

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 14 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580181

研究課題名(和文)フルクトース過剰摂取に起因した脂肪性肝炎と機能性食品成分によるその発症予防

研究課題名(英文)Nonalcoholic steatohepatitis induced by the excess ingestion of fructose and its prevention by functional foods ingredient

研究代表者

乾 博(Inui, Hiroshi)

大阪府立大学・総合リハビリテーション学部・教授

研究者番号：20193568

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：肥満モデルマウス(KK-Ayマウス)に高スクロース食もしくは高フルクトース食を摂取させると、盲腸内の細菌叢に変化が起こり、特にビフィズス菌の減少が見られた。このような変化は高脂肪食でも見られるものであり、フルクトース過剰摂取に起因した脂肪性肝炎の発症に関係していると考えられる。ユーカリ抽出物を摂取させると腸管におけるフルクトース吸収が抑制され、高フルクトース食に起因した脂肪肝が抑制されるが、その活性成分としてテリマガランジンIを見いだした。また、ユーカリ抽出物以外に、バナバ、グァバ、オリーブ抽出物にもフルクトース吸収阻害活性があり、高フルクトース食に起因した脂肪肝の抑制に有効であった。

研究成果の概要(英文)：When KK-Ay mice were fed a high-sucrose or high-fructose diet, the growth of Bifidobacterium in cecum was suppressed. The change in microflora may associate with the pathology of nonalcoholic steatohepatitis induced by the excess ingestion of fructose, as well as the case of the ingestion of high-fat diets.

From eucalyptus extract, tellimagrandin I, a kind of ellagitannins, was isolated as an inhibitor for intestinal fructose absorption. In addition to eucalyptus extract, banaba, guava and olive extracts also inhibited intestinal fructose absorption and suppressed adiposity induced by the excess ingestion of fructose in rats.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：スクロース フルクトース 腸管吸収 腸内細菌叢 脂肪性肝炎 肥満 機能性食品成分 NASH

1. 研究開始当初の背景

スクロースは優れた甘味料であり、フルクトースはスクロースの構成単糖として先進国ではこれまでから多量に摂取されてきた。さらに、近年、安価な高果糖液糖(転化糖; high-fructose corn syrup)が開発され、食品や飲料などの甘味料として多用され、フルクトースが単糖としても多量に摂取されるようになってきた。

フルクトースはグルコースと異なり食後の血糖値、インスリンレベルの急激な上昇を引き起こさない。ところが、フルクトースを長期間多量に摂取すると、内臓脂肪型肥満からメタリックシンドロームさらに耐糖能異常、インスリン抵抗性の原因となり、糖尿病や動脈硬化症の発症を引き起こす。そのため、米国糖尿病協会は糖尿病診断のガイドラインでスクロースの代替としてフルクトースを使用するといった行為に対して警告を発しており、我が国でも厚生労働省が策定した「日本人の食事摂取基準」2010年版において注意を喚起している。さらに、近年我が国においても他の先進国と同様に非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)の患者が急激に増加しているが、その原因として高脂肪食摂取とともにフルクトースの過剰な摂取が指摘されている。なお、研究代表者の研究グループでは、ラットを高フルクトース食で飼育すると肝臓障害が現れるが、その病変がNASH患者で観察されるものと酷似していることを明らかにしている(Kawasaki et al. *J. Nutr.* **139**, 2067-2071 (2009))。

フルクトースを多量に摂取すると肝臓における脂肪酸合成が亢進し、高脂肪食摂取と同様に脂肪肝や内臓脂肪型肥満の原因となる。これまでは、肝臓に蓄積した脂肪が炎症を引き起こし、NASHを発症すると考えられていた。ところが、最近の研究で、高脂肪食摂取に起因した肥満や肝臓障害の発症に、腸内細菌が産生するエンドトキシン(リポ多糖)が重要な役割を担っていることが明らかになってきている(Bäckhed et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 937-984 (2007); Cani et al. *Diabetes* **57**, 1470-1481 (2008) etc.)。すなわち、高脂肪食を摂取すると腸内細菌叢が変化し、ビフィズス菌が減少するとともに腸管粘膜バリアー機能が低下する。その結果、腸内細菌が産生するエンドトキシンが体内に取り込まれ、マクロファージが活性化され、炎症性サイトカインの分泌が起こり、肝臓障害の原因となる。そのため、無菌状態にしたマウスでは高脂肪食を与えても肝臓障害は起こらない。さらに興味深いことに、このような無菌マウスでは脂肪肝や内臓脂肪の蓄積も抑制されることから、エンドトキシンが肥満(脂肪の蓄積)そのものに関係していると考えられている。フルクトースの過剰摂取に起因した肥満や肝臓障害にも腸管内で生成したエンドトキシンの関与が報告されている(Spruss and Bergheim *J. Nutr.*

Biochem. **20**, 657-662 (2009))。しかし、腸内細菌叢の変化や炎症性サイトカインレベルなど詳細についてはよくわかっていない。

研究代表者の研究グループでは、これまでに、ユーカリ葉抽出物がフルクトースやスクロースを過剰摂取したラットの肥満を抑制すること、さらにそのメカニズムが腸管におけるフルクトース吸収阻害であることを見いだしている(Sugimoto et al. *Br. J. Nutr.* **93**, 957-963 (2005))。フルクトースは、SGLT1によって能動的に取り込まれるグルコースと異なり、GLUT5の作用で受動的に小腸上皮から吸収される。したがって、腸管におけるフルクトース吸収を特異的に阻害することが可能であり、その結果フルクトース過剰摂取に起因した脂肪肝や肝臓障害の効果的な予防につながると考えられる。ユーカリ葉抽出物については、実用化を目指してさらなる検討を行い、ヒトに対しても有効であることを確認している(Sugimoto et al. *Food Sci. Technol. Res.* **16**, 509-512 (2010))。

2. 研究の目的

本研究では、研究代表者のこれまでの研究成果をもとに、NASH発症メカニズムに関する最新の知見を加え、フルクトース過剰摂取に起因したNASHについて、下記の研究課題について検討した。

(1) フルクトース過剰摂取に起因した腸内細菌叢の変化に関する研究

高脂肪食を摂取すると腸内細菌叢が変化し、その変化がNASH発症につながると言われている。本研究では、高スクロース食や高フルクトース食でも腸内細菌叢が影響を受け、NASH発症の原因となっているかどうかについて検討した。

(2) フルクトース吸収阻害作用を有する新規機能性食品素材の開発

腸管フルクトース吸収を抑制すると、フルクトースの過剰摂取に起因する肥満や肝臓障害など様々な疾患の予防、病態改善につながる。研究代表者は、ユーカリ葉抽出物にこのような作用が存在するを見だし、詳細について検討してきた。本研究では、ユーカリ葉抽出物以外に同様の作用を有する機能性食品素材を探索し、肥満や肝臓障害の予防に対する有用性を検討した。また、ユーカリ葉抽出物に見いだされるフルクトース吸収阻害作用について活性成分が明らかにされていないので、本研究で単離・同定を行った。

3. 研究の方法

(1) フルクトース過剰摂取に起因した腸内細菌叢の変化に関する研究

4週齢のオスKK-A^yマウスに標準食を与え、1週間予備飼育を行った。なお、標準食(スターチ食)の組成は、1kg当たりスターチ700g、カゼイン170g、ビタミン混合物10g、ミネラル混合物40g、メチオニン3g、塩化

コリン 2 g、大豆油 30 g、セルロース 45 g とした。予備飼育後、スターチ食、高スクロース食および高脂肪食を摂取させ、8 週間飼育した。なお、高スクロース食として、標準食のスターチをスクロースに置き換えたものを用いた。また、高脂肪食では、標準食のスターチを 570 g にまた大豆油を 20 g に減らし、その代わりに牛脂と豚脂を各 90 g 添加した。飼育期間中は、体重増加量と飼料摂取量を測定した。飼育終了後、麻酔下で下大静脈から採血を行い、さらに肝臓、脂肪組織、盲腸などの臓器・組織を採取した。血液については、血清アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) 活性を、肝臓はトリアシルグリセロール (TAG) 値を、また盲腸は内容物を取り出し HPLC にて有機酸組成を調べるとともに RT-PCR 法で菌叢解析を行った。

また、5 週齢のオス KK-A^y マウスに、標準食 (スターチ食)、高グルコース食 (標準食のスターチをグルコースに置換)、高フルクトース食 (標準食のスターチをフルクトースに置換)、高スクロース食を与え 4 週間飼育し、盲腸内の有機酸組成と菌叢の解析を行った。

(2) フルクトース吸収阻害作用を有する新規機能性食品素材の開発

新規フルクトース阻害作用を有する食品素材の探索

フルクトースの腸管吸収阻害活性は、研究代表者らが以前に確立した方法 (Sugimoto *et al. Br. J. Nutr.* **93**, 957-963 (2005)) を用いて測定した。具体的には、絶食させた 8 週齢オスラットに各種植物抽出物 (0.5 mL の水で溶解したもの) を体重 1 kg 当たり 1 g 経口投与し、その 10 分後にフルクトース (水溶液) を体重 1 kg 当たり 2 g 摂取させた。さらにその 30 分後に麻酔下で門脈血を採取し、門脈血血清中のフルクトース濃度を酵素法で測定した。コントロール群 (植物抽出物未投与) と比較してフルクトース濃度上昇の抑制率を計算し、吸収阻害率とした。

各種植物抽出物によるフルクトース過剰摂取に起因した脂肪肝・肝臓障害抑制作用

5 週齢のオスラットにフルクトース-グルコース食 (FG 食) を与え、5 週間飼育した。なお、FG 食の組成は、1 kg 当たりグルコース 350 g、フルクトース 350 g、カゼイン 170 g、ビタミン混合物 10 g、ミネラル混合物 40 g、メチオニン 3 g、塩化コリン 2 g、大豆油 30 g、セルロース 45 g とした。また、各種植物抽出物は飼料中に 1% となるように添加した (セルロースと置換)。飼育期間中は、体重増加量と飼料摂取量を測定した。飼育終了後、麻酔下で下大静脈から採血を行い、さらに肝臓を採取した。血液については、血清アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) 活性を、また肝臓についてはトリアシルグリセロール (TAG) 値、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (G6PDH) 活性、脂肪酸合成酵素 (FAS) 活性、トリオキナーゼ (TK) 活

性を測定した。

ユーカリ葉抽出物のフルクトース吸収阻害剤の単離・同定

ユーカリ葉抽出物を Dia-ion HP40 および Toyopearl HW-40 を用いたカラムクロマトグラフィーで分画し、さらに PAQ カラムによる HPLC にて活性成分を単離した。なお、阻害活性の測定は、小腸モデル系である Coco-2 細胞系を用いて、フルクトースの取り込みにおよぼす阻害作用を測定した。

4. 研究成果

(1) フルクトース過剰摂取に起因した腸内細菌叢の変化に関する研究

5 週齢のオス KK-A^y マウスに標準食 (スターチ食)、高スクロース食、高脂肪食を摂取させ 8 週間飼育した。その結果、体重増加量は高脂肪食で標準食に比べて有意に高値を示した。高スクロース食でも増加傾向は見られたが、標準食との間に統計的有意差はなかった。一方で、肝臓重量は、高スクロース食で有意な増加が見られた。次に、肝臓 TAG 量を調べると、高スクロース食、高脂肪食で有意に増加していた。さらに、肝臓障害の指標である血清 ALT 活性を調べると、高スクロース食で有意な上昇が見られた。したがって、高スクロース食では脂肪肝から肝臓障害が起こっていることが示された。そこで、脂肪肝、肝臓障害発症に腸内細菌叢が関係しているかどうか、盲腸内容物について検討した。その結果、高スクロース食では、高脂肪食と同様に、酪酸の生成量が低下しており、また *Bifidobacterium* の減少が観察された。したがって、高スクロース食でも高脂肪食の場合と同様に腸内細菌叢の変化が脂肪肝さらに肝臓障害の原因になっている可能性が示された。

次に、標準食、高グルコース食、高フルクトース食、高スクロース食を与え、KK-A^y マウスを 4 週間飼育し、同様に腸内細菌叢に関する検討を行った。その結果、高フルクトース食では高スクロース食同様に酪酸の生成量が低下し、*Bifidobacterium* の減少が観察されたが、高グルコース食ではこのような変化は見られなかった。したがって、フルクトースの過剰な摂取が腸内細菌叢に大きな変化を起こし、脂肪肝から肝臓障害を引き起こしていることが明らかになった。

(2) フルクトース吸収阻害作用を有する新規機能性食品素材の開発

新規フルクトース阻害作用を有する食品素材の探索

月桃、明日葉、オレンジフラワー、橙皮、春ウコン、甘草、ギムネバ葉、ヒソップ、バナバ葉、レモンバーム、月見草、オリーブ葉、五加皮根茎、グアバ葉、ブルーベリー、紅景天の各抽出物について、ラットを用いて腸管フルクトース吸収阻害活性を測定した。その結果、体重 1 kg 当たり 1 g 投与して、フルクトースの吸収を約 50% 阻害したのものとして、

バナバ葉、月見草、オリーブ葉、五加皮根茎、
グアバ葉を見いだした。

各種植物抽出物によるフルクトース過剰
摂取に起因した脂肪肝・肝臓障害抑制作用

腸管フルクトース吸収阻害活性が見いだ
された上記5種類の抽出物について、フルク
トース-グルコース食 (FG 食) にそれぞれ
1%添加した飼料を作製し、5週齢オスラット
を2週間飼育して肝臓 TAG 量におよぼす影
響を調べた。その結果、バナバ葉、オリーブ
葉、グアバ葉には有意な肝臓 TAG 蓄積抑制
作用が見られたが、他の2種類では有意な影
響は見られなかった。そこで有意な影響が見
られた3種類の抽出物について、ラットを5
週間飼育して、詳細について検討した。その
結果、これら3種の抽出物は、ユーカリ葉抽
出物と同様に、肝臓 TAG 量の有意な減少を
引き起こすとともに、脂肪酸合成に關与する
G6PDHおよびFASの誘導が明らかに抑制さ
れていた。また、肝臓におけるフルクトース
代謝に特異的な酵素であるTKの活性もバナ
バ葉抽出物以外では有意に低下していた。ま
た、精巢周辺脂肪組織重量および血清 ALT
活性も有意に低値であった。したがって、バ
ナバ葉、オリーブ葉、グアバ葉の抽出物は、
ユーカリ葉抽出物と同様に腸管フルクトース
吸収阻害作用を有しており、スクロースや
フルクトースの過剰な摂取に起因した肥満、
脂肪肝そして肝臓障害の予防に有用な食品
素材として期待される。

ユーカリ葉抽出物のフルクトース吸収阻
害剤の単離・同定

ユーカリ葉抽出物を各種クロマトグラフ
ィーにより分画し、腸管フルクトース吸収阻
害物質の単離を試みた。なお、腸管フルク
トース吸収阻害活性の測定は Caco-2 培養細胞
系を用いた。その結果、主要な活性成分を1
つ単離した。得られた化合物について NMR
でその構造を調べた結果、
エラジタンニンの1つである tellimagrandin
I であった。なお、本化合物の阻害活性 (IC₅₀
値) は 5 µg/mL であった。一方で、グルコー
スの取り込みは全く阻害しなかった。次に、
これまでにユーカリ葉抽出物から単離され
ている加水分解性タンニン (エラジタンニン、
ガロタンニン) について阻害活性を調べた。
その結果、tellimagrandin I と同レベルの阻
害活性が、tellimagrandin II、pedunculagin、
strictinin、casuarictin、1,3-digalloyl-4,6-
HHDP-glucose、oenothein B (以上、エラジ
タンニン)、pentagalloylglucose、1,2,3,6-
tetragalloylglucose、1,2,3-trigalloylglucose
(以上、ガロタンニン) に見られた (なお、
使用した加水分解性タンニンは松山大学薬
学部天倉教授から提供を受けた)。一方で、
これらの加水分解性タンニンのアグリコン
である ellagic acid、gallic acid や代表的なポ
リフェノール類である quercetin、epigallo-
catechin gallate にはほとんど阻害活性は見
られなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に
は下線)

[雑誌論文](計 2件)

杉本圭一郎、乾博、山内俊一：フルク
トースによるグリケーションが健康・美容
に与える影響とその予防 (ユーカリ葉ポ
リフェノール). フレグランスジャーナル
42, 25-32 (2014).

Sugimoto K, Yoshizawa K, Amako M,
Yoshimura M, Amakura Y, Harada N,
Yamaji R, Fujita T, Nakagawa K,
Hayashi S and Inui H: Hydrolyzable
tannins in the leaf extract of
Eucalyptus globulus suppress fructose
absorption in the Caco-2 cell line. *Anal.
Nutr. Metab.* **63**, 1628-1629 (2013).

[学会発表](計 1件)

尾崎桃子、杉本圭一郎、中川一弥、副島
友莉恵、熊谷有紗、高橋芳久、福里利夫、
山内俊一、庄條愛子、原田直樹、中野長
久、乾博、山地亮一：高スクロース食摂
取 KK-Ay マウスの腸内細菌叢と肝臓障害。
2013 年度日本農芸化学会大会 (仙台)
(2013.3.25)。

[図書](計 1件)

Sugimoto K, Inui, H and Yamanouchi
T: Assays of fructose in experimental
nutrition; in *Dietary Sugars:
Chemistry, Analysis, Function and
Effects (Food and Nutritional
Components in Focus)*; Preedy, V. R.
Ed.: pp. 464-483, Royal Society of
Chemistry, London, 2012.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

乾 博 (INUI Hiroshi)

大阪府立大学・総合リハビリテーション学
部・教授

研究者番号：20193568