

<平成 30 年度助成>

香辛料感受性腸内菌 (S-SIB) —その増減は宿主の健康に寄与するのか—

久田 孝

(国立大学法人 東京海洋大学学術研究院・食品生産科学部門)

日本では高齢化や食事バランスのくずれにより、生活習慣病患者とその予備軍が増加しており、かかる医療費は全体の 1/3 に達する¹⁾。生活習慣病の予防・改善には食生活の改善、適度な運動が重要であるが、機能性食品の効果も期待されている。健常成人の大腸内には 500 ～ 1000 種の細菌類が百兆個も存在するといわれ、菌体そのものや代謝活動が宿主の健康に影響を及ぼすと考えられている²⁾。一般的に、ヒトではビフィズス菌 *Bifidobacterium* や乳酸桿菌 *Lactobacillus* が腸内常在の有用菌（善玉菌）と認識され、その割合を増加させる（プレバイオティクス性）食品成分の探索が続けられている。今世紀に入り、次世代シーケンサー（NGS）による腸内菌叢の解析および、メタゲノミクス、メタボロミクスを組み合わせた研究がめざましく発展し、門レベルでのバランスと疾病スコアとの関連が多く報告されるようになった。しかし、各食品（機能性成分）に感受性を持ち増減する菌種 = SIB（Susceptible gut Indigenous Bacteria）が存在するのか、またその増減が、実際に宿主の健康に寄与するのかを明らかにすることも重要と考えられる。

本研究では、様々な健康機能性が報告されてきた香辛料³⁾、特に一般的なカレーに使用されるクミン、コリアンダー、ウコン、およびトウガラシを投与したマウス盲腸内の SIB の特定と分離を試みた。

材料および方法

香辛料

クミンシード（インド産）、コリアンダーシード（モロッコ産）、ウコン（ターメリック、インド産）、お

よびトウガラシ（中国産）の乾燥粉末製品を小売店より購入し使用した。

高シヨ糖低食物繊維食マウスに及ぼす影響

動物実験は文部科学省「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」を遵守し、東京海洋大学動物実験委員会による承認（H30-4）を受けて行った。5 週齢雄性 ICR マウス 30 匹を三共ラボサービスより購入し、ステンレス製網ケージ（3 匹／ケージ）で飼育した。Table 1 に示す高シヨ糖低食物繊維食（No fibre, NF）で 3 日間予備飼育後、無作為に 5 群（CM：クミン、CR：コリアンダー、TM：ウコン、RP：トウガラシ）に分け、NF 食にそれぞれの香辛料を 2%（w/w）加えた食餌を 7 日間投与した。投与終了後、イソフルラン吸気麻酔下で放血致死後、盲腸を摘出した。

Table 1 Composition of test diets (g/100 g)

	No fibre	2% Spice
Dried spice powder		2.0
Milk casein	20	20
DL-Methionine	0.3	0.3
Corn starch	20	18
Sucrose	50	50
Corn oil	5.0	5.0
Vitamin mix (AIN-76)	1.0	1.0
Mineral mix (AIN-76)	3.5	3.5
Choline bitartrate	0.2	0.2

総菌数および分離

盲腸内容物を無菌的に 0.1% 寒天加リン酸緩衝生理的食塩水で 10 倍段階希釈し、細菌カウンタ (PHC) を用いた誘電泳動インピーダンス計測法 (DEPIM) で総菌数を測定した。また各希釈液 0.03mL を Blood Liver (BL) 寒天培地 (ニッスイ製薬) に塗抹し、37℃で 48h 嫌気培養後、出現した特徴的なコロニーを、BL 寒天培地を用いて純粋分離した。分離菌は常法どおり 16S rDNA の BLASTn 検索による同定後、マイクロバンクビーズ (イワキ) を用いて、-80 で保存した。

盲腸内菌叢

(株) ファスマックに委託し、盲腸内容物の全ゲノムを抽出後、16S rDNA (V4) 領域のアンプリコンのシーケンスを Illumina 社 MiSeq システムを用いて行い、解析ソフト QIIME2、データベース SILVA を用いて、約 250 塩基の配列について 97% 相同の operational taxonomic unit (OTU) を得た。

DSS 誘導 IBD マウス に 及 ぼ す 常 在 *Bifidobacterium* 投与の影響

5 週齢雄性 ICR マウス 18 匹を通常食 CE-2 (日本クレア) で 4 日間予備飼育後、3 群 (Intact、DSS Control、DSS+Bp) に分け、DSS+Bp 群の餌を、上記の実験で分離した *B. pseudolongum* Spice-7 を 9log cells/g 加えた CE-2 に置き換えた。群分け 3 日後、DSS Control と DSS+Bp 群の飲料水に 5% (w/v) デキストラン硫酸ナトリウム (DSS、WAMV=5000、フジフイルム和光純薬) を加え、7 日間飼育した。飼育期間中の体重、糞便の状態を観察し、Table 2 に沿って Disease activity index (DAI) を求めた。飼育終了後、盲腸および大腸を摘出し、大腸長を測定し、大腸中間部の断面のヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色像を観察した。

Table 2 Disease activity index (DAI) scoring system.

Score	Body weight loss	Stool condition	Blood in Stool
0	< 0	Normal	No
1	1-5%		
2	6-10%	Loose	Occult
3	11-15%		
4	>15%	Diarrhea	Gross

結果および考察

盲腸内菌叢

総菌数は各群とも 11log cells/g で、OTU の主座標分析 PCoA では、CM、CR、および RP 群で NF 群と明確に異なる菌叢構成を持つことが示された (Fig. 1)。

Table 3 にリード数の高い 30 OTU を示す。最優勢 OTU は CM 群で *Bacteroides sartorii*、CR 群で *Lactobacillus johnsonii*、TM で *Bifidobacterium pseudolongum*、BP 群で *L. johnsonii* および *L. murinus* 類縁菌であった。そのリード数は NF 群より高い傾向であり、それぞれの SIB とした。これら

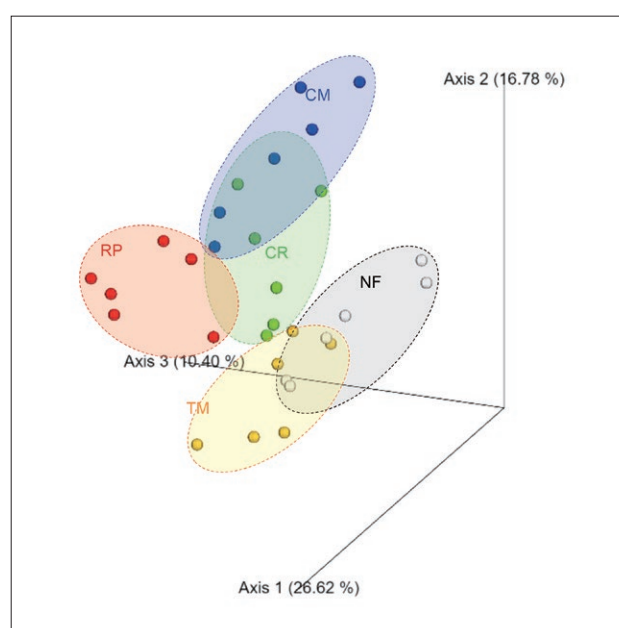


Fig. 1 PCoA of the OTU

Table 3 Read numbers of the dominant OTU of the caecal microbiome of test mice.

Defined by 16S rDNA BLAST of the de-novo sequence (similarity %)	NF	CM	CR	TM	RP
Proteobacteria					
<i>Desulfovibrionaceae</i> sp. (91)	3172 ± 2099	4190 ± 1602	1197 ± 178	4107 ± 1556	1511 ± 534
Fiemicutes					
<i>Turicibacter</i> sp. (100)	3 ± 2	378 ± 372	6566 ± 6555	429 ± 335	3594 ± 3578
<i>Faecalibaculum rodentium</i> (100)	9061 ± 7068	1020 ± 944	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>Eubacterium coprostanoligenes</i> (94)	6406 ± 3190	3757 ± 930	1096 ± 209	1702 ± 792	866 ± 398
<i>Eisenbergiella</i> sp. (100)	2076 ± 1850	944 ± 642	473 ± 175	5133 ± 2240	248 ± 171
<i>Eisenbergiella</i> sp. (100)	81 ± 67	88 ± 61	127 ± 88	1434 ± 831	906 ± 826
<i>Lachnospiraceae</i> g. s. (98)	179 ± 135 ^b	163 ± 91 ^b	288 ± 94 ^b	2313 ± 1028 ^a	86 ± 57 ^b
<i>Anaerotruncus</i> sp. (100)	827 ± 381	1169 ± 316	261 ± 59	597 ± 325	285 ± 127
[<i>Clostridium</i>] <i>symbiosum</i> (88)	4840 ± 2398 ^{ab}	8495 ± 3114 ^a	446 ± 175 ^b	579 ± 529 ^b	12 ± 11 ^b
[<i>Clostridium</i>] <i>innocuum</i> (100)	7418 ± 5196 ^a	812 ± 483 ^{ab}	88 ± 87 ^{ab}	6 ± 6 ^{ab}	0 ± 0 ^b
[<i>Clostridium</i>] <i>innocuum</i> (99)	2176 ± 1517	245 ± 145	26 ± 26	1 ± 1	0 ± 0
<i>Clostridium disporicum</i> (99)	10 ± 6	1014 ± 969	3812 ± 3670	40 ± 22	205 ± 135
<i>Clostridium</i> sp. (96)	849 ± 754 ^{ab}	2381 ± 1007 ^a	66 ± 57 ^{ab}	4 ± 2 ^b	11 ± 5 ^b
<i>Lactobacillus johnsonii</i> (100)	22170 ± 11675	20210 ± 11210	44518 ± 3543	24727 ± 8183	41997 ± 4530
<i>Lactobacillus murinus</i> (100)	10978 ± 8081	2897 ± 1714	10652 ± 1395	7270 ± 3980	20340 ± 6949
<i>Lactobacillus reuteri</i> (100)	243 ± 127	289 ± 125	698 ± 210	98 ± 51	1039 ± 474
Deferribacteres					
<i>Mucispirillum schaedleri</i> (100)	1623 ± 1554	387 ± 236	131 ± 56	661 ± 250	379 ± 176
Bacteroidetes					
<i>Muribaculum intestinale</i> (94)	1533 ± 559 ^{ab}	1703 ± 1047 ^{ab}	1056 ± 422 ^b	4588 ± 1106 ^a	658 ± 254 ^b
<i>Muribaculum intestinale</i> (93)	1360 ± 345	3087 ± 1046	1252 ± 404	1466 ± 947	256 ± 117
<i>Muribaculum</i> sp. (100)	861 ± 307	1258 ± 378	453 ± 52	464 ± 211	374 ± 73
<i>Muribaculum</i> sp. (99)	728 ± 243	1289 ± 367	454 ± 49	470 ± 217	381 ± 71
<i>Muribaculum</i> sp. (92)	685 ± 373	804 ± 263	484 ± 121	300 ± 117	115 ± 69
<i>Muribaculum</i> sp. (99)	443 ± 156 ^{ab}	821 ± 160 ^a	544 ± 91 ^{ab}	357 ± 102 ^{ab}	166 ± 57 ^b
<i>Muribaculum</i> sp. (90)	434 ± 118	599 ± 180	435 ± 39	408 ± 97	411 ± 136
<i>Alloprevotella rava</i> (92)	3887 ± 1646	6329 ± 2713	2176 ± 406	1208 ± 588	599 ± 352
<i>Bacteroides sartorii</i> (100)	7057 ± 2990	11284 ± 3037	2847 ± 705	5082 ± 2625	1838 ± 1113
<i>Bacteroides acidifaciens</i> (100)	2620 ± 2150	5319 ± 2390	1493 ± 379	3487 ± 2160	981 ± 666
<i>Bacteroides acidifaciens</i> (100)	4253 ± 2537	4747 ± 2024	1524 ± 389	1339 ± 439	712 ± 288
<i>Bacteroides sartorii</i> (99)	2001 ± 1494	2150 ± 1589	872 ± 342	628 ± 240	375 ± 192
Actinobacteria					
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> (100)	32152 ± 7652	30194 ± 5734	31048 ± 6408	42519 ± 6703	34855 ± 3111

Values are mean and SEM ($n = 6$). ^{a,b} Means with different superscript letters are significantly different ($p < 0.05$).

の SIB のうち、*L. Johnsonii*、*L. murinus* および *B. pseudolongum* が分離、同定された。

IBD マウスに及ぼす常在 *B. pseudolongum* 投与の影響

ウコンおよび主要成分のクルクミンの多くの機能が知られており、そのうち IBD 抑制効果も報告されている⁴⁾。そこで、上記の実験で分離した *B.*

pseudolongum Spice-7 の IBD 抑制効果を検討した。DSS による糞便の軟化、下痢、血便は *B. pseudolongum* Spice-7 により抑制され、DAI の上昇も抑制された (Fig. 2)。DSS 誘導 IBD の指標とされる大腸長の低下と、大腸上皮細胞、基底層の損傷は本実験でも認められ、*B. pseudolongum* Spice-7 により抑制される傾向であった (Fig. 3)。

本研究ではカレーで使用する主な香辛料である

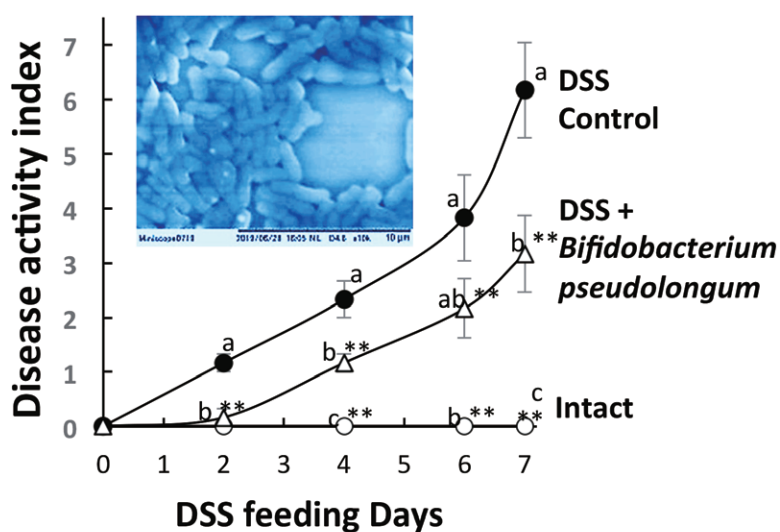


Fig. 2 Changes of DAI in tested mice

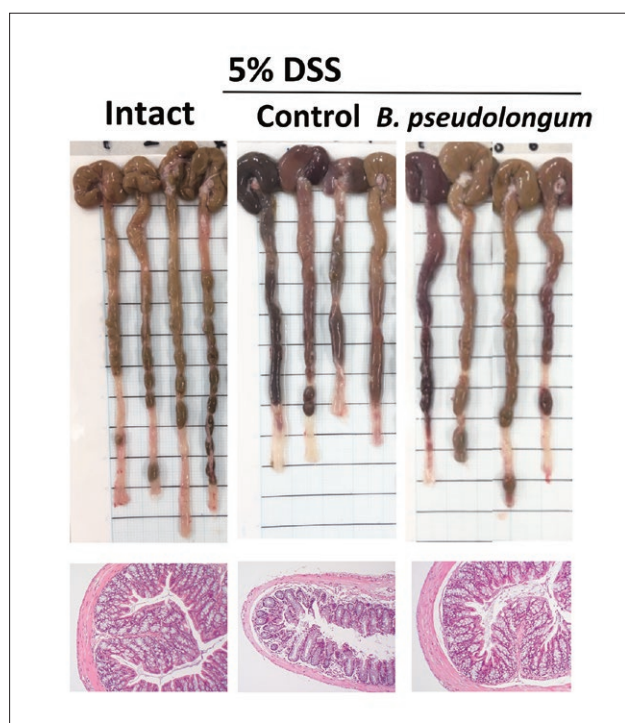


Fig. 3 Image of caecum, colon and HE stained colon tissue.

クミン、コリアンダー、ウコン、トウガラシを投与し、それぞれ増加する SIB の菌種を推定した。さらにウコンにより増加する SIB として分離、同定した *B. pseudolongum* の DSS 誘導 IBD マウスにおける炎症抑制効果がみられた。これらの結果は、各香辛料の機能性は腸内菌叢の変動と相関することを示唆している。今後は、分離 SIB と各香辛料の相乗効果につ

いて、IBD モデルだけではなく、ほかの生活習慣病モデルにおける検討も行う予定である。また、将来はヒト糞便培養系を用いたヒト SIB の分離と機能性の検討につなげることが必要と考えられる。

(本研究内容の一部は 2019 年度日本乳酸菌学会、および Xia Y., Kuda T., et al. 2020. *J. Funct Foods* 61, 103467 に公表済みである。)

謝 辞

本研究の遂行にあたり、多大なご援助を賜りました公益財団法人 浦上食品・食文化振興財団に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) 2019 年度「高齢化白書」、内閣府。
- 2) Cani PD 2018. *Gut*, 67, 1716-25.
- 3) Bower A et al. 2016. *Crit Rev Food Sci Nutr* 56, 2728-46.
- 4) Gong Z et al. 2018. *Mol Immunol* 104, 11-9.

Spice-susceptible gut indigenous bacteria (S-SIB) – Does either an increase or decrease contribute to host health? –

Takashi KUDA

Food Science and Technology, Tokyo University of Marine Science and Technology

Some food ingredients are thought to be correlated with the gut microbiome. To clarify the presence of susceptible gut indigenous bacteria (SIB) against four popular spices, ICR mice were fed with a high-sucrose diet containing no-fibre (NF), 2% w/w cumin-seeds (CM), coriander-seeds (CR), turmeric (TM), or red chili pepper (RP) for seven days. The caecal microbiome was then examined by 16S rDNA amplicon sequencing using a MiSeq system. A principal coordinate analysis of the operational taxonomic units (OTUs) revealed microbiome alterations in the CM, CR, and RP groups. Typical SIBs increased in the CM, CR, TM, and RP groups were *Bacteroides acidifaciens*- and *Bacteroides sartorii*-like, *Lactobacillus johnsonii*-like, *Bifidobacterium pseudolongum*-like, and *Lactobacillus murinus*-like bacteria, respectively. Of these SIBs, *B. pseudolongum*, *L. johnsonii*, and *L. murinus* were isolated and identified using BL agar and a 16S rDNA BLAST search, respectively. Turmeric and its main functional compound, curcumin have an ameliorative effect on dextran sodium sulphate (DSS)-induced inflammatory bowel disease (IBD). To determine the role of SIB on the host, the effect of the *B. pseudolongum* Spice-7 strain, which was isolated from the mouse in this study, on 5% (w/v) DSS drinking water-induced IBD ICR mice was examined. The increased disease activity index was suppressed by *B. pseudolongum* (9 log cells/g diet). The IBD indices of colon length shortage, as well as mucosa and submucosa damage, observed with haematoxylin and eosin (HE) staining, also tended to be suppressed by *B. pseudolongum*. These results suggest that the *B. pseudolongum* strain, which is a turmeric-SIB, has a synergistic effect with turmeric on host health.