

博士〈健康科学〉論文

グアーガム部分分解物摂取と  
自発運動が高脂肪食餌誘導性肥満に  
及ぼす相補作用効果の検討

2021年3月

青木 孝文

川崎医療福祉大学大学院

医療技術学研究科

健康科学専攻

# 目次

<b>【序論】</b>	.....	<b>pp. 2-4</b>
<b>【目的】</b>	.....	<b>p. 5</b>
<b>【方法】</b>	.....	<b>pp. 5-9</b>
実験Ⅰ：高脂肪食餌摂取マウスの肥満および腸内環境変化に影響を 及ぼす PHGG 摂取濃度の検討		
実験Ⅱ：高脂肪食餌摂取マウスの肥満および腸内細菌叢変化に及ぼす PHGG 摂取の影響と自発運動負荷に伴う相補作用効果の検討		
<b>【結果】</b>	.....	<b>pp. 10-13</b>
<b>【考察】</b>	.....	<b>pp. 13-20</b>
高脂肪食餌摂取マウスの腸内環境に影響を及ぼす PHGG 摂取濃度 PHGG 摂取および自発運動が肥満、糖代謝能に及ぼす影響 PHGG 摂取および自発運動が腸内環境に及ぼす影響 PHGG 摂取および自発運動が腸内細菌叢に及ぼす影響 本研究の健康科学への貢献		
<b>【結論】</b>	.....	<b>p. 20</b>
<b>【利益相反開示】</b>	.....	<b>p. 20</b>
<b>【謝辞】</b>	.....	<b>p. 21</b>
<b>【参考文献】</b>	.....	<b>pp. 22-29</b>
<b>【図・表】</b>	.....	<b>pp. 30-49</b>

## 【序論】

肥満は、先進国の深刻な社会問題となって久しいが、減量に成功した国は1つもないと言われており、全世界では21億人にまで増加したと報告されている (Ng, et al., *Lancet*, 2014)。日本においても例外ではない。平成30年の国民健康栄養調査（厚生労働省, 平成30年国民健康栄養調査, 2020）における成人肥満者の割合は、男性で32.2%、女性で21.9%を占め、急激な増加はないものの減少するまでには至っていない。特に、肥満で問題となるのが、糖尿病をはじめとする内分泌疾患や心疾患、肝疾患、腎疾患、がん、精神疾患など、生活習慣病のリスクファクターとなる点である (Malnick and Knobler, *QJM*, 2006)。肥満に伴う合併疾患の増加は、死亡率の増加、QOLの低下、さらには医療費の増加を引き起こす (Conway and Rene, *Obes Rev*, 2004, Corica, et al., *Pharmacoeconomics*, 2015)。近年では、加齢に伴って生じる骨格筋量と骨格筋力の低下である「サルコペニア」との関連も指摘されている (Barazzoni, et al., *Clin Nutr*, 2018)。すなわち、肥満は解決できていないだけでなく、時代と共に新たな問題が噴出してきている社会問題である。したがって、肥満の改善は古くかつ新しい健康科学的な課題と言える。

近年の研究では、高脂肪食餌摂取などの食習慣や不活動を含めた生活習慣の変化が腸内細菌叢の変化をもたらし、それとともに肥満や糖尿病、がんなどの生活習慣病の発症、そして重症化が誘導されると報告されている (Cerda, et al., *Front Physiol*, 2016)。実際に、肥満マウスの便を無菌マウスに移植することで肥満が誘導されることが報告されており (Turnbaugh, et al., *Nature*, 2006)、腸内細菌叢の形成が我々の健康に強く影響することが広く認識されつつある。この特徴的な腸内細菌叢の変化は、主にdysbiosisと呼ばれる腸内細菌叢の悪化（多様性の減少や有害菌の増加など）によるとされている (Weiss and Hennet, *Cell Mol Life Sci*, 2017)。高脂肪食餌性肥満の典型的な腸内細菌叢変化としては、*Firmicutes*の増加、*Bacteroidetes*の低下、それに付随する*Firmicutes / Bacteroidetes* (F/B) 比の増加があげられている (Murphy, et al., *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2015)。メカニズムに関しては、不明な点が多いが、dysbiosis状態の改善は、生活習慣病の予防や

治療に寄与することが期待されている(Rinninella, et al., *Microorganisms*, 2019)。したがって、腸内細菌叢という新たな視点から考えた、生活習慣病予防や改善のための実践可能な栄養管理や運動処方につながる研究を行う事は、健康科学の発展に寄与するものと考えられる。

従来から生活習慣病、特に肥満の予防や治療として効果を発揮してきた食習慣と運動習慣の改善は、組み合わせることで相加的、相乗的にその効果が得られることは周知の事実である。この食餌と運動の改善はdysbiosisの改善策としても期待され、どちらも腸内細菌叢を変化させることが報告されてきている (Hills, et al., *Nutrients*, 2019, Karl, et al., *Front Microbiol*, 2018, Mailing, et al., *Exerc Sport Sci Rev*, 2019)。

そこで本研究では、腸内細菌叢に大きな影響を及ぼす食餌因子の1つである食物繊維に注目した。MarkowiakとSlizewska (*Nutrients*, 2017)、あるいはSlavin (*Nutrients*, 2013) のレビューによると、食物繊維を含む難消化性物質のうち、特に強い影響を及ぼすのがprebioticsである。このprebioticsは、*Bifidobacterium*もしくは*Lactobacillus*など、宿主に対し有益な作用を持つ菌に資化されることで、これらの菌を選択的に成長および増殖させる。結果として短鎖脂肪酸(short chain fatty acids: SCFAs) 産生が高まり、腸内pHの低下、病原菌の減少を引き起こすことが関連するとされている。言い換えると、直接的に腸内細菌に影響するということである。SCFAsは、体重の増加抑制、大腸がんの予防、脂質代謝の調節、免疫調節など多くの生理作用を発揮することも報告されている (Koh, et al., *Cell*, 2016)。prebioticsの内、近年注目されている水溶性食物繊維にグアーガムを酵素により低分子化したグアーガム部分分解物 (Partially Hydrolyzed Guar Gum: PHGG) がある (Rao and Quartarone, *Nutrition*, 2019)。特徴としては、そのほとんどが腸内細菌に資化されるため、他の食物繊維と比較しSCFAs産生量が多いことがあげられる (Velazquez, et al., *Anaerobe*, 2000, Pylkas, et al., *J Med Food*, 2005)。実際に、過敏性腸症候群の症状の緩和 (Giannini, et al., *Nutrition*, 2006) や、小腸内細菌異常増殖症 (small intestinal bacterial overgrowth: SIBO) (Furnari, et al., *Aliment*

*Pharmacol Ther*, 2010)、小児の機能性胃腸障害 (Romano, et al., *World J Gastroenterol*, 2013)、コレラ (Alam, et al., *Digestion*, 2008) の治療に有効であるなど、dysbiosis が懸念されている疾患、特に便秘や下痢など消化管異常を呈す疾患に対し、その効果が報告されている。

一方、運動が腸内細菌叢を変化させること、さらにはその代謝産物である SCFAs 産生に影響することも報告されている。動物を用いた研究では、自発運動マウスにおいて、SCFAs の 1 つである酪酸の産生菌増加とそれに伴う盲腸酪酸濃度の増加 (Matsumoto, et al., *Biosci Biotechnol Biochem*, 2008) や、同じく SCFAs の 1 つである血中酢酸濃度の増加と HFD 摂取に伴う血中酢酸濃度の減少を改善すること (Watanabe, et al., *J Phys Fitness Sports Med*, 2020) が報告され、ヒトを対象とした研究では、週 3 回中等度強度の運動介入により、SCFAs 産生菌の増加と糞便中 SCFAs 濃度が増加することが報告されている (Allen, et al., *Med Sci Sports Exerc*, 2018)。運動がどのように腸内細菌叢を変化させるかは、十分に解明されていないものの、腸管上皮細胞のリンパ球における炎症性サイトカインの増加、抗炎症性サイトカインおよび抗酸化酵素の増加など免疫細胞の変化や、便の腸通過時間の短縮など消化管神経反応の変化、骨格筋収縮に伴うマイオカインや代謝産物、ホルモン分泌の変化など、宿主の種々の代謝変化が間接的に影響を及ぼすと考えられている (Mailing, et al., *Exerc Sport Sci Rev*, 2019)。すなわち、prebiotics とは異なる影響と考えられるものの、運動においても腸内細菌叢の変化だけでなく、その代謝産物である SCFAs 産生にも影響する可能性がある。

以上のように、食物繊維摂取あるいは運動は、それぞれ単独で腸内細菌叢、さらには SCFAs 産生を変化させることが検討されてきているが、食物繊維摂取による腸内細菌叢の変化が運動習慣によって促進されるのかについては明らかとはなっていない。また、腸内細菌叢変化の視点から、食物繊維摂取と運動を組み合わせた肥満の予防改善効果の検討は行われていない。

## 【目的】

PHGG 摂取および自発運動による腸内細菌叢を介した相補作用効果の可能性について、高脂肪食餌誘導性肥満への影響を中心にマウスを用い検討を行うこととした。

## 【方法】

### 1. 実験動物

4週齢のC57BL/6J雄マウスを用いた。飼育期間は10週間とし、食餌および水は自由摂取とした。体重および食餌摂取量は、毎週測定を行った。飼育環境は、明暗サイクルを12時間（8～20時：明期、20～8時：暗期）、室温を $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ とした。なお、本研究は川崎医療福祉大学動物実験委員会の承認を得て実施した（承認番号：18-010、18-017）。

### 2. 実験計画

#### **実験I：高脂肪食餌摂取マウスの肥満および腸内環境変化に影響を及ぼすPHGG摂取濃度の検討**

高脂肪食餌（high-fat-diet: HFD）誘導性肥満、糖代謝能および腸内環境変化に影響を及ぼすPHGG摂取濃度を検討することを目的とした。マウスにはHFDを基に、PHGG無添加のHFDを摂取させるHFD群（n=6）、PHGG（G）をそれぞれ1%、5%、7.5%重量添加したHFDを摂取させるG1HFD群（n=6）、G5HFD群（n=6）、G7.5HFD群（n=6）の4群とした（Fig. 1）。

#### **実験II：高脂肪食餌摂取マウスの肥満および腸内細菌叢変化に及ぼすPHGG摂取の影響と自発運動負荷に伴う相補作用効果の検討**

PHGG摂取および自発運動負荷がHFD誘導性肥満に及ぼす影響、さらにはHFD誘導性肥満による腸内細菌叢変化を改善するか検討することを目的とした。実験には、通常食餌（control-diet: CD）およびHFDを用いた。両食餌条件ともに、

PHGG添加または無添加食、さらに自発運動の効果を検討するため安静または自発運動を負荷した。安静状態とするCD+安静(CDC)群(n=8)、HFD+安静(HFDC)群(n=8)、自発運動(wheel running: W)を負荷するCDW群(n=8)、HFDW群(n=8)、餌の5%重量のPHGG(G)を摂取させるGCDC群(n=12)、GHFDC群(n=12)、PHGG摂取と自発運動を組み合わせるGCDW群(n=12)、GHFDW群(n=12)の合計8群とした(Fig. 2)。

### 3. 食餌

CDには、三大栄養素のエネルギー比率が、脂質10%、たんぱく質20%、炭水化物70%の食物繊維を含まない飼料(D12450Jpx1, Research Diets, New Brunswick, NJ)を、HFDには、三大栄養素のエネルギー比率が、脂質60%、たんぱく質20%、炭水化物20%の食物繊維を含まない飼料(D12492Gpx10, Research Diets, New Brunswick, NJ)をそれぞれ用いた。PHGG摂取群には、CDに5%重量、HFDに1~7.5%重量のPHGG(Sunfiber®, Taiyo Kagaku Co., Ltd, Yokkaichi, Japan)を添加したGCDあるいはGHFD食を供した(Table 1)。

### 4. 自発運動

自発運動群には、24時間アクセス可能な回転輪付き飼育ケージ(ケージサイズ: 10 × 23 × 10 cm, 回転輪サイズ: 幅5.5 cm × 円周22 cm, Natsume Seisakusho, Co., Ltd, Tokyo, Japan)にて、自発運動を負荷し、毎週回転数の測定を行った。

### 5. 最大酸素摂取量( $\dot{V}O_2\max$ )の測定

$\dot{V}O_2\max$ の測定は、飼育10週目にマウス用のトレッドミルチャンバー(MOUSEBELT-2000, ARCO SYSTEM, Inc., Chiba, Japan)を質量分析装置(ARCO-2000, ARCO SYSTEM, Inc., Chiba, Japan)に連結し、オープンサーキット法で測定した。全てのマウスは、トレッドミルでの走行に慣れさせるために、測定の前5~7日前に15~20m/minで走行学習を行った。測定プロトコールは、傾斜角度20

度、5m/minで5分間、10m/minで5分間の計10分間のウォーミングアップの後、30秒ごとに1m/minの速度漸増法を用いた。 $\dot{V}O_2\text{max}$ の判定は、 $\dot{V}O_2$ のレベリングオフが観察された時点、あるいは5秒間以上の微電圧の電気ショックを受けても走行を継続できない時点でのpeak  $\dot{V}O_2$ とした (Ishihara and Taniguchi, *PLoS ONE*, 2018)。

## 6. 耐糖能試験 (Glucose tolerance test: GTT)

GTTは、飼育10週目に行った。血糖値の測定は、マウスの尾静脈を剃刀でカットして得られた血液50 $\mu$ l以下にて、血糖測定器 (ACCU-CHEK®, Roche, Basel, Schweiz) を用いて行った。GTTの5時間以上前よりマウスを絶食させ、イソフルラン麻酔下にて、2g/kg体重のグルコースを腹腔投与した。グルコース投与前、投与後15分、30分、60分、120分に血糖値の測定を実施した。得られた血糖値より、血糖値曲線下面積 (blood glucose area under the curves: BGAUC) を算出した (Bradley, et al., *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2008)。なお、GTTは $\dot{V}O_2\text{max}$ の測定から48時間以上の間を空け実施した。

## 7. 新鮮便pHの測定

腸内環境の指標として、新鮮便のpH測定を実験Iでは6週目と10週目に、実験IIでは6週目にそれぞれ行った。新鮮便は、マウスの腹部あるいは臀部を優しくなで、排便を促し、1.5mlのサンプリングチューブへ直接回収した。得られた便は、2~3倍重量の超純水で攪拌し、ペッセルを用い破碎した。作成した希釈糞便液のpHを、pHメーター (twin pH B-212, HORIBA, Ltd, Kyoto, Japan) にて測定した (Ji-Lin, et al., *J Food Nutr Res*, 2014)。

## 8. 盲腸内容物有機酸解析

盲腸内容物は、飼育終了後、採取した盲腸を切開し、直接1.5mlのサンプリングチューブへ取り出し回収した。回収後直ちに液体窒素で凍結し、解析まで一



80°Cで保存を行った。有機酸の解析は、pH緩衝化ポストカラム電気伝導度検出法を用いた液体クロマトグラフィーにて解析した (Aoe, et al., *Nutrients*, 2018)。

## 9. 腸内細菌叢の解析

飼育10週目に糞便の回収を行った。得られた糞便より、DNAを抽出し、次世代シーケンサーを用いて、16S-rRNAメタゲノミクス解析を行った。得られた16S-rRNAの配列は、メタゲノム解析オープンソフトウェアのQuantitative Insight into Microbial Ecology (QIIME ver. 1.8.0) (Caporaso, et al., *Nat Methods*, 2010) を用い、Ribosomal Database Project (RDP Release 11 Update 4 May 26, 2015) (Cole, et al., *Nucleic Acids Res*, 2014) の塩基配列データベースを基に、97%の相同性でOTUs (operational taxonomic units) に分類した。OUT数は、サンプルの内、OUT数が最も少ないサンプルを基準に、サブサンプリングを行う事で標準化した。 $\alpha$ 多様性は、OTUs、Chao-1、Shannon、inverse Simson指数をQIIMEで算出した。 $\beta$ 多様性は、クラスター分析 (完全連結法) およびヒートマップ化をフリー統計解析ソフトウェアのR (R Development Core Team, 2019, version 3. 5. 3, <https://www.r-project.org/>) で行った [使用パッケージ : gplots (version 3.0.1.1)、使用関数 : heatmap.2)]。

## 10. 試料採取

飼育終了後、イソフルラン麻酔下で、眼下静脈叢より採血を行った後、心臓、骨格筋 (ヒラメ筋、腓腹筋、足底筋)、大腸、盲腸、体脂肪 (内臓脂肪、副睾丸上体脂肪、皮下脂肪) を採取した。

## 11. 統計解析

統計解析は、SPSS Statistics 23.0 (IBM, Armonk, NY)、フリー統計解析ソフトウェアのR、ネットワーク可視化用オープンソースソフトウェアプラットフォームのCytoscape (2020, version 3.7.2, <https://cytoscape.org/>)、オンライン解析ツール

フレームワークのGalaxy内のLEfSe (Linear discriminant analysis Effect Size) アプリケーション (<https://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy/>) をそれぞれ用いた。実験Iでは、SPSSにて一元配置分散分析を行い、post-hoc解析にBonferroni法を用いた。実験IIでは、SPSSにてまず、HFDの影響を検討するためにCDC群とHFDC群に対してMann-WhitneyのU検定を行った。次に、同様にSPSSにて、各食餌条件 (CDもしくはHFD) に対し一元配置分散分析をKruskal-Wallis検定にて行い、post-hoc解析にはMann-WhitneyのU検定を用いた。有意水準 (p値) は5%未満とした。

腸内細菌叢の関係性の可視化は、RおよびCytoscapeを用いた。各群内の属レベルでの腸内細菌間のSpearmanの順位相関係数をRにて算出し、得られたデータをCytoscapeに読み込み、三次元上に可視化した。菌 (ノード: 丸) の配置は、力学モデルによるグラフ描画アルゴリズムPrefuse Force Directed Layoutを用いることで、グラフの頂点と辺に仮想的な力を割り当て、力学的エネルギーの低い安定状態を探し、辺の長さが均一、頂点の散らばり具合が均一、対称性があるように配置した (Fruchterman and Reingold, *Softw Prac Exp*, 1991)。p値が10%未満の場合エッジ (線) を描画し、正の相関関係を赤、負の相関関係を青、相関係数の大きさを色の濃淡とエッジ (線) の太さで、相対的な菌数をノード (丸) および菌名の大小で示した。

腸内細菌叢変化の生物学的特徴の検討は、LEfSeを用いた (Segata, et al., *Genome Biol*, 2011)。食餌条件ごとにKruskal-Wallis検定を、post-hoc解析にWilcoxonの符号順位検定をそれぞれ行い、有意差の見られた菌に対しては、実験に用いたサンプルから構築された線形判別分析モデルを用いて効果量の推定値を算出した。得られた値と分類階級を基に分岐図 (クラドグラム) 化した。このクラドグラムは、腸内細菌の分類階級のうち、中央が上位階級、周辺に行くほど下位階級、各菌をノード (丸) で示しており、各群において他群と比較し有意に特徴的である菌 (ノード: 丸) とその分岐群 (クレード: 扇) を4色に塗り分けることで、腸内細菌叢変化の生物学的特徴を可視化した。

## 【結果】

### 実験 I

#### 1. PHGG 摂取濃度の違いが肥満および糖代謝能に及ぼす影響

PHGG 摂取濃度の違いによる体重の変化は、G5HFD 群および G7.5HFD 群の間に有意な差が観察されたものの、HFD 群と比較し 10 週間の PHGG 摂取による体重および体脂肪の増加抑制は観察されなかった (Fig. 3a, b)。同様に、PHGG 摂取は、食餌摂取量にも影響しなかった (Fig. 3c)。さらに糖代謝能への影響も観察されなかった (Fig. 4)。

#### 2. PHGG 摂取濃度の違いが腸内環境に及ぼす影響

一方で、腸内環境は大きな変化を示した。新鮮便 pH は、6 週目には HFD 群と比較し、5%の PHGG 濃度から低下が観察され、10 週目においてもその変化は維持された (Fig. 5a)。盲腸重量でも、5%濃度の PHGG 摂取から高値傾向、7.5%濃度の PHGG 摂取により HFD 群と比較し有意に高値を示した ( $p < 0.01$ , Fig. 5b)。

### 実験 II

#### 1. PHGG 摂取と自発運動が肥満に及ぼす影響

10 週間の HFD 摂取により、体重と脂肪蓄積の増加が観察され、肥満の誘導が確認された (いずれも  $p < 0.01$ , Fig. 6a, b)。この肥満は、自発運動により改善した (Fig. 6a, b)。さらに、HFD 条件では、併用群で最も体脂肪の蓄積が抑制された (Fig. 6b)。一方、体重当たりの摂取エネルギー量は、HFD 摂取により低下、CD 条件では、PHGG 摂取により低下、両食餌条件ともに運動による増加がそれぞれ観察された (Fig. 6c)。

#### 2. PHGG 摂取と自発運動が筋重量および $\dot{V}O_2\max$ に及ぼす影響

筋重量に対する HFD 摂取および PHGG 摂取による影響は観られず、自発運動

負荷に伴うトレーニング効果のみが観察された (Fig. 7a, b)。 $\dot{V}O_2\max$  は、HFD 条件のみ、運動の効果が観察された (Fig. 7c)。

### 3. PHGG 摂取と自発運動が糖代謝能に及ぼす影響

HFD 誘導性肥満は、併せて糖代謝能の悪化も引き起こした (Fig. 8)。この悪化に対して、PHGG 摂取の効果は限定的であり、BGAUC では運動の効果のみ観察された (Fig. 8b)。

### 4. PHGG 摂取と自発運動が腸内環境に及ぼす影響

飼育 6 週目の新鮮便 pH は、HFD 誘導性変化は見られなかったものの、HFD 条件において PHGG 摂取および自発運動により減少した (いずれも  $p < 0.01$ , Fig. 9a)。また、併用群では両食餌条件ともに最も低値を示した (Fig. 9a)。盲腸重量は、HFD 誘導性の減少が観察された ( $p < 0.01$ , Fig. 9b)。この変化は、PHGG 摂取により打ち消され、運動の効果はみられなかったものの、両食餌条件ともに併用群で最も高値を示した (Fig. 9b)。

### 5. PHGG 摂取と自発運動が盲腸内容物 SCFAs 濃度に及ぼす影響

HFD 摂取は、盲腸内 SCFAs 濃度にも影響し、酢酸、酪酸濃度が減少した (いずれも  $p < 0.01$ , Fig. 10)。この変化は PHGG 摂取により緩和された (Fig. 10b, d)。一方、運動の影響は、CD 条件において、SCFAs 濃度の減少、中でも酢酸濃度の減少、HFD 条件では、プロピオン酸、酪酸濃度の減少が観察された (CD 条件 : いずれも  $p < 0.01$ , Fig. 10a, b, HFD 条件 : いずれも  $p < 0.05$ , Fig. 10c, d)。この運動の影響は、PHGG 摂取の併用により打ち消され、CD 条件で酢酸の増加、HFD 条件で全ての SCFAs の増加が観察された (CD 条件 :  $p < 0.01$ , Fig. 10b, HFD 条件 : いずれも  $p < 0.01$ , Fig. 10b–d)。

## 6. PHGG 摂取と自発運動が腸内細菌叢に及ぼす影響

まず、腸内細菌叢全体へ影響を検討するために多様性について検討した。腸内細菌叢の $\alpha$ 多様性は、HFD 摂取により、全ての指数で増加が観察された (Fig. 11)。一方、HFD 条件における PHGG 摂取および運動の影響はそれぞれ異なり、PHGG 摂取では、Shannon、Simpson 指数が減少、運動では OTUs、Chao-1、Shannon 指数が増加した (Fig. 11)。GHFDW 群では、いずれの指数も CDC 群のレベルまで減少し、HFD 摂取による増加が打ち消されていた (Fig. 11)。 $\beta$ 多様性では、PHGG 摂取の有無により、2つのクラスターに分かれた (Fig. 12)。

次に、腸内細菌間の関係性にも注目し PHGG 摂取と自発運動の影響を検討した。属レベルでの腸内細菌叢の関係性は、HFD 摂取により希薄になり、優勢菌が減少した (Fig. 13a, 14a)。両食餌条件ともに PHGG 摂取は、菌間の相互関係を濃密かつ複雑に (Fig. 13c, 14c)、一方、運動は、一対一の関係性、すなわち単純な関係性に変化させた。(Fig. 13b, 14b)。併用群では、CD 条件でより複雑な関係性に、HFD 条件では、HFDW 群と比較し、GHFDW 群で、より複雑な関係性を持つようになった (Fig. 13d, 14d)。また、両食餌条件ともに優勢菌である *Bacteroides* と正の関係性を持つ菌がほとんど観察されなくなった (Fig. 13d, 14d)。

さらに、腸内細菌数への影響について検討した。まず全体像を把握するために、クラドグラムを用いて各群における腸内細菌叢の生物学的特徴を可視化した。通常食餌条件では、安静群において *Firmicutes* 門、中でも *Lactobacillus* 属が有意に高値を示し、併用群において *Bacteroidetes* 門、中でも *Bacteroides* 属が有意に高値を示した (Fig. 15a)。高脂肪食餌条件では、運動群において *Firmicutes* 門が有意に高値、安静群において *Lactobacillus* 属が有意に高値であり、一部通常食条件とは結果が異なった (Fig. 15b)。一方、併用群では高脂肪食餌条件においても *Bacteroidetes* 門および *Bacteroides* 属が有意に高値を示し、食餌条件に関わらず一定の菌叢の変化が観察された (Fig. 15)。

この変化を相対的な菌数で確認すると、まず門レベルの構成変化は主に *Firmicutes* と *Bacteroidetes* に変化がみられた (Fig. 16)。PHGG 摂取により、両食

餌条件で *Firmicutes* の減少、CD 条件で、F/B 比の減少が観察された (Fig. 17)。運動では、CD 条件のみ *Bacteroidetes* の増加が観察された (Fig. 17b)。併用群では、両食餌条件ともに *Firmicutes*、F/B 比の最も大きな変化が観察され、PHGG 摂取による変化が運動を併用することで顕著に表れるようになった (Fig. 17a, c)。

属レベルでも同様に構成変化を確認すると *Lactobacillus* と *Bacteroides* に変化が観察された (Fig. 18)。この変化に対し、両食餌条件ともに PHGG 摂取による変化は見られず、運動により *Lactobacillus* が減少した (Fig. 19)。併用群では、両食餌条件ともに *Bacteroides* において最も高値を示した (Fig. 19b)。

## 【考察】

本研究は、10 週間の HFD 誘導性の腸内細菌叢の悪化、すなわち dysbiosis 状態が、PHGG 摂取および自発運動により予防され、肥満を抑制するという仮説を立て実施した。結果として、HFD 誘導性の肥満、糖代謝能および dysbiosis 状態の改善には PHGG 単独では効果が不十分であった。しかしながら、自発運動を組み合わせることで、肥満はコントロールレベルまで、腸内細菌叢の変化に至ってはコントロールレベル以上に、劇的な変化が観察された。腸内細菌叢に直接的な影響を及ぼす PHGG と、宿主の変化を介し間接的に影響を及ぼすと考えられる運動の相補作用効果が、極めて重要であることが示唆された。

### 高脂肪食餌摂取マウスの腸内環境に影響を及ぼす PHGG 摂取濃度

新鮮便 pH と盲腸重量は、1%濃度の PHGG 摂取では変化がみられなかったものの、5%濃度の PHGG 摂取から変化が観察された。この変化は、5%濃度から 7.5%濃度に PHGG を増量しても有意な増強は観察されなかった。腸内 pH は、腸内細菌による基質の発酵とそれに伴う有機酸、特に産生量の多い SCFAs の影響を受ける (Markowiak and Slizewska, *Nutrients*, 2017, Slavin, *Nutrients*, 2013)。盲腸重量は、食物繊維などの難消化性多糖類や腸内細菌叢変化の影響を受ける。特に水溶性の難消化性多糖類は、その保水性、難消化性の特性により盲腸重量の増

加が引き起こされる (Weaver, et al., *J Agric Food Chem*, 2011)。一方、保水性や難消化性を持たないものの、腸内細菌叢に影響を及ぼす物質 (ポリフェノールや n-3 多価不飽和脂肪酸、高脂肪食餌など) により盲腸重量に影響を及ぼすことも報告されている (Neyrinck, et al., *Br J Nutr*, 2013; Pachikian, et al., *Nutr Metab (Lond)*, 2011)。したがって、盲腸重量の変化は、腸内細菌叢変化の指標にも使用されている。すなわち、5%濃度の PHGG 摂取から観察された pH の減少は、腸内細菌による PHGG の発酵に伴い、有機酸産生の増加を、盲腸重量の増加は、内容物の発酵の促進、それに伴う有機酸の増加、腸内細菌叢変化の可能性を示唆すると考えられる。以上のことから、5%濃度の PHGG 摂取で十分に、腸管内有機酸の変化、腸内細菌叢変化が引き起こされる可能性が示唆された。この結果を踏まえ、実験 II では PHGG 摂取の濃度を 5%と設定することとした。

### **PHGG 摂取および自発運動が肥満、糖代謝能に及ぼす影響**

10 週間の HFD 摂取により、CDC 群と比較し HFDC 群では、有意な体重増加と体脂肪の蓄積が観察され、肥満の誘導さらには糖代謝能の悪化が確認できた。この肥満および糖代謝能の悪化に対して、少なくとも 7.5%濃度の PHGG 摂取単独では予防効果が不十分であった。しかしながら、5%濃度の PHGG 摂取に運動を併用した GHFDW 群では肥満、糖代謝能の改善効果が、さらに体脂肪の蓄積に関しては最も効果的であった。食物繊維が糖代謝能に影響を及ぼす因子に粘性がある (McRorie and McKeown, *Acad Nutr Diet*, 2017)。粘性の高い食物繊維は、小腸における糖類の吸収を抑制し、急激な血糖上昇を抑制することで効果が発揮される。一方、高い粘性は、食品に使用する際に物性等に大きな影響を及ぼすため利用性、利便性は低くなる。PHGG は、粘性のあるグアーガムを酵素により、低分子化、低粘度化することで、利用性さらには発酵性が高められている (Rao and Quartarone, *Nutrition*, 2019)。先行研究において、粘性のあるグアーガムの場合に観察されている肥満および糖代謝の改善が (den Beaten, et al., *PLoS ONE*, 2015)、グアーガム部分分解物である PHGG では改善されるまでに至っていない

(Yasukawa, et al., *J Clin Biochem Nutr*, 2012, Dall'Alba, et al., *Br J Nutr*, 2013)。以上のことから、高脂肪食餌誘導性肥満および糖代謝能の悪化を予防するためには、PHGG 摂取単独では効果が乏しく、運動を組み合わせることで十分な予防効果をもたらすことが示唆された。

### **PHGG 摂取および自発運動が腸内環境に及ぼす影響**

10 週間の HFD 摂取は、腸内環境にも影響し、新鮮便 pH の上昇と盲腸重量の減少を引き起こした。この変化は、実験 I 同様に実験 II においても、5%濃度の PHGG 摂取により打ち消された。さらに興味深いことに、この PHGG 摂取の影響は、運動により促進され、自発運動併用群で最も顕著な効果が観察された。PHGG は、粘性の低下と共に肥満や糖代謝能の改善効果がグアーガムよりも低下しているものと考えられるが、発酵性が高まることで SCFAs 産生量は増加する (Velazquez, et al., *Anaerobe*, 2000, Pylkas, et al., *J Med Food*, 2005)。すなわち、腸内環境あるいは腸内細菌叢に及ぼす影響は高まっていると言える。本研究においても、HFD 誘導性の腸内環境悪化に対し、高発酵である PHGG 摂取により有機酸産生が高まり、腸内環境に強く影響し、改善効果がもたらされたものと考えられた。一方、運動によっても、腸内細菌叢が変化すること、さらには腸内 SCFAs 濃度にも影響することが報告されている (Matsumoto, et al., *Biosci Biotechnol Biochem*, 2008, Allen, et al., *Med Sci Sports Exerc*, 2018)。実際に、高脂肪食餌条件では自発運動単独でも新鮮便 pH の低下が観察された。以上の結果から、少なくとも 5%濃度以上の PHGG 摂取により、HFD 摂取マウスの腸内環境改善効果が得られることが示唆された。さらに PHGG 摂取と運動を組み合わせることで、PHGG 摂取による変化が促進され、より大きな影響が腸内細菌叢およびその代謝産物に影響を与えたと推察された。

### **PHGG 摂取および自発運動が腸内細菌叢に及ぼす影響**

まず、腸内細菌叢全体へ影響を検討するために多様性への影響を検討した。腸



内細菌の豊富さ、均一さ、多様さを示す指標である $\alpha$ 多様性は、CD 条件ではほとんど変化がみられなかったのに対し、HFD 摂取により増加が観察された。運動ではこの増加を促進した一方で、PHGG 摂取では減少した。併用群では、いずれも CDC 群のレベルまで減少し、HFD 摂取による増加が打ち消されていた。腸内細菌叢の多様性は、高い、すなわち菌の種類が豊富で、ある特定の菌に偏っていない均一な状態が安定していて好ましいと考えられているが、個々の研究によりその変化は一定ではなく必ずしも結論が出ているとは言えない。実際に、肥満、運動、prebiotics の多様性への影響は、増加、減少、変化しないなど、多種多様である (Hassan, et al., *Nutr Neurosci*, 2019, Liu, et al., *J Agric Food Chem*, 2019, Rinninella, et al., *Microorganisms*, 2019, Mika, et al., *PLoS ONE* 2015, Reider, et al., *Nutrients*, 2020, Hills, et al., *Nutrients*, 2019)。本研究での $\alpha$ 多様性の変化は、まず HFD 摂取により影響を受け、変化した状態に対し、PHGG あるいは運動の影響を受けていることが示唆された。また、併用群では、高脂肪食餌誘導性の腸内細菌種数の増加、あるいは腸内細菌数の変化を打ち消し、コントロールレベルまで低下したことが示唆された。次にグループ間の相違度を距離によってあらわす $\beta$ 多様性では、PHGG 摂取の有無により中央で大きくクラスターが分かれた。すなわち、PHGG 摂取により特徴的な腸内細菌叢が形成されること、PHGG 摂取の有無によって高脂肪食餌あるいは運動の影響が異なってくることを示唆された。

次に、多様性だけでなく各腸内細菌間の関係性にも注目し検討した。興味深いことに、本研究で得られた腸内細菌叢の関係性は、両食餌条件ともに PHGG 摂取群では関係し合う菌の種類および数が増え、複雑に腸内細菌叢が形成されるようになった。運動は逆に、関係性し合う菌の種類と数が減少し、関係性が希薄になった。PHGG は、腸内細菌に資化されることにより、特定の菌の増加、さらには二次的にその代謝産物の増加により腸内細菌叢に直接的に作用する (Markowiak and Slizewska, *Nutrients*, 2017, Slavin, *Nutrients*, 2013)。一方、運動は、免疫細胞の変化、消化管神経反応の変化、マイオカインや乳酸、その他の代謝産物、ホルモンの変化など宿主の代謝変化を介して、間接的に作用すると考えられ

ている (Mailing, et al., *Exerc Sport Sci Rev*, 2019)。すなわち、本結果は腸内細菌への直接的あるいは間接的な影響により、腸内細菌叢の形成、関係性が変化することが推察されるデータと考えられる。PHGG 摂取と運動の影響が同時に負荷されている併用群での関係性は、腸内環境の結果同様に PHGG 摂取の影響を促進した。すなわち、より複雑かつ、より優勢菌が支配的に腸内細菌叢を形成するようになった。この結果は、より強固な腸内細菌叢が PHGG 摂取と運動により形成された可能性を示唆すると考えられる。また、多様性に加えて腸内細菌の関係性を検討することで、CD 条件で変化が捉えられなかった腸内細菌叢全体への影響を捉えることが出来たと言える。さらに、本研究結果の併用群における多様性の低下という現象がどのように引き起こされたのかについて可視的に検討が行えたといえる。今後、更なる検討および研究を行い、腸内細菌叢変化の全体像をつかむための多角的な解析方法を検討していくことが必要であると考えられる。

最後に、腸内細菌数への影響を検討した。HFD 摂取による腸内細菌叢の変化としては、*Firmicutes* の増加、*Bacteroidetes* の減少、それに付随する F/B 比の増加が報告されている (Murphy, et al., *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2015)。Weitkunat ら (*Sci Rep*, 2017) は、脂肪エネルギー比 40%程度の HFD 摂取マウスの *Firmicutes* と *Bacteroidetes* は、グアーガム摂取によって変化がないことを報告している。本研究においても、HFDC 群と比較し GHFDC 群では、*Firmicutes* は減少したものの、*Bacteroidetes* と F/B 比は有意な差はみられず、先行研究の結果と一致しており、HFD 誘導性変化を完全に改善するまでには至っていないと考えられる。一方、PHGG 摂取に運動を組み合わせることで F/B 比の変化が促進され、最も低値を示した。実際に、運動と腸内細菌の研究では、ヒトの研究において  $\dot{V}O_2\max$  と F/B 比に関連が認められること (Durk, et al., *Int J Sport Nutr Exerc Metab*, 2019) や、ラットを用いた研究では、若齢期から自発運動を行わせると *Firmicutes* の減少と *Bacteroidetes* 増加が報告されている (Mika, et al., *PLoS ONE*, 2015)。しかしながら、逆に F/B 比が増加する報告や、影響しないという報告もあり、結果は一致をみない (Mika, et al., *PLoS ONE*, 2015, Clarke, et al., *Gut*, 2014,

Oyanagi, et al., *J Phys Fitness Sports Med*, 2018)。すなわち、運動習慣のみで体重増加を抑制することは、必ずしも腸内細菌叢の改善を介して、あるいは F/B 比に影響しているとは限らないということである。以上のことから、本研究の結果で観察されたように、運動単独ではなく PHGG 摂取を組み合わせ、変化を補うことで劇的に F/B 比の低下を引き起こし、HFD 摂取に伴う dysbiosis を改善できることが示唆された。

運動による腸内細菌の変化は、属レベルで、*Lactobacillus* の減少をもたらした。*Lactobacillus* は、probiotics として広く知られている一方で、肥満との関連も報告されている (Armougom, et al., *PLoS ONE*, 2009)。また、*Lactobacillus* spp. は肥満者特有の酵素活性を持っていることがわかっている (Turnbaugh, et al., *Nature*, 2009)。ヒトと動物が対象のシステマティックレビュー (Million, et al., *Microb Pathog*, 2012) では、probiotics のサプリメントとして摂取させた *Lactobacillus* の内、*Lactobacillus acidophilus*、*L. ingluviei* もしくは *L. fermentum* は体重増加がみられ、*L. gasseri* と *L. plantarum* は抗肥満効果をもたらしたことが報告されている。すなわち、*Lactobacillus* の種類によって肥満あるいは抗肥満に関連するという事である。以上のことから、併用群における自発運動は *Lactobacillus* の変化も介して肥満予防に貢献した可能性が推察される。

PHGG 摂取は運動と組み合わせることで、*Bacteroides* などの酢酸産生菌 (Miller, *Archive Microbiol*, 1978, Wrzosek, et al., *BMC Biol*, 2013) の増加や運動単独群で観察されない盲腸内酢酸濃度の増加を引き起こした。酢酸は腸内細菌の発酵により産生される SCFAs の大部分を占めており、肥満もしくは糖尿病のマウスにおいて体脂肪の蓄積を抑制させるだけでなく、抗炎症も促進する (Carvalho, et al., *Diabetologia*, 2012, Kondo, et al., *J Agric Food Chem*, 2009, Yamashita, et al., *Biosci Biotechnol Biochem*, 2007)。本研究においても、HFDW 群と比較し酢酸の増加がみられる GHFDW 群では、最も体脂肪の蓄積が抑制されていた。また、PHGG 摂取は、*Bacteroides* の蓄積を増加させることも報告されている (Fu, et al., *J Food Biochem*, 2019)。このことも、本研究における PHGG 摂取の効果が強

まっている運動併用群の結果と一致している。以上のことから、PHGG 摂取に運動を組み合わせることで、PHGG 摂取の持つ腸内細菌叢への影響を補い、より大きな *Bacteroides* の変化が引き起こされること、また単に運動で増加しなかった酢酸の増加が引き起こされ、肥満予防に貢献する可能性が推察される。しかし、運動が腸内細菌叢の変化以外、すなわちエネルギー消費量あるいは代謝量を増加させることで、肥満予防に対し影響することも容易に推測される。したがって、運動に伴うエネルギー出納の変化と肥満予防の間に、腸内細菌叢がどの程度影響するかを検討することも重要ではあるが、本研究では十分検討できておらず今後の検討課題の 1 つである。

以上のことから、腸内細菌に資化されることで直接的に腸内細菌叢へ影響を及ぼす PHGG 摂取と、宿主の代謝変化を介し間接的に腸内細菌叢へ影響を及ぼすと考えられる運動との組み合わせが、高脂肪食餌による *dysbiosis* を改善させる腸内細菌叢のコントロール方法の 1 つである可能性が示唆された。

### 本研究の健康科学への貢献

本研究は、先進国の深刻な社会問題の肥満の改善に対し、適切な運動と栄養に関する健康科学的な知見を新たな視点から得るために、肥満に伴う腸内細菌叢変化を軸に、PHGG 摂取と自発運動の相補作用効果について検討を実施した。結果、腸内細菌叢に直接的な影響を及ぼす PHGG 摂取と、宿主の変化を介し間接的に影響を及ぼすと考えられた自発運動の相補作用効果が、高脂肪食餌による *dysbiosis* の改善を介した肥満の改善に重要であることが示唆された。この腸内細菌叢の変化に注目した新たな視点は、生活習慣病予防や改善のための実践可能な栄養管理や運動処方につながる、より効率的な、あるいはより効果的な新しい方法の 1 つに成り得る可能性がある。本研究の結果を踏まえ、食物繊維摂取と運動の組み合わせによる腸内細菌叢の安定化や持続性などの特徴と、骨格筋など宿主の臓器に対する腸内細菌叢の影響、あるいはヒトを対象とした、より実

践的な研究に発展させることで、健康科学の発展に寄与し、肥満に伴う社会問題の解決につながるものと期待される。

### **【結論】**

PHGG 摂取と運動を併用することで、高脂肪食餌性肥満マウスの腸内細菌叢を相補的に改善し、肥満を抑制する可能性が示唆された。

### **【利益相反開示】**

本演題発表に関連し、開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

## 【謝辞】

大学院在職進学制度の利用をご快諾、ご推薦頂いた、川崎医療福祉大学医療技術学部臨床栄養学科 特任教授 寺本房子先生、その利用中に業務内容等、多大なるご配慮を頂きました臨床栄養学科 学科長 武政睦子先生に深謝する。

進学中の業務調整や、学会発表や研究等で不在時の対応などに対し、快くご協力ご配慮いただいた臨床栄養学科の教職員、関係の方々に厚く御礼申し上げます。

本論文作成に関し、示唆に富むご指導をいただいた副学長 小野寺昇先生、国際的な活動、論文執筆に対し、多大なるご指導ご協力をいただいた健康体育学科准教授 Michael J. Kremenik 先生、本研究を遂行するにあたり、組織のサンプリングや測定にご指導ご協力いただいた、流通科学大学人間社会学部人間健康学科 准教授 北村裕美先生、立命館大学スポーツ健康科学部スポーツ健康学科 助教 内田昌孝先生に心から感謝する。

本研究遂行するにあたり、動物飼育からサンプリング、測定に至るまであらゆる面でご協力頂いた川崎医療福祉大学大学院医療技術学研究科健康体育学専攻の渡邊知央氏、三浦鈴夏氏、横川由佳氏、ならびに研究生 小引菜々子氏、臨床栄養学科 学部生 岡内奈穂氏、河崎愛氏に深謝する。

本研究は以下の研究助成を受けて実施した。ここに深く感謝の意を記す。

- ・平成 30 年度および令和元年度川崎医療福祉大学医療福祉研究費助成 (To H.Y.)
- ・令和元年度および 2 年度公益財団法人ウエスコ学術振興財団研究活動費助成 (To T.A.)

最後に、研究や論文の作成のみならず、研究者あるいは指導者としての価値観、物事の捉え方、指導方法、さらには、多くの貴重な経験をさせて頂いた川崎医療福祉大学医療技術学部健康体育学科 学科長 矢野博已先生、講師 小柳えり先生に、心から厚く感謝申し上げます。

## 【参考文献】

- 厚生労働省. 平成 30 年国民健康栄養調査. **2020**,  
<https://www.mhlw.go.jp/content/000615325.pdf>.
- Alam, N.H.; Ashraf, H.; Sarker, S.A.; Olesen, M.; Troup, J.; Salam, M.A.; Gyr, N.; Meier, R. Efficacy of Partially Hydrolyzed Guar Gum-Added Oral Rehydration Solution in the Treatment of Severe Cholera in Adults. *Digestion* **2008**, 78: 24–29.
- Allen, J.M.; Mailing, L.J.; Niemi, G.M.; Moore, R.; Cook, M.D.; White, B.A.; Holscher, H.D.; Woods, J.A. Exercise Alters Gut Microbiota Composition and Function in Lean and Obese Humans. *Med. Sci. Sports Exerc.* **2018**, 50: 747–757.
- Aoe, S.; Nakamura, F.; Fujiwara, S. Effect of Wheat Bran on Fecal Butyrate-Producing Bacteria and Wheat Bran Combined with Barley on Bacteroides Abundance in Japanese Healthy Adults. *Nutrients* **2018**, 10: 1980.
- Armougom, F.; Henry, M.; Vialettes, B.; Raccach, D.; Raoult, D. Monitoring Bacterial Community of Human Gut Microbiota Reveals an Increase in *Lactobacillus* in Obese Patients and Methanogens in Anorexic Patients. *PLoS ONE* **2009**, 4: e7125.
- Barazzoni, R.; Bischoff, S.C.; Boirie, Y.; Busetto, L.; Cederholm, T.; Dicker, D.; Toplak, H.; Van Gossum, A.; Yumuk, V.; Vettor, R. Sarcopenic Obesity: Time to Meet the Challenge. *Clin. Nutr.* **2018**, 37: 1787-1793.
- Bradley, R.L.; Jeon, J.Y.; Liu, F.F.; Maratos-Flier, E. Voluntary Exercise Improves Insulin Sensitivity and Adipose Tissue Inflammation in Diet-Induced Obese Mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2008**, 295: E586–E594.
- Caporaso, J.G.; Kuczynski, J.; Stombaugh, J.; Bittinger, K.; Bushman, F.D.; Costello, E.K.; Fierer, N.; Peña, A.G.; Goodrich, J.K.; Gordon, J.I.; et al. QIIME Allows Analysis of Highthroughput Community Sequencing Data. *Nat. Methods* **2010**, 7: 335–336.
- Carvalho, B.M.; Guadagnini, D.; Tsukumo, D.M.L.; Schenka, A.A.; Latuf-Filho, P.; Vassallo, J.; Dias, J.C.; Kubota, L.T.; Carvalheira, J.B.C.; Saad, M.J.A. Modulation

- of Gut Microbiota by Antibiotics Improves Insulin Signalling in High-Fat Fed Mice. *Diabetologia* **2012**, 55: 2823–2834.
- Cerda, B.; Perez, M.; Perez-Santiago, J.D.; Tornero-Aguilera, J.F.; Gonzalez-Soltero, R.; Larrosa, M. Gut Microbiota Modification: Another Piece in the Puzzle of the Benefits of Physical Exercise in Health? *Front. Physiol.* **2016**, 7: 51.
- Clarke, S.F.; Murphy, E.F.; O'Sullivan, O.; Lucey, A.J.; Humphreys, M.; Hogan, A.; Hayes, P.; O'Reilly, M.; Jeffery, I.B.; Wood-Martin, R.; et al. Exercise and Associated Dietary Extremes Impact on Gut Microbial Diversity. *Gut* **2014**, 63: 1913–1920.
- Cole, J.R.; Wang, Q.; Fish, J.A.; Chai, B.; McGarrell, D.M.; Sun, Y.; Brown, C.T.; Porras-Alfaro, A.; Kuske, C.R.; Tiedje, J.M. Ribosomal Database Project: Data and Tools for High throughput rRNA Analysis. *Nucleic Acids Res.* **2014**, 42: D633–D642.
- Conway, B.; Rene, A. Obesity as a Disease: no Lightweight Matter. *Obes. Rev.* **2004**, 5:145-151.
- Corica, F.; Bianchi, G.; Corsonello, A.; Mazzella, N.; Lattanzio, F.; Marchesini, G. Obesity in the Context of Aging: Quality of Life Considerations. *Pharmacoeconomics* **2015**, 33: 655-672.
- Dall'Alba, V.; Silva, F.M.; Antonio, J.P.; Steemburgo, T.; Royer, C.P.; Almeida, J.C.; Gross, J.L.; Azevedo, M.J. Improvement of the Metabolic Syndrome Profile by Soluble Fibre-Guar Gum-in Patients with Type 2 Diabetes: A Randomised Clinical Trial. *Br. J. Nutr.* **2013**, 110: 1601–1610.
- den Besten, G.; Gerding, A.; van Dijk, T.H.; Ciapaite, J.; Bleeker, A.; van Eunen, K.; Havinga, R.; Groen, A.K.; Reijngoud, D.J.; Bakker, B.M. Protection against the Metabolic Syndrome by Guar Gum-Derived Short-Chain Fatty Acids Depends on Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  and Glucagon-Like Peptide-1. *PLoS ONE* **2015**, 10: e0136364.
- Durk, R.P.; Castillo, E.; Márquez-Magaña, L.; Grosicki, G.J.; Bolter, N.D.; Lee, C.M.; Bagley, J.R. Gut Microbiota Composition is Related to Cardiorespiratory Fitness in



- Healthy Young Adults. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* **2019**, 29: 249–253.
- Fruchterman, T.; Reingold, E. Graph Drawing by Force-Directed Placement. *Softw. Pract. Exp.* **1991**, 21: 1129–1164.
- Fu, X.; Li, R.; Zhang, T.; Li, M.; Mou, H. Study on the Ability of Partially Hydrolyzed Guar Gum to Modulate the Gut Microbiota and Relieve Constipation. *J. Food Biochem.* **2019**, 43: e12715.
- Furnari, M.; Parodi, A.; Gemignani, L.; Giannini, E.G.; Marengo, S.; Savarino, E.; Assandri, L.; Fazio, V.; Bonfanti, D.; Inferrera, S.; et al. Clinical Trial: The Combination of Rifaximin with Partially Hydrolysed Guar Gum Is More Effective than Rifaximin Alone in Eradicating Small Intestinal Bacterial Overgrowth. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2010**, 32: 1000–1006.
- Giannini, E.G.; Mansi, C.; Dulbecco, P.; Savarino, V. Role of Partially Hydrolyzed Guar Gum in the Treatment of Irritable Bowel Syndrome. *Nutrition* **2006**, 22: 334–342.
- Hassan, A.M.; Mancano, G.; Kashofer, K.; Fröhlich, E.E.; Matak, A.; Mayerhofer, R.; Reichmann, F.; Olivares, M.; Neyrinck, A.M.; Delzenne, N.M.; et al. High-Fat Diet Induces Depression-Like Behaviour in Mice Associated with Changes in Microbiome, Neuropeptide Y, and Brain Metabolome. *Nutr. Neurosci.* **2019**, 22: 877–893.
- Hills, R.D. Jr.; Pontefract, B.A.; Mishcon, H.R.; Black, C.A.; Sutton, S.C.; Theberge, C.R. Gut Microbiome: Profound Implications for Diet and Disease. *Nutrients* **2019**, 11: E1613.
- Ishihara, K.; Taniguchi, H. Fat Max as an Index of Aerobic Exercise Performance in Mice during Uphill Running. *PLoS ONE* **2018**, 13: e0193470.
- Ji-Lin, D.; Ying-ying, Z.; Lin, L.; Rui-ling, S.; Hong, L. Effect of Oat Soluble and Insoluble  $\beta$ -Glucan on Lipid Metabolism and Intestinal *Lactobacillus* in High-Fat Diet-Induced Obese Mice. *J. Food Nutr. Res.* **2014**, 2: 510–516.
- Karl, J.P.; Hatch, A.M.; Arcidiacono, S.M.; Pearce, S.C.; Pantoja-Feliciano, I.G.; Doherty,

- L.A.; Soares, J.W. Effects of Psychological, Environmental and Physical Stressors on the Gut Microbiota. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*: 2013.
- Koh, A.; De Vadder, F.; Kovatcheva-Datchary, P.; Backhed, F. From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. *Cell* **2016**, *165*: 1332–1345.
- Kondo, T.; Kishi, M.; Fushimi, T.; Kaga, T. Acetic Acid Upregulates the Expression of Genes for Fatty Acid Oxidation Enzymes in Liver to Suppress Body Fat Accumulation. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*: 5982–5986.
- Krumbeck J.A.; Walter, J.; Hutkins, R.W. Synbiotics for Improved Human Health: Recent Developments, Challenges, and Opportunities. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **2018**, *9*: 451-479.
- Liu, D.; Huang, J.; Luo, Y.; Wen, B.; Wu, W.; Zeng, H.; Zhonghua, L. Fuzhuan Brick Tea Attenuates High-Fat Diet-Induced Obesity and Associated Metabolic Disorders by Shaping Gut Microbiota. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*: 13589–13604.
- Mailing, L.J.; Allen, J.M.; Buford, T.W.; Fields, C.J.; Woods, J.A. Exercise and the Gut Microbiome: A Review of the Evidence, Potential Mechanisms, and Implications for Human Health. *Exerc. Sport. Sci. Rev.* **2019**, *47*: 75–85.
- Malnick, S.D.H.; Knobler, H. The Medical Complications of Obesity. *QJM.* **2006**, *99*: 565-579.
- Markowiak, P.; Slizewska, K. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients* **2017**, *9*: E1021.
- Matsumoto, M.; Inoue, R.; Tsukahara, T.; Ushida, K.; Chiji, H.; Matsubara, N.; Hara, H. Voluntary Running Exercise Alters Microbiota Composition and Increases n-Butyrate Concentration in the Rat Cecum. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2008**, *72*: 572–576.
- McRorie, J.W., Jr.; McKeown, N.M. Understanding the Physics of Functional Fibers in the Gastrointestinal Tract: An Evidence-Based Approach to Resolving Enduring

- Misconceptions about Insoluble and Soluble Fiber. *J. Acad. Nutr. Diet.* **2017**, 117: 251–264.
- Mika, A.; Van Treuren, W.; González, A.; Herrera, J.J.; Knight, R.; Fleshner, M. Exercise is More Effective at Altering Gut Microbial Composition and Producing Stable Changes in Lean Mass in Juvenile Versus Adult Male F344 Rats. *PLoS ONE* **2015**, 10: e0125889.
- Miller, T.L. The Pathway of Formation of Acetate and Succinate from Pyruvate by *Bacteroides Succinogenes*. *Archive. Microbiol.* **1978**, 117: 145–152.
- Million, M.; Angelakis, E.; Paul, M.; Armougom, F.; Leibovici, L.; Raoult, D. Comparative Meta-Analysis of the Effect of *Lactobacillus* Species on Weight Gain in Humans and Animals. *Microb. Pathog.* **2012**, 53: 100–108.
- Murphy, E.A.; Velazquez, K.T.; Herbert, K.M. Influence of High-Fat Diet on Gut Microbiota: a Driving Force for Chronic Disease Risk. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **2015**, 18: 515–520.
- Nakaji, S.; Sugawara, K.; Saito, D.; Yoshioka, Y.; MacAuley, D.; Bradley, T.; Kernohan, G.; Baxter, D. Trends in Dietary Fiber Intake in Japan Over the Last Century. *Eur. J. Nutr.* **2002**, 41: 222-7.
- Neyrinck, A.M.; Van Hée, V.F.; Bindels, L.B.; De Backer, F.; Cani, P.D.; Delzenne, N.M. Polyphenol-rich Extract of Pomegranate Peel Alleviates Tissue Inflammation and Hypercholesterolaemia in High-Fat Diet-Induced Obese Mice: Potential Implication of the Gut Microbiota. *Br. J. Nutr.* **2013**; 109: 802-809.
- Ng, M.; Fleming, T.; Robinson, M.; Thomson, B.; Graetz, N.; Margono, C.; Mullany, E.C.; Biryukov, S.; Abbafati, C.; Abera, S.F.; et al. Global, Regional and National Prevalence of Overweight and Obesity in Children and Adults 1980-2013: A Systematic Analysis. *Lancet* **2014**, 384: 766–781.
- Oyanagi, E.; Uchida, M.; Kremenik, M.J.; Yano, H. Altered Gut Microbiota by Voluntary Exercise Induces High Physical Activity in High-Fat Diet Mice. *J. Phys. Fitness*

*Sports Med.* **2018**, 7: 81–85.

Pachikian, B.D.; Neyrinck, A.M.; Porto, L.; De Backer, F.C.; Sohet, F.M.; Hacquebard, M.; Carpentier, Y.A.; Cani, P.D.; Delzenne, N.M. Involvement of Gut Microbial Fermentation in the Metabolic Alterations Occurring in n-3 Polyunsaturated Fatty Acids-Depleted Mice. *Nutr. Metab. (Lond)*. **2011**, 8: 44.

Pylkas, A.M.; Juneja, L.R.; Slavin, J.L. Comparison of Different Fibers for in Vitro Production of Short Chain Fatty Acids by Intestinal Microflora. *J. Med. Food* **2005**, 8: 113–116.

Rao, T.P.; Quartarone, G. Role of Guar Fiber in Improving Digestive Health and Function. *Nutrition* **2019**, 59: 158–169.

Reider, S.J.; Moosmang, S.; Tragust, J.; Trgovec-Greif, L.; Tragust, S.; Perschy, L.; Przysiecki, N.; Sturm, S.; Tilg, H.; Stuppner, H.; et al. Prebiotic Effects of Partially Hydrolyzed Guar Gum on the Composition and Function of the Human Microbiota-Results from the PAGODA Trial. *Nutrients* **2020**, 12: 1257.

Rinninella, E.; Raoul, P.; Cintoni, M.; Franceschi, F.; Miggiano, G.A.D.; Gasbarrini, A.; Mele, M.C. What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms* **2019**, 7: 14.

Romano, C.; Comito, D.; Famiani, A.; Calamara, S.; Loddo, I. Partially Hydrolyzed Guar Gum in Pediatric Functional Abdominal Pain. *World J. Gastroenterol.* **2013**, 19: 235–240.

Segata, N.; Izard, J.; Waldron, L.; Gevers, D.; Miropolsky, L.; Garrett, W.S.; Huttenhower, C. Metagenomic Biomarker Discovery and Explanation. *Genome Biol.* **2011**, 12: R60.

Slavin, J. Fiber and Prebiotics: Mechanisms and Health Benefits. *Nutrients* **2013**, 5: 1417–1435.

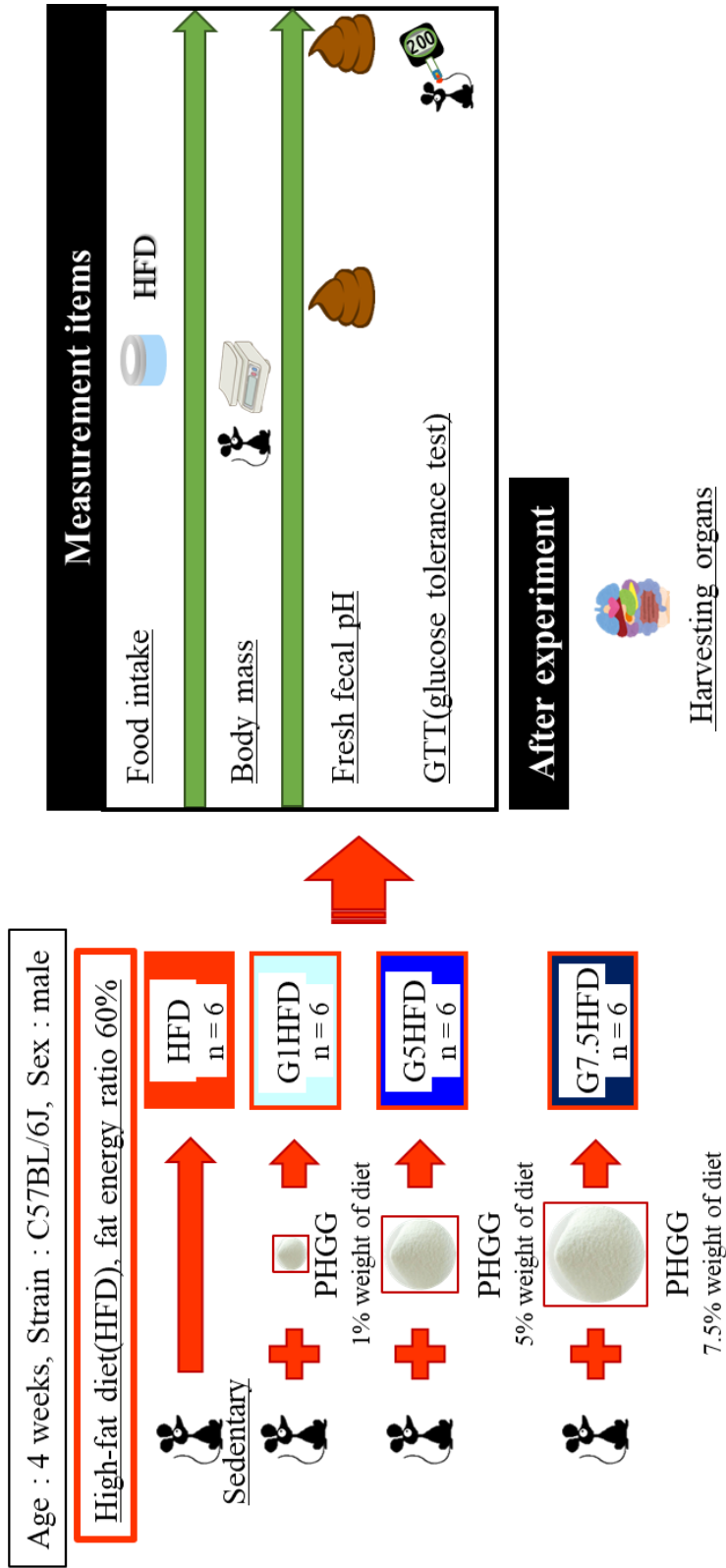
Turnbaugh, P.J.; Hamady, M.; Yatsunenko, T.; Cantarel, B.L.; Duncan, A.; Ley, R.E.;

- Sogin, M.L.; Jones, W.J.; Roe, B.A.; Affourtit, J.P. et al. A Core Gut Microbiome in Obese and Lean Twins. *Nature* **2009**, 457: 480–484.
- Turnbaugh, P.J.; Ley, R.E.; Mahowald, M.A.; Magrini, V.; Mardis, E.R.; Gordon, J.I. An Obesity-Associated Gut Microbiome with Increased Capacity for Energy Harvest. *Nature* **2006**, 444: 1027–1031.
- Velazquez, M.; Davies, C.; Marett, R.; Slavin, J.L.; Feirtag, J.M. Effect of Oligosaccharides and Fiber Substitutes on Short-Chain Fatty Acid Production by Human Faecal Microflora. *Anaerobe* **2000**, 6: 87–92.
- Watanabe, C.; Kobiki, N.; Aoki, T.; Kremenik, M.J.; Nagano, T.; Yano, H.; Oyanagi, E. Effects of Voluntary Exercise on Plasma and Urinary Metabolites and Gut Microbiota in Mice Fed with High-Fat-Diet. *J. Phys. Fitness Sports Med.* **2020**; 9: 205-215.
- Weaver, C.M.; Martin, B.R.; Nakatsu, C.H.; Armstrong, A.P.; Clavijo, A.; McCabe, L.D.; McCabe, G.P.; Duignan, S.; Schoterman, M.H.; van den Heuvel, E.G. Galactooligosaccharides Improve Mineral Absorption and Bone Properties in Growing Rats Through Gut Fermentation. *J. Agric. Food. Chem.* **2011**, 59: 6501-6510.
- Weiss, G.A.; Hennet, T. Mechanisms and Consequences of Intestinal Dysbiosis. *Cell Mol. Life Sci.* **2017**, 74: 2959–2977.
- Weitkunat, K.; Stuhlmann, C.; Postel, A.; Rumberger, S.; Fankhänel, M.; Woting, A.; Petzke, K.J.; Gohlke, S.; Schulz, T.J.; Blaut, M.; et al. Short-Chain Fatty Acids and Inulin, but not Guar Gum, Prevent Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance Through Differential Mechanisms in Mice. *Sci. Rep.* **2017**, 7: 6109.
- Wrzosek, L.; Miquel, S.; Noordine, M.L.; Bouet, S.; Joncquel, Chevalier-Curt. M.; Robert, V.; Philippe, C.; Bridonneau, C.; Cherbuy, C.; Robbe-Masselot, C.; et al. *Bacteroides thetaiotaomicron* and *Faecalibacterium prausnitzii* Influence the Production of Mucus Glycans and the Development of Goblet Cells in the Colonic Epithelium of

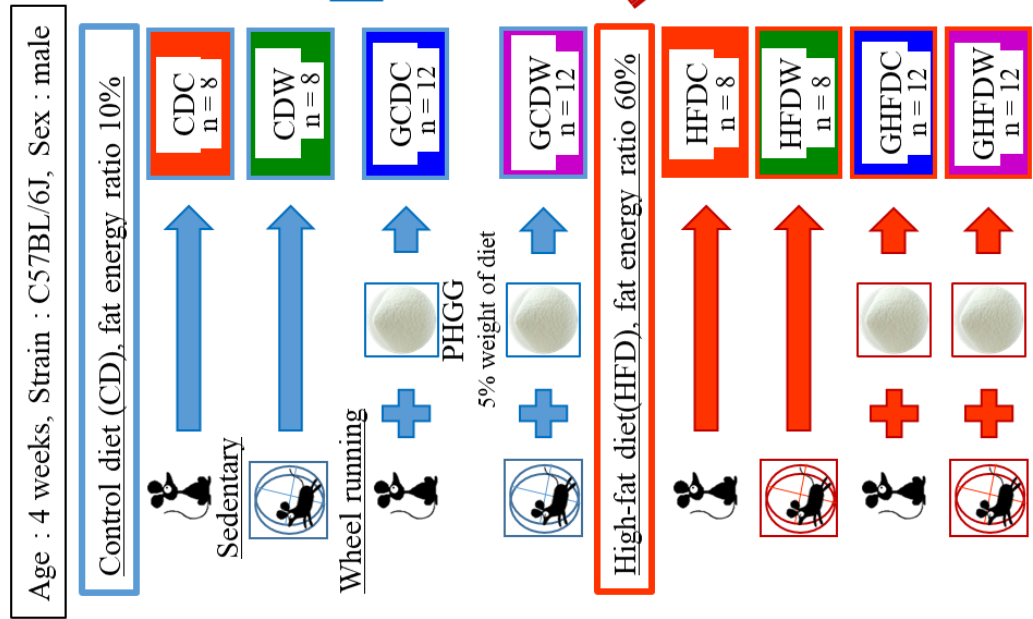
a Gnotobiotic Model Rodent. *BMC Biol.* **2013**, 11: 61.

Yamashita, H.; Fujisawa, K.; Ito, E.; Idei, S.; Kawaguchi, N.; Kimoto, M.; Hiemori, M.; Tsuji, H. Improvement of Obesity and Glucose Tolerance by Acetate in Type 2 Diabetic Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) Rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2007**, 71: 1236–1243.

Yasukawa, Z.; Naito, Y.; Takagi, T.; Mizushima, K.; Tokunaga, M.; Ishihara, N.; Juneja, L.R.; Yoshikawa, T. Partially Hydrolyzed Guar Gum Affects the Expression of Genes Involved in Host Defense Functions and Cholesterol Absorption in Colonic Mucosa of *db/db* Male Mice. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **2012**, 51: 33–38.



**Figure 1** Schematic illustration of experimental design of experiment I.  
HFD: high-fat-diet (HFD) (n=6), G1HFD: PHGG-intake (G) of 1% by weight of HFD (n=6), G5HFD: 5%PHGG (n=6) and G7.5HFD: 7.5%PHGG (n=6).



**Figure 2 Schematic**

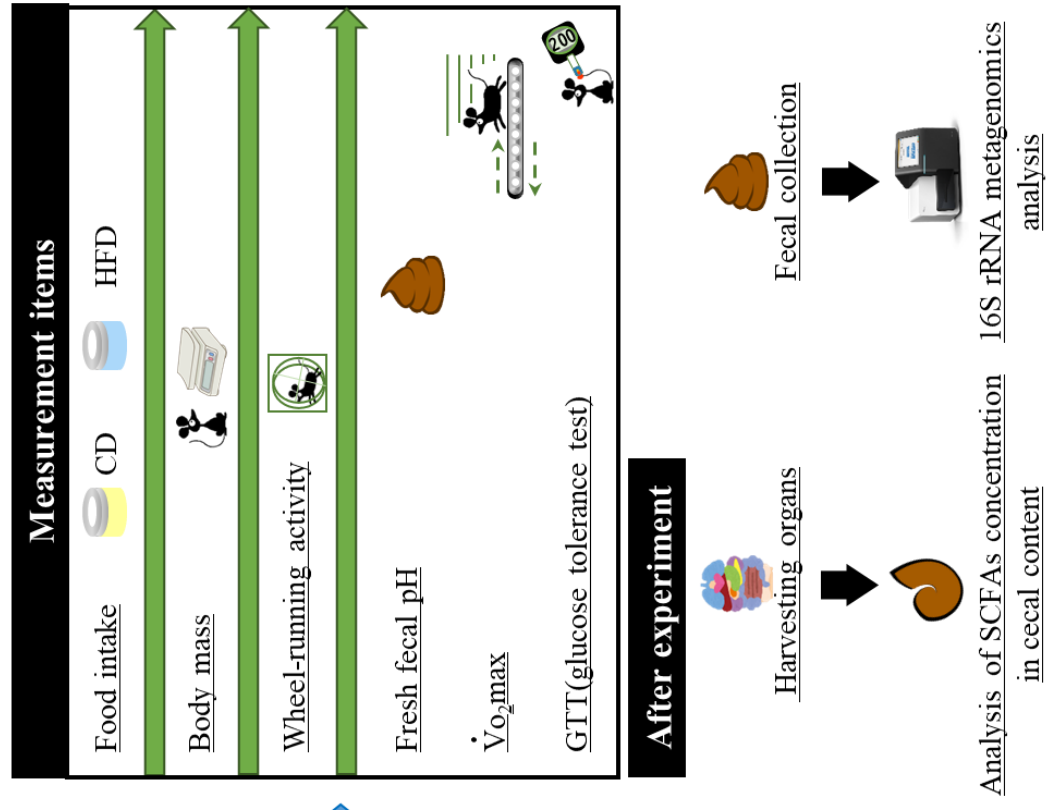


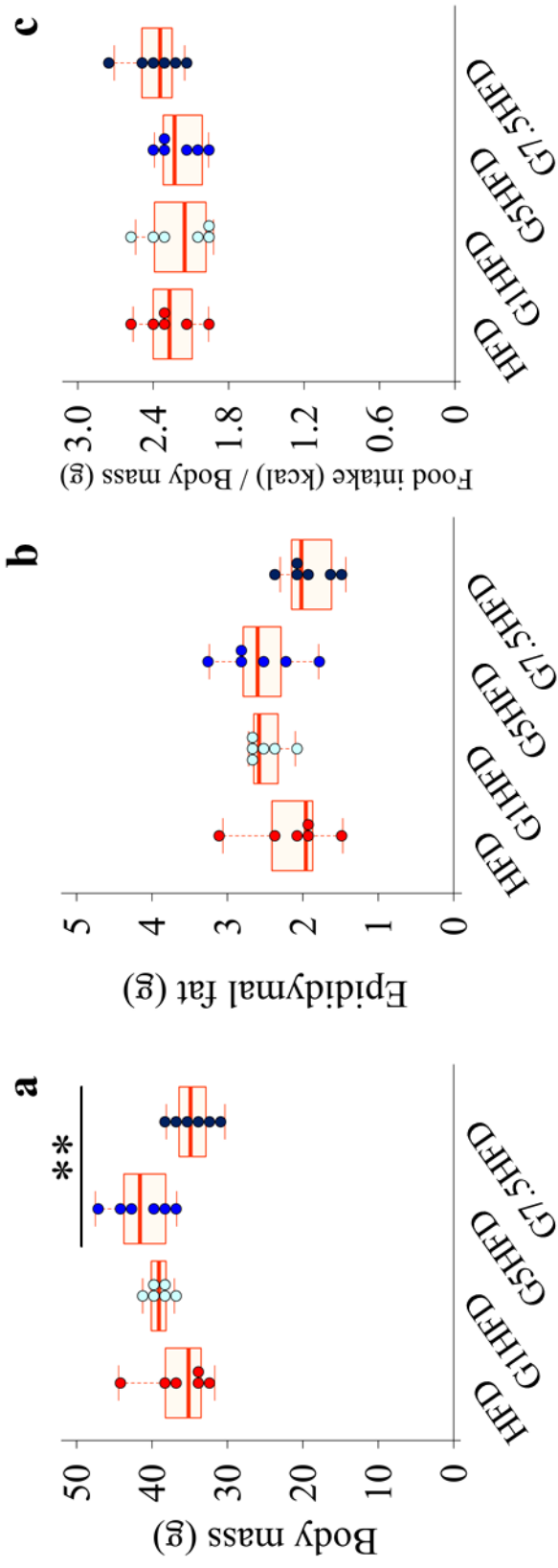
illustration of experimental design of experiment II.

CDC: control-diet (CD) and sedentary control(C) (n=8), GCDC: PHGG intake (G) and CDC (n=12), CDW: CD and wheel running (W) (n=8), GCDW (n=12), HFDC: high-fat-diet (HFD) and C (n=8), GHFDC (n=12), HFDW (n=8), and GHFDW (n=12).

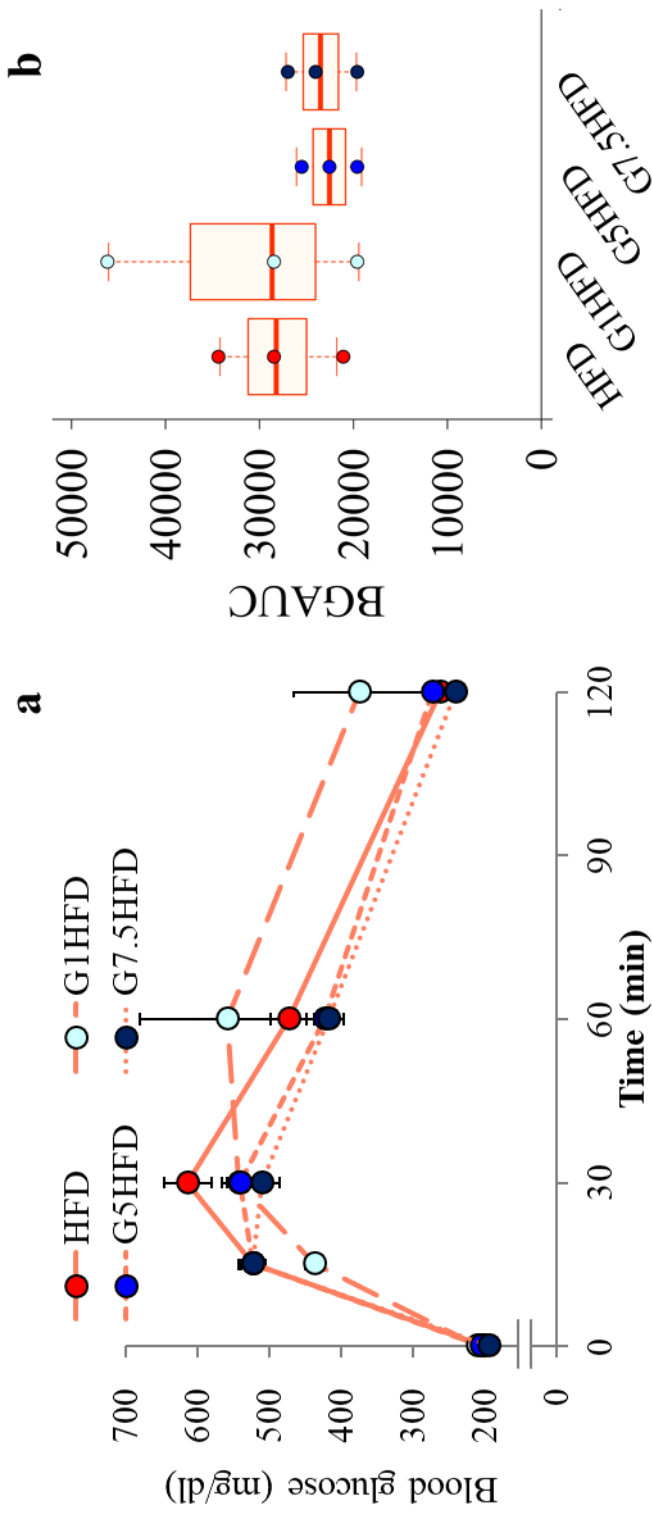


Table 1 Composition of the experimental diets

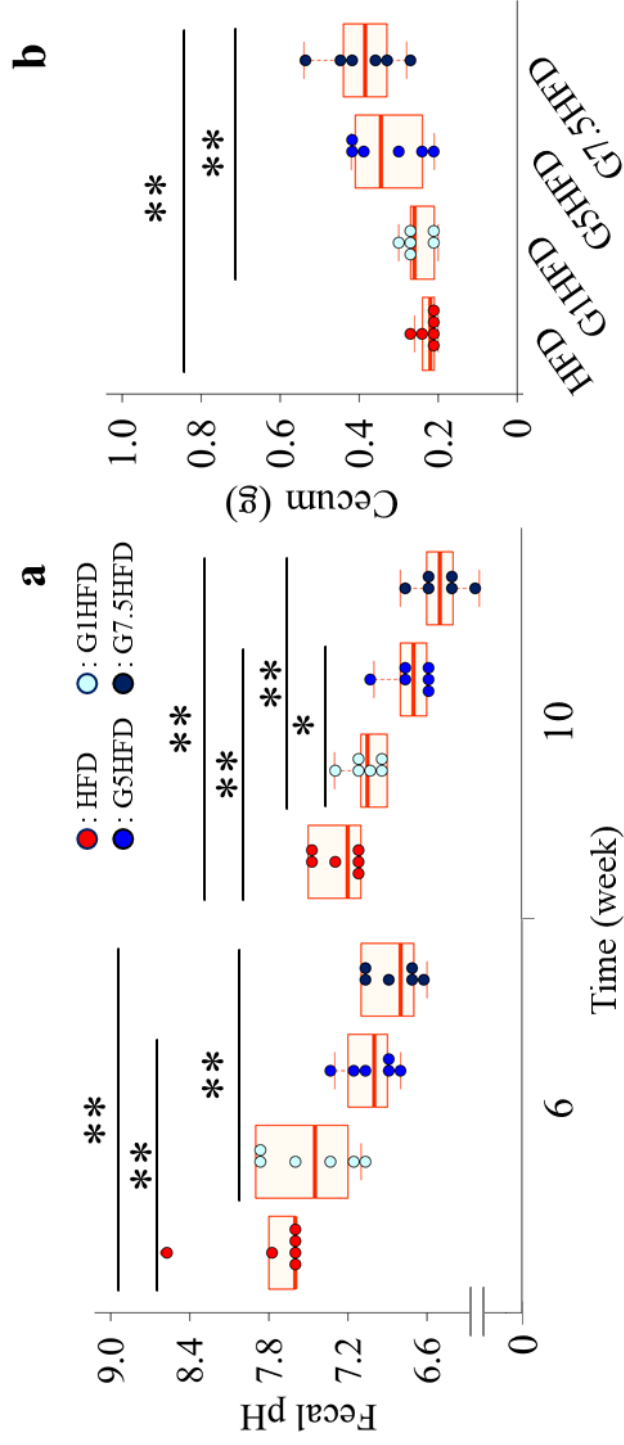
Contents	CD	GCD	HFD	G1HFD	G5HFD	G7.5HFD
	kcal	kcal	kcal	kcal	kcal	kcal
Protein	20	19	20	20	20	19
Carbohydrate	70	71	20	20	22	23
Fat	10	10	60	60	59	58
Total	100	100	100	100	100	100
kcal/g	4.0	3.9	5.6	5.6	5.4	5.3
	g%	g%	g%	g%	g%	g%
<b>Protein</b>	<b>20.2</b>	<b>19.0</b>	<b>28.0</b>	<b>27.7</b>	<b>26.4</b>	<b>25.6</b>
Casein	19.9	18.7	27.6	27.3	26.0	25.2
L-Cystine	0.3	0.3	0.4	0.4	0.4	0.4
<b>Carbohydrate</b>	<b>70.6</b>	<b>72.0</b>	<b>32.2</b>	<b>33.0</b>	<b>36.2</b>	<b>38.2</b>
Corn Starch	50.4	47.4	0.0	0.0	0.0	0.0
Maltodextrin	12.4	11.7	17.3	17.1	16.3	15.7
Sucrose	10.7	10.1	14.9	14.7	14.0	13.6
Cellulose	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
PHGG	0.0	5.0	0.0	1.0	5.0	7.5
<b>Fat</b>	<b>4.5</b>	<b>4.2</b>	<b>37.3</b>	<b>36.9</b>	<b>35.1</b>	<b>34.0</b>
Soybean Oil	2.5	2.3	3.5	3.4	3.3	3.1
Lard	2.0	1.9	33.8	33.4	31.9	30.9



**Figure 3** The effect of PHGG treatment on body weight (a), food intake (b) and adipose tissue mass (c) in HFD mice. Food intake (kcal/g) showed as total energy intake (kcal) for a week per body mass (g) at final week. The values were expressed as the boxplot. \*\*:  $p < 0.01$ .



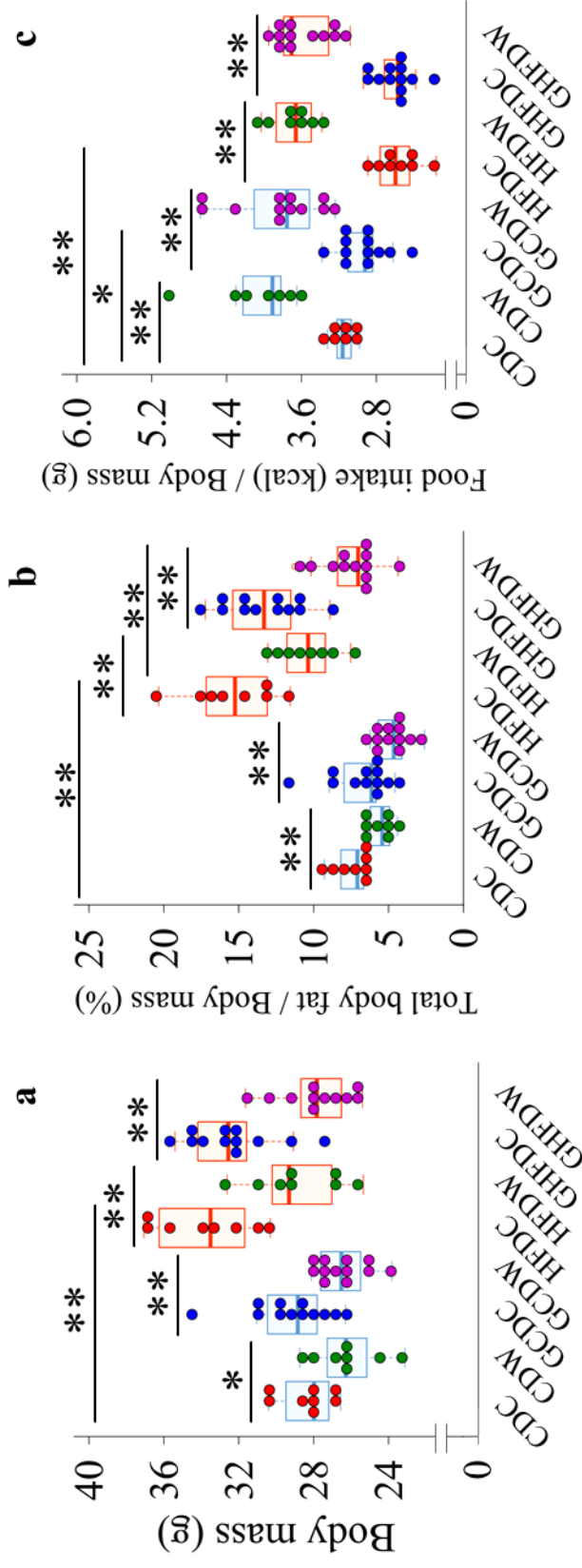
**Figure 4** The effect of PHGG on blood glucose concentration and the incremental area under the curve (AUC) of blood glucose during GTT in HFD mice. Time dependent blood glucose level after glucose load (2 g/kg, i.p.) (a), and the corresponding incremental blood glucose area under the curves (BG AUC) (b). The values were expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. (a) and as the boxplot (b).



**Figure 5** The effect of PHGG treatment on fecal pH and cecum mass in HFD mice.

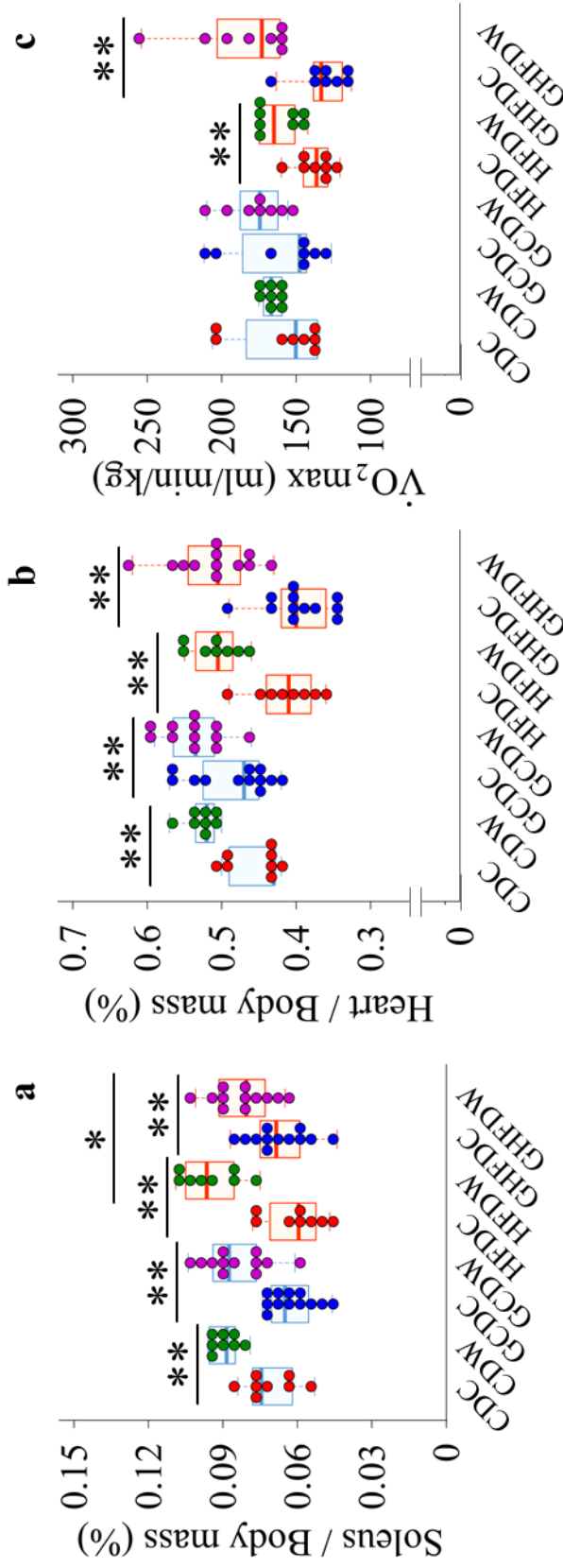
Fecal pH at 6 week and 10 week (a), and cecum mass (b) showed as percentage of body mass after 10 weeks.

The values were expressed as the boxplot. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ .



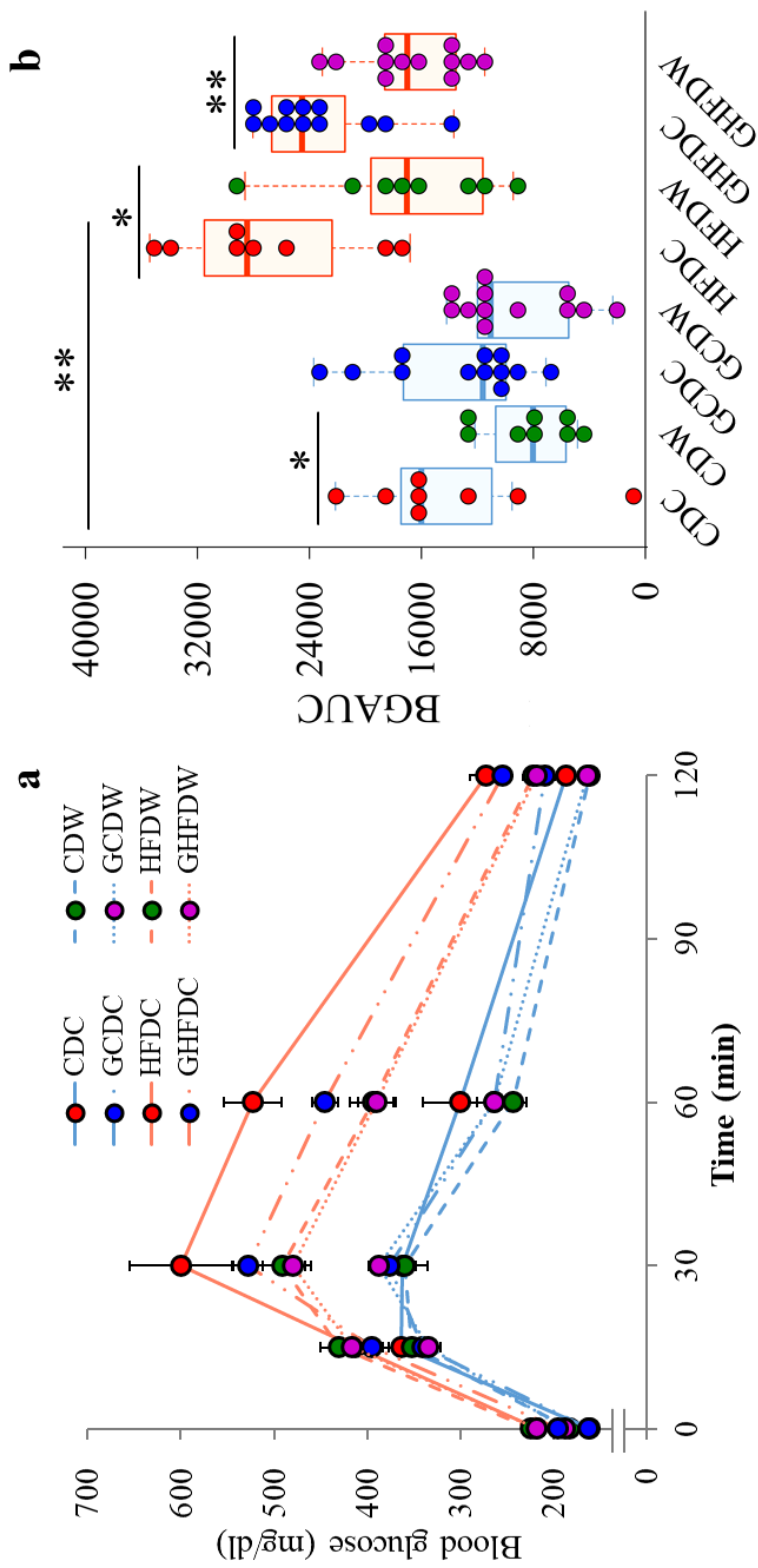
**Figure 6** The complementary effect of PHGG and wheel running on body mass (a), total body fat (b) and food intake (c) in mice under CD and HFD-feeding.

The data in (a)-(c) were shown as percentage of body mass at the end of the experiment II. Total body fat showed as the total amount of epididymal, subcutaneous and visceral fats. Food intake (kcal/g) showed as total energy intake (kcal) for a week per body mass (g) at final week. The values were expressed as the boxplot. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ .



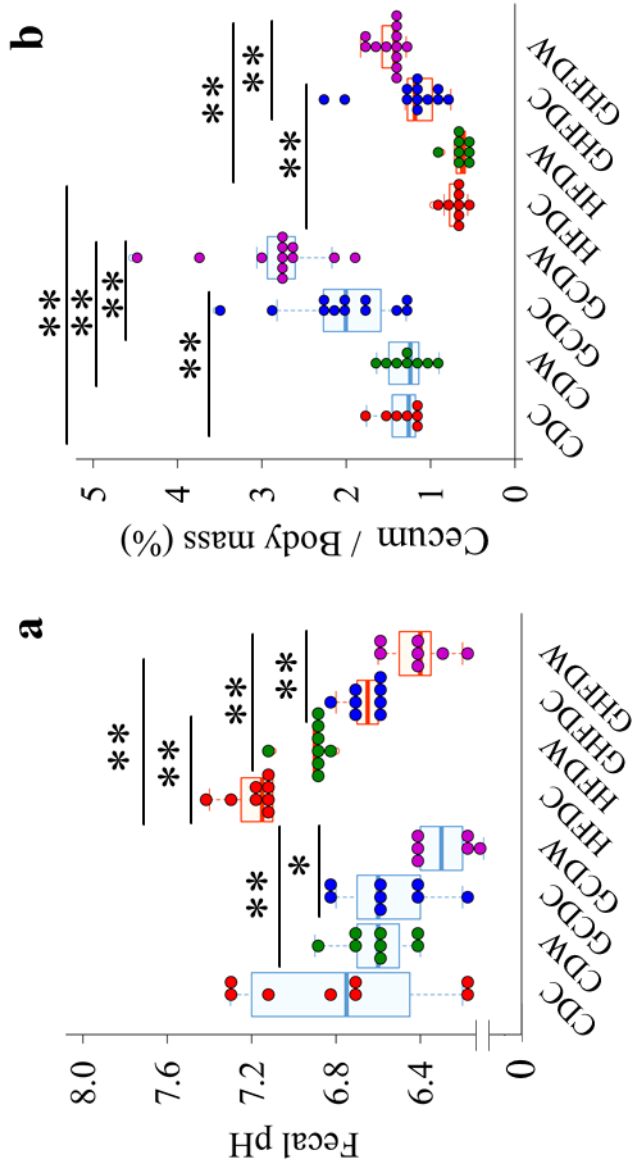
**Figure 7** The complementary effect of PHGG and wheel running on soleus muscle mass (a), heart mass (b) and  $\dot{V}O_2\text{max}$  (c) in mice under CD and HFD-feeding.

The data in (a) and (b) were shown as percentage of body mass at the end of the experiment II.  $\dot{V}O_2\text{max}$  was measured by measuring respiratory gas while running on a treadmill using a mass spectrometer (ALCO). The values were expressed as the boxplot. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ .



**Figure 8** The complementary effect of PHGG and wheel running on blood glucose concentration and the incremental area under the curve (AUC) of blood glucose during GTT in mice under CD and HFD-feeding.

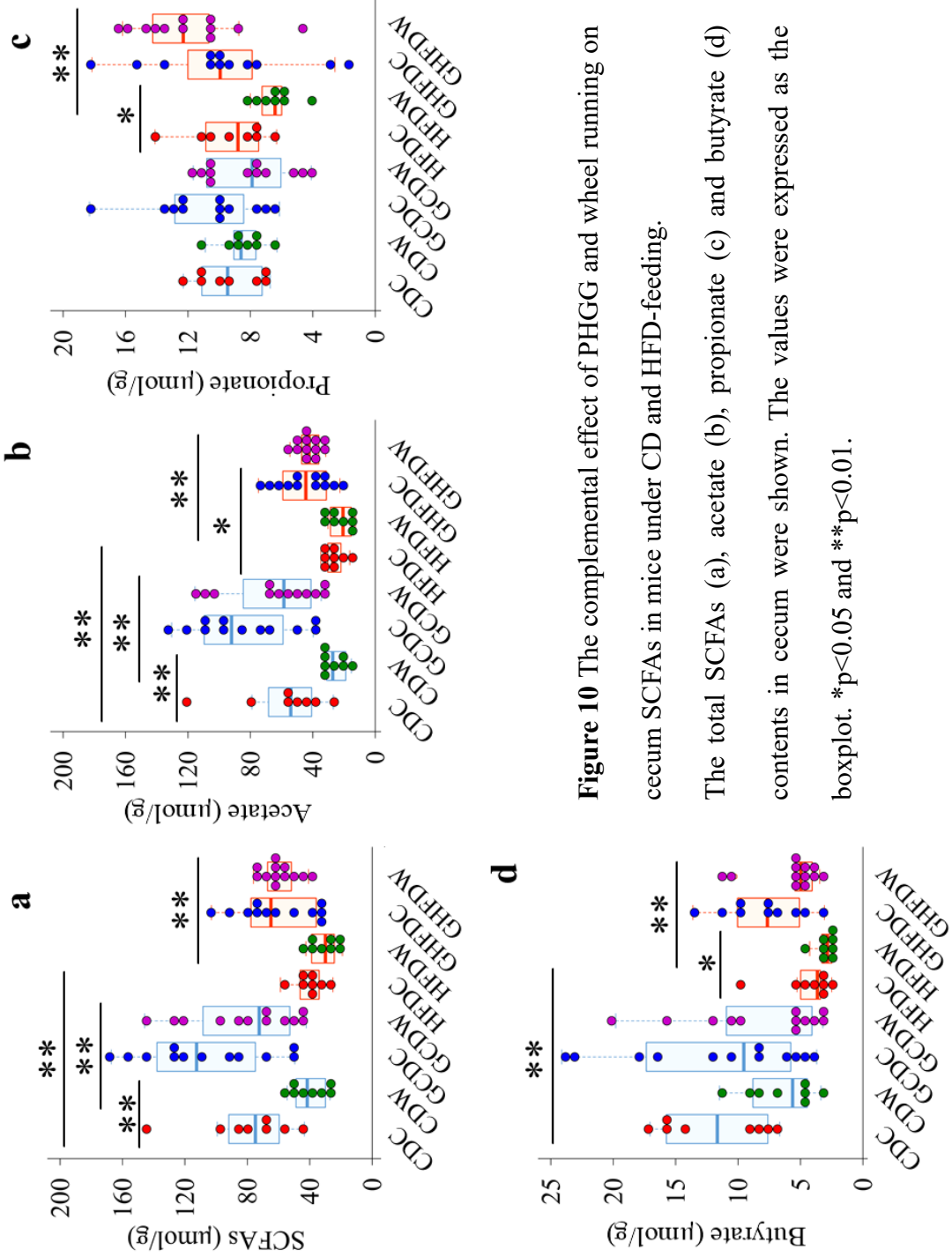
Time dependent blood glucose level after glucose load (2mg/g body mass) into the abdominal cavity (a) and the corresponding incremental blood glucose area under the curves (BGAUC) (b). The values were expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. (a) and as the boxplot (b). \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ .



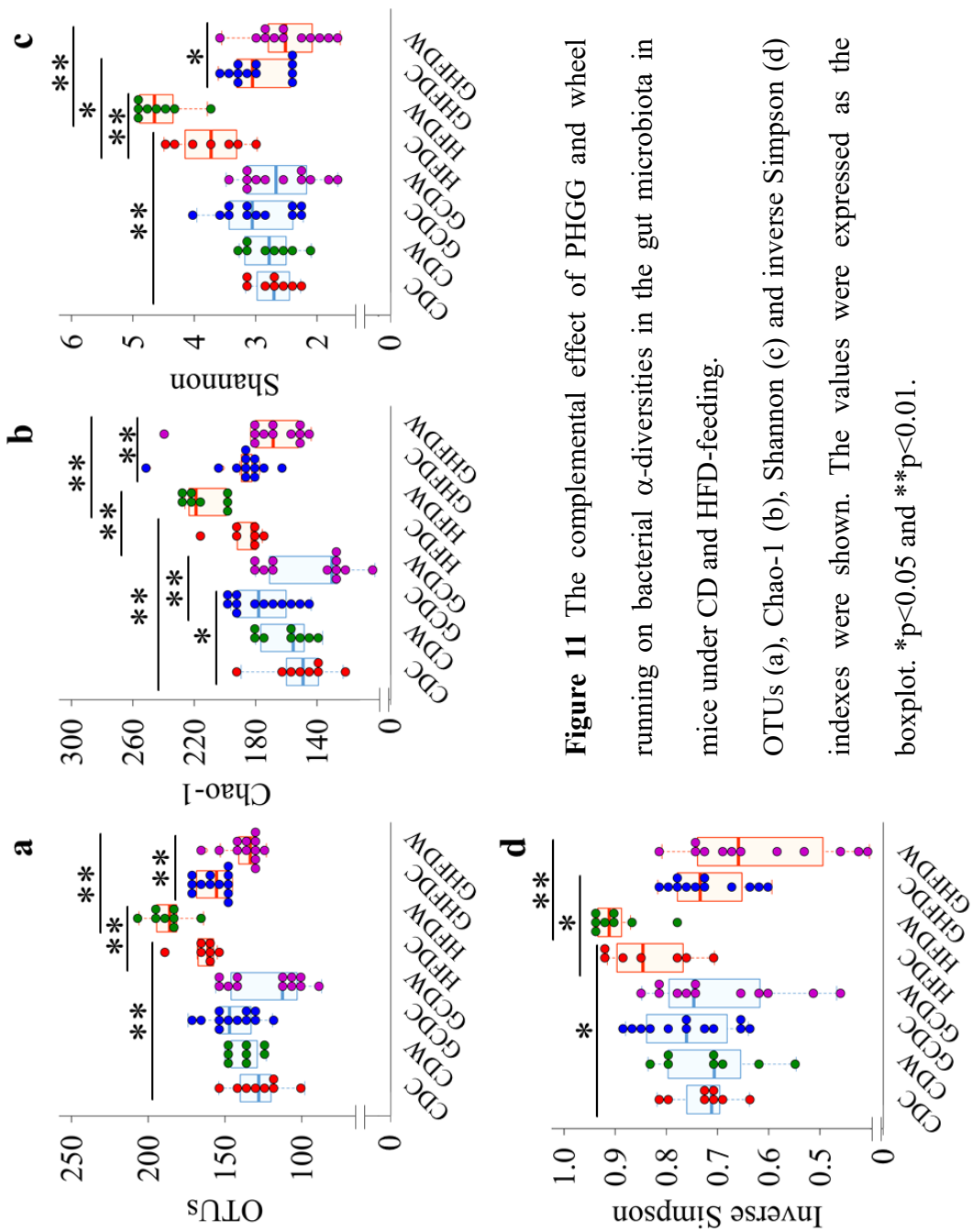
**Figure 9** The complementary effect of PHGG and wheel running on fecal pH and cecum mass in mice under CD and HFD-feeding.

Fecal pH at 6 weeks (a), and cecum mass (b) showed as percentage of body mass after 10 weeks. The values were expressed as the boxplot. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ .

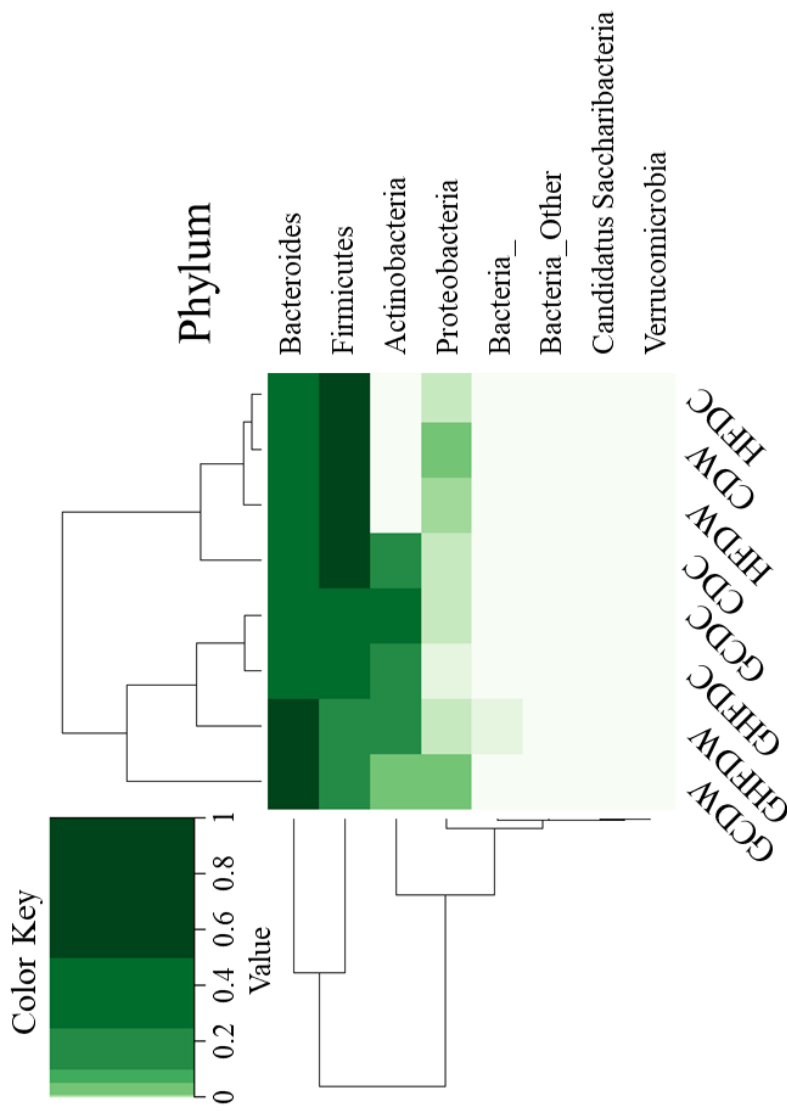




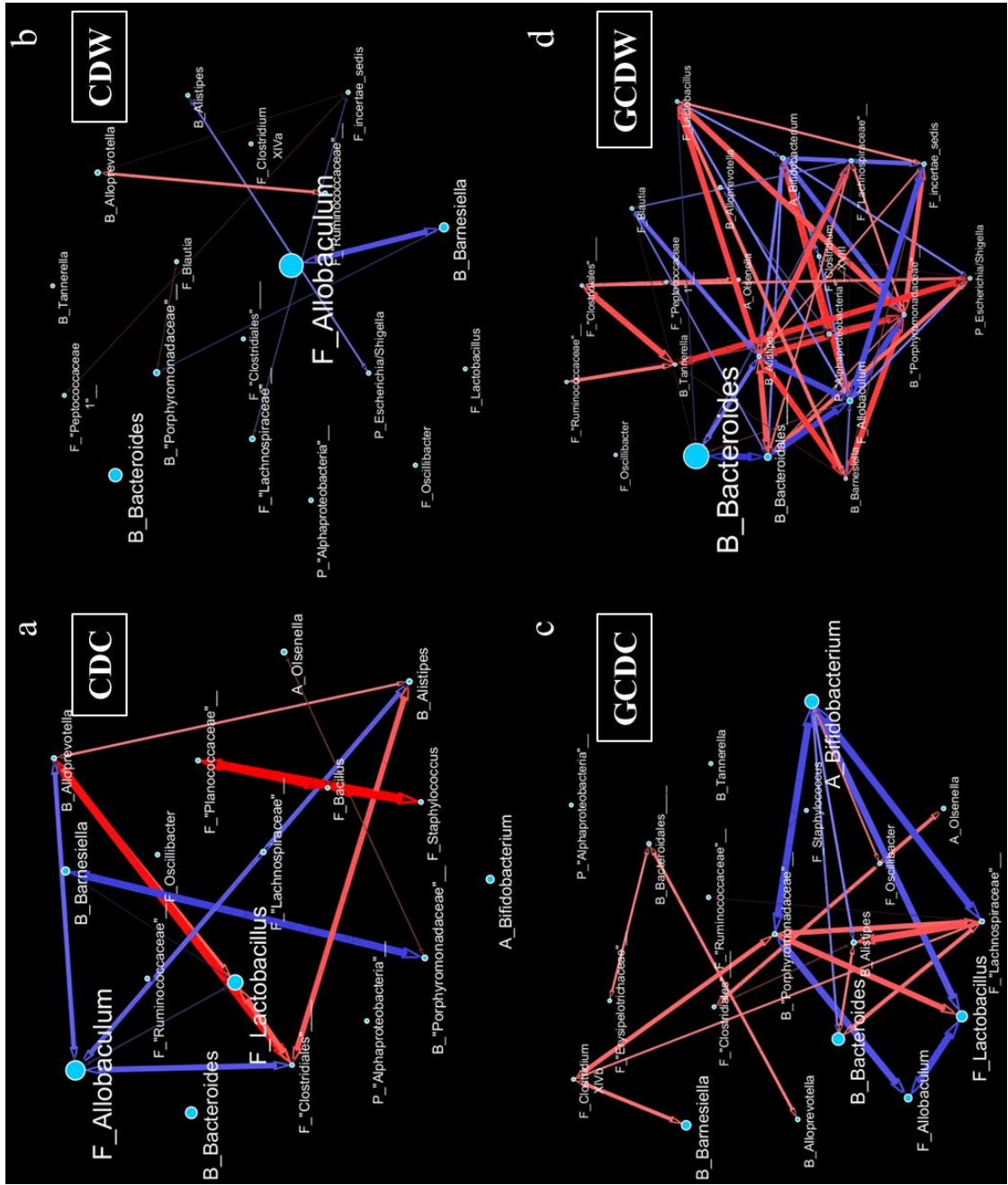
**Figure 10** The complementary effect of PHGG and wheel running on cecum SCFAs in mice under CD and HFD-feeding. The total SCFAs (a), acetate (b), propionate (c) and butyrate (d) contents in cecum were shown. The values were expressed as the boxplot. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ .



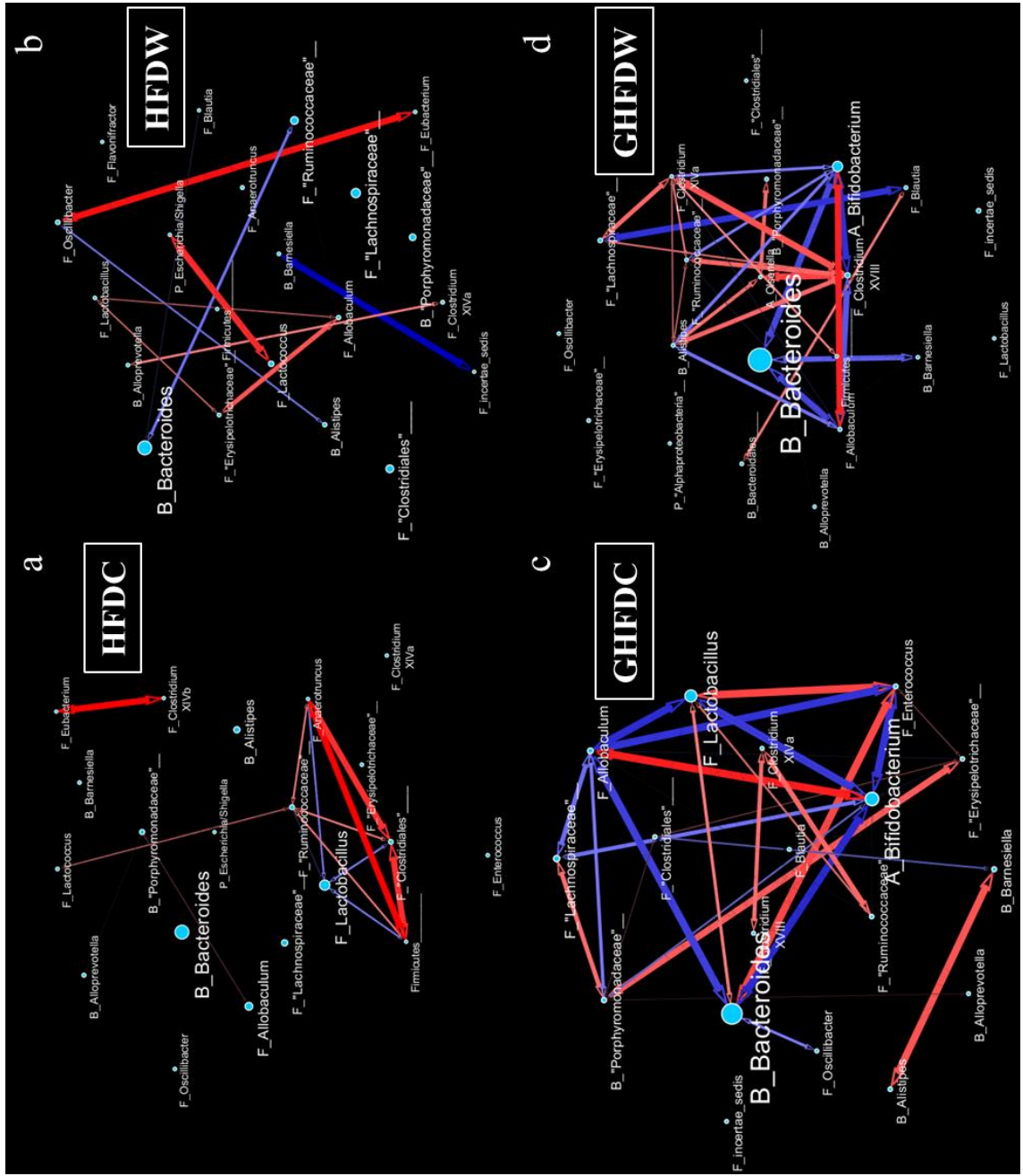
**Figure 11** The complementary effect of PHGG and wheel running on bacterial  $\alpha$ -diversities in the gut microbiota in mice under CD and HFD-feeding. OTUs (a), Chao-1 (b), Shannon (c) and inverse Simpson (d) indexes were shown. The values were expressed as the boxplot. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ .



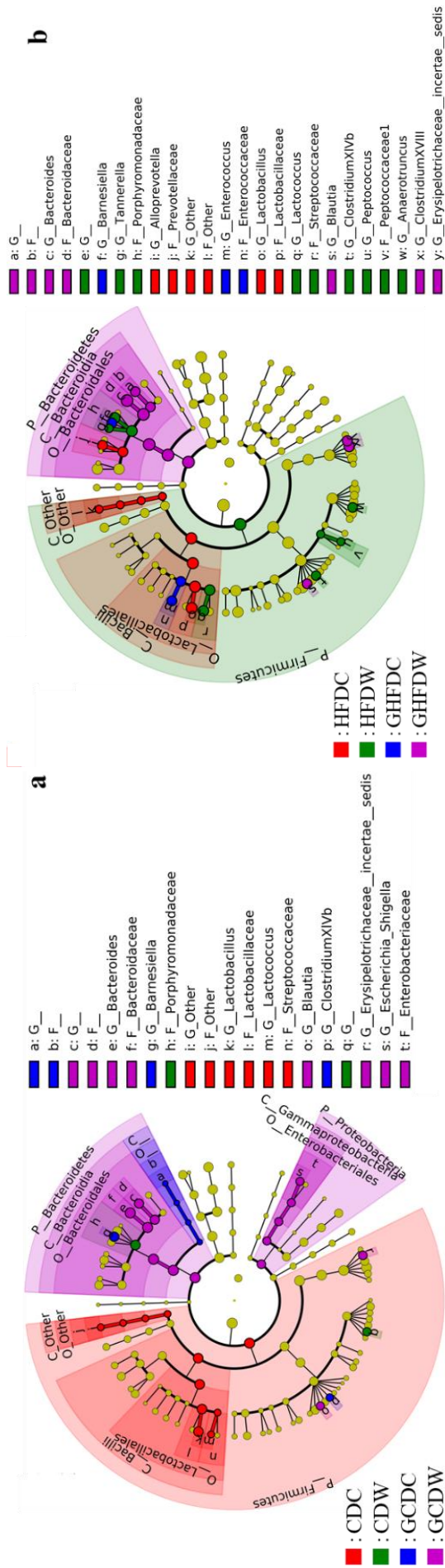
**Figure 12** The complementary effect of PHGG and wheel running on bacterial  $\beta$ -diversities in the gut microbiota in mice under CD and HFD-feeding. The heatmap showed gut microbiota distribution at phyla level of taxon, and the dendrogram showed the clustering of phyla.



**Figure 13** The correlation matrix of gut microbiota at genus level in mice under CD-feeding using Cytoscape network analysis. Within-group correlation between gut microbes at genus level was visualized using the Prefuse Force Directed Layout in the Cytoscape. CDC (a), CDW (b), GCDC (c) and GCDW (d) after 10 weeks. The edges were drawn if  $p$ -value  $< 0.1$ . Red or blue edges indicate a positive or a negative correlation, respectively. The magnitude of correlation coefficient was indicated by the edge color strength and the edge width. Relative abundance of gut microbe was indicated by the node size and the letter size of the bacterial name.

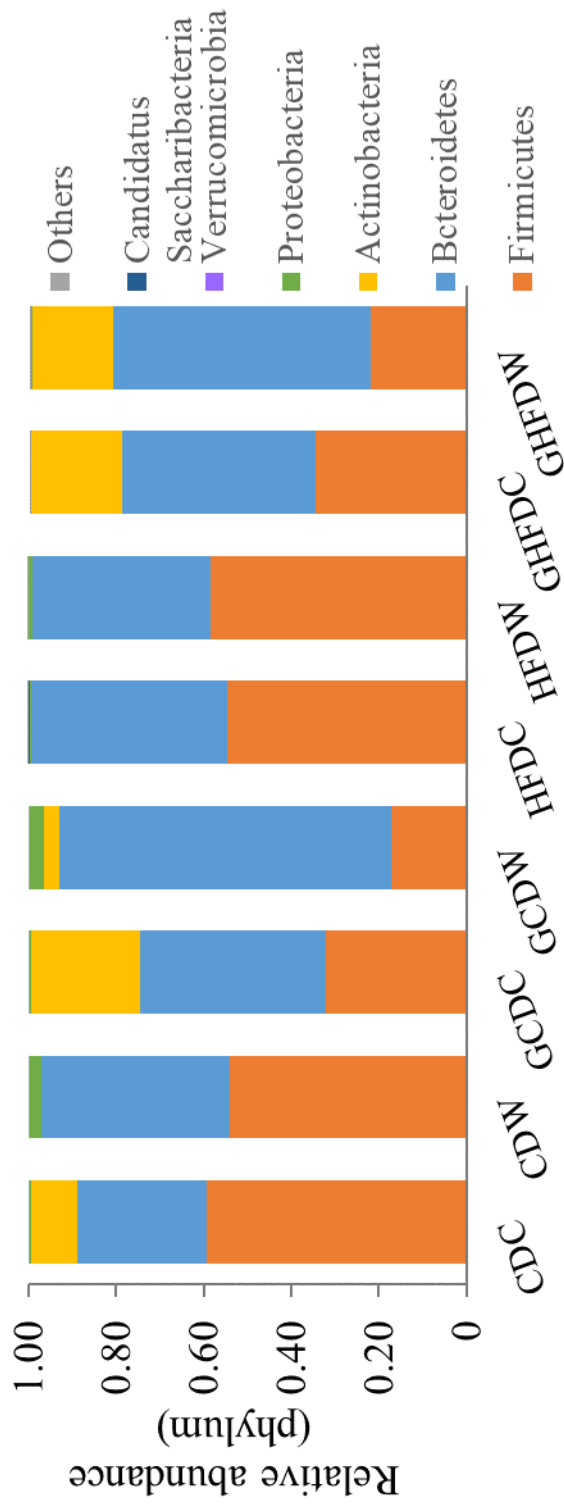


**Figure 14** The correlation matrix of gut microbiota at genus level in mice under HFD feeding using Cytoscape network analysis. Within-group correlation between gut microbes at genus level was visualized using the Prefuse Force Directed Layout in the Cytoscape. HFDC (a), HFDW (b), GHFDC (c) and GHFDW (d) after 10 weeks. The edges were drawn if  $p$ -value < 0.1. Red or blue edges indicate a positive or a negative correlation, respectively. The magnitude of  $p$ -value was indicated by the edge color strength and the edge width. Relative abundance of gut microbe was indicated by the node size and the letter size of the bacterial name.



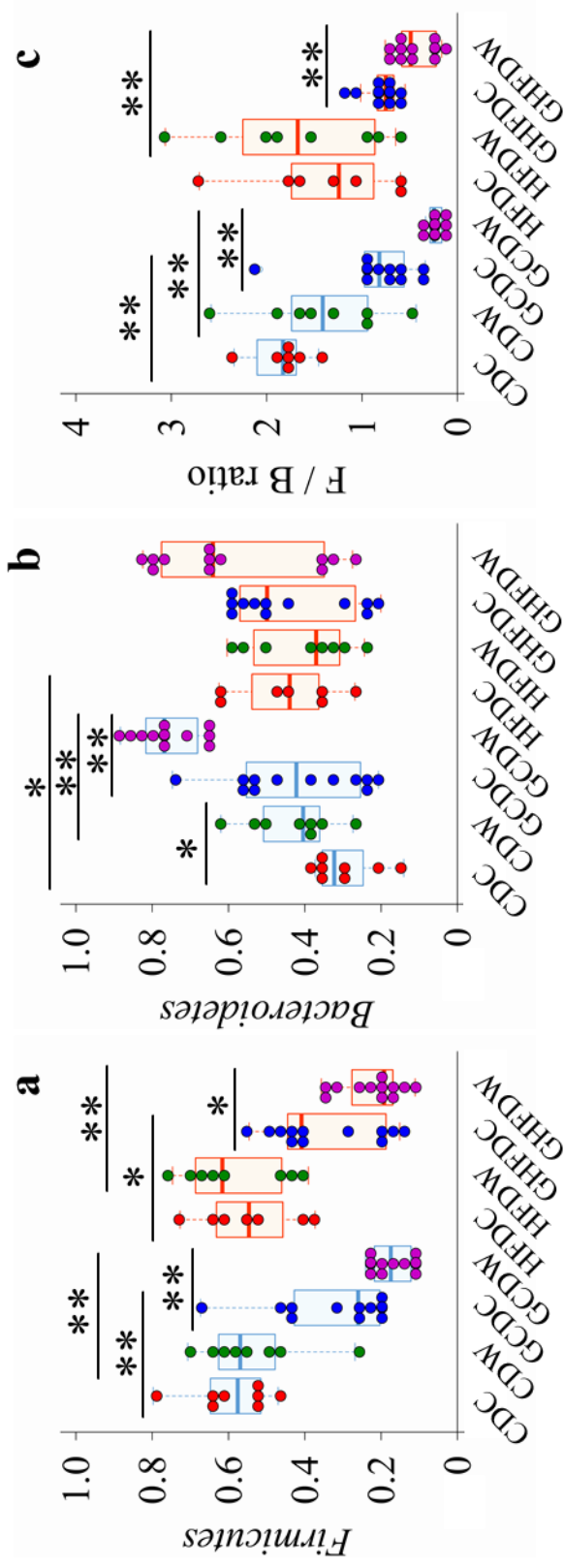
**Figure 15** The biological features of gut microbiota in mice under CD and HFD-feeding represented using the taxonomic cladogram analyzed by the linear discriminant analysis (LDA) effect size (LEfSe).

CD mice (a) and HFD mice (b) were shown. The more the node is located in the center of the cladogram, representing the high level taxon, in contrast, the more the node is located in the periphery of the cladogram, representing the low level taxon. Statistically significant differences in the relative abundance of gut microbes between groups were indicated by clade and node colors. Below the cladogram, bacterial names with statistically significant differences from family level to the genus level are displayed. The taxonomic level of each gut microbe was shown in the first letter of each bacterial name: phylum (P), class (C), order (O), family (F) and genus (G).



**Figure 16** The complementary effect of PHGG and wheel running on gut microbiota at phylum level in mice under CD and HFD-feeding.

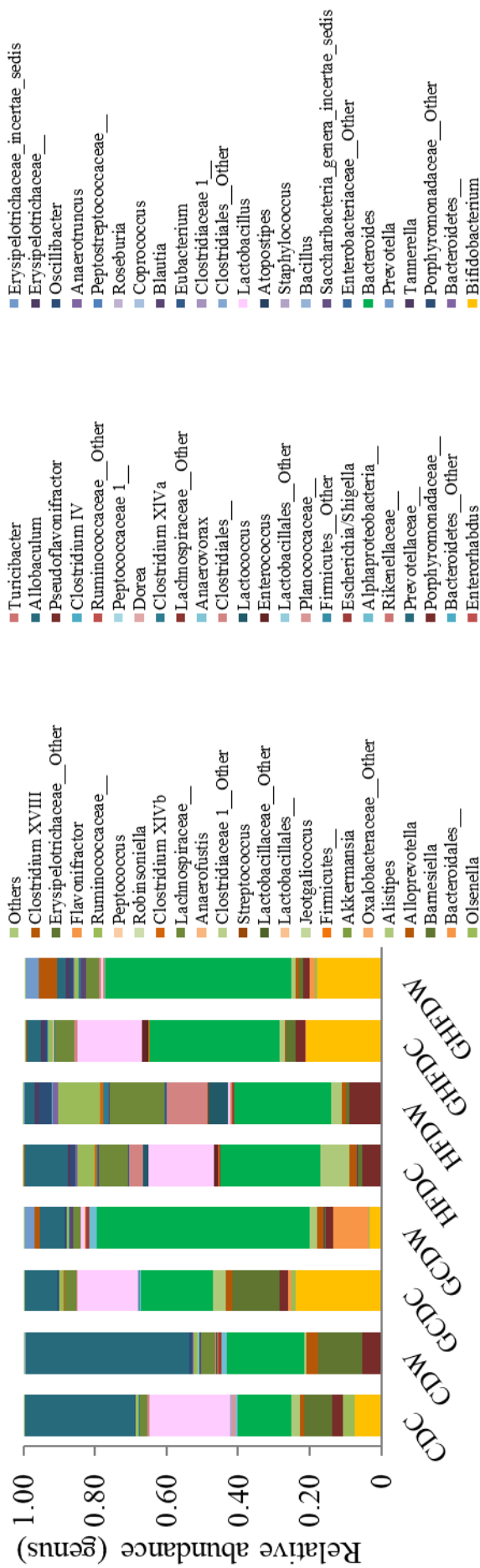
The values were shown as mean value of relative abundance in the group after 10 weeks.



**Figure 17** The complementary effect of PHGG and wheel running on *Firmicutes* (a), *Bacteroidetes* (b) and F/B ratio (*Firmicutes* and *Bacteroidetes* ratio) (c) in mice under CD and HFD-feeding.

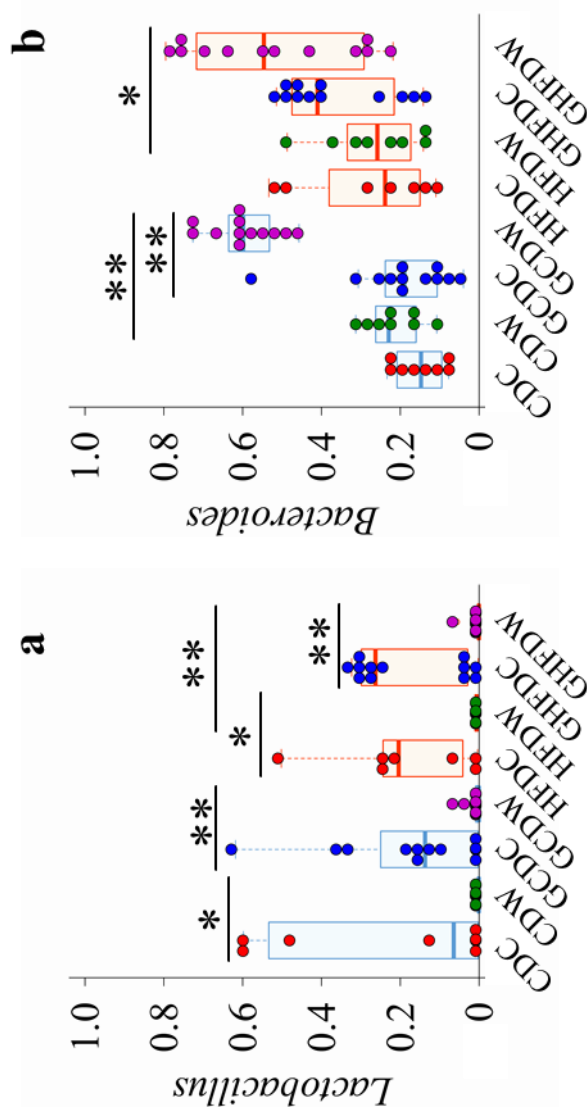
The values were shown relative abundance at phylum level after 10 weeks and expressed as the boxplot. \*p<0.05 and \*\*p<0.01.





**Figure 18** The complementary effect of PHGG and wheel running on gut microbiota at genus level in mice under CD and HFD-feeding.

The values were shown as mean value of relative abundance in the group after 10weeks.



**Figure 19** The complementary effect of PHGG and wheel running on *Lactobacillus*

(a) and *Bacteroides* (b) in mice under CD and HFD-feeding.

The values were shown relative abundance at genus level after 10 weeks and expressed as the boxplot. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ .