

健康寿命伸長のための大腸内ポリアミン増強食品の開発 —狙った生理活性物質を腸内細菌に 産生させることができるのか?—

(協同乳業株式会社研究所技術開発グループ) 松本 光晴

筆者らは、「腸内常在菌を介した腸管内ポリアミン濃度の増強により、老化の主要因である慢性炎症が抑えられ、その結果、寿命伸長（アンチエイジング）効果が得られる」という仮説の基、研究を進めてきた^{1,2)}。一連の研究で、腸内常在菌のポリアミン産生増強因子としてアルギニンの有効性を見だし、アルギニンとプロバイオティクス LKM512 を用いて腸内ポリアミン濃度を上昇させることで寿命伸長効果が得られるとともに、加齢時の学習記憶力の成績も対照群に比して良いことをまとめた論文が先日公開された³⁾。この詳細内容は原著論文を参照して頂くとして、本稿では、原著論文では表現できないポリアミン増強物質の探索におけるこだわりを中心に紹介する。

ポリアミン

ポリアミンは低分子の塩基性物質であり、プトレッシン、スペルミジン、スペルミンなどの総称で、単細胞原核生物から単細胞真核生物、さらに多細胞の無脊椎動物、ほ乳類および高等植物に至るまで、生物を構成しているすべての細胞が含有している物質で、核酸の合成や安定化、細胞の増殖や分化など多方面の生命現象に関連している。加齢に伴い組織中含量が減少し、炎症抑制作用、腸管バリア機能の充実、強い抗変異原性や酸素ストレスからの保護作用も知られている⁴⁾。

食事由来ポリアミンはほとんどが小腸上部で吸収され、消化管下部のポリアミンのほとんどは腸内細菌由来であること⁵⁾から、筆者は長年、ポリアミンを産生する菌種の探索を試みてきた。しかしながら、さまざまな腸内常在菌を糞便で培養したところ、同一菌株による実験でも、用いる糞便により（提供者や排泄日の違い）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思われるに至った。

ターゲットは糞便内の低分子物質

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た。そのためには、糞便中の低分子物質を網羅的に解析する必要がある。我々はキャピラリー電気泳動－飛行時間型質量分析装置（CE-TOF-MS）を用いたメタボロミクスを行うことに決定した。この方法は、イオン性物質を広いスペクトルで解析できる点で、糞便中の低分子イオン性物質をターゲットとした場合、他の分析機器によるメタボロミクスより適している⁵⁾。

また、我々はヒト糞便で実験した場合、糞便の部位によりメタボロームパターンが異なることを予備的に確認していた。これは、食事成分がメタボロームに強く影響している可能性がきわめて高いことを示していた。「食事成分を揃えないと正確な解析はできない。」そこで食事を統一して解析することにした。

統一食事摂取試験～良い糞便を得るために～

CE-TOF-MS メタボロミクスの前では嘘はつけない。提供した食品以外は飲食禁止した統一食摂取の予備試験を実施した結果、1名からカフェインが検出された。問いただすと、その被験者はこっそりコーヒーを飲んでいった事が判明した。すなわち被験者は共通の食事を残さず摂取するだけではなく、供給された食品以外を摂取することも禁止しなければならないのである。カロリーや野菜、肉、魚のバランスは栄養士コントロールのもと、食事由来成分のバイアスがない糞便試料を得るために、4日間の厳密な統一食摂取試験を実施した（図1）。また、食事バイアスをなくすことを徹底するために4日目の昼食由来の糞便をターゲットとし、消化され難いひじきをメニューに仕込んだ。そして、次の日の午前にひじきが含まれている糞便部位を回収して解析に用いた。

解析の結果、221成分が検出され、食事を揃えたにも関わらず個体差が認められた。しかしながら、各成分の試験前後の変動係数（＝標準偏差/平均値）を算出し投

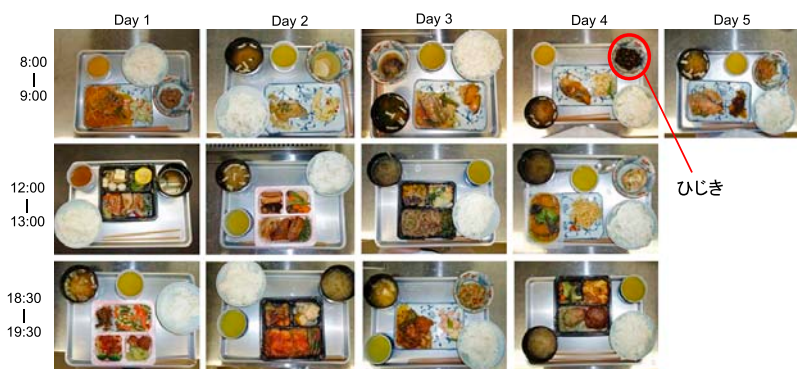


図1. 統一食摂取試験に用いたメニュー。試験期間中はこれ以外にはこちらで用意したミネラルウォーター（1 L程度）以外は飲食厳禁で行った。4日目の朝食にひじきをメニューに加え、糞便は5日目の午前中に回収し、ひじきのある部位の糞便を回収した。

と前後を比較したところ、投与後で有意に低値になっており ($p = 0.000036$)、食事成分によるバイアスを極力減らした糞便を得ることができたと考えて間違いない。一方、統一食摂取により、被験者全員の糞便メタボロームパターンが酷似することはなく明確な差が存在することから、この差は腸内常在菌の差異に依存している可能性が高いと考えられた。

ポリアミン増強物質のスクリーニング

ヒト腸管内でもっとも高濃度含まれており他の活性の強いポリアミンの前駆体であるプトレッシンと各検出成分との相関性を調べた結果、28成分に有意な相関性が認められた。この中から、純粋培養系および糞便培養系でスクリーニングを行った結果、用いたすべてのヒト糞便への添加でプトレッシン濃度の上昇が観察されたアルギニンをポリアミン増強物質として決定した。さらに、マウスやラットへのアルギニン経口投与でも糞便内ポリアミン濃度が濃度依存的に上昇することが認められた(図2)。これは、個体差を超越して、腸内常在菌に狙った生理活性物質を産生させることに成功したことを意味し、筆者が知る限り過去に例のないことである。

マウスに対する健康寿命伸長効果

アルギニンとすでに寿命伸長効果のあったプロバイオティクス LKM512 を12か月齢の高齢マウスに半年間投与して比較したところ、それぞれに老年病の主要因である炎症マーカーや老化マーカーの抑制効果が認められたが、併用することでもっとも効果が強かった。そこで14か月齢マウスを用いてアルギニン&LKM512の経口投与を開始した。この月齢は日本人平均寿命換算すると50歳代になり、ここまでスタートを遅らせた理由は筆者がある程度老化が始まった個体を対象にした試験に

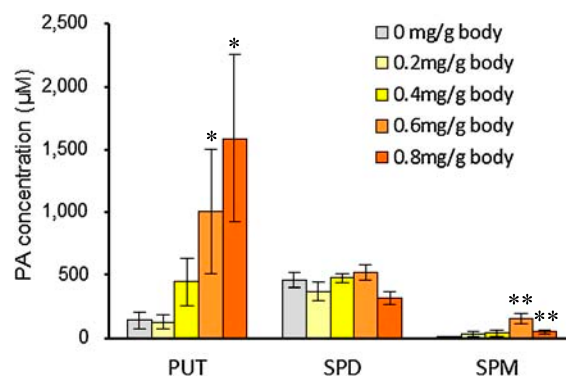


図2. マウスへのアルギニン経口投与による糞便中ポリアミン濃度。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

拘ったからである(多くの人は自身の老化を何らかの現象で感じてから行動を起こすからである)。すなわち、4週齢マウスを導入し14か月齢時点で生存していた個体を用いたため、実に13か月近く、雌雄合わせて200匹近くのマウスが年をとるのをただひたすら飼育して待っていたことになる。日常の世話に要する労力を考えると、「いつまでスタートしないんだ」と不安に思っていたであろうチーム内のスタッフに感謝するしかない。

14か月齢からのアルギニン&LKM512の週3回の経口投与により、雌雄両方のマウスで寿命が伸長し、腸内ポリアミン濃度の上昇が寿命伸長に有効であることが再確認できた(図3a)。また、健康寿命をターゲットとしているため、脳の健康にも着目し、モリス水迷路試験による空間認識・学習記憶力の測定を行った。1週間の訓練期間を終えた後のプローブ試験の結果、投与開始前は両群間に差がなかったが、投与6か月後(20か月齢)にはアルギニン&LKM512投与群の方が、有意に成績が高く、加齢時の学習記憶力にポリアミンが関与している

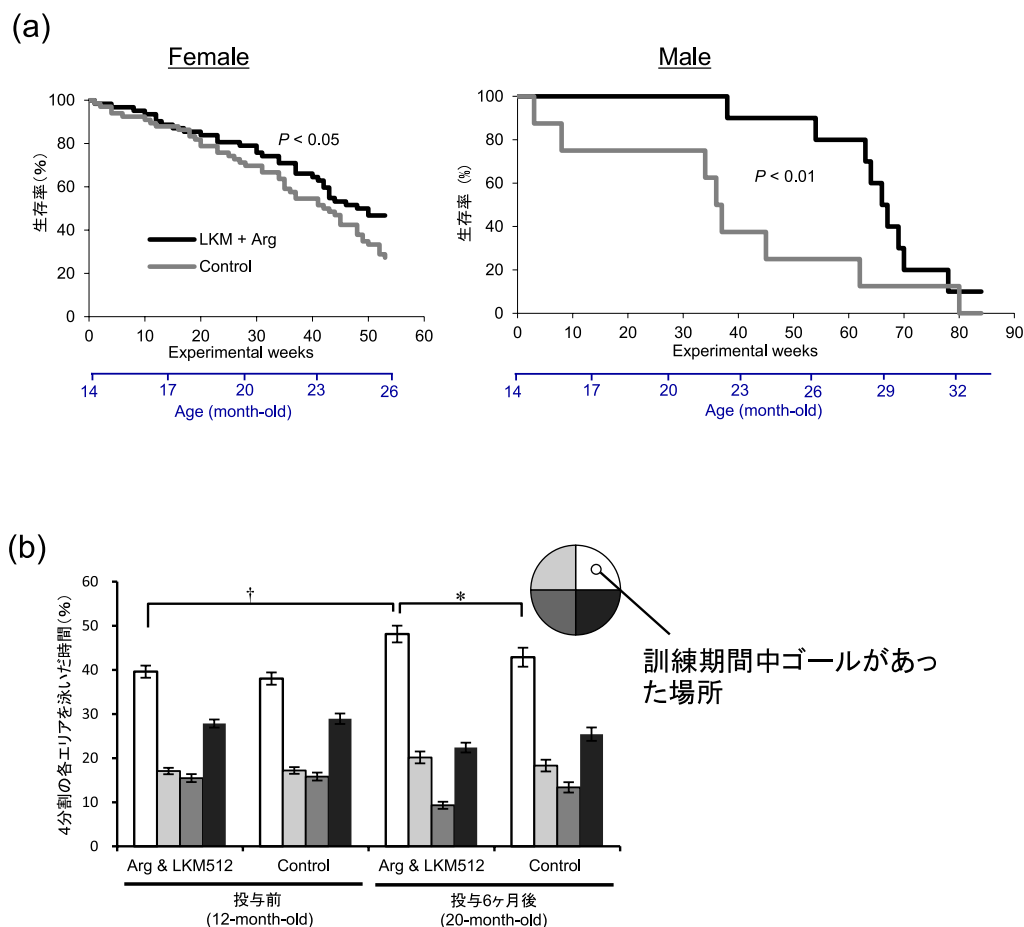


図3. マウスへのアルギニン&LKM512投与が寿命および空間認識力に及ぼす影響. (a) 生存曲線. 雌性マウス ($n = 140$), 雄性マウス ($n = 20$). (b) モリス水迷路試験でのプローブ試験結果. 決まった場所にプラットフォームを置き(水面下に置きマウスからは見えない), 3回/日, 1週間の訓練(実際に泳がせて位置を覚えさせる. 一定時間内にプラットフォームに到達できなかった場合は, プラットフォームに人為的に乗せて15秒間景色を覚えさせる)を繰り返し, プローブ試験ではプラットフォームを取り除き, そのエリアを遊泳した時間を比較する(棒グラフの色は右上の位置を示す). * $p < 0.05$ (Student's *t*-test), $^{\dagger}p < 0.01$ (paired *t*-test).

可能性が示された(図3b). ポリアミンが加齢時の学習記憶力の維持に関連するなど誰も考えていないと思っていたが, 我々が論文審査中の2013年に, ショウジョウバエでのレポートであるが, 高ポリアミン食で加齢に伴う記憶力低下の抑制に関する研究成果⁶⁾が発表され驚いたのは記憶に新しい。

おわりに

実は, 今回ポリアミン増強物質に決定したアルギニンは, 一部の腸内常在菌の代謝経路においてはポリアミンの前駆物質である(腸内常在菌のゲノム情報からの推測). すなわち, この結果は当然の結果と捉える事もできる. しかしながら, 200を超える検出代謝産物の中から前駆体を選ばれたということは, 今回実施した統一食

事摂取糞便を用いてメタボロミクスを行う方法が, 代謝産物を探索する上できわめて有効であることを示していると言えるのではないであろうか. また, 腸内常在菌の代謝産物の研究を行うためには, 食事由来のファクターをコントロールしなければ正しいデータは得られないことも本研究で得られた重要な知見である。

文 献

- 1) Matsumoto, M. and Kurihara, S.: *Med. Hypotheses*, **77**, 469 (2011).
- 2) Matsumoto, M. *et al.*: *PLoS One*, **6**, e23652 (2011).
- 3) Kibe, R. *et al.*: *Sci. Rep.*, **4**, 4548 (2014).
- 4) Park, M. H. and Igarashi, K.: *Biomol. Ther.*, **21**, 1 (2013).
- 5) Matsumoto, M. *et al.*: *Sci. Rep.*, **2**, 233 (2012).
- 6) Gupta, V. K. *et al.*: *Nat. Neurosci.*, **16**, 1453 (2013).