

ウコギ葉摂取が糖尿病ラットの盲腸内発酵および糞便排泄に及ぼす影響

田村 朝子, 田渕三保子, 山田 則子

(山形県立米沢女子短期大学)

原稿受付平成 16 年 4 月 19 日; 原稿受理平成 17 年 1 月 14 日

Effects of Ingesting Ukogi (*Acanthopanax sieboldianum*) Leaves on Intestinal Fermentation and Fecal Excretion by Diabetic Rats

Asako TAMURA, Mihoko TABUCHI and Noriko YAMADA

Yonezawa Women's College of Yamagata Prefecture, Yonezawa, Yamagata 992-0025

Ukogi (*Acanthopanax sieboldianum*) leaves have been used as vegetables in the Yonezawa area of Yamagata Prefecture since the Edo period. The effects of ingesting ukogi leaves on intestinal fermentation and fecal excretion were investigated in rats with neonatally induced streptozotocin (type 2) diabetes (n-STZ rats). The n-STZ rats were divided into 3 groups (control, ukogi, and dietary fiber). The control group was given the control diet, the ukogi group was given a diet containing 10% ukogi leaves, and the dietary fiber group was given a diet containing 2.5% cellulose and 0.5% pectin. Normal rats were given the control diet (normal). The blood HbA_{1c} level of the ukogi group was significantly lower than that of the control group. The fecal excretion by the ukogi group was significantly higher than that of the control and dietary fiber groups. The total short-chain fatty acid level in the cecum of the ukogi group was significantly higher than that of the control and dietary fiber groups, the viable cell count of *Bifidobacterium* in the ukogi group also being significantly higher than that of the control and dietary fiber groups. These results indicate that ukogi leaves promoted fecal excretion and intestinal fermentation in the n-STZ rats. These actions might have been induced by cellulose, pectin and different components of the dietary fiber in ukogi leaves.

(Received April 19, 2004; Accepted in revised form January 14, 2005)

Keywords: ukogi leaf ウコギ葉, streptozotocin-induced diabetic rat ストレプトゾトシン誘導 2 型糖尿病ラット, intestinal bacteria 腸内細菌, HbA_{1c} 糖化ヘモグロビン, short-chain fatty acid 短鎖脂肪酸.

1. 緒 言

現在, わが国では生活習慣病, 特に糖尿病に罹患する人が急増しており, 患者数は 740 万人, 予備軍を含めると 1,620 万人に達するといわれている¹⁾. これは日本人成人の 6.3 人に 1 人という計算になり, 糖尿病は国民的な病気になろうとしている. 腸内環境は宿主の健康や疾病に深く関連しており, *Bifidobacterium* などの有用菌の増殖を促進し, *Clostridium* のような腐敗菌の増殖を抑制することが疾病の予防や改善に有効であると考えられている²⁾. 糖尿病の発症によっても腸内の有用菌が劣勢になり, 腐敗菌が優勢になって腸

内環境が悪化する³⁾といわれており, 有用菌の投与により 1 型糖尿病モデルの NOD マウスや BB ラットの糖尿病発症が軽減したとの報告⁴⁾もなされている. さらに, 食物繊維は腸内環境改善作用に加えて, 血糖値上昇抑制作用を有することが明らかにされている. これらのことから, 腸内環境を改善することにより糖尿病軽減に寄与できる可能性が考えられる.

山形県米沢地方では, 江戸時代に上杉 9 代藩主上杉鷹山公(上杉治憲公)が救荒対策としてヒメウコギ(*Acanthopanax sieboldianum*)の植栽を奨励して以来, その葉は「切りあえ」「おひたし」などに野菜として

Table 1. Composition of the experimental diets (%)

Ingredient	Normal	Control	Ukogi	Dietary fiber
CE-2	90.0	90.0	90.0	90.0
Corn starch	10.0	10.0		7.0
Ukogi			10.0	
Pectin				0.5
Cellulose				2.5
	100.0	100.0	100.0	100.0

用いられ、郷土料理となっている。また葉を乾燥させてお茶としても飲用⁵⁾されている。

先にわれわれはウコギ葉を新生児期におけるストレプトゾトシン誘導2型糖尿病ラット neonatally streptozotocin diabetic rat (n-STZ ラット)⁶⁾に投与し、ウコギ葉の耐糖能および血糖値改善効果を明らかに⁷⁾している。そこで本研究では、ウコギ葉摂取が n-STZ ラットの腸内環境に及ぼす影響、すなわち盲腸内発酵および糞便排泄について検討した。さらにウコギ葉には食物繊維が多く含まれること⁸⁾を見出しており、ウコギ葉と同量の食物繊維を摂取させて同様に検討を行った。

2. 実験方法

(1) ウコギ葉粉末の調製

ウコギ葉は平成14年6～7月に米沢市内で採取し、凍結乾燥を行った。その後ミルミキサーで粉碎し、以下の実験に用いた。

(2) 動物、飼料および飼育方法

動物実験は総理府告示の実験動物の飼養および保管等に関する基準に従い、実験動物に対し十分に配慮した上で行った。

出生後2日目のWistar系新生仔雄ラットに0.1 M クエン酸緩衝液 (pH 4.5) に溶かしたストレプトゾトシン (STZ, 和光純薬 (株)) を 80 mg/kgBW を皮下注射し、n-STZ ラットを作製した。対照ラットには同じく生後2日目の雄ラットに0.1 M クエン酸緩衝液のみを等量皮下に注射した (正常ラット)。注射後、1 ケージ当たり母親1匹につき新生仔ラット7匹に調整して母乳で飼育した。ラットは生後28日目 (4週齢) で離乳し、市販の固形飼料 (CE-2, 日本クレア製) および飲料水 (水道水) を自由に与えて生後56日目 (8週齢) まで飼育した。8週齢より基本食となる市販の粉末飼料 (CE-2, 日本クレア製) で1週間予備飼

育した後、9週齢のn-STZラットを、体重および空腹時血糖値に基づいて3群に分け、投与する実験飼料により糖尿コントロール群 (Control 群, $n=7$)、糖尿ウコギ群 (Ukogi 群, $n=6$)、糖尿食物繊維群 (Dietary fiber 群, $n=6$) とした。また、正常ラットは正常群 (Normal 群, $n=7$) とした。実験飼料は Table 1 に示したものを各群それぞれ投与し、10週間飼育した。なお、食物繊維には、セルロース (オリエンタル酵母工業 (株), 木材パルプ由来) とペクチン (関東化学 (株), 柑橘類由来) を用い、ウコギ食物繊維量に相当する割合⁸⁾で投与した。

ラットは底が網目のケージに個別に入れ、室温 22～23℃、湿度 50～60%、12 時間の明暗サイクル (明期: 8:00～20:00) の空調動物室で飼育した。飼料は一定量 (20 g/日) を、飲料水は自由摂取させた。

実験開始時および終了時に体重を測定し、糞便は実験飼料投与後10週目に回収し測定した。

10 週間の実験飼料投与を終了したラットを20時間絶食させ、エーテル麻酔下で腹部大動脈から全採血した。全血は血中糖化ヘモグロビン値の測定に用いるとともに遠心分離 (3,000 rpm, 15 min) 後得られた血清は脂質分析に用いた。さらに盲腸を摘出し、回収した内容物は重量を測定後、短鎖脂肪酸および腸内細菌叢の分析に用いた。

(3) 血中糖化ヘモグロビン (HbA_{1c}) および血清中脂質の測定

血中 HbA_{1c} 値の測定は DCA2000HbA_{1c} カートリッジ (バイエルメディカル (株)) を用いた。また血清中の総コレステロールおよび中性脂肪の測定はそれぞれコレステロール E-テストワコー (和光純薬)、トリグリセライド G-テストワコー (和光純薬) を用いて行った。

(4) 盲腸内の短鎖脂肪酸の分析

盲腸内容物にイオン交換水 3 ml を加え懸濁溶解後、

ウコギ葉摂取が糖尿病ラットの盲腸内発酵および糞便排泄に及ぼす影響

Table 2. Body weight gain, water intake, blood HbA_{1c}, serum total cholesterol and triglyceride levels of rats fed on the experimental diets

	Normal	Control	Ukogi	Dietary fiber
Body weight gain (g/10 weeks)	73.7±6.1	76.0±5.7	62.7±3.8	73.0±5.5
Water intake (g/day)	28.1±1.6	28.3±1.7	26.5±1.6	29.4±1.8
Blood HbA _{1c} (%)	2.98±0.08 ^c	3.64±0.11 ^a	3.33±0.06 ^b	3.42±0.03 ^{a,b}
T-chol (mg/dl)	59.6±5.4	66.9±2.0	65.4±4.6	61.0±1.7
TG (mg/dl)	114.5±7.2 ^b	169.0±15.8 ^a	107.8±10.4 ^b	124.7±8.2 ^a

Each value is presented as the mean±SE. ^{a,b} Values with the same letters in a row are not significantly different at $p<0.05$.

遠心分離 (3,000 rpm, 15 min) した。上清 1.5 ml に同量のクロロホルムを加え除タンパクし、水層を 0.45 μ m の水系フィルターでろ過し、短鎖脂肪酸測定用試料とした。

短鎖脂肪酸の測定は、高速液体クロマトグラフ (日立 L-7100) を用いて行った。分析条件は、カラム (GL-C610H-S, 7.8 mm×300 mm), 溶離液 1 mM 過塩素酸, カラム温度 60℃, 流速 0.5 ml/分, 検出波長 210 nm であった。定量は各標準短鎖脂肪酸と試料中の相当する脂肪酸のエリア比で算出した。

(5) 盲腸内細菌叢の分離・同定

腸内細菌の分離・同定は光岡の方法⁹⁾で行った。試料はラット 1 匹当たり盲腸内容物 1.0 g を用いた。まず盲腸内容物を二酸化炭素充填下で、9 ml の生理的食塩水に懸濁後、1 ml を採取して生理的食塩水で 10 倍に希釈した。この希釈操作を 7 回繰り返した。この希釈液を 25 μ l ずつ 13 種類の選択平板培地にそれぞれ接種し、嫌気性菌は、二酸化炭素を充填した嫌気ジャーに入れ、37℃で 48 時間培養した。通性嫌気性菌および好気性菌は、そのまま 37℃で 48 時間培養した。培養終了後、各培地上に出現したコロニーを計測し、コロニーの色、形状などの観察を行った。細菌数は盲腸 1 g 当たりに換算して算出した。さらに、出現したコロニーをそれぞれ釣菌し、グラム染色を行い、顕微鏡下で形態観察を行った後、細菌群の同定を行った。

(6) 統計処理

実験結果は、各実験群の平均値±標準誤差で表した。各群間の有意差検定は、分散分析による検定後 Tukey の多重比較により行った。有意差は $p<0.05$ を統計的に有意と判定した。

3. 実験結果および考察

(1) 体重増加量, 飲水量, 血中 HbA_{1c} および血清脂質

各群のラットの体重増加量, 飲水量, 血中 HbA_{1c}, 血中脂質値を Table 2 に示した。

その結果, 糖尿ウコギ群の体重増加は糖尿コントロール群に比べて抑制される傾向にあったが, 各群間で有意差は認められなかった。また飲水量についても差は認められなかった。本研究で作製した n-STZ ラットは, 糖尿病特有の多飲, 多尿の症状は示さないものの, 実験食投与開始時の空腹時血糖値が, 正常ラットの 85.5±2.4 mg/dl に対し, 110.6±2.2 mg/dl と有意に高い値を示したことから, 軽度の糖尿病症状を呈していたと考えられる (実験終了時の血糖値: 正常群 86.2±1.5 mg/dl, 糖尿コントロール群 108.9±5.9 mg/dl, 糖尿ウコギ群 98.8±2.0 mg/dl, 糖尿食物繊維群 102.3±4.2 mg/dl)。また, 実験終了時の糖尿コントロール群は過去の平均血糖値を反映する血中 HbA_{1c} 値が, 正常群に比べ有意に高い値であり, 血糖上昇が継続していたことを示している。一方, 糖尿ウコギ群と糖尿食物繊維群の血中 HbA_{1c} 値は, 糖尿コントロール群に比べて低値を示したが, 糖尿ウコギ群のみに糖尿コントロール群との間に有意差が認められた。しかし, 糖尿ウコギ群と糖尿食物繊維群との間に有意差がなかったことから, ウコギ葉摂取による血糖値上昇抑制作用はウコギ葉に含まれる食物繊維のうち, セルロースとペクチンが主因であることが示唆された。

糖尿病を発症すると血清脂質が増加し, 糖尿病の進行に伴って動脈硬化症を合併することが知られている。本研究においても, 糖尿コントロール群は中性脂肪が正常群に比べ有意に高い値となっていた。総コレステロールについては, 有意差は認められなかったが, 高い値を示した。しかし, 糖尿ウコギ群の中性脂肪は糖

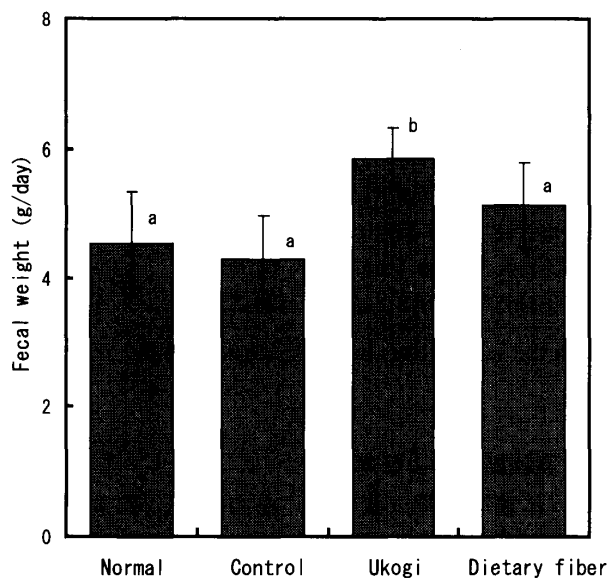


Fig. 1. Fecal weight of rats fed on the experimental diets

a, b Values with the same letters are not significantly different at $p < 0.05$.

尿コントロール群に比べて有意に低値を示し、さらに糖尿病食物繊維群よりも有意に低い値を示したことから、ウコギ葉摂取による血清脂質改善には、ウコギに含有されるセルロースとペクチン以外の食物繊維成分やその他の成分が関与しているものと推察される。この点については今後さらに検討する必要があると思われる。

(2) 糞便排泄量

実験飼料投与 10 週目の糞便排泄量を Fig. 1 に示した。糖尿病症状を呈するとしばしば便秘または下痢を引き起こす¹⁰⁾ことが知られている。本研究においては、n-STZ ラットの 3 群ともに糞便中の水分含量は正常群と同様であり、便秘や下痢を呈するラットは認められなかったが、糖尿病コントロール群の糞便重量は正常群に比べて有意差はないが低下していた。一方、糖尿ウコギ群の糞便重量は糖尿コントロール群に比べて有意に高い値を示した。さらに、糖尿ウコギ群は糖尿食物繊維群よりも有意に高値であったことから、ウコギ葉摂取による糞便排泄増加は、ウコギ葉に含有されるセルロースとペクチンが主要成分と考えられるが、それ以外の食物繊維の影響も示唆される。なお、糖尿ウコギ群の糞便の色調は黒緑になり、他群と比べて特徴的であった。これはウコギに含有される葉緑素と、ポリフェノールの一種、クロロゲン酸の酸化によるものと推察されるが、ウコギ葉摂取が糞便排泄成分に及ぼす影響については、今後さらに検討する必要がある。

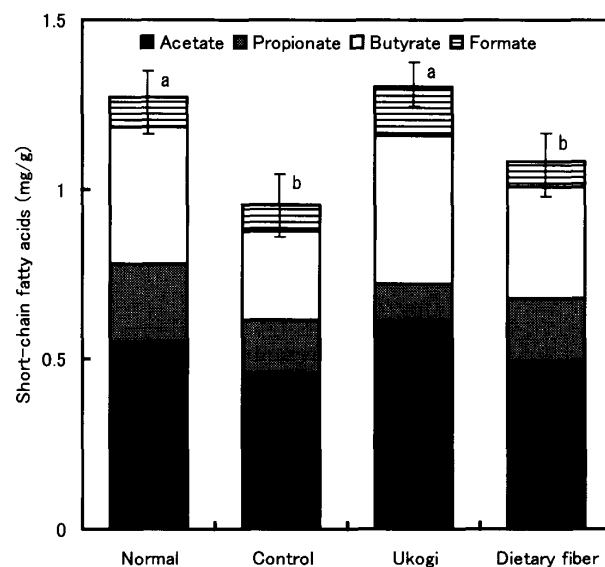


Fig. 2. Contents of short-chain fatty acids in the cecum of rats fed on the experimental diets

a, b Values with the same letters are not significantly different at $p < 0.05$.

(3) 盲腸内容物の短鎖脂肪酸含量

盲腸内容物の短鎖脂肪酸含量の測定結果を Fig. 2 に示した。

盲腸内容物重量 (g) は、正常群 3.91 ± 0.68 、糖尿コントロール群 3.30 ± 0.54 、糖尿ウコギ群 4.53 ± 0.32 、糖尿食物繊維群 4.11 ± 0.73 で、Fig. 1 の糞便排泄量と同様に、糖尿ウコギ群で最も高値を示し、糖尿コントロール群と比べ有意に高値を示した。しかし、糖尿食物繊維群との間に有意差は認められなかった。

盲腸内容物中の短鎖脂肪酸総量は、正常群に比べて糖尿コントロール群は有意に低値を示した。糖尿ウコギ群は、糖尿コントロール群および糖尿食物繊維群に比べて有意に高値を示した。

また、糖尿ウコギ群の盲腸内容物 pH は 7.46 ± 0.10 で、他の 3 群の pH (正常群 7.52 ± 0.13 、糖尿コントロール群 7.59 ± 0.15 、糖尿食物繊維群 7.56 ± 0.07) よりも有意差はないが低値を示していた。ラットの大腸発酵のおもな場所は盲腸であり、発酵性の飼料を摂取すると腸内細菌による短鎖脂肪酸産生が促進し、盲腸重量が増加することにより糞便重量が増加すること¹¹⁾¹²⁾が知られている。したがって、糖尿ウコギ群の糞便重量が糖尿コントロール群に比べて高値を示していたのは、ウコギ葉を摂取したことによって腸内細菌による発酵が進み、盲腸内容物が増加したと推察される。しかし、盲腸の内容物重量および短鎖脂肪酸量は、

ウコギ葉摂取が糖尿病ラットの盲腸内発酵および糞便排泄に及ぼす影響

Table 3. Viable cell count in the cecum of rats fed on the experimental diets
(log CFU/g wet cecal weight)

	Normal	Control	Ukogi	Dietary fiber
<i>Enterobacteriaceae</i>	7.6±1.6	7.4±1.4	7.9±0.8	8.4±1.2
<i>Lactobacillus</i>	9.7±0.5	9.9±0.2	10.1±0.4	9.9±0.2
<i>Bifidobacterium</i>	9.4±0.4 ^a	6.6±1.2 ^b	8.1±1.6 ^c	8.7±1.5 ^{a,c}
<i>Clostridia</i>	8.8±1.3	8.0±2.3	8.3±1.3	8.5±1.5
Total	10.1±0.4	10.2±0.4	10.3±0.3	10.5±0.6

Each value is presented as the mean±SE. ^{a, b, c} Values with the same letters in a row are significantly different at $p<0.05$.

糖尿ウコギ群と糖尿食物繊維群との間に有意差が認められたことから、ウコギ葉摂取による盲腸内発酵促進は、ウコギ葉に含まれるセルロースとペクチンおよびその他の食物繊維の関与が示唆される。しかし、本研究で用いたセルロースとペクチンは、ウコギ葉由来でないことから、分子量、枝分れ、構成分子、発酵性の違いが生じることも予想され、今後はウコギ葉由来の食物繊維を用いた検討が必要であると考えられる。

(4) 腸内細菌叢

盲腸内容物 1 g 当たりの腸内細菌の生菌数を対数で表したものを Table 3 に示した。

総菌数については、各群間で有意差は認められなかったが、糖尿コントロール群の *Bifidobacterium* 属の菌数は、正常群に比べ有意に低値であった。一方、糖尿ウコギ群と糖尿食物繊維群の *Bifidobacterium* 属は、糖尿コントロール群に比較し、菌数が有意に高値であった。また *Lactobacillus* 属の菌数は糖尿ウコギ群で高値を示した。このことからウコギ葉摂取によって腸内における有用菌の増殖が促進され、産生された短鎖脂肪酸によって腸内環境が改善されたと推察できる。しかし、糖尿ウコギ群と糖尿食物繊維群の腸内細菌叢に有意差がみられなかったことから、ウコギ葉摂取による腸内細菌叢の改善は、ウコギ葉に含まれる食物繊維のうち、セルロースとペクチンが主因であると示唆される。

以上の結果より、ウコギ葉摂取により n-STZ ラットの糖尿病症状の改善に加えて、糞便排泄量の増加、盲腸内の発酵促進、および菌叢の改善が明らかになった。これらのことから、ウコギ葉摂取により、糖尿病発症によって悪化していた腸内環境が改善したと考えられる。これは主にウコギ葉の食物繊維によるものと推察されるが、糖尿ウコギ群の糞便排泄および短鎖脂肪酸量は、糖尿食物繊維群に比べ有意に改善されてい

たことから、セルロースとペクチン以外の食物繊維成分やポリフェノールなどの他の成分が関与したと考えられる。したがって今後は、詳細なウコギ成分の分析を行うとともに、腸内環境改善作用について検討していきたいと考えている。

4. 要 約

ウコギ葉摂取がストレプトゾトシン誘導 2 型糖尿病ラットの腸内環境に及ぼす影響について、盲腸内発酵および糞便排泄について検討した。投与した飼料により、糖尿コントロール群、糖尿ウコギ群、糖尿食物繊維（セルロース+ペクチン）群および正常群の 4 群にラットを群分けし、ウコギの効果を比較検討した。

- 1) 糖尿ウコギ群の血中 HbA_{1c} 値は、糖尿コントロール群に比べ有意に低い値を示した。
- 2) 糖尿ウコギ群の糞便排泄量は、糖尿コントロール群および糖尿食物繊維群に比べ有意に高くなった。
- 3) 糖尿ウコギ群の盲腸内短鎖脂肪酸総量は、糖尿コントロール群および糖尿食物繊維群より有意に高い値を示し、正常群とほぼ同程度であった。
- 4) 糖尿ウコギ群の盲腸内 *Bifidobacterium* 属の菌数は糖尿コントロール群より有意に高い値となった。

以上の結果から、ウコギ葉摂取により糖尿病症状が改善されることに加えて、糞便排泄量も増加し、腸内環境の改善が認められた。この効果は、ウコギ葉に含まれるセルロースとペクチンが主因であるが、それ以外の食物繊維の関与も示唆される。

なお本研究の一部は、平成 14 年度山形県立米沢女子短期大学共同研究費によって行われたものです。付記して謝意を表します。

引用文献

- 1) 厚生省保健医療局生活習慣病対策室：糖尿病実態調査の概要（速報分），糖尿病，**41**，325-331（1998）
- 2) 武田智美，井原 裕，清野 裕：糖尿病における酸化ストレス，『別冊医学のあゆみ 酸化ストレスフリーラジカル医学生物学の最前線』（吉川敏一編），医歯薬出版，東京，262-265（2001）
- 3) 光岡知足：『腸内フローラと健康』，学会出版センター，東京，149-165（1998）
- 4) Rabinovitch, A.: Immunoregulatory and Cytokine Imbalances in the Pathogenesis of IDDM, *Diabetes*, **43**, 613-621 (1994)
- 5) 日本の食生活全集 山形編集委員会：『日本の食生活全集 6 聞き書山形の食事』，農山漁村文化協会，東京，180-199（1988）
- 6) 石田 均：n-STZ，『糖尿病研究ストラテジー第1版』（清野 進，岡 芳知監修），秀潤社，東京，385-387（1995）
- 7) 田淵三保子，田村朝子，山田則子：ウコギ（*Acanthopanax sieboldianum*）葉投与が新生児期のストレプトゾシン投与による2型糖尿病ラットの耐糖能に及ぼす影響，栄食誌，**56**，243-246（2003）
- 8) 山田則子，田村朝子，田淵三保子：ウコギの一般成分と抗酸化特性，山形県立米沢女子短期大学紀要，**38**，1-6（2003）
- 9) 光岡知足：『腸内菌の世界』，叢文社，東京（1980）
- 10) 糸川嘉則，岩崎良文：『臨床栄養学』，南江堂，東京（1998）
- 11) 奥 恒行，小西史子，細谷憲政：ラットの生理機能に及ぼす難消化性多糖の性状ならびに飼育期間の影響，栄養と食糧，**34**，437-443（1981）
- 12) 田代 操，加藤みずほ：コーンスターチより調製された難消化性デキストリン投与がストレプトゾシン糖尿病ラットの耐糖能に及ぼす影響，栄食誌，**52**，21-29（1999）