

1. 課題名 小豆成分がヒト腸内細菌叢に与える影響
2. 研究者 (研究代表者) 岐阜大学 応用生物科学部 助教 稲垣瑞穂  
(共同研究者) 岐阜大学 応用生物科学部 准教授 柳瀬笑子

### 3. 成果概要

#### 【研究目的】

近年、人々の健康と腸内細菌叢の関連性が相次いで報告されている。しかしながら、腸内細菌叢は、個人の遺伝的背景・年齢・生活習慣などの様々な要因により変動するため、個人の変動要因を排除したかたちで、食品素材（食べ物）がヒト腸内細菌叢にどのような影響を与えるのかをシンプルに検証することが望まれる。

小豆の煮汁は、餡製造工程（渋切工程）で生じる副産物であり、煮汁中の成分として、抗酸化活性を有するアントシアニンやカテキンが報告されている。本研究では、ヒト糞便を用いたヒト腸内細菌叢培養モデルを用い（Takagi et al., PLoS ONE, 2016）、「小豆煮汁」および煮汁成分の一つである「ケルセチン」がヒト腸内細菌叢にどのような影響を与えるのかを評価した。評価項目としては、培養中の pH 変動、培養開始から 24 時間後の培養液の主要有機酸解析および次世代シーケンサーを用いた 16S rRNA 腸内細菌叢解析を実施した。本研究は岐阜大学医学研究等倫理審査委員会の承認を経て実施した（no. 29-106）。

#### 【研究方法および手法】

##### 1. 小豆煮汁の調製

小豆煮汁（株式会社御座候、渋切り水）を遠心分離し（5,000 rpm, 15°C, 10 分）、上清を小豆煮汁サンプルとして用いた。

##### 2. 小豆煮汁投与試験

GAM 培地 5.9 g を 80 mL の蒸留水で溶解し、115°C、15 分の高圧滅菌を行った。この GAM 培地に対して滅菌水 20 mL を加えた対照（CT）と小豆煮汁 20 mL を加えた小豆煮汁（RB）を用意した。健常ボランティアから提供を受けた糞便を生理食塩水に懸濁した糞便希釈液を植菌し、嫌気条件下にて、攪拌および pH をモニタリングしながら 24 時間の培養を行った。24 時間後の培養液は、有機酸解析およびメタゲノム解析を実施した。

##### 3. ケルセチン投与試験

上述の検証（CT, RB）をコントロールとし、ケルセチン二水和物（富士フィルム和光純薬工業）4 mg 投与（Q4）と 20 mg 投与（Q20）がヒト腸内細菌叢に与える影響を評価した。試験は、*Bifidobacterium* の保有割合の高い被験者（A）と *Bifidobacterium* の保有割合の低い被験者（D）の 2 名で実施した。

#### 【研究成果】

##### 1. 小豆煮汁投与試験

4 名すべての被験者において、RB は、CT と比較して、僅かながら pH の低下が観察された（図 1）。この pH の差は培養 8 時間前後から観察され、培養終了時まで維持されていた。腸内環境の指標となる主要 5 種の有機酸について HPLC 解析を実施したが、それらの構成割合に顕著な変化

は見られなかった（データ未掲載）。16S rRNA メタゲノム解析により腸内細菌叢の変動を解析したところ、RB では *Bifidobacterium* の増加および *Clostridium* の減少の傾向が観察された（図2）。以上の結果より、小豆煮汁は *Bifidobacterium* を増加させ、腸内環境の pH を下げる機能を持つことが示唆された。

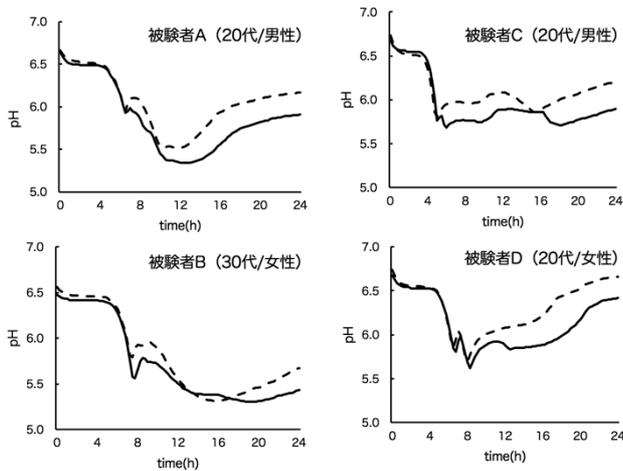


図1 小豆煮汁が培養液pHに与える影響（被験者4名で実施）

点線は対照（小豆煮汁添加なし）、実線は煮汁投与の際のpHの遷移を示している。いずれの被験者においても、小豆煮汁を加えることによりpHが低下したことから、腸内pHを下げる効果があることが示唆された。

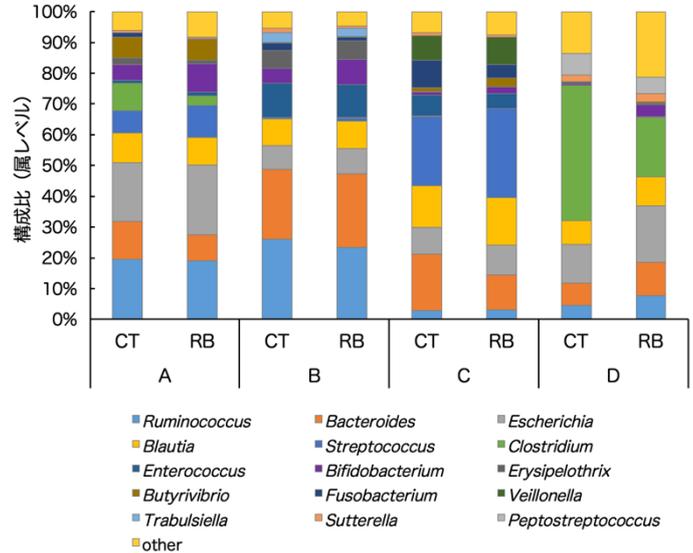


図2 24時間後培養液中の微生物解析（被験者4名で実施）

培養液から抽出した細菌DNAについて16S rRNAメタゲノム解析を実施した（CT：小豆煮汁添加なし、RT：小豆煮汁添加）。煮汁添加による*Bifidobacterium*の存在比率の増加、*Clostridium*の存在比率の減少が観察された。

## 2. ケルセチン投与試験

被験者 A (*Bifidobacterium* の保有割合の高い被験者、図3左) では、CTと比較して、RBで0.2ほどのpH低下が見られたものの、ケルセチン投与群 (Q4/Q20) ではpH低下が観察されなかった。

被験者 D (*Bifidobacterium* の保有割合の低い被験者、図3右) では、pHの低下の程度は変わらないものの、最も低いpHに到達するタイミングが異なっていた (CTでは培養11時間後、Q4では培養17時間後、Q20では培養13時間後)。

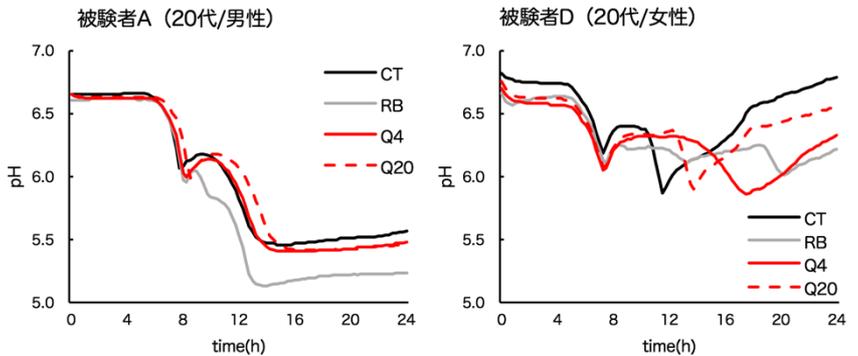


図3 ケルセチンが培養液pHに与える影響（被験者2名で実施）

腸内細菌叢の特徴が異なる被験者2名の被験者で実施した。被験者Aでは、対照 (CT)と比較して、煮汁 (RB)でのみpH低下が観察された。一方、被験者Dでは、RB、ケルセチン4mg (Q4)、ケルセチン20mg (Q20)においても培養後期のpHを低下させた。

有機酸解析を実施したが、被験者 A に関しては有機酸構成比に顕著な変化がなかった。一方で、被験者 D に関しては、プロピオン酸の増加および酪酸の減少が観察された（データ未掲載）。

16S rRNA メタゲノム解析により腸内細菌叢の変動を解析したところ、被験者 A ではケルセチン投与による腸内細菌叢への影響は観察されなかったが、被験者 D では Q4 のみで *Bacteroides* の増加が観察された（データ未掲載）。被験者 A および D の試験から得られた合計 8 サンプルの結

果について主成分分析を実施した（図4）。プロットの配置から、被験者A（*Bifidobacterium* 保有割合が高い被験者）では、煮汁投与は腸内細菌叢の変化を誘導するが、ケルセチン投与は腸内細菌叢に影響を与えないこと、被験者D（*Bifidobacterium* 保有割合が低い被験者）では、RB および Q4 では腸内細菌叢が変化したが、Q20 では腸内細菌叢へ影響を与えなかったことが読み取れた。

以上より、ケルセチン 4 mg 投与は、*Bifidobacterium* 保有割合が低い被験者に対して、*Bacteroides* を増加させ、プロピオン酸の増加および酪酸の減少傾向を導いたと考えられた。

### 【まとめ】

粗精製である小豆煮汁を用いた試験では、すべての被験者において *Bifidobacterium* 比率の増加傾向が観察された。精製物であるケルセチンを用いた試験では、その効果・影響が個人特有の腸内細菌叢に依存することが示唆された。以上より、小豆煮汁の日常的な摂取は、腸内細菌叢を穏やかに整え、人々の健康に貢献できると考えられた。

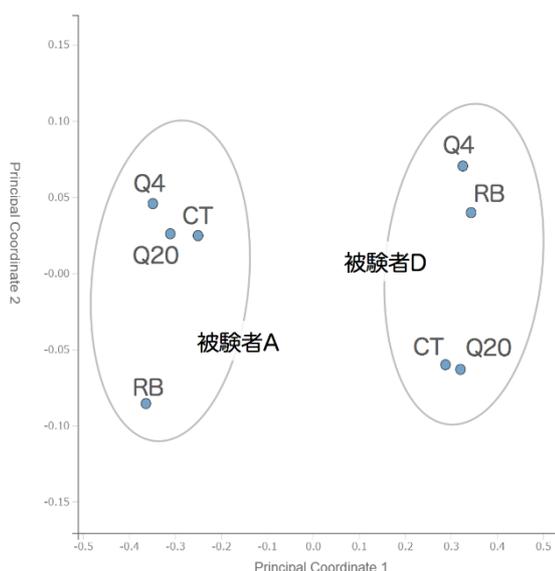


図4 被験者AおよびDの腸内細菌叢の比較（主成分分析）

得られた腸内細菌のデータを用いて主成分分析を実施した。（被験者A）RBのプロットが離れて配置されたことから、RB添加条件が最も腸内細菌叢に変化を及ぼしたことが読み取れる。（被験者D）CTと比較して、Q20は配置が近いことから細菌叢への影響は少なく、一方で、RBおよびQ4では配置が遠いことから、腸内細菌叢への影響があったことが読み取れる。