

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05505

研究課題名(和文)ファイトケミカルの腸内動態と腸内環境におよぼす影響の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the effects of phytochemicals on their intestinal dynamics and the intestinal environment

研究代表者

福田 伊津子 (Fukuda, Itsuko)

神戸大学・農学研究科・助教

研究者番号：50418943

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)：本研究では、ファイトケミカルのうちケルセチン(フラボノイド)、イヌリン(多糖類)、ルテイン(カロテノイド)、グルコラファニン(含硫化合物)に着目し、これらの腸内動態と腸内環境におよぼす影響を培養系ヒト腸内細菌叢モデルおよびヒト結腸がん由来HT29-MTX細胞を用いて評価した。ケルセチンは抗菌様作用を示した一方、イヌリンはプレバイオティクスとして働くことが確認され、イヌリンは腸内細菌叢により資化されることが確認できた。ルテインとグルコラファニンは、今回の試験条件では腸内細菌叢およびその代謝物に影響をおよぼさなかった。また、腸内細菌叢代謝物も、HT29-MTX細胞にも影響をおよぼさなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、個々人で異なる腸内エコシステムにおいて、ファイトケミカルがどのような腸内動態を辿り、腸内環境にどのような影響をおよぼすのかを培養系ヒト腸内細菌叢モデルとヒト結腸がん由来HT29-MTX細胞を用いて解明した。腸内エコシステムは個々人で異なるため、個々人の糞便細菌叢を培養スターターとした培養系ヒト腸内細菌叢モデルを使用することに独自性があり、ヒト介入試験や動物実験では入手できない試料採取と解析を可能にできる点で学術的意義が高い。

研究成果の概要(英文)：In this study, I focused on quercetin (flavonoids), inulin polysaccharides), lutein (carotenoids), and glucoraphanine (sulfur compounds) among phytochemicals, and evaluated their effects on intestinal dynamics and intestinal environment by using Kobe University Human Intestinal Microbiota Model (KUHIMM) and human colon adenocarcinoma HT29-MTX cells. While quercetin showed antibacterial activity, inulin was confirmed to act as a prebiotic, and inulin was found to be decomposed by the intestinal microbiota. Lutein and glucoraphanine did not affect the intestinal microbiota and its metabolites under the conditions of this study. Also, intestinal microbiota metabolites did not affect HT29-MTX cells.

研究分野：食品機能性、食品安全性

キーワード：腸内細菌叢 ファイトケミカル 腸内環境

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトの腸管内には 500~1000 種類、100 兆個を超える腸内細菌が生息しており、この腸内細菌の集団を腸内細菌叢(フローラ)と呼ぶ。近年、腸内フローラが宿主の恒常性維持や疾患発症と深く関連することが報告されている。

腸内フローラは、宿主が摂取した食べ物や消化液の量や質など、腸内の化合物組成に大きく依存してその構成が最適化されており、個々人で異なる構成バランスを保つことが知られている。

腸内フローラによる代謝産物や摂取した食べ物から腸内発酵により産生される代謝物質が、宿主の腸管の上皮細胞や免疫細胞等に作用することで、腸内環境を含む生体機能全体に影響を与え、結果として再び腸内フローラの構成に影響するといった宿主-腸内フローラ間クロストークに基づく複雑な腸内生態系、すなわち「腸内エコシステム」を形成している。

ポリフェノール、カロテノイド、含硫化合物、 β -グルカン等、植物性由来の化合物であるファイトケミカルは、主に植物自身が活性酸素種や紫外線等のストレスから身体を守るために産生されるものであるが、その抗酸化性からヒトの健康にも寄与することが期待されており、その効果は体内に吸収されてから発揮するものと考えられてきた。

個々人で異なる腸内エコシステムにおいて、ファイトケミカルがどのような腸内動態を辿り、腸内環境にどのような影響を及ぼすのかは明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究は、個々人で異なる腸内エコシステムにおいて、ファイトケミカルがどのような腸内動態を辿り、腸内環境にどのような影響を及ぼすのかを培養系ヒト大腸フローラモデルを用いて解明することを目的とした。

培養系ヒト腸内細菌叢モデルを用いて、個々人の腸内フローラを培養スターターとしてファイトケミカルと共培養し、この培養液を試料として以下のことを明らかにした。

1. ファイトケミカルの腸内動態
2. ファイトケミカルによる腸内細菌叢の構成変化
3. ファイトケミカルによる腸内細菌叢の代謝産物への影響
4. 腸内細菌叢の代謝産物がヒト由来培養細胞株におよぼす影響

ファイトケミカルにはポリフェノール、カロテノイド、含硫化合物、 β -グルカン等が含まれる。広範囲にわたる化合物群のうち、本研究では、体内動態に関する研究が比較的進んでいるケルセチン、イヌリン、ルテイン、グルコラファニンに着目し、これらを用いて上記 1~4 を健康人 6 名について明らかにした。

3. 研究の方法

腸内エコシステムは個々人で異なるため、個々人の糞便細菌叢を培養スターターとした培養系ヒト腸内細菌叢モデル(Kobe University Human Intestinal Microbiota Model, KUHIMM)を使用して評価した。従来型の KUHIMM は 8 連続嫌気培養装置から構成されており、多検体処理能が低い。さらに試験効率を上げるため、KUHIMM を小スケール化したブチルゴム栓を用いた密閉系の KUHIMMiB を確立し、KUHIMM と KUHIMMiB の両方で評価した。いずれの方法も、ヒト試験や動物実験では入手できない試料採取と解析を可能にできる特徴がある。KUHIMM または KUHIMMiB の培地中に一日摂取量を勘案したファイトケミカルを添加し、これにヒト糞便細菌叢を播種して培養した。

ファイトケミカルの腸内動態を明らかにするため、イヌリンについては薄層クロマトグラフ

イーによる重合度の分析を行った。

腸内細菌叢の菌種構成の大部分は 4 つの門(Firmicutes、Bacteroidetes、Actinobacteria、Proteobacteria)で占められており、その大多数が偏性嫌気性細菌である。さらに属レベルでは 6 つ (*Bacteroides*、*Bifidobacterium*、*Clostridium*、*Eubacterium*、*Collinsella*、*Prevotella*) が大半を占め、宿主の食事や健康状態によってその構成が変動することが知られている。また、近年、腸内環境を改善する短鎖脂肪酸である酪酸を産生する細菌群として、*Roseburia* spp. & *E. rectale* および *Faecalibacterium prausnitzii* が着目されている。そこで、培養時の腸内フローラの構成を総菌数のほか、9 属・グループ (*Bacteroides fragilis* group、*Prevotella*、*Clostridium coccooides* group、*Clostridium leptum* group、*Bifidobacterium* 属、*Roseburia* spp. & *E. rectale*、*Faecalibacterium prausnitzii*、*Lactobacillus* 属、*Enterococcus* 属、*Entrobacteriaceae* group) 必要に応じて門・種レベルで現有設備備品であるサーマルサイクラダイスリアルタイムシステムライトを用いて解析した。

腸内細菌叢による代謝産物として、短鎖脂肪酸、インドール、アンモニアが挙げられる。主に炭水化物の代謝産物である短鎖脂肪酸は、腸管上皮細胞のエネルギー源となるほか、病原微生物の感染防御や宿主エネルギー代謝に関与することが報告されている。タンパク質の代謝産物であるインドールは、腸管のタイトジャンクションを修復する等健康維持に寄与する機能を発揮していることが報告されているが、同じくタンパク質の代謝産物であるアンモニアは、悪臭の原因となるほか多量に産生されると毒性を発現する。短鎖脂肪酸は現有設備備品である高速液体クロマトグラフィー(HPLC)にて分析した。インドールは、現有設備備品の HPLC に申請設備である蛍光検出器を追加で取り付けすることで分析した。また、アンモニアは、市販の測定キットを使用して分析した。

ファイトケミカルの共培養により変動が見られた腸内細菌叢の代謝産物について、ヒト由来培養細胞株であるヒト結腸がん由来 HT29-MTX 細胞を用いてどのような効果があるか、分泌型ムチンを指標としてその発現変動を mRNA レベルで解析した。

4 . 研究成果

○フラボノイドの一種であるケルセチンは、6 名の糞便細菌叢を培養スターターとして KUHIMM で評価した。その結果、特に、Firmicutes 門および Actinobacteria 門の細菌群を減少させ (表 1) 、その結果、腸内細菌叢の代表的な代謝物である酢酸、プロピオン酸、酪酸などの短鎖脂肪酸の産生量も低下した (表 2) 。一方で、Proteobacteria 門の細菌群は増加傾向にあった。また培養後の培地中 pH が低値を示した 2 検体の培養液中のアンモニア性窒素量を測定したところ、1 名で有意にケルセチン添加群でアンモニア産生量が低かった (データ不掲載) 。糞便細菌叢の培養試験では通常、培養前期にグルコースやでんぷん等を糖源として短鎖脂肪酸の産生が進行し、培養後期にはアミノ酸を資化してアンモニアの産生が進行する。ケルセチン添加により、糞便細菌叢による発酵が円滑に進行しなかったため、培養後期におけるアンモニア産生量の低下につながったと考えられる。これらのことから、ケルセチンは、従来から明確であるように糞便細菌叢に対しても抗菌様活性が強く、かつ、それは特定の細菌群に顕著であることが示唆された。

表 1 . KUHIMM においてケルセチン処理が細菌叢構成におよぼす変化

門/属/グループ	増加 () または減少 ()
All eubacteria	
Bacteroidets	
<i>Prevotella</i>	
<i>B. fragilis</i> group	
Firmicutes	
<i>Clostridium coccooides</i> group	
<i>Clostridium leptum</i> group	
<i>Rrec</i>	
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	
<i>Lactobacillus</i>	
<i>Enterococcus</i>	
Actinobacteria	
<i>Bifidobacterium</i>	
Proteobacteria	
Enterobacteriaceae group	

糞便提供者 6 名の糞便細菌叢を解析し、細菌数の有意な増加または減少を矢印で示した。

表 2 . KUHIMM においてケルセチン処理が短鎖脂肪酸産生量におよぼす変化

短鎖脂肪酸	増加 () または減少 ()
酢酸	
プロピオン酸	
酪酸	
総量	

糞便提供者 6 名の糞便細菌叢を解析し、短鎖脂肪酸産生量の有意な増加または減少を矢印で示した。

○プレバイオティクスとしての効果が期待されるイヌリンは、鎖長の異なる 3 つのフラクタン、すなわち、重合度 3~5 のフラクトオリゴ糖 (FOS)、重合度 3~30 (平均 16) のフジ FF (Fuji FF)、重合度不明のイヌリン (Inulin、Alfa Aesar 製) を用いて KUHIMM で 6 名の糞便細菌叢を培養スターターとして評価した。*Bifidobacterium* 属、*Prevotella* 属、*Faecalibacterium prausnitzii* などの細菌群を増加させた一方で、*Bacteroides fragilis* group を減少させた。糞便細菌叢の代謝産物である短鎖脂肪酸のうち、酢酸、プロピオン酸は重合度の低いフラクトオリゴ糖の添加で減少傾向であったが、酪酸産生量は増加傾向にあった (表 3)。アンモニアおよびインドールは、イヌリンによって減少傾向にあった。培養後にイヌリンが消失していたことから、糞便細菌叢により資化されていることが考えられた。また、この効果は、糞便提供者によって異なることが明らかとなった。

表 3 . KUHIMM においてイヌリン処理が短鎖脂肪酸産生量におよぼす変化

短鎖脂肪酸	増加 () または減少 ()		
	FOS	Fuji FF	Inulin
酢酸			
プロピオン酸			
酪酸			
総量			

糞便提供者 6 名の糞便細菌叢を解析し、短鎖脂肪酸産生量の有意な増加または減少を矢印で示した。

〇ルテインとグルコラファニン、今回の試験条件では腸内細菌叢およびその代謝物に影響をおよぼさなかった。また、腸内細菌叢代謝物も、HT29-MTX 細胞にも影響をおよぼさなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Itsuko Fukuda and Ro Osawa
2. 発表標題 Effects of quercetin on human intestinal microbiota and short-chain fatty acids production
3. 学会等名 7th International Conference on Food Factors (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sho Yamamoto and Itsuko Fukuda
2. 発表標題 Evaluation of the prebiotic effects of inulin-type fructans on human colonic microbiota
3. 学会等名 7th International Conference on Food Factors (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福田伊津子、大澤朗
2. 発表標題 In vitro培養系ヒト腸内細菌叢モデル (KUHIMM) を用いたケルセチンおよびその配糖体の影響評価
3. 学会等名 第23回日本フードファクター学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------