

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：32604

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24500995

研究課題名(和文) 穀類の摂取による抗炎症作用の臓器間クロストークの研究と有効成分の探索

研究課題名(英文) Studies on the cross-talk among organs of anti-inflammatory effects by cereal intake and exploratory research of active components

研究代表者

青江 誠一郎 (AOE, Seiichiro)

大妻女子大学・家政学部・教授

研究者番号：90365049

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)： β -グルカンを含有する大麦の摂取が腸内細菌叢を介して、脂肪組織のみならず肝臓、皮膚組織の炎症を抑制する作用を有するか検討した。さらに、大麦以外の穀類の中から、玄米、黒米、ライ麦、オート麦などの成分分析を行い、大麦と比較し、有効な穀類の選抜を行った。高脂肪食摂取において、腸内細菌叢の変動、短鎖脂肪酸の産生量の変化、大腸内の炎症、各種臓器の炎症性変化、 β -グルカンを介して連鎖的に起こり、結果としてメタボリックシンドローム関連指標の悪化を招くことが示された。さらに、高 β -グルカン大麦の摂取はこれら指標を腸内細菌叢の改善を介して抑制することが示された。

研究成果の概要(英文)：Anti-inflammatory effects of barley beta-glucan intake on inflammation of liver, skin tissues as well as adipose tissues by modification of gut microbiota were studied. Compositions of brown rice, black rice, rye, oat were also analyzed and compared to the barley. These results indicated that parameters related to metabolic syndrome were deteriorated in the high fat diet by cross talk among dysbiosis, production of short chain fatty acid synthesis, large bowel and organs inflammation. Our results also indicated that high beta-glucan barley has protective effect on inflammation of organs by modification of gut microbiota compared to other cereals.

研究分野：生活科学

キーワード：メタボリックシンドローム 大麦 β -グルカン 雑穀 肥満モデルマウス

1. 研究開始当初の背景

過食と運動不足などによる脂肪細胞への中性脂肪の蓄積が種々の病気を発症させるというメタボリックシンドロームの概念は広く知られるようになってきた。特に蓄積脂肪で増加した酸化ストレスは、メタボリックシンドロームの初期の誘導因子であり、重要な発症メカニズムであることが明らかとなってきた。

日本人の食物繊維の摂取量は平成 21 年度国民健康・栄養調査によれば、平均で男性は 14.5g、女性は 14.2g であり、成人の目標量である男性 20g 以上、女性 18g 以上に達していない。これは、穀類の摂取量が減少したためであり、現在の食物繊維摂取の寄与率は野菜が 40%、穀類が 20% となり、穀類摂取の減少が食物繊維摂取量の減少の原因である。したがって、今一度穀類摂取の重要性を再認識し、摂取量の増加とメタボリックシンドロームの発症予防の啓発が急務となっている。

2. 研究の目的

本研究では、 α -グルカンを含有する大麦の摂取が消化管機能を介して、脂肪組織のみならず肝臓の炎症を抑制する作用を有するか検討する。すなわち、大麦摂取による消化管機能と脂肪、肝臓、および皮膚組織とのクロストークを明らかにすることを研究目的とする。また、大麦のどの成分に効果があるのか、有効成分の特定を行う。以上の結果が明らかになったら、大麦以外の穀類の中から、玄米、黒米、ライ麦、オート麦などの成分分析を行い、大麦と比較し、有効な穀類の選抜を行う。

3. 研究の方法

(1) 実験 24 - 1

5 週齢の C57BL/6J マウスを 1 群 8 匹の 5 群に群分けした。AIN-93G 組成の飼料を基本として、脂肪エネルギー比が 50% になるように、ラードを 20% 添加した。各穀物を 42% 添加し、総食物繊維量が 5% になるようにセ

ルロースで調整した。各飼料と水は 12 週間自由摂取させた。マウスは 6 時間絶食後に麻酔下で採血し、肝臓、盲腸、腹腔内脂肪組織を摘出後、重量を測定し、血清脂質、肝臓脂質を分析した。飼育 11 週目に 4 日間採糞した。糞便、盲腸それぞれの腸内細菌数をリアルタイム PCR 法で測定し、標準菌株を用いた検量線により菌数を算出した。また、総菌数を FISH 法で蛍光顕微鏡を用いて測定した。

飼料組成

	[g/kg diet]				
	白米	玄米	黒米	八ト麦	モチ麦
カゼイン	171	173	168	169	173
L-シスチン	3	3	3	3	3
コーンスターチ	47.31	67.57	77.93	78.73	86.45
大豆油	63.28	55.72	52.36	33.46	60.34
ラード	200	200	200	200	200
セルロース	47.9	33.2	31.2	48.3	9.7
白米	420				
玄米		420			
黒米			420		
八ト麦				420	
モチ麦					420
AIN-93G ミネラル混合	35	35	35	35	35
AIN-93G ビタミン混合	10	10	10	10	10
亜硝酸石炭酸コリン	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
L-ブチルヒドロキノン	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014

(2) 実験 25 - 1

5 週齢雄の CBF1 マウス(日本エスエルシー株式会社)を 1 群 8 匹の 2 群に群分けした。コントロール(CO)群の飼料は AIN-93G 組成を基本とし、脂肪エネルギー比が 50% になるよう、ラードを添加し高脂肪食とした。接触皮膚炎の病態を形成するために、マウスの耳介にハプテンとしてトリニトロクロロベンゼン(TNCB, 和光純薬工業株式会社)を反復塗布した。各飼料の摂取開始から 4 週間後、初回感作としてアセトン溶液に溶解した 1% TNCB を 20 μ L、右耳介内側に塗布した。初回感作の 1 週間後より、同様の方法を 2~3 日毎に繰り返し、4 週間の間に計 12 回塗布を行って炎症を惹起した。麻酔下で開腹し、心臓より採血、耳介、肝臓、後腹壁脂肪組織、副睾丸周辺脂肪組織、腸間膜脂肪組織を摘出し、重量を測定した。

凍結した盲腸から、「QIAamp DNA Stool」(QIAGEN 社)を用いて DNA を抽出した。盲腸内容物の腸内細菌数をリアルタイム PCR 法で測定し、標準菌株を用いた検量線によって菌数を算出した。

飼料組成

	(g/kg diet)	
	高脂肪食 コントロール群 (C0)	大麦添加 高脂肪食群 (C5)
カゼイン	200	180.36
L-シスチン	3	3
?-コングスターチ	132	-
?-コングスターチ	197.486	195.507
スクロース	100	100
大豆油	70	70
ラード	200	200
セルロース	50	-
大麦(ビューフアイバー全粒粉)	-	212.8
AIN-93Gミネラル混合	35	35
AIN-93ビタミン混合	10	10
重酒石酸コリン	2.5	2.5
t-ブチルヒドロキノン	0.014	0.014

(3) 実験 25 - 2

5 週齢の C57BL/6J マウスを 1 群 8 匹の 2 群に群分けした。AIN93G 組成の飼料を基本として、脂肪エネルギー比が 50% になるように、ラードを 20% 添加した。大麦 β -グルカン抽出物を 3% になるように添加し、総食物繊維量が 5% になるようにセルロースで調整した。各飼料と水は 83 日間自由摂取させた。耐糖能試験(OGTT)は、飼育最終週に、6 時間の絶食後、20% グルコース溶液を 1 g/kg 体重となるようにマウスに経口投与した。血糖値を電極法により測定した。マウスは 6 時間絶食後に麻酔下で採血し、肝臓、腹腔内脂肪組織、盲腸を摘出後、重量を測定した。採取した血液は、血清を分離し、血清脂質を酵素法で、ホルモン濃度を ELISA 法で測定した。

(4) 実験 26 - 1

5 週齢の雄 C57BL/6J マウスを用い、脂肪エネルギー比が 50% の高脂肪食に、発芽玄米、もち麦、赤米、黒米を配合して 12 週間給餌した。マウスは 6 時間絶食後に麻酔下で採血し、肝臓、盲腸、腹腔内脂肪組織を摘出後、重量を測定し、血清脂質、肝臓脂質を分析した。脂肪組織の炎症マーカーの mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法で分析した。

飼料組成

	g/kg diet				
	Control	もち麦	発芽玄米	黒米	赤米
コングスターチ	132.0	-	-	-	-
コングスターチ	197.5	86.6	43.6	45.2	48.9
ミルクカゼイン	200.0	157.3	170.8	169.5	173.4
グラニュー糖(シヨ糖)	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
大豆油	70.0	70.0	70.0	70.0	70.0
ラード	200.0	193.2	187.7	187.0	187.7
セルロースパウダー	50.0	-	34.9	35.3	27.1
雑穀	-	342.5	342.5	342.5	342.5
AIN-93Gミネラル混合	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0
AIN-93ビタミン混合	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
L-シスチン	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
重酒石酸コリン	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
t-ブチルヒドロキノン	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014

(5) 実験 26 - 2

大麦の β -グルカンに有効性ならびに腸内細菌と脂肪組織の炎症のクロストークが存在する可能性が示唆されたため、 β -グルカンを高含有する大麦と β -グルカンを含まない大麦を 5 週齢の C57BL/6J 雄マウスに高脂肪食とともに 12 週間摂取させ、糞便内腸内細菌叢を T-RFLP 法で検索し、副睾丸周辺脂肪組織の炎症マーカーとの関連性を調べた。

飼料組成

	β -グルカン欠損大麦	高 β -グルカン大麦
アルファ化コングスターチ	42.3	58.2
ミルクカゼイン	139.2	140.8
シヨ糖	100	100
大豆油	70	70
ラード	185.3	183.7
セルロースパウダー	15.9	-
β -グルカン欠損大麦	396.8	-
高 β -グルカン大麦	-	396.8
AIN-93Gミネラル混合	35	35
AIN-93ビタミン混合	10	10
L-シスチン	3	3
重酒石酸コリン	2.5	2.5
t-ブチルヒドロキノン	0.014	0.014

(6) 実験 27 - 1

高 β -グルカン含有大麦を摂取することにより、大腸内代謝にどのように影響を及ぼすか食餌性肥満マウスを用いて検証した。4 週齢の C57BL/6J マウスを 1 群 8 匹の 2 群に群分けした。飼料は、AIN-93G 組成を基本とし、脂肪エネルギー比が 50% になるように高 β -グルカン大麦を配合したものを調製した。各飼料は 5 週間自由摂取させた。糞中細菌は DNA を抽出後、リアルタイム PCR 法で分析した。大腸の炎症マーカーの mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法で分析した。

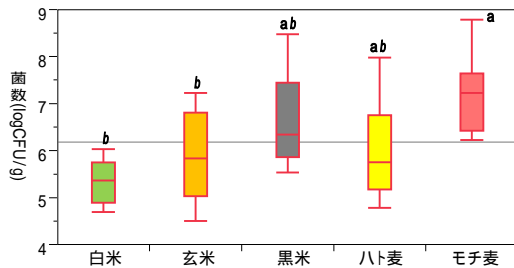
(7) 実験 27 - 2

高 β -グルカン含有大麦を摂取することにより、短鎖脂肪酸産生にどのように影響を及ぼすか食餌性肥満マウスを用いて検証した。4 週齢の C57BL/6J マウスを 1 群 8 匹の 2 群に群分けした。飼料は、AIN-93G 組成を基本とし、脂肪エネルギー比が 50% になるようにラードを配合し、 β -グルカン欠損大麦および高 β -グルカン大麦を配合したものを調製した。各飼料と水は 8 週間自由摂取させた。糞中短鎖脂肪酸は塩酸酸性下でエーテル抽出後、GC/MS で分析した。

4. 研究成果

(1) 実験 24 - 1

腸内細菌数は、糞便、盲腸ともにモチ麦群で *Bifidobacterium* 属が有意に多く、モチ麦は *Bifidobacterium* 属を増加させると考えられた。また、肝臓トリグリセリド濃度はモチ麦群で有意に低く、肝臓の脂肪蓄積を抑制した可能性が考えられた。血清総コレステロール濃度も白米・玄米群に比べてモチ麦群で有意に低かった。さらに、*Bifidobacterium* 属と上記の結果を相関分析すると、盲腸重量は有意な正の相関、肝臓トリグリセリド濃度、血清総コレステロール濃度は有意な負の相関が見られ、*Bifidobacterium* 属の数が増加することにより、メタボリックシンドローム指標の改善がもたらされる可能性が示された。



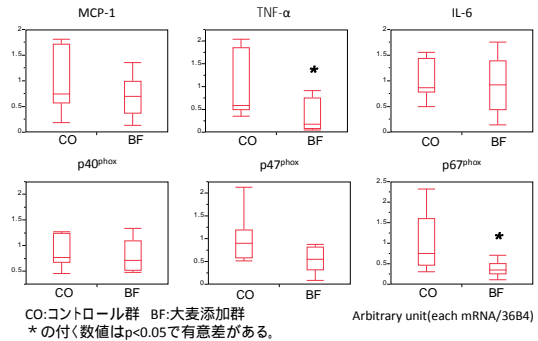
糞中の腸内細菌数 (*Bifidobacterium* 属)

異なるアルファベット間で有意差あり ($p < 0.05$)

(2) 実験 25 - 1

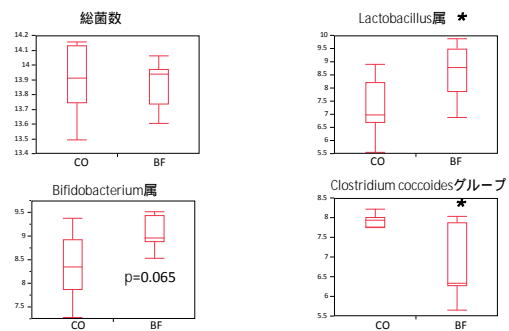
耳介の肥厚増加量は高-グルカン含有大麦群でコントロール群に比べて低い傾向にあった ($p=0.058$)。1 領域あたりの耳介のトリジンブルー陽性細胞の平均数は高-グルカン含有大麦群で有意に少なかった。盲腸内容物の総菌数は、群間で有意差は見られなかった。菌種別の菌数では高-グルカン含有大麦群において *Lactobacillus* 属の菌数が有意に多く、*Clostridium coccooides* グループの菌数が有意に少なかった。また、*Bifidobacterium* 属の菌数は高-グルカン含有大麦群で多い傾向にあった ($p=0.065$)。 *Eubacterium* 属、

Bacteroides 属の菌数は、群間に有意差は見られなかった。



CO:コントロール群 BF:大麦添加群
*の付く数値は $p < 0.05$ で有意差がある。

右耳の炎症マーカーmRNA 発現量



CO:コントロール群 BF:大麦添加群
*の付く数値は $p < 0.05$ で有意差がある。

盲腸の腸内細菌数

(3) 実験 25 - 2

飼料摂取量はコントロール群に比べて大麦-グルカン抽出物群で有意に高かったが、終体重に有意差はなかった。盲腸重量は、コントロール群に比べて大麦-グルカン抽出物群で有意に高かった。血清コレステロール濃度はコントロール群に比べて大麦-グルカン抽出物群で有意に低かった。血清インスリン濃度、耐糖能試験に有意差はなかった。大麦-グルカン抽出物には、耐糖能改善作用が見られなかった。大麦-グルカン抽出物は、脂質代謝改善作用を有するが糖代謝改善作用は、デンプンとマトリックスを形成していることが重要と推定した。

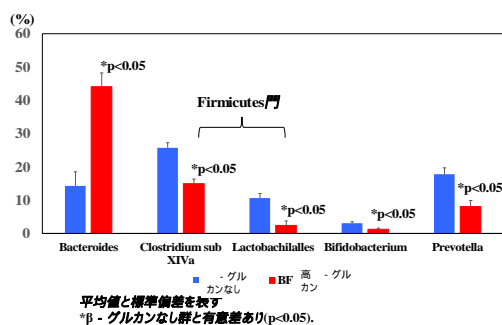
(4) 実験 26 - 1

盲腸重量がモチ麦群で有意に高かったことから、モチ麦に含まれる-グルカンが腸内細菌によって発酵を受けたことが考えられた。血清脂質濃度では、遊離脂肪酸濃度がコ

ントロール群に比べもち麦群と黒米群で有意に低く、マクロファージのマーカーである F4/80 も、もち麦群と黒米群で有意に低かった。さらに、各種炎症マーカーと各臓器脂肪重量との相関を見ると、F4/80, TNF- α , IL-10, CD11c とは有意な正の相関がみられた。以上のことから、もち麦は β -グルカンによって、また黒米はポリフェノールによって脂肪細胞の軽度炎症を抑制したことが示された。

(5) 実験 26 - 2

高 β -グルカン大麦は、 β -グルカンを含まない大麦を摂取したマウスに比べて、腹腔内脂肪重量が有意に低く、F4/80 と TNF- α の mRNA 発現量が有意に低下した。腸内細菌叢の解析の結果、高 β -グルカン大麦摂取により、Firmicutes 門 (*Clostridium subcluster XIVa*, *Lactobacillales*) の比率が有意に減少した。相関解析の結果、*Clostridium subcluster XIVa* と F4/80 は有意な正の相関を、TNF- α は相関傾向(p=0.06)を示した。 β -グルカンを高含有する大麦摂取により *Clostridium subcluster XIVa* の比率が低下し、炎症抑制につながる可能性が示された。腸内細菌と臓器炎症のクロストークが存在することが示された。



T-RFLP 法による腸内細菌叢解析

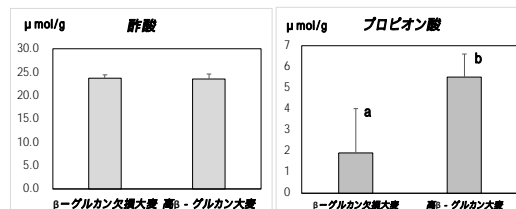
(6) 実験 27 - 1

大腸の抗炎症マーカー IL-10 の mRNA 発現量は、対照群と比べて、高 β -グルカン含有大麦群で高い傾向にあった。糞中の *Clostridium coccooides* グループ菌数は、コントロール群と比較して、高 β -グルカン含有大麦群におい

て有意に低い値を示した。*Bifidobacterium* 属の菌数は、高 β -グルカン含有大麦群で有意に菌数が多かった。

(7) 実験 27 - 2

糞便中のプロピオン酸濃度が β -グルカン欠損大麦群に比べて、高 β -グルカン大麦群で有意に高かった。



盲腸内容物の短鎖脂肪酸解析結果

エラーバーは標準偏差を表す。

異なるアルファベット間で有意差あり (p < 0.05)。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

山岸あづみ、工藤陽香、青江誠一郎、軟化处理昆布が食餌性肥満モデルマウスのメタボリックシンドローム関連指標に及ぼす影響、日本栄養・食糧学会誌 査読有、Vol.68、2015、119-128

笹岡 歩、河本 高伸、青江 誠一郎、大麦粉含有ホットケーキの摂取による食後の血糖応答に及ぼす影響、栄養学雑誌 査読有、Vol.73、2015、253-258

Seiichiro A., Haruka K, Seiya S, Effects of liquid konjac on parameters related to obesity in diet-induced obese mice、Biosci Biotech and Biochem、査読有、Vol.179、2015、1141-1146

Aoe S., Ikenaga T, Noguchi H, Kohashi C, Kakumoto K, Kohda N, Effect of cooked white rice with high β -glucan barley on appetite and energy intake in healthy Japanese

subjects: a randomized controlled trial, Plant Foods Hum Nutr 査読有 Vol.69, 2014, 325-330

青江誠一郎、野口洋樹、池永武、小梯知英子、角元慶二、甲田哲之、健常成人における大麦 β-グルカン 1 g 含有クラッカーの食後血糖応答に及ぼす影響 無作為化二重盲検プラセボ対照クロスオーバー比較試験、薬理と治療 査読有、Vol.452, 2014, 687-693

〔学会発表〕(計 11 件)

青江誠一郎、加藤美智子、山中千恵美、工藤陽香、一ノ瀬靖則、神山紀子、小前幸三、高橋飛鳥、吉岡藤治、柳澤貴司、大麦中の β-グルカンの有無ならびに搗精処理が食餌性肥満モデルマウスのメタボリック関連指標に及ぼす影響、日本食物繊維学会第 20 回学術集会、平成 27 年 11 月 28 日、伊那食品工業株式会社 (伊那)

青江誠一郎、吉岡藤治、柳沢貴司、内臓脂肪蓄積に対する高ベータグルカン大麦ご飯の影響: プラセボ二重盲検比較試験、平成 27 年 10 月 2 日、第 36 回日本肥満学会、名古屋国際会議場(名古屋)

青江誠一郎、大麦 β-グルカンの新機能と腸内代謝、第 15 回日本抗加齢医学会総会(招待講演)平成 27 年 5 月 30 日、福岡国際会議場(福岡)

青江誠一郎、大麦の機能性研究の最新エビデンス、第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会(招待講演)、平成 27 年 5 月 22 日、門司港ホテル(北九州)

青江誠一郎、穀物食物繊維の機能性研究に関する最新情報、日本食物繊維学会第 19 回学術集会(招待講演)、平成 26 年 11 月 29 日、大妻女子大学(東京)

青江誠一郎、食物繊維と腸から考えるアンチエイジング食、第 14 回日本抗加齢医学会総会(招待講演)平成 26 年 6

月 7 日、大阪国際会議場(大阪)

加藤美智子、小前幸三、一ノ瀬靖則、吉岡藤治、青江誠一郎、大麦または大麦 β-グルカン抽出物の摂取が食餌性肥満マウスの耐糖能に及ぼす影響、第 68 回日本栄養・食糧学会大会、平成 26 年 5 月 31 日、酪農学園大学(帯広)

加藤美智子、青江誠一郎、雑穀の摂取が食餌性肥満マウスの耐糖能に及ぼす影響、第 60 回日本栄養改善学会学術総会、平成 25 年 9 月 13 日、神戸国際会議場(神戸)

青江誠一郎、大麦 β-グルカンの健康価値と最新の研究動向、第 60 回日本栄養改善学会学術総会(招待講演)、平成 25 年 9 月 13 日、神戸国際会議場(神戸)

小林悦子、高波嘉一、青江誠一郎、高炭水化物食および高脂肪食の摂取が接触皮膚炎モデルマウスに及ぼす影響、第 67 回日本栄養・食糧学会大会、平成 25 年 5 月 25 日、名古屋大学(名古屋)

加藤美智子、椿和文、久下高生、青江誠一郎、高脂肪食中の大麦由来 β-グルカン含量がマウスの耐糖能と腹腔内脂肪蓄積に及ぼす影響、第 67 回日本栄養・食糧学会大会、平成 25 年 5 月 25 日、名古屋大学(名古屋)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青江誠一郎(AOE, Seichiro)
大妻女子大学・家政学部・教授
研究者番号: 90365049