

令和 6 年 4 月 25 日現在

機関番号：17701
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2020～2023
課題番号：20K05928
研究課題名（和文）アントシアニンパラドックス解明に挑む：アントシアニンと腸内細菌の相互作用の研究

研究課題名（英文）Challenging to resolve the paradox in anthocyanin function: Study on the interactions between anthocyanin and gut microbiome

研究代表者
侯 徳興（HOU, De-Xing）
鹿児島大学・農水産獣医学域農学系・教授

研究者番号：90305160
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）：アントシアニンは胃・小腸での吸収率は極めて低く、生体での機能性を説明できない。本研究はアントシアニンと腸内細菌の相互作用を解析し、その矛盾を解明することを目的にした。マウス実験は鹿児島大学動物実験に関する規則に従い実施した。5週齢のマウスに標準食(ND)及び過剰栄養食(WD)を設定し、その上にブルーベリーアントシアニン抽出物(BA)及びその主要な代謝産物PGAやPCAを添加し3ヶ月間飼育した。その結果、アントシアニンは主に大腸内でPCAやPGA等へ分解され、脂質代謝等に関する腸内細菌及びそのネットワークを調節し、過剰栄養による脂質代謝異常及び腸細菌叢の乱れ等を改善した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アントシアニンは胃・小腸での吸収率は極めて低く、生体での機能性を説明できない。本研究はアントシアニンと腸内細菌の相互作用を解析し、その矛盾を解明することを目的にした。その結果、アントシアニンは主に大腸内でPCやPG等へ分解され、脂質代謝等に関する腸内細菌及びそのネットワークを調節し、過剰栄養による脂質代謝異常及び腸細菌叢の乱れ等を改善させた。これらの成果は、アントシアニンの低生体利用率と高機能性の矛盾解明に説明できる科学根拠を提示したものであり、アントシアニン食材を今後の食卓への健康利用に促進する社会的意義が大きい。

研究成果の概要（英文）：The absorption rate of anthocyanin in the stomach and small intestine is too much low to explain its functionality in the living body. The purpose of this study was challenged to elucidate the contradiction between their low bioavailability and high functionality by investigating the interaction between anthocyanins and intestinal bacteria. Mouse experiments were conducted in accordance with the Kagoshima University Animal Experiment Regulations. Five-week-old mice were fed a standard diet and Westernized diet, or blueberry anthocyanin extract (BA) and its major metabolites, PGA and PCA, for 3 months. The results revealed that anthocyanins were mainly degraded into PCA and PGA in the large intestine, and then regulated intestinal bacteria and their networks related to lipid metabolism, and finally improved lipid metabolism abnormalities and disturbances in intestinal flora caused by WD.

研究分野：食品機能科学

キーワード：アントシアニン アントシアニン代謝産物 非アルコール性脂肪肝 脂質異常症 腸内細菌叢

1. 研究開始当初の背景

アントシアニンにはブルーベリー、黒豆、黒米、紫芋など多くの食材に含まれる赤色や紫色を呈するポリフェノール性化合物で、カテコール構造を有することから、インビトロにおいて強い抗酸化能を有することが知られている¹⁾。また、動物やヒトを用いた研究で見出された様々な機能がこれらの抗酸化能に基づく作用だと考えられてきた。しかしながら、食事やサプリメントとしてアントシアニンを摂取した場合には、体内代謝でその化学構造が大きく変化し、アントシアニンの抗酸化能がほとんど失われてしまう。また、アントシアニンの生体への移行率は極めて低く、0.1%程度と報告されている²⁾。それにもかかわらずアントシアニンの摂取により抗酸化作用³⁾、抗炎症作用³⁾、脂質異常症⁴⁾やインスリン感受性⁵⁾の改善効果、さらに、最近では認知機能維持作用⁶⁾などといった有効性も報告されている。このように、アントシアニンの低生体利用率と高機能性が矛盾した“パラドックス”が生じている。

2. 研究の目的

そこで、本研究は、アントシアニンと腸内細菌叢との相互作用の解明を研究課題の核心をなす学術的「問」とし、腸内細菌叢により分解されたアントシアニンの機能及びアントシアニンによる腸内細菌叢等への影響について実験動物マウスを用いて、16S rRNA 遺伝子解析による腸内細菌叢の変化を明らかにし、アントシアニンの低生体利用率と高機能性のパラドックスの解明に挑む。

3. 研究の方法

①実験サンプル：アントシアニンは、Indena 社のミルトセレクト（アントシアニン 36% (w/w)以上）をブルーベリーアントシアニン(BA)として用いた。アントシアニン代謝産物として、プロトカテキュ酸 (PC) とフロログルシノールアルデヒド (PG) を使用した。

② 動物実験：「国立大学法人鹿児島大学における動物実験に関する規則」に従って、動物実験委員会の審査・承認（承認番号：第 A19011 号）を得て実施した。実験用マウスは、日本エスエルシー株式会社より 5 週齢の C57BL/6NCrSlc マウスを購入した。飼育条件は、23°C、12 時間明暗周期、飼料と水は自由摂食とした。体重測定は週 1 回行った。1 週間の予備飼育期間は全てのマウスに標準食 (ND) と水を与え、予備飼育期間終了後、群分けをして 12 週間の本飼育を行った。実験群は標準食 (ND) 群、過剰栄養食(WD) 群、それらの上に BA 食群、PG 食群及び PC 食群を設定した。床替え、エサや水の交換を週に 2 回行い、体重は週に 1 回測定した。また、マウスの糞を予備飼育終了後と実験終了直前に回収した。実験期間終了後、マウスは麻酔で安楽死させ、血清及び肝臓を回収し、各種の解析に用いた。

③ 血液生化学指標の分析：血液生化学指標 ((アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、総コレステロール(T-Cho)、低比重リポタンパク質コレステロール (LDL-c)、高比重リポタンパク質コレステロール (HDL-c)、グルコース(Glu))は SPOTCHEMTMEZ 機器で測定した。

④ 肝臓脂肪染色：20%スクロース液に浸け肝臓組織は脱水後に凍結切片を作成し、Oil Red O 染色により肝臓組織の脂肪滴を染色し、顕微鏡で観察した。

⑤ 腸内細菌の解析：糞便はラミックとシリカの粒子が入っている Lysing Matrix E tube で破砕した。抽出された DNA は、シリカを素材とするスピンフィルターで精製し

た。得られた糞便 DNA は 16S リボソーム RNA (16S rRNA) 遺伝子を標的とし PCR 増幅を行い、次世代シーケンサーで網羅的に腸内細菌叢を解析した。

⑥ 統計処理: 本研究において得られたデータは統計学的解析を行った。結果は平均値±SD として表した。2 群間の有意差検定は *t* 検定で、多群間の有意差検定は一元配置分散分析 (ANOVA) と Duncan 法による多重分析を行った。統計ソフトは IBM SPSS Statistics (バージョン 19.0、IBM Corp.、ニューヨーク州アーモンク) を用いた。5%水準で有意差を認め、異なるアルファベットを付けて表現した。

4. 研究成果

1) BA 給餌による体重、組織及び血液生化学指標に対する影響

12 週間マウスを飼育した結果、WD を与えられたマウスの最終体重、肝臓重量、精巣上体脂肪重量、肝臓重量/体重比、肝臓脂肪重量および総糞便脂肪は、ND に比べて有意に高かった。BA 給餌は精巣上体脂肪重量を除き、WD で増強されたすべての症状が有意に減少させた。

また、BA 給餌は、WD で上昇された血中アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、炎症マーカー MCP-1 の濃度を有意に低減させたので、BA の肝機能保護作用が示唆された。さらに、血中総コレステロール (T-Cho) 及び低比重リポタンパク質コレステロール (LDL-c) の濃度も顕著に低減された。BA 給餌は、WD で誘発された脂質代謝異常を改善する効果が認められた。

2) BA 給餌による脂肪肝の改善効果

肝臓切片をオイルレッドで染色した結果、WD により蓄積された多くの脂肪滴は、BA 給餌で顕著に減少された。

3) BA 給餌による腸内細菌叢の変動

腸内細菌叢の変動は、16S rRNA 遺伝子配列により解析した。BA 給餌が WD で増加した *p_Firmicutes/p_Bacteroidetes* (F/B) の比率は有意に減少した。BA 給餌は *g_Bacteroides*; *s_acidifaciens*、*g_Parabacteroides* 及び *g_Akkermansia*; *s_muciniphila* の相対量を有意に増加し、*f_S24-7(5D)*、*g_Prevotella*、*o_Lactobacillales* 及び *o_Clostridiales* の相対量を減少させた。

これらのデータから BA 給餌は WD 誘発性腸内細菌叢の乱れを改善し、脂質異常及び脂肪肝を軽減させることが示唆された。

4) アントシアニン代謝物給餌による脂質代謝及び腸内細菌叢変動への影響

次はこれらの効果の作用機構を明らかにするため、BA の主要な代謝産物 PC、PG、または両者の混合物(CG)をそれぞれの比例で WD に添加し、動物実験を実施した。具体的に、C57BL/6N 雄マウスを 5 つのグループに分け、ND、WD、WD+0.5%PC、WD+0.5%PG および WD+0.25%PC+0.25%PG(CG)の混合を 12 週間与えた。

その結果、アントシアニン代謝産物 PC、PG 及び CG とも WD で増加した最終体重、精巣上体脂肪重量、肝臓重量を有意に減少させた。

また、血中総コレステロール濃度(T-Cho)、低比重リポタンパク質コレステロール(LDL-c)及び肝臓脂肪率もPG-CG>PCの順で有意に減少させた。血糖値やインスリン抵抗性も改善されたが、CG混合物では有意の差がなかった。

腸内細菌叢分析の結果、PGがパラバクテロイデス、プレボテラの相対存在量、プレボテラ/バクテロイデス比、およびグルコース分解経路の上方制御を有意に増加させたことが明らかになった。

興味深いことは腸内細菌叢のネットワークの解析結果である。PCおよびPGグループにおけるラクノスピラ科とデスルホビブリオン科の共発生ネットワークは、NDグループと類似していたが、WDグループとは異なっていた。これらのデータは、PCとPGがWDによって引き起こされる腸内細菌叢のネットワークと腸内細菌叢の機能異常から回復できたことを示唆している。したがって、PGはアントシアニンのマスター代謝産物として機能し、WD誘発性脂質代謝異常および腸内細菌叢の乱れを防ぐ可能性が示唆された。

最後に、動物実験で変化が大きく見られた腸内細菌に対して、体外培養でその効果を直接解析した。BA、PGAやPCAはこれらの腸内細菌を直接的に増殖させず、胆汁酸ストレス下で培養すると、抑制された腸内細菌の増殖を回復させ、動物実験と同じ傾向を示した。従って、アントシアニンは主に大腸内に到達しPCAやPGA等へ分解され、脂質代謝等に関する腸内細菌に作用し、過剰栄養による脂質代謝異常及び腸内細菌叢の乱れ等を改善することが明らかになった。これらの成果は、アントシアニンの低生体利用率と高機能性のパラドックスの解明に説明できる科学根拠を提示したものである。

まとめ

アントシアニンは胃・小腸での吸収率は極めて低く、生体での機能性を説明できない。本研究はアントシアニンと腸内細菌の相互作用を解析し、その矛盾を解明することを目的にした。マウス実験は鹿児島大学動物実験に関する規則に従い実施した。5週齢のマウスに標準食(ND)及び過剰栄養食(WD)を設定し、その上にブルーベリーアントシアニン抽出物(BA)及びその主要な代謝産物PGやPCを給餌させ3ヶ月間飼育した。その結果、アントシアニンは主に大腸内でPCやPG等へ分解され、脂質代謝等に関する腸内細菌及びそのネットワークを調節し、過剰栄養による脂質代謝異常及び腸内細菌叢の乱れ等を改善させた。これらの成果は、アントシアニンの低生体利用率と高機能性のパラドックスの解明に説明できる科学根拠を提示し、アントシアニン食材を今後の食卓への健康利用に促進するものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nakano Hironobu, Sakao Kozue, Wada Koji, Hou De-Xing	4. 巻 11
2. 論文標題 Ameliorative Effects of Anthocyanin Metabolites on Western Diet-Induced NAFLD by Modulating Co-Occurrence Networks of Gut Microbiome	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 2408 ~ 2424
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/microorganisms11102408	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 -

1. 著者名 Hironobu Nakano, Shusong Wu, Kozue Sakao, Taichi Hara, Jianhua He, Santos Garcia, Kalidas Shetty and De-Xing Hou	4. 巻 12
2. 論文標題 Bilberry Anthocyanins Ameliorate NAFLD by Improving Dyslipidemia and Gut Microbiome Dysbiosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 3252
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/nu12113252.	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 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 HOU De-Xing
2. 発表標題 Innovation of anthocyanin food from laboratory bench to healthy dining table
3. 学会等名 JAACT2023（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 HOU De-Xing
2. 発表標題 Anthocyanins food innovation: from laboratory bench to healthy dining table
3. 学会等名 EAFTA2023（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中野 拓宜・坂尾こず枝・侯 徳興
2. 発表標題 非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)におけるビルベリー及びアントシアニン代謝産物による予防効果：腸内細菌叢の視点から
3. 学会等名 第76回 日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔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	坂尾 こず枝 (SAKAO Kozue) (40713285)	鹿児島大学・農水産獣医学域農学系・准教授 (17701)	

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
---------	---------