

定量的PCR法による腸内細菌叢の解析法の確立とマウスを用いたMACs (Microbiota-accessible carbohydrates) の評価

Establishment of microbiota analytical methods by quantitative PCR method and evaluation of
Microbiota-accessible carbohydrates in mice.

青江 誠一郎^{1,2}

¹大妻女子大学人間生活文化研究所, ²大妻女子大学家政学部

Seiichiro Aoe^{1,2}

¹Institute of Human Culture Studies, Otsuma Women's University

12 Sanban-cho, Chiyoda-ku, Tokyo, Japan 102-8357

²Faculty of Home economics, Otsuma Women's University

12 Sanban-cho, Chiyoda-ku, Tokyo, Japan 102-8357

キーワード：腸内細菌叢, 定量的PCR, 大麦

Key words : Microbiota, Quantitative-PCR, Barley

抄録

腸内細菌解析のための標準菌株の入手と検量線の作成を実施した。その結果, *Bacteroides fragilis* group, *Prevotella*属, *Eubacterium*属, *Clostridium coccooides* group, *Clostridium leptum* subgroup, *Lactobacillus*属, *Bifidobacterium*属, *Atopobium cluster*属の検量線を作成することができた。

品種・βグルカン量が異なるもち種の大麦3種を高脂肪食飼料に配合してマウスに給餌し, 盲腸内の腸内細菌叢ならびに短鎖脂肪酸量を測定した。その結果, ビフィズス菌, 乳酸菌数を増加させる整腸作用は, 3種のもち麦に共通であった。短鎖脂肪酸, 特にプロピオン酸の産生量が多いもち麦が選出された。2種のもち麦は, 炎症性細菌である*Clostridium coccooides* groupを減少させた。本結果は, 脂質代謝, 糖代謝のメカニズムの一端を担っている可能性が示唆された。

1. はじめに

腸内細菌叢(腸内フローラ)は, 消化管内に生息する細菌群を指し, ヒトの糞便 1g 当たり 10^{11} 個, 消化管全体では 100 兆 (10^{14}) 個の菌が生息している。腸内細菌は宿主にとって有益にも有害にも作用することはよく知られており, 有益な機能として病原菌の排除, 免疫賦活作用, 短鎖脂肪酸の産生などの影響が挙げられる。後者としては腸内菌の代謝による毒性物質(リポポリサッカライドなど), 発ガン物質の生成(2次胆汁酸など)などが挙げられる。近年, 多くの疾患モデル動物が遺伝子組換え技術により作成されている。炎症性腸疾患, 食物アレルギー, メタボリックシンドロームなどの病態モデル動物は, 無菌化すると発病が見られなくなり, 一方, 無菌動物に特定の腸内細菌を移植することで疾病が発症することが報告さ

れている。これは腸内細菌の存在が病気の発症に関与していることを示している^[1,2]。

腸内細菌叢の解析方法も, 従来の培養法から 16SrRNA の塩基配列を用いた分子生物学的方法が開発され, 腸内細菌叢の機能研究が多く研究者によって行われるようになった^[3]。1990年代は FISH 法, DGGE 法, TGGE 法, T-RFLP 法などの分子生物学的手法が開発され, さらにメタゲノム解析法など高速シーケンサー(次世代シーケンサー)の登場が近年の腸内細菌叢研究ブームを後押しした。

従来の培養法では, 多くの労力と時間が必要である上, 嫌気性菌を培養するためには特殊な機器ならびに熟練した手技が必要であった。腸内細菌にも rRNA が存在し, rRNA の塩基配列が細菌の系統解析に用いられた。細菌の 16S rRNA 遺伝子

の塩基配列のデータベースが構築され、それを利用した分子生物学的手法が細菌の分類・同定に有効であることが証明され、培養せずに rRNA の検出により腸内細菌叢を解析する方法が取り入れられた。分子生物学的手法を用いた微生物叢の解析手法は、培養法に比べて簡便であり、熟練の技術を必要とせず、難培養微生物を含めて解析できるため、腸内細菌叢の解析にもこの手法が取り入れられていった。腸内細菌叢の分子生物学的解析に用いられる菌群または菌種特異的プライマーが利用されている。分子生物学的手法により、ヒト腸内細菌叢では、*Clostridium coccooides* group, *Clostridium leptum* subgroup, *Bacteroides fragilis* group, *Bifidobacterium*, *Atopobium cluster* といった菌群が最優勢に検出されると報告されており、多くの研究分野で腸内細菌叢の解析にこれら分子生物学的方法が用いられている^[4]。

本研究は、これまで有効性を検証してきた食物繊維について、新たな概念である MACs

(Microbiota-accessible carbohydrates) の観点から評価を行う^[5]。定量的 PCR 法による腸内細菌叢の解析法を導入して、マウスの腸内細菌叢を解析し、腸内細菌叢を変化させる難消化性成分を検討することを目的に本年度は、大麦 β -グルカンに着目して実施した。

2. 実験方法

2.1 実験試料

3 種のもち麦は、株式会社 はくばくより提供を受けた。平均総食物繊維含量はそれぞれ 11.1, 11.4, 11.6%, β -グルカン量はそれぞれ 6.8, 5.9, 5.7% であった。総食物繊維量は、AOAC Method 911.43 (Prokxy 法) に準じて測定した。総脂質量は、日本食品分析センターに依頼して酸分解法にて測定した。飼料中の β -グルカン量は、もち麦品種 1 群で 3.1% と最も多く、ついでもち麦品種 2 群で 2.6%, もち麦品種 3 で 2.5% であった。

2.2 動物実験

動物実験の飼料組成を表 1 に示した。試験群は、対照, もち麦品種 1, もち麦品種 2, もち麦品種 3 群とした。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。各大麦は総食物繊維量が 5% になるように配合した。各群のたんぱく質, 脂質量が

等しくなるようにカゼイン, 大豆油で調整した。

4 週齢の雄 C57BL/6J マウス (日本チャールス・リバー株式会社) を用いた。固形飼料 (NMF, オリエンタル酵母工業株式会社) で 1 週間の予備飼育後、体重が均一になるように 1 群 8 匹ずつに群分けした。マウスには表 1 に示した実験飼料と水を 15 週間自由摂取させ、体重と飼料摂取量を 2 日おきに測定した。なお、飼育環境は、室温 $22 \pm 1^\circ\text{C}$, 湿度 $50 \pm 5\%$ 。12 時間の明暗サイクル (9:00~21:00) とした。マウスは、実験最終日に、飼料摂取量, 体重を測定後、8 時間絶食させ、インフルラン・炭酸ガスで安楽死後、開腹し、心臓より血液を採取した。肝臓, 後腹壁脂肪, 腸間膜脂肪, 副睾丸周辺脂肪組織, 盲腸を摘出し、重量を測定した。その後、肝臓は凍結乾燥, 粉碎し、分析用の試料とした。

表 1. 飼料組成

	g/kg diet			
	対照	もち麦品種1	もち麦品種2	もち麦品種3
アルファ化コーンスターチ	329.5	-	-	-
ミルクカゼイン	200.0	163.5	171.7	147.9
ショ糖	100.0	51.9	84.9	35.6
大豆油	70.0	70.0	70.0	70.0
ラード	200.0	192.5	191.8	190.9
セルロースパウダー	50.0	-	-	-
もち麦品種1	-	471.7	-	-
もち麦品種2	-	-	431.0	-
もち麦品種3	-	-	-	505.1
AIN-93Gミネラルミックス	35.0	35.0	35.0	35.0
AIN-93ビタミンミックス	10.0	10.0	10.0	10.0
L-システチン	3.0	3.0	3.0	3.0
重酒石酸コリン	2.5	2.5	2.5	2.5
ヒプチルヒドロキノン	0.014	0.014	0.014	0.014

2.3 血清脂質, インスリン濃度の分析

採取した血液は、血清を分離し、トリグリセリド, 遊離脂肪酸, 総コレステロール濃度を酵素法にて分析した。トリグリセリドの定量に「トリグリセリド E-テストワコー」, 遊離脂肪酸の定量に「NEFAC-テストワコー」, 総コレステロール濃度の定量に「コレステロール E-テストワコー」(いずれも和光純薬工業株式会社) を使用した。血清インスリン濃度は、レビス インスリン-ラット (Hタイプ) (株式会社シバヤギ製) を用い、ELISA 法で分析した。

2.4 肝臓脂質の分析

肝臓を凍結乾燥後、粉碎し、クロロホルム:メタノール (2:1) 溶液を用いた Folch 法により抽出、Folch 水洗液 (クロロホルム:メタノール:水 = 3:48:47) で水洗後、窒素気流下によって溶媒

を除去 (60°C) し, 10% TritonX-100 を含むイソプロパノールを加えて溶解し, トリグリセリド, 総コレステロール濃度を酵素法にて分析した. トリグリセリドの定量には「トリグリセリド E-ワコー」, 総コレステロールの定量には「コレステロール E-ワコー」(いずれも和光純薬工業株式会社) を使用した.

2.5 耐糖能試験

耐糖能試験は, 飼育最終週に朝 8 時より 8 時間の絶食後, 20% グルコース溶液を, 1.5g/kg 体重となるように, 胃ゾンデを用いてマウスの胃内に投与した. 投与前に尾部より採血し(0 分), 投与後 15 分, 30 分, 60 分, 120 分後に同様に採血を行った. 血糖値の定量には「小型血糖測定器 グルテストエース R」(株式会社三和科学研究所) を使用した. 時間と血糖値の曲線から IAUC (血糖上昇濃度-時間曲線下面積) を算出した.

2.6 盲腸内有機酸の分析

盲腸内要物の誘導体化は, 盲腸内容物を 10mg 測りとり, 100 μ M クロトン酸および濃塩酸, ジエチルエーテル加え TissueLyzerII (Quiagen 社) を用いてホモジナイズして有機酸を抽出した. 遠心分離 (3000rpm, 10min) 後, 上層 (エーテル層) を採取し, オキシム化, 誘導体化した. オキシム化, 誘導体化条件は以下の通り.

オキシム化: メトキシアミン塩酸塩 40 mg/mL 10 μ L 添加, 30°C 90 分間反応

トリメチルシリル化: MSTFA + 1% TMCS を 90 μ L 添加, 37°C 30 分間反応

装置: 7890 GC/5975C MSD with 7693 自動前処理機能付きオートサンプラ (Agilent Technologies 社)

カラム: DB-5ms + Duragurd (10m) 30m, 0.25mm, 0.25 μ m

注入量: 1 μ L

注入法: スプリット, 10:1

注入口温度: 250°C

オープン: 60°C(7min)-10°C/min-325°C(10min)

カラム流量: 1.1 ml/min (定流量モード)

インターフェース温度: 290°C

イオン源温度: 250°C

測定モード: スキャン測定, 質量範囲,

m/z 50-600

以下の標準物質を用いて, 10 種類の有機酸を同

定し, 内部標準物質との比から濃度を算出した. 標準物質は, ギ酸, 酢酸, プロピオン酸, イソ酪酸, 酪酸, イソ吉草酸, 吉草酸, 乳酸, コハク酸を用いた (いずれも和光純薬 (株) 製).

2.7 盲腸内細菌叢の分析^[3]

盲腸内容物から, 「QIAamp DNA Stool kit」

(QIAGEN 社) を用いてプロトコールに従い, DNA を抽出した. DNA 量を吸光度で測定し, 260nm での吸光度が 0.1-1.0 であることを確認した.

腸内細菌数は, Applies Biosystems 7300 Real-Time PCR System を用いた SYBER Green 法で測定した. DNA 溶液 (2 μ l) に *Bacteroides* 属, *Lactobacillus* 属, *Bifidobacterium* 属, *Eubacterium* 属, *Prevotella* 属, *Atopobium cluster*, *Clostridium coccoides* グループ及び *Clostridium leptum* サブグループのそれぞれのプライマーを添加した SYBER Green 溶液 (10.5 μ l) を加えて増幅させた. 求められた Ct 値から, 検量線を用いてそれぞれの菌数を算出した. なお, 検量線は標準菌株から抽出した DNA 溶液を段階希釈して測定した Ct 値を用いて作成した.

2.8 統計解析

全ての統計処理は統計ソフト (JMP12 Pro) を用いて, 一元配置の分散分析を行い, 平均値の差の検定は Dunnett または Tukey-Kramer (短鎖脂肪酸, 腸内細菌叢) の多重比較法を用いて対照群との差を検出した. 測定結果は平均値 \pm 標準偏差で示し, 有意水準は 5% とした.

3. 実験結果

3.1 マウスの成長結果

各飼料を与えたマウスの成長結果を表 2 に示す. 終体重, 体重増加量, 飼料摂取量, 飼料効率はいずれも有意差は見られなかった. 成長はほぼ同等と考えられる.

表 2. 成長結果

	対照	もち麦品種1	もち麦品種2	もち麦品種3
初体重(g)	20.1 \pm 0.8	20.1 \pm 0.8	20.1 \pm 0.9	20.1 \pm 0.9
終体重(g)	41.3 \pm 4.1	41.4 \pm 3.6	43.6 \pm 2.4	41.8 \pm 3.0
体重増加量 (g/d)	0.20 \pm 0.03	0.20 \pm 0.03	0.22 \pm 0.02	0.20 \pm 0.02
飼料摂取量 (g/d)	2.9 \pm 0.1	2.8 \pm 0.3	2.9 \pm 0.1	2.8 \pm 0.2
飼料効率 (%)	6.78 \pm 1.04	7.04 \pm 0.78	7.51 \pm 0.50	7.16 \pm 0.42

数値は平均 \pm 標準偏差を示す。

3.2 マウスの臓器重量

マウスの臓器重量を表3に示す。肝臓重量は各群間に差は見られなかったが、盲腸(内容物を含む)重量で対照群に比べ、もち麦品種1、もち麦品種3群で有意に多かった。腹腔内脂肪重量はいずれの組織で有意差は見られなかった。

表3. 臓器重量

	対照	もち麦品種1	もち麦品種2	もち麦品種3
肝臓重量(g)	1.59 ± 0.48	1.39 ± 0.25	1.54 ± 0.33	1.47 ± 0.31
盲腸重量(内容物含む)(g)	0.22 ± 0.03	0.28 ± 0.04*	0.26 ± 0.04	0.30 ± 0.04*
後壁腹脂肪重量(g)	0.93 ± 0.21	1.02 ± 0.19	1.08 ± 0.12	1.00 ± 0.10
副睾丸周辺脂肪重量(g)	2.11 ± 0.39	2.34 ± 0.25	2.38 ± 0.42	2.32 ± 0.46
腸間膜脂肪重量(g)	0.95 ± 0.50	1.07 ± 0.39	1.20 ± 0.26	1.12 ± 0.34

数値は平均±標準偏差を示す。
*対照群と比べて有意差あり(p<0.05)

3.3 脂質代謝解析

(1) 血清生化学

血清中の各脂質濃度を表4に示す。血清総コレステロールおよび遊離脂肪酸濃度は、対照群に比べてもち麦品種1群で有意に低かった。血清トリグリセリド濃度は各群の間に有意差は見られなかった。血清インスリン濃度は、対照群で低下し、もち麦品種2群との間に有意差が検出された。

表4. 血清脂質およびインスリン濃度

	対照	もち麦品種1	もち麦品種2	もち麦品種3
総コレステロール(mg/dl)	175.0 ± 39.9	137 ± 20.8*	164 ± 22.5	170 ± 25.1
トリグリセリド(mg/dl)	95.4 ± 10.3	113 ± 14.4	112 ± 18.2	120 ± 23.5
NEFA(mEq/L)	0.72 ± 0.09	0.59 ± 0.11*	0.65 ± 0.11	0.61 ± 0.07
インスリン(ng/ml)	0.63 ± 0.21	1.12 ± 0.75	1.48 ± 0.91*	1.38 ± 0.58

数値は平均±標準偏差を示す。
*対照群と比べて有意差あり(p<0.05)

(2) 肝臓脂質

肝臓中の各脂質濃度を表5に示す。肝臓トリグリセリドおよびコレステロール量は各群の間に有意差は見られなかった。

表5. 肝臓脂質

	対照	もち麦品種1	もち麦品種2	もち麦品種3
トリグリセリド(mg/肝臓)	161.8 ± 90.4	99.5 ± 58.7	138.9 ± 89.7	131.6 ± 94.6
トリグリセリド(mg/g肝臓)	96.3 ± 31.4	67.4 ± 29.0	84.1 ± 35.0	82.0 ± 41.9
コレステロール(mg/肝臓)	10.4 ± 3.5	10.2 ± 2.6	11.2 ± 4.9	9.5 ± 4.3
コレステロール(mg/g肝臓)	7.2 ± 1.6	7.3 ± 0.6	7.0 ± 1.5	6.2 ± 1.4

数値は平均±標準偏差を示す。

3.4 耐糖能試験

耐糖能試験の結果を表6に示す。15分後の血糖値は、対照群に比べ、もち麦品種1群が有意に低かった。60分後の血糖上昇値は対照群に比べても

ち麦全群が有意に低かった。IAUCは対照群に比べ、もち麦品種1およびもち麦品種2群が有意に低かった。

表6. 耐糖能試験

	対照	もち麦品種1	もち麦品種2	もち麦品種3
0分(mg/dl)	186 ± 34.5	187 ± 30.7	177 ± 15.2	176 ± 14.7
Δ15分	192 ± 38.7	127 ± 44.3*	172 ± 32.4	167 ± 32.3
Δ30分	110 ± 73.3	61.0 ± 50.5	43.5 ± 36.5 ^(*)	118 ± 62.3
Δ60分	83.8 ± 70.9	22.8 ± 22.6*	24.1 ± 24.3*	31.3 ± 28.9*
Δ120分	4.8 ± 10.1	0.0 ± 0.0	9.3 ± 17.5	7.1 ± 15.5
IAUC(Σmg/dl*min)	9252 ± 5197	4294 ± 2486*	4927 ± 1438*	6789 ± 3146

数値は平均±標準偏差を示す。

*対照群と比べて有意差あり(p<0.05), (**)p=0.07

3.5 盲腸内有機酸の分析

盲腸内有機酸濃度を表7に示す。腸内発酵産物である総短鎖脂肪酸濃度は、もち麦品種1群が、対照群に比べて有意に高く、次いでもち麦品種2群、もち麦品種3の順であった(有意差なし)。中でも、短鎖脂肪酸ではプロピオン酸濃度が高く、有機酸では乳酸濃度が高かった。酪酸濃度にも有意差が検出されたが、産生量が少なかった。

表7. 盲腸内有機酸濃度

	対照	もち麦品種1	もち麦品種2	もち麦品種3
酢酸(μmol/g cecum)	8.03 ± 0.48	11.1 ± 4.00	9.50 ± 1.76	7.77 ± 2.73
プロピオン酸(μmol/g cecum)	2.55 ± 3.19 ^c	10.9 ± 4.91 ^a	7.57 ± 0.91 ^{ab}	6.52 ± 2.36 ^{bc}
イン酪酸(μmol/g cecum)	1.04 ± 0.30	1.11 ± 1.2	1.09 ± 0.45	1.10 ± 0.30
酪酸(μmol/g cecum)	0.50 ± 0.11 ^a	0.41 ± 0.09 ^{ab}	0.18 ± 0.12 ^c	0.29 ± 0.10 ^{bc}
吉草酸(μmol/g cecum)	1.11 ± 0.42	1.23 ± 0.72	0.80 ± 0.20	0.56 ± 0.21
乳酸(μmol/g cecum)	0.82 ± 0.24 ^b	2.20 ± 1.23 ^a	1.49 ± 0.24 ^{ab}	0.76 ± 0.36 ^b
総短鎖脂肪酸(μmol/g cecum)	13.2 ± 2.51 ^b	24.7 ± 10.02 ^a	19.14 ± 2.61 ^{ab}	16.2 ± 5.5 ^b

数値は平均±標準偏差を示す。
異なるアルファベットの付く数値はp<0.05で有意差がある。

3.6 盲腸内細菌叢の分析

盲腸内細菌数を、表8に示す。Bifidobacterium属の菌数が、大麦3群で有意に多かった。Lactobacillus属の菌数も同様の傾向にあり、もち麦品種1群およびもち麦品種3群が、対照群に比べて有意に菌数が多かった。Clostridium coccoidesグループの菌数は、もち麦品種3群が、対照群に比べて有意に菌数が少なかった。

表8. 盲腸内腸内細菌数

	対照	もち麦品種1	もち麦品種2	もち麦品種3
Bifidobacterium属(log ₁₀ CFU/g cecum)	8.0 ± 0.3 ^c	9.1 ± 0.3 ^a	9.0 ± 0.4 ^a	9.6 ± 0.4 ^a
Bacteroides属(log ₁₀ CFU/g cecum)	9.1 ± 0.2	8.7 ± 0.5	9.0 ± 0.6	8.9 ± 0.5
Eubacterium属(log ₁₀ CFU/g cecum)	10.5 ± 0.3	10.7 ± 0.2	10.8 ± 0.3	10.6 ± 0.2
Prevotella属(log ₁₀ CFU/g cecum)	7.8 ± 0.2 ^a	7.8 ± 0.2 ^a	7.7 ± 0.2 ^a	7.4 ± 0.1 ^b
Lactobacillus属(log ₁₀ CFU/g cecum)	8.8 ± 0.2 ^c	9.3 ± 0.3 ^b	9.1 ± 0.3 ^{bc}	9.8 ± 0.4 ^a
Clostridium coccoides group(log ₁₀ CFU/g)	9.7 ± 0.3 ^a	9.5 ± 0.3 ^{ab}	9.0 ± 0.3 ^{bc}	8.4 ± 0.8 ^c
Clostridium leptum subgroup(log ₁₀ CFU/g)	10.7 ± 0.3	10.8 ± 0.3	10.5 ± 0.2	10.5 ± 0.2
Atopobium cluster(log ₁₀ CFU/g cecum)	8.6 ± 1.4	8.6 ± 1.1	8.6 ± 1.1	8.5 ± 1.2

数値は平均±標準偏差を示す。
異なるアルファベットの付く群間で有意差あり(p<0.05)。

4. 考察

もち種の大麦 3 品種を用いて、高脂肪食に配合し、盲腸内の短鎖脂肪酸産生量、腸内細菌叢を調べる実験を行った。

本実験において、終体重、体重増加量、飼料摂取量、飼料効率に有意差はなく、各群間で成長は同様だったと考えられる。マウスの臓器重量では、肝臓重量、腹腔内脂肪重量（後腹壁脂肪、副睾丸周辺脂肪、腸間膜脂肪組織）に各群間で有意差は見られなかった。同様に肝臓脂質（トリグリセリド、コレステロール）蓄積量にも差が見られなかった。本実験は高脂肪食による腸内細菌叢の変動、腸内代謝産物の変化を調べるために抗肥満実験より長期に飼育したため、いずれのマウスも肥満を呈したためと考えられる。しかし、盲腸重量は、もち麦品種 1、もち麦品種 3 群が対照群に比べて有意に重く、難消化性分の蓄積および腸内細菌の増殖の結果と考えられる。

血清脂質値は、対照群に比べてもち麦品種 1 群で血清総コレステロールおよび遊離脂肪酸濃度が有意に低かったことから、もち麦品種 1 には脂質代謝改善作用があると考えられる。今回用いたもち麦の中で飼料中 β -グルカン量が多かったことから、もち麦の品種の差は β -グルカン含量の差の可能性が考えられる。 β -グルカンを同量摂取した場合には同様の効果があると考えられる。

対照群に比べて、もち麦品種 1、もち麦品種 2 群で耐糖能改善作用が見られたことから、長期摂取により肥満が進行したが、耐糖能改善作用は維持されたと考えられる。また、グルコース投与後、60 分後ではもち麦 3 群とも対照群に比べて血糖値が有意に下がったことから、高脂肪食摂取によるインスリン抵抗性がもち麦摂取により改善されたことが示された。もち麦は高脂肪食で誘発されるインスリン分泌増加を抑制し、耐糖能異常を改善する作用があると考えられる。

盲腸内短鎖脂肪酸の結果より、もち麦品種 1 群の総短鎖脂肪酸、プロピオン酸の濃度が対照群と比べて有意に高かったことから、血清コレステロール濃度、遊離脂肪酸濃度、OGTT における血糖値への影響は腸内発酵と関係がある可能性が高く、耐糖能に影響した可能性がある。短鎖脂肪酸は、GLP-1 分泌に影響することから、耐糖能に影響した可能性が考えられる。

腸内細菌数の結果より、すべての大麦には

Bifidobacterium 属の菌数を増やす作用があることが認められた。大麦摂取による整腸作用には、一部 *Bifidobacterium* 属の増加が関与していると考えられる。同様の傾向が *Lactobacillus* 属でも認められた（もち麦品種 2 群では有意差なし）。一方、炎症性の細菌である *Clostridium coccoides* グループの菌数は、もち麦品種 2 群およびもち麦品種 3 群で低下し、特にもち麦品種 3 群で顕著であった。したがって、もち麦品種 2 およびもち麦品種 3 には、*Clostridium coccoides* グループの菌数を抑制して、大腸内の腸内環境を改善することが示された^[6]。盲腸内 LPS 量を測定することによりさらに明確にできるかもしれない。もち麦品種 1 群に低下作用が認められなかった原因は明らかにできなかったが、*Bifidobacterium* 属や *Lactobacillus* 属の増加作用やプロピオン酸産生による血清脂質、耐糖能改善作用が認められたことから有用性が高い品種と考えられる。

以上の結果、3 種のもち麦の機能性の特性を以下にまとめる。

1. 血清脂質改善作用は、 β -グルカン量の最も多いもち麦品種 1 が顕著である。
2. 耐糖能改善作用は、もち麦品種 1 ともち麦品種 2 が顕著である。
3. ビフィズス菌、乳酸菌数を増加させる整腸作用は、3 種のもち麦に共通にある。
4. 短鎖脂肪酸、特にプロピオン酸の産生量が多いのは、もち麦品種 1 で、次いでもち麦品種 2 である。
5. もち麦品種 3 ともち麦品種 2 は、炎症性細菌である *Clostridium coccoides* グループを減少させた。

謝辞

本研究は、戦略的個人研究費(S2808)の他に、大麦食品推進協議会からの委託費用によって実施した。

引用文献

- [1] 大草敏文. 腸内細菌叢の消化管疾患への関与. モダンメディア. 2014, 60, p.325-331.
- [2] 渡邊邦友. ヒト腸内マイクロビオータの関与が疑われる話題の疾患. モダンメディア. 2014, 60, p.356-368. 藤澤倫彦ほか. 腸内

- 細菌検索法の変遷と現状. 腸内細菌学雑誌. 2011, 25, p.165-179.
- [3] 渡辺幸一. 腸内フローラの分子生物学的解析法の応用と課題. 腸内細菌学雑誌. 2007, 21, p.199-208.
- [4] Matsuda K, et al. Sensitive quantitative detection of commensal bacteria by rRNA-targeted reverse transcription-PCR. Appl Environ Microbiol. 2007, 73, p.32-39.
- [5] Sonnenburg ED, et al. Diet-induced extinctions in the gut microbiota compound over generations. Nature. 2016, 529, p.212-215.
- [6] Kedia S, et al. Gut microbiome diversity in acute infective and chronic inflammatory gastrointestinal diseases in North India. J Gastroenterol. 2016, 51, p.660-671.

Abstract

Standard bacterial strains for microbiota analysis were obtained and standard curves were calculated by quantitative PCR. Standard curves of *Bacteroides fragilis* group, *Prevotella* genus, *Eubacterium* genus, *Clostridium coccoides* group, *Clostridium leptum* subgroup, *Lactobacillus* genus, *Bifidobacterium* genus, *Atopobium cluster* genus were prepared successfully. Cecal microbiota and short chain fatty acid production were analyzed in mice fed high fat diet containing three different types of barley cultivars with different β -glucan contents. The effect of intestinal regulating function which increases the population of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* was same among three different types of barley cultivars. Increase in propionate production was observed in one type of barley cultivar. Two types of barley cultivars also decreased the population of *Clostridium coccoides* group which promotes in intestinal pro-inflammation. These results indicated that these changes were related to the beneficial effects of barley on lipid and carbohydrate metabolism.

(受付日：2017年6月28日，受理日：2017年7月6日)

青江 誠一郎（あおえ せいいちろう）

現職：大妻女子大学家政学部教授

千葉大学大学院自然科学研究科博士課程修了。

専門は食品および栄養化学。現在は肥満を予防するための食品成分の探索と作用機構の解明について研究中。特に、穀類や昆布の食物繊維の研究に注力している。

主な著書：ルミナコイド研究のフロンティアー食物繊維・オリゴ等・レジスタントスターチの最新研究動向ー（共著，建帛社）