

ペオノールとかき肉エキスまたはアデノシンの併用が 乳酸菌増殖に与える影響について

根 來 宗 孝¹⁾, 澤 村 弘 美²⁾, 榎 原 周 平¹⁾, 渡 邊 敏 明^{1,2)}, 石 田 達 也³⁾,
松 井 博 之³⁾, 松 田 芳 和³⁾

(¹⁾大阪青山大学健康科学部健康栄養学科*, (²⁾兵庫県立大学環境人間学部**, (³⁾日本クリニック株式会社中央研究所***)
(受付 2022 年 8 月 30 日, 受理 2022 年 10 月 11 日)

The Effects of the combination of paeonol and oyster powder extract or adenosine on the growth of lactic bacteria (*Lactobacillus plantarum*)

Munetaka NEGORO¹⁾, Hiromi SAWAMURA²⁾, Shuhei EBARA¹⁾, Toshiaki WATANABE^{1,2)},
Tatsuya ISHIDA³⁾, Hiroyuki MATSUI³⁾, Yoshikazu MATSUDA³⁾

¹⁾Department of Health and Nutrition, Faculty of Health Science, Osaka Aoyama University

²⁾School of Human Science and Environment, University of Hyogo

³⁾Central Research Institute, Japan Clinic Co, Ltd.

Summary

Oysters (*Crassostrea gigas*) are a highly nutritious shellfish that are widely consumed worldwide, and their polysaccharides have been confirmed to have prebiotic properties through *in vivo* digestion. It has been demonstrated that polysaccharides derived from oysters greatly increases *Lactobacillus reuteri*. We have previously reported on the antioxidant activity of paeonol (2'-Hydroxy-4'-methoxyacetophenone), which has the chemical structure of hydroxyacetophenone in this compound, and its oral administration showed therapeutic effect on ulcerative colitis in rats. The absorption kinetics of paeonol in rat intestines has also been investigated. On the other hand, paeonol has been reported to have an antibacterial effect, so we tried to examine the effect of this compound on lactic bacteria (*Lactobacillus plantarum*) *in vitro* when used in combination with oyster powder extract or adenosine. Adenosine was used as a component confirmed in the oyster powder extract tested. As a result of this study, we found that the combined use of paeonol and oyster powder extract was effective in restoring the growth of lactic bacteria. Specifically, the recovery rate of the growth was 92 % in the 1 % oyster powder extract containing 25 mM paeonol group compared to the 5 % DMF control group. We also confirmed the effect of the combination with paeonol and adenosine on lactobacillus proliferation, but the recovery rate of the combination with 0.125 mM adenosine containing 25 mM paeonol was only 69 %. Therefore, it is suggested that oyster powder extract may include something ingredients other than adenosine, indicating that can be expected to have the effect of increasing the growth of *Lactobacillus plantarum*.

牡蠣（かき）は世界的に広く消費されている栄養価の高い貝類の一種であり，含有される多糖類の中で，消化管で部分的にしか加水分解されない難消化性多糖類にはプレバイオティクス的な特性が確認されている。消化過程で出現する難消化性多糖類の部分水解物は，微生物群の構成内容と多様性を調節し，特に *Bacteroides* 属，*Prevotella* 属，*Faecalibacterium* 属などの有益な細菌の存在量を増加させ

る可能性が指摘されている¹⁾。さらに，かき由来の多糖類を経口投与することでアルコール性肝障害を予防し，腸内の *Lactobacillus reuteri* を大幅に増加させることも報告されている²⁾。われわれは，これまでにヒドロキシアセトフェノンの化学構造を骨格にもつペオノール (2'-Hydroxy-4'-methoxyacetophenone) の抗酸化作用について報告を行ってきた³⁾。本化合物については，潰瘍性大腸炎ラット

*所在地：大阪府箕面市新稲2-11-1（〒562-8580）

**所在地：兵庫県姫路市新在家本町1-1-12（〒670-0092）

***所在地：京都市北区大將軍1（〒603-8331）

連絡先：E-mail：m-negoro@osaka-aoyama.ac.jp（根來）

に経口投与すると治療効果が認められること⁴⁾、ラットの腸における吸収動態⁵⁾、抗菌作用⁶⁾が報告されている。特にその抗菌活性は、*E. coli* DH5 α 株では94%、*P.aeruginosa* PAO1 株では92%⁶⁾と強力である。

一方、ペオノールの位置異性体であるアポシニン(4-Hydroxy-3-methoxyacetophenone)ではNADPHと併用することにより、脳卒中モデル実験動物の脳神経細胞に対する保護作用が報告されている⁷⁾。このようなアポシニンとNADPHとの併用効果から本実験ではペオノールの抗菌作用に着目し、かき肉エキスあるいはNADPHの構成成分であるアデノシンとペオノールを併用した場合に、*in vitro*で乳酸菌にどのような効果をもたらされるのか検討を試みた。

実験方法

1. 乳酸菌の培養

乳酸菌 *L. plantarum* ATCC 8014 株を完全栄養培地(MRS 培地: Fluka Analytical 社製)で培養した。このときジメチルホルムアミド(DMF)に溶解した0.5 Mのペオノール(東京化成工業株式会社製, 東京都)を最終濃度25 mMとなるように培地に加えた。

かき肉エキス粉末(かき肉エキスサプリメント(オイスターZパウダー[®]: 日本クリニック株式会社, 京都市))0.15 gを生理食塩水750 μ Lに溶解後, 15,000 rpm \times 10分間遠心分離し, 得られた上清を0.22 μ mのフィルターでろ過したものをかき肉エキスとした。ペオノール添加培地に、このエキスを最終濃度0.2または1.0%になるように加え、増殖回復を検討した。調製したかき肉エキスにはアデノシンが300 μ mol/100 g(日本食品分析センター, 東京)が含まれていたため、エキス0.2または1%添加培地には、アデノシンがそれぞれ6 μ Mまたは30 μ Mのアデノシンが含まれたことになる。

これらとは別に、アデノシン(富士フィルム和光純薬株式会社製, 東京都)を最終濃度0.125 mMから1 mMを培地に加え、増殖への影響を検討した。

乳酸菌の増殖はマイクロプレートリーダーのカイネティック測定プログラムを用いて、室温、OD 600 nmで吸光度を経時的に測定した。

2. 統計処理

かき肉エキス添加群においては、かき肉エキスを培地に添加すると、添加量に依存して吸光度の違いが認められたため、コントロール培地を含め、測定0時間の吸光度で補正を行ったが、その他の実験系では実測値をそのまま用いた。これらの測定値の群間比較は、統計アプリケーション(Statcel 4: オーエムエス出版, 東京都)を用いた、一元配置分散分析と、Scheffeによる多重比較検定により実施した。

結果と考察

ペオノール(Fig 1)は、古くから牡丹の根由来の生薬として知られ、これまでに抗酸化作用、抗炎症作用^{7,8)}およびオートファジーの促進効果⁹⁾などについて報告があるものの、乳酸菌に対するかき肉エキスやアデノシンとの併用効果は確認されていない。

かき肉エキスとペオノール併用が乳酸菌増殖に及ぼす影響について検討した結果を Fig. 2 に示した。ペオノールを添加すると乳酸菌の増殖は大きく阻害されるが、かき肉エキスを同時に添加した場合には、培養36時間では5% DMFコントロール群に対して、1% かき肉エキス+ 25 mM ペオノール添加で92%、0.2% かき肉エキス+ 25 mM ペオノール添加で87%にまで増殖が回復した。また培養6時間では、5%DMF コントロール群に対して、0.2% かき肉エキス+ 25 mM ペオノール添加群では有意($p < 0.01$)な増殖促進が認められた。

Fig. 3には0.125 mMから1 mMのアデノシン単独添加の乳酸菌増殖に及ぼす影響について検討した結果を示した。今回検討した濃度範囲においては、アデノシンを単独添加しても、乳酸菌の増殖に有意な影響は認められなかった。

Fig. 4に、0.125 mMから1 mMのアデノシンとペオノールを併用した時の乳酸菌増殖を示した。0.125 mM アデノシン+ 25 mM ペオノール添加群では、他群と比較すると培養6時間および15時間で有意($p < 0.01$)な増殖を認めた。しかしながら36時間では5%DMF コントロール群に対して、0.125 mM アデノシン+ 25 mM ペオノール添加群の乳酸菌の増殖は69%にとどまった。

このようにペオノール添加培地では、培養6時間目における乳酸菌の増殖に関して、0.2% かき肉エキス添加と0.125 mM アデノシン添加は似たような効果を示した。しかし、0.2% かき肉エキス添加培地でのアデノシン濃度は6 μ Mにすぎないことから、アデノシン以外のかき肉エキスに含まれる成分が、乳酸菌の増殖に影響を与えた可能性が示唆された。従って、ペオノールとかき肉エキスを併用することにより認められる乳酸菌の増殖効果については、ペオノールとアデノシン併用のみでは説明ができず、かき由来の多糖類^{1,2)}を含めたアデノシン以外の成分も複数の因子が関与している可能性がある。今後、ペオノールとか

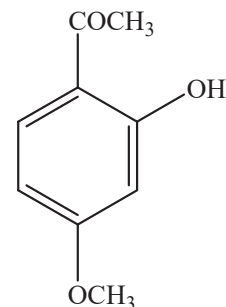


Fig. 1. The chemical structure of Paenol (2-Hydroxy-4-methoxyacetophenone).

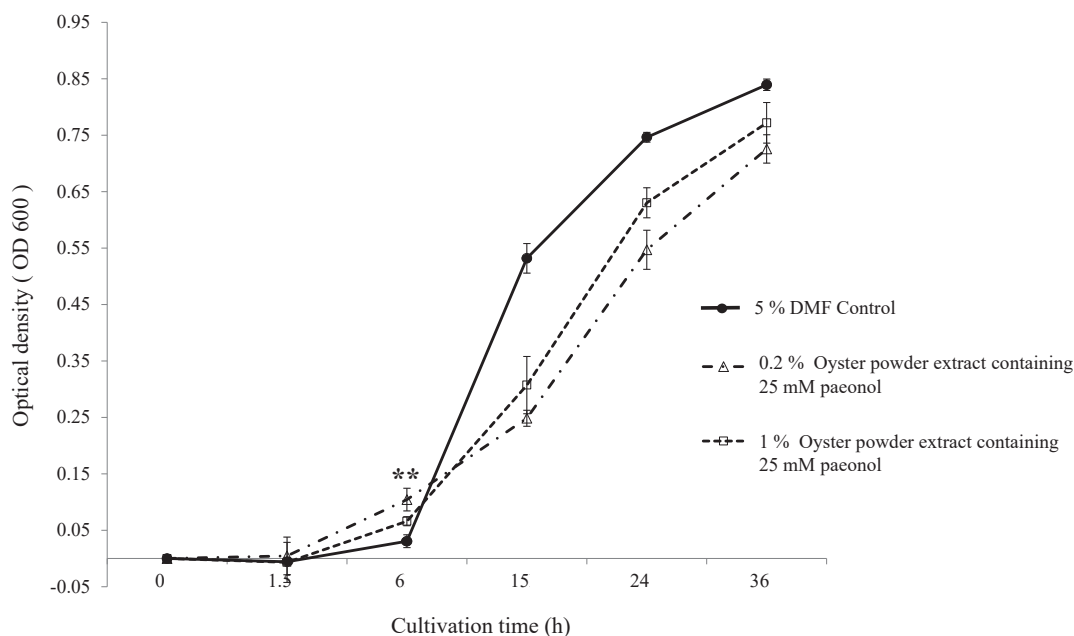


Fig. 2. Exponential growth curves for *L. plantarum* ATCC 8014 strain. The cells were grown in 5% DMF media in the absence (●) and presence of 0.2% (△) or 1% (□) oyster powder extract containing 25 mM paeonol, respectively. Each point represents the mean of at three determinations. Error bars are SD. Significance ($p < 0.01$, Scheffe's F test) is expressed as two asterisks.

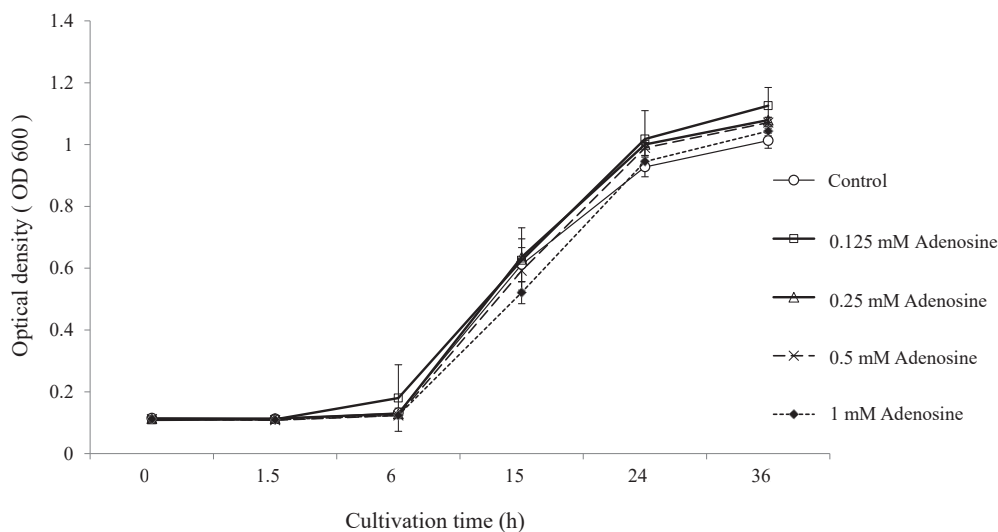


Fig. 3. Exponential growth curves for *L. plantarum* ATCC 8014 strain. The cells were grown in media in the absence (○) and presence of four adenosine concentrations (0.125 mM -1 mM), respectively. Each point represents the mean of at three determinations. Error bars are SD.

き肉エキスを併用することにより、今回認められた乳酸菌の増殖効果をもたらすかき肉エキスに含まれる成分を明らかにしたいと考えている。さらに実験動物にペオノールとかき肉エキスを含む混合物を経口投与し、腸内細菌叢に与える影響についても検討を加えたい。

利益相反

本論文の発表に関して、申告すべき COI 状態にはないが、著者に含まれる石田、松井、松田は牡蠣肉エキス粉末を供試した日本クリニックに所属している。

参考文献

- 1) Ma Y, Jiang S, Zeng M (2021) In vitro simulated digestion and fermentation characteristics of polysaccharide from oyster (*Crassostrea gigas*), and its effects on the gut microbiota. Food Res Int 149: 110646.
- 2) Jiang S, Ma Y, Li Y, Liu R, Zeng M. (2021) Mediation of the microbiome-gut axis by oyster (*Crassostrea gigas*) polysaccharides: A possible protective role in alcoholic liver injury. Int J Biol Macromol

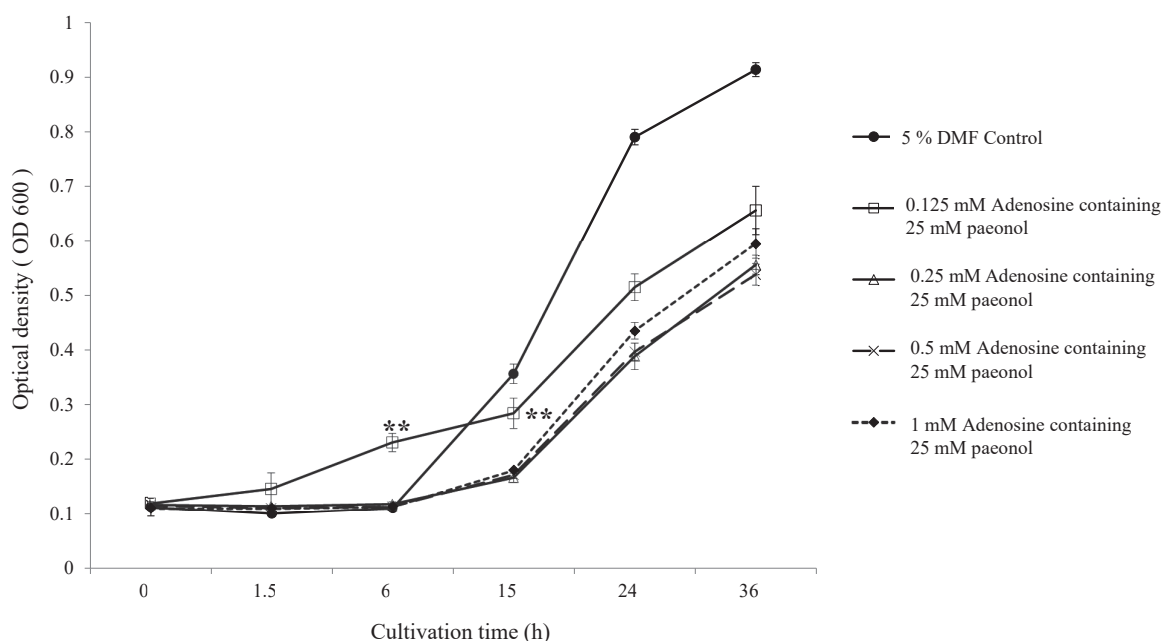


Fig. 4. Exponential growth curves for *L. plantarum* ATCC 8014 strain. The cells were grown in 5% DMF media in the absence (●) and presence of four adenosine concentrations (0.125 mM-1 mM) containing 25 mM paeonol, respectively. Each point represents the mean of at three determinations. Error bars are SD. Significances ($p < 0.01$, Scheffé's F test) are expressed as two asterisks.

182: 968–976.

- 3) 根来宗孝, 香西彩加, 澤村弘美, 榎原周平, 渡邊敏明, 前川隆嗣 (2020) かつおだし及びその原材料等の抗酸化能発現に関する研究. 微量栄養素研究 37: 33–37.
- 4) Zong SY, Pu YQ, Xu BL, Zhang T, Wang B. (2017) Study on the physicochemical properties and anti-inflammatory effects of paeonol in rats with TNBS-induced ulcerative colitis. *Int Immunopharmacol* 42: 32–38.
- 5) Hu RF, Fang CW, Zou AF, Mei KK, Tang J, Han LL. (2008) Studies on absorption kinetics of paeonol and paeonol-beta-CD in rat's intestines. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 33: 35–37.
- 6) Jiao J, Sun L, Guo Z, Hou S, Holyst R, Lu Y, Feng X. (2016) Antibacterial and anticancer PDMS surface for mammalian cell growth using the Chinese herb extract paeonol (4-methoxy-2-hydroxyacetophenone). *Sci Rep* 6: 38973.
- 7) Qin YY, Li M, Feng X, Wang J, Cao L, Shen XK, Chen J, Sun M, Sheng R, Han F, Qin ZH (2017) Combined NADPH and the NOX inhibitor

apocynin provides greater anti-inflammatory and neuroprotective effects in a mouse model of stroke. *Free Radic Biol Med* 104: 333–345.

- 8) Tang H, Li K, Zhang S, Lan H, Liang L, Huang C, Li T (2021) Inhibitory effect of paeonol on apoptosis, oxidative stress, and inflammatory response in human umbilical vein endothelial cells induced by high glucose and palmitic acid induced through regulating SIRT1/FOXO3a/NF- κ B pathway. *J Interferon Cytokine Res* 3: 111–124.
- 9) Choy KW, Mustafa MR, Lau YS, Liu J, Murugan D, Lau CW, Wang L, Zhao L, Huang Y (2016) Paeonol protects against endoplasmic reticulum stress-induced endothelial dysfunction via AMPK/PPAR δ signaling pathway. *Biochem Pharmacol* 116: 51–62.
- 10) Dong Z, Xie X, Sun Y, Wu H, Dai M (2020) Paeonol prevents lipid metabolism dysfunction in palmitic acid-induced HepG2 injury through promoting SIRT1-FoxO1-ATG14-dependent autophagy. *Eur J Pharmacol* 880: 173145.