



<原著>

## 潰瘍性大腸炎モデルラットにおける カフェイン摂取の病態への影響

岡田光貴<sup>1,2)</sup>、佐々木流空<sup>2)</sup>、登尾慎太郎<sup>2)</sup>、田岡優冴<sup>2)</sup>、山本海都<sup>2)</sup>

### Effects of caffeine intake on pathogenesis of experimental ulcerative colitis in rats

Kohki Okada<sup>1,2)</sup>, Ruku Sasaki<sup>2)</sup>, Shintaro Noborio<sup>2)</sup>, Yugo Taoka<sup>2)</sup>, Kaito Yamamoto<sup>2)</sup>

**Summary** The study examined the effects of caffeine on the pathogenesis of ulcerative colitis (UC) in rats. UC was experimentally induced by administering dextran sulfate sodium (DSS) orally for 10 days, after which the rats were maintained for 10 days on distilled water, 0.3 g/L caffeine, or 1.0 g/L caffeine solution as drinking water (N, 0.3 CAF, and 1.0 CAF groups, respectively). Rats in the N group gained weight, while those in the 1.0 CAF group lost weight. UC severity scores significantly increased in the 1.0 CAF group. Neutrophil infiltration in the colon tissue was more severe in the 0.3 CAF and 1.0 CAF groups compared to the N group. The proinflammatory cytokine interleukin-6 increased in the serum and colon of rats in the 1.0 CAF group. These findings suggest that caffeine consumption may aggravate UC progression.

**Key words:** caffeine, dextran sulfate sodium, ulcerative colitis

#### I. 緒言

潰瘍性大腸炎 (UC) は厚生労働省が指定する難病であり、腹痛、下痢、および下血などの症状を主訴とする<sup>1)</sup>。日本におけるUCの患者数は右肩上がりに増加しており、近年は20万人を超えている<sup>2)</sup>。UCは症状の再燃と寛解を繰り返すため、患者の精神的・身体的負担が大きい。UCを完治するための手段は現状存在せず、患者は定期的な通院と検査

を必要とする。UCの病態には、環境要因、遺伝要因、免疫学的要因が指摘されているが、その詳細は未だ不明である<sup>3)</sup>。環境要因の中でも、食事習慣がUCの病態に与える影響は大きい。特に高炭水化物および高脂質の食事は腸内細菌の分布を乱し、UCを悪化に導くことが報告されている<sup>4,5)</sup>。そのため、UCの食事療法では炭水化物や脂質の摂り過ぎを防ぎつつ、十分なカロリーを含む食事が推奨されている<sup>6,7)</sup>。一方で、日常的な低カロリー食、および再

<sup>1)</sup>京都橘大学 健康科学部 臨床検査学科  
〒607-8175 京都府京都市山科区大宅山田町34

<sup>2)</sup>京都橘大学大学院 健康科学研究科  
〒607-8175 京都府京都市山科区大宅山田町34

連絡先：岡田 光貴  
京都橘大学健康科学部臨床検査学科  
Tel: +81-755-74-4486 (ex.4942)  
E-mail: okada-ko@tachibana-u.ac.jp

<sup>1)</sup>Department of Medical Technology and Sciences, Faculty of Health Sciences, Kyoto Tachibana University, 34 Yamada-cho Oyake, Yamashina-ku, Kyoto-shi, Kyoto, 607-8175, Japan

<sup>2)</sup>Graduate School of Health Sciences, Kyoto Tachibana University, 34 Yamada-cho Oyake, Yamashina-ku, Kyoto-shi, Kyoto, 607-8175, Japan

受付日：2025年6月2日  
採択日：2025年9月20日

燃時の絶食によって寛解導入に至ったUC症例もあり、確立した食事療法は存在しないのが実情である<sup>8)</sup>。

また、嗜好品がUCの病態に与える影響を探索する報告は多い。UC患者は「食事制限がない人が羨ましい」、「食事による症状の悪化が不安」と考える傾向が示されている<sup>9)</sup>。そのため、UCに罹患していても安心して摂取できる嗜好品の選定は重要である。近年、コーヒーの摂取量が多いほど、UCの重症化リスクが減少することが報告された<sup>10)</sup>。通常、コーヒーは大腸への刺激物でありUC患者へ推奨すべきでない<sup>11)</sup>と認識されているため、これは従来の報告と異なる興味深い知見である。コーヒーの最も特徴的な成分はカフェインであり、これは苦味をもつアルカロイドの一種で、中枢神経系に対して覚醒作用がある<sup>11)</sup>。カフェインの摂取は2型糖尿病や肝疾患のリスク軽減に寄与するなど、健康効果に関する報告が多い<sup>12, 13)</sup>。一方で、カフェインはカルシウムやビタミンB群の吸収阻害や排泄促進に寄与するため、関連疾患の発症と悪化が懸念されている<sup>14)</sup>。以上のように、カフェインにはメリットとデメリットの両面が報告されており、特定の疾患に対するその影響も情報が錯綜している場合が多い。

我々は、硫酸化デキストラン (DSS) および2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) 大腸炎を発症させたラットに、各種単糖類を過剰に含む特殊飼料を与え、経過を観察した経験がある<sup>15, 16)</sup>。ヒトを対象とした研究では様々な環境要因が結果に反映されるが、動物実験ではその影響が抑えられ、研究対象とする因子の効果を深く探求することが可能である。今回、我々はコーヒーの摂取が実際にUCの病態を改善するのか、問題提起となり得ると考えた。そこで、コーヒーの最も特徴的な成分であるカフェインに注目し、それがラットの実験性UCの病態に与える影響を精査するという、本研究の発想に至った。ラットの場合、カフェインの摂取がストレス解消に繋がる可能性は低く、純粋にUCの病態への影響を精査できると考えた。本研究はUCにおけるカフェインの実質的な効果のエビデンスとして、消化器内科学や食品科学分野への有益な情報提供となりうる。

## II. 材料と方法

### 1. 対象動物

本研究は京都橋大学動物実験委員会に承認を受け実施した (承認番号: 23-04)。野生型Slc: Wistarラット (WT、オス、9週齢、220-250 g) は、清水実験材料株式会社 (京都) から入手した。実験に先立ち固形飼料 (MF、オリエンタル酵母工業株式会社、東京) と蒸留水を自由に摂取できるようにして、1週間飼育した。実験期間中は温度 (22℃) と湿度 (60%) を制御し、昼夜のサイクルが12時間おきに切り換わるよう人工光で調整した。ラットは金網を敷いたプラスチックケージで飼育した。

### 2. 材料

カフェイン粉末、DSS粉末、および3,3'-ジアミノベンジジン (DAB) は、富士フイルム和光純薬工業株式会社 (東京) から購入した。マイヤーヘマトキシリン液とピュア・エオシン液は武蔵化学株式会社 (東京) から入手した。インターロイキン (IL) -6、IL-1 $\beta$ 、およびTumor necrosis factor (TNF) - $\alpha$ の酵素結合免疫吸着法 (ELISA) 測定キット、ウサギ由来抗ラット好中球エラスターゼ (NE) ポリクローナル抗体 (Anti-NE IgG、製品番号 PAA181RA01)、タンパク抽出液PRO-PREP™はコスモ・バイオ株式会社 (東京) から入手した。遺伝子抽出液TRIzol™ reagent、SuperScript™ II Reverse Transcriptase、PowerUp SYBR Green Master Mix、およびIL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-10、Transforming growth factor (TGF) - $\beta$ のプライマーはThermo Fisher Scientific, Inc. (Waltham, MA, USA) から入手した。設計したプライマーの配列は過去に使用したものと同様で、Table 1の通りである<sup>15, 16)</sup>。Peroxidase (HRP) -labeled anti-rabbit IgG (H+L) goat-poly IgGはフナコシ株式会社 (東京) から入手した。その他の試薬は全て和研薬株式会社 (京都) あるいはナカライテスク株式会社 (京都) から購入した。

### 3. 方法

#### 1) 動物実験のプロトコル

動物実験に先立ち、DSS粉末を3%の濃度になるよう蒸留水に溶解した (3%DSS)。また、カフェイン粉末を0.3 g/Lあるいは1.0 g/Lの濃度になるよう蒸留水に溶解した。このカフェイン濃度は、カフェイ

Table 1 List of primers used in this study.

	Gene	Forward	Reverse	Size (bp)
For Real-Time PCR	<b>β-Actin</b>	5'-TGTGTTGTCCCTGTATGCCTCTG-3'	5'-ATAGATGGGCACAGTGTGGGTG-3'	85
	<b>IL-1β</b>	5'-CACCTCTCAAGGAGAGCACAGA-3'	5'-ACGGGTTCCATGGTGAAGTC-3'	81
	<b>IL-6</b>	5'-ATATGTTCTCAGGGAGATCTTGAA-3'	5'-GTGCATCATCGCTGTTCATACA-3'	80
	<b>IL-10</b>	5'-CCCTCTGGATACAGCTGCG-3'	5'-GCTCCACTGCCTTGCTTTTATT-3'	69
	<b>TNF-α</b>	5'-GTGATCGGTCCCAACAAGGA-3'	5'-AGGGTCTGGGCCATGGAA-3'	71
	<b>TGF-β</b>	5'-ACCTGCAAGACCATCGACATG-3'	5'-CGAGCCTTAGTTTGGACAGGAT-3'	85

Table 2 Criteria used for DAI scoring.

DAI scores			
Scores	Weight loss (%)	Stool consistency	Occult/gross bleeding
0	None	Normal	Normal
1	1–5	(Completely solid stool)	(Stool that does not contain any blood)
2	6–10	Loose stool	Occult bleeding
3	11–20	(Soft, but not watery stool)	(Blood on stool surface)
4	>20	Diarrhea (Completely watery stool)	Gross bleeding (Mucous and bloody stool)

ン摂取がラットの摂食行動に与える影響を検証した過去の報告に倣った<sup>17)</sup>。吸水瓶に3%DSSを充填し、全てのWT (N=24) にそれを自由摂取させて10日間飼育することで、ラットに実験性UCを発症させた。その後、N=8ずつ以下の①-③のグループに分類した。① Negative control (N) 群 – 吸水瓶の中身を3%DSSから蒸留水に切り替え、それを自由摂取させて10日間飼育した対照群。② 0.3 CAF群 – 吸水瓶の中身を3%DSSから0.3 g/Lカフェイン溶液に切り替え、それを自由摂取させて10日間飼育した対照群。③ 1.0 CAF群 – 吸水瓶の中身を3%DSSから1.0 g/Lカフェイン溶液に切り替え、それを自由摂取させて10日間飼育した対照群。実験期間中、各ラットの体重を毎朝測定し、臨床的重症度 (DAI) スコアをTable 2に示す基準に基づいて0-4の数値で評価した<sup>18)</sup>。実験の20日目に3種混合麻酔 (塩酸メドミジン0.15 mg/kg+ミダゾラム 2 mg/kg+酒石酸ブトルファノール2.5 mg/kg) を腹腔内注射し、深麻酔下で解剖を実施した。解剖時に心臓から採血し、大腸をすばやく摘出、その長さを測定した。

## 2) 検体の採取と調製

血液検体 (3 mL/ラット) は凝固を確認した後で遠心分離 (3,500 rpm、10分) し、得られた血清をチューブに移し、使用するまで-80℃で保存した。

大腸検体は摘出した後で均等に3分割し、直腸

に近い側から直腸部、中間部、近位部と名付けた。組織学的評価のために大腸各部位を10%ホルマリン/0.1Mリン酸緩衝液 (pH7.4) で固定し、その後パラフィンに包埋した。未固定の残存組織中のタンパク質とmRNAは以下の要領で抽出した。

大腸各部位 (直腸部、中間部、近位部) 300 mg をそれぞれ1.5 mLチューブに入れ、そこに1.0 mLのPRO-PREP™を添加し、-20℃で20分間インキュベートした。その後にチューブを遠心分離 (3,500 rpm、10分) し、得られた上清 (タンパク抽出液) をチューブに移し、使用するまで-80℃で保存した。

また、大腸各部位 (直腸部、中間部、近位部) 300 mg をそれぞれ1.5 mLチューブに入れ、そこに1.0 mLのTRIzol™ reagentを添加し、氷上で10分間インキュベートした。その後は、本試薬のプロトコルに従って大腸組織のmRNAを抽出した。続けてSuperScript™ II Reverse Transcriptaseを用いて、本試薬のプロトコルに従いmRNAからcDNAを合成、それらをチューブ内にて-20℃で保存した。本研究では、直腸部由来のタンパク抽出液およびcDNAを用いて得られた結果を採用した。

## 3) 大腸組織の病理組織学的解析

全ラットの大腸組織から3μm厚の組織切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン (H&E) 染色を実施した。ラットの大腸各部位 (直腸部、中間部、近位

部) 全てを鏡検し、最も炎症所見を強く認めた直腸部の写真を、本論文に掲載した。さらに、Anti- NE IgGを用いて、直腸部における好中球浸潤の程度 (NEの発現) を、DABを用いた免疫染色により確認した<sup>15, 16)</sup>。画像はBIOREVO BZ-9000顕微鏡 (株式会社キーエンス、大阪) を用いて撮影した。

#### 4) ELISA

血清中の炎症性サイトカイン濃度をELISAにて測定した。IL-6、IL-1 $\beta$ 、およびTNF- $\alpha$ 濃度を、それぞれのELISAキットを用いて、製品プロトコルに従って測定した。発色反応の吸光度はBio-Rad Laboratories, Inc (Hercules, CA, USA) のiMark<sup>TM</sup> マイクロプレートリーダーを用いて波長450 nmで測定した。

#### 5) Real-Time PCR

Real-Time PCRは、StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific社製) を用いて、過去の報告と同様の手法でサイトカイン5種類 (IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-10、TGF- $\beta$ ) を測定した<sup>15, 16)</sup>。分析試料には、各ラット群の直腸部から抽出したmRNAに由来するcDNAを採用した。ハウスキーピング遺伝子は $\beta$ -actinとし、N群の直腸部における各種サイトカインmRNA発現量を「1」とした相対定量値を算出した ( $\Delta\Delta CT$ 法)。

#### 6) ラット血清に対する生化学検査

オリエンタル酵母工業株式会社、長浜工場、長浜ライフサイエンスラボラトリー (滋賀) に外注し、ラット血清の生化学検査20項目を分析した。試料として、各群N=8のラット血清を等量混合し、試料間の個体差を平均化した。測定機器はJCA-BM6050 (日本電子株式会社、東京) であり、測定項目は次の通りである。総蛋白 (TP)、アルブミン (ALB)、グルコース (GLU)、尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (CRE)、総ビリルビン (T-Bil)、尿酸 (UA)、鉄 (Fe)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、アルカリホスファターゼ (ALP)、乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH)、クレアチンキナーゼ (CK)、コリンエステラーゼ (ChE)、総コレステロール (T-CHO)、トリグリセリド (TG)、LDL-コレステロール (LDL-C)、HDL-コレステロール

(HDL-C)、ビルビン酸 (PA)、乳酸 (LA)。

#### 7) 統計解析

各群間の有意差は統計解析ソフトウェアEasy R 4.3.1を用いて、Dunnett's testにより評価した<sup>19)</sup>。全ての数値データはグラフ内に平均値 $\pm$ 標準偏差 (SD) で示した。P値<0.05を統計的に有意とした。

### Ⅲ. 結果

#### 1. 飲用水と飼料の消費量

飲用水の消費量はN群 ( $18.2 \pm 2.82$  mL/day) と0.3 CAF群 ( $17.9 \pm 2.28$  mL/day) が同等で、1.0 CAF群 ( $22.5 \pm 5.08$  mL/day) はやや増加したが、有意差は認めなかった (Fig. 1A)。飼料の消費量はN群 ( $22.9 \pm 1.82$  g/day)、0.3 CAF群 ( $23.6 \pm 4.27$  g/day)、1.0 CAF群 ( $24.7 \pm 4.09$  g/day) の間でほとんど差を認めなかった (Fig. 1B)。

#### 2. 体重とDAIスコアの変動

実験10日目に給水瓶の中身を3%DSSから蒸留水 (N群) あるいはカフェイン溶液 (0.3 CAF群および1.0 CAF群) に切り替えてから、各群の体重変動に差を認めた。N群では体重が増加し、0.3 CAF群でも体重は増加傾向を示したもののN群に比べ有意に低かった (Fig. 2A)。一方、1.0 CAF群に関してはさらに体重を減少させ、一時的な回復を示したものの0.3 CAF群よりもさらに低い傾向を示した (Fig. 2A)。DAIスコアは実験10日目以降、N群で減少し、0.3 CAF群でも緩やかに減少を示した (Fig. 2B)。一方、0.3 CAF群では有意に増加した (Fig. 2B)。

#### 3. 大腸の長さの違い

大腸の長さはN群 ( $15.95 \pm 1.49$  cm)、0.3 CAF群 ( $16.54 \pm 1.31$  cm)、1.0 CAF群 ( $15.04 \pm 2.72$  cm) であり、各群間で有意差を認めなかった (Fig. 3A and B)。

#### 4. 大腸組織の病理組織解析

3群とも大腸組織における杯細胞の消失と粘膜上皮の脱落が高度であった (Fig. 4A)。特に0.3 CAF群と1.0 CAF群における免疫細胞の浸潤が高度であっ

た (Fig. 4A)。好中球の浸潤を確認したところ、N群よりも0.3 CAF群と1.0 CAF群の大腸組織で陽性部位 (茶褐色) が多く確認された (Fig. 4B)。

## 5. 血清中炎症性サイトカインの測定結果

血清中のIL-1 $\beta$ は、N群 ( $31.56 \pm 14.08$  pg/mL) と0.3 CAF群 ( $35.58 \pm 13.70$  pg/mL) に対して、1.0 CAF群 ( $23.00 \pm 11.80$  pg/mL) でやや低い傾向となったが、有意差は認めなかった (Fig. 5A)。血清中IL-6に関して

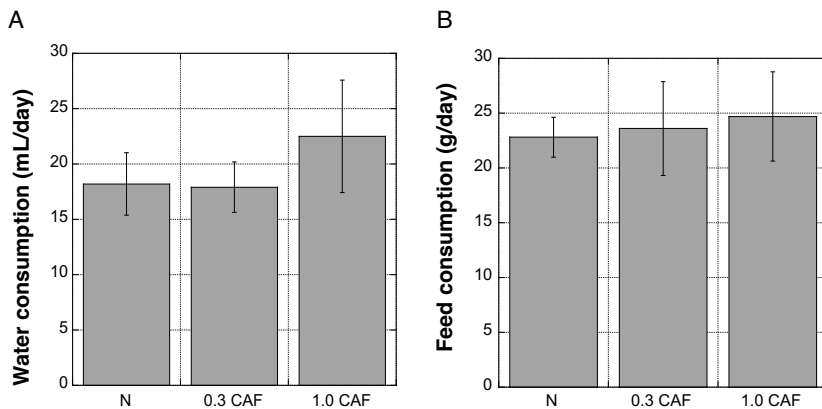


Fig. 1 Water and feed consumption: (A) Y-axis represents daily intake of distilled water consumed for N group, distilled water containing 0.3 g/L caffeine for 0.3 CAF group, and distilled water containing 1.0 g/L caffeine for 1.0 CAF group. On the x-axis, the rat groups are arranged from left to right as follows: N, 0.3 CAF, and 1.0 CAF. (B) Y-axis shows amount of food consumed per day. On x-axis, rat groups are arranged from left to right as follows: N, 0.3 CAF, and 1.0 CAF. Data are shown as means  $\pm$  standard deviations ( $\pm$ SD); N=8.

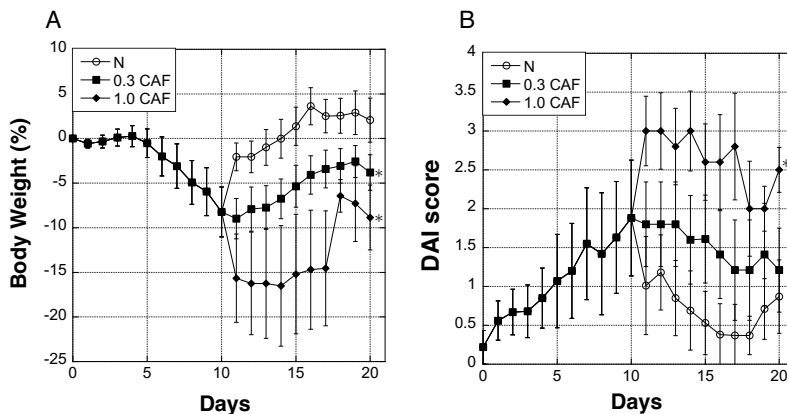


Fig. 2 Changes in rat body weights and DAI scores. (A) Y-axis shows percentage changes in body weight for N (white circle), 0.3 CAF (black square), and 1.0 CAF (black diamond) rat groups. X-axis represents number of days after experiment initiation. (B) Y-axis represents fluctuations in DAI scores, assessed using established criteria<sup>18</sup>, for N (white circle), 0.3 CAF (black square), and 1.0 CAF (black diamond) rat groups. X-axis represents days after experiment initiation. Data are shown as means  $\pm$  standard deviations ( $\pm$ SD). \*P < 0.05 (N vs other groups); N=8.



は、N群 ( $141.20 \pm 30.05$  pg/mL) と 0.3 CAF群 ( $174.70 \pm 23.00$  pg/mL) に対して、1.0 CAF群 ( $207.20 \pm 24.10$  pg/mL) が有意に高濃度であった (Fig. 5B)。血清中 TNF- $\alpha$  に関しては、N群 ( $71.33 \pm 19.20$  pg/mL) と 0.3 CAF群 ( $75.88 \pm 26.60$  pg/mL) に対して、1.0 CAF群 ( $89.65 \pm 15.30$  pg/mL) がやや高濃度であったが有意差は認めなかった (Fig. 5C)。

## 6. 大腸組織中炎症性サイトカインの測定結果

大腸組織中の IL-1 $\beta$  は、N群 ( $240.0 \pm 106.0$  pg/mL $\cdot$ g) と 0.3 CAF群 ( $268.80 \pm 94.20$  pg/mL $\cdot$ g) に対して、1.0 CAF群 ( $183.90 \pm 138.00$  pg/mL $\cdot$ g) でやや低い傾向となったが、有意差は認めなかった (Fig. 6A)。大腸組織中 IL-6 に関しては、N群 ( $347.20 \pm 93.60$  pg/mL $\cdot$ g) と 0.3 CAF群 ( $429.0 \pm 123.0$  pg/mL $\cdot$ g) に対して、1.0 CAF群 ( $630.0 \pm 128.0$  pg/mL $\cdot$ g) が有意に高濃度であった

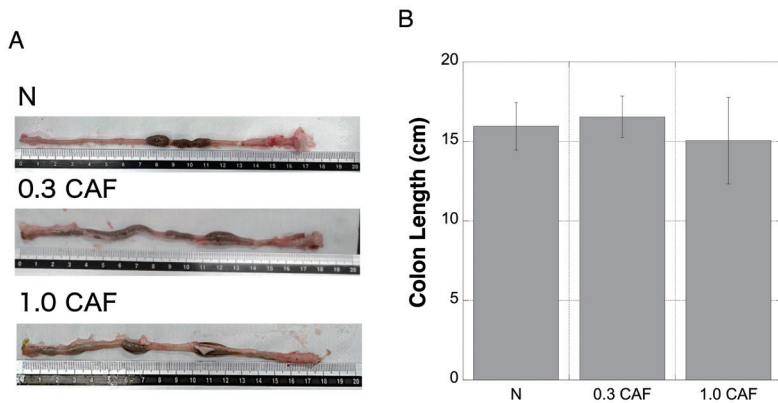


Fig. 3 Changes in rat colon lengths. (A) Representative images of colon tissues from N, 0.3 CAF, and 1.0 CAF rat groups (top to bottom). (B) Rat groups are arranged left to right as N, 0.3 CAF, and 1.0 CAF on x-axis. Data are shown as means  $\pm$  standard deviations ( $\pm$  SD); N=8.

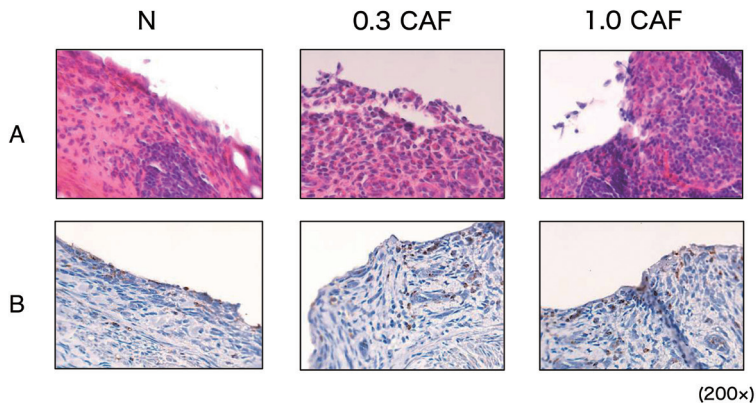


Fig. 4 Evaluation of histological severity in rat colonic tissues. (A) H&E-stained microscopic images of colon tissues from N, 0.3 CAF, and 1.0 CAF groups (left to right). (B) Immunohistochemical staining using DAB to visualize neutrophil elastase (dark brown) in colon tissues from N, 0.3 CAF, and 1.0 CAF rat groups (left to right). Nuclei were stained blue with hematoxylin. All microscopic images were captured using a BIOREVO BZ-9000 microscope (Keyence Co. Ltd., Osaka, Japan). High power magnification (200 $\times$ ) was used for all panels.

(Fig. 6B)。大腸組織中TNF- $\alpha$ に関しては、N群(265.80 $\pm$ 67.20 pg/mL $\cdot$ g)と0.3 CAF群(316.40 $\pm$ 88.5 pg/mL $\cdot$ g)に対して、1.0 CAF群(231.30 $\pm$ 77.40 pg/mL $\cdot$ g)がやや低い傾向を示し、有意差を認めなかった(Fig. 6C)

## 7. 大腸組織におけるサイトカイン5種類のmRNA発現結果

炎症性サイトカイン3種類の内、IL-6とTNF- $\alpha$ に関して、1.0 CAF群でmRNAの発現量が有意に増加した(Fig. 7)。ただし、抗炎症性サイトカインであるTGF- $\beta$ に関しても同様に1.0 CAF群でやや増加傾向にあった(Fig. 7)

## 8. 生化学項目の測定結果

血清TPおよびALBは、0.3 CAF群および1.0 CAF群で低値を示した(Table 3)。一方、腎機能(BUN、CRE)および肝機能(AST、ALT、LDH)の指標に関しては、0.3 CAF群および1.0 CAF群で低値であった(Table 3)。血清Fe濃度は、0.3 CAF群および1.0 CAF群で低値であった。脂質系の項目(T-CHO、LDL-C、HDL-C)やPAおよびLAも、0.3 CAF群および1.0 CAF群で低値であった(Table 3)。

## IV. 考察

本研究では、経口摂取したカフェインがラットの実験性UCの病態に及ぼす影響を検討した。本研究の

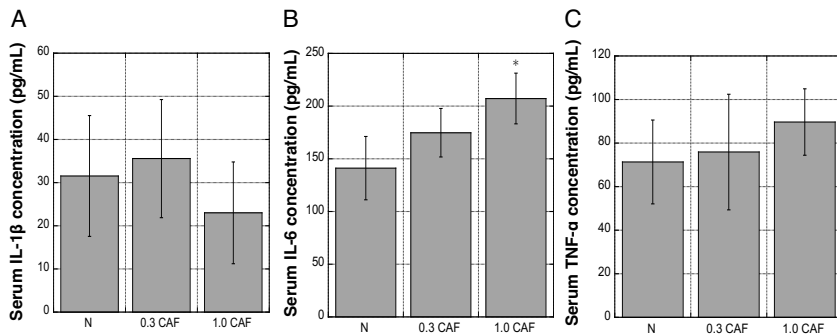


Fig. 5 Analysis of serum inflammatory cytokines. The y-axis indicates IL-1 $\beta$  (A), IL-6 (B), and TNF- $\alpha$  (C) concentrations (pg/mL) in the sera of N, 0.3 CAF, and 1.0 CAF rat groups (left to right). Data are shown as means  $\pm$  standard deviations ( $\pm$  SD). \*P < 0.05 (N vs other groups); N=8.

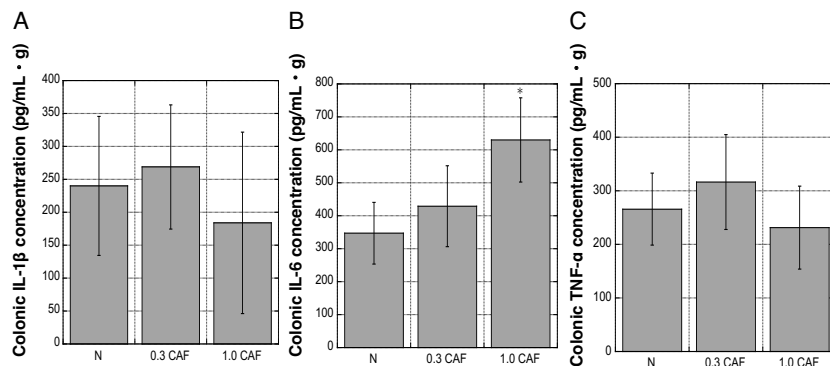


Fig. 6 Analysis of colonic inflammatory cytokines. Y-axis indicates IL-1 $\beta$  (A), IL-6 (B), and TNF- $\alpha$  (C) concentrations per gram of colon tissue (pg/mL  $\cdot$  g) from N, 0.3 CAF, and 1.0 CAF rat groups (left to right) in each graph. Data are shown as means  $\pm$  standard deviations ( $\pm$  SD). \*P < 0.05 (N vs other groups); N=8.

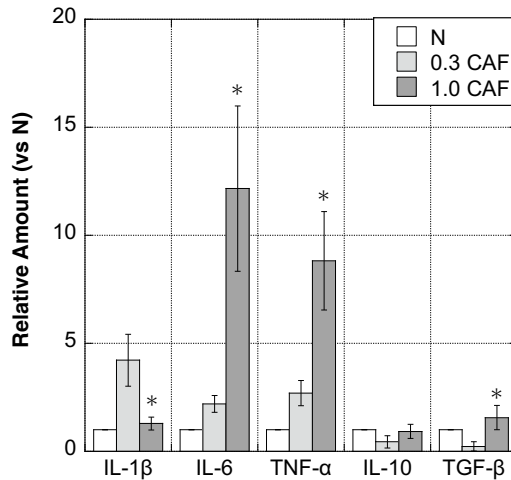


Fig. 7 Alterations in colonic mRNA rat cytokine levels. Y-axis represents IL-1  $\beta$ , IL-6, TNF-  $\alpha$ , IL-10, and TGF-  $\beta$  mRNA expression levels (left to right) in colon tissues from N (white bar), 0.3 CAF (light gray bar), and 1.0 CAF (dark gray bar) rat groups relative to the N rat group. Data are shown as means  $\pm$  standard deviations ( $\pm$  SD). \*P < 0.05 (0.3 CAF vs 1.0 CAF); N=8.

結果をまとめると、ほぼ全ての検討項目で、カフェインの摂取量に比例して、ラットのUCが悪化する傾向が示された。特に飲用水を3%DSSから蒸留水に切り替えて直ぐラットの体重が急激に回復すること、反対に1.0 g/Lカフェイン溶水の摂取では体重減少が著しいこと、の2点が注目された。実験10日目までの3%DSSの飲用や、それに伴うUCの悪化は、ラットの食欲不振および頻繁な下痢症状に繋がり、体重減少を引き起こすものと思われる。その後、飲用水が蒸留水に切り替わると、まず食欲不振が改善することで餌水の摂取が促進し、急激な体重の回復に繋がると推測された。一方、高濃度カフェイン溶水の摂取では基礎代謝が著しく亢進し、急激な体重減少に繋がると思われる。UCの重症度以外にもこれら複合的な原因が存在することで、各群の体重変動率に大きな差が生じたと推測する。また、カフェインの摂取量が多いほど、大腸組織における炎症性サイトカインIL-6の産生と分泌が増加することが判った。IL-6は好中球の活性化、ヘルパーT細胞の増殖と分化などに寄与し、炎症を重症化させる原因となる<sup>20)</sup>。実際、ヒトにおいてカフェインの摂取が血漿中のIL-6濃度を増加させた報告があり、やはりカフェインはIL-6の活性を高め、炎症を増悪に導く可能性が高い<sup>21)</sup>。0.3 CAF群や1.0 CAF群ではIL-6の作用により、大腸組織への好中球やその他の自然免疫細胞が誘導され、大腸炎は寛解せず悪化の一途を辿ったと思われた。また、0.3

Table 3 Assay items of clinical chemistry in rat serum.

	N	0.3 CAF	1.0 CAF
TP (g/dL)	8.1	5.5	5.8
ALB (g/dL)	5.5	3.8	3.8
GLU (mg/dL)	279	224	202
BUN (mg/dL)	33.1	18.9	19.4
CRE (mg/dL)	0.53	0.29	0.34
T-Bil (mg/dL)	0.04	0.03	0.02
UA (mg/dL)	3.3	1.8	1.9
Fe ( $\mu$ g/dL)	233	120	61
AST (IU/L)	287	132	166
ALT (IU/L)	156	48	46
ALP (IU/L)	173	115	118
LDH (IU/L)	2658	1653	1367
CK (IU/L)	2841	1257	1484
ChE (IU/L)	18	10	7
T-CHO (mg/dL)	94	61	82
TG (mg/dL)	107	82	80
LDL-C (mg/dL)	6	4	5
HDL-C (mg/dL)	37	26	31
PA (mg/dL)	3.16	1.77	1.10
LA (mg/dL)	113.7	77.0	66.9

CAF群や1.0 CAF群ではUCの重症化に伴い食餌成分の吸収不良を起こすことが、栄養状態の悪化や脂質系項目の低下に繋がったと思われる。なお、カフェイン摂取は肝機能や腎機能を改善するという報告が多い<sup>22, 23)</sup>。本研究においても、血清中AST、ALT、LDHなどの肝機能を反映する項目は、N群に



比ベカフェイン摂取群で低下しており、改善が示唆された。同様に、血清中BUNやCREもN群に比ベカフェイン摂取群で低下しており、腎機能への好影響が示唆された。カフェイン摂取で血清Feが低下したのはUCの重症化に伴い下痢と下血が進行し、赤血球が失われたことが原因と思われる。脂質項目に関して、文献によるとWistarラットの血清中T-CHOの基準値は10-54 mg/dL、その大半はHDL-Cであることが示されている<sup>24)</sup>。本研究における3群は、いずれもT-CHOが基準値を超えた。概ね3群とも実験の後半に体重が回復傾向を示すことから、この期間は食欲不振が改善し食餌の摂取量が増え、TGが上昇したことがT-CHOの増加に繋がったと予想する。T-CHOに対する割合から考えると、3群ともHDL-Cの数値はやや低い。UCの病態やカフェインの過剰摂取が、コレステロールの正常な代謝機構を阻害している可能性が考えられる。LDL-Cの数値自体は低いものの、これはWistarラットの特徴であり妥当と思われる<sup>24)</sup>。なお、本研究の生化学検査は、各群の血清を等量混合して測定されているため統計解析が行えず、個体差の把握も困難となっている。そのため、各群の差が統計的に有意であるのか不明であり、この結果をもってカフェイン摂取の影響を断定すべきではない。この点は、本研究における方法的限界として留意されたい。生化学検査の結果は参考程度としても、カフェインの摂取にはメリットとデメリットの両面があることは確認できる。したがって、カフェインの有用な効果が発揮され、悪影響が極力出ないような摂取量の見極めは必要と考えられる。

本研究の結果は、近年報告された「コーヒーの摂取量が多いほど、UCの重症化リスクが減少する」論文に反しているように思われる<sup>10)</sup>。ただし、コーヒーにはカフェイン以外にポリフェノールやジテルペン類を含み、これらはNuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) 経路の抑制を通じて抗炎症作用を発揮することが報告されている<sup>25, 26)</sup>。したがって、本研究ではカフェインのみに注目したが、これら抗炎症成分が効果を発揮し、UCの病態制御に貢献している可能性も考えられた。そして、やはりカフェインの摂取量にも注目すべきである。今回、0.3 g/Lあるいは1.0 g/Lのカフェイン溶水を実験に用いたことで、ラット1匹あたりの1日摂取量は平均して17.9 mLおよび22.5 mLであった。ここから0.3 CAF群と1.0 CAF群は、それぞれ約5.37 mgと約22.5 mgのカフェインを1日で摂取したことになる。コーヒー1杯に含まれるカフェイン量は、抽出方法や豆の

種類、焙煎度などによって大きく異なるが25-214 mg程度であり、1.0 CAF群が摂取した約22.5 mgのカフェインはコーヒー1杯よりも少ない量と推定される<sup>27)</sup>。しかし、ラットにカフェインを摂取させる多くの実験において、摂取量は本研究と同等かそれ以下に設定されている<sup>17)</sup>。これはラットのカフェインへの耐容量がヒトよりも少ないためである。実際、体重200 g程度のラットでカフェインの半数致死量LD50は38.4 mgと報告されている<sup>28)</sup>。すなわち1.0 CAF群ではLD50の半量以上のカフェインを摂取している。ヒトの場合でもLD50の半量以上のカフェインを摂取した場合は十分に中毒リスク領域であることから、ラットにとっても相当なカフェイン摂取量であったことが判る<sup>28)</sup>。0.3 CAF群でもUCの大腸炎は重症化した。1.0 CAF群に比べると緩やかであったことから、UCを改善に導くカフェイン適量は存在し、その適量を超えるまではUCに対してカフェインが効果的に働く可能性がある。

カフェインは経口摂取後、消化管から迅速に吸収され30-60分で血中濃度はピークを迎え、肝臓に運ばれ代謝される<sup>29)</sup>。その後、カフェインは肝臓のCYP1A2酵素の作用により、大部分はパラキサンチン、一部はテオブロミンやテオフィリンに代謝される<sup>29)</sup>。最終的にはこれら物質もさらに代謝され、カフェイン摂取から1日以内に尿中へ排泄される<sup>29)</sup>。代謝産物のうちパラキサンチンはカフェインよりも毒性が低く、より選択的に作用し、強力な抗炎症作用を発揮するという報告がある<sup>30)</sup>。現在、パラキサンチンを肝疾患や神経疾患の治療に応用する研究が進んでおり、カフェイン自体よりも有用な成分である可能性が高まっている<sup>30)</sup>。テオブロミンは血管拡張作用や利尿作用、平滑筋弛緩作用が報告されており、テオフィリンは気管支拡張薬として喘息の治療に用いられている<sup>29)</sup>。テオブロミンやテオフィリンの効果がUCに有効とは考えにくく、カフェイン代謝物の中で最もUCに良好な効果を発揮するのはパラキサンチンである可能性が高い。したがって、今後はUCとパラキサンチンの関連性に注目した研究が望まれる。

本研究以外にUCとカフェインの関連性に注目した研究は存在する。マウスに対して経口的にカフェインを投与することで、腸管上皮細胞におけるPI3K/AKT経路の発現が抑制され、急性大腸炎の症状が改善されることが報告されている<sup>31)</sup>。さらに、UCモデルマウスにカフェインで処理した間葉系幹細胞を移植した場合には、炎症性サイトカイン(IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$ )の産生が有意に減少し、大腸組織の損傷が軽減した<sup>32)</sup>。これら例も含め、複数の研究で、カフェ

インやコーヒーの摂取がUCのリスク低下と関連していることが示されている。興味深いことに、動物実験ではカフェインのUCに対する有効な作用の報告が大半だが、UC患者を対象とした研究ではカフェインの有害な効果も報告されている。おそらく、カフェインの摂取がヒトのUCに与える影響は個人差が大きく、症状に対する患者の主観的な評価も含まれると予想する。また、コーヒーの愛飲家にとっては飲用を制限されることのストレスが大きく、飲用を禁止したことによるUCの症状の改善を実感しにくい可能性がある。また、UCにカフェインが効果的であろうが、やはり大腸にとって刺激物であることには変わりがない。そのため、UCの活動期にはカフェインの摂取を控えるべきであり、寛解後も摂取量や摂取タイミングには注意が必要と思われる。我々の研究ではカフェインがUCの病態に負の影響をもたらす結果を示しているため、なおさら慎重な摂取を推奨するものである。また、本研究は、カフェインがUCを悪化に導く詳細なメカニズムには迫っていないという弱点が挙げられる。カフェインがIL-6の産生と分泌を誘導する可能性を示したが、IL-6を誘導する細胞内経路は複数あり、どのような細胞内因子の活性化を経てUCに影響を与えるかについて、追求の余地が大きい。今後は、カフェインが免疫細胞の機能に及ぼす具体的な役割を検証すると共に、代謝産物であるパラキサンチンにも注目し、研究を継続したい。

## V. 結語

本研究におけるラット実験性UCの病態に対して、カフェイン摂取は高リスクと思われた。カフェインの摂取量や病態悪化メカニズムの解明に追求の余地があるが、過剰なカフェイン摂取に対する警鐘として有用なエビデンスを提供できたと考えている。

## VI. 謝辞

ラット血清の生化学検査を実施いただきましたオリエンタル酵母工業株式会社 長浜工場 長浜ライフサイエンスラボラトリー(滋賀)には心より御礼申し上げます。

本論文内容に関連する著者らの利益相反:なし

## 文 献

- 1) Marks DJ, Segal AW: Innate immunity in inflammatory bowel disease: A disease hypothesis. *J Pathol.* 214: 260–266, 2008.
- 2) 久松理一: 炎症性腸疾患-診断と治療の最前線-. 日本消化器内視鏡学会雑誌. 61: 1523-1537, 2019.
- 3) Sartor RB: Mechanisms of disease: Pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* 3: 390–407, 2006.
- 4) Bibbò S, Ianiro G, Giorgio V, Scaldaferrì F, Masucci L, Gasbarrini A, Cammarota G: The role of diet on gut microbiota composition. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 20: 4742–4749, 2016.
- 5) Chicco F, Magri S, Cingolani A, Paduano D, Pesenti M, Zara F, Tumbarello F, Urru E, Melis A, Casula L, Fantini MC, Usai P. Multidimensional Impact of Mediterranean Diet on IBD Patients. *Inflamm Bowel Dis.* 27: 1–9, 2021.
- 6) 多田正大,大塚弘友,岡村雅子,清水誠治,川井啓市: 潰瘍性大腸炎 治療.臨床消化器内科. 6: 980-990, 1991.
- 7) 馬場忠雄: IBD患者の生活指導と食養生.日本医師会雑誌. 125: 181-185, 2001.
- 8) 石神信治: 12年間観察できた低カロリー食摂取潰瘍性大腸炎の1例. 鹿児島大学医学雑誌. 63: 1-5, 2011.
- 9) 富田真佐子, 高添正和, 近藤健司, 福田能啓, 矢吹浩子, 片岡優実: 炎症性腸疾患患者のQuality of Lifeと食事に関する問題—潰瘍性大腸炎とクローン病との比較—. 静脈経腸栄養. 20: 57-65, 2005.
- 10) Tanaka K, Okubo H, Miyake Y, Nagata C, Furukawa S, Andoh A, Yokoyama T, Yoshimura N, Mori K, Ninomiya T, Yamamoto Y, Takeshita E, Ikeda Y, Saito M, Ohashi K, Imaeda H, Kakimoto K, Higuchi K, Nunoi H, Mizukami Y, Suzuki S, Hiraoka S, Okada H, Kawasaki K, Higashiyama M, Hokari R, Miura H, Miyake T, Kumagi T, Kato H, Hato N, Sayama K, Hiasa Y: Coffee and caffeine intake reduces risk of ulcerative colitis: a case-control study in Japan. *J Gastroenterol Hepatol.* 39: 512-518, 2024.
- 11) Wolde T: Effect of caffeine on health and nutrition: A review. *Food Science and Quality Management.* 30: 59-65, 2014.
- 12) Salazar-Martinez E, Willett WC, Ascherio A, Manson JE, Leitzmann MF, Stampfer MJ, Hu FB: Coffee consumption and risk for type 2 diabetes mellitus. *Ann Intern Med.* 140: 1-8, 2004.
- 13) Ruhl CE, Everhart JE: Coffee and tea consumption are associated with a lower incidence of chronic liver

- disease in the United States. *Gastroenterology*. 129: 1928-1936, 2005.
- 14) Tucker KL: Dietary intake and bone status with aging. *Curr Pharm Des*. 9: 2687-2704, 2003.
  - 15) Okada K, Matsuo K, Amada M, Kashihara S, Katsuragi K, Doumae M, Moriwaki M, Yamauchi R, Yoshida J: Excessive glucose and fructose intake aggravates the pathogenesis of rat experimental colitis. *Gastrointestinal Disorders*. 5: 474-486, 2023.
  - 16) 岡田光貴, 佐々木流空, 登尾慎太郎: 単糖類過剰餌の摂取が急性大腸炎モデルラットの病態に与える影響. *生物試料分析*. 47: 135-147, 2024.
  - 17) Pettenuzzo LF, Noschang C, von Pozzer Toigo E, Fachin A, Vendite D, Dalmaz C: Effects of chronic administration of caffeine and stress on feeding behavior of rats. *Physiol Behav*. 95: 295-301, 2008.
  - 18) Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, Sedergran DJ: Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest*. 69: 238-249, 1993.
  - 19) Kanda Y: Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant*. 48: 452-458, 2013.
  - 20) 橋詰美里, 大杉義征: 「IL-6の多様な作用」自己免疫性疾患および炎症性疾患におけるIL-6の意義. *日薬理誌*. 144: 172-177, 2014.
  - 21) Rodas L, Martinez S, Aguilo A, Tauler P: Caffeine supplementation induces higher IL-6 and IL-10 plasma levels in response to a treadmill exercise test. *J Int Soc Sports Nutr*. 17: 47, 2020.
  - 22) Amer MG, Mazen NF, Mohamed AM: Caffeine intake decreases oxidative stress and inflammatory biomarkers in experimental liver diseases induced by thioacetamide: Biochemical and histological study. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 30: 13-24, 2017.
  - 23) Kennedy OJ, Pirastu N, Poole R, Fallowfield JA, Hayes PC, Grzeszkowiak EJ, Taal MW, Wilson JF, Parkes J, Roderick PJ: Coffee Consumption and Kidney Function: A Mendelian Randomization Study. *Am J Kidney Dis*. 75: 753-761, 2020.
  - 24) Harini M, Astirin OP: Blood cholesterol levels of hypercholesterolemic rat (*Rattus norvegicus*) after VCO treatment. *Nusantara Bioscience*. 1: 53-58, 2009.
  - 25) Artusa V, Ciaramelli C, D'Aloia A, Facchini FA, Gotri N, Bruno A, Costa B, Palmioli A, Airolidi C, Peri F: Green and Roasted Coffee Extracts Inhibit Interferon- $\beta$  Release in LPS-Stimulated Human Macrophages. *Front Pharmacol*. 13: 806010, 2022.
  - 26) Buelna-Chontal M: Coffee: Fuel for Your Day or Foe for Your Arteries. *Antioxidants (Basel)*. 13: 1455, 2024.
  - 27) Desbrow B, Hughes R, Leveritt M, Scheelings P: An examination of consumer exposure to caffeine from retail coffee outlets. *Food Chem Toxicol*. 45: 1588-1592, 2007.
  - 28) Nawrot P, Jordan S, Eastwood J, Rotstein J, Hugenholtz A, Feeley M: Effects of caffeine on human health. *Food Addit Contam*. 20: 1-30, 2003.
  - 29) Tassaneeyakul W, Birkett DJ, McManus ME, Tassaneeyakul W, Veronese ME, Andersson T, Tukey RH, Miners JO: Caffeine metabolism by human hepatic cytochromes P450: contributions of 1A2, 2E1 and 3A isoforms. *Biochem Pharmacol*. 47: 1767-1776, 1994.
  - 30) Klemmer I, Yagi S, Gressner OA: Oral application of 1,7-dimethylxanthine (paraxanthine) attenuates the formation of experimental cholestatic liver fibrosis. *Hepatol Res*. 41: 1094-1109, 2011.
  - 31) Lee IA, Low D, Kamba A, Llado V, Mizoguchi E: Oral caffeine administration ameliorates acute colitis by suppressing chitinase 3-like 1 expression in intestinal epithelial cells. *J Gastroenterol*. 49: 1206-1216, 2014.
  - 32) Beygi M, Shayegh J, Esmaeili Gouvarchin Ghaleh H: Caffeine and naloxone treated mesenchymal stem cells improve symptoms and reduce inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. *Transpl Immunol*. 82: 101986, 2024.