

食品機能を評価する生体指標開発

三好規之

静岡県立大学食品栄養科学部生化学研究室 准教授

緒言

「疾病・介護の予防」や「次世代ヘルスケア」は、我が国の重要な成長戦略のひとつであり、健康長寿実現に向けた戦略の一つが検診（スクリーニング）と予防（リスク因子の低減）の充実である。米国で行われた大規模疫学研究（1975-2000）でも明確に示されているように、米国の大腸がん罹患率・死亡率の低下の要因は、大部分が検診（スクリーニング）、次いで予防（リスク因子の低減）である¹⁾。治療技術の進歩による貢献は重要であることに間違いはないが、その割合は僅かである。つまり、集団に対する影響は検診（スクリーニング）と予防（リスク因子の低減）が効果的である。病気になる、病気で死なないうための方策について、生涯にわたる健康づくりを支える柱の一つが毎日の食生活であることと併せて考えると、検診（スクリーニング）と予防（リスク因子の低減）に活用できる食品機能評価の生体指標開発は重要である。食品は天然物であるため、機能性食品成分の作用標的は非特異的であることが多い。したがって、食品機能評価の生体指標開発では、メタボロミクスのようなプロファイルデータの解析が不可欠である。一方、無菌飼育装置や次世代シーケンサー等の技術の進歩に伴い、腸内細菌叢が様々な生体調節機能の中心的役割を担っていることが確立されつつある。メタボリック症候群の症状は腸内細菌叢の変化と深くかかわることが確認されており、その腸内細菌叢の変化は食餌内容や過食と相互に影響しあうことが示唆されている。さらに、ヒトにおける腸内細菌叢の増悪化は肥満やメタボリック症候群だけでなく、現代の3大死因である、がん・心疾患・脳血管疾患、さらに認知症など多くの病気と関係していることが指摘されている。その一つの理由として、これら疾患の共通リスク要因として炎症があり、腸内細菌叢の変化に伴う低レベルの持続的な炎症状態が、生活習慣病やメタボリック症候群の諸症状の引き金になっていることが明らかになってきている。腸管内の起炎症性化合物が同定されれば、それ自身が炎症の原因であるために、その後引き起こさ

れる炎症応答を早期に判定できる可能性がある。さらに、腸内細菌叢は食事に大きく影響を受ける特性を利用すると、腸内炎症生体指標に基づく栄養指導や機能性食品成分による介入試験へ発展させるなど、広範囲な応用が可能である。本研究では、メタボリック症候群の慢性炎症に関連した生体指標の開発を目的とした疾患モデル動物の血液や糞便分析を実施し、食事内容や病態に依存して変化する起炎症性代謝物の探索と同定を行った。

結果

LC-MSやGC-MSを用いた生体試料のノンターゲット分析を行い、疾患モデル群と対照（正常）群のプロファイルデータの比較（差分解析）や、生体試料の分画と炎症バイオアッセイ（生物活性試験）により候補化合物を絞り込み、目的の起炎症性代謝物を同定する。まず、肥満・糖尿病モデルマウスとして汎用されている *ob/ob* マウスと対照の C57BL/6J マウスから回収したマウス糞便を Bligh & Dyer 法にて水層と有機層に抽出し、それらを LC-MS 分析や NF- κ B レポータージーンアッセイに供し、起炎症性の糞便代謝物探索を行った。最終的に *ob/ob* マウス糞便で増加する起炎症性の代謝物の一つとして、ヘムの腸内細菌代謝物の一つである stercobilin を同定した。*ob/ob* マウスの腸内細菌代謝で高生産した stercobilin は消化管で再吸収され、血中においても有意に高いレベルで存在することや、stercobilin はマクロファージ様 RAW264 細胞で TNF- α や IL-1 β など炎症性サイトカインを誘導することを初めて見出した²⁾。興味あることに、他の生活習慣病モデル動物（KK-*A^y* マウスなど）糞便の LC-MS 分析においても、stercobilin と同様の urobilinoids である urobilinogen が増加していた。Urobilinogen は、stercobilin 代謝の前駆体である。そこで、urobilinogen を正常マウスへ飲水投与し、栄養素代謝への影響を検討した。その結果、極低濃度（10 ppb〜）の urobilinogen 投与においても、耐糖能異常が惹起されることが分かった。このことは、生体を構成する様々

な代謝物のうち1種類の生体レベルが変化するだけで糖質代謝に影響を及ぼしうる、ということを示しており、炎症を基盤とする代謝関連疾患の予防標的と食による制御の可能性を示唆している。

肥満、過食、高脂血症、高血糖などメタボリックシンドロームの症状を呈するモデルマウスKK-A^yの糞便分析にも取り組んだ³⁾。ここでは、GC-MSによる糞便の揮発性化合物 (volatile organic compounds; VOCs) 分子の分析結果を示す。なぜなら我々は、マウス糞便可溶性画分の分析試料調製 (濃縮) の際に、臭気成分の多くが消失していることに気付いていたし、近年単鎖脂肪酸など揮発性化合物の生体調節機構が注目されているからである。本検討では、病態変化の生体指標探索だけでなく食事内容の影響も評価するために、KK-A^yマウスと対象のC57BL/6Jマウスに通常食と高脂肪食を与えた計4群のマウスより糞便を経時的に回収し、そのVOCsをhead-space auto-samplerでGC-MSへinjectした。その

結果、高脂肪食投与開始からわずか1週間で、食事内容の影響とマウス系統 (病態) の明確な分離を示す糞便VOCsプロファイルデータ (主成分分析) が得られた (図1A)。高脂肪食の影響で有意に増加する糞便VOCsのうち、代表的な化合物は脂肪酸由来のアルデヒドnonanal、octanal、heptanalであった (図1B)。一方、高脂肪食の影響を受けずにKK-A^yマウス (糖尿病群) で有意に増加していた13の代謝物のうち、最も変化が顕著だったのがacetoneである (図1C)。Acetoneは脂質代謝で生成されるケトン体の1つであり、KK-A^yマウスの病態を反映する生体指標であることが示唆された。注目すべきは、糞便VOCsプロファイルデータの2元配置分散分析 (2-way ANOVA) で食事 (高脂肪食) とマウス系統 (病理的变化) の相互作用を示した代謝物、つまり「高脂肪食」と「病態」の相乗効果で増加したVOCがphenolである (図1D)。ある種の腸内細菌はチロシンの代謝によりphenolを生成する。しかし、慢性的なphenolへの曝

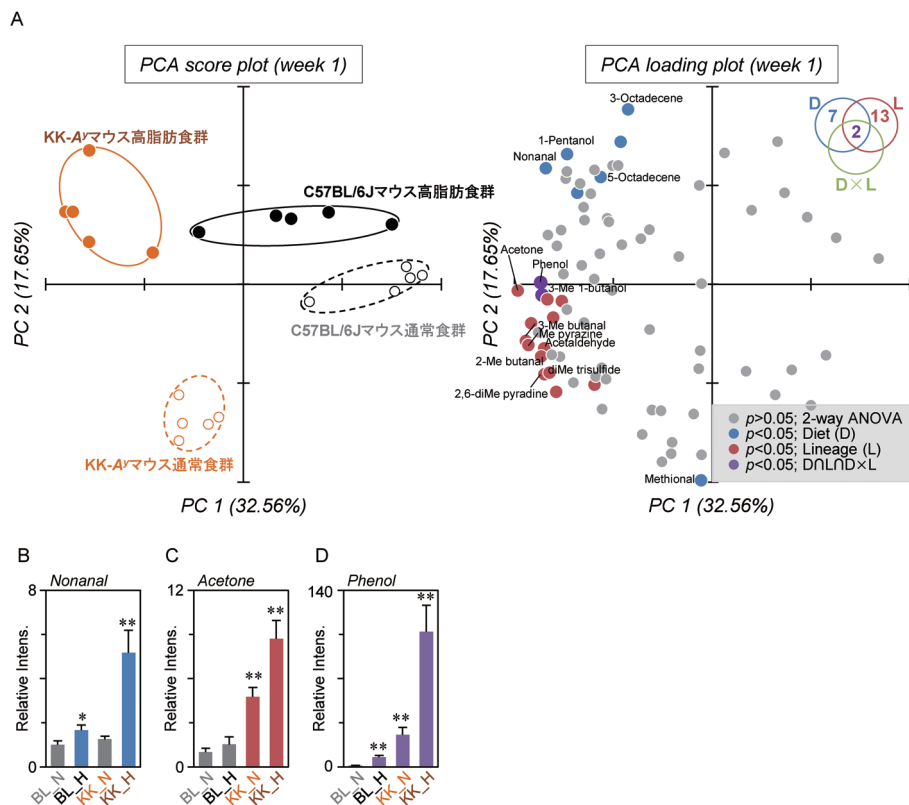


図1 通常食あるいは高脂肪食を1週間摂取したC57BL/6JマウスあるいはKK-A^yマウスの糞便VOCsプロファイル

(A) 回収した糞便のGC-MS分析を行い、VOCsプロファイルを取得し、主成分分析 (PCA) に供した。Loading plotの右上ダイアグラムは、高脂肪食 (食事: D) の影響と糖尿病 (マウス系統: L) の影響、およびその相互作用 (D x L) を二元配置分散分析で解析した際に有意 ($p < 0.05$) に変化した化合物数を示す。C57BL/6Jマウス通常食群 (BL_N)、C57BL/6Jマウス高脂肪食群 (BL_H)、KK-A^yマウス通常食群 (KK_N)、KK-A^yマウス高脂肪食群 (KK_H) におけるnonanal (B)、acetone (C)、phenol (D) の相対定量値を示す。BL_N群と比較して、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ (One-way ANOVA with post hoc test)。Uchi-kawa M *et al.*, *Sci. Rep.*, 2020

露は肝障害、腎障害、神経障害などを引き起こすことが知られている。糞便のphenolレベルは高脂肪食群やKK-A^yマウスで週齢依存的に増加傾向を示し、血中phenolレベルもKK-A^yマウスや高脂肪食群で増加していたので、全身で毒性を示すphenolのような代謝物の生成を抑制する食生活が、代謝性疾患や老化・健康長寿に有効であるか、今後の検討課題である。

考 察

腸内細菌移植や抗生物質による菌叢破壊、ノトダイオートマウスの開発など実験技術の進歩により、腸内細菌叢の変化と様々な生体調節に関する多くの重要な知見が蓄積されてきた。腸内細菌叢の変化に伴う代謝物の変化が生体に作用することが推定されており、例えば、食物繊維摂取で増加する酪酸などの短鎖脂肪酸は、宿主の生体機能を整える好ましい腸内細菌代謝物の代表格である。一方、腸内細菌代謝物の好ましくない活性（作用）の代表格は、生活習慣病などの分子基盤である慢性炎症であり、腸内細菌叢dysbiosisと生活習慣病の関係性を支持する多くの論文が報告されている。腸管内の起炎症分子が1つでも多く同定されれば、それ自身が炎症の原因であるために、その後引き起こされる炎症応答を早期に判定できる可能性がある。炎症は様々な疾患の分子基盤であるため、機能性食品成分の格好の予防標的となる。これまでに、血液・糞便・尿など複雑なバイオマトリックスに存在する様々な代謝物について、その化学特性を考慮した試料調製法や分析法で生体試料分析を行い、病態を反映する生体指標や食品機能評価の生体指標を見出してきた。高脂肪食など生活習慣病のリスクとなるような食事様式では、腸内細菌代謝の腐敗産物として位置付けられているphenolが糞便と血中で増加していた。Phenolは、マウロファーシ様培養細胞などで炎症性サイトカインの発現を強く誘導する起炎症性の代謝物であることから、生体内で慢性炎症を推進する負のループを形成しているであろう。また、腸内細菌代謝物の一つであるstercobilinが消化管で再吸収され血中で検出されることを初めて見出し、その血中濃度がメタボリック症候群モデルマウスで高値であることも報告した。Phenolやstercobilinなど起炎症活性を示す腸内細菌代謝物が血中へ移行していることは、全身で代謝調節に影響を及ぼしている可能性を示唆している。これら腸内細菌代謝物は糞便からの検出が可能であるため、自己検査キットなどセルフメディケーション分野への展開が期待

される。消化管内で増加する起炎症性腸内細菌代謝物の再吸収メカニズム、輸送体の同定や、輸送メカニズム、解毒のメカニズムの解明などが新たな機能性食品開発の標的として有用である。

要 約

豊かな食生活は、運動・睡眠と等しく健康維持に重要な生活習慣病予防戦略であり、生体制御異常を正常化する様々な食品栄養成分の作用メカニズム解析は、人類の健康増進・QOLの向上・健康長寿へと繋がる重要な研究分野である。筆者らは、食品の機能を正確に評価し、生活習慣病の予防や早期発見に貢献できる生体指標の確立に取り組んでいる。これまでに、いくつかの生活習慣病モデルマウスの糞便分析を通じて、宿主に対して生物活性を示す代謝物が一定の割合で存在することが分かってきた。特に、生活習慣病の病態や食事内容（高脂肪食など）に対し鋭敏に反応する糞便代謝物の一つとして同定されたphenolは、生活習慣病の慢性炎症を惹起する分子基盤として重要であるかもしれない。慢性炎症を評価する生体指標として糞便代謝物が確立されれば、採血などを必要としない非侵襲的な評価というようなメリットがある。炎症が生活習慣病をはじめとする様々な疾患の共通リスクであるとする、高齢化社会で対策が急務である認知症やフレイル予防のための生体指標としても期待ができる。

謝 辞

この度は、大変栄誉ある三島海雲学術賞を賜り、公益財団法人三島海雲記念財団の今関博理事長をはじめ財団関係の皆様、御選考いただきました学術委員の先生方に厚く御礼申し上げます。また、本学術賞にご推薦いただきました、日本農芸化学会 会長 吉田稔先生をはじめ学会関係の先生方に厚く御礼申し上げます。本研究は、静岡県立大学で行われたものであり、格別のご指導とご高配を賜りました、同食品栄養科学部の大島寛史名誉教授に心から感謝申し上げます。本研究の実施に当たり、ご指導とご協力をいただきました諸先生方と研究に従事して頂いたスタッフや学生の皆様に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) B. K. Edwards, et al. : *Cancer*, **116**, 544-573, 2010.
- 2) S. Sanada, et al. : *Sci. Rep.*, **10**, 6479, 2020.
- 3) M. Uchikawa, et al. *Sci. Rep.*, **10**, 5681, 2020.

著者紹介



三好 規之 (みよし のりゆき)

1976年 兵庫県生まれ
1999年3月 鳥取大学医学部卒
2004年3月 名古屋大学大学院生命農学研究科 博士課程修了
2004年3月 博士(農学)の学位取得(名古屋大学)
2004年5月 アメリカ国立衛生研究所 Visiting Fellow
2005年10月 東京大学医科学研究所 Research Fellow
2006年6月 静岡県立大学COEポスドク、助教
2017年6月 静岡県立大学食品栄養科学部 准教授

(研究テーマと抱負)
食品機能学。静岡県産の農作物に含まれる機能性成分の解析を通じて、地域社会へ貢献したいと考えています。