

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：84404

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659356

研究課題名(和文)腸内嫌気性発酵ガスによる新規食品機能概念の創生と代替医療への応用展開

研究課題名(英文)Effects of unabsorbable fibers and foods on biogas in adult human

研究代表者

下内 章人(Shimouchi, Akito)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号：80211291

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：腸内発酵を促進する食品群のうち代表的食品を選び、呼気成分に与える影響を検討した。乳糖を含む食品群では腸内嫌気性発酵が種々の腹部症状を引き起こすことがある。具体的には、成人を対象に食品摂取質問紙票の調査結果と生体ガスに関連、食物繊維と難消化性多糖類を含む食品摂取による呼気水素の急性変動を検討した。また乳糖を多く含む牛乳摂取に伴う腸内嫌気性発酵を抑制する方法を検討した。さらに嫌気性発酵ガス成分をより直接的に計測するため、糞便由来のガス成分の単位重量あたりガス放出量を計測するシステムを開発し硫黄化合物のガス放出量を計測可能にした。

研究成果の概要(英文)：Human body possesses H₂-producing process via colonic fermentation. Ingestion of milk causes a marked and sustained rise in breath H₂. Breath H₂ levels after milk ingestion had a significantly positive correlation to the venous Biological Anti-oxidant Potential. Milk and dairy decrease the risks of mortality from cerebrovascular disease or stroke. It is also reported that preventive effect of arcabose on cardiovascular events in diabetic patients might be attributed to H₂ increase in the body. Breath H₂ significantly decreases depending upon ages. Thus, we propose a hypothesis that molecular H₂ production by colonic fermentation may play a role of "endogenous" antioxidant weakly but for long-term periods of life. In the present study, we examined effects of various foods containing plenty of unabsorbable fibers on exhaled breath in adult humans.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：呼気水素 呼気成分 食物繊維 難消化性多糖類 代替医療

1. 研究開始当初の背景

呼気水素 (H_2) は従来、大腸における未消化炭水化合物の嫌気性代謝醗酵によるものとされ、主に小腸通過時間、腸内異常発酵、小腸内細菌叢の存在、過敏性腸症候群などの消化器疾患の診断に用いられてきた。1988年英国研究者により H_2 の還元性から酸化ストレスの消去作用を予測する仮説が提唱されたが、2007年以降、吸入 H_2 は脳梗塞/心筋虚血再還流障害や肝障害、小腸移植などの動物モデルにおける反応性の強い $OH\cdot$ を選択的に消去し、酸化ストレス障害を有意に改善することが報告された。さらに H_2 を溶存させた水素水の飲水によりマウスの拘束ストレスモデルに伴う認知機能低下の改善作用が報告され、種々の酸化ストレス性動物モデルの病態が H_2 吸入または水素水の飲水により改善することが明らかにされつつあり、論文報告は100編を超えようとしていた。他方、生体内 H_2 は食物残渣物が下部消化管に到達した後、腸内細菌の醗酵作用で生成されることから小腸通過時間の測定や消化不良の指標として用いられてきたが、 H_2 の抗酸化作用が明らかとなるに至り、腸内醗酵に伴う H_2 の生理的効能を再評価する必要がでてきた。これに関連し、これまで申請者はウコン含有のカレーには腸内嫌気性による生体内 H_2 濃度を高め、 H_2 分子による $OH\cdot$ 消去が期待されること (Shimouchi A. *et al.* DDS, 2009)、また、牛乳摂取による呼気 H_2 生成量が水素水飲水と比較し60~100倍以上高いこと (Shimouchi A, *et al.* Biomarker Insights, 2010)、さらにこの際、少数例であるが、呼気 H_2 が抗酸化ストレス能と有意な正相関を示すことを明らかにしていた。

2. 研究の目的

本研究では「腸内嫌気性醗酵を促進させる食品群には生体内活性酸素消去による抗酸

化ストレス作用がある」という仮説を立て、腸内醗酵を促進する食品群のうち代表的食品を選び、呼気水素に与える影響を検討した。さらに未消化のまま下部消化管に至り腸内醗酵による生成ガス成分中には H_2 のような有用な生理機能を発揮する成分が他にもあると考えた。他方、乳糖を含む食品群では腸内嫌気性発酵が種々の腹部症状を引き起こす原因ともなることがある。そこで平成24~26年度の3年間にわたり、以下の項目について調査した。「生体微量ガスの調査」に参加した成人1011名を対象に呼気 H_2 を含む生体微量ガス成分と食品嗜好の関連を詳細に解析した。食物繊維と難消化性多糖類を含む食品摂取による呼気水素の急性変動を検討した。乳糖を多く含む牛乳摂取に伴う腸内嫌気性発酵を抑制する方法を検討した。

採取した新鮮な糞便からのガス放出量を連続的にモニター可能なシステムを開発し、糞便由来の付着性ガスの定量分析を行った。

3. 研究の方法

調査1. 食品嗜好と呼気成分の関連

この調査では牛乳・乳製品嗜好者における呼気水素と種々の健康関連因子の疫学的検討を行った。方法は乳製品嗜好と呼気水素の関連をみる目的で早朝空腹の成人被験者1011名を対象に、高純度空気を呼吸した状態で、安静時分時呼気流量と呼気水素 (H_2) をガスクロマトグラフ半導検知により計測した。また静脈血の一般スクリーニング検査、食品嗜好を含む生活習慣に関するアンケート調査を実施した。被験者には早朝空腹の状態で来研してもらい、高純度人工空気を約12分間呼吸した状態で安静時の呼気・皮膚ガスを採取し、 H_2 以外にも超高感度質量分析による質量スペクトラムと CH_4 , CO , NO/NOX , O_2 , CO_2 等の低分子化合物を GCMS GC 半導体検知、化学発光法ならびに質量分析装置により分

析した。また静脈血採血を行い、一般スクリーニング検査を実施した。

調査 2．食物繊維を含む食品群の呼気水素に与える影響

公募被験者による健康成人を対象に、前日は乳製品、大豆食品、食物繊維など呼気水素濃度を高める可能性のある食品をひかえ、早朝空腹状態で調査に参加してもらった。同量の玄米由来の玄米または白米、糠水溶液（いずれも 25 g）のいずれかを一定速度で摂取し、摂取前、摂取後 9 時間までの各 1 時間毎の呼気を採取し呼気の急性変動を計測した。以上の実験は無作為交叉により 1 週間以上の間隔をあけた上で実施した。

調査 3．牛乳摂取時におけるクルクミンの腸内発酵抑制作用

乳糖不耐性では乳製品の大量摂取時に腹痛、腹部膨満感、下痢・軟便、放屁などの自覚症状が出現する。乳糖不耐性は成人で頻度が高く世界人口の 70%、日本人成人の 90% に達する。大部分は原発性成人型ラクターゼ欠乏症で、乳幼児過頃からの小腸ラクターゼ活性の低下による。他方、アーユルベエダによればターメリックは腹部膨満感を解消するとされている。そこで牛乳摂取時のクルクミン添加の腸内発酵への効果を検討した。成人被験者はクルクミン非摂取期間を 1 週間以上置いた後、早朝空腹の状態でクルクミン（20mg または 0mg）を添加した牛乳 200mL を摂取、投与後 6 時間後まで 15 分毎に終末呼気を採取し、呼気水素の経時変化をみた。呼気水素はガスクロマトグラフ半導体センサーで計測した。クルクミン添加の有無は無作為交差により実施した。

調査 4．ヒト糞便中から放出される硫黄化合物の動態

硫化水素は他のガス状低分子の NO や CO と並んで重要な生理機能を果たす。種々の臓器で硫化水素合成酵素を発現し、その受容体は KATPkinase である。NaHS の腹腔内持続注入

によりマウス心筋梗塞モデルの NO 障害を抑制し循環器疾患の病態生理に關与する。また歯科口腔感染症のみならず慢性気道感染、cystic fibrosis などで呼気 H₂S が上昇する。他方、硫化水素は硫黄を含む蛋白やアミノ酸、アニリンなどの摂取や腸内発酵により生成され、放屁中の硫黄化合物は大腸がんと密接な関連を有すると報告されている。こうしたことから硫化水素計測の医学的意義は高まりつつあるが、反応性・付着性が強く、ガス採取保管に工夫を要する。健康成人を対象に排便から放出されるガス成分を調査した。昼食後に定期的に排便できる被験者を選んで、その糞便塊を嫌氣的に採取バッグに落とし込み、ただちに密封し、一定量の純窒素または人工空気を入れ、38℃ で加温、低流量の窒素ガスを還流しながらヘッドスペースガスを間歇的または連続的に採取できるシステムを製作した。これを用いて糞便から放出される付着性の強いメルカプトエタノールや硫化水素、アンモニアなどを高感度かつ計測が容易な環境モニター用途に開発された検知テープ光電光度法と北側式検知管を用い、糞便から放出される硫黄化合物の計測を試みた。特記すべき疾患のない成人の排泄直後の糞便を空気または純窒素存在下でただちに密封封入後、室温または 37℃ で保管し、定時間隔でヘッドスペースの硫化水素、二酸化硫黄、メルカプトエタノールなどを計測した。

4．研究成果

調査 1．食品嗜好と呼気成分の関連

乳製品の食品嗜好を「常に」から「ときどき」まで摂取するとした女性群では 90% 以上、男性群では 80% 以上に及び、乳製品摂取頻度は女性に高い傾向が認められた。男女共に年代が上がるにつれ乳製品の摂取率が増加した。乳製品嗜好は野菜、肉、魚肉、甘味類と有意の正相関を示し、他方、辛い・塩辛いものへの嗜好とは負の相関を示した。また飲

酒・喫煙習慣が少ない傾向にあった。乳製品を全く摂取しない群の血液検査結果では、アルブミンは有意に低下し、GOT, GPT, GTP, 直接ビリルビン, 尿酸は有意に増加した。喫煙者を除外した解析では乳製品摂取が頻回である群では早朝空腹時の呼気水素が有意に高かった。乳製品嗜好の程度とBMIは無関係であったが、脂質検査の総コレステロール, HDL/LDL コレステロール値, 中性脂肪などでは乳製品嗜好各群間では有意差はないものの肝機能・尿酸値は非摂取群と比較し良好であり、いわゆる機能性食品として種々のポテンシャルを示唆していた。また乳製品嗜好には野菜・魚肉嗜好があり飲酒・喫煙習慣は少ない傾向が認められたことから乳製品摂取者の健康意識が高いことも伺え、これが血液検査結果に反映されていることも推察された。乳製品嗜好者では呼気水素が比較的高かった理由として、早朝空腹の状態でも前日の未消化残渣物の腸管内残留による影響と考えられた。また、乳製品嗜好の有無は総窒素酸化物排気量に影響しなかったが、乳製品の摂取頻度が低下するにつれ、一酸化窒素排気量が減少し、二酸化窒素排気量が増加したことから、一酸化窒素が酸化されやすい生体内環境にあることを示唆し、活性酸素種による酸化である可能性も考えられた。水素のラジカル消去は弱いながらも腸内醗酵に伴う内因性水素の多寡が慢性長期的には生活習慣病の発症や老化現象に繋がるものと考えられた。日常生活行動内における呼気水素変動は著しい。このため一時点で計測した呼気水素をもって生体内水素の病態生理学的意義を論ずることは難しく、今後、牛乳・乳製品摂取に伴う腸内水素産生の酸化ストレス消去作用効果を厳密に評価するためには簡便な呼気水素ガスモニタリング法と *in vivo* ラジカル検出法を開発し、本調査の仮説の成否をさらに検証していく必要がある。

調査 2 . 食物繊維を含む食品群の呼気水素に

与える影響

玄米・白米・糠を摂食前と直後におけるベースラインの呼気水素は5~15ppm とばらつきがあったが、食直後1時間から4時間後にかけて呼気水素は安定する傾向にあった。しかし、5時間を経過したところから玄米摂食時には呼気水素濃度は徐々に増加し、平均20ppm程度まで増加した。糠と白米の摂食では呼気水素の有意な増加は認められなかったが、玄米摂食では8~9時間後に呼気水素は有意な増加を認めた。玄米食は牛乳やラクツロースほどの呼気水素上昇作用は顕著ではないが、呼気水素の変動パターンは生体内酸化ストレスのそれに類似し、朝食にしっかりと玄米を食することで腸内発酵由来水素分子の果たす抗酸化作用が期待できた。

調査 3 . 牛乳摂取時におけるクルクミンの腸内醗酵抑制作用

クルクミン無添加では牛乳摂取後1時間後から呼気水素は徐々に増加し、4時間後にピークを迎え、6時間後には呼気水素濃度はやや低下した。クルクミン添加では呼気水素の上昇は抑制され、6時間後によりやくクルクミン無添加のレベルに達した。同一被験者でクルクミン投与を増やしたところ容量依存的に曲線下面積は低下した。以上から牛乳に添加したクルクミンには腸内細菌叢に対して静菌的作用がある可能性が考えられた。クルクミン添加は呼気水素上昇を緩やかに抑制し一過性であった。乳糖不耐性に対する対処法としてクルクミンの添加が有効であると考えられた。

調査 4 . ヒト糞便中から放出される硫黄化合物の動態

独自に考案した糞便採取システムを用いたところ、嫌氣的に体温と同程度に保管することにより鋭敏に硫黄化合物の放出速度を計測できた。糞便温度、糞便ガス放出への影響を検討した結果、腸内ガス環境の状況に近い低酸素状態で37℃に置くと糞便の硫黄化

合物の放出速度が有意に増加し、嫌気性・生理的温度下では糞便中細菌の硫化水素産生能が亢進した可能性が示唆された。しかし、この条件下でも時間経過と共に糞便からの硫化水素放出が減少傾向にあり、糞便からのガス放出、便への再吸着、バッグ内面への付着、化学反応による消失などの可能性も考えられ、計測法にさらに工夫が必要と考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

1. Shimouchi A, Nose K, Mizukami T, Che DC, Shirai M. Molecular hydrogen consumption in the human body during the inhalation of hydrogen gas. *Adv Exp Med Biol.* 789:315-321. 2013(査読有)
2. Che DC, Shimouchi A, Mizukami T, Nose K, Seiyama A, Kasai T. Emanation of hydroxyl radicals from human skin. *IEEE Sensors J* 13(4):1223-1227, 2013 (査読有)
3. Wakida S, Miyado T, Shimazu K, Shibutani Y, Mizukami T, Nose K, Shimouchi A. High-Throughput Separation Assay for NO Metabolites in Blood Using Microfluidic Electrophoresis. *ECS Trans.*50(12): 165-170, 2013 (査読有)
4. 下内章人, 宮道隆, 神野直哉, 水上智恵, 近藤孝晴. 玄米, 白米ならびに糠の摂食による呼気水素の変動比較. 安定同位体と生体ガス 6(1): 33-38, 2014 (査読有)
5. 利川 寶, 下内章人, 池田大祐, 鈴木登, 大槻知佐, 木村郁彦. 携帯型呼気水素計測器の開発と臨床使用経験. 安定同位体と生体ガス, 5(1): 7-13, 2013 (査読有)

[学会発表](計11件)

1. Shimouchi A, Kondo T. Possible clinical significance of breath hydrogen monitoring as an anti-oxidative biomarker. *Breath Analysis Summit 2013*, Saarbruecken, Germany, June, 2013.
2. Shimouchi A, Mizukami T, Jinno N, Taniguchi K, Nose K, Kondo T. Breath hydrogen may be an anti-oxidative biomarker. 17th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research International (SFRR 2014), Kyoto, May 2014
3. Shimouchi A, Kondo T. Possible clinical significance of breath hydrogen monitoring as an anti-oxidative biomarker. *Breath Analysis Summit 2013*, Saarbruecken, Germany, June, 2013.
4. Shimouchi A, Nose K, Mizukami T, Che D-C, Shirai M. Hydrogen Consumption in the Human Body during the Inhalation of Hydrogen Gas. (English Symposium) Tokyo, April, 2012
5. Shimouchi A, Nose K, Mizukami T, Che D-C, Shirai M, Kondo T. Molecular Hydrogen Consumption in the Human Whole Body during Inhalation of Hydrogen Gas, *International Society of Oxygen Transport to Tissues*, July, 2012, Belgium.
6. 下内章人, 野瀬和利, 神野直哉, 山口誠, 近藤孝晴. 牛乳摂取におけるクルクミンの併用効果. 第6回日本安定同位体・生体ガス医学応用学会, 2014年10月30日, 東京
7. 下内章人, 宮道隆, 神野直哉, 水上智恵, 近藤孝晴. 玄米, 白米ならびに米糠の摂食による呼気水素の変動. 第6回日本安定同位体・生体ガス医学応用学会, 2014

年 10 月 30 日，東京

8. 下内章人，池田大祐，鈴木登，大槻知佐，野瀬和利，木村郁彦，利川寶．携帯型呼気水素計測器の開発と臨床使用経験．第 63 回日本分析化学討論会 2014 年 9 月，広島
9. 下内章人，野瀬和利，山口誠，神野直哉．牛乳摂取時におけるクルクミンの腸内醗酵抑制作用．第 67 回日本酸化ストレス学会，2014 年 9 月，京都
10. 下内章人，野瀬和利，水上智恵，神野直哉．ヒト糞便から放出される硫黄化合物の計測．第 5 回日本安定同位体・生体ガス医学応用学会，2013 年 11 月 9 日，東京
11. 下内章人，細田享平，水上智恵，野瀬和利，利川寶．呼気水素の日内変動と携帯型呼気水素計測器の使用経験．第 4 回日本安定同位体・生体ガス医学応用学会，2012 年 10 月，東京

〔図書〕(計 5 件)

1. 下内章人．呼気検査による診断的価値と市場．非侵襲的検体検査の最前線 唾液検査・呼気検査を中心に．シーエムシー出版，東京，pp159-165 2015 年
2. 下内章人．生体内活性酸素が生体ガス分析からみえてくる．医療ガス情報ファイル 13:4-11，2014．
3. 下内章人．分析化学から臨床研究，医療応用への道のり ぶんせき 12:699 2014．
4. 下内章人．Breath Analysis 2014.Aroma Research 15(3):270-271,2014.
5. 下内章人，近藤孝晴．呼気ガス医療診断の現状と課題，今後の展望．応用物理 83(1)：26-32，2014．

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

http://www.ncvc.go.jp/res/divisions/cardiac_physiology/studium_b.html

6．研究組織

(1)研究代表者

下内 章人 (SHIMOUCHI, Akito)

国立循環器病研究センター研究所・心臓生理機能部・室長

研究者番号：80211291

(2)研究分担者

佐田 誠 (SATA, Makoto)

国立循環器病研究センター・病院・医長

研究者番号：00280892

(3)連携研究者

近藤 孝晴 (KONDO, Takaharu)

中部大学・生命健康科学部・教授

中部大学研究者番号：20135388