

持久性運動の抗肥満効果を高める手法の解明 ——腸内細菌叢に着目して——

谷口 祐一^{*,**} 青井 渉^{*} 秋山 奈生^{**}
石原 健吾^{**}

ANTI-OBESITY EFFECTS OF ENDURANCE EXERCISE WITH PROBIOTICS IN MICE

Hirokazu Taniguchi, Wataru Aoi, Nao Akiyama,
and Kengo Ishihara

Key words: gut microbiota, *Bifidobacterium*, *Bacteroides/Firmicutes*, exercise intensity, oxygen uptake.

緒 言

これまでに、肥満者の腸内細菌叢を移植することでマウスが肥満型になることや⁷⁾、肥満者において *Bacteroides* 門/*Firmicutes* 門比率が低下した、特徴的な腸内細菌叢の存在が報告されていることから⁸⁾、腸内細菌叢が体脂肪の蓄積と関係すると考えられている。一方で、持久性運動を行ったマウスにおいて、肥満型の腸内細菌叢の改善 (*Bacteroides* 門/*Firmicutes* 門比率の上昇) が報告されていることや⁴⁾、高齢者における 8 週間の持久性運動が、腸内細菌叢の代謝回転を高めることが示唆されていることから⁹⁾、持久性運動は腸内細菌叢を介した肥満抑制作用をもつ可能性が考えられる。

また先行研究において、*Bifidobacterium* 属などの腸内細菌から産生される短鎖脂肪酸が、エネルギー代謝を高めることにより、体脂肪の燃焼を促進することが示唆されている³⁾。近年、持久性運

動によって、便中の短鎖脂肪酸濃度が上昇することが報告されていることから¹⁾、持久性運動は、*Bifidobacterium* 属などを豊富に含む、好ましい腸内細菌叢の獲得に役立つ可能性が考えられる。加えて、プロバイオティクスと持久性運動の組み合わせは、好ましい腸内細菌叢の獲得と、腸内細菌における代謝回転の活性化が合わさることにより、相加・相乗的に体脂肪の燃焼効果を高める可能性も考えられる。

そこで本研究は、まず持久性運動による代謝亢進作用と腸内細菌叢との関係性について検証し、更にプロバイオティクスと持久性運動の組み合わせが体脂肪蓄積に及ぼす影響を明らかとすることにより、持久性運動による抗肥満効果を高める手法の解明を目指した。

* 京都府立大学大学院生命環境科学研究科 Division of Applied Life Sciences, Graduate School of Life and Environmental Sciences, Kyoto Prefectural University, Kyoto, Japan.

** 龍谷大学農学部 Faculty of Agriculture, Ryukoku University, Otsu, Japan.

方 法

【研究1：抗生物質投与およびプロバイオティクスが運動による代謝亢進作用に及ぼす影響】

A. 実験動物

本実験は、龍谷大学における動物実験倫理委員会の承認を得て実施した（承認番号：2019-研-5）。9週齢のBALB/cCrSlc マウス（清水実験材料株式会社）24匹を1週間の予備飼育後、①コントロール群（8匹）、②抗生物質投与群（8匹）、③プロバイオティクス群（8匹）の3群に群分けを行い、1週間後に運動負荷試験ならびに代謝測定を行った。

腸内細菌叢を抑制するために、抗生物質投与群には、バンコマイシン塩酸塩（500 mg/l）およびポリミキシンB硫酸塩（100 mg/l）を滅菌蒸留水で溶解した溶液を飲水として与えた⁶⁾。またプロバイオティクス群には、プロバイオティクスカクテル VSL#3（VSL Pharmaceuticals）1袋を1lの蒸留水に混合した溶液を飲水として与えた¹⁰⁾。VSL#3には、*Bifidobacterium* 属と、その増殖を助ける *Lactobacillus* 属など8種類の有用菌が約4500億含まれている。

餌は通常試料（CLEA Rodent Diet CE-2、日本クレア株式会社）とし、コントロール群の飲水は水道水とした。すべてのマウスは自由摂餌・摂水とし、抗生物質投与群およびプロバイオティクス群の飲水は毎日交換した。

B. 運動負荷試験および代謝測定

先行研究と同様の手法を用いて代謝測定を行った⁵⁾。運動負荷試験にはトレッドミル（Mousebelt-2000、有限会社アルコシステム）を、呼気ガス解析にはARCO-2000（有限会社アルコシステム）を用いた。

運動負荷試験は高強度運動と低強度運動の2条件を実施した。高強度運動では、斜度を40度に固定し、速度は運動開始から5分後までを5 m/min、5～11分までを10 m/minとし、11分から1分ごとに速度を1 m/min 漸増的に、疲労困憊に至るまで増加させた。酸素および二酸化炭素消費量から、運動中の最大酸素摂取量、最大糖質酸化量および

最大脂質酸化量を求めた。また腸内細菌叢が運動後の酸素消費量に及ぼす影響を検証するために、運動終了後から3時間の代謝測定を行った。

低強度運動では、斜度を40度、速度を10 m/minに固定した条件において30分間の連続した持久性運動を行い、運動中の平均酸素摂取量および呼吸商を求めた。また別日に、代謝チャンバーを用いて安静時の酸素消費量および呼吸商を求めた。

C. 統計解析

統計処理はSPSS Statistics 26（IBM）を用いて行った。Kolmogorov-Smirnov 検定により正規性の確認を行った。正規性がないものはKruskal-Wallis 検定を、正規性があるものは一元配置分散分析を行った後、Tukey's HSD testによる多重比較検定を行った。測定結果は平均値±標準誤差で示し、有意水準は5%とした。

【研究2：長期的な運動とプロバイオティクスの組み合わせによる肥満抑制効果の検証】

A. 実験動物

本実験は、龍谷大学における動物実験倫理委員会の承認を得て実施した（承認番号：2019-研-5）。6週齢のC57BL/6J JmsSlc マウス（清水実験材料株式会社）42匹を1週間の予備飼育期間後、①低脂肪食群（LF群、9匹）、②高脂肪食群（HF群、9匹）、③高脂肪食・プロバイオティクス群（HF+P群、8匹）、④高脂肪食・運動群（HF+E群、8匹）、⑤高脂肪食・プロバイオティクス・運動群（HF+P+E群、8匹）の5群に群分けを行った。プロバイオティクス群には研究1と同じプロバイオティクス溶液を飲水として与え、運動群は回し車（フライングソーサー、Ware Manufacturing）を与えて自発的な持久性運動を行わせた。低脂肪食群には、エネルギー比率が蛋白質20%、脂質10%、炭水化物70%の餌（D12450J, Research Diets）を与え、高脂肪食群には、エネルギー比率が蛋白質20%、脂質60%、炭水化物20%の餌（D12492, Research Diets）を与えた。すべてのマウスは自由摂餌・摂水とし、プロバイオティクス群の飲水は毎日交換した。各群を群分けから10週間後に糞を回収し、運動負荷試験ならびに代謝測定を行った後、解剖を行い、骨格筋、肝臓、脂肪

組織および盲腸を摘出して各種解析に用いた。

B. 運動負荷試験および代謝測定

すべてのマウスに対して、研究1と同様の手法により運動負荷試験および代謝測定を行った。安静時の代謝測定は、回し車を除いた条件で測定を行った。

C. 便細菌叢および遺伝子発現解析

盲腸内容物から QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (QIAGEN) を用いてゲノム DNA を抽出し、Applied Biosystems 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems) を用いたリアルタイム PCR 法により総細菌、*Bacteroides* 門、*Firmicutes* 門および *Bifidobacterium* 属のゲノム DNA 配列を増幅した。遺伝子増幅は TB Green Premix ExTaq II (タカラバイオ株式会社) を用い、求められた Ct 値から各細菌数を 2-Ct として算出し、総細菌数に対する各細菌の相対的な存在比を算出した²⁾。

褐色脂肪組織から RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (QIAGEN) を用いて RNA を抽出し、PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (タカラバイオ株式会社) および T100 Thermal Cycler (BioRad) を用いて、ゲノム DNA の除去ならびに逆転写反応を行った。その後、Applied Biosystems 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems) を用いたリアルタイム PCR 法により、褐色脂肪組織における Uncoupling protein (UCP)1、peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α および PPAR γ 発現量を求めた。Cyclophilin をハウスキーピング遺伝子とし、求められた Ct 値から比較 Ct 法を用いて遺伝子発現量を相対定量した。

D. 統計解析

統計処理は、研究1と同様の手法により解析を行った。

結 果

【研究1】

A. 体重、摂餌量および飲水量

群分けから1週間後、コントロール群 (25.0 ± 1.2 g) とプロバイオティクス群 (25.0 ± 0.7 g) の体重に差は認められなかった一方で、抗生物質投与群 (22.9 ± 0.9 g) では他の2群と比較して有意に低い値が認められた ($P < 0.05$)。摂餌量について

は、コントロール群 (3.26 ± 0.10 g) およびプロバイオティクス群 (3.11 ± 0.14 g) と比較して、抗生物質投与群 (2.89 ± 0.23 g) において有意に低い値が認められた ($P < 0.05$)。飲水量については、プロバイオティクス群 (4.52 ± 0.21 ml) がコントロール群 (4.19 ± 0.13 ml) と比較して高い傾向を示した ($P < 0.10$) 一方で、抗生物質投与群 (3.38 ± 0.32 ml) は他の2群と比較して有意に低い値を示した ($P < 0.05$)。

B. 運動負荷試験および代謝測定

高強度運動条件において、体重当たりの最大酸素摂取量はコントロール群 (137 ± 5 ml/min/kg)、抗生物質投与群 (134 ± 7 ml/min/kg) およびプロバイオティクス群 (135 ± 7 ml/min/kg) との間で有意差を示さなかった。運動中の最大糖質および脂質酸化量や、運動後の酸素消費量および呼吸商についても、3群間で差は認められなかった。同様に、低強度運動における酸素消費量および呼吸商や、安静時における24時間の酸素消費量および呼吸商についても、3群間における差は認められなかった。

【研究2】

A. 体重、摂餌量、飲水量および臓器重量

体重、摂餌量、飲水量および臓器重量の測定結果を表1に記す。10週間の高脂肪食摂餌の結果、HF群およびHF+P群は、LF群と比較して有意に高い体重を示し ($P < 0.05$)、持久性運動を行ったHF+E群およびHF+P+E群の体重は、HF+P群と比較して低い傾向を示した ($P < 0.10$)。HF群およびHF+P群との間の体重に有意な差は認められなかった。摂餌量は、他の4群間の間に差が認められなかった一方で、HF+P群において有意に低い値を示した ($P < 0.05$)。また飲水量は群間で有意差を示さなかった。

体重100g当たりの臓器重量について群間比較を行ったところ、ヒラメ筋重量が運動群において高値を示し、HF+P+E群はLF群、HF群およびHF+P群と比較して有意に高い値を示した ($P < 0.05$)。腹腔内脂肪重量については、LF群と比較してHF群およびHF+P群において有意に高い値が認められた ($P < 0.05$)。またHF群および

表 1. 各群における体組成、摂餌量および飲水量

Table 1. Body composition, food intake, and amount of drinking after the 10-week experimental period.

	LF	HF	HF+P	HF+E	HF+P+E
Body weight (g)	29.2 ± 2.3 ^b	36.9 ± 2.8 ^a	37.8 ± 6.0 ^a	32.7 ± 4.4 ^{ab}	32.4 ± 3.0 ^{ab}
Food intake (g/day)	2.85 ± 0.25 ^a	2.86 ± 0.03 ^a	2.67 ± 0.13 ^b	2.93 ± 0.27 ^a	2.95 ± 0.13 ^a
Amount of drinking (ml/day)	3.97 ± 0.97	4.22 ± 0.54	4.49 ± 1.24	3.60 ± 0.89	4.80 ± 1.59
Organ weight per 100 g body weight (g)					
Liver	3.82 ± 0.65	3.46 ± 0.36	3.82 ± 0.51	3.47 ± 0.51	3.84 ± 0.38
Intra abdominal fat					
Epididymal fat	2.11 ± 0.49 ^b	4.60 ± 1.14 ^a	4.35 ± 1.84 ^a	3.65 ± 1.21 ^{ab}	3.25 ± 1.21 ^{ab}
Retroperitoneal fat	0.89 ± 0.33 ^b	2.19 ± 0.48 ^a	1.91 ± 0.68 ^a	1.72 ± 0.73 ^{ab}	1.45 ± 0.63 ^{ab}
Mesenteric fat	1.03 ± 0.25 ^b	1.74 ± 0.56 ^{ab}	2.03 ± 1.07 ^a	1.44 ± 0.55 ^{ab}	1.30 ± 0.47 ^{ab}
Total fat	1.19 ± 0.35 ^b	3.19 ± 1.00 ^a	3.31 ± 1.87 ^a	2.31 ± 1.02 ^{ab}	1.96 ± 0.84 ^{ab}
Organ weight per 100 g body weight (mg)					
Skeletal muscle					
Soleus muscle	27.2 ± 3.7 ^b	25.5 ± 2.7 ^c	24.5 ± 2.4 ^c	31.6 ± 4.3 ^{ab}	34.7 ± 4.6 ^a
Plantaris muscle	69.0 ± 4.1	61.3 ± 12.9	58.5 ± 13.3	63.5 ± 9.5	67.9 ± 9.6
Gastrocnemius muscle	464 ± 28	411 ± 35	401 ± 66	446 ± 30	440 ± 47
Brown adipose tissue	292 ± 69	336 ± 62	315 ± 73	266 ± 28	293 ± 72
Cecum	229 ± 49 ^a	170 ± 28 ^b	179 ± 34 ^{ab}	176 ± 29 ^b	204 ± 39 ^a

Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$, one-way ANOVA followed by Tukey's HSD test). Equal and no letters indicate no statistically significant results. Data are expressed as mean ± SD.

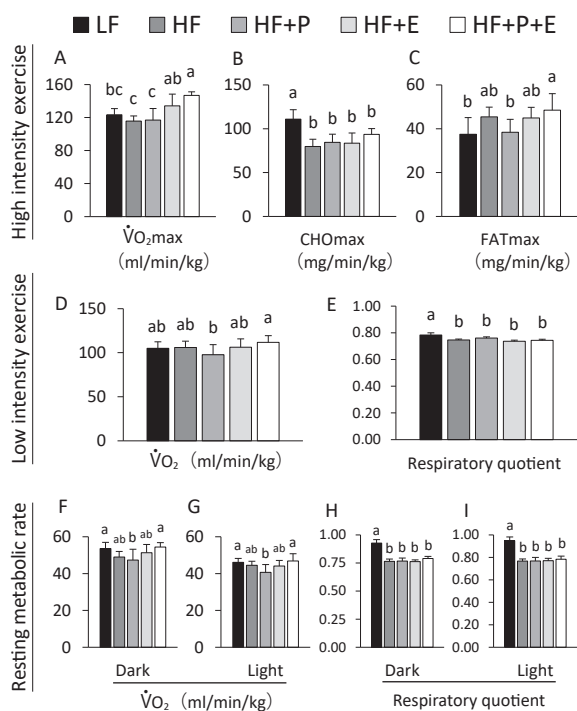


図 1. 運動中および安静時の酸素摂取量と基質酸化量
Fig.1. Oxygen uptake and substrate oxidation during exercise and rest.

Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$, one-way ANOVA followed by Tukey's HSD test), and equal letters indicate no statistically significant results. Data are expressed as mean ± SD.

HF+E 群における盲腸重量は、LF 群および HF+P+E 群と比較して有意に低い値を示した ($P < 0.05$)。

B. 運動負荷試験および代謝測定

高強度運動における体重当たりの最大酸素摂取量は、HF 群および HF+P 群と比較して、運動群において有意に高い値を示した (図 1 A, $P < 0.05$)。また LF 群と比較して、HF+P+E 群において有意に高い最大酸素摂取量が認められた (図 1 A, $P < 0.05$)。最大糖質酸化量は、他の 4 群と比較して、LF 群において有意に高い値が認められた (図 1 B, $P < 0.05$)。また HF+P+E 群における最大脂質酸化量は、LF 群および HF+P 群と比較して有意に高い値を示した (図 1 C, $P < 0.05$)。

低強度運動では、HF+P+E 群における運動中の酸素摂取量が、HF+P 群と比較して有意に高い値を示した (図 1 D, $P < 0.05$)。また呼吸商は、他の 4 群と比較して、LF 群において有意に高い値が認められた (図 1 E, $P < 0.05$)。安静条件における代謝測定では、暗期および明期の平均酸素摂取量は、HF+P 群と比較して、LF 群および HF+P+E 群において有意に高い値を示した (図

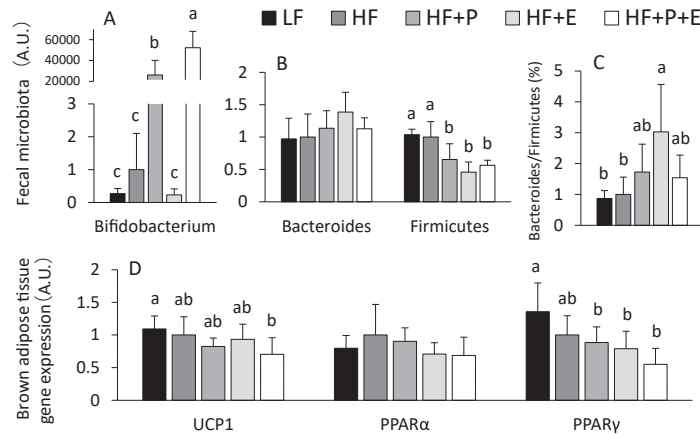


図2. 便細菌叢および褐色脂肪組織における遺伝子発現量

Fig.2. Fecal microbiota and gene expression in brown adipose tissue. Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$; one-way ANOVA followed by Tukey's HSD test), and equal and no letters indicate no statistically significant results. Data are expressed as mean \pm SD.

1 F \cdot G, $P < 0.05$).呼吸商については、LF群において有意に高い値が認められた(図1 H \cdot I, $P < 0.05$)。

C. 便細菌叢および遺伝子発現解析

便細菌叢における *Bifidobacterium* 属は、HF+P群および HF+P+E群において顕著に高い値を示し、HF+P群よりも HF+P+E群において有意に高い値となることが認められた(図2 A, $P < 0.05$)。また *Bacteroides* 門は群間で有意差を認めなかった一方で、*Firmicutes* 門は LF群および HF群において有意に高い値を示した(図2 B, $P < 0.05$)。 *Bacteroides* 門/*Firmicutes* 門比率については、LF群および HF群と比較して、HF+E群において有意に高い値を示した(図2 C, $P < 0.05$)。

図2 Dに褐色脂肪組織の遺伝子発現解析結果を記す。PPAR α については各群間での差は認められなかったが、UCP1は LF群と比較して HF+P+E群において有意に低い値を示し($P < 0.05$)、PPAR γ については LF群と比較して HF+P群、HF+E群および HF+P+E群において有意に低い値が認められた($P < 0.05$)。

考 察

本研究は、持久性運動による代謝亢進作用と腸内細菌叢との関係性について検証するために、プロバイオティクス溶液を短期間および長期間投与したマウスを用いて、強度の異なる2条件の持久性運動時と、安静時の代謝解析を行った。

短期間(1週間)の実験において、抗生物質投与およびプロバイオティクスによる腸内細菌叢への介入は、マウスの心肺持久力と、運動時および安静時の基質酸化量を変化させなかったことから、短期間の腸内細菌叢の変化は、宿主の代謝調節に強い影響を及ぼさない可能性が示唆された。また抗生物質を投与したマウスでは、摂餌量および飲水量の低下に伴う体重減少が認められたことから、腸内細菌叢の欠失が食欲低下につながる可能性が考えられる。

次に長期間(10週間)の運動とプロバイオティクスの組み合わせによる効果を検証したところ、プロバイオティクスによる脂肪重量の減少は認められなかったが、高強度運動時の最大脂質酸化量、低強度運動時の酸素消費量ならびに安静時における酸素消費量が、運動とプロバイオティクスを組み合わせたマウスにおいて有意に高い値を示した。これらの結果は、プロバイオティクスによる好ましい腸内細菌叢を長期間維持することが、運動時および安静時の代謝を亢進させる可能性を示唆している。しかしながら、この組み合わせによる代謝亢進作用は、運動のみを行った群と比較して有意差を示さなかったため、運動による代謝亢進作用との相加・相乗効果は生じなかったと考えられる。

また便細菌叢解析の結果、プロバイオティクス溶液投与による *Bifidobacterium* 属の増加が、持久性運動との組み合わせにより高まっていた。

HF+P 群と HF+P+E 群との間で飲水量に差が認められなかったことから、持久性運動による代謝回転の亢進が⁹⁾、腸内における *Bifidobacterium* 属の増殖を促した可能性が考えられる。またプロバイオティクスおよび運動群において、*Firmicutes* 門の減少に伴う高い *Bacteroides* 門/*Firmicutes* 門比率が認められたが、LF 群ではその増加は認められなかった。したがって、本研究で示された *Bacteroides* 門/*Firmicutes* 門比率の低下は、肥満度よりも運動やプロバイオティクスによる介入で生じた可能性が考えられる。

褐色脂肪における遺伝子発現解析を行ったところ、脂肪の褐色化を促進する転写因子 PPAR γ と、エネルギー消費を高める UCP1 の発現量はプロバイオティクスによる影響を受けず、むしろ H+P+E 群では低い値を示した。これらの結果は、H+P+E 群において認められた代謝亢進作用が、褐色脂肪とは異なる臓器において生じている可能性を示唆している。また本研究では、運動中の最大酸素摂取量および最大脂質酸化量が、運動とプロバイオティクスの組み合わせにより高い値を示した。運動時の代謝は主に骨格筋により亢進されていることから、今後、骨格筋など他の臓器を対象とした追加解析を行うことを予定している。

総 括

本研究により、短期間の腸内細菌叢の抑制およびプロバイオティクスが、運動時および安静時の代謝に影響を及ぼさないことと、長期間の運動とプロバイオティクスの組み合わせが、プロバイオティクス単独の効果と比較して、運動時の酸素消費量および安静時のエネルギー消費を亢進させる可能性が示唆された。

謝 辞

本研究に対して助成いただきました公益財団法人明治安田厚生事業団ならびに関係者の皆様に感謝致します。

参 考 文 献

- 1) Allen M, et al. (2018): Exercise alters gut microbiota composition and function in lean and obese humans. *Med Sci Sports Exerc*, **50**(4), 747-757.
- 2) Bose S, et al. (2012): In vitro and in vivo protective effects of fermented preparations of dietary herbs against lipopolysaccharide insult. *Food Chem*, **134**(2), 758-765.
- 3) Canfora E, et al. (2015): Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity. *Nat Rev Endocrinol*, **11**(10), 577-591.
- 4) Evans C, et al. (2014): Exercise prevents weight gain and alters the gut microbiota in a mouse model of high fat diet-induced obesity. *PLoS One*, **9**(3), e92193.
- 5) Ishihara K, et al. (2018): Fat max as an index of aerobic exercise performance in mice during uphill running. *PLoS One*, **13**(2), e0193470.
- 6) Kuno T, et al. (2016): Effect of intestinal flora on protein expression of drug-metabolizing enzymes and transporters in the liver and kidney of germ-free and antibiotics-treated mice. *Mol Pharm*, **13**(8), 2691-2701.
- 7) Ridaura K, et al. (2013): Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science*, **341**(6150), 1241214.
- 8) Sweeney T, et al. (2013): The human gut microbiome: a review of the effect of obesity and surgically induced weight loss. *JAMA Surg*, **148**(6), 563-569.
- 9) Taniguchi, H., et al. (2018): Effects of short-term endurance exercise on gut microbiota in elderly men. *Physiol Rep*, **6**(23), e13935.
- 10) Velayudham A, et al. (2009): VSL#3 probiotic treatment attenuates fibrosis without changes in steatohepatitis in a diet-induced nonalcoholic steatohepatitis model in mice. *Hepatology*, **49**(3), 989-997.