

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 18 日現在

機関番号：27301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22300263

研究課題名（和文）老化促進マウスを用いた難消化性オリゴ糖・食物繊維の新しい機能探索に関する研究

研究課題名（英文）Study on new functions survey of nondigestible oligosaccharide and dietary fiber using accelerated senescence model mouse

研究代表者

奥 恒行 (OKU TSUNEYUKI)

長崎県立大学・看護栄養学部・名誉教授

研究者番号：50010096

研究成果の概要（和文）：

本研究は、2種類の老化促進モデルマウス（SAMP6、SAMP8）をコントロール(CON)飼料、難消化性オリゴ糖(FOS)飼料、食物繊維(GM)飼料で長期間飼育し、先天的に保有する疾病発症抑制とその要因について腸内細菌叢改善を介した Nutrigenomics の観点から解明するものである。SAMP6 では、CON 群に比較して FOS 群と GM 群の骨代謝関連マーカーが有意に良好で骨粗鬆症発症が遅延した。一方 SAMP8 では特に FOS 群において記憶障害および情動障害発症が有意に遅延し、その要因として腸内細菌を介した抗酸化・抗炎症作用との関連性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The object of the present study was to investigate the cause which the onset of inborn error of metabolism is suppressed, when senescence accelerated mouse-prone 6 and 8 (SAMP6 and SAMP8) were raised on non-digestible oligosaccharide (FOS) and dietary fiber (GM) diets for long period. The composition of diet fed changes intestinal microflora and is transformed the activity of metabolism. As a result, the products of intestinal microbes are changed quantitatively and qualitatively and the existence of host is affected. To clarify the interaction between the change of intestinal microflora and the vital activity of host via intestinal by FOS and GM feeding, the variation of biological markers in concerned with oxidative stress, immune function, and bone metabolism was investigated. In 2012 and 2013, SAMP6 (n=45) with three groups (n=15 each group) and SAMP8 (n=45) with three groups (n=15 each group) were raised on control diet (CONT), FOS diet and GM diet for 32 weeks or 43 weeks, and the biological markers were determined. In SAMP6 fed FOS diet and GM diet, intestinal microbes were improved and the bone metabolism became a very excellent. In especially, *Bifidobacterium* increased markedly and the activity of  $\beta$ -glucuronidase and  $\beta$ -galactosidase decreased in FOS group, while in GM group *Clostridium* increased and the activity of  $\beta$ -glucuronidase and  $\beta$ -galactosidase increased. However, the effect for RANKL and ICTP was different from between FOS group and GM group. These results demonstrate that the function mechanism of FOS and GM are different between FOS and GM. SAMP8 fed FOS diet and GM diet was determined memory and learning disorder and oxidative markers such as BAP test, d-ROMs test, 8-OHdG and isopratan. In FOS group and GM group, intestinal microbes were

improved and the senescence of brain was delayed. In addition, anti-oxidative function increased in comparison with that of control group, and inflammatory cytokines were suppressed. In 2013, in focus to brain function, SAMP8 was raised on CONT diet and FOS diet, and SAMR (normal senescence) was raised on CONT diet for 40 weeks to investigate the interaction among the memory and learning disorder, intestinal microbes and brain functions (amyloid- $\beta$ , catecholamine, brain histochemistry, cytokines, oxidative stress markers and et al.). The accumulation of amyloid- $\beta$  in brain was suppressed by FOS ingestion, but the concentration of catecholamine was not changed. Inflammatory cytokines were decreased by FOS ingestion, and anti-inflammatory cytokines were increased. The oxidative stress markers such as Bap test, d-Roms test, 8-OHdG and isoprastan were improved by FOS ingestion. These results demonstrate that long-term intake of FOS and GM improves intestinal microbes and also suppress or delay the learning and memory disorder and the aging in SAMP8. Thus, the suppression of oxidative stress and deposition of amyloid- $\beta$  through intestinal microflora is concerned with senescence and brain function.

#### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	10,600,000	3,180,000	13,780,000
2011年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2012年度	2,000,000	600,000	2,600,000
年度			
年度			
総計	15,400,000	4,620,000	20,020,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：老化促進マウス、難消化性オリゴ糖、食物繊維、腸内フローラ、SAMP マウス、記憶・行動異常、骨代謝

#### 1. 研究開始当初の背景

老化促進モデルマウス SAMP の存在を知ったが使用した経験はなかった。老化に腸内フローラが関わっているのではないかということ是指摘されていたが、プレバイオティクスが腸内フローラの改善を介して老化に関わっていることを証明した研究は皆無であった。我々は難消化性オリゴ糖や食物繊維などのプレバイオティクスの研究をヒトならびに動物を用いて長年研究していたので、老化と腸内フローラとの関係について老化促進モデルマウスを用いて検証することとした。

#### 2. 研究の目的

本研究の一つの目的は、老化によって発症する骨代謝異常が腸内フローラに直接的あるいは間接的に関わっていることを、老化に伴って骨粗鬆症が発症する SAMP6 を用いて検証することである。もう一つの目的は、老化に伴って発症する認知症が腸内フローラの変化によってもたらされていることを記憶・学習障害を発症する SAMP8 の飼育によって検証することである。

#### 3. 研究の方法

老化によって骨代謝異常が生じて骨粗鬆症が発症することが明らかにされているので、老化に伴って骨粗鬆症が発症する SAMP6 を難消化性オリゴ糖含有飼料ならびに食物繊維含有飼料で長期間 (43~44 週) 飼育して、骨代謝に及ぼす影響を観察した。

一方、老化に伴って認知症が発症することも明らかにされている。このため、老化に伴って記憶・学習障害を発症する老化促進マウス SAMP8 を難消化性オリゴ糖含有飼料ならびに食物繊維含有飼料で長期間 (43~44 週) 飼育して、学習・記憶に及ぼす影響を観察した。血液性状、尿性状、酸化ストレスマーカー、サイトカインなどの測定、出納試験、行動試験、画像解析などを行った。

#### 4. 研究成果

平成 22、23 年度には、老年性骨粗鬆症発症マウス SAMP6 および記憶・行動異常マウス SAMP8 をそれぞれ 45 匹(計 90 匹)を CON 飼料、FOS 飼料ならびに GM 飼料を用いて各群 15 匹ずつに分けて 32 または 43 週間飼育し、各生体指標に及ぼす影響を観察した。

SAMP6 については、FOS 群および GM 群のいずれも腸内フローラが良好になり Ca 代謝が改善した。特に、FOS 群では *Bifidobacterium* 属の占有率が高くなって  $\beta$ -グルクロニダーゼおよび  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性が低下した。GM 群では *Clostridium* 属が増加してこれらの有害酵素活性は増加した。しかし、FOS 群と GM 群では Ca 代謝に関する RANKL や I CTP などに及ぼす影響に差異があることからその作用機序が異なること示唆された。

SAMP8 については、パッシブアポイダンスを用いて記憶・行動異常と腸内フローラと尿および血液の酸化ストレスマーカーである BAP test、d-ROMs test、8-OHdG および

Isoprotane との関係を観察した。FOS 群および GM 群は対照群に比べて腸内フローラが改善されて脳老化が抑制され、また抗酸化作用が向上していることが観察された。さらに、血液の炎症性サイトカインが抑制されていることが明らかになった。平成 24 年度は、この結果を受けて脳機能に焦点をあて、SAMP8 を CON 飼料および FOS 飼料、正常老化マウス SAMR を CON 飼料で約 40 週飼育し、記憶・行動異常と腸内細菌と脳機能指標 ( $\beta$ -アミロイドタンパク質、カレコラミン、脳組織化学、サイトカイン、酸化ストレスマーカーなど) との関連を観察した。 $\beta$ -アミロイドタンパク質の蓄積は FOS 摂取によって抑制されたが、カレコラミン濃度は変化しなかった。炎症性サイトカインは FOS 摂取によって減少し、抗炎症性サイトカインは増加した。酸化ストレスマーカーである BAP test、d-ROMs test、8-OHdG および Isoprostane はいずれも FOS 摂取によって改善されることが観察された。脳組織における  $\beta$ -アミロイドタンパク質の蓄積の形態学的観察は現在進行中である。腸内フローラは老化に関わると共に、脳機能にも関与していることが明らかになった。しかし、どのような腸内細菌が骨代謝の改善や学習・記憶の改善に関わっているかは明らかになっていない。

#### 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 16 件)

1) ◦山口喜勇, 後田ちひろ, 宮原明美, 中村禎子, 田辺賢一, 奥 恒行; 老化促進マウス SAMP8 の加齢に伴う学習・記憶および情動と脳機能因子に及ぼす難消化性オリゴ糖継続摂取の影響. 日本栄養・食糧学会、2013/5/24-26、名古屋大学 (名古屋市).

2) ○中村禎子, 近藤直幸, 山口喜勇, 田辺賢一, 奥 恒行; 老化促進マウス SAMP8 における多尿ならびに高血糖の発症とその要因の検討. 老化促進モデルマウス研究協議会、2013/7/5-6、愛知学院大学 (名古屋市).

3) ○田辺賢一, 山口喜勇, 中村禎子, 奥 恒行; フラクトオリゴ糖摂取が腸内細菌叢の改善を介して老化促進マウス SAMP6 の酸化ストレスならびに骨代謝に及ぼす影響. 老化促進モデルマウス研究協議会、2013/7/5-6、愛知学院大学 (愛知県).

4) ○Yamaguchi Y; Kondo N; Tanabe K; Nakamura S; Oku T; Effects of long-term feeding with non-digestible oligosaccharide and dietary fiber on age-related learning and memory of senescence accelerated mice. 20th Inter Cong Nutr, Sep 16-23, 2013, Granada, Spain

5) ○田辺賢一, 北島美穂, 中村禎子, 奥 恒行; 老化促進マウス SAMP6 の骨粗鬆症発症に及ぼす難消化性オリゴ糖および食物繊維長期摂取の影響. 日本栄養・食糧学会、2012/5/18-20、東北大学 (仙台市).

6) ○山口喜勇, 近藤直幸, 橋口美智留, 田辺賢一, 中村禎子, 奥 恒行; 老化促進マウス SAMP8 の加齢に伴う脳機能因子に及ぼす難消化性オリゴ糖および食物繊維継続摂取の影響. 日本栄養・食糧学会、2012/5/18-20、東北大学 (仙台市).

7) ○山口喜勇, 中村禎子, 田辺賢一, 後田ちひろ, 近藤直幸, 奥 恒行; 老化促進マウス SAMP8 の学習・記憶能力ならびに脳機能因子に及ぼす難消化性オリゴ糖および食物繊維の継続摂取の影響. 日本食物繊維学会、2012/11/23-24、中村学園大学 (福岡市).

8) ○中村禎子, 伊森千晃, 橋口美智留, 田辺賢一, 奥 恒行; ラットにおける  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害物質と同時に摂取した消化性糖質のプレバイオティクス効果. 日本栄養・

食糧学会、2011/5/13-15、お茶の水女子大 (東京都).

9) ○江島寛幸, 伊森千晃, 福嶋恭子, 田辺賢一, 中村禎子, 奥 恒行; 老化促進マウス SAMP6 の各種生体指標に及ぼす難消化性糖質の影響. 日本栄養・食糧学会、2011/5/14、お茶の水女子大 (東京都).

10) ○高見昌之, 田辺賢一, 中村禎子, 奥 恒行; 老化促進マウス SAMP8 の腸内フローラに及ぼす難消化性糖質の影響. 日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部大会、2011/9/3-4、佐賀大学 (佐賀市).

11) ○江島寛幸, 田辺賢一, 中村禎子, 奥 恒行; 老化促進マウス SAMP8 の腸内細菌生成物に及ぼす難消化性糖質の影響. 日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部大会、2011/9/3-4、佐賀大学 (佐賀市).

12) ○近藤直幸, 中村禎子, 奥 恒行; 老化促進マウス SAMP8 の記憶・行動に及ぼす難消化性糖質の影響. 日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部大会、2011/9/3-4、佐賀大学 (佐賀市).

13) ○中村禎子, 福嶋恭子, 奥 恒行; 腸内細菌を介した難消化吸収性単糖・オリゴ糖の生体利用の相違. 日本食物繊維学会、2011/11/27-28、国立健康・栄養研究所 (東京都).

14) ○田辺賢一, 森山美枝, 中村禎子, 奥 恒行; 老化促進マウス SAMP6 の骨代謝に及ぼす難消化性糖質の影響. 日本食物繊維学会、2011/11/27-28、国立健康・栄養研究. (東京都).

15) ○江島寛幸, 田辺賢一, 中村禎子, 奥 恒行; 老化促進マウス SAMP6 の生体防御に及ぼす難消化性糖質の影響. 日本食物繊維学会、2011/11/27-28、国立健康・栄養研 (東京都).

16) 近藤直幸, 田辺賢一, 中村禎子, 奥 恒行; 老化促進マウス SAMP8 の記憶・行動異常に及ぼす難消化性糖質の影響. 日本食物繊

維学会、2011/11/27-28、国立健康・栄養研究  
(東京都)。

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

奥 恒行 (OKU TSUNEYUKI)

長崎県立大学・看護栄養学部・名誉教授

研究者番号：50010096

### (2)研究分担者

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

### (3)連携研究者

山口 義彦 (YAMAGUCHI YOSHIHIKO)

医療法人宏善会諫早記念病院・病院長

研究者番号：70253656

四童子 好廣 (SHIDOJI YOSHIHIRO)

長崎県立大学・看護栄養学部・教授

研究者番号：00111518