難消化吸収性糖質摂取による腸内細菌由来水素ガスと疾病予防ならびに重症化予防との関連性

誌名	応用糖質科学 : 日本応用糖質科学会誌 = Bulletin of applied glycoscience
ISSN	21856427
著者名	中村,禎子 田辺,賢一 中山,敏幸 奥,恒行
発行元	日本応用糖質科学会
巻/号	8巻2号
掲載ページ	p. 124-128
発行年月	2018年5月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council Secretariat

応用糖質科学　第8巻　第2号　124-128 (2018)

総説

Interaction of Hydrogen Gas Produced by Intestinal Microbes from Nondigestible Saccharides and Prevention of Diseases*

難消化吸収性糖質摂取による腸内細菌由来水素ガスと疾病予防ならびに重症化予防との関連性*

(2018年3月1日受付；2018年3月15日受理)

中村禎子[1,**]，田辺賢一[2]，中山敏幸[3]，奥　恒行[1]
(なかむら さだこ，たなべ けんいち，なかやま としゆき，おく つねゆき)

Sadako Nakamura,[1,**] Kenichi Tanabe,[2] Toshiyuki Nakayama,[3] and Tsuneyuki Oku[1]

[1] 十文字学園女子大学人間生活学部食物栄養学科／食・栄養・健康研究所／大学院人間生活学研究科
352-8510 埼玉県新座市菅沢 2-1-28
[2] 名古屋女子大学家政学部食物栄養学科
467-8610 愛知県名古屋市瑞穂区汐路町 3-40
[3] 産業医科大学医学部第二病理学
807-8555 福岡県北九州市八幡西区医生が丘 1-1

[1] Department of Food and Nutritional Sciences/ Institute of Food, Nutrition, and Health/ Graduate School of Human Life Sciences, Jumonji University
2-1-28, Sugasawa, Niiza, Saitama 352-8510 Japan
[2] Department of Food Science and Nutrition, Nagoya Women's University
3-40 Shioji-cho, Mizuho-ku, Nagoya, Aichi 467-8610 Japan
[3] Department of Pathology, School of Medicine, University of Occupational and Environmental Health, Japan
1-1 Iseigaoka, Yahatanishi-ku, Kitakyushu, Fukuoka 807-8555 Japan

要旨：我々は，腸内細菌が難消化吸収性糖質から産生する水素ガスに着目し，腸内細菌由来水素ガスは，吸入などによる水素ガスと同様の抗酸化作用があり，疾病の発症遅延や重症化予防に寄与するという仮説をたて，実験動物を用いて検証してきた．老化促進モデルマウスを難消化吸収性糖質含有飼料で長期間飼育し，学習・記憶障害を発症するSAMP8特有の症状発症と重症化の遅延を観察した．Passive avoidance testの結果では，フラクトオリゴ糖 (FOS) 5%含有飼料群の成績が対照飼料群に比較して有意に良好で，学習・記憶障害の発症が遅延した．FOS群では水素ガス体外排出が有意に高く，老化度得点，酸化ストレスや炎症の関連指標は有意に低値を示した．また，鉄過剰投与による肝障害モデルラットをFOS含有飼料で飼育した実験では，血液中のALTならびに酸化度は有意に低値を示し，肝障害の改善や発症遅延が観察された．以上の結果より，難消化吸収性糖質継続的摂取は，生体内水素ガス濃度をある程度高く維持し，疾病予防や重症化遅延に寄与している可能性がある．しかし，その機序については，今後の検討が必要である．

キーワード：難消化吸収性糖質，腸内細菌由来水素ガス，疾病予防，重症化予防***

1. はじめに

生体には，酸素や二酸化炭素のほか，アセトン，窒素，硫化水素，水素などさまざまなガスが存在し，それらは呼気や皮膚などから排出されている．古い文献には，水素ガスとメタンガスは，生体においてはエネルギー代謝に関係していないガスであり，酸素や二酸化炭素などとは由来の異なる (外来) のガスであることを示している[1]．この記述は，哺乳類の細胞は水素ガスを産生する機構を備えていないため，水素ガスの由来は生体に備わった機構によるものではないことを明記している．血液や組織，呼気中などに存在するガスのうち，水素ガスは腸内細菌由来であり，難消化吸収性糖質を発酵することによってのみ産生し，消化管粘膜上皮細胞より拡散によって吸収されたものである

*本原稿は，日本応用糖質科学会平成29年度大会応用糖質科学シンポジウムで一部発表された．
**連絡先 (Tel. 048-477-0555 (代表), Fax. 048-478-9367 (代表), E-mail: nacsacj@jumonji-u.ac.jp)
***Key words: nondigestible and/or nonabsorbable saccharide, hydrogen gas-derived from intestinal microbes, prevention of disease, prevention of progressing of diseases
略記：SAM, senescence accelerated model mouse; FOS, fructooligosaccharide, GM, glucomannan.

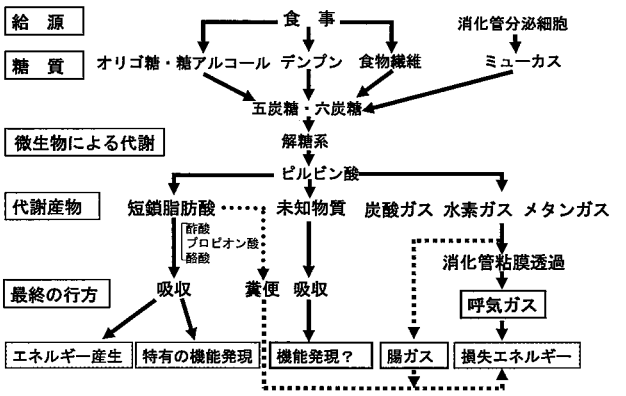

図 1. 腸内細菌を介した難消化吸収性糖質の代謝の特徴とその運命

文献 1), 2) を改変.

(図 1)[2-4]. 我々は，難消化吸収性糖質の生体における利用性や生理作用を探索する研究の過程で，ヒトの呼気水素ガス排出動態を数十年にわたり測定し，腸内細菌による発酵性を評価する一つの重要な指標としてのデータを蓄積してきた．その集大成として，2014 年に，水素ガス排出動態を指標とした難消化吸収性糖質の間接的エネルギー評価方法を提案したところである[5,6].

一方，2007 年になり，臨床領域における研究を中心として水素ガス吸引や水素ガス溶存溶液を利用した治療の有効性が報告された[7]．その後，水素ガスのラジカル消去能が着目されて水素ガスと健康との相互関連性に対する関心が高まり，水素水や水素ガスを用いることの有効性が報告された．我々は，腸内細菌由来の水素ガスにも同じ生理作用があるという仮説を立て，疾患モデル動物を用いて検証した．水素ガスが生体ガスとして観察されるのは，腸内細菌が難消化吸収性糖質を利用した場合に限られている．難消化吸収性糖質の経口摂取によって発現するさまざまな生理作用の中には，水素ガスのラジカル消去能が関連していると考えられる．ここでは，その中から主な 2 つの実験について紹介する．

2. 生体の健康状態の指標としての水素ガス

生体の水素ガス測定は，消化・吸収や発酵の指標として古くから臨床領域において利用されており[8]，乳糖不耐症の診断のみならず，消化管 (口—盲腸) 通過時間評価，消化吸収障害の診断，異常細菌増殖の診断，クローン病や大腸がんなどで観察される消化管内通過障害など，さまざまな疾病を早期に発見する指標として利用されてきた[8,9]．また，Yoshida らは，消化器疾患だけではなく循環器疾患においても呼気中の水素ガス濃度に変化が生じ，肺疾患の程度によってその濃度が低下してくることを，実験動物を用いて明らかにしている[10].

一方，健常なヒトの場合には，難消化吸収性糖質摂取後の呼気水素ガス排出は長時間にわたり継続的に高値を維持する．その排出動態は分子量によって異なり，高分子の食物繊維を摂取後の呼気水素ガス排出動態は，摂取後の立ち上がりには時間がかかるが，摂取 14 時間後においても減衰することはない[5,6]．難消化性オリゴ糖摂取後の場合は，摂取 3 時間後前後より明確な呼気水素ガス排出が観察され，その濃度は数十 ppm から数百 ppm にもなる[11-13]．この高濃度の呼気水素ガス排出は，摂取 14 時間後も維持される．下内らは，健常人を対象に，市販されている水素水または牛乳を 300 mL 経口摂取させ，摂取後の呼気水素ガス排出動態を比較している．その結果，水素水摂取の場合は摂取後短時間に速やかに上昇し，60 分以内に減衰して摂取前のレベルに戻るのに対して，牛乳摂取では長時間高値を維持することを明らかにし，水素ガス濃度の高い状態が維持されることの有効性について言及している[14]．生体内において，水素ガスがラジカル消去などを介して恒常性の維持に寄与しているとすれば，難消化吸収性糖質経口摂取によって腸内細菌由来水素ガスが産生されている状態を維持することは，非常に重要な意味を持つことになる．これまでの報告は，疾病下，あるいは酸素不足の組織における水素ガスの有効性であり，健常な生体における水素ガスの有効性についてはまだ結論を得るに至っていない．現在，生体における適切な水素ガス濃度の検討のみならず，その体内分布や消長などについて基礎的研究に取り組んでいるところである．

3. 疾病モデル動物における難消化吸収性糖質の経口摂取による腸内細菌由来水素ガス産生と疾病予防との関連性

多くの疾病の背景には，生体の炎症，酸化，糖化などの変化があり，加齢によってこれらの変化が加速することが明らかになっている．抗炎症作用や抗酸化作用を示す食品成分の研究が進み，ビタミンやポリフェノール類などとの関連性が報告されている．腸内細菌由来水素ガスは，消化管から拡散によって吸収された後，血液循環を経て肺胞に至り，呼気へ排出される．我々は，循環血液中の水素ガスが生体酸化に何らかの作用を及ぼすものと考え，疾病の発症遅延および重症化予防との関連性を検討した．

3.1. 老化促進モデルマウスに発症する記憶・学習障害の重症化予防

老化促進モデルマウス (senescence accelerated model mouse, prone 8, 以下 SAMP8) は，加齢に伴って記憶・学習障害や情動障害を自然発症するモデルマウスであり，その発症要因が多岐にわたることから，ヒトの認知障害のモデルになると考えられている[15]．SAM 系統の対照マウスとして用いられる senescence accelerated model mouse, resistance (SAMR) では，50 % 生存率 (survival rate) が約 81 週齢であるのに対し，SAMP8 のそれは 43 週齢と短い．また，成体マウスになってからの成熟期間 (mature phase) が SAMR 系統に比較して短く，早期から加齢現象が始ま

ることが特徴である．SAMシリーズのマウスの老化については，細川らが開発した老化度評点によって評価することが可能で，客観的に老化の程度を比較することができる[15,16]．SAM系統のモデルマウスは，時間をかけて老化が促進するため，食品成分の緩徐な影響を観察する実験系の場合には適していると考えている．

我々は，このSAMP8を難消化吸収性糖質含有飼料で継続的に飼育し，腸内細菌叢の変化を観察するとともに，受動回避試験 (passive avoidance test) を用いて記憶・学習障害の発症や重症化の遅延を観察した．発症の要因として，腸内細菌由来水素ガス，ならびに他の代謝産物による抗酸化作用や抗炎症作用があるものと考え，これらの指標を測定して検討した．

予備飼育後，実験飼料はAIN93G精製飼料を基本飼料として，腸内細菌の発酵基質となるセルロースをコーンスターチに置換した飼料をSAMR1およびSAMP8の対照群 (CONT群) に給餌した．また，CONT群の飼料からスクロース5％をフラクトオリゴ糖 (fructooligosaccharide，株式会社明治，東京，5％FOS群)，もしくはグルコマンナン (glucomannan，清水化学株式会社，広島，5％GM群) に置換した飼料を調製してSAMP8に与え，それぞれの飼料で5週齢から飼育した．飼育途中で老化度評点の変化を観察し，50％生存率 (survival rate) の少し手前になる37～38週に記憶・学習障害の発症程度を測定した．また，そのときの血液中の酸化・抗酸化関連指標，炎症・抗炎症に関連する指標などを測定した．結果の詳細は，文献16)に示しているが，概要は以下のとおりである．5％FOS群と5％GM群の老化度評点の増加は，いずれもCONT群に比較して有意に低値を示した．受動回避試験の結果は，FOS群においてSAMR1群との間に有意差が観察されず，さらにCONT群との間に有意な差異が観察される結果となった (図2)．このことは，難消化吸収性糖質を5％含有する飼料で継続的に飼育することにより，SAMP8の促進老化が遅延し，また，特異的に発症する記憶・学習障害の発症ならびに重症化が遅延したことを示している．我々はその説明要因として，酸化・抗酸化関連指標，ならびに炎症・抗炎症関連指標を測定し，解剖時の組織・臓器についての組織病理学的観察を行った．酸化・抗酸化関連指標では，FOS群の尿中8OHdG，ならびに15-isoprostaneはSAMR1と同程度のレベルを維持し，また，炎症・抗炎症関連指標では，IL-6，TNF-α，IL-17αなどにおいてCONT群に比較するとFOS群で低値を示した．これらの結果は，難消化吸収性糖質含有飼料を継続的に摂取させたSAMP8においては，生体の酸化による代謝産物が少なくなることや炎症反応が抑制されていることを示唆している．また，難消化吸収性糖質含有飼料群の大脳皮質および海馬において，アミロイドβタンパク質沈着が抑制されていることが病理学的に明らかになった．難消化吸収性糖質含有飼料群の水素ガス体外排出は，非含有飼料群のそれに比較すると常時高値を維持しており，腸内細菌由来水素ガスが常に産生されている状態であることを確認している．

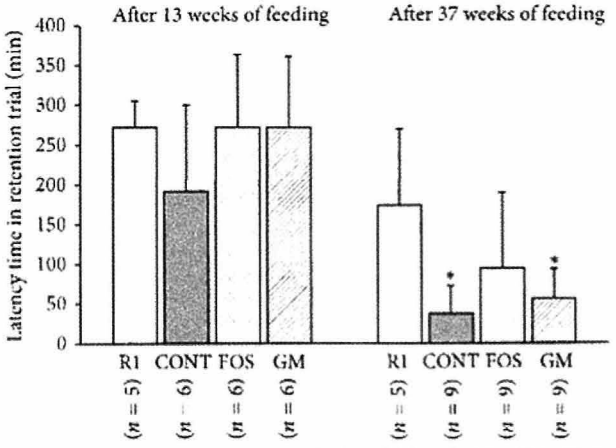

図2. SAMP8における難消化吸収性糖質含有飼料の継続摂取による学習・記憶障害の重症化遅延へ及ぼす影響

SAMR1, senescence accelerated model mouse resistance; CONT, SAMP8対照飼料群；FOS，SAMP8 5％フラクトオリゴ糖飼料群；GM，SAMP8 5％グルコマンナン飼料群．＊，飼料摂取37週間後の受動回避試験の結果，FOS群の成績はSAMR1と有意差が観察されなかった[16]．

加齢に伴う記憶・学習障害の進行にはタンパク質の沈着が関係し，その過程には生体の酸化や炎症と関連性のあることが示されている[17,18]．本研究で得られた結果においても，SAMP8の生体では酸化や炎症の反応が抑制されていた．しかし，このことと腸内細菌由来水素ガスとの直接的な関連性はまだ立証できていないので，今後の課題である．一方，SAMP8においてもCONT群に比較するとビフィズス菌や乳酸菌などが属のレベルで増加した．難消化吸収性糖質の継続的摂取は，腸内細菌叢の改善を介して老化の遅延に関与している可能性も考えられる．

3.2. 過剰鉄誘因性肝障害モデルラットの重症化予防

前述したように，腸内細菌が難消化吸収性糖質を発酵することによって産生された水素ガスは，拡散によって大腸から吸収された後，門脈から肝臓に運搬され，肝静脈より循環血流にはいる．仮に，腸内細菌由来水素ガスが抗酸化を介した作用を及ぼすとすれば，肝臓が影響を受けやすいと考えられる．我々は，Wistar系雄性成体ラットにクエン酸鉄を腹腔内投与することにより過剰鉄による酸化ストレスを介した肝障害モデルラットを作成し，FOSの摂取による肝障害軽減作用を観察した．

前述した飼料と同じように，予備飼育後，対照ラット (CONT群) には，AIN93M精製飼料のセルロースをコーンスターチに置換した飼料を，FOS群はスクロースの1/2を置換した飼料を5日間摂取させた．また，肝炎の発症に伴って摂食量が低下するので [FOS 5％飼料+FOS溶液ゾンデ] 群 (FOS+群) を設けた．クエン酸鉄を生理的食塩水に溶解し，6日目から1日おきに3回腹腔内投与した．3回目の投与後に採血し，ラットを解剖して，血清中のASTおよびALTを測定し，肝臓の病理組織学的観察を行って，肝障害の状態を観察した．FOSによる抗酸化作

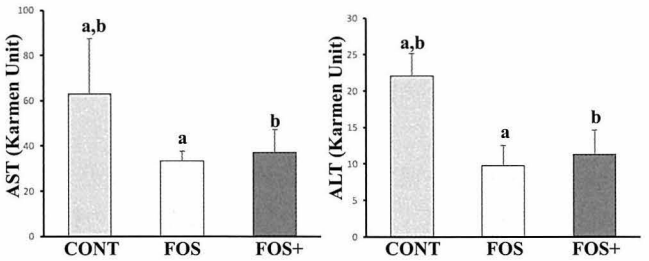

図 3. 5％フラクトオリゴ糖含有飼料が過剰鉄による肝障害ラットの血清 AST ならびに ALT へ及ぼす影響

CONT，フラクトオリゴ糖非含有飼料群；FOS，5％フラクトオリゴ糖含有飼料群；FOS+，5％フラクトオリゴ糖含有飼料+FOS 溶液経口投与群．フラクトオリゴ糖群では，コントロール群に比較して，AST および ALT 値が有意に低値を示した ($p < 0.05$，ANOVA による検定).

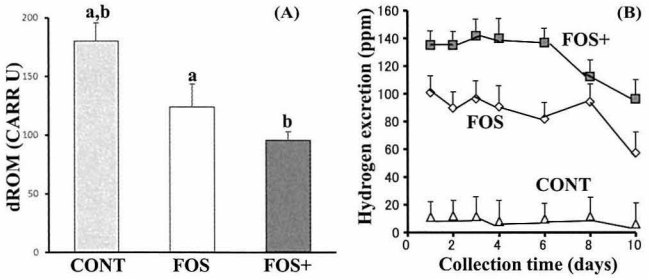

図 4. 5％フラクトオリゴ糖含有飼料が過剰鉄による肝障害ラットの血清中酸化度ならびに水素ガス体外排出へ及ぼす影響

CONT，フラクトオリゴ糖非含有飼料群；FOS，5％フラクトオリゴ糖含有飼料群；FOS+，5％フラクトオリゴ糖含有飼料+FOS 経口投与群．CARR，U は 0.08 mg H_2O_2/dL に相当する．フラクトオリゴ糖群では，コントロール群に比較して，(A) 血清中酸化度が低値を示し，(B) 水素ガス体外排出が有意に高値を示した ($p < 0.05$，ANOVA による検定).

用を観察するために，血液の酸化度 (ヒドロペルオキシド) を d-ROM テストを用いて測定し，肝臓組織を HE 染色および Berlin-Blue 染色によって組織病理学的に観察した．

図 3 に示す通り，FOS+群の AST は CONT 群に比較して有意に低値を示した．また，血中酸化度の指標であるヒドロペルオキシドについても低値を示し，5％ FOS を摂取させたラットでは，FOS 群と FOS+群のいずれにおいても，飼料摂取翌日から水素ガス体外排出が観察された (図 4). 一方，FOS 群のラットに四塩化炭素による薬物毒性に起因する重症の肝障害を誘発させた場合には，過剰鉄肝障害モデルラットに観察されたような差異が観察されなかった．これらの結果は，FOS の摂取によって生体の酸化が抑制されることを介して，過剰鉄による肝障害の症状が軽減したことを示唆している．

3.3. 腸内細菌由来水素ガス産生と酸化または炎症との関連性

SAMP8 ならびに過剰鉄による肝障害の 2 種類の疾病モデル動物を用いた実験では，疾病の重症化遅延とともに，血液および尿中の酸化ストレス関連指標が低値を示した．この他にも，我々は，SAM 系統の中で骨粗鬆症を自然発症する SAM prone 6 (SAMP6) を用いて，FOS 含有飼料群において老人性骨粗鬆症の発症が遅延し，その背景として生体の炎症が軽減していることを観察している (投稿中). いずれの実験においても，難消化吸収性糖質を飼料中に含有しているか，否かの違いのみである．哺乳類の細胞は水素ガスを産生する機構がないため，マウスやラットにおいても難消化吸収性糖質を摂取させたときにのみ水素ガスは観察される．おそらく，生体の酸化や炎症を要因とする疾病の重症化遅延に，腸内細菌由来水素ガスがカギとなる働きをしているものと考えられる．しかし，現時点では，その機序を説明できる結果に辿りついていない状況であり，探索中である．

4. おわりに

水素ガスは小分子であるため，生体内ではかなり自由に移動している可能性がある．組織や細胞が損傷を受けた状態においては，多くの実験において水素ガスの有効性が示されている．我々は，治療の目的ではなく，疾病の罹患予防ならびに重症化予防における腸内細菌由来水素ガスの有用性を明らかにしたいと考えている．食事成分として摂取する難消化吸収性糖質が，我々の生体内において腸内細菌によって利用され，その代謝産物が直接的あるいは間接的に生体の酸化や炎症を軽減し，疾病の予防や治療，抑制などに寄与することが明らかになれば，その意義は大きいものと考える．難消化吸収性糖質は医薬品ではなく食事成分として身近に摂取することができる．腸内細菌由来水素ガスの産生には，難消化吸収性糖質の経口摂取が必須条件となる．生体における水素ガスの基礎的情報を蓄積し，生体の恒常性維持にどのように寄与しているかについて，今後も研究を続けたいと考えている．

謝辞

日本応用糖質科学会平成 29 年度大会応用糖質科学シンポジウムにおいて，本研究の発表の機会を与えて頂きました日本応用糖質科学会会長ならびにご関係の先生方に深謝申し上げます．また，本研究を実施するにあたり，ご指導や援助を賜りました十文字学園女子大学学長・志村二三夫先生はじめ諸先生方に深謝申し上げます．実験の遂行にあたり試験物質を供与頂きました企業の皆様，ならびにご関係の皆様に深謝申し上げます．実験にご協力頂きました元長崎県立大学大学院人間健康科学研究科保健栄養学 (奥恒行) 研究室の皆様に御礼申し上げます．

なお，本研究の一部は(独)日本学術振興会科学研究費補助金 (基盤研究 B) 22300263，(基盤研究 C) 22590599 および 26350128 の助成を受けて実施致しました．

文献

1) A.M. McIver, C.A. Redfield, and B.E. Benedict: Gaseous exchange between the blood and the lumen of the stomach and intestine. *Am. J. Physiol.*, **76**, 92−111 (1926).

2) M.D. Levitt and M.R. Donaldson: Use of respiratory hydrogen (H_2) excretion to detect carbohydrate malabsorption. *J. Lab. Clin. Med.,* **75**, 937–945 (1970).
3) H.J. Cummings and T.G. Macfarlane: The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *J. Applied Bacteriol.,* **79**, 443–459 (1991).
4) 奥 恒行：難消化吸収性糖質の消化・発酵・吸収ならびに許容量に関する研究. 栄食誌, **58**, 337–342 (2005).
5) T. Oku and S. Nakamura: Evaluation of the relative available energy of several dietary fiber preparations using breath hydrogen evolution in healthy humans. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.,* **60**, 246–254 (2014).
6) 中村禎子, 奥 恒行：ヒトにおける呼気水素ガス試験による発酵分解評価の有効性とそれに基づく各種食物繊維素材のエネルギー評価の試み. 日本食物繊維学会誌, **9**, 43–46 (2005).
7) I. Ohsawa, M. Ishikawa, K. Takahashi, M. Watanabe, K. Nishimaki, K. Yamagata, K. Katsura, Y. Katayama, S. Aso, and S. Ohta: Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. *Nat. Med.,* **13**, 688–694 (2007).
8) 瓜田久純, 杉本元信, 三木一正：呼気中の水素・メタン—消化管の活動を診る—. におい・かおり環境学会誌, **37**, 99–104 (2006).
9) P.E. Trulock: Arterial blood gases. in *Clinical Methods: The history, physical and laboratory examinations,* H.K. Walker and W.D. Hall, eds., 3rd Ed., Butterworth Publishers, Boston, USA, pp. 254–257 (1990).
10) A. Yoshida, H. Asanuma, H. Sasaki, S. Sanada, S. Yamazaki, Y. Asano, Y. Shinozaki, H. Mori, A. Shimouchi, M. Sano, M. Asakura, T. Minamino, S. Takashima, M. Sugimachi, N. Mochizuki, and M. Kitakaz: H(2) mediates cardioprotection via involvements of K(ATP) channels and permeability transition pores of mitochondria in dogs. *Cardiovasc. Drugs Ther.,* **26**, 217–226 (2012).
11) T. Oku and S. Nakamura: Comparison of digestibility and breath hydrogen gas excretion of fructo-oligosaccharise, galactosyl-sucrose, and isomalto-oligosaccharide in healthy human subjects. *Eur. J. Clin. Nutr.,* **57**, 1150–1156 (2003).
12) S. Nakamura, K. Tanabe, S. Morita, N. Hamaguchi, F. Shimura, and T. Oku: Metabolism and bioavailability of newly developed dietary fiber materials, resistant glucan and hydrogenated resistant glucan in rats and humans. *Nutr. Metab. (Lond).,* **13**, 13 (2016).
13) T. Oku, M. Nakamura, M. Hashiguchi-Ishiguro, K. Tanabe, and S. Nakamura: Bioavailability and laxative threshold of 1-kestose in human adults. *DBPBMB.,* **3** (S), 90–95 (2009).
14) A. Shimouchi, K. Nose, M. Yamaguchi, H. Ishiguro, and T. Kondo: Breath hydrogen produced by ingestion of commercial hydrogen water and milk. *Biomark. Insights,* **9**, 27–32 (2009).
15) A. Shimada and S. Hasegawa: Senescence-accelerated mice (SAMs) as a model for brain aging and immunosenescence. *Aging Dis.,* **2**, 414–435 (2011).
16) S. Nakamura, N. Kondo, Y. Yamaguchi, M. Hashiguchi, K. Tanabe, C. Ushiroda, M. Kawahashi-Tokuhisa, K. Yui, M. Miyakoda, and T. Oku: Dairy feeding of fructooligosaccharide or glucomannan delays onset of senescence in SAMP8 mice. *Gastroenterol. Res. Pract.,* ID303184 (2014).
17) P. Agostinho, R.A. Cunha, and C. Oliveira: Neuroinflammation, oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr. Pharm. Des.,* **16**, 2766–2778 (2010).
18) A.E. Moneim: Oxidant/Antioxidant imbalance and the risk of Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.,* **12**, 335–349 (2015).