

## エンドトキシンショックに対する大麦の効果

吉澤みな子, 篠田 千波<sup>1)</sup>,  
曾谷 宮子<sup>1)</sup>, 中井 絵美<sup>1)</sup>

### 要 旨

炎症性腸疾患 (IBD) は、大腸や小腸の粘膜に慢性の炎症や潰瘍を引き起こす難治性疾患であり、我が国では、近年、患者数が増加している。原因はまだ明らかにされていないものの、遺伝的素因や環境因子の影響と腸管免疫系の異常が関与していると考えられている。IBD 患者においては炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6 が、活動期に増加する傾向があり、IBD の寛解に  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-グルカンを含む大麦の効果期待されている。

本研究では、リポ多糖 (LPS) によってエンドトキシンショックを誘導させ、種々の炎症性サイトカインの分泌が促進したマウスを用い、大麦の炎症性サイトカインへの影響について検討した。

本研究の結果、TNF- $\alpha$  はコントロール群、大麦群ともに LPS 投与 1 時間後に最高値を示し、IL-10 は大麦群で有意に高値を示した。大麦を摂取することで、IFN- $\gamma$  に有意差は認められなかったものの、TNF- $\alpha$  が上昇すると、TNF- $\alpha$  を抑制するために IL-10 が上昇し、それに伴って IFN- $\gamma$  が上昇するというサイトカインの相互作用が確認できた。

以上のことから、今後さらなる研究を続けることが必要であるが、大麦には難治性免疫疾患の寛解に使用できる機能性食品としての活用が期待された。

**キーワード** : エンドトキシンショック、大麦、炎症性腸疾患、IL-10、  
 $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-グルカン

---

1) 大手前栄養学院卒業生

## 1. はじめに

炎症性腸疾患 (Inflammatory bowel disease : IBD) は、消化管である大腸や小腸の粘膜に慢性の炎症や潰瘍を引き起こす疾患の総称で、寛解と再燃を繰り返す難治性の疾患である。IBD の代表的疾患には、クローン病 (Crohn's disease : CD) や潰瘍性大腸炎 (Ulcerative colitis : UC) があり、原因はまだ明らかにされていないものの、遺伝的素因や環境因子の影響と腸管免疫系の異常が関与していると考えられている<sup>1,2)</sup>。我が国では、CD や UC は特定疾患に指定されているが、近年、患者数の増加が続いており、CD は約4万人、UC は約17万人と推計されている<sup>3)</sup>。

これまで IBD の原因や治療法に関する研究がおこなわれており、炎症性サイトカインの増加<sup>4)</sup>が明らかにされ、ステロイド製剤や免疫抑制剤<sup>5)</sup>、抗 TNF- $\alpha$  抗体製剤<sup>6)</sup>などの治療法が選択されている。また、IBD においては、血中や大腸粘膜で、腫瘍壊死因子- $\alpha$  (Tumor necrosis factor- $\alpha$  : TNF- $\alpha$ )、インターロイキン-1 $\beta$  (Interleukin-1 $\beta$  : IL-1 $\beta$ ) 及びインターロイキン-6 (Interleukin-6 : IL-6) のような炎症性サイトカインは増加する傾向がある。IBD における栄養療法では、高残渣食は腸管運動を亢進し、腸管安静が保てない危険性があることから、一様に食物繊維の制限や低残渣食が推奨されている<sup>7)</sup>。しかし、最近では、食物繊維の中でも水溶性で腸管刺激が少ないペクチンの推奨<sup>8)</sup>や、食物繊維を多く含む発芽大麦の有効性も報告<sup>9,10)</sup>されているが、明確な栄養療法は明らかにされていない。大麦には水溶性食物繊維で、免疫賦活作用を有する  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-グルカンを多く含有していることから、大麦摂取により各種免疫細胞が活性化され、IBD の寛解に効果があるのではないかと考えられた。

よって本研究では、これらの基礎研究として、リポ多糖 (Lipopolysaccharide : LPS) によってエンドトキシンショックを誘導させ、種々の炎症性サイトカインの分泌が促進したマウスを用い、大麦の効果について検討したので報告する。

## 2. 実験材料および方法

### 2-1 リポ多糖および大麦粉末

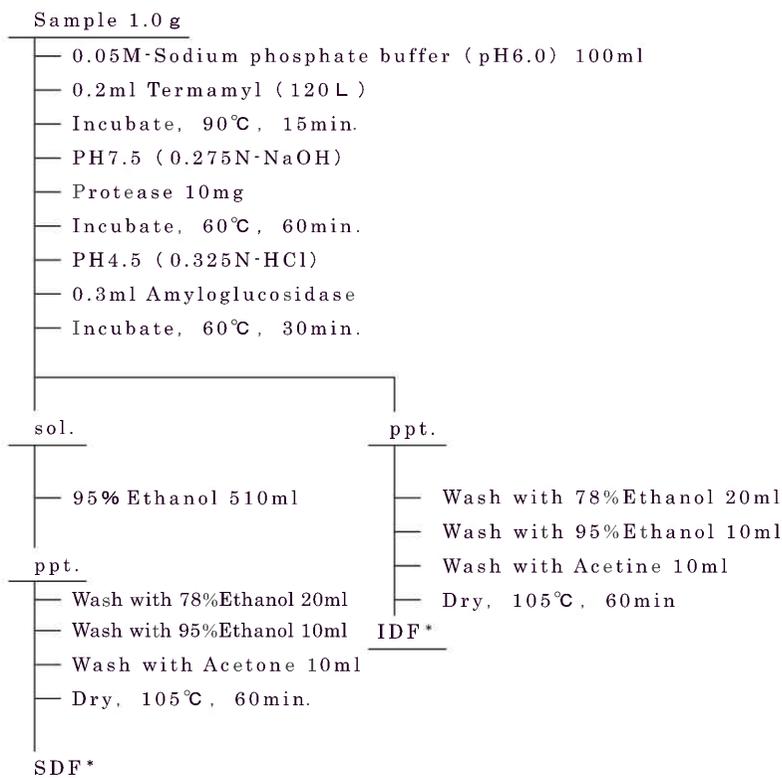
エンドトキシンショックには、大腸菌由来の LPS (sigma, cat. no. L3024-5MG) を使用した。

実験試料である大麦粉末は、ドラフト分級製粉精粒法<sup>11)</sup>による歩留まり75%のものを100メッシュ以下に粉碎して使用した (イトメン株式会社提供)。

## 2-2 大麦粉末の水溶性食物繊維およびβ-(1→3)-グルカンの定量

食物繊維は、Scheme 1 に示すように、酵素ターマミル、プロテアーゼ、β-アミログルコシダーゼ（シグマ社製）を使用する Prosky<sup>12)</sup>法を用いて定量を行った。また、β-(1→3)-グルカンは、Scheme 2 及び図 1 に示すようにβ-(1→3)結合に隣在するβ-(1→4)結合をリキナーゼで切断し、その後β-(1→3)結合を切断する酵素であるβ-(1→3)グルコシダーゼ（日本バイオコン社）で加水分解を行う McCleary<sup>13,14)</sup>法により遊離したグルコースを Glucose B-Test Wako（和光純薬 K. K.製）を用い、505nm で測定し、McCleary の計算法により求めた。

Scheme 1. Determination of total dietary fiber  
(Prosky-AOAC)



$$\text{SDF} = \text{SDF}^* - (\text{Ash} + \text{Protein}) \quad \text{IDF} = \text{IDF}^* - (\text{Ash} + \text{Protein})$$

**Scheme 2. McCleary method for assay of  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4), (1 $\rightarrow$ 3)-Glucan**

Sample 100mg

- 50% Ethanol 1.0ml
- 20mM Sodium phosphate buffer(ph 6.5), 5.0ml
- Stir using a Vortex mixer
- Incubate in a boiling water bath
- Stir using a Vortex mixer
- Cool, 40°C
- Lichenase(10U) in Sodium phosphate buffer(ph6.5), 0.2ml
- Stir
- Incubate, 40°C, 1hr
- Fill up to 25ml with distilled water
- Centrifuge, 5500rpm $\times$ 10min, 5°C

filtrate

0.1 ml (reaction)	0.1 ml (blank)
$\beta$ -Glucosidase (0.2U) in Acetate buffer, 0.1ml	50mM Acetate buffer (ph4.0), 0.1ml
Incubate, 40°C, 15min	

0.1ml	0.1ml
Glucose B-test Wako reagent, 3.0ml	Glucose B-test Wako reagent, 3.0ml
Incubate, 40°C, 20min	Incubate, 40°C, 20min
505nm Absorbance	505nm Absorbance

(A)

(B)

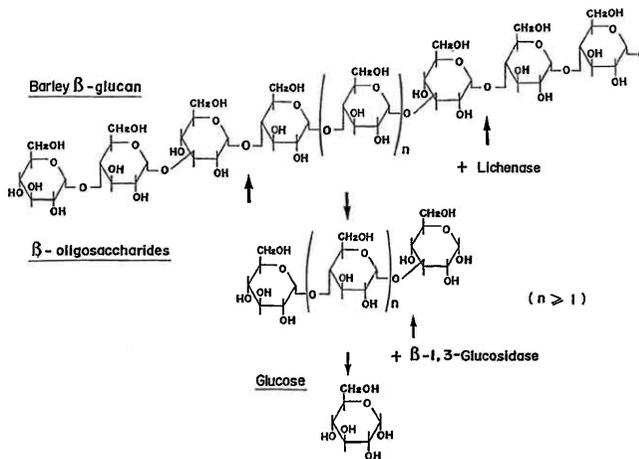


図 1. 大麦の  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4), (1 $\rightarrow$ 3)-グルカン

### 2-3 実験動物および飼料組成

動物実験は、株式会社 紀和実験動物研究所より購入した体重70g 前後、5 週齢の BALB/C オスマウスをコントロール群と大麦群に分け、各群20匹ずつ合計40匹を使用した。マウスは温度 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ に設定し、照明は12時間毎に自動的に明暗（点灯8：00～20：00）が切り替わる動物室で14日間個別ケージを用いて飼育した。

大麦群には表1に示すようにコントロール飼料の $\beta$ 化コーンスターチとセルロースパウダーの合計10%を大麦粉末に置き換えた飼料を用い、それぞれ水と均等に混和し、半練り状としたものを給餌し、給水は水道水を自由摂取させた。

### 2-4 LPS による実験的エンドトキシンショック

それぞれの飼料（表1）をマウスに2週間投与し、体重と摂食量を測定した。飼育後、LPS を生理食塩水で100倍に希釈（ $10\mu\text{g}/\text{ml}$ ）して0.1ml を腹腔内投与し、LPS 投与0、1、3及び6時間後に採血と肝臓を採取後、肝臓は10%ホルマリンを用いて固定した。採血した血液は、 $12,000 \times g$ 、5分間、 $4^\circ\text{C}$ で遠心分離し、 $-30^\circ\text{C}$ にて保管した。サイトカインは酵素免疫測定法（Biosource 社）にて TNF- $\alpha$ 、インターロイキン-10（Interleukin-10：IL-10）、インターフェロン- $\gamma$ （Interferon- $\gamma$ ：IFN- $\gamma$ ）を、生化学検査は、血糖はムタローゼ・GOD 法（和光純薬工業株式会社）、中性脂肪はグリセロール-3-リン酸オキシダーゼ・DAOS 法（和光純薬工業株式会社）、総コレステロールはコレステロールオキシダーゼ・DAOS 法（和光純薬工業株式会社）により定量を行った。また、LPS 投与が臓器に及ぼす影響を確認するため、ヘマトキ

表1. 餌の組成 (%)

	コントロール群	大麦群
$\beta$ 化コーンスターチ <sup>a)</sup>	46.57	41.57
$\alpha$ 化コーンスターチ <sup>b)</sup>	15.50	15.50
グラニュー糖 <sup>c)</sup>	10.00	10.00
ミルクカゼイン <sup>d)</sup>	14.00	14.00
精製大豆油 <sup>e)</sup>	4.00	4.00
セルロースパウダー <sup>f)</sup>	5.00	0.00
ミネラルミックス <sup>g)</sup>	3.50	3.50
ビタミンミックス <sup>h)</sup>	1.00	1.00
DL-メチオニン <sup>i)</sup>	0.18	0.18
重酒石酸コリン <sup>j)</sup>	0.25	0.25
大麦	—	10.00

a, b) オリエンタル酵母工業株式会社、c) 伊藤忠製糖株式会社、d, e, f, g, h) 日本クレア株式会社/日本配合飼料株式会社、i, j) 和光純薬工業株式会社

シリン・エオシン染色によって肝臓組織の観察を行った。

なお、本実験は「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(平成18年文部科学省)を遵守し、大阪府立大学動物実験委員会の承認を受け実施した。

## 2-5 統計処理

すべてのデータは平均±標準偏差で示した。2群間の検定はF検定で等分散性を確認した後、t検定またはMann-Whitney検定を行った。統計解析は、SPSS Statistics 20 (IBM) を用い、 $p < 0.05$ で有意差ありと判定した。

## 3. 実験結果および考察

### 3-1 大麦粉末の水溶性食物繊維および $\beta$ -(1→3)-グルカン含有量

大麦粉末は、表2に示すように水溶性食物繊維は4.6%、 $\beta$ -(1→3)-グルカンは3.4%であった。

### 3-2 ラットの成長および摂食量

2週間の飼育期間における、摂食量、初期体重、最終体重を表3に示した。コントロール群および大麦群ともに実験開始より順調な成長を示し、両群間に有意差は認められなかった。

### 3-3 LPSによる実験的エンドトキシンショック

LPS投与前である0時間、投与後1時間、3時間、6時間の血糖、血中中性脂肪と総コレステロールの値をそれぞれ図2、図3、図4に示した。血糖値はLPS投与

表2. 大麦粉末中の $\beta$ -(1→3)-グルカンの収量と収率

サンプル	収量 (g)	収率 (%)	$\beta$ -(1→3)-グルカンの収量 (g)
大麦粉	100.0	3.4	3.4
大麦粉中の水溶性食物繊維	4.6	21.3	0.99

表3. 摂食量と体重の変化 (g)

グループ	摂食量	初期体重	最終体重
コントロール群	70.5±4.4	19.4±0.7	25.3±1.2
大麦群	68.1±3.6	19.3±0.6	24.6±1.2

### エンドトキシンショックに対する大麦の効果

前及び投与1時間後では高いものの、投与3時間後及び6時間後では空腹時の正常値に戻っていた。本研究ではLPS投与前に絶食を行なわなかったため、LPS投与直前まで摂食していたと考えられた。中性脂肪がコントロール群に比べ大麦群で低値を示

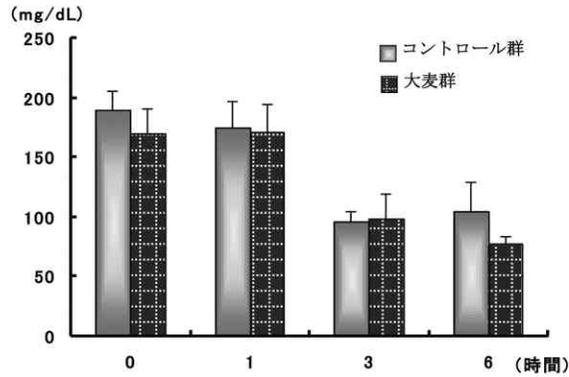


図2. LPS投与による血糖値の変化

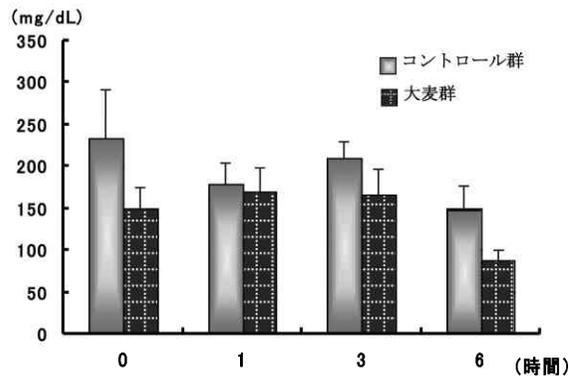


図3. LPS投与による血中中性脂肪の変化

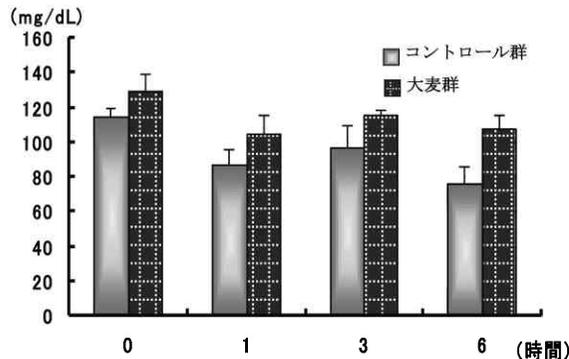


図4. LPS投与による血中総コレステロールの変化

したが、これはコントロール群には含まれていない大麦の水溶性食物繊維による影響と思われた。逆に総コレステロールでは大麦群において高値を示したが、水溶性食物繊維にはコレステロール低下作用がある一方で、HDL-コレステロールを増加させる効果もあるため<sup>15)</sup>、その影響ではないかと考えられた。しかし、各項目においてコントロール群および大麦群ともに、有意差は認められなかった。

図5に示したように、LPS投与前とLPS投与6時間後の肝臓の写真において、LPS投与前では、血管内皮が完全な状態で認められた。一方、投与6時間後では、コントロール群、大麦群のいずれにおいても、血管内皮は剥離しており、LPS投与での肝臓の炎症にはコントロール群、大麦群間に差は認められなかった。

サイトカインへの影響として、TNF- $\alpha$ の変化を図6に示した。コントロール群において若干高値を示したものの有意差は認められなかった。TNF- $\alpha$ は癌を抑制するサイトカインであるため、一見すると大麦群の方が低値であることに違和感があるが、TNF- $\alpha$ は分泌上昇により、自己免疫疾患や、クローン病、潰瘍性大腸炎、敗血症の悪化を招くとされている。そのため、現在ではクローン病や潰瘍性大腸炎の治療にはTNF- $\alpha$ 作用を抑制する「抗TNF- $\alpha$ 抗体製剤」が使用されており<sup>16)</sup>、大麦群において低値であることから、大麦の抗TNF- $\alpha$ 抗体製剤としての作用が示唆された。

IL-10の変化を図7に示した。LPS投与1時間後において、大麦群が有意に高値を示した。IL-10はヘルパーTリンパ球2型(Th 2)タイプのCD 4<sup>+</sup> (cluster of

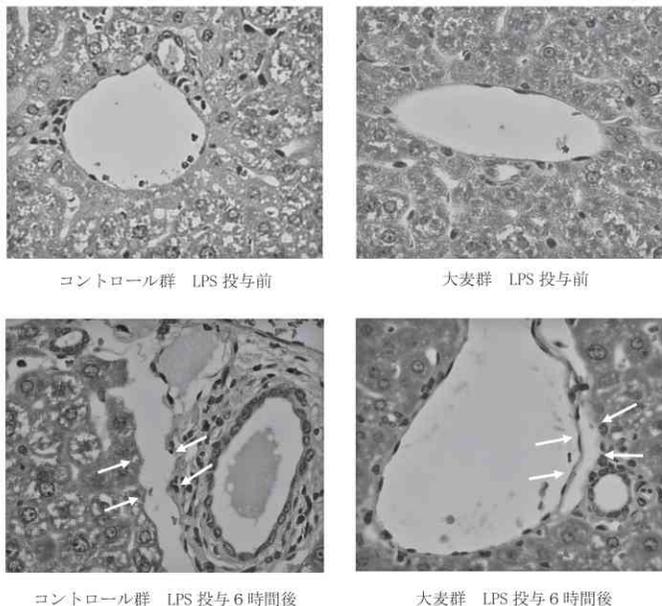


図5. LPS投与前、投与6時間後のマウスの肝臓 (500×)

differentiation 4<sup>+</sup>) T細胞に由来する抗炎症性サイトカインの一つで、LPS や IFN- $\gamma$  の刺激により単球/マクロファージから誘導される炎症性サイトカイン (IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$ ) の産生を抑制する。また、動物モデルにおいてエンドトキシン血症の致死率は IL-10 投与により改善し、血中 TNF- $\alpha$  濃度が低下する。IL-10 遺伝子のノックアウトマウスでは、十二指腸、近位空腸及び近位大腸に腸炎が発症し、粘膜の過剰な増生、壁肥厚、びらん形成、陰窩の拡大、腸管上皮細胞における MHC クラス II 抗原発現の増強を認める。これらの所見は、IL-10 の欠失により、腸内細菌叢などの通常抗原に対する免疫応答の抑制が誘導されず、慢性腸炎が惹起されることを意味する。これらの働きに着目し、TNF- $\alpha$  分泌を抑制し、炎症性腸疾患の寛解維持に有用とされ、近年多くの研究がなされており、IL-10 による治療が試みられている<sup>17)</sup>。

IFN- $\gamma$  の変化を図 8 に示した。有意差は見られなかったものの、大麦群において高値を示した。IFN- $\gamma$  は、Th 2 の応答阻害に関与するため、IL-10 上昇後に分泌が増加する傾向にあり、本研究においても、時間の経過とともに上昇していた。IFN- $\gamma$  の増加により、マクロファージや他のインターフェロンの産生を促進し、細胞内の細菌や微生物殺傷能力を高めていると考えられる<sup>18)</sup>。

これらのサイトカインの変動の結果から、大麦群において、LPS 投与 1 時間後に、

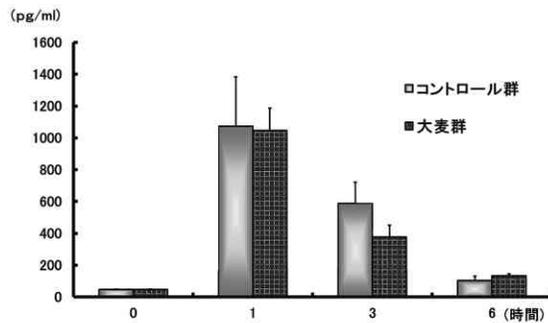


図 6. LPS 投与による TNF- $\alpha$  の変化

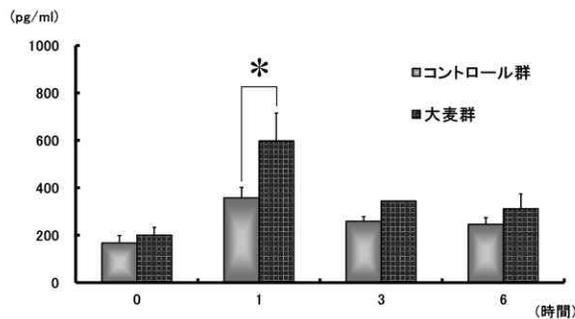


図 7. LPS 投与による IL-10 の変化

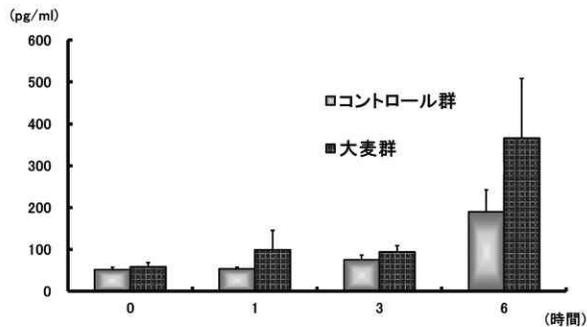


図 8. LPS 投与による IFN- $\gamma$  の変化

IL-10が有意に高値を示した。TNF- $\alpha$ の上昇により、それらを抑制するためにIL-10が上昇し、それに伴ってIFN- $\gamma$ が上昇するというサイトカインの相互作用を、大麦群で顕著に確認することができた。

#### 4. まとめ

LPS 投与により炎症が刺激され、好中球、マクロファージの遊出・活性化、炎症局所への集積が起こることにより、マクロファージでのIL-10、TNFの産生が促進される。その後TNF- $\alpha$ の急激な上昇が起こり、マクロファージでのIL-10、TNFの産生により、IL-10、IFNの産生刺激が促進され、IFN- $\gamma$ の急激な上昇が起こる。それにより、IL-10によるマクロファージでのTNF産生が抑制され、TNF- $\alpha$ の急激な低下が起こる。本研究では、大麦を摂取することで、これらの反応が起こっているのではないかと考えられ、大麦が難治性免疫疾患の寛解に利用できる機能性食品としての活用が期待されるが、人体における効果を確認するためにはさらなる基礎研究と臨床研究が必要である。

#### 参考文献

- 1) Satsangi, J., Welsh, K. I., Bunce, M., Julier, C., Farrant, J. M., Bell, J. I. and Jewell, D. P.: Contribution of genes of the major histocompatibility complex to susceptibility and disease phenotype in inflammatory bowel disease. *Lancet*, 347, 1212-1217 (1996)
- 2) Fiocchi, C.: Immune events associated with inflammatory bowel disease. *Scand. J. Gastroenterol Suppl.*, 172, 4-12 (1990)
- 3) 難病情報センター : <http://www.nanbyou.or.jp>
- 4) Fiocchi, C.: Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology*, 115 (1), 182-205 (1998)

- 5) 藤山佳秀、馬場重樹：炎症性腸疾患の治療(4)免疫抑制剤の使い方、診断と治療、100(6)、1001-1006 (2012)
- 6) 清原裕貴、水野慎大、長沼誠、金井隆典：潰瘍性大腸炎内科的治療の最前線、日本消化器病学会雑誌、113(3)、413-423 (2016)
- 7) 近藤和雄、市丸雄平、佐藤和人：医科栄養学、建帛社、325 (2010)
- 8) 高添正和、前川厚子：炎症性腸疾患ケアマニュアル、医学書院、151-153 (1997)
- 9) Hanai H., Kanauchi O., Mitsuyama K.: Germinated barley foodstuff prolongs remission in patients with ulcerative colitis. *Int. J. Mol. Med.*, 13, 643-647 (2004)
- 10) 好川謙一、穂苅量太、三浦総一郎：腸疾患とプレバイオティクス、日本機能性食品医学学会誌（機能性食品と薬理栄養）、8(6)、513-519 (2015)
- 11) 中村尚夫：ドラフト大麦粉末の食品・栄養学的研究、甲子園大学紀要、15(A)、7-12 (1987)
- 12) Prosky, L., Asp, N.-G., Schweizer, T. F., DeVries, J. and Furda, I.: Determination of insoluble, soluble and total dietary fiber in foods and food products. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 71, 1017-1023 (1988)
- 13) McCleary, B. V., Glennie-Holmes, M.: Enzymic quantification of (1→3)(1→4)- $\beta$ -glucan in barley and malt. *J. Inst. Brew.*, 91, 285-295 (1985)
- 14) McCleary, B. V., Nurthen, E. J.: Measurement of (1→3)(1→4)- $\beta$ -D-glucan in malt, wort and beer. *J. Inst. Brew.*, 92, 168-173 (1986)
- 15) 中村治夫、石川俊次、高島恵美子、佐藤典子、長野允：Ishabgul (Isapgola) の臨床成績、臨床栄養、57(7)、753-755 (1980)
- 16) 杉田昭、小金井一隆、辰巳健志、二木了、黒木博介、山田恭子、荒井勝彦、福島恒男：潰瘍性大腸炎に対する治療の最近の動向、日本外科学会雑誌、116(2)、99-103 (2015)
- 17) 馬場忠雄：炎症性腸疾患—最近の動向—、松仁会医学誌、39(1)、1-14 (2000)
- 18) Blumberg, R. S.: Relapse of chronic inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 98, 792-796 (1990)