

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：32415

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350128

研究課題名(和文) 難消化性糖質摂取による腸内細菌由来水素ガスの抗酸化能を介した老化遅延に関する研究

研究課題名(英文) Correlation among the delaying effect on the onset of diseases and hydrogen produced from intestinal microbes by intake of nondigestible saccharide

研究代表者

中村 禎子 (Nakamura, Sadako)

十文字学園女子大学・人間生活学部・准教授

研究者番号：60382438

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：加齢に伴い生理機能や認知機能障害が発症し、その要因の1つに酸化ストレスの影響が考えられる。水素ガスは抗酸化作用を示す物質である。難消化性糖質を経口摂取すると腸内細菌がこれを代謝して水素ガスが産生され、ガスは血流を介して肝臓および末梢組織へ運搬される。申請者らは、難消化性糖質経口摂取による腸内細菌由来内因性水素ガスの抗酸化作用を介して、疾病の発症あるいは重症化が遅延するという仮説を立て、これを検証した。

その結果、過剰鉄による肝障害モデル動物および老化促進モデル動物において、難消化性糖質経口摂取による発症遅延ならびに重症化遅延が観察され、その要因として腸内細菌由来水素ガスの関連性が示唆された。

研究成果の概要(英文)： Disorder or diseases in physiology and/or cognitive function are developed by aging and the oxidative stress is one of the factors to affect and induce these diseases. Hydrogen gas is a antioxidative agent. Hydrogen gas is produced by the fermentation of nondigestible saccharide by intestinal microbes, absorbed, and circulate through liver and peripheral tissues. We hypothesize that the ingestion of nondigestible saccharide brings the delaying effect on the onset of these diseases through the antioxidative potentials of the hydrogen which is the metabolite by intestinal microbes.

In the rat with liver disfunction by the excessive Fe or senescence accelerated model mice, the onset of diseases delayed by the intake of nondigestible saccharide. However, these effects were not significant in the case of normal rats. The results suggest that intestinal microbes-derived hydrogen gas is related.

研究分野：健康科学

キーワード：難消化性糖質 腸内細菌 水素ガス 抗酸化作用 疾病発症予防 重症化遅延 プレバイオティックス

1. 研究開始当初の背景

わが国における老年人口比率は 24.1% (平成 24 年 10 月 1 日現在推計人口) に昇っていた。加齢に伴う疾病の発症には、炎症、酸化、糖化との関連性が明らかになってきており、これらの生体の変化をどのように制御できるかが課題であると考えた。生理機能や認知機能の低下は加齢に伴って必ず発症する現象である。これらの発症や重症化をいかに遅延させるかは、我が国の健康問題の解決のために重要な課題であると考えた。

一方、加齢に伴う疾病の発症は、生活習慣との関連性が高いと考えられており、炎症、酸化、糖化に対する抵抗性を具備した食品成分への関心が高まっている。

生理機能や認知機能の疾患の発症は様々な要因の影響を受けているが、認知機能低下には酸化ストレスへの暴露が影響していると考えられている。そこで、申請者らは、水素ガスのラジカル消去能、とくに、ヒトが生体内で産生する水素ガスの抗酸化作用に着目した。食物繊維や難消化性オリゴ糖などを経口摂取すると、腸内細菌がこれらを代謝することによって水素ガスが産生される。この腸内細菌由来水素ガスは、血流を介して肝臓ならびに末梢へ運搬される。申請者らは、難消化性糖質の下痢抑制作用をはじめとする様々は生理機能を明らかにし、ヒトにおける難消化性糖質経口摂取後の呼気へ排出される水素ガス濃度を測定することによって難消化性糖質の腸内細菌による利用性を明らかにした。しかし、この水素ガスの生理機能や血中濃度についてはほとんど明らかにされていない。

そこで、申請者らは、難消化性糖質経口摂取による腸内細菌由来内因性水素ガスの抗酸化作用を介して、疾病の発症あるいは重症化が遅延するという仮説を立て、これを検証した。

2. 研究の目的

申請者らが蓄積してきた基礎データに基づいて、生体内における腸内細菌由来水素ガスの抗酸化作用が疾病の症状改善や加齢に伴う認知機能低下へ及ぼす影響について、以下の実験により検討した。

3. 研究の方法

下記の実験方法により、腸内細菌由来水素ガスの抗酸化能を介した疾病発症へ及ぼす影響を検討した。

【実験 I と】酸化ストレスに敏感に反応する組織である肝臓を標的として、水素ガスが肝障害の症状軽減に作用することを明らかにする。

急性()ならびに慢性()の肝障害モデル動物を作成し、これらの動物を難消化性オリゴ糖含有飼料で飼育することによる肝障害の症状軽減作用を検討した。

【実験 II と】老化促進モデルマウス

SAMP8 に観察された学習・記憶障害の発症遅延について脳アミロイドタンパク質沈着ならびに腸内細菌由来水素ガスによる抗酸化の関連性について検討した。

多種類の難消化性糖質について、それらを含む飼料で飼育することによる酸化ストレス関連指標に対する影響を観察した。

【実験 III】ヒトにおける血液中水素ガス濃度と呼気水素ガス濃度の関連性について、基礎的な知見を得ることを目的とした。

実験の概要

【実験 I -】

過剰鉄による急性肝障害発症モデルラットを用いた難消化性糖質(フラクトオリゴ糖、FOS、(株)明治)含有飼料摂取による肝障害の症状軽減へ及ぼす影響を観察する実験。

<実験方法>

1) 実験動物

8 週齢 Wistar 系雄性成体ラット(約 230 g、日本ククリア株式会社、静岡県)を使用した。

本実験は、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」(平成 18 年、環境省告示第 88 号)を遵守し、長崎県立大学ならびに十文字学園女子大学動物実験委員会の承認を得て実施した。

2) 実験の群分け

AIN93M の飼料組成からセルロースを β -コーンスターチに置換した飼料、以下 EXP) で 7 日間予備飼育した後、次の 3 群に 15 匹ずつ割り付けた。

EXP 群

EXP のショ糖(10%)の半分を FOS で置換した飼料(FOS 群)

FOS 飼料群に FOS 溶液を毎日経口投与する群(FOS プラス群)

各飼料で 1 週間飼育後、それぞれの飼料群のうち、10 匹に鉄を腹腔内投与して肝障害を誘発し、残りの 5 匹には生理的食塩水を腹腔内投与した。

3) 過剰鉄による肝障害モデルラットの作成

肝障害モデルラットは、クエン酸鉄の腹腔内投与による方法を用いて作成した。鉄投与にはクエン酸鉄を用い、三価の鉄として 15 mg/kg 体重を隔日に 3 回腹腔内投与し、残り各群 5 匹には生理的食塩水を投与した。

4) 肝障害の程度の測定方法

3 回目の投与 24 時間後に採血後、解剖した。肝臓の湿重量を測定し、血液の酸化ストレス指標(d-ROM、血液中のヒドロペルオキシド量)および AST、ALT を測定した。また、肝臓および腎臓を採取して組織病理学的観察を実施した。

5) データは、平均値と標準偏差を算出し、正規性の検定後、ANOVA を行い、有意確率 5%未満を統計的有意差ありとした。

<結果概要>

鉄投与によって体重増加は遅滞したが、鉄投与群では群間の有意差は観察されなかった。鉄投与群の肝臓重量にも有意差は観察さ

れなかった。酸化ストレス関連指標である d-ROM ならびに AST は FOS プラス群で低値を示した ($p < 0.05$)。また、ALT は FOS プラス群で有意に低値を示した。組織病理学的所見には有意な影響は観察されなかったが、肝臓への鉄沈着は FOS プラス群で低値を示す傾向にあった。FOS 群では、EXP 群に比較して、水素ガス体外排出濃度が有意に高値を示した。以上の結果、過剰鉄による急性の肝障害に対して FOS は症状軽減作用のあることが示唆された。水素ガスは、ヒドロペルオキシドに対する抗酸化作用を持つことが明らかになっている。本実験の肝障害は、強い酸化反応を示す鉄を過剰に投与したモデルであることから、抗酸化作用を介する症状軽減作用が観察されたものと考えられる。

一方、肝障害の惹起物質として四塩化炭素を用いて同様の実験を実施した結果では、FOS 群の肝障害症状は対照群のそれと統計的有意差が観察されなかった。四塩化炭素による肝障害は、毒物による障害であり、酸化とは異なる機序によるため、FOS による腸内細菌由来水素ガスの影響が観察されなかったものと考えられる。以上の結果より、過剰鉄により惹起した肝障害の症状軽減作用は、FOS 摂取による腸内細菌由来の内因性水素ガスによる抗酸化と関連性があることが示唆された。

【実験 I - 】

過剰鉄による持続的肝障害発症モデルラットを用いた難消化性糖質含有飼料摂取による肝障害の症状軽減へ及ぼす影響を観察する実験

< 実験方法 >

1) 実験動物

4 週齢 Wistar 系雄性成体ラット(約 60 g、日本クレア株式会社、静岡県)を使用した。

本実験は、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」(平成 18 年、環境省告示第 88 号)を遵守し、十文字学園女子大学動物実験委員会の承認を得て実施した。

2) 実験の群分け

AIN93G の飼料組成からセルロースを β -コーンスターチに置換した飼料、以下 EXP) で 7 日間予備飼育した後、次の 6 群に 5~6 匹ずつ割り付け、8 週間飼育した。Fe は、Iron(III) Citrate n-hydrate(和光純薬工業株)を使用し、Fe 等量で算出した。

EXP 飼料群

EXP 飼料群に Fe 0.3% 添加群

EXP 飼料群に Fe 0.6% 添加群

EXP のショ糖(10%)の半分を FOS で置換した飼料(FOS 群)

FOS 飼料群に Fe 0.3% 添加群

FOS 飼料群に Fe 0.6% 添加群

3) 測定項目および測定方法

(1) 飼育期間中、摂食量は毎日、体重は隔日に測定した。飼育 6 週目にガラス製循環式

代謝ケージ(メタボリカ、株スギヤマゲン)を用いて、水素ガス体外排出量を測定し、24 時間の糞便と尿を分別回収した。

(2) イソフルラン麻酔下に採血後解剖し、各臓器を摘出して湿重量を測定後、肝臓および腎臓の一部をホルマリン固定し、組織病理学的観察を行った。肝臓は、ホモジネートを調製し、酸化ストレス関連指標を測定した。血液試料および尿を用いて、Fe 濃度、酸化ストレス関連指標ならびに肝障害関連指標を測定した。

4) データは、平均値と標準偏差を算出し、正規性の検定後、2 要因分散分析を行い、有意確率 5% 未満を統計的有意差ありとした。

< 結果概要 >

血液中の鉄濃度は群間に統計的有意差は観察されず、維持されていた。しかし、尿中の鉄排泄量は鉄摂取群において有意に高値を示した。酸化ストレス関連指標は、FOS 摂取群において対照飼料群に比較して低値を示し、肝機能関連指標は低値を示した。また、水素ガス体外排出動態は FOS 摂取群において顕著に観察された。一方、組織病理学的観察では、群間に統計的有意差は観察されなかった。

以上の結果は、持続的な過剰鉄摂取によって発症する肝障害に対して、難消化性糖質の摂取は予防的に作用する可能性のあることを示唆している。

【実験 II - 】

申請者らは、老化促進モデルマウス SAMP8 を難消化性糖質含有飼料で継続的に飼育することにより学習・記憶障害の発症が遅延し、老化度得点が低値を示すことを明らかにしている。これらの結果に基づいて、SAMP8 を同じ条件で飼育し、記憶障害の機序として脳アミロイドタンパク質等の沈着ならびに腸内細菌由来水素ガスによる抗酸化の関連性について検討した。

< 実験方法 >

1) 実験動物

老化促進モデルマウス(SAMP8)4 週齢(日本 SLC 株式会社、静岡県)を使用した。本実験は、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」(平成 18 年、環境省告示第 88 号)を遵守し、長崎県立大学ならびに十文字学園女子大学動物実験委員会の承認を得て実施した。

2) 実験の群分け

実験 I と同じ対照飼料を調製し、スクロース 10% のうちの 5% を FOS またはグルコマンナンに置換し、各群 15 匹を割り付けて 38 週間飼育した。

3) 測定項目および測定方法

(1) 飼育期間中、摂食量は毎日、体重は隔日に測定した。飼育 25 週目にガラス製循環式代謝ケージ(メタボリカ、株スギヤマゲン)を用いて、水素ガス体外排出量を測定し、解剖前の 1 週間代謝ケージに移動して 72 時間

の糞便と尿を分別回収した。

(2) 頸椎脱臼後、採血・解剖し、脳および各臓器を摘出して湿重量を測定後ホルマリン固定し、組織病理学的観察を行った。肝臓は、ホモジネートを調製し、酸化ストレス関連指標を測定した。血液試料または尿を用いて、炎症性サイトカイン、記憶障害関連タンパク質、酸化ストレス関連指標を測定した。また、脳組織標本を作製し、染色により各タンパク質の沈着程度を測定した。

4) データは、平均値と標準偏差を算出し、正規性の検定後、ANOVA を行い、有意確率5%未満を統計的有意差ありとした。

<結果概要>

酸化ストレス関連指標、炎症性サイトカイン、および記憶障害関連タンパク質濃度は、FOS 群において対照群に比較して有意に低値を示した。また、脳組織標本の記憶障害関連タンパク質沈着においても低値を示した。

以上の結果より、SAMP8 を難消化性糖質含有飼料で飼育することにより観察された記憶障害発症遅延は、酸化、炎症、記憶障害関連タンパク質沈着の軽減と関連性のあることが示唆された。

【実験 II - 】

糖アルコールや人工的に生成された食物繊維について、これらを含む飼料で通常ラットを飼育し、酸化ストレス関連指標への影響を観察した。本実験は、十文字学園女子大学動物実験委員会の承認を得て実施した。

この結果、通常ラットにおいて、酸化ストレス関連指標は低値を示すものの、統計的有意差は観察されないこと、また、腸内細菌による発酵性の低い難消化性糖質を経口摂取させた場合には、酸化ストレス関連指標への有意な影響は観察されなかった。以上の結果は、難消化性糖質経口摂取による腸内細菌由来水素ガスの影響は、加齢や傷病下において顕著に観察されることが示唆された。

【実験 III】

ヒトにおける血液中水素ガス濃度と呼気水素ガス濃度の関連性について、基礎的な知見を得ることを目的とした。健常な成人男女を対象として難消化性糖質を経口摂取させ、摂取後の水素ガス排出動態と末梢血水素ガス濃度との関連性を比較検討した。本研究は、長崎県立大学研究倫理委員会の承認を得て実施した。この結果、血液中水素ガス濃度は呼気水素ガス排出濃度に比較して、変動幅が少ないことが観察された。

4 . 研究成果

本研究では、難消化性糖質を経口摂取することによって、生体内の酸化を伴う疾病や障害の発症ならびに重症化を遅延する可能性のあること、また、その機序として、腸内細菌が難消化性糖質を代謝することによって産生する水素ガスの抗酸化作用が関連して

いることが示唆された。

難消化性糖質の新しい生理機能として、腸内細菌由来水素ガスの抗酸化を介した疾病に対する予防的作用を明らかにした。本研究成果は、我が国の高齢化に伴う健康問題の解決に寄与できるものと考えられる。

5 . 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 7 件)

Nakamura S, Tanabe K, Morita S, Hamaguchi N, Shimura F, Oku T. (2016) Metabolism and bioavailability of newly developed dietary fiber materials, resistant glucan and hydrogenated resistant glucan, in rats and humans. *Nutr Metab (Lond)*. [open access] Feb 16; 13: 13. doi: 10.1186/s12986-016-0073-2. 査読有 .

中村禎子, 田辺賢二, 宮原明美, 泉千代子, 吉永一浩, 山崎優子, 佐々木菜穂, 奥恒行. (2016) ラットを 1,5 - アンヒドログルシトール飼料で飼育したときの成長, 臓器重量, 血液性状ならびに酸化ストレスなどに及ぼす影響. *日本食物繊維学会誌(ルミナコイド研究)* 20: 77-84. 査読有 .

Oku T, Tanabe K, Morita S, Hamaguchi N, Shimura F, Nakamura S. (2015) Digestibility of new dietary fibre materials, resistant glucan and hydrogenated resistant glucan in rats and humans, and the physical effects in rats. *Br J Nutr* 114: 1550-1559. 査読有 .

中村禎子, 福島恭子, 田辺賢二, 志村二三夫, 奥恒行. (2015) 性状の異なる難消化吸収性オリゴ糖および糖アルコールの腸内細菌を介した生体利用性—抗菌剤による除菌ラットを用いた検討—*ルミナコイド研究(日本食物繊維学会誌)* 19: 11-21. 査読有 .

Nakamura S, Kondo N, Yamagichi Y, Hashiguchi M, Tanabe K, Ushiroda C, Kawahashi-Tokuhisa M, Yui K, Miyakoda M, Oku T. (2014) Dietary feeding of fructooligosaccharide or glucomannan delays onset of senescence in SAMP8 mice. *Gastroenterology Research and Practice* 2014, Article No. 303184. [open access] . 査読有 .

Nakamura S, Takami M, Tanabe K, Oku T. (2014) Characteristics hydrolyzing of megalosaccharide by human salivary α -amylase and small intestinal enzymes, and its bioavailability in healthy subjects. *Int J Food Sci Nutr* 65: 754-760. 査読有 .

Oku T, Nakamura S. (2014) Evaluation of the relative available energy of several dietary fiber preparations using breath hydrogen evolution in healthy man. *J Nutr Sci Vitaminol* 60: 246 - 254. 査読有 .

〔学会発表〕(計 10 件)

中村禎子, 田辺賢一, 市村真祐子, 森田茂樹, 大曲勝久, 中山敏行, 奥恒行. 過剰鉄による肝障害モデルラットにおけるフラクトオリゴ糖摂取の症状軽減作用. 第 71 回日本栄養・食糧学会, 2017 年 5 月 19~21 日, 沖縄コンベンションセンター, (沖縄県, 宜野湾市).〔発表済〕

中村禎子, 田辺賢一, 奥恒行. KKAY マウスの糖尿病発症に及ぼす 1,5-アンヒドログルシトール含有飼料飼育の影響. 第 70 回日本栄養・食糧学会, 2016 年 5 月 13~15 日. 武庫川女子大学 (兵庫県, 神戸市).

中村禎子, 田辺賢一, 奥恒行. 難消化性糖質の発酵性の指標としての腸内細菌由来呼吸水素ガスの利用. 2016 年日本安定同位体・生体ガス医学応用学会, 2016 年 10 月 14~15 日. 東京慈恵会医科大学, (東京都, 港区).

中村禎子, 田辺賢一, 山手美沙, 長田早苗, 山崎優子, 金高有里, 奥恒行. ラットにおける D-ソルボースまたは D-ブシコースの代謝へ及ぼすそれらの含有飼料への馴化の影響. 日本食物繊維学会学術集会, 2016 年 11 月 26~27 日, 静岡大学, (静岡県, 静岡市).

Nakamura S, Tanabe K, Oku T. Improvement of intestinal microflora by feeding of prebiotics delays onset of learning and memory disorder in senescence-accelerated mice (SAM)P8. The 12th International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Diseases and Related Neurological Disorders (AD/PDTM 2015), 18th~22nd. March 2015, Niece La Belle, (Niece, France).

Oku T, Nakamura S, Tanabe K, Hamaguchi N, Shimura F. Bioavailability and available energy of newly developed dietary fiber materials, resistant glucan and hydrogenated resistant glucan, in rats and humans. Global Biotechnology Congress 2015, Hynes Convention Center, 22nd~25th. July 2015, (Boston, U.S.A).

奥恒行, 田辺賢一, 山口喜勇, 宮原明美, 濱口徳寿, 中村禎子. 難消化性グルカンおよび還元難消化性グルカンの消化・発酵・吸収と代謝ならびにエネルギー評価の試み. 第 68 回日本栄養・食糧学会大会, 2014 年 5 月 30 日~6 月 1 日. 酪農学園大学, (北海道, 江別市).

山口喜勇, 中村禎子, 田辺賢一, 宮原明美, 中山敏幸, 大曲勝久, 奥恒行. 老化促進モデルマウス SAMP8 の加齢に伴う老化および脳機能に及ぼす難消化性オリゴ糖継続摂取の影響. 第 68 回日本栄養・食糧学会大会, 2014 年 5 月 30 日~6 月 1 日. 酪農学園大学 (北海道, 江別市).

中村禎子, 山口喜勇, 田辺賢一, 中山敏幸, 奥恒行. 老化促進モデルマウス SAMP8 における難消化性オリゴ糖摂取による腸内フローラの改善, 学習・記憶障害発症遅延ならびに脳アミロイドβ沈着との関連性の検討. SAM 研究協議会第 29 回研究発表会, 2014 年 7 月 5~6 日, 東京都健康長寿医療センター, (東京都, 豊島区).

田辺賢一, 山口喜勇, 中村禎子, 奥恒行. 老化促進モデルマウス SAMP6 の腸内フローラならびに酸化ストレスに及ぼす難消化性オリゴ糖摂取の影響. SAM 研究協議会第 29 回研究発表会, 2014 年 7 月 5~6 日, 東京都健康長寿医療センター, (東京都, 豊島区).

6. 研究組織

(1)研究代表者

中村 禎子 (Nakamura Sadako)
十字学学園女子大学・人間生活学部・准教授
研究者番号: 60382438

(2)研究分担者

奥 恒行 (Oku Tsuneyuki)
十字学学園女子大学・食・栄養・健康研究所・
客員教授
研究者番号: 50010096

森田 茂樹 (Morita Shigeki)
長崎県立大学・看護栄養学部・教授
研究者番号: 00220062

大曲 勝久 (Omagari Katsuhisa)
長崎県立大学・看護栄養学部・教授
研究者番号: 90244045

田辺 賢一 (Tanabe Kinichi)
名古屋女子大学・家政学部・講師
研究者番号: 60585727

中山 敏幸 (Nakayama Toshiyuki)
産業医科大学・医学部・教授
研究者番号: 30284673