

腸内細菌のエクオール産生に及ぼす食物繊維の評価

— *ex vivo*培養試験—

小寺美有紀、中村浩平*、横山慎一郎

The assessment of equol production via dietary fiber in gut microbiota.

— *ex vivo* culture tests —

Miyuki KODERA, Kohei NAKAMURA* and Shin-ichiro YOKOYAMA

食物繊維が及ぼすエクオール産生への影響を評価するため、エクオール産生者の糞便培養物を用いた*ex vivo*培養試験を行った。ペクチンおよびレジスタントスターチの添加では、エクオール変換率は対照群と比較してそれぞれ約1/10および1/3に低下していた。一方で、キチンの添加では約2.7倍に増加し、エクオール産生に関する促進効果が期待された。

1. はじめに

エクオールは大豆イソフラボン類の一種であり、骨粗鬆症の予防や更年期症状の緩和といったホルモン依存性疾患に対する緩和作用が期待されている¹⁾。エクオールは大腸内においてダイゼインが還元作用を受け変換される化合物であり、関連した酵素遺伝子を有するエクオール産生菌の関与が示唆されている²⁾。本研究では、エクオール産生能が確認されているヒト糞便培養物を用いて、3種の食物繊維(ペクチン、キチン、レジスタントスターチ)がエクオール産生へ及ぼす影響を調査した。

2. 実験方法

2.1 培養試験

2.1.1 培地調製

アディキュアGAMブイヨン培地(島津ダイアグスティクス(株))にダイゼインを1 mg/L、食物繊維またはレジスタントスターチを1%添加した。食物繊維はペクチン(東京化成工業(株))、キチン(東京化成工業(株))、レジスタントスターチ(RS)としてハイアミローススターチ((株)Jオイルミルズ)を用いた。20 mL容ガラスバイアルへ培地および窒素/二酸化炭素混合ガスを封入し、ブチルゴム栓を用いて密閉後、115℃、15分オートクレーブ滅菌を行った。

2.1.2 培養およびサンプリング

エクオール産生者の糞便を採取し(n=8)、アディキュアGAMブイヨン培地を用いて37℃で培養後、グリセロールを混合してヒト糞便培養物とし、使用まで-80℃で保管した。オートクレーブ滅菌を行った培地入りガラスバイアルにヒト糞便培養物を1 mL注入し、37℃で3日間培養を行った。培養初日から1 日毎に培地を採取した。採取した培養液は12,000 rpm、15 分間遠心分離を行い上清と沈殿物に分け、分析まで-30℃で保管した。本研究は岐阜大学倫理委員会の承認に基づいて行った(承認番号2018-114)。

2.2 イソフラボンの抽出および測定

Uenoらの方法³⁾に一部改変を加えて行った。培養液上清200 μ Lを1.5 mL容マイクロチューブへ注入後、酢酸エチル1 mLを加えミキサー(タイテック(株))にて15分間ボルテックス混合を行った。KUBOTA 3700(久保田商事(株))にて12,000 rpm、10分間遠心分離を行った。上清850 μ Lを新しいマイクロチューブへ移し、窒素ガスを吹付ながら乾固させた。乾固物に0.05%りん酸含有80%エタノール溶液200 μ Lを加え再溶解し、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)に供した。HPLCは、PDA検出器を備えたAlliance system(日本ウオーターズ(株))により分析した。移動相はA液:0.05%りん酸含有80%メタノール溶液、B液:2%酢酸エチル含有メタノール溶液のリニアグラジエントとした。グラジエント条件は t_{0-10} , B=25-50%; $t_{10-17.9}$, B=50%; t_{18-23} , B=25%とした(t =時間(分))。CORTECS T3、150-mm $\times$ 4.6 mm $\times$ 2.1 μ mを用いて分離を行い、検出波長は260 nm(ダイゼイン)および280 nm(エクオール)にて定量を行った。培養液中のエクオール濃度を培養初日のダイゼイン濃度で割算した値をエクオール変換率とした。

2.3 エクオール産生菌数の定量

培養液1 mLを1.5 mL容マイクロチューブへ移し、12,000 rpm、15分間遠心分離を行った。沈殿物を対象にEZ-Beads(プロメガ(株))を用いてフェノールクロロホルム法によりDNAを抽出し、2 ng/ μ Lに調製した。エクオール産生菌の検出用プライマー(Fw: GACTACGASGCCGTGA-AGAAG、Rv: GGGTGSGACGCGTTGATGCCGA)各0.3- μ M、THUNDERBIRD SYBR qPCR mix(東洋紡(株))10- μ L、DNA溶液5 μ L、DEPC処理水を用いて容量を調整し20 μ L反応系のqPCR反応液を調製した。StepOne(Applied Biosystems)を用いて初期変性95℃2分を1サイクル、変性95℃20秒-伸長反応60℃30秒を40サイクルの条件にて、リアルタイムPCR反応を実行した。

2.4 短鎖脂肪酸の測定

培養液上清200 μ Lを1.5 mL容マイクロチューブへ移し、濃塩酸100 μ L、ジエチルエーテル1 mLを加えボルテック

*岐阜大学応用生物科学部

ス混合を行った。12,000 rpm、5分間遠心分離を行い、上清を新しい1.5 mL容マイクロチューブへ移した。無水硫酸ナトリウムを加えて脱水後、1 μ Lをフィルター越しガスクロマトグラフィー-マススペクトル(GC-MS)分析に供した。GC-MS分析では、カラムにAgilent DB-FATWAX UI 30 mを使用した。オープン温度は130℃で15分間加熱後、10℃/minで230℃まで昇温した。SIMスキャンとし、酢酸 $m/z=60$ 、45、プロピオン酸 $m/z=57$ 、45、酪酸 $m/z=73$ 、55でスキャンした。乳酸においてはLactate Assay Kit-WST((株)同仁化学研究所)を用い、プロトコルの指示に従って測定を行った。

2. 5 pHの測定

培養液上清をLAQUA pHメーター((株)堀場製作所)を用いてpHの測定を行った。

2. 6 統計解析

培養液中におけるエクオール変換率、エクオール産生菌数に関してはSteel法、培養液中における短鎖脂肪酸濃度およびpHに関してはTukey-Kramer法による多重比較検定を行った。 $P < 0.05$ で有意差ありと判定した。

3. 結果と考察

エクオール変換率の推移 ($n=8$) に関して図1に示した。ペクチン添加群、RS添加群では日数経過に伴うエクオール変換率の上昇は確認されなかった。一方キチン添加群においては、日数経過に伴いエクオール変換率が上昇していた。培養3日目における培養液中の対照群を基準として比較したエクオール変換率について図2に示した。ペクチン添加群では約1/10、RS添加群では約1/3に低下した一方で、キチン添加群では約2.7倍に上昇した。

エクオール産生菌に関して、培養3日目における対照群に対する各群のエクオール産生菌数の比率を算出し、図3に示した。キチン添加群では対照群と比較して有意に増加していた。

培養液中の短鎖脂肪酸濃度について図4に示した。キチン添加群では対照群と同等の値を保っていた一方で、ペクチン添加群では酢酸、プロピオン酸、酪酸が対照群と比較して有意に低下し、RS添加群ではプロピオン酸が有意に低下していた。培養液中の乳酸濃度はペクチン添加群やRS添加群で対照群と比較して増加の傾向があることが確認された。培養液中のpHでは、キチン添加群では対照群 ($\text{pH}6.5 \pm 0.26$) と同等の $\text{pH}6.7 \pm 0.21$ であったが、ペクチン添加群は $\text{pH}5.3 \pm 0.21$ 、RS添加群では $\text{pH}5.1 \pm 0.31$ と有意に低下していた(図5)。

これらの結果より、ペクチンやRSの添加では、乳酸の蓄積に伴うpHの低下が生じたことが示唆された。エクオール産生菌の一種である*Slackia* sp. D-G6の至適

pHは $\text{pH}6 \sim 10$ と報告されている⁴⁾。また、Huらの報告⁵⁾では、ダイゼインレダクターゼおよびジヒドロダイゼインレダクターゼの至適pHをそれぞれ $\text{pH}6.5$ および $\text{pH}7.5$ と報告している。ペクチン添加群やRS添加群では過度なpHの低下が生じたことにより、エクオール産生が妨げられたことが示唆された。

一方で、キチン添加においては対照群と同等のpHを保持しており、エクオール変換率の上昇およびエクオール産生菌数の増加が示された。

ヒトにおける消化管内のpHは、 $\text{pH}5.7 \sim 7.4$ であることが報告⁶⁾されている。本研究では一部の食物繊維で過度なpH低下が生じたことにより、エクオール変換率が低下したことが示唆された。今後、*in vivo*による試験やpH制御を加えた培養試験により、エクオール産生に関する食物繊維の影響をより詳細に明らかにする必要がある。

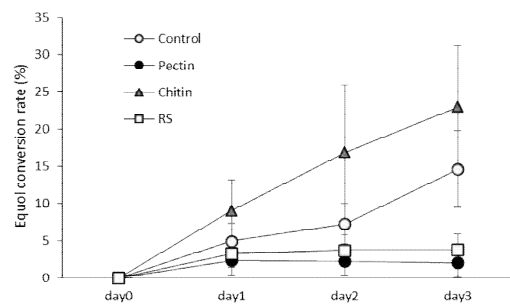


図1 エクオール変換率の推移

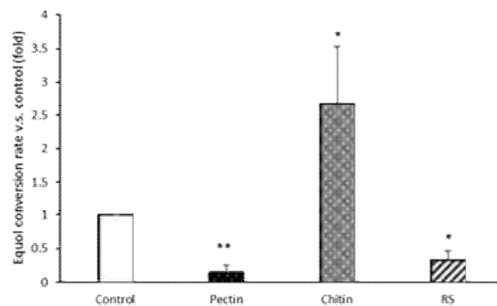


図2 エクオール変換率

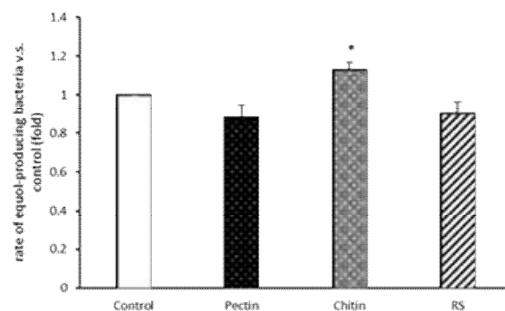


図3 エクオール産生菌数

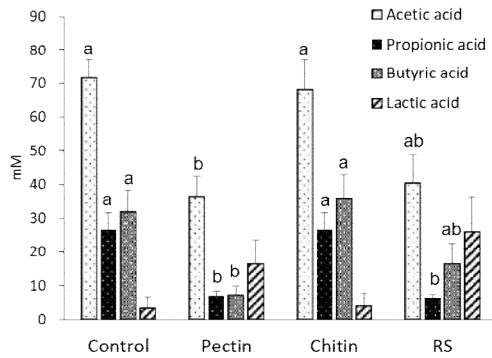


図4 短鎖脂肪酸濃度

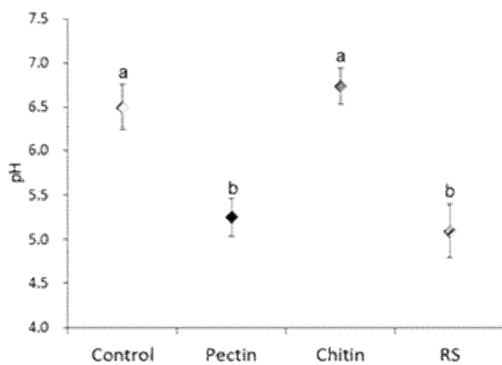


図5 培地中pH

4. まとめ

食物繊維によるエクオール産生への影響について、ヒト糞便培養物を用いた *ex vivo* 試験により評価した。キチン添加により培地中のエクオール変換率が約2.7倍に増加し、キチンによるエクオール産生の促進効果が期待された。

【謝 辞】

本報告は、*Anaerobe* 誌 (vol.91, 102923, 2025) に掲載されたものを抜粋・要約したものです。本研究を行うにあたり、糞便を提供頂きました被験者の皆様へ深謝致します。

【参考文献】

- 1) Atiya *et al.*, *Current Pharmaceutical Design*, 26, pp.5837-5843, 2020
- 2) Kawada *et al.*, *Bioscience of Microbiota, Food and Health*, 35, pp.113-121, 2016
- 3) Ueno *et al.*, *Journal of Functional Foods*, 7, pp.129-135, 2016
- 4) Gao *et al.*, *Toxins*, 12(2), 2020
- 5) Hu *et al.*, *Frontiers in Microbiology*, 13, 2022
- 6) Fallingborg *et al.*, *Danish Medical Bulletin*, 46, pp.183-196, 1999