体重	↓ (NS)	↓ (NS)
摂食量	↓ (NS)	—
盲腸内容物 水分含有量	↓ (p<0.01)	↓ (p<0.01)
α多様性	↑ (p<0.01)	↑ (p<0.05)
β多様性	p=0.0070	p=0.0090
<i>Akkermansia</i>	↑ (p<0.01)	↑ (NS)
<i>Bacteroides</i>	↑ (p<0.01)	↑ (p<0.01)
<i>Bifidobacterium</i>	↑ (NS)	↓ (NS)
<i>Lactobacillus</i>	↓ (p<0.01)	↓ (p=0.0951)
<i>Lactococcus</i>	↓ (NS)	↓ (p<0.05)
<i>Odoribacter</i>	↓ (p<0.01)	↓ (p=0.0668)
盲腸内pH	↑ (p<0.0001)	↑ (p<0.01)
乳酸	↑ (NS)	↑ (NS)
酢酸	↓ (p=0.0665)	↓ (NS)
プロピオン酸	↓ (NS)	↓ (NS)
酪酸	↓ (p<0.01)	↓ (p<0.05)
乳酸+総SCFA	↓ (p<0.05)	↓ (p=0.0787)

NS: 有意差なし、↑,↓: 有意差あり、HFD: 高脂肪食

Table 12 4.2の結果のまとめ

Sampling Time	ZT4		ZT16	
比較群	Control vs 2.5% Inulin	2.5% Inulin vs 2.5% Inulin + ZT0 MgO	Control vs 2.5% Inulin	2.5% Inulin vs 2.5% Inulin + ZT12 MgO
体重	↓ (p<0.05)	↓ (NS)	↓ (NS)	↓ (NS)
盲腸内容物 水分含有量	↑ (p=0.0766)	↑ (NS)	↑ (p=0.0804)	↑ (p<0.0001)
α多様性	↑ (p=0.0795)	↑ (NS)	↓ (NS)	↑ (p<0.05)
β多様性	p=0.023	p=0.025	p=0.018	p=0.0040
<i>Akkermansia</i>	↑ (NS)	↑ (p<0.01)	↑ (NS)	↑ (NS)
<i>Bacteroides</i>	↑ (NS)	↑ (NS)	↓ (NS)	↑ (p<0.01)
<i>Bifidobacterium</i>	↑ (NS)	↑ (NS)	↓ (NS)	↓ (NS)
<i>Lactobacillus</i>	↓ (p<0.05)	↓ (NS)	↓ (NS)	↓ (NS)
<i>Lactococcus</i>	↓ (NS)	↓ (NS)	↓ (NS)	↓ (NS)
<i>Odoribacter</i>	↓ (NS)	↓ (NS)	↑ (NS)	↓ (p<0.05)
盲腸内pH	↓ (NS)	↑ (p<0.05)	↓ (p<0.01)	↑ (p<0.0001)
乳酸	↑ (NS)	↓ (NS)	↑ (NS)	↓ (NS)
酢酸	↑ (NS)	↓ (p<0.05)	↑ (NS)	↓ (NS)
プロピオン酸	↑ (p<0.05)	↓ (NS)	↑ (p<0.01)	↓ (NS)
酪酸	↑ (NS)	↓ (p<0.05)	↑ (NS)	↓ (p<0.05)
乳酸+総SCFA	↑ (NS)	↓ (p<0.05)	↑ (p<0.05)	↓ (p=0.0706)

NS: 有意差なし、↑, ↓: 有意差あり

第 5 章 本研究結果の臨床応用と総括

(1) MgO の服用の仕方と腸内環境への影響について

ここまで、各章末で得られた結果について考察をしてきたが、ここでは本研究の結果を総合的に考察する。

第 4 章では、Inulin 併用の有無に関わらず、MgO は ZT0 に投与するよりも、ZT12 で投与した方が盲腸内酢酸濃度への影響が少ないことが示され、盲腸内酢酸濃度に配慮した場合には ZT0 よりも、ZT12 の投与の方が適していることが示唆された。しかし、MgO が盲腸内 SCFA 濃度に及ぼす影響は投与タイミングだけではなく、一回の投与量や Inulin の併用の有無によっても異なると考えられる。

Inulin と MgO を併用した場合には、一回の投与量に関わらず、Inulin で上昇した SCFA 濃度を MgO が低下させたが、MgO を単独で投与した 2.1、2.3 の実験では異なる結果が得られた。普通食では MgO により盲腸内 SCFA 濃度は低下せず (Figure 11)、高脂肪食では MgO によりプロピオン酸濃度が有意に上昇した (Figure 26(d))。先行研究では、マグネシウムが豊富に含まれる海洋ミネラルミックスをラットに与えた場合、盲腸内のプロピオン酸が上昇したことが報告されており (Crowley *et al.*, 2018)、本研究での結果は先行研究に矛盾しない。

一方で、MgO を 250 mg/kg 経口投与で ZT0 もしくは ZT12 に投与した場合、盲腸内 SCFA 濃度は対照群よりも低値を示した。これらの結果は、MgO の単独投与時の盲腸内 SCFA 濃度に対する影響が混餌投与と経口投与で異なることを示している。すなわち、一日量を長時間かけて少しずつ投与する場合と、一度に投与する場合で影響が異なることを示唆している。2.3 の実験では、高脂肪食に MgO を 0.25% 混ぜて投与した際、腸内細菌叢の α 多様性に有意な変化をもたらさないことが示された (Figure 24(a))。一方で、4.1 の実験では、MgO を 250 mg/kg・BW で経口投与したところ、 α 多様性の指標である Simpson Index が有意に上昇した (Figure 55(a))。これらの結果は、MgO を餌と一緒に少しずつ摂取する場合と、経口投与で一回に投与される場合で腸内細菌叢への影響が異なることを示唆している。先行研究では、食餌性マグネシウムは投与量によって腸内細菌叢への影響が異なり、高用量マグネシウムは腸内細菌叢の α 多様性を低下させるとの報告があり (García-Legorreta *et al.*, 2020)、本研究の結果とも矛盾がない。

日本における MgO の用法・用量は、成人が下剤として用いる場合、1 日 2 g を毎

食前または毎食後に 1 日 3 回に分割して服用するか、就寝前に 2 g を 1 回で服用するかである。MgO を単独で服用する場合には、就寝前に 2 g を 1 回で服用するよりも、毎食前または毎食後の 3 回に分割投与し、一回量を減らす方が盲腸内 SCFA への影響は少ないと考えられる。

(2) Inulin と MgO の併用が便秘以外の疾病に及ぼす影響

① 高マグネシウム血症

難消化性糖質はカルシウムやマグネシウムの腸管吸収を促進することが知られている。ミネラルの吸収促進作用の機序の一つとして、pH の変化による不溶性塩の可溶化が挙げられる。難消化性糖質が腸内細菌に代謝され、短鎖脂肪酸を生成することで、腸内の pH を下げ、腸内の不溶性カルシウム塩、不溶性マグネシウム塩等を可溶化することに起因すると考えられている(原, 2008)。

MgO は非吸収性の下剤であるが、ラットの実験では、約 15% が吸収され、尿中排泄されることが明らかになっている(吉村ら, 2017)。近年、高齢者などの腎機能が低下した患者が MgO を長期服用することで、高マグネシウム血症を起こすことが問題視されている。これらの事実から、MgO と Inulin の併用は高マグネシウム血症のリスクファクターになり得るのではないかとの仮説を立てた。MgO は腸内で最終的に不溶性の塩である炭酸マグネシウムに変換される。MgO を単独で服用した場合に比べ、MgO と Inulin を併用した場合には、Inulin により SCFA が生成され、腸内の pH が低下する可能性がある。このことにより、不溶性の塩である炭酸マグネシウムが可溶化し、腸内の Mg^{2+} が増加し、腸からの Mg^{2+} 吸収が促進される可能性があると考ええる。しかし、本論文でのデータだけではこの仮説を確かめることはできない。今後の実験では、MgO 単独投与した場合と、MgO と Inulin を併用した場合の血中マグネシウム濃度を比較する必要があると考える。

② 統合失調症

抗精神病薬や抗うつ薬はそれらが持つ抗コリン作用から副作用として便秘症状が現れる。発生頻度は薬剤によっても異なるが、多元受容体作用抗精神病薬(MARTA)であるクロザピンは 33.8% の患者に便秘の発現が見られる(岩崎, 2017)。Guo らは、統合失調症のマウスで *Akkermansia* が増加しており、炎症性サイトカインと正

の相関を示すと述べている (Guo *et al.*, 2021)。また、統合失調症マウスが Inulin を摂取することにより *Akkermansia* が有意に減少することも報告している (Guo *et al.*, 2021)。統合失調症は脳だけが問題となる疾患ではなく、腸内細菌叢や、腸以外での炎症とも関連があるとされている。したがって、炎症性サイトカインと正の相関を示す *Akkermansia* を減少させる Inulin は、統合失調症治療に役立つ可能性があると考えられる。しかしながら、現実の治療では、統合失調症患者が抗精神病薬と便秘薬を併用する場面があり、抗精神病薬、便秘薬、Inulin の 3 つの併用を考える必要がある。第 2 章では、Inulin 併用の有無に関わらず、MgO は *Akkermansia* の相対存在量を増加させた。この結果は、抗精神病薬、MgO、Inulin を併用した際、MgO が Inulin の効果を打ち消してしまう可能性があることを示唆している。これらことから、統合失調症の補助的治療として Inulin を使用する場合、抗精神病薬の副作用対策で服用する便秘薬として MgO は適さない可能性があると考えた。多くの薬は副作用を持っており、治療のために服用している薬の副作用対策で別の薬を併用している患者は少なくない。また、治療の補助として食事療法や運動療法を取り入れている場合もある。そのため、本論文で扱っている Inulin と MgO の組み合わせのみならず、様々な薬や食の相互作用を考えながら服薬することが全身の健康管理に極めて重要だと考えられる。

(4) 総括

本論文では、MgO の単独投与、あるいは MgO と Inulin の併用が腸内細菌叢および盲腸内 SCFA 濃度に及ぼす影響を検証するとともに、それらの影響を考慮した適切な MgO の投薬タイミングを検証した。第 2 章では普通食ならびに HFD 摂食時の腸内環境における影響を検証し、第 3 章では MgO 以外の下剤・制酸剤が腸内環境に与える影響を調べることで MgO との比較を試みた。第 4 章では、マウスの非活動期の開始時刻である ZT12 に MgO を経口投与する場合と、マウスの活動期の開始時刻である ZT0 に MgO を経口投与する場合で腸内細菌叢および盲腸内 SCFA に対する影響が異なるかを検証した。その結果、腸内細菌が Inulin を発酵して SCFA を産生する過程で関与する事項を Figure 67 のように想定した。①～③に示すことのいずれかまたは複数が SCFA 産生に抑制的に働くと考えた。

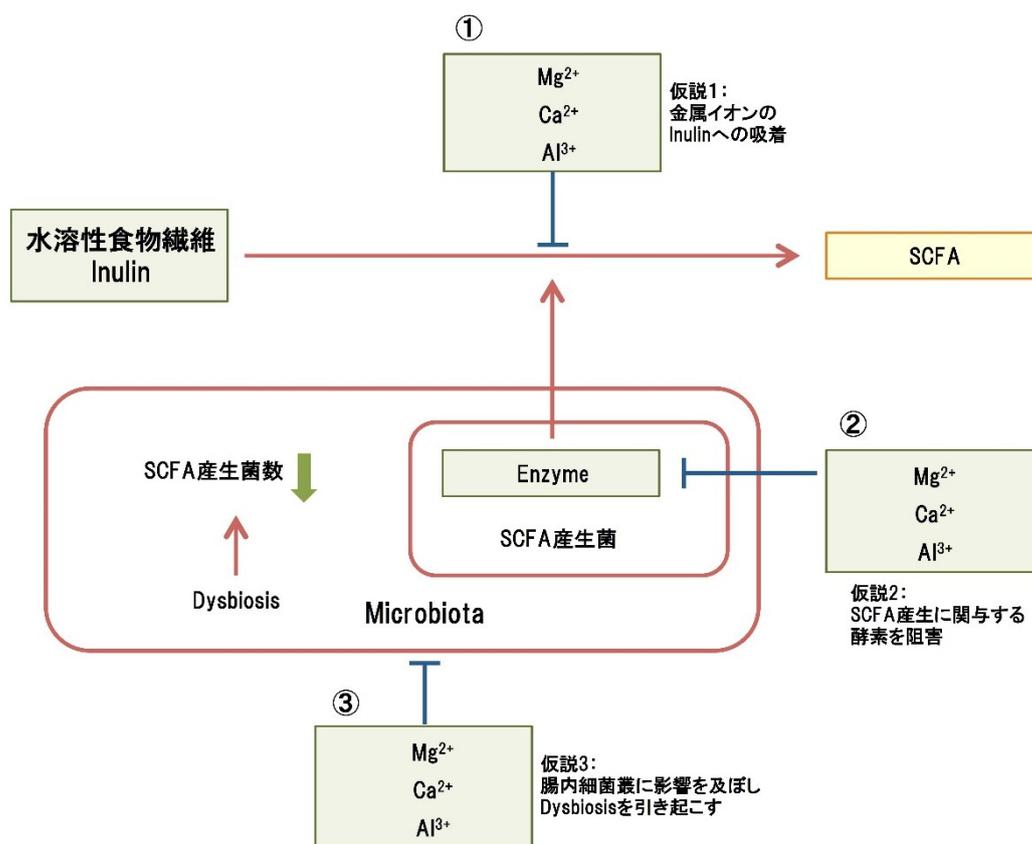


Figure 67 腸内細菌が Inulin を発酵して SCFA を産生する過程で関与する因子の想定図

Figure68 で示すように、MgO やダイオウが腸内細菌叢に影響を与えることが分かり、中でも、*Akkermansia* 属や *Odoribacter* 属の相対存在量の変化が目立った。*Akkermansia* 属や *Odoribacter* 属はいずれも疾病との関連で近年注目を集めている。*Akkermansia muciniphila* は疾病の予防に役立つプロバイオティクスとして、治療の補助に役立つ細菌として期待されている (Zhai *et al.*, 2019) 一方で、結腸直腸がんの患者では *Akkermansia muciniphila* が増加することが明らかになり、結腸直腸がんのバイオマーカーになる可能性があるとされている (Osman *et al.*, 2021)。また、2021 年の Dao らの発表では、ヒトを対象とした研究で、肥満外科手術であるルーワイ胃バイパス術の施術後、*Akkermansia muciniphila* の相対存在量が有意に上昇したが、その上昇と代謝改善に関連がないことが示された (Dao *et al.*, 2021)。*Akkermansia* の増加は必ずしも生体に有益な意味を持つとは限らず、*Akkermansia* の相対存在量の増減が持つ意味を各々の研究ごとによく検討することが重要であるが、*Akkermansia* はプロバイオティクスにもがんのバイオマーカーにもなり得る菌であり、治療上、注目すべき菌であると考えられる。

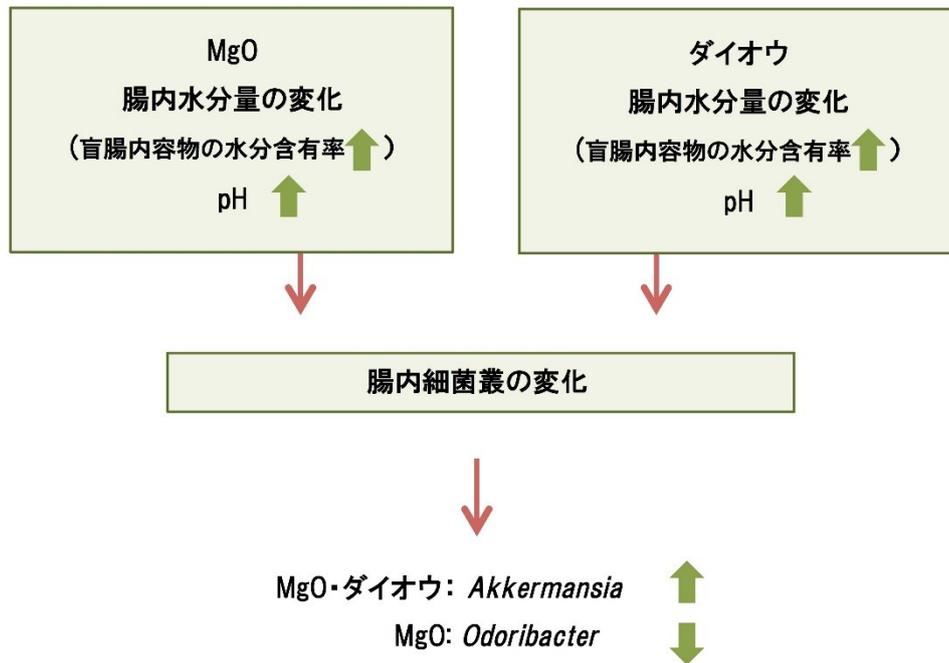


Figure 68 MgO とダイオウによる腸内細菌叢の変化

第4章、第5章でも述べたように、本研究からMgOの至適服用タイミングが提案された(Figure 69)。私達の日常では、食事と服薬は同時に起こることである。また、治療の補助として食事療法を取り入れる場合も多い。したがって、より効果的な薬物治療のためには、食と薬の相互作用を考えることは極めて重要である。

本研究は、日常生活で併用が想定されるInulinとMgOを対象に、それらの併用が腸内細菌叢および腸内のSCFAに与える影響を検証した初めての研究である。また、本研究はInulinとMgOの併用が腸内細菌叢に与える影響を時間薬理的観点から検証し、SCFAへの影響を考慮した至適服用タイミングの提案を試みた点でも新規性の高い研究であると考えられる。

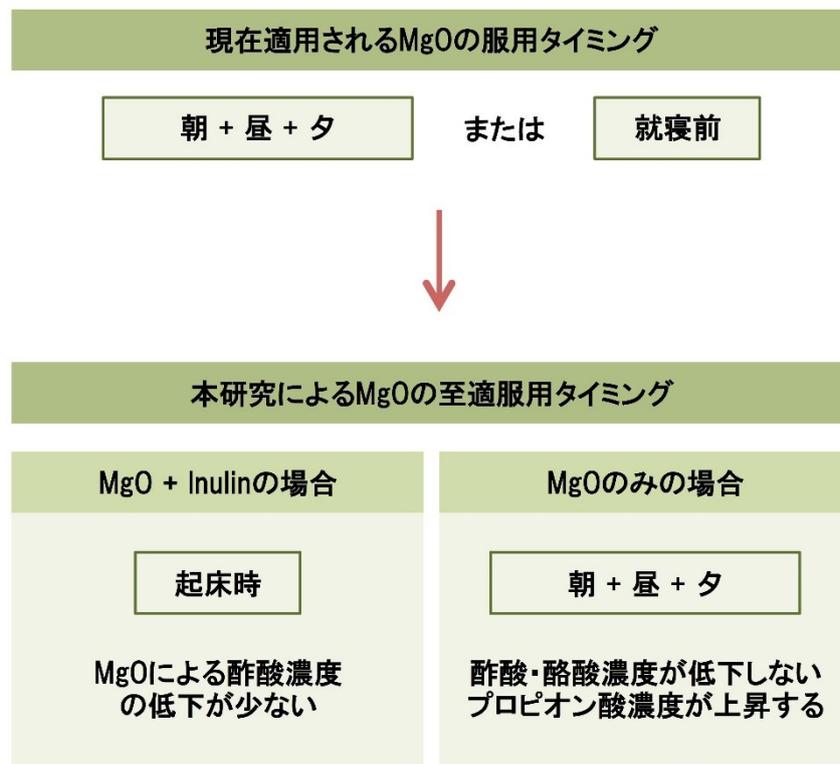


Figure 69 盲腸内 SCFA 濃度への影響を考慮した MgO の服用

【謝辞】

本論文の作成にあたり、ご指導・ご鞭撻を賜りました早稲田大学大学院先進理工学研究科 柴田重信教授に深甚なる謝意を表します。また、本論文の作成にあたり、ご助言とご高閲を賜りました早稲田大学大学院先進理工学研究科 大島登志男教授、早稲田大学大学院先進理工学研究科 竹山春子教授、東京農工大学工学研究院 稲田全規准教授、早稲田大学大学院先進理工学研究科 田原優准教授に謹んで感謝申し上げます。本研究の遂行にあたり、測定分析機器を使わせていただいた早稲田大学先進理工学研究科 竹山研究室の皆様にご心より感謝致します。また、試料の分析に関して、親身になってご助言・ご指導くださいました早稲田大学環境保全センター、物性計測センターの皆様にご深く御礼申し上げます。最後に、本研究の遂行にあたりご協力いただきました早稲田大学先進理工学研究科 柴田研究室の皆様にご心より感謝致します。

【参考文献】

Abutair, A.S., Naser, I. A., & Hamed, A. T. (2016). Soluble fibers from psyllium improve glycemic response and body weight among diabetes type 2 patients (randomized control trial). *Nutr J*, *15*, 86.

Albrecht, U. (2017). Molecular mechanisms in mood regulation involving the circadian clock. *Front Neurol*, *8*, 30.

Alvaro, A., Solà, R., Rosales, R., Ribalta, J., Anguera, A., Masana, L., & Vallvé, J. C. (2008). Gene expression analysis of a human enterocyte cell line reveals downregulation of cholesterol biosynthesis in response to short-chain fatty acids. *IUBMB Life*, *60*, 757-764,

Anbazhagan, A. N., Priyamvada, S., Alrefai, W. A., & Dudeja, P. K. (2018). Pathophysiology of IBD associated diarrhea. *Tissue Barriers*, *6*, e1463897.

Anderson, J.W., Baird, P., Davis Jr, R. H., Ferreri, S., Knudtson, M., Koraym, A., Waters, V., & Williams, C. L. (2009). Health benefits of dietary fiber. *Nutr Rev*, *67*, 188-205.

Andresen, V., Gschossmann, J., & Layer, P. (2020). Heat-inactivated *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75 (SYN-HI-001) in the treatment of irritable bowel syndrome: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, *5*, 658-666.

Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D. R., Fernandes, G. R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J.-M., Bertalan, M., Borruel, N., Casellas, F., Fernandez, L., Gautier, L., Hansen, T., Hattori, M., Hayashi, T., Kleerebezem, M., Kurokawa, K., Leclerc, M., Hansen, T., Hattori, Hayashi, T., Kleerebezem, M., Kurokawa, K., Leclerc, M., Levenez, F., Manichanh, C., Nielsen, H. B., Nielsen, T., Pons, N., Poulain, J., Qin, J., Sicheritz-Ponten, T., Tims, S., Torrents, D., Ugarte, E., Zoetendal, E. G., Wang, J., Guarner, F., Pedersen, O., de Vos, W. M., Brunak, S., Doré, J.,

MetaHIT Consortium, Weissenbach, J., Ehrlich, S. D., & Bork, P. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, *473*, 174-180.

Bae, S.H. (2014). Diets for constipation. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr*, *17*, 203-208.

Barrea, L., Muscogiuri, G., Annunziata, G., Laudisio, D., Pugliese, G., Salzano, C., Colao, A., & Savastano, S. (2019). From gut microbiota dysfunction to obesity: could short-chain fatty acids stop this dangerous course? *Hormones(Athens)*, *18*, 245-250.

Baxter, N.T., Schmidt, A. W., Venkataraman, A., Kim, K. S., Waldron, C., & Schmidt, T. M. (2019). Dynamics of human gut microbiota and short-chain fatty acids in response to dietary interventions with three fermentable fibers. *mBio*, *10*, e02566-18.

Beli, E., Prabakaran, S., Krishnan, P., Evans-Molina, C., & Grant, M. B. (2019). Loss of diurnal oscillatory rhythms in gut microbiota correlates with changes in circulating metabolites in type 2 diabetic db/db mice. *Nutrients*, *11*, 2310.

Belzer, C., & de Vos, W. M. (2012). Microbes inside - from diversity to function: the case of *Akkermansia*. *ISME J*, *6*, 1449-1458.

Bermon, S., Petriz, B., Kajènienè, A., Prestes, J., Castell, L., & Franco, O. L. (2015). The microbiota: An exercise immunology perspective. *Exerc Immunol Rev*, *21*, 70-79.

Biagi, E., Franceschi, C., Rampelli, S., Severgnini, M., Ostan, R., Turrone, S., Consolandi, C., Quercia, S., Scurti, M., Monti, D., Capri, M., Brigidi, P., & Candela, M. (2016). Gut microbiota and extreme longevity. *Curr Biol*, *26*, 1480-1485.

Biedermann, L., Zeitz, J., Mwinyi, J., Sutter-Minder, E., Rehman, A., Ott, S. J., Steurer-Stey, C., Frei, A., Frei, P., Scharl, M., Loessner, M. J., Vavricka, S. R., Fried, M., Schreiber, S., Schuppler, M., & Rogler, G. (2013). Smoking cessation induces profound changes in the composition of the intestinal microbiota in humans. *PLoS One*, *8*, e59260.

Bishehsari, F., Engen, P. A., Preite, N. Z., Tuncil, Y. E., Naqib, A., Shaikh, M, Rossi, M., Wilber, S., Green, S. J., Hamaker, B. R., Khazaie, K., Voigt, R. M., Forsvth, C. B., & Keshavarzian, A. (2018). Dietary fiber treatment corrects the composition of gut microbiota promotes SCFA production, and suppresses colon carcinogenesis. *Genes (Basel)*, *9*, 102.

Brun, L. R., Traverso, A., & Rigalli, A. (2009). Aggregation and inhibition of rat intestinal alkaline phosphatase by high concentrations of calcium. Reversibility of the processes. *J Enzyme Inhib Med Chem*, *24*, 691-696.

Canani, R. B., Sangwan, N., Stefka, A. T., Nocerino, R., Paparo, L., Aitoro, R., Calignano, A., Khan, A. A., Gilbert, J. A., & Nagler, C. R. (2016). *Lactobacillus rhamnosus* GG-supplemented formula expands butyrate-producing bacterial strains in food allergic infants. *The ISME Journal*, *10*, 742-750.

Chan, A.O.O., Hui, W. M., Leung, G., Tong, T., Hung, I. F. N., Chan, P., Hsu, A., But, D., Wong, B. C. Y., Lam, S. K., & Lam, K. F. (2007). Patients with functional constipation do not have increased prevalence of colorectal cancer precursors. *Gut*, *56*, 451-452.

Chaplin, A., Parra, P., Laraichi, S., Serra, F., & Palou, A. (2016). Calcium supplementation modulates gut microbiota in a prebiotic manner in dietary obese mice. *Mol Nutr Food Res*, *60*, 468-480.

Chen, C.-C., Chen K-J., Kong M-S., Chang, H-J., & Huang, J-L. (2016). Alterations in the gut microbiotas of children with food sensitization in early life. *Pediatr Allergy and Immunol*. *27*, 254-262.

Cheng, S., Mao, H., Ruan, Y., Wu, C., Xu, Z., Hu, G., Guo, X., Zhang, C., Cao, H., & Liu, P. (2020). Copper changes intestinal microbiota of the cecum and rectum in female mice by 16S rRNA gene sequencing. *Biol Trace Elem Res*, *193*, 445-455.

Cho I., Yamanishi, S., Cox, L., Methé, B. A., Zavadil, J., Li, K., Gao, Z., Mahana, D., Raju, K., Teitler, I, Li, H., Alekseyenko, A. V., & Blaser, M. J. (2012). Antibiotics in early life alter the murine colonic microbiome and adiposity. *Nature*, *488*, 621-626.

Cohen, S. E., & Golden, S. S. (2015). Circadian rhythms in cyanobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, *79*, 373-385.

Crowley, E. K., Long-Smith, C. M., Murphy, A., Patterson, E., Murphy, K., O'Gorman, D. M., Stanton, C., & Nolan, Y. M. (2018). Dietary supplementation with a magnesium-rich marine mineral blend enhances the diversity of gastrointestinal microbiota. *Mar Drugs*, *16*, 216.

Cruz-Ortiz, R., Gutiérrez-Dorado, R., Osorio-Díaz, P., Alvarado-Jasso, G. M., Tornero-Martínez, A., Guzmán-Ortiz, F. A., & Mora-Escobedo, R. (2020). Optimized germinated soybean/cornstarch extrudate and its in vitro fermentation with human inoculum. *J Food Sci Technol*, *57*, 848-857.

Dao, M. C., Belda, E., Prifti, E., Everard, A., Kayser, B. D., Bouillot, J.-L., Chevallier, J.-M., Pons, N., Le Chatelier, E., Ehrlich, S. D., Doré, J., Aron-Wisnewsky, J., Zucker, J.-D., Cani, P. D., & Clément, K. (2019). *Akkermansia muciniphila* abundance is lower in severe obesity, but its increased level after bariatric surgery is not associated with metabolic health improvement. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, *317*, E446-E459.

Davis, L. M. G., Martinez, I., Walter, J., Goin, C., & Hutkins, R. W. (2011). Barcoded pyrosequencing reveals that consumption of galactooligosaccharides results in a highly specific bifidogenic response in humans. *PLoS One*, *6*, e25200.

De Filippis, F., Pellegrini, N., Vannini, L., Jeffery, I. B., La Stora, A., Laghi, L., Serrazanetti, D. I., Di Cagno, R., Ferrocino, I., Lazzi, C., Turrone, S., Cocolin, L., Brigidi, P., Neviani, E., Gobbetti, M., O'Toole, P. W., & Ercolini, D. (2016). High-level adherence

to a Mediterranean diet beneficially impacts the gut microbiota and associated metabolome. *Gut*, *65*, 1812-1821.

Deehan, E. C., Duar, R. M., Armet, A. M., Perez-Muñoz, M. E., Jin, M., & Walter, J. (2017). Modulation of the gastrointestinal microbiome with nondigestible fermentable carbohydrates to improve human health. *Microbiol Spectr*, *5*, doi: 10.1128/microbiolspec.BAD-0019-2017.

Derrien, M., Vaughan, E. E., Plugge, C. M., & de Vos, W. M. (2004). *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol*, *54*, 1469-1476.

Desai, M. S., Seekatz, A. M., Koropatkin, N. M., Kamada, N., Hickey, C. A., Wolter, M., Pudlo, N., B., Wi A., Kitamoto, S., Terrapon, N., Muller, A., Young, V. B., Henrissat, B., Wilmes, P., Stappenbeck, T. S., Núñez, G., & Martens, E. C. (2016). A dietary fiber-deprived gut microbiota degrades the colonic mucus barrier and enhances pathogen susceptibility. *Cell*, *167*, 1139-1353.

Dominguez, L. J., Gea, A., Ruiz-Estigarribia, L., Sayón-Orea, C., Fresán, U., Barbagallo, M., Ruiz-Canela, M., & Martínez-González, M. A. (2021). Low dietary magnesium and overweight/obesity in a mediterranean population: A detrimental synergy for the development of hypertension. The SUN project. *Nutrients*, *13*, 125.

Eelderink-Chen, Z., Bosman, J., Sartor, F., Dodd, A. N., Kovács, A. T., & Merrow, M. (2021). A circadian clock in a nonphotosynthetic prokaryote. *Sci Adv*, *7*, eabe2086.

El-Serag, H.B., Satia, J. A., & Rabeneck, L. (2005). Dietary intake and the risk of gastro-oesophageal reflux disease: A cross sectional study in volunteers. *Gut*, *54*, 11-17.

Everard, A., Belzer, C., Geurts, L., Ouwerkerk, J. P., Druart, C., Bindels, L. B., Guiot, Y., Derrien, M., Muccioli, G. G., Delzenne, N. M., de Vos, W. M., & Cani, P. D. (2013). Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium control diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci USA*, *110*, 9066-9071.

Fang, D., Shi, D., Lv, L., Gu, S., Wu, W., Chen, Y., Guo, J., Li, A., Hu, X., Guo, F., Ye, J., Li, Y., & Li, L. (2017). *Bifidobacterium pseudocatenulatum* LI09 and *Bifidobacterium catenulatum* LI10 attenuate D-galactosamine-induced liver injury by modifying the gut microbiota. *Sci Rep*, *7*, 8770.

Farmer, A. D., Ruffle, J. K., & Hobson, A. R. (2019). Linaclotide increases cecal pH, accelerates colonic transit, and increases colonic motility in irritable bowel syndrome with constipation. *Neurogastroenterol Motil*, *31*, e13492.

Feeney, K. A., Hansen, L. L., Putker, M., Olivares-Yañez, C., Day, J., Eades, L. J., Larrondo, L. F., Hoyle, N. P., O'Neill, J. S., & van Ooijen, G. (2016). Daily magnesium fluxes regulate cellular timekeeping and energy balance. *Nature*, *532*, 375-379.

Freedbreg, D. E., Toussaint, N. C., Chen, S. P., Ratner, A. J., Whittier, S., Wang, T.C., Wang, H. H., & Abrams, J. A. (2015). Proton pump inhibitors alter specific taxa in the human gastrointestinal microbiome: A crossover trial. *Gastroenterology*, *149*, 883-885.

Fujisaka, S., Usui, I., Nawaz, A., Igarashi, Y., Okabe, K., Furusawa, Y., Watanabe, S., Yamamoto, S., Sasahara, M., Watanabe, Y., Nagai, Y., Yagi, K., Nakagawa, T., & Tobe, K. (2020). Bofutsushosan improves gut barrier function with a bloom of *Akkermansia muciniphila* and improves glucose metabolism in mice with diet-induced obesity. *Sci Rep*, *10*, 5544.

Fukushima, Y., Yamano, T., Kusano, A., Takada, M., Amano, M., & Iino, H. (2004). Effect of fermented milk containing *Lactobacillus johnsonii* La1 (LC1®) on defecation in healthy Japanese adults - A double blind placebo controlled study-. *Biosci Microflora*, *23*, 139-147.

Furusawa, Y., Obata, Y., Fukuda, S., Endo, T. A., Nakato, G., Takahashi, D., Nakanishi, Y., Uetake, C., Kato, K., Kato, T., Takahashi, M., Fukuda, N. N., Murakami, S., Miyauchi, E., Hino, S., Atarashi, K., Onawa, S., Fujimura, Y., Lockett, T., Clarke, J. M., Topping, D., Tomita, M., Hori, S., Ohara, O., Morita, T., Koseki, H., Kikuchi, J., Honda, K., Hase, K., & Ohno, H. (2013). Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature*, *504*, 446-450.

Furutani, A., Ikeda, Y., Itokawa, M., Nagahama, H., Ohtsu, T., Furutani, N., Kamagata, M., Yang, Z-H., Hirasawa, A., Tahara, Y., & Shibata, S. (2015). Fish oil accelerates diet-induced entrainment of the mouse peripheral clock via GPR120. *PLoS One*, *10*, e0132472.

García-Legorreta, A., Soriano-Pérez, L. A., Flores-Buendia, A. M., Medina-Campos, O. N., Noriega, L. G., Granados-Portillo, O., Nambo-Venegas, R., Tovar, A. R., Mendoza-Vargas, A., Barrera-Oviedo, D., Pedraza-Chaverri, J., & Palacios-González, B. (2020). Effect of dietary magnesium content on intestinal microbiota of rats. *Nutrients*, *12*, 2889.

Gibson G.R., & Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *J Nutr*, *125*, 1401-1412.

Gomez-Arango, L. F., Barrett, H. L., McIntyre, H. D., Callaway, L. K., Morrison, M., & Nitert, M. D. (2016). Increased systolic and diastolic blood pressure is associated with altered gut microbiota composition and butyrate production in early pregnancy. *Hypertension*, *68*, 974-981.

Gong, F., Zhang, T., Chi, Z., Sheng, J., Li, J., & Wang, X. (2008). Purification and characterization of extracellular inulinase from a marine yeast *Pichia guilliermondii* and inulin hydrolysis by the purified inulinase. *Biotechnol Bioprocess Eng*, *13*, 533-539.

Graham, D.Y., Opekun, A. R., Willingham, F. F., & Qureshi, W. A. (2005). Visible small-intestinal mucosal injury in chronic NSAID users. *Clin Gastroenterol Hepatol*, *3*, 55-59.

- Guérin, A., Mody, R., Fok, B., Lasch, K. L., Zhou, Z., Wu, E. Q., Zhou, W., & Talley, N. J. (2014). Risk of developing colorectal cancer and benign colorectal neoplasm in patients with chronic constipation. *Aliment Pharmacol Ther*, *40*, 83-92.
- Guo, B-S., Zheng, F., Crouch, L., Cai, Z-P., Wang, M., Bolam, D. N., Liu, L., & Voglmeir, J. (2018). Cloning, purification and biochemical characterisation of a GH35 beta-1,3/beta-1,6-galactosidase from the mucin-degrading gut bacterium *Akkermansia muciniphila*. *Glycoconj J*, *35*, 255-263.
- Guo, L., Xiao, P., Zhang, X., Yang, Y., Yang, M., Wang, T., Lu, H., Tian, H., Wang, H., & Liu, J. (2021). Inulin ameliorates schizophrenia *via* modulation of the gut microbiota and anti-inflammation in mice. *Food Funct*, *12*, 1156-1175.
- Gutman, R., Barnea, M., Haviv, L., Chapnik, N., & Froy, O. (2012). Peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) activation advances locomotor activity and feeding daily rhythms in mice. *Int J Obes*, *36*, 1131-1134.
- Hara, H., Haga, S., Aoyama, Y., & Kiriya, S. (1999). Short-chain fatty acids suppress cholesterol synthesis in rat liver and intestine. *J Nutr*, *129*, 942-948.
- He, C., Cheng, D., Peng, C., Li, Y., Zhu, Y., & Lu, N. (2018). High-fat diet induces dysbiosis of gastric microbiota prior to gut microbiota in association with metabolic disorders in mice. *Front Microbiol*, *9*, 639.
- Herman, C., Adlercreutz, T., Goldin, B. R., Gorbach, S. L., Hockerstedt, K. A. V., Watanabe, S., Hamalainen, E. K., Mrkkanen, M. H., Makela, T. H., & Wahala, K. T. (1995). Soybean Phytoestrogen Intake and Cancer Risk. *J Nutr*, *125*, 757S-770S.
- Higgins, P., & Johanson, J. (2004). Epidemiology of constipation in North America: A systematic review. *Am J Gastroenterol*, *99*, 750-759.

- Hiippala, K., Barreto, G., Burrello, C., Diaz-Basabe, A., Suutarinen, M., Kainulainen, V., Bowers, J. R., Lemmer, D., Engelthaler, D. M., Eklund, K. K., Facciotti, F., & Satokari, R. (2020). Novel *Odoribacter splanchnicus* strain and its outer membrane vesicles exert immunoregulatory effects *in vitro*. *Front Microbiol*, *11*, 575455.
- Hildebrandt, M.A., Hoffman, C., Sherrill-Mix, S. A., Keilbaugh, S. A., Hamady, M., Chen, Y-Y., Knight, R., Ahima, R. S., Bushman, F., & Wu, G. D. (2009). High fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity. *Gastroenterology*, *137*, 1716-24.e1-2.
- Hirao, A., Nagahama, H., Tsuboi, T., Hirao, M., Tahara, Y., & Shibata, S. (2010). Combination of starvation interval and food volume determines the phase of liver circadian rhythm in *Per2::Luc* knock-in mice under two meals per day feeding. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, *299*, G1045-G1053.
- Hoogerwerf, W. A. (2006). Biologic clocks and the gut. *Curr Gastroenterol Rep*, *8*, 353-359.
- Hoogerwerf, W. A., Hellmich, H. L., Cornélissen, G., Halberg, F., Shahinian, V. B., Bostwick, J., Savidge, T. C., & Cassone, V. M. (2007). Clock gene expression in the murine gastrointestinal tract: Endogenous rhythmicity and effects of a feeding regimen. *Gastroenterology*, *133*, 1250-1260.
- Ilhan, Z. E., Marcus, A. K., Kang, D-W., Rittmann, B. E., & Krajmalnik-Brown, R. (2017). pH-mediated microbial and metabolic interactions interactions in fecal enrichment cultures. *mSphere*, *2*, e00047-17.
- Imhann, F., Bonder, M. J., Vila, A. V., Fu, J., Mujagic, Z., Vork, L., Tigchelaar, E. F., Jankipersadsing, S. A., Cenit, M. C., Harmsen, H. J. M., Dijkstra, G., Franke, L., Xavier, R., Jonkers, D., Wijmenga, C., Weersma, R. K., & Zhernakova, A. (2016). Proton pump inhibitors affect the gut microbiome. *Gut*, *65*, 740-748.

Isobe, J., Maeda, S., Obata, Y., Iizuka, K., Nakamura, Y., Fujimura, Y., Kimizuka, T., Hattori, K., Kim, Y-G., Morita, T., Kimura, I., Offermanns, S., Adachi, T., Nakao, A., Kiyono, H., Takahashi, D., & Hase, K. (2020). Commensal-bacteria-derived butyrate promotes the T-cell-independent IgA response in the colon. *Int Immunol*, *32*, 243-258.

Ito, M., Kanno, S., Nosho, K., Sukawa, Y., Mitsuhashi, K., Kurihara, H., Igarashi, H., Takahashi, T., Tachibana, M., Takahashi, H., Yoshi, S., Takenouchi, T., Hasegawa, T., Okita, K., Hirata, K., Maruyama, R., Suzuki, H., Imai, K., Yamamoto, H., & Shinomura, Y. (2015). Association of fusobacterium nucleatum with clinical and molecular features in colorectal serrated pathway. *Int J Cancer*, *137*, 1258-1268.

Jackson, M. A., Goodrich, J. K., Maxan, M.-E., Freedberg, D. E., Abrams, J. A., Poole, A. C., Sutter, J. L., Welter, D., Ley, R. E., Bell, J. T., Spector, T. D., & Steves, C. J. (2016). Proton pump inhibitors alter the composition of the gut microbiota. *Gut*, *65*, 749-756.

Jayasimhan, S., Yap, N-Y., Roest, Y., & Rafandram, R. (2013). Efficacy of microbial cell preparation in improving chronic constipation: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clin Nutr*, *32*, 928-934.

Karlsson, C. L. J., Önnarfält, J., Xu, J., Molin G., Ahrné, S., & Thorngren-Jerneck, K. (2012). The microbiota of the gut in preschool children with normal and excessive body weight. *Obesity*, *20*, 2257-2261.

Kato, K., Ishida, S., Tanaka, M., Mitsuyama, E., Xiao, J.-Z., & Odamaki, T. (2018). Association between functional lactase variants and a high abundance of *Bifidobacterium* in the gut of healthy Japanese people. *PLoS One*, *13*, e0206189.

Kim, M., Qie, Y., Park, J., & Kim, C. H. (2016). Gut microbial metabolites fuel host antibody responses. *Cell Host Microbe*, *10*, 202-214.

Kimura, I., Ozawa, K., Inoue, D., Imamura, T., Kimura, K., Maeda, T., Terasawa, K., Kashihara, D., Hirano, K., Tani, T., Takahashi, T., Miyauchi, S., Shioi, G., Inoue, H., & Tsujimoto, G. (2013). The gut microbiota suppresses insulin-mediated fat accumulation via the short-chain fatty acid receptor GPR43. *Nat Commun*, *4*, 1829.

Kleessen, B., Hartmann, L., & Blaut, M. (2001). Oligofructose and long-chain inulin: influence on the gut microbial ecology of rats associated with a human faecal flora. *Br J Nutr*, *86*, 291-300.

Koebnick, C., Wagner, I., Leitzmann, P., Stern, U., & Zunft, H. J. F. (2003). Probiotic beverage containing *Lactobacillus casei* Shirota improves gastrointestinal symptoms in patients with chronic constipation. *Can J Gastroenterol*, *17*, 655-659.

Koh, A., De Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P., & Bäckhed, F. (2016). From dietary fiber to host physiology: Short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. *Cell*, *165*, 1332-1345.

Koloski, N.A., Jones, M., Wai, R., Gill, R. S., Byles, J., & Talley, N. J. (2013). Impact of persistent constipation on health-related quality of life and mortality in older community-dwelling women. *Am J Gastroenterol*, *108*, 1152-1158.

Kon, R., Yamamura, M., Matsunaga, Y., Kimura, H., Minami, M., Kato, S., Ikarashi, N., & Sugiyama, K. (2018). Laxative effect of repeated Daiokanzoto is attributable to decrease in aquaporin-3 expression in the colon. *J Nat Med*. *72*, 493-502.

Kuang, Z., Wang, Y., Li, Y., Ye, C., Ruhn, K. A., Behrendt, C. L., Olson, E. N., & Hooper, L. V. (2019). The intestinal microbiota programs diurnal rhythms in host metabolism through histone deacetylase 3. *Science*, *365*, 1428-1434.

Le Bastard, Q., Chapelet, G., Javaudin, F., Lepelletier, D., Batard, E., & Montassier, E. (2020). The effects of inulin on gut microbial composition: a systematic review of evidence from human studies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, *39*, 403-413.

Lee, S. M., Kim, N., Nam, R. H., Park, J. H., Choi, S. I., Park, Y-T., Kim, Y-R., Seok, Y-J., Shin C. M., & Lee, D. H. (2019). Gut microbiota and butyrate level changes associated with the long-term administration of proton pump inhibitors to old rats. *Sci Rep*, 9, 6626.

Leung, L., Riutta, T., Kotecha, J., & Rosser, W. (2011). Chronic constipation: An evidence-based review. *J Am Board Fam Med*, 24, 436-451.

Ley, R.E., Bäckhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C. A., Knight, R. D., & Gordon, J. I. (2005). Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102, 11070-11075.

Li, S., Flint, A., Pai, J. K., Forman, J. P., Hu, F. B., Willett, W. C., Rexrode, K. M., Mukamal, K. J., & Rimm, E. B. (2014). Dietary fiber intake and mortality among survivors of myocardial infarction: Prospective cohort study. *BMJ*, 348, g2659.

Li, S., Gao, L., Chen, L., Ou, S., Wang, Y., & Peng, X. (2015). Continuously ingesting fructooligosaccharide can't maintain rats' gut *Bifidobacterium* at a high level. *J Food Sci*, 80, M2530-M2534.

Liang, X., Bushman, F. D., & FitzGerald, G. A. (2015). Rhythmicity of the intestinal microbiota is regulated by gender and the host circadian clock. *Proc Natl Acad Sci USA*, 112, 10479-10484.

Lin, D., Peters, B. A., Friedlander, C., Freiman, H. J., Goedert, J. J., Sinha, R., Miller, G., Bernstein, M. A., Hayes, R. B., & Ahn, J. (2018). Association of dietary fibre intake and gut microbiota in adults. *Br J Nutr*, 120, 1014-1022.

Lindberg, G., Hamid, S. S., Malfertheiner, P., Thomsen, O. O., Fernandez, B., Garisch, J., Thomson, A., Goh, K-L., Tandon, R., Fedail, S., Wong, B. C. Y., Khan, A. G., Krabshuis, J. H., & LeMair, A. (2011). World gastroenterology organisation global guideline: Constipation - a global perspective. *J Clin Gastroenterol*, 45, 483-487.

- Louis, P., & Flint, H. J. (2017). Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environ Microbiol*, *19*, 29-41.
- Maeda, J., Nishida, M., Takikawa, H., Yoshida, H., Azuma, T., Yoshida, M., & Mizushima, Y. (2010). Inhibitory effects of sulfobacin B on DNA polymerase and inflammation. *Int J Mol Med*, *26*, 751-758.
- Malloy, J. N., Paulose, J. K., Li, Y., & Cassone, V. M. (2012). Circadian rhythms of gastrointestinal function are regulated by both central and peripheral oscillators. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, *303*, G461-G473.
- Mariño, E., Richards, J. L., McLeod, K. H., Stanley, D., Yap, Y. A., Knight, J., McKenzie, C., Kranich, J., Oliveira, A. C., Rossello, F. J., Krishnamurthy, B., Nefzger, C. M., Macia, L., Thorburn, A., Baxter, A. G., Morahan, G., Wong, L. H., Polo, J. M., Moore, R. J., Lockett, T. J., Clarke, J. M., Topping, D. L., Harrison, L. C., & Mackay, C. R. (2017). Gut microbial metabolites limit the frequency of autoimmune T cells and protect against type 1 diabetes. *Nat Immunol*, *18*, 552-562.
- Mascolo, N., Rajendran, V. M., & Binder, H. J. (1991). Mechanism of short-chain fatty acid uptake by apical membrane vesicles of rat distal colon. *Gastroenterology*, *101*, 331-338.
- Maslowski, K.M., Vieira, A. T., Ng, A., Kranich, J., Sierro, F., Yu, D., Schilter, H. C., Rolph, M. S., Machay, F., Artis, D., Xavier, R. J., Teixeira, M. M., & Mackay, C. R. (2009). Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature*, *461*, 1282-1286.
- Matt, S.M., Allen, J. M., Lawson, M. A., Mailing, L. J., Woods, J. A., & Johnson, R. W. (2018). Butyrate and dietary soluble fiber improve neuroinflammation associated with aging in mice. *Front Immunol*, *9*, 1832.

McGinnis, G.R., & Young, M. E. (2016). Circadian regulation of metabolic homeostasis: Causes and consequences. *Nat Sci Sleep*, 8, 163-180.

McKnite, A.M., Perez-Munoz, M. E., Lu, L., Williams, E. G., Brewer, S., Andreux, P. A., Bastiaansen, J. W. M., Wang, X., Kachman, S. D., Auwerx, J., Williams, R. W., Benson, A. K., Peterson, D. A., & Ciobanu, D. C. (2012). Murine gut microbiota is defined by host genetics and modulates variation of metabolic traits. *PLoS One*, 7, e39191.

Messina, M., & Hughes, C. (2003). Efficacy of soyfoods and soybean isoflavone supplements for alleviating menopausal symptoms is positively related to initial hot flush frequency. *J Med Food*, 6, 1-11.

Meyer, D. & Stasse-Wolthuis, M. (2009). The bifidogenic effect of inulin and oligofructose and its consequences for gut health. *Eur J Clin Nutr*, 63, 1277-1289.

Mistry, R.H., Gu, F., Schols, H. A., Verkade, H. J., & Tietge, U. J. F. (2018). Effect of the prebiotic fiber inulin on cholesterol metabolism in wildtype mice. *Sci Rep*, 8, 13238.

Mitsui, A., Kumazawa, S., Takahashi, A., Ikemoto, H., Cao, S., & Arai, T. (1986). Strategy by which nitrogen-fixing unicellular cyanobacteria grow photoautotrophically. *Nature*, 323, 720-722.

Müller-Lissner, S.A., Kamm, M.A., Scarpignato, C., & Wald, A. (2005). Myths and misconceptions about chronic constipation. *Am J Gastroenterol*, 100, 232-242.

Murakami, K., Sasaki, S., Okubo, H., Takahashi, Y., Hosoi, Y., Itabashi, M. & the Freshmen in Dietetic Courses Study II Group. (2007). Association between dietary fiber, water and magnesium intake and functional constipation among young Japanese women. *Eur J Clin Nutr*, 61, 616-622.

Murakami, S., Goto, Y., Ito, K., Hayasaka, S., Kurihara, S., Soga, T., Tomita, M., & Fukuda, S. (2015). The consumption of bicarbonate-rich mineral water improves glycemic control. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 824395.

Nadatani, Y., Watanabe, T., Suda, W., Nakata, A., Matsumoto, Y., Kosaka, S., Higashimori, A., Otani, K., Hosomi, S., Tanaka, F., Nagami, Y., Kamata, N., Taira, K., Yamagami, H., Tanigawa, T., Hattori, M., & Fujiwara, Y. (2019). Gastric acid inhibitor aggravates indomethacin-induced small intestinal injury via reducing *Lactobacillus johnsonii*. *Sci Rep*, 9, 17490.

Narishige, S., Kuwahara, M., Shinozaki, A., Okada, S., Ikeda, Y., Kamagata, M., Tahara, Y., & Shibata, S. (2014). Effects of caffeine on circadian phase, amplitude and period evaluated in cells in vitro and peripheral organs in vivo in PER2::LUCIFERASE mice. *Br J Pharmacol*, 171, 5858-5869.

Nellesen, D., Yee, K., Chawia, A., Lewis, B. E., & Carson, R. T. (2013). A systematic review of the economic and humanistic burden of illness in irritable bowel syndrome and chronic constipation. *J Manag Care Pharm*, 19, 755-764.

Neyrinck, A. M., Etxeberria, U., Taminiu, B., Daube, G., Van Hul, M., Everard, A., Cani, P. D., Bindels, L. B., & Delzenne, N. M. (2017). Rhubarb extract prevents hepatic inflammation induced by acute alcohol intake, an effect related to the modulation of the gut microbiota. *Mol Nutr Food Res*, 61, 1500899.

Nishijima, S., Suda, W., Oshima, K., Kim, S.-W., Hirose, Y., Morita, H., & Hattori, M. (2016). The gut microbiome of healthy Japanese and its microbial and functional uniqueness. *DNA Res*, 23, 125-133.

Nishina, P. M., & Freedland, R. A. (1990). Effects of propionate on lipid biosynthesis in isolated rat hepatocytes. *J Nutr*, 120, 668-673.

Odamaki, T., Kato, K., Sugahara, H., Hashikura, N., Takahashi, S., Xiao, J-Z., Abe, F., & Osawa, R. (2016). Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: a cross-sectional study. *BMC Microbiol*, *16*, 90.

Ohkusa, T., Koido, S., Nishikawa, Y., & Sato, N. (2019). Gut microbiota and chronic constipation: A review and update. *Front Med*, *6*, 19.

Okumura, R., Kurakawa, T., Nakano, T., Kayama, H., Kinoshita, M., Motooka, D., Gotoh, K., Kimura, T., Kamiyama, N., Kusu, T., Ueda, Y., Wu, H., Iijima, H., Barman, S., Osawa, H., Matsuno, H., Nishimura, J., Ohba, Y., Nakamura, S., Iida, T., Yamamoto, M., Umemoto, E., Sano, K., & Takeda, K. (2016). Lypd8 promotes the segregation of flagellated microbiota and colonic epithelia. *Nature*, *532*, 117-121.

Omori, K., Miyakawa, H., Watanabe, A., Nakayama, Y., Lyu, Y., Ichikawa, N., Sasaki, H., & Shibata, S. (2021). The combined effects of magnesium oxide and inulin on intestinal microbiota and cecal short-chain fatty acids. *Nutrients*, *13*, 152.

Osman, M. A., Neoh, H., Ab Mutalib, N.-S., Chin, S.-F., Mazian, L., Ali, R. A. R., Zakaria, A. D., Ngiu, C. S., Ang, M. Y., & Jamal, R. (2021). *Parvimonas micra*, *Peptostreptococcus stomatis*, *Fusobacterium nucleatum* and *Akkermansia muciniphila* as a four-bacteria biomarker panel of colorectal cancer. *Sci Rep*, *11*, 2925.

Pachikian, B. D., Neyrinck, A. M., Deldicque, L., De Backer, F. C., Catry, E., Dewulf, E. M., Sohet, F. M., Bindels, L. B., Everard, A., Francaux, M., Guiot, Y., Cani, P. D., & Delzenne, N. M. (2010). Changes in intestinal Bifidobacteria levels are associated with the inflammatory response in magnesium-deficient mice. *J Nutr*, *140*, 509-514.

Palm, N. W., de Zoete, M. R., Cullen, T. W., Barry, N. A., Stefanowski, J., Hao, L., Degnan, P. H., Hu, J., Peter, I., Zhang, W., Ruggiero, E., Cho, J. H., Goodman, A. L., &

- Flavell, R. A. (2014). Immunoglobulin A coating identifies colltogenic bacteria in inflammatory bowel disease. *Cell* 158, 1000-1010.
- Park, Y. M., Lee, S.-Y., Kang, M.-J., Kim, B.-S., Lee, H.-J., Jung, S. S., Yoon, J. S., Cho, H.-J., Lee, E., Yang, S.-I., Seo, J.-H., Kim, H.-B., Suh, D. I., Shin, Y. H., Kim, K. W., Ahn, K., & Hong, S.-J. (2020). Imbalance of gut *Streptococcus*, *Clostridium*, and *Akkermansia* determines the natural course of atopic dermatitis in infant. *Allergy Asthma Immunol Res*, 12, 322-337.
- Pompei, A., Cordisco, L., Raimondi, S., Amaretti, A., Pagnoni, U. M., Matteuzzi, D., & Rossi, M. (2008). *In vitro* comparison of the prebiotic effects of tw inulin-type fructans. *Anaerobe*, 14, 280-286.
- Rafii, F. (2015). The Role of colonic bacteria in the metabolism of the natural isoflavone daidzin to equol. *Metabolites*, 5, 56-73.
- Rajilić-Stojanović, M. & de Vos, W. M. (2014). The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS Microbiol Rev*, 38, 996-1047.
- Régnier, M., Rastelli, M., Morissette, A., Suriano, F., Le Roy, T., Pilon, G., Delzenne, N. M., Marette, A., Van Hul, M., & Cani, P. D. (2020). Rhubarb supplementation prevents diet-induced obesity and diabetes in association with increased *Akkermansia muciniphila* in mice. *Nutrients*, 12, 2932.
- Richards, J., & Gumz, M. (2012). Advances in understanding the peripheral circadian clocks. *FASEB J*, 26, 3602-3613.
- Ríos-Covián, D., Ruas-Madiedo, P., Margolles, A., Gueimonde, M., de los Reyes-Gavilán, C. G., & Salazar, N. (2016). Intestinal short chain fatty acids and their link with diet and human health. *Front Microbiol*, 7, 185.

- Rolhion, N., & Chassaing, B. (2016). When pathogenic bacteria meet the intestinal microbiota. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, *371*, 20150504.
- Roque, M.V., & Bouras, E. P. (2015). Epidemiology and management of chronic constipation in elderly patients. *Clin Interv Aging*, *10*, 919-930.
- Ryan-Harshman, M., & Aldoori, W. (2004). How diet and lifestyle affect duodenal ulcers. *Can Fam Physician*, *50*, 727-732.
- Santacruz, A., Collado, M. C., Garcia-Valdés, L., Segura, M. T., Martin-Lagos, J. A., Anjos, T., Marti-Romero M., Lopez, R. M., Florido, J., Campoy, C., & Sanz, Y. (2010). Gut microbiota composition is associated with body weight, weight gain and biochemical parameters in pregnant women. *Br J Nutr*, *104*, 83-92.
- Sawicki, C. M., Livingston, K. A., Obin, M., Roberts, S. B., Chung, M., & McKeown, N. M. (2017). Dietary fiber and the human gut microbiota: Application of evidence mapping methodology. *Nutrients*, *9*, 125.
- Scheiman, J., Luber, J. M., Chavkin, T. A., MacDonald, T., Tung, A., Pham, L-D., Wibowo, M. C., Wurth, R. C., Punthambaker, S., Tierney, B. T., Yang, Z., Hattab, M. W., Avila-Pacheco, J., Clish, C. B., Lessard, S., Church, G. M., & Kostic, A. D. (2019). Meta'omic analysis of elite athletes identifies a performance-enhancing microbe that functions via lactate metabolism. *Nat Med*, *25*, 1104-1109.
- Scher, J. U., Sczesnak, A., Longman, R. S., Segata, N., Ubeda, C., Bielski, C., Rostron, T., Cerundolo, V., Pamer, E. G., Abramson, S. B., Huttenhower C., & Littman D. R. (2013). Expansion of intestinal *Prevotella copri* correlates with enhanced susceptibility to arthritis. *eLife*, *2*, e01202.
- Schneeberger, M., Everard, A., Gomez-Valades, A. G., Matamoros, S., Ramirez, S., Delzenne, N. M., Gomis, R., Claret, M., Cani, P. D. (2015). *Akkermansia muciniphila*

inversely correlates with the onset of inflammation, altered adipose tissue metabolism and metabolic disorders during obesity in mice. *Sci Rep*, 5, 16643.

Sheng, J., Chi, Z., Gong, F., & Li, J. (2008). Purification and characterization of extracellular inulinase from a marine yeast *Cryptococcus aureus* G7a and inulin hydrolysis by the purified inulinase. *Appl Biochem Biotechnol*, 114, 111-121.

Shimizu, K., Tamada, T., Ogura, H., Mohri, T., Kiguchi, T., Fujimi, S., Asahara, T., Yamada, T., Ojima, M., Ikeda, M., & Shimazu, T. (2018). Synbiotics modulate gut microbiota and reduce enteritis and ventilator-associated pneumonia in patients with sepsis: A randomized controlled trial. *Crit Care*, 22, 239.

Shutten, J.C., Joosten, M. M., de Borst, M. H., & Bakker, S. J. L.(2018). Magnesium and blood pressure: A physiology-based approach. *Adv Chronic Kidney Dis*, 25, 244-250.

Slavin, J. (2013). Fiber and prebiotics: Mechanisms and health benefits. *Nutrients*, 5, 1417-1435.

Stoll, M. L., Pierce, M. K., Watkins, J. A., Zhang, M., Weiss, P. F., Weiss, J. E., Elson, C. O., Cron, R. Q., Kumar, R., Morrow, C. D., & Schoeb, T. R. (2019). *Akkermansia muciniphila* is permissive to arthritis in the K/BxN mouse model of arthritis. *Genes Immun*, 20, 158-166.

Sun, S.X., Dibonaventura, M., Purayidathil, F. W., Wagner, J-S., Dabbous, O., & Mody, R. (2011). Impact of chronic constipation on health-related quality of life, work productivity, and healthcare resource use: An analysis of the national health and wellness survey. *Dig Dis Sci*, 56, 2688-2695.

Tahara, Y., & Shibata, S. (2014). Chrono-biology, chrono-pharmacology, and chrono-nutrition. *J Pharmacol Sci*, 124, 320-335.

Tahara, Y., Shiraishi, T., Kikuchi, Y., Haraguchi, A., Kuriki, D., Sasaki, H., Motohashi, H., Sakai, T., & Shibata, S. (2015). Entrainment of the mouse circadian clock by sub-acute physical and psychological stress. *Sci Rep*, *5*, 11417.

Tahara, Y., & Shibata, S. (2016). Circadian rhythms of liver physiology and disease: Experimental and clinical evidence. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, *13*, 217-226.

Tahara, Y., Aoyama, S., & Shibata, S. (2017). The mammalian circadian clock and its entrainment by stress and exercise. *J Physiol Sci*, *67*, 1-10.

Tahara, Y., Yamazaki, M., Sukigara, H., Motohashi, H., Sasaki, H., Miyakawa, H., Haraguchi, A., Ikeda, Y., Fukuda, S., & Shibata, S. (2018). Gut microbiota-derived short chain fatty acids induce circadian clock entrainment in mouse peripheral tissue. *Sci Rep*, *8*, 1395.

Takagi, R., Tsujikawa, Y., Nomoto, R., & Osawa, R. (2014). Comparison of the growth of *Lactobacillus delbrueckii*, *L. paracasei* and *L. plantarum* on inulin in co-culture systems. *Biosci Microbiota Food Health*, *33*, 139-146.

Takemura, N., Ozawa, K., Kimura, N., Watanabe, J., & Sonoyama, K. (2010). Inulin-type fructans stimulated the growth of exogenously administered *Lactobacillus plantarum* No. 14 in the mouse gastrointestinal tract. *Biosci Biotechnol Biochem*, *74*, 375-381.

Tamai, T. K., Nakane, Y., Ota, W., Kobayashi, A., Ishiguro, M., Kadofusa, N., Ikegami, K., Yagita, K., Shigeyoshi, Y., Sudo, M., Nishiwaki-Ohkawa, T., Sato, A., & Yoshimura, T. (2018). Identification of circadian clock modulators from existing drugs. *EMBO Mol Med*, *10*, e8724.

Tamura, A., Tomita, T., Oshima, T., Toyoshima, F., Yamasaki, T., Okugawa, T., Kondo, T., Kono, T., Tozawa, K., Ikehara, H., Ohda, Y., Fukui, H., Watari, J., & Miwa, H. (2016).

Prevalence and self-recognition of chronic constipation: Results of an internet survey. *J Neurogastroenterol Motil*, 22, 677-685.

Tamura, K., Sasaki, H., Shiga, K., Miyakawa, H. & Shibata, S. (2020). The timing effects of soy protein intake on mice gut microbiota. *Nutrients*, 12, 87.

Tana, C., Umesaki, Y., Imaoka, A., Handa, T., Kanazawa, M., & Fukudo, S. (2010). Altered profiles of intestinal microbiota and organic acids may be the origin of symptoms in irritable bowel syndrome. *Neurogastroentero Motil*, 22, 512-519.

Thaiss, C. A., Zeevi, D., Levy, M., Zilberman-Schapira, G., Suez, J., Tengeler, A. C., Abramson, L., Katz, M. N., Korem, T., Zmora, N., Kuperman, Y., Biton, I., Gilad, S., Harmelin, A., Shapiro, H., Halpern, Z., Segal, E., & Elinav, E. (2014). Transkingdom control of microbiota diurnal oscillations promotes metabolic homeostasis. *Cell*, 159, 514-529.

Trompette, A., Gollwitzer, E. S., Yadava, K., Sichelstiel, A. K., Sprenger, N., Ngom-Bru, C., Blanchard, C., Junt, T., Nicod, L. P., Harris, N. L., & Marsland, B. J. (2014). Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. *Nat Med*, 20, 159-166.

Tropini, C., Moss, E. L., Merrill, B. D., Ng, K. M., Higginbottom, S. K., Casavant, E. P., Gonzalez, C. G., Fremin, B., Bouley, D. M., Elias, J. E., Bhatt, A. S., Huang, K. G., & Sonnenburg, J. L. (2018). Transient osmotic perturbation causes long-term alteration to the gut microbiota. *Cell*, 173, 1742-1754.

Tsujikawa, Y., Nomoto, R., & Osawa, R. (2013). Difference in degradation patterns on inulin-type fructans among strains of *Lactobacillus delbrueckii* and *Lactobacillus paracasei*. *Biosci Microbiota Food Health*, 32, 157-165.

Uesugi, T., Toda, T., Okuhira, T., & Chen, J-T. (2003). Evidence of estrogenic effect by the three-month-intervention of isoflavone on vaginal maturation and bone metabolism in early postmenopausal women. *Endocrine J*, 50, 613-619.

Uetani, N., Hardy, S., Gravel, S-P., Kiessling, S., Pietrobon, A., Wong, N. N., Chénard, V., Cermakian, N., St-Pierre, J., & Tremblay, M. L. (2017). PRL2 links magnesium flux and sex-dependent circadian metabolic rhythms. *JCI Insight*, 2, e91722.

van der Beek, C.M., Canfora, E. E., Kip, A. M., Gorissen, S. H. M., Damink, S. W. M. O., van Eijk, H. M., Hoist, J. J., Blaak, E. E., Dejong, C. H. C., & Lenaerts, K. (2018). The prebiotic inulin improves substrate metabolism and promotes short-chain fatty acid production in overweight to obese men. *Metabolism*, 87, 25-35.

Van Herreweghen, F., Van den Abbeele, P., De Mulder, T., De Weirdt, R., Geimaert, A., Hernandez-Sanabria, E., Vilchez-Vargas, R., Jauregui, R., Pieper, D. H., Belzer, C., De Vos, W. M., & Van de Wiele, T. (2016). *In vitro* colonisation of the distal colon by *Akkermansia muciniphila* is largely mucin and pH dependent. *Benef Microbes*, 8, 81-96.

Wakai, E., Ikemura, K., Sugimoto, H., Iwamoto, T., & Okuda, M. (2019). Risk factors for the development of hypermagnesemia in patients prescribed magnesium oxide: A retrospective cohort study. *J Pharm Health Care Sci*, 5, 4.

Wald, A., Scarpignato, C., Kamm, M. A., Mueller-Lissner, S., Helfrich, I., Schuijt, C., Bubeck, J., Limoni, C., & Petrini, O. (2007). The burden of constipation on quality of life: Results of a multinational survey. *Aliment Pharmacol Ther*, 26, 227-236.

Walker, A. W., Duncan, S. H., Leitch, E. C. M., Child, M. W., & Flint, H. J. (2005). pH and peptide supply can radically alter bacterial populations and short-chain fatty acid ratios within microbial communities from the human colon. *Appl Environ Microbiol*, 71, 3692-3700.

Walker, A. W., Pfitzner, B., Harir, M., Schaubeck, M., Calasan, J., Heinzmann, S. S., Turaev, D., Rattei, T., Endesfelder, D., zu Castell, W., Haller, D., Schmid, M., Hartmann, A., & Schmitt-Kopplin, P. (2017). Sulfonolipids as novel metabolite markers of *Alistipes* and *Odoribacter* affected by high-fat diets. *Sci Rep*, 7, 11047.

Wallace, J.L., Syer, S., Denou, E., De Palma, G., Vong, L., McKnight, W., Jury J., Bolla, M., Bercik, P., Collins, S. M., Verdu, E., & Ongini, E. (2011). Proton pump inhibitors exacerbate NSAID-induced small intestinal injury by inducing dysbiosis. *Gastroenterology*, 141, 1314–1322.

Wang, L., Christophersen, C. T., Sorich, M. J., Gerber, J. P., Angley, M. T., Conlon, M. A. (2011). Low relative abundances of mucolytic bacterium *Akkermansia muciniphila* and *Bifidobacterium* spp. in feces of children with autism. *Appl Environ Microbiol*, 77, 6718-6721.

Wang, Y., Kuang, Z., Yu, X., Ruhn, K. A., Kubo, M., & Hooper, L. V. (2017). The intestinal microbiota regulates body composition through NFIL3 and the circadian clock. *Science*, 357, 912-916.

Wang, Z., Zhang, X., Zhu, L., Yang, X., He, F., Wang, T., Bao, T., Lu, H., Wang, H., & Yang, S. (2020). Inulin alleviates inflammation of alcoholic liver disease via SCFAs-inducing suppression of M1 and facilitation of M2 macrophages in mice. *Int Immunopharmacol*, 78, 106062.

Watanabe, A., Sasaki, H., Miyakawa, H., Nakayama, Y., Lyu, Y., & Shibata, S. (2020). Effect of dose and timing of burdock(*Arctium lappa*) root intake on intestinal microbiota of mice. *Microorganisms*, 8, 220.

Watanabe, T., Nishio, H., Tanigawa, T., Yamagami, H., Okazaki, H., Watanabe, K., Tominaga, K., Fujiwara, Y., Oshitani, N., Asahara, T., Nomoto, K., Higuchi, K., Takeuchi, K., & Arakawa, T. (2009). Probiotic *Lactobacillus casei* strain Shirota prevents

indomethacin-induced small intestinal injury: involvement of lactic acid. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 297, G506-G513.

Wilck, N., Matus, M. G., Kearney, S. M., Olesen, S. W., Forslund, K., Bartolomaeus, H., Haase, S., Mähler, A., Balogh, A., Markó, L., Vvedenskaya, O., Kleiner, F. H., Dmitry, T., Klug, L., Costea, P. I., Sunagawa, S., Maier, L., Rakova, N., Schatz, V., Neubert, P., Frätzer, C., Krannich, A., Gollasch, M., Grohme, D. A., Côrte-Real, B. F., Gerlach, R. G., Basic, M., Typas, A., Wu, C., Titze, J. M., Jantsch, J., Boschmann, M., Dechend, R., Kleinewietfeld, M., Kempa, S., Bork, P., Linker, R. A., Alm, E. J., & Müller, D. N. (2017). Salt-responsive gut commensal modulates T_H17 axis and disease. *Nature*, 551, 585-589.

Williams, B.B., Van Benschoten, A. H., Cimermancic, P., Donia, M. S., Zimmermann, M., Taketani, M., Ishihara, A., Kashyap, P. C., Fraser, J. S., & Fischbach, M. A. (2014). Discovery and characterization of gut microbiota decarboxylases that can produce the neurotransmitter tryptamine. *Cell Host Microbe*, 16, 495-503.

Wolever, T. M., Spadafora, P., & Eshuis, H. (1991). Interaction between colonic acetate and propionate in humans. *Am J Clin Nutr*, 53, 681-687.

Wolf, K. J., Daft, J. G., Tanner, S. M., Hartmann, R., Khafipour, E., & Lorenz, R. G. (2014). Consumption of acidic water alters the gut microbiome and decreases the risk of diabetes in NOD mice. *J Histochem Cytochem*, 62, 237-250.

World Gastroenterology Organisation. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines. Constipation: A Global Perspective.

<https://www.worldgastroenterology.org/guidelines/global-guidelines/constipation/constipation-english>(2021年3月1日閲覧)

Wright, R. S., Anderson, J. W., & Bridges, S. R. (1990). Propionate inhibits hepatocyte lipid synthesis. *Proc Soc Exp Biol Med*, 195, 26-29.

Wu, G. D., Chen, J., Hoffmann, C., Bittinger, K., Chen, Y-Y., Keilbaugh, S.A., Bewtra, M., Knights, D., Walters, W. A., Knight, R., Sinha, R., Gilroy, E., Gupta, K., Baldassano, R., Nessel, L., Li, H., Bushman, F. D., & Lewis, J. D. (2011). Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science*, *334*, 105-108.

Yamada, T., Hino, S., Iijima, H., Genda, T., Aoki, R., Nagata, R., Han, K-H., Hirota, M., Kinashi, Y., Oguchi, H., Suda, W., Furusawa, Y., Fujimura, Y., Kunisawa, J., Hattori, M., Fukushima, M., Morita, T., & Hase, K. (2019). Mucin *O*-glycans facilitate symbiosynthesis to maintain gut immune homeostasis. *EBioMedicine*, *48*, 513-525.

Yamashita, M., Okubo, H., Kobuke, K., Ohno, H., Oki, K., Yoneda, M., Tanaka, J., & Hattori, N. (2019). Alteration of gut microbiota by a Westernized lifestyle and its correlation with insulin resistance in non-diabetic Japanese men. *J Diabetes Investig*, *10*, 1463-1470.

Yano, J. M., Yu, K., Donaldson, G. P., Shastri, G. G., Ann, P., Ma, L., Nagler, C. R., Ismagilov, R. F., Mazmanian, S. K., & Hsiao, E. Y. (2015). Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis. *Cell*, *161*, 264-276.

Yoshihara, T., Oikawa, Y., Kato, T., Kessoku, T., Kobayashi, T., Kato, S., Misawa, N., Ashikari, K., Fuyuki, A., Ohkubo, H., Higurashi, T., Tateishi, Y., Tanaka, Y., Nakajima, S., Ohno, H., Wada, K., & Nakajima, A. (2020). The protective effect of *Bifidobacterium bifidum* G9-1 against mucus degradation by *Akkermansia muciniphila* following small intestine injury caused by a proton pump inhibitor and aspirin. *Gut Microbes*, *11*, 1385-1404.

Yoshioka, H., Ohish, R., Hirose, Y., Torii-Goto, A., Park, S. J., Miura, N., & Yoshikawa, M. (2019). Chronopharmacology of dapagliflozin-induced antihyperglycemic effects in C57BL/6J mice. *Obes Res Clin Pract*, *13*, 505-510.

Yu, L., Duan, H., Kellingray, L., Cen, S., Tian, F., Zhao, J., Zhang, H., Le Gall, G., Mayer, M. J., Zhai, Q., Chen, W., & Narbad, A. (2020). *Lactobacillus plantarum*-mediated regulation of dietary aluminum induces changes in the human gut microbiota: an in vitro colonic fermentation study. *Probiotics Antimicrob Proteins*, doi: 10.1007/s12602-020-09677-0.

Yuan, L., Zhang, S., Li, H., Yang, F., Mushtaq, N., Ullah, S., Shi, Y., An, C., & Xu, J. (2018). The influence of gut microbiota dysbiosis to the efficacy of 5-fluorouracil treatment on colorectal cancer. *Biomed Pharmacother*, *108*, 184-193.

Yue, S-J., Liu, J., Wang, W-X., Wang, A-T., Yang, X-Y., Guan, H-S., Wang, C-Y., & Yan, D. (2019). Berberine treatment-emergent mild diarrhea associated with gut microbiota dysbiosis. *Biomed Pharmacother*, *116*, 109002.

Zhai, Q., Feng, S., Arjan, N., & Chen, W. (2019). A next generation probiotic, *Akkermansia muciniphila*. *Crit Rev Food Sci Nutr*, *59*, 3227-3236.

Zhang, X., Shen, D., Fang, Z., Jie, Z., Qiu, X., Zhang, C., Chen, Y., & Ji, L. (2013). Human gut microbiota changes reveal the progression of glucose intolerance. *PLoS One*, *8*, e71108.

Zhang, X., Li Y., Del Gobbo, L. C., Rosanoff, A., Wang, J., Zhang, W., & Song, Y. (2016). Effects of magnesium supplementation on blood pressure. A meta-analysis of randomized double-blind placebo-controlled trials. *Hypertension*, *68*, 324-333.

Zhou, Y., & Zhi, F. (2016). Lower level of *Bacteroides* in the gut microbiota is associated with inflammatory bowel disease: A meta-analysis. *BioMed Res Int*, *2016*, 5828959.

Zhu, L., Qin, S., Zhai, S., Gao, Y., & Li, L. (2017). Inulin with different degrees of polymerization modulates composition of intestinal microbiota in mice. *FEMS Microbiol Lett*, *364*, fnx075.

Zhuang, X., Li, T., Li, M., Huang, S., Qiu, Y., Feng, R., Zhang, S., Chen, M., Xiong, L., & Zeng, Z. (2019). Systematic review and meta-analysis: Short-chain fatty acid characterization in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, 25, 1751-1763.

伊藤喜久治. (1994). 腸内細菌と動物実験系. *化学と生物*, 32, 44-47.

医薬品医療機器総合機構. 酸化マグネシウム. マグミット錠(協和化学工業株式会社)インタビューフォーム(2017年7月改訂:改訂第7版). <https://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/iyakuDetail/GeneralList/2344009C1> (2021年3月1日閲覧)

岩崎真三. (2017). 精神科領域の慢性便秘対策. *漢方医学*, 41, 88-91.

宇佐美眞, 三好真琴, 西本幸子, 戸田明代, 吉原勢津子. (2019). 多様な酪酸投与とその効果. *甲南女子大学研究紀要 II*, 3, 25-35.

内山成人, 上野友美, 鈴木淑水. (2007). 新規エクオール産生乳酸菌のヒト糞便からの単離・同定. *腸内細菌学雑誌*, 21, 217-220.

大蔵直樹, 大石勝隆. (2012). 血栓症と体内時計. *The Chemical Times*, 3, 7-15.

岡村均. (2005). 体内時計の分子機構—腸・肝臓などの末梢臓器は時をどのように刻むか—. *日本消化器病学会雑誌*, 102, 1259-1266.

小田巻俊孝, 境洋平, 石川大. (2019). 7章 腸内細菌叢をどのように制御するのか?. もっとわかる! 腸内細菌叢. 福田真嗣(編), 羊土社, 東京, pp.82-93.

厚生労働省. 令和元年国民健康・栄養調査報告. 第1部 栄養素等摂取状況調査の結果. 第5表の1.

https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/kenkou/eiyuu/r1-houkoku_00002.html (2021年3月1日閲覧)

厚生労働省. 生活習慣病予防のための健康情報サイト. 食物繊維の必要性和健康.
<https://www.e-healthnet.mhlw.go.jp/information/food/e-05-001.html> (2021年3月1日閲覧)

国立健康・栄養研究所. 国民健康・栄養調査 栄養素等摂取量 食物繊維摂取量.
https://www.nibiohn.go.jp/eiken/kenkounippon21/eiyouchousa/keinen_henka_eiyou.htm
1 (2021年3月1日閲覧)

柴田重信. (2013). 2章 時計遺伝子と食餌リズム. 香川靖雄(編). 時間栄養学 時計遺伝子と食事のリズム. 女子栄養大学出版社, 東京, pp. 37-54.

竹田潔, 奥村龍, 香山尚子, 梅本英司. (2017). 3章 粘膜免疫と腸内細菌叢. 熊ノ郷淳(編). 免疫ペディア 101 のイラストで免疫学・臨床免疫学に強くなる! 羊土社, 東京, pp.117-139.

辻啓介, 辻悦子, 中川靖枝, 鈴木慎次郎. (1988). 食物繊維のナトリウム吸着能が高血圧自然発症ラットの血圧に及ぼす影響. *日本家政学会誌*, 39, 187-195.

日本消化器病学会関連研究会慢性便秘の診断・治療研究会.(2017). 慢性便秘症診療ガイドライン. 南江堂, 東京, pp.1-92.

長谷耕二, 大野博司. (2006). 粘膜免疫系の最前線における上皮細胞の生体防御機構. *Jpn J Clin Immunol*, 29, 16-26.

服部正平. (2014). ヒト腸内マイクロバイオーーム解析のための最新技術. *Jpn J Clin Immunol*, 37, 412-422.

原博. (2002). プレバイオティクスから大腸で産生される短鎖脂肪酸の生理効果. *腸内細菌学雑誌*, 16, 35-42.

平山和宏. (2016). ヒトの腸内菌の分類に関する総論. *腸内細菌学雑誌*, 30, 5-15.

藤澤倫彦. (2017). ヒト腸内菌の分類学的位置. *腸内細菌学雑誌*, 31, 159-168.

細野朗. (2013). バクテロイデスと免疫. *腸内細菌学雑誌*, 27, 203-209.

水上健. (2020). 慢性便秘症の既存治療とその問題点-酸化マグネシウムと刺激性下剤-. *消化器内科-慢性便秘症診療ガイドライン時代の便秘診療*. 中島淳(編), 医学出版, 東京, pp.38-44.

水野英彰, 阿部展次. (2018). 経腸栄養管理合併症に対するプレバイオティクスやプロバイオティクスの有用性. *日本静脈経腸栄養学会雑誌*, 33, 1115-1120.

光岡知足. (2002). 腸内フローラの研究と機能性食品. *腸内細菌学雑誌*, 15, 57-89.

吉村勇哉, 藤崎孝輔, 山本武範, 篠原康雄. (2017). 酸化マグネシウム製剤を経口投与したラットでのマグネシウムの動態解析. *Yakugaku Zasshi*, 137, 581-587.

渡部恂子. (2005). 腸内糖代謝と腸内細菌. *腸内細菌学雑誌*, 19, 169-177.

【掲載ジャーナル】

本学位論文は、下記の原著論文を基に作成され、早稲田大学大学院先進理工学研究科に提出されたものである。

Kanako Omori, Hiroki Miyakawa, Aya Watanabe, Yuki Nakayama, Yijin Lyu, Natsumi Ichikawa, Hiroyuki Sasaki, Shigenobu Shibata. The Combined Effects of Magnesium Oxide and Inulin on Intestinal Microbiota and Cecal Short-Chain Fatty Acids. *Nutrients* 2021; 13: 152.

【研究業績】

- 講演

大森 加南子、佐々木 裕之、渡邊 文、中山 由紀、呂 怡錦、市川 なつみ、柴田 重信「MgO がマウスの盲腸内 SCFA ならびに腸内細菌叢に与える影響」、日本薬学会 第 140 年会、27Q-pm136S、国立京都国際会館、2020 年 3 月

大森 加南子、佐々木 裕之、渡邊 文、中山 由紀、呂 怡錦、市川 なつみ、柴田 重信「水溶性食物繊維と MgO の併用がマウスの盲腸内 SCFA ならびに腸内細菌叢に与える影響」、第 7 回 研究交流セミナー、早稲田大学 先端生命医科学センター、2020 年 2 月(新型コロナウイルス流行で延期)

Kanako Omori, Hiroyuki Sasaki, Hiroki Miyakawa, Aya Watanabe, Yuki Nakayama, Yijin Lyu, Shigenobu Shibata. Effects of magnesium oxide, clinically used as an antacid or a laxative, on intestinal environment in mice. 5th Core-to-Core International Symposium “3D Lab-Exchange Program”, No.22 沖縄科学技術大学院大学(OIST), 2019 年 2 月

- 論文

Shin-Ichi Yokota, Kaai Nakamura, Midori Ando, Atsushi Haraguchi,

Kanako Omori, Shigenobu Shibata. A low-protein diet eliminates the circadian rhythm of serum insulin and hepatic lipid metabolism in mice. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2019; 63: 177-185.