大麦若葉搾汁成分のラット腸内細菌叢に及ぼす影響

駒込　乃莉子　（指導：海野　知紀）

Effects of Juice Component of Young Barley Leaves
on the Composition of Gut microbiota in Rats.
By Noriko Komagome

１．諸言

ヒトの大腸には、10^{11}/g 以上の細菌が常在しており、腸内細菌叢を形成している[1)]。腸内細菌は、難消化性糖質などを利用して短鎖脂肪酸（酢酸、プロピオン酸、酪酸など）を産生する[2)]。腸内細菌叢は、食物成分などの環境要因により変動する[3)]。近年では、肥満者と痩せの者では、細菌叢を構成する菌種の占有率が異なることが報告されており、生活習慣病の進展あるいはその予防の観点から注目が集っている[2、4-6)]。一方、大麦若葉は、イネ科オオムギ属に属するオオムギ（*Hordeum vulgare* L.）の幼穂形成開始期に採取した草丈20～30㎝の葉のことをさし、その葉や茎などを収穫後、乾燥、微粉砕したものや、葉や茎を搾汁後、粉末化した大麦若葉搾汁粉末（以下、搾汁粉末という。）がいわゆる「青汁」の原材料として利用されている。搾汁粉末は、先行研究にて、ラットの糞重量を増加させることや *Prevotella* の占有率を上昇させることが報告されている[7)]。

２．目的

搾汁粉末の高脂肪食負荷時における有効性および搾汁粉末に由来する機能性関与成分についての知見は得られていない。そこで、本研究では、まず高脂肪食負荷時におけるラットの腸内細菌叢に及ぼす影響について検討した（実験Ⅰ）。引き続き、機能性関与成分の探索を目的として、大麦若葉搾汁液から分画を作成し、これをラットに投与した場合の腸内細菌叢および短鎖脂肪酸を指標とした盲腸発酵性に与える影響について検討した（実験Ⅱ）。

３．方法

３－１　食餌組成

本研究で用いた搾汁粉末または搾汁液は、ヤクルトヘルスフーズ株式会社より供与いただいた。実験Ⅰでは、コントロール食を基本に、ラードを20%（w/w）配合した高脂肪食を設定し、高脂肪食に搾汁粉末2%、10%（いずれも w/w）となるように添加した。食餌組成を表１に示す。

実験Ⅱでは、搾汁液を凍結乾燥した搾汁粉末および搾汁液から４種類の分画を調製した。分画方法は、冷凍保存された大麦若葉搾汁液２L を解凍後、1,000 回転、10 分間遠心分離し、沈殿物（分画 1）と上清（分画 2）にわけた。得られた分画１に、80%（v/v）濃度となるようにアセトンを加え、10 分間攪拌し、1,000 回転、10 分間遠心分離後、上清（アセトン抽出画分：分画 1-1）と沈殿物（アセトン沈殿画分：分画 1-2）に分けた。また、分画２は、減圧濃縮後、80%（v/v）濃度となるようにエタノールを加えて 10 分間攪拌後、1,000 回転、10 分間遠心分離し、上清（エタノール抽出画分：分画 2-1）と沈殿物（エタノール沈殿画分：分画 2-2）にわけた。分画 1-1 はヘキサンに溶解させ、冷蔵保存した。分画 1-2、2-1、2-2 は、減圧濃縮後、凍結乾燥させた。それらの得られた収率をもとに飼料に添加した。食餌組成を表２に示す。

３－２　動物実験

４週齢のウィスター系雄ラットを購入し、１週間の予備飼育の後、上述の配合飼料を用いて４週間飼育した。飼育期間中、糞を回収し、飼育４週

目に回収した糞を用いてT-RFLP法により腸内細菌叢を解析した。飼育終了時に開腹し、盲腸を摘出した後、盲腸内容物を回収した。得られた盲腸内容物中の短鎖脂肪酸含量は、ニトロフェニルヒドラジンを用いて誘導化した後、高速液体クロマトグラフィーにより測定した。

表１　食餌組成（実験Ⅰ）（%）

	コントロール	高脂肪	YBL2%	YBL10%
カゼイン	20.0	20.0	20.0	20.0
DL- メチオニン	0.3	0.3	0.3	0.3
コーンスターチ	25.0	5.0	5.0	5.0
スクロース	10.0	10.0	10.0	10.0
デキストリン	30.0	30.0	28.0	20.0
セルロースパウダー	5.0	5.0	5.0	5.0
ラード	–	20.0	20.0	20.0
コーンオイル	5.0	5.0	5.0	5.0
AIN-76 ミネラル配合	3.5	3.5	3.5	3.5
AIN-76 ビタミン配合	1.0	1.0	1.0	1.0
重酒石酸コリン	0.2	0.2	0.2	0.2
大麦若葉搾汁粉末（YBL）	–	–	2.0	10.0

表２　食餌組成（実験Ⅱ）（%）

	コントロール	YBL10%	分画 1-1	分画 1-2	分画 2-1	分画 2-2
カゼイン	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
DL- メチオニン	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
コーンスターチ	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0
スクロース	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
デキストリン	30.0	20.0	29.3	27.6	26.0	27.1
セルロースパウダー	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
コーンオイル	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
AIN-76 ミネラル配合	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
AIN-76 ビタミン配合	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
重酒石酸コリン	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
大麦若葉搾汁粉末（YBL）	0.0	10.0	–	–	–	–
搾汁粉末分画	–	–	0.7	2.4	4.0	2.9

３－３　統計解析

T-RFLP法による腸内細菌叢の占有率の比較以外は、一元配置分散分析の後、Tukeyの多重比較検定によって行った。なお、リアルタイムPCR法による遺伝子コピー数は、対数変換した後に統計解析に供した。実験Ⅰにおける予備飼育期間に回収した糞中の腸内細菌叢と飼育４週目に回収した糞中の腸内細菌叢の比較は、Wilcoxonの符号付き順位検定により行った。飼育４週目に回収した糞中の腸内細菌叢の群間比較は、Kruskal-Wallis検定の後、Dunnの方法による多重比較検定を行った。いずれも有意水準を5%未満とした。

４．結果

実験Ⅰ　大麦若葉搾汁粉末の高脂肪食負荷ラット腸内細菌叢への影響

４－１　体重、摂餌量、脂肪組織重量、盲腸重量

摂餌量は、コントロール群と比較して高脂肪食群、搾汁粉末2%群、搾汁粉末10%群で有意に減少したが、初期体重および最終体重に有意差は確認されなかった（表3）。

表３　体重、摂餌量、脂肪組織重量、盲腸重量（g）

	コントロール	高脂肪食	YBL2%	YBL10%
初期体重	144 ± 6	144 ± 5	144 ± 4	144 ± 3
最終体重	365 ± 24	384 ± 35	362 ± 19	367 ± 15
摂餌量（/4w）	640 ± 44 [a]	565 ± 46 [b]	567 ± 29 [b]	558 ± 28 [b]
脂肪組織重量	21.5 ± 2.3	23.5 ± 5.2	21.8 ± 4.1	19.2 ± 3.0
腸間膜周囲	5.8 ± 0.8	6.0 ± 1.0	5.4 ± 1.2	5.2 ± 0.8
睾丸周囲	7.8 ± 1.5	8.6 ± 2.3	8.4 ± 1.7	7.1 ± 1.6
腎臓周囲	7.8 ± 1.0 [ab]	8.9 ± 2.1 [a]	7.9 ± 1.3 [ab]	6.9 ± 1.0 [b]
盲腸全体重量	4.3 ± 1.0	3.9 ± 0.8	3.7 ± 1.0	3.9 ± 1.1
盲腸内容物重量	3.3 ± 0.9	2.9 ± 0.7	2.8 ± 1.0	2.9 ± 1.0

平均値±標準偏差（n=8）
a-b 間で5%未満（$p<0.05$）で有意差があることを示す（Tukeyの多重比較検定）

４－２　乾燥糞重量

飼育４週間に排泄された乾燥糞重量は、コントロール群および高脂肪食群と比較して、搾汁粉末2%群、搾汁粉末10%群で有意に増加した（表4）。

表４　飼育４週間の乾燥糞重量に及ぼす大麦若葉搾汁粉末の影響（g/ 匹）

コントロール	高脂肪食	YBL2%	YBL10%
44.9 ± 3.0 [b]	47.7 ± 5.0 [b]	64.1 ± 4.1 [a]	60.0 ± 3.2 [a]

平均値±標準偏差（n=8）
a-b 間で 5% 未満（p<0.05）で有意差があることを示す（Tukey の多重比較検定）

４－３　盲腸内容物中の短鎖脂肪酸含量

ラット１匹当たりの盲腸内容物中の短鎖脂肪酸量を表５に示した。酢酸は、コントロール群と比較して、高脂肪食群および搾汁粉末 2% 群で有意に減少した。また、プロピオン酸も、コントロール群と比較して高脂肪食群で有意に減少した。高脂肪食群は、酢酸およびプロピオン酸を減少させたが、搾汁粉末 10% の配合により回復する傾向がみられた（表５）。

表５　ラット１匹あたりの盲腸内容物中の短鎖脂肪酸量に及ぼす大麦若葉搾汁粉末の影響（μmol/ 匹）

	酢　酸	プロピオン酸	酪　酸
コントロール	554 ± 165 [a]	90 ± 34 [a]	44 ± 17
高脂肪食	318 ± 119 [b]	43 ± 19 [b]	23 ± 16
YBL2%	272 ± 168 [b]	59 ± 39 [ab]	26 ± 14
YBL10%	358 ± 171 [ab]	76 ± 34 [ab]	35 ± 20

平均値±標準偏差（n=8）
a-b 間で 5% 未満（p<0.05）で有意差があることを示す（Tukey の多重比較検定）

４－４　リアルタイム PCR および T-RFLP 解析

リアルタイム PCR 法により、乾燥糞中の標的遺伝子のコピー数を測定した。予備飼育期間および飼育４週目の乾燥糞 1g あたりのコピー数は、統計的な群間有意差は得られなかった（表６）。また、予備飼育期間および飼育４週目の乾燥糞を用いて、細菌叢に由来する 16S rRNA 遺伝子部分塩基配列の T-RFLP 解析を行った。予備飼育期間と飼育４週間目の *Prevotella* の占有率を表６に示した。飼育４週目においてコントロール群と比較して、搾汁粉末 2% 群、搾汁粉末 10% 群で *Prevotella* の占有率の上昇が有意に増加した。

表６　リアルタイム PCR のコピー数（乾燥糞重量当たり）および *Prevotella* の占有率（%）

	Log10 copies（/g dry feces）[1]	
	予備飼育	飼育４週目
コントロール	11.95 ± 0.08	11.87 ± 0.18
高脂肪食	11.96 ± 0.11	11.82 ± 0.12
YBL2%	11.90 ± 0.11	11.76 ± 0.07
YBL10%	11.90 ± 0.06	11.83 ± 0.06
	Prevotella [2、3]	
	予備飼育	飼育４週目
コントロール	7.4（5.6、9.8）	8.6（4.6、11.3）[b]
高脂肪食	9.6（7.1、11.4）	9.0（5.9、19.4）[ab]
YBL2%	6.1（5.0、7.1）	29.8（23.4、36.3）[**、a]
YBL10%	4.5（2.4、11.3）	27.2（24.0、30.6）[**、a]

[1] 平均値±標準偏差（n=8）
[2] 中央値（25 パーセンタイル、75 パーセンタイル）
[3] 予備飼育期間の糞と飼育４週目の糞の腸内細菌叢の比較は、Wilcoxon の符号付き順位検定により行った（*p<0.05、**p<0.01）。また、飼育４週目の糞の腸内細菌の群間比較では、Kruskal-Wallis 検定の後、Dunn の方法による多重比較検定を行った（異なるアルファベット記号がついている場合、p<0.05 で有意差があることを示す）

実験Ⅱ　ラット盲腸内容物中の短鎖脂肪酸含量および腸内細菌叢に及ぼす大麦若葉搾汁成分の影響

４－５　収率

大麦若葉搾汁液２Ｌから搾汁粉末及び各分画を作成した収率は、搾汁粉末（3.1%）、分画 1-1（0.2%）、分画 1-2（0.6%）、分画 2-1（1.1%）、分画 2-2（0.8%）であった。

４－６　盲腸内容物中の短鎖脂肪酸含量

短鎖脂肪酸の測定結果を表７に示した。プロピオン酸および酪酸は、コントロール群と比較して搾汁粉末群で有意に増加した。酢酸は、群間で有意差が得られなかったが、コントロール群と比較して、搾汁粉末 10% 群で増加する傾向がみられた。特に、搾汁粉末 10% 群と分画 2-1 群は同程度に増加する傾向がみられた。

４－７　リアルタイム PCR および T-RFLP 解析

リアルタイム PCR 法で求めた飼育４週目の乾

燥糞１ｇあたりのコピー数は、統計的な有意差は得られなかったが、搾汁粉末群、分画 2-1 群、分画 2-2 群で増加する傾向がみられた。

また、飼育４週目の乾燥糞を対象に、細菌叢に由来する 16S rRNA 遺伝子部分塩基配列の T-RFLP 解析を行った。*Prevotella* は、分画 1-1 群、分画 1-2 群と比較して、分画 2-2 群で有意に増加した（表 8）。

表７　ラット１匹あたりの盲腸内容物中の短鎖脂肪酸含量（μmol/ 匹）

	酢　酸	プロピオン酸	酪　酸
コントロール	222 ± 73	50 ± 9 [b]	15 ± 4 [b]
YBL10%	363 ± 108	86 ± 13 [a]	31 ± 8 [a]
分画 1-1	253 ± 56	61 ± 25 [ab]	19 ± 10 [ab]
分画 1-2	292 ± 105	63 ± 17 [ab]	18 ± 6 [ab]
分画 2-1	359 ± 87	74 ± 16 [ab]	20 ± 4 [ab]
分画 2-2	328 ± 88	73 ± 13 [ab]	26 ± 9 [ab]

平均値±標準偏差（コントロール群（n=6）、他（n=5））

表８　リアルタイム PCR のコピー数（乾燥糞重量当たり）および *Prevotella* の占有率（%）

	Log10 copies（/g dry feces）[1]	*Prevotella* [2、3]
コントロール	12.79 ± 0.14	3.0（ 2.5、3.6）
YBL10%	12.91 ± 0.06	8.1（ 3.5、16.4）
分画 1-1	12.85 ± 0.12	2.1（ 0.7、2.6） [b]
分画 1-2	12.82 ± 0.07	2.7（ 2.2、2.7） [b]
分画 2-1	12.94 ± 0.15	6.3（ 4.7、7.7）
分画 2-2	12.94 ± 0.08	14.1（ 13.4、23.1） [a]

[1] 平均値±標準偏差（コントロール群（n=6）、他（n=5））
[2] 中央値（25 パーセンタイル、75 パーセンタイル）
[3] 飼育４週目の糞の腸内細菌の群間比較では、Kruskal-Wallis 検定の後、Dunn の方法による多重比較検定を行った。

５．考察

ラットの盲腸内容物中の短鎖脂肪酸含量および腸内細菌叢に及ぼす大麦若葉搾汁成分の影響について検討した。

実験Ⅰでは、搾汁粉末 2% の配合により、乾燥糞重量および *Prevotella* の占有率の有意な上昇が認められた。既報同様に、高脂肪食負荷時においても *Prevotella* の占有率の上昇が認められたことから、搾汁粉末由来成分が、特定の腸内細菌の占有率を変化させることが示唆された。

実験Ⅱでは、搾汁粉末 10% の配合により盲腸内容物量は有意に増加し、統計的な有意差は確認できなかったが、水溶性の分画（分画 2-1、分画 2-2）において盲腸内容物中の酢酸含量を増加させる傾向が観察された。また、*Prevotella* の占有率の最も顕著な増加を示したのは、分画 2-2 群であった。分画 2-2 は主に水溶性食物繊維を含む画分のため、乾燥糞重量および盲腸内容物の増加に大麦若葉由来の水溶性食物繊維が関与することが推測された。一方で、分画 2-1 にも腸内細菌数を増加させる可能性が確認されたことから、大麦若葉搾汁粉末のより詳細な分画を進め、*Prevotella* の増殖因子の解明や、大麦若葉の搾汁粉末の機能性を明らかにすることが期待される。

６．総括

本研究は、ラットの腸内細菌叢および盲腸内容物中の短鎖脂肪酸含量に及ぼす大麦若葉搾汁成分の影響について検討した。その結果、以下の知見が得られた。

1. 大麦若葉搾汁粉末は、既報同様に高脂肪食負荷時においても、*Prevotella* の占有率を上昇させた。
2. 大麦若葉搾汁液から調製した分画 2-2 に、*Prevotella* の占有率を有意に上昇させることが明らかとなり、分画 2-2 に含まれる水溶性食物繊維による関与が示唆された。
3. 分画 2-1 は、腸内細菌数の増加傾向がみられた。

参考文献

1）光岡知足 . 腸内細菌学雑誌 15, 57-89, 2002.
2）Topping DL et al. Physiol. Rev. 81, 1031-1064, 2001.
3）安井久子 . 日本食物繊維研究会誌 6, 41-53, 2002.
4）Schwiertz A et al. Obesity 18, 190-195, 2009.
5）Duncan SH et al. Appl. Environ. Microbiol. 73, 1073-1078, 2007.
6）佐々木雅也ら . 腸内細菌学雑誌 19, 1-8, 2005.
7）海野知紀ら . 日本食品科学工学会誌 63, 510-515, 2016.