

フラボノイドとフラクトオリゴ糖の組み合わせによる 腸内細菌代謝産物に及ぼす影響に関する研究

濱田 梨佳子 (指導：海野 知紀)

Study on the combined effect of flavonoids and fructooligosaccharide
on intestinal bacterial metabolites

By Rikako Hamada

1. 緒言

近年、腸内細菌叢がヒトの健康に影響を与えるとして注目を集めている。腸内細菌は主に大腸内に存在しており、その数は約 100 兆個とされる。腸内細菌の構成は、抗生物質の投与、偏った食事、ストレスや過労、加齢によって変化し、そのバランスに異常が生じると、宿主の恒常性が崩れ、腸管感染症や炎症性腸疾患、過敏性腸症候群、大腸がんなどの消化管疾患の発症に関与する¹⁾。腸内細菌叢の変化は、腸内細菌が産生する物質の量にも影響を及ぼす。

植物に含まれるある種のフラボノイド化合物は大腸に到達し、腸内細菌が産生する物質量を変化させる。また、腸内細菌叢に影響を及ぼす様々な食品で多く研究されているものとして、プレバイオティクスに分類されるものがある。その中でも、フラクトオリゴ糖 (以下 FOS と略す) は、多くの先行研究がある。FOS は、腸内細菌叢に影響を及ぼすだけでなく便秘改善効果や整腸作用^{2, 3)}が認められている。

2. 目的

本研究では、フラボノイド化合物の中でもミカンの果皮に含まれるヘスペリジン (以下 HD と略す) や、そのアグリコンであるヘスペレチン (以下 HT と略す) を対象とした。これらのフラボノイドと FOS を組み合わせた研究は報告されていないため、食餌として同時に摂取させたときの腸内細菌代謝産物に及ぼす影響を調査することを目的とした。

実験 I では、ある種のフラボノイドが溶液中の

pH によって構造が変化することが知られているため、腸管腔内での生理的な温度条件に基づいてフラボノイドの経時的な変化を観察した。使用したフラボノイドは、HT 及び緑茶やチョコレートに含まれるエピカテキン (以下、EC と略す) を用いた。実験 II では、HT、HD 単独摂取群と FOS を配合した飼料でラットの飼育を行い、腸内細菌が産生する代謝産物として短鎖脂肪酸や馬尿酸などへの影響を検討した。

3. 方法

3-1. pH 安定性

HT、EC の pH 安定性を確認するため、pH 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 のリン酸緩衝液 (100 mM) を作成し、各フラボノイドを溶解した (終濃度 0.2 mM)。37℃ の恒温槽に放置し、時間経過ごとに採取し、高速液体クロマトグラフィー (以下、HPLC と略す) を用いて測定した。検出は吸光度 283 nm、移動相はアセトニトリル：蒸留水：リン酸 (200：300：0.25 (v/v/v)) の割合で混成し、流速は 0.8 mL/分、カラム温度は 40℃ に維持し、注入量は 10 μ L、解析時間は 15 分に設定した。

3-2. 食餌組成

コントロール食 (AIN93G) を基準とし、これに HT を 0.5% (w/w)、HD を 1.0% (w/w) となるように配合した。FOS の配合割合は、5% (w/w) と設定した。なお、FOS の添加分はコーンスターチを減じ、HT、HD の添加分はセルロースを減じることで調整した。さらにその 2 つを混合した食餌も用意し、全部で 6 種類とした。HD のモル

質量はHTのモル質量の約2倍のため、フラボノイドアグリコンとしての物質量を同じにするためHTを半量とした。

3-3. 動物実験

4週齢のウイスター系雄ラット30匹を東京実験動物株式会社より購入し、5連のステンレスケージに入れ、コントロール食で1週間予備飼育を行った。その後、平均体重が均等になるようにコントロール群、0.5%HT群、1%HD群、5%FOS群、0.5%HT + 5%FOS群、1%HD+5%FOS群にわけ、3週間飼育した。飼育期間中の食餌及び水は自由摂取とした。飼育期間中の摂餌量と体重の測定、糞・尿の回収は2日または3日おきに行った。回収した糞・尿は -40°C で保存した。飼育終了日には、後大静脈より採血を行い、遠心分離機にかけ血漿を得た。得られた血漿は分析まで -40°C で保存した。また肝臓、盲腸内容物、睪丸、腸間膜周囲及び腎臓周囲の脂肪組織を摘出し、重量を測定した。得られた盲腸内容物は -40°C で保存した。なお、本実験は東京家政学院大学動物実験に関する規程に基づき、東京家政学院大学動物実験委員会の承認を受けて実施した。

3-4. 分析項目

今回分析した項目は、血漿中のHT濃度、盲腸内容物の湿重量、pH、短鎖脂肪酸量、乳酸量、尿中の馬尿酸量、HT量、糞便の乾燥重量、HD量、HT量とした。

盲腸内容物中の短鎖脂肪酸は、市販のHPLC用長鎖・短鎖脂肪酸分析用ラベル化試薬FA（株式会社ワイエムシー）を使用し、HPLCで測定した。尿中の馬尿酸は、HPLCで測定を行った。その際、ヤッフエ法で測定した尿中クレアチニン量で補正した。

3-5. 統計解析

0.5%HT群、1%HD群と5%FOSを含む群の比較を行う際はt検定を行い、馬尿酸についてはKruskal-Wallis検定を行った後、Tukeyの多重比較検定を採用した。それ以外の項目については、一元配置分散分析の後、Tukeyの多重比較検定

を採用した。有意水準は5%とした。

4. 結果

実験Ⅰ pHによるフラボノイドの安定性

4-1. 各フラボノイドのpH安定性

37°C に保った恒温槽で5時間放置したが、pH 8.0におけるHTの残存率は安定していた。ECはpH 8.0の条件では時間の経過とともに残存率が低下していき、5時間が経過すると60%近くにまで減少した（図1）。しかし、pHを徐々に酸性へ傾けていくと残存率の減少は抑えられ、pH 6では経時的な変化が認められなくなった。

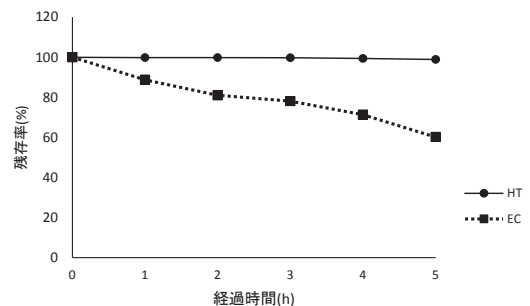


図1. pH 8.0の条件下におけるHTとECの経時的変化

HT、ECをpH 8.0の100 mMリン酸緩衝液に溶解し（終濃度0.2 mM）、5時間インキュベートした。残存率は、インキュベーション前のHPLCのピーク面積を100%とし、経時的に採取した溶液中のHTのピーク面積を比較した。

実験Ⅱ HT、HDとFOSの組み合わせによる腸内細菌代謝産物に及ぼす影響

4-2. 体重、摂餌量、乾燥糞重量、各脂肪組織重量、肝臓重量

体重、摂餌量、乾燥糞重量、腸間膜周囲、腎臓周囲、睪丸周囲の脂肪組織重量、肝臓重量に群間有意差は認められなかった。

4-3. 尿中馬尿酸量

尿中に排出されたクレアチニン量を測定し、クレアチニンmg当たりの馬尿酸量として算出した。0.5%HT群と1%HD群は、その他の群と比較して有意に高値であった。0.5%HT群と1%HD群との間には有意差はなかった。一方、HTとHDの配合による馬尿酸量の上昇は、FOSを添加す

ることによって抑制された (図2)。

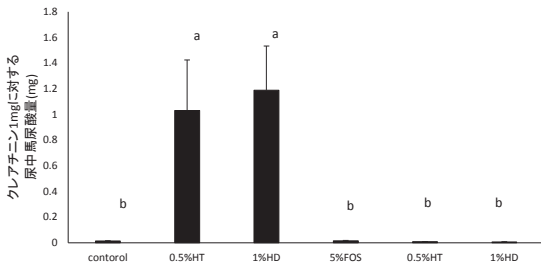


図2. クレアチンで補正した尿中馬尿酸量平均値±標準誤差 (n=5) で示している。Kruskal-Wallis 検定を行った。異なるアルファベットがついている場合は、有意差が認められることを表している (p<0.01)。

4-4. 盲腸内容物湿重量

コントロール群と比較して、0.5%HT 群、1%HD 群の盲腸内容物の湿重量に有意差はなかった。FOS を添加した群では、FOS を添加していない群と比較して、それ以外の群より有意に高値であった。5%FOS 群と比較して 0.5%HT+5%FOS 群、1%HD+5%FOS 群の間には有意差がなかった。

4-5. 盲腸内容物中の短鎖脂肪酸

ラット 1 匹あたりにおける盲腸内容物中の短鎖脂肪酸量を比較した (図3)。コントロール群の盲腸内容物中の各短鎖脂肪酸は、酢酸>プロピオン酸>酪酸の順に含量が多い傾向があった。短鎖脂肪酸量の合計値は、FOS を含む群が FOS を含まない群と比較して高い傾向があった。5%FOS 群のプロピオン酸量は、コントロール群、0.5%HT 群、1%HD 群と比較して有意に高かった。酪酸では各群間に有意差が認められなかった。

5. 考察

実験 I では、5 時間のインキュベーション時間では pH5.0~8.0 での HT の減少は認められなかった。大腸管腔内の pH は通常 7 付近であることから、重合等による変化が少ないことが示唆された。一方、EC は管腔内の pH の条件下では徐々に減少した。pH 8.0 では溶液が褐変していたことから、EC の重合が起こっていると推察された。重

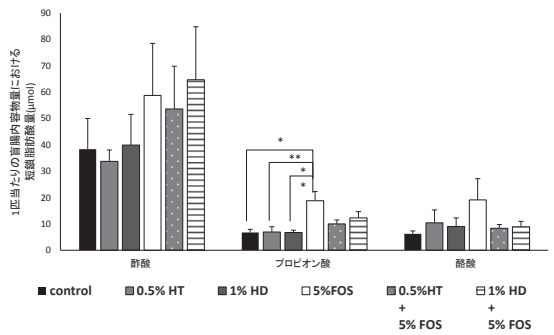


図3. ラット 1 匹当たりの盲腸内容物量における各短鎖脂肪酸量平均値±標準誤差 (n=5) で示している。Tukey の多重比較検定を行った。

* p<0.05, **p<0.01

合によって EC が高分子化されると、生体内吸収性が得られにくくなることから、管腔内の pH の環境をより低い状態に変化させることが重要であると考えられた。

実験 II では、尿中の馬尿酸値において、0.5%HT 群、1%HD 群では上昇し、0.5%HT + 5%FOS 群、1%HD + 5%FOS 群では上昇しなかった。このことから FOS を共に摂取することにより、馬尿酸生成を抑えられることが示唆された。HD が加水分解を受け HT になり、HT から体内の酵素や腸内細菌による複数の異化反応を経て馬尿酸などの最終生成物になるが、体内酵素や腸内細菌による異化の過程に FOS が影響を与えていると考えられた。ラットの食餌に FOS を混合させた場合では盲腸内容物量が有意に増加した。一般的に盲腸内容物の湿重量の増加は腸内細菌による発酵の程度を反映していると理解されていることから、FOS は腸内細菌による盲腸内発酵を促したと考えられた。また、HT、HD 単独摂取群もコントロール群と比較して盲腸内容物重量を増やす傾向を示していたことから、HT、HD も盲腸内発酵を促していた可能性が考えられた。今回の実験から、HT、HD を混合させていたとしても、FOS の盲腸内容物を増加させる作用を維持していることが確認できた。そして、統計学的な有意差を認めることはできなかったが盲腸内容物中の短鎖脂肪酸も増加する傾向が確認された。各短鎖脂肪酸で比

べると、FOSの添加によって酢酸が増加した。しかし、FOSが入っているにも関わらず、増加が確認された短鎖脂肪酸は酢酸のみで、プロピオン酸、酪酸では増加を確認することができなかった。

今回の実験では調査した項目が限定的であったため、調査項目を増やす必要があると考えられた。

6. 総括

本研究は、フラボノイドとフラクトオリゴ糖の組み合わせによるラットの腸内細菌代謝産物に及ぼす影響について検討した。その結果、以下の知見が得られた。

1. HT、HDとFOSを同時に摂取することにより、HT、HD単独投与より尿中への馬尿酸の排出が有意に低くなることを確認した。このことはFOSが腸内細菌叢を変化させ、その影響により馬尿酸合成を阻害している可能性が示唆された。
2. FOSの摂取により、盲腸内容量は増加し、

盲腸内容物のpHは低下した。また、短鎖脂肪酸では酢酸において増加傾向を確認した。しかし、HT、HDとFOSの組み合わせは相乗・相加的なものではなかった。

7. 参考文献

- 1) 大草敏文. 腸内細菌叢の消化管疾患へ関与. モダンメディア. 60 (11). [腸内細菌叢]. 325-331. 2014.
- 2) H Hidaka, T Eida, T Takizawa, T Tokunaga and Y Takahiro. Effect of Fructooligosaccharides on Intestinal Flora and Human Health. *Bifidobacteria Microflora*. 5 (1). 37-50. 1986.
- 3) 奥恒行. 新しい糖質甘味料フラクトオリゴ糖の生体利用とその用途. 栄養学会誌. 44 (6). 291-306. 1986.
- 4) T Unno, T Hisada and S Takahashi. Hesperetin Modifies the Composition of Fecal Microbiota and Increases Cecal Levels of Short-Chain Fatty Acids in Rats. *J. Agric Food Chem*. 63 (36). 7952-7957. 2015.