

新たな腸内標的を有する機能性食品素材 アガロオリゴ糖

大野木 宏

はじめに

アガロオリゴ糖は寒天を原料として得られるオリゴ糖である。寒天は古くから、ところてんなどの加工食品として用いられており、食物繊維を豊富に含むことから整腸・ダイエット素材としても近年利用されている。寒天の主成分はアガロースであり、D-ガラクトース (Gal) と3,6-L-アンハイドロガラクトース (AhGal) が交互に直線的に結合した多糖構造を有する。このアガロースを弱酸性下で加熱することにより、3,6-L-アンハイドロガラクトースとD-ガラクトースとの結合 (α 1-3結合) が選択的に切断され、その結果として、3,6-L-アンハイドロガラクトースを還元末端に有する2糖 (アガロビオース)、4糖 (アガロテトラオース)、6糖 (アガロヘキサオース) および8糖 (アガロオクタオース) が生成する (図1)。これら4種のオリゴ糖を総称してアガロオリゴ糖

糖という。筆者らは、アガロオリゴ糖の機能性について研究を進め抗酸化作用や抗炎症効果などの多くの生理作用を解明するとともに、アガロオリゴ糖の安定的な製造方法を確立した。本稿では、これまでにない新たな腸管標的を介したアガロオリゴ糖の機能性を紹介し、今後の機能性食品素材としての可能性を述べたい。

アガロオリゴ糖の抗炎症作用

アガロオリゴ糖は強い抗炎症作用を有するオリゴ糖であり、その作用機序は細胞内のヘムオキシゲナーゼ (HO)-1の発現促進である¹⁾ (図2)。HOは、寿命を終えた赤血球が壊れる際に発生するヘム分子を速やかに分解する酵素であり、ヘムを等モルの一酸化炭素、ビリベルジン、鉄イオンに代謝する。同時にHOは、ヘム代謝酵素としてだけでなく、酸化ストレスから細胞を防御するタンパク質としても知られている。HOのアイソザイムであるHO-1は虚血、熱ショック、紫外線などさまざまなストレス刺激で誘導される酵素であり、HO-1により産生される一酸化炭素はTNF- α やIL-1 β 、IL-6などの炎症性サイトカインの産生を抑制する一方で、抗炎症性サイトカインであるIL-10の産生を促進し抗炎症作用を発揮することが知られている。また、ヘムの分解に伴い、産生されるビリベルジンはビリベルジンレダクターゼにより還元され、強力な抗酸化作用を有するビリルビンへと変換される。このように、HO-1は複数の作用機序により抗炎症・抗酸化作用を発揮し、種々の障害ストレスから細胞・組織を保護する役割を有している。

筆者らは、マウスマクロファージ様細胞株Raw264.7細胞を用いて、アガロオリゴ糖が濃度依存的にHO-1の発現を亢進させることを明らかにした。また、分子機序の解析を行った結果、アガロオリゴ糖によるHO-1発現亢進には、酸化ストレス応答転写因子であるNrf-2が関与していることも明らかにした²⁾。

アガロオリゴ糖の抗炎症作用について、lipopolysaccharide刺激したRaw264.7細胞やマウス腹腔マクロファージを用いて解析した結果、TNF- α やIL-1 β 、IL-6などの炎症性サイトカインならびに炎症性メディエーターである一酸化窒素の産生亢進が、アガロ

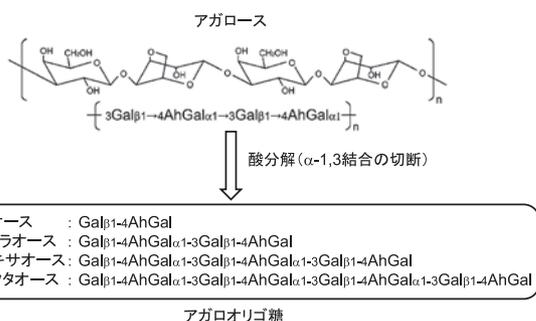


図1. アガロオリゴ糖の構造

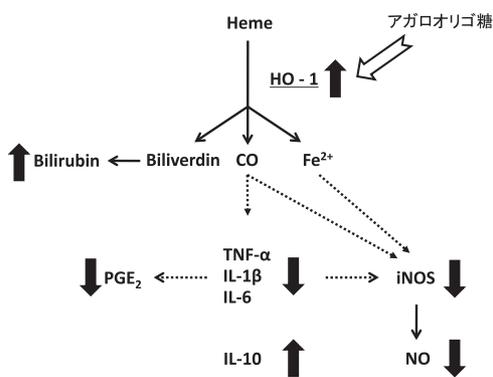


図2. アガロオリゴ糖の抗炎症作用機序

オリゴ糖存在下において有意に抑制された³⁾。また、これらアガロオリゴ糖の抗炎症作用は、HO阻害剤である tin protoporphyrin (SnPP) の添加や、RNA 干渉技術を用いた HO-1 の発現抑制により明らかにキャンセルされた。すなわち、アガロオリゴ糖の抗炎症作用には HO-1 の産生誘導が強く関係していることが強く示された。

腸管炎症に対するアガロオリゴ糖の保護作用

アガロオリゴ糖の抗炎症作用については、これまでに実験モデル動物を用いて、関節炎や皮膚炎など全身的な炎症反応の抑制効果が確認されている。さらに、最近の研究において、腸管における炎症に対する保護作用が解明されてきている。潰瘍性大腸炎やクローン病などの炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease: IBD) は再燃と寛解を繰り返す慢性的な腸管炎症を主体とする疾患であり、近年、罹患者数が急激に上昇していることから、大きな問題となっている。IBD は多因子疾患として知られており、その確たる病因の解明には至っていない。それゆえ、IBD の病因・病態の解明に加え、有効な予防手段の開発は重要課題である。また、IBD に限らず、現代人の腸内環境は過剰な脂質や糖質、薬剤、環境汚染物質などさまざまな外来因子によるストレスにされており、種々の消化器疾患の予防の観点からも腸内環境の改善は重要な課題である。腸管粘膜において、活性酸素種をはじめとした高い反応性を有する酸化物の蓄積は IBD 発症の一因と考えられている。すでにいくつかの HO-1 誘導剤の腸管炎症に対する有効性が検証されているが、これまでに、臨床的に安全かつ有用な食品由来の HO-1 誘導剤は見つかっていない。

筆者らは、アガロオリゴ糖を6日間経口投与した C57BL/6 マウスの大腸粘膜において、HO-1 の発現が有意に亢進することを見いだした⁴⁾。HO-1 は主に大腸粘膜下層の単球様細胞に分布しており、HO-1 陽性細胞はマクロファージのマーカーである F4/80 と共局在したことから、アガロオリゴ糖による HO-1 発現亢進は腸管粘膜のマクロファージにおけるものであることが明らかとなった。これらの結果から、経口で摂取したアガロオリゴ糖が腸管組織においても実際に、HO-1 発現を促進していることが確認できた。

そこで、炎症性腸疾患の実験モデルとして 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) 誘導性大腸炎モデルを用いて、アガロオリゴ糖の投与が腸管炎症に及ぼす影響を評価した。肉眼的所見および組織染色の結果、TNBS 投与に伴い、粘膜構造の破綻や、炎症細胞の浸潤などが観察され、これら腸管炎症の病徴はアガロオリ

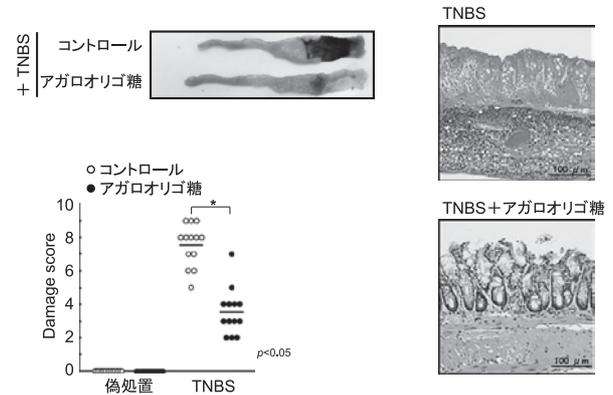


図3. アガロオリゴ糖の大腸炎に対する抑制効果

リゴ糖投与群では明らかに抑制された (図3)。さらに大腸粘膜を用いて、炎症部位への好中球浸潤を表す指標であるミエロペルオキシダーゼ活性と、炎症性サイトカインである TNF- α の発現を解析した。その結果、TNBS 投与により上昇したミエロペルオキシダーゼ活性ならびに TNF- α の発現は、アガロオリゴ糖投与群において有意に抑えられた。アガロオリゴ糖を経口投与したマウスに HO 阻害剤 (SnPP) を腹腔内投与したところ、アガロオリゴ糖投与群において観察された腸管炎症の抑制効果は完全に消失した。同様の知見は NSAID 誘導性小腸潰瘍モデルにおいても認められている⁵⁾。すなわち、アガロオリゴ糖は腸管粘膜での HO-1 の発現上昇を介して、腸管炎症の抑制に働くことが示された。

アガロオリゴ糖の腸内環境の異常 (gut dysbiosis) に対する有効性

このようにアガロオリゴ糖は直接的に腸管粘膜組織に働きかけ、抗炎症作用を発揮することが解明されたが、最近の筆者らの研究において、もう一つの住人である腸内細菌叢を介して抗炎症や発がん抑制効果を持つ可能性もでてきた。大腸では多くの細菌がフローラを形成し、宿主である我々の健康状態と密接に関わっている。通常、これら腸内細菌叢は宿主と良好な共生関係を構築することで、排便活動や免疫寛容といった腸管機能の恒常性維持に大きく貢献している。この共生バランスの崩壊が dysbiosis であり、多くの疾病との関連性が示唆されている。食事内容や環境因子は腸内細菌叢に大きく影響を及ぼすことが知られているが、中でも高脂肪食過多に伴う dysbiosis は大腸がんや生活習慣病発症のリスクファクターとして考えられている。

腸内細菌叢の主な機能として、食物繊維をはじめとする難消化性多糖類の発酵分解がある。この発酵により産

生される短鎖脂肪酸は、大腸上皮細胞のエネルギー源として利用されるだけでなく、いわゆる悪玉菌種の増殖抑制、免疫機能の維持など、さまざまな有益性を有する。また、腸内細菌は胆汁酸の代謝にも寄与し、肝臓で合成された後、十二指腸内へ放出された一次胆汁酸は、一部の腸内細菌によりさらに代謝を受ける(二次胆汁酸)。二次胆汁酸の機能に関しては未だ不明な点が多いが、高脂肪食摂取に伴う dysbiosis は、発がん性を有する二次胆汁酸であるデオキシコール酸 (deoxycholic acid: DCA) の産生を亢進することで、大腸がんや肝がんなどの形成に関係することが知られている。そこで筆者らは、アガロオリゴ糖の dysbiosis への有効性を評価するうえで、腸内細菌叢の解析だけでなく、短鎖脂肪酸組成や胆汁酸プロファイルといった腸内環境を包括的に評価することにした。

Dysbiosis のモデルとして高脂肪食マウスを用いて評価を行った⁶⁾。C57BL6マウスを、コントロール群、高脂肪食群、高脂肪食+アガロオリゴ糖群の3群に分け、8週間飼育した。アガロオリゴ糖の投与は3%水溶液の自由摂取にて行った。試験開始から4週目に新鮮便を回収し、T-RFLP法により腸内細菌叢の解析を行った。その結果、高脂肪食摂取に伴い、*Lactobacillales* 目の減少、日和見感染菌として知られる *Bacteroides* 属および *Clostridium* subcluster XIVa の増加が認められた。一方、高脂肪食+アガロオリゴ糖群では、高脂肪食摂取に伴い観察された *Lactobacillales* 目の減少や *Clostridium* subcluster XIVa の増加が有意に抑制された(図4)。

次に、試験開始から8週目に盲腸内容物中の短鎖脂肪

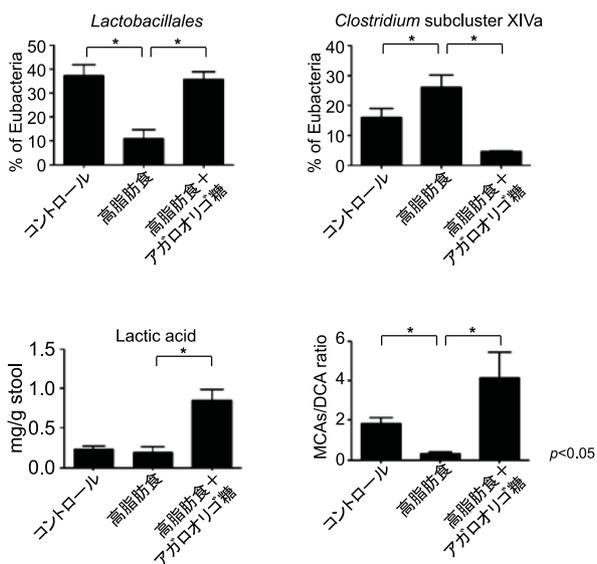


図4. アガロオリゴ糖の腸内環境改善効果

酸組成を HPLC にて解析した結果、高脂肪食摂取に伴い、酢酸、プロピオン酸、酪酸濃度が低下し、コハク酸濃度が上昇した。一方、高脂肪食+アガロオリゴ糖群では、コハク酸濃度の上昇が抑制される傾向が示された。短鎖脂肪酸の中でもコハク酸は、腸管運動機能の低下や上皮細胞の増殖抑制をもたらすことが知られており、負の短鎖脂肪酸として考えられている。また、高脂肪食+アガロオリゴ糖群では乳酸濃度が有意に高値を示したことから、アガロオリゴ糖に伴う *Lactobacillales* 目の上昇との相関性が示された。さらに、LC-MS/MSを用いて、血中胆汁酸組成を解析した結果、高脂肪食摂取に伴い、発がん性の二次胆汁酸である DCA の割合が上昇する傾向を見いだした。一方、アガロオリゴ糖摂取群では、高脂肪食摂取に伴う DCA の上昇が抑制される傾向が示された。DCA はコール酸 (cholic acid: CA) が代謝されて生成する二次胆汁酸であり、その代謝は *Clostridium* subcluster XIVa に属する細菌種が担っている。すなわち、アガロオリゴ糖はこの細菌種の増加を抑えることで、DCA の量を減らしたと考えられた。また、アガロオリゴ糖は高脂肪食摂取に伴う、組織保護作用のある一次胆汁酸であるミュリコール酸 (muricholic acid: MCA) の減少を抑制し、DCA/MCA バランスを是正した。

アガロオリゴ糖の大腸発がん予防作用

続いて、筆者らは、アガロオリゴ糖摂取による dysbiosis 改善効果が大腸がんの発生を抑制し得るかに関して明らかにするために、発がんイニシエーターとして azoxymethane (AOM) を、発がんプロモーターとして高脂肪食を用いた大腸発がん試験を行った。まず、C57BL6マウスを、コントロール群、高脂肪食+AOM群、高脂肪食+AOM+アガロオリゴ糖群の3群に分け、8週間飼育した。発がん病変の評価に関しては、大腸における異常腺管 (aberrant crypt foci: ACF) 数を計測することにより行った。その結果、高脂肪食摂取と AOM 投与によって顕著な異常腺管を多数認めた。しかし、これ

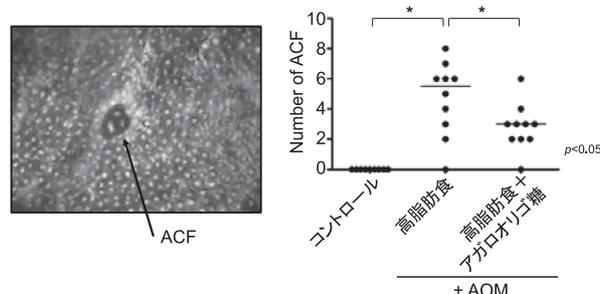


図5. アガロオリゴ糖の大腸発がん予防効果

ら異常腺管の発生は、アガロオリゴ糖摂取群において有意に抑制された(図5)。

以上の結果より、アガロオリゴ糖の摂取は高脂肪食に伴うdysbiosisを改善することで、大腸発がんを予防する可能性が示唆された。

アガロオリゴ糖のヒトの腸内細菌叢への効果

さらに、筆者らはアガロオリゴ糖のヒトの腸内細菌叢に与える効果について研究を進めた。健常成人被験者13名に4週間、アガロオリゴ糖を1日200 mg摂取してもらい、摂取前後の腸内細菌叢を次世代シーケンサーにより解析した。その結果、Firmicutes門の減少、Bacteroidetes門の増加が認められた。先行研究において、相対的に肥満者にはFirmicutesが、痩せの人にはBacteroidetesがそれぞれ多いことが知られており、アガロオリゴ糖が腸内環境を改善する可能性が示された。さらに、健常成人被験者63名に4週間、アガロオリゴ糖を1日200 mg摂取してもらい、同様に腸内細菌叢や体調の評価を解析した。その結果、体調面では、肌荒れや疲労感の改善が認められた。また、腸内細菌叢解析の結果、種々の腸内細菌の変動が認められたが、特に酪酸産生菌のRoseburia菌の有意な増加が認められた。酪酸は一部の腸内細菌によって食物繊維の発酵で生じる短鎖脂肪酸であり、大腸の上皮細胞のエネルギー源となりその増殖を促進することで腸のバリア機能の向上に働く。また、酪酸は強い抗炎症作用を有することも知られている。実際に炎症性腸疾患患者にはRoseburia菌が少ないことが報告されており、腸管炎症保護因子の一つとして注目されている。このように、アガロオリゴ糖が、ヒトの腸内細菌叢改善を介して、腸管炎症や生活習慣病の予防に期待できることもわかりはじめてきた。

おわりに

本稿で紹介したように、寒天由来のオリゴ糖であるアガロオリゴ糖が、炎症性メディエーターである一酸化窒素や、種々の炎症性サイトカインの産生を抑制し、炎症性腸疾患のモデル動物において、強い抗炎症作用を発揮することが明らかとなりつつある。一方で、腸内細菌叢の悪化予防やその代謝産物である短鎖脂肪酸や、腸内細菌により代謝される胆汁酸の組成にも影響を及ぼすことが明らかとなり、その結果としての大腸がん予防効果が示された。さらに、最近の知見では、アガロオリゴ糖の摂取により抗炎症に働くと考えられるRoseburia菌が増加することも明らかとなり、これまでにない標的を持ってアガロオリゴ糖が腸内環境を改善する働きがわかってきた。これまで単なる食物繊維としての機能しかないと考えられていた寒天にこのような機能性が秘められていたことは非常に興味深いことであり、予防医学の観点からも、アガロオリゴ糖は新しい機能性素材として有望と考えられ、今後もさまざまな側面からの研究の進展が期待される。

文 献

- 1) Enoki, T. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 766 (2010).
- 2) 榎 竜嗣ら: 日本食品科学工学会誌, **57**, 157 (2010).
- 3) Enoki, T. *et al.*: *Biol. Pharm. Bull.*, **35**, 1145 (2012).
- 4) Higashimura, Y. *et al.*: *J. Gastroenterol.*, **48**, 897 (2013).
- 5) Higashimura, Y. *et al.*: *J. Gastroenterol. Hepatol.*, **29**, 310 (2014).
- 6) Higashimura, Y. *et al.*: *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **310**, 367 (2016).