

## *Caenorhabditis elegans*を用いた 大麦若葉末由来糖脂質の炎症抑制作用の検討

宮田富弘<sup>\*1</sup> 三浦紀称嗣<sup>\*1</sup> 三宅沙知<sup>\*1</sup> 奥和之<sup>\*1</sup>

### 要 約

本研究では、線虫 *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) を用いた炎症動物モデルの作製と大麦若葉末由来糖脂質 (YBLP-GL) の炎症性サイトカイン産生抑制作用について検討した。 *C. elegans* に炎症メディエーターとして、DPPH, TNBS および DSS を投与した後、炎症性サイトカインである Interleukin-6 (IL-6) を測定した。いずれの炎症メディエーターで処理した線虫においても、IL-6濃度は炎症メディエーター無処理の線虫に比べて有意に増加したけれども、YBLP-GL の添加により有意に低下した。これらの結果は、YBLP-GL が炎症抑制作用を有することを示唆している。

### 1. 緒言

潰瘍性大腸炎やクローン病のような炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease, IBD) では、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って分泌された炎症メディエーターを介した腸管の微小循環障害・組織破壊が関与していると考えられている<sup>1,2)</sup>。腸管バリアの破綻による Bacterial translocation により異常亢進したマクロファージなどが tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) や interleukin-6 (IL-6) のような炎症性サイトカインを分泌し、これらが腸管上皮細胞に作用して、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<sup>3)</sup>。

大麦若葉末 (young barley leaf powder, YBLP) 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、水溶性食物繊維の  $\beta$ -グルカンや不溶性食物繊維のヘミセルロースを豊富に含んでいるほか、脂質 (糖脂質を含む) を約20%含有している。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 (glycolipid, GL) が含まれており、チラコイド GL 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<sup>4)</sup>。また、ヒト腸管上皮様細胞

に分化する Caco-2細胞を用いた研究では、大麦若葉由来糖脂質 (YBLP-GL) は炎症性サイトカイン IL-6や IL-8分泌を抑制することが報告されている<sup>5)</sup>。それゆえ、YBLP-GL においても、炎症性腸疾患の治癒・予防に対して有効性が期待される。

線虫 (*Caenorhabditis elegans*, *C. elegans*) は、孵化後幼虫期 (L1~L4) を経て young adult, adult (産卵可能な成虫) と成長し、寿命はおよそ1ヵ月程度である<sup>6)</sup>。体長約1mm と多細胞生物の中でも小型であるが、神経系、生殖系、筋肉、消化器系など、他の高等生物と類似した機能をもつ組織や器官を有しており、栄養学研究においてもマウスやラットに代わるモデル動物として注目されている<sup>7)</sup>。動物愛護の観点からも、動物倫理に抵触しない *C. elegans* のモデル動物としての利用が推奨されている。また、*C. elegans* は感染防御や炎症抑制など自然免疫機能も有することから、免疫機能に関する医薬品・食品成分の探索や作用機序の解明にも利用されている<sup>8)</sup>。

本研究では、*C. elegans* を用いた炎症モデルの作製と YBLP-GL の炎症性サイトカイン産生抑制作用について IL-6産生を指標に検討した。

\*1 川崎医療福祉大学 医療技術学部 臨床栄養学科  
(連絡先) 宮田富弘 〒701-0193 倉敷市松島288 川崎医療福祉大学  
E-mail: miyada@mw.kawasaki-m.ac.jp

## 2. 方法

### 2.1 試料

2,2-ジフェニル-1-ピクリルヒドラジル (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH), 2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム (2,4,6-trinitrobenzenesulfonate, TNBS) およびデキストラン硫酸ナトリウム (dextran sulfate sodium, DSS) は、試薬特級 (富士フィルム和光(株)製) のものを使用した。YBLP は、東洋新薬(株)より購入した。YBLP 25 g を75%エタノール250mL で80℃, 30分間加熱抽出し、残渣をろ過したものを、強カチオン交換樹脂ダイアイオン HP-20 (三菱ケミカル(株)製) を用いたカラムクラマトグラフィーに供した。カラムに吸着した GL 画分は95%エタノールにて溶出し、乾固させて YBLP-GL 画分を調製した<sup>5)</sup>。

### 2.2 *C. elegans* の飼育方法

*C. elegans* の飼育は、三浦らの方法に準じた<sup>9)</sup>。*C. elegans* および飼料である大腸菌 OP-50 は Caenorhabditis Genetics Center (University of Minnesota) から入手した。線虫は大腸菌 OP-50 を塗布した線虫育成培地 (nematode growth medium, NGM) 上で20℃のインキュベーター内で培養した。1週間ごとに線虫が存在する培地の一部を切り取り、新しい NGM 上に継代した。

### 2.3 *C. elegans* の同調化

NGM 上の線虫を M9 buffer (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6.0g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4.0g, NaCl 5.0g/脱イオン水 1L) で回収した。実験に用いる線虫は、ライフステージを揃えるために同調化溶液 (脱イオン水50mL, 5%次亜塩素酸ナトリウム溶液40mL, 5 M NaOH 10mL/100mL) を用いて卵を回収し、卵を M9 buffer で洗浄した後、NGM 上で孵化させて同調化した。

### 2.4 *C. elegans* を用いた炎症モデルの検討

同調化した線虫を、2000rpm で1分間遠心分離し、液量が1mL になるように上清を取り除いて L1 幼虫を含む懸濁液 (L1 懸濁液) を作成した。L1 懸濁液を NGM 上に移し、20℃のインキュベーター内で2日間培養した線虫を回収し、約1000匹/mL となるように15 mL 容チューブに1mL ずつ分注した。これに炎症メディエーターとして DPPH (終濃度5 μg/mL, 20℃, 2時間, DPPH 群), TNBS (終濃度5mg/mL, 20℃, 24時間, TNBS 群) または DSS (終濃度5mg/mL, 20℃, 24時間, DSS 群) を添加して培養後、2000rpm で1分間遠心分離して上清を取り除いた。炎症メディエーターを添加しない群を無処理群とした。これを M9 buffer 1mL に懸濁した後、NGM 上に塗布して2日間培養した。培養した

線虫を M9 buffer で回収し、2000rpm で1分間遠心分離した後、上清を取り除き、M9 buffer で3回洗浄した。液体窒素を用いて線虫を凍結させ、乳鉢で粉碎した後、細胞溶解液 (mammalian protein extraction reagent, MPER, Thermo Scientific 製) 2mL を用いて溶解して、タンパク質を抽出した。炎症性サイトカイン IL-6 は、市販キット (Mouse IL-6 Quantikine ELISA Kit, R&D SYSTEMS, USA) を用いて ELISA 法により測定した<sup>8)</sup>。

### 2.5 *C. elegans* を用いた炎症モデルにおける YBLP-GL の炎症抑制効果の検討

DPPH, TNBS または DSS 処理後の *C. elegans* を回収し、2000rpm で1分間遠心分離して上清を取り除いた後、M9 buffer 1mL に懸濁した。線虫を含む懸濁液に YBLP-GL 画分を終濃度10 μg/mL になるよう添加し、MGN 上に塗布して2日間培養した。培養後、凍結粉碎した線虫から MPER を用いてタンパク質を抽出し、炎症性サイトカイン IL-6 を ELISA 法により測定した。

### 2.6 統計処理

本研究では、各実験群を n=4 で行った。結果は平均値 ± 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、Dunnnett 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 *C. elegans* を用いた炎症モデルの検討

DPPH を2時間処理後の *C. elegans* は運動性が低下していたが、TNBS や DSS の24時間処理後では運動性には無処理群と差がなかった。各種炎症メディエーター処理による *C. elegans* 中の IL-6 濃度を表1に示した。いずれの炎症メディエーター処理により IL-6 濃度は無処理群に比べ有意に増加した。特に、DPPH 群の IL-6 濃度は無処理群の36倍と高値であった。

### 3.2 *C. elegans* を用いた炎症モデルによる YBLP-GL の炎症抑制効果の検討

*C. elegans* を用いた炎症モデルによる IL-6 濃度に及ぼす YBLP-GL 添加の影響を図1に示した。炎症メディエーター処理による IL-6 濃度は YBLP-GL 添加により低下した。特に、DPPH 群において YBLP-GL 無添加 (コントロール群) の28%に低下した。

## 4. 考察

食品因子による生体防御能のコントロールは、免

表1 *C.elegans* における炎症メディエーター処理後のIL-6濃度

	IL-6濃度 (pg/mL)
無処理	17.9 ± 1.9
炎症メディエーター処理	
DPPH	647.0 ± 137.8*
TNBS	90.2 ± 17.4*
DSS	50.1 ± 7.1*

means ± SD (n=4), \*:無処理群に対して有意差あり (p<0.05)

IL-6: Interleukin-6

DPPH :2,2-ジフェニル-1-ピクリルヒドラジル

TNBS :2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム

DSS :デキストラン硫酸ナトリウム

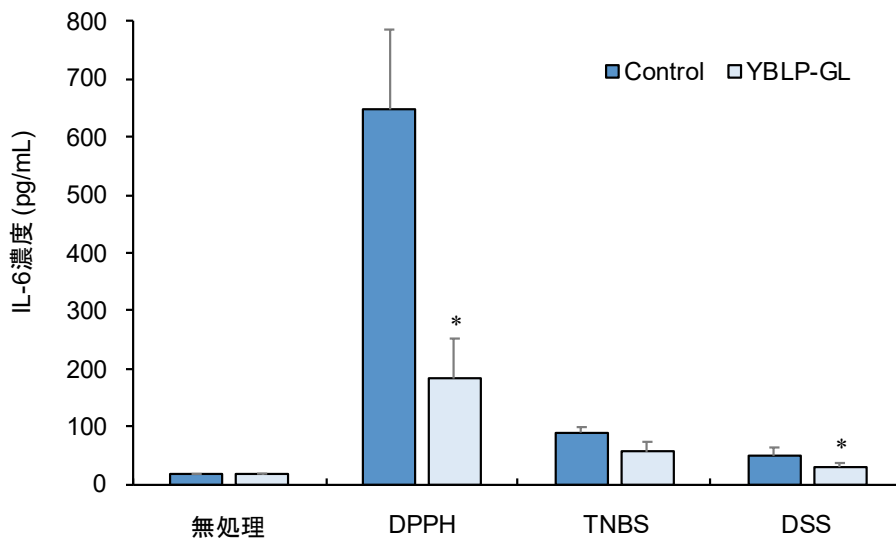


図1 *C.elegans* を用いた炎症モデルにおけるIL-6濃度に及ぼす大麦若葉末糖脂質の影響

YBLP-GL:大麦若葉末糖脂質添加群, Control:コントロール群(YBLP-GL無添加)

Means ± SD (n=4), カラムは平均値, バーはSDを示す.

\*: Control群に比べて有意差あり (p<0.05).

IL-6: Interleukin-6

DPPH: 2,2-ジフェニル-1-ピクリルヒドラジル

TNBS: 2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム

DSS: デキストラン硫酸ナトリウム

疫応答異常が引き金となっているIBDの治療や予防につながる<sup>1)</sup>. 奥らは, Caco-2を用いたIBDモデルにおいて, YBLP-GLがTNF-α処理後の細胞障害と炎症性サイトカイン分泌を抑制することを報告した<sup>5)</sup>. 一方, 線虫の消化管は管腔側に微絨毛が発達した20個の上皮細胞で構成されており, 形態的にも機能的にも哺乳動物の消化管上皮細胞に類似している. 病原体に晒された線虫では既知の病原体の多くが腸管細胞に感染しており, それらの有害な影響

を制御するために免疫応答(自然免疫)が活性化している<sup>10)</sup>. 線虫には適応免疫はないが, 消化管内防御システムとしての自然免疫を有しており, それと類似の免疫システムが進化的に高等生物においても保存されている<sup>11,12)</sup>.

本研究では, *C. elegans*を用いた炎症モデルの作製とYBLP-GLの炎症性サイトカイン分泌抑制作用を検討した. 炎症メディエーターとして, 強力な水溶性ラジカル発生剤であるDPPHとIBDモデル動

物（ラット，マウス）作製に用いられる TNBS ならびに DSS を用いて，処理後の炎症性サイトカイン IL-6濃度を測定した．TNBS はタンパク質と非特異的に結合するハプテンであり，直腸内に投与により急性大腸炎モデルの作成に用いられている．DSS はムコ多糖の一種であり，経口投与により浅い潰瘍性の大腸炎を誘発する．DPPH 処理により誘導された IL-6濃度は無処理群の36倍と高値であった．DPPH の結果は，強力なラジカルによる細胞障害により IL-6産生が誘導されたことを示唆している．IBD の発生機序については，活性酸素種や高反応性の酸化物の大腸粘膜への異常な蓄積が発症要因の一つとして考えられている<sup>13)</sup>．DPPH 群に比べると TNBS 群や DSS 群での IL-6濃度は低かったが，どちらの炎症メディエーター処理においても IL-6濃度は無処理群に比べて有意に増加した．TNBS 誘発性大腸炎モデルにおいては，抗酸化経路を制御することで大腸炎を抑制できることが示されている<sup>14)</sup>．DSS 誘発性大腸炎モデルにおいては活性酸素除去作用を有する物質により大腸炎抑制効果が観察されており，DSS による酸化ストレスが大腸炎を誘発することが示唆されている<sup>15)</sup>．*C. elegans* に炎症メディエーターを投与することによって，ラジカルによる腸管上皮でのバリア破綻が生じ，食餌の大腸菌の Bacterial translocation とそれに伴う炎症性サイトカイン分泌促進が生じた可能性があり，腸管炎症モデルとして有用であると考えられる．

炎症メディエーターを投与した *C. elegans* を用いて，YBLP-GL の炎症抑制効果について検討した．DPPH 群においては，炎症メディエーター処理によって上昇した IL-6濃度は，YBLP-GL 投与によりコントロール群に対して28%に低下し，YBLP-GL の炎症性サイトカインの抑制効果が認められた．この結果は，YBLP-GL がラジカルによる腸管バリア破綻の予防と，その結果としての炎症性サイトカイン分泌を抑制したことによると考えられる．YBLP

には，抗酸化作用を有する葉緑素（クロロフィル）やフラボノイドを含むことが報告されている<sup>16)</sup>．*in vitro* での大麦若葉搾汁液の DPPH ラジカルに対する消去活性を測定した研究では，大麦若葉に含まれるフラボノイドに強い DPPH ラジカル消去活性があることが報告されている<sup>17)</sup>．YBLP-GL も，DPPH ラジカルに対する消去活性を有する可能性がある．TNBS 群では有意差はないものの YBLP-GL 投与により IL-6濃度は低下傾向にあり，DSS 群においては YBLP-GL 投与により IL-6濃度は有意に低下した．これらの結果は，YBLP-GL が IBD モデル動物作成に使用される炎症メディエーターに対しても炎症抑制作用を有することを示唆している．*C. elegans* において，葉草に含まれるフラボノイド配糖体であるバicalin (Baicalin) が，リポ多糖 (LPS) 刺激によって誘導された TNF- $\alpha$  や IL-6 の分泌を阻害することが報告されている<sup>8)</sup>．YBLP-GL が，炎症性腸疾患に対する抗炎症作用を有することが期待される．

*C. elegans* において，サイトカインに関する研究は限られている．*C. elegans* は体腔細胞 (coelomocytes) というマクロファージ様細胞を有しているが，免疫応答におけるその働きは不明な点が多い<sup>18)</sup>．哺乳類での様々なストレスに対する炎症性サイトカイン産生に関与する p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase) キナーゼの，*C. elegans* におけるホモログの一つである SEK-1 は酸化ストレス時に消化管で活性化し免疫系に関与することが明らかになっている<sup>19)</sup>．食品に含まれる炎症抑制物質のその作用機序解明を目的として *C. elegans* が用いられており，MAP キナーゼ経路を介した免疫調節強化作用が考えられている<sup>20)</sup>．

*C. elegans* を用いた炎症モデルは，食品中の IBD 抑制物質の探索やその作用機序の解明に有益であると考えられる．

## 謝 辞

本研究は，川崎医療福祉大学の平成29年度医療福祉研究費の助成により行われた．

## 利益相反 (COI)

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: Immunodiagnostics, immunotherapeutics, and ecotherapeutics. *Gastroenterology*, 120(3), 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) 金井隆典：腸炎とサイトカイン。医学のあゆみ, 234(5), 532-537, 2010.
- 4) Mizushima Y, Kamisuki S, Mizuno T, Takemura M, Asahara H, Linn S, Yamaguchi S, Matsukage A, Hanaoka F, ...Sakaguchi K : Dehydroaltenusin, a mammalian DNA polymerase inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 33957-33961, 2000.
- 5) 奥和之, 川崎靖子, 三浦紀称嗣, 山岡伸：培養細胞を用いた大麦若葉末の炎症性腸疾患抑制作用。川崎医療福祉学会誌, 27(2), 385-391, 2018.
- 6) Sulston JE and Horvitz HR : Post-embryonic cell lineages of the nematode. *Caenorhabditis elegans. Developmental Biology*, 56(1), 110-156, 1977.
- 7) Gottschling DC and Doring F : Is *C.elegans* a suitable model for nutritional science? *Genes & Nutrition*, 14(1), 1-4, 2019, <https://doi.org/10.1186/s12263-018-0625-3>.
- 8) Ma J, Wang R, Yan H, Xu R, Xu A and Zhng J : Protective effects of baicalin on lipopolysaccharide-Induced injury in *Caenorhabditis elegans*. *Pharmacology*, 205(1), 109-117, 2020.
- 9) 三浦紀称嗣, 宮田富弘：<sup>13</sup>C 呼気分析法を応用した線虫 *Caenorhabditis elegans* の短鎖脂肪酸代謝能の測定。川崎医療福祉学会誌, 32(1), 91-98, 2022.
- 10) Martineau CN, Kirienko NV and Pujol N : Innate immunity in *C. elegans*. *Current Topics in Developmental Biology*, 144, 309-351, 2021.
- 11) Kim DH and Ausubel FM : Evolutionary perspectives on innate immunity from the study of *Caenorhabditis elegans*. *Current Opinion in Immunology*, 17(1), 4-10, 2005.
- 12) Pukkila-Worley R and Ausubel FM : Immune defense mechanisms in the *Caenorhabditis elegans* intestinal epithelium. *Current Opinion in Immunology*, 24(1), 3-9, 2012.
- 13) Khor B, Gardet A and Xavier RJ : Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, 474, 307-317, 2011.
- 14) 東村泰希：抗酸化経路制御に基づく大腸疾患予防に関する食品機能学的研究。日本栄養・食糧学会誌, 71(5), 237-241, 2018.
- 15) 静間徹, 石渡一夫, 福山直人：動物モデルを用いた, トリプトファンによるデキストラン硫酸ナトリウム誘発性大腸炎の抑制効果。静脈経腸栄養, 27(2), 89-96, 2012.
- 16) 萩原義秀, 萩原秀昭, 上山英夫：大麦若葉青汁粉末の生理機能性物質。日本食品科学工学会誌, 48(10), 712-725, 2001.
- 17) 上山英夫, 青塚康幸, 大川雅史, 小倉洋子, 釜口桃江, 帆足和憲, 金城順英：大麦若葉から分離したルトナリンの抗酸化作用。日本食品科学工学会誌, 58(4), 170-172, 2011.
- 18) Fares H and Greenwald I : Genetic analysis of endocytosis in *Caenorhabditis elegans*: Coelomocyte uptake defective mutants. *Genetics*, 159(1), 133-145, 2001.
- 19) Kim DH, Feinbaum R, Alloing G, Emerson FE, Garsin DA, Inoue H, Tanaka-Hino M, Hisamoto N, Matsumoto K, ...Ausubel FM : A conserved p38 MAP kinase pathway in *Caenorhabditis elegans* innate immunity. *Science*, 297(5581), 623-626, 2002.
- 20) Zhang X, Li W, Feng K, Xiao J, Du J, Cao Y and Chen Y : Immunomodulatory effect of pentagalloyl glucose in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages and PAO1-induced *Caenorhabditis elegans*. *Experimental Gerontology*, 150, 111388, 2021, <https://doi.org/10.1016/j.exger.2021.111388>.

(2023年5月9日受理)

## Inhibitory Effects of Glycolipid Extracted from Young Barley Leaf Powder (YBLP) on Inflammatory Cytokine Production in *Caenorhabditis elegans*

Tomihiro MIYADA, Kiyoshi MIURA, Sachi MIYAKE and Kazuyuki OKU

(Accepted May 9, 2023)

**Key words** : glycolipid, young barley leaf powder, interleukin-6, inflammatory bowel disease, *C. elegans*

### Abstract

In this study, we investigated the animal model of inflammation using the *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) and the inhibitory effect of young barley leaf powder-extracted glycolipids (YBLP-GL) on the production of inflammatory cytokines. *C. elegans* were treated with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), sodium 2,4,6-trinitrobenzenesulfonate (TNBS), and dextran sulfate sodium (DSS) as inflammatory mediators, and then Interleukin-6 (IL-6) was measured. In *C. elegans* treated with any of the inflammatory mediators, IL-6 levels were significantly increased compared to those in worms treated with no inflammatory mediator, but were significantly decreased by the addition of YBLP-GL. These results suggest that YBLP-GL has an anti-inflammatory effect.

Correspondence to : Tomihiro MIYADA

Department of Clinical Nutrition  
Faculty of Health Science and Technology  
Kawasaki University of Medical Welfare  
288 Matsushima, Kurashiki, 701-0193, Japan  
E-mail : [miyada@mw.kawasaki-m.ac.jp](mailto:miyada@mw.kawasaki-m.ac.jp)

(Kawasaki Medical Welfare Journal Vol.33, No.1, 2023 75 – 80)