

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：32648

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500998

研究課題名(和文) 茶ポリフェノールによる腸内細菌叢への影響評価と盲腸発酵代謝産物の解析

研究課題名(英文) Research on the effects of tea polyphenols on gut microbiota and biomarkers of colonic fermentation.

研究代表者

海野 知紀 (Unno, Tomonori)

東京家政学院大学・現代生活学部・准教授

研究者番号：90439753

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：緑茶に含まれるエピガロカテキンガレート(EGCG)をラットに混餌投与したとき、ラットの糞重量を増加させ、腸内細菌叢バランスを変化させた。一方、盲腸内容物の短鎖脂肪酸含量は減少したことから、EGCGは盲腸内発酵性に影響を及ぼすことが示唆された。さらに、高脂肪食負荷ラットの盲腸発酵性について緑茶抽出物と紅茶抽出物を比較したところ、高分子ポリフェノールを含む紅茶抽出物では盲腸内短鎖脂肪酸含量が増加したことから、ポリフェノール化合物の化学的特徴によって腸内細菌に及ぼす作用が異なることが推察された。

研究成果の概要(英文)：Dietary supplementation of (-)-epigallocatechin gallate (EGCG), a major component of green tea, increased in fecal output and modified the composition of gut microbiota in rats. EGCG significantly decreased the cecum levels of short chain fatty acids (SCFA), suggesting that it suppressed the microbial fermentation in the cecum. Treatment with black tea extract brought about increases in the SCFA levels in the cecum of rats fed a high fat diet as compared to green tea extract. Results indicated that chemical features of tea polyphenols may have a critical impact on the fermentation activity of gut microbiota.

研究分野：食品機能学

キーワード：ポリフェノール 腸内細菌 短鎖脂肪酸 茶

1. 研究開始当初の背景

(1) ポリフェノールの生体吸収性

ポリフェノールは野菜, 果実, 嗜好飲料等に含まれ, 近年ではその第三次機能(生体調節作用)が注目され, ポリフェノール化合物を強化した特定保健用食品等が上市されている。一方, ヒトにおけるポリフェノールの吸収率は, 緑茶に含まれる(-)-エピガロカテキンガレート(EGCG)でわずか0.1%程度とされており, 一般的にポリフェノールの生体利用率(バイオアバイラビリティ)は非常に限定的である。これを裏返すと, 経口摂取されたポリフェノール類の一部は小腸での吸収を免れ, 大腸へと到達することが考えられる。

(2) ポリフェノールの腸内細菌叢への作用

大腸に形成されている腸内細菌叢に対するポリフェノールの影響について検討した報告例は少ない。上述のEGCGは古くから抗菌作用を示すことが知られている。その意味では腸内細菌叢への作用も示唆されるが, 菌叢に対する影響を生体レベルで評価した報告は見当たらない。一方, 我々の実施した先行研究において, EGCGを含有する飼料をラットに摂取させたところ, デンプン排泄量が有意に増加し, 盲腸内容物の重量が増加するという結果が得られた。このことから, カテキン類は食餌性デンプンの消化を抑制し, 吸収を免れた食餌性デンプンは大腸内へと流入し, 腸内細菌の発酵性に影響を与える可能性が推察された。

2. 研究の目的

(1) EGCGのラット腸内細菌叢に及ぼす影響

日本人が日常的に摂取する緑茶には没食子酸エステル型のEGCGや遊離型のEGCが含まれており, 一般的に没食子酸エステル型のカテキン種に強い抗菌作用が報告されていることから, EGCGの腸内細菌叢に及ぼす影響を観察することとした。具体的には, EGCGを混餌した飼料を実験動物に摂取させ, 定期的に糞を回収し, Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP)解析によって腸内細菌分類群の変化について比較を行った。また, 解剖時に摘出した盲腸内容物中の短鎖脂肪酸含有量と, エネルギー栄養素(炭水化物, タンパク質, 脂質)の糞中排泄量からEGCGの腸内発酵性への影響を考察した。

(2) 高分子ポリフェノールのラット腸内細菌叢に及ぼす影響

古くから高分子ポリフェノールの摂取は便秘を誘発するとも言われている。しかし, それらを明確に説明するエビデンスは乏しい。本研究では, いわゆる発酵茶として理解されている紅茶抽出物中のポリフェノールの影響を検討した。紅茶抽出物にはカテキン類が重合した高分子ポリフェノール(テアフラビン, テアルビジン等)を含むことか

ら, これらの分子構造的な特徴について考察するため, 緑茶抽出物(カテキン類を高含有するエキスを作成)と紅茶抽出物(高分子ポリフェノールを高含有するエキスを作成)を実験動物に食餌投与し, 上記2.(1)と同様に, 糞および盲腸の分析をもとに, 高分子化したポリフェノールの影響を評価した。

3. 研究の方法

(1) EGCGのラット腸内細菌叢に及ぼす影響 動物実験

4週齢のウイスター系雄ラットを5連のステンレスケージにて, 1週間, 市販の固形飼料(MF, オリエンタル酵母株式会社)を用いて予備飼育した。予備飼育終了時の体重をもとに, ランダムに3群(コントロール食群, 0.3%EGCG群, 0.6%EGCG群)に分け, 4週間飼育した。コントロール食群はAIN-76配合を一部改変した。各EGCG群におけるEGCGの添加分はセルロースを減じることに調整した。飼料と水は自由摂取とし, 飼育期間中, 定期的に体重と摂餌量を測定した。各ラットが排出した糞を回収し, 乾燥後, 1週間当たりの糞重量を求めた。飼育終了日, 麻酔下で開腹し, 心臓より採血した。その後, 脂肪組織, 盲腸内容物を摘出し, それぞれの湿重量を測定した。

腸内細菌叢の解析

〔全菌数の比較〕ラット糞便をGTC緩衝液に懸濁し, これをジルコニアビーズにより破砕した後, この懸濁液から自動核酸抽出装置にてDNAを抽出した。標識プライマーとして341fと534rのプライマーを用いてDNA増幅を行い(リアルタイムPCR), 鋳型DNAの量(コピー数)から各群間での全菌数を比較した。

〔腸内細菌叢の解析〕標識プライマーとして516fを用いてDNA増幅を行い, 16S rRNA遺伝子を制限酵素BsiIで処理した。フラグメント解析はABI PRISM 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems)で行い, 解析ソフトウェアはGene mapper (Applied Biosystems)を用いた。Operational Taxonomic Unit (OTU)を求め, 総面積ピークに対する各OTUのピーク面積の比率を求めた。

盲腸内容物の短鎖脂肪酸の測定

盲腸内容物を蒸留水で希釈して, ホモジネートを作成した。盲腸内容物のホモジネート中の短鎖脂肪酸は, ラベル化試薬FA(株)ワイエムシー)を用いてジニトロフェニルヒドラジン誘導体化し, これを有機溶媒(ジエチルエーテル, ヘキサン)で抽出・精製した。短鎖脂肪酸(酢酸, プロピオン酸, 酪酸)は高速液体クロマトグラフィーにて分離・定量した。

糞中エネルギー栄養素の測定

〔糞中糖質排泄量の測定〕飼育4週目に得られた乾燥糞を用い, 糞中の糖質をジメチルスルホキシドにて抽出した。抽出液の一部を

ねじ付試験管に移し、80 mM リン酸緩衝液 (pH6.3) 1.0 mL にて希釈後、熱耐性 α -アミラーゼ、プロテアーゼ、アミログルコシダーゼ (いずれも和光純薬工業株) で順次加水分解した。遊離したグルコースを市販のグルコース測定キット (グルコースオキシダーゼ法、和光純薬工業株) を用いて測定した。得られたグルコース量に 0.9 を乗じて、糞中デンプン換算値とした。

〔糞中タンパク質排泄量の測定〕 飼育 4 週目に得られた乾燥糞の一部をケルダールガラスコに入れ、濃硫酸を用いてアンモニアへと分解した。アンモニアを水蒸気蒸留により 4% ホウ酸に回収し、これを 0.1 mol/L の硫酸溶液で滴定した。得られた窒素量から、窒素タンパク質換算係数 (6.25) を乗じ、糞中に含まれるタンパク質の含有量を算出した。

統計解析

コントロールと各 EGCG 群の有意差検定は、一元配置分散分析の後、Dunnett 法を用いて行った。有意水準は 5% 未満とした。

(2) 高脂肪負荷ラットの腸内細菌叢に及ぼす緑茶抽出物と紅茶抽出物の比較

緑茶抽出物と紅茶抽出物の作成

緑茶 (番茶) と紅茶 (アッサム種) の茶葉を用い、50% エタノールで昼夜抽出した。抽出液は濾過後、減圧濃縮し、凍結乾燥にて粉末を得た。緑茶抽出物と紅茶抽出物の総カテキン量はそれぞれ 30.1%、3.6% であり、カフェイン量は 6.1%、7.8% であった。また、総ポリフェノールは、それぞれ 41.7%、38.0% であった。

動物実験

4 週齢のウイスター系雄ラットを、1 週間予備飼育した後、ランダムに 4 群 (コントロール食群、高脂肪食群、緑茶群、紅茶群) に分け、3 週間飼育した。コントロール食は AIN-76 配合を改変した組成である。高脂肪食は 20% ラードを含む食餌であり (コントロール群におけるデンプンをラードに置き換えた)、緑茶食、紅茶食は、高脂肪食に緑茶抽出物、紅茶抽出物をそれぞれ 2.5% 混餌した。茶抽出物の添加分はセルロースを減じることにて調整した。以降は、前述の (1) のと同様に実施した。

腸内細菌叢の解析

前述の (1) のと同様に実施した。

盲腸内容物の短鎖脂肪酸の測定

前述の (1) のと同様に実施した。

糞中エネルギー栄養素の測定

前述の (1) のと同様に実施した。

統計解析

各試験群間での有意差検定は、一元配置分散分析の後、Tukey の多重比較検定法によって行った。有意水準は 5% 未満とした。

(3) 緑茶抽出物と紅茶抽出物の α -アミラーゼ阻害作用

可溶性デンプン溶液にブタ膵 α -アミラーゼ

を作用させて遊離したマルトースを HPLC にて定量した。このとき、様々な濃度の緑茶抽出物と紅茶抽出物を添加し、マルトース生成抑制量をもって、各サンプルの α -アミラーゼ阻害率を算出した。

4. 研究成果

(1) EGCG の腸内細菌叢に及ぼす影響

体重増加量、摂餌量、脂肪組織重量

飼育 4 週間でのコントロール群、0.3% EGCG 群、0.6% EGCG 群における摂餌量、体重増加量の群間有意差は認められなかった。解剖時の脂肪組織重量 (腸間膜周囲、腎臓周囲、睾丸周囲) の合計は、コントロール食群と比較して 0.6% EGCG 群で有意に低値を示し、既報の通り、EGCG による体脂肪低減作用が再現された。一方、盲腸内容物の重量は、0.6% EGCG 群で有意に増加した。

糖質、タンパク質の糞中排泄

飼育 4 週目に回収した 0.6% EGCG 群の乾燥糞重量は、コントロール群と比較して有意に増加した。また、1 週間当たりの糖質とタンパク質の糞中排泄量は、糖質、タンパク質とも EGCG 配合量依存的に増加しており、0.6% EGCG 群ではコントロール食群に比べて見かけの消化吸収率が有意に低下した。EGCG は糖質消化酵素 (α -アミラーゼ) の阻害作用を有することが報告されており、in vivo の条件下でも食餌性デンプンの消化を抑制することが明らかとなった。一方、糞中にタンパク質排泄量が増えた要因は、EGCG が直接的に食餌性タンパク質の消化阻害したためか、あるいは、消化液として外分泌される内因性タンパク質 (プロテアーゼ等) を減じたためかは、現時点で不明である。

腸内細菌叢

リアルタイム PCR にて求めた全細菌のコピー数は、EGCG 添加による有意な影響は観察されなかった (表 1)。

表 1. 糞中腸内細菌数の推定 (コピー数)

試験群	Log ₁₀ copies
コントロール	12.87 ± 0.25
0.3% EGCG	12.78 ± 0.05
0.6% EGCG	12.76 ± 0.14

平均値 ± SD (各群 5 匹について測定)

飼育 4 週目の糞中腸内細菌数として

T-RFLP 法で測定した腸内細菌叢 (全体に占める割合) を図 1 に示した。Clostridium 属は EGCG の配合量依存的に減少し、0.6% EGCG 群ではほとんど検出されなかった。特に、Clostridium subcluster XIVA の減少が著しかった。その一方、Bacteroides 属はコントロール群と比較して EGCG の食餌添加群で増加傾向を示した。

盲腸内短鎖脂肪酸

ラット 1 匹当たり盲腸内容物に含有する酢酸、酪酸は、コントロール群と比較して 0.6% EGCG 群で有意に低い値を示した。プロピオン

酸は有意な影響は観察されなかった。

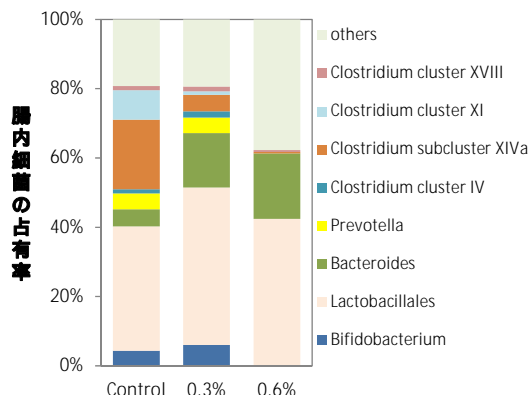


図1 .EGCGによるラット腸内細菌叢の変化

(2) 高脂肪負荷ラットの腸内細菌叢に及ぼす緑茶抽出物と紅茶抽出物の比較

体重増加量, 摂餌量, 脂肪組織重量

緑茶抽出物と紅茶抽出物の添加は, 食餌摂取量を低下させた。紅茶群においては, 高脂肪食群と比較して体重増加量も減少した。脂肪組織重量は, コントロール食群と比較して高脂肪食群で増加したが, 緑茶群と紅茶群の両群でコントロール群のレベルまで低下した。

糖質・タンパク質の糞中排泄

飼育3週目に回収した糞便に含まれる糖質量は, 高脂肪食群と紅茶群で有意差が認められた。また, タンパク質の排泄量は, 高脂肪食群と比較して, 緑茶群と紅茶群の両群とも有意に増加した。このことより, 紅茶抽出物は緑茶抽出物よりも *in vivo* の条件下で食餌性糖質の消化吸收を抑制する効果が高いことが示唆された。

腸内細菌叢

T-RFLP 法を用いてラット糞便の腸内細菌叢を解析した。緑茶群の糞便中からは *Bifidobacterium* が検出されず, *Clostridium* の顕著な減少が確認され, 上述の EGCG 添加での動物実験と同様の結果が得られた。この結果は, カテキン類が有する選択的な抗菌作用によるものと推察された。また, コントロール食群と比較して, 高脂肪食群では *Bacteroides* の占有率が有意に低下したが, 緑茶群, 紅茶群では高脂肪食群と比較して有意な増加を示し, 特に紅茶群ではコントロール食群以上の占有率であった。

盲腸内短鎖脂肪酸

高脂肪食群のラット盲腸内容物の酢酸, プロピオン酸含有量はコントロール食群と比較して有意に低下した(図2)。また, その高脂肪食群の盲腸内容物の酢酸含量と比べ, 緑茶群でさらに低値を示したが, 一転, 紅茶群では増加してコントロール食群のレベルに戻った。

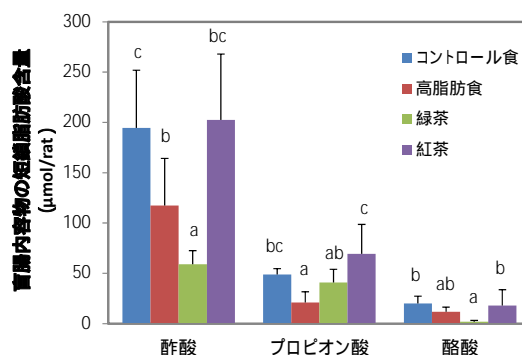


図2. 茶抽出物のラットの盲腸短鎖脂肪酸含有量に及ぼす影響 異なるアルファベットの場合は統計的有意差があることを示す (p<0.05)

(3) 緑茶抽出物と紅茶抽出物の α -アミラーゼ阻害作用

緑茶抽出物, 紅茶抽出物ともに *in vitro* でのブタ膵アミラーゼ阻害活性を示したが, 緑茶抽出物よりも紅茶抽出物の方が低濃度で強い阻害活性を示した(図3)。緑茶抽出物と紅茶抽出物ではほぼ同等のポリフェノール含量を有していたが, 高分子ポリフェノールであることで阻害作用が増強する可能性が示唆された。

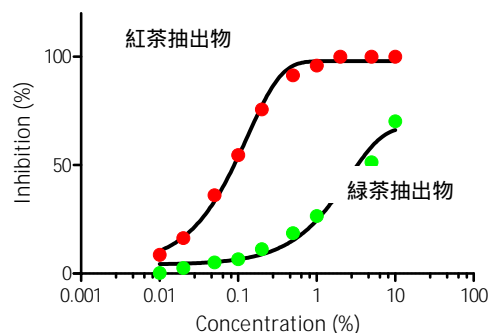


図3. 茶抽出物の α -アミラーゼ阻害効果

(4) 今後の課題

EGCG は, ラット腸内細菌叢に影響を与えることが明らかとなった。一方, 盲腸短鎖脂肪酸含有量は有意に減少したことから, EGCG は腸内細菌の発酵性を低下させる可能性が推察された。しかしながら, 高分子ポリフェノールを含む紅茶抽出物の投与は, 緑茶抽出物と比較して盲腸内短鎖脂肪酸含量を増加させた。ポリフェノール化合物の構造によって腸内細菌叢への作用は異なることが考えられた。

Bacteroides と *Firmicutes* の比率は, 肥満や糖尿病の進展と関連性があることが指摘されている。本研究では, EGCG または茶抽出物の投与によって確認された体脂肪低減作用が腸内細菌叢の変化, さらには盲腸発酵性の指標として求めた短鎖脂肪酸による結果であるのかは明らかでない。今後は腸内細菌叢バランスとエネルギー出納の両面から詳細に評価する必要がある。さらには, 高分子

ポリフェノールの特徴を明確にして食事因子としての有効性を評価していくことが課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Tomonori Unno, Mina Sakuma, Shiho Mitsuhashi. Effect of dietary supplementation of (-)-epigallocatechin gallate on gut microbiota and biomarkers of colonic fermentation in rats. Journal of Nutritional Science and Vitaminology. 査読有, vol.60, 2014, pp.213-219.

<http://doi.org/10.3177/jnsv.60.213>

〔学会発表〕(計4件)

Tomonori Unno, Kaori Ono, Noriko Komagome, Fusako Yamasuge, Yumi Mori. Effects of tea extracts on Fecal microbiota in rats fed a high-fat diet. 12th Asian Congress of Nutrition. 2015年5月16日. パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

海野知紀, 小原奈々, 種子島亜希, 三好美緑. ラットにおけるヘスペレチンとヘスペリジンの盲腸発酵代謝産物に及ぼす影響. 日本栄養・食糧学会. 2014年5月31日. 酪農学園大学(北海道・江別市)

Tomonori Unno, Sakuma Mina, Shiho Mitsuhashi. Modulatory activity of (-)-epigallocatechin gallate on rat fecal microbiota profile. The 5th International Conference on O-CHA (Tea) Culture and Science. 2013年11月7日. 静岡県コンベンションアーツセンター「グランシップ」(静岡県・静岡市)

海野知紀, 佐久間未奈, 三橋志保. ラットの腸内細菌叢に及ぼすエピガロカテキンガレート(EGCG)の影響. 日本栄養・食糧学会. 2013年5月25日. 名古屋大学(愛知県・名古屋市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

海野 知紀 (UNNO Tomonori)

東京家政学院大学・現代生活学部・准教授

研究者番号: 90439753