

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月20日現在

機関番号：23401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22780120

研究課題名（和文） 食品成分の生理機能性と腸内細菌の寄与に関する研究

研究課題名（英文） Effects of intestinal microbiota on physiological functions of polyphenols

## 研究代表者

川畑 球一（KAWABATA KYUICHI）

福井県立大学・生物資源学部・助教

研究者番号：60452645

## 研究成果の概要（和文）：

ビフィズス菌や乳酸菌がポリフェノールに与える影響は不明であった。そこで本研究では、ポリフェノールの抗炎症作用を指標として、これら有用菌の作用について解析した。ポリフェノールとビフィズス菌を培養した場合、それら単独よりも強力な抗炎症活性が認められたことから、ポリフェノールがより高活性な物質に変換されたと予想した。しかし、活性成分はビフィズス菌由来であり、ポリフェノールがその分泌もしくは生産を促進するという新たな機能的相互作用を見出した。

## 研究成果の概要（英文）：

Effects of probiotics, such as bifidobacteria and lactic acid bacteria, on the functions of polyphenols have been unclear. In this study, we investigated functional interactions between probiotic bacteria and polyphenols. When *Bifidobacterium adolescentis* and the polyphenol were co-cultured, the culture media showed the higher anti-inflammatory activity than that of the mono-culture media, suggesting that *B. adolescentis* may convert the polyphenol to more active compound(s). Interestingly, however, we have found that *B. adolescentis* may secrete anti-inflammatory compound(s), and the polyphenol may promote the secretion or the production, namely, prebiotic-like effect.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：プロバイオティクス、ポリフェノール、抗炎症作用、機能的相互作用、プレバイオティクス様作用

## 1. 研究開始当初の背景

野菜や果物に豊富に含まれるポリフェノ

ールは、抗酸化活性や抗炎症活性などの有益な生理機能性を示すことが明らかとなって

いる。ポリフェノールが体内で機能性を発揮するためには、腸管での効率的な吸収が重要となるが、近年、腸内細菌によるポリフェノールの代謝変換について多数報告されており、これらがポリフェノールの生理機能性に大きな影響を与えると考えられている。一方、乳酸菌などのプロバイオティクスに関して、そのような検討はこれまでになされておらず、ポリフェノールに対してどのような振る舞いを示すかは不明であった。

## 2. 研究の目的

ビフィズス菌や乳酸菌とポリフェノールの培養物について機能性評価を行うとともに、代謝変換物を分析することにより、腸内有用細菌（プロバイオティクス）がポリフェノールの機能性発現における役割について検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

プロバイオティクスとポリフェノールを培養し、その培養上清を細胞株に処理して、機能性評価を行った。本研究では、マウスマクロファージ由来 RAW264 細胞における一酸化窒素 (NO) の産生抑制活性（抗炎症活性）およびマウス肝がん細胞 Hepal1c7 細胞における NADPH quinone oxidoreductase (NQO1) 活性（第二相解毒酵素）の誘導作用について検討した。ポリフェノールは、代表的なフラボノイドであるケルセチンおよび構造が類似した化合物 4 種（ガランギン、ケンフェロール、ミリセチンおよびフィセチン）を用いた。

細胞の培養液である DMEM にプロバイオティクスとフラボノイドを添加し、1-6 時間、嫌気培養した。遠心操作を 2 回繰り返すことで培養上清を調製し、RAW264 細胞もしくは Hepal1c7 細胞に処理して機能性評価を行った。

## 4. 研究成果

### (1) ポリフェノール/腸内細菌培養液の機能性評価

フラボノイド 5 種について、それぞれ腸内細菌 10 種（乳酸菌 3 種、ビフィズス菌 3 種および常在菌 4 種）と組み合わせて 3 時間培養し、その培養上清を RAW264 細胞および Hepal1c7 細胞に添加した。RAW264 細胞は、リポ多糖刺激によって NO を産生することから、これに対する抑制活性を検討した。その結果、本研究で試験したフラボノイドと腸内細菌の組み合わせについて、そのほとんどは活性に変化が認められなかったが、興味深いことに、プロバイオティクスであるビフィズ

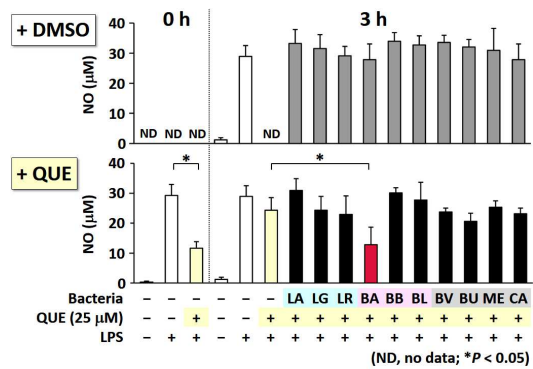


図 1 ケルセチンと腸内細菌の共培養上清における抗炎症活性の変化(BA, *B. adolescentis*; BB, *B. bifidum*; BL, *B. longum*; BU, *Bacteroides uniformis*; BV, *B. vulgatus*; CA, *Collinsella aerofaciens*; LA, *Lactobacillus acidophilus*; LG, *L. gasseri*; LPS, lipopolysaccharide; LR, *L. reuteri*; QUE, quercetin)

ス菌 (*Bifidobacterium adolescentis*, BA) とフラボノイド (ケルセチン、ガランギンおよびフィセチン) を培養した場合において、強い抑制活性が認められた (図 1)。

また、培養上清を処理した Hepal1c7 細胞について、第二相解毒酵素である NQO1 活性を測定した結果、常在菌 1 種と乳酸菌 2 種について NQO1 活性の誘導効果が認められた。

### (2) フラボノイドと BA の培養上清における抗炎症活性増強メカニズムの解析

BA は、検討した腸内細菌の中で唯一、フラボノイドとの培養において抗炎症活性の増強を示したことから、このビフィズス菌に注目して、その作用機構を解析した。フラボノイド/BA 培養上清の抗炎症活性は、培養時間およびフラボノイドの濃度に依存して上昇した。加熱処理した BA では活性の上昇が認められなかったことから、BA は生菌として存在する必要があり、BA がフラボノイドを高活性な化合物に代謝変換している可能性が示唆された。一方、培養上清を酢酸エチル分配したところ、水層に抗炎症活性が認められたことから、活性成分は高極性物質であることが明らかとなった。BA がフラボノイドを代謝変換している可能性を検討するため、培養上清におけるフラボノイド残存率を解析した結果、残存率は培養時間の経過とともに減少したが、その推移は BA の有無に依存しないことが明らかとなった。この結果は、BA はフラボノイドを積極的に代謝しないことを示唆しており、培養上清中の活性成分は BA に由来する可能性が新たに見出された。そこで、BA の菌体数を増加させたところ、BA 単独の培養上清においても菌体数に依存して抗炎症活性が発現した (図 2 左)。この結果から、BA は抗炎症活性成分をわずかながら分泌しており、フラボノイドが分泌もしくは生産を増強していることが示唆された。さらに、活性成分の同定を目的として、その性状につい

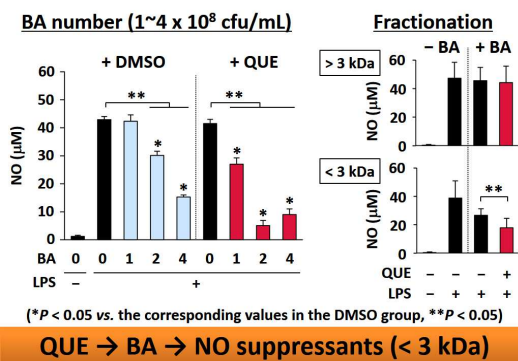


図 2 BA 菌体数に依存した抗炎症活性の増加と分画した培養上清の活性変化

て検討した結果、耐熱性を有する分子量 3000 以下の物質であることが明らかとなった (図 2 右)。

本研究は、当初、フラボノイドの生理機能性におけるプロバイオティクスの役割について検討することを目的としてスタートした。腸内細菌は、フラボノイドを代謝分解することから、プロバイオティクスも同様の作用を示すと考えられた。フラボノイドとビフィズス菌や乳酸菌の培養は、抗炎症作用や第二相解毒酵素誘導作用など、有益な生理機能性の増強を示し、(新規な) 高活性代謝物への変換が期待された。しかし、解析を進めた結果、フラボノイドとプロバイオティクスの培養上清における活性成分は、プロバイオティクスに由来する物であり、フラボノイドがその分泌もしくは生産を促進していることが明らかとなった。このようなフラボノイドのプレバイオティクス様作用は、本研究が世界で初めて明らかにしたものである (図 3)。本研究の成果は、野菜や果物とプロバイオティクス製品の組み合わせが有用であることを示唆しており、食べ合わせによる機能性の向上についての検討や新製品の開発に繋がると期待される。また、プロバイオティクスの生理機能性は長年研究されており、何らかの活性成分を産生していることが示唆され

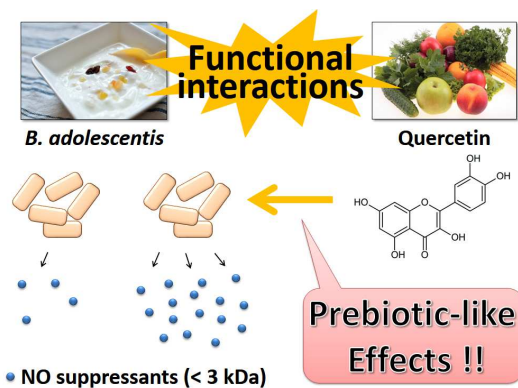


図 3 ビフィズス菌とフラボノイドの機能的相互作用—フラボノイドのプレバイオティクス様作用—

ていたが、同定は未だされていない。本研究で見出した現象は、プロバイオティクスの機能性解析および活性成分の同定において重要なツールとなることから、当該分野の発展に大きく寄与すると考えられる。一方、フラボノイドは、吸収され、体内を循環したのち、標的臓器で機能性を発揮すると考えられているが、その活性本体は本当にフラボノイドなのか?、プロバイオティクス由来活性成分ではないのか (プロバイオティクスの機能性増強を介した作用なのではないか) ? といった疑問を本研究結果は与えており、食品機能性研究に新たな展開を促す可能性が考えられる。

### 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 1 件)

(1) Kawabata K, Sugiyama Y, Sakano T, Ohigashi H, Flavonols enhanced production of anti-inflammatory substans(s) by *Bifidobacterium adolescentis*: prebiotic actions of galangin, quercetin, and fisetin., BioFactors, 査読有り, in press, 2013, in press, 10.1002/biof.1081

[学会発表] (計 5 件)

(1) 坂野太研、川畑球一、大東 肇 『ケルセチンによるビフィズス菌の抗炎症活性増強効果』 日本農芸化学会 2013 年度大会、2013 年 3 月 27 日、仙台

(2) 川畑球一、坂野太研、大東 肇 『フラボノールによるビフィズス菌の抗炎症活性増強効果』 第 17 回日本フードファクター学会学術集会、2012 年 11 月 10 日、静岡【Young Investigator Award 受賞】

(3) 坂野太研、川畑球一、大東 肇 『ビフィズス菌の抗炎症活性成分に関する解析』 北陸合同バイオシンポジウム、2012 年 11 月 3 日、福井

(4) Kawabata K., Ohigashi H., Actions of enterobacteria to anti-inflammatory activity of flavonols, 2011 International Conference on Food Factors, November 22, 2011, Taipei, Taiwan

(5) 川畑球一、大東 肇 『腸内細菌がフラボノールの抗炎症作用に与える影響』 北陸合同バイオシンポジウム、2011 年 11 月 11 日、富山

〔その他〕

ホームページ等

福井県立大学生物資源学物分子機能化学研  
究領域 機能食品学分野ホームページ

<http://www.fpu.ac.jp/faculty/biotechnology/labs/food/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

川畑 球一 (KAWABATA KYUICHI)

福井県立大学・生物資源学部・助教

研究者番号：60452645

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし