

## ヒト大腸発酵におけるビタミン B<sub>12</sub> の生理的意義の解明

静岡大学大学院農学領域 森田達也

**【背景】** グルコースのようなヘキソースはビタミン B<sub>12</sub> (VB<sub>12</sub>) を利用したコハク酸経路 (図 1) と VB<sub>12</sub> を利用しないアクリル酸経路を介して腸内細菌によりプロピオン酸の一部変換される。当研究室ではラットに高アミロースデンプン (HACS) を与えるとコハク酸経路によるプロピオン酸生成が障害され、大腸内に中間代謝産物であるコハク酸が蓄積することを見出した。また、このようなラットに VB<sub>12</sub> や VB<sub>12</sub> の構成成分であるコバルト (Co) を投与するとプロピオン酸生成は正常化し、コハク酸蓄積は解消することも明らかにした。すなわ

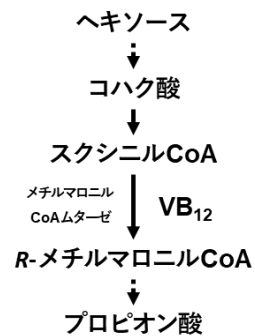


図 1 コハク酸経路によるプロピオン酸生成

ち、コハク酸経路を介したプロピオン酸生成を VB<sub>12</sub> で調節できる可能性を示した。腸内細菌により生成されたプロピオン酸はさまざまな生理作用を示すため、その有効量を明らかにすることは重要である。しかし、大腸からのプロピオン酸吸収は速く、正味のプロピオン酸生成量を把握できないため、有効量を見出すに至っていない。一方、ラットと異なりヒト大腸内にコハク酸はほとんど検出されず、プロピオン酸生成経路が異なる可能性も考えられる。本試験では腸内細菌叢を用いた HACS の *in vitro* 発酵により、プロピオン酸生成量に及ぼす VB<sub>12</sub> の影響をラットとヒトで比較することを目的とした。

**【方法】実験 1:** 大腸発酵によるプロピオン酸生成に及ぼす VB<sub>12</sub> の影響を明らかにするため、ラット腸内細菌叢を用いた HACS の *in vitro* 発酵による有機酸生成量の経時変化を追跡した。VB<sub>12</sub> 無添加食を 11 日間与えた 6 匹の SD 系雄ラットの盲腸内容物から嫌氣的に調製した盲腸内容物 10 倍希釈液を植菌液とした。VB<sub>12</sub> 無添加基本培地を対照とし、それに 73.9 ng/mL VB<sub>12</sub> 添加 (下記 Co 添加培地による培養 48 時間後の VB<sub>12</sub> 当量と同等になるように添加)、もしくは 4.95 µg/mL Co 添加した培地を用意した。

**実験 2:** ヒト大腸発酵によるプロピオン酸生成に及ぼす VB<sub>12</sub> の影響を明らかにするため、ヒト糞便細菌叢を用いた HACS の *in vitro* 発酵による有機酸生成量の経時変化を追跡した。なお本実験は、静岡大学の人を対象とする研究倫理委員会の承認を受けた後、実施された。提供された 6 名の新鮮便から嫌氣的に調製した糞便 10 倍希釈液を植菌液とした。VB<sub>12</sub> 無添加基本培地を対照とし、それに 5.00 ng/mL VB<sub>12</sub> 添加、もしくは 4.95 µg/mL Co 添加した培地を用意した。

両実験ともに、発酵基質として HACS (終濃度 3%) を添加し、植菌液 [盲腸内容物 (実験 1) および糞便 (実験 2) として終濃度 2%] を接種した。培養温度 37°C, pH 下限値 5.5, 二酸化炭素ガス通気下で 48 時間培養した。培養開始時, 1, 3, 6, 9, 12, 24, 36,

48 時間後に培養液を採取し、有機酸濃度と VB<sub>12</sub> 濃度を測定した。

**【結果・考察】実験 1:** 植菌液調製に使用した盲腸内容物中のコハク酸濃度は 55.2 (52.3-57.2)  $\mu\text{mol/g}$ , VB<sub>12</sub> 当量は 27.0 (25.7-27.5)  $\text{pmol/g}$  だった。培養開始から 12 時間後まで VB<sub>12</sub> 添加群の VB<sub>12</sub> 当量は低下しつづけ、培養初期に VB<sub>12</sub> 利用が高まることが示唆された。Co 添加群の VB<sub>12</sub> 当量は培養 48 時間後に 50  $\text{pmol/mL}$  に達した。培養 48 時間後、対照群に比べ VB<sub>12</sub> 添加群でコハク酸とプロピオン酸の生成量はそれぞれ有意に減少および増加した (図 2-A)。このように VB<sub>12</sub> に同調したコハク酸とプロピオン酸の相反する変動が認められたことから、ラット腸内細菌叢による HACS からのプロピオン酸生成は主にコハク酸経路に依存することがわかった。

**実験 2:** ヒト糞便中にコハク酸濃度はほぼ検出されず [0.00 (0.00-6.57)  $\mu\text{mol/g}$ ] , VB<sub>12</sub> 当量はラット盲腸内容物の 20 倍 [534 (268-1124)  $\text{pmol/g}$ ] だった。実験 1 同様、培養 48 時間後の Co 添加群の VB<sub>12</sub> 当量は培養開始時に比べ有意に上昇した。しかし、培地中の VB<sub>12</sub> 当量によらず、培養 48 時間後のコハク酸生成量はいずれの群でもラット腸内細菌叢による培養時の 1.5%以下にとどまり、プロピオン酸生成量はそれと同程度であった (図 2-B)。これはヒト大腸で VB<sub>12</sub> に依存せずプロピオン酸が生成されることを示している。このように、コハク酸がほとんど検出されないなかでプロピオン酸が VB<sub>12</sub> によらず生成されたことから、ヒト腸内細菌叢による主なプロピオン酸生成は VB<sub>12</sub> を利用しないアクリル酸経路に依存すると示唆される。

以上をまとめると、腸内細菌叢を用いた HACS の *in vitro* 発酵により、ラット腸内細菌叢は主にコハク酸経路を、ヒト腸内細菌叢は主にアクリル酸経路を利用してプロピオン酸を生成すると考えられる。このため、ヒト大腸ではラット大腸のような VB<sub>12</sub> に同調したプロピオン酸生成量の変動は認められないと考えられる。

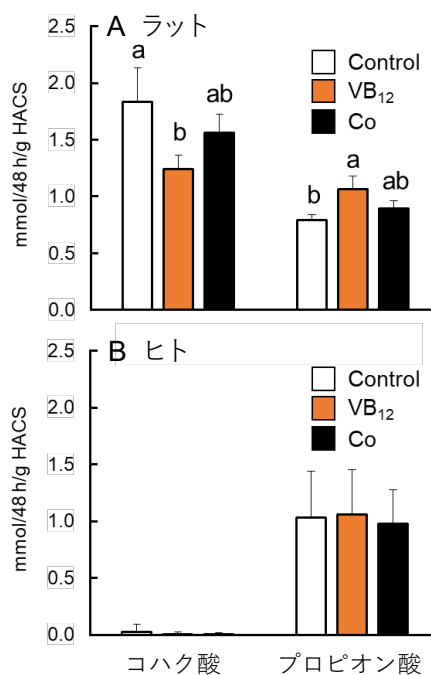


図 2 HACS からのコハク酸およびプロピオン酸の生成量 (A) ラット腸内細菌叢 (B) ヒト腸内細菌叢