

令和元年6月22日現在

機関番号：25301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08300

研究課題名(和文) エラジタンニンが腸内フローラのバランス改善に及ぼす影響に関する研究

研究課題名(英文) Balance improvement of intestinal microflora by ellagitannins

研究代表者

伊東 秀之 (Hideyuki, Ito)

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：腸内有用菌の*Bifidobacterium longum* 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。整腸薬のゲンノショウコについて、短時間および長時間煎液中に含まれるエラジタンニンについて定量NMR法により、一斉定量法を新たに開発し、産地別、抽出方法の違いによる成分の一斉定量にも応用できることが分かった。さらに、高脂肪食により腸内細菌叢を乱したマウスにゲンノショウコ短時間および長時間煎液を投与14日後の腸内細菌叢およびIgA産生能を評価した結果、大きな改善効果は見られなかったが、今後、投与期間を延長し、さらに効果を検討する必要があると考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エラジタンニン抗含有素材のザクロアリルおよびゲンノショウコには、*in vitro*実験系で腸内有用菌に対する生存作用を有することを見出した。今回の実験モデルマウスを使用した*in vivo*実験系では、特にゲンノショウコエキスには腸内環境改善作用は見られなかったが、投与期間の延長など実験デザインを検討することにより、効果を実証できる余地があると考えており、実証できれば、経験的に用いられてきた民間薬の整腸作用解明につながると思われる。一方、本研究により開発したqNMR法による素材中のエラジタンニンの一斉分析法は、各種生薬の品質評価にも有効な分析法で、学術的および社会的意義は高いと考えている。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effect of polyphenol-rich plants on survival of beneficial intestinal bacteria (*Bifidobacterium longum*) to improve the intestinal microbial balance. The pomegranate aril extract showed the survival effect on *B. longum*. Quantitative nuclear magnetic resonance (qNMR) is a recently developed method for accurate quantification of natural compounds in extracts. The simultaneous quantification of ellagitannins and the related polyphenols of *Geranium thunbergii* was studied using qNMR after a short-term and long-term decoction. Our data indicated that the qNMR method can be used to perform accurate, simple, and rapid analysis of target analyte content. Furthermore, we evaluated intestinal flora balance and IgA production after administration of *G. thunbergii* for a short- and long-term decoction to mice compared to high fat diet. These results showed no significant improvement effect. It is necessary to extend the administration period to clarify the positive effects.

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

近年、薬用植物や食品に含まれる多種多様なポリフェノールの化学構造の解明に伴い、天然ポリフェノールの多彩な機能性も明らかになってきている。しかし多くの薬用植物や食品に含まれるタンニン、抗酸化活性を起因とする多様な機能性が知られてきているが、その詳細な生体利用性に関してはほとんど報告されていなかった。申請者らは、タンニンの中でも geraniin をはじめとするエラジタンニンは、ほとんど未変化体では吸収されず、腸内細菌によって代謝、分解され、いくつかの代謝産物として吸収されることを明らかにしてきた。1) さらにその主要代謝産物が植物体内に存在するエラジタンニンの分子形（インタクト）よりも強い抗酸化活性および抗炎症活性を有することも報告している。これらの結果、エラジタンニンの代謝産物は分子内共通のビフェニル構造を有するアシル基（hexahydroxydiphenyl 基）から分解、生成されるため、エラジタンニンの機能性は、どのインタクトからも共通に生成する代謝産物に集約されると考えられる。しかし、実際様々なタンニン高含有素材において、その機能性は多彩で、さらに単離されたタンニン個々の動物実験による機能効果も、タンニンの分子形によって異なる。これらを総合すると、エラジタンニンは代謝、吸収される前に、消化管内でインタクトのまま何らかのシグナルを介して全身への機能発現に関与している可能性が示唆される。

Geraniin を多量含むゲンノショウコは、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が腸粘膜のタンパク質と結合することによって生じる腸粘膜の保護、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基礎データが提供されていない。一方、特定保健用食品の中では、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。通常これら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。そこで、申請者らは有用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、有用菌の生存を維持させる新たな着眼点から、研究に着手している。その結果、代表的な有用菌である *Bifidobacterium longum* の減衰期において、ゲンノショウコの短時間抽出液よりも長時間抽出液の方が、有意に *B. longum* の生存維持効果が大きいことを見出している。また、それぞれの抽出液に含まれる主要ポリフェノール成分組成も大きく異なり、長時間抽出液の主成分である corilagin が、*B. longum* の生存維持作用を有することも報告している。

2. 研究の目的

当研究グループの化合物ライブラリーの中からエラジタンニン成分およびザクロ、ゲンノショウコなどのエラジタンニン高含有素材を中心に、*in vitro* 実験系による評価を行う（図1）。さらに民間薬のゲンノショウコの短時間および長時間煎液中の成分組成を明らかにするために、エキス中のエラジタンニンの一斉定量を行う。網羅的に腸内細菌に与える影響を検討するために、ゲンノショウコの短時間および長時間煎液について、高脂肪食を摂取させ、腸内フローラの有用菌と悪玉菌のバランスを乱したマウスに被験サンプルを投与し、高脂肪食摂取動物と被験サンプル投与動物の腸内フローラ変動について比較解析を行う。さらに、腸内フローラ改善

の機序解明の一環として IgA 産生能を測定し、腸内バリア機能の評価を行い、被験サンプルの整腸作用機序の一端を明らかにする。

3. 研究の方法

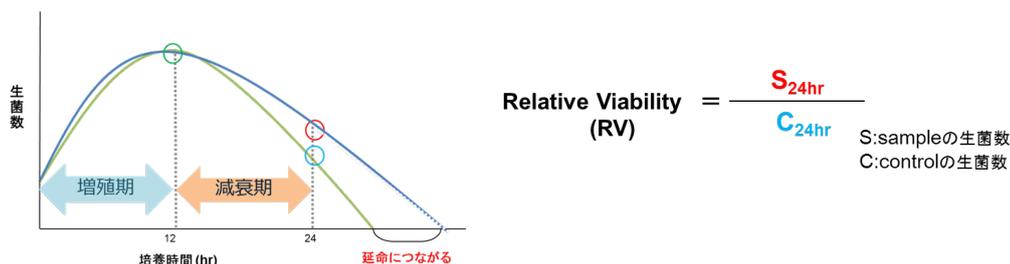


図1. 腸内有用菌の減衰期における延命効果

(1) 成人のヒトの腸内に多く見られる *Bifidobacterium longum* 菌を用い、生菌数を Colony Forming Unit (CFU) / mL で表した。12時間後と24時間後のサンプル添加時の菌数とcontrolの菌数の比をRelative Viability (RV)として図1中の式を用いて算出した。培地はcontrolとサンプル添加時の生菌数の差を大きくし、生存維持作用が評価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もつ Gifu Anaerobic Medium (GAM) 培地を通常より5倍希釈をして用いた。

(2) 薬用植物中のエラジタンニンおよび関連ポリフェノール成分については、従来、単離した成分を標準品とした HPLC のピーク面積からそれら成分の定量が行われてきた。しかし、その定量値が測定対象成分の標準品の純度に左右されることや、エラジタンニンにはアノマーなどの平衡混合物として存在しているものが多く、そのピークの複雑化によりピーク面積を正確に算出し難いことなどの短所がある。そこで本研究では、従来の方法よりも簡便かつ正確な定量が期待できるNMRによる定量法(qNMR法)により、ゲンノショウコおよびザクロの主要エラジタンニンおよび関連ポリフェノール成分の定量を試みた。ゲンノショウコの各種煎液の70%含水アセトンエキス(各20 mg)について、qNMR 基準物質の1,4-Bis(trimethylsilyl)benzene(1,4-BTMSB)-*d*₄ (0.1 mg)を含む測定溶媒acetone-*d*₆/D₂O/CF₃COOD (70:25:5) (1.0 mL)を用いて、NMR サンプルを調製した。定量対象化合物の特徴的なシグナル積分値と、1,4-BTMSB-*d*₄ のメチル基由来のシグナル積分値との比から、各成分の定量値を求めた。

(3) 馴化期間中は全てのマウスに普通飼料(ラボ MR ストック固型, 日本農産工業株)を給餌し、投与日以降は、普通飼料群はそのままで、高脂肪飼料を与える群については高脂肪飼料(D12492, リサーチダイエツト製, 以下「HFD」)を給餌した。14日間強制経口投与(5%アラビアゴム末懸濁液として, 10 mL/kg で投与液量換算して投与した)し、0日, 7日及び14日目に一晩分の糞便を回収し、エッペンチューブ等で凍結保存した。マウス糞便を凍結乾燥後粉砕し, 100mg 量り取りDNA抽出を行った。DNAの濃度を測定し, 群ごとに 400 または 800 倍希釈液を採用してリアルタイム PCR アッセイ(プライマー濃度 0.5 uM each, pre incubation 95°C・5分, PCR サイクル 95°C・10秒, 60°C・10秒, 72°C・10秒×45 サイクル)を行った。解析対象は全菌種の他, Firmicutes, Bacteroidetes (門)とし, 合計 3 菌種の解析を行った。解析して得られた CP 値から Δ Ct 法により, 全菌種に対する相対比率(%)を算出した。また, マウス糞便を凍結乾燥後

粉碎し、50mg 量り取り Mouse IgA ELISA Kitに従い IgA 測定を行った。

4. 研究成果

(1) 本培養開始から12時間後のサンプルをそれぞれ加え、24時間後の生菌数をCFU/mLで表し、RVを算出した。サンプルはザクロの可食部（ザクロアリル）のエキスとゲンノショウコを浅く煎じたエキス（ゲンノショウコ茶、短時間煎液）、深く煎じたエキス（ゲンノショウコ煎液、長時間煎液）を使用した。結果、ザクロアリルのエキスがRV = 3.3、ゲンノショウコの煎液エキスがRV = 1.2、ゲンノショウコ茶エキスがRV = 1.1となり、延命効果が期待できることが示唆された。

(2) qNMRの分析条件を種々検討した結果、定量対象化合物として、エラジタンニンおよび関連ポリフェノール(geraniin, corilagin, ellagic acid, gallic acid, brevifolincarboxylic acid)、フラボノイド(kaempferitrin)に加えて、その他の成分としてグルコース、クエン酸、リンゴ酸の計9種の化合物を一斉定量することができた(図2)。本法により、ゲンノショウコの煎じる時間と成分組成の変化、各種有機溶媒抽出による分画部および産地による成分組成の違いが明確となった。本研究により、各成分の標準品を必要とせず、ゲンノショウコ中の9種の主要エラジタンニンについて簡便かつ精度の高い一斉定量が可能となり、さらに他の薬用植物や機能性食品中のエラジタンニンやポリフェノールなどの定量にも、本法が有効である可能性を示した。

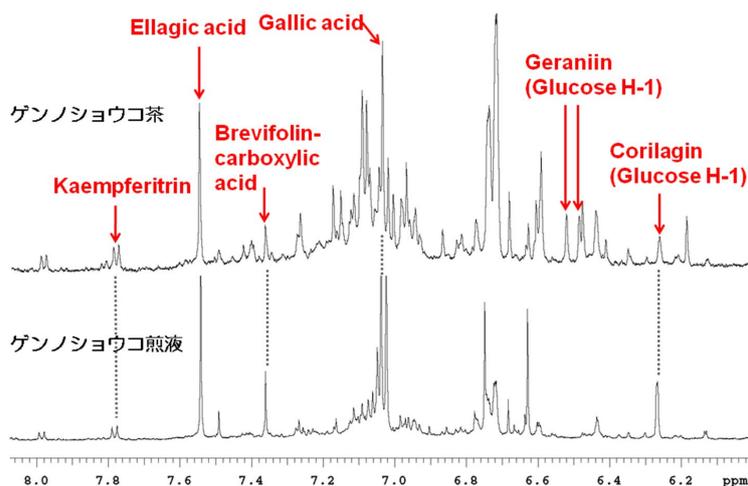
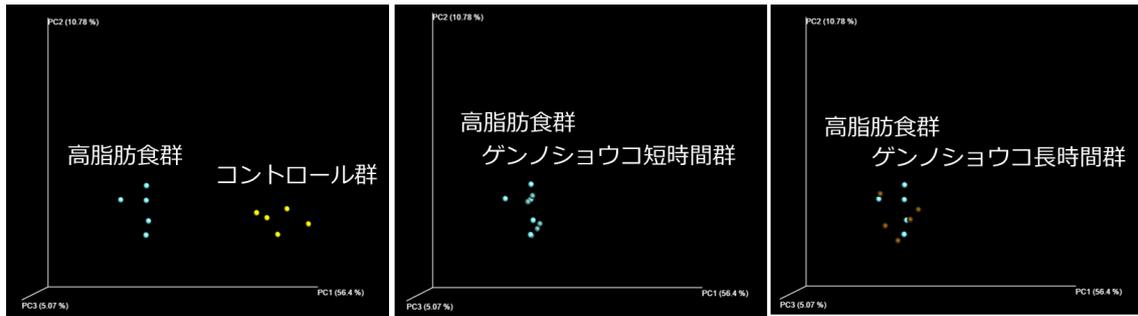


図2. ゲンノショウコ各種煎液のqNMRスペクトル(芳香族プロトン領域)

(3) 高脂肪食を投与し、腸内環境を乱したマウスに、整腸作用を有する民間薬のゲンノショウコ短時間抽出エキス(便秘に効果)および長時間抽出エキス(下痢に効果)の腸内環境改善作用を検討した。菌叢解析結果を、群内の平均値に直して表示したところ、コントロールは高脂肪食によって腸内細菌叢は変化するが、ゲンノショウコ短時間および長時間エキスとも大きな変化は見られなかった(図3)。今回は実験期間が2週間であったが、さらに長期間実験を行うことで、腸内環境改善効果がよりはっきり表れる可能性が示唆された。上記効果の作用機序を検討するために、腸管上皮における生体防御作用機序の指標であるIgAとムチン含量の増加効果を検討したが、それらの結果からは顕著な効果を見出すことはできなかった。



コントロールvs 高脂肪食

図3. ゲンノショウコ短時間および長時間煎液投与後のモデルマウス中の腸内細菌叢の変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計1件)

- ①Bastian, F., Ito, Y., Ogahara, E., Ganeko, N., Hatano, T., and Ito, H.* (2018) Simultaneous quantification of ellagitannins and related polyphenols in *Geranium thunbergii* using quantitative NMR, *Molecules*, **23** (6), 1346.
<https://doi.org/10.3390/molecules23061346>

〔学会発表〕 (計6件)

- ①Februadi Bastian, Takanori Nakajima, Masatake Kudo, Hiroaki Yamamoto, and Hideyuki Ito Anti-aging effects of ellagitannin metabolites, urolithins, on the skins The 8th International Conference on Polyphenols and Health (ICPH2017), 3-6 October, 2017, Québec, Canada.
- ②Februadi Bastian, Natsuki Ganeko, Morio Yoshimura, Yoshiaki Amakura, and Hideyuki Ito A new ellagitannin monomer from arils of *Punica granatum* 日本薬学会第138年会, 2018.3.26-28 (金沢)
- ③Bastian Februadi, 我如古菜月, 好村守生, 天倉吉章, 伊東秀之 ザクロアリルに含まれるポリフェノール成分とその抗糖化作用 第72回日本栄養・食糧学会大会, 2018.5.11-13 (岡山)
- ④伊東秀之, ザクロポリフェノールの化学構造とその抗糖化作用, シンポジウム「フードポリフェノールの機能開拓」, 第72回日本栄養・食糧学会大会, 2018年5月11-13日, 岡山
- ⑤Februadi Bastian, Natsuki Ganeko, Morio Yoshimura, Yoshiaki Amakura, and Hideyuki Ito Polyphenols From Arils of *Punica granatum* and Their Anti-glycation Activities XXIX International Conference on Polyphenols and 9th Tannin Conference, 16-20 July, 2018, Madison, WI, USA.
- ⑥Hideyuki Ito, Metabolites of Ellagitannins and Their Biological Activities, Symposium: New Era Application of Biosources, The 31st Annual and International Meeting of Japanese Association for Animal Cell Technology (JAAC 2018), November 5-8, 2018, Tsukuba.

〔図書〕（計1件）

①Special Issue Dedicated to Late Professor Takuo Okuda, Tannins and Related Polyphenols
Revisited: Chemistry, Biochemistry and Biological Activities

Edited by Ito, H., Hatano, T., Yoshida, T., MDPI books, Switzerland, 1-316 (2019)

DOI: <https://doi.org/10.3390/books978-3-03897-835-0>

ISBN 978-3-03897-834-3 (Pbk); ISBN 978-3-03897-835-0 (PDF)

〔産業財産権〕：該当なし

〔その他〕：該当なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者：該当なし

(2) 研究協力者：該当なし