

〔原著〕

NAFLDモデルマウスの口腔内および腸内細菌叢に対するホップの影響

森川 哲郎¹⁾, 中本 規裕²⁾, 杉山 のどか²⁾, 平木 大地³⁾, 原田 文也⁴⁾, 植原 治⁵⁾, 古市 保志²⁾, 安彦 善裕¹⁾

- 1) 北海道医療大学歯学部生体機能・病態学系臨床口腔病理学分野
- 2) 北海道医療大学歯学部口腔機能修復・再建学系歯周歯内治療学分野
- 3) 北海道医療大学歯学部生体機能・病態学系組織再建口腔外科学分野
- 4) 北海道医療大学歯学部生体機能・病態学系顎顔面口腔外科学分野
- 5) 北海道医療大学歯学部口腔構造・機能発育学系保健衛生学分野

The effect of hops on oral and gut microbiota in NAFLD model mice

Tetsuro MORIKAWA¹⁾, Norihiro NAKAMOTO²⁾, Nodoka SUGIYAMA²⁾, Daichi HIRAKI³⁾,
Fumiya HARADA⁴⁾, Osamu UEHARA⁵⁾, Yasushi FURUICHI²⁾, Yoshihiro ABIKO¹⁾

- 1) Division of Oral Medicine and Pathology, Department of Human Biology and Pathophysiology, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido
- 2) Division of Periodontology and Endodontology, Department of Oral Rehabilitation, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido
- 3) Division of Reconstructive Surgery for Oral and Maxillofacial Region, Department of Human Biology and Pathophysiology, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido
- 4) Division of Oral Maxillofacial Surgery, Department of Human Biology and Pathophysiology, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido
- 5) Division of Disease Control and Molecular Epidemiology, Department of Oral Growth and Development, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

Key words : non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), Hops, microbiota, 16S rRNA, Next-Generation Sequencing (NGS)**Abstract**

Hops are one of the main components in beer brewing. The constituents in hops have been reported to have anti-inflammatory, anti-bacterial, anti-obesity, and anticancer effects. Anti-bacterial effects of hops have also been observed in the oral cavity. Recently, the bacterial flora in the body has come into focus, and it is known that the intestinal microflora affects the whole body. In addition, the oral microflora, which is part of the digestive tract, has also become a focus of research. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a disease characterized by fatty liver deposits accumulating in the absence of alcohol abuse, and in viral, autoimmune, drug-induced and genetic etiologies. The NAFLD has also been reported to have a relationship with the oral and intestinal microflora. We analyzed Hop-in-

duced changes in oral and intestinal microflora in NAFLD model mice using next-generation sequencing. Fatty deposits were observed in the liver of a Control group, while fatty deposits in the liver were minimal in the Hops group. In the alpha diversity analysis, the oral microbiota showed statistically significant differences in the Shannon index, observed features, and Faith's PD. The intestinal microbiota showed statistically significant differences in the observed features and the Shannon index. The results indicated that fat deposition in the liver was suppressed by the feeding of Hops, and changes in the bacterial flora related to fat suppression were also observed in the oral and intestinal microflora.

緒 言

Humulus lupulus L. (カラハナソウ科) の毬花 (雌) から得られるホップは、ビールの主要な構成要素のひとつである。ホップには、ホップポリフェノール、ホップ精油、ケルセチン、ホップピター酸およびプレニルフラボノイドが含まれている (Chen et al., 2014; Hong et al., 2021)。これらの成分には抗炎症作用、抗菌作用、抗肥満作用、抗癌作用があることが報告されている (Harish et al., 2021; Ponticelli et al., 2021)。口腔内においてもホップの抗菌作用が認められており、ホップポリフェノールが齲蝕病原菌の増殖を抑制したとの報告もある (Shinada et al., 2007)。

近年、生体内の細菌叢が注目され、特に腸内細菌叢が全身に影響を与えていることが知られている (Carlessi et al., 2021; Kitamoto et al., 2020)。それに伴い、消化管の一部である口腔内の細菌叢も注目されてきている (Kitamoto et al., 2020)。口腔内細菌が関わる疾患としては慢性感染症である齲蝕や歯周病がある。そのほかには、粘膜疾患、口腔がんに関係すると考えられている (Gao et al., 2018)。また、口腔内細菌は口腔内の疾患を引き起こすだけでなく、口腔内細菌叢の変化が糖尿病、肥満、関節リウマチやアルツハイマー病などの全身疾患に関わることが示されている (Gao et al., 2018)。マウスへの *Porphyromonas gingivalis* の経口投与が腸内細菌叢を変化させるという報告があり (Arimatsu et al., 2014)、口腔内細菌叢の変化は腸内細菌叢の組成に影響を及ぼす可能性がある。

非アルコール性脂肪性肝疾患 (non-alcoholic fatty liver disease: NAFLD) は、習慣的な飲酒歴、ウイルス感染、または自己免疫疾患がない場合の肝脂肪沈着を特徴とする疾患である。NAFLDは、非アルコール性脂肪肝 (nonalcoholic fatty liver: NAFL) と非アルコール性脂肪肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis: NASH) に分類され、前者は病態がほとんど進行せず、後者は進行性で肝硬変や肝癌の発症母地にもなる。NAFLDは肥満、糖尿病、脂質異常症などの代謝異常が関係しているとされている (Brunt et al., 2015; Smith & Adams, 2011)。近年、NAFLDは口腔内細菌、腸内細菌との関係性についても報告されている (Kolodziejczyk et al., 2019; Kuraji et al., 2021)。

本研究では、ホップによるNAFLDへの影響を口腔内および腸内細菌叢に注目し検証することとした。そこで、コリン欠乏高脂肪飼料を与えてNAFLDを誘発したモデルマウスを用いて、ホップによる口腔内細菌叢と腸

内細菌叢の変化について次世代シーケンス (Next-Generation Sequencing: NGS) を用いて解析した。

材料および方法

1. 動物

C57BL/6Jマウス (雄, 5週齢) は三共ラボサービス株式会社 (東京, 日本) から購入した。購入後のマウスはケージの入れ替えを行い細菌叢に偏りが生じないように考慮した。マウスを実験群と対照群に分け (各群3匹)、対照群にはコリン欠乏高脂肪飼料 (Control: オリエンタル酵母工業株式会社 東京)、実験群には5%ホップ配合コリン欠乏高脂肪飼料 (Hop: オリエンタル酵母工業株式会社 東京) を2週間与えた。2週間後、ペントバルビタール (50 mg/kg) を用いて麻酔し、口腔内細菌を採取した。その後、ペントバルビタール (100 mg/kg) の過剰投与により屠殺し肝臓の摘出と腸内細菌の採取を行った。本実験は、北海道医療大学の動物実験委員会および倫理委員会の承認を得ている (No. 21-065)。

2. サンプル採取およびDNA抽出

口腔内細菌はマウスの口腔粘膜からスワブを用いて採取した。腸内細菌は直腸内より糞便を採取した。スワブ及び糞便はDNeasy Blood & Tissue Kits (Qiagen, Venlo, Netherland) およびDNeasy PowerSoil Kit (Qiagen) を用いてDNAを抽出した。抽出したDNAは、NGSのライブラリー調製に使用するまで-80°Cで保存した。

3. 組織学的観察

肝臓の形態学的変化を観察するためHematoxylin eosin (H-E) 染色を行った。肝臓は10%中性緩衝ホルマリン溶液にて24時間浸漬固定の後、通常に従いパラフィンに包埋した。パラフィン切片 (4 μm) を作製し、脱パラフィンの後、H-E染色を行った。画像は、FLOVEL Filing Systemカメラ (Flovel, 東京, 日本) を用いてOLYMPUS BX50 (Olympus, 東京, 日本) で撮影した。

4. ライブラリー調製およびシーケンシング

16S Metagenomic Sequencing Library Preparation (Illumina, CA, USA) に基づいて、16S rRNAのV3-4領域をPCRで増幅させた後 (5' TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG 3' および5' GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTA 3'), AMPure XPビーズ (Beckman Coulter Genomic) でPCR産物を精製した。

Nextera XT Index kit v2 Set A (Illumina) を用いてサンプルDNAにilluminaシーケンサー用アダプターおよびインデックス配列を付加した。PCR産物をAMPure XPビーズを用いてライブラリーを精製した後、二重鎖DNA特異的な検出が可能なQubit 3.0 (Thermo Fisher Scientific) で濃度を測定した。測定したDNA濃度は、MiSeqの最終インプット濃度 (pM) に調製するために、平均ライブラリーサイズ (PCR産物の平均サイズ) を基にnM単位に換算した。ライブラリー調製後、AmpliconライブラリーとPhiX Control (Illumina) を混合し、MiSeq Reagent Kit v3 (600 cycles, illumina) のMiSeq Reagent Cartridgeにアプライした。シーケンシング深度は、口腔内では9,959リード、腸内では42,171リードで解析した。

5. データの解析

シーケンスデータの解析は、細菌叢解析ソフトウェア Quantitative Insights into Microbial Ecology 2 (QIIME2, ver. 2020.2) を用いた。16S rRNAデータベース (Greengenes v13.8) に割り当てられた16S rRNA遺伝子配列に対して分析した (Khurelchuluun et al., 2021; Uehara et al., 2021)。アンプリコンシーケンスのデータ分析は、DADA 2 パイプラインを使用した。口腔内および腸内の

Control群およびHop群間の細菌叢の比較には、 α 多様性と β 多様性を用いた。 α 多様性は、shannon index, observed featuresおよびfaith's phylogenetic diversity (Faith's PD) を使用し、Kruskal-Wallis検定により $p < 0.05$ を有意差ありとした。 β 多様性は、Weighted UniFrac距離とUnweighted UniFrac距離で評価し、視覚的に比較するために、主座標分析 (PCoA) を使用した。Weighted UniFrac距離とUnweighted UniFrac距離には順列多変量分散分析 (PERMANOVA) を用いて、統計学的有意性は $p < 0.05$ に設定した。口腔内および腸内のControl群およびHop群間のFirmicutes門とBacteroidetes門の比較はStudent's t-testを用いた。統計学的有意性は $p < 0.05$ に設定した。QIIME 2の細菌叢 (ANCOM) の組成分析を使用して、口腔内および腸内のControl群およびHop群間の微生物分類群の存在量の有意差を分析した。最終的な重要性は、W値として表した。

6. 機能予測解析

PICRUSt 2 ソフトウェアによるコミュニティの系統学的調査は、16S rRNAマーカー遺伝子配列に基づいて遺伝子の機能を予測するために使用した (Douglas et al., 2020)。メタゲノムプロファイルの統計分析 (STAMP) ソフトウェアパッケージを使用して、PICRUSt 2の結果

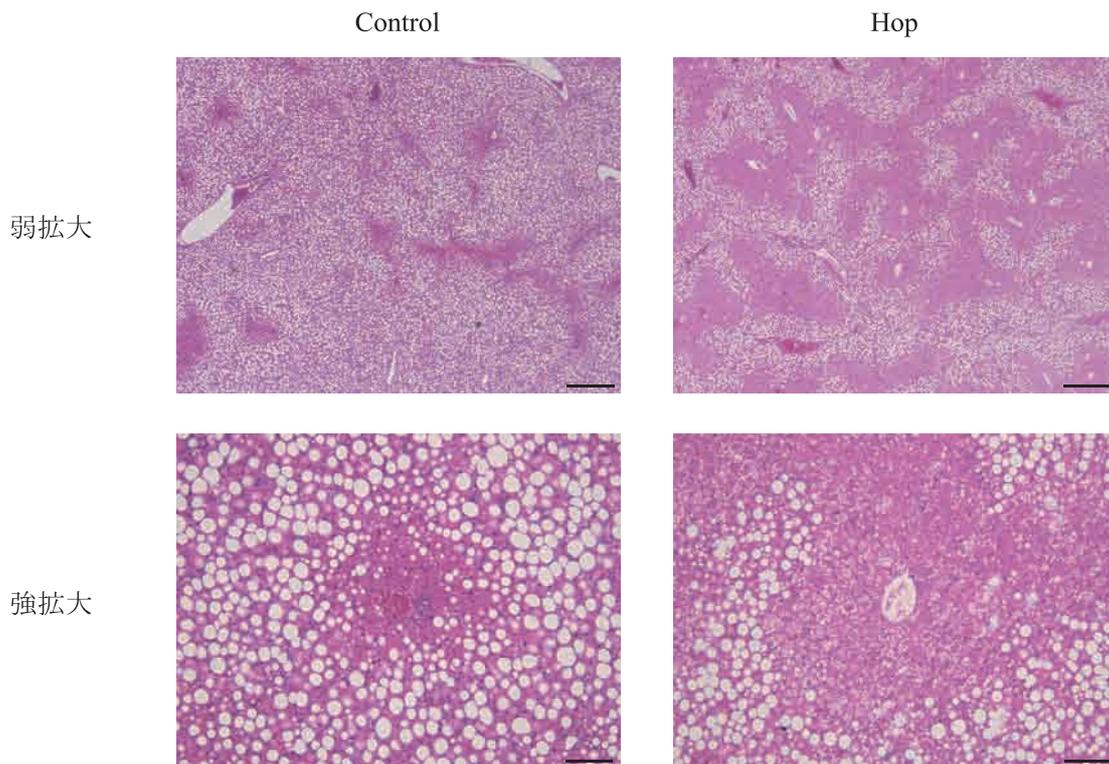


図1 組織学的観察 (H-E染色)

マウスより摘出した肝臓組織をH-E染色にて評価した。Control群では肝臓にびまん性の脂肪沈着が確認され、Hop群では肝臓の中心静脈周囲での脂肪沈着は軽度であり小葉辺縁帯の脂肪化が確認された。弱拡大：Scale bar 500 μ m, 強拡大：Scale bar 100 μ m

を分析した。Welchのt検定は、2つのグループの比較に使用され、Welchの逆信頼区間法は、信頼区間の計算に使用した。The Benjamini-Hochberg false discovery rate法を使用してp値を算出し、統計学的有意性は $p < 0.05$ に設定した。

結 果

1. 組織学的観察

Control群とHop群から抽出した肝臓組織への脂肪沈着をH-E染色を行って評価した。Control群では肝臓にびまん性の脂肪沈着が確認され脂肪化が進行していた。一方、Hop群では肝臓の中心静脈周囲での脂肪沈着は軽度であり小葉辺縁帯の脂肪化が確認された(図1)。NAFLDはMatteoni分類によりType 1~4に分類できる(Matteoni et al., 1999)。Type 1は単純性脂肪肝、Type 2は炎症を伴う脂肪肝、Type 3は炎症と肝細胞風船様腫大を伴った状態、Type 4は肝細胞風船様腫大、肝線維化、炎症を伴う状態とされ、Type 1と2はNAFL、Type 3と4はNASHと診断される。今回の標本観察では脂肪変性のみを認め肝細胞障害は認められなかった。Control群とHop群の組織像では、肝細胞風船様腫大、線維化、著名な炎症細胞浸潤といった所見は認められなかった。よって、Control群とHop群はType 1に相当しNAFLとの診断が得られた。

2. α 多様性解析

α 多様性とはひとつのサンプル内の多様性を示しており、値が大きいほど種の多様性が高い。shannon indexは α 多様性解析に最もよく使われる指標で、それぞれの種が均等に存在していると高い数値を示す。observed featuresは一定以上の類似性を持つリード同士を一つの菌種とする分類単位を用いて、菌種の存在量を示す。faith's PDは多様性を分子系統樹の枝長の和で評価する。本研究ではすべてのサンプルをMiSeqにてシーケンスし、口腔内では合計97,917リードがControl群とHop群から増幅された。1サンプルあたり最小9,595から最大25,852リード、サンプルあたり平均16,319リードの範囲で存在した。腸内では合計319,269リードがControl群とHop群から増幅された。1サンプルあたり最小42,171から最大62,874リード、サンプルあたり平均53,211リードの範囲で存在した。各群の平均多様性を評価するために、口腔内と腸内より抽出したサンプルの α 多様性を分析した。口腔内より抽出したサンプルのshannon index, observed featuresとfaith's PDは、Hop群はControl群よりも増加しており、それらの発現量の差に統計学的な有意差を認めた($p=0.049$ 図2 a, b, c)。腸内より抽出したサンプルのshannon index とobserved featuresでは、Hop群はControl群よりも低下しており、それらの発現量の差に統計学的な有意差を認めた($p=0.049$ 図2 d, e)。faith's PD

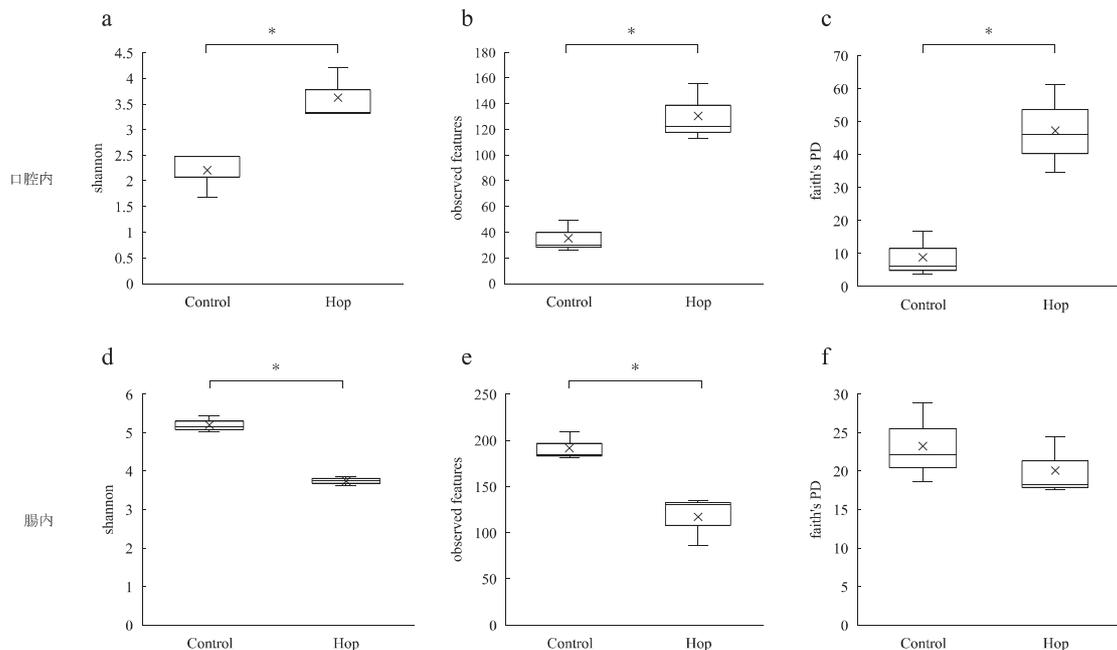


図2 α 多様性解析

口腔内細菌叢はshannon index (a), observed features (b), faith's PD (c) では、Hop群においてControl群と比較して増加しており、それらの発現量の差に統計学的な有意差を認めた ($p=0.049$, $q=0.049$)。

腸内細菌叢はshannon index (d) とobserved features (e) では、Hop群においてControl群と比較して低下しておりそれらの発現量の差に統計学的な有意差を認めた ($p=0.049$, $q=0.049$)。faith's PD (f) では有意差は認められなかった。Kruskal-Wallis (pairwise) * $P < 0.05$

において有意差は認められなかった (図 2 f).

3. β 多様性解析

β 多様性とは2サンプル間での多様性の差を表す指標である。 β 多様性は2点間の距離として表され、距離の長さはサンプル間の多様性の差の大きさを意味している。UniFrac 距離は2サンプルのうちどちらか一方でも観測された種に着目して算出され、遺伝的な類似度が反映される。観測された種に対し「定数E」とおき、観測されなかった種を「0」とおいて計算した距離をUnweighted UniFrac距離、観測された種に対しサンプル全体の割合によって重みづけした距離をWeighted UniFrac距離という。本研究では各群間の多様性の違いを評価するために、UniFrac距離のPCoAを解析した。PCoAプロットは、 β 多様性を視覚化する方法であり、図3ではグループ間のクラスタリングを示した。プロットの1つ1つが各サンプルの細菌叢を示す。口腔内細菌叢のWeighted UniFrac距離においてControl群は近い位置にプロットされ、Hop群は広がった位置にプロットされた (図 3 a)。Unweighted UniFrac距離においてはControl群、Hop群共に広がった位置にプロットされた (図 3 b)。腸内細菌叢のWeighted UniFrac距離とUnweighted

UniFrac距離ではControl群、Hop群共に広がった位置にプロットされた (図 3 c, d)。各群の β 多様性に差を確認するためにPERMANOVAを用いて統計解析した。口腔内細菌叢および腸内細菌叢のWeighted UniFrac距離とUnweighted UniFrac距離には、有意差は認められなかった。

4. タクソノミー

QIIME 2 による解析では、口腔サンプルでのFirmicutes門は、Hop群においてControl群と比べ減少しており、それらの発現量の差に統計学的な有意差を認めた (図 4 a)。Bacteroidetes門は、Hop群においてはControl群と比べ増加していたが有意差は認められなかった (図 4 b)。口腔内サンプルでは各群合計96の異なる細菌属を検出した。Control群で最も豊富な属はLactococcus属であり、Staphylococcus属、Lactobacillus属が続いた。Hop群で最も豊富な属はAkkermansia属であり、Lactococcus属、Cupriavidus属が続いた (図 5)。ANCOMでは、各群での細菌に有意差はみられなかった。一方、腸内サンプルでのFirmicutes門は、Hop群ではControl群と比べ減少しており、それらの発現量の差に統計学的な有意差を認めた (図 4 c)。Bacteroidetes門は、Hop群ではControl

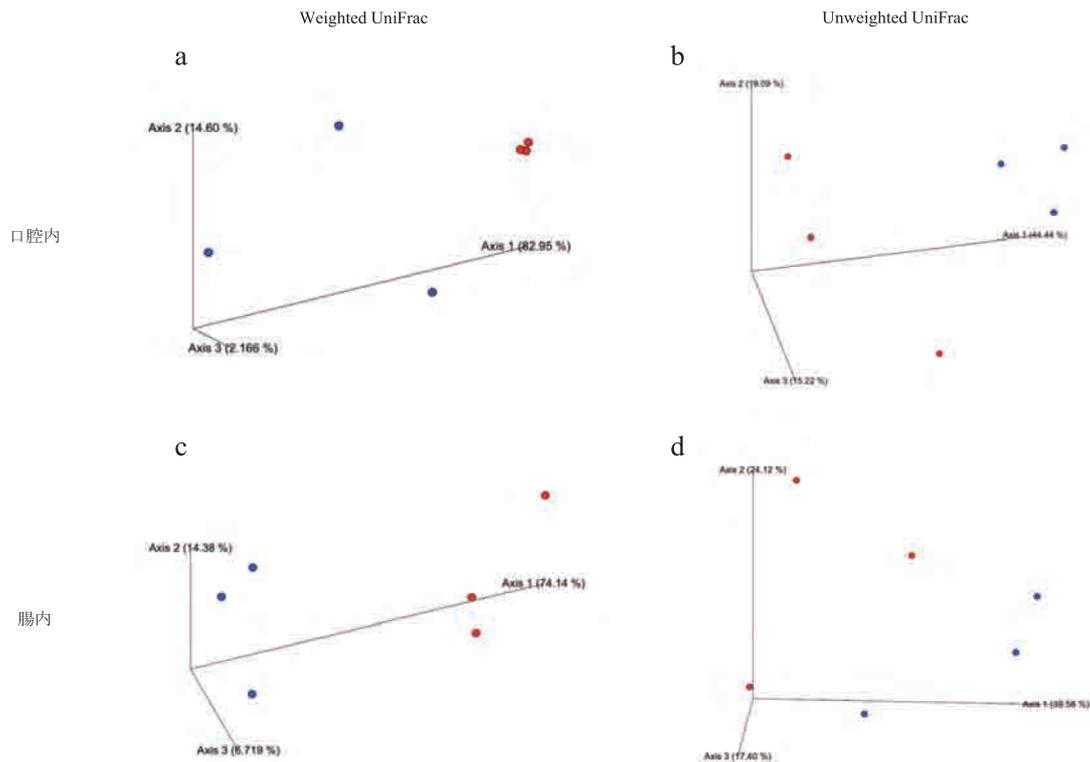


図3 β 多様性解析

UniFrac距離のPCoAを分析し、Control群とHop群の2つのグループ間の口腔内細菌叢と腸内細菌叢の多様性の違いを評価した。PCoAプロットは、Control群 (赤点) とHop群 (青点) のクラスタリングを示した。口腔内細菌叢 (a, b) と腸内細菌叢 (c, d) のWeighted UniFracとUnweighted UniFracには、Hop群とControl群の間に有意差は認められなかった。

群と比べ有意差は認められなかった (図 4 d). 腸内サンプルでは各群合計57の異なる細菌属を検出した. Control群で最も豊富な属は, *Bacteroides* 属であり, *Akkermansia* 属, *Lachnospiraceae* 科が続いた. Hop群で最も豊富な属は, *Akkermansia* 属であり, *Bacteroides* 属, *Desulfovibrionaceae* 科が続いた (図 6). ANCOMでは, 各群で *Erysipelotrichaceae* 科に有意差が認められた ($W = 34$). *Erysipelotrichaceae* 科は, Hop群よりもControl群で高い割合で存在していた (表 1).

5. 機能予測

シーケンスで得られたデータから, 口腔内細菌叢および腸内細菌叢の代謝経路を予測した. 口腔では8, 腸内では21の細菌叢の代謝経路に統計学的に有意差を認めた. Hop群ではControl群と比較して口腔内では6経路, 腸内では7経路が増加し, 口腔内の2経路と腸内の14経路は減少した (図 7 a, b). 口腔内では, 炭水化物の生合成に関わるコラン酸の代謝経路やsuperpathway of pyri-

doxal 5'-phosphate biosynthesis and salvage (PWY0-845; ビタミンB6), cob (II) yriinate a,c-diamide biosynthesis I (PWY-7377; ビタミンB12), superpathway of thiamine diphosphate biosynthesis II (PWY-6895; ビタミンB1) といったビタミンB群の生合成に関わる経路が, Hop群ではControl群と比較して増加していた. コレステロールの生合成に関わるメバロン酸の代謝経路は, Hop群ではControl群と比較して減少していた. 腸内では, 炭水化物の生合成に関わるコラン酸の代謝経路やbiotin biosynthesis II (PWY-5005; ビタミンB7), superpathway of thiamine diphosphate biosynthesis II (PWY-6895; ビタミンB1), superpathway of L-methionine biosynthesis (PWY-5345; メチオニン), adenosylcobalamin salvage from cobinamide I (COBALSYN-PWY; ビタミンB12) といったビタミンB群の生合成やL-メチオニン生合成に関わる経路が, Hop群ではControl群と比較して増加していた. 細菌の代謝や細胞壁に関わる経路は, Hop群ではControl群と比較して減少していた.

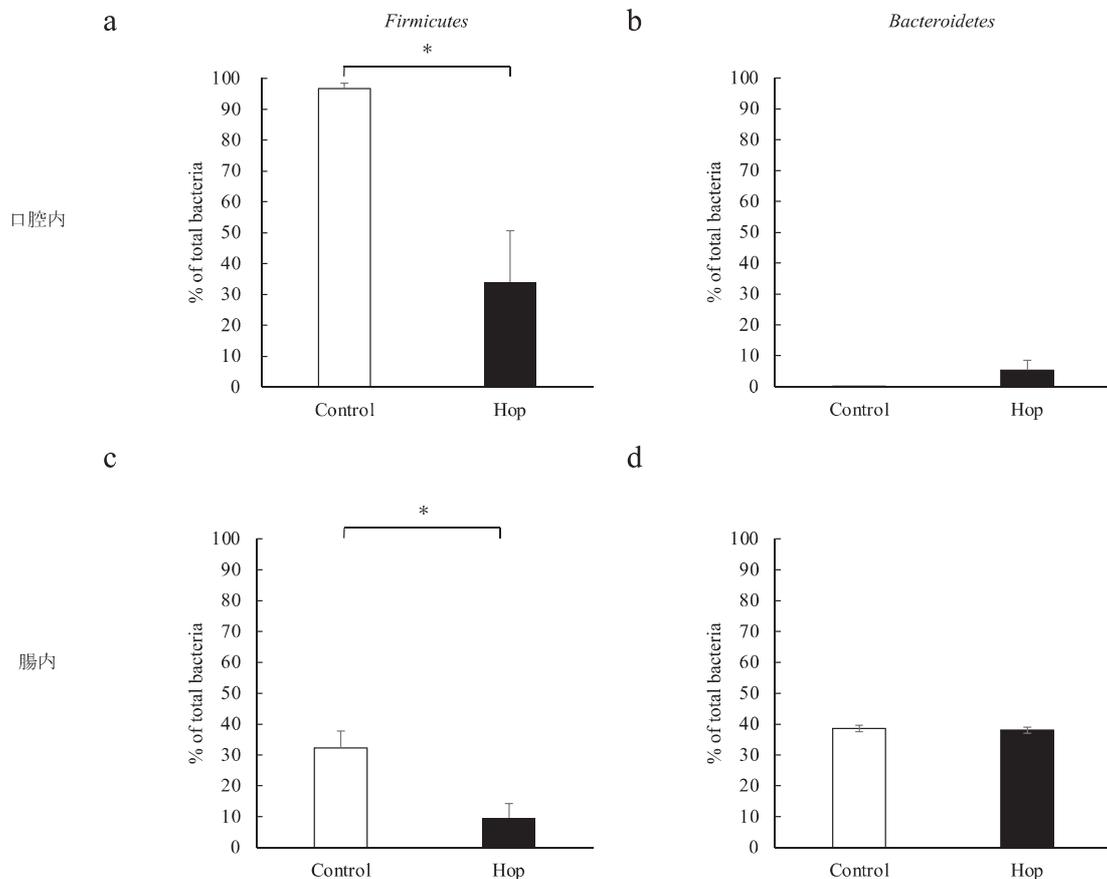


図 4 口腔内と腸内のFirmicutes門とBacteroidetes門

Firmicutes門とBacteroidetes門をControl群とHop群にて比較した. 口腔内でのFirmicutes門は, Hop群においてControl群と比べ減少しており, それらの発現量の差に統計学的な有意差を認めた (a). Bacteroidetes門は, Hop群においてはControl群と比べ増加していたが有意差は認められなかった (b). 腸内でのFirmicutes門は, Hop群ではControl群と比べ減少しており, それらの発現量の差に統計学的な有意差を認めた (c). Bacteroidetes門は, Hop群では有意差は認められなかった (d). Student's t-test * $P < 0.05$

考 察

本研究では、NAFLDモデルマウスを使用し、ホップによる肝組織の病理組織学的変化に加え口腔内細菌叢及び腸内細菌叢の変化を解析した。NAFLDは肝脂肪沈着

を特徴とする疾患であり、今回行った研究においてもNAFLDモデルマウスでは、肝臓への脂肪沈着が確認された。Control群としてコリン欠乏高脂肪飼料のみを与えたマウスでは、肝臓全体へのびまん性の脂肪沈着を認め、一方、実験群として5%ホップを配合したコリン

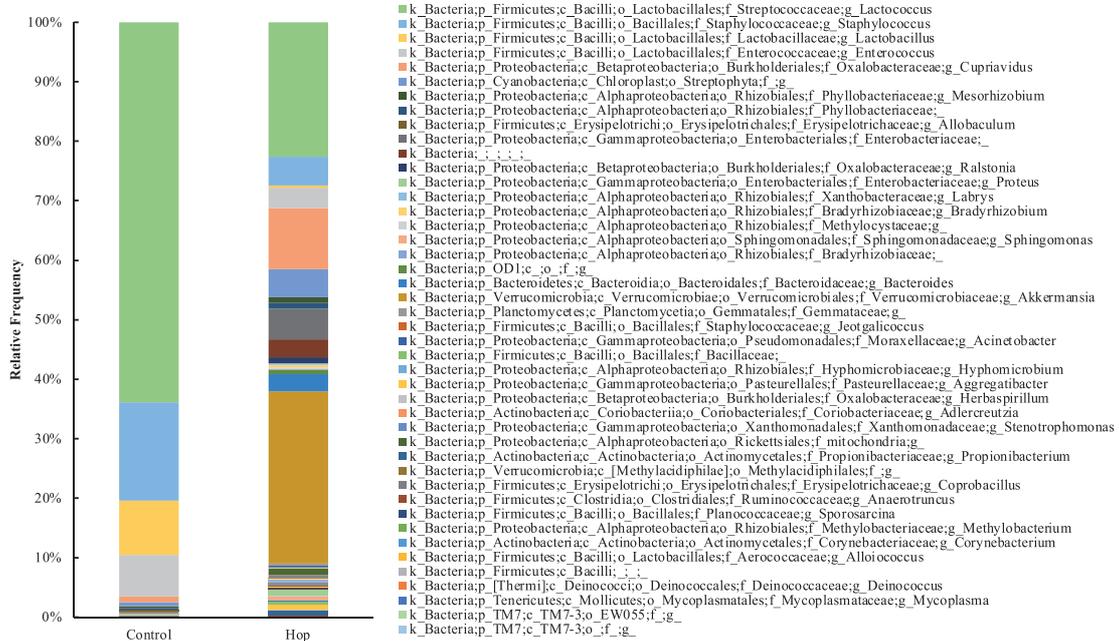


図5 タクソノミー (口腔内)

QIIME 2による解析において、口腔内サンプルでは各群合計96の異なる細菌属を検出した。Control群で最も豊富な属は*Lactococcus*属であり、*Staphylococcus*属、*Lactobacillus*属が続いた。Hop群で最も豊富な属は*Akkermansia*属であり、*Lactococcus*属、*Cupriavidus*属が続いた。ANCOMでは、各群での細菌に有意差はみられなかった。

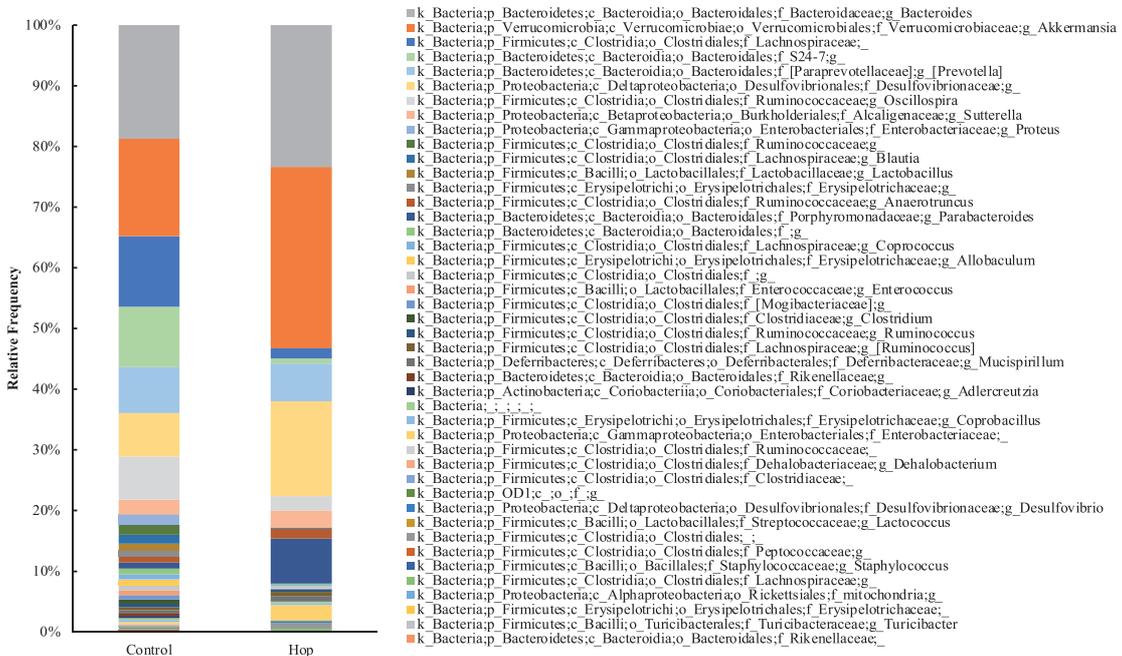


図6 タクソノミー (腸内)

QIIME 2による解析において、腸内サンプルでは各群合計57の異なる細菌属を検出した。Control群で最も豊富な属は、*Bacteroides*属であり、*Akkermansia*属、*Lachnospiraceae*科が続いた。Hop群で最も豊富な属は、*Akkermansia*属であり、*Bacteroides*属、*Desulfovibrionaceae*科が続いた。

欠乏高脂肪飼料を与えたマウスでは、小葉辺縁帯への脂肪沈着が確認されたが中心静脈周囲では脂肪沈着の程度はControl群と比較すると軽微であった。Control群に対するHop群の細菌叢解析において、口腔内での α 多様性が増加し、腸内での α 多様性は減少していた。

ホップ由来成分のキサントフモール (XN) は、肝臓の脂肪酸代謝の調節と腸での脂肪吸収の阻害に関連している (Liu et al., 2015)。このメカニズムとしては、XNが脂質代謝に関わるPPAR- α や、脂肪組織に発現し、脂肪細胞の増殖、分化、脂質貯蔵に関わる遺伝子を制御するPPAR- γ を活性化することが分かっている (Yajima et al., 2004)。また、XNの摂食は肝臓の炎症を軽減し、非アルコール性脂肪性肝炎のマウスモデルにおける線維形成促進遺伝子の発現を阻害する (Dorn et al., 2010; Liu et al., 2015)。本研究においても、肝臓のH-E染色では、ホップを与えたマウスはControl群と比較して肝臓の脂

肪沈着が抑制されていることが確認された。この結果は、本実験で用いたホップに含まれるXNがPPAR- α やPPAR- γ などの遺伝子を活性化し、肝臓への脂肪沈着を抑制した可能性を示唆している。

肥満、高エネルギーの摂食および老化は、腸内細菌叢の多様性の低下と関連している (Leite et al., 2021; Rautmann & de La Serre, 2021)。さらに、肥満の患者では、口腔および腸内細菌叢の多様性が減少していることが報告されている (Gasmi Benahmed et al., 2021)。腸内の α 多様性解析では、ホップを与えたマウスではControl群と比較してshannon indexとobserved featuresが有意に減少していることが確認された。ホップに含まれるXN、フムロン、ルプロンには抗菌作用があることが報告されている (Cermak et al., 2017)。動物モデルでは、腸内でのXNの吸収はわずか11%で、89%は腸内にとどまっている (Cermak et al., 2017)。今回もホップに含まれる成分

表 1 ANCOM解析

	Median Percentile Abundance		Max Percentile Abundance		W
	Control	Hop	Control	Hop	
<i>k_Bacteria</i> ; <i>p_Firmicutes</i> ; <i>c_Erysipelotrichi</i> ; <i>o_Erysipelotrichales</i> ; <i>f_Erysipelotrichaceae</i> ; <i>g_</i>	449.0	1.0	661	1.0	34

腸内細菌のErysipelotrichaceae科は、Hop群よりもControl群で増加し、それらの発現量の差に統計学的な有意差を認めた。

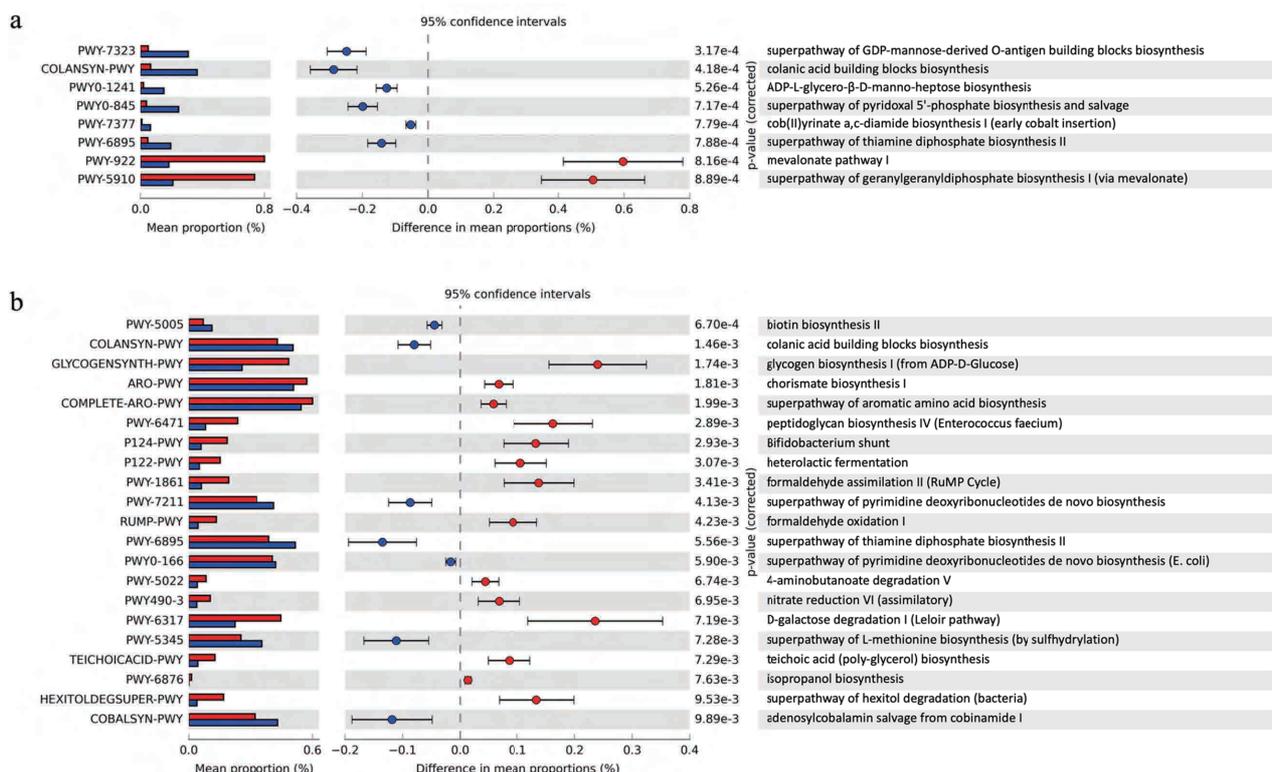


図 7 機能予測

口腔では 8 (a)、腸内では 21 (b) の細菌叢の代謝経路に統計学的な有意差を認めた。Hop群 (青) ではControl群 (赤) と比較して口腔内では 6 経路、腸内では 7 経路が増加し、口腔内の 2 経路と腸内の 14 経路は減少した。

が腸内に止まることにより、抗菌作用が長期間働き、腸内細菌叢の多様性の減少を引き起こしたことが考えられる。肝疾患を持ったヒトでは腸内細菌の *Firmicutes* 門が増加し *Bacteroidetes* 門が減少することが特徴の1つとして報告されている (Fukui, 2015)。NAFDLモデルマウスの糞便においても、*Firmicutes* 門を豊富に認め、*Bacteroidetes* 門の減少が確認されている (Nakamura et al., 2022, p. 14)。本研究においては腸内ではホップを与えたマウスではControl群と比較して *Firmicutes* 門が有意に減少していることが確認されたが、*Bacteroidetes* 門の変化はほとんど認められなかった。この結果は、ポリフェノールを与えることで高脂肪食によって引き起こされる *Firmicutes* 門の増加を改善できるという報告と一致した (Taira et al., 2015)。

ANCOM解析では *Erysipelotrichaceae* 科はControl群と比較してHop群では有意に減少していることが確認された。海藻類に含まれているフコキサンチンやプーアール茶といった天然由来成分を高脂肪食給餌マウスに与えた研究においては、高脂肪食グループのマウスでは、*Erysipelotrichaceae* 科の割合が増加し、高脂肪食と天然由来成分を与えたグループでは、*Erysipelotrichaceae* 科が減少し、肝臓での脂肪沈着も予防されていた (Sun et al., 2020; Ye et al., 2021)。*Erysipelotrichaceae* 科は肥満と正の相関があることが報告されている (Kaakoush, 2015; Ye et al., 2021)。ケルセチンが *Erysipelotrichaceae* 科の増殖を阻害することが報告されている (Etxeberria et al., 2015; Kaakoush, 2015)。つまり、ホップによる脂質代謝関連遺伝子の活性化機序の他に、*Erysipelotrichaceae* 科の減少が肝臓の脂肪沈着を抑制した可能性が示唆される。

歯周炎、う蝕、カンジダ症の増加といった口腔内の疾患が、口腔内細菌叢における多様性の低下に関係している (Ai et al., 2017; Kraneveld et al., 2012; Simón-Soro et al., 2013)。肥満では、唾液中の細菌叢の多様性が低下していることが報告されている (Wu et al., 2018)。今回の実験結果は、口腔内においてはshannon index, observed featuresとfaith's PDは、Hop群においてControl群と比較して有意に高かったことから、ホップを摂取することで高脂肪食のみを与えられたマウスより口腔内細菌叢の多様性が増加することが確認された。肥満における口腔内の *Firmicutes* 門の比率は高く、*Bacteroidetes* 門の比率は低いことが報告されている (Mohamed Qadir & Assafi, 2021)。高脂肪食のみを与えたマウスの口腔内における *Firmicutes* 門の保有率は、ホップを与えたマウスではControl群と比較して *Firmicutes* 門が有意に減少していることが確認され、*Bacteroidetes* 門の保有率はホップを与

えることで統計学的有意差は認められないが増加していた。ホップを与えることで、口腔内では肥満に影響すると考えられる *Firmicutes* 門の減少と *Bacteroidetes* 門の増加により肝臓の脂肪沈着抑制に影響を及ぼす可能性が示唆されるが、この点についてはさらなる研究が必要である。

機能予測の結果から、腸内細菌ではメチオニンを生合成やビタミンBの生成に関わる代謝経路がContorl群と比べてHop群では増加していることが確認された。メチオニンは、体内で生成することのできない必須アミノ酸である。メチオニン欠乏症は、動物モデルでは脂肪症または脂肪肝疾患を誘発することが報告されている (Radziejewska et al., 2020)。腸内細菌叢においては、ビタミンKやビタミンBを合成し、生成されたビタミンは腸から吸収される可能性がある (Ramakrishna, 2013)。腸内で生成されたビタミンBが生体に作用し、糖質や脂質の代謝に働いた可能性が考えられる。一方で、細菌が産生したビタミンBが宿主に作用するという報告はあるが十分な根拠は得られていない (Magnúsdóttir et al., 2015; Pham et al., 2021)。このことから、ホップを投与することにより腸内細菌のメチオニン生合成やビタミン生成が促進され、肝臓の脂肪沈着が抑制された可能性がある。口腔内においてもビタミンBの生成に関わる代謝経路の増加が確認されている。口腔内細菌が産生するビタミンB群が宿主に対してどのような効果を及ぼすかは不明な点が多くさらなる研究が必要である。

本研究はサンプルサイズが限られているが、今後の研究におけるサンプルサイズ計算の基礎として使用することもできる (Al-Mekhlafi et al., 2020)。本研究の結果は、ホップの抗肥満効果を探るための参考となるが、今後はサンプルサイズを増やして検証する必要がある。

結 論

今回の実験では、ホップを与えることにより肝臓への脂肪沈着が抑制され、口腔内細菌叢と腸内細菌叢においても脂肪抑制に関わる細菌叢の変化が観察された。しかし、ホップによる正確な脂肪を抑制するメカニズムの詳細を明らかにするためにはさらなる調査が必要であり、ホップの抗肥満効果に関してはさらなる検討の必要がある。

利益相反

本研究は2019年度北海道医療大学歯学会奨励研究金の助成により行われた。本研究の遂行および本論文の作成にあたり、開示すべき利益相反はない。

文 献

- Ai, D., Huang, R., Wen, J., Li, C., Zhu, J., & Xia, L. C. Integrated metagenomic data analysis demonstrates that a loss of diversity in oral microbiota is associated with periodontitis. *BMC Genom.* 18 : 1041, 2017.
- Al-Mekhlafi A., Becker T., & Klawonn F. Sample size and performance estimation for biomarker combinations based on pilot studies with small sample sizes. *Commun. Stat. Theory Methods* 51 : R5534–R5548, 2020.
- Arimatsu, K., Yamada, H., Miyazawa, H., Minagawa, T., Nakajima, M., Ryder, M. I., Gotoh, K., Motooka, D., Nakamura, S., Iida, T., & Yamazaki, K. Oral pathobiont induces systemic inflammation and metabolic changes associated with alteration of gut microbiota. *Sci. Rep.* 4 : 4828, 2014.
- Brunt, E. M., Wong, V. W.–S., Nobili, V., Day, C. P., Sookoian, S., Maher, J. J., Bugianesi, E., Sirlin, C. B., Neuschwander–Tetri, B. A., & Rinella, M. E. Nonalcoholic fatty liver disease. *Nat. Rev. Dis. Primers* 1 : 15080. 2015.
- Carlessi, A. S., Borba, L. A., Zugno, A. I., Quevedo, J., & Réus, G. Z. Gut microbiota–brain axis in depression : The role of neuroinflammation. *Eur. J. Neurosci.* 53 : R222–R235, 2021.
- Cermak, P., Olsovska, J., Mikyska, A., Dusek, M., Kadleckova, Z., Vanicek, J., Nyc, O., Sigler, K., Bostikova, V., & Bostik, P. Strong antimicrobial activity of xanthohumol and other derivatives from hops (*Humulus lupulus* L.) on gut anaerobic bacteria. *APMIS* 125 : R1033–R1038, 2017.
- Chen, W., Becker, T., Qian, F., & Ring, J. Beer and beer compounds : Physiological effects on skin health. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 28 : R142–R150, 2014.
- Dorn, C., Kraus, B., Motyl, M., Weiss, T. S., Gehrig, M., Schölmerich, J., Heilmann, J., & Hellerbrand, C. Xanthohumol, a chalcon derived from hops, inhibits hepatic inflammation and fibrosis. *Mol Nutr Food Res* 54 : RS205–R213, 2010.
- Douglas, G. M., Maffei, V. J., Zaneveld, J. R., Yurgel, S. N., Brown, J. R., Taylor, C. M., Huttenhower, C., & Langille, M. G. I. PICRUSt 2 for prediction of metagenome functions. *Nat. Biotechnol.* 38 : R685–R688, 2020.
- Etxeberria, U., Arias, N., Boqué, N., Macarulla, M. T., Portillo, M. P., Martínez, J. A., & Milagro, F. I. Reshaping faecal gut microbiota composition by the intake of trans–resveratrol and quercetin in high–fat sucrose diet–fed rats. *J. Nutr. Biochem.* 26 : R651–R660, 2015.
- Fukui, H. Gut Microbiota and Host Reaction in Liver Diseases. *Microorganisms* 3 : R759–R791, 2015.
- Gao, L., Xu, T., Huang, G., Jiang, S., Gu, Y., & Chen, F. Oral microbiomes : More and more importance in oral cavity and whole body. *Protein Cell* 9 : R488–R500. 2018.
- Gasmi Benahmed, A., Gasmi, A., Doşa, A., Chirumbolo, S., Mujawdiya, P. K., Aaseth, J., Dadar, M., & Bjørklund, G. Association between the gut and oral microbiome with obesity. *Anaerobe* 70 : R102248, 2021.
- Harish, V., Haque, E., Śmiech, M., Taniguchi, H., Jamiesson, S., Tewari, D., & Bishayee, A. Xanthohumol for Human Malignancies : Chemistry, Pharmacokinetics and Molecular Targets. *Int. J. Mol. Sci.* 22 : R4478, 2021.
- Hong, K., Wang, L., Johnpaul, A., Lv, C., & Ma, C. Key Enzymes Involved in the Synthesis of Hops Phytochemical Compounds : From Structure, Functions to Applications. *Int. J. Mol. Sci.* 22 : R9373, 2021.
- Kaakoush, N. O. Insights into the Role of Erysipelotrichaceae in the Human Host. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 5 : R1–R4, 2015.
- Khurelchuluun, A., Uehara, O., Paudel, D., Morikawa, T., Kawano, Y., Sakata, M., Shibata, H., Yoshida, K., Sato, J., Miura, H., Nagayasu, H., & Abiko, Y. Bee Pollen Diet Alters the Bacterial Flora and Antimicrobial Peptides in the Oral Cavities of Mice. *Foods* 10 : 1282, 2021.
- Kitamoto, S., Nagao–Kitamoto, H., Hein, R., Schmidt, T. M., & Kamada, N. The Bacterial Connection between the Oral Cavity and the Gut Diseases. *J. Dent. Res.* 99 : R1021–R1029, 2020.
- Kolodziejczyk, A. A., Zheng, D., Shibolet, O., & Elinav, E. The role of the microbiome in NAFLD and NASH. *EMBO Mol. Med.* 11 : e9302, 2019.
- Kraneveld, E. A., Buijs, M. J., Bonder, M. J., Visser, M., Keijser, B. J. F., Crielaard, W., & Zaura, E. The Relation between Oral Candida Load and Bacterial Microbiome Profiles in Dutch Older Adults. *PLoS ONE* 7 : e42770, 2012.
- Kuraji, R., Sekino, S., Kapila, Y., & Numabe, Y. Periodontal disease–related nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis : An emerging concept of

- oral-liver axis. *Periodontol.* 2000 87 : R204–R240, 2021.
- Leite, G., Pimentel, M., Barlow, G. M., Chang, C., Hosseini, A., Wang, J., Parodi, G., Sedighi, R., Rezaie, A., & Mathur, R. Age and the aging process significantly alter the small bowel microbiome. *Cell Rep.* 36 : 109765, 2021.
- Liu, M., Hansen, P. E., Wang, G., Qiu, L., Dong, J., Yin, H., Qian, Z., Yang, M., & Miao, J. Pharmacological Profile of Xanthohumol, a Prenylated Flavonoid from Hops (*Humulus lupulus*). *Molecules* 20 : R754–R779, 2015.
- Nakamura, A., Yamamoto, K., Takeda, R., Yamada, R., Kubo, A., Morikawa, K., Ando, S., Shimazaki, T., Izumi, T., Umemura, M., Kitagataya, T., Shigesawa, T., Suzuki, K., Kimura, M., Nakai, M., Sho, T., Suda, G., Natsuzaka, M., Ogawa, K., Ohnishi, S., Sugiyama, T., Takeda, H., Sakamoto, N. The potential of soluble CD14 in discriminating nonalcoholic steatohepatitis from nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatol. Res.* 52 : R508–R521, 2020.
- Magnúsdóttir, S., Ravcheev, D., de Crécy–Lagard, V., & Thiele, I. Systematic genome assessment of B–vitamin biosynthesis suggests co–operation among gut microbes. *Front. Genet.* 6 : 148, 2015.
- Matteoni, C. A., Younossi, Z. M., Gramlich, T., Boparai, N., Liu, Y. C., & McCullough, A. J. Nonalcoholic fatty liver disease : A spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* 116 : R1413–R1419, 1999.
- Mohamed Qadir, R., & Assafi, M. S. The association between body mass index and the oral Firmicutes and Bacteroidetes profiles of healthy individuals. *Malaysian Family Physician : Malays Fam Physician* 16 : R 36–R 43, 2021.
- Pham, V. T., Dold, S., Rehman, A., Bird, J. K., & Steinert, R. E. Vitamins, the gut microbiome and gastrointestinal health in humans. *Nutr Res* 95 : R35–R53, 2021.
- Ponticelli, M., Russo, D., Faraone, I., Sinisgalli, C., Labanca, F., Lela, L., & Milella, L. The Promising Ability of *Humulus lupulus* L. Iso– α –acids vs. Diabetes, Inflammation, and Metabolic Syndrome : A Systematic Review. *Molecules* 26 : 954, 2021.
- Radziejewska, A., Muzsik, A., Milagro, F. I., Martínez, J. A., & Chmurzynska, A. One–Carbon Metabolism and Nonalcoholic Fatty Liver Disease : The Crosstalk between Nutrients, Microbiota, and Genetics. *Lifestyle Genom* 13 : R53–63, 2020.
- Ramakrishna, B. S. Role of the gut microbiota in human nutrition and metabolism. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 28 : R 9–R17, 2013.
- Rautmann, A. W., & de La Serre, C. B. Microbiota’s Role in Diet–Driven Alterations in Food Intake : Satiety, Energy Balance, and Reward. *Nutrients* 13 : 3067, 2021.
- Shinada, K., Tagashira, M., Watanabe, H., Sopapornamorn, P., Kanayama, A., Kanda, T., Ikeda, M., & Kawaguchi, Y. Hop Bract Polyphenols Reduced Three–day Dental Plaque Regrowth. *J. Dent. Res.* 86 : R848–R851, 2007.
- Simón–Soro, Á., Belda–Ferre, P., Cabrera–Rubio, R., Alcaraz, L. D., & Mira, A. A Tissue–Dependent Hypothesis of Dental Caries. *Caries Res.* 47 : R591–R600, 2013.
- Smith, B. W., & Adams, L. A. Nonalcoholic fatty liver disease and diabetes mellitus : Pathogenesis and treatment. *Nat. Rev. Endocrinol.* 7 : R456–R465, 2011.
- Sun, X., Zhao, H., Liu, Z., Sun, X., Zhang, D., Wang, S., Xu, Y., Zhang, G., & Wang, D. Modulation of Gut Microbiota by Fucoxanthin During Alleviation of Obesity in High–Fat Diet–Fed Mice. *J. Agric. Food Chem.* 68 : R 5118–R5128, 2020.
- Taira, T., Yamaguchi, S., Takahashi, A., Okazaki, Y., Yamaguchi, A., Sakaguchi, H., & Chiji, H. Dietary polyphenols increase fecal mucin and immunoglobulin A and ameliorate the disturbance in gut microbiota caused by a high fat diet. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 57 : R212–R216, 2015.
- Uehara, O., Hiraki, D., Kuramitsu, Y., Matsuoka, H., Takai, R., Fujita, M., Harada, F., Paudel, D., Takahashi, S., Yoshida, K., Muthumala, M., Nagayasu, H., Chiba, I., & Abiko, Y. Alteration of oral flora in betel quid chewers in Sri Lanka. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 54 : R1159–R1166, 2021.
- Wu, Y., Chi, X., Zhang, Q., Chen, F., & Deng, X. Characterization of the salivary microbiome in people with obesity. *PeerJ* 6 : e4458, 2018.
- Yajima, H., Ikeshima, E., Shiraki, M., Kanaya, T., Fujiwara, D., Odai, H., Tsuboyama–Kasaoka, N., Ezaki, O., Oikawa, S., & Kondo, K. Isohumulones, bitter acids derived from hops, activate both peroxisome proliferator–activated receptor alpha and gamma and reduce insulin resistance. *J. Biol. Chem.* 279 : R33456–R33462, 2004.
- Ye, J., Zhao, Y., Chen, X., Zhou, H., Yang, Y., Zhang, X., Huang, Y., Zhang, N., Lui, E. M. K., & Xiao, M. Pu–erh tea ameliorates obesity and modulates gut microbiota in high fat diet fed mice. *Food Res. Int.* 144 : 110360, 2021.



森川 哲郎

平成27年 3月 北海道医療大学歯学部歯学科 卒業

平成27年 4月 北海道医療大学病院 研修歯科医

平成31年 3月 北海道医療大学大学院歯学研究科博士課程 修了

平成31年 4月 北海道医療大学歯学部生体機能・病態学系臨床口腔病理学分野 助教