

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：34605

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K11587

研究課題名（和文）柿タンニンが関与する腸内細菌叢の変化と肥満予防との関連

研究課題名（英文）Relationship between persimmon tannin-related changes in gut microbiota and obesity prevention

研究代表者

松村 羊子（Matsumura, Yoko）

畿央大学・健康科学部・教授

研究者番号：80412154

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：柿タンニンは複雑な構造を持つ高分子で、血中コレステロールを低下作用を有する。柿タンニンの酸加水分解あるいはチオール分解を行い、HPLCで分析した。分解によりHPLCクロマトグラムが変化し、分解物のピークが現れたが、結果の再現性を検討中である。また、柿タンニンの肥満抑制効果を評価するために、ラットに柿タンニンを含む高脂肪食を11週間投与する動物実験を行った。その結果、肝臓への脂肪蓄積が抑制され、肝臓コレステロール値が低下した。さらに、糞便中の腸内細菌叢を解析したところ、タンニン摂取により腸内細菌叢が変化して多様性が高まり、肥満抑制に関与するアッカーマンシア菌が顕著に増加した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで柿タンニンは複雑な高分子のため、消化吸収されず胆汁酸と結合してコレステロールの吸収を抑制することは知られていた。今回、柿タンニンの摂取により、腸内細菌叢が多様化し、肥満抑制に関与するとされるアッカーマンシア菌が顕著に上昇した。また、BMIの高い人において上昇するBacillota門/Bacteroidota門の存在比がタンニン摂取によって顕著に低下した。さらに肝臓の脂肪面積が低下し、肝コレステロール量も減少した。すなわち、タンニンの摂取によって肥満抑制型の腸内細菌叢に変化し、肝臓の脂肪蓄積も抑制したことから、柿タンニンの脂質蓄積改善効果の可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Persimmon tannin is a polymer with a complex structure that has the effect of lowering blood cholesterol. We investigated the acid hydrolysis or thiol decomposition of persimmon tannin and analyzed by HPLC. The decomposition changed the HPLC chromatogram and peaks of the decomposition products appeared, but the reproducibility of the results is currently under investigation. In addition, to evaluate the obesity prevention effect of persimmon tannin, we conducted an animal experiment in which rats were given a high-fat diet containing persimmon tannin for 11 weeks. As a result, fat accumulation in the liver was suppressed and liver cholesterol levels were reduced. Furthermore, when the intestinal flora in the feces was analyzed, it was found that the intake of tannin changed the intestinal flora, increasing its diversity and significantly increasing the Akkermansia bacteria involved in obesity suppression.

研究分野：栄養学および健康科学関連

キーワード：柿タンニン 腸内細菌叢 脂質蓄積

1. 研究開始当初の背景

現代の日本における大きな関心事のひとつに、健康寿命の延伸がある。肥満は生活習慣病をはじめとする種々の疾患の引き金となるため、健康維持のため肥満予防が重要となっている。肥満になる主たる要因は、エネルギーの摂取と消費のバランスがとれていないことであるが、それ以外にも腸内細菌叢が肥満の一要因となることが報告されており、特にバクテロイデス門の細菌の増加と体重の減少に有意な相関が見出されている (Turnbaugh et al., 2006)。また、腸内細菌を活性化させるためには食物繊維の摂取が有効であることが既に広く知られているが、バクテロイデス門の細菌はオリゴ糖をはじめとする難消化性糖類を資化し、腸内において増殖すると報告されている (細野, 2013)。

柿タンニンにはカテキン類が重合した高分子化合物であり、たんぱく質や胆汁酸と結合する性質を有するため、消化吸収されないとされている。また、柿タンニンには血中コレステロール低下作用があることが既に報告されており (Gorinstein et al., 1998) 脂質改善効果が期待される。

申請者は、柿タンニンを多く含む干柿の抽出残渣をラットに投与したところ、血液中の抗酸化性を示す指標である ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) 値が投与後 1 週間において上昇することを見出した。この結果より柿タンニンが消化管内で低分子化することによって生体に対して抗酸化性を発現することが予想された。このことを検証するため、人工消化実験で各消化段階を再現し柿タンニンを処理して比較したところ、大腸段階において ORAC 値が大きく上昇することを見出した。このように申請者は、柿タンニンの低分子化には腸内細菌の作用が関与している可能性があることを見出し報告している。

さらに慢性肺感染症である肺 MAC 症モデルマウスに柿タンニン含有飼料を摂取させたところ、肺内の菌数が有意に低下し、病態が顕著に改善した。その効果はタンニンが加水分解により低分子化することにより発揮されることも報告している。同様に潰瘍性大腸炎モデルマウスにも柿タンニン食を投与すると、腸内細菌叢が変化し体重減につながるバクテロイデス門が増加し病態が著しく改善することを見出した。したがって、タンニンは腸内細菌の作用により代謝され低分子化し、抗酸化性や抗菌性など健康増進に寄与する可能性、あるいは腸内細菌叢を変化させ腸内環境を改善し健康に寄与する可能性が考えられたが、詳細は明らかではない。

2. 研究の目的

渋柿に多く含まれる柿タンニンは、カテキン類が重合した高分子化合物であることから、タンパク質や胆汁酸と結合する性質を有するため、前述のように消化吸収されないと考えられてきた。しかし柿タンニンの投与によりマウスの病態が改善したことから、腸内細菌のはたらきによってタンニンが低分子化され、生体に対して様々な効果を発現する可能性、あるいは腸内細菌叢を変化させ腸内環境が改善したことによる健康効果を有する可能性が考えられた。そこで、現代の日本における生活習慣病の要因のひとつである肥満に対する柿タンニンの効果を検証し、腸内細菌叢との関連を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

1) バクテロイデス門の菌株による柿タンニン低分子化の検討

購入可能なバクテロイデス門の菌株を入手し、タンニンを添加した液体培地で培養し、培養前後の液体培地を HPLC 分析してクロマトグラムを比較し、培養によって低分子化されたピークが出現するかどうかを確認した。大量に培養した培養液を用いた HPLC 分析で出現したピークを分取して、ORAC 値の測定を行い、タンニンの効果発現を確認を行う予定であった。

2) 生体内に対するタンニン摂取の評価

動物実験

生体における高脂肪食に対するタンニンの影響を検証するために、ラットによる動物実験を行った。具体的には、馴化飼育後ラットを 3 群に分け、コントロール食群 (Control)・高脂肪食群 (HF)・高脂肪タンニン食群 (HFT) とした。コントロール食には脂質として大豆油が含まれ、高脂肪食の 2 群にはさらにラードを添加した。タンニン群にはコントロール食に 5% 含まれている結晶セルロースのうち 2% をタンニンパウダー (石井物産株) に置き換えた。各飼料は 11 週間自由摂食させた。

11 週間の飼育後、肝臓と血液、盲腸内容物を採取した。血液は遠心分離後得られた血漿を採取した。肝臓、血漿、盲腸内容物は、分析まで -80 下で冷凍保存した。

中性脂肪量および総コレステロール量の測定

凍結肝臓よりホルチ法を用いて脂質を抽出した。抽出した脂質中の中性脂肪量と総コレステロールを測定キット (トリグリセライド E-テストワコーおよびコレステロール E-テストワコー; 富士フィルム和光純薬株式会社) を用いて測定を行った。血漿についても、同様に測定キットを用いて測定を行った。算出した脂質の量について、Tukey 検定を用いて 3 群間の有意差検定を行った。

肝臓の組織観察

凍結肝臓を用いて組織標本を作製し、オイルレッド染色を行った。倒立顕微鏡を用いて肝臓組織の赤く染色された脂肪滴を観察し、画像を保存した。画像処理ソフトウェア Image J (National Institutes of Health) を用いて画像中の脂肪滴面積を計測し、Tukey 検定を用いて、3 群間の有意差検定を行った。

盲腸内容物中の腸内細菌叢の解析

採取した盲腸内容物を株式会社テクノスルガ・ラボに委託し、16S rDNA 部分塩基配列を標的としたアンプリコンシーケンス解析を実施した。解析結果は Kruskal-Wallis 検定を用いて 3 群間の有意差検定を行った。

4. 研究成果

1) バクテロイデス門の菌株による柿タンニン低分子化の検討

バクテロイデス門の菌株をタンニン添加液体培地で培養し培養前後の液体培地を HPLC 分析してクロマトグラムを比較し、一部ピークが出現したが、再現性に乏しい結果となった。大量に培養した培養液においても HPLC 分析を行ったが同様であった。そこで、タンニンを酸加水分解した反応液を用いて HPLC 分析を行ったところ、培養後にピークが出現したが、これに関してもなかなか再現性が得られず、条件検討を継続中である。

2) 動物実験による高脂肪食摂取に対するタンニンの評価

体重および摂食量

総摂食量は Control 群と比較して高脂肪食の 2 群 (HF、HFT) で少なく、約 85% の摂食量となった。総摂食量をエネルギー換算すると、総エネルギー摂取量は 3 群とも同程度であった。体重は Control 群と比較して HF 群は体重の増加傾向を示したが有意差はなく、HF 群と HFT 群の間でも有意差はなかった。高脂肪食の摂取による体重の大きな増加はない結果となり、高脂肪食にタンニンを添加することによる体重への影響も認められなかった。

中性脂肪量および総コレステロール量の測定

血漿の中性脂肪量と総コレステロール量では、3 群間で有意差は認められなかった。図 1 の通り、肝臓の中性脂肪量は Control 群と比較して HF 群で有意に増加したが (図 1-A)、タンニン添加による有意な減少は認められなかった (図 1-B)。肝臓の総コレステロール量は、Control 群と比較して HF 群で有意に増加し、タンニン添加により有意に減少した。

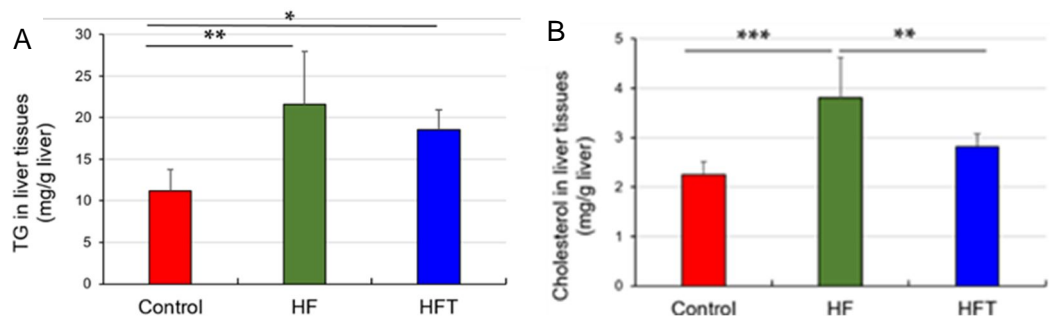


図 1. 肝臓の中性脂肪量および総コレステロール量

肝臓の組織観察

図 2 に肝臓組織をオイルレッド染色した顕微鏡写真を、図 3 には赤く染色された脂肪滴面積の計測結果を示す。Control 群と比較して HF 群で脂肪滴が顕著に増加したが、HFT 群で大幅に減少した。さらに Image J を用いて脂肪滴面積を計測した結果、Control 群と比較して HF 群で有意に増加し、HFT 群で有意に減少した。オイルレッド染色は主に中性脂肪が染色されるため、先述した肝臓の中性脂肪量の結果とは矛盾する結果になった。

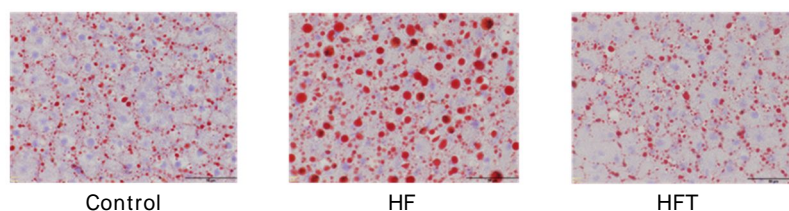


図 2. 肝臓組織のオイルレッド染色 (40 倍)

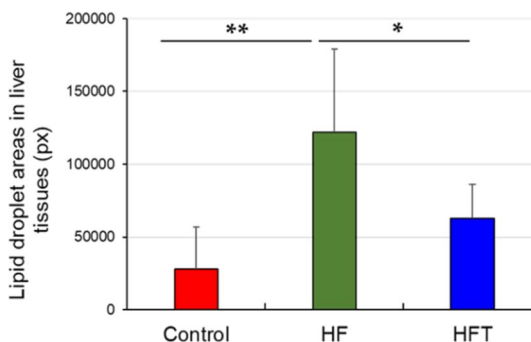


図 3. 肝臓組織の脂肪滴面積

盲腸内容物中の腸内細菌叢の解析

腸内細菌叢の多様性を示す指標である Chao1 Index と Shannon Index は、タンニンの摂取により有意に多様性が増加した。また多様性を示す Unifrac 距離、Unweighted Unifrac 距離においても、タンニンを添加した飼料を摂取することにより、増加していた。腸内細菌叢を門レベルで解析すると HF 群では圧倒的に Bacillota 門の存在比が高くなり、HFT 群では Bacteroidota 門、Verrucomicrobiota 門が顕著に増加した。また、肥満型腸内細菌叢の評価指標であり、高脂肪食の摂取で値が上昇する Bacillota/Bacteroidota 比は Control 群よりも HF 群で顕著に上昇したが、HFT 群で劇的に低下した。さらに、Control 群と HF 群ではほぼみられなかった Verrucomicrobiota 門が HFT 群で顕著に増加し、今回の実験ではこの門の細菌は *Akkermansia muciniphila* の 1 種のみが特定された。*Akkermansia muciniphila* は粘液素であるムチンを単一の栄養源として生育する特徴を持ち、脂質代謝に関与することや、抗肥満作用を持つ可能性があるとして注目されている。なお、本結果は結果が未公表のため、図の記載は控えさせていただいた。

3) 結論

本来、消化吸収されないとされてきた柿タンニンについて、高脂肪食にタンニンを添加すると、肥満の防止は確認できなかったが、明らかに肝臓の脂肪滴が減少し、肝臓コレステロール量も低下した。また、腸内細菌叢の門レベルにおける多様性はタンニン摂取によって上昇し、タンニン摂取によって腸内細菌叢が多様化した。さらに肥満によって上昇する Bacillota/Bacteroidota 比が顕著に低下し、脂質代謝に関与するとされる *Akkermansia muciniphila* の存在比が増加した。以上のことから、高脂肪食摂取による腸内細菌叢の乱れがタンニン摂取により改善し、タンニンを摂取したマウスでは腸内細菌叢が多様化し、*Akkermansia muciniphila* の存在比や Bacillota/Bacteroidota 比が変化したことから、肥満抑制につながる効果が期待できることが示唆された。しかし、この効果の詳細は明らかでなく、直接腸内細菌叢がタンニンを資化したかどうかは明らかではない。今後、タンニンの低分子化についての詳細は継続して研究し、明らかにしたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Matsumura Yoko, Kitabatake Masahiro, Kayano Shin-ichi, Ito Toshihiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Dietary Phenolic Compounds: Their Health Benefits and Association with the Gut Microbiota	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 880(1-41)
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/antiox12040880	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Mochida Naoko, Matsumura Yoko, Kitabatake Masahiro, Ito Toshihiro, Kayano Shin-ichi, Kikuzaki Hiroe	4. 巻 11
2. 論文標題 Antioxidant Potential of Non-Extractable Fractions of Dried Persimmon (<i>Diospyros kaki</i> Thunb.) in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 1555 ~ 1555
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/antiox11081555	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松下美稀, 大園千晴, 餅田尚子, 北畠正大, 伊藤利洋, 菊崎泰枝, 栢野新市, 松村羊子, 松村羊子
2. 発表標題 高脂肪食投与ラットに対する柿タンニンの影響
3. 学会等名 第77回日本栄養・食糧学会近畿支部大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大園千晴, 松下美稀, 餅田尚子, 北畠正大, 伊藤利洋, 菊崎泰枝, 栢野新市, 松村羊子, 松村羊子
2. 発表標題 高脂肪食投与ラットの腸内細菌叢に対する柿タンニンの影響
3. 学会等名 第77回日本栄養・食糧学会近畿支部大会
4. 発表年 2023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
研究 分担者	栢野 新市 (Kayano Shin-ichi) (40412150)	畿央大学・健康科学部・教授 (34605)	
研究 分担者	伊藤 利洋 (Ito Toshihiro) (00595712)	奈良県立医科大学・医学部・教授 (24601)	
研究 分担者	今北 英高 (Imagita Hidetaka) (00412148)	埼玉県立大学・保健医療福祉学部・教授 (22401)	

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
---------	---------