

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：32648

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K11565

研究課題名(和文)腸内細菌が産生するチロシン由来の尿毒素に及ぼす茶カテキンの関与

研究課題名(英文)Effect of tea catechins on gut bacterially produced uremic toxins derived from tyrosine.

研究代表者

海野 知紀(Unno, Tomonori)

東京家政学院大学・人間栄養学部・教授

研究者番号：90439753

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：p-クレゾール(PC)は腸内細菌の異化作用によってチロシンから生成される尿毒素の一種である。本研究では、緑茶に含まれるエピガロカテキンガレート(EGCG)の摂取が、尿中、血漿中PC濃度に影響を及ぼすかについて検討した。

マウスにEGCGを0, 0.05, 0.1, 0.2% (w/w) 配合した食餌を2週間投与したとき、用量依存的に尿中と血漿中のPC濃度が低下した。しかし、EGCGをエピガロカテキンと没食子酸に加水分解すると、PC濃度の低下は消失した。EGCGはPC生成に関与しているClostridiales目の腸内細菌の割合を低下させたが、EGCGの加水分解物では有意な腸内細菌叢の変化を認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、尿毒素の一種であるp-クレゾール(PC)が緑茶に含まれるエピガロカテキンガレート(EGCG)によって抑制されることを明らかにした。その作用機序として、EGCGがチロシンからPCを産生する腸内細菌の種類を抑制したためであると推察された。腸内細菌が産生したPCは体内に取り込まれると抱合体に変換されるが、クレシル硫酸は糖尿病性腎症の憎悪因子として理解されていることから、食品成分の摂取によってそのリスク低減に影響する可能性を示唆するとして学術的な意義を有する。

研究成果の概要(英文)：p-Cresol (PC) is recognized as an uremic toxin that is bacterially produced from tyrosine. This study aimed to reveal whether epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a major catechin in green tea, could reduce the plasma and urinary levels of PC by limiting its bacterial production in mice.

Mice were fed respective diets: a control diet, a 0.05% EGCG diet, a 0.1% EGCG diet or a 0.2% EGCG diet for 2 weeks. The results demonstrated that the addition of EGCG decreased the plasma and urinary concentrations of PC in a dose-dependent manner. However, once EGCG was hydrolyzed to epigallocatechin and gallic acid, such effects were lost almost completely. Dietary EGCG (0.2%) was accompanied by a decreased abundance of Clostridiales at the order level, which constitute a part of PC production from tyrosine, but EGCG hydrolyte did not show significant differences on the fecal bacterial composition.

研究分野：食品科学

キーワード：カテキン クレゾール 尿毒素 腸内細菌

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 慢性腎臓病と尿毒素の蓄積

慢性腎臓病 (chronic kidney disease, 以下 CKD と略す。) は、糖尿病、高血圧症、慢性糸球体腎炎などを原疾患として、慢性的に腎機能が低下していく病態であり、日本における CKD 患者は約 1330 万人 (20 歳以上の成人の 8 人に 1 人) と見積もられている。近年、腸内細菌叢の「乱れ」が CKD の進展に関与していることに注目が集まっており、腸内細菌との正常な共生関係が破綻すると、宿主にとって有害となる物質の形成が促進されると考えられている。例えば、CKD 患者では尿毒素 (uremic toxins) の血中濃度が高いことが報告されているが、この要因は腸内細菌叢の変化に伴って尿毒素の産生量が高められているためと理解されている。代表的な尿毒素としてトリプトファンから生成されるインドール、チロシンから生成されるフェノール、*p*-クレゾール (以下、PC と略す) などが挙げられる。これらは肝臓における抱合を経て尿中へと排泄されるが、CKD 患者ではこれらのクリアランスも低下しているため、体内に尿毒素が蓄積する。

### (2) ポリフェノールが腸内細菌叢に及ぼす影響

食事として摂取する成分のうち、小腸での吸収を免れ大腸に到達するものにポリフェノール化合物が挙げられる。我々は、緑茶に含まれる epigallocatechin-3-*O*-gallate (以下、EGCG と略す) や柑橘系果実に含まれるヘスペレチンをラットに混餌投与した場合、その一部が大腸へ移行することを確認し、ラットの腸内細菌叢における *Clostridium* subcluster XIVa の比率を有意に低下させることを明らかにした。*Clostridium* cluster XIVa に属する腸内細菌はフェノール、PC の産生に関与することが報告されていることから、EGCG やヘスペレチンの摂取は尿毒素の生成を抑制する可能性が示唆される。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、ポリフェノール化合物の一種である茶カテキンが大腸に到達し、腸内細菌叢の改変をもたらすことで、尿毒素 (フェノール、PC) の産生に影響を及ぼすかについて明らかにすることである。実験動物を用いて茶カテキンを食餌投与し、フェノール、PC の血中、尿中濃度を測定するとともに、茶カテキンによる腸内細菌叢への影響を考察する。また、茶に含まれるカテキンには主にガレート型と非ガレート型が存在するため、これらの分子種による効果の差異についても検討を加える。本研究は、食経験のあるポリフェノールの尿毒素産生に及ぼす効果を明らかにし、糖尿病性腎症の進展予防の観点から将来の臨床的研究への基礎とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 生体試料中のフェノール、PC 濃度に及ぼす EGCG の影響【実験 1】

#### 動物実験

雄 ICR マウス (4 週齢) を購入し、自動的に制御された 12 時間明暗サイクルの室内で、22 の温度環境のもと、ステンレスの代謝ケージで 3 日間馴化させた。馴化期間中は AIN93G 配合飼料を与えた。その後、4 群に分け、コントロール食 (control)、0.05% (w/w) EGCG 配合食、0.1% EGCG 配合食または 0.2% EGCG 配合食を与えた (各群  $n=3$ )。実験食と水道水は 2 週間自由摂取させた。実験期間を通じて糞を採取し、実験の最後の 2 日間は尿を採取した。

#### スルファターゼ、 $\beta$ -グルクロニダーゼによるフェノール及び PC の脱抱合化

冷凍保存した尿を解凍し、蒸留水で 50 倍に希釈した。血漿は希釈せずにそのまま使用した。盲腸内容物は、解凍した盲腸内容物の一部に 4 容量の蒸留水を加え、ホモジネートを調製した。

フェノール及び PC (遊離型、硫酸抱合型及びグルクロン酸抱合型の総量) の測定は、まず試料を 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) の条件下でスルファターゼを反応させ、次に 5 mM 塩化ナトリウムを含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.8) の条件下で  $\beta$ -グルクロニダーゼを反応させ、脱抱合化処理を行った。遊離型については、試料に対して酵素処理を行わなかった。

#### HPLC 分析

内部標準物質として 0.5 mM の *p*-クロロフェノール溶液 10  $\mu$ L を加えた後、反応混合物を固相抽出カートリッジ (Strata-X、粒子径 33  $\mu$ m、フェノメネックス社製) に直接供した。カートリッジを水 1 mL 及び 20% (v/v) メタノール水溶液 1 mL で洗浄した後、フェノール及び PC をメ

タノール 1 mL で溶出させた。フィルターを通過後、得られたろ液 10  $\mu$ L を蛍光検出器を備えた HPLC システム (島津製作所社製) に注入した。分離には、分析カラム (Unison UK-3C<sub>18</sub>, 100 mm $\times$ 4.6 mm i.d., インタクト社製) を用いた。蛍光検出器は、励起波長 270 nm, 発光波長 305 nm に設定した。溶媒 A (25%(v/v)メタノール)と溶媒 B (メタノール)の割合を変えて勾配溶出を行い、流量は 1 分間当たり 1 mL とした。移動相組成は 100%溶媒 A (0%溶媒 B)で開始し、その後溶媒 B の比を 15 分間で 50%まで直線的に増加させ、続いて 2 分間で溶媒 B を 70%までさらに増加させた。次いで、組成を 2 分間かけて初期条件に戻し、次の測定を行った。なお、尿中濃度は尿中クレアチニン濃度当たりに換算補正した。盲腸内容物ホモジネートは、遊離型のフェノール、PC のみを測定した。

## (2) 生体試料中の PC 濃度に及ぼす EGCG とその加水分解物の比較【実験 2】

EGCG 加水分解物 (エピガロカテキン (EGC) と没食子酸 (GA) の混合物) の調製  
麹菌由来のタンナーゼ (タンナーゼ-KTFHR, キッコマン株式会社) 1 g を EGCG の水溶液 (10 g/L) に添加し、37  $^{\circ}$ C で 60 分間反応させ、減圧濃縮後、凍結乾燥した。タンナーゼ処理後のサンプル中に EGCG が消失したことは、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で確認した。EGC と GA を除いて、新しく発生したピ - クは検出されなかった。

### 動物実験

雄 ICR マウス (4 週齢) を購入し、3 群 (各群 n = 4) に分け、コントロール食、0.2% (w/w) EGCG 配合食、または EGCG と同モル量となるように配合した EGC + GA 配合食を 2 週間与えた。実験 1 と同様に糞と尿を採取した。実験の最終日に血液および盲腸の内容物を採取した。得られた生体試料中のフェノール、PC の測定は、実験 1 の通りに実施した。

### 16S rRNA 遺伝子アンプリコン解析

糞から DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子 (V3-V4 領域) を、汎用プライマー 341F (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') および 805R (5'-GGACTACCAGGGTATCTAAT-3') を用い、PCR によって増幅した。MiSeq 試薬キット ver.3 (イルミナ社製) を用いた MiSeq シーケンシングを行った。配列のクオリティチェック後、配列類似性でクラスタリングして分類単位 (OTU) 解析を行った。テクノスルガラボ株式会社によるデータベースに基づき微生物を同定した。

## 4. 研究成果

### (1) EGCG の食餌投与は血漿中と尿中の PC 濃度を低下させる【実験 1】

#### 血漿中と尿中のフェノール、PC 濃度

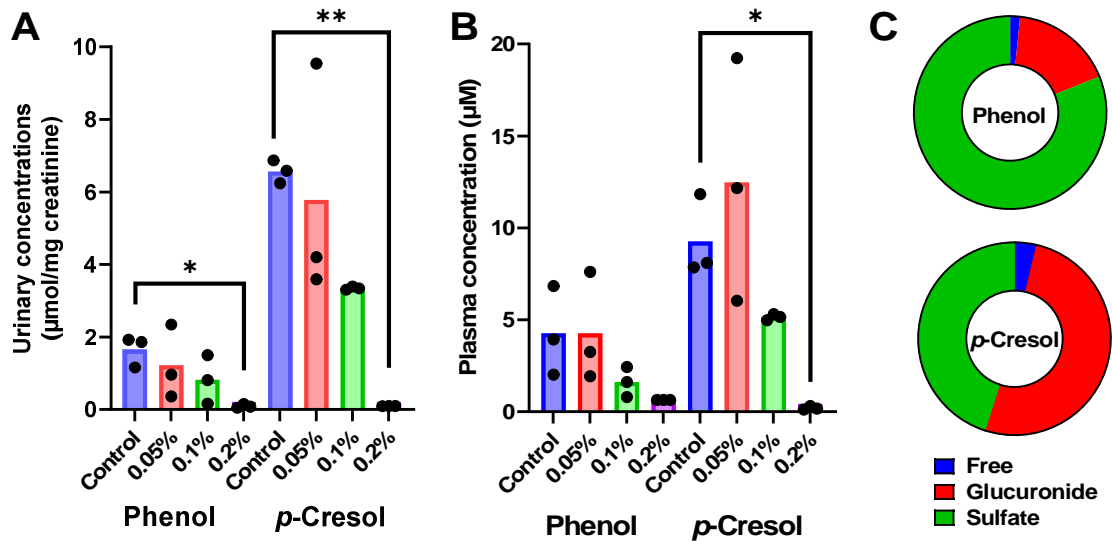
血漿と尿のサンプルをスルファターゼ及び  $\beta$ -グルクロニダーゼを用いて脱抱合し、これを HPLC にて測定した。スルファターゼと  $\beta$ -グルクロニダーゼの両方を用いた場合から、 $\beta$ -グルクロニダーゼのみを用いた場合を減じることで硫酸抱合型の定量値とした。 $\beta$ -グルクロニダーゼのみを用いた場合から、遊離型 (両方の酵素処理を行わない場合) を減じることでグルクロン酸抱合型の定量値とした。

図 1A はフェノール及び PC の尿中濃度 (遊離型及び硫酸・グルクロン酸抱合体の総濃度として)、図 1B は血漿中濃度の結果を示した。コントロール群では、尿中に排泄された PC の平均量がフェノールの 4 倍であった。EGCG の食餌添加は、フェノール、PC の尿中排泄を用量依存的に減少させ、0.2%EGCG 食を与えたマウスの尿中にはほとんど検出されなかった。また、血漿中濃度も PC の方がフェノールより高かった。PC の血漿濃度の平均値は、コントロール食群で  $9.3 \pm 2.2 \mu\text{M}$ 、0.2%EGCG 食群で  $0.2 \pm 0.1 \mu\text{M}$  であった ( $p < 0.05$ )。血漿中フェノール濃度は EGCG の添加に伴い低下傾向を示したが、統計学的な有意差には至らなかった。

#### 硫酸抱合型とグルクロン酸抱合型の比率

コントロール食群における尿中のフェノールは硫酸抱合体が優勢であり、全濃度の 77% を占めていた。しかし、PC の硫酸抱合型は 45%、グルクロン酸抱合型は 51% と、フェノールにおけるそれぞれの割合とは異なる傾向を示した。

EGCG を 0.05% および 0.1% 添加した飼料を与えたマウスにおいて、フェノール、PC の尿中濃度に対する硫酸抱合型またはグルクロン酸抱合型の割合は、EGCG の添加量にかかわらず、コントロール食群を与えたマウスとほぼ一致していた。



**図1. チロシンから産生される尿毒素の尿中、血漿中濃度に及ぼす EGCG の効果【実験1】**

A: フェノール, *p*-クレゾールの尿中濃度 (クレアチニン補正), B: フェノール, *p*-クレゾールの血漿中濃度, C: コントロール食群におけるフェノール, *p*-クレゾールの抱合体の様式. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$

(2) タンナーゼによる EGCG の加水分解物は血漿中と尿中の PC 濃度に影響しない【実験2】

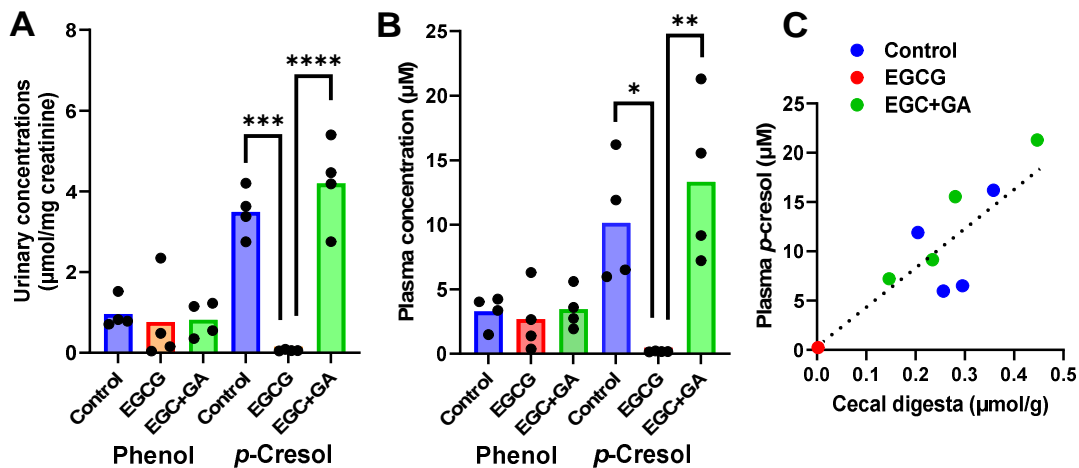
血漿中と尿中の PC 濃度

EGCG の食餌添加 (0.2%) により PC の尿中排泄が減少する結果が認められ, 実験 1 と同様の再現性が得られた。しかし, この効果はタンナーゼで EGCG を加水分解することで完全に失われた (図 2A)。EGCG とその加水分解物 (EGC と GA の等モル混合物) の間で統計的な有意差があった。一方, フェノールの尿中濃度に関しては, 群間での有意差を示さなかった。

このような結果は血漿中濃度に関しても一貫して現れた (図 2B)。コントロール食群, EGCG 食群, EGC + GA 食群での血漿中 PC 濃度は, それぞれ  $10.8 \pm 5.2 \mu\text{M}$ ,  $0.2 \pm 0.1 \mu\text{M}$ , および  $12.4 \pm 8.0 \mu\text{M}$  (平均値 $\pm$ 標準偏差) であった。

盲腸内容物中の PC 濃度

盲腸内容物の湿重量当たりの遊離型の PC 濃度は, 0.2%EGCG 食群のマウスの盲腸内容物にはほとんど存在しなかった。一方, EGCG 加水分解物は, 盲腸内容物中の PC 含有量にほとんど影響を及ぼさなかった。また, 盲腸内容物中の PC 含有量は, その血漿濃度と密接に相関していたことを確認した (図 2C)。



**図2. 尿毒素産生に対する EGCG の作用は EGC と GA に加水分解されることで失われる【実験2】**

A: フェノール, *p*-クレゾールの尿中濃度 (クレアチニン補正), B: フェノール, *p*-クレゾールの血漿中濃度, C: 盲腸内容物中と血漿中の *p*-クレゾールに関する相関性. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$

### 腸内細菌叢

コントロール食群における糞中の微生物組成は、4つの主要な門 (Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria) で大半を占めていた (図 3A)。そのなかでも、Firmicutes 門が最も優勢であった。飼料に EGCG (0.2%) を添加すると、コントロール食群と比較して Firmicutes の相対値が減少したが、EGCG 加水分解物 (EGC + GA の等量混合物) を配合した飼料では影響はなかった (図 3B)。一方、EGCG 食群では、Bacteroidetes 門および Verrucomicrobia 門が逆に増加したが、EGCG 加水分解物の場合、実際的な影響はなかった。主成分分析を行ったところ、コントロール食及び EGC + GA 食を給餌したマウスの門レベルでの分類学的プロファイルは近接しており、EGCG 食を給餌したマウスとは異なったプロファイルをもたらした (図 3C)。

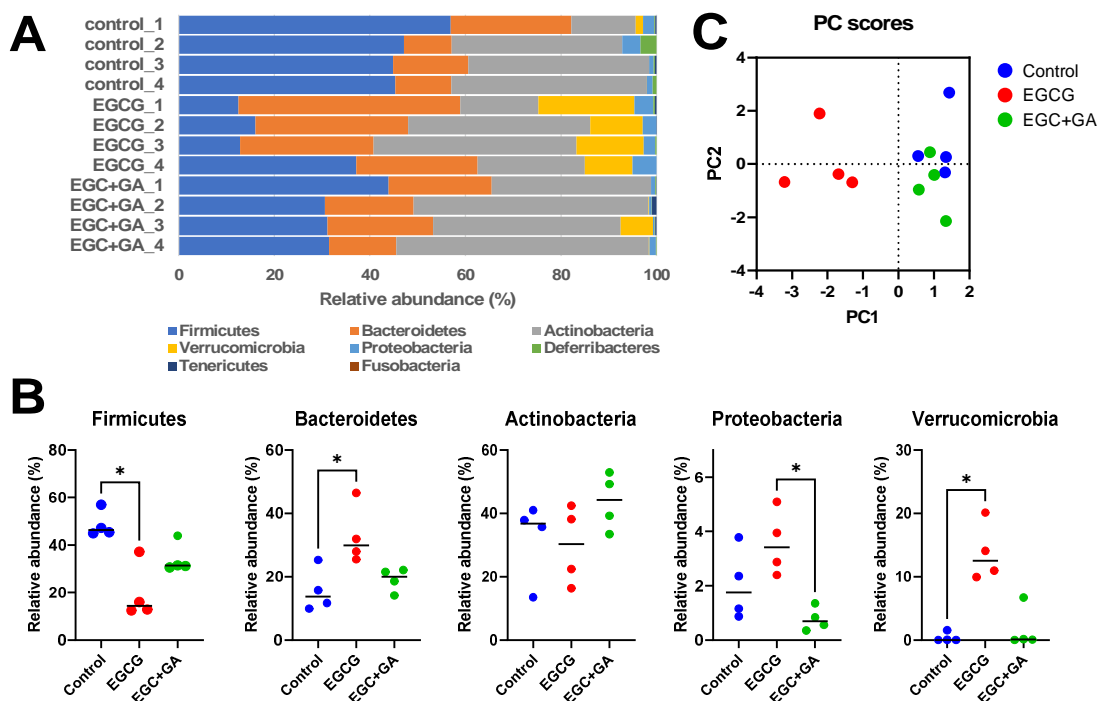


図 3. 飼育 2 週目に回収した糞中の門レベルでの腸内細菌叢の比較【実験 2】

A: 個々のマウスの糞中腸内細菌叢, B: 主な門レベルでの比較 (横線は中央値), C: 主成分分析による比較. \*p<0.05.

### (3) 考察

近年の研究では、ポリフェノールに富む食品が腸内細菌叢を変化させ、そのことによって腸内細菌が産生する代謝物についても増加もしくは抑制に働くとして多くの注目を集めている。本研究では、健康マウスのフェノール、PC の尿中、血漿中濃度に及ぼす EGCG (緑茶の主要ポリフェノール) の効果を検証した。

実験 1 では、飼料に添加された EGCG の量に応じて、尿および血漿中の PC 濃度が低下することを明らかにした。この結果は、EGCG が PC 産生の抑制に有益な効果を有するという直接的証拠といえる。なお、EGCG が肝臓における PC の抱合反応にほとんど影響を及ぼしていないことも確認した。緑茶ポリフェノールは 2 つの主要なクラスに分けられる。1 つはガロイル部分を有するカテキンであり、もう 1 つはガロイル部分を有さないカテキンである。実験 2 では、ガロイル型と非ガロイル型の活性相関を明らかにするために実施した。0.2% EGCG 食群ではコントロール食群と比較して尿中および血漿中の PC 濃度が著しく低かったが、EGC + GA 食を給餌したマウスはコントロール食群と同等程度の PC を尿中に排泄していた。この結果は、フラバン-3-オール構造へのガロイル基の有無が PC 産生に重要な役割を果たすことを意味している。

これらの結果を裏づけるために、腸内細菌叢の変化を調べた。0.2% EGCG 食群では、Firmicutes 門の相対値が有意に減少することを確認した。Firmicutes 門には、PC 産生に係る Clostridium 目 が属する。このことから、EGCG の尿中、血漿中 PC 濃度を抑制した理由として、PC 産生菌の抑制効果に基づくものと推察された。

腸内細菌による PC の産生が慢性腎臓病患者における心血管死亡の有意なリスクと関連していることを考慮すると、EGCG は本疾患の予防・治療作用を有する化合物となる可能性がある。今後は、EGCG の腸内細菌への作用の詳細について検討する必要がある。

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 Unno Tomonori, Ichitani Masaki	4. 巻 7
2. 論文標題 Epigallocatechin-3-gallate decreases plasma and urinary levels of p-cresol by modulating gut microbiota in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 40034 ~ 40041
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsomega.2c04731	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 海野知紀, 一谷正己
2. 発表標題 エピガロカテキンガレートはマウスの腸内細菌叢を変化させることで血漿と尿中のp-クレゾールを低下させる
3. 学会等名 日本栄養・食糧学会
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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