

## カカオ豆外皮由来物質の腸内菌叢改善効果

水谷 武夫 (理化学研究所動物試験室長)

わたくしたちの腸内にはたくさんの細菌がすみついて、腸内菌叢とよばれる複雑な集団を形成している。その中には、宿主との間に長い進化の過程で高度の適応・馴化をかちえた定住菌と腸内に侵入してすみつくことのできない通過菌がある。前者の多くは腸内の優勢菌を構成し、後者は通常優勢菌とはなりえず、いわば食餌や体の部分（口腔、咽頭など）からの汚染菌である。菌叢を構成する腸内菌は100種類、その数は、糞便1gあたり1,000億をかぞえる。腸内菌は食餌成分や腸内に分泌・排泄される生体成分をさまざまな物質に代謝変換し、一生の間には宿主にきわめて重大な影響を及ぼすことが考えられている。

腸内菌は、ヒトを形成している細胞数よりも多く、したがって酵素の種類も多彩で、肝臓に存在する酵素をはるかに上回り、代謝活性も高く、宿主の生理機能、発がん、各種疾病に関係している。また、ある種の腸内菌によってつくられる細菌毒素や菌体成分は、宿主の免疫機構を修飾し、免疫能の促進にも抑制にも作用する。腸内菌の有用面には、ビタミンやたんぱく質を合成するほか、外来の病原菌による腸管感染を防止することが知られている。

バクテロイデスや乳酸菌は、大腸に到達した食物繊維や難消化性でんぷんなどの食餌成分を代謝し、酢酸、プロピオン酸、酪酸などの短鎖脂肪酸と炭酸ガス、メタン、水素などに分解し、生体の代謝生理や腸内菌による腸内代謝全般に影響を与えている。すなわち、短鎖脂肪酸は、宿主のエネルギー源となるほか、大腸内のpHを低下させ、腸内菌の酵素活性、特に発がん関連酵素の活性を抑制させる。一方、バクテロイデスやクロストリジウムなどによってアンモニア、硫化水素、アミン、フェノール、インドールなどの有毒物質が産生される。これらの腸内菌の有用性あるいは有害性をまとめると図1のようになる。

腸内菌叢改善とは、どのような腸内菌による、どのような状態をいうのか、まだ、明白ではない。しかしながら、腸内菌による代謝産物のうち有害物質の産生が少ない腸内環境になれば、菌叢が改善されたことになると思われる。現在までのところ、そのような環境に寄与する腸内菌として、ビフィズス菌やラクトバチルスなどの乳酸菌があげられる。したがって、これらの乳酸菌が増加することは、少なくとも菌叢改善に関連する。

ビフィズス菌が、生体に対して腸内環境の改善と整腸効果のあることが明らかにされている。天然物中のビフィズス増殖因子の探索も多くされているが、そのヒト腸内菌叢に対する影響について検討した成績は非常に少ない。本研究は、カカオ豆外皮の水溶性および不溶性物質について腸内菌による培養試験、ヒト腸内菌叢ならびに便通への影響を検討したものである。

### 実験方法

#### 1. カカオ豆外皮の水溶性および不溶性物質の調製

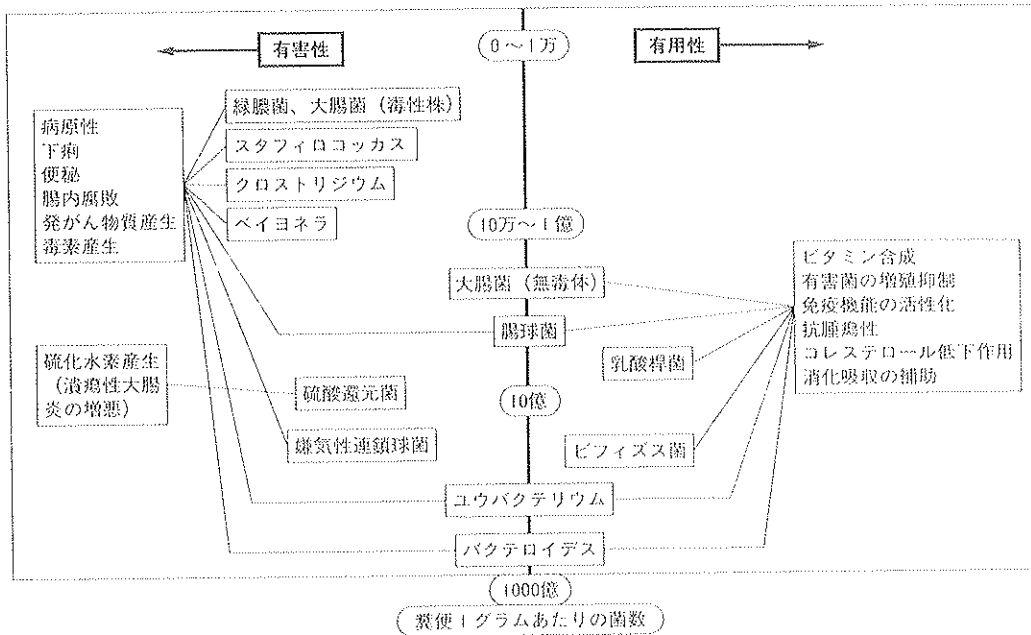


図1 腸内菌叢の構成菌とそのはたらき

カカオ豆外皮を粉砕後、エタノールを加え、還流抽出した。遠心分離により上清と沈殿に分離し、得られた沈殿に水を加え、再度還流抽出した。それを上清と沈殿に遠心分離し、この上清を凍結乾燥し、カカオ豆外皮水溶性物質（以下外皮エキスと略す）とし、沈殿を不溶性物質（以下外皮ファイバーと略す）として実験に供した(図2)。なお、前者の組成分析(%)では、たんぱく質26.4、脂質1.0、炭水化物54.9、灰分17.7、後者は、サウスゲート法で58.0%が食物繊維で、その他の成分(%)はたんぱく質20.0、脂質6.4、灰分9.5、水分6.4であった。

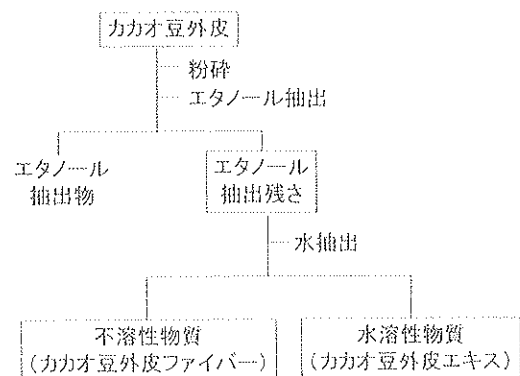


図2 カカオ豆外皮の水溶性および不溶性物質の調製方法

## 2. 外皮エキスの腸内菌による培養試験

外皮エキスによる腸内菌の増殖は、糖質による増殖はPYF brothを用いて、糖質のみによらない増殖は改変 György broth を用いて検索した。Briggs liver broth または EGF broth で培養した供試菌の懸濁液を外皮エキス0.06% (W/V)、0.6% (W/V) 添加した上記試験培地に接種し、37℃、48時間嫌気培養後、培養液の pH 変化により増殖度を推測した。

## 3. 外皮エキスの消化酵素に対する安定性試験

外皮エキス50%、水溶液 (W/V) 10g を濃塩酸で pH2.0 に調整し、37℃、1 時間放置した後、ペプシン、リパーゼ、アミラーゼをそれぞれ加え、各酵素処理物を得た。各処理物の腸内菌増殖作用は、*Bifidobacterium longum* JCM1217 および *Clostridium perfringens* ATCC13124 の 2 株を供試菌として György broth で検索された。

## 4. 外皮エキスおよび外皮ファイバーの摂取試験

外皮エキス2.4g を朝、昼、夕食後の 3 回に分けて、健康な成人 7 名 (女性 5 名、男性 2 名、年齢

22歳～33歳)に14日間摂取させた。外皮ファイバーは20gを朝、昼、夕食後の3回に分けて、健康な成人女性7名(25歳～32歳)に14日間摂取させた。試験スケジュールは、摂取前後7日間を非摂取期間とし、摂取前、摂取開始1週間目、2週間目、終了1週間後に被験者の糞便を採取し、糞便菌叢および糞便pHを測定した(図3)。本研究はヘルシンキ宣言の精神に則り、十分な配慮の下に実施した。

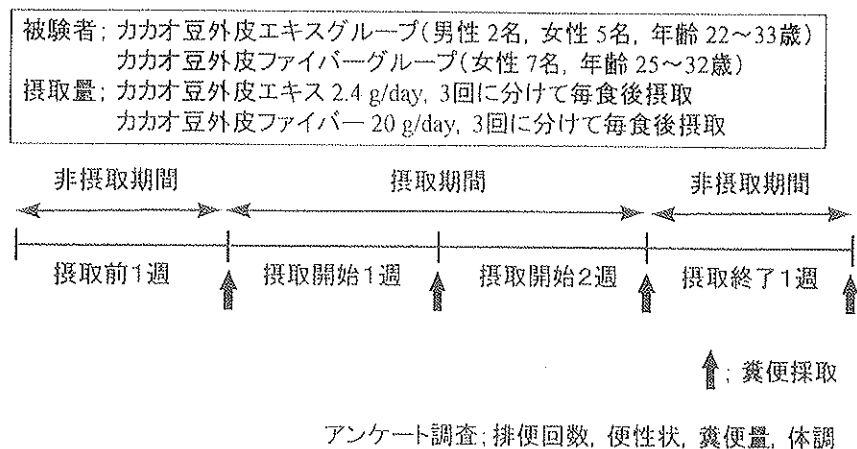


図3 摂取試験スケジュール

## 5. 糞便菌叢の検索

採取した糞便検体1gの10倍希釈系列を作製した。これを嫌気性菌用平板培地8種類、好気性菌用平板培地6種類に塗抹し、好気性は37°C、48時間、嫌気性は37°C、72時間培養後、同定および菌数計算を行った。細菌の同定は、平板培地上の集落形態、グラム染色標本の鏡検、好氣的条件下における発育試験、及び各種生化学的性状試験により行った。

## 6. 糞便pHの測定

糞便適量をカップに採り、pH電極を直接糞便に差込み測定した。

## 7. 便通調査

被験者に試験期間中の排便回数、便性状、糞便量(湿重量)について記録させた。また、試験終了後、外皮エキスおよび外皮ファイバー摂取による便通などの自覚症状について自由に記入させた。

## 結果

### 1. 外皮エキスの腸内菌の増殖に及ぼす影響

外皮エキスの糖質は、*Bifidobacterium infantis*、*Bacteroides distasonis*、*Eubacterium aerofaciens*の3株を除いては、ほとんど利用されなかった。しかし、その3株についても利用能に濃度依存性は認められなかった(表1)。糖質のみによらない外皮エキスの増殖作用は、*B. bifidum*を除くビフィズス菌属(以下ビ菌と略す)の8株と*Lactobacillus casei*、*Ruminococcus productus*に対して示され、そのうち、*B. adolescentis*、*Ruminococcus productus*に対して濃度依存的に示された。一方、*Bacteroides*属、*Clostridium*属、*Eubacterium*属、*Escherichia coli*に対しては、外皮エキスは全く増殖作用を示さなかった。以上の結果から外皮エキスは*Bifidobacterium*属、*Lactobacillus*属の細菌を選択的に増殖させることが示された(表2)。

### 2. 外皮エキスの消化酵素に対する安定性

外皮エキスは、消化処理しても、*B. longum*に増殖作用を示したが、*C. perfringens*に増殖を示さず、

表1 腸内細菌の増殖に対するカカオ豆外皮エキスの影響 (PYF broth)

	添加量		
	0%	0.06%	0.6%
<i>Bifidobacterium longum</i> JCM1217	+	+	++
<i>B. infantis</i> JCM1222	---	+	+
<i>B. bifidum</i> JCM 1255	---	---	---
<i>Lactobacillus casei</i> JCM1134	++	++	++
<i>Clostridium perfringens</i> ATCC13124	(+)	---	(+)
<i>C. perfringens</i> JCM 1290	(+)	---	(+)
<i>C. difficile</i> JCM 1296	(+)	(+)	(+)
<i>Bacteroides distasonis</i> W-8	+	+	+
<i>B. distasonis</i> JCM5825	---	+	+
<i>Escherichia coli</i> JCM 1649	(+)	(+)	+
<i>Eubacterium aerofaciens</i> JCM7790	---	+	+

--- : >6.1 (培地 pH) (+) : 5.6~6.0 + : 5.1~5.5 ++ : 4.5~5.0

表2 腸内細菌の増殖に対するカカオ豆外皮エキスの影響 (György broth)

	添加量				添加量		
	0%	0.06%	0.6%		0%	0.06%	0.6%
<i>Bifidobacterium bifidum</i> E-319, A-234-4	---	---	---	<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 13124	---	---	---
<i>B. bifidum</i> JCM 1255	---	---	---	<i>C. beijerinckii</i> ATCC 14823	---	---	---
<i>B. adolescentis</i> E-319a	---	---	+	<i>C. celanoni</i> JCM 1394	---	---	---
<i>B. adolescentis</i> E-298b	---	+	++	<i>C. ramosum</i> JCM1298	---	---	---
<i>B. breve</i> S-1, S-46	---	+	+	<i>C. difficile</i> JCM 1296	---	---	---
<i>B. infantis</i> I-10-5	---	+	+	<i>Eubacterium cylindroides</i> JCM 7787	---	---	---
<i>B. infantis</i> JCM 1222	+	++	++	<i>E. aerofaciens</i> S-601	---	---	---
<i>B. longum</i> M-602, JCM 1217	---	++	++	<i>E. aerofaciens</i> JCM 7790	---	---	++
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	---	---	---	<i>E. lentum</i> VPI 0255-1	---	---	---
<i>L. casei</i> ATCC 7469, JCM 1134	---	++	++	<i>E. limosum</i> ATCC 8486	---	---	---
<i>L. gasseri</i> JCM 1130	---	---	---	<i>Escherichia coli</i> F604, JCM 1649	---	---	---
<i>Bacteroides distasonis</i> S 601, W-8, JCM 5825	---	---	---	<i>Mitsuokella multacidia</i> JCM 2054	---	---	---
<i>B. fragilis</i> M-601	---	---	---	<i>Peptostreptococcus parvulus</i> 1612	---	---	---
<i>B. thetaiotaomicron</i> AS-126	---	---	---	<i>Ruminococcus prodactus</i> JCM 1471	---	+	++
<i>B. vulgatus</i> S-601	---	---	---	<i>Rikenella microflatus</i> NCTC 11190	---	---	---
				<i>Interooccus faecalis</i> IF-20478	---	---	---

--- : >6.1 (培地 pH) + : 5.1~5.5 ++ : 4.5~5.0

その処理前後で変化しなかった。

### 3. 外皮エキスおよび外皮ファイバー摂取による腸内菌叢の変化

ビ菌菌数は摂取前に比べて、外皮エキス摂取開始2週間目に有意に増加し ( $p < 0.05$ )、*Lactobacillus* 菌数も摂取開始1週間目および2週間目に有意に増加した ( $p < 0.05$ )。その他の腸内菌は変化しなかった(表3)。被験者個々のビ菌菌数の変化についてみると、外皮エキス摂取により、7名中6名の被験者でビ菌菌数の増加が認められた(図4)。総菌数に占めるビ菌の占有率は摂取前、摂取2週間目とほとんど変わらなかった。摂取前10%であった *Bacteroidaceae* の占有率は、個人差が大きく有意な差は認められなかった。摂取前のビ菌占有率が20%以下であった被験者2名(16.5%及び18.0%)については摂取前に比べてビ菌占有率、*Bacteroidaceae* 占有率ともに大きく増加し、摂取開始1週間目において前者は3.2倍、後者は5.2倍に増加した。一方、外皮ファイバーによる糞便フローラは、ビ菌菌数が摂取前に比べて摂取開始1週間目および2週間目に有意に増加した ( $p < 0.05$ )。また、*Eubacterium*、*Lactobacillus* および *Bacteroides* の菌数も増加する傾向を示し、総菌数は摂取前に比べて、摂取開始1週間目およ

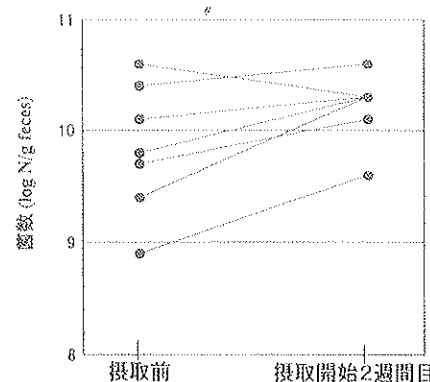


図4 カカオ豆外皮エキス摂取による各被験者のビフィズス菌数の変化

表3 健康人の腸内フローラに及ぼすカカオ豆外皮エキス摂取の影響 (n = 7)

菌種	摂取前	摂取開始		摂取終了 1週間後
		1週間目	2週間目	
Enterobacteriaceae	7.7±0.9 (7/7)	8.2±0.8 (7/7)	7.9±0.7 (7/7)	8.0±0.5 (7/7)
Staphylococcus	4.9±1.1 (6/7)	4.1±1.2 (7/7)	4.4±1.2 (6/7)	4.4±1.2 (6/7)
Streptococcus	6.8±0.5 (2/7)	7.9±0.4 (3/7)	7.6±1.1 (4/7)	8.0±1.0 (3/7)
Enterococcus	6.5±1.1 (7/7)	6.6±1.3 (7/7)	6.8±1.3 (7/7)	7.1±1.2 (7/7)
Bacillus	6.1±2.2 (4/7)	5.0±2.0 (5/7)	3.6±0.9 (5/7)	3.2±0.3 (5/7)
Pseudomonas	(0/7)	3.0 (1/7)	4.3 (1/7)	(0/7)
Yeasts	3.3±0.2 (2/7)	3.3±1.1 (3/7)	3.3±1.0 (2/7)	2.7±0.6 (2/7)
Bifidobacterium	9.8±0.6 (7/7)	10.1±0.3 (7/7)	10.2±0.3*(7/7)	10.1±0.2 (7/7)
Eubacterium	9.3±0.8 (7/7)	9.7±0.3 (7/7)	9.5±0.5 (7/7)	9.8±0.1 (7/7)
Peptostreptococcus	9.3±0.4 (4/7)	9.5±0.4 (3/7)	9.4±0.9 (3/7)	9.2±0.3 (4/7)
Lactobacillus	5.7±1.6 (7/7)	6.2±1.8*(7/7)	6.7±1.2*(7/7)	7.0±0.9 (7/7)
Lec (+) Clostridium	6.5±2.4 (4/7)	6.1±2.3 (4/7)	5.1±1.6 (3/7)	6.2±1.4 (3/7)
C. perfringens	7.5±1.5 (3/7)	7.1±1.4 (3/7)	5.8±1.4 (2/7)	7.0±0.2 (2/7)
Lec (-) Clostridium	7.8±0.5 (7/7)	7.7±0.6 (7/7)	7.9±0.4 (7/7)	7.7±0.5 (7/7)
C. difficile	6.1 (1/7)	5.5 (1/7)	2.6 (1/7)	(0/7)
Veillonella	6.3±1.3 (7/7)	6.2±1.4 (7/7)	6.3±1.6 (7/7)	6.8±0.9 (7/7)
Megasphaera	(0/7)	(0/7)	(0/7)	(0/7)
Bacteroidaceae	9.1±0.6 (7/7)	9.7±0.2 (7/7)	9.8±0.5 (7/7)	9.9±0.2 (7/7)
B. flagilis group	9.1±0.6 (7/7)	9.7±0.2 (7/7)	9.8±0.5 (7/7)	9.9±0.2 (7/7)
Fusobacterium	5.2±1.7 (7/7)	5.8±1.9 (5/7)	6.8±2.0 (6/7)	5.7±1.8 (7/7)
Total counts	10.2±0.5	10.5±0.2	10.5±0.4	10.4±0.1

a : 平均値±標準偏差 (糞便1gあたりの菌数の対数値) カッコ内は検出率を示す  
 摂取前と比べて; \*p<0.05

び2週間目で有意(各々p<<0.01、p<0.05)に増加した。  
*Clostridium perfringens* は摂取前では7名中5名に検出されたが、摂取期間中の検出率は減少傾向にあり、摂取開始2週間目には7名中1名に減少した(表4)。外皮ファイバー摂取により、被験者個々のビ菌菌数の増加が認められた(図5)。特に、菌数の最も少なかった被験者については、摂取開始1週間目に約20倍に増加した。試験期間中のビ菌の占有率は、摂取前に比べて摂取開始1週間目で有意に(p<0.05)増加したが、摂取開始2週間目には若干減少した。

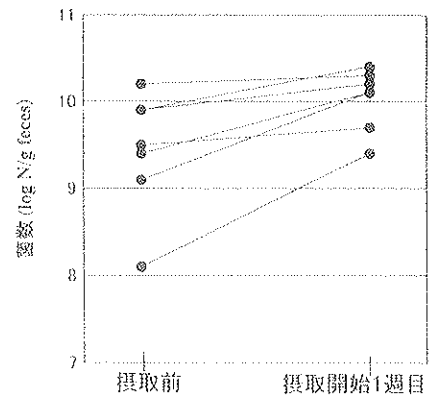


図5 カカオ豆外皮ファイバー摂取による各被験者のビフィズス菌数の変化

表4 健康人の腸内フローラに及ぼすカカオ豆外皮ファイバー摂取の影響 (女性7名)

菌種	摂取前	摂取開始		摂取終了 1週間後
		1週間目	2週間目	
Enterobacteriaceae	7.7±0.8 (7/7)	7.6±0.7 (7/7)	7.8±0.3 (7/7)	8.1±0.5 (7/7)
Staphylococcus	4.9±1.6 (2/7)	4.2±0.6 (4/7)	3.7±0.9 (4/7)	3.8±0.8 (3/7)
Streptococcus	7.4 (1/7)	7.7±0.0 (2/7)	8.1 (1/7)	8.1 (1/7)
Enterococcus	6.6±1.1 (7/7)	7.1±1.5 (7/7)	7.3±1.5 (7/7)	7.5±0.7 (7/7)
Bacillus	5.0±2.3 (5/7)	4.6±2.1 (6/7)	4.6±2.1 (6/7)	5.2±2.5 (6/7)
Pseudomonas	(0/7)	2.6 (1/7)	(0/7)	(0/7)
Yeasts	4.9±0.2 (4/7)	4.1 (1/7)	4.4±1.0 (4/7)	4.3±0.9 (3/7)
Bifidobacterium	9.4±0.7 (7/7)	10.0±0.4*(7/7)	10.0±0.5*(7/7)	10.1±0.4 (7/7)
Eubacterium	8.8±0.5 (7/7)	9.2±0.6 (7/7)	9.4±0.7 (7/7)	9.7±0.5 (7/7)
Peptostreptococcus	8.5±0.2 (3/7)	8.0±0.8 (3/7)	8.5±0.7 (3/7)	8.8±0.3 (3/7)
Lactobacillus	5.8±1.3 (7/7)	6.4±1.0 (7/7)	6.7±1.2 (7/7)	6.3±0.9 (7/7)
Lec (+) Clostridium	6.1±1.2 (5/7)	6.0±0.8 (2/7)	4.6 (1/7)	6.0±1.0 (3/7)
C. perfringens	6.1±1.2 (5/7)	6.0±0.8 (2/7)	4.6 (1/7)	6.0±1.0 (3/7)
Lec (-) Clostridium	7.7±0.6 (7/7)	7.3±0.6 (7/7)	7.4±0.5 (7/7)	7.5±0.3 (7/7)
C. difficile	(0/7)	(0/7)	(0/7)	(0/7)
Veillonella	5.6±1.6 (6/7)	5.1±1.3 (6/7)	5.9±1.3 (6/7)	4.7±0.9 (7/7)
Megasphaera	(0/7)	(0/7)	(0/7)	(0/7)
Bacteroidaceae	9.1±0.8 (7/7)	9.5±0.2 (7/7)	9.6±0.4 (7/7)	9.8±0.4 (7/7)
B. flagilis group	9.1±0.8 (7/7)	9.5±0.2 (7/7)	9.6±0.4 (7/7)	9.8±0.4 (7/7)
Fusobacterium	4.2±0.9 (4/7)	5.6±1.7 (3/7)	4.7±1.5 (3/7)	4.3±0.8 (3/7)
Total counts	9.8±0.5	10.3±0.3**	10.3±0.4*	10.4±0.4

a : 平均値±標準偏差 (糞便1gあたりの菌数の対数値) カッコ内は検出率を示す  
 摂取前と比べて; \*p<0.05、\*\*p<0.01

Bacteroidaceae の占有率は、摂取前に比べて摂取期間中やや減少する傾向にあった。

#### 4. 外皮エキスおよび外皮ファイバー摂取による糞便 pH の変化

両試料による糞便 pH は摂取前 pH6.2 であったが、摂取 1 週間目及び 2 週間目とほとんど変化はなかった。

#### 5. 外皮エキスおよび外皮ファイバー摂取による便通状態

外皮エキス摂取による排便については、被験者 7 名中 5 名は特に変化はなかったが、残りの 2 名の被験者は外皮エキスの摂取により摂取前に比べて便通が改善された。外皮ファイバー摂取により排便回数は増加傾向を示し、摂取前 1 週間の排便回数 5.3 回/週が、摂取開始 1 週間で 7 回/週、摂取開始 2 週間では 8.8 回/週に増加し、摂取終了 1 週間では 6.3 回/週に減少した。排便については 7 名中 6 名の被験者が外皮ファイバーの摂取により便通が良くなった。

#### 考察

食用ニンジンからピフィズス菌の生育因子 (BGF)、バンテテイン関連化合物が見出されている。しかしながら、この化合物を必須ビタミンとして要求するピフィズス菌の割合は高いものの、人工栄養児に投与しても顕著な効果は認められないこと、ビタミンなどの微量物質は大腸菌などの腸内菌からもかなりの量が供給されることから、ピフィズス菌の腸内増殖にとってより重要な因子は、糖源であると指摘されている。一方、プロピオン酸菌は、ピフィズス菌増殖物質 (BGS) を生産し、その活性物質は新規物質 2-アミノ-3-カルボキシ-1,4-ナフトキノンであり、培養試験では培地中に 0.1ng/ml 添加することでその増殖効果を示すことが明らかにされている。また、プロピオン酸菌醗酵液粉末の投与によってピフィズス菌数が、低い被験者においては菌数および総菌数に対する占有率も著しく増加することからも、糖質以外に腸内のピフィズス菌を増加させる因子の存在が考えられる。一方、食物繊維は、その組成や性状が異なるため、腸内菌叢に与える影響は一様ではない。例えば、水溶性食物繊維である米ぬかヘミセルロースおよび高メトキシルペクチンをそれぞれ単独でラットに与えると前者ではピフィズス菌と Bacteroides が増加し、後者では Bacteroides が増加する。不溶性食物繊維であるコーンファイバーは健康人の腸内菌叢に影響しない。水溶性食物繊維ブランタゴオパータは健康人では Bacteroides、*Eubacterium* 及び糞便中の総菌数が有意に減少する。

現研究において腸内菌の増殖に対する影響を培養試験で検索したところ、外皮エキスには糖質以外に水溶性食物繊維を含むピフィズス菌増殖物質のあることが示唆された。さらに、この作用は胃酸、消化酵素に対しても極めて安定なことが示された。これは実際にヒトに投与し、*Lactobacillus*、ピ菌の有意な増加が認められたことから支持された。オリゴ糖はピ菌の菌数だけでなく、占有率も増加するが、今回の試験ではピ菌占有率に有意差が認められなかった。これは、オリゴ糖摂取試験における被験者の摂取前のピ菌占有率が 7.6~17.8% であるのに比べ、今回の被験者の摂取前占有率が 52% と高かったことによると考えられる。これは、摂取前のピ菌占有率が 20% 以下であった 2 名の被験者では、外皮エキス摂取により、ピ菌占有率が約 3 倍に増加したことからも支持される。このように外皮エキスの摂取は、ピ菌を選択的に増加させることから、腸内菌叢改善効果があると考えられる。また、そのうちの 1 名に便通改善が認められた。この便通改善は、外皮エキスが水溶性物質であり、不溶性食物繊維のような糞便増量効果ではないことから、腸内菌叢改善によることも考えられる。一方、外皮ファイバーは、腸内菌に分解されないリグニンが最も多く含まれているに

もかわらず、ビ菌の有意な増加や *Eubacterium*、*Lactobacillus* 等の嫌気性菌の増加傾向、総菌数の有意な増加と *Clostridium* の検出率の低下が認められた。摂取前のビ菌占有率が48%と高かったにも関わらず、有意な増加が認められた。ビ菌占有率が50%以下であった2名の被験者は、その占有率は約2倍に増加しており、外皮エキスと同様な成績が得られた。便通の変化については、被験者7名中6名という高い割合で便通の改善や排便回数が増加しており、外皮ファイバーの摂取によって排便状態を良好に導くことが示唆された。外皮ファイバーは、糞便量の増大や腸内通過時間の短縮という不溶性繊維の特徴的な効果の他に、腸内菌叢の改善効果も排便を改善する働きがあると推察される。しかしながら、外皮エキスおよび外皮ファイバーによる *Lactobacillus*、ビ菌の増加が認められたにも関わらず、糞便 pH に差が認められなかったことについて本研究から説明することはできなかった。今後、外皮エキスや外皮ファイバー摂取時の短鎖脂肪酸や腸内腐敗産物などの腸内代謝についても明らかにする予定である。今回の成績から、カカオ豆外皮は腸内菌叢を改善する新しい資源として利用できることが明らかとなった。