

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：13801

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K12719

研究課題名(和文) 難消化性糖質由来の大腸水素は生体内で電子供与体としてアスコルビン酸を代替するか？

研究課題名(英文) Can colonic hydrogen derived from non-digestible saccharides substitute for ascorbic acid as an electron donor in vivo?

研究代表者

西村 直道 (Nishimura, Naomichi)

静岡大学・農学部・教授

研究者番号：10341679

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：難消化性糖質の大腸発酵によって多量に生み出される水素は生体内で還元性を発揮し、炎症抑制に寄与する。水素が強力な酸化物質であるヒドロキシラジカルを選択的に消去することがin vitroで示されているが、生体内でも同様の機序によって作用するかは不明である。本研究では、大腸水素が脂肪組織で電子供与体として α -トコフェロール再生を促進することにより酸化ストレスを軽減することを見出した。水素は非極性分子で酸化還元電位が低く、脂肪組織におけるこの作用は合理的である。

研究成果の概要(英文)：Hydrogen molecule, which is produced by colonic fermentation of non-digestible saccharides, show the reducibility in vivo and then contribute to inhibited inflammation. Hydrogen have been reported to scavenge a potent reactive oxygen species, hydroxyl radical, in vitro. However, it remains unclear whether it will act by the same mechanism in vivo. In this study, we found that colonic hydrogen alleviates oxidative stress by promoting the regeneration of α -tocopherol as an electron donor in the adipose tissue. Hydrogen is a nonpolar molecule and its redox potential is very low, so the effect in adipose tissue is reasonable.

研究分野：栄養化学

キーワード：水素 大腸発酵 抗酸化作用 難消化性糖質 α -トコフェロール アスコルビン酸

1. 研究開始当初の背景

酸化ストレスの上昇はさまざまな疾病発症のリスク要因であり、この制御は疾病予防の観点から重要な課題となっている。近年、水素分子(H₂)が生体でも還元性を発揮することが示された。我々は難消化性糖質摂取時に大腸発酵で多量に生成される H₂ の一部が門脈に吸収され、肝酸化ストレスおよび酸化障害を軽減することをラットで明らかにした。一方、大腸 H₂ が腹腔内にも拡散し、さまざまな腹腔内組織(特に脂肪組織)に移行し、高 H₂ 濃度の脂肪組織で炎症性サイトカイン発現が低下することも見出した。H₂ はヒドロキシルラジカルを消去することが *in vitro* 研究で報告されているが、生体でも同様の機序によって作用を示すかは不明のままである。酸化ストレスの主要因はミトコンドリアから放出される活性酸素種であり、これらの除去に α-トコフェロール(α-Toc)が利用され、α-Toc ラジカルが生成される。生体位ではアスコルビン酸(AsA)からの電子供与により α-Toc が再生され、酸化還元バランスが保たれている。H₂ の酸化還元電位は AsA や α-Toc よりも低いため、電子供与できる可能性が高い。非極性の H₂ は脂質と親和性が高く、脂質を多く含む部位に局在するため、大腸 H₂ の酸化ストレス軽減効果は脂溶性の α-Toc の再生によるという仮説を立てた。

2. 研究の目的

上記の背景をもとに、大腸 H₂ が α-Toc 再生に寄与し、大腸 H₂ の酸化ストレス軽減作用の主要機構である可能性を明らかにすることを目的とし、1) AsA 欠乏時の生体組織中 α-Toc 濃度変動、2) AsA 欠乏時に大腸 H₂ 生成を促した場合の生体組織中 α-Toc 濃度変動、3) AsA 欠乏時の大腸 H₂ 生成促進による α-Toc 濃度変動と酸化ストレスマーカー変動との関係について調べた。なお、ラットは AsA を生合成できるため、実験動物として遺伝的 AsA 合成能欠如ラットを用いた。

3. 研究の方法

(1) AsA 欠乏時の生体組織中 α-Toc 濃度変動と大腸 H₂ 生成亢進による影響

実験動物に遺伝的 AsA 合成能欠如ラット (ODS/ShiJcl-od/od, 日本クレア) を用いた。コントロール (C) 食とラットの最大成長に必要な 240 ppm AsA 溶液で 4 日間予備飼育後、体重を基準に 3 群に組分け、それぞれに C 食 + 240 ppm AsA 溶液 (AC)、C 食 + 20 ppm AsA 溶液 (LC)、LC + 4% フラクトオリゴ糖溶液 (LCF) を 14 日間与えた。試験最終日にイソフルラン吸入投与による麻酔下で門脈を採取し、一部を H₂ 濃度測定に用いた。残りの門脈血から血漿を得た後、α-Toc 濃度と AsA 濃度を測定した。採血後、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、精巣、精巣上体脂肪を採取し、α-Toc 濃度と AsA 濃度を測定した。また、盲腸を摘出した後、内容物を得て短鎖脂肪酸濃

度を測定した。

(2) 大腸 H₂ 生成亢進時の脂肪組織における α-Toc 再生を介した酸化ストレスの軽減作用
実験動物に遺伝的 AsA 合成能欠如ラット (ODS/ShiJcl-od/od, 日本クレア) を用いた。コントロール (C) 食とラットの最大成長に必要な 240 ppm AsA 溶液で 4 日間予備飼育後、大腸 H₂ 生成能の指標となる (呼気+放屁) H₂ 排出量を測定した。体重と (呼気+放屁) H₂ 排出量を基準に 3 群に組分け、それぞれに C 食 + 240 ppm AsA 溶液 (AC)、C 食 + 20 ppm AsA 溶液 (LC)、LC + 4% フラクトオリゴ糖溶液 (LCF) を 14 日間与えた。試験期間中の大腸 H₂ 生成量の変動を観察するため、試験開始 3, 7, 10, 14 日後に (呼気+放屁) H₂ 排出量を測定した。試験最終日にイソフルラン吸入投与による麻酔下で門脈を採取し、一部を H₂ 濃度測定に用いた。残りの門脈血から血漿を得た後、α-Toc 濃度と AsA 濃度を測定した。採血後、腎周囲脂肪および精巣上体脂肪を摘出し、α-Toc 濃度、AsA 濃度、および H₂ 濃度を測定した。また、酸化ストレス状態を調べるため、グルタチオン濃度および抗酸化酵素を測定した。さらに盲腸を摘出した後、内容物を得て短鎖脂肪酸濃度を測定した。

なお、以上の動物実験を静岡大学動物実験委員会で承認 (承認番号: 28-16, 29A-15) を得て行った。

4. 研究成果

(1) AsA 欠乏時の生体組織中 α-Toc 濃度変動と大腸 H₂ 生成亢進による影響

LCF 群の摂食量は、他の 2 群に比べ有意に低かった。AsA 摂取量は、AC 群より LC 群で、LC 群より LCF 群で有意に低値を示した。(Table 1) 体重増加量は、LCF 群で他の 2 群に比べ有意に低く、摂食量の差を反映した。門脈 H₂ 濃度は統計的有意差には達しなかったが、LC 群の 1.3 倍の値を示した (AC 群, 1.86±0.22^b μmol/L; LC 群, 2.86±0.17^a μmol/L; LCF 群, 3.84±0.82^{ab} μmol/L; Steel-Dwass test)。LCF 群の盲腸内酢酸濃度も LC 群より有意に高かったことから、AsA 欠乏ラットでもフラクトオリゴ糖による大腸発酵の亢進が認められた。

大腸発酵は腸内細菌によって行われるため、フラクトオリゴ糖が大腸に供給されている期間に、大腸 H₂ 生成が常時亢進したと考えられる。したがって、試験最終日の脂肪 H₂ 濃度が有意な高値を示さなかったが、試験期間中にわたり脂肪組織は H₂ に曝露し続けたと予想される。

各組織および血漿中の AsA 濃度は、AC 群

Table 1 Body weight and food intake

	AC	LC	LCF
Initial body weight, g	147 ± 2	146 ± 2	147 ± 3
Body weight gain, g/14d	70 ± 2 ^a	62 ± 2 ^a	53 ± 2 ^b
Food intake, g/21d	231 ± 5 ^a	214 ± 5 ^a	181 ± 4 ^b
AsA intake, mg/14d	76.2 ± 3.2 ^a	5.81 ± 0.20 ^b	4.73 ± 0.11 ^c
Vitamin E intake, mg/14d	15.0 ± 0.3	13.9 ± 0.3	11.8 ± 0.3

比べ AsA を欠乏させた LC 群と LCF 群で有意に低かった。これにより 2 週間低 AsA 食を与えた群で AsA 欠乏を生じたことが確認された。各飼料中の α -Toc 量に差はないため、本実験における α -Toc 摂取量は LCF 群で LC 群より低かった (データ未掲載)。脾臓および精巣上体脂肪を除く各組織および血漿中の α -Toc 濃度は 3 群間に有意な差は認められなかった。脾臓 α -Toc 濃度は LC 群より LCF 群で有意に低かった (データ未掲載)。一方、精巣上体脂肪でのみ α -Toc 濃度は LC 群に比べ、LCF 群で高くなる傾向を示した (Figure 1)。以上より、難消化性糖質による大腸 H_2 生成の亢進により、脂肪組織が曝露される H_2 量が増加し、 α -Toc 再生を促進したと考え

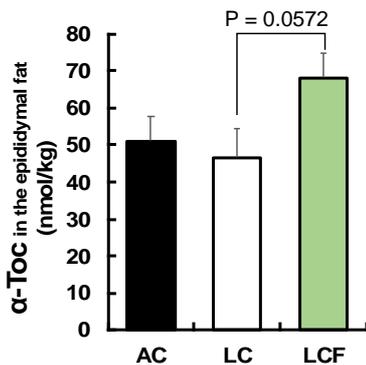


Figure 1 精巣上体脂肪中の α -トコフェロール濃度られる。

(2) 大腸 H_2 生成亢進時の脂肪組織における α -Toc 再生を介した酸化ストレスの軽減作用
 試験期間中の体重変化をみると、AC 群が最大成長を示したのに対し、LC 群の体重は AC 群に比べ試験 12 日以降有意に低かった (Figure 2)。これは AsA 欠乏によると考えられる (Table 2)。一方、LCF 群の体重は LC 群より低いものの、統計的有意差は認められなかった。摂食量と AsA 摂取量の群間変化は先の実験と同様であり、摂食量はフラクトオリゴ糖の影響を受け、AsA 摂取量は AsA 欠乏の影響を受けると考えられる。

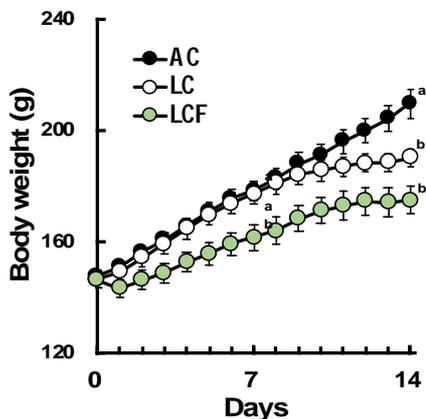


Figure 2 試験期間中の体重変化

Table 2 Body weight and food intake

	AC	LC	LCF
Initial body weight, g	147 \pm 2	146 \pm 3	146 \pm 3
Body weight gain, g/14 d	61.8 \pm 3.4 ^a	43.7 \pm 2.5 ^b	33.5 \pm 4.6 ^b
Food intake, g/14 d	217 \pm 6 ^a	215 \pm 4 ^a	165 \pm 8 ^b
AsA intake, mg/14 d	71.6 \pm 2.0 ^a	5.82 \pm 0.24 ^b	5.08 \pm 0.37 ^b

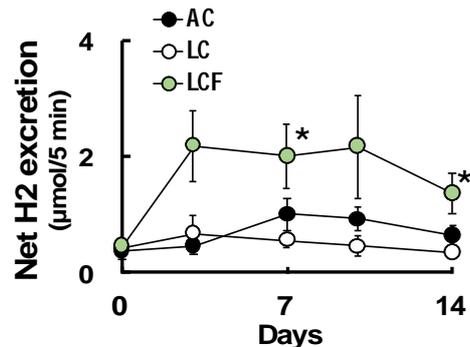


Figure 3 試験期間中の (呼気+放屁) H_2 排出量変動

試験期間中の (呼気+放屁) H_2 排出量は、試験 3 日以降他の群に比べ高値を維持した (Figure 3)。これは、脂肪組織が試験期間中多くの H_2 に曝露されたことを示している。統計的有意差はみられなかったが、LCF 群の門脈 H_2 濃度は LC 群の 2 倍、腎周囲脂肪で 4.4 倍だった (Figure 4)。一方、精巣上体脂肪の H_2 濃度は、LC 群に比べ LCF 群で有意に高かった。

両脂肪組織中の AsA 濃度は、AC 群比べ AsA を欠乏させた LC 群と LCF 群で有意に低かった。LCF 群の脂肪組織中 α -Toc 濃度は、腎周囲脂肪で LC 群の 4.2 倍、精巣上体脂肪で 1.1 倍で、有意に高値を示した (Figure 5)。このことから、大腸 H_2 が電子供与体として

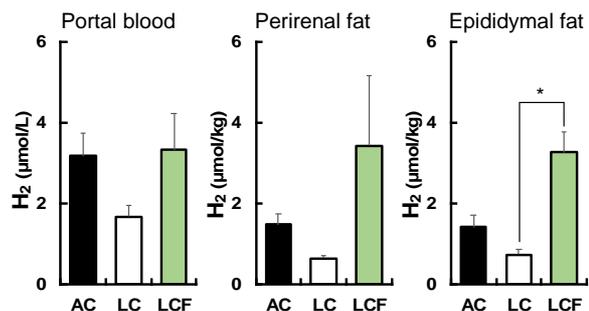


Figure 4 門脈血および脂肪組織中の α -トコフェロール濃度

脂肪組織で α -Toc を再生する可能性が示唆される。しかし、LC 群の α -Toc 濃度が腎周囲脂肪で 16.6 μ mol/g だったのに対し、精巣上体脂肪で 60.7 μ mol/g だった。すなわち、フラクトオリゴ糖を非摂取ラットの脂肪組織間で α -Toc 濃度に大きな差があることが判明した。

脂肪組織中の酸化ストレス状態を評価するため、グルタチオン濃度および抗酸化酵素活性の違いを調べた。腎周囲脂肪の総グルタチオン濃度および還元型グルタチオン濃度は、LCF 群で LC 群で有意に高かったが、精

巢上体脂肪ではその変化が認められなかった (Figure 6)。先に述べたように、精巢上体脂肪の α -Toc 濃度は LC 群でも高かったため、レドックスバランスを維持する上で十分だったと考えられる。そのため、 H_2 の影響が認められなかったと推察される。一方、 α -Toc 濃度の低い腎周囲脂肪では、 H_2 による α -Toc 再生が進み、酸化ストレスが軽減され還元型グルタチオンの利用が抑えられたと考えられる。両脂肪組織において、抗酸化酵素であるグルタチオンリダクターゼ活性は LC 群より LCF 群で有意に低かった。しかし、いずれの脂肪組織でもスーパーオキシドジスムターゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ、カタラーゼの活性に変化は認められなかった。

以上をまとめると、難消化性糖質摂取により大腸 H_2 生成が促進すると、その一部は腹腔内に拡散し、脂肪組織に移行する。AsA 欠乏時に α -Toc 濃度が低い脂肪組織において H_2 が電子供与体として AsA に代替して α -Toc 再生に寄与することが示唆される。この結果、酸化ストレス軽減につながると考えられる。食物繊維を始めとする難消化性糖質の栄養学的意義はこれまで便秘改善や血糖値上昇抑制作用などにとどまっていた。近年、腸内細菌叢の改善や大腸発酵産物の短鎖脂肪酸によるさまざまな生理作用に注目が集まっている。今後、大腸 H_2 による抗酸化作用も難消化性糖質の栄養学的意義として加えられる可能性が期待される。

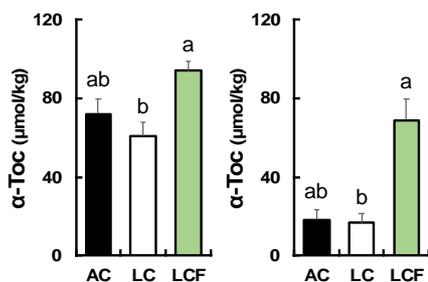


Figure 5 脂肪組織中 α -トコフェロール濃度

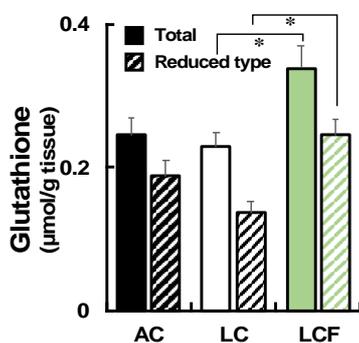


Figure 6 腎周囲脂肪中の α -トコフェロール濃度

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔学会発表〕(計1件)

石田陽亮, 小室嘉彦, 日野真吾, 森田達也, 西村直道, 大腸水素は α -トコフェロール再生を介してラット脂肪組織の酸化ストレスを軽減する, 第72回日本栄養・食糧学会大会, 2018年

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agr.shizuoka.ac.jp/abc/nishimura/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西村 直道 (NISHIMURA, Naomichi)

静岡大学・農学部・教授

研究者番号: 10341679