

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：25301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580184

研究課題名(和文)腸内有益菌の延命効果をプローブとしたマルチアセスメントによる腸内環境改善素材開発

研究課題名(英文)Effect of ellagitannins on the sustainable survival of beneficial intestinal bacteria

研究代表者

伊東 秀之 (ITO, HIDEYUKI)

岡山県立大学・保健福祉学部・教授

研究者番号：70253002

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、まず腸内有用菌の*Bifidobacterium longum* 菌の減衰期に着目して、菌の生存維持作用の評価を行い、ザクロアリルエキスに生存維持作用を有することを見出した。ザクロにはエラジタンニンが豊富に含まれていることから、ザクロエラジタンニンの腸内細菌による代謝物の探索も行い、uroolithin Aを同定した。さらにザクロの腸内細菌生存維持作用を有する成分を特定するために、ザクロ果実エキスを分離、精製を行い、新規化合物3種を含む8種の成分を単離し、それぞれの構造を解明した。現在それら成分の生存維持作用について検討を進めている。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effect of pomegranate arils on survival of beneficial intestinal bacteria (*Bifidobacterium longum*) to improve the intestinal microbial balance. The aril extract showed the survival effect on *B. longum*. We explored metabolites derived from gallagyl moiety in rat urine after administration of punicalagin. Urolithin A was observed 12-96 h after the ingestion of punicalagin, suggesting that a hexahydroxydiphenoyl group in the molecule was converted to urolithin A. We further investigated the isolation and structure elucidation of bioactive constituents from edible pomegranate arils. Two new ellagitannin oligomers, pomegranins A and B, a new glucose ester of neolignan, pomegralignan, and 6-O-(4-hydroxybenzoyl)-1-O-galloylglucose were isolated from the arils of pomegranate. Six known ellagitannins were also isolated from the pericarps of pomegranate. The structures of the new compounds were determined by spectroscopic analyses and chemical evidence.

研究分野：食品化学, 天然物化学

キーワード：腸内細菌 ビフィズス菌 エラジタンニン 整腸作用 プレバイオティクス ポリフェノール

## 1. 研究開始当初の背景

特定保健用食品は、今ではその承認数が1000品目を超えようとしている。中でもおなかの調子を整える食品が半数以上を占め、プロバイオティクスやプレバイオティクスの範疇に入るものがほとんどである。プレバイオティクスは「腸内のいわゆる善玉菌を増やし或いは悪玉菌を減らすことにより、宿主に有利な影響を与え、宿主の健康を改善する難消化性食品成分」と定義され、フルクトオリゴ糖やガラクトオリゴ糖などが知られている。通常プレバイオティクスの評価は有用菌の増殖や資化によって生ずる短鎖脂肪酸量の増加を目標としている。しかし、申請者らは有益菌の減衰期の挙動に着目し、有益菌の減衰期における菌の減少を如何に抑え、有益菌の生存を維持させる新たな着眼点を持って、既に研究に着手している。その結果、ゲンノショウコに含まれる corilagin に、代表的な有益菌である *Bifidobacterium longum* の減衰期における生存維持作用を有することを見出し、報告している。

ゲンノショウコは、日本三大民間薬の一つで整腸薬として古くから使用され、その整腸作用機序に関しては、腸の蠕動運動の制御や収斂性の強いタンニン成分などが腸粘膜のタンパク質と結合することによって生ずる腸粘膜の保護、抗炎症によるとされているが、腸内細菌への影響を含めて未だ明確な科学的データが提供されていない。一方、腸内細菌が天然成分に影響を与え、構造変換させる場合も少なくない。申請者らは、geraniin をはじめとするエラジタンニンが、腸内細菌によって代謝分解されることも見出し、報告しているが、腸内細菌自身にとって、より有益な物質を得るために構造変換している可能性も否定できない。従って、腸内細菌による代謝産物についても、有益菌の増殖、減衰抑

制作用や食中毒原因菌に対する抗菌作用を評価する必要があると考えている。

## 2. 研究の目的

難消化性食品成分のオリゴ糖や多糖などが、プレバイオティクスとして知られているが、それらはビフィズス菌や乳酸菌などの有用菌の増殖効果のみに注目されて評価、開発されているのが現状である。本研究では、有用菌の減衰期に着目して菌の生存維持作用の評価を行う。一方、ポリフェノールをはじめとする天然成分には、腸内細菌によって代謝され、吸収後、活性代謝物として機能を発揮する可能性があることが報告されてきている。腸内細菌は、天然成分を代謝変換することにより、その代謝産物が有用菌に対してより有益に働き、また食中毒原因菌に対しては抗菌的な働きを示す可能性も十分考えられる。このような観点からも、活性天然物において、さらにその腸内代謝物も探索、化学構造を解明し、代謝産物について上記各種作用を評価することも重要と考える。

一方、ある成分は延命効果を示すが、抗菌活性は無く、また別の成分は延命効果を示さないが、抗菌活性を有するような、異なる作用を持つ活性成分が同じ素材（ザクロ）に含まれることを申請者らは既に見出している。本研究では、ザクロの腸内環境改善作用を有する活性成分を明らかにするために、ザクロの可食部位であるアリルの成分研究も行った。

## 3. 研究の方法

(1) ザクロの果皮は古くから整腸作用を有する生薬として使用されているが、作用機序に関する科学的データはない。そこで、作用機序の一端の解明を目的として本実験を行った。本実験は、腸内有用菌の中でも成人のヒトに

において優勢な有用菌の一種である *Bifidobacterium longum* 菌を用いた。生菌数は、Colony Forming Unit (CFU)/mL で表した。その後、*B. longum* の減衰が開始される12時間後から24時間後における生存維持作用を数値化して評価するために、control に対する相対的な生存維持作用、Relative Viability (RV) を図1の式を用いて算出した。さらに、control とサンプルの生菌数の差を大きくし、生存維持作用の評価がしやすくなるように、ビフィズス菌が生育しにくい条件を持つ Gifu Anaerobic Medium (GAM) 培地を用いた。

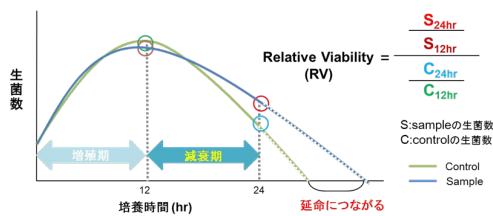


図1. 腸内細菌の生存維持作用評価

(2) ザクロエラジタンニン (punicalagin または punicalin) の尿中代謝物の探索を行うために、ラットを24時間絶食させ、飲料水を自由に与えた。5%アラビアゴム末溶液に懸濁した被験サンプルを20 mg/匹の濃度で強制経口投与した。経口投与前の24 hrの絶食期間中、経口投与後0-12, 12-24, 24-48, 47-72 および72-96 hrの自然排泄尿を採取した。経口投与前の24 hrの絶食期間の尿はBlank, 採取した尿サンプルは分析を行うまで-20℃にて冷凍保存した。採取した尿(1 mL)を0.58 M 酢酸でpHを調整し、 $\beta$ -glucuronidase (Sigma, G-7017) を加えて、37℃, 1時間インキュベーションを行い、脱抱合化処理した。溶液にMeOHを1 mL 加えて攪拌し、12000 rpmで10分間遠心後、得られた上清を0.2  $\mu$ m フィルターに通して、以下の条件でHPLC分析を行った。Column: Nucleosil 100-10C18 (4.6 mm I.D.  $\times$  250 mm), カラム温度: 40℃, Flow Rate:

1.0 mL/min, Mobile phase: A: H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN:HCOOH =95:4:1, B: H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN:HCOOH=79:20:1, グラジエント: mobile phase B: 0%-100% (0-10 min), 100% (10-30 min), 100%-0% (31 min)、0% (31 min-40 min)。

(3) ザクロ果皮および果肉(アリル)について含水アセトン中でホモジナイスを行い、ろ過、濃縮後、得られたエキスをDiaion HP-20, Toyopearl HW-40, Sephadex LH-20, MCI GEL CHP-20P などのカラムクロマトおよび分取HPLCによる分離、精製を繰り返し、ザクロ果皮から3種の既知化合物、ザクロアリルからは2種の既知エラジタンニン2量体および1種の3量体に加えて3種の新規化合物を単離した。

#### 4. 研究成果

(1) アリルエキスについて、*B. longum* 菌の生存維持作用菌数をCFU/mLで表し、RVの値を評価した。その結果、アリルエキスのRV=1.2となり、コントロールと比較して延命効果があるという結果が得られた。しかし、減衰期の菌数の減少度が小さかったために、GAM培地の濃度を5倍希釈し、菌にとってより厳しい条件下で実験を行うこととした。その結果アリルエキスはRV=6.9となり、延命効果が期待できる結果となった。しかし、このアリルエキスには菌の資化となり得る糖類も多く含まれており、生存維持作用に影響していることも考えられる。そこでMega Bond Elut カートリッジカラムで、糖部分を分離して再度実験を行うこととした。

水溶出部(糖画分)では、アリルサンプル(非糖画分)と同様に12時間後の菌数の増減では、あまり変化はなく有意差も見られなかった。24時間後の菌数の増減では、*t*検定により有意差を求めると

<0.05となり有意に延命していることがわかった。また、RVを

求めると糖画分は  $RV = 1.3$  となり、非糖画分の結果と同様に延命効果があるという結果が得られた (図 2)。水溶出部においても延命効果が見られたため、果糖およびブドウ糖においても効果があるか確認を行った。その結果、グルコースにおいては  $RV$  値と  $t$  検定ともに延命効果がないことがわかった。フルクトースにおいては  $RV = 1.1$  となったが、 $t$  検定による有意差は見られなかった。

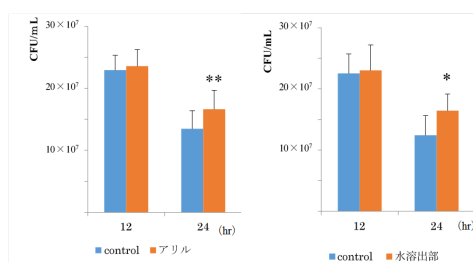


図 2. ザクローアリの糖画分および非糖画分の *B. longum* 菌の生存維持作用

(2) Punicalagin および punicalin (図 3) をラットに経口投与後の尿を採取し、そのサンプルを  $\beta$ -glucuronidase による酵素処理し、脱抱合化を行った後、HPLC-DAD分析を行った。その結果、punicalagin 投与後12-96時間のラット尿サンプルについて、punicalagin から代謝産物として生成したと考えられる urolithin A に相当する明瞭なピークが観察された。このことは punicalagin および punicalin の分子内の hexahydroxydiphenoyl 基が腸内細菌によって加水分解され、ellagic acid を経由して urolithin A が生成したと推測される。その他、代謝産物と思われるピークが複数検出されたので、現在、分離、精製を行っている。

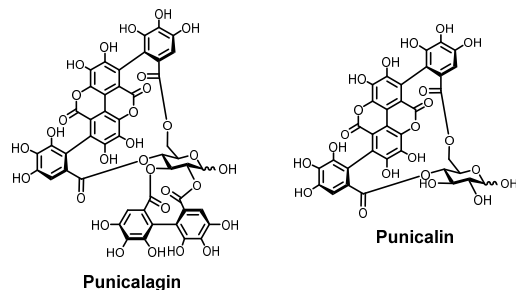


図 3. ザクローの既知エラジタンニン (punicalagin, punicalin) の構造

(3) ザクロー中の腸内有用菌の生存維持作用を有する成分を特定するために、成分研究を進めた。ザクロー果実を果皮、果肉 (アリアル) に分けてHPLC分析を行った結果、果皮ではエラジタンニン単量体の punicalaginがメインピークとして検出されたが、果肉の方では果皮とは異なり、多数のピークが観察された。さらに果肉では順相系HPLC分析における保持時間15分前後にエラジタンニン 2 量体と思われるピークが比較的大きなピークとして複数観察された。なお今までザクローにはエラジタンニン 2 量体の存在は全く報告されていない。

ザクロー果皮および果肉について含水アセトン中でホモジナイスを行い、ろ過、濃縮後、得られたエキスを各種カラムクロマトおよび分取HPLCによる分離、精製を繰り返し、ザクロー果皮から3種の既知化合物 (punicalin, punicalagin, punicacortin C)、ザクロー果肉からは2種の既知エラジタンニン 2 量体 (oenothein B, eucalbanin B) および3量体 (eucarpanin T<sub>1</sub>) に加えて、3種の新規化合物を単離した。なおザクローにエラジタンニン 2 量体が含まれていることは、本研究による初めての知見である。新規化合物の構造は、NMR, MS などのスペクトルデータの解析および化学反応の結果からエラジタンニン 3 量体 (Pomegranin A)、4 量体 (Pomegranin B)、ネオリグナン (Pomegralignan) および 6-*O*-(4-hydroxybenzoyl)-1-*O*-galloylglucose で

あると決定した(図4)。各成分の活性については、現在、試験に耐え得る量の植物から分離、精製し、量産している。

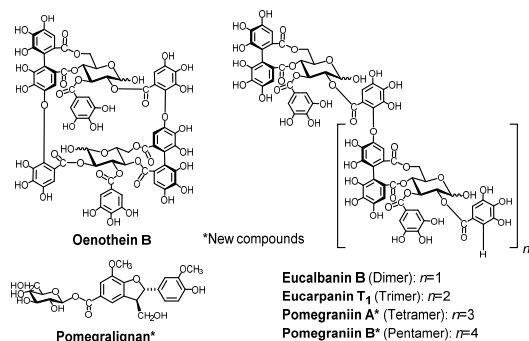


図4. ザクロの既知および新規エラジタンニンオリゴマー (pomegranin A, B) と新規ネオリグナン (pomegralignan) の構造

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計23件)

Ito, H., Li, P., Koreishi, M., Nagatomo, A., Nishida, N., and Yoshida, T., Ellagitannin oligomers and a neolignan from pomegranate arils and their inhibitory effects on the formation of advanced glycation end products, Food Chem., 査読有, 152, 2014, 323-330. [http://dx.DOI.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.160](http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.160)

Kawakami, K., Li, P., Uraji, M., Hatanaka, T., Ito, H., Inhibitory effects of pomegranate extracts on recombinant human maltase-glucoamylase, J. Food Sci., 査読有, 79, 2014, 1848-1852. DOI: 10.1111/1750-3841.12568

伊東秀之, 加水分解性ポリフェノール, エラジタンニンの生体内代謝産物とその機能, バイオサイエンスとインダストリー, 査読有, 72, 2014, 123-124.

〔学会発表〕(計60件)

伊東秀之, ザクロに含まれるエラジタンニ

ンの化学構造とその機能性, 日本農芸化学会中四国支部 第19回若手シンポジウム(第7回農芸化学の未来開拓セミナー), 2015年5月15, 16日, 岡山

Mao Kanada, Peng Li, Akifumi Nagatomo, Norihisa Nishida, Yoichi Matsuura, Natsuki Ganeko and Hideyuki Ito, New ellagitannin oligomers and related polyphenols from pomegranate arils and their inhibition of AGEs formation, XXVIIth International Conference on Polyphenols & 8th Tannin Conference, 2-6 September 2014, Nagoya.

Erika Ogahara, Satoshi Nishimura, Tsutomu Hatano, and Hideyuki Ito, Effects of ellagitannins from Geranium thunbergii on survival of Bifidobacterium longum in the decline phase, International Conference on Biologically Active Substances, Bioactive Okayama 2012 -Food and Health-, September 13-14, 2012, Okayama.

〔図書〕

該当なし

〔産業財産権〕

該当なし

〔その他〕

該当なし

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

伊東 秀之 (ITO HIDEYUKI)

岡山県立大学・保健福祉学栄養学科・教授

研究者番号: 70253002