

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590646
 研究課題名 (和文) 難消化性糖質経口摂取による腸内細菌叢の改変と下痢抑制作用との関連性に関する研究
 研究課題名 (英文) Interaction among the alteration of intestinal microflora and the improvement of diarrhea by the ingestion of non-digestible and/or non-absorbable saccharides

研究代表者
 中村 禎子 (NAKAMURA SADAKO)
 長崎県立大学・看護栄養学部・助教
 研究者番号 60382438

研究成果の概要：

下痢の要因は多様であるが、本研究は、経管・経腸栄養等の処方時や難消化性甘味糖質の大量摂取時に誘発する高浸透圧性下痢について、難消化性糖質の種類、下痢誘発とその修復過程における腸内細菌叢の変化ならびに消化管組織の変化との関連性を検討した。ラットを用いた実験結果から、高浸透圧性下痢誘発と修復過程には腸内細菌数および細菌叢、および腸内細菌の代謝産物、消化管組織の変化が相互に関連していることが示唆された。また、ヒトにおいて難消化性甘味糖質による下痢誘発は不溶性食物繊維であるセルロース添加により抑制されることをはじめて明らかにした。これらの結果は今後、経管・経腸栄養剤などの開発に寄与するものと考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度		0	
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・公衆衛生学・健康科学

キーワード：難消化性糖質，腸内細菌叢，下痢，下痢抑制効果，オリゴ糖，糖アルコール，短鎖脂肪酸，炎症性細胞

1. 研究開始当初の背景

下痢症は開発途上国の 5 歳以下の小児に罹患率が高く、その主な原因はロタウイルス、カンピロバクター属、シゲラ属などの病原性下痢症である。しかし、下痢症は先進国においても深刻な健康問題であり、臨床においては消化管機能の低下した高齢者や術後患者に

しばしば観察され、経口補液や経管・経腸栄養剤の処方による下痢誘発が報告されている。また、難消化性甘味糖質を大量に含有するいわゆる健康食品の過剰摂取では乳糖不耐症と同様に腸管内の高浸透圧による下痢症が発症している。このように下痢症の原因は病原性、消化管機能低下ならびに高浸透圧性など著し

く異なっている。それにもかかわらず、いずれの下痢に対してもオリゴ糖や食物繊維などの難消化性糖質を経口摂取させることによる発症予防や症状改善効果が観察されている。しかし、これらの難消化性糖質経口摂取による下痢症状改善作用はどのような機序によるのか、またどのような特徴をもつ難消化性糖質に下痢症状抑制作用があるかなどの基礎的解析についてはほとんど報告されていない。これらの基礎的データを提供することは難消化性糖質を添加した経管栄養剤や経口補液の開発、ならびに安全な食品開発において有用であると考えられる。

そこで、本研究は、難消化性糖質経口摂取による下痢症状改善作用の機序を解明することを目的として、まず難消化性糖質の種類と腸内細菌叢の変化を解析し、さらに消化管粘膜の形態的変化との関連因子を明らかにして、これらの相互的関連性を検討する。

我々は1)、バングラデシュのスラム街に在住する2~5歳児を対象として二重盲検プラセボコントロール試験を実施し、難消化性甘味糖質であるフラクトオリゴ糖を含む等張液を6ヶ月間継続的に経口摂取させて下痢に対する改善効果を観察した。その結果、下痢総日数ならびに1回の下痢エピソード当たりの下痢便排泄回数がプラセボ群に比べて有意に改善したことを既に報告している。さらに、我々は、健常なヒトにおいて発症する二糖アルコールであるマルチトールの大量摂取による一過性緩下作用に対して、難消化性多糖であるグアールガムの同時摂取が有効であることを明らかにした2)。一方Alamらは3)下痢を発症した小児に対して投与する経口補液(Oral Rehydration Salt, ORS)に難消化性多糖である食物繊維を添加することによって下痢症状の改善効果が認められたことを、Ramakrishnaら4)はコレラ性下痢に対しても難消化性多糖の改善作用が認められたことを報告している。さらに、経管栄養療法の高齢者においては、経管栄養剤に難消化性多糖を添加することによって下痢症状が回復し、この作用は低下した消化管機能の改善によるものであることがNakaoら5)によって報告されている。

難消化性糖質の種類の違いは腸内細菌叢の変化に影響を及ぼすことを研究分担者である辨野はすでに報告しているが、短鎖脂肪酸や酵素などの腸内細菌の代謝産物の違いによって抑制可能な下痢症が異なることが考えられるため、これらの関連性を解析する必要性があると考えられる。一方、研究分担者である奥らはラットを用いて難消化性糖質の経口摂取に

よって盲腸および結腸に肥大が認められたこと、またこの肥大は消化管粘膜上皮細胞の過形成によること、さらにこの変化が難消化性糖質の摂取を中止することによって回復する可逆的変化であることを明らかにしている6)。過形成は代償など生体の必要性に対応して誘導されるものであり、このような変化には細胞増殖とアポトーシスならびに生体防御反応に関連する因子が影響しているものと考えられる。このことは、難消化性糖質経口摂取の下痢症状改善作用は腸内細菌叢の変化だけではなく、消化管組織に起こる変化とそれを掌る因子とに相互的に関連していることを示唆している。これらの研究成果は、難消化性糖質を添加したより効果的かつ安全な経管栄養剤ならびに経口補液の開発、ならびに生理機能を備えた食品開発に必要な基礎的で具体的な情報を提供できるものと考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、難消化性糖質経口摂取による下痢症状改善作用の機序を解明することを目的として、以下の事柄について明らかにする。

(1) 下痢発症時と下痢修復時の腸内細菌叢およびその代謝産物の変化、消化管組織における変化などを観察し、さらにその変化が難消化性糖質の種類によってどのように異なるかをラットを用いて明らかにする。

(2) 先に公表した2)ヒトを対象とした実験においてマルチトールの大量摂取によって誘発した下痢がグアールガムの同時摂取によって改善したことに基づいて、小分子の難消化性甘味糖質大量摂取によって誘発する高浸透圧性の緩下作用に対する下痢抑制効果がどのような種類の難消化性糖質(食物繊維)において認められるかを明らかにする。

以上の結果をもとに、難消化性糖質経口摂取による下痢症状改善作用の機序と腸内細菌叢ならびに消化管粘膜の変化に関連する因子との相互関連性を明らかにし、経口摂取する難消化性糖質の種類との関連性について検討する。

1) Nakamura S, Oku T, et al. (2006) *Tropical Medicine & Health* 34:125-131.

2) Nakamura S, Hongo R, Moji K, Oku T. (2007) *Eur J Clin Nutr* 61:1086-1093.

3) Alam NH, et al. (2000) *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 31:503-507.

4) Ramakrishna BS, et al. (2000) *N Engl J Med* 342:308-313.

5) Nakao M, et al (2002) *Nutrition* 18:35-39.

6) Oku T (1995) *Nutr Res* 15:1355-1366.

3. 研究の方法

(1) ラットを用いて下痢発症時と下痢修復時の腸内細菌叢ならびにその代謝産物の変化、および消化管組織における変化を観察し、さらにその変化が難消化性糖質の種類によってどのように異なるかを明らかにする実験

【実験Ⅰ】①実験動物：Wistar 系幼若雄ラットを用い、AIN93 純化飼料組成の糖質 10% を 4 種類の異なる難消化性糖質（フラクトオリゴ糖、ガラクトシルスクロース、イソマルトオリゴ糖、ラクチュロース）で置換し、摂取量を同量にして、各群 6 匹ずつ 44 日間飼育した。②Outcome：難消化性糖質の違いによる高浸透圧性下痢誘発、腸内細菌の代謝産物である有機酸濃度および菌体酵素活性の差異を検討した。

【実験Ⅱ】①実験動物：Wistar 系幼若雄ラットを用い、AIN93 純化飼料組成の糖質 10% のうち 8% を 2 種類の異なる難消化性糖質（フラクトオリゴ糖、ラクチトール）で置換して摂取させ、高浸透圧性下痢を誘発させた。摂取 1~3 日後の高浸透圧性下痢期、7~10 日後の修復期、理想的な糞便を排泄する下痢修復後期に 5 匹ずつ、各群計 15 匹を割付けた。②Outcome：各期に 5 匹ずつと殺し、盲腸内容物中腸内細菌の培養および腸内細菌の DNA を用いた T-RFLP 解析、盲腸内容物中有機酸濃度、胆汁酸ならびに有害酵素活性の測定を行った。

【実験Ⅲ】①実験動物：Wistar 系生体雄ラットを用い、実験Ⅱと同様の方法（フラクトオリゴ糖、マルチトール）で飼育した。摂取 1~3 日後の高浸透圧性下痢期、下痢修復後期に 10 匹ずつ、各群計 20 匹を割付けた。

②Outcome：試料調製及び測定は実験ⅠおよびⅡと同一の方法で行った。また、各期の小腸、盲腸、結腸の消化管組織における変化について HE 染色を行って比較検討し、下痢修復に関連する要因を検索した。

(2) 健常なヒトを対象とした難消化性甘味糖質摂取による高浸透圧による一過性緩下作用に対する難消化性多糖の改善作用を比較検討する実験

①試験物質：高浸透圧性下痢を誘発させる難消化性糖質としてマルチトールとフラクトオリゴ糖を、下痢抑制作用を観察する食物繊維としてセルロースと低分子化アルギン酸ナトリウムを用いた。②対象および摂取方法：健常なヒトに小分子難消化性甘味糖質を少量より段階的に摂取させて高浸透圧による一過性緩下作用を誘発させた。本実験では摂取量 40g を最大とし、下痢誘発の観察されなかった被験者は下痢抑制実験から除外した。次に、こ

の誘発量に難消化性多糖 5g を添加して同時摂取させ、一過性緩下作用に対する抑制効果を比較検討した。

本研究は本大学動物実験指針を遵守して実施し、ヒトを対象とした実験は本大学研究倫理委員会の承認を得た後、被験者に十分な説明を実施して、文書によるインフォームドコンセントを得て実施した。

4. 研究成果

難消化性糖質経口摂取による下痢症状改善作用の機序を解明することを目的として、ラットを用いて難消化性糖質の種類と腸内細菌叢の変化を解析し、さらに消化管粘膜の形態的变化を観察した。また、ヒトに難消化性甘味糖質を摂取させて一過性の高浸透圧性下痢を誘発させ、これに異なる種類の食物繊維を添加したときの下痢抑制作用を比較検討した。おもな結果は以下の通りである。

(1) ラットへ小腸における消化性の異なる難消化性糖質 4 種類を摂取させてそれぞれ 44 日間飼育し多結果、難消化性糖質の種類によって高浸透圧性下痢の誘発と糞便性状およびその修復に有意な差異が観察された。また、腸内細菌の代謝産物である短鎖脂肪酸および有機酸、ならびに有害菌体酵素活性においても有意な差異が観察された (Fig. 1、2) (引用：雑誌論文③)。消化性が低く大腸において腸内細菌による資化性の高い難消化性糖質は、短鎖脂肪酸産生量が多く、また菌体有害酵活性の低いことが明らかになった。

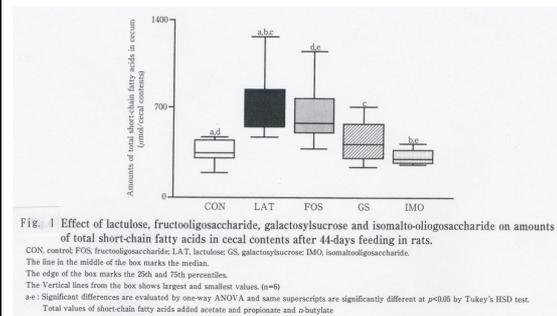


Fig. 1 Effect of lactulose, fructooligosaccharide, galactosylsucrose and isomaltoligosaccharide on amounts of total short-chain fatty acids in cecal contents after 44-days feeding in rats. CON, control; FOS, fructooligosaccharide; LAT, lactulose; GS, galactosylsucrose; IMO, isomaltoligosaccharide. The line in the middle of the box marks the median. The edge of the box marks the 25th and 75th percentiles. The vertical lines from the box shows largest and smallest values. (n=6) a-e: Significant differences are evaluated by one-way ANOVA and same superscripts are significantly different at p<0.05 by Tukey's HSD test. Total values of short-chain fatty acids added acetate and propionate and n-butyrate

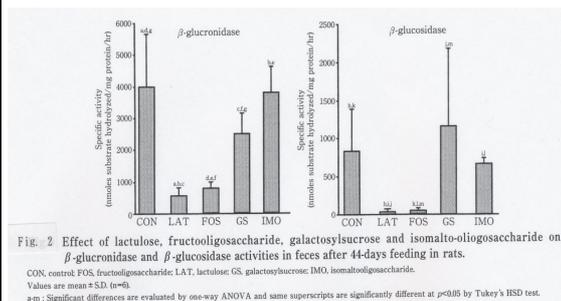


Fig. 2 Effect of lactulose, fructooligosaccharide, galactosylsucrose and isomaltoligosaccharide on β-glucuronidase and β-glucosidase activities in feces after 44-days feeding in rats. CON, control; FOS, fructooligosaccharide; LAT, lactulose; GS, galactosylsucrose; IMO, isomaltoligosaccharide. Values are mean ± S.D. (n=6). a-e: Significant differences are evaluated by one-way ANOVA and same superscripts are significantly different at p<0.05 by Tukey's HSD test.

(2) ラットへ難消化性オリゴ糖または糖アルコールを継続的に経口摂取させると、高浸透圧性下痢期（摂取 1-3 日後）にはコントロール群に比べて腸内細菌数が有意に増加し、この変化は高浸透圧性下痢誘発期間を通して継続した。下痢修復後期には腸内細菌数はコントロール群と同程度となった。また、腸内細菌数の変化に伴って有機酸産生量が変化した。下痢誘発から下痢修復までの腸内細菌叢の変化を、下痢誘発期、下痢修復期（修復した直後）、下痢修復後期（下痢修復 2 週間後）の 3 期に分け、腸内細菌の DNA を抽出して T-RFLP 解析を行った結果、それぞれの期別に特徴的な腸内細菌叢が観察された。また、これらの腸内細菌叢は摂取させた難消化性糖質に依存して異なることが観察された。

(3) ラットへ難消化性オリゴ糖または糖アルコールを継続的に摂取させ、下痢誘発期と下痢修復後期の消化管組織における変化を観察した。その結果、盲腸組織においてコントロール群と難消化性糖質摂取群に有意な差異が観察された。

Table 1. Suppressive effect of adding 5 g of cellulose or PHA-Na to test solution on osmotic diarrhea caused by maltitol ingestion in human subjects.

Sample No.	MMD (g)	Suppressive effect	
		Cellulose (5 g)	PHA-Na (5 g)
1	20	○	●
2	20	○	×
3	25	○	○
4	30	○	○
5	30	○	●
6	35	○	○
7	35	○	○
8	40	○	○
9	40	○	○
10	45	○	○
11	45	○	○
12	45	○	●
13	45	○	●
14	25	●	●
15	35	●	○
16	35	●	○
17	40	●	●
18	40	●	●
19	45	●	●
20	35	×	●
21	35	×	●
22	35	×	×
Number of trials		19	20
Number of salutary effects		13	10
% of improvement		68.4	50.0

○, suppressed osmotic diarrhea; ●, still experienced diarrhea; ×, did not completely ingest the mixed solution of maltitol and dietary fiber. MMD: the amount of maltitol that induced osmotic diarrhea in each subject. To evaluate the suppressive effect on diarrhea, 5 g of cellulose or PHA-Na was added to MMD.

(4) 健常なヒトへ難消化性甘味糖質であるマルチトールを摂取させて一過性の高浸透圧性下痢を誘発させ、これに不溶性食物繊維のセルロースおよび水溶性食物繊維の低分子化アルギン酸ナトリウムをそれぞれ添加して下痢誘発に対する抑制作用を観察した。その結果、セルロース添加および低分子化アルギン酸ナトリウム添加のいずれの場合にも高浸透圧性下痢誘発に対する抑制作用が観察され、セルロースの方が強い抑制作用を示した (Table 1) (引用: 雑誌論文①)。

また、ラットを用いてこの作用機序を検討した結果、いずれの食物繊維を添加した場合にもマルチトールの胃内容排出時間が遅延することが明らかになった (Fig. 3) (引用: 雑誌論文①)。

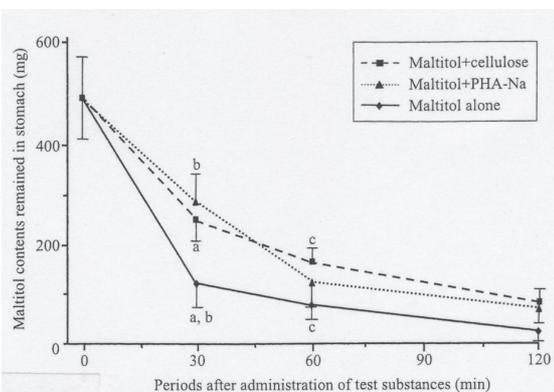


Fig. 3 Effect of adding cellulose or PHA-Na to a maltitol solution on gastric emptying in rats. ■, maltitol+cellulose; ▲, maltitol+PHA-Na; ◆, maltitol alone. Values were expressed as means and SD of 5 rats. The control solution of 2 mL of maltitol (300 mg/mL), a mixed solution of maltitol and cellulose [(300 mg+75 mg)/mL], or a mixed solution of maltitol and PHA-Na [(300 mg+75 mg)/mL] was administered to 20 rats in each group. Five rats from each group were sacrificed at 0, 30, 60 and 120 min, respectively. After the decapitation, the stomachs were removed and the digesta were collected from each rat, and the maltitol in the digesta was analyzed by the HPLC system. a, c: The maltitol content remaining in the stomach was significantly greater following the addition of cellulose than that of controls at 30 min ($p=0.019$) and 60 min ($p=0.013$) after administration, respectively, by ANOVA and Tukey's post hoc test. b: Maltitol contents remaining in the stomach following the addition of PHA-Na were significantly greater than that of controls at 30 min ($p=0.013$) after administration by ANOVA and Tukey's post hoc test.

ラットを用いた以上の実験結果から、難消化性甘味糖質経口摂取による下痢誘発と修復過程には腸内細菌数および細菌叢の変化と消化管組織の変化が相互に関連していることが示唆された。また、これらの変化は摂取する難消化性甘味糖質の種類に特徴的であることが示唆された。本研究は、難消化性甘味糖質

摂取によって誘発される高浸透圧性下痢の発症期とその修復過程における腸内細菌数ならびに細菌叢の変化およびそれに伴う代謝産物の変化を追跡したものであり、難消化性甘味糖質を用いた食品開発に重要な基礎資料を提供できるものとする。

一方、ヒトを対象とした実験においては、難消化性甘味糖質によって誘発した高浸透圧性下痢の抑制作用が水溶性食物繊維だけでなく不溶性食物繊維のセルロースに観察されることを明らかにし、セルロースの新規な機能性をはじめ報告した。消化管機能低下のある患者に対して経口補液療法や経管・経腸栄養を行うと下痢を誘発することが報告されており、下痢抑制は重要な課題となっている。本研究結果は、これら経口補液や経管・経腸栄養剤の改良に寄与できる資料を提供できたと考える。

下痢はさまざまな要因によって誘発するが、本研究によって、高浸透圧性下痢の誘発と修復過程には、難消化性糖質経口摂取による腸内細菌ならびに消化管組織の変化が関与していることが示唆された。今後、さらに難消化性糖質経口摂取による下痢抑制に関連する因子を明らかにし、相互関連性を検討する。

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)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Oku T, Hongo R, Nakamura S. Suppressive effect of cellulose on osmotic diarrhea caused by maltitol in healthy female subjects. *J Nutr Sci Vitaminol* 54, 309-314 (2008). 査読有.
- ② Nakamura S, Oku T. Bioavailability of 2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid as ascorbic acid in healthy humans. *Nutrition* 25, 686-691. (2009) [Feb 20th. 2008 Epub ahead of print] 査読有.
- ③ 田辺賢一, 中村禎子, 奥恒行. 難消化性オリゴ糖の性状の違いがラットの成長、高浸透圧性下痢誘発、脂質代謝、糞便有害酵素活性ならびに短鎖脂肪酸産生に及ぼす影響. *日本食物繊維学会誌* 12, 17-29 (2008). 査読有.
- ④ 奥恒行, 中村まり子, 石黒美智留, 田辺賢一, 山口義彦, 中村禎子. ヒトにおける糖アルコール含有チューインガムの肝下性および安全性の検討. *日本食物繊維学会誌* 11, 67-74 (2007). 査読有.
- ⑤ 奥恒行, 田辺賢一, 渡邊有希, 尾野春子, 成瀬真理, 中村禎子. 難消化性オリゴ糖の性状の違いがラットのカルシウムならびにマグネシウム代謝に及ぼす影響. *日本栄養・食糧学会誌* 60, 233-240 (2007). 査読有.

[学会発表] (計 12 件)

- ① Oku T, Nakamura M, Hashiguchi-Ishiguro M, Nakamura S. Laxative threshold and available energy of fructooligosaccharide, cellobiose, and lactulose in human adults. 6th International Fructane Symposium, July, 2008, Sapporo.
- ② Nakamura S, Tanabe K, Oku T. Digestibility and inhibitory effect of l-kestose on human and rat small intestinal disaccharidases. 6th International Fructane Symposium, July, 2008, Sapporo.
- ③ Nakamura S, Moji K, Sarker SA, Wahed MA, Wagatsuma Y, Oku T. Effect of fructo-oligosaccharide intake on improvement of diarrhea among children in Bangladesh urban slum by RCT. International Congress of Dietetics, Sept. 2008, Yokohama.
- ④ 川橋美保, 西紗樹子, 中村禎子, 辨野義己, 奥恒行. 難消化性甘味糖質誘発下痢の修復と腸内細菌叢変化の関連性. 第 13 回日本食物繊維学会学術集会, 2008 年 11 月, 東京都.
- ⑤ 本郷涼子, 中村禎子, 奥恒行. ラットにおけるマンニトールの腸内細菌を介した生体利用性の検討. 第 13 回日本食物繊維学会学術集会, 2008 年 11, 東京都.
- ⑥ 中村禎子, Sarker S, Wahed MA, 我妻ゆき子, 門司和彦, 奥恒行. フラクトオリゴ糖継続摂取がバングラデシュ都市部スラム街小児の下痢症状改善に及ぼす効果. 第 61 回日本栄養・食糧学会, 2007 年 5 月, 京都市.
- ⑦ 本郷涼子, 中村禎子, 奥恒行. マルチトール誘発下痢に対する水溶性ならびに不溶性食物繊維の抑制作用機序. 第 61 回日本栄養・食糧学会, 2007 年 5 月, 京都市.
- ⑧ 道川優子, 安藝真里子, 渡邊有希, 中村禎子, 奥恒行. ヒトにおける D-タガトースの生体利用性と有効エネルギー量. 第 61 回日本栄養・食糧学会, 2007 年 5 月, 京都市.
- ⑨ 中村禎子, 土橋一弘, 渡邊有希, 奥恒行. ヒト小腸粘膜ホモジネートならびにラット小腸粘膜微絨毛膜刷子縁を用いた 1-kestose の消化性と小腸二糖類水解酵素に対する阻害効果. 第 56 回日本応用糖質科学会, 2007 年 9 月, 藤沢市.
- ⑩ 田辺賢一, 川橋美保, 西紗樹子, 中村禎

子, 奥恒行. 難消化性オリゴ糖の違いがラットのカルシウムならびにマグネシウム代謝に及ぼす影響. 日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部大会, 2007年9月, 熊本市.

- ⑪ 川橋美保, 西紗樹子, 中村禎子, 奥恒行. 難消化性甘味糖質誘発下痢の修復過程における腸内細菌叢の変化. 日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部大会, 2007年9月, 熊本市.
- ⑫ 中村禎子, 中村まり子, 奥恒行. ヒトにおける1-ケストースの消化性と生体利用性. 第29回日本臨床栄養学会, 2007年11月. 京都市.

[図書] (計2件)

- ① 中村禎子. 第一出版. オリゴ糖・糖アルコール: 食物繊維: 基礎と応用 (日本食物繊維学会編集). 2008, 14ページ.
- ② 奥恒行, 中村禎子. 医学書院. 食物繊維 (プレバイオティクス), 新臨床栄養学 (岡田正, 馬場忠雄, 山城雄一郎編), 2007, 6ページ.

[その他]

- ① 奥恒行, 中村禎子. セルロースの新しい機能を発見. 第7回産学官連携推進会議パネル展示. 2008年6月. 京都市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 禎子 (NAKAMURA SADAKO)
長崎県立大学・看護栄養学部・助教
研究者番号: 60382438

(2) 研究分担者

奥 恒行 (OKU TSUNEYUKI)
長崎県立大学・看護栄養学部・教授
研究者番号: 50010096

(3) 連携研究者

辨野 義己
独立行政法人理化学研究所・微生物材料開発室
研究者番号: 40087599