

豆類摂取が腸内細菌叢および体格に与える影響

東京大学大学院 農学生命科学研究科
(現所属: 女子栄養大学 栄養科学研究所)

五十嵐 麻希

近年、豆類の食品機能に腸内細菌叢が深く介在していることが明らかになってきた。特に、大豆のイソフラボンは、 β グルコシターゼ産生菌によりアグリコン型に変換されることにより肥満の抑制に寄与することが報告されている (1)。また、アグリコン型イソフラボンのうちエクオールは、エクオール産生菌によって代謝されることでエストロゲン様作用を発揮し、更年期女性の内臓脂肪蓄積、骨粗しょう症、心血管疾患、乳がんなどを予防する (2)。このように、日本人の主要な豆類摂取源である大豆の健康効果には、腸内細菌叢の関与が知られているが、ヒトにおける摂取量と腸内細菌叢および BMI の関連についてはほとんど報告がない。

腸内細菌叢の構成比や多様性は、食生活、居住地域などの環境要因および人種などの遺伝的要因によって異なるため、同じ量の豆類を摂取しても同様の作用を得るとは限らない

(3)。よって、個人に対して豆類の食品機能を考えるときは、日本人における豆類摂取と腸内細菌叢の疫学研究を基盤として、腸内細菌の影響を考慮に入れる必要がある。したがって本研究は、豆類摂取が腸内細菌叢の構成や多様性にどの程度関連するかを明確にすることを目的として、日本人 846 人の食物摂取頻度データとメタゲノムデータを用いた関連解析を行った。

【実験方法】

研究対象者

本研究は、東京大学と株式会社ジーンクエストによる共同研究として行った。研究対象者は、株式会社ジーンクエストの持つデータベースに属する 18 歳以上の日本人 846 人 (男性 396 人、女性 450 人) である。すべての対象者からは研究同意を得た後に、便サンプルの DNA 抽出とメタゲノム解析、Web アンケートによる年齢、性別、身長、体重、体脂肪、食物摂取頻度、飲酒および喫煙状況、疾患の有無などの情報取得を行った。本研究は、株式会社ジーンクエストの倫理委員会の承認 (承認番号: 2021-0622-1) を得ている。なお、ユーザーデータを用いた解析は、すべて株式会社ジーンクエストの担当者によって行われた。

納豆および豆腐摂取頻度のスコアリング

研究対象者は、「採便前 1 週間で、食べたものを全てお選びください」という質問に対し、「食べなかった」「1~3 回」「4~6 回」「毎日 1 回」「毎日 2 回以上」という選択枠から回答をした。本研究では、「納豆」および「豆腐、豆乳、おから、きなこ」(以後、豆腐と記載) の 2 品目について、「食べなかった」を 0、「1~3 回」を 2、「4~6 回」を 5、「毎日 1 回」を 7、「毎日 2 回以上」を 14 とスコアリングを行った。

メタゲノム解析

研究対象者より回収された便サンプルからの DNA 抽出 (株式会社サイキンソー) およ

び 16S rRNA アンプリコンシーケンス (株式会社サイキンソー) を行った。類似配列のクラスタ分析より、395 Operational Taxonomic Units (OTUs) へ分類した。395 OTUs を Actinobacteria 門、 Bacteroidetes 門、 Firmicutes 門、 Proteobacteria 門とその他に分類した。さらに、QIIME (4) を用いて α 多様性 (Shannon index) を算出した (株式会社サイキンソー)。属レベルの腸内細菌叢解析には、対象者の 5%以上から検出された 153 OTUs を用いた。

統計解析

すべての解析は、全対象者に対して、および性別で層別化して行われた。豆腐と納豆の摂取頻度は、Actinobacteria 門、 Bacteroidetes 門、 Firmicutes 門、 Proteobacteria 門、その他、および α 多様性との線形回帰解析を行った。次に、Actinobacteria 門、 Bacteroidetes 門、 Firmicutes 門、 Proteobacteria 門、その他、および α 多様性と BMI の線形回帰解析を行った。さらに、豆腐と納豆の摂取頻度と 153 OTUs (属レベルの腸内細菌叢)、最後に、153 OTUs と BMI の線形回帰解析を行った。統計的な有意水準として、門レベルの腸内細菌叢との解析では $P < 0.01$ (0.05/5)、属レベルの腸内細菌叢との解析では $P < 3.3 \times 10^{-4}$ (0.05/153) とした。

【実験結果】

対象者の特徴

表 1 に対象者の特徴を示した。対象者の BMI はで、男性 (23.4 ± 3.3) で女性 (21.7 ± 3.5) よりも高かった (表 1)。対象者の納豆および豆腐の摂取頻度は、それぞれに 2.4 ± 2.6 回/週、 3.6 ± 3.1 回/週で、納豆は男性 (2.7 ± 2.7) が女性 (2.2 ± 2.4) よりも、豆腐は女性 (3.9 ± 3.3) が男性 (3.2 ± 2.8) よりも有意に高かった。

納豆および豆腐の摂取頻度と腸内細菌叢 (門レベル) および多様性との関連

全ての対象者に対して、納豆および豆腐の摂取頻度は、Firmicutes 門および α 多様性との正の関連が見られ、Bacteroidetes 門と負の関連が認められた (図 1)。性別での層別化解析では、男女ともに納豆摂取頻度は Firmicutes 門と正の関連が見られた。一方、豆腐摂取頻度は、女性のみ Firmicutes 門および多様性と正の関連が、Bacteroidetes 門と負の関連が認められた。

腸内細菌叢 (門レベル) および多様性と BMI の関連

全ての対象者において、Firmicutes 門および α 多様性は、BMI と負の関連が見られ、その他の腸内細菌叢と正の関連が認められた (表 2)。男性においては Firmicutes 門と BMI の負の関連が、女性においては α 多様性と BMI に負の関連が見られた。

納豆摂取頻度と関連する腸内細菌叢（属レベル）

納豆摂取頻度と 153 OTUs の関連解析の結果、すべての対象者においては *Coprococcus*, *Butyricicoccus* と正の関連が、*Actinomyces*, *L-Ruminococcus* (*Lachnospiraceae* 科) と負の関連が認められた (表 3)。男性においては *Bacillus* と正の関連が、女性においては *Holdemanina* と正の関連が見られた。

豆腐摂取頻度と関連する腸内細菌叢（属レベル）

納豆摂取頻度と 153 OTUs の関連解析の結果、すべての対象者においては *Coprococcus*, *Butyricicoccus* と正の関連が、*Actinomyces*, *L-Ruminococcus* (*Lachnospiraceae*) と負の関連が認められた (表 4)。男性においては *Bacillus* と正の関連が、女性においては *Holdemanina* と正の関連が見られた。

腸内細菌叢（属レベル）と BMI の関連解析

153 OTUs と BMI の関連解析の結果、すべての対象者においては *Acidaminococcus* と正の関連が、*Coprococcus* と負の関連が認められた (表 5)。男性においては *Coprococcus* と *Faecalibacterium* との負の関連が、女性においては有意な関連は見られなかった。

【考察】

本研究は、日本人 846 人関連解析によって、豆類摂取が Firmicutes 門の分布増加と Bacteroidetes 門の分布低下を主体とする腸内細菌叢の多様性と正に関連すること、さらにその多様性が BMI と負に関連することを見出した。また、Firmicutes 門の中でも *Coprococcus* 属および *Butyricicoccus* 属が豆類摂取頻度と正の関連を示し、*Coprococcus* 属が BMI と負に関連することを示した。本成果は、日本人において豆類摂取が Firmicutes 門の特に *Coprococcus* 属の分布増加を誘導し、BMI 低下と関連する可能性を示唆する。

Coprococcus 属および *Butyricicoccus* 属は、納豆および豆腐摂取で共通して正に関連していた。両者は共に Firmicutes 門に属し、それぞれプロピオン酸と酪酸などの短鎖脂肪酸 (SCFAs) を産生する (5,6)。腸内細菌叢から産生される SCFAs には、抗肥満効果が知られていることから (7)、本研究対象者は大豆摂取によって、主に *Coprococcus* 属および *Butyricicoccus* 属による SCFAs 増加を介して BMI と負に関連したことが推測される。一方で、肥満者は健常人に比べて *Coprococcus* 属の分布が高いという結果も報告されている (8)。したがって、今後はヒトへの介入試験やコホート研究によって、因果関係を明らかにすることが必要である。

腸内細菌叢の分布は、食事、民族、抗生物質、ストレス、心理的要因、妊娠中の母親の健康状態、環境要因、運動などの様々な要因によって影響を受ける (3)。近年では、腸内細菌叢の分布には思春期以降に性差が見られることから、腸内細菌は性ホルモンの影響を受けることが分かってきた (3,9)。よって、本研究で認められた大豆摂取頻度と腸内細菌

叢の関連性の性差には、性ホルモンが関与している可能性が考えられる。特に、女性で納豆摂取頻度と正の関連を示した *Holdemania* 属は、思春期以降の女性において男性より分布が多く、BMI と負に関連することが報告されている (8)。よって、本研究の女性対象者においては、納豆摂取がエストロゲンの存在によって *Holdemania* 属との関連を増強させた可能性が推測される。しかし、*Holdemania* 属はエクオール産生菌との報告はないため、エストロゲンとの関連は間接的であると考えられる。

本研究は、日本人において大豆摂取が Firmicutes 門および Bacteroidetes 門を主とする腸内細菌叢の多様性と関連し、BMI に影響する可能性を示した。さらに、大豆摂取と BMI に関連する腸内細菌には性差があることを示した。本研究成果は、大豆製品の腸内細菌叢を介した健康に対する分子機構解明に貢献すると考える。

【謝辞】

本研究を遂行するにあたり、研究助成を賜りました公益財団法人タカノ農芸化学研究財団に心より感謝いたします。また、解析をご担当頂きました株式会社ジーンクエストの野川駿さん、川船かおるさん、経理をご担当いただきました東京大学大学院の金田佳代さんに深く感謝いたします。

【要約】

豆類の食品機能には、腸内細菌叢が深く介在している。腸内細菌叢の構成比や多様性は、食生活、居住地域などの環境要因および人種などの遺伝的要因によって異なる。このため、日本人に対して豆類食品の健康機能を考察する際には、日本人を用いた疫学研究が必要である。本研究は、豆類摂取の腸内細菌叢を介した健康への影響を観察することを目的として、日本人の食物摂取頻度データとメタゲノムデータを用いた関連解析を行った。

(株) ジーンクエストの保有する日本人 846 人 (男性 396 人、女性 450 人) を対象として、便サンプルの腸内細菌叢解析結果と、アンケート調査結果 (食物摂取頻度、基本属性) を用いた関連解析を行った。その結果、納豆および豆腐摂取頻度は共に Firmicutes 門と α 多様性に正の関連が、豆腐摂取頻度は Bacteroidetes 門と負の関連が認められた。また、Firmicutes 門と α 多様性には、BMI と負の関連が認められた。さらに、対象者の 5% 以上から検出された 153 種類の腸内細菌叢 (属レベル) を対象に、豆類摂取頻度との関連解析を行った。その結果、*Coprococcus* 属および *Butyricicoccus* 属が、納豆および豆腐摂取頻度に共通して正に関連していた。このうち、*Coprococcus* 属は BMI と負に関連していた。また、納豆摂取頻度においては、女性特異的に *Holdemania* 属との関連が見られた。

われわれは、Firmicutes 門の *Coprococcus* 属が、日本人において豆類摂取と体格を介する腸内細菌叢である可能性を示した。また、性特異的な豆類摂取と体格に関連する腸内細菌叢の存在を明らかにした。本研究成果は、ヒトにおける豆類代謝の分子機構の解明に貢献することが期待される。

【文献】

1. Ørgaard A., et al. The effects of soy isoflavones on obesity. *Exp. Biol. Med.* 233, 1066–1080, 2008.
2. Muthyala R.S., et al. Equol, a natural estrogenic metabolite from soy isoflavones: convenient preparation and resolution of R- and S-equols and their differing binding and biological activity through estrogen receptors alpha and beta. *Bioorg Med Chem.* 12: 1559–1567, 2004.
3. Kim Y.S., et al. Sex Differences in Gut Microbiota. *World J Mens Health.* 38: 48–60. 2020.
4. Caporaso J. G., et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods.* 7:335-6. 2010.
5. Liang D., et al. "Potato resistant starch inhibits diet-induced obesity by modifying the composition of intestinal microbiota and their metabolites in obese mice. *Int J Biol Macromol.* 180: 458–469, 2021.
6. Kasai C., et al. Comparison of the gut microbiota composition between obese and non-obese individuals in a Japanese population, as analyzed by terminal restriction fragment length polymorphism and next-generation sequencing. *BMC Gastroenterol.* 15: 1–10, 2015.
7. Geirnaert A. et al. Butyricoccus pullicaecorum, a butyrate producer with probiotic potential, is intrinsically tolerant to stomach and small intestine conditions. *Anaerobe* 30: 70–74, 2014.
8. Chakraborti, C.K. New-found link between microbiota and obesity. *World J Gastrointest. Pathophysiol.* 6: 110, 2015.
9. Yuan X. et al. Sexual dimorphism of gut microbiota at different pubertal status. *Microb Cell Fact.* 19: 152, 2020.

図 1. 納豆および豆腐の摂取頻度と腸内細菌叢（門レベル）および多様性との関連

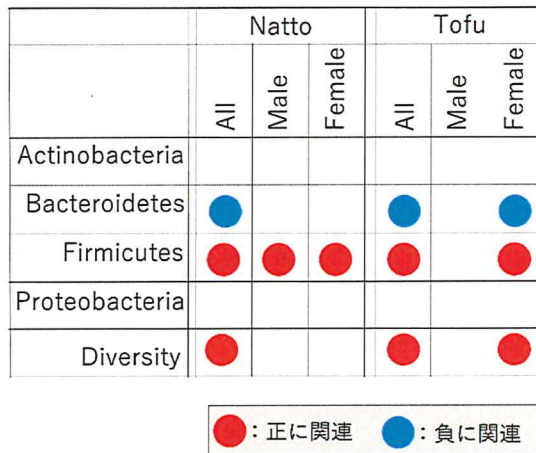


表 1. 解析対象者の特徴

	All (N = 846)		Male (N = 396)		Female (N = 450)	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
BMI, kg/m ²	22.5	3.5	23.4	3.3	21.7	3.5
Food frequency (times/week)						
Natto	2.4	2.6	2.7	2.7	2.2	2.4
Tofu	3.6	3.1	3.2	2.8	3.9	3.3

図 2. 腸内細菌叢（門レベル）および多様性と BMI の関連

	All			Male			Female		
	Estimate	SD	P val	Estimate	SD	P val	Estimate	SD	P val
Actinobacteria	-0.01	0.06	0.86	0.05	0.08	0.52	-0.06	0.08	0.46
Bacteroidetes	0.15	0.07	0.05	0.19	0.12	0.12	0.11	0.09	0.22
Firmicutes	-0.24	0.08	0.005	-0.39	0.14	0.005	-0.12	0.10	0.25
Proteobacteria	0.00	0.04	0.97	-0.01	0.06	0.90	0.00	0.05	0.95
Others	0.10	0.03	0.001	0.16	0.06	0.01	0.06	0.02	0.01
Diversity	-0.03	0.01	<0.0001	-0.03	0.01	0.02	-0.03	0.01	0.001

太字は、有意水準を下回る数値を示す。

表 3. 納豆と関連している腸内細菌層 (属レベル)

Microbiota	All			Male			Female		
	Estimate	SD	P val	Estimate	SD	P val	Estimate	SD	P val
Coprococcus	17.1	3.5	<0.0001	13.4	2.4	0.02	20.3	4.4	<0.0001
Actinomyces	-655.0	161.8	0.0001	-860.1	245.7	0.001	-454.5	212.9	0.03
L-Ruminococcus *	-15.6	4.0	0.0001	-21.3	6.3	0.001	3.7	3.9	0.34
Butyrivibrio	69.3	18.6	0.0002	87.3	29.2	0.003	53.5	23.8	0.03
Lachnospira	18.7	5.3	0.0004	27.6	8.2	0.001	11.1	6.7	0.10
Faecalibacterium	7.6	2.1	0.0004	9.2	3.3	0.005	6.0	2.8	0.03
Bacillus	40.8	12.4	0.001	91.4	20.6	<0.0001	6.3	15.1	0.68
Acidaminococcus	-34.9	10.7	0.001	-32.9	16.8	0.05	-36.7	13.6	0.007
Sutterella	-15.6	5.0	0.002	-20.2	7.4	0.007	-10.6	6.8	0.12
Holdemania	655.1	210.5	0.002	13.6	356.9	0.97	1093.2	250.6	<0.0001

太字は、有意水準を下回る数値を示す。

*Lachnospiraceae 科

表 4. 豆腐と関連している腸内細菌層 (属レベル)

Microbiota	All			Male			Female		
	Estimate	SD	P val	Estimate	SD	P val	Estimate	SD	P val
Butyrificoccus	117.2066	22.4326	<0.0001	125.9356	29.40734	<0.0001	109.5427	33.3204	0.001
Faecalibacterium	11.16169	2.592044	<0.0001	10.74901	3.340587	0.001	11.55551	3.916716	0.003
Coprococcus	17.82889	4.293711	<0.0001	12.37659	5.743127	0.03	22.45723	6.277814	<0.0001
C-Clostridium ¹	60.21803	16.31551	0.0002	40.4433	20.58636	0.05	81.19888	25.1991	0.001
L-Ruminococcus ²	-15.1497	4.890668	0.002	-14.5905	6.479826	0.02	-15.6323	7.209798	0.03
Sutterella	-17.8859	6.077991	0.003	-12.9147	7.59718	0.09	-23.3323	9.483318	0.01
Ruminococcaceae.Other ³	256.4035	91.33095	0.005	412.4414	156.0133	0.01	196.6777	116.1093	0.09
Actinobacillus	3734.758	1416.41	0.009	710.8576	1760.191	0.69	7165.416	2217.48	0.001
R-Ruminococcus ⁴	7.605969	2.891044	0.009	1.084278	4.003344	0.79	12.48889	4.101886	0.002
Desulfovibrionaceae.Other ⁵	-8543.17	3389.665	0.01	-10566.4	4478.209	0.02	-6794.54	5004.82	0.18

太字は、有意水準を下回る数値を示す。

¹ Clostridiaceae 科、² Lachnospiraceae 科、³ Ruminococcaceae 科で分類不能、⁴ Ruminococcaceae 科、⁵ Desulfovibrionaceae で分類不能

表 5. 腸内細菌叢 (属レベル) と BMI の関連解析

	All			Male			Female		
	Estimate	SD	P val	Estimate	SD	P val	Estimate	SD	P val
Acidaminococcus	3.E-04	8.E-05	<0.0001	4.E-04	1.E-04	0.0004	3.E-04	1.E-04	0.01
Coprococcus	-9.E-04	2.E-04	0.0002	-1.E-03	4.E-04	0.0003	-6.E-04	3.E-04	0.07
R-Ruminococcus ¹	-1.E-03	4.E-04	0.001	-2.E-03	5.E-04	0.002	-8.E-04	5.E-04	0.10
Holdemania	-1.E-05	4.E-06	0.002	-7.E-06	6.E-06	0.25	-2.E-05	6.E-06	0.003
Faecalibacterium	-1.E-03	4.E-04	0.002	-2.E-03	6.E-04	0.0003	-4.E-04	5.E-04	0.42
Sutterella	5.E-04	2.E-04	0.003	5.E-04	3.E-04	0.06	5.E-04	2.E-04	0.02
Ruminococcaceae.Other ²	-3.E-05	1.E-05	0.007	-4.E-05	1.E-05	0.004	-3.E-05	2.E-05	0.17
Lachnospira	-3.E-04	2.E-04	0.10	-6.E-04	3.E-04	0.02	-2.E-05	2.E-04	0.94
Butyrivibrio	-4.E-05	5.E-05	0.42	-7.E-05	7.E-05	0.35	-1.E-05	6.E-05	0.81
L-Ruminococcus ³	-2.E-04	2.E-04	0.43	-3.E-04	3.E-04	0.41	-1.E-04	3.E-04	0.74
Desulfovibrionaceae.Other ⁴	-2.E-07	3.E-07	0.44	3.E-07	5.E-07	0.49	-7.E-07	4.E-07	0.10
Actinomyces	4.E-06	5.E-06	0.48	2.E-05	8.E-06	0.06	-5.E-06	7.E-06	0.46
Bacillus	-5.E-05	7.E-05	0.50	9.E-05	1.E-04	0.39	-2.E-04	1.E-04	0.13
C-Clostridium ⁵	-4.E-05	7.E-05	0.54	-9.E-05	1.E-04	0.37	1.E-06	8.E-05	0.99

¹ Ruminococcaceae 科、2 Ruminococcaceae 科で分類不能、3 Lachnospiraceae 科、4 Desulfovibrionaceae で分類不能、5 Clostridiaceae 科