

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05528

研究課題名(和文)フラボノイドの吸収・代謝に影響を及ぼす腸内菌叢の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the intestinal microbiota that affect the absorption and metabolism of flavonoids

研究代表者

田村 基 (Tamura, Motoi)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品研究部門・主席研究員

研究者番号：70353943

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ケルセチン分解菌やケルセチン分解を抑制することが示されているレスベラトロールの投与が、マウスのケルセチン代謝・吸収に及ぼす影響を検討した。ケルセチン+レスベラトロール添加食は、ケルセチン添加食に比べてマウスの盲腸内容物中のケルセチン濃度が有意に高値を示した。レスベラトロールとケルセチン分解菌を投与したマウスは、ケルセチン分解菌を投与したマウスに比べて血漿ケルセチン代謝物濃度が有意に高値を示した。レスベラトロールをケルセチンとともに摂取すれば、レスベラトロールがケルセチン分解菌のケルセチンの分解を抑制する等の効果によって、ケルセチンの吸収を高める可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で、ケルセチン分解菌19-20株のマウスへの投与が、マウスの内蔵脂肪蓄積を低減させる効果を有することを見出した。ケルセチン分解菌の機能性については、詳しく研究されてこなかったが、本研究により、ケルセチン分解菌の機能性の一端を解明することが出来た。また、レスベラトロールがケルセチン分解菌のケルセチンの分解を抑制する等の効果によって、ケルセチンの吸収を高める可能性が示された。本研究は、腸内菌叢の代謝に注目することでフラボノイドの新しい機能性を見出した研究であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Intestinal microbiota is thought to play an important role in the bioavailability of quercetin. Therefore, we investigated the effects of administration of quercetin-degrading bacteria and resveratrol on quercetin metabolism and absorption in mice. The quercetin plus resveratrol diet resulted in significantly higher quercetin concentrations in the cecal contents of mice than the quercetin diet. Mice treated with resveratrol and quercetin-degrading bacteria showed significantly higher plasma quercetin metabolite concentrations than mice treated with quercetin-degrading bacteria. Consumption of resveratrol together with quercetin showed the possibility of enhancing the absorption of quercetin.

研究分野：食品機能学、腸内細菌学

キーワード：ケルセチン レスベラトロール 腸内菌叢 ケルセチン分解菌

1. 研究開始当初の背景

ケルセチンはタマネギ等に含まれる代表的なフラボノイドであり、その生活習慣病予防効果が期待されている。ヒトでは、同じようにケルセチンを摂取しても吸収・代謝については個人差が存在する。ケルセチンは腸内菌叢によって分解・代謝を受ける。経口摂取したケルセチンの一部は小腸から吸収されるが、大部分のケルセチンは大腸まで到達し、腸内菌叢による分解を受けて低分子化合物へと変換される。腸内菌叢はケルセチンの生体利用性に重要な役割を果たしている。しかし、ケルセチンの吸収・代謝に影響を及ぼす腸内菌叢の特徴については、解明されていない。フラボノイドの吸収・代謝に影響を及ぼす腸内菌叢を解明することは意義深いと考えられる。

2. 研究の目的

1. 研究開始当初の背景を踏まえ次の課題に取り組むこととした。

- (1) ケルセチン分解菌の投与がマウスの血漿と盲腸内容物のケルセチンや腸内菌叢に及ぼす影響の検討
- (2) ケルセチン分解菌のケルセチン分解を抑制することが示されているレスベラトロールが、マウスの血漿と盲腸内容物のケルセチンや腸内菌叢に及ぼす影響の検討
- (3) レスベラトロールがケルセチン分解菌を投与したマウスの血漿と盲腸内容物のケルセチンや腸内菌叢に及ぼす影響の検討

3. 研究の方法

動物試験

(1) ケルセチン分解菌の投与がマウスの血漿と盲腸内容物のケルセチンや腸内菌叢に及ぼす影響の検討では、ヒトの腸内細菌を有するヒトフローラマウス(Balb/cA マウス、オス)に 0.05%ケルセチン、大豆油 4.5%、ラード 11.25%を含むガンマ線滅菌ペレット試験食を一カ月間給餌して飼育した。ケルセチン分解菌 19-20 投与群(QHF 群:4 匹)には、変法 GAM 寒天培地で嫌気培養し、液体培地に懸濁してあらかじめストックしたケルセチン分解菌 19-20 を一日一回経口投与した。対照群(CHF 群:5 匹)には液体培地のみを経口投与した。投与は週に 3 回行った。飼育試験後解剖を行い、内臓脂肪重量を測定し、肝臓、盲腸内容物、血漿、大腸、小腸を採取した。

(2) ケルセチン分解菌のケルセチン分解を抑制することが示されているレスベラトロールが、マウスの血漿と盲腸内容物のケルセチンや腸内菌叢に及ぼす影響の検討では、オスマウス(ICR)を試験に利用した。ケルセチン群(Q 群:7 匹)には、AIN-93G 粉末食に 0.025%ケルセチンを添加したケルセチン食を二週間投与した。ケルセチン-レスベラトロール群(QR 群:7 匹)には、AIN-93G 粉末食に 0.025%ケルセチンと 0.05%レスベラトロールを添加したケルセチン-レスベラトロール食を二週間投与した。飼育試験後解剖を行い、内臓脂肪重量を測定し、肝臓、盲腸内容物、血漿、大腸、小腸を採取した。

(3) レスベラトロールがケルセチン分解菌を投与したマウスの血漿と盲腸内容物のケルセチンや腸内菌叢に及ぼす影響の検討では、ヒトの腸内細菌を有するヒトフローラマウス(Balb/cA マウス、オス)を試験に利用した。ケルセチン食群(19Q 群:6 匹)には、0.05%ケルセチンを含むガンマ線滅菌ペレット試験食を給餌した。ケルセチン-レスベラトロール食群(19QR 群:5 匹)には 0.05%ケルセチン-0.1%レスベラトロールを含むガンマ線滅菌ペレット試験食を給餌した。いずれの群も試験食を 32 日間給餌した。19Q 群と 19QR 群のいずれのマウスにも変法 GAM 寒天培地で嫌気培養し、滅菌 PBS に懸濁してあらかじめストックしたケルセチン分解菌 19-20 を一日一回経口投与した。投与は週に 3 回行った。飼育試験後解剖を行い、内臓脂肪重量を測定し、肝臓、盲腸内容物、血漿、大腸、小腸を採取した。

血漿および盲腸内容物のケルセチン濃度は、血漿および盲腸内容物希釈液 50 μ L に β -グルクロニダーゼを含む 酢酸緩衝液 50 μ L を作用させてケルセチン抱合体を脱抱合し、2 倍量の酢酸エチルによる抽出を 2 度行い、抽出液を濃縮後 80%メタノールに再溶解し、LC-MS/MS を用いて分析した。

腸内菌叢の構成を解析するために、盲腸内容物を採取し、ガラスビーズを用いた物理的な破碎方法で盲腸内容物の菌体を破碎し、松木 (松木、腸内細菌学雑誌 (2006)20:259)の方法によって盲腸内菌叢の DNA を抽出し、リアルタイム PCR 法を用いて腸内菌叢の構成を解析した。また、短鎖脂肪酸は、盲腸内容物を滅菌水に懸濁し、ボルテックスした後遠心し、上清を採取し、採取した上清を短鎖脂肪酸分析用ラベル化試薬(ワイエムシィ)でラベル化し、脂肪酸分析用カラム(ワイエムシィ)を利用して HPLC で分析した。

消化管の遺伝子解析のために小腸組織と大腸組織から RNAeasyMiniKit (Qiagen)を用いて RNA を抽出した。得られた RNA を鋳型とし逆転写反応を行い cDNA 合成を行った。得られた cDNA を用いてリアルタイム PCR を行い、小腸組織と大腸組織の *Fiaf*(アンジオポエチン様タンパク 4)と *Gpr41*、*Gpr43* 遺伝子の発現量を解析した。

マウスの血漿総コレステロール濃度、血漿トリグリセリド濃度、血漿 HDL コレステロール濃度、血漿グルコース濃度は、富士フィルム和光純薬のキットを用いて測定した。

マウスの肝脂質は、Bligh and Dyer 法で肝臓から脂質を抽出して測定した。抽出した肝脂質は、10%トリトン X100 含有イソプロパノールに溶解し、この溶解した肝脂質のコレステロールとトリグリセリドを富士フィルム和光純薬のキットを用いて測定した。

4. 研究成果

(1) ケルセチン分解菌の投与がマウスの血漿と盲腸内容物のケルセチンや腸内菌叢に及ぼす影響の検討

血漿ケルセチン濃度は、二群間で有意な差は認められなかった。盲腸内容物のケルセチンとイソラムネチン濃度は、ケルセチン代謝菌投与群で低い傾向があった(図 1)。

内臓脂肪重量は、QHF 群で有意に低値を示した($P < 0.05$)。総コレステロール、血漿グルコース、血漿トリグリセリド濃度については、二群間で有意差は認められなかった。しかし、NEFA 濃度は、CHF 群が QHF 群に比べて有意に高値を示した。肝臓の脂質含有量は、QHF 群が CHF 群よりも有意に低値を示した($P < 0.05$)(図 2)。

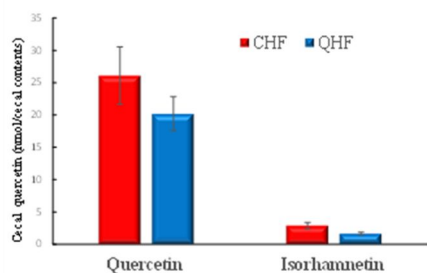


図 1. 盲腸内容物中のケルセチン濃度

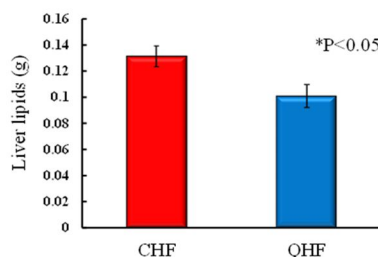


図 2. QHF 群と CHF 群の肝臓脂質含有量

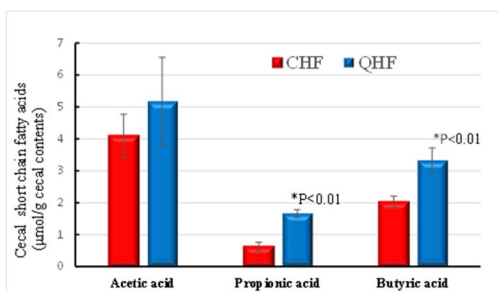


図 3. QHF 群と CHF 群の短鎖脂肪酸濃度

盲腸内容物中の短鎖脂肪酸の分析の結果、QHF 群では、盲腸内容物の酪酸とプロピオン酸濃度が有意に高値を示した($P < 0.05$)(図 3)

小腸の *Gpr41*、*Gpr43* の遺伝子発現量については、QHF 群の方が高い傾向が認められたが、有意な差は認められなかった。*Fiaf* の遺伝子発現量については、QHF 群で有意に高値を示した。大腸の *Fiaf*、*Gpr41*、*Gpr43* の遺伝子発現量については、二群間で有意差は認められなかった。

(2) ケルセチン分解菌のケルセチン分解を抑制することが示されているレスベラトロールが、マウスの血漿と盲腸内容物のケルセチンや腸内菌叢に及ぼす影響の検討

血漿ケルセチン濃度は、QR 群で高い傾向が認められた(図 4)。盲腸内容物のケルセチン濃度、ケルセチン+イソラムネチン濃度とレスベラトロール濃度は QR 群で有意に高値を示した(図 5)。

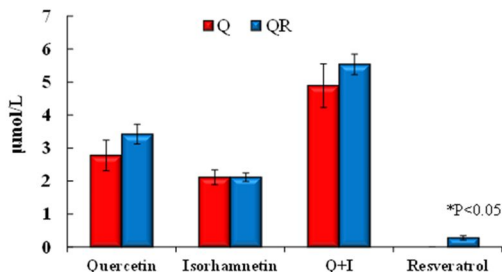


図 4. Q 群と QR 群の血漿ケルセチン、レスベラトロール濃度

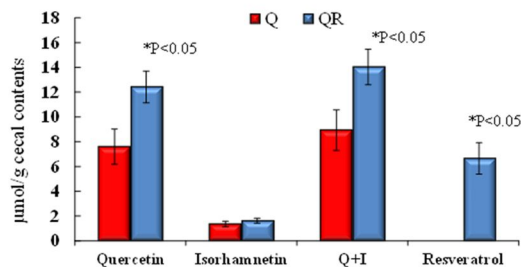


図 5. Q 群と QR 群の盲腸内容物のケルセチン、レスベラトロール濃度

レスベラトロールが消化管内での腸内菌叢によるケルセチン分解を抑制している可能性が示唆された。内臓脂肪重量は二群間で有意な差が認められなかった。血漿トリグリセリド、総コレステロール、血漿グルコース、NEFA 濃度については、二群間で有意差は認められなかった。肝臓の脂質含有量、トリグリセリド含有量については二群間で有意差は認められなかった。一方、盲腸内容物中の酪酸濃度は、QR 群は Q 群よりも有意に高値を示した(図 6)。レスベラトロールが短鎖脂肪酸の産生に影響を及ぼすことが推察された。Q 群と QR 群の g 当たりの盲腸内容物菌数については、二群間で有意差はなかった。大腸と小腸の *Gpr41*、*Gpr43* についての遺伝子発現量解析では、Q 群の方が *Gpr41*、*Gpr43* の発現量がともに高い傾向が認められたが、有意な差は認められなかった。*Fiaf* については、小腸では、QR 群で低い傾向があり、大腸では、QR 群が Q 群に比べて有意に低値を示した。

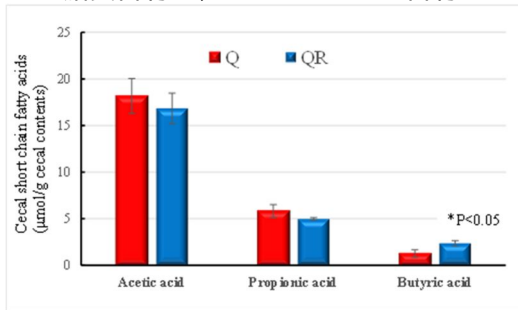


図 6. Q 群と QR 群の短鎖脂肪酸濃度

(3) レスベラトロールがケルセチン分解菌を投与したマウスの血漿と盲腸内容物のケルセチンや腸内菌叢に及ぼす影響の検討

血漿ケルセチン代謝物濃度(ケルセチン+イソラムネチン)は、19QR 群が 19Q 群に比べて有意に高値を示した(図 7)。また、盲腸内容物のケルセチン量についても、19QR 群が 19Q 群に比べて高い傾向を示した(図 8)。

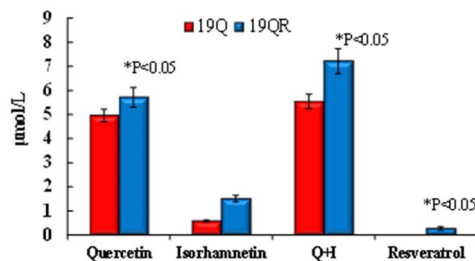


図 7. 19Q 群と 19QR 群の血漿ケルセチン、レスベラトロール濃度

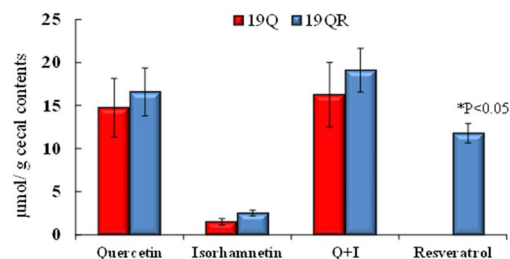


図 8. 19Q 群と 19QR 群の盲腸内容物中ケルセチン、レスベラトロール濃度

内臓脂肪重量は二群間で有意差は認められなかった。血漿トリグリセリド、総コレステロール、NEFA 濃度については、二群間で有意差は認められなかった。しかし、血漿グルコース濃度は、19QR 群が 19Q 群に比べて有意に高値を示した($P<0.01$)。肝臓の脂質含有量、トリグリセリド含有量は二群間で有意な差は認められなかった。盲腸内容物の短鎖脂肪酸濃度では、酢酸濃度、酪酸濃度、プロピオン酸濃度いずれも 19QR 群が 19Q 群に比べて有意に高値を示した(図 9)。

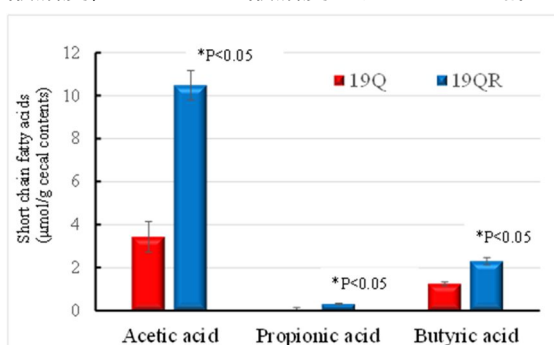


図 9. 19Q 群と 19QR 群の短鎖脂肪酸濃度

大腸の遺伝子発現量解析では、*Fiaf* や *Gpr41* は二群間で差はなかったが、*Gpr43* は、19QR 群が 19Q 群に比べて平均値は高値であった。小腸の遺伝子発現量解析では、*Gpr41* や *Gpr43* は二群間に差はなかったが、*Fiaf* は、19Q 群が 19QR 群に比べて平均値は高値であった。QHF 群と CHF 群に投与した飼料は、脂質の割合が高めであった。肝脂質については、ケルセチン分解菌 19-20 を投与した QHF 群では、非投与の CHF 群よりも脂質の蓄積が有意に少なかった。

内臓脂肪重量は、QHF 群で有意に低値を示した($P<0.05$)。ケルセチン分解菌 19-20 は、マウスの脂質蓄積を抑制する効果を有している可能性が示唆された。一方、QHF 群は、CHF 群よりも盲腸内容物の酪酸濃度が高かった。ケルセチン分解菌 19-20 は、酪酸を産生することから、19-20 を投与した QHF 群のマウス腸内で酪酸産生が高まった可能性がある。また、QR 群は Q 群よりも盲腸内容物の酪酸濃度が高く、19QR 群は 19Q 群よりも盲腸内容物の酪酸濃度が有意に高い結果となった。QR 群も 19QR 群もレスベラトロールを含んでいる。マウスへのレスベラトロール投与が、レスベラトロール代謝菌に影響を及ぼし、その結果として腸内菌叢の酪酸産生が高まった可能性がある。レスベラトロール代謝菌の酪酸産生能については解明されておらず、レスベラトロ

ールの腸内菌叢の酪酸産生に及ぼす影響については、今後の重要な課題となるかもしれない。QHF 群は、CHF 群よりも盲腸内容物中の *Clostridium coccooides* group、*Bifidobacterium*、*Atopobium* cluster の菌数が有意に高値を示した。また、19QR 群は、19Q 群よりも盲腸内容物中の *Atopobium* cluster の菌数が有意に高値を示した。ケルセチン分解菌やレスベラトロール投与は、*Atopobium* cluster の菌数を増加させる可能性が考えられた。

マウス盲腸内容物のケルセチンとケルセチン代謝物イソラムネチン濃度は、ケルセチン分解菌 19-20 投与群で低い傾向があり、ケルセチン分解菌が、消化管内でケルセチン分解を促進している可能性が示唆された。19QR 群の盲腸内容物のレスベラトロール濃度は血漿ケルセチン濃度と正の相関を示した($r=0.806$)。また、血漿レスベラトロール濃度は、血漿ケルセチン代謝物濃度と負の相関を示した($r=-0.621$)。これらの結果より、レスベラトロールの消化管濃度が高いほど血漿ケルセチン濃度が高まり、レスベラトロールの血漿濃度が高い、つまり、レスベラトロールの吸収性が高いと、血漿ケルセチン濃度が低い傾向が認められたことから、消化管内でレスベラトロールが多く残存し、レスベラトロールの吸収が低いほどケルセチンの吸収が高まる可能性が考えられる。レスベラトロールも腸内細菌で分解されることから、ケルセチンの吸収を高めるには、消化管内でレスベラトロールの分解を抑制し、レスベラトロールの吸収をより低くすることが、ケルセチンの吸収を高める条件となるかもしれない。一方、血漿レスベラトロールが血漿ケルセチン濃度と負の相関を有していたことから、レスベラトロールの吸収が、ケルセチンの吸収を何らかの形で抑制した可能性も考えられた。いずれにしても、今回の研究によって、レスベラトロールをケルセチンとともに摂取すれば、レスベラトロールがケルセチン分解菌のケルセチンの分解を抑制する等の効果によって、*in vivo*でケルセチンの吸収を高める可能性が示された。一方、食餌へのケルセチン 0.025%-レスベラトロール 0.05%の添加量では、盲腸内容物のケルセチン量は増加した。しかし、血漿ケルセチン濃度は、ケルセチン 0.025%-レスベラトロール 0.05%添加群は、ケルセチン 0.025%添加群よりも高値を示したが、有意差が認められなかった。ケルセチン分解菌を投与した試験では、ケルセチン 0.05%-レスベラトロール 0.1%添加群は、ケルセチン 0.05%添加群よりも血漿ケルセチン濃度が有意に高かった。これらのことから、ケルセチンの吸収を高めるには、食餌にレスベラトロールを比較的多く添加する必要があることが推察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tamura M, Nakagawa H, Hori S, Suzuki T, Hirayama K.	4. 巻 65
2. 論文標題 Plasma quercetin metabolites are affected by intestinal microbiota of human microbiota-associated mice fed with a quercetin-containing diet.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 232-239
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3164/jcbr.19-45	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田村 基、平山 和宏
2. 発表標題 ケルセチン代謝菌 "Bacterium 19-20" のヒトフローラマウスに及ぼす影響
3. 学会等名 日本無菌生物ノートバイオロジー学会 第54回
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 田村 基（他）	4. 発行年 2019年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 252
3. 書名 腸内環境改善食物繊維の技術と市場	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	中川 博之 (Nakagawa Hiroyuki) (30308192)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・高度解析センター・上級研究員 (82111)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------