

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 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：2014～2016

課題番号：26560059

研究課題名(和文)大腸水素によるメタボリックシンドローム抑制の新戦略創生

研究課題名(英文)Creation of a new strategy for prevention of metabolic syndrome by colonic hydrogen

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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：大腸発酵によって生成される水素がその還元性により食餌性肥満誘導ラットの脂肪組織で炎症を抑制する可能性を調べた。同時に持続的な大腸水素生成に必要な発酵基質量を調べた。その結果、発酵性難消化性糖質由来の大腸水素により脂肪組織中水素濃度が高まり、炎症性サイトカインであるIL-6の脂肪組織からの分泌が抑制されることを見出した。また、持続した大腸水素生成を可能にするために大腸で利用される以上の難消化性糖質を供給することが必要であることがわかった。以上より、十分量の難消化性糖質の供給は大腸からの持続的な水素デリバリーを可能にし、炎症軽減を介したメタボリックシンドローム抑制につながることをわかった。

研究成果の概要(英文)：We examined whether the reducing power of hydrogen molecules (H₂) generated by colonic fermentation could suppress inflammation in diet-induced obese rats. Additionally, we sought to determine the minimum amount of fermentation substrate needed to maintain high colonic H₂ production for 24 h. We found that a high production of colonic H₂ over 24h, derived from the delivery to the large intestine of more non-digestible saccharides than could be used, increased the concentration of H₂ in the adipose tissue and suppressed the secretion of IL-6, which is a proinflammatory cytokine. In short, a high H₂ production from the large intestine over a 24 h period was achievable when sufficient amounts of non-digestible saccharides were delivered to the large intestine as a fermentation substrate, with the resultant high production of H₂ leading to inhibited metabolic syndrome via the alleviation of inflammation.

研究分野：栄養化学

キーワード：水素 大腸発酵 メタボリックシンドローム 難消化性糖質

1. 研究開始当初の背景

肥満はメタボリックシンドロームの発症に強く関与している。肥大化した脂肪組織は低レベルの慢性炎症状態にあり、この状態に維持されることでインスリン抵抗性が誘導される。脂肪組織で慢性炎症を惹起する要因に酸化ストレスの上昇があり、酸化ストレスを軽減する研究が広く行われている。水素分子(H₂)が生体内酸化ストレスを軽減することが明らかにされた後、我々は難消化性糖質の大腸発酵により生成するH₂に着目し、そのH₂が肝酸化ストレスの抑制に有効であることを証明した。また、大腸H₂が腹腔内にも一部拡散し、腹腔内組織のH₂供給に寄与することを突き止め、特に脂肪組織に多量のH₂が移行していることを明らかにした。呼吸や放屁への既知の大腸H₂排出経路から考えると、腹腔内へのH₂拡散は衝撃的事実であり、そのH₂が腹腔内組織、特に脂肪組織で酸化ストレスの軽減に貢献し、メタボリックシンドロームの発症抑制しようという仮説を立てた。大腸H₂生成を促し、安定的に脂肪組織にH₂を供給することができれば、慢性炎症を緩和しメタボリックシンドロームを抑制しようことが予想される。

2. 研究の目的

難消化性糖質の摂取によって多量に発生する大腸H₂は生体内の腹腔内組織におけるレドックス状態の維持に寄与する。メタボリックシンドロームの発症と進展に酸化ストレスの上昇が関わっている。特に肥満により肥大化した脂肪組織では酸化ストレスを要因とする低レベルの慢性炎症状態にある。本研究では、大腸発酵によって生成されるH₂の生体内還元性を介して食餌性肥満誘導ラットの脂肪組織で炎症を抑制する可能性を調べた。同時に大腸H₂生成の安定化に必要な発酵基質を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 難消化性糖質由来の大腸H₂による脂肪組織における慢性炎症抑制

コントロール食(C; 脂肪エネルギー比12%)で予備飼育後、SD系雄ラット(8週齢)を体重とH₂排出量を基準に2群に組分け、それぞれにC食(n=8)と肥満誘導食(HF, 脂肪エネルギー比48%; n=32)を28日間与え、肥満を誘導した。誘導28日後、体重を基準に肥満誘導ラットを3群に組分け、2群にHF食(HFC群とHFH群)を、残りの群にHF+5%FOS食(HFF群)をさらに28日間与えた。HF食を与えた1群にH₂水(平均濃度600 μmol/L; HFH群)を飲水投与した。試験21日後に腹腔内グルコース負荷試験(IPGTT; グルコース投与量1g/kg体重)を行った。試験最終日にペントバルビタール麻酔下で門脈を採取し、H₂濃度およびエンドトキシン濃度を測定した。腎周囲脂肪組織を

採取し、H₂濃度と分泌サイトカイン量を測定した。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) 難消化性糖質摂取による大腸H₂生成の安定性

難消化性糖質として、Bifidobacteriumのような特定の細菌を顕著に増加させることなく、いずれの細菌でも利用可能なグルコースを構成糖とする、高アミロースでんぷん(HAS)を用いた。

大腸に供給される難消化性糖質量の確認
HASは一部消化されることが知られているため、正確に大腸に供給される糖質量を調べた。予備飼育後のSD系雄ラット(8週齢)に麻酔下で回直腸吻合手術(Ope, n=13)および偽手術(Sham, n=12)を施した。術後14日間回復させ、成長速度が術前と同等になったのを確認した後、体重を基準にそれぞれをさらに2群ずつに組み分けた(n=7ないし6)。Ope群とSham群の各1つの群にC食を、もう一方の群に20%HAS食を7日間与えた。試験最終3日間の糞を採取し、でんぷん排泄量を求めた。

口から肛門までのでんぷん消化率をコントロール食Shamラットのデータを用いて以下の式で算出した。

$$\text{でんぷん消化率}_{\text{口肛門}} = \frac{((\text{でんぷん摂取量} - \text{でんぷん排泄量}) / \text{でんぷん摂取量}) \times 100}{}$$

口から小腸までのでんぷん消化率をコントロール食を与えたOpeラットのデータを用いて上記と同様に求めた。

HAS消化率をHAS食ラットのHAS摂取量と糞でんぷん排泄量から算出した。HAS由来の糞でんぷん排泄量をHAS食ラットのでんぷん排泄量からコントロール食ラットのそれを差し引くことで求めた。

大腸におけるでんぷん利用量を以下の式により算出した。

$$\text{大腸でんぷん利用率} = \frac{((\text{でんぷん摂取量} - \text{小腸消化でんぷん量} - \text{でんぷん排泄量}) / \text{でんぷん摂取量}) \times 100}{}$$

大腸におけるHAS由来でんぷんの利用率も同様に求めた。

十分量の難消化性糖質を大腸に供給したラットにおける大腸H₂生成変動

HAS摂取時の大腸H₂生成の日内変動を明らかにするため、HAS食ラットで24時間の呼吸+放屁)H₂排出量変動を調べた。

予備飼育後、SD系雄ラット(8週齢)を体重とH₂排出量を基準に2群に組分け(n=9)、それぞれにコントロール食と20%HAS食を28日間与えた。試験開始時、7、14、28日後に4時間ごとの(呼吸+放屁)

H₂ 排出量を 24 時間測定した。測定時の給餌は暗期のみとした。明期開始時をツァイトゲバー時間 (ZT) の 0 時間とし、そこから測定を開始した。

大腸資化可能量と同等量の難消化性糖質を供給したラットにおける大腸 H₂ 生成変動十分な発酵基質量が大腸に供給されない場合、大腸 H₂ 生成を 24 時間高く維持できるかを明らかにするため、大腸で 24 時間資化できる難消化性でんぷん量に相当する HAS をラットに与えたときの 24 時間の (呼吸+放屁) H₂ 排出量変動を調べた。

予備飼育後、SD 系雄ラット (8 週齢) を体重と H₂ 排出量を基準に 2 群に組分け (n=7 ないし 8) それぞれにコントロール食と 10% HAS 食を 14 日間与えた。14 日後に 4 時間ごとの (呼吸+放屁) H₂ 排出量を 24 時間測定した。測定条件を上記と同様に実施した。

4. 研究成果

エネルギー摂取量、体重増加量に群間差はみられなかった。腎周囲脂肪組織重量は、C 食群に比べ脂肪誘導食群で有意に高かった。IPGTT の結果 (Fig.1) より求めた曲線下面積は、統計的有意差に至らなかったが、HFF 群と HFH 群で HFC 食群の 84% だった (Fig.1)。HFF 群の (呼吸+放屁) H₂ 排出量、門脈 H₂ 濃度および腎周囲脂肪 H₂ 濃度は HFC 群より有意に高かった (Fig.2)。このことから FOS 由来の大腸 H₂ が耐糖能改善に寄与している可能性が考えられる。一方、H₂ 水を与えた HGH 群のそれらは HFC 群の約 2 倍をいずれも示したが、統計的有意差は認められなかった。H₂ 水を与えたラットでは脂肪組織などに存在する H₂ 濃度は低いものの、持続的に一定量の H₂ に曝露されていると考えられ、これが耐糖能改善に寄与していると思われる。H₂ の作用は拡散律速であると考えられるため、低濃度であっても曝露され続けることで酸化ストレスの軽減につながると予想される。

脂肪組織より単離した脂肪細胞から、炎症性サイトカインの 1 つである IL-6 分泌量は HFC 群に比べ有意に HFF 群で低かった (Fig.3)。また、HFH 群のそれは HFC 群に比べ低下傾向を示した。したがって、FOS 由来の大腸 H₂ により脂肪組織で生ずる炎症が抑制されることが示唆された。以前の我々の研究において、FOS を与えた肥満誘導ラットで大腸 H₂ が腎周囲脂肪の IL-6 mRNA 量を低下させることを明らかにしている。タンパク質レベルでも同様の変化が観察され、大腸 H₂ による炎症抑制が強く期待される。高脂肪食により肥大した脂肪組織では酸化ストレスの上昇に伴い、低レベルの慢性炎症が引き起こされることが知られている。これはメタボリックシンドローム発症の要因の 1 つであるため、大腸 H₂ はメタボリックシンドローム発症抑制に少なくとも一部寄与して

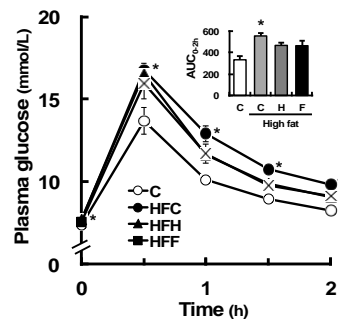


Fig.1 食餌性肥満誘導ラットにおける FOS による血糖値変動

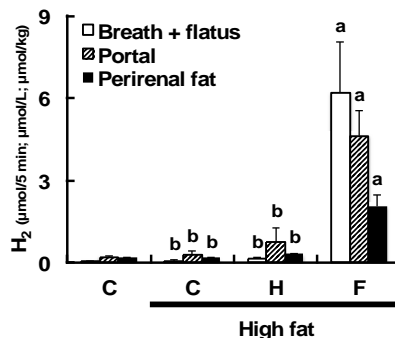


Fig.2 食餌性肥満誘導ラットにおける FOS 摂取による (呼吸+放屁) H₂ 排泄量、門脈 H₂ 濃度および脂肪組織 H₂ 濃度の変化

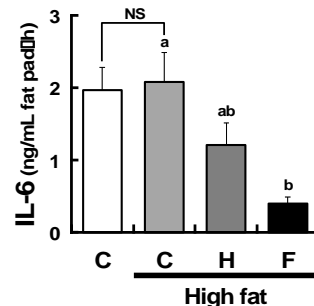


Fig.3 食餌性肥満誘導ラットにおける FOS による脂肪組織からの IL-6 分泌への影響

Table 1 食餌性肥満誘導ラットにおける FOS による脂肪組織からの TNF- α と MCP-1 分泌への影響

	ng/mL fat pad/h	
	TNF- α	MCP-1
C	0.19 \pm 0.10	9.47 \pm 1.44
HFC	0.04 \pm 0.02	10.2 \pm 1.4
HFH	0.02 \pm 0.01	13.0 \pm 2.1
HFF	0.03 \pm 0.00	7.52 \pm 1.47

いると考えられる。

一方、門脈エンドトキシン濃度に群間差は認められなかった (データ未掲載)。高脂肪食摂取はエンドトキシン流入の増大し、炎症を誘導するとされているが、本研究における炎症抑制にエンドトキシン流入の変化が関

与している可能性は低いであろう。しかし、リンパ管を介した流入について本研究で調べておらず、エンドトキシン流入への影響を完全には否定できない。

以上をまとめると、大腸 H₂ 生成を亢進させることは生体内酸化ストレスの軽減を誘導し、メタボリックシンドロームの発症抑制につながることを期待できる。したがって、安定的かつ持続的に生体内に H₂ をデリバリーすることがメタボリックシンドローム抑制に寄与すると考えられる。

持続的な大腸からの高 H₂ デリバリーを可能にする発酵基質量を明らかにするため、発酵基質として HAS を用いその消化管動態と H₂ 生成との関係を調べた。十分量の発酵基質を大腸に供給できる 20% HAS 食を正常ラットおよび大腸切除ラットに与えた結果、HAS の小腸消化率は 53.0% であり、大腸に供給される HAS の難消化性画分は 1.6 g であった (Table 1)。また、その難消化性画分が 1 日に大腸で利用される量は、1.1 g (摂取量に対し、大腸利用は 24.3%) であることがわかった (Table 1)。HAS を与えなかった場合 (でんぷん源はコーンスターチのみ)、小腸におけるでんぷん消化率はほぼ 100% であり、発酵基質の供給源とならないことは明らかである。20% HAS 食ラットの (呼吸+放屁) H₂ 排出量は、24 時間高く維持されたのに対し (Fig.4) 10% HAS 食ラット (0.9 g の HAS 難消化性画分を大腸に供給可能) で H₂ 排出量を 24 時間高く維持することはできなかった (Fig.5)。したがって、腸内細菌が資化できるより多くの発酵基質を大腸に供給できれば、高 H₂ 生成を維持できうると考えられる。

以上より、大腸で利用されるよりも多くの発酵基質を大腸に供給することで高 H₂ 生成を持続できることがわかった。これにより、酸化ストレスを軽減でき、メタボリックシンドローム抑制に寄与しうると考えられる。

Table 2 コーンスターチ由来および HAS 由来の でんぷん消化率と大腸利用率

	Control diet	20% HAS diet
Starch digestibility (%)		
Total starch		
Mouth-small intestine	99.5±0.0	80.1±1.5***
Mouth-anus	99.9±0.0	90.5±1.9***
Colonic utilization	0.4±0.0	10.5±1.5**
Starch derived from HAS		
Mouth-small intestine	—	53.0±5.3
Mouth-anus	—	77.4±4.5
Colonic utilization	—	24.3±3.5

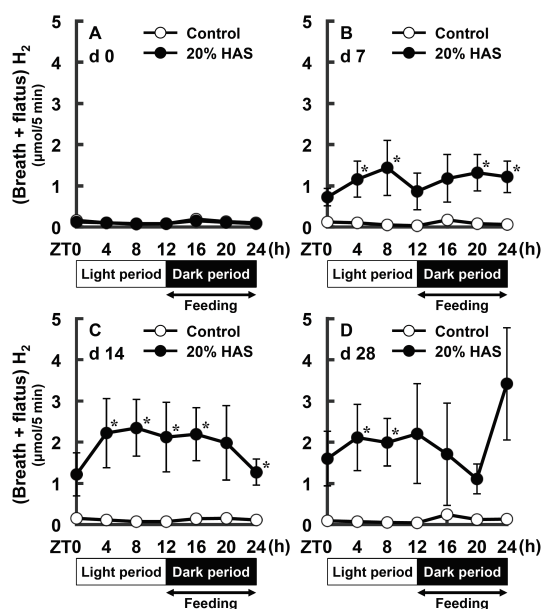


Fig.4 20%HAS 食摂取 0, 7, 14, 28 日後の (呼吸+放屁) H₂ 排出量の経時変化

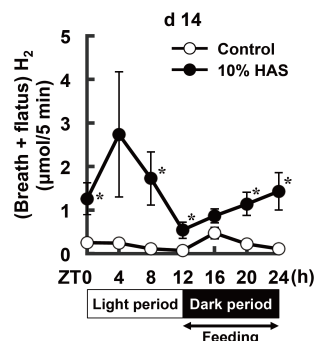


Fig.5 10%HAS 食摂取 14 日後の (呼吸+放屁) H₂ 排出量の経時変化

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 3 件)

Naomichi Nishimura, Hiroki Tanabe, Tatsuro Yamamoto, Sufficient intake of high amylose cornstarch maintains high colonic hydrogen production for 24 h in rats, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 81: 173-180 (2017), 査読有

西村直道, フルクトンによる生体内水素デリバリーと酸化ストレス軽減, *応用糖質科学* 6, 206-211 (2016), 査読無

西村直道, ルミナコイドによる大腸内発酵制御を介した生活習慣病発症抑制に関する研究, *ルミナコイド研究* 18, 79-87 (2014), 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

田邊宏基, 佐藤紗佳子, 山本達朗, 井上亮, 西村直道, グルカンからフラクタンへの転換はラット大腸で高 H₂ 生成を持続させ

る, 日本食物繊維学会第 21 回学術集会, 2016 年 11 月 26 日, 静岡大学 (静岡県静岡市)

田邊宏基, 佐藤紗佳子, 山本達朗, 西村直道, 難消化性糖質の転換がラット大腸 H₂ 生成および腸内細菌叢に与える影響, 第 70 回日本栄養・食糧学会大会, 2016 年 5 月 15 日, 武庫川女子大学(兵庫県西宮市) 松村野乃花, 田邊宏基, 山本達朗, 日野真吾, 森田達也, 西村直道, フラクトオリゴ糖投与ラットの脂肪組織における慢性炎症抑制作用, 日本食物繊維学会第 19 回学術集会, 2014 年 11 月 30 日, 大妻女子大学 (東京都千代田区)

西村直道, 食物繊維をしっかりとって健康なからだをつくろう, 第 68 回日本栄養・食糧学会市民公開講座, 2014 年 6 月 1 日, 北海道大学学術交流会館(北海道札幌市)

大崎みな美, 田邊宏基, 山本達朗, 西村直道, フラクトオリゴ糖による炎症性アディポサイトカイン発現抑制作用の用量依存性, 第 68 回日本栄養・食糧学会大会, 2014 年 5 月 31 日, 酪農学園大学(北海道江別市)

〔その他〕

ホームページ情報:

<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