

## 論文の内容の要旨

論文題目 ラフィノースの生理作用に関する研究

氏名 名倉泰三

ヒトを始め高等動物の腸内には、膨大な数と種類と細菌が生息している。これらの細菌群は腸内フローラと呼ばれ、宿主の健康に大きな影響を与えている。腸内フローラは摂取する食品成分の影響を受け変動する。*Bifidobacterium* などの腸内の有用細菌を選択的に増殖させ、宿主に有用な生理作用を与える食品成分のことをプレバイオティクスと呼んでいる。代表的な例として難消化性オリゴ糖が挙げられる。本研究は、甜菜に含まれ製糖副産物として工業的生産が可能な難消化性3糖類ラフィノースに関して、腸内フローラに及ぼす影響を検討し、宿主に発現する生理作用を明らかにすることを目的とした。特に腸内フローラは宿主の腸管および全身免疫系を発達させるといわれており、ラフィノースのようなプレバイオティクスの摂取によって、宿主の免疫応答が変化するか研究を行った。

### 1. ラフィノースが腸内フローラに及ぼす作用

成人に1日15gのラフィノースを投与した研究報告では、糞中 *Bifidobacterium* が増加するが、難消化性オリゴ糖の副作用として知られる浸透圧性の下痢を伴うことが明らかになっている。そこで下痢をおこさない少量の摂取によって腸内フローラがどのように変化するか検討した。健康成人10名が参加した投与試験では、1日3g以上のラフィノー

ス摂取によって糞中 *Bifidobacterium* の菌数と占有率が有意に増加した。また投与量に依存して *Bifidobacterium* が増加した。一方それ以外の細菌の菌数変化は 5 g 投与では認められなかった。

ヒト腸内に生息する *Bifidobacterium* 属には数種類の菌種が存在するが、難消化性オリゴ糖の *Bifidobacterium* 増殖作用はこれまで属レベルの分類によって評価されていた。そこで生化学的菌種同定法により菌種レベルの変動についても解析した。6 名の健康成人に対して、ラフィノース (Gal-Glu-Fru) を構成する 2 糖類メリビオース (Gal-Glu) を 1 日 2~8 g 投与した。成人の優勢菌種とされる *B. adolescentis* group と *B. longum* は、被験者の糞便からも優勢菌種として検出され、メリビオースの投与によって両菌種は増加した。また成人では劣性菌種とされる *B. bifidum* や *B. breve* が検出された例では、それら菌種も増加した。以上のことからメリビオースは成人腸内 *Bifidobacterium* のいずれの菌種も増殖誘導することが明らかとなった。

一方、実験動物 (ラット) に 5% ラフィノース添加飼料を与えた場合、ヒトと同様に *Bifidobacterium* の顕著な増加が観察されたが、ヒトと異なり *Peptococaceae* や *Clostridium* の増加も認められた。これはラットでは *Bifidobacterium* が優勢菌でないために、ラフィノースが他の腸内細菌の増殖に利用されやすいためと考えられる。

腸内フローラの有害な一面として、有害物質の代謝があり、大腸癌などの疾患との関係が指摘されている。健康成人 7 名に 1 日 5 g のラフィノースを投与した試験では、糞中の *Bifidobacterium* が増加するとともに、アンモニアやインドールなどの有害物質濃度が有意に低下した。ラフィノース投与により有害物質を代謝する活性が腸内フローラ全体において変化する可能性が考えられた。

腸内細菌は糖質からエネルギーを獲得する際に様々な有機酸を生成するが、その中には宿主に有用な作用を示すものがある。例えば、抗菌性や水吸収の促進 (抗下痢作用)、結腸運動の亢進 (便秘促進)、結腸上皮細胞の酸化エネルギー源、がん細胞の増殖阻害、脂質代謝の改善などの作用が示唆されている。しかしながら、ヒト腸内でラフィノースから生成する有機酸の多くは腸管で吸収されてしまうため、糞便成分からその特徴を知ることができなかった。そこで嫌気性ヒト糞便培養にラフィノースを接種し、培養液の有機酸を分析した結果、*Bifidobacterium* が生成する酢酸や乳酸以外にも、酪酸や

プロピオン酸などが増加した。

## 2. ラフィノースの保健効果

ラフィノースから生成される有機酸の中で、酪酸とプロピオン酸には結腸の蠕動運動を亢進する作用が報告されている。そこで、ラフィノースを摂取した場合の生理効果として、便秘に対する作用を検討した。1重盲検交差デザインにより32名の被験者に対して1日5gのラフィノースの投与試験を行った。その結果、排便頻度の少ない便秘傾向者の排便日数および回数が有意に増加したことから、ラフィノースは便秘促進作用があることが明らかとなった。

## 3. ラフィノースの免疫応答に対する作用

近年先進国ではアレルギー疾患が増加している。腸内フローラは免疫系の正常な発達に必要であり、アレルギーとの関わりについても関心が高まっている。我々はラフィノースの投与がアトピー性皮膚炎の改善に有効な例を認めた。アトピー性皮膚炎発症にはI型アレルギーが深く関わりとされている。そこで、ラフィノースがI型アレルギー発症に関連するTh1/Th2免疫応答さらにはIgE産生に対して、どのような作用を示すか検討した。実験には食品抗原の1つである卵白アルブミン(OVA)に対する特異的なT細胞抗原受容体を発現するトランスジェニックマウス(Tg)マウスを用いた。このマウスはOVAを経口投与することにより、抗原特異的なCD4<sup>+</sup>T細胞のTh1/Th2分化が誘導され、さらに長期投与ではIgEなどの抗体産生が誘導される特徴がある。

OVA飼料を1週間給餌したTgマウスの脾臓、腸管膜リンパ節、パイエル板からそれぞれCD4<sup>+</sup>T細胞を調製し、これを*in vitro*で抗原再刺激した時に分泌されるサイトカインパターンによりTh1/Th2分化を評価した。その結果、あらかじめ5%ラフィノース添加飼料を与えた群では、腸管膜リンパ節由来のCD4<sup>+</sup>T細胞からのサイトカインパターンに有意な変化が認められた。すなわちTh2サイトカインであるIL-4産生が低下し、未感作T細胞、Th1細胞が産生するIL-2産生が増加した。一方Th1サイトカインであるIFN- $\gamma$ は変化しなかった。この結果から、ラフィノースの経口投与は未感作T細胞からTh2細胞への分化を抑制することが示唆された。

Th2 サイトカインは B 細胞の抗体産生を誘導するが、特に IL-4 は IgE クラスの産生を誘導する。Tg マウスに 2%OVA 添加水を長期間経口投与することで血中 IgE 上昇を誘導する試験系において、あらかじめラフィノース添加飼料与えた群では、コントロール群と比較すると OVA 経口投与 8 週目の血中総 IgE 濃度が有意に低い値であった。

また、抗原提示細胞が産生し Th1 を誘導する IL-12 にも注目した。5%ラフィノース飼料を与えた BALB/c マウスでは、コントロール食を与えた群と比較すると、腸管内の食品抗原や細菌を取り込み最初の免疫応答を誘導する場であるパイエル板の免疫細胞からの IL-12 産生が有意に増加した。

以上の結果からラフィノースは腸管あるいはその近傍の免疫系の Th1/Th2 分化に影響を与え、それによって I 型アレルギーに深く関与する IgE 産生を抑制することが示唆された。また前述のパイエル板細胞の培養系にラフィノースを直接添加しても IL-12 濃度に変化がなかったことから、本作用は腸内フローラなどを介した間接的な作用ではないかと考えられた。そこで、ラフィノース食によって Tg マウスや BALB/c マウスの腸内フローラがどのように変化するか検討した結果、前述のヒトやラットと異なり、盲腸内容物からは、ラフィノースの投与の有無に関わらず *Bifidobacterium* は検出されなかった。また Tg マウスでは有意な腸内細菌の変化は認められなかった。マウス腸内には培養困難な細菌種が多いことを考慮する必要があるが、ラフィノースを経口投与したマウスで観察した免疫応答の変化には、少なくとも *Bifidobacterium* が関与しないことが明らかとなった。

以上の研究により、ラフィノースを摂取した時のヒトや実験動物の腸内フローラや腸内代謝産物の変化が明らかとなった。また宿主に対する生理作用として排便習慣の改善に有効であった。さらには宿主の免疫応答にも影響し、食品抗原に対する Th2 応答が抑制された。これに関与する腸内細菌種は不明であり、今後の課題となった。ラフィノースは、腸の健康のみならず、将来的にアレルギー疾患の予防などに利用できる可能性がある。