

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：32648

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K00850

研究課題名(和文)短鎖脂肪酸産生を指標としたフラボノイド化合物の腸内発酵性に及ぼす影響解析

研究課題名(英文)Effect of dietary flavonoids on cecal levels of short-chain fatty acids

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・教授

研究者番号：90439753

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)：腸内細菌が産生する短鎖脂肪酸は、宿主のエネルギー恒常性に重要であるとされている。本研究では、代表的な配糖体フラボノイドであるヘスペリジンとそのアグリコンであるヘスペレチンを用いて、盲腸内容物中の短鎖脂肪酸含量に及ぼす影響を検討した。ヘスペレチンは盲腸内容物中の短鎖脂肪酸含量を有意に上昇させたが、ヘスペリジンは変化しなかった。また、ヘスペレチンはデンプン消化の抑制効果を有したことから、未消化のデンプンが大腸に到達し、短鎖脂肪酸産生の基質として利用されたのではないかと推察された。ヘスペレチンは腸内細菌叢に変化をもたらし、特にClostridium subcluster XIVaの占有率を低下させた。

研究成果の概要(英文)：It is recognized that short-chain fatty acids (SCFA) produced by gut bacteria play important roles in energy homeostasis for the host. This study aimed to investigate the effects of hesperidin and its aglycone hesperetin on cecal SCFA in rats. Results demonstrated that hesperetin, but not hesperidin, significantly increased the SCFA pool of cecal digesta. Hesperetin limited starch digestion, suggesting that parts of undigested starch were utilized to produce SCFA by microbial fermentation in the large intestine. Treatment of diet with hesperetin significantly decreased the relative abundance of Clostridium subcluster XIVa in feces.

研究分野：食品栄養学

キーワード：フラボノイド 短鎖脂肪酸 腸内細菌

1. 研究開始当初の背景

大腸内には 100 種類以上、100 兆個以上の腸内細菌が生息しているとされており、その菌叢バランスの変化が肥満や糖尿病などの発症に関連すると考えられている。菌叢バランスの変化は、それらが産生する様々な代謝産物にも影響する。特定の腸内細菌によって産生される短鎖脂肪酸 (SCFA) は、宿主のエネルギー源として利用されるとともに、GPR41 (G タンパク質共役型受容体 41) を介して交感神経を活性化させ、宿主のエネルギー消費を促進するとの報告もある。

フラボノイド類は様々な植物性食品に含まれ、近年ではその三次 (生体調節) 機能に注目が集まっている。フラボノイド化合物の吸収率は一般的に低く、摂取したフラボノイド類の一部は大腸へと到達し、大腸に生息する腸内細菌と直接的に接する機会がもたらされる。フラボノイド骨格を有する化合物は、アグリコンとして存在するもの、配糖体として存在するものに分類される。しかし、フラボノイド化合物の腸内細菌叢への作用並びに盲腸発酵性を論じる上で、構造的性質にフォーカスした生体レベルでの報告例はほとんどない。

2. 研究の目的

本研究では、フラボノイド化合物の化学構造が腸内細菌叢並びに盲腸発酵性に対して異なる影響をもたらすか否かを解明することを目的とした。具体的には、日常的に摂取されている代表的なフラボノイド化合物として、柑橘系果物に含まれるヘスペレチン (アグリコン) とヘスペリジン (ヘスペレチンのルチノース配糖体) (図 1)、玉ねぎ等に含まれるケルセチン (アグリコン) とダットン蕎麦に含まれるルチン (ケルセチンのルチノース配糖体) を用い、実験動物による検討を行った。これらを食餌として摂取させ、糞便サンプルを回収し、腸内細菌分類群に及ぼす影響の相对比较を行った。さらに、解剖時に摘出した盲腸内容物に存在する SCFA を測定し、アグリコンと配糖体に関する構造活性相関を中心に、腸内細菌の発酵性を考察した。さらに、SCFA の産生にはその基質となりうる物質が大腸へと供給される必要があることから、糞中に検出されるエネルギー産生栄養素 (特に糖質) について考察を加えた。

3. 研究の方法

(1) ヘスペレチン (HT) とヘスペリジン (HD) のラット腸内細菌叢並びに盲腸発酵性に及ぼす影響

動物実験

4 週齢のウイスター系雄ラットを、市販の固形飼料を用いて 1 週間予備飼育した。予備飼育終了時の体重をもとに、ランダムに 3 群 (コントロール群, 0.5% HT 群, 1.0% HD 群) に分け、3 週間飼育した (n=7)。コントロール食は AIN-76 配合を一部改変した。HT 及び

HD の添加分はセルロースを減じることによって調整した。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、1 週間当たりの乾燥糞重量を求めた。飼育終了日、腹部動脈より採血し、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。なお、HT と HD はほぼ等モルとなるように食餌に配合した。

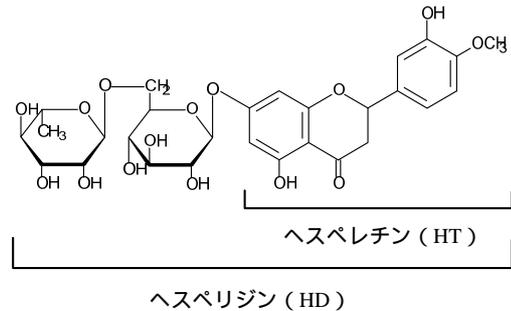


図 1 ヘスペレチン (HT) とヘスペリジン (HD) の化学構造

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碎した後、DNA を抽出した。341f と 534r の標識プライマーを用いてリアルタイム PCR による DNA 増幅を行い、各群の鋳型 DNA の量 (コピー数) を比較した。

〔腸内細菌叢の解析〕 糞中の菌叢解析は、terminal restriction fragment length polymorphism 法 (T-RFLP 法) に基づいて実施した。6-FAM 蛍光標識されたプライマー 516f (5-TGCCAGCAGCCGCGTA-3) と 1510r (5-GGTTACCTTGTTACGACTT-3) を用いて 16S rRNA 遺伝子を増幅させ、その増幅産物を制限酵素 *Bs*II で切断した後、ABI PRISM 3130xl DNA シーケンサー (アプライドバイオシステムズ株) を用いて末端断片の蛍光強度をモニターした。出現した末端断片のピークを Operational Taxonomic Unit (OTU) として割り当て、全ピークの総面積に対する各 OTU のピーク面積の比から、OTU と細菌系統分類群との対応関係をもとに、主要な腸内細菌分類群の構成割合を推定した。

盲腸内容物中の SCFA の測定

盲腸内容物は蒸留水で希釈して、ホモジネートを作成した。ホモジネート中の SCFA 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。SCFA (酢酸、プロピオン酸、酪酸) は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) にて分離・定量した。

糞中デンプンの測定

本飼育 3 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 (DMSO) 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、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 HT, HD の測定

本飼育 3 週目に得られた乾燥糞を用い、DMSO とメタノールの混液によって、糞中 HT と HD を抽出した。抽出液は 0.45 μ m メンブランフィルターにてろ過後、HPLC によって定量した。

-アミラーゼ阻害作用

可溶性デンプン溶液にブタ由来のパンクレアチンを作用させ、遊離したマルトースを HPLC にて定量した。このとき、反応液に様々な濃度の HT と HD を添加し、マルトース生成量の減少をもって -アミラーゼ阻害率を算出した。

統計解析

群間の有意差検定は、一元配置分散分析の後、Tukey の多重比較検定法を用いた。有意水準は 5%未満とした。

(2) ケルセチンとルチンのラット腸内細菌叢並びに盲腸発酵性に及ぼす影響

動物実験

4 週齢のウイスター系雄ラットを、1 週間予備飼育した後、ランダムに 3 群（コントロール群、0.5%ケルセチン群、1.0%ルチン群）に分け、3 週間飼育した（n=6）。コントロール食は AIN-76 配合を一部改変した。ケルセチン、ルチン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(1)のと同様に実施した。

盲腸内容物中の SCFA の測定

前述(1)のと同様に実施した。

糞中デンプンの測定

前述(1)のと同様に実施した。

統計解析

前述(1)のと同様に実施した。

(3) 各種フラボノイド化合物のラット盲腸内容物の湿重量に及ぼす影響

動物実験

4 週齢のウイスター系雄ラットを、1 週間予備飼育した後、ランダムに 7 群（コントロール群、0.5%ケルセチン群、0.5%ヘスペレチン群、0.45%ナリンゲニン群、0.45%アピゲニン群、0.42%クリシン群、0.42%ダイゼイン群）に分け、3 週間飼育した。コントロール食は AIN-76 配合を一部改変した。これらのフラボノイド化合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。

統計解析

コントロール群と各フラボノイド群にお

ける盲腸内容物の湿重量の比較は、Kruskal-Wallis test の後、Dunn's multiple comparison test によって求めた。

4. 研究成果

(1) HT と HD のラット腸内細菌叢並びに盲腸発酵性に及ぼす影響

体重増加量、摂餌量、脂肪組織重量

3 週間の飼育期間におけるコントロール群、0.5%HT 群、1.0%HD 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群と比較して 0.5%HT 群で有意に低下した（ $p<0.05$ ）。

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、HT 及び HD による有意な影響は観察されなかった（データは示さない）。

T-RFLP 法で腸内細菌叢（全体に占める割合）を測定した結果、コントロール群と比較して HT 群の糞中 *Clostridium* subcluster XIVa が有意に低下した（図 2）。*Clostridium* subcluster XIVa は高脂肪食を負荷したマウスの糞中で高い占有率を示すという報告があることから、HT がこの占有率を低下させたことにより前述の脂肪組織重量の低減に影響した可能性が示唆された。この効果は HD 群では認められず、腸内細菌叢の変化にはアグリコンである HT が重要であることが考察された。一方、*Clostridium* cluster IV、*Clostridium* cluster XVIII はいずれもコントロール群と比較して HT 群で有意に増加した（データは示さない）。

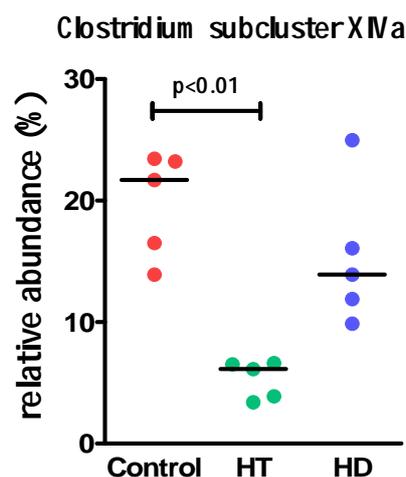


図2 ラット糞中 *Clostridium* subcluster XIVa の占有率に及ぼす 0.5%ヘスペレチン（HT）食の影響

盲腸内容物中の SCFA 含量

盲腸内容物の平均湿重量は、コントロール群が 2.2 ± 0.6 g, HT 群が 3.4 ± 0.9 g, HD 群が 2.7 ± 0.5 g であり、コントロール群と比較し

て HT 群で有意に高い値を示した ($p < 0.05$)。盲腸内容物中の SCFA 含量を図 3 に示した。ラット 1 匹当たりの盲腸内容物の酢酸、酪酸含量はいずれもコントロール群と比較して HT 群で有意に高く、酪酸は HT 群と HD 群の間にも有意な差が観察された (いずれも $p < 0.05$)。一方で、プロピオン酸含量には群間での有意差は認められなかった。これらの結果より、ラットの盲腸発酵に及ぼす化学構造的な関与として、アグリコン型である HT の方がその配糖体である HD よりも高いことが示唆された。

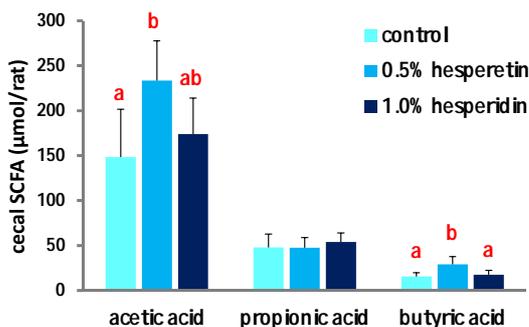


図 3 ラット盲腸内容物中の短鎖脂肪酸 (酢酸, プロピオン酸, 酪酸) 含量に及ぼすヘスペレチン (HT) 食の影響

糞中デンプン排泄

本飼育 3 週目に回収した糞中のデンプンを測定した結果、わずかながら糞中にもデンプンが排泄された。コントロール群, HT 群, HD 群の 1 週間当たりのデンプン排泄量はそれぞれ 65 ± 2 mg, 91 ± 36 mg, 61 ± 5 mg であり, HT 群はコントロール群, HD 群と比較して有意に高い値を示した ($p < 0.05$)。

糞中 HT, HD の排泄量

本飼育 3 週目に回収した糞中の HT と HD の含有量を測定した。HT 群は 1 週間当たりに 0.9 ± 0.3 mmol の HT が排泄され, HD 群は 0.4 ± 0.1 mmol の HD が排泄された。1 週間当たり 2.7 mmol の HT, HD をそれぞれの食餌より摂取したことから, 摂取量の 33%, 15% が直接糞中に排泄された。興味深いことに, HD 群では HT も 1.1 ± 0.6 mmol され, 腸内細菌でルチノース部分が加水分解され, アグリコンである HT がそのまま排泄されたのではないかと考えられた。

HT と HD の α -アミラーゼ阻害作用

HT と HD のブタ澱粉 α -アミラーゼ阻害作用を測定した。図 4 に示す通り, HD はほとんど α -アミラーゼ阻害作用を示さなかったのに対し, HT は濃度依存的な阻害効果を示した。HD 群に比較して, HT 群では糞中へのデンプン排泄量が多かったことから, α -アミラーゼ阻害を介して, 消化を免れた多くのデンプンが大腸へ届き, これが SCFA 産生の基質として利用されたのではないかと推察された。

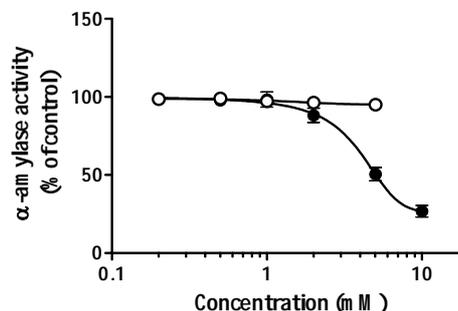


図 4 ヘスペレチン (HT: 黒丸) とヘスペリジン (HD: 白丸) の α -アミラーゼ阻害作用

(2) ケルセチンとルチンのラット腸内細菌叢並びに盲腸発酵性に及ぼす影響

体重増加量, 摂餌量, 脂肪組織重量

本飼育 3 週間における終体重, 食餌摂取量には群間有意差は認められなかった。一方, 体重 100 g あたりの脂肪組織重量 (腸間膜周囲, 睾丸周囲, 腎臓周囲の合計) は, コントロール群と比較して, ケルセチン群とルチン群で有意に低下した (それぞれ $p < 0.05$)。

腸内細菌叢

飼育 3 週目に回収した糞の乾燥重量には群間有意差は認められなかった。

リアルタイム PCR にて求めた全細菌のコピー数は, ケルセチン及びルチンによる有意な影響は観察されなかった。

T-RFLP 法によって求めた *Bifidobacterium* 属の占有率はコントロール群で低く, 6 匹中 3 匹で検出限界以下であった。また, ルチン群と比較して, ケルセチン群では *Clostridium* subcluster XIVa の占有率が有意に低下した (図 5)。

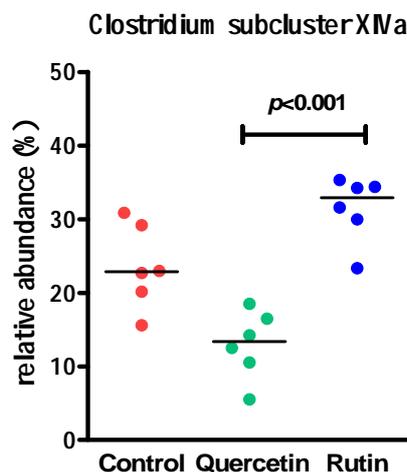


図 5 ラット糞中 *Clostridium* subcluster XIVa の占有率に及ぼす 0.5% ケルセチン (Quercetin) 食の影響

盲腸内容物中の SCFA 含量

盲腸内容物の平均湿重量は, コントロール群が 2.3 ± 0.6 g, ケルセチン群が 3.1 ± 0.5 g,

ルチン群が 3.6 ± 0.6 g であり、体重 100g 当たりの湿重量で換算した場合、コントロール群と比べ、ルチン群で有意に上昇した ($p < 0.05$)。盲腸内容物中の SCFA 含量 (酢酸、プロピオン酸、酪酸の合計) を図 6 に示した。ラット 1 匹当たりの盲腸内容物中 SCFA 含量はコントロール群と比較してケルセチン群で有意に高かった (いずれも $p < 0.05$)。ルチン群でも高い傾向を示したが、有意差には届かなかった。

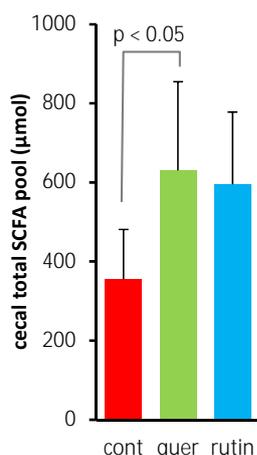


図 6 ラット盲腸内容物中の短鎖脂肪酸 (酢酸, プロピオン酸, 酪酸の合計) 含量に及ぼすケルセチン(quer), ルチン(rutin)の影響

(3) 各種フラボノイド化合物のラット盲腸内容物の湿重量に及ぼす影響

盲腸内容物の湿重量

等モルとなるように各種フラボノイド化合物を配合し、ラットに 3 週間与えた。飼育終了時に得られた盲腸内容物の湿重量を図 7 に示した。コントロール群と比較してヘスペレチン群で有意に増加した ($p < 0.01$)。また、大豆イソフラボン的一种であるダイゼインは盲腸内容物重量の顕著な増加を示した ($p < 0.001$)。その他のフラボノイド化合物は有意差は観察されなかった。

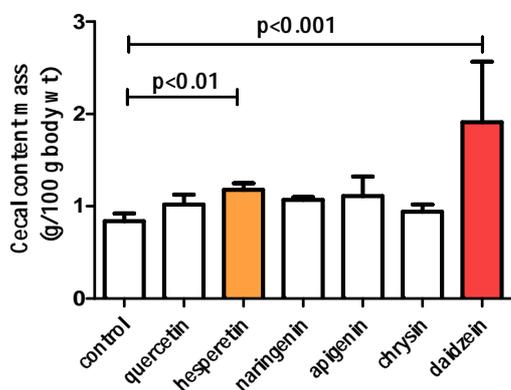


図 7 盲腸内容物湿重量に及ぼす各種フラボノイド化合物の影響

(4) 考察

本研究は、フラバノン化合物のヘスペレチンとヘスペリジン、フラバノール化合物のケルセチンとルチンを用いて、ラットの腸内細菌叢と盲腸内容物中の SCFA 含量に及ぼす影響を検討した。フラボノイドアグリコンであるヘスペレチンとケルセチンとともに、*Clostridium* subcluster XIVa の占有率を低下させた。ヘスペレチンとケルセチンは腸内細菌に対して直接的に作用し、腸内細菌叢の構成を変化させたのではないかと推察された。また、*Clostridium* subcluster XIVa に属する菌種の中にはフラボノイド構造の環分解をもたらす、低分子量のフェノール性化合物へと異化代謝するものが含まれている。このことは、長期にフラボノイド化合物を投与すると、*Clostridium* subcluster XIVa のさらなる占有率の低下をもたらす、フラボノイド化合物のフェノール性化合物への異化速度に影響するかもしれないと考えられた。

ヘスペレチンの摂取は盲腸内容物の湿重量を増加させたのに対し、ケルセチンはそのような作用を有していなかった。一方で、配糖体のルチンは盲腸内容物の湿重量を増加させたが、ヘスペリジンは作用を有していなかった。盲腸内容物の湿重量の増加作用はフラボノイド化合物の水への溶解度が関与している可能性が考えられた。つまり、水への溶解度が高いヘスペレチンとルチンは盲腸内容物重量を増加させ、水への溶解度が低いヘスペリジンとケルセチンはそのような作用を有さないのではないかと推測された。今後は盲腸内容物の湿重量がヘスペレチンやルチンによってどのような作用により増加がもたらされたかというメカニズムの検証が必要である。

盲腸内容物中の SCFA はヘスペレチンとケルセチンによって有意に増加したが、それらの配糖体であるヘスペリジンとルチンには作用が認められなかった。ルチンは盲腸内容物の湿重量を増加させたのに対し、有意な影響が認められなかったことから、盲腸内容物の湿重量の増加と SCFA 含量には正の相関は認められないと考えられた。なお、ヘスペレチンは α -アミラーゼ阻害作用を有していたが、ケルセチンはその水への溶解度が低いことから明確な阻害効果を得ることができなかった。今後、SCFA の基質となる炭水化物の大腸への供給の程度を検討する必要がある。

最後に 6 種類のフラボノイド化合物を等モルとなるように混餌投与した結果、ダイゼインに顕著な盲腸内容物の湿重量の増加作用が確認された。ダイゼインも腸内細菌によって異化代謝を受けることが報告されている。ダイゼインが直接腸内細菌に作用し、菌叢変化をもたらす可能性についての興味もたれる。

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)

Tomonori Unno, Naomi Osakabe. Green tea extract and black tea extract differentially influence cecal levels of short-chain fatty acids in rats. Food Science & Nutrition. 査読有 (2018). DOI: 0.1002/fsn3.607.

Tomonori Unno, Takayoshi Hisada, Shunsuke Takahashi. Hesperetin modifies the composition of fecal microbiota and increases cecal levels of short-chain fatty acids in rats. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 査読有, 63 (2015) 7952-7957.

DOI:10.1021/acs.jafc.5b02649

[学会発表](計3件)

海野 知紀, 鈴木 智美, 添野 佳純, 橋爪 佑佳. ラット盲腸内容物中の短鎖脂肪酸量に及ぼす緑茶抽出物と紅茶抽出物の影響比較. 日本栄養・食糧学会. 2017年

海野 知紀. ヘスペレチンがラット腸内細菌叢と盲腸短鎖脂肪酸含量に及ぼす影響. 糖転移ヘスペリジン・ビタミンP研究会. 2016年

海野 知紀, 笹木 美里, 西村 あゆみ, 伊藤 有未. ラットの腸内細菌叢と盲腸短鎖脂肪酸含量に及ぼすケルセチン, ルチンの影響. 日本ポリフェノール学会. 2016年

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・教授

研究者番号: 90439753

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号:

(4)研究協力者

()