

原 著

培養細胞を用いた大麦若葉末の炎症性腸疾患抑制作用

奥和之*¹ 川崎靖子*¹ 三浦紀称嗣*¹ 山岡伸*²

要 約

近年患者数の増加が懸念されている炎症性腸疾患は腸管免疫系を制御するサイトカインの異常亢進に起因することが知られている。一方、大麦若葉末は食物繊維を多く含んでおり、多くの消化管内機能を示すことが報告されている。本研究では、腸管上皮細胞が産生する炎症性サイトカインに対する大麦若葉末の影響を検討した。腸管上皮モデル Caco-2細胞を用いて TNF- α による細胞障害性とサイトカイン分泌亢進に対する大麦若葉末の作用を検討したところ、大麦若葉末由来糖脂質を添加することによって、細胞障害性および炎症性サイトカイン (IL-6, IL-8) 産生が顕著に抑制されることが見出された。また大麦若葉由来糖脂質は、TNF- α による細胞障害性を濃度依存的に抑制することが明らかとなり、これより、大麦若葉末由来糖脂質は炎症性腸疾患を抑制することが明らかとなった。

1. 緒言

炎症性腸疾患 (IBD : inflammatory bowel disease) は、主に若年層を中心にその罹患率が急激に増加している疾患である。IBD は潰瘍性大腸炎とクローン病が含まれるが、いずれもストレスなど外的因子に対する腸管自律神経あるいは腸管免疫の異常による炎症メディエーターを介して、腸管の微小循環障害・組織破壊が生じていると考えられる^{1,3)}。すなわち異常亢進したマクロファージなどが産生する tumor necrosis factor-alpha (TNF- α)、interleukin-1beta (IL-1 β) といった炎症性サイトカインが腸管上皮細胞に作用し、腸管上皮細胞はこれらの刺激によってさらに好中球の遊走に関与する interleukin-8 (IL-8) を分泌、その結果腸管粘膜組織に好中球が浸潤・集積し腸管上皮に細胞傷害をもたらすことによって、腸炎症状が進展することが知られている^{3,4)}。食物繊維には不溶性食物繊維 (IDF) と水溶性食物繊維 (SDF) があるが、SDF やある種のオリゴ糖は短鎖脂肪酸を生成する前駆体となり、便性の改善や便回数の減少する他、腸内細菌叢や腸管免疫系にも影響する。一方、IDF は病態の活動期などの重度な炎症の場合はその摂取が制限されるが、大腸粘膜を増加し、粘膜表皮バリアを強化

する働きが知られている。

光合成をする微生物や高等植物の葉緑体チラコイド膜には、特有の糖脂質が含まれており、特にハウレン草由来のチラコイド糖脂質には、DNA 合成酵素阻害による抗がん作用や消化管粘膜の増加による腸バリア機能の増強作用が報告されている⁵⁻⁹⁾。

本研究に用いた大麦若葉末は、イネ科オオムギ属に属するオオムギ (*Hordeum vulgare* L.) の若葉部を乾燥、粉碎したものであり、SDF の β -グルカンや IDF のヘミセルロースなどの食物繊維を豊富に含んでいる。また、大麦若葉末には脂質 (脂質・糖脂質) が約20%含有しており、炎症性腸疾患の治療・予防に効果が期待される。神谷らは、大麦若葉末の摂取が便通改善作用や腸内環境を改善する作用を確認してきた¹⁰⁾。また、片山らは、大麦若葉末投与が実験的大腸疾患モデル (大腸ガン、過敏性大腸炎など) を抑制することを確認した^{11,12)}。その中で、我々は、大麦若葉末投与が炎症性腸疾患モデルマウスの症状を強く抑制することを発見した¹³⁾。その作用は食物繊維 (セルロース) 共存下でのみみられ、さらに炎症メディエーターの抑制と抗炎症性サイトカイン (IL-10) 誘導に関与することを確認した¹³⁾。

本研究では、大麦若葉末由来糖脂質に注目し、ヒ

*1 川崎医療福祉大学 医療技術学部 臨床栄養学科

*2 川崎医療福祉大学 大学院 医療技術学研究科 臨床栄養学専攻
(連絡先) 奥和之 〒701-0193 倉敷市松島288 川崎医療福祉大学

E-mail : okukaz1803@mw.kawasaki-m.ac.jp

ト腸管上皮様細胞 (Caco-II) を用いた腸管炎症モデルによる大麦若葉末の炎症抑制効果について検討を行った。

2. 方法

2.1 試料

大麦若葉末は、市販のものを東洋新薬(株)より購入した。大麦若葉末の糖脂質の調製は高橋らの方法¹⁴⁾に準じた(図1)。大麦若葉末50gを60℃の温水抽出し、その残渣からエタノールにて粗脂質画分を抽出した。これを70%エタノールに溶解したものを強カチオン交換樹脂ダイヤイオン HP-20 (三菱ケミカル(株)製)を用いたカラムクロマトグラフィーに供した。カラムに吸着した糖脂質画分を95%エタノールにて溶出し、溶出液を乾固させて調製した(2.1g)。対照として、Monogactosyldiacylglycerol (MGDG, フナコシ(株)製)を使用した。大麦若葉末は10%濃度になるようPBS (-)に懸濁したのちオートクレーブ滅菌して用いた。糖脂質は少量のエタノールに溶解後、PBSで希釈した。

2.2 培養細胞を用いた腸管炎症モデルによる大麦若葉末の炎症抑制効果の検討

ヒト腸管上皮様細胞 (Caco-II) を用いて、TNF- α を炎症メディエーターとした炎症モデルによる大麦若葉末および糖脂質の抑制作用を検討した¹⁴⁾。Caco-IIは12well-transwellに培養されたPOCA[®]小腸吸収 (CACO-2, DSファーマバイオメディカル製)を使用した。培養には、10%牛胎児血清、2mM L-グルタミン、ペニシリン (100 U/mL) およびストレプトマイシン (100 μ g/mL)、非必須

アミノ酸溶液を含むダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) を用い、transwell内に2mL添加した。試料の添加はTNF- α 処理の前培養とし、大麦若葉末懸濁液は10mg/mL、糖脂質は10 μ g/mLになるようtranswellの内側(刷子縁膜側)に添加後、CO₂インキュベーターで37℃、2日間培養した。TNF- α による細胞炎症誘導は、Caco-IIが培養されたtranswellの培地を交換したのち、内側(刷子縁膜側)にTNF- α 10ng/mLになるよう添加し、37℃、3日間培養した。細胞障害性の評価は、細胞膜の損傷により、transwellの外側(基底膜側)に放出された乳酸脱水素酵素 (LDH) をLDH-細胞毒性テストワコー(和光純薬(株)製)にて測定した。また、外側(基底膜側)に分泌されたサイトカイン (IL-6, IL-8およびIL-10) をELISA法により測定した。

2.3 統計処理

本研究では、各実験群をn=10で行った。結果は平均値 \pm SD(標準偏差)で示した。各データは、統計処理ソフトSPSS (Ver. 22)を用いて、一元配置分散分析 (ANOVA) 後、Tukey-Kramer法を用いて平均値を比較した。いずれの統計結果も危険率が5%未満 (p<0.05) を有意とみなした。

3. 結果

3.1 TNF- α による細胞障害性に及ぼす大麦若葉末の影響

Caco-IIの基底膜側に放出されたLDH活性を表1に示した。試料のみの添加 (TNF- α 未処理) では、外側(基底膜側)のLDH活性の増加はほとんど見られなかった(データは示していない)。TNF-

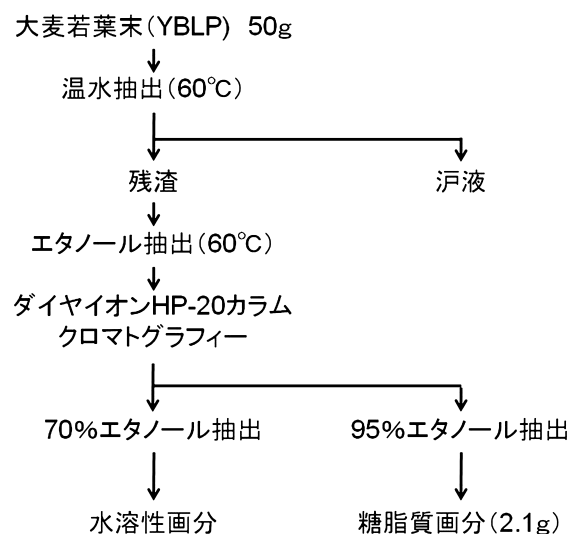


図1 大麦若葉末由来糖脂質の調製方法

表1 TNF- α 添加による細胞障害性 (LDH活性)

	LDH活性 (u/mL)
コントロール	59.6 \pm 8.60
YBLP 10 mg/mL	45.6 \pm 8.56 ^a
YBLP糖脂質	
0.5 μ g/mL	21.1 \pm 6.74 ^b
1.0 μ g/mL	14.1 \pm 3.25 ^b
2.0 μ g/mL	7.94 \pm 2.35 ^b
5.0 μ g/mL	4.72 \pm 1.79 ^b
10 μ g/mL	2.69 \pm 1.11 ^b
MGDG 10 μ g/mL	2.35 \pm 1.31 ^b

LDH活性1 μ : 1分間に1 μ molのNADHを消費する酵素量

^a: コントロールに対して p<0.05で有意差あり

^b: コントロールに対して p<0.01で有意差あり

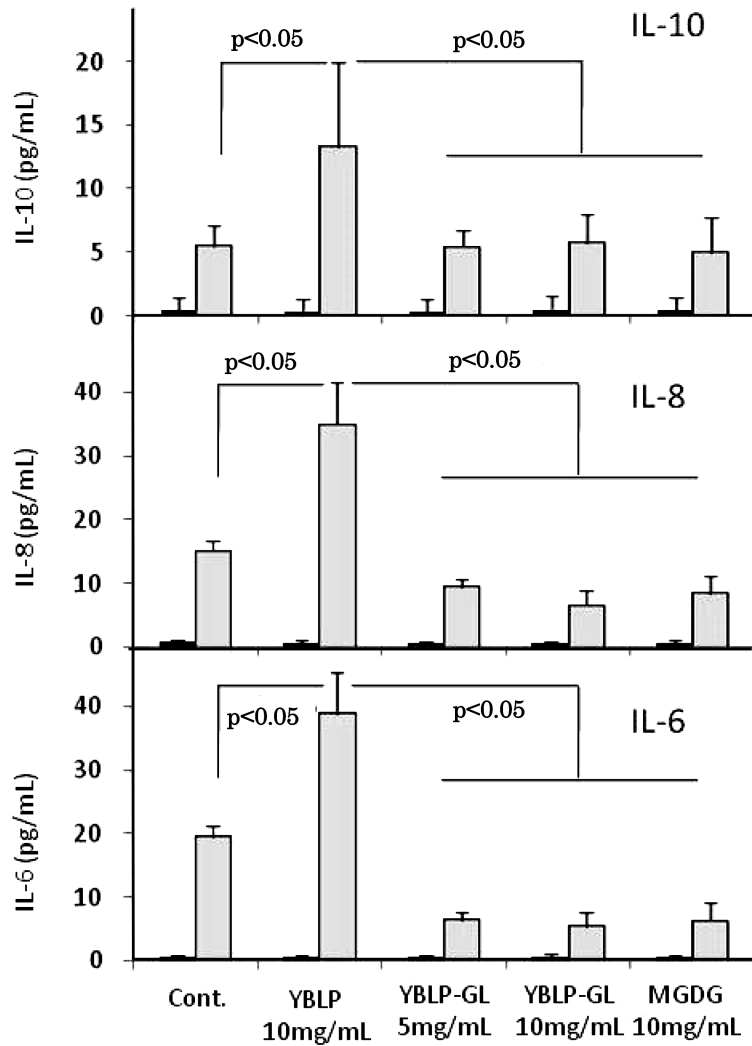


図2 基底膜側に放出されたサイトカイン濃度

YBLP：大麦若葉末懸濁液添加

YBLP-GL：大麦若葉末由来糖脂質

MGDG: モノガラクトシルジアシルグリセロール（糖脂質標準品）

■ 無処理

■ LPS 処理

a 処理後では、細胞障害による外側（基底膜側）の LDH 活性は増大したが、大麦若葉末の添加により低下し、大麦若葉末由来糖脂質および MGDG で顕著であった。また、大麦若葉末由来糖脂質の添加濃度を変えた場合から算出した LDH 活性を半減する濃度 (I_{50}) を求めたところ、 $0.23 \mu\text{g}/\text{mL}$ となった。

3.2 サイトカイン分泌に及ぼす大麦若葉末の影響

Caco- II 細胞に試料を添加して前培養したとき、および大腸菌由来リポ多糖 (LPS) $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ を内側（刷子縁膜側）添加し3日間培養して惹起した場合の外側（基底膜側）に放出されたサイトカイン量

を図2に示した。試料のみの添加 (TNF- α 無処理) では、外側（基底膜側）のサイトカイン量の変化はほとんど見られなかった。一方、LPS 添加により IL-6, IL-8 の炎症性サイトカインは、大麦若葉末懸濁液投与群で顕著に増加した (いずれも $p < 0.05$) が、糖脂質の添加ではサイトカインの増加はわずかであり、大麦若葉末懸濁液投与群に比べ有意に低い値であった ($p < 0.05$)。

TNF- α を添加して炎症を起こさせた場合の外側（基底膜側）に放出されたサイトカイン量を図3に示した。コントロール（試料無処理）では、炎症性

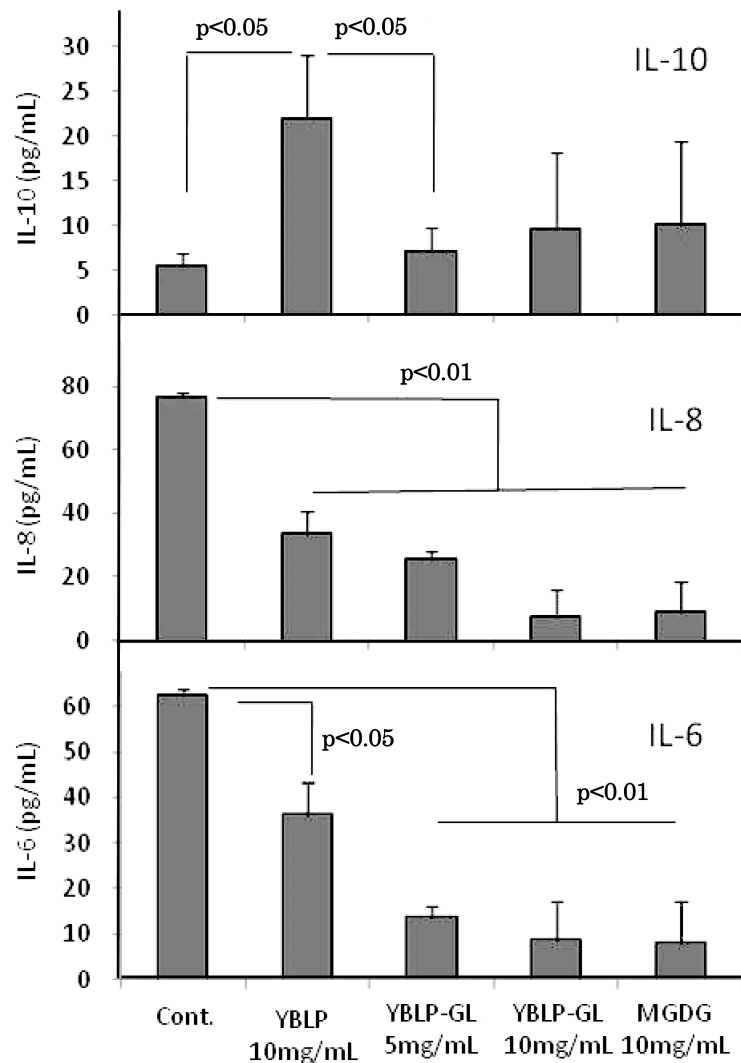


図3 炎症メディエーター処理後の基底膜側に放出されたサイトカイン濃度
 YBLP：大麦若葉末懸濁液添加
 YBLP-GL：大麦若葉末由来糖脂質
 MGDG: モノガラクトシルジアシルグリセロール（糖脂質標準品）

サイトカインのIL-6やIL-8が顕著に増加したが抗炎症性サイトカインのIL-10はわずかに増加するのみであった。一方、大麦若葉末懸濁液添加では、いずれのサイトカインも増加したが、炎症性サイトカインのIL-6 ($p<0.05$)とIL-8 ($p<0.01$)はコントロールに比べ有意に低く、IL-10は有意に増加した ($p<0.05$)。大麦若葉由来糖脂質やMGDGを添加した群では、コントロールに比べ、炎症性サイトカインの増加はわずかであった ($p<0.01$)。

4. 考察

食品因子による生体の恒常性維持や免疫生体防御を有益な方向に統制する方法やこれに基づく応用技

術を開発することは、免疫応答の異常が引き金となっている炎症性腸疾患 (IBD) の治療および予防につながる¹³⁾。奥らは、大麦若葉末投与がデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘発マウス潰瘍性大腸炎の発症を強く抑制することを確認した¹³⁾。DSS投与マウスの血清中のサイトカインプロファイルを調べたところ、炎症メディエーターのTNF- α 生成を抑制し免疫寛容を惹起すること、抗炎症性サイトカイン (IL-10) 誘導に関与することを確認した¹³⁾。本研究では、IBDを模倣した培養系モデル¹⁴⁾を用いて、大麦若葉末のIBD抑制作用とその関与成分について検討した。ヒト腸管上皮様細胞 (Caco-II) を用いて、TNF- α を炎症メディエーターとして添

加することで、内膜側に炎症を起こさせた状態を作成し、IBD患者に見られるTNF- α 産生、腸管上皮単層膜の崩壊、白血球遊走因子のケモカインであるIL-8産生を促した状態を作ることができる。また、小腸上皮細胞粘膜の損傷によって内膜側に放出された乳酸脱水素酵素 (LDH) を測定することにより、細胞障害性を評価できる。TNF- α 処理後の細胞障害による外側 (基底膜側) のLDH活性は増大したが、大麦若葉末の添加により低下し、特に大麦若葉末由来糖脂質およびMGDGでの低下は顕著であった。また、大麦若葉末由来糖脂質の添加濃度を変えて作用させた場合、LDH活性は添加量に応じて減少し、 I_{50} は0.23 μ g/mLとなった。これらの結果から、大麦若葉末由来の糖脂質が、IBDの発症抑制に強く関与していることがわかった。

大麦若葉末には、ヘミセルロースやリグニンなどのIDFや β -1,3グルカンなどのSDFが多く含まれている。これらは腸内細菌の発酵基質となるとともに、腸内環境の改善や腸管免疫系にも大きく影響する。そこでCaco-II細胞培養系に大麦若葉末や糖脂質を添加・培養後、LPS処理を行い、放出されたサイトカインを調べたところ、大麦若葉末懸濁液添加群では、炎症性サイトカイン (IL-6, IL-8) が有意に増加し感染免疫における増強作用が認められた。一方、糖脂質 (大麦若葉末由来糖脂質, MGDG)

添加の作用は弱かった。次にTNF- α を添加して炎症を起こさせた場合の外側 (基底膜側) に放出されたサイトカイン量では、コントロール (試料無処理) では炎症性サイトカインのIL-6やIL-8が顕著に増加したが、大麦若葉末懸濁液添加では、IL-6 ($p < 0.05$), IL-8 ($p < 0.01$) の炎症性サイトカインはコントロールに比べ有意に低く、抗炎症性サイトカインIL-10は有意に増加した ($p < 0.05$)。大麦若葉由来糖脂質やMGDGを添加した群では炎症性サイトカイン量の変化は、大麦若葉末懸濁液添加に比べてわずかであり、コントロールに比べ有意に低い値であった ($p < 0.01$)。これは、LPS添加後のサイトカイン量の変化とも一致する結果である。すなわち、大麦若葉末中の β -グルカンが腸管における免疫寛容に働いていると考えられた。一方、ハウレン草由来糖脂質 (MGDG など) には小腸上皮細胞の粘膜バリアを増強させる作用が報告されている¹⁴⁾。大麦若葉末由来糖脂質のIBD抑制作用は、腸管上皮細胞の粘膜を介した腸管バリア機能への関与によると考えられた。IBD抑制作用を示す大麦若葉末由来の糖脂質の構造解析と単離成分での作用解析および腸管バリア機能への影響について検討する必要がある。

以上の結果から、大麦若葉末の摂取は炎症性腸疾患の発症・病状進行を抑制することが示唆された。

謝 辞

本研究は平成27年度川崎医療福祉大学医療福祉研究費の助成により行われたものである。

利益相反 (COI)

なお、本研究は開示すべき利益相反 (COI) 関係にある企業等はない。

文 献

- 1) Shanahan F : Inflammatory bowel disease: Immunodiagnosics, immunotherapeutics, and ecotherapeutics. *Gastroenterology*, **120**, 622-635, 2001.
- 2) Baggiolini M, Loetscher P and Moser B : Interleukin-8 and the chemokine family. *International Journal of Immunopharmacology*, **17**, 103-108, 1995.
- 3) Satsuma H, Matsuda T, Toshimitsu T, Mori A, Mae T, Tsukagawa M, Kitahara M and Shimizu M : Regulation of interleukin-8 secretion in human intestinal epithelial Caco-2 cells by α -humulene. *Biofactors*, **21**, 137-139, 2004.
- 4) 清水誠 : 消化管由来培養細胞を用いた食品成分の腸管吸収性評価。日本栄養・食糧学会誌, **56**(4), 251-255, 2003.
- 5) 水品善之 : 食品成分・栄養素の新規な生理活性探索に関する研究。日本栄養・食糧学会誌, **64**(6), 377-384, 2011.
- 6) Mizushima Y, Kamisuki S, Mizuno T, Takemura M, Asahara H, Linn S, Yamaguchi S, Matsukage A, Hanaoka F, Yoshida S, Saneyoshi M, Sugawara F and Sakaguchi K : Dehydroaltenusin, a mammalian DNA polymerase inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*. **275**, 33957-33961, 2000.
- 7) Kamisuki S, Murakami C, Ohta K, Yoshida H, Sugawara F, Sakaguchi K and Mizushima Y : Actions of derivatives of dehydroaltenusin, a new mammalian DNA polymerase specific inhibitor. *Biochemical Pharmacology*, **63**, 421-427, 2002.
- 8) Murakami-Nakai C, Maeda N, Yonezawa Y, Kuriyama I, Kamisuki S, Takahashi S, Sugawara F, Yoshida

- H, Sakaguchi K and Mizushina Y : The effects of dehydroaltenusin, a novel mammalian DNA polymerase inhibitor, on cell proliferation and cell cycle progression. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1674**, 193-199, 2004.
- 9) Takahashi S, Kamisuki S, Mizushina Y, Sakaguchi K, Sugawara F and Nakata T : Total synthesis of dehydroaltenusin. *Tetrahedron Letters*, **44**, 1875-1877, 2003.
- 10) 神谷智康, 高野晃, 草場宜廷, 高島慎一郎, 八尋衣里奈, 池口主弥, 高垣欣也, 杉村春日, 片山(須川)洋子 : 大麦若葉末含有粉末飲料の食後血糖値上昇抑制効果. *応用薬理*, **85**(1), 1-6, 2013.
- 11) Sugawa-Katayama Y, Oku K, Shimada R, Yamaguchi Y, Murakami K, Kamiya T, Ikeguchi M and Katayama M : Suppressive effect of dietary young barley leaf powder on colonic aberrant crypt foci induced by 1,2-dimethylhydrazine in mice. *Journal of Japan Association of Dietary Fiber Research*, **21**, 9-18, 2017.
- 12) Shimada R, Oku K, Katayama M, Takano A and Sugawa-Katayama Y : Effects of young barley leaf powder on irritable bowel syndrome in rats. *Trace Nutrients Research*, **33**, 106-111, 2016.
- 13) 奥和之, 松村祐貴乃, 宮岡美月, 小高玲奈, 神谷智康, 高野晃, 池口主弥, 高垣欣也, 海老原清, 片山洋子 : 実験的マウス潰瘍性大腸炎に及ぼす大麦若葉末投与の影響. 第68回日本栄養・食糧学会大会講演要旨集, **175**, 2014.
- 14) 高橋正和 : 食由来機能分子としてのグリセロ糖脂質の利用性—腸管組織への作用と腸管吸収性から見た利用性—. *化学と生物*, **52**(10), 641-642, 2014.

(平成30年1月17日受理)

Study on the Preventive Effects of Young Barley Leaf Powder Ingredients on Inflammatory Bowel Disease Using Intestinal Cell Culture Model

Kazuyuki OKU, Yasuko KAWASAKI, Kiyoshi MIURA
and Shin YAMAOKA

(Accepted Jan. 17, 2018)

Key words : young barley leaf powder, glycolipid, inflammatory bowel disease, intestinal cell culture model, inflammatory cytokines

Abstract

Inflammatory bowel disease (IBD) has been understood to be caused by dysregulation of inflammatory cytokines. Young barley leaf powder (YBLP) is rich in dietary fibers and there are many papers on effects of YBLP on the gastrointestinal functions. In the present study, the authors intended to investigate effect of YBLP components on IBD. We especially focused on inflammatory cytokines (IL-6, IL-8) and the effect of YBLP components on the secretion of inflammatory cytokines in intestinal epithelial cells was examined in this study. Among YBLP components, glycolipid and beta-glucan suppressed TNF- α -induced cell-cytotoxicity and inflammatory cytokines secretion in human intestinal epithelial-like Caco-2 cells. The increased expression level of inflammatory cytokines IL-8 by TNF- α was almost completely suppressed by YBLP. Further, the transcriptional activity of human IL-8 promoter was increased by TNF- α treatment, and glycolipids of YBLP suppressed its induction in a dose-dependent manner. These results show that young barley leaf powder suppressed TNF- α -induced IL-8 production at the transcriptional level, suggesting that young barley leaf powder is a promising glycolipids component for preventing IBD.

Correspondence to : Kazuyuki OKU

Department of Clinical Nutrition
Faculty of Health Science and Technology
Kawasaki University of Medical Welfare
Kurashiki, 701-0193, Japan
E-mail : okukaz1803@mw.kawasaki-m.ac.jp
(Kawasaki Medical Welfare Journal Vol.27, No.2, 2018 385 – 391)

