

腸内細菌産生物質の探索と ビフィズス菌による寿命伸長効果

協同乳業株式会社

《設立》1953年12月

はじめに

腸内細菌は健康に大きな影響を与えます。そのメカニズムとして菌体成分による刺激が研究されてきました、腸内細菌の代謝物は血中にも移行するため、より直接的に健康に関与している可能性もあります。協同乳業株式会社(以下、協同乳業)はこのような観点から、腸内細菌の代謝物質、なかでもポリアミンに着目し、同社のビフィズス菌 *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (以下、LKM512) を用い、様々な独自の研究を行っています。

ポリアミンは低分子の塩基性物質で、プトレッシン、スペルミジン、スペルミンなどがあります。生物を構成する全ての細胞が含有する物質で、核酸の合成・安定化、細胞の増殖・分化など様々な生命現象に関連しています。また、炎症抑制作用や酸化ストレスからの核酸保護作用、抗変異原性をもち、腸管バリア機能(腸管粘液やIgAの分泌促進など)の向上にも関与しています。

今回は、東京都西多摩郡日の出町にある同社研究所を訪れ、腸内細菌産生物質の探索の研究と、LKM512による寿命延長作用を中心に、同社が進める研究の概要を伺いました。

1. メタボローム解析による 腸内常在菌代謝産物の探索

協同乳業では、腸内常在菌の代謝産物を網羅的

に解析するために、メタボロミクスという技術を用い次のような試験を実施しました。

同じ両親から生まれたマウスを2群(無菌マウスと通常菌叢定着マウス)に分け、広範囲の成分を分離・分析することが可能なキャピラリー電気泳動—飛行時間型質量分析装置(CE-TOFMS)を用い、マウスの大腸内容物から腸内常在菌の代謝産物を解析しました。その結果、179成分が検出され、しかもこれらの物質は無菌マウスと通常細菌叢定着マウスで明らかな差があることが判明しました(図1)。これにより、腸内常在菌の有無が大腸内の代謝産物に大きな影響を与えていることが確認されました。[以上、文献1より]

179成分をさらに検討したところ、77成分は通常菌叢定着マウスの方が無菌マウスより有意に多く、逆に46成分は有意に少ない結果となりました。ポリアミンの一種であるプトレッシンや、抑制系神経伝達物質として働くアミノ酸のGABAは、通常菌叢定着マウスの方が有意に多いことがわかりました(図2)。一方、これらの前駆物質のほとんどが無菌マウスと通常菌叢定着マウスで差がみられないため、プトレッシンやGABAは腸内常在菌の作用で産生されていることが確認されました。[以上、文献1より]

2. LKM512による 寿命伸長効果

加齢に伴い体内のポリアミン濃度が低下することがわかっており、これが老化の主要因である慢性炎症や腸管バリア機能などの低下に関連すると仮説を立てました。そこで、LKM512の投与により大腸内でポリアミンを産生させることで、慢性炎症を抑え、寿命延伸に寄与するかを実証す

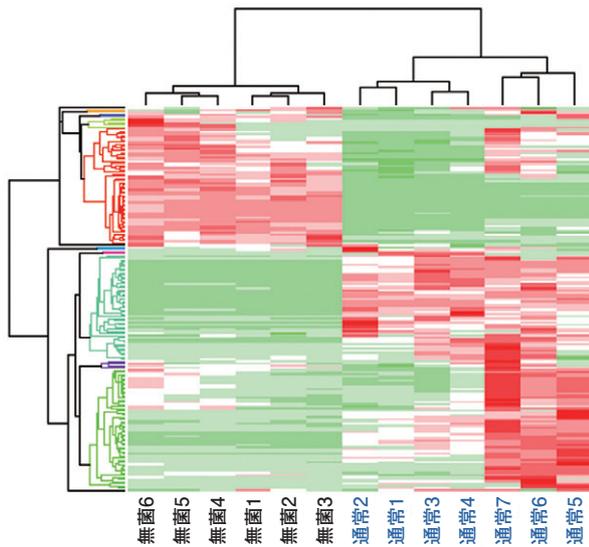


図1 検出成分の階層型クラスタリング

赤色が相対的に多く検出された成分、緑色が少なく検出された成分。無菌マウスと通常菌叢定着マウスでは、成分に大きな差がある。

るための試験を行いました。

通常的环境下で飼育している10カ月齢（ヒト換算：30～35歳）のメスマウスを3グループ（各19～20匹）に分け、それぞれにLKM512、ポリアミン（スペルミン）、生理食塩水（対照群）を週に3回、経口投与。投与6カ月目に糞便と尿を回収し、投与11カ月目に大腸を摘出して寿命や腸内環境、炎症状態に与える影響を調べました。なお、本試験にはICRマウスを使用しました。

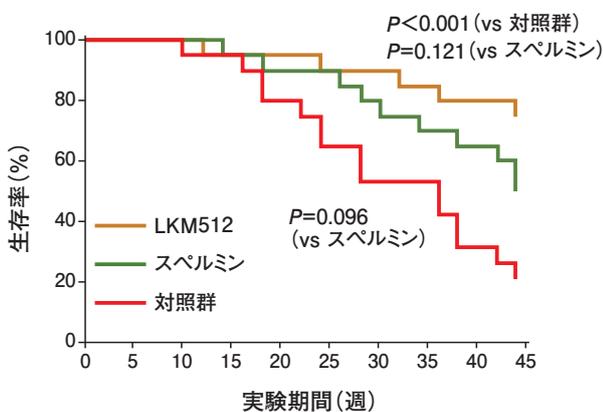


図3 LKM512、スペルミン経口投与が生存曲線に及ぼす影響

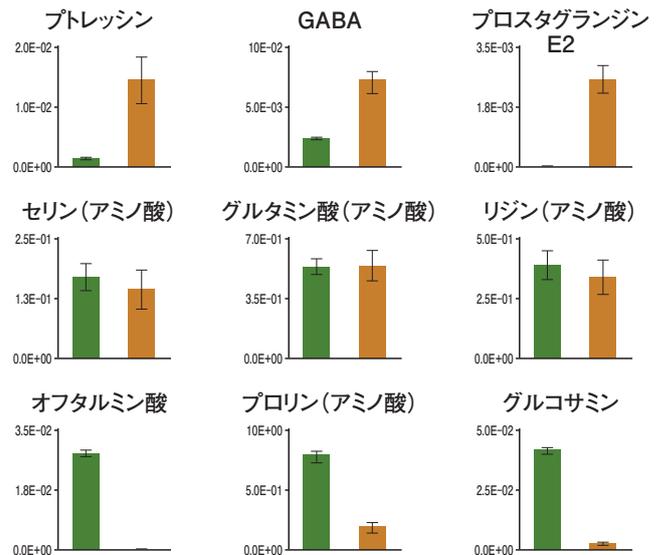


図2 無菌マウス、通常菌叢定着マウスの代謝産物の濃度比較例

グラフの緑色は無菌マウス、オレンジ色は通常菌叢定着マウス。上段は腸内常在菌により産生される成分、中段は腸内常在菌の影響を受けない成分、下段は生体及び食事由来で、腸内常在菌により吸収あるいは分解される成分。

腸内細菌が産生するポリアミンが寿命延伸に効果

試験の結果、LKM512投与群は対照群と比較して有意に寿命が伸びていました（図3）。スペルミン投与群も同様の延伸傾向を示しましたが有意ではありませんでした。これにより、ポリアミンが寿命伸長に何らかの影響を与えていることが確認されました。

更に糞便のスペルミン濃度を調べたところ、LKM512投与群は濃度が上昇しましたが、スペルミン投与群では上昇が認められず、経口摂取したスペルミンは小腸で吸収され、大腸まで到達しな

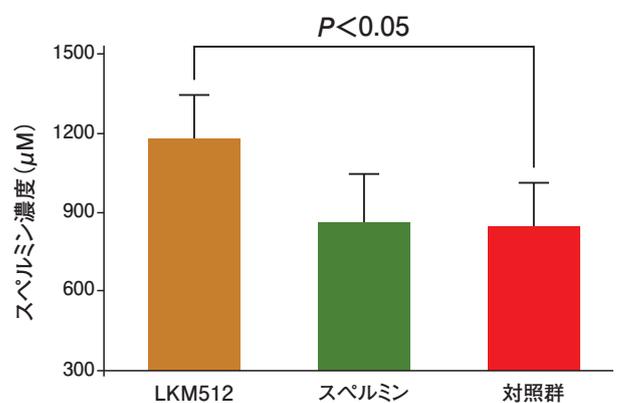


図4 糞便中のスペルミン濃度

糞便中のスペルミンはLKM512で有意に増加したが、スペルミンでは増加せず、大腸に届いていないことが確認された。

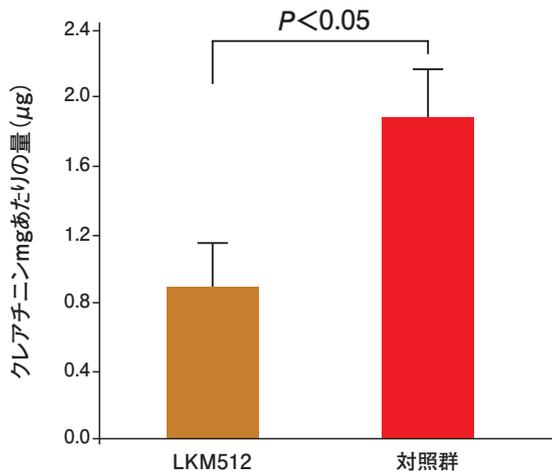


図5 炎症マーカー（尿中ハプトグロビン）の量

LKM512投与群では、炎症マーカーの尿中ハプトグロビン濃度の有意な減少が確認された。

いことが確認されました(図4)。[以上、文献2より]

■LKM512投与群は大腸バリア機能が維持

また、LKM512投与群は、炎症マーカー（尿中ハプトグロビンや炎症性サイトカインの発現）の減少が認められました(図5)。さらに、対照群は皮膚に腫瘍や潰瘍が多く見られたのに対し、LKM512投与群は投与期間中にほとんど観察されませんでした。また、大腸の組織片を確認したところ、対照群の半数は組織が崩壊して粘液を分泌する杯細胞の数が著しく減少していましたが、LKM512投与群は十分に杯細胞が残っていました。これは、大腸のバリア機能を維持していたことを示しています。

大腸の遺伝子発現パターンをマイクロアレイで調べると、LKM512投与マウスは若年マウスと類似したパターンを示し、対照マウスやスペルミン投与マウスとは異なったパターンとなりました(図6)。これにより、大腸の老化に伴う遺伝子発現の変動をLKM512が防いでいることが示唆されました。[以上、文献2より]

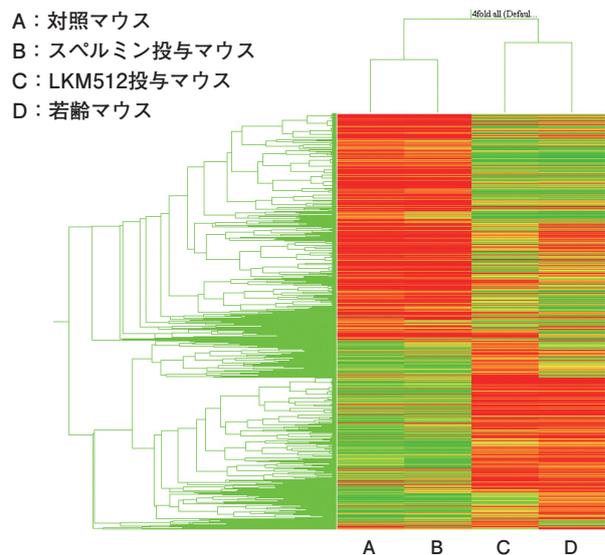


図6 結腸のDNAマイクロアレイ

約2万個の遺伝子発現パターン(帯一つ一つが遺伝子を示す)。LKM512投与マウス(C)と若年マウス(D)が似た発現パターンを示し、対照マウス(A)とスペルミン投与マウス(B)は逆パターンを示している。

上昇効果は個体差が大きく、安定したポリアミン産生は困難でした。ポリアミンを産生する菌種を探索するために、様々な腸内常在菌を糞便で培養して探索したところ、同一菌株による実験でも、用いる糞便によりポリアミン産生量が異なることから、糞便内に腸内細菌以外のポリアミン産生に影響を与える物質が存在すると想定しました。

そこで、糞便中のポリアミン濃度と相関する低分子物質の探索を試みました。食事成分の影響を極力排除するために、被験者に4日間、厳密な統一食を摂取してもらい、その糞便試料を用いてCE-TOFMSを用いたメタボロミクス解析を行ったところ、221成分が検出されました。

ポリアミン代謝系で最初に合成されるポリアミンで、かつ大腸内で最も高濃度に含まれるプトレッシンと各成分との相関性を調べ、その中から培養法で候補物質を絞り込んだ結果、アルギニンヒト糞便に添加した場合に最もプトレッシン濃度の上昇が観察され、ポリアミン増強物質として研究を進めることにしました。[以上、文献3より]

3. 脳のアンチエイジング効果

■ポリアミン増強物質の探索

LKM512投与による大腸内ポリアミン濃度の

■脳のアンチエイジング効果

14カ月齢(ヒト換算:50歳程度)のマウス(メス128匹、オス20匹)を、アルギニン及びLKM512投与群(Arg & LKM512投与群)と対照群の2群

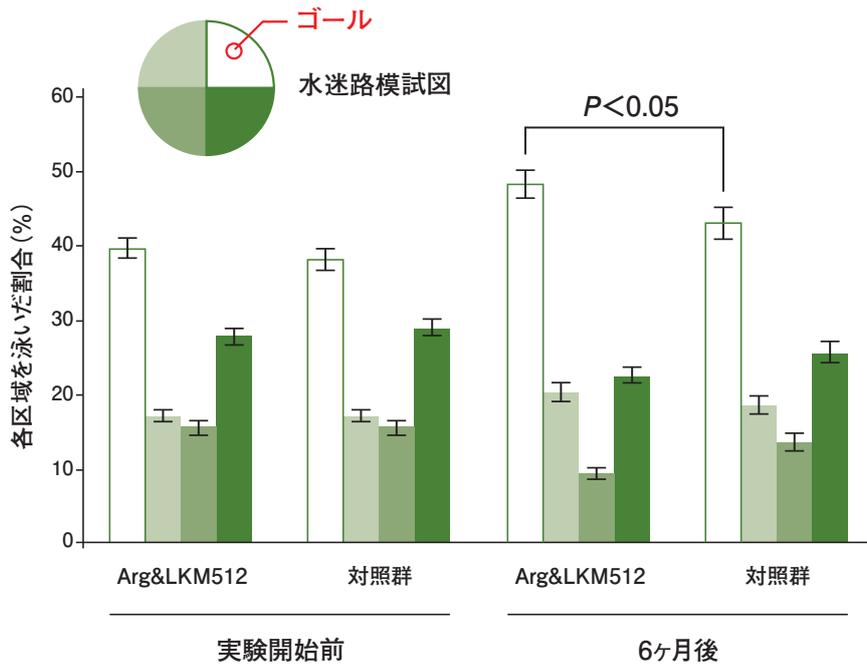


図7 Arg & LKM512混合物の経口投与がモリス水迷路試験の試験結果に及ぼす影響

グラフは、4つに分けたプールの各区域をマウスが泳いだ割合を示している。白い棒グラフは、ゴールのある区域を泳いだ割合を示す。実験開始前は、Arg & LKM512混合物投与群と対照群の間に差はなかったが、6か月後は対照群と比較して有意にゴールのある区域を泳いだ割合が高くなった。

に分け、週3回、1年間経口投与しました。

投与開始6か月後にモリス水迷路試験^{*1}を行い、学習・記憶力を判定したところ、投与開始前は両群間に差がありませんでしたが、投与6か月後(20か月齢：ヒト換算で70歳前後)では、Arg&LKM512投与群は対照群と比較して有意に成績が高く、加齢時の学習記憶力の維持・向上に有効であることが認められました(図7)。「以上、文献3より」

この研究成果は科学誌『Nature』の姉妹誌である『Scientific Reports』に掲載され、同誌の「注目の論文」として取り上げられました。

*1モリス水迷路試験：マウスが嫌う水中を泳がせ、周囲の景色から逃避台の位置を記憶させる試験。今回は、試験前に訓練期間として1日3回、1週間泳がせて場所を記憶させた(1分間の遊泳で逃避台に到達できなかった場合は、逃避台まで人為的に誘導して場所を記憶させた)。その後、逃避台を取り外し、訓練期間中に逃避台があったエリアを泳ぐ時間を測定して評価した。

4. 成人型アトピー性皮膚炎のかゆみ改善効果

協同乳業は、メタボロミクス解析の技術を用いて、他にも様々な研究を行っています。その一つ

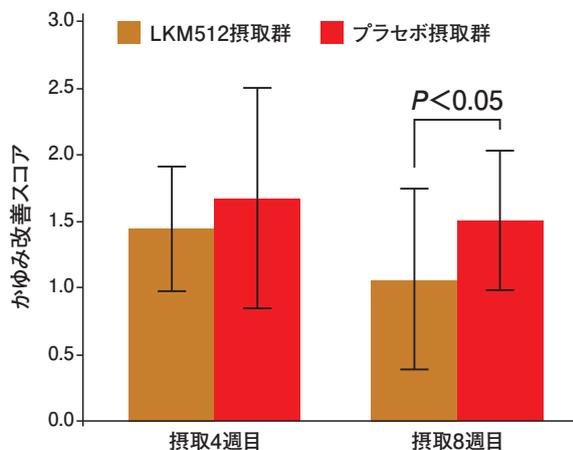


図8 かゆみ改善スコアの比較

スコアの数値が低いほど症状が改善されたことを表す。摂取8週目にLKM512摂取群でかゆみのスコアがプラセボ群と比較して有意に改善された。

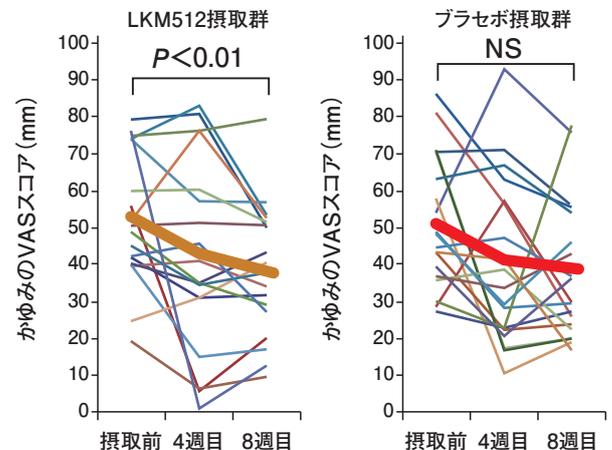


図9 かゆみVASスコアの比較

スコアの数値が低いほど症状が改善されたことを表す。カラーの線は各被験者のスコアの変動、オレンジ及び赤色の太線は平均値を示す。摂取前と比較して、LKM512摂取群は4週目及び8週目で有意な改善がみられた。

が、LKM512による成人型アトピー性皮膚炎軽減のメカニズムを解明する研究です。成人型アトピー性皮膚炎に対し、LKM512がどのような作用を及ぼすかを、医薬品の臨床試験の実施基準（GCP）に準拠した治験により検討しました。

試験は、中等症から重症の成人型アトピー性皮膚炎患者44名を対象に、LKM512粉末カプセル摂取群とプラセボ摂取群に分けて実施。摂取4週間および8週間後に、担当医の診断と被験者の自己評価（①かゆみのスコア ②皮疹の程度 ③QOL）で効果を判定しました。

その結果、医師の診察によるかゆみの改善度をみると、LKM512摂取群はプラセボ摂取群と比較して8週目に有意に高くなりました（図8）。また、①のVAS*2を用いたかゆみの強さの判定でも、摂取前と比較してLKM512摂取群は有意な改善が認められたのに対し、プラセボ摂取群は認められませんでした（図9）。

②の皮疹の程度は、LKM512摂取群は投与前と比較して有意な改善を示しましたが、プラセボ摂取群でも効果があり、グループ間では差が認められませんでした。③のQOLは「感情」「症状」「機能」の全てのカテゴリーでLKM512摂取群は有意な改善が認められた一方、プラセボ摂取群では「症状」カテゴリー以外では認められませんでした。

著効症例の摂取前後の糞便抽出物をメタボロミクス解析したところ、204成分が検出されました。その中で、共通してキヌレン酸の増加が確認されました。キヌレン酸は複数の論文で鎮痛効果を有することが報告されており、また脊髄内への注入でかゆみ抑制効果がラットで報告されている成分です。実際にアトピーモデルマウスを作製し、キヌレン酸を静脈注射した結果、掻痒行動が減少傾向を示すことが認められました。この試験より、LKM512のアトピー性皮膚炎改善のメカニズムとして、腸管内で産生されるキヌレン酸が関与している可能性が示唆されました。〔以上、文献4より〕

*2 VAS：visual analogue scale。かゆみの程度を0～100に分け、自己評価する方法。

5. 漢方薬（大黄：センノシド）の薬効を高める効果

瀉下作用（下剤作用）をもつ漢方薬の大黄は、有効成分のセンノシドが大腸の蠕動運動を促すことがわかっています。その効果は、センノシドが腸内細菌によって薬効成分のレインアンスロンに分解されることで得られます。効果は腸内常在細菌に依存するため、センノシドを分解できず大黄の薬効が得られない人もいます。特に抗生物質服用中は顕著にその割合が増加します。

そこで、どのような腸内細菌がセンノシドからレインアンスロンを産生するかを調べるために、協同乳業が保有する乳酸菌およびビフィズス菌の中から約130種類を選抜し、これらの菌株を接種した培地にセンノシドを添加し、薄層クロマトグラフィーを用いてレインアンスロンの量を測定し、センノシドの分解能を有する菌株を探索しました。その結果、LKM512と *Bifidobacterium pseudocatenulatum* M8（LKM10070）の培地からレインアンスロンが検出され、これらの菌株はセンノシドを分解してレインア

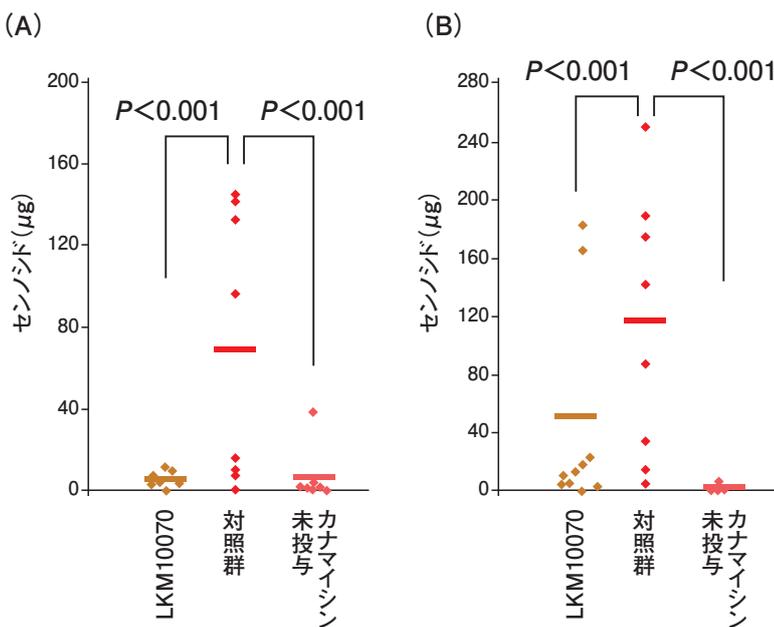


図10 カナマイシン処理マウスへのビフィズス菌投与が腸管内センノシド分解に及ぼす影響

ンスロンを産生することが確認されました。

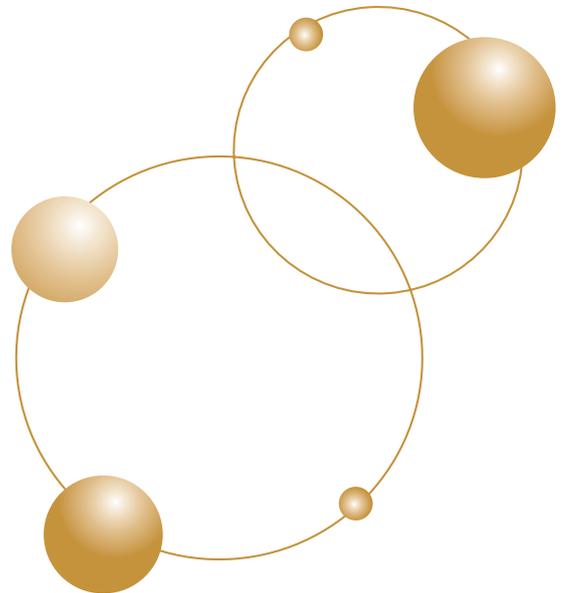
次に、これらのビフィズス菌をマウスに経口投与し、その有効性を検討しました。抗生物質（カナマイシン）を用いて腸内細菌叢にダメージを与えたマウス9匹にLKM512、同8匹にLKM10070を経口投与し、糞便中のセンノシド量を対照群と比較した結果、両ビフィズス菌投与群ともにセンノシド量が有意に減少しており、センノシドが分解されていることが示されました（図10）。またマウスの実験で、LKM512投与後にセンノシドを投与することで腸管の蠕動運動が促進されることも確認されました。〔以上、文献5より〕

おわりに

「近年、ポリアミンによるオートファジー誘導作用が寿命延伸に関わっていることが明らかになり、世界的に大きな注目を集めています」と、今回お話しを伺った研究者は話します。オートファジーは自食作用とも呼ばれ、細胞が持つ、細胞内の異常たんぱく質を分解する仕組みです。細胞の老化に伴い増加する異常たんぱく質の分解は、老化抑制のカギとなると考えられます。特に一生入れ替わることがない脳や神経の細胞では、異常たんぱく質の増加はダメージが大きいため、脳の老化抑制に、ポリアミンによるオートファジーの誘導作用が期待されます。また、がんの予防に対しては、

ポリアミンの抗変異原性作用や抗酸化作用が有効と考えられます。

このように、ポリアミンはアンチエイジングを考える上で極めて有望な物質です。「今後は、ヒトを対象とした試験を行っていくとともに、腸内細菌が産生する様々な代謝物を幅広く探索したい」と研究者は力を込めます。その研究に大きな期待が寄せられます。



《今回の記事は、以下の文献・学会発表を参考にまとめました》

- 1) Matsumoto M, et al. Impact of intestinal microbiota on intestinal luminal metabolome. *Sci Rep.* 2 : 233 (2012)
- 2) Matsumoto M, et al. Longevity in mice is promoted by probiotic-induced suppression of colonic senescence dependent on upregulation of gut bacterial polyamine production. *PLoS ONE.* 6: e23652, (2011)
- 3) Matsumoto M, et al. Upregulation of colonic luminal polyamines produced by intestinal microbiota delays senescence in mice. *Sci Rep.* 4 : 4548 (2014)
- 4) Matsumoto M, et al. Antipruritic effects of the probiotic strain LKM512 in adults with atopic dermatitis. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 113, 209-216 (2014)
- 5) Matsumoto M, et al. Promotion of intestinal peristalsis by *Bifidobacterium* spp. capable of hydrolysing sennosides in mice. *PLoS ONE* 7: e31700 (2012)

《取材・編集：(株)BBプロモーション 高林 昭浩》